



Institut für Biotechnologie

***Polymerunterstützte Synthese
von Oligosacchariden in homogener
flüssiger Phase***

Nils Brinkmann

***Polymerunterstützte Synthese
von Oligosacchariden in homogener
flüssiger Phase***

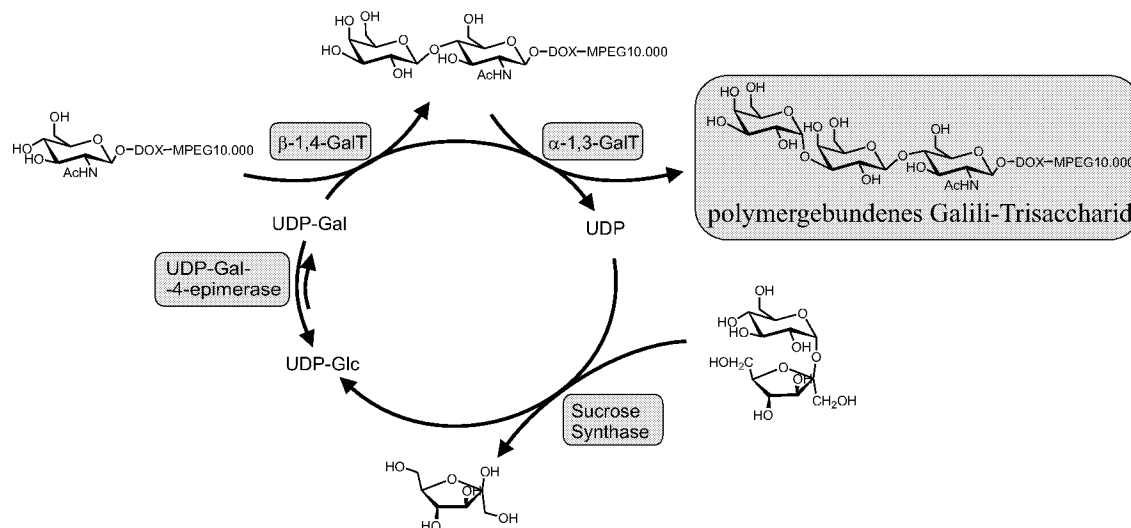
Nils Brinkmann

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3990
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie Jül-3990
D 5 (Diss., Bonn, Univ., 2002)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Polymerunterstützte Synthese von Oligosacchariden in homogener flüssiger Phase

Oligosaccharide übernehmen in biologischen Prozessen Aufgaben, welche weit über die von Gerüststoffen, Energiespeichern u. ä. hinausgehen. Die Informationsübertragung durch Oligosaccharidstrukturen spielt z. B. bei Infektionen, Fertilisation, Entzündungen, Proteinfaltung oder Metastasierung eine entscheidende Rolle. Es ist naheliegend, daß solche Strukturen daher auch als Pharmaka eingesetzt werden. Ein Problem ist bis dato in vielen Fällen allerdings die preisgünstige Bereitstellung von ausreichenden Mengen an Oligosacchariden. Neben den Herausforderungen der eigentlichen Synthese erschwert die oft notwendige arbeits- und damit kostenintensive Säulenchromatographie die Synthese. In dieser Arbeit wurde der Ansatz der Synthese von Oligosacchariden an einem homogen löslichen Polyethylenglykol näher verfolgt. Zur Aufreinigung wurde auf *state of the art*-Ultrafiltration durch keramische Membranen zurückgegriffen, was ein Arbeiten in organischen und wäßrigen Systemen erlaubte. Ein Modellsystem war



Polymergebundene Galili-Trisaccharidsynthese als Modellsystem

die enzymatische Synthese des an ω -Methoxypolyethylenglykol gebundenen sogenannten Galili-Trisaccharides $\text{Gal}\alpha\text{-1,3-Gal}\beta\text{-1,4-GlcNAc}$. Zur Bereitstellung des teuren aktivierten Zuckers UDP-Galactose wurde ein Regeneriersystem verwendet, so daß die in der Zielstruktur enthaltene Galactose-Einheit letztlich aus billiger Saccharose bereitgestellt wurde.

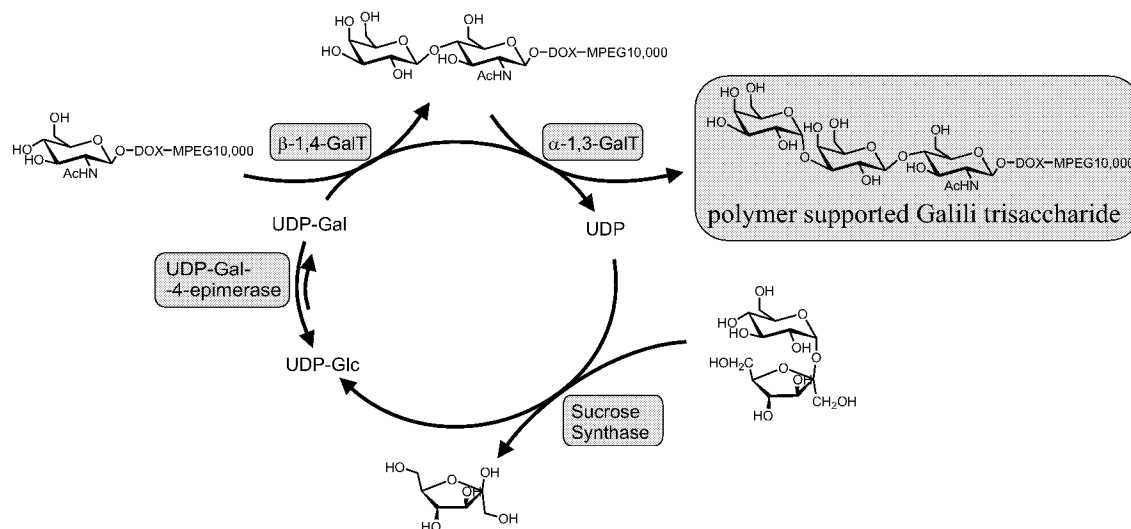
Die vorliegende Arbeit umfaßt unter anderem

- Membrantechniken zur Retention von polymergebundenen Oligosacchariden
- den Einsatz von Linkern zur reversiblen Polymeranbindung
- die Darstellung von $\beta\text{-1,4-Galactosyltransferase}$
- eine chemische und eine enzymatische polymerunterstützte Oligosaccharidsynthese
- die Ausarbeitung einer Analytik zur direkten Untersuchung von polymergebundenen Molekülen.

Polymer Supported Liquid Phase Synthesis of Oligosaccharides

Oligosaccharides fulfil important purposes in biological processes, which exceeds by far the role of giving stability, storing energy and so on. The transfer of information by oligosaccharides plays e. g. in infections, fertilization, inflammations, folding of proteins or cell metastasis a crucial role. It is obvious that those structures can be used as drugs. Today, in most cases the cheap provision with sufficient amounts of defined oligosaccharides is still a problem. Besides the challenge of the synthesis itself, there is often the handicap of laborious and expensive column chromatography.

In this thesis the approach of polyethylene glycol supported liquid phase synthesis of oligosaccharides was pursued. For purification *state of the art* ultrafiltration by ceramic membranes was used, allowing to work as well in organic as in aqueous media. One model



Polymer bound Galili trisaccharide as model system

system was the synthesis of ω -methoxy polyethylene glycol bound so called Galili trisaccharide Gal α -1,3-Gal β -1,4-GlcNAc. For providing the expensive activated sugar UDP-Galactose a regeneration system was used, meaning that the galactose unit of the target was finally supported by cheap sucrose.

The present work comprises among others

- membrane techniques for the retention of polymer supported oligosaccharides
- the use of linkers for the reversible polymer linkage
- the provision of β -1,4-galactosyltransferase
- a chemical and an enzymatic polymer supported oligosaccharide synthesis
- the establishment of a technique for the *direct* analysis of polymer supported molecules.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 1997 bis Juli 2001 am Lehrstuhl für Biotechnologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn unter Leitung von Herrn Prof. Dr. C. Wandrey angefertigt. Die praktischen Arbeiten wurden am Institut für Biotechnologie der Forschungszentrum Jülich GmbH durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt:

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. C. Wandrey für die interessante Themenstellung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die gewährte Freizügigkeit der Bearbeitung des Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen

Herrn Prof. Dr. F. Vögtle, Kékulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn, für die freundliche Übernahme des Korreferates

Herrn Prof. Dr. U. Kragl und Herrn Dr. A. Liese für viele interessante Ideen, fruchtbare Diskussionen und die Durchsicht der Arbeit

Frau Prof. Dr. S. Flitsch, Universität Edinburgh, für die freundliche Aufnahme in Edinburgh

Frau Prof. Dr. D. Vasic-Racki, Universität Zagreb, für Unterstützung bei der Modellierung der enzymatischen Zuckersynthesen

Herrn Prof. Dr. L. Elling, RWTH Aachen, Frau Dipl.-Biol. U. Römer und Herrn Dipl.-Biol. T. Schumacher, Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, für die Unterstützung bei den enzymatischen Arbeiten, nicht zuletzt für die Überlassung der Sucrose Synthase und des *E. coli*-Stammes zur Produktion der β -1,4-GalT

Herrn Prof. Dr. E. G. Berger, Universität Zürich, für die Bereitstellung des Plasmids zur Produktion der α -1,3-GalT und Herrn Dr. Wohlgemuth, Fa. Fluka, Basel, für die Überlassung von α -1,3-GalT

Den Herren Dipl.-Chem. C. Hoh, J. Haberland, D. Kihumbu und L. Greiner für die Durchsicht von Teilen der Arbeit und einige Tips

Frau Doris Hahn und Frau Heike Offermann für die unermüdliche Hilfestellung im Labor

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für finanzielle Unterstützung

Den Mitarbeitern sämtlicher Werkstätten im Forschungszentrum Jülich

Allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie für die gewährte Unterstützung und besonders die angenehme Arbeitsatmosphäre

Meiner Familie und ganz besonders meiner Frau Paraskevi Vassiliou-Brinkmann.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Kohlenhydrate in der Natur	1
1.2	Bedeutung von Oligosacchariden	2
1.2.1	N-Glycane	5
1.2.2	O-Glycane	6
1.2.3	Glycolipide	6
1.3	α -Gal-Epitop / Xenotransplantation	7
1.3.1	Abtrennen von anti-Gal-Antikörpern aus dem menschlichen Blut . .	9
1.3.2	Züchtung transgener Schweine mit veränderter Glycosyltransferase- Ausstattung	9
1.3.3	Abtrennung der α -Gal-Epitope des Organs	10
1.3.4	Inhibierung der anti-Gal-Antikörper im menschlichen Blut	10
1.4	<i>in vivo</i> -Synthese von Oligosacchariden	10
1.4.1	Biosynthese von N-Glycanen	10
1.4.2	Biosynthese von O-Glycanen	11
1.5	<i>in vitro</i> -Synthese von Oligosacchariden	12
1.5.1	Chemische Synthese von Oligosacchariden	12
1.5.2	Enzymatische Synthese von Oligosacchariden	12
1.6	Einsatz von Glycokonjugaten	13
1.7	Kooperationen	16
2	Zielsetzung	17
2.1	Methodenentwicklung zur polymerunterstützten Synthese von Oligosaccha- riden	17
2.2	Chemische Synthese von Oligosacchariden	19
2.3	Enzymatische Synthese von Oligosacchariden	19
3	Polymerunterstützte Synthese	21
3.1	Einleitung	21
3.1.1	Synthesemethoden	21
3.1.2	Historische Entwicklung	23
3.2	Polymere	27
3.3	Linker	30
3.3.1	Flitsch-Linker	32
3.3.2	Dioxyxylyl-Linker	35
3.4	Analytik polymergebundener Moleküle	36
3.5	Zusammenfassung	41

4	Filtration in der Aufarbeitung	43
4.1	Einleitung	43
4.1.1	Membranen	44
4.1.2	Retentionsbestimmung	50
4.2	Ergebnisse	52
4.3	Zusammenfassung	56
5	Chemische polymerunterstützte Flüssigphasensynthese	57
5.1	Einleitung	57
5.1.1	Chemische Kohlenhydratsynthese	57
5.1.2	Trichloracetimidat-Methode	62
5.2	Modelloligosaccharidsynthese	65
5.3	Ergebnisse	67
5.3.1	Membranen	67
5.3.2	Polymer- und membranunterstützte Tetrasaccharid-Synthese	68
5.4	Zusammenfassung	74
6	Enzymatische polymerunterstützte Flüssigphasensynthese	75
6.1	Enzyme in der Oligosaccharidsynthese	75
6.1.1	Glycosidasen	75
6.1.2	Glycosyltransferasen	77
6.1.3	Nukleotidzucker-Regenerierzyklen	79
6.2	Enzymatische Modelloligosaccharidsynthese	81
6.3	Substratsynthese	82
6.4	Bereitstellung der Enzyme	84
6.4.1	β -1,4-Galactosyltransferase	84
6.4.2	α -1,3-Galactosyltransferase	92
6.4.3	Sucrose Synthase	95
6.4.4	UDP-Galactose-4-Epimerase	96
6.4.5	Auswahl der Reaktionsbedingungen	99
6.5	Ultrafiltration	100
6.6	Analytik polymergebundener Moleküle	102
6.7	Synthese des Galili-Trisaccharides 1	104
6.7.1	Ausgangspunkt der Synthese des Galili-Trisaccharides 1	104
6.7.2	UDP-Galactose-Rezyklierzyklus	104
6.7.3	Kinetische Untersuchungen	107
6.7.4	Synthese des Galili-Trisaccharides 1 und Aufarbeitung	114
6.8	Zusammenfassung	120
7	Diskussion und Ausblick	121
7.1	Membranen	121
7.2	Polymerunterstützte Synthese	122
7.2.1	Polymer	122
7.2.2	Linker	125
7.2.3	Chemische, polymerunterstützte Oligosaccharidsynthese	128
7.2.4	Enzymatische, polymerunterstützte Oligosaccharidsynthese	128
7.2.5	Analytik	129

7.2.6	Kinetische Messungen	129
7.3	Vergleich zwischen enzymatischer und chemischer Methode	130
7.4	Bewertung des Verfahrens	132
8	Zusammenfassung	133
8.1	Voraussetzungen der polymer- und membranunterstützten Synthese	133
8.1.1	Membrantechnik	133
8.1.2	Polymer und Linker	133
8.2	Chemische Oligosaccharidsynthese	133
8.3	Enzymatische Oligosaccharidsynthese	134
8.3.1	Bereitstellung der Enzyme	134
8.3.2	Substratbereitstellung	134
8.3.3	Analytik	134
8.3.4	Synthese des Galili-Trisaccharides 1	134
9	Material und Methoden	135
9.1	Analytik	135
9.1.1	HPLC-Analytik	135
9.1.2	Kapillarelektrophorese	139
9.1.3	GPC-Messungen	139
9.1.4	MALDI-TOF-Analytik	140
9.1.5	NMR-Spektroskopie	140
9.2	Enzymassays	140
9.2.1	β -1,4-Galactosyltransferase-Assay	140
9.2.2	α -1,3-Galactosyltransferase-Assay	141
9.2.3	UDP-Galactose-4-Epimerase-Assay	141
9.2.4	Sucrose Synthase-Assay	142
9.3	Bereitstellung der β -1,4-Galactosyltransferase	142
9.3.1	Fermentation	142
9.3.2	Aufreinigung	143
9.4	Kinetikmessungen	145
9.5	Retentionsmessungen	145
9.5.1	Einzelmessung per gravimetrischer Methode	145
9.5.2	Einzelmessung per HPLC	145
9.5.3	Einzelmessung per Enzymassay	145
9.5.4	GPC-Methode	145
9.6	Synthesen	146
9.6.1	Polymer- und Linkersynthesen	146
9.6.2	Chemische Oligosaccharidsynthese	150
9.6.3	Enzymatische Oligosaccharidsynthese	153
9.7	Liste der verwendeten Chemikalien	157
9.8	Liste der verwendeten Geräte	157
9.9	Anhang	159
9.9.1	Chemische Oligosaccharidsynthese	159
9.9.2	Enzymatische Oligosaccharidsynthese	160
10	Literaturverzeichnis	165

Abbildungsverzeichnis

1.1	Kohlenhydrate als Begleiter im täglichen Leben	1
1.2	Glycoproteine in einer Zellmembran	3
1.3	Terminale Kohlenhydratstrukturen von Glycokonjugaten	4
1.4	Beispiele für N-Glycane	5
1.5	O-glycosidische Core-Strukturen	6
1.6	Glycosphingolipid, schematisch	7
1.7	Glycosylinositolphospholipid, schematisch	7
1.8	α -Gal-Stukturen	7
1.9	Biosynthese der Dolichol-gebundenen N-Glycan-Zwischenstufe	11
1.10	Dolichol-gebundene N-Glycan-Zwischenstufe	11
1.11	Globotriose und LST _D als large scale-Produkte	13
1.12	Globo-H-Antigen	15
1.13	Kooperationen	16
2.1	Prinzip der Oligosaccharidsynthese an einem homogen löslichen Polymer bei Anwendung von Ultrafiltration	18
2.2	α -1,2-verbrücktes Tetramannopyranosid 2 als Modelloligosaccharid	19
2.3	α -Gal-Epitop 1	19
3.1	Schaubild zur polymerunterstützten Synthese	21
3.2	Synthesestrategien mit und ohne Polymer im Vergleich	23
3.3	Historische erstmalige Festphasen-Oligosaccharidsynthese	24
3.4	Enzymatische Synthese von O-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1,4)-O- β -D-glucopyranosyl-(1,4)-D-glucopyranose an Polyacrylamid mittels eines photospaltbaren Linkers	25
3.5	Enzymatische Zuckersynthese an Polyacrylamid	25
3.6	Polyacrylamidgebundenes N-Acetylglucosamin mit Spacer und Linker	26
3.7	Glycerol Dendrimer	27
3.8	In der polymerunterstützten Flüssigphasensynthese verwendete lösliche Homopolymere	28
3.9	Strukturformel von MPEG10000 3	29
3.10	polymergebundener Flitsch-Linker 4	32
3.11	Synthese des freien Flitsch-Linkers 10	33
3.12	Carboxylierung von bPEG40.000 11	33
3.13	Polymeranbindung des Flitsch-Linkers 10	34
3.14	Chemische Spaltung des Flitsch-Linkers 10 mit Trifluoressigsäure	34
3.15	Enzymatische Spaltung des Flitsch-Linkers 10 mit Penicillin Amidase	34
3.16	Dioxyxyllinker 13	35

3.17	Synthese des polymergebundenen Dioxyxylyl-Linkers 13	35
3.18	Abspaltung des Dioxyxylyllinkers 13 vom Polymer	36
3.19	schematischer Größenvergleich eines freien mit einem polymergebundenen Zucker	37
3.20	Bestimmung des kritischen Punktes für PEG	39
3.21	HPLC-Chromatogramm zur Beladungsbestimmung von MPEG-DOX-OH 13	39
3.22	HPLC-Chromatogramme der Synthese des polymergebundenen Monosaccharides 16	40
4.1	Membranverfahren in Vergleich mit anderen Trennverfahren	44
4.2	Druckgetriebene Membranprozesse und ihre Trenncharakteristika	45
4.3	Mikroskopische Querschnittsaufnahme einer Ultrafiltrationsmembran	46
4.4	Schematische Darstellung der verwendeten Rohrmodule	47
4.5	Photographien von Dichlormethan-geschädigten Keramikmembranen	48
4.6	Photographie der Dia-Ultrafiltrationsanlage zum Einsatz keramischer Rohrmembranen in organischem Medium	49
4.7	Fließbild der Ultrafiltrationsanlage zum Einsatz keramischer Rohrmembranen in organischem Medium	49
4.8	Fließbild zur gravimetrischen Retentionsmessung	51
4.9	Fließbild zur Retentionsmessung bei stationärem Gleichgewicht	52
4.10	Charakterisierung des Pellicon XL10-Moduls durch GPC-Messungen	53
5.1	Übersicht über gängige chemische Glycosylierungsmethoden	59
5.2	Auswahl gängiger regioselektiver Einführungen von Schutzgruppen	60
5.3	„Optimizer“-gestützte Synthese eines linearen Tetrasaccharides	61
5.4	Allgemeines Reaktionsschema der Synthese von Trichloracetimidaten	62
5.5	Thermodynamisch und kinetisch gesteuerte Acetimidatbildung am Beispiel der Glucose	62
5.6	Reaktion von Glycosyltrichloracetimidaten mit O-Nucleophilen	63
5.7	Reaktion von 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α -D-glucofuranosyltrichloracetimidat und Cholesterol	64
5.8	Globo H-Vorstufe und Gangliosid GM2	64
5.9	Tetrasaccharidsynthese an einem homogen löslichen Polymer	66
5.10	Aufarbeitung von PEG-gebundenen Molekülen	67
5.11	polymer- und membranunterstützte Synthese des Tetrasaccharides 20	68
5.12	Ausspülkurven bei verschiedenen Retentionen im Vergleich	69
5.13	Synthese von 2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyltrichloracetimidat 17	69
5.14	iterative polymer- und membranunterstützte Synthese des Tetrasaccharides 27	70
5.15	Abspaltung des Tetrasaccharides 28 vom Polymer	71
5.16	NMR-Spektren von polymergebundenem acetyliertem Trisaccharid 25 und deacetyliertem Trisaccharid 26	72
5.17	Umsatzverlauf der Synthese des polymergebundenen Monosaccharides 23 im Membranreaktor	73
6.1	Glycosidase-Reaktionen am Beispiel von N-Acetyllactosamin	76

6.2	Schematischer Verlauf der Ausbeute bei Reverser Hydrolyse und Transglycosylierung im Vergleich	77
6.3	Glycosyltransferase-Reaktionen am Beispiel der β -1,4-Galactosyltransferase	78
6.4	Katalogpreise von Nukleotidzuckern	79
6.5	Enzymatische LacNAc-Synthese mittels UDP-Gal-Regenerierung ausgehend von Glucose-6-phosphat und Phosphoenolpyruvat	80
6.6	Enzymatische LacNAc-Synthese mittels UDP-Gal-Regenerierung ausgehend von Sucrose	80
6.7	Katalogpreise von Substraten zur Generierung von Galactoseeinheiten in Oligosacchariden	81
6.8	Enzymatische Synthese des polymergebundenen Modelloligosaccharides 29	82
6.9	Synthese des polymergebundenen <i>N</i> -Acetylglucosamin GlcNAc β -DOX-MPEG 33	83
6.10	Fließbild zur β -1,4-GalT-Produktion	85
6.11	Photo des zur Fermentation von <i>E. coli</i> verwendeten Fermenters	86
6.12	Verlauf der Fermentation von <i>E. coli</i> zur Produktion des Enzyms β -1,4-GalT	87
6.13	Halbwertszeiten der β -1,4-GalT-Aktivität bei verschiedenen Zusätzen	88
6.14	β -1,4-GalT-Aktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes	89
6.15	Desaktivierungskonstanten, k_{des} , der β -1,4-GalT-Aktivität bei unterschiedlichen pH-Werten	89
6.16	β -1,4-GalT-Aktivität in Abhängigkeit der Temperatur	90
6.17	Desaktivierungskonstanten, k_{des} , der β -1,4-GalT-Aktivität bei unterschiedlichen Temperaturen	91
6.18	α -1,3-GalT-Aktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes	92
6.19	Desaktivierungskonstanten, k_{des} , der α -1,3-GalT-Aktivität bei unterschiedlichen pH-Werten	93
6.20	α -1,3-GalT-Aktivität in Abhängigkeit der Temperatur	93
6.21	Desaktivierungskonstanten, k_{des} , der α -1,3-GalT-Aktivität bei unterschiedlichen Temperaturen	94
6.22	Standardreaktion der Sucrose Synthase	95
6.23	Sucrose Synthase-Aktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes	96
6.24	Standardreaktion der UDP-Galactose-4-Epimerase	96
6.25	Aktivität der UDP-Galactose-4-Epimerase aus <i>Streptococcus thermophilus</i> in Abhängigkeit des pH-Wertes	97
6.26	Stabilitäten der UDP-Galactose-4-Epimerase aus <i>Streptococcus thermophilus</i> bei unterschiedlichen Temperaturen	98
6.27	Gegenüberstellung von Aktivitäten und Stabilitäten der β -1,4-GalT, α -1,3-GalT, SuSy und UDP-Gal-4-Epimerase bei verschiedenen pH-Werten	99
6.28	Stabilitäten der β -1,4-GalT, α -1,3-GalT, SuSy und UDP-Gal-4-Epimerase bei verschiedenen Temperaturen	99
6.29	Angestrebter zweistufiger Einsatz der Ultrafiltration in der polymerunterstützten Flüssigphasensynthese von Oligosacchariden	100
6.30	HPLC-Chromatogramm der Trennung von polymergebundenem GlcNAc 33 , LacNAc 34 und Galili-Trisaccharid 29	103
6.31	Vereinfachte Darstellung des Trennmechanismus von polymergebundenen Zuckern an β -Cyclodextrin-Kieselgel	103

6.32	Polymergebundene Galili-Trisaccharidsynthese mit UDP-Galactose-Regenerierzyklus als Modellsystem	104
6.33	Synthese von Galili-DOX-MPEG 29 , Reaktionsbedingungen wie bei Reaktion mit freiem GlcNAc	105
6.34	UDP-Galactose-4-Epimerasen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Streptococcus thermophilus</i> im Vergleich	106
6.35	Bestimmung des für den UDP-Galactose-Rezyklierzyklus am besten geeigneten UDP-Startmaterials	106
6.36	β -1,4-GalT-Reaktion mit polymergebundenem <i>N</i> -Acetylglucosamin 33 als Substrat	107
6.37	β -1,4-GalT-Aktivität als Funktion der Substratkonzentrationen für freies <i>N</i> -Acetylglucosamin	108
6.38	β -1,4-GalT-Aktivität als Funktion der Substratkonzentration, polymergebundenes <i>N</i> -Acetylglucosamin 33	109
6.39	Synthese von polymergebundenem <i>N</i> -Acetylglucosamin 34	110
6.40	Konzentrationsverlauf der Synthese von polymergebundenem <i>N</i> -Acetylglucosamin 34	111
6.41	zeitlicher Verlauf der Galili-Trisaccharid-Ausbeute bei verschiedenen MPEG-DOX-GlcNAc-Startkonzentrationen	113
6.42	Raum-Zeit-Ausbeute bzgl. MPEG-DOX-Galili 29 bei verschiedenen MPEG-DOX-GlcNAc-Startkonzentrationen	113
6.43	Konzentrationsverläufe der Synthese des polymergebundenen Galili-Trisaccharides 29 und Simulation der Konzentrationsverläufe	115
6.44	Konzentrationsverläufe der präparativen Synthese des polymergebundenen Galili-Trisaccharides 29	117
6.45	Fließbild der Diafiltrationsanlage zur Durchführung der Ultrafiltration im wässrigen Medium	118
6.46	Diafiltrationsanlage zur Durchführung der Ultrafiltration im wässrigen Medium	118
6.47	Abspaltung des Produktes Galili-Trisaccharid 1 vom Polymer	119
6.48	Die vier Produkte GlcNAc β -DOX-MPEG 33 , LacNAc β -DOX-MPEG 34 , Galili β -DOX-MPEG 29 und freies Galili-Trisaccharid 1	119
7.1	Eigenschaften von MPEG10.000	122
7.2	Logarithmus der intrinsische Viskosität, η , von PEG und Dendrimeren bei unterschiedlichen Molekulargewichten, schematisch	125
7.3	Idee zur Synthese und Rezyklierung des Flitsch-Linkers am Polymer	126
7.4	Spaltung des DOX-Linkers mittels Scandiumtriflat	127
7.5	Succinoyl-Linker	127
7.6	Fermantative Darstellung von UDP-Galactose	131
7.7	Preisveränderung von Nukleotidzuckern	131
7.8	Synthesemethoden für komplexe Moleküle im Vergleich	132
9.1	MALDI-TOF-MS Spektrum	159
9.2	Plasmidkarte der verwendeten rekombinanten humanen β -1,4-GalT	160
9.3	Plasmidkarte der verwendeten rekombinanten α -1,3-GalT aus Maus	161
9.4	^1H -NMR-Spektrum des Galili-Trisaccharides 1	163

Tabellenverzeichnis

1.1	Aufbau, Vorkommen und Funktion wichtiger Polysaccharide	2
1.2	Zahlenvergleich aller möglichen konstitutionsisomeren Oligomere für den Fall von Oligopeptiden und Oligosacchariden (Hexosen)	3
1.3	Beispiele für zugelassene Medikamente auf Kohlenhydratbasis	13
1.4	Beispiele für Medikamentenkandidaten auf Kohlenhydratbasis	14
3.1	Vergleich der Synthese frei in Lösung und der Synthese an fester Phase . . .	22
3.2	PEG4.000-Grenzlöslichkeiten	29
3.3	Beispiele für Linker in der polymerunterstützten Oligosaccharidsynthese . .	31
4.1	Historische Entwicklung von technischen Membranprozessen	43
4.2	Lösungsmittelkompatibilität der kommerziellen PoroCer- und Membralox- Membranen	48
4.3	Liste der in Wasser ermittelten Retentionen und Flüsse	54
4.4	Liste der in organischen Medien ermittelten Retentionen und Flüsse	55
6.1	Glycosidasen und Glycosyltransferasen im Vergleich	78
6.2	Detaillierter Verlauf der β -1,4-GalT-Aufreinigung	87
6.3	Halbwertszeiten der β -1,4-GalT bei verschiedenen Temperaturen	91
6.4	Halbwertszeiten der α -1,3-GalT bei verschiedenen Temperaturen	94
6.5	Übersicht über Retentionen und Flüsse ausgewählter Membranen für die enzymatische polymerunterstützte Oligosaccharidsynthese	101
6.6	Kinetische Konstanten der humanen β -1,4-Galactosyltransferase	109
6.7	Kinetische Konstanten der β -1,4-GalT und der UDP-Gal-4-Epimerase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	112
6.8	Kinetische Konstanten der enzymatischen Synthese von polymergebunden- em Galili-Trisaccharid 1	116
9.1	Meßwerte zur Ermittlung von kinetischen Parametern des Vierenzym- systems, zu Abbildung 6.43 und Tabelle 6.8	162

Liste der verwendeten Symbole und Abkürzungen

Symbole

A_V	U/mL	volumenspezifische Aktivität
c_x	mol/L	Konzentration, Index x gibt die Substanz an
δ	-	chemische Verschiebung
E_A	J/mol	Aktivierungsenergie
η	%	Ausbeute
J	Hz	Kopplungskonstante
k_{des}	1/d	Desaktivierungskonstante
k_{max}	1/s	Frequenzfaktor
k_M	mol/L	Michaelis-Menten-Konstante
λ	nm	Wellenlänge
ν_{max}	1/cm	Wellenzahl im Maximum
R	-	Retention
RZA	mmol/(L*d)	Raum-Zeit-Ausbeute
t	s, min, h	Zeit
T	°C, K	Temperatur
θ	-	Anzahl der Volumina, Verweilzeiten
V	L	Volumen
V_{Assay}	L	Volumen de Assays
$V_{Enzymlösung}$	L	Volumen der eingesetzten Enzymlösung
X	-	Verdünnungsfaktor

Abkürzungen

ACN	Acetonitril
Ala	Alanin
Ara	Arabinose
bPEG	verzweigtes Polyethylenglykol (<i>branched polyethylene glycol</i>)
CE	Kapillarelektrophorese (<i>capillary electrophoresis</i>)
CMP-Neu5Ac	Cytidin-5'-monophospho- <i>N</i> -acetylneuraminsäure
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan

DIC	Diisopropylcarbodiimid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DOX	α,α' -Dioxyxylyl
dTDP	Thymin-5'-diphosphat
DTT	Dithiothreitol
EC	Enzymklasse (<i>enzyme class</i>)
EEDQ	2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fru	Fructose
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
GC	Gaschromatographie
GDP-Fuc	Guanosin-5'-diphospho- β -L-fucose
GDP-Man	Guanosin-5'-diphospho- α -D-mannose
Glc	Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GlcA	Glucuronsäure <i>glucuronic acid</i>
Gly	Glycin
GPC	Gelpermeationschromatographie
GPI	Glycosylinositolphospholipid
His	Histidin
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (<i>high pressure liquid chromatography</i>)
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
Ile	Isoleucin
IMAC	Affinitätschromatographie mittels immobilisierter Metallionen (<i>immobilized metal affinity chromatography</i>)
IR	Infrarot
Lac	Lactose
LacNAc	<i>N</i> -Acetyllactosamin
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MALDI-TOF-MS	Flugzeitmassenspektroskopie mittels matrixunterstützter Laserdesorptionsionisation (<i>matrix assisted laser desorption ionization</i> <i>time of flight mass spectroscopy</i>)
MAS-NMR	Kernresonanz-Spektroskopie bei Messung im „magischen Winkel“ von $54,7^\circ$ (<i>magic angle spinning nuclear magnetic resonance</i>)
MPEG	ω -methoxyliertes Polyethylenglykol
MurNAc	<i>N</i> -Acetylmuraminsäure
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimid
NAD ⁺	Nicotinadenindinucleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinadenindinucleotid, reduzierte Form
Neu5Ac	Neuraminsäure
NIS	<i>N</i> -Iodosuccinimid
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie

	(<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)
NMWCO	nominelle Ausschlußgrenze (<i>nominal molecular weight cut off</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PEGA	Handelsname eines PEG-Polyacrylamid-Copolymers
PVA	Polvinylalkohol
RNA	Ribonucleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RP	Umkehrphase (<i>reverse phase</i>)
RT	Raumtemperatur
Suc	Sucrose
Tentagel	Handelsname eines Polymers, welches durch Copolymerisation von Styrol mit Divinylbenzol und anschließender Derivatisierung mit PEG-Ketten entsteht.
TESOTf	Triethylsilyltrifluormethansulfonat
TFA	Trifluoressigsäure
TMSOTf	Trimethylsilyltrifluormethansulfonat
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl-Rest
UDP	Uridindiphosphat
UDP-Gal	Uridindiphosphat-Galactose
UDP-GalNAc	Uridindiphosphat- <i>N</i> -Acetylgalactosamin
UDP-Glc	Uridindiphosphat-Glucose
UDP-GlcA	Uridindiphosphat-Glucuronsäure
UDP-GlcNAc	Uridindiphosphat- <i>N</i> -Acetylglucosamin
UDP-Xyl	Uridin-5'-diphospho- α -D-xylose
UF	Ultrafiltration
Val	Valin
Xyl	Xylose

1 Einführung

Kohlenhydrate¹ sind ein täglicher Begleiter des Menschen und man kann wohl zu Recht sagen, daß ohne sie kein menschliches Leben möglich wäre. Wir bedienen uns ihrer nicht nur als Baumaterial (Holz), überliefern unser Wissen und unsere Kultur (Papier) durch sie oder nutzen sie als Nahrungsquelle (Getreide u. v. a. m.) und Genußstoff (Raffinade). Nein, auch unsere Sauerstoffatmosphäre entstand letztlich als Nebenprodukt des Kohlenhydrataufbaus durch pflanzliche und mikrobielle Photosynthese, siehe Abbildung 1.1.

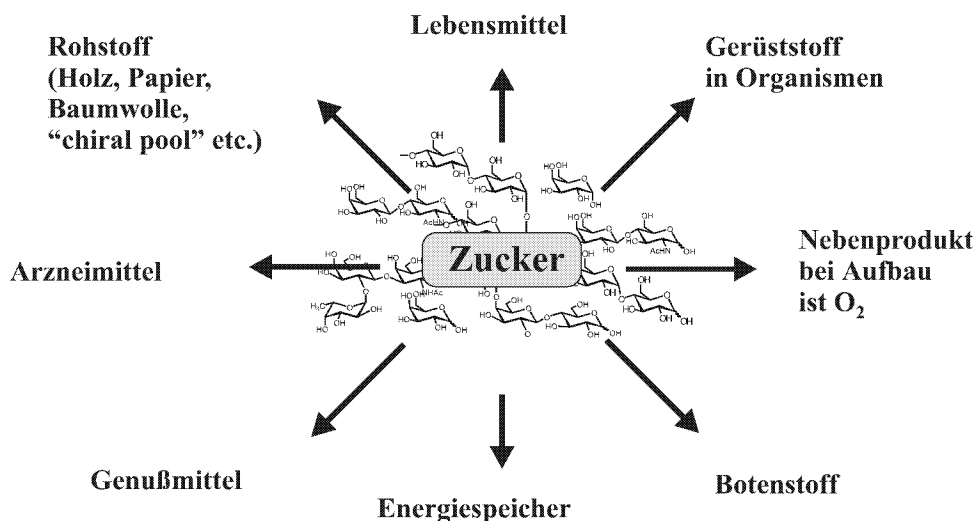


Abbildung 1.1: Kohlenhydrate als Begleiter im täglichen Leben

1.1 Kohlenhydrate in der Natur

Kohlenhydrate kommen ubiquitär vor und werden durch Photosynthese pro Jahr im Maßstab von schätzungsweise 200 Milliarden Tonnen synthetisiert (Lindhorst 2000b), größtenteils als Polysaccharide. Die Aufgabe der Polysaccharide in der Natur ist hauptsächlich die von Gerüstmaterialien, Energiespeicherstoffen und wasserbindenden Stoffen. Die wichtigsten in der Natur vorkommenden Polysaccharide gibt Tabelle 1.1 wieder.

Bei Vergegenwärtigung dieser gigantischen Mengen an in der Natur vorkommenden Polysaccharide geraten allzu leicht Monosaccharide, welche zum Beispiel in biologischen Stoffwechselwegen eine Rolle spielen, und auch Oligosaccharide in Vergessenheit. Gerade aber diese recht kleinen Zuckerstrukturen übernehmen oft ebenfalls essentielle Aufgaben, wie die Speicherung und Weitergabe von Informationen.

¹ Kohlenhydrat ist ein Oberbegriff für Zucker, ob in freier Form oder gebunden an andere Moleküle, identisch mit Glycan und Saccharid.

Tabelle 1.1: Aufbau, Vorkommen und Funktion wichtiger Polysaccharide in der Natur (Koolman & Röhms 1998), (G=Gerüstsubstanz, W=wasserbindend, E=Energiespeicher)

Name	Mono-saccharid 1	Mono-saccharid 2	Ver- knüpfung	Ver- zweigung	Vorkommen, Funktion
<u><i>Bakterien</i></u>					
Murein	D-GlcNAc	D-MurNAc	β -1,4	-	Zellwand (G)
Dextran	D-Glc	-	α -1,6	α -1,3	Schleime (W)
<u><i>Pflanzen</i></u>					
Agarose	D-Gal	L-Gal	β -1,4	β -1,3	Rotalgen (W)
Carrageenan	D-Gal	-	β -1,3	α -1,4	Rotalgen (W)
Cellulose	D-Glc	-	β -1,4	-	Zellwand (G)
Xyloglucan	D-Glc	D-Xyl (D-Gal, L-Fuc)	β -1,4	β -1,6 (β -1,2)	Zellwand (G)
Arabinan	L-Ara	-	α -1,5	α -1,3	Zellwand (G)
Amylose	D-Glc	-	α -1,4	-	Amyloplasten (E)
Amylopectin	D-Glc	-	α -1,4	α -1,6	Amyloplasten (E)
Inulin	D-Fru	-	β -2,1	-	Speicherzellen (E)
<u><i>Tiere</i></u>					
Chitin	D-GlcNAc	-	β -1,4	-	Insekten, Krebse u.a. (G)
Glycogen	D-Glc	-	α -1,4	α -1,6	Leber, Muskel (E)
Hyaluronsäure	D-GlcA	D-GlcNAc	β -1,4 β -1,3	-	Bindegewebe (G, W)

1.2 Bedeutung von Oligosacchariden

In diesem Abschnitt soll das Augenmerk auf den Bereich der Oligosaccharide gelenkt werden. Im Jahr 1902 wurde Emil Fischer bereits „in Anerkennung seiner außerordentlichen Leistungen auf dem Gebiet der Zucker- und Purinsynthese“ der Nobelpreis für Chemie zugesprochen (*Roempp Chemie Lexikon* 1995). Dennoch fristete die Kohlenhydratchemie, und ganz besonders die der Glycokonjugate, bis Ende der 70er Jahre eher ein Schattendasein im Vergleich mit Nucleinsäuren und Proteinen, weil ihr Potential bis dahin nur unzureichend erkannt wurde. Der Begriff „Glycobiology“ wurde erst 1988 von Raymond Dwek geprägt (Alper 2001).

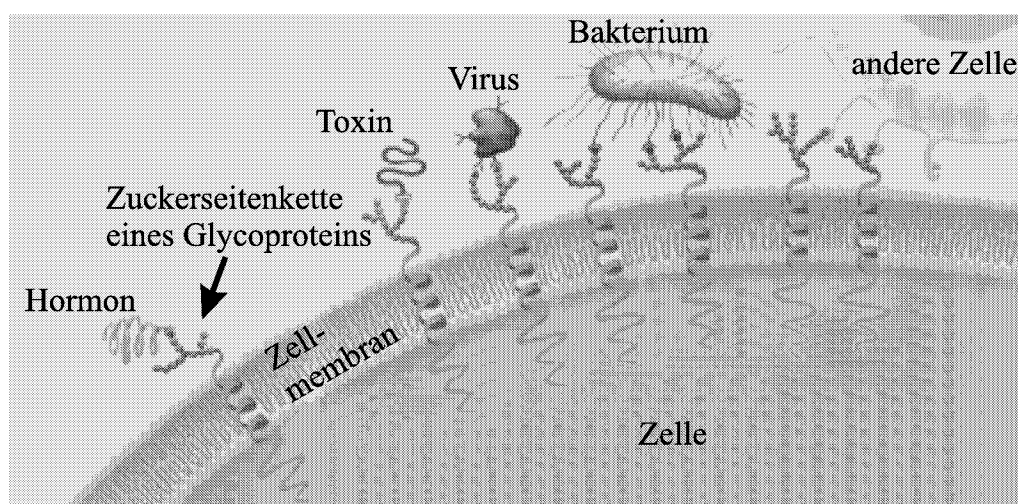
Neben Proteinen, DNA und RNA zählen Kohlenhydrate zu den Biomolekülen, welche eine Fülle von Informationen speichern können. Das Potential der Kohlenhydrate übertrifft hierbei aber bei weitem das der anderen Biomoleküle. So sind bei Kombination dreier unterschiedlicher Aminosäuren zu einem Tripeptid sechs Kombinationen möglich. Bei Kombination von drei unterschiedlichen Hexosen können allerdings schon 720 verschiedene Kombinationen, siehe Tabelle 1.2, erfolgen! Hierbei ist noch nicht der Einsatz von Derivaten, wie z. B. Desoxyzuckern, Amino-zuckern oder sulfatierten Zuckern berücksichtigt. Diese ungeheure Vielfalt resultiert aus der hohen Anzahl an Stereozentren pro Zuckereinheit und der Möglichkeit, Verzweigungen auszubilden.

Tabelle 1.2: Zahlenvergleich aller möglichen konstitutionsisomeren Oligomere für den Fall von Oligopeptiden und Oligosacchariden (Hexosen) (Lindhorst 2000b)

Oligomer	Zusammensetzung	mögliche Oligopeptide	mögliche Oligosaccharide
Dimer	AA/AB	1/2	11/20
Trimer	AAA/ABC	1/6	120/720
Tetramer	AAAA/ABCD	1/24	1424/34560
Pentamer	AAAAA/ABCDE	1/120	17872/2144640

Aufgrund dieser Strukturvielfalt und der damit verbundenen Informationsdichte ist es nicht weiter verwunderlich, daß sich die Natur zur molekularen Verschlüsselung biologischer Informationen Oligosacchariden bedient.

Jean Montreuil prägte bereits 1973 den Begriff der Glycokonjugate (Montreuil 1973, Montreuil 1980) und verstand hierunter sowohl Glycoproteine als auch Glycolipide. Diese Glycokonjugate sind es, welche bei so entscheidenden biologischen Prozessen, wie Infektionen, Fertilisation, Entzündungen, Proteinfaltungen oder Metastasierung eine entscheidende Rolle spielen (McAuliffe & Hindsgaul 1997), siehe Abbildung 1.2. Auch Zell-Zell-Erkennungen, die Erkennung von Viren durch Antikörper und viele andere biologische Prozesse finden über Oligosaccharidmotive statt. Gute Übersichten geben hierzu (Varki 1993, Sharon & Lis 1993, Varki 1997, Mamman, Choi & Whitesides 1998, Varki et al. 1999) und besonders auch (Alper 2001).

**Abbildung 1.2:** Glycoproteine in einer Zellmembran und deren Wechselwirkungen mit Hormonen, Toxinen, Viren, Bakterien und anderen Zellen (Sharon & Lis 1993)

Die Bedeutung von Kohlenhydraten in der belebten Natur wird auch vor dem Hintergrund deutlich, daß mehr als die Hälfte aller Proteine in biologischen Systemen glycosyliert vorliegen und zum Teil hierdurch erst ihre korrekte Faltung und damit eventuelle katalytische Aktivität erhalten.

In Abbildung 1.3 sind einige prominente Vertreter von terminalen Kohlenhydratstrukturen aufgeführt. Die Strukturen A, B und H sind Blutgruppenderminanten, ein Groß-

teil der anderen Strukturen wird besonders auf den Oberflächen von Krebszellen gefunden (Konska et al. 1998, Mamman, Choi & Whitesides 1998). Sialyl-Lewis^x ist unter anderem schon lange dafür bekannt, daß es bei Entzündungsreaktionen eine ganz entscheidende Rolle spielt (Giannis 1994).

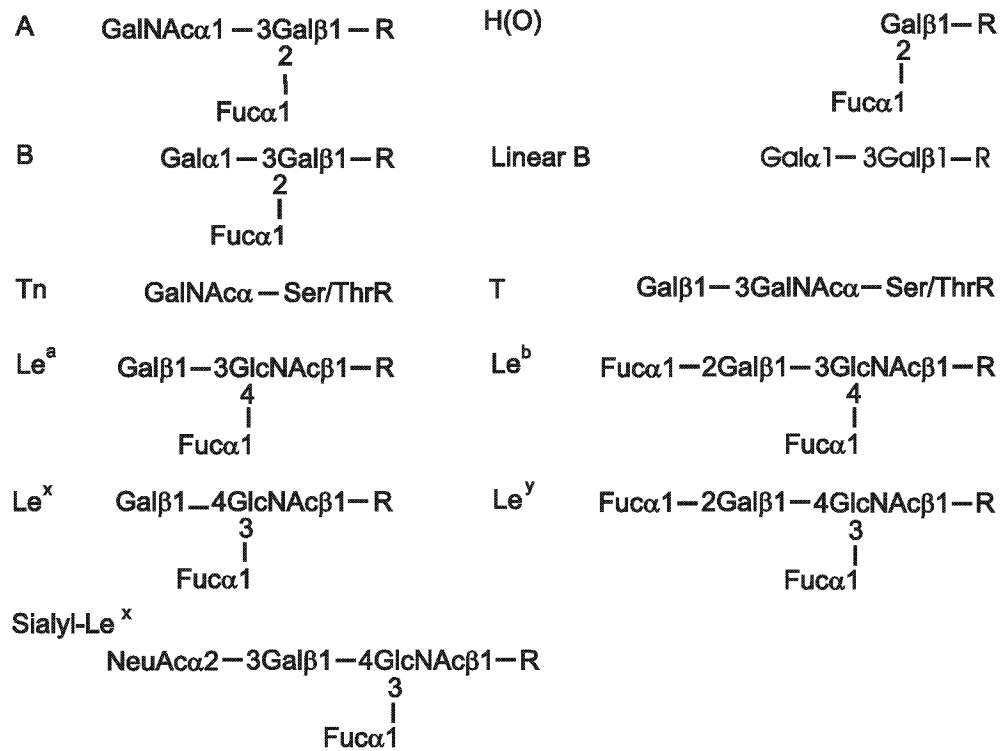


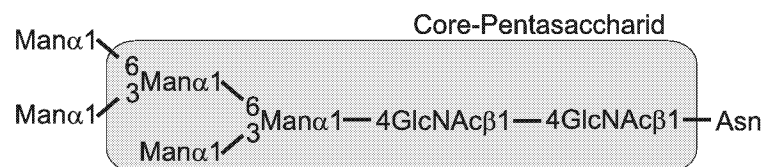
Abbildung 1.3: Terminale Kohlenhydratstrukturen von Glykokonjugaten

Die in eukaryontischen Zellen auftretenden Glycoproteine können in die Klasse der N-Glycane (Flitsch & Watt 1997) und die der O-Glycane eingeteilt werden.

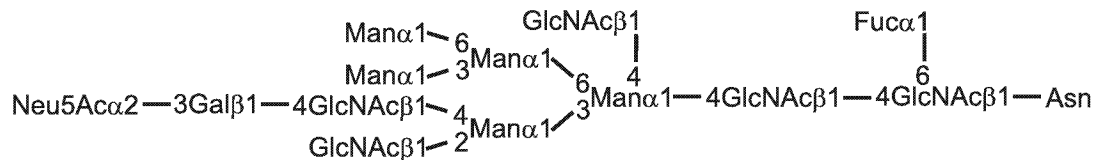
1.2.1 N-Glycane

In N-Glycanen ist das Glycan über eine Amidgruppe eines Asparagins an das Protein verknüpft (Elling 1997), wobei sich das Asparagin dabei stets in einer Sequenz Asn-X-Ser/Thr befindet (Varki et al. 1999). Den N-Glycanen liegt die in Abbildung 1.4 grau unterlegte Core-Pentasaccharid zugrunde. Sie lassen sich weiter unterteilen in Oligomannose-Typ (außer dem Core-Pentasaccharid, liegen ausschließlich α -Mannosyleinheiten vor), Komplex-Typ (außer im Core-Pentasaccharid treten keine Mannose-Einheiten auf, mono- bis pentaantennäre Strukturen aus N-Acetylglucosamin, Galactose, Neuraminsäure und Fucose werden ausgebildet) und dem Hybrid-Typ (Strukturelemente von Oligomannose-Typ und Komplex-Typ treten vereint auf, bildet sowohl Mannosezweige, als auch Nicht-Mannose-Zweige aus).

Oligomannose-Typ:



Hybrid-Typ:



Komplex-Typ:

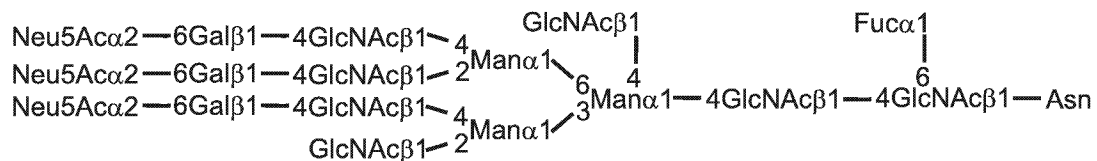


Abbildung 1.4: Beispiele für N-Glycane: Oligomannose-Typ, Hybrid-Typ und Komplex-Typ (Varki et al. 1999)

Wichtige Merkmale der N-Glycane sind nachfolgend zusammengefaßt:

- über N-Acetylglucosamin an Asparagin gebunden
- das an N-Glycane gebundene Asparagin besitzt als übernächsten Nachbarn in der Proteinsequenz stets Serin oder Threonin (spezifisches Glycosylierungsmotif Asn-X-Ser/Thr)
- gemeinsame Core-Struktur
 $\text{Man}\alpha\text{-}1,3\text{-}[\text{Man}\alpha\text{-}1,6\text{-}]\text{Man}\beta\text{-}1,4\text{-}\text{GlcNAc}\beta\text{-}1,4\text{-}\text{GlcNAc}\beta\text{-}\text{Asn}$
- klassifiziert in Oligomannose-Typ, Komplex-Typ und Hybrid-Typ
- Biosynthese: cotranslationaler *en bloc*-Transfer eines Oligosaccharidvorläufers vom Lipid Dolichol auf das naszierende Protein, Trimmen, Verzweigen, Verlängern folgen.

1.2.2 O-Glycane

In O-Glycanen erfolgt die Bindung des Kohlenhydratanteils an das Protein über eine Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin (Elling 1997). Die Gruppe der O-Glycane kann z. T. in sogenannte Core-Strukturen eingeteilt werden, d. h. Strukturen, die den bekannten O-Glycanen zugrunde liegen, siehe Abbildung 1.5.

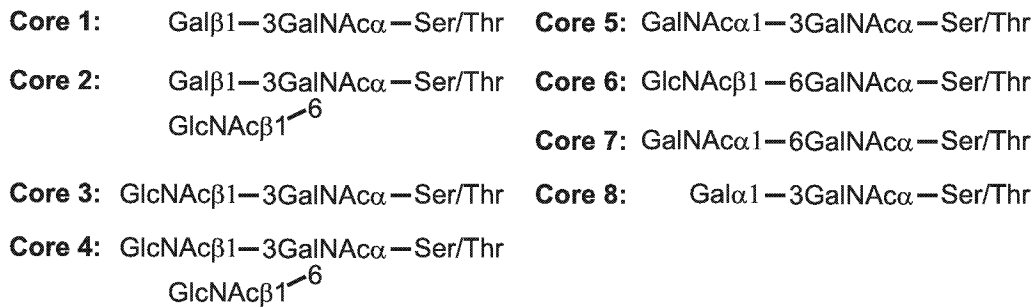


Abbildung 1.5: O-glycosidische Core-Strukturen (den Steen et al. 1998, Varki et al. 1999)

Die wichtigsten Charakteristika von O-Glycanen sind nachfolgend aufgeführt:

- die Struktur am reduzierenden Ende ist bei Säugern häufig $\text{GalNAc}\alpha\text{-Ser/Thr}$ (Tn-Antigen), man spricht dann vom Mucin-Typ
- alle tragen entweder Fuc, Neu5Ac, Gal, GlcNAc oder GalNAc am nichtreduzierenden Ende
- sie sind weniger verzweigt als N-Glycane, dafür treten aber „tandem repeats“ auf, d. h. mehrfache O-Glycosylierung des Proteins, resultierend in clusterartig dichten terminalen Oligosaccharidstrukturen
- oft auftretend sind sogenannte Core-Strukturen, siehe Abbildung 1.5
- die Biosynthese erfolgt ausschließlich durch sequenziellen Aufbau aus Monosacchariden.

1.2.3 Glycolipide

In Glycolipiden (Varki et al. 1999), welche einen wichtigen Bestandteil der Zellmembran darstellen, ist die Oligosaccharidkette an ein Lipid-Aglycon geknüpft. Es handelt sich also um amphiphile Moleküle. Der Lipidteil „verankert“ in der Regel das Glycolipid in Membranen. In höheren Organismen handelt es sich bei den meisten Glycolipiden um sogenannte Glycosphingolipide. In Glycosphingolipiden (Kolter & Sandhoff 1999, Peter-Katalinic & Sandhoff 2001) ist der Zucker mit Ceramid, d. h. einem Konstrukt aus Sphingosin und einer Fettsäure, verknüpft, siehe Abbildung 1.6. Eine weitere wichtige Glycolipidgruppe ist die der Glycosylinositolphospholipide (GPI). Glycosylinositolphospholipide dienen dazu, Proteine in Lipidmembranen zu „verankern“, daher wird oft auch von GPI-Ankern gesprochen, siehe Abbildung 1.7.

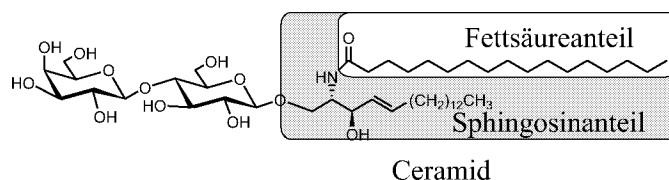


Abbildung 1.6: Glycosphingolipid, schematisch, Fettsäure kann variieren in Länge (C_{14} bis C_{24}) und in Anzahl der Doppelbindungen und Hydroxylierungen

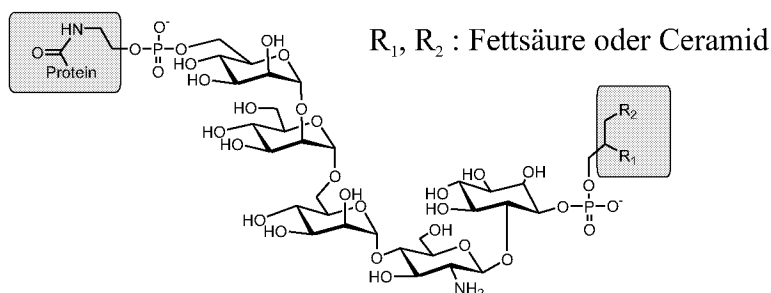


Abbildung 1.7: Glycosylinositolphospholipid, schematisch, Variationen an der Kohlenhydratstruktur kommen vor

1.3 α -Gal-Epitop / Xenotransplantation

Beispielhaft für Oligosaccharidstrukturen, welche zur Weitergabe von Informationen in lebenden Organismen beitragen, wird in diesem Abschnitt die Rolle des Trisaccharides Gal α -1,3-Gal β -1,4-GlcNAc **1** näher beschrieben. Dieses Trisaccharid, siehe Abbildung 1.8, wird auch als Linear B-GlcNAc oder nach Uri Galili als Galili-Epitop² bezeichnet (Galili et al. 1984, Galili & Swanson 1991, Galili & Tanemura 1999).

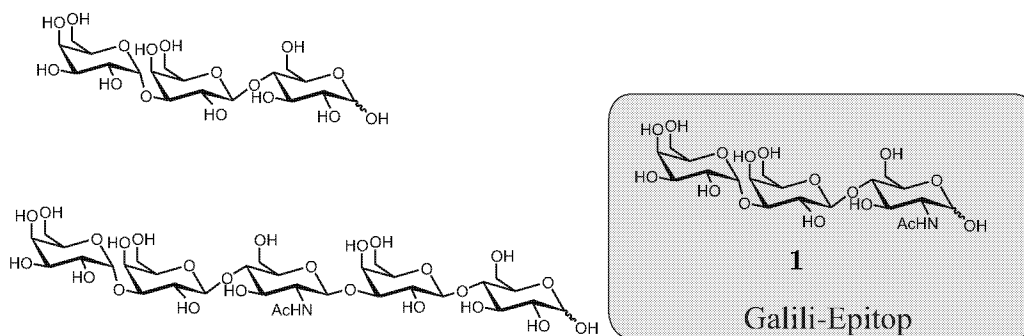


Abbildung 1.8: α -Gal-Stukturen

Organtransplantationen sind mittlerweile zu Routineeingriffen geworden und verhel-fen jedes Jahr tausenden Menschen zu einem verlängerten Leben. Zur Zeit finden noch

² Ein Epitop ist eine aufgrund ihrer sterischen Konfiguration zu einem Antikörper passende Determinante eines Antigens. Die Wechselwirkung zwischen Antigenen und Antikörpern besteht in einer nichtkovalenten Bindung zwischen den hypervariablen Regionen des Antikörpers und eines Epitopes des Antigens, es kommt zur Ausbildung von Immunkomplexen. (Roempp Chemie Lexikon 1995)

sogenannte Allotransplantationen statt, d. h. Transplantationen von menschlichen Organen auf Menschen. Der Menge an verfügbaren Spenderorganen steht heutzutage eine weitaus größere Anzahl von Menschen gegenüber, die auf solch ein Organ warten. In vielen Fällen — in den USA in 70 % der Fälle (Galili & Tanemura 1999) — kann daher nicht transplantiert und damit Leben gerettet werden. Neben dem Versuch mit künstlichen Organen zu arbeiten, was noch nicht zufriedenstellend gelingt³, gibt es Anstrengungen auf die sogenannte Xenotransplantation auszuweichen, d. h. die Transplantation eines Organs zwischen verschiedenen Spezies, z. B. zwischen Schwein und Mensch. Würde dies gelingen, so könnte die Versorgungslücke bezüglich Organen als geschlossen angesehen werden.

Primaten fallen aus verschiedenen Gründen als Organspender aus. Neben ethischen Gründen werden hier z. B. das Problem der Krankheitsübertragung (die zwischen nahe verwandten Spezies erleichtert ist, besonders wenn Immunsuppressiva eingesetzt werden), das Problem der Züchtung (geringe Reproduktionsrate) und weitere ökonomische Gründe angeführt, die an dieser Stelle aber nicht weiter diskutiert werden sollen. Es sei hier auf die Literatur (Chen, Andreana & Wang 1999, Wang et al. 1999) verwiesen.

Das gewöhnliche Hausschwein und Miniaturvarianten hiervon scheinen besonders geeignete Kandidaten zur Organbereitstellung für menschliche Empfänger zu sein. Die Organgrößen und -strukturen sind vergleichbar mit denen von Menschen, die Reproduktionsrate ist hoch und ethische Aspekte lassen sich angesichts der Rolle des Schweins in der Nahrungsmittelversorgung relativieren. Besonders auch im Hinblick auf die Übertragung von Retroviren⁴ gibt es Hinweise, daß eine solche Übertragung verhindert werden kann (Chen, Andreana & Wang 1999).

Auf Endothelzellen von Schweinen finden sich in großen Mengen — 1×10^6 bis 3×10^7 pro Zelle — sogenannte α -Gal-Epitope, wie sie in Abbildung 1.8 dargestellt sind (Galili & Tanemura 1999, Parker et al. 1999). Hauptsächlich vertreten ist das Glycosphingolipid $\text{Gal}\alpha\text{-}1,3\text{-Gal}\beta\text{-}1,4\text{-GlcNAc}\beta\text{-}1,3\text{-Gal}\beta\text{-}1,4\text{-Glc}\beta\text{-Ceramid}$. Ebenfalls auf Zellen von Känguruh, Maus, Ratte, Kuh, Hund, Neuweltaffen⁵ und anderen werden α -Gal-Epitope gefunden (Galili & Tanemura 1999). Keine α -Gal-Epitope wurden bisher auf Zellen von Fischen, Amphibien, Reptilien und Vögeln gefunden. Die Spezies der Altweltaffen⁶ — zu denen auch der Mensch zählt — tragen ebenfalls keine α -Gal-Epitope auf ihren Zellen. Vielmehr produzieren sie ständig große Mengen an natürlichen Antikörpern⁷ gegen α -Gal-Epitope, die sogenannten anti-Gal-Antikörper (Galili et al. 1984, Chen, Andreana & Wang 1999). Diese Antikörper sind mengenmäßig die am meisten vorkommenden menschlichen Antikörper und machen ca. 1 bis 2 % des Immunoglobulin G und

3 Von einer generellen Erfolglosigkeit künstlicher Organe kann jedoch nicht gesprochen werden. So lassen sie sich teilweise lebensverlängernd einsetzen, bis ein Spenderorgan zur Transplantation zur Verfügung steht, zum Beispiel die Dialyse im Vorfeld einer Nierentransplantation.

4 Retrovirus ist die Bezeichnung für Tiere und Menschen befallende Viren, die einsträngige Ribonucleinsäure (RNA) u. das Enzym Reverse Transkriptase enthalten. Mit Hilfe des Letzteren wird die in die Wirtszelle gelangte RNA in DNA transkribiert, um mitsamt zusätzlicher repetitiver Sequenzen anschließend in das Wirts-Genom integriert und als sogenannter Provirus mit ihm repliziert zu werden. Retroviren töten ihre Wirtszelle im allgemeinen nicht. Die meisten von ihnen sind harmlos, manche enthalten jedoch Onkogene. Zu den Retroviren, die menschliche Krankheiten hervorrufen, gehören das HIV (AIDS) sowie HTLV I u. II (Leukämie). (*Roempp Chemie Lexikon* 1995)

5 Die Gruppe der Neuweltaffen stammen aus Mittel- und Südamerika.

6 Die Gruppe der Altweltaffen ist in Afrika und Asien beheimatet und umfaßt unter anderen Große Menschenaffen und Menschen.

7 Von natürlichen Antikörpern spricht man, wenn keine vorangegangene Immunisierung vorliegt (Samuelsson et al. 1994). Jede Säugetierspezies besitzt ein Repertoire solcher Antikörper.

ca. 3 bis 8 % des Immunglobulin M aus (Galili et al. 1984, Wang et al. 1999, Galili & Tanemura 1999). Es wird angenommen, daß diese Antikörperproduktion durch eine kontinuierliche Antigen-Stimulierung durch Magendarmbakterien verursacht wird, genaue Erklärungen stehen noch aus (Galili & Swanson 1991, Galili & Tanemura 1999). Wird nun ein Schweineorgan in einen Menschen transplantiert, so kommt es, induziert durch die Antigen-Antikörperwechselwirkung, zu einer Abstoßung des Fremdorgans. Diese sogenannte hyperakute Abstoßung zerstört dabei das Spenderorgan innerhalb von Minuten bis Stunden, es kommt zur Zell-Lyse (Galili & Tanemura 1999). Mehrere Vorgehensweisen gibt es, um dies zu verhindern. Nachfolgend sollen diese diskutiert werden:

1. Abtrennen von anti-Gal-Antikörpern aus dem menschlichen Blut
2. Züchtung transgener Schweine mit veränderter Glycosyltransferase-Ausstattung
3. Abtrennung der α -Gal-Epitope des Organs
4. Inhibierung der anti-Gal-Antikörper im menschlichen Blut

1.3.1 Abtrennen von anti-Gal-Antikörpern aus dem menschlichen Blut

Da der menschliche Körper ständig anti-Gal-Antikörper produziert, müßten diese auch ständig entfernt werden. Das kann beispielsweise mit Hilfe von Adsorption geschehen. Dabei bieten sich Säulen an, welche mit α -Gal-Epitopen oder auch mit Melibiose (Gal α -1,6-Glu) (Sandrin, Osman & McKenzie 1997) beladen sind und durch die das Blut des Patienten hindurch geleitet wird. Cooper *et al.* synthetisierten ein Polyacrylamid, welches über einen Spacer mit dem Disaccharid Gal- α -1,3-Gal beladen war. Dieses wiederum wurde kovalent an poröses Glas gebunden. Mit diesem Material wurde die extrakorporale Adsorption von anti-Gal-Antikörpern an Pavianen, denen Schweineorgane transplantiert wurden, getestet. Der anti-Gal-Antikörper-Spiegel im Blut und die Cytotoxizität des Serums konnten drastisch gesenkt werden. Durch mehrfache Anwendung konnte dieser Zustand für mehrere Wochen aufrechterhalten werden (Taniguchi et al. 1996).

1.3.2 Züchtung transgener Schweine mit veränderter Glycosyltransferase-Ausstattung

Bei dieser Methode wäre die Vorgehensweise so, Schweine genetisch dahingehend zu verändern, daß sie keine α -Gal-Epitope mehr produzieren (Sandrin, Osman & McKenzie 1997). Zum einen kann man die Produktion der α -1,3-Galactosyltransferase (α -1,3-GalT) unterdrücken, man spricht hier von knock-out-Tieren. Von α -1,3-GalT-knock-out-Mäusen wurde berichtet, daß es zu einer weniger starken Bindung von anti-Gal-Antikörpern kam, jedoch entwickelten sich diese Mäuse nicht gesund (Miyagawa et al. 1999). Zum anderen kann man andere Glycosyltransferasen überexprimieren lassen, welche mit der α -1,3-GalT um das Substrat konkurrieren. In einer anderen Methode wiederum würde das α -Gal-Epitop durch eine weitere Glycosyltransferase maskiert, beispielsweise durch eine α -2,3-Sialyltransferase, und würde im menschlichen Körper nicht mehr erkannt (Miyagawa et al. 1999).

An der Entwicklung von transgenen Schweinen wird intensiv gearbeitet. In Kombination mit dieser Technik gelang es so beispielsweise der Firma Imutran Schweineherzen in Pavianen 99 Tage arbeiten zu lassen (Stolberg 1999).

1.3.3 Abtrennung der α -Gal-Epitope des Organs

Eine Beseitigung der störenden α -Gal-Epitope gelingt mittels α -Galactosidasen. Führt man dies lediglich nach der Organentnahme durch, so ist der Effekt wiederum nur von kurzer Dauer. Osman *et al.* schlägt vor, daß bei transgenen Schweinen die Expressierung einer α -Galactosidase und einer α -1,2-Fucosyltransferase zu einer kontinuierlichen Unterdrückung von α -Gal-Epitopen auf den Organen führen könnte (Sandrin, Osman & McKenzie 1997, Osman *et al.* 1997).

1.3.4 Inhibierung der anti-Gal-Antikörper im menschlichen Blut

Bei dieser Methode werden (synthetische) α -Gal-Epitope in die menschliche Blutbahn gegeben, welche dann die vorhandenen anti-Gal-Antikörper „absättigen“, d. h. inhibieren. Eine Erkennung der α -Gal-Epitope durch die anti-Gal-Antikörper ist dann im Idealfall nicht mehr möglich. Es müßte allerdings zu einer ständigen Zugabe der α -Gal-Epitope kommen. Gerade hierfür ist eine Verfügbarkeit von α -Gal-Epitopen in großen Mengen die Voraussetzung. Diese Arbeit soll hierzu einen Beitrag liefern.

Kobayashi *et al.* berichteten 1997 von PEG-gebundenen α -Gal-Epitopen und deren Verwendung als Inhibitoren zur Verhinderung der hyperakuten Abstoßung von Xenotransplantaten. Die Synthese und eine nähere Beschreibung der PEG-Konjugate bezüglich Molekulargewicht, Art der Anbindung, Größenordnung der Beladung, Verwendung eines Linkers oder Spacers, Homogenität oder Inhomogenität wurden nicht berichtet. Die Halbwertszeiten der α -Gal-Epitope in der Blutbahn konnten durch die PEG-Anbindung drastisch erhöht werden. Für das α -Gal-Trisaccharid wurde eine Steigerung von 20 min für den freien Zucker auf 13 Stunden für den β -PEG-gebundene Zucker berichtet (Nagasaka *et al.* 1997). Auch unter diesem Aspekt liefert die vorliegende Arbeit einen Beitrag. Wang *et al.* berichtete von der Anbindung des α -Gal-Trisaccharides an Acrylamid und der nachfolgenden Polymerisierung. Mit den erhaltenen Polymeren wurden um den Faktor 10^3 bis 10^4 niedrigere IC_{50} -Werte⁸, verglichen mit dem freien Trisaccharid, erzielt (bis herab zu 5,6 nM) (Wang *et al.* 1999). Dieser Ansatz scheint daher ein vielversprechender Weg zu sein.

1.4 *in vivo*-Synthese von Oligosacchariden

1.4.1 Biosynthese von N-Glycanen

Die Synthese von N-Glycanen beginnt ausgehend von Dolichol-Phosphat im endoplasmatischen Retikulum (ER). Zunächst wird, wie in Abbildung 1.9 dargestellt, ein über eine Pyrophosphateinheit an Dolichol-Lipid gebundenes Tetradecasaccharid synthetisiert. Dies erfolgt membrangebunden durch Leloir-Glycosyltransferasen (zu Glycosyltransferasen mehr in Kapitel 6) auf der cytosolischen und auf der luminalen Seite des ER. Dabei wird in ersten Schritt mittels einer GlcNAc-1-Phosphotransferase eine *N*-Acetylglucosaminphosphateinheit auf Dolichol-Phosphat übertragen, im zweiten Schritt durch eine GlcNAc-Transferase eine *N*-Acetylglucosamineinheit. Das nach weiteren Schritten so dargestellte Tetradecasaccharid — siehe Abbildung 1.10, grau unterlegt

⁸ IC_{50} : Inhibitorkonzentration bei 50 %iger Inhibierung

ist das Core-Pentasaccharid der N-Glycane — wird *en bloc* mittels einer Nicht-Leloir-Oligosaccharyltransferase auf ein Asparagin eines naszierenden Proteins übertragen.

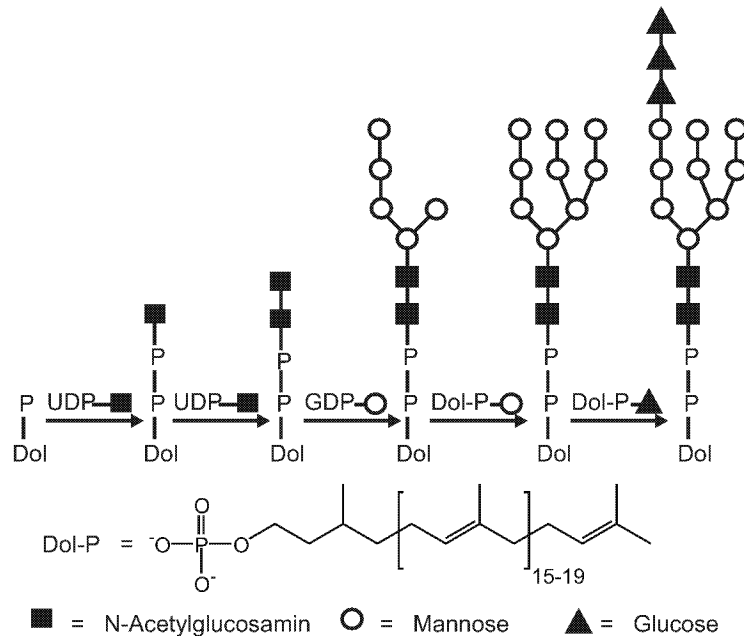


Abbildung 1.9: Biosynthese der Dolichol-gebundenen N-Glycan-Zwischenstufe, schematisch (Varki et al. 1999)

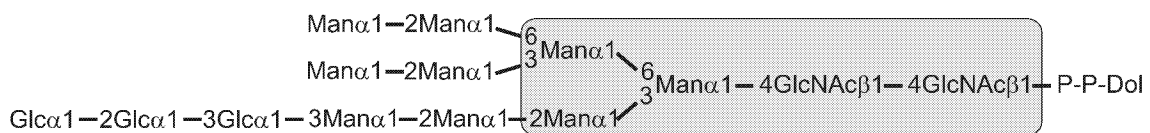


Abbildung 1.10: Dolichol-gebundene N-Glycan-Zwischenstufe als Substrat der Oligosaccharyltransferase

Immer noch im ER findet dann ein Heruntertrimmen des N-Glycoproteins mittels Glucosidasen statt (alle drei Glucose-Einheiten werden entfernt, nicht dargestellt), wobei es auch zur korrekten Faltung des Proteins kommt. Es folgen weitere Trimmsschritte im ER und Golgi-Apparat mittels Mannosidasen und schließlich ein Aufbau mittels Leloir-Glycosyltransferasen, um das endgültige N-Glycan zu erhalten (Varki et al. 1999). Eine gute Übersicht über Biosynthese und Funktion von N-Glycanen geben Helenius und Aebi (Helenius & Aebi 2001).

1.4.2 Biosynthese von O-Glycanen

Die Biosynthese der O-Glycane läuft wesentlich direkter als die der N-Glycane. Nach erfolgter Proteinbiosynthese (Translation) erfolgt — beim Beispiel der GalNAc-Peptid-Bindung, von der sich die Mucine ableiten — die Übertragung eines GalNAc-Monosaccharides von UDP-GalNAc auf Serin oder Threonin der Peptidkette durch eine Polypeptid-GalNAc-Transferase. Durch sequenziellen Aufbau mittels weiterer Leloir-

Glycosyltransferasen entsteht so das fertige O-Glycan. Die Glycosylierung findet im Golgi-Apparat statt. Das Glycosylierungsmuster des Glycans wird dabei im wesentlichen durch die Konzentrationen der Glycosyltransferasen und Nukleotidzucker bestimmt.

1.5 *in vitro*-Synthese von Oligosacchariden

1.5.1 Chemische Synthese von Oligosacchariden

Die chemische Synthese von Kohlenhydraten kann als besondere Herausforderung angesehen werden, obwohl Zucker nichts anderes sind als Polyole mit einer Aldehyd- oder Ketofunktion. Die Schwierigkeit ihrer Darstellung liegt in der Anzahl der Stereozentren, welche relativ ähnliche chemische Reaktivitäten besitzen, und der Notwendigkeit glycosidische Bindungen stereoselektiv durchzuführen. Zur expliziten Knüpfung von glycosidischen Bindungen und Schutzgruppenchemie sei hier auf Kapitel 5, verwiesen. Die folgenden aktuellen Übersichtsartikel geben eine gute Einführung: (Davis 2000, Ye & Wong 2000, Barkley & Arya 2001, Nicolaou & Mitchell 2001, Sears & Wong 2001).

Die chemische Zuckersynthese ist mittlerweile so leistungsfähig, daß man fast beliebige Kohlenhydrate darstellen kann. Besonders zur Darstellung kleiner Mengen, beispielsweise für Screenings und die Darstellung von Oligosaccharidbibliotheken (Hilaire & Meldal 2000) und vor allem von nicht-natürlichen Kohlenhydraten ist die chemische Synthese hervorragend geeignet. Die Nachteile des hohen Arbeits-, Zeit- und Kostenaufwandes, auch durch die Verwendung von organischen Lösungsmitteln, und der aufwendigen anschließenden Aufreinigung sind hierbei oft zweitrangig. Diese Art der Synthese ist so allerdings nur schlecht für eine kostengünstige Darstellung großer Mengen geeignet.

1.5.2 Enzymatische Synthese von Oligosacchariden

Wenn es um die Darstellung von auch in der Natur vorkommenden Oligosacchariden geht, ist der Einsatz von Enzymen heute geradezu zwangsläufig, sofern diese verfügbar sind. In Kapitel 6, wird näher auf die hierbei wichtigen Enzymgruppen der Glycosidasen und Glycosyltransferasen eingegangen. Man kann so enzymatisch unter Umgehung von Schutzgruppenchemie in wäßrigen Medien sehr leicht die gewünschten Produkte erhalten (Palcic & Hindsgaul 1996, Palcic 1999). Dies läßt sich auch im Maßstab von mehreren hundert Gramm durchführen, wie Johnson *et al.* am Beispiel von Globotriose und des Pentasaccharides LST_D, siehe Abbildung 1.11, mittels rekombinanten bakteriellen Glycosyltransferasen zeigen konnte (Johnson 1999). Bakterielle Glycosyltransferasen sind im Unterschied zu Säuger-Glycosyltransferasen keine Glycoproteine und lassen sich daher rekombinant auch leichter in aktiver Form in gängigen bakteriellen Expressionssystemen produzieren, isolieren und vor allem aufreinigen. Bakterien halten jedoch einen Vorrat an Glycosyltransferasen bereit, welcher von dem von Säugern abweicht und daher diese Glycosyltransferasen nur in Teilbereichen ersetzen kann.

Eine interessante Variante der enzymatischen Synthese ist die Ganzzellbiotransformation. Endo *et al.* hat 1999 die Synthese von *N*-Acetyllactosamin durch ein System zweier *E. coli*-Stämme und eines *Corynebacterium*-Stammes beschrieben (Endo *et al.* 1999). Produkttitern von 107 g L⁻¹ wurden in 96 %iger Ausbeute erreicht. Die Zellen wurden hierbei mittels Polyethylenglykoloctadecylamin und Xylen permeabilisiert. Auch zur Synthese von Sialyl-Tn wurde dieser Ansatz verwendet (Endo *et al.* 2001).

Globotriose	$\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$
	Ausbeute: 75 % ausgehend von Lactose Menge: 5 g
LST _D	$\text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$
	Ausbeute: 65 % ausgehend von Lactose Menge: 50 g

Abbildung 1.11: Globotriose und LST_D als large scale-Produkte, mit Angabe der durch die enzymatische Darstellung erhaltenen Gesamtausbeuten und -mengen (Johnson 1999)

Das Problem der Oligosaccharidaufreinigung bleibt bei der klassischen enzymatischen Synthese und erst recht beim Ganzzellansatz bestehen.

1.6 Einsatz von Glycokonjugaten

Da Oligosaccharidstrukturen in der Natur eine so große Rolle spielen und viele Krankheiten durch sie mitverursacht werden, liegt es auf der Hand dieses — noch sehr stark wachsende — Wissen zu nutzen und Oligosaccharide ebenfalls zur Bekämpfung solcher Krankheiten einzusetzen. Tabelle 1.3 gibt eine Auswahl von zugelassenen Medikamenten und Tabelle 1.4 von Medikamentenkandidaten auf Kohlenhydratbasis wieder.

Tabelle 1.3: Beispiele für zugelassene Medikamente auf Kohlenhydratbasis (McAuliffe & Hindsgaul 1997, Varki et al. 1999, Alper 2001, Service 2001)

Name	Indikation/Wirkung	Hersteller
Acarbose	Diabetes, α -Glucosidase-Inhibitor	Bayer AG
AO-128	Diabetes	Takada / Abbot
Heparin	Blutgerinnungshemmer	
Topiramate	Epilepsie	Johnson & Johnson
Acemanan	Infektionen, Wundheilung	Carrington Labs
Lufenuron	Flohbefall bei Tieren, Chitinsynthese-Inhibitor	Ciba-Geigy
GS-4104	Influenza A, Neuraminidase-Inhibitor	Glaxo Wellcome / Biota
Zanamivir (Relenza)	Influenza A, Neuraminidase-Inhibitor	Gilead / Hoffman La Roche

Eine ganz besondere Herausforderung ist die Behandlung von Krebs mittels Glycokonjugaten. Es ist bekannt, daß Krebszellen auf ihren Oberflächen Glycostrukturen besitzen, die von denen gesunder Zellen abweichen. Ein Behandlungsansatz geht von der Möglichkeit aus, das Immunsystem so zu stimulieren, daß es die Krebszellen „erkennt“ (nach Produktion von Antikörpern) und eine Lyse der Zellen herbeiführt (Livingston 1992, Cohen 1993). Ein beeindruckendes Beispiel für eine solche Vorgehensweise wurde 1999 von Danishefsky *et al.* veröffentlicht (Ragupathi et al. 1999). Das in Abbildung 1.12 dargestellte Globo-H-Antigen wurde zuerst in Brustkrebsextrakten identifiziert und konnte anschließend auch in anderen menschlichen Krebsarten nachgewiesen werden, so auch in Prostata-, Lungen-,

Tabelle 1.4: Beispiele für Medikamentenkandidaten auf Kohlenhydratbasis (McAuliffe & Hindsgaul 1997, Varki et al. 1999, Alper 2001, Service 2001)

Name	Indikation/Wirkung	Hersteller	Status
Swainsonin-Derivat	Nierentumore und Hepatitis, α -Mannosidase-Inhibitor	GlycoDesign	Phase III
Fucosyl-G _{M1} -Derivat	Lungenkrebs	Sloan-Kettering	Phase III
Mannan-Mucin-Formulierung	Brustkrebs	Austin Res. Inst.	Phase III
Iminozucker	Gaucher Krankheit	Oxford Glycoscience	Phase III
G _{D2} -Derivat	Krebsvakzine (Hautkrebs)	Bristol Meyers Squibb / Progenics	Phase III
Sialyl-Tn-Derivat (Theratope)	Krebsvakzine (Brustkrebs, metastasierender Krebs)	Chiron / BioMira	Phase III
G _{M1} -Derivat	Durchfall (<i>V. cholerae</i> -Toxin), verhindert Adhäsion	Synsorb Biotech	Phase III
Gal α -1,4-Gal	Nierenversagen (<i>E. coli</i> -Toxin), verhindert Adhäsion	Synsorb Biotech	Phase III
Globo-H-Derivat	Krebsvakzine	Sloan-Kettering	Phase II
pectingebundenes Oligosaccharid	Tumorbehandlung	SafeScience	Phase II
PSGL-1, rekombinant	Behandlung von Herzinfarkt- und Transplantationspatienten, Tumorbehandlung	Wyeth / American Home Products	Phase II
G _{M2} /G _{D2} -Derivat	Krebsvakzine (Haut-, Brustkrebs)	Bristol Meyers Squibb / Progenics	Phase I/II
sulfatiertes Oligosaccharid	Tumorbehandlung	Progen Ind.	Phase I
N-Nonyldeoxy-nojirimycin	Hepatitis B und C	United Therapeutics	Phase I

Dickdarm-, Ovarien-, Bauchspeichel und Magenkrebs. Es wird auf der Tumorzelloberfläche als Glycolipid und möglicherweise auch als Glycoprotein exprimiert (Danishefsky & Allen 2000). Um solch eine Behandlung zu testen, wurde die Synthese von Globo-H und eines Derivates, welches an Stelle des Ceramidrestes einen Allylrest trägt, chemisch über die Glycalkmethode (zur Glycalkmethode siehe Kapitel 5) durchgeführt. Der Allylrest des Derivates diente als Spacer und zur Verknüpfung des Hexasaccharid-Antigens von Globo-H mit einem Carrier-Protein, welches nötig ist, um eine Immunantwort zu induzieren. Die Gabe dieses synthetischen Globo-H-Derivates führte bei Prostatakrebspatienten zu einer Immunantwort. Vor der Impfung waren keine Antikörper gegen Globo-H nach-

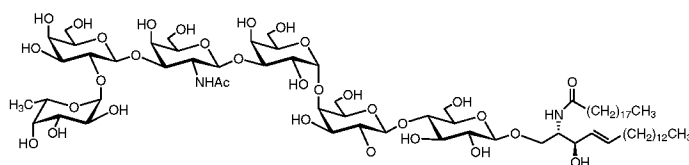


Abbildung 1.12: Globo-H-Antigen (Ragupathi et al. 1999)

weisbar, nach der Impfung konnte eine starke Antikörperbildung beobachtet werden. In weiteren klinischen Studien (Phase II) konnte am Menschen eine Cytolyse von Globo-H-exprimierenden Krebszellen (Prostatakrebs) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der weiteren Untersuchungen in Phase III bleiben abzuwarten.

Neben dem geschilderten Beispiel für Krebsvakzinen in der Testphase gibt es noch weitere (Danishefsky & Allen 2000, Alper 2001). Es besteht Grund zu der Annahme, daß früher oder später potente Vakzinen gegen gewisse Krebsarten auf Kohlenhydratbasis verfügbar sein werden.

Die aufgeführten Beispiele führen den Nutzen, der durch Glycokonjugate entstehen kann, vor Augen. Es ist offensichtlich, daß als Voraussetzung zu einem breiten Einsatz von Oligosaccharid-Strukturen, auch die Möglichkeiten der Synthese im Produktionsmaßstab vorangetrieben werden müssen.

1.7 Kooperationen

Im Laufe der Arbeiten kam es zu verschiedenen Kooperationen, ohne die die Arbeit in diesem Umfang sicher nicht möglich gewesen wäre. In Abbildung 1.13 sind die wichtigsten Kooperationen dargestellt.

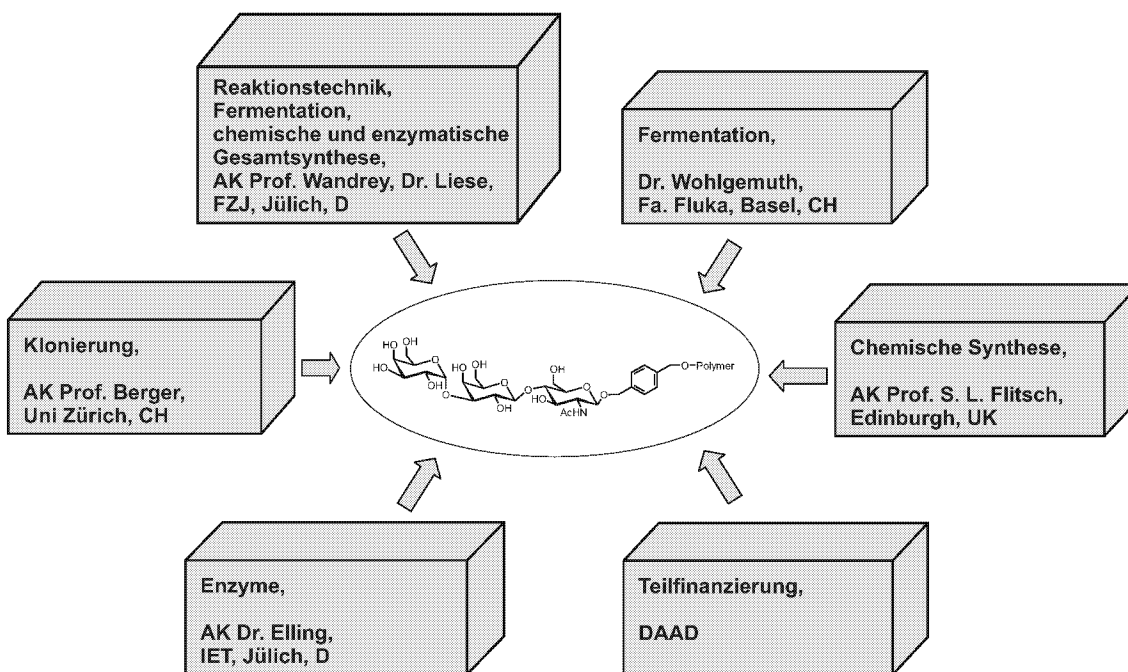


Abbildung 1.13: Kooperationen zur polymerunterstützten Flüssigphasen-Oligosaccharidsynthese

Die eigentliche membran- und polymerunterstützte Flüssigphasen-Oligosaccharidsynthese wurde im Institut für Biotechnologie der Forschungszentrum Jülich GmbH entwickelt und durchgeführt. Die Linkersynthesen, sowie verschiedene chemische Arbeiten, wurden z. T. während eines Forschungsaufenthaltes im AK Prof. Flitsch, Centre for Protein Technology, Universität Edinburgh (UK), durchgeführt. Die Bereitstellung des Enzyms Sucrose Synthase erfolgte durch den AK Dr. Elling, Institut für Enzymtechnologie (IET), Universität Düsseldorf (jetzt Prof. Elling, RWTH Aachen), ebenso die des *E. coli*-Stammes zur β -1,4-Galactosyltransferase-Produktion. Das Plasmid zur α -1,3-Galactosyltransferase-Produktion wurde vom AK Prof. Berger, Physiologisches Institut der Universität Zürich (CH), zur Verfügung gestellt.

2 Zielsetzung

2.1 Methodenentwicklung zur polymerunterstützten Synthese von Oligosacchariden

Wie aus dem vorangegangenen Kapitel hervorgeht, ist die Bereitstellung von definierten Oligosacchariden, insbesondere solchen, welche nicht aus Naturstoffen isoliert werden können, immer noch eine große Herausforderung. Um dies zu überwinden, ist eine Methodenentwicklung hin zu einer zukünftigen Oligosaccharidsynthese in großem Maßstab unabdingbar. Wünschenswert wäre es, hier einmal ein solch wirkungsvolles Werkzeug wie beispielsweise die Merrifield-Technik¹ für Peptide (Merrifield 1963), allerdings auch für den größeren Maßstab, in Händen zu halten. Die angestrebte Methodik sollte polymerunterstützt ablaufen, um die Produktaufarbeitung zu erleichtern. Dabei sollte jedoch die Zugänglichkeit des Polymers so gut sein, daß ein Einsatz von Enzymen gut möglich ist. Es soll hier ein Polymer verwendet werden, welches homogen löslich sowohl in wäßrigen Medien, als auch in vielen gebräuchlichen organischen Medien eingesetzt werden kann. Da diese Methodenentwicklung breit anwendbar sein soll, ist angestrebt, ein möglichst gut verfügbares und kommerziell erhältliches, billiges Polymer zu verwenden.

Bei der klassischen Oligosaccharidsynthese fallen in der Regel viele arbeits- und damit kostenintensive Aufreinigungsschritte an. Ein Auskristallisieren ist besonders bei ungeschützten Zuckern eher die Ausnahme. In der vorliegenden Arbeit ist der Einsatz von Membrantechniken geplant, um diese Aufreinigungsschritte zu minimieren. Membranverfahren, vor allem unter Verwendung keramischer Membranen, sollen für die Abtrennung an Stelle der bislang genutzten Fällung eingesetzt werden. Keramischen Membranen im Bereich der Ultra- und Nanofiltration waren bis vor kurzem nicht wie heute verfügbar und bieten — im Vergleich zu Polymermembranen — einige Vorteile, wie in Kapitel 4.2 noch erläutert wird. Es sollen hier die Grenzen des Einsatzes von keramischen Membranen ausgelotet werden.

Ein weiterer Schwerpunkt soll die Weiterentwicklung der Analytik von an löslichen Polymeren gebundenen Molekülen sein. Hier gilt es eine möglichst allgemeine, direkte, praktikable und mit kleinem Fehler behaftete Methode zur Bestimmung der Reaktanden zu entwickeln.

Eine solche Technik kommt auch gerade einer zukünftigen Maßstabsvergrößerung sehr

¹ Bei der nach R. B. Merrifield benannten Technik handelt es sich um eine Festphasen-Synthese, die heute routinemäßig und automatisiert zur Synthese von Peptiden eingesetzt wird. Bei der Merrifield-Technik werden alle zur Knüpfung der Peptid-Bindung notwendigen Schritte vorgenommen, während die Aminosäuren an einem unlöslichen, quellfähigen Kunstharz (meist ein Copolymerisat aus Styrol mit 2% Divinylbenzol) gebunden sind. Zwischen den einzelnen Reaktionsschritten wird das Reaktionsmedium reagenzfrei gewaschen. Nach Abschluß der Peptid-Synthese wird das Peptid vom Trägermaterial abgespalten. Robert Bruce Merrifield erhielt für die Entwicklung dieser Technik 1984 den Nobelpreis für Chemie. (*Roempp Chemie Lexikon* 1995)

entgegen. Die Methodik soll also ähnlich der etablierten Merrifield-Synthese erfolgen, hier jedoch für Oligosaccharide und nicht für Oligopeptide, sie soll vor allem auch mit Enzymen kompatibel sein und an einem löslichen Polymere erfolgen.

Man kann die Zielsetzung der Arbeit unter folgenden Punkten zusammenfassen:

- Methodenentwicklung hin zur Oligosaccharidsynthese in größerem Maßstab
- Synthese an homogen löslichem Polymer
- Synthese in *wässrigen* und *organischen* Medien
- Einsatz von Membrantechniken zur Aufreinigung, damit Minimierung der kostenintensiven säulenchromatographischen Aufarbeitung
- Etablierung geeigneter Analysenmethoden zur Verfolgung der jeweiligen Reaktion
- Durchführung der Methodik am Beispiel einer *chemischen* und einer *enzymatischen* Oligosaccharidsynthese

Das Ziel ist, eine möglichst universell einsetzbare Methodik zu entwickeln. Abbildung 2.1 verdeutlicht die geplante Vorgehensweise der polymer- und membranunterstützten Oligosaccharidsynthese.

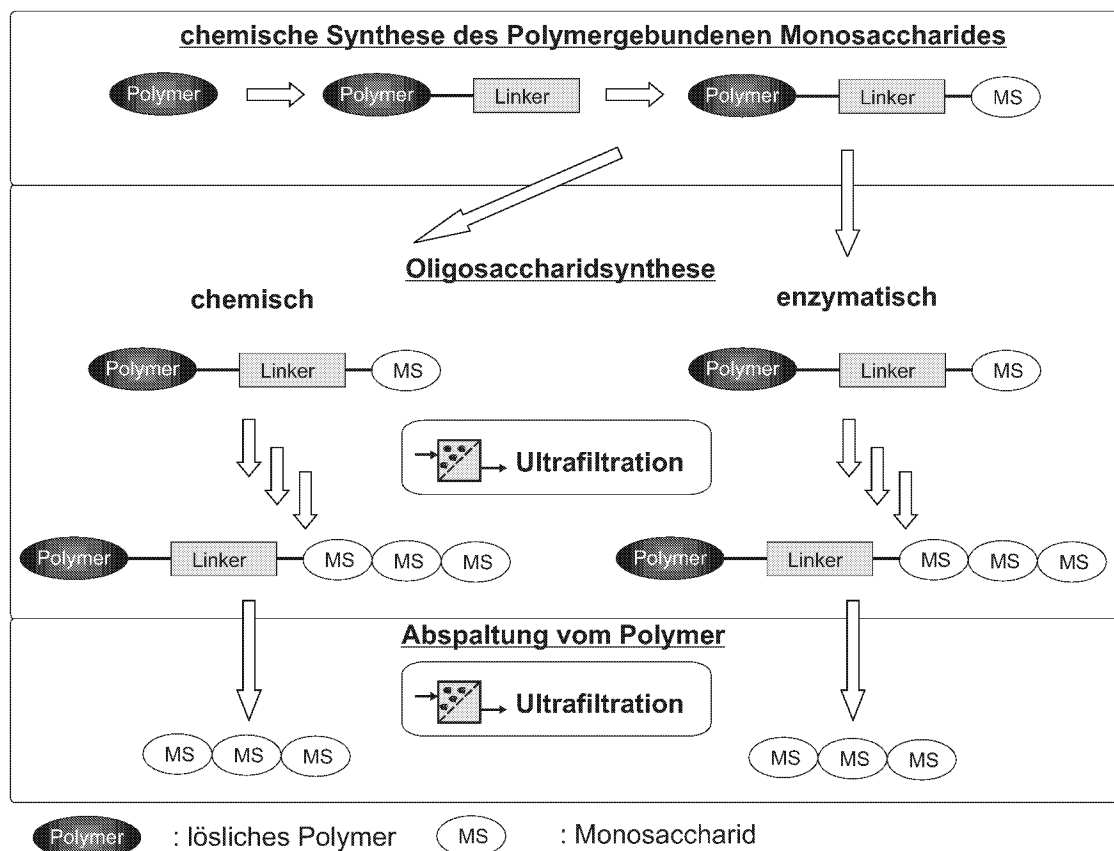
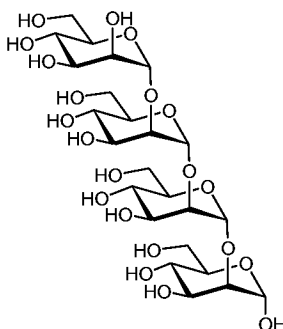


Abbildung 2.1: Prinzip der Oligosaccharidsynthese an einem homogen löslichen Polymer bei Anwendung von Ultrafiltration

2.2 Chemische Synthese von Oligosacchariden

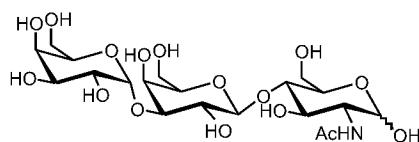
Auf der chemischen Seite wurde als Modelloligosaccharidsynthese die Synthese des in Abbildung 2.2 dargestellten α -1,2-verbrückten Tetramannopyranosides **2** ausgewählt. Die Synthese erfolgt über die Trichloracetimidatmethode, wie in Kapitel 5 näher erläutert. Diese Synthese eignet sich besonders gut als Modellsystem, nicht zuletzt, da sie an verschiedenen Trägern und mit verschiedenen Linkern literaturbeschrieben ist (Douglas, Whitfield & Krepinsky 1995, Rademann & Schmidt 1997).



2

Abbildung 2.2: α -1,2-verbrücktes Tetramannopyranosid **2** als Modelloligosaccharid

2.3 Enzymatische Synthese von Oligosacchariden



1

Gal α -1,3-Gal β -1,4-GlcNAc

Abbildung 2.3: α -Gal-Epitop **1**

Auf der enzymatischen Seite wurde als sinnvolles Zielmolekül das bereits in Kapitel 1 vorgestellte α -Gal-Epitop **1**, siehe Abbildung 2.3, ausgewählt. Für die Wahl des α -Gal-Epitopes **1** spricht neben der Tatsache, daß es sich um ein Oligosaccharid handelt, für das es — wie in der Einleitung dargelegt — ein industrielles Interesse gibt, vor allem die Tatsache, daß sämtliche benötigten Enzyme verfügbar gemacht werden konnten.

3 Polymerunterstützte Synthese

3.1 Einleitung

3.1.1 Synthesemethoden

In diesem Kapitel soll die Synthese von Oligosacchariden im Hinblick auf verschiedene Synthesemethoden beleuchtet werden. Es handelt sich dabei um Synthesemethoden unter Zuhilfenahme von Polymeren oder anderen Trägern (sowohl homogen lösliche, als auch unlösliche Polymere, für andere unlösliche Träger, wie z. B. poröses Glas gilt das für unlösliche Polymere gesagt). Neben einem Polymer zur Molekulargewichtsvergrößerung wird ein Linker verwendet, der die Aufgabe hat, eine während der Synthese stabile Bindung zu stellen und ein Abspalten des gewünschten Zielmoleküls dann nach erfolgter Synthese zu ermöglichen, siehe Abbildung 3.1.

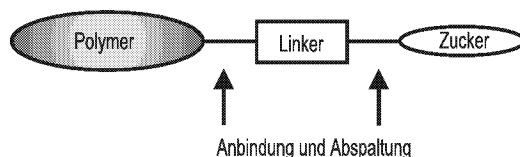


Abbildung 3.1: Schaubild zur polymerunterstützten Synthese

Abbildung 3.2 gibt eine Übersicht über vier zu unterscheidende Synthesemethoden. Methode A) ist die klassische Synthese mit freien Molekülen, bei den Methoden B) bis D) handelt es sich um polymerunterstützte Synthesen. Bei den polymerunterstützten Synthesen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit die fundamental wichtige Stufe der Polymeranbindung nicht dargestellt.

Man sieht, daß die Arbeitserleichterung in der Aufarbeitung — das eigentliche Ziel — bei den Methoden B), C) und D) erst mit zunehmender Anzahl von Synthesestufen zum Tragen kommt. Für kurze Synthesen ist daher die Darstellung nach der klassischen nicht-polymerunterstützten Synthese in homogener Lösung — Methode A) — weiterhin die Methode der Wahl. Für längere Synthesesequenzen wiederum bieten sich die Methoden B) bis D) an, bei denen die Aufarbeitung durch eine Polymeranbindung erleichtert wird. Ein säulenchromatographischer Schritt ist lediglich am Ende einer möglicherweise sehr langen Reaktionssequenz nötig. Beim Arbeiten an fester Phase — Methode B) — reicht in der Regel ein Abfiltrieren und Spülen zur Aufarbeitung in der Sequenz aus. Man erkaufte sich diese Erleichterung allerdings durch einige Nachteile. Ein ganz entscheidender Nachteil ist bei Verwendung eines unlöslichen Polymers, daß die Zugänglichkeit des polymergebundenen Reaktanden beschränkt ist. Besonders auch bei enzymatischen Synthesen ist dies beobachtet worden (Sallas & Nishimura 2000). Tabelle 3.1 faßt die entscheidenden Vor- und Nachteile von freier Synthese A) und Festphasensynthese B) zusammen.

Tabelle 3.1: Vergleich der Synthese frei in Lösung und der Synthese an fester Phase

<i>Synthese ohne Polymer</i>	<i>Synthese an fester Phase</i>
Vorteile: • Linker und Polymer nicht nötig • Standardanalytik (DC, HPLC, GC, IR, NMR u. a.) • gute Zugänglichkeit der Reaktanden	• großer Reaktandenüberschuß kann verwendet werden • Aufreinigung kann bequem durch Filtration erfolgen
Nachteile: • Aufarbeitung oft nur durch arbeits- und kostenintensive Chromatographie	• Linker und Polymer werden benötigt • Reaktandenzugänglichkeit ist behindert • Analytik ist erschwert (MAS-NMR, Analyse nach Polymerabspaltung)

Methode C) verwendet anstatt einer festen Phase ein lösliches Polymer. Hierbei wurde — bei PEG als löslichem Polymer — bis dato die Technik des Ausfällens durch Polaritätswechsel zur Aufreinigung verwendet, näheres dazu im nachfolgenden Abschnitt. Das Problem von Reaktandenzugänglichkeiten und damit Reaktionsgeschwindigkeiten ist damit gelöst (Wentworth, Vandersteen & Janda 1997), jedoch treten die folgenden Limitierungen auf (Krepinsky 1996):

- Wasserspuren (schon Luftfeuchtigkeit) verhindern ein vollständiges Ausfällen
- Synthesen sind beschränkt auf solche ohne Metallionen, Metallionen verhindern ein vollständiges Ausfällen
- Ausfällen aus wäßriger Lösung ist nicht möglich (enzymatisches Arbeiten)
- die Technik des Ausfällens und Umkristallisierens ist bei Verwendung von PEG nicht mit einer „large scale“ Synthese kompatibel
- der am PEG kovalent gebundene Zucker beeinflusst das Präzipitierungsverhalten, so daß abhängig vom Produkt ein Ausfällen z. T. nicht mehr vollständig gegeben ist.

Diese Nachteile werfen die Frage nach einer potenten Alternative zum Ausfällen auf. Hier drängt sich die Technik der Ultrafiltration geradezu auf. Man kommt damit zur Synthesemethode D). Die oben für die Technik des Ausfällens — Methode C) — aufgeführten Nachteile werden damit umgangen, bei Beibehaltung der Vorteile, die durch die Synthese am homogen löslichen Polymer vorliegen. Nicht zuletzt ist damit die Verwendbarkeit der polymerunterstützten Synthese in homogener Phase als Synthesewerkzeug auch um den immer wichtiger werdenden Bereich der enzymatischen Synthese erweitert. Des weiteren wird durch Einsatz eines löslichen Polymers, im Vergleich zur Festphasensynthese, die Analytik wesentlich erleichtert. Besonders auch für eine mögliche zukünftige Automatisierung hin zur einer Synthese im großen Maßstab, wie sie für den Einsatz von Oligosacchariden für medizinische Zwecke gebraucht wird, ist die Synthesemethode D) bestens geeignet und soll in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden.

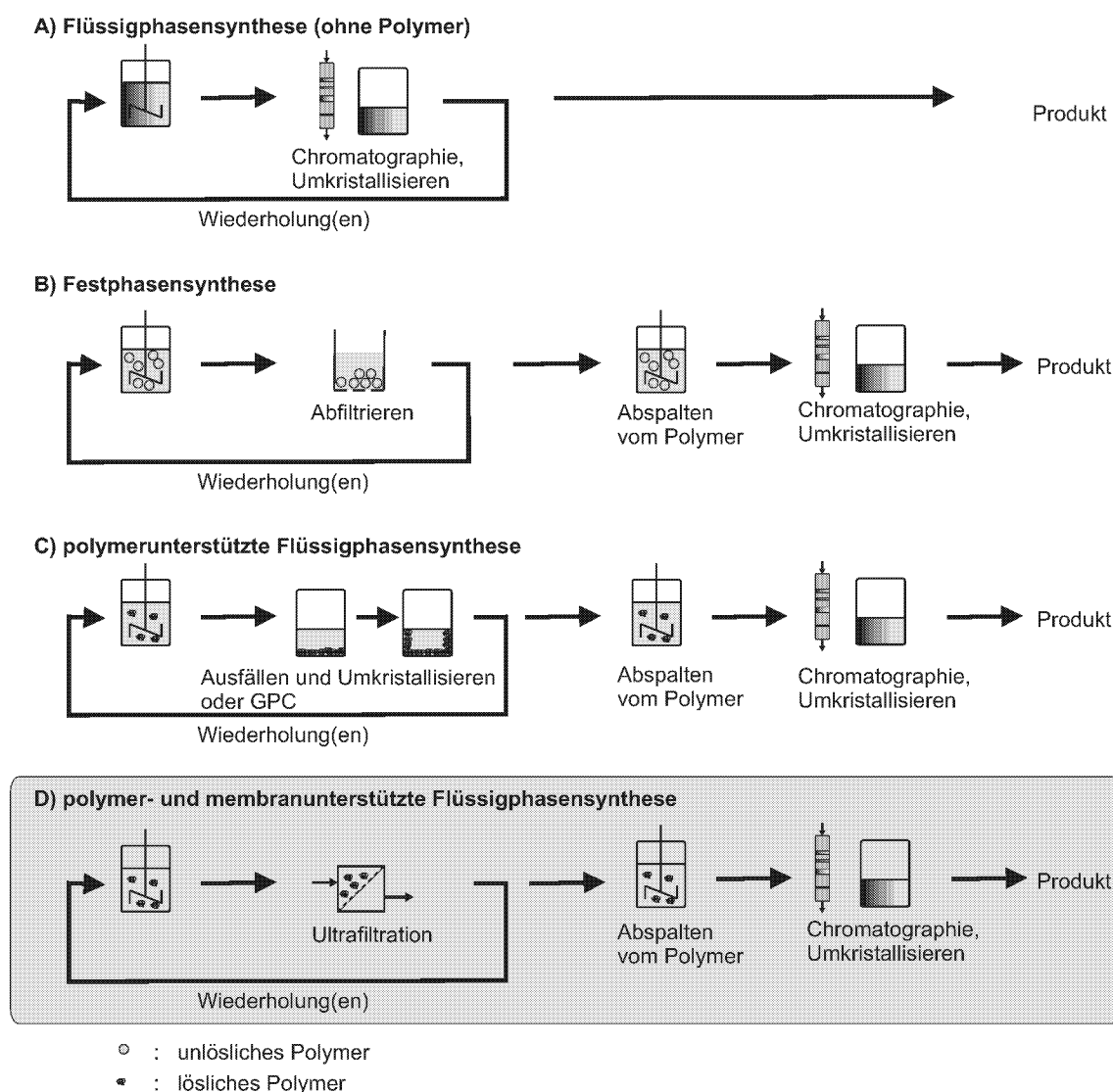


Abbildung 3.2: Synthesestrategien mit und ohne Polymer im Vergleich

3.1.2 Historische Entwicklung

Der Einsatz polymerunterstützter Synthesen nahm seit der Entwicklung der polymerunterstützten Merrifieldsynthese von Peptiden (Merrifield 1963) im Jahre 1963 stetig zu. Hierbei wurde in der Regel mit heterogenen Polymeren gearbeitet. Fréchet und Schürch waren 1971 die ersten, die von Oligosaccharidsynthesen (Di- und Trisaccharide) an einer festen Phase berichteten (Fréchet & Schuerch 1971). In Abbildung 3.3 ist diese Synthese wiedergegeben. Die Synthese wurde an einem funktionalisierten Merrifield-Harz durchgeführt und gravimetrisch verfolgt. Die Reaktionszeiten lagen bei 2-4 Tagen.

Festphasensynthesen sind in der Regel nur für kleine Produktmengen geeignet, so liefert auch die Festphasensynthese von Oligopeptiden und Oligonukleotiden nur mikromolare Produktmengen (Krepinsky 1996). Aus diesem Grund führten Mutter und Bayer

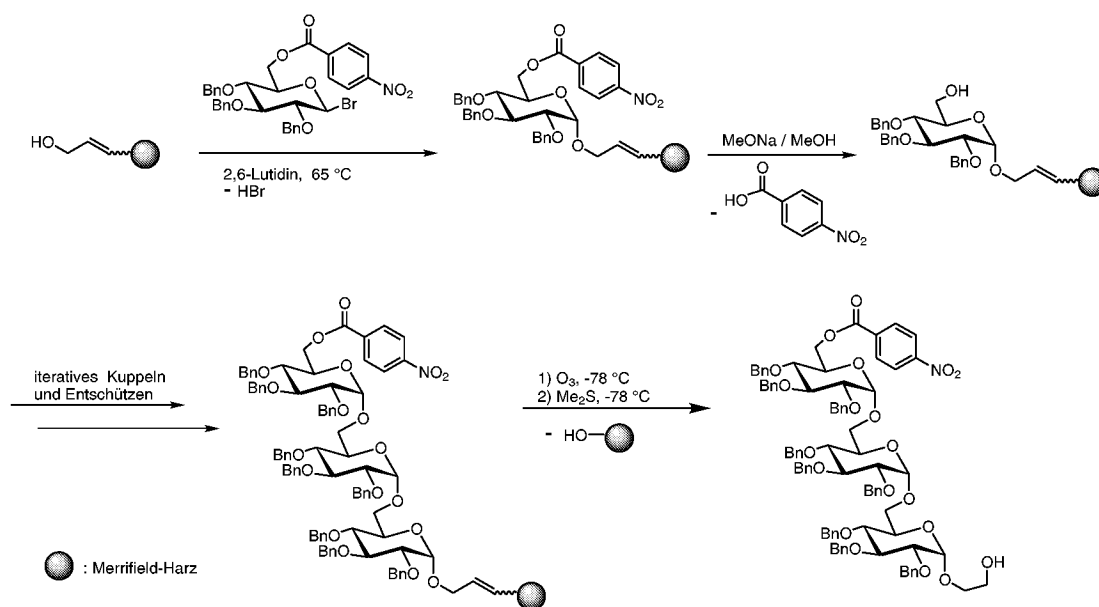


Abbildung 3.3: Historische erstmalige Festphasen-Oligosaccharidsynthese (Fréchet & Schuerch 1971)

(Mutter, Hagenmeyer & Bayer 1971) ebenfalls 1971 die Synthese an einem homogen löslichen Polymer ein. Es handelte sich dabei um die Synthese des Tetrapeptides H-Ile-Ala-Val-Gly-OH. Mit dieser Methode konnten die Nachteile der Festphasensynthese — unter anderem kein quantitativer Umsatz, daher erschwerte Aufreinigung, Einschränkungen bei der Wahl von Lösungsmittel, Schutzgruppen und Kupplungsmethoden — vermieden werden. Die Synthese wurde an einem Polyethylenglykol mit dem Molekulargewicht 20.000 durchgeführt und schon 1971 wurde auch die Ultrafiltration eingesetzt. Allerdings gelang dies nur nach Entfernen des Lösungsmittels und Aufnehmen in Wasser, lösungsmittelstabile Membranen standen nicht zur Verfügung. Auch vom Standpunkt der Analytik bestand noch Verbesserungspotential. Radioaktivassays, sowie ¹⁹F-NMR-Messungen wurden zur Verfolgung der Reaktion verwendet. Die Ausbeuten lagen bei der Synthese an löslichem PEG bei 95 %, während sie bei der Festphasensynthese bei 80 % lag. Diese, vom Ansatz her sehr elegante Methode, konnte sich wegen den noch bestehenden Limitierungen, unter anderem in der Aufarbeitung, jedoch nicht durchsetzen.

Neben der Synthese an PEG wurden Synthesen an Polyacrylamid beschrieben. Die Technik des Polymerausfällens durch Polaritätswechsel lässt sich hier nicht verwenden. Eine enzymatische Oligosaccharidsynthese an einem in Wasser löslichen Polyacrylamid wurde 1983 von Zehavi *et al.* vorgestellt (Zehavi, Sadeh & Herchman 1983). Dabei wurde ein photospaltbarer Linker eingesetzt und mittels einer Galactosyltransferase wurde ein chemisch dargestelltes polymergebundenes Disaccharid, wie in Abbildung 3.4 gezeigt, galactosyliert. Eine Abspaltung vom Polymer gelang nach Bestrahlung. Es resultierte das angestrebte Trisaccharid in einer Gesamtausbeute von 0,87 %!

Weitere Synthesen mit photospaltbaren Linkern an Polyacrylamid folgten, wobei die Ultrafiltration im wässrigen Medium eingesetzt und die Ausbeuten bei den enzymatischen Schritten verbessert wurden (Zehavi & Herchman 1984, Zehavi 1987, Zehavi 1988, Zehavi & Tuchinsky 1998, Zehavi 1999). So ist in (Zehavi, Herchman, Hakomori & Köpper 1990)

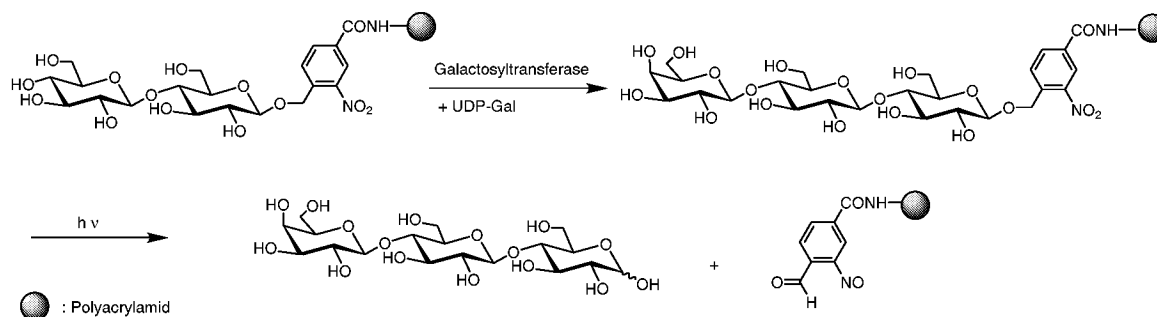


Abbildung 3.4: Enzymatische Synthese von O-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1,4)-O- β -D-glucopyranosyl-(1,4)-D-glucopyranose an Polyacrylamid mittels eines photospaltbaren Linkers (Zehavi, Sadeh & Herchman 1983)

die Rede von 36 % Galactosylierung mittels einer Galactosyltransferase. Auch Glycosphingolipide (Zehavi, Herchman, Schmidt & Bär 1990) wurden auf diese Art dargestellt. Die Anwendung photospaltbarer Linker blieb jedoch begrenzt, da die Ausbeuten zu wünschen übrig lassen und die Synthesen relativ aufwendig sind. In (Nishimura et al. 1994) wird von der Gelfiltration zur Aufreinigung berichtet. Eine quantitative Galactosylierung mit einer bovinen Galactosyltransferase wurde durchgeführt und das Produkt war hierbei das in Abbildung 3.5 dargestellte Neoglycopolymer. Dieses Glycopolymer ließ sich weiter mit Glycosidasen trimmen, so daß nur das gewünschte Trisaccharid am Polymer verblieb. Eine Abspaltung des Polymeres vom Zieltrisaccharid war nicht möglich.

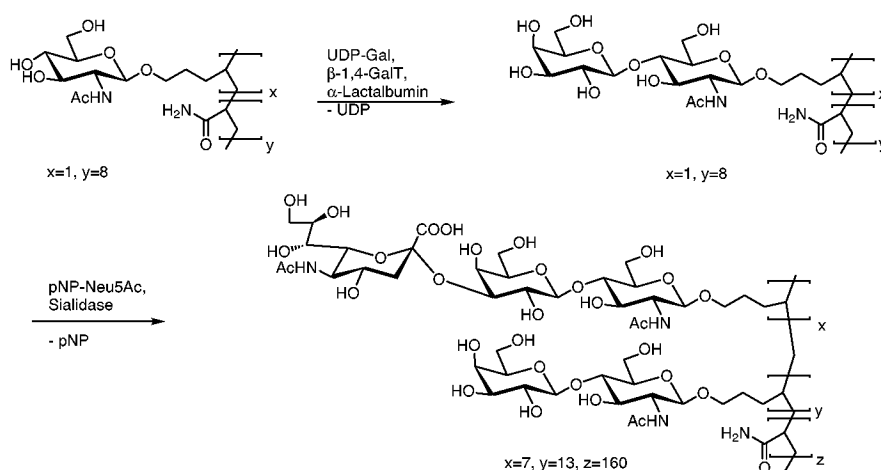


Abbildung 3.5: Enzymatische Zuckersynthese an Polyacrylamid (Nishimura et al. 1994)[pNP-Neu5Ac: *p*-Nitrophenyl-Neuraminsäure, pNP: *p*-Nitrophenol]

Nachfolgend berichteten Nishimura *et al.* auch über die Einführung eines Linkers und eines flexiblen Spacers, wodurch man das Produkt dann auch vom Polymer abspalten konnte und die Substratzugänglichkeiten beeinflussen konnte (Nishimura, Matsuoka & Lee 1994), siehe Abbildung 3.6. Die Synthese wurde so durchgeführt, daß zunächst ein

Monosaccharid mit Linker und Spacer synthetisiert wurde, dann folgte eine Polymerisierung. Die Vorteile einer polymerunterstützten Synthese kommen bei einer solchen Vorgehensweise nicht so gut zum Tragen, wie bei einer frühen Polymeranbindung. In der Folge wurden noch verschiedene Oligosaccharide an Polyacrylamid von Nishimura *et al.* dargestellt (Yamada & Nishimura 1995, Matsuoka & Nishimura 1995, Yamada, Fujita & Nishimura 1998, Sallas & Nishimura 2000). Ziel war das nähere Studium von Zucker-Lectin Wechselwirkungen und die Synthese von Selectin-Inhibitoren.

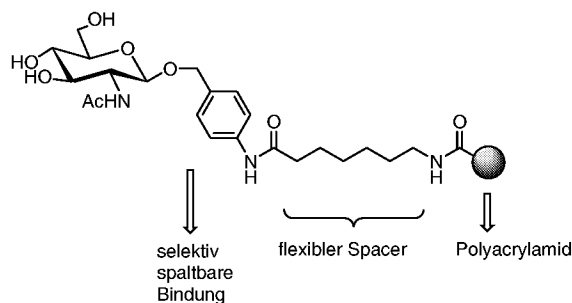


Abbildung 3.6: Polyacrylamidgebundenen *N*-Acetylglucosamin mit Spacer zum Trimmen der *N*-Acetylglucosaminzugänglichkeit und Linker (Nishimura, Matsuoka & Lee 1994)

1990 wurde von Bonora *et al.* die Verwendung von PEG zur Synthese von Oligonucleotiden wieder aufgegriffen (Bonora *et al.* 1990). Von einer Oligosaccharidsynthese an einem homogen löslichen ω -methylierten Polyethylenglykol (MPEG) berichteten Douglas und Krepinsky erst 1991 (Douglas, Whitfield & Krepinsky 1991). Verwendet wurde dabei ein Succinoyl-Linker, der allerdings für chemische Synthesen eine unzureichende Stabilität aufwies. 1995 wurde dann eine Oligosaccharidsynthese ebenfalls von Douglas und Krepinsky veröffentlicht, in der ein sogenannter Dioxylyl-Linker zum Einsatz kam (Douglas, Whitfield & Krepinsky 1995), mehr zu dieser Synthese in Kapitel 5.

Schwachpunkte der bisher beschriebenen PEG-unterstützten Synthesen in homogener Phase waren die Aufarbeitung durch Ausfällen, mit den oben genannten Limitierungen, und die analytischen Möglichkeiten. Eine Abtrennung des funktionalisierten Polymers (Zwischenprodukt oder Produkt) wurde in der Regel durch Niederschlagen mittels Temperatur- oder Lösungsmittelwechsel, Gelpermeationschromatographie oder Membranfiltration erzielt (Wentworth & Janda 1999). Die wohl eleganteste Methode ist die Membranfiltration, welche den Vorteil bietet, daß sie sich gut mit einer Maßstabsvergrößerung vereinbaren läßt (Geckeler 1995). Zur Analyse am Polymer wurde bisher neben der UV-Vis- und IR- vor allem die NMR-Spektroskopie eingesetzt. Eine darüber hinausgehende Analyse konnte erst nach Abspaltung vom Polymer durchgeführt werden (Gravert & Janda 1997a, Gravert & Janda 1997b).

Die PEG-unterstützte Synthese in homogener Lösung in Kombination mit Ausfällen wurde ebenfalls zur Synthese Biarylen (Blettner *et al.* 1998), β -Lactamen (Annunziata *et al.* 2000) und 3,5-Pyrazolidindione (Zhao *et al.* 1998) beschrieben. Gute Übersichten geben hier (Gravert & Janda 1997a, Gravert & Janda 1997b, Khan & O'Neill 1996).

3.2 Polymere

An das in dieser Arbeit verwendete Polymer wurden die folgenden Anforderungen gestellt:

- gute Löslichkeit sowohl im wässrigen als auch im organischen Medium
- gute Zugänglichkeit der Funktionalitäten
- gute chemische Stabilität
- kommerzielle Verfügbarkeit
- niedriger Preis als Voraussetzung zur „large scale“-Synthese
- Rückhaltbarkeit durch Membranen

Mögliche Kandidaten sind neben Polyethylenglykol noch Polyvinylalkohole, Polyacrylamide und auch dendritische Makromoleküle. Lindhorst *et al.* berichten von Glycodendrimeren (Lindhorst 1996, Kieburg & Lindhorst 1997, Lindhorst 2000b), eine Oligosaccharidsynthese am Dendrimer steht allerdings noch aus. Frey und Haag synthetisierten Glyceroldendrimere und pseudo-dendritische Polyglycerole als Träger (Sunder *et al.* 2000b, Haag, Sunder & Stumbe 2000, Sunder *et al.* 2000a, Haag 2001). Diese sind vielversprechend im Hinblick auf eine sehr hohe mögliche Beladung. So weist das in Abbildung 3.7 dargestellte Dendrimer eine mögliche Beladung von 7,1 mmol/g auf. Es ist sehr wahrscheinlich, daß auch die Zugänglichkeiten der Endgruppen und die Löslichkeiten für einen Einsatz in der polymerunterstützten Flüssigphasensynthese ausreichend sind. Allerdings stellt sich hier auch wiederum das Problem, daß die Analytik aufgrund der Polyfunktionalität vermutlich erschwert sein wird.

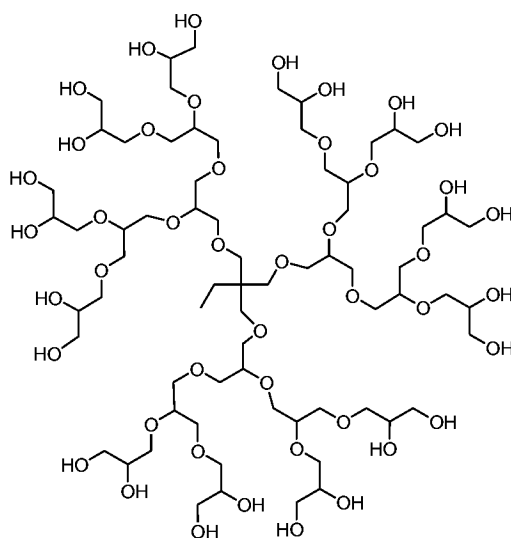


Abbildung 3.7: Glycerol Dendrimer (Haag, Sunder & Stumbe 2000)

Abbildung 3.8 faßt die wichtigsten in der polymerunterstützten Synthese verwendeten löslichen Homopolymere zusammen (Gravert & Janda 1997a). Von den aufgelisteten Homopolymeren wurden Polystyren, Polyvinylalkohol, PEG und Polyacrylamid bereits in der Oligosaccharidsynthese verwendet (Gravert & Janda 1997a). Im folgenden sollen kurz die Vor- und Nachteile der einzelnen Polymere besprochen werden. Dabei soll das Ziel

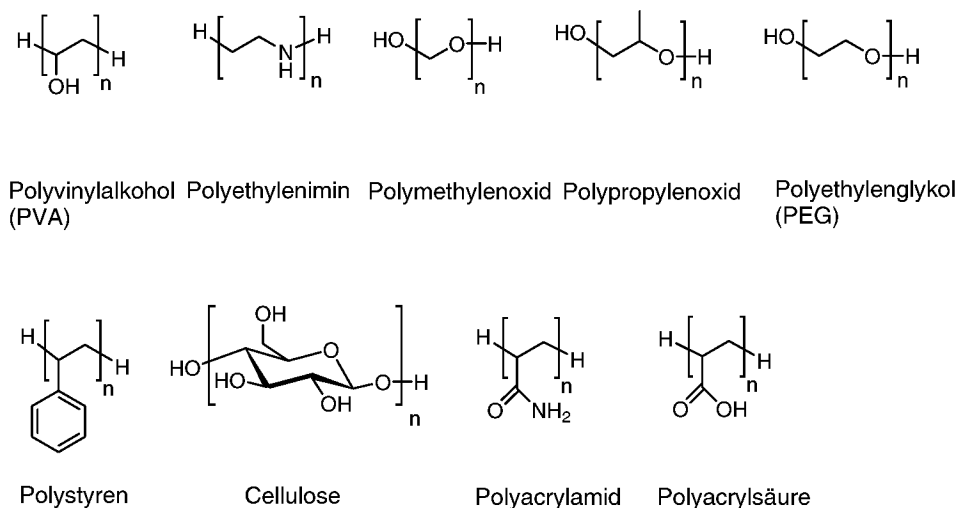


Abbildung 3.8: In der polymerunterstützten Flüssigphasensynthese verwendete lösliche Homopolymere

im Auge behalten werden, ein Polymer für enzymatische *und* chemische Reaktionen zu verwenden. Polystyren bzw. ein Copolymer davon kann den Vorteil einer hohen Beladung liefern. Ein gravierender Nachteil, welcher die Verwendung von Polystyren ausschließt, ist jedoch seine Unlöslichkeit in Wasser. Polyvinylalkohol auf der anderen Seite ist in Wasser hervorragend löslich, ein Arbeiten in den meisten organischen Lösungsmitteln ist jedoch nicht möglich. Gerade dies ist aber unabdingbar, da die Anbindung von Linker und Startmonosaccharid auf chemischem Wege erfolgen soll. Die chemo-enzymatische Synthese von Oligosacchariden an Polyacrylamid wurde bereits oben angesprochen. Allgemein gesagt ist dabei die Vorgehensweise derart, daß ein Saccharid chemisch an einen Linker gebunden und nachfolgend dann mit Acrylamid copolymerisiert wird. Der Nachteil bei dieser Vorgehensweise ist, daß es vergleichsweise schwierig ist, ein Polymer mit genau gleicher Beladung, wie bei einer vorangegangenen Charge zu reproduzieren. Ferner kommt der eigentliche Vorteil der Synthese an Polymeren nur bedingt zum Einsatz. Bis der Zucker am Polymer gebunden ist, sind säulenchromatographische Aufreinigungsschritte nötig. Diese möchte man aber gerade vermeiden. Aufgrund ihrer Polyfunktionalität erlauben Polyacrylamide eine Analyse lediglich per NMR, IR, z. T. MS oder nach Abspalten, nicht jedoch z. B. per GC, DC oder HPLC.

Polyethylenglykol (PEG)

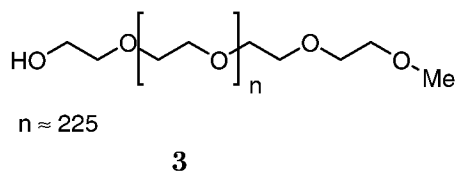
In der vorliegenden Arbeit wurde das Polymer PEG, Polyethylenglykol, verwendet, daher soll es an dieser Stelle näher besprochen werden. PEG ist zu Recht das gebräuchlichste Polymer in der polymerunterstützten Flüssigphasensynthese. Es besitzt hervorragende Lösungseigenschaften in vielen organischen Medien, so in Benzen, Toluol, Dichlormethan, Chloroform, Acetonitril, und ist auch in Wasser bis zu 50 Gew.-% löslich (Geckeler 1995), siehe auch Tabelle 3.2. In heißem THF und Ethanol ist PEG ebenfalls löslich und unlöslich ist es in Hexan, *tert*-Butylmethylether und Diethylether. PEG ist hygroskopisch und bildet Hydratkomplexe, wobei ein Großteil dieses Wassers durch azeotrope Destillation mit Toluol entfernt werden kann (Krepinsky 1996).

Tabelle 3.2: PEG4.000-Grenzlöslichkeiten (Geckeler 1995)

<i>Lösungsmittel</i>	<i>Löslichkeit</i> / m-%
Wasser	55
Dichlormethan	53
Ethanol (60 %)	50
Chloroform	47
Pyridin	40
Methanol	20
Benzen	10
1,4-Dioxan	10
Tetrachlorkohlenstoff	10

Aufgereinigt werden kann PEG durch Ausfällen oder durch Umkristallisieren aus Ethanol. Wie schon erwähnt, bildet PEG mit Metallionen starke Komplexe. Ausfällen und Umkristallisieren sind dann nur noch eingeschränkt möglich. Ein Arbeiten mit Silber-, Quecksilber, Chrom-, oder Cer-Salzen — wie z. B. bei der Königs-Knorr-Synthese, siehe Kapitel 5 — ist daher nicht möglich. Gleiches trifft auf vorhandene Wasserspuren zu. Der Einfluß der Luftfeuchtigkeit führt oft schon dazu, daß beim Abfiltrieren das ausgefallene PEG zerfließt, was die Handhabung wesentlich erschwert. Auch wird ein Ausfällen und Abfiltrieren um so schwieriger, je größer die am PEG gebundenen Moleküle werden (Khan & O'Neill 1996). Diese Probleme lassen sich durch Einsatz der Ultrafiltration umgehen.

Ein erwähnenswerter Nachteil von PEG ist die relativ niedrige maximal mögliche Beladung, welche z. B. bei PEG 5000 (Polyethylenglykol mit dem Molekulargewicht 5000 g/mol) bezüglich Hydroxyfunktionen 0,4 mmol/g beträgt. Eben hieraus resultiert aber auch wieder ein Vorteil. Dadurch, daß pro ω -methyliertem PEG (MPEG) ein bzw. pro PEG zwei Funktionalitäten vorhanden sind, ist eine HPLC-Analytik ermöglicht. Diese wurde allerdings bisher für Oligosaccharide, Oligonukleotide oder Oligopeptide noch nicht beschrieben. Bei Polymeren mit multiplen Funktionalitäten ist solch eine HPLC-Analytik nicht möglich. Ferner ist der extrem niedrige Preis von PEG (ca. DM 38,- pro kg (Sigma-Aldrich 2000)) ein Vorteil, der gerade bei einer Synthese im großen Maßstab zum Tragen kommt. Aus den dargelegten Gründen wurde für diese Arbeiten PEG, genauer MPEG 10000 **3** (ω -methyliertem PEG mit dem Molekulargewicht 10000 g/mol, siehe Abbildung 3.9), als polymerer Träger ausgewählt. MPEG bietet im Vergleich zu PEG den Vorteil, daß die ω -Methoxyfunktion als interner Standard für NMR-Experimente verwendet werden kann ($\delta=3,380$ ppm). Um die Aussagekraft der Spektren zu erhöhen, kann der dem polymeren Rückgrat zuzuordnende Peak bei $\delta=3,640$ ppm unterdrückt werden.

**Abbildung 3.9:** Strukturformel von MPEG10000 **3**

Das Molekulargewicht von 10000 g/mol wurde für die durchgeführten Arbeiten gewählt, weil sich ein PEG dieses Molekulargewichtes per Ultrafiltration zurückhalten läßt, siehe Kapitel 4. Eigene GPC-Messungen¹ des hier verwendeten PEG ergaben ein Molekulargewicht von 9946 g/mol (Mp²). Dies ist in guter Übereinstimmung mit den vom Hersteller angegebenen 10314 g/mol (Mp). Neben der angeführten Literatur sei zu PEG-Eigenschaften auf (Pillai & Mutter 1980, Harris 1992, Geckeler 1995, Zalipsky 1995, Polverari & van der Ven 1996) verwiesen.

Zu Beginn der Arbeiten wurde mit einem bPEG40.000 („branched PEG“) gearbeitet. Bei bPEG40.000 handelt es sich um ein achtarmiges, sternförmiges PEG mit einem Molekulargewicht von 40.000 g/mol. Das Verhältnis von Endgruppen zu Molekulargewicht ist wesentlich günstiger als bei linearem PEG. Aufgrund von extrem langsamen Reaktionsgeschwindigkeiten, welche auf eine unzureichende Zugänglichkeit der Endgruppen zurückgeführt wurde, wurde bPEG40.000 nicht weiter verwendet (Lösungsmittel war Dichlormethan, andere Lösungsmittel wurden nicht getestet).

3.3 Linker

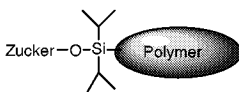
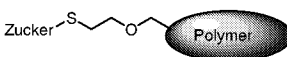
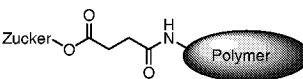
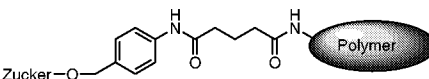
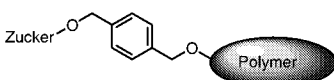
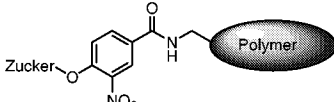
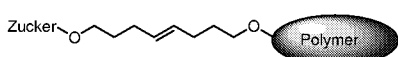
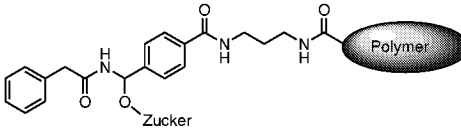
Die Aufgabe des Linkers ist es, das Kohlenhydrat *reversibel* mit dem Polymer zu verbinden. Bei der Festphasensynthese wird durch einen Linker oft noch zusätzlich die Zugänglichkeit des Substrates durch einen gewissen Abstand zum heterogenen Polymer verbessert. Dieser Punkt entfällt bei der Flüssigphasensynthese. In den letzten 15 Jahren wurden über 200 verschiedene Linker beschrieben. Eine gute Übersicht geben hier (Guillier, Orain & Bradley 2000) sowie speziell für Kohlenhydrate (Seeberger & Haase 2000). Der Großteil dieser Linker findet in der Festphasensynthese Anwendung. Es besteht jedoch kein prinzipieller Unterschied zwischen Linkern für die Festphasen und die Flüssigphasensynthese. Um trotz der Linkervielfalt und der Problematik der Linkerklassifizierung eine gewisse Vorstellung von den möglichen Typen bzgl. Spaltungsarten zu geben, ist in Tabelle 3.3 eine Auswahl repräsentativer Beispiele von Linkern für die Oligosaccharidsynthese angeführt. Es ist anzumerken, daß der Großteil der Linker für die Peptidsynthese entwickelt wurde, nur ein Teil ist für die Oligosaccharidsynthese geeignet. Wichtig bei der Auswahl eines geeigneten Linkers ist ferner, ob nach Abspaltung ein Rest des Linkers am Oligosaccharid verbleibt oder nicht. Man spricht hier von *Endo-Linkern*, wenn ein Rest verbleibt, und von *Exo-Linkern*, wenn dies nicht der Fall ist.

Es wurden zwei Linker ausgewählt und deren Einsatzfähigkeit näher getestet. Dies umfaßt Synthese, Anbindung, Abspaltung und Stabilität des Linkers. Im folgenden werden diese näher besprochen.

¹ GPC = Gelpermeationschromatographie oder Größenausschlußchromatographie

² Mp bezeichnet das Molekulargewicht des Polymers im Peaks des GPC-Chromatogramms

Tabelle 3.3: Beispiele für Linker in der polymerunterstützten Oligosaccharidsynthese (Guillier, Orain & Bradley 2000, Seeberger & Haase 2000)

Linkertyp	Beispiel	Spaltbedingungen, Literatur, Anmerkungen
Silylether		(Bu ₄ N)F, AcOH, (Seeberger, Bilodeau & Danishefsky 1997), Exo-Linker
Thiolinker		NBS, MeOH, Di- <i>tert</i> -butylpyridin, (Rademann & Schmidt 1997), nach Abspaltung Methoxyrest an Oligosaccharid
säuren- und basenspaltbar		Acetanhydrid, Pyridin, (Leung et al. 1994), Peracylierung bei Abspaltung
Spaltung unter oxidativen Bedingungen		2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinone, (Seeberger & Haase 2000), Exo-Linker
Spaltung unter reduktiven Bedingungen		Hydrierung mit Raney-Nickel, (Douglas, Whitfield & Krepinsky 1995), Exo-Linker
photospaltbar		h*ν, (Zehavi, Sadeh & Herchman 1983), Exo-Linker
durch Olefin-methathese spaltbar		Grubb's Katalysator, (Melean, Haase & Seeberger 2000), nach Abspaltung Pentenrest an Oligosaccharid
enzymatisch spaltbar		Penicillin-Acylase, (Böhm et al. 1998), Exo-Linker

3.3.1 Flitsch-Linker

Der Linker **4**, siehe Abbildung 3.10, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Flitsch und Prof. Turner entwickelt (Böhm et al. 1998). Es handelt sich hier um einen Exo-Linker, welcher sowohl enzymatisch als auch chemisch spaltbar ist. Die Anbindung erfolgt an der Stelle der Thioethylfunktionalität.

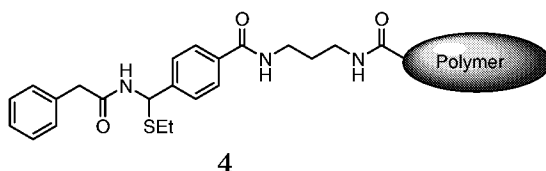


Abbildung 3.10: polymergebundener Flitsch-Linker **4**

Die Synthese des ungebundenen Linkers **10** wurde im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes am Centre for Protein Technology, University of Edinburgh, nach der in Abbildung 3.11 dargestellten Route durchgeführt. Ausgehend von 3-Chlorpropylamin **5** wurde 3-Azidopropylamin **6** in 79 % Ausbeute erhalten. Dieses wurde mit 4-Carboxybenzaldehyd nach der EEDQ-Methode³ umgesetzt. 2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin (EEDQ) diente dabei zur Aktivierung der Carboxylgruppe von 4-Carboxybenzaldehyd, es kam zur Amidierung. Nach 24 h wurde 4-Formyl-(N-azidopropyl)-benzamid **7** in 67 % Ausbeute isoliert. Die Katritzky-Methode (Katritzky & Drewniak 1988) erwies sich als geeignet, um 4-Formyl-(N-azidopropyl)-benzamide **7** mit Benzotriazol und Phenylacetamid zum N-(α -Benzotriazol-1-yl-N'-azidopropylbenzamid)-phenylacetamid **8** umzusetzen (66 % Ausbeute). Ein angenommener Mechanismus (Katritzky & Drewniak 1988) geht davon aus, daß die Carbonylgruppe von 4-Formyl-(N-azidopropyl)-benzamid **7** zunächst durch den Stickstoff in Phenylacetamid angegriffen wurde, nachfolgende Protonierung, Wasserabspaltung und schließlich Addition von Benzotriazol wird angenommen. Nach weiterer Reaktion von N-(α -Benzotriazol-1-yl-N'-azidopropylbenzamid)-phenylacetamid **8** mit Natriumethylthiolat in THF (97 % Ausbeute) zu N-(α -Thioethyl-N'-azidopropylbenzamid)-phenylacetamide **9** wurde mit Triphenylphosphan in Wasser für sieben Tage umgesetzt (95 % Ausbeute) und der freie Flitsch-Linker N-(α -Thioethyl-N'-aminopropylbenzamid)-phenylacetamid **10** als weißer Feststoff erhalten (2,9 g, 32 % Gesamtausbeute).

Der fertige Linker **10** wurde an PEG gebunden. Allerdings in diesem Fall nicht an MPEG10.000 **3** sondern an bPEG40.000 **11**. Die Anbindung erfolgte über Carboxylgruppen. bPEG40.000 **11** wurde daher, wie in Abbildung 3.12 dargestellt, carboxyliert, wobei eine Carboxylierung von 62 % erzielt wurde. Entgegen Literaturangaben für lineare PEG (Royer & Anantharmaiah 1979, Geckeler & Bayer 1980, Harris et al. 1984) war die Geschwindigkeit der Reaktion hier extrem langsam, was auf eine unzureichende Zugänglichkeit der Endgruppen zurückgeführt wurde.

Es folgte die Anbindung des Flitsch-Linkers **10** an das Polymer **12**, siehe Abbildung 3.13. Quantitative Anbindung konnte erreicht werden. Die Abspaltung erfolgt entweder chemisch mittels milder saurer Hydrolyse durch Verwendung von 10%-iger Trifluoressigsäure in quantitativer Ausbeute, siehe Abbildung 3.14, oder enzymatisch, siehe Abbildung 3.15.

³ EEDQ = 2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin

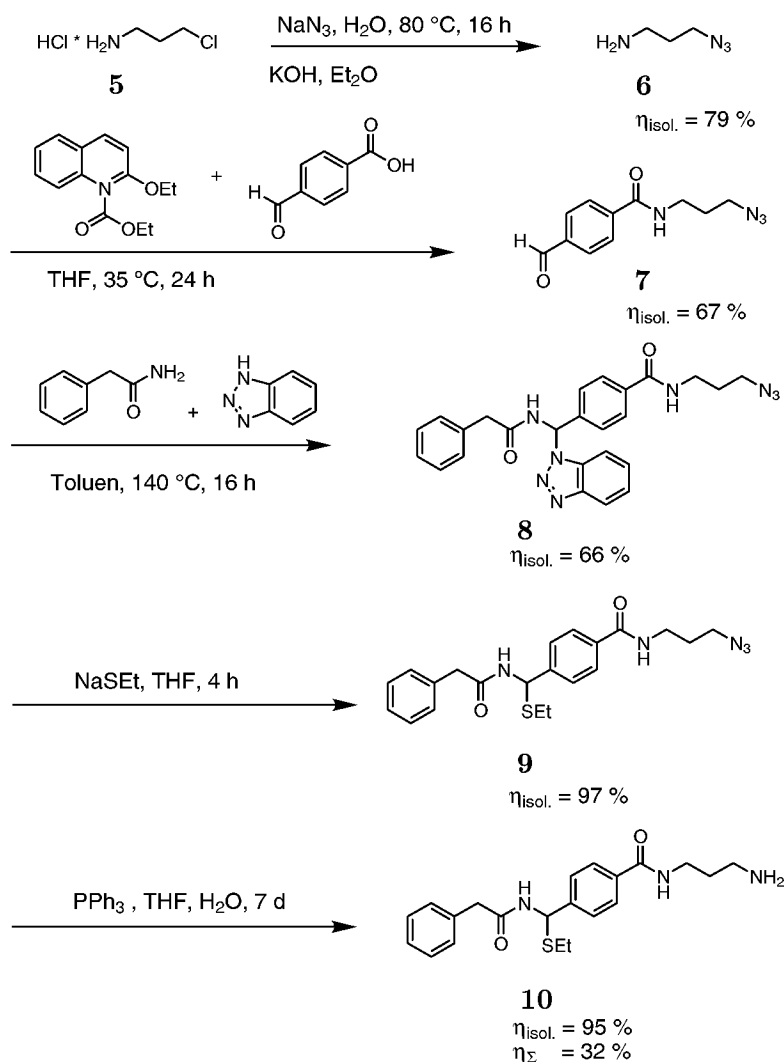


Abbildung 3.11: Synthese des freien Flitsch-Linkers 10

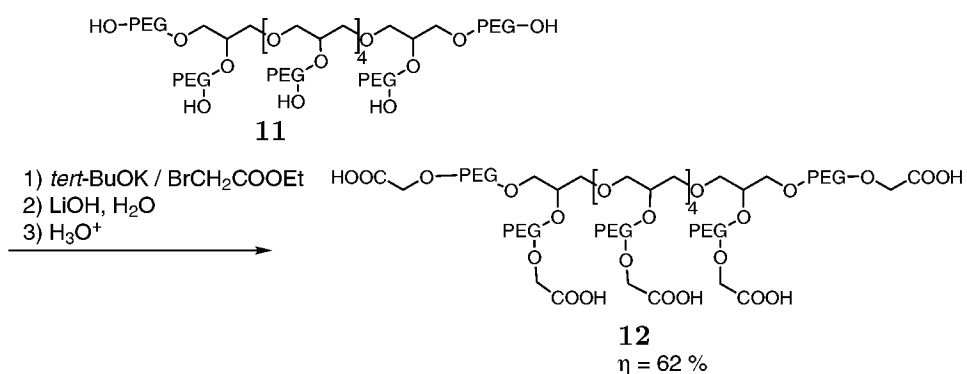


Abbildung 3.12: Carboxylierung von bPEG40.000 11

In der hier vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Linker 10 an einem *homogen*

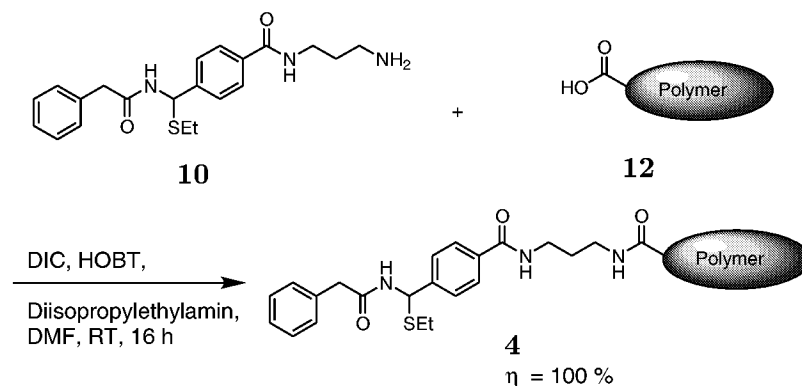


Abbildung 3.13: Polymeranbindung des Flitsch-Linkers **10**

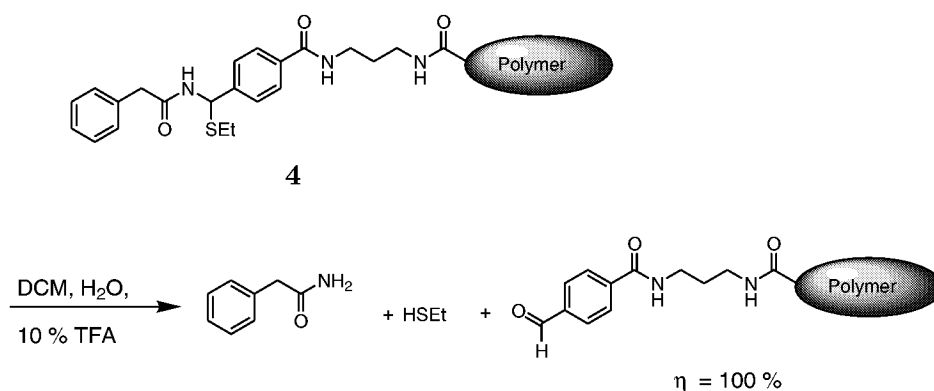


Abbildung 3.14: Chemische Spaltung des Flitsch-Linkers **10** mit Trifluoressigsäure

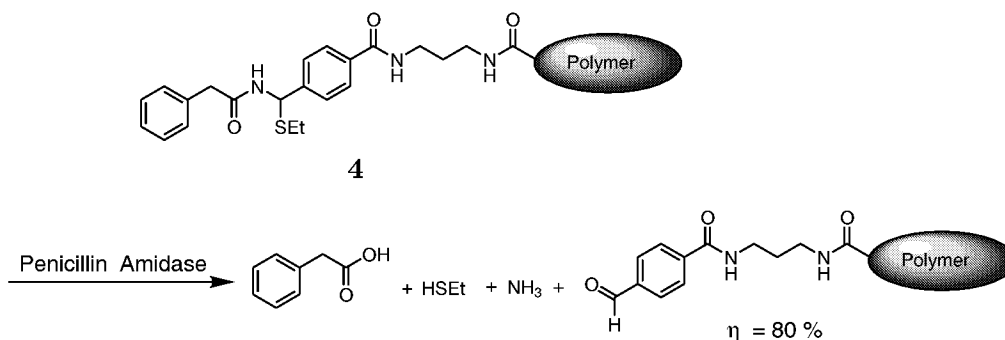


Abbildung 3.15: Enzymatische Spaltung des Flitsch-Linkers **10** mit Penicillin Amidase

löslichen Polymer verwendet. Es konnten mittels Penicillin Amidase nicht-optimierte Abspaltungen mit analytischen Ausbeuten von 80 % realisiert werden. Bekannt ist der Einsatz des Linkers **10** an fester Phase zur Oligosaccharidsynthese, wobei Abspaltungen mittels Penicillin Amidase von 25 % bei Verwendung von PEGA[®]⁴ und 50 % bei Verwendung von Tentagel[®]⁵ erreicht wurden (Böhm et al. 1998).

⁴ PEGA[®] ist der Handelsname eines PEG-Polyacrylamid-Copolymers für die Festphasensynthese.

⁵ Tentagel[®] ist der Handelsname eines Polymers für die Festphasensynthese, welches durch Copolymerisa-

Aufgrund fehlender Stabilität unter den Bedingungen der chemischen Modelloligosaccharidsynthese, siehe Kapitel 5, und der aufwendigen Syntheseroute, neun Stufen bis zum polymergebundenen Linker inklusive der notwendigen Derivatisierung des Polymers mit einer Carboxylfunktion, wurde die Verwendung dieses Linkers für die vorliegende Arbeit jedoch nicht weiter verfolgt.

3.3.2 Dioxyxylyl-Linker

Ein weiterer getesteter Linker ist der polymergebundene α,α' -Dioxyxylyllinker **13**, siehe Abbildung 3.16.

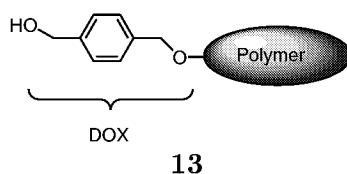


Abbildung 3.16: Dioxyxylyllinker **13**

Dieser Linker (DOX-Linker) wurde von Krepinsky et al. entwickelt (Douglas, Whitfield & Krepinsky 1995). Er besteht durch seine relativ einfache Synthese, siehe Abbildung 3.17, ausgehend von kommerziell erhältlichem α,α' -Dichlor-*p*-xylen **14**. α,α' -Dichlor-*p*-xylen **14** wurde mit MPEG10.000 **3** unter den Bedingungen einer Williamson'schen Ethersynthese zu 4-(Chlormethyl)-phenylmethyl-polyethylenglykolyether **15** (abgekürzt MPEG-DOX-Cl) umgesetzt. Nachfolgend wurde mit wässriger Natriumcarbonatlösung behandelt. Das Produkt 4-(Hydroxymethyl)-phenylmethyl-polyethylenglykolyether **13** (abgekürzt MPEG-DOX-OH) konnte so mit 97 %iger Beladung erhalten werden.

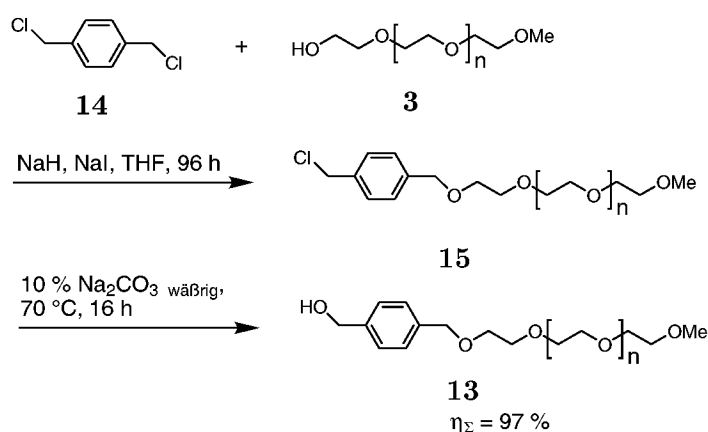


Abbildung 3.17: Synthese des polymergebundenen Dioxyxylyl-Linkers **13**

Bei der Synthese war es wichtig, auf extrem trockene Ausgangsmaterialien zu achten, ansonsten war die resultierende Beladung des MPEG nur höchst unzureichend, z. T. nur um 20 %. Die besten Erfahrungen wurden nach Trocknen von MPEG über P_2O_5 und anschließender azeotroper Destillation mit Toluol gemacht.

tion von Styrol mit 1 - 2 % Divinylbenzol und anschließender Derivatisierung mit PEG-Ketten entsteht.

Der DOX-Linker **13** besitzt den Vorteil, daß er unter den meisten chemischen Reaktionsbedingungen äußerst stabil ist. Eine Abspaltung ist hydrogenolytisch möglich. Je nach Hydrierbedingungen kann er vollständig entfernt werden, um eine Hydroxylgruppe am Zucker zu hinterlassen (beispielsweise durch Hydrierung mit Pd auf Aktivkohle in Essigsäure) oder der polymere Träger kann selektiv abgespalten werden, um so eine *p*-Toluylmethylschutzgruppe (-CH₂C₆H₄CH₃) am Zucker zu hinterlassen (beispielsweise mit Palladium in Ethanol) (Douglas, Whitfield & Krepinsky 1995). Eine solche Steuerung ist vorteilhaft, da man die *p*-Toluylmethylschutzgruppe für eine eventuell notwendige abschließende chromatographische Aufreinigung verwenden kann. Nach Mehta *et al.* ist die Abspaltung mittels Sc(Tf)₃ ebenfalls möglich (Mehta & Whitfield 1998), wobei wiederum eine *p*-Toluylmethylschutzgruppe am Produkt erhalten bleibt. Der DOX-Linker **13** wurde als Linker der Wahl für die in den folgenden Kapiteln vorgestellten polymerunterstützten Oligosaccharidsynthesen verwendet.

Neben den Arbeitsgruppen Krepinsky, Douglas und Whitfield (Douglas, Whitfield & Krepinsky 1995, Hodosi & Krepinsky 1996, Mehta & Whitfield 1998, Yan *et al.* 2000) setzten bereits auch Chan *et al.* (Jiang, Hartley & Chan 1996), Ito (Ito 1997) und Thiem *et al.* (Schmidt & Thiem 2000) den Dioxyxylyl-Linker **13** in der Oligosaccharidsynthese ein.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Abspaltung mittels hydrogenolytischer Abspaltung in Anwesenheit von Pd auf Aktivkohle durchgeführt, siehe Abbildung 3.18. Hierbei wird auch ein über die freie Hydroxylgruppe an **13** verknüpftes Molekül (in dieser Arbeit ein Oligosaccharid) abgespalten, wie nachfolgend noch gezeigt wird.

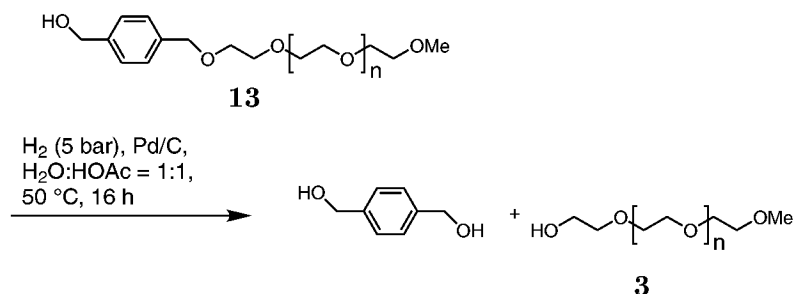


Abbildung 3.18: Abspaltung des Dioxyxylyllinkers **13** vom Polymer

3.4 Analytik polymergebundener Moleküle

Bei der klassischen Festphasensynthese findet eine Reaktionskontrolle in der Regel nach Abspalten vom polymeren Träger statt. Neben dem Nachteil, daß hierbei die Probe zerstört wird, ist vor allem der Zeit- und Arbeitsaufwand negativ zu sehen. Ebenfalls möglich ist die Aufnahme von **magic angle spinning** NMR-Spektren (MAS-NMR). Hierbei wird der Analyt nicht gelöst. Man arbeitet derart, daß man die Probe im Magnetfeld während der Messung mit hoher Geschwindigkeit um eine Achse rotieren läßt, die mit dem Feld den Winkel von 54,73° einschließt. Durch diese Arbeitsweise werden Dipol-Dipol- und Quadrupol-Feldgradienten-Wechselwirkungen, welche in Lösung herausgemittelt werden und bei normaler Arbeitsweise und Vorliegen von Feststoffen zu extremen Linienverbreiterungen führen, teilweise aufgehoben. Näheres hierzu ist zum Beispiel in (Hesse, Meier

& Zeeh 1991) zu finden. MAS-NMR-Spektren sind nur bedingt mit klassischen NMR-Spektren zu vergleichen und nicht so aussagekräftig wie diese, nicht zuletzt, weil es trotz MAS-Technik zu beträchtlichen Linienverbreiterungen kommt.

Krepinsky *et al.* konnten am Beispiel der Synthese eines α -1,2-verknüpften Pentamannopyranosides (Douglas, Whitfield & Krepinsky 1995), welches eine Struktureinheit der D-Mannane der Zelloberfläche von pathogenen Hefen darstellt, das Potential einer MPEG-unterstützten Synthese in Kombination mit dem DOX-Linker aufzeigen. Diese Synthese wurde auch in der vorliegenden Arbeit als Modellsystem für die chemische Oligosaccharidsynthese eingesetzt, siehe Kapitel 5. Trotz der schon beeindruckenden Reaktionsführung unter Verwendung eines PEG lassen sich die durch das Polymer erzielbaren Vorteile noch erhöhen. Eine Reaktionskontrolle der Synthese am löslichen Polymer fand mittels klassischer NMR-Technik statt, was aufgrund von Arbeitsaufwand, Analytmenge, anhaftendem Fehler und Zeitaufwand aber nicht die Methode der Wahl sein kann. Im folgenden soll unter anderem gezeigt werden, daß es möglich ist, NMR-Techniken in der Reaktionskontrolle bei Synthesen an löslichen Polymeren zu ersetzen, und so einen Beitrag zu einer potenten Methode für eine Oligosaccharidsynthese in größerem Maßstab zu liefern.

Wenn auch nicht gebräuchlich, so ist es doch prinzipiell möglich, bei der polymerunterstützten Flüssigphasensynthese, d. h. bei Verwendung von homogen löslichen Polymeren, eine HPLC- oder CE-Analytik⁶ zu verwenden. In der vorliegenden Arbeit soll dies am Beispiel der HPLC-Analytik aufgezeigt werden. Abbildung 3.19 verdeutlicht die ungefähr vorliegenden Größenverhältnisse schematisch. Der Polymerrest am Zucker ist so groß, daß er sehr wahrscheinlich nicht nur teilweise den Zucker maskiert, vielmehr bestimmt er durch das Größenverhältnis auch stark die Polarität bzw. die gesamten Stoffeigenschaften des Glycopolymers.

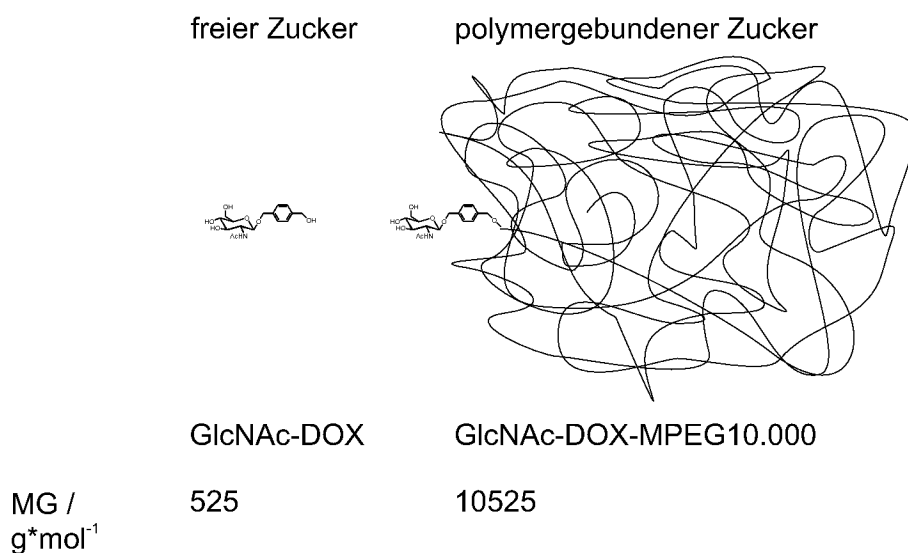


Abbildung 3.19: schematischer Größenvergleich eines freien mit einem polymergebundenen Zucker

Es ist nicht genau bekannt, wie verknäuelte oder entfaltet ein PEG-Polymer in den verschiedenen Lösungsmitteln vorliegt. Ven *et al.* untersuchten wässrige PEG-Lösungen

⁶ CE steht für capillary electrophoresis, Kapillarelektrophorese

und fanden heraus, daß ein thermodynamisches Gleichgewicht vorliegt, in dem zwischen 7 und 18 Gew.-% des Polymers in Clustern mit einigen hundert Polymerketten pro Cluster vorliegen (Polverari & van der Ven 1996). Die Clusterbildung ist neben dem Lösungsmittel noch von Temperatur, Konzentration und vorliegenden Salzen abhängig. Es besteht also Grund zu der Annahme, daß die Polymerketten nicht frei und erst recht nicht entfaltet vorliegen.

Die Trennung von Analyten mittels HPLC beruht zum Großteil auf der Polarität der Analyte. Mit dem oben Gesagten ist es nicht verwunderlich, daß eine Trennung von beispielsweise einem über eine Acetylfunktion geschützten polymergebundenen Monosaccharid vom gleichfalls polymergebundenen deacylierten Monosaccharid schwer möglich ist. Der Einfluß des Polymers, welches ebenfalls mit dem Säulenmaterial wechselwirkt, ist verhältnismäßig groß. Pasch *et al.* beschrieben die Trennung einiger PEG-Derivaten mittels der sogenannten HPLC-Technik des kritischen Punktes (Pasch & Zammert 1994), welche nachfolgend erläutert werden soll.

Abbildung 3.20 zeigt die in dieser Arbeit durchgeführte Bestimmung des sogenannten kritischen Punktes für das System aus verwendeter HPLC-Säule und PEG-Polymere. Bei Verwendung einer RP-Säule⁷ in der Polymeranalytik kann je nach Eluentenzusammensetzung eine Trennung der Polymere über einen RP-Mechanismus ablaufen oder auch über einen GPC-Mechanismus. Bei der RP-Chromatographie (*reverse phase* oder Umkehrphase) erfolgt die Auftrennung in erster Linie aufgrund der Hydrophobizität des Analytes. Bei der GPC hingegen findet eine Auftrennung in erster Linie nach der sphärischen Größe statt. Als Säulenmaterial wird dabei ein Gel verwendet, welches sehr kleine Poren enthält, in welche der Analyt hinein und wieder heraus diffundiert. Kleine Moleküle werden durch diesen Effekt stark zurückgehalten, da sie sehr leicht in die Poren passen und weisen daher eine relativ hohe Retentionszeit auf. Große Moleküle, welche sehr schlecht in die Poren passen, wechselwirken weniger stark mit diesen, es resultieren kleine Retentionszeiten.

Zur Bestimmung des kritischen Punktes werden PEG-Polymere verschiedenen Molekulargewichtes bei verschiedenen Eluentenpolaritäten, hier Prozentanteilen Acetonitril, über die Säule laufen gelassen. Trägt man nun jeweils für die verschiedenen Acetonitrilkonzentrationen die Retentionszeiten gegen das Molekulargewicht auf, so findet man für das verwendete Polymer und die verwendete Säule den kritischen Punkt, d. h. den Punkt der Lösungsmittelzusammensetzung, bei dem *keine* Auftrennung der Polymere nach dem Molekulargewicht stattfindet.

In dem Fall des hier verwendeten HPLC-Systems (stationäre Phase: LiChrospher 100, RP8 (5µm), 250 mm x 4 mm, mobile Phase: Acetonitril/Wasser) liegt der kritische Punkt bei knapp unter 40 % Acetonitril. Wie aus Abbildung 3.20 zu sehen, ist die Elution extrem eluentensensitiv. Bei Acetonitrilkonzentrationen kleiner als 38 % kommt es zu keiner Elution von PEG, die Säule verblockt. In Bereich von 38 bis 40 % Acetonitril liegt eine Elution über einen RP-Mechanismus vor, die Polarität des Polymers ist hier ausschlaggebend. Im Bereich größer 40 % liegt eine Elution primär über einen GPC-Mechanismus vor, leicht erkennbar daran, daß zuerst die räumlich großen und dann die kleinen Polymere eluiert werden. Am kritischen Punkt selbst ist die Elution weder von der Polarität noch von der Größe des Polymers abhängig! Möchte man nun unterschiedlich derivatisierte Polymere

⁷ RP, Reverse Phase oder Umkehrphasen ist die Bezeichnung für stationäre Phasen eines chromatographischen Systems, die im Gegensatz zu der im üblichen Adsorptions-System unpolar, hydrophob sind. Die mobile Phase ist dabei polar, hydrophil.

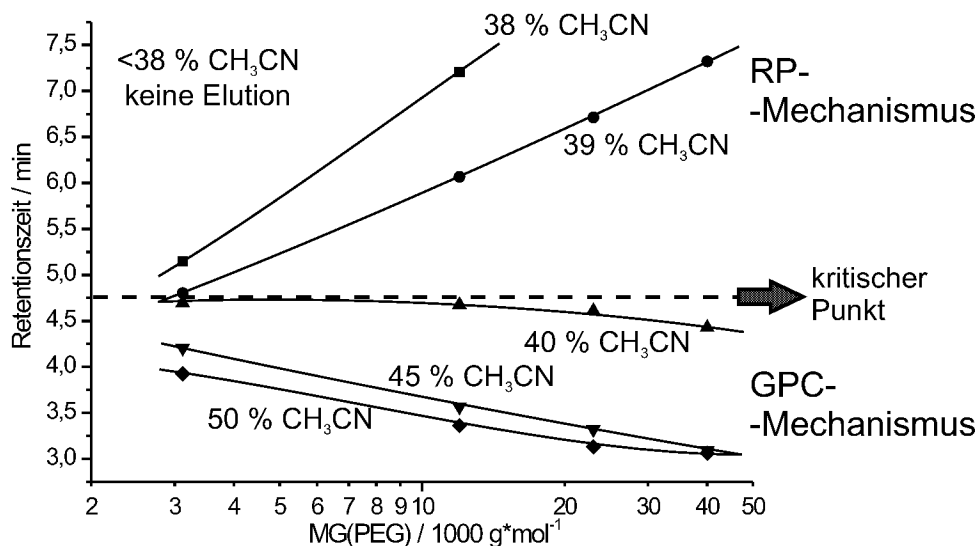


Abbildung 3.20: Bestimmung des kritischen Punktes für PEG, stationäre Phase: LiChrospher 100, RP8 (5 μ m), 250 mm x 4 mm, mobile Phase: Acetonitril/Wasser

von einander trennen, so hat man beim Arbeiten am kritischen Punkt die Eigenschaften des Polymers „maskiert“. Eine Trennung findet dann aufgrund der derivatisierten Endgruppen der Polymere statt. So war die Beladungsbestimmung des Polymers MPEG **3** bezüglich DOX-Linker möglich. Dabei wurde die Detektion per Differentialrefraktometer durchgeführt, was die Beladungsbestimmung erst ermöglichte, da der Brechungsindex in erster Linie durch das Polymer, ob mit oder ohne Linker, bestimmt wird. Somit konnte die aufwendige Beladungsbestimmung per NMR nach vorangegangener Acetylierung abgelöst werden. Aus dem in Abbildung 3.21 dargestellten Chromatogramm konnte beispielsweise eine Beladung des Polymers mit Linker von 74 % ermittelt werden.

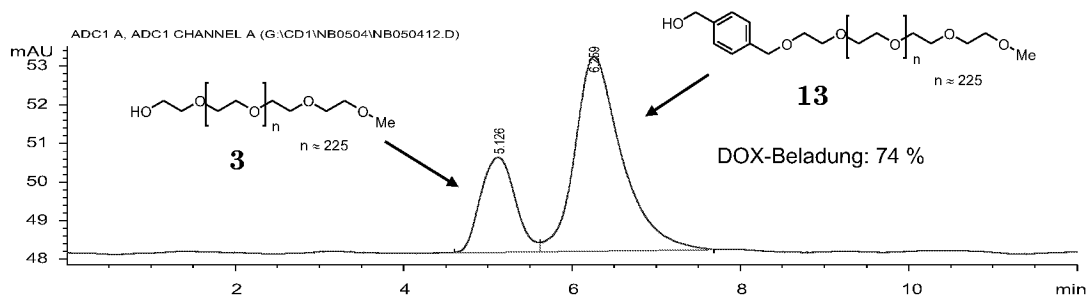


Abbildung 3.21: HPLC-Chromatogramm zur Beladungsbestimmung von MPEG-DOX-OH **13**, stationäre Phase: LiChrospher 100, RP8 (5 μ m), 250 mm X 4 mm, mobile Phase: 40 % Acetonitril 60 % Wasser, Flußrate: 0,5 mL/min, 25 °C, Detektion: Differentialrefraktometer

Neben der Beladungsbestimmung konnte ferner auch die Synthese des polymer-

gebundenen Monosaccharides **16**, siehe Kapitel 5, per HPLC verfolgt werden, wie in Abbildung 3.22 gezeigt. Hierbei stellte es sich als praktikabel heraus lediglich am kritischen Punkt zu starten und danach eine Gradientenelution durchzuführen.

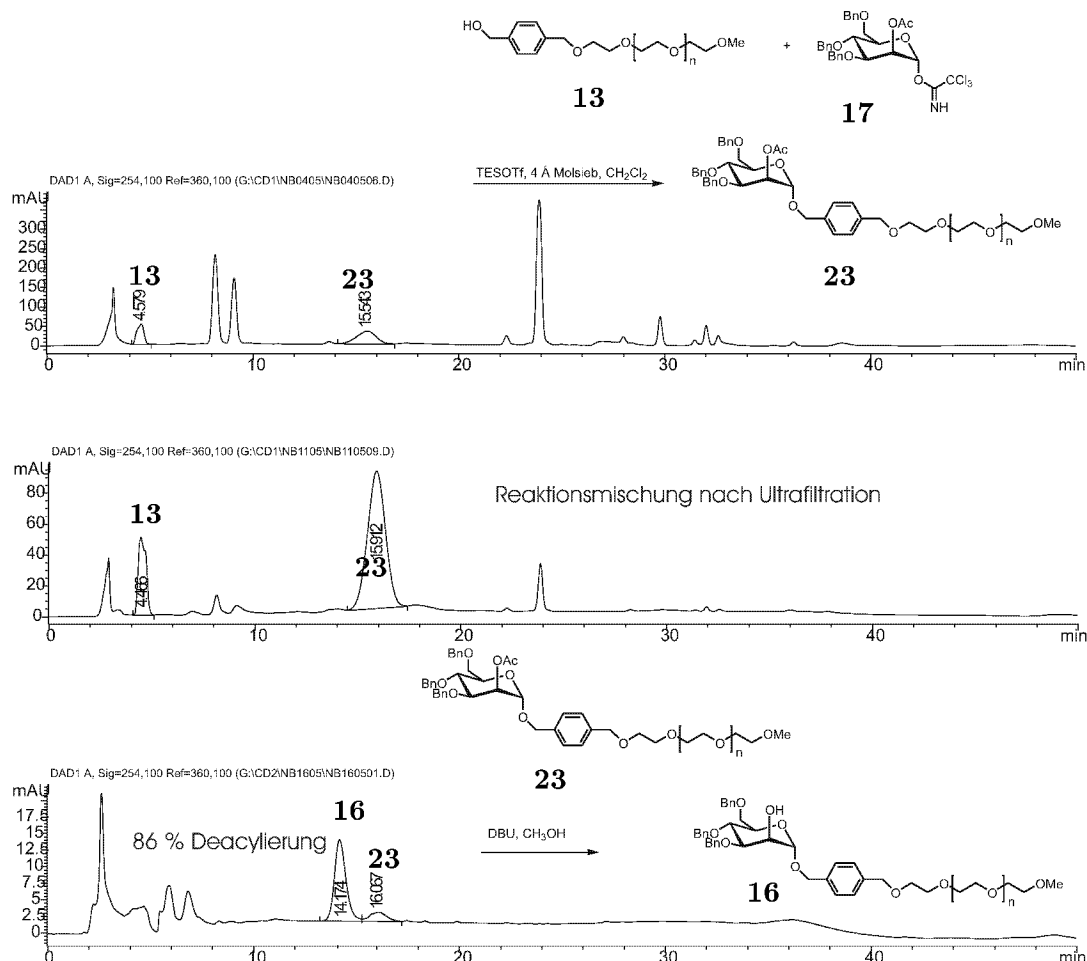


Abbildung 3.22: HPLC-Chromatogramme der Synthese des polymergebundenen Monosaccharides **16**, stationäre Phase: LiChrospher 100, RP8 (5µm), 250 mm X 4 mm, mobile Phase: Acetonitril-Wasser, Gradient: 0 min 60% H₂O; 30 min 20% H₂O; 40 min 80% H₂O; 43 min 60% H₂O; 50 min 60% H₂O, Flußrate: 0,5 mL/min, 25 °C

Die Analytik zur enzymatischen Synthese des α -Gal-Trisaccharides **1**, Kapitel 6, d. h. die Trennung von MPEG-gebundenem *N*-Acetylglucosamin **33**, *N*-Acetylactosamin **34** und Galili-Trisaccharid **29** war ebenfalls möglich und ist in Kapitel 6 näher erläutert.

Eine Analytik per MALDI-TOF-MS⁸ ist ebenfalls möglich (Harvey 1996, Wittmann & Heinzle 2001). Neben dem Aufwand der Probenvorbereitung und dem Problem der Molekulargewichtsverteilung des Polymers spricht aber vor allem eine schlecht mögliche Quantifizierung bei MALDI-TOF-MS klar für eine HPLC-Analytik.

⁸ MALDI-TOF-MS = Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectroscopy

3.5 Zusammenfassung

- Zwei Linker zur polymerunterstützten Oligosaccharidsynthese wurden an MPEG synthetisiert (DOX-Linker **13**) bzw. synthetisiert und an PEG gebunden (Flitsch-Linker **4**).
- Mit dem α, α' -Dioxyxylyl-Linker **13** wurde ein einfach zu handhabender, stabiler, für die hier gestellte Aufgabe geeigneter Linker ermittelt. Eine DOX-Beladung des MPEG von 97 % konnte erzielt werden.
- Das Analytikproblem der Synthese an einem homogen löslichen Polymer wurde gelöst.
- Eine HPLC-Methode für die Beladungsbestimmung von MPEG und die chemische Modelloligosaccharidsynthese wurde mittels Bestimmung des kritischen Punktes erarbeitet.

4 Filtration in der Aufarbeitung

4.1 Einleitung

Membranen werden von der Natur in großem Maße in biologischen Systemen verwendet. Lebende Zellen werden durch Membranen nach außen hin abgegrenzt. Auch in der Aufnahme von Nährstoffen durch den Darmtrakt und dem Ausscheiden von unerwünschten Giftstoffen durch die Niere spielen Membranen ganz entscheidende Rollen. Nichts liegt näher als es der Natur gleich zu machen und Membranen zur Stofftrennung einzusetzen.

Bereits 1855 wurde von Adolph Fick die erste synthetische Membran aus Nitrocellulose entwickelt (Cheryan 1998). Erste kommerzielle Membranen zur praktischen Anwendung wurden ab 1920 durch die Firma Satorius produziert. Seitdem entwickelte sich die Membrantechnik stetig weiter, wie in Tabelle 4.1 dargestellt, und ist mittlerweile eine elegante Trenntechnik, die aber in ihrem Potential bei weitem noch nicht ausgereizt ist.

Tabelle 4.1: Historische Entwicklung von technischen Membranprozessen (Mulder 1991)

<i>Membranprozess</i>	<i>Land</i>	<i>Jahr</i>	<i>Anwendung</i>	<i>Maßstab</i>
Mikrofiltration	D	1920	Bakterienfilter	Labor
Ultrafiltration	D	1930		Labor
Hämodialyse	NL	1950	künstliche Niere	Labor
Elektrodialyse	USA	1955	Entsalzung	Industriell
Umkehrosmose	USA	1960	Meerwasserentsalzung	Industriell
Ultrafiltration	USA	1960	Aufkonzentrierung von Makromolekülen	Industriell
Gaspermeation	USA	1979	Wasserstoff-rückgewinnung	Industriell
Membrandestillation	D	1981	Konzentrierung von wäßrigen Lösungen	Industriell
Pervaporation	D/NL	1982	Trocknung von organischen Lösungsmitteln	Industriell

Zur besseren Einordnung und Erklärung der verschiedenen Membranverfahren stellt Abbildung 4.1 Membranverfahren (grau unterlegt, fett) und andere Trennprozesse im Vergleich dar. Angeordnet sind diese nach dem jeweiligen Trennmechanismus. Um die Dimensionen zu veranschaulichen, sind beispielhafte Vergleichsmaterialien aufgeführt. Als weiterführende Übersichtsliteratur seien (Cheryan 1998, Mulder 1991, Staude 1992) empfohlen.

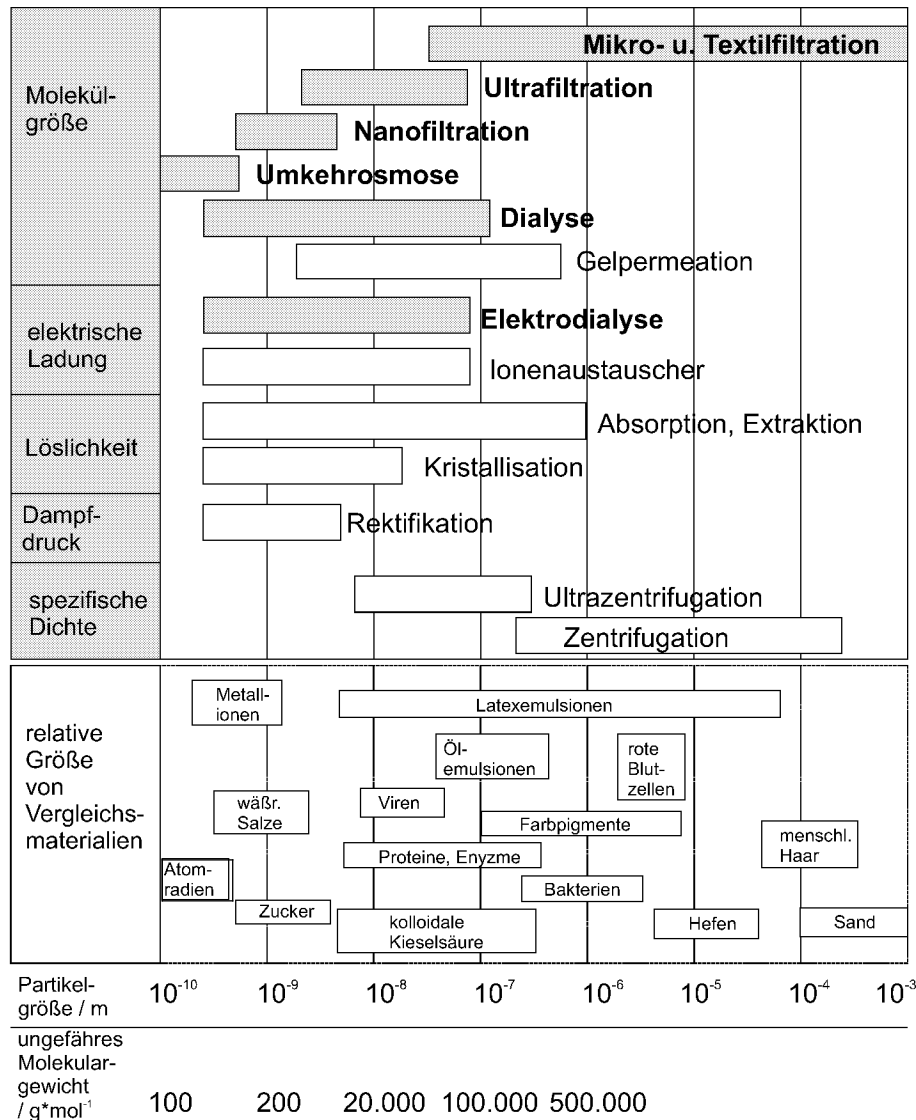


Abbildung 4.1: Membranverfahren (grau unterlegt, fett) in Vergleich mit anderen Trennverfahren, eingeteilt nach ihren Trennmechanismen (Dow Europe Separation Systems 1997, Rautenbach 1995)

4.1.1 Membranen

Man unterscheidet verschiedene Arten von druckgetriebenen Membranprozessen, wie in Abbildung 4.2 dargestellt.

Das Verfahren, welches in der vorliegenden Arbeit Anwendung findet, ist die Ultrafiltration, welche ein Molekulargewicht von ca. 1.000 Da bis ca. 200.000 Da abdeckt und sich daher für die Rückhaltung von Makromolekülen eignet. Die Triebkraft der Ultrafiltration ist eine Druckdifferenz zwischen Permeat- und Retentatseite. Durch Poren in der Membran kommt es zu einem konvektiven Fluß durch die Membran, dem Transmembranfluß. Eine Trennung findet dabei in erster Linie aufgrund der Teilchengröße, aber auch durch Ladungen bzw. hydrophile-hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Membran und

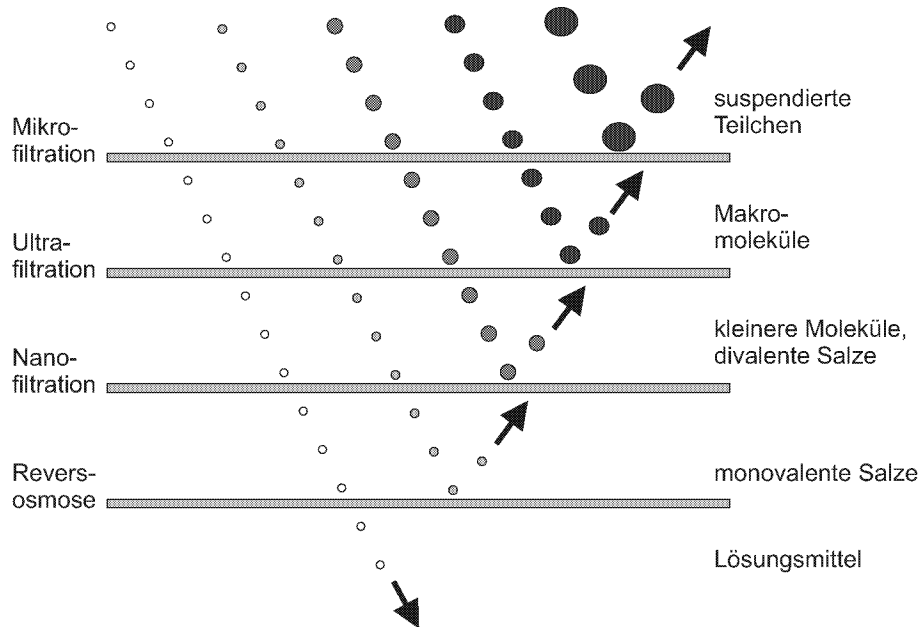


Abbildung 4.2: Druckgetriebene Membranprozesse und ihre Trenncharakteristika (Cheryan 1998)

zurückzuhaltender Substanz statt. Neben den sogenannten Porenmembranen gibt es auch dichte Membranen. Bei ihnen findet ein Transmembrantransport ausschließlich durch Diffusion des Permeates in und wieder aus der Membran heraus statt, Poren liegen nicht vor. Diese Membranen werden bei der Umkehrosmose und Pervaporation und zum Teil auch bei der Dialyse eingesetzt.

4.1.1.1 Polymermembranen

Synthetische Polymermembranen sind in der Regel Kompositmembranen. Sie bestehen aus einem Vlies als Träger (sehr oft Polyester oder Polypropylen), auf dem die eigentlich aktive Membranschicht aufgebracht ist (Schmidt et al. 1999). Der Großteil der synthetischen Membranen für die Ultrafiltration (aktive Schicht) besteht aus regenerierter Cellulose, Polyacrylnitril, Polyvinylalkohol, Polysulfon, Polyethersulfon, Celluloseacetat, Cellulosetriacetat, aromatischen Polyamiden oder Polyimiden. Eine Lösungsmittelbeständigkeit ist im Bereich der Ultra- und Nanofiltration nur bei sehr wenigen Polymermembranen gegeben und auch dann nur sehr beschränkt. Ein Beispiel für gute Beständigkeiten gegenüber organischen Substanzen sind die Membranen MPF-44, MPF-50 und MPF-60 der Firma Koch (Kiryat-Weizmann-Kompositmembranen) (Perry et al. 1991, Felder, Giffels & Wandrey 1997, Brinkmann et al. 1999, Schmidt et al. 1999, Laue et al. 2001).

4.1.1.2 Keramische Membranen

Der Einsatz von *keramischen Membranen* in der Ultra- und auch Nanofiltration begann Anfang der 80er Jahre und nimmt seitdem stetig zu. Die Keramiken bestehen aus Al_2O_3 , ZrO_2 oder TiO_2 (Schmidt et al. 1999, Cheryan 1998). Sie sind aufgebaut aus einem grobporigen Stützgerüst, welches der keramischen Membran Festigkeit verleiht und in der Regel

aus Al_2O_3 besteht und einer feinporigen filtrationsrelevanten aktiven Schicht, welche aus ZrO_2 oder/und TiO_2 besteht. In Abbildung 4.3 ist eine mikroskopische Querschnittsaufnahme solch einer keramischen UF-Membran gezeigt. Die im Rahmen der Arbeit verwendeten keramischen Membranen sind Rohrmodule, wie in der Abbildung angedeutet. Im Inneren des Rohres befindet sich dabei die aktive Schicht. Einkanalrohre (Membralox, Fa. USF) und Dreikanalrohre (PoroCer, Fa. Tami) der Länge 250 mm wurden verwendet. Durch Einsatz von Rohr- oder Hohlfasermusername ist die Möglichkeit gegeben, Foulingprozesse durch cross flow-Arbeitsweise von Beginn an so gering wie möglich zu halten (natürlich generell und nicht nur bei keramischen Membranen). Weiter ist die Möglichkeit gegeben, den Maßstab des apparativen Aufbaus leicht zu vergrößern.

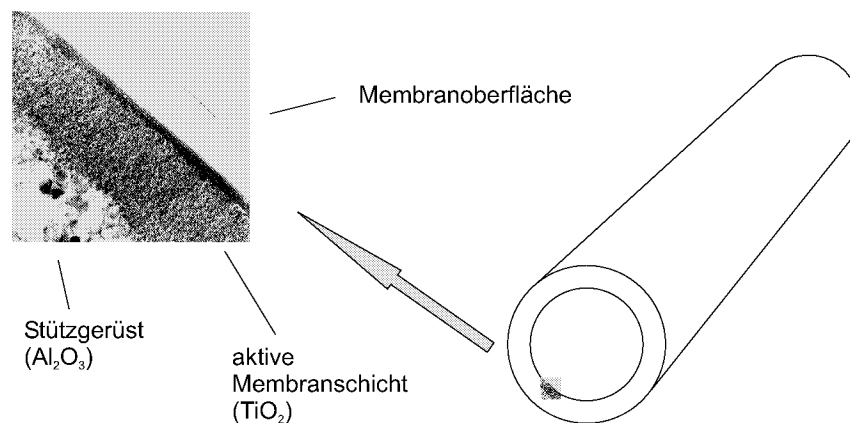


Abbildung 4.3: Mikroskopische Querschnittsaufnahme einer Ultrafiltrationsmembran (Rohrmodul), Wiedergabe des Photos mit freundlicher Genehmigung der Gesellschaft für innovative Keramik GmbH, Hermsdorf

Keramische Membranen bieten gewisse Vorteile gegenüber herkömmlichen Polymermembranen, wie:

- *Beständigkeit gegenüber den meisten Chemikalien und Lösungsmitteln*
- *gute mechanische Beständigkeit*, zum Teil sogar gegen abrasive Stoffe
- *gute Temperaturbeständigkeit*
- *gute pH-Beständigkeit*
- *gute Druckbeständigkeit*, bis zu 50 bzw. 200 bar laut Herstellerangaben
- *gute Rückspülbarkeit zur Reinigung*.

All dies macht Keramiken zu idealen Membranmaterialien und führt zu extrem *hohen Standzeiten*, so daß auch der im Vergleich zu Polymermembranen höhere Preis gerechtfertigt ist. Cheryan gibt nicht näher spezifizierte Temperaturbeständigkeiten von 130 °C für Keramikmembranen, 75 °C für Polysulfon- und Polyvinylidenfluoridmembranen, 50 °C für Polyamid und 30 °C für Celluloseacetatmembranen an (Cheryan 1998). Die angegebene Temperaturbeständigkeit von keramischen Membranen bis 130°C kann als sehr konservativ betrachtet werden. Das Membranmaterial widersteht zum Großteil auch höheren Temperaturen, so geben (Voigt & Voigtsberger 1995) eine Temperaturbeständigkeit von 500°C für eine klassische Ultrafiltrationsmembran aus Al_2O_3 , TiO_2 und ZrO_2 an. Oberhalb

dieser Temperatur kommt es zu Sinterungsprozessen, welche die Struktur der Membran zerstören. Die oft angegebenen, wesentlich unter dieser Temperatur liegenden, Temperaturbeständigkeiten rühren von den verwendeten Dichtungen und Membranhalterungen her.

Ein Problem beim Gebrauch der keramischen Rohrmodule resultiert aus deren Aufbau. Die aktive Schicht der Keramikrohre befindet sich bei den kommerziellen Modulen auf der Rohrrinnenseite und die Rohrenden sind derart abgeschnitten, daß sich an den Kopfseiten der Rohre nicht die feinporige aktive Membranschicht, sondern grobporiges Stützmaterial befindet. Diese Kopfseiten werden vom Lösungsmittel angeströmt. Um zu verhindern, daß das Lösungsmittel unter Umgehung der aktiven Membranschicht die Membran lediglich durch das Stützgerüst passiert, ist es nötig, die Enden der Rohre zu versiegeln. Abbildung 4.4 gibt unter A) schematisch den Einbau der Membranen in das dazugehörige Gehäuse wieder (Ausschnitt) und zeigt unter B) die versiegelten Enden. Kommerziell werden hier Versiegelungen aus einem nicht näher benannten Polyfluorelastomer oder aus Araldit^{®1} angeboten. Es stellte sich im Laufe der Arbeiten heraus, daß die Versiegelungen nur unzureichend lösungsmittelstabil sind. Gewünscht war eine Kompatibilität mit Dichlormethan, welches bei der angestrebten Trichloracetimidatmethode der chemischen Modellreaktion, siehe Kapitel 5, ein hervorragend geeignetes Standardlösungsmittel ist. Bei sämtlichen verwendeten Membranen kam es jedoch hierbei zum Ablösen der Versiegelungen. Ein drastischer Abfall der Retention war die Folge. Abbildung 4.5 zeigt durch Lösungsmittel zerstörte Versiegelungen diverser Keramikmembranen. Es konnte beobachtet werden, daß die Lösungsmittel zum Quellen oder Schrumpfen der Versiegelungen führen. Dadurch bedingt kommt es entweder zum Ablösen der Versiegelung oder zum Abplatzen der oberen Keramikschicht. Tabelle 4.2 faßt die in dieser Arbeit ermittelten Lösungsmittelstabilitäten zusammen. Mit der Membralox-Membran der Fa. USF wurde eine keramische Membran gefunden, welche in den Lösungsmitteln Aceton und Acetonitril einsetzbar ist.

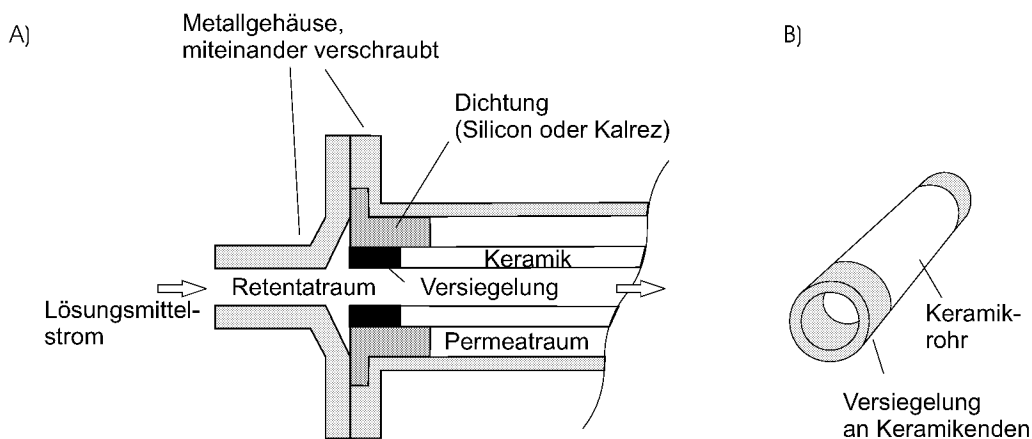


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des verwendeten Rohrmoduls der Fa. TAMI, A) Querschnitt des Keramikrohres im Gehäuse, Ausschnitt (PoroCer Modul), B) keramische Rohrmembran mit Endversiegelungen in der Aufsicht

¹ Warenzeichen der Fa. Ciba-Geigy, Gieß- und Imprägnierharze für Elektrotechnik, Oberflächenschutz, Laminierung u. v. a. m.

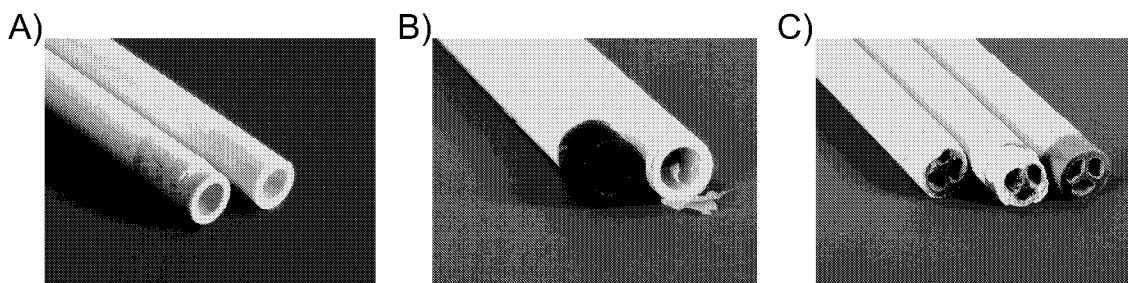


Abbildung 4.5: Photographien von Dichlormethan-geschädigten Keramikmembranen, A) Membralox 1kDa, Fa. USF, B) Membran des Instituts für Umweltkompatible Prozeßtechnologie, Saarbrücken, Versiegelung links: verglast, rechts: Araldit[®], C) PoroCer 1 kDa, Fa. Tami

Tabelle 4.2: Lösungsmittelkompatibilität der kommerziellen PoroCer- und Membralox-Membranen

Membran	Wasser	Ethanol	Acetonitril	Dichlor-methan	Aceton
PoroCer	✓	✓	-	-	-
Membralox	✓	✓	✓	-	✓

Wünschenswert wären an den Enden verglaste Membranen. Ein Problem ist dabei, daß Glas und Keramik unterschiedliche Ausdehnungskoeffizienten besitzen. So kommt es beim Verglasen und Abkühlen zu Brüchen in der Membran. Ein anderes Problem ist, daß die feinporige aktive Schicht der Membran bei starkem Erhitzen, wie es beim Verglasen notwendig ist, sintert und so nicht mehr die gewünschte Struktur besitzt. Im Laufe der Arbeiten wurden auch Membranen des Instituts für umweltkompatible Prozeßtechnik, Saarbrücken, getestet. Bei diesen Ultrafiltrationsmembranen hat man zum Teil den Versuch des Verglasens gemacht. Bei hoher Temperatur wurde vor Aufbringen der feinporigen — gegenüber Sintern anfälligen aktiven Schicht — verglast. Die Membranen wiesen eine nur unzureichende Retention auf, was möglicherweise auf Defekte in den Verglasungen oder der Grenze zwischen aktiver Schicht und Verglasung zurückzuführen ist.

4.1.1.3 Ultrafiltrationsanlage

Um die keramischen Rohrmembranen einzusetzen, siehe auch Kapitel 5, Chemische polymerunterstützte Flüssigphasensynthese, wurde die in Abbildung 4.6 dargestellte Anlage aufgebaut. Mit ihr war es möglich unter Inertbedingungen (essentiell in Kapitel 5), drucküberlagert mit organischen Lösungsmitteln und keramischen Rohrmembranen zu arbeiten.

Abbildung 4.7 zeigt ein Fließbild der Anlage. Das Zwischengefäß steht auf einer Waage. Über das von der Waage detektierte Gewicht steuert ein Regler eine Dosierpumpe, so daß ständig so viel Lösungsmittel in den Kreislauf nachdosiert wird, wie den Kreislauf über die Membran gerade verläßt. Die ganze Anlage kann unter Argonüberdruck gesetzt werden, um ein Arbeiten unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluß zu ermöglichen. Der Kreislauf mit Zwischengefäß kann zwischen 120 mL und 300 mL Volumen aufnehmen.

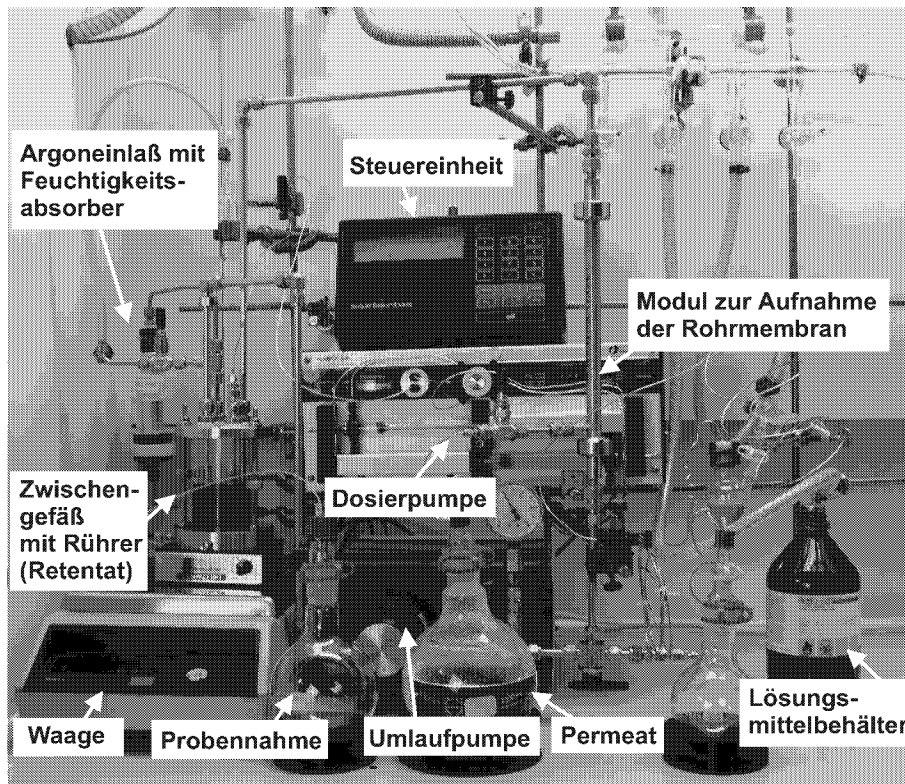


Abbildung 4.6: Photographie der Dia-Ultrafiltrationsanlage zum Einsatz keramischer Rohrmembranen in organischem Medium

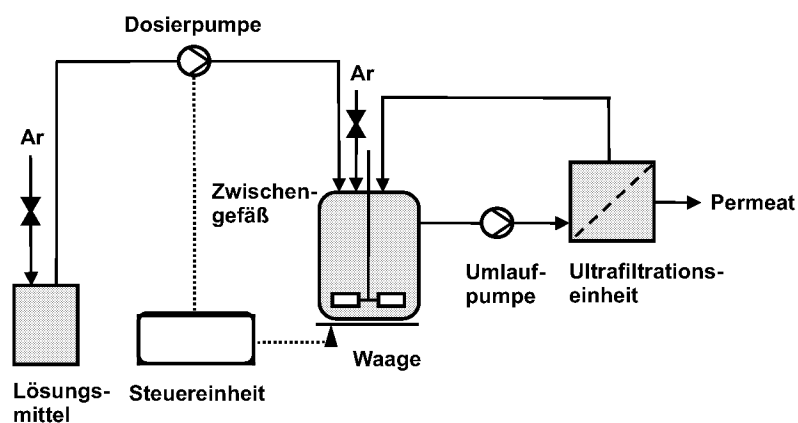


Abbildung 4.7: Fließbild der Ultrafiltrationsanlage zum Einsatz keramischer Rohrmembranen in organischem Medium

Der Aufbau zur Dia-Ultrafiltration mit Pellicon-Modulen im wässrigen Medium erfolgt mit einem ähnlichen Aufbau und ist in Kapitel 6, Enzymatische polymerunterstützte Flüssigphasensynthese, gezeigt. Polymerflachmembranen wurden in kommerziellen Amicon-Zellen verwendet.

4.1.2 Retentionsbestimmung

Die Charakterisierung von Membranen in Bezug auf ihre Eignung zur Filtration erfolgt durch Angabe der Selektivität, ermittelt als Retention, und des Transmembranflusses. Die Retention — auch als Rückhaltevermögen bezeichnet — ist definiert durch Gleichung 4.1.

Besonders bei Angaben von Membranherstellern wird oft der sogenannte „cut off“ angegeben. Dieser wird auch „nominal molecular weight cut off“ (NMWCO) oder Ausschlußgrenze genannt. Man versteht darunter, sofern nicht anders definiert, die Angabe eines Molekulargewichtes, bei dem eine Retention von 90 % erreicht wird. Dabei sollte die Angabe von verwendetem Polymer und Lösungsmittel nicht fehlen. Als Polymere bieten sich PEG und Dextrane an. Wesentlich aussagekräftiger als die Angabe eines „cut off“ ist zur Auswahl einer Membran die Angabe von Retentionen verschieden großer Polymere. Dies erfolgt idealerweise graphisch, so daß man den Grenzwert der Retention erkennen kann. Liegt dieser beim „cut off“, so läßt sich auch ein Polymer mit größerem Molekulargewicht nicht besser zurückhalten. Liegt er wesentlich über dem „cut off“, so liegt die Retention eines größeren Polymers natürlich auch bei mehr als 90 %. Aus Gründen der Zeitersparnis ist, besonders wenn man auf ein Polymer oder eine andere Substanz mit einem bestimmten Molekulargewicht festgelegt ist, oft die Messung der Retention lediglich dieser einen Substanz ausreichend. Es sollten bei Berücksichtigung der Retention als entscheidende Größe zur Membrancharakterisierung die Herstellerangaben auf jeden Fall überprüft werden, da hier signifikante Differenzen festgestellt wurden.

$$R = 1 - \frac{c_{\text{Permeat}}}{c_{\text{Retentat}}} \quad (4.1)$$

mit:	R	-	Retention
	c_{Permeat}	mol/L	Konzentration im Permeat
	c_{Retentat}	mol/L	Konzentration im Retentat

Die Retention ist abhängig von den Parametern Temperatur, Fluß, Konzentration und Ladung:

zunehmende Temperatur	vermindert die Retention,
zunehmende Konzentration	vermindert die Retention,
zunehmender Transmembranfluß	erhöht die Retention,
zunehmende Ladung	erhöht die Retention.

Neben Formel 4.1 kann man auch über Formel 4.2 die Retention berechnen.

$$c(A) = c(A)_0 e^{-(1-R)\theta} \quad (4.2)$$

mit:	R	-	Retention
	$c(A)$	mol/L	Konzentration der Komponente A im Retentat
	$c(A)_0$	mol/L	Anfangskonzentration der Komponente A
	θ	-	Anzahl der Volumina, Verweilzeiten (dimensionslose Verweilzeit)

Es wurden zur Bestimmung der Retention verschiedene Techniken eingesetzt. Man kann zum einen unterscheiden zwischen der Art der Detektion des Analyten und zum anderen zwischen den Meßmodi. Die Arten der Detektion sind z. B. Gravimetrie, Photometrie, Conductometrie oder Refraktometrie, eventuell in Verbindung mit Gel-Permeations-Chromatographie (GPC). In Bezug auf die Meßmodi kann man unterscheiden zwischen

einem Modus, bei welchem durch den Reaktor hindurchgespült und das Permeat gesammelt wird und einem, bei welchem das Permeat rezykliert wird.

Bei der *gravimetrischen Methode* wird — nach ausgiebigem Spülen von Reaktor und Membran mit Lösungsmittel — eine Probe des zu untersuchenden Polymers in den Reaktor gespült. Nach Durchpumpen von weiterem Lösungsmittel über eine gewisse Anzahl von Verweilzeiten wird dieses aus dem getrennt gesammelten Permeat und Retentat abdestilliert und die Rückstände getrocknet. Der apparative Aufwand ist sehr gering, siehe Abbildung 4.8, der Arbeits- und Zeitaufwand allerdings relativ hoch. Mittels Gleichung 4.2 läßt sich die Retention berechnen. Ein Nachteil ist, daß die Methode mit einem relativ großen Fehler behaftet ist, wenn es nicht möglich ist, das Retentat verlustfrei aus dem Reaktor zu entnehmen. Mit der *gravimetrischen Methode* wird ein gemittelter Retentionswert erhalten, was sich gerade bei niedrigen Retentionen bemerkbar macht. Dabei ist zu Beginn die Analytkonzentration im Reaktor hoch und nimmt im Laufe der Retentionsmessung ab. Infolge der Abnahme der Konzentration steigt die Retention. Der schließlich berechnete Wert setzt sich aus den verschiedenen Retentionen zusammen.

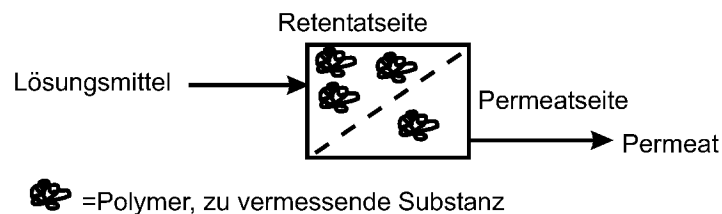


Abbildung 4.8: Fließbild zur gravimetrischen Retentionsmessung

Ist die zu vermessende Substanz UV-aktiv, so bietet sich die *photometrische Methode* an. Zum einen kann man wie bei der gravimetrischen Methode vorgehen, gesammeltes Permeat und gesammeltes Retentat photometrisch vermessen und dann nach Formel 4.1 die Retention berechnen. Es ist auch möglich, nur eine oder mehrere Momentaufnahmen zu messen. Dabei werden dann nach dem Einspülen lediglich Proben von Retentat und Permeat entnommen und die Retention läßt sich nach Gleichung 4.1 bestimmen. Diese Retention ist dann nicht über verschiedene Konzentrationen gemittelt. Ist diese Methode apparativ und analytisch möglich, so ist ihr der Vorzug gegenüber der gravimetrischen zu geben. Ebenfalls möglich ist es, Proben des Retentats zu entnehmen, die Konzentration zu bestimmen und gegen die Anzahl der Verweilzeiten (Anzahl der Volumina, dimensionslose Verweilzeit) aufzutragen. Nach Formel 4.2 läßt sich auch daraus die Retention bestimmen. Diese Vorgehensweise bietet allerdings keinen Vorteil gegenüber dem oben beschriebenen und hat den Nachteil, daß durch die Vorgehensweise die Konzentration im Reaktor abnimmt, was wiederum die Retention beeinflusst.

Neben der Möglichkeit für eine gewisse Zeit reines Lösungsmittel durch den Reaktor hindurch zu spülen, kann man auch die Methode des *stationären Gleichgewichtes* verwenden. Man spült dabei die zu testende Substanz in den Reaktor ein und die Lösung wird dann im Kreis durch die Membran gepumpt, wie in Abbildung 4.9 verdeutlicht. Nach Einstellung eines stationären Gleichgewichtes werden Proben von Retentat und Permeat entnommen und die Konzentrationen des zu retentierenden Stoffes darin bestimmt. Wiederum nach Formel 4.1 wird die Retention berechnet.

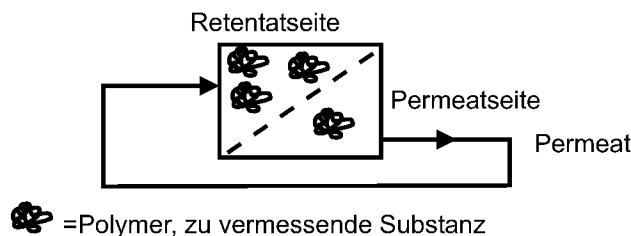


Abbildung 4.9: Fließbild zur Retentionsmessung bei stationärem Gleichgewicht

4.2 Ergebnisse

Die Methode des stationären Gleichgewichtes in Verbindung mit GPC-Messungen wird als die praktikabelste Art der Retentionsmessung angesehen und wurde im Lauf der Arbeiten etabliert. Sie geht zurück auf eine französische Norm (Französische Norm 1997), worauf sich auch viele Membranhersteller stützen, so daß die Ergebnisse besser miteinander vergleichbar sind.

Mit dieser Methode war es möglich, die Retentionen mehrerer PEG-Polymere unterschiedlichen Molekulargewichtes gleichzeitig zu vermessen. Hierzu wurde eine Mischung verschiedener PEG-Polymere in den Reaktor gespült. Wiederum wurden nach Einstellung eines stationären Gleichgewichtes Proben von Retentat und Permeat genommen und dann mittels GPC analysiert.

Abbildung 4.10 zeigt unter A) beispielhaft die GPC-Chromatogramme einer Retentionsmessung mit einem Pellicon XL10-Modul. Es wurden vier Polymere eingespült und so parallel die Retentionen gemessen. Aus diesen Messungen berechnen sich nach Formel 4.1 Retentionen von 0,692 für PEG20.000, 0,556 für PEG10.000, 0,386 für PEG6.000 und 0,051 für PEG1.000. Hieraus erhält man die unter B) dargestellte Charakterisierung des Pellicon XL10-Moduls durch nur einen Versuch. Bei Verwendung der gravimetrischen Methode zur Retentionsmessung wären hierzu vier Versuche notwendig, wobei auch jeder einzelne Versuch noch wesentlich aufwendiger wäre als bei dieser Methode.

Tabellen 4.3 und 4.4 geben die im Laufe der Arbeit gemessenen Retentionen wieder. Grau hinterlegt sind Polymer-Membran-Lösungsmittel-Kombinationen, welche zu Retentionen größer 0,99 führen. Einige dieser Kombinationen, welche zu guten Retentionen führen, scheiden aus anderen Gründen aus. Die Verwendung von bPEG40.000, siehe Kapitel 3, ist aufgrund von schlechten Zugänglichkeiten der Endgruppen, im Vergleich zu MPEG10.000, nicht sinnvoll (es wurden extrem langsame Reaktionsgeschwindigkeiten bei Derivatisierungen gefunden). Die Verwendung von PEG20.000 führt zur gleichen Retention wie PEG10.000, bei nur 50 % der Beladung und scheidet daher auch aus. Fett gekennzeichnet sind die Kombinationen, welche sich für die angestrebte polymer- und membranunterstützte Oligosaccharidsynthese eignen. Mit dem Polymer MPEG10.000 hat man hier gute Retentionen gefunden. Für Arbeiten in organischen Lösungsmitteln eignet sich besonders die Membran *Membralox 1kDa*. Bei Verwendung von Dichlormethan ist allerdings auch hier die Stabilität der Membran, genauer der Versiegelung, so gering, daß ein Einsatz nicht möglich ist. Ein Arbeiten in Acetonitril oder Aceton ist dagegen möglich. Für wäßrige Systeme hat man mit der *Pellicon XL5* eine Membran, welche zu hervorragenden Retentionen, bei gleichzeitig sehr hohen Flüssen führt. Die Membran *PoroCer 1kDa* hat sich ebenfalls als geeignet für die Rückhaltung von MPEG10.000 in wäßrigen

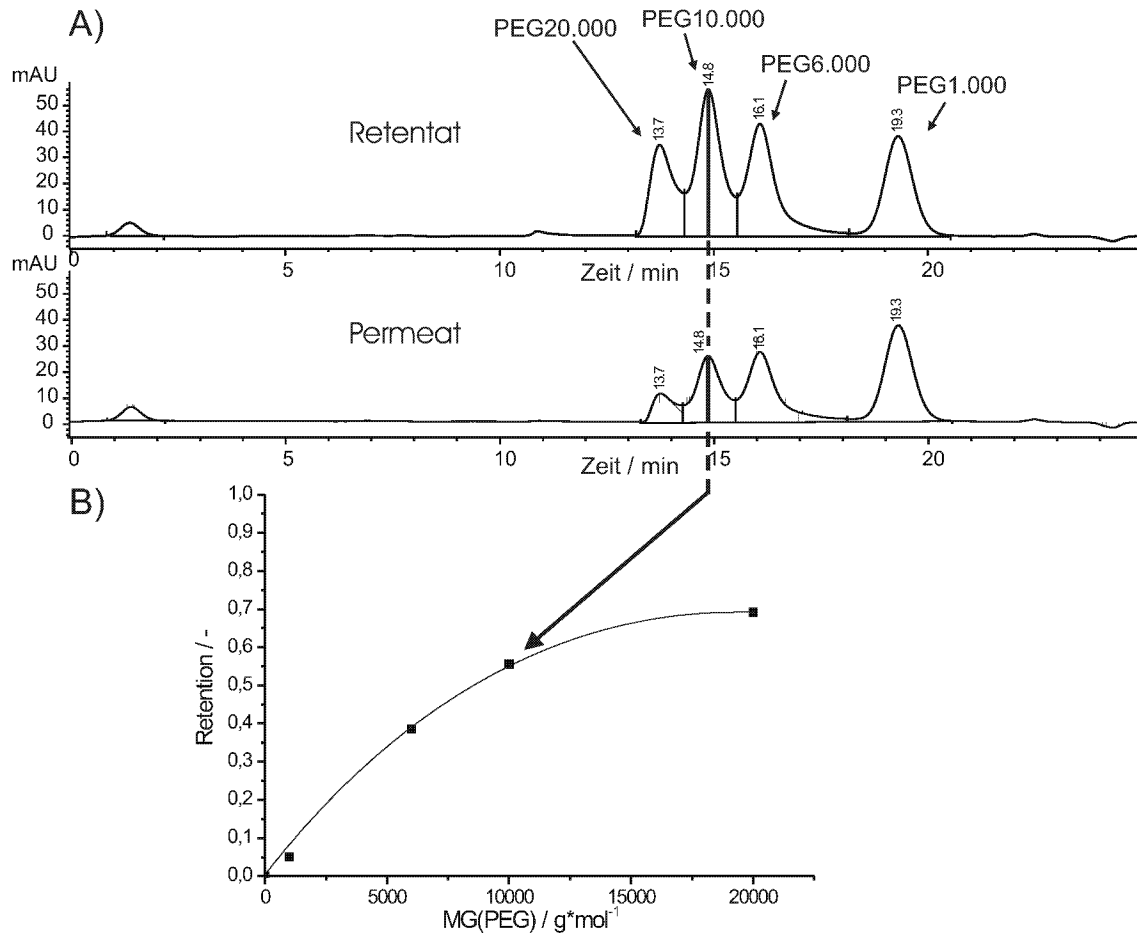


Abbildung 4.10: Charakterisierung des Pellicon XL10-Moduls durch GPC-Messungen, A) GPC-Chromatogramme, B) Retention von PEG-Polymeren in Abhängigkeit des Molekulargewichtes [Retentionsmessung: Medium Wasser, Säule: TosoHaas TSK-Gel- α , Eluent: Wasser Detektion: UV, 195 nm]

Systemen erwiesen, allerdings bei moderaten Transmembranflüssen. Sollte nicht aus anderen Gründen hier eine keramische Membran gewünscht sein, so ist der Pellicon XL5 Membran der Vorzug zu geben. Es muß ferner erwähnt werden, daß beim Pellicon-Modul eine Drucküberlagerung von größer 2 bar vermieden werden sollte, wohingegen man bei den PoroCer-Membranen mit bis zu 90 bar und bei den Membralox-Membranen mit bis zu 50 bar Druck überlagern kann. Hierdurch lassen sich entsprechend hohe Flüsse realisieren, da sich nach Hagen-Poiseuille Fluß und Druck einander proportional verhalten, was auch beobachtet wurde.

Tabelle 4.3: Liste der in Wasser ermittelten Retentionen und Flüsse

Analyt	massensp. Konz. / g L^{-1}	Membran	Lösungs- mittel	spez. Fluß / $\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1} \text{bar}^{-1}$	R / -
PEG1.000	1,13	Pellicon XL10(GPC ^a)	Wasser	160,00	0,051
PEG1.000	3,06	Pellicon XL5(GPC)	Wasser	49,00	0,103
PEG4.000	n.b. ^b	TNO ^c (K ^d ,GPC)	Wasser	n.b.	0,074
MPEG5.000	6,95	PoroCer 5kDa (K,g)	Wasser	26,11	0,954
MPEG5.000	6,26	PoroCer 3kDa(K,g)	Wasser	16,63	0,978
PEG6.000	0,83	Pellicon XL10 (GPC)	Wasser	160,00	0,386
PEG6.000	1,56	Pellicon XL5k (GPC)	Wasser	49,00	0,750
MPEG10.000	5,03	PoroCer 1kDa (K,g)	Wasser	14,53	0,996
MPEG10.000	5,02	PoroCer 1kDa (K,g)	Wasser	13,68	0,993
MPEG10.000	49,95	Pellicon XL10 (GPC)	Wasser	91,77	0,420
GlcNAc-DOX- MPEG10.000	20,85	YM30 (HPLC)	Wasser	9,18	0,060
GlcNAc-DOX- MPEG10.000	20,80	YM10 (HPLC)	Wasser	2,5	0,850
PEG10.000	2,52	Pellicon XL5 (GPC)	Wasser	49,00	0,999
PEG10.000	n.b.	PoroCer 1kDa (K,GPC)	Wasser	n.b.	0,994
PEG10.000	n.b.	TNO-Membran (K,GPC)	Wasser	n.b.	0,748
PEG10.000	1,05	Pellicon XL10 (GPC)	Wasser	160,00	0,556
PEG20.000	n.b.	TNO-Membran (K,GPC)	Wasser	n.b.	0,852
PEG20.000	1,50	Pellicon XL10 (GPC)	Wasser	160,00	0,692
PEG20.000	3,00	Pellicon XL5 (GPC)	Wasser	49,00	0,999
bPEG40.000	5,98	PoroCer 1kDa (K,g)	Wasser	12,42	0,997

^a Meßmethode GPC = Messung nach Gleichgewichtseinstellung über GPC-Messung,

g = gravimetrisch, HPLC = Einzelmessung per HPLC

^b nicht bestimmt

^c nicht-kommerzielle Membran

^d K = keramische Membran

Tabelle 4.4: Liste der in organischen Medien ermittelten Retentionen und Flüsse

Analyt	massensp. Konz. / g L ⁻¹	Membran	Lösungs- mittel	spez. Fluß / L m ⁻² h ⁻¹ bar ⁻¹	R / -
MPEG5.000	199,06	UF-PA-5 (g ^a)	CH ₂ Cl ₂	n.b. ^b	0,865
MPEG10.000	101,23	UF-PA-5 (g)	DCM	n.b.	0,988
MPEG10.000	5,91	UPT-01 ^c (K ^d ,g)	CH ₂ Cl ₂	5,09	0,974
MPEG10.000	5,56	UPT-02 ^e (K,g)	CH ₂ Cl ₂	0,34 - 0,23	0,987
MPEG10.000	59,56	Osmonics RG03 (g)	CH ₂ Cl ₂	4,00	0,862
MPEG10.000	6,68	Membralox 1kDa (K,g)	CH₂Cl₂	14,26	0,996
MPEG10.000	5,26	Membralox 1kDa (K,g)	CH₂Cl₂	1,48 - 1,84	0,998
MPEG10.000	5,58	Membralox 1kDa (K,g)	CH₃CN	22,80 - 11,40	0,996
bPEG40.000	71,83	UF-PA-5 (g)	CH ₂ Cl ₂	20,00	0,998
bPEG40.000	56,15	UF-PA-5 (g)	CH ₂ Cl ₂	n.b.	0,998
bPEG40.000	56,42	Osmonics RG03 (g)	CH ₂ Cl ₂	1,78 - 4,00	0,973
-	-	PoroCer 1kDa (K)	CH ₂ Cl ₂	19,89	-
-	-	Membralox 1kDa (K)	Aceton	26,18	-
-	-	Membralox 1kDa (K)	CH ₂ Cl ₂	18,22	-

^a Meßmethode GPC = Messung nach Gleichgewichtseinstellung über GPC-Messung,

g = gravimetrisch, HPLC = Einzelmessung per HPLC

^b nicht bestimmt

^c Membran an den Enden mit Araldit[®]-Harz versiegelt, nicht-kommerzielle Membran.

^d „(K)“ = keramische Membran

^e Membran an den Enden verglast, nicht-kommerzielle Membran.

4.3 Zusammenfassung

- Es wurde eine **Dia-Ultrafiltrationsanlage** zur Verwendung von **keramischen Rohrmembranen in organischen Medien unter Inertbedingungen** aufgebaut.
- Verschiedene Polymer- und Keramikmembranen wurden bezüglich Retention von Polymeren und Stabilität in organischen Medien getestet.
- Ein **Arbeiten mit organischen Medien** ist auch bei Verwendung kommerzieller Keramikmembranen nur bedingt durchführbar. Gegen Dichlormethan wurde keine Stabilität gefunden, gegen **Ethanol, Aceton und Acetonitril** hingegen schon (Membralox).
- Die **Retentionsmessung mittels GPC** wurde etabliert und erwies sich als die Methode der Wahl.
- Für organische Medien erwies sich bei Verwendung von **MPEG10.000** die **keramische Membran Membralox 1 kDa** mit einer **Retention von 0,996** als geeignet.
- Für wässrige Medien erwies sich bei Verwendung von **MPEG10.000** die **Membran Pellicon 5 kDa** mit einer **Retention von 0,999** als geeignet.

5 Chemische polymerunterstützte Flüssigphasensynthese

5.1 Einleitung

5.1.1 Chemische Kohlenhydratsynthese

Seit mehr als 100 Jahren hat die Chemie der Kohlenhydrate Forscher fasziniert. Dies liegt sicher nicht nur an den interessanten Zielmolekülen, deren Bedeutung in der belebten Natur erst in den letzten 25 Jahren immer mehr gelüftet wurde, sondern auch an der besonderen Herausforderung der notwendigen und anspruchsvollen Schutzgruppenchemie bei deren Synthese. Die Komplexität der Zucker resultiert aus ihrer hohen Funktionalität und der hohen Zahl an Stereozentren.

Königs und Knorr berichteten bereits 1901 über die Kupplung von Glycosylbromiden und -chloriden in Gegenwart von Schwermetallionen mit einer Hydroxykomponente (Koenigs & Knorr 1901). Diese nach ihren Entdeckern benannte *Königs-Knorr-Methode* war lange Zeit die gängige Art der Glycosylierung. Ihre Vorzüge sind:

- die Reaktivität des Glycosylakzeptors kann gut beeinflusst werden (durch Schutzgruppen),
- die Reaktivität des Glycosyldonors kann gut beeinflusst werden (über Schutzgruppen und die Wahl des Halogens),
- Diastereoselektivität wird erreicht (z. B. durch Nachbargruppeneffekte oder heterogene Katalysatoren).

Diesen Vorteilen stehen einige Nachteile gegenüber:

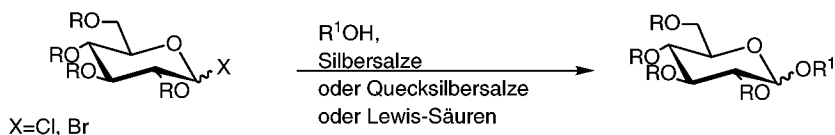
- drastische Bedingungen zur Generierung des Glycosylchlorids / -bromids sind nötig,
- die Glycosylhalogenide besitzen geringe thermische Stabilität, können oft nur *in situ* erzeugt werden, was in der Regel zu Reaktionsmischungen für die Glycosylierung führt,
- die Glycosylhalogenide sind hydrolysesensitiv,
- die Schwermetallsalze sind teuer und giftig, z. T. explosiv.

Diese Nachteile führten zur Entwicklung alternativer Glycosylierungen. Glycosylfluoride, 1923 erstmals synthetisiert, wurden trotz ihrer Vorteile — thermisch und chemisch sehr stabil und chromatographisch gut aufzureinigen — lange nicht verwendet. Erst 1981 führte Mukaiyama die *Glycosylfluorid-Methode* ein (Mukaiyama, Murai & Shoda 1981). Eine interessante Methode ist auch die 1980 von Schmidt *et al.* eingeführte *Trichloracetimidat-Methode* (Schmidt & Michel 1980). Trichloracetimidat-Donoren lassen sich auf einfachem Wege ausgehend von Hydroxyverbindungen und Trichloracetonitril in Gegenwart einer Base gewinnen. Diese Glycosylierung verläuft in der Regel mit ausgezeichneten Ausbeuten

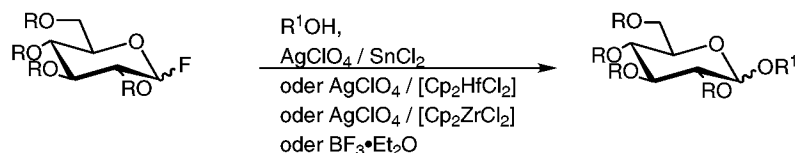
und Anomerenverhältnissen. Die *Methode der Glycale* ist ebenfalls vielseitig verwendbar. Besonders viele eindrucksvolle Beispiele ihrer Einsatzmöglichkeit lieferten hier Danishefsky et al. (Danishefsky & Bilodeau 1996, Seeberger et al. 1997). In einer gängigen Variante wird die Glycan-Doppelbindung zunächst epoxidiert und nachfolgend das Epoxid geöffnet. Gerade mit dieser Methode wurden viele anspruchsvolle, in biologischen Organismen vorkommende Glycokonjugate synthetisiert (Globo H-Hexasaccharid (Ragupathi et al. 1999), Lewis b-Pentasaccharid (Zheng, Seeberger & Danishefsky 1998) u.v.a.m.), ein Großteil von ihnen im Hinblick auf die Wirksamkeit als Krebsvakzinen (Danishefsky & Allen 2000). Abbildung 5.1 gibt eine Übersicht über die wichtigsten Glycosylierungsmethoden. Die Liste stellt bewußt nur einen kleinen Teil der möglichen Methoden dar — die wichtigsten und klassischen — und erhebt keineswegs Anspruch auf Vollständigkeit. Enzymatische Synthesen werden an anderer Stelle separat besprochen. Eine gute Übersicht über Synthesemethoden und Entwicklungen in der chemischen Oligosaccharidsynthese geben (Schmidt 1986, Davis 2000, Nicolaou & Mitchell 2001, Sears & Wong 2001).

Neben einer potenten Glycosylierungsmethode ist bei der chemischen Synthese von Kohlenhydraten besonders eine ausgefeilte Schutzgruppentechnik extrem wichtig. Da die Reaktivitäten der Hydroxygruppen sehr ähnlich sind, würden ansonsten nur schwer zu trennende Produktgemische mit nur wenig erwünschtem Produkt resultieren. Abbildung 5.2 gibt eine kleine Auswahl der gängigen Methoden zur regioselektiven Einführung von Schutzgruppen in der Kohlenhydratchemie wieder. Eine gute Übersicht geben (Hanessian 1997, Binkley 1988, Lindhorst 2000a, Ogura, Hasegawa & Suami 1992) und (Khan & O'Neill 1996).

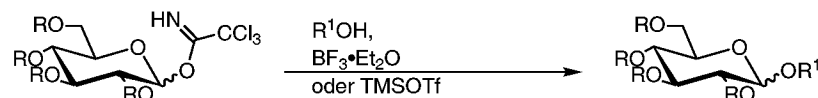
a) Königs-Knorr-Methode



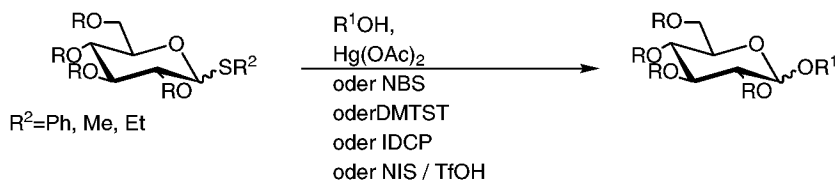
b) Glycosylfluorid-Methode



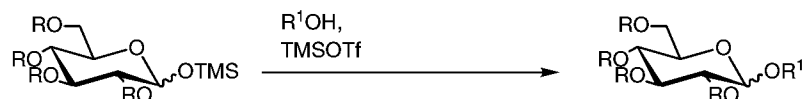
c) Trichloracetimidat-Methode



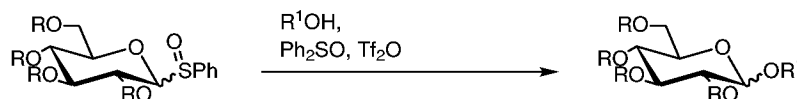
d) Thioglycosid-Methode



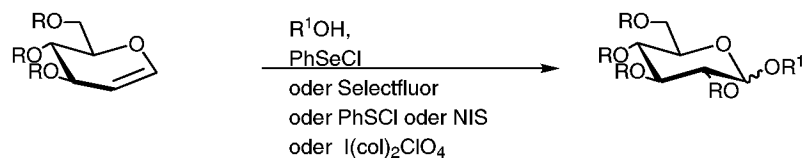
e) Silylether-Methode



f) Sulfoxid-Methode



g) Glycal-Methode



h) n-Pentenylglycosid-Methode

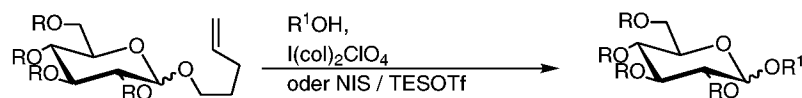
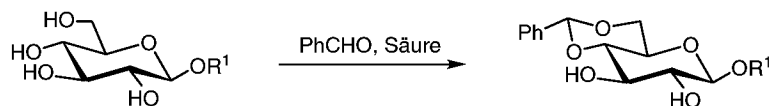
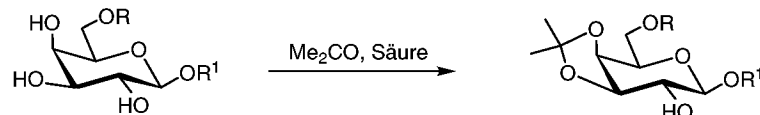


Abbildung 5.1: Übersicht über gängige chemische Glycosylierungsmethoden (Nicolaou & Mitchell 2001)

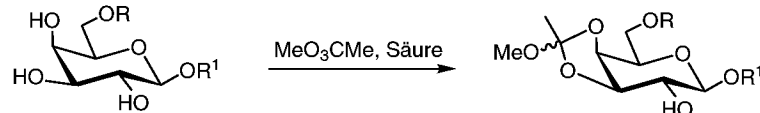
a) Bildung von Benzylidenacetalen



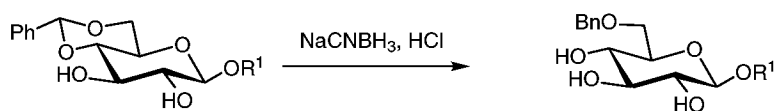
b) Bildung von Acetoniden



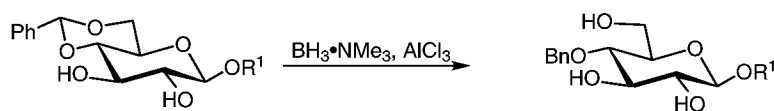
c) Bildung von Orthoestern



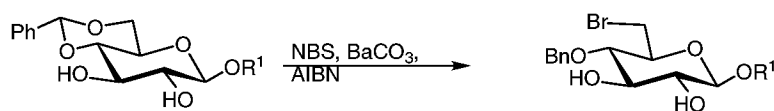
d) Spaltung von Benzylidenacetalen



e) Spaltung von Benzylidenacetalen



f) Spaltung von Benzylidenacetalen



g) Spaltung von Orthoestern

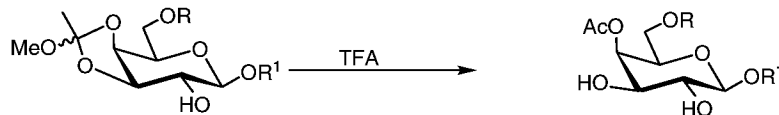
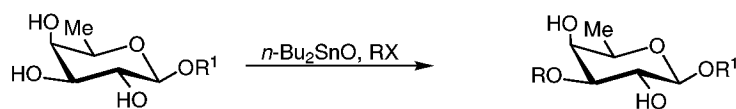

h) Schützen mit *n*-Bu₂SnO


Abbildung 5.2: Auswahl gängiger regioselektiver Einführungen von Schutzgruppen (Hanessian 1997)

Die chemische Kohlenhydratchemie hat mittlerweile solch ein Potential erlangt, daß man wohl zu Recht sagen kann, die Synthese eines beliebigen Kohlenhydrates ist bei entsprechendem Aufwand chemisch möglich. In diesem Zusammenhang soll ein herausragendes Beispiel der Methodenentwicklung in der chemischen Kohlenhydratchemie erwähnt werden. Wong *et al.* berichteten 1999 von einer Methode, die auf der computerunterstützten Synthese von Kohlenhydraten beruht (Zhang *et al.* 1999). Dazu wurden chemische Reaktivitäten verschiedener teilweise geschützter Monosaccharidbausteine bezüglich Standardglycosylierungen aufgenommen und miteinander verglichen. Gleichfalls entwickelt wurde eine dazugehörige Software mit dem Namen „Optimizer“. Das Ziel ist, möglichst einfach und schnell ein definiertes Kohlenhydrat zu synthetisieren, wobei die vorgegebene Zielstruktur durch das Programm Optimizer analysiert wird. Als Ergebnis erhält man mehrere teilgeschützte Monosaccharide aufgelistet, welche — aufgrund ihrer fein aufeinander abgestimmten Reaktivitäten — in einer Ein-Topf-Reaktion das gewünschte Zielmolekül in möglichst hoher Ausbeute ergeben (Koeller & Wong 2000a, Koeller & Wong 2000b). Eine chromatographische Aufreinigung schließt sich an. In Abbildung 5.3 ist dieses Vorgehen am Beispiel eines linearen Tetrasaccharides aufgezeigt. Das Ziel dieses ehrgeizigen Projektes sieht vor, daß sämtliche Grundbausteine der Datenbank kommerziell vertrieben werden. So soll in Verbindung mit der Software eine einfache Synthese von komplizierten Kohlenhydraten in kleinen Mengen auch für weniger versierte Anwender leicht möglich sein. Unter der Voraussetzung, daß die Methodik zuverlässig funktioniert, hat sie für die Synthese kleiner Mengen sicher ihre Berechtigung. Für Synthesen in größerem Maßstab ist diese höchst interessante Methode allerdings nicht die Methode der Wahl. Die Ausbeuten sind zum Teil zu gering und die Edukte komplizierte und damit teure Bausteine.

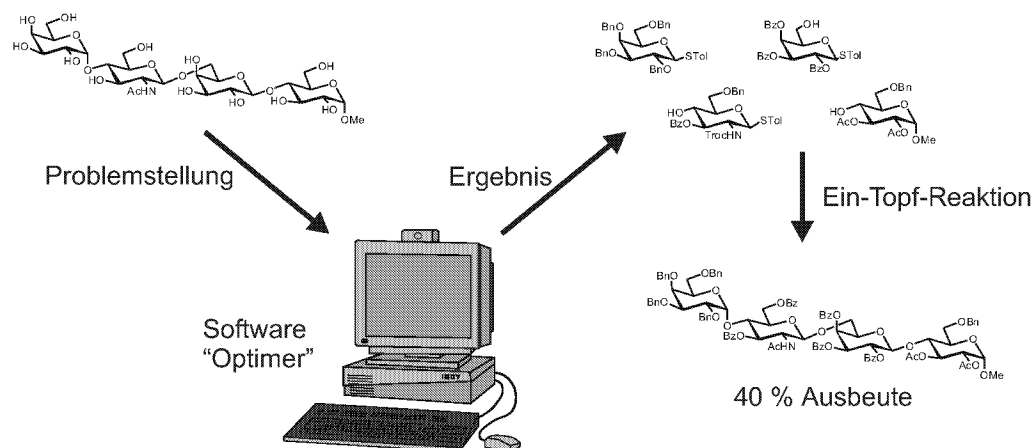


Abbildung 5.3: „Optimizer“-gestützte Synthese eines linearen Tetrasaccharides (Ye & Wong 2000)

5.1.2 Trichloracetimidat-Methode

Im folgenden wird die Trichloracetimidatmethode (Schmidt & Michel 1980) näher beschrieben werden, nicht zuletzt, da sie in der später beschriebenen Synthese eine zentrale Stelle einnimmt.

5.1.2.1 Synthese von Trichloracetimidaten

Zunächst wird der zukünftige Glycosyldonor über eine ungeschützte Hydroxyfunktion, wie in Abbildung 5.4 dargestellt, mit Trichloracetonitril und einer starken Base (zum Beispiel Natriumhydrid) zum entsprechenden Trichloracetimidat umgesetzt. Die resultierenden Trichloracetimide sind stabil und können gut isoliert werden, oft durch einfaches Filtrieren durch Kieselgel.

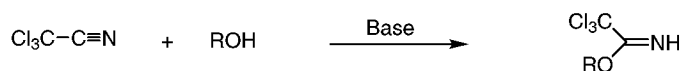


Abbildung 5.4: Allgemeines Reaktionsschema der Synthese von Trichloracetimidaten

Bei Bildung des Acetimidates am anomeren C-Atom eines Zuckers können ein kinetisch und ein thermodynamisch bevorzugtes Produkt entstehen. In Abbildung 5.5 ist dies am Beispiel der Glucose gezeigt. Über die Reaktionszeit und die verwendete Base läßt sich der Reaktionsverlauf steuern. Die beiden anomeren Produkte lassen sich nach Abstoppen der Reaktion säulenchromatographisch trennen (Schmidt 1986). Eine Mutarotation der reinen Produkte findet nicht statt. Die ausgesprochene Stabilität zeigt sich am Beispiel des in Abbildung 5.5 aufgeführten α -Acetimidates, welches bei $-5\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden kann, während das entsprechende α -Glucosylbromid auch bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ nur kurze Zeit stabil ist (Lemieux et al. 1975).

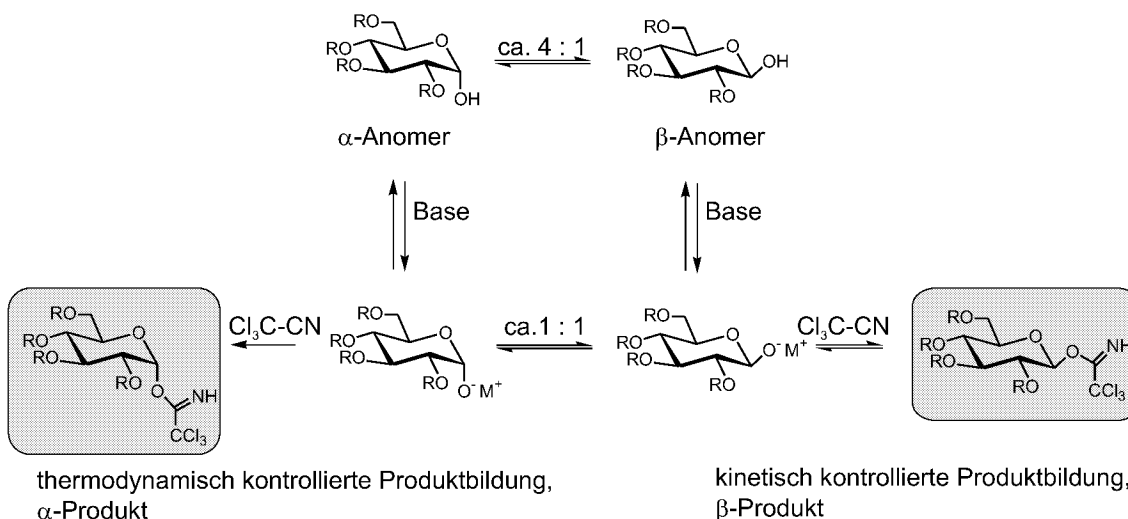


Abbildung 5.5: Thermodynamisch und kinetisch gesteuerte Acetimidatbildung am Beispiel der Glucose, $\text{R}=\text{Bz}$, $\text{M}=\text{Na}$, K (Schmidt 1986)

5.1.2.2 Reaktionen von Trichloracetimidaten

Die so erzeugten Glycosyltrichloracetimide können neben Alkoholen bzw. Hydroxyfunktionen von Zuckern auch mit anderen O-Nucleophilen umgesetzt werden. Abbildung 5.6 zeigt beispielhaft den Umsatz mit Carbonsäuren, Phosphaten und Alkoholen bzw. Zuckern. Die eigentliche Glycosylierung durch O-Glycosyltrichloracetimide bedarf

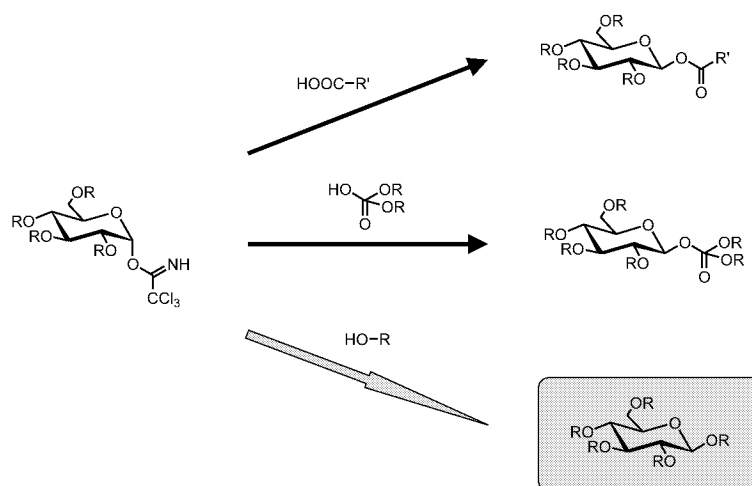
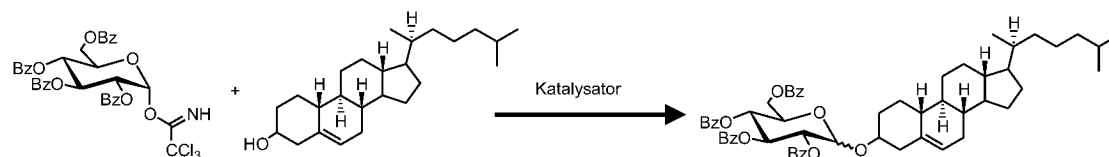


Abbildung 5.6: Reaktion von Glycosyltrichloracetimidaten mit O-Nucleophilen (Schmidt 1986)

eines sauren Katalysators. Bortrifluorid-Etherat bei Temperaturen zwischen -40°C und Raumtemperatur hat sich hier bewährt. Ebenfalls gängig sind Trifluormethansulfonsäure, Toluensulfonsäure, Triethylsilyltrifluormethansulfonat (Triethylsilyltriflat, TESOTf), Trimethylsilyltrifluormethylsulfonat (TMSOTf), Scandiumtriflat oder auch Lithiumperchlorat (Osborne & Khan 1999). Die Stereoselektivität wird auch hier wiederum stark durch einen Nachbargruppeneffekt (Collins & Ferrier 1998) bestimmt. So reagieren die peracetylierten α - und β -Trichloracetimide der Glucose und Galactose aufgrund dieses Effektes der 2-O-Acetylgruppe ausschließlich zu β -Glycosiden (1,2-trans) (Schmidt 1986). Weiter bestimmen Temperatur und Katalysator, ob das thermodynamisch oder das kinetisch bevorzugte Produkt entsteht. Abbildung 5.7 gibt am Beispiel der Reaktion von 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosyltrichloracetimidat und Cholesterol einen Einblick in die Möglichkeiten, die Stereoselektivität zu steuern.

Die Leistungsfähigkeit der Trichloracetimidatmethode konnte unter anderem 1996 von Lassaletta *et al.* (Lassaletta & Schmidt 1996) durch die Synthese einer Globo H Antigen-Vorstufe und 1997 von Castro-Palomino *et al.* (Castro-Palomino *et al.* 1997) durch die Synthese des Gangliosids GM 2 gezeigt werden. Beide Moleküle, siehe Abbildung 5.8, sind tumorassoziiert. Das Globo H Antigen tritt auf menschlichen Brustkrebszellen auf. Das Gangliosid GM 2 tritt ebenfalls auf Zelloberflächen vieler Krebsarten auf und wurde zur Verwendung als Tumorpflanzstoff synthetisiert.



Katalysator	T / °C	t / h	Ausbeute / %	$\alpha : \beta$	Selektivität / %
Toluensulfonsäure	+20	2	70	2 : 1	67 bez. α
Toluensulfonsäure	-10	48	80	1 : 1	50 bez. α
Toluensulfonsäure	-40	36	61	1 : 5	83 bez. β
Bortrifluorid-Etherat	20	20	70	2 : 3	60 bez. β
Bortrifluorid-Etherat	-18	2,5	78	1 : 13	93 bez. β

Abbildung 5.7: Reaktion von 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosyltrichloracetimidat und Cholesterol (Schmidt 1986)

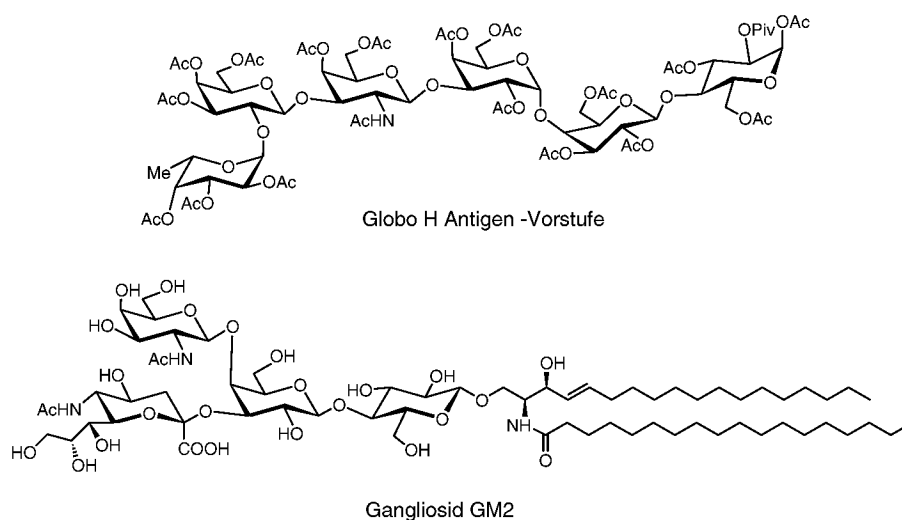


Abbildung 5.8: Globo H-Vorstufe und Gangliosid GM2

5.2 Modelloligosaccharidsynthese

Es wurde zur Realisierung einer chemischen polymer- und membranunterstützten Oligosaccharidsynthese ein geeignetes Modellsystem gesucht, welches relativ einfach zu handhaben ist. Die Trichloracetimidat-Methode wurde hier als Synthese der Wahl herausgegriffen.

Douglas *et al.* beschrieben 1995 die Synthese einer D-Mannopentaose, welche eine Struktureinheit der D-Mannane pathogener Hefen darstellt (Douglas, Whitfield & Krepinsky 1995, Krepinsky, Douglas & Whitfield 1994, Krepinsky 1996). Hierbei wurde polymerunterstützt in homogener Phase gearbeitet, siehe Abbildung 5.9. An MPEG, MW 5000 g/mol, wurde der bereits in Kapitel 3 vorgestellte Dioxyxylyl-Linker synthetisiert. Nachfolgend wurde bei Verwendung von 2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyltrichloracetimidat **17** und Triethylsilyltrifluormethansulfonat als Katalysator eine Mannoseeinheit mit einer Ausbeuten von 92 % an den polymergebundenen Linker geknüpft. Nach Deacylierung in Position zwei mit Ausbeuten zwischen 95 und 99 % mittels DBU¹ wurde durch Zugabe von Diethylether dann die Polarität des Lösungsmittels gewechselt. Das Polymer fiel dabei aus. Trocknen und Umkristallisieren folgten und der Reaktionszyklus, beginnend mit der Glycosylierung, wurde wiederholt. Nach vollendetem Aufbau eines Pentasaccharides in 49 % Gesamtausbeute wurde mittels Hydrierung an Raney-Nickel das Polymer abgespalten. Hierbei wurden auch die in den 3, 4 und 6-Positionen befindlichen Benzylschutzgruppen entfernt. Zur leichteren Charakterisierung wurde peracetyliert, es resultierte das Pentasaccharid **19**.

Die chromatographischen Aufreinigungsschritte konnten — im Vergleich zur klassischen Synthese ohne Polymer — hier schon stark reduziert werden.

Die Technik des PEG-Ausfällens bringt aber auch einige Nachteile mit sich:

- die Ausbeute wird durch Wasserspuren (Luftfeuchtigkeit) oder auch Metallionen stark vermindert,
- PEG fällt in der Regel schleimig aus, besonders auch in Anwesenheit von Wasserspuren,
- Umkristallisieren ist zeitaufwendig, Ausbeuteverluste sind nicht zu vermeiden,
- eine wachsende Kohlenhydratkette sollte — gerade bei sehr großen Oligosacchariden — dazu führen, daß ein Ausfällen zunehmend unvollständiger abläuft.

Diesen Nachteilen stehen nicht zu übersehende Vorteile gegenüber:

- PEG ist billig (ca. 38 DM/kg (Sigma-Aldrich 2000)),
- PEG ist in den meisten organischen Lösungsmitteln homogen löslich, siehe auch Kapitel 3,
- PEG ist chemisch stabil gegenüber den meisten Reaktionsbedingungen, instabil gegenüber z. B. Pyridiniumsalzen,
- PEG läßt sich ausfällen,
- Ultrafiltration von PEG ist möglich,
- eine Analytik ist möglich durch klassische NMR-, UV-, IR- und nun auch HPLC-Technik ohne Abspaltung vom Polymer.

¹ 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en, eine sterisch stark abgeschirmte Base

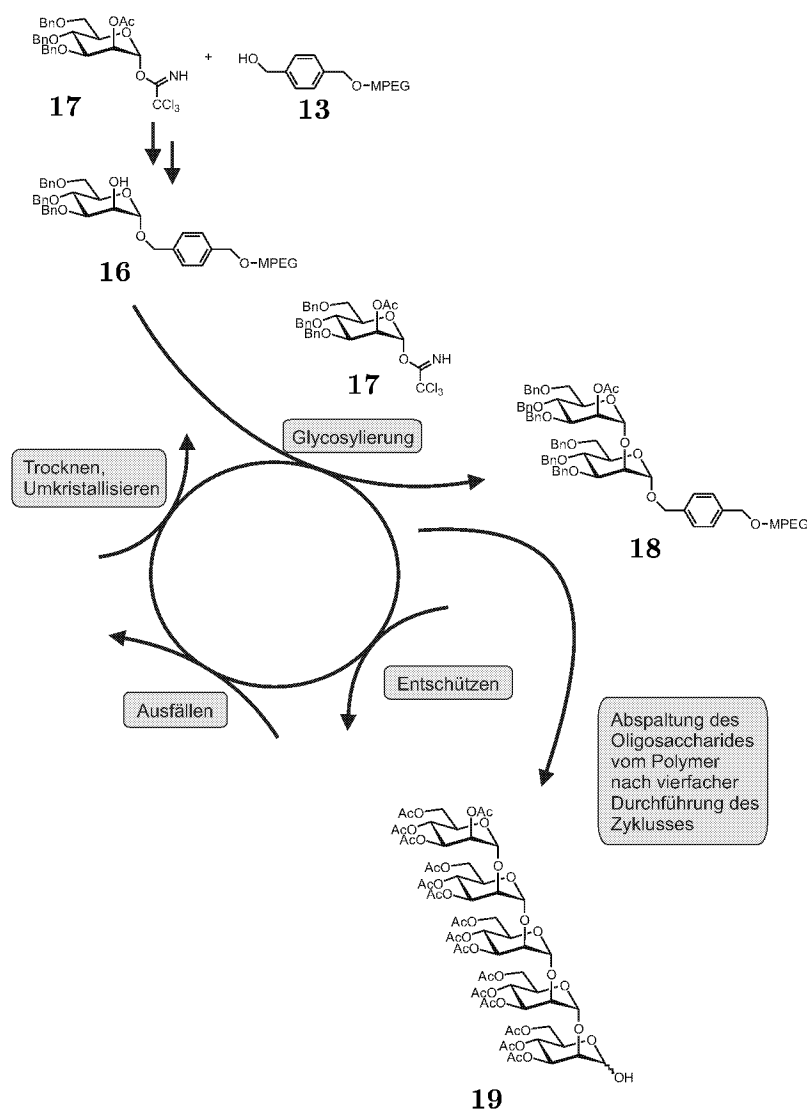


Abbildung 5.9: Tetrasaccharidsynthese an einem homogen löslichen Polymer (Douglas, Whitfield & Krepinsky 1995, Krepinsky, Douglas & Whitfield 1994)

Das Modellsystem zum Aufbau einer α -1,2-verknüpften Oligomannopyranose wurde ebenfalls 1997 von Rademann und Schmidt in einer Synthese an fester Phase (0,6 mmol/g) verwandt (Rademann & Schmidt 1997). Es handelte sich beim Polymer um chlormethyliertes Polystyren-Divinylbenzen-Copolymer, der verwendete Linker war ein Thioether. Das Tetrasaccharid wurde in 34 %iger Gesamtausbeute erhalten. Gleichwohl wird von fast quantitativem Umsatz der Glycosylierungsreaktionen berichtet. Eine Analytik der Reaktion wurde nach Abspaltung vom Träger mittels N-Bromosuccinimid durchgeführt. Heckel *et al.* bedienten sich 1998 ebenfalls dieser Modellsynthese — mit der Abänderung, daß statt einer Acetylschutzgruppe in Position zwei hier eine Phenoxyacetylschutzgruppe verwendete wurde — an einem porösen Glas als Träger (Heckel *et al.* 1998). Wiederum wurde ein Thio-Linker verwendet (0,3 mmol/g) und die Reaktion nach Abspaltung vom Träger mittels Guanidin in DMF durch MALDI-Messungen verfolgt.

5.3 Ergebnisse

Die oben genannten Nachteile der von Krepinsky *et al.* durchgeführten Synthese stehen einer Anwendung in industriellem Maßstab entgegen. Gerade eine dazu einsatzfähige Methode ist aber notwendig, um beispielsweise ein zukünftiges Pharmakon auf Oligosaccharidbasis bereitzustellen. Wie in Abbildung 5.10 dargestellt, stehen neben der Technik des Ausfällens und Umkristallisierens zur Produktaufarbeitung, auch noch Gelpermeationschromatographie und Ultrafiltration zur Verfügung. Die Ultrafiltration ist hierbei die Methode der Wahl, die auch eine Synthese im Produktionsmaßstab und eine mögliche Automatisierung ermöglichen würde.

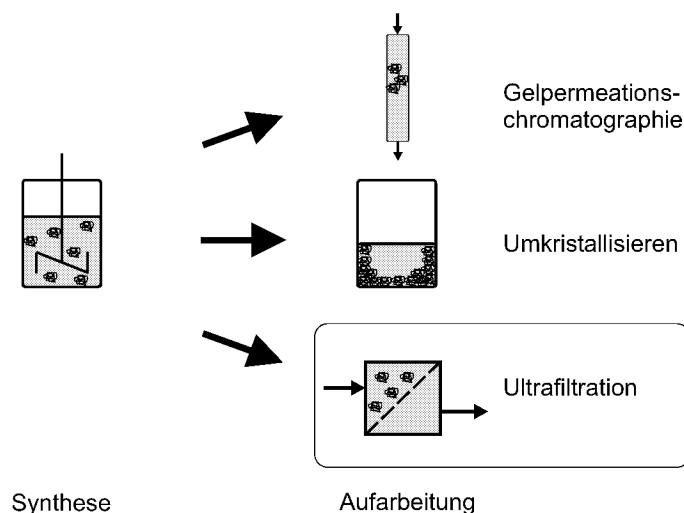


Abbildung 5.10: Aufarbeitung von PEG-gebundenen Molekülen

Durch Einsatz eines homogen löslichen Polymers *in Verbindung mit Ultrafiltration* sollen die oben aufgeführten Nachteile, die durch Ausfällen von PEG entstehen, vermieden werden. Gleichzeitig sollen die Vorteile, die durch das Arbeiten an PEG entstehen, erhalten und erweitert werden. Auf diesem Wege wurde in dieser Arbeit das Tetrasaccharid **20**, wie in Abbildung 5.11 schematisch dargestellt und nachfolgend näher erläutert, synthetisiert.

5.3.1 Membranen

In der hier vorgestellten Synthese wurde als polymerer Träger ein MPEG10.000 (ω -methyliertes Polyethylenglykol, MG 10.000 g/mol) eingesetzt. Wie in Kapitel 4 dargelegt, läßt sich dieses Polymer im organischen Lösungsmittel Acetonitril mittels Ultrafiltrationsmembranen mit hinreichender Retention zurückhalten. Besonders die Membran *Membralox 1 kDa* hat sich hier bewährt. Sie weist bei chemischer Stabilität der Endversiegelungen einen hinreichend guten Transmembranflux von 11,4 bis 22,8 $\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1} \text{bar}^{-1}$ auf. Ein Arbeiten mit Dichlormethan war aufgrund der Trichloracetimidatmethode angestrebt, allerdings nicht möglich, da hier entgegen Herstellerangaben keine Langzeitstabilität gegeben ist. Das Problem ist hier nicht die eigentliche keramische Membran, vielmehr sind die Endversiegelungen der Rohrmodule die Schwachstellen. Je nach Versiegelung kommt es bei Verwendung von organischen Medien zu einem flächigen Ablösen der Versiegelungen

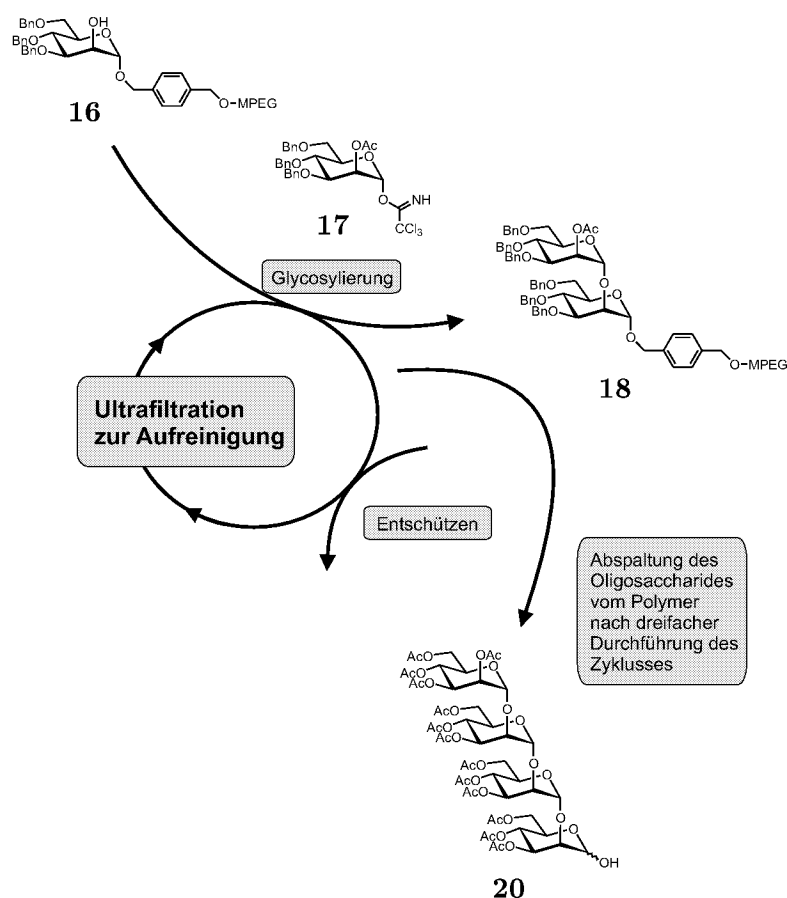


Abbildung 5.11: polymer- und membranunterstützte Synthese des Tetrasaccharides **20**

oder zum Abplatzen der Versiegelungen. In beiden Fällen kam es durch dieser Weise sehr schnell zu einer Zerstörung der Membran.

In Abbildung 5.12 ist in Ausspülkurven die erzielte Retention von 0,996 im Vergleich mit anderen Retentionen dargestellt. Aufgetragen ist der prozentuale Restanteil im Retentat als Funktion der Zeit. Bei der gefundenen Retention von 0,996 resultiert nach Diafiltration über 8 Verweilzeiten noch ein Restanteil von 97 %, wohingegen bei Ausspülen ohne Retention nach der gleichen Anzahl von Verweilzeiten lediglich noch 0,7 % Restanteil verbleiben. Viele sehr niedermolekulare Substanzen, bei denen aufgrund ihrer Größe allein keine nennenswerte Retention erwartet wird, zeigen eine solche aufgrund von ionischen, hydrophoben oder hydrophilen Wechselwirkungen. Nimmt man eine Retention von 0,5 an, so würden nach 8 Verweilzeiten trotzdem lediglich 1,8 % im Retentat verbleiben.

Die Ultrafiltration ist daher zur Aufreinigung in der polymerunterstützten Oligosaccharidsynthese gut geeignet.

5.3.2 Polymer- und membranunterstützte Tetrasaccharid-Synthese

Von kommerziell erhältlichem 3,4,6-Tri-O-benzyl- β -D-mannopyranosyl-1,2-methylorthoester **21** ausgehend wurde zunächst 2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α / β -

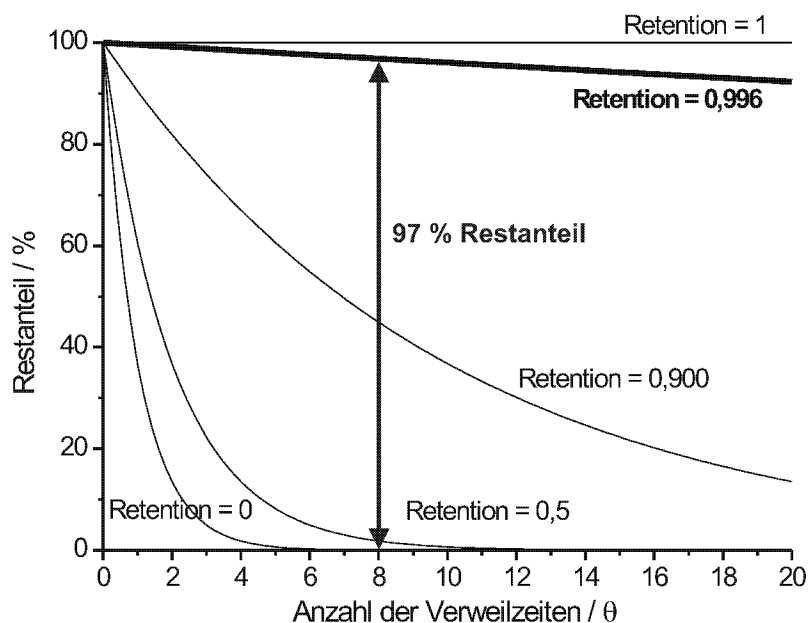


Abbildung 5.12: Ausspülkurven bei verschiedenen Retentionen im Vergleich

mannopyranose **22** dargestellt (80 % Ausbeute). Nachfolgend wurde durch Reaktion mit Trichloracetonitril bei Anwesenheit von DBU durch die thermodynamisch kontrollierte Reaktion 2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl-trichloractimidat **17** mit einer Ausbeute von 40 % synthetisiert (Yamazaki et al. 1990), siehe Abbildung 5.13. Ein Teil des Eduktes wurde über die kinetisch kontrollierte Reaktion zum β -Anomer umgesetzt. Die Trennung der beiden Anomere fand chromatographisch statt.

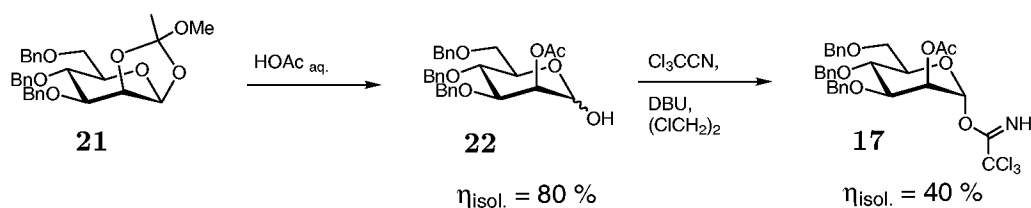


Abbildung 5.13: Synthese von 2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyltrichloractimidat **17**

Ausgehend von 3,0 g polymergebundenem Dioxyxylyl-Linker **13**, MPEG-DOX-OH, siehe Kapitel 3, wurde das geschützte polymergebundene Monosaccharid **23** durch Triethylsilyltrifluormethansulfonat-Katalyse dargestellt, siehe Abbildung 5.14. Eine Aufreinigung fand mittels Ultrafiltration durch eine PoroCer 1kDa-Membran nach Trocknung unter vermindertem Druck und Aufnehmen in 50%-igem Ethanol statt, siehe auch Abbildungen 4.6 und 4.7. Nachfolgende Deacylierung mittels DBU lieferte

das entschützte polymergebundene Monosaccharid **16**. Wiederum wurde ultrafiltriert. Im Rahmen der Meßgenauigkeit wurde sowohl bei der Glycosylierung, als auch bei der Deacylierung per NMR-Untersuchung der Reaktionslösung quantitativer Umsatz ermittelt. Iterativ wurde diese Syntheseabfolge weitergeführt, siehe Abbildung 5.14, bis schließlich das polymergebundene Tetrasaccharid **27** resultierte.

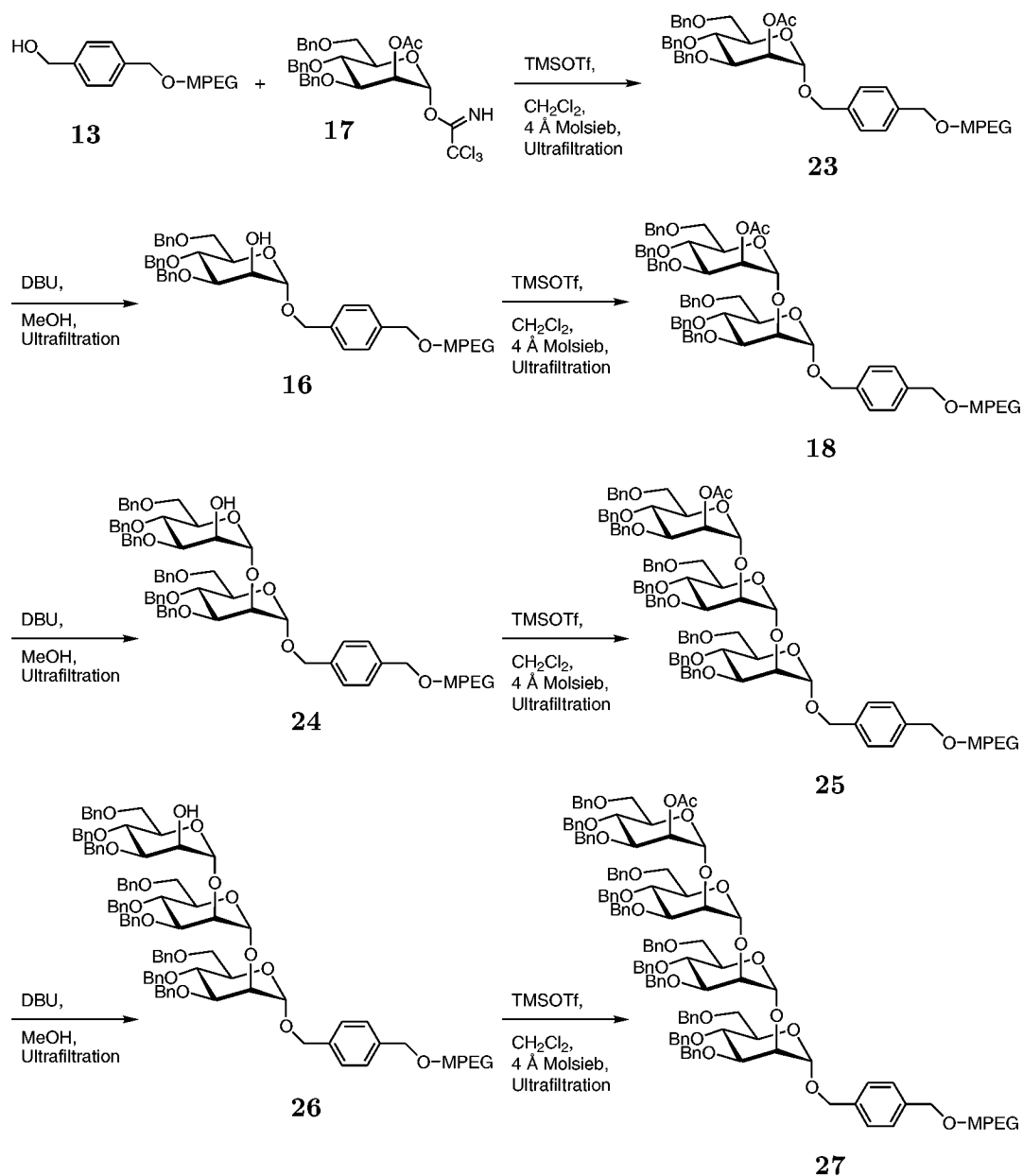


Abbildung 5.14: iterative polymer- und membranunterstützte Synthese des Tetrasaccharides **27**

Das Tetrasaccharid wurde mittels Palladium auf Aktivkohle bei 4,0 bar Wasserstoffdruck vom Polymer hydrogenolytisch abgespalten. Ebenfalls entfernt wurden unter diesen Bedingungen die Benzylschutzgruppen. Eine Peracylieung folgte, siehe Abbildung 5.15.

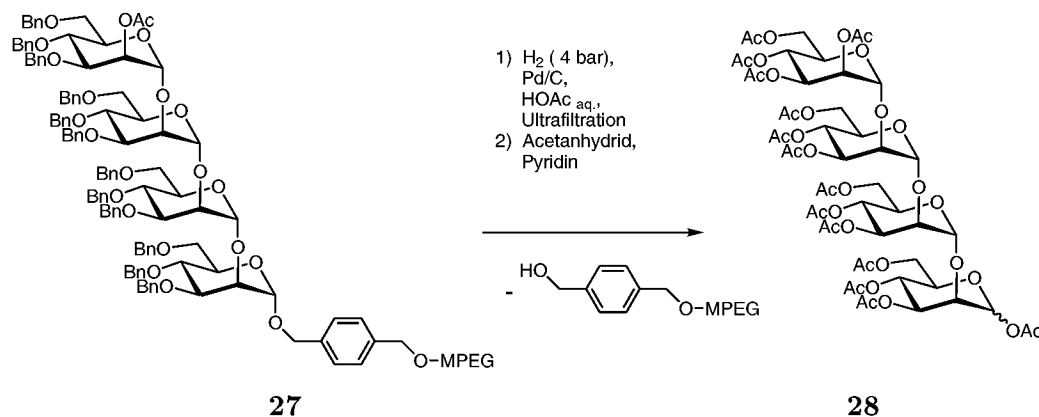


Abbildung 5.15: Abspaltung des Tetrasaccharides **28** vom Polymer

Nach MALDI-Daten lagen 39 % Disaccharid, 44 % Trisaccharid und 17 % Tetrasaccharid **28** vor, siehe Kapitel 9. Bis zum peracylierten Tetrasaccharid **28** sind dies neun Stufen, wenn man die Aufreinigungsschritte unberücksichtigt läßt. Zur Einordnung der Prozentzahl der Ausbeute über alle Stufen sei gesagt, daß eine Ausbeute von jeweils 82 % über neun Stufen zu einer Gesamtausbeute von 17 % führen würde. Hier muß allerdings noch berücksichtigt werden, daß jeweils ein Teil des nach einer Stufe noch vorliegenden polymergebundenen Eduktes im nachfolgenden Reaktionsschritt weiter umgesetzt wird. Die Ausbeute pro Stufe kann daher nur als ungefähre Größe angesehen werden.

5.3.2.1 Analytik

Bei der oben erläuterten Synthese des polymergebundenen Tetrasaccharides **27** wurde eine Reaktionskontrolle per NMR-Analytik durchgeführt. In Abbildung 5.16 sind beispielhaft die Spektren von polymergebundenem acetyliertem Trisaccharid **25** und deacetyliertem Trisaccharid **26** aufgeführt. Der Polymerpeak bei einer Verschiebung δ von 3.64 ppm wurde in diesem Fall z. T. unterdrückt. Leicht vereinfacht geht man dabei so vor, daß man ein Signal der Resonanzfrequenz der Protonen einstrahlt, deren Signal man unterdrücken möchte. Dies führt dazu, daß das betreffende Signal nur noch ansatzweise zu erkennen ist. Hingegen erscheinen die Signale, die man beobachten möchte dadurch deutlicher und sind leichter auszuwerten. Eine gängige Vorgehensweise in der Kohlenhydratchemie ist, die Verfolgung von sogenannten „Reportersignalen“. Dabei handelt es sich um Signale, welche klar von anderen separiert sind und sich für eine eindeutige Aussage über den Reaktionsverlauf gut eignen. In diesem Falle waren dies Signale von Protonen in den Positionen eins und zwei der zuletzt angeknüpften Zuckereinheit. In Abbildung 5.16 sind die verfolgten „Reportersignale“ zwischen Verschiebungen δ von 5,2 und 5,4 ppm eingekreist.

Da diese Analytik für eine effiziente Synthese nicht ausreichend ist, wurde wie bereits in Kapitel 3 beschrieben, eine HPLC-Analytik für polymergebundene Substrate etabliert. Die Vorteile dieser Analytik sind offensichtlich. Neben dem Vorteil der einfachen Durchführung und der Zeitersparnis im Vergleich zur NMR-Analytik, hat man den Vor-

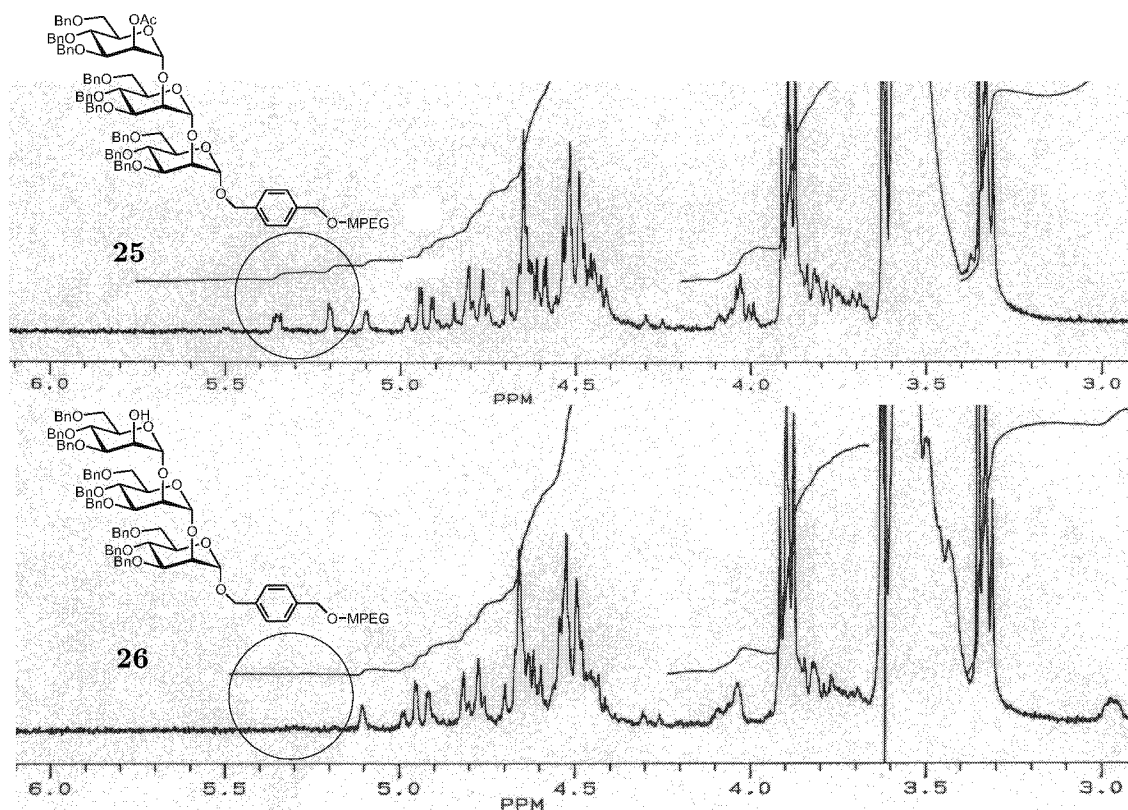


Abbildung 5.16: NMR-Spektren von polymergebundenem acetyliertem Trisaccharid **25** und deacetyliertem Trisaccharid **26**, eingekreist ist die Region der Reportergruppen

teil, daß der Fehler wesentlich geringer ist. Des weiteren muß man — wie es bei der polymerunterstützten Synthese in der Regel gemacht werden muß — bei HPLC-Analyse das Polymer nicht abspalten und kann direkt am Polymer den Umsatz bestimmen. Diese Möglichkeit ist gerade im Hinblick auf eine angestrebte Verwendbarkeit in größeren Maßstabs interessant. Eine leicht durchzuführende und genaue Reaktionskontrolle ist dabei von enormem Vorteil. Erst durch diese Art der Reaktionskontrolle konnte auch nachfolgend der Schwachpunkt der ausgewählten Reaktion deutlich werden. In der oben vorgestellten Reaktionssequenz konnte man nach NMR-Kontrolle immer von quantitativem Umsatz bei Trichloracetimidatglycosylierung und Deacylierung ausgehen. Dies erschien auch sinnvoll, da beide Reaktionen für quantitative Umsätze bekannt sind. Der niedrige Tetrasaccharidanteil von 17 % im Produktgemisch konnte hiermit nicht hinreichend erklärt werden. Nach Versuchen im Membranreaktor konnte nachfolgend mittels HPLC-Analytik der polymergebundenen Substanzen gezeigt werden, daß die Mannosylierung in diesem Falle keineswegs quantitativ ablief.

Aus Abbildung 5.17 ist zu entnehmen, daß die Reaktion von MPEG-DOX-OH **13** mit 2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl-trichloracetimidat **17** unter den zuvor verwendeten Bedingungen im Membranreaktor nur zu einer Ausbeute von ca. 80 % führte. Auch nochmalige Zugabe der gleichen Menge Trichloracetimidat **17** nach 18 h und Katalysator nach 20 h führte nur zu geringer Ausbeutesteigerung. Nach weiterer Katalysator-

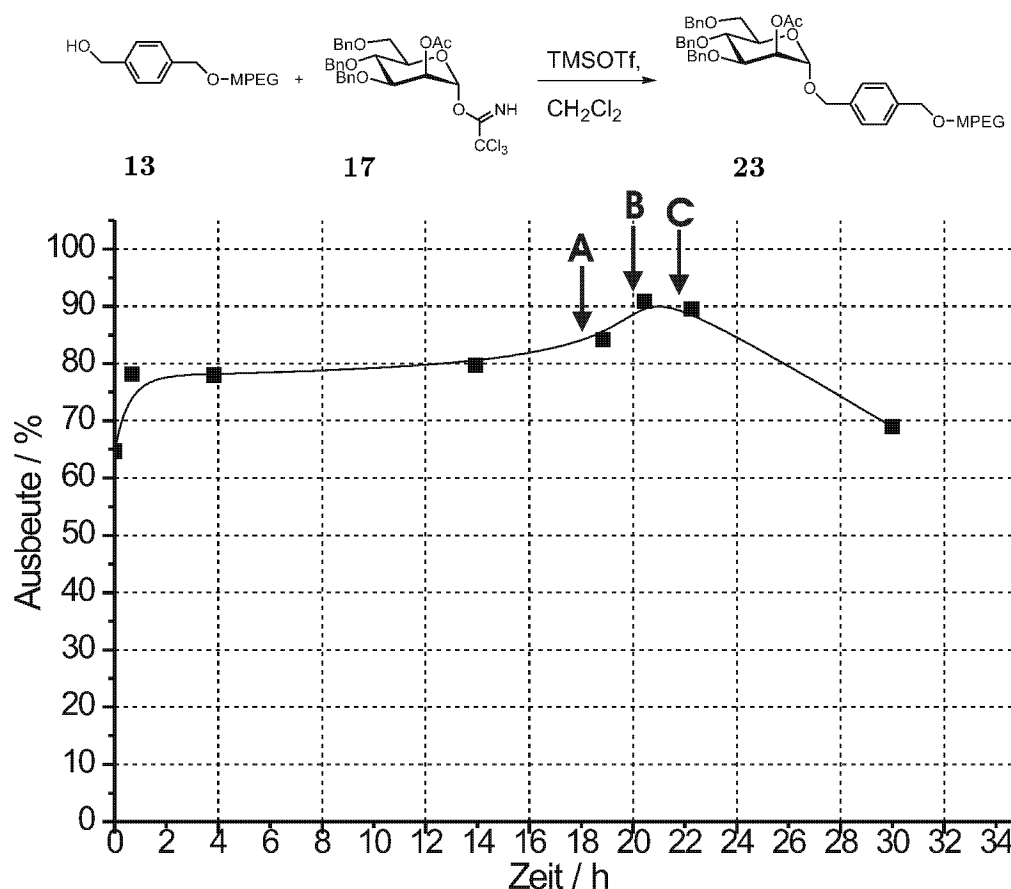


Abbildung 5.17: Umsatzverlauf der Synthese des polymergebundenen Monosaccharides **23** im Membranreaktor nach HPLC-Kontrolle [t=0 h, Zugabe von 0,88 mmol Trichloracetimidat **17** und 0,22 mmol TMSOTf zu 0,44 mmol MPEG-DOX-OH **13**; A: t=18 h, Zugabe von 0,88 mmol Trichloracetimidat **17**; B: t=20 h, Zugabe von 0,22 mmol TMSOTf; C: t=22 h, Zugabe von 0,22 mmol TMSOTf; t=25 h, nach NMR-Daten ist kein Trichloracetimidat **17** mehr vorhanden]

zugabe nach 22 h kam es sogar zu einer Abnahme der Ausbeute, d. h. einem Zerfall des Produktes **23**. Als Grund wird die Hydrolyse des Produktes durch Wasserspuren im Membranreaktor oder, noch wahrscheinlicher, eine Reaktion mit dem Katalysator Trimethylsilyltriflat angenommen. Die Katalysatormengen wurden relativ hoch gewählt, weil beobachtet wurde, daß beim Einsatz im Membranreaktor eine wesentlich geringere Menge nicht zu der gewünschten Reaktion führte. Dies wurde auf eine Desaktivierung des Katalysators durch das Reaktormaterial und wiederum eventuell vorhandenen Feuchtigkeitsspuren im Reaktor zurückgeführt. In Kapitel 3 wurde berichtet, daß nach Mehta *et al.* die Abspaltung des Polymers vom DOX-Linker mittels $Sc(Tf)_3$ möglich ist (Mehta & Whitfield 1998), wobei eine *p*-Toluylmethylschutzgruppe am Produkt erhalten bleibt. Daher überrascht vor diesem Hintergrund die hier beobachtete Spaltung des DOX-Linkers

bei Anwesenheit des Katalysators Trimethylsilyltriflat nicht. Nach 25 h konnte in der Reaktionslösung trotz eingesetzten Überschusses kein Trichloracetimidat **17** mehr detektiert werden, so daß belegt ist, daß unter den Reaktionsbedingungen das Trichloracetimidat **17** auch nur bedingt stabil ist. Da der Katalysator sowohl Bildung als auch Zerfall der Produktes katalysiert, aber andererseits der Zerfall des Eduktes Trichloracetimidat **17** nicht reversibel ist, resultieren nur moderate Ausbeuten. Nach 30 h lag eine Ausbeute von 70 % vor. Dieser unvollständige Ablauf der Reaktion bzw. Zerfall von Edukt **17** und Produkt **23** erklärt den bei der Synthese des polymergebundenen Tetrasaccharides **27** gefundenen Tetrasaccharidanteil von lediglich 17 %.

5.3.2.2 Bewertung

Die Ergebnisse zeigen, daß die entwickelte Methode der polymer- und membranunterstützten Oligosaccharidsynthese möglich, aber mit der verwendeten Glycosylierungsmethode basierend auf Trichloracetimidaten nicht kompatibel ist. Dies offenbarte sich erst durch die im Rahmen der Arbeit entwickelte HPLC-Analytik von polymergebundenen Molekülen und blieb bei der bisher verwendeten NMR-Analytik verborgen. Wesentlich besser geeignet ist eine Zuckersynthese, bei der ein Zerfall von Zuckerdonor und/oder Linkerspaltung nicht auftreten kann und gleichzeitig quantitative Umsätze erzielt werden.

5.4 Zusammenfassung

- Eine **HPLC-Analytik** für an einem homogen löslichen Polymer gebundene Moleküle konnte mittels „**kritischer Punkt**“-**Chromatographie** etabliert werden, siehe Kapitel 3.
- Die Methode der **polymer- und membranunterstützten Synthese** wurde am Beispiel der Synthese des Tetrasaccharides **28** durchgeführt.
- Nach einer neunstufigen Reaktionssequenz mit anschließender Abspaltung von Polymer und Linker konnte das Tetrasaccharid **28** gewonnen werden (nach Abspaltung 39 % Disaccharid-, 44 % Trisaccharid- und 17 % Tetrasaccharidanteil).
- Die Trichloracetimidatmethode ist nicht optimal kompatibel mit der entwickelten Methode.

6 Enzymatische polymerunterstützte Flüssigphasensynthese

Ergebnisse dieses Kapitels sind veröffentlicht in :

Brinkmann, N., M. Malissard, M. Ramuz, U. Römer, T. Schumacher, E. G. Berger, L. Elling, C. Wandrey & A. Liese. 2001. "Chemo-enzymatic synthesis of the Galili epitope $\text{Gal}\alpha(1-3)\text{Gal}\beta(1-4)\text{GlcNAc}$ on a homogeneously soluble PEG polymer by a multi-enzyme system." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 11:2503-2506.

6.1 Enzyme in der Oligosaccharidsynthese

Zur optimalen Verwirklichung der angestrebten membran - und polymerunterstützten Synthesemethodik müssen die folgenden Forderungen an die eigentliche Synthese gestellt werden:

- quantitativer Umsatz,
- möglichst keine Nebenreaktionen am Polymer.

Zur Synthese von Oligosacchariden kann man sich prinzipiell zweier Enzymgruppen bedienen, zum einen der der Glycosidasen, zum anderen der der Glycosyltransferasen. Die obigen Forderungen werden bei der Glycosyltransferase-katalysierten Oligosaccharidsynthese in idealer Weise erfüllt, wie nachfolgend näher erläutert.

6.1.1 Glycosidasen

Glycosidasen sind dem Menschen lange bekannt und schon Michaelis und Menten führten ihre Arbeiten zur Enzymkinetik mit einer Glucosidase durch (Michaelis & Menten 1913). In der Natur fällt der Gruppe der Glycosidasen die Aufgabe zu, vorhandene Oligo- oder Polysaccharide zu spalten bzw. zu trimmen, d. h. diese durch Hydrolyse von glycosidischen Bindungen in ihre Monomere oder Fragmente zu zerlegen. Neben dieser *Hydrolyse* können Glycosidasen aber auch zur Knüpfung von glycosidischen Bindungen dienen. Man spricht dann von der *Reversen Hydrolyse* und der *Transglycosylierung*, siehe Abbildung 6.1. Die Reverse Hydrolyse ist thermodynamisch kontrolliert. Hingegen ist die Transglycosylierung kinetisch kontrolliert. Es kommt zu einer Übertragung eines Glycosids von einem Donor auf einen Akzeptor, nicht so bei der Reversen Hydrolyse. Die Verläufe der Ausbeute beider Reaktionen sind in Abbildung 6.2 gegenübergestellt. Für die Transglycosylierung lassen sich als Zuckerdonoren neben Glycosiden auch aktivierte Zucker, wie Glycosylfluoride oder *p*-Nitrophenolglycoside, verwenden.

Bei der Bildung von glycosidischen Bindungen zeigen Glycosidasen in der Regel eine sehr gute Stereoselektivität bezüglich der anomeren Konfiguration; die Regioselektivität ist allerdings in der Regel niedriger und es kommt zur Bildung von Produktgemischen (Ichikawa, Look & Wong 1992). Die Gleichgewichtsausbeuten bei Glycosidase-katalysierten Reaktionen sind in der Regel sehr gering, oft liegen sie zwischen einigen wenigen bis 20 Prozent. Bessere Ausbeuten lassen sich bei Einsatz der Transglycosylierung erzielen. Sehr vielversprechend ist die Entwicklung von sogenannten Glycosynthasen, einer neuen Klasse von Glycosidase-Mutanten mit extrem herabgesetzter Hydrolaseaktivität. Hier wurde von Ausbeuten bis zu 92 % berichtet (Withers 1999).

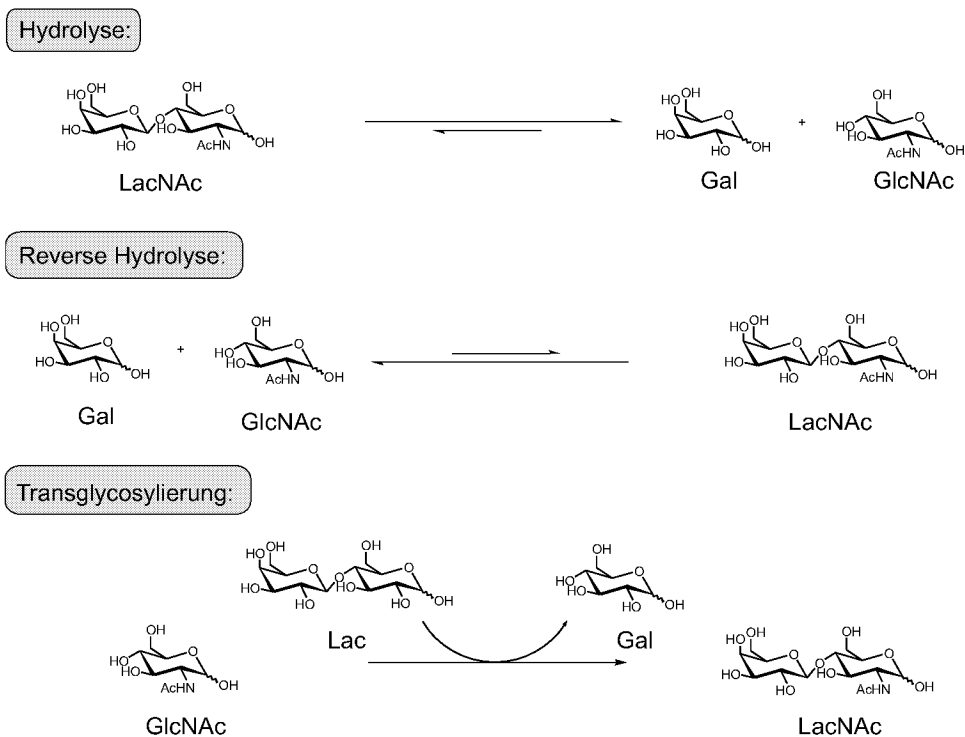


Abbildung 6.1: Glycosidase-Reaktionen am Beispiel von *N*-Acetyllactosamin

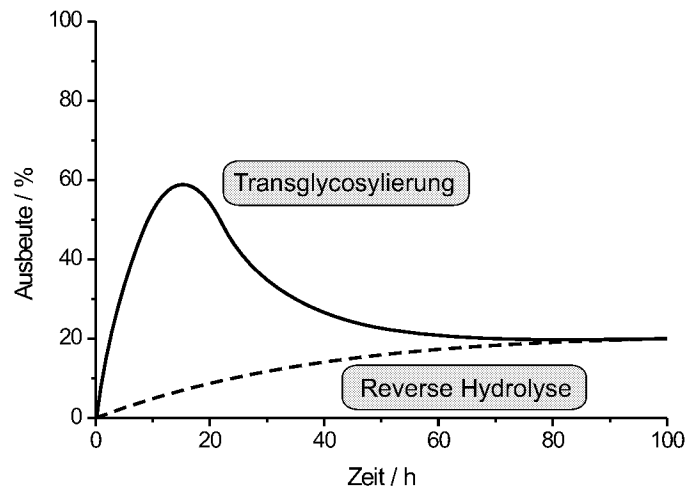


Abbildung 6.2: Schematischer Verlauf der Ausbeute bei Reverser Hydrolyse und Transglycosylierung im Vergleich

6.1.2 Glycosyltransferasen

Glycosyltransferasen werden eingeteilt in Leloir- und Nicht-Leloir-Glycosyltransferasen¹ (Leloir 1971). Nicht-Leloir-Glycosyltransferasen übertragen Monosaccharide ausgehend von Glycosylphosphaten oder Glycosiden und bilden eher die Ausnahme. Wesentlich verbreiteter sind die Leloir-Glycosyltransferasen, welche einen Monosaccharidtransfer von Nukleotidzuckern auf andere Kohlenhydrate, Proteine oder Lipide katalysieren (Kornfeld & Kornfeld 1985). Leloir-Glycosyltransferasen, auf welche im folgenden ausschließlich eingegangen wird, sind für die Synthese von Glycoproteinen und anderen Glykokonjugaten in Säugern verantwortlich. In der Natur kommen neun Nukleotidzucker als natürliche Substrate von Leloir-Glycosyltransferasen in Säugetieren vor (UDP-Glc, UDP-GlcA, UDP-Gal, UDP-GalNAc, UDP-GlcNAc, GDP-Fuc, GDP-Man, CMP-Neu5Ac, UDP-Xyl) (Bülter & Elling 1999). Glycosyltransferasen werden oft membrangebunden im Golgi-Apparat gefunden und liegen auch in löslicher Form in vielen Körperflüssigkeiten, wie Seren oder Milch, vor (Kleene & Berger 1993). Sie bestechen durch die mit ihnen erzielbaren hohen Ausbeuten, sowie durch ihre ausgesprochene Stereo- und Regioselektivität, was sie zu sehr attraktiven Katalysatoren zur Bildung von glycosidischen Bindungen macht. Die Isolierung von Glycosyltransferasen, besonders aus Säugetiergewebe, ist schwierig, da sie nur in geringen Konzentrationen vorkommen und zum Großteil membrangebunden und instabil sind. Besonders zu betonen ist, daß immer mehr Gene, welche Glycosyltransferasen kodieren, aufgeklärt werden. Dadurch steht heutzutage bereits eine sehr große Anzahl dieser Enzyme mit unterschiedlichen Charakteristiken zur Verfügung. Durch rekombinante Klonierungstechniken, sowie die Möglichkeiten homologer und heterologer Genexpression sind viele Glycosyltransferasen schon heute in Mengen verfügbar, die zu deren Einsatz in der präparativen Synthese notwendig sind.

Abbildung 6.3 gibt das allgemeine Reaktionsschema für Leloir-Glycosyltransferasen am Beispiel des *N*-Acetyllactosamin wieder.

¹ Benannt nach L. F. Leloir, der 1970 für ihre Entdeckung den Nobelpreis erhielt.

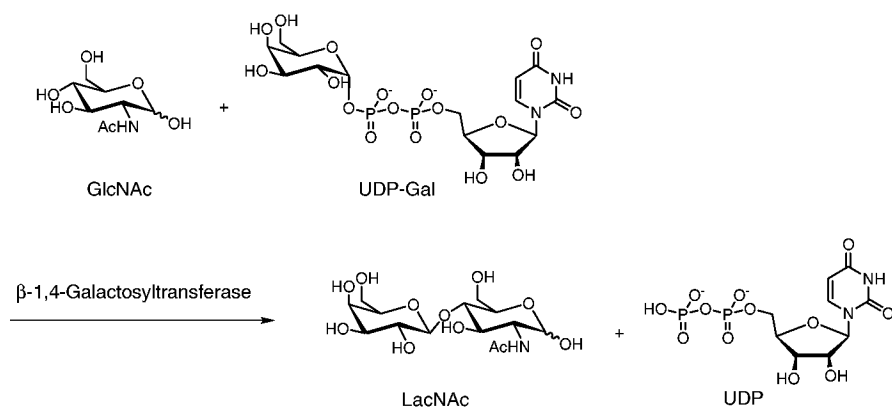


Abbildung 6.3: Glycosyltransferase-Reaktionen am Beispiel der β -1,4-Galactosyltransferase

Die Vor- und Nachteile von Glycosidasen und Glycosyltransferasen sind in Tabelle 6.1 gegenübergestellt.

Tabelle 6.1: Glycosidasen und Glycosyltransferasen im Vergleich

	Glycosidasen	Glycosyltransferasen
erzielbare Ausbeute	-	++
Stereospezifität	+	+
Regiospezifität	-	+
Verfügbarkeit	+	+/-
Enzympreise	+	-
Substratpreise	+	-
Kompatibilität mit organischen Lösungsmitteln	+	-

6.1.3 Nukleotidzucker-Regenerierzyklen

Sämtliche Nukleotidzucker, welche als Cosubstrat zum Einsatz von Glycosyltransferasen nötig sind, sind kommerziell erhältlich. Ihre hohen Preise sind aber mit ein Grund, welcher dem breiten Einsatz von Glycosyltransferasen im Wege steht. In Abbildung 6.4 sind Preise dieser Nukleotidzucker aufgeführt.

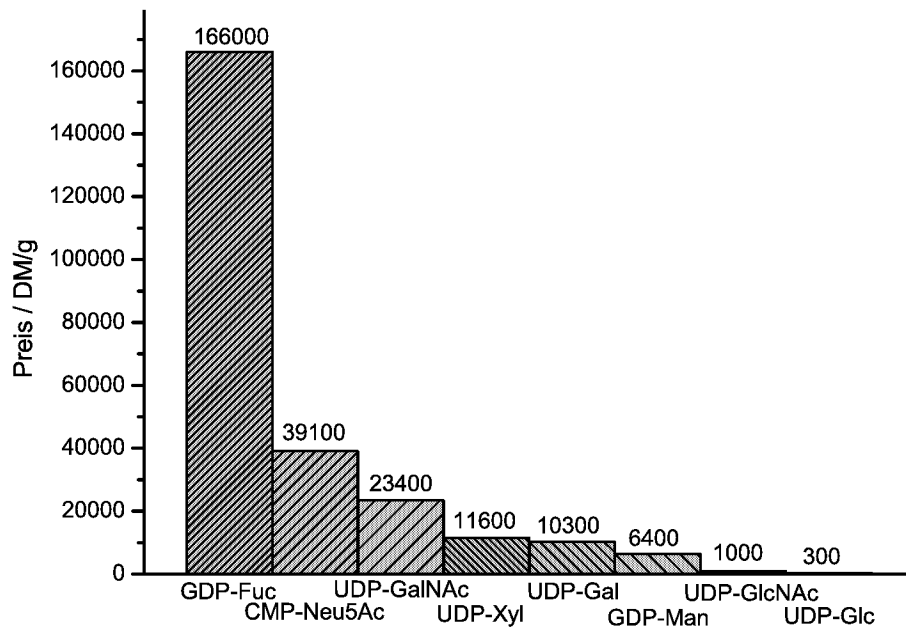


Abbildung 6.4: Katalogpreise von Nukleotidzuckern (Sigma-Aldrich 2000)

Für sieben der neun von Glycosyltransferasen akzeptierten natürlichen Nukleotidzucker — Uridin-5'-diphospho- α -D-glucose (UDP-Glc), Uridin-5'-diphospho- α -D-glucuronsäure (UDP-GlcA), Uridin-5'-diphospho- α -D-galactose (UDP-Gal), Uridin-5'-diphospho-*N*-acetyl- α -D-glucosamin (UDP-GlcNAc), Guanidin-5'-diphospho- β -L-fucose (GDP-Fuc), Guanidin-5'-diphospho- α -D-mannose (GDP-Man) und Cytidin-5'-monophospho-*N*-acetyl- β -D-neuraminsäure (CMP-Neu5Ac) — wurden *in situ*-Regenerationssysteme beschrieben (Bülter & Elling 1999, Koeller & Wong 2000b). Bei Uridin-5'-diphospho-*N*-acetyl- α -D-galactosamin (UDP-GalNAc) und Uridin-5'-diphospho- α -D-xylose (UDP-Xyl) stehen solche Regenerationssysteme in Kombination mit dem Einsatz der entsprechenden Glycosyltransferasen noch aus.

Wong *et al.* (Wong, Haynie & Whitesides 1982) berichtete bereits 1982 von einer *N*-Acetylglucosaminsynthese unter *in situ* Regenerierung der Nukleotidzucker UDP-Glc und UDP-Gal, siehe Abbildung 6.5. Ausgangsmaterial zur UDP-Gal-Regenerierung in diesem Sechsenzymsystem waren Phosphoenolpyruvat und Glucose-6-phosphat.

Ein wesentlich vereinfachter UDP-Gal-Rezyklierzyklus mittels einer Sucrose Synthase wurde von Elling *et al.* 1996 beschrieben (Zervosen & Elling 1996, Hokke *et al.* 1996), siehe Abbildung 6.6. Der Nukleotidzucker UDP-Galactose wird hier ebenfalls *in situ*, allerdings letztlich ausgehend von Sucrose dargestellt. Ferner bedarf es hier lediglich zweier Enzyme zur UDP-Galactose-Bereitstellung, während das von Wong *et al.* entwickelte System hierzu sechs Enzyme benötigt. Neben der drastisch verringerten Anzahl der benötigten

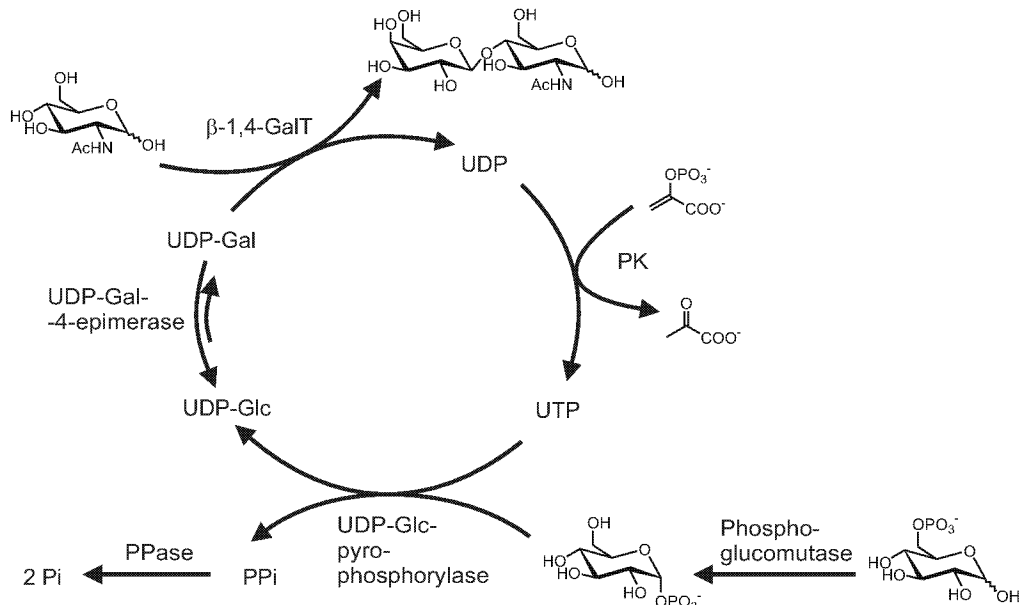


Abbildung 6.5: Enzymatische LacNAc-Synthese mittels UDP-Gal-Regenerierung ausgehend von Glucose-6-phosphat und Phosphoenolpyruvat (Wong, Haynie & Whitesides 1982) [PK: Pyruvatkinase, PPase: Anorganische Pyrophosphatase]

Enzyme ist auch die Verwendung der preisgünstigen Sucrose als Substrat im Vergleich zu Phosphoenolpyruvat und Glucose-6-Phosphat von Vorteil.

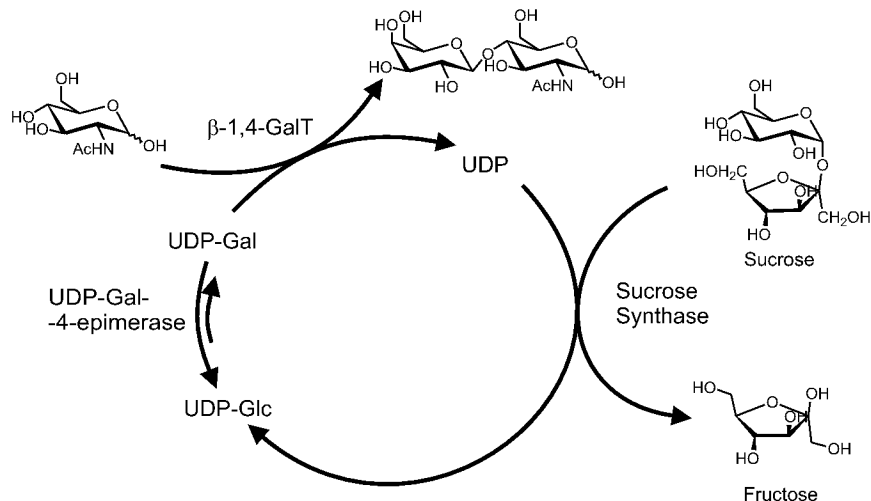


Abbildung 6.6: Enzymatische LacNAc-Synthese mittels UDP-Gal-Regenerierung ausgehend von Sucrose (Zervosen & Elling 1996, Hokke et al. 1996)

UDP-Galactose ist mit Kosten von ca. 6300.- DM/mmol sehr kostenintensiv (Sigma-Aldrich 2000). Verwendet man statt dessen UDP-Glucose, so kann man die Kosten beträchtlich senken, der Preis von UDP-Glucose beträgt ca. 1/30 des UDP-Galactose-

Preises. Ist es möglich, statt UDP-Galactose oder UDP-Glucose die extrem preisgünstige Sucrose (Haushaltszucker) zu verwenden, so liegt man mit einem Preis von 0,013 DM/mmol bei ca. 1/480.000 des UDP-Galactose-Preises, siehe Abbildung 6.7. Dies rechtfertigt auch den Einsatz der Enzyme UDP-Galactose-4-Epimerase und Sucrose Synthase.

In der vorliegenden Arbeit wurde, wie nachfolgend noch näher erläutert, das *in situ*-UDP-Gal-Regenerationssystem mittels Sucrose-Synthase verwendet.

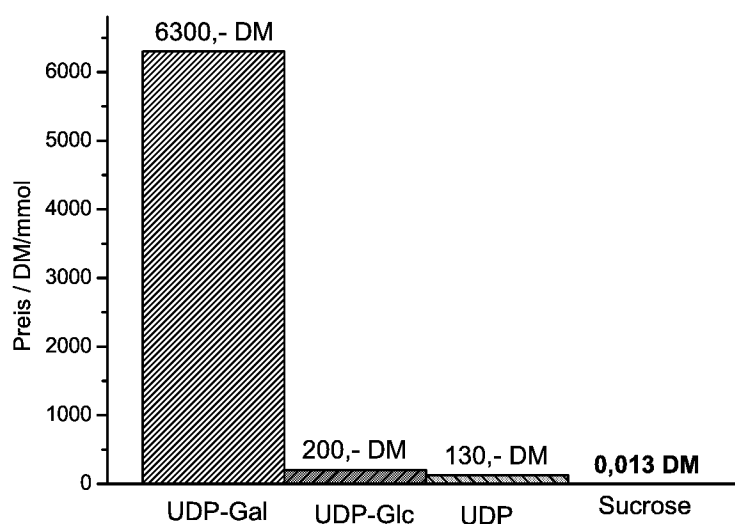


Abbildung 6.7: Katalogpreise von Substraten zur Generierung von Galactoseeinheiten in Oligosacchariden (Sigma-Aldrich 2000)

6.2 Enzymatische Modelloligosaccharidsynthese

In Kapitel 1 wurde bereits die Bedeutung des α -Gal-Trisaccharides **1** — oft auch als Galili-Epitop bezeichnet — im Hinblick auf Xenotransplantationen erläutert. Die in Abbildung 6.8 dargestellte polymerunterstützte Synthese dieses Zielmoleküls mit *in situ*-Regenerierung des Nukleotidzuckers UDP-Gal (nicht dargestellt) wurde als Modellsystem für die Anwendung der membran- und polymerunterstützten Flüssigphasensynthese von Oligosacchariden ausgewählt. Der Vorteil solch einer Synthesestrategie liegt in der Arbeits- und damit Kosteneinsparung bei der Aufarbeitung. Dieser entscheidende Vorteil kommt besonders bei einer Darstellung größerer Mengen von wesentlich größeren Oligosacchariden, als dem hier beispielhaft dargestellten, zum Tragen. Bei der hier durchgeführten regio- und stereoselektiven Synthese handelte es sich um eine Ein-Topf-Reaktion. Die Vorteile einer polymer- und membranunterstützten Synthese würden bei einer notwendigen Aufreinigung zwischen den einzelnen Schritten noch wesentlich deutlicher werden.

Ausgehend von polymergebundenem *N*-Acetylglucosamin wurde mittels der Enzyme β -1,4-GalT und α -1,3-GalT das polymergebundene Trisaccharid **29** synthetisiert. Das Cosubstrat UDP-Galactose wurde *in situ* durch einen Regenerationszyklus letztlich aus Saccharose durch die Enzyme Sucrose Synthase und UDP-Gal-4-Epimerase bereitgestellt.

Elling *et al.* (Hokke *et al.* 1996) konnte bereits eine entsprechende Synthese des Galili-Trisaccharides **1** ausgehend von *nicht-polymergebundenem* *N*-Acetylglucosamin verwirklichen. Es handelt sich dabei um eine potente Synthese, um auch präparative Mengen

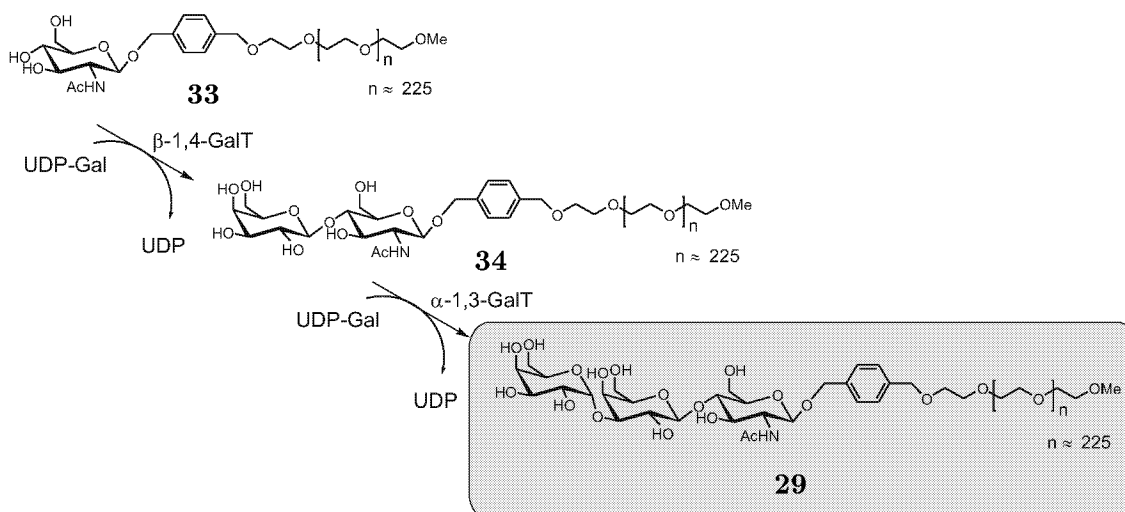


Abbildung 6.8: Enzymatische Synthese des polymergebundenen Modelloligosaccharides **29**

darzustellen. Hier sollte diese Synthese wieder aufgegriffen und dann aber mit Membran- und Polymerunterstützung durchgeführt werden.

6.3 Substratsynthese

Bei der Darstellung des polymergebundenen *N*-Acetylglucosamin ist es essentiell, daß die Kohlenhydrateinheit ausschließlich β -gebunden vorliegt. Vom verwendeten Enzym β -1,4-Galactosyltransferase ist bekannt, daß es ausschließlich β -gebundene Substrate akzeptiert.

Freies *N*-Acetylglucosamin liegt in (deutertem) Wasser gelöst bei 40 °C zu 68 % als α -Pyranose und zu 32 % als β -Pyranose vor, Furanosen liegen nicht vor (Angyal 1984). Durch Mutarotation wird die nicht umgesetzte α -Form in einem vorgelagerten Gleichgewicht teilweise in die β -Form überführt. Hierdurch ist ein quantitativer Umsatz von freiem *N*-Acetylglucosamin durch das Enzym β -1,4-Galactosyltransferase möglich. Solch ein Ablauf ist beim polymergebundenen *N*-Acetylglucosamin nicht möglich, da eine Mutarotation infolge der Anbindung hier nicht erfolgen kann. Folglich muß schon bei der Synthese des polymergebundenen *N*-Acetylglucosamin darauf geachtet werden, daß ausschließlich das β -Anomer entsteht.

Wie in Abbildung 6.9 dargelegt, wurde ausgehend von kommerzieller 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose **30** nach Horton (Horton 1966) 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- α -D-glucopyranosylchlorid **31** dargestellt (32 % Ausbeute). Weiter wurde zurückgehend auf Arbeiten von Hodosi und Krepinsky (Hodosi & Krepinsky 1996) dann eine Anbindung an den polymergebundenen Dioxyxylyl-Linker **13** (siehe Kapitel 3) Silbertriflat-katalysiert in Dichlormethan durchgeführt. Diese Anbindung an das Polymer gelang in nahezu quantitativer Ausbeute (97 %). Die Synthese wurde ferner dahingehend so abgeändert, daß es auch möglich ist, lösungsmittelfrei bei 70 °C in einer PEG-Schmelze zu arbeiten. Hierdurch ist die Synthese gerade in größerem Maßstab wesentlich erleichtert. Nachfolgend wurde mittels DBU in Methanol in 3-, 4- und 6-Position entschützt. Es resultierte so quantitativ mit β -gebundenem *N*-Acetylglucosamin beladenes ω -Methoxy-Polyethylenglykol

10.000, im folgenden als GlcNAc β -DOX-MPEG **33** oder auch MPEG-DOX-GlcNAc **33** abgekürzt. Das Aufreinigen wurde mittels Ausfällen aus apolarem absolutem Lösungsmittel — mittels Diethylether, Methyl-*tert*-butylether oder Hexan — und anschließendem Umkristallisieren aus absolutem Ethanol oder, wesentlich eleganter und einfacher, unter Verringerung von Ausbeuteverlusten, mittels Ultrafiltration durchgeführt. Bei der Arbeitsweise des Ausfällens waren Ausbeuteverluste nicht nur durch Feuchtigkeitsspuren bedingt, sondern vor allem durch das Vorhandensein von Metallionen, siehe Kapitel 3. Dies führte dazu, daß das Produkt nicht kristallin anfiel, vielmehr lag es in der Regel voluminös wachsig bis schleimig vor. Typische Ausbeuten der Aufreinigung mittels Ausfällen lagen bei 70 %, zum Teil auch darunter. Der Einsatz von Ultrafiltrationsmembranen Pellicon XL 5 kDa für wäßrige Aufarbeitung und Membralox 1 kDa für eine Aufarbeitung in organischen Medien schaffte hier Abhilfe. Typische Ausbeuten der Aufreinigung lagen hier — bei einfacher Vorgehensweise — bei bis zu 90 %.

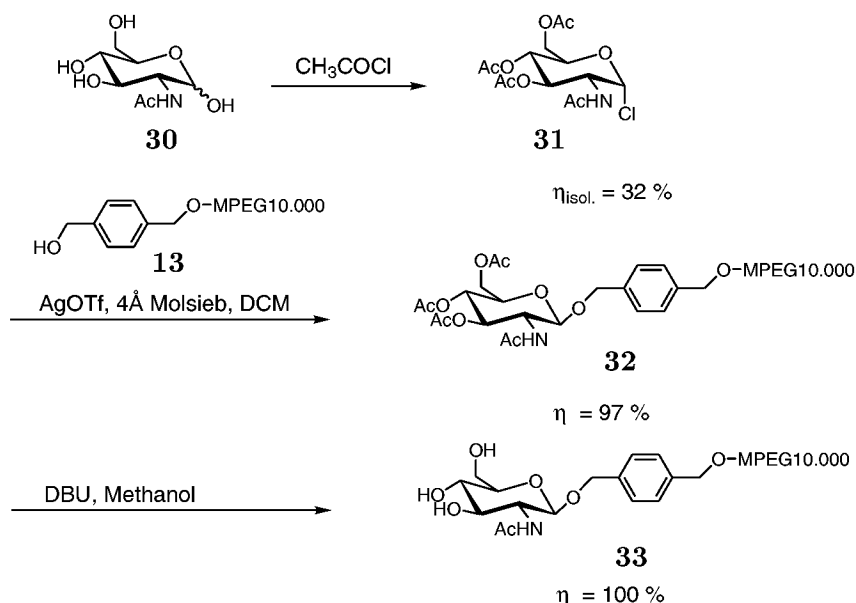


Abbildung 6.9: Synthese des polymergebundenen *N*-Acetylglucosamin GlcNAc β -DOX-MPEG **33**

6.4 Bereitstellung der Enzyme

Die zur Durchführung der α -Gal-Trisaccharidsynthese verwendeten Enzyme

- β -1,4-Galactosyltransferase,
- α -1,3-Galactosyltransferase,
- Sucrose Synthase,
- UDP-Galactose-4-Epimerase

werden nachfolgend vorgestellt.

6.4.1 β -1,4-Galactosyltransferase

Das Enzym β -1,4-Galactosyltransferase (β -1,4-GalT), EC 2.4.1.38, katalysiert die Bildung einer β -1,4-glycosidischen Bindung ausgehend von dem Nukleotidzucker UDP-Galactose und *N*-Acetylglucosamin als Standardsubstrat, siehe Abbildung 6.3. Es sind sechs humane β -1,4-GalT bekannt (Sato & Furukawa 1999), bei der in dieser Arbeit verwendeten handelt es sich um die sogenannte humane β -1,4-GalT I (Schumacher 1999).

Die Klonierung der vollständigen humanen β -1,4-GalT wurde 1988 durch Masri et al. durchgeführt (Masri, Appert & Fukuda 1988). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete β -1,4-GalT wurde in *Escherichia coli* JM109 als Fusionsprotein exprimiert. Dieses Fusionsprotein besteht aus der *N*-terminal um 32 Aminosäuren verkürzten humanen β -1,4-GalT und einem Pre-Pro-Peptid einer Lipase aus *Staphylococcus hyicus*. Durch das Signalpeptid — die Pre-Sequenz der Lipase — kommt es zu einer Sekretion des Fusionsproteins in den periplasmatischen Raum von *E. coli*. Dort findet dann die weitere Prozessierung (Faltung des Proteins, Einführung einer Disulfidbrücke) und auch eine Abspaltung des Pre-Peptides statt. Das Pro-Peptid wird im Laufe der Aufarbeitung — bei der Säulenchromatographie am IMAC-Material² Streamline Chelating — abgespalten und abgetrennt. Das Molekulargewicht des Fusionsproteins ohne Signalpeptid beträgt 63,7 kDa. Nach Abspaltung des Pro-Peptids verbleibt ein Molekulargewicht der Galactosyltransferase von 40,8 kDa. Durch das Vorhandensein eines Lac-Promotors auf dem Plasmid ist eine Induktion durch den natürlichen Induktor Lactose oder auch den nicht-natürlichen Induktor Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) möglich. Des weiteren befindet sich als Selektionsmarker noch ein Gen zur Ampicillinresistenz auf dem Plasmid (Näheres dazu im Anhang in Kapitel 9).

Zuvor wurde die humane β -1,4-GalT I u. a. auch in eukaryontischen Zellen überexprimiert, so in *Saccharomyces cerevisiae* (Zigova et al. 1999). Die in eukaryontischen Systemen erzielten spezifischen Ausbeuten sind in der Regel höher als bei Expression in *E. coli*, da sich dort häufig inaktive, sogenannte „inclusion bodies“ bilden, was auf das Enzymausstattung von *E. coli* zurückzuführen ist (Schumacher 1999). Die Aufreinigung des Enzyms aus *Saccharomyces cerevisiae* gestaltet sich jedoch ungleich schwieriger als die bei rekombinanter Darstellung in *E. coli*. Zudem konnten Elling et al. mit dem in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stamm sehr hohe spezifische Aktivitäten von bis zu 31 mU/mg_{Protein} erzielen (Schumacher 1999).

² IMAC = Immobilized Metal Affinity Chromatography

Ausgehend von Arbeiten aus dem Arbeitskreis Elling *et al.* erfolgte die Bereitstellung der humanen β -1,4-GalT nach dem in Abbildung 6.10 dargestellten Fließbild mittels *E. coli* JM109 pLGalT Δ 38.

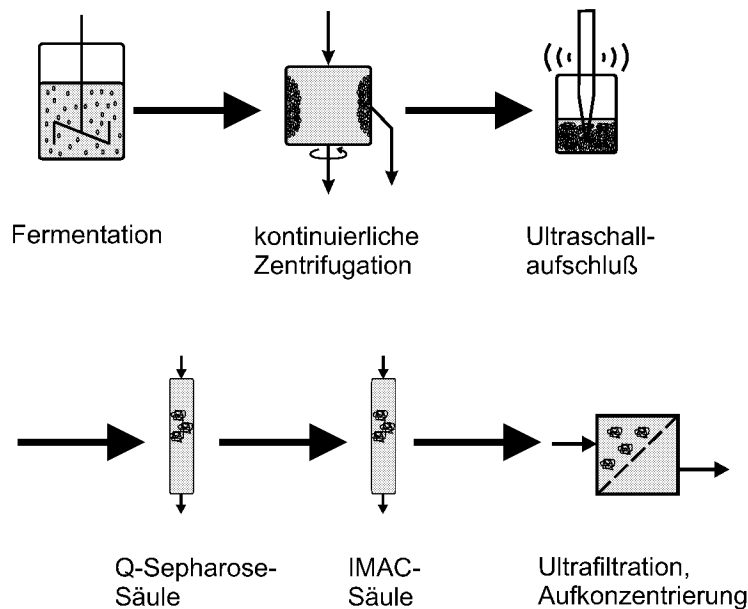


Abbildung 6.10: Fließbild zur β -1,4-GalT-Produktion

6.4.1.1 Fermentation von *E. coli* JM109 pLGalT Δ 38

Es wurde eine 200L-*E. coli*-Fermentation mit Temperatur- und pH-Regelung durchgeführt. Abbildung 6.11 zeigt den verwendeten 300L-Fermenter (mittig) und die dazugehörige Steuereinheit (links).

Den Verlauf der Fermentation bezüglich Glucose-Konzentration, OD_{650} ³ und β -1,4-Galactosyltransferase-Gesamtmenge gibt Abbildung 6.12 wieder. Um Stämme, welche das Plasmid verloren haben, an der Vermehrung zu hindern, wurden dem Medium 100 mg/L Ampicillin zugesetzt (Selektionsmarker), gegen das eine Resistenz auf dem Expressionsvektor integriert ist. Die fermentationsrelevanten Parameter wurden zum Teil online gemessen und per Messdatenerfassungsprogramm MEDUSA aufgezeichnet (T, pH, pO_2 , p), ein Teil wurde nach Probenahme verfolgt (OD_{650} , Enzymaktivität, Glucosekonzentration). 8,5 Stunden nach Animpfen war keine Glucose im Medium mehr zu detektieren und nach 10,3 Stunden wurde mit IPTG (0,2 mM) eine β -1,4-GalT-Produktion induziert. Das Enzym liegt intrazellulär vor. Nach weiteren 12,5 Stunden wurden die Zellen per kontinuierlicher Zentrifuge vom Medium getrennt. Es resultierten insgesamt 1970 Units humaner β -1,4-GalT in 1730 g Feuchtbioasse.

150 g von 1730 g Feuchtbioasse wurden zur Enzymaufreinigung verwendet. Nach Aufschluß der Zellen mittels Ultraschall schloß sich eine zweistufige säulenchromatographische Aufreinigung des Enzyms an. Im ersten Schritt wurde mittels einer Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose FF (Fa. Pharmacia) aufgereinigt. Hierbei kam

³ Die Optische Dichte (OD), oder Trübung, bei 650 nm ist bei Extinktion bis ca. 0,5 proportional der Biomasse. Bei höheren Werten wurde verdünnt, um in diesem Bereich zu bleiben.

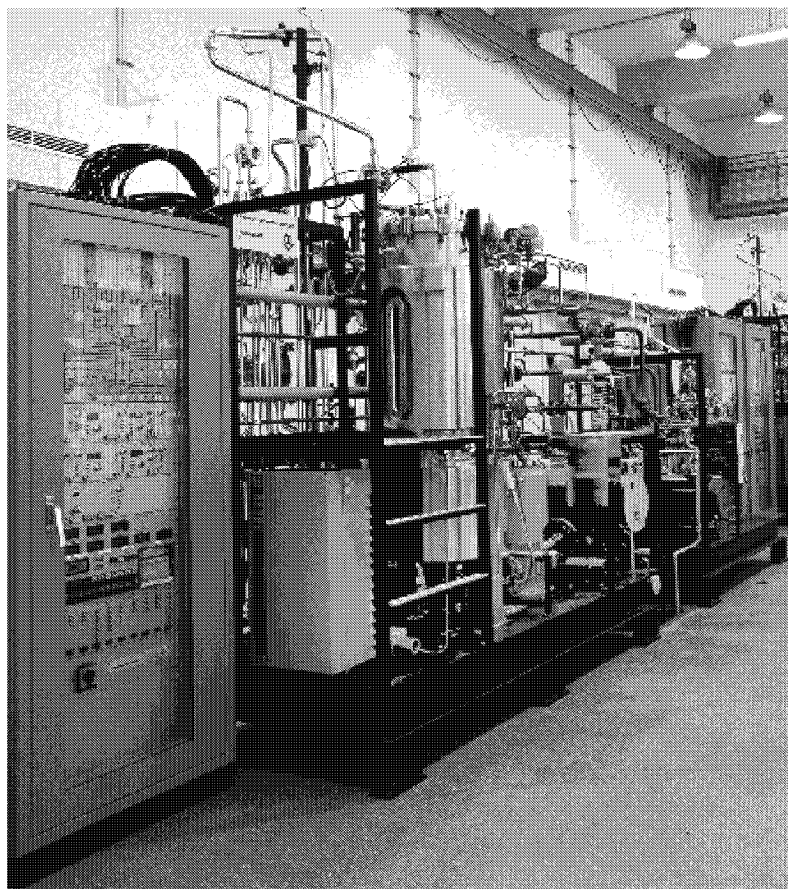


Abbildung 6.11: Photo des zur Fermentation von *E. coli* verwendeten Fermenters

es zur Adsorption von unerwünschten Substanzen — hauptsächlich Proteinen — auf der Säule, das Zielprodukt β -1,4-GalT passierte die Säule. Die zweite Stufe bestand aus einer Säulenchromatographie mit IMAC-Säulenmaterial (Streamline Chelating, Fa. Pharmacia). Die Säule wurde mit Zinkionen beladen, welche vom Säulenmaterial chelatisiert wurden. Bei Einspülen der Enzymlösung kam es zu einer Anbindung des Enzyms über die Zinkionen. Nach Ausspülen von nicht-bindenden Verunreinigungen wurde das Produkt β -1,4-GalT mittels einer 25 mM Imidazol-Lösung eluiert. Die Produktfraktion wurde ferner mittels Ultrafiltration eingeeengt. Hierzu wurde ein cross flow-Pellicon-Modul (Ausschlußgrenze 10 kDa) mit einer Polyethersulfonmembran verwendet. Schumacher *et al.* berichteten, daß bei Verwendung von Polyethersulfon keine membranbedingte Denaturierung des Enzyms bei der Aufkonzentrierung auftritt, nicht so bei anderen Membranmaterialien (Schumacher 2000). Die Enzymlösung wurde bei -20°C in 50 % Glycerin; 2,5 mM MnCl_2 ; 1 mM Mercaptoethanol; 12,5 mM Imidazol und 25 mM HEPES-Puffer, pH 8, gelagert. Es resultierten 58,7 U β -1,4-Galactosyltransferase mit einer spezifischen Aktivität von 381 mU/mg.

Den Verlauf der Aufreinigung gibt Tabelle 6.2 noch einmal detailliert wieder. Aus der Tabelle wird ersichtlich, daß die β -1,4-GalT relativ labil ist. So nahm nach Einfrieren ohne Glycerin-Zusatz bei -20°C (20 h) und weiterem fünfzehnstündigem Lagern des Enzyms bei 4°C die Aktivität um 54 % ab.

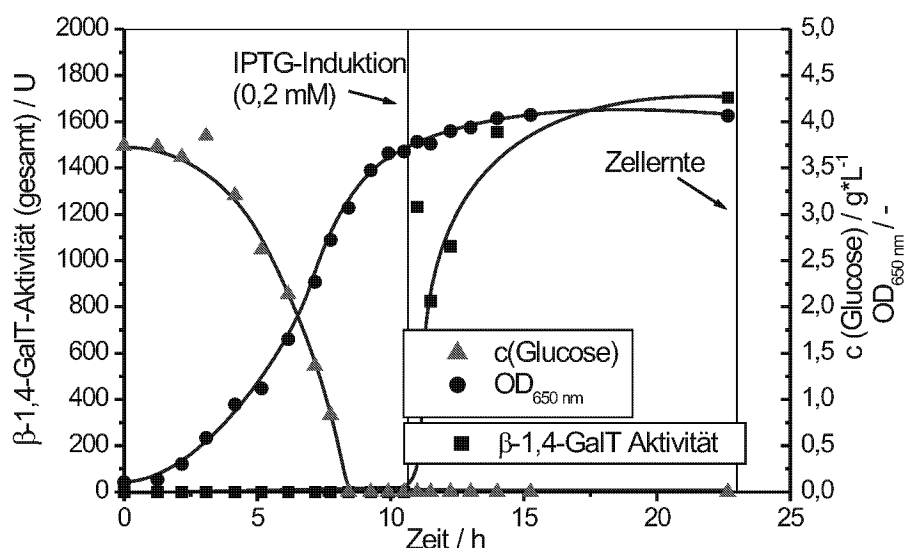


Abbildung 6.12: Verlauf der Fermentation von *E. coli* zur Produktion des Enzyms β -1,4-GalT [*E. coli* JM109 pLGalT Δ 38; 200 L LB-Medium; 5 g/L Glucose; 2 L Inokulum; T = 37 °C; pH_{soll} = 7 (geregelt, NaOH); 500 rpm; 80 % O₂]

Tabelle 6.2: Detaillierter Verlauf der β -1,4-GalT-Aufreinigung ausgehend von 150 g Feuchtbio­masse

Aufreinigungsstufe	Gesamt- aktivität U	Volumen mL	spez. Aktivität mU/mL	Ausbeute %
nach Aufschluß	171,5	720	0,238	100
nach Q-Sepharose-Säule	172,7	1000	0,173	101 ^a
nach IMAC-Säule	143,1	300	0,477	83
nach unstabilisiertem Lagern bei -20 °C (20 h) und 4 °C (15 h)	65,7	300	0,219	38
nach Aufkonzentrieren, Ultrafiltration	58,7	53	1,107	34

^a höherer Meßwert u. U. durch Aktivierung in anderem Medium o. ä.

In Langzeitstabilitätstests konnte nach einjähriger Lagerung bei -20 °C keine Desakti­vierung der β -1,4-GalT festgestellt werden (in 50 % Glycerin; 25 mM Imidazol; 250 mM NaCl und 50 mM HEPES-Puffer, pH 8, mit und auch ohne 1 mM Mercaptoethanol und 2,5 mM MnCl₂).

Aus Abbildung 6.13 ist zu entnehmen, daß unter Reaktionsbedingungen eine Stabilisie­rung des Enzyms sehr gut durch Zusatz von 1 g/L BSA⁴ erfolgen kann. Die Halbwertszeit der β -1,4-GalT-Aktivität läßt sich so um den Faktor 2 auf 3,7 Tage steigern. Zusätze von Sucrose oder PEG5.000 waren erfolglos, Trehalose und Glycerin hatten einen desak-

⁴ BSA = bovine serum albumin

tivierenden Einfluß. Einen Einfluß hat möglicherweise die Belegung der Oberfläche des Probengefäßes durch Protein. An freien Oberflächen kommt es im allgemeinen sehr leicht zur Enzymdesaktivierung. Dies kann sehr oft, wie auch im hier vorliegenden Fall, durch Zusatz von BSA, d. h. Belegung der Oberfläche mit Fremdprotein, reduziert werden.

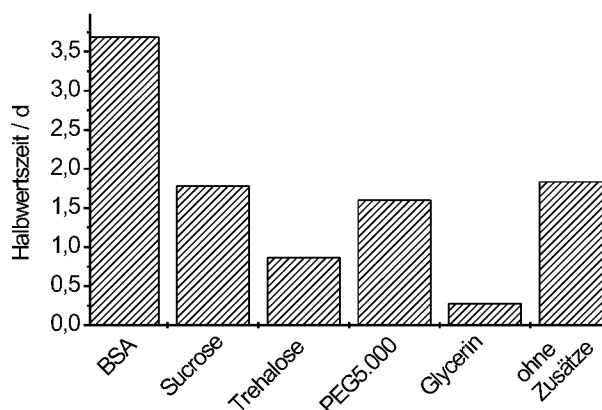


Abbildung 6.13: Halbwertszeiten der β -1,4-GalT-Aktivität bei verschiedenen Zusätzen [100 mM HEPES, pH 8,0; T = 37 °C; BSA: 1 g/L; Sucrose: 3,9 g/L; Trehalose: 3,9 g/L; Glycerin: 50 vol%; PEG5.000: 3,9 g/L]

Zur Bestimmung des optimalen Arbeitsbereiches wurden Maxima bezüglich Aktivität und Stabilität für pH-Wert und Temperatur bestimmt.

6.4.1.2 pH-Optimum

Aus Abbildung 6.14 geht hervor, daß das Aktivitätsmaximum der β -1,4-GalT bezüglich pH-Wert bei pH 8,0 liegt (in Übereinstimmung mit (Schumacher 1999)). Ein Arbeitsbereich zwischen 7,5 und 8,5 ist tolerabel, außerhalb dieses Bereiches ist die Aktivität herabgesetzt.

Neben dem Maximum der Enzymaktivität wurden die Stabilitäten bei verschiedenen pH-Werten näher untersucht. Abbildung 6.15 gibt die ermittelten Stabilitäten in Form von Desaktivierungskonstanten, k_{des} , wieder.

Es ist zu erkennen, daß die Stabilitäten bei pH 5,0 - 6,5 am geringsten sind. Bei pH 7,5 ist die Stabilität maximal. Ein signifikanter Abfall der Enzymstabilität ist wiederum bei pH 8,5 zu beobachten. Erfreulicherweise liegen somit das Maximum der Enzymaktivität und das Maximum der Enzymstabilität bei sehr ähnlichem pH-Wert; pH Wert 8,0 bzw. 7,5; was keineswegs zwangsläufig der Fall sein muß.

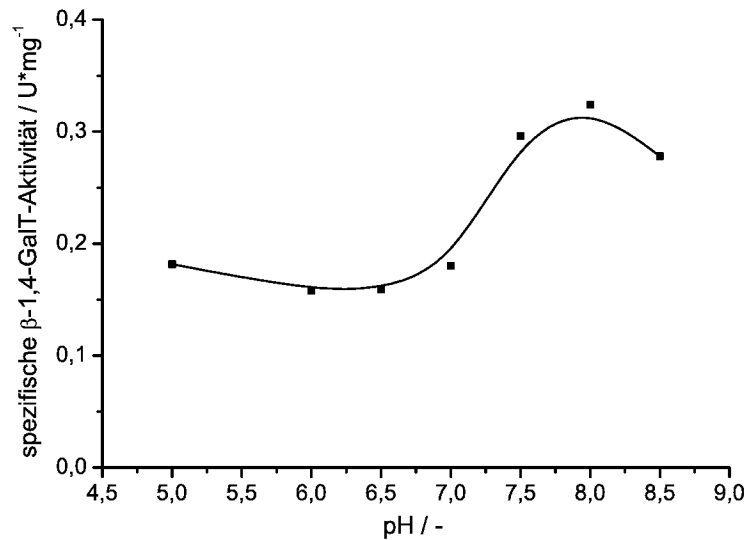


Abbildung 6.14: β -1,4-GalT-Aktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes [100 mM HEPES, 5 mM UDP-Gal, 25 mM GlcNAc, 1 mM MnCl₂, 2 μ L Enzymlösung (2,9 mg_{Protein}/mL), $V_{ges.}$ = 50 μ L, T = 37 °C]

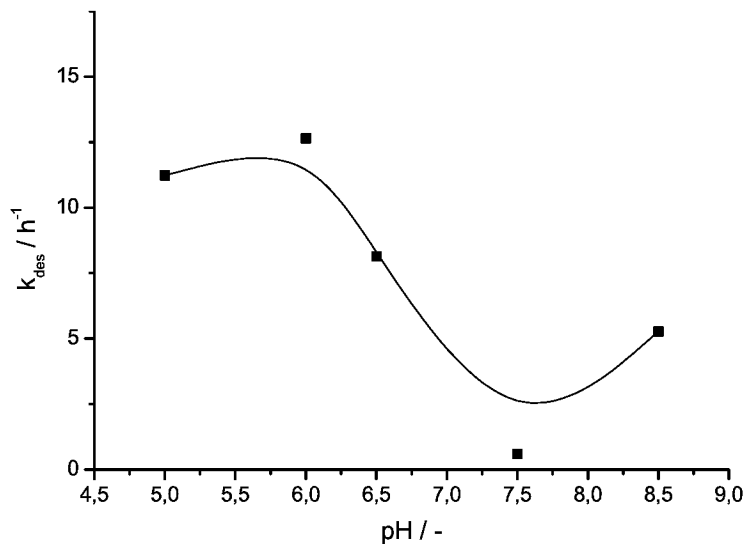


Abbildung 6.15: Desaktivierungskonstanten, k_{des} , der β -1,4-GalT-Aktivität bei unterschiedlichen pH-Werten [Inkubation: 100 mM HEPES, T = 25 °C; Aktivitätsbestimmung: Standardassay bei pH 8,0]

6.4.1.3 Temperatur-Optimum

Nach Arrhenius läßt sich die Aktivierungsenergie einer Reaktion über die Arrhenius'sche Gleichung für die Geschwindigkeitskonstante nach Formel 6.1 berechnen (Arrhenius 1889). Dabei wird die Näherung gemacht, daß die Aktivierungsenergie selbst nicht von der Tem-

peratur abhängig ist.

$$k = k_{max} e^{\frac{-E_A}{RT}} \quad (6.1)$$

mit: k	s^{-1}	Geschwindigkeitskonstante
k_{max}	s^{-1}	Frequenzfaktor
E_A	J^*mol^{-1}	Aktivierungsenergie
R	$J^*K^{-1}mol^{-1}$	allgemeine Gaskonstante; 8,31441
T	K	absolute Temperatur

Abbildung 6.16 gibt die Abhängigkeit der Enzymaktivität der β -1,4-GalT von der Temperatur wieder. Ferner kann man aus der Auftragung des natürlichen Logarithmus der spezifischen Aktivität die Aktivierungsenergie der β -1,4-GalT für die Bildung von *N*-Acetyllactosamin aus UDP-Galactose und *N*-Acetylglucosamin zu $72,0 \text{ kJ}^*mol^{-1}$ bestimmen. Eine thermische Desaktivierung des Enzyms wird durch die starke Abweichung des Meßpunktes von der Regressionsgerade bei einer Temperatur von 50°C sichtbar.

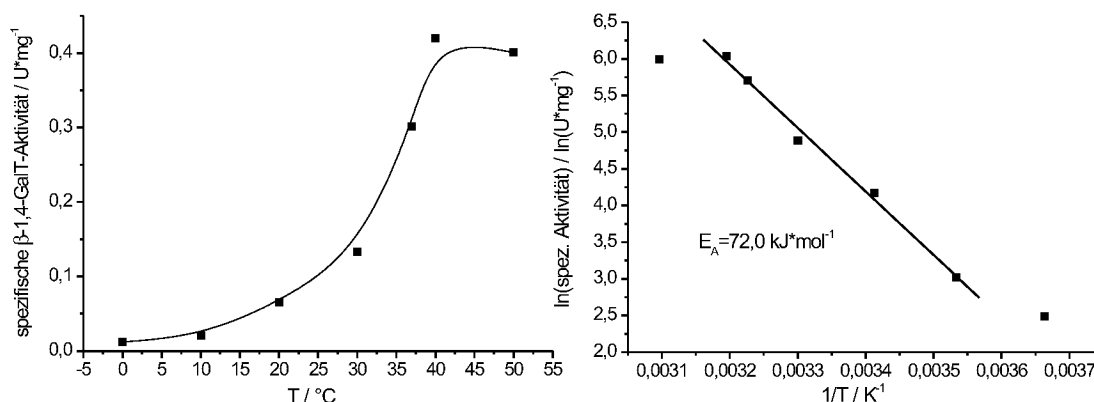


Abbildung 6.16: β -1,4-GalT-Aktivität in Abhängigkeit der Temperatur [100 mM HEPES; pH 8,0; 5 mM UDP-Gal; 25 mM GlcNAc; 1 mM MnCl₂; 5 μ L Enzymlösung]

Abbildung 6.17 gibt die Desaktivierungskonstanten, k_{des} der β -1,4-GalT bei verschiedenen Temperaturen und damit die Stabilitäten wieder. Für die Desaktivierung wurde ein exponentieller Zerfall erster Ordnung angenommen, mit Abfall auf Aktivität Null. Aus den dargestellten Desaktivierungskonstanten, k_{des} , resultieren über $t_{1/2} = \ln 2 / k_{des}$ die in Tabelle 6.3 aufgeführten Halbwertszeiten.

Der optimale Arbeitsbereich der β -1,4-GalT bezüglich der Temperatur liegt zwischen 30 und 40°C .

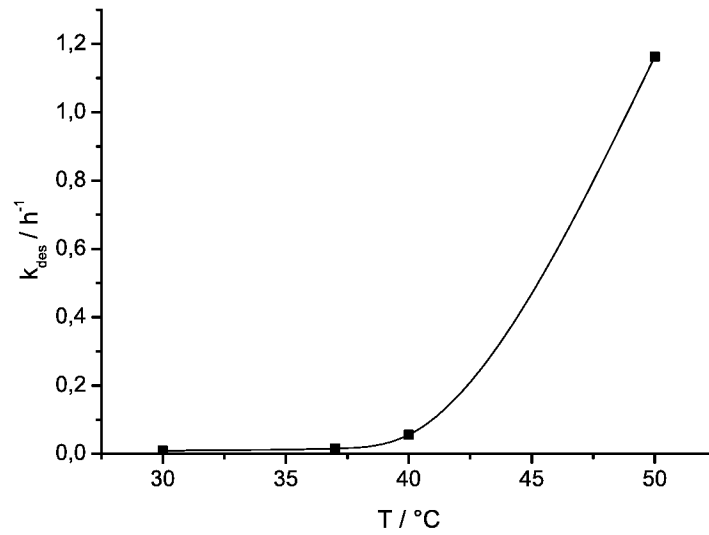


Abbildung 6.17: Desaktivierungskonstanten, k_{des} , der β -1,4-GalT-Aktivität bei unterschiedlichen Temperaturen [100 mM HEPES, pH 8,0]

Tabelle 6.3: Halbwertszeiten der β -1,4-GalT bei verschiedenen Temperaturen

Temperatur / $^{\circ}C$	Desaktivierungskonstante, k_{des} / h^{-1}	Halbwertszeit, $t_{1/2}$ / h
30	0,0092	75
37	0,0156	44
40	0,0556	12
50	1,1630	0,60

6.4.2 α -1,3-Galactosyltransferase

Das Enzym α -1,3-Galactosyltransferase, EC 2.4.1.151, katalysiert die Bildung einer α -1,3-glycosidischen Bindung ausgehend von UDP-Galactose und dem Standardsubstrat *N*-Acetyllactosamin.

Es handelt sich hier um eine α -1,3-Galactosyltransferase (α -1,3-GalT) aus Maus, welche in *E. coli* überexprimiert wurde. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. Berger, Physiologisches Institut der Universität Zürich, zur Verfügung gestellt. Eine Überexpression der α -1,3-GalT wurde wiederum durch Induktion mit IPTG erreicht. Eine Plasmidkarte ist im Anhang, Kapitel 9, zu finden.

Die Fermentation von *E. coli* BL21pET12aHisTag α 1,3GT und die Aufreinigung der α -1,3-GalT wurden freundlicherweise von der Firma Fluka AG, Schweiz, durchgeführt.

6.4.2.1 pH-Optimum

Aus Abbildung 6.18 geht hervor, daß das Aktivitätsmaximum bei pH 6,5 liegt. Bei pH 8,0 besitzt das Enzym nur noch 40 % seiner maximalen Aktivität. Goldstein *et al.* geben für das Enzym ein pH-Optimum von 6,2 an (Elices, Blake & Goldstein 1986).

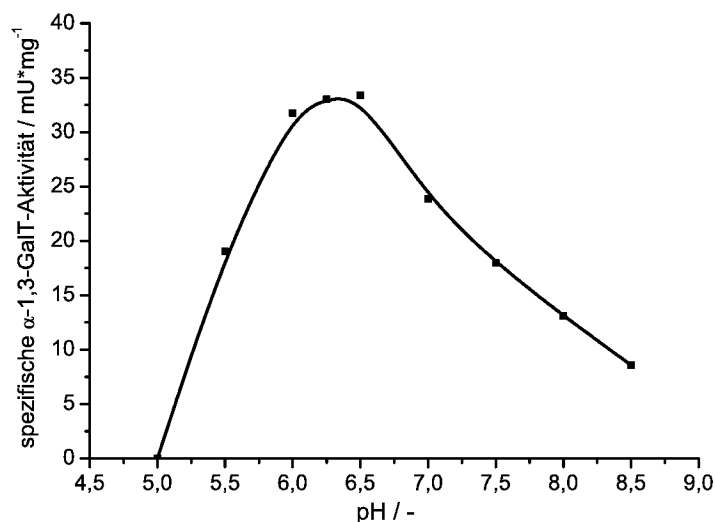


Abbildung 6.18: α -1,3-GalT-Aktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes [100 mM HEPES, 5 mM UDP-Gal, 10 mM LacNAc, 1 mM MnCl₂, 2 μ L Enzymlösung, $V_{ges.}$ =50 μ L, T = 37 °C]

Die Desaktivierungskonstanten der α -1,3-GalT-Aktivität sind in Abbildung 6.19 dargestellt. Im Gegensatz zur β -1,4-GalT liegen bei der α -1,3-GalT das Aktivitätsmaximum und das Maximum der Stabilität nicht bei gleichem pH-Wert. Die geringste Desaktivierung liegt mit einer Halbwertszeit von 512 h bei pH 8,0 vor. Die Halbwertszeit bei pH 6,6; dem pH-Wert, bei dem maximale Aktivität vorliegt, beträgt zum Vergleich dazu 170 h und ist damit im Vergleich mit pH 8,0 um den Faktor drei kleiner.

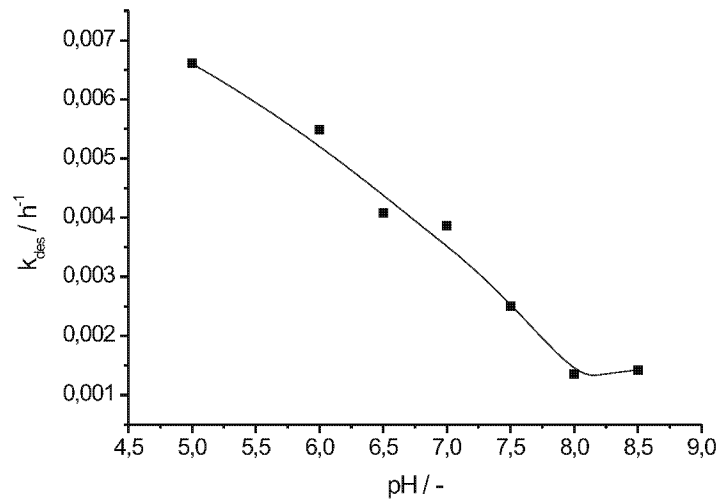


Abbildung 6.19: Desaktivierungskonstanten, k_{des} , der α -1,3-GalT-Aktivität bei unterschiedlichen pH-Werten, [100 mM HEPES, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$]

6.4.2.2 Temperatur-Optimum

Abbildung 6.20 gibt die Temperaturabhängigkeit der Aktivität der α -1,3-GalT wieder.

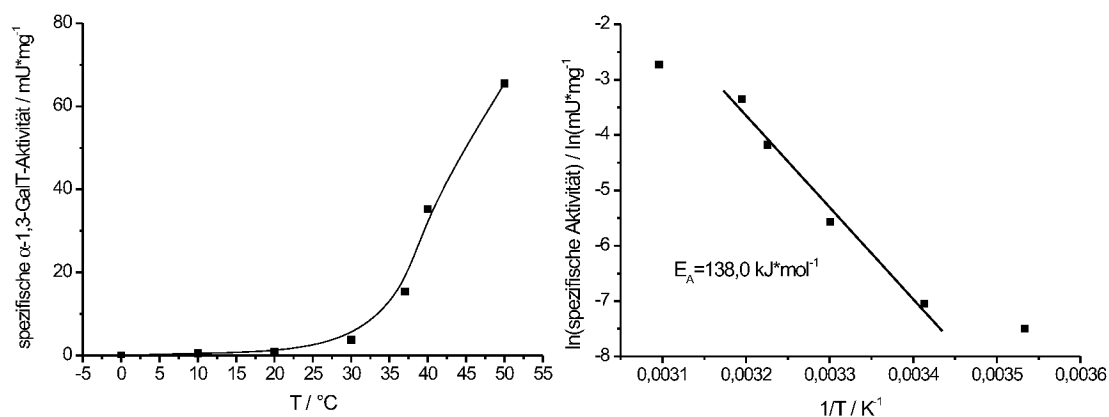


Abbildung 6.20: α -1,3-GalT-Aktivität in Abhängigkeit der Temperatur [100 mM HEPES; pH 7,2; 5 mM UDP-Gal; 10 mM LacNAc; 1 mM MnCl_2 ; 5 μL Enzymlösung]

Über die Arrhenius'sche Gleichung für die Geschwindigkeitskonstante (Formel 6.1) wurde — wie bereits bei der Temperaturabhängigkeit der β -1,4-GalT dargestellt — die Aktivierungsenergie der durch das Enzym katalysierten Reaktion berechnet. Die Aktivierungsenergie beträgt $138,0\text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ und liegt damit bei fast dem doppelten Wert der Aktivierungsenergie der durch die β -1,4-GalT katalysierten Reaktion. Dieser un-

gewöhnlich hohe Wert für eine Aktivierungsenergie eines Enzyms wurde mit der formalen Desaktivierungsenergie des Enzyms, welche sich aus den Desaktivierungskonstanten berechnen läßt, verglichen. Die formale Desaktivierungsenergie wurde zu 275,6 kJ/mol bestimmt. Insofern erscheint auch die obige, recht hohe Aktivierungsenergie plausibel, da der Wert der Desaktivierungsenergie über dem der Aktivierungsenergie liegt.

Abbildung 6.21 gibt die Stabilitäten der α -1,3-Galactosyltransferase bei verschiedenen Temperaturen wieder. Für die Desaktivierung wurde wiederum ein exponentieller Zerfall erster Ordnung angenommen, mit Abfall auf die Aktivität Null. Aus den dargestellten Desaktivierungskonstanten, k_{des} , resultieren die in Tabelle 6.4 aufgeführten Halbwertszeiten.

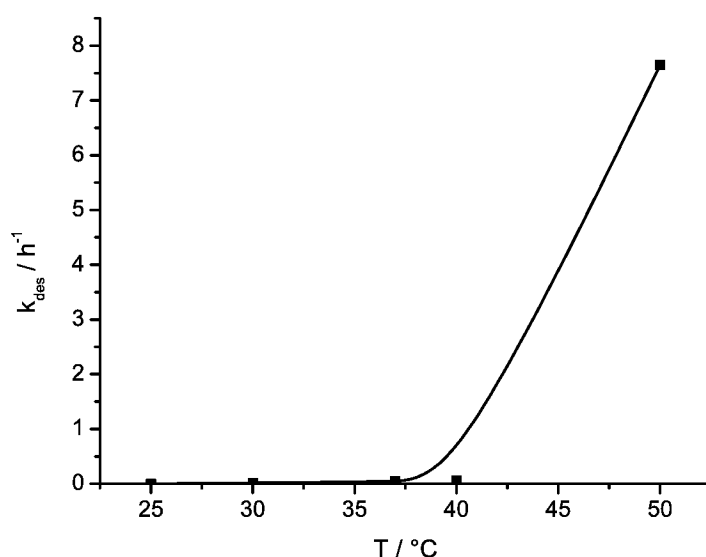


Abbildung 6.21: Desaktivierungskonstanten, k_{des} , der α -1,3-GalT-Aktivität bei unterschiedlichen Temperaturen [100 mM HEPES, pH 8,0]

Tabelle 6.4: Halbwertszeiten der α -1,3-GalT bei verschiedenen Temperaturen

Temperatur / °C	Desaktivierungskonstante, k_{des} / h^{-1}	Halbwertszeit, $t_{1/2}$ / h
25	0,0014	512
30	0,0091	76
37	0,0427	16
40	0,0565	12
50	7,65	0,09

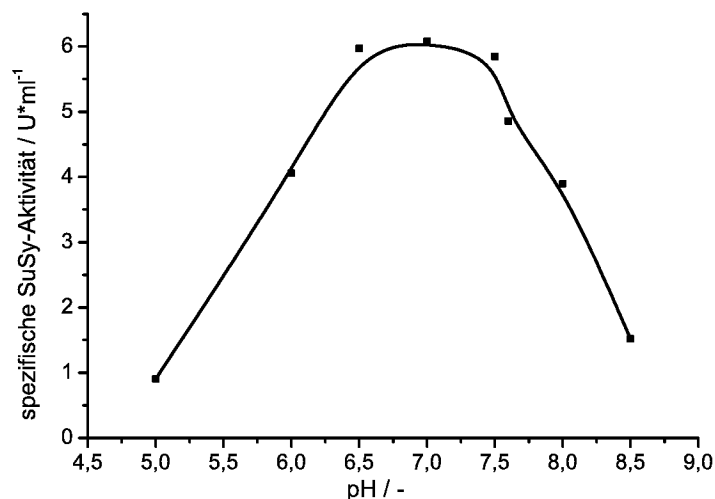


Abbildung 6.23: Sucrose Synthase-Aktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes (Spaltreaktion)[200 mM HEPES, 500 mM Sucrose, 20 mM UDP, T = 30 °C]

6.4.4 UDP-Galactose-4-Epimerase

Das Enzym Uridin-5'-diphospho-galactose-4-epimerase, EC 5.1.3.2, katalysiert die Epimerisierung von UDP-Glucose und UDP-Galactose, siehe Abbildung 6.24. Auch hier handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion, wobei das Gleichgewicht auf der Seite der UDP-Glucose liegt.

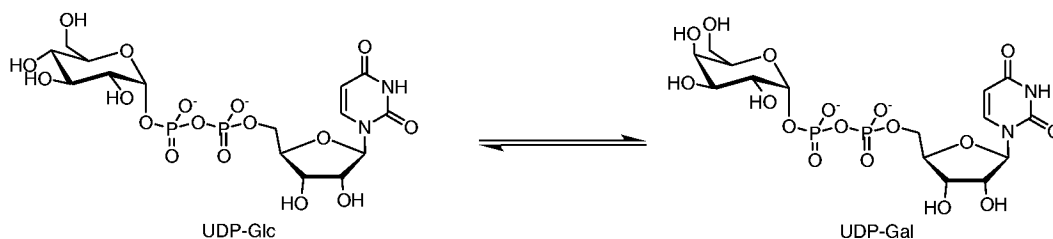


Abbildung 6.24: Standardreaktion der UDP-Galactose-4-Epimerase

Im Laufe der Arbeit wurden zwei kommerziell erhältliche UDP-Glucose-4-Epimerasen getestet. Die eine stammt aus *Streptococcus thermophilus* und ist rekombinant aus *E. coli* erhältlich (Fa. Calbiochem), die andere stammt aus an Galactose angepaßter *Saccharomyces cerevisiae* (Fa. Sigma). Bei der Epimerase aus *Saccharomyces cerevisiae*, die auch bereits von Elling *et al.* zur Rezyklierung von UDP-Galactose verwendet wurde, stellt sich das Problem, daß eine sehr rasche Desaktivierung des Enzyms auftritt. Diese läßt sich wie folgt erklären: Das Enzym ist ein Homodimer mit einem nicht kovalent, aber fest gebundenem Molekül NAD⁺ pro Enzymmolekül (Burke & Frey 1993). Eingeleitet wird die Epimerisierung an C-4 durch Bildung eines UDP-4-ketoglucose-Übergangszustandes bei gleichzeitiger Bildung von NADH. Der Cofaktor NAD⁺ wird anschließend intramolekular

durch Reduktion der Ketofunktion an C-4 regeneriert. Eine reduktive Desaktivierung tritt durch Uridinnukleotide (z. B. UMP), aber auch durch UDP-Glucose und UDP-Galactose selbst auf. Dabei steigert eine Anbindung von UMP durch eine induzierte konformationale Änderung die Reaktivität des NAD^+ gegenüber reduzierenden Zuckern. Der oxidierte Zucker verläßt das Enzym und NADH kann dann nicht mehr regeneriert werden (Zervosen & Elling 1996). Diese Desaktivierung ist reversibel. Elling et al. konnten zeigen, daß eine Reaktivierung durch Zusatz stöchiometrischer Mengen des nicht-natürlichen — und nicht kommerziell erhältlichen — Zuckers dTDP-6-Desoxy-D-xylo-4-hexulose möglich ist. Durch diesen Zusatz konnte eine Verbesserung der Enzymstabilität erreicht werden.

Bei Einsatz der Epimerase aus *Streptococcus thermophilus* wurde beobachtet, daß diese wesentlich weniger schnell desaktiviert, näheres dazu im Abschnitt Ergebnisse. Es wurde daher auf den weiteren Einsatz der Epimerase aus *Saccharomyces cerevisiae* in Verbindung mit dem nicht-natürlichen Zucker dTDP-6-desoxy-D-xylo-4-hexulose zur Reaktivierung verzichtet.

6.4.4.1 pH-Abhängigkeit

Es wurde das Aktivitätsmaximum der rekombinanten UDP-Galactose-4-Epimerase aus *Streptococcus thermophilus* bezüglich pH-Wert bestimmt. Aus Abbildung 6.25 geht hervor, daß das Maximum der Aktivität anscheinend bei pH größer gleich 10 liegt. Fukasawa *et al.* geben für eine UDP-Gal-4-Epimerase aus *Saccharomyces cerevisiae* an, daß das pH-Optimum zwischen 6,8 und 8,0 liegt (Fukasawa et al. 1980).

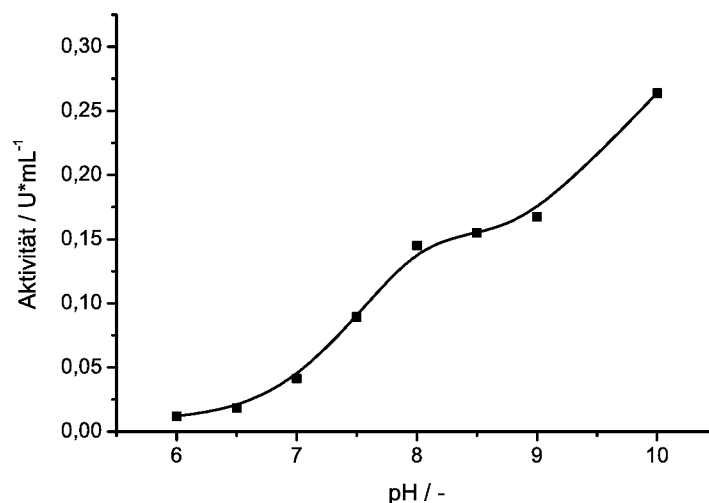


Abbildung 6.25: Aktivität der UDP-Galactose-4-Epimerase aus *Streptococcus thermophilus* in Abhängigkeit des pH-Wertes [90 mM Glycin-NaOH-Puffer; 0,1 mM UDP-Gal; 1 mM NAD; 67 mU UDP-Glc-Dehydrogenase; $V_{ges.} = 1$ mL; $T = 25$ °C]

6.4.4.2 Temperatur-Stabilitäten

Für die rekombinanten UDP-Galactose-4-Epimerase aus *Streptococcus thermophilus* konnte bei Raumtemperatur, sowie bei 30 °C über 50 Stunden keine Desaktivierung, bei 37 °C eine Halbwertszeit von 22,5 h festgestellt werden (pH 7,2), siehe Abbildung 6.26.

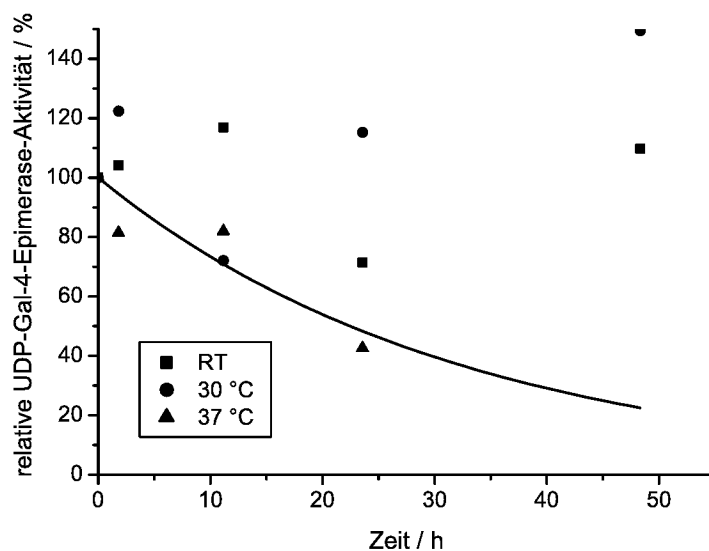


Abbildung 6.26: Stabilitäten der UDP-Galactose-4-Epimerase aus *Streptococcus thermophilus* bei unterschiedlichen Temperaturen [200 mM HEPES; 2 mM UDP-Glc; pH 7,2]

6.4.5 Auswahl der Reaktionsbedingungen

Die vorangegangenen Untersuchungen dienten dazu, geeignete Reaktionsbedingungen für die Synthese des polymergebundenen Trisaccharides **29** zu finden. Bei der Reaktion, siehe Abbildung 6.8, handelt es sich um eine Eintopfreaktion. Dies macht zwangsläufig die Auswahl von Reaktionsbedingungen nötig, welche mit allen verwendeten Enzymen bezüglich pH-Wert und Temperatur kompatibel sind. In Abbildung 6.27 sind qualitativ die ermittelten Aktivitäten und Stabilitäten der verwendeten Enzyme β -1,4-GalT, α -1,3-GalT, SuSy und UDP-Gal-4-Epimerase bei verschiedenen pH-Werten dargestellt. Als Arbeitsbereich wurde pH 7,2 gewählt.

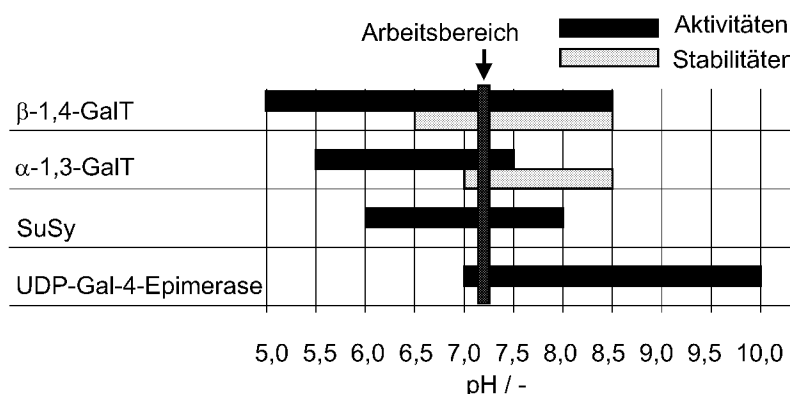


Abbildung 6.27: Gegenüberstellung von Aktivitäten und Stabilitäten der β -1,4-GalT, α -1,3-GalT, SuSy und UDP-Gal-4-Epimerase bei verschiedenen pH-Werten

In Abbildung 6.28 sind qualitativ die Stabilitäten der Enzyme β -1,4-GalT, α -1,3-GalT, SuSy und UDP-Gal-4-Epimerase bei verschiedenen Temperaturen dargestellt. Aufgrund hoher Aktivität, aber gleichzeitiger hoher thermischer Desaktivierung bei hoher Temperatur wurde als Arbeitsbereich 30 °C gewählt.

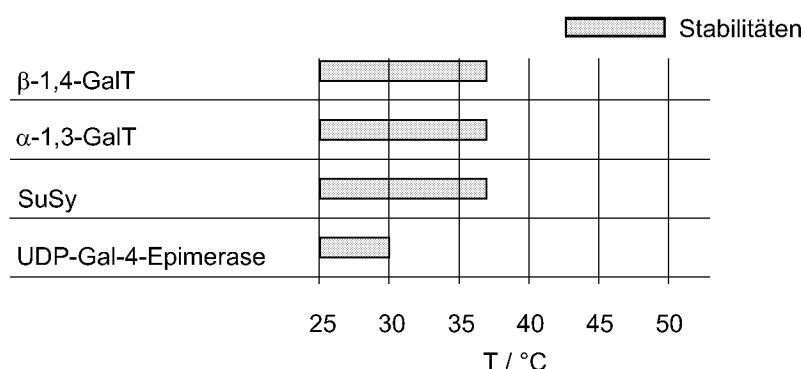


Abbildung 6.28: Stabilitäten der β -1,4-GalT, α -1,3-GalT, SuSy und UDP-Gal-4-Epimerase bei verschiedenen Temperaturen

6.5 Ultrafiltration

Ziel war es, wie in Abbildung 6.29 aufgezeigt, mittels einer zweistufigen Filtration zum einen die Aufreinigung zu erleichtern und zum anderen auch eine Rezyklierung der Enzyme zu ermöglichen. Lediglich *eine* abschließende chromatographische Aufreinigung wäre so nötig. Diese abschließende Aufreinigung ist unabhängig von der Länge der eigentlichen Oligosaccharidsynthese. Der Nutzen der hier präsentierten Methodik wird daher umso ausgeprägter sein, je größer das eigentliche Zieloligosaccharid ist.

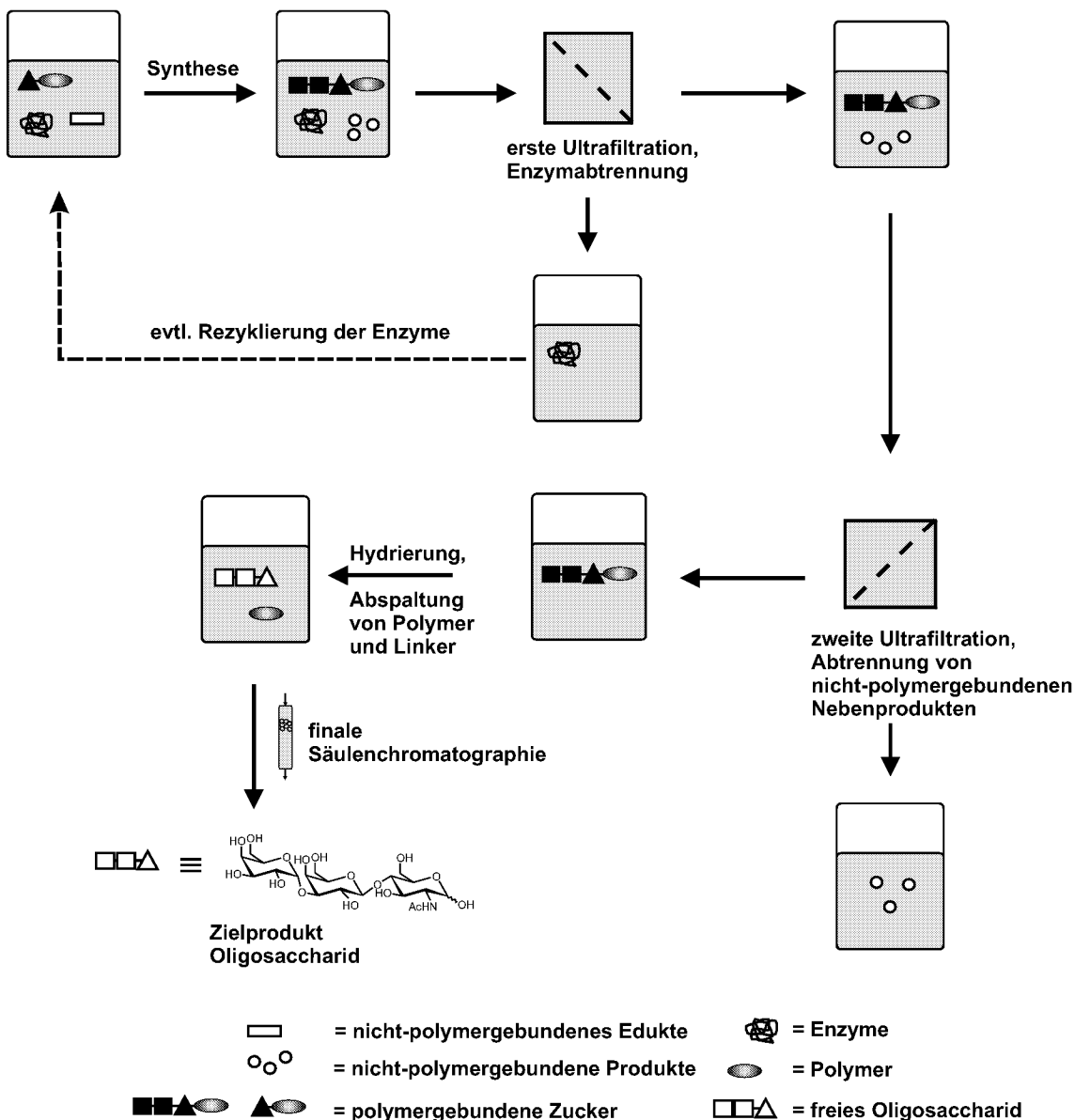


Abbildung 6.29: Angestrebter zweistufiger Einsatz der Ultrafiltration in der polymerunterstützten Flüssigphasensynthese von Oligosacchariden

Wie bereits in Kapitel 4.2 vorgestellt, wurden unter anderem die in Tabelle 6.5 aufgelisteten Membranen für den Einsatz in der enzymatischen polymerunterstützten Oligo-

saccharidsynthese bei Verwendung der Polymere MPEG10.000 oder PEG10.000 ermittelt. Ferner wurden hier Retentionsmessungen bezüglich des Enzyms β -1,4-GalT in Wasser durchgeführt. Das Molekulargewicht der β -1,4-GalT beträgt 40,8 kDa. Damit handelt es sich um dasjenige der vier verwendeten Enzyme, welches das geringste Molekulargewicht besitzt (α -1,3-GalT 43 kDa, SuSy 394 kDa, UDP-Gal-4-Epimerase aus *Streptococcus thermophilus* 185 kDa). Auf Retentionsmessungen der Enzyme mit größerem Molekulargewicht wurde verzichtet. Es wurde die Annahme gemacht, daß eine Membran, welche ein kleines Enzym zurückhält, erst recht auch größere Enzyme zurückhält.

Tabelle 6.5: Übersicht über Retentionen und Flüsse ausgewählter Membranen für die enzymatische polymerunterstützte Oligosaccharidsynthese

Analyt	massensp. Konz. / g L^{-1}	Membran	Lösungs- mittel	spez. Fluß / $\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1} \text{bar}^{-1}$	R / -
MPEG10.000	5,025	PoroCer1000 (K ^a , g ^b)	Wasser	14,530	0,996
MPEG10.000	5,018	PoroCer1000 (K, g)	Wasser	13,681	0,993
PEG10.000	n.b. ^c	PoroCer1000 (K, GPC)	Wasser	n.b.	0,994
PEG10.000	n.b.	TNO-Membran (K, GPC)	Wasser	n.b.	0,748
β -1,4-GalT	0,162 ^d	YM30 (E)	Wasser	22,6	0,996
GlcNAc-DOX-					
MPEG10.000	20,850	YM30 (HPLC)	Wasser	9,184	0,060
GlcNAc-					
DOX-					
MPEG10.000	20,798	YM10 (HPLC)	Wasser	2,5	0,850
β -1,4-GalT	n.b.	PelliconXL10 (E) ^e	Wasser	n.b.	0,999
MPEG10.000	49,95	PelliconXL10 (GPC)	Wasser	91,765	0,420
PEG10.000	1,053	PelliconXL10 (GPC)	Wasser	160,000	0,556
PEG10.000	2,522	PelliconXL5 (GPC)	Wasser	49,000	0,999

^a K = keramische Membranen

^b Meßmethode GPC = Messung nach Gleichgewichtseinstellung über GPC-Messung, g = gravimetrisch, HPLC = Einzelmessung per HPLC, E = per Enzymassay aus Probe Retentat und Probe Permeat

^c nicht bestimmt

^d Proteinkonzentration

^e Diese Membran wurde auch bei der Enzymaufreinigung eingesetzt.

Mit den aufgelisteten Membranen ist nun das oben vorgestellte Konzept prinzipiell möglich. Keramische Membranen wurden hier trotz guter Retentionen aufgrund von nur mittelmäßigen Transmembranflüssen, siehe Tabelle 6.5, und leichter Handhabbarkeit der Polymermembranen — besonders auch der Möglichkeit mit kleineren Volumina zu arbeiten — nicht verwendet. Für ein eventuelles zukünftiges Arbeiten im größeren, industriellen Maßstab bieten die untersuchten keramischen Membranen aber eine hervorragende Alternative. Mit den YM30- und PelliconXL10-Membranen ist die Möglichkeit gegeben, die Enzyme zurückzuhalten, bei gleichzeitiger hinreichend niedriger Retention der poly-

mergebundenen Substrate und Produkte. Mit der PelliconXL5-Membran wiederum ist es möglich die polymergebundene Substrate und Produkte nahezu quantitativ zurückzuhalten und unerwünschte nicht polymergebundene Substrate und Nebenprodukte auszuspielen. Hiermit sind die membrantechnischen Voraussetzungen für die Vorgehensweise mit zwei Membranschritten nach Abbildung 6.29 erfüllt.

6.6 Analytik polymergebundener Moleküle

Essentiell für die Durchführung der polymerunterstützten Trisaccharidsynthese und besonders deren Optimierung ist eine aussagekräftige Analytik. Diese sollte vorzugsweise

- einfach,
- direkt,
- schnell
- und mit einem geringen Fehler behaftet sein.

Gerade bei polymergebundenen Molekülen ergeben sich hier Probleme, siehe auch Kapitel 3 und 5. Zum einen herrschen die Polymereigenschaften in der Regel vor, zum anderen liegen bei Polymeren mit der Möglichkeit multipler Substratanbindung, z. B. bei Polyacrylamiden, uneinheitliche Funktionalisierungen vor. Ein Teil der Polymere liegt mit hoher und ein Teil mit niedriger Funktionalisierung vor. Man muß dabei von einer statistischen Verteilung ausgehen. So kommt zu der Inhomogenität des Polymers durch die Molekulargewichtsverteilung noch eine Inhomogenität bezüglich Funktionalisierungsgrad hinzu. In solchen Fällen bleibt als Analytik nur die NMR-Technik oder eine Analytik nach Abspalten vom Polymer. Bei einer Analyse nach Abspalten ist zu bedenken, daß durch die Abspaltung vom Polymer hier noch ein zusätzlicher Fehler auftreten kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein MPEG10.000 als polymerer Träger gewählt. Das Polymer hat mit einem Mw/Mn-Wert von 1,015 eine sehr geringe Molekulargewichtsverteilung und besitzt nur eine freie Funktionalität zur Substratanbindung, die andere Polymerendgruppe ist als Methoxyfunktionalität geschützt. Hierdurch werden heterogene Substrate und Produkte vermieden, man erhält ein diskretes Substrat und ein diskretes Produkt. Auf dieser Grundlage war es möglich, trotz Vorliegen eines Polymers, eine *direkte HPLC-Methode* zu etablieren. Abbildung 6.30 zeigt beispielhaft die Trennung von polymergebundenem *N*-Acetylglucosamin **33**, polymergebundenem *N*-Acetyllactosamin **34** und polymergebundenem Galili-Trisaccharid **29** in einer realen Probe direkt aus der Reaktionslösung.

Das in Kapitel 5 erläuterte Problem der starken Wechselwirkung zwischen der stationären Phase einer reverse phase-Säule und dem Polymer-Analyten tritt hier nicht auf und daher ist auch die Aufnahme eines Diagrammes zur Bestimmung eines kritischen Punktes hier nicht erforderlich. Bei der verwendeten Nucleodex β -OH-Säule besteht die stationäre Phase aus Nucleosil-Kieselgel, welches kovalent mit β -Cyclodextrinderivaten belegt ist (Macherey-Nagel 2000). β -Cyclodextrine sind cyclische Oligosaccharide aus sieben Glucoseeinheiten⁵. Abbildung 6.31 veranschaulicht den angenommenen, stark vereinfachten Trennmechanismus. Durch eine Wirt-Gast-Beziehung kommt eine unterschiedlich starke

⁵ β bezeichnet hier die Cyclodextrin-Ringgröße, α = 6 Glucoseeinheiten (Cyclohexaamylose), β = 7 Glucoseeinheiten (Cycloheptaamylose), γ = 8 Glucoseeinheiten (Cyclooctaamylose)

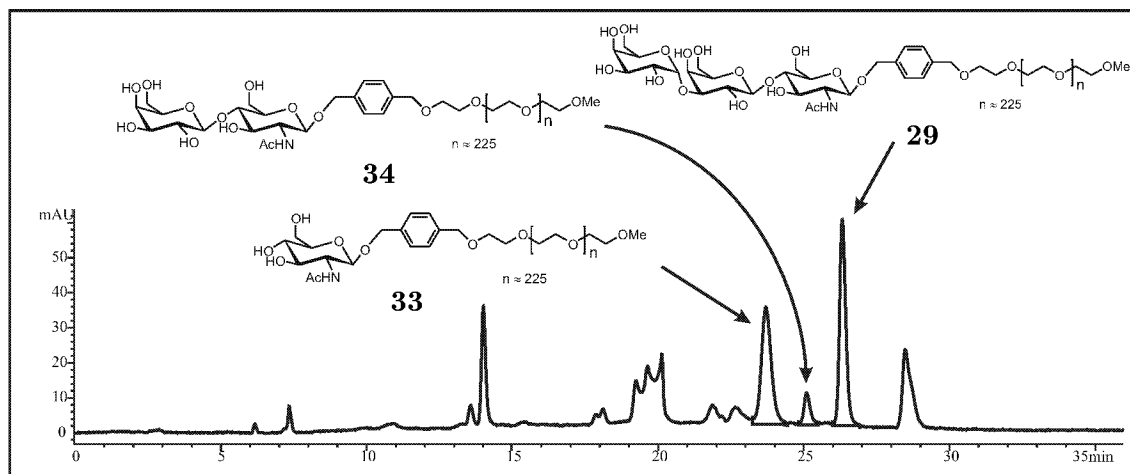


Abbildung 6.30: HPLC-Chromatogramm der Trennung von polymergebundenem GlcNAc **33**, LacNAc **34** und Galili-Trisaccharid **29** [reale Probe direkt aus Reaktionslösung; Säule: Nucleodex β -OH; Eluent: ACN- H_2O -Gradient, 0 min 0% H_2O , 15 min 20% H_2O , 16 min 20% H_2O , 31 min 40% H_2O , 36 min 0% H_2O ; Fluß: 0,7 mL/min; T = 35 °C; Detektor: UV 215 nm]

Wechselwirkung mit verschiedenen Analyten zustande (Lindhorst 2000a). Die räumliche Anordnung der Glucoseeinheiten des Cyclodextrins kann vereinfacht als Kegelstumpf beschrieben werden. Die beiden Öffnungen des Kegelstumpfes sind durch primäre und sekundäre Hydroxygruppen hydrophil, während der Innenraum hydrophober ist. Unpolare Gruppen eines Analyten mit geeigneter Größe können in den Cyclodextrinkäfig eindringen und Inklusionskomplexe bilden. Ferner sind Wechselwirkungen des Analyten mit Hydroxygruppen an den Kegelöffnungen möglich. Durch die chiralen Zuckerbausteine werden so enantioselektive Wechselwirkungen ermöglicht. Die Nucleodex-Säulen wurden zur Trennung von Racematen, Konstitutions- und Konfigurationsisomeren entwickelt.

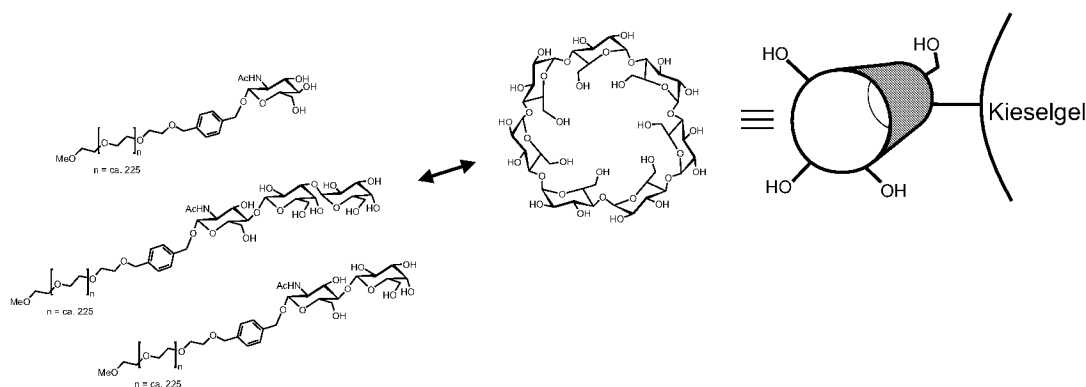


Abbildung 6.31: Vereinfachte Darstellung des Trennmechanismus von polymergebundenen Zuckern an β -Cyclodextrin-Kieselgel

6.7 Synthese des Galili-Trisaccharides 1

6.7.1 Ausgangspunkt der Synthese des Galili-Trisaccharides 1

Das in Abbildung 6.32 dargestellte Reaktionsschema gibt die durchgeführte Modellsynthese des polymergebundenen Galili-Trisaccharides mit dem UDP-Galactose-Regenerierzyklus wieder.

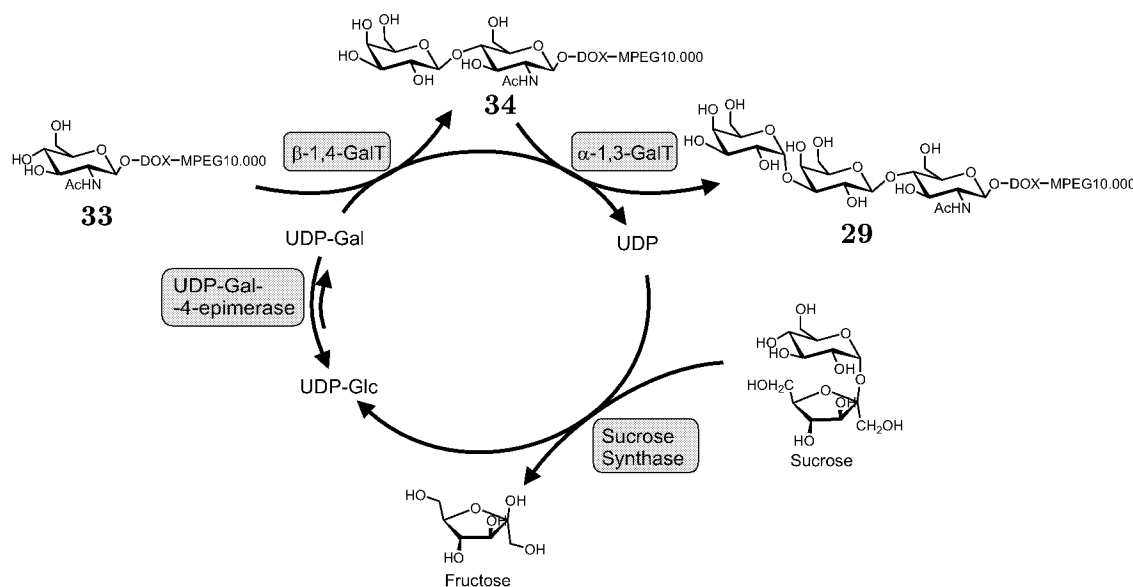


Abbildung 6.32: Polymergebundene Galili-Trisaccharidsynthese mit UDP-Galactose-Regenerierzyklus als Modellsystem

Elling *et al.* beschrieben die Darstellung des freien Galili-Epitopes 1 ausgehend von freiem *N*-Acetylglucosamin (Hokke et al. 1996). Bei Übertragung der dort verwendeten Bedingungen auf die polymerunterstützte Synthese konnten allerdings keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden. Wie in Abbildung 6.33 dargestellt, führen diese Reaktionsbedingungen, welche bei Verwendung des freien *N*-Acetylglucosamin zu quantitativen Umsatz führten, bei Verwendung des polymergebundenen *N*-Acetylglucosamins zu Ausbeuten von kleiner 18 %. Quantitativer Umsatz war gefordert.

6.7.2 UDP-Galactose-Rezyklierzyklus

6.7.2.1 Wahl der Epimerase

Aufgrund der Komplexität des untersuchten Vierenzymsystems wurden in der überwiegenden Mehrheit der Experimente — nicht nur bei der Auswahl der Epimerase — nicht einzelne Teilreaktionen mit jeweils einem Enzym herausgegriffen, vielmehr wurde das Gesamtsystem oder zumindest ein komplexer Teil des Systems bei Variierung eines Parameters beobachtet.

Es wurde unter sonst identischen Bedingungen der Konzentrationsverlauf der polymerunterstützten Galili-Synthese zum einen mit der UDP-Galactose-4-Epimerase aus *Saccharomyces cerevisiae* und zum anderen mit der aus *Streptococcus thermophilus* verfolgt. Aus den in Abbildung 6.34 dargestellten Ausbeuten ist zu entnehmen, daß die Epimerase aus

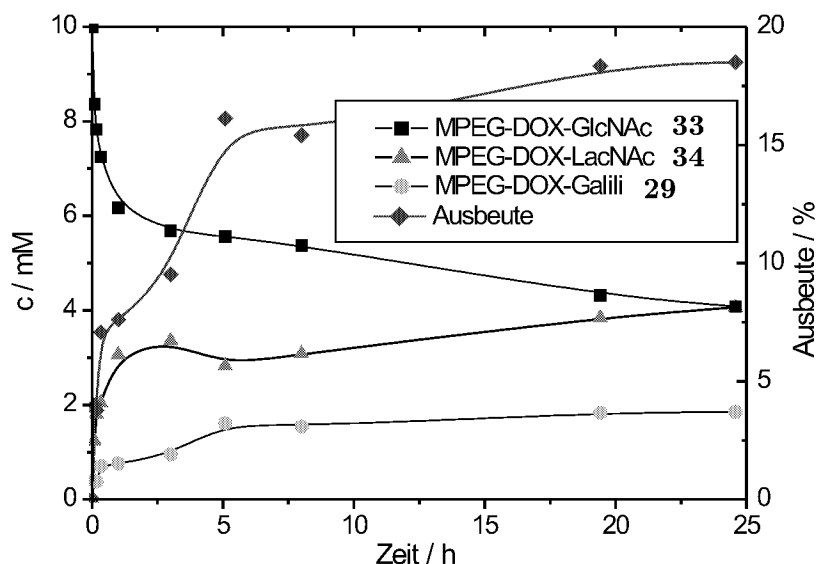


Abbildung 6.33: Synthese von Galili-DOX-MPEG **29**, Reaktionsbedingungen wie bei Reaktion mit freiem GlcNAc nach (Hokke et al. 1996) [$V = 1$ mL; $T = 37$ °C; 200 mM HEPES; pH 7,2 ; 500 mM Sucrose; 2 mM MnCl_2 ; 1 mM UDP-Glc; 1 mg/mL BSA; 10 mM GlcNAc β -DOX-MPEG **33**; 200 mU β -1,4-GalT; 200 mU α -1,3-GalT; 400 mU UDP-Gal-4-Epimerase aus *Streptococcus thermophilus*; 800 mU SuSy]

Streptococcus thermophilus unter den verwendeten Reaktionsbedingungen für das System besser geeignet ist als die aus *Saccharomyces cerevisiae*.

6.7.2.2 Wahl des UDP-Startmaterials

In der vorliegenden Arbeit wurde ein UDP-Gal-Regenerierzyklus mittels der Enzyme SuSy und UDP-Gal-4-Epimerase verwendet, siehe Abbildungen 6.32. Hierzu wird eine katalytische Menge UDP-Startmaterial benötigt, welche UDP, UDP-Galactose oder UDP-Glucose sein kann. Unter limitierten Bedingungen wurde bei der Synthese von polymergebundenem *N*-Acetyllactosamin **34** aus MPEG-DOX-GlcNAc **33** untersucht, welches der UDP-Startmaterialien am besten geeignet ist. Aus Abbildung 6.35 geht — in Übereinstimmung mit (Elling 2000) — hervor, daß dies UDP-Glucose ist. Dieses Ergebnis läßt sich auf unterschiedliche Inhibierungskonstanten eines oder mehrerer der verwendeten Enzyme für UDP-Gal, UDP-Glc und/oder UDP zurückführen (Kreuzinhibierungen). Erfreulich ist die Tatsache, daß der Zyklus am besten mit UDP-Glc gestartet werden sollte, da der Preis von UDP-Glc im Vergleich zu UDP-Gal um den Faktor 30 niedriger liegt, siehe auch Abbildung 6.7.

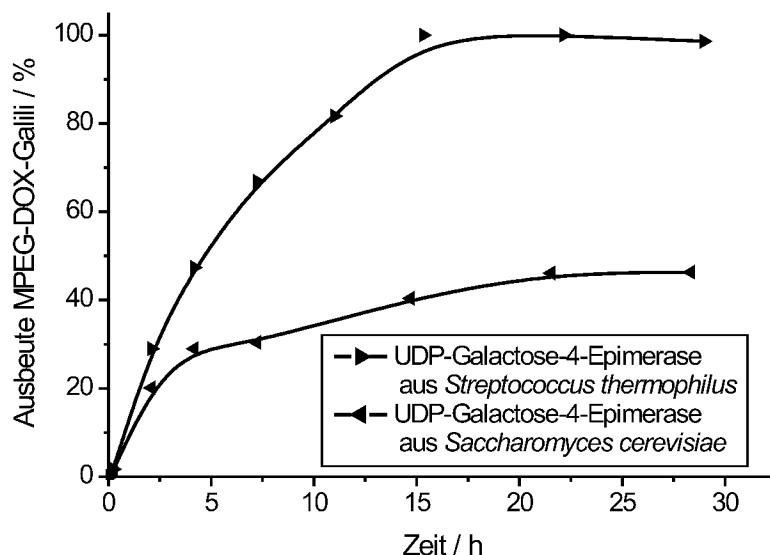


Abbildung 6.34: UDP-Galactose-4-Epimerasen aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Streptococcus thermophilus* im Vergleich [V = 1 mL; T = 30°C; pH 7,2; 200 mM HEPES; 25 mM KCl; 1 mM DTT; 200 mM Sucrose; 1 mM MnCl₂; 0,4 mM UDP-Glc; 1 mg/mL BSA; 2 mM GlcNAc β -DOX-MPEG **33**; 40 mU β -1,4-GalT; 120 mU α -1,3-GalT; 80 mU UDP-Gal-4-Epimerase; 160 mU Sucrose Synthase]

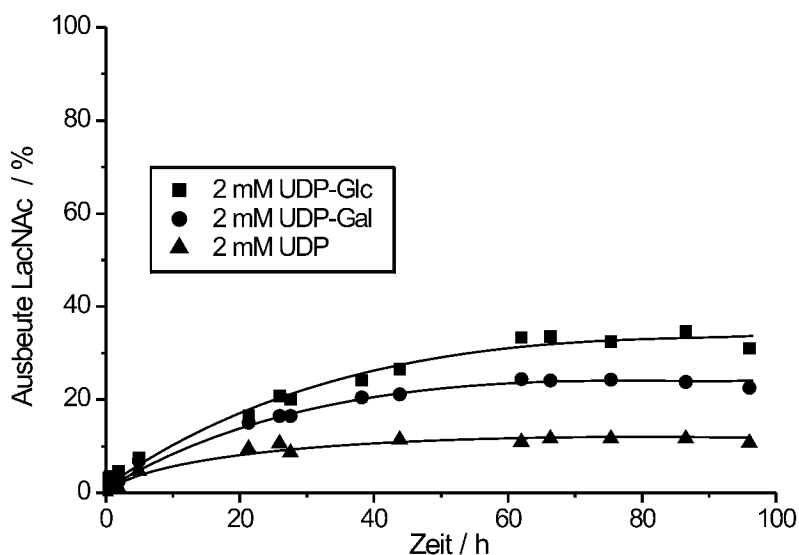


Abbildung 6.35: Bestimmung des für den UDP-Galactose-Rezyklierzyklus am besten geeigneten UDP-Startmaterials [V = 1 mL; T = 30 °C; pH 7,2; 200 mM HEPES; 25 mM KCl; 1 mM DTT; 200 mM Sucrose; 1 mM MnCl₂; 0,7 mg/ml BSA; 7 mM MPEG-DOX-GlcNAc **33**; 200 mU β -1,4-GalT; 800 mU SuSy; 400 mU UDP-Gal-4-Epimerase aus *Saccharomyces cerevisiae*; 0,07 mM dTDP-6-Desoxy-D-xylo-4-hexulose]

6.7.3 Kinetische Untersuchungen

6.7.3.1 Bestimmung von kinetischen Konstanten durch Messung von Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten

Durch die Etablierung einer Analytik für *polymergebundene Zuckermoleküle* wurde die Grundlage zur Durchführung von kinetischen Untersuchung des Vierenzysystems für polymergebundene Substrate gelegt.

In diesem Abschnitt wird untersucht, welchen Einfluß die Molekulargewichtvergrößerung des Substrates auf die Reaktionskinetik hat. Im Anschluß werden die reaktionstechnischen Konsequenzen, die dies für die Reaktionsführung mit sich bringt, näher betrachtet. Die Bestimmung von kinetischen Daten wurde hier für die β -1,4-GalT durchgeführt. Abbildung 6.36 gibt die zugrunde liegende Reaktion mit GlcNAc β -DOX-MPEG **33** als Substrat wieder. Zum Vergleich wurde ebenfalls die Reaktion mit nicht-polymergebundenem Substrat, mit freiem *N*-Acetylglucosamin, untersucht.

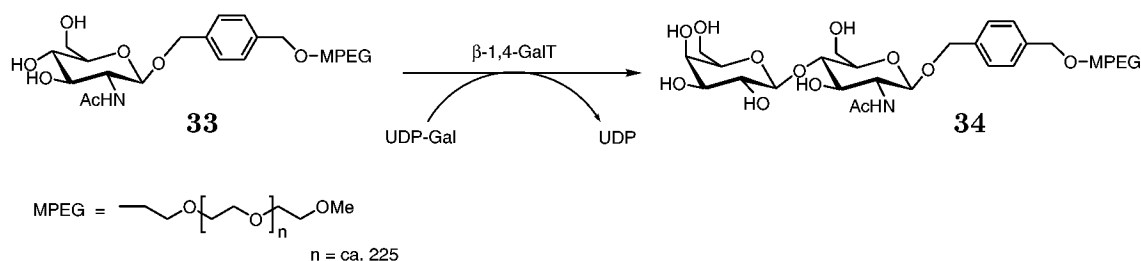


Abbildung 6.36: β -1,4-GalT-Reaktion mit polymergebundenem *N*-Acetylglucosamin **33** als Substrat

In Abbildung 6.37 sind spezifische Aktivitäten in Abhängigkeit von Substratkonzentrationen wiedergegeben. Als Substrat wurde zunächst freies *N*-Acetylglucosamin betrachtet. Die Ermittlung der kinetischer Daten erfolgte unter Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsbedingungen. Für das Substrat *N*-Acetylglucosamin ist eine Substratüberschußinhibition zu erkennen, für das Cosubstrat UDP-Gal nicht. Es wurde eine Doppelsubstratkinetik nach Michaelis-Menten zugrundegelegt, und die Ermittlung der kinetischen Parameter erfolgte durch Anpassung der in Formel 6.2 gegebenen kinetischen Gleichung an die Meßwerte — auch für das polymergebundene Substrat entsprechend — mittels nicht-linearer Regression. Formel 6.2 gibt für *N*-Acetylglucosamin eine unkompetitive Inhibition wieder (Substratüberschußinhibition), für UDP-Gal eine einfache Michaelis-Menten-Kinetik (Bisswanger 1999).

$$v_{\beta 14GalT} = v_{max, \beta 14GalT} \frac{[UDP - Gal]}{k_{M, UDP-Gal, \beta 14GalT} + [UDP - Gal]} * \frac{[GlcNAc]}{k_{M, GlcNAc, \beta 14GalT} + [GlcNAc] + \frac{[GlcNAc]^2}{k_{I, GlcNAc, \beta 14GalT}}} \quad (6.2)$$

mit:	$v_{\beta 14GalT}$	U/mg	Reaktionsgeschwindigkeit der β -1,4-GalT-Reaktion
	$v_{max, \beta 14GalT}$	U/mg	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
	[UDP-Gal]	mM	UDP-Galactose-Konzentration
	$k_{M, UDP-Gal, \beta 14GalT}$	mM	Michaelis-Menten-Konstante bzgl. UDP-Galactose
	[GlcNAc]	mM	<i>N</i> -Acetylglucosamin-Konzentration
	$k_{M, GlcNAc, \beta 14GalT}$	mM	Michaelis-Menten-Konstante bzgl. <i>N</i> -Acetylglucosamin
	$k_{I, GlcNAc, \beta 14GalT}$	mM	Inhibierungskonstante bzgl. <i>N</i> -Acetylglucosamin

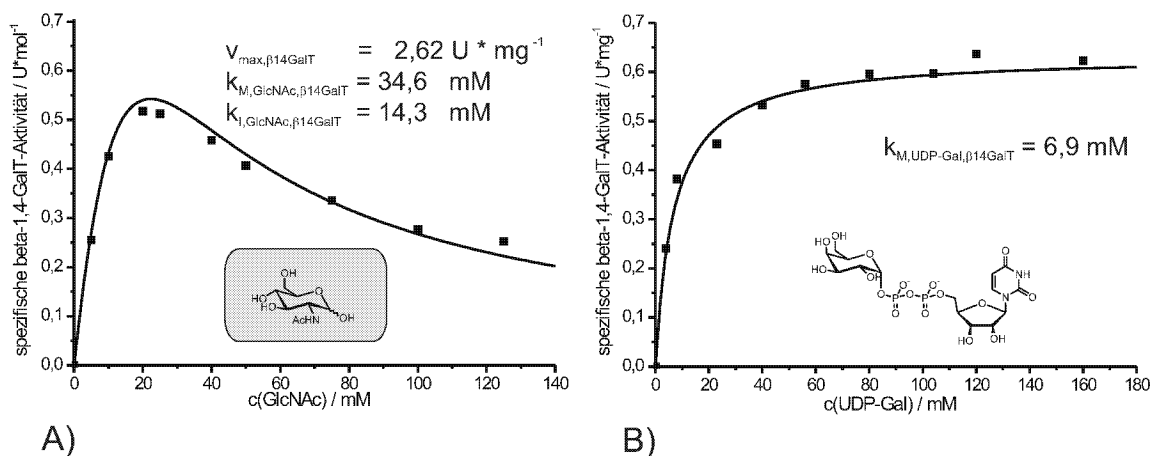


Abbildung 6.37: β -1,4-GalT-Aktivität als Funktion der Substratkonzentrationen für freies *N*-Acetylglucosamin [$V = 50 \mu\text{L}$; 100 mM HEPES; 1 mM MnCl_2 ; pH 8,0; $T = 37^\circ\text{C}$; A: 5 mM UDP-Gal; GlcNAc s. o.; B: 25 mM GlcNAc; UDP-Gal s. o.]

Für die β -1,4-GalT-katalysierte Reaktion von UDP-Gal und polymergebundenem *N*-Acetylglucosamin **33** wurde postuliert, daß sich die Abhängigkeit von der UDP-Gal-Konzentration ähnlich verhält, wie bei der Reaktion mit freiem *N*-Acetylglucosamin. Abbildung 6.38 gibt die Abhängigkeit der β -1,4-Galactosyltransferase-Aktivität von der Substratkonzentration für *polymergebundenen* *N*-Acetylglucosamin **33** wieder. Eine extrem hohe Inhibition ist sichtbar.

Es resultierten die in Tabelle 6.6 aufgelisteten kinetischen Daten der β -1,4-GalT. Bei Betrachtung der Daten ist zu bedenken, daß das freie *N*-Acetylglucosamin zu 68 % in der α -Form vorliegt und nur zu 32 % in der von der β -1,4-GalT akzeptierten β -Form (Angyal 1984). Durch die vorliegende Mutarotation liegt ein Gleichgewicht vor, aus

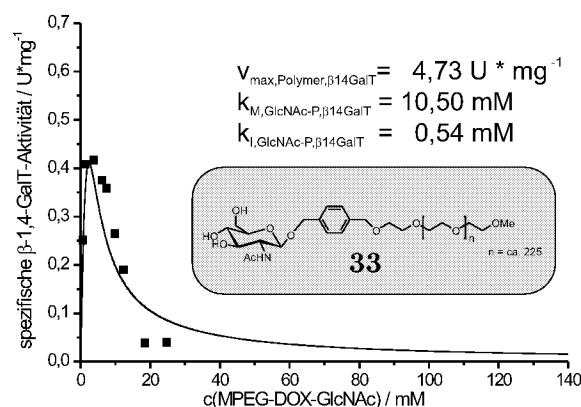


Abbildung 6.38: β -1,4-GalT-Aktivität als Funktion der Substratkonzentration für polymergebundenes *N*-Acetylglucosamin **33** [$V = 50 \mu\text{L}$; 100 mM HEPES; 1 mM MnCl_2 ; pH 8,0; $T = 37^\circ\text{C}$; 40 mM UDP-Gal]

Tabelle 6.6: Kinetische Konstanten der humanen β -1,4-Galactosyltransferase, Literaturwerte in Klammern

	freies GlcNAc	polymergebundenes MPEG-DOX- GlcNAc 33
$k_{M,\beta 14GalT}$	34,6 mM (32 % β -Form) (2,5 mM (Nakazawa et al. 1993))	10,5 mM
$k_{I,\beta 14GalT}$	14,3 mM	0,54 mM
$k_{M,UDP-Gal,\beta 14GalT}$	6,9 mM (0,025 mM (Nakazawa et al. 1993)) (1,59 mM (Schumacher 1999))	n.b.
$v_{max,\beta 14GalT}$	2,62 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (0,53 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (Nakazawa et al. 1993))	4,73 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$

dem eine Spezies entzogen und ständig nachgebildet wird. Das polymergebundene *N*-Acetylglucosamin **33** liegt ausschließlich in der β -Form vor. Sehr wahrscheinlich resultiert hieraus der gefundene kleinerer k_M -Wert, da nur das β -Anomer als Substrat akzeptiert wird. Multiplikation des $k_{M,\text{GlcNAc},\beta 14GalT}$ -Wertes von 34,6 mM mit dem β -Anomer-Anteil für GlcNAc im wässrigen von 0,32 ergibt einem Wert von 11,1 mM, welcher nahe beim ermittelten $k_{M,\text{GlcNAc-P},\beta 14GalT}$ -Wert von 10,5 mM liegt. Aus den kinetischen Daten und den Graphen ist deutlich die *extrem starke Inhibition durch das polymergebundene Substrat GlcNAc β -DOX-MPEG 33* im Vergleich mit dem freien Substrat zu erkennen. Die

tatsächlichen maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten aus Abbildung 6.37, Teil A und 6.38 liegen in der gleichen Größenordnung. Der höhere v_{max} -Wert für das polymergebundene Substrat MPEG-DOX-GlcNAc **33** ($4,73 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$) im Vergleich zum freien Substrat *N*-Acetylglucosamin ($2,62 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$) in Tabelle 6.6 besitzt wegen der starken Substratinhibierung nur formale Bedeutung.

6.7.3.2 Synthese von polymergebundenem *N*-Acetyllactosamin **34**

Die Synthese von polymergebundenem *N*-Acetyllactosamin **34** wurde ausgehend von polymergebundenem *N*-Acetylglucosamin **33** und UDP-Glucose bei Einsatz der Enzyme β -1,4-GalT, UDP-Gal-4-Epimerase und alkalischer Phosphatase durchgeführt, wie in Abbildung 6.39 dargestellt. Durch Umsatz des entstandenen UDP mit alkalischer Phosphatase wurde die Reaktion auf die Produktseite gezogen.

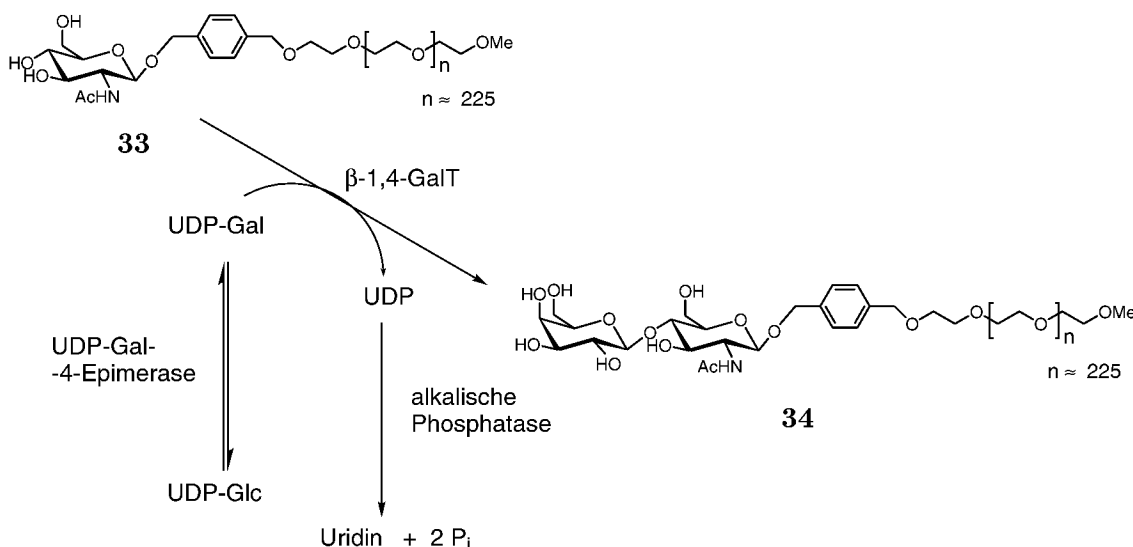


Abbildung 6.39: Synthese von polymergebundenem *N*-Acetyllactosamin **34**

Der Konzentrationsverlauf der Reaktion wurde nach Gleichungen 6.3 und 6.4 und wiederum Gleichung 6.2 für polymergebundenes Edukt und Produkt angepaßt. Das heißt, die Epimerasereaktion wurde separat in Richtung UDP-Glc (Hinreaktion) und UDP-Gal (Rückreaktion) betrachtet. Ferner wurde angenommen, daß aufgrund der hohen Konzentration an alkalischer Phosphatase kein UDP in der Reaktionslösung vorlag.

$$v_{Epimerase,hin} = v_{max,Epimerase,hin} \frac{[UDP - Glc]}{k_{M,UDP-Glc,Epimerase} + [UDP - Glc]} \quad (6.3)$$

mit:	$v_{Epimerase,hin}$	U/mg	Reaktionsgeschwindigkeit der Epimerasereaktion, Hinreaktion
	$v_{max,Epimerase,hin}$	U/mg	maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Epimerasereaktion, Hinreaktion
	$[UDP-Glc]$	mM	UDP-Glucose-Konzentration
	$k_{M,UDP-Glc,Epimerase}$	mM	Michaelis-Menten-Konstante bzgl. UDP-Glucose

$$v_{\text{Epimerase,rück}} = v_{\text{max,Epimerase,rück}} \frac{[\text{UDP-Gal}]}{k_{M,\text{UDP-Gal,Epimerase}} + [\text{UDP-Gal}]} \quad (6.4)$$

mit:	$v_{\text{Epimerase,rück}}$	U/mg	Reaktionsgeschwindigkeit der Epimerasereaktion, Rückreaktion
	$v_{\text{max,Epimerase,rück}}$	U/mg	maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Epimerasereaktion, Rückreaktion
	$[\text{UDP-Gal}]$	mM	UDP-Galactose-Konzentration
	$k_{M,\text{UDP-Gal,Epimerase}}$	mM	Michaelis-Menten-Konstante bzgl. UDP-Galactose

Es resultierte der in Abbildung 6.40 wiedergegebene Reaktionsverlauf mit den in Tabelle 6.7 aufgelisteten kinetischen Konstanten.

Da aus UDP-Glucose erst UDP-Galactose für die eigentliche Glycosylierung gebildet werden muß, muß im Zeitverlauf ein Wendepunkt auftreten, der in Abbildung 6.40 auch schwach zu erkennen ist. Die Ausprägung des Wendepunktes hängt von dem Verhältnis der Epimerase-Aktivität zur Galactosyltransferase-Aktivität ab und ist in nachfolgenden Beispielen noch deutlicher zu erkennen.

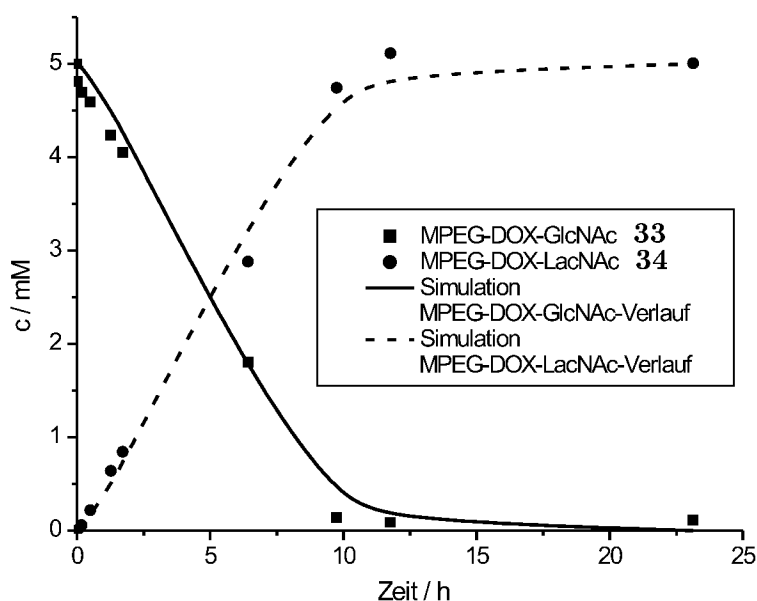


Abbildung 6.40: Konzentrationsverlauf der Synthese von polymergebundenem *N*-Acetyllactosamin **34**, Meßdaten und Simulation [$V = 10$ mL; $T = 30^\circ\text{C}$; 20 mM HEPES; pH 7,2; 25 mM KCl; 1 mM DTT; 1 mM MnCl_2 ; 25 mM UDP-Glc; 1 mg/mL BSA; 5 mM MPEG-DOX-GlcNAc **33**; 500 mU β -1,4-GalT; 500 mU UDP-Gal-4-Epimerase aus *Saccharomyces cerevisiae*; 10 U alkalische Phosphatase]

Tabelle 6.7: Kinetische Konstanten der β -1,4-GalT und der UDP-Gal-4-Epimerase aus *Saccharomyces cerevisiae*, bestimmt über die enzymatische Synthese von polymergebundenem *N*-Acetyllactosamin **34**

$k_{M,GlcNAc-P,\beta 14GalT}$	8,56	mM
$k_{I,GlcNAc-P,\beta 14GalT}$	0,53	mM
$v_{max,Polymer,\beta 14GalT}$	11,30	U*mg ⁻¹
$k_{M,UDP-Gal,Epimerase}$	11,26	mM
$k_{M,UDP-Glc,Epimerase}$	4,71	mM
$v_{max,Epimerase,hin}$	1,32	U*mg ⁻¹
$v_{max,Epimerase,rück}$	2,31	U*mg ⁻¹

Die hier ermittelten Werte der kinetischen Parameter der β -1,4-GalT stehen in guter Übereinstimmung mit den zuvor separat durch Messung von Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten ermittelten Werten. Der hier ermittelte Wert für $k_{M,GlcNAc-P,\beta 14GalT}$ von 8,56 mM ist zu vergleichen mit 10,5 mM und der hier ermittelte Wert für $k_{I,GlcNAc-P,\beta 14GalT}$ von 0,53 mM mit 0,54 mM. Für die maximalen Reaktionsgeschwindigkeit der β -1,4-GalT wurde hier ein um den Faktor zwei höherer Wert ermittelt (hier 11,30 U*mg⁻¹, zuvor 4,73 U*mg⁻¹). Dieser Unterschied für $v_{max,Polymer,\beta 14GalT}$ kann möglicherweise darauf beruhen, daß die Messungen nicht zum gleichen Zeitpunkt vorgenommen wurden und so durch unterschiedliche Aktivitäten ein relativer Fehler vorlag. Die Werte für $v_{max,Epimerase,hin}$ und $v_{max,Epimerase,rück}$, spiegeln unter anderem das Verhältnis der UDP-Glc- und UDP-Gal-Konzentrationen im Gleichgewicht wieder. Es resultiert hier ein Verhältnis von 36 % UDP-Gal und 64 % UDP-Glc, was in Übereinstimmung mit anderen eigenen Experimenten steht (30 % UDP-Gal, 70 % UDP-Glc).

Die Aufarbeitung des polymergebundenen *N*-Acetyllactosamin **34** erfolgte per Ultrafiltration (Pellicon XL 5 kDa). Im Laufe der Enzymabtrennung kam es dabei zu großen Verlusten, die Ausbeute betrug 9,4 % nach Aufarbeitung. Eine Abspaltung des Disaccharides vom Polymer wurde mit 60 % Ausbeute hydrogenolytisch durchgeführt und wird nachfolgend am Beispiel des Galili-Trisaccharides **1** noch gezeigt.

6.7.3.3 Konsequenzen der kinetischen Untersuchungen

Aus den kinetischen Messungen zur β -1,4-GalT geht hervor, daß bei Verwendung des polymergebundenen Substrates **33** eine sehr starke Substratüberschußinhibierung vorliegt. Dies legt ein Arbeiten bei niedriger Konzentration bezüglich des Eduktes MPEG-DOX-GlcNAc **33** nahe.

Auch beim Vierenzymsystem liegt eine starke Abhängigkeit der Reaktion von der Substratanfangskonzentration vor. Abbildung 6.41 zeigt den zeitlichen Verlauf der Ausbeute bezüglich polymergebundenem Galili-Trisaccharid **29** bei verschiedenen MPEG-DOX-GlcNAc-Anfangskonzentrationen. Die Enzymverhältnisse orientierten sich dabei an den Bedingungen der Synthese mit freiem *N*-Acetylglucosamin (Hokke et al. 1996). Ab einer Reaktionszeit von ca. 30 h war kein weiterer Reaktionsfortschritt zu beobachten. Als Ursache hierfür wird die Desaktivierung mindestens eines Enzyms, sehr wahrscheinlich der UDP-Gal-4-Epimerase, angenommen.

Durch Wechsel der Substratanfangskonzentration von 10 mM nach 2 mM ließ sich eine *Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute um den Faktor 43* verwirklichen, wie in Abbildung

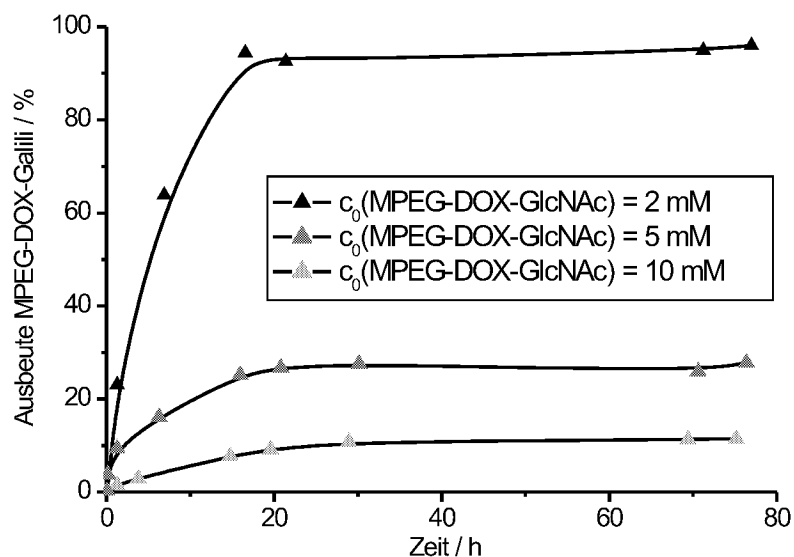


Abbildung 6.41: zeitlicher Verlauf der Galili-Trisaccharid-Ausbeute bei verschiedenen MPEG-DOX-GlcNAc-Startkonzentrationen [$V = 1$ mL; $T = 30^\circ\text{C}$; pH 7,2; 200 mM HEPES; 25 mM KCl; 1 mM DTT; 200 mM Sucrose; 1 mM MnCl_2 ; $c(\text{UDP-Glc}):c(\text{GlcNAc}\beta\text{-DOX-MPEG})=1:5$; 1 mg/mL BSA; 2/5/10 mM $\text{GlcNAc}\beta\text{-DOX-MPEG}$; 200 mU $\beta\text{-1,4-GalT}$; 200 mU $\alpha\text{-1,3-GalT}$; 400 mU UDP-Gal-4-Epimerase aus *Saccharomyces cerevisiae*; 800 mU SuSy; 0,1 mM dTDP-6-Desoxy-D-xylo-4-hexulose]

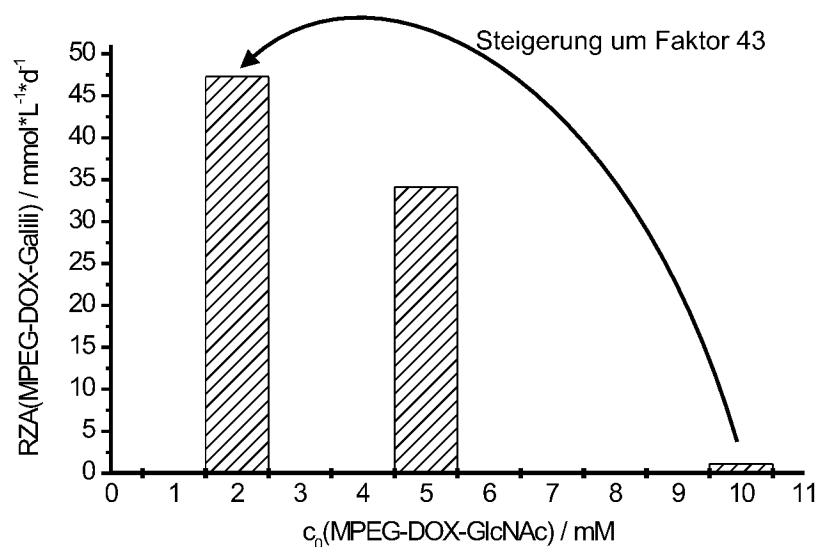


Abbildung 6.42: Raum-Zeit-Ausbeute bzgl. MPEG-DOX-Galili **29** bei verschiedenen MPEG-DOX-GlcNAc-Startkonzentrationen [Bedingungen wie bei Abbildung 6.41]

6.42 dargestellt. Als Folge wurde bei einer $\text{GlcNAc}\beta\text{-DOX-MPEG}$ -Startkonzentration von 2 mM gearbeitet. Eine Nachdosierung des Substrates (fed-batch) wäre ebenfalls denkbar,

vorausgesetzt es liegt keine nennenswerte Produktinhibierung vor. Dies wurde jedoch im Rahmen der Arbeit nicht näher verfolgt.

6.7.4 Synthese des Galili-Trisaccharides 1 und Aufarbeitung

Es war beabsichtigt, Daten zu ermitteln, mit denen man den Verlauf der Reaktionen im Vierenzysystem simulieren kann. Dazu wurde nicht nur die Konzentrationen MPEG-DOX-GlcNAc **33**, MPEG-DOX-LacNAc **34** und MPEG-DOX-Galili **29**, vielmehr auch die Konzentrationen bezüglich UDP-Gal, UDP-Glc, Sucrose, Fructose und UDP über die Zeit verfolgt. Die erhaltenen Daten wurden über eine nicht-lineare Regression an kinetische Gleichungen angepaßt. Für die β -1,4-GalT-Reaktion wurde wie schon zuvor Gleichung 6.2 für polymergebundenen Edukt und Produkt verwendet, s. o., für die UDP-Gal-4-Epimerase-Reaktion wiederum Gleichungen 6.3 und 6.4. Neu hinzu kamen für die α -1,3-GalT-Reaktion Gleichung 6.5 und ferner für die SuSy-Reaktion Gleichung 6.6.

$$v_{\alpha 13GalT} = v_{max,\alpha 13GalT} \frac{[UDP - Gal]}{k_{M,UDP-Gal,\alpha 13GalT} + [UDP - Gal]} * \frac{[LacNAc - P]}{k_{M,LacNAc-P,\alpha 13GalT} + [LacNAc - P]} \quad (6.5)$$

mit:	$v_{\alpha 13GalT}$	U/mg	Reaktionsgeschwindigkeit der α -1,3-GalT-Reaktion
	$v_{max,\alpha 13GalT}$	U/mg	maximale Reaktionsgeschwindigkeit der α -1,3-GalT-Reaktion
	[UDP-Gal]	mM	UDP-Galactose-Konzentration
	$k_{M,UDP-Gal,\alpha 13GalT}$	mM	Michaelis-Menten-Konstante bzgl. UDP-Galactose
	[LacNAc-P]	mM	Konzentration bez. polymergebundenem <i>N</i> -Acetyllactosamin
	$k_{M,LacNAc-P,\alpha 13GalT}$	mM	Michaelis-Menten-Konstante bzgl. polymergebundenem <i>N</i> -Acetylglucosamin

$$v_{SuSy} = v_{max,SuSy} \frac{[Sucrose]}{k_{M,Sucrose,SuSy} + [Sucrose]} * \frac{[UDP]}{k_{M,UDP,SuSy} + [UDP]} \quad (6.6)$$

mit:	v_{SuSy}	U/mg	Reaktionsgeschwindigkeit der SuSy-Reaktion
	$v_{max,SuSy}$	U/mg	maximale Reaktionsgeschwindigkeit der SuSy-Reaktion
	[Sucrose]	mM	Sucrose-Konzentration
	$k_{M,Sucrose,SuSy}$	mM	Michaelis-Menten-Konstante bzgl. Sucrose
	[UDP]	mM	UDP-Konzentration
	$k_{M,UDP,SuSy}$	mM	Michaelis-Menten-Konstante bzgl. UDP

Abbildung 6.43 gibt sowohl den gemessenen Konzentrationsverlauf, als auch den simulierten Reaktionsverlauf wieder, wobei aus Gründen der Übersichtlichkeit lediglich die

Konzentrationen der polymergebundenen Zucker wiedergegeben sind. Die Konzentrationen der restlichen Substanzen befinden sich in Kapitel 9 im Anhang.

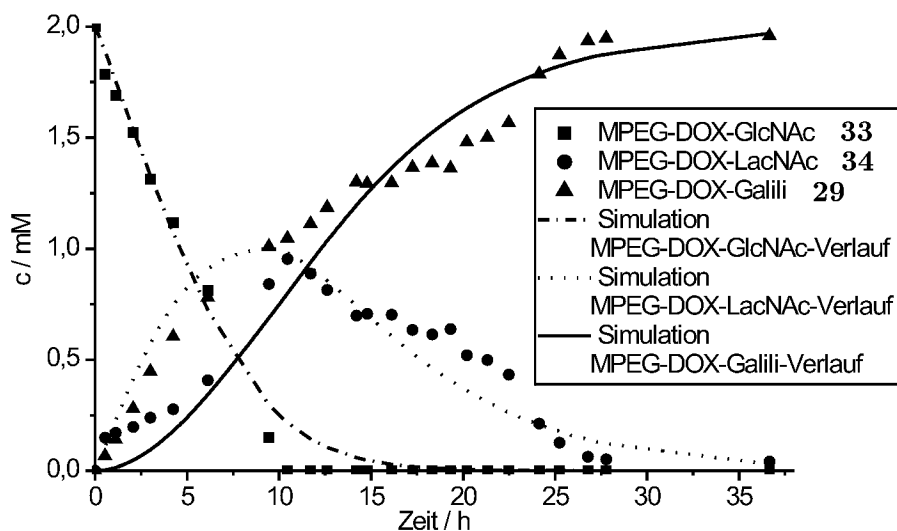


Abbildung 6.43: Konzentrationsverläufe der Synthese des polymergebundenen Galili-Trisaccharides **29** und Simulation der Konzentrationsverläufe [$V = 40$ mL; $T = 25$ °C; 20 mM HEPES; pH 7,2 ; 25 mM KCl; 1 mM DTT; 200 mM Sucrose; 1 mM $MnCl_2$; 0,4 mM UDP-Glc; 1 mg/mL BSA; 2 mM MPEG-DOX-GlcNAc **33**; 3,2 U β -1,4-GalT; 9,6 U α -1,3-GalT; 12,8 U SuSy; 10,9 U UDP-Galactose-4-Epimerase aus *Streptococcus thermophilus*]

Aus der Datenanpassung resultierten die vierzehn in Tabelle 6.8 aufgelisteten kinetischen Parameter. Die hier aus der kompletten Synthese von MPEG-DOX-Galili **29** erhaltenen kinetischen Konstanten sind den zuvor aus Messung von Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten und aus der Synthese von MPEG-DOX-LacNAc **34** erhaltenen Konstanten gegenübergestellt. Es ist eine gute Übereinstimmung der ermittelten Werte zu erkennen. Lediglich bei den Werten der maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten sind starke Unterschiede festzustellen. Dies mag wiederum daran liegen, daß die Messungen nicht zum gleichen Zeitpunkt durchgeführt wurden und so eventuell durch leicht unterschiedliche Aktivitäten ein relativer Fehler auftrat. Auch ist zu bedenken, daß bei Bestimmung der kinetischen Parametern über das komplette Vierzynsystem noch einige Effekte auftraten, die vom Modell nicht erfaßt werden. Dies ist zum Beispiel eine gegen Ende der Synthese aufgetretene Eintrübung, welche einer teilweisen Denaturierung der Enzyme zugeschrieben wurde. Auch wurden nicht alle möglichen Inhibierungen, zum Beispiel auch Produktinhibierungen, erfaßt. Ferner kann das eingesetzte kinetische Modell keine Gleichgewichte beschreiben, wodurch es auch nur eingeschränkt den Reaktionsverlauf richtig wiedergeben kann. An dieser Stelle sei noch einmal auf den lediglich formalen Charakter der ermittelten Daten hingewiesen.

Tabelle 6.8: Kinetische Konstanten der enzymatischen Synthese von polymergebundenem Galili-Trisaccharid **29** im Vergleich mit aus Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten und der MPEG-DOX-LacNAc-Synthese bestimmten Konstanten, Literaturwerte in Klammern

	Daten aus Anfangs- reaktions- geschwindig- keiten	Daten aus MPEG- DOX- LacNAc- Synthese	Daten aus komplettem Vier- enzym- system
$k_{M,GlcNAc-P,\beta 14GalT}$	10,50 mM	8,56 mM	7,71 mM
$k_{I,GlcNAc-P,\beta 14GalT}$	0,54 mM	0,53 mM	0,40 mM
$k_{M,UDP-Gal,\beta 14GalT}$			2,02 mM
$v_{max,\beta 14GalT}$	4,73 U*mg ⁻¹	11,30 U*mg ⁻¹	0,13 U*mg ⁻¹
$k_{M,LacNAc-P,\alpha 13GalT}$			19,45 mM
$k_{M,UDP-Gal,\alpha 13GalT}$			2,22 mM
$v_{max,\alpha 13GalT}$			0,41 U*mg ⁻¹
$k_{M,Sucrose,SuSy}$			67,23 mM (91,6 mM (Römer 2001))
$k_{M,UDP,SuSy}$			0,55 mM (0,004 mM (Römer 2001))
$v_{max,SuSy}$			0,37 U*mg ⁻¹ (12,72 U*mg ⁻¹ (Römer 2001))
$k_{M,UDP-Glc,Epimerase}$		4,71 mM	3,96 mM
$k_{M,UDP-Gal,Epimerase}$		11,26 mM	9,90 mM
$v_{max,Epimerase,hin}$		1,32 U*mg ⁻¹	0,59 U*mg ⁻¹
$v_{max,Epimerase,rück}$		2,31 U*mg ⁻¹	1,97 U*mg ⁻¹

Im Anschluß hieran wurden dann 2,48 g des polymergebundenen *N*-Acetylglucosamin MPEG-DOX-GlcNAc **33** zur präparativen Darstellung des Galili-Trisaccharides **1** umgesetzt. Nach 30 Stunden wurde quantitativer Umsatz erreicht, wie in Abbildung 6.44 dargestellt. Ab etwa Stunde 22 scheint es zu einer Art Beschleunigung zu kommen. Dies könnte an einer Substratüberschußinhibierung der α -1,3-GalT liegen, was plausibel erscheint. Für die β -1,4-GalT wurde dies gezeigt und ist auch im Bereich von Stunde Null bis 10 zu erkennen.

Eine Berechnung der Konzentrationsverläufe mit Hilfe der kinetischen Daten aus dem zuvor angepaßten Reaktionsverlauf war, aus den oben erläuterten Gründen, nur tendenziell möglich, siehe Abbildung 6.44.

Nach vollständigem Umsatz und Abzentrifugieren von denaturiertem Protein konnte die Aufarbeitung mittels Extraktion des Polymers durch Dichlormethan und nachfolgender Ultrafiltration durchgeführt werden. Nach Harris *et al.* verteilt sich PEG6.800 zwischen Wasser und Dichlormethan (gleiche Volumen) im Verhältnis von 75:25 bis 99:1 zu Gunsten der Dichlormethanphase (Harris et al. 1982, Harris 1992). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Verteilungsverhältnisse für MPEG10.000 und dessen Derivat MPEG-DOX-OH **13**, MPEG-DOX-GlcNAc **33**, MPEG-DOX-LacNAc **34** und MPEG-DOX-Galili **29** zwischen Dichlormethan und Wasser von 98,8:1,2 bis größer 99,9:0,1 ermittelt. Die Abtren-

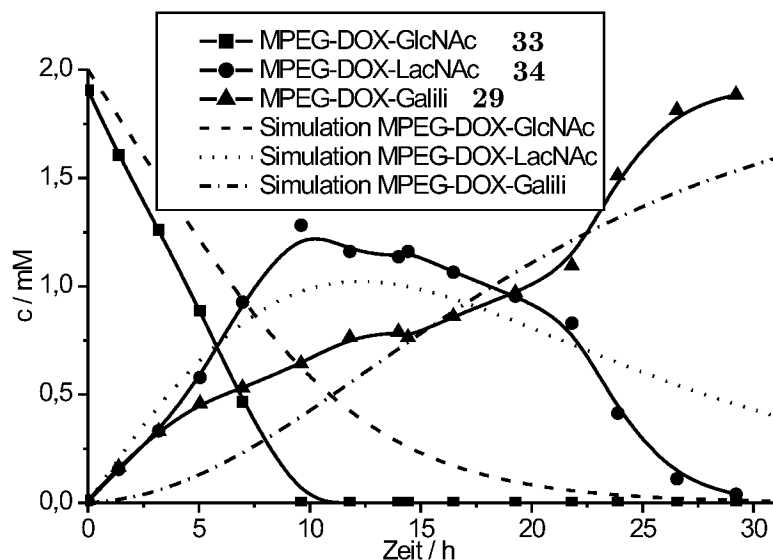


Abbildung 6.44: Konzentrationsverläufe der präparativen Synthese des polymergebundenen Galili-Trisaccharides **29** [$V = 120$ mL; $T = 23$ °C; 20 mM HEPES; pH 7,2; 25 mM KCl; 1 mM DTT; 200 mM Sucrose; 1 mM $MnCl_2$; 0,4 mM UDP-Glc; 1 mg/mL BSA; 2 mM MPEG-DOX-GlcNAc **33**; 4,8 U β -1,4-GalT; 14,4 U α -1,3-GalT; 19,2 U SuSy; 8,6 U UDP-Galactose-4-Epimerase aus *Streptococcus thermophilus*]

nung der MPEG-Kohlenhydratkonjugate durch Ausschütteln mit Dichlormethan ließ sich daher gut durchführen. Ein reines Produkt ließ sich durch Extraktion allein allerdings noch nicht gewinnen. Zur weiteren Ultrafiltration wurde ein kommerzielles PelliconXL10-Membranmodul, dessen Membranen aus Polyethersulfon bestehen, verwendet. Das Modul wurde in der kleinsten erhältlichen Größe (50 cm² Membranfläche) verwendet, die Module sind aber auch in variablen, erweiterbaren Größen — bis hin zum industriellen Produktionsmaßstab — erhältlich. Vor Einsatz der Ultrafiltration wurde das Lösungsmittel Dichlormethan unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Abbildung 6.45 zeigt das Fließbild der verwendeten Diafiltrationsanlage mit einer sogenannten Dosierstrecke. An ein Reaktionsgefäß angeschlossen ist ein Filtrationsmodul (Pellicon XL 10kDa-Modul) und eine Umwälzpumpe, welche für „cross flow“-Bedingungen sorgt. Das Reaktionsgefäß steht dabei auf einer Waage, so daß über eine Steuereinheit eine Dosierpumpe angesteuert werden kann. Diese Dosierpumpe füllt genau die Menge Lösungsmittel nach, welche den Kreislauf als Permeat verläßt. Ein Photo der zur Aufreinigung verwendeten Diafiltrationsanlage zeigt Abbildung 6.46.

Eine Abspaltung des freien Zuckers vom Polymers gelang hydrogenolytisch mittels Palladium auf Aktivkohle (10 % Pd), wie in Abbildung 6.47 aufgeführt. Nach Hydrierung von 983 mg polymergebundenen Trisaccharides **29** und abschließender säulenchromatographischer Aufarbeitung resultierten 26 mg freies Galili-Trisaccharid **1** (51 % Ausbeute bezogen auf **29** nach Säulenchromatographie). Eine Optimierung der Isolierung des polymergebundenen Trisaccharides **29** aus der Reaktionslösung und auch der Hydrierung würde hier sicherlich noch zu besseren Ausbeuten führen.

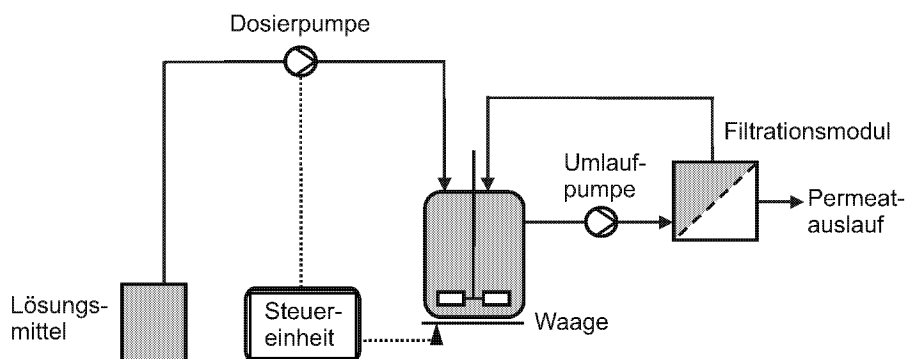


Abbildung 6.45: Fließbild der Diafiltrationsanlage zur Durchführung der Ultrafiltration im wässrigen Medium

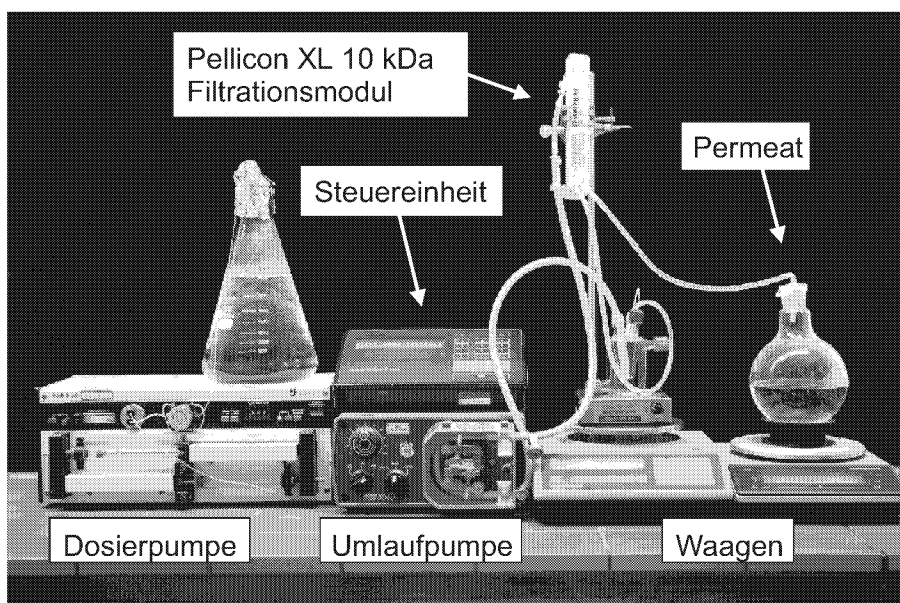


Abbildung 6.46: Diafiltrationsanlage zur Durchführung der Ultrafiltration im wässrigen Medium [PelliconXL 10kDa-Modul mit Dosierstrecke]

In dieser Arbeit wurden so chemo-enzymatisch insgesamt 8,7 g des polymergebundenen *N*-Acetylglucosamin **33**, 100 mg des polymergebundenen *N*-Acetylactosamin **34**, 4,2 g des polymergebundenen Galili-Trisaccharides **29** und 28 mg des freien Galili-Trisaccharides **1** dargestellt, siehe Abbildung 6.48.

Repetitive Reaktionsführung

Eine repetitive Reaktionsführung ließ sich trotz der vielversprechenden Retentionsmessungen nicht durchführen. Als Grund hierfür wird die starke Proteinkonzentration in der Reaktionslösung angenommen. Nach vollständigem Umsatz der Substrate kam es in der Regel zu einer Eintrübung der Reaktionslösung, denaturierte Proteine fielen aus. Verschiedene Versuche mit unterschiedlichen Membranen (Amicon YM10, Amicon YM30, Pellicon XL 10 kDa) wurden durchgeführt. Aus Aktivitätsmessungen vor dem Versuch

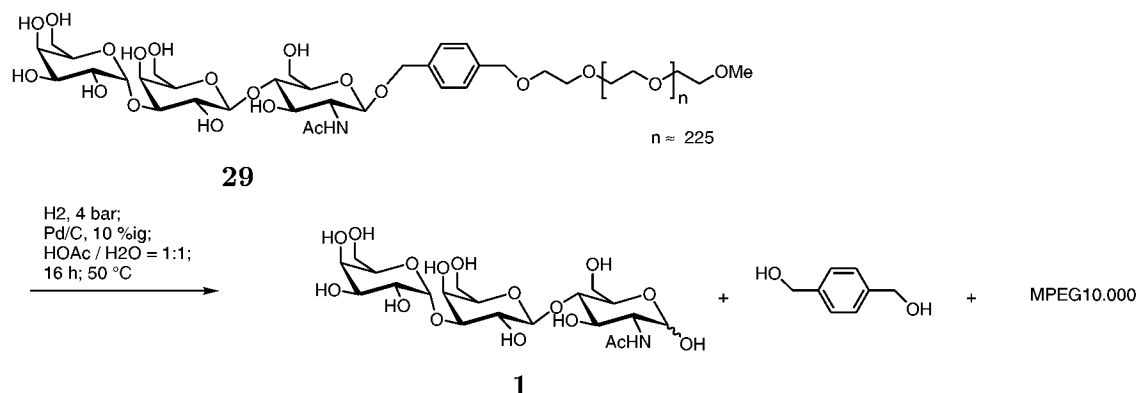


Abbildung 6.47: Abspaltung des Produktes Galili-Trisaccharid **1** vom Polymer

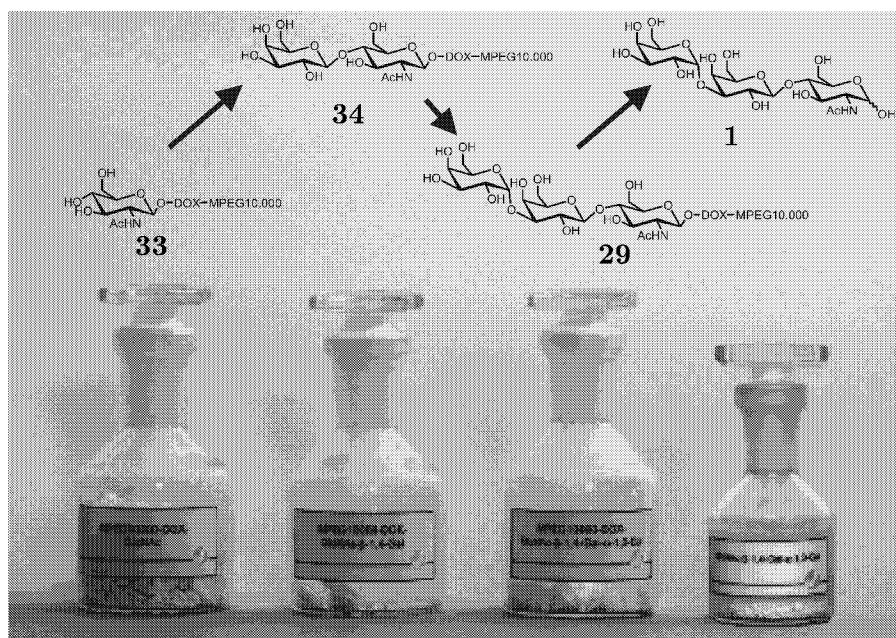


Abbildung 6.48: Die vier Produkte GlcNAc β -DOX-MPEG **33**, LacNAc β -DOX-MPEG **34**, Galili β -DOX-MPEG **29** und freies Galili-Trisaccharid **1**

der Filtration ging hervor, daß bei vollständigem Umsatz auch nach 58 Stunden noch 89 % der α -1,3-GalT-Aktivität und 62 % der β -1,4-GalT-Aktivität vorlagen. Abfiltrieren gelang nicht, es kam zum Verblocken der Membranen. Bei Verwendung der Pellicon XL 10 kDa-Membran resultierte ein Transmembranfluß von $31 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{bar}^{-1}$ im Vergleich zu $92 - 160 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{bar}^{-1}$ bei vorangegangenen Retentionsmessungen. Diese offensichtliche Deckschichtbildung hatte die Auswirkung, daß die Retention des Polymers von 0,42 (erwünschte Möglichkeit des Polymerausspülens) auf quantitative Retention anstieg. Bei Verwendung der Amicon Y10 und Y30-Membranen konnte in kommerziellen Amicon-Filtrationszellen trotz Druckbeaufschlagung (4 bar) und Rühren kein nennenswerter Transmembranfluß erreicht werden.

6.8 Zusammenfassung

- Die **Synthese des Galili-Trisaccharides 1** konnte **polymergebunden** mit Hilfe des Dioxyxylyl-Linkers **13** und eines Vierenzymsystems bestehend aus β -1,4-GalT, α -1,3-GalT, SuSy und UDP-Gal-4-Epimerase durchgeführt werden.
- Das Enzym β -1,4-GalT wurde dargestellt (200L-*E. coli*-Fermentation), es resultierten **1970 U in 1730 g Feuchtbiomasse**. Aus 150 g Feuchtbiomasse wurden **58,7 U β -1,4-GalT aufgereinigt**.
- **Membranen zur quantitativen Retention der polymergebundenen Zucker im Medium Wasser** wurden ermittelt.
- Als zentraler Bestandteil einer polymer- und membranunterstützten Flüssigphasen-Oligosaccharidsynthese konnte eine **HPLC-Analytik für polymergebundene Zucker** etabliert werden.
- **8,7 g polymergebundenes *N*-Acetylglucosamin 33** — ausschließlich β -gebunden — wurden chemisch dargestellt.
- **100 mg polymergebundenes *N*-Acetyllactosamin 34** wurden enzymatisch dargestellt.
- Aufgrund **kinetischer Messungen** konnte bei der Synthese des polymergebundenen Trisaccharides **29 quantitativer Umsatz** nach 30 Stunden erzielt werden.
- **4,2 g polymergebundenes Galili-Trisaccharid 29** wurden enzymatisch dargestellt.
- Die Aufreinigung gelang mit Hilfe von **Extraktion und Ultrafiltration**.
- Eine hydrogenolytische Abspaltung des Galili-Trisaccharides vom Polymer wurde durchgeführt, Ausbeute 51 %.
- **28 mg freies Galili-Trisaccharid 1** wurden dargestellt.

7 Diskussion und Ausblick

Im vorliegenden Kapitel sollen die Ergebnisse der vorangegangenen Kapitel näher beurteilt und mit anderen Arbeiten verglichen werden.

7.1 Membranen

Es wurde in dieser Arbeit besonders der Einsatz von keramischen Membranen näher untersucht, da kommerzielle Polymermembranen für den Einsatz in organischen Lösungsmitteln nur bedingt zu verwenden sind (Schmidt et al. 1999, Brinkmann et al. 1999) und nicht die Stabilitäten aufweisen, die Keramiken versprechen. Bei keramischen Membranen ist bisher — trotz all ihrer Vorzüge, wie guter mechanischer und chemischer Stabilität der Keramik, guter Rückspülbarkeit, hoher Standzeiten — die unzureichende Lösungsmittelstabilität der Membranversiegelungen an den Rohrenden zu bemängeln. Ein Einsatz in sämtlichen organischen Lösungsmitteln ist dadurch bisher ausgeschlossen. Die Versiegelung der Wahl wäre hier durch verglaste Enden gegeben. Getestete keramische Rohrmembranen, welche sich noch in der Entwicklung befindenden und bei denen das Verglasen aber gelungen sein sollte, hielten nicht die in sie gesetzten Erwartungen.

Seit Beginn 2001 werden nun erstmals vom Hermsdorfer Institut für Technische Keramik e. V. Membranen im Bereich der Nano- und Ultrafiltration angeboten, bei denen eine Verglasung gelungen scheint (Voigt 2001). Dies soll laut Herstellerangaben verwirklicht sein bei hervorragenden Ausschlußgrenzen und Transmembranflüssen, die die der bisher besten kommerziell verfügbaren Membranen Porocer und Membralox übertreffen (Puhlfurss et al. 2000). Für die Zukunft dürfte dies eine gute Alternative sein, die Herstellerangaben sollten allerdings noch verifiziert werden. Die sich hier bietenden Chancen werden sicher zu einem weiteren Anwachsen des Einsatzes von Ultrafiltrationstechniken in der Produktaufarbeitung führen.

Verschiedene Arten der Retentionsmessungen wurden durchgeführt. Als besonders vorteilhaft zur Charakterisierung von Membranen hat es sich erwiesen, mehrere PEG-Retentionen gleichzeitig unter Zuhilfenahme der Gelpermeationschromatographie zu messen (Französische Norm 1997).

Es wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig die Ultrafiltration in organischen Medien in der polymerunterstützten Flüssigphasen-Oligosaccharidsynthese eingesetzt. Es konnte damit gezeigt werden, daß ein Ausfällen beim Arbeiten an der homogen löslichen Phase PEG vollständig umgangen werden kann. Gleichwohl muß in jedem Einzelfall abgewogen werden, welches Verfahren mit weniger Aufwand verbunden ist und die besseren Ergebnisse liefert. So zeigte sich beim enzymatischen Arbeiten, daß bei Anwesenheit von großen Proteinmengen die Filtration nur schwer möglich ist. In diesem Fall war es wesentlich einfacher in einem ersten Schritt das PEG mit kovalent daran gebundenen Produktmolekülen in eine Dichlormethanphase zu extrahieren. Nachfolgend konnte dann in einem zweiten

Schritt eine Ultrafiltration zur weiteren Abtrennung von niedermolekularen Substanzen durchgeführt werden, vorzugsweise nach Einrotieren und Wiederaufnahme in Wasser.

7.2 Polymerunterstützte Synthese

Die polymer- und membranunterstützte Methode wurde sowohl im organischen Medium, als auch im wässrigen Medium eingesetzt. Es wurde allerdings offensichtlich, daß der enzymatischen Synthese — falls möglich — der Vorzug zu geben ist. Der Grund ist neben der exzellenten Selektivität der enzymatischen Synthesen die wesentlich leichtere gerätetechnische Handhabung eines wässrigen Systems, wie zuvor aufgezeigt.

7.2.1 Polymer

Das Polymer MPEG10.000 erwies sich für die Durchführung der polymerunterstützten Synthese als ideal. Abbildung 7.1 faßt die wichtigsten Eigenschaften von MPEG10.000, welche es zu einem hervorragenden Träger für die Synthese an einem löslichen Polymer machen, zusammen.

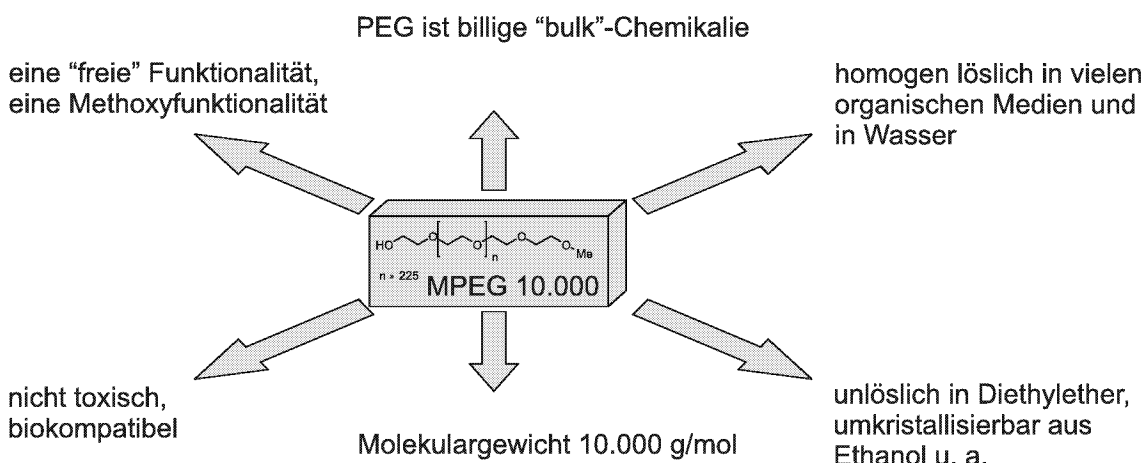


Abbildung 7.1: Eigenschaften von MPEG10.000

Preis

Bei der Synthese in größerem Maßstab sind die Kosten der Edukte nicht unbedeutend. PEG sind „bulk“-Chemikalien und für einen polymeren Träger extrem günstig, der Katalogpreis liegt bei 38.- DM für MPEG5000 (Sigma-Aldrich 2000).

Molekulargewicht

Zur Aufarbeitung läßt sich, neben der beschriebenen Methode des Ausfällens, ab dem Molekulargewicht von 10.000 g/mol auch die Ultrafiltration einsetzen. Der Einsatz von PEG mit größerem Molekulargewicht bringt keinen nennenswerten Vorteil im Hinblick auf die Filtration, bei gleichzeitig schlechterer maximal möglicher Beladung. Durch die Verwendung der Ultrafiltration erweitern sich die Einsatzmöglichkeiten des PEG erheblich. Bei Synthesen im wässrigen Medium ist ein Aufarbeitung mittels Ausfällens nur nach Einrotieren oder Extrahieren, Hochvakuumtrocknung und Wiederaufnahme in organischem

Lösungsmittel möglich. Alternativ kann die Gelpermeationschromatographie eingesetzt werden. Beide Möglichkeiten führen dazu, daß eine PEG-unterstützte Synthese in Wasser als unpraktikabel anzusehen war oder nur mit erheblichem Aufwand durchgeführt werden konnte. Bei Verwendung der Ultrafiltration ist es möglich mit vertretbarem Aufwand in wäßrigen Systemen zu arbeiten. Der Einsatz von Enzymen zur Synthese an PEG wird hierdurch ganz erheblich erleichtert. Gleiches trifft auf die Anwesenheit von Metallionen zu. Metallionen führen dazu, daß sich das Ausfällen von PEG nur sehr schlecht bewerkstelligen läßt. Es kommt zur Inklusion von Metallionen, welche von PEG komplexiert werden. Der Niederschlag fällt in Folge dessen — wie bei Anwesenheit von Wasserspuren — schleimig anstelle von kristallin bis wachsartig an. Auch ist die Ausbeute stark vermindert und wird durch nötiges Umkristallisieren weiter vermindert. Auch bei der PEG-unterstützten Synthese von großen hydrophilen Molekülen stellt sich dieses Problem. Die Ultrafiltration bietet hier eine hervorragende Alternative.

Löslichkeit

PEG besitzt unter den Polymeren einzigartige Löslichkeiten (Geckeler 1995, Krepinsky 1996, Zhao et al. 1998, Harris 1992). Es ist gut löslich in Dichlormethan, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Cyclohexanon, DMF, Pyridin, Benzen, Toluol, Acetonitril, Aceton, heißem Tetrahydrofuran, heißem Ethanol und kaltem Wasser und kaum löslich in Hexan, Diethylether, *t*-Butylmethylether, Isopropanol und Ethylenglykol. Gerade diese Eigenschaften machen PEG als polymeren Träger sehr interessant. Es ist möglich zum einen chemisch in vielen organischen Medien zu arbeiten, zum anderen aber auch enzymatisch in Wasser. Eine gängige Arbeitsweise beruht darauf, in organischen Lösungsmitteln, wie Dichlormethan, Acetonitril und anderen, eine Synthese durchzuführen und anschließend durch Zugabe von beispielsweise Diethylether das Polymer auszufällen. Aus Ethanol kann man umkristallisieren.

Aufgrund seiner guten Löslichkeit bietet sich eine PEG-Anbindung auch zur Solubilisierung von hydrophoben Molekülen an, um so beispielsweise enzymatische Umsetzungen durchzuführen, die ansonsten aufgrund der Löslichkeit in Wasser nur schlecht zu bewerkstelligen sind. Diese Alternative wurde bisher nicht genutzt, da eine Kompatibilität mit Ausfällen hier nicht gegeben ist. Die Ultrafiltration könnte hier Abhilfe schaffen. Da die Solubilisierung über eine kovalente Anbindung allerdings recht aufwendig wäre, wäre die Anwendung sehr beschränkt.

Die mögliche Solubilisierung von Pharmaka durch PEG-Anbindung bietet eventuell in Einzelfällen eine gute Möglichkeit, um zum Beispiel hydrophobe Medikamente in den menschlichen Körper einzuschleusen. Ganz ähnlich bedient sich der Organismus von Säugern der Glucuronidierung zum Ausschleusen von hydrophoben Molekülen.

Die gute Löslichkeit von PEG kommt auch einer Maßstabsvergrößerung und einer eventuellen Automatisierung entgegen.

Monofunktionalität

Wenn es um die Durchführung einer Synthese geht, ist stets die Analytik ein wichtiger Punkt. Bis dato wurde bei der PEG-unterstützten Synthese entweder eine Analytik per NMR oder nach Abspalten der Moleküle vom Polymer durchgeführt. Beide Methoden können nicht als Methode der Wahl angesehen werden. Bei Verwendung von MPEG kann zum einen die Methoxyfunktionalität in NMR-Experimenten als interner Standard

verwendet werden. Zum anderen konnte aber gezeigt werden, daß eine Reaktionskontrolle per HPLC direkt am Polymer möglich ist. Dies ist nicht zuletzt möglich, weil die Synthese lediglich an einer Funktionalität pro Polymermolekül stattfindet. Desweiteren ist auch die Zugänglichkeit der Endgruppen hierdurch wesentlich besser als bei einem Polymer mit mehreren Endgruppen. Ein Nachteil ist allerdings, daß die maximal mögliche Beladung des Polymers damit recht niedrig ist (z. B. bei MPEG10000 beträgt diese 0,1 mmol/g).

Toxizität

PEG ist ab einem Molekulargewicht von 400 g/mol nicht toxisch und Pharmaka lassen sich daher auch in Form ihrer PEG-Konjugate einsetzen. Hierdurch werden unter Umständen erhebliche Vorteile erzielt. So konnte gezeigt werden, daß sich Halbwertszeiten im Körper durch Polymeranbindung wesentlich erhöhen lassen (Nagasaka et al. 1997, Lee et al. 1999, Yasukawa et al. 1999). Ferner sei erwähnt, daß PEG auch in der Lage ist Pharmaka durch Membranen hindurch zu transportieren, so kann PEG beispielsweise die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Dies zeigt, daß PEG nicht nur als Mittel zur Durchführung der Synthese sinnvoll einzusetzen ist. Vielmehr können auch direkt die PEG-gebundenen Moleküle von großem Interesse sein.

Bei der Auswahl geeigneter Träger sind auch weiterhin Dendrimere von großem Interesse (Buhleier, Wehner & Vögtle 1978, Moors & Vögtle 1993, Issberger, Moors & Vögtle 1994, Matthews, Shipway & Stoddart 1998, Kieburg & Lindhorst 1997). Zwar besitzen sie nicht all die vorteilhaften Eigenschaften der PEG, wie zum Beispiel Monofunktionalität. Dafür haben sie aber andere sehr positive Eigenschaften. So besitzen sie in der Regel ebenfalls hervorragende Löslichkeiten und man kann sie auch mittels Ultrafiltration zurückhalten (Brinkmann et al. 1999, Kleij et al. 2000). Auch sollten, bedingt durch den Aufbau des Moleküls die Endgruppen bevorzugt in den äußeren Bereichen des Dendrimers liegen, was zu einer leichteren Zugänglichkeit führt. Ferner durchläuft die intrinsische Viskosität von Dendrimeren mit steigendem Molekulargewicht ein Maximum, während die intrinsische Viskosität von PEG mit steigendem Molekulargewicht steigt, wie in Abbildung 7.2 schematisch dargestellt (Frey, Lorenz & Lach 1996). Dies könnte ein nicht zu unterschätzender Vorteil von Dendrimeren sein. Nähere Untersuchungen dazu bleiben abzuwarten.

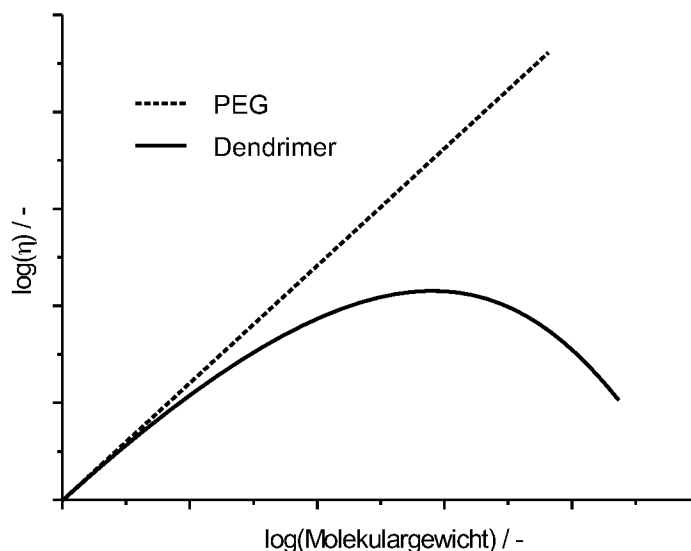


Abbildung 7.2: Logarithmus der intrinsische Viskosität, η , von PEG und Dendrimeren bei unterschiedlichen Molekulargewichten, schematisch (Frey, Lorenz & Lach 1996)

7.2.2 Linker

Im Rahmen dieser Arbeit wurden der Flitsch-Linker **10** und der Dioxyxylyl-Linker **13** synthetisiert und auf ihre Eignung zur polymerunterstützten Synthese von Oligosacchariden getestet. Das Ziel war einen möglichst universellen Linker zu verwenden, der sowohl bei chemischen als auch bei enzymatischen Arbeiten eingesetzt werden kann.

Flitsch-Linker

Der vorgestellte Flitsch-Linker **4** wurde im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert und getestet, aber aufgrund seiner aufwendigen Synthese und seiner Labilität bei Anwesenheit von Trimethylsilyltriflat und Scandiumtriflat nicht weiter verfolgt. Dies heißt jedoch nicht, daß dieser Linker nicht seine Vorzüge hat und durchaus bei anderen Synthesen sinnvoll zu verwenden ist, zumal bei rein enzymatischen.

Die eigentliche Synthese besitzt noch Verbesserungspotential. Naheliegender wäre es hier, die Linkersynthese leicht modifiziert direkt am Polymer durchzuführen, um so auch schon bei der Linkersynthese selbst die chromatographischen Aufreinigungsschritte einzusparen. Bei Einsatz der Williamson'schen Ethersynthese direkt über die Hydroxyfunktion des Polymers könnte man so auch die sonst nötige Derivatisierung des Polymers vermeiden. Zur Anbindung des freien Linkers an das Polymer war eine Carboxyfunktion anstelle einer Hydroxyfunktion notwendig. So sollte sich die Anzahl der zur Synthese notwendigen Stufen von neun auf vier reduzieren lassen, bei gleichzeitigem Ersatz der chromatographischen Aufarbeitung durch Ultrafiltration, siehe Abbildung 7.3. Ferner kann man das Polymer nach erfolgter Oligosaccharidsynthese und Abspaltung — chemisch oder enzymatisch mittels Penicillin Amidase — rezyklieren und ausgehend von der dann vorliegenden Aldehydfunktion in nur zwei Stufen den Linker wieder aufbauen.

Ob dieser Syntheseweg gangbar ist, bleibt zu überprüfen. Voraussetzung ist, daß

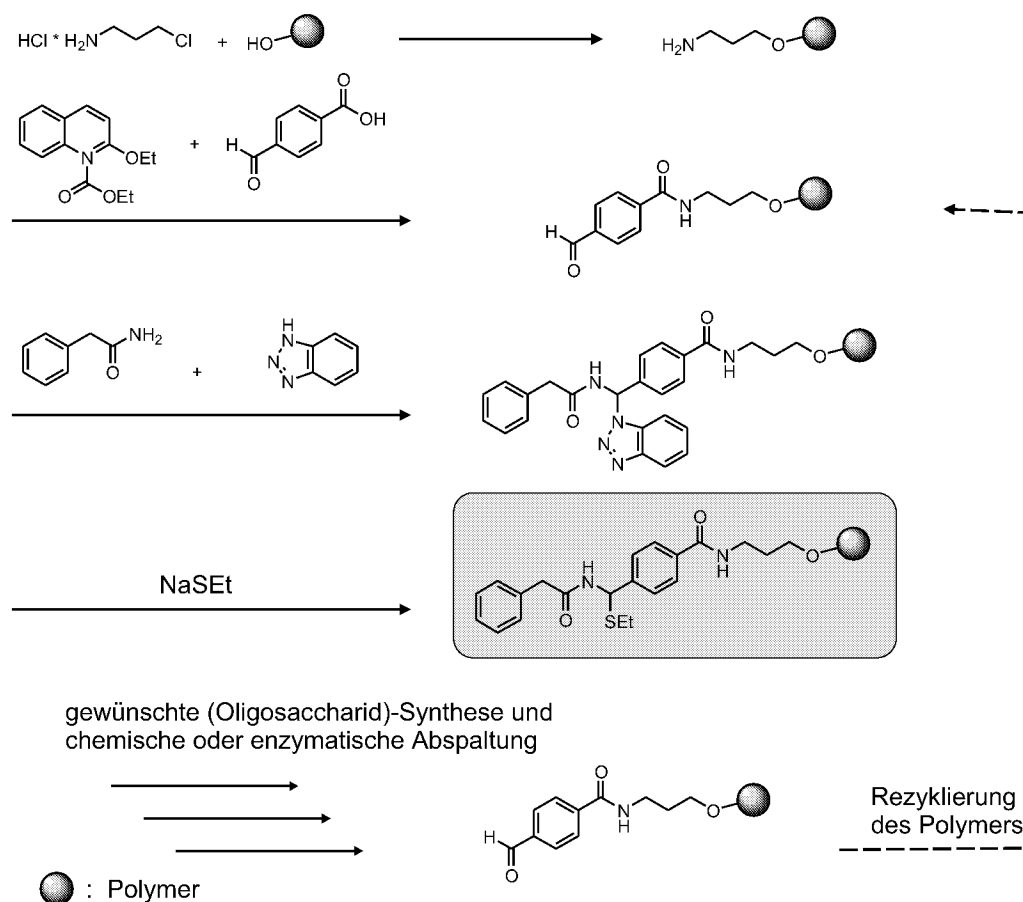


Abbildung 7.3: Idee zur Synthese und Rezyklierung des Flitsch-Linkers am Polymer, grau unterlegt ist der polymergebundene Flitsch-Linker

die entstehenden unerwünschten Nebenprodukte komplett oder doch zum Großteil frei in Lösung anfallen und sich dann vom Polymer abtrennen lassen.

Bei der enzymatischen Synthese des Galili-Trisaccharides am Polymer wäre ein Einsatz des Flitsch-Linkers durchaus sinnvoll, wenn sich die eigentliche Linker-Synthese vereinfachen lässt.

Dioxyxylyl-Linker

Mit dem Dioxyxylyl-Linker **13** wurde ein leicht zu synthetisierender Linker ausgewählt, der sowohl in der chemischen als auch in der enzymatischen Synthese von Oligosacchariden eingesetzt werden konnte. Neben der in dieser Arbeit verwendeten Technik des hydrogenolytischen Abspaltens steht auch die Abspaltung mittels $\text{Sc}(\text{OTf})_3 / \text{Ac}_2\text{O}$ zur Verfügung (Mehta & Whitfield 1998). Dabei findet, wie in Abbildung 7.4 dargestellt, die Spaltung des Linkers an der C-O-Bindung der dem Polymer MPEG zugewandten Seite und nicht an der anomeren Position des Zuckers statt. Die Reaktion läuft in Folge einer Koordinierung des Sc^{3+} durch das PEG ab. Durch den so am Zucker verbleibenden aromatischen Rest wäre auch eine finale säulenchromatographische Aufreinigung erleichtert, es käme allerdings dann noch eine weitere Stufe zur Entfernung des aromatischen Restes hinzu.

Welcher Weg der einfachere ist, läßt sich nicht pauschal sagen.

Neben den beiden vorgestellten Linkern würde sich bei einer rein enzymatischen Synthese am Polymer auch ein Succinoyl-Linker eignen (Douglas, Whitfield & Krepinsky 1991), siehe Abbildung 7.5. Hierbei dürfte es wesentlich leichter sein, zu guten Beladungen des Polymers bezüglich Linker zu kommen.

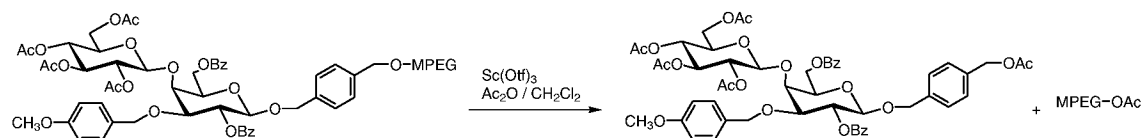


Abbildung 7.4: Spaltung des DOX-Linkers mittels Scandiumtriflat (Mehta & Whitfield 1998)

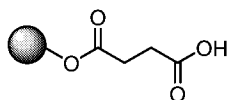


Abbildung 7.5: Succinoyl-Linker (Douglas, Whitfield & Krepinsky 1991)

7.2.3 Chemische, polymerunterstützte Oligosaccharidsynthese

Die Synthese der α -1,2-verbrückten Tetramannopyranose **28** konnte PEG-unterstützt bei Ersatz von Ausfällen durch Ultrafiltration durchgeführt werden. Die Glycosylierung über die Trichloracetimidatmethode lieferte dabei Ausbeuten, die zu lediglich 17 % Tetrasaccharidanteil in der Produktmischung nach hydrogenolytischem Abspalten vom Polymer führten. Schmidt *et al.* beschreiben die Synthese des gleichen Tetrasaccharides an einem Divinylbenzen-Polystyren-Copolymer bei Verwendung eines Thio-Linkers (Rademann & Schmidt 1997). Die Ausbeute betrug dort 34 %. Die in der vorliegenden Arbeit geringere — wenn auch nicht direkt vergleichbare — Ausbeute läßt sich mit den Problemen bei der Ultrafiltration im rein organischen Medium erklären (keine lösungsmittelstabilen Versiegelungen der Membranen). Aufgrund dieser Probleme wurde teilweise so gearbeitet, daß nach Durchführung eines Syntheseschrittes die Lösung trockengezogen und in 50 %igem Ethanol aufgenommen und ultrafiltriert wurde. Es ist sehr wahrscheinlich, daß nach anschließendem Trockenziehen, Trocknen im Hochvakuum und Wiederaufnahme in organischem Medium noch Wasserspuren vom PEG zurückgehalten wurden. Wasserspuren führen bei der Trichloracetimidatmethode jedoch zu drastischen Ausbeuteverlusten.

Schließlich gelang es die Ultrafiltration in Acetonitril bei Verwendung der Membralox 1 kDa-Membran durchzuführen. Auch in Acetonitril, an Stelle von Dichlormethan, läßt sich die Glycosylierung über die Trichloracetimidatmethode durchführen. Desweiteren konnte dann aber gezeigt werden, daß trotz Ausschluß von Wasserspuren das Edukt 2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannosyl-trichloracetimidat **17** und auch das Produkt MPEG-DOX-2-O-acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosid **23** nicht die gewünschte Stabilität besaßen. Als Grund wird hierfür der Katalysator Trimethylsilyltriflat angesehen.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Technik der Ultrafiltration mit Einschränkungen auch in organischen Medien funktionierte, daß aber die Glycosylierungsmethode nur unzureichende Ausbeuten lieferte.

7.2.4 Enzymatische, polymerunterstützte Oligosaccharidsynthese

7.2.4.1 Bereitstellung der Substrate

Die Synthese von MPEG-DOX-2-acetamido-2-deoxy-3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucose **33** konnte anomenenrein ausgehend von 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- α -D-glucopyranosylchlorid **31** durchgeführt werden. Dabei war es möglich im Lösungsmittel Dichlormethan zu arbeiten oder aber auch vollständig auf ein Lösungsmittel zu verzichten und bei 70 °C in einer PEG-Schmelze zu arbeiten. Das Arbeiten ohne Lösungsmittel kommt besonders einer eventuellen Maßstabsvergrößerung entgegen.

7.2.4.2 Synthese des Galili-Trisaccharides 1

Die Synthese des α -Gal-Trisaccharides Gal α -1,3-Gal β -1,4-GlcNAc **1** konnte mit einer Gesamtausbeute von 23 % ausgehend von polymergebundenem *N*-Acetylglucosamin **33** durchgeführt werden. Die Umsetzung des polymergebundenen Monosaccharides zum Trisaccharid lief quantitativ ab, wobei die großen Verluste vermutlich während der Abtrennung der Enzyme auftraten. Auch ist bekannt, daß die hydrogenolytische Abspaltung mittels Pd, Pt oder Ni durch PEG inhibiert wird. Dies ließe sich durch Verwendung von

Sc(OTf)₃ zur Abspaltung umgehen, wobei dann allerdings zunächst noch der Linker am Zucker verbliebe.

Die vorgestellte Methode bietet gerade bei teuren Produkten, wie dem dargestellten Galili-Epitop mit einem Preis von 13500 US\$/g (CMS Carbohydrate 15000 US\$/g, Dextra 14000 Euro/g, Roche 13500 US\$/g, jeweils bei Abnahme von einem Gramm) eine bedenkenswerte Alternativsynthese. Der eigentliche Nutzen der erarbeiteten Methode ist umso größer, je länger die Synthesesequenz ist. Die Galili-Trisaccharidsynthese wurde in dieser Arbeit lediglich als Modellsystem gewählt.

Ganz anders sieht es aus, wenn das gewünschte Produkt nicht der freie Zucker, sondern der an PEG gebundene Zucker selbst ist. In Kapitel 1 wurde bereits auf den Nutzen von PEG-gebundenen α -Gal-Trisacchariden hingewiesen.

Kobayashi *et al.* beschreiben, daß durch die PEG-Anbindung wesentlich längere Halbwertszeiten im Körper resultieren. Ein weiteres entscheidendes Resultat war, daß die PEG-Anbindung des α -Gal-Epitopes gleichzeitig zu einer erhöhten Inhibierung der Cytotoxizität humanen Serums gegenüber kultivierten Schweinezellen führte. Komplette Inhibierung der Cytotoxizität, wie sie für die Behandlung der hyperakuten Abstoßung von Schweineorganen im Menschen wichtig wäre, wurde bei einer Konzentration des polymergebundenen α -Gal-Epitopes von 10 mM erzielt, während das freie Trisaccharid auch bei 50 mM nur teilweise Inhibierung der Cytotoxizität hervorrief (Nagasaka *et al.* 1997). Diese Resultate öffnen einen Weg hin zum Einsatz der Xenotransplantation von Schwein zum Mensch. Durch die in dieser Arbeit vorgestellte Technik wird unter anderem die Darstellung von α -Gal-Trisaccharid-PEG-Konjugaten erleichtert.

Das Vierenzymsystem aus β -1,4-GalT, α -1,3-GalT, Sucrose Synthase und UDP-Gal-4-Epimerase hat sich in der vorliegenden Arbeit bewährt. Der Einsatz von Fusionsenzymen aus UDP-Gal-4-Epimerase und Galactosyltransferase ist allerdings wesentlich einfacher und kostengünstiger, sofern diese Enzyme kostengünstig verfügbar sind. Zur Produktion des Galili-Epitopes wären dann lediglich zwei Fusionsenzyme nötig und als Substrat die im Vergleich zur UDP-Galactose sehr preiswerte UDP-Glucose einzusetzen. Wang *et al.* beschreibt den Einsatz solch eines Galactosyltransferase-Epimerase-Fusionsenzym zur Synthese verschiedene α -Gal-Epitop-Derivate (Fang *et al.* 2000).

7.2.5 Analytik

Im Rahmen dieser Arbeit wurden HPLC-Systeme zur Analytik PEG-gebundenen Moleküle etabliert. So konnte die Bestimmung der Linker-Beladung von MPEG10000 mittels Acetylierung und NMR-Messung ersetzt werden. Auch konnte gezeigt werden, daß die chemische Synthese an PEG direkt per HPLC untersucht werden kann.

Zur Etablierung von PEG-gestützten Oligosaccharidsynthesen und auch anderen PEG-gestützten Synthesen verspricht die erfolgte nähere Untersuchung der Analytik *direkt am Polymer* einen wesentlichen Beitrag zu liefern. Über die Technik der Bestimmung des „kritischen Punktes“ ist die Analytik wie beschrieben relativ einfach durchzuführen.

7.2.6 Kinetische Messungen

Bei den enzymatischen Arbeiten ermöglichte die Etablierung der HPLC-Analytik von PEG-gebundenen Kohlenhydraten erstmalig die Aufnahme von kinetischen Daten enzy-

matischer Reaktionen mit polymergebundenen Substraten. Hierdurch war es möglich die Ausbeute bei der Synthese von polymergebundenem Galili-Trisaccharid **29** von 18 % auf quantitative Ausbeute zu verbessern.

Die Anpassung von kinetischen Parametern des gesamten Vierzymsystems auf einmal wurde ebenfalls gezeigt. Dazu wurden die Konzentrationen von MPEG-DOX-GlcNAc **33**, MPEG-DOX-LacNAc **34**, MPEG-DOX-Galili **29**, Sucrose, Fructose, UDP-Gal, UDP-Glc und UDP bei der Synthese von MPEG-DOX-Galili **29** verfolgt. Es wurden dann die Daten mittels der einzelnen zugrunde liegenden kinetischen Gleichungen angepaßt. Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung wäre eine „black box“-Optimierung über einen genetischen Algorithmus (Hoh 1999).

7.3 Vergleich zwischen enzymatischer und chemischer Methode

Bei der Oligosaccharidsynthese in organischen Lösungsmitteln traten die Probleme auf, daß die Versiegelungen der keramischen Membranen nicht mit allen organischen Medien kompatibel waren und daß die chemische Synthese nicht quantitative Umsätze lieferte.

Diese Probleme fallen bei der enzymatischen Synthese komplett weg. Als weitere Vorteile einer enzymatischen Synthese sind zu nennen, daß als Lösungsmittel in der Regel Wasser verwendet wird. Speziell der Einsatz von Glycosyltransferasen ist besonders geeignet zur Synthese von Oligosacchariden. Glycosyltransferasen sind nicht nur hervorragend chemo- und regio-, sondern vor allem auch stereospezifisch. Ferner ist es leicht möglich quantitative Umsätze zu erzielen, wenn das Nukleotidnebenprodukt abgefangen wird. So wurde beispielsweise in der vorliegenden Arbeit auch polymergebundenes *N*-Acetyllactosamin **34** durch kombinierten Einsatz von β -1,4-GalT und alkalischer Phosphatase synthetisiert. Die Glycosyltransferasen sind somit den Glycosidasen weit überlegen. Als Nachteile sind zu nennen, daß nur bestimmte glycosidische Bindungsknüpfungen möglich sind. In der Regel sind dies solche, welche auch in der Natur vorkommen oder doch zumindest diesen ähnlich sind. Hierzu ist zu sagen, daß mittlerweile immer mehr rekombinante Glycosyltransferasen kommerziell erhältlich sind. Dadurch fällt auch der Preis und Glycosyltransferasen sind heute schon längst nicht mehr die Exoten, die sie einmal waren. Nicht zuletzt durch die preiswerte Verfügbarkeit von Nukleotidzuckern scheint einer breiten Anwendung von Glycosyltransferasen auch für präparative Synthesen im großen Maßstab der Weg geöffnet zu sein.

Der Firma Kyowa Hakko Kogyo Inc., Japan, gelang durch „metabolic engineering“ bereits 1998 ein Durchbruch bezüglich der fermentativen Darstellung von Nukleotidzuckern (Koizumi et al. 1998). Die meisten wichtigen Nukleotidzucker können heute preisgünstig fermentativ produziert werden und sind ab Anfang 2001 auch kommerziell zu beziehen. Abbildung 7.6 zeigt am Beispiel der UDP-Galactose die Vorgehensweise. Die Preise für Nukleotidzucker veränderten sich dadurch zu Beginn 2001 wie in Abbildung 7.7 gezeigt.

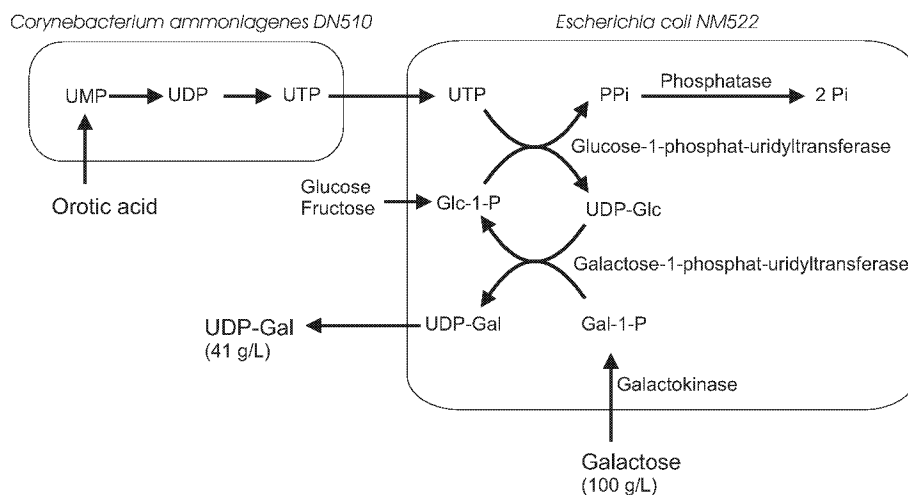


Abbildung 7.6: Fermentative Darstellung von UDP-Galactose (Koizumi et al. 1998)

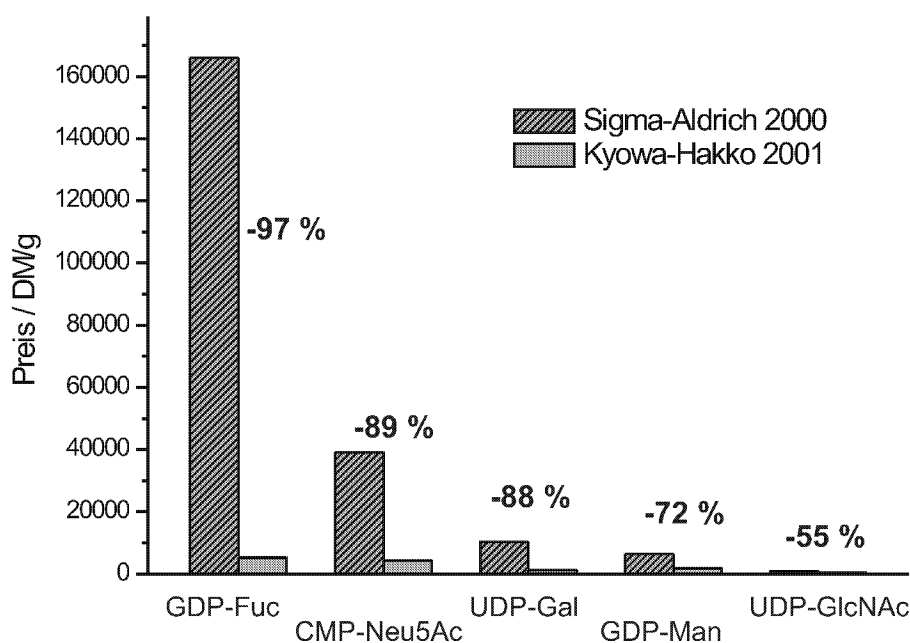


Abbildung 7.7: Preisveränderung von Nukleotidzuckern nach Einführung der fermentativen Darstellung durch Kyowa Hakko Kogyo Inc. auf Grundlage von „metabolic engineering“ (Sigma-Aldrich 2000, Kyowa-Hakko 2001)

Zusammenfassend kann man sagen, daß die enzymatische Darstellung von Oligosacchariden im Vergleich zur chemischen Methode die Methode der Wahl ist.

Eine sehr zukunftssträchtige Alternative stellt auch die fermentative Synthese von kompletten Oligosacchariden nach erfolgtem „metabolic engineering“ dar. In Zukunft wird man wohl bei einem großen Bedarf eines Oligosaccharides, beispielsweise des Galili-Trisaccharides **1**, diesen Weg nutzen, insbesondere wenn es darum geht, einen großen Be-

darf bezüglich einer Oligosaccharidstruktur *preisgünstig* zu decken. Dies wurde am Beispiel der Globotriose (Gal α -1,4-Gal β -1,4-Glc) gezeigt (Koizumi et al. 1998). Mit einem Drei-Organismen-System, ähnlich dem in Abbildung 7.6 gezeigten Zwei-Organismen-System, lediglich erweitert, gelangen Produkttitern von 372 mM (188 g/L nach 36 h) Globotriose. Diese Vorgehensweise ist allerdings nur bedingt bei Produkten anwendbar, welche nicht den in der Natur vorkommenden ähnlich sind. Auch für die Darstellung von relativ kleinen bis mittelgroßen Mengen eines Oligosaccharidproduktes ist die Methode des „metabolic engineering“ nicht anwendbar. Der Arbeitsaufwand, welcher geleistet werden muß, bis eine Synthese funktioniert, ist beim „metabolic engineering“ extrem hoch. Die nachfolgende fermentative Synthese ist zugegebenermaßen dafür um so leichter. Man muß daher die Methode des „metabolic engineering“ und die klassische Methode als sich ergänzend betrachten. Daneben bleibt jedoch die rein chemische Oligosaccharidzuckersynthese für nicht-natürliche und auch nicht mit natürlichen Strukturen verwandten Zuckern ein ebenso wichtiges Werkzeug.

7.4 Bewertung des Verfahrens

Das in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Verfahren der polymer- und membranunterstützten Synthese von Oligosacchariden stellt eine Bereicherung der möglichen Synthesemethoden dar. In vielen Fällen kann und soll die Methode nicht mit den klassischen chemischen und enzymatischen Methoden der Synthese in Lösung konkurrieren. So ist beispielsweise die chemische Synthese von freien Oligosacchariden in Lösung beim heutigen Stand der Techniken hervorragend geeignet, um kleine Substanzmengen, beispielsweise für screenings, verfügbar zu machen. Die Festphasensynthese hingegen ist — trotz all ihrer Limitierungen — eine leistungsstarke Methode besonders in der kombinatorischen Chemie, wenn es darum geht große Substanzbibliotheken zu erstellen. Die im Rahmen dieser Arbeit bearbeitete Methode ermöglicht die Bereitstellung großer Mengen von vorzugsweise großen, komplexen Oligosacchariden zu günstigen Konditionen, Abbildung 7.8 gibt dies wieder. Die hier angewendete Vorgehensweise erschließt ferner eine effiziente Syntheseroute zur Produktion von polymervergrößerten Pharmaka und Intermediaten.

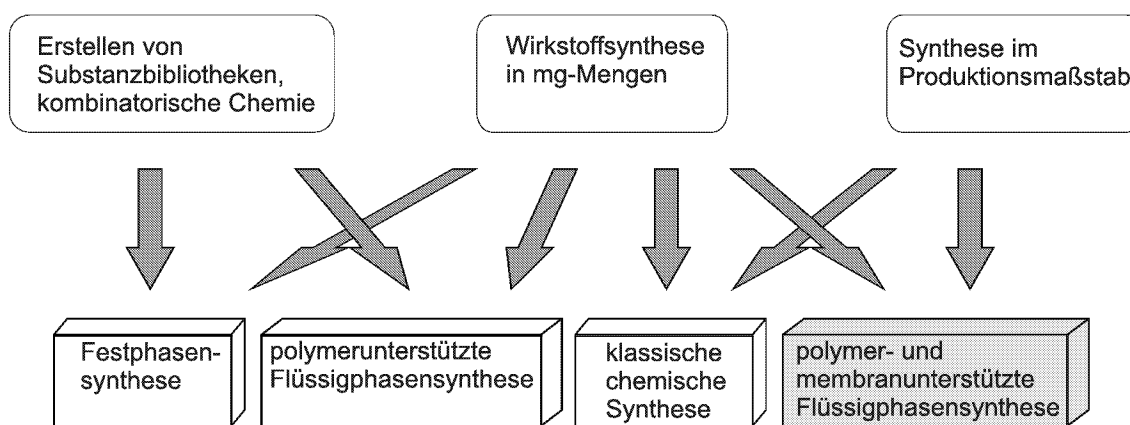


Abbildung 7.8: Synthesemethoden für komplexe Moleküle im Vergleich

Die Methode ist nicht auf Oligosaccharide beschränkt und kann bei hochpreisigen, komplexen anderen Molekülen durchaus auch sinnvoll eingesetzt werden.

8 Zusammenfassung

Die Entwicklung einer membran- und polymerunterstützten Flüssigphasensynthese von Oligosacchariden ist Gegenstand dieser Arbeit. Sie soll zur Etablierung einer Methodik dienen, um Oligosaccharide in größeren Mengen verfügbar zu machen. Ferner soll sie einen Beitrag zu einer zukünftigen automatisierten Oligosaccharidsynthese leisten.

8.1 Voraussetzungen der polymer- und membranunterstützten Synthese

8.1.1 Membrantechnik

- Es wurden drei verschiedene **Membranen** identifiziert, die MPEG10.000 mit einer **Retention** von größer **99 %** zurückhalten, darunter keramische für den Einsatz in einigen organischen Medien.
- Eine Anlage zur drucküberlagerten **Ultrafiltration** bei Einsatz von **keramischen Rohrmodulen in organischen Medien unter Inertbedingungen** wurde aufgebaut.
- Eine **Retentionsmeßmethode**, welche auf **GPC-Messungen** beruht und die Messung von mehreren Retentionen gleichzeitig erlaubt, wurde etabliert.



GPC

8.1.2 Polymer und Linker

- Es wurden **zwei** verschiedene **Linker**, Flitsch-Linker **10** und DOX-Linker **13**, synthetisiert und auf ihre Eignung in der chemischen und enzymatischen Oligosaccharidsynthese hin getestet.
- Eine **direkte Methode zur Beladungsbestimmung** des Polymers bezüglich DOX-Linker **13** per HPLC wurde nach Bestimmung des „kritischen Punktes“ etabliert und löste die Bestimmung per NMR nach Derivatisierung ab.



8.2 Chemische Oligosaccharidsynthese

- Es wurde das α -1,2-verbrücktes Tetramannopyranosid **28** PEG-gebunden und unter **Ersatz von chromatographischen Schritten durch Ultrafiltration** synthetisiert. Es resultierte nach hydrogenolytischer Abspaltung vom Polymer ein Produktgemisch (80 mg) bestehend aus 17 % Tetrasaccharid, 44 % Trisaccharid und 39 % Disaccharid.



28

- Eine HPLC-Analytik zur **Verfolgung der Synthese direkt am Polymer** wurde nach Bestimmung des „kritischen Punktes“ etabliert.

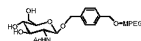
8.3 Enzymatische Oligosaccharidsynthese

8.3.1 Bereitstellung der Enzyme



- Eine 200L-Fermentation von *E. coli* JM109 pLGalTΔ38 zur Produktion von β -1,4-GalT wurde durchgeführt. Es resultierten insgesamt **1970 Units humaner β -1,4-GalT** in 1730 g Feuchtbiomasse.
- Mittels Q-Sepharose FF und IMAC-Säulenchromatographie wurden **58,7 U β -1,4-GalT** mit einer spezifischen Aktivität von 381 mU/mg aufgereinigt.

8.3.2 Substratbereitstellung


33

- 8,7 g polymergebundenen *N*-Acetylglucosamin **33**, ausschließlich β -gebunden, wurden mit einer Ausbeute von 66 % synthetisiert.
- Die Synthese konnte auch lösungsmittelfrei in einer PEG-Schmelze durchgeführt werden.

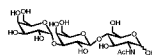
8.3.3 Analytik

HPLC

- Eine HPLC-Analytik zur **direkten Bestimmung von PEG-gebundenem *N*-Acetylglucosamin **33**, *N*-Acetylglucosamin **34** und Galili-Trisaccharid **29**** wurde etabliert.

8.3.4 Synthese des Galili-Trisaccharides 1

- **Kinetische Daten** zur enzymatischen Synthese von freiem und polymergebundenem *N*-Acetylglucosamin und polymergebundenem Galili-Trisaccharid **29** wurden bestimmt.
- Mit Hilfe der kinetischen Daten wurde die Ausbeute bei der Synthese von PEG-gebundenem Galili-Epitop 29 von 18 % auf **quantitative Ausbeute** gesteigert.
- **4,2 g PEG-gebundenes Galili-Trisaccharid **29**** wurden bei Einsatz eines Vier-enzymsystems bestehend aus einer β -1,4-GalT, α -1,3-GalT, Sucrose Synthase und UDP-Gal-4-Epimerase synthetisiert.
- Aufreinigungsschritte wurden per Extraktion und durch **Ultrafiltration** der PEG-gebundenen Zucker durchgeführt.
- Abschließend wurde das Galili-Trisaccharid **1** durch Hydrogenolyse vom Polymer abgespalten (Ausbeute 51 %), es resultierten **28 mg Galili-Trisaccharid **1****, Gal α -1,3-Gal β -1,4-GlcNAc.


1

9 Material und Methoden

9.1 Analytik

9.1.1 HPLC-Analytik

9.1.1.1 HPLC-System 1

Das System diene zur Bestimmung von *N*-Acetyllactosamin, dem freien Galili-Trisaccharid **1** (Gal α -1,3-Gal β -1,4-GlcNAc), Essigsäure und Phenyllessigsäure.

Geräte:	S1100 Solvent Delivery System, S2000 HPLC Controller, Integrator Pyramid Software ERC-3312 Vakuumentgaser GAT-CH-150 Säulenofen	Sykam, Gilching ERMA, über Sykam Gamma Analysen Technik, über Sykam
	851-AS Autosampler UV-Detektor Linear 206 PHD	Jasco, Groß-Zimmern Gamma Analysen Technik, über Sykam
	760 Series Interface	Nelson Analytical, Wuppertal
Säule:	Aminex HPX-87-H (300x7,8 cm)	Bio-Rad, München
Vorsäule:	Micro-Guard Cation H cartridge	Bio-Rad, München
Säulentemperatur:	65°C	
Eluent:	6 mM H ₂ SO ₄	
Flußrate:	0,6 mL/min	
Detektion:	UV-Absorption, 205 nm	
Retentionszeiten:	<i>N</i> -Acetyllactosamin	10,2 min
	Gal α -1,3-Gal β -1,4-GlcNAc 1	8,9 min
	Essigsäure	15,6 min
	Phenyllessigsäure	34,7 min

9.1.1.2 HPLC-System 2

Zur Bestimmung der polymergebundenen Zucker MPEG-DOX-GlcNAc **33**, MPEG-DOX-LacNAc **34** und MPEG-DOX-Galili **29** diene ein Nucleodex- β -OH-Säulen-System.

Geräte:	Binäre Pumpe 1100 series, Probengeber ALS 1100 series, Probengeberthermostat, ALSTherm 1100 series,
---------	--

	Säulenofen ColComp 1100 series, Detektor DAD 1100 series, Degasser 1100 series, Software ChemStation for LC	Agilent Technologies (USA)
Säule:	Nucleodex- β -OH (200x4 mm)	Macherey-Nagel, Düren
Vorsäule:	Nucleodex- β -OH	Macherey-Nagel, Düren
Säulentemperatur:	35°C	
Eluent:	A Acetonitril B Wasser	
Gradient:	0 min 0% B, 15 min 20% B, 16 min 20% B, 31 min 40% B, 36 min 0% B	
Flußrate:	0,7 mL/min	
Detektion:	UV-Absorption, 215 nm	
Retentionszeiten:	MPEG-DOX-GlcNAc 33 MPEG-DOX-LacNAc 34 MPEG-DOX-Galili 29	23,7 min 25,1 min 26,3 min

9.1.1.3 HPLC-System 3

Zur Bestimmung von Sucrose und Fructose.

Geräte:	Pumpe PU 1580, Mixer LG 1580-62, Degasser DG 1580-53, Autosampler AS 1550, Detektor DAD MD 1510 Detektor PL-ELS 1000	JASCO, Gross-Umstadt Polymer Laboratories, Darmstadt
Säule:	Aminex HPX-87-C (300x7,8 mm)	Bio-Rad, München
Vorsäule:	Aminex HPX-87-H	Bio-Rad, München
Säulentemperatur:	65 °C	
Eluent:	Wasser	Flußrate: 0,5 mL/min
Detektion:	UV-Absorption, 205 nm und per Lichtstreuendetektor	
Retentionszeiten:	Sucrose Fructose	8,3 min 12,6 min

9.1.1.4 HPLC-System 4

Zur Beladungsbestimmung des MPEG10.000 **3** bezüglich Dioxyxylyl-Linker.

Geräte:	Binäre Pumpe 1100 series, Probengeber ALS 1100 series, Probengeberthermostat, ALSTherm 1100 series, Säulenofen ColComp 1100 series, Detektor DAD 1100 series,
---------	--

	Degasser 1100 series,	
	Software ChemStation for LC	Agilent Technologies (USA)
	Detektor Differential-Refraktometer	Knauer, Berlin
Säule:	Lichrospher 100 RP-8 (5 μ m, 250x4 mm), Hibar	Merck, Darmstadt
Vorsäule:	Lichrospher 100 RP-8 (5 μ m)	Merck, Darmstadt
Säulentemperatur:	25 °C	
Eluent:	40 % Acetonitril, 60 % Wasser	
Flußrate:	0,5 mL/min	
Detektion:	RI-Detektion und UV-Absorption, 215 nm	
Retentionszeiten:	MPEG10.000 3	5,0 min
	MPEG-DOX 13	6,3 min

9.1.1.5 HPLC-System 5

Zur Trennung von MPEG-DOX **13**, MPEG-DOX-2-O-acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosid **23** und MPEG-DOX-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosid **16**.

Geräte:	Binäre Pumpe 1100 series, Probengeber ALS 1100 series, Probengeberthermostat, ALSTherm 1100 series, Säulenofen ColComp 1100 series, Detektor DAD 1100 series, Degasser 1100 series, Software ChemStation for LC	Agilent Technologies (USA)
	Detektor Differential-Refraktometer	Knauer, Berlin
Säule:	Lichrospher 100 RP-8 (5 μ m, 250x4 mm)	Merck, Darmstadt
Vorsäule:	Lichrospher 100 RP-8 (5 μ m)	Merck, Darmstadt
Säulentemperatur:	25 °C	
Eluent:	A Acetonitril B Wasser	
Gradient:	0 min 60% B, 30 min 20% B, 40 min 80% B, 43 min 60% B, 50 min 60% B	
Flußrate:	0,5 mL/min	
Detektion:	RI-Detektion und UV-Absorption, 215 nm	
Retentionszeiten:	MPEG-DOX 13	4,6 min
	MPEG-DOX-2-O-acetyl-3,4,6-tri- -O-benzyl- α -D-mannopyranosid 23	15,9 min
	MPEG-DOX-3,4,6-tri-O-benzyl- - α -D-mannopyranosid 16	14,2 min

9.1.1.6 HPLC-System 6

Zur präparativen Aufreinigung des Trisaccharides Gal α -1,3-Gal β -1,4-GlcNAc **1** nach Abspaltung vom Polymer.

Geräte:	Binäre Pumpe 1100 series, Probengeber ALS 1100 series, Probengeberthermostat, ALSTherm 1100 series, Säulenofen ColComp 1100 series, Detektor DAD 1100 series, Degasser 1100 series, Software ChemStation for LC,	Agilent Technologies (USA)
Säule:	Lichrosorb NH ₂ (5 μ m, 250x4 mm)	Merck, Darmstadt
Vorsäule:	Lichrosorb NH ₂ (5 μ m)	Merck, Darmstadt
Säulentemperatur:	10 °C	
Eluent:	85 % Acetonitril, 15 % Wasser	
Flußrate:	0,2 mL/min	
Detektion:	UV-Absorption, 205 nm	
Retentionszeit:	Gal α -1,3-Gal β -1,4-GlcNAc 1	37,8 min

9.1.1.7 HPLC-System 7

Zur Quantifizierung von Phenylacetamid.

Geräte:	Binäre Pumpe 1100 series, Probengeber ALS 1100 series, Probengeberthermostat, ALSTherm 1100 series, Säulenofen ColComp 1100 series, Detektor DAD 1100 series, Degasser 1100 series, Software ChemStation for LC	Agilent Technologies (USA)
Säule:	Lichrosorb RP18 (5 μ m, 250x4 mm)	Merck, Darmstadt
Vorsäule:	Lichrosorb RP18 (5 μ m)	Merck, Darmstadt
Säulentemperatur:	25 °C	
Eluent:	20 % Acetonitril, 80 % Kaliumphosphatpuffer pH 6,5	
Flußrate:	0,5 mL/min	
Detektion:	UV-Absorption, 200 nm	
Retentionszeit:	Phenylacetamid	13,5 min

9.1.2 Kapillarelektrophorese

Zur Bestimmung von UDP-Galactose, UDP-Glucose, UDP und UMP wurde ein Kapillarelektrophorese-System verwendet (Copper 1998, Copper & Whitaker 1998).

Gerät:	P/ACE System MDQ	Beckmann, München
Kapillare:	L = 52 cm, ID = 50 μ m, fused silica	
Kapillartemperatur:	30 °C	
Laufpuffer:	90 mM Borat, pH 9,2	
Trennungsspannung:	20 kV	
Detektion:	UV-Absorption, 260 nm.	

Die Migrationszeiten der Analyte waren sehr variabel.

9.1.3 GPC-Messungen

Zur GPC-Messung von PEG-Polymeren im Bereich von 1000 bis 20000 g/mol hat sich das hier beschriebene System bewährt. Ein besonderer Vorteil der verwendeten GPC-Säule TSKgel α -3000 (Fa. TosoHaas) ist ihre Robustheit. Es ist möglich, zwischen organischen und wässrigen Eluenten zu wechseln, ohne daß es hierbei zu einer Schädigung der Säule kommt. Bei den meisten GPC-Säulen ist dies nur wenige Male möglich und auch dann nicht zwischen beliebigen Lösungsmitteln. Der Grund hierfür sind Quell- und Schrumpfungsprozesse bei verschiedenen Lösungsmitteln. Ferner ist bei der verwendeten Säule die Anzahl der theoretischen Böden kaum vom Eluenten abhängig. PEG-Standards der Firma Polymer Standards, Mainz, wurden zur Kalibrierung verwendet.

Geräte:	Binäre Pumpe 1100 series, Probengeber ALS 1100 series, Probengeberthermostat, ALSTherm 1100 series, Säulenofen ColComp 1100 series, Detektor DAD 1100 series, Degasser 1100 series, Software ChemStation for LC Detektor Differential-Refraktometer	Agilent Technologies (USA) Knauer, Berlin
Säule:	TSKgel α -3000 (300x7,8 mm)	TosoHaas (USA)
Säulentemperatur:	25 °C	
Eluent:	Wasser	
Flußrate:	1,0 mL/min	
Detektion:	RI-Detektion	
Retentionszeiten:	PEG970	19,6 min
	PEG2010	18,5 min
	PEG3210	17,8 min
	PEG6240	16,5 min
	PEG12000	15,0 min
	PEG23000	14,3 min
	PEG40000	13,5 min

9.1.4 MALDI-TOF-Analytik

MALDI-TOF-Aufnahmen¹ wurden freundlicherweise durch Herrn Van Dy Nguyen am Institut für Angewandte Physikalische Chemie (ICG-7), FZ Jülich, durchgeführt. Es handelte sich um ein Biflex III Gerät der Fa. Bruker-Daltonik, Bremen. Als Matrix wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure verwendet.

9.1.5 NMR-Spektroskopie

Die im Rahmen der Arbeit angefertigten NMR-Messungen erfolgten mit einem AM-300 MHz-Spektrometer (Firma Bruker) des Instituts für Biotechnologie, einem Gemini 200 MHz-Spektrometer (Firma Varian, Darmstadt) und einem 500 MHz-Spektrometer (Fa. Bruker) der University of Edinburgh, sowie einem AM-400 MHz-Spektrometer (Firma Bruker) der Zentralanalytik der Universität Bonn. Die angegebenen Verschiebungen δ in ppm beziehen sich auf den Standard Tetramethylsilan, die Angabe der Kopplungskonstanten J erfolgt in Hz. Die Spinnmultiplizitäten werden folgendermaßen abgekürzt:

s Singulett
d Dublett
dd Dublett von Dubletts
t Triplett
q Quartett
qui Quintett
m Multipllett

9.2 Enzymassays

9.2.1 β -1,4-Galactosyltransferase-Assay

Als Standardreaktion diente die Umsetzung von UDP-Galactose mit *N*-Acetylglucosamin. Das entstehende Disaccharid *N*-Acetylglucosamin wurde per HPLC quantifiziert.

Assaybedingungen:

Es wurde mit einem Gesamtvolumen von 50 μ L gearbeitet; 5 mM UDP-Gal; 1 mM MnCl_2 ; 100 mM HEPES-Puffer; pH 8,0; 25 mM *N*-Acetylglucosamin und β -1,4-Galactosyltransferase-Enzymlösung. Vor dem Starten der Reaktion wurde die Assaymischung mit Enzym bei 37 °C vorinkubiert. Gestartet wurde durch UDP-Gal-Zugabe, inkubiert bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch 5-minütiges Erhitzen auf 95 °C abgestoppt. Die Mischung wurde mit weiteren 50 μ L Wasser verdünnt und 10 Minuten bei 13200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde per HPLC untersucht. Die Reaktionszeiten wurden so gewählt, daß die Umsätze im Bereich von 2-5 % lagen. Ein Unit (U) ist definiert als die Enzymmenge, die 1 μ mol *N*-Acetylglucosamin pro Minute umsetzt. Hier erfolgte der Umsatz ausschließlich zu *N*-Acetylglucosamin. Die volumenspezifische Aktivität errechnet sich nach Formel 9.1:

¹ Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight-Massenspektroskopie

$$A_V = \frac{c_{LacNAc} * V_{Assay} * X}{t * V_{Enzymlösung} * 1000} \quad (9.1)$$

mit: A_V	U/mL	volumenspezifische Aktivität
c_{LacNAc}	mol/L	Konzentration <i>N</i> -Acetyllactosamin
V_{Assay}	μL	Volumen des Assays
X	-	Verdünnungsfaktor, s. o., hier X=2
t	min	Zeit
$V_{Enzymlösung}$	μL	Volumen der eingesetzten Enzymlösung

9.2.2 α-1,3-Galactosyltransferase-Assay

Als Standardreaktion diente die Umsetzung von UDP-Galactose mit *N*-Acetyllactosamin. Das entstehende Trisaccharid Galα-1,3-Galβ-1,4-GlcNAc **1** wurde per HPLC quantifiziert. Dieser modifizierte Assay geht zurück auf einen Radioaktivitätsassay nach Berger *et al.* (Ramuz 2000).

Assaybedingungen:

Es wurde mit einem Gesamtvolumen von 50 μL gearbeitet; 5 mM UDP-Gal; 1 mM MnCl₂; 100 mM HEPES-Puffer; pH 7,2; 10 mM *N*-Acetyllactosamin und α-1,3-Galactosyltransferase-Enzymlösung. Vor dem Starten der Reaktion wurde die Assaymischung mit Enzym bei 37 °C vorinkubiert. Gestartet wurde durch UDP-Gal-Zugabe, inkubiert bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch 5-minütiges Erhitzen auf 95 °C abgestoppt. Die Mischung wurde mit weiteren 50 μL Wasser verdünnt und 10 Minuten bei 13200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde per HPLC untersucht. Die Reaktionszeiten wurden so gewählt, daß die Umsätze im Bereich von 2-5 % lagen. Die volumenspezifische Aktivität errechnet sich analog zu Formel 9.1. Ein Unit (U) ist definiert als die Enzymmenge, die 1 μmol *N*-Acetyllactosamin pro Minute umsetzt. Hier erfolgte der Umsatz ausschließlich zu Galα-1,3-Galβ-1,4-GlcNAc **1**.

9.2.3 UDP-Galactose-4-Epimerase-Assay

Als Standardreaktion diente die Epimerisierung von UDP-Glucose. Das entstehende Gemisch aus UDP-Glucose und UDP-Galactose wurde per Kapillarelektrophorese analysiert. Assaybedingungen:

Es wurde mit einem Gesamtvolumen von 250 μL gearbeitet; 200mM HEPES; pH 7,2; 2 mM UDP-Glc und UDP-Galactose-4-Epimerase-Enzymlösung. Vor dem Starten der Reaktion wurde die Assaymischung mit Enzym bei 37 °C vorinkubiert. Gestartet wurde durch UDP-Glc-Zugabe, inkubiert bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch 5-minütiges Erhitzen auf 95 °C abgestoppt. Es wurden Proben über die Zeit genommen, welche jeweils 1:2 verdünnt und bei 13200 rpm zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde per CE untersucht. Nach Auftragung der UDP-Galactose-Konzentration gegen die Inkubationszeit wurde der lineare Bereich der Auftragung zur Bestimmung der Aktivität verwendet. Dies erfolgte durch lineare Regression. Ein Unit (U) ist definiert als die Enzymmenge, die 1 μmol UDP-Glucose pro Minute umsetzt. Der Umsatz erfolgte ausschließlich zu UDP-Galactose.

9.2.4 Sucrose Synthase-Assay

Als Standardreaktion diente die Spaltung von Sucrose, d. h. die Reaktion von Sucrose und UDP zu UDP-Glucose und Fructose. Das entstehende Gemisch wurde per Kapillarelektrophorese getrennt.

Assaybedingungen:

Es wurde mit einem Gesamtvolumen von 50 μ L gearbeitet; 100mM HEPES; pH 7,0; 500 mM Sucrose; 2 mM UDP und Sucrose Synthase-Enzymlösung. Vor dem Starten der Reaktion wurde die Assaymischung mit Enzym bei 37 °C vorinkubiert. Gestartet wurde durch UDP-Zugabe, inkubiert bei 30 °C. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 95 °C für 90 Sekunden abgestoppt. Die Mischung wurde 10 Minuten bei 13200 rpm zentrifugiert und der Überstand per CE untersucht. Die Reaktionszeiten wurden so gewählt, daß die Umsätze im Bereich von 2-5 % lagen. Die volumenspezifische Aktivität errechnet sich analog zu Formel 9.1.

9.3 Bereitstellung der β -1,4-Galactosyltransferase

9.3.1 Fermentation

Die Fermentation von *E. coli* JM109 pLGaIT Δ 38 zur Produktion der β -1,4-GaIT erfolgte in einem 300 L-Chemap-Biorektor in LB-Medium².

1. Vorkultur:

Aus 1 mL Glycerin-Stock wurde eine Vorkultur gezogen.

Bedingungen:

- 100 mL LB-Medium
- pH 7,0
- 100 μ g/mL Ampicillin
- 10 g/L Glucose
- in 1 L Schüttelkolben mit Schikanen
- Schüttlergeschwindigkeit 150 rpm
- Temperatur 37 °C
- Inkubationszeit 24 h

2. Vorkultur:

Aus Vorkultur 1 wird eine zweite Vorkultur gezogen.

Bedingungen:

- 10 x 200 mL LB-Medium
- jeweils aus 1 mL Vorkultur 1
- 100 μ g/mL Ampicillin
- 20 g/L Glucose
- in 1 L Schüttelkolben mit Schikanen
- Schüttlergeschwindigkeit 150 rpm
- Temperatur 37 °C
- Inkubationszeit 17 h, dann OD₆₂₀ = ca. 2, Restglucose = 4 g /L
- Nach starker pH-Wert-Abnahme wurde mit Ammoniak-Lösung auf pH 7 nachtitriert.

² LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 1 L Millipore-Wasser

Produktionsfermentation:

Bedingungen:

- 200 L LB-Medium
- pH 7,0
- angeimpft mit 2 L Vorkultur 2
- 100 μ g/mL Ampicillin
- 5 g/L Glucose
- in 300 L-Chemap-Biorektor
- Induktion mit IPTG nach 10 h 40 min
- Temperatur 37 °C
- Rührgeschwindigkeit 500 rpm
- Sauerstoffpartialdruck größer 80 %

Zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes wurde mit 4 N Natronlauge und 4,5 N Phosphorsäure titriert. Zur Verhinderung von übermäßiger Schaumbildung wurde Antischaummittel Dehysan (10 %ig) zugesetzt. Nach ca. 15 h Fermentation und Abkühlen der Fermentationsbrühe auf 16 °C für weitere 8 Stunden wurden die Zellen per kontinuierlicher Zentrifuge (KA 2 Zellseparator, Westfalia Separator AG, Ölde) vom Medium abgetrennt. 1730 g Feuchtbiomasse resultierten.

9.3.2 Aufreinigung

Zur Aufreinigung wurden die Zellen per Ultraschall aufgeschlossen. Hierzu wurde aus 50 g feuchten Zellen eine 25 %ige Suspension in 100 mM HEPES-Puffer; pH 8,0 hergestellt. Die Suspension wurde in eine 300 mL-Ultraschallrosette gegeben und die Zellen mit Hilfe eines Ultraschallgerätes (Ultraschall-Desintegrator Sonifier II, Fa. Branson) aufgeschlossen (4 x 10 min bei 90 cycles, output 6 - 7). Die Rosette wurde während des Aufschlusses von außen mit einem Salz-Eisbad (-10 °C) gekühlt. Nach erfolgtem Aufschluß wurde zentrifugiert (1 x 15 min, 2 x 30 min bei 10000 rpm) und der Überstand zur weiteren säulenchromatographischen Aufreinigung per Q-Sepharose- und IMAC-Säule verwendet. Die Leitfähigkeit des Überstandes lag bei 5 mS, ein Verdünnen mit Wasser war daher nicht notwendig.

9.3.2.1 Q-Sepharose-Säule

Bedingungen:

- Säulenmaterial: Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia, Freiburg), 980 mL
- Säulendimensionen: 50 cm x 5 cm
- Temperatur 4 °C

Vor Verwendung des Säulenmaterials wurde dieses durch Spülen mit einer Mischung aus 10 mM NaOH, 1,5 M NaCl und 25 vol% Isopropanol regeneriert. Eine Äquilibration mit 10 mM HEPES-Puffer; pH 8,0; (5 Säulenvolumina) schloß sich an (Leitfähigkeit Eluent 5 mS). Der Zellüberstand wurde auf die Säule gepumpt (33 mL/min) und Spülen mit 100 mM HEPES-Puffer; pH 8,0; folgte (Druck ansteigend bis 0,6 bar, 4 L). Es wurden mehrere Fraktionen gesammelt und bei 4 °C gelagert. Die β -1,4-GalT passierte die Säule, ein Teil der unerwünschten Begleitstoffe verblieb auf der Säule bzw. wurde in anderen

Fraktionen gesammelt. Nach Elution des Produktes wurde die Säule regeneriert und in 20 % Ethanol gelagert. Die Produktfraktionen (zusammen 172,7 U in 1 L Puffer) wurden per IMAC-Säule weiter aufgearbeitet.

9.3.2.2 IMAC-Säule

Bedingungen: - Säulenmaterial: IMAC-Material Streamline Chelating (Pharmacia, Freiburg), 265 mL
- Säulendimensionen: 54 cm x 2,5 cm
- Temperatur 4 °C

Die mit IMAC Streamline Chelating Material gepackte Säule wurde zunächst mit 3 Säulenvolumina Wasser gewaschen (15 mL/min), dann mittels 300 mM ZnSO₄ mit Zink-Ionen beladen (5 mL/min, 2 Säulenvolumen). Nachfolgend wurde mit Millipore-Wasser gewaschen (15 mL/min; 4,5 Säulenvolumina), bis bei Zugabe eines Tropfens konz. Natronlauge zum Säulenauslauf kein Zinkhydroxid mehr ausfiel (NaOH-Tropfen-Test). Die Säule wurde mit 50 mM HEPES-Puffer; pH 8,0 äquilibriert, wobei pH-Wert und Leitfähigkeit von Säuleneinlauf und Säulenauslauf getestet wurden (2 Säulenvolumina). Daraufhin wurden die von der Q-Sepharose-Säule stammenden Enzymlösungen auf die Säule gepumpt und mit HEPES-Puffer; pH 8,0; gespült, bis keine Absorption bei 280 nm zu erkennen war. Die β -1,4-GalT wurde dann mit einer Lösung aus 100 mM HEPES-Puffer; pH 8,0; und 25 mM Imidazol eluiert, bis bei 280 nm keine Absorption mehr zu erkennen war. Versehentlich wurden verschiedene Fraktionen ohne Glycerin-Zugabe eingefroren (64 h). Nach Auftauen wurden 146 U bestimmt (eingesetzt wurden 150 g feuchte Zellen, entsprechend 172 U, Wiederfindungsrate 85 %). Die Säule wurde mit 50 mM HEPES; pH 8,0; äquilibriert, mit einer wässrigen 20 %igen EthanolLösung gewaschen und bei 4 °C eingelagert. Nach weiterer Lagerung der Enzymfraktionen bei 4 °C (15 h) resultierten 65,7 U, (45 % Wiederfindungsrate).

9.3.2.3 Ultrafiltration

Die von der IMAC-Säule resultierenden Fraktionen (300 mL) wurden per Ultrafiltration weiter eingengt. Es wurde hierzu ein Pellicon XL-Modul mit einer Ausschlußgrenze von 10.000 Da verwendet (Fa. Millipore GmbH, Eschborn). Es handelt sich hierbei um ein crossflow-Modul, das Membranmaterial ist Polyethersulfon. Vor dem Einengen wurde das Modul mit 25 mM Imidazol; 50 mM HEPES-Puffer, pH 8,0; gespült (300 mL Permeat). Während der Aufkonzentrierung wurde das Retentatvolumen mehrmals mit 25 mM Imidazol; 50 mM HEPES-Puffer, pH 8,0; aufgefüllt, so daß umgepuffert wurde. Die aufkonzentrierte Enzymlösung wurde mit 5 mL 25 mM Imidazol; 50 mM HEPES-Puffer, pH 8,0; ausgespült, es resultierten 25 mL Enzymlösung (Aufkonzentrierung um Faktor 12). Zur Stabilisierung wurde das Enzym in 50 % Glycerin; 2,5 mM MnCl₂; 1 mM Mercaptoethanol; 12,5 mM Imidazol und 25 mM HEPES; pH 8,0; bei -20 °C aufbewahrt. Es resultierten 58,7 U; im Permeat wurden 4,6 U gefunden und verworfen (Wiederfindungsrate 96,3 %). Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1972) ergab eine spezifische Aktivität von 381 mU/mg_{Protein}.

9.4 Kinetikmessungen

Kinetikmessungen wurden u. a. durch Messung von Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten durchgeführt, Umsätze unter 5 % wurden berücksichtigt. Bei Variierung einer Substratkonzentration wurden die jeweiligen spezifischen Aktivitäten gemessen. Die kinetischen Parameter aus Formel 6.2, Kapitel 6 wurden durch nicht-lineare Regression mit dem Programm Scientist[®] MicroMath[®] angepaßt. Kinetische Daten wurden ferner aus den kompletten Reaktionsverläufen der Synthese von polymergebundenem *N*-Acetyllactosamin **34** und polymergebundenem Galili-Trisaccharid **29** mittels der Formeln 6.3, 6.4, 6.5, 6.6 und analog Formel 6.2 angepaßt.

9.5 Retentionsmessungen

9.5.1 Einzelmessung per gravimetrischer Methode

Nach Spülen der jeweiligen Membran wurde die zu untersuchende Substanz in den Reaktor gepumpt. Wie bereits in Kapitel 4.2 dargestellt, wurde Lösungsmittel durch die Membran gepumpt und gesammelt. Nach ca. 10 Verweilzeiten wurde das Retentat aus dem Reaktor entnommen und nach Einengen unter vermindertem Druck wurden Permeat- und Retentatrückstand im Hochvakuum getrocknet. Aus den Massen und der Anzahl der Verweilzeiten wurde nach Formel 4.2, Kapitel 4.2, die Retention bestimmt.

9.5.2 Einzelmessung per HPLC

Nach Spülen der Membran und Einspülen der zu untersuchenden Substanz wurde eine Probe von Permeat und Retentat genommen. Die Konzentrationen der betrachteten Substanz wurde dann per HPLC bestimmt und nach Formel 4.1, Kapitel 4.2, die Retention bestimmt.

9.5.3 Einzelmessung per Enzymassay

Nach Spülen der Membran und Einspülen des zu untersuchenden Enzyms wurde eine Probe von Permeat und Retentat genommen. Die Enzymaktivität in Permeat- und Retentatlösung wurde bestimmt und nach Formel 4.1, Kapitel 4.2, die Retention ermittelt.

9.5.4 GPC-Methode

Bei der GPC-Methode wurden die Retentionen mehrerer Polymere gleichzeitig gemessen. Nach Spülen der Membran wurde die Polymermischung eingespült und es wurden Proben von Permeat und Retentat genommen. Diese wurden per GPC untersucht und aus den Peakhöhen der Chromatogramme von Permeat und Retentat wurden die Retentionen nach Formel 4.1, Kapitel 4.2, bestimmt (Französische Norm 1997).

9.6 Synthesen

9.6.1 Polymer- und Linkersynthesen

9.6.1.1 Synthese des Flitsch-Linkers 10

3-Azidopropylamin 6

3-Chlorpropylaminhydrochlorid **5** (10,01 g; 77 mmol) und Natriumazid (11,52 g; 177 mmol) wurden in Wasser gelöst (75 ml) und bei 80 °C für 22 h gerührt. Nach Abkühlen auf 0 °C wurden Diethylether (100 mL) und KOH-Pellets (5,26 g; 94 mmol) zugegeben. Die Zugabe erfolgte graduell, so daß die Temperatur nicht über 10 °C stieg. Die wäßrige Phase wurde mit Diethylether ausgeschüttelt (2 x 100 mL), mit NaCl gesättigt und wiederum mit Diethylether ausgeschüttelt (3 x 50 mL). Die vereinten organischen Phasen wurden mit Kaliumcarbonat getrocknet und das Lösungsmittel bei Raumtemperatur unter vermindertem Druck abgezogen. Es resultierte ein hellgelbes Öl (6,11 g, 78.6% Ausbeute). IR ν_{max} (cm⁻¹): NH₂ 3370, CH₂ 2939 und 2870, N₃ 2098.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3,32 (t; $J_{CH_2,CH_2} = 6,6$ Hz; 2 H; N_3CH_2); 2,74 (t; $J_{CH_2,CH_2} = 7,0$ Hz; 2 H; CH_2NH_2); 1,67 (qui, 2 H, $CH_2CH_2CH_2$); 1,28 (s, 2H, NH₂).

4-Formyl-(N-azidopropyl)-benzamid 7

Unter einer trockenen Stickstoffatmosphäre wurden trockenes THF (150 mL) zu 3-Azidopropylamin **6** (6,11 g; 60,5 mmol) und 4-Carboxybenzaldehyd (9,17 g; 60,5 mmol) gegeben. 2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin (18,33 g; 72,7 mmol) wurde danach graduell zugegeben und die Reaktionslösung bei einer Temperatur von 35 °C gerührt. DC (EtOAc:Hex = 2:1; R_f = 0,41) zeigte nach 24 h vollständigen Umsatz an. 200 mL Wasser wurden zugesetzt und das Produkt mit Chloroform extrahiert (4 x 40 mL). Die vereinten organischen Phasen wurden mit 1 M Salzsäure (3 x 50 mL), Wasser (100 mL), gesättigte NaCl-Lösung (2 x 100 mL) und wiederum mit Wasser (2 x 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet (MgSO₄) und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgezogen. Es resultierten 15,55 g eines schwach gelben Öls. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgearbeitet (Gradientenelution von EtOAc:Hex 10:90 über 30:70 zu 50:50). Es resultierten 9,49 g Produkt als weißer Feststoff (67 % Ausbeute). IR ν_{max} (Nujol, cm⁻¹): NH 3289, CH₂ 2953, 2926, 2855, N₃ 2127, C=O (Aldehyd) 1698, C=O (Amid) 1633, C=C_{ar} 1544.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 10,00 (s, 1 H, CHO); 7,887 (s, 4 H, H_{ar}); 6,69 (s, 1 H, NH); 3,51 (q; $J_{CH_2,CH_2} = 6,6$ Hz; $J_{CH_2,NH} = 6,6$ Hz; 2H; $NHCH_2$); 3,40 (t; $J_{CH_2,CH_2} = 6,2$ Hz; 2H; CH_2N_3); 1,86 (qui, $J_{CH_2,CH_2} = 6,6$ Hz; $J_{CH_2,CH_2} = 6,6$ Hz; 2H; $CH_2CH_2CH_2$).

N-(α -Benzotriazol-1-yl-N'-azidopropylbenzamid)-phenylacetamid 8

Unter einer Stickstoffatmosphäre wurde eine Mischung aus 4-Formyl-(N-azidopropyl)-benzamid **7** (9,17 g; 39,5 mmol), Benzotriazol (4,70 g; 39,5 mmol), Phenylacetamid (5,34 g; 39,5 mmol) und trockenem Toluol (170 mL) bei einer äußeren Temperatur von 135 °C refluxiert. Mittels Dean-Stark-Apparatur wurde das Nebenprodukt Wasser abgeschieden. Nach 16 h zeigte DC (EtOAc:Petrolether (Siedebereich 45°-60°C) = 2:1, R_f = 0,33) vollständige Reaktion an. Das Rohprodukt wurde in Form eines weißen Feststoffes abfiltriert. Nach Suspendieren in Diethylether (150 mL) wurde 3 h bei Raumtemperatur

gerührt, um nicht reagiertes Benzotriazol und 4-Formyl-(N-azidopropyl)-benzamid zu entfernen. Das Rohprodukt wurde abfiltriert. Es resultierten 9,70 g. Das Rohmaterials wurde per Flash-Chromatographie bei Verwendung eines Eluenten aus DCM mit 1 % Methanol aufgearbeitet. Es resultierten 4,41 g eines weißen Feststoffes (22 % Ausbeute).

IR ν_{max} (Nujol, cm^{-1}): NH (Amid) 3277, CH 2955, N_3 2113, C=O (Amid) 1650, $\text{C}=\text{C}_{ar}$ 1547.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8,07 (d; $J_{\text{NH},\text{CH}_2} = 8,4$ Hz; 1 H; NHCH); 7,90 (d; $J_{ortho} = 9,4$ Hz; 4 H; C_6H_4); 7,66 - 7,00 (m, 13 H, H_{ar}); 6,42 (s, 1H, NHCH_2); 3,64 (d, $J_{a,b} = 14,2$ Hz; 2 H; PhCH_2); 3,50 (q, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6,6$ Hz; 2H; NHCH_2); 3,42 (t; $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6,7$ Hz; 2H; CH_2N_3); 1,87 (m, 2H, CCH_2C).

N-(α -Thioethyl-N'-azidopropylbenzamid)-phenylacetamide 9

Natriumethylthiolat (1,52 g; 18,1 mmol) wurde unter einer Stickstoffatmosphäre partiell in trockenem THF (20 mL) gelöst. N-(α -Benzotriazole-1-yl-N-azido-propylbenzamid)-phenylacetamid **8** (4,02 g; 8,6 mmol) wurde ebenfalls unter Stickstoff in trockenem THF (120 mL) suspendiert und gradiell zur Natriumethylthiolate-Suspension zugegeben. Es resultierte eine braune Lösung mit darin enthaltenem weißen Feststoff. Nach 3 h 40 min zeigte DC (EtOAc:Hex = 2:1; $R_f = 0,36$) vollständigen Umsatz an. Wasserzugabe (50 mL) führte zu einer trüben hellgelben Lösung. Das Produkt wurde durch Chloroform extrahiert (1 x 100 mL, 3 x 30 mL), die wässrige Lösung mit NaCl gesättigt und wiederum mit Chloroform ausgeschüttelt (3 x 30 mL). Die vereinten organischen Phasen wurden getrocknet (NaSO_4) und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgezogen. Es resultierten 3,43 g eines weißen Feststoffes (97 % Ausbeute).

Schmelzpunkt: 159 °C

IR ν_{max} (Nujol, cm^{-1}): NH (Amid) 3290, CH 2955, N_3 2096, C=O (Amid) 1639, $\text{C}=\text{C}_{ar}$ 1524.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7,61 (d; $J_{ortho} = 8,1$ Hz; 4 H; H_{ar}); 7,33 - 7,20 (m, 5 H, H_{ar}); 6,39 (s, 1 H, CONH_2CH_2); 6,19 (d; $J_{\text{CH},\text{NH}} = 9,2$ Hz; 1 H; CONHCH); 6,00 (d; $J_{\text{CH},\text{NH}} = 9,2$ Hz; 1 H; CONHCH); 3,58 (s, 2H, PhCH_2); 3,45 (qui; $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6,6$ Hz; $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6,6$ Hz; 2H; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 3,37 (t; $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6,6$ Hz; 2H; CH_2N_3); 2,54 (q; $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_3} = 7,3$ Hz; 1H; SCH_2CH_3); 2,39 (q; $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_3} = 7,3$ Hz; 1H; SCH_2CH_3); 1,84 (t; $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 6,6$ Hz; 2 H; CONHCH_2); 1,17 (t; $J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 7,3$ Hz; 3H; SCH_2CH_3).

N-(α -Thioethyl-N'-aminopropylbenzamid)-phenylacetamid 10

N-(α -Thioethyl-N'-azidopropylbenzamide)-phenylacetamide **9** (3,29 g; 7,99 mmol) wurde in THF gelöst (100 mL). Triphenylphosphan (2,48 g; 9,47 mmol) und schließlich Wasser (1,65 mL, 91,56 mmol) wurden zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde eine Woche gerührt, bis DC vollständigen Umsatz anzeigte (EtOAc:Hex = 2:1; $R_f = 0,18$). Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abgezogen und der Rückstand nach Aufnahme in Diethylether (160 mL) 2 h gerührt. Das Produkt wurde abfiltriert und zweimal mit je 30 mL Diethylether gewaschen. Es resultierten 2,94 g eines weißen Feststoffes (95 % Ausbeute).

IR ν_{max} (Nujol, cm^{-1}): NH (Amid) 3276, CH 2955, C=O (Amid) 1648, $\text{C}=\text{C}_{ar}$ 1538.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 7,86 (d; $J_{ortho} = 8,5$ Hz; 2 H; H_{ar}); 7,60 (d; $J_{ortho} = 8,2$ Hz; 2 H; H_{ar}); 7,42 - 7,29 (m, 5 H, H_{ar}); 6,34 (s, 1 H, NHCHSEt); 3,71 (d; $J_{\text{CH}_b,\text{CH}_a} = 16,4$ Hz; 1 H; PhCH_b); 3,65 (d; $J_{\text{CH}_a,\text{CH}_b} = 16,4$ Hz; 1 H; PhCH_a); 3,52

(t; $J_{CH_2,CH_2} = 6,9$ Hz; 2 H; $CONHCH_2$); 2,78 (t; $J_{CH_2,CH_2} = 6,9$ Hz; 2H; CH_2NH_2); 2,74 - 2,50 (m, 2H, SCH_2CH_3); 1,83 (qui; $J_{CH_2,CH_2} = 6,9$ Hz; $J_{CH_2,CH_2} = 6,9$ Hz; 2H; $CH_2CH_2CH_2$); 1,30 (t; $J_{CH_3,CH_2} = 7,4$ Hz; 3H; SCH_2CH_3) ^{13}C -NMR (63 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 171 ($C=O$), 168 ($C=O$), 142, 135, 133 (C_{ar}), 131, 128, 128, 127, 126 (CH_{ar}), 55 ($NHCHSEt$), 42 (SCH_2CH_3), 38 (CH_2NH_2), 37 ($CONHCH_2$), 32 ($CH_2CH_2CH_2$), 24 ($PhCH_2$), 13 (SCH_2CH_3).

9.6.1.2 Polymerfunktionalisierung

ω -Methcarboxy-bPEG40.000 **12**

Aus trockenem THF (40 mL), Natrium (1,15 g; 50 mmol) und Naphthalin (6,40 g; 50 mmol) wurde eine frische Natriumnaphthalin-Lösung bereitet. bPEG40.000 **11** (5,00 g; 0,125 mmol) wurde unter Rühren und leichtem Erwärmen auf 50 °C in trockenem THF (50 mL) gelöst. Bei kräftigem Rühren wurde die PEG-Lösung mit der Natriumnaphthalin-Lösung titriert, bis eine grüne Farbe bestehen bleibt. Hierbei kam es zum Niederschlag eines nicht näher bestimmten schwarzen Feststoffes. Die Reaktionslösung wurde weitere 30 Minuten gerührt und während einer Stunde wird eine Lösung aus 2-Brom-ethylacetat (0,25 mL; 2,25 mmol) in THF (10 mL) zugetropft. Der Schwarze Niederschlag löste sich und es resultierte eine braune Lösung. Es wurde 4,5 Stunden gerührt und die Lösung schließlich in eiskalten Diethylether (200 mL) gegossen. Nach Abfiltrieren und Waschen mit Diethylether (100 mL) wurde der Feststoff in 0,1 M Natronlauge (100 mL) gelöst und 24 Stunden gerührt. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 2,8 wurde das Wasser unter vermindertem Druck entfernt und im Hochvakuum getrocknet. Der verbliebene Rückstand wurde in Dichlormethan (50 mL) aufgenommen und drei Stunden bei RT gerührt. Der verbliebene Feststoff wurde verworfen. Nach Trockenziehen unter Vakuum wurde aus trockenem Ethanol umkristallisiert (2 x 100 mL). Es resultierten 3,13 g eines gelben Feststoffes (62 % Ausbeute).

IR ν_{max} (Nujol, cm^{-1}): OH 3468, CH 2923, 2857.

Titration mit Natronlauge zeigte 62 %ige Carboxylierung an, pK_a 7,9.

9.6.1.3 Anbindung und Abspaltung des Flitsch-Linkers

Anbindung des Flitsch-Linkers **10** an das Polymer

ω -Methcarboxy-bPEG40.000 **12** (190 mg; 4,8 μ mol), N-(α -Thioethyl-N'-aminopropylbenzamid)-phenylacetamid **10** (53 mg, 308 μ mol) und 1-Hydroxybenzotriazol (42 mg, 308 μ mol) wurden unter einer Stickstoffatmosphäre in DMF (1 mL) gelöst. Dann wurden Diisopropylcarbodiimid (47 μ L, 300 μ mol) und Diisopropylethylamin (56 μ L, 322 μ mol) zugegeben und bei RT wurde für 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in THF (3 mL) aufgenommen. Das Produkt **4** wurde mittels Ultrafiltration aufgereinigt (Nadir-UF-PA5-Membran, Lösungsmittel THF, Dichlormethan, Chloroform und Chloroform:Methanol:Wasser = 10:10:3, 24 Verweilzeiten). Es resultierten 160 mg eine weißen Feststoffes. Spaltung des Linkers und HPLC-Analyse bezüglich Phenylacetamid zeigte quantitative Linkeranbindung an.

Chemische Spaltung des Flitsch-Linkers am Polymer

Polymergebundener Linker **4** (10 mg; 0,3 μ mol) wurde mit einer Mischung aus Trifluoressigsäure, Dichlormethan und Wasser (9:10:1 bez. Volumen, 1 mL) versetzt und bei RT

wurde für 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Nach Aufnahme in 25 mM Kaliumphosphatpuffer (1 mL; pH 6,5) wurde das freigesetzte Phenylacetamid per HPLC quantifiziert.

Enzymatische Spaltung des Flitsch-Linkers am Polymer

Polymergebundener Linker **4** (10 mg; 0,3 μ mol) wurde mit Penicillin Amidase in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (1 mL; 750 U) bei pH 7,5 versetzt. Bei RT wurde für 16 gerührt. Mittels Ultrafiltration wurde das Enzym abgetrennt (Nadir-UF-PA5-Membran), das Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingengt und getrocknet. Nach Wiederaufnahme in 25 mM Kaliumphosphatpuffer (1 mL; pH 6,5) wurde die freigesetzte Phenyllessigsäure per HPLC quantifiziert.

9.6.1.4 Synthese des polymergebundenen Dioxyxylyl-Linkers **13**

MPEG-DOX-Cl, 4-(Chlormethyl)-phenylmethyl-polyethylenglykolyether **15**

Es ist essentiell, daß mit extrem trockenen Reagenzien gearbeitet wird. Besonders beim PEG ist hier große Vorsicht geboten, PEG ist sehr hygroskopisch. Zum Trocknen von PEG stehen verschiedene Verfahren zur Auswahl. Gute Ergebnisse wurden folgendermaßen erzielt: Nach Vortrocknen über P_2O_5 wurde in trockenem Toluol aufgenommen und am Wasserabscheider refluxiert. Nach Entfernen des Toluols unter vermindertem Druck wurde im Hochvakuum getrocknet. Auch mit PEG, welches ausschließlich mehrere Wochen (≥ 3) über P_2O_5 aufbewahrt wurde, wurden zum Teil gute Ergebnisse erzielt. Glasgeräte sollten möglichst mit einer Flamme ausgeheizt werden und das Lösungsmittel THF, sowie alle weiteren Reagenzien unmittelbar vor Gebrauch sorgfältig getrocknet werden.

Trockenes MPEG10.000 **3** (10 g, 1 mmol) wurde in THF (100 mL) mittels Erwärmen gelöst. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde Natriumhydrid (0,32 g; 12,7 mmol) zugegeben. Nach weiteren 10 min wurden Natriumiodid (210 mg; 1,4 mmol) und α, α' -Dichlor-*p*-xylen **14** (5,8 g; 33,1 mmol) zugegeben. Die Lösung wurde unter Argon bei Raumtemperatur gerührt. Nach 5 d wird durch Celite filtriert und mit DCM nachgespült (20 mL). Eine weitere Aufreinigung erfolgte per Ultrafiltration (Membralox 1 kDa-Membran, Acetonitril). Quantitative Ausbeute resultierte.

Alternativ zur Ultrafiltration wurde das Produkt auch nach der Celite-Filtration und nach Einengen mittels Diethylether (200 mL) niedergeschlagen. Nach Abfiltrieren des Niederschlages wurde dieser erneut in Diethylether resuspendiert (200 mL) und eine Stunde gerührt. Der Feststoff wurde dann abfiltriert, im Hochvakuum getrocknet und aus trockenem Ethanol (160 mL) umkristallisiert. Nach Hochvakuumtrocknung resultierten 7,70 g eines weißen Feststoffes (77 Gew% Ausbeute).

Die Ultrafiltration zur Aufreinigung kann als Methode der Wahl angesehen werden.

1H -NMR (360 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7,33 (d, 4 H, H_{ar}); 4,56 (s, 2 H, $OCH_2C_6H_4$); 4,46 (s, 2 H, $ClCH_2C_6H_4$); 3,36 (s, 3 H, $CH_3 - PEG$).

Das Signal des polymeren Rückrates bei 3,62 ppm wurde unterdrückt.

MPEG-DOX-OH, 4-(Hydroxymethyl)-phenylmethyl-polyethylenglykolyether **13**

MPEG10.000-DOX-Cl **15** (9,66 g; 0,96 mmol) wurde in einer Lösung aus Natriumcarbonat (10 g; 119 mmol) in entgastem Wasser (100 mL) gelöst. Unter Argon wurde bei 80 °C über Nacht gerührt. Nach Ausschütteln mit DCM (4 x 30 mL) wurde per Ultrafiltration aufgereinigt (Membralox 1 kDa-Membran, Acetonitril) und die resultierende Lösung

durch Celite filtriert. Unter vermindertem Druck wurde das Lösungsmittel des Filtrats entfernt und der Rückstand in absolutem Ethanol (30 mL) unter Erwärmen gelöst. Nach Auskristallisieren bei 4 °C, Abfiltrieren und Hochvakuumtrocknung resultierte ein weißes amorphes Pulver (7,40 g; 77 % Ausbeute; Polymerbeladung mit DOX $\geq$ 96 % nach HPLC).

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7,321 (s, 4 H, H_{ar}); 4,660 (s, 2 H, $\text{HOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4 - \text{MPEG}$); 4,543 (s, 2H, $\text{HOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{O} - \text{MPEG}$); 3,360 (s, 3 H, $\text{CH}_3\text{O} - \text{PEG} - \text{DOX} - \text{OH}$).

Das Signal des polymeren Rückrates bei 3,62 ppm wurde unterdrückt.

Bestimmung der DOX-Beladung von MPEG10.000-DOX-OH 13

Wie in Kapitel 3 bereits beschrieben, ist eine Beladungsbestimmung per HPLC sehr gut möglich. Ebenfalls möglich, allerdings wesentlich aufwendiger, ungenauer und mit vergleichbar großem Substanzverlust verbunden, ist eine Beladungsbestimmung nach chemischer Derivatisierung per NMR:

MPEG-DOX-OH 13 (100 mg) wurde in trockenem Pyridin (2 mL) gelöst. Nach Zugabe von Acetanhydrid (1 mL) wurde unter Argon bei RT 16 h gerührt. Durch Zugabe von trockenem Diethylether (30 mL) wird das Polymer niedergeschlagen. Nach Abfiltrieren wurde mit trockenem Diethylether (5 mL) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Die Menge des zuvor nicht mit DOX-Linker beladenen Polymers wurde durch Vergleich von $^1\text{H-NMR}$ -Signalen bestimmt

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3), ausgewählte Signale, δ (ppm): 5,027 (s, 2 H, $\text{MPEG} - \text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2 - \text{OAc}$); 4,499 (s, 2 H, $\text{MPEG} - \text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2 - \text{OAc}$); 2,061 (s, 3H, $\text{MPEG} - \text{DOX} - \text{OCOCH}_3$); Signale für MPEG-OAc konnten nicht detektiert werden. (4,191 (t, 2 H, $\text{MPEG} - \text{OCH}_2\text{CH}_2 - \text{OAc}$), 2,020 (s, 3 H, $\text{MPEG} - \text{OCH}_2\text{CH}_2 - \text{OCOCH}_3$)). Dies deutet auf quantitative Beladung des Polymers mit DOX-Linker hin.

9.6.2 Chemische Oligosaccharidsynthese

9.6.2.1 Synthese von

2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyltrichloracetimidat 17

2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α/β -mannopyranose 22

Eine Lösung aus 3,4,6-tri-O-Benzyl- β -D-mannopyranose-1,2-methylorthoacetate 21 (2,26 g; 4,46 mmol) in 60%iger wässriger Essigsäure (200 mL) wurde 3 h gerührt und anschließend unter vermindertem Druck trockengezogen. Der verbliebene Sirup wurde an Kieselgel ($\text{EtOAc}:\text{Hex} = 1:1$) chromatographisch aufgereinigt. Es resultierten 1,76 g 2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α/β -mannopyranose 22 (80 % Ausbeute).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7,33 - 7,14 (m, 15 H, 3 x C_6H_5); 5,50 (d; $J_{1,2} = 3,0$ Hz; 1 H; H-1; α -Form); 5,39 (dd; $J = 1,9$ Hz + 3,3 Hz; 1 H; H-3 oder H-4; β -Form); 5,24 (dd; $J = 1,8$ Hz + 3,5 Hz; 1 H; H-3 oder H-4; β -Form); 4,86 (d, $J_{\text{CH}_a,\text{CH}_b} = 10,8$ Hz, 1 H, PhCH_2); 4,71 (d, $J_{\text{CH}_a,\text{CH}_b} = 11,1$ Hz, 1 H, PhCH_2); 4,85 - 4,44 + 4,09 - 4,02 + 3,80 - 3,51 (m, 10 H; H-1, H-2, H-5, 2 x H-6, 2 x PhCH_2); 2,22 (s, 3 H, COCH_3), α -Form); 2,15 (s, 3 H, COCH_3), β -Form).

Laut ^1H -NMR-Daten liegt zu 13 % die α - und zu 87 % die β -Form vor.

2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyltrichloracetimidat **17**

2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α/β -mannopyranose **22** (1,53 g; 3,12 mmol) wurde in trockenem DCM (12,5 mL) unter einer Stickstoffatmosphäre gelöst. Bei einer Temperatur von -5 bis -10 °C wurden Trichloracetonitril (3,25 mL; 32,53 mmol) und DBU (125 μL ; 0,88 mmol) zugesetzt. DC-Kontrolle (Toluol:EtOAc = 3:1; Rf = 0,52) nach 15 Minuten zeigte vollständigen Umsatz an. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt an Kieselgel aufgereinigt (Toluol:EtOAc = 6:1). Es resultierten 0,81 g des farblosen sirupösen Produktes (40 % Ausbeute).

^1H -NMR (200 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 8,61 (s, 1 H, NH); 7,25 - 7,09 (m, 15 H, 3 x C_6H_5); 6,24 (d; $J_{1,2} = 1,8$ Hz; 1 H; H-1); 5,43 (t; $J_{1,2} = J_{2,3} = 1,8$ Hz; 1 H; H-2); 4,81 und 4,46 (2 x d; $J_{CH_a,CH_b} = 10,6$ Hz; 2 H; $PhCH_2$); 4,67 und 4,62 (2 x d; $J_{CH_a,CH_b} = 11,5$ Hz; 2 H; $PhCH_2$); 4,53 und 4,44 (2 x d; $J_{CH_a,CH_b} = 13,4$ Hz; 2 H; $PhCH_2$); 4,00 und 3,62 (m, 4 H, H-4, H-5, 2 x H-6); 2,12 (s, 3 H, $COCH_3$); 3,78 (dd, $J_{2,3} = 2,6$ Hz; $J_{3,4} = 11,0$ Hz; 1 H; H-3).

9.6.2.2 Aufbau des polymergebundenen Tetramannopyranosides

MPEG-DOX-2-O-acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosid **23**

MPEG10.000-DOX-OH **13** (3 g; 0,3 mmol; DOX-Beladung 55 %) wurde in DCM gelöst (20 mL) und auf dem Eisbad gekühlt. Es wurde eine Lösung aus 2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyltrichloracetimidat **17** in trockenem DCM (15 mL) zugegeben. Nach 10 Minuten wurden 180 μL einer 0,5 M Lösung aus Trimethylsilyltrifluormethansulfonat in DCM zugegeben. Die Lösung wurde 16 h gerührt, zu Beginn auf dem Eisbad (ein Temperaturanstieg auf Raumtemperatur im Laufe der 16 h wurde zugelassen). Unter vermindertem Druck wurde das Lösungsmittel entfernt und anschließend im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in Ethanol/Wasser (1:1, 100 mL) aufgenommen und es wurde durch Celite filtriert. Eine Aufreinigung fand mittels Ultrafiltration statt (PoroCer 1 kDa; Ethanol:Wasser = 1:1; 5 Verweilzeiten). Nach Trocknung im Hochvakuum resultierten 3,25 g (quantitative Ausbeute).

^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3), ausgewählte Signale, δ (ppm): 7,422 - 7,113 (m, 19 H, H_{ar}); 5,378 (dd; $J = 3,4$ Hz / 1,8 Hz; 1 H, H-2 mit Linker); 5,335 (dd; $J = 3,4$ Hz / 1,9 Hz; 1 H, H-2 ohne Linker); 4,894 (d; $J = 1,8$ Hz; 1 H, H-1 mit Linker); 4,850 (d; $J = 1,8$ Hz; 1 H, H-1 ohne Linker); 4,833 - 4,810 (m); 4,688 - 4,642 (m); 4,535 - 4,434 (m); 3,353 (s, 3 H, $MPEG - OCH_3$); 2,111 (s, 3 H, $OCOCH_3$).

MPEG-DOX-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosid **16**

MPEG-DOX-2-O-acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranoside **23** (3,25 g) wurde durch vorsichtiges Erwärmen in trockenem Methanol (25 mL) gelöst. Nach Abkühlen auf RT wurden 200 μL DBU zugesetzt und die Lösung gerührt. Nach 16 h zeigten NMR-Daten vollständige Deacetylierung an (Acetyl-Signal bei 2,111 ppm und H-2 Signale bei 5,378 ppm (mit Linker) und 5,335 ppm (ohne Linker) waren nicht mehr vorhanden). Die Aufreinigung erfolgte per Ultrafiltration (PoroCer 1 kDa; Ethanol:Wasser = 1:1;

5,5 Verweilzeiten). Nach Trockenziehen unter vermindertem Druck und Trocknung im Hochvakuum resultierten 2,98 g (94 Gew% Ausbeute).

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, CDCl_3), ausgewählte Signale, δ (ppm): 7,38 - 7,17 (m, 19, H_{ar}); 5,00 (s, breit, 1H, H-1 mit Linker); 4,96 (s, 1 H, H-1 ohne Linker); 4,84 (d; $J = 10,7$ Hz; 1 H; $PhCH_2$); 4,74 - 4,48 (m, 9 H); 4,08 (s, breit, 1 H, H-2); 3,40 (s, 3 H, $MPEG-OCH_3$).

Alle weiteren, sich jeweils wiederholenden, Schritte des Mannopyranosidaufbaus wurden in analoger Weise wie hier beschrieben durchgeführt. Reaktionskontrolle wurde über $^1\text{H-NMR}$ -Spektren durchgeführt, wobei je nach Stufe das Erscheinen oder Verschwinden eines Acetyl-Signals beobachtet wurde. Eine genaue Angabe der Ausbeute bezüglich der Zwischenstufen kann daher nicht gemacht werden.

MPEG10.000-DOX-2-O-(2-O-acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl)-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosid 18

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3), ausgewählte Signale, δ (ppm): 7,38 - 7,17 (m, 34, H_{ar}); 5,50 (s, breit, 1 H, H-2b); 5,38 (m, 1H, H-2a mit Linker); 5,32 (m, 1 H, H-2a ohne Linker); 5,05 (m, 1 H, H-1b); 4,95 (s, 1 H, H-1a); 4,9 - 4,4 (m, 16 H); 3,36 (s, 3 H, $MPEG-OCH_3$); 2,12 (s, 3 H, $OCOCH_3$).

MPEG10.000-DOX-3,4,6-tri-O-benzyl-2-O-(3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl)- α -D-mannopyranosid 24

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3), ausgewählte Signale, δ (ppm): 7,38 - 7,17 (m, 34, H_{ar}); 5,20 (s, breit, 1H, H-1b); 4,98 (s, breit, 1 H, H-1a); 5,05 (m, 1 H, H-1b); 4,90 - 4,4 (m, 16 H); 3,34 (s, 3 H, $MPEG-OCH_3$).

MPEG10.000-DOX-2-O-[(2-O-acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl)-2-O-(3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl)]-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosid 25

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3), ausgewählte Signale, δ (ppm): 7,38 - 7,17 (m, 49, H_{ar}); 5,35 (m, 1 H, H-2c); 5,21 (d, 1H, H-1c); 5,10 (d, 1 H, H-1b); 4,97 (d, 1 H, H-1a); 4,95 - 4,40 (m, 22 H); 4,10 - 3,95 (m, 2 H, H-2a-b); 3,35 (s, 3 H, $MPEG-OCH_3$); 2,11 (s, 3 H, $OCOCH_3$).

MPEG10.000-DOX-3,4,6-tri-O-benzyl-2-O-[(3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl)-2-O-(3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl)]- α -D-mannopyranosid 26

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3), ausgewählte Signale, δ (ppm): 7,38 - 7,14 (m, 49, H_{ar}); 5,10 (s, broad, 1 H, H-1c); 4,95 - 4,4 (m); 4,1 - 4,00 (m); 3,35 (s, 3 H, $MPEG-OCH_3$).

MPEG10.000-DOX-2-O-[(2-O-acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl)-2-O-(3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl)-2-O-(3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl)]-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosid 27

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3), ausgewählte Signale, δ (ppm): 7,38 - 7,10 (m, 64, H_{ar});

5,50 (m, 1 H, H-2d); 3,35 (s, 3 H, *MPEG* – *OCH*₃); 2,09 (s, 3 H, *OCOCH*₃).

Aufgrund einer polymergebundenen Substanzmischung konnten nicht sämtliche Signale zweifelsfrei zugeordnet werden (bis zu acht verschiedene Zucker am Polymer, Mono-, Di-, Tri-, und Tetrasaccharid mit und ohne Linker an das Polymer gebunden).

9.6.2.3 Abspaltung des Tetrasaccharids vom Polymer

MPEG10.000-DOX-2-O-[(2-O-acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl)-2-O-(3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl)-2-O-(3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl)]-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosid **27** (1,92 g; 0,166 mmol) wurde mit Pd/C (10 %ig; 1,9 g) und Essigsäure (HOAc/Wasser = 1:1, 50 mL) versetzt. Bei 50 °C und 4 bar wurde für 20 h mit H₂ hydriert. Nach Abkühlen wurde die Mischung durch Celite filtriert, mit Methanol/Wasser = 9:1 (500 mL) wurde nachgespült. Eine Abtrennung des Polymers erfolgte per Ultrafiltration (PoroCer 1 kDa, Methanol/Wasser = 9:1). Das Permeat wurde unter vermindertem Druck eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in trockenem Pyridin aufgenommen (5 mL), auf dem Eisbad gekühlt und mit Acetanhydrid (3 mL) versetzt. Unter Argon wurde 16 h gerührt. Dann wurde unter vermindertem Druck bis zur Trockene eingengt, mit Toluol (20 mL) versetzt, erneut unter vermindertem Druck bis zur Trockene eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Es folgten zwei partielle Aufreinigung an Kieselgel (2 % Methanol in DCM). Es resultierten 84,4 mg Rohprodukt (quantitative Ausbeute bezüglich der linker gebundenen Zucker)

Eine Analytik wurde per MADLI-TOF-MS durchgeführt und lieferte:

39 % Disaccharid, 44 % Trisaccharid und 17 % Tetrasaccharid **28**.

9.6.3 Enzymatische Oligosaccharidsynthese

9.6.3.1 Synthese von MPEG10.000-DOX-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucose **33**

2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- α -D-glucopyranosylchlorid **31**

2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose **30** (10 g, 45 mmol) wurde unter starkem Rühren mit Acetylchlorid (20 mL, 280 mmol) versetzt. Die weiße Suspension wurde für 16 h bei RT gerührt. Die entstandene klare braune Lösung wurde dann mit Chloroform (80 mL) versetzt und die Mischung unter starkem Rühren auf Eis (100 g) gegeben. Die organische Phase wurde mit eiskalter gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (150 mL) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck wurde das Lösungsmittel entfernt. Diethylether (100 mL) wurde zugesetzt und nach ca. einer Minute begann ein Feststoff auszukristallisieren. Der Feststoff wurde abfiltriert, zweimal mit Diethylether (je 20 mL) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Es resultierten 10,14 g Rohprodukt, welches säulen-chromatographisch an Kieselgel (Laufmittel Ethylacetat, *R_f*=0,51) gereinigt wurde. Es resultierten 5,19 g Produkt (32 % Ausbeute).

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6,13 (d, *J* = 4 Hz, 1 H, H-1); 5,78 (d, breit, *J* = 9 Hz, 1 H, *NHAc*); 5,24 (dd, *J* = 9 / 10 Hz, 1 H, H-3); 5,15 (dd, *J* = 9 Hz, 1 H, H-4); 4,47 (ddd, *J* = 10 / 9 / 4 Hz, 1 H, H-2); 4,16 - 4,27 (m, 2 H, H-5 und H-6a); 4,02 - 4,13 (m, 1 H, H-6b); 2,04 / 1,99 / 1,93 (3 x s, 12 H, *NHAc*).

MPEG10.000-DOX-2-acetamido-2-deoxy-3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucose 32

MPEG10.000-DOX-OH **13** (5,0 g; 0,5 mmol), 2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- α -D-glucopyranosylchlorid **31** (904 mg; 2,5 mmol), Silbertrifluormethansulfonat (444 mg; 1,7 mmol) und zwei Spatelspitzen 4 Å Molsieb wurden mit trockenem DCM (40 mL) versetzt und bei einer Ölbadtemperatur von 50 °C 16 h refluxiert. Es wurde durch Celite filtriert und mit DCM nachgewaschen (20 mL). Die Aufreinigung erfolgte zunächst per Ultrafiltration (Membralox 1 kDa, Acetonitril). Dann wurde nach Einengen unter vermindertem Druck und Trocknen im Hochvakuum aus trockenem Ethanol umkristallisiert. Es resultierten 4,2 g eines leicht gelblichen Feststoffes (85 % Ausbeute).

Ein Arbeiten ohne Lösungsmittel, in einer PEG-Schmelz bei 70 °C war ebenfalls möglich. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃), ausgewählte Signale, δ (ppm): 7,31 - 7,22 (m, 4 H, H_{ar}); 5,53 (d; $J_{NH,H-2} = 9$ Hz; 1 H; NH) 5,25 - 5,00 (m, 3 H); 4,85 (d, $J_{MPEGCH_2C_6H_4CH_a,MPEGCH_2C_6H_4CH_b}$, 1 H, $CH_2C_6H_4CH_a$); 4,54 (s, 2 H, $MPEGCH_2C_6H_4$); 4,65 - 4,53 (m, 3 H) 4,29 - 4,11 (m); 3,35 (s, 3 H, $PEG - OCH_3$); 2,08 (s, 3 H *Acetyl*); 1,99 (s, 6 H 2 x *Acetyl*); 1,89 (s, 3 H, *Acetyl*).

MPEG10.000-DOX-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucose 33

MPEG10.000-DOX-2-acetamido-2-deoxy-3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucose **32** (3,19 g; 0,30 mmol) wurde in trockenem Methanol (20 mL) unter leichtem Erwärmen gelöst. Nach Abkühlen auf RT wurde DBU (477 μ L; 3,19 mmol) zugesetzt und bei RT wurde 24 h gerührt. Die Lösung wurde unter vermindertem Druck eingengt und in eiskalten Diethylether (350 ml) getropft. Das ausgefallene Polymer wurde abfiltriert und aus absolutem Ethanol (50 mL) umkristallisiert (4 °C) und mit trockenem Diethylether gewaschen. Nach Trocknen im Hochvakuum resultierten 2,48 g (78 % Ausbeute).

¹H-NMR (300 MHz, d-DMSO), ausgewählte Signale, δ (ppm): 7,73 (d; $J_{NH,H-2} = 8,8$ Hz; 1 H; NH); 7,30 - 7,24 (m, 4 H; H_{ar}); 5,03 - 4,93 (m); 4,79 - 4,75 (m); 4,58 - 4,49 (m); 4,47 (s, 2 H, $MPEG - CH_2C_6H_4$); 4,34 (d; $J = 8,2$ Hz; 1 H); 3,75 - 3,25 (m, unter anderem Signale für Polymerkette); 3,23 (s, 1 H, $PEG - O - CH_3$); 3,09 (s, breit, 1 H, OH); 3,07 (s, breit, 1 H, OH); 1,81 (s, 3 H, *Acetyl*).

NMR-Signale von α -gebundener Glucose konnten nicht detektiert werden.

9.6.3.2 Enzymatische Zuckersynthesen

Synthese von MPEG10.000-DOX-LacNAc **34**

Es wurde in einem Gesamtvolumen von 10 mL in HEPES-Puffer (200 mM; pH 7,2), KCl (25 mM), DTT (1 mM), MnCl₂ (1 mM) und BSA (1 mg/mL) gearbeitet. MPEG10.000-DOX-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucose **33** (516 mg, 50 μ mol, 5 mM) und UDP-Glucose (153 mg, 250 μ mol, 25 mM) wurden in obiger Lösung mit β -1,4-GalT (500 mU), UDP-Gal-4-Epimerase aus *Saccharomyces cerevisiae* (5 U) und alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (10 U) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei 30 °C gerührt. Nach 12 h lag eine analytische Ausbeute von 98 % vor. Die Aufarbeitung erfolgte nach 24 h per Ultrafiltration (Pellicon XL 5 kDa, 22 Verweilzeiten) und anschließender Lyophilisation. Im Laufe der Enzymabtrennung kam es dabei zu großen Verlusten bezüglich Produkt. Es resultierten 50 mg Produkt **34** (Ausbeute 9,4 % nach Aufarbeitung).

¹H-NMR (300 MHz, d-DMSO), ausgewählte Signale, δ (ppm): 7,36 -7,46 (dd; J = 8,1 / 21,7 Hz; 4 H; *H*_{aromatisch}; DOX-Linker); 4,59 (s, 2 H, C₄H₆CH₂ – MPEG); 4,52 (d; J = 8,2 Hz; 1 H; H-1 GlcNAc, β -gebunden); 4,44 (d; J = 7,7 Hz; 1 H; H-1 Gal, β -gebunden); 1,92 (s, 3 H, *Acetyl*).

Synthese von MPEG10.000-DOX-Galili **29**

Es wurde in einem Gesamtvolumen von 120 mL in HEPES-Puffer (200 mM; pH 7,2), KCl (25 mM), DTT (1 mM), MnCl₂ (1 mM) und BSA (1 mg/mL) gearbeitet. MPEG10.000-DOX-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucose **33** (2,48 g, 240 μ mol, 2 mM), UDP-Glucose (29 mg; 48 μ mol; 0,4 mM) und Sucrose (8,2 g, 24 mmol, 200 mM) wurden in obiger Lösung mit β -1,4-GalT (4,8 U), α -1,3-GalT (14,4 U), UDP-Gal-4-Epimerase aus *Streptococcus thermophilus* (8,6 U) und Sucrose Synthase (19,2 U) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei 30 °C gerührt. Nach 30 h lag eine analytische Ausbeute von 99 % vor. Die Aufreinigung erfolgte nach Abzentrifugieren (10000 rpm) zunächst durch Extraktion mittels DCM (3 x 50 mL). Nach Einengen unter vermindertem Druck und Trocknung im Hochvakuum wurde per Ultrafiltration weiter aufgereinigt (Pellicon XL 5 kDa, Wasser). Es resultierten 1,06 g Produkt (41,5 % Ausbeute nach Aufarbeitung).

¹H-NMR (300 MHz, d-DMSO), ausgewählte Signale, δ (ppm): 7,37 -7,46 (dd; J = 8,0 / 21,7 Hz; 4 H; *H*_{aromatisch}; DOX-Linker); 5,14 (d; J = 3,7 Hz; 1 H, Gal α , H-1) 4,62 (s, 2 H, C₄H₆CH₂ – MPEG); 4,55 (d; J = 8,4 Hz; 1 H; GlcNAc; H-1); 5,54 (d; J = 7,7 Hz; 1 H; Gal β ; H-1); 1,93 (s, 3 H, *Acetyl*).

Abspaltung von N-Acetylactosamin vom Polymer

Zu MPEG10.000-DOX-LacNAc **34** (70 mg, 7 μ mol) gelöst in 50 %iger Essigsäure (10 mL) wurde Palladium auf Aktivkohle (10 %ig, 70 mg) zugesetzt. Bei 50 °C und 4 bar H₂ wurde für 20 h hydriert. Die Mischung wurde durch eine Sepack-bC18-Säule gegeben. Mit Wasser (50 mL) wurde das Produkt heruntergespült, Lyophilisation folgte. Die Ausbeute betrug 2,4 mg N-Acetylactosamin (60 % Ausbeute).

¹H-NMR (300 MHz, d-DMSO), ausgewählte Signale, δ (ppm): 5,13 (d; J = 2,0 Hz; GlcNAc; H-1; α -Anomer); 4,65 (d; J = 7,4 Hz; GlcNAc; H-1; β -Anomer); 4,41 (d; J = 7,7 Hz; Gal; H-1); 1,97 (s, 3 H, *Acetyl*).

Das ¹H-NMR-Spektrum stimmte mit dem von kommerziell erhältlichem N-

Acetyllactosamin überein.

Abspaltung des Galili-Trisaccharides 1 vom Polymer

Zu MPEG10.000-DOX-Galili **29** (983 mg, 92 μ mol) gelöst in 50 %iger Essigsäure (20 mL) wurde Palladium auf Aktivkohle (10 %ig; 1,4 g) zugesetzt. Bei 50 °C und 4 bar H₂ wurde für 16 h hydriert. Die Mischung wurde durch eine Sepack-bC18-Säule gegeben. Mit Wasser (100 mL) wurde das Produkt heruntergespült, Lyophilisation folgte. Es resultierten 169 mg Rohprodukt. Nach präparativer HPLC, s. o., resultierten 26 mg freies Galili-Trisaccharid **1** (51 % Ausbeute).

¹H-NMR (300 MHz, d-DMSO), ausgewählte Signale, δ (ppm): 5,21 (d; J = 2,1 Hz: GlcNAc; H-1; α -Anomer); 5,15 (d; J = 3,8 Hz; Gal α ; H-1); 4,73 (d; J = 7,7 Hz; GlcNAc; H-1; β -Anomer); 4,55 (d; J = 7,9 Hz; Gal β ; H-1); 2,04 (s, 3 H, *Acetyl*).

Das ¹H-NMR-Spektrum stimmte mit dem von kommerziell erhältlichem Galili-Trisaccharid überein.

MS, positiv, m/z: 568,3 (M + Na⁺).

9.7 Liste der verwendeten Chemikalien

Boehringer, Mannheim	Ampicillin, BSA, alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach	UDP-Galactose-4-Epimerase, rekombinant aus <i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i>
Maybridge Chemicals Company (UK) Pharmacia, Freiburg	α -Phenylacetamide Q-Sepharose FF, IMAC-Material Streamline Chelating
Polymer Standards Service, Mainz	PEG-Standards, MW 106 bis 41.500 g/mol
Roth, Karlsruhe	IPTG
Shearwater Polymers (NL)	MPEG10.000, bPEG40.000
Sigma-Aldrich, Steinheim	UDP-Galactose-4-Epimerase aus an Galactose angepaßter <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Penicillin Amidase
Toronto Research Chemicals (C)	3,4,6-tri-O-Benzyl- - β -D-mannopyrannose- -1,2-methylorthoacetate

Alle weiteren Laborchemikalien wurden bezogen über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, oder Merck, Darmstadt.

9.8 Liste der verwendeten Geräte

Amicon, Witten	Ultrafiltrationszelle der Serie 8000, Ultrafiltrationsmembranen YM10 und YM30
Beckmann, München	Zentrifuge Microfuge E, Kapillarelektrophorese P/ACE System MDQ
Branson Ultrasonics Corp. (USA)	Ultraschall-Desintegrator Sonifier II, Modell W450
Büchi GmbH, Göttingen	Rotationsverdampfer Rotavapor RE 111, Membranpumpe Vakobox B 160, Vakuumpumpe Vac V-513, B-721
Chemap AG (CH)	300 L-Fermenter
Christ, Osterode	Gefriertrockner Alpha2-4
Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg	Tischzentrifuge
Glasbläserei, FZ Jülich	diverse Glasgeräte

Green, Tweed & Co., Königstein	Chemraz-Dichtungen (z. T. Sonderanfertigungen)
Haake, Karlsruhe	Wasserbad F3 digital, Wärmebad G-D8, Kryostat K20, DC3
Hoechst Celanese, Wiesbaden	Ultrafiltrationsmembran UF-PA-5
IKA Labortechnik, Staufen	Magnetrührer Ikamag RET-G
Ingold Meßtechnik, Steinbach	pH-Elektrode
Knauer	Differential-Refraktometer
Latek, Heidelberg	Teflonschläuche, Verbindungsstücke
Labsystems, Frankfurt	Pipetten Finnpiquette Colour
Leybold-Haereus, München	Ölschieberpumpen Divac 2,4 L; Trivac D4B; Vacuummeßgerät Thermovac TM210
Metrohm Herisau (CH)	pH-Meter 691
Millipore GmbH, Eschborn	Pellicon XL-Ultrafiltrationsmodule
Molecular Devices Deutschland, München	Thermo Max Microplate Reader
Osmonics(USA)	Nanofiltrationsmembranen
Pharmacia LKB, Freiburg	Kolbenpumpe P-500, UV-Detektor 2138 Uvicords, Schreiber 2210 2-CH Recorder, Fraktionssammler 2070 Ultrarack II, Fraktionssammler Frac-100, Chromatographie-Säulen
Satorius, Göttingen	Sterilfilter; Waagen LC 2200 S, BP 211 D, BP2100 S, LC 4200 S; Dosierregler YFC 02Z
Scientific Ind. (USA)	Vortex Genie2
TAMI, Hermsdorf	keramische PoroCer-Menbranen
USF Filtration Separation, Bazet (F)	keramische Membralox-Membranen
Verder	Zahnradpumpe V288.06
Watson Marlow, Rotterdam (NL)	Schlauchpumpen 504 U und 503 U/RL
Westfalia Separator AG, Ölde	KA 2 Zellseparator

9.9 Anhang

9.9.1 Chemische Oligosaccharidsynthese

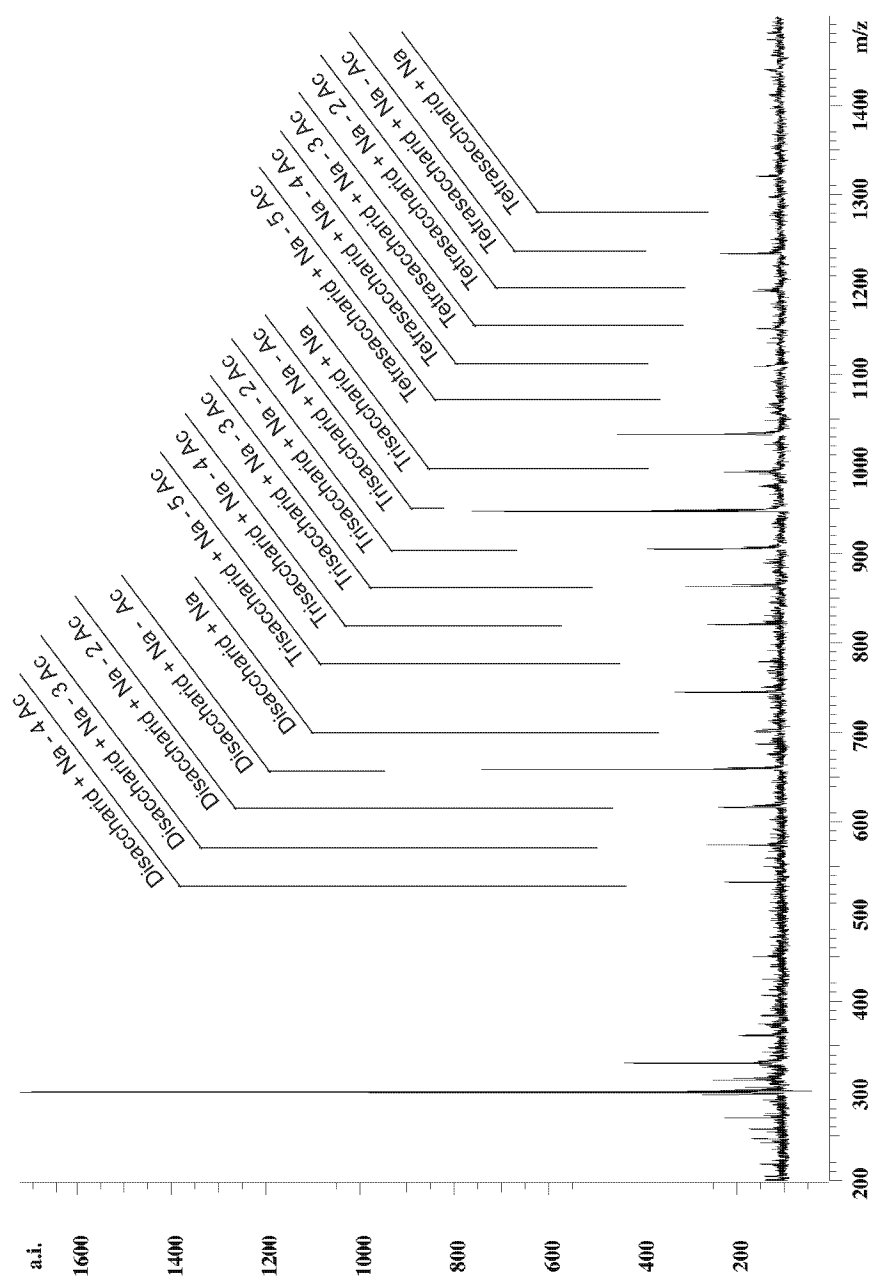


Abbildung 9.1: MALDI-TOF-MS Spektrum zur chemischen Oligosaccharidsynthese

9.9.2 Enzymatische Oligosaccharidsynthese

9.9.2.1 β -1,4-GalT

Die Sequenz der humanen β -1,4-Galactosyltransferase stammt aus der Arbeitsgruppe Ernst, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, und geht auf die von Dr. Masri klonierte β -1,4-Galactosyltransferase zurück (Masri, Appert & Fukuda 1988). Das Plasmid wurde von Dr. Klein, IBT 1, umklont und das erhaltene Plasmid *pLGalT Δ 38*, siehe Abbildung 9.2, wurde zur Expression des Fusionsproteins in *E. coli* JM109 eingesetzt. Der Stamm *E. coli* JM109 *pLGalT Δ 38* wurde von Dr. Elling, Institut für Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

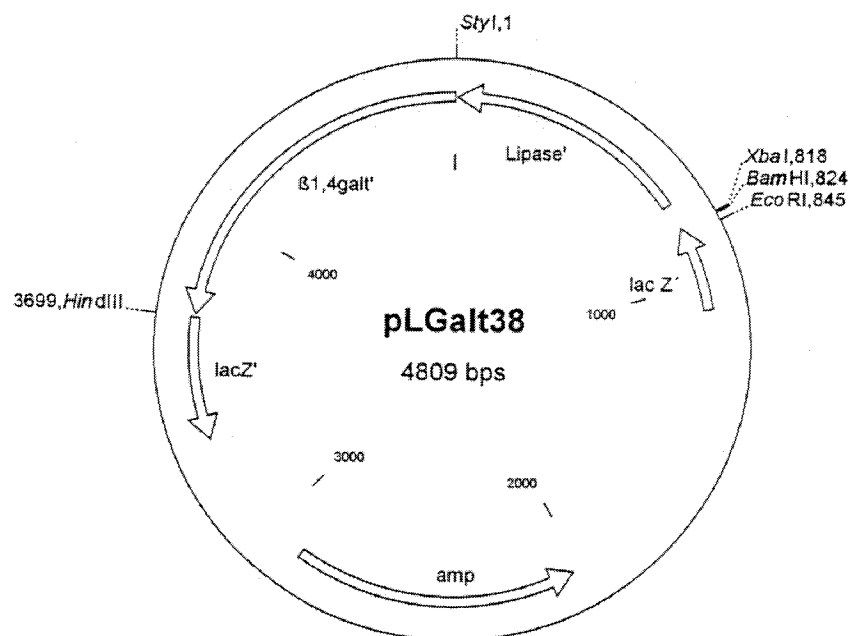
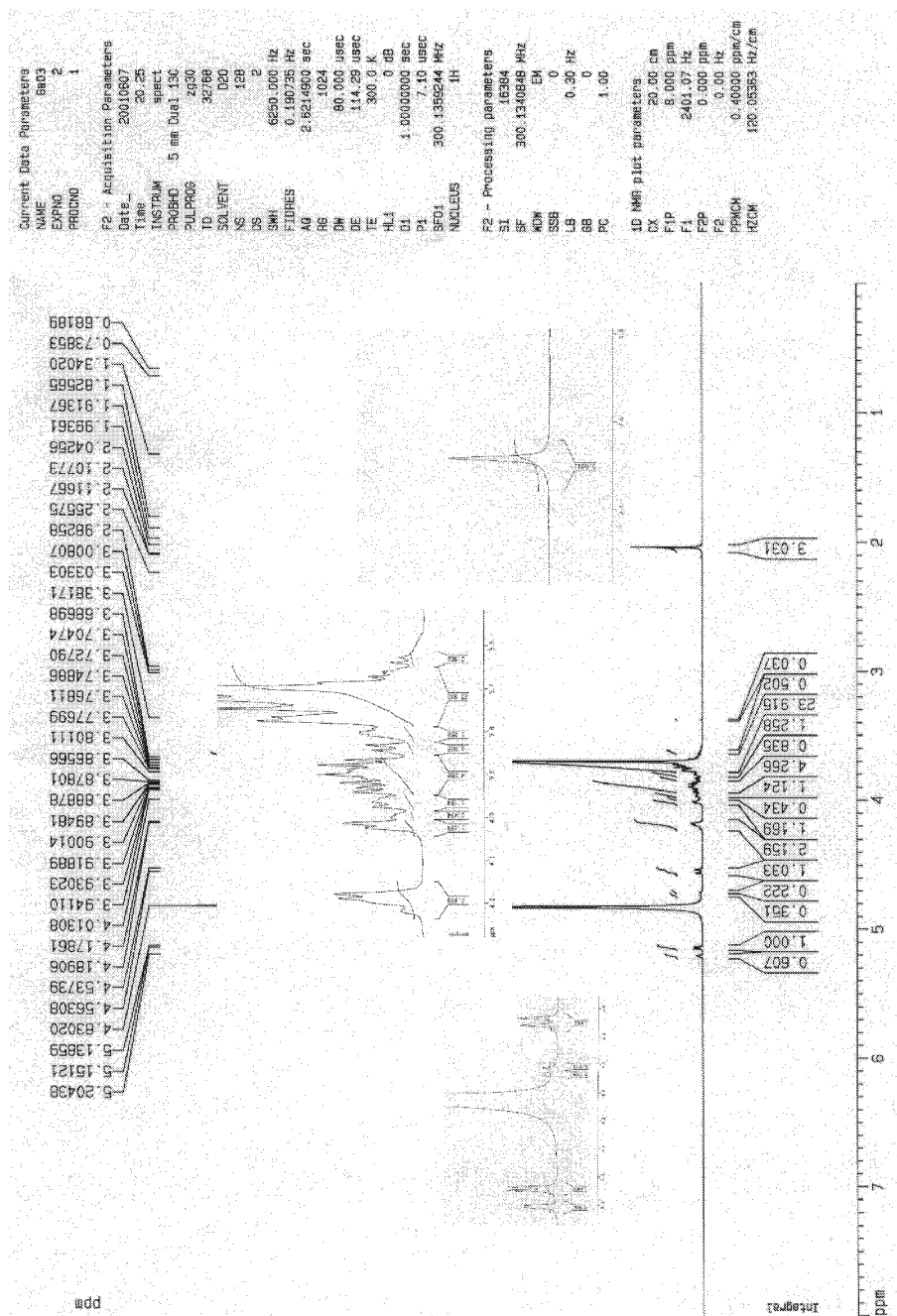


Abbildung 9.2: Plasmidkarte der verwendeten rekombinanten humanen β -1,4-GalT

9.9.2.3 Ermittlung von kinetischen Daten aus der Synthese von 29

Tabelle 9.1: Meßwerte zur Ermittlung von kinetischen Parametern des Vierenzystems, zu Abbildung 6.43 und Tabelle 6.8

Zeit / h	MPEG- DOX- GlcNAc / mM	MPEG- DOX- LacNAc / mM	MPEG- DOX- Galili / mM	Sucrose / mM	Fructose / mM	UDP-Glc / mM	UDP-Gal / mM
0	2,000	0,000	0,000	199,24	0,000	n.b.	n.b.
0,53	1,784	0,149	0,067	207,91	n.b.	0,1495	0,0349
1,12	1,689	0,171	0,140	n.b.	n.b.	0,1848	0,0497
2,07	1,523	0,198	0,280	205,33	n.b.	0,1987	0,0520
3,00	1,314	0,239	0,447	202,89	n.b.	0,2156	0,0675
4,23	1,118	0,278	0,604	205,53	1,291	0,2042	0,0681
6,12	0,812	0,408	0,780	208,14	1,755	0,2023	0,0614
9,45	0,149	0,841	1,009	200,82	2,587	n.b.	n.b.
10,45	0,000	0,954	1,046	204,96	n.b.	0,1667	0,0562
11,70	0,000	0,888	1,112	205,94	3,159	n.b.	n.b.
12,62	0,000	0,814	1,186	207,32	n.b.	0,1645	0,0472
14,20	0,000	0,700	1,300	199,90	3,360	0,1623	0,0558
14,78	0,000	0,707	1,293	199,92	n.b.	0,1564	0,0500
16,12	0,000	0,702	1,298	202,57	3,610	0,1508	0,0438
17,25	0,000	0,635	1,365	196,77	3,414	0,1314	0,0430
18,32	0,000	0,615	1,385	206,17	n.b.	n.b.	n.b.
19,32	0,000	0,638	1,362	n.b.	3,777	0,1312	n.b.
20,20	0,000	0,521	1,479	202,67	3,630	0,1085	0,0358
21,32	0,000	0,500	1,500	n.b.	3,872	0,0955	0,0346
22,48	0,000	0,434	1,566	198,35	n.b.	0,0951	0,0306
24,13	0,000	0,212	1,788	199,18	3,097	0,0755	0,0219
25,23	0,000	0,126	1,874	198,01	2,793	0,0591	0,0224
26,78	0,000	0,064	1,936	200,38	n.b.	0,0461	0,0219
27,78	0,000	0,052	1,948	198,59	n.b.	0,0425	0,0143
36,65	0,000	0,042	1,958	199,73	n.b.	0,0000	0,0000

9.9.2.4 ^1H -NMR-Spektrum des Galili-Trisaccharides 1Abbildung 9.4: ^1H -NMR-Spektrum des Galili-Trisaccharides 1

10 Literaturverzeichnis

- Alper, J. 2001. "Searching for medicine's sweet spot." *Science* 291(5512):2338–2343.
- Angyal, S. J. 1984. The composition of reducing sugars in solution. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Vol. 42 pp. 15–68.
- Annunziata, R., M. Benaglia, M. Cinquini & F. Cozzi. 2000. "Soluble-polymer-supported synthesis of beta-lactams on a modified poly(ethylene glycol)." *Chemistry-a European Journal* 6(1):133–138.
- Arrhenius, S. 1889. "Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren." *Zeitschrift für physikalische Chemie* 4:226–248.
- Avigad, G. 1982. Sucrose and other disaccharides. In *Encyclopedia of plant physiology*. Vol. 13A of *Plant Carbohydrates I* Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag pp. 217–347.
- Barkley, A. & P. Arya. 2001. "Combinatorial chemistry toward understanding the function(s) of carbohydrates and carbohydrate conjugates." *Chemistry-a European Journal* 7(3):555–563.
- Böhm, G., J. Dowden, D. C. Rice, I. Burgess, J. F. Pilard, B. Guilbert, A. Haxton, R. C. Hunter, N. J. Turner & S. L. Flitsch. 1998. "A novel linker for the attachment of alcohols to solid supports." *Tetrahedron Letters* 39:3819–3822.
- Binkley, R. M. 1988. *Modern Carbohydrate Chemistry*. New York, Basel: Marcel Dekker, Inc.
- Bisswanger, H. 1999. *Enzymkinetik*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Blettner, C. G., W. A. König, W. Stenzel & T. Schotten. 1998. "Poly(ethylene glycol) supported liquid phase synthesis of biaryls." *Synlett* (March 1998):295–297.
- Bülter, T. & L. Elling. 1999. "Enzymatic synthesis of nucleotide sugars." *Glycoconjugate Journal* 16(2):147–159.
- Bonora, G. M., C. L. Scremin, F. P. Colonna & A. Garbesi. 1990. "HELP (High Efficiency Liquid Phase) new oligonucleotide synthesis on soluble polymeric support." *Nucleic Acid Research* 18(11):3155–3159.
- Bradford, M. M. 1972. "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical Biochemistry* 72:248–254.

- Brinkmann, N., D. Giebel, G. Lohmer, M. T. Reetz & U. Kragl. 1999. "Allylic substitution with dendritic palladium catalysts in a continuously operating membrane reactor." *Journal of Catalysis* 183(2):163–168.
- Brinkmann, N., M. Malissard, M. Ramuz, U. Römer, T. Schumacher, E. G. Berger, L. Elling, C. Wandrey & A. Liese. 2001. "Chemo-enzymatic synthesis of the Galili epitope Gal- α (1-3)-Gal- β (1-4)-GlcNAc on a homogeneously soluble PEG polymer by a multi-enzyme system." *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* (11):2503–2506.
- Buhleier, E., W. Wehner & F. Vögtle. 1978. "Cascade- and nonskid-chain-like synthesis of molecular cavity topologies." *Synthesis* (February):155–158.
- Burke, J. R. & P. A. Frey. 1993. "The importance of binding-energy in catalysis of hydride transfer by UDP-Galactose-4-Epimerase - a C-13 and N-15 NMR and kinetic-study." *Biochemistry* 32(48):13220–13230.
- Castro-Palomino, J. C., G. Ritter, S. R. Fortunato, S. Reinhardt, L. J. Old & R. R. Schmidt. 1997. "Eine effiziente Synthese von Gangliosid GM2 für die Verwendung in Tumorimpfstoffen." *Angewandte Chemie* 109(18):2081–2085.
- Chen, X., P. R. Andreana & P. G. Wang. 1999. "Carbohydrates in transplantation." *Current Opinion in Chemical Biology* 3(6):650–658.
- Cheryan, M. 1998. *Ultrafiltration and Microfiltration*. Lancaster, Basel: Technomic Publishing Co., Inc.
- Cohen, J. 1993. "Cancer vaccines get a shot in the arm." *Science* 262(5 November):841–843.
- Collins, P. & R. Ferrier. 1998. *Monosaccharides - Their Chemistry and their Roles in Natural Products*. Chichester: Wiley.
- Copeland, L. 1990. "Enzymes of sucrose metabolism." *Methods in Plant Biochem.* 3:73–85.
- Copper, C. L. 1998. "Capillary electrophoresis part I. Theoretical and experimental background." *Journal of Chemical Education* 75(3):343–346.
- Copper, S. L. & K. W. Whitaker. 1998. "Capillary electrophoresis part II. Applications." *Journal of Chemical Education* 75(3):347–351.
- Danishefsky, S. J. & J. R. Allen. 2000. "From the laboratory to the clinic: A retrospective on fully synthetic carbohydrate-based anticancer vaccines." *Angewandte Chemie-International Edition* 39(5):837–863.
- Danishefsky, S. J. & M. T. Bilodeau. 1996. "Glycals in organic synthesis: the evolution of comprehensive strategies for the assembly of oligosaccharides and glycoconjugates of biological consequence." *Angewandte Chemie - International Edition* 35:1380–1419.
- Davis, B. G. 2000. "Recent developments in oligosaccharide synthesis." *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* (14):2137–2160.

-
- den Steen, P. Van, P. M. Rudd, R. A. Dwek & G. Opdenakker. 1998. "Concepts and principles of O-linked glycosylation." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 33(3):151–208.
- Douglas, S. P., D. M. Whitfield & J. J. Krepinsky. 1991. "Polymer-supported solution synthesis of oligosaccharides." *Journal of the American Chemical Society* 113(13):5095–5097.
- Douglas, S. P., D. M. Whitfield & J. J. Krepinsky. 1995. "Polymer-supported solution synthesis of oligosaccharides using a novel versatile linker for the synthesis of D-mannopentaose, a structural unit of D-mannans of pathogenic yeast." *Journal of the American Chemical Society* 117:2116–2117.
- Dow Europe Separation Systems. 1997. Produktinformation Filtration. Technical report.
- Elices, M. J., D. A. Blake & I. J. Goldstein. 1986. "Purification and characterization of a UDP-Gal-beta-D-Gal-1,4-D-GlcNAc-alpha-1,3-galactosyltransferase from Ehrlich ascites tumor-cells." *Journal of Biological Chemistry* 261(13):6064–6072.
- Elling, L. 1997. "Glycobiotechnology: enzymes for the synthesis of nucleotide sugars." *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* 58:90–144.
- Elling, L. 2000. *persönliche Mitteilung*.
- Endo, T., S. Koizumi, K. Tabata, S. Kakita & A. Ozaki. 1999. "Large-scale production of N-acetylactosamine through bacterial coupling." *Carbohydrate Research* 316(1-4):179–183.
- Endo, T., S. Koizumi, K. Tabata, S. Kakita & A. Ozaki. 2001. "Large-scale production of the carbohydrate portion of the sialyl-Tn epitope, alpha-Neup5Ac-2,6-D-GalpNAc, through bacterial coupling." *Carbohydrate Research* 330(4):439–443.
- Fang, J. W., X. Chen, W. Zhang, A. Janczuk & P. G. Wang. 2000. "Synthesis of alpha-Gal epitope derivatives with a galactosyltransferase-epimerase fusion enzyme." *Carbohydrate Research* 329(4):873–878.
- Felder, M., G. Giffels & C. Wandrey. 1997. "A polymer-enlarged homogeneously soluble oxazaborolidine catalyst for the asymmetric reduction of ketones by borane." *Tetrahedron: Asymmetry* (8):1975–1977.
- Flitsch, S. L. & G. M. Watt. 1997. Chemical synthesis of glycoprotein glycans. In *Glycopeptides and Related Compounds*, ed. D. G. Large & C. Warren. first ed. New York: Marcel Dekker Inc. pp. 207–243.
- Französische Norm. 1997. Filtration des liquides-membranes poreuses-taux des retention des membranes d'ultrafiltration et de nanofiltration. Norm NF X 45-103 Association Francaise de Normalisation (AFNOR).
- Fréchet, J. M. & C. Schuerch. 1971. "Solid phase synthesis of oligosaccharides. I. Preparation of the solid support poly[p-(1-propen-3-ol-1-yl)styrene]." *Journal of the American Chemical Society* 93(2):492–496.

- Frey, H., K. Lorenz & C. Lach. 1996. "Dendrimere - von der Ästhetik zur Anwendung?" *Chemie in unserer Zeit* 30(2):75–85.
- Fukasawa, T., K. Obonai, T. Segawa & Y. Nogi. 1980. "The enzymes of the galactose cluster in *Saccharomyces cerevisiae*." *The Journal of Biological Chemistry* 255(7):2705–2707.
- Galili, U., E. A. Rachmilewitz, A. Peleg & I. Flechner. 1984. "A unique natural human-Igg antibody with anti-alpha-galactosyl specificity." *Journal of Experimental Medicine* 160(5):1519–1531.
- Galili, U. & K. Swanson. 1991. "Gene-sequences suggest inactivation of alpha-1,3-galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(16):7401–7404.
- Galili, U. & M. Tanemura. 1999. "Significance of alpha-Gal (Gal-alpha-1,3-Gal-beta-1,4-GlcNAc-R) epitopes and alpha-1,3-galactosyltransferase in xenotransplantation." *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 11(62):317–327.
- Geckeler, K. E. 1995. "Soluble polymer supports for liquid-phase synthesis." *Advances in Polymer Science* 121:31–79.
- Geckeler, K. & E. Bayer. 1980. "Functionalization of soluble polymers 3. Preparation of carboxy-telechelic polymers." *Polymer Bulletin* 3:347–352.
- Giannis, A. 1994. "Die Sialyl-Lewis-X-Gruppe und ihre Analoga als Liganden für Selektin: chemoenzymatische Synthesen und biologische Funktionen." *Angewandte Chemie* 106(2):188–191.
- Gravert, D. J. & K. D. Janda. 1997a. "Organic synthesis on soluble polymer supports: liquid-phase methodologies." *Chemical Review* (97):489–509.
- Gravert, D. J. & K. D. Janda. 1997b. "Synthesis on soluble polymers: new reactions and the construction of small molecules." *Current Opinion in Chemical Biology* 1:107–113.
- Guillier, F., D. Orain & M. Bradley. 2000. "Linkers and cleavage strategies in solid-phase organic synthesis and combinatorial chemistry." *Chemical Reviews* 100(6):2091–2157.
- Haag, R. 2001. "Dendrimers and hyperbranched polymers as high-loading supports for organic synthesis." *Chemistry-a European Journal* 7(2):327–335.
- Haag, R., A. Sunder & J. F. Stumbe. 2000. "An approach to glycerol dendrimers and pseudo-dendritic polyglycerols." *Journal of the American Chemical Society* 122(12):2954–2955.
- Hanessian, S. 1997. *Preparative Carbohydrate Chemistry*. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker, Inc.
- Harris, J. M. 1992. *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry - Biotechnical and Biomedical Applications*. New York, London: Plenum Press.

-
- Harris, J. M., E. C. Struck, M. G. Case, M. S. Paley, M. Yalpani, J. M. van Alstine & D. E. Brooks. 1984. "Synthesis and characterisation of poly(ethylene glycol) derivatives." *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition* 22:341–352.
- Harris, J. M., N. H. Hundley, T. G. Shannon & E. C. Struck. 1982. "Poly(ethylene glycols) as soluble, recoverable, phase-transfer catalyst." *Journal of Organic Chemistry* 47:4789–4791.
- Harvey, D. J. 1996. "Matrix-assisted laser desorption ionisation mass spectrometry of oligosaccharides and glycoconjugates." *Journal of Chromatography A* 720(1-2):429–446.
- Heckel, A., E. Mross, K.-H. Jung, J. Rademann & R. R. Schmidt. 1998. "Oligosaccharide synthesis on controlled-pore glass as solid phase material." *Synlett* Februar:171–173.
- Helenius, A. & M. Aeby. 2001. "Intracellular functions of N-linked glycans." *Science* 291(5512):2364–2369.
- Hesse, M., H. Meier & B. Zeeh. 1991. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 4. ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Hilaire, P. M. St & M. Meldal. 2000. "Glycopeptide and oligosaccharide libraries." *Angewandte Chemie-International Edition* 39(7):1163–1179.
- Hodosi, O. & J. J. Krepinsky. 1996. "Polymer-supported solution synthesis of oligosaccharides: Probing glycosylations of MPEG-DOX-OH with 2-acetamidoglycopyranosyl derivatives." *Synlett* (February 1996):159–162.
- Hoh, C. 1999. *Optimierung der enzymatischen core2-Trisaccharid-Synthese: Anwendung eines genetischen Algorithmus*. Diplomarbeit Universität Bonn.
- Hokke, C. H., A. Zervosen, L. Elling, D. H. Joziase & D. H. Van den Eijnden. 1996. "One-pot enzymatic synthesis of the Gal- α -1,3-Gal- β -1,4-GlcNAc sequence with in situ UDP-Gal regeneration." *Glycoconjugate Journal* 13(4):687–692.
- Horton, D. 1966. "2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl chloride." *Organic Synthesis* 46:1–5.
- Ichikawa, Y., G. C. Look & C. H. Wong. 1992. "Enzyme-catalyzed oligosaccharide synthesis." *Analytical Biochemistry* 202:215–238.
- Issberner, J., R. Moors & F. Vögtle. 1994. "Dendrimere: von Generationen zu Funktionalitäten und Funktionen." *Angewandte Chemie* 106(23/24):2507–2514.
- Ito, Y. 1997. "Polymer support synthesis of oligosaccharide." *Riken Review* 15(August):41–42.
- Jiang, L., R. C. Hartley & T. H. Chan. 1996. "Use of low molecular weight polyethylene glycol linker for polymer-supported solution synthesis of oligosaccharides." *Journal of the Chemical Society, Chemical Communication* pp. 2193–2194.
- Johnson, K. F. 1999. "Synthesis of oligosaccharides by bacterial enzymes." *Glycoconjugate Journal* 16(2):141–146.

- Katritzky, A. R. & M. Drewniak. 1988. "The chemistry of benzotriazole. A novel 2-step procedure for the N-alkylation of amides." *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* (8):2339–2344.
- Khan, S. H. & R. A. O'Neill. 1996. *Modern Methods in Carbohydrate Chemistry*. Harwood Academic Publishers.
- Kieburg, C. & T. K. Lindhorst. 1997. "Glycodendrimer synthesis without using protective groups." *Tetrahedron Letters* 38(22):3885–3888.
- Kleene, R. & E. G. Berger. 1993. "The molecular and cell biology of glycosyltransferases." *Biochimica Biophysica Acta* 1154(3-4):283–325.
- Kleij, A. W., R. A. Gossage, R. Gebbink, N. Brinkmann, E. J. Reijerse, U. Kragl, M. Lutz, A. L. Spek & G. van Koten. 2000. "A dendritic effect in homogeneous catalysis with carbosilane-supported arylnickel(II) catalysts: Observation of active-site proximity effects in atom-transfer radical addition." *Journal of the American Chemical Society* 122(49):12112–12124.
- Koeller, K. M. & C. H. Wong. 2000a. "Complex carbohydrate synthesis tools for glycobiologists: enzyme-based approach and programmable one-pot strategies." *Glycobiology* 10(11):1157–1169.
- Koeller, K. M. & C. H. Wong. 2000b. "Synthesis of complex carbohydrates and glycoconjugates: Enzyme-based and programmable one-pot strategies." *Chemical Reviews* 100(12):4465–4493.
- Koenigs, W. & E. Knorr. 1901. "Ueber einige Derivate des Traubenzuckers und der Galactose." *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 34:957–981.
- Koizumi, S., T. Endo, K. Tabata & A. Ozaki. 1998. "Large-scale production of UDP-galactose and globotriose by coupling metabolically engineered bacteria." *Nature Biotechnology* 16(9):847–850.
- Kolter, T. & K. Sandhoff. 1999. "Sphingolipids - Their metabolic pathways and the pathobiochemistry of neurodegenerative diseases." *Angewandte Chemie-International Edition* 38(11):1532–1568.
- Konska, G., J. Guillot, M. De Latour & Y. Fonck. 1998. "Expression of Tn antigen and N-acetyllactosamine residues in malignant and benign human breast tumors detected by lectins and monoclonal antibody 83 D4." *International Journal of Oncology* 12:361–367.
- Koolman, J. & K.-H. Röhm. 1998. *Taschenatlas der Biochemie*. 2. ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Kornfeld, R. & S. Kornfeld. 1985. "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." *Annual Review of Biochemistry* 54:631–664.
- Krepinsky, J. 1996. Advances in polymer-supported solution synthesis of oligosaccharides. In *Modern Methods in Carbohydrate Synthesis*, ed. S. H. Khan & R. A. O'Neill. Harwood Academic Publishers.

-
- Krepinsky, J. J., S. P. Douglas & D. M. Whitfield. 1994. "Polymer-supported solution synthesis of oligosaccharides." *Methods in Enzymologie* 242:280–293.
- Kyowa-Hakko, Fa. 2001. "Produktinformation."
- Lassaletta, J. M. & R. R. Schmidt. 1996. "Synthesis of the hexasaccharide moiety of globo-H (human breast-cancer) antigen." *Liebigs Annalen* (9):1417–1423.
- Laue, S., L. Greiner, J. Wöltinger & A. Liese. 2001. "Continuous application of chemzymes in a membrane reactor: Asymmetric transfer hydrogenation of acetophenone." *Advanced Synthesis & Catalysis* (343):711–720.
- Lee, L. S., C. Conover, C. Shi, M. Whitlow & D. Filpula. 1999. "Prolonged circulating lives of single-chain Fv proteins conjugated with polyethylene glycol: A comparison of conjugation chemistries and compounds." *Bioconjugate Chemistry* 10(6):973–981.
- Leloir, L. F. 1971. "Two decades of research on the biosynthesis of saccharides." *Science* 172(3990):1299–1303.
- Lemieux, R. U., K. B. Hendriks, R. V. Stick & K. James. 1975. "Halide ion catalyzed glycosylation reactions. Synthesis of alpha-linked disaccharides." *Journal of the American Chemical Society* 97(14):4056–4062.
- Leung, O. T., S. P. Douglas, D. M. Whitfield, H. Y. S. Pang & J. J. Krepinsky. 1994. "Syntheses of model oligosaccharides of biological significance. 13. Syntheses of derivatives of GalpNAc-beta-1,4-Galp-beta-1,O), the common binding theme of adhesins of various bacteria - solution and polymer-supported solution approaches - an improved preparation of 2-deoxy-2-phthalimido-1,3,4,6-tetra-O-acetyl galactosamine and glucosamine." *New Journal of Chemistry* 18(3):349–363.
- Lindhorst, T. K. 1996. "Glycodendrimere." *Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium* 44(11):1073–1079.
- Lindhorst, T. K. 2000a. *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. first ed. Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley-VCH.
- Lindhorst, T. K. 2000b. "Struktur und Funktion von Kohlenhydraten." *Chemie in Unserer Zeit* 34(1):38–52.
- Livingston, P. O. 1992. "Construction of cancer vaccines with carbohydrate and protein (peptide) tumor antigens." *Current Opinion in Immunology* 4:624–629.
- Macherey-Nagel, Fa. 2000. "Produktinformation HPLC Trennsäulen Nucleodex."
- Mamman, M., S. Choi & G. M. Whitesides. 1998. "Polyvalente Wechselwirkungen in biologischen Systemen: Auswirkungen auf das Design und die Verwendung multivalenter Liganden und Inhibitoren." *Angewandte Chemie* 110:2909–2953.
- Masri, K. A., H. E. Appert & M. N. Fukuda. 1988. "Identification of the Full-Length Coding Sequence for Human Galactosyltransferase (beta-N-Acetylglucosaminide - beta-1,4- Galactosyltransferase)." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 157(2):657–663.

- Matsuoka, K. & S. I. Nishimura. 1995. "Glycoconjugates. 5. Polymeric sugar ligands available for determining the binding-specificity of lectins." *Macromolecules* 28(8):2961–2968.
- Matthews, O. A., A. N. Shipway & J. F. Stoddart. 1998. "Dendrimers - branching out from curiosities into new technologies." *Progress in Colloid and Polymer Science* 23:1–56.
- McAuliffe, J. C. & O. Hindsgaul. 1997. "Carbohydrate drugs - an ongoing challenge." *Chemistry & Industry* (3.3.1997):170–174.
- Mehta, S. & D. Whitfield. 1998. "Beneficial participation of the polymer: Improvement in polymer-supported oligosaccharide synthesis." *Tetrahedron Letters* 39(33):5907–5910.
- Melean, L. G., W. C. Haase & P. H. Seeberger. 2000. "A novel 4,5-dibromooctane-1,8-diol linker for solid-phase oligosaccharide synthesis." *Tetrahedron Letters* 41(22):4329–4333.
- Merrifield, R. B. 1963. "Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide." *Journal of the American Chemical Society* 85:2149–2154.
- Michaelis, L. & M. Menten. 1913. "Die Kinetik der Invertinwirkung." *Biochemische Zeitschrift* 49:333–369.
- Miyagawa, S., M. Tanemura, S. Koyota, M. Koma, Y. Ikeda, R. Shirakura & N. Taniguchi. 1999. "Masking and reduction of the galactose- α 1,3-galactose (α -Gal) epitope, the major xenoantigen in swine, by the glycosyltransferase gene transfection." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 264(3):611–614.
- Montreuil, J. 1973. Méthodologies concernant la structure et le métabolisme des glycoconjugués. In *Actes du Colloque International du C.N.R.S.* Vol. 221 Villeneuve d'Ascq: C.N.R.S.
- Montreuil, J. 1980. "Primary structure of glycoprotein glycans-basis for the molecular biology of glycoproteins." *Journal of Advanced Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 37:157–223.
- Moors, R. & F. Vögtle. 1993. "Dendrimere Polyamine." *Chemische Berichte* 126:2133–2135.
- Mukaiyama, T., Y. Murai & S. Shoda. 1981. "An efficient method for glucosylation of hydroxy compounds using glucopyranosyl fluoride." *Chemistry Letters* (3):431–432.
- Mulder, M. 1991. *Basic principles of membrane technology*. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers.
- Mutter, M., H. Hagenmeyer & M. Bayer. 1971. "New methods of polypeptide synthesis." *Angewandte Chemie International Edition English* 10(11):811–812.
- Nagasaka, T., T. Kobayashi, H. Muramatsu, H. Fujimoto, I. Matsuo, K. Ajisaka, K. Kadomatsu, S. Hayashi, I. Yokoyama, A. Hayakawa, T. Muramatsu & H. Takagi. 1997. "Alpha-Galactosyl oligosaccharides conjugated with polyethylene glycol as potential inhibitors of hyperacute rejection upon xenotransplantation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 232(3):731–736.

-
- Nakazawa, K., K. Furukawa, H. Narimatsu & A. Kobata. 1993. "Kinetic study of human beta-1,4-galactosyltransferase expressed in *E. coli*." *Journal of Biochemistry* (113):747–753.
- Nicolaou, K. C. & H. J. Mitchell. 2001. "Adventures in carbohydrate chemistry: New synthetic technologies, chemical synthesis, molecular design, and chemical biology." *Angewandte Chemie-International Edition* 40(9):1576–1624.
- Nishimura, S. I., K. B. Lee, K. Matsuoka & Y. C. Lee. 1994. "Chemoenzymatic preparation of a glycoconjugate polymer having a sialyloligosaccharide: Neu5Ac-alpha(2,3)-Gal-beta(1,4)-GlcNAc." *Biochemical and Biophysical Research Communication* 199(1):249–254.
- Nishimura, S. I., K. Matsuoka & Y. C. Lee. 1994. "Chemoenzymatic oligosaccharide synthesis on a soluble polymeric carrier." *Tetrahedron Letters* 35(31):5657–5660.
- Ogura, H., A. Hasegawa & T. Suami. 1992. *Carbohydrates - Synthetic Methods and Applications in Medicinal Chemistry*. Weinheim, New York, Cambridge, Basel: VCH.
- Osborne, H. M. I. & T. Q. Khan. 1999. "Recent developments in polymer supported syntheses of oligosaccharides and glycopeptides." *Tetrahedron* 55:1807–1850.
- Osman, N., I. F. C. McKenzie, K. Ostenried, Y. A. Ioannou, R. J. Desnick & M. S. Sandrin. 1997. "Combined transgenic expression of alpha-galactosidase and alpha 1,2-fucosyltransferase leads to optimal reduction in the major xenoepitope Gal alpha(1,3)Gal." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(26):14677–14682.
- Palcic, M. M. 1999. "Biocatalytic synthesis of oligosaccharides." *Current Opinion in Biotechnology* 10(6):616–624.
- Palcic, M. M. & O. Hindsgaul. 1996. "Glycosyltransferases in the synthesis of oligosaccharide analogs." *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 8(39):37–49.
- Parker, W., S. S. Lin, P. B. Yu, A. Sood, Y. C. Nakamura, A. Song, M. L. Everett & J. L. Platt. 1999. "Naturally occurring anti-alpha-galactosyl antibodies: relationship to xenoreactive anti-alpha-galactosyl antibodies." *Glycobiology* 9(9):865–873.
- Pasch, H. & I. Zammert. 1994. "Chromatographic investigations of macromolecules in the critical range of liquid-chromatography. VIII. Analysis of polyethylene oxides." *Journal of Liquid Chromatography* 17(14-15):3091–3108.
- Perry, M., H. Yacubowicz, C. Linder, M. Nemas & R. Katrarro. 1991. "Polyphenylene oxide-derived membranes for separation in organic solvents." *Patent US 5151182A*.
- Peter-Katalinic, J. & K. Sandhoff. 2001. "Highlight: Glycobiology." *Biological Chemistry* 382(2):141–142.
- Pillai, V. N. R. & M. Mutter. 1980. "New, easy removable poly(ethylene glycol) supports for the liquid-phase method of peptide synthesis." *Journal of Organic Chemistry* (45):5364–5370.

- Polverari, M. & T. G. M. van der Ven. 1996. "Dilute aqueous poly(ethylene oxide) solutions: Clusters and single molecules in thermodynamic equilibrium." *Journal of Physical Chemistry* (100):13687–13695.
- Puhlfurss, P., A. Voigt, R. Weber & M. Morbe. 2000. "Microporous TiO₂ membranes with a cut off below 500 Da." *Journal of Membrane Science* 174(1):123–133.
- Rademann, J. & R. R. Schmidt. 1997. "Repetitive solid phase glycosylation on an alkyl thiol polymer leading to sugar oligomers containing 1,2-trans- and 1,2-cis-glycosidic linkages." *Journal of Organic Chemistry* 62:3650–3653.
- Ragupathi, G., S. Slovin, S. Adluri, D. Sames, I. J. Kim, H. M. Kim, M. Spassova, W. G. Bornmann, K. O. Lloyd, H. I. Scher, P. O. Livingston & S. J. Danishefsky. 1999. "Ein totalsynthetischer Globo-H-Kohlenhydrat-Impfstoff verursacht eine gezielte humorale Immunantwort bei Prostatakrebs-Patienten: der Beweis des Prinzips." *Angewandte Chemie* 111(4):590–594.
- Ramuz, M. 2000. *persönliche Mitteilung*.
- Rautenbach, R. 1995. "Membranverfahren." *Vorlesungsskript RWTH Aachen*.
- Römer, U. 1998. *Charakterisierung und Anwendung der rekombinanten Saccharose Synthase aus Kartoffel zur Synthese von Saccharose-Analoga*. Diplomarbeit Universität Düsseldorf.
- Römer, U. 2001. *persönliche Mitteilung*.
- Roempp Chemie Lexikon. 1995. 9. ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Royer, G. P. & G. M. Anantharmaiah. 1979. "Peptide synthesis in water and the use of immobilized carboxypeptidase Y for deprotection." *Journal of the American Chemical Society* 101(12):3394–3396.
- Sallas, F. & S. I. Nishimura. 2000. "Chemo-enzymatic synthesis of glycopolymers and sequential glycopeptides bearing lactosamine and sialyl Lewis x unit pendant chains." *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* (13):2091–2103.
- Samuelsson, B. E., L. Rydberg, M. E. Breimer, A. Backer, M. Gustavsson, J. Holgersson, E. Karlsson, A. C. Uytterwaal, T. Cairns & K. Welsh. 1994. "Natural antibodies and human xenotransplantation." *Immunological Reviews* 141:151–168.
- Sandrin, M. S., N. Osman & I. F. C. McKenzie. 1997. "Transgenic approaches for the reduction in expression of Gal-alpha-(1,3)-Gal for xenotransplantation." *Frontiers in Bioscience* (2):e1–e11.
- Sato, T. & K. Furukawa. 1999. "Differences in N-acetyllactosamine synthesis between beta-1,4- galactosyltransferases I and V." *Glycoconjugate Journal* 16(1):73–76.
- Schmidt, D. & J. Thiem. 2000. "Sialidase-catalyzed transsialylation using polymer-supported solution-phase techniques." *Chemical Communication* (19):1919–1920.

-
- Schmidt, M., S. Mirza, R. Schubert, H. Rödticker, S. Kattanek & J. Malisz. 1999. "Nanofiltrationsmembranen für Trennprobleme in organischen Lösungen." *Chemie Ingenieur Technik* 71(3):199–206.
- Schmidt, R. R. 1986. "New methods for the synthesis of glycosides and oligosaccharides - are there alternatives to the Koenigs-Knorr method?" *Angewandte Chemie International Edition English* 25:212–235.
- Schmidt, R. R. & J. Michel. 1980. "Einfache Synthese von alpha- und beta-O-Glykosylimidaten; Herstellung von Glykosiden und Disacchariden." *Angewandte Chemie* 92(9):763–764.
- Schumacher, T. 1999. *Expression, Isolierung und Charakterisierung eines rekombinanten, humanen beta-1,4-Galactosyltransferase-Fusionsproteins aus Escherichia coli*. Diplomarbeit Universität Düsseldorf.
- Schumacher, T. 2000. *persönliche Mitteilung*.
- Sears, P. & C. H. Wong. 2001. "Toward automated synthesis of oligosaccharides and glycoproteins." *Science* 291(5512):2344–2350.
- Seeberger, P. H., M. T. Bilodeau & S. J. Danishefsky. 1997. "Synthesis of biologically important oligosaccharides and other glycoconjugates by the glycal assembly method." *Aldrichimica Acta* 30(3):75–92.
- Seeberger, P. H. & W. C. Haase. 2000. "Solid-phase oligosaccharide synthesis and combinatorial carbohydrate libraries." *Chemical Reviews* 100(12):4349ff.
- Seeberger, P. H., X. Beebe, G. D. Sukenick, S. Pochapsky & S. J. Danishefsky. 1997. "Verfolgung von Festphasen-Oligosaccharidsynthesen mit hochauflösender MAS-NMR-Spektroskopie: Selektivität der Festphasenkupplung von alpha-1,2-Didehydrozuckerdonoren zu beta-Glycosiden." *Angewandte Chemie* 109:507–510.
- Service, R. F. 2001. "After the fall." *Science* 291(5512):2340–2341.
- Sharon, N. & H. Lis. 1993. "Carbohydrates in cell recognition." *Scientific American* 268(3):84–92.
- Sigma-Aldrich, Fa. 2000. *Feinchemikalienkatalog Sigma-Aldrich 2000/2001*.
- Staude, E. 1992. *Membranen und Membranprozesse*. Weinheim: VCH.
- Stolberg, S. G. 1999. "Could this pig save your life?" *The New York Times Magazine* (October 3):46–51.
- Sunder, A., R. Mulhaupt, R. Haag & H. Frey. 2000a. "Chiral hyperbranched dendron analogues." *Macromolecules* 33(2):253–254.
- Sunder, A., R. Mulhaupt, R. Haag & H. Frey. 2000b. "Hyperbranched polyether polyols: A modular approach to complex polymer architectures." *Advanced Materials* 12(3):235–239.

- Taniguchi, S., F. A. Neethling, E. Y. Korchagina, N. Bovin, Y. Ye, T. Kobayashi, M. Niekrasz, S. Li, E. Koren, R. Oriol & D. K. C. Cooper. 1996. "In vivo immunoadsorption of antipig antibodies in baboons using a specific Gal-alpha-1,3-Gal column." *Transplantation* 62(10):1379–1384.
- Varki, A. 1993. "Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct." *Glycobiology* 3(2):97–130.
- Varki, A. 1997. "Selectin ligands: Will the real ones please stand up?" *Journal of Clinical Investigation* 99(2):158–162.
- Varki, A., R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart & J. Marth. 1999. *Essentials of Glycobiology*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Voigt, I. 2001. *persönliche Mitteilung*.
- Voigt, I. & B. Voigtsberger. 1995. Mesoporöse keramische Membranen über die Sol-Gel-Technik, P06/95. Technical report Hermsdorfer Institut für Technische Keramik e. V.
- Wang, J. Q., X. Chen, W. Zhang, S. Zacharek, Y. S. Chen & P. G. Wang. 1999. "Enhanced inhibition of human anti-Gal antibody binding to mammalian cells by synthetic alpha-Gal epitope polymers." *Journal of the American Chemical Society* 121(36):8174–8181.
- Wentworth, P., A. M. Vandersteen & K. D. Janda. 1997. "Poly(ethylene glycol) (PEG) as a reagent support: the preparation and utility of a PEG-triarylphosphine conjugate in liquid-phase organic synthesis (LPOS)." *Chemical Communication* (17):759–760.
- Wentworth, P. & K. D. Janda. 1999. "Liquid-phase chemistry: recent advances in soluble polymer-supported catalysts, reagents and synthesis." *Chemical Communication* (19):1917–1924.
- Withers, S. G. 1999. "1998 Hoffmann La Roche Award Lecture - Understanding and exploiting glycosidases." *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* 77(1):1–11.
- Wittmann, C. & E. Heinzle. 2001. "MALDI-TOF MS for quantification of substrates and products in cultivations of *Corynebacterium glutamicum*." *Biotechnology and Bioengineering* 72(6):642–647.
- Wong, C. H., S. L. Haynie & G. M. Whitesides. 1982. "Enzyme-catalyzed synthesis of N-acetyllactosamine with in situ regeneration of uridine-5'-diphosphate glucose and uridine 5'-diphosphate galactose." *Journal of Organic Chemistry* 47:5416–5418.
- Yamada, K., E. Fujita & S. I. Nishimura. 1998. "High performance polymer supports for enzyme-assisted synthesis of glycoconjugates." *Carbohydrate Research* (305):443–461.
- Yamada, K. & S. I. Nishimura. 1995. "An efficient synthesis of sialoglycoconjugates on a peptidase-sensitive polymer support." *Tetrahedron Letters* 36(52):9493–9496.
- Yamazaki, F., S. Sato, T. Nukada, Y. Ito & T. Ogawa. 1990. "Synthesis of alpha-D-Manp-(1-3)-beta-D-GlcpNAc-(1-4)-alpha-D-Manp-(1-6)-beta-D-Manp-(1-4)-beta-D-GlcpNAc-(1-4)-alpha-L-Fucp-(1-6)-D-GlcNAc, a core glycoheptaose of a bisected complex-type glycan of glycoproteins." *Carbohydrate Research* 201:31–50.

-
- Yan, F. Y., W. W. Wakarchuk, M. Gilbert, J. C. Richards & D. M. Whitfield. 2000. "Polymer-supported and chemoenzymatic synthesis of the *Neisseria meningitidis* pentasaccharide: a methodological comparison." *Carbohydrate Research* 328(1):3–16.
- Yasukawa, T., H. Kimura, Y. Tabata, H. Miyamoto, Y. Honda, Y. Ikada & Y. Ogura. 1999. "Targeted delivery of anti-angiogenic agent TNP-470 using water-soluble polymer in the treatment of choroidal neovascularization." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40(11):2690–2696.
- Ye, X. S. & C. H. Wong. 2000. "Anomeric reactivity-based one-pot oligosaccharide synthesis: A rapid route to oligosaccharide libraries." *Journal of Organic Chemistry* 65(8):2410–2431.
- Zalipsky, S. 1995. "Functionalized poly(ethylene glycol) for preparation of biologically relevant conjugates." *Bioconjugate Chemistry* 6:150–156.
- Zehavi, U. 1987. "Polymers as supports for enzymic oligo- and polysaccharide synthesis." *Reactive Polymers* (6):189–196.
- Zehavi, U. 1988. "Application of photosensitive protecting groups in carbohydrate chemistry." *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 46:179–204.
- Zehavi, U. 1999. "Perspectives of oligosaccharide and glycosphingolipid synthesis on polymer supports." *Reactive & Functional Polymers* 41(1-3):59–68.
- Zehavi, U. & A. Tuchinsky. 1998. "Enzymic glycosphingolipid synthesis on polymer supports. III. Synthesis of GM3, its analog NeuNAc- α -2,3-Gal- β -1,4-Glc- β -1,3-Cer and their lyso-derivatives." *Glycoconjugate Journal* 15:657–662.
- Zehavi, U. & M. Herchman. 1984. "Enzymic synthesis of oligosaccharides on a polymer support, light-sensitive, water-soluble substituted polyvinyl-alcohol." *Carbohydrate Research* 128(1):160–164.
- Zehavi, U., M. Herchman, R. R. Schmidt & T. Bär. 1990. "Enzymic glycosphingolipid synthesis on polymer supports." *Glycoconjugate Journal* 7:229–234.
- Zehavi, U., M. Herchman, S. I. Hakomori & S. Köpper. 1990. "Enzymic Glycosphingolipid Synthesis on Polymer Supports." *Glycoconjugate Journal* 7:219–228.
- Zehavi, U., S. Sadeh & M. Herchman. 1983. "Enzymatic synthesis of oligosaccharides on a polymer support. Light-sensitive, substituted polyacrylamide beads." *Carbohydrate Research* 124:23–24.
- Zervosen, A. & L. Elling. 1996. "A novel three-enzyme reaction cycle for the synthesis of N-acetylglucosamine with in situ regeneration of uridine 5'-diphosphate glucose and uridine 5'-diphosphate galactose." *Journal of the American Chemical Society* 118(8):1836–1840.
- Zhang, Z., I. R. Ollmann, X. S. Ye, R. Wischnat, T. Baasov & C. H. Wong. 1999. "Programmable one-pot oligosaccharide synthesis." *Journal of the American Chemical Society* 121:734–753.

- Zhao, X. Y., W. A. Metz, F. Sieber & K. D. Janda. 1998. "Expanding on the purification methodology of polyethylene glycol (PEG) bound molecules: The synthesis of 3,5-pyrazolidinediones." *Tetrahedron Letters* 39(46):8433–8436.
- Zheng, C., P. H. Seeberger & S. J. Danishefsky. 1998. "Aminoglycosylierung von polymergebundenen Glycanen: eine komplette Festphasensynthese des Oligosaccharids der Blutgruppenderminante Lewis b." *Angewandte Chemie* 110(6):831–834.
- Zigova, J., M. Mahle, H. Paschold, M. Malissard, E. G. Berger & D. Weuster-Botz. 1999. "Fed-batch production of a soluble beta-1,4-galactosyltransferase with *Saccharomyces cerevisiae*." *Enzyme and Microbial Technology* 25(3-5):201–207.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-3990
Juni 2002
ISSN 0944-2952