

UNIVERSITÄT
BAYREUTH

**Darstellung von *N*-Glycanaziden und
deren Konjugaten für glycobiologische
Untersuchungen**

Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde (Dr. rer. nat.) der Fakultät
für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Irene Boos

aus Arkalyk

Bayreuth 2015

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2011 bis Januar 2015 in Bayreuth am Lehrstuhl für Bioorganische Chemie unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Carlo Unverzagt angefertigt.

Dissertation eingereicht am:	19.08.2015
Zulassung durch die Promotionskommission:	26.08.2015
Wissenschaftliches Kolloquium:	22.12.2015

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Rhett Kempe

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Carlo Unverzagt	(Erstgutachter)
Prof. Dr. Rainer Schobert	(Zweitgutachter)
Prof. Dr. Clemens Steegborn	(Vorsitz)
(Prof. Dr. Birgit Weber)	

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einführung	1
1.1 <i>N</i> -Glycane: Biosynthese und Bedeutung	1
1.2 Chemische <i>N</i> -Glycansynthese	7
1.3 Gewinnung von Oligosacchariden aus biologischen Quellen	10
1.4 Strukturelle und funktionelle Untersuchungen von Glycanen	12
2 Themenstellung	15
3 Gewinnung von freien <i>N</i>-Glycanen	16
3.1 Isolierung und chemische Modifikation von biantennären <i>N</i> -Glycanen	16
3.2 Synthese von biantennären Glycosyloxazolinen	21
3.3 Synthese von oligomannosidischen β -Glycosylaziden	25
3.3.1 Darstellung eines pauci-mannosidischen <i>N</i> -Glycans	25
3.3.2 Synthesewege zu einem oligomannosidischen Heptasaccharid	32
4 Biotinylierung von <i>N</i>-Glycanen	45
4.1 Darstellung von biotinylierten Glycanen durch Amidkupplung	45
4.2 Anwendung der Click-Chemie zur Biotinylierung von Glycanen	47
5 Aminofunktionalisierung für Glycanarrays	56
6 Synthese von Fluorophorkonjugaten	62
7 Synthese homogener Interleukin 6 Glycopeptide	68
8 Synthese von Glycokonjugaten mit Lanthanoid-bindenden Tags	76
9 Zusammenfassung	81
10 Summary	84
11 Experimenteller Teil	87
11.1 Allgemeine Arbeitstechniken und Methoden	87
11.2 Versuche zu Kapitel 3.1	89

Inhaltsverzeichnis

11.3	Versuche zu Kapitel 3.2	97
11.4	Versuche zu Kapitel 3.3.1	102
11.5	Versuche zu Kapitel 3.3.2	114
11.6	Versuche zu Kapitel 4.1	133
11.7	Versuche zu Kapitel 4.2	138
11.8	Versuche zu Kapitel 5	146
11.9	Versuche zu Kapitel 6	159
11.10	Versuche zu Kapitel 7	164
11.11	Versuche zu Kapitel 8	171
12	Literatur	175
13	Danksagung	185

Abkürzungsverzeichnis

δ	chemische Verschiebung
Ψ -pro	Pseudoprolin
$[\alpha]_D^T$	spezifischer Drehwert bei 589 nm und der Temperatur T
Ac	Acetyl
AcOH	Essigsäure
ADMP	2-Azido-1,3-dimethylimidazolium-hexafluorphosphat
ber	berechnet
Bn	Benzyl
BSA	bovines Serumalbumin
Bz	Benzoyl
CIAP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
CMP	Cytidinmonophosphat
ConA	Concanavalin A
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i>
d	Durchmesser, Dublett (NMR)
dFBz	2,5-Difluorbenzoyl
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMC	2-Chlor-1,3-dimethylimidazoliumchlorid
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
E. C.	<i>enzyme commission</i>
ECL	<i>Erythrina cristagalli</i> Lectin

Abkürzungsverzeichnis

EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid
eq	Äquivalent(e)
ERMan	Mannosidase des Endoplasmatischen Retikulums
ESI	<i>electrospray ionisation</i>
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FT	Fourier-Transformation
Gal	D-Galactose
gef	gefunden
GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamin
GNL	<i>Galanthus nivalis</i> Lectin
GnT	<i>N</i> -Acetylglucosamintransferase
GolgiMan	Mannosidase des Golgi-Apparates
GSL II	<i>Griffonia (Bandeiraea) simlicifolia</i> Lectin II
GSL	<i>Griffonia (Bandeiraea) simlicifolia</i> Lectin I
HOAt	1- <i>N</i> -Hydroxy-7-azabenzotriazol
HATU	<i>N</i> -[(Dimethylamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-[4,5- <i>b</i>]-pyridin-1-yl-methylen]- <i>N</i> -methylmethanaminium-hexafluorophosphat- <i>N</i> -oxid
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
<i>J</i>	skalare Kopplung
Jmod	<i>J-modulation experiment</i>
LC	<i>liquid chromatography</i>
l	Länge

Abkürzungsverzeichnis

MAL II	<i>Maackia amurensis</i> Leukoagglutinin
Man	D-Mannose
m	Multipllett
Mp	<i>para</i> -Methoxyphenyl
MS	<i>mass spectrometry</i>
Neu5Ac	5- <i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NIS	<i>N</i> -Iodsuccinimid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOE	<i>nuclear overhauser effect</i>
NOESY	<i>nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
NPht	Phthalimido
p. a.	<i>pro analysis</i>
PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i> Leukoagglutinin
PNGase F	Peptid- <i>N</i> -glycosidase F
ppm	<i>parts per million</i>
<i>p</i> TosOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
Pyr	Pyridin
rel. Abs.	relative Absorption
R _f	Retentionsfaktor
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Zimmertemperatur

Abkürzungsverzeichnis

SG	Schutzgruppe
SNA	<i>Sambucus nigra</i> Agglutinin
s	Singulett
TBAF	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumfluorid
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBTA	Tris[(1-benzyl- <i>1H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)-methyl]-amin
TCAI	Trichloracetimidat
TES	Triethylsilan
TFAc	Trifluoracetyl
TFA	Trifluoressigsäure
TfOH	Trifluormethansulfonsäure
TGNAcTA	Tris[(1-[2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl]- <i>1H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)-methyl]-amin
TGTA	Tris[(1-glucopyranosyl- <i>1H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)-methyl]-amin
THF	Tetrahydrofuran
TMSOTf	Trimethylsilyltrifluormethansulfonsäure
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
Tol	Tolyl
t	Triplett
UGGT	α -Glucosyltransferase

1 Einführung

1.1 N-Glycane: Biosynthese und Bedeutung

Die *N*-Glycosylierung ist eine der häufigsten posttranslationalen Modifikationen von eukaryotischen Proteinen.^[1, 2] Es wird angenommen, dass mehr als die Hälfte aller Proteine glycosyliert sind.^[3] *N*-Glycane sind mit dem Stickstoffatom der Seitenkette von Asparagin verknüpft und in 90 % der bekannten Glycoproteine vertreten.^[2] Bei *O*-Glycoproteinen sind die Saccharide über die Seitenkette von Serin oder Threonin gebunden. *N*-glycosidische Modifikationen sind sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten zu finden. Während in Prokaryoten und Archaeen die Vorläuferstrukturen für *N*-Glycane strukturell unterschiedlich sind, ist diese Verbindung bei allen Eukaryoten konserviert (Abbildung 1.1).^[4-6] Durch nachfolgende Prozessierung von **1** kann bei Eukaryoten eine hohe Diversität der *N*-Glycane entstehen.

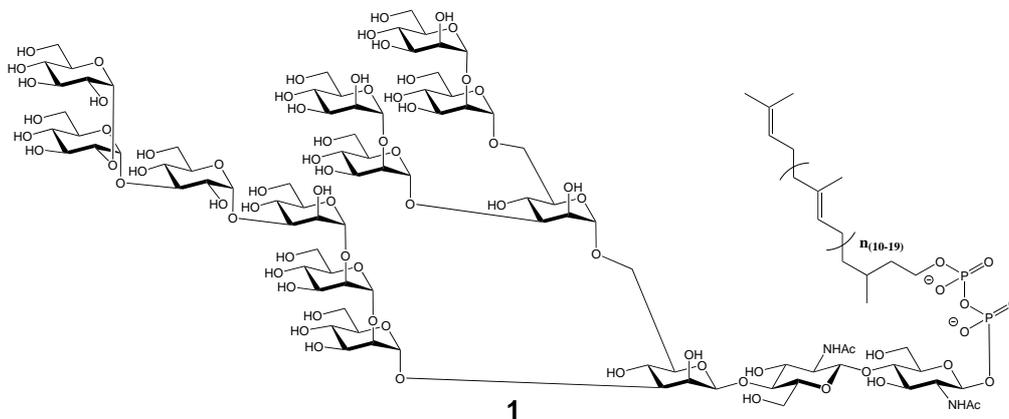


Abbildung 1.1: Dolichol-verknüpfte *N*-Glycan-Vorläuferstruktur **1**.

Die Verknüpfung der *N*-Glycane mit Proteinen erfolgt bei Eukaryoten im rauen Endoplasmatischen Retikulum.^[7, 8] Dabei wird ein komplexes Tetradecamer cotranslational auf ein Protein übertragen, welches anschließend im glatten Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat zu einer Vielzahl von weiteren Strukturen prozessiert werden kann. Die Vorläuferstruktur enthält das Core-Pentasaccharid und drei mannosereiche Antennen, wobei eine Verzweigung zusätzlich drei Glucosen trägt (Abbildung 1.1). Das Tetradecamer wird durch Glycosyltransferasen an einem Lipid-Anker, dem Dolicholpyrophosphat, aufgebaut.

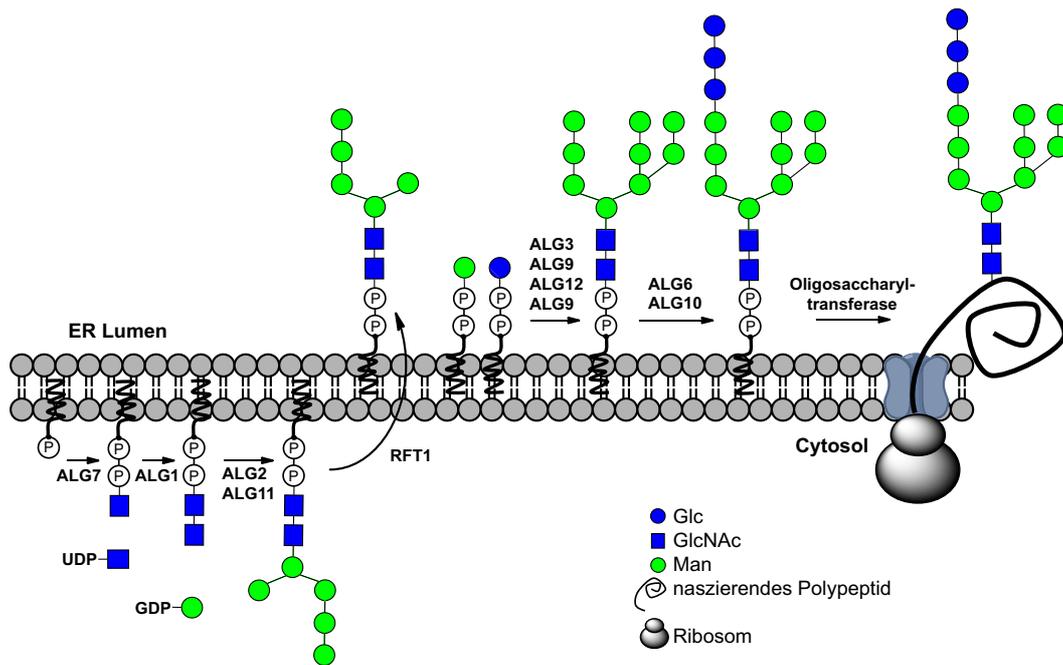


Abbildung 1.2: Biosynthese des Tetradecamers 1.

Die Kettenlänge des Dolicholteils ist abhängig von der Spezies. Bei Wirbeltieren liegt hauptsächlich Dol₁₉ vor.^[9] Dieses Pyrophosphopolyisoprenoid wird aus Produkten des Mevalonatweges, dem Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat, aufgebaut. Die Verknüpfung der ersten sieben Saccharide an den Lipidanker findet im Cytoplasma statt (Abbildung 1.2). Die *N*-Acetylglucosamine werden durch die GlcNAc-1-Phosphotransferase ALG7 und anschließend durch die GlcNAc-Transferase ALG1 an Dolicholpyrophosphat angefügt.^[10] Hierbei werden aktivierte Monosaccharidendonoren (UDP-GlcNAc) aus dem Cytosol verwendet. Für die Anknüpfung der fünf Mannoseeinheiten benötigen die Manno-syltransferasen ALG2 und ALG11 GDP-aktivierte Mannose. Anschließend gelangt durch die Flipase RFT1 das Heptasaccharid in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums, wo die restlichen Saccharidbausteine angefügt werden. Im rauen ER liegen die aktivierten Monosaccharide nicht löslich vor, sondern sind ebenfalls an einem Dolicholphosphatanker gebunden.^[6, 10] Der Lipidanker sorgt für eine erhöhte lokale Konzentration der aktivierten Vorläuferstruktur **1**, welche als Substrat für die Oligosaccharyltransferase dient. Weiterhin wird durch das Lipid ein kontinuierlicher Fluss durch den Syntheseweg gewährleistet.^[4, 11] Die Oligosaccharyltransferase überträgt den *N*-Glycanvorläufer *en bloc* auf eine naszierende Polypeptidkette. Dabei wird die Konsensussequenz Asn-Xaa-Ser/Thr (Xaa: beliebige Aminosäure bis auf Prolin) erkannt.^[12] Vergleichende Untersuchungen zeigen, dass die Sequenz

mit Threonin bevorzugt glycosyliert wird.^[13, 14] Es wurde jedoch gefunden, dass auch andere Sequenzen glycosyliert werden können. So wurden weitere glycosylierte Aminosäureabfolgen in isolierten IgG Fc-Fragmenten von CHO Zellen entdeckt.^[15, 16] In der Maus werden auch Asn-Gly-Xaa bzw. Asn-Xaa-Val als Sequenzen erkannt.^[17] Offenbar lässt die Oligosaccharyltransferase eine gewisse Variation der Aminosäureabfolge im Sequon zu. Es ist anzumerken, dass nicht jede im Peptid auftretende Konsensussequenz glycosyliert wird. Das Sequon muss bei der Erkennung durch die Oligosaccharyltransferase eine spezifische Konformation einnehmen, welche bei ca. 90 % aller Glycosylierungsstellen vorliegt.^[18, 19]

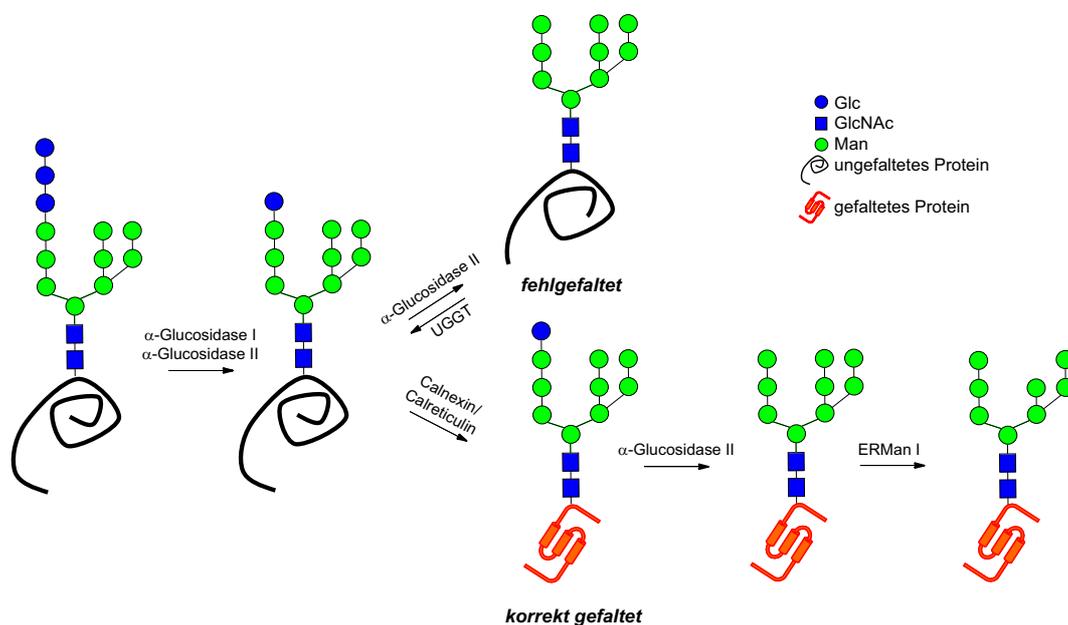


Abbildung 1.3: Prozessierung des Tetradecamers im Endoplasmatischen Retikulum einschließlich der Faltungskontrolle durch Calnexin/Calreticulin.

Nach dem Transfer des Glycans wird das Tetradecamer durch Glucosidasen und Mannosidasen im Endoplasmatischen Retikulum teilweise abgebaut (Abbildung 1.3). Für viele Proteine ist die Glycosylierung notwendig, um die native Konformation einzunehmen.^[20] Nur wenn das Glycoprotein die richtige Faltung aufweist, wird es in den Golgi-Apparat transportiert.^[21] Für die Qualitätskontrolle der Proteinfaltung werden zunächst zwei terminale Glucosemoleküle abgespalten. Dies wird durch die membrangebundene α -Glucosidase I und die freie α -Glucosidase II durchgeführt. Die freigesetzten Glycoproteine können von den Lectinen Calnexin und Calreticulin erkannt werden.^[22] Calreticulin bindet die verbleibende terminale α 1,3-Glucose des Dodecasaccharids. Hierbei wird eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen

Calreticulin und der 2-Hydroxylgruppe der verbleibenden Glucose ausgebildet. Die Chaperone unterstützen mit Hilfe der Oxidoreduktase ERp57 die korrekte Faltung des Glycoproteins. ERp57 ist in dem Faltungskomplex für die Reduktion falsch-verbundener Disulfide zuständig. Bei korrekter Faltung kann die letzte Glucoseeinheit durch α -Glucosidase II hydrolysiert werden. Dieser Schritt findet jedoch auch an falsch-gefalteten Glycoproteinen statt. Ohne die terminale Glucose kann das Chaperonsystem (Calnexin/Calreticulin) nicht an das Glycoprotein binden. In diesem Fall kann die α -Glucosyltransferase UGGT den 1,3-Arm des Glycans mit UDP-Glucose reglycosylieren.^[23] Dadurch ist die Erkennung des fehlgefalteten Glycoproteins durch die Chaperone möglich. Verbleiben jedoch fehlgefaltete Proteine im ER, werden sie durch Lectine, wie Htm1 in Hefen oder durch EDEM in Säugetieren, erkannt.^[24] Dadurch wird der ER-assoziierte Abbau dieser Glycoproteine im Cytoplasma induziert.^[25]

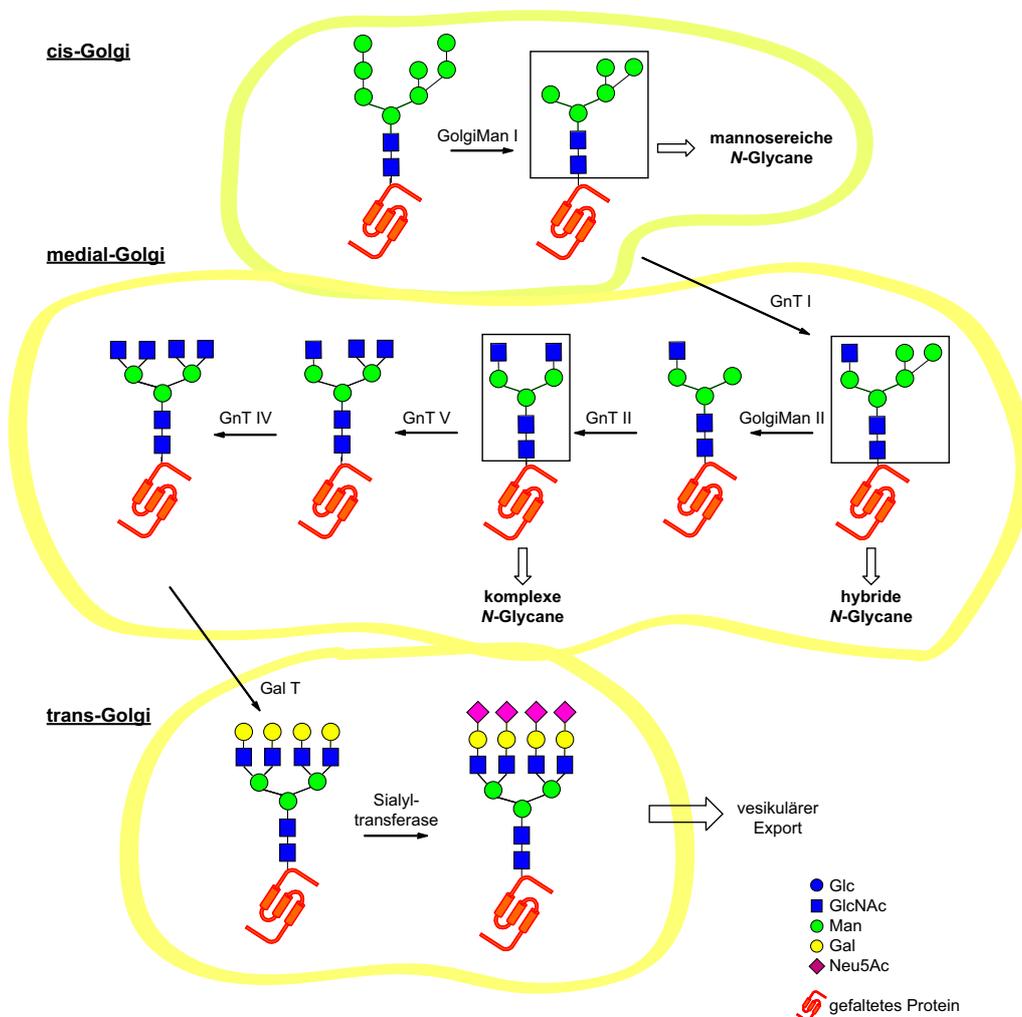


Abbildung 1.4: Prozessierung der N-Glycane in den drei Kompartimenten des Golgi-Apparates.

Richtig gefaltete Glycoproteine werden im ER meist durch die α 1,2-Mannosidase I (ERMan I) prozessiert (Abbildung 1.3), bevor sie in den Golgi-Apparat transportiert werden. Hier durchläuft das *N*-Glycan weitere Prozessierungsschritte, wodurch eine Vielzahl an *N*-Glycanstrukturen entstehen können (Abbildung 1.4). Die Ausbildung von spezifischen Strukturen wird durch die Expression verschiedener Glycosyltransferasen bestimmt. Deren Expression ist abhängig vom Entwicklungsstadium der Zelle sowie ihrem physiologischen bzw. pathologischen Zustand.^[26] Die Glycosyltransferasen treten in den drei Golgi-Kompartimenten (*cis*-, *medial*- und *trans*-Golgi) unterschiedlich häufig auf. $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ -Proteine, in manchen Fällen auch $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Proteine, aus dem Endoplasmatischen Retikulum gelangen zunächst in das *cis*-Golgi Kompartiment. Hier sorgen α 1,2-Mannosidasen (GolgiMan Ia,b,c) für den Abbau des *N*-Glycans bis zu $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, welches als wichtiges Intermediat für die Synthese von komplexen und hybriden *N*-Glycanen gilt.^[27] Erfolgt keine oder nur eine partielle Prozessierung im *cis*-Golgi, so entstehen Glycoproteine mit oligomannosidischen *N*-Glycanen ($\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$). Gelangen $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -Proteine in den *medialen* Golgi-Apparat, können sie durch die *N*-Acetylglucosamintransferase GnT I am 1,3-Arm des Glycans modifiziert werden. Das resultierende *N*-Glycan kann durch die α -Mannosidase II (GolgiMan II) prozessiert werden. Das dabei entstehende $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ wird durch GnT II am 1,6-Arm verlängert und bildet ein biantennäres Heptasaccharid des komplexen Typs. Findet keine Prozessierung durch Mannosidase II statt, so entstehen Oligosaccharide des hybriden Typs. In dem *medialen* Golgi Kompartiment können durch weitere *N*-Acetylglucosamintransferasen, wie zum Beispiel GnT IV und GnT V, tri- und tetraantennäre Glycane gebildet werden. Weiterhin kann in diesem Subkompartiment auch ein *bisecting*-GlcNAc durch GnT III eingebracht werden. Die weitere Verlängerung der hybriden und komplexen *N*-Glycane findet im *trans*-Golgi statt. Dort sind Fucosyl-, Galactosyl- und Sialyltransferasen aktiv. Durch die Prozessierung im Golgi-Apparat wird eine hohe Diversität der *N*-Glycane erzielt.^[28] Diese Vielfalt ist in Abbildung 1.5 am Beispiel der komplexen *N*-Glycane dargestellt, wobei die terminalen Modifikationen (Galactose/Sialinsäure) nicht abgebildet sind.

Den drei Hauptklassen der *N*-Glycane ist das Core-Pentasaccharid gemeinsam, welches aus der gemeinsamen Vorläuferstruktur der *N*-Glycane stammt.^[27, 29] Durch die unterschiedliche relative Aktivität der Glycosyltransferasen werden von Glycoproteinen verschiedene Glycoformen gebildet. Eine Glycoform ist durch die Kombination eines Proteins mit einem oder

mehreren spezifischen Glycanen definiert. Dabei unterscheidet man zwischen der Mikro- und der Makroheterogenität. Liegen an der gleichen Glycosylierungsstelle unterschiedliche Glycane vor, so spricht man von Mikroheterogenität. Bei Makroheterogenität handelt es sich um die Glycosylierung unterschiedlicher Sequons in einem Protein. Durch diese Heterogenität wird die Gewinnung einheitlicher *N*-Glycoproteine und somit die Erforschung der biologischen Aktivität unterschiedlicher Glycoformen erschwert.

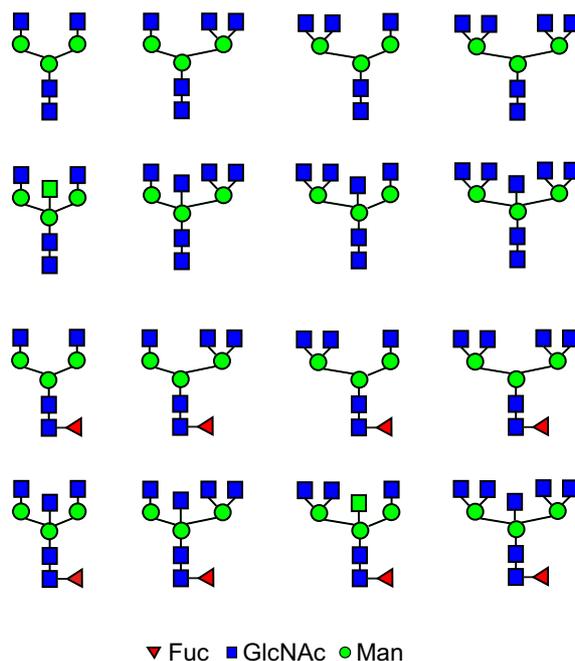


Abbildung 1.5: Bibliothek komplexer *N*-Glycane.

Trotz der oft schwierigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die *N*-Glycosylierung wichtige biologische Funktionen in Organismen ausübt.^[30–32] Unter anderem schützt die Glycosylierung die Proteine vor Denaturierung und Proteolyse und unterstützt die Faltung.^[20, 33] Außerdem wird die Stabilität und Aktivität von Immunoglobulinen reguliert.^[34] Oligosaccharide können durch Lectine, Antikörper und Rezeptoren erkannt werden. Dadurch werden wichtige zelluläre Ereignisse, wie die Proliferation, die Morphogenese und der Eintritt in den Zellzyklus induziert.^[27, 35] *N*-Glycane liegen häufig auf der Zelloberfläche vor und sind hier für die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten verantwortlich.^[36, 37] Die auf der Zelloberfläche präsentierten *N*-Glycane können daher auch von Pathogenen erkannt werden.^[32, 38]

Da die *N*-Glycane viele wichtige Funktionen in Zellen einnehmen, ist das Auftreten von anormalen Oligosaccharidstrukturen oft mit Krankheiten assoziiert. So kann durch enzymatische Modifikation am Core-Pentasaccharid eine Feinregulation auftreten.^[7, 39] Diese

kann beispielsweise durch das Einführen eines *bisecting*-Restes und/oder durch eine Core-Fucosylierung erfolgen. Diese Veränderungen können auch im Zusammenhang mit Krebs gefunden werden.^[27, 39] Weitere Beispiele sind Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis, Herz- sowie Leberkrankheiten.^[27, 40]

Über die Biosynthese von *N*-Glycanen ist viel bekannt. Jedoch liegen bislang nur wenige Ergebnisse über ihre biologischen Eigenschaften vor. Weshalb wird eine so hohe Diversität erzeugt? Um diese Frage eindeutig beantworten zu können, ist es notwendig, diese Oligosaccharide in Reinform zu erhalten. Die Gewinnung und Reinigung von Glycanen aus Zellen wird durch die Mikroheterogenität erschwert (Abbildung 1.5).^[1, 3] Nur wenige *N*-Glycane können bisher in ausreichenden Mengen isoliert werden. Eine Alternative bietet die chemische Synthese.

1.2 Chemische *N*-Glycansynthese

Es wurden unterschiedliche Routen zur *N*-Glycansynthese in Lösung entwickelt.^[41–43] Bei den Synthesen liegt die Herausforderung darin, die richtige Synthese- und Schutzgruppenstrategie zu finden. Es werden sowohl temporäre als auch permanente Schutzgruppen benötigt, dadurch soll die Regio- und Stereoselektivität während der Synthese gewährleistet werden. Meistens wird versucht, *N*-Glycane in einfachere Bausteine aufzuteilen, wobei häufig eine Unterteilung in das Core-Trisaccharid und die verschiedenen Antennen durchgeführt wird.^[44–46]

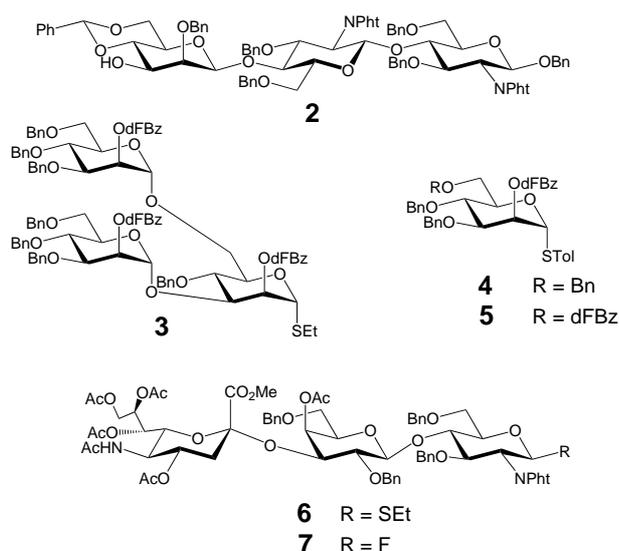


Abbildung 1.6: Bausteine für die Synthese von oligomannosidischen sowie di- und triantennären komplexen *N*-Glycanen nach Danishefsky.^[47, 48]

Zahlreiche Ansätze für die Synthese komplexer und mannosidischer *N*-Glycane zeigten *Danishefsky et al.*^[47–49] Es wurde zunächst ein Core-Trisaccharid **2** dargestellt, welches als Grundbaustein für die Synthese von *N*-Glycanen diente (Abbildung 1.6).^[50, 51] Für die Synthese von Core-fucosylierten Glycanen wurde ein anderer Grundbaustein aufgebaut.^[41] Durch die Glycosylierung von **2** mit den Donoren **4** bzw. **5** konnten bi- und triantennäre *N*-Glycane aufgebaut werden. Nach Entfernen der dFBz-Schutzgruppe wurden 2,3-sialylierte Glycane durch Verwendung der Trisaccharidonoren **6** bzw. **7** erhalten. Aus dem Monosacchariddonor **4** in Kombination mit dem mannosidischen Thioglycosid **3** wurde das Heptasaccharid $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ gewonnen.^[48]

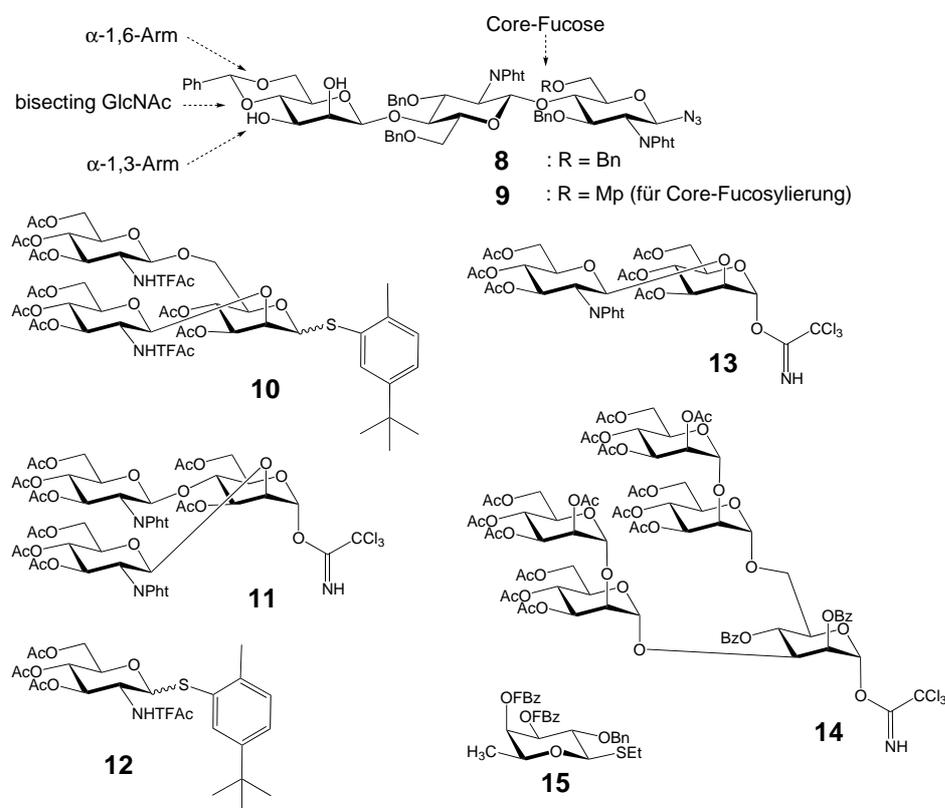


Abbildung 1.7: Bausteine für *N*-Glycansynthesen nach *Unverzagt*.^[52, 53]

Eine alternative *N*-Glycansynthese stellt das modulare Bausteinsystem nach *Unverzagt et al.* dar.^[54] Hierbei dienen die hochfunktionalisierten Core-Trisaccharide **8** und **9** als Ausgangspunkt für verschiedene *N*-Glycane (Abbildung 1.7).^[55–57] Zur Verlängerung der Core-Trisaccharide werden unterschiedliche Donoren verwendet. Eine Auswahl ist in Abbildung 1.7 dargestellt. Durch den Einsatz von Trichloracetimidaten und Thioglycosiden können komplexe und hybride *N*-Glycane mit bis zu fünf Antennen dargestellt werden.^[57, 58] Weiterhin können die modular aufgebauten *N*-Glycane abschließend Core-substituiert wer-

den. *Eller et al.* zeigten, dass über den Donor **12** ein *bisecting*-GlcNAc-Rest nachträglich in multiantennäre *N*-Glycane eingeführt werden kann.^[59] Durch die Verwendung des Bausteins **9** konnte nach der vollständigen Synthese auch eine Core-Fucose über **15** eingebracht werden (Abbildung 1.7).^[52] Die komplett stereoselektive α 1,6-Verknüpfung der Core-Fucose stellt eine Herausforderung dar.^[52, 60, 61] Durch die Optimierung des Schutzgruppenmusters des Donors sowie der Reaktionsbedingungen konnten *Niemietz* und *Ott* die α -Selektivität auf $\geq 99\%$ steigern.^[61, 62] Eine Verlängerung der Antennen kann nach der Entschützung durch Galactosyl- und Sialyltransferasen erfolgen.^[63–65] Diese chemoenzymatische Synthesestrategie ermöglicht die Darstellung von *N*-Glycanen mit Galactosen und Sialinsäuren, um die Auswirkung der biologisch relevanten terminalen Saccharide zu studieren.

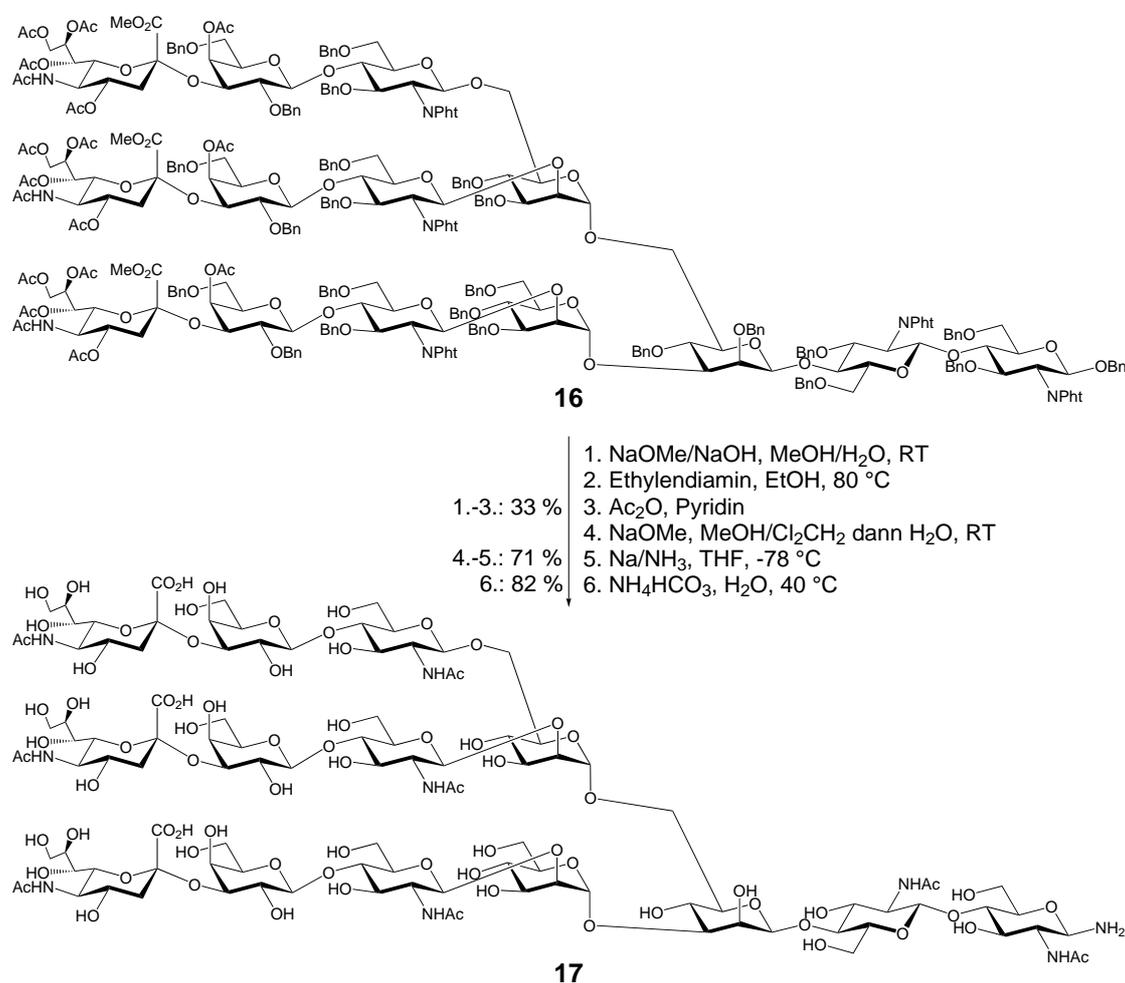


Abbildung 1.8: Entschützungsstrategie nach Danishefsky.^[47]

Mit der Wahl unterschiedlicher Schutzgruppen müssen die Entschützungsverfahren angepasst werden. *Danishefsky et al.* benötigten fünf Reaktionsschritte ausgehend von dem trianten-

nären Glycan **16**, um das vollständig entschützte Halbacetal zu erhalten (Abbildung 1.8).^[47] Im Anschluss konnte durch eine *Kochetkov*-Aminierung das Amin **17** gewonnen werden.^[66]

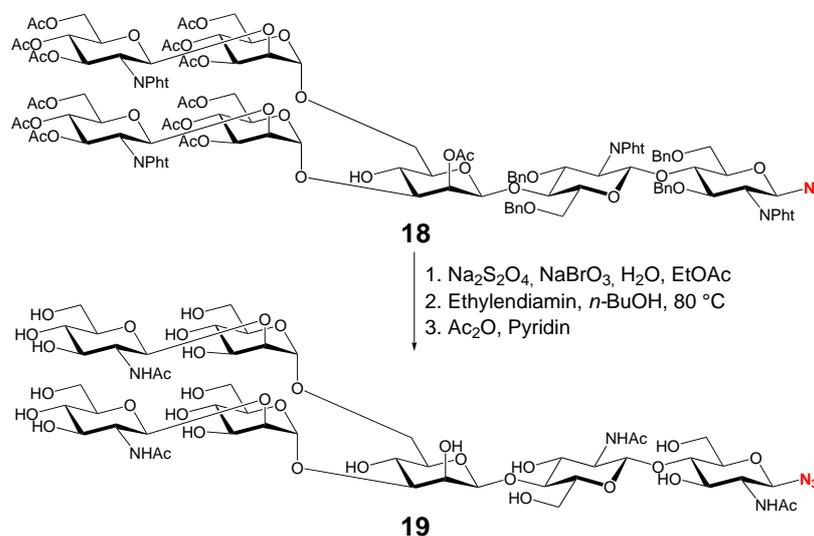


Abbildung 1.9: Entschützungsstrategie nach Niemietz *et al.*^[67]

Schuberth et al. entschützten die basenlabilen Schutzgruppen und reacetylierten die Aminofunktionen in drei Schritten.^[68] Dabei blieben die anomere Azidfunktion und die Benzylschutzgruppen erhalten. Erst nach Reduktion des Azids und nachfolgender Kupplung eines Spacers an das reduzierende Ende wurden die Benzylschutzgruppen hydrogenolytisch entfernt. Mit dieser Entschützungsstrategie konnte auch die Halbacetalform der *N*-Glycane erhalten werden.^[59] *Niemietz et al.* entwickelten eine Methode, wodurch freie *N*-Glycanazide (**19**) zugänglich wurden (Abbildung 1.9).^[61, 67] Hierbei wurden zunächst die Benzylschutzgruppen oxidativ mit Natriumdithionit und Natriumbromat in einem Zweiphasensystem entfernt. Im Anschluss folgte die Entschützung der basenlabilen Schutzgruppen und die Reacetylierung der Aminofunktionen. Glycosylazide wie **19** können über „Click“-Reaktionen und Amidierungen für unterschiedliche glycobiologische Untersuchungen funktionalisiert werden kann.

1.3 Gewinnung von Oligosacchariden aus biologischen Quellen

Die Isolierung von komplexen *N*-Glycanen aus biologischen Quellen ist wegen der Mikroheterogenität sehr schwierig. Die Gewinnung ist zeitaufwendig und die erhaltenen Men-

gen sind gering. Bislang werden daher nur wenige Isolierungsverfahren genutzt. Bei diesen werden zuerst Glycoproteine isoliert, die eine begrenzte Anzahl an Glycoformen aufweisen.^[69, 70] Anschließend müssen die *N*-Glycane abgespalten und gereinigt werden. Die Abspaltung kann chemisch oder enzymatisch erfolgen. Häufige Anwendung finden Endo- β -*N*-Acetylglucosaminidasen sowie die Peptid-*N*-glycosidase F.^[71, 72] Es ist zu beachten, dass Endo-Glucosaminidasen die β -glycosidische Bindung zwischen den *N*-Acetylglucosaminen der Chitobiose spalten. PNGase F hingegen spaltet die Amidbindung zum Asparagin. Verostek *et al.* entwickelten eine schnelle Methode zur Isolierung von komplexen, hybriden und mannosereichen *N*-Glycanen.^[70] Dabei nutzten sie unterschiedliche organische Lösungsmittel zur Fällung und Extraktion der Oligosaccharide. Komplexe *N*-Glycane konnten so aus dem Glycoprotein Thyroglobin erhalten werden.

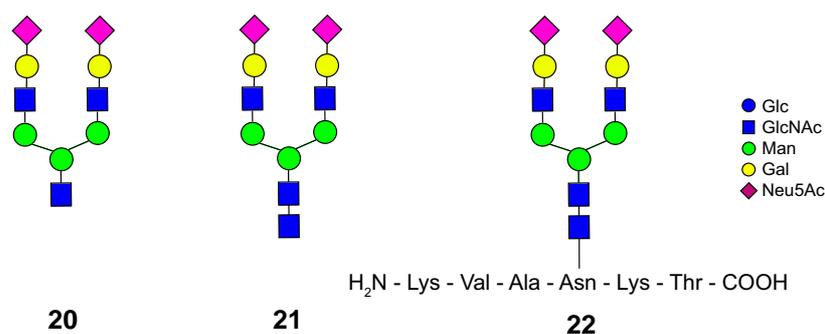


Abbildung 1.10: Zusammensetzung der freien Sialoglycane **20** und **21** und des Sialoglycopeptids **22**.^[73]

Es ist bekannt, dass sowohl Eigelb als auch Eiweiß in Hühnereiern viele *N*-glycosidisch verknüpfte Oligosaccharide enthält.^[74] Für die Gewinnung eines Glycopeptids aus Eigelb existiert eine Vorschrift von Seko *et al.*^[73] Damit können die freien Sialoglycane **20** und **21** sowie das Sialoglycopeptid **22** gewonnen werden (Abbildung 1.10). Es besteht aus einem biantennären Undecasaccharid und einem Hexapeptid (Abbildung 1.10). Das mehrstufige Reinigungsverfahren beginnt mit einer Phenolfällung, danach folgen mehrere chromatographische Trennverfahren wie Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration. Die Reinigung des Sialoglycopeptids **22** wurde durch mehrere Arbeitsgruppen weiter optimiert.^[75] Das Saccharid **21** kann mit PNGase F aus dem Peptid **22** freigesetzt werden. Enzymatisch lassen sich die terminalen Neuraminsäuren mit Neuraminidase abspalten.^[76]

Reduzierende *N*-Glycane können für die *N*-Glycopeptidsynthese modifiziert werden. Hierfür ist eine Aminogruppe am reduzierenden Ende notwendig, wobei diese Funktion in β -Konfiguration vorliegen muss. Damit wird die Ausbildung einer β -Amidbindung zwischen Peptid und *N*-Glycan ermöglicht. Eine Möglichkeit das Glycosylamin zu gewinnen, stellt die Reduktion einer Azidfunktion dar.^[77] *Tanaka et al.* zeigten, dass die selektive Azidierung von ungeschützten Oligosacchariden an der anomeren Position möglich ist.^[78] Mit Hilfe von 2-Chlor-1,3-dimethylimidazoliumchlorid (DMC) kann die Aktivierung des anomeren Kohlenstoffs erreicht werden, wodurch die Azidgruppe eingeführt werden kann.^[76, 78, 79] Wird die Azidfunktion des Saccharids zu einem Amin reduziert, können mit aktivierten Aspartylpeptiden Glycopeptide gewonnen werden (Abbildung 1.11).^[76, 80, 81]

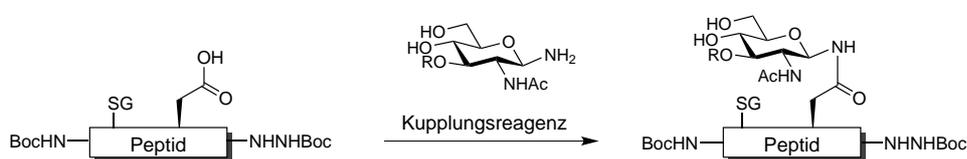


Abbildung 1.11: Kupplung eines Glycosylamins an ein geschütztes Peptid mit freiem Aspartat.

1.4 Strukturelle und funktionelle Untersuchungen von Glycanen

Zur Untersuchung von Glycoproteinen werden Techniken wie metabolische Markierung oder Antikörper/Lectin-Wechselwirkungen verwendet.^[82, 83] Nachdem ein Glycoprotein identifiziert wurde, wird oft die Zusammensetzung der Glycane untersucht. Hierbei werden chromatographische und massenspektrometrische Methoden verwendet. Mit Hilfe dieser Methoden kann z. B. durch Verwendung von Glucosidasen auf die Zusammensetzung der Glycane, d. h. auf die vorhandenen Monosaccharide, geschlossen werden.^[84]

Können größere Mengen an Kohlenhydraten isoliert werden, so kann mit Hilfe der NMR-Spektroskopie deren Struktur und Konformation aufgeklärt werden.^[85, 86] Diese Methode hat den Vorteil, dass die Verbindungen nicht zerstört werden und für weitere Analysen zur Verfügung stehen. Die Strukturaufklärung durch NMR wird erleichtert, wenn die Zusammensetzung des Glycans bereits bekannt ist. Stehen chemisch synthetisierte Glycane zur Verfügung, können diese mit den isolierten Glycanen verglichen werden. In der NMR-Spektroskopie werden hauptsächlich drei Parameter genutzt: die chemische Verschiebung, NOEs und

Kopplungskonstanten.^[87] Die chemische Verschiebung gibt Auskunft über die chemische Umgebung der Kerne, Substitutionen und über die dreidimensionale Struktur der Moleküle.^[88, 89] NOE-Experimente ermöglichen es, die Abstände zwischen Kernen zu bestimmen,^[90] wodurch Modelle über die Konformation von Kohlenhydraten durch Moleküldynamik-Simulation erstellt werden können. Die Drehbarkeit der glycosidischen Bindungen führt zu einer erhöhten Flexibilität der Glycane und beeinflusst die Konformation. Die Beweglichkeit macht die Bestimmung der bevorzugten Konformation von Oligosacchariden jedoch oft schwierig.^[87, 91] Für die strukturelle Aufklärung sind die Kopplungskonstanten über drei Bindungen obligatorisch. Es ist dabei zu beachten, dass die Konstanten stark vom Torsionswinkel der glycosidischen Bindung abhängig sind.^[91] Aus der Karplus-Beziehung kann man auf die relative Konfiguration der einzelnen Saccharide schließen. C-H Kopplungskonstanten geben ebenfalls Auskunft über die anomere Konfiguration der einzelnen Saccharide im Glycan.^[92–94]

Die NMR-Spektroskopie kann auch zur Untersuchung von Glycan-Protein Interaktionen herangezogen werden.^[95] Andere Methoden zur Aufklärung des Bindungsverhaltens von Glycanen sind isotherme Kalorimetrie, Oberflächenplasmonresonanz und Lectinbindungsassays.^[96–98] Eine Hochdurchsatz-Analyse ermöglichen Glycanarrays.^[99–101] Diese Microarrays haben den Vorteil, dass nur geringe Mengen an Substanz benötigt werden. Weiterhin können viele Verbindungen gleichzeitig auf ihr Interaktionsverhalten mit Lectinen, Antikörpern, bakteriellen Toxinen und sogar Viren untersucht werden.^[101] Mit Hilfe der Glycanmicroarrays kann die Zelloberfläche und ihre Glycanverteilung nachgeahmt und das Bindungsverhalten studiert werden. Wichtig bei dieser Methode ist die effiziente Immobilisierung der Kohlenhydrate auf einer entsprechenden Oberfläche. Es wurden zahlreiche Methoden zur Verknüpfung von einfachen und komplexen Oligosacchariden mit einem geeigneten Trägermaterial publiziert.^[102–106] Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen kovalenter und nicht-kovalenter Immobilisierung. Für nicht-kovalente Immobilisierung werden häufig Nitrocellulose-Träger verwendet, hierbei findet die Bindung über hydrophobe Wechselwirkungen statt.^[107] Für diese Wechselwirkungen müssen die Kohlenhydrate teilweise mit hydrophoben Linkern versehen werden.^[108]

Aktiviert Glassträger sind für die kovalente Immobilisierung von freien und derivatisierten Glycanen etabliert.^[109] Als effiziente Konjugationsreaktionen werden die Reaktionen zwischen Thiolgruppen und Maleimid oder zwischen Aminofunktionen und einem *N*-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Ester) genutzt.^[107] Die derzeit größten Bibliothek-Arrays mit

etwa 600 Glycanen wurden vom *Center for Functional Glycomics* (CFG) aufgebaut.^[101] Das CFG verwendet NHS-aktivierte Glasoberflächen und Glycane mit *N*-Alkoxyglycosidspacer (Abbildung 1.12). Unabhängig von der eingesetzten Methode ist es wichtig, dass durch die bedruckte Oberfläche oder das Immobilisierungsverfahren keine falsch-positiven Ergebnisse erhalten werden. Weiterhin sollten die Saccharide frei beweglich bleiben und sollten nicht zu dicht bzw. zu weit entfernt voneinander liegen. Letzteres ist wichtig, da viele Glycan bindende Proteine (GBP) multivalente Interaktionen mit Glycanen ausbilden können.^[110] Die Bindung zwischen Glycan und Protein ist häufig sehr schwach, sodass die Dissoziationskonstante im millimolaren Bereich liegt. Durch die multivalente Bindung von Glycanen kann die Bindungskonstante und die Spezifität der Interaktion deutlich erhöht werden.^[110] Um die Bindung analysieren zu können, müssen die Glycan-Protein-Interaktionen sichtbar gemacht werden. Eine Möglichkeit besteht darin Fluorophor-markierte Antikörper bzw. Lectine (Abbildung 1.12) zu verwenden. Eine weitere Methode verwendet Biotin-derivatisierte GBPs, welche anschließend über gelabeltes Streptavidin sichtbar gemacht werden.^[43]

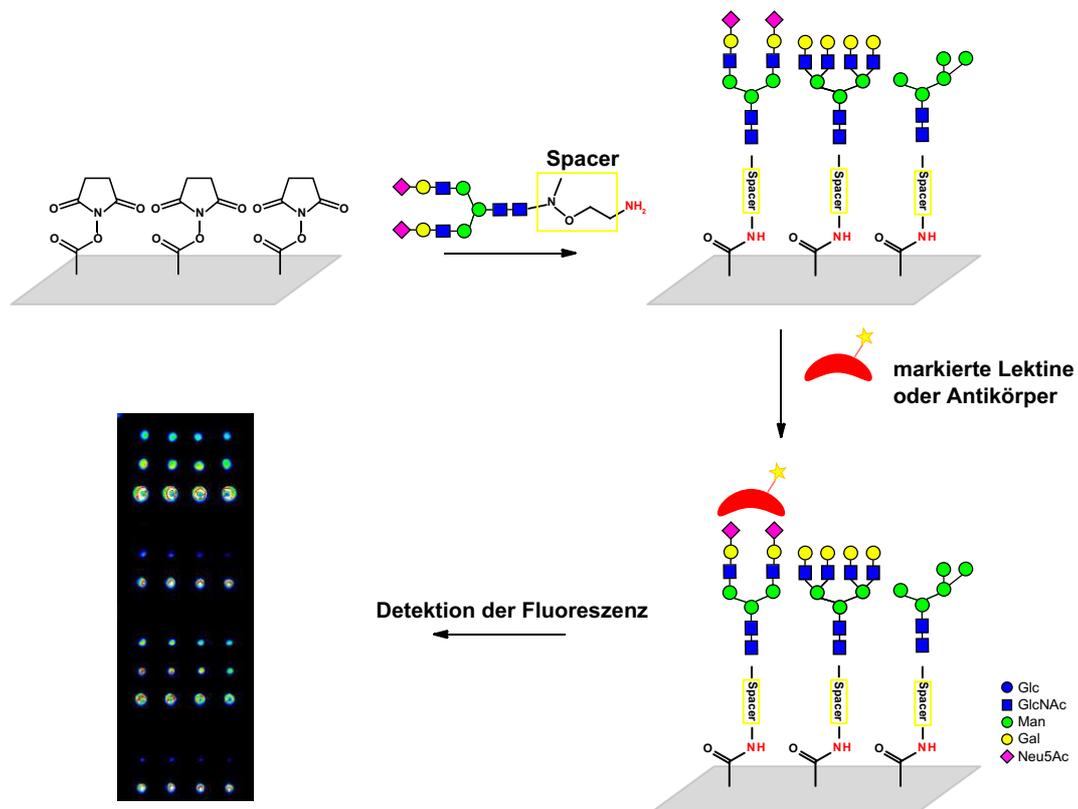


Abbildung 1.12: Immobilisierung und Detektion von *N*-Glycanderivaten auf einer NHS-aktivierten Glasoberfläche.

2 Themenstellung

Für die Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von *N*-Glycanen müssen diese in ausreichenden Mengen zugänglich sein und oft eine passende Derivatisierung aufweisen. *N*-Glycane können durch chemo-enzymatische Synthese oder aus biologischen Quellen gewonnen werden. Eine anomere Azidfunktion an den Glycanen ermöglicht hierbei den Einsatz der Oligosaccharide z. B. in der Click-Chemie und der konvergenten Glycopeptidsynthese.

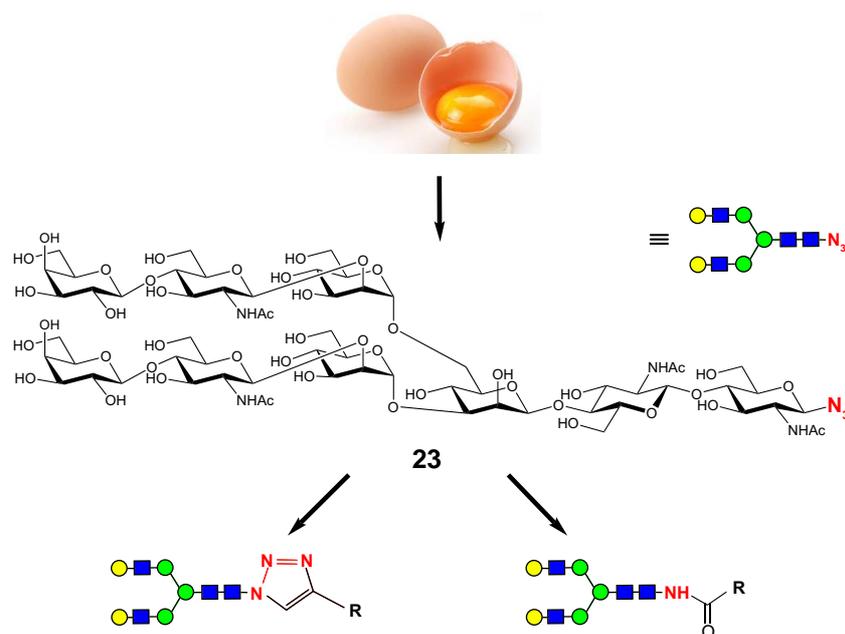


Abbildung 2.1: Derivatisierung von *N*-Glycanaziden. Das biantennäre Azid **23** soll als Modellverbindung für Derivatisierungsversuche dienen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten *N*-Glycanazide synthetisiert und für Bindungs-, Aktivitäts- und Konformationsstudien derivatisiert werden. Die Azide sollten für die konvergente Synthese von Glycopeptiden eingesetzt werden und durch Click-Reaktionen ein Zugang zu aminofunktionalisierten *N*-Glycanen für Glycanarray-Analysen etabliert werden.

3 Gewinnung von freien *N*-Glycanen

3.1 Isolierung und chemische Modifikation von biantennären *N*-Glycanen

N-Glycanen

Aus dem aus Eigelb isolierten Sialoglycopeptid **22** können biantennäre *N*-Glycanazide zugänglich gemacht werden. Diese können zur Lansbury-Aspartylierung von Peptiden und zur Synthese von Glycokonjugaten verwendet werden. Es wurden mehrere Wege zur Isolierung des Glycopeptids beschrieben.^[46, 73] Ausgehend von dem Sialoglycopeptid **22** konnte in Vorarbeiten eine Syntheseroute zu dem Nonasaccharidazid **23** entwickelt werden.^[76, 111]

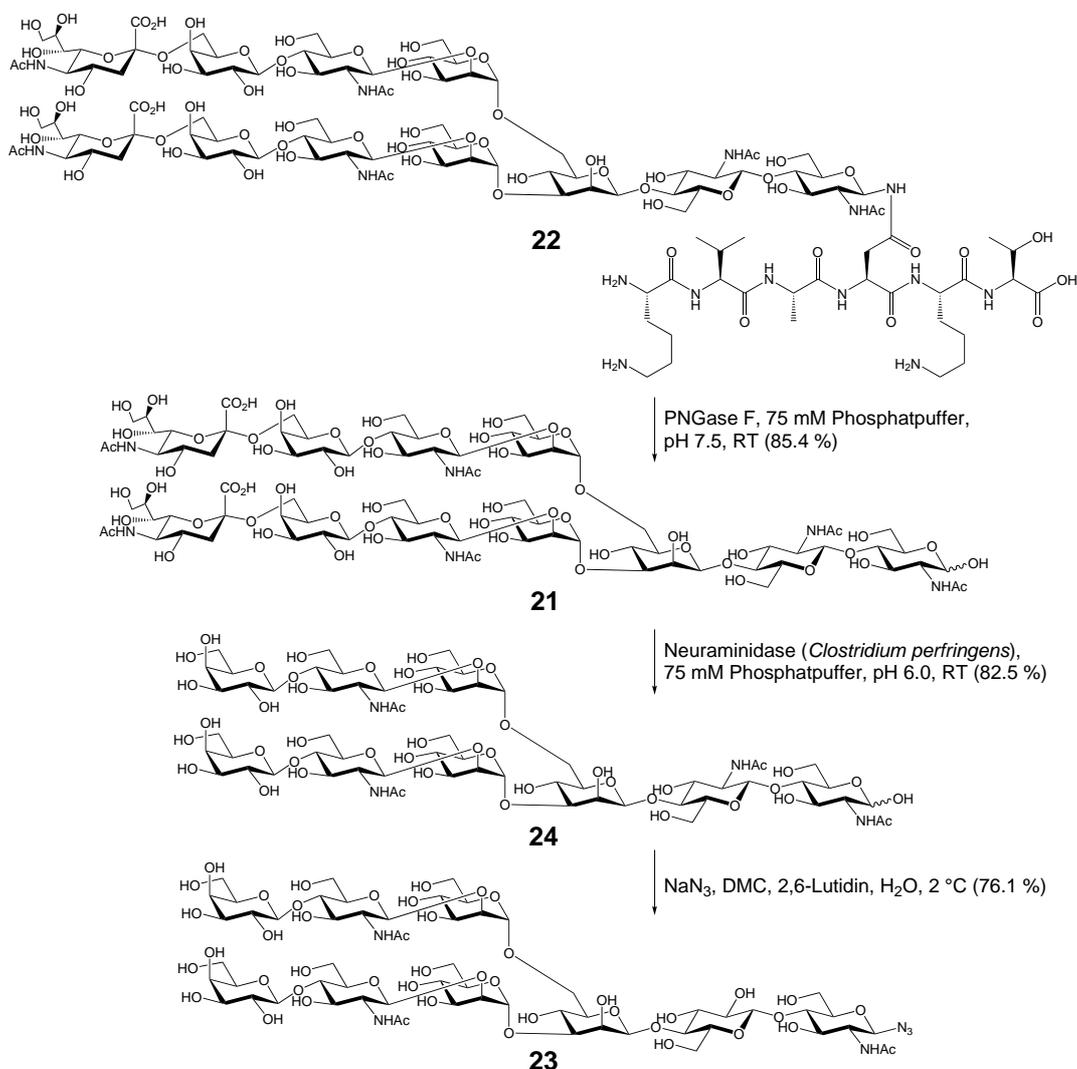


Abbildung 3.1: Synthese des biantennären Azids **23** über die Halbacetale **21** und **24**.

Diese Methode beinhaltet die Freisetzung des Saccharids **21** durch PNGase F,^[71] die Behandlung mit Neuraminidase^[112] und abschließend die Azidierung^[78] der anomeren Position (Abbildung 3.1). Die Azidierung verläuft stereo- und regioselektiv unter Einsatz des Aktivierungsreagenzes 2-Chlor-1,3-dimethylimidazoliumchlorid (DMC). Bei den einzelnen Reaktionen sind hohe Ausbeuten möglich.^[76] Durch eine Gelfiltration können das Undecasaccharid **21** sowie das Nonasaccharid **24** als Halbacetal isoliert werden. Dadurch stehen diese auch für andere Modifikationen, z. B. für die Kochetkov-Aminierung oder Derivatisierung mit einem *N*-Alkoxyglycosidspacer, zur Verfügung.^[61, 66, 113]

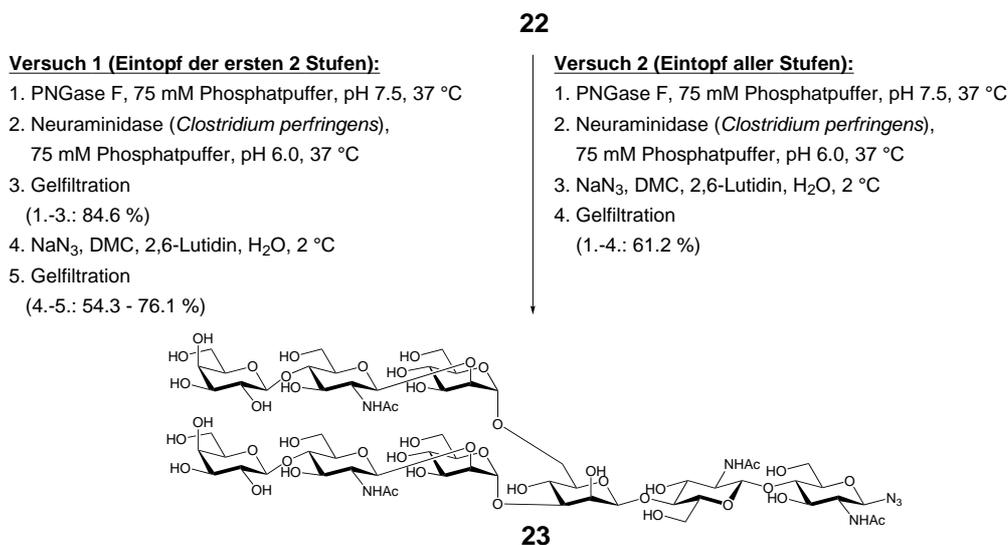


Abbildung 3.2: Eintopfsynthesen des biantennären Nonasaccharidazids **23**.

Die Reinigungen mittels Gelfiltration nach jedem Schritt sind sehr zeitaufwendig. Um größere Mengen an Nonaazid **23** bereitstellen zu können, sollten die enzymatischen Reaktionen und die Reinigungen optimiert werden. Daher wurde zunächst ein Eintopfverfahren entwickelt, bei dem die enzymatischen Reaktionen nacheinander ohne Zwischenreinigung durchgeführt wurden. Es wurde eine 14 mM Lösung des Sialoglycopeptids **22** in 75 mM Phosphatpuffer (pH 7.5) mit PNGase F umgesetzt. Dabei wurde die Reaktionstemperatur von Zimmertemperatur auf 37 °C erhöht, was die Reaktionsdauer von drei Tagen auf 24 Stunden verkürzte. Anschließend wurde der pH-Wert der Reaktion auf 6.0 eingestellt und Neuraminidase zur Lösung gegeben. Über diese zwei enzymatischen Stufen konnte eine Ausbeute von 84.6 % nach Gelfiltration erzielt werden (Abbildung 3.2, Versuch 1).

Es sollte anschließend untersucht werden, inwieweit sich die Änderung der Azidierungsbedingungen, z. B. Reaktionstemperatur oder Konzentration des Saccharids, auf den Umsatz

auswirken. Die allgemeine Durchführung der Azidierung ist wie folgt: Zunächst wird eine 40 mM Saccharidlösung in Wasser hergestellt. Diese Lösung wird mit 40 Äquivalenten 2,6-Lutidin versetzt und im Eisbad gekühlt. Danach werden 200 Äquivalente Natriumazid und abschließend 20 Äquivalente DMC zugegeben. Die Reaktion dauert drei Tage, wobei die Reaktionstemperatur bei 2 °C gehalten wird.

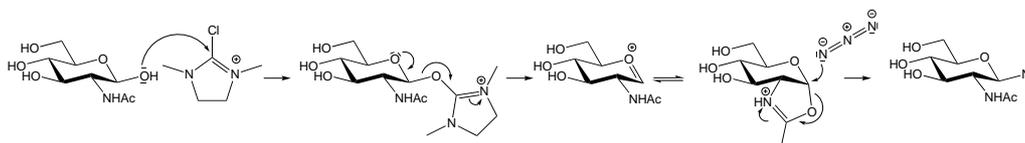


Abbildung 3.3: Möglicher Mechanismus der Azidierung nach Tanaka et al.^[78]

Die Regioselektivität wird durch den niedrigeren pK_s-Wert der anomeren Hydroxylgruppe hervorgerufen. DMC induziert die Bildung eines Oxazoliniumions, welches mit Natriumazid zu dem β-Glycosylazid reagieren kann (Abbildung 3.3). Die Stereoselektivität der Reaktion beruht auf dem Nachbargruppeneffekt der *N*-Acetylgruppe.

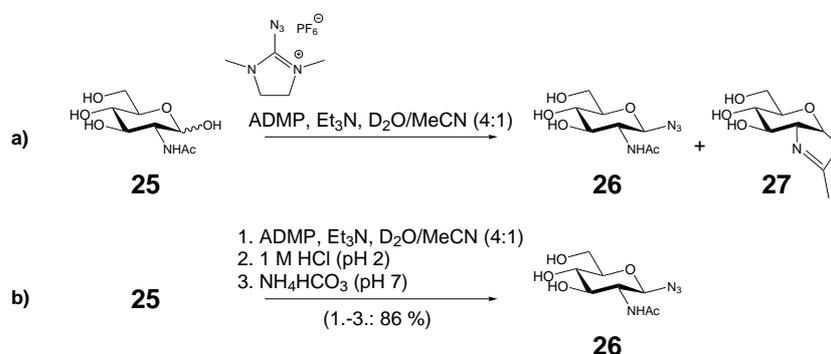


Abbildung 3.4: Direkte Herstellung des Glycosylazids **26**; a) Azidierung mit ADMP; b) Azidierung mit ADMP und anschließendem Ansäuern mit Salzsäure.

Im Rahmen der Vorarbeiten wurde festgestellt, dass die Reihenfolge der Reagenzienzugabe Voraussetzung für einen optimalen Verlauf der Reaktion ist.^[111] Wurde die Reihenfolge variiert, konnten keine bzw. nur sehr geringe Ausbeuten erzielt werden. Die Erhöhung der Reaktionstemperatur, der Konzentration (60 mM) sowie der Äquivalente an Base und DMC führten zu vermehrter Bildung von Nebenprodukten und niedrigeren Ausbeuten.^[114] Weniger als 200 Äquivalente Natriumazid führte ebenfalls zu mehr Nebenprodukten.^[114]

Lim et al. zeigten eine analoge anomere Azidierung mit 2-Azido-1,3-dimethylimidazolium Hexafluorophosphat (ADMP).^[115] Dieses Reagenz dient sowohl zur Aktivierung der anomeren Position als auch als Azidquelle. Dabei wurde festgestellt, dass sich neben dem gewünschten azidierten *N*-Acetylglucosamin auch das Oxazolin **27** bildet (Abbildung 3.4, a). Das Oxazolin **27** reagierte nicht zum Glycosylazid, was den zuvor beschriebenen Mechanismus (Abbildung 3.3) infrage stellt.^[78] Deswegen säuerten *Lim et al.* die Reaktionslösung mit 1 M Salzsäure auf pH 2.0 an und neutralisierten danach die Lösung. Dadurch wurde das Oxazolin **27** geöffnet und das Saccharid war für die Azidierung zugänglich. Um festzustellen, inwiefern das Oxazolin tatsächlich nicht zum Glycanazid reagiert, wurde das Oxazolin **27** in Deuteriumoxid hergestellt. Dabei wurden 15 Äquivalente DMC und 45 Äquivalente Triethylamin eingesetzt. In Deuteriumoxid konnte die Reaktion durch NMR-Spektroskopie verfolgt werden. Anschließend wurde die Reaktion mit 20 Äquivalenten Natriumazid versetzt. Es konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden. Das Oxazolin **27** blieb stabil und bildete das Glycanazid **26** nicht. Durch Ansäuern wurde versucht das Azid **26** zu erzeugen. Jedoch konnte auch dabei kein Umsatz zum Azid **26** festgestellt werden. Es bildete sich nur das Halbacetal **25**. Somit scheint die Annahme von *Lim et al.* bestätigt zu sein. Es finden während der Azidierung mit DMC zwei kompetitive Reaktionen statt. Die eine ist die Bildung des azidierten Produkts, die andere die Ausbildung eines Oxazolins. Durch den großen Überschuss an Natriumazid wird die Synthese eines Glycanazids bevorzugt. Die Bedingungen von *Lim et al.* konnten bisher allerdings nicht auf das Nonasaccharid **24** übertragen werden.^[115] Deswegen wurden weiterhin die etablierten Bedingungen mit DMC verwendet.

Es wurde auch eine Eintopfreaktion einschließlich Azidierung durchgeführt (Abbildung 3.2, Versuch 2). Nach vollständigem Umsatz zu **24** wurde die Lösung lyophilisiert, um die optimalen Reaktionsbedingungen der Azidierung zu gewährleisten. Daraufhin wurde nach *Ullmann et al.* azidiert.^[76, 111] Hierbei konnte über drei Stufen eine Ausbeute von 61.2 % erzielt werden. Es zeigte sich jedoch, dass die Eintopfreaktion über drei Stufen stark von der Reinheit des eingesetzten Sialoglycopeptids **22** und dem vollständigen Umsatz aller Reaktionen abhängt.^[65, 116] Das Nonasaccharid **23** kann Verunreinigungen durch Zwischenprodukte und das abgespaltene Peptid aufweisen. Deswegen sollte für die Synthese des reinen Glycanazids **23** eine Gelfiltration nach dem enzymatischen Verdau oder eine abschließende HPLC-Reinigung mit einer Hydrosphere C18-Säule erfolgen.^[65] Bei allen drei Herangehens-

weisen wurden Reaktionen mit 1 g Sialoglycopeptid **22** durchgeführt, wobei vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden. Die Eintopfreaktionen verkürzten die Synthese zu **23**, so dass in einem Zeitraum von 2 Wochen ca. 200 mg **23** erhalten wurden (ausgehend von 1 g **22**). Insgesamt konnten im Laufe dieser Arbeit rund 1.5 g Nonasaccharidazid **23** für Glycopeptid- sowie Konjugatsynthesen bereitgestellt werden.

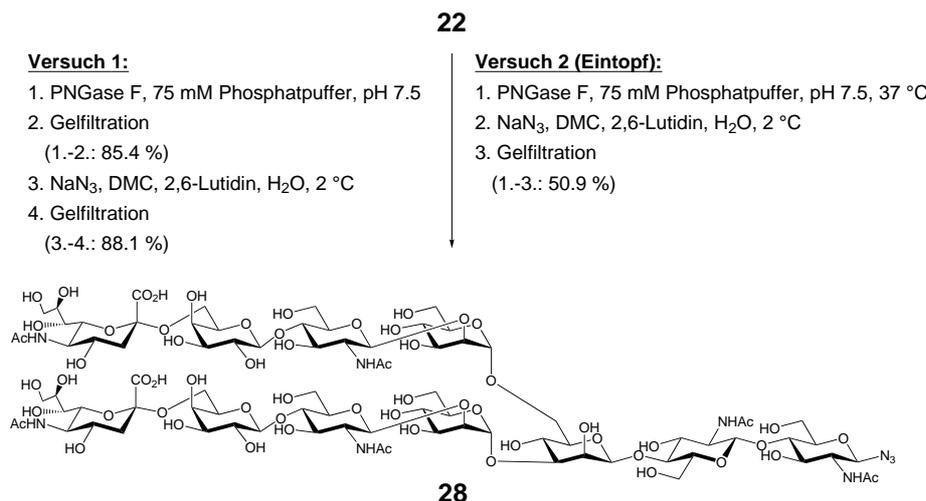


Abbildung 3.5: Eintopfsynthese des biantennären Undecasaccharidazids **28**.

Um das sialylierte Glycan **28** zu erhalten, wurde zunächst das Undecasaccharid **21** mittels PNGase freigesetzt (Abbildung 3.5; Versuch 1). Für die Azidierung wurde eine 40 mM Saccharidlösung in Wasser hergestellt. Diese Lösung wurde mit 40 Äquivalenten 2,6-Lutidin versetzt und im Eisbad gekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 200 Äquivalenten Natriumazid und 20 Äquivalenten DMC. Nebenreaktionen an den Sialinsäuren wurden nicht beobachtet, so dass das Azid **28** aus dem Halbacetal **21** in bis zu 88.1 % Ausbeute gewonnen werden konnte.^[117, 118] Auch in diesem Fall wurde eine Eintopfsynthese durchgeführt. Dabei konnten vergleichbare Reinheiten aber nur geringere Gesamtausbeute (50.9 %) erzielt werden (Abbildung 3.5; Versuch 2).

Weiterhin wurde das Nonasaccharidazid **23** zu dem Heptasaccharid **19** mit β -Galactosidase abgebaut. Es wurden Galactosidasen aus *Escherichia coli* und *Aspergillus oryzae* getestet. Das Azid **23** wurde in 100 mM Phosphatpuffer (pH 6.8) mit 1.5 mM MgCl₂ gelöst. Nach Zugabe des jeweiligen Enzyms wurde die Reaktion bei 37 °C drei Tage belassen. Bei beiden Enzymen war die Reinheit und Ausbeute mit rund 70 % vergleichbar (Abbildung 3.6).

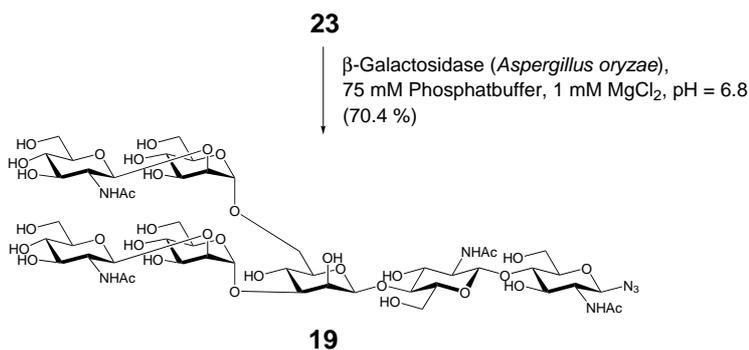


Abbildung 3.6: Enzymatischer Verdau des Glycans **23** zu dem Heptasaccharidazid **19**.

3.2 Synthese von biantennären Glycosyloxazolen

Die Synthese von *N*-Glycopeptiden und Glycoproteinen über Glycanoxazoline wird zunehmend angewendet.^[42, 43, 119] Für die Gewinnung verkürzter *N*-Glycane kann mit Hilfe einer Endoglycosidase das benötigte Glycan aus dem Glycopeptid **22** freigesetzt werden.

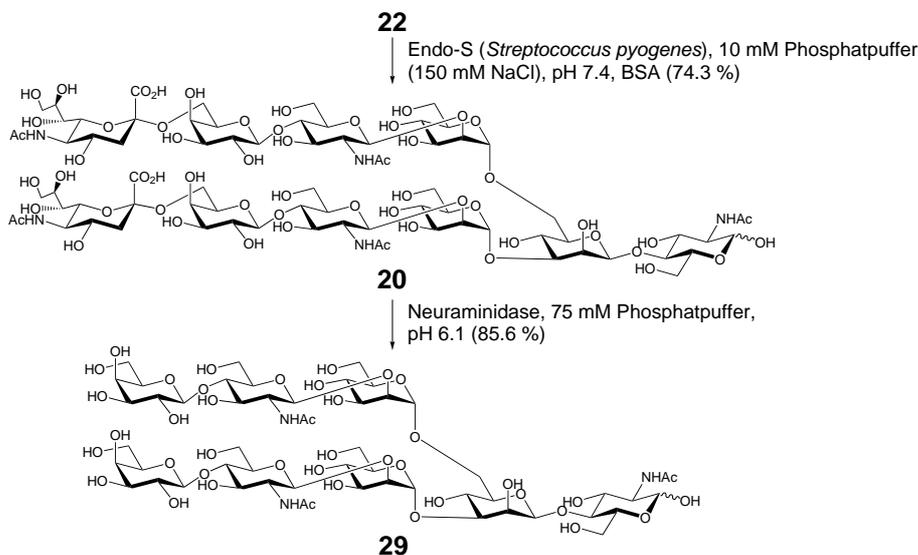


Abbildung 3.7: Enzymatischer Verdau des Sialoglycopeptids **22** zu den Glycanen **20** und **29**.

Ziel dieser Arbeit war die Gewinnung von biantennären Oxazolinen mit und ohne terminale Sialinsäuren. Zunächst wurde die Spaltung des Sialoglycopeptids **22** mit verschiedenen Endoglycosidasen untersucht. Es wurde die Enzyme Endo-F2, Endo-F3 sowie Endo-S getestet. Ein Umsatz mit den ersten beiden konnte nicht detektiert werden. Endo-S dagegen lieferte gute Ergebnisse (Abbildung 3.7). Es wurde jedoch festgestellt, dass das zunächst eingesetzte

Sialoglycopeptid **22** Verunreinigungen aufwies. Diese inhibierten den Verdau, so dass maximal die Hälfte des Glycopeptids **22** (laut Dünnschichtchromatographie) umgesetzt wurde. Durch eine Gelfiltration von **22** (Sephadex G25, 5 % Ethanol) konnten diverse Glycopeptide abgetrennt werden. Das gereinigte Sialoglycopeptid **22** lieferte bei der Umsetzung mit Endo-S eine Ausbeute des Halbacetals **20** von 74.3 %. Für die Reinigung von **20** eignete sich die Festphasenextraktion mit C18-Material.

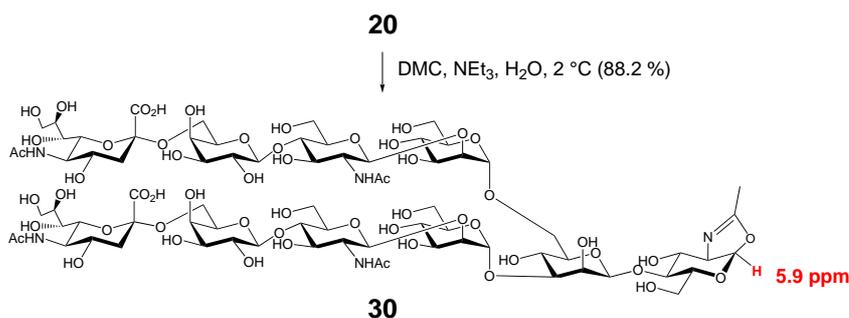


Abbildung 3.8: Darstellung des Oxazolins **30**

Das isolierte Halbacetal **20** wurde mit Neuraminidase behandelt. Dabei wurden analog zu Kapitel 3.1 die terminalen Sialinsäuren in Phosphatpuffer (pH 6.1) durch Neuraminidase (*Clostridium perfringens*) abgespalten (Abbildung 3.7). Die Ausbeute lag bei 85.6 %. Für die Reinigung des Octasaccharids **29** war die Festphasenextraktion nicht geeignet. Es wurde eine Gelfiltration durchgeführt, um die abgespaltenen Sialinsäuren und die Salze vollständig zu entfernen.

Als nächstes sollten die Oxazoline **30** und **31** synthetisiert werden. Hierbei wurde nach der Vorschrift von Wang *et. al.* gearbeitet.^[43] Das Oxazolin entsteht mit DMC unter basischen Bedingungen (vgl. Azidierung in Kapitel 3.1). Zunächst wurde das Halbacetal **20** in Wasser gelöst (Saccharidkonzentration 50 mM), mit 45 Äquivalenten Triethylamin versetzt und im Eisbad gekühlt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 Äquivalenten DMC. Das Verfolgen der Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie oder ESI-MS war nicht möglich. Deswegen wurde nach Wang nach einer Stunde die Reaktion über eine Sephadex G25-Gelfiltrationssäule gereinigt. Dabei wurde Wasser mit 0.05 % Triethylamin als Laufmittel eingesetzt. Die Trennung im Basischen ist wichtig, da Oxazoline bereits im leicht sauren Milieu instabil sind. Leider konnte bei der NMR-Analyse kein Oxazolin nachgewiesen werden. Da bereits bei der Azidierung zu **23** die Reihenfolge der Zugabe von DMC und Base entscheidend war, wurde diese variiert. Die notwendige Reihenfolge war DMC vor Triethylamin zu dem Glycan zu

geben. Nach der Gelfiltration war im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bei 5.9 ppm das charakteristische Signal des anomeren Protons des Oxazolins zu erkennen (Abbildung 3.9). Die Ausbeuten an Oxazolin **30** lagen zwischen 72.2 % und 88.2 % (Abbildung 3.8).

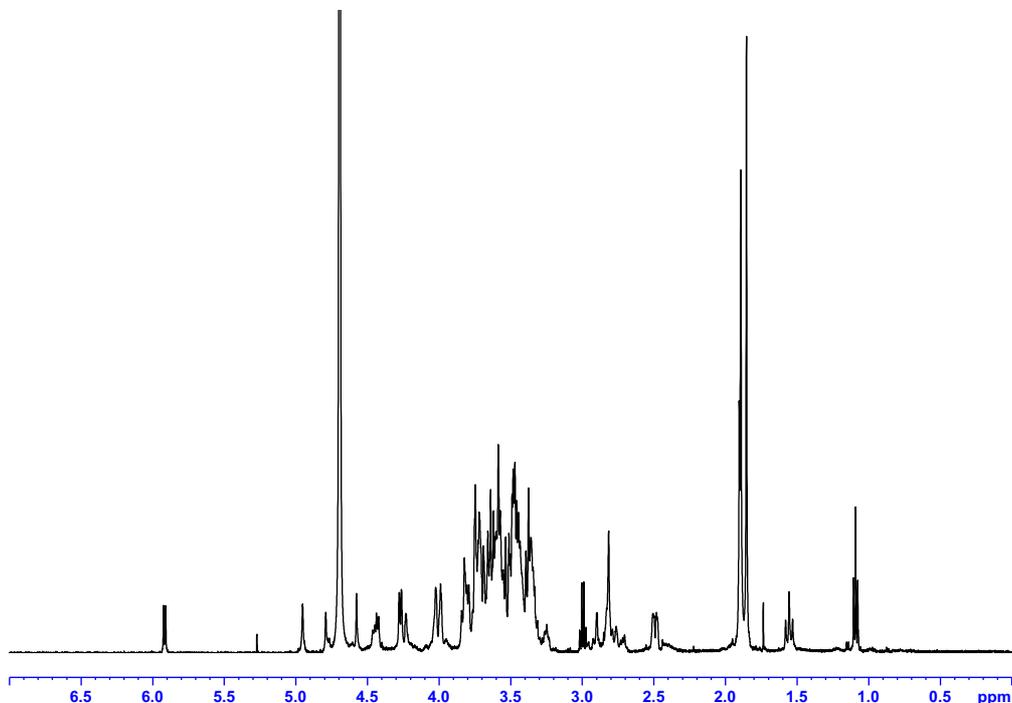


Abbildung 3.9: 500 MHz $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Decasaccharidoxazolins **30**, in D_2O .

Die Darstellung von **31** erfolgte analog zu **30** (Abbildung 3.10). Unter Beachtung der Reihenfolge bei der Zugabe der Reagenzien konnte eine quantitative Umsetzung des Halbacetals **29** erreicht werden.

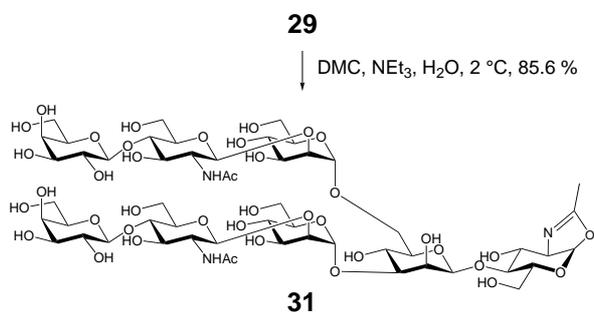


Abbildung 3.10: Umsatz des Octasaccharids **29** zum Oxazolin **31**.

Die Eignung der Oxazoline für Transglycosylierungen wurde mit der Verbindung **30** getestet. Dafür wurde ein Fc-Peptid (IgG1 287-320) **32** verwendet, welches ein *N*-Acetylglucosamin

trug (Abbildung 3.11).^[120] Für die Glycosylierung wurde eine mutierte Endoglycosidase M (Endo-M-N175Q) eingesetzt. Hierbei war es wichtig, das Oxazolin in einem Phosphatpuffer bei pH 8.1 vorzulösen. Wenn Puffer mit niedrigerem pH-Wert eingesetzt wurden, konnte kein Produkt detektiert werden. Der pH-Wert der Reaktionslösung wurde jedoch auf das Optimum des Enzyms bei 7.1 eingestellt. Weiterhin wurde das Peptidfragment in Dimethylsulfoxid vorgelöst, da es ansonsten nicht umgesetzt wurde. Nach 1 h konnte das Glycopeptid **33** per LC-MS identifiziert werden (Abbildung 3.12). Dabei lag der Umsatz bei etwa 15 %. Längere Reaktionszeiten sowie die erneute Zugabe von Enzym ergaben keinen weiteren Umsatz. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz des Oxazolins **30** GlcNAc-haltige Glycopeptide modifiziert werden können.

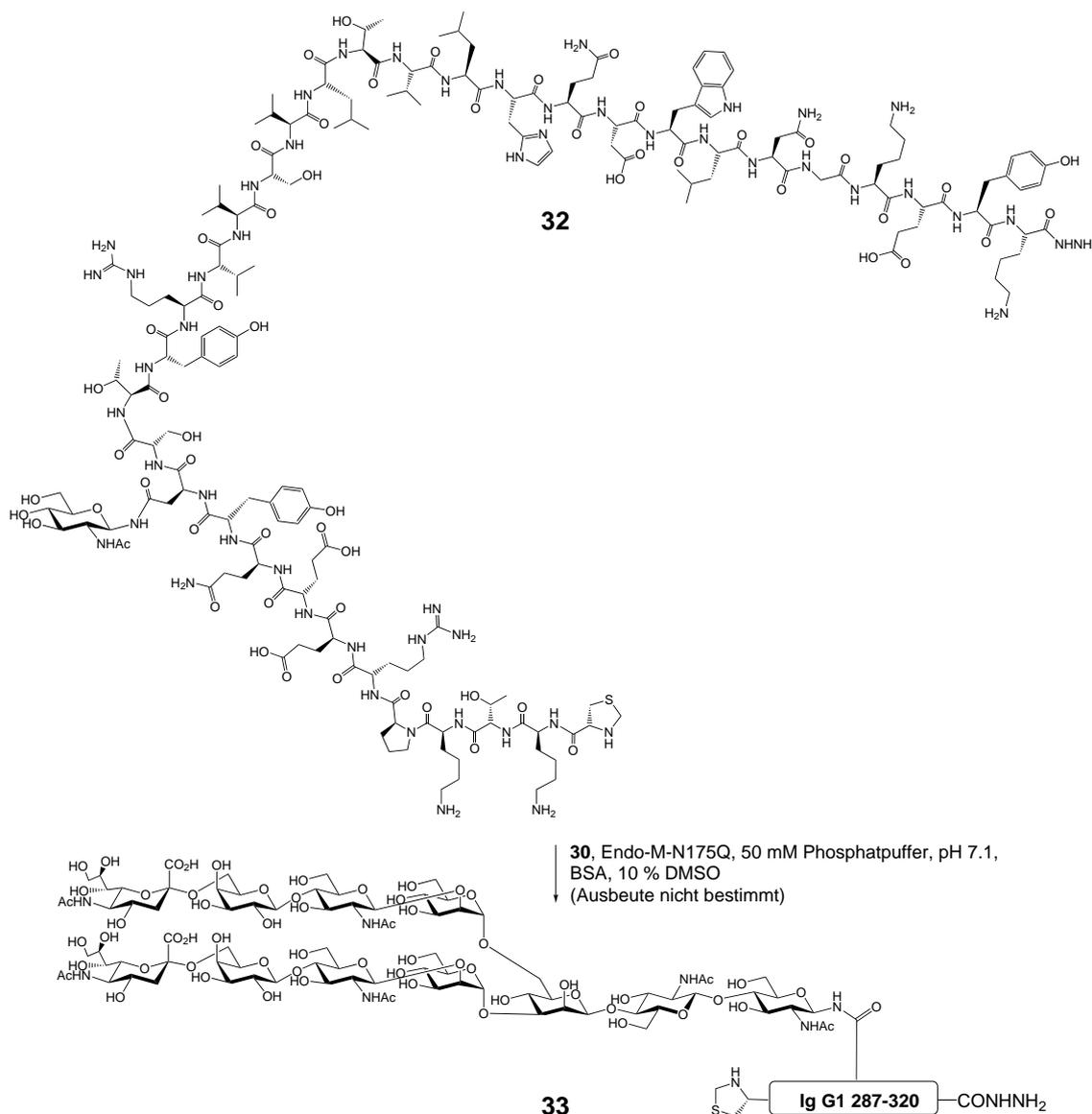


Abbildung 3.11: Umsetzung des Oxazolins **30** mit dem IgG-Glycopeptid **32**.

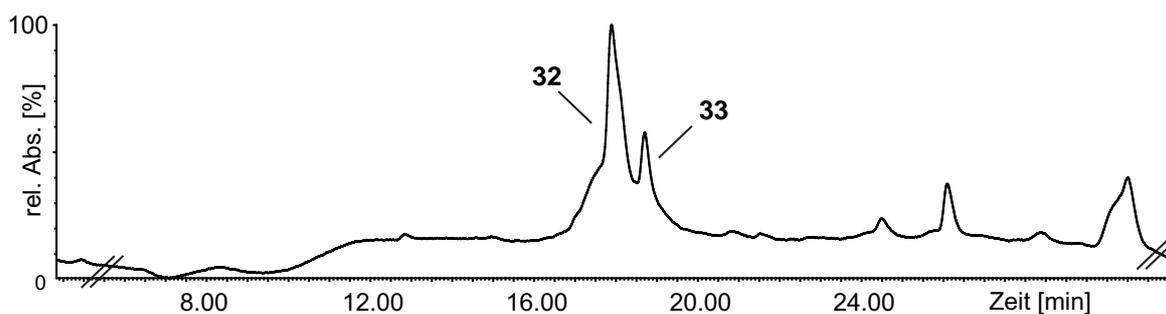


Abbildung 3.12: RP-HPLC-Chromatogramm der Umsetzung des Oxazolins **30** mit dem IgG-Glycopeptid **32** nach 1 h.

3.3 Synthese von oligomannosidischen β -Glycosylaziden

Eine wichtige Voraussetzung zur Untersuchung von Glycoproteinen ist die Bereitstellung homogener Glycoformen. Damit können z. B. die Proteinaktivität und -stabilität in Abhängigkeit von der Glycaneinheit studiert werden. Zur Synthese von Glycoformen werden die jeweiligen Saccharide in Reinform benötigt. Für die Darstellung oligomannosidischer Interleukin 6 Glycoformen sollten zwei mannosidische *N*-Glycane **34** und **35** nach dem Bausteinprinzip von *Unverzagt et al.* aufgebaut werden (Abbildung 3.13).^[55, 57]

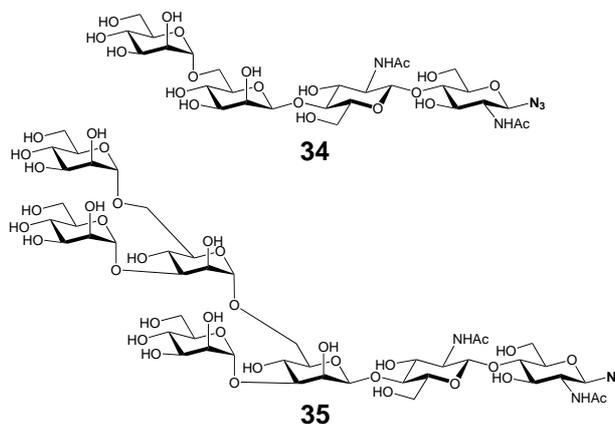


Abbildung 3.13: Oligomannosidische Zielstrukturen **34** und **35**.

3.3.1 Darstellung eines pauci-mannosidischen *N*-Glycans

Das pauci-mannosidische *N*-Glycan **34** ist außergewöhnlich klein, jedoch ist es das am häufigsten auftretende *N*-Glycan von Interleukin 6.^[121] Für die Synthese des Saccharids lagen

bereits erste Versuche von *Berger* vor (Abbildung 3.14).^[122] Er konnte zeigen, dass die selektive 1,6-Mannosylierung des Core-Trisacchariddiols **36** mit zwei freien Hydroxylgruppen in Position 4 und 6 schwierig ist.

Um die Bildung der Nebenprodukte **37** und **38** zu verhindern, öffnete *Berger* das Benzylidenacetal ausgehend von dem Core-Trisaccharid **8** selektiv. Die freie 6-Hydroxylgruppe von **39** konnte somit mit dem Donor **40** glycosyliert werden (Abbildung 3.15). Es konnte jedoch wegen der Bildung des Orthoesters **41** nur eine Ausbeute von 52.6 % erzielt werden. Allerdings konnte das freie Glycan **34** nicht erhalten werden, da die Entschützung nicht gelang. Vermutlich war das Tetrasaccharid **42** zu polar, so dass es bei der oxidativen Debenzylierung im Zweiphasensystem in die wässrige Phase überging. Diese Phase wird durch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4/\text{NaBrO}_3$ stark sauer und kann glycosidische Bindungen angreifen.

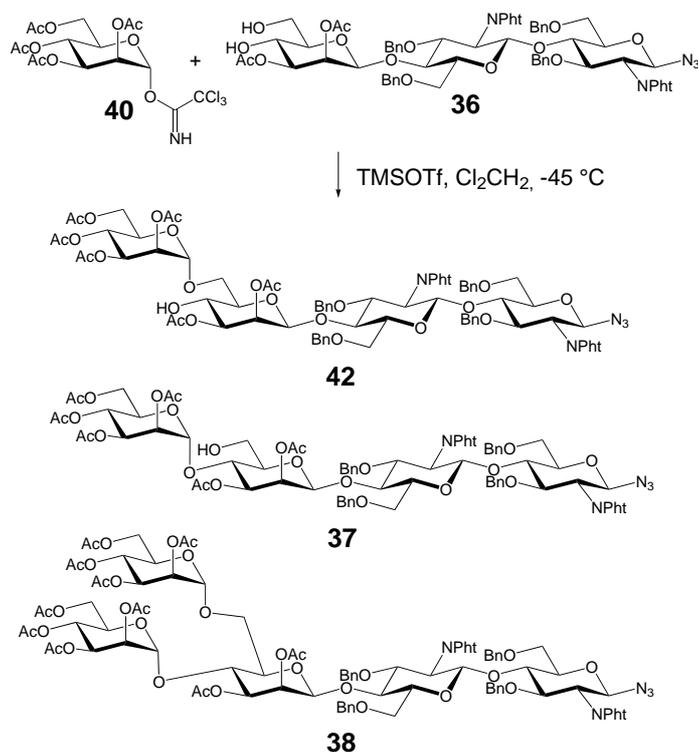


Abbildung 3.14: Erste Versuche zur Synthese des pauci-mannosidischen Glycans **42**.

Wegen der Probleme bei der Verwendung des Donors **40** wurden die Disaccharidbausteine **13a** und **13b** eingesetzt. Diese sollten die Regioselektivität der Glycosylierung erhöhen und die Entschützung zum Glycanazid ermöglichen.

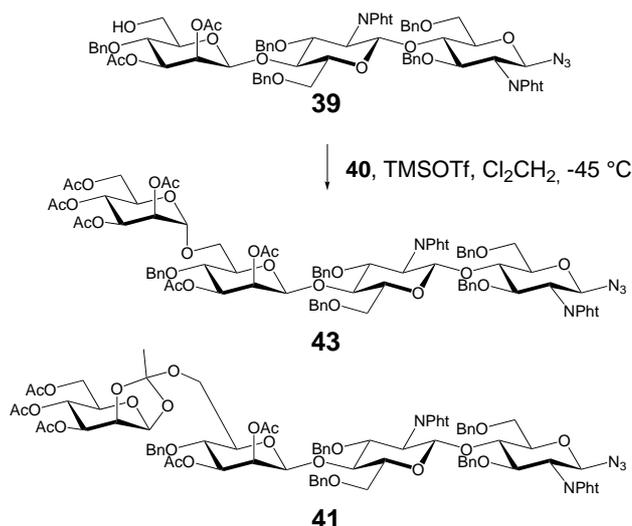


Abbildung 3.15: Synthese des pauci-mannosidischen Glycans **43** nach Berger.^[122]

Als Ausgangspunkt der Synthese wurde das Core-Trisaccharid **8** verwendet. Dieses wurde acetyliert (vgl. Berger^[122]) und debenzylideniert (Abbildung 3.16). Mit 8 Äquivalenten *para*-Toluolsulfonsäure konnte das Acetal entfernt werden, was den Akzeptor **36** mit 62.3 % über zwei Stufen ergab.^[123] Da die Öffnung des Benzylidenacetals eine Gleichgewichtsreaktion ist, konnte das Zwischenprodukt der zweistufigen Schutzgruppenmodifikation isoliert und erneut umgesetzt werden.

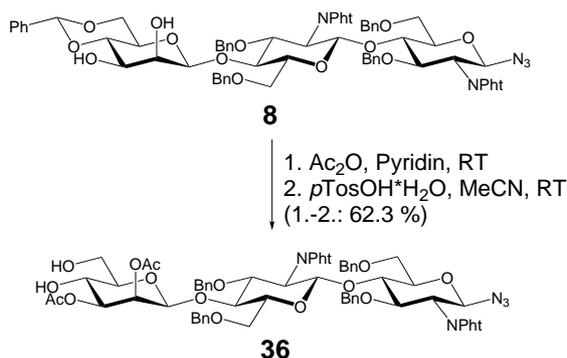


Abbildung 3.16: Acetylierung und Debenzylidenierung von Core-Trisaccharid **8**.^[122]

Anschließend wurde das Trisaccharid **36** mit dem Disaccharid **13a** umgesetzt. Es wurde der Phthalimido-geschützte Donor **13a** verwendet, da diese Schutzgruppe verglichen mit einem Trifluoracetamid sterisch anspruchsvoller ist. Die Reaktion wurde mit 0.05 Äquivalenten TMSOTf gestartet und 75 min bei -50 °C gerührt. Es wurden 1.1 Äquivalente Donor **13a**

verwendet. Unter diesen Bedingungen konnte keine Überreaktion festgestellt werden. Jedoch wurde nur eine Ausbeute von 50.8 % an Pentasaccharid **44** erzielt, da der Akzeptor **36** mit 1.1 Äquivalenten Donor nicht vollständig umgesetzt wurde. Das Erhöhen der Donor- und/oder TMSOTf-Äquivalente führte zu geringeren Ausbeuten, da Überreaktionen stattfanden.

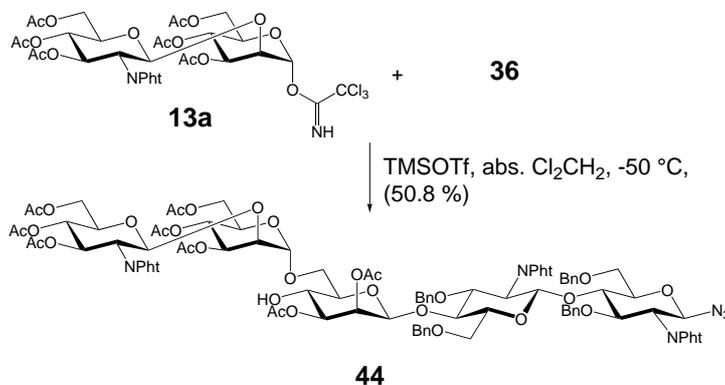


Abbildung 3.17: Glycosylierung zum Pentasaccharid **44**.

Die Regioselektivität bei der Glycosylierung des Akzeptors **36** ist offensichtlich nicht nur von der höheren Reaktivität der primären Hydroxylgruppe abhängig. Die Abschirmung der 4-Hydroxylgruppe durch den Substituenten an O-3 spielt möglicherweise eine Rolle. Es wurde daher eine Benzoylierung von **8** durchgeführt (Abbildung 3.18). Danach wurde das Benzylidenacetal mit *p*-Toluolsulfonsäure entfernt. Über zwei Stufen konnte eine Ausbeute von 35.6 % an Trisaccharid **45** erzielt werden. Die niedrige Ausbeute kam durch den Verlust von Benzoylschutzgruppen während der sauer katalysierten Debenzylidenierung zustande.

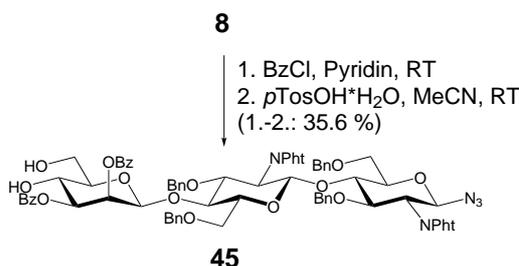


Abbildung 3.18: Benzoylierung des Core-Trisaccharids **8** und anschließende Debenzylidenierung zu Akzeptor **45**.

Die Glycosylierung von **45** zum Pentasaccharid **46** verlief analog zu dem acetylierten Akzeptor (Abbildung 3.19). Hierbei konnte ebenfalls nur eine Ausbeute von 47.1 % erhalten werden. Es wurde sowohl Überreaktion als auch ein Verlust von Benzoylschutzgruppen beobachtet.

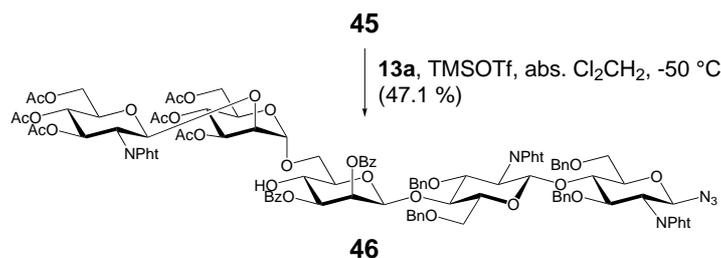


Abbildung 3.19: Glycosylierung des benzylierten Akzeptors **45**.

Daher wurde ein alternativer Weg zum Tetrasaccharid **34** getestet, der auf der reduktiven Benzylidenacetal-Öffnung zum Trisaccharid **39** basierte.^[49, 122, 123] Hierfür wurde das Core-Trisaccharid **8** acetyliert und ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt umgesetzt (Abbildung 3.20). Für die selektive Ringöffnung wurde das Saccharid in 1 M Boran-Tetrahydrofuran-Komplexlösung (10 Äquivalente) aufgenommen und auf -60 °C gekühlt. Danach wurden langsam 3.5 Äquivalente Dibutyltrifluormethansulfonyloxyboran (1 M Lösung in Dichlormethan) zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über einen Zeitraum von 1.5 h auf 0 °C erwärmt. Nach vollständigem Umsatz wurde die Reaktion mit Triethylamin gestoppt. Nach *Ohlin et al.* ist die selektive Öffnung nicht auf sterische Effekte zurückzuführen.^[124] Man geht vielmehr von einem stereoelektronischen Modell aus, welches abhängig von den eingesetzten Reduktions- und Lösungsmitteln ist. Bislang konnte der Reaktionsverlauf jedoch nicht vollständig aufgeklärt werden.

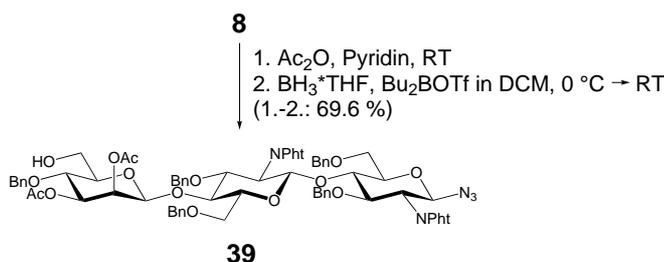


Abbildung 3.20: Selektive Benzylidenacetal-Öffnung zu **39**.

Da eine Mehrfachglycosylierung von **39** nicht mehr stattfinden konnte, wurden die Reaktionsbedingungen angepasst. Es wurden 1.3 Äquivalente an Donor **13b** und 0.1 Äquivalente TMSOTf eingesetzt. Weiterhin wurde die Reaktionstemperatur auf -30 °C erhöht. Nach vollständiger Umsetzung laut Dünnschichtchromatographie wurde die Reaktion 19 h bei Zimmertemperatur gerührt. Es konnte eine Ausbeute von 78.0 % erzielt werden (Abbildung 3.21).

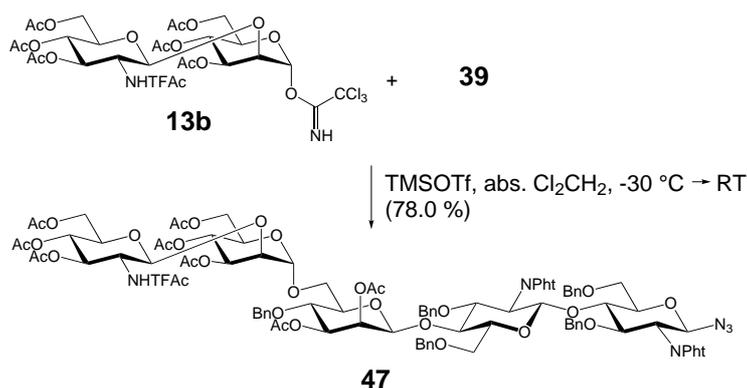


Abbildung 3.21: Glycosylierung des Trisaccharids **39** mit dem Donor **13b**.

Auch hier wurde die Schützung des Akzeptors mit Benzoylchlorid getestet (Abbildung 3.22). Das benzylierte Zwischenprodukt konnte ohne weitere Reinigung für die Benzylidenacetalöffnung eingesetzt werden. Es wurde keine Ausbeute bestimmt, da das gewünschte Produkt nicht chromatographisch rein gewonnen werden konnte.

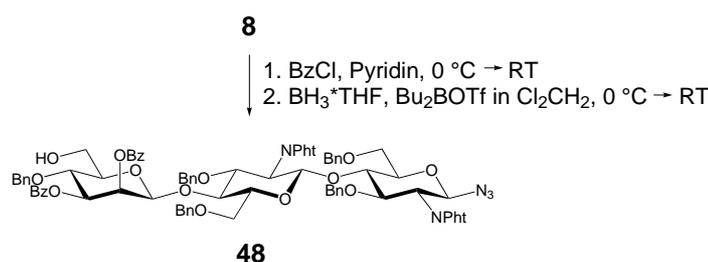


Abbildung 3.22: Selektive Benzylidenacetal-Öffnung zu **48**.

Nachdem die Pentasaccharide **44** und **47** aufgebaut waren, wurde ihre Entschützung versucht. Mit beiden Verbindungen sollte die vierstufige Entschütungsstrategie nach *Niemietz et al.* versucht werden.^[67] Zwischen den einzelnen Schritten fand keine Aufreinigung statt. Im ersten Schritt wurden die Benzylschutzgruppen oxidativ in einem Zweiphasensystem mit Natriumdithionit und Natriumbromat abgespalten. Ein möglicher Mechanismus dieser Reaktion wird von *Adinolfi et al.* beschrieben.^[125] Es wird vermutet, dass Natriumdithionit unter wässrigen Bedingungen zu Natriumhydrogensulfoxylat und -hydrogensulfit disproportioniert. Letzteres kann mit Natriumbromat hypobromige Säure bilden, welches zur Bildung von Bromradikalen führt. Die gut sichtbaren Radikale können in die organische Phase übergehen und dort die Methylengruppen der Benzylgruppen bromieren. Die dadurch stark erhöhte Elektrophilie erlaubt die Hydrolyse der Schutzgruppe unter Freisetzung von Benzaldehyd.

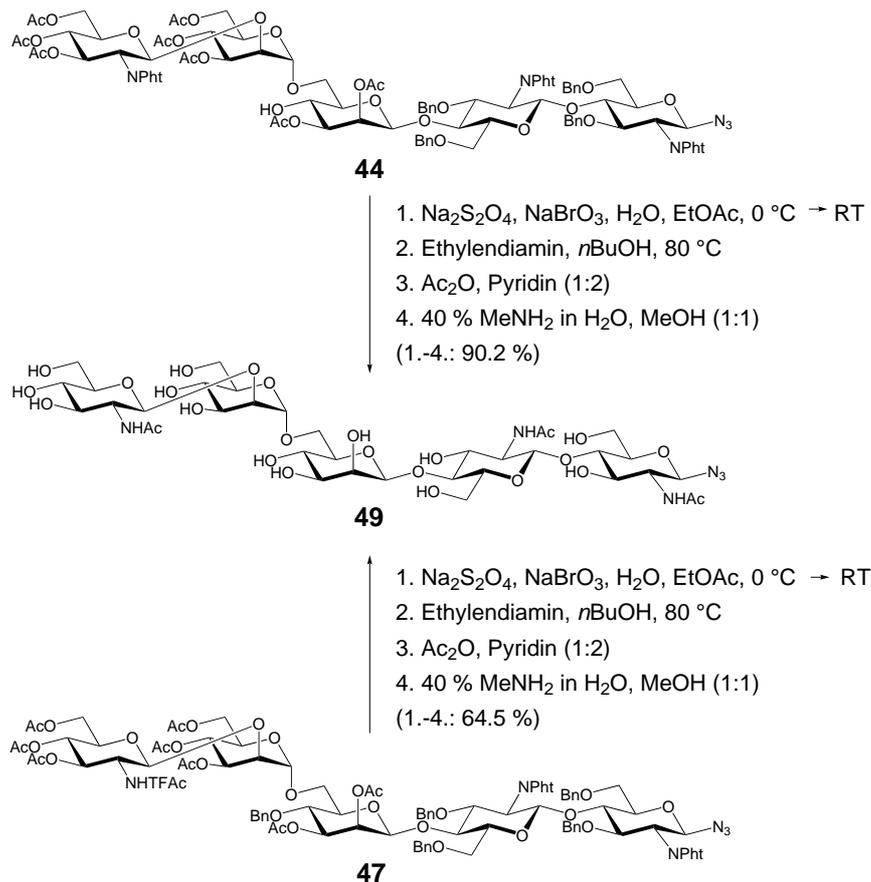


Abbildung 3.23: Entschützung der Pentasaccharide **44** und **47** zu dem Glycosylazid **49**.

Es wurden in beiden Entschütungsreaktionen 15 Äquivalente Natriumbromat und 12.5 Äquivalente Natriumdithionit bei einer Ausgangstemperatur von 0 °C eingesetzt. Die Reaktion wurde nach dem Start langsam auf Zimmertemperatur erwärmt und 23 h gerührt. Darauf folgte die globale Entschützung mit *n*-Butanol und Ethylendiamin bei 80 °C. Nach Reaktionsende wurde mit Toluol codestilliert und die Rohprodukte wurden unter Hochvakuum getrocknet. Letzteres ist wichtig, um das Ethylendiamin vollständig zu entfernen und die Peracetylierung nicht zu beeinflussen. Im Folgeschritt wurden die Verbindungen mit Acetanhydrid und Pyridin peracetyliert und wiederum nach Reaktionsende gut getrocknet. Durch eine selektive Des-*O*-Acetylierung konnte das freie Saccharidazid **49** erhalten werden. Im abschließenden Schritt wurden die Rohprodukte mittels Gelfiltration gereinigt.

In Abbildung 3.23 sind die Reaktionssequenzen veranschaulicht. Die Entschützung von **44** verlief sehr gut mit einer Ausbeute von 90.2 %. Die Ausbeute bei der Entschützung von **47** lag bei 64.5 %, da die Debenzylierung nicht vollständig ablief. Es konnte bei der Gelfiltration eine Fraktion mit einfach benzyliertem Saccharid abgetrennt werden. Ein weiterer Grund

könnte in der Aminoschutzgruppe des 1,6-Arms liegen. Die Phthalimidogruppe in **44** ist unpolarer und hält das Molekül besser in der organischen Phase bei der Debenzylierung als die Trifluoracetamidogruppe.

An dem freien Pentasaccharid **49** konnte der enzymatische Verdau zu der Zielverbindung **34** untersucht werden (Abbildung 3.24). Es wurde eine β -*N*-Acetylglucosaminidase eingesetzt, die spezifisch für die Hydrolyse terminaler *N*-Acetylglucosamine ist. Für die Reaktion wurde das Azid **49** in 50 mM HEPES-Puffer (pH 6.0, 1 mg/mL BSA) gelöst. Nach Enzymzugabe wurde die Lösung bei 37 °C einen Tag inkubiert. Laut Dünnschichtchromatographie war die Reaktion vollständig, jedoch konnte bei der Gelfiltration Edukt **49** abgetrennt werden. Dadurch lässt sich die Ausbeute von 55.3 % erklären.

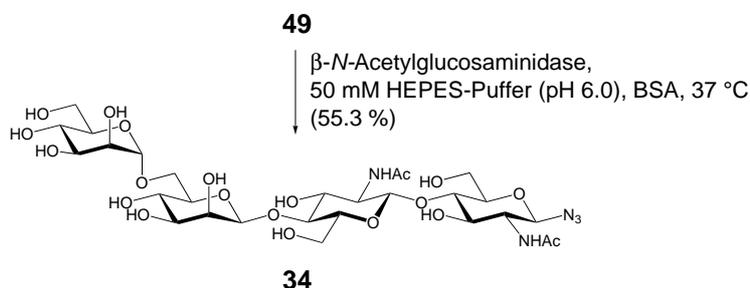


Abbildung 3.24: Enzymatischer Verdau von **49** zum pauci-mannosidischen Glycan **34**.

3.3.2 Synthesewege zu einem oligomannosidischen Heptasaccharid

Das oligomannosidische Glycan **35** stellt in der Biosynthese ein Intermediat für die Synthese von hybriden und komplexen Glycanen dar (siehe Kapitel 1.1). Deswegen wird es häufig auf Glycoproteinen gefunden.^[121, 126] **35** sollte aus den Bausteinen **8**, **13a** und **50** aufgebaut werden (Abbildung 3.25).

Schratt etablierte für die Synthese von **50** eine Route ausgehend von Benzylmannosid **51**.^[127] Dieses kann mit Hilfe von Trimethylorthobenzoat selektiv an der 2- und 4-Hydroxylgruppe zu **52** benzyliert werden (Abbildung 3.26). Dabei entsteht als Nebenprodukt auch das 2,6-Benzoylmannosid **53**. Durch Veränderung der Reaktions- und Chromatographiebedingungen konnte eine höhere Reinheit des Dibenzoylmannosids **52** erzielt werden. Hierfür wurde Benzylmannosid **51** mit 8 Äquivalenten Trimethylorthobenzoat in Acetonitril mit 0.06 Äquivalenten Trifluoressigsäure umgesetzt. Das Saccharid ging langsam in Lösung. Dabei bildete sich das Zwischenprodukt mit zwei Orthoesterfunktionen. Dies konnte sehr

gut mittels Dünnschichtchromatographie beobachtet werden. Nach Zugabe einer 80 %igen Trifluoressigsäure-Lösung (1.8 Äquivalente) wurde die Hydrolyse der Orthoester zu den Produkten **52** und **53** induziert. Das gewünschte 2,4-benzoylierte Benzylmannosid **52** konnte in guter Ausbeute (42.1 %) isoliert werden.

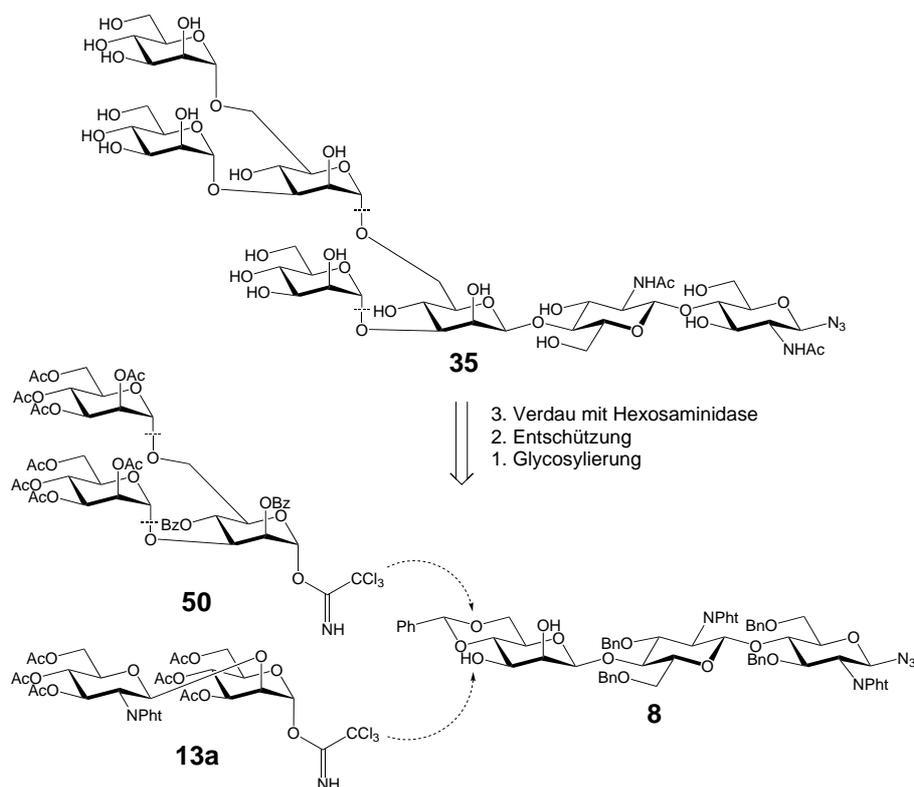


Abbildung 3.25: Retrosynthese des mannosidischen Glycans **35**.

Zur Synthese des Trisaccharids **54** wurde der Akzeptor **52** mit dem Thioglycosid **55** umgesetzt (Abbildung 3.27). Es wurden 6 Äquivalente an Donor eingesetzt, welche mit *N*-Iodsuccinimid und Trifluormethansulfonsäure aktiviert wurden. Die Reaktionstemperatur lag bei 0 °C. Nach 3 h konnte das gewünschte Mannosid **54** in guter Reinheit und Ausbeute (81.3 %) gewonnen werden.

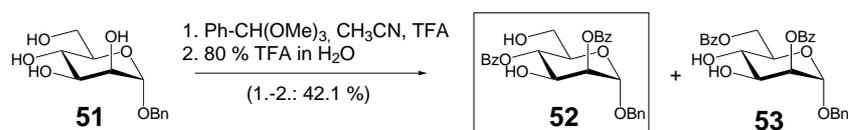


Abbildung 3.26: Darstellung der 2,4-benzoylierten Mannose **52**.

Anschließend wurde das Trisaccharid **54** an der anomeren Position entschützt. Hierfür wurde die Benzylschutzgruppe nach *Niemietz et al.* entfernt (Abbildung 3.28). Bei der Entschützung wurde festgestellt, dass sich neben dem Halbacetal **56** auch ein Nebenprodukt mit anomerer Benzoylfunktion **57** bildete (Abbildung 3.29). Diese Nebenreaktion verminderte die Gesamtausbeute, da das entstehende Saccharid nicht direkt weiter zum Imidat umgesetzt wurde.

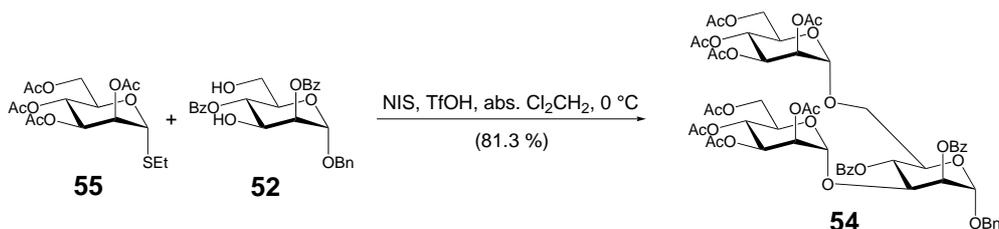


Abbildung 3.27: Umsetzung von Dibenzoylmannosid **52** zu dem Trisaccharid **54**.

Daher wurden die Äquivalente an Natriumdithionit und Natriumbromat variiert. Es stellte sich heraus, dass der Einsatz von 4.1 Äquivalenten Dithionit und 4.7 Äquivalenten Bromat zu mehr Benzoat **57** führte. Ein Verhältnis von 8.2 zu 9.4 Äquivalenten (NaS₂O₄/NaBrO₃) führte zu höheren Ausbeuten an Halbacetal **56**. Eine weitere Erhöhung der Äquivalente verbesserte die Umsetzung nicht, führte aber auch nicht zu vermehrten Nebenprodukten. Ein Wechsel des Lösungsmittels zu Dichlormethan verschob die Reaktion mehr in Richtung des Nebenprodukts **57**. Die Verdünnung der organischen Phase erbrachte ebenfalls nicht den gewünschten Erfolg. Die besten Bedingungen wurden durch das Lösen des Trisaccharids **54** in Ethylacetat in einer Konzentration von 74 mM und Kühlen im Eisbad für 5 min eingestellt. Dann wurde Bromat (9.4 Äquivalente) und abschließend Natriumdithionit (8.2 Äquivalente) langsam zugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde das Eisbad entfernt. Man erkennt an der orangenen Reaktionsfarbe, dass die Reaktion startet. Mittels Dünnschichtchromatographie kann die Reaktion gut verfolgt werden. Nach einer Reaktionsdauer von 3 h und flashchromatographischer Trennung konnte eine Ausbeute von 80.6 % erhalten werden.

Das gereinigte Halbacetal **56** wurde mit Trichloracetonitril im Basischen zu dem Imidat **50** umgesetzt. Diese Reaktion ergab eine Ausbeute von 85.5 %. Damit stand der verzweigte Donor **50** für den Aufbau von Oligomannosiden zur Verfügung (Abbildung 3.28).

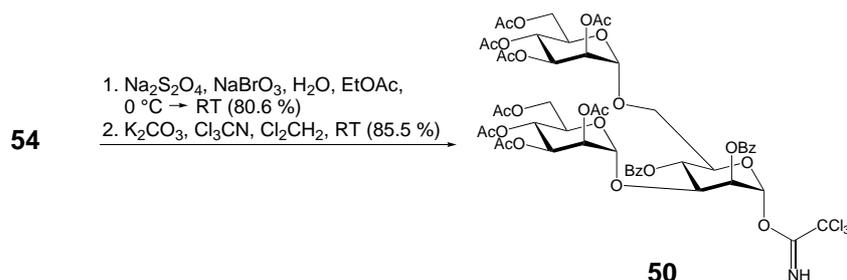


Abbildung 3.28: Synthese des Donors **50**.

Das Pentasaccharid **58** wurde aus dem Core-Trisaccharid **8** und dem Donor **13a** hergestellt (Abbildung 3.30). Die Glycosylierung wurde sowohl unter TMSOTf- als auch unter $\text{BF}_3 \cdot \text{xOEt}_2$ -Aktivierung durchgeführt. Es wurden jeweils 0.1 Äquivalente des Aktivierungsmittels und 2 Äquivalente Donor **50** eingesetzt. Beide Reaktionen verliefen vergleichbar, wobei Ausbeuten um 73 % erhalten wurden. Abschließend wurde die axiale Hydroxylgruppe der β -Mannose acetyliert und das Benzylidenacetal entfernt (81 % Ausbeute an **59**).

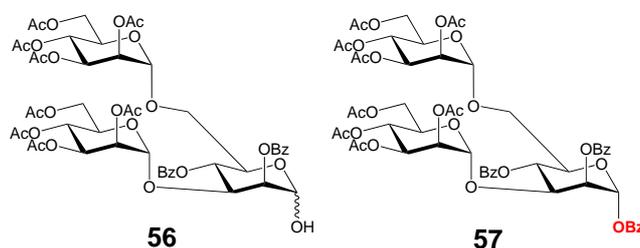


Abbildung 3.29: Produkte der Debenzylierung von **54**.^[67]

Zur Verknüpfung der Bausteine **50** und **59** wurde zunächst die Aktivierung mit Bortrifluorid-Diethyletherat versucht. Hierfür wurden mehrere Testreaktionen durchgeführt, um die optimalen Bedingungen zu finden. Es wurden sowohl die Temperatur und die Äquivalente des Aktivierungsmittels als auch des Donors variiert. Das Hauptproblem dieser Aktivierungsmethode bestand in der Bildung des Nebenprodukts **60** (Abbildung 3.31). Dieses konnte nur unter hohem Ausbeuteverlust durch Flashchromatographie abgetrennt werden. Weiterhin hydrolysierte der Donor **50** zu schnell zum Halbacetal **56**. Durch Verwendung von nur 1.1 Donoräquivalenten konnte die Bildung des Nebenprodukts **60** unterdrückt werden. Dennoch lag die Ausbeute nur bei 44.2 %.

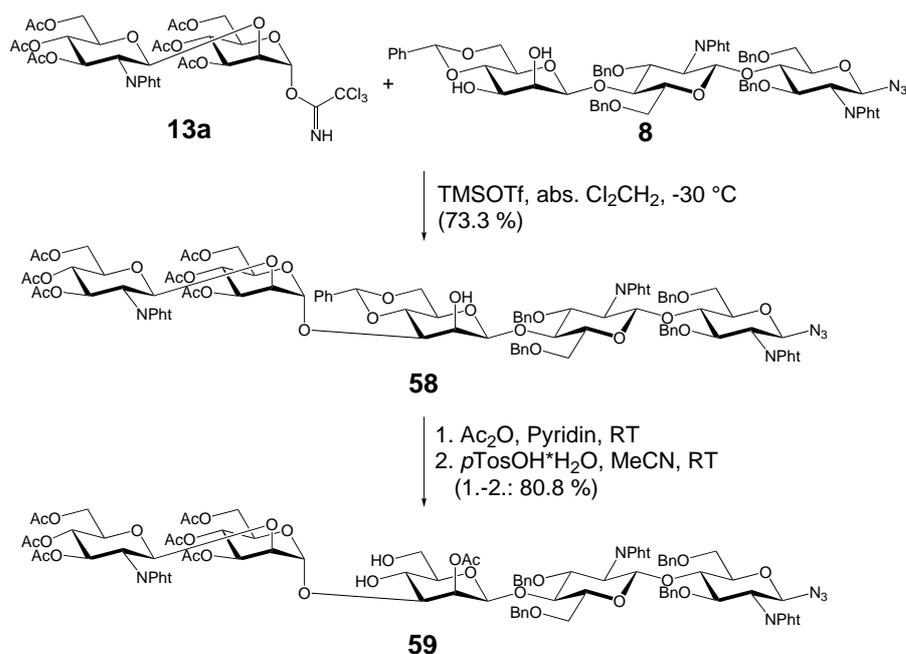


Abbildung 3.30: Gewinnung Pentasaccharids **59**.

Aufgrund der Nebenproduktbildung mit Bortrifluorid-Diethyletherat wurde eine Aktivierung mit TMSOTf getestet. In den ersten Versuchen wurden 1.4 Äquivalente des Donors eingesetzt, die mit 0.3 Äquivalenten TMS-Triflat aktiviert wurden. Bei einer Reaktionstemperatur von $-30\text{ }^\circ\text{C}$ konnten nur 39.0 % des Octasaccharids **61** gewonnen werden. Die geringe Ausbeute ließ sich hier vor allem darauf zurückführen, dass der aktivierte Donor zum Halbacetal **56** reagierte. Dies konnte per LC-MS nachgewiesen werden. Daher wurde die Menge an Aktivierungsreagenz reduziert. Eine Verringerung der Menge an eingesetztem Donor **50** sollte zudem der Bildung des Dimers **60**, die in vorhergehenden Versuchen auftrat, entgegenwirken. Bei Einsatz von 1.2 Äquivalenten **50** und einer Aktivierung durch 0.08 Äquivalenten TMSOTf konnte eine Ausbeute von 86.3 % erreicht werden. Die Reaktionstemperatur lag bei $-40\text{ }^\circ\text{C}$. Bei der Wiederholung der Reaktion wurde durch LC-MS festgestellt, dass die Reaktionstemperatur entscheidend ist. Wenn das Temperaturfenster zu tief gewählt wird, entsteht der Orthoester **62** (Abbildung 3.32). Dessen Bildung kann umgangen werden, wenn die Reaktion bei $-30\text{ }^\circ\text{C}$ gestartet wird. Ist der Akzeptor **59** laut Dünnschichtchromatographie vollständig umgesetzt, kann die Reaktion langsam auf Zimmertemperatur erwärmt werden. Somit konnte die Bildung des Orthoesters **62** unterbunden werden und die Reaktion verlief reproduzierbar in Ausbeuten zwischen 70 und 80 %.

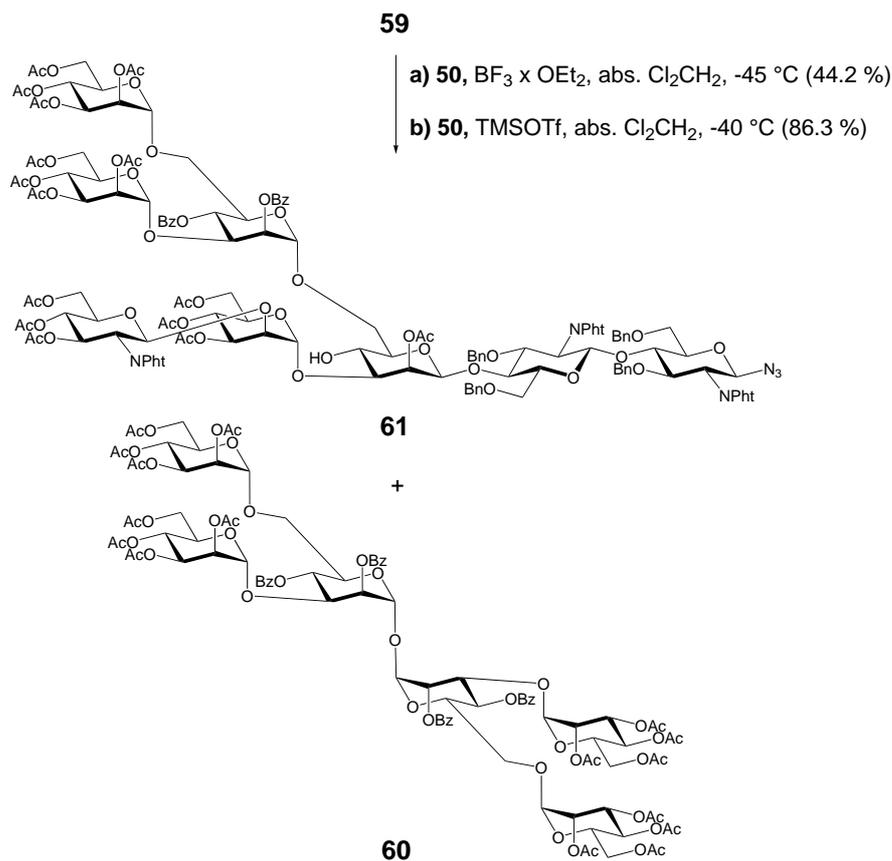


Abbildung 3.31: Synthese des Octasaccharids **61**.

Für die weitere Verwendung sollte das gewonnene Octasaccharid **61** entschützt werden (Abbildung 3.33). Um den Erhalt der anomeren Azidfunktion zu gewährleisten, wurde die Debenzylierung ebenfalls unter oxidativen Bedingungen mit Natriumbromat und Natriumdithionit durchgeführt (vgl. Kapitel 3.3.1).^[67] Bei der Verwendung von 15.0 Äquivalenten Natriumbromat, 12.5 Äquivalenten Natriumdithionit und einer 74 mM Saccharid-Lösung erfolgte allerdings keine vollständige Debenzylierung. Erneuter Umsatz des unvollständig debenzylierten Produktes nach Peracetylierung nach der gleichen Vorschrift führte zur vollständigen Debenzylierung. Trotz der oxidativen Bedingungen kann es zur sauren Hydrolyse des Azids und somit zur Bildung des Halbacetals kommen. Um eine unvollständige Debenzylierung zu vermeiden, wurden die Äquivalente an $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ und NaBrO_3 erhöht. Unter Einsatz von 18 Äquivalenten Natriumbromat und 15 Äquivalenten Natriumdithionit konnten direkt alle Benzylschutzgruppen entfernt werden. Dabei wurde die Saccharidkonzentration in Ethylacetat auf 30 mM reduziert. Die anomere Azidfunktion blieb laut ESI-MS erhalten.

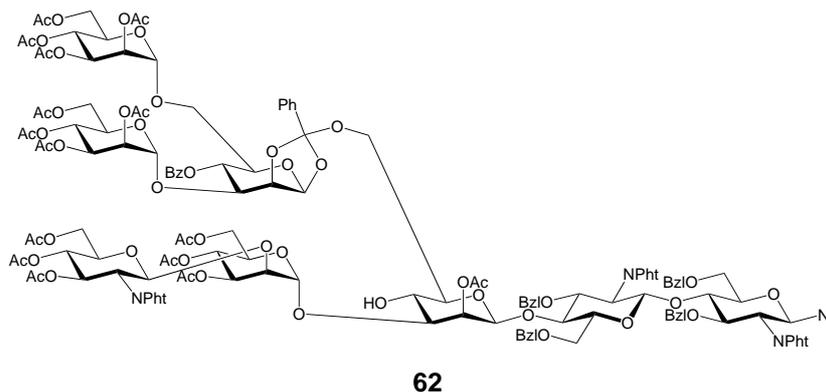


Abbildung 3.32: Intermediärer Orthoester **62** bei der Synthese des hybridischen Octasaccharids **61**.

Die basenlabilen Schutzgruppen wurden durch Erhitzen mit Ethylendiamin in *n*-Butanol entfernt.^[128] In einer Testreaktion wurde die Entschützung bei 80 °C über Nacht durchgeführt. Die Analyse via ESI-MS zeigte jedoch, dass ein Teil des Octasaccharids noch einfach benzoat vorlag. Es handelte sich hierbei vermutlich um das sterisch schwer zugängliche Benzoat an O-4 der 1,6-verknüpften α -Mannose. Eine verlängerte Reaktionszeit (zwei Tage) zeigte das gleiche Bild. Das benzoyleerte Glycan konnte bei der abschließenden Gelfiltration abgereichert werden. Durch die Probleme während der Entschützung konnte nur eine Ausbeute von 17.0 % für das freie Glycosylazid **63** erhalten werden.

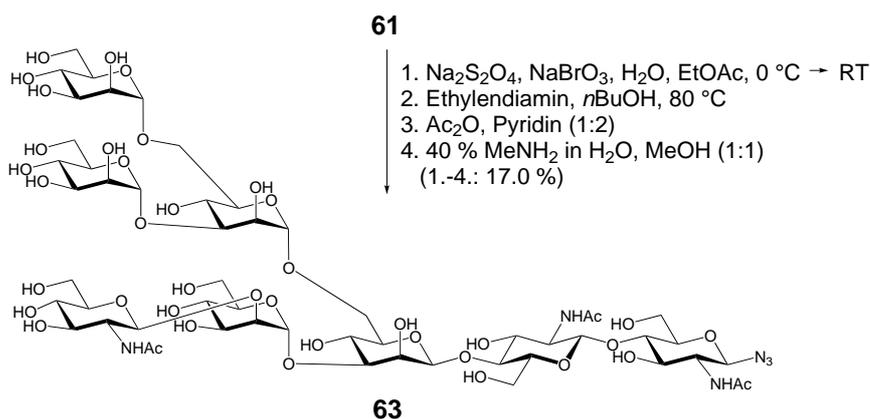


Abbildung 3.33: Entschützung des hybridischen Saccharids **61**.

Ab diesem Punkt wurden zwei Lösungswege verfolgt. Der erste Weg ging über die Synthese des Trimannosids unter Vermeidung der Benzoylfunktionen. Der zweite Weg verfolgte die Optimierung der Entschützung.

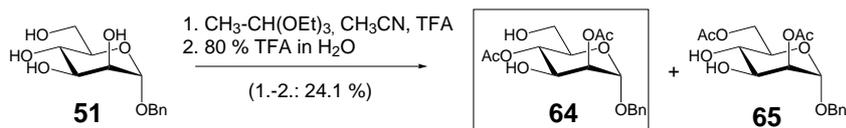


Abbildung 3.34: Darstellung des 2,4-acetylierten Mannosids **64**.

Für die Synthese eines verbesserten trimannosidischen Donors wurde eine selektive Acetylierung von **51** versucht (Abbildung 3.34). Es wurde Triethylorthoacetat eingesetzt, welches durch saure Katalyse zunächst den 2,3- und 4,6-Orthoester bildet. Nach Umlagerung mit 80 %iger Trifluoressigsäure konnte das 2,4-acetylierte Mannosid **64** in einer Ausbeute von 13 % gewonnen werden. Die Reinigung war bei dieser Reaktion ein kritischer Schritt. Erst durch den Einsatz von Dichlormethan/Methanol als Laufmittel bei der Flashchromatographie konnte das Regioisomer **65** abgetrennt und die Ausbeute auf 24.1 % gesteigert werden.

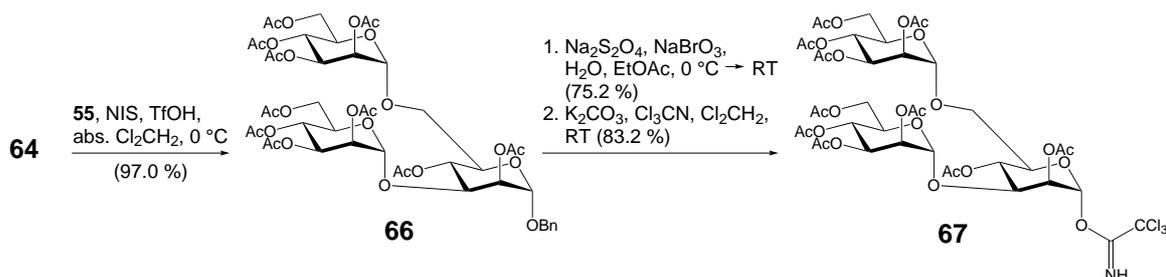


Abbildung 3.35: Synthese des Trisacchariddonors **67**.

Die Synthese des Trimannosids **66** erfolgte durch Umsetzung des Akzeptors **64** mit 4 Äquivalenten des Thioglycosiddonors **55** (Abbildung 3.35), 10 Äquivalenten *N*-Iodsuccinimid und 6 Äquivalenten Trifluormethansulfonsäure. Nach Flashchromatographie konnte das Trisaccharid **66** in einer sehr hohen Ausbeute (97.0 %) gewonnen werden.

Im nächsten Schritt wurde die Benzylschutzgruppe durch oxidative Debenzylierung entfernt. Dazu wurde das Trimannosid **66** mit 9.4 Äquivalenten Natriumbromat und 8.2 Äquivalenten Natriumdithionit umgesetzt. Das Halbacetal wurde in einer Ausbeute von 75.2 % erhalten und mit Trichloracetonitril im basischen Milieu zum Imidat **67** umgesetzt.

Der Donor **67** konnte auch durch Schutzgruppenmodifikation erhalten werden. Dazu wurde das benzylierte Trimannosid **54** zunächst basisch entschützt (Abbildung 3.36). Die Abspaltung der Esterfunktionen gelang sowohl mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung in Methanol, als

auch mit Hydrazinhydrat in Ethanol. Nach dem Einengen der Rohprodukte wurde jeweils das entschützte Trisaccharid peracetyliert und ohne weitere Reinigung an der anomeren Position debenzyliert. Bei beiden Reaktionsfolgen konnten die Benzoylschutzgruppen vollständig entfernt werden. Die Gesamtausbeute war mit dem Hydrazinhydrat-Schritt um 15.0 % höher (Abbildung 3.36). Jedoch war die Reproduzierbarkeit mit Natriumhydroxid deutlich besser. Dies lag möglicherweise an der Hygroskopie des Hydrazinhydrats. Dadurch wird die Reaktivität herabgesetzt bzw. die tatsächlich eingesetzte Menge ist nicht genau zu ermitteln. Das Halbacetal **68** konnte mit Trichloracetonitril im Basischen zum Imidat **67** umgesetzt werden.

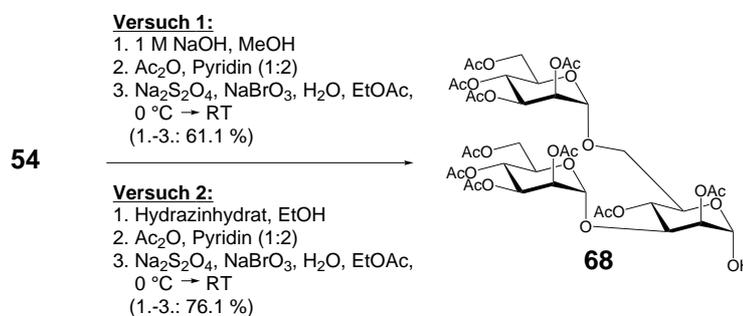


Abbildung 3.36: Schutzgruppenmodifikation für die Darstellung des Halbacetals **68**.

Schließlich wurde die Glycosylierung des Pentasaccharids **59** mit dem peracetylierten Donor **67** untersucht. Die Aktivierung erfolgte mit 0.08 Äquivalenten TMSOTf und 1.2 Äquivalenten des Donors **67**. Dabei stellte sich heraus, dass neben dem Zielprodukt **69** auch der Orthoester **70** entstand (Abbildung 3.37). Durch eine Veränderung der Reaktionstemperatur wurde versucht, die Nebenreaktion zu unterdrücken. Nach Aktivierung mit TMSOTf bei -30 °C und einer vollständigen Umsetzung laut Dünnschichtchromatographie wurde die Reaktionstemperatur auf Zimmertemperatur erhöht. Dies veränderte das Verhältnis von Produkt zu Orthoester nur leicht in Richtung des Octasaccharids **69** (Abbildung 3.38, a). Deswegen wurden mehr Äquivalente an Lewis-Säure sowie Trifluormethansulfonsäure als Aktivierungsreagens getestet. Dies hatte jedoch nicht den gewünschten Erfolg. Der Orthoester **70** konnte durch Flashchromatographie nicht abgetrennt werden (Abbildung 3.38, b). Deswegen wurde diese Synthesestrategie aufgegeben und die Optimierung der Entschützung des benzoylierten Octasaccharids **61** weiterverfolgt.

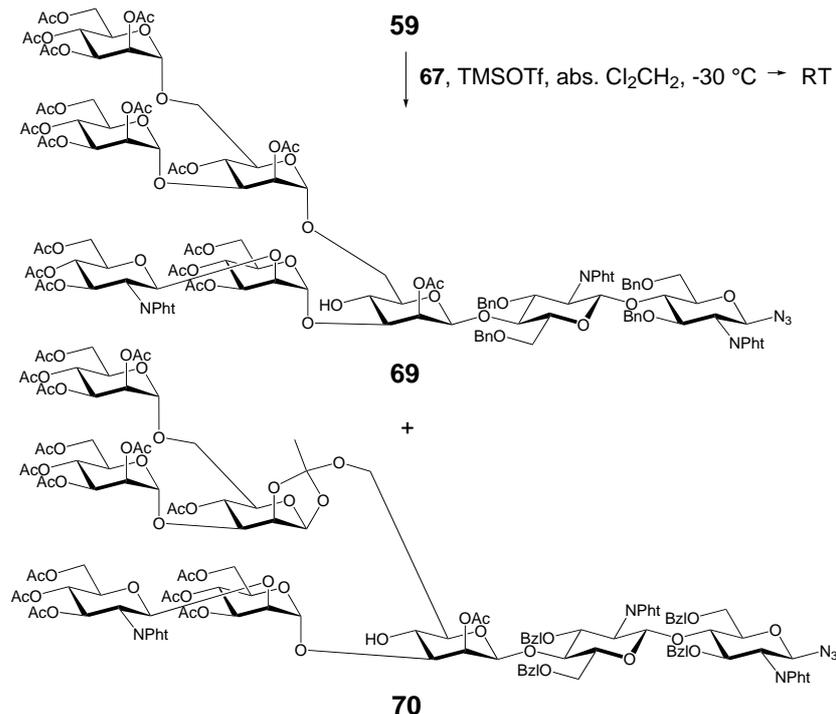


Abbildung 3.37: Glycosylierung mit dem peracetyliertem Donor **67**.

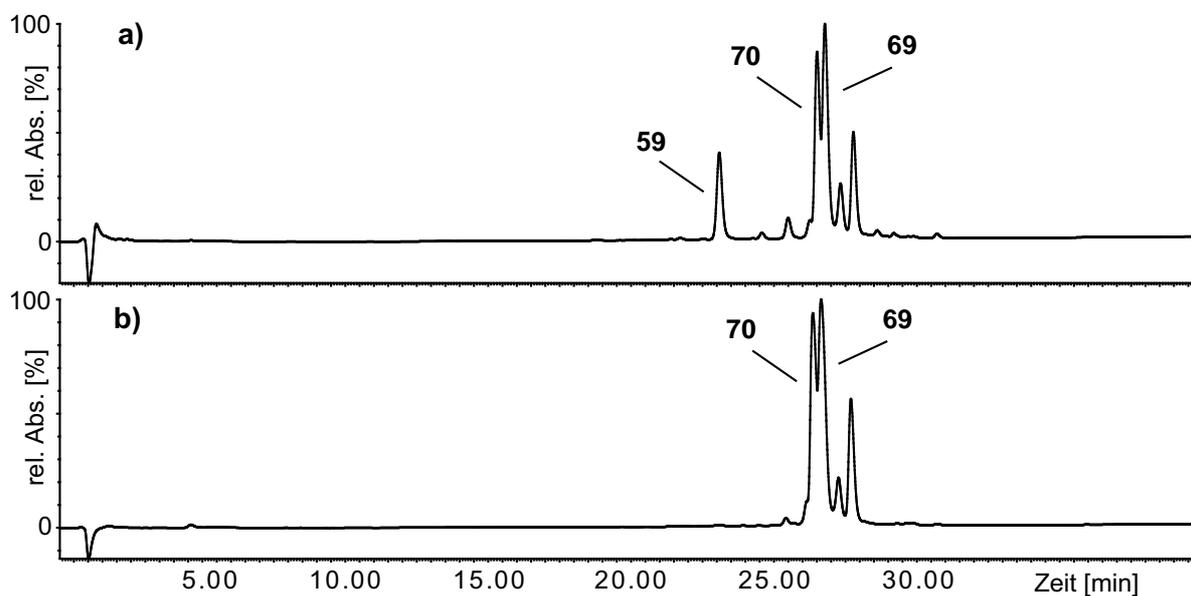


Abbildung 3.38: RP-HPLC Chromatogramm der Synthese des Octasaccharids **69** über den peracetylierten Donor **67**; a) Rohprodukt; b) nach Flashchromatographie.

Es wurde versucht die Bedingungen für die Entschützung des Trisaccharids **54** auf das Octasaccharid **61** anzuwenden. In Abbildung 3.39 sind die Entschütungssequenzen dargestellt. Zunächst erfolgte eine oxidative Debenzylierung. Im Anschluss wurde mit Hydrazinhydrat in

Ethanol bei 80 °C eine globale Entschützung durchgeführt (Versuch 1). Anschließend folgte eine Peracetylierung und eine selektive Des-*O*-Acetylierung.

Im zweiten Versuch wurde nach der Debenzylierung erst eine globale Entschützung mit Ethylendiamin in *n*-Butanol durchgeführt. Dies war notwendig, um die Phthalimidoschutzgruppen abzuspalten. Die vollständige Debenzoylierung konnte dann mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung erzielt werden. Nach Einengen des Rohprodukts erfolgte eine Peracetylierung und anschließende Desacetylierung. Mit beiden Entschützungsvorschriften konnte das freie Glycan **63** in ähnlicher Ausbeute gewonnen werden. Eine unvollständige Entschützung konnte nicht festgestellt werden. Die Glycane waren laut NMR rein, jedoch zeigte eine LC-MS Messung über eine Hydrosphere C18-RP-Säule noch Verunreinigungen. Durch Festphasenextraktion konnte die Reinheit des Octasaccharids **63** verbessert werden (Abbildung 3.40).

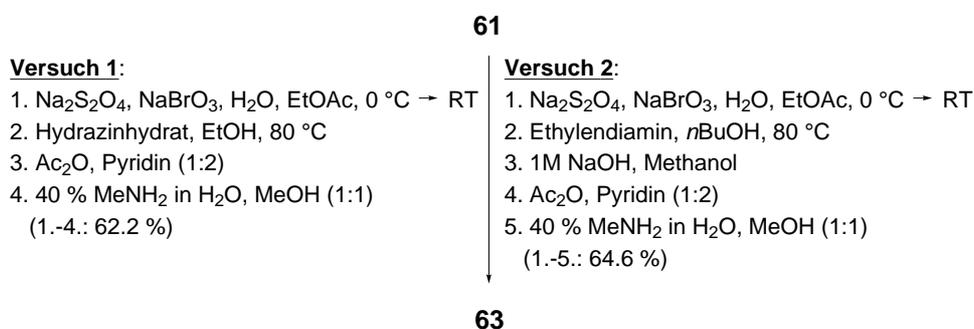


Abbildung 3.39: Versuche zur Optimierung der Entschützung von **61**.

Im letzten Schritt sollte das gewünschte mannosidische Heptasaccharid **35** durch enzymatischen Verdau aus **63** freigesetzt werden. Das Saccharid **63** wurde in 50 mM HEPES-Puffer (pH 6.0) gelöst und mit β -*N*-Acetylglucosaminidase versetzt (Abbildung 3.41). Nach zwei Tagen erfolgte eine Gelfiltration. Das ¹H-NMR-Spektrum deutete auf eine vollständige Umsetzung hin. Die LC-MS-Analyse zeigte jedoch noch vorhandenes Octasaccharid **63**. Eine erneute Umsetzung mit der Glycosidase hatte nicht den gewünschten Erfolg. Auch die Veränderung der Reaktionsbedingungen führte nicht zum Ziel. Eine Abtrennung des Edukts **63** sowohl über Festphasenextraktion als auch über Hydrosphere C18-RP-HPLC gelang nicht. Deswegen wurde das Gemisch aus **63** und **35** peracetyliert und flashchromatographisch getrennt. Nach Desacetylierung, Gelfiltration und abschließender HPLC-Reinigung konnte das Heptasaccharid **35** in einer guten Reinheit erhalten werden (Abbildung 3.42). Dies hatte jedoch eine Ausbeute von 30 % zur Folge.

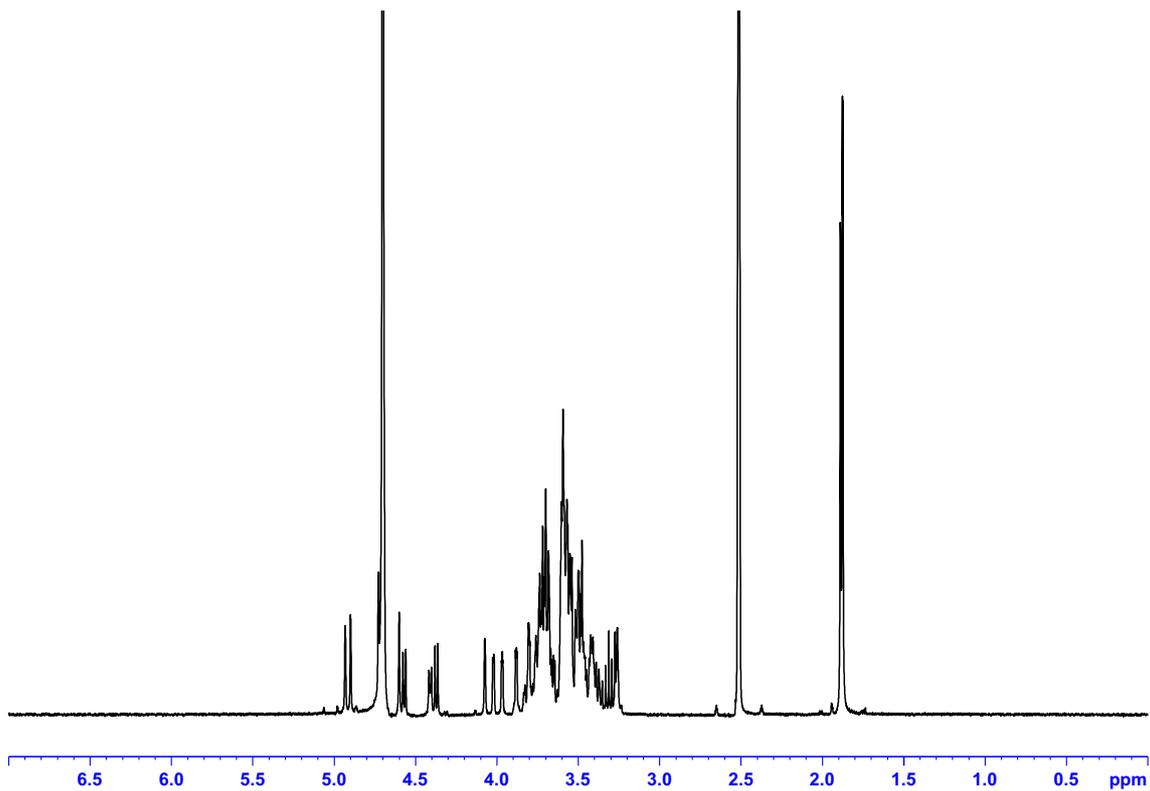


Abbildung 3.40: 500 MHz, ^1H -NMR-Spektrum des Glycanazids **63** in D_2O .

Aus diesem Grund sollte die Synthesestrategie des Heptasaccharidazids **35** weiter verbessert werden. Eventuell kann der abschließende enzymatische Schritt umgangen werden.^[129] Dabei liegt eine Schwierigkeit in der α 1,3-Mannosylierung des Core-Trisaccharids **8**. Monosaccharidendonoren erschweren die regioselektive Glycosylierung des Diols **8**.

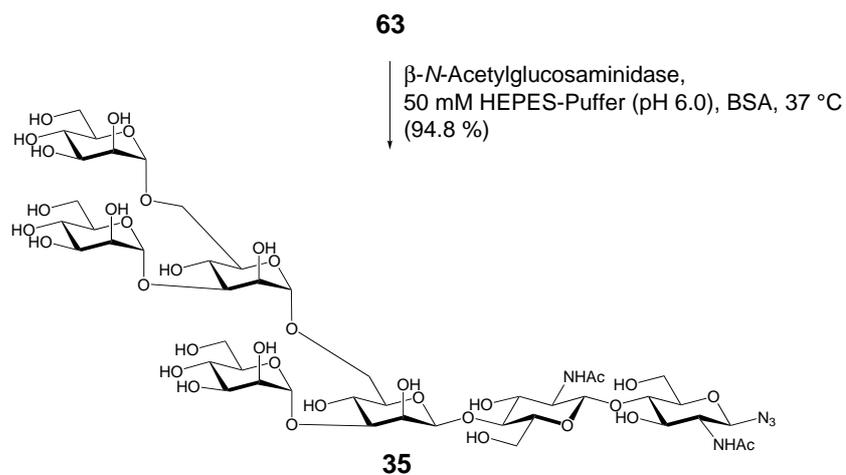


Abbildung 3.41: Enzymatischer Verdau des hybridischen Saccharids **63** zum mannosidischen Glycan **35**.

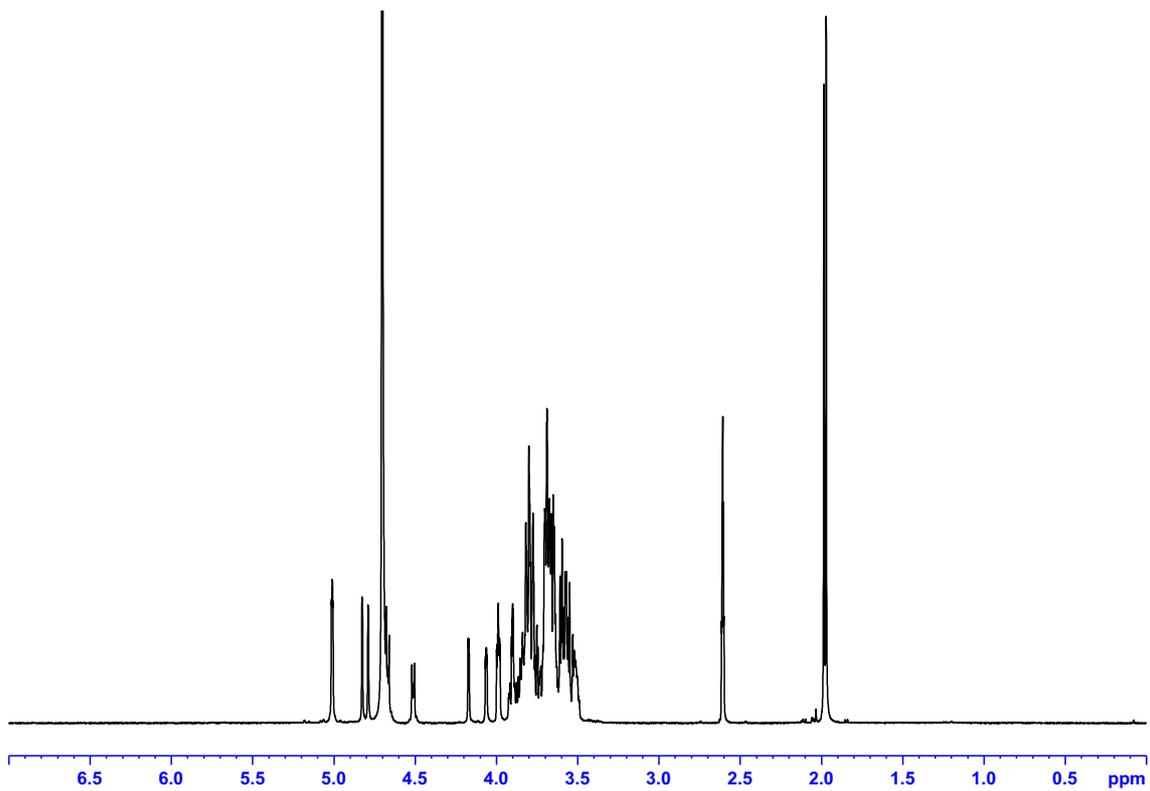


Abbildung 3.42: 500 MHz ¹H-NMR-Spektrum des gereinigten Glycanazids 35 in D₂O.

4 Biotinylierung von *N*-Glycanen

Bei der Immobilisierung von Glycanen für Bindungsstudien oder Lectinaufreinigungen wird häufig eine Derivatisierung an der anomeren Position eingesetzt. Eine Möglichkeit ist die Verknüpfung mit Biotin. Damit kann durch die Interaktion mit Streptavidin eine starke Bindung ausgebildet werden. Die biotinylierten Kohlenhydrate können z. B. auf Glycanarrays oder in Affinitätschromatographiesäulen immobilisiert werden.^[104]

4.1 Darstellung von biotinylierten Glycanen durch Amidkupplung

Die Verknüpfung der biantennären Glycosylazide **23** und **28** mit Biotin **71** sollte durch Amidkupplung versucht werden. In beiden Fällen wurde zunächst die Azidfunktion zum Halbaminal reduziert. Eine etablierte Methode ist die Reduktion im Basischen mit Propanedithiol in Methanol.^[77] Die Bildung des Halbaminals konnte sehr gut mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt werden. Bei beiden Sacchariden konnte laut Dünnschichtchromatographie eine vollständige Umsetzung mit 60 Äquivalenten Propanedithiol und 10 Äquivalenten Diisopropylamin erzielt werden.

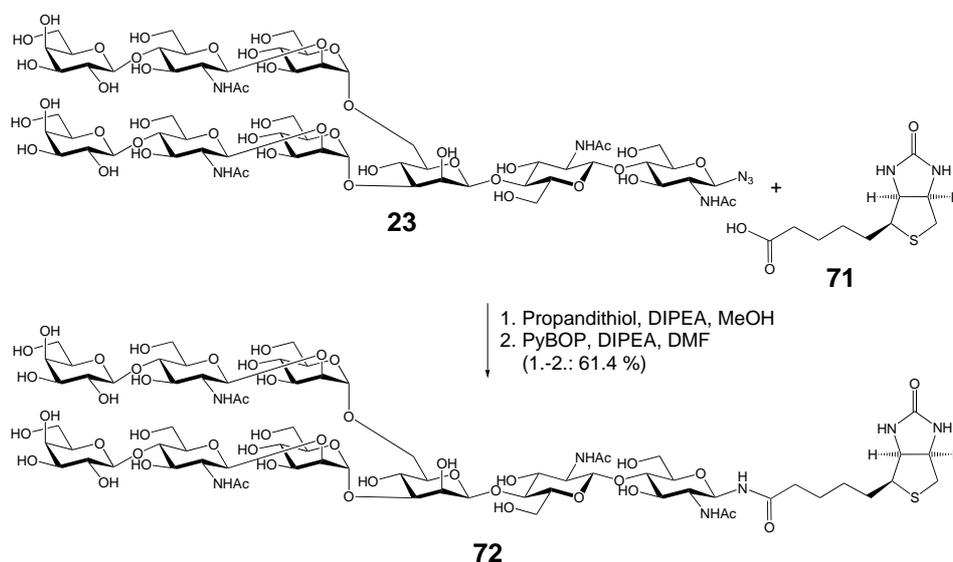


Abbildung 4.1: Verknüpfung des Nonasaccharids **23** mit Biotin **71** über Amidkupplung.

Anschließend wurde Biotin **71** unter PyBOP-Aktivierung gekuppelt. Bei der Umsetzung des reduzierten Nonasaccharids wurden 3 Äquivalente Biotin mit 3 Äquivalenten PyBOP einge-

setzt (Abbildung 4.1). Hierbei war zu beachten, dass der pH-Wert im Basischen lag. Dies konnte mit 2.3 Äquivalenten Diisopropylethylamin eingestellt werden. Als Lösungsmittel wurde *N,N*-Dimethylformamid gewählt. Nach zwei Tagen wurde das Rohprodukt durch Gel-filtration über eine *HiLoad* Superdex 30 Säule gereinigt. Es konnte eine Ausbeute von 61.4 % erzielt werden. Durch NMR konnte die β -Konfiguration an der anomeren Position des Biotin-konjugats **72** gezeigt werden.

Für die Kupplung des Undecasaccharidazids **28** wurde analog vorgegangen. Nach 21 h wurde eine Reinigung über eine C18-SepPak Kartusche mit 0.1 % Ameisensäure im Laufmittel durchgeführt. Danach wurde das Produkt **73** mit einer Ausbeute von 36.0 % erhalten (Abbildung 4.2). Die geringe Ausbeute beruhte auch auf der partiellen Hydrolyse der terminalen Sialinsäuren. Um diese Abspaltung zu unterbinden, wurde versucht die Carboxylgruppe der terminalen Neuraminsäuren zu schützen.^[130]

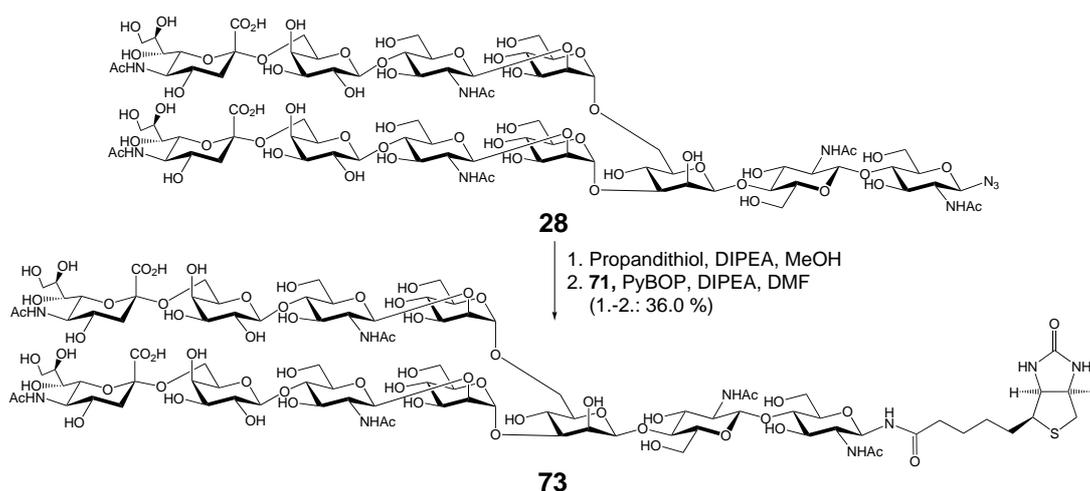


Abbildung 4.2: Verknüpfung des Glycosylazids **28** mit Biotin **71**.

Es wurde hierzu die Phenacylschutzgruppe getestet (Abbildung 4.3). Dabei wurde nach *Murakami et al.* vorgegangen.^[130] Das Glycosylazid **28** wurde in Wasser gelöst und durch Zugabe von Cäsiumcarbonat das Cäsiumsalz der Carbonsäure gebildet. Es wurde ein pH-Wert von 9.8 eingestellt und die Lösung wurde eingengt. Der Rückstand wurde in DMF aufgenommen und bei einer Saccharidkonzentration von 2.1 mM mit 3.6 Äquivalenten Phenacylbromid unter Argonatmosphäre umgesetzt. Unter diesen Bedingungen konnte das Produkt **74** nach acht Stunden mit Ether ausgefällt werden. Es folgte die Reinigung über eine C18-SepPak Kar-

tusche, wonach laut NMR-Analyse eine hohe Reinheit erzielt werden konnte. Die Ausbeute betrug 69.6 %.

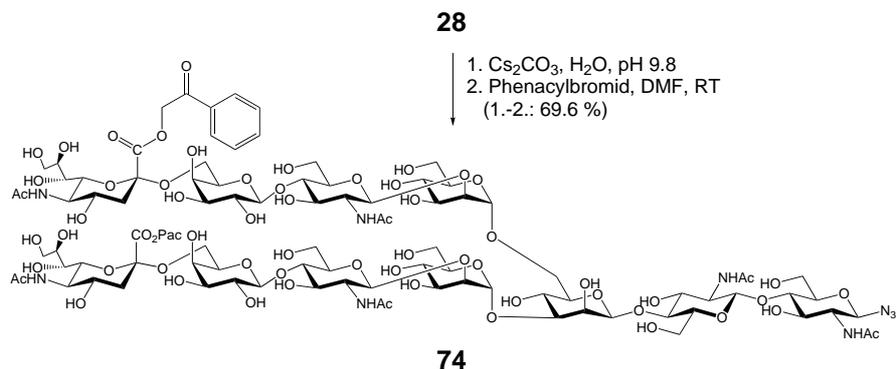


Abbildung 4.3: Einführen von Phenacylschutzgruppen an den Sialinsäuren des Undecasaccharids **28**.

Nach der Schützung der Sialinsäuren wurde das Glycan **74** mit Biotin **71** derivatisiert (Abbildung 4.4). Es wurden Bedingungen verwendet analog zur Umsetzung des ungeschützten Undecasaccharids **28**. Die Ausbeute lag bei 48.7 %.

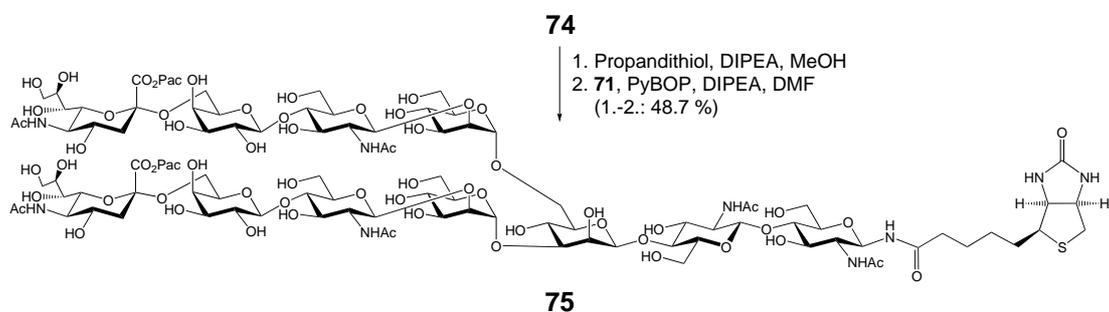


Abbildung 4.4: Verknüpfung des geschützten Glycosylazids **74** mit Biotin **71**.

4.2 Anwendung der Click-Chemie zur Biotinylierung von Glycanen

Als direkte Möglichkeit zur Derivatisierung von Aziden mit Biotin sollte die Azid-Alkin-Cycloaddition versucht werden.^[131] Dabei wurde nach *Lin et al.* vorgegangen.^[132] Zur Anknüpfung eines Alkins wurde die Carboxylgruppe von Biotin **71** zunächst mit *N*-Hydroxysuccinimid/1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid aktiviert und zum Bio-

tinpropargylamid **76** umgesetzt.^[132, 133] Nach Flashchromatographie konnte das Produkt **76** in einer Ausbeute von 72.9 % über zwei Stufen erhalten werden (Abbildung 4.5).

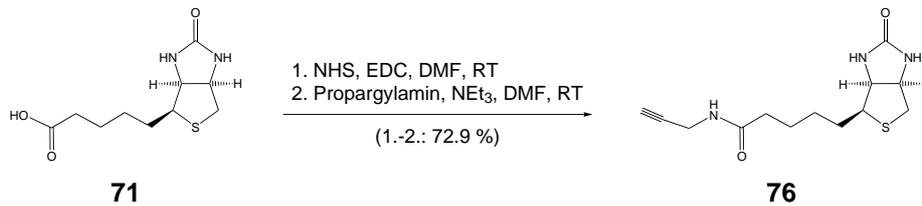


Abbildung 4.5: Synthese des Propargylamids **76**.

Die 1,3-dipolare Cycloaddition von Aziden mit Acetylenen zu 1,2,3-Triazolen ist kompatibel mit vielen funktionellen Gruppen. Die Reaktion ist auch in Wasser bei Zimmertemperatur durchführbar. Da es sich um einen additiven Mechanismus handelt, entstehen keine Nebenprodukte. Die Katalyse durch Kupfer ermöglicht eine hohe Regioselektivität.^[134, 135] Der Einsatz von Kupfer(I)-Salzen erlaubt es, ausschließlich das 1,4-Regioisomer herzustellen,^[134, 136] wohingegen das 1,5-Isomer sowie das 1,4,5-trisubstituierte 1,2,3-Triazol über die Katalyse mit Ruthenium-Komplexen erhalten werden.^[135] In der Kupfer(I)-katalysierten Reaktion werden häufig die Cu(I)-Salze *in situ* aus Cu(II) erzeugt. Dies gelingt durch Zugabe von Antioxidantien oder elementarem Kupfer zu einem Cu(II)-Salz.^[134]

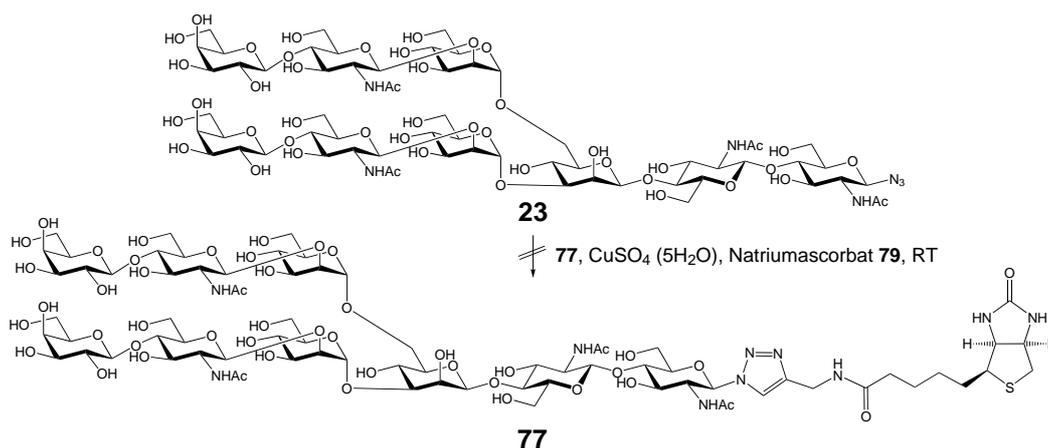


Abbildung 4.6: Umsetzung des Nonasaccharidazids **23** mit dem Biotinderivat **76** in Gegenwart von Kupfersulfat- und Natriumascorbat.

Eine Synthese von **77** wurde mit Kupfersulfat und Natriumascorbat **78** in Wasser versucht. Das Azid **23** wurde zunächst mit 2.5 Äquivalenten des Biotinderivats **76** umgesetzt. Es wurden 4.5

Äquivalente Kupfersulfat und 9 Äquivalente Natriumascorbat **78** verwendet.^[137] Unter diesen Bedingungen konnte keine Umsetzung zu **77** festgestellt werden (Abbildung 4.6). Laut LC-MS-Analyse fand eine partielle Hydrolyse des Saccharids **23** statt (Abbildung 4.7). Es konnten Fragmente des Oligosaccharids identifiziert werden.

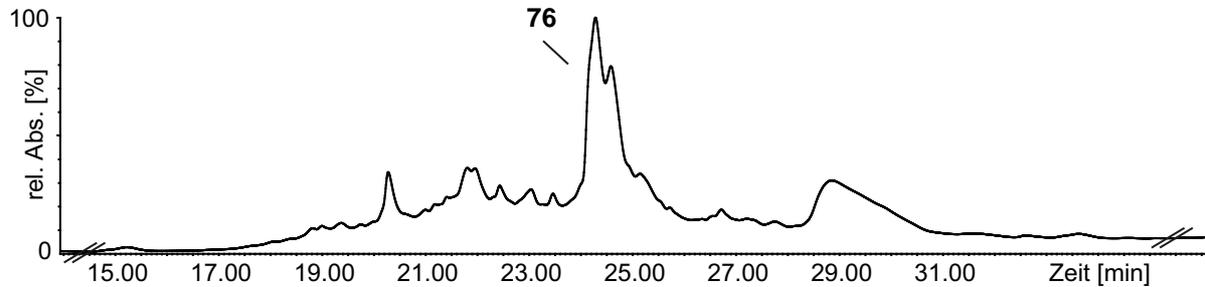


Abbildung 4.7: RP-HPLC Chromatogramm der Umsetzung von **23** und **76** mit Kupfersulfat und Natriumascorbat **78**.

Die Hydrolyse beruht möglicherweise darauf, dass Cu(I) unter Sauerstoff-Atmosphäre thermodynamisch instabil ist. Dadurch kann es zu Cu(II) und Cu(0) disproportionieren. Andererseits können durch die *Fenton*-Reaktion Radikale entstehen, welche die glycosidischen Bindungen angreifen können.^[138–140] In Abbildung 4.8 sind mögliche Radikalbildungen dargestellt. Besonders die Kombination aus Wasserstoffperoxid und Kupfersulfat führt zum spezifischen Abbau von Sacchariden an *N*-Acetylglucosaminen.^[140] Um dies zu umgehen, wurde zunächst versucht, Argon als inerte Atmosphäre zu verwenden. Damit konnte die Hydrolyse jedoch nicht vollständig unterbunden werden, da das entstehende Ascorbat-Radikal ebenfalls glycosidische Bindungen spalten kann.^[141]

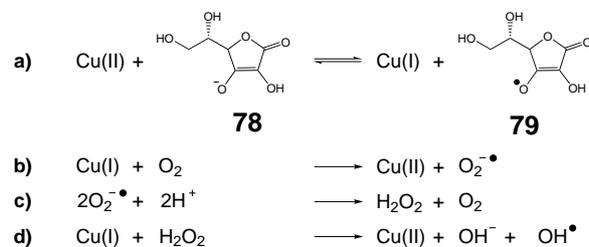


Abbildung 4.8: Radikalreaktionen, welche zur Hydrolyse von Glycanen beitragen; a) Bildung von Cu(I) durch Natriumascorbat **78**; b) Entstehung von Superoxiden; c) Wasserstoffperoxid Bildung durch die Superoxid-Radikale; d) Regeneration von Cu(II).

Mit weniger Äquivalenten an Kupfersulfat und Natriumascorbat **78** bildete sich zwar das Produkt **77**, jedoch wurden auch Fragmente des Saccharids **23** gefunden. Deswegen wurde die Reaktion mit stabilen Kupfer(I)-Komplexen durchgeführt.^[142–144] Damit konnte auf den Einsatz des Reduktionsmittel verzichtet werden, da Cu(I) direkt zu der Reaktion gegeben wurde. Weiterhin stabilisierten die Liganden das Kupfer(I), wodurch die Disproportionierung verhindert und das Arbeiten ohne Schutzgas-Atmosphäre ermöglicht wurde. Als Kupfer(I)-Quelle diente Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)hexafluorophosphat. Als Ligand wurde TBTA **80** verwendet (Abbildung 4.9).

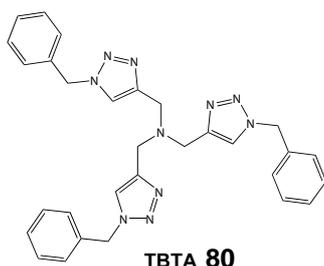


Abbildung 4.9: Ligand TBTA **80** für Azid-Alkin-Cycloadditionen.

Es wurden jeweils 0.1 Äquivalente des Liganden **80** und des Cu(I)-Komplexes eingesetzt. Diese wurden zusammen 30 min inkubiert, was zwischen TBTA **80** und Cu(I) zu einem stabilen Komplex führte.^[145] Aufgrund der schlechten Löslichkeit des Liganden **80**, des Kupfer(I)-Komplexes ($[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$) sowie des Biotinderivats **76** wurde für die Reaktion ein Gemisch aus Wasser/Dimethylsulfoxid (1:1) eingesetzt (Abbildung 4.10, a).

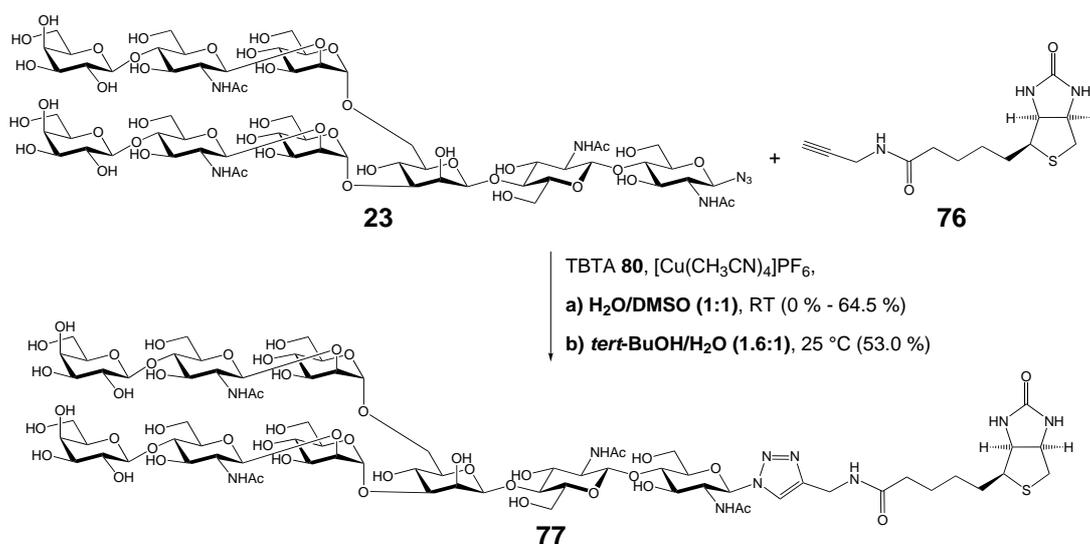


Abbildung 4.10: Verwendung des Cu(I)-Liganden TBTA **80** für die Synthese des Konjugats **77** in unterschiedlichen Lösungsmitteln.

Laut LC-MS-Analyse konnte ein guter Umsatz, aber auch die Bildung eines Nebenprodukts bemerkt werden (Abbildung 4.11). Die Ausbeute lag bei 64.5 %. Jedoch wurde festgestellt, dass größere Umsetzungen zu mehr Nebenprodukt führten. Bei einer Umsetzung von 100 mg **23** wurde fast ausschließlich Nebenprodukt gebildet. Daher wurde die Reaktion mit *N*-Acetylglucosaminazid **26** optimiert.

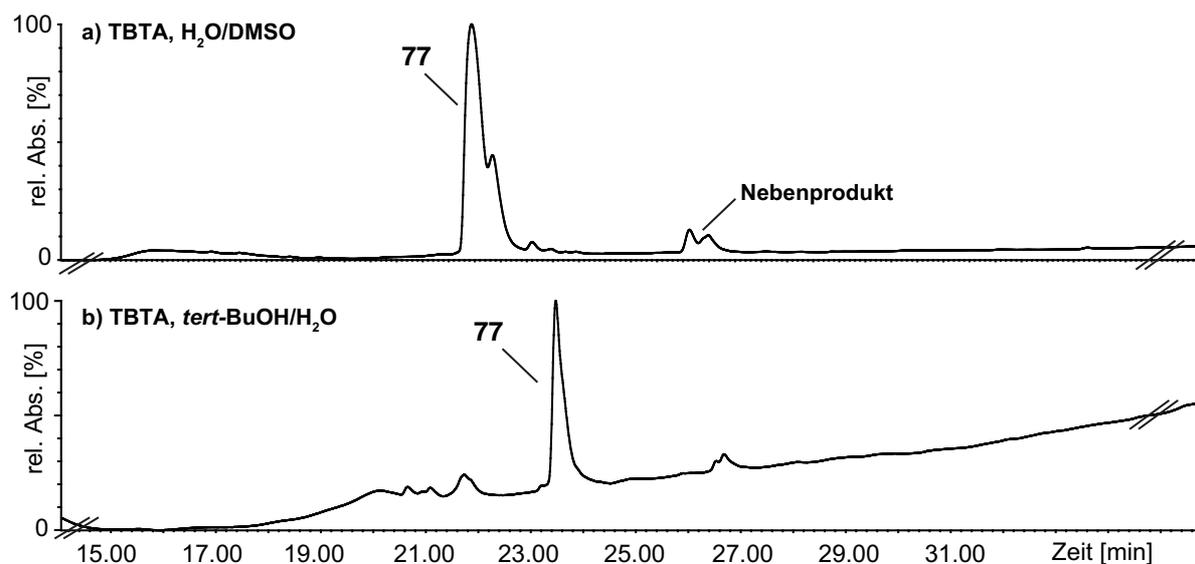


Abbildung 4.11: RP-HPLC Chromatogramme der Synthese des biotinylierten Nonasaccharids **77** unter Einsatz von TBTA **80**; a) Reaktion in Wasser/DMSO; b) Reaktion in *tert*-Butanol/Wasser.

Zunächst wurde aus dem peracetylierten Monosaccharid **81** GlcNAc-Azid **26** nach *Zemplén* freigesetzt (Abbildung 4.12).^[146] Dieses wurde mit **76** umgesetzt. Auch hierbei bildete sich ein Nebenprodukt, welches ein höheres Molekulargewicht aufwies und unpolarer war. Es stellte sich die Frage, ob die Bildung des Nebenprodukts abhängig von dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid war. Deswegen wurden vergleichende Reaktionen mit unterschiedlichen Verhältnissen an Wasser und Dimethylsulfoxid durchgeführt (Abbildung 4.13).

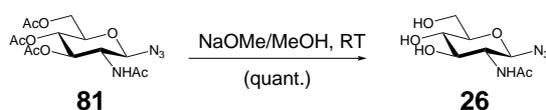


Abbildung 4.12: Synthese des *N*-Acetylglucosylaminazids **26**.

4 Biotinylierung von *N*-Glycanen

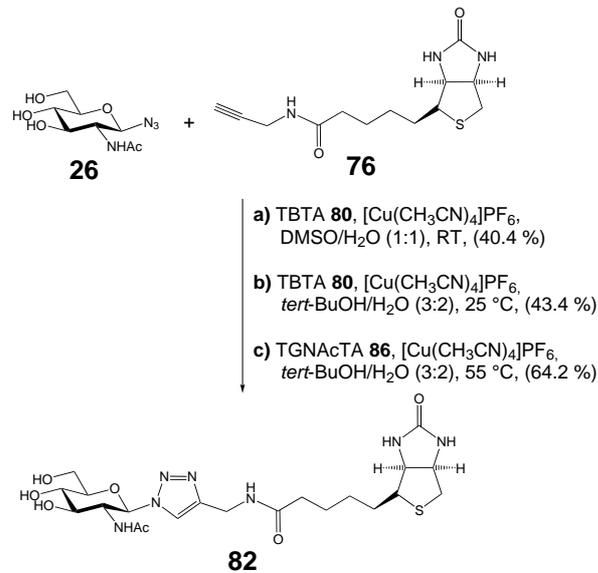


Abbildung 4.13: Biotinylierung des GlcNAc-Azids **26** mit verschiedenen Liganden.

In Abbildung 4.14 sind die LC-Chromatogramme der Reaktionen mit 25 %, 50 %, 75 % und 100 % Dimethylsulfoxid abgebildet. Bei 25 % und 100 % DMSO war die Bildung des Nebenprodukts am größten. Bei einer Wiederholung der Reaktionen wurden die gleichen Ergebnisse erhalten. Das LC-Chromatogramm des Versuches mit 100 % Dimethylsulfoxid zeigte aufgrund des Lösungsmittels andere Retentionszeiten (Abbildung 4.14, d).

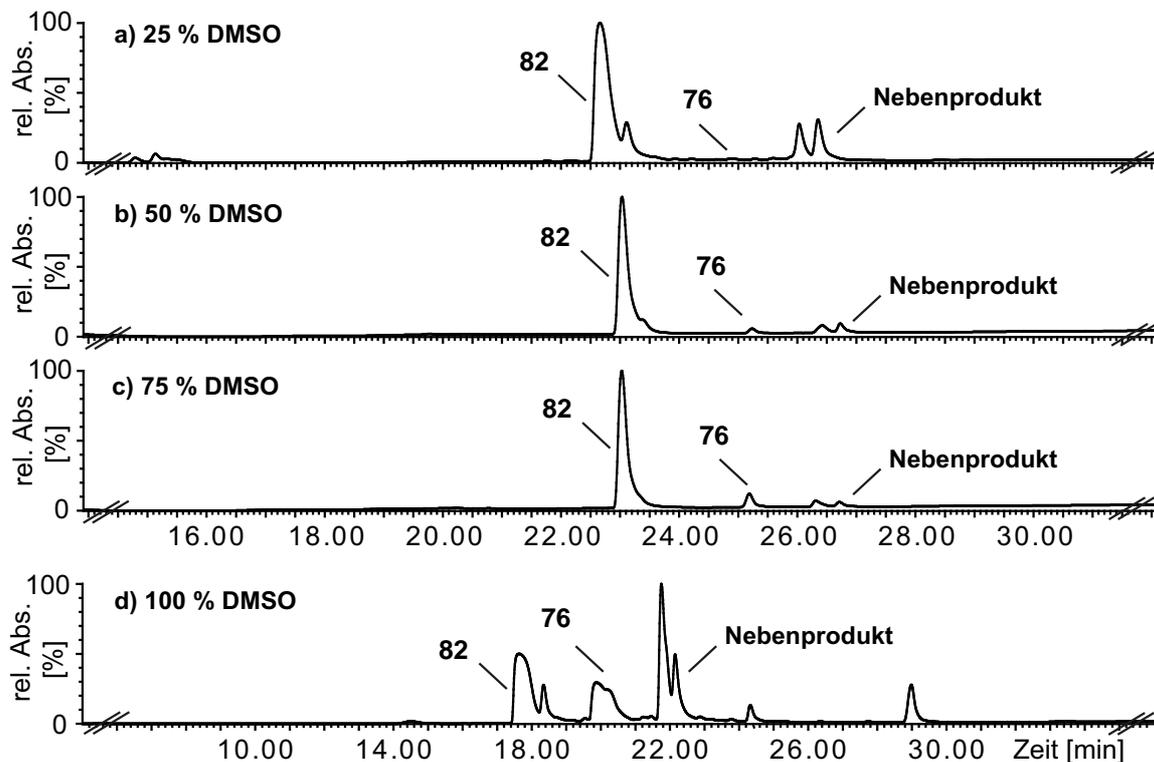


Abbildung 4.14: Testreaktionen mit GlcNAc-Azid **26** in Dimethylsulfoxid-Wasser-Mischungen.

Wegen der Bildung von Nebenprodukten in DMSO wurde die Click-Reaktion mit *tert*-Butanol/Wasser im Verhältnis (3:2) durchgeführt. Aufgrund des niedrigen Schmelzpunktes von *tert*-Butanol wurde eine Reaktionstemperatur von 25 °C eingestellt, da sich sonst ein Gel ausbildete. Weiterhin verlangsamte sich die Reaktion, so dass mindestens zwei Tage für eine vollständige Umsetzung gerührt werden musste. Bei der Reaktion mit dem Azid **26** (Abbildung 4.13, Versuch 2) konnte keine Nebenproduktbildung gefunden werden. Auch bei der Reaktion mit dem Nonasaccharidazid **23** (Abbildung 4.10, b) konnte kein Nebenprodukt nachgewiesen werden. Das LC-Chromatogramm der Reaktion ist in Abbildung 4.11 (b) dargestellt. Die Ausbeute des Biotinderivats **77** lag bei 53.0 %, wobei sowohl das Glycanazid **23** als auch das Biotinderivat **76** bei der abschließenden Gelfiltration zurückgewonnen werden konnten.

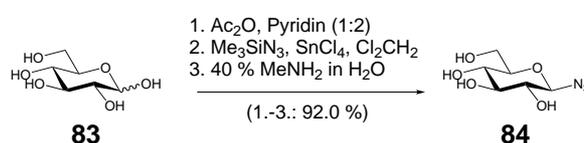


Abbildung 4.15: Synthese des Glucosylazids **84**.

Die organischen Lösungsmittel waren bei den Click-Reaktionen notwendig, um den Liganden **80** sowie die Kupfer(I)-Quelle zu lösen. Mit einem in Wasser löslichen Liganden sollte die lösungsmittelabhängige Nebenproduktbildung umgangen werden können. Sobald die Cu(I) Quelle in Kontakt mit dem Liganden kommt, sollte es einen stabilen Komplex mit diesem bilden. Die Wahl fiel auf zwei Tris(triazoyl)-Liganden mit Kohlenhydratfunktionen,^[147] die in Form der Monosaccharidazide **26** und **84** eingebracht werden sollten.

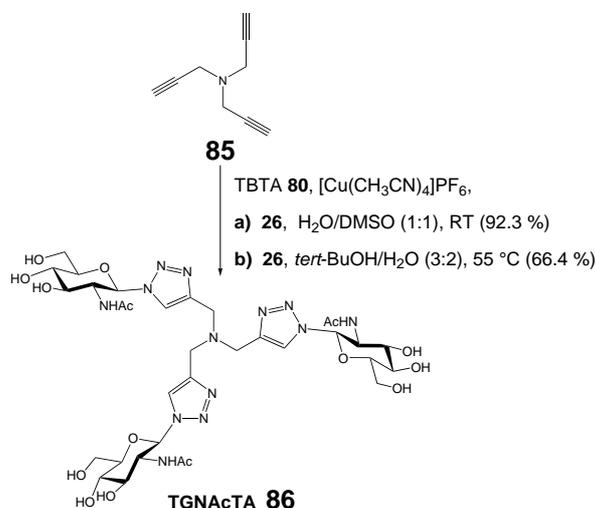


Abbildung 4.16: Synthese des wasserlöslichen Liganden **86**.

Zunächst wurde Glucose **83** acetyliert (Abbildung 4.15). Ohne Reinigung des Rohprodukts erfolgte die Azidierung an der anomeren Position.^[148] Hierbei wurde das Peracetat mit 3.6 Äquivalenten Zinn(IV)tetrachlorid und 5.6 Äquivalenten Trimethylsilylazid versetzt. Anschließend wurden die Acetylschutzgruppen mit 40 % Methylamin in Wasser abgespalten.

Ausgehend von den Glycosylaziden **84** und **26** sollten durch eine dreifache Click-Reaktion mit Trispropargylamin **85** die Liganden **86** und **87** dargestellt werden. Je 0.1 Äquivalente des benzylierten Liganden **80** wurden mit je 0.1 Äquivalenten $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$ zur Komplexierung zusammengegeben. Es wurden 100 mM Saccharid-Lösungen in Wasser/Dimethylsulfoxid (v/v 1:1) sowie *tert*-Butanol/Wasser (v/v 3:2) hergestellt und mit je 3 Äquivalenten Trispropargylamin **85** versetzt. Die unterschiedlichen Lösungsmittelgemische wurden verglichen um eine Nebenproduktbildung auszuschließen. Zum Start der Reaktionen wurde der Ligand **80**/Cu(I)-Komplex zu den Sacchariden gegeben. Nach beendeter Umsetzung wurde das Produkt durch Gelfiltration über *Hi Load* Superdex 30 bzw. über HPLC gereinigt und durch NMR und LC-MS charakterisiert. Die Synthese des Liganden TGNACta **86** gelang am besten in Wasser/Dimethylsulfoxid 1:1, was zu einer Ausbeute von 92.3 % führte (Abbildung 4.16). Dagegen benötigte die Reaktion in *tert*-Butanol/Wasser 11 Tage bis es zu einer vollständigen Umsetzung kam. Mit Wasser/Dimethylsulfoxid konnte die Reaktion nach einem Tag aufgearbeitet werden. Sowohl NMR als auch ESI-MS zeigten eine hohe Reinheit des Liganden in beiden Reaktionen. Die Entstehung von Nebenprodukten wurde nicht beobachtet. Die Herstellung des Liganden TGTA **87** verlief in *tert*-Butanol/Wasser 3:2 besser (Abbildung 4.17). Dabei konnte eine Ausbeute von 76.7 % im Vergleich zu 68.2 % in Wasser/Dimethylsulfoxid erzielt werden.

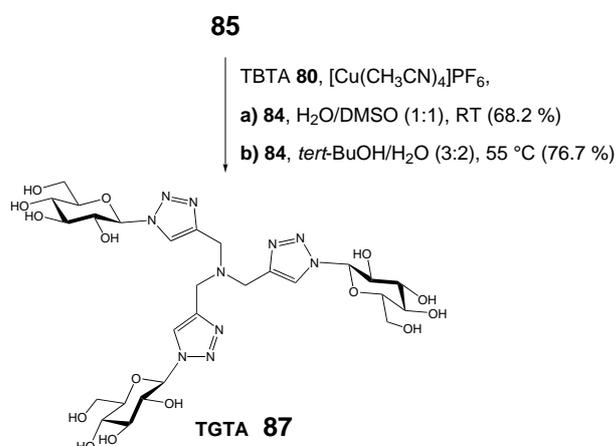


Abbildung 4.17: Synthese des wasserlöslichen Liganden **87**.

Abschließend wurden die Liganden **87** und **86** für die Umsetzung des Nonasaccharidazids **23** getestet. In Abbildung 4.18 ist die Reaktion mit dem Glucose-Liganden **87** dargestellt. Beide Liganden führten zu dem Produkt **77** mit gleicher Ausbeute. Es konnte keine Bildung von Nebenprodukten nachgewiesen werden (Abbildung 4.19). Die Ausbeute von 54.0 % kam durch die geringe Löslichkeit des Biotinderivats **76** zustande. Nicht umgesetztes Edukt konnte durch Gelfiltration zurückgewonnen werden.

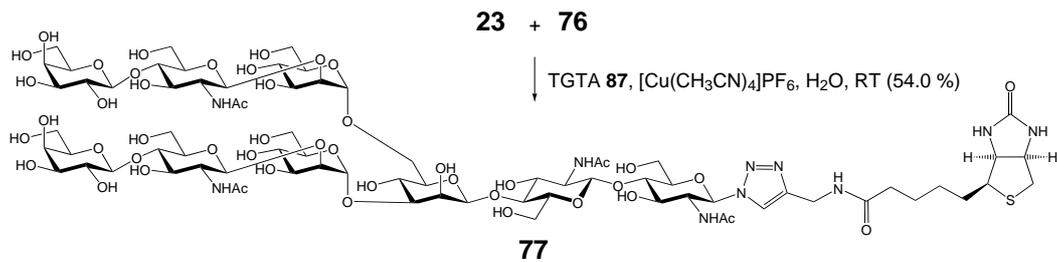


Abbildung 4.18: Verwendung von TGTA **87** für die Synthese des Konjugats **77**.

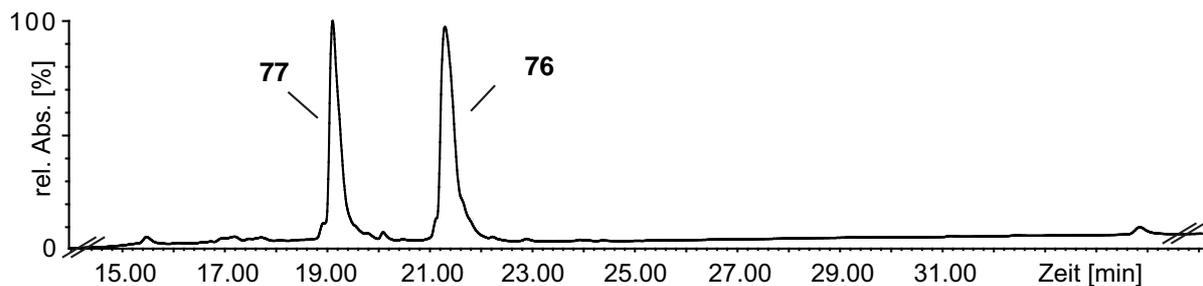


Abbildung 4.19: RP-HPLC-Chromatogramm der Reaktion zu **77** unter Verwendung des Liganden **87**.

5 Aminofunktionalisierung für Glycanarrays

Eine Möglichkeit die Bindung von Glycanen an Proteine zu untersuchen, bieten Microarrays (vgl. Kapitel 1.4). *Eller* konnte eine Bibliothek von multiantennären *bisected N*-Glycanen aufbauen, wobei alle Glycane einen *N*-Alkoxyglycosidspacer (Abbildung 1.12) trugen.^[59] In Vorarbeiten von *Eller, Hoffman, Niemi*etz und *Ott* konnte festgestellt werden, dass dieser Spacer unter sauren Bedingungen instabil ist.^[59, 61, 62, 149] Insbesondere wenn enzymatische Veränderungen der gespacerten Glycane durchgeführt werden sollen, kann das ein großer Nachteil sein.

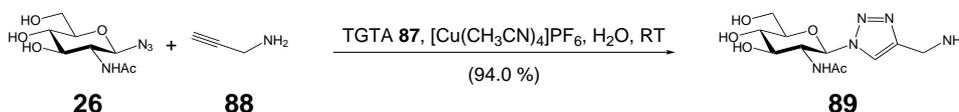


Abbildung 5.1: Synthese der Testverbindung **89** für den Säure-Stabilitätstest von Triazoliden.

Deswegen sollten ω -Aminoalkinspacer mit Saccharidaziden verknüpft werden. Dabei wurden die optimierten Bedingungen aus Kapitel 4.2 verwendet. Die ω -Aminoalkine wiesen eine ausreichende Wasserlöslichkeit auf, so dass die Click-Reaktionen ohne organische Lösungsmittel stattfinden konnten. Die Stabilität der entstehenden Triazolide war sowohl bei 100 %iger Essigsäure als auch mit bis zu 50 %iger Trifluoressigsäure über mehrere Tage gewährleistet.^[150] Dies wurde mit dem gespacerten Triazolid **89** getestet, welches mit TGTA **87**/Cu(I) aus dem Azid **26** und Propargylamin **88** hergestellt wurde fig:glcnacprop.^[150] Die Stabilität des *N*-Glycosids **89** ist auch auf die Aromatizität des Triazol-Rings zurückzuführen.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Kupfer(I)-Liganden TGNAcTA **86** und TGTA **87** für die Verknüpfung des Azids **23** mit Propargylamin **88** geeignet sind (Abbildung 5.2). Dafür wurden drei Bedingungen verglichen. Die Reaktionen wurden in einer 100 mM Lösung des Nonasaccharidazids **23** in Wasser durchgeführt. Der Spacer **88** wurden in dreifachem Überschuss eingesetzt mit jeweils 0.1 Äquivalenten an Kupfer(I)-Komplex und Ligand. Nach einem Tag erfolgte die Reinigung durch Größenausschlusschromatographie. Die Umsetzung mit den wasserlöslichen Liganden **87** sowie **86** verliefen sehr ähnlich und führten zu einer um ca. 10 % höheren Ausbeute als mit dem benzylierten Ligand **80**. Eine Nebenproduktbildung wurde nicht beobachtet.

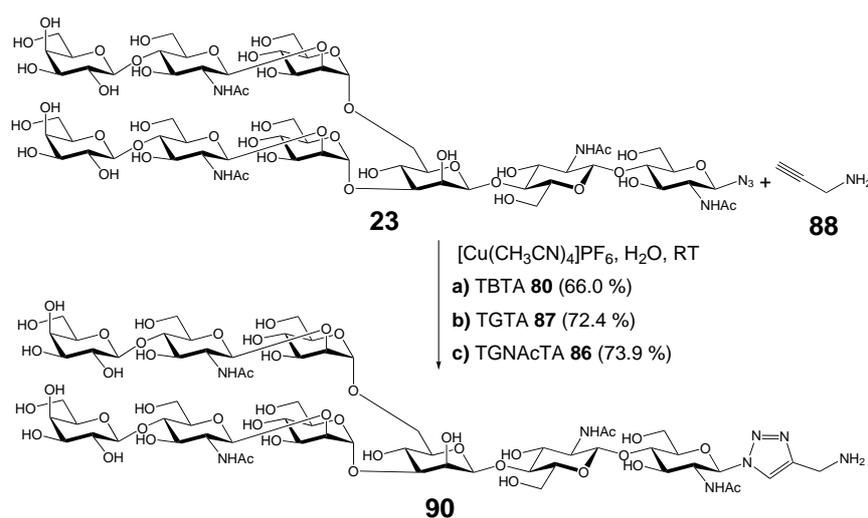


Abbildung 5.2: Anknüpfen von Propargylamin **88** unter Verwendung verschiedener Kupfer-(I)-Liganden.

Die folgenden Reaktionen wurden mit dem glucosylierten Liganden **87** durchgeführt, da dieser leichter im Großmaßstab hergestellt werden konnte als der GlcNac-Ligand **86**. Eine erneute Kupplung des Propargylspacers **88** mit TGTA **87** an das Nonasaccharid **23** erbrachte eine Ausbeute von 93.0 %.^[150]

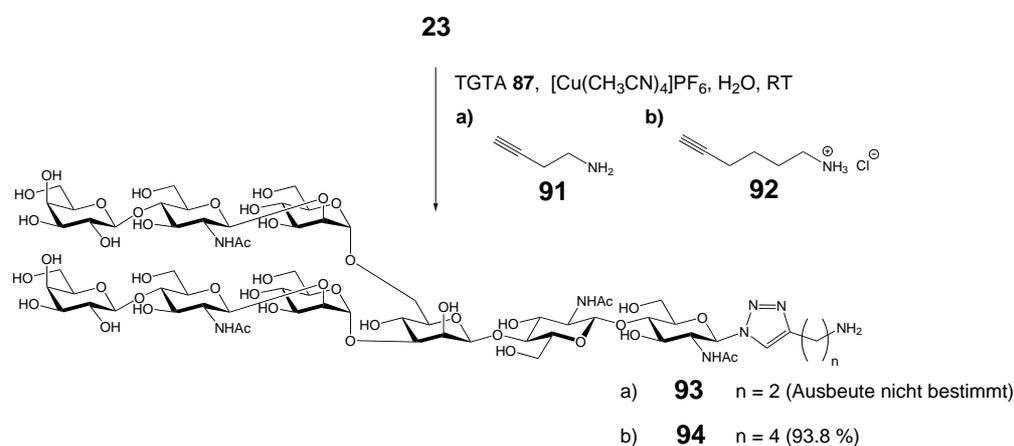


Abbildung 5.3: Click-Kupplung der ω -Aminoalkyne **91** und **92** mit dem biantennären Glycanazid **23**.

Neben dem Propargylamin **88** sollten auch ω -Aminobutin **91** sowie ω -Aminohexin **92** als Spacer verwendet werden (Abbildung 5.3).^[150] Dabei konnte eine Ausbeute von 93.8 % an dem gespacerten Nonasaccharid **94** erzielt werden. Die Kupplung des Butinylspacers **91** war nicht erfolgreich. Die Umsetzung war nicht vollständig und es wurden diverse Nebenprodukte

gebildet. Es konnte nur ein Gemisch an Nonasaccharidazid **23** sowie gespacertem Glycan **93** isoliert werden. Die Reinheit der gespacerten *N*-Glycane hängt auch von der Reinheit der eingesetzten ω -Aminoalkine ab. Das Butinylamin **91** konnte nur in einer 95 %igen Reinheit bezogen werden. Propargylamin **88** und Hexinylaminhydrochlorid **92** lagen in 98 % Reinheit vor. Um einheitliche ω -Aminoalkine für die Reaktionen einzusetzen, reinigte *Balk* Propargylamin **88** sowie Aminobutin **91** als Hydrochlorid.^[116] *Balk* war damit in der Lage, das butingespacerte Nonasaccharid **93** zu isolieren. Jedoch konnte nur eine Ausbeute von 55.3 % erhalten werden.

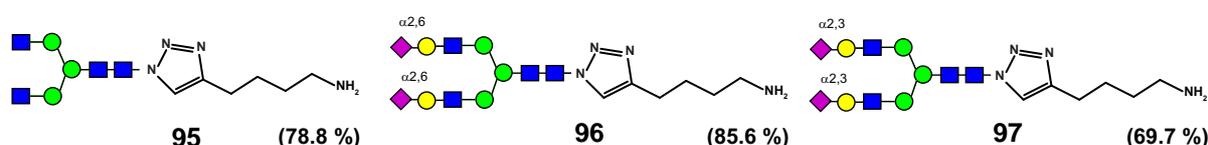


Abbildung 5.4: Anknüpfen des Hexinylspacers **92** an die biantennären Glycane **19**, **28** und **98**.

Der Typ des verwendeten Spacers kann die Glycan-Protein-Bindung beeinflussen.^[151–154] In Abhängigkeit des gewählten Linkers können Artefakte auf Glycanarrays hervorgerufen werden. Der Linker ist für die Präsentation des Saccharids auf der Oberfläche verantwortlich, daher sollten möglichst natürliche Bedingungen nachgeahmt werden. Durch die Länge und Flexibilität des Linkers können die Interaktionen mit der Oberfläche und das Bindungsverhalten gesteuert werden.^[154] Der Propargylaminspacer **88** weist eine geringe Flexibilität und Länge auf, was die Präsentation der Glycane beeinflussen könnte. Daher wurden mehrere Glycanazide zunächst mit Hexinylamin **92** modifiziert. Dabei sollte auch die Anwendbarkeit der Click-Reaktion auf unterschiedliche Glycane mit und ohne terminale Sialinsäuren sowie der Einfluss von Core-Modifikationen getestet werden.

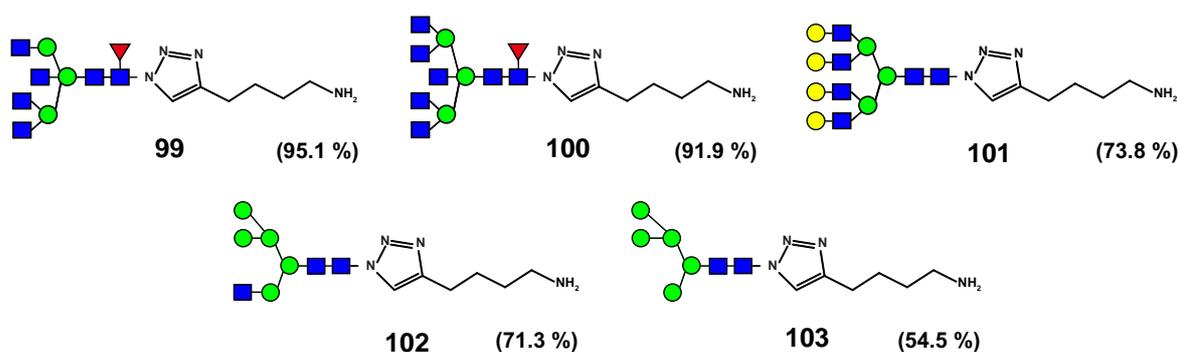


Abbildung 5.5: Anknüpfung des Hexinylamin-Spacers **92** an multiantennäre Glycane.

Sowohl das Heptasaccharid **19** als auch die beiden Undecasaccharide **28** und **98** konnten unter den optimierten Click-Bedingungen umgesetzt werden (Abbildung 5.4). Nebenreaktionen, insbesondere bei den sialylierten Verbindungen, konnten nicht festgestellt werden. Die Ausbeuten waren durchweg gut. Anschließend wurden fünf weitere Glycane modifiziert, die im Verzweigungsgrad und den Core-Modifikationen variierten (Abbildung 5.5). Sowohl eine Core-Fucosylierung als auch ein *bisecting* GlcNAc-Rest beeinflussen die Reaktion nicht. Die Cycloaddition zu dem tetraantennären Konjugat **101** sowie zu den mannosidischen Verbindungen **102** und **103** ergaben eine etwas niedrigere Ausbeute, was durch eine längere Reaktionszeit möglicherweise verbessert werden kann.

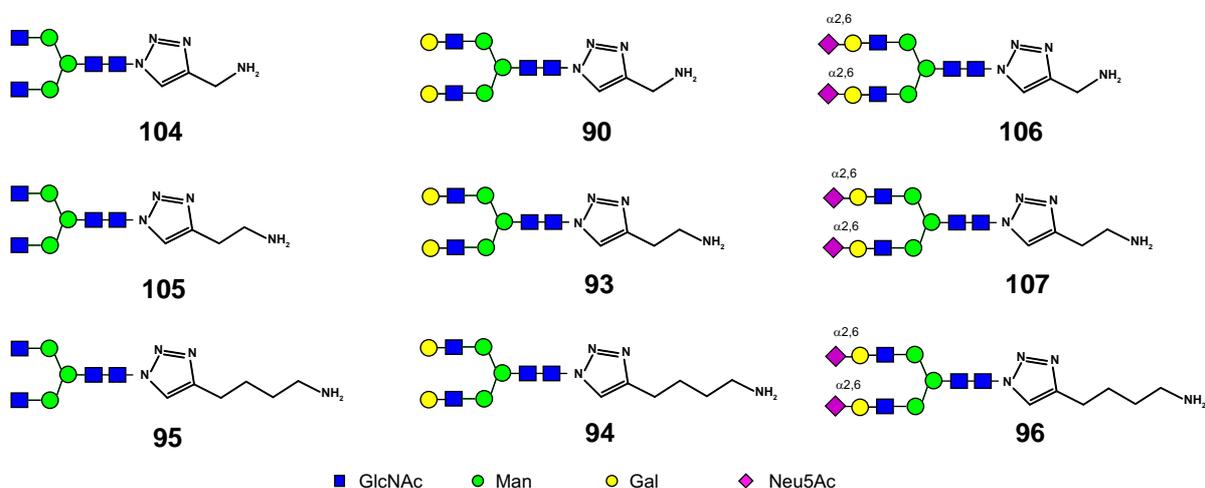


Abbildung 5.6: Von Balk synthetisierte Bibliothek biantennärer Glycankonjugate.^[116]

Anschließend sollte eine Bibliothek biantennärer *N*-Glycane mit den drei verschiedenen Spacern hergestellt und auf NHS-aktivierte Glasträger gedruckt werden. *Balk* stellte je drei Triazolderivate des Hepta-, Nona- und Undecasaccharids in ausreichender Menge dar (Abbildung 5.6).^[116] Die Arbeitsgruppe von *Nicolai Bovin* (Moskau, Russland) immobilisierte die neun Verbindungen mit Triazolspacern auf einen aktivierten Glasträger. Referenzverbindungen wurden zusätzlich gedruckt. Das Heptasaccharid **108** und das Nonasaccharid **109** trugen einen Glycinamidspacer. Es wurde als Negativkontrolle ein ungespacertes Glycan eingesetzt, welches nicht an die Oberfläche binden sollte. Damit sollte das Hintergrundsignal der Microarray-Messungen bestimmt werden. Der Glycanarray wurde mit acht Lectinen getestet. Die Spezifitäten der Lectine sind der Tabelle 5.1 zu entnehmen. Weiterhin wurde eine Mischung von Immunglobulinen (CIP) verwendet, welche IgG, IgM und IgA enthält.

Tabelle 5.1: Spezifitäten der eingesetzten Lectine für die Glycanarrayanalyse.

Lectin	Spezifität
MAL II	Sialinsäure
ConA	Mannose
ECL	Galactose
SNA	Sialinsäure
GSL II	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GNL	Mannose
PHA-L	β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,6]- α -Man-1,6- β -Man-1,4
GSL	Galactose

In Abbildung 5.7 ist zu erkennen, dass die Mischung aller acht Lectine (blau) in allen Verbindungen ein hohes Signal induziert. Dies entsprach den Erwartungen. Das Bindungsmuster der geklickten Verbindungen (**90**, **93**, **94**, **95**, **104** und **105**) ist vergleichbar mit den Referenzverbindungen **108** und **109**, wobei die Intensitäten der Butinyl-derivate **93** und **105** niedriger waren als bei den Propargyl- **90** und **104** und Hexinyl-derivaten **94** und **95**. Dies könnte daran liegen, dass Verunreinigungen in den Butinylverbindungen vorlagen, da die Reinigung mit dem Butinylspacer schwierig war. Insgesamt fiel auf, dass die Bindung von Concanavalin A (ConA) nur an den Triazol-Glycanen auftritt. Dies könnte an einer Interaktion mit dem Triazolring liegen, könnte aber auch auf abgebaute Glycane hindeuten. Enthalten diese endständige Mannosen, so können sie von ConA erkannt werden. Das Hexinyl-derivat des Undecasaccharids **96** zeigte keine Interaktion mit ConA.

Nach entsprechender Optimierung ist das Anbringen eines Spacers mittels Click-Chemie leicht und schnell durchzuführen. Es konnten hohe Ausbeuten erreicht werden, was beim Einsatz geringer Mengen wertvoller Verbindungen essentiell ist. Propargylamin **88** und Hexinylamin **92** lieferten bei der Synthese bessere Ergebnisse als Butinylamin **91**. Das gleiche Bild zeigte sich bei den Intensitäten auf dem Array. Jedoch sollte die Reinheit der Verbindungen geprüft und gegebenenfalls erhöht werden, um mögliche Artefakte sicher zu eliminieren.

5 Aminofunktionalisierung für Glycanarrays

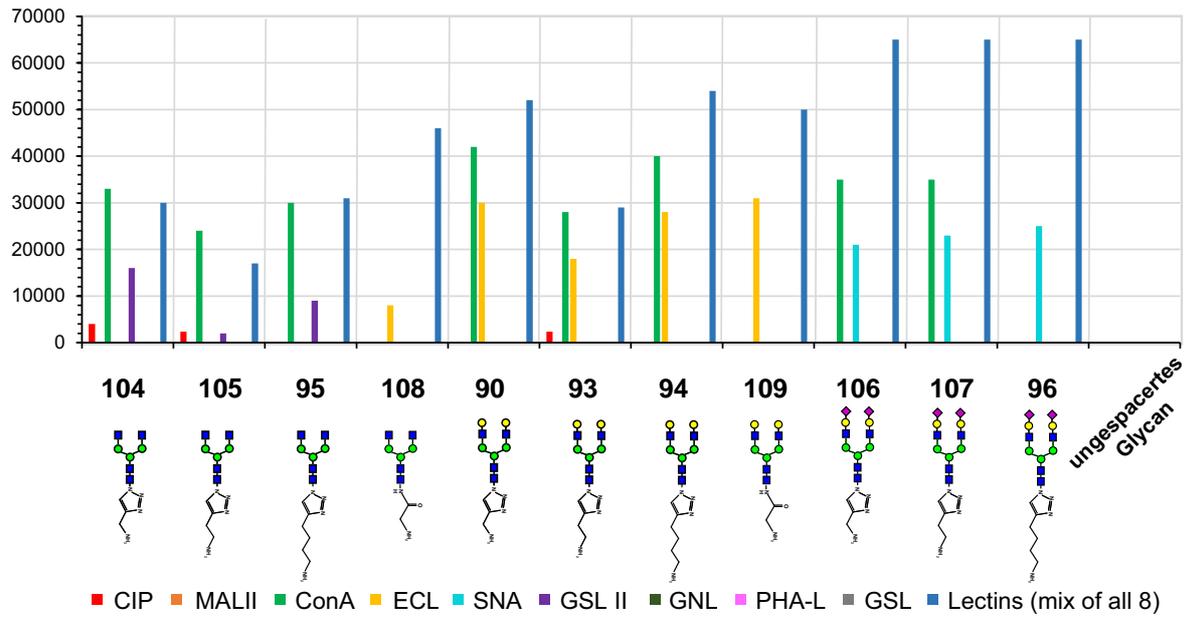


Abbildung 5.7: Bibliothek biantennärer Glycankonjugate im Microarray-Test.

6 Synthese von Fluorophorkonjugaten

Eine Möglichkeit das Bindungsverhalten von Glycanen in Lösung zu studieren, bietet die Anwendung von Fluorophorderivaten. Das Derivat kann z. B. in der Fluoreszenzkorrelationspektrometrie eingesetzt werden, mit der Bindungsstudien von glycanbindenden Proteinen durchgeführt werden können.^[155] Diese Methode wurde vorwiegend für die Untersuchung der Interaktion von Peptiden und Proteinen verwendet.^[156, 157] Auch die Anwendung in der Microfluidik^[158, 159] oder *in vitro* Studien sind vorstellbar.

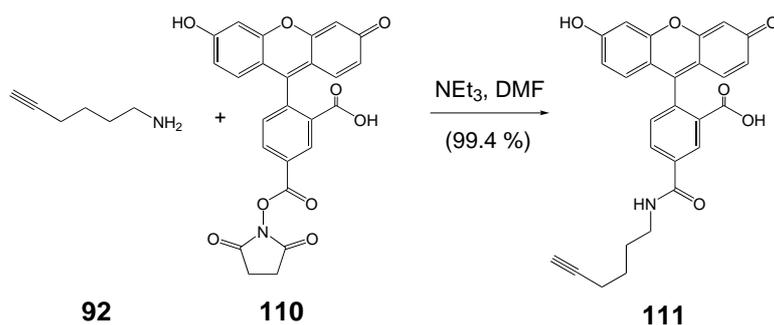


Abbildung 6.1: Synthese des Fluoresceinderivats **111**.

Zur Untersuchung von Galectinen sollten multiantennäre *N*-Glycane mit terminalen Galactosen mit dem Fluoresceinderivat **111** modifiziert werden. Die Synthese des Alkins **111** erfolgte aus dem Aktivester **110** und Hexinylamin **92** unter basischen Bedingungen (Abbildung 6.1). Der Umsatz der Reaktion war nach 22 h vollständig und ergab eine Ausbeute von 99.4 %.

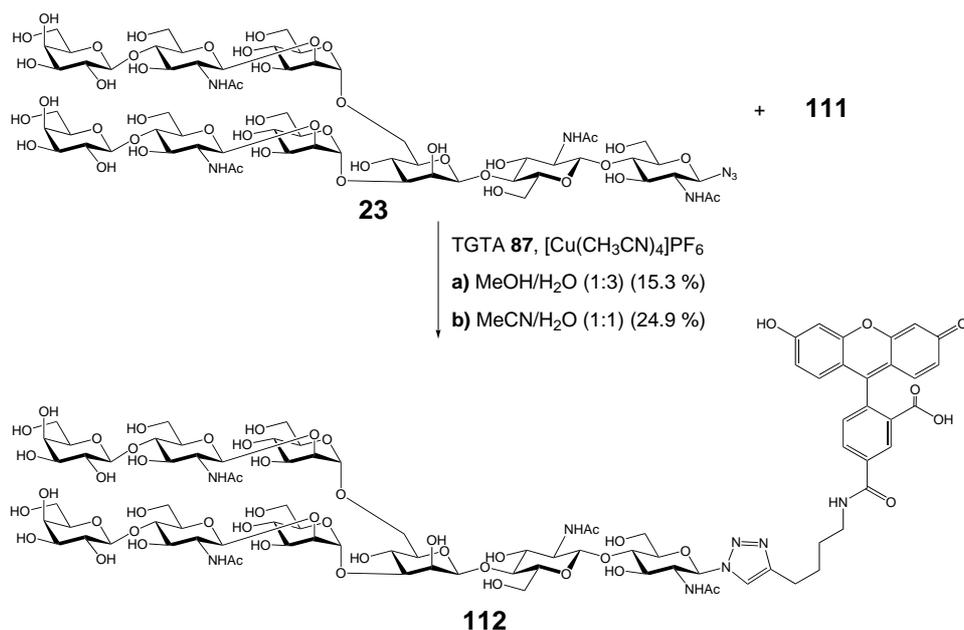


Abbildung 6.2: Darstellung des Fluorescein-Konjugats **112**.

Das Alkinylderivat **111** wurde mit dem Nonasaccharidazid **23** unter optimierten Click-Bedingungen (Kapitel 4.2) umgesetzt. Es wurden 0.1 Äquivalente an Cu(I) und dem Liganden **87** bei einer anfänglichen Saccharidkonzentration von 100 mM verwendet. Eine Schwierigkeit lag jedoch in der Löslichkeit des Fluorophors **111**. Deswegen wurde zunächst eine Reaktion durchgeführt, in dem der Fluorophor **111** in Methanol aufgenommen wurde. Der Anteil an Methanol betrug 25 %. Jedoch führte dies nicht zur vollständigen Lösung des Alkins **111**. Nach einem Tag wurde nochmals Methanol zugegeben, wodurch der Anteil bei 40 % lag. Es wurde nur eine Ausbeute des Nonasaccharidkonjugats **112** von 15.3 % erzielt. Daher wurde auch eine Umsetzung des Nonasaccharids **23** in Acetonitril/Wasser (v/v 1:1) durchgeführt. Dort war die Löslichkeit des Fluoresceinderivats **111** besser und die Ausbeute konnte auf 24.9 % erhöht werden (Abbildung 6.2). Anschließend wurde getestet, ob das Fluoresceinylalkin **111** unter basischen Bedingungen besser löslich ist. Es wurde eine 100 mM-Suspension des Fluorophors **111** in Wasser hergestellt und diese mit Diisopropylethylamin versetzt. Bei einem vierfachen Überschuss an Base ging das Derivat **111** in Lösung. Auch unter den basischen Bedingungen wurde das tetraantennäre Glycan **113** derivatisiert (Abbildung 6.3). Es konnte eine Steigerung der Ausbeute auf 52.9 % erzielt werden.

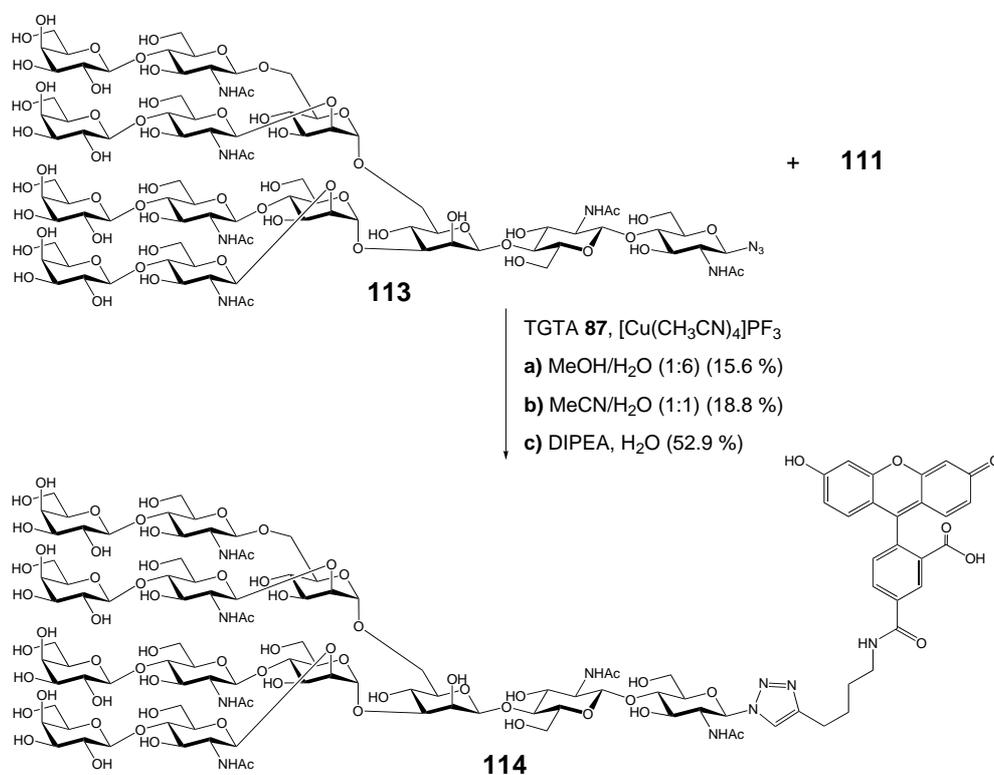


Abbildung 6.3: Derivatisierung des tetraantennären Glycans **113**.

Das Glycokonjugat konnte durch Festphasenextraktion gereinigt werden. Dies erwies sich als günstige Reinigungsmethode für die Fluorophorderivate. Damit wurden die geringsten Verluste und die beste Reinheit erzielt.

Da die Cycloaddition mit **112** unter basischen Bedingungen gut verlief, wurden auch zwei triantennäre Verbindungen derivatisiert. Die Modifikation des 2,6-triantennären Glycans **115** ergab eine Ausbeute von 82.5 % nach Festphasenextraktion (Abbildung 6.4).

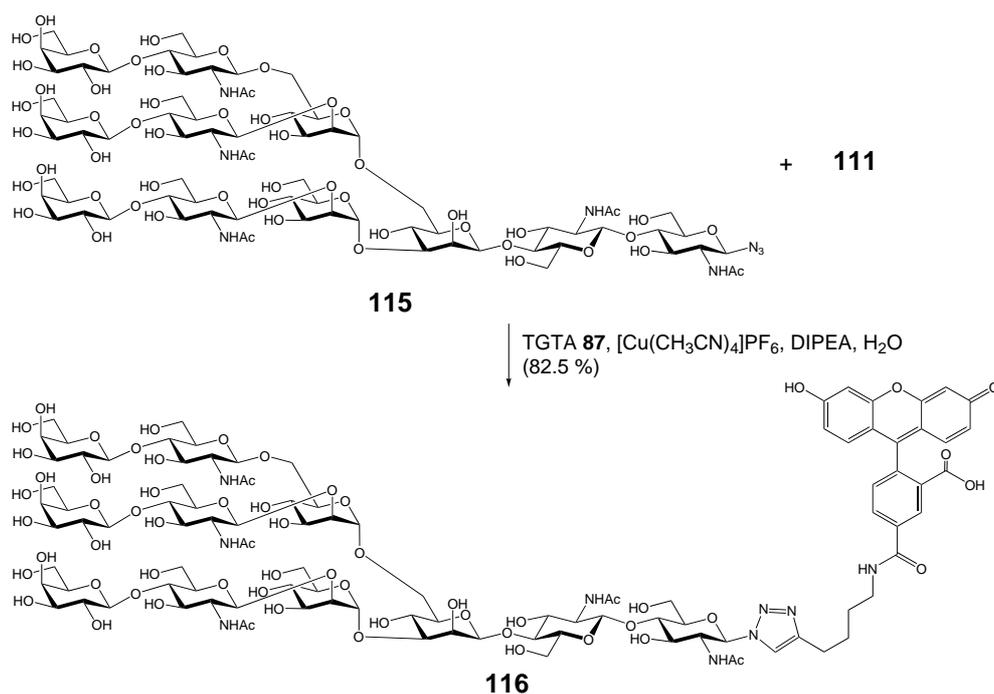


Abbildung 6.4: Synthese des triantennären Glycans **116**.

Die Kupplung des Fluoresceinderivats **111** an das 2,4-verzweigte Saccharid **117** verlief anlog. Auch hier konnte eine gute Umsetzung und eine Ausbeute von 65.8 % erhalten werden.

Die vier Verbindungen **112**, **114**, **116** und **118** wurden in der Gruppe von *Hakon Leffler* an der Universität Lund, Schweden, durch Fluoreszenzanisotropiemessungen untersucht. Es wurden sechs Galectine auf ihr Bindungsverhalten mit den vier Konjugaten studiert.^[155]

Für Fluoreszenzpolarisationsmessungen wird eine fluoreszierende Sonde mit linear polarisiertem Licht angeregt und der Winkel der emittierten Polarisation gemessen. Die verbleibende Polarisation nimmt mit der Beweglichkeit der Sonde während des angeregten Zustandes ab. Durch die Bindung der Fluoreszenzsonde an ein Protein (hier an ein Galectin)

rotiert die Sonde langsamer als das ungebundene Fluorophor, was zu einer höheren verbleibenden Fluoreszenzpolarisation führt.

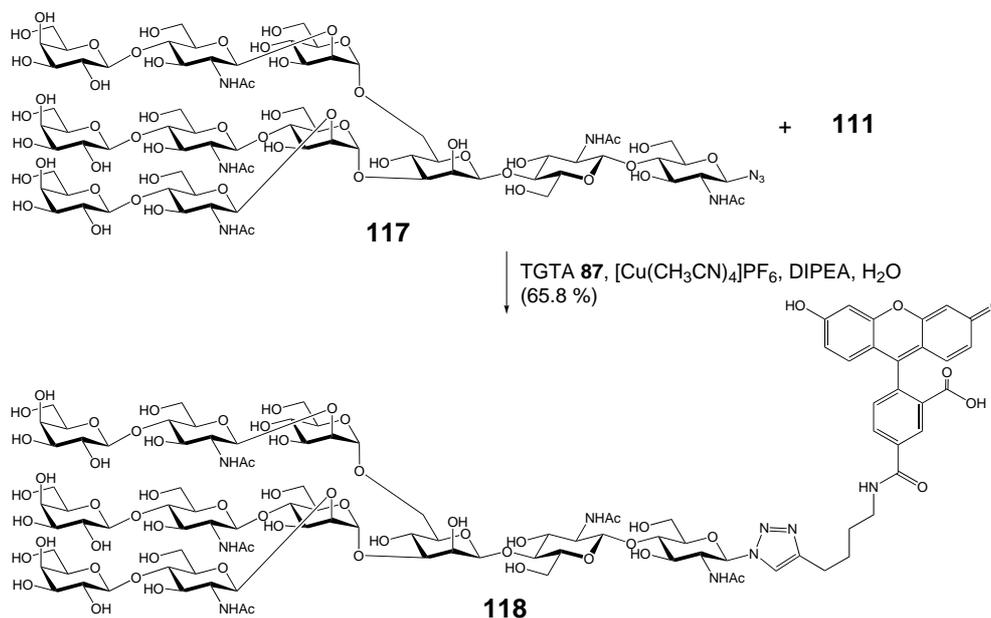


Abbildung 6.5: Derivatisierung des 2,4-triantennären Glycans **117**.

Es wurden 20 nM Lösungen der fluoreszierenden Glycane mit einer steigenden Konzentration an Lectin eingesetzt (Abbildung 6.6). Für jede Konzentration wurden jeweils zwei Proben nach fünfminütiger Inkubationszeit gemessen. Die Anisotropie steigt von A_0 , die das freie Glycan beschreibt, bis A_{Max} , bei der alle Glycane in Lösung gebunden sind. Der Zustand zwischen A_0 und A_{Max} ermöglicht eine Aussage über das Verhältnis des freien zum gebundenen Glycan. Je weiter die Anisotropiekurven zu geringen Konzentrationen verschoben sind, desto höher ist die Affinität der Glycane zum jeweiligen Lectin. Es wurden die vier Galectine 1, 2, 3 und 8 und zwei Lectinfragmente 8N und 9C getestet. Galectin 8N ist das *N*-terminale Fragment von Galectin-8, das die Glycanerkennungs-Domäne enthält.

Man erkennt in den Kurven in Abbildung 6.6, dass das Bindungsverhalten der jeweiligen Galectine unterschiedlich ist. Galectin-3 zeigte die höchste Affinität zu allen vier Glycanen. Weiterhin erlaubte die Höhe der erhaltenen A_{Max} -Werte einen Rückschluss auf die freie Beweglichkeit der Glycan-Galectin-Komplexe. Galectin-3 und 9C zeigten vergleichsweise hohe A_{Max} -Werte. Dies deutete auf eine eingeschränkte Beweglichkeit des Fluorophors hin. Einerseits kann dies auf eine Interaktion des Fluorophors mit dem Lectin hinweisen. Andererseits könnte es auf eine weitere Bindungsstelle des Lectins hindeuten, was die Beweglichkeit des Glycans und somit des Fluorophors einschränkt.

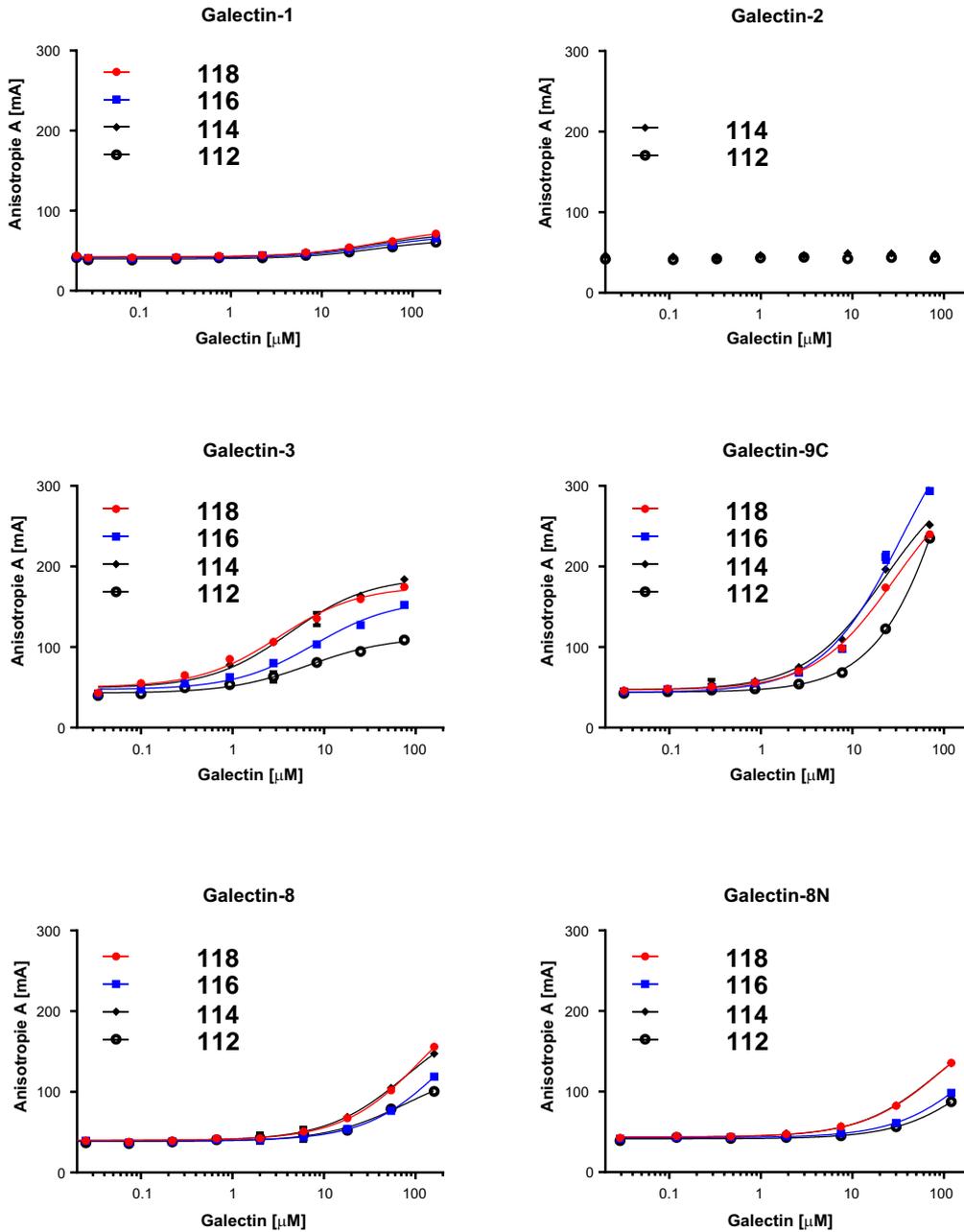


Abbildung 6.6: Anisotropiemessungen mit den Fluoresceinderivaten 112, 114, 116 und 118.

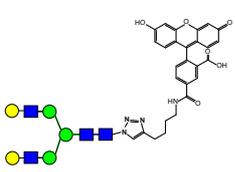
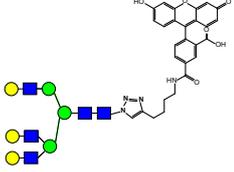
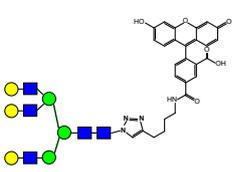
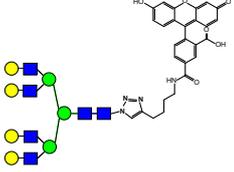
Die Anisotropiemessungen ermöglichten weiterhin das Berechnen von Dissoziationskonstanten K_d (Tabelle 6.1). Die Arbeitsgruppe *Leffler* setzte dafür die folgende Gleichung ein:

$$A = A_0 + (A_{Max} - A_0) * ([G]/([G] + K_d))$$

A = gemessene Anisotropie

G = Galectin-Konzentration [µM]

Tabelle 6.1: Dissoziationskonstanten K_d [μM], berechnet durch Gleichung 1 und den gemessenen Anisotropien in Abbildung 6.6.

				
Galectin	112	118	116	114
1	38	43	40	36
2	keine Bindung	nicht getestet	nicht getestet	keine Bindung
3	6.3	2.9	7	3.8
3^b	6.3	0.8	3	0.8
8	78	120	217	80
8N	180	96	217	90
9C	71	22	30	22

A_{Max} wurde für die Berechnung der Dissoziationskonstanten für alle Werte außer für Galectin-3^b auf < 130 mA festgelegt. Bei der Messreihe Galectin-3^b wurde für Galectin 3 ein kleinerer A_{Max} -Wert gewählt, da somit die Kurven dieser Messreihe besser gefittet werden konnten. Dadurch ergab sich eine hohe Affinität von Galectin-3 von $K_d < 1 \mu\text{M}$ zu allen vier Glycanen. Das 2,4-verzweigte tri- **118** sowie das tetraantennäre Glycan **114** interagierten am besten mit Galectin 3. Dies ist verwunderlich, da in vorhergehenden Untersuchungen eine Präferenz für 2,6-triantennäre Glycane analog zu **116** gezeigt wurde. Galectin 2 zeigte keine Bindung an die beiden Glycane **112** und **114**.

Die gezeigte Methode ermöglicht es die Bindungsspezifität von Lectinen zu studieren. Um Interaktionen des Fluoresceins mit den Lectinen auszuschließen, können andere Fluorophore wie Rhodamin eingesetzt werden.

7 Synthese homogener Interleukin 6 Glycopeptide

Die in Kapitel 3 hergestellten *N*-Glycane sollten für die Synthese von IL6-Fragmenten verwendet werden. Ziel war die Darstellung einer Bibliothek (Abbildung 7.1) von Glycopeptiden, die zu den jeweiligen homogenen IL6-Glycoproteinen ligiert werden sollten.^[160, 161]

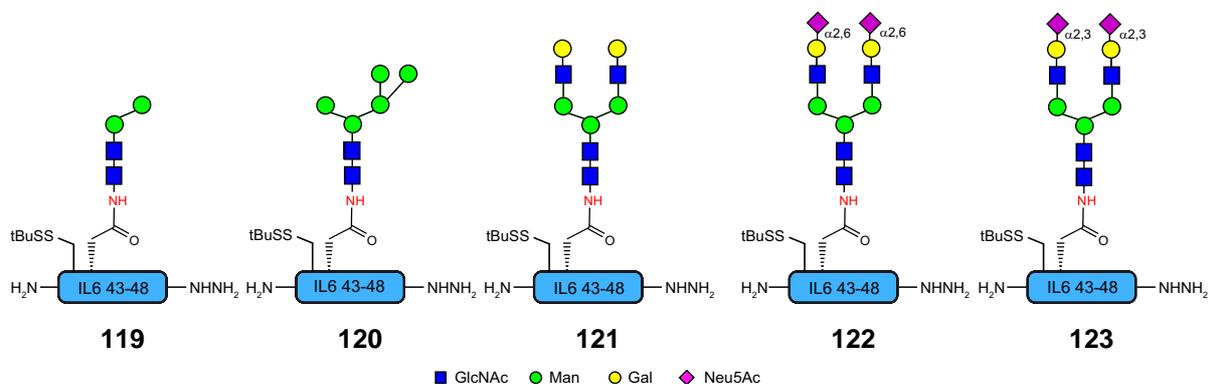


Abbildung 7.1: Bibliothek von IL6 (43-48) Glycopeptiden.

Die Bibliothek sollte durch die Kupplung der Glycane **23**, **28**, **34** und **35** an die freie Asparatseitenkette eines IL6 (43-48) Peptids in Lösung erzeugt werden.^[162, 163] Die Glycokupplung in Lösung hat den Vorteil, dass gereinigte Peptide eingesetzt werden können und keine Retention des Glycopeptids am Harz auftreten kann.^[164, 165] Das eingesetzte IL6-Fragment (43-48) **124** lag als Boc-geschütztes Hydrazid vor mit einer freien Seitenkette am Asparat. Im Glycosylierungs-Sequon ist ein Pseudoprolin eingebaut, das die Bildung von Aspartimid während der Glycokupplung unterbindet.^[76, 164] Als *N*-terminales Cystein wurde Boc-geschütztes *S*-*tert*-Butylthiocystein eingebaut. Nach der Entschützung wird dadurch die Reinigung der Glycopeptide vereinfacht.^[165]

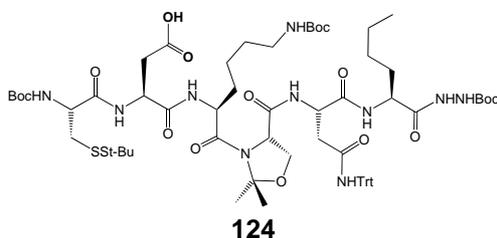


Abbildung 7.2: IL6 (43-48) Peptidhydrazid **124**.

Zunächst wurde das Glycanazid **23** an das Peptid gekuppelt (Abbildung 7.3). Dazu wurde die Azidofunktion mit Propandithiol zum Halbaminial reduziert.^[77] Anschließend wurde nach

der Aktivierung des Peptidfragments **124** mit HATU/HOAt in DMF/DMSO das Glycosylamin zugegeben. Nach zwei Tagen wurde das Glycopeptid mit Trifluoressigsäure entschützt und durch RP-HPLC gereinigt (Abbildung 7.3). Es konnte keine vergleichbare Ausbeute zu *Schmälzlein* erhalten werden (Ausbeuten zwischen 45 und 65 %). Die erzielte Ausbeute von 31.9 % lässt sich möglicherweise durch eine geringere Reinheit des verwendeten Nonasaccharidazids **23** erklären. Die verwendete Charge wurde zuvor über eine *HiLoad* Superdex 30 Gelfiltrationssäule mit Ammoniumbicarbonat (0.1 M) gereinigt. Reste von Ammoniumbicarbonat im Glycan sollten sich auf die Kupplungseffizienz auswirken. *Schmälzlein* verwendete Sephadex G25-gereinigtes Nonasaccharidazid **23**, welches mit 5 % Ethanol eluiert wurde.

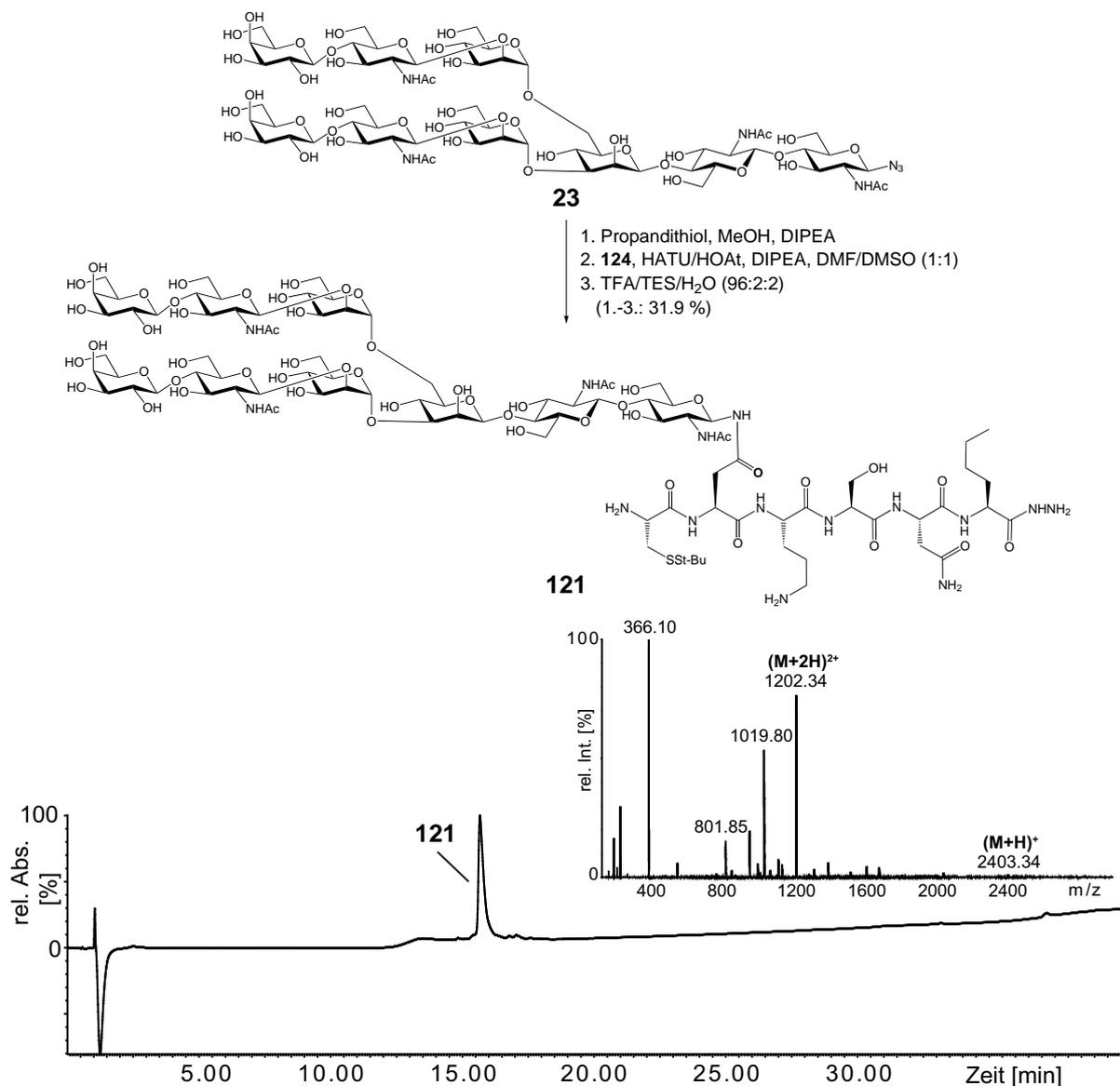


Abbildung 7.3: Umsetzung des IL6-Peptids **124** mit dem Glycanazid **23** unter HATU/HAOt-Aktivierung und zugehörige LC-MS Analyse des gereinigten Glycopeptids **121**.

Das Nonasaccharidglycopeptid **121** sollte als Ausgangsverbindung für die Synthese des 2,3-sialylierten Glycopeptids **123** dienen. Es wurden verschiedene enzymatische Verlängerungen durchgeführt, ausgehend von den Bedingungen nach *Balk* (Abbildung 7.4).^[116] Diese waren für 1 mg des Nonasaccharidazids **23** optimiert. Es wurden 10 mU α 2,3-Sialyltransferase (*Pasteurella multocida*) in 100 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8.5) mit 1 mg/mL BSA und 3 Äquivalenten CMP-*N*-Acetylneuraminsäure eingesetzt. Um eine kompetitive Inhibition durch das Nucleotid zu verhindern, wurde 1 U alkalische Phosphatase hinzugefügt. Es ist bekannt, dass diese α 2,3-Sialyltransferase bei niedrigen pH-Werten auch eine Sialidaseaktivität aufweist.^[166] Diese kann durch pH-Kontrolle während der Reaktion weitgehend unterbunden werden.

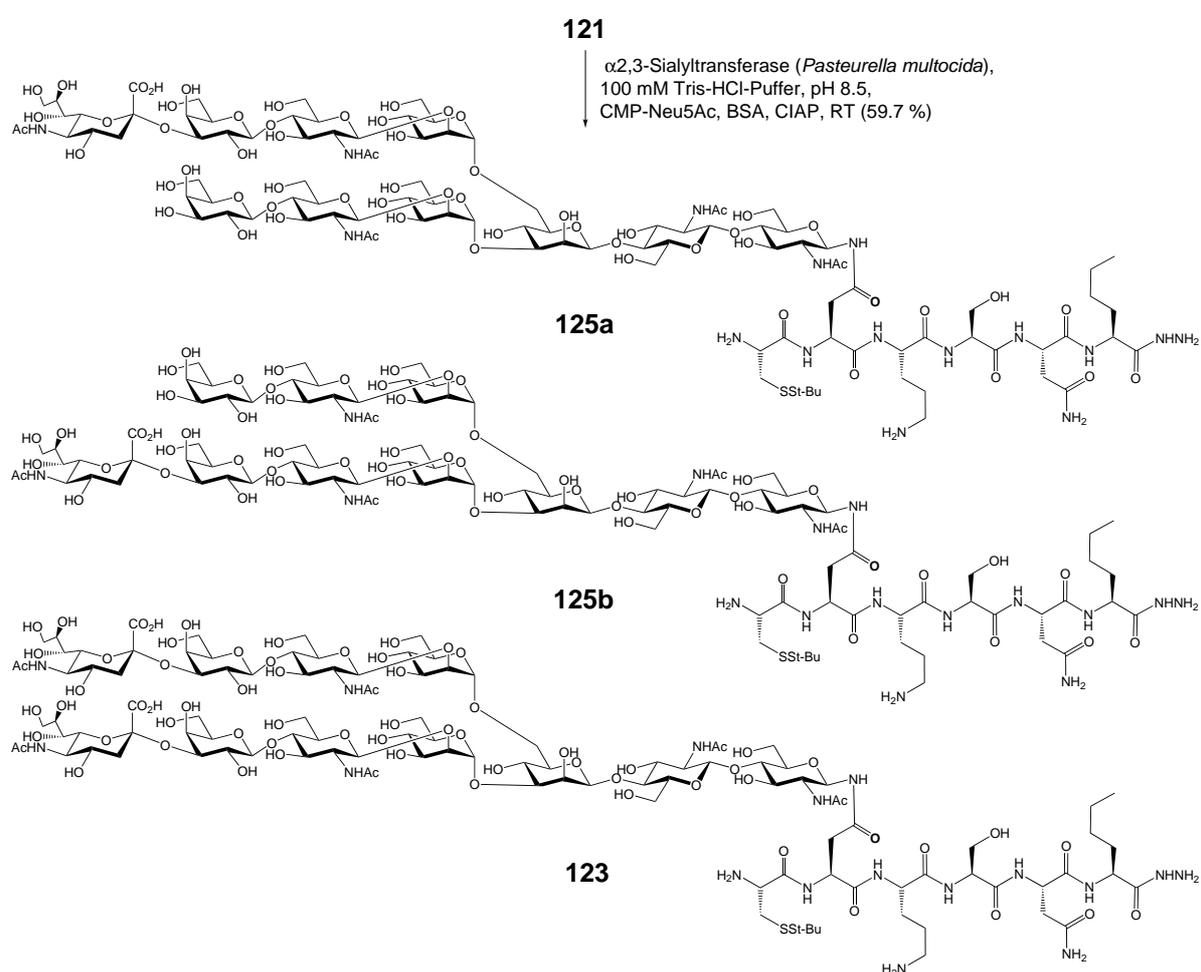


Abbildung 7.4: Enzymatische 2,3-Sialylierung des Interleukin-Fragments **121**.

Es stellte sich heraus, dass bei der Umsetzung von 0.5 mg des Nonasaccharidglycopeptids **121** 10 mU der Sialyltransferase optimal sind. Die Menge an Enzym wurde bei Erhöhung der Eduktmenge angepasst. Es wurden weitere Glycopeptidkonzentrationen getestet: 0.5 mM, 1 mM, 6 mM und 10 mM (Abbildung 7.5). Bei einer Konzentration von 6 mM konnte der

höchste Umsatz beobachtet werden (Abbildung 7.5). *Perkams* stellte bei der enzymatischen α 2,6-Sialylierung fest, dass die wiederholte Zugabe von CMP-*N*-Acetylneuraminsäure zur vollständigen Umsetzung des Glycopeptids führen kann.^[65] Deswegen wurde bei der 2,3-Sialylierung ebenfalls CMP-*N*-Acetylneuraminsäure im Verlauf der Reaktion nachgegeben. Die Reaktion wurde mit 3 Äquivalenten CMP-NeuAc gestartet. Es wurde eine 6 mM Glycopeptidkonzentration gewählt und 10 mU der Sialyltransferase eingesetzt. Der Reaktionsverlauf wurde durch LC-MS überprüft (Abbildung 7.6). Die weitere Zugabe von CMP-*N*-Acetylneuraminsäure hatte einen negativen Effekt auf die Reaktion. Der maximale Umsatz zum Undecasaccharidglycopeptid **123** lag bei ungefähr 60 %, was bereits nach 1 h und 3 Äquivalenten CMP-Neu5Ac erzielt werden konnte. Die erneute Zugabe von CMP-Neu5Ac führte zur Abspaltung der terminalen Sialinsäuren. Dies konnte auch durch pH-Angleichung auf pH 8.5 nicht unterbunden werden. Um die Reaktion in Richtung des Zielprodukts **123** zu ver-

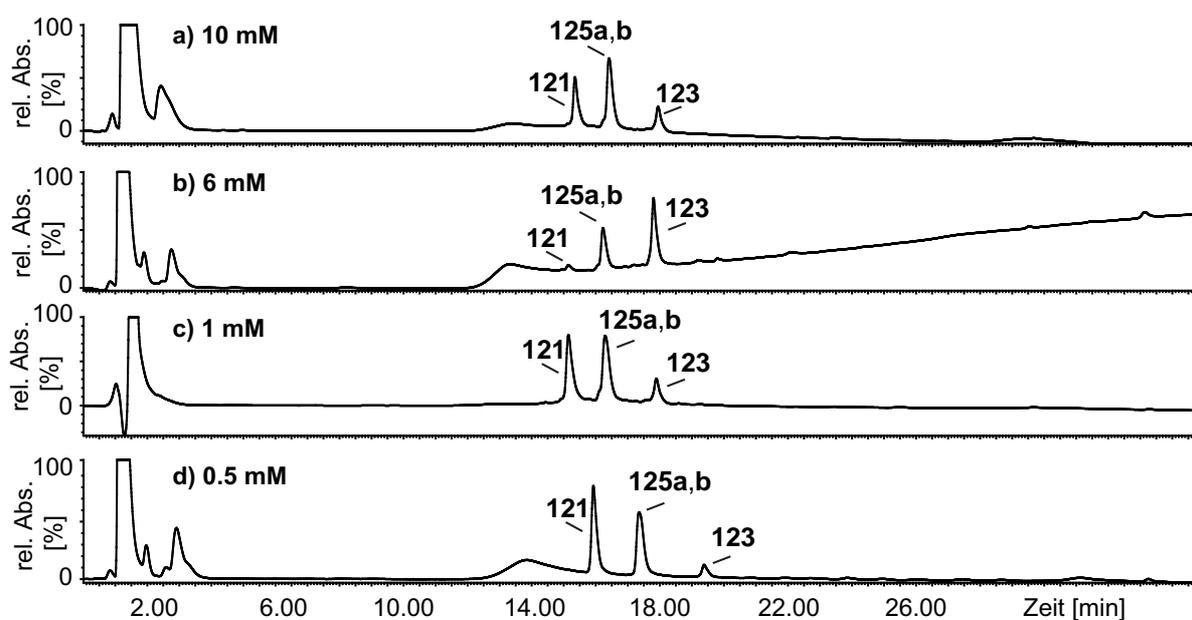


Abbildung 7.5: Enzymatische 2,3-Sialylierung des Interleukin-Fragments **121** bei verschiedenen Glycopeptidkonzentrationen.

schieben, wurde mit 6.3 Äquivalenten CMP-Neu5Ac begonnen und die Reaktion nach 1 h abgebrochen (Abbildung 7.4). Über eine Hydrosphere C18-RP-Säule konnte das 2,3-sialylierte Glycopeptid **123** vom Edukt getrennt werden. Zusätzlich konnte eine weitere Fraktion abgetrennt werden, dessen LC-MS-Analyse auf die monosialylierten Zwischenprodukte **125a** oder **125b** hinweist (Abbildung 7.7). Es konnte für **123** eine Ausbeute von 59.7 % erreicht werden. Die Fraktion einer einfachen Sialylierung wurde in einer Ausbeute von 29.7 % erhalten. Dabei sollte es sich um eine Mischung von **125a** und **125b** handeln.

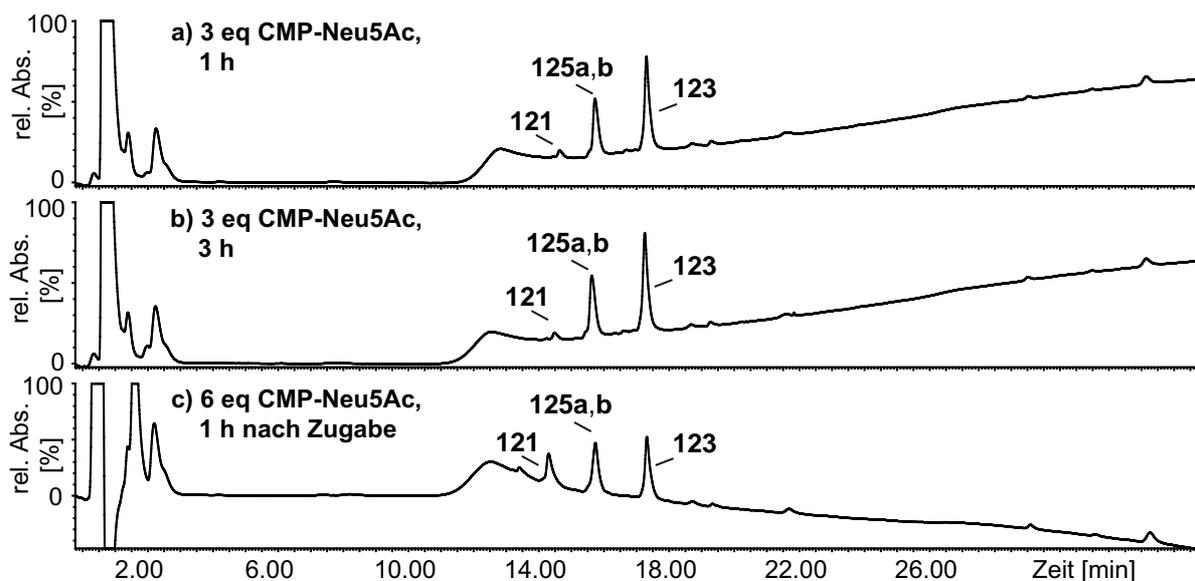


Abbildung 7.6: Enzymatische Sialylierung des Interleukin-Fragments **121**; a) 3 eq CMP-Neu5Ac, 1 h nach Reaktionsstart; b) 3 eq CMP-Neu5Ac, 3 h nach Reaktionsstart; c) 3+3 eq CMP-Neu5Ac, 1 h nach erneuter CMP-Neu5Ac Zugabe.

Weiterhin sollte das 2,6-sialylierte Peptidylhydrazid **122** hergestellt werden. Wie bereits in Kapitel 4.1 gezeigt, sind terminale 2,6-Sialoside säurelabil. Deswegen wurde neben der Umsetzung mit dem Undecasaccharid **28** auch die Glycokupplung mit dem Phenacyl-geschützten Saccharid **74** durchgeführt. Jedoch konnte auch nach mehreren Versuchen, das geschützte Undecasaccharid **74** zu koppeln, kein Produkt erhalten werden. Bereits während der Kupplung wurde die Phenacylschutzgruppe abgespalten, was bei der Entschützung und Reinigung des Peptids zum Verlust der terminalen Sialinsäuren führte. Die Verwendung von weniger Äquivalenten an Diisopropylethylamin während der Kupplungsreaktion hatte nicht den gewünschten Erfolg.

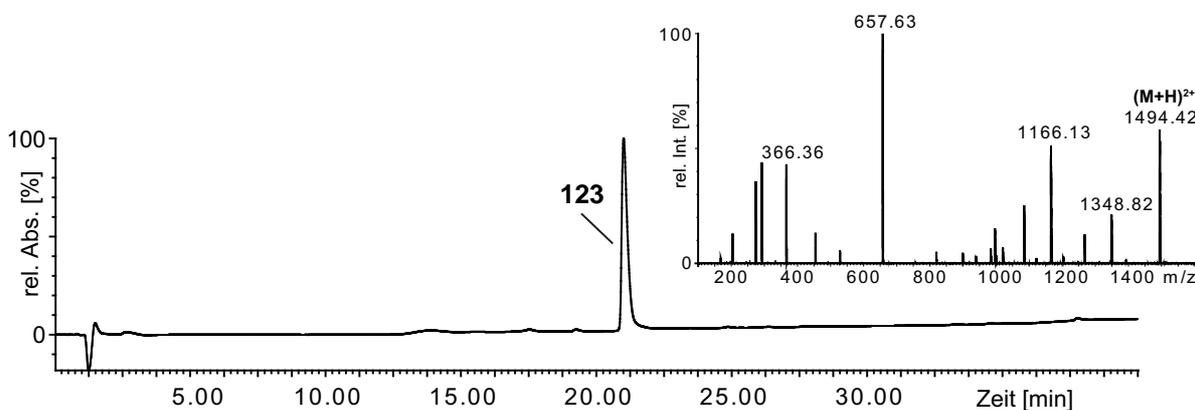


Abbildung 7.7: LC-MS des gereinigten 2,3-sialylierten IL6-Fragments **123**.

7 Synthese homogener Interleukin 6 Glycopeptide

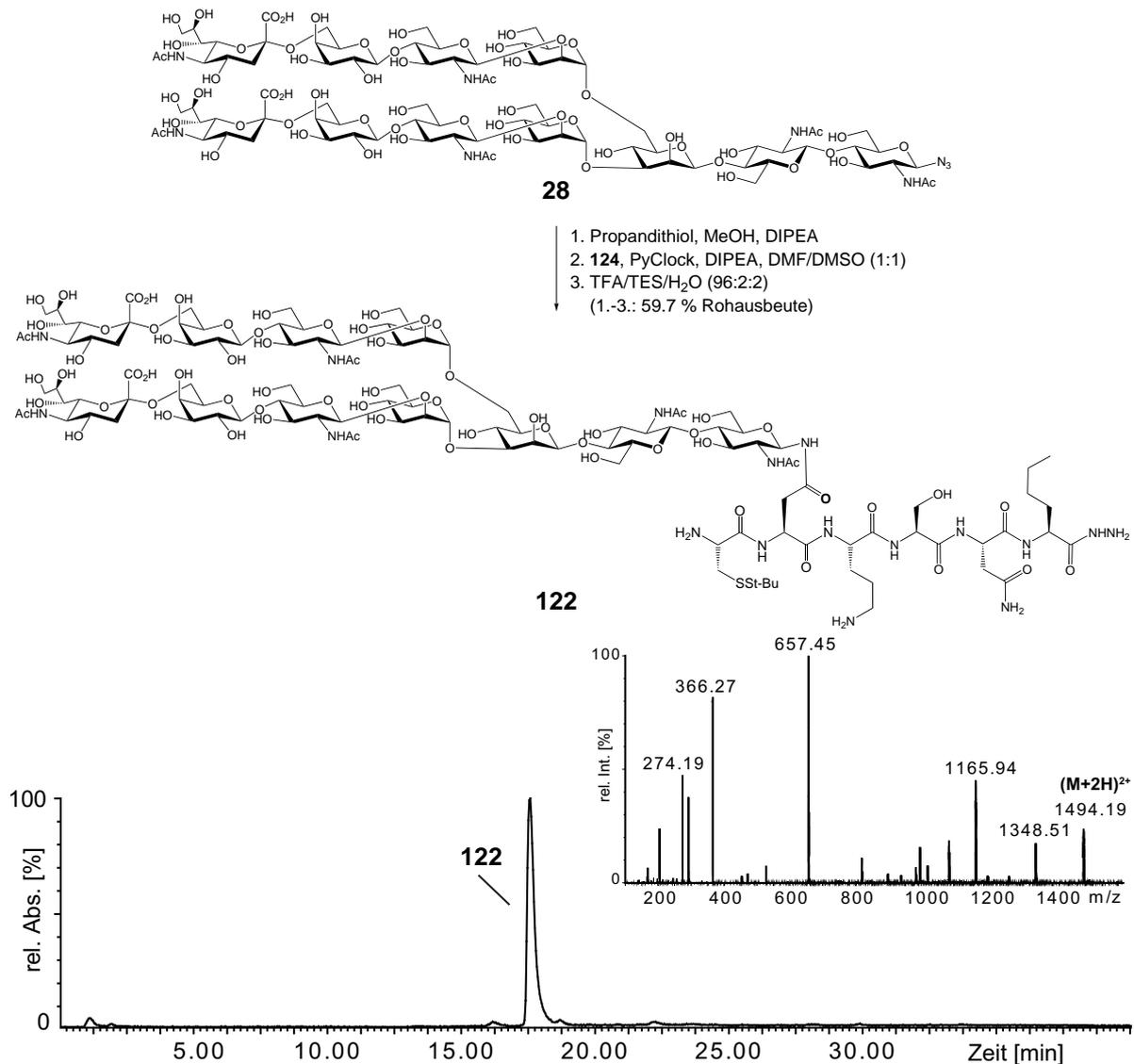


Abbildung 7.8: Glycokupplung zu dem Hydrazid **122** sowie die LC-MS Analyse des gereinigten Glycopeptids **122**.

Deswegen wurde die Reaktion über das 2,6-sialylierte Glycanazid **28** versucht. Es wurde zunächst ein Stabilitätstest von **28** unter Entschützungsbedingungen (TFA/TES/H₂O 96:2:2) durchgeführt. Die Sialinsäuren waren unter diesen Bedingungen bis zu 6 h stabil. Erst bei längerer Behandlung konnte der Verlust einer Sialinsäure beobachtet werden. Es wurde daraus der Schluss gezogen, dass die zuvor beobachtete Abspaltung von 2,6-Sialosiden bevorzugt im Verlauf der HPLC-Reinigung des Peptidylhydrazids **122** erfolgte. Diese wurde in Gegenwart von 0.1 % Trifluoressigsäure durchgeführt. Der Einsatz von Laufmitteln mit 0.1 % Ameisensäure führte ebenfalls zum Verlust von Sialinsäure. Die Reinigung ohne Säurezusatz ermöglichte keine Isolierung des gewünschten Produkts, da die Trennung nicht mehr effizient war. Es

wurde vermutet, dass die Neuraminsäuren besonders während der Gefriertrocknung hydrolysierten. Daher wurden nach der HPLC-Trennung mit 0.1 % Trifluoressigsäure die Fraktionen mit 0.1 M Ammoniumbicarbonat-Lösung neutralisiert. Dies stabilisierte die terminalen 2,6-Sialoside, wobei eine Rohausbeute von 59.7 % erhalten wurde, allerdings enthielt das Produkt danach Trifluoressigsäuresalze. Hervorzuheben ist, dass bei der Reinigung des 2,3-sialylierten Interleukin-Fragments **123** keine Neutralisation notwendig war. Diese glycosidische Bindung scheint weniger säurelabil zu sein als die 2,6-glycosidische Bindung.

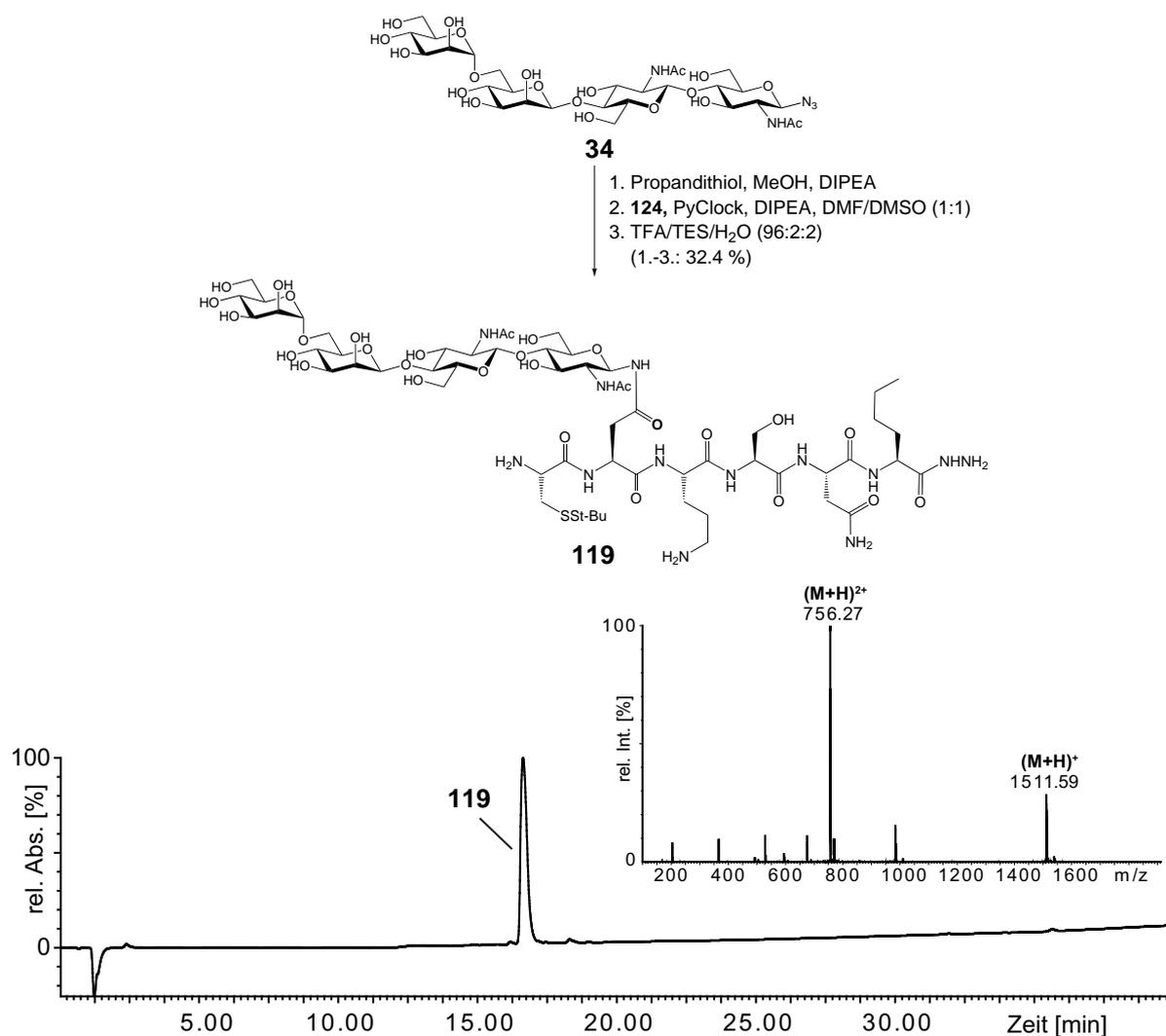


Abbildung 7.9: Darstellung des paucimannosidischen Peptidylhydrazids **119** und das zugehörige LC-MS von gereinigtem **119**.

Als nächstes wurden die mannosidischen Glycanazide **34** und **35** an das Peptidylhydrazid **124** gekuppelt. Bei diesen Glycanen wurde das Peptid in einem 1.5-fachen Überschuss eingesetzt. Das trunkierte Glycan **34** ist das am häufigsten auftretende *N*-Glycan von Interleukin 6.^[121] **34**

konnte nach der Reduktion mit Propandithiol unter PyClock-Aktivierung mit **124** umgesetzt werden (Abbildung 7.9). Die Reaktion ergab eine Ausbeute von 32.4 % nach RP-HPLC Reinigung.

Die Kupplung des Oligomannosids **35** verlief analog (Abbildung 7.10). Hierbei wurde jedoch das Glycan **35** vor dem Umsatz HPLC-gereinigt, was zu einer erhöhten Ausbeute (66.3 %) führte.

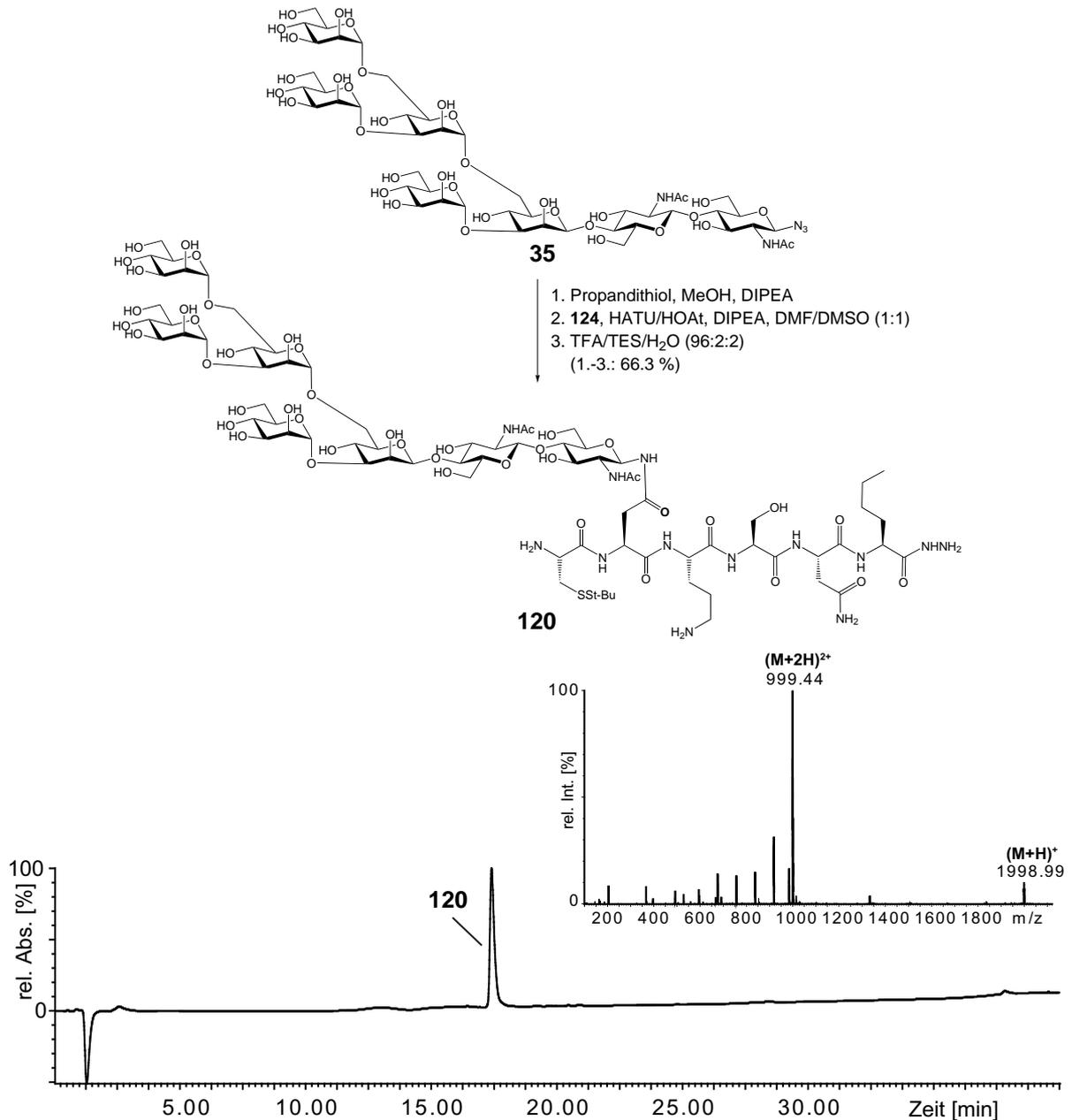


Abbildung 7.10: Kupplung des IL6-Peptides **124** mit dem Oligomannosid **35** und dem HPLC-MS des gereinigten Glycopeptides **120**.

8 Synthese von Glykokonjugaten mit Lanthanoid-bindenden Tags

Durch eine Derivatisierung von Glycanen mit Lanthanoid-bindenden Tags können paramagnetische NMR-Studien zur Konformationsbestimmung durchgeführt werden. Diese Methode wurde bereits für die Analyse der globalen Konformation von Proteinen angewendet.^[167, 168] Dabei können durch die Interaktion von paramagnetischen Lanthanoiden Änderungen der chemischen Verschiebung induziert werden, sogenannte *Pseudo Contact Shifts* (PCS). Diese Veränderungen sind abhängig von der Position der Nuklei zu dem Lanthanoidion. Je näher die Nuklei am Lanthanoid sind, desto größer ist die Änderung. Dadurch ist es möglich, die räumliche Anordnung der modifizierten Moleküle zu bestimmen. Der Einsatz dieser Methode wurde für Di- und Trisaccharide durch *Yamamoto et al.* publiziert.^[169, 170] Für die eindeutige Interpretation der PCS-Daten ist es wichtig, dass der eingebrachte Lanthanoid-bindende Ligand möglichst starr ist und einen stabilen Komplex mit dem Lanthanoid-Ion eingeht. *Yamamoto et al.* konnten zeigen, dass diese Methode für die Bestimmung der Saccharid-Konformation in Lösung gut geeignet ist. Die Gruppe arbeitete mit Tm^{3+} -Ionen, welche jedoch für die Untersuchung von größeren Glycanen nicht anwendbar sind. Dies ist auf deren geringen Reichweite zurückzuführen. Deswegen sollten Lanthanoide wie Dy^{3+} und Tb^{3+} für weiterreichende Informationen eingesetzt werden.

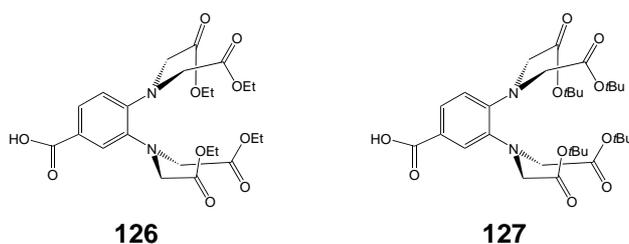


Abbildung 8.1: Geschützte Lanthanoid-bindende Liganden **126** und **127**.

An dem komplexen *N*-Glycanazid **23** sollte versucht werden, durch Anknüpfung eines Lanthanoid-Tags PCS-Daten zu bestimmen. Es wurde zunächst versucht, die geschützten Komplexliganden **126** und **127** (Abbildung 8.1) mit dem Nonasaccharid **23** zu verknüpfen. Für die Kupplung der Liganden wurde die anomere Azidfunktion mit Propandithiol reduziert (vgl. Kapitel 7). Danach erfolgte die Kupplung durch PyBOP-Aktivierung (Abbildung 8.2). Es stellte sich heraus, dass die Anknüpfung des Ethyl-geschützten Liganden **126** effizienter

war (38.2 % Ausbeute). Bei der Anknüpfung des Liganden **127** konnte nur eine Ausbeute von 14.0 % erreicht werden. Die Entschützung der Ethylester **126** mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung erwies sich ebenfalls als effizienter verglichen mit der TFA-Entschützung der *t*Bu-Ester **127**.

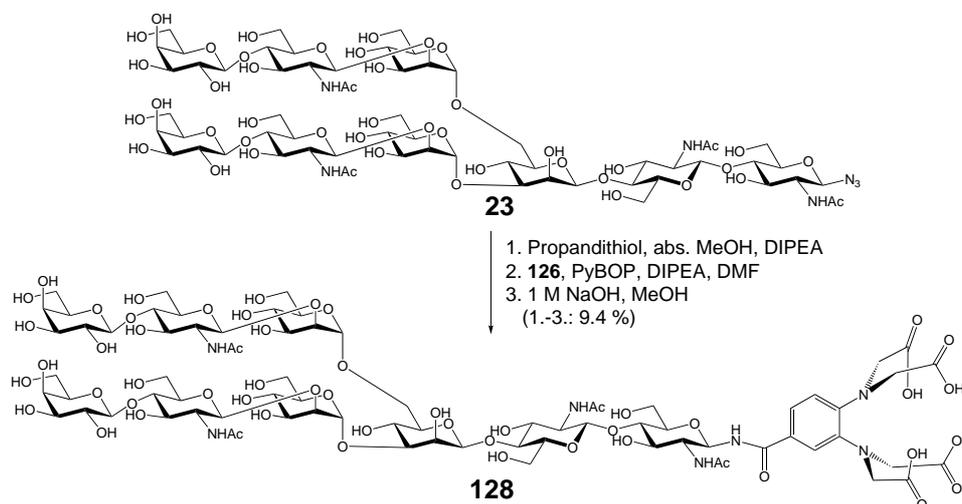


Abbildung 8.2: Synthese und Entschützung des biantennären Nonasaccharidderivats **128**.

Die Reinigung des Derivats **128** war schwierig, da das Rohprodukt zunächst sowohl bei Gel-filtration, Festphasenextraktion und RP-HPLC Reinigung breite Elutionspeaks ergab. Durch Ansäuern des Rohprodukts vor der Reinigung konnte dies minimiert werden, jedoch wurde nach der Kupplung und Entschützung des Liganden **126** an **23** nur eine Gesamtausbeute von 9.4 % an Konjugat **128** erzielt. Die erhaltene Menge an **128** war jedoch ausreichend, um NMR-Experimente durchführen zu können.

Die Messungen wurden am *Centro de Investigaciones Biológicas* (CSIC) sowie in der *Universidad Complutense de Madrid* in Madrid, Spanien, durchgeführt. Es wurde zunächst der Komplex von **128** mit dem diamagnetischen Ion La^{3+} hergestellt. Dieser zeigte die typische Signalüberlappung der 1,3- und 1,6-verknüpften Antennen des Nonasaccharids **128**. Wurde stattdessen ein Komplex mit dem paramagnetischen Lanthanoid Dy^{3+} erzeugt, so spalteten die Signale der pseudosymmetrischen Antennen auf. Erstmals konnten beide Antennen deutlich per NMR unterschieden werden. Dies beruht auf der Abstandsabhängigkeit der PCS der beiden Antennen zum paramagnetischen Lanthanoid. In Abbildung 8.3 sind die HSQC-Spektren mit La^{3+} (rote Signale) und Dy^{3+} (blaue Signale) übereinander gelegt. Hierbei wird die Aufspaltung und Verschiebung der Signale ersichtlich. Aus den gemessenen PCS-Daten konnte

die Population der verschiedenen Konformere des Glycans berechnet werden.

In Abbildung 8.4 sind die gemessenen PCS-Daten aus den Versuchen mit La^{3+} und Dy^{3+} gezeigt. Die PCS-Verschiebungen der 1,6-verknüpften Antenne sind größer als die Verschiebungen des 1,3-Arms. Dies ließ den Schluss zu, dass die 1,6-Antenne flexibler ist und dem anomeren Zentrum näher kommen kann. Die Gruppe von *Jiménez-Barbero* konnte die gemessenen PCS mit den theoretischen Werten einer Moleküldynamik-Analyse^[171, 172] des biantennären Saccharids abgleichen. Die fünf Konformationen, welche durch eine MD-Simulation bestimmt wurden, konnten mittels der PCS-Daten bestätigt werden.^[173] Die T-förmige Konfiguration (Abbildung 8.4, 2: *extended*, *gg*) stellte sich dabei als die Hauptkonformation heraus.

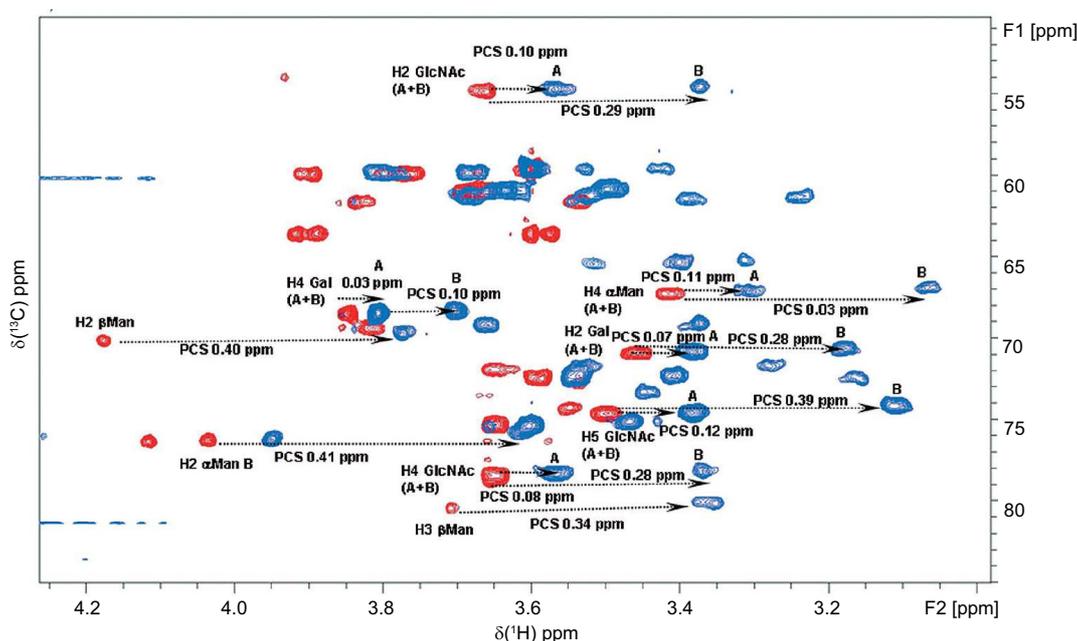


Abbildung 8.3: Überlagerung der HSQC-Spektren (600 MHz) des Nonasaccharids **128** im Komplex mit diamagnetischem La^{3+} (rote Signale) bzw. mit paramagnetischem Dy^{3+} (blaue Signale); mit den Pfeilen wird die Verschiebung verdeutlicht.

Durch die paramagnetischen Lanthanoide konnte zwischen den einzelnen Antennen erstmals unterschieden werden. Dies konnte auch für Bindungsstudien an die Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne (CRD) des humanen Galectin-3 genutzt werden. Die Probe von **128** mit paramagnetischen Dy^{3+} wurde mit dem Lectin versetzt. Die Bindung des Lectins konnte durch die Verbreiterung spezifischer Saccharidsignale festgestellt werden. Damit gelang der Nachweis, dass das humane Galectin-3 beide Antennen gleichermaßen erkennt und an diese bindet.^[173]

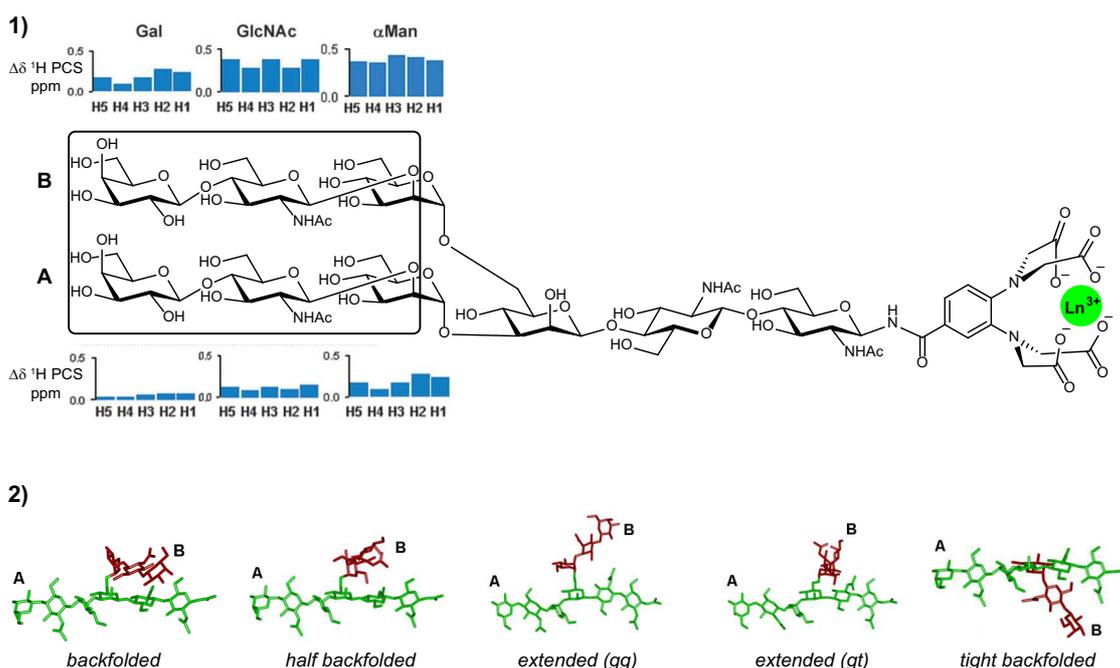


Abbildung 8.4: 1) Vergleich der gemessenen PCS der beiden Antennen des Ln^{3+} Konjugats **128**; 2) Energieminimierte Konformationen des freien Nonasaccharids **24**^[171, 172]; grün: Core-Trisaccharid mit der 1,3-verknüpften Antenne A; rot 1,6-verknüpfte Antenne B.

Daraufhin stellte sich die Frage, ob auch die Signale multiantennärer Glycane analog aufgespalten werden. Dies sollte durch Messungen mit dem tetraantennären galactosylierten Konjugat **129** untersucht werden. Die Synthese des Konjugats **129**^[174] erfolgte analog zur Derivatisierung des biantennären Saccharids **23** (Abbildung 8.5). Nach Reduktion der Azidfunktion wurde der Ligand **126** unter PyBOP-Aktivierung gekuppelt. Nach der Entschützung mit Natriumhydroxid in Methanol konnte das Glycankonjugat **129** in einer Ausbeute von 32.6 % gewonnen werden. Der pH-Wert des Rohprodukts wurde nach der Entschützung mit Salzsäure auf 7 eingestellt, was die Reinigung des Derivats **129** wesentlich vereinfachte.

Die ersten NMR-Messungen des tetraantennären Konjugats **129** zeigten die Aufspaltung der Signale aller vier Antennen. Dadurch konnte erstmals die Konformation eines tetraantennären Glycans in Lösung bestimmt werden. Desweiteren sollte es die neue Sonde ermöglichen die Armspezifität von Lectinen durch NMR-Studien in Lösung zu bestimmen.

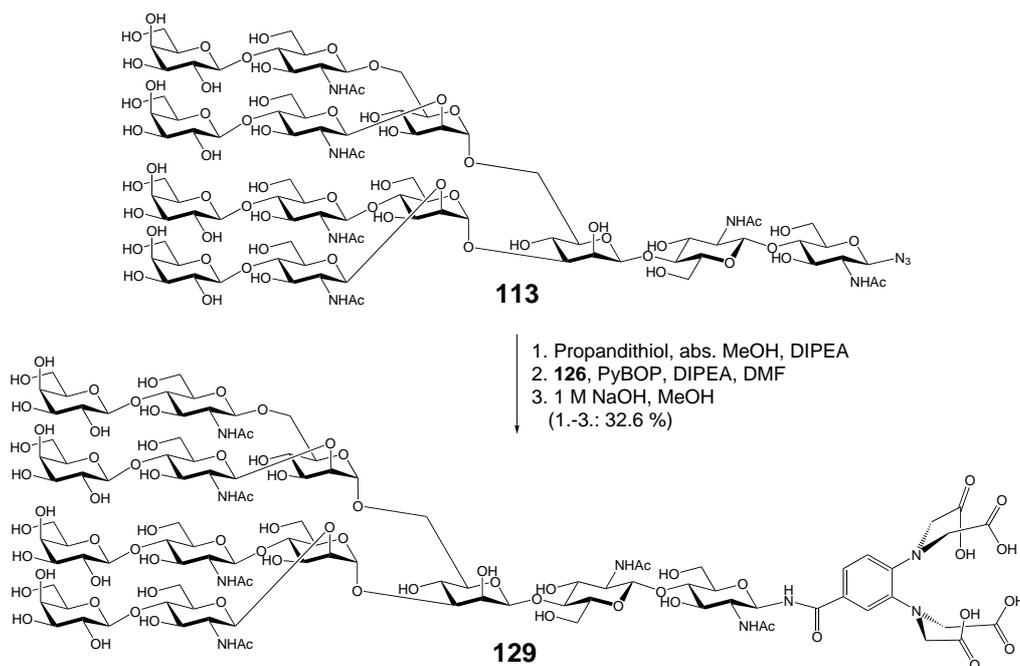


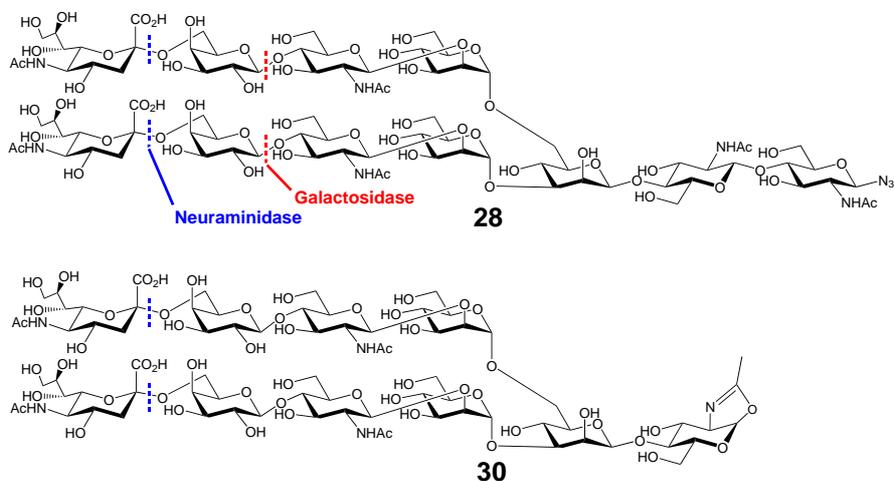
Abbildung 8.5: Synthese des tetraantennären Glycokonjugats **129**.

Die Derivatisierung der Glycane **23** und **113** durch Lanthanoid Tags erlaubt die Konformationsbestimmung von *N*-Glycanen in Lösung. Die anomere Azidfunktion ermöglicht die Synthese beliebiger Saccharidkonjugate durch Amidbindung oder Click-Kupplung. Durch die einfache Darstellung biantennärer Glycanazide aus Eigelb konnten unterschiedliche Derivatisierungsreaktionen etabliert und optimiert werden. Das modulare Bausteinprinzip und die selektive Entschützung ermöglichten die Gewinnung mannosidischer Glycanazide. Diese Glycanazide wurden für den Aufbau einer Interleukin 6 Glycopeptidbibliothek verwendet, so dass nach Ligation eine erste systematische Untersuchung der Aktivität der unterschiedlichen Glycoformen möglich wird. Aber auch die Konjugate der Click-Chemie lieferten interessante Ergebnisse bei Bindungsstudien mit Lectinen auf einem Glycanarray, sowie durch Fluoreszenzpolarisationsmessungen.

9 Zusammenfassung

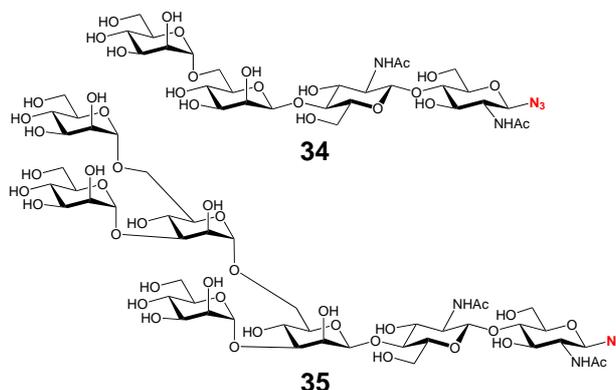
N-Glycane stellen eine sehr häufige posttranslationale Modifikation von sekretorischen Proteinen dar. Sie beeinflussen die Faltung, Halbwertszeit und Eigenschaften der Glycoproteine maßgeblich. Um die Eigenschaften von *N*-Glycanen untersuchen zu können, müssen diese entweder isoliert oder durch chemische Synthese bereitgestellt werden. Dabei bietet sich die Nutzung einer anomeren Azidfunktion an, um weitergehende Derivatisierungen der Glycane durchführen zu können.

In dieser Arbeit konnten biantennäre Glycane aus dem Sialoglycopeptid **22** gewonnen werden. Dies konnte sowohl durch die Amidase PNGase F als auch durch die Endoglycosidase S erreicht werden. Nach Abspalten des Undecasaccharids **21** mit PNGase F konnte das Glycan durch DMC zu **28** azidiert werden. Daraus konnten durch den Einsatz von Neuraminidase und Galactosidase die Glycosylazide **23** und **19** gewonnen werden. Der Einsatz der Endoglycosidase S und eine anschließende Oxazolinbildung führte zu dem aktivierten Octa- **31** und Decasaccharid **30**, welche für enzymatische Glycopeptidsynthesen eingesetzt werden konnten.

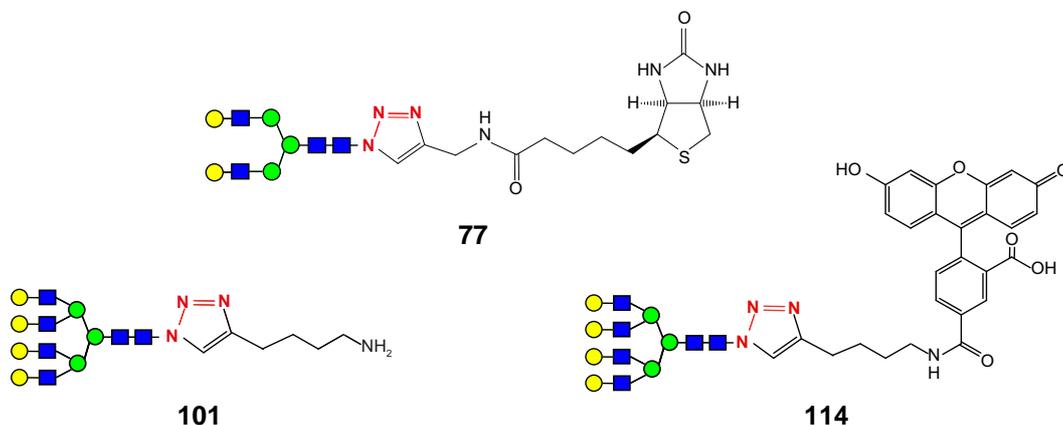


Weiterhin konnten die mannosidischen Glycanazide **34** und **35** aus modularen Bausteinen synthetisiert werden. Dabei wurden jeweils hybridische Glycane als Vorstufen hergestellt, die nach der Entschützung mit einer β -*N*-Acetylglucosaminidase verkürzt wurden. Das paucimannosidische Glycan **34** konnte über den Akzeptor **39** in guter Ausbeute gewonnen werden. Die Glycosylierung des Core-Trisaccharids **39** mit dem Disaccharid **13b** verhinderte die Bildung eines Orthoesters.

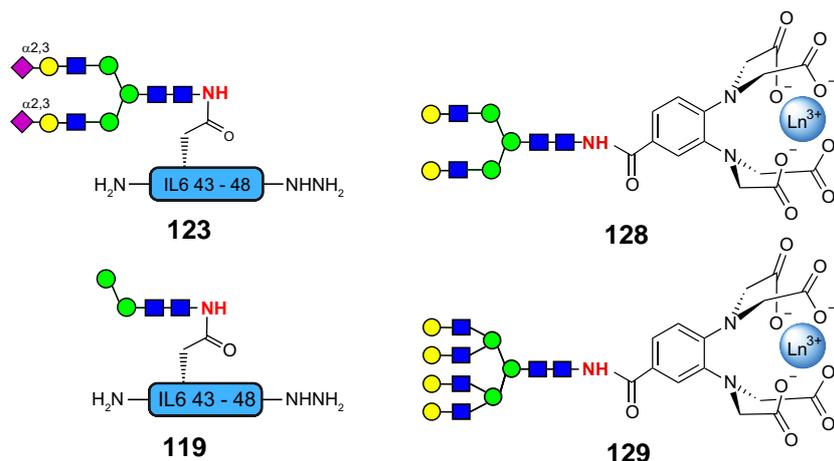
Bei der Glycosylierung von **59** mit dem Trimannosid **50** konnte die Entstehung des Orthoesters **62** minimiert werden. Die Entschützung des Octasaccharids **61** konnte optimiert werden, der abschließende enzymatische Verdau des Glycosylazids **63** zum Heptasaccharid **35** ergab jedoch keine vollständige Umsetzung. Die Trennung der Saccharide **63** und **35** gelang über die peracetylierten Derivate.



Für die Synthese von Glykokonjugaten wurde die Click-Chemie angewandt. Der Einsatz der Kupfer-katalysierten Cycloaddition mit Alkinen musste jedoch für *N*-Glycane optimiert werden. Durch den Einsatz der wasserlöslichen Liganden **86** und **87** konnte der Abbau der *N*-Glycane umgangen und biotinylierte und Fluorescein-modifizierte Saccharide in guten Ausbeuten erhalten werden. Das Einbringen eines Fluoresceintags ermöglichte Bindungsstudien von vier galactosylierten *N*-Glycanen mit sechs unterschiedlichen Galectinen durch Fluoreszenzpolarisationsmessungen. Weiterhin konnten *N*-Glycanazide einfach und schnell mit ω -Aminoalkinen funktionalisiert werden. Eine Bibliothek aminofunktionalisierter Glycane wurde in Kooperation auf aktivierte Glasoberflächen gedruckt und mit Lectinen getestet.



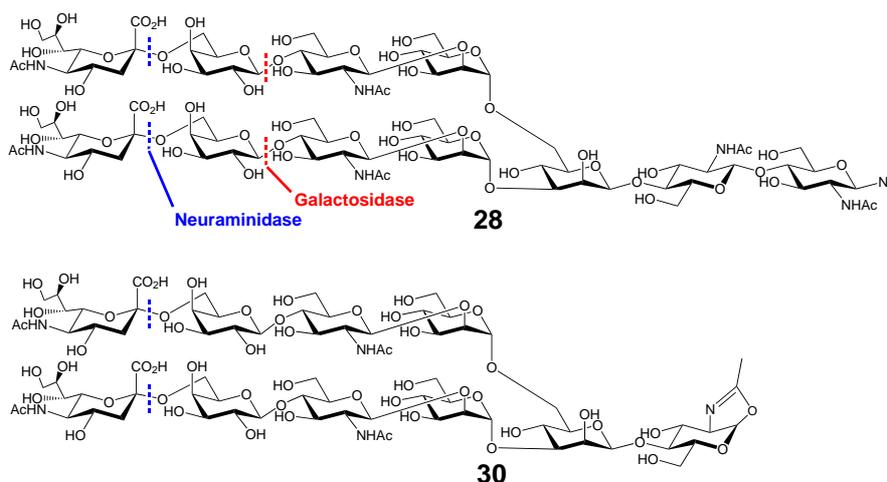
Die Glycanazide **23**, **34**, **35** und **28** ermöglichten den Zugang zu IL6 43-48 Glycopeptid-hydraziden durch Pseudoprolin-vermittelte Lansbury-Aspartylierung. Dafür wurde das Azid zum Halbaminol reduziert und mit einem aktivierten Aspartat des Peptids umgesetzt. Das 2,3-sialylierte Hydrazid **123** konnte aus **121** durch die α 2,3-Sialyltransferase (*Pasteurella multocida*) in guter Ausbeute erhalten werden. Durch die Synthese von derivatisierten Glycanen mit einem Lanthanoid-tag (**128** und **129**) konnte durch NMR-Spektroskopie die globale Konformation eines biantennären *N*-Glycans erstmals in Lösung bestimmt werden.



10 Summary

N-glycans are one of the most common posttranslational modifications of proteins. They affect the folding, the regulation of the activity and the half-life of glycoproteins. In order to study the behaviour of homogeneous glycoforms, *N*-glycans have to be isolated or chemically synthesised. The presence of an anomeric azido group within the saccharide can give access to different glycoconjugates.

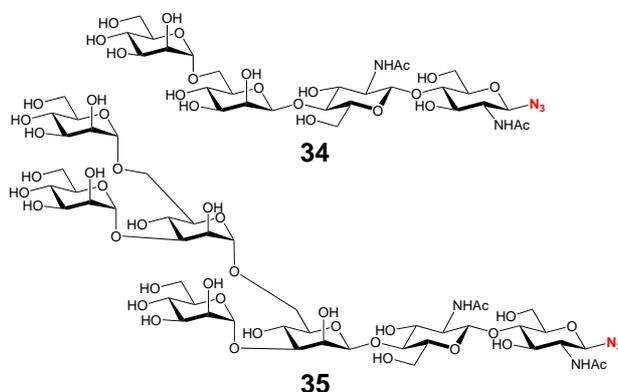
In this work biantennary glycans were gained from the sialoglycopeptide **22**. This was performed by the amidase PNGase F as well as the endoglycosidase S. After the release of the biantennary saccharide **21** by PNGase F the glycan **21** was azidated with DMC to yield **28**. After further treatment with neuraminidase and galactosidase the nonasaccharide **23** and heptasaccharide **19** were obtained. The use of Endo S and the subsequent oxazoline formation led to the decasaccharide **30** and octasaccharide **31** in good yields. Glycan **30** was successfully applied in the enzymatic glycopeptide synthesis.



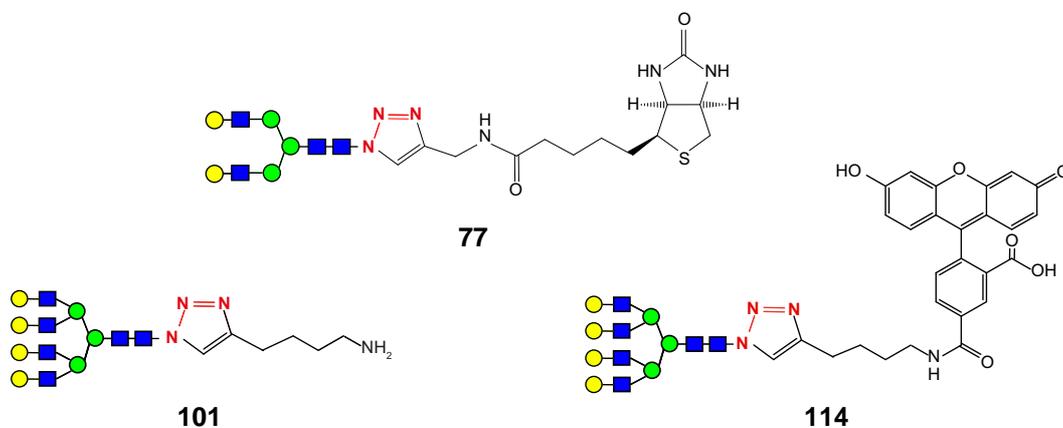
Moreover, the mannosidic azides **34** and **35** could be yielded by chemical synthesis with modular building blocks. In each case hybridic glycans were obtained, deprotected over multistage reactions and finally fermented by an *N*-acetylglucoaminidase. The truncated glycan **34** was gained in a good yield by 1,6-glycosylation of acceptor **39**. By using the imidate **13b** orthoester formation was avoided.

During the glycosylation of **59** with trisaccharide **50** the formation of the orthoester **62** was suppressed. The deprotection route of octasaccharide **61** was optimised. The enzymatic hy-

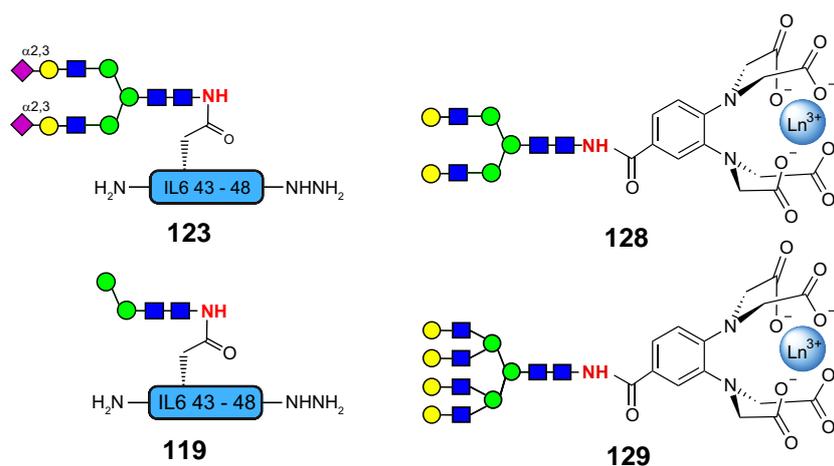
drolysis of the glycosylazide **63** to the heptasaccharide **35** was challenging due to incomplete fermentation. The mannosidic glycosylazide **35** could be isolated via the peracetylated derivative.



In order to obtain glycoconjugates, click-chemistry was applied. The use of copper-catalysed cycloaddition was optimised for *N*-glycans. Two water soluble ligands **86** and **87** were synthesised in order to prevent hydrolysis by different copper species. Thus biotinylated and fluorescein-tagged *N*-glycans were gained in good yields. The use of a fluorescein-tag allowed binding studies with six galectins by fluorescence polarisation measurements. Furthermore, the click-chemistry enabled an easy and quick introduction of amino functionalised spacers to immobilise the oligosaccharides on glycan arrays. In cooperation a library of biantennary glycans with different spacer-lengths was successfully printed on activated glass slides and tested with Lectins.



The use of glycan azides **23**, **35**, **34** and **28** for pseudoproline assisted Lansbury aspartylation gave access to IL6 43-48 glycopeptide fragments. Therefore, the azide was reduced to the hemiaminal and coupled with an activated aspartate within the IL6 peptide fragment. The 2,3-sialylated fragment **123** was obtained by the use of α 2,3-sialyltransferase (*Pasteurella multocida*). The synthesis of glycoconjugates with a lanthanide-tag allowed to determine the global conformation of a biantennary *N*-glycan **128** in solution for the first time by NMR spectroscopy.



11 Experimenteller Teil

11.1 Allgemeine Arbeitstechniken und Methoden

Die verwendeten Lösungsmittel (Aceton, Cyclohexan, Dichlormethan, Diethylether, Ethanol, Ethylacetat, Hexan, Methanol, *iso*-Propanol und Toluol) waren von technischer Qualität und wurden durch Destillation gereinigt. Dichlormethan wurde durch mehrstündige Destillation über Diphosphorpentoxid und Methanol über Magnesiumspänen absolutiert. Acetonitril, Ethylacetat, *n*-Butanol, Dimethylsulfoxid, *N,N*-Dimethylformamid und Pyridin wurden in p.a.-Qualität verwendet.

Argon 5.0 wurde als Schutzgas verwendet. Das Molekularsieb 4 Å (Kugeln) wurde von der Firma Roth bezogen, für Glycosylierungsreaktionen vor der Verwendung gemörsert und im Hochvakuum mit einem Heißluftfön ausgeglüht.

Die rekombinante α 2,3-Sialyltransferase (*Pasteurella multocida*, E.C. 2.4.99.4), die β -*N*-Acetylglucosaminidase (E.C. 3.2.1.52), die Neuraminidase (*Clostridium perfringens*, EC 3.2.1.18) sowie die β -Galactosidase (*Aspergillus oryzae*, E.C. 3.2.1.23) wurden gefriergetrocknet bei Sigma Aldrich® bezogen und in den jeweiligen Puffern vor Anwendung gelöst.

Aluminiumfertigfolien „Alugram Sil G/UV254“ der Firma Macherey-Nagel wurden für die Dünnschichtchromatographie eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzlösung bei 254 nm und durch ein kohlenhydratspezifisches Anfärbereagenz. Das Reagenz besteht aus gleichen Teilen 2 N Schwefelsäure und 0.2 %iger ethanolischer Resorcinmonomethyletherlösung. Die DC-Platte wird in das Anfärbereagenz getaucht und mittels eines Heißluftstroms entwickelt. Biotin sowie dessen Konjugate wurden mit einer Lösung aus 2.5 g Phosphormolybdänsäure $H_3[P(Mo_3O_{10})_4]$ und 1 g $Ce(SO_4)_2 \times 4 H_2O$ in 94 mL Wasser und 6 mL konzentrierter Schwefelsäure gefärbt.

Zur Flashchromatographie wurde eine Reveleris® *iEs* Grace-Flash-Anlage mit Reveleris® SRC Säulen verwendet. Die Detektion erfolgt per ELS- und UV-Detektion (254 nm und 280 nm). Die angegebenen Mischungsverhältnisse für Dünnschichtchromatographie und Flashchromatographie sind Volumenanteile.

Für die Festphasen-RP-Extraktionen wurden SepPak C18 Classic Kartuschen der Firma Waters® verwendet. Mit einer Spritze wurde das Lösungsmittel langsam durch die Kartuschen gedrückt. Für die Elution wurden Acetonitril/Wasser-Gemische verwendet.

ESI-Massenspektren wurden an einem Micromass LCT-Spektrometer aufgenommen, das an eine Agilent HP 1100 HPLC-Anlage mit Diodenarray-Detektor gekoppelt war. Für die LC-MS-Analysen wurden folgende Säulen verwendet: C8: YMC Pro-C8, 120 Å, S-03 µm (Säulengröße: 2.1x50 mm), YMC Pro-C18 sowie YMC-Pack Hydrosphere C18, 120 Å, 3 µm (Säulengröße: 2.0 x 50 mm). Als Eluent A diente Wasser und als Eluent B Acetonitril mit je 0.1 % Ameisensäure. Die Zeitdauer des Gradienten betrug für eine Endkonzentration von 95 % B 25 min. Die Flussrate lag bei 0.2 mL/min. Proben für Direkteinlässe wurden in Wasser, Wasser/Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure oder Methanol gelöst und über eine Spritzenpumpe ins Spektrometer eingebracht.

Ein Pharmacia Äkta Purifier 100 mit einer Pharmacia Biotech P-900 Gradientenpumpe und einem Pharmacia Biotech UV-900 Detektor kam für die Größenausschlusschromatographie zum Einsatz. Detektiert wurde bei 214 nm, 254 nm und 280 nm. Folgende Säulen wurden verwendet: HiLoad Superdex 30 (Säulengröße: 16x600 mm und 26x600 mm) mit 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung als Laufmittel; Sephadex G25 (Säulengröße: 25x710 mm und 25x160 mm). Die Elution erfolgte mit 5 % Ethanol in Wasser.

Für analytische und präparative HPLC-Trennungen wurde eine Amersham Pharmacia Äkta-Basic-Anlage mit einer Pharmacia Biotech P-900 Gradientenpumpe und einem Pharmacia Biotech UV-900 Detektor sowie eine Anlage von Agilent Technologies, Inc. mit einem Entgaser und Quaternärpumpe der Serie 1200 und einem Multiwellenlängendetektor der Serie 1100 verwendet. Die Detektion wurde bei 214 nm, 254 nm und 280 nm durchgeführt. Folgende Säulen kamen zum Einsatz: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8 (150x4.6 mm), Supelco Ascentis® C18 der Größe 100x4.6 mm und 250x10 mm.

Die spezifischen Drehwerte wurden bei Zimmertemperatur an einem Perkin-Elmer Polarimeter 241 bestimmt. Die Messungen wurden in einer 1 mL bzw. einer 5 mL Küvetten der Länge 10 cm bei einer Wellenlänge von 589 nm durchgeführt.

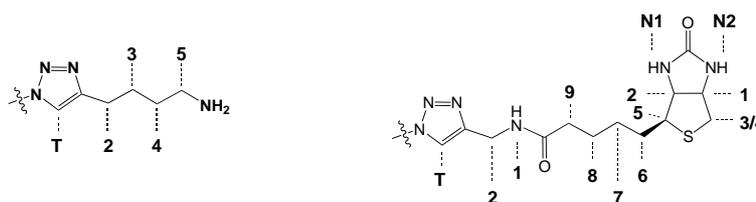


Abbildung 11.1: Zuordnung der NMR-Signale der angeknüpften Tags.

NMR-Spektren wurden bei Zimmertemperatur an einem Jeol JNM-EX-270-FT-Spektrometer, einem Bruker Avance 360 sowie einem Bruker DRX 500-Spektrometer gemessen. Relativ zum Lösungsmittelsignal von [D₆]-DMSO ($\delta(^1\text{H}) = 2.49$ ppm, $\delta(^{13}\text{C}) = 39.5$ ppm) wurden die chemischen Verschiebungen bestimmt, diese beziehen sich auf Tetramethylsilan ($\delta = 0$ ppm). Die Signale wurden mit Hilfe von Spektrensätzen bestehend aus ^1H , ^{13}C (JMOD), HH-COSY, HH-TOCSY, NOESY und HMQC-COSY-Experimenten zugeordnet.^[175, 176] Die Verknüpfungen der einzelnen Zuckerringe wurden mittels NOESY-Experimenten ermittelt.^[177] Durch C,H-Kopplungskonstanten aus gekoppelten HSQC-Spektren wurde die Konfiguration der anomeren Zentren bestimmt.^[93, 178] Die Zuordnung der NMR-Signale wurde, wie in Abbildung 11.1 sowie Abbildung 11.2 dargestellt, durchgeführt.

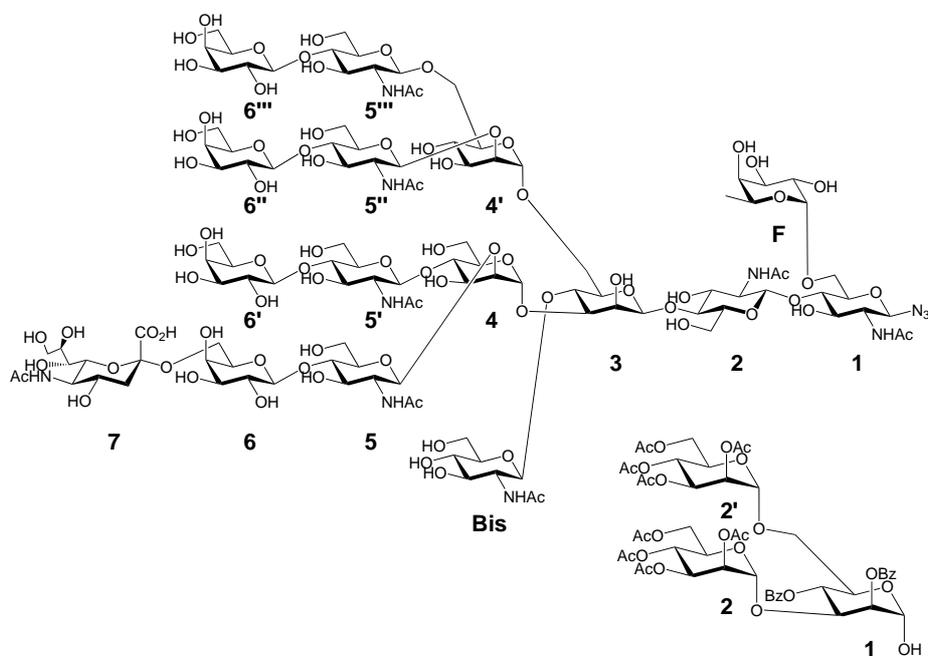


Abbildung 11.2: Zuordnung der NMR-Signale für N-Glycan.

11.2 Versuche zu Kapitel 3.1

O-(5-Acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-

(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-O-2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranose **21**

(α-Neu5Ac-2,6-β-Gal-1,4-β-GlcNAc-1,2-α-Man-1,3-[α-Neu5Ac-2,6-β-Gal-1,4-β-GlcNAc-1,2-α-Man-1,6]-β-Man-1,4-β-GlcNAc-1,4-β-GlcNAc)

200 mg (55.9 μmol, 1 eq) Glycopeptid **22** werden in 33.0 mL 75 mM Phosphatpuffer (pH 7.5) gelöst. Die Reaktion wird mit 3.50 μL PNGase F (5250 U, *Elizabethkingia meningoseptica*, E. C. 3.5.1.52) gestartet. Nach 3 d (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1:1) wird die Lösung lyophilisiert. Das Rohprodukt wird mittels Gelpermeationschromatographie gereinigt (HiLoad Superdex 30; Säulengröße: 26x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung; Fluss: 1.5 mL/min; Retentionszeit: 247.5 min).

Ausbeute: 106.1 mg (47.7 μmol, 85.4 %),

$R_f = 0.81$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1:1),

$C_{84}H_{138}N_6O_{62}$ (2224.00),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 2222.78$,

$M_{\text{gef}} = 2223.95$ (M+H)⁺, 1111.78 (M+2H)²⁺.

O-(5-Acetamido-3,5-didesoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2→6)-O-(β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-O-α-D-mannopyranosyl-(1→3)-[O-(5-acetamido-3,5-didesoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2→6)-O-(β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(O-2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-O-α-D-mannopyranosyl-(1→6)]-O-(β-D-mannopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)azid **28**

(α-Neu5Ac-2,6-β-Gal-1,4-β-GlcNAc-1,2-α-Man-1,3-[α-Neu5Ac-2,6-β-Gal-1,4-β-GlcNAc-1,2-α-Man-1,6]-β-Man-1,4-β-GlcNAc-1,4-β-GlcNAc-N₃)

18.1 mg (8.14 μmol, 1 eq) Undecasaccharid **21** werden in 225 μL Wasser gelöst und im Eisbad gekühlt. Zunächst erfolgt die Zugabe von 48.0 μL (413 μmol, 51 eq) 2,6-Lutidin,

danach 117 g (1.80 mmol, 221 eq) Natriumazid und zuletzt 35.0 mg (207 μmol , 25 eq) 2-Chloro-1,3-dimethylimidazoliumchlorid. Die Reaktion wird bei 2 °C für 6 d belassen (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1). Das Rohprodukt wird mittels Gelpermeation gereinigt (Sephadex G25; Säulengröße: 25x710 mm; Eluent: 5 % Ethanol in Wasser; Fluss: 1.5 mL/min; Retentionszeit: 114.7 min).

Ausbeute: 16.1 mg (7.17 μmol , 88.1 %),

$R_f = 0.20$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$[\alpha]_D^{29} = 21.6$ (0.6, Wasser),

$\text{C}_{84}\text{H}_{137}\text{N}_9\text{O}_{61}$ (2249.01),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 2247.79$,

$M_{\text{gef}} = 2248.64$ (M+H)⁺, 2270.95 (M+Na)⁺.

¹H-NMR (360 MHz, D₂O): $\delta = 4.92$ (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1⁴ α), 4.73 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1⁴ α), 4.58-4.51 (m, 2H, H-1³, H-1¹), 4.43-4.36 (m, 3H, H-1² β , H-1⁵ β , H-1⁵ β), 4.25-4.21 (m, 2H, H-1⁶, H-1⁶), 4.04 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H-2³), 3.98 (dd, 1H, $J_{1,2} = 2.19$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H-2⁴), 3.90 (dd, 1H, $J_{1,2} = 2.61$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H-2⁴), 3.82-3.63 (m, 16H, H-6a², H-6⁷, H-6⁷, H-9⁷, H-9⁷, H-6a⁶, H-3¹, H-3⁴, H-6a⁶, H-3⁴, H-6a⁴, H-3⁶, H-3⁶, H-6a¹, H-6a⁵, H-6a⁴), 3.62-3.49 (m, 20H, H-6a⁵, H-3⁵, H-5⁷, H-5⁷, H-3⁵, H-2², H-3³, H-6a,b³, H-3², H-6b⁵, H-2⁵, H-5⁴, H-4¹, H-2⁵, H-6b⁵, H-4⁵, H-2¹, H-4⁵, H-5⁴), 3.48-3.25 (m, 26H, H-5¹, H-6b¹, H-4⁶, H-8⁷, H-8⁷, H-5³, H-5⁵, H-6b⁴, H-4³, H-6b⁶, H-4⁶, H-5⁵, H-6b⁴, H-6b⁶, H-5⁶, H-4⁷, H-4⁷, H-4², H-5⁶, H-7⁷, H-7⁷, H-6b², H-2⁶, H-2⁶, H-4⁴, H-4⁴), 2.49-2.42 (m, 2H, H-3eq⁷, H-3eq⁷), 1.89-1.80 (m, 18H, NAc) 1.55-1.46 (m, 2H, H-3ax⁷, H-3ax⁷).

¹³C-NMR (90 MHz, D₂O): $\delta = 175.2$, 175.2, 175.1, 175.0, 173.9 (C=O NAc), 103.9 (C-1⁶ β , $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 164.5$ Hz), 103.9 (C-1⁶ β , $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 164.5$ Hz), 101.7 (C-1² β , $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 165.8$ Hz), 100.8 (C-1³ α , $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 161.9$ Hz), 100.5 (C-1⁷), 100.5 (C-1⁷), 99.9 (C-1⁴ β , $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 171.9$ Hz), 99.7 (C-1⁵ β , $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 162.4$ Hz), 99.6 (C-1⁵ β , $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 162.4$ Hz), 97.3 (C-1⁴ α , $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 171.9$ Hz), 88.9 (C-1¹ β , $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 161.9$ Hz), 81.1 (C-4²), 81.0 (C-8⁷), 81.0 (C-8⁷), 80.8 (C-3³), 80.0 (C-4⁵), 80.0 (C-4⁵), 79.1 (C-4³), 76.8 (C-2⁴), 76.8 (C-4⁷), 76.8 (C-4⁷), 76.6 (C-2⁴), 74.8 (C-5⁶), 74.8 (C-5⁶), 74.7 (C-5³), 74.1 (C-3⁵), 74.1 (C-3⁵),

73.9 (C-4¹), 73.2 (C-3²), 72.9 (C-5⁵), 72.8 (C-5^{5'}), 72.6 (C-5⁴), 72.5 (C-5^{4'}), 72.4 (C-5¹), 72.1 (C-3⁶), 72.1 (C-3^{6'}), 71.1 (C-2⁶), 71.1 (C-2^{6'}), 70.6 (C-2³), 69.8 (C-3⁴), 69.8 (C-3^{4'}), 68.8 (C-7⁷), 68.8 (C-7^{7'}), 68.7 (C-3¹), 68.6 (C-4⁶), 68.6 (C-4^{6'}), 67.7 (C-4⁴), 67.7 (C-4^{4'}), 66.2 (C-6³), 66.1 (C-9⁷), 66.1 (C-9^{7'}), 63.7 (C-6²), 63.0 (C-6⁴), 63.0 (C-6^{4'}), 62.1 (C-6⁶), 62.0 (C-6^{6'}), 60.6 (C-6⁷), 60.6 (C-6^{7'}), 60.6 (C-6¹), 60.3 (C-6⁵), 60.3 (C-6^{5'}), 55.3 (C-2²), 55.0 (C-5⁵), 55.0 (C-5^{5'}), 54.8 (C-2¹), 52.2 (C-5⁷), 52.2 (C-5^{7'}), 40.4 (C-3⁷), 40.4 (C-3^{7'}), 22.8, 22.6, 22.5, 22.4 (NAc).

Eintopfreaktion des enzymatischen Verdaus und Azidierung:

51.1 mg (17.8 μmol , 1 eq) Glycopeptid **22** werden in 1.30 mL 75 mM Phosphatpuffer (pH 7.5) gelöst. Die Reaktion wird mit 1.0 μL PNGase F (1500 U, *Elizabethkingia meningoseptica*, E. C. 3.5.1.52) gestartet und bei 37 °C im Thermoschüttler inkubiert. Nach 3 d (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1:1) wird die Lösung lyophilisiert.

Das Rohprodukt wird in 446 μL Wasser gelöst und im Eisbad gekühlt. Zunächst erfolgt die Zugabe von 82.9 μL (714 μmol , 40 eq) 2,6-Lutidin, danach 676 mg (10.7 mmol, 600 eq) Natriumazid und zuletzt 60.3 mg (3.56 mmol, 20 eq) 2-Chloro-1,3-dimethylimidazoliumchlorid. Die Reaktion wird bei 2 °C für 3 d belassen (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1). Das Rohprodukt wird mittels Gelpermeationschromatographie gereinigt (Sephadex G25; Säulengröße: 25x710 mm; Eluent: 5 % Ethanol in Wasser; Fluss: 1.5 mL/min; Retentionszeit: 108 min).

Ausbeute: 20.2 mg (8.97 μmol , 50.9 %),

$R_f = 0.31$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1),

$\text{C}_{84}\text{H}_{137}\text{N}_9\text{O}_{61}$ (2249.01),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 2247.79$,

$M_{\text{gef}} = 2248.64$ (M+H)⁺.

O- β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(*O*-2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-

(1→4)-O-(2-desoxy-2-acetamido-β-D-glucoopyranosyl)-(1→4)-O-(2-desoxy-2-acetamido-β-D-glucoopyranose **24**

(β-Gal-1,4-β-GlcNAc-1,2-α-Man-1,3-[β-Gal-1,4-β-GlcNAc-1,2-α-Man-1,6]-β-Man-1,4-β-GlcNAc-1,4-β-GlcNAc)

23.0 mg (10.0 μmol, 1 eq) Undecasaccharid **21** werden in 750 μL Phosphatpuffer (75 mM, pH 6.0) gelöst. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 μL Neuraminidase (0.25 U, *Clostridium perfringens*, E. C. 3.2.1.18) gestartet. Nach 2 d (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1) wird die Lösung lyophilisiert. Das Rohprodukt wird mittels Gelpermeationschromatographie gereinigt (HiLoad Superdex 30; Säulengröße: 16x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung; Fluss: 1 mL/min; Retentionszeit: 180.0 min).

Ausbeute: 14 mg (8 μmol, 82.5 %),

$R_f = 0.62$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1),

$C_{62}H_{104}N_4O_{46}$ (1641.49),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1640.59$,

$M_{\text{gef}} = 1641.89$ (M+H)⁺, 1662.89 (M+Na)⁺.

Eintopfreaktion des enzymatischen Verdaus

1.0 g (349 μmol, 1 eq) Glycopeptid **22** werden in 34.9 mL 75 mM Phosphatpuffer (pH 7.5) gelöst. Die Reaktion wird mit 6.0 μL PNGase F (9000 U, *Elizabethkingia meningoseptica*, E. C. 3.5.1.52) gestartet und bei 37 °C inkubiert. Nach 2 d (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1:1) wird der pH auf 5.5 eingestellt und 40 μL (1.0 μg, *Clostridium perfringens*, E. C. 3.2.1.18) Neuraminidase zugegeben. Nach 3 d (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1) wird die Lösung lyophilisiert. Das Rohprodukt wird mittels Gelpermeationschromatographie gereinigt (HiLoad Superdex 30; Säulengröße: 16x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung; Fluss: 0.5 mL/min; Retentionszeit: 413.3 min).

Ausbeute: 500 mg (304 μmol, 87.2 %),

$R_f = 0.63$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1),

$C_{62}H_{104}N_4O_{46}$ (1641.49),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1640.59$,

$M_{\text{gef}} = 1641.89 (M+H)^+$, $1662.89 (M+Na)^+$.

O- β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(*O*-2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranosyl)azid **23**

(β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N₃)

44.0 mg (27.0 μ mol, 1 eq) Nonasaccharid **24** werden in 690 μ L Wasser gelöst und im Eisbad gekühlt. Zunächst erfolgt Zugabe von 118 μ L (1.10 mmol, 40 eq) 2,6-Lutidin, danach 1.20 g (19.0 mmol, 685 eq) Natriumazid und zuletzt 93 mg (550 μ mol, 20 eq) 2-Chloro-1,3-dimethylimidazoliumchlorid. Die Reaktion wird bei 2 °C für 3 d belassen (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1). Das Rohprodukt wird mittels Gelpermeationschromatographie gereinigt (Sephadex G25; Säulengröße: 25x710 mm; Eluent: 5 % Ethanol in Wasser; Fluss: 0.5 mL/min; Retentionszeit: 404.8 min).

Ausbeute: 34 mg (20 μ mol, 76.1 %),

$R_f = 0.72$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$[\alpha]_D^{29} = -10.5$ (0.6, Wasser),

$C_{62}H_{103}N_7O_{45}$ (1666.50),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1665.60$,

$M_{\text{gef}} = 1666.89 (M+H)^+$, $1688.31 (M+Na)^+$, $1704.92 (M+K)^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, D₂O mit [D₆]-DMSO als interner Standard): $\delta = 4.92$ (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1⁴ α), 4.73 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1⁴ α), 4.61-4.55 (m, 2H, H-1¹, H-1³), 4.43-4.34

(m, 3H, H-1^{2β}, H-1^{5β}, H-1^{5β}), 4.30-4.24 (m, 2H, H-1⁶, H-1⁶), 4.05 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H-2³), 3.99 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H-2⁴), 3.90 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H-2⁴), 3.81-3.64 (m, 15H, H-6a⁶, H-6a⁶, H-6a³, H-6a², H-3⁶, H-3⁶, H-6a⁴, H-6a⁴, H-3⁴, H-3⁴, H-6a¹, H-6a², H-6b², H-6b⁶, H-6b⁶), 3.63-3.47 (m, 26H, H-6b⁶, H-6b⁶, H-3², H-2², H-6b³, H-3³, H-4², H-4¹, H-4³, H-5¹, H-6b¹, H-2¹, H-2⁵, H-5⁴, H-5⁴, H-5⁶, H-5⁶, H-2⁵, H-6a,b⁵, H-6a,b⁵, H-3⁵, H-3⁵, H-4⁵, H-4⁵), 3.47-3.25 (m, 13H, H-4⁶, H-4⁶, H-6b⁴, H-6b⁴, H-5², H-3¹, H-5³, H-5⁵, H-5⁵, H-2⁶, H-2⁶, H-4⁴, H-4⁴), 1.90-1.82 (m, 12H, NAc).

¹³C-NMR (90 MHz, D₂O mit [D₆]-DMSO als interner Standard): δ= 176.2, 176.1 (C=O NAc), 104.5 (C-1^{6β}, $^1J_{C-1,H-1} = 164.1$ Hz), 104.5 (C-1^{6β}, $^1J_{C-1,H-1} = 163.4$ Hz), 102.9 (C-1^{2β}, $^1J_{C-1,H-1} = 165.9$ Hz), 101.1 (C-1^{4α}, $^1J_{C-1,H-1} = 170.4$ Hz), 102.0 (C-1^{3β}, $^1J_{C-1,H-1} = 161.7$ Hz), 98.6 (C-1^{4α}, $^1J_{C-1,H-1} = 170.6$ Hz), 96.0 (C-1^{5β}, $^1J_{C-1,H-1} = 164.5$ Hz), 95.8 (C-1^{5β}, $^1J_{C-1,H-1} = 167.2$ Hz), 90.0 (C-1^{1β}, $^1J_{C-1,H-1} = 162.6$ Hz), 82.0 (C-3³), 81.0 (C-4²), 80.6 (C-3²), 80.4 (C-4¹), 80.2 (C-4⁵), 80.2 (C-4⁵), 78.1 (C-2⁴), 78.1 (C-2⁴), 77.9 (C-3¹), 76.9 (C-5⁶), 76.9 (C-5⁶), 76.3 (C-4³), 76.3 (C-5¹), 76.0 (C-5⁵), 76.0 (C-5⁵), 75.2 (C-5²), 75.1 (C-5³), 74.4 (C-5⁴), 74.4 (C-5⁴), 73.7 (C-4⁶), 73.6 (C-4⁶), 73.5 (C-3¹), 72.5 (C-3⁵), 72.5 (C-3⁵), 72.5 (C-2⁶), 72.5 (C-2⁶), 71.7 (C-2³), 71.0 (C-3⁴), 71.0 (C-3⁴), 70.1 (C-3⁶), 70.1 (C-3⁶), 68.9 (C-4⁴), 68.9 (C-4⁴), 67.2 (C-6³), 63.3 (C-6⁴), 63.3 (C-6⁴), 62.5 (C-6²), 62.5 (C-6⁵), 62.5 (C-6⁵), 61.5 (C-6⁶), 61.5 (C-6⁶), 61.5 (C-6¹), 56.5 (C-2²), 56.4 (C-2⁵), 56.4 (C-2⁵), 56.1 (C-2¹), 24.0, 23.8, 23.7 (NAc).

Eintopfreaktion des enzymatischen Verdaus und Azidierung

162 mg (56.5 μmol, 1 eq) Glycopeptid **22** werden in 5.65 mL 75 mM Phosphatpuffer (pH 7.5) gelöst. Die Reaktion wird mit 1.5 μL PNGase F (2250 U, *Elizabethkingia meningoseptica*, E. C. 3.5.1.52) gestartet und bei 37 °C inkubiert. Nach 3 d (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumäacetat 1:1) wird der pH auf 6.0 eingestellt und 20 μL (0.50 U, *Clostridium perfringens*, E. C. 3.2.1.18) Neuraminidase zugegeben. Nach 3 d (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumäacetat 1.5:1) wird die Lösung lyophilisiert. Das Rohprodukt wird in 1.41 mL Wasser gelöst und im Eisbad gekühlt. Zunächst erfolgt die Zugabe von 262 μL (2.26 mmol, 40 eq) 2,6-Lutidin, danach 1.10 g (17.0 mmol, 300 eq) Natriumazid und zuletzt 191 mg (1.13 mmol, 20 eq) 2-Chloro-1,3-dimethylimidazoliumchlorid. Die Reaktion wird bei 2 °C

für 3 d belassen (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1). Das Rohprodukt wird mittels Gelpermeation gereinigt (Sephadex G25; Säulengröße: 25x710 mm; Eluent: 5 % Ethanol in Wasser; Fluss: 0.5 mL/min; Retentionszeit: 404.8 min).

Ausbeute: 57.61 mg (34.6 μ mol, 61.2 %),

$R_f = 0.72$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$C_{62}H_{103}N_7O_{45}$ (1666.50),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1665.60$,

$M_{\text{gef}} = 1666.89$ (M+H)⁺, 1688.31 (M+Na)⁺.

O-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)azid **19**

(β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N₃)

5.10 mg (3.10 μ mol, 1 eq) Nonasaccharidazid **23** werden in 203 μ L 100 mM Phosphatpuffer (pH 6.8, 1.5 M MgCl₂) gelöst. Mit 25 μ L β -Galactosidase (10 U, *Aspergillus oryzae*, E. C. 232.864.1) wird die Reaktion gestartet und bei 37 °C im Thermoschüttler inkubiert. Nach 3 d (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) wird die Lösung lyophilisiert. Das Rohprodukt wird mittels Gelpermeation gereinigt (HiLoad Superdex 30; Säulengröße: 16x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung; Fluss: 0.9 mL/min; Retentionszeit: 95.6 min).

Ausbeute: 2.88 mg (2.15 μ mol, 70.4 %),

$R_f = 0.56$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$[\alpha]_D^{28} = -9.0$ (0.5, Wasser),

$C_{50}H_{83}N_7O_{35}$ (1342.22),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1341.49$,

$M_{\text{gef}} = 1342.62 (M+H)^+$, $1364.75 (M+Na)^+$, $1380.39 (M+K)^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, D_2O mit [D6]-DMSO als interner Standard): $\delta = 4.92$ (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1 $^4\alpha$), 4.73 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1 $^4\alpha$), 4.57-4.53 (m, 2H, H-1 1 , H-1 3), 4.41 (d, 1H, H-1 $^2\beta$), 4.38-4.33 (m, 2H, H-1 $^5\beta$, H-1 $^5\beta$), 4.07-4.03 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H-2 3), 3.98 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H-2 4), 3.90 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H-2 4), 3.81-3.64 (m, 14H, H-6a 3 , H-6a 4 , H-6a 5 , H-6a $^{5'}$, H-6a $^{4'}$, H-3 4 , H-3 $^{4'}$, H-6a 2 , H-6a 1), 3.63-3.47 (m, 15H, H-6b 3 , H-4 3 , H-2 2 , H-3 1 , H-3 3 , H-b 5 , H-b $^{5'}$, H-6b 2 , H-2 1 , H-3 2 , H-5 4 , H-4 1 , H-2 5 , H-2 $^{5'}$, H-6b 1), 3.46-3.28 (m, 11H, H-4 2 , H-6b 4 , H-6b $^{4'}$, H-5 $^{4'}$, H-5 3 , H-5 2 , H-5 1 , H-3 $^{5'}$, H-3 $^{5'}$, H-4 4 , H-4 $^{4'}$), 3.27-3.19 (m, 4H, H-4 5 , H-4 $^{5'}$, H-5 5 , H-5 $^{5'}$) 1.87-1.84 (m, 9H, NAc).

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, D_2O mit [D6]-DMSO als interner Standard): $\delta = 176.4$, 176.3 , 176.2 (C=O NAc), 103.0 (C-1 $^2\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 165.9$ Hz), 102.4 (C-1 $^3\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 161.7$ Hz), 101.2 (C-1 $^4\alpha$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 170.4$ Hz), 101.2 (C-1 $^5\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 164.5$ Hz), 101.2 (C-1 $^5\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 167.2$ Hz), 98.6 (C-1 $^4\alpha$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 170.6$ Hz), 90.0 (C-1 $^1\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 162.6$ Hz), 82.1 (C-3 3), 81.1 (C-4 1), 80.3 (C-4 2), 78.1 (C-2 4), 78.1 (C-5 2), 77.9 (C-2 4), 77.4 (C-5 5), 77.4 (C-5 $^{5'}$), 76.0 (C-5 1), 75.9 (C-5 3), 75.2 (C-5 $^{4'}$), 75.0 (C-3 5), 74.9 (C-3 $^{5'}$), 74.5 (C-5 4), 73.9 (C-3 1), 73.6 (C-3 2), 71.8 (C-2 3), 71.5 (C-4 5), 71.5 (C-4 $^{5'}$), 71.1 (C-3 4), 71.0 (C-3 $^{4'}$), 69.0 (C-4 4), 69.0 (C-4 $^{4'}$), 67.5 (C-4 3), 67.2 (C-6 3), 63.3 (C-6 4), 63.2 (C-6 4), 62.2 (C-6 5), 62.2 (C-6 $^{5'}$), 61.5 (C-6 1), 61.5 (C-6 2), 56.9 (C-2 5), 56.9 (C-2 $^{5'}$), 56.5 (C-2 2), 56.1 (C-2 1), 24.0 , 23.8 , 23.7 (NAc).

11.3 Versuche zu Kapitel 3.2

O-(5-Acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranose **20**

(α -Neu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[α -Neu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc)

50.2 mg (17.5 μ mol, 1 eq) Glycopeptid **22** werden in 300 μ L 10 mM Phosphatpuffer (pH 6.1), welcher 0.1 mg/mL bovines Serumalbumin und 150 mM Natriumchlorid enthält, gelöst. Die Reaktion wird mit 50 μ L Endo-S (IgGZERO™ (EndoS), *Streptococcus pyogenes*, E.C. 3.2.1.96) gestartet. Nach Reaktionsende (10 d, DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1:1) wird die Lösung lyophilisiert. Das Rohprodukt wird mittels Festphasen-RP-Extraktion gereinigt (Waters SepPak C18, Kartuschengröße: 2x 360 mg; Elution: 0 %, 5 %, 100 % Acetonitril; Fraktionsgröße: 5 mL). Das Produkt **20** eluiert bei 0 % Acetonitril.

Ausbeute: 26.6 mg (13.2 μ mol, 75.2 %),

$R_f = 0.52$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$C_{76}H_{125}N_5O_{57}$ (2020.81),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 2019.70$,

$M_{\text{gef}} = 1010.92$ (M+2H)²⁺.

O-(5-Acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-
O-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-
O- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-
nonulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy-
 β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-
(1 \rightarrow 4)-*O*-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl-oxazolin **30**

(α -Neu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[α -Neu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-oxazolin)

15.1 mg (7.45 μ mol, 1 eq) Decasaccharid **20** werden in 149 μ L Wasser gelöst und im Eisbad für 5 min gekühlt. Es folgt die Zugabe von 25.4 mg (150.3 μ mol, 20 eq) 2-Chloro-1,3-dimethylimidazoliumchlorid. Abschließend wird die Reaktion mit 46.5 μ L (334 μ mol, 45 eq) Triethylamin versetzt. Die Reaktion wird bei 2 °C für 40 min belassen. Das Rohprodukt

wird ohne Gefriertrocknung mittels Gelpermeationschromatographie gereinigt (Sephadex G25; Säulengröße: 25x160 mm; Eluent: 0.05 % Triethylamin in Wasser; Fluss: 0.8 mL/min; Retentionszeit: 37.6 min).

Ausbeute: 10.8 mg (5.38 μ mol, 72.2 %),

$C_{76}H_{123}N_5O_{56}$ (2002.79).

1H -NMR (500 MHz, D_2O mit [D6]-DMSO als interner Standard): δ = 5.90 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.29$ Hz, H-1²), 4.93 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1⁴ α), 4.77 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1⁴ α), 4.63-4.53 (m, 1H, H-1³ β), 4.45-4.39 (m, 2H, H-1⁵ β , H-1⁵ β), 4.28-4.23 (m, 2H, H-1⁶, H-1⁶), 4.20 (dd, 1H, $J_{2,3} < 1$ Hz, $J_{3,4} < 1$ Hz, H-3²), 4.02-3.95 (m, 4H, H-2², H-2⁴, H-2⁴, H-2³), 3.83-3.76 (m, 5H, H-6a³, H-6a⁶, H-6⁷, H-6⁷, H-6a⁶), 3.75-3.65 (m, 12H, H-9⁷, H-9⁷, H-6a⁴, H-6a⁴, H-3⁴, H-3⁶, H-6a⁵, H-6a⁵, H-3⁴, H-3⁶, H-6a², H-6b⁶), 3.65-3.50 (m, 18H, H-6b⁶, H-5⁵, H-5⁷, H-5⁷, H-5⁵, H-8⁷, H-8⁷, H-2⁵, H-4⁵, H-4⁵, H-2⁵, H-4², H-7⁷, H-7⁷, H-4³, H-4⁷, H-4⁷, H-5⁴), 3.50-3.38 (m, 13H, H-5⁴, H-3⁵, H-4⁶, H-6b⁴, H-6b⁴, H-6b¹, H-4⁶, H-5³, H-3⁵, H-5⁶, H-6b⁵, H-6b⁵, H-5⁶), 3.38-3.20 (m, 7H, H-4⁴, H-4⁴, H-6b³, H-2⁶, H-2⁶, H-4³, H-5²), 2.51-2.47 (m, 2H, H-3eq⁷, H-3eq⁷), 1.90-1.81 (m, 15H, NAc, CH₃), 1.55-1.49 (m, 2H, H-3ax⁷, H-3ax⁷).

^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O mit [D6]-DMSO als interner Standard, Verschiebungen wurden aus einem HSQC-Spektrum ermittelt): δ = (C-3²), 175.2 (C=O NAc), 105.0 (C-1⁶), 105.0 (C-1⁶) 102.8 (C-1³), 101.4 (C-1²), 100.9 (C-1⁴), 100.7 (C-1⁵), 100.7 (C-1⁵), 98.0 (C-1⁴), 82.1 (C-5³), 82.0 (C-4³), 79.3 (C-4²), 77.8 (C-2⁴), 77.5 (C-2⁴), 75.8 (C-5⁶), 75.8 (C-5⁶), 75.2 (C-5⁵), 75.5 (C-5⁵), 74.9 (C-7⁷), 74.9 (C-7⁷), 74.1 (C-4⁷), 74.1 (C-4⁷), 73.9 (C-5⁴), 73.9 (C-5⁴), 73.8 (C-4⁶), 73.8 (C-4⁶), 73.6 (C-8⁷), 73.6 (C-8⁷), 73.5 (C-4⁵), 73.5 (C-4⁵), 73.2 (C-3⁶), 73.2 (C-3⁶), 72.3 (C-5²), 72.1 (C-2⁶), 72.1 (C-2⁶), 71.7 (C-2³), 71.0 (C-3⁴), 71.0 (C-3⁴), 70.5 (C-3²), 69.8 (C-4⁴), 69.8 (C-4⁴), 69.7 (C-9⁷), 69.7 (C-9⁷), 69.6 (C-3⁵), 69.6 (C-3⁵), 68.7 (C-4³), 67.2 (C-6⁷), 67.2 (C-6⁷), 66.6 (C-2²), 64.6 (C-6³), 64.1 (C-6²), 63.1 (C-6⁵), 63.1 (C-6⁵), 62.9 (C-6⁴), 62.9 (C-6⁴), 61.6 (C-6⁶), 61.6 (C-6⁶), 56.0 (C-2⁵), 56.0 (C-2⁵), 53.2 (C-5⁷), 53.2 (C-5⁷), 23.8, 23.5 (NAc), 14.3 (CH₃).

O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy-

β -D-glucopyranosyl)-(1→2)-O- α -D-mannopyranosyl-(1→6)]-O-(β -D-mannopyranosyl)-(1→4)-O-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranose **29**

(β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc)

26.4 mg (13.1 μ mol, 1 eq) Halbacetal **20** werden in 934 μ L 75 mM Phosphatpuffer (pH 6.1) gelöst. Die Reaktion wird durch Zugabe von 15 μ L Neuraminidase (0.4 U, *Clostridium perfringens*, E.C. 3.2.1.18) gestartet. Nach 1 d (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1) wird die Lösung lyophilisiert. Das Rohprodukt wird mittels Festphasen-RP-Extraktion (Waters SepPak C18, Kartuschengröße: 2x 360 mg; Elution: 0 %, 5 %, 100 % Acetonitril; Fraktionsgröße: 5 mL, Elution von **29** bei 0 % Acetonitril) und Gelpermeationschromatographie gereinigt (HiLoad Superdex 30; Säulengröße: 16x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung; Fluss: 0.8 mL/min; Retentionszeit: 98.8 min).

Ausbeute: 16.1 mg (11.2 μ mol, 85.5 %),

$R_f = 0.56$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1),

$C_{54}H_{91}N_3O_{41}$ (1438.30),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1437.51$,

$M_{\text{gef}} = 1460.24$ (M+Na)⁺.

O- β -D-galactopyranosyl-(1→4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1→2)-O- α -D-mannopyranosyl-(1→3)-[O- β -D-galactopyranosyl-(1→4)-(O-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1→2)-O- α -D-mannopyranosyl-(1→6)]-O-(β -D-mannopyranosyl)-(1→4)-O-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl-oxazolin **31**

(β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-oxazolin)

6.13 mg (4.26 μ mol, 1 eq) Octasaccharid **29** werden in 85.2 μ L Wasser gelöst und im Eisbad für 10 min gekühlt. Es folgt die Zugabe von 16.1 mg (95.0 μ mol, 22 eq) 2-Chloro-1,3-dimethylimidazoliumchlorid. Abschließend wird die Reaktion mit 26.7 μ L (192 μ mol, 45 eq)

Triethylamin versetzt. Die Reaktion wird bei 2 °C für 45 min belassen. Das Rohprodukt wird ohne Gefriertrocknung mittels Gelpermeationschromatographie gereinigt (Sephadex G25; Säulengröße: 25x160 mm; Eluent: 0.05 % Triethylamin in Wasser; Fluss: 1.0 mL/min; Retentionszeit: 42.0 min).

Ausbeute: 6.61 mg (4.65 µmol, quant.),

C₅₄H₈₉N₃O₄₀ (1420.28).

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D6]-DMSO als interner Standard): δ = 5.90 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.20$ Hz, H-1²), 4.92 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1^{4α}), 4.78-4.53 (m, 2H, H-1^{4α}, H-1^{3β}), 4.43-4.36 (m, 2H, H-1^{5β}, H-1^{5β}), 4.29-4.25 (m, 2H, H-1⁶, H-1⁶), 4.02-3.93 (m, 4H, H-2⁴, H-2², H-2⁴, H-2³), 3.82-3.62 (m, 11H, H-3², H-6a², H-6a⁴, H-4³, H-6a⁴, H-3⁴, H-3⁴, H-6b², H-6a⁵, H-6a³, H-6a⁵), 3.61-3.50 (m, 20H, H-6b⁵, H-6b⁵, H-5⁴, H-6a,b⁶, H-2⁵, H-4⁶, H-5⁶, H-5³, H-4⁶, H-4⁵, H-6a,b⁶, H-5⁶, H-5⁴, H-2⁵, H-5⁵, H-4⁵, H-3³, H-5⁵), 3.49-3.26 (m, 13H, H-4², H-3⁶, H-6b⁴, H-3⁶, H-6b⁴, H-6b³, H-3⁵, H-3⁵, H-2⁶, H-5², H-2⁶, H-4⁴, H-4⁴), 1.90-1.81 (m, 9H, NAc, CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O mit [D6]-DMSO als interner Standard): δ = (C-3²), 176.3, 176.2 (C=O NAc), 104.5 (C-1⁶), 104.5 (C-1⁶), 103.0 (C-1³), 101.5 (C-1²), 101.1 (C-1⁵), 101.1 (C-1⁵), 100.9 (C-1⁴), 98.1 (C-1⁴), 82.1 (C-5⁴), 82.0 (C-5⁴), 80.1 (C-5⁵), 80.1 (C-5⁵), 77.9 (C-2⁴), 77.6 (C-2⁴), 76.9 (C-5⁶), 76.9 (C-5⁶), 76.9 (C-3³), 76.4 (C-3⁵), 76.3 (C-3⁵), 76.3 (C-5²), 74.9 (C-5³), 74.5 (C-4²), 74.1 (C-3⁶), 74.1 (C-3⁶), 73.6 (C-4⁵), 73.5 (C-4⁵), 72.5 (C-2⁶), 72.5 (C-2⁶), 71.9 (C-2³), 71.8 (C-4⁶), 71.8 (C-4⁶), 71.0 (C-3⁴), 70.8 (C-3⁴), 70.2 (C-4³), 68.9 (C-4⁴), 68.9 (C-3²), 68.8 (C-4⁴), 66.8 (C-2²), 64.9 (C-6³), 63.3 (C-6⁴), 63.2 (C-6⁴), 62.6 (C-6⁶), 62.6 (C-6⁶), 61.6 (C-6²), 61.6 (C-6⁵), 61.6 (C-6⁵), 56.5 (C-2⁵), 56.5 (C-2⁵), 23.9, 23.7 (NAc).

Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn-(*O*-(5-Acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2→6)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1→4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1→2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1→3)-[*O*-(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2→6)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1→4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1→2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1→6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1→4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-

glucopyranosyl)-(1→4)-O-2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranose)-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys **33**

Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn-(α-Neu5Ac-2,6-β-Gal-1,4-β-GlcNAc-1,2-α-Man-1,3-[α-Neu5Ac-2,6-β-Gal-1,4-β-GlcNAc-1,2-α-Man-1,6]-β-Man-1,4-β-GlcNAc-1,4-β-GlcNAc)-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys

0.05 mg (12.0 nmol, 1 eq) Fc-Glycopeptid **32**, gelöst in 0.4 μL Dimethylsulfoxid, werden zu 0.1 mg (50.0 nmol, 4.2 eq) Oxazolin **30**, gelöst in 0.4 μL Phosphatpuffer (50 mM, 8.1 pH), gegeben. 3.17 μL Phosphatpuffer (50 mM, 7.1 pH) und 24 μg Endo-M-N175Q (24 μg/μL, *Mucor hiemalis*, E. C. 3.2.1.96) werden zu der Glycopeptidlösung gegeben und das Gemisch wird bei 30 °C gerührt. Nach 1 h und 24 h wird eine LC-MS Probe vorbereitet.

Ausbeute: *nicht bestimmt*

C₅₄H₉₁N₃O₄₁ (6345.63),

ESI-MS:

M_{ber} = 6341.89,

M_{gef} = 1269.38 (M+5H)⁵⁺, 1058.31 (M+6H)⁶⁺, 906.98 (M+7H)⁷⁺.

11.4 Versuche zu Kapitel 3.3.1

O-(2,3-Di-O-acetyl-β-D-mannopyranosyl)-(1→4)-O-(3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-O-3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosylazid **36**

(β-Ac₂Man-1,4-β-Bn₂GlcNPht-1,4-β-Bn₂GlcNPht-N₃)

99.3 mg (80.3 μmol, 1 eq) Core-Trisaccharid **8** werden in 3.2 mL (39.6 mmol, 500 eq) Pyridin gelöst, mit 1.6 mL (16.8 mmol, 210 eq) Acetanhydrid versetzt und 1.5 h bei Zimmertemperatur gerührt. Nach Reaktionsende (DC: Hexan/Aceton 1.5:1) wird viermal mit Toluol codestilliert und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das acetylierte Trisaccharid wird

mit einer Lösung von 142.8 mg (642.5 μmol , 8 eq) *para*-Toluolsulfonsäure Monohydrat in 5.4 mL Acetonitril versetzt und 30 min bei Zimmertemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsetzung (DC: Hexan/Aceton 1.5:1) wird die Reaktion mit 64.8 μL (803 μmol , 10 eq) Pyridin gestoppt und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in 60 mL Dichlormethan aufgenommen, mit 1 M Salzsäure- sowie 2 M Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen und die wässrigen Phasen werden zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, im Vakuum eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 \rightarrow 1.5:1, d: 2 cm, l: 10 cm) gereinigt.

Ausbeute: 61.7 mg (50.1 μmol , 62.3 %),

$R_f = 0.26$ (Hexan/Aceton 1.5:1),

$\text{C}_{66}\text{H}_{65}\text{N}_5\text{O}_{19}$ (1232.24),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1231.43$,

$M_{\text{gef}} = 1255.42$ (M+Na)⁺.

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 7.95\text{--}7.66$ (m, 8H, Pht), 7.37–7.18 (m, 10H, Ar), 6.97–6.71 (m, 10H, Ar), 5.33–5.17 (m, 4H, H-2³, H-1¹, OH-4³, H-1²), 4.97–4.86 (m, 2H, OCH₂, H-1³), 4.85–4.73 (m, 2H, H-3³, OCH₂), 4.63–4.45 (m, 3H, OCH₂, OH-6³), 4.42–4.28 (m, 4H, OCH₂, OCH₂), 4.21–3.94 (m, 5H, H-3², H-5¹, H-3¹, H-4², H-2²), 3.81–3.15 (m, 11H, H-2¹, H-6a¹, H-6a³, H-6b¹, H-5², H-4³, H-6a², H-6b³, H-6b², H-4¹, H-5³), 2.06–1.92 (m, 6H, OAc).

¹³C-NMR (90 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 169.5, 169.7$ (C=O Ac), 168.1, 167.4, 167.1 (C=O Pht), 138.4, 138.3, 138.1, 137.9 (C-1 Ar), 134.8 (C Pht), 130.8, 130.7, 130.6 (C Ar), 128.3, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 127.4, 127.3, 127.1, 127.1 (C Ar), 123.5, 123.4 (C Pht), 97.4 (C-1³ β , ¹ $J_{\text{C-1,H-1}} = 163.53$ Hz), 96.4 (C-1² β , ¹ $J_{\text{C-1,H-1}} = 167.74$ Hz), 84.9 (C-1³ β , ¹ $J_{\text{C-1,H-1}} = 167.95$ Hz), 77.3 (C-5³), 77.2 (C-4²), 76.9 (C-3²), 76.2 (C-5¹), 75.6 (C-5²), 77.2 (C-3¹), 74.2 (C-4¹), 74.0 (OCH₂), 73.8 (OCH₂), 73.5 (C-3³), 72.1 (OCH₂), 71.7 (OCH₂), 69.2 (C-2³), 68.0 (C-6¹), 67.6 (C-6²), 64.1 (C-4³), 60.6 (C-6³), 56.0 (C-2²), 54.6 (C-2¹), 20.7, 20.6 (Ac).

O-(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)-*O*-(2,3-di-*O*-acetyl- β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosylazid **44**

(β -Ac₃GlcNPht-1,2- α -Ac₃Man-1,6- β -Ac₂Man-1,4- β -Bn₂GlcNPht-1,4- β -Bn₂GlcNPht-N₃)

34.3 mg (27.8 μ mol, 1 eq) Trisaccharid **36** werden unter Argon mit 21.9 mg (25.1 μ mol, 1.1 eq) Donor **13a** und 73.2 mg frisch ausgeglühtem, gemörsertem Molekularsieb vereint. Das Gemisch wird in 930 μ L absolutem Dichlormethan suspendiert und 20 min bei Zimmertemperatur gerührt. Nach Rühren der Suspension bei -60 °C für 2 h werden 252 μ L (1.4 μ mol, 0.05 eq) einer 0.1 %igen -Stammlösung in absolutem Dichlormethan langsam zugetropft. Das Gemisch wird 75 min bei -50 °C gerührt. Nach Reaktionsende (DC-Kontrolle: Hexan/Aceton 1.5:1) werden 4.5 μ L (55.7 μ mol, 2 eq) Pyridin zugegeben und 25 min bei Zimmertemperatur gerührt. Im Anschluss wird mit Dichlormethan verdünnt, über Celite filtriert, mit 2 M Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen und die wässrige Phase wird zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, im Vakuum eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Aceton 2.5:1 \rightarrow 2:1, d: 2 cm, l: 10 cm) gereinigt.

Ausbeute: 27.4 mg (14.1 μ mol, 50.8 %),

R_f = 0.14 (Hexan/Aceton 1.5:1),

$[\alpha]_D^{25}$ = -5.13 (0.55, Dichlormethan),

C₉₈H₁₀₀N₆O₃₆ (1937.86),

ESI-MS:

M_{ber} = 1936.62,

M_{gef} = 1956.39 (M+H₂O)⁺, 1977.39 (M+K)⁺.

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 7.95-7.68 (m, 12H, Pht), 7.36-7.19 (m, 8H, C-1/5 Ar), 6.93-6.73 (m, 12H, C-2/3/4 Ar), 5.53 (dd, 1H, $J_{2,3}$ = 9.72 Hz, $J_{3,4}$ = 11.25 Hz, H-3^{4'}), 5.44 (d, 1H, $J_{\text{OH},4}$ = 5.08 Hz, HO-4³), 5.32-5.13 (m, 3H, H-1², H-1¹, H-1³), 5.05-4.76 (m, 7H, H-3³, H-2^{4'}, H-3^{5'}, H-4^{5'}, H-1^{4'}, OCH₂), 4.72-4.65 (m, 1H, OCH₂), 4.58-5.52 (m, 2H, OCH₂), 4.45-4.29 (m, 3H, OCH₂, OCH₂), 4.18-3.88 (m, 12H, H-6a^{5'}, H-4³, H-4¹, H-3³, H-2², H-6b^{5'},

H-3¹, H-4^{4'}, H-5^{4'}, H-2^{5'}, H-2³, H-4³), 3.81-3.62 (m, 4H, 2¹, H-6a^{4'}, H-6a², H-6a³), 3.60-3.43 (m, 5H, H-5¹, H-6b², H-6b^{4'}, H-5³, H-6a¹), 3.42-3.24 (m, 4H, H-6b³, H-5³, H-6b¹, H-5²), 2.13-1.71 (m, 24H, OAc).

¹³C-NMR (90 MHz, [D6]-DMSO, Verschiebungen wurden aus einem HSQC-Spektrum ermittelt): δ = 134.6 (Pht), 127.6, 127.5, 127.3 (Ar), 123.3 (Pht), 96.8 (C-1^{5'}), 96.7 (C-1^{4'}), 96.5 (C-1³), 95.9 (C-1²), 84.6 (C-1¹), 77.4 (C-4²), 76.3 (C-4^{4'}), 76.1 (C-3²), 76.1 (C-4¹), 75.4 (C-5¹), 75.2 (C-5^{4'}), 74.5 (C-5³), 74.0 (C-5²), 73.8, 73.6, 73.5 (CH₂O), 73.5 (C-3¹), 73.3 (C-4³), 72.2 (CH₂O), 71.5 (CH₂O), 70.8 (C-2³), 70.4 (C-5^{5'}), 69.5 (C-3^{4'}), 69.1 (C-2^{4'}), 68.8 (C-4^{5'}), 68.4 (C-3³), 67.7 (C-6²), 67.2 (C-6¹), 64.2 (C-3^{5'}), 61.6 (C-6^{5'}), 61.5 (C-6³), 61.4 (C-6^{4'}), 55.4 (C-2^{5'}), 54.4 (C-2¹), 53.6 (C-2²), 20.4, 20.3, 20.2, 20.2, 20.0, 19.8 (OAc).

O-(2,3-Di-*O*-acetyl-4-benzyl- β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosylazid **39**

(β -Ac₂BnMan-1,4- β -Bn₂GlcNPht-1,4- β -Bn₂GlcNPht-N₃)

50.0 mg (40.4 μ mol, 1 eq) Core-Trisaccharid **8** werden in 1.63 mL (20.2 mmol, 500 eq) Pyridin gelöst und 809 μ L (8.48 mmol, 210 eq) Acetanhydrid werden zugetropft. Das Gemisch wird 50 min bei Zimmertemperatur gerührt. Nach Reaktionsende (DC: Hexan/ Aceton 1.5:1) wird im Vakuum eingengt, der Rückstand viermal mit Toluol codestilliert und im Hochvakuum getrocknet.

Das acetylierte Trisaccharid wird unter Argon bei -60 °C in 400 μ L (404 μ mol, 10 eq) Tetrahydrofuran-Boran-Komplexlösung (1 M) gelöst. Unter Rühren werden 142 μ L (141.6 μ mol, 3.5 eq) Dibutyltrifluormethansulfonyloxyboran (1 M in Dichlormethan) zuge- tropft. Die Lösung wird über 1.5 h auf 0 °C temperiert und 25 min bei 0 °C gerührt. Nach Reaktionsende (DC: Cyclohexan/Ethylacetat 1:1) werden 50 μ L Triethylamin in 250 μ L Me- thanol zugegeben und unter Rühren wird die Lösung über 1 h auf Zimmertemperatur erwärmt. Das Reaktionsprodukt wird mit Dichlormethan verdünnt, mit 2 M Kaliumhydrogencarbonat- Lösung gewaschen und die wässrige Phase wird zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, im Vakuum ein-

geengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Aceton 5:1 → 3:1, d: 2 cm, l: 10 cm) gereinigt.

Ausbeute: 37.2 mg (28.1 μmol , 69.6 %),

$R_f = 0.52$ (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1),

$\text{C}_{73}\text{H}_{71}\text{N}_5\text{O}_{19}$ (1322.37),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1321.47$,

$M_{\text{gef}} = 1345.25$ ($M+\text{Na}$)⁺.

O-(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-trifluoracetamido- β -D-glucopyranosyl)-(1→2)-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1→6)-*O*-(2,3-di-*O*-acetyl-4-benzyl- β -D-mannopyranosyl)-(1→4)-*O*-(3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1→4)-*O*-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosylazid **47**

(β -Ac₃GlcNTFAc-1,2- α -Ac₃Man-1,6- β -Ac₂BnMan-1,4- β -Bn₂GlcNPht-1,4- β -Bn₂GlcNPht-N₃)

44.7 mg (33.8 μmol , 1 eq) Trisaccharid **39** werden unter Argon mit 35.9 mg (43.9 μmol , 1.3 eq) Donor **13b** und 88.7 mg frisch ausgeglühtem, gemörsertem Molekularsieb vereint. Das Gemisch wird in 676 μL absolutem Dichlormethan suspendiert und 20 min bei Zimmertemperatur gerührt. Nach Rühren der Suspension bei -40 °C für 1 h werden 612 μL (3.4 μmol , 0.1 eq) einer 0.01 %igen -Stammlösung in absolutem Dichlormethan langsam zutropft. Das Gemisch wird 60 min bei -30 °C gerührt, mit 500 μL Dichlormethan verdünnt und weitere 19 h bei Zimmertemperatur gerührt. Nach Reaktionsende (DC: Hexan/Aceton 1.5:1) werden 5.5 μL (67.6 μmol , 2 eq) Pyridin zugegeben und 30 min bei Zimmertemperatur gerührt. Im Anschluss wird mit 30 mL Dichlormethan verdünnt, über Celite filtriert, mit 2 M Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen und die wässrige Phase wird dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, im Vakuum eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat 3:1→1:1, d: 2 cm, l: 10 cm) gereinigt.

Ausbeute: 52.6 mg (26.4 μmol , 78.0 %),

$R_f = 0.26$ (Hexan/Aceton 1.5:1),

$[\alpha]_D^{27} = -1.61$ (0.55, Dichlormethan),

$\text{C}_{99}\text{H}_{103}\text{N}_6\text{O}_{35}$ (1993.89),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1992.64$,

$M_{\text{gef}} = 2012.46$ ($\text{M}+\text{NH}_4$)⁺, 2016.54 ($\text{M}+\text{K}$)⁺.

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 9.42$ (d, 1H, $J_{\text{NH},2} = 9.50$ Hz, NHTFAc), 7.93-7.65 (m, 8H, Pht), 7.38-7.21 (m, 15H, Ar), 6.98-6.92 (m, 2H, Ar), 6.87-6.72 (m, 8H, Ar), 5.33 (dd, 1H, H-3^{4'}), 5.27 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.59$ Hz, H-1¹), 5.20-5.10 (m, 2H, H-1², H-4^{4'}), 5.07-4.88 (m, 4H, H-2³, H-2^{4'}, H-1³, H-3^{5'}), 4.87-4.65 (m, 5H, H-1^{4'}, CH₂O, H-4^{5'}, CH₂O), 4.62-4.49 (m, 4H, CH₂O, CH₂O), 4.45 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.52$, H-1^{5'}), 4.37-4.32 (m, 3H, CH₂O, CH₂O), 4.19-3.91 (m, 9H, H-3², H-4¹, H-4³, H-3¹, H-2², H-3³, H-6a^{5'}, H-4², H-6b^{5'}), 3.89-3.52 (m, 11H, H-6a,b^{4'}, H-2^{5'}, H-5^{4'}, H-2¹, H-6a³, H-6a², H-6b³, H-5³, H-6b², H-5¹), 3.45-3.23 (m, 3H, H-6a¹, H-6b¹, H-5²), 3.18-3.11 (m, 1H, H-5^{5'}), 2.11 (s, 3H, OAc), 2.03-1.83 (m, 18H, OAc), 1.75 (s, 3H, OAc).

¹³C-NMR (90 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 169.9, 169.7, 169.5, 169.4, 169.1, 169.1, 167.7, 167.2$ (C=O OAc), 156.5 (q, $^2J_{\text{C,F}} = 36.7$, C=O TFAc), 138.3, 138.2, 138.1, 138.0 (C-1 Ar), 134.8, 134.6 (C-4/5 Pht), 130.7, 130.6, 130.5 (C-1/2 Pht), 128.2, 128.2, 128.0, 127.8, 127.7, 127.4, 127.4, 127.3, 127.2, 127.1, 126.8 (C Ar), 115.7 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 286.7$, CF₃), 99.2 (C-1^{5'}), 97.2 (C-1^{4'}), 96.7 (C-1³), 96.5 (C-1²), 84.8 (C-1¹), 77.6 (C-4²), 76.4 (C-3¹), 75.6 (C-4³), 75.6 (C-4¹), 75.6 (C-5¹), 75.1 (C-3²), 74.6 (C-3³), 74.1 (C-5²), 73.8, 73.7, 73.4 (CH₂O), 73.3 (C-5³), 73.2 (C-4^{4'}), 73.1 (C-5^{4'}), 72.2 (CH₂O), 71.6 (CH₂O), 71.5 (C-2^{4'}), 70.6 (C-5^{5'}), 69.8 (C-3^{5'}), 69.1 (C-3^{4'}), 67.9 (C-6²), 67.7 (C-4^{5'}), 67.5 (C-6¹), 67.1 (C-6^{4'}), 64.4 (C-2³), 61.5 (C-6^{5'}), 61.4 (C-6³), 55.7 (C-2²), 54.5 (C-2¹), 52.9 (C-2^{5'}), 20.5, 20.5, 20.4, 20.4, 20.3, 20.2, 20.2, 20.0, 20.0 (OAc).

O-(2,3-Di-*O*-benzoyl- β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosylazid **45**

(β -Bz₂Man-1,4- β -Bn₂GlcNPht-1,4- β -Bn₂GlcNPht-N₃)

40.0 mg (32.4 μ mol, 1 eq) Core-Trisaccharid **8** werden in 600 μ L Dichlormethan und 32.4 μ L (402 μ mol, 12.4 eq) Pyridin gelöst und im Eisbad gekühlt. 46.4 μ L (402 μ mol, 12.4 eq) Benzoylchlorid, verdünnt mit 200 μ L Dichlormethan, werden langsam zum Saccharid zugetropft. Nach Reaktionsende (DC: Hexan/Aceton 1.5:1) wird mit 1 mL Methanol verdünnt, das Lösungsmittel eingeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das benzylierte Trisaccharid wird mit einer Lösung von 49.2 mg (286 μ mol, 8.8 eq) *para*-Toluolsulfonsäure Monohydrat in 2.1 mL Acetonitril versetzt und 30 min bei Zimmertemperatur gerührt. Nach vollständiger Umsetzung (DC: Hexan/Aceton 1.5:1) wird die Reaktion mit 36.6 μ L (453 μ mol, 14 eq) Pyridin gestoppt und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in 30 mL Dichlormethan aufgenommen, mit 1 M Salzsäure sowie 2 M Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen und die wässrigen Phasen werden zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, im Vakuum eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Aceton 3:1, d: 2 cm, l: 7 cm) gereinigt.

Ausbeute: 15.6 mg (11.5 μ mol, 35.6 %),

$R_f = 0.22$ (Hexan/Aceton 1.5:1),

C₇₆H₆₉N₅O₁₉ (1356.38),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1355.46$,

$M_{\text{gef}} = 1378.85$ (M+Na)⁺.

O-(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)-*O*-(2,3-di-*O*-acetyl- β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosylazid **46**

(β -Ac₃GlcNPht-1,2- α -Ac₃Man-1,6- β -Ac₂Man-1,4- β -Bn₂GlcNPht-1,4- β -Bn₂GlcNPht-N₃)

6.70 mg (4.94 μmol , 1 eq) Trisaccharid **45** werden unter Argon mit 6.10 mg (7.03 μmol , 1.4 eq) **13a** und 14.5 mg frisch ausgeglühtem, gemörsertem Molekularsieb vereint. Das Gemisch wird in 444 μL absolutem Dichlormethan suspendiert und 15 min bei Zimmertemperatur gerührt. Nach Rühren der Suspension bei $-60\text{ }^\circ\text{C}$ für 1.5 h werden 100 μL (0.544 μmol , 0.11 eq) einer 0.1 %igen-Stammlösung in absolutem Dichlormethan langsam zugetropft. Das Gemisch wird 2 h bei $-60\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Nach Reaktionsende (DC-Kontrolle: Hexan/Aceton 1.5:1) werden 0.88 μL (10.9 μmol , 2.2 eq) Pyridin zugegeben und 25 min bei Zimmertemperatur gerührt. Im Anschluss wird mit 10 mL Dichlormethan verdünnt, über Celite filtriert, mit 2 M Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen und die wässrige Phase wird zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, im Vakuum eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Aceton 2.5:1 \rightarrow 2:1, d: 2 cm, l: 10 cm) gereinigt.

Ausbeute: 4.8 mg (2.33 μmol , 47.1 %),

$R_f = 0.22$ (Hexan/Aceton 1.5:1),

$\text{C}_{108}\text{H}_{104}\text{N}_6\text{O}_{36}$ (2062.00),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 2060.65$,

$M_{\text{gef}} = 2079.18$ ($\text{M}+\text{NH}_4$)⁺, 2083.16 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺.

O-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosylazid **49**

(β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N₃)

ausgehend von Pentasaccharid **44**

23.1 mg (11.9 μmol , 1 eq) Pentasaccharid **44** werden in 397 μL Ethylacetat gelöst und im Eisbad auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Unter Rühren werden langsam 596 μL (179 μmol , 15 eq) einer 300 mM Natriumbromat-Stammlösung in Wasser und anschließend 1.46 mL (149 μmol , 12.5 eq) einer 130 mM Natriumdithionit-Stammlösung in Wasser zugegeben. Bei Zimmertemperatur wird 21 h heftig gerührt. Nach Reaktionsende (DC: Dichlormethan/Aceton 2:1) werden

40 μL einer 10 %igen Natriumthiosulfatlösung zugegeben. Das Gemisch wird mit 20 mL Dichlormethan verdünnt, mit Wasser gewaschen und die wässrige Phase wird dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, im Vakuum eingengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Die erhaltene Rohsubstanz wird in 1.19 mL *n*-Butanol gelöst und auf 80 °C temperiert. 320 μL (4.76 mmol) Ethylendiamin werden langsam zugetropft und das Gemisch wird 135 min bei 80 °C gerührt. Nach Reaktionsende (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1:1) wird auf Zimmertemperatur abgekühlt und anschließend im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird viermal mit Toluol codestilliert und im Hochvakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird in einem Gemisch aus 530 μL (5.6 mmol) Acetanhydrid und 1.06 mL (13.1 mmol) Pyridin gelöst und 16 h bei Zimmertemperatur gerührt. Nach Reaktionsende (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) wird dreimal mit Toluol codestilliert und im Hochvakuum getrocknet.

Der Rückstand wird in Dichlormethan gelöst, mit 1 M Salzsäure und 2 M Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen und die wässrigen Phasen werden dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, im Vakuum eingengt und im Hochvakuum getrocknet.

Die Rohsubstanz wird in 1.19 mL Methanol gelöst. Unter Rühren werden 1.19 mL (29.4 mmol) Methylamin (40 % in Wasser) zugetropft und 13.5 h bei Zimmertemperatur gerührt. Nach Reaktionsende (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) wird viermal mit Toluol codestilliert und im Hochvakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird in 1 mL Methanol gelöst und mit ca. 40 mL Diethylether gefällt. Das Präzipitat wird bei 4000 rpm 5 min zentrifugiert, nochmal in 1 mL Methanol aufgenommen und mit ca. 40 mL Diethylether gefällt. Im Anschluss wird durch Gelpermeationschromatographie gereinigt (HiLoad Superdex 30; Säulengröße: 16x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung; Fluss: 1 mL/min; Retentionszeit: 85.2 min).

Ausbeute: 10.5 mg (10.7 μmol , 90.2 %),

R_f (debenzyliertes Pentasaccharid) = 0.48 (Dichlormethan/Aceton 2:1),

R_f (global entschütztes Pentasaccharid) = 0.38 (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1:1),

R_f (Peracetat) = 0.88 (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

R_f (Produkt **49**) = 0.68 (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$C_{36}H_{60}N_6O_{25}$ (976.89),

ESI-MS:

Debenzylisiertes Pentasaccharid

$M_{\text{ber}} = 1576.43$,

$M_{\text{gef}} = 1599.36 (M+Na)^+$, $1615.57 (M+K)^+$,

Produkt 49

$M_{\text{ber}} = 976.36$,

$M_{\text{gef}} = 977.78 (M+H)^+$, $999.61 (M+Na)^+$.

ausgehend von Pentasaccharid 47:

117 mg (62.4 μmol , 1 eq) Pentasaccharid **47** werden in 832 μL Ethylacetat gelöst und im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Unter Rühren werden langsam 3.12 mL (936 μmol , 15 eq) einer 300 mM Natriumbromat-Stammlösung in Wasser und anschließend 7.06 mL (780 μmol , 12.5 eq) einer 130 mM Natriumdithionit-Stammlösung in Wasser langsam zugegeben. Bei Zimmertemperatur wird 16 h heftig gerührt. Nach Reaktionsende (DC: Dichlormethan/Aceton 2:1) werden 100 μL einer 10 %igen Natriumthiosulfatlösung zugegeben. Das Gemisch wird mit 150 mL Dichlormethan verdünnt, mit Wasser gewaschen und die wässrigen Phasen werden fünfmal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, im Vakuum eingengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Die erhaltene Rohsubstanz wird in 6.24 mL *n*-Butanol gelöst und auf 90 °C temperiert. 1.67 mL (25.0 mmol) Ethylendiamin werden langsam zugetropft und das Gemisch wird für 19 h bei 90 °C gerührt. Nach Reaktionsende (DC: iso-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) wird auf Zimmertemperatur abgekühlt und anschließend im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird mit Toluol codestilliert und im Hochvakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird in einem Gemisch aus 2.77 mL (29.3 mmol) Acetanhydrid und 5.55 mL (68.8 mmol) Pyridin gelöst und 3 d bei Zimmertemperatur gerührt. Nach Reaktionsende (DC: iso-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) wird achtmal mit Toluol codestilliert und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird in 150 mL Dichlormethan gelöst, mit 1 M Salzsäure und 2 M Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen und die wässrigen Phasen werden dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, im Vakuum eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Rohsubstanz wird in

6.24 mL Methanol gelöst. Unter Rühren werden 6.24 mL (180 mmol) Methylamin (40 % in Wasser) zugetropft und 17.5 h bei Zimmertemperatur gerührt. Nach Reaktionsende (DC: iso-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) wird fünfmal mit Toluol codestilliert und im Hochvakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird in 3.5 mL Methanol gelöst und mit ca. 40 mL Diethylether gefällt. Das Präzipitat wird bei 4000 rpm 5 min zentrifugiert, nochmal in 3.5 mL Methanol aufgenommen und mit ca. 40 mL Diethylether gefällt. Im Anschluss wird durch Gelpermeationschromatographie gereinigt (HiLoad Superdex 30; Säulengröße: 16x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung; Fluss: 1 mL/min; Retentionszeit: 85.1 min).

Ausbeute: 39.3 mg (40.3 μmol , 64.5 %),

R_f (debenzyliertes Pentasaccharid) = 0.48 (Dichlormethan/Aceton 2:1),

R_f (global entschütztes Pentasaccharid) = 0.38 (iso-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1:1),

R_f (Peracetat) = 0.88 (iso-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

R_f (Produkt **49**) = 0.68 (iso-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{N}_6\text{O}_{25}$ (976.89),

ESI-MS:

Debenzyliertes Pentasaccharid

$M_{\text{ber}} = 1576.43$,

$M_{\text{gef}} = 1599.36$ (M+Na)⁺, 1615.57 (M+K)⁺,

Produkt 49

$M_{\text{ber}} = 976.36$,

$M_{\text{gef}} = 977.78$ (M+H)⁺, 999.61 (M+Na)⁺.

¹H-NMR (360 MHz, D₂O mit [D6]-DMSO als interner Standard): $\delta = 4.72$ (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1 $\alpha^{4'}$), 4.64-4.53 (m, 2H, H-1 β^3 , H-1 β^1), 4.41 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.64$ Hz, H-1 β^2), 4.35 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.48$ Hz, H-1 $\beta^{5'}$), 3.92-3.86 (m, 2H, H-2 $^{4'}$, H-2 3), 3.77-3.64 (m, 6H, H-6a 3 , H-6a $^{5'}$, H-3 $^{4'}$, H-6a 1 , H-6a $^{4'}$, H-6a 2), 3.63-3.33 (m, 18H, H-6b 3 , H-6b $^{5'}$, H-2 2 , H-6a 2 , H-2 1 , H-4 3 , H-4 1 , H-5 2 , H-2 $^{4'}$, H-6a $^{4'}$, H-3 3 , H-5 1 , H-6b 1 , H-3 1 , H-5 $^{4'}$, H-3 2 , H-5 3 , H-3 $^{4'}$), 3.32-3.19 (m, 4H, H-4 4 , H-4 2 , H-4 $^{5'}$, H-5 $^{5'}$), 1.90-1.84 (m, 9H, NAc).

¹³C-NMR (90 MHz, D₂O mit [D6]-DMSO als interner Standard): $\delta = 176.3, 176.2, 176.2$ (C=O NAc), 102.9 (C-1 $^2\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 164.4$ Hz), 102.2 (C-1 $^3\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 162.2$ Hz), 101.2 (C-1 $^5\alpha$,

$^1J_{C-1,H-1} = 163.6$ Hz), 98.6 (C-1 $^4\alpha$, $^1J_{C-1,H-1} = 171.2$ Hz), 90.1 (C-1 $^1\beta$, $^1J_{C-1,H-1} = 164.4$ Hz), 81.1 (C-5 2), 80.4 (C-5 1), 78.1 (C-2 4), 77.9 (C-5 3), 77.4 (C-5 5), 76.1 (C-3 2), 76.0 (C-3 5), 75.0 (C-5 4), 74.5 (C-3 3), 73.9 (C-4 3), 73.6 (C-4 1), 72.0 (C-2 3), 71.5 (C-4 2), 71.5 (C-4 4), 71.0 (C-3 4), 70.0 (C-4 4), 68.2 (C-3 1), 67.8 (C-6 3), 63.2 (C-6 1), 62.2 (C-6 4), 61.6 (C-6 2), 61.4 (C-6 5), 56.9 (C-2 5), 56.5 (C-2 1), 56.0 (C-2 2), 23.9, 23.8, 23.7 (NAc).

O-(α -D-Mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosylazid **34**

(α -Man-1,6- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N $_3$)

21.7 mg (22.2 μ mol, 1 eq) Pentasaccharid **49** werden in 1.07 mL HEPES-Puffer (pH 6.0, 0.1 mg/mL BSA) gelöst und mit 9.4 μ L *exo*- β -N-Acetylglucosaminidase (0.6 U, *Canavalia ensiformis*, E. C. 3.2.1.30) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird für 19 h bei 37 °C im Thermoschüttler inkubiert (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1). Das Rohprodukt wird mittels Gelpermeationschromatographie gereinigt (Sephadex G25; Säulengröße: 25x750 mm; 5 % Ethanol in Wasser; Fluss: 0.75 mL/min; Retentionszeit: 60 min).

Ausbeute: 9.52 mg (12.3 μ mol, 55.4 %)

$R_f = 0.72$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$[\alpha]_D^{27} = -22.1$ (c = 0.3, Wasser)

C $_{28}$ H $_{47}$ N $_5$ O $_{20}$ (773.69),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 773.28$,

$M_{\text{gef}} = 774.88$ (M+H) $^+$, 769.89 (M+Na) $^+$.

1 H-NMR (360 MHz, D $_2$ O mit [D6]-DMSO als interner Standard): $\delta = 4.72$ (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1 α^4), 4.62-4.53 (m, 2H, H-1 β^3 , H-1 β^1), 4.41 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.75$ Hz, H-1 β^2), 3.88 (dd, 1H, $J_{1,2} = 2.11$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H-2 3), 3.77 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H-2 4), 3.74-3.65 (m, 5H, H-6a 1 , H-6a 3 , H-3 4 , H-6a 2 , H-6a 4), 3.643-3.48 (m, 10H, H-6b 3 , H-2 2 , H-3 2 , H-6b 2 , H-2 1 , H-6b 1 , H-3 1 , H-5 2 , H-5 4 , H-6b 4), 3.48-3.35 (m, 7H, H-5 1 , H-3 3 , H-4 4 , H-4 2 , H-4 3 , H-5 3 , H-4 1), 1.88 (s, 3H, NAc), 1.85 (s, 3H, NAc).

^{13}C -NMR (90 MHz, D_2O mit $[\text{D}_6]$ -DMSO als interner Standard): $\delta = 176.5, 176.5$ (C=O NAc), 103.2 (C-1 $^2\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 168.1$ Hz), 102.4 (C-1 $^3\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 164.2$ Hz), 101.5 (C-1 $^4\alpha$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 173.3$ Hz), 90.3 (C-1 $^1\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 164.9$ Hz), 81.4 (C-5 2), 80.6 (C-5 1), 78.3 (C-5 3), 76.2 (C-4 1), 76.2 (C-4 2), 74.5 (C-3 3), 74.1 (C-5 4), 73.8 (C-3 1), 73.4 (C-3 2), 72.2 (C-2 3), 72.2 (C-3 4), 71.7 (C-2 4), 68.6 (C-4 3), 68.6 (C-4 4), 68.0 (C-6 3), 62.8 (C-6 2), 61.8 (C-6 1), 61.7 (C-6 4), 56.7 (C-2 2), 56.3 (C-2 1), 24.0, 23.9 (NAc).

11.5 Versuche zu Kapitel 3.3.2

2,4-Di-benzoyl-1-benzyl- α -D-mannopyranosid 52

(2,4- α -Bz $_2$ ManOBn)

5.0 g (18.5 mmol, 1 eq) des Monosaccharids **51** werden in 250 mL Acetonitril gelöst, mit 25 mL (145.6 mmol, 8 eq) Trimethylorthobenzoat sowie 103 μL (1.1 mmol, 0.06 eq) Trifluoressigsäure versetzt. Nach 15 min werden 4 mL (33.6 mmol) einer 80 %igen Trifluoressigsäure-Stammlösung und 3 mL (17.5 mmol) Trimethylorthobenzoat zugegeben. Nach Reaktionsende (DC: Dichlormethan/Methanol 10:1) wird die Reaktion mit 2.6 mL (32.2 mmol, 1.7 eq) Pyridin versetzt, das Lösungsmittel eingengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das gewonnene Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Aceton 4:1 \rightarrow 3:1 \rightarrow 2:1; d: 9 cm, l: 17 cm) gereinigt.

Ausbeute: 3.7 g (7.8 μmol , 42.1 %),

$R_f = 0.81$ (Dichlormethan/Methanol 10:1),

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -8.7$ (0.5, Dichlormethan),

$\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{O}_8$ (478.49),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 478.49$,

$M_{\text{gef}} = 479.38$ (M+H) $^+$, 496.41 (M+NH $_4$) $^+$, 501.38 (M+Na) $^+$.

^1H -NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 8.05$ -7.98 (m, 4H, Ar), 7.73-7.63 (m, 2H, Ar), 7.62-7.56 (m, 2H, Ar), 7.56-7.50 (m, 2H, Ar), 7.45-7.32 (m, 5H, Ar), 5.56 (d, 1H, $J_{\text{OH},3} = 5.73$ Hz,

OH-3), 5.39 (dd, 1H, $J_{3,4} = 11.90$ Hz, $J_{4,5} = 9.70$ Hz, H-4), 5.29 (dd, 1H, $J_{1,2} = 1.60$ Hz, $J_{2,3} = 2.00$ Hz, H-2), 5.04 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1 α), 4.87 (t, 1H, $J_{\text{OH},6} = 5.06$ Hz, OH-6), 4.78 (d, 1H, $J_{\text{gem}} = 11.83$ Hz, OCH₂), 4.58 (d, 1H, $J_{\text{gem}} = 11.83$ Hz, OCH₂), 4.24-4.19 (m, 1H, H-3), 3.93-3.89 (m, 1H, H-5), 3.56-3.49 (m, 2H, H-6a,b).

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 165.1, 165.1$ (C=O Bz), 137.5 (C-1 Ar), 133.6, 133.4 (C Ar), 129.7, 129.5 (C-1 Ar), 129.4, 128.8, 128.7, 128.4, 128.0, 127.8 (C Ar), 96.2 (C-1¹), 72.9 (C-2¹), 71.6 (C-5¹), 70.0 (C-4¹), 68.5 (OCH₂), 66.8 (C-3¹), 60.6 (C-6¹).

O-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-*O*-[(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-2,4-di-benzoyl-1-benzyl- α -D-mannopyranosid **54**

(3,6-(α -Ac₄Man)-2,4- α -Bz₂ManOBn)

201 mg (418 μ mol, 1 eq) Diol **52**, 985 mg (2.51 mmol, 6 eq) Thiomannosid **55** und 941 mg (4.18 mmol, 10 eq) *N*-Iodsuccinimid werden mit 2.33 g gemörsertem und ausgeheiztem Molekularsieb unter Argonatmosphäre in 9.50 mL absolutem Dichlormethan suspendiert und 15 min bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wird durch Zutropfen von 222 μ L (2.51 mmol, 6 eq) Trifluormethansulfonsäure gestartet. Nach 3 h (DC: Cyclohexan/Ethylacetat 1:1) wird mit 250 mL Dichlormethan verdünnt, über Celite abfiltriert, je mit gesättigter Natriumthiosulfat- und 2 M Kaliumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und die wässrigen Phasen zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Aceton 4:1 \rightarrow 3.5:1 \rightarrow 3:1; d: 6.5 cm, l: 15.5 cm) gereinigt.

Ausbeute: 320 mg (305 μ mol, 81.3 %),

$R_f = 0.32$ (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1),

$[\alpha]_D^{25} = -8.65$ (0.5, Dichlormethan),

C₅₅H₆₂O₂₆ (1139.1),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1138.35$,

$M_{\text{gef}} = 1161.72$ (M+Na)⁺.

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$): δ = 8.10-8.04 (m, 2H, Ar), 8.03-8.00 (m, 2H, Ar), 7.74 (t, 1H, Ar), 7.67-7.61 (m, 3H, Ar), 7.52-7.32 (m, 7H, Ar), 5.71 (dd, 1H, $J_{3,4} = 11.08$, $J_{4,5} = 10.02$ Hz, H-4¹), 5.48 (dd, 1H, $J_{1,2} = 1.38$, $J_{2,3} = 1.69$, H-2¹), 5.28-5.23 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3.60$, $J_{3,4} = 9.94$, H-3²), 5.22-5.20 (dd, 1H, $J_{1,2} = 3.38$, $J_{2,3} = 1.27$, H-2²), 5.18 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1¹ α), 5.09-5.02 (m, 2H, H-1² α , H-4²), 4.93 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1² α), 4.91-4.74 (m, 3H, H-4², H-3², OCH₂), 4.70 (dd, 1H, $J_{1,2} = 3.56$, $J_{2,3} = 1.70$, H-2²), 4.63-4.54 (m, 2H, OCH₂, H-3¹), 4.27-4.20 (m, 1H, H-5¹), 4.04-3.72 (m, 7H, H-5², H-6a,b², H-6a², H-5², H-6a¹, H-6b²), 3.67-3.60 (m, 1H, H-6b¹), 2.09-2.05 (m, 6H, Ac), 1.98 (s, 3H, Ac), 1.93-1.88 (m, 6H, Ac), 1.78-1.74 (m, 9H, Ac).

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$): δ = 169.8, 169.7, 169.6, 169.5, 169.5, 169.0, 168.6 (C=O Ac), 165.1, 164.9 (C=O Bz), 136.8 (C-1 Ar), 133.9, 133.7, 129.6, 129.4, 129.1 (C Ar), 128.9 (C-1 Ar), 128.6, 128.4, 128.3, 128.0 (C Ar), 98.4 (C-1²), 96.6 (C-1²), 93.3 (C-1¹), 74.8 (C-3¹), 71.5 (C-2¹), 68.9 (OCH₂), 68.8 (C-5²), 68.8 (C-5¹), 68.5 (C-3²), 68.3 (C-2²), 68.3 (C-2²), 67.9 (C-3²), 67.8 (C-5²), 67.7 (C-4¹), 65.4 (C-6¹), 65.4 (C-4²), 65.2 (C-4²), 61.9 (C-6²), 61.7 (C-6²), 20.5, 20.5, 20.3, 20.2, 20.2, 20.0 (Ac).

O-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-*O*-[(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-2,4-di-benzoyl- α -D-mannopyranose **56**

(3,6-(α -Ac₄Man)-2,4- α -Bz₂Man)

49.9 mg (43.8 μmol , 1.0 eq) Trisaccharid **54** werden in 0.59 mL Ethylacetat gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es folgt die Zugabe von 61.5 mg (407 μmol , 9.4 eq) Natriumbromat, welches in 1.19 mL Wasser gelöst ist. Anschließend werden unter starkem Rühren über 20 min langsam 73.4 mg (358 μmol , 8.2 eq) Natriumdithionit, gelöst in 2.39 mL Wasser, zugetropft. Danach wird das Kühlbad entfernt. Nach 2 h (DC: Cyclohexan/Ethylacetat 1:2) wird mit 30 mL Dichlormethan verdünnt, mit 100 μL 10 %iger Natriumthiosulfat-Lösung versetzt, mit Wasser gewaschen und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel eingeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Grace Resolve[®] 80 g; Cyclohexan/Aceton 10 \rightarrow 50 %, 25.5 min, 28 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: 37.0 mg (35.3 μmol , 80.6 %),

$R_f = 0.73$ (Cyclohexan/Ethylacetat 1:2),

$[\alpha]_D^{25} = -14.6$ (0.5, Dichlormethan),

$\text{C}_{48}\text{H}_{56}\text{O}_{26}$ (1048.95),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1048.31$,

$M_{\text{gef}} = 1066.48$ ($\text{M}+\text{NH}_4$)⁺, 1071.46 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺.

O-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-*O*-[(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-2,4-di-benzoyl- α -D-mannopyranosyl-trichloracetimidat **50**

(3,6-(α -Ac₄Man)-2,4- α -Bz₂ManTCAI)

623 mg (594 μmol , 1 eq) Trisaccharid **56** werden unter Argonatmosphäre mit 164 mg (1.19 mmol, 2 eq) frisch ausgeglühtem und gemörsertem Kaliumcarbonat versetzt und in 8.49 mL absolutem Dichlormethan gelöst. Nach 15 min werden 596 μL (5.94 mmol, 10 eq) Trichloracetnitril hinzugefügt und die Reaktion wird bei Zimmertemperatur gerührt. Nach 1 d (DC: Cyclohexan/Ethylacetat 1:2) wird die Lösung mit 200 mL Dichlormethan verdünnt, über Celite filtriert und mit Dichlormethan nachgewaschen. Anschließend wird das Lösungsmittel eingengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1, d: 3.5 cm, l: 18.0 cm) gereinigt.

Ausbeute: 605 mg (508 μmol , 85.5 %),

$R_f = 0.77$ (Cyclohexan/Ethylacetat 1:2),

$[\alpha]_D^{25} = 0.5$ (0.5, Dichlormethan),

$\text{C}_{50}\text{H}_{56}\text{Cl}_3\text{NO}_{26}$ (1193.33),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1191.22$,

$M_{\text{gef}} = 1192.46$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

¹H-NMR (500 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 10.16$ (s, 1H, NH), 8.10-8.07 (m, 2H, Ar), 8.06-8.02 (m, 2H, Ar), 7.77 (t, 1H, Ar), 7.70-7.74 (m, 3H, Ar), 7.53-7.49 (m, 2H, Ar), 6.44 (d, 1H, $J_{1,2}$)

= 5.77 Hz, H-1^{1α}), 5.85 (dd, 1H, $J_{3,4} = 11.19$, $J_{4,5} = 10.03$ Hz, H-4¹), 5.62 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$, $J_{2,3} < 1$, H-2¹), 5.23-5.17 (m, 2H, H-3², H-2²), 5.15 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1^{2α}), 5.04 (dd, 1H, $J_{3,4} = 9.72$ Hz, $J_{4,5} = 10.16$ Hz, H-4²), 4.96 (dd, 1H, $J_{3,4} = 9.88$ Hz, $J_{4,5} = 10.00$ Hz, H-4²), 4.91 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1^{2α}), 4.86 (dd, 1H, $J_{2,3} = 3.26$ Hz, $J_{3,4} = 10.03$ Hz, H-3²), 4.73 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$, $J_{2,3} < 1$, H-2²), 4.61 (dd, 1H, $J_{2,3} = 2.71$ Hz, $J_{3,4} = 10.08$ Hz, H-3¹), 4.37-4.32 (m, 1H, H-5¹), 4.00-3.87 (m, 3H, H-5², H-6a,b²), 3.83-3.76 (m, 2H, H-6a¹, H-6a²), 3.72-3.61 (m, 3H, H-5², H-6b¹, H-6b²), 2.10-2.06 (m, 6H, Ac), 2.00-1.95 (m, 6H, Ac), 1.91 (s, 3H, Ac), 1.82-1.71 (m, 9H, Ac).

¹³C-NMR (125 MHz, [D6]-DMSO): δ= 169.9, 169.8, 169.6, 169.4, 169.1, 168.8 (C=O Ac), 165.0, 164.9 (C=O Bz), 157.1, (C=NH), 134.2, 133.9 (C Ar), 129.7, 129.5, 129.2, 128.7 (C Ar), 128.6, 128.4 (C-1 Ar), 98.6 (C-1²), 96.6 (C-1²), 93.6 (C-1¹), 74.8 (C-3¹), 71.4 (C-5¹), 70.2 (C-2¹), 68.8 (C-3²), 68.8 (C-5²), 68.4 (C-2²), 68.2 (C-2²), 67.9 (C-3²), 67.6 (C-5²), 66.6 (C-4¹), 65.1 (C-4²), 65.0 (C-6¹), 64.9 (C-4²), 61.7 (C-6²), 61.5 (C-6²), 20.8, 20.6, 20.5, 20.4, 20.3, 20.2, 20.2 (Ac).

O-(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-α-D-mannopyranosyl)-(1→3)-*O*-(4,6-*O*-benzyliden-β-D-mannopyranosyl)-(1→4)-*O*-(3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-*O*-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosylazid **58**

(β-Ac₃GlcNPht-1,2-α-Ac₃Man-1,3-β-BdnMan-1,4-β-Bn₂GlcNPht-1,4-β-Bn₂GlcNPht-N₃)

503 mg (407 μmol, 1.0 eq) Core-Trisaccharid **8** und 702 mg (809 μmol, 2.0 eq) Trichloracetimidat **13a** werden zusammen mit 1.33 g gemörsertem, frisch ausgeglühtem Molekularsieb unter Argonatmosphäre vorgelegt und in 11.6 mL absolutem Dichlormethan suspendiert. Das Gemisch wird 15 min bei Zimmertemperatur gerührt, auf -30 °C abgekühlt und für 30 min gerührt. Die Reaktion wird durch langsame Zugabe von 49.9 μL (40.4 μmol, 0.1 eq) einer 10 %igen Bortrifluorid-diethyletherat-Lösung gestartet und bei -30 °C gerührt. Nach 1 h (DC: Hexan/Aceton 1.5:1) wird die Reaktion durch Zugabe von 65.3 μL (809 μmol, 2.0 eq) Pyridin gestoppt. Die Reaktionslösung wird mit 150 mL Dichlormethan verdünnt, über Celite filtriert, mit 2 M Kaliumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und die wässrigen Phasen zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat

getrocknet. Das Lösungsmittel wird eingengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Grace Resolve[®] 80 g; Cyclohexan/Aceton 15→50 %, 42 min, 32 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: 578 mg (297 μ mol, 73.1 %),

$R_f = 0.27$ (Hexan/Aceton 1.5:1),

$C_{101}H_{100}N_6O_{34}$ (1941.89),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1940.63$,

$M_{\text{gef}} = 1963.99$ (M+Na)²⁺.

O-(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1→2)-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1→3)-*O*-(2-*O*-acetyl- β -D-mannopyranosyl)-(1→4)-*O*-(3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1→4)-*O*-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosylazid **59**

(β -Ac₃GlcNPht-1,2- α -Ac₃Man-1,3- β -AcMan-1,4- β -Bn₂GlcNPht-1,4- β -Bn₂GlcNPht-N₃)

540 mg (287 μ mol, 1 eq) Pentasaccharid **58** werden in 3.7 mL (45.8 mmol) Pyridin gelöst, mit 1.9 mL (20.1 mmol) Acetanhydrid versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. Nach Reaktionsende (DC: Hexan/Aceton 1.5:1) wird dreimal mit Toluol codestilliert und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das acetylierte Trisaccharid wird mit einer Lösung von 425 mg (2.23 mmol, 7.8 eq) *para*-Toluolsulfonsäure Monohydrat in 18.5 mL Acetonitril versetzt und 45 min bei Zimmertemperatur gerührt. Nach vollständiger Umsetzung (DC: Hexan/Aceton 1.5:1) wird die Reaktion mit 400 μ L (4.96 mmol) Pyridin gestoppt und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in 150 mL Dichlormethan aufgenommen, mit 1 M Salzsäure- sowie 2 M Kaliumhydrogencarbonatlösung gewaschen und die wässrigen Phasen dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, im Vakuum eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Grace Resolve[®] 80 g; Cyclohexan/Aceton 30→50 %, 37 min, 50 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: 439 mg (232 μmol , 80.8 %),

$R_f = 0.70$ (Hexan/Aceton 1.5:1),

$\text{C}_{96}\text{H}_{98}\text{N}_6\text{O}_{35}$ (1895.82),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1894.61$,

$M_{\text{gef}} = 1913.13$ ($M+\text{NH}_4$)⁺.

O-(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-*O*-{(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-*O*-[2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(2,4-di-benzyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)}-*O*-(2-*O*-acetyl- β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosylazid **61**

(β -Ac₃GlcNPh_t-1,2- α -Ac₃Man-1,3- α -Ac₄Man-1,3-[α -Ac₄Man-1,6]- α -Bz₂Man- β -AcMan-1,4- β -Bn₂GlcNPh_t-1,4- β -Bn₂GlcNPh_t-N₃)

Aktivierung mit BF₃xOEt₂

21.9 mg (11.6 μmol , 1.0 eq) Pentasaccharid **59** und 15.2 mg (12.7 μmol , 1.1 eq) Trichloracetimidat **50** werden zusammen mit 40 mg gemörsertem, frisch ausgeglühtem Molekularsieb (4 Å) unter Argonatmosphäre vorgelegt und in 2.6 mL absolutem Dichlormethan suspendiert. Das Gemisch wird 15 min bei Zimmertemperatur gerührt und dann auf -30 °C abgekühlt. Die Reaktion wird durch langsame Zugabe von 43.0 μL (3.5 μmol , 0.3 eq) einer 1 %igen Bortrifluoriddiethyletherat-Lösung gestartet und bei -30 °C gerührt. Nach 75 min (DC: Hexan/Aceton 1.5:1) wird die Reaktion auf Zimmertemperatur erwärmt und weitere 65 min gerührt. Durch Zugabe von 3.0 μL (37.2 μmol) Pyridin wird die Reaktion gestoppt. Die Reaktionslösung wird mit 20 mL Dichlormethan verdünnt, über Celite filtriert, mit 2 M Kaliumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und die wässrige Phase zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, im Vakuum eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Grace Resolve[®] 2x4 g; Cyclohexan/Aceton 5 \rightarrow 15 %, 20 min, 18 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: 15.0 mg (5.13 μmol , 44.2 %),

$R_f = 0.43$ (Hexan/Aceton 1:1),

$\text{C}_{144}\text{H}_{152}\text{N}_6\text{O}_{60}$ (2926.75),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 2924.90$,

$M_{\text{gef}} = 2948.72$ (M+Na)⁺.

Aktivierung mit TMSOTf

62.4 mg (32.9 μmol , 1.0 eq) Pentasaccharid **59** und 47.2 mg (39.6 μmol , 1.2 eq) Trichloracetimidat **50** werden zusammen mit 134 mg gemörsertem, frisch ausgeglühtem Molekularsieb (4 Å) unter Argonatmosphäre vorgelegt und in 3.3 mL absolutem Dichlormethan suspendiert. Das Gemisch wird 15 min bei Zimmertemperatur gerührt, dann auf -40 °C abgekühlt und für 30 min gerührt. Die Reaktion wird durch langsame Zugabe von 4.8 μL (2.7 μmol , 0.08 eq) einer 10 %igen Trimethylsilyltrifluormethansulfonat-Lösung gestartet und bei -30 °C gerührt. Nach 65 min (DC: Hexan/Aceton 1:1) wird die Reaktion durch Zugabe von 5.5 μL (68.1 μmol , 2.0 eq) Pyridin gestoppt. Die Reaktionslösung wird 40 mL mit Dichlormethan verdünnt, über Celite filtriert, mit 2 M Kaliumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und die wässrige Phase zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, im Vakuum eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Dichlormethan/Aceton 5 % \rightarrow 8 % \rightarrow 10 % \rightarrow 12 % Aceton, d: 2.4 cm, l: 12.0 cm) gereinigt.

Ausbeute: 83.1 mg (28.4 μmol , 86.3 %),

$R_f = 0.43$ (Hexan/Aceton 1:1),

$[\alpha]_D^{27} = -4.2$ (c = 0.6, Dichlormethan),

$\text{C}_{144}\text{H}_{152}\text{N}_6\text{O}_{60}$ (2926.75),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 2924.90$,

$M_{\text{gef}} = 1485.43$ (M+2Na)²⁺.

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, [D6]-DMSO): δ = 8.10-7.40 (m, 22H, Pht, Ar), 7.39-7.06 (m, 10H, Ar), 6.93-6.61 (m, 10H, Ar), 5.83-5.56 (m, 2H, H-4⁴), 5.47 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$, $J_{2,3} < 1$, H-2⁴), 5.35 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.62$, H-1²), 5.31-5.11 (m, 6H, H-1¹, H-2³, H-1⁴, H-4⁵, H-1³, OH-4³), 5.10-4.92 (m, 3H, H-4², H-3^{5''}, H-3^{5'}), 4.91-4.60 (m, 12H, H-2^{5'}, H-1^{5'}, H-1⁴, H-2^{5''}, H-4⁴, H-1^{5''}, OCH₂, H-4^{5''}, H-1⁵, OCH₂, H-2⁴, OCH₂), 4.52-4.21 (m, 10H, OCH₂, OCH₂, H-3⁴, H-3⁴, OCH₂, H-3³, H-3⁵, H-6a⁴), 4.20-3.48 (m, 25H, H-2³, H-5⁴, H-3¹, H-6b⁴, H-6a⁵, H-4³, H-2⁵, H-4¹, H-5⁴, H-5¹, H-6b⁵, H-6a², H-6a,b^{5'}, H-2¹, H-6a,b^{4'}, H-4^{5'}, H-6a,b^{5''}, H-6a¹, H-5², H-6b², H-6b¹, H-5⁵), 3.46-3.15 (m, 4H, H-5^{5'}, H-6a³, H-5³, H-6b³), 2.13-1.60 (m, 45H, OAc).

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, [D6]-DMSO): δ = 170.2, 169.9, 169.8, 169.7, 169.7, 169.6, 169.5, 169.4, 169.3, 169.2, 168.9, 168.6, 167.8, 167.1, 165.0, 164.8 (C=O), 138.2, 138.0, 138.0, 137.9, 137.8 (Ar), 134.9, 134.8, 134.6 (Pht), 133.8, 133.7, 133.6 (Pht), 130.6, 129.5, 129.4, 129.3, 129.1, 129.0, 128.6, 128.5, 128.4, 128.2, 127.9, 127.8, 127.7, 127.4, 127.4, 127.3, 127.1, 123.5 (C Ar), 98.8 (C-1⁴ α , $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 175.3$ Hz), 97.5 (C-1⁵ β , $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 162.3$ Hz), 97.2 (C-1⁵ α , $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 175.4$ Hz), 96.8 (C-1^{5''} α , $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 177.9$ Hz), 96.8 (C-1³ β , $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 164.8$ Hz), 96.5 (C-1⁴ α , $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 174.1$ Hz), 96.1 (C-1² β , $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 166.8$ Hz), 84.8 (C-1¹ β , $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 164.4$ Hz), 77.3 (C-4³), 76.4 (C-3¹), 75.8 (C-5⁵), 75.6 (C-3⁴), 75.0 (C-5³), 74.4 (C-3⁴), 73.8, 73.6 (CH₂O), 73.5 (C-3⁵), 71.8, 71.6 (CH₂O), 71.3 (C-3³), 71.1 (C-2⁴), 71.1 (C-4¹), 70.5 (C-4⁵), 69.7 (C-3²), 69.1 (C-4^{5''}), 68.9 (C-2³), 68.7 (C-4²), 68.6 (C-5¹), 68.4 (C-4⁴), 68.3 (C-2⁴), 68.3 (C-5⁴), 67.9 (C-5²), 67.8 (C-5⁵), 67.5 (C-6³), 67.1 (C-4⁴), 66.6 (C-5⁴), 65.1 (C-4⁵), 65.0 (C-2^{5''}), 65.0 (C-2^{5'}), 64.6 (C-3^{5'}), 64.6 (C-3^{5''}), 61.9 (C-6⁴), 61.9 (C-6²), 61.7 (C-6⁵), 61.6 (C-6⁴), 61.5 (C-6^{5''}), 61.5 (C-6⁵), 61.0 (C-6¹), 56.0 (C-2⁵), 54.6 (C-2¹), 53.7 (C-2³), 20.6, 20.5, 20.4, 20.4, 20.3, 20.3, 20.2, 20.1, 20.1 (OAc).

2,4-Di-acetyl-1-benzyl- α -D-mannopyranosid 64

(2,4- α -Ac₂ManOBn)

1.5 g (5.55 mmol, 1 eq) Monosaccharid **51** werden in 75.0 mL Acetonitril gelöst, mit 7.1 mL (38.9 mmol, 7 eq) Trimethylorthobenzoat sowie 31.8 μL (0.3 mmol, 0.06 eq) Trifluoressigsäure versetzt. Nach 3 min werden 1.2 mL (10.0 mmol) einer 80 %igen Trifluoressigsäure-Stammlösung und nach 15 min weitere 1.0 mL (17.5 mmol) Trimethylorthobenzoat zugege-

ben. Nach Reaktionsende (DC: Dichlormethan/Methanol 10:1) wird das Lösungsmittel eingengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das gewonnene Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Grace Resolve[®] 80 g; Dichlormethan/Methanol 1→5 %, 27 min, 50 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: 474 mg (1.34 mmol, 24.1 %),

$R_f = 0.58$ (Dichlormethan/Methanol 10:1),

$[\alpha]_D^{27} = +23.8$ ($c = 1.2$, Dichlormethan),

$C_{27}H_{26}O_8$ (354.35),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 354.13$,

$M_{\text{gef}} = 708.48$ (2M+H)⁺.

¹H-NMR (500 MHz, [D6]-DMSO): $\delta = 7.40$ - 7.29 (m, 5H, Ar), 5.33 (d, 1H, $J_{\text{OH},3} = 6.29$ Hz, OH-3), 4.95 (dd, 1H, $J_{1,2} = 3.60$ Hz, $J_{2,3} = 1.44$ Hz, H-2), 4.85 (t, 1H, $J_{\text{OH},6a,b} = 9.98$ Hz, OH-6), 4.82-4.79 (m, 2H, H-1, H-4), 4.67 (d, 1H, $J_{\text{gem}} = 11.69$ Hz, OCH₂), 4.47 (d, 1H, $J_{\text{gem}} = 11.69$ Hz, OCH₂), 3.89-3.84 (m, 1H, H-3), 3.62-3.57 (m, 1H, H-5), 3.45-3.36 (m, 2H, H-6a,b).

¹³C-NMR (125 MHz, [D6]-DMSO): $\delta = 170.0$, 169.8, (C=O NAc), 137.1 (C-1 Ar), 128.5, 128.0, 127.9, (C Ar), 96.0 (C-1¹), 71.9 (C-2¹), 71.5 (C-5¹), 69.3 (C-4¹), 68.1 (OCH₂), 66.5 (C-3¹), 60.6 (C-6¹), 21.0 (Ac).

O-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1→3)-*O*-[(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1→6)]-2,4-di-acetyl-1-benzyl- α -D-mannopyranosid **66**

(3,6-(α -Ac₄Man)-2,4- α -Ac₂ManOBn)

456 g (1.29 mmol, 1.0 eq) Diol **64**, 2.02 mg (5.15 mmol, 4.0 eq) Thiomannosid **55** und 2.90 mg (12.9 mmol, 10.0 eq) *N*-Iodsuccinimid werden mit 5.92 g gemörsertem und ausgeheiztem Molekularsieb unter Argonatmosphäre in 29.0 mL absolutem Dichlormethan suspendiert und 15 Minuten bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wird durch Zutropfen von 680 μ L (7.74, 6.0 eq) Trifluormethansulfonsäure gestartet. Nach 40 min (DC: Dichlormethan/Methanol 20:1) wird mit 200 mL Dichlormethan verdünnt, über Celite abfiltriert, je einmal mit gesättig-

ter Natriumthiosulfat- und 2 M Kaliumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet, eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Grace Resolve[®] 80 g; Cyclohexan/Aceton 20→35 %, 31 min, 50 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: 1.27 g (1.25 mmol, 97.0 %),

$R_f = 0.61$ (Dichlormethan/Methanol 20:1),

$[\alpha]_D^{27} = +18.0$ (1.0, Dichlormethan),

$C_{45}H_{58}O_{26}$ (1014.93),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1014.32$,

$M_{\text{gef}} = 1015.38$ (M+H)⁺, 1037.34 (M+Na)⁺.

¹H-NMR (500 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 7.40$ - 7.733 (m, 5H, Ar), 5.22 - 5.09 (m, 5H, H-2^{2'}, H-2¹, H-4¹, H-4², H-3^{2'}), 5.08 - 4.99 (m, 3H, H-1², H-3², H-4^{2'}), 4.98 - 4.90 (m, 3H, H-1¹, H-2², H-1^{2'}), 4.69 (d, 1H, $J_{\text{gem}} = 11.80$ Hz, OCH₂), 4.54 (d, 1H, $J_{\text{gem}} = 11.80$ Hz, OCH₂), 4.22 - 4.14 (dd, 1H, H-3¹), 4.13 - 4.04 (m, 3H, H-6a,b^{2'}, H-6a²), 4.03 - 3.95 (m, 3H, H-5^{2'}, H-6b², H-5²), 3.92 - 3.86 (m, 1H, H-5¹), 3.70 - 3.56 (m, 2H, H-6a,b¹), 2.14 - 2.07 (m, 9H, Ac), 2.06 - 1.99 (m, 12H, Ac), 1.96 - 1.89 (m, 9H, Ac).

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 170.0$, 169.9, 169.7, 169.6, 169.6, 169.5, 169.5, 169.3, 169.2, 169.1 (C=O Ac), 136.6 (C-1 Ar), 128.4, 128.2, 127.9 (C Ar), 98.1 (C-1² α , $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 178.1$ Hz), 96.5 (C-1^{2'} α , $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 177.2$ Hz), 95.8 (C-1¹ α , $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 174.3$ Hz), 74.0 (C-3¹), 70.2 (C-4¹), 68.9 (C-2²), 68.8 (C-5¹), 68.8 (C-2^{2'}), 68.8 (C-5^{2'}), 68.8 (C-5²), 68.6 (C-2¹), 68.6 (OCH₂), 68.0 (C-4^{2'}), 67.8 (C-4²), 65.7 (C-6¹), 65.3 (C-3²), 65.3 (C-3^{2'}), 61.9 (C-6²), 61.3 (C-6^{2'}), 20.5, 20.5, 20.4, 20.4, 20.3, 20.2 (Ac).

O-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1→3)-*O*-[(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1→6)]-2,4-di-acetyl- α -D-mannopyranose **68**

(3,6-(α -Ac₄Man)-2,4- α -Ac₂Man)

160 mg (158 μ mol, 1.0 eq) Trisaccharid **66** werden in 2.1 mL Ethylacetat gelöst und unter Kühlung im Wasserbad auf 10 °C gerührt. Es folgt die Zugabe von 220 mg (1.44 mmol,

9.4 eq) Natriumbromat, welches in 4.1 mL Wasser gelöst ist. Danach wird das Kühlbad entfernt. Anschließend werden unter starkem Rühren über 22 min langsam 260 mg (1.25 mmol, 8.2 eq) Natriumdithionit, gelöst in 8.2 mL Wasser, zugetropft. Nach 1.5 h wird mit 70 mL Dichlormethan verdünnt, mit 4 mL 10 %iger Natriumthiosulfat-Lösung versetzt, mit Wasser gewaschen und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel eingeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Grace Resolve[®] 12 g; Cyclohexan/Aceton 10→40 %, 22 min, 28 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: 106 mg (115 μmol , 75.2 %),

$R_f = 0.26$ (Cyclohexan/Ethylacetat 1:2),

$[\alpha]_D^{27} = +19.4$ (1.1, Dichlormethan),

$\text{C}_{48}\text{H}_{56}\text{O}_{26}$ (924.81),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 924.27$,

$M_{\text{gef}} = 948.79$ (M+Na)⁺.

O-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1→3)-*O*-[(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1→6)]-2,4-di-acetyl- α -D-mannopyranosyl-trichloracetimidat **67**

(3,6-(α -Ac₄Man)-2,4- α -Ac₂ManTCAI)

45.5 mg (49.2 μmol , 1 eq) Trisaccharid **68** werden unter Argonatmosphäre mit 13.6 mg (98.4 μmol , 2.0 eq) frisch ausgeglühtem und gemörsertem Kaliumcarbonat versetzt und in 3.90 mL absolutem Dichlormethan gelöst. Anschließend werden 49.3 μL (492 μmol , 10 eq) Trichloracetonitril hinzugefügt und die Reaktion wird bei Zimmertemperatur gerührt. Nach 1 d (DC: Cyclohexan/Ethylacetat 1:2) wird die Lösung mit 50 mL Dichlormethan verdünnt, über Celite filtriert und mit Dichlormethan nachgewaschen. Anschließend wird das Lösungsmittel eingeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat 1.5:1→1:1, d: 2.5 cm, l: 8.5 cm) gereinigt.

Ausbeute: 43.7 mg (41.0 μmol , 83.2 %),

$R_f = 0.77$ (Cyclohexan/Ethylacetat 1:2),

$[\alpha]_D^{27} = +22.7$ (1.1, Dichlormethan),

$C_{40}H_{52}Cl_3NO_{26}$ (1069.19),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1067.18$,

$M_{\text{gef}} = 1066.48$ (M+Na)⁺.

¹H-NMR (500 MHz, [D6]-DMSO): $\delta = 10.05$ (s, 1H, NH), 6.26 (d, 1H, $J_{1,2} < 5.77$ Hz, H-1¹ α), 5.33-5.25 (m, 2H, H-4¹, H-2¹), 5.15-5.05 (m, 5H, H-4², H-2^{2'}, H-1², H-4^{2'}, H-2²), 5.05-4.93 (m, 2H, H-3^{2'}, H-3²), 4.89 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1^{2'} α), 4.25-4.19 (dd, 1H, $J_{2,3} = 2.71$ Hz, $J_{3,4} = 9.23$ Hz, H-3¹), 4.17-4.04 (m, 2H, H-6a², H-6a^{2'}), 4.03-3.95 (m, 4H, H-6b², H-5¹, H-5², H-6b^{2'}), 3.94-3.87 (m, 3H, H-5^{2'}), 3.71-3.59 (m, 2H, H-6a,b¹), 2.18 (s, 3H, Ac), 2.11-2.06 (m, 9H, Ac), 2.04-1.97 (m, 12H, Ac), 1.95-1.90 (m, 6H, Ac).

¹³C-NMR (125 MHz, [D6]-DMSO): $\delta = 170.0, 169.9, 169.7, 169.6, 169.6, 169.5, 168.5$ (C=O Ac), 157.0 (C=NH), 98.2 (C-1² α , $^1J_{C-1,H-1} = 178.7$ Hz), 96.5 (C-1^{2'} α , $^1J_{C-1,H-1} = 176.8$ Hz), 93.6 (C-1¹ α , $^1J_{C-1,H-1} = 181.8$ Hz), 74.0 (C-3¹), 71.3 (C-5¹), 68.9 (C-2¹), 68.6 (C-5¹), 68.3 (C-4²), 68.3 (C-4^{2'}), 68.1 (C-3²), 67.9 (C-3^{2'}), 67.7 (C-5^{2'}), 65.9 (C-4¹), 65.2 (C-6¹), 65.0 (C-2²), 64.9 (C-2^{2'}), 61.7 (C-6²), 61.5 (C-6^{2'}), 20.6, 20.5, 20.4, 20.3 (Ac).

O-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-*O*-[(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-2,4-di-acetyl- α -D-mannopyranose **68**

(3,6-(α -Ac₄Man)-2,4- α -Ac₂Man)

Schutzgruppenmodifikation mittels Hydrazinhydrat

50.1 mg (44.0 μ mol, 1.0 eq) Trisaccharid **54** werden in 1.46 mL Ethanol gelöst und es folgt die Zugabe von 1.46 mL (348.0 mmol, 9.4 eq) Hydrazinhydrat. Nach 67 min (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1) wird mit Aceton verdünnt, das Lösungsmittel eingeeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird in 2.65 mL (32.8 mmol) Pyridin gelöst, mit 1.32 mL (14.0 mmol) Acetanhydrid versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. Nach Reaktionsende (DC: Hexan/Aceton 1.5:1) wird dreimal mit Toluol codestilliert und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Ohne weiter Reinigung wird das peracetylierte Trisaccharid in 0.59 mL Ethylacetat gelöst und unter Kühlung im Wasserbad auf 10 °C gerührt. Es folgt die Zugabe von 63.0 mg (418 µmol, 9.4 eq) Natriumbromat, welches in 1.19 mL Wasser gelöst ist. Anschließend werden unter starkem Rühren langsam 74.1 mg (362 µmol, 8.2 eq) Natriumdithionit, gelöst in 2.37 mL Wasser, zugetropft. Nach 1.5 h wird mit 20 mL Dichlormethan verdünnt, mit 200 µL 10 % Natriumthiosulfat-Lösung versetzt, mit Wasser gewaschen und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel eingeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Grace Resolve® 12 g; Cyclohexan/Aceton 10→50 %, 25.5 min, 28 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: 31.0 mg (33.5 µmol, 76.1 %),

$R_f = 0.28$ (Cyclohexan/Ethylacetat 1:2),

$C_{48}H_{56}O_{26}$ (924.81),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 924.27$,

$M_{\text{gef}} = 947.22$ (M+Na)⁺.

Schutzgruppenmodifikation mittels Natriumhydroxid

50.2 mg (44.1 µmol, 1.0 eq) Trisaccharid **54** in 1.46 mL Methanol gelöst und es folgt die Zugabe von 1.46 mL 1 M Natriumhydroxid-Lösung. Nach 70 min (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1) wird mit Essigsäure neutralisiert, das Lösungsmittel eingeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird in 2.65 mL (32.8 mmol) Pyridin gelöst, mit 1.32 mL (14.0 mmol) Acetanhydrid versetzt und 22 h bei Zimmertemperatur gerührt. Nach Reaktionsende (DC: Hexan/Aceton 1.5:1) wird dreimal mit Toluol codestilliert und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Ohne weiter Reinigung wird das peracetylierte Trisaccharid in 0.59 mL Ethylacetat gelöst und unter Kühlung im Wasserbad auf 10 °C gerührt. Es folgt die Zugabe von 62.7 mg (416 µmol, 9.4 eq) Natriumbromat, welches in 1.19 mL Wasser gelöst ist. Anschließend werden unter starkem Rühren langsam 74.1 mg (362 µmol, 8.2 eq) Natriumdithionit, gelöst in 2.37 mL Wasser, zugetropft. Nach 1.5 h wird mit 40 mL Dichlormethan verdünnt, mit 250 µL 10 %

Natriumthiosulfatlösung versetzt, mit Wasser gewaschen und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel eingeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Grace Resolve[®] 12 g; Cyclohexan/Aceton 10→50 %, 25.5 min, 28 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: 24.9 (26.9 μmol , 61.1 %),

$R_f = 0.32$ (Cyclohexan/Ethylacetat 1:2),

$\text{C}_{48}\text{H}_{56}\text{O}_{26}$ (924.81),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 924.27$,

$M_{\text{gef}} = 947.18$ ($M+\text{Na}$)⁺.

O-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1→2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl-(1→3)-*O*-[(α -D-mannopyranosyl)-(1→3)-*O*-[α -D-mannopyranosyl-(1→6)]-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1→6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1→4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1→4)-*O*-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosylazid **63**

(β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3- α -Man-1,3-[α -Man-1,6]- α -Man- β -1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc- N_3)

Vierstufige Entschüttung

77.7 mg (26.6 μmol , 1.0 eq) Octasaccharid **61** werden in 885 μL Ethylacetat gelöst, im Eisbad gekühlt und mit 72.3 mg (479 μmol , 18.0 eq) Natriumbromat, gelöst in 1.59 mL Wasser, versetzt. Danach wird die Reaktion gestartet, indem 81.8 mg (399 μmol , 15 eq) Natriumdithionit, gelöst in 3.06 mL Wasser, über 5 min zur Suspension zugetropft werden. Danach wird die Kühlung entfernt und das Reaktionsgemisch bei Zimmertemperatur stark gerührt. Nach 3.5 h (ESI-MS in Methanol; DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) wird die Reaktion durch Zugabe von 60 μL 10 %ige Natriumthiosulfat-Lösung (38.0 μmol , 1.4 eq) gestoppt. Die organische Phase wird mit 60 mL Ethylacetat verdünnt, mit Wasser gewaschen und die wässrige Phase zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über

Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel eingengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Das erhaltene debenzilylierte Octasaccharid wird ohne weitere Reinigung in 2.7 mL *n*-Butanol gelöst, die Lösung auf 80 °C temperiert und mit 724 µL (10.8 mmol) Ethylendiamin versetzt. Nach 8.5 h (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) wird die Lösung eingengt, der Rückstand viermal mit Toluol codestilliert und im Hochvakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird in 2.4 mL (29.7 mmol) Pyridin gelöst, mit 1.2 mL (12.7 mmol) Acetanhydrid bei Zimmertemperatur gelöst und 17 h gerührt. Nach vollständigem Reaktionsumsatz (ESI-MS in Methanol; DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) wird viermal mit Toluol codestilliert. Der Rückstand wird im Hochvakuum getrocknet, in Dichlormethan aufgenommen und die Lösung mit 1 M Salzsäure- und 2 M Kaliumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel eingengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Das ungereinigte Peracetat wird in 2.7 mL Methanol und 2.7 mL Methylamin (40 % in Wasser) gelöst und bei Zimmertemperatur gerührt. Nach 3.5 h (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) wird die Lösung eingengt, der Rückstand viermal mit Toluol codestilliert und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird in 1.5 mL Methanol aufgenommen und mit 35 mL kaltem Diethylether versetzt. Das Präzipitat wird bei 4000 rpm 5 min zentrifugiert, nochmal in 3.5 mL Methanol aufgenommen und mit 35 mL Diethylether gefällt. Das Rohprodukt wird mittels Gelpermeationschromatographie (HiLoad Superdex 30; Säulengröße: 16x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumbicarbonat; Fluss: 0.8 mL/min; Retentionszeit: 98.5 min) und Festphasenextraktion (Waters Sep-Pak C18; Kartuschengröße: 330 mg; Eluent: Acetonitril in Wasser; Fraktionsgröße: 7 mL) gereinigt. Elution von **63** erfolgt bei 0 % Acetonitril in Wasser.

Ausbeute: 6.60 mg (4.51 µmol, 17.0 %),

R_f (debenzilyliertes Octasaccharid) = 0.84 (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

R_f (Peracetat) = 0.87 (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

R_f (Produkt **63**) = 0.56 (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$[\alpha]_D^{25} = 27.6$ ($c = 0.6$, Wasser),

$C_{54}H_{90}N_6O_{40}$ (1463.31),

ESI-MS:

Debenzylisiertes Octasaccharid $M_{\text{ber}} = 2564.71,$ $M_{\text{gef}} = 2587.62 (M+\text{Na})^+, 2603.75 (M+\text{K})^+,$ *Global entschlützes Octasaccharid* $M_{\text{ber}} = 1336.49,$ $M_{\text{gef}} = 1337.59 (M+\text{H})^+,$ *Peracetat* $M_{\text{ber}} = 2386.75,$ $M_{\text{gef}} = 1216.43 (M+2\text{Na})^{2+}, 2410.17 (M+\text{Na})^+,$ **Produkt 63** $M_{\text{ber}} = 1462.52,$ $M_{\text{gef}} = 1463.53 (M+\text{H})^+, 1485.52 (M+\text{Na})^+, 1501.50 (M+\text{K})^+.$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O mit $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$ als interner Standard): $\delta = 4.91$ (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1 α^4), 4.88 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1 α^5), 4.71 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1 α^4), 4.70-4.63 (m, 1H, H-1 β^3), 4.58 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1 $\alpha^{5''}$), 4.55 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.30$ Hz, H-1 β^1), 4.39 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.20$ Hz, H-1 α^2), 4.35 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.35$ Hz, H-1 α^5), 4.05 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H-2 $\alpha^{5''}$), 4.00 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H-2 α^4), 3.95 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H-2 α^3), 3.86 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H-2 α^5), 3.82-3.77 (m, 2H, H-2 α^4 , H-6a 5), 3.76-3.62 (m, 11H, H-6a 3 , H-6a 4 , H-4 3 , H-3 4 , H-6a 2 , H-6a 1 , H-6a 5 , H-6a $^{5''}$, H-3 $^{5''}$, H-3 3 , H-3 4), 3.61-3.43 (m, 21H, H-2 2 , H-5 $^{5''}$, H-6b 2 , H-6b 5 , H-6b $^{5''}$, H-5 4 , H-3 2 , H-5 5 , H-5 2 , H-6b 1 , H-3 1 , H-6a 4 , H-2 1 , H-6b 5 , H-2 5 , H-4 4 , H-6b 4 , H-5 3 , H-5 1 , H-3 5 , H-4 $^{5''}$), 3.42-3.10 (m, 8H, H-6b 5 , H-4 5 , H-4 2 , H-4 1 , H-3 5 , H-4 4 , H-4 5 , H-5 5) 1.88-1.84 (m, 9H, NAc).

? $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O mit $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$ als interner Standard): $\delta = 176.4, 176.1$ (C=O NAc), 104.0 (C-1 $^5\alpha$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 173.8$ Hz), 103.1 (C-1 $^2\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 165.9$ Hz), 102.1 (C-1 $^{5''}\alpha$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 173.8$ Hz), 101.6 (C-1 $^3\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 163.3$ Hz), 101.3 (C-1 $^4\alpha$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 172.9$ Hz), 101.3 (C-1 $^4\alpha$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 171.9$ Hz), 100.9 (C-1 $^5\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 164.2$ Hz), 90.2 (C-1 $^1\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 166.8$ Hz), 82.1 (C-5 $^{5''}$), 81.2 (C-5 2), 80.3 (C-4 3), 80.3 (C-5 3), 80.3 (C-5 1), 78.1 (C-4 5), 78.1 (C-4 1), 78.0 (C-2 4), 77.5 (C-5 5), 76.1 (C-4 2), 76.0 (C-4 $^{5''}$), 75.2 (C-5 5),

75.0 (C-5⁴), 74.9 (C-4⁵), 74.4 (C-4⁴), 73.9 (C-3¹), 73.6 (C-3²), 72.2 (C-3⁴), 72.0 (C-2^{5''}), 71.9 (C-2^{5'}), 71.8 (C-2^{5'''}), 71.6 (C-4⁵), 71.6 (C-3³), 71.1 (C-2³), 68.9 (C-4⁴), 68.3 (C-3^{5'}), 67.7 (C-6³), 67.2 (C-3^{5''}), 66.7 (C-6⁵), 63.4 (C-6⁴), 62.7 (C-6²), 62.6 (C-6^{5'}), 62.3 (C-6^{4'}), 61.5 (C-6^{5''}), 61.5 (C-6¹), 57.0 (C-2⁵), 56.5 (C-2²), 56.1 (C-2¹), 24.0, 23.9, 23.8 (NAc).

Entschüttung mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung

259.1 mg (88.5 μmol , 1 eq) Octasaccharidazid **61** werden in 1.2 mL Ethylacetat gelöst, im Eisbad gekühlt und mit 242.3 mg (1.6 mmol, 18 eq) Natriumbromat, gelöst in 5.3 mL Wasser, versetzt. Danach wird die Reaktion gestartet, indem 272.4 mg (1.3 mmol, 15 eq) Natriumdisulfid, gelöst in 10.2 mL Wasser, über 10 min zur Suspension zugetropft werden. Anschließend wird das Eisbad entfernt und das Reaktionsgemisch bei Zimmertemperatur stark gerührt. Nach 1 d (DC: Hexan/Aceton 1.2:1) wird mit 150 mL Dichlormethan verdünnt, mit Wasser gewaschen und die wässrige Phase zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel eingengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Der Rückstand wird in 8.7 mL *n*-Butanol gelöst und auf 90 °C temperiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2.3 mL (34.1 mmol) Ethylendiamin gestartet. Nach 1 d (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) wird sechsmal mit Toluol codestilliert und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird in 3 mL Methanol und 3 mL 1 M Natriumhydroxid-Lösung gelöst und das Gemisch für 1.5 h bei Zimmertemperatur gerührt. Nach Neutralisation mit 300 μL Essigsäure werden die Lösungsmittel eingengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Zum Rückstand werden 11.8 mL Acetanhydrid/Pyridin 1:2 gegeben und das Gemisch bei Zimmertemperatur gerührt. Nach 1 d (DC: Dichlormethan/Methanol 10:1) wird fünfmal mit Toluol codestilliert und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Das peracetylierte Octasaccharid wird in 8.7 mL Methanol und 8.7 mL Methylamin (40 % in Wasser) gelöst und bei Zimmertemperatur gerührt. Nach 2 h wird mit Toluol codestilliert und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird in 3.5 mL Methanol aufgenommen und mit 45 mL kaltem Diethylether versetzt. Das Präzipitat wird bei 4000 rpm 5 min zentrifugiert, nochmal in 3.5 mL Methanol aufgenommen und mit 45 mL Diethylether gefällt. Das Rohprodukt wird mittels Gelpermeationschromatographie gereinigt (HiLoad Superdex

30; Säulengröße: 26x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumbicarbonat; Fluss: 1.5 mL/min; Retentionszeit: 140.0 min).

Ausbeute: 85.2 mg (58.2 μmol , 65.7 %),

$R_f = 0.56$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$\text{C}_{54}\text{H}_{90}\text{N}_6\text{O}_{40}$ (1463.31),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1462.52$,

$M_{\text{gef}} = 1463.53$ (M+H)⁺, 1485.52 (M+Na)⁺.

O-(α -D-Mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3))-*O*-{[(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3))-*O*-[α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]}-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4))-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4))-*O*-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosylazid **35**

(α -Man-1,3- α -Man-1,3-[α -Man-1,6]- α -Man- β -1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc-N₃)

3.9 mg (2.7 μmol) Octasaccharid **63** werden in 97 μL HEPES-Puffer (pH 6.0, 0.1 mg/mL BSA) gelöst und mit 9.4 μL *exo*- β -*N*-Acetylglucosaminidase (0.6 U, *Canavalia ensiformis*, E. C. 3.2.1.30) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird für 20 h bei 37 °C im Thermoschüttler inkubiert (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1). Das Rohprodukt wird mittels Gelpermeationschromatographie gereinigt (Sephadex G25; Säulengröße: 25x750 mm; 5 % Ethanol in Wasser; Fluss: 0.75 mL/min; Retentionszeit: 60 min).

Ausbeute: 3.2 mg (2.5 μmol , 94.8 %)

$R_f = 0.58$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 3:1),

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 20.0$ (c = 0.5, Wasser),

$\text{C}_{54}\text{H}_{90}\text{N}_6\text{O}_{40}$ (1260.12),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1259.44$,

$M_{\text{gef}} = 1260.95$ (M+H)⁺, 1282.91 (M+Na)⁺.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O mit [D₆]-DMSO als interner Standard): $\delta = 4.89$ (m, 2H, H-

$1\alpha^5$, H- $1\alpha^4$), 4.71 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.59$ Hz, H- $1\alpha^5$), 4.67 (d, 1H, $J_{1,2} = 1.45$ Hz, H- $1\alpha^4$), 4.60-4.54 (m, 2H, H- $1\beta^3$, H- $1\beta^1$), 4.40 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.92$ Hz, H- $1\beta^2$), 4.05 (dd, 1H, $J_{1,2} < 2.03$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H- 2^3), 3.95 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1.87$ Hz, $J_{2,3} < 3.15$ Hz, H- 2^4), 3.88-3.85 (m, 2H, H- 2^5 , H- 2^4), 3.81-3.77 (m, 2H, H- $6a^3$, H- 2^5), 3.76-3.62 (m, 12H, H- $6a^4$, H- 3^4 , H- $6a^5$, H- $6a^4$, H- 3^5 , H- $6a^5$, H- 3^4 , H- $6a^2$, H- 3^2 , H- $6a^1$, H- 3^5 , H- 3^1), 3.62-3.50 (m, 16H, H- 4^5 , H- 4^4 , H- 2^2 , H- 4^4 , H- 3^3 , H- $6b^5$, H- $6b^4$, H- $6b^4$, H- 5^2 , H- $6b^5$, H- $6b^3$, H- 4^1 , H- $6b^2$, H- 2^1 , H- 5^5 , H- 5^4), 3.42-3.10 (m, 8H, H- $6b^1$, H- 4^2 , H- 4^5 , H- 5^4 , H- 4^3 , H- 5^1 , H- 5^5 , H- 5^3) 1.87 (s, 3H, NAc), 1.85 (s, 3H, NAc).

^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O mit [D6]-DMSO als interner Standard): $\delta = 176.4, 176.1$ (C=O NAc), 104.2 (C- $1^4\alpha$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 175.6$ Hz), 103.9 (C- $1^5\alpha$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 175.6$ Hz), 103.1 (C- $1^2\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 165.3$ Hz), 102.1 (C- $1^3\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 164.1$ Hz), 101.5 (C- $1^4\alpha$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 173.2$ Hz), 100.9 (C- $1^5\alpha$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 173.2$ Hz), 90.1 (C- $1^1\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 164.1$ Hz), 82.2 (C- 5^2), 81.2 (C- 5^5), 81.2 (C- 5^4), 80.3 (C- 5^4), 80.2 (C- 3^4), 78.1 (C- 5^3), 76.1 (C- 5^5), 76.0 (C- 5^1), 75.1 (C- 4^5), 74.9 (C- 4^4), 74.3 (C- 4^2), 73.8 (C- 4^1), 73.6 (C- 4^4), 72.4 (C- 3^5), 72.2 (C- 3^1), 72.0 (C- 3^5), 71.9 (C- 3^4), 71.8 (C- 2^3), 71.8 (C- 2^5), 71.6 (C- 2^5), 71.6 (C- 2^4), 71.1 (C- 2^4), 68.5 (C- 4^3), 68.3 (C- 4^5), 67.6 (C- 6^4), 67.3 (C- 3^2), 67.1 (C- 3^3), 66.8 (C- 6^3), 62.8 (C- 6^5), 62.7 (C- 6^4), 62.6 (C- 6^5), 61.6 (C- 6^2), 61.5 (C- 6^1), 56.5 (C- 2^2), 56.1 (C- 2^1), 23.8, 23.7 (NAc).

11.6 Versuche zu Kapitel 4.1

*(1-(O-(β -D-Galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-O- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[O-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(O-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-O- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-O-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-N-biotinylamid **72***

(1-(β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc)-NH-Biotin)

29.6 mg (17.7 μmol , 1 eq) Nonasaccharid **23** werden unter Argonatmosphäre in 985 μL absolutem Methanol gelöst und mit 30.0 μL (177 μmol , 10 eq) Diisopropylethylamin sowie

107 μL (1.06 mmol, 60 eq) 1,3-Propanedithiol versetzt. Nach 3 h wird das Lösungsmittel eingengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wird der Rückstand in 2 mL absolutem Methanol gelöst und mit 12 mL kaltem Diethylether ausgefällt. Die Reaktion wird für 1 h gekühlt und anschließend für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird mit einer Lösung aus 13.2 mg (54.4 μmol , 3.1 eq) Biotin **71**, 27.6 mg (53.0 μmol , 3 eq) PyBOP und 6.90 μL (40.6 μmol , 2.3 eq) Diisopropylethylamin in 885 μL Dimethylformamid versetzt. Nach vollständigem Umsatz (2 d, DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) wird das Rohprodukt im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung erfolgt durch Gelpermeationschromatographie (HiLoad Superdex 30; Säulengröße: 26x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumbicarbonat; Fluss: 1.5 mL/min; Retentionszeit: 136.4 min).

Ausbeute: 20.3 mg (10.9 μmol , 61.6 %),

R_f (Halbaminale) = 0.33 (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

R_f (**72**) = 0.41 (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$[\alpha]_D^{26} = +45.6$ (0.6, Wasser),

$\text{C}_{72}\text{H}_{119}\text{N}_7\text{O}_{47}\text{S}$ (1866.80),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1865.69$,

$M_{\text{gef}} = 1866.58$ (M+H)⁺, 1888.96 (M+Na)⁺.

¹H-NMR (360 MHz, D₂O mit [D₆]-DMSO als interner Standard): $\delta = 4.92$ (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1⁴ α), 4.85 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.31$ Hz, H-1¹ β), 4.73 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1⁴ α), 4.62-4.54 (m, 1H, H-1³ β), 4.48 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.59$ Hz, H-1² β), 4.43-4.33 (m, 3H, H-1, H-1⁵ β , H-1⁵ β), 4.29-4.19 (m, 3H, H-1⁶ β , H-1⁶ β , H-2), 4.05 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H-2³), 3.99 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H-2⁴), 3.90 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H-2⁴), 3.82-3.64 (m, 15H, H-6a⁶, H-6a⁶, H-6a³, H-6a⁴, H-6a⁴, H-3⁶, H-3⁶, H-3⁴, H-3⁴, H-3⁶, H-2¹, H-6a¹, H-6a², H-6b⁶, H-6b⁶), 3.63-3.49 (m, 22H, H-6b⁶, H-6b⁶, H-2², H-4³, H-6b³, H-3³, H-6b², H-6b¹, H-2⁵, H-4², H-2⁵, H-6a,b⁵, H-6a,b⁵, H-4⁶, H-4⁶, H-3¹, H-4⁵, H-4⁵, H-3⁵, H-3⁵), 3.48-3.22 (m, 16H, H-5⁶, H-5⁶, H-4¹, H-6b⁴, H-6b⁴, H-5³, H-5¹, H-5², H-5⁵, H-5⁵, H-5⁴, H-5⁴, H-2⁶, H-2⁶, H-4⁴, H-4⁴), 3.17-3.09 (m, 1H, H-5), 2.80 (dd, 1H, $J_{3,4} = 4.36$ Hz, $J_{\text{Bio1},\text{Bio4}} = 13.17$ Hz,

H-4), 2.58 (d, 1H, $J_{1,3} = 12.7$ Hz, H-3), 2.13-2.04 (m, 2H, H-9), 1.91-1.79 (m, 12H, NAc), 1.60-1.31 (m, 4H, H-6, H-8), 1.25-1.16 (m, 2H, H-7).

^{13}C -NMR (90 MHz, D_2O mit $[\text{D}_6]$ -DMSO als interner Standard): $\delta = 179.0, 176.1, 176.0$, (C=O NAc), 166.8 (C=O Biotin), 104.5 (C-1 $^6\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 166.0$ Hz), 104.5 (C-1 $^6\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 166.0$ Hz), 102.9 (C-1 $^2\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 165.5$ Hz), 102.0 (C-1 $^3\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 163.9$ Hz), 101.1 (C-1 $^4\alpha$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 172.9$ Hz), 100.0 (C-1 $^5\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 162.9$ Hz), 100.0 (C-1 $^5\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 162.9$ Hz), 98.6 (C-1 $^4\alpha$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 172.9$ Hz), 82.0 (C-3 3), 81.0 (C-4 5), 81.0 (C-4 5), 80.2 (C-2 4), 80.1 (C-2 4), 79.8 (C-1 $^1\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 158.6$ Hz), 78.0 (C-5 1), 77.9 (C-5 3), 77.8 (C-4 2), 76.9 (C-5 5), 76.9 (C-5 5), 76.3 (C-3 1), 76.3 (C-5 6), 76.2 (C-5 6), 76.0 (C-5 2), 75.1 (C-4 1), 74.4 (C-3 5), 74.2 (C-3 5), 74.1 (C-5 4), 74.1 (C-5 4), 73.6 (C-4 3), 73.5 (C-4 6), 73.5 (C-4 6), 72.5 (C-2 6), 72.5 (C-2 6), 71.7 (C-3 2), 71.0 (C-3 4), 71.0 (C-3 4), 70.1 (C-3 6), 70.1 (C-3 6), 68.9 (C-4 4), 68.9 (C-4 4), 67.3 (C-6 3), 63.6 (C-2), 63.3 (C-6 4), 63.2 (C-6 4), 62.5 (C-6 5), 62.5 (C-6 2), 62.5 (C-6 5), 62.5 (C-6 5), 61.7 (C-1), 61.5 (C-6 6), 61.5 (C-6 6), 61.5 (C-6 1), 56.8 (C-5), 56.5 (C-2 5), 56.5 (C-2 5), 56.4 (C-2 2), 55.4 (C-2 1), 37.1 (C-9), 41.2 (C-3/4), 37.1 (C-9), 29.3 (C-6), 29.2 (C-7), 26.5 (C-8), 23.9, 23.8, 23.7 (NAc).

1-{*O*-(5-Acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl}-*N*-biotinylamid **73**

(1-(α -Neu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[α -Neu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc)-NH-Biotin)

4.0 mg (1.8 μmol , 1 eq) Undecasaccharid **28** werden unter Argonatmosphäre in 98.9 μL absolutem Methanol gelöst und mit 3.0 μL (17.8 μmol , 10 eq) Diisopropylethylamin sowie 10.7 μL (107 μmol , 60 eq) 1,3-Propanedithiol versetzt. Nach 4 h (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1) wird das Lösungsmittel eingeeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wird der Rückstand in 1.0 mL absolutem Methanol gelöst, mit 13 mL kaltem

Diethylether ausgefällt und 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird mit einer Lösung aus 1.3 mg (5.4 μmol , 3 eq) Biotin **71**, 2.8 mg (5.4 μmol , 3 eq) PyBOP und 0.7 μL (4.1 μmol , 2.3 eq) Diisopropylethylamin in 90.0 μL *N,N*-Dimethylformamid versetzt. Nach 21 h wird das Produkt durch 15 mL Diethylether ausgefällt und 3 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung erfolgt durch Festphasenextraktion (Waters SepPak C18, Kartuschengröße: 360 mg; Elution: 0 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 100 % Acetonitril in Wasser; Fraktionsgröße: 5 mL). Das Produkt **73** eluiert bei 5 % Acetonitril.

Ausbeute: 1.6 mg (0.70 μmol , 36.0 %),

R_f (Halbaminale) = 0.49 (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1),

R_f (**73**) = 0.20 (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$\text{C}_{94}\text{H}_{153}\text{N}_9\text{O}_{63}\text{S}$ (2449.32),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 2447.88$,

$M_{\text{gef}} = 1224.96 (\text{M}+2\text{H})^{2+}$.

O-(5-Acetamido-3,5-didesoxy-1-phenacyl- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(5-acetamido-3,5-didesoxy-1-phenacyl- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosylazid **74**

(α -PacNeu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[α -PacNeu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc- N_3)

5.0 mg (2.22 μmol , 1 eq) Undecasaccharid **28** werden in 8.0 μL Wasser gelöst und mit 500 μg (1.54 μmol , 0.7 eq) Cäsiumcarbonat in 200 μL Wasser versetzt, sodass ein pH von 9.8 eingestellt wird. Die Reaktion wird lyophilisiert, der Rückstand unter Argonatmosphäre

in *N,N*-Dimethylformamid gelöst und es werden 1.6 mg (8.0 μmol , 3.6 eq) Phenylacetyl bromid zugegeben. Nach 5 h (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1) wird das Produkt mit 20 mL kaltem Diethylether ausgefällt und 2 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung erfolgt durch Festphasenextraktion (Waters SepPak C18, Kartuschengröße: 360 mg; Elution: 0 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 30 %, 100 % Acetonitril in Wasser; Fraktionsgröße: 5 mL). Das Produkt **74** eluiert bei 20 % und 30 % Acetonitril.

Ausbeute: 3.5 mg (1.5 μmol , 69.6 %),

$R_f = 0.87$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1),

$\text{C}_{100}\text{H}_{149}\text{N}_9\text{O}_{63}$ (2485.29),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 2483.87$,

$M_{\text{gef}} = 2504.49$ (M+Na)⁺.

1-{*O*-(5-Acetamido-3,5-didesoxy-1-phenacyl- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(5-acetamido-3,5-didesoxy-1-phenacyl- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl}-*N*-biotinylamid **75**

(1-(α -PacNeu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[α -PacNeu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc)-NH-Biotin)

4.0 mg (1.61 μmol , 1 eq) Pac-geschütztes Undecasaccharid **74** werden unter Argonatmosphäre in 89.3 μL absolutem Methanol gelöst und mit 2.7 μL (16.1 μmol , 10 eq) Diisopropylethylamin sowie 9.7 μL (96.6 μmol , 60 eq) 1,3-Propandithiol versetzt. Nach 3 h (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1) wird das Lösungsmittel eingeeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wird der Rückstand in 1.0 mL absolutem Methanol gelöst und mit 13 mL kaltem Diethylether ausgefällt und 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird mit einer Lösung aus 1.20 mg (4.91 μmol , 3.1 eq) Biotin **71**, 2.54 mg (4.91 μmol , 3.1 eq) PyBOP und 0.63 μL (3.75 μmol , 2.3 eq) Diisopropylethylamin in 84.5 μL *N,N*-Dimethylformamid versetzt. Nach 1 d wird das Produkt durch 2 mL Diethylether ausgefällt. Der Überstand wird abgenommen und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung erfolgt durch Festphasenextraktion (Waters SepPak C18, Kartuschengröße: 360 mg; Elution: 0 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 100 % Acetonitril in Wasser jeweils mit 0.1 % Ameisensäure; Fraktionsgröße: 5.5 mL). Das Produkt **75** eluiert bei 20 und 30 % Acetonitril.

Ausbeute: 2.11 mg (784 nmol, 48.7 %),

R_f (Halbaminol) = 0.64 (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1),

$\text{C}_{110}\text{H}_{165}\text{N}_9\text{O}_{65}\text{S}$ (2685.59),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 2683.96$

$M_{\text{gef}} = 1343.46 (M+2H)^{2+}$, $1343.46 (M+H+Na)^{2+}$.

11.7 Versuche zu Kapitel 4.2

1-N-(Prop-3-ynyl)-biotinylamid 76

(Propin-Biotinamid)

501 mg (2.05 mmol, 1.0 eq) Biotin, 260 mg (2.26 mmol, 1.1 eq) *N*-Hydroxysuccinimid und 486 mg (2.53 mmol, 1.2 eq) EDC Hydrochlorid werden in 25 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Nach 23 h (DC: Dichlormethan/Methanol 5:1) wird das Lösungsmittel eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wird der Rückstand mit 10 mL Methanol dreimal gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird in 29 mL *N,N*-Dimethylformamid aufgenommen und mit 150 μL (2.34 mmol, 1.1 eq) Propargylamin **88** und 450 μL (3.25 μmol , 1.6 eq) Triethylamin versetzt. Nach 15 h (DC: Dichlormethan/Methanol 5:1) wird das Lösungsmittel eingeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Grace ResolveTM 40 g, Dichlormethan/Methanol 5 \rightarrow 50 %, 17 min, 32 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: 420 mg (1.49 μmol , 72.9 %),

R_f (Succinimid-Ester) = 0.51 (Dichlormethan/Methanol 5:1),

R_f (**76**) = 0.36 (Dichlormethan/Methanol 5:1),

$\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ (281.37),

ESI-MS:

Succinimid-Ester:

$M_{\text{ber}} = 341.10$,

$M_{\text{gef}} = 342.45 (\text{M}+\text{H})^+$, $683.92 (2\text{M}+\text{H})^+$,

Produkt 76:

$M_{\text{ber}} = 281.12$,

$M_{\text{gef}} = 281.88 (\text{M}+\text{H})^+$, $303.87 (\text{M}+\text{Na})^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 8.22$ (t, 1H, H-S1), 6.42 (d, 1H, H-N1), 6.35 (d, 1H, H-N2), 4.29 (q, 1H, H-3), 4.12 (t, 1H, H-4), 3.83 (d, 2H, H-2), 3.08 (m, 2H, H-1, H-5), 2.85-2.78 (m, 1H, H-3), 2.59 (m, 1H, H-4), 2.10-2.05 (t, 2H, H-9), 1.59-1.23 (m, 6H, H-6, H-7, H-8).

β -D-Glucopyranosylazid 84

(β -Glc- N_3)

5.0 g (27.8 mmol, 1 eq) Glucose-Monohydrat **83** werden in 134.4 mL (1.7 mol, 60 eq) Pyridin und 78.7 mL (832.5 mmol, 30 eq) Acetanhydrid gelöst. Nach 1 d (DC: Dichlormethan/Methanol 20:1) wird dreimal mit Toluol codestilliert und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Der gesamte Rückstand wird in 200 mL Dichlormethan gelöst. Anschließend werden 20.2 mL (155.4 mmol, 5.6 eq) Trimethylsilylazid und 11.7 mL (99.9 mmol, 3.6 eq) Zinntetrachlorid zugegeben. Nach 1 d (DC: Cyclohexan/Aceton 1.5:1) gibt man zu dem Ansatz unter Eiskühlung Wasser und so viel festes Natriumhydroxid bis die Dichlormethan-Phase klar wird. Anschließend wird zweimal mit Dichlormethan extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird eingeeengt, der Rückstand im Hochvakuum getrocknet und ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Ausbeute: 9.5 g (25.5 mmol, 92.0 %),

$R_f = 0.49$ (DC: Cyclohexan/Aceton 1.5:1),

$C_{14}H_{19}N_3O_9$ (373.32),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 373.11$,

$M_{\text{gef}} = 374.37$ (M+H)⁺.

101 mg (270 μmol , 1 eq) Acetyl-geschütztes Glucoseazid wird in 0.9 mL (27.0 mmol, 100 eq) Methylamin (40 % in Wasser) gelöst. Nach 1 d (DC: Cyclohexan/Aceton 1:2) wird zweimal mit Toluol codestilliert und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 55.5 mg (270 μmol , quant.),

$R_f = 0.13$ (DC: Cyclohexan/Aceton 1:2),

$C_6H_{11}N_3O_5$ (205.17).

¹H-NMR (270 MHz, D₂O): $\delta = 4.71$ (d, 1H, $J = 8.56$ Hz, H-1 β^1), 3.89 (m, 1H, H-6a¹), 3.72 (m, 1H, H-6b¹), 3.52-3.38 (m, 3H, H-3¹, H-4¹, H-5¹), 3.25 (t, 1H, H-2¹).

2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosylazid 26

(β -GlcNAc-N₃)

50.0 mg (2.17 mmol, 0.3 eq) elementares Natrium werden in 20 mL absolutem Methanol unter Rühren gelöst. Nachdem sich das Natrium vollständig gelöst hat, wird die Methanolat-Lösung in einen Kolben mit 3.0 g (8.06 mmol, 1 eq) **81** überführt. Nach 1.5 h (DC: Hexan/Aceton 2:1) wird zum Neutralisieren der saure Ionenaustauscher Amberlyst 15 zugegeben. Anschließend wird über Celite filtriert, das Lösungsmittel eingengt und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1.98 g (8.04 mmol, quant.),

$R_f = 0.38$ (DC: Hexan/Aceton 2:1),

$C_9H_{17}N_4O_5$ (246.22),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 246.10$,

$M_{\text{gef}} = 269.13$ (M+Na)⁺, 515.27 (2M+Na)⁺.

Tris[1-{N-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl}-methyl]amin **86**

((β-GlcNAc-Triazol-CH₃)₃-N)

39.1 μL (0.9 μmol, 0.10 eq) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorphosphat, sowie 39.2 μL (0.9 μmol, 0.10 eq) TBTA **80** werden als jeweils 23 mM Dimethylsulfoxid-Lösung zusammengegeben und für 30 min bei Zimmertemperatur geschüttelt. 11.1 mg (44.2 μmol, 5 eq) β-Glycosylazid **26** werden in 898 μL Dimethylsulfoxid/Wasser (1:1) gelöst, sodass die Saccharidkonzentration 100 mM beträgt. Anschließend werden 1.30 μL (9.00 μmol, 1 eq) Trispropargylamin **85** sowie der Cu(I)-TBTA-Komplex zu der Glycanlösung gegeben. Nach 1 d (DC: Dichlormethan/Methanol 4:1) wird die Lösung lyophilisiert. Die Reinigung erfolgt mittels RP-HPLC (Supelco Ascentis C18, 5 μm (10x250 mm), 4 mL/min, 0 → 50 % Wasser/Acetonitril + 0.1 % Ameisensäure in 55 min).

Ausbeute: 7.2 mg (8.3 μmol, 92.3 %),

$R_f = 0.37$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1),

C₃₃H₅₁N₁₃O₁₅ (869.84),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 869.36$,

$M_{\text{gef}} = 871.31$ (M+H)⁺.

¹H-NMR (360 MHz, D₂O mit [D₆]-DMSO als interner Standard): δ= 8.04 (s, 3H, H-T), 5.67 (d, 3H, $J_{1,2} = 9.55$ Hz, H-1β), 4.10 (dd, 3H, H-2), 3.79-3.47 (m, 21H, H-6a,b, H-3, H-4, H-S2, H-5), 1.59 (s, 9H, NAc).

¹³C-NMR (90 MHz, D₂O mit [D₆]-DMSO als interner Standard): δ= 175.7 (C=O NAc), 144.8 (C=CH T), 125.6 (C=CH T), 88.0 (C-1β, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 161.1$ Hz), 80.6 (C-4), 75.2 (C-3), 70.9 (C-5), 62.0 (C-6), 57.0 (C-2), 48.1 (C-S2), 23.3 (NAc).

Tris[1-{N-(β-D-glucopyranosyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl}-methyl]amin **87**

((β-Glc-Triazol-CH₃)₃-N)

3.9 μL (1.2 μmol , 0.10 eq) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat, sowie 11.9 μL (1.2 μmol , 0.10 eq) TBTA **80** werden als jeweils 23 mM Dimethylsulfoxid-Lösung zusammengegeben und für 30 min bei Zimmertemperatur geschüttelt. 12.1 mg (44.2 μmol , 5 eq) β -Glycosylazid **84** werden in 343 μL *tert*-Butanol und 229 μL Wasser (*tert*-Butanol/Wasser 3:2) gelöst, sodass die Saccharidkonzentration 100 mM beträgt. Anschließend werden 1.70 μL (11.7 μmol , 1 eq) Trispropargylamin **85** sowie der Cu(I)-TBTA-Komplex zu der Glycanlösung gegeben. Die Reaktion wird bei 55 °C für 1 d (DC: Dichlormethan/Methanol 4:1) inkubiert und abschließend lyophilisiert. Die Reinigung erfolgt durch Gelpermeationschromatographie (HiLoad Superdex 30; Säulengröße: 16x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumbicarbonat; Fluss: 1.0 mL/min; Retentionszeit: 93.0 min).

Ausbeute: 6.7 mg (9.0 μmol , 76.7 %),

$R_f = 0.37$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1),

$\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{N}_{10}\text{O}_{15}$ (746.68),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 746.28$,

$M_{\text{gef}} = 746.36$ (M+H)⁺, 768.30 (M+Na)⁺.

¹H-NMR (360 MHz, D₂O mit [D₆]-DMSO als interner Standard): $\delta = 8.05$ (s, 3H, H-T), 5.67 (d, 3H, $J_{1,2} = 9.33$ Hz, H-1 β), 3.80 (dd, 3H, H-2) 3.75-3.63 (m, 9H, H-6a, H-S2), 3.62-3.38 (m, 4H, H-6b, H-5, H-3, H-4).

¹³C-NMR (90 MHz, D₂O mit [D₆]-DMSO als interner Standard): $\delta = 145.1$ (C=CH T), 126.1 (C=CH T), 89.0 (C-1 β , $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 160.90$ Hz), 80.4 (C-5), 77.5 (C-3), 73.8 (C-2), 70.5 (C-4), 62.0 (C-6), 48.4 (C-S2).

1-{*N*-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl}-*N*-methylenbiotinylamid **82**

(1-(β -GlcNAc)-Triazol-4-CH₂-Biotinamid)

Umsatz mit TBTA **80** in DMSO/H₂O

24.3 μL (3.7 μmol , 0.10 eq) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorphosphat gelöst in Dimethylsulfoxid (Stammlösung: 152 mM), sowie 60.9 μL (3.7 μmol , 0.10 eq) TBTA **80** gelöst in Dimethylsulfoxid (Stammlösung: 93 mM) werden zusammengegeben und für 30 min bei Zimmertemperatur geschüttelt. 10.0 mg (40.6 μmol , 1 eq) **84** werden in 133 μL Dimethylsulfoxid und 218.0 μL Wasser (Dimethylsulfoxid/Wasser 1:1) gelöst, sodass die Saccharidkonzentration 100 mM beträgt. Anschließend werden 31.9 mg (114 μmol , 2.8 eq) Biotinderivat **76** sowie der Cu(I)-TBTA-Komplex zu der Glycanlösung gegeben. Die Reaktion wird bei Zimmertemperatur für 2 d (DC: Dichlormethan/Methanol 4:1) inkubiert und abschließend lyophilisiert. Die Reinigung erfolgt mittels RP-HPLC (Supelco Ascentis C18, 5 μm (10x250 mm), 4 mL/min, 0 \rightarrow 50 % Wasser/Acetonitril + 0.1 % Ameisensäure in 55 min).

Ausbeute: 9.6 mg (16.4 μmol , 44.6 %),

$R_f = 0.18$ (Dichlormethan/Methanol 4:1),

$\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}_7\text{S}$ (527.59),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 527.22$,

$M_{\text{gef}} = 549.53$ (M+Na)⁺.

*Umsatz mit TGNAcTA **86** in tert-Butanol/Wasser 3:2*

8.0 μL (2.4 μmol , 0.10 eq) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorphosphat gelöst in Dimethylsulfoxid, sowie 2.1 mg (2.4 μmol , 0.10 eq) TGNAcTA **86** werden zusammengegeben und für 30 min bei Zimmertemperatur geschüttelt. 5.9 mg (24.0 μmol , 1 eq) β -Glycosylazid **84** werden in 144 μL *tert*-Butanol und 96 μL Wasser (*tert*-Butanol/Wasser 3:2) gelöst, sodass die Saccharidkonzentration 100 mM beträgt. Anschließend werden 13.5 mg (48.0 μmol , 2 eq) Biotinderivat **76** sowie der Cu(I)-TGNAcTA-Komplex zu der Glycanlösung gegeben. Die Reaktion wird bei 55 $^{\circ}\text{C}$ für 1 d (DC: Dichlormethan/Methanol 3:1) inkubiert und abschließend lyophilisiert. Die Reinigung erfolgt mittels Festphasenextraktion (Waters SepPak C18, Kartuschengröße: 360 mg; Elution: 0 %, 2.5 %, 5 %, 7.5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 100 % Acetonitril in Wasser; Fraktionsgröße: 6 mL). Das Produkt **82** eluiert bei 5 und 7.5 % Acetonitril.

Ausbeute: 8.2 mg (15.4 μmol , 64.2 %),

$R_f = 0.37$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1),

$\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}_7\text{S}$ (527.59),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 527.22$,

$M_{\text{gef}} = 528.82$ (M+H)⁺, 549.53 (M+Na)⁺.

¹H-NMR (360 MHz, D₂O mit [D6]-DMSO als interner Standard): $\delta = 7.89$ (s, 1H, H-T), 5.62 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.77$ Hz, H-1 β^1), 4.43-4.38 (m, 1H, H-1), 4.33-4.24 (m, 3H, H-2, H-S2), 4.14 (dd, 1H, $J_{1,2} = 9.90$ Hz, $J_{2,3} = 10.78$ Hz, H-2¹), 3.78-3.70 (m, 1H, H-6a¹), 3.66-3.44 (m, 4H, H-6b¹, H-3¹, H-5¹, H-4¹), 3.17-3.08 (m, 1H, H-5), 2.80 (dd, 1H, $J_{3,4} = 4.87$ Hz, $J_{1,4} = 13.0$ Hz, H-4), 2.58 (dd, 1H, $J_{\text{Bio1,Bio3}} = 12.86$ Hz, H-3), 2.13-2.07 (t, 2H, H-9), 1.63 (3, 3H, NAc), 1.57-1.31 (m, 4H, H-6, H-8), 1.28-1.14 (m, 2H, H-7).

¹³C-NMR (90 MHz, D₂O mit [D6]-DMSO als interner Standard): $\delta = 178.1$ (C=O NAc), 175.4 (NH-C=O), 121.1 (C-T), 88.1 (C-1 β , $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 160.83$ Hz), 80.5 (C-5¹), 75.0 (C-3¹), 71.0 (C-4¹), 63.6 (C-2), 62.0 (C-6¹), 61.7 (C-1), 57.0 (C-2¹), 57.0 (C-5), 41.4 (C-3/4), 37.1 (C-9), 35.8 (C-S2), 29.4 (C-7), 29.2 (C-6), 26.6 (C-8), 23.3 (NAc).

*1-[(N-(β -D-Galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-O- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[O-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(O-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-O- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-O-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-N-methylenbiotinylamid **72***

(1-(β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc)-Triazol-4-CH₂-Biotinamid)

*Umsatz mit TBTA **80***

9.04 μL (0.27 μmol , 0.09 eq) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorphosphat gelöst in Dimethylsulfoxid, sowie 28.9 μL (0.27 μmol , 0.09 eq) TBTA **80** werden zusammengegeben und

für 30 min bei Zimmertemperatur geschüttelt. 5.0 mg (3.0 μmol , 1 eq) β -Glycosylazid **23** werden in 123 μL *tert*-Butanol und 80 μL Wasser (*tert*-Butanol/Wasser 3:2) gelöst. Anschließend werden 2.37 mg (8.42 μmol , 2.8 eq) Biotinderivat **76** sowie der Cu(I)-TBTA-Komplex zu der Glycanlösung gegeben. Die Reaktion wird bei 25 °C für 2 d inkubiert und abschließend lyophilisiert. Die Reinigung erfolgt mittels Gelpermeationschromatographie (HiLoad Superdex 30; Säulengröße: 16x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumbicarbonat; Fluss: 0.75 mL/min; Retentionszeit: 97.3 min).

Ausbeute: 3.77 mg (1.94 μmol , 64.5 %),

$R_f = 0.25$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1),

$\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}_7\text{S}$ (1947.88),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1946.72$,

$M_{\text{gef}} = 1947.74$ (M+H)⁺.

Umsatz mit TGTA 87

0.91 μL (112 μg , 0.30 μmol , 0.1 eq) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorphosphat gelöst in Dimethylsulfoxid, sowie 1.12 μL (224 μg , 0.3 μmol , 0.1 eq) TGTA **87** gelöst in Wasser werden zusammengegeben und für 30 min bei Zimmertemperatur geschüttelt. 5.67 mg (3.40 μmol , 1 eq) β -Glycosylazid **23** werden in 20.9 μL *tert*-Butanol und 13.1 μL Wasser (*tert*-Butanol/Wasser 3:2) gelöst, sodass die Saccharidkonzentration 100 mM beträgt. Anschließend werden 2.56 mg (9.10 μmol , 2.7 eq) Biotinderivat **76** sowie der Cu(I)-TGTA-Komplex zu der Glycanlösung gegeben. Die Reaktion wird bei Zimmertemperatur für 1 d (DC: Dichlormethan/Methanol 3:1) inkubiert und abschließend lyophilisiert. Die Reinigung erfolgt mittels Gelpermeationschromatographie (HiLoad Superdex 30; Säulengröße: 16x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumbicarbonat; Fluss: 0.75 mL/min; Retentionszeit: 97.5 min).

Ausbeute: 3.55 mg (1.82 μmol , 53.6 %),

$R_f = 0.25$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1),

$\text{C}_{75}\text{H}_{122}\text{N}_{10}\text{O}_{47}\text{S}$ (1947.87),

ESI-MS:

$$M_{\text{ber}} = 1946.72,$$

$$M_{\text{gef}} = 1947.74 (M+H)^+.$$

11.8 Versuche zu Kapitel 5

Generelle Vorgehensweise für die Kupfer-katalysierte Cycloaddition mit den ω -Aminoalkinen 88, 91 und 92

0.1 eq Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorphosphat gelöst in Dimethylsulfoxid sowie 0.1 eq Ligand gelöst in Wasser werden zusammengegeben und für 30 min bei Zimmertemperatur geschüttelt. 1.0 eq β -Glycosylazid wird in Wasser gelöst. Die ω -Aminoalkine, Propargylamin **88** (Reinheit: 98 %) und Aminobutin **91** (Reinheit: 95 %) liegen als Lösung vor. Das Hexinylamin-Hydrochlorid (Reinheit: 98 %) wird in Wasser aufgenommen und als Stammlösung zu dem Glycosylazid zugegeben. Die Aminoalkine werden mit 3 Äquivalenten eingesetzt. Insgesamt liegt die Endkonzentration des Glycosylazids bei 100 mM. Zum Start der Reaktion wird der Cu(I)-Ligand-Komplex zu der Glycanlösung gegeben.

*1-{O- β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O-(2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-O- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(O-2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-O- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-O-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranosyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl-methylamin **90***

(1-(β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc)-Triazol-4-methyl-NH₂)

*Umsetzung mit dem TBTA **80**:*

Die Synthese erfolgt entsprechend der generellen Vorgehensweise für die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition. 2.07 mg (1.24 μ mol, 1 eq) Nonasaccharidazid **23** werden in 12.4 μ L Wasser gelöst. Es werden 1.9 μ L (0.124 μ mol, 0.10 eq) Kupfer(I)-Komplex und 1.0 μ L (0.124 μ mol, 0.10 eq) TBTA **80** eingesetzt. 0.24 μ g (3.72 μ mol, 3 eq) Propargylamin **88** werden zugegeben. Nach 1 d (DC: iso-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) wird das

Rohprodukt lyophilisiert. Die Reinigung erfolgt mittels Gelpermeationschromatographie (HiLoad Superdex 30; Säulengröße: 16x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumbicarbonat; Fluss: 1.0 mL/min; Retentionszeit: 78.2 min).

Ausbeute: 1.41 mg (0.82 μ mol, 66.0 %),

$R_f = 0.19$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$[\alpha]_D^{24} = +13.5$ (0.3, Wasser),

$C_{65}H_{108}N_8O_{45}$ (1721.58),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1720.64$,

$M_{\text{gef}} = 1740.89$ ($M+NH_4$)⁺.

¹H-NMR (360 MHz, D₂O mit [D6]-DMSO als interner Standard): $\delta = 7.96$ (s, 1H, H-T), 5.64 (m, 1H, $J_{1,2} = 9.51$ Hz, H-1¹ β), 4.92 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1⁴ α), 4.74 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1⁴ α), 4.60-4.55 (m, 1H, H-1³), 4.47 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.58$ Hz, H-1² β), 4.41-4.36 (m, 2H, H-1⁵, H-1⁵'), 4.30-4.25 (m, 2H, H-1⁶, H-1⁶'), 4.12-4.04 (m, 2H, H-2¹, H-2³), 3.99 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H-2⁴), 3.91 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H-2⁴'), 3.84-3.65 (m, 17H, H-S2, H-6a⁶, H-6a⁶', H-6a³, H-3¹, H-6a⁴, H-6a⁴', H-3⁶, H-3⁶', H-3², H-3⁴, H-3⁴', H-6a¹, H-6a², H-6b⁶, H-6b⁶'), 3.64-3.47 (m, 26H, H-6b⁶, H-6b⁶', H-2², H-4¹, H-4³, H-6b³, H-3³, H-6b², H-6b¹, H-2⁵, H-5⁴, H-5⁴', H-4², H-5², H-2⁵', H-6a,b⁵, H-6a,b⁵', H-4⁵, H-4⁵', H-5¹, H-5⁶, H-5⁶', H-3⁵, H-3⁵'), 3.46-3.21 (m, 11H, H-4⁶, H-4⁶', H-6b⁴, H-6b⁴', H-5³, H-5⁵, H-5⁵', H-2⁶, H-2⁶', H-4⁴, H-4⁴'), 1.91-1.84 (m, 9H, NAc), 1.62 (s, 3H, NAc).

¹³C-NMR (90 MHz, D₂O mit [D6]-DMSO als interner Standard): $\delta = 176.1$, 175.6 (C=O NAc), 123.8 (C-T), 104.6 (C-1⁶ β , $^1J_{C-1,H-1} = 163.4$ Hz), 104.5 (C-1⁶ β , $^1J_{C-1,H-1} = 163.4$ Hz), 102.9 (C-1² β , $^1J_{C-1,H-1} = 164.2$ Hz), 102.0 (C-1³ β , $^1J_{C-1,H-1} = 161.5$ Hz), 101.1 (C-1⁴ α , $^1J_{C-1,H-1} = 173.1$ Hz), 101.0 (C-1⁵ β , $^1J_{C-1,H-1} = 162.3$ Hz), 101.0 (C-1⁵ β , $^1J_{C-1,H-1} = 162.3$ Hz), 98.6 (C-1⁴ α , $^1J_{C-1,H-1} = 170.4$ Hz), 87.8 (C-1¹ β , $^1J_{C-1,H-1} = 160.7$ Hz), 82.0 (C-3³), 81.1 (C-5²), 80.2 (C-4⁵), 80.2 (C-4⁵'), 80.0 (C-3²), 79.1 (C-4³), 79.1 (C-4¹), 78.0 (C-2⁴), 77.9 (C-2⁴'), 76.9 (C-4²), 76.3 (C-5⁵), 76.3 (C-5⁵'), 76.0 (C-5⁶), 76.0 (C-5⁶'), 75.1 (C-5³), 74.4 (C-5¹), 74.1 (C-3⁵), 74.1 (C-3⁵'), 73.7 (C-5⁴), 73.7 (C-5⁴'), 73.5 (C-4⁶), 73.5 (C-4⁶'), 72.5 (C-2⁶), 72.5 (C-2⁶'), 71.8 (C-2³), 71.1 (C-3¹), 71.0 (C-3⁴), 71.0 (C-3⁴'), 70.1 (C-3⁶), 70.1 (C-3⁶'), 68.9 (C-4⁴), 68.9 (C-4⁴'), 67.3 (C-6³), 63.2 (C-6⁴), 63.2 (C-6⁴'), 62.6 (C-6⁵), 62.6 (C-6²), 62.6

(C-6⁵), 62.6 (C-6^{5'}), 61.6 (C-6⁶), 61.6 (C-6^{6'}), 61.4 (C-6¹), 56.4 (C-2¹), 56.4 (C-2²), 56.4 (C-2⁵), 56.4 (C-2^{5'}), 36.3 (C-S2), 24.0, 23.9, 23.2 (NAc).

Umsetzung mit dem TGTA 87:

Die Synthese erfolgt entsprechend der generellen Vorgehensweise für die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition. 2.10 mg (1.26 μmol , 1 eq) Nonasaccharidazid **23** werden in 12.6 μL Wasser gelöst. Es werden 1.9 μL (0.124 μmol , 0.10 eq) Kupfer(I)-Komplex und 0.09 mg (0.126 μmol , 0.10 eq) TGTA **87** eingesetzt. 0.24 μg (3.72 μmol , 3 eq) Propargylamin **88** werden zugegeben. Nach 1 d (DC: iso-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) wird das Rohprodukt lyophilisiert. Die Reinigung erfolgt mittels Gelpermeationschromatographie (HiLoad Superdex 30; Säulengröße: 16x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumbicarbonat; Fluss: 1.0 mL/min; Retentionszeit: 78.1 min).

Ausbeute: 1.57 mg (0.91 μmol , 72.4 %),

$R_f = 0.19$ (iso-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$\text{C}_{65}\text{H}_{108}\text{N}_8\text{O}_{45}$ (1721.58),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1720.64$,

$M_{\text{gef}} = 1722.22$ (M+H)⁺.

Umsetzung mit dem TGNAcTA 86

Die Synthese erfolgt entsprechend der generellen Vorgehensweise für die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition. 2.08 mg (1.25 μmol , 1 eq) Nonasaccharidazid **23** werden in 12.5 μL Wasser gelöst. Es werden 1.9 μL (0.124 μmol , 0.10 eq) Kupfer(I)-Komplex und 0.11 mg (0.125 μmol , 0.10 eq) TGNAcTA **86** eingesetzt. 0.24 μL (3.72 μmol , 3 eq) Propargylamin **88** werden zugegeben. Nach 1 d (DC: iso-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) wird das Rohprodukt lyophilisiert. Die Reinigung erfolgt mittels Gelpermeationschromatographie (HiLoad Superdex 30; Säulengröße: 16x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumbicarbonat; Fluss: 1.0 mL/min; Retentionszeit: 78.2 min).

Ausbeute: 1.59 mg (0.92 μmol , 73.9 %),

$R_f = 0.19$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$\text{C}_{65}\text{H}_{108}\text{N}_8\text{O}_{45}$ (1721.58),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1720.64$,

$M_{\text{gef}} = 1722.22$ (M+H)⁺.

1-{*O*- β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(*O*-2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranosyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl-butylamin **94**

(1-(β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc)-Triazol-4-butyl-NH₂)

Die Synthese erfolgt entsprechend der generellen Vorgehensweise für die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition. 5.07 mg (3.04 μmol , 1 eq) Nonasaccharidazid **23** werden in 30.4 μL Wasser gelöst. Es werden 0.91 μL (0.303 μmol , 0.10 eq) Kupfer(I)-Komplex und 1.12 μL (0.304 μmol , 0.10 eq) TGTA **87** eingesetzt. 4.51 μL (9.12 μmol , 3 eq) Hexinylamin **92** werden zugegeben. Nach 1 d (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) wird das Rohprodukt lyophilisiert. Die Reinigung erfolgt mittels Gelpermeationschromatographie (HiLoad Superdex 30; Säulengröße: 16x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumbicarbonat; Fluss: 1.0 mL/min; Retentionszeit: 77.0 min).

Ausbeute: 5.02 mg (2.85 μmol , 93.8 %),

$R_f = 0.37$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1),

$[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -9.5$ (0.3, Wasser),

$\text{C}_{68}\text{H}_{114}\text{N}_8\text{O}_{45}$ (1763.66),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1762.69$,

$M_{\text{gef}} = 1764.16$ (M+H)⁺.

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, D_2O mit [D6]-DMSO als interner Standard): $\delta = 7.80$ (s, 1H, H-T), 5.59 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.60$ Hz, H-1 $^1\beta$), 4.93 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1 $^4\alpha$), 4.74 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1 $^4\alpha$), 4.60-4.55 (m, 1H, H-1 $^3\beta$), 4.48 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.59$ Hz, H-1 $^2\beta$), 4.42-4.36 (m, 2H, H-1 $^5\beta$, H-1 $^5\beta$), 4.30-4.24 (m, 2H, H-1 $^6\beta$, H-1 $^6\beta$), 4.10-4.02 (m, 2H, H-2 1 , H-2 3), 3.99 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H-2 4), 3.91 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H-2 4), 3.84-3.65 (m, 15H, H-6a 6 , H-6a 6 , H-6a 3 , H-3 1 , H-6a 4 , H-6a 4 , H-3 6 , H-3 6 , H-3 2 , H-3 4 , H-3 4 , H-6a 1 , H-6a 2 , H-6b 6 , H-6b 6), 3.64-3.47 (m, 26H, H-6b 6 , H-6b 6 , H-2 2 , H-4 1 , H-4 3 , H-6b 3 , H-3 3 , H-6b 2 , H-6b 1 , H-2 5 , H-5 4 , H-5 4 , H-4 2 , H-5 2 , H-2 5 , H-6a,b 5 , H-6a,b 5 , H-4 5 , H-4 5 , H-5 1 , H-5 6 , H-5 6 , H-3 5 , H-3 5), 3.46-3.21 (m, 11H, H-4 6 , H-4 6 , H-6b 4 , H-6b 4 , H-5 3 , H-5 5 , H-5 5 , H-2 6 , H-2 6 , H-4 4 , H-4 4), 2.76-2.67 (m, 2H, H-S2), 2.61-2.52 (m, 2H, H-S5), 1.92-1.82 (m, 9H, NAc), 1.61 (s, 3H, NAc), 1.58-1.45 (m, 2H, H-S4), 1.44-1.34 (m, 2H, H-S3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, D_2O mit [D6]-DMSO als interner Standard): $\delta = 176.3$, 175.5 (C=O NAc), 149.9 (C=C T), 123.3 (C-T), 104.6 (C-1 $^6\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 164.3$ Hz), 104.5 (C-1 $^6\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 166.4$ Hz), 103.0 (C-1 $^2\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 162.8$ Hz), 102.0 (C-1 $^3\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 161.5$ Hz), 101.1 (C-1 $^4\alpha$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 171.4$ Hz), 101.0 (C-1 $^5\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 163.9$ Hz), 101.0 (C-1 $^5\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 163.9$ Hz), 98.6 (C-1 $^4\alpha$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 172.5$ Hz), 87.8 (C-1 $^1\beta$, $^1J_{\text{C-1,H-1}} = 163.7$ Hz), 82.1 (C-3 3), 81.1 (C-5 2), 80.2 (C-4 5), 80.2 (C-4 5), 80.0 (C-3 2), 79.1 (C-4 3), 79.1 (C-4 1), 78.0 (C-2 4), 77.9 (C-2 4), 76.9 (C-4 2), 76.3 (C-5 5), 76.3 (C-5 5), 76.0 (C-5 6), 76.0 (C-5 6), 75.1 (C-5 3), 74.4 (C-5 1), 74.1 (C-3 5), 74.1 (C-3 5), 73.7 (C-5 4), 73.7 (C-5 4), 73.6 (C-3 1), 73.5 (C-4 6), 73.5 (C-4 6), 72.6 (C-2 6), 72.6 (C-2 6), 71.8 (C-2 3), 71.0 (C-3 4), 71.0 (C-3 4), 70.1 (C-3 6), 70.1 (C-3 6), 68.9 (C-4 4), 68.9 (C-4 4), 67.3 (C-6 3), 63.3 (C-6 4), 63.3 (C-6 4), 62.6 (C-6 5), 62.6 (C-6 2), 62.6 (C-6 5), 62.6 (C-6 5), 61.6 (C-6 6), 61.6 (C-6 6), 61.4 (C-6 1), 56.6 (C-2 1), 56.5 (C-2 2), 56.5 (C-2 5), 56.5 (C-2 5), 41.0 (C-S2), 28.7 (C-S3), 27.1 (C-S4), 25.5 (C-S5), 24.0, 23.9, 23.2 (NAc).

1-{O-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-O- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-O- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-O-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)}-1H-1,2,3-triazol-4-yl-butylamin **95**

(1-(β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc)-Triazol-4-butyl-NH₂)

Die Synthese erfolgt entsprechend der generellen Vorgehensweise für die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition. 1.50 mg (1.12 μ mol, 1 eq) Heptasaccharidazid **19** werden in 2.21 μ L Wasser gelöst. Es werden 0.77 μ L (0.112 μ mol, 0.10 eq) Kupfer(I)-Komplex und 3.97 μ L (0.112 μ mol, 0.10 eq) TGTA **87** eingesetzt. 4.25 μ L (3.35 μ mol, 3 eq) Hexinylamin **92** werden zugegeben. Nach 1 d wird das Rohprodukt mittels Gelpermeationschromatographie (HiLoad Superdex 30; Säulengröße: 16x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumbicarbonat; Fluss: 1.0 mL/min; Retentionszeit: 79.0 min) gereinigt.

Ausbeute: 1.27 mg (0.88 μ mol, 78.8 %),

C₅₆H₉₄N₈O₃₅ (1439.38),

ESI-MS:

M_{ber} = 1438.58,

M_{gef} = 1439.45 (M+H)⁺.

*1-{O-(5-Acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-O-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-O- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[O-(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-O-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(O-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-O- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-O-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranose)}-1H-1,2,3-triazol-4-yl-butylamin **96***

(1-(α -Neu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[α -Neu5Ac-2,6- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc)-Triazol-4-butyl-NH₂)

Die Synthese erfolgt entsprechend der generellen Vorgehensweise für die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition. 5.09 mg (2.22 μ mol, 1 eq) 2,6-sialyliertes Undecasaccharidazid **28** werden in 12.3 μ L Wasser gelöst. Es werden 0.66 μ L (0.222 μ mol, 0.10 eq) Kupfer(I)-Komplex und 0.82 μ L (0.222 μ mol, 0.10 eq) TGTA **87** eingesetzt. 8.47 μ L (6.66 μ mol, 3 eq)

Hexinylamin **92** werden zugegeben. Nach 1 d (DC: iso-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) wird das Rohprodukt mittels Gelpermeationschromatographie (HiLoad Superdex 30; Säulengröße: 16x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumbicarbonat; Fluss: 1.5 mL/min; Retentionszeit: 125.7 min) gereinigt.

Ausbeute: 4.98 mg (2.12 μmol , 95.6 %),

$R_f = 0.13$ (iso-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$\text{C}_{90}\text{H}_{148}\text{N}_{10}\text{O}_{61}$ (2346.17),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 2344.88$,

$M_{\text{gef}} = 1173.41$ ($M+2H$)²⁺.

*1-{O-(5-Acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 3)-O-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-O- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[O-(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 3)-O-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(O-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-O- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-O-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranose)}-1H-1,2,3-triazol-4-yl-butylamin **97***

(1-(α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[α -Neu5Ac-2,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc)-Triazol-4-butyl-NH₂)

Die Synthese erfolgt entsprechend der generellen Vorgehensweise für die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition. 1.10 mg (0.489 μmol , 1 eq) 2,3-sialyliertes Undecasaccharidazid werden in 7.96 μL Wasser gelöst. Es werden 0.07 μL (0.049 μmol , 0.10 eq) Kupfer(I)-Komplex und 1.20 μL (0.049 μmol , 0.10 eq) TGTA **87** eingesetzt. 1.57 μL (1.47 μmol , 3 eq) Hexinylamin **92** werden zugegeben. Nach 1 d (DC: iso-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) wird das Rohprodukt mittels Gelpermeationschromatographie (HiLoad Superdex 30; Säulengröße: 16x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumbicarbonat; Fluss: 0.8 mL/min; Retentionszeit: 76.9 min) gereinigt.

Ausbeute: 0.80 mg (0.340 μmol , 69.7 %),

$R_f = 0.20$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$\text{C}_{90}\text{H}_{148}\text{N}_{10}\text{O}_{61}$ (2346.17),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 2344.88$,

$M_{\text{gef}} = 1184.87$ ($M+2\text{Na}$)²⁺.

1-{*O*-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-*O*-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]-{*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)}-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[*O*-(α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)}-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl-butylamin **99**

(1-(β -GlcNAc-1,2-{ β -GlcNAc-1,4}- α -Man-1,3-[β -GlcNAc-1,4]-{ β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6}- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4-[α -Fuc-1,6]- β -GlcNAc)-Triazol-4-butyl-NH₂)

Die Synthese erfolgt entsprechend der generellen Vorgehensweise für die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition. 1.44 mg (0.760 μmol , 1 eq) triantennäres Decasaccharidazid werden in 1.62 μL Wasser gelöst. Es werden 0.55 μL (0.079 μmol , 0.10 eq) Kupfer(I)-Komplex und 2.8 μL (0.079 μmol , 0.10 eq) TGTA **87** eingesetzt. 3.0 μL (2.38 μmol , 3.1 eq) Hexinylamin **92** werden zugegeben. Nach 1 d wird das Rohprodukt mittels Gelpermeationschromatographie (HiLoad Superdex 30; Säulengröße: 16x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumbicarbonat; Fluss: 1.0 mL/min; Retentionszeit: 74.7 min) gereinigt.

Ausbeute: 1.44 mg (0.723 μmol , 95.1 %),

$\text{C}_{78}\text{H}_{130}\text{N}_{10}\text{O}_{49}$ (1991.90),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1990.80$,

$M_{\text{gef}} = 997.42$ ($M+2\text{H}$)²⁺.

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, D_2O mit $[\text{D}6]\text{-DMSO}$ als interner Standard): $\delta =$ 7.79 (s, 1H, H-T), 5.60 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.70$ Hz, H-1 $^1\beta$), 4.86 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1 $^4\alpha$), 4.80 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1 $^4\alpha$), 4.69 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.64$ Hz, H-1 $^F\alpha$), 4.62-4.48 (m, 2H, H-1 $^3\beta$, H-1 $^2\beta$), 4.37-4.29 (m, 4H, H-1 5 , H-1 $^{5''}$, H-1 $^{5'}$), 4.27 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.88$ Hz, H-1 $^{\text{Bis}}\beta$), 4.14 (dd, 1H, $J_{1,2} = 9.72$ Hz, $J_{2,3} = 10.26$ Hz, H-2 1), 4.09 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, H-2 4), 3.97-3.93 (m, 2H, H-2 4 , H-2 3), 3.91-3.82 (m, 3H, H-5 F , H-4 3 , H-3 4), 3.81-3.65 (m, 14H, H-6a 2 , H-6a $^{5'}$, H-6a 4 , H-4 1 , H-6a 5 , H-6a $^{5''}$, H-3 1 , H-3 2 , H-6a $^{\text{Bis}}$, H-6a,b 3 , H-6a 1 , H-3 $^{4'}$, H-4 F), 3.65-3.47 (m, 18H, H-3 3 , H-2 2 , H-3 $^{5'}$, H-6b $^{5'}$, H-6a $^{4'}$, H-6b 5 , H-2 F , H-6b $^{5''}$, H-2 $^{5'}$, H-6b $^{\text{Bis}}$, H-4 $^{4'}$, H-6b 1 , H-2 5 , H-3 F , H-2 $^{5''}$, H-5 1 , H-6b 2 , H-2 $^{\text{Bis}}$), 3.46-3.19 (m, 18H, H-3 5 , H-6b 4 , H-4 4 , H-3 $^{5''}$, H-5 $^{4'}$, H-3 $^{\text{Bis}}$, H-6b $^{4'}$, H-4 2 , H-5 3 , H-5 $^{5'}$, H-4 5 , H-4 $^{5'}$, H-5 2 , H-5 4 , H-4 $^{5''}$, H-5 5 , H-5 $^{\text{Bis}}$, H-5 $^{5''}$), 3.07 (dd, 1H, $J_{3,4} = 9.18$ Hz, $J_{4,5} = 10.53$ Hz, H-4 $^{\text{Bis}}$), 2.84-2.79 (m, 2H, H-S2), 2.60-2.54 (m, 2H, H-S5), 1.91-1.84 (m, 15H, NAc), 1.61 (s, 3H, NAc), 1.55-1.42 (m, 4H, H-S4, H-S3), 0.84 (d, 3H, $J_{5,6} = 6.48$ Hz, H-6 F).

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, D_2O mit $[\text{D}6]\text{-DMSO}$ als interner Standard, Verschiebungen wurden aus einem HSQC-Spektrum ermittelt): $\delta =$ 176.1, 175.2 (C=O NAc), 123.3 (C-T), 103.3 (C-1 $^5\beta$), 103.2 (C-1 $^{5''}\beta$), 102.4 (C-1 $^2\beta$), 101.2 (C-1 $^{\text{Bis}}\beta$), 101.1 (C-1 $^5\beta$), 101.1 (C-1 $^{5''}\beta$), 100.9 (C-1 $^3\alpha$), 100.9 (C-1 $^4\alpha$), 100.1 (C-1 $^F\alpha$), 99.5 (C-1 $^4\alpha$), 87.5 (C-1 $^1\beta$), 80.4 (C-5 $^{4'}$), 80.2 (C-4 $^{4'}$), 80.2 (C-4 F), 78.3 (C-5 $^{\text{Bis}}$), 77.9 (C-4 1), 77.7 (C-2 $^{4'}$), 77.6 (C-2 4), 77.5 (C-5 $^{5'}$), 77.4 (C-5 4), 77.3 (C-5 5), 77.2 (C-5 $^{5''}$), 76.1 (C-4 4), 75.8 (C-5 3), 75.2 (C-4 2), 75.1 (C-5 2), 74.9 (C-3 5), 74.9 (C-3 $^{5''}$), 74.8 (C-3 $^{\text{Bis}}$), 74.8 (C-5 1), 73.6 (C-3 1), 73.5 (C-3 F), 73.4 (C-3 $^{5'}$), 73.3 (C-4 3), 72.7 (C-4 $^{\text{Bis}}$), 71.8 (C-2 3), 71.4 (C-4 5), 71.3 (C-4 $^{5''}$), 71.1 (C-3 2), 71.0 (C-3 $^{4'}$), 71.0 (C-3 3), 69.8 (C-3 4), 69.6 (C-2 F), 68.9 (C-4 $^{5'}$), 68.3 (C-5 F), 67.0 (C-6 3), 63.3 (C-6 4), 63.2 (C-6 2), 63.0 (C-6 $^{4'}$), 62.4 (C-6 $^{\text{Bis}}$), 62.1 (C-6 5), 62.1 (C-6 $^{5''}$), 62.0 (C-6 $^{5'}$), 61.7 (C-6 1), 57.5 (C-2 $^{\text{Bis}}$), 57.0 (C-2 $^{5'}$), 56.9 (C-2 5), 56.9 (C-2 $^{5''}$), 56.7 (C-2 2), 56.3 (C-2 1), 40.5 (C-S2), 27.5 (C-S3), 26.9 (C-S4), 25.3 (C-S5), 23.8, 23.1 (NAc), 16.7 (C-6 F).

1-{*O*-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-*O*-[*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]-[(*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-[(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[*O*-(α -L-

*fucopyranosyl)-(1→6)]-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl))-1H-1,2,3-triazol-4-yl-butylamin **100***

(1-(β-GlcNAc-1,2-{β-GlcNAc-1,4}-α-Man-1,3-[β-GlcNAc-1,4]-{β-GlcNAc-1,2-[β-GlcNAc-1,6]-α-Man-1,6}-β-Man-1,4-β-GlcNAc-1,4-[α-Fuc-1,6]-β-GlcNAc)-Triazol-4-butyl-NH₂)

Die Synthese erfolgt entsprechend der generellen Vorgehensweise für die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition. 2.32 mg (1.11 μmol, 1 eq) tetraantennäres Dodecasaccharidazid werden in 6.10 μL Wasser gelöst. Es werden 0.34 μL (0.111 μmol, 0.10 eq) Kupfer(I)-Komplex und 0.41 μL (0.111 μmol, 0.10 eq) TGTA **87** eingesetzt. 4.21 μL (3.32 μmol, 3 eq) Hexinylamin **92** werden zugegeben. Nach 1 d (DC: iso-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) wird das Rohprodukt mittels Gelpermeationschromatographie (HiLoad Superdex 30; Säulengröße: 16x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumbicarbonat; Fluss: 0.8 mL/min; Retentionszeit: 90.3 min) gereinigt.

Ausbeute: 2.23 mg (1.02 μmol, 91.9 %),

$R_f = 0.24$ (iso-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$C_{86}H_{143}N_{11}O_{54}$ (2195.10),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 2193.88$,

$M_{\text{gef}} = 1097.65 (M+2H)^{2+}$, $1119.66 (M+2Na)^{2+}$.

¹H-NMR (360 MHz, D₂O mit [D₆]-DMSO als interner Standard): δ = 7.79 (s, 1H, H-T), 5.61 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.63$ Hz, H-1^{1β}), 4.87 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1^{4α}), 4.72 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1^{4α}), 4.69 (d, 1H, $J_{1,2} = 4.01$ Hz, H-1^{Fα}), 4.62-4.50 (m, 2H, H-1³, H-1²), 4.41-4.23 (m, 5H, H-1⁵, H-1^{5''}, H-1^{5'}, H-1^{5'''}, H-1^{Bis}), 4.18-4.01 (m, 3H, H-2¹, H-2⁴, H-6^{4'}), 4.00-3.83 (m, 4H, H-4³, H-2^{4'}, H-5^F, H-3⁴), 3.82-3.65 (m, 15H, H-6a^{Bis}, H-3^F, H-6a⁵, H-6a¹, H-6a^{5''}, H-4^F, H-6a^{5'}, H-6a^{5'''}, H-3¹, H-3², H-6a², H-6a,b³, H-3³, H-2³), 3.64-3.46 (m, 19H, H-2^F, H-6a^{Bis}, H-3^{4'}, H-5⁴, H-6b^{5''}, H-5⁵, H-6b^{5'}, H-2², H-6b¹, H-2^{5'''}, H-2^{5''}, H-6b^{5'}, H-6b², H-2^{5'}, H-5², H-4¹, H-6a⁴, H-2^{Bis}, H-3^{Bis}), 3.46-3.21 (m, 22H, H-2⁵, H-5¹, H-6b^{4'}, H-4⁴, H-3^{5'}, H-3^{5'''}, H-5^{4'}, H-6b⁴, H-3^{5''}, H-5^{5''}, H-5³, H-4^{5''}, H-5^{5'}, H-5^{5'''}, H-3⁵, H-4^{5'}, H-4^{5'''}, H-4², H-4^{4'}, H-4⁵, H-5^{Bis}, H-4^{Bis}), 2.78-2.72 (m, 2H, H-S2), 2.60-2.53 (m, 2H, H-S5), 1.93-1.82 (m, 15H, NAc), 1.61

(s, 3H, NAc), 1.56-1.47 (m, 2H, H-S4), 1.46-1.38 (m, 2H, H-S3), 0.84 (d, 3H, $J_{5,6} = 6.40$ Hz, H-6^F).

¹³C-NMR (90 MHz, D₂O mit [D6]-DMSO als interner Standard, Verschiebungen wurden aus einem HSQC-Spektrum ermittelt): $\delta =$ 176.1, 175.2 (C=O NAc), 123.3 (C-T), 103.4 (C-1^{5'}), 102.7 (C-1³), 102.2 (C-1^{Bis}), 101.7 (C-1²), 101.2 (C-1⁵), 101.2 (C-1^{5''}), 101.0 (C-1⁴), 100.5 (C-1^F), 99.2 (C-1^{4'}), 87.7 (C-1¹), 80.1 (C-4⁴), 79.9 (C-5³), 79.8 (C-4¹), 79.7 (C-5⁵), 79.1 (C-3^F), 78.1 (C-2^{4'}), 77.6 (C-4^F), 77.5 (C-2⁴), 77.4 (C-5^{Bis}), 77.3 (C-5^{5''}), 77.2 (C-5^{5'}), 77.2 (C-5^{5''}), 75.8 (C-5^{4'}), 75.6 (C-5³), 74.9 (C-3⁵), 74.5 (C-3^{5'}), 74.5 (C-3^{5''}), 74.1 (C-3^{Bis}), 73.4 (C-3¹), 73.2 (C-5²), 73.0 (C-5⁴), 72.7 (C-5¹), 72.1 (C-4^{Bis}), 71.8 (C-4³), 71.6 (C-3^{5''}), 71.5 (C-6^{4'}), 71.2 (C-3⁴), 71.2 (C-4^{5''}), 71.2 (C-4^{5'}), 71.2 (C-4^{5'''}), 71.0 (C-4²), 70.8 (C-2²), 70.3 (C-3^{4'}), 68.9 (C-4^{4'}), 68.3 (C-5^F), 67.7 (C-6¹), 67.1 (C-2^F), 66.4 (C-6³), 62.6 (C-6⁴), 62.6 (C-6^{Bis}), 62.4 (C-6²), 62.2 (C-6⁵), 62.2 (C-6^{5''}), 62.0 (C-6^{5'}), 62.0 (C-6^{5'''}), 57.1 (C-2⁵), 57.1 (C-2^{5''}), 56.8 (C-2²), 56.8 (C-2^{5'}), 56.8 (C-2^{5'''}), 56.8 (C-2^{Bis}), 56.4 (C-2³), 55.9 (C-2¹), 40.5 (C-S2), 28.2 (C-S3), 26.8 (C-S4), 25.2 (C-S5), 23.8, 23.1 (NAc), 16.7 (C-6^F).

1-{*O*-(β -D-Galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-[(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-*O*-[(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-[(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)}-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl-butylamin **101**

(1-(β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,4]- α -Man-1,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,6]- α -Man-1,6- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc)-Triazol-4-butyl-NH₂)

Die Synthese erfolgt entsprechend der generellen Vorgehensweise für die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition. 1.12 mg (0.467 μ mol, 1 eq) tetraantennäres Saccharid **113** werden in 3.47 μ L Wasser gelöst. Es werden 0.19 μ L (0.063 μ mol, 0.13 eq) Kupfer(I)-Komplex und 0.23 μ L (0.063 μ mol, 0.13 eq) TGTA **87** eingesetzt. 2.41 μ L (1.90 μ mol, 4.1 eq) Hexinylamin **92** werden zugegeben. Nach 1 d (DC: iso-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1)

wird das Rohprodukt mittels Gelpermeationschromatographie (HiLoad Superdex 30; Säulengröße: 16x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumbicarbonat; Fluss: 0.8 mL/min; Retentionszeit: 84.8 min) gereinigt.

Ausbeute: 0.86 mg (0.344 μmol , 73.8 %),

$R_f = 0.20$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1),

$\text{C}_{96}\text{H}_{160}\text{N}_{10}\text{O}_{65}$ (2494.33),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 2492.95$,

$M_{\text{gef}} = 1246.76 (M+2H)^{2+}$.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): $\delta = 7.81$ (s, 1H, H-T), 5.59 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.73$ Hz, H-1 $^1\beta$), 4.93 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1 $^4\alpha$), 4.68 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1 $^4\alpha$), 4.64-4.54 (m, 1H, H-1 3), 4.47 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.38$ Hz, H-1 $^2\beta$), 4.23-4.33 (m, 4H, 1 5 , 1 $^{5''}$, 1 5 , 1 $^{5''}$), 4.30-4.25 (m, 4H, 1 6 , 1 $^{6'}$, 1 $^{6''}$, 1 $^{6'''}$), 4.08-3.98 (m, 3H, 2 1 , 2 4 , 2 3), 3.90 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, 2 4), 3.86 (dd, 1H, $J_{2,3} = 2.19$ Hz, $J_{3,4} = 8.75$ Hz, 3 4), 3.83-3.71 (m, 10H, 6a 2 , 6a 5 , 6a $^{5'}$, 6a $^{5''}$, 6a $^{5'''}$, 3 1 , 4 5 , 4 $^{5'}$, 4 $^{5''}$, 4 $^{5'''}$), 3.70-3.49 (m, 40H, 6a 4 , 6b 2 , 3 4 , 6a,b 1 , 6b 5 , 6b $^{5'}$, 6b $^{5''}$, 6b $^{5'''}$, 2 2 , 5 3 , 2 5 , 2 $^{5''}$, 4 2 , 5 4 , 6b 2 , 6a,b 6 , 6a,b $^{6'}$, 4 5 , 4 $^{5'}$, 4 $^{5''}$, 4 $^{5'''}$, 6b 4 , 6a,b $^{6''}$, 6a,b $^{6'''}$, 6a 4 , 5 5 , 5 $^{5'}$, 5 $^{5''}$, 5 $^{5'''}$, 5 6 , 5 $^{6'}$, 5 $^{6''}$, 5 $^{6'''}$, 2 5), 3.48-3.30 (m, 17H, 3 6 , 3 $^{6'}$, 3 $^{6''}$, 3 $^{6'''}$, 3 5 , 3 $^{5''}$, 4 3 , 3 3 , 4 4 , 3 2 , 3 $^{5'}$, 3 $^{5''}$, 6b 4 , 2 6 , 2 $^{6'}$, 2 $^{6''}$, 2 $^{6'''}$), 3.21 (dd, 1H, $J_{3,4} = 10.10$ Hz, $J_{4,5} = 10.85$ Hz, 4 4), 2.73 (t, 2H, $J_{S2,S3} = 7.28$ Hz, H-S2), 2.57 (t, 2H, $J_{S4,S5} = 7.50$ Hz, H-S5), 1.91-1.82 (m, 18H, NAc), 1.61 (s, 3H, NAc), 1.55-1.49 (m, 2H, H-S4), 1.45-1.38 (m, 2H, H-S3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O mit [D6]-DMSO als interner Standard, Verschiebungen wurden aus einem HSQC-Spektrum ermittelt): $\delta = 123.1$ (C-T), 104.6 (C-1 6), 104.6 (C-1 $^{6'}$), 104.5 (C-1 $^{6''}$), 104.5 (C-1 $^{6'''}$), 103.3 (C-1 5), 103.3 (C-1 $^{5''}$), 102.8 (C-1 2), 101.9 (C-1 3), 101.2 (C-1 $^{5'}$), 101.2 (C-1 $^{5'''}$), 100.6 (C-1 4), 98.7 (C-1 4), 87.8 (C-1 1), 81.8 (C-5 4), 80.9 (C-5 5), 80.2 (C-5 $^{5'}$), 80.1 (C-5 $^{5''}$), 79.9 (C-4 3), 79.9 (C-4 4), 78.2 (C-2 4), 77.5 (C-2 4), 77.0 (C-5 6), 77.0 (C-5 $^{6'}$), 77.1 (C-5 $^{6''}$), 77.1 (C-5 $^{6'''}$), 76.5 (C-3 3), 76.5 (C-3 2), 76.4 (C-3 $^{5'}$), 76.4 (C-3 $^{5''}$), 76.3 (C-3 5), 76.3 (C-3 $^{5''}$), 74.1 (C-3 6), 74.1 (C-3 $^{6'}$), 74.1 (C-3 $^{6''}$), 74.1 (C-3 $^{6'''}$), 74.0 (C-5 1), 73.9 (C-4 5), 73.9 (C-4 $^{5''}$), 73.6 (C-4 $^{5'}$), 73.6 (C-4 $^{5'''}$), 73.6 (C-3 1), 73.2 (C-4 2), 72.7 (C-4 1), 72.6 (C-2 6), 72.6 (C-2 $^{6'}$), 72.6 (C-2 $^{6''}$), 71.5 (C-2 3), 71.0 (C-3 4), 70.2 (C-4 6), 70.2 (C-4 $^{6'}$), 70.2 (C-4 $^{6''}$), 70.2 (C-4 $^{6'''}$), 69.7 (C-3 4), 69.1 (C-4 4), 62.8 (C-6 4), 62.6 (C-6 6), 62.6 (C-6 $^{6'}$), 62.6

(C-6^{6''}), 62.6 (C-6^{6'''}), 61.7 (C-6^{4'}), 61.6 (C-6¹), 61.6 (C-6²), 61.6 (C-6³), 61.6 (C-6⁵), 61.6 (C-6^{5'}), 61.6 (C-6^{5''}), 61.6 (C-6^{5'''}), 61.2 (C-6⁴), 56.5 (C-2^{5'}), 56.5 (C-2^{5''}), 56.4 (C-2⁵), 56.4 (C-2^{5'}), 56.4 (C-2²), 56.4 (C-2¹), 40.8 (C-S2), 28.2 (C-S3) 26.9 (C-S4) 25.3 (C-S5), 23.9, 23.8, 23.4, 23.1 (NAc).

1-{*O*-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-*O*-{[(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-*O*-[α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]}-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl))}-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl-butylamin **102**

(1-(β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3- α -Man-1,3-[α -Man-1,6]- α -Man- β -1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc)-Triazol-4-butyl-NH₂)

Die Synthese erfolgt entsprechend der generellen Vorgehensweise für die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition. 1.56 mg (1.07 μ mol, 1 eq) Octasaccharid **63** werden in 4.75 μ L Wasser gelöst. Es werden 0.15 μ L (0.107 μ mol, 0.10 eq) Kupfer(I)-Komplex und 2.4 μ L (0.107 μ mol, 0.10 eq) TGTA **87** eingesetzt. 3.40 μ L (3.20 μ mol, 3 eq) Hexinylamin **92** werden zugegeben. Nach 1 d wird das Rohprodukt mittels Gelpermeationschromatographie (HiLoad Superdex 30; Säulengröße: 16x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumbicarbonat; Fluss: 0.8 mL/min; Retentionszeit: 94 min) gereinigt.

Ausbeute: 1.19 mg (763 nmol, 71.3 %),

C₆₀H₁₀₁N₇O₄₀ (1560.47),

ESI-MS:

M_{ber} = 1559.61,

M_{gef} = 1560.54 (M+H)⁺.

1-{*O*-(α -D-Mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-*O*-{(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-*O*-[α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]}-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl))}-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl-butylamin **103**

(1-(α -Man-1,3- α -Man-1,3-[α -Man-1,6]- α -Man- β -1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc)-Triazol-4-butyl-NH₂)

Die Synthese erfolgt entsprechend der generellen Vorgehensweise für die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition. 3.0 mg (2.38 μ mol, 1 eq) Heptasaccharid **35** werden in 9.9 μ L Wasser gelöst. Es werden 0.4 μ L (0.238 μ mol, 0.10 eq) Kupfer(I)-Komplex und 5.9 μ L (0.238 μ mol, 0.10 eq) TGTA **87** eingesetzt. 7.60 μ L (7.14 μ mol, 3 eq) Hexinylamin **92** werden zugegeben. Nach 1 d wird das Rohprodukt mittels Gelpermeationschromatographie (Hi-Load Superdex 30; Säulengröße: 16x600 mm; Eluent: 0.1 M Ammoniumbicarbonat; Fluss: 0.8 mL/min; Retentionszeit: 100 min) gereinigt.

Ausbeute: 1.76 mg (1.30 μ mol, 54.5 %),

C₅₃H₉₀N₆O₃₅ (1357.27),

ESI-MS:

M_{ber} = 1356.53,

M_{gef} = 1357.53 (M+H)⁺.

11.9 Versuche zu Kapitel 6

1-N-(Hex-6-ynyl)-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)-benzoesäure **111**

(Hexinylcarbamoyl-Fluorescein)

30.6 mg (63.4 μ mol, 1.0 eq) OSu-Fluorescein **110** und 25.7 mg (190 μ mol, 3.0 eq) Hexinylamin **92** werden in 1.27 mL *N,N*-Dimethylformamid aufgenommen und mit 105 μ L (761 μ mol, 12 eq) Triethylamin versetzt. Nach 22 h (DC: Dichlormethan/Methanol 20:1) wird der Rückstand eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Festphasenextraktion (2x Waters SepPak Classic C18, Elution: 2x 20 %, 3x 30 %, 3x 40 %, 3x 50 %, 60 %, 100 % Acetonitril in Wasser mit 0.1 % Ameisensäure). Das Produkt **111** eluiert bei 40 und 50 % Acetonitril.

Ausbeute: 28.7 mg (63.0 μmol , 99.4 %),

$R_f = 0.33$ (Dichlormethan/Methanol 20:1),

$\text{C}_{27}\text{H}_{21}\text{NO}_6$ (455.46),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 455.14$

$M_{\text{gef}} = 456.35(\text{M}+\text{H})^+$.

*Generelle Vorgehensweise für die Kupfer-katalysierte Cycloaddition mit dem Fluoresceinderivat **111***

0.1 eq Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorphosphat gelöst in Dimethylsulfoxid (332 mM) sowie 0.1 eq TGTA **87** gelöst in Wasser (271 mM) werden zusammengegeben und für 30 min bei Zimmertemperatur geschüttelt. 1 eq β -Glycosylazid wird in Wasser gelöst. Das Fluorophorderivat **111** wird entweder in Methanol, Acetonitril oder Wasser mit 12 eq Diisopropylethylamin aufgenommen und zum Saccharid gegeben. Insgesamt liegt die Endkonzentration des Glycosylazids bei 100 mM. Zum Start der Reaktion wird der Cu(I)-Ligand-Komplex zu der Glycanlösung gegeben.

Alle Gefäße, in denen sich das Fluorescein **111** bzw. dessen Derivate befinden, werden stets mit Aluminiumfolie ummantelt.

*1-{N- β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O-(2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucoopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-O- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(O-2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucoopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-O- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-O-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucoopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucoopyranosyl)-5-(4-1H-1,2,3-triazol-4-yl)}-N-butyl-carbamoyl-2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)-benzoesäure **112***

({1-(β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc)-5-(4-(1H-1,2,3-triazol-4-yl))-N-butylcarbamoyl)-Fluorescein)

Die Synthese erfolgt entsprechend der generellen Vorgehensweise für die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition. 2.10 mg (1.25 μmol , 1 eq) Nonasaccharidazid **23** werden in 7.0 μL Wasser gelöst. Es werden 0.36 μL (0.12 μmol , 0.10 eq) Kupfer(I)-Komplex und 0.54 μL

(0.15 μmol , 0.12 eq) TGTA **87** eingesetzt. 1.0 μg (2.20 μmol , 1.8 eq) Fluoresceinderivat **111** werden in 7.0 μL Acetonitril aufgenommen. Nach 1 d (DC: iso-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) werden 14.0 μL Wasser/Acetonitril (1:1) zugegeben. Die Reinigung durch RP-HPLC (Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8 (150x4.6 mm); Detektion: 214, 254 und 280 nm) erfolgt nach 2 d.

Ausbeute: 0.66 mg (0.31 μmol , 24.9 %),

$R_f = 0.37$ (iso-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1),

$\text{C}_{89}\text{H}_{124}\text{N}_8\text{O}_{51}$ (2121.96),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 2120.74$

$M_{\text{gef}} = 2121.95$ (M+H)⁺.

1-{*N*-(β -D-Galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-[(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-*O*-[(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-[(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-5-(4-*1H*-1,2,3-triazol-4-yl)}-*N*-butyl-carbamoyl-2-(6-hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-benzoesäure **114**

({1-(β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,4]- α -Man-1,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,6]- α -Man-1,6- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc)-5-(4-(1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)))-*N*-butylcarbamoyl)-Fluorescein)

Die Synthese erfolgt entsprechend der generellen Vorgehensweise für die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition. 1.52 mg (1.25 μmol , 1 eq) Tridecamerazid **113** werden in 6.3 μL Wasser gelöst und mit 1.87 μL (7.56 μmol , 12 eq) Diisopropylethylamin versetzt. Es werden 0.18 μL (0.06 μmol , 0.10 eq) Kupfer(I)-Komplex und 0.22 μL (0.06 μmol , 0.10 eq) TGTA **87** eingesetzt. 0.83 μg (1.89 μmol , 3.0 eq) Fluoresceinderivat **111** zur Reaktionslösung gegeben. Nach 1 d (DC: iso-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1) erfolgt die Reinigung mittels Festphasenextraktion (Waters SepPak Classic C18, Elution: 2 x 1 mL 5 %, 2 x 0.75 mL 10 %, 2 x

0.75 mL 12.5 %, 2 x 0.75 mL 15 %, 2 x 1.0 mL 20 % Acetonitril in Wasser). Das Produkt **114** eluiert bei 12.5 % Acetonitril.

Ausbeute: 0.95 mg (0.33 μmol , 52.9 %),

$R_f = 0.37$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1),

$\text{C}_{117}\text{H}_{170}\text{N}_{10}\text{O}_{71}$ (2852.63),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 2851.00$

$M_{\text{gef}} = 2852.35$ (M+H)⁺.

1-{*N*-(β -D-Galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-*O*-{(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-[(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)}-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-5-(4-*1H*-1,2,3-triazol-4-yl)}-*N*-butyl-carbamoyl-2-(6-hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-benzoesäure **116**

({1-(β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,6]- α -Man-1,6- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc)-5-(4-(1*H*-1,2,3-triazol-4-yl))}-*N*-butylcarbamoyl)-Fluorescein)

Es werden 0.182 μL (0.049 μmol , 0.1 eq) einer Cu(I)-Stammlösung mit 0.148 μL (0.049 μmol , 0.1 eq) einer TGTA-Stammlösung **87** versetzt. 1 mg (0.492 μmol , 1 eq) Glycosylazid **115** und 0.673 mg (1.48 μmol , 3 eq) des Fluoresceinalkins **111** werden in 4.92 μL Wasser aufgenommen und mit 1.01 μL (5.91 μmol , 12 eq) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Nach Reaktionsende (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) wird mittels Festphasenextraktion (Waters SepPak Classic C18, Elution: 2 x 0.5 mL 5 %, 2 x 0.75 mL 10 %, 2 x 0.5 mL 12.5 %, 2 x 0.5 mL 15 %, 2 x 0.5 mL 20 %, 1 mL 30 % Acetonitril in Wasser) gereinigt. Das Produkt **116** eluiert bei 12.5 % Acetonitril.

Ausbeute: 1.01 mg (0.406 μmol , 82.5 %),

$R_f = 0.32$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$C_{105}H_{165}N_9O_{74}$ (2487.29),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 2485.87$

$M_{\text{gef}} = 2486.22 (M+H)^+$, $1244.92(M+2H)^{2+}$.

1-{*N*-(β -D-Galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-[(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)]-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-*O*-{(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)}-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-5-(4-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)}-*N*-butyl-carbamoyl-2-(6-hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-benzoesäure **118**

((1-(β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,4]- α -Man-1,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc)-5-(4-(1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)}-*N*-butyl-carbamoyl)-Fluorescein)

Es werden 0.468 μ L (0.127 μ mol, 0.1 eq) einer Cu(I)-Stammlösung mit 0.381 μ L (0.127 μ mol, 0.1 eq) einer TGTA-Stammlösung **87** versetzt. 2.57 mg (1.27 μ mol, 1 eq) Glycosylazid **117** und 1.73 mg (3.80 μ mol, 3 eq) des Fluoresceinalkins **111** werden in 12.7 μ L Wasser aufgenommen und mit 2.60 μ L (15.2 μ mol, 12 eq) *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Nach Reaktionsende (DC: *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) wird mittels Festphasenextraktion (SepPak Classic C18, Elution: 2 x 0.5 mL 5 %, 2 x 0.75 mL 10 %, 2 x 0.5 mL 12.5 %, 2 x 0.5 mL 15 %, 2 x 0.5 mL 20 %, 1 mL 30 % Acetonitril in Wasser) gereinigt. Das Produkt **118** eluiert bei 12.5 % Acetonitril.

Ausbeute: 2.08 mg (0.836 μ mol, 65.8 %),

$R_f = 0.28$ (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$C_{105}H_{165}N_9O_{74}$ (2487.29),

ESI-MS:

$$M_{\text{ber}} = 2485.87$$

$$M_{\text{gef}} = 2486.22 (M+H)^+, 1244.30 (M+2H)^{2+}.$$

11.10 Versuche zu Kapitel 7

Generelle Vorgehensweise für die Glycankupplung an das IL6(43-48)-Hydrazid 124

Das Glycosylazid wird unter Argon-Atmosphäre in absolutem Methanol gelöst und mit Diisopropylethylamin sowie mit 1,3-Propandithiol versetzt. Nach Reaktionsende wird mit 1 mL kaltem Ether bei -18 °C das Glycosylamin ausgefällt. Das Präzipitat wird abzentrifugiert und der Ether abdekantiert. Der Rückstand wird erneut zweimal mit 1 mL kaltem Ether gewaschen, abzentrifugiert und im Hochvakuum getrocknet.

Die für die Kupplung verwendeten Lösungsmittel und *N*-Diisopropylethylamin werden über ausgeglühtem Molekularsieb (nicht gemörst) und unter Argon-Atmosphäre gelagert.

Für die Aktivierung des IL6-Peptids **124** wird es entweder mit PyClock oder HATU/HOAt eingewogen, in Dimethylformamid/Dimethylsulfoxid (v/v 1:1) gelöst und mit *N*-Diisopropylethylamin versetzt. Nach 25 min Schütteln wird die Peptidlösung zum Glycosylamin gegeben. Die Saccharidkonzentration während der Kupplung liegt bei 50 mM. Teilweise werden die Lösungen mit PyClock bzw. HATU nach 12 bis 24 h nachaktiviert. Nach 2 d wird das Glycopeptid in 0.5 mL Trifluoressigsäure/Triethylsilan/Wasser (v/v 96:2:2) aufgenommen und 2 h geschüttelt. Die Lösungen werden im Hochvakuum eingengt und der Rückstand mit 1 mL Diethylether ausgefällt. Das Präzipitat wird abzentrifugiert und der Ether abdekantiert. Der Rückstand wird erneut 2x mit kaltem Ether gewaschen, abzentrifugiert und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird mittels RP-HPLC gereinigt. Die Fraktionen die das Glycopeptid enthalten, werden lyophilisiert.

H-Cys(StBu)-Asn[O-β-D-Galactopyranosyl-(1→4)-O-(2-desoxy-2-acetamido-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-O-α-D-mannopyranosyl-(1→3)-[O-β-D-galactopyranosyl-(1→4)-O-(2-desoxy-2-acetamido-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-O-α-D-mannopyranosyl-(1→6)]-O-(β-D-mannopyranosyl)-(1→4)-O-(2-desoxy-2-acetamido-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-O-(2-desoxy-2-acetamido-β-D-glucopyranosyl)]-Lys-Ser-Asn-Nle-NH-NH₂ 121

(IL6 43-48 (Nona) Hydrazid)

7.75 mg (4.65 μmol , 1.5 eq) Nonasaccharids **23** werden in 233 μL absolutem Methanol (18 mM) gelöst und mit 14.3 μL (84.0 μmol , 20 eq) Diisopropylethylamin sowie 50.6 μL (504.0 μmol , 120 eq) 1,3-Propandithiol versetzt. Nach 3 h wird der das Glycosylamin mit 1 mL Ether gefällt und zweimal mit Ether gewaschen, zentrifugiert und das Präzipitat im Hochvakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird mit einer Lösung aus 4.18 mg (3.07 μmol , 1.0 eq) **124**, 1.84 mg (4.84 μmol , 1.6 eq) HATU, 0.66 mg (4.85 μmol , 1.6 eq) HOAt und 1.10 μL (6.47 μmol , 2.1 eq) Diisopropylethylamin in 61.0 μL Dimethylformamid/Dimethylsulfoxid (1:1) versetzt. Nach 21 h werden nochmal 1.72 mg (4.52 μmol , 1.5 eq) HATU zugegeben. Die Reaktion wird nach insgesamt 3 d mit 0.7 mL Trifluoressigsäure/Triethylsilan/Wasser (v/v 96:2:2) versetzt. Nach 2 h wird im Hochvakuum eingeeengt und mit 1 mL Diethylether (2x) das Glycopeptid **121** ausgefällt. Nach dem Trocknen im Hochvakuum wird der Rückstand in 5 % Acetonitril aufgenommen und mittels RP-HPLC (YMC Hydrosphere C18, 5 μm (10x150 mm), 4 mL/min, 5 \rightarrow 20 % Acetonitril + 0.1 % Ameisensäure in 40 min) gereinigt.

Ausbeute: 2.35 mg (0.98 μmol , 31.9 %),

R_f (Halbaminol) = 0.33 (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$\text{C}_{92}\text{H}_{159}\text{N}_{15}\text{O}_{54}\text{S}_2$ (2403.44),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 2401.96$

$M_{\text{gef}} = 2403.34$ (M+H)⁺, 1202.34 (M+H)²⁺.

H-Cys(*StBu*)-Asn[*O*-(5-Acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 6)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)]-Lys-Ser-Asn-Nle-NH-NH₂ **122**

(IL6 43-48 (2,6-Undeca) Hydrazid)

4.54 mg (2.02 μmol , 1 eq) Undecasaccharid **28** werden in 240 μL absolutem Methanol (9 mM) gelöst und mit 6.86 μL (40.4 μmol , 20 eq) Diisopropylethylamin sowie 24.3 μL (242 μmol , 120 eq) 1,3-Propanedithiol versetzt. Nach 2 h wird die Lösung mit 1 mL Ether gefällt und zweimal mit Ether gewaschen, zentrifugiert und das Präzipitat im Hochvakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird mit einer Lösung aus 2.92 mg (2.14 μmol , 1.1 eq) **124**, 1.76 mg (3.18 μmol , 1.6 eq) PyClock und 0.69 μL (4.04 μmol , 2.0 eq) Diisopropylethylamin in 40.4 μL Dimethylformamid/Dimethylsulfoxid (1:1) versetzt. Nach 2 d wird die Lösung mit 0.8 mL Trifluoressigsäure/Triethylsilan/Wasser (v/v 96:2:2) versetzt. Nach 2 h wird im Hochvakuum eingengt, mit 1 mL Diethylether das Glycopeptid **122** ausgefällt und im Hochvakuum getrocknet. Rückstand wird in 5 % Acetonitril aufgenommen und mittels RP-HPLC (Supelco Ascentis C18, 5 μm (10x250 mm), 4 mL/min, 5 \rightarrow 30 % Acetonitril + 0.1 % Trifluoressigsäure in 55 min) gereinigt. Die Fraktionen werden mit 1 mL 0.1 M Ammoniumbicarbonat-Lösung versetzt und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute: 3.60 mg (1.21 μmol , 59.7 %),

R_f (Halbaminol) = 0.17 (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$\text{C}_{114}\text{H}_{193}\text{N}_{17}\text{O}_{70}\text{S}_2$ (2985.95),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 2984.15$,

$M_{\text{gef}} = 1494.22$ (M+H)²⁺.

H-Cys(*StBu*)-Asn[*O*-(5-Acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 3)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[*O*-(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2 \rightarrow 3)-*O*-(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)]-Lys-Ser-Asn-Nle-NH-NH₂ **123**

(IL6 43-48 (2,3-Undeca) Hydrazid)

1.50 mg (0.62 μmol , 1.0 eq) IL6 43-48 (Nona) **121** und 2.52 mg (3.96 μmol , 6.3 eq) CMP-*N*-Acetylneuraminsäure werden in 99.5 μL Tris-HCl-Puffer (100 mM, pH 8.5, 1 mg/mL BSA) gelöst. Es wird eine Glycopeptidkonzentration von 6 mM eingestellt. Es folgt die Zugabe von 2.0 μL (2 U) alkalischer Phosphatase (aus Kalbsdarm, E.C. 3.1.3.1) und 3.0 μL (30 mU) α -2,3-Sialyltransferase (aus *Pasteurella multocida*, E.C. 2.4.99.4). Nach 1 h wird die Lösung direkt mittels RP-HPLC (YMC Hydrosphere C18, 5 μm (10x150 mm), 4 mL/min, 0→40 % Acetonitril + 0.1 % Ameisensäure in 45 min) gereinigt.

Ausbeute: 1.10 mg (0.37 μmol , 59.0 %),

$\text{C}_{114}\text{H}_{193}\text{N}_{17}\text{O}_{70}\text{S}_2$ (2985.95),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 2984.15$

$M_{\text{gef}} = 1494.19 (\text{M}+\text{H})^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): $\delta = 4.92$ (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1 α^4), 4.84 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.61$ Hz, H-1 β^1), 4.73 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1 α^4), 4.63-4.52 (m, 3H, α -CH Asn-47, H-1 β^3 , α -CH Asn-44), 4.41 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.78$ Hz, H-1 β^2), 4.39-4.33 (m, 4H, H-1 β^5 , H-1 $\beta^{5'}$, H-1 β^6 , H-1 $\beta^{6'}$), 4.23 (t, 1H, $J = 5.49$ Hz, α -CH Ser), 4.13-3.98 (m, 5H, α -CH Cys, α -CH Lys, 2 3 , α -CH Nle, 2 4), 3.94-3.90 (m, 3H, 3 6 , 2 4 , 3 6), 3.81-3.73 (m, 7H, 6a 6 , 6a $^{6'}$, 6 7 , 6 $^{7'}$, 3 2 , 4 6 , 4 $^{6'}$), 3.72-3.64 (m, 14H, 9a 7 , 9a $^{7'}$, 3 4 , 3 1 , 6a $^{4'}$, 3 4 , 3 5 , 3 $^{5'}$, β -CH $_2$ Ser, 6b 6 , 6b $^{6'}$, 6a 4 , 2 1), 3.63-3.48 (m, 24H, 5 7 , 5 $^{7'}$, 6a 2 , 2 2 , 3 3 , 6b 2 , 5 2 , 6a 5 , 6a $^{5'}$, 2 5 , 4 1 , 2 $^{5'}$, 5 1 , 6a 1 , 5 5 , 5 $^{5'}$, 6a,b 3 , 6b 5 , 6b $^{5'}$, 5 3 , 4 3 , 4 7 , 4 $^{7'}$), 3.47-3.26 (m, 20H, 4 5 , 4 $^{5'}$, 6b $^{4'}$, 8 7 , 8 $^{7'}$, 6b 1 , 6b 4 , 5 4 , 5 4 , 9b 7 , 9b $^{7'}$, 5 6 , 4 2 , 2 6 , 2 $^{6'}$, 5 $^{6'}$, 7 7 , 7 $^{7'}$, 4 $^{4'}$, 4 4), 3.11-3.00 (m, 2H, β -CH $_2$ Cys), 2.80 (t, 2H, $J = 7.32$, ϵ -CH $_2$ Lys), 2.74-2.53 (m, 6H, β -CH $_2$ Asn-47, β -CH $_2$ Asn-44, 3eq 7 , 3eq $^{7'}$), 1.90-1.81 (m, 18, NAc), 1.73-1.45 (m, 8H, β -CH $_2$ Lys, β -CH $_2$ Nle, 3ax 7 , 3ax $^{7'}$, δ -CH $_2$ Lys), 1.33-1.22 (m, 2H, γ -CH $_2$ Lys), 1.18-1.06 (m, 13H, γ -CH $_2$ Nle, δ -CH $_2$ Nle, CH $_3$ *t*Bu), 0.68 (t, 3H, $J = 6.56$, ϵ -CH $_3$ Nle).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O mit [D6]-DMSO als interner Standard, Verschiebungen wurden aus einem HSQC-Spektrum ermittelt): $\delta = 104.1$ (C-1 6), 104.1 (C-1 $^{6'}$), 102.8 (C-1 2), 101.8 (C-1 3), 101.1 (C-1 4), 101.0 (C-1 5), 101.0 (C-1 $^{5'}$), 98.6 (C-1 $^{4'}$), 80.6 (C-5 2), 80.2 (C-8 7), 80.2 (C-8 $^{7'}$), 79.8 (C-1 1), 79.7 (C-5 5), 79.7 (C-5 $^{5'}$), 77.9 (C-2 4), 77.7 (C-2 $^{4'}$), 77.5 (C-7 7), 77.5 (C-7 $^{7'}$), 77.0 (C-3 6), 77.0 (C-3 $^{6'}$), 76.7 (C-5 3), 76.3 (C-5 $^{6'}$), 75.9 (C-5 $^{6'}$), 75.0 (C-5 1), 74.4 (C-5 $^{4'}$), 74.4 (C-5 4), 74.1 (C-3 3), 73.6 (C-4 7), 73.6 (C-4 $^{7'}$), 73.5 (C-4 1), 73.2 (C-3 $^{4'}$), 73.2 (C-3 4), 71.6 (C-2 3), 70.9 (C-3 1), 70.9 (C-3 $^{5'}$), 70.9 (C-3 $^{5'}$), 70.8 (C-2 6), 70.8 (C-2 $^{6'}$), 69.9 (C-4 3), 69.8 (C-

4⁵), 69.8 (C-4⁵), 69.5 (C-3²), 69.0 (C-6⁷), 69.0 (C-6^{7'}), 68.7 (C-4⁴), 68.7 (C-4^{4'}), 64.0 (C-6⁴), 64.0 (C-6^{4'}), 63.2 (C-6⁷), 63.2 (C-6^{7'}), 62.5 (C_β Ser) 62.5 (C-6³), 62.5 (C-6⁵), 62.5 (C-6^{5'}), 61.4 (C-6⁶), 61.4 (C-6^{6'}), 61.3 (C-6³), 61.3 (C-6¹), 57.3 (C_α Ser), 56.3 (C-2²), 56.3 (C-2⁵), 56.3 (C-2^{5'}), 55.5 (C_α Lys), 55.0 (C-5⁷), 55.0 (C-5^{7'}), 54.4 (C_α Nle), 54.1 (C_α Cys), 53.2 (C-2¹), 51.8 (C_α Asn-44), 51.4 (C_α Asn-47), 41.5 (C_β Cys), 41.1 (C-3⁷), 41.1 (C-3^{7'}), 40.6 (C_ε Lys), 37.7 (C_β Asn-47, C_β Asn-44), 32.0 (C_β Nle), 31.9 (C_β Lys), 30.3 (CH₃ *t*Bu), 28.5 (C_γ Nle), 27.8 (C_δ Lys), 23.7 (C_γ Lys), 23.7 (NAc), 23.0 (C_δ Nle), 14.6 (C_ε Nle).

H-Cys(StBu)-Asn[O-(α-D-Mannopyranosyl)-(1→6)-O-(β-D-mannopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-O-2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl]-Lys-Ser-Asn-Nle-NH-NH₂ **119**

(IL6 43-48 (Pauci) Hydrazid)

6.88 mg (8.89 μmol, 1 eq) Tetrasaccharid **34** werden in 680 μL absolutem Methanol (18 mM) gelöst und mit 20.9 μL (123 μmol, 14 eq) Diisopropylethylamin sowie 74.1 μL (738 μmol, 83 eq) 1,3-Propandithiol versetzt. Nach 2.5 h wird der Rückstand eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wird mit 1 mL Ether gefällt und zweimal mit Ether gewaschen, zentrifugiert und das Präzipitat im Hochvakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird mit einer Lösung aus 18.5 mg (13.6 μmol, 2.0 eq) **124**, 11.1 mg (20.0 μmol, 2.25 eq) PyClock und 4.50 μL (26.7 μmol, 3.0 eq) Diisopropylethylamin in 178 μL Dimethylformamid/Dimethylsulfoxid (1:1) versetzt. Nach 4 d wird die Reaktion mit 0.5 mL Trifluoressigsäure/Triethylsilan/Wasser (v/v 96:2:2) versetzt. Nach 2 h wird die Reaktionslösung eingeeengt, im Hochvakuum getrocknet und mit 1 mL Diethylether das Glycopeptid **119** ausgefällt und zweimal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wird in 5 % Acetonitril aufgenommen und mittels RP-HPLC (Supelco Ascentis C18, 5 μm (10x250 mm), 4 mL/min, 5→30 % Acetonitril + 0.1 % Trifluoressigsäure in 55 min) gereinigt.

Ausbeute: 4.47 mg (2.89 μmol, 32.4 %),

R_f (Halbaminol) = 0.35 (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

C₅₈H₁₀₃N₁₃O₂₉S₂ (1510.64)

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1509.64$,

$M_{\text{gef}} = 1510.92 (M+H)^+$, $755.48 (M+2H)^{2+}$.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): $\delta = 4.84$ (d, 1H, $J_{1,2} = 9.22$ Hz, H-1 β^1), 4.72 (d, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, H-1 α^4), 4.63-4.54 (m, 3H, $\alpha\text{-CH Asn-47}$, H-1 β^3 , $\alpha\text{-CH Asn-44}$), 4.41 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.89$ Hz, H-1 β^2), 4.22 (t, 1H, $J = 5.81$ Hz, $\alpha\text{-CH Ser}$), 4.12-4.06 (m, 3H, $\alpha\text{-CH Cys}$, $\alpha\text{-CH Lys}$, $\alpha\text{-CH Nle}$), 3.88 (dd, 1H, $J_{1,2} = 3.02$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, 2 3), 3.76 (dd, 1H, $J_{1,2} = 3.33$ Hz, $J_{2,3} = 1.58$ Hz, 2 4), 3.72-3.64 (m, 7H, 3 4 , 6a 1 , 6a 2 , 6a 3 , $\beta\text{-CH}_2$ Ser, 2 1), 3.63-3.50 (m, 8H, 6b 3 , 6b 1 , 2 2 , 3 2 , 6a 4 , 3 1 , 6b 2 , 5 2), 3.48-3.39 (m, 8H, 5 4 , 5 1 , 6b 4 , 4 4 , 5 3 , 3 3 , 4 2 , 4 3), 3.36-3.32 (m, 1H, 4 1), 3.11-3.00 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$ Cys), 2.80 (t, 2H, $J = 6.92$, $\epsilon\text{-CH}_2$ Lys), 2.76-2.53 (m, 4H, $\beta\text{-CH}_2$ Asn-47, $\beta\text{-CH}_2$ Asn-44), 1.88 (s, 3H, NAc), 1.82 (s, 3H, NAc), 1.74-1.47 (m, 6H, $\beta\text{-CH}_2$ Lys, $\beta\text{-CH}_2$ Nle, $\delta\text{-CH}_2$ Lys), 1.33-1.21 (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$ Lys), 1.18-1.06 (m, 13H, $\gamma\text{-CH}_2$ Nle, $\delta\text{-CH}_2$ Nle, CH_3 *t*Bu), 0.69 (t, 3H, $J = 6.56$, $\epsilon\text{-CH}_3$ Nle).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O mit [D6]-DMSO als interner Standard): $\delta = 176.4$, 176.0, 175.6, 174.1, 173.9, 173.5, 173.1, 169.5 (C=O), 103.0 (C-1 2), 102.2 (C-1 3), 101.3 (C-1 4), 81.3 (C-5 2), 80.3 (C-5 1), 79.9 (C-1 1), 77.9 (C-4 1), 76.0 (C-4 2), 76.0 (C-5 3), 74.3 (C-5 4), 74.3 (C-3 3), 74.3 (C-3 1), 73.6 (C-3 2), 72.1 (C-2 3), 72.0 (C-3 4), 71.5 (C-2 4), 68.5 (C-4 3), 68.5 (C-4 4), 67.9 (C-6 3), 62.6 (C-6 2), 62.5 (C $_{\beta}$ Ser), 61.7 (C-6 1), 61.4 (C-6 4), 57.6 (C $_{\alpha}$ Ser), 56.5 (C-2 2), 55.9 (C $_{\alpha}$ Lys), 55.4 (C-2 1), 54.4 (C $_{\alpha}$ Nle), 54.1 (C $_{\alpha}$ Cys), 52.0 (C $_{\alpha}$ Asn-44), 51.5 (C $_{\alpha}$ Asn-47), 50.4 (C $_{\text{q}}$ *t*Bu), 41.7 (C $_{\beta}$ Cys), 40.8 (C $_{\epsilon}$ Lys), 38.2, 37.7 (C $_{\beta}$ Asn-47, C $_{\beta}$ Asn-44), 32.1 (C $_{\beta}$ Nle), 31.9 (C $_{\beta}$ Lys), 30.6 (CH_3 *t*Bu), 28.8 (C $_{\gamma}$ Nle), 28.1 (C $_{\delta}$ Lys), 23.9 (C $_{\gamma}$ Lys), 23.9, 23.7 (NAc), 23.2 (C $_{\delta}$ Nle), 14.9 (C $_{\epsilon}$ Nle).

*H-Cys(StBu)-Asn[O-(α -D-Mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-O-{\[(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-O-[α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-O-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]}-O-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl]-Lys-Ser-Asn-Nle-NH-NH $_2$ **120***

(IL6 43-48 (Man5) Hydrazid)

2.09 mg (1.66 μmol , 1 eq) Heptasaccharid **35** werden in 184 μL absolutem Methanol (9 mM) gelöst und mit 8.47 μL (49.8 μmol , 30 eq) Diisopropylethylamin sowie 30.0 μL (299 μmol ,

180 eq) 1,3-Propanedithiol versetzt. Nach 2.5 h wird der Rückstand eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wird mit 1 mL Ether gefällt und zweimal mit Ether gewaschen, zentrifugiert und das Präzipitat im Hochvakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird mit einer Lösung aus 4.13 mg (3.03 μmol , 1.8 eq) **124**, 1.51 mg (3.97 μmol , 2.4 eq) HATU, 0.51 mg (3.74 μmol , 2.3 eq) HOAt und 0.85 μL (4.98 μmol , 3.0 eq) Diisopropylethylamin in 33.2 μL Dimethylformamid/Dimethylsulfoxid (1:1) versetzt. Nach 20.5 h werden abermals 0.77 mg (5.66 μmol , 3.4 eq) HATU zugegeben. Die Reaktion wird nach insgesamt 2 d mit 0.5 mL Trifluoressigsäure/Triethylsilan/Wasser 96:2:2 versetzt. Nach 2 h wird die Reaktionslösung im Hochvakuum eingengt und mit 1 mL Diethylether das Glycopeptid **120** ausgefällt und einmmal mit Ether gewaschen. Der Rückstand wird in 5 % Acetonitril aufgenommen und mittels RP-HPLC (Supelco Ascentis C18, 5 μm (10x250 mm), 4 mL/min, 5 \rightarrow 25 % Acetonitril + 0.1 % Trifluoressigsäure in 55 min) gereinigt.

Ausbeute: 2.19 mg (1.10 μmol , 66.3 %),

R_f (Halbaminol) = 0.23 (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$\text{C}_{76}\text{H}_{133}\text{N}_{13}\text{O}_{44}\text{S}_2$ (1997.06),

ESI-MS:

$M_{\text{ber}} = 1995.80$

$M_{\text{gef}} = 1998.99 (\text{M}+\text{H})^+$, $999.44 (\text{M}+2\text{H})^{2+}$.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): $\delta =$ 4.91-4.88 (m, 2H, H-1 $^{5'}$, H-1 4), 4.84 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.78$ Hz, H-1 β^1), 4.73-4.58 (m, 4H, H-1 $^{5''}$, H-1 4 , α -CH Asn-47, H-1 3), 4.56-4.53 (t, 1H, $J = 6.71$ Hz, α -CH Asn-44), 4.40 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.16$ Hz, H-1 β^2), 4.24 (t, 1H, $J = 5.94$ Hz, α -CH Ser), 4.13-4.01 (m, 4H, α -CH Cys, H-2 3 , α -CH Lys, α -CH Nle), 3.96 (dd, 1H, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, 2 4), 3.89-3.86 (m, 2H, 2 $^{5'}$, 2 4), 3.83-3.78 (m, 2H, 2 $^{5''}$, 6a 3), 3.76-3.63 (m, 15H, 6a 4 , 6a 2 , 3 4 , 6a 1 , 3 $^{5'}$, 3 4 , 3 $^{5''}$, 3 2 , 6a $^{5''}$, 6a $^{5'}$, 6a 4 , β -CH $_2$ Ser, 3 1 , 2 1), 3.63-3.51 (m, 14H, 4 4 , 2 2 , 6b 4 , 3 3 , 4 1 , 4 $^{5'}$, 4 4 , 5 2 , 6b 2 , 6b 1 , 6b $^{5'}$, 6b $^{5''}$, 6b 4 , 4 2), 3.51-3.33 (m, 9H, 6b 3 , 4 3 , 5 $^{5'}$, 5 4 , 5 4 , 5 1 , 4 $^{5''}$, 5 3 , 5 $^{5''}$), 3.08-2.98 (m, 2H, β -CH $_2$ Cys), 2.81 (t, 2H, $J = 6.29$, ϵ -CH $_2$ Lys), 2.76-2.54 (m, 4H, β -CH $_2$ Asn-47, β -CH $_2$ Asn-44), 1.87 (s, 3H, NAc), 1.83 (s, 3H, NAc), 1.75-1.46 (m, 6H, β -CH $_2$ Lys, β -CH $_2$ Nle, δ -CH $_2$ Lys), 1.34-1.23 (m, 2H, γ -CH $_2$ Lys), 1.18-1.07 (m, 13H, γ -CH $_2$ Nle, δ -CH $_2$ Nle, CH $_3$ *t*Bu), 0.69 (t, 3H, $J = 6.56$, ϵ -CH $_3$ Nle).

^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O , Verschiebungen wurden aus einem HSQC-Spektrum ermittelt): δ = 104.4 (C-1⁴), 104.2 (C-1⁵), 103.1 (C-1²), 102.2 (C-1³), 101.8 (C-1⁴), 101.1 (C-1⁵), 82.4 (C-5²), 80.4 (C-3⁴), 80.2 (C-5¹), 80.0 (C-1¹), 77.9 (C-5⁵), 76.4 (C-5³), 76.2 (C-5¹), 75.2 (C-4⁴), 75.0 (C-3¹), 74.6 (C-5⁵), 74.6 (C-5⁴), 74.5 (C-4⁵), 74.5 (C-4⁴), 73.8 (C-4¹), 72.5 (C-3⁵), 72.3 (C-3⁵), 72.2 (C-3⁴), 72.0 (C-2³), 72.0 (C-2⁵), 71.8 (C-2⁴), 71.7 (C-2⁵), 71.3 (C-2⁴), 68.6 (C-4⁵), 68.5 (C-4⁴), 67.4 (C-3²), 67.2 (C-3³), 66.8 (C-6³), 63.0 (C-6⁴), 63.0 (C-6²), 62.7 (C-6¹), 62.7 (C-6⁵), 62.7 (C $_{\beta}$ Ser), 61.6 (C-6⁵), 61.6 (C-6⁴), 57.6 (C $_{\alpha}$ Ser), 56.6 (C-2²), 56.0 (C $_{\alpha}$ Lys), 55.5 (C-2¹), 54.7 (C $_{\alpha}$ Nle), 54.6 (C $_{\alpha}$ Cys), 52.1 (C $_{\alpha}$ Asn-44), 51.7 (C $_{\alpha}$ Asn-47), 40.8 (C $_{\epsilon}$ Lys), 37.9, 37.7 (C $_{\beta}$ Asn-47, C $_{\beta}$ Asn-44), 32.1 (C $_{\beta}$ Nle), 32.0 (C $_{\beta}$ Lys), 30.7 (CH₃ *t*Bu), 28.8 (C $_{\gamma}$ Nle), 28.2 (C $_{\delta}$ Lys), 24.0 (C $_{\gamma}$ Lys), 23.9, 23.8 (NAc), 23.3 (C $_{\delta}$ Nle), 14.9 (C $_{\epsilon}$ Nle).

11.11 Versuche zu Kapitel 8

1-{*O*- β -D-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-(*O*-2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-2-desoxy-2-acetamido- β -D-glucopyranosyl}-2,2',2'',2'''-(4-carboxy-1,2-phenylen)bis(azanetriyl)tetraessigsäure

128

({1-(β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,3-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2- α -Man-1,6]- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc)}-carboxyphenylendiaminessigsäure)

12.5 mg (7.5 μmol , 1 eq) Nonasaccharidazid **23** werden unter Argon-Atmosphäre in 450 μL absolutem Methanol gelöst und mit 13.0 μL (75.0 μmol , 10 eq) Diisopropylethylamin sowie 45.0 μL (450 μmol , 60 eq) 1,3-Propanedithiol versetzt. Nach 2 h wird eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wird der Rückstand in 0.8 mL abs. Methanol gelöst und mit 8.0 mL kaltem Diethylether ausgefällt. Die Reaktion wird für 40 min bei -18 °C gekühlt und anschließend für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird mit einer Lösung aus 8.1 mg (16.3 μmol , 2.2 eq) **126**, 9.1 mg (17.6 μmol , 2.4 eq) PyBOP und 2.9 μL (17.3 μmol , 2.3 eq) Diisopropylethylamin in 375 μL Dimethylfor-

mamid versetzt. Nach vollständigem Umsatz (16 h, *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) wird das Produkt durch 8.0 mL Diethylether ausgefällt. Der Überstand wird abgenommen und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Das geschützte Konjugat wird ohne weitere Reinigung in 500 µL Methanol sowie 100 µL 1 M Natriumhydroxidlösung aufgenommen. Nach 2 h wird der Rückstand eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird durch RP-HPLC (Supelco Ascentis C18, 5 µm (10x250 mm), 4 mL/min, 0 - 50 % Wasser/Acetonitril + 0.1 % Ameisensäure in 55 min) gereinigt.

Ausbeute: 1.4 mg (0.71 µmol, 9.4 %),

R_f (Halbaminal) = 0.33 (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

R_f (geschütztes Konjugat) = 0.66 (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

R_f (**128**) = 0.20 (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$C_{77}H_{119}N_7O_{54}$ (2006.78),

ESI-MS:

geschütztes Konjugat:

$M_{\text{ber}} = 2117.80$,

$M_{\text{gef}} = 2120.51$ (M+H)⁺,

Produkt 128:

$M_{\text{ber}} = 2005.68$,

$M_{\text{gef}} = 2007.01$ (M+H)⁺.

1-{O-(β-D-Galactopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glycopyranosyl)-(1→2)-[(β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glycopyranosyl)-(1→4)]-O-(α-D-mannopyranosyl)-(1→3)-O-{(β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glycopyranosyl)-(1→2)-O-[(β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glycopyranosyl)-(1→6)]-O-(α-D-mannopyranosyl)-(1→6)}-O-(β-D-mannopyranosyl)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glycopyranosyl)-(1→4)-O-2-acetamido-2-desoxy-β-D-glycopyranosyl}-2,2',2'',2'''-(4-carboxy-1,2-phenylen)bis(azanetriyl)tetraessigsäure 129

({1-(β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,4]- α -Man-1,3- β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,2-[β -Gal-1,4- β -GlcNAc-1,6]- α -Man-1,6- β -Man-1,4- β -GlcNAc-1,4- β -GlcNAc)}-carboxyphenylendiaminensäure)

8.0 mg (3.34 μ mol, 1 eq) Tridecasaccharid **113** werden unter Argon-Atmosphäre in 520 μ L absolutem Methanol gelöst und mit 17.0 μ L (100 μ mol, 30 eq) Diisopropylethylamin sowie 60.3 μ L (601 μ mol, 180 eq) 1,3-Propanedithiol versetzt. Nach 5.5 h wird das Rohprodukt mit 10.0 mL kaltem Diethylether ausgefällt. Die Reaktion wird für 10 min bei -18 °C gekühlt und für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand wird abgenommen und der Rückstand erneut in 1.0 mL Methanol aufgenommen und mit 10.0 mL Diethylether gefällt. Nach Kühlen bei -18 °C und Zentrifugieren für 5 min bei 4000 rpm wird der Überstand abgenommen und der Rückstand erst an Luft (30 min) und dann im Hochvakuum getrocknet.

Das Rohprodukt wird mit einer Lösung aus 4.95 mg (9.97 μ mol, 3 eq) **126**, 5.3 mg (10.2 μ mol, 3 eq) PyBOP und 5.2 μ L (3.08 μ mol, 4.6 eq) Diisopropylethylamin in 66.8 μ L Dimethylformamid versetzt. Nach 2.5 h wird erneut 5.3 mg (10.2 μ mol, 3 eq) PyBOP und 2.6 μ L (1.54 μ mol, 2.3 eq) Diisopropylethylamin zugegeben. Nach vollständigem Umsatz (2 d, *iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1) wird das Produkt durch 10.0 mL Diethylether ausgefällt. Der Überstand wird abgenommen und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet.

Das geschützte Konjugat wird ohne weitere Reinigung in 500 μ L Methanol sowie 100 μ L 1 M Natriumhydroxidlösung aufgenommen. Nach 1 h wird die Lösung mit 1 M Salzsäurelösung neutralisiert, der Rückstand eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird mittels RP-HPLC (Supelco Ascentis C18, 5 μ m (10x250 mm), 4 mL/min, 2.5 - 20 % water/acetonitrile + 0.1 % Trifluoressigsäure in 55 min) gereinigt.

Ausbeute: 2.98 mg (1.09 μ mol, 32.6 %),

R_f (Halbaminal) = 0.37 (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 1.5:1),

R_f (geschütztes Konjugat) = 0.65 (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

R_f (**129**) = 0.24 (*iso*-Propanol/1 M Ammoniumacetat 2:1),

$C_{105}H_{165}N_9O_{74}$ (2737.45),

ESI-MS:

geschütztes Konjugat:

$M_{\text{ber}} = 2848.07$,

$$M_{\text{gef}} = 2849.52 (M+H)^+, 1425.70 (M+2H)^{2+}$$

Produkt 129:

$$M_{\text{ber}} = 2735.94,$$

$$M_{\text{gef}} = 1369.80 (M+2H)^{2+}.$$

12 Literatur

- [1] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683–720.
- [2] R. Apweiler, H. Hermjakob, N. Sharon, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 4–8.
- [3] J. Balzarini, *Nat. Rev. Micro.* **2007**, *5*, 583–597.
- [4] F. Schwarz, M. Aebi, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, *21*, 576–582.
- [5] J. Lechner, F. Wieland, *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, *58*, 173–194.
- [6] A. Dell, A. Galadari, F. Sastre, P. Hitchen, *J. Med. Microbiol.* **2010**, *2010*.
- [7] A. Helenius, M. Aebi, *Ann. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 1019–1049.
- [8] A. Helenius, M. Aebi, *Science* **2001**, *291*, 2364–2369.
- [9] T. Chojnacki, G. Dallner, *Biochem. J.* **1988**, *251*, 1–9.
- [10] A. Seko, K. Yamashita, *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes* **2014**, (Hrsg.: N. Taniguchi, K. Honke, M. Fukuda, H. Narimatsu, Y. Yamaguchi, T. Angata).
- [11] P. Burda, M. Aebi, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1426*, 239–257.
- [12] R. D. Marshall, *Biochem. Soc. Symp.* **1974**, 17–26.
- [13] Y. Gavel, G. Heijne, *Protein Eng.* **1990**, *114*, 433–442.
- [14] M. M. Chen, K. J. Glover, B. Imperiali, *Biochemistry* **2007**, *46*, 5579–5585.
- [15] J. F. Valliere-Douglass, C. M. Eakin, A. Wallace, R. R. Ketchem, W. Wang, M. J. Treuheit, A. Balland, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 16012–16022.
- [16] J. F. Valliere-Douglass, P. Kodama, M. Mujacic, L. J. Brady, W. Wang, A. Wallace, B. Yan, P. Reddy, M. J. Treuheit, A. Balland, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 32493–32506.
- [17] D. F. Zielinska, F. Gnad, J. R. Wisniewski, M. Mann, *Cell* **2010**, *141*, 897–907.
- [18] Y. Gavel, G. v. Heijne, *Protein Eng.* **1990**, *3*, 433–442.
- [19] I. Nilsson, G. von Heijne, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 17338–17343.
- [20] B. Imperiali, S. E. O’Connor, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 643–649.
- [21] H. H. Freeze, J. D. Esko, A. J. Parodi, *Essentials of Glycobiology* **2009**, (Hrsg.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler).

- [22] D. B. Williams, *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 615–623.
- [23] S. Dejgaard, J. Nicolay, M. Taheri, D. Y. Thomas, J. J. M. Bergeron, *Curr. Issues Mol. Biol.* **2004**, *6*, 29–42.
- [24] R. Spiro, English, *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 1025–1041.
- [25] M. A. Lehrman, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2006**, *41*, 51–75.
- [26] J. Iijima, Y. Zhao, T. Isaji, A. Kameyama, S. Nakaya, X. Wang, H. Ihara, X. Cheng, T. Nakagawa, E. Miyoshi, A. Kondo, H. Narimatsu, N. Taniguchi, J. Gu, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 13038–13046.
- [27] P. Stanley, H. Schachter, N. Taniguchi, *Essentials of Glycobiology* **2009**, (Hrsg.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler).
- [28] P. Stanley, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*.
- [29] K. Marino, J. Bones, J. J. Kattla, P. M. Rudd, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 713–723.
- [30] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130.
- [31] P. Gagneux, A. Varki, *Glycobiology* **1999**, *9*, 747–755.
- [32] J. D. Marth, P. K. Grewal, *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 874–887.
- [33] D. Russell, N. J. Oldham, B. G. Davis, *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 1508–1514.
- [34] J. N. Arnold, M. R. Wormald, R. B. Sim, P. M. Rudd, R. A. Dwek, *Annu. Rev. Immunol.* **2007**, *25*, 21–50.
- [35] K. S. Lau, E. A. Partridge, A. Grigorian, C. I. Silvescu, V. N. Reinhold, M. Demetriou, J. W. Dennis, *Cell* **2007**, *129*, 123–134.
- [36] J. Gu, N. Taniguchi, *Cell Adh. Mig.* **2008**, *2*, 243–245.
- [37] O. Vagin, E. Tokhtaeva, I. Yakubov, E. Shevchenko, G. Sachs, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 2192–2202.
- [38] P. Gagneux, A. Varki, *Glycobiology* **1999**, *9*, 747–755.
- [39] Y. Zhao, Y. Sato, T. Isaji, T. Fukuda, A. Matsumoto, E. Miyoshi, J. Gu, N. Taniguchi, *FEBS J.* **2008**, *275*, 1939–1948.
- [40] D. Chui, G. Sellakumar, R. S. Green, M. Sutton-Smith, T. McQuistan, K. W. Marek, H. R. Morris, A. Dell, J. D. Marth, *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 1142–11470.

- [41] B. Wu, Z. Hua, J. D. Warren, K. Ranganathan, Q. Wan, G. Chen, Z. Tan, J. Chen, A. Endo, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 5577–5579.
- [42] T. W. Rising, T. D. Claridge, N. Davies, D. P. Gamblin, J. W. Moir, A. J. Fairbanks, *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 1574–1596.
- [43] Y. Wang, X. Ye, L. Zhang, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2189–2200.
- [44] Z.-W. Guo, Y. Nakahara, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4799–4802.
- [45] G. M. Watt, G.-J. Boons, *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 181–193.
- [46] B. Sun, B. Srinivasan, X. Huang, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7072–7081.
- [47] M. A. Walczak, J. Hayashida, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4700–4703.
- [48] B. Aussedat, Y. Vohra, P. K. Park, A. Fernández-Tejada, S. M. Alam, S. M. Dennison, F. H. Jaeger, K. Anasti, S. Stewart, J. H. Blinn, H.-X. Liao, J. G. Sodroski, B. F. Haynes, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 13113–13120.
- [49] P. Nagorny, B. Fasching, X. Li, G. Chen, B. Aussedat, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5792–5799.
- [50] V. Y. Dudkin, J. S. Miller, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1791–1793.
- [51] M. A. Walczak, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 16430–16433.
- [52] S. Eller, R. Schuberth, G. Gundel, J. Seifert, C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4173–4175.
- [53] C. Unverzagt, S. Eller, S. Mezzato, R. Schuberth, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1304–1311.
- [54] C. Unverzagt, *Habilitationsschrift* **1996**, Technische Universität München.
- [55] C. Unverzagt, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 1369–1376.
- [56] D. Ott, J. Seifert, I. Prah, M. Niemietz, J. Hoffman, J. Guder, M. Mönnich, C. Unverzagt, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 5054–5068.
- [57] X. Schrott, C. Unverzagt, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 691–694.
- [58] C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1989–1992.
- [59] S. Eller, *Dissertation* **2010**, Universität Bayreuth.
- [60] A. V. Demchenko, *Synlett* **2003**, *9*, 1225–1240.

- [61] M. Niemietz, *Dissertation* **2013**, Universität Bayreuth.
- [62] D. Ott, *Dissertation in Vorbereitung*, Universität Bayreuth.
- [63] C. Unverzagt, H. Kunz, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9308–9309.
- [64] I. Prahl, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4434–4437.
- [65] L. Perkams, *Dissertation in Vorbereitung*, Universität Bayreuth.
- [66] L. M. Likhoshesterov, O. S. Novikova, V. A. Derevitskaja, N. K. Kochetkov, *Carbohydr. Res.* **1986**, *146*, C1–C5.
- [67] M. Niemietz, L. Perkams, J. Hoffman, S. Eller, C. Unverzagt, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10485–10487.
- [68] R. Schuberth, C. Unverzagt, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 4201–4204.
- [69] N. S. Fedarko, *Cell. Mol. Life Sci.* **1993**, *49*, 369–383.
- [70] M. F. Verostek, C. Lubowski, R. B. Trimble, *Anal. Biochem.* **2000**, *278*, 111–122.
- [71] A. L. Tarentino, C. M. Gomez, T. H. Plummer, *Biochemistry* **1985**, *24*, 4665–4671.
- [72] A. Varki, S. Kornfeld, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 2808–2818.
- [73] A. Seko, M. Koketsu, M. Nishizono, Y. Enoki, H. R. Ibrahim, L. R. Juneja, M. Kim, T. Yamamoto, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1335*, 23–32.
- [74] W. Sumiyoshi, S. Nakakita, N. Miyanishi, J. Hirabayashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2009**, *73*, 543–551.
- [75] B. Sun, W. Bao, X. Tian, M. Li, H. Liu, J. Dong, W. Huang, *Carbohydr. Res.* **2014**, *396*, 62–69.
- [76] V. Ullmann, M. Rädisch, I. Boos, J. Freund, C. Pöhner, S. Schwarzingler, C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11566–11570.
- [77] H. Bayley, D. N. Standring, J. R. Knowles, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 3633–3634.
- [78] T. Tanaka, H. Nagai, M. Noguchi, A. Kobayashi, S. Shoda, *Chem. Commun.* **2009**, *40*, 3378–3379.
- [79] N. Vinson, Y. Gou, C. R. Becer, D. M. Haddleton, M. T. Gibson, *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 107–113.
- [80] T. Conroy, K. A. Jolliffe, R. J. Payne, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 3723–3733.

- [81] R. Chen, T. J. Tolbert, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3211–3216.
- [82] S. Nakamura Tsuruta, N. Uchiyama, J. Hirabayashi, *Glycobiology*, *Methods in Enzymology* **2006**, *415*, (Hrsg.: M. Fukuda), 311–325.
- [83] M. T. Goodarzi, A. Fotinopoulou, G. A. Turner, English, *The Protein Protocols Handbook* **2002**, (Hrsg.: J. M. Walker), 795–802.
- [84] B. Mulloy, G. W. Hart, P. Stanley, *Essentials of Glycobiology* **2009**, (Hrsg.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler).
- [85] C. T. Weller, *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* **1999**, (Hrsg.: J. C. Lindon), 172–180.
- [86] W. A. Bubb, *Concept. Magnetic Res.* **2003**, *19A*, 1–19.
- [87] M. D. Battistel, H. F. Azurmendi, B. Yu, D. I. Freedberg, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2014**, *79*, 48–68.
- [88] P. Soderman, P.-E. Jansson, G. Widmalm, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, 639–648.
- [89] M. Lundborg, G. Widmalm, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 1514–1517.
- [90] F. A. L. Anet, A. J. R. Bourn, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 5250–5251.
- [91] B. Coxon, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2009**, *62*, (Hrsg.: D. Horton), 17–82.
- [92] A. Perlin, B. Casu, *Tetrahedron Lett.* **1969**, *10*, 2921–2924.
- [93] K. Bock, C. Pedersen, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1974**, 293–297.
- [94] K. Bock, I. Lundt, C. Pedersen, *Tetrahedron Lett.* **1973**, *14*, 1037–1040.
- [95] A. Poveda, J. Jimenez-Barbero, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 133–144.
- [96] Y. Takeda, I. Matsuo, *Lectins: Methods and Protocols* **2014**, *1200*, (Hrsg.: J. Hirabayashi), 207–214.
- [97] G. Safina, *Anal. Chim. Acta* **2012**, *712*, 9–29.
- [98] T. Zheng, D. Peelen, L. M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9982–9983.
- [99] T. Feizi, F. Fazio, W. Chai, W. CH., *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 637–645.
- [100] I. Shin, S. Park, M. Lee, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 2894–2901.

- [101] C. D. Rillahan, J. C. Paulson, *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 797–823.
- [102] D. Wang, S. Liu, B. J. Trummer, C. Deng, A. Wang, *Nature Biotechnol.* **2002**, *20*, 275–281.
- [103] D. M. Ratner, E. W. Adams, J. Su, B. R. O’Keefe, M. Mrksich, P. H. Seeberger, *Chem-BioChem* **2004**, *5*, 379–383.
- [104] B. S. Bochner, R. A. Alvarez, P. Mehta, N. V. Bovin, O. Blixt, J. R. White, R. L. Schnaar, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 4307–4312.
- [105] L. G. Harris, W. C. E. Schofield, K. J. Doores, B. G. Davis, J. P. S. Badyal, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7755–7761.
- [106] O. Blixt, S. Head, T. Mondala, C. Scanlan, M. E. Huflejt, R. Alvarez, M. C. Bryan, F. Fazio, D. Calarese, J. Stevens, N. Razi, D. J. Stevens, J. J. Skehel, I. van Die, D. R. Burton, I. A. Wilson, R. Cummings, N. Bovin, C.-H. Wong, J. C. Paulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 17033–17038.
- [107] J. Heimburg-Molinaro, X. Song, D. F. Smith, R. D. Cummings, *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2001**.
- [108] Y. Liu, T. Feizi, M. A. Campanero-Rhodes, R. A. Childs, Y. Zhang, B. Mulloy, P. G. Evans, H. M. Osborn, D. Otto, P. R. Chrocker, W. Chai, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 847–859.
- [109] S. Park, M.-R. Lee, I. Shin, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 155–162.
- [110] C.-Y. Wu, C.-H. Wong, English, *Glycoscience: Biology and Medicine* **2014**, (Hrsg.: N. Taniguchi, T. Endo, G. W. Hart, P. H. Seeberger, C.-H. Wong), 35–43.
- [111] I. Boos, *Masterarbeit* **2011**, Universität Bayreuth.
- [112] R. Schauer, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem* **1982**, *40*, (Hrsg.: R. S. Tipson, D. Horton), 131–234.
- [113] E. Clo, O. Blixt, K. J. Jensen, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 540–554.
- [114] K. Balk, *Bachelorarbeit* **2012**, Universität Bayreuth.
- [115] D. Lim, M. A. Brimble, R. Kowalczyk, A. J. A. Watson, A. J. Fairbanks, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *126*, 12101–12105.
- [116] K. Balk, *Masterarbeit* **2014**, Universität Bayreuth.

- [117] L. Neubauer, *Bachelorarbeit* **2012**, Universität Bayreuth.
- [118] J. Winkler, *Schriftliche Hausarbeit* **2013**, Universität Bayreuth.
- [119] T. B. Parsons, M. K. Patel, A. B. Boraston, D. J. Vocadloc, A. J. Fairbanks, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1861–1869.
- [120] M. Rädisch, *Dissertation in Vorbereitung*, Universität Bayreuth.
- [121] R. B. Parekh, R. A. Dwek, T. W. Rademacher, G. Opdenakker, J. van Damme, *FEBS* **1992**, *203*, 135–141.
- [122] S. Berger, *Masterarbeit* **2012**, Universität Bayreuth.
- [123] A. Winkler, *Bachelorarbeit* **2013**, Universität Bayreuth.
- [124] U. E. M. Ohlin, R. Johnsson, *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 1358–1370.
- [125] M. Adinolfi, G. Barone, L. Guariniello, A. Iadonisi, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8439–8441.
- [126] K. Ito, N. Takahashi, A. Takahashi, I. Shimada, Y. Arata, J. S. O’Brien, Y. Kishimoto, *Eur. J. Biochem* **1993**, *215*, 171–179.
- [127] X. Schrott, *Dissertation* **2005**, Universität Bayreuth.
- [128] O. Kania, S. C. Crawley, M. M. Palcica, O. Hindsgaul, *Carbohydr. Res.* **1993**, *243*, 139–164.
- [129] M. Mönnich, *Dissertation in Vorbereitung*, Universität Bayreuth.
- [130] M. Murakami, R. Okamoto, M. Izumi, Y. Kajihara, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3567–3572.
- [131] R. Huisgen, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 403–419.
- [132] P.-C. Lin, S.-H. Ueng, S.-C. Yu, M.-D. Jan, A. Adak, C.-C. Yu, C.-C. Lin, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2131–2134.
- [133] X. Wang, L. Liu, Y. Luo, H. Zhao, *Langmuir* **2009**, *25*, 744–750.
- [134] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [135] J. E. Hein, V. V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1302–1315.
- [136] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal., *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.

- [137] H. Lin, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13998–14003.
- [138] H. J. H. Fenton, *J. Chem. Soc. Proc.* **1894**, *10*, 157–158.
- [139] D. C. Kennedy, C. S. McKay, M. C. B. Legault, D. C. Danielson, J. A. Blake, A. F. Pegoraro, A. Stolow, Z. Mester, J. P. Pezacki, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17993–18001.
- [140] H. Eguchi, Y. Ikeda, S. Koyota, K. Honke, K. Suzuki, J. M. C. Gutteridge, N. Taniguchi, *J. Biochem.* **2002**, *131*, 477–484.
- [141] C. Gaulier, A. Hospital, B. Legeret, A. F. Delmas, V. Aucagne, F. Cisnetti, A. Gautier, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4005–4007.
- [142] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853–2855.
- [143] D. S. D. Amo, W. Wang, H. Jiang, C. Besanceney, A. C. Yan, M. Levy, Y. Liu, F. L. Marlow, P. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16893–16899.
- [144] J. Broggi, N. Joubert, V. Aucagne, T. Zevaco, S. Berteina-Raboin, S. P. Nolan, L. A. Agrofoglio, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2007**, *26*, 779–783.
- [145] P. S. Donnelly, S. D. Zanatta, S. C. Zammit, J. M. White, S. J. Williams, *Chem. Commun.* **2008**, *21*, 2459–2461.
- [146] G. Zemplén, *Chem. Ber.* **1926**, *59*, 1258–1261.
- [147] A. Dumont, A. Malleron, M. Awwad, B. V. S. Dukan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *124*, 3197–3200.
- [148] C. Unverzagt, H. Kunz, *J. prakt. Chem.* **1992**, *334*, 570–578.
- [149] J. Hoffman, *Dissertation* **2013**, Universität Bayreuth.
- [150] L. Karst, *Bachelorarbeit* **2012**, Universität Bayreuth.
- [151] D. M. Lewallen, D. Siler, S. S. Iyer, *Chembiochem* **2009**, *10*, 1486–1489.
- [152] V. Padler-Karavani, X. Song, H. Yu, N. Hurtado-Ziola, S. Huang, S. Muthana, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 22593–22608.
- [153] M. B. Tessier, O. C. Grant, J. Heimbürg-Molinaro, D. Smith, S. Jadey, A. M. Gulick, J. Glushka, S. L. Deutscher, K. Rittenhouse-Olson, R. J. Woods, *PLoS One* **2013**, *39*, e54874.

- [154] O. Grant, H. M. K. Smith, D. Firsova, E. Fadda, R. J. Woods, *Glycobiology* **2014**, *24*, 17–25.
- [155] P. Sörme, B. Kahl-Knutsson, M. Huflejt, U. J. Nilsson, H. Leffler, *Anal. Biochem.* **2004**, *334*, 36–47.
- [156] H. Zhang, P. Nimmer, S. H. Rosenberg, S. C. Ng, M. Joseph, *Anal. Biochem.* **2002**, *307*, 70–75.
- [157] K. J. Peterson, J. D. Sadowsky, E. A. Scheef, S. Pal, K. D. Kourentzi, R. C. Willson, E. H. Bresnick, N. Sheibani, S. H. Gellman, *Anal. Biochem.* **2008**, *378*, 8–14.
- [158] Y. Shang, Y. Zeng, *18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences October 2014*, San Antonio, Texas, USA.
- [159] G. Simone, *J. Glycomics Lipidomics* **2014**, *4*.
- [160] A. Reif, S. Siebenhaar, A. Tröster, M. Schmälzlein, C. Lechner, P. Velisetty, K. Gottwald, C. Pöhner, I. Boos, V. Schubert, S. Rose-John, C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12125–12131.
- [161] A. Reif, *Dissertation in Vorbereitung*, Universität Bayreuth.
- [162] S. T. Anisfeld, P. T. Lansbury, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5560–5561.
- [163] S. T. Cohen-Anisfeld, P. T. Lansbury, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10531–10537.
- [164] V. Biedermann, *Dissertation* **2012**, Universität Bayreuth.
- [165] M. Schmälzlein, *Dissertation* **2013**, Universität Bayreuth.
- [166] H. Yu, H. Chokhawala, R. Karpel, H. Yu, B. Wu, J. Zhang, Y. Zhang, Q. Jia, X. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17618–17619.
- [167] C. D. Barry, A. C. T. North, J. A. Glasel, R. J. P. Williams, A. V. Xavier, *Nature* **1971**, *232*, 236–245.
- [168] P. H. Keizers, J. F. Desreux, M. Overhand, M. Ubbink, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9292–9293.
- [169] S. Yamamoto, T. Yamaguchi, M. Erdélyi, C. Griesinger, K. Kato, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9280–9282.
- [170] S. Yamamoto, Y. Zhang, T. Yamaguchi, T. Kameda, K. Kato, *Chem. Commun* **2012**, *48*, 4752–4754.

- [171] S. Re, N. Miyashita, Y. Yamaguchi, Y. Sugita, *Biophys. J.* **2011**, *101*, L44–46.
- [172] W. Nishima, N. Miyashita, Y. Yamaguchi, Y. Sugita, S. Re, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 8504–8512.
- [173] A. Canales, J. P.-C. A. Mallagaray, I. Boos, C. Unverzagt, F. J. C. S. André, H.-J. Gabius, J. Jiménez-Barbero, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13789–13793.
- [174] L. Karst, *Masterarbeit* **2015**, Universität Bayreuth.
- [175] H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 490–536.
- [176] H. Kessler, P. Schmieder, M. Kurz, *J. Magn. Reson.* **1989**, *85*, 400–405.
- [177] A. Bax, M. F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2093–2094.
- [178] M. F. Moody, P. T. Jones, J. A. Carver, J. Boyd, I. D. Campbell, *J. Mol. Biol.* **1987**, *193*, 759–774.

13 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt **Prof. Dr. Carlo Unverzagt** für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Ermöglichung viele interessante Projekte zu bearbeiten und die vielen hilfreichen Tips.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die nette Aufnahme, ihre Hilfsbereitschaft und die vielen abendlichen Ablenkungen. Das hat sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mathäus Niemiets und *Vera Biedermann* haben mir den Einstieg in die BOC erleichtert und mir sehr viel beigebracht. *Mathäus*, danke für die Unterstützung zu Beginn der Promotion und Beantwortung aller Fragen. Du hast mir den Spaß an der Zuckerchemie vermittelt.

Meinen Laborkollegen *Joanna Siebenhaar*, *Dimitri Ott*, *Janika Walcher*, *Thomas Lubert*, *Lukas Berger* und *Kristin Balk* danke ich für eine tolle Zeit im Zuckerlabor. Die vielen Gespräche sowohl chemischer als auch privater Natur haben mich inspiriert, motiviert und unterstützt.

Mein weiterer Dank gilt *Mathäus Niemiets* und *Dimitri Ott* für die Einführung in die Administration der NMR-Geräte. Für die Unterstützung der Aufrechterhaltung dieser danke ich *Janika Walcher*, *Lukas Perkams* und *Manuel Mönnich*.

Für die Aufnahme vielzähliger ESI-MS und LC-MS-Spektren danke ich *Karen Gottwald*, *Malisa Rädisch*, *Thomas Lubert* und *Christopher Graf*. Ich weiß, dass es eine aufwendige Aufgabe war/ist und bin dankbar für euren Einsatz.

Für die Aufrechterhaltung des ganzen Lehrstuhls sei es durch Bestellungen, Destillation von Lösungsmitteln, Reparaturen der Laborgeräte oder einfach Verbreitung guter Laune möchte ich mich bei *Silvia Krapp* und *Volker Schubert* bedanken. Weiterhin danke ich ihnen für ihre große Hilfe bei der Darstellung der Nonasaccharids.

Marina Schmäzlein und *Christopher Graf* danke ich für die Bereitstellung des Interleukin 6 Fragments. Mein Dank gilt auch dem ganzen Peptidlabor, die mir alle hilfreiche Tips für die Peptidkupplungen gegeben haben.

Zusätzlich danke ich *Traudl Herold* und *Silvia Kastner* für die Erledigungen aller organisatorischen Aufgaben und für den Nachschub an Süßigkeiten.

Unseren Kooperationspartner *Jesus Jimenez Barbero* (Madrid, Spanien), *Hakon Leffler* (Lund, Schweden) und *Nikolai Bovin* (Moskau, Russland) danke ich für die unterschiedlichen Messungen. Durch diese Kooperationen lernte ich neue Anwendungen kennen und konnte dadurch sehr interessante Projekte bearbeiten.

Ich danke *Lukas Karst*, *Thomas Luber*, *Lukas Perkams*, *Janika Walcher* und *Dr. Claudia Pöhner* für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ganz großer Dank gilt meinen Praktikanten, ohne diese ich vieles während meiner Promotion nicht geschafft hätte. Besonders danke ich *Kristin Balk*, *Kerstin Bauernfeind* und *Lisa Neubauer* die mich bei vielen Projekten unterstützt haben und mir eine große Hilfe waren. Meine Bachelorstudenten *Kristin Balk*, *Lisa Neubauer*, *Lukas Karst*, *Jutta Winkler*, *Janina Friedrich*, *Markus Hessefort*, *Anika Winkler* und die beiden *Julias* (*Julia Simon*, *Julia Vogel*) haben viel zu dieser Arbeit beigetragen. *Ina Pöhner*, *Martin Panneck*, *Ralf Ackermann*, *Janika Walcher*, *Theodoros Karagiannis*, *Tobias Rehm*, *Tanja Feller*, *Tobias Jurczyk*, *Markus Petermichl*, *Sebastian Herlitz*, *Jennifer Nack*, *Nina Wolf*, *Heike Panzer*, *Tereza Janickova*, *Tamara Preiß*, *Kevin Ament*, *Sascha Weidler*, *Michael Seiler*, *Florian Reihls* und *Matthias Rothemund* bedanke ich mich für ihr Interesse und ihren Beitrag zu dieser Arbeit.

Abschließend möchte ich mich für die Unterstützung bei meinen Eltern, *Olga* und *Waldemar Boos* sowie bei meiner Schwester *Angelina* mit meinem Neffen *Nikita* bedanken. Ihr habt mir durch anstrengende Zeiten geholfen, mich motiviert und habt euch mit mir über Erfolge gefreut. Nicht zuletzt danke ich *Lukas Karst* für sein sonniges Gemüt, welches mir die Arbeit im Labor um vieles leichter gemacht hat. Danke, dass du mich unterstützt hast, trotz mancher Launen. Ohne deine Hilfe wäre das Schreiben dieser Arbeit deutlich schwieriger geworden.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass keine Tatsachen vorliegen, die mich nach den gesetzlichen Bestimmungen über die Führung akademischer Grade zur Führung eines Doktorgrades unwürdig erscheinen lassen.

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung hinsichtlich der eigenständigen Anfertigung der Dissertation unterzogen werden kann.

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und habe auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden.

Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehmen werde.

Bayreuth, den 19.08.2015

Irene Boos