

**Synthese von *N*-Glycanen des Hybrid-Typs und
Untersuchungen zur Chemie von Glycosyltriazolen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät
für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Xaver Schratt

aus Pfaffenhofen a. d. Ilm

Bayreuth, 2005

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum von Februar 2001 bis April 2005 am Lehrstuhl für Bioorganische Chemie der Universität Bayreuth unter der Leitung von Prof. Dr. Carlo Unverzagt durchgeführt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Annahme der Dissertation: 26.10.2005

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 03.04.2006

Erster Gutachter: Prof. Dr. C. Unverzagt

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. K.-H. Seifert

Vorsitzender: Prof. Dr. G. Platz

Prof. Dr. G. Krauss

Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.

(Albert Einstein)

meiner Familie

Inhalt

Abkürzungen	6
1. Einleitung	9
2. Synthese von <i>N</i>-Glycanen	10
2.1. Glycoproteine	10
2.2. Problemstellung	16
2.3. Synthese eines <i>N</i> -Glycans vom Hybrid-Typ	17
2.3.1. β -Mannosid-Synthesen	17
2.3.2. Oligomannosid-Synthesen	28
3. Synthese von Glycosyltriazenen	35
3.1. Festphasensynthese von Oligosacchariden	35
3.2. Problemstellung	36
3.3. Untersuchungen zur Synthese und Chemie von Glycosyltriazenen	36
4. Kohlenhydrat-PAMAM-Konjugate	51
4.1. Transfektion	51
4.2. Problemstellung	57
4.3. Synthese und Transfektionseffizienz von Kohlenhydrat-SuperFect TM -Konjugaten	57
4.3.1. Synthese der Konjugate	57
4.3.2. Transfektionseffizienz der Pentasaccharid-SuperFect TM -Konjugate	60
5. Methylierung von Diginatin	68
5.1. Herzglycoside	68
5.2. Problemstellung	69
5.3. Regioselektive Methylierung von Diginatin	70
6. Zusammenfassung	72
7. Summary	76
8. Experimenteller Teil	80
8.1. Versuche zu Kapitel 2	83
8.1.1. Versuche zu Kapitel 2.3.1	83
8.1.2. Versuche zu Kapitel 2.3.2	99
8.2. Versuche zu Kapitel 3.3	110
8.3. Versuche zu Kapitel 4.3.1	136
8.4. Versuche zu Kapitel 5.3	139
9. Danksagung	141
10. Literatur	142

Abkürzungen

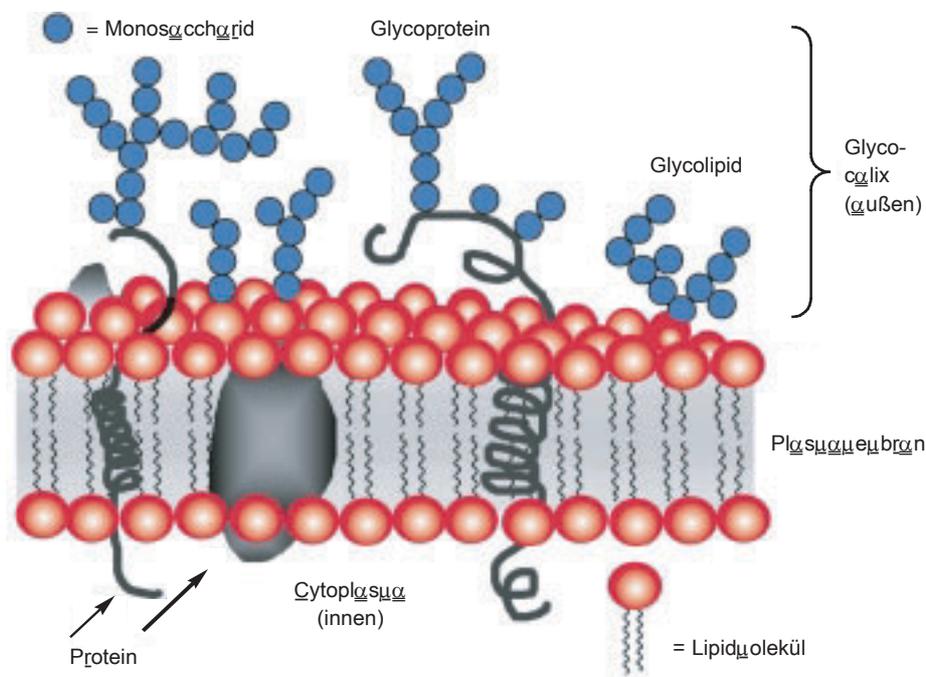
[α]	spezifischer Drehwert
Å	Angström
abs.	absolut
Ac	Acetyl-
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
Ar	Aromat
ASGP(-R)	Asialoglycoprotein (rezeptor)
Asn	Asparagin
Asx	Asparagin oder Aspartat
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ber	berechnet
BSA	Rinderserumsalbumin
Bn	Benzyl-
br	breit
Bu	<i>n</i> -Butyl-
BuOH	<i>n</i> -Butanol
Bz	Benzoyl-
CH	Cyclohexyl
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
ClAc	Chloracetyl-
ClAc ₂ O	Chloressigsäureanhydrid
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
D	Natrium-Licht der Wellenlänge 589 nm
DBU	1,8-Diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie, -chromatogramm
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett vom Dublett
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyan-1,4-benzochinon
DEAE	Diethylaminoethyl-
DIPEA	Ethyl-diisopropylamin
DMAP	4-(<i>N,N</i> -Dimethylamino)-pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dn	Diginatin
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
Dol	Dolichol
DTBMP	2,6-Di- <i>tert</i> -butyl-4-methylpyridin
E.C.	<i>enzyme commission</i>
ER	endoplasmatisches Reticulum
ESI	Electrospray-Ionisation
Et	Ethyl-

Fa.	Firma
FAB	<i>fast atom bombardement</i>
Fuc	L-Fucose
Gal	D-Galactose, D-Galactosyl-
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
GalT	Galactosyltransferase
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
gef.	gefunden
gem	geminal
ges.	gesättigt
GFC	Gelfiltrationschromatographie, -chromatogramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Glc	D-Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GnT	UDP- <i>N</i> -acetylglucosamin:α-D-mannosid β1,2- <i>N</i> -acetylglucosaminyltransferase
gp-120	Glycoprotein 120 (des HIV)
GT	UDP-Glucose:Glycoprotein Glucosyltransferase
h	Stunde(n)
HCB	2-Hydroxycarbonylbenzyl-
HI-Virus	<i>human immunodeficiency virus</i>
HMQC-COSY	<i>heteronuclear multiple quantum coherence correlated spectroscopy</i>
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
<i>J</i>	skalare Kopplung
kb	1000 Basen
LC/MS	<i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>
μw	Mikrowelle
m	<i>medium</i> (IR)
m	Multiplett (NMR)
M	molar
Man	D-Mannose
MCPBA	3-Chlorperbenzoesäure
Me	Methyl-
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
Mp	4-Methoxyphenyl-
Mpm	4-Methoxybenzyl-
m-RNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MS	Massenspektrometrie, -spektrum
MW	Mittelwert
NAc	Acetamido-
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
n.d.	nicht detektiert
NeuAc	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
NIS	<i>N</i> -Iodsuccinimid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i>
NPht	Phthalimido-

OT	Oligosaccharyltransferase
<i>p</i>	para
PAMAM	Polyamidoamin-
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
Pfp	Pentafluorphenyl-
Ph	Phenyl-
Phcm	Phenylcarbamoyl-
PL	Polylysin
PNB	4-Nitrobenzyl-
PNGase	Peptid- <i>N</i> ⁴ -[<i>N</i> -acetyl- β -D-glucosaminy] asparagin amidase
PP-Dol	Dolicholpyrophosphat
Pr	Propyl-
<i>p</i> -Tos	4-Toluolsulfonyl-
q	Quadruplett
quant.	quantitativ
RER	rauhes Endoplasmatisches Reticulum
R _f	Retentionsfaktor
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Zimmertemperatur
s	Standardabweichung (Schemata)
s	<i>strong</i> (IR)
s	Singulett (NMR)
Ser	Serin
SEt	Ethylthio-
SPE	<i>solid phase extraction</i>
t	Triplett
t-Bu	<i>tert</i> -Butyl-
TBA	Tetrabutylammonium-
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TCAI	Trichloracetimido-
Tf	Trifluormethansulfonyl-
Tf ₂ O	Trifluormethansulfonsäureanhydrid
TFA	Trifluoressigsäure/Trifluoracetyl-
THF	Tetrahydrofuran
Thr	Threonin
TIPS	Triisopropylsilyl-
TMS	Trimethylsilyl-
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
TOF	<i>time of flight</i>
UDP	Uridin-5'-diphosphat
vic	vicinal
w	<i>weak</i> (IR)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactosid

1. Einleitung

Kohlenhydrate spielen nicht nur im Energiehaushalt von Lebewesen eine entscheidende Rolle, sondern fungieren auch als Gerüstsubstanzen oder werden zur Codierung von Informationen genutzt.^[1] So nehmen sie als Bestandteil von Nucleinsäuren an der Konservierung und Weitergabe genetischer Informationen teil. In Form von Glycoproteinen sind sie darüber hinaus an Prozessen wie Zellerkennung (beispielsweise Blutgruppensubstanzen oder die Wechselwirkung eines Virus mit einer Wirtszelle), Steuerung der Halbwertszeit von Proteinen im Blut oder Entzündungsvorgängen beteiligt. Die eukaryotische Zelle besitzt hierzu auf ihrer Oberfläche viele Kohlenhydratreste, die sog. Glycocalyx (Schema 1). Auch beim Informationsfluß innerhalb eines Organismus wirken Kohlenhydrate mit, so sind viele Hormone glycosyliert,^[2] wie beispielsweise das Choriongonadotrophin.



Schema 1: Vereinfachte schematische Darstellung der Lipid-Doppelschicht der Zellmembran einer eukaryotischen Zelle.^[1a]

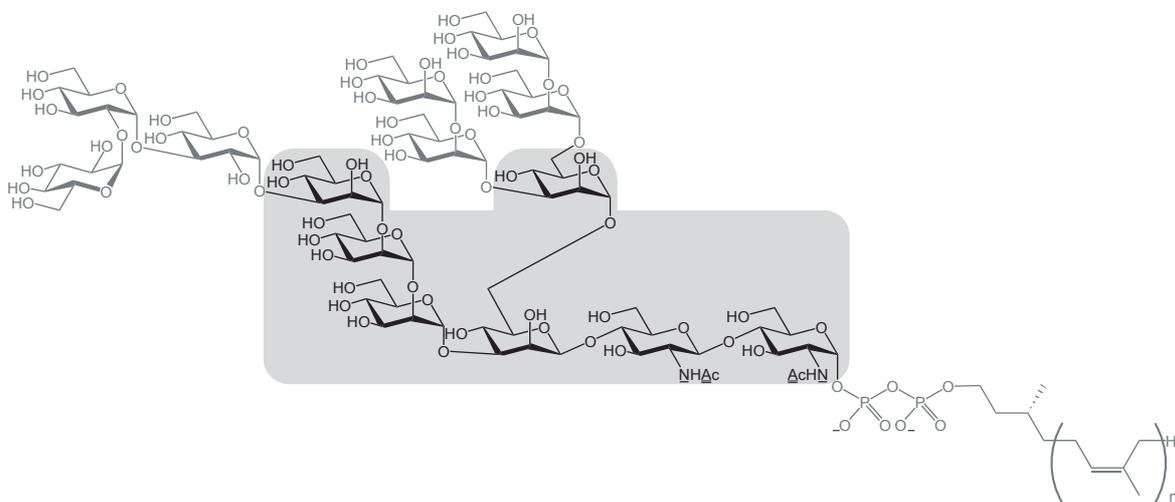
Neben Prozessen innerhalb eines Organismus werden Kohlenhydrate auch für die Abwehr von Fremdorganismen eingesetzt. Als Beispiel seien die 1957 aus *Streptomyces kanamyceticus* isolierten Kanamycine^[3] und die 1963 aus *Micromonospora spec.* gewonnenen Gentamycine^[4] erwähnt. Viele Naturstoffe liegen als Glycoside vor und werden erst durch Enzyme aktiviert, wie beispielsweise die cyanogenen Glycoside der Rosaceen (z. B. Amygdalin). Weitere glycosylierte Naturstoffe stellen die im Fingerhut *Digitalis spec.* enthaltenen Steroidglycoside dar, welche aufgrund ihrer Wirkung auch heute noch als Medikament bei Herzinsuffizienz eingesetzt werden.

2. Synthese von *N*-Glycanen

2.1. Glycoproteine

Die Glycosylierung stellt eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen dar.^[5] Hierbei werden *O*-Glycane, welche über die Seitenkette von Serin, Threonin bzw. Hydroxylysin gebunden sind, sowie *N*-Glycane, die mit dem Stickstoffatom der Seitenkette von Asparagin *N*-glycosidisch verknüpft sind, unterschieden. Durch diese Modifikationen werden sowohl die physikochemischen Eigenschaften von Proteinen wie Löslichkeit, Ladung oder Faltung als auch ihre biologische Aktivität stark beeinflusst.^[6] Störungen der Proteinglycosylierung können somit dramatische Auswirkungen auf den Organismus haben, die sich in unterschiedlichen Krankheitsbildern äußern.^[7]

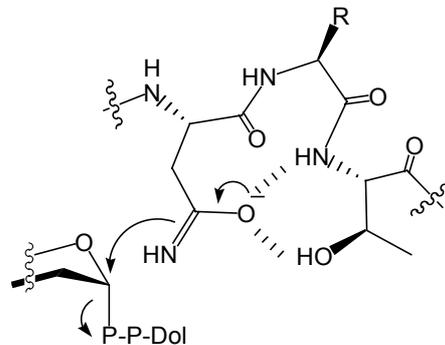
Die Biosynthese von *N*-Glycanen ist in Eukaryoten streng konserviert und beginnt mit der mehrfachen Glycosylierung von Dolicholpyrophosphat auf der cytosolischen Seite des ER.^[8] Nach einem Flip durch die Membran wird das Heptasaccharid an der Innenseite des ER um weitere sieben Kohlenhydrateinheiten verlängert (Schema 2).



Schema 2: Das im ER auf das naszierende Protein übertragene Tetradasaccharid, gebunden an den Lipidanker Dolicholpyrophosphat ($n = 13-20$); markiert ist das Heptasaccharid, welches auf der cytosolischen Seite des ER aufgebaut wird.

Das entstandene Tetradasaccharid wird *en bloc* durch die Oligosaccharyl-Transferase (OT)^[9] cotranslational auf das naszierende Protein übertragen. Hierbei müssen sich ca. 14 Aminosäuren bereits im Lumen des RER befinden, damit das membranassoziierte Enzym eine lokale

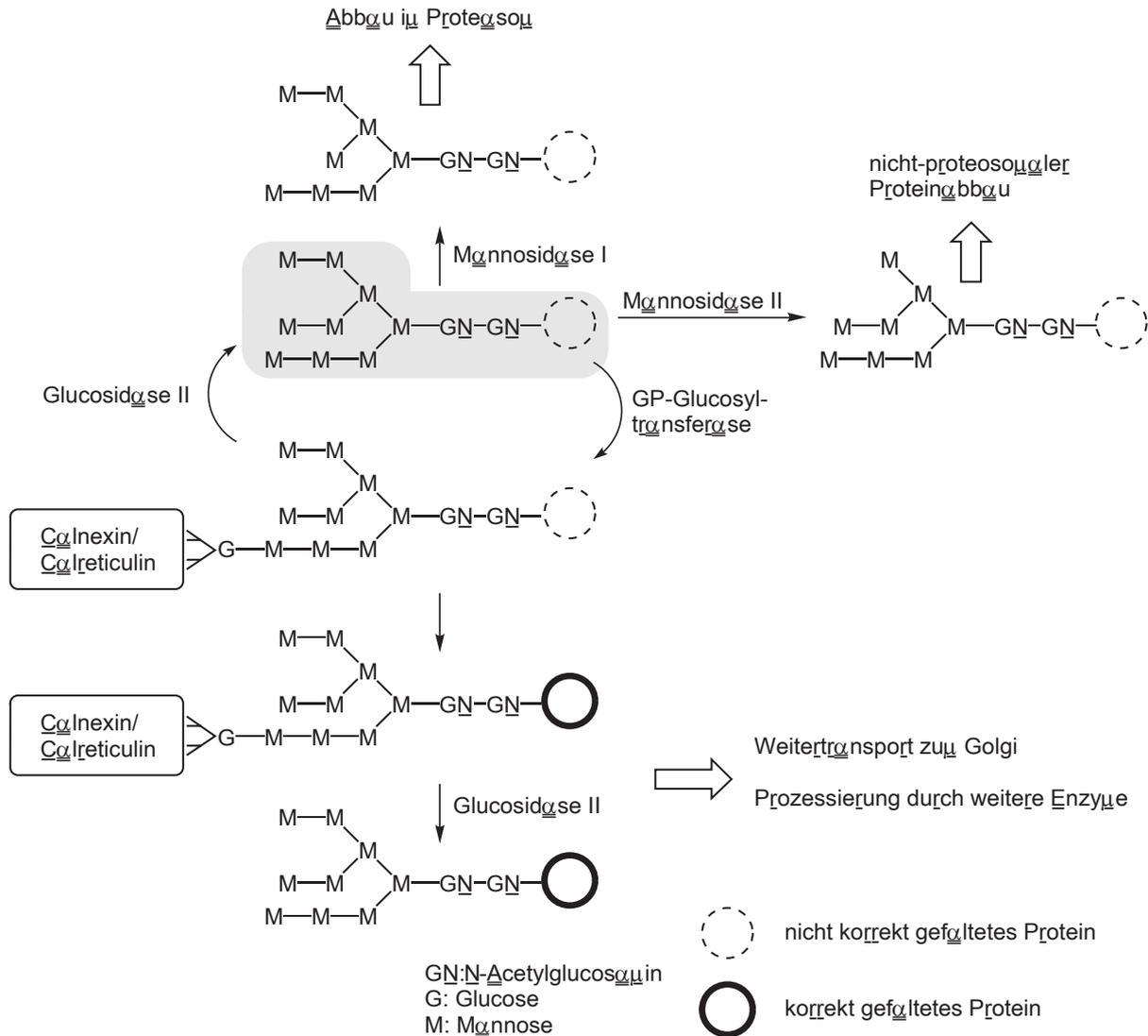
Sekundärstruktur erkennen kann. Diese wird von dem Motiv Asn-Xxx-Ser/Thr gebildet, wobei Xxx jede beliebige Aminosäure mit Ausnahme von Prolin darstellen kann. Durch die Ausbildung eines Asx-Loops (Schema 3) wird die Nucleophilie des Amids vermutlich durch Tautomerisierung soweit erhöht, daß eine Glycosylierung stattfinden kann.^[10]



Schema 3: Aktivierung des Asparagin-Stickstoffatoms durch einen Asx-Loop.^[10]

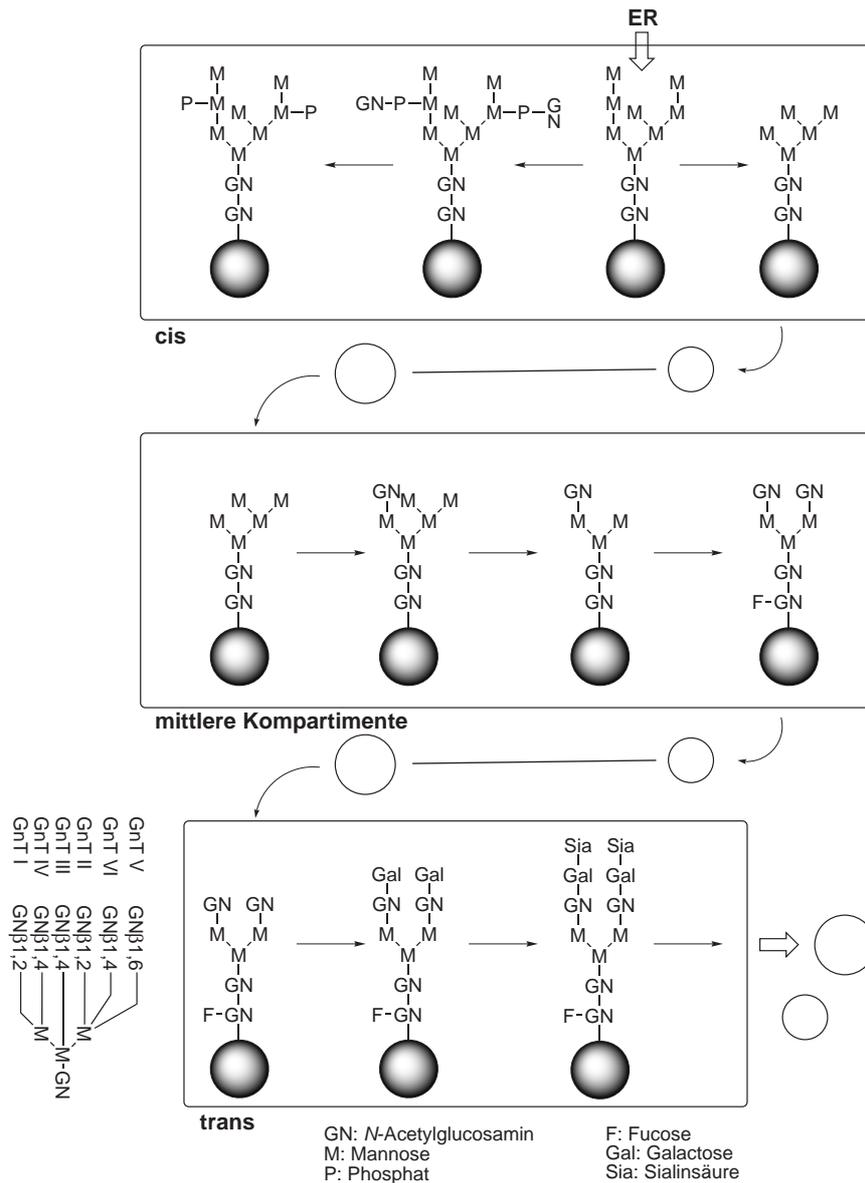
Das entstehende Glycoprotein beginnt im folgenden weitere Sekundär- bzw. Tertiärstrukturelemente auszubilden, wobei neben der durch physikalische Parameter bestimmten spontanen Faltung auch Enzyme beteiligt sind.^[11] Bei diesem Vorgang im ER wird auch der Kohlenhydratanteil weiter prozessiert, wobei er als Marker für die korrekte Faltung dient.^[12] Durch Glucosidase I und II werden sehr schnell die beiden terminalen Glucosesubstituenten abgespalten. Der nun freiliegende Glucoserest wird von Calnexin bzw. Calreticulin erkannt und das nur teilweise oder ungefaltete Protein gebunden. Durch diese Chaperone wird eine Aggregation verhindert und die korrekte Faltung unterstützt. Nach Abspaltung des Glucoseterminus durch Glucosidase II wird das Protein wieder freigesetzt. Falls es noch nicht korrekt gefaltet ist, wird es durch die Glycoprotein-Glucosyltransferase (GT) erkannt und reglucosyliert und dieser Zyklus beginnt wieder von neuem. Fehlfaltete Proteine werden aufgrund ihrer längeren Verweildauer im ER durch Mannosidasen prozessiert, wodurch sie für den Abbau markiert werden (Schema 4).^[13]

Korrekt gefaltete Proteine werden z. T. unter Beteiligung von Lectinen^[12] zum Golgi-Apparat transportiert. Auf diesem Weg und im cis-Golgi-Bereich werden durch Mannosidasen weitere Mannosereste abgespalten.^[14] Für den Transport zu den Lysosomen bestimmte Proteine werden durch Phosphorylierung markiert und im trans-Golgi-Netzwerk durch den Mannosephosphat-Rezeptor erkannt.^[15]



Schema 4: Qualitätskontrolle von Glycoproteinen im ER: Glucosidase II entfernt den Glucoseterminus; durch GT werden nicht korrekt gefaltete Proteine erkannt und reglucosyliert; Calnexin bzw. Calreticulin wirken als Lektine und Chaperone: sie erkennen den terminalen Glucoserest und unterstützen die korrekte Faltung; verweilt ein Glycoprotein zu lange im ER wird durch Mannosidase I der terminale Mannoserest im mittleren Arm abgespalten, wodurch es für den Abbau über das Ubiquitin/Proteasom-System markiert ist.^[13]

Sezernierte Glycoproteine werden weiter durch Glycosyltransferasen bis hin zu komplexen N-Glycanen prozessiert. Hierbei konkurrieren verschiedene N-Acetylglucosaminyltransferasen (GnT) um das gleiche Substrat,^[16] wodurch die Vielfalt von N-Glycanen des komplexen, hybriden oder oligomannosidischen Typs entsteht (Schema 5). Dies ist die Ursache für das Phänomen der Mikroheterogenität,^[17] da im Gegensatz zur einheitlichen Peptidkette eines Proteins häufig an einer Glycosylierungsstelle verschiedene Kohlenhydratsubstituenten gefunden werden. Diese Glycoformen besitzen unterschiedliche biologische Eigenschaften und sind nur sehr schwer voneinander trennbar, was ihre Untersuchung erschwert.



Schema 5: Prozessierung im Golgi-Apparat: durch Mannosidasen werden in den cis- bzw. mittleren Kompartimenten alle Mannosereste bis auf die drei inneren abgespalten und durch konkurrierende Glycosyltransferasen (z. B. N-Acetylglucosaminyltransferasen (GnT)) in den mittleren bzw. trans-Kompartimenten die unterschiedlichen Substituenten der komplexen N-Glycane angefügt.^[14, 16a]

Die Einführung des „bisected“ N-Acetylglucosamin-Restes in Position 4 des zentralen Mannose-Bausteins durch die GnT III stellt für weitere Enzyme ein Stop-Signal dar (GnT II, IV, V, Mannosidase II, Fucosyltransferase). Durch unterschiedliche Konzentrationen der jeweiligen Enzyme wird bestimmt, welche N-Glycane die fertigen Glycoproteine tragen. Im Anschluß werden komplexe N-Glycane in der Regel noch galactosyliert (β-1,4) und mit Sialinsäuren (α-2,3 bzw. α-2,6) versehen. Darüber hinaus sind weitere Modifikationen^[1c] wie

beispielsweise Sulfatierung, *N*-Acetyllactosamin-Repetiereinheiten, Fucosylierung und Galactosylierung bekannt.

Die unterschiedlichen Glycosylierungsmuster von Proteinen werden auch im Zusammenhang mit Krebsentstehung und Malignität von Tumoren diskutiert. So wurde die β -1,6-Verzweigung mit der Mobilität von Krebszellen und damit der Neigung der Tumore zur Metastasenbildung in Verbindung gebracht,^[18] weshalb Swainsonin (ein Alkaloid, welches die Golgi- α -Mannosidase kompetitiv hemmt) in klinischen Untersuchungen bei der Tumorbekämpfung eingesetzt wird.

Der hier vorgestellte Biosyntheseweg komplexer *N*-Glycane wird vor allem in Säugetieren gefunden. Da die *N*-Glycosylierung ein hochkonservativer Vorgang ist, kann über deren Evolution spekuliert werden.^[12] *N*-Glycosylierte Proteine finden sich bereits in der äußersten Schicht der Zellwand von Archäobakterien sowie in der Zellwand bestimmter gram-negativer Bakterien. Bei den Archäobakterien wird ebenfalls ein Oligosaccharid an Dolichylphosphat bzw. -pyrophosphat im Cytoplasma aufgebaut und nach einem Flip durch die Membran auf das Protein übertragen. Im Gegensatz zu den Eukaryoten wird bei Prokaryoten noch eine große Vielfalt an Kohlenhydraten eingesetzt. Bei ersteren wird immer das o. a. Tetradecasaccharid übertragen, nur bei Trypanosomen wird ein $\text{Man}_{6,9}\text{GlcNAc}_2$ -Saccharid verwendet, da die notwendigen weiteren Glucosyltransferasen bei diesen primitiven Organismen noch fehlen. Somit kann man vermuten, daß das auf der cytosolischen ER-Seite synthetisierte Heptasaccharid dem ursprünglich bei dem gemeinsamen Vorfahren der Eukaryoten verwendeten Kohlenhydrat entspricht.

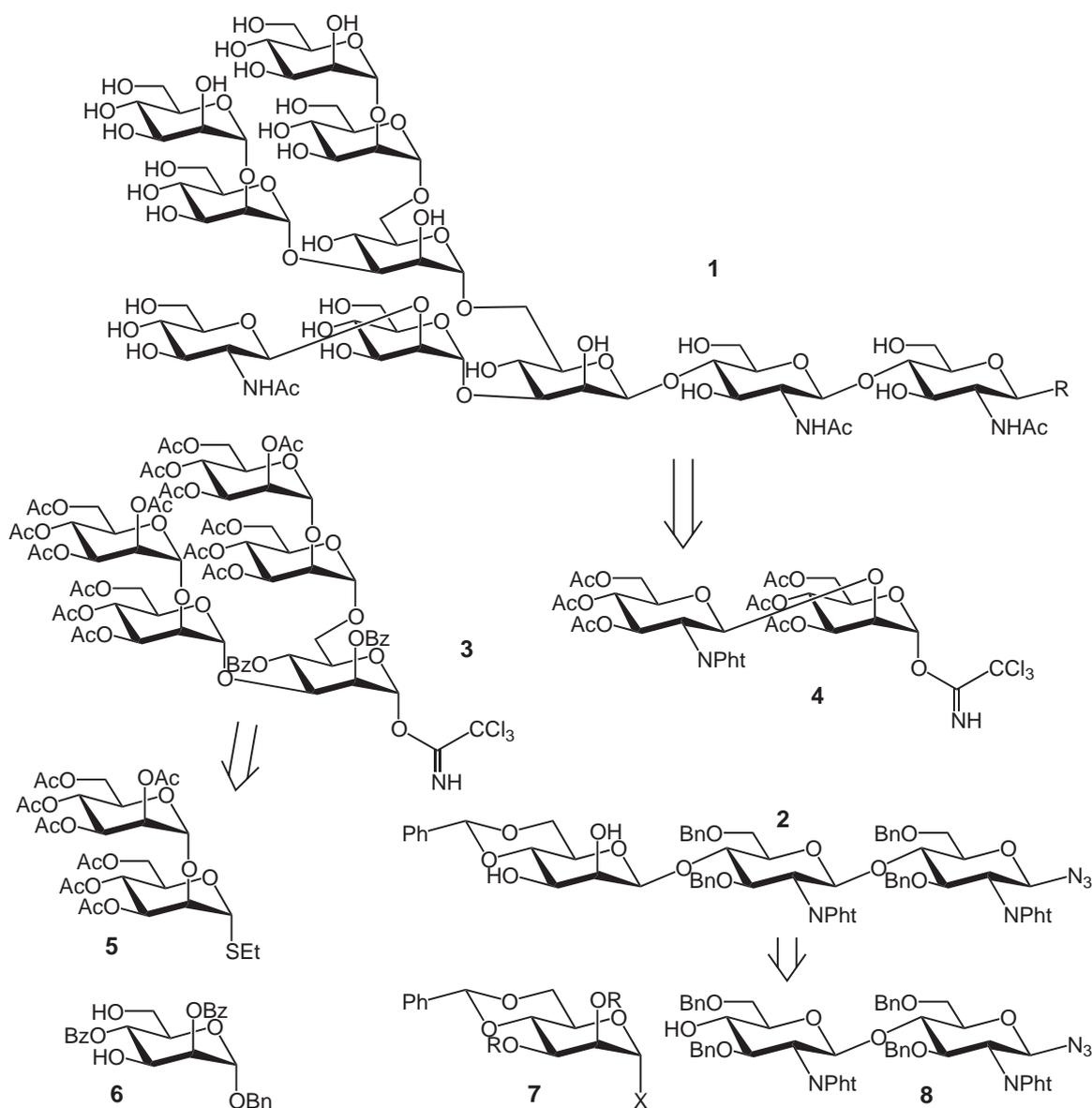
Protozoen^[19] zeigen ein uneinheitliches Bild der Glycosylierung, so wurden beispielsweise auf einem Oberflächenprotein („*variant surface protein*“, VSG) von *Trypanosoma brucei* neben mannosereichen bereits komplexe und polylactosaminreiche *N*-Glycane gefunden. Die MSPs („*merozoit surface protein*“) von *Plasmodium falciparum*, welche eine wesentliche Rolle bei der Invasion in die Erythrocyten spielen, tragen mannosereiche *N*-Glycane, wenn sie in HeLa-Zellen bzw. Insektenzellen exprimiert werden, jedoch wird bei nativen *P. falciparum* kaum eine *N*-Glycosylierung beobachtet. Bei *Toxoplasma* wurden *N*-Glycane auf dem gp23 gefunden, die weder Sialinsäuren noch Fucose enthielten, dafür jedoch GalNAc-Termini trugen. In Hefen wird in der Regel^[20] das in den Golgi-Apparat eintretende ($\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$)-Glycoprotein lediglich durch Mannosyltransferasen verlängert, so daß mannosereiche (sog. hypermannosylierte, bis zu 200 Mannosereste) *N*-Glycane entstehen. Für höhere Organismen scheint die Notwendigkeit aufgetreten zu sein, komplexe Phänomene, wie z. B. Zell-Zell-

Interaktionen zu regulieren, weshalb sich bei diesen weitere Schritte der Prozessierung entwickelt haben. Pflanzen^[21] synthetisieren häufig komplexe *N*-Glycane, die durch einen β -1,2-Xylosubstituenten an der zentralen Mannoseeinheit bzw. einen α -1,3-Fucoserest am reduzierenden *N*-Acetylglucosamin modifiziert sind. Diese Substituenten finden sich nicht im Säugerorganismus, weshalb wahrscheinlich Allergien u. a. auf diese Strukturen zurückzuführen sind.^[22] Im Gegensatz zur Meinung, daß Pflanzen keine besonders komplexen Strukturen aufbauen, konnte das Lewis^a-Motiv (Gal β 1,3[Fuc α 1,4]GlcNAc) auch dort gefunden werden, was ebenfalls im Zusammenhang mit allergischen Reaktionen stehen kann.^[23] Bei Insekten finden sich normalerweise^[24] zu 60-70 % mannosereiche und sog. paucimannosidische *N*-Glycane, bei denen nur noch zwei bzw. drei der innersten Mannosereste vorhanden sind. Als Besonderheit^[21] tritt gelegentlich eine doppelte Core-Fucosylierung auf, nämlich die bei Säugern bekannte α -1,6- und die bei Pflanzen beschriebene α -1,3-Modifikation. Aus der Gruppe der Insekten ist *Drosophila* am besten untersucht und da bei dieser Art keine komplexen *N*-Glycane nachgewiesen wurden, wird vermutet, daß eine Hexosaminidase die für die Fucosylierung notwendigen GlcNAc-Substituenten der Antennen wieder entfernt. Als Ausnahme sei die im Bienengift gefundene Phospholipase A₂ erwähnt, von der vier gefundene Glycoformen am α -1,3-Arm eine Lewis^x-ähnliche Struktur (GalNAc β 1,4[Fuc α 1,3]GlcNAc) tragen, was auch im Zusammenhang mit Allergien diskutiert wird.^[25] Die Kohlenhydratstrukturen von *Caenorhabditis elegans* spiegeln im wesentlichen den bei Insekten gefundenen Sachverhalt wider, auch wenn für diese Aussage die Datengrundlage noch etwas dürftig ist.^[21,23]

Ein großes Problem stellt diese gefundene Diversität dar, wenn Proteine, die als Therapeutikum für Menschen vorgesehen sind, in heterologen Organismen exprimiert werden. Die durch den Erzeugerorganismus angefügten Kohlenhydrate können vom menschlichen Körper als fremd erkannt werden und eine Immunantwort auslösen.^[26] Deshalb wird zunehmend versucht, durch Umgestaltung der Enzymausstattung heterologe Systeme so zu verändern, daß deren Glycoproteine kompatibel zum menschlichen Organismus werden. Beispielsweise konnten mit *Pichia pastoris* durch Inaktivierung des Gens für die α -1,6-Mannosyltransferase, die für die Hypermannosylierung verantwortlich ist, und Einführen von Genen für die GnT I und β -Galactosyltransferase Proteine exprimiert werden, die hybride *N*-Glycane tragen.^[27]

2.2. Problemstellung

Als Zielstruktur wurde das hybride Decasaccharid **1** gewählt, welches am α -1,3-Arm bereits durch *N*-Acetylglucosamin modifiziert ist und am α -1,6-Arm noch das Pentamannosid als größtmöglichen Substituenten trägt. Es sollte sich aus dem bekannten Core-Trisaccharid **2** und den beiden Donoren **3** und **4** aufbauen lassen (Schema 6). Diese Art der retrosynthetischen Zerlegung hat sich bereits bei vielen Synthesen komplexer *N*-Glycane als sehr effizient erwiesen.^[28,29,30,31,32,33,34,35] Bei der Darstellung des Trisaccharids **2** sollte untersucht werden, ob durch eine direkte β -Mannosylierung des Chitobiosylbausteins **8** die bisherige Synthese verbessert werden kann. Für die Gewinnung des Pentamannosid-Bausteins **3** sollte eine möglichst kurze und effektive Synthese eines geeignet geschützten Akzeptors **6** sowie eines Dimannosyl-Donors **5** entwickelt werden.



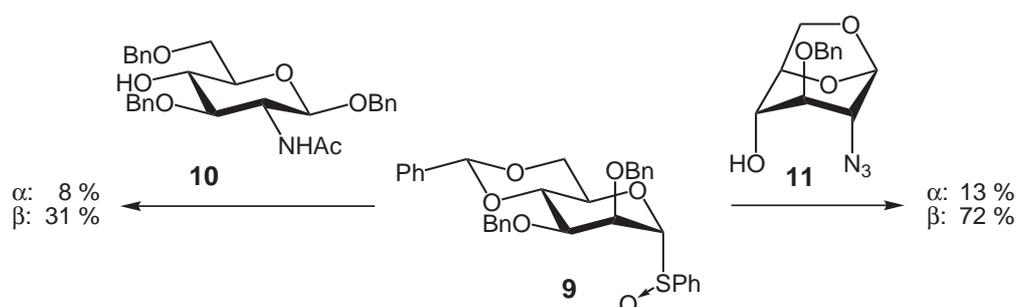
Schema 6: Retrosynthetische Betrachtung des Decasaccharids **1** vom Hybrid-Typ.

2.3. Synthese eines *N*-Glycans vom Hybrid-Typ

2.3.1. β -Mannosid-Synthesen

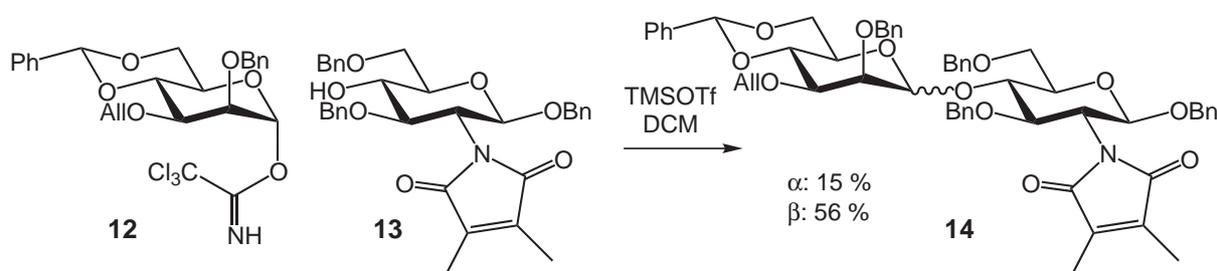
Das Trisaccharid **2** enthält eine β -mannosidische Verknüpfung, die nur schwer zu synthetisieren ist. Zu Beginn dieser Arbeit war es noch nicht gelungen, diese in zufriedenstellenden Ausbeuten direkt aus einem Mannosyldonor und einem dem Chitobiosylakzeptor **8** ähnlichen Baustein darzustellen.^[36] Mannosyldonoren liefern in der Regel aufgrund des anomeren Effektes α -verknüpfte Produkte, was sich nicht durch Zuhilfenahme eines nachbargruppenaktiven Substituenten an C-2 umgehen läßt. Eine weitere Schwierigkeit liegt darin, daß *N*-Acetylglucosamin- und Chitobiosyl-Akzeptoren dafür bekannt sind, daß deren 4-Hydroxylfunktion sehr schlecht zugänglich ist.^[36,37] Dieses Problem umging *H. Paulsen*,^[37,38] indem er den Akzeptor in der ¹C₄-Konfiguration fixierte, wodurch dessen Reaktivität wesentlich erhöht wurde. Zur direkten β -Mannosylierung konnten bisher nur α -Mannosylhalogenide verwendet werden, die mit unlöslichem Silbersilicat aktiviert wurden. Die Ausbeuten lagen hierbei mit einem Chitobiosylazid als Akzeptor^[39] lediglich bei 40 % (neben erheblicher Menge an α -verknüpftem Produkt), bei dem angesprochenen 1,6-Anhydrozucker hingegen bei etwa 65 %.^[37] Nachdem bei dieser Methode wiederum weitere Syntheseschritte bis zu dem gewünschten Trisaccharid notwendig sind, ist diese Methode nur mit Einschränkungen verwendbar. Eine Lösung dieses Problems bestand bisher darin, zuerst eine leicht zu erzwingende β -glucosidische Bindung aufzubauen, die Glucose an C-2 zum Keton zu oxidieren und dieses anschließend wieder zu reduzieren.^[40] Auch die direkte Inversion einer β -Glucose über eine S_N2-Reaktion des 2-Triflats mit Cs⁻^[41] bzw. TBA-Acetat^[42], -Nitrit^[43] oder -Benzoat^[44] wurde beschrieben. Nachdem diese Inversionen in vielen Fällen nicht vollständig ablaufen, können hierbei Gemische aus Mannose- und Glucosederivaten entstehen. *H. Kunz* entwickelte deshalb eine Methode zur intramolekularen Inversion, wodurch bei jedem Schritt eine vollständige Kontrolle der sterischen Verhältnisse gegeben ist.^[45] Durch Vorziehen der verlustreichen Schritte konnte *C. Unverzagt* auf diese Weise das gewünschte Trisaccharid **2** in hoher Ausbeute und unter voller Stereokontrolle synthetisieren.^[46] Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung einer β -mannosidischen Verknüpfung stellt die „*intramolecular aglycon delivery*“ dar:^[47] hierbei wird der Akzeptor über eine Hilfsgruppe an Position 2 der Mannose oberhalb der Ringebene fixiert und im Anschluß der Mannosyldonor aktiviert. *T. Ogawa* und *Y. Ito* optimierten diese Strategie für die Synthese eines Core-Trisaccharides^[48] und konnten mit diesem Schlüsselschritt sowohl die Grundstruktur des LEC14-Saccharids^[49] als auch ein Undecasaccharid vom komplexen Typ synthetisieren.^[50]

D. Crich und *S. Sun* entdeckten, daß durch Aktivierung eines Mannosylsulfoxids ohne nachbargruppenaktive Substituenten, wie z. B. **9**, bei tiefen Temperaturen vor der Zugabe des Akzeptors in hohen Ausbeuten β -Mannoside erhalten werden.^[51] Als reaktive Zwischenstufe konnte das α -Triflat identifiziert werden,^[52] welches durch ein 4,6-Acetal stabilisiert wird. Dieses wird im Zuge einer S_N2 -Reaktion durch Nucleophile zu dem β -Mannosid abgefangen. In weiteren Untersuchungen^[53] konnten sie auch direkt mit Thiomannosiden durch Aktivierung mit Phenylsulfonyltriflat zu vergleichbaren Ergebnissen gelangen. Durch diese sehr leistungsfähige Methode können selbst schlechte Akzeptoren wie tertiäre Alkohole selektiv in hohen Ausbeuten umgesetzt werden.^[54] Bei dem Versuch, diese Methode auf Glucosamin-Bausteine wie **10** zu übertragen, zeigte sich jedoch wiederum die schlechte Reaktivität dieser Bausteine. Lediglich der von *Paulsen* beschriebene 1,6-Anhydrosucker **11** konnte in brauchbaren Ausbeuten zur Reaktion gebracht werden (Schema 7).



Schema 7: Untersuchungen zur direkten β -Mannosylierung von Glucosaminbausteinen.^[54]

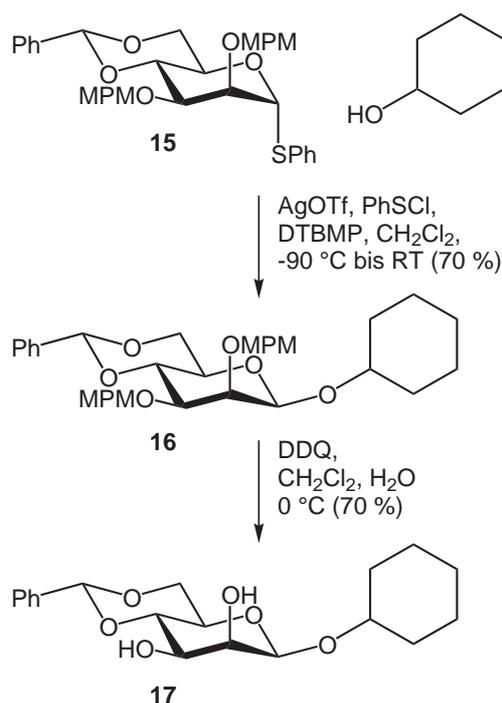
R. Schmidt konnte ähnliche Ergebnisse auch mit Trichloracetimidaten erzielen^[55] und auf diese Weise an dem Glucosaminbaustein **13** in guten Ausbeuten eine β -1,4-mannosidische Bindung aufbauen.



Schema 8: Synthese der β -1,4-mannosidischen Bindung über das Trichloracetimidat **12**.^[55]

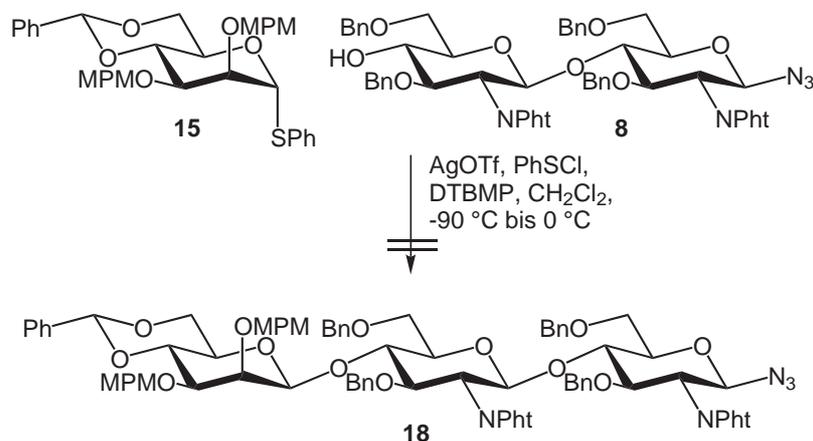
Zur Synthese des Trisaccharids **2** wurde in Vorarbeiten^[56] versucht, verschiedene Donoren an das Disaccharid **8** zu koppeln. Hierfür wurde wie in der Literatur^[53] ein 4,6-Benzylidenacetal-

geschütztes Thiophenylmannosid eingesetzt. Als Schutzgruppen an den Positionen 2 und 3 dürfen nur Substituenten ohne Nachbargruppenaktivität verwendet werden, die ferner orthogonal zu den anderen im Molekül vorhandenen Schutzgruppen entfernbar sein müssen. In Testreaktionen lieferte die 4-methoxybenzilyerte Verbindung **15** die besten Ergebnisse.^[56] Deshalb wurde hiermit zunächst die Reaktion mit Cyclohexanol wiederholt, was ohne Schwierigkeiten gelang. Um zu untersuchen, ob die beiden MPM-Ether entfernt werden können, ohne das Benzylidenacetal anzugreifen, wurde **16** mit DDQ oxidiert (Schema 9).



Schema 9: Synthese des Cyclohexyl- β -mannosids **17**.

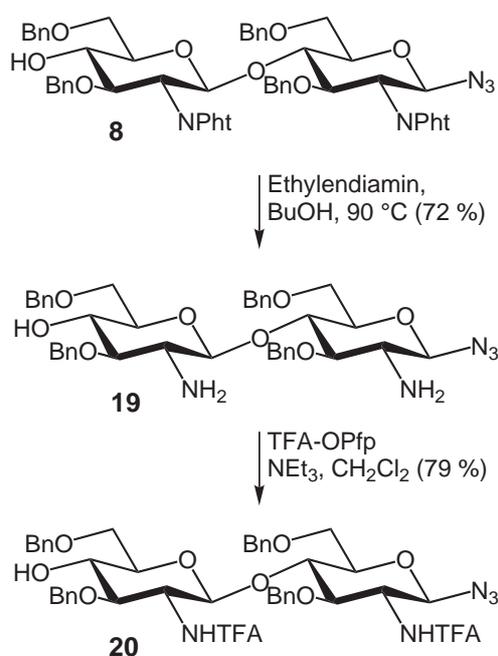
Mit dem bekannten Chitobiosylakzeptor **8** wurden jedoch von *I. Prahl*^[56] auch nach Variation der Reaktionsparameter nur schlecht trennbare Gemische erhalten.



Schema 10: Versuch zur Synthese des Trisaccharids **18**.^[56]

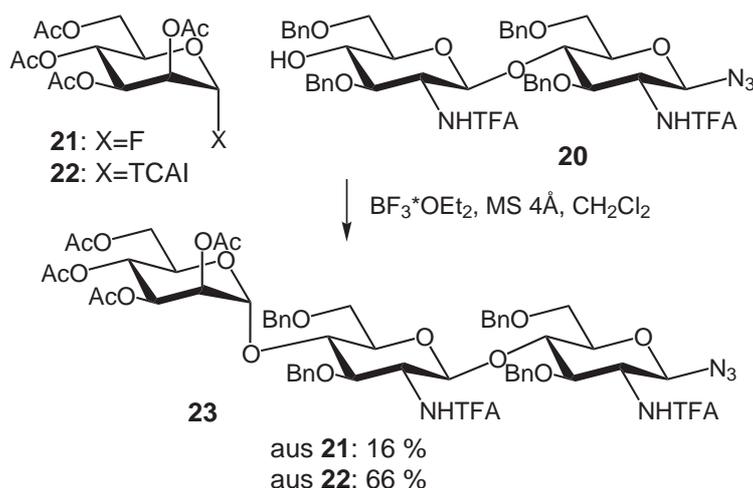
Nach *I. Prahl* könnte durch Verkleinerung der Schutzgruppen am Akzeptor die Zugänglichkeit zur 4-Hydroxylfunktion eventuell soweit verbessert werden, daß die Reaktion in akzeptablen Ausbeuten möglich ist. Nachdem die Benzylether am Ende der Synthese eine Reinigung mittels RP-HPLC ermöglichen,^[166] sollten diese Positionen nicht verändert werden. Die Phthalimidgruppen sind sehr raumerfüllend und deren Ersatz durch beispielsweise Trifluoracetamidsubstituenten^[57] würde die Zugänglichkeit zur Hydroxylfunktion erleichtern, was durch MM2- und PM3-Rechnungen gezeigt wurde.^[56]

Aus diesem Grund wurden zunächst 25 g Chitobiosylazid **8** über 15 Stufen^[46,56] synthetisiert und mit Ethylendiamin in Butanol die Aminogruppen freigesetzt.^[58] Das Diamin **19** wurde auf diese Weise in 72 % Ausbeute erhalten. Dieses wurde mit dem Pentafluorphenylester der Trifluoressigsäure selektiv an den Aminofunktionen geschützt (Schema 11).^[59]



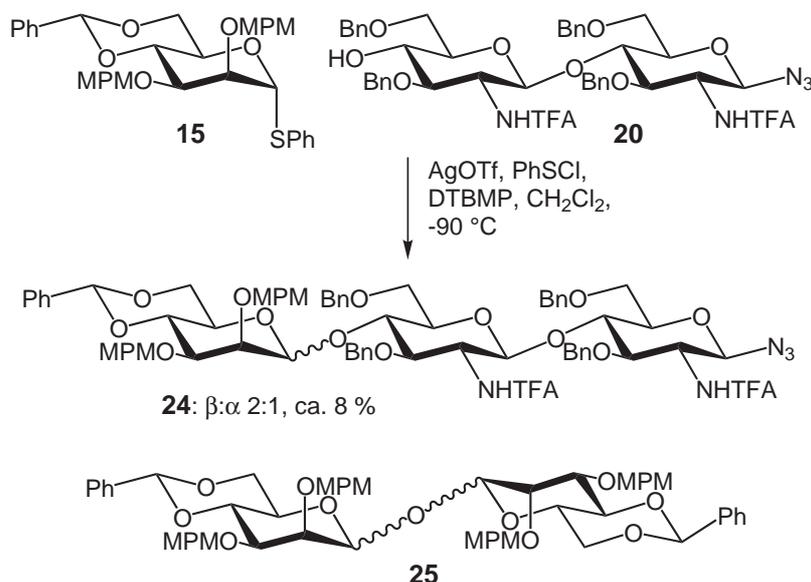
Schema 11: Umwandlung der Phthalimid- zu Trifluoracetamid-Funktionen.

Um die prinzipielle Eignung dieses Akzeptors für Glycosylierungen zu untersuchen, wurde zunächst mit dem Tetraacetylmannosylfluorid **21** und -trichloacetimidat **22** eine α -mannosidische Verknüpfung aufgebaut. Durch das Fluorid **21** konnte das gewünschte Trisaccharid **23** nur verunreinigt in max. 16 % Ausbeute erhalten werden, durch das Trichloracetimidat **22** hingegen mit 66 % (Schema 12). Die geringe Reaktivität des Fluorids **21** zeigte sich ebenfalls bei der Synthese von Mannobiosylbausteinen (Kapitel 2.3.2).



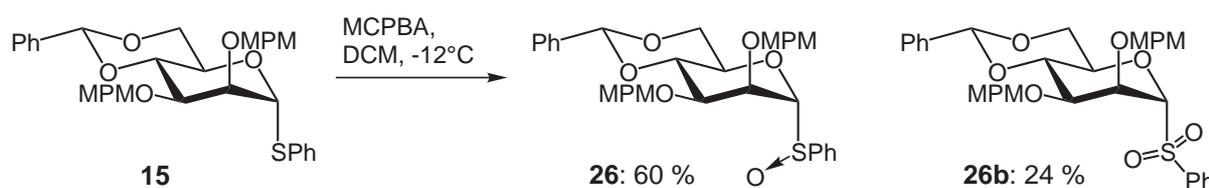
Schema 12: Testreaktionen zur Reaktivität von **20**.

Nachdem die Reaktionsfähigkeit dieses Akzeptors nachgewiesen war, wurde die β -Mannosid-synthese analog zur Reaktion mit Cyclohexanol wiederholt. Es entstand jedoch ein schlecht trennbares Gemisch, welches mittels LC/MS untersucht wurde. Neben nicht identifizierbaren Verbindungen konnte nur nicht umgesetzter Akzeptor **20** und viel 1,1-verknüpfter Donor **25** nachgewiesen werden (Schema 13). Nach zweimaliger flashchromatographischer Reinigung konnte eine Fraktion (8 %) angereichert werden, die aus einem Isomerengemisch (β : α \approx 2:1 lt. LC/MS) des Produktes **24** bestand. Für diese Untersuchungen wurde angenommen, daß das β -Isomer etwas polarer als das α -Isomer ist und demzufolge eine etwas niedrigere Retentionszeit bei der RPC aufweist. Diese Annahme wurde auch durch Hinweise aus einem gekoppeltem HMQC-Experiment gestützt, da für das entsprechende Anomere der Hauptkomponente in dem erhaltenen Gemisch eine $^1J_{\text{C,H}}$ von 159 Hz bestimmt werden konnte.



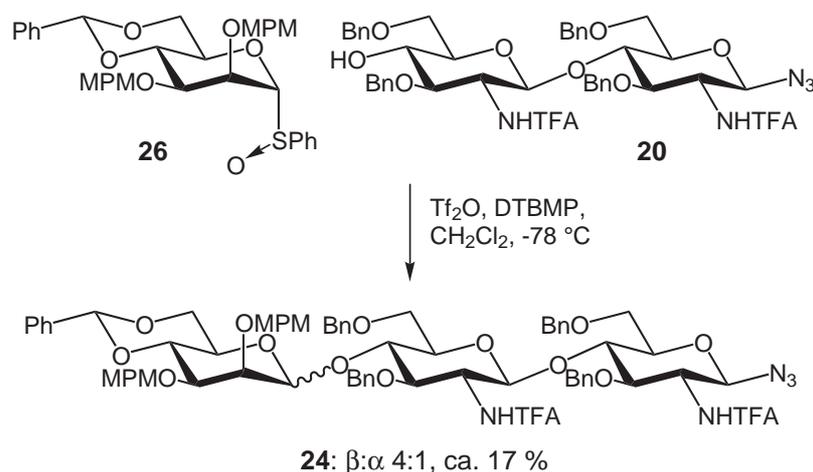
Schema 13: Versuch der direkten β -Mannosylierung.

Die Reaktion wurde mit vier Äquivalenten Donor **15** wiederholt. Hierbei konnte wiederum nach chromatographischer Reinigung nur eine Mischfraktion erhalten werden, die neben viel 1,1-verknüpftem Donor **25** etwas Produkt enthielt. Diese wurde mit DDQ oxidiert, um durch Entfernung der MPM-Schutzgruppen von Produkt und Verunreinigung ein besser trennbares Gemisch zu erhalten, was jedoch mißlang. Das gleiche Resultat zeigte sich bei Verwendung von sechs Äquivalenten Donor **15**. Anschließend wurde anstelle des Thiomannosids **15** das Sulfoxid **26** eingesetzt. Dieses wurde durch Oxidation des Thiomannosids **15** mit MCPBA gewonnen (Schema 14).^[60]



Schema 14: Synthese des Sulfoxid-Donors **26**.

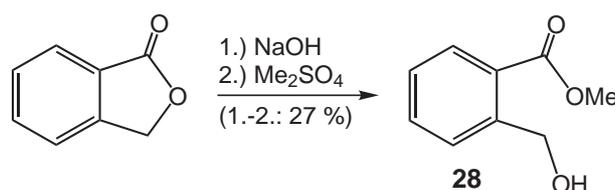
Bei dem Versuch, mit dem Sulfoxid **26** das Trisaccharid **24** aufzubauen, zeigte sich ein geringer Umsatz des Akzeptors und es konnte bei der Reinigung nur eine Mischfraktion erhalten werden. Die Analyse mittels LC/MS zeigte eine Verbesserung des Anomerenverhältnisses auf $\beta:\alpha \approx 4:1$, jedoch wurde die Ausbeute nur auf ca. 17 % erhöht (Schema 15).



Schema 15: Synthese des Trisaccharids **24** aus dem Sulfoxid **26**.

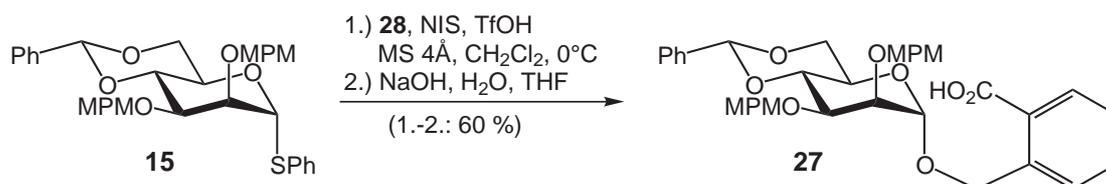
Theoretisch laufen beide Reaktionen über das identische Triflat als Zwischenstufe, weshalb dieses Resultat verwundert. Ein mögliches Problem bei der Aktivierung des Thiomannosids stellt der Einsatz von Phenylsulfenylchlorid dar, um das Triflat zu generieren. Diese Verbindung besitzt nur eine begrenzte Stabilität, weshalb nicht auszuschließen ist, daß hierbei

Nebenreaktionen auftreten. Nachdem offensichtlich die Natur des Donors einen Einfluß auf des Ergebnis der Reaktion besitzt, wurde das analoge 2-(Hydroxycarbonyl)-benzylmannosid^[61] **27** untersucht. Deshalb wurde zunächst 2-Hydroxymethylbenzoesäuremethylester **28** hergestellt. Obwohl in der Literatur^[62] beschrieben ist, daß sich **28** aus Phthalid direkt durch Aktivierung mit einem sauren Ionenaustauscher in Methanol darstellen läßt, liegt das Gleichgewicht vollständig auf der Eduktseite, so daß nur dieses wieder isoliert werden kann. Deshalb wurde der Umweg über Verseifung und Alkylierung in einer zweistufigen Eintopfreaktion gewählt (Schema 16).



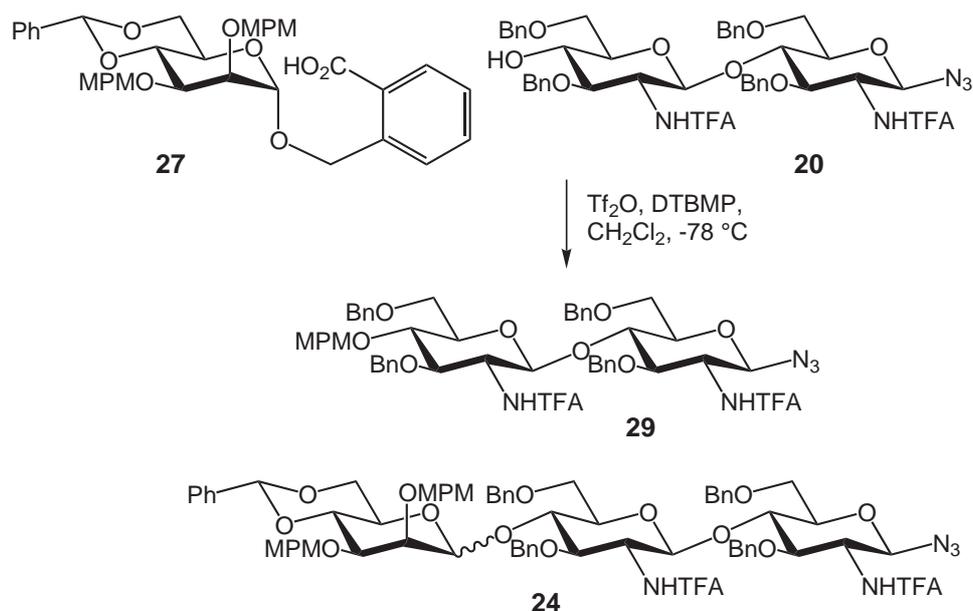
Schema 16: Synthese des Hydroxymethylbenzoesäureesters **28**.

Problematisch war hierbei, daß es mittels Flashchromatographie nicht möglich war, das nicht umgesetzte Phthalid bei den ersten Stufen abzutrennen. Es wurde nicht weiter versucht, die ersten Schritte zu optimieren, da diese Verunreinigung vor der Mannosylierungsreaktion abgetrennt werden konnte. Diese Probleme sollten sich durch Einsatz des Benzyl- statt Methylesters umgehen lassen, da sich dieser aufgrund seiner erhöhten Stabilität besser reinigen läßt. Aus dem Thiophenylmannosid **15** wurde durch Glycosylierung und anschließender Verseifung der gewünschte Donor **27** dargestellt (Schema 16).



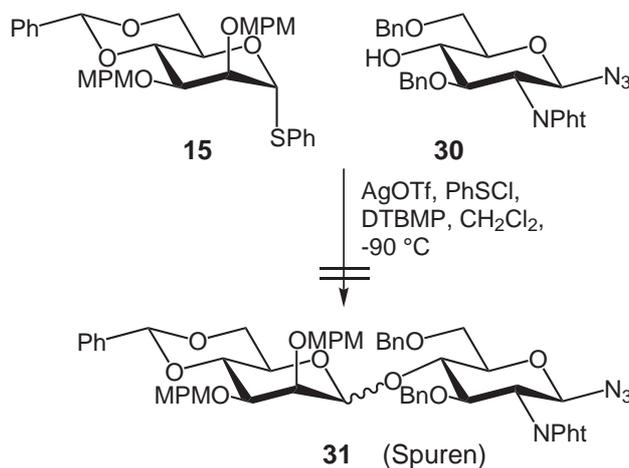
Schema 17: Synthese des HCB-Donors **27** aus dem Thiomannosid **15**.

Mittels dieses Donors wurde die Literaturvorschrift^[61] mit dem Disaccharid **20** als Akzeptor nachvollzogen. Analog zur Sulfoxid-Aktivierung wird hierbei mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid das Mannosyltriflat generiert. Bei dieser Reaktion konnte mittels LC/MS kaum Produkt nachgewiesen werden, jedoch eine Verbindung, die mit *m/z* 1060 dem Na-Addukt des MPM-geschützten Akzeptors **29** entspricht (Schema 18).



Schema 18: Versuch der Trisaccharidsynthese mit dem HCB-Donor **27**.

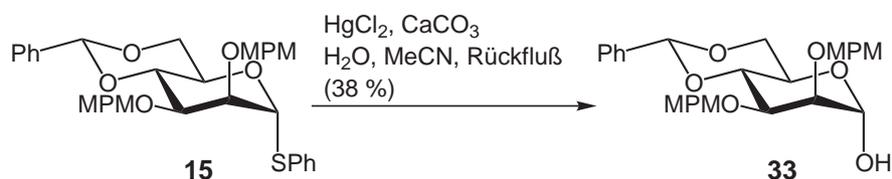
Weiterhin wurde versucht, durch die Verwendung des Monosaccharids **30** als Akzeptor eine Verbesserung der Reaktion zu erreichen, da im Vergleich zum Disaccharid **20** die sterische Umgebung der Hydroxylfunktion verändert ist. Jedoch konnte bei dieser Reaktion ebenfalls nur mittels LC/MS ein Produkt mit dem passenden Molekulargewicht nachgewiesen werden (Schema 19).



Schema 19: β -Mannosylierung mit dem Monosaccharid **30** als Akzeptor.

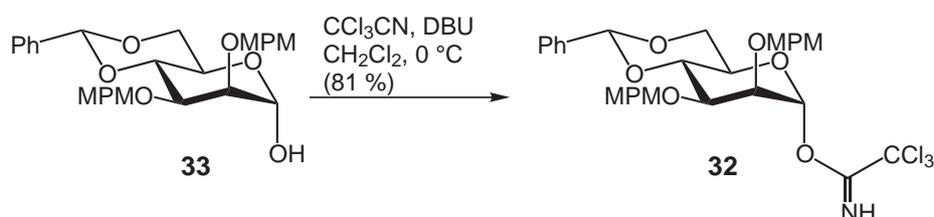
Nachdem auch Trichloracetimidate erfolgreich für β -Mannosylierungen eingesetzt werden können,^[55] wurde aus dem Thiomannosid **15** das analoge Trichloracetimidat **32** synthetisiert. Hierbei erwies es sich als problematisch, das Halbacetal **33** zu generieren. Die Standardmethoden durch Oxidation in feuchtem Aceton das Thioglycosid zu aktivieren, scheiterten.

Durch NBS^[63] bildete sich das Halbacetal nur als Zwischenstufe, da andere Schutzgruppen ebenfalls angegriffen wurden. Auch die Verwendung des milderen NIS brachte keine Verbesserung, durch Zusatz von Base (CaCO₃, NaOAc) wurde die Reaktion unterdrückt. Deshalb wurde mit Quecksilber-(II)-chlorid unter Zusatz von CaCO₃ in einer siedenden Mischung aus Acetonitril und Wasser^[64] das Halbacetal **33** gewonnen (Schema 20).



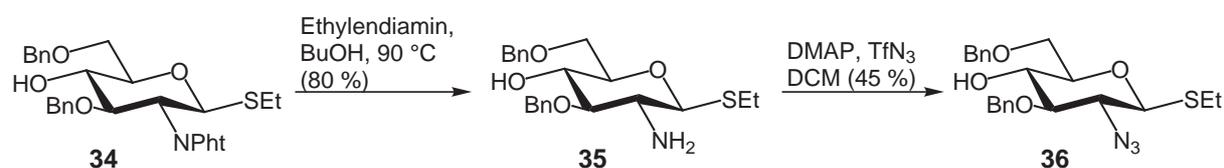
Schema 20: Synthese des Halbacetals **33** aus dem Thiomanosid **15**.

Aus diesem Halbacetal konnte in 81 % Ausbeute das Trichloracetimidat **32** problemlos gewonnen werden (Schema 21).



Schema 21: Synthese des Trichloracetimidats **32**.

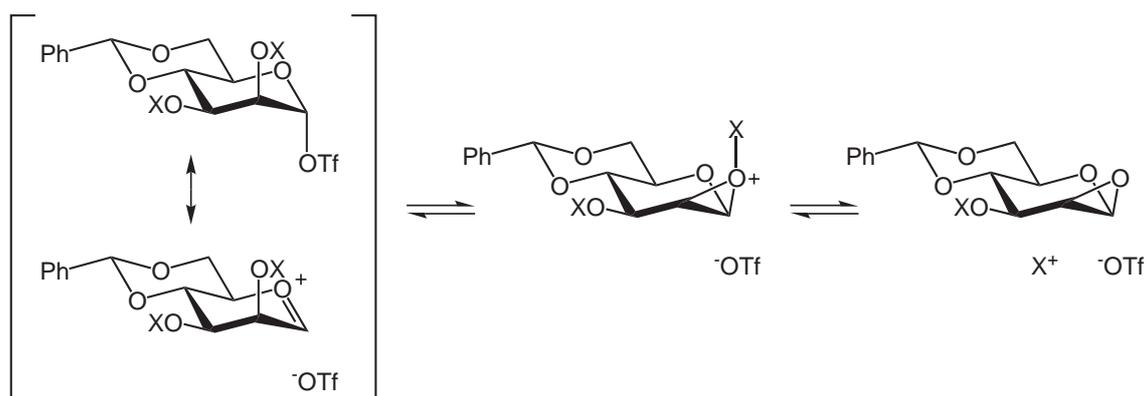
In einer Testreaktion mit Cyclohexanol wurde zunächst sichergestellt, daß auch mit dem Trichloracetimidat **32** eine β -mannosidische Verknüpfung aufgebaut werden kann. Anschließend wurde diese Reaktion mit dem phthalimid-geschützten Monosaccharid **30** als Akzeptor wiederholt, jedoch konnte nur das entsprechende Halbacetal isoliert werden. Durch den Einsatz von Molekularsieb und Verwendung eines 1.5-fachen Überschusses an Akzeptor konnte eine Mischung erhalten werden, die lt. NMR ca. 11 % des gewünschten β -Mannosids enthielt. Da die Glycosylierungsbedingungen für die säureempfindlichen Schutzgruppen problematisch sein könnten, wurden die Reaktionsbedingungen durch Zusatz von DTBMP abgemildert, wodurch jedoch keine Verbesserung erzielt werden konnte. Um den sterischen Anspruch am Akzeptor weiter zu verringern, wurde das Thioglycosid **34** zu dem Amin **35** entschützt und in einer Diazotransferreaktion^[65] mit einem Azidosubstituenten funktionalisiert (Schema 22).



Schema 22: Umschützen des Thioglycosids **34** zum azidgeschützten Akzeptor **36**.

Bei dem Versuch, mit diesem Akzeptor und dem Trichloracetimidat **32** ein β -Mannosid zu synthetisieren, konnte lediglich der Akzeptor unverändert reisoliert werden.

Ein Hauptproblem bei diesen Reaktionen scheint die lange Reaktionszeit zu sein, die benötigt wird, um die sehr schlecht ansprechbare Hydroxylfunktion der Glucosaminakzeptoren zu erreichen. Auf diese Weise kann das hochreaktive Mannosyltriflat Nebenreaktionen eingehen, die wahrscheinlich durch Schutzgruppen begünstigt werden, die leicht als Kation abgespalten werden. Besonders MPM-Schutzgruppen scheinen problematisch zu sein, da von Tetra-(4-methoxybenzyl)-glucosylsulfoxid bekannt ist, daß es bei $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ aktiviert werden muß, nachdem schon bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ Zersetzung auftritt.^[66] Durch das 4,6-Acetal wird das Triflat zwar soweit stabilisiert, daß es bei $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingesetzt werden kann,^[67] aber aufgrund der schlechten Nucleophilie des Akzeptors wird dies in vorliegenden Fall wahrscheinlich kompensiert. So konnten in diesen Studien mittels LC/MS teilweise Nebenverbindungen gefunden werden, die aus einer Schutzgruppenübertragung des Donors auf den Akzeptor resultieren. Dies deckt sich mit Beobachtungen von *I. Prahl*, der eine analoge Silylgruppenübertragung beschreibt.^[56]

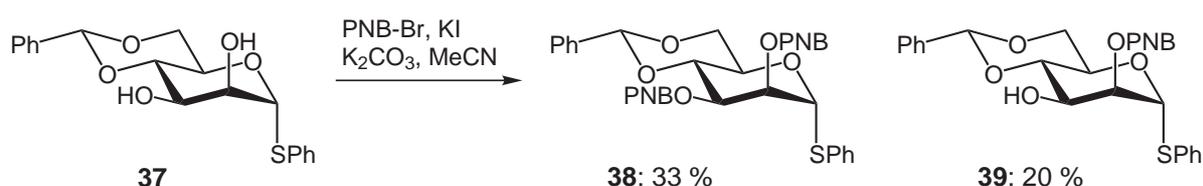


*Schema 23: Mögliche Nebenreaktion bei der β -Mannosylierung: das α -Triflat wird durch das Sauerstoffatom an C-2 nucleophil angegriffen. Ein elektronenreicher Substituent *X* (z. B. TMS, MPM) wird als Kation abgespalten und es bildet sich der 1,2-Anhydrozucker.*

Wie in Schema 23 dargestellt, könnte durch einen nucleophilen Angriff des Sauerstoffatoms an C-2 der 1,2-Anhydrozucker gebildet werden, wobei die Schutzgruppe als Kation abgespalten wird. Dieses greift leichter als das Glycosylkation den Akzeptor an, wodurch die Nebenprodukte erklärt werden können. Welche entscheidende Rolle die Schutzgruppen bei dieser Reaktion spielen, zeigt die Tatsache, daß der 2-Benzyl-3-TBDMS-Donor sehr schlechte Selektivitäten aufweist, der 2-TBDMS-3-benzyl-geschützte jedoch sehr gute.^[68] Weiterhin ist

bekannt, daß elektronegative Schutzgruppen an Position 2 diese Reaktion durch dipolare Stabilisierung der Twist-Boot Konformation des Triflats begünstigen.^[69]

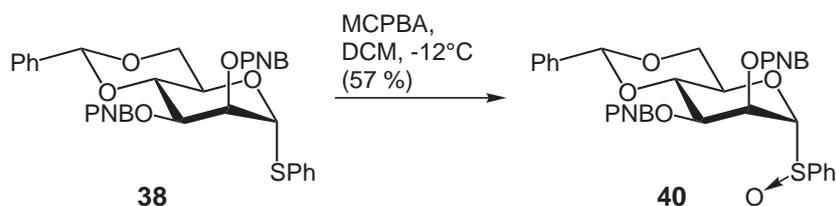
Aus diesen Gründen wurde das Diol **37**^[70] mit Nitrobenzylgruppen geschützt. Da diese nicht mittels NaH in DMF über das entsprechende Bromid eingeführt werden können, wird normalerweise Silberoxid in Dichlormethan bzw. Benzol eingesetzt.^[71] Nachdem jedoch Nebenreaktionen mit dem Schwefelatom des Thiomannosids möglich sind, wurde mit K₂CO₃ und KI in siedendem Acetonitril gearbeitet (Schema 24).^[72]



Schema 24: Einführung der 4-Nitrobenzylschutzgruppen.

Selbst mit einem größeren Überschuß an 4-Nitrobenzylbromid konnte kein vollständiger Umsatz erzielt werden. Neben 33 % an Produkt **38** wurden 20 % der in Position 2 monoalkylierten Zwischenstufe **39** erhalten.

Aufgrund der stark elektronenziehenden Substituenten war es im Gegensatz zur MPM-geschützten Verbindung **15** nicht möglich, das Thiomannosid **38** mit Phenylsulfenyltriflat direkt zu aktivieren. Dieses Phänomen wurde bereits bei einem 2-Azidothiomannosid beschrieben.^[73] Nachdem bei Sulfoxiden dieses Problem nicht auftritt, wurde **38** mittels MCPBA oxidiert (Schema 25).



Schema 25: Oxidation des Thiomannosids **38** zum Sulfoxid **40**.

Dieses Sulfoxid **40** ließ sich zwar unter den für die MPM-geschützte Verbindung **26** beschriebenen Bedingungen aktivieren, jedoch konnte bei der Reaktion mit dem TFA-geschützten Chitobiosylakzeptor **20** auch mittels LC/MS kein Produkt nachgewiesen werden.

Für die Schwierigkeiten bei der direkten Synthese des benötigten Core-Trisaccharids **2** sind mehrere Probleme verantwortlich: neben den beschriebenen Nebenreaktionen des intermediär

gebildeten Mannosyltriflats ist die Ansprechbarkeit der Hydroxylfunktion des Akzeptors essentiell. Von *D. Crich* und *V. Dudkin*^[74] wurde das Amidproton des Akzeptors als eine Ursache identifiziert, da durch den Übergang von Acetamid über Phthalimid zu Azid die Ausbeuten wesentlich verbessert werden konnten. Eine erste Lösung des Problems bestand deshalb in der Kopplung eines 2-Benzyl-3-methoxybenzyl-Donors mit Pentenyl 2-azido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-glucosid.^[75] Hierbei waren noch einige umständliche Reaktionsschritte bis zum benötigten Trisaccharid notwendig, jedoch konnten *Dudkin*, *Miller* und *Danishefsky* durch Verwendung von Sulfonamidschutzgruppen die Synthese auf direktem Weg durchführen.^[76]

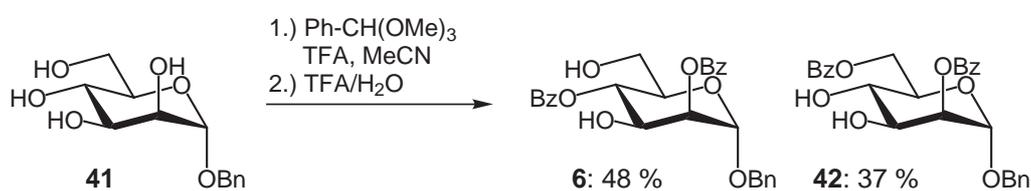
Nachdem durch die versuchte direkte Route das gewünschte Trisaccharid **2** nicht zugänglich war, wurden 28 g des 4,6-Benzyliden-2-chloracetyl-3-phenylcarbamoyl-glycosyltrichloracetimidats synthetisiert,^[166,77] aus welchem sich nach der Glycosylierung mit **8** und intramolekularer Inversion die gewünschte β -mannosidische Verbindung **2** generieren läßt.^[46]

2.3.2. Oligomannosid-Synthesen

Der Pentamannosyldonor **3** sollte in möglichst wenig Schritten und minimalen Schutzgruppenoperationen dargestellt werden. Die Synthese eines analogen Bausteins durch *T. Ogawa*^[78] wurde ausgehend von Benzyl 2,4-di-*O*-benzylmannosid durch aufeinanderfolgende Glycosylierungen und anschließende Umschützung zu einem Pentamannosylbromid bzw. -chlorid durchgeführt, wobei in einer Gesamtausbeute von 16 % sieben Reaktionsschritte benötigt wurden. Erstes Syntheseziel war deshalb ein ähnlicher Mannosylakzeptor, an welchem in einem Schritt durch eine doppelte Glycosylierung ein symmetrisches Substitutionsmuster aufgebaut werden kann. *F. Kong* konnte inzwischen zwar zeigen,^[79] daß ein 1,2-Ethylidenacetal ausreichend ist, jedoch wurden bis zu dem gewünschten Trichloracetimidat fünf weitere Schritte benötigt.^[80] Deshalb wurde nach einem Mannosebaustein gesucht, der an Position 2 und 4 orthogonal zum anomeren Zentrum geschützt sein sollte. Verschiedene Strategien sind hierfür denkbar, so konnte beispielsweise *T. Ogawa* über Stannyleneacetale Methylmannosid in vier Stufen an Position 2 und 4 benzylieren.^[81] Ein ähnlicher Baustein wurde von *I. Matsuo* durch Pivaloylierung von Position 3 und 6 des Thiophenylmannosids, anschließender Benzylierung und Verseifung erhalten.^[82] Der so gewonnene Akzeptor eignete sich zum Aufbau von mannosereichen *N*-Glycanen^[83] bzw. deren Teilstrukturen.^[84] Durch Glycosylierung des so gewonnenen mannosereichen Undecasaccharids konnte kürzlich auch das um drei Glucoseeinheiten verlängerte Tetradasaccharid synthetisiert werden.^[85] Auch in den neuesten Arbeiten von *S. Danishefsky* zur Synthese von *N*-Glycanen vom Hybrid-Typ

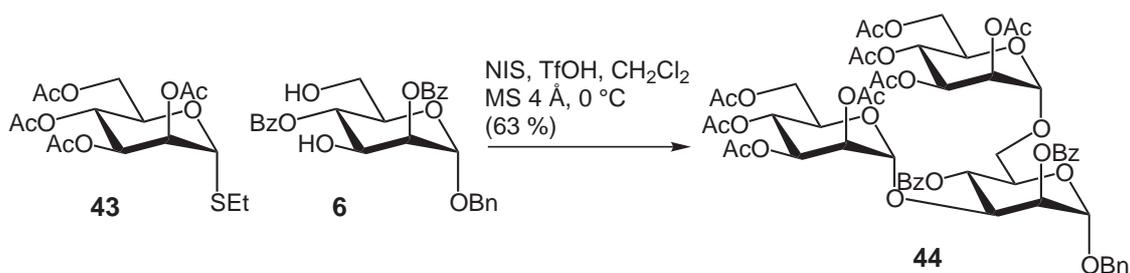
wurde dieser Baustein eingesetzt.^[86] Von *P. Seeberger*^[87] wurde ausgehend von einem 3,6-geschützten Glucal in sieben Stufen ein analoges Pentenylmannosid synthetisiert. Ziel dieser Arbeit war es hingegen Ester als Schutzgruppen zu verwenden, da es sich bewährt hat, diese am Ende der Synthese zu entfernen.^[29,31,32] *F. Kong* entwickelte eine Eintopfreaktion,^[88] bei der durch aufeinanderfolgende Zugabe von Tryptyl-, TBDMS- und Benzoylchlorid zu einer Lösung von α -Allylmannosid ein passendes Schutzgruppenmuster aufgebaut wurde. Von *S. Oscarson* wurde durch simultane Bildung und anschließende Hydrolyse von 2,3- und 4,6-Bisorthoestern eine analoge Struktur aufgebaut,^[89] wodurch die Anzahl der Reaktionsschritte minimiert wurde.

Deshalb wurde diese Reaktionssequenz auf die Umsetzung von α -Benzylmannosid^[90] **41** mit Orthobenzoesäuretrimethylester übertragen. In Vorversuchen wurde der Einfluß des Lösungsmittels und der verwendeten Säure auf die Reaktion untersucht. Hierbei zeigt sich, daß die Reaktion in absolutem Acetonitril besser verlief als in THF, Essigsäureethylester, DMF, Dichlormethan oder Diethylether. Bei dem Hydrolyseschritt erwies es sich am günstigsten, 80 %ige Trifluoressigsäure direkt in die Reaktionslösung zu geben ohne das Bisorthobenzoat vorher aufzuarbeiten (Schema 26). Ferner erwies es sich als wesentlich, vor dem anschließenden Einengen die Reaktion mit Pyridin zu neutralisieren, da anderweitig durch die hohe Säurekonzentration ein Teil des Produkts wieder zerstört wurde. Um durch den Ersatz der Benzoate durch Acetat-Schutzgruppen einen sterisch weniger anspruchsvollen Akzeptor zu gewinnen, wurde die Reaktion ebenfalls mit Triethylorthoacetat durchgeführt. Hierbei war es jedoch nicht möglich, das 2,4- von dem 2,6-Isomer zu trennen, weshalb diese Variante nicht weiter verfolgt wurde.



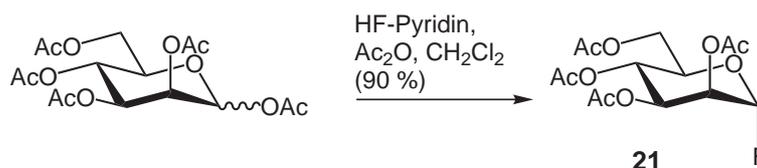
Schema 26: Synthese des Akzeptors **6**.

Um die Akzeptoreigenschaften des Mannosebausteins **6** zu untersuchen, wurde mit dem Thiomannosid **43** in einem Schritt das 3,6-verzweigte Trimannosid **44** aufgebaut (Schema 27), welches als Bestandteil in hybriden und mannosereichen *N*-Glycanen gefunden wird.



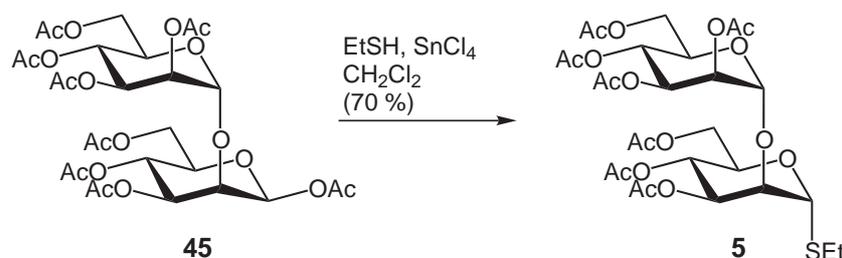
Schema 27: Aufbau des Trimannosids **44**.

Nachdem die gewünschte Reaktivität von **6** gezeigt war, wurde der für den Aufbau des Pentamannosids benötigte Disaccharid-Baustein **45** nach einer Vorschrift von *D. Varón*^[91] gewonnen, indem 1,3,4,6-Tetraacetylmannose^[92] **46** mit einem peracetylierten Mannosyldonor umgesetzt wurde. Hierfür wurden das Trichloracetimidat **22**, das Thioethylmannosid **47** und das Fluorid **21** synthetisiert. Die Ausbeute bei der Synthese des Fluorids **21** konnte durch Zusatz von Essigsäureanhydrid^[93] von ca. 70 %^[91b] auf 90 % verbessert werden (Schema 28).



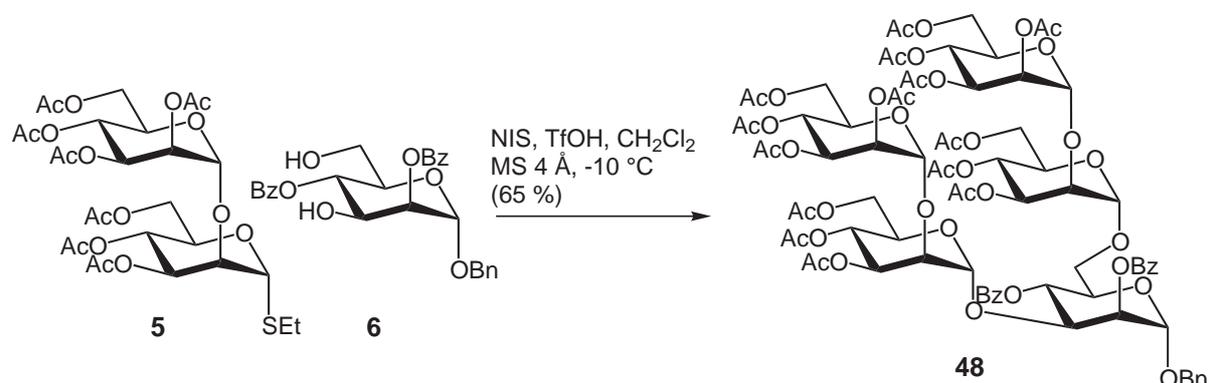
Schema 28: Synthese des peracetylierten Mannosylfluorids **21**.

Bei der Darstellung des Mannobiosebausteins zeigte sich, daß sowohl das Trichloracetimidat **22** als auch das Thioglycosid **47** geeignete Donoren sind,^[91b,94] das Fluorid **21** hingegen sehr schlecht reagiert. Durch die benötigten langen Reaktionszeiten wird darüberhinaus der säureempfindliche Akzeptor **46** zum Halbacetal umgelagert, was zu Nebenprodukten führt. Das so gewonnene peracetylierte Disaccharid **45** wurde anschließend mit Ethanthiol und Zinntetrachlorid zu dem entsprechenden Thioethylglycosid **5** umgesetzt (Schema 29).



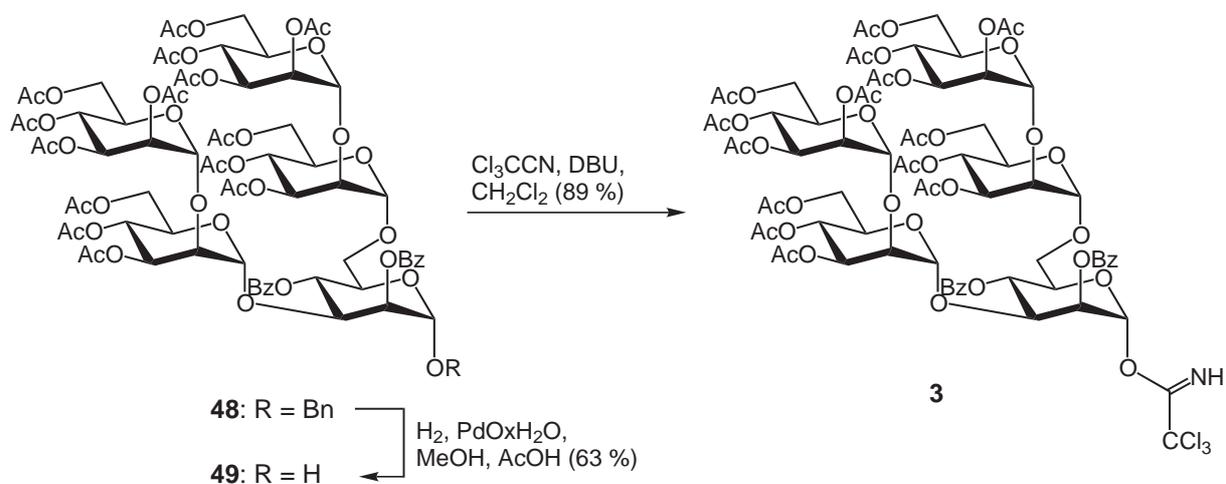
Schema 29: Synthese des Thioglycosids **5**.

Anschließend wurde mit diesem Donor analog zu dem Trimannosid **44** das Pentamannosid **48** synthetisiert (Schema 30), wobei die Ausbeuten vergleichbar waren.



Schema 30: Aufbau des Pentamannosids **48**.

Im folgenden wurde das anomere Zentrum von **48** hydrogenolytisch freigesetzt und das Halbacetal **49** mit Trichloracetonitril und DBU in das Trichloracetimidat **3** umgewandelt (Schema 31).^[95]

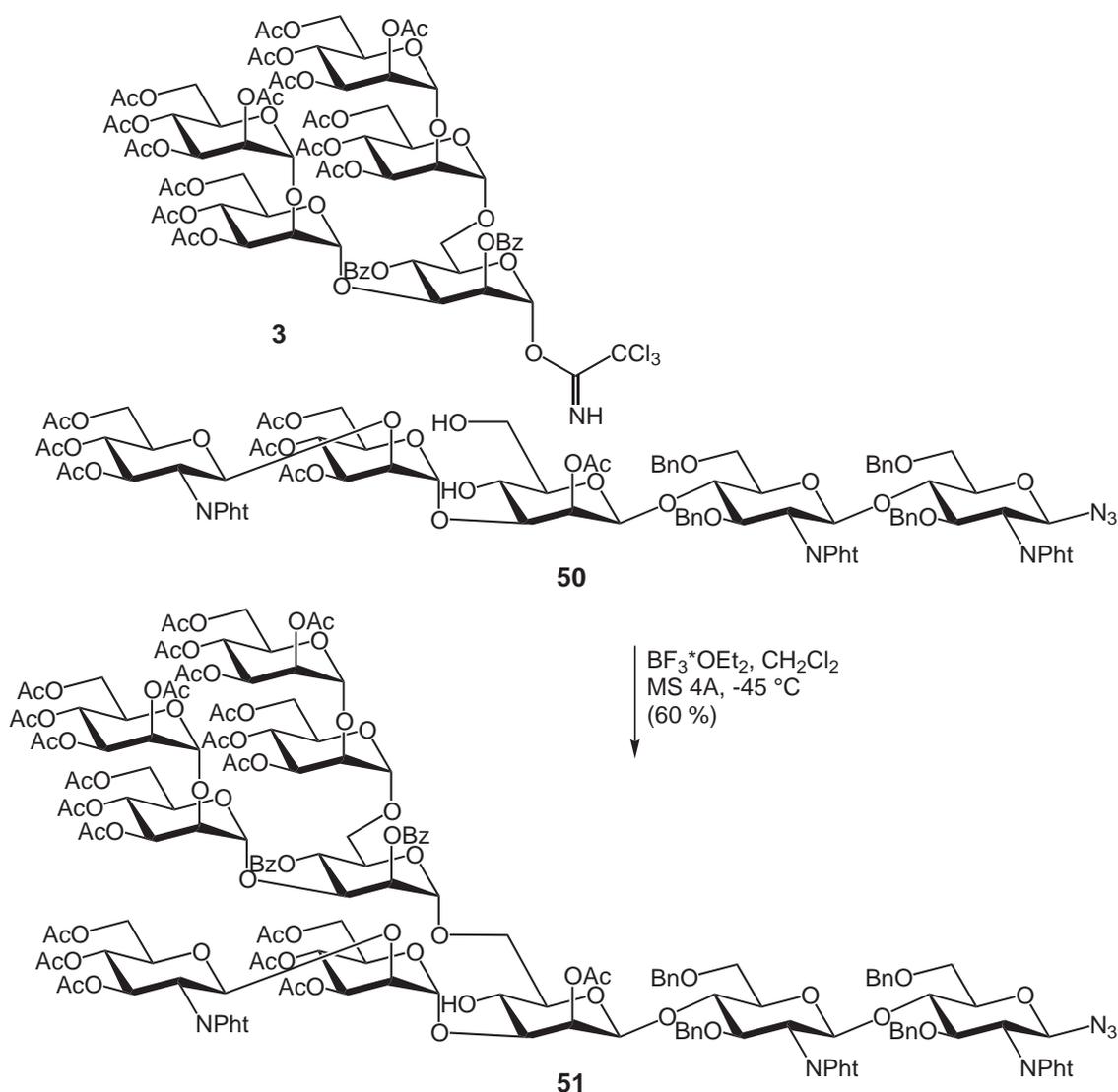


Schema 31: Entfernung der Benzylschutzgruppe und Umwandlung des Halbacetals **49** in das Trichloracetimidat **3**.

Auf diese Weise war ein sehr kurzer und effizienter Weg zur Synthese dieses Pentamannosid-Donors gefunden.

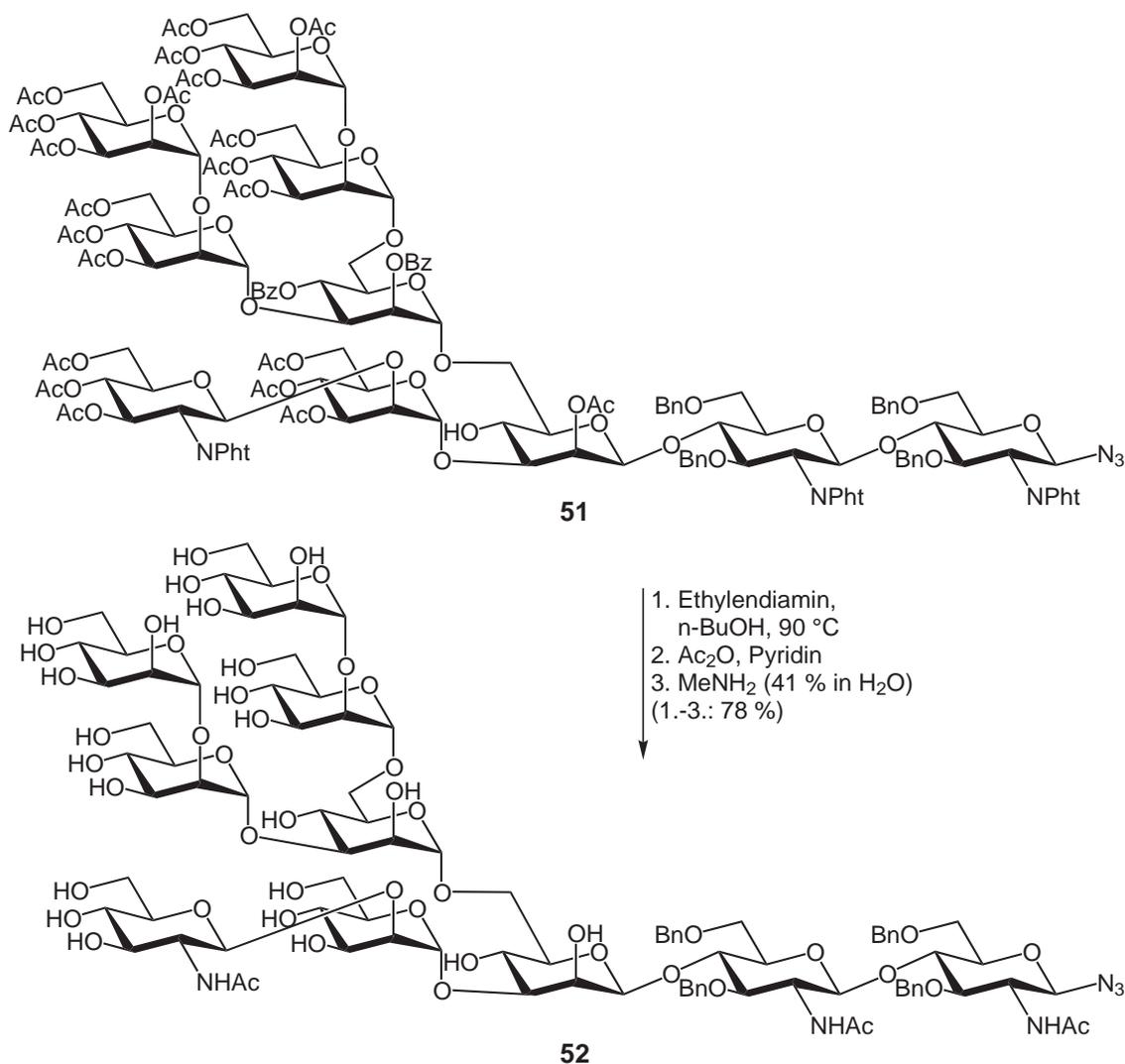
Mit diesem Trichloracetimidat konnte an dem Pentasaccharidakzeptor **50**^[29] regioselektiv die 6-Hydroxylfunktion angesprochen werden. Hierzu wurden die Bedingungen der Synthese komplexer *N*-Glycane^[29,166] auf das Pentamannosid **3** übertragen und das Decasaccharid **51** in

60 % Ausbeute isoliert (Schema 32). Diese ist vergleichbar dem Resultat, das mit einem analogen Thiomannosid-Baustein bei einem ähnlichen Akzeptor erzielt wurde.^[86b]



Schema 32: Synthese des Decasaccharids **51**.

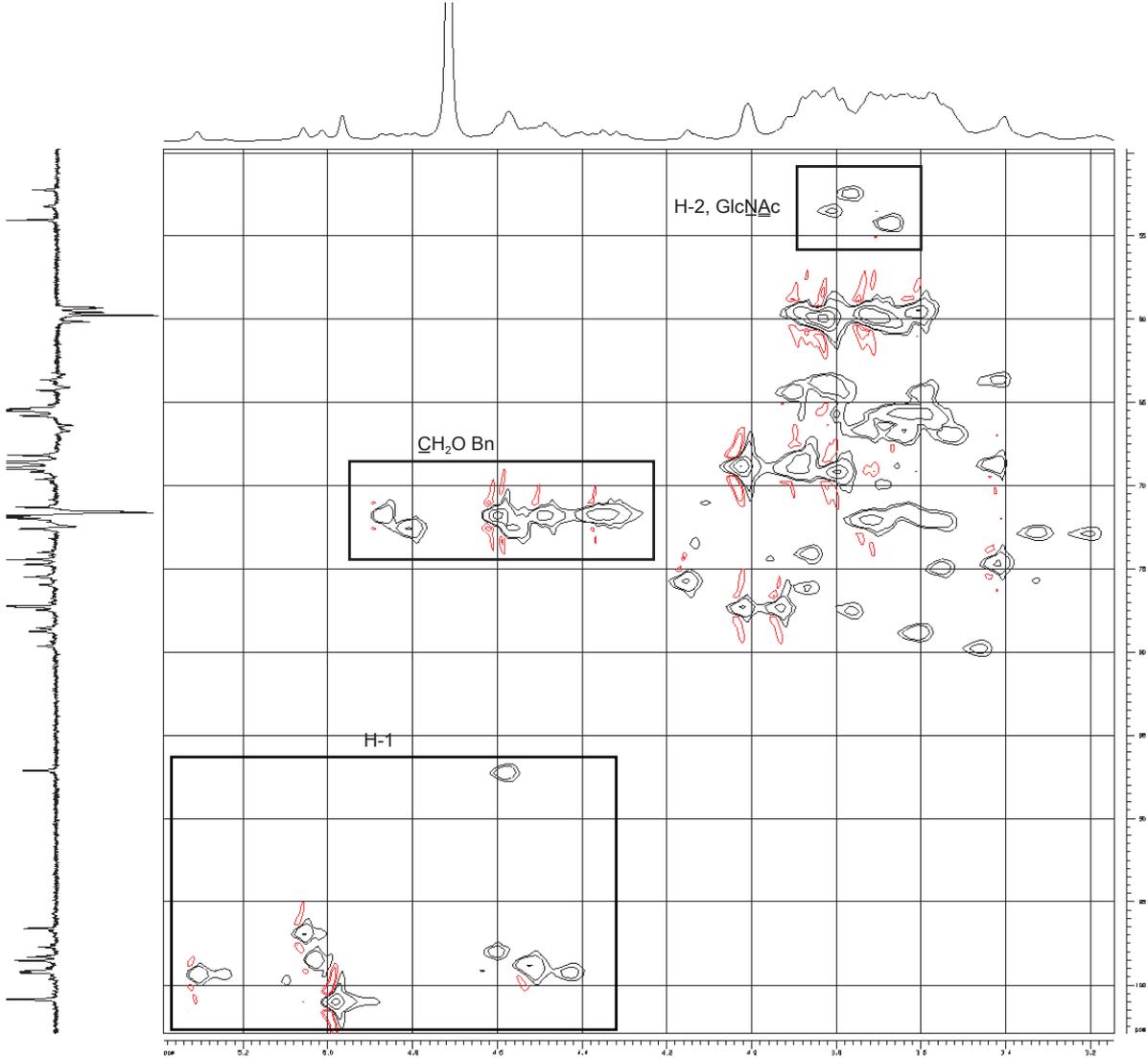
Ausgehend von diesem Decasaccharid sollten die Ester- und Imid-Schutzgruppen entfernt werden. Nachdem der Einsatz von Hydrazin bei Glycosylaziden problematisch ist,^[29] wurde die schonendere Methode durch Erwärmen mit Ethylendiamin in *n*-Butanol gewählt (Schema 33).^[58] Die Reaktion wurde u. a. durch LC/MS verfolgt, wobei sich zeigte, daß nach 24 Stunden bei einem Drittel des Produktes ein Benzoat nicht abgespalten worden war. Dies wird das Benzoat an Position 4 sein, da diese sterisch abgeschirmt ist. Nach 48 Stunden war die Reaktion beendet und nach Reacetylierung und folgender Entfernung der Ester konnte das teilentschützte Decasaccharid **52** in 78 % Ausbeute durch Festphasenextraktion isoliert werden.



Schema 33: Entfernung der Ester- und Imid-Schutzgruppen.

Das erhaltene Decasaccharid wurde mittels ESI-MS und NMR charakterisiert. Aufgrund von Signalüberlagerungen konnten lediglich charakteristische Signale angegeben werden (Schema 34).

Auf diese Weise ist nun ein effizienter Zugang zu *N*-Glycanen vom Hybrid-Typ gefunden. Durch die Azidfunktion am reduzierenden Ende ist nach Reduktion zum Amin die Anheftung eines Spacers für die Synthese von Neoglycokonjugaten^[96] bzw. einer geschützten Asparaginsäure für die Glycopeptidsynthese^[97] möglich. Durch einfache Variationen bei der Oligomannosid-Synthese sollte es auch möglich sein, weitere bekannte Antennenbausteine schnell zu gewinnen und so zusätzliche Variationen der *N*-Glycane vom Hybrid-Typ mit dieser Synthesestrategie zugänglich zu machen.



Schema 34: Ausschnitt aus dem HMOC-COSY-Experiment von 52.

3. Synthese von Glycosyltriazolen

3.1. Festphasensynthese von Oligosacchariden

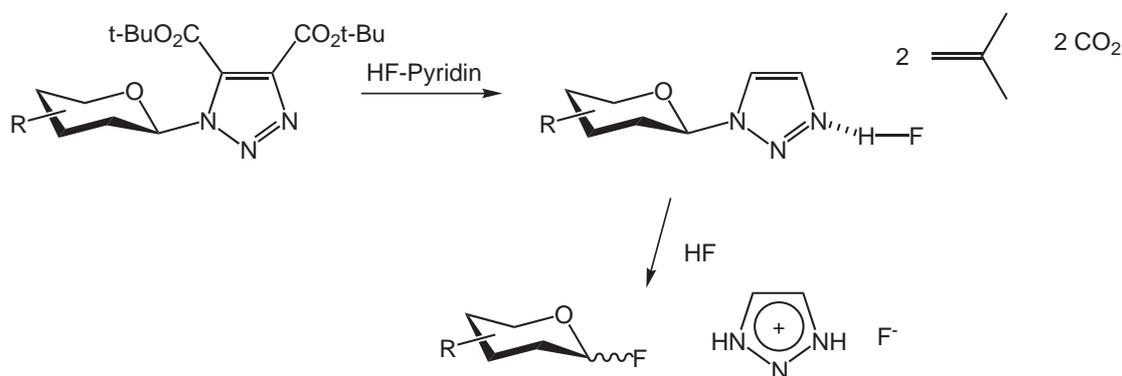
Oligosaccharide werden im Gegensatz zu Peptiden und Oligonucleotiden in der Regel in Lösung synthetisiert. Die Synthese an der festen Phase bietet jedoch verschiedene Vorteile wie hohe Ausbeuten durch den Einsatz von Überschüssen, einfache Reinigung der Produkte durch Filtration und die Möglichkeit der Automation.^[98] Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren viele Anstrengungen unternommen, auch Kohlenhydrate mittels Festphasensynthese darzustellen.^[99] Durch Entwicklung neuer Glycosylierungsstrategien und Trägermaterialien wie beispielsweise PEG^[100] oder perfluorierter Polymere konnten seit Beginn der 1990er Jahre große Fortschritte auf diesem Gebiet verzeichnet werden. So stellte die Arbeitsgruppe von *Danishefsky* 1993^[101] eine glycalbasierte Methode vor, Oligosaccharide durch abwechselnde Oxidation und Glycosylierung am *Merrifield*-Harz zu gewinnen. Sie konnten an einem silylfunktionalisierten Polystyrolharz mit diesem Ansatz auch die *N*-glycosidische Bindung an ein Peptid knüpfen und dieses über eine Fragmentkupplung zu einem Octapeptid verlängern.^[102] Erwähnenswert ist weiterhin die Synthese eines Dodecasaccharids durch die Arbeitsgruppe um *K. C. Nicolaou*,^[103] bei der zunächst an einem funktionalisierten *Merrifield*-Harz ein Trisaccharid aufgebaut wurde, welches als Thioglycosid abgespalten wurde. Dieser Donor konnte an nicht abgespaltenes Trisaccharid gekoppelt und so durch repetitive Glycosylierungen das Dodecasaccharid aufgebaut werden. Nach Belichtung wurde das Produkt vom photolabilen Linker abgespalten. In der Arbeitsgruppe um *R. R. Schmidt* wurden zunächst Glucose-^[104] bzw. Mannosebausteine^[105] über einen Thiollinker am *Merrifield*-Harz bzw. an einer Glasoberfläche^[106] befestigt und über die Trichloracetimidat-Methode verlängert. Mit dieser Technik war es auch möglich, eine Pentasaccharid-Teilstruktur eines komplexen *N*-Glycans zu synthetisieren.^[107] Ebenfalls am *Merrifield*-Harz, jedoch mit einem 1,4-Bis-(hydroxymethyl)-benzol-Linker, wurde von ihnen schlußendlich ein komplexes Hexasaccharid-*N*-Glycan aufgebaut.^[108] Diese Synthesestrategie konnte in der Arbeitsgruppe von *P. H. Seeberger* an einem Octendiollinker vollautomatisch innerhalb von drei Tagen wiederholt werden.^[109] Hierfür nutzten sie den modifizierten Peptidsynthesizer, mit dem sie bereits u. a. mehrere der vorgestellten Oligosaccharide erfolgreich aufbauen konnten.^[110] Problematisch bei allen vorgestellten Synthesen ist die Tatsache, daß die Oligosaccharide meist als Halbacetale bzw. mit einer Schutzgruppe am anomeren Zentrum abgespalten wurden. Demzufolge ist für die Synthese von Glycopeptiden nach weiteren Schutzgruppenmanipulationen noch die Modifikation des anomeren Zentrums notwendig, um die *N*-glycosidische Bindung zu installieren.

3.2. Problemstellung

W. Bröder und H. Kunz untersuchten die thermische [3+2]-Cycloaddition von Glycosylaziden und Acetylendicarbonsäurediestern zu Triazolen. Hierbei konnten sie zeigen, daß sich diese sowohl in Glycosylierungen als Donoren einsetzen,^[111] als auch durch HF-Pyridin in Glycosylfluoride als universelle Donoren umwandeln ließen.^[112,113] Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob diese Kombination von Reaktionen geeignet ist, Oligosaccharide in Triazole zu überführen und wieder zurück in Azide bzw. Fluoride zu konvertieren. Dabei war zu klären, ob Triazole auch als Akzeptoren bei Glycosylierungen eingesetzt werden können. Dies würde für spätere Arbeiten die Nutzung als Linkersystem für die Festphasensynthese von *N*-Glycanen ermöglichen und die Übertragung des im Arbeitskreis entwickelten Bausteinsystems (vgl. Kapitel 2.2) auf die Festphase erlauben.

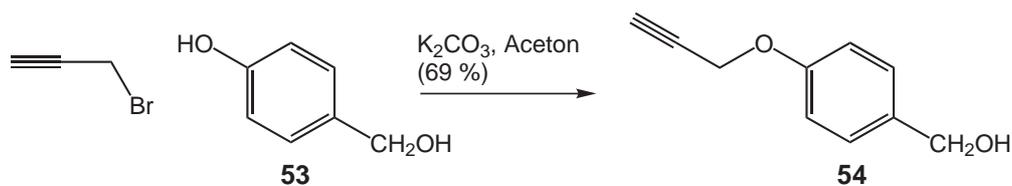
3.3. Untersuchungen zur Synthese und Chemie von Glycosyltriazolen

Als Ausgangspunkt diente die Hypothese, daß bei der Reaktion mit HF-Pyridin die Triazoldicarbonsäurediester vor Bildung des Glycosylkations zunächst gespalten und decarboxyliert werden (Schema 35).^[112]



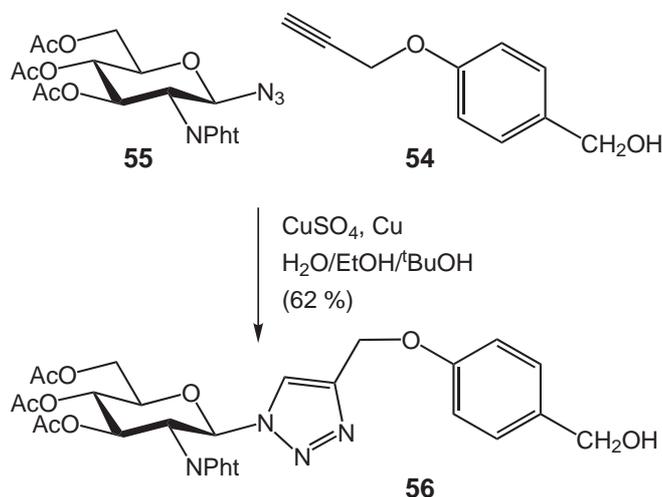
Schema 35: Vorgeschlagener Mechanismus^[112] zur Bildung des Glycosylfluorids aus dem Triazoldicarbonsäurediester mittels HF.

Demnach sollte die aktivierbare Spezies das freie Glycosyltriazol sein, welches basisch genug wäre, um protoniert oder durch eine Lewis-Säure aktiviert zu werden. Ein an Position 4 oder 5 alkyliertes Triazol sollte sich elektronisch nicht wesentlich von dem freien Triazol unterscheiden, weshalb dort die Anknüpfung eines Linkers möglich sein sollte. Hierfür wurde ein 4-Alkoxyphenylether gewählt, da dieser Abspaltungen unter oxidierenden Bedingungen für analytische Zwecke während der Festphasensynthese ermöglichen würde. Deshalb wurde zunächst 4-Hydroxybenzylalkohol **53** mit Propargylbromid in einer nucleophilen Substitution verknüpft (Schema 36).^[114]



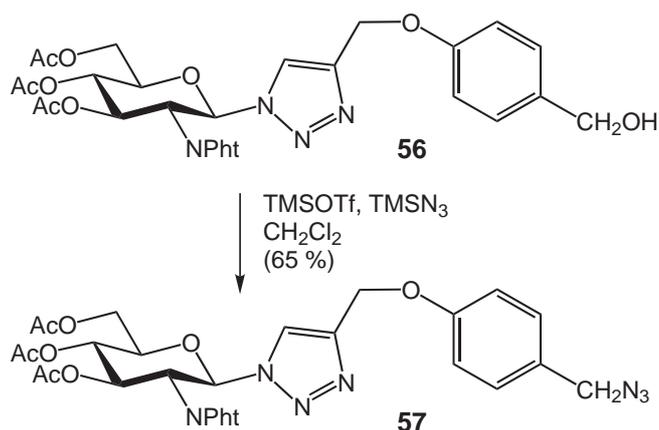
Schema 36: Alkylierung von 4-Hydroxybenzylalkohol **53**.

Mit dem terminalen Alkin **54** und dem acetylierten Glycosylazid **55** wurden verschiedene Bedingungen untersucht, unter denen das gewünschte Triazol **56** aufgebaut werden kann. Durch zweiwöchiges Erhitzen in Toluol unter Rückfluß konnte mittels DC kaum Umsatz ($< 20\%$) beobachtet werden. In den Arbeitsgruppen um *K. B. Sharpless*^[115] und *M. Meldal*^[116] wurde entdeckt, daß die [3+2]-Cycloaddition eines terminalen Alkins mit Aziden durch Cu(I) katalysiert wird. Vorteil dieser Reaktion im Vergleich zur thermischen *Huisgen*-Cycloaddition ist neben den wesentlich milderen Bedingungen und kürzeren Reaktionszeiten die Tatsache, daß nur das 4-Alkyltriazol entsteht und keinerlei Bildung des 5-Isomers beobachtet wird. Durch Übertragung dieser Bedingungen auf die Reaktion mit dem Glycosylazid **55** (Schema 37) konnte bereits nach 34 Stunden in einem Gemisch aus Wasser, Ethanol und *tert*-Butanol sehr guter Umsatz beobachtet werden.



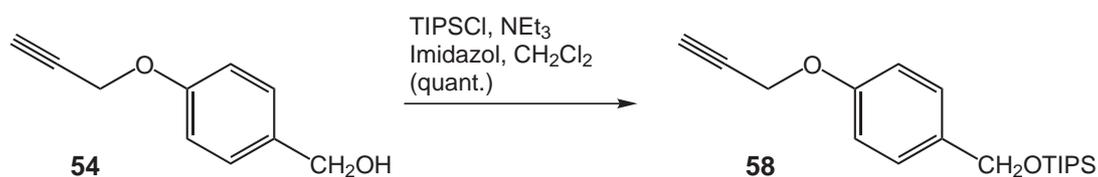
Schema 37: Selektive [3+2]-Cycloaddition zum N-Glycosyl-4-alkyltriazol **56**.

Bei dem Versuch, das Triazol **56** durch TMSOTf zu aktivieren und mit $TMSN_3$ das Glycosylazid wiederzugewinnen, reagierte nur der Benzylalkohol in einer Substitutionsreaktion und es entstand das entsprechende Benzylazid **57** (Schema 38).



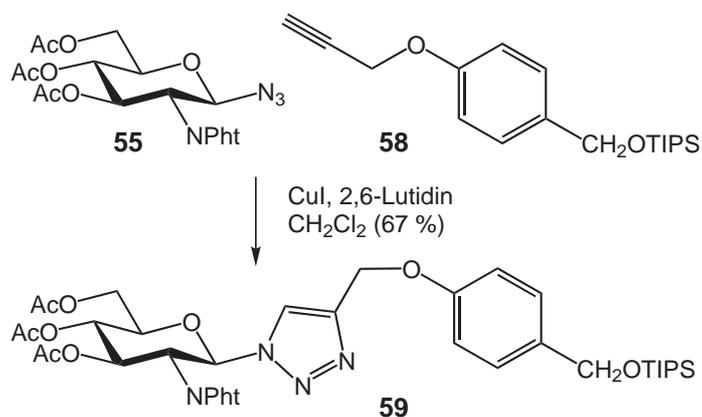
Schema 38: Substitution des Benzylalkohols **56** zum Benzylazid **57**.

Um diese reaktive Position zu schützen und die Anbindung an ein silylfunktionalisiertes Harz zu simulieren, wurde der Benzylalkohol **54** mittels TIPSCl derivatisiert (Schema 39).



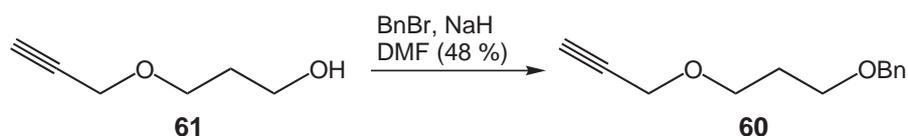
Schema 39: Schutz des Benzylalkohols **54** als Silylether.

Mit diesem Alkin **58** wurden die Reaktionsbedingungen weiter optimiert. Es sollte vor allem ein Lösungsmittelsystem gefunden werden, in welchem sich geschützte Kohlenhydrate gut lösen und später Reaktionen an einem Polystyrolharz möglich sein sollten. Hierzu wurden NMP, DMF, Dichlormethan, THF sowie DIPEA untersucht. Da die Löslichkeit von CuSO₄ in diesen Lösungsmitteln gering ist und somit die Bildung einer Cu(I)-Spezies erschwert wird, wurde direkt CuI eingesetzt. Die Reaktionen wurden mittels DC und LC/MS verfolgt und Dichlormethan erwies sich als Lösungsmittel der Wahl (Schema 40).



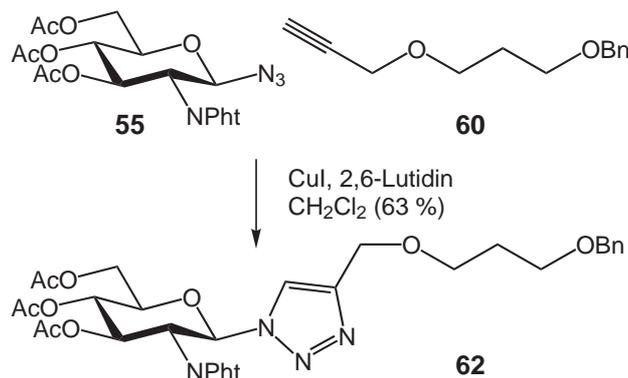
Schema 40: [3+2]-Cycloaddition mit dem TIPS-geschützten Benzylalkohol **58**.

Bei der Reaktion dieses Triazols **59** mit TMSN_3 unter TMSOTf -Aktivierung entstand ein nicht identifiziertes Produkt, welches im $^1\text{H-NMR}$ neben allen charakteristischen Signalen des Edukts lediglich eine Hochfeldverschiebung der benzylichen Methylengruppe um ca. 0.2 ppm aufwies. Da die Schwierigkeiten auf der Labilität des Linkers gegen Säuren beruhten, wurde statt des Alkoxybenzylethers der analoge Propyllinker **60** untersucht. Hierzu wurde zunächst 1,3-Propandiol mit Propargylbromid monoalkyliert^[117] und anschließend benzyliert (Schema 41).



Schema 41: Benzylierung des Propargyloxypropanols **61**.

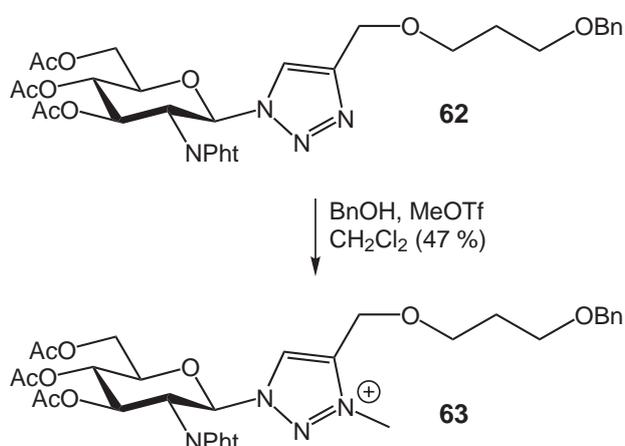
Mit diesem Alkin konnte die Cycloaddition analog zu dem Alkin **58** durchgeführt werden (Schema 42).



Schema 42: Synthese des Triazols **62** mit Propandioll-Linker.

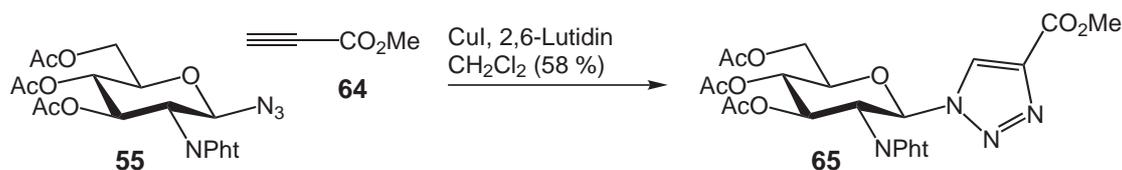
Im folgenden wurde mittels DC und LC/MS die Stabilität des Triazols **62** unter sauren Bedingungen untersucht. Nach 2.5 Stunden waren sowohl Triazol als auch Linker unter allen untersuchten Bedingungen (z. B. 80 % Essigsäure bei 70 °C, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA}$ 1:4:5) intakt. Nach 2.5 Tagen war bei dem ternären Lösungsmittelsystem eine Mischung aus Edukt, ein- und mehrfach deacetylierten Glycosyltriazolen entstanden (Edukt: 12 %, -1Ac: 29 %, -2Ac: 38 %, -3Ac: 21 % lt. Integration der UV-Spur bei 300 nm). Nur mit 10 % $p\text{-TosOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ in Acetonitril wurde ein Nebenprodukt beobachtet, welches im Laufverhalten während der HPLC etwas polarer als das Edukt erschien. Im folgenden wurde versucht, sowohl mit HF -Pyridin-Komplex das Fluorid, mit TMSN_3 und TfOH bzw. TMSOTf das Azid als auch mit Benzylalkohol und TMSOTf bzw. BF_3 -Ethyletherat das Benzylglycosid aus dem Triazol zu

generieren. Bei allen diesen Reaktionen war entweder kein Umsatz oder nur die Bildung polarerer Verbindungen im DC zu beobachten. So wurde mit HF-Pyridin-Komplex in Dichlormethan nach drei Tagen kräftigem Rühren bei Zimmertemperatur mittels ESI-MS neben sehr viel Edukt nur etwas debenzylisiertes Triazol nachgewiesen. Nach *Kunz* und *Bröder* sollte die Aktivierung durch Protonierung am N-3 des freien Triazols erfolgen (Schema 35). Eine stärkere Aktivierung sollte demzufolge durch Alkylierung möglich sein, weshalb die Glycosylierung von Benzylalkohol mit Methyltriflat als Aktivator wiederholt wurde. Das Produkt wurde mittels RP-SPE gereinigt und als das stabile 1-Glycosyl-3-methyltriazolium-Salz identifiziert **63** (Schema 43).



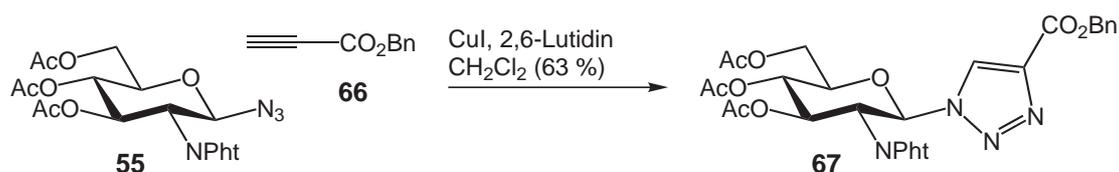
Schema 43: Methylierung des Triazols **62**.

Demzufolge konnte der vorgeschlagene Mechanismus nicht korrekt sein, sondern wurde vermutet, daß die freie Triazolcarbonsäure die aktivierbare Spezies sei. Dies wäre auch mit dem Befund von *Kunz* und *Bröder* im Einklang, daß das 1-glycosylierte 4,5-Dibenzoyltriazol nicht aktivierbar ist.^[112] Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden im folgenden Triazolcarbonsäurederivate synthetisiert. Da sich nur terminale Alkine Cu(I)-katalysiert zu Triazolen umsetzen lassen, wurde zunächst die Cycloaddition mit Propiolsäuremethylester **64** wiederholt.



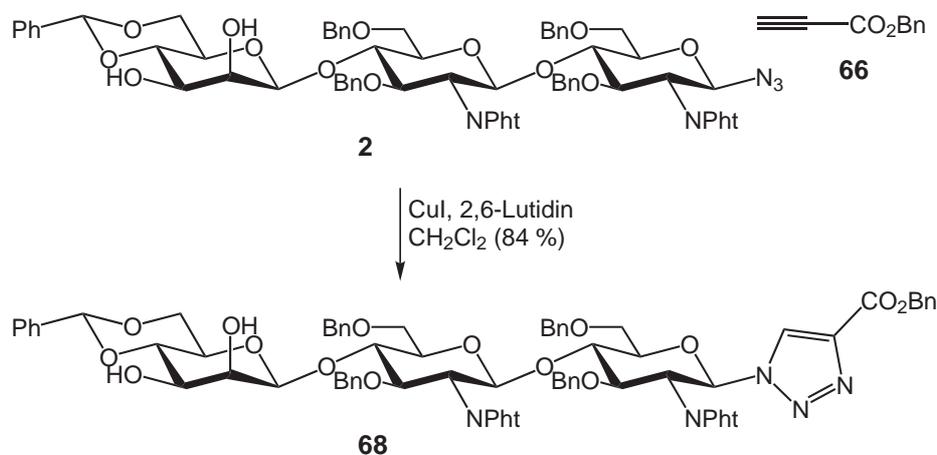
Schema 44: Synthese des Triazol-4-carbonsäuremethylesters **65**.

Bei dieser Reaktion fiel auf, daß sich die Reaktionszeit drastisch reduzierte. Dies dürfte auf die erhöhte Acidität des terminalen Alkinprotons zurückzuführen sein, wodurch sich das Cu-Acetylid leichter bildet. Mit diesem Triazol **65** konnte durch TMSOTf-Aktivierung ebenfalls weder das Azid noch das Benzylglycosid erhalten werden, was auf die Stabilität des Methylesters zurückgeführt wurde. Folglich wurde auf den mit HF abspaltbaren Benzylester ausgewichen und Propiolsäurebenzylester **66**^[118] sowie hieraus der Triazolcarbonsäurebenzylester **67** synthetisiert (Schema 45).



Schema 45: Synthese des benzylgeschützten Triazolcarbonsäureesters **67**.

Um zu untersuchen, ob diese Reaktion ebenfalls mit Oligosacchariden durchgeführt werden kann, wurde sie mit dem Core-Trisaccharid **2** wiederholt (Schema 46).

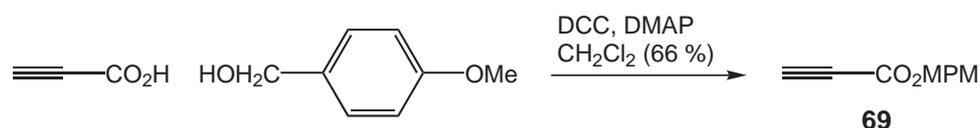


Schema 46: Synthese des benzylierten Triazolcarbonsäureesters **68** aus dem Trisaccharid **2**.

Auf diese Weise war sichergestellt, daß auch Oligosaccharide mit raumerfüllenden Schutzgruppen in sehr guten Ausbeuten Cu(I)-katalysiert zu Triazolen umgesetzt werden können.

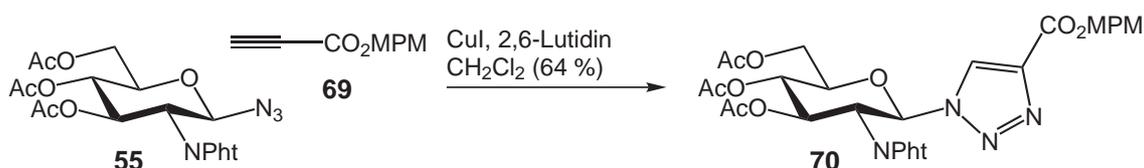
Im folgenden wurde die Überführung des Triazols **67** in das Glycosylfluorid mittels HF-Pyridin-Komplex untersucht. Hierbei konnte selbst nach mehreren Tagen keine Bildung des unpolaren Fluorids im DC beobachtet werden. Interessanterweise war unter diesen Bedingungen der Benzylester stabil, mittels ESI-MS konnten nur deacetylierte Nebenprodukte nachgewiesen werden. Nachdem die Stabilität des Benzylesters unter den Reaktionsbedin-

gungen zu groß war, wurde das methoxybenzylierte Analogon synthetisiert. Hierzu wurde das Cs-Salz der Propiolsäure mit MPM-Cl im Zuge einer S_N2 -Reaktion unter Zusatz von KI umgesetzt.^[119] Nachdem die Ausbeute mit 28 % sehr unbefriedigend war, wurde die Acylierung Carbodiimid-vermittelt durchgeführt, wodurch der Ester **69** in einer Ausbeute von 66 % zugänglich war (Schema 47).



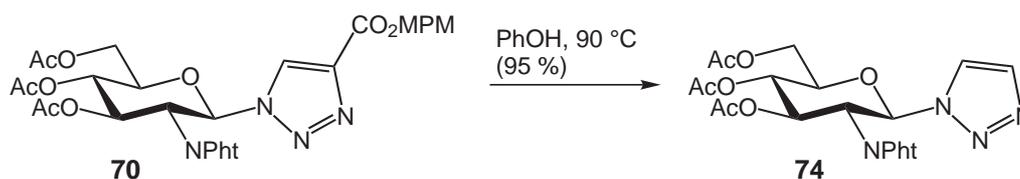
Schema 47: Synthese von Propiolsäure-(4-methoxybenzyl-)ester **69**.

Hiermit konnte analog zu dem Benzylester **67** das MPM-geschützte Triazol **70** synthetisiert werden (Schema 48).



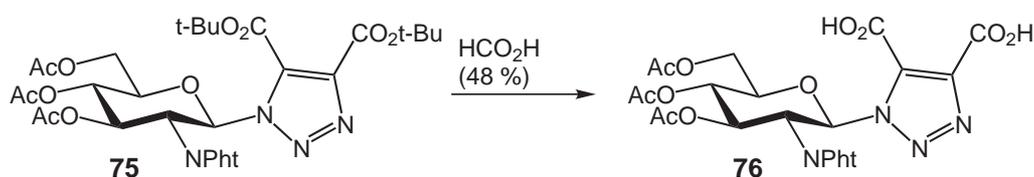
Schema 48: Synthese des MPM-geschützten Glycosyltriaazolcarbonsäureesters **70**.

Durch Behandlung des Triazols **70** mit HF-Pyridin-Komplex in Dichlormethan bei Zimmertemperatur wurde nach 74 Stunden mittels DC fast ausschließlich die Triazolcarbonsäure **71** und nur wenig Fluorid **72** beobachtet, was durch LC/MS bestätigt werden konnte. Demzufolge ist es zwar prinzipiell möglich, aus der Triazol-4-carbonsäure **71** das entsprechende Glycosylfluorid **73** zu generieren, jedoch wird selbst bei Zimmertemperatur nach langen Reaktionszeiten nur ein geringer Umsatz erzielt. Um den postulierten Mechanismus der Aktivierung von Glycosyltriazenen (vgl. S. 40) näher zu untersuchen, wurde das freie Triazol **74** synthetisiert. Nachdem MPM-Ester durch Phenol in der Wärme gespalten werden^[120] und Triazolcarbonsäuren thermisch decarboxyliert werden können,^[121] wurde dies ausgehend von **70** in einem Schritt versucht (Schema 49).



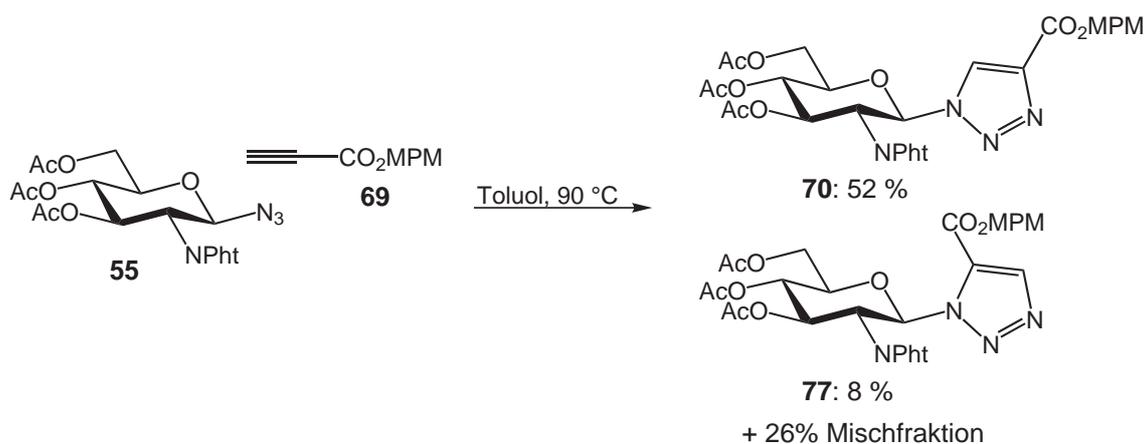
Schema 49: Entschützung und Decarboxylierung von **70**.

Nach 30 Minuten bei 90 °C war das Edukt **70** vollständig verbraucht, die Decarboxylierung benötigte jedoch weitere 36 Stunden. Diese Reaktionsbedingungen machten den von *Kunz* und *Bröder* für die Fluoridbildung postulierten Mechanismus noch unwahrscheinlicher, da die hierfür notwendige Decarboxylierung unter den von ihnen verwendeten Bedingungen (16 Stunden bei 5 °C) ausgeschlossen werden kann. Durch Synthese von **74** war es auch direkt möglich, das freie Triazol als Zwischenstufe auszuschließen: mit HF-Pyridin konnte weder in Dichlormethan noch lösungsmittelfrei durch DC die Bildung des Glycosylfluorids **72** beobachtet werden, es entstanden nur teilweise deacetylierte Nebenprodukte. Ähnlich verhielt sich der MPM-geschützte Triazol-4-carbonsäureester **70**, woraus geschlossen wurde, daß die für die Aktivierung notwendige Struktur die Triazol-5-carbonsäure bzw. -4,5-dicarbonsäure darstellt. Um dies zu überprüfen, wurde der Triazol-4,5-dicarbonsäure-di-*tert*-butylester **75** synthetisiert^[112] und durch Auflösen in Ameisensäure entschützt (Schema 50).^[122]



Schema 50: Entfernen der beiden *tert*-Butyl-Estergruppen.

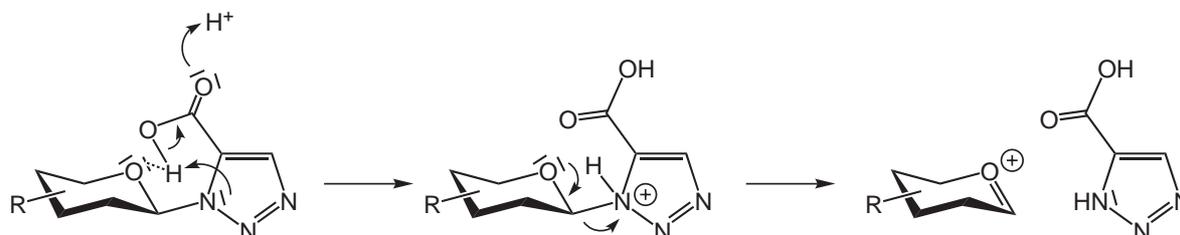
Um darüber hinaus auch ein Triazol-5-carbonsäurederivat zu erhalten, wurde die [3+2]-Cycloaddition des Glycosylazids **55** und des Propiolsäureesters **69** thermisch induziert,^[112] wodurch als Nebenprodukt der Triazol-5-carbonsäureester **77** entstand (Schema 51).



Schema 51: Thermisch induzierte [3+2]-Cycloaddition.

Mit dem Di-*tert*-butylester **75**, der Triazoldicarbonsäure **76** und dem MPM-geschützten Triazol-5-carbonsäureester **77** wurde untersucht, in welcher Geschwindigkeit mittels HF-

Pyridin-Komplex das Glycosylfluorid **72** synthetisiert werden kann. In Testreaktionen war mit allen drei untersuchten Triazolen bei 0 °C innerhalb von einer Stunde die Reaktion abgeschlossen. Auf diese Weise war die Triazol-5-carbonsäure als das entscheidende Strukturelement identifiziert. Wahrscheinlich ist die Aktivierung durch eine intramolekulare Protonierung des *N*-1 des Triazols möglich (Schema 52).



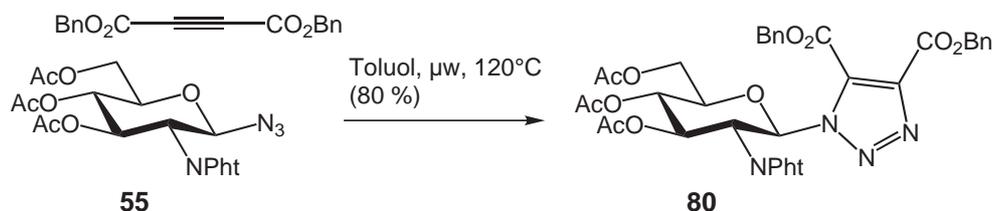
Schema 52: Mechanismus zur Aktivierung von Glycosyltriazol-5-carbonsäurederivaten.

Aufgrund des postulierten Mechanismus' wurde im folgenden eine Methode gesucht, mit der dieses Strukturelement effektiv aufgebaut werden kann. Die [3+2]-Cycloaddition eines terminalen Alkins kam hierfür nicht in Betracht, da mittels Cu(I)-Katalyse stets das 4-Isomer des Triazols entsteht^[116] und durch thermische Induktion in der Regel Mischungen erhalten werden. Die Verwendung von TMS-Propiolsäureestern, welche auch an der Festphase das gewünschte Substitutionsmuster bei thermisch induzierter Cycloaddition ergeben,^[123] besitzen gegenüber den bereits von *Kunz* und *Bröder* verwendeten symmetrischen Acetylendicarbonsäurediestern keine Vorteile, weshalb letztere im folgenden weiter untersucht wurden. Um jedoch die langen Reaktionszeiten zu vermeiden, wurde versucht, durch Mikrowellenbestrahlung diese Reaktion zu verbessern. Ausgangspunkt hierfür waren die mikrowellenbeschleunigten Synthesen von einfachen Triazolen.^[124] In der Zwischenzeit konnte durch *Fokin et al.*^[125] auch gezeigt werden, daß unter Mikrowellenbestrahlung 1,4-disubstituierte Triazole aus Alkylbromiden, Alkinen und Natriumazid mittels Cu(I) direkt in 10-15 Minuten darstellbar sind. In einer Testreaktion wurde Propiolsäure-di-*tert*-butylester mit dem Azid **55** in Toluol fünf Minuten mit 100 W bestrahlt. Das Produkt wurde mittels ESI-MS und ¹H-NMR charakterisiert, aufgrund der chemischen Verschiebung des Triazolprotons war hauptsächlich der Triazol-4-carbonsäureester **78** entstanden (Schema 53).



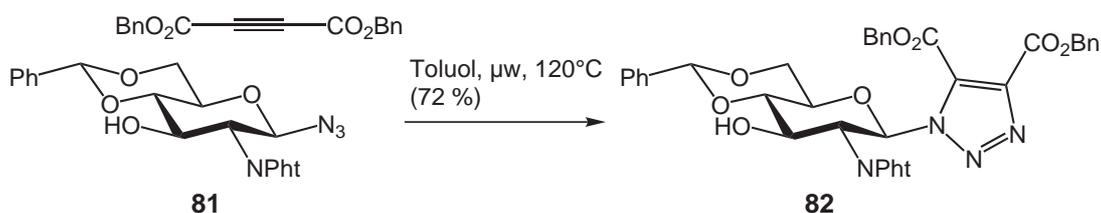
Schema 53: Testreaktion zur mikrowellenbeschleunigten Triazolsynthese.

Offenbar eliminierte durch die hohe thermische Belastung der Ester in Position 5 und decarboxylierte anschließend. Da *tert*-Butylester vermutlich unter Glycosylierungsbedingungen ebenfalls nicht stabil sein dürften, wurde im folgenden Propiolsäuredibenzylester **79**^[126] eingesetzt. Mit diesem konnte in guter Ausbeute mittels Mikrowellenbestrahlung in nur 50 Minuten das gewünschte Triazol **80** erhalten werden (Schema 54).



Schema 54: Synthese des Triazolidicarbonyl dibenzylesters **80** mittels Mikrowellenbestrahlung.

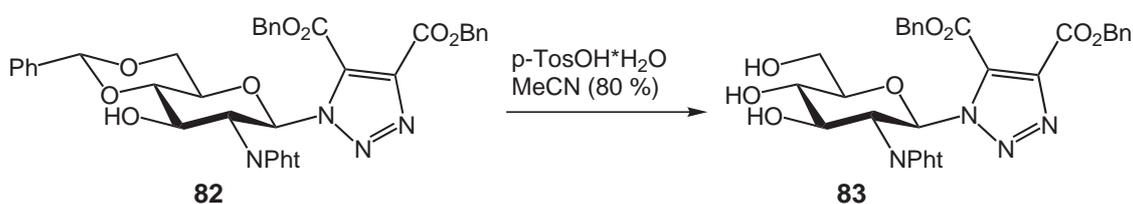
Nachdem mikrowellenbeschleunigte Reaktionen an der Festphase bereits mit Erfolg durchgeführt wurden,^[127] dürfte sich diese Triazolbildung für die Anknüpfung an einen polymeren Träger besonders eignen, da der wertvolle Kohlenhydratbaustein im Überschuss eingesetzt werden kann, ohne daß er durch Nebenreaktionen verbraucht wird, und sich nicht vollständig umgesetztes Alkin bei den Folgereaktionen inert verhält. Um die Stabilität der weiteren im Core-Trisaccharid **2** vorhandenen funktionellen Gruppen bei dieser Reaktion sicherzustellen, wurde darüber hinaus das benzyliden-geschützte Glycosylazid **81** unter diesen Bedingungen umgesetzt. Hierbei konnte das gewünschte Triazol **82** in einer Ausbeute von 72 % gewonnen werden (Schema 55).



Schema 55: Triazolsynthese mit dem benzyliden-geschützten Glycosylazid **81**.

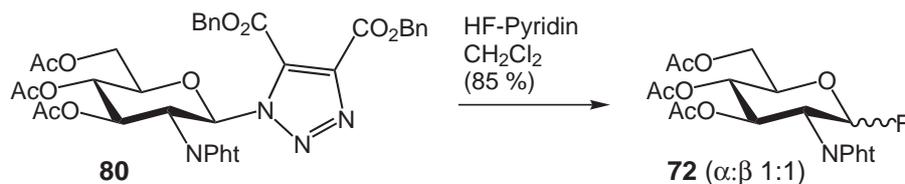
Die Reaktion wurde wiederholt, wobei das Alkin in einem vier- anstatt zweifachen Überschuss eingesetzt wurde, jedoch sank hierbei die Ausbeute auf 44 %. Mit dem Triazol **82** konnte die hydrolytische Entfernung des Benzylidenacetals untersucht werden, da dies als eine problematische Reaktion bei der Synthese von größeren *N*-Glycanen angesehen wurde. Deshalb wurde das Acetal **82** in Acetonitril mit *p*-Toluolsulfonsäure Monohydrat versetzt und

nach 15 Minuten neutralisiert. Auf diese Weise konnte das Triol **83** in 80 % Ausbeute dargestellt werden (Schema 56), ohne daß das Triazol angegriffen wurde.



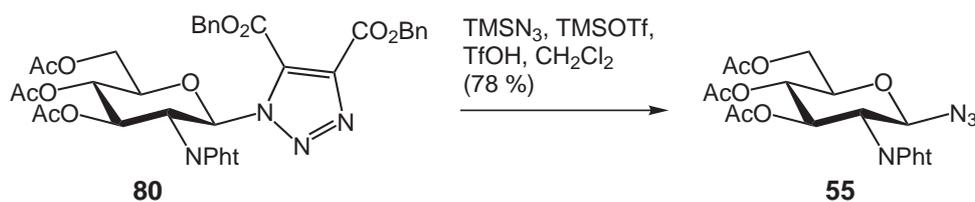
Schema 56: Hydrolytische Entfernung des Benzylidenacetals.

Da somit das gewünschte Substitutionsmuster am Triazol aufgebaut werden konnte und eine ausreichende Stabilität des Triazols unter sauren Bedingungen nachgewiesen war, wurde untersucht, unter welchen Bedingungen aus dem Triazol **80** ein Fluorid dargestellt werden kann. Durch HF-Pyridin-Komplex konnte –wie aus dem *tert*-Butylester **75**^[112] in einer zwei-phasigen Reaktion in Dichlormethan problemlos das Fluorid **72** erhalten werden (Schema 57).



Schema 57: Umwandlung des Triazols **80** in das Glycosylfluorid **72**.

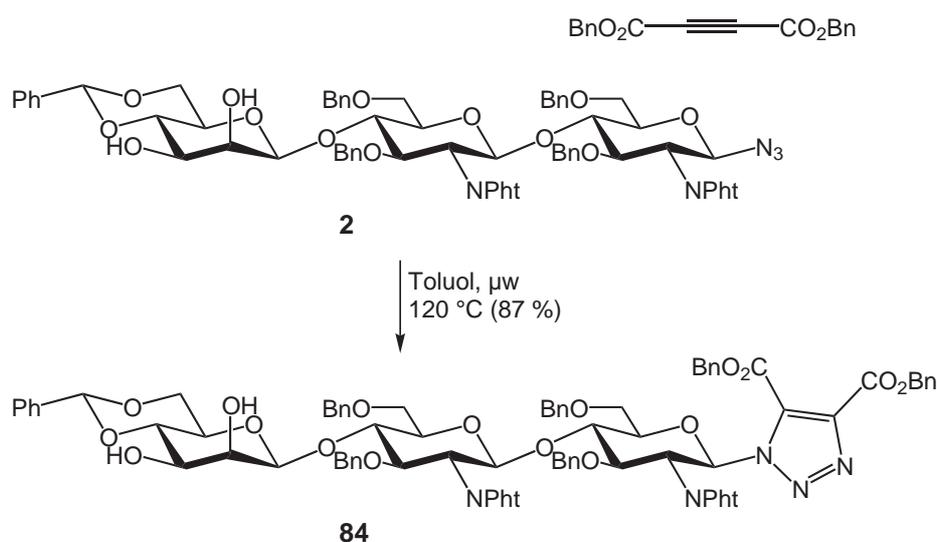
Nachdem sich aus dem Di-*tert*-butylester **75** nicht nur das Glycosylfluorid **72** darstellen läßt, sondern dieser auch für Glycosylierungen von verschiedenen Alkoholen einsetzbar ist,^[111] wurde versucht, direkt aus dem Triazol **80** das Azid **55** zu regenerieren. Dies würde die Möglichkeit bieten, die Triazolbildung für eine Verankerung an der Festphase und die Regeneration des Azids als Abspaltungsreaktion zu nutzen. Hierzu wurde das Triazol **80** zunächst in Dichlormethan mit fünf Äquivalenten TMSN₃ versetzt und mittels zwei Äquivalenten TMSOTf aktiviert. Unter diesen Bedingungen war selbst nach 24 Stunden kein Umsatz zu beobachten, weshalb zwei Äquivalente TfOH zugegeben wurden. Dies führte lt. DC zu vollständigem Umsatz innerhalb einer Stunde (Schema 58).



Schema 58: Umsatz des Triazols **80** zum Glycosylazid **55**.

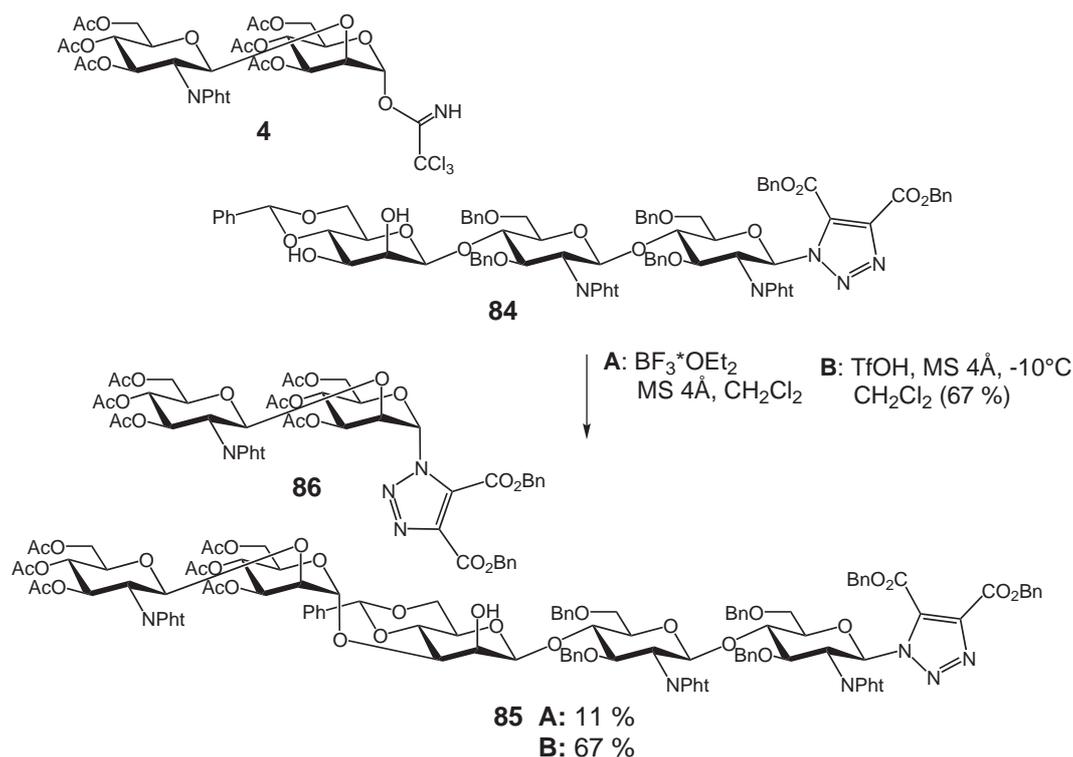
Weitere Experimente zeigten, daß mit TfOH alleine für einen vollständigen Umsatz vier Äquivalente notwendig sind. Um zu untersuchen, ob durch Stickstoffwasserstoffsäure alleine diese Reaktion möglich ist, wurde das Triazol **80** in einer Lösung von HN_3 in Dichlormethan aufgenommen. Es wurde aber selbst nach 72 Stunden keine Reaktion lt. DC beobachtet. Um auszuschließen, daß die Stabilität der Schutzgruppen die Reaktion verhinderte, wurden sowohl der Di-*tert*-Butylester **75** als auch die freie Dicarbonsäure **76** ebenfalls mit dieser Lösung versetzt. Selbst bei der freien Säure war nach 18 Stunden keine Reaktion mittels DC zu beobachten, durch Zusatz von fünf Äquivalenten TfOH war die Reaktion innerhalb weniger Sekunden abgeschlossen. Dies zeigt, daß eine Aktivierung der Triazol-5-carbonsäure erst unter stark sauren Bedingungen möglich ist.

Um die Eignung von glycosylierten Dibenzyltriazoldicarboxylaten als Akzeptoren in Glycosylierungen zu untersuchen, wurde das Core-Trisaccharid **2** in das entsprechende Triazol **84** überführt, was in der sehr guten Ausbeute von 87 % gelang (Schema 59).



Schema 59: Synthese des Triazols **84** aus dem Core-Trisaccharid **2**.

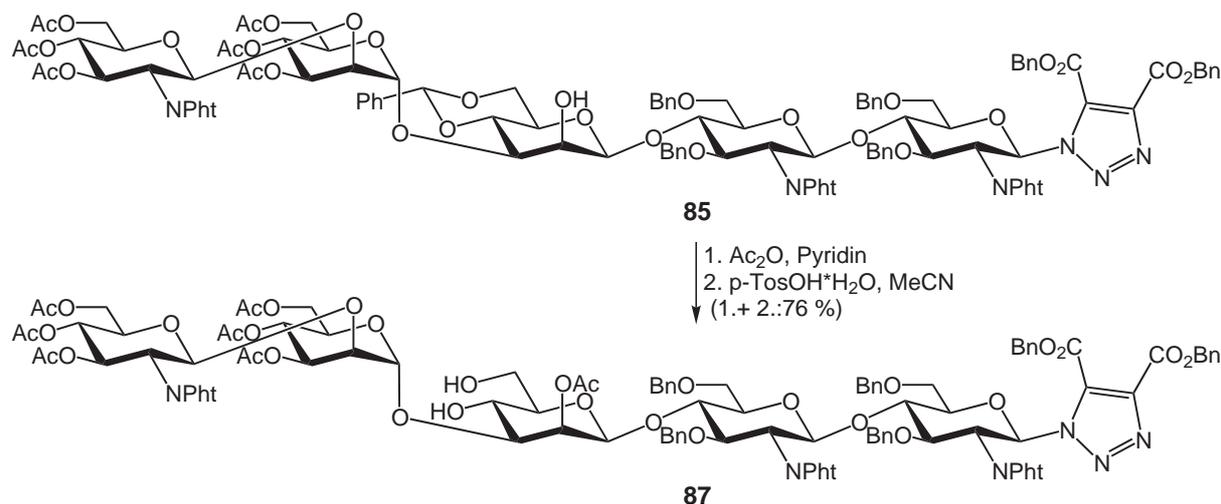
Das Pentasaccharid **85** sollte durch eine regioselektive Glycosylierung der 3-Hydroxyfunktion des Trisaccharids **84** erhältlich sein. Es wurden die Bedingungen^[166] der analogen Reaktion mit dem Akzeptor **2** verwendet, wobei das gewünschte Produkt **85** nur in 11 % Ausbeute isoliert werden konnte (Schema 60).



*Schema 60: Synthese des Pentasaccharids **85** mit Aglycontransfer als Nebenreaktion.*

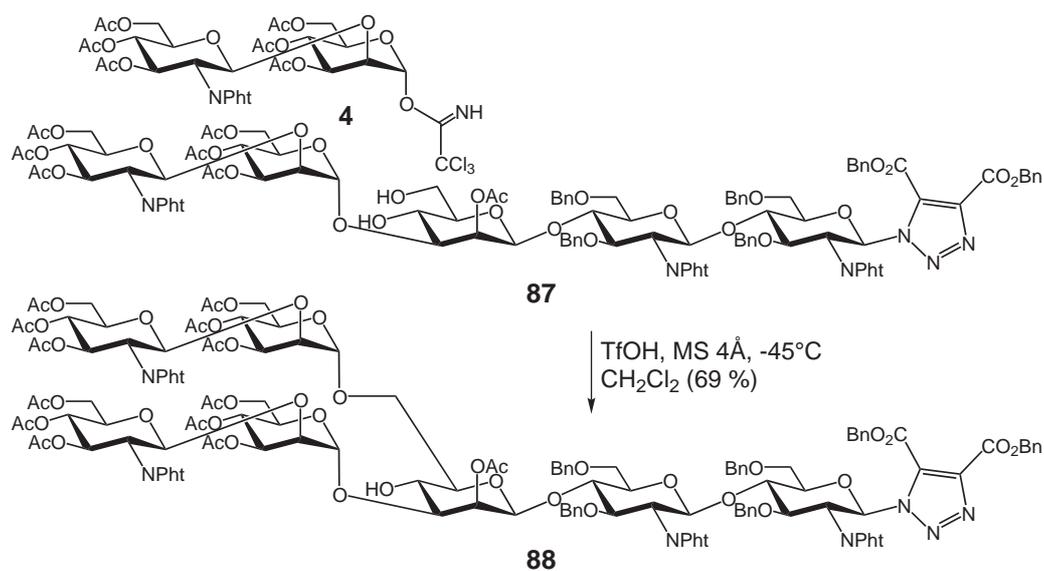
Bei der Untersuchung der Nebenprodukte fiel auf, daß ein Aglycontransfer stattgefunden haben mußte, da eine Verbindung im ESI-MS das entsprechende Molekulargewicht zeigte. Dieses Phänomen war bisher vor allem von Thio-^[128] und Alkylglycosiden^[129,162] als Akzeptoren bekannt. Untersuchungen zur Vermeidung dieser Reaktion zeigten, daß neben Temperatur,^[130a] Aktivator und Lösungsmittel^[128b] vor allem elektronische Faktoren entscheiden,^[130] ob der elektrophile Angriff des Glycosylkations am Schwefelatom oder an der freien Hydroxylgruppe stattfindet. Nachdem jedoch der Austausch der Benzylgruppen des Akzeptors durch elektronenziehende Schutzgruppen nicht möglich war, wurde versucht, durch Veränderungen der Reaktionsbedingungen diese Nebenreaktion zu unterdrücken. Durch die Variation des Aktivators (BF_3 -Ethyletherat bzw. Brönstedt-Säure TfOH) und der Temperatur zeigte sich, daß durch BF_3 -Ethyletherat der Aglycon-Transfer stark gefördert wird und dieser durch tiefere Temperatur sowie der Verwendung von Molekularsieb weitestgehend unterdrückt werden kann. Portionsweise Zugabe und Verwendung eines geringeren Überschusses des Trichloracetimidats konnten die Ausbeute nicht verbessern. Möglicherweise könnte diese Nebenreaktion an der Festphase eine weit geringere Rolle spielen, da der Zugang des Glycosylkations zum Triazol durch das Harz sterisch erschwert sein dürfte. Die Ausbeute wurde insgesamt auf 67 % verbessert, was im Bereich der mit dem entsprechenden Azid-Baustein erzielten liegt (73 %).^[29]

Nach erfolgreicher Glycosylierung wurde das Pentasaccharid **85** durch Acetylierung und nachfolgender saurer Hydrolyse des Benzylidenacetals in das Diol **87** überführt (Schema 61). Wie erwartet konnten die Bedingungen der analogen Azidoverbindung verwendet und eine Ausbeute von 76 % realisiert werden, welche nur unwesentlich unter der für diese beschriebenen liegt (84 %).^[166]



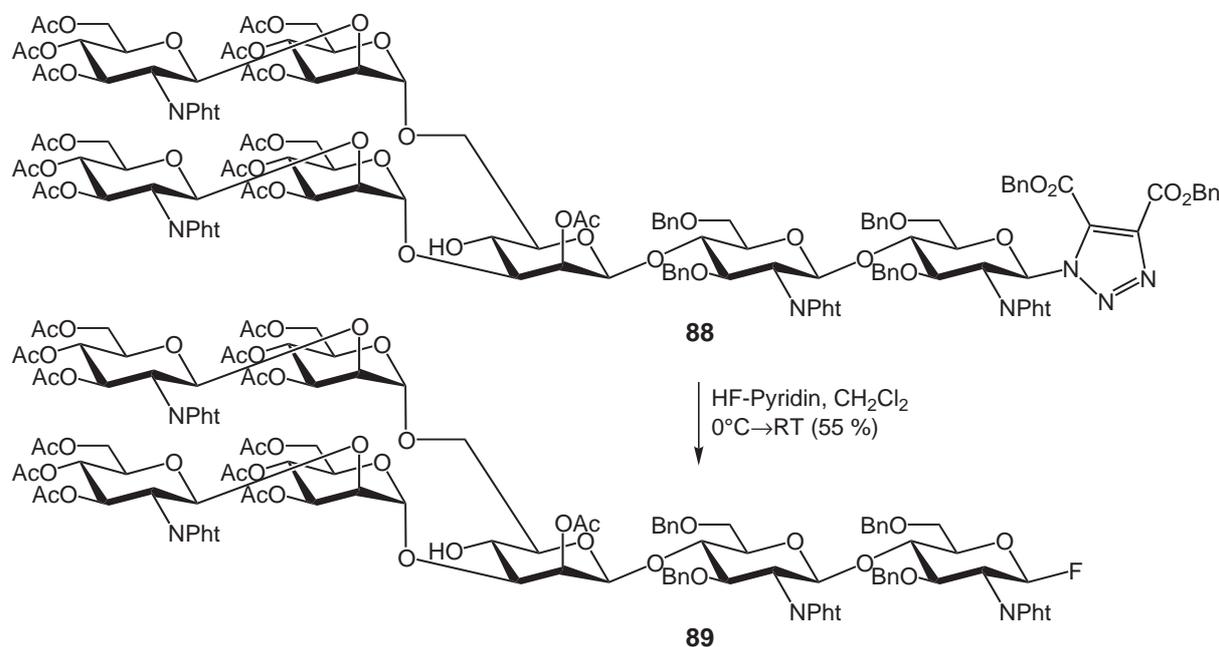
Schema 61: Entschützen des Pentasaccharids **85** zum Diol **87**.

Auf die Glycosylierung zum Heptasaccharid **88** wurden die Bedingungen der Synthese des Pentasaccharids **85** übertragen, wobei die Temperatur auf $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ gesenkt wurde.^[29] Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 69 % isoliert, was wiederum in der Größenordnung der analogen Azidoverbindung liegt (73 %).^[29]



Schema 62: Synthese des Heptasaccharids **88**.

Aglycontransfer wurde nicht beobachtet, was durch die verbesserte Zugänglichkeit der primären Hydroxylfunktion erklärt werden kann. Abschließend wurde versucht, das Heptasaccharid-Triazol **88** in das entsprechende Fluorid **89** zu konvertieren (Schema 62).



Schema 63: Umwandlung des Glycosyltriazols **88** in das entsprechende Fluorid **89**.

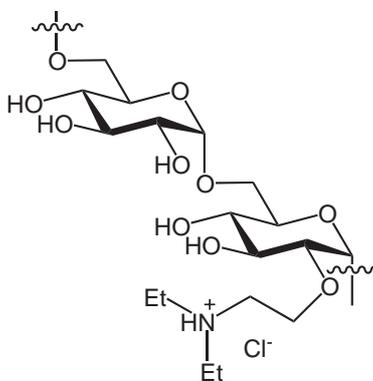
Hierdurch sollte überprüft werden, ob sich das Heptasaccharid von einem Harz abspalten läßt, ohne daß die glycosidischen Bindungen angegriffen werden. Darüber hinaus würde das Fluorid einen universellen Donor für weitere Umsetzungen darstellen. Diese Reaktion wurde unter den literaturbeschriebenen zweiphasigen Bedingungen in Dichlormethan und HF-Pyridin durchgeführt. Die Reaktion läßt sich mittels DC nur sehr schwer verfolgen, weshalb sich die Optimierung schwierig gestaltete. So wurde im Rohprodukt mittels LC/MS neben 61 % des gewünschten Fluorids **89** auch 12 % des einfach debenzylierten Produktes gefunden. Möglicherweise läßt sich die Ausbeute durch längere Reaktionszeiten bei 0 °C noch weiter verbessern bzw. im Zuge der Abspaltung vom Triazol auch die simultane Entfernung der vier Benzylschutzgruppen erreichen.

Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß das glycosylierte Dibenzyltriazoldicarboxylat auch als Akzeptor in Glycosylierungen eingesetzt werden kann und auch gängige Schutzgruppenoperationen möglich sind. Am Ende der Synthese kann das Triazol in das Glycosylfluorid umgewandelt werden, so daß ein universeller Donor zur Verfügung steht. Dementsprechend könnte zukünftig eine effiziente Festphasensynthese von Oligosacchariden möglich sein, insbesondere sollte sich hiermit die im Arbeitskreis entwickelte Baukastensynthese von *N*-Glycanen einfach auf die Festphase übertragen lassen.

4. Kohlenhydrat-PAMAM-Konjugate

4.1. Transfektion

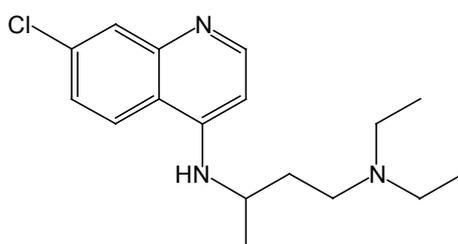
Unter Transfektion versteht man das Einschleusen fremder DNA in Zellen,^[131] wobei zwischen transienter und stabiler Transfektion unterschieden wird. Während sich im ersten Fall Genaktivität ausschließlich direkt nach dem Einbringen der DNA nachweisen läßt, wird bei letzterer das Gen dauerhaft in das Erbgut eingebaut. Da eine Transfektion ohne Hilfsmittel nur in Spezialfällen möglich ist,^[132] war die Entwicklung physikalischer, viraler und chemischer Techniken nötig. Zu den ersten gehört die Elektroporation,^[133] bei der durch einen kurzen Spannungsstoß die Zellmembran perforiert und so eine Diffusion der DNA in die Zellen ermöglicht wird. Weiterhin kann DNA mittels Mikrobullistik^[134] durch mit DNA beladene Goldpartikel in die zu transfizierenden Zellen geschossen werden oder auch direkt über eine Kapillare in den Nucleus injiziert werden.^[135] Eine weit größere Bedeutung haben jedoch virale Techniken: hierbei wird die gewünschte DNA in Viren eingebaut und durch diese in die Zielzellen eingeschleust. Der Einsatz von Viren als natürliche Genfähren verläuft meist erfolgreich, da diese per se schon durch die Evolution für diese Aufgabe optimiert wurden. Ihr großer Nachteil ist jedoch, daß die Größe der einzubringenden DNA durch das Volumen des Virus limitiert wird, diese Technik zudem zeitaufwendig ist und bei *in vivo* Anwendungen die Immunogenität der Viren berücksichtigt werden muß.^[136,137] Deshalb wurden verschiedene chemische Systeme entwickelt, die inzwischen mit großem Erfolg *in vitro* und *in vivo* eingesetzt werden. Die wahrscheinlich älteste noch gebräuchliche Technik ist die Diethylaminoethyl(DEAE)-Dextran-Komplexierung (Schema 63),^[138] welche durch einfache Handhabung und verlässliche Ergebnisse^[131] besticht.



Schema 64: Ausschnitt aus DEAE-Dextran; das Polymer besitzt ein durchschnittliches Molekulargewicht von über 500 000 und ist im Durchschnitt an jeder 2. Glucoseeinheit modifiziert.

In einem Medium mit niedriger Serumkonzentration wird die DNA mit dem Dextran gemischt und diese Lösung auf die Zellen appliziert. Via Endocytose werden die Komplexe von den Zellen aufgenommen. Ähnlich einfach ist die Calciumphosphat-Methode,^[139] bei der die DNA in Phosphatpuffer gelöst wird. Durch Zugabe einer CaCl_2 -Lösung bildet sich ein Calciumphosphat/DNA-Niederschlag, der direkt auf die Zellen aufgetragen wird. Eine sehr moderne Methode stellen kationische Liposome^[140] dar. Diese werden entweder aus einem einzelnen kationischen Amphiphil (sog. Cytofektin) oder aus einem Gemisch eines Cytofektins mit einem neutralen Lipid gebildet. Die positiv geladenen Liposomen wechselwirken mit der negativ geladenen Nucleinsäure und bilden so einen Komplex. Dieser wird wahrscheinlich nicht über ein Verschmelzen der Lipiddoppelschicht mit den Liposomen, sondern über Endocytose in die Zelle aufgenommen.

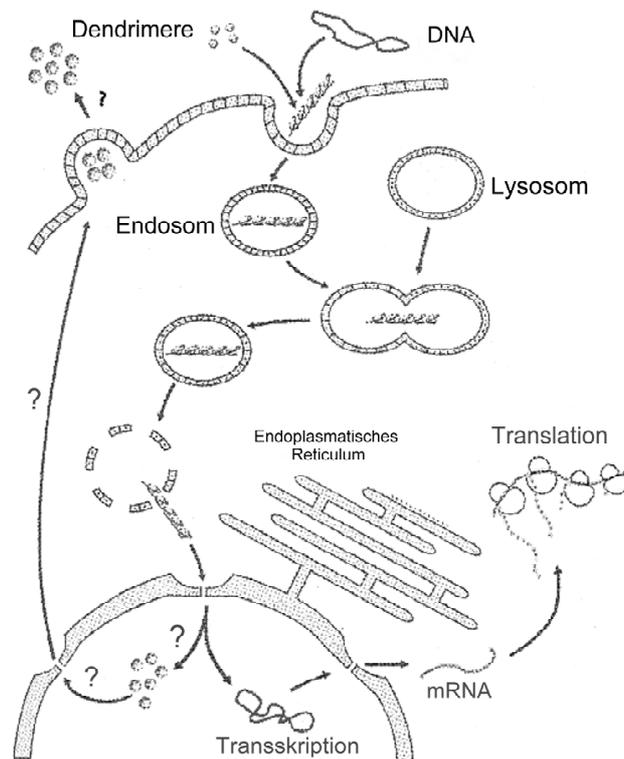
Der DEAE-Dextran-Methode verwandt ist die Verwendung anderer kationischer Polymere,^[141] wie Polyethylenimin (PEI),^[142] Polylysin (PL)^[143,144] oder PAMAM-Dendrimere.^[145] Auch diese bilden mit Nucleinsäuren Komplexe, welche von den Zellen via Endocytose aufgenommen werden. Die genannten Systeme sind inzwischen gut untersucht: anhand von Polylysin konnte z. B. gezeigt werden,^[146] daß für den Transfektionserfolg eine bestimmte Molekülgröße –in diesem Fall ein 18mer– nötig ist. Die Transfektionseffizienz wird durch Zugabe von Chloroquin (Schema 65) erhöht,^[147] einem Amin, das den sauren pH-Wert in Lysosomen bzw. Endosomen abpuffert und diese destabilisiert. So wird der Abbau der DNA verhindert und deren Freisetzung erleichtert. Der große Nachteil liegt jedoch darin, daß es aufgrund seiner Toxizität nicht allgemein verwendet werden kann.



Schema 65: Chloroquin.

Im Gegensatz dazu wurde bei den PAMAM-Dendrimern festgestellt,^[145] daß durch lysosomotrope Agenzien wie Chloroquin ihre Effizienz nicht beeinflusst wird und die Überlebensrate der untersuchten Zellen im Vergleich zu Polylysin wesentlich höher liegt. Während Polylysin nur primäre Aminogruppen mit einem pK_A von 9-10 besitzt und somit erst ab einem pH oberhalb von 8 eine Pufferwirkung erreicht, können PAMAM-Dendrimere,

deren innere tertiäre bzw. äußere primäre Aminofunktionen pK_A -Werte von 3.9 bzw. 6.9 aufweisen, über einen breiten pH-Bereich puffern. Dies hat vermutlich zur Folge, daß in den sauren Lysosomen die Dendrimere stärker protoniert sind und durch die erhöhte elektrostatische Abstoßung der Äste quellen. Die resultierende Destabilisierung des Kompartiments führt zur Freisetzung der DNA-Dendrimere-Komplexe (Schema 66).

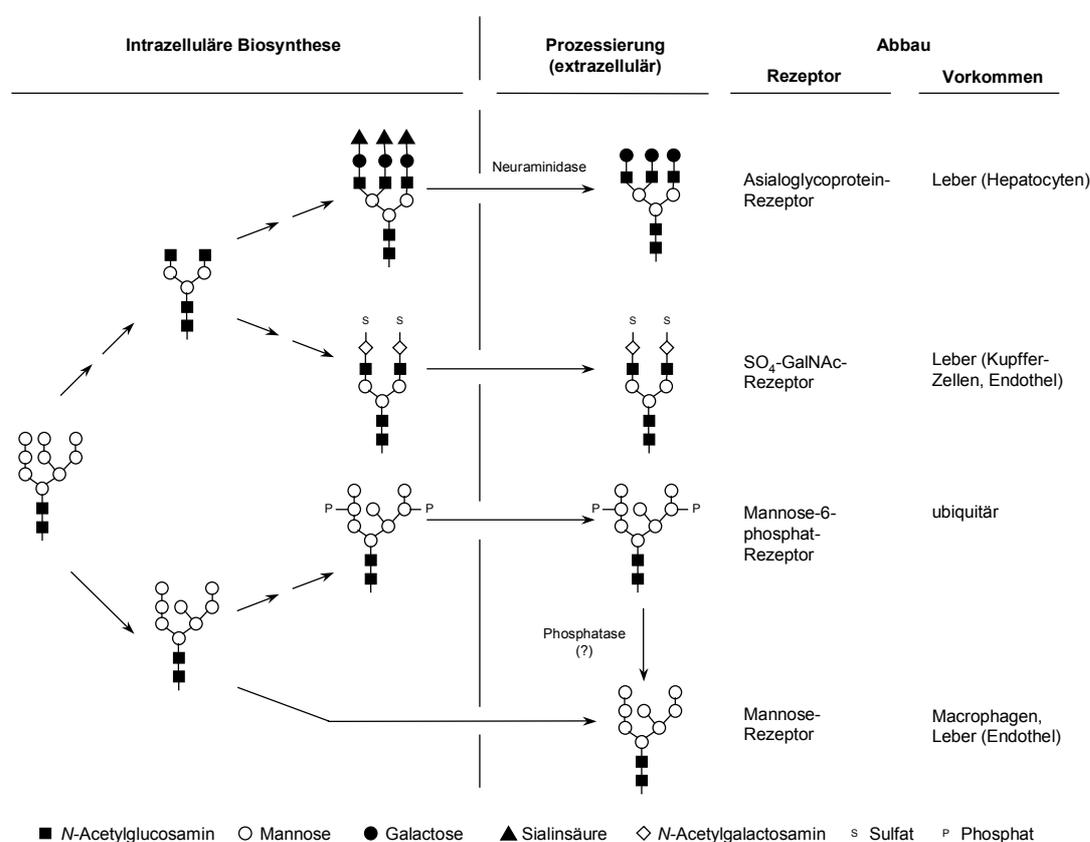


Schema 66: Hypothetischer Ablauf der Transfektion.^[136]

Diese Ergebnisse konnten 1996 noch verbessert werden,^[148] indem die Dendrimere solvolytisch zum Teil wieder abgebaut wurden. Dadurch erhöht sich die Flexibilität der Arme und die Effizienz bei der Transfektion wird um zwei bis drei Größenordnungen gesteigert.^[136] Inzwischen bietet Qiagen diese Dendrimere unter dem Handelsnamen SuperFectTM bzw. PolyFectTM an.

Auf der Oberfläche eukaryotischer Zellen ist eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren lokalisiert, die verschiedenste Liganden erkennen. Deren Vielfalt reicht von Peptiden und Proteinen, wie Insulin, über Kohlenhydratreste von Glycoproteinen bis hin zu kleinen Molekülen, wie z. B. Acetylcholin. Soll in einem Organismus nur ein bestimmtes Organ oder eine bestimmte Zellart transfiziert werden, so bieten sich diese Oberflächenstrukturen als Selektionskriterium an. Dies geschieht auch bei natürlichen Prozessen, so bindet beispielsweise das gp-120-Hüllprotein des HIV mit Erkennungsstrukturen spezifisch an den

CD-4-Rezeptor der Wirtszellen. Auch für verschiedene *N*-Glycane sind Rezeptoren beschrieben (Schema 67). Einer der bekanntesten ist der Asialoglycoprotein-Rezeptor (ASGP-R),^[149] welcher nur in den parenchymalen Hepatocyten exprimiert wird. Dies zeichnet ihn z. B. gegenüber dem Transferrinrezeptor aus, der auf sehr vielen Zelltypen lokalisiert ist (z. B. Leberzellen oder hämatopoietischen Blutstammzellen). Der ASGP-R erkennt Glycoproteine, welchen durch Neuraminidasen auf der Oberfläche des Endothels der Blutgefäße die terminalen Sialinsäuren entfernt wurden. Die Galactose am nichtreduzierenden Ende des Oligosaccharids wird erkannt und der ASGP-R entfernt somit das Glycoprotein durch Endocytose aus dem Blut.



Schema 67: Übersicht über verschiedene Glycoprotein-Rezeptoren.^[150]

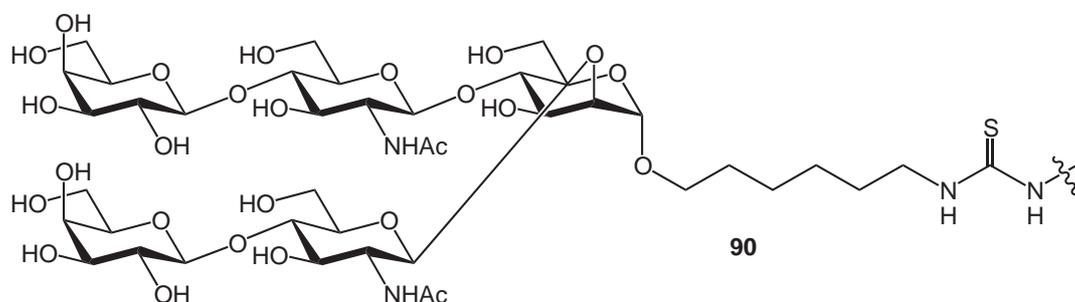
Um diesen Rezeptor für eine Transfektion zu nutzen, koppelten *Wu* und *Wu*^[144] desialyliertes Orosomucoid an PL und konnten auf diese Weise Hepatocyten mit dem ASGP-R im Gegensatz zu Leberzellen ohne diesen Rezeptor transfizieren. Sie übertrugen diese *in vitro*-Ergebnisse auf Ratten,^[151] welchen sie ein Plasmid, das ein Gen für humanes Serumalbumin trug, mit diesem Transfektionssystem injizierten. Nach 72 Stunden war humanes Serumalbumin im Serum der Ratten nachweisbar, was über einen Zeitraum von vier Wochen anhält. Durch reduktive Aminierung von Lactose mit Lysin synthetisierten *E. Wagner*

et al.^[152] einen künstlichen Liganden für diesen Rezeptor, welchen sie ebenfalls an PL koppelten. Das Markergen codierte in diesem Fall für Luciferase, was eine wesentlich einfachere Detektion der Genaktivität ermöglichte. Mit diesem Konstrukt transfizierten sie Hepatocyten, hierbei war allerdings der Zusatz von Chloroquin bzw. Adenoviruspartikeln nötig, um eine hohe Effizienz zu erreichen. Dabei zeigte der artifizielle Ligand eine ähnliche Wirksamkeit wie Asialofetuin oder Transferrin. In dieser Arbeit wurde jedoch nicht die Wirksamkeit der Transfektion bei anderen Zelllinien untersucht. Bei PEI wurde hingegen gezeigt,^[153] daß durch die gleiche Modifikation die Transfektionseffizienz für Hepatocyten im Gegensatz zu Fibroblasten um vier bis fünf Zehnerpotenzen gesteigert werden konnte. Durch reduktive Aminierung mit Glucose änderte sie sich hingegen kaum. Auch zeigte sich in diesem Experiment der Vorteil von PEI gegenüber PL, da weder Chloroquin noch Adenoviruspartikel notwendig waren, um eine effektive Transfektion zu erreichen. Interessanterweise wurde in diesem Experiment durch Modifikation mit Asialofetuin in einer Zelllinie ein kontraproduktiver Effekt erreicht. Als weitere Studien zu diesem Thema seien noch Transferrin-PL-Konjugate erwähnt,^[154] mit denen Erythroblasten effektiver transfiziert werden konnten als „normale“ Knochenmarkszellen, die keine Transferrinrezeptoren besitzen. Eine aktuellere Studie^[155] konnte zeigen, daß sich durch Anheften von Mannose an PEI die Transfektionseffizienz bei dendritischen Zellen (humanen und murinen) um das zehnfache steigern ließ. Die Transfektion ließ sich in diesem Fall durch Mannose-BSA-Konjugate kompetitiv hemmen, was die Beteiligung des Mannose-Rezeptors dieser Zellen an der DNA-Aufnahme zeigt. Eine weitere Steigerung der Effizienz wurde durch Zugabe von Adenoviruspartikeln erreicht, was teilweise den oben genannten Vorteilen von PEI widerspricht, da dieses System wenig Schwierigkeiten besitzen sollte, aus den Lysosomen zu entkommen. Es ist eher wahrscheinlich, daß die Steigerung durch die Möglichkeit hervorgerufen wurde, den normalen Infektionsweg des Virus zu wählen und so die DNA in die Zellen zu schleusen. Als Kontrolle wurden BM2-Myeloblasten aus Hühnern verwendet, die den Mannoserezeptor in weit geringerem Ausmaß exprimieren als die dendritischen Zellen. Diese ließen sich per se wesentlich besser transfizieren und zeigten auch eine verbesserte Transfizierbarkeit durch das Anheften von Mannose. Bei ihnen war die Verbesserung durch die Viruspartikel nur um den Faktor zehn möglich, während sie bei den dendritischen Zellen um ungefähr vier Größenordnungen gelang. Dies zeigt, wie schwierig die Wahl der verschiedenen Parameter der Experimente ist. Von der Arbeitsgruppe um *B. G. Davis*^[156] wurde kürzlich berichtet, daß es durch Glycosylierung eines intakten Virus möglich ist, dessen Spezifität neu zu programmieren. *Monsigny et al.*^[157] zeigten in einer Arbeit über

Mannose-PL-Konjugate mit Lungenzelllinien, daß die mit Fluorescein markierten Komplexe zwar sehr gut von den Zellen aufgenommen wurden, allerdings das Markergen so gut wie gar nicht exprimiert wurde. Dies unterstreicht wieder die Schwierigkeit der PL-Komplexe aus dem Lysosom zu entkommen. In der Arbeitsgruppe von *K. G. Rice* konnten schon 1995^[158] PL-Konjugate mit einem triantennären *N*-Glycan mit terminalen Galactoseresten synthetisiert werden. Mit diesem Undecasaccharidrest konnten die Transfektionsraten bei HepG2-Leberzellen um zwei Größenordnungen im Vergleich zu nicht modifiziertem oder durch Galactosidase verkürztem Glycosyl-PL erhöht werden. Die extrem starke Bindung dieses Liganden an den ASGP-R zeigte sich durch die Tatsache, daß die Transfektion selbst durch die Gegenwart von 100 mM Galactose nicht beeinflusst wurde. Auch in diesem Experiment wurde die Effizienz noch einmal durch die Zugabe von Chloroquin um zwei Zehnerpotenzen gesteigert. Um die Selektivität und *in vivo*-Tauglichkeit dieses Systems zu testen, wurde dieses mit ¹²⁵I markiert und es wurden Experimente an Mäusen durchgeführt.^[159] Dabei zeigte sich, daß fünf Minuten nach i. v. Injektion für alle getesteten Komplexe (mit und ohne Galactosetermini) der Großteil der Radioaktivität in der Leber nachweisbar war. Nach zwei Stunden war dort nur noch 7 % der Radioaktivität der markierten DNA zu finden, wodurch die sehr effektive Metabolisierung in der Leber demonstriert wird. Nähere Untersuchungen zeigten, daß sich die DNA Komplexe in der Leber zu 68 % in den Kupfferschen Zellen befanden und nur zu 32 % in den Hepatocyten. Um die unspezifische Aufnahme durch die Kupfferschen Zellen zu verringern (Erkennung der Komplexe aufgrund ihrer Ladung), wurden PL-Konjugate mit PEG bei der Komplexbildung zugegeben und die Komplexe durch Quervernetzung mit Glutaraldehyd stabilisiert. Auf diese Weise wurde erreicht, daß 80 % der Radioaktivität der Leber in den Hepatocyten zu finden war und nur noch 20 % in den Kupfferschen Zellen. Die Halbwertszeit in der Leber stieg aufgrund der Quervernetzung im besten Fall auf 4.7 Stunden. Das von dem Reporter gen codierte Protein konnte nach einer Woche nur im Serum der Mäuse nachgewiesen werden, die mit dem Galactose-tragenden Liganden transfiziert wurden, allerdings war dies nicht von Dauer. Um eine umgekehrte Selektivität zu erreichen, synthetisierte die gleiche Arbeitsgruppe ein PL-Konjugat mit einem mannosereichen *N*-Glycan (Man₉GlcNAc₂).^[160] Dies konnten sie erfolgreich einsetzen,^[161] um den Mannoserezeptor der Kupfferschen Zellen anzusprechen. Es war hierbei jedoch nötig, 50 mol% an glycosyliertem PL einzusetzen, um 80 % der Radioaktivität in den Kupfferschen Zellen zu finden. Bei dem galactosylierten PL reichten schon 2 mol% glycosyliertes PL und 98 % PEGyliertes PL aus um diesen Erfolg zu erreichen, was 14 Kohlenhydratresten pro 6.9 kb Plasmid entspricht.

4.2. Problemstellung

Obwohl an unterschiedlichen Transfektionssystemen bereits verschiedene Studien über rezeptorvermittelte Transfektion durch Kohlenhydratreste durchgeführt wurden, sind bisher noch keine Versuche mit glycosylierten PAMAM-Dendrimeren publiziert worden. Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit Kohlenhydrat-SuperFect™-Konjugate synthetisiert werden, um bei der Firma Qiagen an verschiedenen Zelllinien getestet zu werden. Als Kohlenhydratrest wurde ein Ausschnitt aus dem triantennären komplexen *N*-Glycan gewählt, welches schon bei PL mit Erfolg getestet wurde.^[159] Es sollte einen Spacer mit einer terminalen Aminogruppe tragen, über die es als Thioharnstoff kovalent an ein Polyamin geknüpft werden kann.



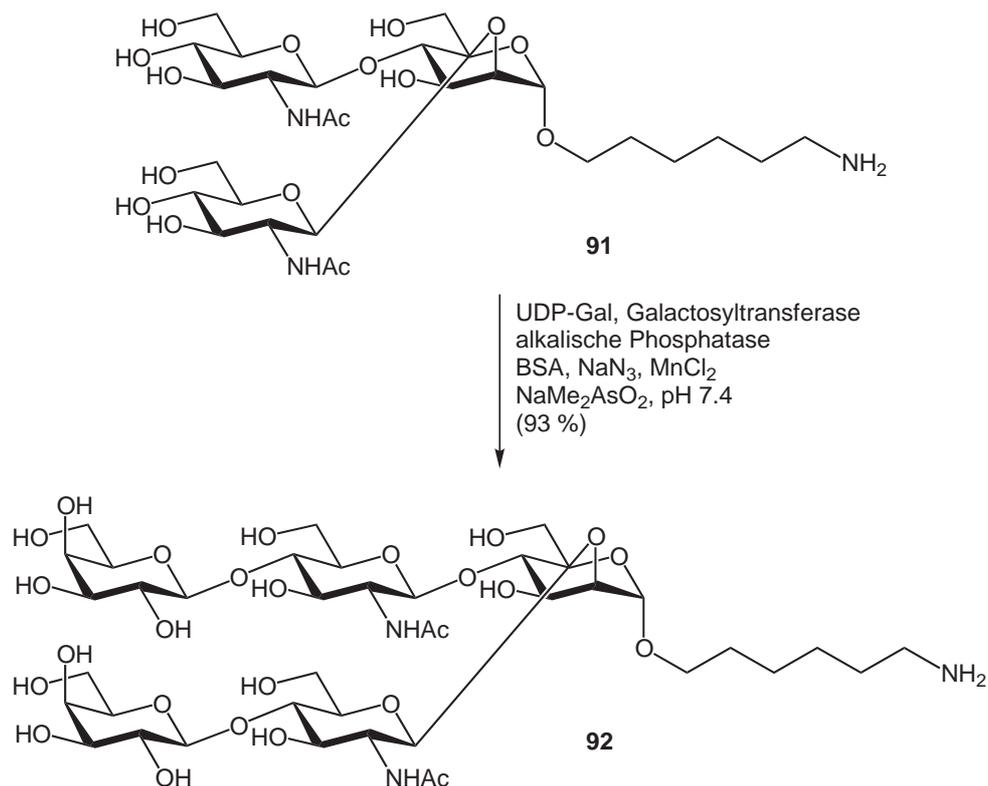
Schema 68: verzweigtes Pentasaccharid mit Galactosyltermini.

4.3. Synthese und Transfektionseffizienz von Kohlenhydrat-SuperFect™-Konjugaten

4.3.1. Synthese der Konjugate

Ausgehend von dem im Vorfeld^[162] synthetisierten Trisaccharid **91** konnten über eine enzymatische Galactosylierung^[163] 12.7 mg Pentasaccharid **92** in einer Ausbeute von 93 % erhalten und dies mittels NMR und ESI-MS charakterisiert werden. Die eingesetzte UDP-Gal besitzt in etwa die gleiche Größe wie das Produkt und stört somit bei der Reinigung mittels GFC. Die überschüssige UDP-Gal läßt sich jedoch durch hohe Konzentrationen von $MnCl_2$ zerstören und konnte auf diese Weise vor der Reinigung abgebaut werden.

Das so gewonnene Pentasaccharid **92** war durch die Aminofunktion entsprechend funktionalisiert, um über das Isothiocyanat **93** mit den SuperFect™-Polyaminen zum gewünschten thioharnstoffverbrückten Konjugat umgesetzt zu werden.^[164]



Schema 69: Galactosylierung des Trisaccharids **91**.

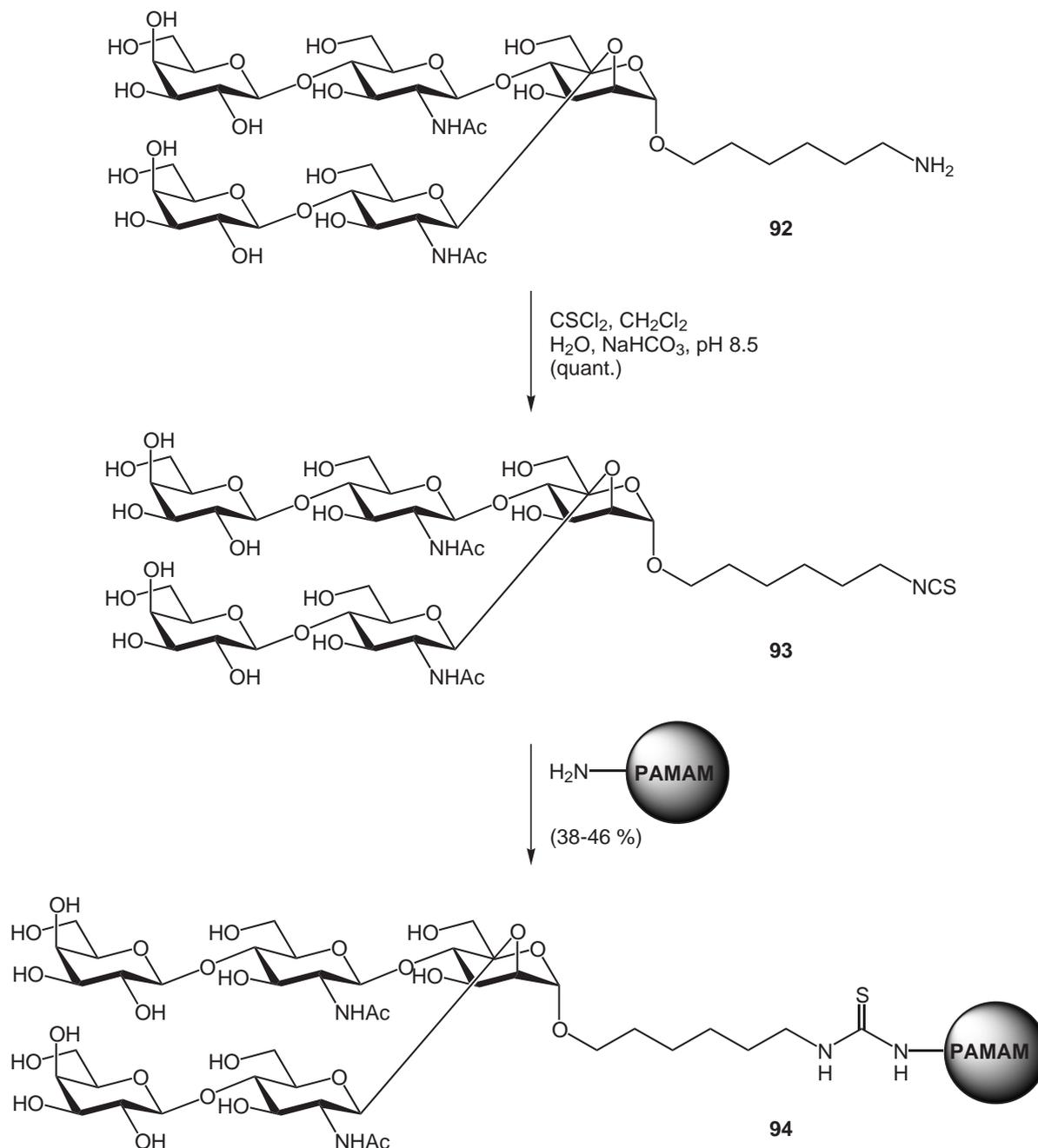
Es wurden drei verschiedene Konjugate unterschiedlicher Beladung synthetisiert, um den Einfluß des Beladungsgrads auf die Transfektionseigenschaften untersuchen zu können. Dabei sollten nicht zu viele Kohlenhydrateinheiten pro Dendrimer gebunden sein, da durch partielle Acetylierung der Aminofunktionen gezeigt wurde,^[148] daß bereits ab 10 % Derivatisierung die Transfektionseffizienz sinkt und bei 25 % Acetylierung nur noch 40 % beträgt. Hierzu wurden 3.5 mg Pentasaccharid **92** in schwach basischer Lösung zum Isothiocyanat **93** umgesetzt, das in unterschiedliche Portionen aufgeteilt und zu jeweils 6 mg SuperFectTM gegeben wurde.

Tabelle 1: Ergebnisse der Kopplung des Pentasaccharidisothiocyanats **93** an SuperFectTM.

Konjugat	Amin 92 [mg]	Ausbeute [mg]	Kopplungs- ausbeute [%]	Kohlenhydratreste pro Dendrimer
K1	0.66	3.2	38	2.3
K2	1.1	3.6	39	3.6
K3	1.5	3.7	46	6.5

Die Umsetzung zum Isothiocyanat **93** verlief laut DC quantitativ, die Kopplungsausbeute wurde colorimetrisch^[165] bestimmt. Mit 38-46 % (Tabelle 1) liegt diese etwas über den

Ausbeuten (20-30 %), die mit komplexen *N*-Glycanen an BSA erzielt wurden.^[166] Dies erklärt sich durch die im Vergleich zu Proteinen wesentlich höhere Dichte an Aminogruppen an der Oberfläche der Dendrimere. Nimmt man für die SuperFect™-Dendrimere ein durchschnittliches Molekulargewicht von 28.5 kD an,^[148] so erhält man ein mittleres Verhältnis von Kohlenhydrat zu Dendrimer zwischen 2.3 und 6.5 (Tabelle 1).

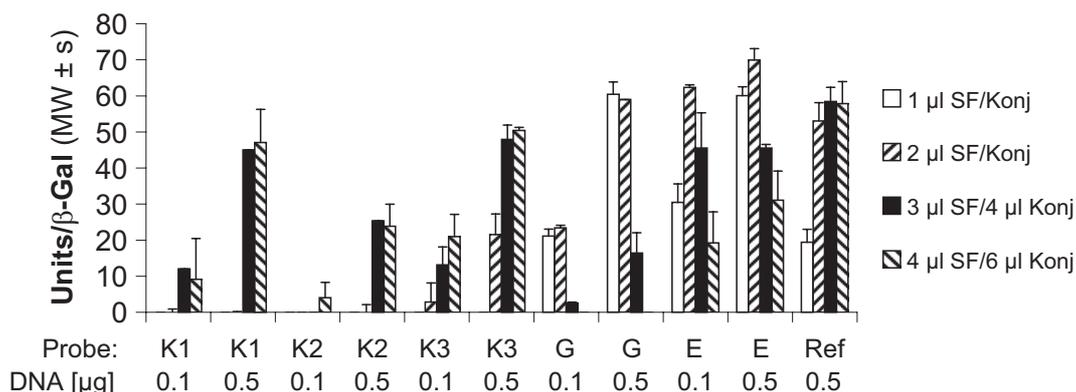


Schema 70: Synthese der SuperFect™-Pentasaccharid-Konjugate **94** (K1-K3).

4.3.2. Transfektionseffizienz der Pentasaccharid-SuperFect™-Konjugate

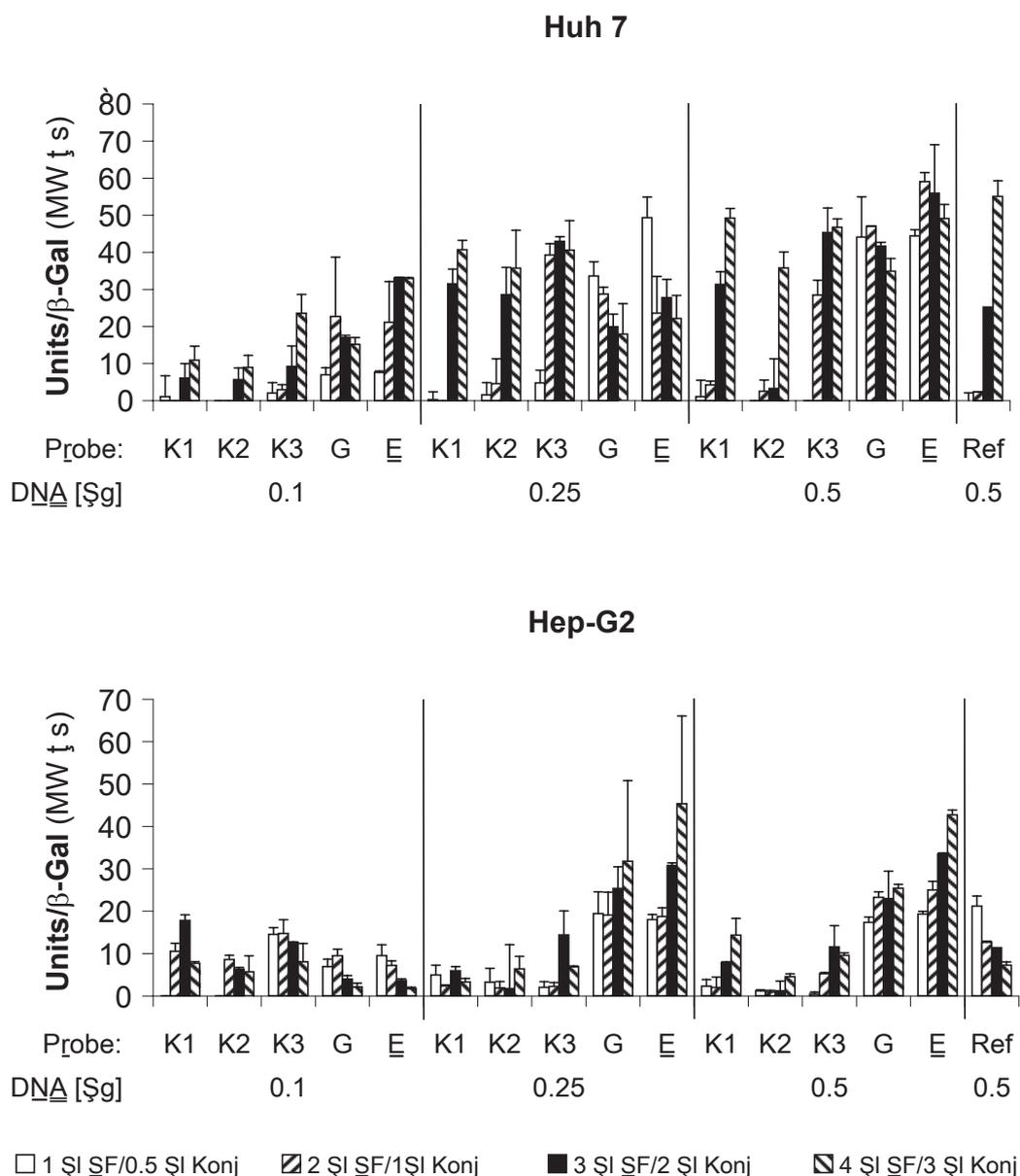
Die Untersuchungen zum Einfluß des Pentasaccharid-Substituenten auf die Transfektionseigenschaften von SuperFect™ wurden von Dr. U. Krüger (Fa. Qiagen) durchgeführt.^[167] Für eine optimale Transfektion ist auch der niedermolekulare Anteil der teilweise wieder abgebauten Dendrimere notwendig. Da bei der GFC-Reinigung der Konjugate ein Teil der Dendrimerfragmente (\leq Pentasaccharid) zwingenderweise abgetrennt wurde, müssen die Eigenschaften der glycosylierten Dendrimere mit denen der entsprechenden Fraktion aus der GFC verglichen werden. Für diese Experimente wurden daher verschiedene Kontrollen verwendet: Standard der Fa. Qiagen, das SuperFect™-Edukt sowie eine SuperFect™-Probe, von welcher ein zu den Kopplungsversuchen vergleichbarer Ausschnitt aus der Gelfiltration präpariert wurde. Als Testsysteme wurden die Plasmide pCMV β und pEGFP gewählt, wobei ersteres das Gen für β -Galactosidase enthält und letzteres für das „green fluorescent protein“ GFP codiert. Auf diese Weise ist eine Detektion der Transfektionseffizienz durch Messung der β -Galactosidaseaktivität bzw. mittels Bestimmung des relativen Anteils an fluoreszierenden Zellen möglich. Die Transfektion wurde an verschiedenen Zelllinien durchgeführt und dabei getestet, ob die Effektivität an Leberkrebszelllinien (Huh-7 und Hep-G2) mit dem ASGP-R^[168] im Vergleich zu Affennierenzellen (COS-7), Hamsterovazellen (CHO-K1), humanen Gebärmutterhalszellen (HeLa) bzw. Mausfibroblasten (NIH-3T3) höher ist. Hierzu wurde die DNA mit den Dendrimern komplexiert und in einem serumhaltigen Medium auf die Zellen gegeben. Diese wurden 24 h Stunden vor der Transfektion in einer Zelldichte von 2×10^4 pro Einbuchtung ausplattiert. Soweit nicht anders vermerkt, wurde nach drei Stunden Inkubation ein Serumwechsel durchgeführt.

Anhand von HeLa- und COS-7-Zelllinien wurde in der ersten Testreihe sichergestellt (Daten nicht gezeigt), daß die Dendrimere nach der Behandlung weiterhin Transfektionseigenschaften besitzen. Hierbei konnte in COS-7- im Gegensatz zu HeLa-Zellen auch bei niedriger DNA-Menge für nahezu alle Dendrimere noch eine hohe Transfektionsrate detektiert werden. Im folgenden wurden Hep-G2-Zellen mit unterschiedlichen Mengen an pCMV β transfiziert, um zu untersuchen, ob Zellen mit dem ASGP-R durch Dendrimere mit Galactosesubstituenten besser angesprochen werden können (Schema 71). Hierbei wiesen die Dendrimere, deren niedermolekularer Anteil durch die GFC-Behandlung entfernt wurde (K1-K3, G), bei geringer DNA-Menge eine sehr niedrige Aktivität auf. Ferner reichten die modifizierten Dendrimere nur in höherer Dosis an die Referenzen heran.



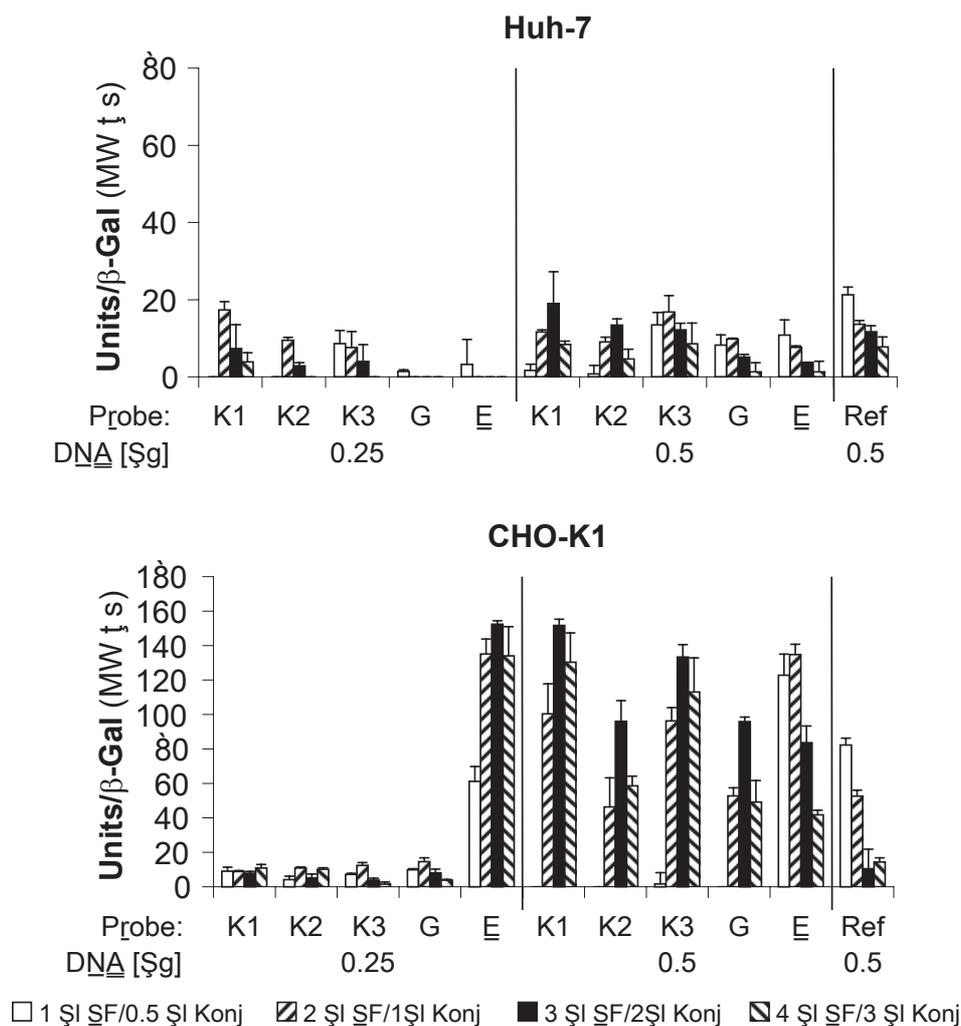
Schema 71: Transfektion von Hep-G2-Zellen: je 0.1 µg bzw. 0.5 µg DNA wurden mit unterschiedlichen Mengen an SuperFect™-Konjugaten (1, 2, 4, 6 µl einer 1.5 mg/ml-Lösung) K1-K3 bzw. der GFC-Referenz G, des Edukts E oder der Referenz Ref (1, 2, 3, 4 µl einer 3 mg/ml-Lösung) komplexiert und zu den Zellen pipettiert. Nach zwei Tagen wurde die β-Galactosidase-Aktivität gemessen.

Anschließend wurde untersucht, ob unter für SuperFect™ ungünstigen Bedingungen ein größerer Unterschied zwischen den modifizierten im Vergleich zu den unveränderten Dendrimeren auftritt (Schema 72). Nachdem in den vorangegangenen Experimenten keine bis geringe cytotoxische Effekte beobachtet wurden, konnte auf den Mediumwechsel verzichtet werden. Weiter wurde die eingesetzte Konjugat-Menge verringert, da bisher durch höhere Dosen keine Effizienzsteigerung festgestellt werden konnte und durch einen großen Überschuss an Aminen die Gefahr cytotoxischer Effekte steigt. In dieser Versuchsreihe zeigte die SuperFect™-Referenz bei Hep-G2 eine ungewöhnlich niedrige Aktivität, so nahm die β-Galactosidase-Aktivität mit zunehmender Dendrimermenge von 20 units bis unter die Nachweisgrenze von 10 units ab, während sie in der vorhergehenden Reihe (Schema 71) auf über 60 units anstieg. Durch die Kohlenhydratmodifikation konnte keine Verbesserung nachgewiesen werden. Mit steigender Plasmidmenge wurde eine immer deutlichere Diskriminierung der modifizierten Dendrimeren festgestellt, bei niedriger DNA-Konzentration konnten jedoch die Ergebnisse im Vergleich zur vorherigen Testreihe verbessert werden. Mit geringen Mengen an Konjugat war teilweise keine Transfektion nachweisbar bzw. lag die β-Galactosidaseaktivität unterhalb der Nachweisgrenze von 10 units. Widersprüchlich ist allerdings, daß durch steigenden Kohlenhydratanteil die Transfektionseffizienz von K1 bis K3 (besonders bei Huh-7) ansteigt, jedoch liegen alle diese Veränderungen im Rahmen der Schwankungsbreite des Testsystems.



Schema 72: Transfektion von Leberkrebs-Zellen: unterschiedliche Mengen DNA wurden mit verschiedenen Mengen an SuperFect™-Konjugaten (0.5, 1, 2, 3 μ l einer 1.5 $^{mg}/_{ml}$ -Lösung) K1-K3 bzw. der GFC-Referenz G, des Edukts E oder der Referenz Ref (1, 2, 3, 4 μ l einer 3 $^{mg}/_{ml}$ -Lösung) komplexiert und zu den Zellen pipettiert. Nach zwei Tagen wurde die β -Galactosidase-Aktivität gemessen.

In einer weiteren Testreihe wurde untersucht, ob Zellen mit dem ASGP-R besser mit Galactose-tragendem SuperFect™ transfiziert werden können als Zellen ohne ASGP-R. Hierzu wurden neben Huh-7-Zellen aus der Leber auch Zellen aus Hamster-Ovarien (CHO-K1) transfiziert (Schema 73), auf den Mediumwechsel wurde wiederum verzichtet.



Schema 73: Transfektion von Leberkrebs (Huh-7)- und Hamsteroovar (CHO-K1)-Zellen: unterschiedliche Mengen DNA wurden mit verschiedenen Mengen an SuperFectTM-Konjugaten (0.5, 1, 2, 3 µl einer 1.5^{mg/ml}-Lösung) K1-K3 bzw. der GFC-Referenz G, des Edukts E oder der Referenz Ref (1, 2, 3, 4 µl einer 3^{mg/ml}-Lösung) komplexiert und zu 2×10^4 Zellen pipettiert. Nach zwei Tagen wurde die β -Galactosidase-Aktivität gemessen.

Der Vergleich mit der vorhergehenden Versuchsreihe (Schema 72) zeigt, daß bei Huh-7 die Transfektionseffizienz der Referenz von 1 µl bis 4 µl auf 60 Einheiten anstieg, hier (Schema 73) hingegen auf die Nachweisgrenze von 10 units absank. Ferner waren hier generell niedrigere Raten an Huh-7 zu beobachten, wofür keine Erklärung gefunden werden konnte. Durch Einsatz größerer Mengen an DNA konnte die Transfektionsrate meist gesteigert werden, der Kohlenhydratanteil führte auch hier zu keiner Verbesserung. Die Effizienzsteigerung bei 0.25 µg DNA dürfte darauf zurückzuführen sein, daß die Aktivitäten an der Nachweisgrenze liegen und somit eher zufälliger Natur sind. In den Hamsteroovazellen erzielten alle durch GFC gereinigten SuperFectTM-Variationen bei 0.25 µg DNA wesentlich schlechtere Ergebnisse als das Edukt. Die Unterschiede scheinen nicht maßgeblich durch den

Kohlenhydratanteil, sondern durch experimentelle Schwankungen bedingt zu sein. Das Experiment wurde analog mit pEGFP wiederholt. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht und deren Anteil mit GFP abgeschätzt (Tabelle 2).

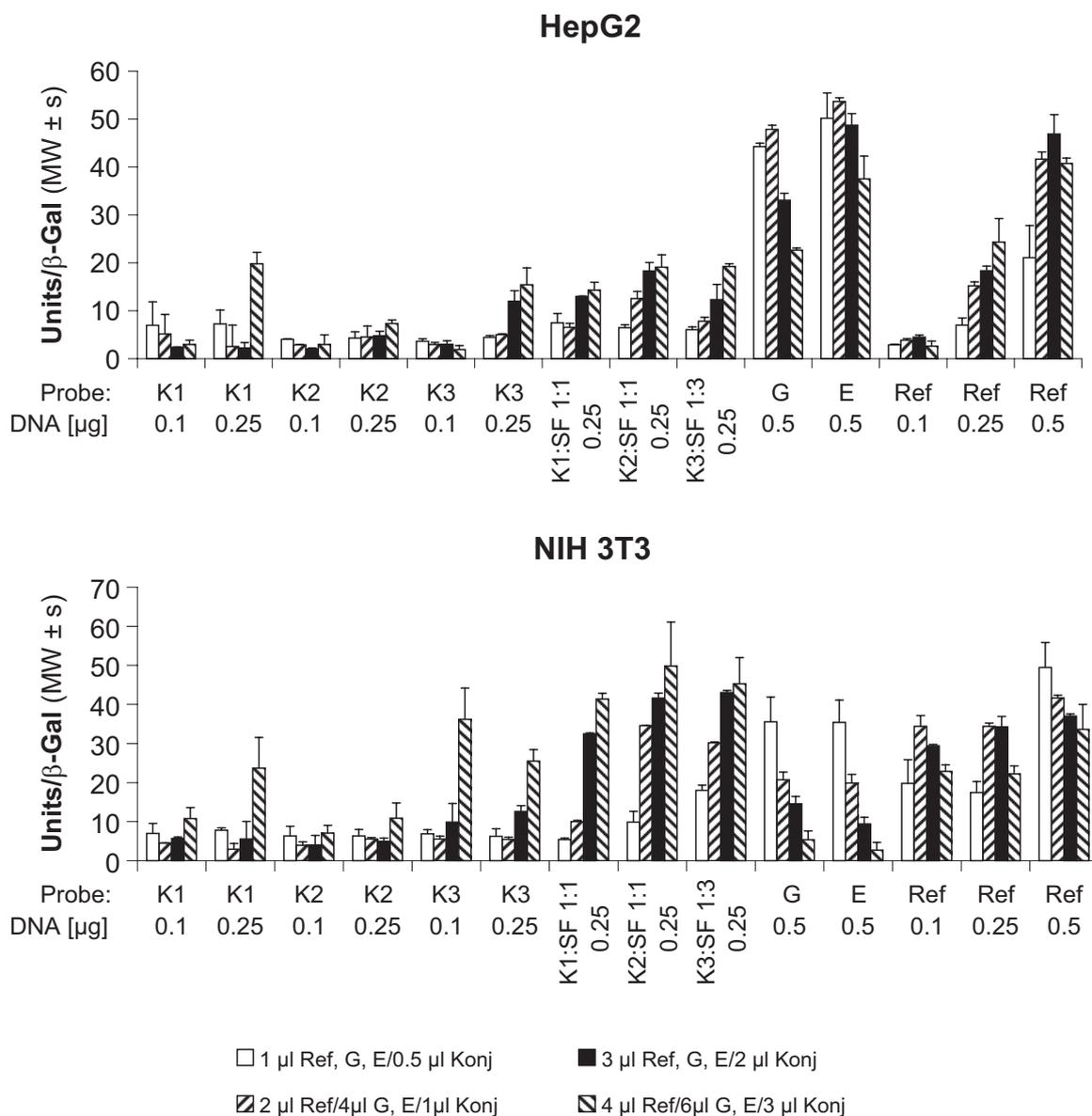
Tabelle 2: Transfektion von Leberkrebs- (Huh-7) und Hamsterovar-Zellen (CHO-K1): unterschiedliche Mengen des für das „green fluorescent protein“ codierenden Plasmids pEGFP wurden mit Hilfe der SuperFect™-Konjugate K1-K3 bzw. des Standards (G: GFC-Referenz, E: Edukt, Ref: Qiagen-Referenz) transfiziert und nach zwei Tagen der Anteil der fluoreszierenden Zellen abgeschätzt.

Huh-7	K1	K2	K3	G	E	Ref
0.25 µg DNA	1-15 %	1-5 %	5 %	1 %	< 1 %	n. d.
0.5 µg DNA	10-15 %	10 %	5-15 %	10 %	10 %	10-20 %

CHO-K1	K1	K2	K3	G	E	Ref
0.25 µg DNA	5 %	5 %	5 %	5 %	5 %	n. d.
0.5 µg DNA	90 %	60 %	80 %	60 %	90 %	60 %

Diese Ergebnisse spiegeln die mit dem β -Galactosidase-Test gewonnenen Resultate wider. Auch hier konnte durch die Konjugation bei niedrigen DNA-Mengen eine Verbesserung erzielt werden, die vermutlich jedoch auf zufällige Schwankungen an der Nachweisgrenze zurückzuführen sind. Wie im vorangegangenen Test ließen sich die Ovarzellen wesentlich besser transfizieren, weshalb auch in diesem Experiment keine Verbesserung durch eine Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung beobachtet werden konnte. Zusammenfassend dürften die Unterschiede zwischen den verschiedenen Konjugaten bzw. SuperFect™-Referenzen eher auf experimentellen Schwankungen als auf wesentlichen Einflüssen des Kohlenhydratrests beruhen.

Nachdem mit den reinen Konjugaten keine Verbesserung erzielt werden konnte, wurde anschließend untersucht, ob eine rezeptorvermittelte Transfektion durch Mischen von Konjugaten mit unmodifiziertem SuperFect™ möglich ist. Hierzu wurden 1:1-Mischungen von Konjugaten mit SuperFect™ hergestellt und damit Hep-G2- und NIH-3T3-Zellen transfiziert (Schema 74).



Schema 74: Transfektion von Leberkrebszellen (Hep-G2) und Mausfibroblasten (NIH-3T3): verschiedene Dosen DNA (0.1 μ g, 0.25 μ g bzw. 0.5 μ g) wurden mit unterschiedlichen Mengen an SuperFectTM-Konjugaten (0.5 μ l, 1 μ l, 2 μ l, 3 μ l einer 1.5 ^{mg/ml}-Lösung) K1-K3 und Mischungen davon mit unmodifiziertem SuperFectTM, bzw. der GFC-Referenz G, des Edukts E (1, 2, 4, 6 μ l einer 3 ^{mg/ml}-Lösung) oder der Referenz Ref (1, 2, 3, 4 μ l einer 3 ^{mg/ml}-Lösung) komplexiert und zu den Zellen pipettiert. Nach zwei Tagen wurde die β -Galactosidase-Aktivität gemessen

Während sich bei Hep-G2 die Referenzen in den Transfektionseigenschaften ähneln, verschlechtern sich diese bei den NIH-3T3-Zellen bei Edukt und GFC-Referenz mit zunehmender Dendrimermenge. Bei den Konjugaten liegen die Werte sowohl mit 0.1 μ g als auch mit 0.25 μ g DNA an der Nachweisgrenze, nur K3 vermag in höherer Dosis eine deutlich nachweisbare Transfektion zu vermitteln. Ein einheitlicher Trend ist nicht erkennbar, die Unterschiede dürften eher auf experimentelle Schwankungen zurückzuführen sein. Mit

Mischungen ließen sich generell höhere Aktivitäten erzielen als mit reinen Konjugaten. Bei NIH-3T3 ist dieser Trend besonders ausgeprägt, jedoch liegen in beiden Zelllinien die Aktivitäten höchstens in dem Bereich der SuperFectTM-Referenz von Qiagen. Die Unterschiede reichen nicht aus, um von wesentlichen Einflüssen zu sprechen, allerdings scheinen die Konjugate die Transfektionseffizienz etwas zu verschlechtern. Nachdem zwischen GFC-Referenz und Edukt kein nennenswerter Unterschied detektiert werden konnte, scheint dieses nicht an der GFC-Reinigung zu liegen. Die transfizierten Zellen wurden darüberhinaus mit X-Gal gefärbt, um den Anteil blauer Zellen mit den Ergebnissen des Enzymtests zu vergleichen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Transfektion von Leberkrebszellen (Hep-G2)- und Maus-Fibroblasten (NIH-3T3): unterschiedliche Mengen des für β -Galactosidase codierenden Plasmids pCMV β wurden mit Hilfe der SuperFectTM-Konjugate K1-K3, sowie 1:1-Gemischen dieser mit SuperFectTM bzw. -Standards (G: GFC-Referenz, E: Edukt, Ref: Qiagen-Referenz) transfiziert, nach zwei Tagen mit X-Gal gefärbt und der Anteil blauer Zellen abgeschätzt.

Hep-G2	K1	K2	K3	K1:SF	K2:SF	K3:SF	G	E	Ref
0.1 μg DNA	3 %	5 %	5 %	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	1 %
0.25 μg DNA	5 %	5 %	5 %	5 %	5 %	5 %	n. d.	n. d.	10 %
0.5 μg DNA	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	40 %	30 %	40 %

NIH-3T3	K1	K2	K3	K1:SF	K2:SF	K3:SF	G	E	Ref
0.1 μg DNA	3 %	3 %	3 %	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	10 %
0.25 μg DNA	3 %	3 %	10 %	10 %	10 %	10 %	n. d.	n. d.	10 %
0.5 μg DNA	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	10 %	10 %	30 %

Durch die Färbung konnten die Ergebnisse des β -Galactosidase-Tests bestätigt werden. Während in den Leberzellen der Anteil gefärbter Zellen bei Konjugaten bzw. Mischungen unter der Referenz lag, konnten in den Fibroblasten mit den Mischungen bzw. K3 zur Referenz vergleichbare Resultate erzielt werden.

Durch PAMAM-Dendrimere ließ sich mit Hilfe des biantennären Ausschnitts aus einem komplexen *N*-Glycan keine rezeptorvermittelte Transfektion erreichen. Die mit den modifizierten Dendrimeren K1-K3 erhaltenen Resultate lagen meist unter den mit den

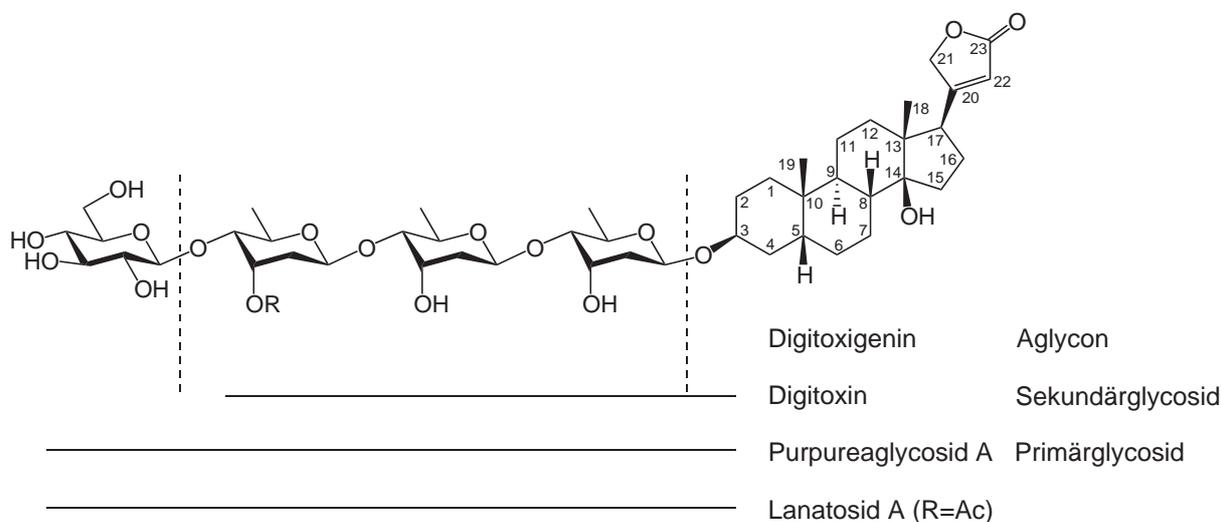
Referenzsubstanzen erzielten bzw. übertrafen diese nicht wesentlich. Die registrierten Unterschiede dürften eher auf experimentelle Schwankungen als auf Einflüsse durch den Kohlenhydratanteil zurückzuführen sein. Hierfür sind mehrere Ursachen denkbar: zum einen könnte die unspezifische Bindung der Dendrimer-DNA-Komplexe mit der Zelloberfläche aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen so stark sein, daß die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung keinen wesentlichen Einfluß hat. Zum anderen könnte die Bindung an den Rezeptor zu schwach sein. Eine stärkere Wechselwirkung sollte z. B. durch ein triantennäres *N*-Glycan möglich sein, welches bei Polylysin schon gute Ergebnisse geliefert hat^[159] bzw. ein Ausschnitt hiervon, welcher mehr Galactosetermini trägt. Durch mehrfache Bindung des Kohlenhydrats an den Rezeptor („Cluster-Effekt“) könnten eindeutiger Resultate erzielt werden.^[169]

5. Methylierung von Diginatin

5.1. Herzglycoside

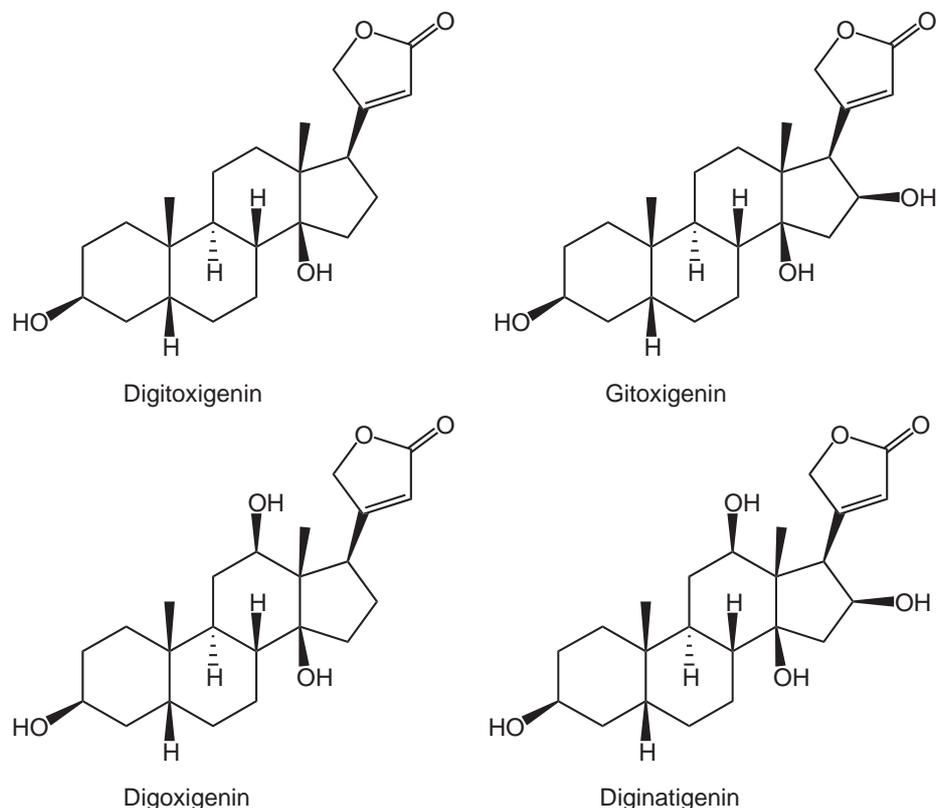
Der englische Arzt *William Withering* beschrieb schon 1785 in seinem Buch „An Account of the Foxglove and some of its Medical Uses: With Practical Remarks on Dropsy and other Diseases“ die Behandlung der Wassersucht unter Zuhilfenahme des Fingerhuts.^[170] Heute wird die Krankheit treffender als Herzinsuffizienz bezeichnet, die verschiedene Ursachen haben kann, wie beispielsweise coronare Herzkrankheiten (z. B. Schädigung durch Sauerstoffmangel nach einem Herzinfarkt), chronische Druck- bzw. Volumenbelastungen (z. B. durch arterielle Hypertonie), Herzrhythmusstörungen. Diese Krankheit wird teilweise auch heute noch mit Herzglycosiden behandelt, wobei verschiedene Präparate auf dem Markt sind. Gemeinsam ist ihnen, daß sie an die Mg-abhängige K^+/Na^+ -ATPase binden, wodurch der Na^+ -Spiegel in der Zelle erhöht wird und die K^+ -Konzentration sinkt. Dies führt dazu, daß der Na^+/Ca^{2+} -Austauscher gestört wird und auch der Ca^{2+} -Spiegel in der Muskelzelle ansteigt. Da eine Kontraktion des Muskels durch eine Ca^{2+} -Ausschüttung ausgelöst wird, steigt durch die höhere Grundkonzentration die Auswurfleistung des Herzens (positiver inotroper Effekt). Durch die innerhalb der Zelle verringerte K^+ -Konzentration sinkt die Leitungsgeschwindigkeit und somit die Herzfrequenz (negativer chronotroper Effekt). Diese Effekte bewirken eine wesentliche Verbesserung der Lebensqualität und -erwartung der Herzpatienten.

Herz- oder auch Digitalisglycoside bestehen aus einem Steroidteil und bis zu vier Kohlenhydratresten (Schema 75).^[171] Ist der terminale Glucoserest vorhanden, so spricht man von Primär-, bei lediglich drei Digitoxosen von Sekundärglycosiden.



Schema 75: Einteilung der Herzglycoside.^[171]

Vor allem kristalline Sekundärglycoside, im wesentlichen das aus *Digitalis purpurea* gewonnene Digitoxin und das aus *D. lanata* isolierbare Digoxin, werden als Arzneimittel genutzt, da sie im Vergleich zu dem Pflanzenmaterial leichter und sicherer zu dosieren sind. Die genannten Glycoside unterscheiden sich lediglich in der Hydroxylfunktion an Position 12 im Steroidgerüst (Schema 76).



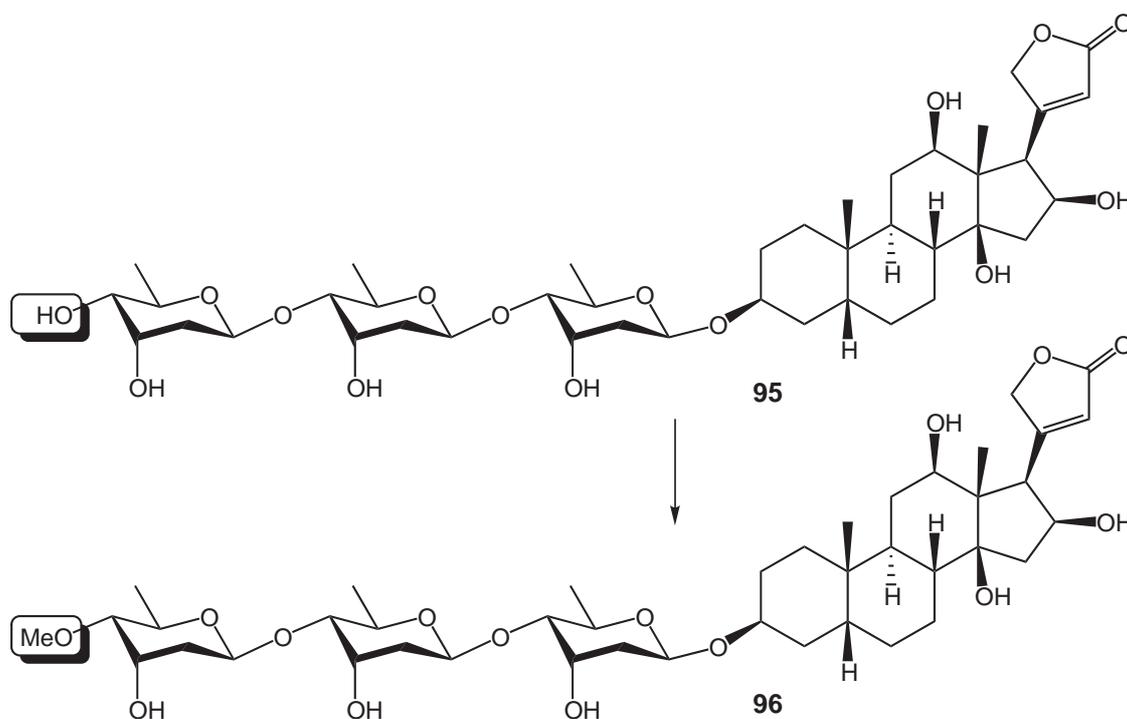
Schema 76: Natürliche Steroide aus *Digitalis spec.*

Um die Pharmakokinetik zu verbessern, werden diese durch Acetylierung bzw. Methylierung für manche Präparate teilweise modifiziert. 1985 waren in Deutschland nach GKV-Index Novodigal (4'''-Acetyldigoxin, 7 115 000 Verschreibungen) und Lanitop (4'''-Methyldigoxin, 5 607 000 Verschreibungen) die am häufigsten verschriebenen Arzneimittel.^[170] Durch die Entwicklung neuerer Medikamente sind diese Zahlen bis 2003 auf 2 358 000 (4'''-Acetyldigoxin) bzw. 616 000 (4'''-Methyldigoxin) Verordnungen zurückgegangen, der Umsatz belief sich jedoch immer noch auf ca. 13 Millionen € bzw. 5.5 Millionen €. ^[172]

5.2. Problemstellung

Da in natürlichem Material neben den Hauptglycosiden auch die anderer Steroide enthalten sind, müssen diese bei der Isolierung nach Möglichkeit abgetrennt werden. Durch Umkristallisierung von Digoxin gelingt es, dieses in über 96 % Reinheit zu erhalten.^[173] Bei

der Methylierung zu 4''-Methyldigoxin werden die übrigen Verunreinigungen zwangsläufig mit umgesetzt. Da diese für die Verwendung als Medikament ebenfalls analysiert werden müssen, ist es notwendig, die methylierten Nebenprodukte als saubere Referenz zu besitzen. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, Diginatin **95** an 4''-Position regioselektiv zu methylieren ohne die anderen sechs Hydroxylfunktionen anzusprechen (Schema 77).

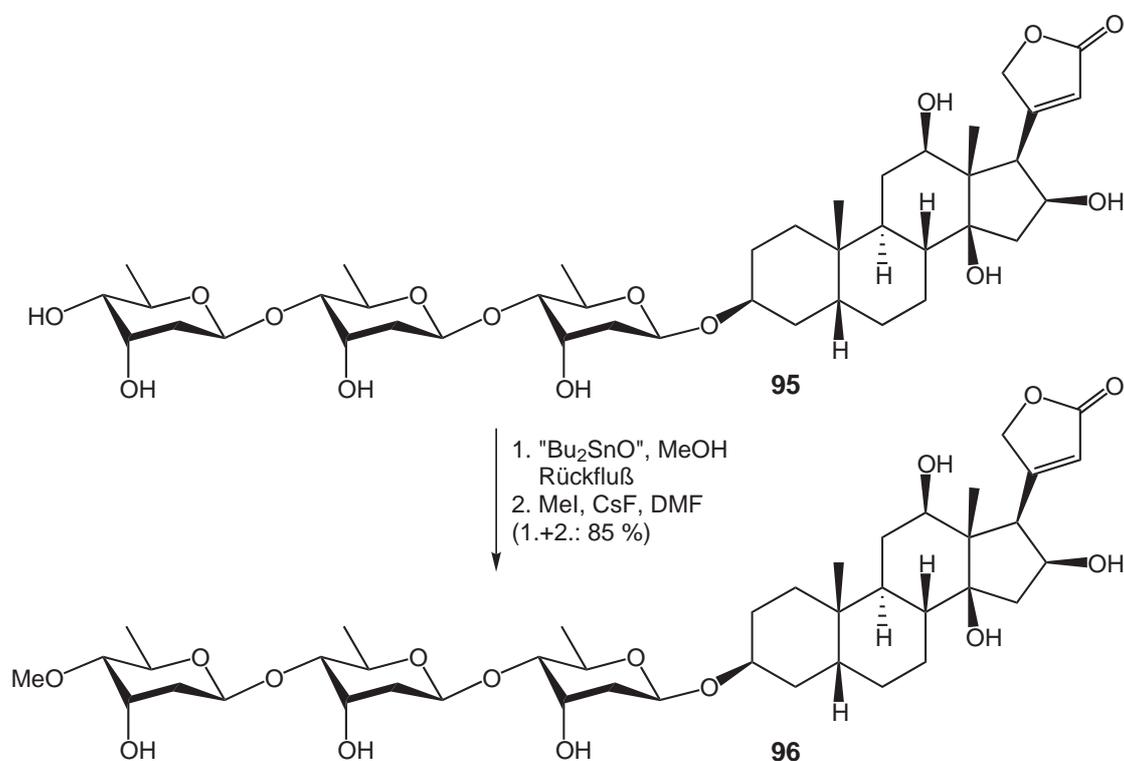


Schema 77: regioselektive Methylierung von Diginatin **95**.

5.3. Regioselektive Methylierung von Diginatin

Ausgehend von einer Vorschrift der Firma Roche wurde zunächst versucht, mit Hilfe von Strontiumhydroxid als chelatisierendem Agens unter Zusatz von Aluminiumoxid mit Dimethylsulfat eine selektive Alkylierung zu erreichen.^[174] Als wichtig bei dieser Reaktionsführung erwies sich, das Diginatin **95** mit den anorganischen Komponenten vor Zugabe des Methylierungsmittels 15-20 Minuten bei 0 °C zu rühren. Dies dürfte zum einen notwendig sein, um die Reaktion ausreichend abzukühlen, zum anderen aber um der Bildung des Chelatkomplexes Zeit zu geben. Es zeigte sich im DC, daß sowohl Dimethylsulfat als auch Methyljodid als Alkylierungsmittel gleichermaßen wirksam waren. Nach 90-120 Minuten muß die Reaktion abgebrochen werden, da durch Überreaktion mehr Produkt zerstört wird, als weiteres entsteht. Die Ausbeuten bei dieser Reaktionsführung lagen knapp unter 40 %. Um diese zu verbessern, wurde nach einer weiteren Möglichkeit gesucht, über einen fünfgliedrigen Ring als Zwischenstufe selektiv die äquatoriale Hydroxylfunktion zu modifizieren. Von

Stannyleneacetalen ist bekannt, daß sie sich leicht aus den entsprechenden vicinalen Diolen herstellen und selektiv an der äquatorialen Position alkylieren und acylieren lassen.^[175] Zu Beginn wurde in Testreaktionen versucht, das Stannyleneacetal in Methanol oder einem Gemisch aus Methanol und Toluol zu synthetisieren. Eine Alkylierung benötigt im Gegensatz zu Acylierung meist noch einen Katalysator, weshalb entweder Tetrabutylammoniumiodid (TBAI) oder Cäsiumfluorid zugesetzt wurden.^[176] Es zeigte sich, daß sich das Acetal am einfachsten durch Kochen in Methanol bildete und ein azeotropes Entfernen des freiwerdenden Wassers mittels Toluol und Wasserabscheider nicht nötig war. Die Methylierung gelang am besten mit CsF als Katalysator, weshalb größere Reaktionen mit diesem System durchgeführt wurden. Auf diese Weise waren mit 5 g Diginatin **95** als Edukt Ausbeuten von 85 % nach Flashchromatographie möglich (Schema 78).

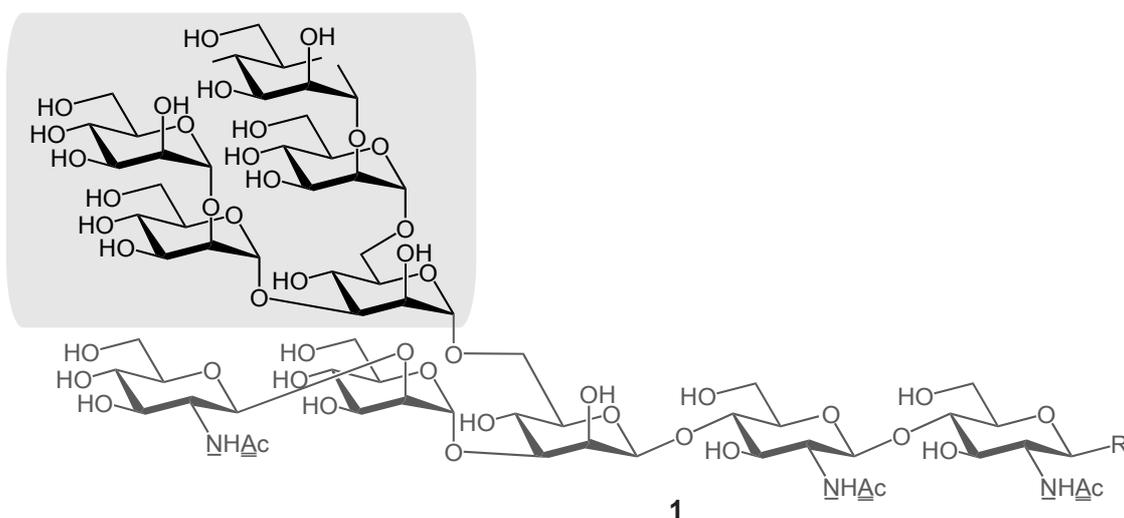


Schema 78: Regioselektive Methylierung von Diginatin **95** an Position 4''' über das Stannyleneacetal als Zwischenprodukt.

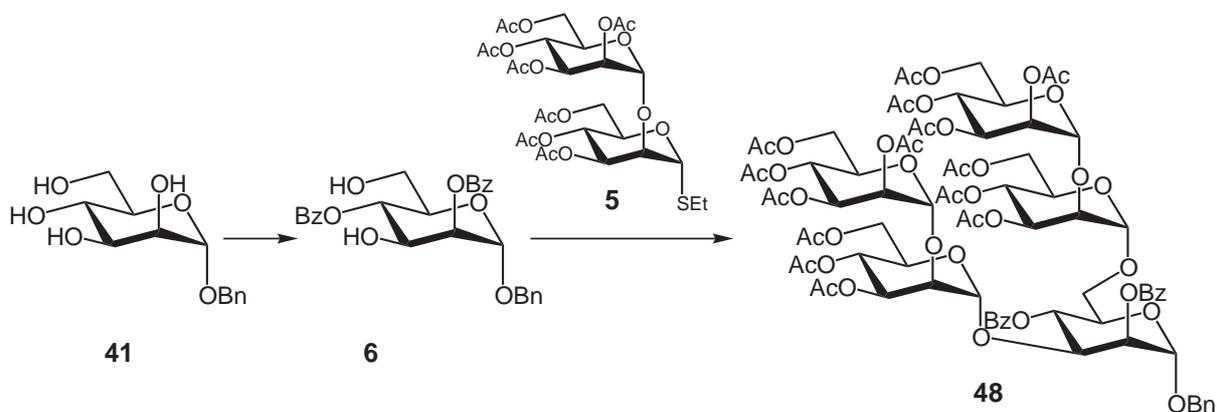
Das Produkt konnte vollständig über ESI-MS und NMR charakterisiert werden, wobei die 4'''-Verküpfung über ein HMBC-Experiment nachgewiesen wurde. Bei der Analyse mittels LC/MS konnte eine Schulter mit ca. 15 % der Peakfläche detektiert werden, die ein identisches MS aufwies. Höchstwahrscheinlich handelt es sich hierbei um das 3'''-Methylisomer, welches über Flashchromatographie nicht abgetrennt werden konnte.

6. Zusammenfassung

Kohlenhydrate spielen nicht nur im Energiehaushalt von Lebewesen eine entscheidende Rolle, sondern werden auch für die Codierung von Informationen genutzt. So sind die meisten sezernierten Proteine durch Glycosylierung modifiziert, wobei *N*-Glycane, welche mit der Seitenkette von Asparagin verknüpft sind, eine wichtige Rolle spielen. Je nach Substituenten am nichtreduzierenden Ende werden diese in mannosereiche, hybride oder komplexe *N*-Glycane eingeteilt. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst das im Arbeitskreis entwickelte Bausteinsystem für die Synthese komplexer *N*-Glycane um den Hybrid-Typ **1** erweitert.

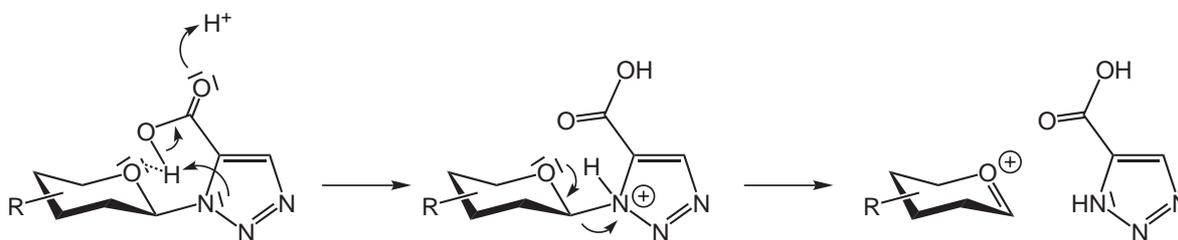


Hierzu wurde ein neuer Pentamannosid-Donor **3** entwickelt, der über eine sehr kurze Reaktionssequenz ausgehend von Benzylmannosid **41** gewonnen werden konnte. Über Bisorthoester-Bildung und nachfolgender Hydrolyse wurde das notwendige Schutzgruppenmuster von **6** in einem Schritt aufgebaut und durch eine doppelte Glycosylierung mit dem Dimannosid-Donor **5** das Pentasaccharid **48** erhalten.

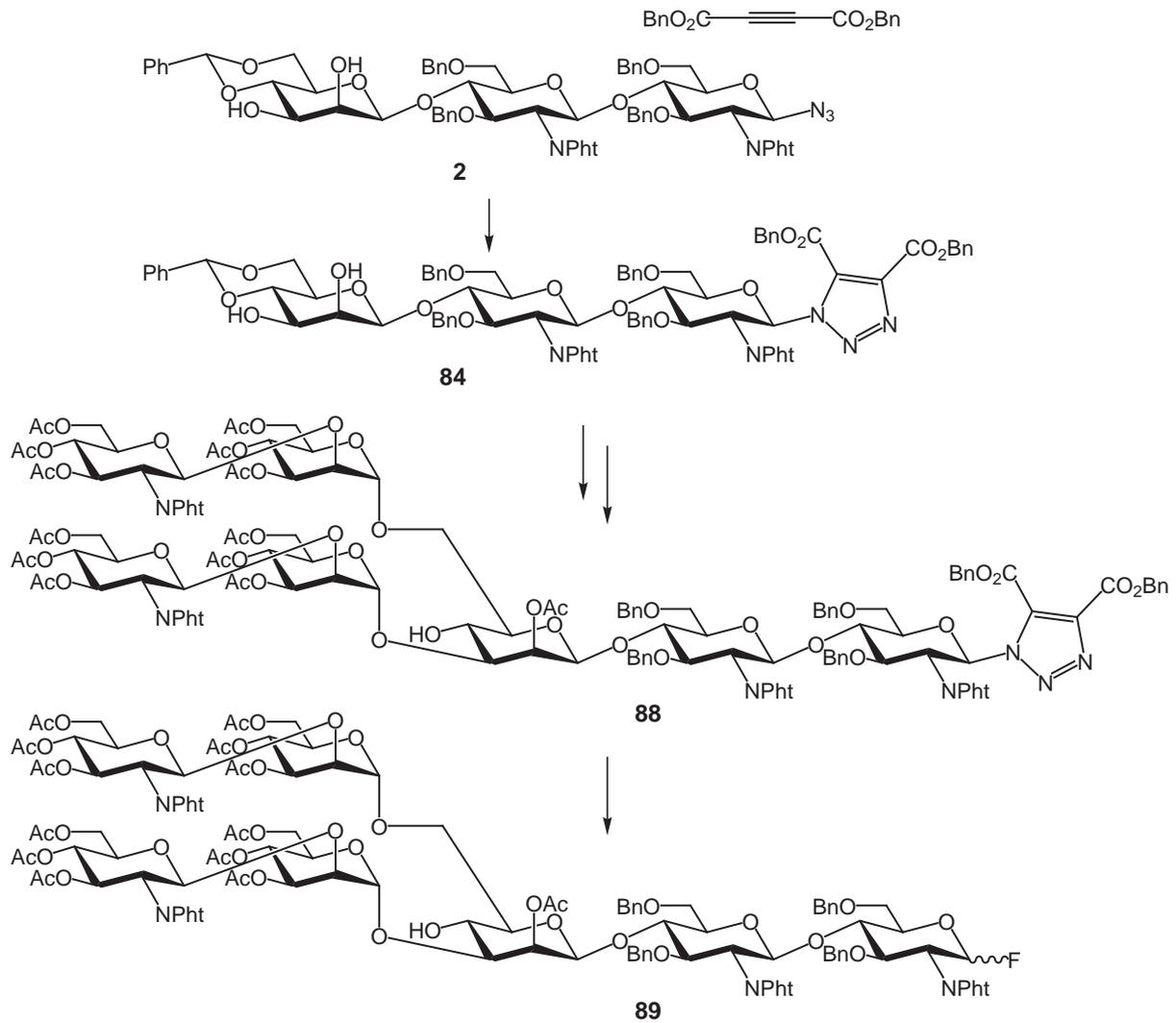


Nach der Umwandlung zu dem Trichloracetimidat **3** konnte der Pentasaccharid-Akzeptor **50** selektiv an der primären Hydroxylgruppe zu dem Decasaccharid **51** umgesetzt werden. Dieses wurde von den Acylschutzgruppen befreit, so daß an Verbindung **52** je nach Bedarf ein Spacer oder ein Asparaginrest eingeführt werden kann.

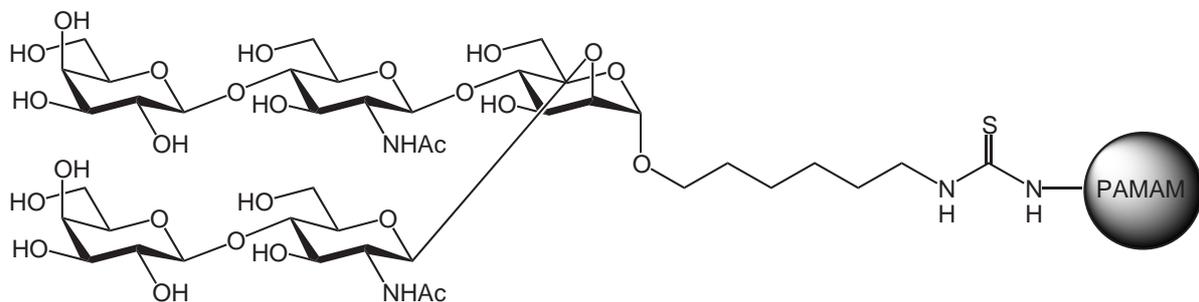
Daneben wurde eine Strategie entwickelt, mit der die Baukastensynthese von *N*-Glycanen auf die Festphase übertragen werden soll. Hierzu wurde die 1,3-dipolare Addition von Glycosylaziden und Alkinen untersucht. Diese gelang mit Hilfe von Cu(I) als Katalysator an verschiedene terminale Alkine. Beim Versuch, die erhaltenen Triazole entweder in das entsprechende Fluorid oder Azid umzuwandeln, zeigte sich, daß der literaturbeschriebene Mechanismus nicht korrekt ist. Durch mikrowellenbeschleunigte bzw. thermisch induzierte Cycloaddition an Acetylendicarbonsäurediester konnten weitere Glycosyltriazole gewonnen werden. Aufgrund der Aktivierbarkeit der erhaltenen Triazole wurde ein neuer Mechanismus postuliert, der mit den experimentellen Befunden in Einklang steht: die Triazol-5-carbonsäure, welche sich durch die sauren Bedingungen (HF, TMSOTf bzw. TfOH) bildet, wird protoniert oder durch ein starkes Elektrophil aktiviert. Durch intramolekulare Wechselwirkung des Säureprotons mit dem Stickstoffatom des Triazols lockert sich die *N*-glycosidische Bindung, was zur Freisetzung des Glycosylkations führt.



Dieses Reaktionspaar (Triazolbildung und -spaltung) stellt eine Möglichkeit dar, *N*-Glycane an der Festphase zu fixieren und wieder freizusetzen. Um die Stabilität dieses Linkersystems zu demonstrieren, wurde ausgehend von dem Core-Trisaccharid **2** das entsprechende Triazol **84** synthetisiert und aus diesem das komplexe Heptasaccharid **88** aufgebaut. Hierbei mußten die Reaktionsbedingungen im Vergleich zu dem analogen Glycosylazid modifiziert werden, um Nebenreaktionen wie den Aglycontransfer zu vermeiden. Nach zwei Glycosylierungen in guten Ausbeuten (67 % bzw. 69 %) und Schutzgruppenoperationen (Acetylierung, saure Hydrolyse des Benzylidenacetals) konnte das Triazol **88** mittels HF-Pyridin in das Glycosylfluorid **89** konvertiert werden. Somit ist auch die Abspaltungsreaktion gewährleistet und ein universeller Donor steht zur Verfügung.

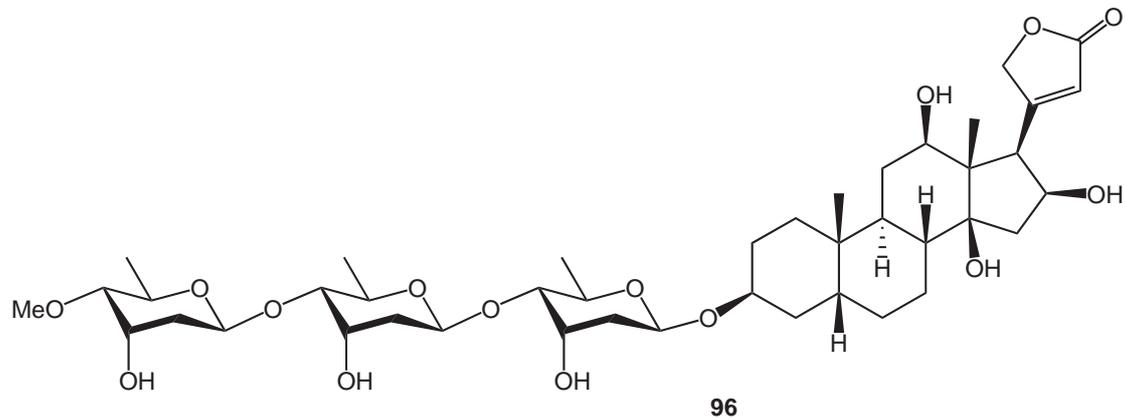


Darüber hinaus wurde die Pentasaccharid-Teilstruktur **92** aus einem triantennären *N*-Glycan synthetisiert und an PAMAM-Dendrimere (SuperFect™) gekoppelt, die hocheffizient die Transfektion verschiedener Zelllinien vermitteln.



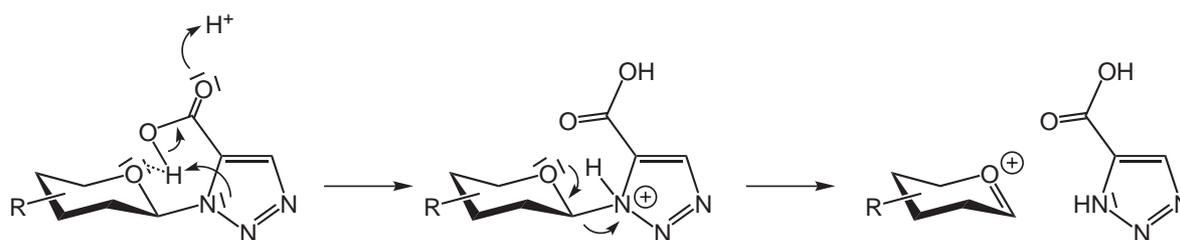
Mit Hilfe der Konjugate sollte überprüft werden, ob die Galactosyltermini eine rezeptorvermittelte Transfektion ermöglichen und dadurch bestimmte Zelllinien gezielt angesprochen werden können.

Bei der Isolierung von Herzglycosiden aus *Digitalis spec.* können die Nebenkomponenten nicht vollständig abgetrennt werden, weshalb u.a. 4'''-Methyl-diginatin **96** als Referenzsubstanz bei der Produktion des Medikaments Lanitop[®] benötigt wird. Die selektive Alkylierung konnte durch Bildung eines Stannyleneacetals und folgender Methylierung auch mit großen Mengen durchgeführt werden.

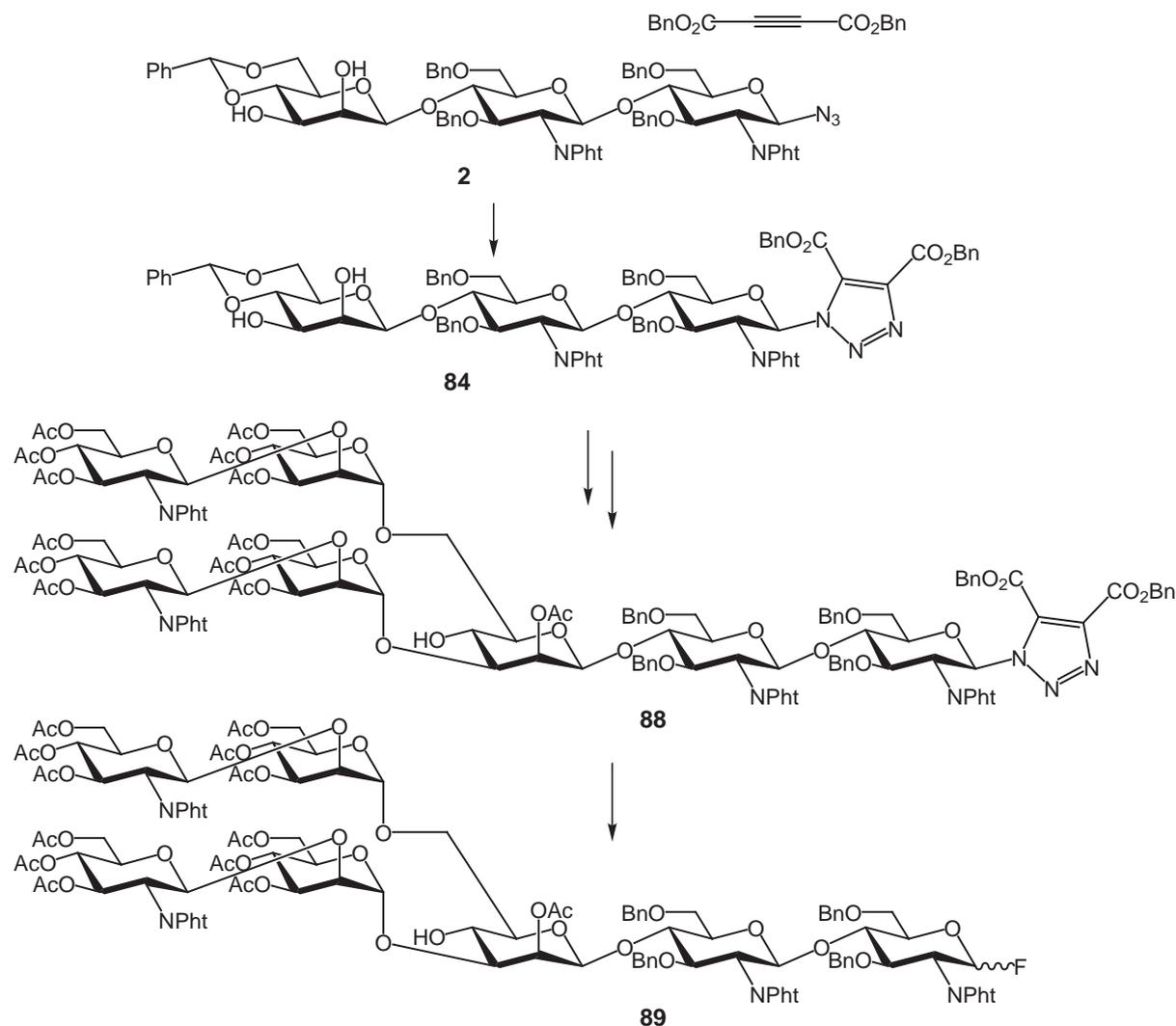


After conversion to the trichloroacetimidate **3** the pentasaccharide **50** was selectively glycosylated yielding the decasaccharide **51**. The removal of the acyl protecting groups from the decasaccharide **51** allows the subsequent introduction of a spacer or an asparagine residue.

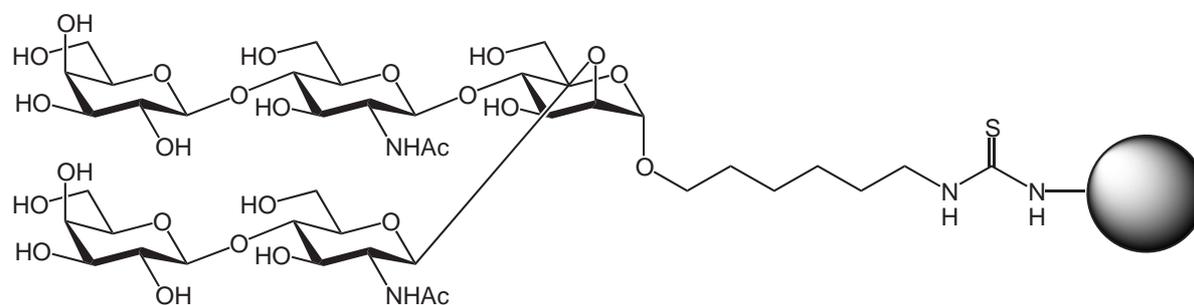
Furthermore a strategy was developed to transfer the building block synthesis of *N*-glycans to the solid phase. To this end the 1,3-dipolar addition of glycosylazides and alkynes was investigated. The use of terminal alkynes allowed the application of Cu(I) as a catalyst. Attempts to convert the triazoles thus obtained to the corresponding glycosyl fluorides or azides revealed that the published mechanism is not correct. Microwave irradiation or thermal induction gave [3+2] cycloaddition with acetylenedicarboxylic acid esters yielding further triazoles. These triazoles could be activated leading to a new mechanism, which is in accordance with the experimental data: the triazole-5-carboxylic acid, which is formed by the acidic conditions (HF, TMSOTf, TfOH respectively), is protonated or activated by a strong electrophile. By intramolecular interaction of the carboxylic proton and the triazole nitrogen the *N*-glycosidic linkage is weakened and the glycosyl cation is liberated.



The formation and cleavage of triazoles provides a possibility to attach and remove *N*-glycans at the solid phase. To prove the stability of this linker the core trisaccharide triazole **84** was synthesized starting from the corresponding azide **2** followed by elongation to the complex heptasaccharide **88**. Compared with the azide analogues the reaction conditions needed to be modified to prevent side reactions like aglycon transfer. After two glycosylations in good yields (67 % and 69 % respectively) and protecting group manipulations (acetylation and acidic hydrolysis of the benzylidene acetal) the triazole **88** was converted to the glycosyl fluoride **89** by HF-pyridine treatment. Thus, the final cleavage reaction was shown with a complex *N*-glycan yielding a universal donor.

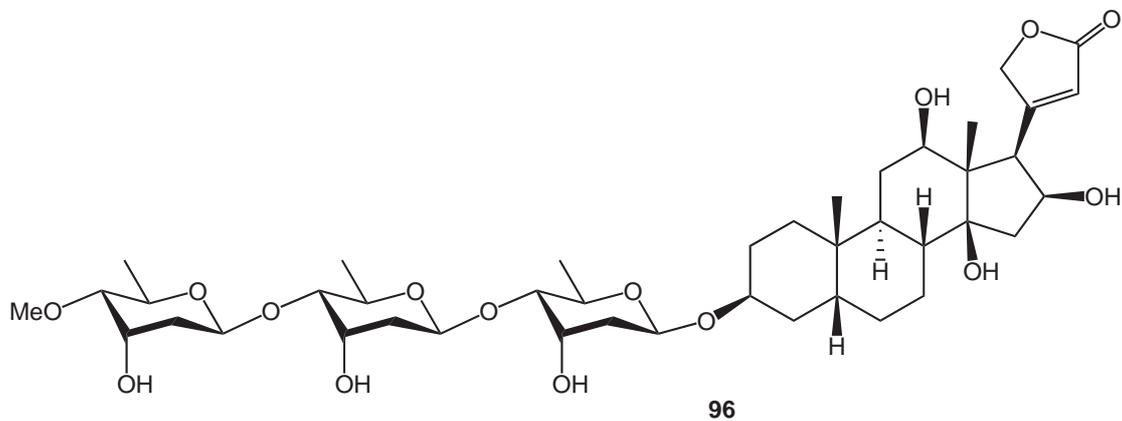


Additionally the pentasaccharide partial structure **92** of a triantennary *N*-glycan was synthesized and coupled to PAMAM-dendrimers (SuperFectTM), which mediate the transfection of different cell lines in high efficiency.



The conjugates were used to investigate targeted gene delivery via the galactosyl termini facilitating receptor mediated transfection.

Industrial isolation of digitalis glucosides does not separate minor components completely. Therefore among others 4'''-methylidiginatin **96** is required as a reference for the production of the drug Lanitop[®]. Formation of a stannylene acetal and successive methylation gave **96** in high yields.



8. Experimenteller Teil

Die verwendeten Lösungsmittel waren von technischer Qualität und wurden durch Destillation gereinigt. Absolute Lösungsmittel wurden durch Destillation mit folgenden Trocknungsmitteln erhalten: Dichlormethan mit Diphosphorpentoxid, Methanol mit Magnesiumspänen, Tetrahydrofuran und Diethylether mit Natrium/Benzophenon, Acetonitril mit Calciumhydrid. *N,N*-Dimethylformamid und Dioxan (Fluka) wurden absolut über Molekularsieb 4 Å bezogen. Essigsäureanhydrid, Pyridin und Ethanol wurden in p.a.-Qualität verwendet, als Schutzgas diente Argon 5.0. Das Molekularsieb 4 Å (Kugeln) wurde von der Firma Fluka bezogen und vor der Verwendung bei Glycosylierungen gemörsert.

Zur Flashchromatographie wurde Kieselgel 60 der Firma Merck mit einer Korngröße von 0.040-0.063 mm (230-400 mesh ASTM) verwendet. Der Stickstoffdruck betrug 1.5-1.9 bar. Die angegebenen Mischungsverhältnisse sind Volumenanteile.

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Aluminiumfertigfolien „Alugram Sil G/UV₂₅₄“ von Macherey-Nagel verwendet. Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzlöschung im UV-Licht bei 254 nm und/oder Eintauchen in eine Reagenzlösung und nachfolgendes Erhitzen im Heißluftstrom. Zum Anfärben von Kohlenhydraten wurde eine 1:1 Mischung aus 2 N H₂SO₄ und 0.2 %iger ethanolischer Resorcinmonomethyletherlösung verwendet.

Mikrowellen-Reaktionen wurden in einem MLS MicrochemistTM ($W_{\max} = 1200$ W, Temperaturkontrolle durch einen faseroptischen Sensor) in druckbeständigen Glasgefäßen durchgeführt.

GFC-Trennungen wurden an einer Pharmacia LKB Gradientenpumpe 2249 mit einem Pharmacia LKB Detektor VWM 2141 durchgeführt. Detektiert wurde bei 214 nm und bei 254 nm. Als Trennsäulen kamen Pharmacia Hi Load Superdex 30 (600 x 16 mm und 600 x 26 mm) Säulen zum Einsatz. Als Lösungsmittel diente 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer. Präparative HPLC-Trennungen wurden an einer Äkta Basic (Amersham Bioscience; Trennsäule: YMC-Pack ODS-A, 250 x 20 mm, 120 Å, S-05 µm; Lösungsmittel: Wasser/Acetonitril mit je 0.1 % Ameisensäure) durchgeführt und bei 215 nm, 255 nm sowie 280 nm detektiert.

Spezifische Drehwerte wurden an einem Perkin-Elmer Polarimeter 241 bei 589 nm in 1 ml und 5 ml Küvetten der Länge 10.00 cm bestimmt. UV-Spektren wurden an dem Gerät „Specord 200“ der Fa. Analytik Jena mit der Software WinAspect 1.2 aufgezeichnet.

Die EI-Massenspektren wurden an einem MAT-8500-Spektrometer der Firma Finnigan (Datensystem MAT SS 300) nach Direkteinlaß mit einer Ionisierungsenergie von 70 eV

aufgenommen. Die FAB-Massenspektren wurden am gleichen Gerät mit einer m-Nitrobenzylalkohol-Matrix bei einer Beschleunigungsspannung von 5 kV gemessen. Die apparative Grenze für die größte Masse betrug 2000 atomare Masseneinheiten.

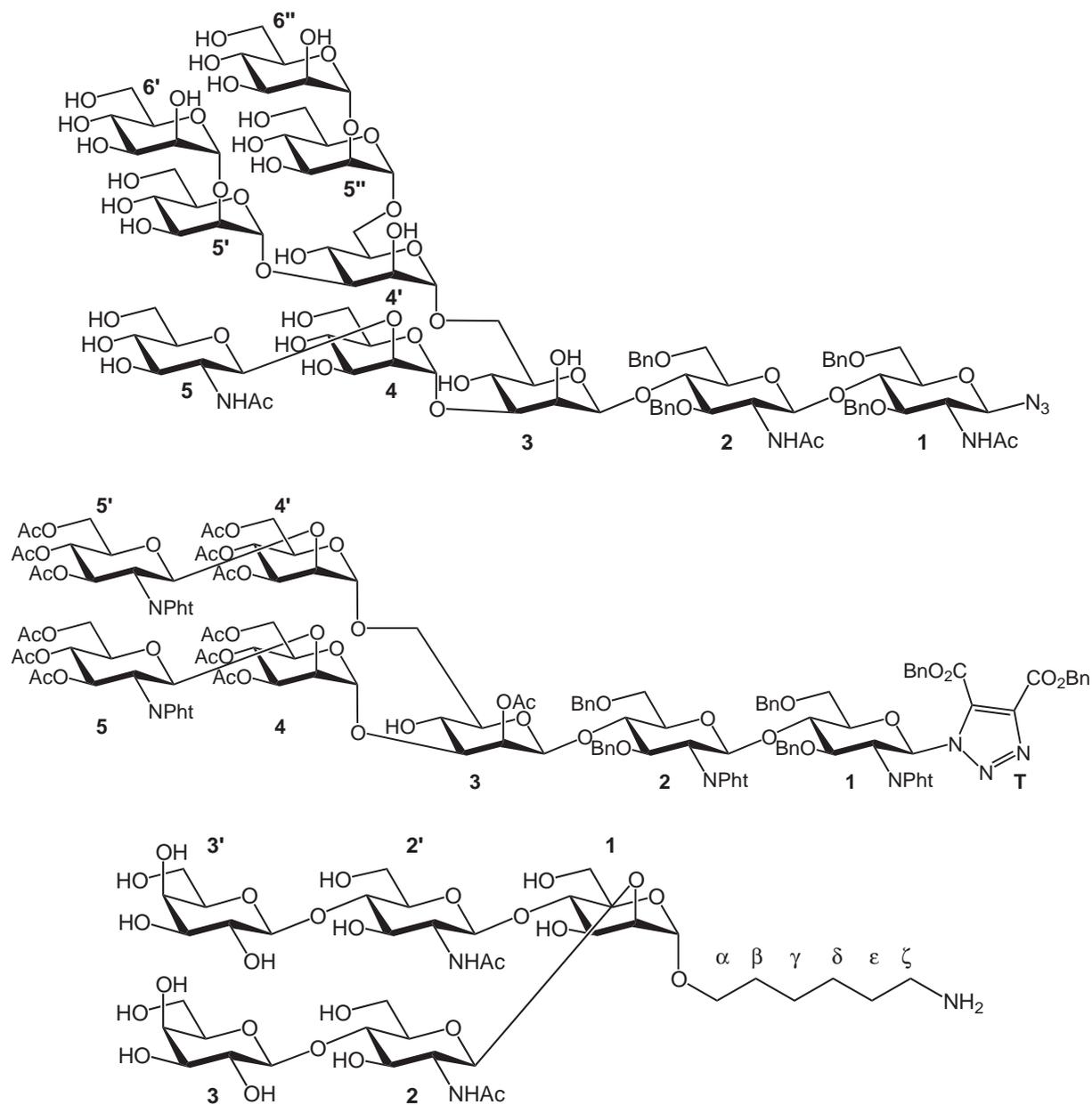
Die ESI-Massenspektren wurden an einem Micromass LCT-Spektrometer aufgenommen, das an eine Agilent 1100 HPLC (Lösungsmittel: Wasser/Acetonitril mit je 0.1 % Ameisensäure) mit Diodenarray-Detektor gekoppelt war. Wenn nicht anders angegeben, kam folgende Trennsäule zum Einsatz: YMC-Pack ODS-A, 2.1 x 100 mm, 120 Å, S-03 µm. Ferner wurden nachstehende Säulen eingesetzt: **C4**: YMC Pro-C4, 2.1 x 50 mm, 120 Å, S-03 µm; **C8**: YMC Pro-C8, 2.1 x 50 mm, 120 Å, S-03 µm; **HS**: YMC Pro-C18 Hydrosphere, 2.1 x 50 mm, 120 Å, S-03 µm; **RS**: YMC Pro-C18RS, 2.1 x 50 mm, 80 Å, S-05 µm. Direkteinlaß wurde über eine Spritzenpumpe mit Wasser, Acetonitril, Methanol oder Gemischen davon als Lösungsmittel durchgeführt. Akkurate ESI-MS wurden auf Brucin als internen Standard kalibriert. MALDI-Massenspektren wurden an einem Bruker Reflex III gemessen, das mit einem gepulsten Stickstofflaser bei 337 nm arbeitet.

IR-Spektren wurden an einem Perkin-Elmer FT-IR Spectrometer Paragon 1000 gemessen. Die Intensität der einzelnen Absorptionsbanden wird durch folgende Abkürzungen wiedergegeben: w: schwach, m: mittelstark, s: stark, br: breit.

Schmelzpunkte wurden an einer Büchi 510 Schmelzpunktapparatur bestimmt und sind unkorrigiert. Zur Temperaturmessung wurde ein Platinwiderstandsthermometer Pt-1000 TTX 483 der Firma Ebro verwendet.

Die NMR-Spektren wurden an einem Jeol JNM-EX-270-FT-Spektrometer, einem Bruker Avance 360 und einem Bruker DRX-500-Spektrometer gemessen. Die chemischen Verschiebungen wurden relativ zum Lösungsmittelsignal von [D₆]-DMSO ($\delta(^1\text{H}) = 2.49$ ppm, $\delta(^{13}\text{C}) = 39.5$ ppm) bzw. CD₃CN ($\delta(^1\text{H}) = 1.93$ ppm, $\delta(^{13}\text{C}) = 1.3$ ppm) bestimmt und beziehen sich auf Tetramethylsilan ($\delta = 0$ ppm).

Die Zuordnung der NMR-Spektren wurde nach folgender Konvention getroffen (Schema 79):



Schema 79: Konvention zur NMR-Zuordnung der einzelnen Saccharideinheiten.

Die Zuordnungen erfolgten anhand von Spektrensätzen bestehend aus ^1H , ^{13}C , HH-COSY, TOCSY, HMQC-COSY, HMQC-TOCSY, HMBC und NOESY.

Die verwendeten Zuckernucleotide, Diginatin und Enzyme wurden von Roche bezogen.

8.1. Versuche zu Kapitel 2

8.1.1. Versuche zu Kapitel 2.3.1

Cyclohexyl 4,6-O-benzyliden-β-D-mannopyranosid 17

β-BenzylidenMan-OCH

8.5 mg (14 μmol) Methoxybenzylether **16** werden in 1 ml Dichlormethan gelöst und mit 50 μl Wasser bei 0°C kräftig gerührt. Nach zehn Minuten werden 7.4 mg (41 μmol) DDQ zugegeben und nach weiteren zehn Minuten wird die Eiskühlung entfernt. Nach 20 Stunden (DC: Cyclohexan/Aceton 1:1) wird gesättigte KHCO₃-Lösung zugegeben und mit Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden mit MgSO₄ getrocknet und eingengt. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie (Cyclohexan/Aceton 4:1, Säulendurchmesser: 1.5 cm, Füllhöhe: 6.5 cm) gereinigt.

Ausbeute: 3.49 mg (69.3 %),

$R_f = 0.57$ (Cyclohexan/Aceton 1:1),

$[\alpha]_D^{23} = -28.7$ (0.07, Dichlormethan),

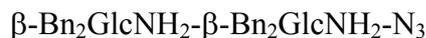
C₁₉H₂₆O₆ (350.4),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 350.17$ $M_{\text{gef}} = 373.18$ (M+Na)⁺,

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 7.49-7.30 (m, 5H, Ar), 5.54 (s, 1H, =CH-Ph), 4.87 (d, $J_{\text{OH},3} = 6.2$ Hz, 1H, OH-3), 4.69-4.63 (m, 2H, H-1, OH-2), 4.15 (dd, $J_{\text{gem}} = 10.1$ Hz, $J_{5,6a} = 4.7$ Hz, 1H, H-6a), 3.73-3.49 (m, 5H, H-6b, H-4, H-2, H-3, OCH_{CH}), 3.27 (m, 1H, H-5), 1.90-0.80 (m, 10H, CH),

¹³C-NMR (67.5 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 137.9 (C_q-Ar), 128.7, 127.9, 126.3 (Ar), 101.0 (=CH-Ph), 98.6 (C-1), 78.5 (C-4), 75.6 (C-3), 71.7 (C-2), 70.0 (OCH_{CH}), 68.0 (C-6), 66.6 (C-5), 33.2, 31.4, 25.2, 23.6, 23.5 (CH).

O-(2-Amino-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucofuranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-amino-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucofuranosylazid **19**



5.0 g (5.1 mmol) Disaccharid **8** werden in einem Gemisch aus 100 ml *n*-Butanol und 25 ml Ethylendiamin gelöst und 22 Stunden bei 90 °C gerührt. Nach Ende der Reaktion (DC: Dichlormethan/Methanol 20:1) wird das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Dichlormethan/Methanol 100:1, Säulendurchmesser: 5 cm, Füllhöhe: 11 cm) gereinigt.

Ausbeute: 2.6 g (72 %),

$R_f = 0.23$ (Dichlormethan/Methanol 20:1),

$[\alpha]_D^{23} = -10.7$ (0.5, Dichlormethan),

$\text{C}_{40}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{O}_8$ (725.8),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 725.34$ $M_{\text{gef}} = 726.44$ (M+H)⁺,

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 7.41\text{-}7.17$ (m, 20H, Ar), 5.33 (d, br, 1H, OH-4'), 4.99 (d, $J_{\text{gem}} = 11.1$ Hz, 1H, CH₂O), 4.91 (d, $J_{\text{gem}} = 11.5$ Hz, 1H, CH₂O), 4.66 (d, $J_{\text{gem}} = 11.6$ Hz, 1H, CH₂O), 4.61 (d, $J_{\text{gem}} = 11.3$ Hz, 1H, CH₂O), 4.59-4.46 (m, 4H, CH₂O, H-1), 4.30-4.26 (m, 2H, CH₂O, H-1'), 3.96 (dd, $J_{\text{gem}} = 11.2$ Hz, $J_{5,6a} = 3.0$ Hz, 1H, H-6a), 3.91 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.6$ Hz, 1H, H-4), 3.79-3.70 (m, 2H, H-6a', H-6b), 3.63 (m, 1H, H-5), 3.43-3.23 (m, 4H, H-6b', H-4', H-3, H-5'), 3.12 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.0$ Hz, 1H, H-3'), 2.57 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} = 9.0$ Hz, 1H, H-2'), 2.48 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} = 8.8$ Hz, 1H, H-2), 1.57 (m, br, 4H, NH₂),

¹³C-NMR (67.5 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 139.2, 138.8, 138.2$ (C_q-Ar), 128.3-127.1 (Ar), 102.7 (C-1'), 91.0 (C-1), 84.8 (C-3'), 82.6 (C-3), 76.4 (C-5), 76.3 (C-5'), 74.6 (C-4), 73.6, 73.3, 72.4, 72.1 (CH₂O), 70.4 (C-4'), 69.7 (C-6'), 67.7 (C-6), 57.0 (C-2'), 56.6 (C-2).

O-(3,6-Di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-trifluoracetamido- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-trifluoracetamido- β -*D*-glucopyranosylazid **20**

β -Bn₂GlcNHTFA- β -Bn₂GlcNHTFA-N₃

Zu einer Lösung von 2.5 g (3.4 mmol) Diamin **19** in 75 ml absolutem Dichlormethan werden 1.2 ml Triethylamin und 1.3 ml (7.6 mmol) Trifluoressigsäure-pentafluorphenylester getropft. Nach 1.5 Stunden Rühren (DC: Dichlormethan/Methanol 30:1) wird mit Dichlormethan verdünnt und je einmal mit 1M HCl und gesättigter KHCO₃-Lösung extrahiert. Die organischen Phasen werden über MgSO₄ abfiltriert, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Dichlormethan/Methanol 200:1, Säulendurchmesser 5 cm, Füllhöhe 9 cm) gereinigt.

Ausbeute: 2.5 g (79 %),

$R_f = 0.32$ (Dichlormethan/Methanol 30:1),

$[\alpha]_D^{23} = -37.2$ (0.5, Dichlormethan),

C₄₄H₄₅F₆N₅O₁₀ (917.9),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 917.31$ $M_{\text{gef}} = 935.46$ (M+Na)⁺,

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 9.64$ (d, $J_{\text{NH},2} = 9.0$ Hz, 1H, NH'), 9.61 (d, $J_{\text{NH},2} = 8.2$ Hz, 1H, NH), 7.35-7.16 (m, 20H, Ar), 5.61 (d, $J_{\text{OH},4,4} = 6.8$ Hz, 1H, OH-4'), 4.95 (d, $J_{\text{gem}} = 11.1$ Hz, 1H, CH₂O), 4.86 (d, $J_{\text{gem}} = 11.5$ Hz, 1H, CH₂O), 4.82 (d, $J_{1,2} = 8.7$ Hz, 1H, H-1 β), 4.65 (d, $J_{1,2} = 8.3$ Hz, 1H, H-1' β), 4.61 (d, $J_{\text{gem}} = 12.1$ Hz, 1H, CH₂O), 4.58-4.50 (m, 3H, CH₂O), 4.42 (d, $J_{\text{gem}} = 16.6$ Hz, 1H, CH₂O), 4.25 (d, $J_{\text{gem}} = 12.3$ Hz, 1H, CH₂O), 3.98 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.1$ Hz, 1H, H-4), 3.82-3.67 (m, 6H, H-2', H-6a', H-6a/b, H-2, H-3), 3.66-3.54 (m, 2H, H-3', H-5), 3.44-3.32 (m, 2H, H-4', H-6b'), 3.26 (m, 1H, H-5'),

¹³C-NMR (90 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 156.7, 156.3$ (C=O), 138.7, 138.7, 138.6, 138.3 (C_q-Ar), 128.2-127.0 (Ar), 98.9 (C-1'), 87.1 (C-1), 81.3 (C-3'), 79.2 (C-3), 76.3 (C-5), 76.1 (C-5'), 74.2 (C-4), 73.8, 73.6, 72.4, 71.9 (CH₂O), 70.6 (C-4'), 69.1 (C-6'), 67.8 (C-6), 55.5 (C-2'), 54.2 (C-2).

O-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-trifluoracetamido- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-trifluoracetamido- β -*D*-glucopyranosylazid **23**

α -Ac₄Man- β -Bzl₂GlcNHTFA- β -Bzl₂GlcNHTFA-N₃

über Fluorid **21**:

51 mg (56 μ mol) Chitobiosylakzeptor **20** werden zusammen mit 25 mg (71 μ mol) Fluorid **21** und 50 mg gemörsertem und ausgeheiztem Molekularsieb 4 Å in 2 ml absolutem Dichlormethan unter Argon-Atmosphäre suspendiert und 20 Minuten gerührt. Anschließend wird mit 6.7 μ l (70 μ mol) Bortrifluorid-Etherat aktiviert, nach 17 Stunden (DC: Dichlormethan/Methanol 50:1) werden weitere 6.7 μ l Bortrifluorid-Etherat zugegeben. Nach 18.5 Stunden wird mit Dichlormethan verdünnt, über Celite abfiltriert, mit gesättigter KHCO₃-Lösung zweimal extrahiert und über MgSO₄ abfiltriert. Das Rohprodukt wird über Flashchromatographie (Cyclohexan/ Essigester 3:1, Säulendurchmesser: 1.5 cm, Füllhöhe: 7 cm) gereinigt.

Ausbeute: 11 mg (16 %) verunreinigt,

R_f = 0.19 (Dichlormethan/Methanol 30:1),

LC-MS: t_R = 28.2 min (10-95%),

über Trichloracetimidat **22**:

51 mg (56 μ mol) Chitobiosylakzeptor **20** werden zusammen mit 38 mg (77 μ mol) Imidat **22** und 50 mg gemörsertem und ausgeheiztem Molekularsieb 4 Å in 2 ml absolutem Dichlormethan unter Argon-Atmosphäre bei -30 °C suspendiert. Nach 20 Minuten Rühren wird mit 5.0 μ l (52 μ mol) Bortrifluorid-Etherat aktiviert. Nach vier Stunden (DC: Hexan/Aceton 2:1) wird mit Dichlormethan verdünnt, über Celite abfiltriert, mit gesättigter KHCO₃-Lösung zweimal extrahiert und über MgSO₄ abfiltriert. Das Rohprodukt wird über Flashchromatographie (Hexan/Aceton 7:1, Säulendurchmesser: 1.5 cm, Füllhöhe 8 cm) gereinigt.

Ausbeute: 46 mg (66 %) farblos, amorph,

R_f = 0.31 (Hexan/Aceton 2:1),

LC-MS: t_R = 28.1 min (10-95%),

C₅₈H₆₃F₆N₅O₁₉ (1248.1),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 1247.40$ $M_{\text{gef}} = 1270.5 (M+\text{Na})^+$,

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO): $\delta = 9.79$ (d, $J_{\text{NH},2} = 8.1$ Hz, 1H, NH^1), 9.57 (d, $J_{\text{NH},2} = 8.8$ Hz, 1H, NH^2), 7.36-7.15 (m, 20H, Ar), 5.22-5.20 (m, 2H, H-1^3 , H-2^3), 5.15 (dd, $J_{3,4} = 9.9$ Hz, $J_{2,3} = 2.7$ Hz, 1H, H-3^3), 5.07 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.9$ Hz, 1H, H-4^3), 4.94 (d, $J_{\text{gem}} = 11.4$ Hz, 1H, OCH_2), 4.82 (d, $J_{1,2} = 8.8$ Hz, 1H, H-1^1), 4.66 (d, $J_{1,2} = 7.2$ Hz, 1H, H-1^2), 4.64 (s, 2H, OCH_2), 4.61 (s, 2H, OCH_2), 4.52 (d, $J_{\text{gem}} = 11.4$ Hz, 1H, OCH_2), 4.45 (d, $J_{\text{gem}} = 12.2$ Hz, 1H, OCH_2), 4.26 (d, $J_{\text{gem}} = 12.2$ Hz, 1H, OCH_2), 4.06-3.99 (m, 2H, H-6a^3 , H-4^1), 3.96-3.91 (m, 4H, H-5^3 , H-6b^3 , H-2^2 , H-3^2), 3.87 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.5$ Hz, 1H, H-4^2), 3.83-3.66 (m, 5H, H-6a^1 , H-6b^1 , H-2^1 , H-3^1 , H-6a^2), 3.58-3.56 (m, 1H, H-5^1), 3.51-3.48 (m, 1H, H-6b^2), 3.29 (m, 1H, H-5^2), 2.03, 2.00, 1.94, 1.93, (4s, 12H, OAc),

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO): $\delta = 169.9$, 169.7, 169.4, 169.4 (C=O Ac), 156.6 (q, $J_{\text{C,F}} = 36$ Hz, 2C, C=O TFA), 138.5, 138.3, 138.3, 137.4 ($\text{C}_q\text{-Ar}$), 128.4-127.0 (Ar), 115.9 (q, $J_{\text{C,F}} = 287$ Hz, CF_3), 115.8 (q, $J_{\text{C,F}} = 287$ Hz, CF_3), 98.6 (C-1^2), 98.0 ($J_{\text{C,H}} = 175$ Hz aus gekoppeltem HMQC, α , C-1^3), 87.1 (C-1^1), 80.8 (C-3^2), 79.3 (C-3^1), 76.3 (C-5^1), 76.1 (C-4^2), 74.2 (C-4^1), 73.9 (C-5^2), 73.8, 72.9, 72.2, 72.0 (OCH_2), 68.9 (C-2^3), 68.8 (C-5^3), 68.5 (C-6^2), 68.4 (C-3^3), 67.9 (C-6^1), 65.1 (C-4^3), 61.9 (C-6^3), 55.5 (C-2^2), 54.2 (C-2^1), 20.4, 20.4, 20.4, 20.4 (Ac).

4,6-O-Benzyliden-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- α -D-mannopyranosyl-phenyl-sulfoxid **26**

4,6-O-Benzyliden-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- α -D-mannopyranosyl-phenyl-sulfon **26b**

α -BenzylidenMPM₂Man-S(O)_{1,2}Ph

0.50 g (0.83 mmol) Thiomannosid **15** werden in 5 ml Dichlormethan gelöst und bei -12 °C 15 Minuten gerührt. Anschließend werden 0.23 g (0.93 mmol, 70 %ig) MCPBA zugegeben und das Kältebad entfernt. Nach zwei Stunden (DC: Cyclohexan/Essigsäureethylester 2:1) wird gesättigte KHCO_3 -Lösung zugegeben und zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 abfiltriert, eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird flashchromatographisch (Cyclohexan/Essigsäureethylester 6:1, Säulendurchmesser: 3 cm, Füllhöhe: 9 cm) gereinigt.

Ausbeute: 309 mg (60 %) Sulfoxid,

121 mg (24 %) Sulfon,

Sulfon 26b:

$R_f = 0.45$ (Cyclohexan/Essigsäureethylester 2:1),

$C_{35}H_{36}O_9S$ (633.7),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{ber} = 632.21$ $M_{gef} = 655.25$ (M+Na)⁺,

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 7.93$ (d, $J_{2,3} = 7.4$ Hz, 2H, Ph-SO₂-2/6), 7.82 (dd, $J_{3,4} = 7.3$ Hz, 1H, Ph-SO₂-4), 7.69 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 7.4$ Hz, 2H, Ph-SO₂-3/5), 7.46-7.35 (m, 5H, Ph-CH), 7.24-7.20 (m, 4H, MPM), 6.89-6.86 (m, 4H, MPM), 5.71 (s, 1H, =CH-Ph), 5.35 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1), 4.64 (d, $J_{gem} = 11.3$ Hz, 1H, CH₂Oa), 4.53-4.44 (m, 4H, CH₂O, CH₂Ob, H-2), 4.35-4.27 (m, 1H, H-5), 4.16-4.00 (m, 2H, H-3, H-4), 4.01 (dd, $J_{gem} = 10.0$ Hz, $J_{5,6a} = 4.6$ Hz, 1H, H-6a), 3.79-3.71 (m, 6H, OMe, OMe), 3.64 (dd, $J_{gem} = J_{5,6b} = 10.0$ Hz, 1H, H-6b),

¹³C-NMR (67.5 MHz [D₆]-DMSO): $\delta = 158.9, 158.7, 137.5, 136.1$ (C_q-Ar), 134.6 (Ar), 130.1, 130.1 (C_q-Ar), 129.9, 129.9, 129.5, 129.1, 128.9, 128.1, 126.0, 113.6, 113.5 (Ar), 100.6 (=CH-Ph), 90.6 (C-1), 76.4 (C-3/4), 75.1 (C-3/4), 71.7 (CH₂O), 70.9 (CH₂O), 70.7 (C-2), 68.3 (C-5), 67.3 (C-6), 55.0, 55.0 (OMe).

Sulfoxid 26:

$R_f = 0.36$ (Cyclohexan/Essigsäureethylester 2:1),

$C_{35}H_{36}O_8S$ (616.7),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{ber} = 616.21$ $M_{gef} = 639.27$ (M+Na)⁺,

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 7.69$ -7.58 (m, 5H, Ph-SO), 7.48-7.36 (m, 5H, Ph-CH), 7.15 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, MPM), 6.97 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, MPM'), 6.87 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, MPM), 6.79 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, MPM'), 5.72 (s, 1H, =CH-Ph), 4.76 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1), 4.48-4.34 (m, 3H, CH₂Oa, CH₂Ob, CH₂Oa'), 4.23-4.09 (m, 6H, H-6a, H-5, CH₂Ob', H-3, H-4, H-6b), 4.03 (dd, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, 1H, H-2), 3.75 (s, 3H, OMe), 3.74 (s, 3H, OMe),

^{13}C -NMR (67.5 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): δ = 158.8, 158.7, 141.0, 137.6 (C_q -Ar), 131.4 (Ar), 130.2, 130.2 (C_q -Ar), 129.8, 129.4, 129.1, 128.8, 128.1, 126.1, 124.4, 113.5, 113.5 (Ar), 100.6 ($=\underline{\text{C}}\text{H}$ -Ph), 95.3 (C-1), 76.9 (C-3/4), 75.4 (C-3/4), 71.2 (C-2), 71.1 (CH_2O), 70.9 (CH_2O), 69.7 (C-5), 67.3 (C-6), 55.1 (OMe), 55.0 (OMe).

2-Hydroxymethylbenzoesäuremethylester 28

15 g (0.11 mmol) Phthalid werden zusammen mit 5.6 g (0.14 mmol) NaOH in 75 ml Wasser gelöst. Zu dieser Lösung (DC: Cyclohexan/Essigsäureethylester 3: 1, 1 % Essigsäure) werden 25 ml 1M HCl gegeben und unter Eiskühlung 10.6 ml (0.11 mmol) Dimethylsulfat getropft. Nach 16 Stunden Rühren (DC: Cyclohexan/Essigsäureethylester 3: 1, 1 % Essigsäure) bei Zimmertemperatur wird mit Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden über MgSO_4 abfiltriert und eingedampft. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie (Cyclohexan/Ethanol 5:1, Säulendurchmesser: 7.5 cm, Füllhöhe: 9 cm) gereinigt.

Ausbeute: 14.5 g (27 %, Gemisch, enthält zu 70 % Edukt) farblos, amorph,

R_f (Produkt) = 0.34 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 3:1, 1 % AcOH),

R_f (Säure) = 0.14 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 3:1, 1 % AcOH),

$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$ (166.2),

^1H -NMR (270 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): δ = 7.90-7.30 (m, 4H, Ar), 5.23 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{OH}}$ = 5.5 Hz, 1H, OH), 4.81 (d, $J_{\text{CH}_2,\text{OH}}$ = 5.5 Hz, 2H, CH_2), 3.80 (s, 3H, Me),

^{13}C -NMR (67.5 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): δ = 167.0 (C=O), 144.2 (C-1), 132.2, 129.7, 126.8, 126.4 (Ar), 124.8 (C-2), 61.0 (CH_2), 51.9 (Me).

2-(Hydroxycarbonyl)-benzyl 4,6-O-benzyliden-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- α -D-mannopyranosid 27 α -BenzylidenMPM₂Man-HCB

500 mg (0.83 mmol) Thiomannosid **15** werden zusammen mit 670 mg (entspr. 1.2 mmol Alkohol **28**) Akzeptorgemisch, 260 mg (1.2 mmol) NIS und 500 mg gemörsertem und ausgeheiztem Molekularsieb 4 Å in 10 ml absolutem Dichlormethan 15 Minuten bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 µl einer gesättigten Lösung von TfOH in absolutem Dichlormethan gestartet. Nach zehn Minuten (DC: Cyclohexan/Essigsäureethylester 2:1) wird verdünnt, über Celite abfiltriert und je einmal mit gesättigter Na₂S₂O₃- und KHCO₃-Lösung extrahiert. Die organischen Phasen werden über MgSO₄ abfiltriert, eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird flashchromatographisch (Cyclohexan/Essigsäureethylester 6:1, Säulendurchmesser: 7.5 cm, Füllhöhe: 9 cm) gereinigt. Der Methylester (780 mg) wird in einer Lösung von 70 mg (1.75 mmol) NaOH in 2 ml Wasser und 20 ml THF gerührt. Im Laufe von sechs Tagen werden insgesamt weitere 580 mg NaOH und 2 ml Wasser zugegeben. Anschließend (DC: Cyclohexan/Essigsäureethylester 2:1, 1 % Essigsäure) wird mit 100 ml Dichlormethan verdünnt und je einmal mit 1M HCl sowie gesättigter Kochsalzlösung extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ abfiltriert, eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird flashchromatographisch (Cyclohexan/Essigsäureethylester 4:1, 0.5 % Essigsäure, Säulendurchmesser: 3 cm, Füllhöhe: 10 cm) gereinigt.

Ausbeute: 320 mg (60 % über beide Stufen), farblos, amorph,

R_f (Methylester) = 0.52 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 2:1),

R_f (Säure) = 0.38 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 2:1, 1 % Essigsäure),

$[\alpha]_D^{20} = -32.5$ (0.6, Dichlormethan),

C₃₇H₃₈O₁₀ (642.7),

ESI-MS (Methylester, Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 656.26$ $M_{\text{gef}} = 679.31$ (M+Na)⁺,

ESI-MS (Säure, Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 642.25$ $M_{\text{gef}} = 665.26$ (M+Na)⁺,

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 12.8$ (s, br, 1H, CO₂H), 7.83 (d, $J_{3,4} = 7.7$ Hz, 1H, HCB-3), 7.70 (d, $J_{5,6} = 7.8$ Hz, 1H, HCB-6), 7.56 (dd, $J_{5,6} = 7.8$ Hz, $J_{4,5} = 6.4$ Hz, 1H, HCB-5), 7.41-7.29 (m, 6H, HCB-4, Ph), 7.33-7.23 (m, 4H, MPM), 6.87-6.84 (m, 4H, MPM),

5.66 (s, 1H, =CH-Ph), 5.15 (d, $J_{\text{gem}} = 14.7$ Hz, 1H, CH₂Oa), 4.99 (d, $J_{\text{gem}} = 14.7$ Hz, 1H, CH₂Ob), 4.82-4.81 (m, 3H, CH₂O_{HCB}, H-1), 4.78 (d, $J_{\text{gem}} = 11.4$ Hz, 1H, CH₂Oa'), 4.68 (d, $J_{\text{gem}} = 11.4$ Hz, 1H, CH₂Ob'), 4.21 (dd, $J_{\text{gem}} = 10.1$ Hz, $J_{5,6} = 4.8$ Hz, 1H, H-6a), 4.13 (dd, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, 1H, H-2), 3.95 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.6$ Hz, 1H, H-4), 3.77-3.72 (m, 8H, H-6b, H-3, 2 OMe), 3.38 (m, 1H, H-5),

¹³C-NMR (67.5 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 168.3$ (C=O), 158.6, 158.6 (MPM-4), 144.2 (HCB-2), 137.8 (C_q-Ar), 132.0, 131.8 (Ar), 130.9, 130.6 (MPM-1), 129.9, 129.5, 128.8 (Ar), 128.3 (HCB-1), 128.0, 126.7, 126.3, 126.0, 113.5, 113.4 (Ar), 101.4 (=CH-Ph), 100.5 (C-1), 77.8 (C-4), 77.5 (C-3), 76.3 (C-2), 74.1, 69.6 (CH₂O), 68.4 (C-6), 66.8 (C-5), 61.1 (CH₂O_{HCB}), 55.0 (2 OMe).

O-(4,6-*O*-Benzyliden-2,3-di-*O*-(4-methoxybenzyl)- α/β -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-trifluoracetamido- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-trifluoracetamido- β -*D*-glucopyranosylazid **24**

β -BenzylidenMPM₂Man- α/β -Bn₂GlcNHTFA- β -Bn₂GlcNHTFA-N₃

über Thiomannosid **15**:

Zur Synthese des gewünschten Trisaccharids **24** wurden verschiedene Versuche unternommen, die sich im wesentlichen nur durch die Menge an zugesetztem Akzeptor **20** unterscheiden. Als Beispiel ist im folgenden eine Reaktion mit äquimolaren Verhältnissen von Donor und Akzeptor angegeben.

In einem mit Aluminiumfolie umwickelten Kolben wird 40 mg (0.27 mmol) Silbertriflat unter Argon-Atmosphäre in 0.7 ml absolutem Dichlormethan 15 Minuten bei -85 °C gerührt. Anschließend wird eine Lösung von 17 μ l (ca. 3 mmol) Phenylsulfenylchlorid in 0.3 ml absolutem Dichlormethan zugetropft. Zu dem Sulfenyltriflat wird eine Lösung aus 38 mg (63 μ mol) Thiomannosid **15** und 33 mg (0.16 mmol) DTBMP getropft. Wenn mittels DC (Cyclohexan/Aceton 2:1) eine Aktivierung nachweisbar ist, werden 58 mg (63 μ mol) Akzeptor **20**, gelöst in 0.3 ml absolutem Dichlormethan, zugetropft. Nach 45 Minuten hat sich die Reaktion auf -60 °C erwärmt, nach insgesamt zwei Stunden (-10 °C Endtemperatur, DC: Dichlormethan/Methanol 100:1) wird verdünnt und mit gesättigter KHCO₃-Lösung extrahiert. Die organischen Phasen werden über MgSO₄ abfiltriert, eingeengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Dichlormethan/Methanol

400:1, Säulendurchmesser: 1 cm, Füllhöhe: 6 cm) gereinigt. Es wurden 4 Fraktionen erhalten, die mittels ESI-MS untersucht wurden. In den beiden mittleren Fraktionen konnte der Akzeptor **20**, 1,1-verknüpfter Donor **25**, etwas Produkt **24** und nicht identifizierbare Verbindungen mit m/z 1129 und 1237 nachgewiesen werden. Deshalb wurden diese beiden Fraktionen vereinigt (45 mg) und wiederum durch Flashchromatographie (Cyclohexan/Essigsäureethylester 5:1, Säulendurchmesser: 1 cm, Füllhöhe: 6.5 cm) getrennt. Es wurden zwei Fraktionen erhalten, von denen die erste (7 mg, 7.9 %, $\beta:\alpha = 2:1$ lt. LC/MS) das gewünschte Produkt enthielt, die zweite (36 mg) die Verunreinigungen.

LC-MS: $t_R(\text{Akzeptor}) = 21.4$ min (50-95%), $M_{\text{ber}} = 917.31$ $M_{\text{gef}} = 940.30$ (M+Na)⁺,

LC-MS: $t_R(1-1) = 25.3$ min (50-95%), $M_{\text{ber}} = 998.41$ $M_{\text{gef}} = 1021.40$ (M+Na)⁺,

LC-MS: $t_R(\beta\text{-Isomer}) = 28.6$ min (50-95%), $M_{\text{ber}} = 1407.51$ $M_{\text{gef}} = 1430.52$ (M+Na)⁺,

LC-MS: $t_R(\alpha\text{-Isomer}) = 28.9$ min (50-95%), $M_{\text{ber}} = 1407.51$ $M_{\text{gef}} = 1430.52$ (M+Na)⁺.

über Sulfoxid **26**:

100 mg (0.16 mmol) Sulfoxid **26** werden zusammen mit 57 mg (0.28 mmol) DTBMP in 1 ml absolutem Dichlormethan gelöst und unter Argon-Atmosphäre fünf Minuten bei -78°C gerührt. Anschließend werden 27 μl (0.16 mmol) Tf_2O zugetropft. Nach weiteren fünf Minuten wird 113 mg (0.12 mmol) Disaccharid **20** gelöst in 0.5 ml absolutem Dichlormethan zugegeben. Nach zwei Stunden (DC: Cyclohexan/Essigsäureethylester 2:1) wird mit Dichlormethan verdünnt, mit gesättigter KHCO_3 -Lösung extrahiert, die organische Phase über MgSO_4 abfiltriert, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie (Dichlormethan/Methanol 400:1, Säulendurchmesser: 1.5 cm, Füllhöhe: 8.5 cm) gereinigt. Es wurde eine Fraktion erhalten (60 mg), die lt. LC/MS etwa zur Hälfte Produkt **24** ($\beta:\alpha = 4:1$, 17 %) neben nicht umgesetztem Akzeptor **20** und einer unbekannteren Verbindung mit $m/z = 1059.6$ enthielt.

über HCB-Mannosid **27**:

100 mg (0.16 mmol) Donor **27** und 57 mg (0.28 mmol) DTBMP werden zusammen mit 100 mg gemörsertem und ausgeheiztem Molekularsieb 4 Å in 1 ml absolutem Dichlormethan zehn Minuten bei -78°C gerührt. Anschließend werden 27 μl (0.16 mmol) Tf_2O zugegeben. Nach weiteren zehn Minuten werden 113 mg (0.12 mmol) Disaccharid **20** gelöst in 0.5 ml absolutem Dichlormethan zugegeben. Nach zwei Stunden (DC: Cyclohexan/Essigsäureethylester 2:1) wird verdünnt, über Celite abfiltriert und mit gesättigter KHCO_3 -Lösung

extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO_4 abfiltriert, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie (Cyclohexan/Essigsäureethylester 4:1, Säulendurchmesser: 3 cm, Füllhöhe: 6 cm) fraktioniert. Produkt läßt sich mittels LC/MS nur in Spuren nachweisen.

4,6-O-Benzyliden-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)-D-mannopyranose **33**

BenzylidenMPM₂Man-OH

Zu einer Lösung aus 1.6 g (2.7 mmol) Thiomannosid **15** in 35 ml Acetonitril werden 5 ml Wasser, 3 g (11 mmol) HgCl_2 und 1.2 g (12 mmol) Calciumcarbonat gegeben. Die Reaktion wird unter Rückfluß 24 Stunden (DC: Cyclohexan/Essigester 3:1) heftig gerührt. Die Reaktionslösung wird mit gesättigter K_2CO_3 -Lösung basisch eingestellt, über Celite filtriert und eingengt. Der Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen und mit 1N HCl und gesättigter KHCO_3 -Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO_4 abfiltriert, eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Essigester 9:1 → 4:1, Säulendurchmesser: 3.5 cm, Füllhöhe: 9 cm) gereinigt.

Ausbeute: 510 mg (38 %) $\beta/\alpha = 1:5$ lt. NMR,

$R_f = 0.21$ (Cyclohexan/ Essigester 3:1),

$\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_8$ (508.6),

HRESI-MS (95% Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 508.2097$ $M_{\text{gef}} = 531.1993$ ($\text{M}+\text{Na}$)⁺,

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO, nur α -Anomer): $\delta = 7.43\text{-}7.35$ (m, 5H, Ph), 7.28-7.22 (m, 4H, Ar), 6.90-6.85 (m, 4H, Ar), 6.72 (d, $J_{\text{OH},1} = 4.3$ Hz, 1H, OH), 5.67 (s, 1H, = $\underline{\text{C}}\text{H-Ph}$), 5.05 (dd, $J_{\text{OH},1} = 4.3$ Hz, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1), 4.65-4.53 (m, 4H, OCH_2 , OCH_2), 4.07 (dd, $J_{\text{gem}} = 9.5$ Hz, $J_{5,6a} = 4.2$ Hz, 1H, H-6a), 4.01 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.5$ Hz, 1H, H-4), 3.82 (dd, $J_{3,4} = 9.5$ Hz, $J_{2,3} = 2.9$ Hz, 1H, H-3), 3.80-3.71 (m, 9H, H-5, H-2, H-6b, 2 OCH_3),

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 158.7, 158.6, 138.0, 130.6, 130.5$ ($\text{C}_q\text{-Ar}$), 129.4, 128.9, 128.7, 128.0, 126.0, 113.5, 113.5 (Ar), 100.6 (= $\underline{\text{C}}\text{H-Ph}$), 92.7 (C-1), 78.4 (C-4), 76.6 (C-2), 75.0 (C-3), 72.1, 70.7 (CH_2O), 68.1 (C-6), 63.4 (C-5), 55.0 (2 OCH_3).

4,6-O-Benzyliden-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- α -D-mannopyranosyl-trichloracetimidat **32**
 α -BenzylidenMPM₂Man-TCAI

500 mg (0.98 mmol) Halbacetal **33** werden in 15 ml absolutem Dichlormethan und 1.0 ml (10 mmol) Trichloracetonitril gelöst und 15 Minuten bei 0 °C unter Argon-Atmosphäre gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 36 μ l (0.24 mmol) DBU gestartet. Nach 15 Minuten (DC: Cyclohexan/Aceton 3:1) wird bei Zimmertemperatur eingedampft und das Rohprodukt im Hochvakuum getrocknet. Dieses wird anschließend mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Aceton 6:1, Säulendurchmesser: 3.5 cm, Füllhöhe: 9 cm) gereinigt.

Ausbeute: 522 mg (81.4 %) farblos, amorph,

$R_f = 0.50$ (Cyclohexan/Aceton 3:1),

$[\alpha]_D^{22} = +13.4$ (0.5, Dichlormethan),

$C_{31}H_{32}Cl_3NO_8$ (653.0),

HRESI-MS (95 % Acetonitril): $M_{ber} = 651.1194$ $M_{gef} = 674.1085$ (M+Na)⁺,

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 9.88$ (s, 1H, NH), 7.41-7.20 (m, 9H, Ar), 6.93-6.84 (m, 4H, Ar), 6.19 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1), 5.74 (s, 1H, =CH-Ph), 4.65 (s, br, 2H, CH₂O), 4.55 (s, br, 2H, CH₂O), 4.21-4.08 (m, 2H, H-4, H-6a), 3.96 (dd, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, 1H, H-2), 3.85-3.66 (m, 9H, H-3, H-6b, H-5, 2 OCH₃),

¹³C-NMR (67.5 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 158.9, 158.8$ (C_q-Ar), 157.3 (C=N), 137.5, 130.0, 129.0 (C_q-Ar), 129.6, 129.4, 128.8, 128.1, 126.0, 113.6, 113.6 (Ar), 100.6 (=CH-Ph), 95.5 ($J_{C,H} = 178.4$ Hz aus gekoppeltem HMQC, α , C-1), 90.7 (CCl₃), 77.2 (C-4), 74.2 (C-3), 74.2 (C-2), 72.4, 71.0 (CH₂O), 67.3 (C-6), 66.6 (C-5), 55.0 (2 OCH₃).

Cyclohexyl 4,6-O-benzyliden-2,3-di-O-(4-methoxybenzyl)- β -D-mannopyranosid **16**
 β -BenzylidenMPM₂Man-OCH

30 μ l (0.29 mmol) Cyclohexanol werden unter Argon-Atmosphäre in 0.5 ml absolutem Dichlormethan gelöst und 15 Minuten bei -80 °C gerührt. Anschließend werden entweder 15 μ l Trimethylsilyltriflat-Lösung (5.7 μ mol; 6.9 μ l TMSOTf in 100 μ l Dichlormethan) oder

50 μl Trifluormethansulfonsäure-Lösung (6.5 μmol ; 3.4 μl TfOH in 300 μl Dichlormethan) zugegeben. Über eine Spritzenpumpe (das Ende der Kapillare taucht in die Akzeptorlösung) wird eine Lösung aus 12.5 mg (19 μmol) Imidat **32** in 200 μl absolutem Dichlormethan zugefügt. Nach beendeter Zugabe wird noch 20 Minuten (DC: Cyclohexan/Aceton 3:1) weiter gerührt (die Temperatur steigt bis auf $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ an), mit Dichlormethan verdünnt und mit gesättigter KHCO_3 -Lösung extrahiert. Das Rohprodukt wird direkt NMR-spektroskopisch analysiert. Der Zuckeranteil entspricht der Literatur.^[56]

Ethyl 2-amino-3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-1-thio- β -D-glucopyranosid 35

β -Bn₂GlcNH₂-SEt

1.9 g (3.6 mmol) Thioglycosid **34** werden in 40 ml n-BuOH und 10 ml Ethylendiamin gelöst und 18 Stunden bei $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Nach Beendigung der Reaktion (DC: Dichlormethan/Methanol = 30:1) wird eingedampft und das Rohprodukt im Hochvakuum getrocknet. Dieses wird durch Flashchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 100:1, Säulendurchmesser 3.5 cm, Füllhöhe 10 cm) gereinigt.

Ausbeute: 1.2 g (84 %) farbloser Sirup,

$R_f = 0.68$ (Dichlormethan/Methanol = 30:1),

$[\alpha]_D^{22} = -36.6$ (0.5, Dichlormethan),

$\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{NO}_4\text{S}$ (403.54),

HRESI-MS (50 % Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 403.1817$ $M_{\text{gef}} = 404.1902$ (M+H)⁺,

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 7.39\text{-}7.34$ (m, 10H, Ar), 5.35 (d, $J_{4,\text{OH}} = 6.2$ Hz, 1H, OH), 4.90 (d, $J_{\text{gem}} = 11.4$ Hz, 1H, CH₂Oa), 4.71 (d, $J_{\text{gem}} = 11.4$ Hz, 1H, CH₂Ob), 4.53 (s, 2H, CH₂O), 4.29 (d, $J_{1,2} = 9.9$ Hz, 1H, H-1 β), 3.75 (dd, $J_{\text{gem}} = 10.4$ Hz, $J_{\text{vic}} < 1$ Hz, 1H, H-6a), 3.55 (dd, $J_{\text{gem}} = 10.4$ Hz, $J_{\text{vic}} = 5.8$ Hz, 1H, H-6b), 3.44-3.31 (m, 2H, H-5, H-4), 3.19 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.7$ Hz, 1H, H-3), 2.66-2.50 (m, 3H, S-CH₂-CH₃, H-2), 1.53 (s, 2H, NH₂), 1.22 (t, $J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 7.4$ Hz, 3H, S-CH₂-CH₃),

^{13}C -NMR (67.5 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 139.2, 138.6$ (C_q -Ar), 128.1, 128.0, 127.7, 127.3, 127.2, 127.2 (Ar), 86.5 (C-3), 86.1 (C-1), 79.6 (C-5), 73.7, 72.2 (CH_2O), 70.0 (C-4), 69.7 (C-6), 56.0 (C-2), 23.2 (S- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ - $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 15.3 (S- $\text{C}\underline{\text{H}}_2$ - $\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

Ethyl 2-azido-3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-thio- β -D-glucopyranosid 36

β -Bn₂GlcN₃-SEt

2.0 g (31 mmol) NaN_3 werden in 5 ml Wasser gelöst, mit 6 ml Dichlormethan versetzt und 15 Minuten bei 0 °C gerührt. Zu dem Gemisch wird langsam 1 ml Trifluormethansulfonsäureanhydrid zugetropft und weitere zwei Stunden bei 0 °C heftig gerührt. Anschließend wird die organische Phase im Scheidetrichter abgetrennt und die wässrige zweimal mit je 2 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter KHCO_3 -Lösung gewaschen und mit MgSO_4 getrocknet.

1.0 g (2.5 mmol) Amin **35** wird zusammen mit 1.0 g (8.2 mmol) DMAP in 20 ml Dichlormethan gelöst. Zu dieser Lösung wird portionsweise Triflylazid-Lösung getropft bis vollständiger Umsatz (DC: Dichlormethan/Methanol = 30:1) erreicht ist. Die Reaktion wird mit Dichlormethan verdünnt, zweimal mit 1 N HCl und einmal mit gesättigter KHCO_3 -Lösung extrahiert, über MgSO_4 abfiltriert, eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Essigester = 7:1, Säulendurchmesser: 5 cm, Füllhöhe: 10 cm) gereinigt.

Ausbeute: 480 mg (45 %) farbloser Sirup,

$R_f = 0.90$ (Dichlormethan/Methanol = 30:1),

$[\alpha]_D^{22} = -69.2$ (0.5, Dichlormethan),

$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ (429.53),

HRESI-MS (95 % Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 429.1722$ $M_{\text{gef}} = 452.1605$ ($\text{M}+\text{Na}$)⁺,

^1H -NMR (270 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 7.41$ -7.24 (m, 10H, Ar), 5.62 (d, $J_{4,\text{OH}} = 4.6$ Hz, 1H, OH), 4.91 (d, $J_{\text{gem}} = 11.3$ Hz, 1H, CH_2Oa), 4.71 (d, $J_{\text{gem}} = 11.3$ Hz, 1H, CH_2O), 4.51-4.47 (m, 3H, CH_2O , H-1), 3.72 (dd, $J_{\text{gem}} = 9.9$ Hz, $J_{\text{vic}} < 1$ Hz, 1H, H-6a), 3.56-3.35 (m, 5H, H-6b, H-5, H-3, H-2, H-4), 2.80-2.60 (m, 2H, S- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ - $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 1.22 (t, $J_{\text{CH}_3,\text{CH}_2} = 7.5$ Hz, 3H, S- $\text{C}\underline{\text{H}}_2$ - $\underline{\text{C}}\text{H}_3$),

^{13}C -NMR (67.5 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 138.5, 138.5$ (C_q -Ar), 128.1, 128.1, 128.0, 128.0, 127.7, 127.7, 127.3, 127.3 (Ar), 84.2 (C-3), 82.6 (C-1), 79.3 (C-5), 73.9, 72.2 (CH_2O), 69.9 (C-4), 69.3 (C-6), 64.8 (C-2), 23.5 (S- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ - CH_3), 15.2 (S- CH_2 - $\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

Phenyl 4,6-O-benzyliden-2,3-di-O-(4-nitrobenzyl)-1-thio- α -D-mannopyranosid 38

BenzylidenPNB₂Man-SPh

Phenyl 4,6-O-benzyliden-2-O-(4-nitrobenzyl)-1-thio- α -D-mannopyranosid 39

BenzylidenPNBMan-SPh

500 mg (1.4 mmol) Diol **37** werden zusammen mit 1.2 g (5.6 mmol) 4-Nitrobenzylbromid, einer Spatelspitze KI sowie 700 mg fein gepulvertem K_2CO_3 in 10 ml absolutem Acetonitril suspendiert und 23 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Anschließend werden weitere 600 mg (2.8 mmol) 4-Nitrobenzylbromid zugegeben und noch einmal 24 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktionsmischung wird über eine Porzellanfritte filtriert, eingengt und mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Essigester = 6:1, Säulendurchmesser: 3 cm, Füllhöhe: 8 cm) gereinigt. Hierbei werden zwei Fraktionen gewonnen, von denen die erste das gewünschte Produkt **38**, die zweite Verbindung **39** enthält.

Ausbeute: 290 mg (33 %) **38**, gelber Sirup,

140 mg (20 %) **39**, gelber Sirup,

38:

$R_f = 0.56$ (Cyclohexan/Essigsäureethylester = 2:1),

$[\alpha]_D^{21} = +50.5$ (2.5, Dichlormethan),

$\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}$ (630.67),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 630.17$ $M_{\text{gef}} = 669.20$ (M+K)⁺,

^1H -NMR (270 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 8.29$ -8.11 (m, 4H, PNB), 7.68-7.58 (m, 4H, PNB), 7.54-7.32 (m, 10H, Ar), 5.90 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1), 5.76 (s, 1H, = $\underline{\text{C}}\text{H}$ -Ph), 4.99 (d, $J_{\text{gem}} = 13.4$ Hz, 1H, CH_2Oa), 4.85-4.79 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{O}'$, CH_2Ob), 4.31 (dd, $J_{2,3} = 3.1$ Hz, $J_{1,2} < 1$ Hz,

1H, H-2), 4.27 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.4$ Hz, 1H, H-4), 4.19-4.07 (m, 2H, H-5, H-6a), 3.94-3.82 (m, 2H, H-3, H-6b),

^{13}C -NMR (67.5 MHz $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 147.8, 147.7, 146.5, 146.2, 137.6, 133.0$ (C_q -Ar), 131.4, 129.2, 128.8, 128.3, 128.1, 127.9, 127.6, 126.1, 123.3, 123.3 (Ar), 100.1 ($=\underline{\text{C}}\text{H-Ph}$), 85.5 (C-1), 77.9 (C-2), 77.8 (C-4), 76.2 (C-3), 70.8, 70.1 (CH_2O), 67.4 (C-6), 65.1 (C-5).

39:

$R_f = 0.47$ (Cyclohexan/Essigsäureethylester = 2:1),

$\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{NO}_7\text{S}$ (495.55),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 495.1$ $M_{\text{gef}} = 496.8$ ($\text{M}+\text{H}^+$),

^1H -NMR (360 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 8.21$ (d, $J_{\text{ortho}} = 8.6$ Hz, 2H, PNB), 7.70 (d, $J_{\text{ortho}} = 8.6$ Hz, 2H, PNB), 7.53-7.42 (m, 4H, Ar), 7.41-7.30 (m, 6H, Ar), 5.80 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1), 5.68 (s, 1H, $=\underline{\text{C}}\text{H-Ph}$), 5.53 (d, $J_{\text{OH},3} = 5.9$ Hz, 1H, OH), 4.94 (d, $J_{\text{gem}} = 13.5$ Hz, 1H, CH_2Oa), 4.83 (d, $J_{\text{gem}} = 13.5$ Hz, 1H, CH_2Ob), 4.18-3.96 (m, 4H, H-5, H-6a, H-4, H-2), 3.92-3.87 (m, 1H, H-3), 3.83 (dd, $J_{\text{gem}} = J_{5,6b} = 9.5$ Hz, 1H, H-6b),

^{13}C -NMR (90 MHz $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 146.8, 146.6, 137.8, 133.3$ (C_q -Ar), 131.3, 129.2, 128.9, 128.2, 128.1, 128.0, 127.5, 126.4, 123.3 (Ar), 101.1 ($=\underline{\text{C}}\text{H-Ph}$), 85.8 (C-1), 80.9 (C-2), 78.6 (C-4), 71.1 (CH_2O), 68.2 (C-3), 67.5 (C-6), 65.3 (C-5).

4,6-O-Benzyliden-2,3-di-O-(4-nitrobenzyl)- α -D-mannopyranosyl-phenyl-sulfoxid 40

α -BenzylidenPNB₂Man-S(O)Ph

120 mg (0.19 mmol) Thiomannosid **38** werden in 2 ml Dichlormethan gelöst und zehn Minuten bei -12 °C gerührt. Anschließend werden 36 mg (0.15 mmol, 70 %ig) MCPBA in zwei Portionen zugegeben. Nach 30 Minuten (DC: Cyclohexan/Essigsäureethylester 2:1) wird gesättigte Na_2CO_3 -Lösung zugegeben und zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 abfiltriert, eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird flashchromatographisch (Cyclohexan/Essigsäureethylester 2:1, Säulendurchmesser: 2 cm, Füllhöhe: 6 cm) gereinigt.

Ausbeute: 70 mg (57 %) gelb, amorph,

$R_f = 0.33$ (Cyclohexan/Essigsäureethylester 2:1),

$[\alpha]_D^{20} = -61.7$ (0.5, Dichlormethan),

$C_{33}H_{30}N_2O_{10}S$ (646.7),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{ber} = 646.16$ $M_{gef} = 669.24$ (M+Na)⁺,

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 8.14$ (d, $J_{2,3} = 7.9$ Hz, 2H, PNB-3/5), 8.09 (d, $J_{2,3} = 7.9$ Hz, 2H, PNB-3/5'), 7.78-7.52 (m, 9H, Ph, PNB-2/6, PNB-2/6'), 7.45-7.34 (m, 5H, Ph'), 5.78 (s, 1H, =CH-Ph), 4.88 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1), 4.79 (s, 2H, CH₂O), 4.72 (d, $J_{gem} = 13.3$ Hz, 1H, CH₂Oa'), 4.49 (d, $J_{gem} = 13.3$ Hz, 1H, CH₂Ob'), 4.28-4.10 (m, 5H, H-3, H-4, H-6a, H-2, H-5), 3.75 (dd, $J_{gem} = 9.2$ Hz, $J_{5,6b} < 1$ Hz, 1H, H-6b),

¹³C-NMR (67.5 MHz [D₆]-DMSO): $\delta = 146.8, 146.7, 146.4, 145.3, 140.9, 137.4$ (C_q-Ar), 131.5, 129.4, 128.9, 128.5, 128.1, 128.0, 126.1, 124.5, 123.3 (Ar), 100.6 (=CH-Ph), 95.2 (C-1), 76.9 (C-3/4), 76.4 (C-3/4), 72.7 (C-2), 70.7, 70.6 (CH₂O), 69.7 (C-5), 67.2 (C-6).

8.1.2. Versuche zu Kapitel 2.3.2

Benzyl 2,4-di-O-benzoyl- α -D-mannopyranosid 6

Benzyl 2,6-di-O-benzoyl- α -D-mannopyranosid 42

6.0 g (33 mmol) Orthobenzoesäuretrimethylester und 2.0 g (7.4 mmol) Benzylmannosid **41** werden in 100 ml absolutem Acetonitril suspendiert. Hierzu werden 200 μ l Trifluoressigsäure gegeben. Nachdem sich das Benzylmannosid vollständig gelöst hat (DC: Dichlormethan/Methanol 10:1), werden 7 ml einer 80%igen Trifluoressigsäure zugegeben und dreißig Minuten gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 6.5 ml Pyridin neutralisiert, es wird eingedampft, in Dichlormethan aufgenommen und je einmal mit 1M HCl und gesättigter KHCO₃-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ abfiltriert, eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie (Cyclohexan/Essigsäureethylester 4:1→1:1, Säulendurchmesser: 4.5 cm, Füllhöhe: 10 cm) gereinigt.

Ausbeute: 1.7 g (48 %) 2,4-Isomer **6**, farblos, amorph,
1.3 g (37 %) 2,6-Isomer **42**, farblos, amorph,

$C_{27}H_{26}O_8$ (478.5),

2,4-Isomer **6**:

$R_f = 0.62$ (Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:1),

$[\alpha]_D^{22} = -8.0$ (0.5, Dichlormethan),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{ber} = 478.16$ $M_{gef} = 501.16$ (M+Na)⁺,

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 8.10-7.91$ (m, 5H, Ar), 7.72-7.25 (m, 10H, Ar), 5.57 (d, $J_{OH,3} = 4.9$ Hz, 1H, OH-3), 5.38 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.8$ Hz, 1H, H-4), 5.28 (dd, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} = 3.1$ Hz, 1H, H-2), 5.03 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1), 4.88 (m, 1H, OH-6), 4.77 (d, $J_{gem} = 11.8$ Hz, 1H, CH₂Oa), 4.57 (d, $J_{gem} = 11.8$ Hz, 1H, CH₂Ob), 4.21 (dd, $J_{2,3} = 3.1$ Hz, $J_{3,4} = 9.8$ Hz, 1H, H-3), 3.88 (m, 1H, H-5), 3.56-3.48 (m, 2H, H-6a/b),

¹³C-NMR (67.5 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 165.1, 165.1$ (C=O), 137.1 (C_q-Ar), 133.6, 133.3 (Ar), 129.7, 129.5 (C_q-Ar), 129.3, 129.3, 128.7, 128.5, 128.3, 127.9, 127.8 (Ar), 96.2 (C-1), 72.9 (C-2), 71.6 (C-5), 70.0 (C-4), 68.5 (CH₂O), 66.8 (C-3), 60.6 (C-6).

2,6-Isomer **42**:

$R_f = 0.47$ (Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:1),

$[\alpha]_D^{21} = +18.2$ (0.7, Dichlormethan),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{ber} = 478.16$ $M_{gef} = 501.20$ (M+Na)⁺,

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 8.01-7.97$ (m, 5H, Ar), 7.56-7.37 (m, 10H, Ar), 5.42 (d, $J_{OH,4} = 3.9$ Hz, 1H, OH-4), 5.35 (d, $J_{OH,3} = 4.1$ Hz, 1H, OH-3), 5.19 (dd, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, 1H, H-2), 4.98 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1), 4.71 (d, $J_{gem} = 11.8$ Hz, 1H, CH₂Oa), 4.62 (dd, $J_{gem} = 11.4$ Hz, $J_{5,6a} < 1$ Hz, 1H, H-6a), 4.54 (d, $J_{gem} = 11.8$ Hz, 1H, CH₂Ob), 4.48 dd, $J_{gem} = 11.4$ Hz, $J_{5,6a} = 3.6$ Hz, 1H, H-6b), 3.98-3.77 (m, 3H, H-3, H-4, H-5),

^{13}C -NMR (67.5 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 165.5, 165.1$ (C=O), 137.2 (C_q-Ar), 133.4, 133.4 (Ar), 129.8, 129.6 (C_q-Ar), 129.2, 129.0, 128.7, 128.6, 128.3, 127.8, 127.8 (Ar), 96.5 (C-1), 72.8 (C-2), 71.1 (C-5), 68.8 (C-3), 68.5 (CH₂O), 66.8 (C-4), 63.6 (C-6).

*Benzyl 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-mannopyranosid **44***

3,6-(α -Ac₄Man)₂- α -Bz₂ManOBn

208 mg (0.44 mmol) Diol **6**, 520 mg (1.3 mmol) Thiomannosid **43** und 500 mg (2.2 mmol) NIS werden mit 500 mg gemörsertem und ausgeheiztem Molekularsieb 4 Å unter Argon-Atmosphäre in 10 ml absolutem Dichlormethan suspendiert und 15 Minuten bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wird durch Zutropfen von 41 µl Trifluormethansulfonsäure gestartet. Nach 30 Minuten (DC: Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:1) wird verdünnt, über Celite abfiltriert, je einmal mit gesättigter Na₂S₂O₃- und KHCO₃-Lösung extrahiert, über MgSO₄ abfiltriert, eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird über Flashchromatographie (Cyclohexan/Essigsäureethylester 3:1, Säulendurchmesser: 3.5 cm, Füllhöhe: 7.5 cm) gereinigt.

Ausbeute: 311 mg (63 %) farblos, amorph,

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

$[\alpha]_D^{22} = +19.2$ (0.5, Dichlormethan),

C₅₅H₆₂O₂₆ (1139.1),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 1138.35$ $M_{\text{gef}} = 1161.72$ (M+Na)⁺,

^1H -NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 8.06$ (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, Bz-2/6), 8.01 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 2H, Bz-2'/6'), 7.74 (dd, $^3J = 7.5$ Hz, 1H, Bz-4), 7.65-7.62 (m, 3H, Bz-4', Bz-3/5), 7.49 (dd, $^3J = 7.7$ Hz, 2H, Bz-3'/5'), 7.44 (d, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, Bn-2/6), 7.40 (dd, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, Bn-3/5), 7.35 (dd, $^3J = 7.2$ Hz, 1H, Bn-4), 5.72 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 10.0$ Hz, 1H, H-4), 5.48 (dd, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, 1H, H-2), 5.26 (dd, $J_{2,3} = 2.9$ Hz, $J_{3,4} = 10.0$ Hz, 1H, H-3⁶), 5.22 (dd, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, 1H, H-2⁶), 5.18 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1), 5.07 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1³), 5.05 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 10.0$ Hz, 1H, H-4⁶), 4.93 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1⁶), 4.89 (dd,

$J_{3,4} = J_{4,5} = 9.7$ Hz, 1H, H-4³), 4.83 (dd, $J_{3,4} = 9.7$ Hz, 1H, H-3³), 4.77 (d, $J_{\text{gem}} = 11.7$ Hz, 1H, CH₂Oa), 4.70 (dd, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, 1H, H-2³), 4.60 (d, $J_{\text{gem}} = 11.7$ Hz, 1H, CH₂Ob), 4.57 (dd, $J_{2,3} = 2.9$ Hz, $J_{3,4} = 10.0$ Hz, 1H, H-3), 4.24-4.22 (m, 1H, H-5), 4.01-3.92 (m, 3H, H-5³, H-6³, H-6⁶), 3.86 (dd, $J_{\text{gem}} = 11.7$ Hz, $J_{5,6b} = 5.9$ Hz, 1H, H-6b⁶), 3.83-3.73 (m, 3H, H-5⁶, H-6a, H-6b³), 3.63 (dd, $J_{\text{gem}} = 10.5$ Hz, $J_{5,6b} < 1$ Hz, 1H, H-6b), 2.08, 2.06, 1.98, 1.92, 1.89, 1.77, 1.76, 1.75 (8s, 24H, OAc),

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 169.8, 169.7, 169.6, 169.6, 169.6, 169.5, 169.0, 168.6$ (C=O Ac), 165.1, 164.9 (C=O Bz), 136.8 (C_q-Ar), 133.9, 133.7, 129.6, 129.4, 129.1 (Ar), 128.9, 128.6 (C_q-Ar), 128.4, 128.3, 128.0 (Ar), 98.4 ($J_{\text{C,H}} = 176$ Hz aus gekoppeltem HMQC, α , C-1³), 96.6 ($J_{\text{C,H}} = 175$ Hz, aus gekoppeltem HMQC, α , C-1⁶), 96.3 ($J_{\text{C,H}} = 175$ Hz, aus gekoppeltem HMQC, α , C-1), 74.8 (C-3), 71.5 (C-2), 68.9 (CH₂O), 68.8 (C-5³), 68.7 (C-3⁶, C-5), 68.5 (C-2⁶), 68.3 (C-2³), 67.9 (C-4/3³), 67.8 (C-4/3⁶), 67.7 (C-5⁶), 65.4 (C-6), 65.3 (C-4³), 65.1 (C-4⁶), 61.9 (C-6³), 61.7 (C-6⁶), 20.54, 20.48, 20.35, 20.25, 20.16, 20.00 (8 OAc).

2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosylfluorid 21

Ac₄ManF

40 ml HF-Pyridin-Komplex und 4 ml Essigsäureanhydrid werden 30 Minuten in einen Kunststoff-Gefäß bei 0 °C gerührt. 5.0 g (12.8 mmol) Pentaacetylmannose werden in 20 ml absolutem Dichlormethan gelöst langsam zugetropft. Die zweiphasige Mischung wird fünf Stunden bei 0 °C gerührt. Anschließend wird mit 100 ml Dichlormethan verdünnt, je einmal mit Eiswasser, 1 M HCl und gesättigter KHCO₃-Lösung gewaschen, über MgSO₄ abfiltriert, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Essigsäureethylester 4:1; Säulendurchmesser: 5.5 cm, Füllhöhe: 7.0 cm) gereinigt.

Ausbeute: 4.1 g (90%) farbloses Öl.

Ethyl O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(3,4,6-tri-O-acetyl-thio- α -D-mannopyranosid 5 α -Ac₄Man-1 \rightarrow 2- α -Ac₃ManSEt

2.0 g (2.9 mmol) peracetyliertes Disaccharid **45** werden unter Argon-Atmosphäre mit 0.3 ml (4.0 mmol) Ethanthiol in 20 ml absolutem Dichlormethan gelöst und mit 0.2 ml (1.7 mmol) Zinntetrachlorid aktiviert. Nach 45 Minuten Rühren (DC: Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:2) wird mit konzentrierter Natronlauge extrahiert, bis sich der Zinnstein vollständig löst. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ abfiltriert, eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird über Flashchromatographie (Cyclohexan/Essigsäureethylester 2:1 \rightarrow 1:1, Säulendurchmesser: 4 cm, Füllhöhe: 8 cm) gereinigt.

Ausbeute: 1.4 g (70 %) farblos, amorph,

$R_f = 0.68$ (Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:2),

$[\alpha]_D^{22} = +67.3$ (0.5, Dichlormethan),

C₂₈H₄₀O₁₇S (680.7),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 680.20$ $M_{\text{gef}} = 703.24$ (M+Na)⁺,

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 5.50$ (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1), 5.22 (dd, $J_{2,3} = 3.0$ Hz, $J_{3,4} = 10.2$ Hz, 1H, H-3'), 5.20 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.8$ Hz, 1H, H-4), 5.13-5.05 (m, 4H, H-2', H-1', H-4', H-3), 4.21-4.00 (m, 7H, H-2, H-5, H-5', H-6a, H-6a', H-6b, H-6b'), 2.66 (q, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, CH₂S), 2.10 (s, 3H, OAc), 2.03-1.96 (m, 15H, 5 OAc), 1.95 (s, 3H, OAc), 1.24 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 3H, Me),

¹³C-NMR (90 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 170.1, 170.0, 169.8, 169.5, 169.4, 169.4, 169.3$ (C=O), 98.0 ($J_{\text{C,H}} = 175$ Hz, aus gekoppeltem HMQC, α , C-1'), 82.3 ($J_{\text{C,H}} = 169$ Hz, aus gekoppeltem HMQC, α , C-1), 77.2 (C-2), 69.8 (C-3), 68.7 (C-2'), 68.6, 68.5 (C-5, C-5'), 67.9 (C-3'), 65.8 (C-4), 65.4 (C-4'), 62.0 (C-6'), 61.7 (C-6), 24.8 (CH₂S), 20.5-20.3 (7 OAc), 14.8 (Me).

*Benzyl O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(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 2)-(3,4,6-tri-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-2,4-di-O-benzoyl- α -D-mannopyranosid **48***

α -Ac₄Man-1 \rightarrow 2- α -Ac₃Man-1 \rightarrow 3-[α -Ac₄Man-1 \rightarrow 2- α -Ac₃Man]-1 \rightarrow 6- α -Bz₂ManOBn

240 mg (0.50 mmol) Benzylmannosid **6** und 1.0 g (1.5 mmol) Thiomannosid **5** werden mit 2.0 g ausgeheiztem und gemörsertem Molekularsieb 4 Å und 500 mg (2.2 mmol) NIS in 10 ml absolutem Dichlormethan suspendiert und bei -10 °C unter Argon-Atmosphäre 30 Minuten gerührt. Anschließend wird die Reaktion durch tropfenweise Zugabe von 20 μ l Trifluormethansulfonsäure gestartet. Nach 45 Minuten (DC: Hexan/Aceton 1:1) wird verdünnt, über Celite abfiltriert und mit je einmal mit gesättigter Na₂S₂O₃- und KHCO₃-Lösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird über Flashchromatographie (Hexan/Aceton 3:2, Säulendurchmesser: 4.5 cm, Füllhöhe: 8 cm) gereinigt.

Ausbeute: 564 mg (65 %) farblos, amorph,

$R_f = 0.40$ (Hexan/Aceton 1:1),

$[\alpha]_D^{25} = +10.4$ (0.5, Dichlormethan),

C₇₉H₉₄O₄₂ (1715.6),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 1714.5$ $M_{\text{gef}} = 1737.4$ (M+Na)⁺,

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 8.05$ (d, ³J = 7.3 Hz, 2H, Bz-2/6), 8.00 (d, ³J = 7.2 Hz, 2H, Bz-2'/6'), 7.73 (dd, ³J = 7.4 Hz, 1H, Bz-4), 7.67-7.56 (m, 3H, Bz-4', Bz-3/5), 7.48 (dd, ³J = 7.6 Hz, 2H, Bz-3'/5'), 7.43-7.35 (m, 5H, Bn), 5.64 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.9$ Hz, 1H, H-4), 5.46 (dd, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, 1H, H-2), 5.30 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1³), 5.25 (dd, $J_{2,3} = 3.0$ Hz, $J_{3,4} = 10.1$ Hz, 1H, H-3⁶), 5.20-4.93 (m, 11H, H-1, H-3⁶, H-4⁶, H-2⁶, H-3³, H-4⁶, H-4³, H-1⁶, H-1⁶, H-4³, H-2³), 4.87 (dd, $J_{3,4} = 10.2$ Hz, $J_{2,3} = 2.8$ Hz, 1H, H-3³), 4.74 (d, $J_{\text{gem}} = 11.4$ Hz, 1H, CH₂Oa), 4.59 (d, $J_{\text{gem}} = 11.4$ Hz, 1H, CH₂Ob), 4.53 (dd, $J_{2,3} = 3.0$ Hz, $J_{3,4} = 9.9$ Hz, 1H, H-3), 4.47 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1³), 4.18 (m, 1H, H-5), 4.09-3.73 (m, 14H, H-5⁶, H-2⁶, H-6a/b³, H-6a/b³, H-6a/b⁶, H-6a/b⁶, H-5³, H-5³, H-6a, H-5⁶), 3.66 (dd, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-2³), 3.62 (dd, $J_{\text{gem}} = J_{5,6} = 11.2$ Hz, 1H, H-6b), 2.1-1.8 (14s, 42H, OAc),

^{13}C -NMR (90 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 169.9$ - 169.1 (14 C=O OAc), 165.1 , 165.0 (2 C=O Bz), 136.6 (C_q -Ar), 133.9 , 133.7 , 129.5 , 129.4 , 129.1 (Ar), 128.8 (C_q -Ar), 128.7 (Ar), 128.6 (C_q -Ar), 128.4 , 128.4 , 128.3 (Ar), 99.2 ($J_{\text{C,H}} = 176$ Hz, aus gekoppeltem HMQC, α , C-1³), 98.1 ($J_{\text{C,H}} = 177$ Hz, aus gekoppeltem HMQC, α , C-1⁶), 97.9 ($J_{\text{C,H}} = 175$ Hz, aus gekoppeltem HMQC, α , C-1³), 97.3 ($J_{\text{C,H}} = 175$ Hz, aus gekoppeltem HMQC, α , C-1⁶), 96.1 ($J_{\text{C,H}} = 175$ Hz, aus gekoppeltem HMQC, α , C-1), 76.3 (C-2³), 75.7 (C-2⁶), 75.2 (C-3), 71.6 (C-2), 69.6 (C-3⁶), 69.0 (CH_2O), 68.9 (C-5), 68.7 (C-2⁶, C-5³, C-3³), 68.5 (C-5⁵, C-2³), 68.5 (C-5⁶), 68.0 (C-3⁶), 67.9 (C-3³, C-4, C-5⁶), 65.8 (C-6), 65.5 (C-4⁶), 65.2 (C-4⁶, C-4³, C-4³), 62.0 , 61.5 , 61.3 (C-6³, C-6³, C-6⁶, C-6⁶), 20.6 - 20.2 (14 OAc).

*(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(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 2)-(3,4,6-tri-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-2,4-di-O-benzoyl- α -D-mannopyranose **49***

α -Ac₄Man-1 \rightarrow 2- α -Ac₃Man-1 \rightarrow 3-[α -Ac₄Man-1 \rightarrow 2- α -Ac₃Man]-1 \rightarrow 6- α -Bz₂ManOH

erhalten In einem Kolben werden 600 mg Palladiumoxidhydrat mit 8 ml Methanol (HPLC-Qualität) versetzt. Der Kolben wird mit einer Argon-Atmosphäre versehen und durch ein Septum verschlossen. Durch dieses wird über eine Kanüle ein mit Wasserstoff gefüllter Ballon angebracht und mehrere Kolbenvolumen der Atmosphäre mit einer Spritze entnommen. Durch das Septum werden 1.2 g (0.70 mmol) Benzylglycosid **48** gelöst in 10 ml Methanol und 1.8 ml Essigsäure zugegeben. Nach 16 Stunden Rühren (DC: Hexan/Aceton 1:1) wird mit Dichlormethan verdünnt und über Celite filtriert. Das Filtrat wird eingedampft, in Dichlormethan aufgenommen, mit gesättigter KHCO_3 -Lösung extrahiert und über MgSO_4 abfiltriert. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Dieser wird über Flashchromatographie (Hexan/Aceton 2:1, Säulendurchmesser: 4.5 cm, Füllhöhe: 6 cm) gereinigt.

Ausbeute: 717 mg (63 %) farblos, amorph,

$R_f = 0.39$ (Hexan/ Aceton 1:1),

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -8.2$ (0.6, Dichlormethan),

$\text{C}_{72}\text{H}_{88}\text{O}_{42}$ (1625.4),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 1624.5$ $M_{\text{gef}} = 1647.3$ (M+Na)⁺,

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 8.05$ (d, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, Bz-2/6), 8.00 (d, $^3J = 7.2$ Hz, 2H, Bz-2'/6'), 7.73 (t, $^3J = 7.9$ Hz, 1H, Bz-4), 7.67-7.57 (m, 3H, Bz-4', Bz-3/5), 7.50-7.47 (m, 3H, OH, Bz-3'/5'), 5.65 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 10.0$ Hz, 1H, H-4), 5.36 (dd, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} = 3.0$ Hz, 1H, H-2), 5.27-5.25 (m, 2H, H-1³, H-1), 5.19-5.12 (m, 3H, H-3⁶, H-3^{6'}, H-4⁶), 5.09-5.01 (m, 4H, H-2^{6'}, H-4^{6'}, H-4³, H-3^{3'}), 4.99-4.92 (m, 4H, H-4^{3'}, H-1⁶, H-2^{3'}, H-1^{6'}), 4.89 (dd, $J_{2,3} = 2.9$ Hz, $J_{3,4} = 10.0$ Hz, 1H, H-3³), 4.58 (dd, $J_{2,3} = 3.0$ Hz, $J_{3,4} = 10.0$ Hz, 1H, H-3), 4.50 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1^{3'}), 4.31 (m, 1H, H-5), 4.07-3.65 (m, 15H, H-6a/b³, H-6a/b^{3'}, H-6a/b⁶, H-6a/b^{6'}, H-5^{6'}, H-2⁶, H-5^{3'}, H-5³, H-6a, H-5⁶, H-2³), 3.56 (dd, $J_{\text{gem}} = 12.0$ Hz, $J_{5,6} < 1$ Hz, 1H, H-6b), 2.10-1.80 (14s, 42H, OAc),

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 170.0$ -169.2 (14 C=O OAc), 165.2, 164.9 (2 C=O Bz), 133.8 (Bz-4), 133.6 (Bz-4), 129.5 (Bz-2/6), 129.4 (Bz-2/6), 129.0 (Bz-1), 129.0 (Bz-3/5), 128.8 (Bz-1), 128.6 (Bz-3/5), 99.1 (C-1³), 98.0 (C-1⁶), 97.9 (C-1^{3'}), 97.6 (C-1^{6'}), 90.9 (C-1), 76.2 (C-2³), 75.6 (C-2⁶), 75.1 (C-3), 72.9 (C-2), 69.7 (C-3⁶), 69.0-67.7 (C-2^{6'}, C-3³, C-2^{3'}, C-5³, C-5^{3'}, C-5⁶, C-4, C-5, C-3^{6'}, C-3^{3'}, C-5^{6'}), 66.4 (C-6), 65.4 (C-4^{6'}), 65.2 (C-4⁶, C-4³, C-4^{3'}), 62.0, 61.9, 61.3, 61.2 (C-6³, C-6^{3'}, C-6⁶, C-6^{6'}), 20.6-20.1 (14 OAc).

*(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(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 2)-(3,4,6-tri-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-2,4-di-O-benzoyl- α -D-mannopyranosyltrichloracetimidat **3***

α -Ac₄Man-1 \rightarrow 2- α -Ac₃Man-1 \rightarrow 3-[α -Ac₄Man-1 \rightarrow 2- α -Ac₃Man]-1 \rightarrow 6- α -Bz₂ManTCAI

600 mg (0.37 mmol) Halbacetal **49** werden zusammen mit 340 μl (3.4 mmol) Trichloracetonitril in 7 ml absolutem Dichlormethan unter Argon-Atmosphäre 15 Minuten bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 16 μl (0.1 mmol) DBU gestartet. Nach einer Stunde (DC: Hexan/Aceton 1:1) wird die Reaktionsmischung eingedampft, im Hochvakuum getrocknet und über Flashchromatographie (Hexan/Aceton 3:1 \rightarrow 2:1, Säulendurchmesser: 5 cm, Füllhöhe: 8 cm) gereinigt.

Ausbeute: 580 mg (89 %) farblos, amorph,

$R_f = 0.48$ (Hexan/Aceton 1:1),

$[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +4.6$ (0.5, Dichlormethan),

$C_{74}H_{88}Cl_3NO_{42}$ (1769.8),

ESI-MS (Methanol): $M_{\text{ber}} = 1767.4$ $M_{\text{gef}} = 1790.2$ (M+Na)⁺,

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 10.2$ (s, 1H, NH), 8.58 (d, ³J = 7.3 Hz, 2H, Bz-2/6), 8.02 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H, Bz-2/6'), 7.75-7.58 (m, 4H, Bz-4, Bz-4', Bz-3/5), 7.49 (dd, ³J = 7.6 Hz, 2H, Bz-3/5'), 6.46 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1), 5.78 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.7$ Hz, 1H, H-4), 5.64 (dd, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, 1H, H-2), 5.30 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1³), 5.20-5.02 (m, 7H, H-3⁶, H-3^{6'}, H-4⁶, H-2^{6'}, H-4^{6'}, H-3^{3'}, H-4³), 4.99-4.97 (m, 2H, H-1⁶, H-1^{6'}), 4.95-4.89 (m, 3H, H-2^{3'}, H-4^{3'}, H-3³), 4.57-4.50 (m, 2H, H-1^{3'}, H-3), 4.36-4.26 (m, 1H, H-5), 4.10-3.60 (m, 16H, H-5^{6'}, H-2⁶, H-6a/b³, H-6a/b^{3'}, H-6a/b⁶, H-6a/b^{6'}, H-5³, H-5^{3'}, H-6a, H-2³, H-6b, H-5⁶), 2.1-1.8 (14s, 42H, OAc),

¹³C-NMR (90 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 169.9$ -169.2 (14 C=O OAc), 164.9 (2 C=O Bz), 157.1 (C=N), 134.0 (Bz-4), 133.8 (Bz-4'), 129.6 (Bz-2'/6'), 129.5 (Bz-2/6), 129.1 (Bz-3/5), 128.7 (Bz-3'/5'), 128.5 (Bz-1), 128.4 (Bz-1'), 98.9 (C-1³), 97.9 (2C C-1^{6'}, C-1^{3'}), 97.5 (C-1⁶), 93.5 ($J_{C,H} = 178$ Hz, aus gekoppeltem HMQC, α , C-1), 76.2 (C-2³), 75.4 (C-2⁶), 74.1 (C-3), 71.0 (C-5), 70.2 (C-2), 69.6 (C-3⁶), 68.8-68.5 (C-3³, C-2^{6'}, C-2^{3'}, C-5³, C-5^{3'}, C-3^{3'}, C-5^{6'}, C-3^{6'}), 68.0 (C-5⁶), 67.9 (C-4), 65.4 (C-4^{6'}, C-4³), 65.3 (C-6), 65.3 (C-4^{3'}), 65.0 (C-4⁶), 62.0, 61.8, 61.7, 61.2 (C-6³, C-6^{3'}, C-6⁶, C-6^{6'}), 20.8-20.1 (14 OAc).

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 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 2)-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl- α -*D*-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-*O*-2,4-di-*O*-benzoyl- 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)-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -*D*-glucopyranosylazid **51**

[β -Ac₃GlcNPht- α -Ac₃Man]1 \rightarrow 3-[3,6-(α -Ac₄Man- α -Ac₃Man)₂- α -Bz₂Man]-1 \rightarrow 6- β -AcMan- β -Bn₂GlcNPht- β -Bn₂GlcNPhtN₃

205 mg (116 μ mol) Imidat **3** und 110 mg (58 μ mol) Diol **50** werden zusammen mit 350 mg Molekularsieb 4 Å bei -45 °C unter Argon-Atmosphäre in 10 ml absolutem Dichlormethan zehn Minuten gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 3 μ l (24 μ mol) Bortrifluorid-etherat gestartet. Man läßt die Lösung auf Raumtemperatur kommen und nach zwei Stunden

(DC: Hexan/Aceton 1:1) wird verdünnt, über Celite filtriert und mit gesättigter KHCO_3 -Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO_4 abfiltriert, eindampft und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Hexan/Aceton 2:1, Säulendurchmesser: 1.5 cm, Füllhöhe: 9 cm) gereinigt.

Ausbeute: 122 mg (60 %),

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

$[\alpha]_D^{23} = +0.25$ (2.0, Dichlormethan),

$\text{C}_{168}\text{H}_{184}\text{N}_6\text{O}_{76}$ (3503.3),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 3501.07$ $M_{\text{gef}} = 3524.39$ (M+Na)⁺,

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 8.00$ -7.48 (m, 22H, Pht, Bz), 7.25-6.57 (m, 20H, Bn), 5.73-5.63 (m, 2H, H-3⁵, H-4⁴), 5.57 (d, $J_{\text{OH},4} = 5.9$ Hz, 1H, OH), 5.47 (dd, $J_{1,2} < 1$ Hz, $J_{2,3} < 1$ Hz, 1H, H-2⁴), 5.36 (d, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, 1H, H-1⁵ β), 5.29-4.84 (m, 19H, H-1¹, H-1⁵, H-3⁵, H-3⁶, H-4⁵, H-1⁴, H-1², H-2⁶, H-4⁶, H-4⁵, H-3⁶, H-2³, H-4⁵, H-4⁴, H-1⁶, H-4⁶, H-1⁵, H-2⁶, H-1⁴), 4.81-4.75 (m, 3H, H-3⁵, CH₂Oa, H-3⁴), 4.70 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1³), 4.58 (d, $J_{\text{gem}} = 13$ Hz, 1H, CH₂Oa'), 4.50-4.36 (m, 7H, H-3⁴, 4 CH₂O, H-1⁶, CH₂Ob'), 4.34-4.12 (m, 4H, CH₂Ob, H-2⁴, H-6a⁵, H-2⁵), 4.10-3.43 (m, 33H, H-3¹, H-2⁵, H-5⁶, H-6b⁵, H-3², H-6a/b⁴, H-6a/b⁵, H-6a/b⁶, H-6a/b⁶, H-4¹, H-4², H-5⁵, H-2², H-5⁵, H-5⁶, H-5⁵, H-5⁴, H-6a⁴, H-6b⁴, H-3³, H-2¹, H-5⁴, H-4³, H-6a², H-2⁵, H-5¹, H-6b²), 3.40-3.15 (m, 6H, H-6a¹, H-6a³, H-5³, H-6b¹, H-6b³, H-5²), 2.10-1.80 (21s, 63H, OAc),

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 170.2$ -169.2 (21 C=O OAc), 167.6, 167.2 (C=O NPht), 165.0, 164.8 (C=O Bz), 138.1, 138.0 (2C), 137.7 (C_q Bn), 135.0-133.6 (C-4/5 Pht, C-4 Bz), 130.8-130.5 (C_q Pht), 129.5-128.7 (Ar), 128.6, 128.5 (C_q Bz), 128.3-127.3 (Ar), 123.6 (C-3/6 Pht), 99.2 (C-1⁵), 98.0 (C-1⁶), 97.9 (C-1⁴), 97.8 (C-1⁶), 97.6 (C-1³), 97.5 (C-1⁵), 97.1 (C-1⁴), 96.5 (C-1²), 96.1 (C-1⁵), 84.8 (C-1¹), 77.6 (C-3³), 76.4 (C-3¹), 76.1 (C-2⁵), 75.7-75.5 (C-3², C-2⁵, C-5¹, C-4¹, C-4²), 75.3 (C-3⁴), 75.2 (C-5³), 74.1 (C-5²), 73.8, 73.6 (CH₂O), 73.5 (C-2⁴), 72.2, 71.7 (CH₂O), 71.3 (C-2⁴), 71.1 (C-5⁵), 69.7 (C-3⁵, C-3⁵), 68.8-68.4 (C-3⁴, C-2⁶, C-3⁵, C-5⁵, C-5⁴, C-4⁵, C-2³, C-5⁶, C-5⁴, C-2⁶, C-5⁶), 68.2 (C-5⁵), 68.1 (C-3⁶), 67.9 (C-3⁶), 67.8 (C-4⁴), 67.7 (C-6²), 67.5 (C-6¹, C-6³), 66.3 (C-4³), 65.8 (C-6⁴), 65.5 (C-4⁶), 65.3 (C-4⁵),

65.0 (C-4^{6'}), 64.8 (C-4^{5''}), 64.7 (C-4⁴), 55.9 (C-2²), 54.6 (C-2¹), 53.8 (C-2⁵), 61.8-61.1 (C-6⁴, C-6⁵, C-6^{5'}, C-6^{5''}, C-6^{6'}, C-6^{6''}), 20.7-20.0 (21 OAc).

O-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-*O*-{ α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-*O*-[α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-*O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)}-*O*-(β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosylazid **52**

[β -GlcNAc- α -Man]1 \rightarrow 3-[3,6-(α -Man- α -Man)- α -Man]-1 \rightarrow 6- β -Man- β -Bn₂GlcNAc- β -Bn₂GlcNAc-N₃

102 mg (29 mmol) geschütztes Decasaccharid **51** werden in einer Mischung aus 10 ml n-Butanol und 2.5 ml Ethylendiamin 48 Stunden bei 90 °C gerührt. Anschließend (DC: Isopropanol/1M Ammoniumacetat 4:1) wird eingeeengt, zweimal mit Toluol codestilliert und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das Triamin wird durch Auflösen in 10 ml Pyridin und 2 ml Essigsäureanhydrid reacctyliert. Nach 20 Stunden (DC: Isopropanol/1M Ammoniumacetat 4:1) wird eingeeengt, zweimal mit Toluol codestilliert und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das peracetylierte Kohlenhydrat wird in 12 ml Methylamin-Lösung (40 % in Wasser) aufgenommen und 18 Stunden gerührt. Anschließend (DC: Isopropanol/1M Ammoniumacetat 4:1) wird eingeeengt und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird in 20 ml Wasser aufgenommen und auf drei verbundene SPE-Kartuschen (Waters, SepPak[®], je 330 mg Füllmaterial) aufgetragen. Durch Waschen mit je 30 ml Wasser-Acetonitril (in 10% Schritten von 0% bis 50%) wird stufenweise eluiert. Das Produkt befindet sich in den Fraktionen mit 20 % bzw. 30 % Acetonitril (ESI-MS). Diese werden vereinigt und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 49 mg (78 %),

R_f (Triamin) = 0.35 (Isopropanol/1M Ammoniumacetat 4:1),

R_f (Peracetat) = 0.95 (Isopropanol/1M Ammoniumacetat 4:1),

R_f (Produkt **52**) = 0.52 (Isopropanol/1M Ammoniumacetat 4:1),

$[\alpha]_D^{24} = +25.7$ (0.5, Methanol),

C₉₄H₁₃₄N₆O₅₀ (2148.1),

LC-MS: t_R (Triamin+1Bz) = 11.1 min (10-95%), $M_{ber} = 2124.81$ $M_{gef} = 2126.18$ (M+H)⁺,

LC-MS: $t_R(\text{Triamin}) = 10.5 \text{ min (10-95\%)}$, $M_{\text{ber}} = 2020.78$ $M_{\text{gef}} = 2022.05 (\text{M+H})^+$,
 ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 2146.81$ $M_{\text{gef}} = 2169.46 (\text{M+Na})^+$.

Tabelle 4: Schlüsselsignale im NMR (500 MHz, D_2O , MeCN als Standard); M: Mannose.

Position	1 ¹	2 ¹	1 ²	2 ²	1 ⁵	2 ⁵	1 ^M						
$\delta (^1\text{H})$	4.58	3.76	4.43	3.81	4.53	3.67	4.51	4.60	4.98	4.98	5.03	5.05	5.31
$\delta (^{13}\text{C})$	87.1	52.3	99.0	53.4	98.7	54.0	98.8	97.7	100.9	100.9	98.3	96.7	99.3

8.2. Versuche zu Kapitel 3.3

4-(2-Propinyloxy)-benzylalkohol **54**

10 g (80.6 mmol) p-Hydroxybenzylalkohol **53** werden zusammen mit 9.1 ml Propargylbromid (80 % in Toluol, 84.7 mmol) und 12.2 g (88.4 mmol) K_2CO_3 in 100 ml Aceton unter Rückfluß gerührt. Nach acht Stunden (DC: Cyclohexan/Aceton 1:1) wird das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand zwischen 2 N NaOH und Dichlormethan verteilt. Die organische Phase wird noch einmal mit 2 N NaOH extrahiert, über $MgSO_4$ abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. Das Produkt ist lt. NMR sauber, wird aber zur Entfernung von Spuren von Propargylbromid und Lösungsmittel destilliert.

Ausbeute: 9.1 g (69.3 %) farbloses Öl,

$R_f = 0.48$ (Cyclohexan/Aceton 1:1),

$n_D^{22} = 1.552$,

$k_p = 128 \text{ °C (0.2 mbar)}$,

$d^{20} = 1.11 \text{ g/ml}$,

$C_{10}H_{10}O_2$ (162.2),

HREI-MS: $M_{\text{ber}} = 162.06808$ $M_{\text{gef}} = 162.06800$,

weitere Signale: 144 (10), 131 (70), 103 (25), 95 (25), 77 (55), 67 (75), 39 (100),

IR (KBr): $\nu = 3400$ (s, br, OH), 2926, 2874 (s, CH), 2121 (m, $C\equiv C$), 1610, 1588, 1511 (s, Ar),

$^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 7.25$ (d, $J_{2,3} = 8.3$ Hz, 2H, Ar-2/6), 6.94 (d, $J_{2,3} = 8.3$ Hz, 2H, Ar-3/5), 5.08 (t, $J_{\text{CH}_2,\text{OH}} = 5.1$ Hz, 1H, OH), 4.77 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Pr}$), 4.43 (d, $J_{\text{CH}_2,\text{OH}} = 5.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 3.54 (s, 1H, $\equiv\text{CH}$),

$^{13}\text{C-NMR}$ (67.5 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 156.0$ (C-4), 135.3 (C-1), 127.8 (C-2/6), 114.5 (C-3/5), 79.4 ($\equiv\text{CC}$), 78.1 ($\equiv\text{CH}$), 62.5 ($\text{CH}_2\text{-Bn}$), 55.3 ($\text{CH}_2\text{-Pr}$).

*N*¹-(3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-4-(p-hydroxymethyl-phenoxy-methyl)-1,2,3-triazol **56**

$\text{Ac}_3\text{GlcNPht-Triaz-OBnOH}$

100 mg (0.22 mmol) Azid **55** und 64 μl (0.44 mmol) Alkin **54** werden zusammen mit einer Spatelspitze CuSO_4 in einem Gemisch aus 3 ml Wasser, 2 ml Ethanol (p.a.) und 5 ml *tert*-Butanol gelöst und es wird ein blanker Kupferdraht (1 cm) zugegeben. Nach 34 Stunden (DC: Cyclohexan/ Aceton 1:1) wird der Draht entfernt, eingeeengt und der Rückstand zwischen Dichlormethan und gesättigter KHCO_3 -Lösung verteilt. Die organische Phase wird über MgSO_4 abfiltriert, eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flash-chromatographie (Cyclohexan/Aceton 3:1, Säulendurchmesser: 1 cm, Füllhöhe: 8 cm) gereinigt.

Ausbeute: 84 mg (62 %) farblos, amorph,

$R_f = 0.39$ (Cyclohexan/Aceton 1:1),

$[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -33.2$ (1.4, Dichlormethan),

$\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_{11}$ (622.58),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 622.19$ $M_{\text{gef}} = 645.36$ (M+Na)⁺,

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 8.57$ (s, 1H, $=\text{CH}^{\text{T}}$, NOESY-Signal zu 6.85), 7.92-7.77 (m, 4H, Pht), 7.17 (d, $J_{2,3} = 8.2$ Hz, 2H, H-3/5^{Ar}), 6.88 (d, $J_{2,3} = 8.2$ Hz, 2H, H-2/6^{Ar}), 6.85 (d, $J_{1,2} = 10.1$ Hz, 1H, H-1), 5.81 (dd, $J_{2,3} = 10.1$ Hz, $J_{3,4} = 9.7$ Hz, 1H, H-3), 5.31 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.7$ Hz, 1H, H-4), 5.14 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} = 10.1$ Hz, 1H, H-2), 5.08-5.02 (m, 3H, OH, $\text{CH}_2\text{-Pr}$), 4.48-4.42 (m, 1H, H-5), 4.38 (d, $J_{\text{CH}_2,\text{OH}} = 5.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 4.21 (dd, $J_{\text{gem}} = 12.5$ Hz, $J_{5,6a} = 5.0$ Hz, 1H, H-6a), 4.13 (dd, $J_{\text{gem}} = 12.5$ Hz, $J_{5,6a} < 1$ Hz, 1H, H-6b), 2.04, 2.02, 1.81 (3s, 9H, OAc),

^{13}C -NMR (67.5 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 170.0, 169.7, 169.3$ (C=O OAc), 166.1 (C=O Pht), 156.7 (C-1^{Ar}), 143.6 (C-4^T), 135.2 (C-3/6 Pht), 134.9 (C-4^{Ar}), 130.2 (C-1/2 Pht), 127.8 (C-3/5^{Ar}), 123.8 (C-5^T), 123.6 (C-4/5 Pht), 114.2 (C-2/6^{Ar}), 81.9 (C-1), 73.7 (C-5), 70.0 (C-3), 67.7 (C-4), 62.4 (CH₂-Bn), 61.6 (C-6), 60.8 (CH₂-Pr), 53.0 (C-2), 20.5, 20.4, 20.0 (OAc).

*N*¹-(3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-4-(p-azidomethyl-phenoxy)methyl)-1,2,3-triazol **57**

Ac₃GlcNPht-Triaz-OBnN₃

60 mg (96 μmol) Triazol **56** werden mit 64 μl (480 μmol) TMSN₃ in 2 ml absolutem Dichlormethan gelöst und mit 35 μl (190 μmol) TMSOTf versetzt. Nach 10 Minuten Rühren (DC: Cyclohexan/Aceton 1:1) wird mit Dichlormethan verdünnt und je einmal mit 1 M HCl und gesättigter KHCO₃-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ abfiltriert, eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Aceton 3:1, Säulendurchmesser: 1 cm, Füllhöhe: 7 cm) gereinigt.

Ausbeute: 39 mg (62 %) farblos, amorph,

$R_f = 0.55$ (Cyclohexan/Aceton 1:1),

$[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -37.9$ (0.6, Dichlormethan),

C₃₀H₂₉N₇O₁₀ (647.2),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 647.59$ $M_{\text{gef}} = 670.13$ (M+Na)⁺,

IR (KBr): $\nu = 2951, 2880$ (w, CH), 2100 (s, N₃), 1774 (s, C=O), 1750 (s, C=O), 1720 (s, C=O),

^1H -NMR (270 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 8.60$ (s, 1H, =CH^T), 7.93-7.77 (m, 4H, Pht), 7.27 (d, $J_{2,3} = 8.2$ Hz, 2H, H-2/6^{Ar}), 6.98 (d, $J_{2,3} = 8.2$ Hz, 2H, H-3/5^{Ar}), 6.87 (d, $J_{1,2} = 9.9$ Hz, 1H, H-1), 5.83 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.9$ Hz, 1H, H-3), 5.33 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.9$ Hz, 1H, H-4), 5.16 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} = 10.2$ Hz, 1H, H-2), 5.10 (s, 2H, CH₂-Pr), 4.47 (m, 1H, H-5), 4.35 (s, 2H, CH₂-Bn), 4.23 (dd, $J_{\text{gem}} = 12.3$ Hz, $J_{5,6a} = 4.4$ Hz, 1H, H-6a), 4.17 (dd, $J_{\text{gem}} = 12.3$ Hz, $J_{5,6a} < 1$ Hz, 1H, H-6b), 2.06, 2.03, 1.82 (3s, 9H, OAc),

^{13}C -NMR (67.5 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 170.0, 169.7, 169.3$ (C=O OAc), 167.2, 166.1 (C=O Pht), 157.8 (C-4^{Ar}), 143.5 (C-4^T), 135.3 (C-3/6 Pht), 130.2 (C-1/2 Pht, C-1^{Ar}), 130.0 (C-2/6^{Ar}), 123.7 (C-4/5 Pht, C-5^T), 114.8 (C-3/5^{Ar}), 82.0 (C-1), 73.8 (C-5), 70.1 (C-3), 67.8 (C-4), 61.6 (C-6), 60.9 (CH₂-Pr), 53.1 (CH₂-Bn), 53.1 (C-2), 20.6, 20.4, 20.0 (OAc).

(4-(Prop-2-inyloxy)-benzyloxy)-triisopropylsilan **58**

2 ml (13.7 mmol) Benzylalkohol **54** werden zusammen mit 2.4 g (34.3 mmol) Imidazol in 5 ml absolutem Dichlormethan suspendiert und mit 3.2 ml (14.9 mmol) TIPS-Cl versetzt. Nach 10 Minuten (DC: Cyclohexan/Aceton 4:1) ist die Erwärmung abgeklungen und es wird mit Dichlormethan verdünnt. Die Lösung wird zweimal mit 1 M HCl und einmal mit gesättigter KHCO₃-Lösung extrahiert. Es wird über MgSO₄ abfiltriert, eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Aceton 9:1, Säulendurchmesser: 3.5 cm, Füllhöhe: 5 cm) gereinigt.

Ausbeute: 4.4 g (quant.) farbloses Öl,

$R_f = 0.64$ (Cyclohexan/Aceton 4:1),

$n_D^{22} = 1.498$,

$d^{20} = 0.92$ g/ml,

C₁₉H₃₀O₂Si (318.5),

HREI-MS: $M_{\text{ber}} = 318.20151$ $M_{\text{gef}} = 318.20150$,

weitere Signale: 275 (65), 145 (100), 39 (20),

IR (film): $\nu = 3311$ (m, $\equiv\text{CH}$), 2944 (s, br, CH), 2867 (s, CH), 2123 (w, C \equiv C), 1611, 1588, 1511 (m, Ar),

^1H -NMR (270 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 7.25$ (d, $J_{2,3} = 8.3$ Hz, 2H, H-2/6), 6.94 (d, $J_{2,3} = 8.3$ Hz, 2H, H-3/5), 4.75-4.72 (m, 4H, CH₂-Pr, CH₂-Bn), 3.54 (s, 1H, $\equiv\text{CH}$), 1.15-0.90 (m, 21 H, CH, CH₃),

^{13}C -NMR (67.5 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 156.1$ (C-4), 134.0 (C-1), 126.9 (C-2/6), 114.5 (C-3/5), 79.3 ($\equiv\text{CC}$), 78.1 ($\equiv\text{CH}$), 64.0 (CH₂-Bn), 55.4 (CH₂-Pr), 17.8 (CH₃), 11.4 (CH).

*N*¹-(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-*D*-glucopyranosyl)-4-(*p*-triisopropylsilyloxymethyl-phenoxyethyl)-1,2,3-triazol **59**Ac₃GlcNPht-Triaz-OBnOTIPS

300 mg (0.65 mmol) Azid **55** und 250 mg (0.78 mmol) Alkin **58** werden zusammen mit 10 mg (0.053 mmol) CuI und 153 μl (1.3 mmol) 2,6-Lutidin in 30 ml Dichlormethan gelöst. Nach drei Stunden (DC: Hexan/Essigsäureethylester 2:1) werden noch einmal 20 mg (0.11 mmol) CuI zugegeben und man rührt 20 Stunden. Anschließend wird die Reaktionsmischung zwischen Dichlormethan und gesättigter KHCO₃-Lösung verteilt. Die organische Phase wird über MgSO₄ abfiltriert, eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Hexan/Aceton 7:1, Säulendurchmesser: 5 cm, Füllhöhe: 8 cm) gereinigt.

Ausbeute: 338 mg (67 %) farblos, amorph,

$R_f = 0.19$ (Hexan/Essigsäureethylester 2:1),

$[\alpha]_D^{23} = -17.0$ (0.5, Dichlormethan),

C₃₉H₅₀N₄O₁₁Si (778.9),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 778.32$ $M_{\text{gef}} = 801.26$ (M+Na)⁺,

IR (KBr): $\nu = 3150$ (w, C_{ar}-H), 2947, 2868 (s, CH), 1800-1700 (s, C=O),

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 8.59$ (s, 1H, =CH^T), 7.92-7.80 (m, 4H, Pht), 7.22 (d, $J_{2,3} = 8.6$ Hz, 2H, H-3/5^{Ar}), 6.91 (d, $J_{2,3} = 8.6$ Hz, 2H, H-2/6^{Ar}), 6.86 (d, $J_{1,2} = 9.9$ Hz, 1H, H-1), 5.85 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.9$ Hz, 1H, H-3), 5.34 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.9$ Hz, 1H, H-4), 5.18 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} = 9.9$ Hz, 1H, H-2), 5.06 (s, 2H, CH₂-Triazol), 4.71 (s, 2H, CH₂-Bn), 4.48-4.42 (m, 1H, H-5), 4.30-4.08 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.05, 2.03, 1.82 (3s, 9H, OAc), 1.20-0.90 (m, 21H, CH, CH₃),

¹³C-NMR (67.5 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 170.0, 169.7, 169.3$ (C=O OAc), 156.8 (C-1^{Ar}), 143.6 (C-4^T), 135.1 (C-3/6 Pht), 133.7 (C-4^{Ar}), 127.0 (C-3/5^{Ar}), 123.7-123.4 (C-4/5 Pht, C-5^T), 114.3 (C-2/6^{Ar}), 81.9 (C-1), 73.8 (C-5), 70.1 (C-3), 67.8 (C-4), 64.0 (CH₂-Bn), 61.5 (C-6), 60.8 (CH₂-Triazol), 53.0 (C-2), 20.5, 20.4, 20.0 (OAc), 17.9 (CH₃ TIPS), 11.4 (CH TIPS).

3-Benzoyloxypropyl-propargylether 60

3.0 g (26 mmol) Alkohol **61** werden zusammen mit 3.4 ml (29 mmol) Benzylbromid in 10 ml DMF gelöst und 15 Minuten bei 0 °C gerührt. 1.1 g (27.5 mmol, 60 % in Mineralöl) Natriumhydrid werden in zwei Portionen zugegeben und man rührt zwei Stunden (DC: Cyclohexan/Essigsäureethylester 9:1). Die Reaktion wird durch Zugabe von gesättigter NaCl-Lösung abgebrochen und zwischen Dichlormethan und gesättigter NaCl-Lösung verteilt. Die organische Phase wird über MgSO₄ abfiltriert, eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Aceton 29:1, Säulendurchmesser: 5 cm, Füllhöhe: 7 cm) gereinigt.

Ausbeute: 2.6 g (48 %) farbloses Öl,

$R_f = 0.41$ (Cyclohexan/Essigsäureethylester 9:1),

$n_D^{20} = 1.502$,

$d^{20} = 1.12 \text{ g/ml}$,

C₁₃H₁₆O₂ (204.3),

HREI-MS: $M_{\text{ber}} = 204.11503$ $M_{\text{gef}} = 204.11500$,

weitere Signale: 107 (40), 91 (100), 65 (20), 39 (45)

IR (KBr): $\nu = 3290$ (s, $\equiv\text{C-H}$), 2863 (s, br, CH), 2116 (m, $\text{C}\equiv\text{C}$),

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 7.38\text{-}7.25$ (m, 5H, Ar), 4.45 (s, 2H, CH₂-Bn), 4.10 (d, ⁴ $J = 1.9$ Hz, 2H, CH₂-C \equiv C), 3.55-3.46 (m, 4H, OCH₂-Pr), 3.41 (t, ⁴ $J = 1.9$ Hz, 1H, $\equiv\text{CH}$), 1.78 (tt, $J_{1,2} = J_{2,3} = 6.4$ Hz, 2H, CH₂-Pr),

¹³C-NMR (67.5 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 138.6$ (C_q-Ar), 128.2, 127.3, 127.3 (Ar), 80.4 ($\equiv\text{CC}$), 76.9 ($\equiv\text{CH}$), 71.8 (OCH₂-Bn), 66.6, 66.3 (OCH₂-Pr), 57.3 (OCH₂-C \equiv C), 29.4 (CH₂-Pr).

*N*¹-(3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-4-(3-benzyloxy-propyloxymethyl)-1,2,3-triazol **62**

Ac₃GlcNPht-Triaz-OPrOBn

300 mg (0.65 mmol) Azid **55** und 160 mg (0.78 mmol) Alkin **60** werden zusammen mit 10 mg (0.053 mmol) CuI und 153 μl (1.3 mmol) 2,6-Lutidin in 30 ml Dichlormethan gelöst. Nach drei Stunden (DC: Hexan/Essigsäureethylester 2:1) werden noch einmal 20 mg (0.11 mmol) CuI zugegeben und man rührt 20 Stunden. Anschließend wird die Reaktionsmischung zwischen Dichlormethan und gesättigter KHCO₃-Lösung verteilt. Die organische Phase wird über MgSO₄ abfiltriert, eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Essigsäureethylester 2:1, Säulendurchmesser: 5 cm, Füllhöhe: 8 cm) gereinigt.

Ausbeute: 273 mg (63 %) farblos, amorph,

*R*_f = 0.35 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:1),

[α]_D²³ = -10.7 (0.6, Dichlormethan),

C₃₃H₃₆N₄O₁₁ (664.7),

ESI-MS (Acetonitril): M_{ber} = 664.24 M_{gef} = 687.15 (M+Na)⁺,

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 8.43 (s, 1H, =CH^T), 7.92-7.74 (m, 4H, Pht), 7.35-7.23 (m, 5H, Bn), 6.81 (d, *J*_{1,2} = 9.9 Hz, 1H, H-1), 5.83 (dd, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} = 9.9 Hz, 1H, H-3), 5.32 (dd, *J*_{3,4} = 9.9 Hz, *J*_{4,5} = 9.5 Hz, 1H, H-4), 5.13 (dd, *J*_{1,2} = *J*_{2,3} = 9.9 Hz, 1H, H-2), 4.50-4.35 (m, 5H, H-5, CH₂-Bn, CH₂-Triazol), 4.25-4.07 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.42-3.33 (m, 4H, OCH₂-Pr, OCH₂-Pr), 2.04, 2.02, 1.81 (3s, 9H, OAc), 1.70 (tt, *J*_{1,2} = *J*_{2,3} = 6.3 Hz, 2H, CH₂-Pr),

¹³C-NMR (67.5 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 170.0, 169.7, 169.3 (C=O OAc), 166.9 (C=O Pht), 144.8 (C-4^T), 138.6 (C_q-Bn), 135.2 (C-3/6 Pht), 130.1, 129.8 (C-1/2 Pht), 128.6, 128.2, 127.3 (Bn) 123.6 (C-4/5 Pht), 122.9 (C-5^T), 81.9 (C-1), 73.8 (C-5), 71.8 (OCH₂-Bn), 70.0 (C-3), 67.8 (C-4), 66.6, 66.5 (OCH₂-Pr), 62.3 (CH₂-Triazol), 61.6 (C-6), 53.2 (C-2), 29.5 (CH₂-Pr), 20.5, 20.4, 20.0 (OAc).

*N*¹-(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-*D*-glucopyranosyl)-4-(3-benzyloxy-propyloxymethyl)-3-methyl-1,2,3-triazoliumchlorid **63**

Ac₃GlcNPht-TriazMe⁺-OPrOBn Cl⁻

20 mg (0.03 mmol) Triazol **62** werden zusammen mit 50 µl (0.49 mmol) Benzylalkohol in 1 ml absolutem Dichlormethan gelöst. Die Reaktion wird durch Zugabe von 6.5 µl (0.06 mmol) MeOTf gestartet. Nach drei Tagen (DC: Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:1) wird mit Dichlormethan verdünnt und je einmal mit 1 N HCl und gesättigter KHCO₃-Lösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ abfiltriert, eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird in 50 % Acetonitril aufgenommen und über zwei miteinander verbundene und mit diesem Lösungsmittelgemisch äquilibrierte SepPak-Kartuschen gereinigt. Das Produkt wird anschließend gefriergetrocknet.

Für die weitere Charakterisierung wurde Chlorid als Gegenion angenommen, dieser Sachverhalt aber nicht überprüft.

Ausbeute: 10 mg (47 %) farblos, amorph,

*R*_f = 0.0 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:2),

C₃₄H₃₉ClN₄O₁₁ (715.15),

ESI-MS (50 % Acetonitril): *M*_{ber} = 679.26 *M*_{gef} = 679.32 (M)⁺,

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 9.29 (s, 1H, =CH^T), 7.92-7.74 (m, 4H, Pht), 7.53-7.27 (m, 5H, Bn), 7.10 (d, *J*_{1,2} = 10.0 Hz, 1H, H-1β), 5.76 (dd, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} = 9.8 Hz, 1H, H-3), 5.37 (dd, *J*_{1,2} = *J*_{2,3} = 10.1 Hz, 1H, H-2), 5.36 (dd, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 9.8 Hz, 1H, H-4), 4.71 (s, 2H, CH₂-Triazol), 4.56 (m, 1H, H-5), 4.44 (s, 2H, CH₂-Bn), 4.22 (dd, *J*_{gem} = 12.7 Hz, *J*_{5,6a} = 4.7 Hz, 1H, H-6a), 4.15-4.09 (m, 4H, H-6b, Me), 3.58 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, TriazolOCH₂-Pr), 3.48 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, BnOCH₂-Pr), 2.04, 1.99 (2s, 6H, OAc), 1.82 (m, 2H, CH₂-Pr), 1.79 (s, 3H, OAc),

¹³C-NMR (90 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 170.0, 169.6, 169.3 (C=O OAc), 142.1 (C-4^T), 138.5 (C_q-Bn), 135.1 (C-3/6 Pht), 128.2 (Bn), 127.4 (2 Bn, C-5^T), 123.7 (C-4/5 Pht), 84.1 (C-1), 74.2 (C-5), 71.9 (CH₂-Bn), 69.8 (C-3), 68.1 (TriazolOCH₂-Pr), 67.1 (C-4), 66.3 (BnOCH₂-Pr), 61.3 (C-6), 60.3 (CH₂-Triazol), 52.1 (C-2), 38.7 (Me), 29.3 (CH₂-Pr), 20.5, 20.4, 19.9 (OAc).

*N*¹-(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-*D*-glucopyranosyl)-4-(methoxycarbonyl)-1,2,3-triazol **65**

Ac₃GlcNPht-Triaz-CO₂Me

500 mg (1.1 mmol) Azid **55** werden zusammen mit 1.4 ml (1.3 mmol) Propiolsäuremethylester **64** und 250 μl (2.1 mmol) 2,6-Lutidin in 50 ml Dichlormethan gelöst. Die Reaktion wird durch Zugabe von 50 mg (0.26 mmol) CuI gestartet. Nach 2.5 Stunden (DC: Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:1) wird mit Dichlormethan verdünnt und je einmal mit 1 N HCl und gesättigter KHCO₃-Lösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ abfiltriert, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Hexan/Aceton 4:1, Säulendurchmesser: 3.5 cm, Füllhöhe: 8 cm) gereinigt.

Ausbeute: 340 mg (58 %) farblos, amorph,

*R*_f = 0.32 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:1),

[α]_D²⁵ = -42.6 (0.6, CH₂Cl₂),

C₂₄H₂₄N₄O₁₁ (544.47),

ESI-MS (Acetonitril): M_{ber} = 544.14 M_{gef} = 567.15 (M+Na)⁺,

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 9.23 (s, 1H, =CH^T), 7.90-7.70 (m, 4H, Pht), 6.88 (d, *J*_{1,2} = 10.0 Hz, 1H, H-1β), 5.88 (dd, *J*_{2,3} = 10.0 Hz, *J*_{3,4} = 9.7 Hz, 1H, H-3), 5.34 (dd, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 9.7 Hz, 1H, H-4), 5.21 (dd, *J*_{1,2} = *J*_{2,3} = 10.0 Hz, 1H, H-2), 4.47 (m, 1H, H-5), 4.26-4.13 (m, 2H, H-6a/b), 3.81 (s, 3H, Me), 2.05, 2.03, 1.82 (3s, 9H, OAc),

¹³C-NMR (67.5 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 170.0, 169.6, 169.3 (C=O Ac), 160.0 (C=O Triazol), 139.3 (C-4^T), 135.2 (C-3/6 Pht), 130.4, 129.9 (C-1/2 Pht), 128.4 (C-5^T), 123.8 (C-4/5 Pht), 82.2 (C-1), 73.9 (C-5), 69.8 (C-3), 67.7 (C-4), 61.5 (C-6), 53.1 (C-2), 51.8 (Me), 20.5, 20.4, 20.0 (OAc).

*N*¹-(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-*D*-glucopyranosyl)-4-(benzyloxycarbonyl)-1,2,3-triazol **67**

Ac₃GlcNPht-Triaz-CO₂Bn

500 mg (1.1 mmol) Azid **55** werden zusammen mit 208 mg (1.3 mmol) Propiolsäurebenzylester **66** und 250 µl (2.1 mmol) 2,6-Lutidin in 50 ml Dichlormethan gelöst. Die Reaktion wird durch Zugabe von 50 mg (0.26 mmol) CuI gestartet. Nach sechs Stunden (DC: Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:1) wird mit Dichlormethan verdünnt und je einmal mit 1 N HCl und gesättigter KHCO₃-Lösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ abfiltriert, eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Hexan/Aceton 3:1, Säulendurchmesser: 3.5 cm, Füllhöhe: 8 cm) gereinigt.

Ausbeute: 426 mg (63 %) farblos, amorph,

*R*_f = 0.43 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:1),

[α]_D²⁵ = -43.5 (0.6, Dichlormethan),

C₃₀H₂₈N₄O₁₁ (620.56),

ESI-MS (Acetonitril): *M*_{ber} = 620.18 *M*_{gef} = 643.32 (M+Na)⁺,

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 9.29 (s, 1H, =CH^T), 7.90-7.75 (m, 4H, Pht), 7.50-7.31 (m, 5H, Bn), 6.88 (d, *J*_{1,2} = 10.0 Hz, 1H, H-1β), 5.86 (dd, *J*_{2,3} = 10.0 Hz, *J*_{3,4} = 9.9 Hz, 1H, H-3), 5.34 (dd, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 9.9 Hz, 1H, H-4), 5.32 (s, 2H, CH₂O), 5.24 (dd, *J*_{1,2} = *J*_{2,3} = 10.0 Hz, 1H, H-2), 4.46 (m, 1H, H-5), 4.26-4.13 (m, 2H, H-6a/b), 2.05, 2.03, 1.82 (3s, 9H, OAc),

¹³C-NMR (67.5 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 170.0, 169.6, 169.3 (C=O OAc), 159.4 (C=O Triazol), 139.3 (C_q Bn), 135.5 (C-4^T), 135.2 (C-4/5 Pht), 130.9 (C-1/2 Pht), 128.6 (C-5^T), 128.5, 128.3 (Bn), 123.6 (C-3/6 Pht), 82.2 (C-1), 73.8 (C-5), 69.8 (C-3), 67.7 (C-4), 66.2 (CH₂O), 61.5 (C-6), 53.1 (C-2), 20.5, 20.4, 20.0 (OAc).

*N*¹-[*O*-(4,6-*O*-Benzyliden- β -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -*D*-glucopyranosyl)-4-(benzyloxycarbonyl)-1,2,3-triazol **68**

β -BenzylidenMan- β -Bn₂GlcNPht- β -Bn₂GlcNPht-Triaz-CO₂Bn

500 mg (0.40 mmol) Azid **2** werden zusammen mit 84 mg (0.53 mmol) Alkin **66** und 90 μ l (0.76 mmol) 2,6-Lutidin in 18 ml Dichlormethan gelöst. Die Reaktion wird durch Zugabe von 18 mg (95 μ mol) CuI gestartet. Nach 21 Stunden (DC: Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:1) wird mit Dichlormethan verdünnt und mit gesättigter KHCO₃-Lösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ abfiltriert, eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Essigsäureethylester 2:1, Säulendurchmesser: 3.5 cm, Füllhöhe: 6 cm) gereinigt.

Ausbeute: 473 mg (84 %) farblos, amorph,

R_f = 0.31 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:1),

$[\alpha]_D^{23}$ = +37.2 (0.6, Dichlormethan),

C₇₉H₇₃N₅O₁₉ (1396.5),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 1395.49$ $M_{\text{gef}} = 1418.84$ (M+Na)⁺,

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 9.11 (s, 1H, =CH^T), 7.95-7.77 (m, 8H, Pht), 7.43-7.21 (m, 20H, Ar), 6.97-6.81 (m, 8H, Ar), 6.77-6.71 (m, 2H, Ar), 6.41 (d, $J_{1,2} = 9.9$ Hz, 1H, H-1¹ β), 5.52 (s, 1H, =CH-Ph), 5.33 (d, $J_{1,2} = 8.3$ Hz, 1H, H-1² β), 5.26 (s, 2H, CH₂O Ester), 4.99 (d, $J_{\text{OH},2} = 4.4$ Hz, 1H, OH-2³), 4.96 (d, $J_{\text{OH},3} = 6.7$ Hz, 1H, OH-3³), 4.85-4.79 (m, 3H, 2 CH₂Oa, H-2¹), 4.63-4.59 (m, 3H, H-1³, CH₂O), 4.45-4.32 (m, 5H, 2 CH₂Ob, CH₂O, H-4¹), 4.24 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.3$ Hz, 1H, H-3¹), 4.21 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.3$ Hz, 1H, H-3²), 4.06-3.97 (m, 3H, H-6a³, H-4², H-2²), 3.83-3.66 (m, 5H, H-5¹, H-2³, H-6a², H-4³, H-6b²), 3.60-3.31 (m, 5H, H-6b³, H-3³, H-6a¹, H-5², H-6b¹), 3.09 (m, 1H, H-5³),

¹³C-NMR (90 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 168.1, 167.4, 167.3, 166.4 (C=O Pht), 159.5 (C=O Triazol), 139.0, 138.4, 138.3, 138.1, 137.9, 137.9, 135.5 (C_q-Ar), 134.8 (C-4/5 Pht), 130.8, 130.4, 130.1 (C-1/2 Pht), 129.2-126.2 (C-Ar), 123.6, 123.5 (C-3/6 Pht), 101.0 (=CH-Ph), 100.4 (C-1³), 96.6 (C-1²), 82.7 (C-1¹), 78.3 (C-4³), 77.3 (C-4²), 76.6 (C-5¹), 76.4 (C-3¹), 76.0

(C-3²), 74.5 (C-4¹), 74.4 (C-5²), 73.7, 73.7, 72.2, 71.6 (CH₂O), 70.9 (C-2³), 69.9 (C-3³), 68.0 (C-6²), 67.9 (C-6³), 67.5 (C-6¹), 66.8 (C-5³), 66.1 (CH₂O Ester), 56.1 (C-2²), 54.2 (C-2¹).

Propiolsäure-4-methoxybenzylester 69

2.7 g (39 mmol) Propiolsäure werden zusammen mit 4.4 ml (35 mmol) Anisalkohol in 20 ml absolutem Dichlormethan gelöst und 15 Minuten bei -20 °C gerührt. Es wird eine Lösung von 8.5 g (41 mmol) DCC und 280 mg (2.3 mmol) DMAP in 50 ml absolutem Dichlormethan innerhalb einer Stunde zugetropft und bei Zimmertemperatur eine weitere Stunde (DC: Cyclohexan/ Essigsäureethylester 9:1) gerührt. Die Reaktionsmischung wird über Glaswolle filtriert und je einmal mit 1 N HCl und gesättigter KHCO₃-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ abfiltriert, eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Essigsäureethylester 19:1, Säulendurchmesser: 6 cm, Füllhöhe: 6 cm) gereinigt.

Ausbeute: 4.44 g (66 %) farbloses Öl,

$R_f = 0.26$ (Cyclohexan/Essigsäureethylester 9:1),

$n_D^{22} = 1.527$,

$k_p = 187$ °C (22 mbar),

C₁₁H₁₀O₃ (190.2),

HREI-MS: $M_{\text{ber}} = 190.06299$ $M_{\text{gef}} = 190.06300$,

weitere Signale: 121 (100), 91 (18), 77 (27), 53 (28)

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 7.30$ (d, ³J = 8.6 Hz, 2H, H-2/6), 6.88 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H, H-2/6), 5.14 (s, 2H, CH₂O), 3.79 (s, 3H, OMe), 2.86 (s, 1H, ≡CH),

¹³C-NMR (67.5 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 160.1$ (C-4), 152.7 (C=O), 130.6 (C-2/6), 126.7 (C-1), 114.1 (C-3/5), 74.9 (≡CH), 67.9 (CH₂O), 65.9 (≡CC), 55.4 (Me).

*N*¹-(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-*D*-glucopyranosyl)-4-(*p*-methoxybenzyloxy-carbonyl)-1,2,3-triazol **70**

Ac₃GlcNPht-Triaz-CO₂MPM

5.0 g (11 mmol) Azid **55** werden zusammen mit 2.3 g (12 mmol) Alkin **69** und 25 ml (21 mmol) 2,6-Lutidin in 300 ml Dichlormethan gelöst. Die Reaktion wird durch Zugabe von 500 mg (2.6 mmol) CuI gestartet. Nach drei Stunden (DC: Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:1) wird mit Dichlormethan verdünnt und einmal mit gesättigter KHCO₃-Lösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ abfiltriert, eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Essigsäureethylester 2:1, Säulendurchmesser: 5.5 cm, Füllhöhe: 7 cm) gereinigt.

Ausbeute: 4.5 g (64 %) farblos, amorph,

*R*_f = 0.43 (Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:1),

[α]_D²¹ = -36.1 (0.6, Dichlormethan),

C₃₁H₃₀N₄O₁₂ (650.59),

ESI-MS (Acetonitril): *M*_{ber} = 650.19 *M*_{gef} = 651.10 (M+H)⁺,

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 9.24 (s, 1H, =CH'), 7.89-7.82 (m, 4H, Pht), 7.39 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, MPM-2/6), 6.95 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, MPM-3/5), 6.86 (d, *J*_{1,2} = 9.9 Hz, 1H, H-1β), 5.85 (dd, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} = 9.8 Hz, 1H, H-3), 5.33 (dd, *J*_{3,4} = *J*_{4,5} = 9.8 Hz, 1H, H-4), 5.29-5.13 (m, 3H, CH₂O, H-2), 4.44 (m, 1H, H-5), 4.23-4.13 (m, 2H, H-6a/b), 3.76 (s, 3H, OMe), 2.04, 2.02, 1.81 (3s, 9H, OAc),

¹³C-NMR (67.5 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 170.0, 169.6, 169.3 (C=O OAc), 159.5 (C-4 MPM), 159.3 (C=O Triazol), 139.4 (C-4^T), 135.2 (C-4/5 Pht), 130.3 (C-2/6 MPM), 128.5 (C-5^T), 127.4 (C-1 MPM), 123.7, 123.6 (C-3/6 Pht), 113.8 (C-3/5 MPM), 82.2 (C-1), 73.8 (C-5), 69.8 (C-3), 67.7 (C-4), 66.1 (CH₂O), 61.5 (C-6), 55.1 (OMe), 53.1 (C-2), 20.4, 20.3, 19.9 (OAc).

*N*¹-(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-phthalimido-β-*D*-glucopyranosyl)-1,2,3-triazol **74**Ac₃GlcNPht-Triaz

300 mg (0.46 mmol) Methoxybenzylester **70** werden zusammen mit 500 mg (5.3 mmol) Phenol 36 Stunden (DC: Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:1) bei 90 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wird das Reaktionsgemisch in Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit gesättigter Na₂CO₃-Lösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ abfiltriert, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:1, Säulendurchmesser: 3.5 cm, Füllhöhe: 6 cm) gereinigt.

Ausbeute: 212 mg (95 %) farblos, amorph,

$R_f = 0.29$ (Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:1),

$[\alpha]_D^{20} = +14.5$ (0.5, Dichlormethan),

C₂₂H₂₂N₄O₉ (486.43),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 486.14$ $M_{\text{gef}} = 509.09$ (M+Na)⁺,

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 8.49$ (d, $J < 1$ Hz, 1H, H-5^T), 7.95-7.80 (m, 4H, Pht), 7.74 (d, $J < 1$ Hz, 1H, H-4^T), 6.84 (d, $J_{1,2} = 9.9$ Hz, 1H, H-1β), 5.84 (dd, $J_{2,3} = 9.9$ Hz, $J_{3,4} = 9.5$ Hz, 1H, H-3), 5.32 (dd, $J_{3,4} = 9.5$ Hz, $J_{4,5} = 9.9$ Hz, 1H, H-4), 5.12 (dd, $J_{1,2} = 9.9$ Hz, $J_{2,3} = 9.5$ Hz, 1H, H-2), 4.45 (m, 1H, H-5), 4.25-4.10 (m, 2H, H-6a/b), 2.04, 2.02, 1.81 (3s, 9H, OAc),

¹³C-NMR (67.5 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 170.0$, 169.7, 169.3 (C=O Ac), 167.2, 166.1 (C=O Pht), 135.3 (C-4/5 Pht), 134.1 (C-4^T), 130.3, 129.8 (C-1/2 Pht), 124.1 (C-5^T), 123.8, 123.6 (C-3/6 Pht), 81.8 (C-1), 73.8 (C-5), 70.0 (C-3), 67.8 (C-4), 61.5 (C-6), 53.3 (C-2), 20.5, 20.4, 20.0 (OAc).

*N*¹-(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-phthalimido-β-*D*-glucopyranosyl)-1,2,3-triazol-4,5-dicarbonsäure **76**

Ac₃GlcNPht-Triaz-(CO₂H)₂

200 mg (0.29 mmol) *tert*-Butylester **75** werden in 20 ml Ameisensäure gelöst. Nach drei Stunden (DC: Dichlormethan/Methanol 10:1) wird die Ameisensäure abdestilliert und der Rückstand mittels Flashchromatographie (Dichlormethan/Methanol 6:1, Säulendurchmesser: 3 cm, Füllhöhe: 5 cm) gereinigt. Nachdem im Produkt (105 mg, 63 %) noch ca. 10 % Verunreinigung enthalten sind, werden diese mittels HPLC (YMC: ODS-A, 250 x 20 mm, 120 Å, S-05 μm; Fluß: 9.5 ml/min Wasser/Acetonitril, 0.1 % Ameisensäure; 30-90 % Acetonitril in 50 Minuten) abgetrennt.

Ausbeute: 81 mg (48 %) farblos, amorph,

$R_f = 0.40$ (Dichlormethan/Methanol 6:1),

C₂₄H₂₂N₄O₁₃ (574.45),

ESI-MS (neg., Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 574.12$ $M_{\text{gef}} = 573.07$ (M-H)⁻,

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 7.82-7.79 (m, 4H, Pht), 7.40 (d, br, 1H, H-1), 5.81 (dd, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, $J_{3,4} = 9.7$ Hz, 1H, H-3), 5.29 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} = 10.0$ Hz, 1H, H-2), 5.18 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.7$ Hz, 1H, H-4), 4.26 (dd, $J_{\text{gem}} = 12.5$ Hz, $J_{\text{vic}} = 4.8$ Hz, 1H, H-6a), 4.17 (m, 1H, H-5), 4.05 (dd, $J_{\text{gem}} = 12.5$ Hz, $J_{\text{vic}} < 1$ Hz, 1H, H-6b), 2.03, 2.01, 1.82 (3s, 9H, OAc),

¹³C-NMR (90 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 170.1, 169.8, 169.2 (C=O OAc), 166.1, 165.0 (C=O Pht), 161.7 (C=O Triazol), 135.1 (C-4/5 Pht), 130.6, 130.2 (C-1/2 Pht), 123.6 (C-3/6 Pht), 80.6 (C-1), 73.9 (C-5), 70.7 (C-3), 67.9 (C-4), 61.8 (C-6), 52.0 (C-2), 20.5, 20.4, 20.1 (OAc).

*N*¹-(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-*D*-glucopyranosyl)-4-(*p*-methoxybenzyloxy-carbonyl)-1,2,3-triazol **70**

*N*¹-(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-*D*-glucopyranosyl)-5-(*p*-methoxybenzyloxy-carbonyl)-1,2,3-triazol **77**

Ac₃GlcNPht-Triaz-CO₂MPM (Isomerengemisch)

1.25 g (2.7 mmol) Azid **55** werden zusammen mit 550 mg (2.9 mmol) Alkin **69** in 7 ml Toluol bei 90 °C gerührt. Nach vier Tagen (DC: Hexan/Aceton 3:2) wird eingengt und das Rohprodukt mittels Flashchromatographie (Hexan/Essigsäureethylester 2:1 → Aceton, Säulendurchmesser: 4.5 cm, Füllhöhe: 9 cm) gereinigt.

Ausbeute: 120 mg (8 %) **77**, farblos, amorph,

410 mg (26 %) Mischfraktion,

850 mg (52 %) **70**,

R_f (**77**) = 0.39 (Hexan/Aceton 3:2),

R_f (**70**) = 0.32 (Hexan/Aceton 3:2),

70: vgl. S. 122

77:

$[\alpha]_D^{21} = +76.4$ (0.5, Dichlormethan),

C₃₁H₃₀N₄O₁₂ (650.59),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 650.19$ $M_{\text{gef}} = 673.26$ (M+Na)⁺,

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 8.35 (s, 1H, =CH^T), 7.87-7.82 (m, 4H, Pht), 7.45 (d, $J_{2,3} = 8.6$ Hz, 2H, MPM-2/6), 7.25 (d, $J_{1,2} = 10.0$ Hz, 1H, H-1β), 6.98 (d, $J_{2,3} = 8.6$ Hz, 2H, MPM-3/5), 5.78 (dd, $J_{2,3} = 10.0$ Hz, $J_{3,4} = 9.7$ Hz, 1H, H-3), 5.35 (s, 2H, CH₂O), 5.32 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} = 10.0$ Hz, 1H, H-2), 5.20 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.7$ Hz, 1H, H-4), 4.21 (dd, $J_{\text{gem}} = 12.2$ Hz, $J_{\text{vic}} = 3.8$ Hz, 1H, H-6a), 4.10-3.98 (m, 2H, H-5, H-6b), 3.77 (s, 3H, OMe), 2.02, 2.00, 1.83 (3s, 9H, OAc),

^{13}C -NMR (67.5 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 169.9, 169.8, 169.2$ (C=O OAc), 159.5 (C-4 MPM), 156.8 (C=O Triazol), 138.5 (C-4^T), 135.1 (C-4/5 Pht), 130.5 (C-2/6 MPM), 129.0 (C-1 MPM), 126.8 (C-5^T), 123.7 (C-3/6 Pht), 114.0 (C-3/5 MPM), 81.1 (C-1), 74.1 (C-5), 70.4 (C-3), 67.6 (C-4), 67.3 (CH₂O), 61.0 (C-6), 55.2 (OMe), 51.7 (C-2), 20.4, 20.4, 20.0 (OAc).

*N*¹-(3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -*D*-glucopyranosyl)-4,5-di-(benzyloxycarbonyl)-1,2,3-triazol **80**

Ac₃GlcNPht-Triaz-(CO₂Bn)₂

2.0 g (4.4 mmol) Glycosylazid **55** und 3.0 g (10 mmol) Dibenzylacetylendicarboxylat werden in 20 ml Toluol suspendiert. Nach Zugabe eines Reflon-Stabs wird die Mischung in der Mikrowellenapparatur 50 Minuten mit max. 500 W bei 120 °C bestrahlt, wobei innerhalb von drei Minuten aufgeheizt wird. Nach Ende der Reaktion (DC: Hexan/Aceton 3:2) wird das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Essigsäureethylester 3:1, Säulendurchmesser: 4.5 cm, Füllhöhe: 7 cm) gereinigt.

Ausbeute: 2.6 g (80 %) farblos, amorph,

$R_f = 0.47$ (Hexan/Aceton 3:2),

$[\alpha]_D^{21} = +22.7$ (0.6, Dichlormethan),

C₃₈H₃₄N₄O₁₃ (754.70),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 754.21$ $M_{\text{gef}} = 777.19$ (M+Na)⁺,

^1H -NMR (270 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 7.86\text{--}7.82$ (m, 4H, Pht), 7.41–7.39 (m, 5H, Bn), 7.35–7.33 (m, 5H, Bn'), 7.02 (d, $J_{1,2} = 9.7$ Hz, 1H, H-1 β), 5.85 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.8$ Hz, 1H, H-3), 5.36 (s, 2H, CH₂O), 5.24 (s, 2H, CH₂O), 5.14 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.8$ Hz, 1H, H-4), 5.09 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} = 10.1$ Hz, 1H, H-2), 4.30 (m, 1H, H-5), 4.22 (dd, $J_{\text{gem}} = 12.8$ Hz, $J_{\text{vic}} = 4.4$ Hz, 1H, H-6a), 3.99 (dd, $J_{\text{gem}} = 11.6$ Hz, $J_{\text{vic}} < 1$ Hz, 1H, H-6b), 2.04, 1.98, 1.82 (3s, 9H, OAc),

^{13}C -NMR (90 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 169.9, 169.6, 169.1$ (C=O OAc), 158.6, 157.3 (C=O Triazol), 138.5 (C-4^T), 135.1 (C-4/5 Pht), 135.0, 134.1 (C-1 Bn), 131.3 (C-5^T), 130.5 (C-1/2 Pht), 128.7–128.4 (Bn), 123.7 (C-3/6 Pht), 82.3 (C-1), 74.1 (C-5), 69.7 (C-3), 68.6 (CH₂O), 67.4 (C-4), 67.1 (CH₂O), 61.1 (C-6), 52.5 (C-2), 20.4, 20.3, 20.0 (OAc).

*N*¹-(4,6-*O*-Benzyliden-2-desoxy-2-phthalimido-β-*D*-glucopyranosyl)-4,5-di-(benzyloxycarbonyl)-1,2,3-triazol **82**

BenzylidenGlcNPht-Triaz-(CO₂Bn)₂

100 mg (0.24 mmol) Glycosylazid **81** und 130 mg (0.88 mmol) Dibenzylacetylendicarboxylat werden in 1.4 ml Toluol suspendiert. Nach Zugabe eines Reflon-Stabs wird die Mischung in der Mikrowellenapparatur 50 Minuten mit max. 500 W bei 120 °C bestrahlt, wobei innerhalb von drei Minuten aufgeheizt wird. Nach Ende der Reaktion (DC: Hexan/Aceton 3:2) wird das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Essigsäureethylester 3:1, Säulendurchmesser: 2 cm, Füllhöhe: 5 cm) gereinigt.

Ausbeute: 123 mg (72 %) farblos, amorph,

$R_f = 0.43$ (Hexan/Aceton 3:2),

$[\alpha]_D^{20} = -29.3$ (0.5, Dichlormethan),

C₃₉H₃₂N₄O₁₀ (716.69),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 716.21$ $M_{\text{gef}} = 739.43$ (M+Na)⁺,

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 7.95$ -7.82 (m, 4H, Pht), 7.46-7.32 (m, 15H, Ar), 6.74 (d, $J_{1,2} = 9.9$ Hz, 1H, H-1β), 6.04 (d, $J_{\text{OH},3} = 4.9$ Hz, 1H, OH), 5.67 (s, 1H, =CH-Ph), 5.38 (d, $J_{\text{gem}} = 12.0$ Hz, 1H, CH₂Oa), 5.31 (d, $J_{\text{gem}} = 12.0$ Hz, 1H, CH₂Ob), 5.26 (s, 2H, CH₂O), 4.76 (dd, $J_{1,2} = 9.9$ Hz, $J_{2,3} = 9.7$ Hz, 1H, H-2), 4.55 (m, 1H, H-3), 4.22 (dd, $J_{\text{gem}} = 9.8$ Hz, $J_{\text{vic}} = 4.4$ Hz, 1H, H-6a), 3.78 (m, 1H, H-5), 3.67-3.58 (m, 2H, H-4, H-6b),

¹³C-NMR (90 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 167.8$, 166.6 (C=O Pht), 158.6, 157.8 (C=O Triazol), 137.4, 137.3, 135.0 (C_q-Ar), 134.8 (C-4/5 Pht), 134.2, 131.6, 131.1, 130.4 (C_q-Ar), 129.1-128.2, 126.3 (Ar), 123.6, 123.3 (C-3/6 Pht), 100.8 (=CH-Ph), 83.7 (C-1), 79.8 (C-4), 69.2 (C-5), 68.6 (CH₂O), 67.2 (C-3), 67.0 (CH₂O), 66.9 (C-6), 56.3 (C-2).

*N*¹-(2-Desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)-4,5-di-(benzyloxycarbonyl)-1,2,3-triazol **83**
GlcNPht-Triaz-(CO₂Bn)₂

100 mg (0.14 mmol) Benzyldenacetal **82** werden in 10 ml Acetonitril aufgenommen und mit einer Lösung von 560 mg (2.9 mmol) p-TosOH*H₂O in 22 ml Acetonitril versetzt. Nach 15 Minuten Rühren (DC: Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:1) wird mit 0.5 ml (6.1 mmol) Pyridin die Säure neutralisiert, das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand mit gesättigter Kochsalzlösung extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ abfiltriert, eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Aceton 1:1, Säulendurchmesser: 2 cm, Füllhöhe: 5 cm) gereinigt.

Ausbeute: 70 mg (80 %) farblos, amorph,

$R_f = 0.34$ (Cyclohexan/Aceton 1:1),

C₃₂H₂₈N₄O₁₀ (628.59),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 628.18$ $M_{\text{gef}} = 651.29$ (M+Na)⁺,

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 7.84\text{-}7.81$ (m, 4H, Pht), $7.38\text{-}7.37$ (m, 5H, Bn), $7.34\text{-}7.33$ (m, 5H, Bn'), 6.63 (d, $J_{1,2} = 9.9$ Hz, 1H, H-1β), 5.77 (d, $J_{\text{OH},3} = 4.5$ Hz, 1H, OH-3), 5.45 (d, $J_{\text{OH},4} = 5.4$ Hz, 1H, OH-4), 5.31 (s, 2H, CH₂O), 5.23 (s, 2H, CH₂O'), 4.75 (m, 1H, OH-6), 4.64 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} = 9.9$ Hz, 1H, H-2), 4.22 (m, 1H, H-3), 3.68 (m, 1H, H-6a), $3.57\text{-}3.50$ (m, 2H, H-5, H-6b), 3.40 (m, 1H, H-4),

¹³C-NMR (67.5 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 168.0$, 166.6 (C=O Pht), 158.8 , 157.7 (C=O Triazol), 137.8 (C-4^T), 135.0 (C-1 Bn), 134.8 , 134.7 (C-4/5 Pht), 134.2 (C-1 Bn'), 131.5 (C-5^T), 131.2 , 130.6 (C-1/2 Pht), $128.6\text{-}128.3$ (Bn), 123.4 , 123.8 (C-3/6 Pht), 83.2 (C-1), 80.8 (C-5), 70.6 (C-3), 69.3 (C-4), 68.6 (CH₂O), 67.0 (CH₂O), 60.2 (C-6), 55.9 (C-2).

3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- α,β -D-glucoopyranosylfluorid
(Anomerengemisch) **72**

Ac₃GlcNPhtF

600 mg (0.79 mmol) Triazol **80** werden in 15 ml absolutem Dichlormethan gelöst und in einem Plastikgefäß auf 0 °C gekühlt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 3 ml HF*Pyridin (70 % HF) gestartet und 30 Minuten bei 0 °C kräftig gerührt, anschließend (DC: Hexan/Aceton 3:2) wird das Eisbad entfernt. Nach einer weiteren Stunde wird mit Dichlormethan verdünnt, je einmal mit 1M HCl und gesättigter KHCO₃-Lösung extrahiert, über MgSO₄ abfiltriert, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Essigsäureethylester 3:1, Säulendurchmesser: 3.5 cm, Füllhöhe: 7 cm) gereinigt.

Ausbeute: 295 mg (85 %), farblos amorph, lt. ¹H-NMR zu 50 % α .

3,4,6-Tri-O-acetyl-2-deoxy-2-phthalimido- β -D-glucoopyranosylazid **55**

Ac₃GlcNPhtN₃

200 mg (0.27 mmol) Triazol **80** werden zusammen mit 150 μ l (1.13 mmol) TMSN₃ in 5 ml absolutem Dichlormethan gelöst und mit 103 μ l (0.53 mmol) TMSOTf versetzt. Nach 24 Stunden (DC: Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:1) werden 50 μ l (0.57 mmol) TfOH zugegeben und es wird eine weitere Stunde gerührt. Die Reaktionsmischung wird verdünnt, je einmal mit 1M HCl und gesättigter KHCO₃-Lösung extrahiert, über MgSO₄ abfiltriert, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Aceton 3:1, Säulendurchmesser: 2 cm, Füllhöhe: 6 cm) gereinigt.

Ausbeute: 95 mg (78 %), farblos amorph.

*N*¹-[*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)-(3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-*D*-glucopyranosyl)]-4,5-di-(benzyloxycarbonyl)-1,2,3-triazol **84**

β-BenzylidenMan-β-Bn₂GlcNPht-β-Bn₂GlcNPht-Triaz-(CO₂Bn)₂

410 mg (0.33 mmol) Azid **2** und 180 mg (0.61 mmol) Dibenzylacetylendicarboxylat werden in 1.5 ml Toluol suspendiert. Nach Zugabe eines Reflon-Stabs wird die Mischung in der Mikrowellenapparatur 50 Minuten mit max. 500 W bei 120 °C bestrahlt, wobei innerhalb von drei Minuten aufgeheizt wird. Nach Ende der Reaktion (DC: Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:1) wird das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand mittels Flashchromatographie (Cyclohexan/Essigsäureethylester 3:2, Säulendurchmesser: 3.5 cm, Füllhöhe: 5 cm) gereinigt.

Ausbeute: 440 mg (87 %) farblos, amorph,

$R_f = 0.40$ (Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:1),

$[\alpha]_D^{21} = -12.0$ (0.6, Dichlormethan),

C₈₇H₇₉N₅O₂₁ (1530.6),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 1529.53$ $M_{\text{gef}} = 1552.22$ (M+Na)⁺,

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 8.00$ -7.63 (m, 8H, Pht), 7.43-7.20 (m, 20H, Ar), 7.15-7.10 (m, 5H, Ar), 6.95-6.84 (m, 8H, Ar), 6.77-6.72 (m, 2H, Ar), 6.50 (d, $J_{1,2} = 9.9$ Hz, 1H, H-1¹β), 5.52 (s, 1H, =CH-Ph), 5.23 (d, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, 1H, H-1²β), 5.18 (s, 2H, CH₂O-4^T), 5.08 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂O-5^T), 4.99 (d, $J_{\text{OH},2} = 3.8$ Hz, 1H, OH-2³), 4.94 (d, $J_{\text{OH},3} = 6.8$ Hz, 1H, OH-3³), 4.84-4.79 (m, 2H, 2 CH₂Oa), 4.76 (dd, $J_{1,2} = 9.9$ Hz, $J_{2,3} = 10.1$ Hz, 1H, H-2¹), 4.62 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1³), 4.61 (s, 2H, CH₂O), 4.48-4.39 (m, 3H, 2x CH₂Ob, CH₂Oa), 4.31 (d, $J_{\text{gem}} = 12.4$ Hz, 1H, CH₂Ob), 4.26 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.5$ Hz, 1H, H-4¹), 4.21-4.16 (m, 2H, H-3¹, H-3²), 4.06-3.97 (m, 3H, H-6a³, H-4², H-2²), 3.83-3.77 (m, 2H, H-6a², H-2³), 3.71 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.4$ Hz, 1H, H-4³), 3.67 (m, 1H, H-6b²), 3.60-3.53 (m, 3H, H-6b³, H-3³, H-5¹), 3.39-3.30 (m, 2H, H-5², H-6a¹), 3.23 (dd, $J_{\text{gem}} = 10.4$ Hz, $J_{5,6b} < 1$ Hz, 1H, H-6b¹), 3.10 (m, 1H, H-5³),

¹³C-NMR (90 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 168.1, 167.4, 167.3, 166.1$ (C=O Pht), 158.5, 157.3 (C=O Triazol), 138.4, 138.3, 137.9, 137.9, 137.7, 135.0 (C_q-Ar), 135.0, 135.0 (C-4/5 Pht),

134.2, 131.6, 130.8, 130.8, 130.6, 130.2 (C_q-Ar), 128.8-126.0 (C-Ar), 123.6, 123.5 (C-3/6 Pht), 101.0 (=CH-Ph), 100.4 (C-1³), 96.3 (C-1²), 82.8 (C-1¹), 78.3 (C-4³), 77.2 (C-4²), 76.4 (C-5¹), 75.9 (C-3²), 75.8 (C-3¹), 74.6 (C-5²), 74.0 (C-4¹), 73.9, 73.7, 72.2, 71.5 (CH₂O), 70.9 (C-2³), 69.9 (C-3³), 68.3 (CH₂O-5^T), 67.8 (C-6², C-6³), 67.2 (C-6¹), 66.9 (CH₂O-4^T), 66.8 (C-5³), 56.0 (C-2²), 53.6 (C-2¹).

*N*¹-[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)-(3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl)]-4,5-di-(benzyloxycarbonyl)-1,2,3-triazol **85**

β-Ac₃GlcNPht-α-Ac₃Man-β-benzylidenMan-β-Bn₂GlcNPht-β-Bn₂GlcNPht-Triaz-(CO₂Bn)₂

100 mg (65.3 μmol) Trisaccharid **84** und 114 mg (127 μmol) Trichloracetimidat **4** werden zusammen mit 200 mg ausgeheiztem und gemörsertem Molekularsieb 4 Å unter Argon-Atmosphäre in 2 ml absolutem Dichlormethan suspendiert und 30 Minuten bei -10 °C gerührt. Die Reaktion wird durch Zutropfen von 50 μl gesättigter TfOH in Dichlormethan gestartet. Nach 15 Minuten (DC: Hexan/Aceton 1:1) wird verdünnt, über Celite abfiltriert, mit gesättigter KHCO₃-Lösung extrahiert, über MgSO₄ abfiltriert, eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird mittels Flashchromatographie (Hexan/Aceton 2:1, Säulendurchmesser: 2.5 cm, Füllhöhe: 6 cm) gereinigt.

Ausbeute: 98 mg (67 %) farblos, amorph,

*R*_f = 0.54 (Hexan/Aceton 1:1),

[α]_D²¹ = -26.1 (1.2, Dichlormethan),

C₁₁₉H₁₁₄N₆O₃₈ (2236.2),

ESI-MS (Acetonitril): M_{ber} = 2234.72 M_{gef} = 2257.36 (M+Na)⁺,

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 8.00-7.79 (m, 12H, Pht), 7.69-7.57 (m, 3H, Ar), 7.51-7.20 (m, 17H, Ar), 7.16-7.05 (m, 5H, Ar), 7.01-6.84 (m, 8H, Ar), 6.82-6.75 (m, 2H, Ar), 6.50 (d, *J*_{1,2} = 9.9 Hz, 1H, H-1^β), 5.63 (s, 1H, =CH-Ph), 5.52 (dd, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} = 10.0 Hz, 1H, H-3⁵), 5.24-5.20 (m, 2H, OH-2³, H-1²), 5.18 (s, 2H, CH₂O-4^T), 5.08 (d, *J*_{gem} = 7.3 Hz, 2H, CH₂O-5^T), 5.01 (dd, *J*_{2,3} = 3.0 Hz, *J*_{3,4} = 9.4 Hz, 1H, H-3⁴), 4.95 (d, *J*_{1,2} = 8.6 Hz, 1H, H-1^{5β}),

4.92-4.73 (m, 6H, H-4⁴, H-4⁵, CH₂Oa, CH₂Oa, H-1⁴, H-2¹), 4.65-3.94 (m, 17H, CH₂O, H-1³, CH₂Ob, CH₂Ob, CH₂O, H-4¹, H-3¹, H-3², H-2⁵, H-6a³, H-6a⁵, H-2², H-4², H-2⁴, H-5⁴), 3.89 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 8.9$ Hz, 1H, H-4³), 3.83-3.69 (m, 4H, H-6a², H-2³, H-6b⁵, H-6b²), 3.66-3.48 (m, 5H, H-6b³, H-6a⁴, H-6b⁴, H-3³, H-5¹), 3.38-3.29 (m, 2H, H-5², H-6a¹), 3.23 (dd, $J_{\text{gem}} = 10.1$ Hz, $J_{5,6} < 1$ Hz, 1H, H-6b¹), 3.11 (m, 1H, H-5³), 2.63 (m, 1H, H-5⁵), 2.05-1.80 (6s, 18H, OAc),

¹³C-NMR (90 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 169.9, 169.8, 169.6, 169.2$ (C=O Ac), 168.1, 167.4, 167.3, 167.1, 166.1 (C=O Pht), 158.5, 157.2 (C=O Triazol), 138.3, 138.2, 138.0, 138.0, 137.9, 137.9, 137.8, 137.7, 135.0 (C_q-Ar), 135.0, 134.9, 134.5 (C-4/5 Pht), 134.1, 131.6, 131.2, 130.8, 130.8, 130.6, 130.2 (C_q-Ar), 129.5, 128.4-126.6 (C-Ar), 123.5-123.1 (C-3/6 Pht), 101.1 (=CH-Ph), 99.6 (C-1³), 97.6 (C-1⁴), 96.3 (C-1²), 95.4 (C-1⁵), 82.8 (C-1¹), 77.8 (C-3³), 77.3 (C-4³), 76.9 (C-4²), 76.4 (C-5¹), 75.8 (C-3²), 75.7 (C-3¹), 74.6 (C-5²), 73.9 (C-4¹), 73.6, 73.4 (CH₂O), 73.0 (C-2⁴), 72.4, 72.1 (CH₂O), 70.8 (C-5⁵), 69.8 (C-2³), 69.5 (C-3⁵), 69.0 (C-3⁴), 68.3 (CH₂O-5^T), 68.3 (C-4⁵), 67.8 (C-6², C-6³), 67.6 (C-5⁴), 67.2 (C-6¹), 66.9 (CH₂O-4^T), 66.1 (C-5³), 65.1 (C-4⁴), 62.0 (C-6⁴), 61.2 (C-6⁵), 55.9 (C-2²), 53.7 (C-2¹, C-2⁵), 20.5-20.1 (OAc).

*N*¹-[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-O-acetyl- β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-O-(3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-(3,6-di-O-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)]-4,5-di-(benzyloxycarbonyl)-1,2,3-triazol **87**

β -Ac₃GlcNPht- α -Ac₃Man- β -AcMan- β -Bn₂GlcNPht- β -Bn₂GlcNPht-Triaz-(CO₂Bn)₂

100 mg (45 μ mol) Pentasaccharid **85** werden in einem Gemisch aus 1 ml Pyridin und 0.5 ml Essigsäureanhydrid gelöst. Nach 16 Stunden (LC/MS) Rühren wird eingengt, dreimal mit Toluol codestilliert und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird in 2 ml Acetonitril aufgenommen und eine Lösung von 180 mg (0.95 mmol) *p*-TosOH*H₂O in 7 ml Acetonitril zugegeben. Nach 30 Minuten (DC: Hexan/Aceton 1:1) wird mit 300 μ l Pyridin neutralisiert und eingedampft. Der Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen und je einmal mit 1 N HCl und gesättigter KHCO₃-Lösung extrahiert, über MgSO₄ abfiltriert, eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Hexan/Aceton 5:2, Säulendurchmesser: 2 cm, Füllhöhe: 8 cm) gereinigt.

Ausbeute: 74 mg (76 %) farblos, amorph,

R_f (Acetylierung) = 0.54 (Hexan/Aceton 1:1),

R_f (Hydrolyse) = 0.46 (Hexan/Aceton 1:1),

$[\alpha]_D^{21} = -12.8$ (0.4, CH_2Cl_2),

$\text{C}_{114}\text{H}_{112}\text{N}_6\text{O}_{39}$ (2190.1),

LC-MS (C4): t_R (Edukt) = 18.5 min (50-95%),

LC-MS (C4): t_R (Acetylierung) = 19.1 min (50-95%),

ESI-MS (Acetylierung, Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 2276.73$ $M_{\text{gef}} = 2300.09$ (M+Na)⁺,

ESI-MS (Hydrolyse, Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 2188.70$ $M_{\text{gef}} = 2211.61$ (M+Na)⁺,

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 7.99$ -7.60 (m, 12H, Pht), 7.35-7.03 (m, 20H, Ar), 6.95-6.70 (m, 10H, Ar), 6.48 (d, $J_{1,2} = 9.9$ Hz, 1H, H-1^β), 5.66 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 10.0$ Hz, 1H, H-3⁵), 5.47 (d, $J_{\text{OH},4} = 5.3$ Hz, 1H, OH-4³), 5.32 (d, $J_{1,2} = 8.8$ Hz, 1H, H-1^{5β}), 5.21-5.11 (m, 4H, CH₂O-4^T, H-1², H-2³), 5.09 (d, $J_{\text{gem}} = 3.6$ Hz, 2H, CH₂O-5^T), 5.02 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 10.0$ Hz, 1H, H-4⁵), 4.97 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 10.3$ Hz, 1H, H-4⁴), 4.92-4.86 (m, 2H, H-1⁴, CH₂Oa), 4.80-4.65 (m, 4H, CH₂Ob, H-2¹, H-3⁴, H-1³), 4.54-4.45 (m, 3H, CH₂O, OH-6³), 4.42 (d, $J_{\text{gem}} = 12.4$ Hz, 1H, CH₂Oa), 4.36-3.93 (m, 12H, CH₂O, CH₂Ob, H-6a⁵, H-2⁴, H-4¹, H-3¹, H-2⁵, H-3², H-4², H-6b⁵, H-2²), 3.89 (m, 1H, H-5⁵), 3.79 (m, 1H, H-5⁴), 3.72-3.63 (m, 4H, H-6a⁴, H-6b⁴, H-6a³, H-6a¹), 3.60-3.43 (m, 5H, H-4³, H-6b¹, H-6b³, H-5¹, H-3³), 3.29 (m, 1H, H-6a²), 3.20 (m, 2H, H-6b², H-5²), 3.06 (m, 1H, H-5³), 2.10-1.80 (7s, 21H, OAc),

¹³C-NMR (90 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 170.1$, 169.9, 169.9, 169.7, 169.6, 169.3, 169.2 (C=O Ac), 168.1, 167.3, 166.1 (C=O Pht), 158.5, 157.2 (C=O Triazol), 138.4, 138.1, 137.9, 137.8, 137.6, 134.9 (C_q-Ar), 134.9, 134.8 (C-4/5 Pht), 134.1, 131.6, 130.8, 130.6, 130.2 (C_q-Ar), 128.4-127.0 (C-Ar), 123.5 (C-3/6 Pht), 97.5 (C-1⁴), 97.2 (C-1³), 96.2 (C-1²), 96.0 (C-1⁵), 82.7 (C-1¹), 76.6-76.4 (C-5³, C-3², C-4², C-3³), 75.8 (C-3¹), 74.4 (C-5²), 74.1 (C-4¹), 73.9 (CH₂O), 73.4 (C-2⁴), 72.2 (CH₂O), 71.6 (CH₂O), 71.0 (C-5⁵), 70.6 (C-2³), 69.7 (C-5¹), 69.1 (C-3⁵), 68.6 (C-3⁴), 68.3 (CH₂O-5', C-4⁵), 68.0 (C-5⁴), 67.6 (C-6¹), 67.3 (C-6²), 66.9 (CH₂O-4'), 66.8 (C-4³), 64.6 (C-4⁴), 61.9 (C-6⁵), 61.7 (C-6⁴), 60.3 (C-6³), 55.9 (C-2²), 53.6 (C-2¹, C-2⁵), 20.6-20.1 (7 OAc).

*N*¹-{*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*-[(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-*O*-acetyl- β -*D*-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -*D*-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -*D*-glucopyranosyl}-4,5-di-(benzyloxycarbonyl)-1,2,3-triazol **88**

β -Ac₃GlcNPht- α -Ac₃Man-1,3-(β -Ac₃GlcNPht- α -Ac₃Man-1,6)- β -AcMan- β -Bn₂GlcNPht- β -Bn₂GlcNPht-Triaz-(CO₂Bn)₂

33 mg (15 μ mol) Pentasaccharid **87** und 20 mg (23 μ mol) Trichloracetimidat **4** werden zusammen mit 50 mg ausgeheiztem und gemörsertem Molekularsieb 4 Å unter Argon-Atmosphäre in 4 ml absolutem Dichlormethan suspendiert und 30 Minuten bei -45 °C gerührt. Die Reaktion wird durch Zutropfen von 10 μ l gesättigter TfOH-Lösung in Dichlormethan gestartet. Nach fünf Minuten (DC: Hexan/Aceton 1:1) wird verdünnt, über Celite abfiltriert, mit gesättigter KHCO₃-Lösung extrahiert, über MgSO₄ abfiltriert, eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird mittels Flashchromatographie (Hexan/Aceton 2:1, Säulendurchmesser: 1.5 cm, Füllhöhe: 7 cm) gereinigt.

Ausbeute: 30 mg (69 %) farblos, amorph,

$R_f = 0.33$ (Cyclohexan/Aceton 1:1),

$[\alpha]_D^{20} = -9.2$ (1.4, Dichlormethan),

C₁₄₆H₁₄₇N₇O₅₆ (2895.7),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 2893.89$ $M_{\text{gef}} = 2917.96$ (M+Na)⁺,

¹H-NMR (360 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 8.02$ -7.61 (m, 16H, Pht), 7.36-7.03 (m, 20H, Ar), 6.93-6.69 (m, 10H, Ar), 6.47 (d, $J_{1,2} = 9.9$ Hz, 1H, H-1¹), 5.68 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 10.0$ Hz, 1H, H-3⁵), 5.60 (d, br, 1H, OH-4³), 5.56 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 10.0$ Hz, 1H, H-3^{5'}), 5.33 (d, $J_{1,2} = 8.3$ Hz, 1H, H-1⁵), 5.23 (d, $J_{1,2} = 8.3$ Hz, 1H, H-1^{5'}), 5.17 (s, 2H, CH₂O-4^T), 5.15-4.88 (m, 9H, H-1², H-2³, CH₂O-5^T, H-4⁵, H-4⁴, H-3^{4'}, H-4^{4'}, H-4^{5'}), 4.87-4.81 (m, 2H, H-1⁴, CH₂Oa), 4.76-4.69 (m, 2H, H-2¹, H-3⁴), 4.66-4.59 (m, 2H, CH₂Oa', H-1³), 4.55-4.35 (m, 5H, CH₂O, CH₂Ob', CH₂Ob, H-1^{4'}), 4.30-3.87 (m, 15H, CH₂O, H-6a⁵, H-2⁴, H-2⁵, H-3¹, H-2^{5'}, H-4¹, H-2⁴, H-6a^{5'}, H-3², H-2², H-6b⁵, H-4², H-5⁵), 3.81 (m, 1H, H-5⁴), 3.76-3.40 (m, 14H, H-6a⁴, H-6b⁴, H-6b^{5'}, H-6a³, H-6b³, H-5^{4'}, H-6a², H-6a^{4'}, H-4³, H-5¹, H-6b², H-3³, H-5^{5'}, H-6b^{4'}), 3.27-3.16 (m, 3H, H-6a¹, H-5³, H-5²), 3.10 (m, 1H, H-6b¹), 2.03-1.80 (13s, 39H, OAc),

^{13}C -NMR (90 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 170.1, 169.9, 169.9, 169.9, 169.7, 169.7, 169.7, 169.4, 169.3, 169.3, 169.2, 169.1$ (C=O Ac), $167.9, 167.4, 167.1, 167.0, 166.1$ (C=O Pht), $158.5, 157.2$ (C=O Triazol), $138.2, 138.1, 137.9, 137.8, 137.7, 135.0$ (C_q -Ar), $134.9, 134.7$ (C-4/5 Pht), $134.1, 131.6, 130.8, 130.6, 130.5, 130.2$ (C_q -Ar), 128.6 - 126.9 (C-Ar), 123.5 (C-3/6 Pht), 97.8 (C-1⁴), 97.2 (C-1⁴), 96.9 (C-1³), 96.5 (C-1²), 96.1 (C-1⁵, C-1⁵), 82.7 (C-1¹), 77.0 (C-4²), 76.4 (C-3¹, C-3³), 75.7 (C-3²), $74.5, 74.4$ (C-4¹, C-5²), 74.1 (CH_2O), 73.8 (C-5³), 73.5 (C-2⁴), 73.4 (CH_2O), 72.3 (CH_2O), 71.5 (CH_2O), 71.0 (C-5⁵), 70.7 (C-5⁵), 70.4 (C-2³), 69.6 (C-5¹, C-3⁴, C-3⁵, C-3⁵), 69.1 (C-3⁴), 68.6 (C-4⁵, C-4⁵), 68.3 (CH_2O -5^T), 68.1 (C-5⁴), 67.7 (C-6²), 67.5 (C-5⁴), 67.1 (C-6¹, C-6³), 67.0 (C-4³), 66.9 (CH_2O -4^T), 64.6 (C-4⁴), 64.3 (C-4⁴), 61.9 (C-6⁵), 61.8 (C-6⁴), 61.6 (C-6⁴), 61.4 (C-6⁵), 55.6 (C-2²), 53.8 (C-2⁵), 53.7 (C-2⁵), 53.6 (C-2¹), 20.7 - 20.0 (13 OAc).

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*-[(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-*O*-acetyl- β -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-*O*-(3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-3,6-di-*O*-benzyl-2-desoxy-2-phthalimido- α -D-glucopyranosylfluorid **89**

β -Ac₃GlcNPht- α -Ac₃Man-1,3-(β -Ac₃GlcNPht- α -Ac₃Man-1,6)- β -AcMan- β -Bn₂GlcNPht- α -Bn₂GlcNPht-F

38.2 mg (13.2 μmol) Triazol **88** werden in einem Eppendorfgefäß in 0.5 ml absolutem Dichlormethan 10 Minuten bei 0 °C gerührt. Es werden 50 μl HF-Pyridin-Komplex zugetropft. Nach einer Stunde unter heftigem Rühren (DC: Hexan/Aceton 2:3) wird die Eiskühlung entfernt und eine weitere Stunde gerührt. Die Reaktionsmischung wird in einen Teflonscheidetricher mit Dichlormethan, Eis und 1 N HCl überführt und extrahiert. Nach folgender Extraktion mit gesättigter KHCO_3 -Lösung wird über MgSO_4 abfiltriert, eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird mittels Flashchromatographie (Hexan/Aceton 1.7:1, Säulendurchmesser: 1.5 cm, Füllhöhe: 7 cm) gereinigt.

Ausbeute: 18.7 mg (55 %, enthält zu 10 % einfach debenzyliertes Produkt) farblos, amorph,

$R_f = 0.74$ (Cyclohexan/Aceton 2:3),

$\text{C}_{128}\text{H}_{133}\text{FN}_4\text{O}_{52}$ (2578.4),

ESI-MS (Acetonitril): $M_{\text{ber}} = 2576.79$ $M_{\text{gef}} = 2600.31$ (M+Na)⁺,

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 7.96\text{-}7.70$ (m, 16H, Pht), $7.40\text{-}6.69$ (m, 20H, Ar), $5.71\text{-}5.53$ (m, 4H, H-3⁵, H-1¹, OH-4³, H-3^{5'}), 5.32 (d, $J_{1,2} = 8.3$ Hz, 1H, H-1⁵), 5.27 (d, $J_{1,2} = 8.3$ Hz, 1H, H-1^{5'}), $5.19\text{-}4.89$ (m, 8H, H-1², H-2³, CH₂Oa, H-4⁵, H-4⁴, H-4^{4'}, H-3⁴, H-4^{5'}), $4.86\text{-}4.81$ (m, 2H, H-1⁴, CH₂Ob), 4.71 (dd, $J_{2,3} < 1$ Hz, $J_{3,4} = 7.9$ Hz, 1H, H-3⁴), $4.66\text{-}4.59$ (m, 2H, CH₂Oa', H-1³), $4.43\text{-}3.25$ (39H, CH₂Ob', H-1⁴, CH₂O, CH₂O, H-6a⁵, H-2⁴, H-2⁵, H-2^{4'}, H-6a^{5'}, H-2^{5'}, H-3¹, H-3², H-6b⁵, H-2², H-2¹, H-4², H-5⁵, H-5¹, H-5⁴, H-6b^{5'}, H-4¹, H-6a⁴, H-6b⁴, H-5^{4'}, H-6a^{4'}, H-6a², H-5^{5'}, H-6a³, H-6b³, H-4³, H-3³, H-6b², H-6b^{4'}, H-6a¹, H-6b¹, H-5², H-5³), $2.03\text{-}1.79$ (13s, 39H, OAc),

$^{13}\text{C-NMR}$ (90 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 170.1, 170.0, 169.9, 169.9, 169.6, 169.6, 169.6, 169.6, 169.3, 169.2, 169.2, 169.1$ (C=O Ac), $167.9, 167.5, 167.2, 167.1$ (C=O Pht), $138.6, 138.2, 138.1, 138.0, 137.7, 135.4$ (C_q-Ar), 134.9 (C-4/5 Pht), 130.6 (C_q-Ar), $128.5\text{-}126.9$ (C-Ar), $123.6\text{-}123.0$ (C-3/6 Pht), 105.8 (aus HMQC, $J_{\text{C,F}} = 216$ Hz, C-1¹), 97.8 (C-1⁴), 97.8 (C-1^{4'}), 96.8 (C-1³, C-1²), 96.1 (C-1⁵, C-1^{5'}), 77.0 (C-4²), 75.9 (C-3²), 75.7 (C-3³), 74.7 (C-3¹), 74.4 (C-5²), 74.1 (C-5³), 73.8 (C-2^{4'}), 73.5 (C-2⁴), 72.3 (CH₂O), 72.3 (CH₂O), 71.8 (CH₂O, C-4¹), 71.7 (CH₂O, C-5¹), 71.0 (C-5⁵), 70.7 (C-5^{5'}), 70.4 (C-2³), 69.7 (C-3^{4'}, C-3^{5'}, C-3⁵), 69.1 (C-3⁴), 68.6 (C-4⁵), 68.4 (C-4^{5'}), 68.1 (C-5⁴), 67.5 (C-5^{4'}), 66.9 (C-4³), 66.7 (C-6²), 67.3 (C-6³), 67.2 (C-6¹), 64.6 (C-4⁴), 64.3 (C-4^{4'}), 61.9 (C-6⁵), 61.8 (C-6⁴), 61.6 (C-6^{4'}), 61.4 (C-6^{5'}), 55.7 (C-2²), 55.1 (aus HMQC, $J_{\text{C,F}} = 27$ Hz, C-2¹), 53.8 (C-2⁵), 53.7 (C-2^{5'}), $20.5\text{-}20.0$ (13 OAc).

8.3. Versuche zu Kapitel 4.3.1

6-Amino-1-hexyl O-(β-D-galactopyranosyl-(1→4)-2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-O-[β-D-galactopyranosyl-(1→4)-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)]-α-D-mannopyranosid 92

2,4-(β-Gal-1,4-β-GlcNAc)₂-α-Man-OHexNH₂

Zu einer Lösung von 9.3 mg (14 μmol) Trisaccharid **91** in 582 μl Wasser werden 271 μl einer wässrigen Lösung von BSA (10 mg/ml) und 18 μl einer 1 M NaN₃-Lösung pipettiert. Anschließend werden 36 μl einer 0.1 M MnCl₂-Lösung und 144 μl eines 0.5 M Natriumcacodylatpuffers (pH = 7.4) hinzugefügt. Weiterhin gibt man 25 mg (41 μmol) UDP-Galactose (Dinatriumsalz) gelöst in 2.5 ml Wasser zu und homogenisiert. Zum Start der Reaktion werden 27 μl CIAP (E.C. 3.1.3.1, 1000 U/ml) und 54 μl Galactosyltransferase (5 U/ml, E.C. 2.4.1.22) zugegeben. Nach zwei Tagen bei 37 °C (DC: Isopropanol/1M Ammoniumacetat

4:1) wird die Reaktionsmischung durch Gelfiltrationschromatographie an Pharmacia Hi Load Superdex 30 (600 x 16 mm, Eluent 0.1M NH₄HCO₃, Fluß 750 µl/min; Detektion: 214 und 254 nm) aufgetrennt und das Produkt zweimal lyophilisiert.

Ausbeute: 12.7 mg (93 %) farblos, amorph,

$R_f = 0.35$ (Isopropanol/1M Ammoniumacetat 2:1),

C₄₀H₇₁N₃O₂₆ (1010.0),

ESI-MS (Wasser): $M_{\text{ber}} = 1009.43$ $M_{\text{gef}} = 1010.3$ (M+H)⁺,

¹H-NMR (360 MHz, D₂O (mit CH₃CN als internem Standard)): $\delta = 4.77$ (d, $J_{1,2} = 1.6$ Hz, 1H, H-1¹), 4.50 (d, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, 1H, H-1² β), 4.45 (d, $J_{1,2} = 8.1$ Hz, 1H, H-1² β), 4.39 (2d, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, 2H, H-1³, H-1³'), 4.00 (dd, $J_{1,2} = 1.6$ Hz, $J_{2,3} = 3.1$ Hz, 1H, H-2¹), 3.95-3.90 (m, 2H, H-6a², H-6a²), 3.85-3.83 (m, 3H, H-3¹, H-4³, H-4³'), 3.78-3.72 (m, 2H, H-6b², H-6b²), 3.70-3.61 (m, 14H, H-2², H-6a/b³, H-6a/b³', H-5³, H-5³', H-6a¹, H- α a, H-4², H-2², H-3², H-3², H-4²), 3.60 (dd, $J_{2,3} = 3.3$ Hz, $J_{3,4} = 1.2$ Hz, 1H, H-3³), 3.57 (dd, $J_{2,3} = 3.3$ Hz, $J_{3,4} = 1.2$ Hz, 1H, H-3³'), 3.54-3.43 (m, H-5², H-4¹, H-5¹, H-6b¹, H-5², H-2³, H- α b, H-2³'), 2.90 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H- ζ), 1.98, 1.97 (2s, 6H, OAc), 1.62-1.50 (m, 4H, H- β , H- ϵ), 1.35-1.25 (m, 4H, H- γ , H- δ),

¹³C-NMR (90 MHz, D₂O (mit CH₃CN als internem Standard)): $\delta = 174.6, 174.3$ (C=O), 102.8 (C-1³, C-1³'), 101.5 (C-1²'), 99.4 (C-1²), 96.4 (C-1¹), 78.5 (C-4²), 78.1 (C-4²'), 77.9 (C-4¹), 75.9 (C-2¹), 75.3 (C-5³, C-5³'), 74.7 (2C-5², C-5²), 72.4 (C-3³, C-3³'), 72.1 (C-3²'), 71.9 (C-3²), 71.3 (C-5¹), 70.9 (C-2³, C-2³'), 68.5 (C-4³, C-4³'), 68.3 (C-3¹), 67.8 (C- α), 60.9 (C-6¹, C-6³, C-6³'), 60.0, 59.9 (C-6², C-6²'), 55.0 (C-2'), 54.8 (C-2²), 39.4 (C- ζ), 28.2 (C- β), 26.6 (C- ϵ), 25.3, 24.9 (C- γ , C- δ), 22.3, 22.0 (NAc).

Synthese der Pentasaccharid-Dendrimer-Konjugate 94

3.5 mg (3.5 μmol) Aminoethylglycosid **92** werden in 35 μl Wasser aufgenommen und mit 365 μl NaHCO_3 -Lösung (10 %) verdünnt. Die Lösung wird mit 200 μl Dichlormethan sowie 5 μl Thiophosgen versetzt und eine Stunde kräftig bei Zimmertemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC: Isopropanol/1M Ammoniumacetat 2:1) wird zentrifugiert und die wäßrige Phase abpipettiert. Die organische Phase wird zweimal mit je 200 μl NaHCO_3 -Lösung (10 %) versetzt und zentrifugiert. Die vereinigten wäßrigen Phasen werden dreimal mit je 200 μl Dichlormethan versetzt, extrahiert und zentrifugiert. Die organischen Phasen werden abgetrennt und verworfen.

Anschließend wird die jeweilige Menge an Isocyanatlösung zu einer Lösung von 6 mg SuperFectTM in 60 μl Wasser zugesetzt. Nach Beendigung der Reaktion (DC: Isopropanol/1M Ammoniumacetat 2:1) wird durch Gelfiltrationschromatographie an Pharmacia Hi Load Superdex 30 (600 x 16 mm, Eluent 0.1M NH_4HCO_3 , Fluß 750 $\mu\text{l}/\text{min}$; Detektion: 214 und 254 nm) aufgetrennt und anschließend lyophilisiert.

Tabelle 5: Ausbeuten und Beladungsgrade der Kohlenhydrat-SuperFectTM-Kopplung.

Konjugat	Isocyanat [μl]	Ausbeute [mg]	Kohlenhydrateinheiten pro Dendrimer
1	150	3.5	2.3
2	250	3.9	3.6
3	350	3.9	6.5

8.4. Versuche zu Kapitel 5.3

4'''-O-Methyldiginatin 96

5.0 g (6.3 mmol) Diginatin **95** werden zusammen mit 1.6 g (6.4 mmol) Dibutylzinnoxid drei Stunden in 100 ml absolutem Methanol unter Rückfluß gekocht. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgedampft, das entstandene Stannylacetal zweimal mit Toluol codestilliert, mit 1.5 g (9.9 mmol) CsF versetzt und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird unter Eiskühlung in 100 ml DMF gelöst und mit 19 ml (310 mmol) Methyljodid versetzt. Nach 15 Stunden Rühren bei Zimmertemperatur (DC: Dichlormethan/Methanol 7:1) werden zu der entstandenen Suspension 20 ml Wasser gegeben und 10 Minuten gerührt. Die Lösung wird mit Chloroform verdünnt und je einmal mit 1 M HCl, gesättigter KHCO₃-Lösung und gesättigter Kochsalzlösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ abfiltriert, eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie (Hexan/Aceton 1:1 → 1:2, Säulendurchmesser: 7 cm, Füllhöhe: 10 cm) gereinigt.

Ausbeute: 4.3 g (85 %), enthält zu ca. 15 % eine isomere Verunreinigung,

$R_f = 0.63$ (Dichlormethan/Methanol 7:1),

$[\alpha]_D^{28} = +20.1$ (0.5, Chloroform),

C₄₂H₆₆O₁₅ (811.0),

ESI-MS (Methanol): $M_{\text{ber}} = 810.44$ $M_{\text{gef}} = 833.33$ (M+Na)⁺,

¹H-NMR (500 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 5.85$ (s, 1H, H-22), 5.01 (d, $J_{\text{gem}} = 18.6$ Hz, 1H, H-20a), 4.96 (d, $J_{\text{gem}} = 18.6$ Hz, 1H, H-20b), 4.86 (d, $J_{\text{OH},16} = 5.2$ Hz, 1H, OH-16), 4.81 (dd, $J_{\text{trans}} = 8.5$ Hz, $J_{\text{cis}} < 1$ Hz, 1H, H-1³), 4.79 (dd, $J_{\text{trans}} = 8.5$ Hz, $J_{\text{cis}} < 1$ Hz, 1H, H-1²), 4.76 (dd, $J_{\text{trans}} = 9.1$ Hz, $J_{\text{cis}} < 1$ Hz, 1H, H-1¹), 4.64-4.61 (m, 2H, OH-12, OH-3³), 4.64-4.60 (m, 1H, H-16), 4.27 (s, 1H, OH-14), 4.24 (d, $J_{\text{OH},3^2} = 2.0$ Hz, 1H, OH-3²), 4.17 (d, $J_{\text{OH},3^1} = 2.0$ Hz, 1H, OH-3¹), 4.17-4.12 (m, 1H, H-3³), 4.05-4.01 (m, 2H, H-3², H-3¹), 3.90-3.86 (m, 1H, H-3), 3.74-3.60 (m, 3H, H-5², H-5³, H-5¹), 3.52 (d, $J_{16,17} = 7.9$ Hz, 1H, H-17), 3.25 (s, 3H, OMe), 3.16-3.10 (m, 3H, H-12, H-4¹, H-4²), 2.73 (dd, $J_{4,5} = 9.3$ Hz, $J_{3,4} = 2.2$ Hz, 1H, H-4³), 2.34 (dd, $J_{\text{gem}} = 14.5$ Hz, $J_{15,16} = 8.4$ Hz, 1H, H-15a), 1.88 (ddd, $J_{\text{gem}} = 12.2$ Hz, $J_{1,2a} < 1$ Hz, $J_{2a,3} <$

1 Hz, 1H, H-2^{3a}), 1.84 (ddd, $J_{\text{gem}} = 12.8$ Hz, $J_{1,2a} < 1$ Hz, $J_{2a,3} < 1$ Hz, 1H, H-2^{2a}), 1.76-1.68 (m, 4H, H-2^{1a}, H-4a, H-6a, H-7a), 1.62-1.48 (m, 8H, H-2^{3b}, H-2^{2b}, H-2^{1b}, H-15b, H-9, H-5, H-2a, H-2b), 1.38-1.26 (m, 5H, H-11a, H-8, H-1a, H-1b, H-4b), 1.15-1.01 (m, 12H, H-6b, H-6¹, H-6², H-6³, H-11b, H-7b), 0.82 (s, 3H, H-19), 0.68 (s, 3H, H-18),

¹³C-NMR (125 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 173.9$ (C-23), 172.4 (C-20), 118.7 (C-22), 99.1 (C-1³), 98.9 (C-1²), 95.3 (C-1¹), 83.6 (C-14), 82.1 (C-4³), 81.9 (C-4¹), 81.7 (C-4²), 75.6 (C-21), 73.0 (C-12), 72.1 (C-3), 71.0 (C-16), 67.7 (C-5³), 67.6 (C-5²), 67.5 (C-5¹), 66.2 (C-3¹), 66.1 (C-3²), 61.9 (C-3³), 56.0 (C-13), 55.7 (OMe), 52.8 (C-17), 43.0 (C-15), 40.7 (C-8), 38.4 (C-2¹), 37.9 (C-2², C-2³), 36.2 (C-5), 34.5 (C-10), 31.6 (C-9), 30.1 (C-1), 29.5 (C-4), 29.5 (C-11), 26.3 (C-6), 26.0 (C-2), 23.6 (C-19), 21.2 (C-7), 18.3, 18.0 (C-6¹, C-6², C-6³), 10.0 (C-18).

9. Danksagung

Mein Dank gilt *Prof. Dr. C. Unverzagt* für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die vielen interessanten Themenstellungen.

Weiterhin schulde ich folgenden Personen Dank:

Dr. U. Krüger, Fa. Qiagen, für die Testung der Kohlenhydrat-PAMAM-Konjugate.

Dr. H. Weiß, *Dr. S. Mezzato*, *S. Schramm*, *D. Varón Silva* sowie *C. Piontek* für das kameradschaftliche und reibungslose gemeinsame Arbeiten am LC/MS. Dem Lehrstuhl MC II für die Möglichkeit, das MALDI zu nutzen, und *Dr. M. Lanzendörfer* für die Einweisung in dieses Gerät. *M. Gläßner* für die Aufnahmen der EI-Massenspektren. *Dr. G. Gundel*, *Dr. S. Mezzato*, *Dr. M. Schaffrath* und *D. Varón Silva* für die stets funktionsfähigen HPLC-Anlagen. *Dr. G. Gundel*, *Dr. R. Schuberth*, *Dr. S. Mezzato*, *Dr. S. Reicheneder*, *M. Schnabel*, *D. Varón Silva* und *S. Eller* für die Aufnahme der Hochfeld-NMR-Spektren. *Dr. M. Püttner* und *M. Schnabel* für den allseits tadellosen Zustand des 270 MHz-NMR. *Dr. I. Prahl* und *Dr. M. Püttner* für die Bereitstellung und Wartung unseres Computersystems, das ich in einem hervorragenden Zustand übernehmen konnte. Den Mitarbeitern des Rechenzentrums, die mir bei Fragen zu Netzwerk- und Hardwareproblemen stets schnell und unbürokratisch weiterhalfen. *Dr. G. Voß* für die vielen anregenden Diskussionen, v. a. zu Fragen der „Klassischen Organik“. Den Mitarbeitern des Lehrstuhls Bioorganische Chemie, die durch viele „Kleinigkeiten“ den Laboralltag sehr erleichterten, insbesondere: *T. Herold*, *A. Behr*, *N. Antonakis*, *S. Leuschner*, *J. Kastner* und *V. Schubert*. *Dr. R. Schuberth* und *S. Schramm* für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Dem Lehrstuhl OC I, insbesondere *C. Jagusch* für die Unterstützung bei den Mikrowellenreaktionen.

Prof. P. Strohriegl für die Möglichkeit, am Nobelpreisträgertreffen 2002 in Lindau teilzunehmen.

Meinen Praktikanten *D. Degenkolb*, *A. Schlottermüller*, *A. Bock*, *W. Übersetzig*, *S. Eller*, *C. Wolf*, *S. Kinzel*, *I. Zeitler* und *S. Ryczek*, die zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinen Laborkollegen, *Dr. S. Reicheneder*, *S. Leuschner*, *J. Kastner*, *V. Schubert* und *T. Pfrezschner*, für die angenehme Atmosphäre und die vielen fruchtbaren Diskussionen.

Insbesondere *Bine*, ohne deren Verständnis für die vielen im Labor verbrachten Abende bzw. Wochenenden, ihre Unterstützung und Liebe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

10. Literatur

- [1] a) T. K. Lindhorst, *Chem. unserer Zeit* **2000**, *34*, 38-52.
b) A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 2, 97-130.
c) H.-J. Gabius, S. Gabius, *Glycoscience*, Weinheim **1997**, Chapman & Hall.
d) J. Lehmann, *Kohlenhydrate: Chemie und Biologie*, Stuttgart **1996**, Thieme.
- [2] M. Alevizaki, I. Huhtaniemi, *Hormones* **2002**, *1*, 224-232.
- [3] J. Kumazawa, M. Yagisawa, *J. Infect. Chemother.* **2002**, *8*, 125-133.
- [4] D. Schaaf, *Deutsche Apotheker Zeitung* **1969**, *109*, 421-423.
- [5] a) R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683-720.
b) R. Apweiler, H. Hermajokob, N. Sharon, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *473*, 4-8.
- [6] a) H. Lis, N. Sharon, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *218*, 1-27.
b) S. E. O'Connor, B. Imperiali, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 803-812.
c) B. Imperiali, S. E. O'Connor, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 643-649.
- [7] J. B. Lowe, J. D. Marth, *Ann. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 643-691.
- [8] P. Burda, M. Aebi, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1426*, 239-257.
- [9] a) B. Imperiali, T. L. Hendrickson, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1565-1578.
b) S. Silberstein, R. Gilmore, *FASEB J.* **1996**, *10*, 849-858.
- [10] B. Imperiali, *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 452-459.
- [11] G. Fischer, F. X. Schmid, *Biochemistry* **1990**, *29*, 2205-2212.
- [12] a) A. Helenius, M. Aebi, *Ann. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 1019-1049.
b) E. S. Trombetta, *Glycobiology* **2003**, *13*, 77R-91R.
c) A. J. Parodi, *Ann. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 69-93.
- [13] R. G. Spiro, *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 1025-1041.
- [14] R. Kornfeld, S. Kornfeld, *Ann. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 631-664.
- [15] S. Kornfeld, I. Mellman, *Ann. Rev. Cell Biol.* **1989**, *5*, 483-525.
- [16] a) H. Schachter, *Biochem. Cell. Biol.* **1986**, *64*, 163-181.

- b) I. Brockhausen, H. Schachter, *Glycosyltransferases Involved in N- and O-Glycan Biosynthesis*, in [1c].
- [17] T. W. Rademacher, R. B. Parekh, R. A. Dwek, *Ann. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 785-838.
- [18] a) J. W. Dennis, M. Granovsky, C. E. Warren, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 21-34.
- b) J. W. Dennis, M. Granovsky, *Protein Glycosylation and Cancer* in: B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinaÿ (eds.), *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, Weinheim **2000**, Wiley.
- [19] A. Guha-Niyogi, D. R. Sullivan, S. J. Turco, *Glycobiology* **2001**, *11*, 45R-59R.
- [20] N. Dean, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1426*, 309-322.
- [21] I. B. H. Wilson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 569-577.
- [22] K. Fötisch, S. Vieths, *Glycoconj. J.* **2001**, *18*, 373-390.
- [23] I. B. H. Wilson, R. Zeleny, D. Kolarich, E. Staudacher, C. J. M. Stroop, J. P. Kamerling, F. Altman, *Glycobiology* **2001**, *11*, 261-274.
- [24] S. Chen, A. M. Spence, H. Schachter, *Trends Glycosci. Glycotechn.* **2001**, *13*, 447-462.
- [25] V. Kubelka, F. Altmann, E. Staudacher, V. Tretter, L. März, K. Hård, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegthart, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *213*, 1193-1204.
- [26] M. J. Betenbaugh, N. Tomiya, S. Narang, J. T. A. Hsu, Y. C. Lee, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 601-606.
- [27] W. Vervecken, V. Kaigorodov, N. Callewaert, S. Geysens, K. De Vusser, R. Contreras, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 2639-2646.
- [28] C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1170-1173; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1102-1104.
- [29] C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2507-2510; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2350-2353.
- [30] C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2078-2081; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1989-1992.
- [31] C. Unverzagt, J. Seifert, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 4549-4553.

- [32] G. Gundel, *Dissertation*, Universität Bayreuth **2002**.
- [33] I. Prah, C. Unverzagt, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 10189-10193.
- [34] H. Weiss, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4389-4392; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 4261-4263.
- [35] R. Schuberth, C. Unverzagt, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 4201-4204.
- [36] J. J. Gridley, H. M. I. Osborn, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **2000**, 1471-1491.
- [37] H. Paulsen, R. Lebuhn, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1047-1072.
- [38] H. Paulsen, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 851-968; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 823-839.
- [39] T. Ogawa, T. Kitajima, T. Nukada, *Carbohydr. Res.* **1983**, *123*, C5-C7.
- [40] a) G. Ekborg, B. Lindberg, J. Lönngrén, *Acta Chem. Scand.* **1972**, *26*, 3287-3292.
b) M. A. E. Shaban, R. W. Jeanloz, *Carbohydr. Res.* **1976**, *52*, 115-127.
c) C. D. Warren, C. Augé, M. L. Laver, S. Suzuki, D. Power, R. W. Jeanloz, *Carbohydr. Res.* **1980**, *82*, 71-83.
d) C. Augé, C. D. Warren, R. W. Jeanloz, M. Kiso, L. Anderson *Carbohydr. Res.* **1980**, *82*, 85-95.
e) J. Kerékgyártó, J. G. M. van der Ven, J. P. Kamerling, A. Lipták, J. F. G. Vliegenthart, *Carbohydr. Res.* **1993**, *238*, 135-145.
- [41] I. Matsuo, M. Isomura, K. Ajisaka, *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, *18*, 841-850.
- [42] a) A. Fürstner, I. Konetzki, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5721-5724.
b) G. M. Watt, G.-J. Boons, *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 181-193.
- [43] S. Weiler, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2299-2302.
- [44] M. V. Chiesa, R. R. Schmidt, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 3541-3554.
- [45] a) H. Kunz, W. Günther, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 1118-1119; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1086-1087.
b) W. Günther, H. Kunz, *Carbohydr. Res.* **1992**, *228*, 217-241.
- [46] C. Unverzagt, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 6, 1369-1376.

- [47] a) F. Barresi, O. Hindsgaul, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9376-9377.
b) G. Stork, G. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1087-1088.
c) F. Barresi, O. Hindsgaul, *Can. J. Chem.* **1994**, *72*, 1447-1465.
d) G. Stork, J. J. La Clair, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 247-248.
- [48] a) Y. Ito, T. Ogawa, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1843-1845; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1765-1767.
b) Y. Ito, T. Ohnishi, T. Ogawa, Y. Nakahara, *Synlett* **1998**, 1102-1104.
c) A. Dan, M. Lergemüller, M. Amano, Y. Nakahara, T. Ogawa, Y. Ito, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 2182-2190.
d) M. Lergemüller, T. Nukada, K. Kuramochi, A. Dan, T. Ogawa, Y. Ito, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 1367-1376.
- [49] Y. Ohnishi, H. Ando, T. Kawai, Y. Nakahara, Y. Ito, *Carbohydr. Res.* **2000**, *328*, 263-276.
- [50] J. Seifert, M. Lergemüller, Y. Ito, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 541-544; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 531-534.
- [51] a) D. Crich, S. Sun, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4506-4507.
b) D. Crich, S. Sun, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1198-1199.
- [52] D. Crich, S. Sun, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11217-11223.
- [53] D. Crich, S. Sun, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 435-436.
- [54] D. Crich, S. Sun, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 8321-8348.
- [55] R. Weingart, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 8753-8758.
- [56] I. Prah, *Dissertation*, Universität Bayreuth **2002**.
- [57] D. J. Silva, H. Wang, N. M. Allanson, R. K. Jain, M. J. Sofia, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5926-5929.
- [58] O. Kanie, S. C. Crawley, M. P. Palcic, O. Hindsgaul, *Carbohydr. Res.* **1993**, *243*, 139-164.
- [59] H. Weiss, *Dissertation*, Universität Bayreuth, **2002**.

- [60] D. Kahne, S. Walker, Y. Cheng, D. Van Engen, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6881-6882.
- [61] K. S. Kim, J. H. Kim, Y. J. Lee, Y. J. Lee, J. Park, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8477-8481.
- [62] R. C. Anand, N. Selvapalm, *Synth. Comm.* **1994**, *24*, 2743-2747.
- [63] M. S. Motawia, J. Marcussen, B. L. Møller, *J. Carbohydr. Chem.* **1995**, *14*, 1279-1294.
- [64] K. Koike, M. Sugimoto, S. Sato, Y. Ito, Y. Nakahara, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1987**, *163*, 189-208.
- [65] A. Vasella, C. Witzig, J.-L. Chiara, M. Martin-Lomas, *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 2073-2077.
- [66] R. K. Boeckman, Y. Liu, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7984-7985.
- [67] D. Crich, M. A. de la Mora, R. Cruz, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 35-44.
- [68] D. Crich, V. Dudkin, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5643-5646.
- [69] A. A.-H. Abdel-Rahman, S. Jonke, E. H. El Ashry, R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3100-3103; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2972-2974.
- [70] a) T. Oshitari, M. Tomita, S. Kobayashi, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6493-6494.
b) T. Oshitari, M. Shibasaki, T. Yoshizawa, M. Tomita, K. Takao, S. Kobayashi, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 10993-11006.
- [71] K. Fukase, H. Tanaka, S. Torii, S. Kusumoto, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3, 389-392.
- [72] L. Hu, Z. Chen, Y. Xie, Y. Jiang, H. Zhen, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1515-1521.
- [73] R. E. J. N. Litjens, M. A. Leeuwenburgh, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8693-8696.
- [74] D. Crich, V. Dudkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6819-6825.
- [75] V. Y. Dudkin, D. Crich, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1787-1789.
- [76] V. Y. Dudkin, J. S. Miller, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1791-1793.
- [77] S. Mezzato, *Dissertation*, Universität Bayreuth **2004**.
- [78] T. Nukada, T. Kitajima, Y. Nakahara, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1992**, *228*, 157-170.

- [79] J. Zhang, F. Kong, *Tetrahedron: Asym.* **2002**, *13*, 143-252.
- [80] Y. Zhu, L. Chen, F. Kong, *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 207-215.
- [81] T. Ogawa, M. Matsui, *Carbohydr. Res.* **1978**, *62*, C1-C4.
- [82] I. Matsuo, M. Isomura, T. Miyazaki, T. Sakakibara, K. Ajisaka, *Carbohydr. Res.* **1998**, *305*, 401-413.
- [83] a) K. Ajisaka, *Trends Glycosci. Glycotech.* **2001**, *13*, 305-318.
b) I. Matsuo, M. Wada, S. Manabe, Y. Yamaguchi, K. Otake, K. Kato, Y. Ito, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3402-3403.
- [84] I. Matsuo, T. Miyazaki, M. Isomura, T. Sakakibara, K. Ajisaka, *J. Carbohydr. Chem.* **1998**, *17*, 1249-1258.
- [85] I. Matsuo, T. Kashiwagi, K. Totani, Y. Ito, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 4197-4200.
- [86] a) M. Mandal, V. Y. Dudkin, X. Geng, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2611-2615; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 2557-2561.
b) X. Geng, V. Y. Dudkin, M. Mandal, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2616-2619; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 2562-2565.
- [87] D. M. Ratner, O. J. Plante, P. H. Seeberger, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 826-833.
- [88] Y. Du, M. Zhang, F. Kong, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3797-3800.
- [89] a) S. Oscarson, P. Svahnberg, *Carbohydr. Res.* **1998**, *309*, 207-212.
b) N. Smiljanic, S. Halila, V. Moreau, F. Djedaïni-Pilard, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8999-9002.
- [90] J. Alais, A. Veyrières, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1981**, 377-381.
- [91] a) D. Varon, E. Lioy, M. E. Patarroyo, X. Schrott, C. Unverzagt, *Aust. J. Chem.* **2002**, *55*, 161-165.
b) D. Varon, *Diplomarbeit*, Universität Bayreuth, **2003**.
- [92] a) J. O. Deferrari, E. G. Gros, I. O. Mastronardi, *Carbohydr. Res.* **1967**, *4*, 432-434.
b) N. V. Bovin, S. É Zurabyan, A. Y. Khorlin, *Izvestiya Akademii Nauk SSSR, Seriya Khimicheskaya* **1981**, *7*, 1638-1641.
c) P. Kováč, *Carbohydr. Res.* **1986**, *153*, 168-170.

- [93] M. Wiesner, *Patentschrift* **1992**, DE 4021001A1.
- [94] M. Upreti, D. Ruhela, R. A. Vishwakarma, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6577-6584.
- [95] a) R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 213-236; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 212-235.
b) H. Paulsen, B. Helpap, *Carbohydr. Res.* **1991**, *216*, 289-313.
- [96] S. André, C. Unverzagt, S. Kojima, X. Dong, C. Fink, K. Kayser, H. J. Gabius, *Bioconj. Chem.* **1997**, *8*, 845-855.
- [97] C. Unverzagt, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5627-5630.
- [98] P. H. Seeberger, *J. Carbohydr. Chem.* **2002**, *21*, 613-643.
- [99] P. H. Seeberger, W.-C. Haase, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4349-4393.
- [100] a) S. P. Douglas, D. M. Whitfield, J. J. Krepinsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5095-5097.
b) S. Hanashima, S. Manabe, Y. Ito, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4290-4296; *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2005**, *44*, 4218-4224.
- [101] S. J. Danishefsky, K. F. McClure, J. T. Randolph, R. B. Ruggeri, *Science* **1993**, *260*, 1307-1309.
- [102] a) J. Y. Roberge, X. Beebe, S. J. Danishefsky, *Science* **1995**, *269*, 202-204.
b) J. Y. Roberge, X. Beebe, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3915-3927.
- [103] K. C. Nicolaou, N. Watanabe, J. Li, J. Pastor, N. Winssinger, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1636-1638; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 1559-1561.
- [104] J. Rademann, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3989-3990.
- [105] J. Rademann, R. R. Schmidt, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3650-3653.
- [106] A. Heckel, E. Mross, K.-H. Jung, J. Rademann, R. R. Schmidt, *Synlett* **1998**, 171-173.
- [107] J. Rademann, A. Geyer, R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1309-1313; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 1241-1245.
- [108] X. Wu, M. Grathwohl, R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4664-4668; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 4489.

- [109] D. M. Ratner, E. R. Swanson, P. H. Seeberger, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4717-4720.
- [110] O. J. Plante, E. R. Palmacci, P. H. Seeberger, *Science* **2001**, *291*, 1523-1527.
- [111] W. Bröder, H. Kunz, *Synlett* **1990**, 251-252.
- [112] W. Bröder, H. Kunz, *Carbohydr. Res.* **1993**, *249*, 221-241.
- [113] W. Bröder, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1-19.
- [114] S. Kanamathareddy, C. D. Gutsche, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2511-2516.
- [115] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708-2711; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [116] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [117] I. Kadota, M. Kawada, V. Gevorgyan, Y. Yamamoto, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7439-7446.
- [118] L. Balas, B. Jousseau, B. Langwest, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4525-4526.
- [119] Vorschrift analog zum Katalog Novabiochem 2004, Beladung eines Wang-Harzes.
Vgl. auch: A. Fischli, E.-M. Gutknecht, D. Obrecht, *Patentschrift* **1988**, EP 0282898A2.
- [120] S. Torii, H. Tanaka, M. Taniguchi, Y. Kameyama, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3633-3637.
- [121] a) G. I. Tsy-pin, T. F. Sharamet, T. A. Kravchenko, M. S. Pevzner, *Chem. Heterocycl. Comp.* **1980**, *2*, 199-201.
b) G. Biagi, O. Livi, A. Lucacchini, *Eur. J. Med. Chem.* **1985**, *20*, 267-271.
c) Y. Nagawa, K. Honda, H. Nakanishi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 2931-2935.
- [122] S. Chandrasekhar, A. F. Kluge, J. A. Edwards, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 3972-3974.
- [123] S. J. Coats, J. S. Link, D. Gauthier, D. J. Hlasta, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1469-1472.
- [124] a) F. Louërat, K. Bougrin, A. Luopy, A. M. Ochoa de Retana, J. Pagalday, F. Palacios, *Heterocycl.* **1998**, *48*, 161-170.
b) A. R. Katritzky, S. K. Singh, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 9077-9079.
c) A. R. Katritzky, Y. Zhang, S. K. Singh, P. J. Steel, *ARKIVOC* **2003**, *xv*, 47-64.
d) K. A. Savin, M. Robertson, D. Gernet, S. Green, E. J. Hembre, J. Bishop, *Mol. Diversity* **2003**, *7*, 171-174.

- [125] P. Appukkuttan, W. Dahaen, V. V. Fokin, E. Van der Eycken, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4223-4225.
- [126] G. Lowe, D. D. Ridley, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1973**, 2024-2029.
- [127] C. O. Kappe, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6408-6443; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 6250-6284.
- [128] a) D. A. Leigh, J. P. Smart, A. M. Truscetto, *Carbohydr. Res.* **1995**, *276*, 417-424.
b) F. Belot, J.-C. Jacquinet, *Carbohydr. Res.* **1996**, *290*, 79-86.
- [129] J. Madaj, A. Trynda, M. Jankowska, A. Wiśniewski, *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 1495-1498.
- [130] a) H. Yu, B. Yu, X. Wu, Y. Hui, X. Han, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 1445-1453.
b) T. Zhu, G.-J. Boons, *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 709-715.
- [131] J. E. Phillips, M. P. Calos, in: Nature Publishing Group, *Encyclopedia of life science, Bd. 18*; 388-393, London **2002**, Macmillan Publishers Ltd.
- [132] J. A. Wolff, R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani, P. L. Felgner, *Science* **1990**, *247*, 1465-1468.
- [133] a) T. K. Wong, E. Neumann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1982**, *107*, 584-587.
b) E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, P. H. Hofschneider, *EMBO J.* **1982**, *1*, 841-845.
- [134] N.-S. Yang, J. Burkholder, B. Roberts, B. Martinell, D. McCabe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 9568-9572.
- [135] M. R. Capecchi, *Cell* **1980**, *22*, 479-488.
- [136] M. Weber, *Nachr. Chem.* **2000**, *48*, 18-23.
- [137] S. Lehrmann, *Nature* **1999**, *401*, 517-518.
- [138] A. Vaheri, J. S. Pagano, *Virology* **1965**, *27*, 434-436.
- [139] F. L. Graham, A. J. Van der Eb, *Virology* **1973**, *52*, 456-467.
- [140] a) P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 7413.

- b) A. D. Miller, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1862-1880; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 1768-1785.
- [141] S. C. De Smedt, J. Demeester, W. E. Hennink, *Pharmaceut. Res.* **2000**, *17*, 113-126.
- [142] O. Boussif, F. Lezoulac'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J.-P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7297-7301.
- [143] H. J. Li, C. Chang, M. Weiskopf, *Biochemistry* **1973**, *12*, 1763-1772.
- [144] G. Y. Wu, C. H. Wu, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 4429-4432.
- [145] J. Haensler, F. C. Szoka, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 372-379.
- [146] D. L. McKenzie, W. T. Collard, K. G. Rice, *J. Peptide Res.* **1999**, *54*, 311-318.
- [147] M. Zenke, P. Steinlein, E. Wagner, M. Cotten, H. Beug, M. L. Birnstiel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 3655-3659.
- [148] M. X. Tang, C. T. Redemann, F. C. Szoka, *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 703-714.
- [149] M. Spiess, *Biochemistry* **1990**, *29*, 10009-10018.
- [150] K. Drickamer, *Cell* **1991**, *67*, 1029-1032.
- [151] G. Y. Wu, J. M. Wilson, F. Shalaby, M. Grossman, D. A. Shafaritz, C. H. Wu, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 14338-14342.
- [152] C. Plank, K. Zatloukal, M. Cotten, K. Mechtler, E. Wagner, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 533-539.
- [153] M.-A. Zanta, O. Boussif, A. Adib, J.-P. Behr, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 839-844.
- [154] a) E. Wagner, M. Zenke, M. Cotten, H. Beug, M. L. Birnstiel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 3410-3414.
- b) M. Zenke, P. Steinlein, E. Wagner, M. Cotten, H. Beug, M. L. Birnstiel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 3655-3659.
- c) E. Wagner, M. Cotten, R. Foisner, M. L. Birnstiel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 4255-4259.
- [155] S. S. Diebold, M. Kursa, E. Wagner, M. Cotten, M. Zenke, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 19087-19094.

- [156] O. M. T. Pearce, K. D. Fisher, J. Humphries, L. W. Seymour, A. Smith, B. G. Davis, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1081-1085; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 1057-1061.
- [157] I. Fajac, P. Briand, M. Monsigny, *Glycoconjugate J.* **2001**, *18*, 723-729.
- [158] M. S. Wadhwa, D. L. Knoell, A. P. Young, K. G. Rice, *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 283-291.
- [159] W. T. Collard, Y. Yang, K. Y. Kwok, Y. Park, K. G. Rice, *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 499-512.
- [160] W. T. Collard, D. L. Evers, D. L. McKenzie, K. G. Rice, *Carbohydr. Res.* **2000**, *323*, 176-184.
- [161] Y. Yang, Y. Park, S. Man, Y. Liu, K. G. Rice, *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 2010-2022.
- [162] X. Schrott, *Diplomarbeit 2000*, Universität Bayreuth.
- [163] a) C. Unverzagt, H. Kunz, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9308-9309.
b) C. Unverzagt, S. Kelm, J. C. Paulson, *Carbohydr. Res.* **1994**, *251*, 285-301.
c) C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2507-2510; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2350-2353.
- [164] C. R. McBroom, C. H. Samanen, I. J. Goldstein, *Methods Enzymol.* **1972**, *28*, 212-219.
- [165] M. Monsigny, C. Petit, A.-C. Roche, *Anal. Biochem.* **1988**, *175*, 525-530.
- [166] C. Unverzagt, *Habilitationschrift 1996*, Technische Universität München.
- [167] Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Dr. U. Krüger.
- [168] C. Rohlf, S. A. Watson, T. M. Morris, L. Skelton, A. L. Jackman, M. J. Page, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 1268-1272.
- [169] K. G. Rice, *Glycoconjugate-Mediated Drug Targeting*, in [1c]
- [170] H. Scholz, *Pharm. unserer Zeit* **1987**, *16*, 77-91.
- [171] B. Fugmann, G. Adam [Hrsg.], *Römpp-Lexikon Naturstoffe*, 180-181, Stuttgart **1997**, Thieme.
- [172] H. Schröder, WIdO, pers. Mitteilung.
- [173] H.-J. Schmidt, G. Kammann, H. Dietz, R. Herzog, H. Tönjes, *Patenschrift* **1983**, DD298997.

-
- [174] R. Franzmair, H. Schneider, J. Becker, *Patentschrift* **1982**, AT384227.
- [175] S. David, S. Hanessian, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 643-663.
- [176] a) D. Wagner, J. P. H. Verheyden, J. G. Moffatt, *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 24-30.
- b) G. Hodosi, P. Kováč, *Carbohydr. Res.* **1997**, *303*, 239-243.
- c) N. Nagashima, M. Ohno, *Chem. Lett.* **1987**, 141-144.
- d) J. Arukwe, *Acta Chem. Scand.* **1998**, *52*, 819-823.
- e) S. David, *Carbohydr. Res.* **2001**, *331*, 327-329.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, daß ich nicht diese oder eine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden habe.

Bayreuth, den 29. September 2005

Xaver Schratt