

**Synthese und Untersuchung
membrangängiger Derivate
von Mannose-1-Phosphat**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Synke Rutschow
aus Rostock

Hamburg 2002

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Thiem

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Meyer

Tag der Disputation: 28. Juni 2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1998 bis Juni 2002 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Joachim Thiem am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Joachim Thiem möchte ich für die interessante Themenstellung, die stete Unterstützung und Anregung während der Durchführung dieser Arbeit und die Gewährung eines großen wissenschaftlichen Freiraumes danken.

Mein Dank gilt PD Dr. Thorsten Marquardt für die Initialzündung dieser Arbeit.

Für meine Eltern

Wenn die Zedern in Flammen stehen,
was sollen dann die kleinen Moose tun?

Talmudische Weisheit

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Bedeutung von Glycoproteinen	1
1.2. Struktur und Biosynthese der Glycoproteine	4
1.3. Congenital Disorder of Glycosylation – CDG	11
1.4. Glycosylphosphate	16
2. Zielsetzung	21
3. Mannose-1-Phosphat-Derivate mit bioaktiven Phosphatschutzgruppen.....	22
3.1. Einleitung	22
3.2. Synthese der Mannose-1-Phosphat-Derivate	24
3.3. Enzymatische und biologische Untersuchungen	29
4. Mannose-1-Phosphat-Derivate mit Alkoholen als lipophile Einheit	37
4.1. Einleitung	37
4.2. Synthese der Mannose-1-Phosphat-Derivate	40
4.3. Untersuchungen zur Anwendung der H-Phosphonat-Methode.....	56
5. Zusammenfassung.....	59
Summary	61
6. Experimenteller Teil.....	63
6.1. Allgemeine Methoden	63
6.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften	64
6.3. Chemische Arbeitsvorschriften	66
6.4. Enzymatische und biologische Arbeitsvorschriften	127
7. Literatur	132
8. Gefahrenhinweise.....	138

Abkürzungen

Ac	Acetyl
Äq	Äquivalent
All	Allyl
AM	Acetoxymethyl
Bn	Benzyl
Bt	Butyryl
CE	2-Cyanoethyl
DC	Dünnschichtchromatographie
DIPA	Di- <i>iso</i> -propylamin
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-di- <i>iso</i> -propylamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethyl- <i>N,N</i> -formamid
ESI	Electron Spray Ionisation
Et ₃ N	Triethylamin
Farn	Farnesyl
Hex	2- <i>trans</i> -Hexen-1-yl
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LLO	Lipid Linked Oligosaccharides
Man	Mannose
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MeCN	Acetonitril
MEM	Modified Eagle's Medium
MCPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure bzw. 3-Chlorperbenzoesäure
PBS	Phosphate Buffer Saline
PE	Petrolether
Phy	Phytyl
Piv	Pivaloyl
POM	Pivaloyloxymethyl
RT	Raumtemperatur
TCE	2,2,2-Trichlorethyl
TEAB	Triethylammoniumhydrogencarbonat

1. Einleitung

1.1. Bedeutung von Glycoproteinen

Glycoproteine gehören neben den Glycolipiden zur Familie der Glycoconjugate. Sie sind charakterisiert durch eine kovalente Bindung zwischen Kohlenhydraten und Proteinen bzw. Lipiden. Glycoproteine existieren in nahezu allen lebenden Organismen. Die Entdeckung von E. Eichwald im Jahr 1865,¹ daß es sich bei Mucinen um glycosylierte Proteine handelt, wird als die Geburtsstunde ihrer Erforschung angesehen. Es dauerte über ein Jahrhundert, bis 1968 ihre einzigartige molekularbiologische Bedeutung bei der Signalerkennung manifestiert wurde.² Die Gründe für diese langsame Entwicklung liegen nahe. Erst durch die Anwendung neuer Verfahren zur Strukturanalyse wie NMR, FAB-MS, MALDI-TOF und die Einführung moderner, u. a. enzymatischer Oligosaccharidsynthesemethoden waren Herstellungen und Untersuchungen komplexer Kohlenhydratstrukturen möglich. Zum anderen wurde die Bedeutung der Kohlenhydrate als Informationsträger schlicht unterschätzt, Forschungen an Stärke und Cellulose waren zwar von hohem industriellem Interesse,³ jedoch ohne molekularbiologischen Hintergrund.

Umfangreiche Untersuchungen haben seither eine kaum zu überblickende Strukturvielfalt der Saccharide gezeigt. Der Kohlenhydratanteil in Glycoproteinen variiert von weniger als 1 % in einigen Collagenen bis zu über 99 % in Glycogen. Die Kohlenhydrate liegen in Form von Mono- oder Disacchariden vor, häufiger jedoch als Oligo- oder Polysaccharide. Sie bilden lineare und verzweigte Ketten, sind unterschiedlich derivatisiert und ihre Anzahl ist variabel. Außerdem sind verschiedene Kohlenhydrat-Protein-Bindungen realisiert.

Glycoproteine sind gemeinsam mit den Glycolipiden Bestandteil von eukaryontischen Zellmembranen.⁴ Sie kommen außerdem im Blut, im Cytosol und in Schleimsekreten vor. Die an der extrazellulären Seite der Membran befindlichen Oligosaccharide sind wesentlicher Bestandteil der sogenannten Glycocalix. In ihrer Eigenschaft als Zelloberflächenmoleküle erfüllen sie wichtige Funktionen bei der Zell-Zell-Erkennung und –Wechselwirkung.^{4,5,6} Sie bilden spezifische Ligandstrukturen aus, die als Bindungsstellen für Rezeptoren von Lectinen,^{7,8,9} Selectinen,¹⁰ Enzymen, Antikörpern, Bakterien,¹¹ Viren¹² und Toxinen¹³ dienen.

Untersuchungen von Ashwell^{2,14} haben gezeigt, daß Kohlenhydrate an einem durch Lectine vermittelten biologischen Erkennungsprozeß beteiligt sind. Lectine sind Rezeptorproteine, die Saccharidstrukturen spezifisch erkennen und binden. Beispielsweise bindet der auf der Plasmamembran von Leberzellen lokalisierte Asialoglycoproteinrezeptor desialysierte Glycoproteine und leitet somit ihre Entfernung aus dem Blut und anschließende Endocytose in der Leberzelle ein. Lectin-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen spielen außerdem eine wichtige Rolle bei Zelladhäsionsprozessen. So bindet das Influenzavirus über eigene Lectine, die Hämagglutinine, an terminale Sialinsäureeinheiten von Membranglycoproteinen und ermöglicht damit die Invasion in die Wirtszellen.¹⁵

Selectine,¹⁰ eine weitere Gruppe von Lectinen, gehören zu den Zelladhäsionsmolekülen, die wichtige Aufgaben im Rahmen der körpereigenen Abwehr erfüllen.^{4,16} Die Bekämpfung von Infektionen und die Beseitigung von abgestorbenen körpereigenen Zellen wird von Leukozyten durchgeführt. Zur Ausübung dieser Funktionen müssen sie die Blutgefäße verlassen und durch das Endothel hindurch zum Infektionsherd treten. Dieser Vorgang setzt eine gegenseitige Erkennung zwischen den im Blut zirkulierenden Leukozyten und den Endothelzellen voraus. Diese Wechselwirkung wird durch die E-,¹⁷ P-¹⁸ und L-Selectine^{19,20} vermittelt, die auf der Oberfläche von Endothel- und Plateletzellen sowie Lymphozyten exprimiert sind. Die Sialyl-Lewis^x-Struktur auf der Oberfläche der Leukozyten fungiert hierbei als Ligand.^{21,22} Die Bewegung der Leukozyten wird dadurch verlangsamt („Rollen“), so daß eine höhere Bindungsaffinität am Ort der Entzündung entsteht.

Darüber hinaus legen bestimmte Kohlenhydratsequenzen der Erythrozytenmembran die Blutgruppenzugehörigkeit fest.²³ Man unterscheidet die Blutgruppenderminanten A, B, H sowie Lewis-a und Lewis-b. Den Kohlenhydraten kommt außerdem eine fundamentale Bedeutung bei verschiedensten Krankheiten wie Krebs,²⁴ CDG²⁵ und Autoimmunkrankheiten²⁶ zu. Veränderungen im Glycosylierungsmuster führen zu Veränderungen der Eigenschaften biologisch relevanter Glycoproteine.

Des weiteren sind Kohlenhydrate an der Modifikation der Eigenschaften der Proteine beteiligt. Neben rein strukturellen Funktionen, wie der Stabilisierung der Proteinkonformation und dem Schutz vor proteolytischem Abbau oder der Erkennung durch Antikörper, beeinflussen die Kohlenhydrate die biologische Aktivität u. a. von Enzymen und physikochemische Eigenschaften wie Löslichkeit und Ladung. Die Glycosylierung von Proteinen ist außerdem ein wesentlicher Faktor für die Induktion der korrekten Faltung der Proteine.²⁷

1.2. Struktur und Biosynthese von Glycoproteinen

In Glycoproteinen wird die glycosidische Verknüpfung durch eine kovalente Bindung zwischen dem anomeren Zentrum eines Kohlenhydratbausteins und einer entsprechend funktionalisierten Seitenkette einer Aminosäure eines Proteins realisiert. Die Art der glycosidischen Bindung dient der weiteren Klassifizierung. Es existieren drei verschiedene Bindungstypen zwischen Kohlenhydraten und Proteinen: *N*- und *O*-Glycoproteine und GPI-Anker.²⁸

In *N*-Glycoproteinen wird die Verknüpfung zwischen Protein- und Saccharidbaustein fast ausschließlich über eine β -glycosidische Bindung zwischen *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und der Amidgruppe von L-Asparagin realisiert^{29,30,31} (Abb. 1). Erst in den letzten Jahren wurden in *N*-Glycoproteinen von Bakterien auch Bindungen zwischen Asparagin und anderen Kohlenhydraten wie α - und β -Glucose (Glc),^{32,33} β -*N*-Acetylgalactosamin (GalNAc)³⁴ und L-Rhamnose (Rha)³⁵ entdeckt.

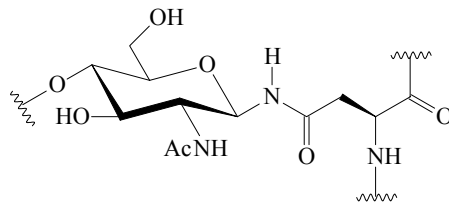


Abb. 1 Schema einer *N*-glycosidischen Bindung

In *O*-Glycoproteinen ist der Kohlenhydratbaustein *O*-glycosidisch an eine Hydroxy-Funktion in der Seitenkette der Aminosäure gebunden (Abb. 2). Im Gegensatz zu *N*-Glycoproteinen existiert eine große Vielzahl von Kohlenhydrat-Protein-Verknüpfungen. Neben *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc) sind Xylose (Xyl), *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc), Galactose (Gal), Mannose (Man) und Fucose (Fuc) in *O*-Glycoproteinen nachgewiesen worden, was zu einer immensen Strukturvielfalt führt.^{27,36} L-Serin und L-Threonin sind die am häufigsten vorkommenden Hydroxyaminosäuren, Bindungen zu 4-Hydroxyprolin,³⁶ 5-Hydroxylysin³⁷ und Tyrosin³⁸ sind jedoch bekannt.

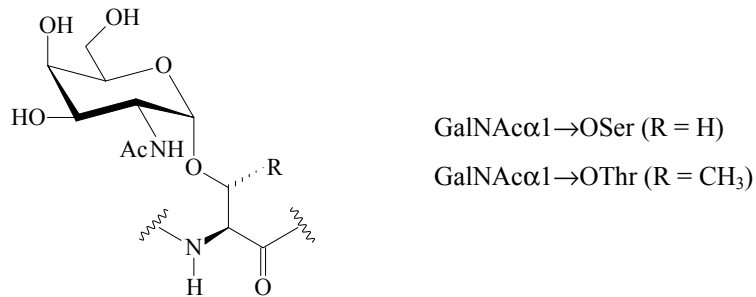


Abb. 2 Beispiel einer O-glycosidischen Bindung vom Mucin-Typ

GPI-Anker (Glycosylphosphatidylinositol) sind durch eine Ethanolamin-Phosphat-Brücke zwischen dem C-Terminus einer Aminosäure des Proteins und einem Kohlenhydrat, dem terminalen Bestandteil einer unterschiedlich aufgebauten Kohlenhydratkette, die an Phosphatidylinositol gebunden ist, gekennzeichnet. Alle charakterisierten GPI-Anker haben ein gemeinsames Strukturelement:

Ethanolamin-PO₄-6Man α 1 $\rightarrow$ 2Man α 1 $\rightarrow$ 6Man α 1 $\rightarrow$ 4GlcNH₂ α 1 $\rightarrow$ 6*myo*-Inositol-1-PO₄-Lipid^{39,40} (Abb. 3).

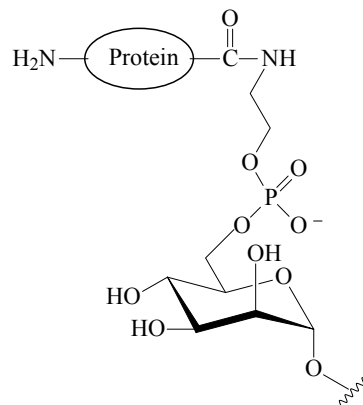


Abb. 3 Schema einer Ethanolamin-Phosphat-Brücke

Bei der Biosynthese der N-Glycoproteine^{41,42,43} handelt es sich um einen mehrstufigen Prozeß, der im endoplasmatischen Reticulum (ER) beginnt und im Golgi-Apparat fortgesetzt wird, er verläuft co-translational. Der Aufbau der Oligosaccharidstruktur erfolgt stufenweise an einem Lipidanker (Dolicholphosphat, Dol-P) unter Beteiligung verschiedener spezifischer Enzyme. Er beginnt auf cytosolischer Seite der ER-Membran. Zum Verständnis der Krankheit CDG (Kap. 1.3.) wird die Biosynthese der N-Glycoproteine im folgenden detailliert beschrieben.

Dolicholphosphat, ein langkettiges Phosphopolyprenol, ist bei Tieren, Pflanzen und Pilzen ein essentielles Trägermolekül für Kohlenhydrate bei der Bildung von Glycoproteinen (Abb. 4).

Seine Funktion als Coenzym ist beschrieben.⁴⁴ Es ist membrangebunden und fungiert als Akzeptor bei der Übertragung von Kohlenhydraten aus aktivierten Donorsubstraten (XDP- und Dol-P-Zucker).

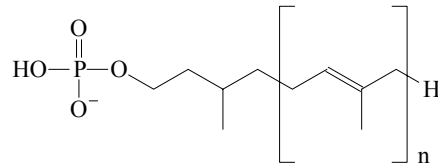
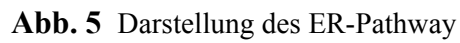


Abb. 4 Dolicholphosphat $n = 10 - 11$

Im ersten Schritt erfolgt der Transfer von *N*-Acetylglucosamin-Phosphat aus UDP-*N*-Acetylglucosamin (Abb. 5 oben). Der erhaltene Dolicholpyrophosphat-*N*-acetylglucosamin-Baustein (Dol-P-P-GlcNAc) wird um eine weitere *N*-Acetylglucosamin-Einheit verlängert. Anschließend werden fünf Mannose-Einheiten übertragen, GDP-Mannose fungiert als Donorsubstrat (Abb. 5 links). Es kommt zum Aufbau der biantennären Struktur Dol-P-P-GlcNAc₂-Man₅. Alle Reaktionen werden durch spezifische Glycosyltransferasen katalysiert.

GDP-Mannose als essentielles Molekül bei der Kettenverlängerung wird im Cytosol synthetisiert (Abb. 5 links oben). Ausgehend von Glucose wird katalysiert über eine Hexokinase Glucose-6-Phosphat gebildet. Anschließend erfolgt die Isomerisierung zu Fructose-6-Phosphat mit einer Glucose-Phosphat-Isomerase. In einer weiteren Isomerisierung mit Phosphomannoisomerase (PMI) entsteht Mannose-6-Phosphat, dessen Bildung auch über einen Seitenweg aus Mannose mit einer Hexokinase möglich ist. Aus Mannose-6-Phosphat wird nun mit Hilfe einer Phosphomannomutase (PMM) Mannose-1-Phosphat gebildet, welches dann mit einer GDP-Mannose-Synthase zur GDP-Mannose reagiert.

Für das „Umklappen“ des lipidgebundenen Oligosaccharides auf die luminal Seite wird ein Flip-Flop-Mechanismus mit Hilfe einer Flipase angenommen.⁴⁵ Die Übertragung von vier Mannose- und drei Glucose-Bausteinen komplettiert den Aufbau des Oligosaccharides (Abb. 5 unten). Die Kettenverlängerung verläuft jetzt über Dolicholphosphat-aktivierte Kohlenhydrate, Dol-P-Mannose und Dol-P-Glucose fungieren als Donorsubstrate. Alle Glycosylierungsschritte sind Transferase-katalysiert.



Dol-P-Mannose und Dol-P-Glucose werden zunächst wie GDP-Mannose im Cytosol synthetisiert. GDP-Mannose und UDP-Glucose übertragen als Donormoleküle den jeweiligen Kohlenhydratbaustein auf Dolicholphosphat. Beide Reaktionen sind durch Transferasen katalysiert. Da die Übertragung von Mannose und Glucose auf das wachsende Oligosaccharid jedoch auf luminaler Seite erfolgt, wird ebenfalls ein Flip-Flop-Mechanismus postuliert, in welchem die Strukturen von der cytosolischen zur luminalen Seite der ER-Membran translozieren (Abb. 5 oben rechts).

Das synthetisierte Oligosaccharid, bestehend aus 2 *N*-Acetylglucosamin-, 9 Mannose- und 3 Glucose-Bausteinen, wird dann durch einen Oligosaccharid-Transferasekomplex (OST) auf die naszierende Polypeptidkette übertragen. Das Proteinrückgrat wird an den Ribosomen, die an der ER-Membran (rauhes ER) anhaften, synthetisiert. Nur bei einigen sekretorischen Proteinen (z. B. bei der Hefe) erfolgt die Synthese im Cytoplasma. Anschließend wird die Proteinkette durch die ER-Membran in das Lumen geschleust. Die Übertragung des Oligosaccharides verläuft spezifisch auf einen Asparaginrest, der Teil einer Consensus-Sequenz Asn-X-Ser/Thr sein muß, wobei X jede beliebige Aminosäure außer Prolin sein kann. Neben der Signalsequenz wird der Erkennungsprozeß durch sterische Faktoren beeinflusst. Das freigesetzte Dolicholpyrophosphat wird durch eine Phosphatase zum Dolichol zurückgebildet. In einem als „Trimming“ bezeichneten Prozeß werden durch spezifische Glycosidasen drei Glucose- und ein Mannose-Baustein des *N*-glycosidisch gebundenen Oligosaccharides abgespalten. Anschließend erfolgt der vesikuläre Transport des so verkürzten Glycoproteins zum Golgi-Apparat.

Im Golgi-Apparat wird die im ER begonnene Glycosylierung fortgesetzt und für die Sortierung der Proteine nach ihren Zielorten gesorgt. Im cis-Kompartiment findet zunächst durch die Aktivität von Glycosidasen eine weitere Verkürzung statt. Bei der anschließenden Wanderung durch die medial- und trans-Kompartimente wird durch Glycosyltransferasen das komplette Glycoprotein aufgebaut. Hierbei werden die Kohlenhydrate schrittweise aus XDP-Zuckern bzw. CMP-Neu5Ac direkt auf das Glycoprotein übertragen. Im Gegensatz zum ER werden keine Oligosaccharidvorstufen an Ankern wie Dolicholphosphat aufgebaut.

Alle *N*-Glycoproteine haben aufgrund ihrer Biosynthese ein als Core-Struktur bezeichnetes Pentasaccharid gemeinsam $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow [\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3] \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}$. An diese Core-Struktur können nun bis zu fünf weitere Kohlenhydratketten, die Antennen, gebunden sein. Entsprechend ihrer Struktur und ihres Substitutionsmusters werden die *N*-Glycoproteine in vier Gruppen eingeteilt: Oligomannose-, Komplex-, Hybrid- und Xylose-enthaltender-Typ. Die Strukturvielfalt der *N*-Glycoproteine beruht also im wesentlichen auf der Vielzahl der Saccharidbausteine, die an die Core-Struktur gebunden sein können, auf dem Grad der Verzweigung und auf der großen Variationsbreite der antennären Strukturen (Abb. 6).

Im Gegensatz zur Biosynthese von *N*-Glycoproteinen ist die der Glycanketten der *O*-Glycoproteine ein vollständig post-translationaler Prozeß. Der Syntheseweg beginnt im Golgi-Apparat, der Initialschritt ist die Glycosyltransferase-katalysierte Verknüpfung eines einzelnen Monosaccharids an eine Hydroxyaminosäure des Proteinrückgrats. Anschließend wird das monoglycosylierte Protein stufenweise durch spezifische Transferasen mit XDP-Zuckern und CMP-Neu5Ac als Donoren glycosyliert. Eine weitere Modifizierung durch Sulfatierung und Acetylierung führt zu einer großen Anzahl von *O*-Glycoproteinen. In der Natur weit verbreitet ist die α -glycosidische Bindung *N*-Acetylgalactosamin-Serin/Threonin, die erstmals in Mucinen⁴⁶⁻⁴⁹ nachgewiesen wurde. *O*-Glycoproteine mit diesem Strukturelement werden deshalb als Mucin-Typ klassifiziert. Allein für diese Gruppe von Glycoproteinen sind acht verschiedene Core-Strukturen bekannt. Es konnten eine Vielzahl weiterer *O*-glycosidischer Verknüpfungen identifiziert werden. Einige wichtige Strukturen sind im folgenden genannt:

Xylose($\beta 1 \rightarrow \text{O}$)Serin in Heparin⁵⁰

L-Fucose($\alpha 1 \rightarrow \text{O}$)Serin/Threonin in Epidermal Growth Factor⁵¹

N-Acetylglucosamin($\beta 1 \rightarrow \text{O}$)Serin/Threonin in intrazellulären Glycoproteinen^{52,53}

Glucose($\alpha 1 \rightarrow \text{O}$)Tyrosin in Glycogenin³⁸

Die Strukturvielfalt der *O*-Glycoproteine wird also durch die unterschiedlichen Kohlenhydrat-Protein-Bindungen, die große Vielzahl der Kohlenhydrate und ihre unterschiedlichen Substitutionsmuster bestimmt.

1.3. Congenital Disorders of Glycosylation – CDG

CDG zählen zur Gruppe der Stoffwechselerkrankungen. Sie sind angeboren und haben Multisystemstörungen zur Folge, wobei Enzymdefekte in der Biosynthese der Glycoproteine als Ursache anzusehen sind. Anfang der 80er Jahre wurde von J. Jaeken erstmals ein Krankheitsbild an zwei Kindern beschrieben, das später als CDG-Syndrom identifiziert wurde.⁵⁴ Zunächst wurde CDG als Synonym für „Carbohydrate Deficient Glycoproteine Syndrome“ verwendet, bis 1999 eine neue Definition eingeführt wurde, da die alte Nomenklatur zunehmend unübersichtlich wurde. Daher wurde der Abkürzung eine neue Bezeichnung zugeordnet: „Congenital Disorders of Glycosylation“.⁵⁵

Die biochemischen Grundlagen zum Verständnis dieser Krankheit wurden bereits im vorangegangenen Kapitel vorgestellt. Bei der Biosynthese der *N*-Glycoproteine kommt es zunächst im endoplasmatischen Reticulum (ER) zum Aufbau einer Oligosaccharidstruktur, bestehend aus 2 *N*-Acetylglucosamin-, 9 Mannose- und 3 Glucose-Bausteinen, die anschließend mit Hilfe eines Oligosaccharid-Transferasekomplexes auf das Protein übertragen wird. Es schließt sich die Prozessierung im endoplasmatischen Reticulum (ER) und im Golgi-Apparat an, bis die *N*-Glycoproteine vollständig aufgebaut sind. Alle bisher bekannten CDG-Typen weisen Defekte bei der *N*-Glycosylierung der Proteine auf, obwohl auch Störungen der *O*-Glycosylierung und der Glycosylierung von Glycolipiden in Betracht gezogen werden können. Eine allgemeine Hypoglycosylierung unterschiedlicher Glycoproteine ist deshalb ein wichtiges Kennzeichen von CDG. Enzymdefekte in frühen Phasen der Biosynthese führen zu einer einheitlichen Hypoglycosylierung der Glycoproteine. Ursache hierfür ist die Substratspezifität des Oligosaccharid-Transferasekomplexes, der nur komplett aufgebaute Oligosaccharidketten effizient auf das Protein überträgt, andere Intermediate hingegen nicht. Aus diesem Grunde können unterschiedliche Enzymdefekte, die zu verschiedenen verkürzten Oligosaccharidketten führen, für eine gleichartige fehlerhafte Glycosylierung des Proteins verantwortlich sein.²⁵ Die Einteilung der CDG-Typen beruht nun auf der intrazellulären Lokalisierung des Enzymdefektes, wohingegen die alte Nomenklatur auf den Ergebnissen der isoelektrischen Fokussierung (IEF) von Serumtransferrin basierte.⁵⁵ Ist der Defekt im Aufbau des Dolicholpyrophosphat-gebundenen Oligosaccharids und/oder dessen Transfer auf das Protein lokalisiert, handelt es sich um einen Typ I. Liegt der Defekt hingegen bei der Modifizierung des bereits proteingebundenen Oligosaccharids, handelt es

sich um einen Typ II. Die einzelnen Untergruppen werden durch kleine Buchstaben charakterisiert, unbekannte Enzymdefekte erhalten ein x (Tab. 1).

Typ	Defekt	Lokalisierung
CDG-Ia	Phosphomannomutase 2	Cytosol
CDG-Ib	Phosphomannose Isomerase	Cytosol
CDG-Ic	$\alpha 1 \rightarrow 3$ -Glucosyltransferase	ER
CDG-Id	$\alpha 1 \rightarrow 3$ -Mannosyltransferase	ER
CDG-Ie	Dol-P-Mannose Synthase 1	ER
CDG-If	Mannose-Dol-P Utilization Defect (MPDU 1)	ER
CDG-IIa	GlcNAc-Transferase II	Golgi
CDG-IIb	Glucosidase I	ER
CDG-IIc	GDP-Fucose-Transporter	Golgi

Tab. 1 CDG-Typen

Das CDG-Ia („klassisches CDG“) ist die am längsten bekannte und mit bislang über 300 beschriebenen Patienten die am häufigsten diagnostizierte CDG-Erkrankung.⁵⁴ Das klinische Erscheinungsbild ist durch mehr oder weniger stark ausgeprägte geistige und körperliche Behinderung, eingezogene Brustwarzen, auffällige Fettverteilung, ein verringertes Kleinhirnvolumen, Schielen, Muskelschwäche, Ataxie, Wachstums- und Leberfunktionsstörungen gekennzeichnet. Rund 20 % der Patienten sterben im 1. Lebensjahr. Die Symptome verändern sich mit dem Alter und lassen sich in vier altersabhängige Stadien einteilen. Im Jahr 1995 wurde ein Defekt der Phosphomannomutase 2 (PMM 2) als Ursache von CDG-Ia nachgewiesen.⁵⁶ Dieses cytosolische Enzym wandelt Mannose-6-Phosphat in Mannose-1-Phosphat um. Als Folge dieser Defizienz ist die Synthese von GDP-Mannose gestört. Die Menge an GDP-Mannose in Fibroblasten von CDG-Ia-Patienten ist im Vergleich zu gesunden Zellen auf 10 % gesunken.⁵⁷ Dieser GDP-Mannose-Mangel hat nun einen immensen Einfluß auf die Glycansynthese im endoplasmatischen Reticulum (ER) und ist Ursache für die vorwiegende Bildung von verkürzten Oligosaccharidketten (Man₅GlcNAc₂-P-P-Dol). Ein vollständiges Fehlen von Enzymaktivität hätte Lethalität zur Folge.

Ein Defekt des cytosolischen Enzyms Phosphomannose Isomerase (PMI), das Fructose-6-Phosphat in Mannose-6-Phosphat umwandelt, wird als CDG-Ib klassifiziert und ist erstmals 1998 beschrieben. Patienten dieses Typs zeigen keine neurologischen Krankheitszeichen und sind normal entwickelt. Sie leiden jedoch an schweren Durchfällen und einer Lebererkrankung. CDG-Ib kann im Gegensatz zu allen anderen CDG-Typen effektiv durch Zuführung von Mannose behandelt werden.

CDG-Ic ist ebenfalls seit 1998 bekannt und gekennzeichnet durch eine $\alpha 1 \rightarrow 3$ -Glucosyltransferase-Defizienz. Die Übertragung von Glucose im ersten Kettenverlängerungsschritt mit Dol-P-Glucose als Donorsubstrat ist gestört. Es kommt zu einer Ansammlung von $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$. Das Krankheitsbild ist am ehesten mit CDG-Ia vergleichbar, die Symptomatik ist jedoch weniger stark ausgeprägt. Die Kardinalssymptome wie eingezogene Brustwarzen, Fettverteilungsstörungen und Kleinhirnhypoplasie fehlen, wodurch diese Erkrankungsgruppe sehr wahrscheinlich unterdiagnostiziert ist.

Beim CDG-Id ist der erste Schritt der Kettenverlängerung mit Dol-P-Mannose als Donorsubstrat wegen eines Defektes der $\alpha 1 \rightarrow 3$ -Mannosyltransferase gestört. Beim CDG-Ie liegt hingegen ein Dol-P-Mannose Synthase I-Defekt vor, so daß die cytoplasmatische Synthese von Dol-P-Mannose nur unzureichend verläuft. In beiden Fällen kommt es zur Akkumulation von $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$. Die Patienten sind schwerstbehindert und zeigen kaum neurologische Entwicklung.

CDG-If ist der neueste Typ und wurde erst kürzlich identifiziert.⁵⁸ Ursache ist eine Mutation des Gens MPDU1 (mannose-P-dolichol utilization defect 1), welches essentiell ist für die Verfügbarkeit von Dol-P-Mannose und Dol-P-Glucose innerhalb des rauhen ER. Es ist wahrscheinlich verantwortlich für die korrekte Positionierung der Dol-P-Zucker beim „Umklappen“ auf die luminal Seite des endoplasmatischen Reticulums, da es sich bei dem Enzym nicht um die Flipase selbst handelt. CDG-If ist somit die erste Erkrankung, bei der nicht die Synthese eines Substrates gestört ist, sondern dessen Verfügbarkeit.

Bei Erkrankungen vom Typ CDG-II handelt es sich um Störungen bei der Prozessierung des Glycoproteins im ER und im Golgi-Apparat. Für eine weitergehende Erklärung sei auf die Literatur verwiesen.²⁵

Der mit Abstand wichtigste diagnostische Test für CDG ist die isoelektrische Fokussierung von Serumtransferrin, einem Glycoprotein, das für den Eisentransport im Plasma verantwortlich ist. Es besitzt zwei Glycosylierungsstellen Asn (413) und Asn (611), an denen *N*-glycosidisch zwei biantennäre Kohlenhydratketten vom *Komplex*-Typ mit insgesamt vier endständigen Sialinsäuren gebunden sind (Abb. 7).

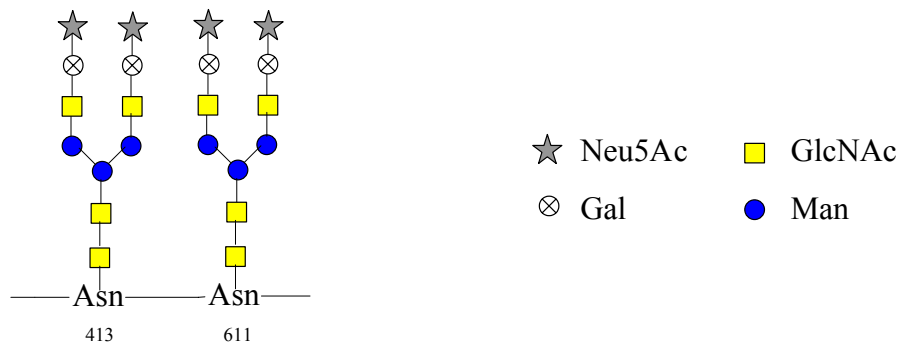


Abb. 7 Struktur von Serumtransferrin

Störungen in der Biosynthese des Glycoproteins führen zu einer Hypoglycosylierung, die erstmals 1984 von J. Jaeken nachgewiesen wurde.⁵⁹ Die Kohlenhydratseitenketten fehlen teilweise oder vollständig, was sich im Verlust der endständigen Sialinsäuren äußert. In CDG-Patienten liegen neben korrekt glycosyliertem Transferrin (tetrasialo – S₄) auch monoglycosyliertes Transferrin mit zwei Sialinsäuren (disialo – S₂) und unglycosyliertes Transferrin ohne Sialinsäuren (asialo – S₀) vor.

Bei der isoelektrischen Fokussierung werden die Glycoproteine durch Elektrophorese, d. h. Bewegung geladener Teilchen im elektrischen Feld, entsprechend ihres isoelektrischen Punktes getrennt. Der isoelektrische Punkt (pI) ist als der pH-Wert definiert, an dem die Nettoladung gleich Null ist. An diesem Punkt kommt die elektrophoretische Bewegung zum Stillstand. Die fehlenden Sialinsäuren haben einen Verlust von negativer Ladung zur Folge, was bei der isoelektrischen Fokussierung zu einer Verschiebung der isoelektrischen Punkte zu höheren Werten führt. Die Banden werden hierbei mit Anti-Transferrin-Antikörpern sichtbar gemacht.

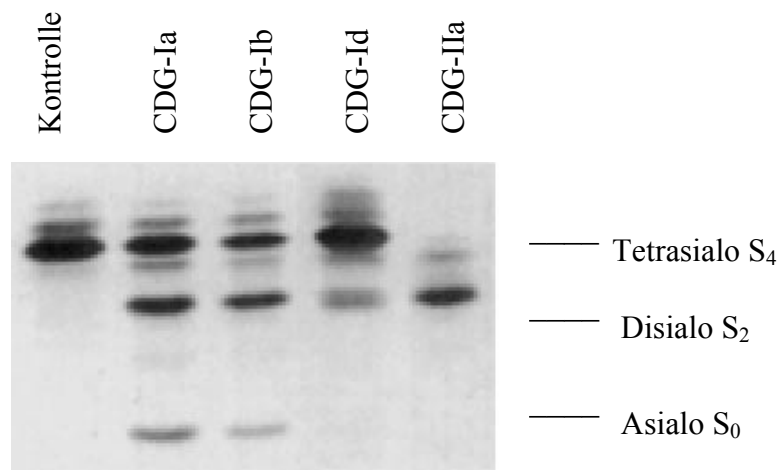


Abb. 8 Isoelektrische Fokussierung von Serumtransferrin

Des weiteren geben SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und zweidimensionale Elektrophorese von Serumproteinen sowie die Messung der Enzymaktivität weitere Aufschlüsse. Die HPLC-Analyse von LLO (Lipid Linked Oligosaccharides) und PDO (Protein Derived Oligosaccharides) stellt eine weitere diagnostische Möglichkeit dar. Radioaktiv markierte Zellkulturen aus Fibroblasten werden verschiedenen Extraktionsschritten unterzogen. Milde saure Hydrolyse und Behandlung mit PNGase F setzen die entsprechenden Oligosaccharidstrukturen frei.

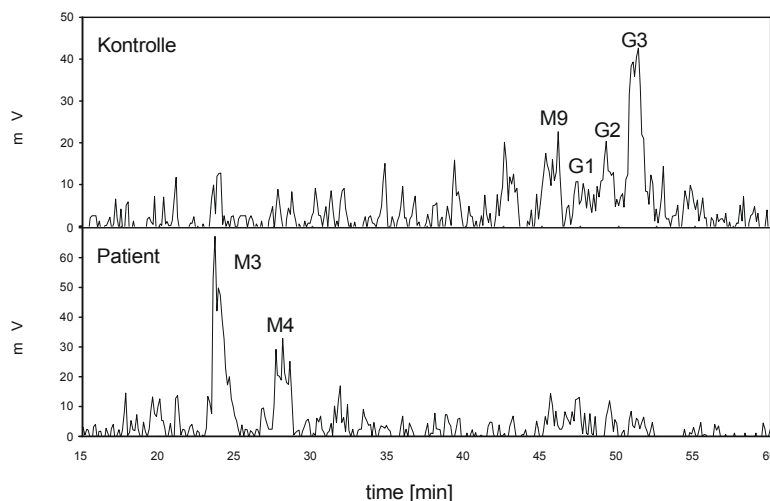


Abb. 9 HPLC-Analyse von LLO

Indizierung der Peaks: $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (G3), $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (G2), $\text{GlcMan}_9\text{GlcNAc}_2$ (G1), $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (M9), $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ (M4) und $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (M3).

1.4. Glycosylphosphate

Phosphorsäureester von Kohlenhydraten sind in der Natur weit verbreitet und in vielfältiger Art an biologischen Prozessen wie der Biosynthese und dem Metabolismus von Sacchariden beteiligt. So gehen nahezu alle Stoffwechselvorgänge, die den Aufbau einer glycosidischen Bindung zur Folge haben, von Nucleosiddiphosphat-Zuckern aus. Diese werden enzymatisch aus Glycosyl-1-Phosphaten und Nucleosidtriphosphat synthetisiert (Abb. 10). Nucleosiddiphosphat-Zucker spielen auch eine wichtige Rolle bei der biologischen Interkonversion der Kohlenhydrate. Außerdem bilden die Phosphate der D-Ribose und seines 2-Desoxy-Derivats als Nucleotide die molekularen Grundlagen von RNA und DNA. Neben ihrer Funktion als Nucleinsäurebausteine bilden die Nucleotide wichtige Coenzyme wie ATP und NAD. Anhand dieser Beispiele sei die Bedeutung der Phosphatbindung und das Interesse an der Synthese von Glycosylphosphaten gezeigt.⁶⁰

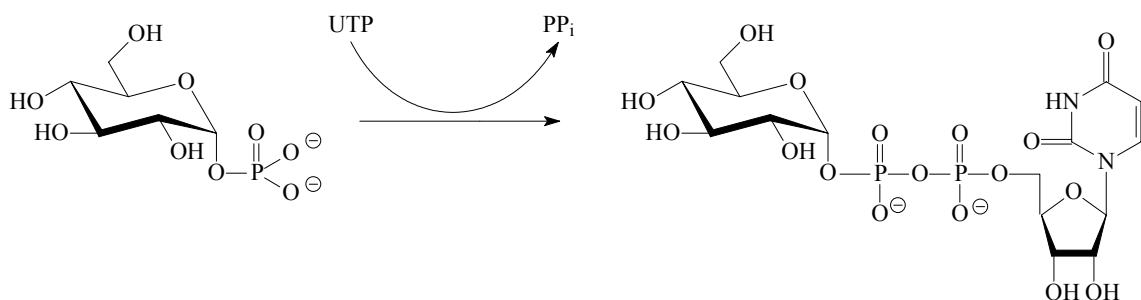
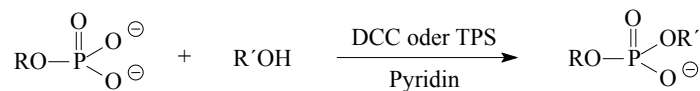


Abb. 10 Biosynthese der Nucleosiddiphosphatglucose UDP-Glc

Bei der Synthese von Glycosylphosphaten sollte zunächst unterschieden werden, ob es sich um nicht-anomere oder anomere Zuckerphosphate handelt. Die chemische Bildung einer glycosidischen Bindung z. B. auch bei Glycosylphosphaten verläuft nicht diastereoselektiv. Da häufig nur ein Anomer biochemisch relevant ist, ist eine entsprechend stereoselektive Synthese vorteilhaft, um schwierige Trennungen von Anomerengemischen zu vermeiden. Des weiteren können Phosphate als Mono-, Di- oder Triester synthetisiert werden, was unterschiedliche Anforderungen an die Edukte stellt. Sowohl chemische als auch enzymatische Methoden sind nun für die Synthese spezifischer Phosphate anwendbar.

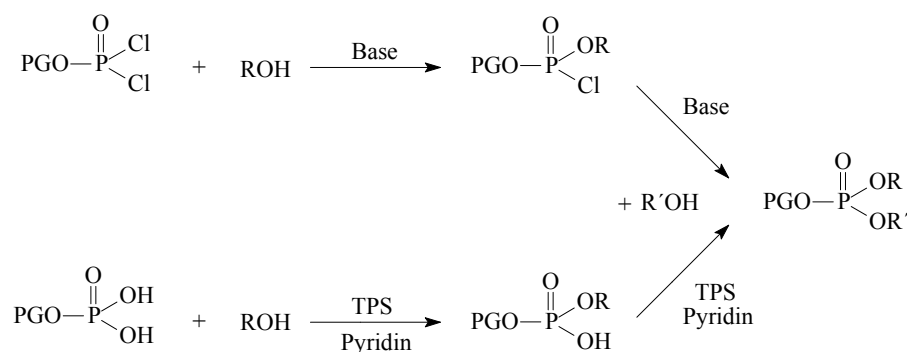
Hierbei wird auf Erfahrungen bei der Entwicklung effizienter Oligonucleotidsynthesen zurückgegriffen. Zum einen stellt die 1956 von Khorana⁶¹ entwickelte Phosphordiester-Methode einen wichtigen Beitrag dar, bei der ausgehend von einem Monoalkylphosphat, einem Alkohol und einem geeigneten Kupplungsreagenz ein Phosphordiester synthetisiert wird (Abb. 11).



R, R' = Nucleoside

Abb. 11 Phosphordiester-Methode

Zum anderen spielt auch die ein Jahr zuvor demonstrierte Phosphortriester-Methode von Michelson und Todd⁶² eine wichtige Rolle, die rund ein Jahrzehnt später von Letsinger und Mahadevan⁶³ sowie Eckstein und Rizk⁶⁴ revitalisiert wurde (Abb. 12). Bei der Oligonucleotidsynthese wird hier im Gegensatz zur Phosphordiester-Methode die verbleibende OH-Funktion durch eine Schutzgruppe blockiert. Die Triester-Synthese ist hierbei ein zweistufiger Prozeß, der ein bifunktionales Phosphorylierungsreagenz erfordert. Es handelt sich entweder um ein Dichlorphosphat oder ein Dihydrogenphosphat, die mit einer 2-Cyanoethyl-, einer 2,2,2-Trichlorethyl- oder einer Benzylgruppe geschützt sind.



PG = Schutzgruppe R, R' = Nucleoside

Abb. 12 Phosphortriester-Methode

Viel Beachtung bei der Synthese der Phosphordiester-Einheiten der Nucleinsäuren findet die 1976 von Letsinger vorgestellte Phosphit-Methode,⁶⁵ die auf variiertem Weg zu Phosphortriestern führt. Dabei werden geschützte Dichlorphosphite entsprechend mit Nucleosiden umgesetzt und anschließend oxidiert (Abb. 13).

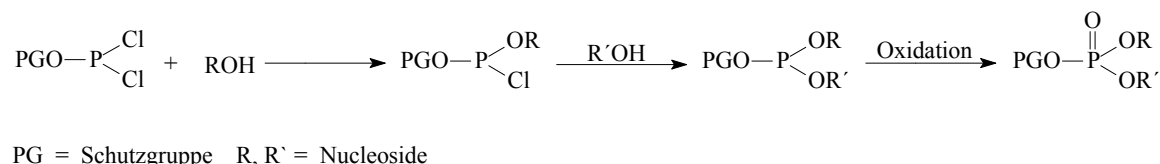


Abb. 13 Phosphit-Methode

Bei der Darstellung von anomeren Zuckerphosphaten gibt es nun zwei grundlegende Ansätze. Entweder werden die Kohlenhydrate mit einer freien anomeren Hydroxy-Funktion als Akzeptoren in einer Phosphorylierungsreaktion umgesetzt, oder der Saccharidbaustein trägt eine geeignete Abgangsgruppe am anomeren Zentrum und reagiert als Donor in einer entsprechenden Glycosylierungsreaktion. Beim Akzeptorverfahren lassen sich einerseits Phosphor-V-Verbindungen, andererseits Phosphor-III-Verbindungen, die anschließend zum Phosphat oxidiert werden, einsetzen. Monochlorphosphate finden bei diesen Phosphorylierungsreaktionen breite Anwendung. Als Phosphatschutzgruppen dienen Phenyl-,⁶⁶ *tert*-Butyl-⁶⁷ und Benzylester⁶⁸ (Abb. 14).

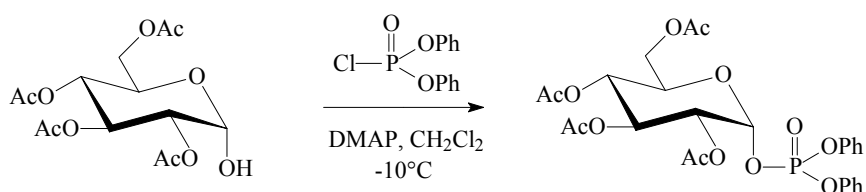


Abb. 14 Synthese eines Phosphorsäuretriesters mit Diphenylchlorphosphat

Verfahren, bei denen anomere Phosphit-Triester als Zwischenstufe bei der Synthese von Glycosylphosphaten durchlaufen werden, sind beschrieben. So setzen Ogawa *et al.*⁶⁹ zwei Kohlenhydratbausteine mit einem geschützten Dichlorphosphit um und anschließend wird zum Phosphat oxidiert (Abb. 15).

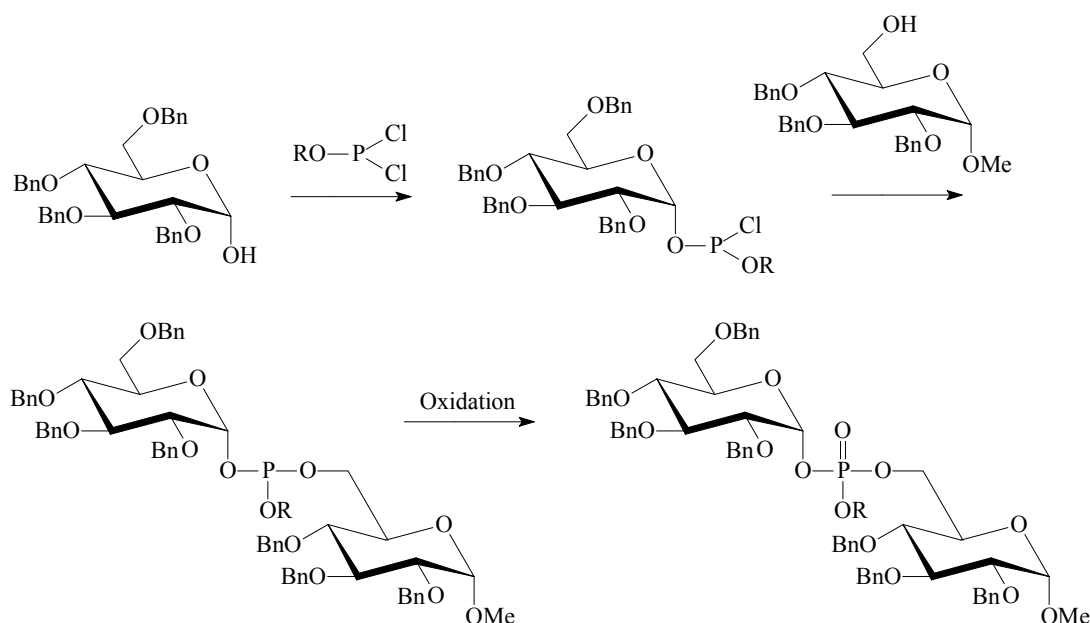


Abb. 15 Synthese eines Phosphorsäuretriesters mit Dichlorphosphit

In jüngerer Zeit findet die von Perich und Johns^{70,71} eingeführte Phosphoramidit-Methode, eine Phosphit-Variante, viel Aufmerksamkeit. Im Gegensatz zu den Chlorphosphiten kommen die stabileren Phosphoramidite zum Einsatz, bei denen eine Amin-Funktion das Halogenid als Abgangsgruppe ersetzt (Abb. 16). Weite Verbreitung haben u. a. Chlor-2-cyanoethyl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit^{72,73} und die entsprechenden Benzyl⁷⁴ und Phenylderivate⁷⁵ sowie Dibenzyl-*N,N*-diethylphosphoramidit⁷⁶ gefunden. Die Oxidation des Glycosylphosphites erfolgt *in situ* mit *meta*-Chlorperbenzoesäure,⁷⁷ Wasserstoffperoxid,⁷⁸ *tert*-Butylhydroperoxid⁷² oder Iod.⁷⁹

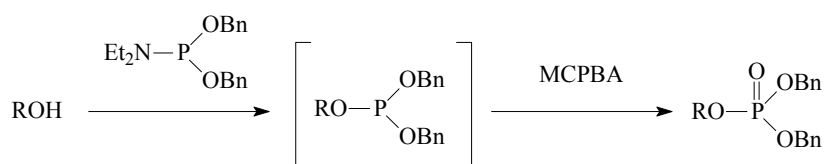


Abb. 16 Phosphoramidit-Methode

Eine weitere effiziente Methode zur Darstellung von Glycosylphosphaten stellt die H-Phosphonat-Methode dar, die 1986 von van Boom *et al.*⁸⁰ eingeführt wurde. Die Reaktion von Salicylchlorphosphit erzeugt einen Phosphit-Triester, der zum H-Phosphonat-Monoester

hydrolysiert wird. Die Kupplung mit einem weiteren Monosaccharid resultiert in einem H-Phosphonat-Diester, der *in situ* zum Phosphorsäurediester oxidiert wird (Abb. 17).

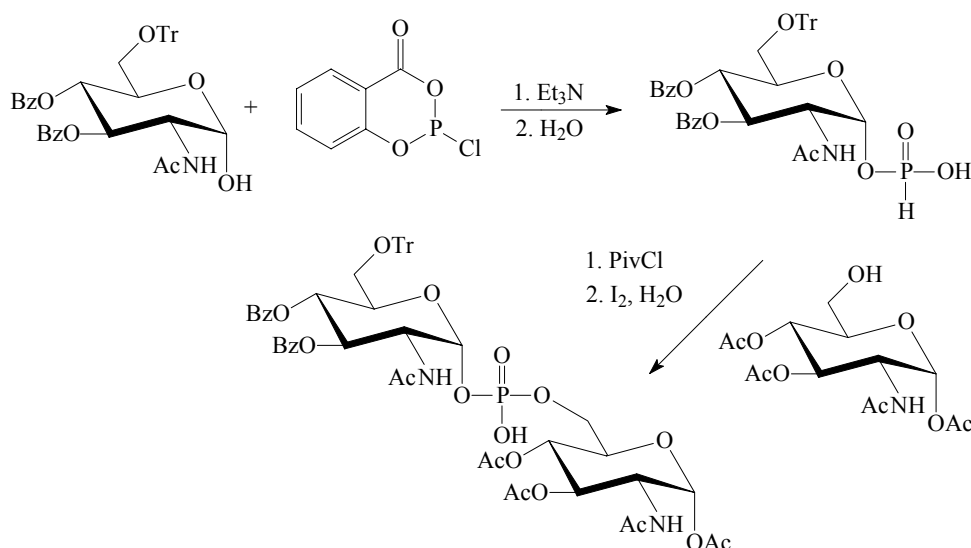


Abb. 17 H-Phosphonat-Methode

Bei der Darstellung von Glycosylphosphaten nach dem Donorverfahren lassen sich alle Glycosylierungsvarianten aus dem Bereich der Oligosaccharidsynthese anwenden.^{81,82,83} Glycosylbromide und -chloride werden meist mit dem gebräuchlichsten Phosphorylierungsreagenz Dibenzylphosphat⁸⁴ unter Koenigs-Knorr-Bedingungen umgesetzt. Eine Aktivierung erfolgt mit Silber(I)-carbonat⁸⁵ oder Silber(I)-oxid.⁸⁶ Als ein Beispiel sei die Umsetzung eines acetylierten Glucosylbromids aufgeführt (Abb. 18). Aufgrund des Nachbargruppeneffekts wird hauptsächlich das β -Anomer erhalten. Auch Reaktionen unter Phasentransferkatalyse sind in der Literatur beschrieben.⁸⁷ Alternativ zu den Halogeniden können auch die Glycosyltrichloracetimide, Thioglycoside oder 1,2-Orthoester als Donoren eingesetzt werden.

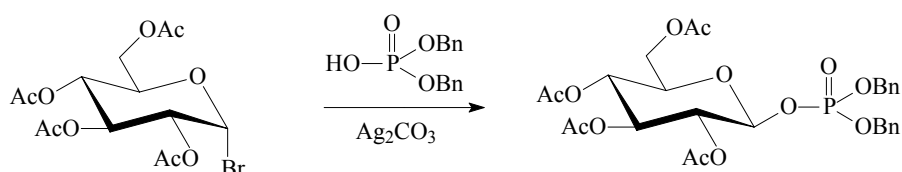


Abb. 18 Reaktion eines Glycosylbromids

2. Zielsetzung

Ursache für CDG-Ia ist ein genetischer Defekt der Phosphomannomutase 2 (PMM 2), so daß die Umwandlung von Mannose-6-Phosphat in Mannose-1-Phosphat gestört ist. Ein möglicher Ansatz zur Therapie wäre die Applikation von Mannose-1-Phosphat, welches jedoch als geladenes und somit sehr polares Molekül nicht durch die Membran in die Zelle penetrieren kann.

Ziel dieser Arbeit ist nun die Synthese und Untersuchung membrangängiger Derivate von Mannose-1-Phosphat. Die zu synthetisierenden Phosphate sollen sich hierbei durch eine hohe Lipophilie auszeichnen, die es ihnen ermöglicht, durch die Zellmembran zu gelangen. Nach Durchtritt sollte Mannose-1-Phosphat wieder freigesetzt werden.

Hierfür werden zunächst Mannose-1-Phosphate mit geeignetem Schutzgruppenmuster und bioaktive Phosphatschutzgruppen, die enzymatisch durch Esterasen geöffnet werden können, zum Einsatz kommen. Des weiteren sollen unter Anwendung verschiedener Routen, der Phosphoramidit- und der H-Phosphonat-Methode, geeignete Phosphortriester und -diester dargestellt werden. Als lipophile Einheit bei diesen Phosphaten sollen Hexenol sowie Farnesol und Phytol dienen, die innerhalb der Terpenbiosynthese Vorläufer des Dolichols darstellen und somit als Modellsubstanzen prädestiniert scheinen. Darüber hinaus soll die biologische Aktivität der potentiellen Therapeutika *in vitro* getestet werden.

3. Mannose-1-Phosphat-Derivate mit bioaktiven Phosphatschutzgruppen

3.1. Einleitung

Wie in den vorangegangenen Kapiteln ausführlich dargestellt, spielt Mannose-1-Phosphat eine entscheidende Rolle in der Biosynthese von Glycoproteinen. Trotz dieser wichtigen Funktion im Zellmetabolismus ist der Einsatz als potentiell Therapeutikum beschränkt. Die Verwendung von Mannose-1-Phosphat als Wirkstoff setzt voraus, daß dieser in ausreichender Konzentration resorbiert und zum Zielort transportiert werden kann. Mannose-1-Phosphat ist jedoch bei physiologischem pH-Wert zweifach negativ geladen und damit als polares Molekül zu hydrophil, um durch die Membran hindurch in die Zelle zu penetrieren.^{88,89} Außerdem ist Mannose-1-Phosphat anfällig gegen den unspezifischen Abbau durch alkalische und saure Phosphatasen (E.C. 3.1.3.1 und 3.1.3.2).^{90,91}

Es sind nun geeignete Ansätze zu finden, um den Wirkstoff durch Derivatisierung so zu verändern, daß eine höhere Lipophilie und Stabilität erreicht wird. Nach erfolgter Aufnahme des Prodrug-Moleküls im Körper und Transport zum Zielort sollen die Fettlöslichkeit vermittelnden Schutzgruppen enzymatisch abgespalten werden.

Bei Mannose-1-Phosphat handelt es sich formal um einen Phosphorsäuremonoester. Zunächst sollte die Phosphat-Funktion vollständig verestert werden, so daß ein neutraler Phosphorsäuretriester entsteht. Es bieten sich biologisch reversible Schutzgruppen an, die in der Vergangenheit eingesetzt wurden, um Carbonsäuren,^{92,93,94} Phosphonate,⁹⁵ Nucleotide^{96,97} oder Inositole^{98,99} in ungeladene, membrangängige Derivate zu überführen. Die Acetoxymethyl- (AM) und die Pivaloyloxymethyl-Schutzgruppe (POM) haben hier vielfältigen Einsatz gefunden, sind in hydrolytischen Studien und Inhibitionsexperimenten bezüglich Membrangängigkeit und enzymatischen Abbau untersucht worden und scheinen deshalb für die Synthese am besten geeignet.

Die entsprechenden neutralen Phosphorsäuretriester sollen durch passive Diffusion die Membran der Zelle passieren können. Im Anschluß soll durch intrazelluläre enzymatische Öffnung durch Carboxylatesterasen (E.C. 3.1.1.1)^{100,101} der ursprüngliche

Phosphorsäuremonoester zurückgebildet werden. Hierbei wird zunächst eine Acyloxymethylester-Bindung zum Hydroxymethyl-Derivat hydrolysiert. Das erhaltene Intermediat ist chemisch labil und stabilisiert sich unter Verlust eines Moleküls Formaldehyd zum Phosphorsäurediester.^{101,102}

Zur Abspaltung der zweiten Acyloxymethyl-Gruppe werden unterschiedliche Mechanismen postuliert. Zum einen wird angenommen, daß die zweite Estergruppe in gleicher Weise durch Esterasen hydrolysiert wird, so daß über das Hydroxymethyl-Derivat der Phosphorsäuremonoester erhalten wird.^{101,102} Auf der anderen Seite wird postuliert, daß die Esterase durch die negative Ladung am Phosphorsäurediester in ihrer Aktivität gehindert ist. Erst durch die enzymatische Spaltung durch eine Phosphodiesterase (E.C. 3.1.4.1) wird der Phosphorsäuremonoester zugänglich (Abb. 19).^{101,102} Die Geschwindigkeit des hydrolytischen Abbaus ist abhängig von der Art der Phosphat-Schutzgruppe.¹⁰¹ Die POM-Funktion weist hierbei als sterisch anspruchsvollere Gruppe eine höhere Stabilität auf als die AM-Gruppe. Sowohl Formaldehyd als auch die freigesetzte Essigsäure sind physiologisch gesehen tolerierbar. Bei Pivalinsäure, die bei der POM-Abspaltung entsteht, ist hingegen von einer geringeren Toleranz auszugehen.

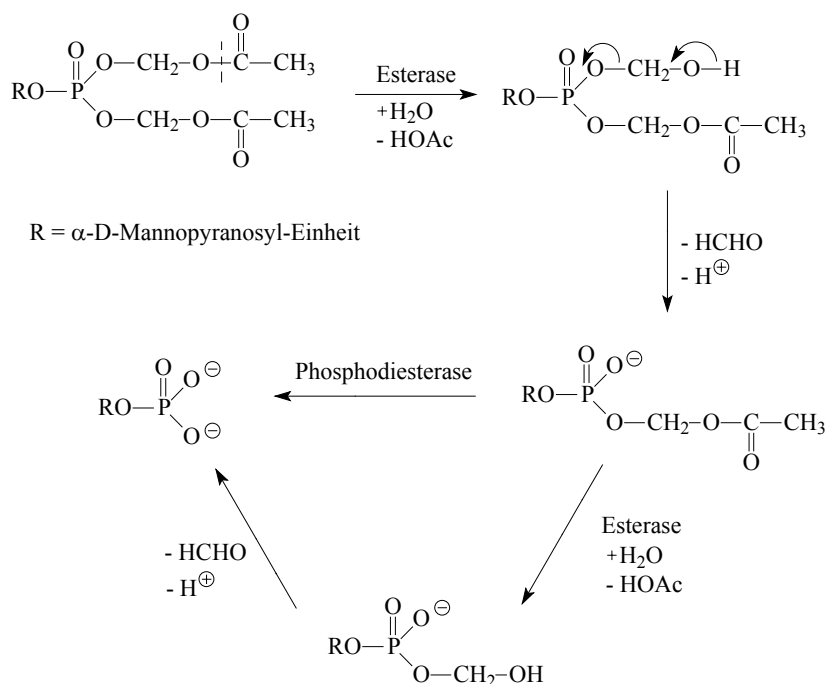


Abb. 19 Enzymatische Öffnung am Beispiel eines Bis-acetoxymethyl-mannopyranosyl-1-phosphats

Neben der Phosphat-Funktion werden auch die Hydroxy-Funktionen am Zucker durch Schutzgruppen maskiert. Dies erscheint sinnvoll, um sowohl Stabilität als auch Lipophilie zu verbessern, denn Hydroxy-Gruppen, die sich in vicinaler Stellung zum Phosphorsäuretriester befinden, können nach enzymatischer Spaltung an der Bildung von cyclischen Phosphat-Intermediaten beteiligt sein. Die Hydroxy-Gruppen werden als Ester und Carbonate geschützt. Die Butyryl-Schutzgruppe kam in der Vergangenheit erfolgreich bei Nucleotiden^{103,104} und Polyphosphatinositolen⁹⁷ zum Einsatz. Von Vorteil ist, daß dieser Ester ebenso wie die AM- und die POM-Schutzgruppen durch intrazelluläre Esterasen gespalten wird. Neben der Butyryl-Gruppe werden Acetyl- und Pivaloyl-Schutzgruppen verwendet, da anzunehmen ist, daß sie in gleicher Weise enzymatisch angegriffen werden. Des weiteren sollten durch ihre Einführung Variationen des lipophilen Charakters erreicht werden. Außerdem wird die *iso*-Propylcarbonat-Funktion als Schutzgruppe eingesetzt. Carbonate haben sich bei der Peptidsynthese als Schutz der Aminogruppe in Aminosäuren bewährt. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Estern erfolgt die Abspaltung nicht enzymatisch, sondern chemisch unter sehr milden sauren Bedingungen. Bei einem physiologischen pH-Wert zerfällt die *iso*-Propylcarbonat-Gruppe über einen Kohlensäurehalbester in Kohlendioxid und *iso*-Propanol. Beide Produkte sind in der Zelle tolerierbar und somit aus biologischer Sicht unbedenklich.

3.2. Synthese der Mannose-1-Phosphat-Derivate

Ausgehend von D-Mannose werden zunächst die OH-Gruppen am Zucker maskiert, um dann die Phosphat-Gruppe in das Molekül einzuführen.

D-Mannose wird in einer säurekatalysierten Fischer-Glycosylierung¹⁰⁵ mit Benzylalkohol zum Benzylmannosid **1** umgesetzt. Die restlichen OH-Gruppen werden anschließend als Ester bzw. Carbonate unter Verwendung von Buttersäurechlorid, Pivaloylchlorid, Essigsäureanhydrid bzw. *iso*-Propylchlorformiat blockiert, so daß die entsprechenden substituierten α -Mannopyranoside **3**, **4**, **5**, und **6** erhalten werden. Die folgende hydrogenolytische Abspaltung der Benzylschutzgruppe an Pd/C (10 %) liefert die Mannose-Derivate **7**, **8**, **9** und **10** mit freier anomerer OH-Gruppe. Das acetylierte Derivat **10** ist alternativ über das Pentaacetat **2** und folgende selektive Deacetylierung mit Hydrazinacetat leicht zugänglich (Abb. 20).^{106,107}

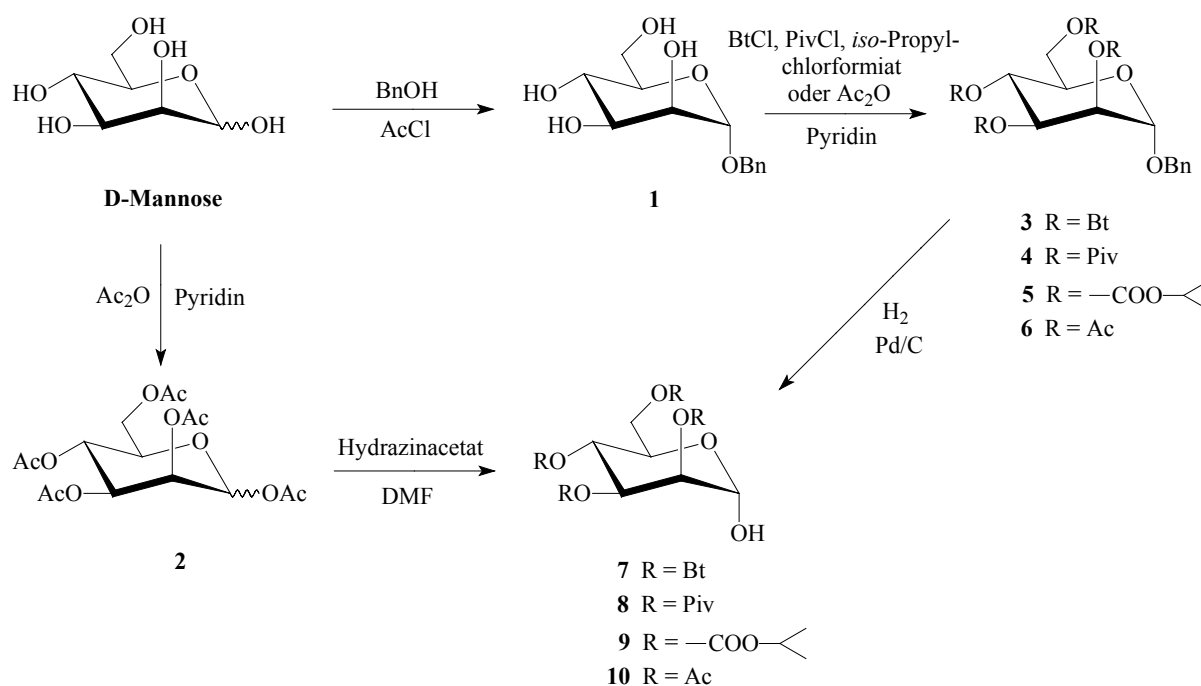


Abb. 20 Synthese der Mannose-Akzeptoren

Bemerkenswert ist, daß schon auf dieser Stufe der Synthese alle Mannose-Derivate anomerenrein als α -Anomer vorliegen. Es sei an dieser Stelle deshalb auf die Besonderheiten der anomer Konfiguration von Mannose hingewiesen.

Bei den meisten Monosacchariden ist das α -Anomer als thermodynamisches Produkt trotz der sterisch ungünstigeren axialen Stellung wegen des anomeren Effektes begünstigt. Durch den Einfluß von Lösungsmitteln, Substituenten und Temperatur läßt sich jedoch auch das β -Anomer synthetisieren, so daß Glycoside und Glycosen als Anomerengemische vorliegen. Die Größe des anomeren Effektes wird zusätzlich durch den Substituenten an Position 2 beeinflusst. Bei einer axialen Stellung wie bei Mannose kommt es zu einer Verstärkung des anomeren Effektes, da das antibindende σ^* -Orbital der C-2-X-Bindung in die Wechselwirkung des freien Elektronenpaares am Ringsauerstoff mit dem σ^* -Orbital der C-1-X-Bindung einbezogen wird. Deshalb entsteht bei Mannose fast ausschließlich das α -Anomer.

Die Anomerität glycosidischer Bindungen läßt sich im allgemeinen anhand des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums bestimmen. Nach der Karplus-Beziehung ergibt sich für α -Glycoside bei einem Diederwinkel von 60° , d. h. einer cis-trans-Stellung von H-1 und H-2, eine

Kopplungskonstante von $J_{1,2} \approx 3.5$ Hz. β -Glycoside zeigen bei einem Diederwinkel von 180° , der einer trans-trans-Stellung von H-1 zu H-2 entspricht, eine Kopplungskonstante von $J_{1,2} \approx 8$ Hz. Bei D-Mannose ist die Zuordnung schwieriger. Hier weisen beide Anomere einen Diederwinkel von etwa 60° und damit eine ähnliche Kopplungskonstante $J_{1,2}$ auf. Eine eindeutige Unterscheidung von α - und β -Mannopyranosiden ist nur mit einem ^{13}C -gated-NMR-Spektrum möglich. In diesem nicht entkoppelten Spektrum kann die Kopplungskonstante zwischen C-1 und H-1 bestimmt werden, deren Größe für beide Anomere charakteristische Unterschiede aufweist.^{108,109,110} Sie beträgt für α -Mannopyranoside $^1J_{\text{C-1,H-1}} \approx 170 - 180$ Hz, für β -Mannopyranoside werden Werte $^1J_{\text{C-1,H-1}} \approx 150 - 160$ Hz beobachtet.

Im nächsten Schritt wird die Phosphat-Gruppe in das Molekül eingeführt. Die Mannose-Derivate **7**, **8**, **9** und **10** mit der freien anomeren Hydroxy-Funktion werden hierbei als Akzeptoren in einer Phosphorylierungsreaktion eingesetzt. Unter Verwendung von Dibenzyl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit in Gegenwart von 1*H*-Tetrazol wird zunächst der Phosphit-Triester erzeugt, der *in situ* mit 3-Chlorperbenzoesäure (MCPBA) zum Phosphat oxidiert wird, so daß die Phosphorsäuretriester **11**, **12**, **13** und **14** in sehr guten Ausbeuten ($\sim 90\%$ über beide Stufen) erhalten werden (Abb. 21).

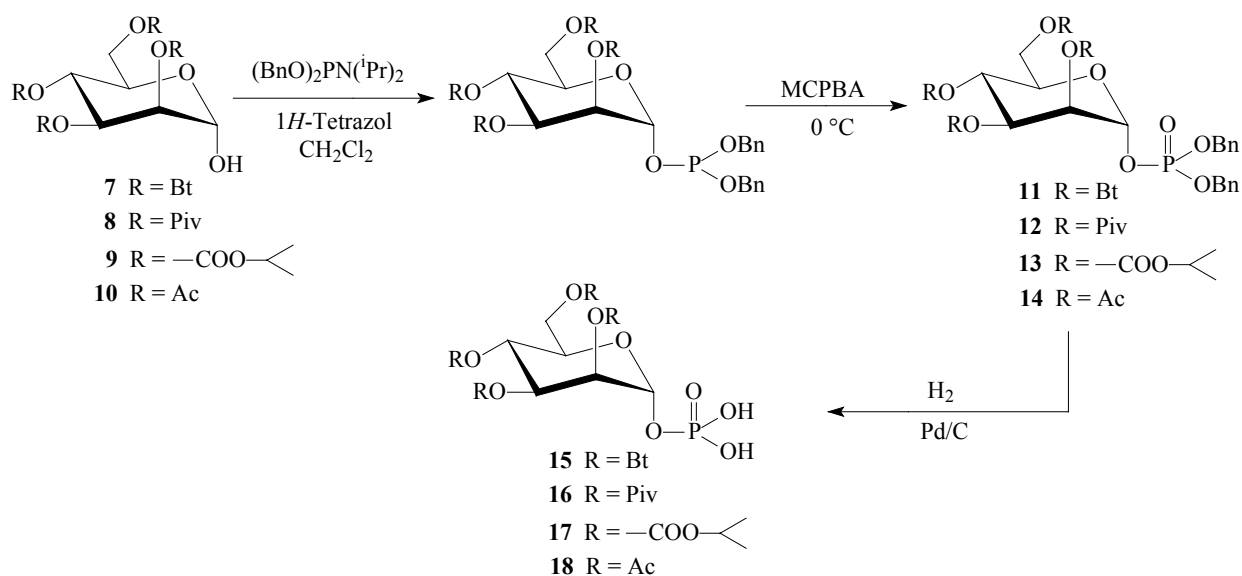


Abb. 21 Synthese verschiedener Mannose-1-Phosphate

1*H*-Tetrazol als schwache Säure ($pK_a = 4.9$) kommt bei der Aktivierung des Phosphors eine wichtige Funktion zu.^{111,112} Es bildet mit dem Phosphoramidit-Reagenz nach Austritt der Aminfunktion ein Tetrazolid, wodurch der nucleophile Angriff der OH-Gruppe auf das Phosphoratom erleichtert wird. Die Synthese der dibenzylgeschützten Phosphate nach der Phosphoramidit-Methode zeigt hinsichtlich der Ausbeute und der Reaktionsführung deutliche Vorteile gegenüber der häufig angewendeten Darstellung von Glycosylphosphaten aus dem entsprechenden Glycosylbromid mit Dibenzylphosphat als Reagenz.^{84,85}

Mittels NMR-Spektroskopie kann eindeutig nachgewiesen werden, daß die Phosphat-Gruppe erfolgreich in das Molekül eingeführt wurde. Im ^1H -NMR ist eine zusätzliche Aufspaltung des H-1 zu einem dd-System zu beobachten. Die Kopplungskonstante beträgt $^3J_{\text{H-1,P}} \approx 6.5$ Hz. Auch im ^{13}C -NMR sind zusätzliche Aufspaltungen sichtbar. So sind neben C-1 ($^2J_{\text{C-1,P}} \approx 5$ Hz) und C-2 ($^3J_{\text{C-2,P}} \approx 11$ Hz) auch die CH_2 -Einheit der Benzylschutzgruppe ($^2J_{\text{CH}_2,\text{P}} \approx 6$ Hz) zum Dublett aufgespalten. Ein weiterer Nachweis gelingt durch die ^{31}P -NMR-Spektroskopie. Chemische Verschiebungen im Bereich von -1.7 ppm bis -2.0 ppm entsprechen denen von Phosphaten. Anhand des ^{13}C -gated-NMR kann gezeigt werden, daß alle Verbindungen als α -Anomere vorliegen ($J_{\text{C-1,H-1}} \approx 179$ Hz).

Die anschließende hydrogenolytische Spaltung der Benzylschutzgruppen an Pd/C (10 %) verläuft problemlos in hohen Ausbeuten und führt zur Bildung der ungeschützten Phosphate **15**, **16**, **17** und **18** (Abb. 21). Die NMR-spektroskopische Untersuchung dieser Moleküle ist durch die freie Phosphat-Gruppe erschwert, da es aufgrund dynamischer Effekte zu einer starken Linienverbreiterung kam. Die Auswertung der MALDI-TOF-Spektren bestätigt das Vorhandensein der entsprechenden Phosphate, liefert aber darüber hinaus überraschende Erkenntnisse. Alle drei Verbindungen zeigen die erwarteten Molekülpeaks $[\text{M}+\text{Na}]^+$ und $[\text{M}+\text{K}]^+$. Es werden jedoch die Massen weiterer Spezies beobachtet, die wie folgt zu erklären sind. Nach Deprotonierung der freien Phosphate kommt es durch Anlagerung eines Metall-Kations (Na oder K) zur Neutralisierung. Dieses Molekül lagert nun ein weiteres Metall-Kation an, so daß es zur Ausbildung folgender Molekülpeaks kommt: $[\text{M}-\text{H}+\text{Na}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}-\text{H}+\text{Na}+\text{K}]^+$ und $[\text{M}-\text{H}+\text{K}+\text{K}]^+$. Dieses Phänomen ist im Mittel nur an einer der beiden P-OH-Funktionen zu beobachten.

Die freigesetzte Phosphat-Funktion dieser Verbindungen wird nun mit den eingangs erwähnten bioaktiven Schutzgruppen maskiert. Brommethylacetat ist ein käufliches Reagenz, wohingegen Iodmethylpivaloat aus Chlormethylpivaloat und Natriumiodid frisch hergestellt wird.⁹⁵ Beide Verbindungen reagieren unter Basenkatalyse von *N*-Ethyl-di-*iso*-propylamin (DIPEA) mit den Zuckerphosphaten in einer nucleophilen Substitution⁹⁹, wobei die gewünschten AM-geschützten Mannose-1-Phosphate **19**, **21**, **23** und **25** und die entsprechend POM-geschützten Verbindungen **20**, **22**, **24** und **26** erhalten werden (Abb. 22).

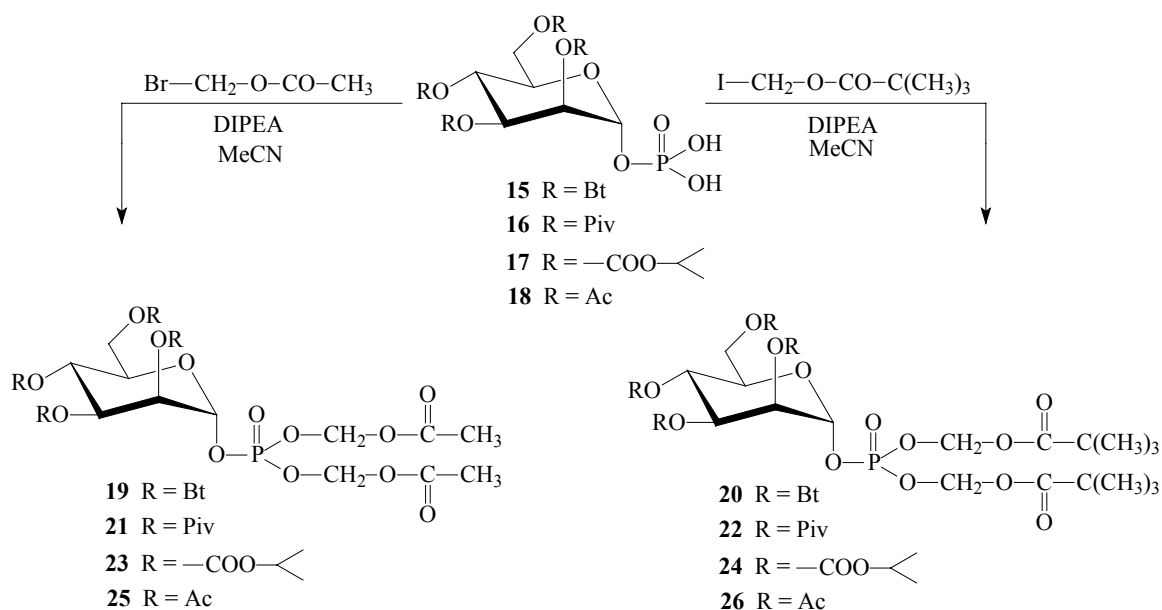


Abb. 22 Synthese der Mannose-1-Phosphat-Derivate unter Verwendung bioaktiver Phosphatschutzgruppen

Die erzielten Ausbeuten sind allerdings nur mäßig, obwohl laut dünnschichtchromatographischer Kontrolle eine vollständige Umsetzung der Edukte angezeigt wurde. Leichte Verbesserungen können durch Arbeiten unter Schutzgasatmosphäre, Vortrocknung der Reagenzien und die Destillation von DIPEA erzielt werden. Reaktionszeiten und Temperatur haben keinen entscheidenden Einfluß auf die Ausbeute. Die schwache Nucleophilie der Phosphatgruppe und ihre mangelnde Stabilität unter den leicht basischen Reaktionsbedingungen, sichtbar durch das Auftreten der geschützten Mannose mit freier anomerer OH-Gruppe, scheinen die Ursache für die geringen Ausbeuten zu sein. Die besten Resultate werden so mit der AM-Schutzgruppe bei den Butyryl-, Pivaloyl- bzw. Acetyl-geschützten Mannose-1-Phosphaten erreicht (**19**: 58 %, **21**: 31 %, **25**: 31 %). Die

Ausbeuten beim Einsatz der POM-Gruppe sind stets schlechter als die bei Verwendung der AM-Gruppe. Ebenso zeigt das *iso*-Propylcarbonat-geschütztes Mannose-1-Phosphat von allen Derivaten die größte Labilität, was zur schlechtesten Ausbeute von 4 % für Verbindung **24** führt.

Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen belegen, daß alle Verbindungen anomenrein vorliegen. Die $^1J_{C-1,H-1}$ -Kopplungskonstanten im ^{13}C -gated-Spektrum weisen Werte zwischen 174 Hz und 181 Hz auf, was beweist, daß es sich um α -Anomere handelt. Die nucleophile Substitution erfolgt also ohne Umlagerungen oder unter Öffnung der glycosidischen Bindung. Die Kopplungskonstanten zum Phosphor im 1H -NMR- und im ^{13}C -NMR-Spektrum zeigen die erwarteten Werte. Ebenso entsprechen die chemischen Verschiebungen im ^{31}P -NMR denen von Phosphaten. Im Vergleich zu den Dibenzyl-geschützten Verbindungen **11** – **14** sind die Werte leicht hochfeldverschoben ($\delta \approx -5$ ppm).

3.3. Enzymatische und biologische Untersuchungen

Es ist durch Einsatz von bioaktiven Phosphatschutzgruppen und die Verwendung von Estern und Carbonaten gelungen, Mannose-1-Phosphat derartig zu derivatisieren, daß eine Membrangängigkeit und damit eine Penetrierung der Zelle möglich erscheint.

Es gilt zunächst, den in der Literatur^{100,101} beschriebenen enzymatischen Abbau der Fettlöslichkeit vermittelnden Schutzgruppen zu überprüfen. Hierfür wird der als Modellkomponente ausgesuchte AM-Ester des butyrylierten Mannose-1-Phosphates **19** in einer enzymatischen Reaktion mit Carboxylatesterasen eingesetzt. Als erstes wird eine Standardreaktion ohne Enzym durchgeführt, um die Stabilität der Verbindung unter den gegebenen Reaktionsbedingungen zu testen. Die Substanz wird in Phosphatpuffer (pH 7.4, 0.05 M) bei 37 °C über Nacht inkubiert. Sowohl DC- als auch NMR-Analyse zeigen, daß das Phosphat unter den vorliegenden Reaktionsbedingungen stabil ist.

Anschließend wird Verbindung **19** in Phosphatpuffer (pH 7.4, 0.05 M) mit Schweineleberesterase (roh, E.C. 3.1.1.1) bei 37 °C für 3 Stunden inkubiert. Eine säulenchromatographische Reinigung an Biogel und Auftrennung aller einzelnen Produkte mit anschließender NMR-spektroskopischer Analyse erscheint auch angesichts der geringen Substanzmenge als nicht realistisch. Es bietet sich deshalb eine MALDI-TOF-

massenspektrometrische Analyse des Reaktionsgemisches an. Durch das wäßrige salzhaltige Reaktionsmedium wird diese Untersuchungsmethode jedoch nahezu unmöglich. Der Einsatz von ZipTip™ verspricht eine Lösung dieses Problems. Es handelt sich hierbei um eine Pipettenspitze, die ein Chromatographiemedium enthält, das zur Reinigung, Aufkonzentrierung und Entsalzung von Proteinen oder Oligonucleotiden im Femto- und Picomolmaßstab verwendet wird. Die Probe wird wie bei einer Säulenchromatographie aufgebracht und durch entsprechende Lösungsmittel eluiert. Die Eluate sind hierbei für den direkten Transfer auf einen MALDI-TOF-Teller geeignet. Der Reaktionsansatz wird also mit Methanol gequenchet, zentrifugiert und unter Verwendung von ZipTip_{C-18} entsalzt. Die Eluierung des Produktes erfolgt entlang eines Wasser-Methanol-Gradienten. Eine MALDI-TOF-Analyse zeigt neben dem Edukt **19** die Komponenten mit einer sowie mit keiner AM-Funktion, was darauf hinweist, daß die AM-Schutzgruppen nacheinander enzymatisch geöffnet werden. Des weiteren wird eine Butyryl-Schutzgruppe entfernt. Es ist anzunehmen, daß es sich dabei um die in Position 6 befindliche Funktion handelt, da ein Ester eines primären Alkohols als besonders reaktiv erachtet werden muß. Überraschenderweise werden die anderen Zucker-Schutzgruppen nicht entfernt. Außerdem wird die Bildung der butyrylierten Mannopyranose mit freier 1-OH-Gruppe als Nebenprodukt nachgewiesen (Abb. 23).

Der gleiche enzymatische Test wird nun mit Schweineleberesterase als Reinezym (3.2 M (NH₄)₂SO₄-Lösung, pH 8) durchgeführt. Verbindung **19** wird wieder in Phosphatpuffer (pH 7.4, 0.05 M) mit dem Enzym bei 37 °C für 3 Stunden inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgt wie zuvor beschrieben. Zusätzlich zur MALDI-TOF-Analyse wird ein ESI-Spektrum aufgenommen. Es kann erneut gezeigt werden, daß beide AM-Funktionen entfernt werden. Im MALDI-TOF-Spektrum ist wiederum nur der Verlust einer Butyryl-Gruppe zu identifizieren. Ebenso kann butyrylierte Mannopyranose mit freier anomerer OH-Gruppe als Nebenprodukt zugeordnet werden. Im ESI-Spektrum wird zusätzlich deutlich, daß alle vier Butyryl-Schutzgruppen abgespalten werden, womit der Nachweis von entschütztem Mannose-1-Phosphat gelungen ist. Die beim enzymatischen Abbau auftretenden Hydroxymethyl-Intermediate können ebenfalls identifiziert werden (Abb. 23).

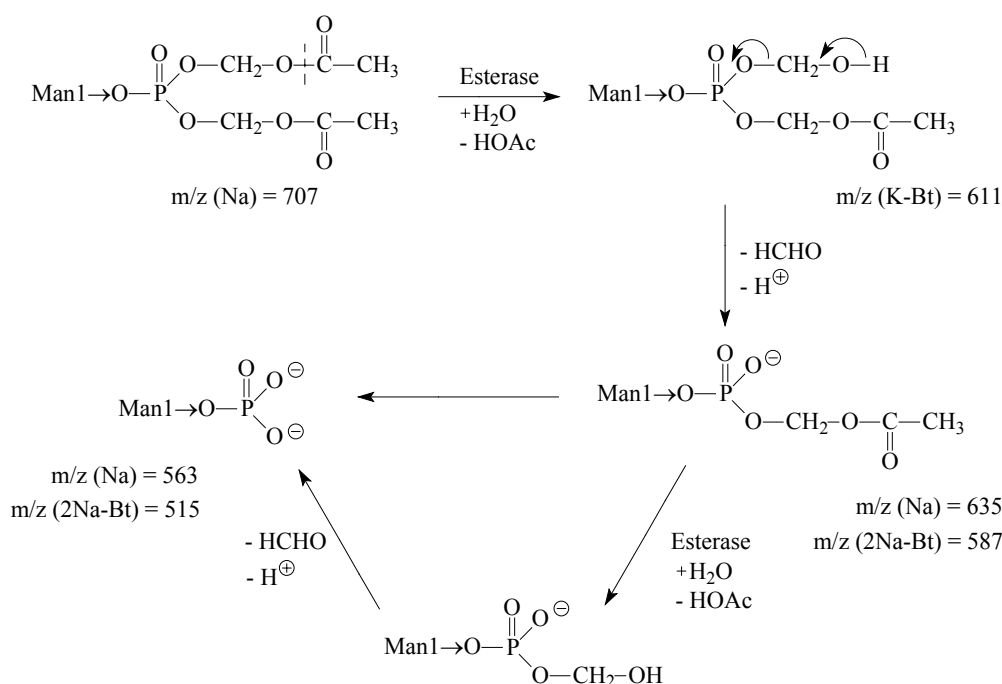


Abb. 23 MALDI-TOF-Analyse des Enzymversuchs von Verbindung **19** mit einigen exemplarischen Massenzuordnungen

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß diese ersten Versuche mit Carboxylatesterasen eindeutig belegen, daß sowohl die bioaktiven Phosphatschutzgruppen als auch die Butyryl-Funktionen an der Kohlenhydrateinheit enzymatisch geöffnet werden, so daß Mannose-1-Phosphat als Zielmolekül zugänglich wird. Aufgrund dieser positiven Ergebnisse scheint es angebracht, die Wirksamkeit der synthetisierten Verbindungen **19** – **26** an Zellen *in vitro* zu untersuchen.

Die biologischen Tests an menschlichen Zellen sollen zeigen, ob die Substanzen in der Lage sind, sich am Aufbau der Oligosaccharidstrukturen für die Synthese der Glycoproteine zu beteiligen. Dies setzt voraus, daß die Komponenten durch die Membran in die Zelle penetrieren können. Innerhalb der Zelle muß es dann zur enzymatischen Abspaltung sowohl der Phosphat- als auch der Kohlenhydrat-Schutzgruppen kommen. Die Tests werden an Zellkulturen von Gesunden zur Kontrolle und von CDG-Ia-Patienten durchgeführt. Ein Enzymdefekt der Phosphomannomutase 2 führt bei diesen Patienten zur Bildung von verkürzten Oligosaccharidketten, die dann für eine fehlerhafte Glycosylierung des Proteins verantwortlich sind. Eine biologische Aktivität der Substanzen würde sich dementsprechend in einer Korrektur der aufgebauten Oligosaccharidstruktur äußern.

Die Versuche werden durchgeführt an Fibroblasten aus der Haut, die in Earle's MEM (spezielles Nährmedium) kultiviert sind.¹¹³ Diese Zellkulturen werden radioaktiv mit $[2\text{-}^3\text{H}]$ -Mannose markiert. Dem Markierungsmedium wurden zuvor die entsprechenden Versuchssubstanzen (1 M Stammlösung in DMSO) zugesetzt, so daß eine Konzentration von 1 mM Substanz erreicht wird. Eine jeweilige Kontrollzellkultur (Patient und zur Kontrolle Gesunder) wird ohne Zugabe von Substanz markiert. Die so behandelten Zellkulturen werden bei 37 °C inkubiert, hierbei kommt es zum Aufbau der zu untersuchenden Oligosaccharidstrukturen. Anschließend werden die Zellen verschiedenen Reinigungs- und Extraktionsschritten unterworfen. Es werden hierbei unterschiedliche Pellets gewonnen. Die einen enthalten die Protein-gebundenen Oligosaccharide (PDO-Analyse) und die anderen Dolicholpyrophosphat-gebundene Oligosaccharide (LLO-Analyse). Bei der LLO-Analyse werden die Kohlenhydrate durch saure Hydrolyse freigesetzt und anschließend durch HPLC untersucht.

Die Verbindungen **19**, **20**, **21**, **25** und **26** werden in DMSO gelöst und an Kontroll- und Patientenfibroblasten getestet. Die Substanzen **25** und **26** zeigen eine alle Erwartungen übertreffende biologische Aktivität. Nach ihrer Zugabe zu Patientenfibroblasten kommt es zu einer Totalkorrektur des Phänotyps (Abb. 24). Das bedeutet, es werden vollständig aufgebaute Oligosaccharidstrukturen ($\text{G3} - \text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) gebildet. Ohne Zugabe von Substanz zeigt das HPLC-Spektrum nur unvollständig aufgebaute Oligosaccharidstrukturen ($\text{M4} - \text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ und $\text{M3} - \text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$).

Die Substanz **19** zeigt ebenfalls einen positiven Effekt. Nach ihrer Zugabe zu Patientenfibroblasten kommt es zu einer Teilkorrektur des Phänotyps. Die charakteristischen verkürzten Oligosaccharidstrukturen M4 und M3 sind nicht mehr sichtbar. Stattdessen können Peaks im Bereich höher glycosylierter Oligosaccharide erkannt werden. So ist ein kleiner Peak einer G3-Struktur zuzuordnen (Abb. 25).

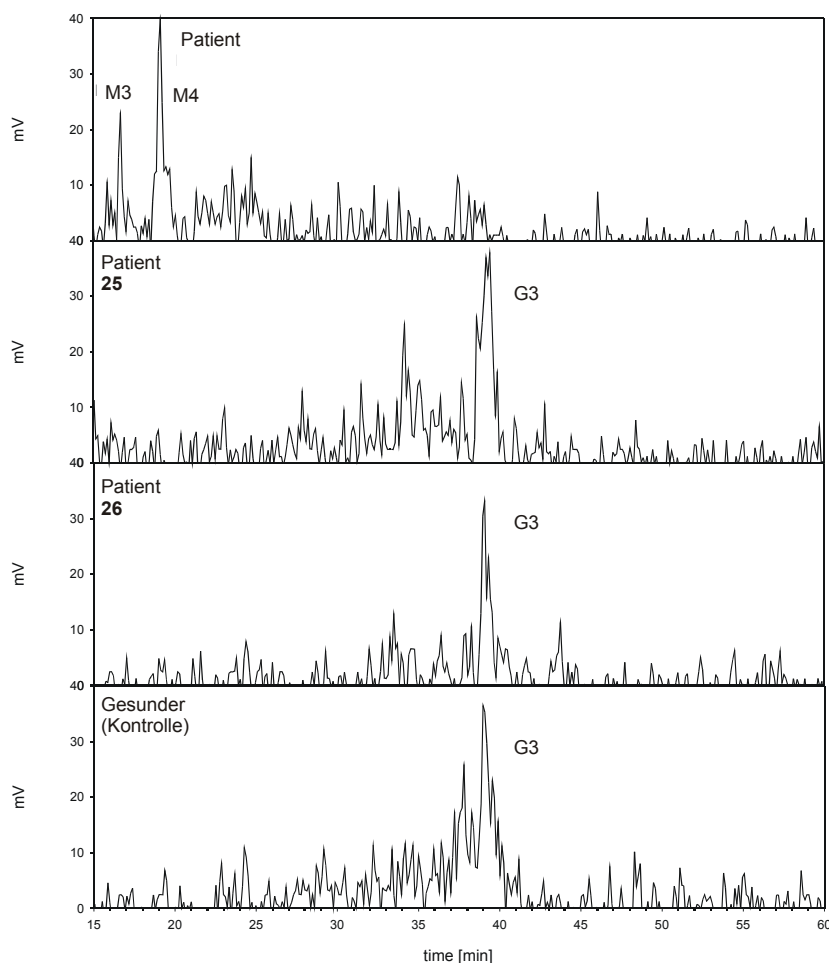


Abb. 24 HPLC-Analyse der LLO (Lipid Linked Oligosaccharides) der Substanzen **25** und **26** $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (G3), $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ (M4) und $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (M3)

Die Verbindungen **20** und **21** zeigen keinen Effekt auf den Aufbau der Oligosaccharide. Das HPLC-Spektrum weist nach ihrer Zugabe zu den Patientenfibroblasten keine Veränderung auf. Die verkürzten Kohlenhydratketten M3 und M4 sind weiterhin sichtbar (Abb. 26).

Die Verbindungen **22**, **23** und **24** zeigen sich schon beim Ansetzen einer Stammlösung als in DMSO unlöslich und können somit nicht im eigentlichen Zellversuch eingesetzt werden. Es lassen sich deshalb keine Aussagen über ihr biologischen Potential treffen.

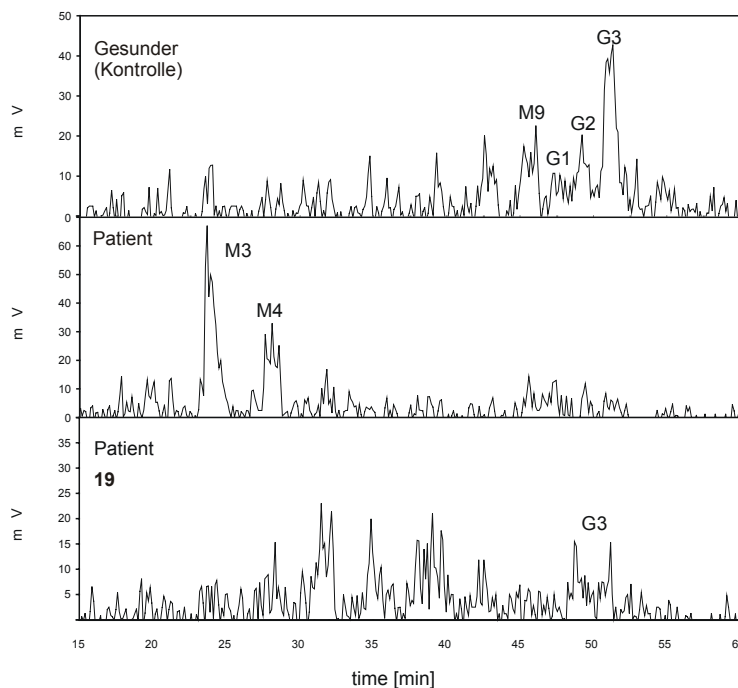


Abb. 25 HPLC-Analyse der LLO (Lipid Linked Oligosaccharides) von Substanz **19**
 $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (G3), $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (G2), $\text{GlcMan}_9\text{GlcNAc}_2$ (G1), $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (M9), $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ (M4) und $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (M3)

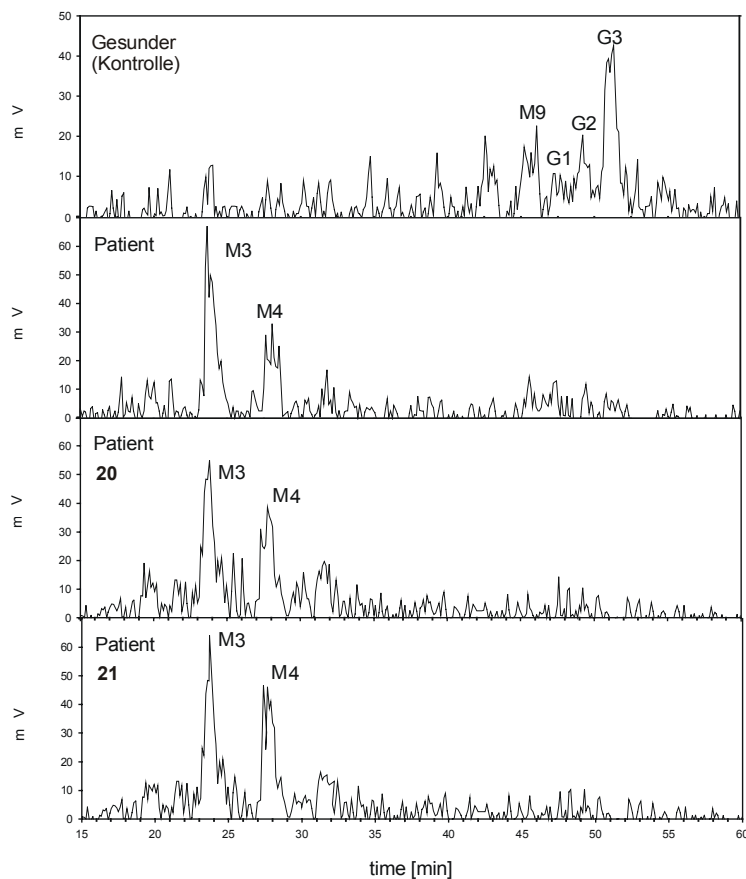


Abb. 26 HPLC-Analyse der LLO (Lipid Linked Oligosaccharides) von Substanzen **20** und **21**
 $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (G3), $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (G2), $\text{GlcMan}_9\text{GlcNAc}_2$ (G1), $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (M9), $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ (M4) und $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (M3)

In der Literatur ist beschrieben,⁵⁷ daß bei *in vitro* Tests Veränderungen des Phänotyps, d. h. ein vollständiger Aufbau der Oligosaccharidstrukturen, durch Zugabe von hohen Konzentrationen D-Mannose erreicht wird. Eine exakte Erklärung dieses Phänomens steht noch aus. Es muß nun gezeigt werden, daß die beschriebenen Korrekturen nicht durch freie Mannose verursacht werden, die durch Zersetzung der inkorporierten Substanzen entstehen kann. Hierzu wird eine GC-Analyse der Verbindungen durchgeführt. 0.25 µl der 1M Stammlösung werden im gleichen Medium, das bei der LLO-Analyse verwendet wird, inkubiert. Hierbei wird MEM einmal mit FCS (fetales Kälberserum) und einmal ohne FCS versetzt. Nach entsprechenden Reinigungs- und Extraktionsschritten und nachfolgender Bildung von Trimethylsilyl-Derivaten erfolgt die GC-Analyse, anhand derer die Aussage getroffen werden kann, da die getesteten Substanzen keine Mannose freisetzen, so daß die beobachteten Korrekturen des Phänotyps auf die biologische Aktivität des zugeführten Mannose-1-Phosphates zurückzuführen sind.

Um im weiteren die biologische Stabilität abschätzen zu können, werden erste Untersuchungen in Plasma und in Fibroblasten vorgenommen. Verbindung **19** wird erneut als Modellkomponente ausgewählt. Die Substanz wird in PBS (pH 7.4) gelöst. Eine 1mg-Portion dieser Stammlösung wird in Plasma und in Fibroblasten (PBS, 0.33 µg/µl) aufgenommen und bei 37 °C für 3 Stunden bzw. über Nacht inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgt in gleicher Weise wie für die beschriebenen enzymatischen Versuche. Die Aufnahme eines MALDI-TOF-Spektrums liefert für die Ansätze in Plasma und in Fibroblasten die gleichen Ergebnisse. Es kann gezeigt werden, daß beide AM-Funktionen entfernt werden bei gleichzeitigem Verlust einer Butyryl-Gruppe. Butyrylierte Mannopyranose mit freier anomerer OH-Gruppe kann als Nebenprodukt identifiziert werden. Außerdem tritt in allen Spektren ein gleicher Signalsatz auf, dessen Massen keine Strukturen zugeordnet werden können ($m/z = 647, 663, 685$ und 701). Abschließend bleibt festzustellen, daß die Zeitdauer der Inkubation keinen Einfluß hat, weil die aufgenommenen Spektren unverändert bleiben.

Diese ersten enzymatischen und biologischen Untersuchungen haben gezeigt, daß das unter Einsatz von biologisch reversiblen Schutzgruppen derivatisierte Mannose-1-Phosphat durch die Membran in die Zelle penetrieren kann und dort durch intrazelluläre enzymatische Öffnung durch Carboxylatesterasen freigesetzt wird. Das so zugängliche Mannose-1-Phosphat führt zu einer Korrektur im Aufbau der Oligosaccharidstrukturen, was einen Einsatz als Therapeutikum möglich erscheinen läßt. Um ein umfassenderes Bild der biologischen Aktivität zu erhalten, stehen in Zukunft weitere Untersuchungen an. So sollen *in vivo* Tests am Mausmodell durchgeführt werden. Des weiteren spielt die Verbesserung der Löslichkeit und die Wahl eines geeigneteren Lösungsmittels als DMSO eine wichtige Rolle. Auch galenische Aspekte müssen in Betracht gezogen werden.

4. Mannose-1-Phosphat-Derivate mit Alkoholen als lipophile Einheit

4.1. Einleitung

Im vorgangegangenen Kapitel wurde dargestellt, wie verschieden substituierte Mannose-1-Phosphate durch Einsatz bioaktiver Phosphatschutzgruppen in membrangängige Verbindungen umgewandelt und deren biologische Aktivitäten getestet wurden. Neben dieser Prodrug-Strategie sind auch andere Ansätze zur Synthese entsprechend lipophiler Mannose-1-Phosphat-Derivate verfolgt worden.

Das Ziel ist wiederum, Mannose-1-Phosphat derart zu derivatisieren, daß höhere Lipophilie und Stabilität erreicht werden, die eine Membrangängigkeit erlauben. Es soll erneut der Phosphoramidit-Weg bei der Synthese der entsprechenden Derivate zur Anwendung kommen. Im Gegensatz zu der im vorherigen Kapitel beschriebenen Synthesesequenz, bei der die Methode nur zur Etablierung der Phosphat-Funktion im Molekül diente, soll im vorliegenden Fall eine lipophile Einheit direkt über ein entsprechend synthetisiertes Phosphoramidit-Reagenz in das Molekül eingebracht werden.

Bei dieser von Perich und Johns^{70,71} eingeführten Methode, einer Phosphit-Variante, kommen die Phosphoramidite, P(III)-Verbindungen mit Amin-Funktionen als Abgangsgruppen, zum Einsatz. Anschließende Oxidation führt zur Bildung eines Phosphates, einer P(V)-Verbindung. Ein Vorteil ist, daß Funktionalisierungen am Phosphor im Vorwege leicht bei der Synthese der Phosphoramidit-Reagenzien etabliert werden können, um entsprechend asymmetrische Phosphorsäureester zu erzeugen. Bei Verwendung von Phosphat-Reagenzien ist diese Funktionalisierung schwieriger, so daß häufig käufliche symmetrische Phosphate eingesetzt werden. Außerdem zeichnen sich Phosphate durch eine geringere Reaktivität aus. Des weiteren weisen bei den P(III)-Komponenten Phosphoramidite gegenüber Chlorphosphiten eine höhere Stabilität und bessere Abgangsgruppen auf. Schließlich hat sich diese Methode schon bei der Synthese der dibenzylgeschützten Phosphate als äußerst effizient erwiesen (Kap. 3.2.). Im Gegensatz zum dort verwendeten Dibenzyl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit ist hier die Synthese eines entsprechend funktionalisierten Phosphoramidit-Reagenzes notwendig.

Als Fettlöslichkeit vermittelnde Gruppen bieten sich Farnesol und Phytol als langkettige Terpen-Alkohole an, die innerhalb der Terpenbiosynthese Vorläufer des Dolichols darstellen. Wie beschrieben, ist Dolichol als Dolicholphosphat das essentielle Trägermolekül für Kohlenhydrate in der Biosynthese der Glycoproteine.⁴⁴ Hierbei ist ein „Umklappen“ der Dolicholphosphat-gebundenen Oligosaccharide von der cytosolischen zur luminalen Seite der ER-Membran mittels eines Flip-Flop-Mechanismus beschrieben.⁴⁵ Es wird nun angenommen, daß bei Farnesol und Phytol als strukturell sehr ähnlichen Molekülen ein ähnlicher Flip-Flop-Mechanismus zur Überwindung der Zellmembran vermittelt wird. Mannose-1-Phosphat wird folglich durch Kupplung mit Farnesol oder Phytol so derivatisiert, daß eine Penetration durch die Zellmembran in die Zelle möglich erscheint. Da Farnesol und Phytol als cis-trans-Stereoisomerengemische vorliegen, wird zunächst *trans*-2-Hexen-1-ol als Modellsubstanz eingesetzt (Abb. 27). Dadurch können die Methodik des gewählten Reaktionsweges getestet und die spektroskopischen Untersuchungen vereinfacht werden.

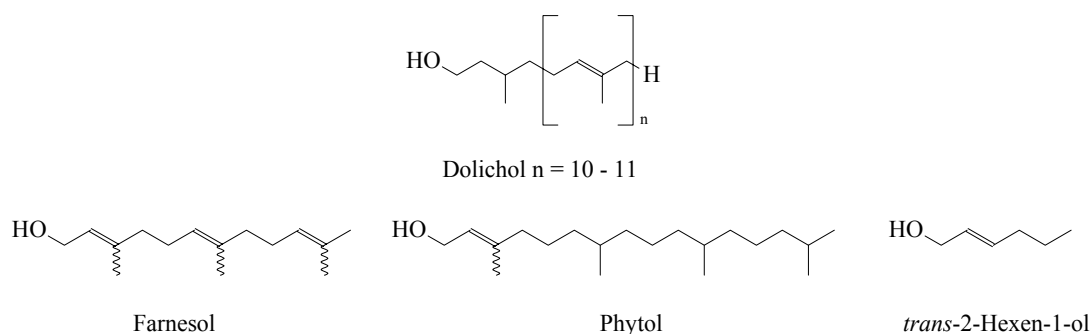


Abb. 27 Dolichol und lipophile Alkohole

Ist die Phosphat-Funktion nun mit einem Mannose-Rest und einer lipophilen Einheit verestert, liegt sie dementsprechend als Phosphorsäurediester vor. Dies würde ein bifunktionales Phosphoramidit-Reagenz voraussetzen (Abb. 28a). Mehrfachsubstitutionen und Produktgemische bei der Einführung der Kohlenhydratkomponekte wären unvermeidlich. Deshalb scheint es sinnvoller, ein monofunktionales asymmetrisches Phosphoramidit-Reagenz einzusetzen (Abb. 28b), bei dem eine weitere Position durch eine Schutzgruppe blockiert ist, die am Ende der Synthese wieder abgespalten wird, so daß Mannose-1-Phosphat mit einer freien Hydroxy-Funktion die Zellmembran überwinden kann.



R' = lipophile Einheit PG = Schutzgruppe

Abb. 28 Beispiele eines mono- und bifunktionalen Phosphoramidit-Reagenzes

Bei der Wahl der Schutzgruppen ist zum einen die Stabilität der glycosidischen Phosphat-Bindung zu beachten, die im Basischen relativ stabil, bei saurem pH-Wert jedoch eher labil ist. Auf der anderen Seite sollte auch die Struktur der lipophilen Einheit unter den Reaktionsbedingungen der Entschützung unverändert bleiben. Somit scheidet eine Schutzgruppe, die durch Hydrogenolyse entfernt wird, aus, da es sicherlich zu Reaktionen an den ungesättigten Bereichen der Alkohole kommt.

Für diese Problemstellungen wurde deshalb folgender Schutzgruppensatz ausgewählt: 2-Cyanoethyl- (CE), Allyl- (All) und 2, 2, 2-Trichlorethyl- (TCE) Schutzgruppen. Sowohl die Cyanoethyl- als auch die Trichlorethyl-Funktionen haben bisher weite Verbreitung als Phosphatschutzgruppen in der Oligonucleotidsynthese gefunden. Die Cyanoethyl-Gruppe, ursprünglich von Tener für die Phosphordiester-Methode eingeführt,¹¹⁴ wurde von Letsinger *et al.* in der Phosphortriester-Methode eingesetzt.^{63,115} Die Cyanoethyl-Gruppe ist stabil unter sauren Bedingungen, läßt sich aber leicht durch eine milde Base entfernen. Die Trichlorethyl-Gruppe wurde erstmals von Eckstein und Rizk zur Oligonucleotidsynthese eingesetzt.⁶⁴ Diese Gruppe ist sowohl säure- als auch basenstabil und kann durch Zn bzw. Zn/Cu-Paar reduktiv entfernt werden. Der Einsatz der Allyl-Gruppe bietet sich an, da ihre Entschützung katalytisch möglich ist.

Somit stehen verschiedene Alternativen offen, um der Stabilität der Mannosyl-Phosphat-Bindung Rechnung zu tragen. Ein weiterer Aspekt bei der Auswahl der Schutzgruppen ist, daß sie alle strukturell sehr unterschiedlich sind, was eine NMR-spektroskopische Identifizierung erleichtert.

Analog zur Darstellung der Mannose-1-Phosphat-Derivate mit bioaktiven Phosphatschutzgruppen sollen auch hier die Hydroxy-Funktionen am Zucker durch Schutzgruppen maskiert werden. Es kommen aufgrund der zuvor eingehend besprochenen Aspekte die gleichen Ester und Carbonate zum Einsatz: Butyryl-, Pivaloyl-, Acetyl- und *iso*-Propylcarbonat-Schutzgruppen (Kap. 3.1.).

4.2. Synthese der Mannose-1-Phosphat-Derivate

Zunächst werden die entsprechend funktionalisierten Phosphoramidit-Reagenzien synthetisiert. Um ein monofunktionales asymmetrisches Amidit zu erhalten, müssen Schutzgruppenfunktion und lipophile Einheit in ein geeignetes phosphorhaltiges Molekül eingeführt werden.

Ausgehend von Phosphortrichlorid erfolgt zuerst die Umsetzung mit einem Schutzgruppenalkohol zu den Phosphordichloriditen **27** und **28** (Abb. 29).^{116,117} Im Gegensatz zu den in der Literatur¹¹⁸ beschriebenen Reaktionen in Diethylether bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ liefert die Umsetzung in Acetonitril bei Raumtemperatur wesentlich bessere Ergebnisse hinsichtlich Ausbeute und Produktspezifität. Auf eine Reinigung des jeweils flüssigen Rohprodukts wird verzichtet, da in der Literatur mehrfach beschrieben wurde, daß bei Destillation eine Zersetzung eintrat¹¹⁶ und außerdem die Reaktionsführung aufgrund starker HCl-Gasentwicklung schwierig war. Durch den Einsatz von Phosphortrichlorid im Überschuß wird eine Mehrfachsubstitution durch weitere Alkoholmoleküle vermieden. Dies konnte mittels NMR-Spektroskopie durch Integration und Vergleich der Signallage nachgewiesen werden. Das ^{31}P -NMR-Spektrum zeigt chemische Verschiebungen von $\delta = 181.5\text{ ppm}$ und $\delta = 180.4\text{ ppm}$, die denen von Phosphordichloriditen entsprechen.

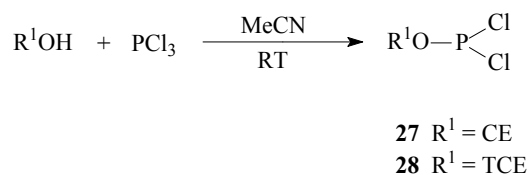


Abb. 29 Synthese substituierter Phosphordichloridite

Phosphordichloridite wurden erstmals von Letsinger *et al.*¹¹⁹ in der Synthese von Desoxynucleotiden eingesetzt. Deshalb wird in einem ersten Versuch getestet, ob diese Methode¹¹⁸ auch auf die Bildung eines Phosphorsäuretriesters bestehend aus Kohlenhydrat, lipophiler Einheit und Schutzgruppenfunktion übertragbar ist. Das Mannose-Derivat **10** wird unter Schutzgasatmosphäre mit dem Phosphordichloridit **28** und Hexenol bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ umgesetzt. Anschließende Oxidation des gebildeten Triphosphits mit Iod/Wasser soll das gewünschte Phosphat liefern (Abb. 30). Bei dieser Reaktion kann jedoch kein Produkt erkannt werden. Es ist anzunehmen, daß schon die beiden Kupplungsschritte nicht erfolgreich waren,

denn ein großer Nachteil der Phosphordichloridite ist ihre geringe Stabilität. Sie werden deshalb im folgenden als reaktive Vorstufen in der Synthese der wesentlich stabileren Phosphoramidite dienen.

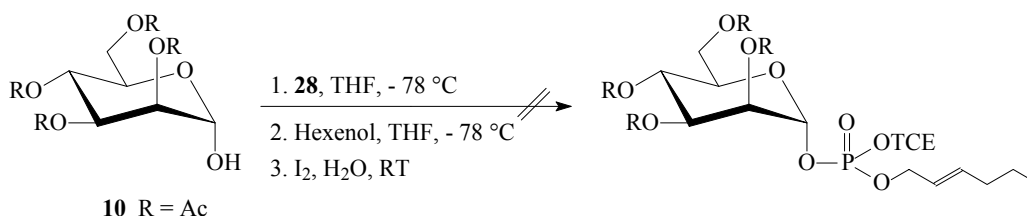


Abb. 30 Versuch der Synthese eines acetylierten Mannose-1-Phosphates mit Hexenol als lipophiler Einheit unter Verwendung von Phosphordichloriditen

Die anschließende Reaktion der Phosphordichloridite mit Di-*iso*-propylamin liefert die Phosphoramidite **30** und **32**, die stabiler und somit leichter handhabbar sind (Abb. 31).¹¹⁹ Bei Verbindung **30** ist keine weitere Reinigung notwendig, da das Produkt hinreichend sauber entsteht. Substanz **32** hingegen wird durch Kugelrohrdestillation gereinigt. Durch einen 10-molaren Überschuß an Amin wird bei dieser Reaktionssequenz gewährleistet, daß beide Chloratome im Molekül substituiert werden. Im ³¹P-NMR-Spektrum ist dadurch eine deutliche Hochfeldverschiebung der Signale zu konstatieren ($\delta = 15.8$ ppm und $\delta = 15.6$ ppm).

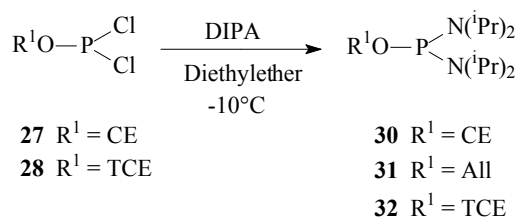


Abb. 31 Synthese substituierter Bis-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidite

Im weiteren Reaktionsverlauf reagieren diese bifunktionalen Phosphoramidite nun mit einem als lipophile Einheit fungierenden Alkohol.¹²⁰ Die allylierte Variante **31** ist als käufliches Reagenz erhältlich. Zur Aktivierung wird 1*H*-Tetrazol als schwache Säure verwendet. Umsetzung mit *trans*-2-Hexen-1-ol liefert die asymmetrischen Phosphoramidite **33**, **34** und **35** in zufriedenstellender Ausbeute von 55 - 77 % (Abb. 32). Die Verbindungen sind im Vergleich zu den Phosphordichloriditen so stabil, daß eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (Laufmittel: Diethylether/Pentan) möglich ist.

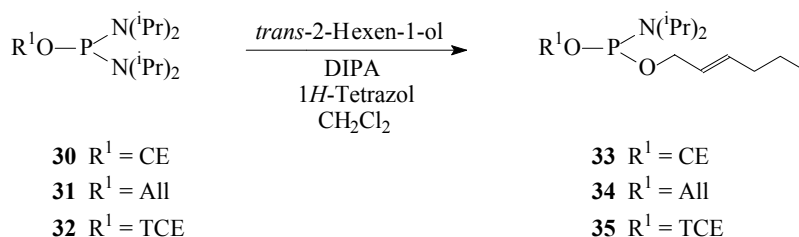


Abb. 32 Synthese substituierter *N,N*-Di-*iso*-propylphosphoramidite unter Verwendung von *trans*-2-Hexen-1-ol

Der Erfolg der Reaktion kann wiederum durch NMR-spektroskopische Untersuchungen belegt werden. So sind im ^1H - und ^{13}C -NMR die typischen durch Phosphor verursachten Aufspaltungen zu beobachten. Die ^3J -Kopplungen im ^1H -NMR nehmen Werte zwischen 7 und 8 Hz an. Im ^{13}C -NMR betragen die ^2J -Kopplungskonstanten ~ 18 Hz, die ^3J -Kopplungen sind 7 – 8 Hz groß. Die chemischen Verschiebungen im ^{31}P -NMR-Spektrum zeigen die für asymmetrische Phosphoramidite erwarteten Werte um $\delta \sim 150$ ppm.

Nach der erfolgreichen Synthese der monofunktionalen Phosphoramidit-Reagenzien **33**, **34**, und **35** folgen die Kupplungsreaktionen mit Mannose, um die Phosphat-Funktion im Zuckermolekül zu etablieren. Als Mannose-Derivate mit einer freien anomeren Hydroxy-Funktion werden erneut die Akzeptoren **7**, **8**, **9** und **10** verwendet (Abb. 21). Analog zu der im Kapitel 3.2. beschriebenen Phosphorylierungsreaktion wird nach Aktivierung durch 1*H*-Tetrazol zunächst ein Phosphorigsäuretriester erzeugt, der *in situ* mit 3-Chlorperbenzoesäure oder *tert*-Butylhydroperoxid zum Phosphat oxidiert wird. Es werden die Phosphorsäuretriester **44** - **52** und **55** in guten bis sehr guten Ausbeuten von 50 % - 90 % erhalten (Abb. 33).

Die Einführung der Phosphat-Funktion in das Kohlenhydratmolekül über ein Phosphoramidit-Reagenz hat sich wiederum als eine sehr effiziente Methode bewährt. Abweichend zur bisher verwendeten 3-Chlorperbenzoesäure (MCPBA) wird nun auch *tert*-Butylhydroperoxid als Oxidationsmittel eingesetzt. Dessen Verwendung hat sich hinsichtlich der Ausbeute als nicht nachteilig erwiesen. Ebenso führen leichte Veränderungen im Reaktionsablauf wie Lösungsmittelwechsel (Acetonitril/Dichlormethan) und Wechsel in der Reihenfolge der Zugabe der Reagenzien sowie in der Aufarbeitung weder zu schlechteren noch zu besseren

Ausbeuten. Es bleibt festzuhalten, daß für den Erfolg der Reaktion die Verwendung von 1*H*-Tetrazol zur Aktivierung essentiell notwendig ist. Die Wahl der Lösungs- und Oxidationsmittel spielt anscheinend nur eine untergeordnete Rolle.

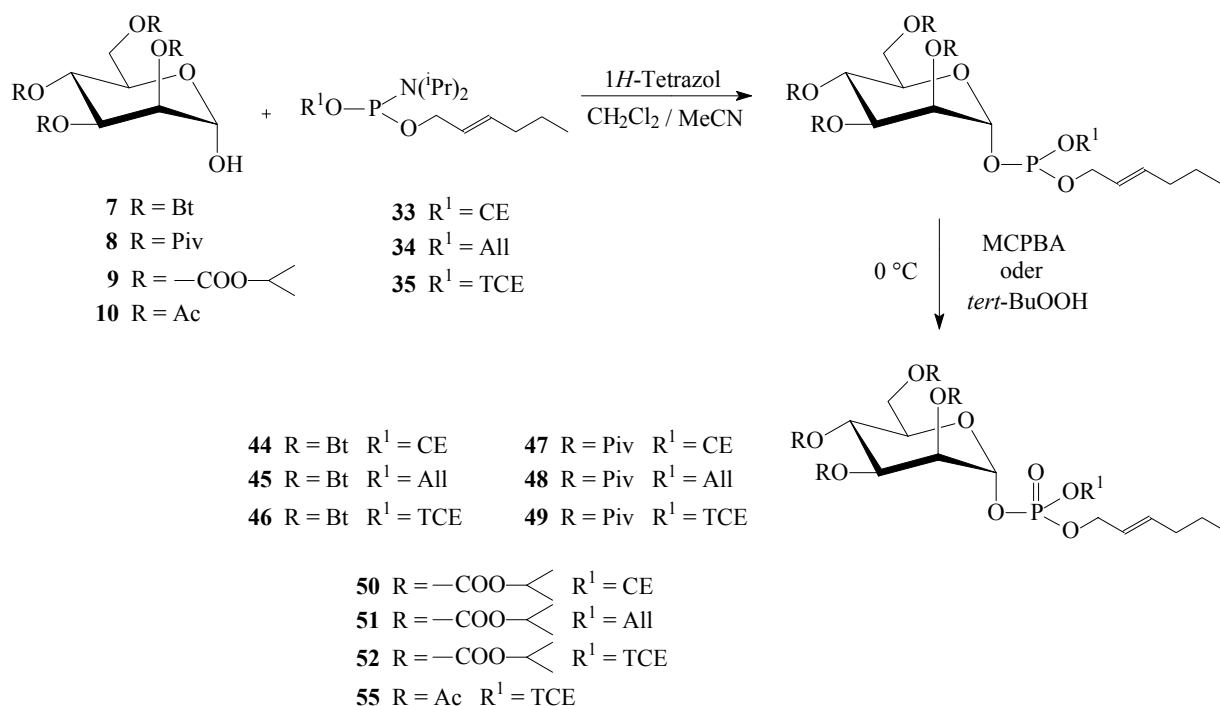


Abb. 33 Synthese verschiedener Mannose-1-Phosphate mit *trans*-2-Hexen-1-ol als lipophile Einheit
 Alle Verbindungen liegen als Diastereomerengemische vor, die Verbindungen **46** und **52** außerdem als α -/ β -Anomerengemische.

Die erfolgreiche Kupplung und anschließende Oxidation zum Phosphat kann wiederum NMR-spektroskopisch belegt werden. Im ¹H-NMR ist das H-1 durch die zusätzliche Phosphor-Kopplung zum dd-System aufgespalten. Die Kopplungskonstante beträgt ³J_{H-1,P} ≈ 6 - 7 Hz. Auch im ¹³C-NMR sind zusätzliche Aufspaltungen sichtbar. Neben C-1 (²J_{C-1,P} ≈ 5 - 6 Hz) und C-2 (³J_{C-2,P} ≈ 9 - 12 Hz) sind auch die in Nachbarschaft befindlichen C-Atome der Schutzgruppen und des Hexenols zu entsprechenden d-Systemen aufgespalten (Kap. 6.3.). Alle Verbindungen besitzen drei verschiedene Substituenten an der Phosphat-Funktion, weshalb sie als Diastereomerenpaar vorliegen. Im ³¹P-NMR wird dies durch das Auftreten von zwei Signalen für das Phosphoratom deutlich. Die chemischen Verschiebungen liegen im Bereich -1.7 ppm bis -3.5 ppm und gleichen damit den Werten der dibenzylgeschützten Phosphate **11** - **14**. Eine Diastereomerentrennung ist nur bei den Verbindungen **50** und **55** gelungen, sie ist angesichts der Zielsetzung der Anwendung dieser Moleküle auch nicht zwangsläufig notwendig.

Anhand des ^{13}C -gated-Spektrums läßt sich zeigen, daß die Verbindungen **44**, **45**, **47** – **51** und **55** ausschließlich als α -Anomere vorliegen wie die Kopplungskonstanten $^1J_{\text{C-1,H-1}} \approx 177 - 184$ Hz dies beweisen. Bei den Substanzen **46** und **52** hingegen kann anhand der Kopplungskonstanten festgestellt werden, daß neben dem α - überraschend auch das β -Anomere gebildet wurde. Die Kopplungskonstanten für die β -Produkt zeigen eine Größe von 155 Hz bzw. 166 Hz.

Diesen beiden Molekülen gemeinsam ist die Trichlorethyl-Schutzgruppe. Die pivaloylierten und acetylierten Verbindungen **49** und **55** mit der gleichen Schutzgruppe zeigen jedoch keine β -Anomerenbildung. Die Synthese beider Substanzen **46** und **52** erfolgt in Acetonitril, *tert*-Butylhydroperoxid fungiert als Oxidationsmittel. Die Verbindungen **44** und **55**, die in analoger Weise dargestellt werden, zeigen ebenfalls keine Bildung des β -Anomeren. Die Ursache für das Auftreten eines β -Produktes bleibt somit unklar.

Beide Anomere können separat erhalten werden und liegen im Verhältnis von ungefähr 1 : 1 vor. Das jeweilige Anomer bildet wiederum ein Diastereomerenpaar, was durch die zwei Signale im ^{31}P -NMR bestätigt wird. Die NMR-spektroskopische Auswertung wird also nicht nur durch das Vorhandensein von Phosphor, sondern auch durch die Bildung von Diastereomeren und Anomeren zusätzlich erschwert.

Bei der zuvor beschriebenen Synthese der Phosphate kam ein monofunktionales Phosphoramidit-Reagenz zum Einsatz, das mit einer Schutzgruppe (CE, All, TCE) und mit *trans*-2-Hexen-1-ol als lipophile Einheit blockiert war. Alternativ zu dieser Methode erscheint es möglich, ein Phosphoramidit-Reagenz zu synthetisieren, in dem sich neben der Schutzgruppe eine Mannose-Einheit befindet. Das bedeutet, daß es innerhalb der Phosphat-Synthese zu einem Reihenfolgewechsel zwischen Hexenol und Mannose kommt. Dieser Wechsel sollte durchführbar sein, wenn man davon ausgeht, daß die freie Lactol-Gruppe der Mannose in gleicher Weise wie ein Alkohol reagiert.

Bei der Synthese dieses mit Schutzgruppe und Mannose funktionalisierten Phosphoramidit-Reagenzes kommen zwei unterschiedliche bifunktionale Amidite zum Einsatz.¹²¹ Zunächst reagiert die acetylierte Mannose **10** mit Chlor-2-cyanoethyl-*N,N*-di-*iso*-propylamin in Gegenwart von *N*-Ethyl-di-*iso*-propylamin (DIPEA) und Dichlormethan als Lösungsmittel.

Die Umsetzung liefert das asymmetrische Phosphoramidit **42** in 66 % Ausbeute (Abb. 34). Im Gegensatz zu den bisher verwendeten reinen Amiditen mit zwei Aminfunktionen als Abgangsgruppen fungiert hier Chlorid als Austrittsgruppe. Die Aktivierung erfolgt nicht durch 1*H*-Tetrazol, sondern basisch mit DIPEA.

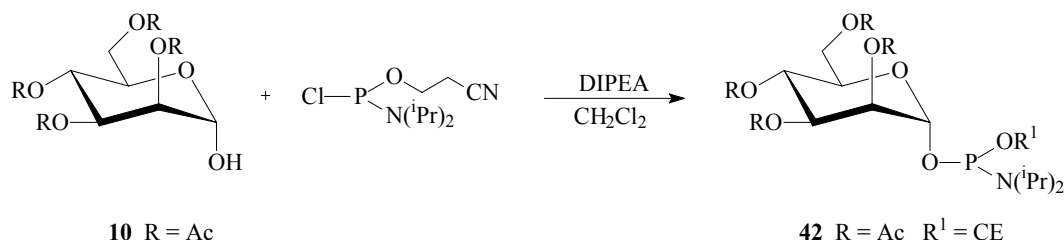


Abb. 34 Synthese eines substituierten *N,N*-Di-*iso*-propylphosphoramidites unter Verwendung einer acetylierten Mannose

Das allylierte Phosphoramidit **31** wird mit der acetylierten Mannose **10** in gleicher Weise wie bei der Synthese der monofunktionalen Phosphoramidit-Reagenzien **33**, **34** und **35** umgesetzt, wobei die Aktivierung durch 1*H*-Tetrazol erfolgt. Das asymmetrische Phosphoramidit **43** kann in 84 % Ausbeute erhalten werden (Abb. 35).

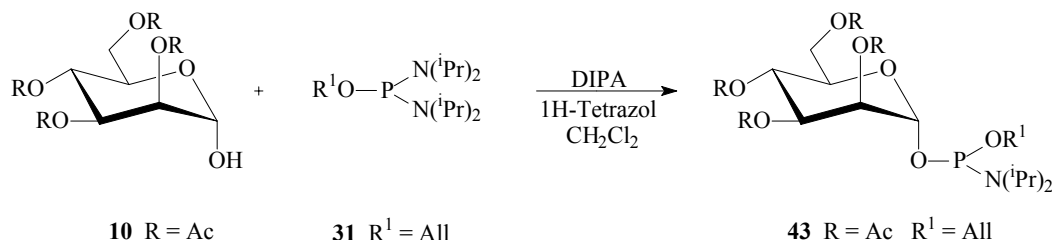


Abb. 35 Synthese eines substituierten *N,N*-Di-*iso*-propylphosphoramidites unter Verwendung einer acetylierten Mannose

Die Reinigung beider Verbindungen erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: Toluol/Ethylacetat). Das Vorhandensein eines Kohlenhydrats erleichtert diesen Schritt im Vergleich zu den Phosphoramiditen **33**, **34** und **35** erheblich. Eine NMR-spektroskopische Untersuchung zeigt die durch den Phosphor bedingten typischen Aufspaltungsmuster. In beiden Komponenten beträgt die Kopplungskonstante $^3J_{\text{H-1,P}} = 5.1 \text{ Hz}$. Im ^{13}C -NMR zeigen die Kopplungskonstanten den Amiditen entsprechende Werte ($^2J_{\text{C-1,P}} \approx$

15 - 16 Hz, $^3J_{C-2,P} \approx 5 - 7$ Hz) und auch die chemischen Verschiebungen im ^{31}P -NMR finden sich mit $\delta = 141.9$ ppm und 150.0 ppm im erwarteten Bereich.

Die monofunktionalen Phosphoramidit-Reagenzien **42** und **43** werden nun mit *trans*-2-Hexen-1-ol unter 1*H*-Tetrazol-Aktivierung zum Triphosphit verknüpft, der *in situ* mit *tert*-Butylhydroperoxid zu den Phosphaten **53** und **54** oxidiert wird (Abb. 36). Die Ausbeuten betragen 53 % und 23 % und liegen damit unter denen, die mit den Phosphoramidit-Reagenzien **33**, **34** und **35** erzielt wurden.

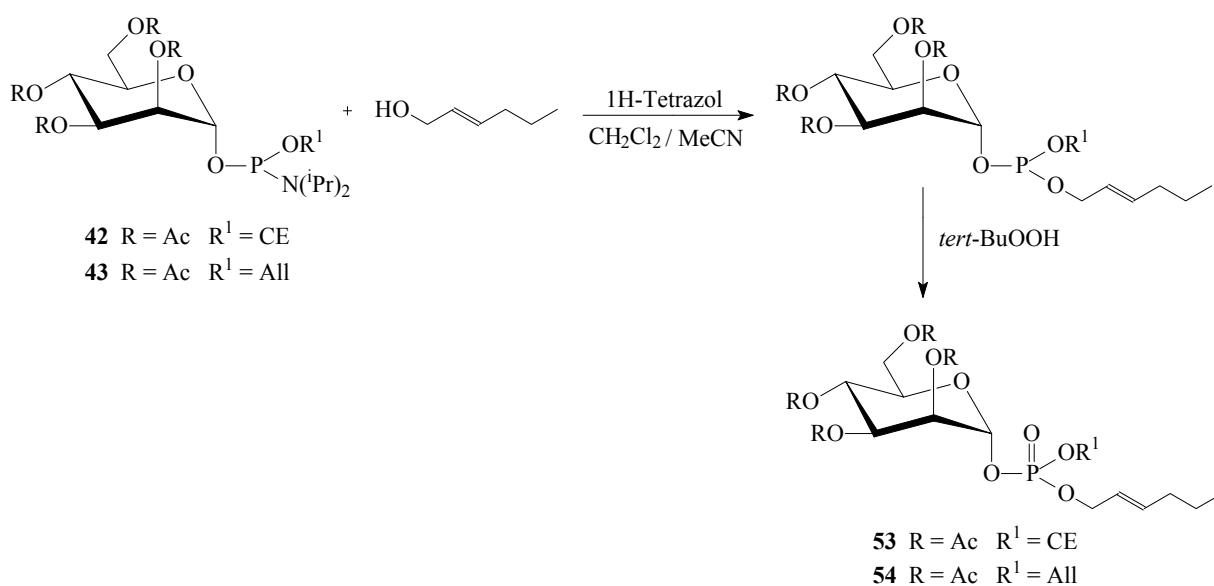


Abb. 36 Synthese acetylierter Mannose-1-Phosphate mit *trans*-2-Hexen-1-ol als lipophile Einheit
Beide Verbindungen liegen als Diastereomerengemische vor.

^1H -, ^{13}C -, ^{13}C -gated- und ^{31}P -NMR-Spektren zeigen die erwarteten Verschiebungen, Aufspaltungsmuster und Kopplungen für Phosphate. Beide Verbindungen liegen aus schon genannten Gründen als Diastereomerenpaare und anomerenrein als α -Anomere vor.

Es ist erfolgreich gelungen, potentiell membrangängige Mannose-1-Phosphat-Derivate nach der Phosphoramidit-Methode zu synthetisieren. Unter Verwendung unterschiedlich maskierter Mannosen-Derivate **7**, **8**, **9** und **10** und Einsatz von Cyanoethyl-, Allyl- und Trichlorethyl-Schutzgruppen konnte die Methodik des Reaktionsweges mit *trans*-2-Hexen-1-ol als lipophiler Modellsubstanz etabliert werden.

Es gilt nun, Farnesol und Phytol als eigentliche lipophile Einheiten im Syntheseweg einzusetzen. Die bifunktionalen Phosphoramidite **30**, **31** und **32** werden mit den beiden Alkoholen unter Aktivierung von 1*H*-Tetrazol umgesetzt. Es werden die asymmetrischen Diesterphosphoramidite **36**, **38** und **41** erhalten (Abb. 37). Die Ausbeuten liegen mit 26 %, 39 % und 45 % unter denen der Phosphoramidite **33**, **34** und **35**. Die Reinigung der Verbindungen ist säulenchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: Petrolether/Ethylacetat oder Diethylether/Pentan) möglich, gestaltet sich aber schwierig, da die dünnschichtchromatographische Kontrolle auf die Bildung mehrerer Reaktionsprodukte hinweist.

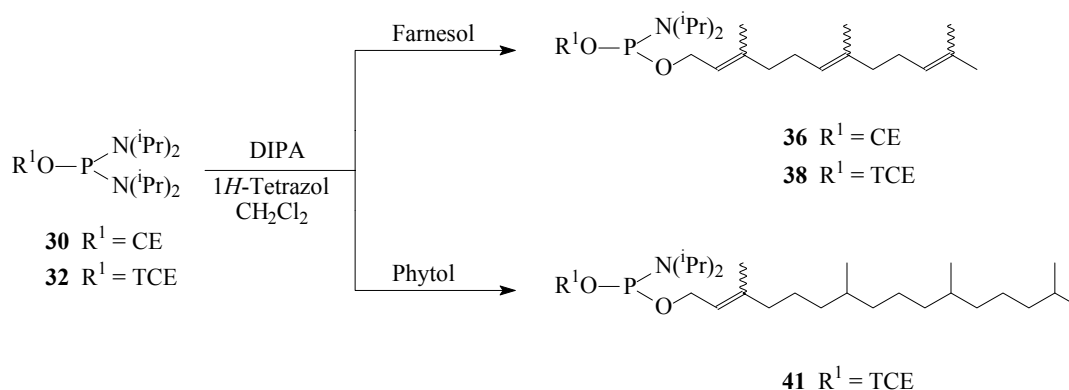


Abb. 37 Synthese substituierter *N,N*-Di-*iso*-propylphosphoramidite unter Verwendung von Farnesol und Phytol

Da Farnesol und Phytol als *cis-trans*-Stereoisomerengemische vorliegen, ist die NMR-spektroskopische Untersuchung kompliziert. Im ^1H - und ^{13}C -NMR sind die durch Phosphor verursachten typischen Aufspaltungen zu erkennen, die Bestimmung aller Kopplungskonstanten im Protonenspektrum ist jedoch durch das Auftreten vieler Multipletts erschwert. Die ^3J -Kopplungen im ^1H -NMR zeigen Werte zwischen 7 und 8 Hz. Im ^{13}C -NMR betragen die ^2J -Kopplungskonstanten ~ 18 Hz, die ^3J -Kopplungen sind 7 – 8 Hz groß. Im ^{31}P -NMR sind jeweils zwei Signale im Bereich 149 – 152 ppm zu beobachten. Des weiteren kann anhand von MALDI-TOF-Massenspektren eindeutig das Vorhandensein der gewünschten Phosphoramidite nachgewiesen werden.

Bei der Darstellung der Phosphoramidite **38** und **41** kann neben dem entsprechenden Alkohol als Edukt auch ein H-Phosphonat-Diester als Nebenprodukt abgetrennt und identifiziert werden (Abb. 38).

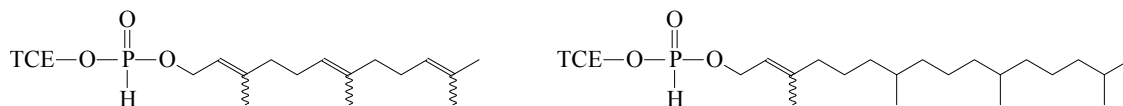


Abb. 38 H-Phosphonat-Diester als Nebenprodukt der Synthese substituierter *N,N*-Di-*iso*-propylphosphoramidite unter Verwendung von Farnesol und Phytol

Um die Ursache für die Bildung des H-Phosphonat-Diesters zu erklären, sind zunächst einige Erläuterungen über H-Phosphonate notwendig.¹²² Phosphonate sind Salze und Ester der Phosphonsäure $\text{HP}(\text{O})(\text{OH})_2$, die das Tautomer der Phosphorigen Säure $\text{P}(\text{OH})_3$ ist. Die Salze und Ester der Phosphorigen Säure heißen Phosphite, wobei die Mono- und Diphosphite wegen des tautomeren Gleichgewichtes als Phosphonate vorliegen. Phosphonate sind durch eine P-H-Bindung und ein fehlendes Elektronenpaar am Phosphor gekennzeichnet (Abb. 39).

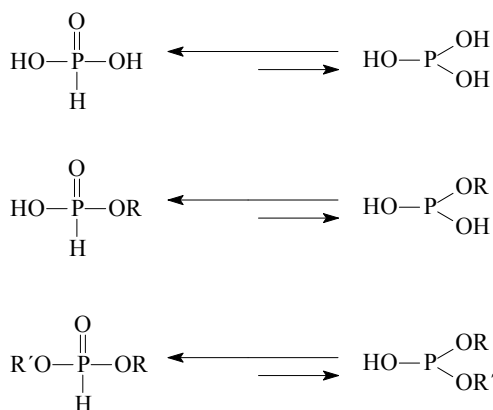


Abb. 39 Tautomeres Gleichgewicht der Phosphorigen Säure und ihrer Mono- und Diester.

Im Verlauf der Synthese kann es zu einer teilweisen Hydrolyse des Bis-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidites **32** kommen. Unter Verlust einer Aminfunktion bildet sich ein Mono-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit, das zum entsprechenden H-Phosphonat tautomerisiert (Abb. 40). Durch nachfolgende Kupplung mit einem Alkohol ist der H-Phosphonat-Diester entstanden.

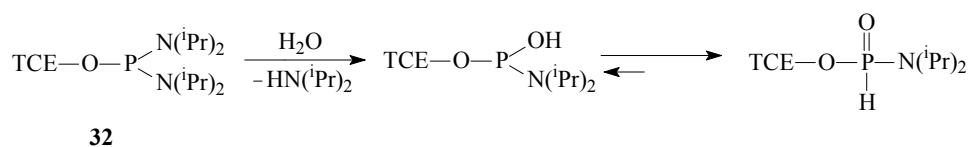


Abb. 40 H-Phosponat-Bildung bei Bis-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramiditen

Der H-Phosponat-Diester zeigt bei der NMR-spektroskopischen Untersuchung charakteristische Merkmale. So ist im ^1H -NMR eine direkte Kopplung von Wasserstoff zu Phosphor zu sehen ($^1J_{\text{P-H}} = 646 \text{ Hz}$). Das ^{31}P -NMR zeigt eine chemische Verschiebungen von 15.6 ppm, die für diese Spezies charakteristisch sind.

Bei der Reaktion des allylierten Phosphoramidits **31** mit Farnesol und Phytol können die erwarteten Produkte, trotz gleicher Reaktionsbedingungen, nicht erhalten werden (Abb. 41). Es ist nicht möglich, aus den entstandenen Produktgemischen eine Phosphor enthaltende Substanz zu identifizieren. Auch die Bildung eines H-Phosponat-Diesters kann NMR-spektroskopisch nicht nachgewiesen werden. Farnesol und Phytol können sauber zurückgewonnen werden. Eine denkbare Zersetzung des Phosphoramidit-Reagenzes ließ sich NMR-spektroskopisch nicht belegen, so daß die Ursache unklar bleibt.

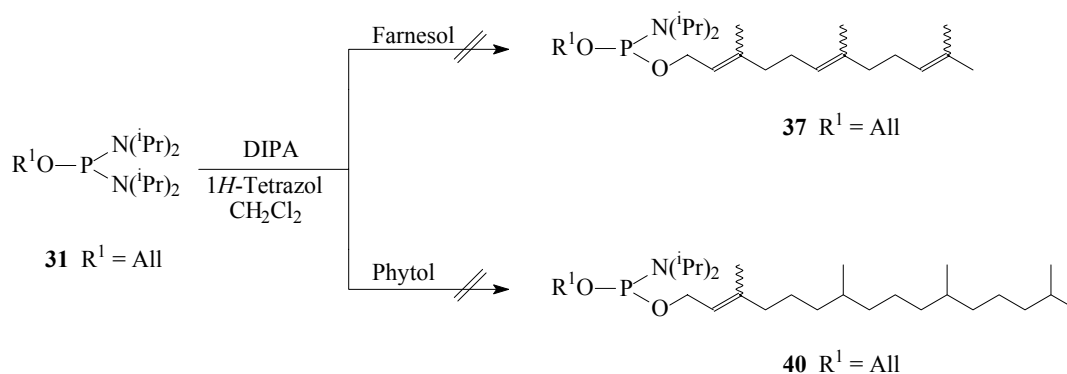


Abb. 41 Versuch der Synthese allylierter *N,N*-Di-*iso*-propylphosphoramidite unter Verwendung von Farnesol und Phytol

Auch die Umsetzung des bifunktionalen Phosphoramidit-Reagenzes **30** mit Phytol liefert nicht das gewünschte Produkt. Stattdessen kann jedoch ein H-Phosphonatester in allerdings minimaler Ausbeute von 6 % isoliert werden (Abb. 42).

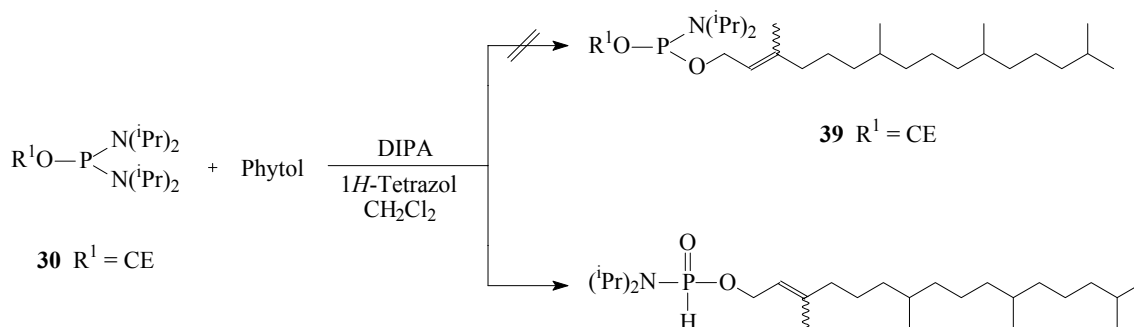


Abb. 42 H-Phosphonat-Bildung bei der Synthese von cyanoethyliertem *N,N*-Di-*iso*-propylphosphoramidit unter Verwendung von Phytol

Besonderheit dieser Verbindung ist, daß neben Phytol noch eine Aminfunktion vorliegt. Es muß also zunächst zur Abspaltung der Cyanoethyl-Gruppe gekommen sein. Das erhaltene Bis-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit tautomerisiert analog einem Diphosphit (Abb. 43). Die erhaltene Komponente reagiert dann weiter mit Phytol zum H-Phosphonatester (Abb. 42). Diese Struktur wird durch NMR-spektroskopische Untersuchungen bestätigt. Im ^1H -NMR ist deutlich das charakteristische Dublett der P-H-Bindung zu erkennen ($\delta = 6.9$ ppm, $^1J_{\text{P,H}} = 627.9$ Hz). Im ^{31}P -NMR ist ein Signal mit der chemischen Verschiebung $\delta = 13.6$ ppm sichtbar. Sowohl im ^1H - und im ^{13}C -NMR treten keine Signale der Cyanoethyl-Gruppe auf, es sind jedoch eindeutig die *iso*-Propyl-Gruppen der Aminfunktion zuzuordnen. Außerdem wird das Vorliegen der genannten Verbindung durch ein MALDI-TOF-Spektrum bestätigt, in dem die Signale $(\text{M}+\text{Na})^+$ bei $m/z = 467$ und $(\text{M}+\text{K})^+$ bei $m/z = 483$ zu identifizieren sind.

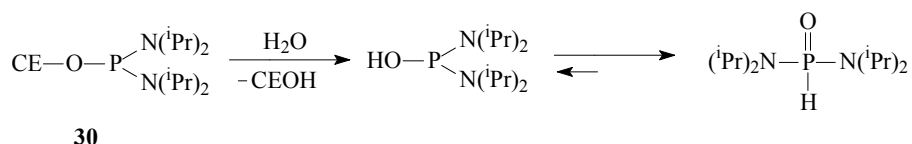


Abb. 43 Besonderheiten bei H-Phosphonat-Bildung bei Bis-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramiditen

Die synthetisch zugänglichen asymmetrischen Phosphoramidite **36**, **38** und **41** werden anschließend in Kupplungsreaktionen mit unterschiedlich geschützten Mannose-Derivaten mit freier anomerer OH-Gruppe eingesetzt. Die Phosphorylierungsreaktion wird analog zur Darstellung der dibenzylgeschützten Phosphate (Kap. 3.2.) durchgeführt. Nach Aktivierung durch 1*H*-Tetrazol wird ein Triphosphit gebildet, das *in situ* mit 3-Chlorperbenzoesäure zum Triphosphat oxidiert wird.

Zunächst wird die butyrylierte Mannose **7** mit den drei Phosphoramidit-Reagenzien zur Reaktion gebracht. In einer Ausbeute von 15 % und 37 % werden ausgehend von **38** und **41** die Phosphate **56** und **57** erhalten. Trotz gleicher Reaktionsbedingungen führt die Reaktion von Verbindung **7** mit dem Phosphoramidit **36** zu keiner Produktbildung (Abb. 44). Wie schon bei der Darstellung der Phosphoramidit-Reagenzien gestaltet sich die säulenchromatographische Trennung schwierig, da wiederum laut dünnschichtchromatographischer Kontrolle ein komplexes Produktgemisch entstanden ist. Neben der Identifizierung des jeweiligen Produkts gelingt nur die des Kohlenhydratedukts. Allen bis zu vier weiteren abgetrennten Fraktionen kann keine Struktur zugeordnet werden.

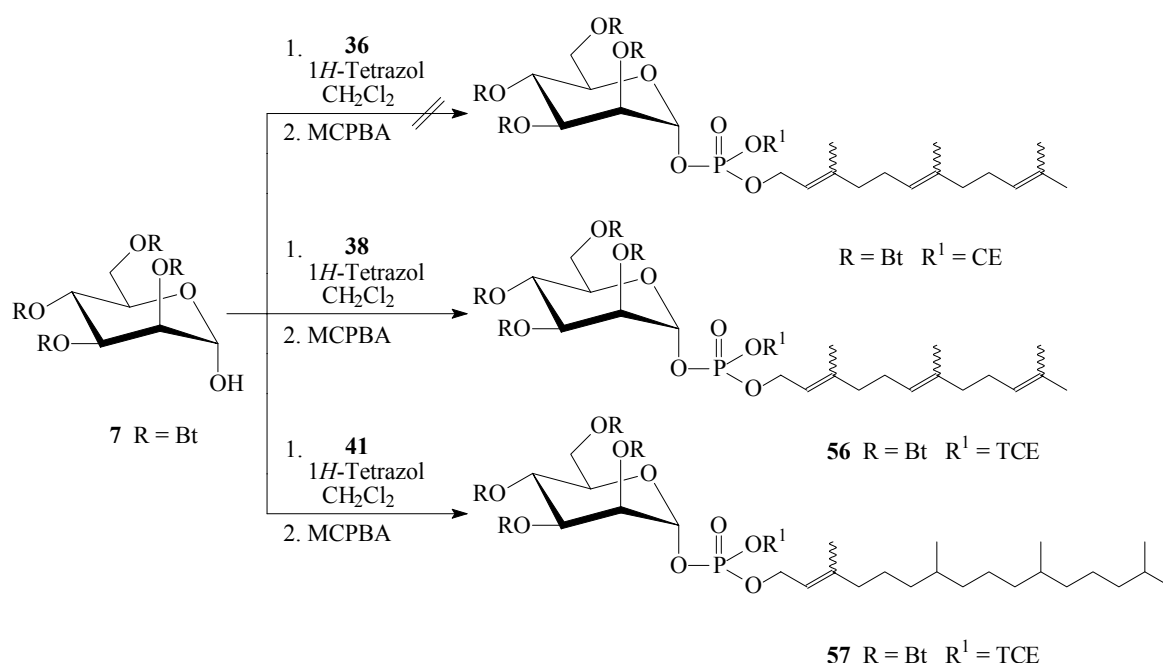


Abb. 44 Synthese butyrylierter Mannose-1-Phosphate mit Farnesol und Phytol als lipophile Einheit. Die Verbindungen liegen als Diastereomerengemische vor.

Erste Informationen über das Vorhandensein des gewünschten Produkts sind zunächst aus einem MALDI-TOF-Spektrum erhältlich, da auch die NMR-spektroskopische Auswertung des Produkts wegen des Auftretens vieler Multipletts die Bestimmung der Kopplungskonstanten erschwert. Nur bei Verbindung **56** kann die $^3J_{\text{H-1,P}}$ -Kopplungskonstante mit einer Größe von 5.9 Hz aus dem ^1H -NMR bestimmt werden. Im ^{13}C -NMR sind ebenfalls die durch Phosphor verursachten zusätzlichen Aufspaltungen sichtbar. Neben C-1 ($^2J_{\text{C-1,P}} \approx 6 - 7$ Hz) und C-2 ($^3J_{\text{C-2,P}} \approx 11$ Hz) sind auch die in Nachbarschaft befindlichen C-Atome der lipophilen Einheit und der Phosphatschutzgruppe aufgespalten (Kap. 6.3.). Neben der Diastereoisomerie aufgrund des Triphosphats mit drei verschiedenen Substituenten kommt es durch die cis-trans-Isomerie bei Farnesol und Phytol zu weiterer Isomerenbildung. Dies spiegelt sich im Auftreten mehrerer Signale im ^{31}P -NMR wider. Die chemischen Verschiebungen liegen im Bereich von -3.8 ppm bis -5.4 ppm. Anhand der ^{13}C -gated-Spektren läßt sich zeigen, daß beide Verbindungen als α -Anomere mit Kopplungskonstanten $^1J_{\text{C-1,H-1}} \approx 182 - 185$ Hz vorliegen.

Nachfolgend wird nun die pivaloylierte Verbindung **8** mit den Phosphoramidit-Reagenzien **36** und **41** umgesetzt. Es kann das Phosphat **58** in 14 % Ausbeute isoliert werden. Die Reaktion des Phosphoramidits **36** führt erneut trotz gleicher Reaktionsbedingungen zu keiner Produktbildung (Abb. 45).

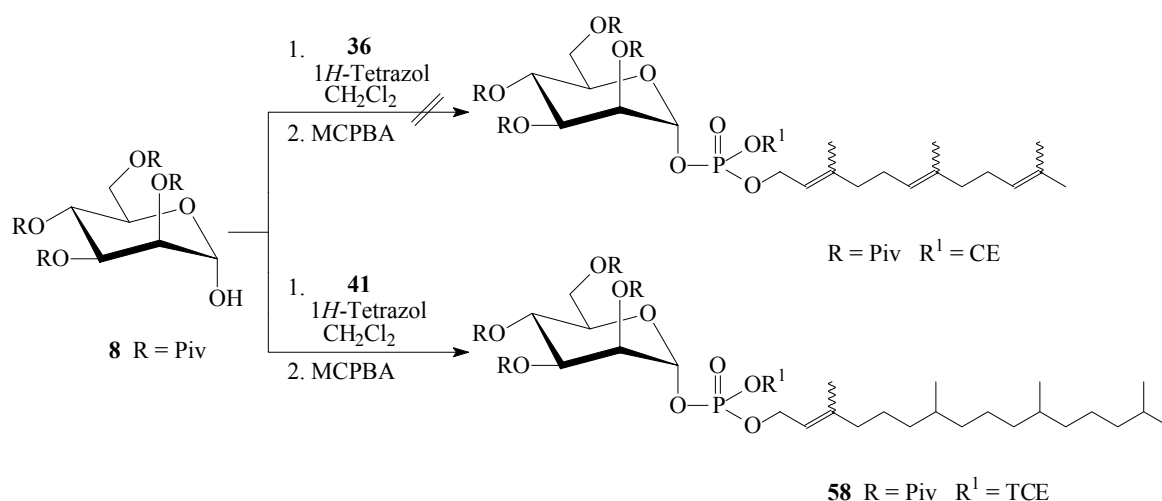


Abb. 45 Synthese pivaloylierter Mannose-1-Phosphate mit Farnesol und Phytol als lipophile Einheit. Die Verbindung **58** liegt als Diastereomerengemisch vor.

Alternativ wird nun das Kohlenhydrat-Amidit **43** verwendet und mit den Alkoholen Farnesol und Phytol zur Reaktion gebracht. Die Reaktionsbedingungen bleiben unverändert, d. h. es wird mit 1*H*-Tetrazol aktiviert und das erhaltene Triphosphit *in situ* mit 3-Chlorperbenzoesäure zum Triphosphat oxidiert. Leider kann auch bei diesen Reaktionen kein derivatisiertes Mannose-1-Phosphat erhalten werden (Abb. 47).

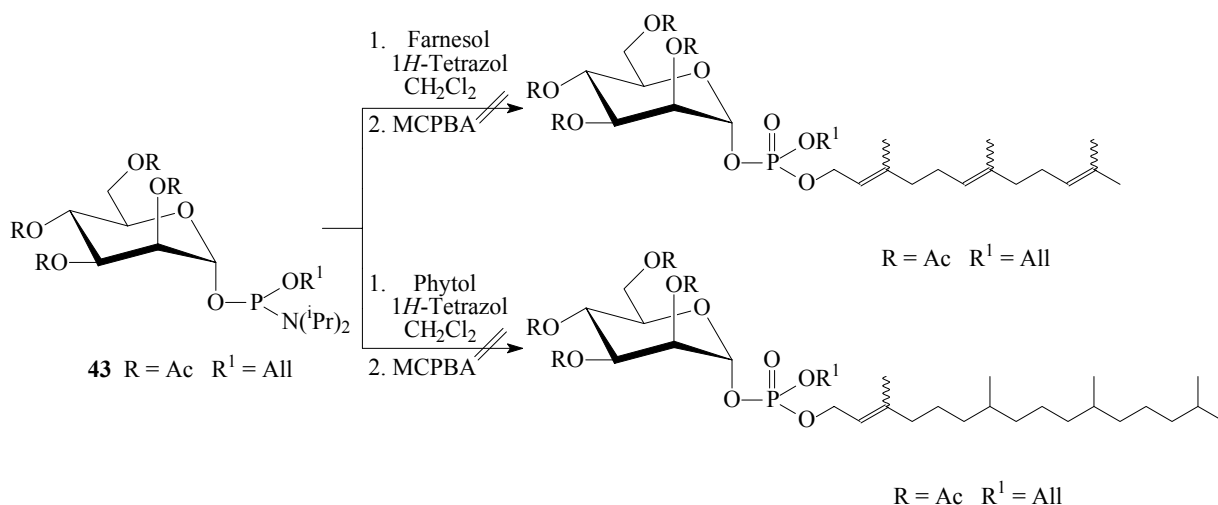


Abb. 47 Versuch der Synthese acetylierter Mannose-1-Phosphate mit Farnesol und Phytol als lipophile Einheit

Es liegt wiederum ein sehr komplexes Produktgemisch vor, aus dem der entsprechende Alkohol und eine weitere Komponente abgetrennt werden können, die als ein H-Phosphonat identifiziert ist. Diese Verbindung zeigt im ^{31}P -NMR eine chemische Verschiebung $\delta = 9$ ppm und die typische P-H-Aufspaltung ($^1J_{\text{P,H}} = 620$ Hz). Dieses H-Phosphonat enthält jedoch keine Kohlenhydratstrukturen mehr.

Abschließend läßt sich sagen, daß die Synthese von membrangängigen Mannose-1-Phosphaten nach der Phosphoramidit-Methode mit Farnesol und Phytol in drei Fällen gelungen ist. Isolierung und Identifizierung der jeweiligen Produkte ist nicht unproblematisch. Die bei der Synthese der dibenzylgeschützten Phosphate **11** – **14** und der mit Hexenol derivatisierten Mannose-1-Phosphate **44** – **55** äußerst effiziente Phosphorylierungsmethode hat sich bei Verwendung von Farnesol und Phytol als lipophile Einheit als nicht sehr wertvoll erwiesen. Die Bildung komplexer Reaktionsgemische und auch die mangelnde Stabilität der Phosphatgruppe während der Oxidation hat sich als nachteilig gezeigt. Die Methodik ist also nicht ohne weiteres übertragbar.

Trotzdem wird versucht, aus den synthetisierten Mannose-1-Phosphaten mit Hexenol, Farnesol und Phytol als lipophile Einheit die entsprechenden Phosphorsäurediester als Zielmolekül zu erhalten. Es soll nun die durch eine Schutzgruppe blockierte Position wieder freigesetzt werden. Aus der Vielzahl der zur Entschützung möglichen Methoden werden die

folgenden Prozeduren ausgewählt und exemplarisch an den mit Hexenol derivatisierten Phosphaten **47**, **45** und **55** getestet.

Zur Abspaltung der 2-Cyanoethyl-Gruppe aus Verbindung **47** wird mit Triethylamin umgesetzt (pH = 8),⁹⁸ wobei jedoch kein Produkt identifiziert werden konnte (Abb. 48).

Die Allyl-Funktion soll nach einer von Ogawa *et al.* verwendeten Methode erfolgen.¹²³ Verbindung **45** wird mit Palladiumchlorid/Natriumacetat/Essigsäure zur Reaktion gebracht. Hierbei kommt es laut Dünnschichtchromatographie zur Bildung von freier Mannose. Als Ursache hierfür kann der saure pH-Wert angesehen werden (Abb. 48).

Die 2, 2, 2-Trichlorethyl-Schutzgruppe ist in der Vergangenheit üblicherweise durch Zink oder ein Zink-Kupfer-Paar in einer reduktiven Eliminierung entfernt worden.^{124,125} Diese klassische Methode wird nun bei Verbindung **55** eingesetzt. Die Substanz wird mit Zink-Kupfer-Paar¹²⁶ in DMF als Lösungsmittel zur Reaktion gebracht. Es kann jedoch auch nach erneuter Zugabe von Zink-Kupfer-Paar keine Umsetzung beobachtet werden (Abb. 48). Da es sich um einen heterogenen Prozess handelt, können viele Faktoren verantwortlich sein. Es ist möglich, daß die Oberfläche des Zinks nicht reaktiv genug ist oder auch durch Salzbildung verunreinigt wird.

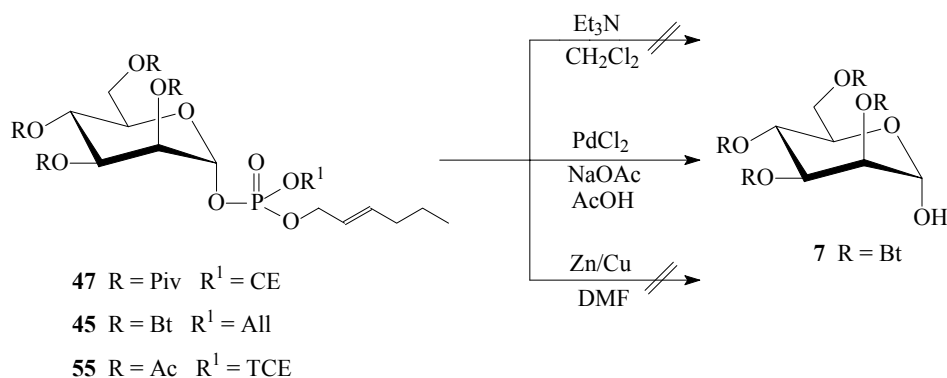


Abb. 48 Erfolgreiche Entschützungsversuche

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß neben der Verbesserung der Synthese der mit Farnesol und Phytol derivatisierten Mannose-1-Phosphate eine Optimierung der Methoden zur Entschützung anzustreben ist.

4.3. Untersuchungen zur Anwendung der H-Phosphonat-Methode

Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung lipophiler Mannose-1-Phosphat-Derivate stellt die 1986 von van Boom *et al.*⁸⁰ eingeführte H-Phosphonat-Methode dar, auf die hier jedoch nur kurz eingegangen wird. Charakteristisches Merkmal dieser Synthese ist das Durchlaufen einer als H-Phosphonat bezeichneten P(III)-Verbindung (Kap. 4.2., Abb. 39), die anschließend zum Phosphat oxidiert wird. Erfolgreiche Anwendung hat diese Methode in der Synthese von Oligosacchariden gefunden, die glycosidisch über eine Phosphatbindung verknüpft sind (Abb. 17).^{127,128} Die Verknüpfung ist als Phosphordiester-Brücke realisiert. Ein Vorteil dieses Synthesekonzeptes wäre demzufolge, daß die Mannose-1-Phosphat-Derivate direkt als Phosphorsäurediester ohne zusätzliche Entfernung einer Schutzgruppe zugänglich sind.

Die Mannose-Derivate **7** und **9** mit einer freien anomeren Hydroxy-Funktion reagieren mit Tris-imidazolylphosphin, welches *in situ* aus Phosphortrichlorid, Imidazol und Triethylamin gebildet wird, unter nachfolgender Hydrolyse mit Triethylammoniumhydrogencarbonat (TEAB) zu den Mannosyl-H-Phosphonaten **59** und **60** in einer Ausbeute von 66 % und 67 % (Abb. 49). Die NMR-spektroskopischen Daten sind typisch für H-Phosphonat-Monoester. Im ¹H-NMR ist eine direkte Kopplung zwischen Wasserstoff und Phosphor zu erkennen (¹J_{P,H} ≈ 639 Hz). Das Proton ist bei einer chemischen Verschiebung von δ = 7.00 ppm zu einem Dublett aufgespalten. Das H-1 liegt durch die Nachbarschaft zum Phosphor als dd-System vor (³J_{H-1,P} ≈ 9 Hz). Auch im ¹³C-NMR sind zusätzliche Aufspaltungen von C-1 und C-2 sichtbar (²J_{C-1,P} ≈ 4 Hz und ³J_{C-2,P} ≈ 8 Hz). Das ³¹P-NMR zeigt eine ebenfalls charakteristische chemische Verschiebung, zwei Signale liegen jeweils im Bereich von 1.6 ppm. Anhand des ¹³C-gated-Spektrums läßt sich zeigen, daß beide Verbindungen als α-Anomere vorliegen. Die Kopplungskonstanten ¹J_{C-1,H-1} zeigen Werte von ~ 174 Hz. Ein H-Phosphonat-Monoester der acetylierten Mannose **10** ist nicht zugänglich, da sich die Substanz unter Hydrolyse mit TEAB zersetzte.

Nachfolgende Kondensation dieser H-Phosphonat-Monoester mit *trans*-2-Hexen-1-ol als lipophile Einheit soll die gewünschten H-Phosphonat-Diester liefern. Die Aktivierung erfolgt mit Pivaloylchlorid, wodurch ein reaktives gemischtes Anhydrid erzeugt wird, das nucleophil vom Alkohol angegriffen wird. Die resultierenden H-Phosphonat-Diester sollen *in situ* mit Iod in einem Pyridin-Wasser-Gemisch zu den Phosphorsäurediestern oxidiert werden (Abb. 49).

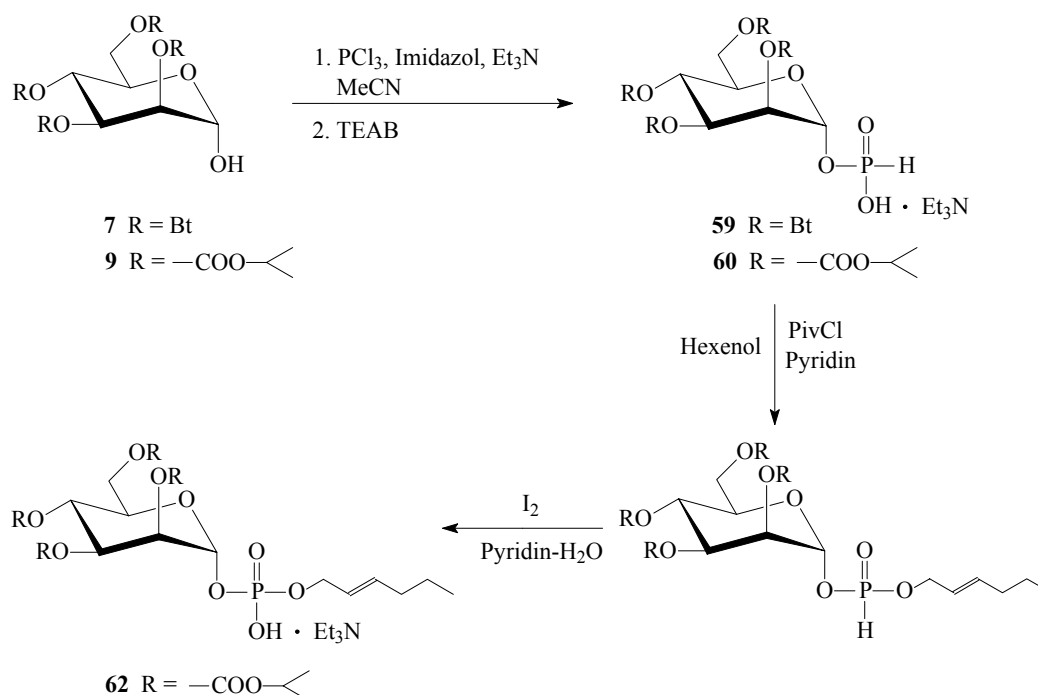


Abb. 49 Synthese verschiedener Mannose-1-Phosphate mit *trans*-2-Hexen-1-ol als lipophile Einheit über H-Phosphonat-Intermediate

Obwohl die Kupplungsreaktion in der Literatur^{127,128} als schnell und in hohen Ausbeuten ablaufend beschrieben wird, ist es nur für Verbindung **60** gelungen, den entsprechenden Phosphorsäurediester **62** in 21 % Ausbeute zu erhalten. NMR-spektroskopische Untersuchungen belegen die Umsetzung des H-Phosphonat-Monoesters. Die P-H-Kopplung ist weder im ^1H - noch im ^{31}P -NMR mehr sichtbar. Die Signale des einzuführenden Alkohols *trans*-2-Hexen-1-ol sind jedoch zu identifizieren. Daß es sich beim Produkt um das Oxidationsprodukt handelt, zeigen die Signale im ^{31}P -NMR. Neben dem Hauptsignal bei -4.03 ppm, das charakteristisch für Phosphate ist, sind auch einige kleinere Signale zu erkennen ($\delta \approx -2$, -5 und -9 ppm), die ohne Zuordnung auch in der Literatur¹²⁷ erwähnt worden sind. Bei der Umsetzung der Verbindung **59** kann statt des gewünschten Reaktionsproduktes nur das Mannose-1-Phosphat **15** in Form des Triethylammoniumsalzes

isoliert werden. Auch hier zeigen die NMR-Spektren, daß der H-Phosphonat-Monoester umgesetzt wurde. Signale des Alkoholes sind nicht erkennbar. Die chemischen Verschiebungen im ^{31}P -NMR sagen aus, daß es sich um ein Phosphat handelt ($\delta = -3.88$ ppm). Die Durchführung der letzten Reaktionssequenz erweist sich also als nicht unproblematisch. Auch der mehrmalige Versuch, Phytol als lipophile Einheit einzuführen schlägt fehl.

Verbesserung bei der Kupplung zum H-Phosphonat-Diester durch Einsatz neuer Katalysatoren und die Optimierung der Reaktionsbedingungen während der Oxidation sind im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt worden.

5. Zusammenfassung

Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) sind angeborene Stoffwechselerkrankungen, deren Ursache in einer Störung der Biosynthese der Glycoproteine liegt. Enzymdefekte innerhalb der Synthese führen zu einer allgemeinen Hypoglycosylierung unterschiedlicher Glycoproteine. Die verschiedenen CDG-Typen werden nach der intrazellulären Lokalisierung des Enzymdefektes eingeteilt. CDG-Ia ist der am längsten bekannte und am häufigsten diagnostizierte Typ. Bei dieser Erkrankung liegt eine Defizienz des Enzyms Phosphomannomutase 2 (PMM 2) vor. Als Folge ist die Umwandlung von Mannose-6-Phosphat in Mannose-1-Phosphat und damit die Synthese von GDP-Mannose, dem wichtigsten Mannose-Donor innerhalb der Glycoproteinsynthese, gestört. Eine Therapie dieser Erkrankung wäre durch Applikation von Mannose-1-Phosphat möglich, das aber aufgrund seiner Polarität und den daraus resultierenden hydrophilen Eigenschaften nicht in der Lage ist, durch die Membran in die Zelle zu penetrieren und dementsprechend in membrangängige Derivate umgewandelt werden soll.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden lipophile Derivate von Mannose-1-Phosphat unter Einsatz bioaktiver Phosphatschutzgruppen synthetisiert. Ausgehend von durch Ester und Carbonate geschützten Mannose-Bausteinen (**7**, **8**, **9** und **10**) wurde die Phosphat-Funktion nach der Phosphoramidit-Methode in das Molekül eingeführt. Anschließende Maskierung der Phosphatgruppe mit Acetoxymethyl- (AM) und Pivaloyloxymethyl-(POM)-Funktionen als biologisch reversiblen Schutzgruppen lieferte die gewünschten, potentiell membrangängigen Mannose-1-Phosphat-Derivate (**19** – **26**).

Nach Durchtritt dieser Phosphorsäuretriester durch die Zellmembran soll der ursprüngliche Phosphorsäuremonoester durch enzymatische Spaltung der bioaktiven Phosphatschutzgruppen zurückgebildet werden. Die Ester-Funktionen am Kohlenhydrat sollen hierbei in gleicher Weise geöffnet werden, die Abspaltung der Carbonate erfolgt bei physiologischen pH-Wert auf chemischem Wege. In einer ersten Studie der Verbindung **19** wurde der enzymatische Abbau der Fettlöslichkeit vermittelnden Schutzgruppen überprüft. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl die bioaktiven Phosphatschutzgruppen als auch die Butyryl-Funktionen am Kohlenhydrat enzymatisch abgespalten werden, so daß Mannose-1-Phosphat als Zielmolekül zugänglich wird.

Des weiteren wurden die synthetisierten Substanzen in *in vitro* Tests an menschlichen Fibroblasten eingesetzt. Hierbei wird nachgewiesen, ob die Verbindungen in der Lage sind, sich am Aufbau der für die Glycoproteinsynthese notwendigen Oligosaccharidstrukturen zu beteiligen. Die Verbindungen **25** und **26** zeigten eine überragende biologische Aktivität. Nach ihrer Zugabe kam es zu einem vollständigen Aufbau der Oligosaccharideinheiten. Auch Verbindung **19** zeigte einen positiven Effekt, denn es kam zu einer teilweisen Korrektur. Die anderen Verbindungen zeigten keinen Effekt oder ein zu geringes Löslichkeitsverhalten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Mannose-1-Phosphat-Derivate synthetisiert, die *trans*-2-Hexen-1-ol, Farnesol oder Phytol als lipophile Einheit tragen. Es kamen wiederum die Mannose-Akzeptoren (**7**, **8**, **9** und **10**) zum Einsatz. Unter Anwendung der Phosphoramidit-Methode wurden die zuvor aus Hexenol als lipophile Modellschubstanz mit den Schutzgruppen 2-Cyanoethyl (CE), Allyl (All) oder 2,2,2-Trichlorethyl (TCE) synthetisierten Phosphoramidit-Reagenzien mit den Kohlenhydrat-Bausteinen zu den entsprechenden Phosphorsäuretriester **44** - **55** verknüpft. Die Synthese der Phosphoramidit-Reagenzien mit Farnesol und Phytol als lipophile Einheit gelang nicht in allen Fällen, ebenso wie die zugehörigen Kupplungsreaktionen. Versuche zur Entfernung der Schutzgruppen wurden durchgeführt. Ein alternativer Weg zur Synthese von Mannose-1-Phosphat-Derivaten wurde mit der H-Phosphonat-Methode beschritten, wobei H-Phosphonat-Monoester mit unterschiedlich geschützten Kohlenhydrat-Bausteinen und ein Phosphorsäurediester synthetisiert wurden.

5. Summary

Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) are metabolic diseases caused by a congenital defect in the biosynthesis of glycoproteins. Defective enzymes participating in the biosynthesis lead to hypoglycosylation of various glycoproteins. The different CDG types have been categorised according to the location of the enzyme defect. CDG-Ia was the first CDG type to be recognised, and is also the most commonly diagnosed variation. In CDG-Ia, patients suffer from a deficiency of the enzyme phosphomannomutase 2. This results in disturbance of the transformation of mannose-6-phosphate into mannose-1-phosphate, which impedes the biosynthesis of GDP-mannose, the most important mannose donor involved in glycoprotein synthesis. Treatment of CDG-Ia patients with mannose-1-phosphate would potentially inhibit the disease, however, the polarity of mannose-1-phosphate and its hydrophilic nature prevent this compound from penetrating the cell membrane. Hence, mannose-1-phosphate must be transformed into a membrane-permeant derivative.

In the first part of this work, lipophilic derivatives of mannose-1-phosphate with bioactive phosphate protecting groups were synthesised. Beginning with the mannose building blocks **7**, **8**, **9** and **10**, protected as esters and carbonates, the phosphate function was introduced via the phosphoramidite method. Subsequent masking of the phosphate group with acetoxymethyl (AM) and pivaloyloxymethyl (POM) groups, which served as biologically reversible protecting groups, delivered the desired potentially membrane-permeant mannose-1-phosphate derivatives (**19** - **26**).

It was hoped that after these phosphoric acid triesters had crossed the cell membrane, the original phosphoric acid monoester would be reformed by enzymatic cleavage of the biologically active protecting groups. The ester function on the carbohydrate should ideally also be released enzymatically, with the cleavage of the carbonate occurring chemically at physiological pH. In an initial investigation of compound **19**, the enzymatic degradation of the protecting groups which result in fat solubility was tested. It could be shown that the bioactive phosphate protecting group and also the carbohydrate butyryl function could be cleaved enzymatically, giving the target molecule mannose-1-phosphate.

In addition, compounds **19** – **20** were tested *in vitro* in human fibroblasts. These experiments were designed to show whether or not the compounds are able to be used in the biosynthesis of the necessary oligosaccharide structures. Compounds **25** and **26** exhibited outstanding biological activity. Treatment of the human fibroblasts with these compounds lead to complete and normal oligosaccharide synthesis. Compound **19** also had a positive effect, resulting in partial correction of the defective biosynthesis. The remaining compounds either demonstrated solubility problems or had no effect.

In the second part of this work, mannose-1-phosphate derivatives with hexenol, farnesol or phytol as lipophilic units were synthesised. The mannose acceptors **7**, **8**, **9** and **10** were employed again. The phosphoramidite reagents with hexenol as the lipophilic model substance and one protecting group (2-cyanoethyl, allyl or 2,2,2-trichloroethyl) were synthesised for application to the phosphoramidite method, giving the corresponding phosphoric acid triesters **44** – **55**. The synthesis of phosphoramidite reagents with farnesol and phytol as the lipophilic moiety were not successful in all cases, nor were the subsequent coupling reactions. Attempts to remove the protecting groups were made. An alternative synthetic pathway to mannose-1-phosphate derivatives, involving the H-phosphonate method, was investigated. H-Phosphonate monoesters with various protected carbohydrate building blocks and a phosphoric acid diester could be synthesised.

6. Experimenteller Teil

6.1. Allgemeine Methoden

Alle Reaktionen wurden dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel-Fertigfolien (Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck) verfolgt. Die Detektion erfolgte durch UV-Absorption sowie durch Besprühen mit 10 %iger ethanolischer Schwefelsäure mit anschließender Wärmebehandlung.

Die säulenchromatographischen Trennungen wurden an Kieselgel 60 (230 – 400 mesh, Korngröße 0.040 – 0.063 nm, Merck) nach dem Flash-Verfahren bei einem Überdruck von 0.2 – 0.4 bar durchgeführt. Es wurden stets destillierte Lösungsmittel verwendet.

Die NMR-Spektren wurden mit den Bruker-Spektrometern AMX-400 (¹H: 400 MHz, ¹³C: 100.62 MHz), DRX-500 (¹H: 500 MHz, ¹³C: 125.77 MHz, ³¹P: 202.46 MHz) und AC-250 (³¹P: 101.26 MHz) aufgenommen. Als interner Standard für ¹H- und ¹³C-Spektroskopie bei Messungen in CDCl₃ diente Tetramethylsilan (δ = 0.00 ppm), bei Messungen in D₂O wurde Aceton (δ = 2.22 ppm) zugesetzt. Spektren in MeOD wurden auf die Lösungsmittelpeaks (δ = 3.31 bzw. 4.79 ppm) geeicht. Bei ³¹P-Spektroskopie wurde 85 %ige Phosphorsäure als externer Standard genutzt. Zur eindeutigen Zuordnung der Signale wurden ¹H¹H-COSY-, ¹H¹³C-HMQC- und HMBC-Experimente durchgeführt. Die Bestimmung der Anomerität bei Mannopyranosiden gelang mit ¹³C-gated-Spektren.

MALDI-TOF-Massenspektren wurden an einem Bruker Biflex III im *positive reflector mode* aufgenommen. Als Matrices dienten DHB (2,5-Dihydroxybenzoesäure) oder *nor*-Harmarn. ESI-Massenspektren wurden an einem Hewlett-Packard-Gerät bestehend aus Elektrospray LC/MS Interface und MS Engine Massenspektrometer im *positive mode* gemessen.

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Schmelzpunktbestimmungsgerät ST-apotec gemessen und sind unkorrigiert. Die optischen Drehwerte wurden mit einem Perkin-Elmer Polarimeter 341 (Natrium-D-Linie: 589 nm, Küvettenlänge: 1 dm) bestimmt. Elementaranalysen wurden in der Abteilung Zentrale Elementanalytik des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg durchgeführt. Für Druckhydrierungen wurde ein Berghof-Maasen Laborautoklav verwendet. Die Trocknung der Lösungsmittel erfolgte nach gängigen Labormethoden.

Phytol und Farnesol wurden destilliert und liegen als *cis-trans*-Stereoisomerengemische vor. Mannopyranosylphosphate sind anomenenrein. Bei verschiedenen Schutzgruppen am Phosphat ergeben sich Diastereoisomerengemische, ebenso bei allen Verbindungen mit Farnesol oder Phytol. In diesem Fall wurde keine Drehwertbestimmung vorgenommen.

6.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: Katalytische Hydrierung

a) Normaldruck

Die zu hydrierende Verbindung wird in etwas Ethylacetat gelöst, vorsichtig mit Pd/C-Katalysator (10 %) und anschließend mit trockenem Methanol versetzt. Es wird bei Raumtemperatur und Normaldruck unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Zur Aufarbeitung wird über Celite filtriert und der Ansatz unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt. Eventuell erforderliche Reinigung erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel.

b) Hochdruck

Das zu hydrierende Mannopyranosylphosphat wird im Lösungsmittelgemisch Ethylacetat/Methanol/Wasser (1 : 2 : 1) gelöst und vorsichtig mit Pd/C-Katalysator (10 %) versetzt. Die Suspension wird im Autoklaven unter Rühren dreimal mit Stickstoff (5 bar) gespült. Anschließend wird der Reaktionsansatz unter Wasserstoffatmosphäre (50 bar) bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird der Katalysator über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgetrennt und gegebenenfalls lyophilisiert. Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt.

AAV 2: Phosphitylierung von Man-1-OH mit unterschiedlich substituierten *N,N*-Di-*iso*-propylphosphoramiditen und anschließender Oxidation

Unter Argon-Schutzatmosphäre werden 5 Äquivalente 1*H*-Tetrazol in trockenem Dichlormethan suspendiert. Nach Zugabe von 2.5 Äquivalenten Phosphoramidit wird die Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird 1 Äquivalent der 1-OH-freien Verbindung, gelöst in trockenem Dichlormethan, zugetropft. Der Reaktionsansatz wird für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt bis die Umsetzung laut dünnschichtchromatographischer Kontrolle vollständig ist. Die Lösung wird dann auf 0 °C abgekühlt und mit 3 Äquivalenten 3-Chlorperbenzoesäure versetzt. Es wird für 1 Stunde bei

0 °C gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

AAV 3: Darstellung von Bis-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramiditen aus Phosphordichloriditen

Alle Arbeiten werden unter Luftausschluß (Schlenck-Bedingungen) durchgeführt. Zu einer 0.1–0.5 M Lösung des Phosphordichloridits in trockenem Diethylether werden bei –10 °C 9 Äquivalente Di-*iso*-propylamin über einen Zeitraum von 1 Stunde zugetropft. Nach Beendigung der Zugabe wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird filtriert und zweimal mit Diethylether gewaschen. Das Lösungsmittel wird bei Raumtemperatur in eine Kühlfalle destilliert. Der ölige Rückstand wird durch Kugelrohrdestillation gereinigt.

AAV 4: Darstellung von unterschiedlich substituierten *N,N*-Di-*iso*-propylphosphoramiditen aus Alkoholen und Bis-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramiditen

Unter Argonschutzatmosphäre wird 1 Äquivalent 1*H*-Tetrazol in trockenem Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von 1 Äquivalent Di-*iso*-propylamin wird die Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 2.1 Äquivalente Phosporamidit, gelöst in trockenem Dichlormethan, und 2 Äquivalente Alkohol zugetropft. Es wird für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung wird der Reaktionsansatz auf gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung gegeben und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal gegen gesättigte Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgetrennt. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel.

6.3. Chemische Arbeitsvorschriften

Benzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-butyryl- α -D-mannopyranosid (3)

1.40 g (5.19 mmol) Benzyl- α -D-mannopyranosid (1)¹⁰⁵ werden bei 0 °C in 50 ml trockenem Pyridin und 20 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Anschließend werden langsam 6.50 ml (62.2 mmol, 3 Äq/OH) Buttersäurechlorid zugetropft. Die Reaktionsmischung wird dann bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Zur Aufarbeitung wird durch Zugabe von Methanol abgebrochen. Die Reaktionslösung wird unter vermindertem Druck eingeeengt und mehrmals mit Toluol codestilliert. Der Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit Wasser ausgeschüttelt. Es wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgetrennt. Gegebenenfalls wird erneut mit Toluol codestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Petrol-ether(50/70)/Ethylacetat, 3 : 1).

C₂₉H₄₂O₁₀ (550.65)

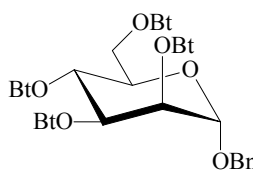
Ausbeute: 2.86 g (79 %)

hellgelber Sirup

$[\alpha]_D^{20} = +36.8^\circ$ (c 1.0, CHCl₃)

berechnet: C 63.26 H 7.69

gefunden: C 63.32 H 7.63



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 573.12 [M+Na]^+$, $589.08 [M+K]^+$

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.39$ - 7.30 (m, 5H, Ph), 5.41 (dd, 1H, H-3), 5.35 (dd~t, 1H, H-4), 5.32 (dd, 1H, H-2), 4.89 (d, 1H, H-1), 4.72 (d, 1H, -CH₂-Ph), 4.57 (d, 1H, -CH₂-Ph), 4.24 (dd, 1H, H-6a), 4.09 (dd, 1H, H-6b), 4.01 (ddd, 1H, H-5), 2.42 - 2.15 (m, 8H, 4x-CO-CH₂-), 1.73 - 1.53 (m, 8H, 4x-CH₂-CH₃), 1.00 - 0.88 (m, 12H, 4x-CH₃) ppm.

$J_{1,2} = 1.3$, $J_{2,3} = 3.2$, $J_{3,4} = 10.1$, $J_{4,5} = 10.1$, $J_{5,6a} = 5.1$, $J_{5,6b} = 2.2$, $J_{6a,6b} = 12.2$, $^2J_{CH_2} = 12.2$ Hz.

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): $\delta = 173.22$, 172.57 , 172.36 , 172.27 (C=O), 136.36 (C_q, Ph), 128.58 , 128.19 , 128.09 (Ph), 96.88 (C-1), 69.70 (-CH₂-Ph), 69.40 (C-2), 69.12 (C-3), 69.91

(C-5), 65.77 (C-4), 62.15 (C-6), 36.09, 36.04, 35.97, 35.92 (-CO-CH₂-), 18.47, 18.32, 18.15 (-CH₂-CH₃), 13.72, 13.59, 13.57 (-CH₃) ppm.

¹³C-gated (100.62 MHz, CDCl₃): δ = 97.29 (d, C-1) ppm.

¹J_{C-1,H-1} = 175.0 Hz.

Benzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-pivaloyl-α-D-mannopyranosid (4)

1.95 g (7.21 mmol) Benzyl-α-D-mannopyranosid (**1**)¹⁰⁵ werden bei 0 °C in 40 ml trockenem Pyridin und 15 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Anschließend werden langsam 8.96 ml (72.1 mmol, 2.5 Äq/OH) Pivalinsäurechlorid zugetropft. Die Reaktionsmischung wird dann bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wird unter vermindertem Druck eingeeengt und mehrmals mit Toluol codestilliert. Der Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit Wasser ausgeschüttelt. Es wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgetrennt. Gegebenenfalls wird erneut mit Toluol codestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 7 : 1).

C₃₃H₅₀O₁₀ (606.75)

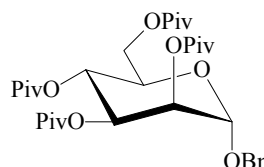
Ausbeute: 2.35 g (54 %)

gelber Sirup

[α]_D²⁰ = + 15.0° (c 1.0, CHCl₃)

berechnet: C 65.33 H 8.31

gefunden: C 64.22 H 8.43



MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 629.50 [M+Na]⁺, 645.44 [M+K]⁺

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.40-7.30 (m, 5H, Ph), 5.50 (dd~t, 1H, H-4), 5.43 (dd, 1H, H-3), 5.32 (dd, 1H, H-2), 4.87 (d, 1H, H-1), 4.74 (d, 1H, -CH₂-Ph), 4.57 (d, 1H, -CH₂-Ph), 4.18 (dd, 1H, H-6a), 4.14-4.04 (m, 2H, H-5, H-6b), 1.26, 1.25, 1.16, 1.12 (4xs, 36H, 4xC(CH₃)₃) ppm.

$J_{1,2} = 1.5$, $J_{2,3} = 3.1$, $J_{3,4} = 10.2$, $J_{4,5} = 10.2$, $J_{5,6a} = 4.6$, $J_{5,6b} = 1.5$, $J_{6a,6b} = 12.2$, $^2J_{CH_2} = 12.2$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 178.12$, 177.21 , 177.09 , 176.72 (C=O), 136.50 (C_q , Ph), 128.57 , 128.12 , 127.83 (Ph), 97.18 (C-1), 69.70 ($-\underline{CH}_2$ -Ph), 69.50 (C-2, C-3), 69.16 (C-5), 65.22 (C-4), 62.04 (C-6), 38.91 , 38.80 , 38.76 (C_q , $-\underline{C}(\underline{CH}_3)_3$), 27.19 , 27.15 , 27.11 , 27.07 ($-\underline{C}(\underline{CH}_3)_3$) ppm.

^{13}C -gated (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 97.61$ (d, C-1) ppm.

$^1J_{C-1,H-1} = 171.9$ Hz.

Benzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-iso-propylcarbonat- α -D-mannopyranosid (5)

1.31 g (4.84 mmol) Benzyl- α -D-mannopyranosid (**1**)¹⁰⁵ werden bei 0 °C in 60 ml trockenem Pyridin gelöst. 13.7 ml (1 M in Toluol, 1.5 Äq/OH) *Iso*-propylchlorformiat werden über einen Tropftrichter zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird mit Chloroform verdünnt und anschließend zweimal mit 1 M Salzsäure und einmal mit Wasser ausgeschüttelt. Es wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingeeengt und mit Toluol codestilliert. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 5 : 1).

$C_{29}H_{42}O_{14}$ (614.64)

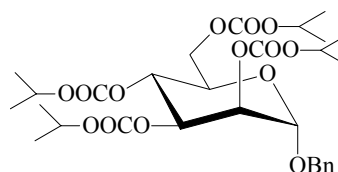
Ausbeute: 2.51 g (84 %)

hellgelber Sirup

$[\alpha]_D^{20} = +27.4^\circ$ (c 1.0, $CHCl_3$)

berechnet: C 56.67 H 6.89

gefunden: C 57.27 H 7.07



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 637.40$ $[M+Na]^+$, 653.37 $[M+K]^+$

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.35$ - 7.32 (m, 5H, Ph), 5.24 (dd, 1H, H-2), 5.20 (dd, 1H, H-3), 5.10 (dd~t, 1H, H-4), 4.98 (d, 1H, H-1), 4.92 - 4.78 (m, 4H, $4 \times \underline{CH}(\underline{CH}_3)_2$), 4.73 (d, 1H,

-CH₂-Ph), 4.55 (d, 1H, -CH₂-Ph), 4.32 (dd, 1H, H-6a), 4.20 (dd, 1H, H-6b), 4.05 (ddd, 1H, H-5), 1.32-1.24 (m, 24H, 4x-CH(CH₃)₂) ppm.

$J_{1,2} = 1.0$, $J_{2,3} = 3.1$, $J_{3,4} = 10.2$, $J_{4,5} = 9.7$, $J_{5,6a} = 6.1$, $J_{5,6b} = 2.5$, $J_{6a,6b} = 12.2$, $^2J_{CH_2} = 11.7$ Hz.

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): δ = 154.43, 153.89, 153.57, 153.44 (C=O), 136.25 (C_q, Ph), 128.55, 128.20, 128.16 (Ph), 96.37 (C-1), 72.95, 72.88 (C-2, C-3), 72.63, 72.60, 72.30, 72.28 (-CH(CH₃)₂), 70.02 (C-4), 69.63 (-CH₂-Ph), 68.61 (C-5), 65.87 (C-6), 21.78, 21.67, 21.62, 21.06 (-CH(CH₃)₂) ppm.

¹³C-gated (100.62 MHz, CDCl₃): δ = 96.79 (d, C-1) ppm.

$^1J_{C-1,H-1} = 174.0$ Hz.

2,3,4,6-Tetra-*O*-butyryl- α -D-mannopyranose (7)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 1a.

1.49 g (2.70 mmol) Benzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-butyryl- α -D-mannopyranosid (**3**), 0.46 g Pd/C (10 %), 10 ml trockenes Methanol, Reaktionsdauer: 1 d, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 3 : 1).

C₂₂H₃₆O₁₀ (460.52)

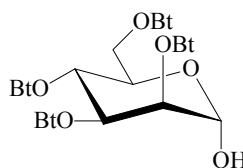
Ausbeute: 850 mg (69 %)

farbloser Sirup

$[\alpha]_D^{20} = +12.9^\circ$ (c 1.0, CHCl₃)

berechnet: C 57.38 H 7.88

gefunden: C 57.30 H 7.99



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 483.27$ [M+Na]⁺, 499.11 [M+K]⁺

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.44 (dd, 1H, H-3), 5.37 (dd~t, 1H, H-4), 5.31 (dd, 1H, H-2), 5.24 (s, 1H, H-1), 4.27-4.16 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 3.12 (bs, 1H, OH), 2.42-2.16 (m, 8H, 4x-CO-CH₂-), 1.77-1.52 (m, 8H, 4x-CH₂-CH₃), 1.03-0.88 (m, 12H, 4x-CH₃) ppm.

$J_{1,2} = 2.0$, $J_{2,3} = 3.1$, $J_{3,4} = 10.2$, $J_{4,5} = 9.7$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 173.36$, 172.68 , 172.47 , 172.30 (C=O), 92.37 (C-1), 69.68 (C-2), 68.81 , 68.63 (C-3, C-5), 65.72 (C-4), 62.16 (C-6), 36.10 , 36.01 , 35.98 , 35.95 (-CO-CH₂-), 18.48 , 18.32 , 18.17 (-CH₂-CH₃), 13.69 , 13.60 (-CH₃) ppm.

^{13}C -gated (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 92.76$ (d, C-1) ppm.

$^1J_{\text{C-1,H-1}} = 172.9$ Hz.

2,3,4,6-Tetra-*O*-pivaloyl- α -D-mannopyranose (8)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 1a.

1.65 g (2.73 mmol) Benzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-pivaloyl- α -D-mannopyranosid (4), 800 mg Pd/C (10 %), 20 ml trockenes Methanol, Reaktionsdauer: über Nacht, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 5 : 1).

$\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{O}_{10}$ (516.63)

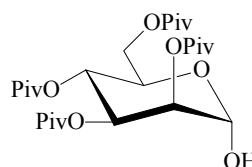
Ausbeute: 1.38 g (98 %)

weiße Kristalle, Smp.: 175.8°C

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +14.7^\circ$ (c 1.0, CHCl_3)

berechnet: C 60.45 H 8.58

gefunden: C 60.48 H 8.53



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 539.34$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 555.26 $[\text{M}+\text{K}]^+$

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.53$ (dd~t, 1H, H-4), 5.46 (dd, 1H, H-3), 5.28 (dd, 1H, H-2), 5.19 (bs, 1H, H-1), 4.29 (ddd, 1H, H-5), 4.22 - 4.13 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.17 (d, 1H, OH), 1.27 , 1.24 , 1.16 , 1.12 (4xs, 36H, $4\times\text{-C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

$J_{1,2} = 1.8$, $J_{2,3} = 3.1$, $J_{3,4} = 10.2$, $J_{4,5} = 10.2$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 178.30, 177.27, 176.66 (C=O), 92.51 (C-1), 69.89 (C-2), 69.12 (C-3), 68.93 (C-5), 65.15 (C-4), 61.91 (C-6), 38.93, 38.82 (C_q , $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.16, 27.12, 27.09 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

^{13}C -gated (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 92.93 (d, C-1) ppm.

$^1\text{J}_{\text{C-1,H-1}}$ = 172.9 Hz.

2,3,4,6-Tetra-*O*-*iso*-propylcarbonat- α -D-mannopyranose (9)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 1a.

1.88 g (3.06 mmol) Benzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-*iso*-propylcarbonat- α -D-mannopyranosid (5), 0.740 g Pd/C (10 %), 15 ml trockenes Methanol, Reaktionsdauer: 2 d, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 3 : 1).

$\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_{14}$ (524.52)

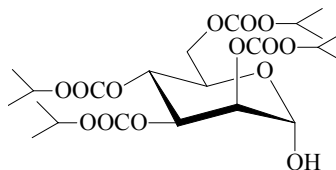
Ausbeute: 1.47 g (92 %)

farbloser Sirup

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -6.2^\circ$ (c 0.5, CHCl_3)

berechnet: C 50.38 H 6.92

gefunden: C 50.47 H 7.04



MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 547.32 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 563.26 $[\text{M}+\text{K}]^+$

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 5.34 (s, 1H, H-1), 5.26-5.22 (m, 2H, H-2, H-3), 5.09 (dd~t, 1H, H-4), 4.93-4.80 (m, 4H, 4x- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.32-4.28 (dd, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 1.34-1.26 (m, 24H, 4x- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

$\text{J}_{4,5}$ = 9.7 Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 154.34, 153.93, 153.62, 153.43 (C=O), 92.08 (C-1), 72.99, 72.95, 72.67, 72.44 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 72.48, 72.10 (C-2, C-3), 69.97 (C-4), 68.52 (C-5), 66.08 (C-6), 21.76, 21.68, 21.63 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

^{13}C -gated (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 92.48$ (d, C-1) ppm.

$^1\text{J}_{\text{C-1,H-1}} = 174.0$ Hz.

Dibenzyl-(2,3,4,6-tetra-*O*-butyryl- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (11)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 2.

1.80 g (3.92 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-butyryl- α -D-mannopyranose (7), 3.29 ml (9.79 mmol) Dibenzyl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit, 1.37 g (19.6 mmol) 1*H*-Tetrazol, 2.03 g (11.7 mmol) 3-Chlorperbenzoesäure, 20 ml + 20 ml trockenes Dichlormethan, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 2 : 1).

$\text{C}_{36}\text{H}_{49}\text{O}_{13}\text{P}$ (720.76)

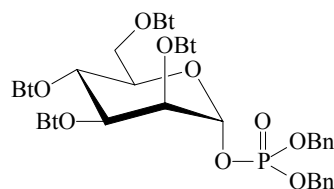
Ausbeute: 2.51 g (89 %)

farbloser Sirup

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +13.7^\circ$ (c 0.4, CHCl_3)

berechnet: C 59.99 H 6.85

gefunden: C 60.01 H 6.74



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 743.51$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 759.48 $[\text{M}+\text{K}]^+$

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.40$ - 7.30 (m, 10H, Ph), 5.62 (dd, 1H, H-1), 5.36 (dd~t, 1H, H-4), 5.31 (dd, 1H, H-3), 5.26 (dd~t, 1H, H-2), 5.12 - 5.09 (m, 4H, 2x- CH_2 -Ph), 4.14 (dd, 1H, H-6a), 4.03 (ddd, 1H, H-5), 3.95 (dd, 1H, H-6b), 2.40 - 2.19 (m, 8H, 4x-CO- CH_2 -), 1.75 - 1.53 (m, 8H, 4x- CH_2 - CH_3), 1.01 - 0.88 (m, 12H, 4x- CH_3) ppm.

$J_{1,2} = 1.5$, $J_{2,3} = 3.1$, $J_{3,4} = 10.2$, $J_{4,5} = 9.7$, $J_{5,6a} = 4.1$, $J_{5,6b} = 2.0$, $J_{6a,6b} = 12.2$, $^3J_{\text{H-1,P}} = 6.1$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 173.10$, 172.26 , 172.07 , 172.05 (C=O), 130.18 , 129.75 (C_q , Ph), 128.81 - 128.04 (Ph), 95.31 (d, C-1), 70.45 (C-5), 70.03 (d, - CH_2 -Ph), 69.85 (d, - CH_2 -Ph), 68.60 (d, C-2), 68.21 (C-3), 64.84 (C-4), 61.39 (C-6), 35.95 , 35.91 , 35.89 , 35.84 (-CO- CH_2 -), 18.42 , 18.29 , 18.22 , 18.12 (- CH_2 - CH_3), 13.65 , 13.58 (- CH_3) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 4.8$, $2 \times ^2J_{CH_2,P} = 6.1$, $^3J_{C-2,P} = 10.9$ Hz.

^{13}C -gated (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 95.74$ (dd, C-1) ppm.

$^1J_{C-1,H-1} = 179.0$ Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, $CDCl_3$): $\delta = -1.97$ ppm.

Dibenzyl-(2,3,4,6-tetra-*O*-pivaloyl- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (12)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 2.

1.38 g (2.63 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-pivaloyl- α -D-mannopyranose (8), 2.21 ml (6.57 mmol) Dibenzyl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit, 0.92 g (13.1 mmol) 1*H*-Tetrazol, 1.36 g (7.89 mmol) 3-Chlorperbenzoesäure, 20 ml + 20 ml trockenes Dichlormethan, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 3 : 1).

$C_{40}H_{57}O_{13}P$ (776.86)

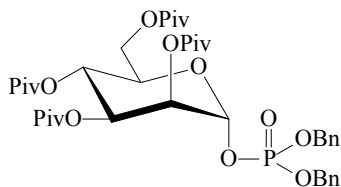
Ausbeute: 1.43 g (70 %)

farbloser Sirup

$[\alpha]_D^{20} = +22.1^\circ$ (c 0.7, $CHCl_3$)

berechnet: C 61.84 H 7.40

gefunden: C 61.11 H 7.35



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 799.53$ $[M+Na]^+$, 815.46 $[M+K]^+$

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.38$ - 7.33 (m, 10H, Ph), 5.58 (dd, 1H, H-1), 5.52 (dd~t, 1H, H-4), 5.31 (dd, 1H, H-3), 5.24 (dd~t, 1H, H-2), 5.16-5.08 (m, 4H, 2x- $\underline{CH_2}$ -Ph), 4.07-3.99 (m, 2H, H-5, H-6a), 3.89 (dd, 1H, H-6b), 1.25, 1.21, 1.14, 1.12 (4xs, 36H, 4x- $C(\underline{CH_3})_3$) ppm.

$J_{1,2} = 1.9$, $J_{2,3} = 3.2$, $J_{3,4} = 10.4$, $J_{4,5} = 10.1$, $J_{5,6a} = 2.8$, $J_{5,6b} = 1.3$, $J_{6a,6b} = 12.6$, $^3J_{H-1,P} = 6.3$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 177.97$, 176.57, 176.40 (C=O), 133.72-127.51 (Ph), 95.58 (d, C-1), 70.58 (C-5), 70.11 (d, - $\underline{CH_2}$ -Ph), 69.93 (d, - $\underline{CH_2}$ -Ph), 68.68 (C-3), 68.68 (d,

C-2), 64.22 (C-4), 61.05 (C-6), 38.98, 38.78 (C_q, -C(CH₃)₃), 27.15, 27.10, 27.06 (-C(CH₃)₃) ppm.

²J_{C-1,P} = 5.6, 2x ²J_{CH₂,P} = 5.6, ³J_{C-2,P} = 11.7 Hz.

¹³C-gated (100.62 MHz, CDCl₃): δ = 97.42 (dd, C-1) ppm.

¹J_{C-1,H-1} = 180.1 Hz.

³¹P-NMR (202.46 MHz, CDCl₃): δ = - 1.76 ppm.

Dibenzyl-(2,3,4,6-tetra-*O*-*iso*-propylcarbonat-α-D-mannopyranosyl)-phosphat (13)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 2.

1.19 g (2.27 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-*iso*-propylcarbonat-α-D-mannopyranose (9), 1.91 ml (5.67 mmol) Dibenzyl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit, 0.80 g (11.4 mmol) 1*H*-Tetrazol, 1.18 g (6.84 mmol) 3-Chlorperbenzoesäure, 20 ml + 20 ml trockenes Dichlormethan, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 3 : 1).

C₃₆H₄₉O₁₇P (784.76)

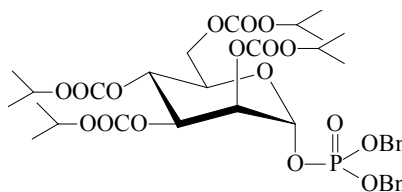
Ausbeute: 1.54 g (87 %)

gelber Sirup

[α]_D²⁰ = + 6.7° (c 0.5, CHCl₃)

berechnet: C 55.10 H 6.29

gefunden: C 55.23 H 6.45



MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 807.44 [M+Na]⁺, 823.39 [M+K]⁺

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.37-7.32 (m, 10H, Ph), 5.75 (dd, 1H, H-1), 5.23 (dd~t, 1H, H-2), 5.14-5.07 (m, 6H, H-3, H-4, 2x-CH₂-Ph), 4.86 (m, 4H, 4x-CH(CH₃)₂), 4.26 (dd, 1H, H-6a), 4.18-4.11 (m, 2H, H-5, H-6b), 1.33-1.23 (m, 24H, 4x-CH(CH₃)₂) ppm.

J_{1,2} = 1.6, J_{2,3} = 2.2, J_{5,6a} = 5.7, J_{6a,6b} = 11.7, ³J_{H-1,P} = 6.6 Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 154.27, 153.52, 153.43 (C=O), 128.72-128.12 (Ph), 94.86 (d, C-1), 73.32, 73.05, 72.83, 72.33 ($-\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)_2$), 71.68 (C-3), 71.53 (d, C-2), 70.21 (C-5), 69.96 (d, $-\underline{\text{CH}}_2\text{-Ph}$), 69.84 (d, $-\underline{\text{CH}}_2\text{-Ph}$), 69.13 (C-4), 65.25 (C-6), 21.71-21.61 ($-\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$) ppm.

$^2\text{J}_{\text{C-1,P}} = 5.6$, $2 \times ^2\text{J}_{\text{CH}_2,\text{P}} = 5.6$, $^3\text{J}_{\text{C-2,P}} = 11.7$ Hz.

^{13}C -gated (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 92.27 (dd, C-1) ppm.

$^1\text{J}_{\text{C-1,H-1}} = 179.0$ Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, CDCl_3): δ = - 1.90 ppm.

Dibenzyl-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (14)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 2.

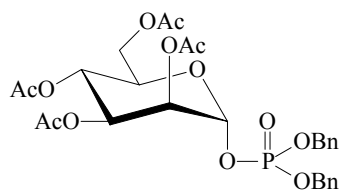
1.00 g (2.87 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranose (**10**),^{106,107} 2.40 ml (7.14 mmol) Dibenzyl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit, 1.01 g (14.4 mmol) 1*H*-Tetrazol, 1.50 g (8.70 mmol) 3-Chlorperbenzoesäure, 20 ml + 20 ml trockenes Dichlormethan, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 1 : 1).

$\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{O}_{13}\text{P}$ (608.54)

Ausbeute: 1.54 g (88 %)

farbloser Sirup

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 29.5^\circ$ (c 1.0, CHCl_3)



MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 631.36 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 647.27 $[\text{M}+\text{K}]^+$

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.38-7.33 (m, 10H, Ph), 5.62 (dd, 1H, H-1), 5.31-5.28 (m, 2H, H-3, H-4), 5.23 (dd~t, 1H, H-2), 5.12-5.01 (m, 4H, $2 \times -\underline{\text{CH}}_2\text{-Ph}$), 4.18 (dd, 1H, H-6a), 4.05 (ddd, 1H, H-5), 3.93 (dd, 1H, H-6b), 1.2.1, 2.04, 2.00, 1.99 (4xs, 12H, $4 \times -\text{CH}_3$) ppm.

$\text{J}_{1,2} = 1.8$, $\text{J}_{2,3} = 3.3$, $\text{J}_{4,5} = 9.7$, $\text{J}_{5,6a} = 4.6$, $\text{J}_{5,6b} = 2.3$, $\text{J}_{6a,6b} = 12.5$, $^3\text{J}_{\text{H-1,P}} = 6.4$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 170.53, 169.73, 169.55 (C=O), 133.37 (C_q , Ph), 128.84-128.06 (Ph), 95.19 (d, C-1), 70.30 (C-5), 70.05 (d, $-\underline{\text{CH}}_2\text{-Ph}$), 69.88 (d, $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-Ph}$), 68.81 (d, C-2), 68.27 (C-3), 65.32 (C-4), 61.81 (C-6), 20.73, 20.65, 20.62 ($-\text{CH}_3$) ppm.

$^2\text{J}_{\text{C-1,P}} = 5.1$, $^2\text{J}_{\text{CH}_2,\text{P}} = 5.6$, $^2\text{J}_{\text{CH}_2,\text{P}} = 5.1$, $^3\text{J}_{\text{C-2,P}} = 11.7$ Hz.

^{13}C -gated (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 95.59 (dd, C-1) ppm.

$^1\text{J}_{\text{C-1,H-1}} = 179.0$ Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, CDCl_3): δ = - 2.03 ppm.

2,3,4,6-Tetra-*O*-butyryl- α -D-mannopyranosyl-phosphat (**15**)

Die Umsetzung erfolgt gemäß **AAV 1b**.

2.43 g (7.37 mmol) Dibenzyl-(2,3,4,6-tetra-*O*-butyryl- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (**11**), 1.25 g Pd/C (10 %), 10 ml Ethylacetat, 20 ml Methanol, 10 ml Wasser, Reaktionsdauer: 5 h, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser, 6 : 3.5 : 0.3).

$\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{O}_{13}\text{P}$ (540.50)

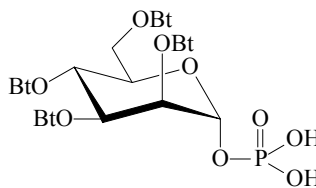
Ausbeute: 1.35 g (74 %)

gelber Sirup

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 37.3^\circ$ (c 1.0, CHCl_3)

berechnet: C 48.89 H 6.90

gefunden: C 48.90 H 6.60



MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 563.61 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 579.50 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 585.49 $[\text{M}-\text{H}+\text{Na}+\text{Na}]^+$, 601.41 $[\text{M}-\text{H}+\text{Na}+\text{K}]^+$

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 5.60 (bs, 1H, H-1), 5.40 (dd, 1H, H-3), 5.36 (bs, 1H, H-2), 5.17 (dd~t, 1H, H-4), 4.27-4.13 (m, 1H, H-5), 3.79-3.62 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.41-2.24 (m, 8H, 4x-CO-CH₂-), 1.71-1.53 (m, 8H, 4x-CH₂-CH₃), 1.0-0.87 (m, 12 H, 4x-CH₃) ppm.

$J_{2,3} = 3.6$, $J_{3,4} = 9.7$, $J_{4,5} = 10.2$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 174.85$ - 172.52 (C=O), 94.86 (bs, C-1), 72.22 (C-5), 69.14 (C-2), 68.49 (C-3), 65.81 (C-4), 61.59 (C-6), 36.02, 35.88 (-CO-CH₂-), 18.40, 18.38, 18.30, 18.08 (-CH₂-CH₃), 13.5 (-CH₃) ppm.

$^3J_{\text{C-2,P}} = 9.2$ Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, CDCl_3): $\delta = -1.71$ ppm.

2,3,4,6-Tetra-*O*-pivaloyl- α -D-mannopyranosyl-phosphat (16)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 1b.

1.3 g (1.7 mmol) Dibenzyl-(2,3,4,6-tetra-*O*-pivaloyl- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (**12**), 0.82 g Pd/C (10 %), 8 ml Ethylacetat, 16 ml Methanol, 8 ml Wasser, Reaktionsdauer: 6 h, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser, 6 : 3.5 : 0.3).

$\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{O}_{13}\text{P}$ (596.61)

Ausbeute: 0.82 g (82 %)

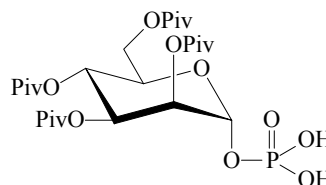
weißer Feststoff, Smp.: ~ 245 °C Zersetzung

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +27.0^\circ$ (c 1.0, CHCl_3)

berechnet: C 52.34 H 7.60

gefunden: C 45.28 H 6.61

(Material stark hygroskopisch)



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 619.42$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 635.35 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 641.40 $[\text{M}-\text{H}+\text{Na}+\text{Na}]^+$, 657.33 $[\text{M}-\text{H}+\text{Na}+\text{K}]^+$, 673.29 $[\text{M}-\text{H}+\text{K}+\text{K}]^+$

^1H -NMR (400 MHz, Methanol- d_4): $\delta = 5.58$ (dd~t, 1H, H-4), 5.48 (dd~t, 2H, H-1, H-3), 5.32 (bs, 1H, H-2), 4.48-4.15 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 1.28, 1.23, 1.15, 1.10 (4xs, 36H, 4x-C(CH₃)₃) ppm.

$J_{3,4} = 10.4$, $J_{4,5} = 10.1$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, Methanol- d_4): δ = 179.83, 179.29, 178.82 (C=O), 95.27 (bs, C-1), 71.71 (d, C-2), 71.38 (C-3), 70.83 (C-5), 66.49 (C-4), 62.86 (C-6), 40.31, 40.27, 40.16, 40.07 (C_q , $-\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 28.02, 27.94, 27.88 ($-\text{C}(\underline{\text{CH}}_3)_3$) ppm.

$^3J_{\text{C-2,P}} = 12.7$ Hz.

^{31}P -NMR (101.26 MHz, Methanol- d_4): δ = - 1.75 ppm.

2,3,4,6-Tetra-*O*-*iso*-propylcarbonat- α -D-mannopyranosyl-phosphat (17)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 1b.

0.45 g (0.57 mmol) Dibenzyl-(2,3,4,6-tetra-*O*-*iso*-propylcarbonat- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (**13**), 0.23 g Pd/C (10 %), 2 ml Ethylacetat, 4 ml Methanol, 2 ml Wasser, Reaktionsdauer: über Nacht, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser, 6 : 3.5 : 0.3).

$\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{O}_{17}\text{P}$ (604.51)

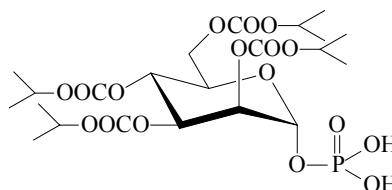
Ausbeute: 0.26 g (75 %)

Feststoff, Smp.: 184.1 °C

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 23.4^\circ$ (c 1.0, CHCl_3)

berechnet: C 43.71 H 6.17

gefunden: C 44.32 H 6.06



MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 627.35 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 643.29 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 649.33 $[\text{M}-\text{H}+\text{Na}+\text{Na}]^+$, 665.28 $[\text{M}-\text{H}+\text{Na}+\text{K}]^+$

^1H -NMR (400 MHz, Methanol- d_4): δ = 5.58 (d, 1H, H-1), 5.26 (bs, 1H, H-2), 5.21 (dd, 1H, H-3), 5.12 (dd~t, 1H, H-4), 4.90-4.79 (m, 4H, 4x- $\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)_2$), 4.36-4.21 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 1.23-1.20 (m, 24H, 4x- $\text{CH}(\underline{\text{CH}}_3)_2$) ppm.

$J_{2,3} = 3.1$, $J_{3,4} = 10.2$, $J_{4,5} = 9.9$, $J_{\text{H-1,P}} = 7.1$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, Methanol- d_4): δ = 156.22, 155.52, 155.09 (C=O), 95.11 (d, C-1), 74.41, 74.16, 73.81, ($-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$), 74.36 (d, C-2), 74.30 (C-3), 70.91 (C-4), 70.43 (C-5), 66.52 (C-6), 22.34, 22.25, 22.22 ($-\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$) ppm.

$^2\text{J}_{\text{C-1,P}} = 3.6$, $^3\text{J}_{\text{C-2,P}} = 9.7$ Hz.

^{31}P NMR (101.26 MHz, Methanol- d_4): δ = - 1.02 ppm.

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl-phosphat (18)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 1b.

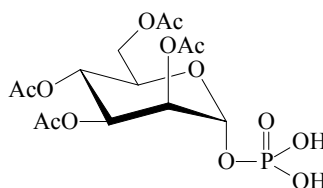
0.50 g (0.82 mmol) Dibenzyl-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (14), 0.40 g Pd/C (10 %), 4 ml Ethylacetat, 8 ml Methanol, 4 ml Wasser, Reaktionsdauer: 5 h, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser, 6 : 3.5 : 0.3).

$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{O}_{17}\text{P}$ (428.29)

Ausbeute: 0.22 g (63 %)

Beigefarbener Feststoff, Smp.: 176.4 °C

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 18.1^\circ$ (c 1.0, CHCl_3)



MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 451.18 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 467.06 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 473.06 $[\text{M}-\text{H}+\text{Na}+\text{Na}]^+$, 488.99 $[\text{M}-\text{H}+\text{Na}+\text{K}]^+$, 504.91 $[\text{M}-\text{H}+\text{K}+\text{K}]^+$

^1H -NMR (400 MHz, Methanol- d_4): δ = 5.46 (bs, 1H, H-1), 5.39-5.23 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 4.24 (d, 2H, H-5, H-6a), 4.11 (bs, 1H, H-6b), 2.11, 2.02, 1.99, 1.91 (4xs, 12H, 4x- CH_3) ppm.

$\text{J}_{2,3} = 3.1$, $\text{J}_{3,4} = 10.2$, $\text{J}_{4,5} = 9.9$, $^3\text{J}_{\text{H-1,P}} = 7.1$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, Methanol- d_4): δ = 171.90, 171.85, 171.76, 171.74 (C=O), 95.19 (d, C-1), 71.71 (d, C-2), 71.04 (C-3), 70.65 (C-4), 67.46 (C-5), 63.60 (C-6), 20.95, 20.89, 20.87 ($-\text{CH}_3$) ppm.

$^3\text{J}_{\text{C-2,P}} = 9.2$ Hz.

^{31}P NMR (101.26 MHz, Methanol- d_4): $\delta = -0.92$ ppm.

Bis-acetoxymethyl-(2,3,4,6-tetra-*O*-butyryl- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (19)

Eine Lösung von 131 mg (0.240 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-butyryl- α -D-mannopyranosylphosphat (**15**) in 3 ml trockenem Acetonitril wird unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingengt. Dann werden 0.200 ml (1.20 mmol) *N*-Ethyl-di-*iso*-propylamin und 3 ml trockenes Acetonitril zugegeben und erneut bis zur Trockne eingengt. Anschließend wird unter Argon-Schutzatmosphäre der Ansatz mit 0.410 ml (2.40 mmol) *N*-Ethyl-di-*iso*-propylamin, 3 ml trockenem Acetonitril und 0.590 ml (6.10 mmol) Brommethylnacetat versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 1 : 1) gereinigt.

$\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{O}_{17}\text{P}$ (684.51)

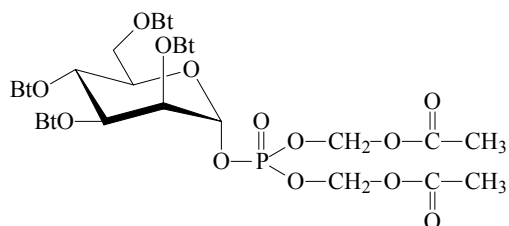
Ausbeute: 68.0 mg (41 %)

farbloser Sirup

$[\alpha]_D^{20} = +7.5^\circ$ (c 0.5, CHCl_3)

berechnet: C 49.12 H 6.63

gefunden: C 49.60 H 6.79



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 707.29$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 723.19 $[\text{M}+\text{K}]^+$

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.73$ - 5.64 (m, 5H, H-1, 2x- CH_2 -, AM), 5.41 (dd~t, 1H, H-4), 5.38 (dd~t, 1H, H-2), 5.35 (dd, 1H, H-3), 4.28 - 4.15 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 2.42 - 2.19 (m, 8H, 4x-CO- CH_2 -), 2.17 , 2.16 (2xs, 6H, - CH_3 , AM), 1.75 - 1.52 (m, 8H, 4x- CH_2 - CH_3), 1.04 - 0.87 (m, 12H, 4x- CH_3) ppm.

$J_{1,2} = 1.9$, $J_{2,3} = 3.2$, $J_{3,4} = 9.9$, $J_{4,5} = 9.9$, $J_{5,6a} = 3.8$, $J_{5,6b} = 1.5$, $J_{6a,6b} = 11.7$, $^3J_{\text{H-1,P}} = 7.7$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 173.10$, 172.27 , 172.08 (C=O), 169.27 , 169.17 (C=O, AM), 95.93 (d, C-1), 82.66 (dd~t, - CH_2 -, AM), 70.81 (C-5), 68.32 (d, C-2), 68.11 (C-3), 64.69 (C-4), 61.42 (C-6), 35.90 , 35.81 (-CO- CH_2 -), 20.60 , 20.57 (- CH_3 , AM), 18.42 , 18.30 , 18.25 , 18.10 (- CH_2 - CH_3), 13.7 , 13.6 , 13.5 (- CH_3) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 6.1$, $^2J_{CH_2,P} = 6.1$, $^3J_{C-2,P} = 12.2$ Hz.

^{13}C -gated (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 96.31$ (d, C-1) ppm.

$^1J_{C-1,H-1} = 174.0$ Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, $CDCl_3$): $\delta = -5.05$ ppm.

Bis-pivaloyloxymethyl-(2,3,4,6-tetra-*O*-butyryl- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (**20**)

0.11 g (0.21 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-butyryl- α -D-mannopyranosyl-phosphat (**15**) wird in 1 ml trockenem Acetonitril suspendiert. *N*-Ethyl-di-*iso*-propylamin (0.11 ml, 0.62 mmol) und Iodmethylpivaloat (0.15 g, 0.62 mmol) werden zugegeben. Der Ansatz wird bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die Lösung wird zweimal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, getrocknet über Natriumsulfat, filtriert und unter vermindertem Druck eingeeengt. Reinigung des Rohproduktes erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat + 1 % Triethylamin, 1 : 1).

$C_{34}H_{57}O_{17}P$ (768.81)

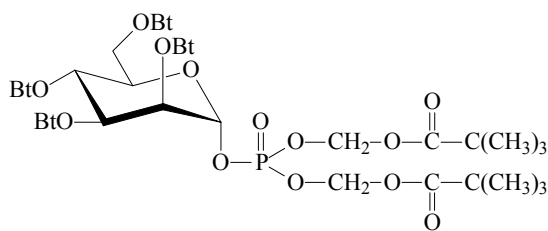
Ausbeute: 39 mg (24 %)

gelblicher Sirup

$[\alpha]_D^{20} = +4.1^\circ$ (c 0.4, $CHCl_3$)

berechnet: C 53.12 H 7.47

gefunden: C 53.75 H 7.56



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 791.32$ $[M+Na]^+$, 807.29 $[M+K]^+$

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.67$ - 5.58 (m, 5H, H-1, 2x- CH_2 -, POM), 5.34 (dd~t, 1H, H-4), 5.31 (bs, 1H, H-2), 5.29 (dd, 1H, H-3), 4.22 - 4.07 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 2.33 (dt, 2H, -CO- CH_2 -), 2.27 (t, 2H, -CO- CH_2 -), 2.19 (dt, 2H, -CO- CH_2 -), 2.12 (dt, 2H, -CO- CH_2 -), 1.68 - 1.46 (m, 8H, 4x- $\underline{CH}_2$ - CH_3), 1.18 (s, 18H, 2x-C(CH_3)₃, POM), 0.96 - 0.81 (m, 12H, 4x- CH_3) ppm.

$J_{1,2} = 1.5$, $J_{2,3} = 3.1$, $J_{3,4} = 9.2$, $J_{4,5} = 9.7$, $J_{5,6a} = 4.1$, $J_{6a,6b} = 12.2$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 173.50$, 172.55 , 172.48 , 172.41 (C=O), 96.35 (d, C-1), 82.99 (d, $-\text{CH}_2-$, POM), 82.83 (d, $-\text{CH}_2-$, POM), 71.12 (C-5), 68.76 (d, C-2), 68.48 (C-3), 65.17 (C-4), 61.86 (C-6), 39.14 (C_q , $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$, POM), 36.34 , 36.22 ($-\text{CO}-\text{CH}_2-$), 27.21 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$, POM), 18.82 , 18.70 , 18.66 , 18.51 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 14.12 , 14.01 , 13.95 ($-\text{CH}_3$) ppm.

$^2J_{\text{C-1,P}} = 6.1$, $2 \times ^2J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 6.1$, $^3J_{\text{C-2,P}} = 12.2$ Hz.

^{13}C -gated (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 96.82$ (dd, C-1) ppm.

$^1J_{\text{C-1,H-1}} = 179.0$ Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, CDCl_3): $\delta = -4.92$ ppm.

Bis-acetoxymethyl-(2,3,4,6-tetra-*O*-pivaloyl- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (21)

269 mg (0.450 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-pivaloyl- α -D-mannopyranosyl-phosphat (**16**) werden in 3 ml trockenem Acetonitril und 0.500 ml trockenem Toluol suspendiert. *N*-Ethyl-di-*iso*-propylamin (0.220 ml, 1.35 mmol) und Brommethylacetat (0.130 ml, 1.35 mmol) werden hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und der Fortgang der Reaktion dünn-schichtchromatographisch (Laufmittel: Petrol-ether(50/70)/Ethylacetat, 1 : 1) verfolgt. Nach weiterer Zugabe von 0.100 ml (1.02 mmol) Brommethylacetat und 0.100 ml (0.590 mmol) *N*-Ethyl-di-*iso*-propylamin wird der Ansatz für 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 5 ml Ethylacetat und 5 ml Dichlormethan gelöst. Die Lösung wird zweimal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 2 : 1).

$C_{32}H_{53}O_{17}P$ (740.74)

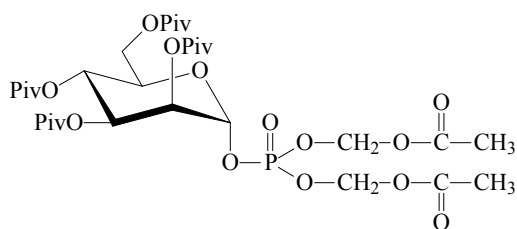
Ausbeute: 104 mg (31 %)

gelber Feststoff, Smp.: 88.5 °C

$[\alpha]_D^{20} = +12.0^\circ$ (c 0.5, $CHCl_3$)

berechnet: C 51.89 H 7.21

gefunden: C 51.19 H 7.32



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 763.52 [M+Na]^+$, $779.46 [M+K]^+$

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.74$ - 5.63 (m, 5H, H-1, 2x- CH_2 -, AM), 5.58 (dd~t, 1H, H-4), 5.39 - 5.35 (m, 2H, H-2, H-3), 4.29 - 4.16 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 2.17 , 2.16 (2xs, 6H, - CH_3 , AM), 1.28 , 1.24 , 11.16 , 1.12 (4xs, 36H, 4x- $C(CH_3)_3$) ppm.

$J_{1,2} = 1.8$, $J_{3,4} = 9.4$, $J_{4,5} = 10.2$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 177.95$, 176.44 (C=O), 171.15 , 169.24 , 169.14 (C=O, AM), 96.16 (d, C-1), 82.74 (d, - CH_2 -, AM), 82.66 (d, - CH_2 -, AM), 70.98 (C-5), 68.59 (C-3), 68.45 (d, C-2), 64.11 (C-4), 61.13 (C-6), 38.91 , 38.80 , 38.78 (C_q , - $C(CH_3)_3$), 27.09 , 27.07 (- $C(CH_3)_3$), 21.05 , 20.61 , 20.57 (- CH_3 , AM) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 5.1$, $2x \ ^2J_{CH_2,P} = 5.1$, $^3J_{C-2,P} = 12.2$ Hz.

^{13}C -gated (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 91.71$ (dd, C-1) ppm.

$^1J_{C-1,H-1} = 172.9$ Hz.

^{31}P -NMR (101.26 MHz, $CDCl_3$): $\delta = -5.47$ ppm.

Bis-pivaloyloxymethyl-(2,3,4,6-tetra-*O*-pivaloyl- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (22)

Die Umsetzung erfolgt analog zur Darstellung der Verbindung **20**.

0.23 g (0.39 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-pivaloyl- α -D-mannopyranosyl-phosphat (**16**), 0.57 g (2.3 mmol) Iodmethylpivaloat, 0.40 ml (2.3 mmol) *N*-Ethyl-di-*iso*-propylamin, 3 ml trockenes Acetonitril, 1 ml trockenes Toluol, Rühren bei Raumtemperatur für 3 Tage,

säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Petroether/Ethylacetat + 1 % Triethylamin, 3 : 1).

$C_{38}H_{65}O_{17}P$ (824.90)

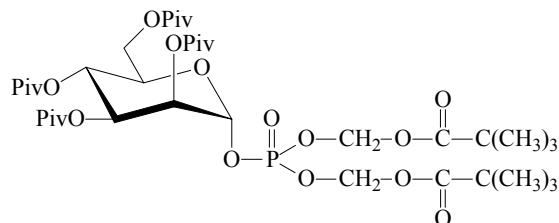
Ausbeute: 18 mg (6 %)

weißer Feststoff, Smp.: 86.7 °C

$[\alpha]_D^{20} = + 6.1^\circ$ (c 0.5, $CHCl_3$)

berechnet: C 55.33 H 7.94

gefunden: C 56.10 H 7.99



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 847.33 [M+Na]^+$, $863.30 [M+K]^+$

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.75$ - 5.64 (m, 5H, H-1, 2x- CH_2 -POM), 5.58 (dd~t, 1H, H-4), 5.41 - 5.36 (m, 2H, H-2, H-3), 4.32 - 4.22 (m, 2H, H-5, H-6a), 4.13 (d, 1H, H-6b), 1.27 , 1.23 , 1.16 , 1.11 (4xs, 36H, 4x- $C(CH_3)_3$), 1.24 (2xs, 18H, 2x- $C(CH_3)_3$, POM) ppm.

$J_{1,2} = 1.5$, $J_{2,3} = 3.1$, $J_{3,4} = 9.9$, $J_{4,5} = 9.9$, $J_{5,6a} = 2.8$, $J_{6a,6b} = 11.2$ $^3J_{H-1,P} = 5.6$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 177.93$, 176.93 , 176.66 , 176.48 (C=O), 96.15 (d, C-1), 83.03 (d, $-CH_2-$, POM), 82.89 (d, $-CH_2-$, POM), 70.91 (C-5), 68.51 (d, C-2), 68.54 (C-3), 64.20 (C-4), 61.16 (C-6), 38.90 , 38.82 , 38.75 (C_q , $-C(CH_3)_3$, Piv, POM), 27.13 , 27.09 , 27.06 ($-C(CH_3)_3$), 26.8 ($-C(CH_3)_3$, POM) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 5.6$, $2x^2J_{CH_2,P} = 5.1$ $^3J_{C-2,P} = 12.7$ Hz.

^{13}C -gated (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 94.55$ (dd, C-1) ppm.

$^1J_{C-1,H-1} = 175.1$ Hz.

^{31}P -NMR (101.26 MHz, $CDCl_3$): $\delta = - 5.38$ ppm.

Bis-acetoxymethyl-(2,3,4,6-tetra-*O*-iso-propylcarbonat- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (23)

Die Umsetzung erfolgt analog zur Darstellung von Verbindung 19.

26 mg (40 μ mol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-iso-propylcarbonat- α -D-mannopyranosyl-phosphat (17), trockenes Acetonitril (1.0 ml + 1.0 ml + 0.50 ml), *N*-Ethyl-di-*iso*-propylamin (20 μ l, 0.12 mmol + 40 μ l, 0.24 mmol), Brommethylacetat (96 μ l, 0.98 mmol), Rühren bei Raumtemperatur für 3 Tage, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 1 : 1).

C₂₈H₄₅O₂₁P (748.51)

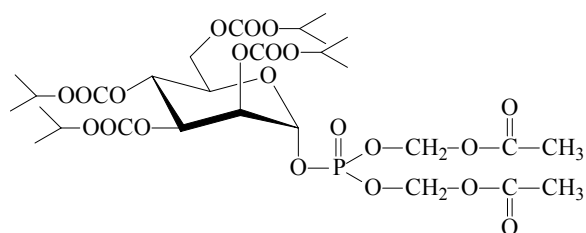
Ausbeute: 5.4 mg (17 %)

farbloser Sirup

$[\alpha]_D^{20} = -1.6^\circ$ (c 0.6, CHCl₃)

berechnet: C 44.92 H 6.06

gefunden: C 45.09 H 6.20



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 771.08 [M+Na]^+$, $787.03 [M+K]^+$

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.79$ (dd, 1H, H-1), 5.73-5.64 (m, 4H, 2x-CH₂-, AM), 5.51 (dd~t, 1H, H-2), 5.16-5.13 (m, 2H, H-3, H-4), 4.92-4.81 (m, 4H, 4x-CH(CH₃)₂), 4.33 (dd, 1H, H-6a), 4.28-4.22 (m, 2H, H-5, H-6b), 2.18, 2.16 (2xs, 6H, -CH₃, AM), 1.34-1.25 (m, 24H, 4x-CH(CH₃)₂) ppm.

$J_{1,2} = 1.5$, $J_{2,3} = 2.0$, $J_{5,6a} = 6.4$, $J_{6a,6b} = 12.2$ Hz.

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): $\delta = 169.22$, 168.13 (C=O, AM), 154.23, 153.53, 153.46, 153.28 (C=O), 95.51 (d, C-1), 82.83 (d, -CH₂-, AM), 82.69 (d, -CH₂-, AM), 73.45, 73.14, 72.90, 72.42 (-CH(CH₃)₂), 71.57, 68.96 (C-3, C-4), 71.28 (d, C-2), 70.55 (C-5), 65.24 (C-6), 21.72, 21.66, 21.58 (-CH(CH₃)₂), 20.61, 20.57 (-CH₃, AM) ppm.

²J_{C-1,P} = 5.1, 2x ²J_{CH₂,P} = 5.1, ³J_{C-2,P} = 12.2 Hz.

¹³C-gated (100.62 MHz, CDCl₃): $\delta = 92.33$ (dd, C-1) ppm.

$^1J_{C-1,H-1} = 174.7 \text{ Hz}$.

^{31}P -NMR (101.26 MHz, CDCl_3): $\delta = -5.30 \text{ ppm}$.

Bis-pivaloyloxy-(2,3,4,6-tetra-*O*-iso-propylcarbonat- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (24)

0.19 mg (0.31 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-iso-propylcarbonat- α -D-mannopyranosyl-phosphat (**17**) werden in 3 ml trockenem Acetonitril gelöst. Nach Zugabe von 0.16 ml (0.94 mmol) *N*-Ethyl-di-*iso*-propylamin und 0.23 g (0.94 mmol) Iodmethylpivaloat wird die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und der Fortgang der Reaktion mittels dünnschichtchromatographischer Kontrolle (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 1 : 1) überprüft. Nach erneuter Zugabe von 0.160 ml (0.94 mmol) *N*-Ethyl-di-*iso*-propylamin und 0.23 g (0.94 mmol) Iodmethylpivaloat wird für weitere 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in 5 ml Ethylacetat und 5 ml Dichlormethan aufgenommen. Die Mischung wird zweimal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, getrocknet über Natriumsulfat, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird anschließend durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat + 1 % Triethylamin, 3 : 1) gereinigt.

$\text{C}_{34}\text{H}_{57}\text{O}_{21}\text{P}$ (832.79)

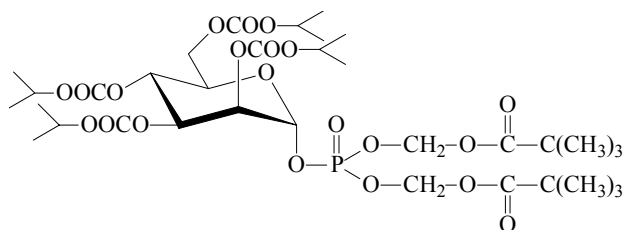
Ausbeute: 9.3 mg (4 %)

farbloser Sirup

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +2.3^\circ$ (c 0.5, CHCl_3)

berechnet: C 49.04 H 6.90

gefunden: C 50.45 H 7.34



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 855.26$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 871.22 $[\text{M}+\text{K}]^+$

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.78$ (dd, 1H, H-1), 5.75-5.65 (m, 4H, 2x- CH_2 -, POM), 5.30 (dd~t, 1H, H-2), 5.16-5.12 (m, 2H, H-3, H-4), 4.91-4.81 (m, 4H, 4x- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.33 (dd, 1H, H-6a), 4.27-4.22 (m, 2H, H-5, H-6b), 1.32-1.26 (m, 24H, 4x- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.24, 1.23 (2xs, 18H, 2x- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, POM) ppm.

$J_{1,2} = 1.8$, $J_{2,3} = 4.9$, $J_{5,6a} = 6.4$, $J_{5,6b} = 2.5$, $J_{6a,6b} = 12.2$, $J_{CH,CH_3} = 6.4$, $^3J_{H-1,P} = 5.6$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 95.54$ (d, C-1), 83.03 (d, $-CH_2-$, POM), 82.98 (d, $-CH_2-$, POM), 73.39, 73.08, 72.85, 72.38 ($-\underline{CH}(CH_3)_2$), 71.56 (C-3), 71.31 (d, C-2), 70.48 (C-5), 69.00 (C-4), 65.24 (C-6), 26.82 ($-C(\underline{CH}_3)_3$, POM), 21.73, 21.65, 21.61 ($-\underline{CH}(CH_3)_2$) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 5.1$, $2 \times ^2J_{CH_2,P} = 5.1$, $^3J_{C-2,P} = 12.2$ Hz.

^{13}C -gated (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 93.61$ (dd, C-1) ppm.

$^1J_{C-1,H-1} = 176.0$ Hz.

^{31}P -NMR (101.26 MHz, $CDCl_3$): $\delta = -5.23$ ppm.

Bis-acetoxymethyl-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (25)

Die Umsetzung erfolgt analog zur Darstellung von Verbindung 19.

139 mg (0.300 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl-phosphat (18), trockenes Acetonitril (3 ml + 3 ml + 3 ml), *N*-Ethyl-di-*iso*-propylamin (0.280 ml, 1.65 mmol + 0.560 ml, 3.30 mmol), Brommethylacetat (0.800 ml, 8.13 mmol), Rühren bei Raumtemperatur über Nacht, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 1 : 2).

$C_{20}H_{29}O_{17}P$ (572.41)

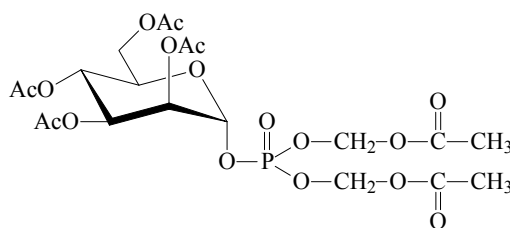
Ausbeute: 59.2 mg (31 %)

gelber Sirup

$[\alpha]_D^{20} = +16.0^\circ$ (c 0.5, $CHCl_3$)

berechnet: C 41.97 H 5.11

gefunden: C 42.87 H 5.29



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 595.43$ $[M+Na]^+$, 611.37 $[M+K]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 5.73-5.64 (m, 5H, H-1, 2x- CH_2 -, AM), 5.36-5.32 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 4.29 (dd, 1H, H-6a), 4.21 (ddd, 1H, H-5), 4.15 (dd, 1H, H-6b), 2.17 (s, 6H, 2x- CH_3 , AM), 2.16, 2.10, 2.06, 1.99 (4xs, 12 H, 4x- CH_3 , Ac) ppm.

$J_{1,2} = 1.8$, $J_{4,5} = 10.4$, $J_{5,6a} = 4.8$, $J_{5,6b} = 2.3$, $J_{6a,6b} = 12.2$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 170.54, 169.72, 169.56, 169.52, 169.24 (C=O), 95.83 (d, C-1), 82.72 (d, $-\text{CH}_2$ -, AM), 82.65 (d, $-\text{CH}_2$ -, AM), 70.96 (C-5), 68.55 (d, C-2), 68.18 (C-3), 65.21 (C-4), 61.90 (C-6), 20.71, 20.67, 20.59, 20.57 ($-\text{CH}_3$, Ac, AM) ppm.

$^2J_{\text{C-1,P}} = 5.1$, 2x $^2J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 5.1 / 6.1$, $^3J_{\text{C-2,P}} = 12.2$ Hz.

$^{13}\text{C-gated}$ (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 96.20 (dd, C-1) ppm.

$^1J_{\text{C-1,H-1}} = 180.1$ Hz.

$^{31}\text{P-NMR}$ (202.46 MHz, CDCl_3): δ = - 5.09 ppm.

Bis-pivaloyloxymethyl-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (26)

Die Umsetzung erfolgt analog zur Darstellung von Verbindung 19.

114 mg (0.270 mmol) 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl-phosphat (18), trockenes Acetonitril (3 ml + 3 ml + 3 ml), *N*-Ethyl-di-*iso*-propylamin (0.170 ml, 1.35 mmol + 0.430 ml, 2.70 mmol), Iodmethylpivaloat (1.61 g, 6.66 mmol), Rühren bei Raumtemperatur über Nacht, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 1 : 1).

$\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{O}_{17}\text{P}$ (656.58)

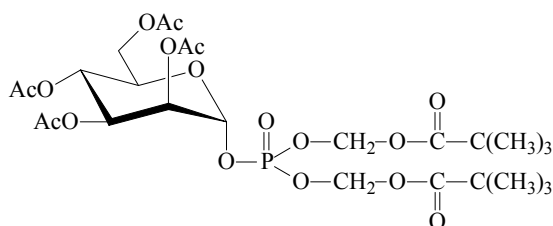
Ausbeute: 39.8 mg (22 %)

gelber Sirup

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 12.7^\circ$ (c 0.4, CHCl_3)

berechnet: C 47.56 H 6.29

gefunden: C 47.66 H 6.65



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 679.14 [M+Na]^+$, $695.09 [M+K]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.74\text{-}5.66$ (m, 5H, H-1, 2x- CH_2 -, POM), $5.37\text{-}5.32$ (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 4.29 (dd, 1H, H-6a), 4.23 (ddd, 1H, H-5), 4.14 (dd, 1H, H-6b), 2.17 , 2.10 , 2.05 , 1.99 (4xs, 12 H, $-\text{CH}_3$), 1.25 (s, 18H, 2x- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, POM) ppm.

$J_{1,2} = 1.5$, $J_{4,5} = 10.2$, $J_{5,6a} = 4.8$, $J_{5,6b} = 2.3$, $J_{6a,6b} = 12.2$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 170.54$, 169.62 , 169.57 , 169.39 (C=O), 96.86 (d, C-1), 83.04 (d, $-\text{CH}_2$ -, POM), 82.88 (d, $-\text{CH}_2$ -, POM), 70.59 (C-5), 68.58 (d, C-2), 68.16 (C-3), 65.30 (C-4), 61.95 (C-6), 38.76 (C_q , $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$, POM), 26.79 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$, POM), 20.69 , 20.64 , 20.56 ($-\text{CH}_3$) ppm.

$^2J_{\text{C-1,P}} = 6.1$, $2x^2J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 5.1$, $^3J_{\text{C-2,P}} = 12.2$ Hz.

$^{13}\text{C-gated}$ (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 95.29$ (dd, C-1) ppm.

$^1J_{\text{C-1,H-1}} = 181.1$ Hz.

$^{31}\text{P-NMR}$ (202.46 MHz, CDCl_3): $\delta = -4.94$ ppm.

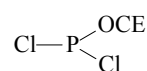
2-Cyanoethyl-phosphordichloridit (27)¹¹⁷

6.1 ml (70 mmol) Phosphortrichlorid werden in 20 ml trockenem Acetonitril gelöst. Anschließend wird über einen Zeitraum von 5 Minuten eine Lösung aus 0.68 ml (10 mmol) 2-Cyanoethanol und 25 ml trockenem Acetonitril zugetropft. Es wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird im Wasserstrahlvakuum filtriert und die Lösung unter vermindertem Druck eingengt. Das Rohprodukt wird ohne zusätzliche Reinigungsschritte weiterverwendet.

$\text{C}_3\text{H}_4\text{Cl}_2\text{NOP}$ (171.95)

Rohausbeute: 1.6 g (95 %) [Lit.¹¹⁷: 93 %]

farblose trübe Flüssigkeit



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.43$ (q, 2H, -O-CH₂-), 2.80 (t, 2H, -CH₂-CN) ppm.

$J_{\text{CH}_2} = 6.1$ / 6.1, $^3J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 7.6$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.77 MHz, CDCl_3): $\delta = 115.99$ (-CN), 61.69 (d, -O-CH₂-), 19.40 (d, -CH₂-CN) ppm.

$^2J_{\text{C,P}} = 3.6$, $^3J_{\text{C,P}} = 10.9$ Hz.

$^{31}\text{P-NMR}$ (202.46 MHz, CDCl_3): $\delta = 181.5$ ppm.

2,2,2-Trichlorethyl-phosphordichloridit (28)¹¹⁸

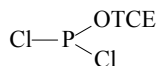
Die Umsetzung erfolgt analog zur Darstellung der Verbindung **27**.

6.1 ml (70 mmol) Phosphortrichlorid, 0.96 ml (10 mmol) 2,2,2-Trichlorethanol, 20 ml + 25 ml trockenes Acetonitril.

$\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_5\text{OP}$ (250.28)

Ausbeute: 2.3 g (92 %) [Lit.¹¹⁸: 29 %]

milchige Flüssigkeit



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.67$ (d, 2H, -O-CH₂-) ppm.

$J_{\text{CH}_2} = 6.6$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.77 MHz, CDCl_3): $\delta = 94.15$ (C_q, -CCl₃), 75.71 (d, -O-CH₂-) ppm.

$^2J_{\text{C,P}} = 11.2$ Hz.

$^{31}\text{P-NMR}$ (202.46 MHz, CDCl_3): $\delta = 180.4$ ppm.

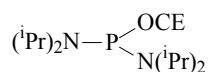
2-Cyanoethyl-bis-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (30)¹²⁰

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 3.

1.27 g (7.40 mmol) 2-Cyanoethyl-phosphordichloridit (**27**), 9.36 ml (66.6 mmol) Di-*iso*-propylamin, 20 ml trockener Diethylether, keine Reinigung des Rohproduktes.

C₁₅H₃₂N₃OP (301.41)

Ausbeute: 1.60 g (72 %) [Lit.¹²⁰: 57 %]



gelbes Öl

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.76 (q, 2H, -O-CH₂-), 3.58-3.45 (m, 4H, 4x-CH(CH₃)₂), 2.76 (dt, 2H, -CH₂-CN), 1.20-1.14 (m, 24H, 4x-CH(CH₃)₂) ppm.

J_{CH₂} = 6.1 / 6.1, ³J_{CH₂,P} = 8.1 Hz.

¹³C-NMR (125.77 MHz, CDCl₃): δ = 116.87 (-CN), 58.15 (d, -O-CH₂-), 45.36, 45.31, 44.63, 44.53 (-CH(CH₃)₂), 24.59-22.92 (-CH(CH₃)₂), 22.10 (d, -CH₂-CN) ppm.

²J_{CH₂,P} = 6.1, ³J_{CH₂,P} = 7.3 Hz.

³¹P-NMR (202.46 MHz, CDCl₃): δ = 15.8 ppm.

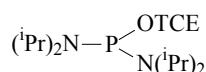
2,2,2-Trichlorethyl-bis-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (32)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 3.

8.15 g (0.033 mol) 2,2,2-Trichlorethyl-phosphordichloridit (**28**), 41.2 ml (0.290 mol) Di-*iso*-propylamin, 100 ml trockener Diethylether, Kugelrohrdestillation T_S = 155 °C, Ölpumpenvakuum.

C₁₄H₃₀Cl₃N₂OP (379.74)

Ausbeute: 4.09 g (33 %)



gelbes Öl

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.46 (q, 2H, -O-CH₂-), 3.62-3.52 (m, 4H, 4x-CH(CH₃)₂), 1.32-1.28 (m, 24H, 4x-CH(CH₃)₂) ppm.

$$J_{\text{CH}_2} = 5.6, {}^3J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 7.8 \text{ Hz.}$$

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 74.84$ (d, $-\text{O}-\text{CH}_2-$), 47.41, 45.38, 45.32, 44.47 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 24.33-22.63 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) ppm.

$${}^2J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 6.5 \text{ Hz.}$$

^{31}P -NMR (202.46 MHz, CDCl_3): $\delta = 15.6$ ppm.

2-Cyanoethyl-*trans*-2-hexen-1-yl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (**33**)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 4.

44 mg (0.63 mmol) 1*H*-Tetrazol, 89 μl (0.63 mmol) Di-*iso*-propylamin, 0.40 g (1.3 mmol) 2-Cyanoethyl-bis-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (**30**), 0.15 ml (1.3 mmol) *trans*-2-Hexen-1-ol, 2 ml + 2 ml trockenes Dichlormethan, Rühren bei Raumtemperatur: 15 Minuten + 2.5 Stunden, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Diethylether/Pentan, 3 : 2).

$\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_2\text{P}$ (300.38)

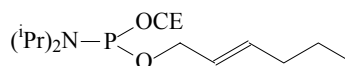
Ausbeute: 0.21 mg (55 %)

gelbes Öl

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +0.3^\circ$ (c 1.0, CHCl_3)

berechnet: C 59.98 H 9.73 N 9.33

gefunden: C 60.39 H 9.90 N 8.97



^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.73$ -5.63 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 5.60-5.52 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 4.18-4.00 (m, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$, Hex), 3.88-3.73 (m, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$, CE), 3.65-3.56 (m, 2x- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.63 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CN}$), 2.01 (dt~q, 2H, $=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 1.39 (m~sex, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, Hex), 1.19, 1.18, 1.17, 1.16 (4xs, 12H, 2x- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.89 (t, 3H, $-\text{CH}_3$, Hex) ppm.

$$2x {}^3J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 7.1 / 7.8 \text{ Hz.}$$

^{13}C -NMR (125.77 MHz, CDCl_3): δ = 132.55 (-CH=CH-), 126.25 (d, -CH=CH-), 116.76 (-CN), 63.55 (d, -O-CH₂-, Hex), 57.60 (d, -O-CH₂-, CE), 42.25, 42.15 (-CH(CH₃)₂), 33.45 (=CH-CH₂-), 23.84, 23.78, 23.69, 23.63 (-CH(CH₃)₂), 21.37 (-CH₂-CH₃, Hex), 19.49 (d, -CH₂-CN), 12.82 (-CH₃, Hex) ppm.

$2 \times {}^2J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 19.4 / 19.4$, ${}^3J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 7.3$, ${}^3J_{\text{CH}=\text{CH},\text{P}} = 7.3$ Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, CDCl_3): δ = 148.6 ppm.

Allyl-*trans*-2-hexen-1-yl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (**34**)

116 mg (1.65 mmol) 1*H*-Tetrazol, 0.230 ml (1.65 mmol) Di-*iso*-propylamin und 1.28 ml (4.00 mmol) Allyl-bis-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (**31**) werden in 9 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Hierzu wird über ein Zeitdauer von 1.5 Stunden eine Lösung von 0.390 ml (3.30 mmol) *trans*-2-Hexen-1-ol in 4 ml trockenem Dichlormethan zugetropft. Anschließend wird für weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird der Ansatz in 15 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung aufgenommen und viermal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgetrennt. Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Diethylether/Pentan, 3 : 1).

$\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{NO}_2\text{P}$ (287.38)

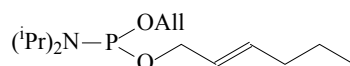
Ausbeute: 880 mg (77 %)

farbloser Sirup

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -0.6^\circ$ (c 1.0, CHCl_3)

berechnet: C 62.69 H 10.52 N 4.87

gefunden: C 60.88 H 10.44 N 4.79



^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 5.98-5.89 (m, 1H, -CH=CH₂), 5.70-5.63 (m, 1H, -CH=CH-), 5.60-5.54 (m, 1H, -CH=CH-), 5.36-5.10 (m, 2H, -CH=CH₂), 4.21-4.04 (m, 4H, -O-CH₂-, All, Hex), 3.65-3.58 (m, 2H, 2x-CH(CH₃)₂), 1.99 (dt~q, 2H, =CH-CH₂-), 1.39 (m~sex, 2H, -CH₂-CH₃, Hex), 1.25 (t, 3H, -CH(CH₃)₂), 1.17 (d, 9H, -CH(CH₃)₂), 0.88 (t, 3H, -CH₃, Hex) ppm.

$$2x \text{ } ^3J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 6.6 / 6.6 \text{ Hz.}$$

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 136.23$ (d, $-\underline{\text{CH}}=\text{CH}_2$), 133.29 ($-\text{CH}=\underline{\text{CH}}-$), 127.90 (d, $-\underline{\text{CH}}=\text{CH}-$), 115.76 ($-\text{CH}=\underline{\text{CH}}_2$), 64.79 , 64.61 (2xd, $-\text{O}-\text{CH}_2-$, All, Hex), 43.32 , 43.20 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 34.73 ($=\text{CH}-\underline{\text{CH}}_2-$), 25.07 , 25.02 , 24.99 , 24.95 ($-\text{CH}(\underline{\text{CH}}_3)_2$), 22.66 ($-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_3$, Hex), 14.09 ($-\text{CH}_3$, Hex) ppm.

$$2x \text{ } ^2J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 8.1 / 8.1, \text{ } ^3J_{\underline{\text{CH}}-\text{CH}_2,\text{P}} = 7.1, \text{ } ^3J_{\underline{\text{CH}}=\text{CH},\text{P}} = 8.1 \text{ Hz.}$$

^{31}P -NMR (202.46 MHz, CDCl_3): $\delta = 148.3$ ppm.

2,2,2-Trichlorethyl-*trans*-2-hexen-1-yl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (35)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 4.

88 mg (1.3 mmol) 1*H*-Tetrazol, 0.18 ml (1.3 mmol) Di-*iso*-propylamin, 1.1 g (2.9 mmol) 2,2,2-Trichlorethyl-bis-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (**32**), 0.35 ml (2.9 mmol) *trans*-2-Hexen-1-ol, 5 ml + 5 ml trockenes Dichlormethan, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Diethylether/Pentan, 3 : 1).

$\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{Cl}_3\text{NO}_2\text{P}$ (378.71)

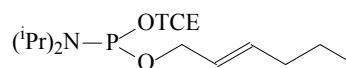
Ausbeute: 0.66 mg (61 %)

gelbes Öl

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +1.2^\circ$ (c 1.0, CHCl_3)

berechnet: C 44.40 H 7.19 N 3.70

gefunden: C 43.99 H 7.00 N 3.64



^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.75$ - 5.66 (m, 1H, $-\text{CH}=\underline{\text{CH}}-$), 5.63 - 5.55 (m, 1H, $-\underline{\text{CH}}=\text{CH}-$), 4.31 - 4.08 (m, 4H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$, TCE, Hex), 3.75 – 3.62 (m, 2x- $\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)_2$), 2.02 (dt~q, 2H, $=\text{CH}-\underline{\text{CH}}_2-$), 1.41 (m~sex, 2H, $-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_3$, Hex), 1.24 - 1.18 (4xs, 12H, 2x- $\text{CH}(\underline{\text{CH}}_3)_2$), 0.90 (t, 3H, $-\underline{\text{CH}}_3$, Hex) ppm.

$$2x \text{ } ^3J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 7.1 / 7.8 \text{ Hz.}$$

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 133.34 ($-\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}-$), 127.12 (d, $-\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}-$), 76.07, 64.74 (2xd, $-\text{O}-\text{CH}_2-$, TCE, Hex), 43.38, 43.25 ($-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$), 34.32 ($=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$), 24.61, 24.54, 24.46 ($-\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 22.24 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_3$, Hex), 13.68 ($-\text{CH}_3$, Hex) ppm.

$2x \text{ } ^2\text{J}_{\text{CH}_2,\text{P}} = 17.3 / 18.3$, $^3\text{J}_{\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH},\text{P}} = 7.1$ Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, CDCl_3): δ = 151.7 ppm.

2-Cyanoethyl-farnesyl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (36)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 4.

57 mg (0.81 mmol) 1*H*-Tetrazol, 0.11 ml (0.81 mmol) Di-*iso*-propylamin, 0.51 mg (1.7 mmol) 2-Cyanoethyl-bis-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (**30**), 0.38 ml (1.6 mmol) Farnesol, 3 ml + 3 ml trockenes Dichlormethan, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 3 : 2).

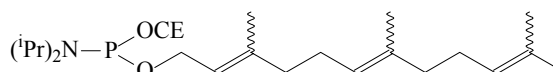
$\text{C}_{24}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_2\text{P}$ (422.59)

Ausbeute: 0.17 mg (26 %)

gelbes Öl

berechnet: C 68.21 H 10.26 N 6.63

gefunden: C 68.42 H 10.36 N 6.06



MALDI-TOF (*nor*-Harmarn, positive mode): m/z = 445.40 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 461.24 $[\text{M}+\text{K}]^+$

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 5.38 (t, 1H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}=\text{C}-$), 5.14-5.04 (m, 2H, $2x-\underline{\text{C}}\text{H}=\text{C}-$), 4.18-4.10 (m, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$, Farn), 3.89-3.77 (m, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$, CE), 3.66-3.56 (m, 2H, $-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$), 2.64 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CN}$), 2.13-1.95 (m, 8H, $4x-\text{CH}_2-$), 1.70-1.65 (m, 12H, $4x-\text{CH}_3$), 1.21, 1.20, 1.19, 1.18 (4xs, 12H, $2x-\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$) ppm.

$2x \text{ } ^3\text{J}_{\text{CH}_2,\text{P}} = 7.1 / 7.8$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 124.33, 123.86, 123.62 ($-\underline{\text{C}}\text{H}=\text{C}-$), 121.75 (d, $-\text{O}-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}=\text{C}-$), 117.21 ($-\text{CN}$), 60.34 (d, $-\text{O}-\text{CH}_2-$, Farn), 58.48 (d, $-\text{O}-\text{CH}_2-$, CE), 43.12, 42.99

(-CH(CH₃)₂), 39.84, 39.72, 39.57, 39.53, 26.76, 26.61, 26.31 (-CH₂-, Farn), 25.71 (-CH₃, Farn), 24.73, 24.65, 24.59, 24.52 (-CH(CH₃)₂), 20.34 (d, -CH₂-CN) ppm.

$2x {}^2J_{CH_2,P} = 18.3 / 18.8$, ${}^3J_{CH_2,P} = 7.1$, ${}^3J_{CH=C,P} = 7.6$ Hz.

${}^{31}P$ -NMR (202.46 MHz, CDCl₃): $\delta = 149.22 / 149.19$ ppm.

2,2,2-Trichlorethyl-farnesyl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (38)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 4.

81 mg (1.2 mmol) 1*H*-Tetrazol, 0.16 ml (1.2 mmol) Di-*iso*-propylamin, 1.0 g (2.7 mmol) 2,2,2-Trichlorethyl-bis-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (**32**), 0.62 ml (2.7 mmol) Farnesol, 5 ml + 5 ml trockenes Dichlormethan, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Diethylether/Pentan, 1 : 1).

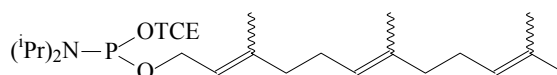
C₂₃H₄₁Cl₃NO₂P (500.92)

Ausbeute: 0.50 mg (39 %)

gelbes Öl

berechnet: C 55.15 H 8.25 N 2.80

gefunden: C 54.87 H 7.91 N 2.85



MALDI-TOF (*nor*-Harmarn, positive mode): $m/z = 522.77 [M+Na]^+$, $538.47 [M+K]^+$

1H -NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.38$ (t, 1H, -O-CH₂-CH=), 5.14-5.04 (m, 2H, 2x-CH=C-), 4.32-4.08 (m, 4H, -O-CH₂-, TCE, Farn), 3.78-3.61 (m, 2H, -CH(CH₃)₂), 2.13-1.95 (m, 8H, 4x-CH₂-), 1.75-1.59 (m, 12H, 4x-CH₃), 1.25-1.18 (m, 12H, 2x-CH(CH₃)₂) ppm.

$2x {}^3J_{CH_2,P} = 7.1 / 7.8$ Hz.

${}^{13}C$ -NMR (125.77 MHz, CDCl₃): $\delta = 124.66, 124.53, 123.87, 123.68$ (-CH=C-), 121.84 (d, -O-CH₂-CH=), 76.10, 60.73 (2xd, -O-CH₂-, TCE, Farn), 43.37, 43.27 (-CH(CH₃)₂), 39.83, 39.73, 39.56, 27.03, 26.75, 26.61, 26.31 (-CH₂-, Farn), 25.73, 25.70 (-CH₃, Farn), 23.51, 23.38, 23.07, 22.83 (-CH(CH₃)₂) ppm.

$$2x {}^2J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 18.2 / 18.2, {}^3J_{\text{CH}=\text{C},\text{P}} = 7.3 \text{ Hz.}$$

^{31}P -NMR (202.46 MHz, CDCl_3): $\delta = 151.8 / 151.7 \text{ ppm.}$

2,2,2-Trichlorethyl-phytyl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (41)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 4.

91 mg (1.3 mmol) 1*H*-Tetrazol, 0.18 ml (1.3 mmol) Di-*iso*-propylamin, 1.5 g (3.0 mmol) 2,2,2-Trichlorethyl-bis-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (**32**), 1.1 ml (3.0 mmol) Phytol, 5 ml + 5 ml trockenes Dichlormethan, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Diethylether/Pentan, 3 : 1).

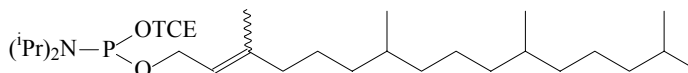
$\text{C}_{28}\text{H}_{55}\text{Cl}_3\text{NO}_2\text{P}$ (575.08)

Ausbeute: 0.78 mg (45 %)

farbloses Öl

berechnet: C 58.48 H 9.64 N 2.44

gefunden: C 58.10 H 9.59 N 2.50



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 598.23 [\text{M}+\text{Na}]^+$, $614.48 [\text{M}+\text{K}]^+$

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.38$ (t, 1H, -O-CH₂-CH=), 4.28-4.10 (m, 4H, -O-CH₂-, TCE, Phy), 3.70-3.63 (m, 2H, -CH(CH₃)₂), 1.65 (t, 3H, =C-CH₃), 1.55-1.48 (m, 1H, -CH-), 1.42-1.35 (m, 2H, 2x-CH-), 1.32-1.00 (m, 30H, 2x-CH(CH₃)₂, 9x-CH₂-), 0.89-0.82 (m, 12H, 4x-CH₃) ppm.

$$2x {}^3J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 7.1 / 7.8 \text{ Hz.}$$

^{13}C -NMR (125.77 MHz, CDCl_3): $\delta = 120.84$ (d, -O-CH₂-CH=), 76.10, 65.86 (2xd, -O-CH₂-, TCE, Phy), 43.37, 43.27 (-CH(CH₃)₂), 39.86 (=C-CH₂-), 39.39, 37.41, 37.31, 25.10, 24.81 (-CH₂-), 32.79, 32.72, 27.99 (-CH-, Phy), 24.61, 24.55, 24.49 (-CH(CH₃)₂), 22.63, 22.34, 19.94, 19.76, 19.69 (-CH₃, Phy), ppm.

$$2x {}^2J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 18.2 / 18.3, {}^3J_{\text{CH}=\text{CH},\text{P}} = 8.4 \text{ Hz.}$$

^{31}P -NMR (202.46 MHz, CDCl_3): $\delta = 151.8 / 151.7$ ppm.

(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-2-cyanoethyl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (42)

103 mg (0.300 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranose (**10**)^{106,107} werden zweimal mit jeweils 3 ml trockenem Pyridin unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingeengt. Unter Argonatmosphäre wird der Rückstand in 10 ml trockenem Dichlormethan aufgenommen. Anschließend werden 75.0 μl (0.440 mmol) *N*-Ethyl-di-*iso*-propylamin und 99.0 μl (0.440 mmol) Chlor-2-cyanoethyl-*N,N*-di-*iso*-propylamin vorsichtig zur Lösung getropft. Es wird 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von 1 ml Methanol wird die Reaktion abgebrochen. Zur Aufarbeitung wird mit Dichlormethan verdünnt und anschließend mit 5 %iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingeengt. Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Toluol/Ethylacetat + 1 % Triethylamin, 2 : 1).

$\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{P}$ (548.53)

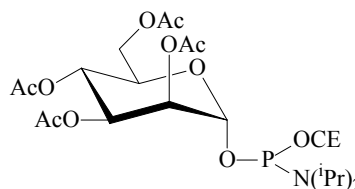
Ausbeute: 107 mg (66 %)

farbloser Sirup

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -3.2^\circ$ (c 0.5, CHCl_3)

berechnet: C 50.36 H 6.80 N 5.11

gefunden: C 50.10 H 6.69 N 5.03



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 571.77$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 587.35 $[\text{M}+\text{K}]^+$

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.39$ - 5.33 (m, 2H, H-3, H-4), 5.23 (dd~t, 1H, H-2), 5.14 (dd~t, 1H, H-1), 4.28 (dd, 1H, H-6a), 4.19 (ddd, 1H, H-5), 4.10 (dd, 1H, H-6b), 3.93 - 3.80 (m, 2H, -O-CH₂-, CE), 3.64 - 3.62 (m, 2H, 2x-CH(CH₃)₂), 2.67 (t, 2H, -CH₂-CN), 2.17 , 2.09 , 2.06 , 2.00 (4xs, 12H, 4x-CH₃, Ac), 1.23 , 1.21 , 1.20 , 1.19 (4xs, 12H, 2x-CH(CH₃)₂) ppm.

$J_{1,2} = 2.5$, $J_{2,3} = 3.1$, $J_{3,4} = 10.2$, $J_{4,5} = 10.2$, $J_{5,6a} = 5.1$, $J_{5,6b} = 2.6$, $J_{6a,6b} = 12.2$, $^3J_{\text{H-1,P}} = 5.1$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 172.85, 170.62, 170.08, 169.72 (C=O), 117.23 (-CN), 92.73 (d, C-1), 72.83 (C-5), 69.16 (C-3), 68.99 (d, C-2), 66.05 (C-4), 62.54 (C-6), 58.89 (d, -O-CH₂-, CE), 43.81, 42.95 (-CH(CH₃)₂), 24.64, 24.53, 24.47 (-CH(CH₃)₂), 20.74, 20.38, 20.34 (-CH₂-CN, -CH₃, Ac), ppm.

$^2J_{\text{C-1,P}}$ = 15.4, $^2J_{\text{CH}_2,\text{P}}$ = 15.6, $^3J_{\text{C-2,P}}$ = 7.1 Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, CDCl_3): δ = 141.9 ppm.

(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-allyl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (43)

Die Umsetzung erfolgt analog zur Darstellung von **34**.

116 mg (1.65 mmol) 1*H*-Tetrazol, 0.230 ml (1.65 mmol) Di-*iso*-propylamin, 1.28 ml (4.00 mmol) Allyl-bis-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit in 9 ml trockenem Dichlormethan, 1.15 g (3.31 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranose (**10**)^{106,107} in 4 ml trockenem Dichlormethan, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Toluol/Ethylacetat, 2 : 1).

$\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{NO}_{11}\text{P}$ (535.53)

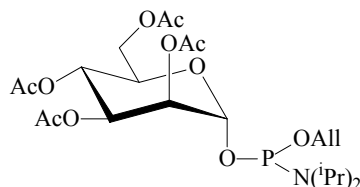
Ausbeute: 1.50 g (84 %)

farbloser Sirup

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -2.5^\circ$ (c 0.5, CHCl_3)

berechnet: C 51.59 H 7.15 N 2.62

gefunden: C 51.98 H 7.18 N 2.62



MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 558. 58 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 6.00-5.88 (m, 1H, -CH=CH₂), 5.42-5.17 (m, 5H, H-2, H-3, H-4, -CH=CH₂), 5.04 (dd, 1H, H-1), 4.32-4.05 (m, 4H, H-6a, H-6b, -O-CH₂-, All), 3.74-3.55 (m, 3H, H-5, 2x-CH(CH₃)₂), 2.17, 2.09, 2.06, 1.99 (4xs, 12H, 4x-CH₃, Ac), 1.23-1.14 (m, 12H, 2x-CH(CH₃)₂) ppm.

$J_{1,2}$ = 1.5, $^3J_{\text{H-1,P}}$ = 5.1 Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 170.67, 170.27, 170.06, 169.76, 169.66 (C=O), 135.14 ($-\underline{\text{CH}}=\text{CH}_2$), 115.49 ($-\text{CH}=\underline{\text{CH}}_2$), 93.53 (d, C-1), 72.61 (C-5), 69.16 (d, C-2), 69.08 (C-3), 66.17 (C-4), 64.86 (d, -O-CH₂-, All), 62.54 (C-6), 43.65, 43.56 ($-\underline{\text{CH}}(\text{CH}_3)_2$), 24.58, 24.50, 24.38 ($-\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 20.87, 20.78, 20.74, 20.61 ($-\text{CH}_3$, Ac), ppm.

$^2\text{J}_{\text{C-1,P}} = 16.3$, $^2\text{J}_{\text{CH}_2,\text{P}} = 15.6$, $^3\text{J}_{\text{C-2,P}} = 4.1$, $^3\text{J}_{\underline{\text{CH}}=\text{CH}_2,\text{P}} = 8.2$ Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, CDCl_3): δ = 150.0 ppm.

(2,3,4,6-Tetra-*O*-butyryl- α -D-mannopyranosyl)-2-cyanoethyl-*trans*-2-hexen-1-yl-phosphat (44)

156 mg (0.340 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-butyryl- α -D-mannopyranose (7) und 204 mg (0.680 mmol) 2-Cyanoethyl-*trans*-2-hexen-1-yl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (33) werden in 4 ml trockenem Dichlormethan aufgenommen. Eine Lösung von 48.0 mg (0.680 mmol) 1*H*-Tetrazol in 2 ml trockenem Acetonitril wird anschließend tropfenweise zugegeben. Der Reaktionsansatz wird für 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt bis die Umsetzung laut dünnschichtchromatographischer Kontrolle vollständig ist (Chloroform/Aceton, 3 : 1). Die Lösung wird dann auf 0 °C abgekühlt und vorsichtig mit 2 ml *tert*-Butylhydroperoxid (80 % in Di-*tert*-butylhydroperoxid) versetzt. Es wird für 1 Stunde bei 0 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird der Reaktionsansatz in 50 ml Wasser aufgenommen und mehrmals mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgetrennt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Chloroform/Aceton, 5 : 1).

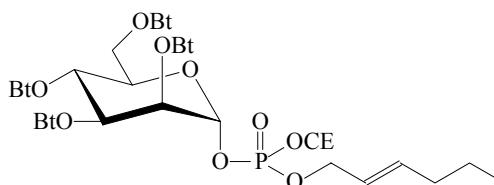
$\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{NO}_{13}\text{P}$ (675.71)

Ausbeute: 204 mg (89 %)

gelber Sirup

berechnet: C 55.10 H 7.46 N 2.07

gefunden: C 53.80 H 7.63 N 2.87



MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 698.28 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 714.40 $[\text{M}+\text{K}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 5.92-5.78 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 5.68-5.54 (m, 2H, H-1, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 5.45-5.32 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 4.63-4.55 (m, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$, Hex), 4.34-4.14 (m, 5H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$, H-5, H-6a, H-6b), 2.79 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CN}$), 2.42-2.18 (m, 8H, 4x- $\text{CO}-\text{CH}_2-$), 2.07 (dt~q, 2H, $=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 1.73-1.54 (m, 8H, 4x- CH_2-CH_3 , Bt), 1.42 (m~sex, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, Hex), 1.03-0.87 (m, 15H, 5x- CH_3 , Bt, Hex) ppm

$J_{3,4} = 9.7$, $J_{4,5} = 9.2$, $^3J_{\text{H-1,P}} = 7.1$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 173.07, 172.36, 172.18, 172.08 (C=O), 138.33 ($-\text{CH}=\text{CH}-$), 123.56 (d, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 116.19 ($-\text{CN}$), 95.48 (d, C-1), 70.68 (C-5), 69.61 (d, $-\text{O}-\text{CH}_2-$, Hex), 68.46 (d, C-2), 68.18 (C-3), 64.72 (C-4), 62.11 (d, $-\text{OCH}_2-$, CE), 61.59 (C-6), 35.96, 35.91, 35.81 ($-\text{CO}-\text{CH}_2-$), 34.17 ($=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 21.91 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, Hex), 19.61 ($-\text{CH}_2-\text{CN}$), 18.41, 18.31, 18.26, 18.09 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, Bt), 13.69, 13.65, 13.58, 13.55 ($-\text{CH}_3$, Bt, Hex) ppm.

$^2J_{\text{C-1,P}} = 5.1$, $2 \times ^2J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 6.1 / 5.1$, $^3J_{\text{C-2,P}} = 10.1$, $^3J_{\text{CH}=\text{CH},\text{P}} = 6.1$ Hz.

$^{13}\text{C-gated}$ (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 95.03 (dd, C-1) ppm.

$^2J_{\text{C-1,H-1}} = 179.2$ Hz.

$^{31}\text{P-NMR}$ (202.46 MHz, CDCl_3): δ = $-2.60 / -2.19$ ppm.

Allyl-(2,3,4,6-tetra-*O*-butyryl- α -D-mannopyranosyl)-*trans*-2-hexen-1-yl-phosphat (45)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 2.

237 mg (0.510 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-butyryl- α -D-mannopyranose (**7**), 371 mg (1.29 mmol) Allyl-*trans*-2-hexen-1-yl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (**34**), 180 mg (2.55 mmol) 1*H*-Tetrazol, 271 mg (1.57 mmol) 3-Chlorperbenzoesäure, 4 ml + 6 ml trockenes Dichlormethan, Reaktionsdauer: 3.5 Stunden bei Raumtemperatur und 1.5 Stunden bei 0 °C, zweimalige säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 3 : 1).

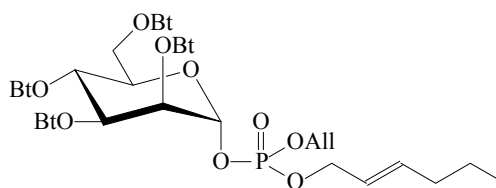
$C_{31}H_{51}O_{13}P$ (662.71)

Ausbeute: 223 mg (66 %)

farbloser Sirup

berechnet: C 56.18 H 7.76

gefunden: C 56.09 H 7.81



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 685.24 [M+Na]^+$, $701.20 [M+K]^+$

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 6.01$ - 5.90 (m, 1H, $-\underline{CH}=CH_2$), 5.88 - 5.79 (m, 1H, $-\underline{CH}=\underline{CH}-$), 5.65 - 5.57 (m, 2H, H-1, $-\underline{CH}=\underline{CH}-$), 5.44 - 5.34 (m, 4H, H-2, H-3, H-4, $-\underline{CH}=\underline{CH}_2$), 5.29 (ddd, 1H, $-\underline{CH}=\underline{CH}_2$), 4.64 - 4.52 (m, 4H, $-\underline{O}-CH_2-$, All, Hex), 4.25 (dd, 1H, H-6a), 4.22 - 4.17 (m, 1H, H-5), 4.13 (dd, 1H, H-6b), 2.42 - 2.17 (m, 8H, $4x-CO-CH_2-$), 2.05 (dt~q, 2H, $=\underline{CH}-\underline{CH}_2-$), 1.75 - 1.53 (m, 8H, $4x-CH_2-CH_3$, Bt), 1.42 (m~sex, 2H, $-\underline{CH}_2-CH_3$, Hex), 1.02 - 0.87 (m, 15H, $5x-CH_3$, Bt, Hex) ppm

$J_{1,2} = 1.8$, $J_{2,3} = 3.8$, $J_{4,5} = 10.2$, $J_{5,6a} = 6.1$, $J_{5,6b} = 2.8$, $J_{6a,6b} = 12.2$, $^3J_{H-1,P} = 6.9$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 173.11$, 172.29 , 172.14 , 172.08 (C=O), 137.56 ($-\underline{CH}=\underline{CH}-$), 132.16 (d, $-\underline{CH}=\underline{CH}_2$), 123.97 (d, $-\underline{CH}=\underline{CH}-$), 118.72 ($-\underline{CH}=\underline{CH}_2$), 95.11 (d, C-1), 70.47 (C-5), 69.20 , 69.01 (2xd, $-\underline{O}-CH_2-$, All, Hex), 68.66 (d, C-2), 68.29 (C-3), 64.96 (C-4), 61.62 (C-6), 35.97 , 35.93 , 35.85 ($-\underline{CO}-\underline{CH}_2-$), 34.18 ($=\underline{CH}-\underline{CH}_2-$), 21.95 ($-\underline{CH}_2-CH_3$, Hex), 18.44 , 18.31 , 18.26 , 18.11 ($-\underline{CH}_2-CH_3$, Bt), 13.69 , 13.64 , 13.58 , 13.56 ($-\underline{CH}_3$, Bt, Hex) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 5.1$, $2x^2J_{CH_2,P} = 5.1 / 6.1$, $^3J_{C-2,P} = 11.2$, $^3J_{\underline{CH}=\underline{CH}_2,P} = 8.1$, $^3J_{\underline{CH}=\underline{CH},P} = 8.1$ Hz.

^{13}C -gated (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 95.71$ (dd, C-1) ppm.

$^2J_{C-1,H-1} = 179.0$ Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, $CDCl_3$): $\delta = -2.51 / -2.49$ ppm.

(2,3,4,6-Tetra-*O*-butyryl- α -D-mannopyranosyl)-2,2,2-trichlorethyl-*trans*-2-hexen-1-yl-phosphat (46 α) und (2,3,4,6-Tetra-*O*-butyryl- β -D-mannopyranosyl)-2,2,2-trichlorethyl-*trans*-2-hexen-1-yl-phosphat (46 β)

Die Umsetzung erfolgt analog zur Darstellung von 44.

129 mg (0.280 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-butyryl- α -D-mannopyranose 7, 212 mg (0.560 mmol) 2,2,2-Trichlorethyl-*trans*-2-hexen-1-yl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (35), 4 ml trockenes Dichlormethan, 39.0 mg (0.560 mmol) 1*H*-Tetrazol in 2 ml trockenem Acetonitril, Rühren bei Raumtemperatur 2.5 Stunden; 1.5 ml *tert*-Butylhydroperoxid (80 % in Di-*tert*-butylhydroperoxid), Rühren bei 0 °C für 20 Minuten, zweimalige säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Chloroform/Aceton, 7 : 1).

C₃₀H₄₈Cl₃O₁₃P (754.04)

Gesamtausbeute: 136 mg (64 %)

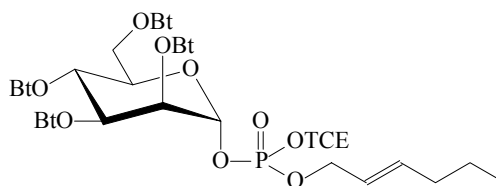
α -Diastereomer:

Ausbeute: 75.6 mg (36 %)

gelber Sirup

berechnet: C 47.79 H 6.42

gefunden: C 43.51 H 6.22



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 777.32 [M+Na]^+$, $793.28 [M+K]^+$

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.93$ - 5.83 (m, 1H, -CH=CH-), 5.71 (dd, 1H, H-1), 5.67 - 5.60 (m, 1H, -CH=CH-), 5.46 - 5.36 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 4.68 - 4.54 (m, 4H, -O-CH₂-, TCE, Hex), 4.30 - 4.13 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 2.48 - 2.18 (m, 8H, 4x-CO-CH₂-), 2.05 (dt~q, 2H, =CH-CH₂-), 1.75 - 1.53 (m, 8H, 4x-CH₂-CH₃, Bt), 1.43 (m~sex, 2H, -CH₂-CH₃, Hex), 1.02 - 0.88 (m, 15H, 5x-CH₃, Bt, Hex) ppm

$J_{1,2} = 1.5$, $^3J_{H-1,P} = 6.1$ Hz.

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): $\delta = 173.08$, 172.31 , 172.07 (C=O), 138.30 (d, -CH=CH-), 124.02 (d, -CH=CH-), 95.63 (d, C-1), 75.99 (d, -O-CH₂-*), 70.76 (C-5), 70.07 (d, -O-CH₂-*),

68.45 (d, C-2), 68.11 (C-3), 64.77 (C-4), 61.56 (C-6), 35.96, 35.90, 35.82 (-CO-CH₂-), 34.19 (=CH-CH₂-), 21.90 (-CH₂-CH₃, Hex), 18.43, 18.30, 18.26, 18.10 (-CH₂-CH₃, Bt), 13.67, 13.65, 13.58 (-CH₃, Bt, Hex) ppm.

* keine genaue Zuordnung möglich

$^2J_{C-1,P} = 6.1$, $2x\ ^2J_{CH_2,P} = 4.1 / 5.1$, $^3J_{C-2,P} = 12.2$, $^3J_{CH=CH,P} = 6.1$ Hz.

^{13}C -gated (100.62 MHz, CDCl₃): $\delta = 96.10$ (dd, C-1) ppm.

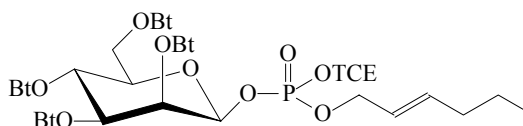
$^2J_{C-1,H-1} = 185.3$ Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, CDCl₃): $\delta = -3.28 / -3.57$ ppm.

β -Diastereomer:

Ausbeute: 59.9 mg (28 %)

gelber Sirup



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 77.65$ [M+Na]⁺, 793.46 [M+K]⁺

1H -NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.92$ - 5.77 (m, 1H, -CH=CH-), 5.69 - 5.58 (m, 1H, -CH=CH-), 5.56 (dd~t, 1H, H-2), 5.51 (dd~t, 1H, H-1), 5.31 (dd~t, 1H, H-4), 5.15 - 5.09 (m, 1H, H-3), 4.68 - 4.45 (m, 4H, -O-CH₂-, TCE, Hex), 4.33 - 4.13 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.88 - 3.77 (m, 1H, H-5), 2.46 - 2.17 (m, 8H, 4x-CO-CH₂-), 2.05 (dt~q, 2H, =CH-CH₂-), 1.74 - 1.53 (m, 8H, 4x-CH₂-CH₃, Bt), 1.42 (m~sex, 2H, -CH₂-CH₃, Hex), 1.03 - 0.87 (m, 15H, 5x-CH₃, Bt, Hex) ppm.

$J_{2,3} = 3.6$, $J_{3,4} = 10.2$, $J_{4,5} = 10.2$, $J_{5,6a} = 2.0$, $^3J_{H-1,P} = 7.7$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl₃): $\delta = 173.07$, 172.53 , 172.27 , 172.13 (C=O), 137.94 (d, -CH=CH-), 123.59 (d, -CH=CH-), 94.33 (d, C-1), 73.33 (C-5), 70.14 (C-3), 69.96 - 69.90 (2xd, -O-CH₂-, TCE, Hex), 68.08 (d, C-2), 64.94 (C-4), 61.79 (C-6), 36.00 - 35.75 (-CO-CH₂-), 34.21 (=CH-CH₂-), 21.92 (-CH₂-CH₃, Hex), 18.52 , 18.31 , 18.26 , 18.10 (-CH₂-CH₃, Bt), 13.69 , 13.65 , 13.58 , 13.56 (-CH₃, Bt, Hex) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 5.1$, $2 \times ^2J_{CH_2,P} = 6.1 / 6.1$, $^3J_{C-2,P} = 9.2$, $^3J_{CH=CH,P} = 7.1$ Hz.

^{13}C -gated (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 94.82$ (dd, C-1) ppm.

$^2J_{C-1,H-1} = 155.0$ Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, $CDCl_3$): $\delta = -3.53 / -3.13$ ppm.

2-Cyanoethyl-*trans*-2-hexen-1-yl-(2,3,4,6-tetra-*O*-pivaloyl- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (47)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 2.

78 mg (0.15 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-pivaloyl- α -D-mannopyranose (8), 0.10 mg (0.33 mmol) 2-Cyanoethyl-*trans*-2-hexen-1-yl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (33), 53 mg (0.76 mmol) 1*H*-Tetrazol, 0.13 mg (0.75 mmol) 3-Chlorperbenzoesäure, 2 ml + 2 ml trockenes Dichlormethan, Reaktionsdauer: 3 Stunden bei Raumtemperatur und 2 Stunden bei 0 °C, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Petrol-ether(50/70)/Ethylacetat, 2 : 1).

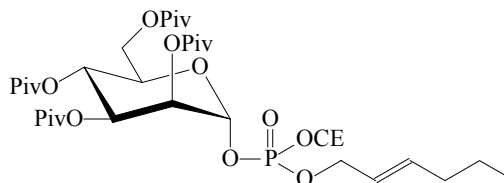
$C_{35}H_{58}NO_{13}P$ (731.82)

Ausbeute: 87 mg (79 %)

weißer Sirup

berechnet: C 57.44 H 7.99 N 1.91

gefunden: C 57.45 H 7.88 N 2.07



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 754.52 [M+Na]^+$, $770.45 [M+K]^+$

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.92$ -5.83 (m, 1H, -CH=CH-), 5.69-5.56 (m, 3H, H-1, H-4, -CH=CH-), 5.41-5.33 (m, 2H, H-2, H-3), 4.64-4.57 (m, 2H, -O-CH₂-, Hex), 4.35-4.10 (m, 5H, H-5, H-6a, H-6b, -O-CH₂-, CE), 2.81 (t, 2H, -CH₂-CN), 2.07 (dt~q, 2H, =CH-CH₂-), 1.43 (m~sex, 2H, -CH₂-CH₃), 1.27, 1.24, 1.17, 1.12 (4xs, 36H, 4x-C(CH₃)₃), 0.91 (t, 3H, -CH₃) ppm.

$J_{1,2} = 1.5$, $J_{3,4} = 10.2$, $J_{4,5} = 10.2$, $^3J_{H-1,P} = 6.6$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 176.83, 167.77, 176.73, 176.65 (C=O), 138.11 (-CH=CH-), 123.45 (d, -CH=CH-), 95.76 (d, C-1), 71.69 (C-5), 70.90 (d, -O-CH₂-, Hex), 69.69 (d, C-2), 68.75 (C-3), 64.12 (C-4), 62.23 (d, -O-CH₂-, CE), 61.17 (C-6), 38.92, 38.83 (C_q, -C(CH₃)₃), 34.18 (=CH-CH₂-), 27.13, 27.09 (-C(CH₃)₃), 21.91 (-CH₂-CH₃), 29.65 (-CH₂-CN), 13.65 (-CH₃) ppm.

$^2J_{\text{C-1,P}} = 5.1$, $2 \times ^2J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 7.1 / 7.1$, $^3J_{\text{C-2,P}} = 8.1$, $^3J_{\text{CH=CH,P}} = 8.1$ Hz.

^{13}C -gated (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 95.17 (dd, C-1) ppm.

$^2J_{\text{C-1,H-1}} = 178.0$ Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, CDCl_3): δ = - 2.92 / - 3.07 ppm.

Allyl-*trans*-2-hexen-1-yl-(2,3,4,6-tetra-*O*-pivaloyl- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (48)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 2.

184 mg (0.360 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-pivaloyl- α -D-mannopyranose (8), 270 mg (0.940 mmol) Allyl-*trans*-2-hexenyl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (34), 126 mg (1.80 mmol) 1*H*-Tetrazol, 186 mg (1.08 mmol) 3-Chlorperbenzoesäure, 3 ml + 5 ml trockenes Dichlormethan, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 2 : 1).

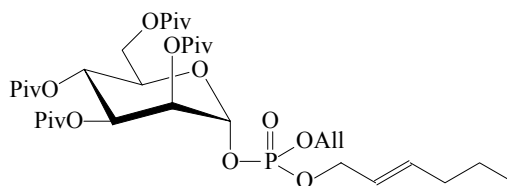
$\text{C}_{35}\text{H}_{59}\text{O}_{13}\text{P}$ (718.82)

Ausbeute: 229 mg (90 %)

farbloser Sirup

berechnet: C 58.48 H 8.27

gefunden: C 58.09 H 8.24



MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 741.14 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 757.11 $[\text{M}+\text{K}]^+$

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 6.02-5.91 (m, 1H, -CH=CH₂), 5.89-5.80 (m, 1H, -CH=CH-), 5.67-5.62 (m, 1H, -CH=CH-), 5.61 (dd, H-1), 5.57 (dd~t, 1H, H-4), 5.43-5.37 (m, 2H, H-3, -CH=CH₂), 5.35 (dd~t, 1H, H-2), 5.29 (ddd~ddt, 1H, -CH=CH₂), 4.63-4.53 (m, 4H,

-O-CH₂-, All, Hex), 4.27-4.08 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 2.05 (dt~q, 2H, =CH-CH₂-), 1.42 (m~sex, 2H, -CH₂-CH₃), 1.27, 1.24, 1.16, 1.12 (4xs, 36H, 4x-C(CH₃)₃), 0.91(t, 3H, -CH₃) ppm

$J_{1,2} = 1.5$, $J_{2,3} = 3.1$, $J_{3,4} = 10.2$, $J_{4,5} = 10.2$, $^3J_{H-1,P} = 6.1$ Hz.

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): δ = 178.04, 177.12, 176.67, 176.46 (C=O), 137.59 (-CH=CH-), 132.10 (d, -CH=CH₂), 123.90 (d, -CH=CH-), 118.99 (-CH=CH₂), 95.37 (d, C-1), 70.60 (C-5), 69.05 (d, -O-CH₂-*), 68.76 (C-3), 68.71-68.56 (2xd, -O-CH₂-, C-2), 64.33 (C-4), 61.29 (C-6), 38.92, 38.81, 38.78 (C_q, -C(CH₃)₃), 34.18 (=CH-CH₂-), 27.11, 27.08 (-C(CH₃)₃), 21.94 (-CH₂-CH₃), 13.64(-CH₃) ppm.

* keine genaue Zuordnung möglich

$^2J_{C-1,P} = 5.1$, $2x ^2J_{CH_2,P} = 5.1 / 5.1$, $^3J_{C-2,P} = 11.2$, $^3J_{CH=CH_2,P} = 7.1$, $^3J_{CH=CH,P} = 7.1$ Hz.

¹³C-gated (100.62 MHz, CDCl₃): δ = 95.93 (dd, C-1) ppm.

$^2J_{C-1,H-1} = 179.0$ Hz.

³¹P-NMR (101.26 MHz, CDCl₃): δ = - 2.23 / - 2.29 ppm.

2,2,2-Trichlorethyl-*trans*-2-hexen-1-yl-(2,3,4,6-tetra-*O*-pivaloyl- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (49)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 2.

240 mg (0.460 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-pivaloyl- α -D-mannopyranose (**8**), 380 mg (1.00 mmol) 2,2,2-Trichlorethyl-*trans*-2-hexen-1-yl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (**35**), 161 mg (2.30 mmol) 1*H*-Tetrazol, 400 mg (2.30 mmol) 3-Chlorperbenzoesäure, 4 ml + 4 ml trockenes Dichlormethan, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 3 : 1).

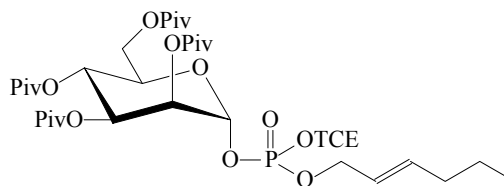
$C_{34}H_{56}Cl_3O_{13}P$ (810.14)

Ausbeute: 170 mg (46 %)

farbloser Sirup

berechnet: C 50.41 H 6.97

gefunden: C 49.32 H 7.02



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 833.63 [M+Na]^+$, $849.59 [M+K]^+$

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.93$ - 5.84 (m, 1H, $-CH=CH-$), 5.70 - 5.65 (m, 1H, $-CH=CH-$), 5.63 - 5.55 (m, H-1, H-4), 5.44 - 5.34 (m, 2H, H-2, H-3), 4.71 - 4.47 (m, 4H, $-O-CH_2-$, TCE, Hex), 4.30 - 4.41 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 2.06 (dt~q, 2H, $=CH-CH_2-$), 1.42 (m~sex, 2H, $-CH_2-CH_3$), 1.27 , 1.24 , 1.16 , 1.12 (4xs, 36H, $4x-C(CH_3)_3$), 0.91 (t, 3H, $-CH_3$) ppm.

$J_{1,2} = 1.5$, $J_{4,5} = 10.2$, $^3J_{H-1,P} = 6.1$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 172.35$, 172.25 , 171.18 , 171.07 (C=O), 138.26 ($-CH=CH-$), 123.61 (d, $-CH=CH-$), 95.78 (d, C-1), 74.72 (C-5), 70.72 (C-3), 69.95 , 69.59 (2xd, $-O-CH_2-$, TCE, Hex), 68.71 (d, C-2), 64.29 (C-4), 61.19 (C-6), 38.92 , 38.82 , 38.79 (C_q , $-C(CH_3)_3$), 34.19 ($=CH-CH_2-$), 27.13 , 27.09 , 27.06 ($-C(CH_3)_3$), 21.90 ($-CH_2-CH_3$), 13.65 ($-CH_3$) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 6.1$, $2x^2J_{CH_2,P} = 5.1 / 5.1$, $^3J_{C-2,P} = 10.2$, $^3J_{CH=CH,P} = 5.1$ Hz.

^{13}C -gated (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 96.39$ (dd, C-1) ppm.

$^2J_{C-1,H-1} = 177.0$ Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, $CDCl_3$): $\delta = -3.24 / -3.22$ ppm.

2-Cyanoethyl-*trans*-2-hexen-1-yl-(2,3,4,6-tetra-*O*-*iso*-propylcarbonat- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (50)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 2.

64 mg (0.12 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-*iso*-propylcarbonat- α -D-mannopyranose (**9**),
81 mg (0.27 mmol) 2-Cyanoethyl-*trans*-2-hexen-1-yl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphor-
amidit (**33**), 42 mg (0.60 mmol) 1*H*-Tetrazol, 0.10 mg (0.60 mmol)
3-Chlorperbenzoesäure, 2 ml + 2 ml trockenes Dichlormethan, zweimalige
säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat,
1 : 1).

$C_{31}H_{50}NO_{17}P$ (739.71)

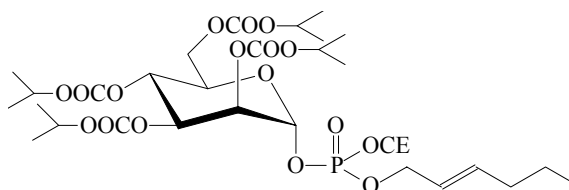
Gesamtausbeute: 49 mg (55 %)

1.Diastereomer:

Ausbeute: 30 mg (33 %)

weißer Schaum

$[\alpha]_D^{20} = +12.1^\circ$ (c 1.0, $CHCl_3$)



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 762.25 [M+Na]^+$, $778.21 [M+K]^+$

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.92$ - 5.83 (m, 1H, $-CH=CH-$), 5.78 (dd, 1H, H-1), 5.68 - 5.59 (m, 1H, $-CH=CH-$), 5.29 (dd~t, 1H, H-2), 5.17 (dd, 1H, H-3), 5.10 (dd~t, 1H, H-4), 4.93 - 4.81 (m, 4H, $4x-CH(CH_3)_2$), 4.60 (dt, 2H, $-O-CH_2-$, Hex), 4.40 - 4.20 (m, 5H, H-5, H-6a, H-6b, $-O-CH_2-$, CE), 2.82 (t, 2H, $-CH_2-CN$), 2.07 (dt~q, 2H, $=CH-CH_2-$), 1.43 (m~q, 2H, $-CH_2-CH_3$), 1.35 - 1.24 (m, 24H, $4x-CH(CH_3)_2$), 0.91 (t, 3H, $-CH_3$) ppm.

$J_{1,2} = 1.8$, $J_{2,3} = 2.8$, $J_{3,4} = 10.2$, $J_{4,5} = 9.7$, $^3J_{H-1,P} = 6.6$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 154.76$, 154.12 , 153.52 , 153.47 (C=O), 138.27 ($-CH=CH-$), 123.51 (d, $-CH=CH-$), 116.32 ($-CN$), 96.00 (d, C-1), 73.47 , 73.23 , 72.96 ($-CH(CH_3)_2$), 71.58 (C-3), 71.37 (d, C-2), 70.46 (C-5), 69.84 (d, $-O-CH_2-$, Hex), 69.13 (C-4), 65.82 (C-6), 62.16 (d, $-O-CH_2-$, CE), 34.16 ($=CH-CH_2-$), 21.91 - 21.61 ($-CH_2-CH_3$, $-CH(CH_3)_2$), 20.00 ($-CH_2-CN$), 13.65 ($-CH_3$) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 6.1$, $2 \times ^2J_{CH_2,P} = 5.1 / 5.1$, $^3J_{C-2,P} = 11.2$ Hz.

^{13}C -gated (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 95.51$ (dd, C-1) ppm.

$^2J_{C-1,H-1} = 178.0$ Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, $CDCl_3$): $\delta = -2.66$ ppm.

2. Diastereomer:

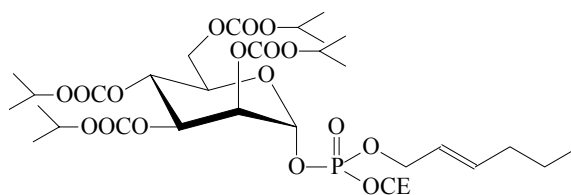
Ausbeute: 20 mg (22 %)

weißer Schaum

$[\alpha]_D^{20} = +20.5^\circ$ (c 0.5, $CHCl_3$)

berechnet: C 50.34 H 6.81 N 1.89

gefunden: C 50.87 H 6.87 N 2.03



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 762.24$ $[M+Na]^+$, 778.20 $[M+K]^+$

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.92$ - 5.82 (m, 1H, -CH=CH-), 5.73 (dd, 1H, H-1), 5.67 - 5.58 (m, 1H, -CH=CH-), 5.29 (dd~t, 1H, H-2), 5.19 - 5.08 (m, 2H, H-3, H-4), 4.94 - 4.82 (m, 4H, 4x-CH(CH₃)₂), 4.63 - 4.57 (m, 2H, -O-CH₂-, Hex), 4.36 - 4.20 (m, 5H, H-5, H-6a, H-6b, -O-CH₂-, CE), 2.81 (t, 2H, -CH₂-CN), 2.09 - 2.02 (m, 2H, =CH-CH₂-), 1.42 (m, 2H, -CH₂-CH₃), 1.34 (m, 24H, 4x-CH(CH₃)₂), 0.91 (t, 3H, -CH₃) ppm.

$J_{1,2} = 1.8$, $J_{2,3} = 2.3$, $J_{3,4} = 9.9$, $J_{4,5} = 10.2$, $^3J_{H-1,P} = 6.6$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 153.45$ (C=O), 138.16 (-CH=CH-), 123.60 (d, -CH=CH-), 116.20 (-CN), 95.04 (d, C-1), 73.47 , 73.18 , 72.97 , 72.48 (-CH(CH₃)₂), 71.58 (C-3), 71.41 (d, C-2), 70.49 (C-5), 69.78 (d, -O-CH₂-, Hex), 69.04 (C-4), 65.48 (C-6), 62.22 (d, -O-CH₂-, CE), 34.18 (=CH-CH₂-), 21.91 (-CH₂-CH₃), 21.76 - 21.58 (-CH(CH₃)₂), 20.00 (-CH₂-CN), 13.64 (-CH₃) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 6.1$, $2 \times ^2J_{CH_2,P} = 7.1 / 7.1$, $^3J_{C-2,P} = 12.2$ Hz.

^{13}C -gated (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 95.62$ (dd, C-1) ppm.

$^2J_{\text{C-1,H-1}} = 181.1$ Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, CDCl_3): $\delta = -3.42$ ppm.

Allyl-*trans*-2-hexen-1-yl-(2,3,4,6-tetra-*O*-iso-propylcarbonat- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (51)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 2.

135 mg (0.260 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-iso-propylcarbonat- α -D-mannopyranose (**9**), 178 mg (0.620 mmol) Allyl-*trans*-2-hexen-1-yl-*N,N*-di-iso-propylphosphoramidit (**34**), 92.0 mg (1.30 mmol) 1*H*-Tetrazol, 130 mg (0.750 mmol) 3-Chlorperbenzoesäure, 3 ml + 4 ml trockenes Dichlormethan, zweimalige säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 3 : 1).

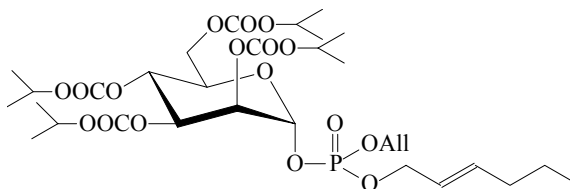
$\text{C}_{31}\text{H}_{51}\text{O}_{17}\text{P}$ (726.71)

Ausbeute: 134 mg (71 %)

gelber Sirup

berechnet: C 51.24 H 7.07

gefunden: C 50.59 H 7.12



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 749.31$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 765.27 $[\text{M}+\text{K}]^+$

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.00$ -5.90 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.88-5.79 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 5.75 (dd~dt, 1H, H-1), 5.66-5.56 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 5.39 (ddd, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.32-5.24 (m, 2H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$, H-2), 5.20-5.11 (m, 2H, H-3, H-4), 4.92-4.81 (m, 4H, 4x- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.63-4.51 (m, 4H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$, All, Hex), 4.34 (dd, 1H, H-6a), 4.25-4.19 (m, 2H, H-5, H-6b), 2.05 (dt~q, 2H, $=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 1.42 (m~sex, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 1.34-1.25 (m, 24H, 4x- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.91 (t, 3H, $-\text{CH}_3$) ppm.

$J_{1,2} = 1.8$, $J_{2,3} = 3.8$, $J_{4,5} = 10.2$, $J_{5,6a} = 6.1$, $J_{5,6b} = 2.8$, $J_{6a,6b} = 12.2$, $^3J_{\text{H-1,P}} = 6.9$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 154.30, 153.58, 153.45, 153.31 (C=O), 137.15 ($-\text{CH}=\text{CH}-$), 132.11 (d, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 124.07 (d, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 118.61 ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), 94.67 (d, C-1), 73.32, 73.07, 72.82, 72.33 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 71.73 (C-3), 71.57 (d, C-2), 70.21 (C-5), 69.20 (C-4), 69.09, 68.76 (2xd, $-\text{O}-\text{CH}_2-$, All, Hex), 65.41 (C-6), 34.19 ($=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 21.95 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 21.77-21.43 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 13.65, 13.62, 13.50 ($-\text{CH}_3$) ppm.

$^2J_{\text{C-1,P}} = 5.1$, $2 \times ^2J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 6.1 / 5.1$, $^3J_{\text{C-2,P}} = 10.2$, $^3J_{\text{CH}=\text{CH}_2,\text{P}} = 7.1$, $^3J_{\text{CH}=\text{CH},\text{P}} = 7.1$ Hz.

^{13}C -gated (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 94.06 (dd, C-1) ppm.

$^2J_{\text{C-1,H-1}} = 179.0$ Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, CDCl_3): δ = - 1.83 / - 1.92 ppm.

2,2,2-Trichlorethyl-*trans*-2-hexen-1-yl-(2,3,4,6-tetra-*O*-iso-propylcarbonat- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (52 α) und 2,2,2-Trichlorethyl-*trans*-2-hexen-1-yl-(2,3,4,6-tetra-*O*-iso-propylcarbonat- β -D-mannopyranosyl)-phosphat (52 β)

Die Umsetzung erfolgt analog zur Darstellung von 44.

126 mg (0.280 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-iso-propylcarbonat- α -D-mannopyranose (**9**),
 119 mg (0.480 mmol) 2,2,2-Trichlorethyl-*trans*-2-hexen-1-yl-*N,N*-di-iso-propylphosphoramidit (**35**), 4 ml trockenes Dichlormethan, 34.0 mg (0.480 mmol) 1*H*-Tetrazol in 2 ml trockenem Acetonitril, Rühren bei Raumtemperatur 3 Stunden; 2.00 ml *tert*-Butylhydroperoxid (80 % in Di-*tert*-butylhydroperoxid), Rühren bei 0 °C für 30 Minuten, zweimalige säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Chloroform/Aceton, 7 :1).

$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{Cl}_3\text{O}_{17}\text{P}$ (818.03)

Gesamtausbeute: 112 mg (57 %)

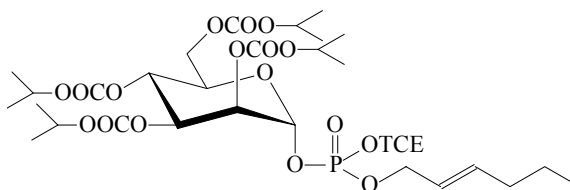
α -Diastereomer:

Ausbeute: 52.9 mg (27 %)

gelber Sirup

berechnet: C 44.05 H 5.91

gefunden: C 44.70 H 6.17



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 841.29 [M+Na]^+$, $857.26 [M+K]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.92\text{--}5.75$ (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 5.83 (dd, 1H, H-1), 5.69–5.56 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 5.31 (dd~t, 1H, H-2), 5.20–5.10 (m, 2H, H-3, H-4), 4.92–4.81 (m, 4H, 4x- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.70–4.60 (m, 4H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$, TCE, Hex), 4.37–4.22 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 2.05 (dt~q, 2H, $=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 1.42 (m~sex, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, Hex), 1.35–1.25 (m, 24H, 4x- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.91 (t, 3H, $-\text{CH}_3$) ppm.

$J_{1,2} = 2.0$, $J_{2,3} = 5.1$, $J_{3,4} = 9.7$, $J_{4,5} = 9.7$, $^3J_{\text{H-1,P}} = 6.1$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 154.26$, 153.51, 153.41, 153.30 (C=O), 138.22 ($-\text{CH}=\text{CH}-$), 123.48 (d, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 95.05 (d, C-1), 77.15 (d, $-\text{OCH}_2-$), 73.45, 73.20, 72.94, 72.50 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 71.58 (C-3, C-4*), 71.33 (d, C-2), 70.41 (C-5), 70.01 (d, $-\text{OCH}_2-$), 69.02 (C-4), 65.46 (C-6), 34.17 ($=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 25.76 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 21.90–21.61 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 13.66 ($-\text{CH}_3$) ppm.

* keine genaue Zuordnung möglich

$^2J_{\text{C-1,P}} = 5.1$, $2x^2J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 6.1 / 6.1$, $^3J_{\text{C-2,P}} = 12.2$, $^3J_{\text{CH}=\text{CH},\text{P}} = 7.1$ Hz.

$^{13}\text{C-gated}$ (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 94.60$ (dd, C-1) ppm.

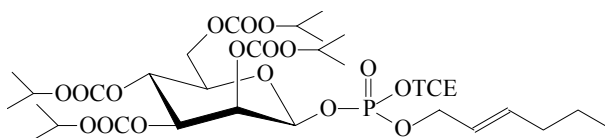
$^2J_{\text{C-1,H-1}} = 174.4$ Hz.

$^{31}\text{P-NMR}$ (202.46 MHz, CDCl_3): $\delta = -3.02 / -3.57$ ppm.

β -Diastereomer:

Ausbeute: 59.0 mg (30 %)

gelber Sirup



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 839.10 [M+Na]^+$, $855.09 [M+K]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.91\text{--}5.77$ (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 5.69–5.56 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 5.52 (dd~t, 1H, H-1), 5.47 (dd, 1H, H-3), 5.07 (dd~t, 1H, H-4), 4.95–4.80 (m, 5H,

H-2, 4x-CH(CH₃)₂), 4.69-4.53 (m, 4H, -O-CH₂-, TCE, Hex), 4.36-4.22 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.90-3.83 (m, 1H, H-5), 2.04 (dt~q, 2H, =CH-CH₂-), 1.42 (m~sex, 2H, -CH₂-CH₃, Hex), 1.35-1.23 (m, 24H, 4x-CH(CH₃)₂), 0.91 (t, 3H, -CH₃) ppm.

$J_{1,2} = 1.5$, $J_{2,3} = 3.1$, $J_{3,4} = 9.2$, $J_{4,5} = 9.7$, $^3J_{H-1,P} = 6.6$ Hz.

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): δ = 154.26, 154.00, 153.41, 153.26 (C=O), 137.87 (-CH=CH-), 123.65 (d, -CH=CH-), 94.02 (d, C-1), 77.15 (d, -O-CH₂-*), 73.45 (C-3*), 73.34, 73.31, 73.25, 73.20 (-CH(CH₃)₂), 73.14 (C-5*), 71.59 (d, C-2), 68.98 (d, -OCH₂-*), 69.04 (C-4), 65.44 (C-6), 34.21 (=CH-CH₂-), 21.90 (-CH₂-CH₃), 21.77-21.61 (-CH(CH₃)₂), 13.66 (-CH₃) ppm.

* keine genaue Zuordnung möglich

$^2J_{C-1,P} = 6.1$, $2x \ ^2J_{CH_2,P} = 6.1 / 6.1$, $^3J_{CH=CH,P} = 6.1$ Hz.

¹³C-gated (100.62 MHz, CDCl₃): δ = 93.17 (dd, C-1) ppm.

$^2J_{C-1,H-1} = 165.9$ Hz.

³¹P-NMR (202.46 MHz, CDCl₃): δ = - 2.99 / - 3.67 ppm.

(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-2-cyanoethyl-*trans*-2-hexen-1-yl-phosphat (53)

95 mg (0.17 mmol) (2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-2-cyanoethyl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (**42**) und 20 μ l (0.17 mmol) *trans*-2-Hexen-1-ol werden in 4 ml trockenem Dichlormethan aufgenommen. Eine Lösung von 14 mg (0.20 mmol) 1*H*-Tetrazol in 2 ml trockenem Acetonitril wird anschließend tropfenweise zugegeben. Der Reaktionsansatz wird für 3.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt bis die Umsetzung laut DC-Kontrolle vollständig ist (Chloroform/Aceton, 3 : 1). Die Lösung wird dann auf 0 °C abgekühlt und vorsichtig mit 2.5 ml *tert*-Butylhydroperoxid (70 % in H₂O) versetzt. Es wird für 20 Minuten bei 0 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird der Reaktionsansatz in 60 ml Wasser aufgenommen und mehrmals mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem

Druck abgetrennt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Toluol/Ethylacetat, 1 : 4).

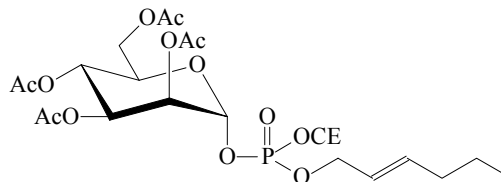
$C_{23}H_{34}NO_{13}P$ (563.50)

Ausbeute: 52 mg (53 %)

gelber Sirup

berechnet: C 49.02 H 6.08 N 2.49

gefunden: C 49.03 H 6.39 N 2.42



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 586.48 [M+Na]^+$, $602.41 [M+K]^+$

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.91$ - 5.79 (m, 1H, $-CH=CH-$), 5.69 - 5.57 (m, 2H, H-1, $-CH=CH-$), 5.40 - 5.30 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 4.63 - 4.57 (m, 2H, $-O-CH_2-$, Hex), 4.34 - 4.12 (m, 5H, H-5, H-6a, H-6b, $-O-CH_2-$, CE), 2.83 - 2.76 (m, 2H, $-CH_2-CN$), 2.17 (s, 3H, $-CH_3$, Ac), 2.10 (dt~q, 2H, $=CH-CH_2-$), 2.07 , 2.06 , 2.01 (3xs, 9H, 3x- CH_3 , Ac), 1.42 (m~sex, 2H, $-CH_2-CH_3$, Hex), 0.91 (t, 3H, $-CH_3$, Hex) ppm.

$J_{1,2} = 1.5$, $^3J_{H-1,P} = 6.6$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 169.82$, 169.75 , 169.67 , 169.62 (C=O), 138.17 ($-CH=CH-$), 123.55 (d, $-CH=CH-$), 94.83 (d, C-1), 70.71 ($-O-CH_2-$, Hex), 70.54 (C-5), 68.34 (d, C-2), 68.22 (C-3), 65.36 (C-4), 62.24 (d, $-O-CH_2-$, TCE), 62.07 (C-6), 34.16 ($=CH-CH_2-$), 22.47 - 21.91 ($-CH_2-CH_3$, Hex), 20.72 - 20.60 ($-CH_3$, Ac), 13.64 ($-CH_3$, Hex) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 6.1$, $2x^2J_{CH_2,P} = 4.9 / 7.3$, $^3J_{C-2,P} = 10.9$, $^3J_{CH=CH,P} = 6.1$ Hz.

^{13}C -gated (100.62 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 95.78$ (dd, C-1) ppm.

$^2J_{C-1,H-1} = 184.1$ Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, $CDCl_3$): $\delta = -2.64 / -2.43$ ppm.

Allyl-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-*trans*-2-hexen-1-yl-phosphat (54)

Die Umsetzung erfolgt analog zur Darstellung von **53**.

427 mg (0.280 mmol) (2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-allyl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (**43**), 60.0 μ l (0.500 mmol) *trans*-2-Hexen-1-ol, 5 ml trockenes Dichlormethan, 58.0 mg (0.82 mmol) 1*H*-Tetrazol in 3 ml trockenem Acetonitril, Rühren bei Raumtemperatur über Nacht; 3.4 ml *tert*-Butylhydroperoxid (70 % in H₂O), Rühren bei 0 °C für 20 Minuten, zweimalige säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Chloroform/Aceton, 5 : 1).

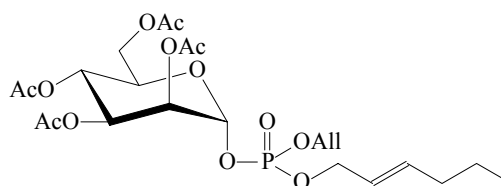
C₂₃H₃₅O₁₃P (550.50)

Ausbeute: 100 mg (23 %)

gelber Sirup

berechnet: C 50.18 H 6.41

gefunden: C 48.81 H 6.79



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 573.67 [M+Na]^+$, $589.56 [M+K]^+$

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 6.00$ - 5.87 (m, 1H, -CH=CH₂), 5.84 - 5.75 (m, 1H, -CH=CH-), 5.63 - 5.55 (m, 1H, -CH=CH-), 5.52 (dd~t, 1H, H-2), 5.48 (dd, 1H, H-1), 5.40 - 5.32 (m, 1H, -CH=CH₂), 5.29 - 5.22 (m, 2H, H-4, -CH=CH₂), 5.09 (dd, 1H, H-3), 4.62 - 4.45 (m, 4H, -O-CH₂-, All, Hex), 4.28 (dd, 1H, H-6a), 4.12 (dd, 1H, H-6b), 3.79 (ddd, 1H, H-5), 2.17 (s, 3H, -CH₃, Ac), 2.08 (dt~q, 2H, =CH-CH₂-), 2.06 , 2.00 , 1.99 (3xs, 9H, 3x-CH₃, Ac), 1.42 (m~sex, 2H, -CH₂-CH₃, Hex), 0.91 (t, 3H, -CH₃, Hex) ppm.

$J_{1,2} = 1.5$, $J_{2,3} = 2.5$, $J_{3,4} = 9.7$, $J_{4,5} = 10.2$, $J_{5,6a} = 6.1$, $J_{5,6b} = 2.8$, $J_{6a,6b} = 12.2$, $^3J_{H-1,P} = 6.6$ Hz.

¹³C-NMR (125.77 MHz, CDCl₃): $\delta = 169.98$, 169.94 , 169.60 , 168.48 (C=O), 139.47 (-CH=CH-), 132.29 (d, -CH=CH₂), 123.81 (d, -CH=CH-), 118.45 (-CH=CH₂), 94.05 (d, C-1), 70.46 (C-5), 68.74 (C-3), 68.58 (d, C-2), 68.59 , 68.51 (2xd, -O-CH₂-, TCE, Hex), 65.49 (C-4), 62.27 (C-6), 34.17 (=CH-CH₂-), 21.16 (-CH₂-CH₃, Hex), 20.97 - 20.15 (-CH₃, Ac), 13.63 (-CH₃, Hex) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 7.3$, $2x^2J_{CH_2,P} = 4.8 / 6.1$, $^3J_{C-2,P} = 12.1$, $^3J_{CH=CH_2,P} = 7.3$, $^3J_{CH=CH,P} = 7.3$ Hz.

^{13}C -gated (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 95.22$ (dd, C-1) ppm.

$^2J_{\text{C-1,H-1}} = 177.0$ Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, CDCl_3): $\delta = -1.99 / -1.48$ ppm.

(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-2,2,2-trichlorethyl-*trans*-2-hexen-1-yl-phosphat (55)

Die Umsetzung erfolgt analog zur Darstellung von **44**.

124 mg (0.360 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranose (**10**),^{106,107} 249 mg (0.660 mmol) 2,2,2-Trichlorethyl-*trans*-2-hexen-1-yl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (**35**), 4 ml trockenes Dichlormethan, 46.0 mg (0.660 mmol) 1*H*-Tetrazol in 2 ml trockenem Acetonitril, Rühren bei Raumtemperatur 3 Stunden; 3 ml *tert*-Butylhydroperoxid (70 % in H_2O), Rühren bei 0 °C für 20 Minuten, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Chloroform/Aceton, 5 : 1).

$\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{Cl}_3\text{O}_{13}\text{P}$ (641.82)

Gesamtausbeute: 193 mg (85 %)

1.Diastereomer:

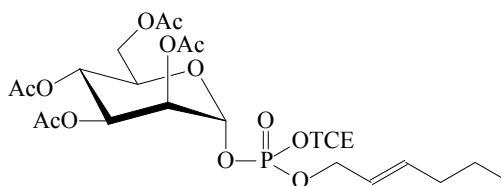
Ausbeute: 93.5 mg (41 %)

gelber Sirup

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +9.7^\circ$ (c 0.5, CHCl_3)

berechnet: C 41.17 H 5.03

gefunden: C 39.15 H 5.25



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 663.39$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 679.37 $[\text{M}+\text{K}]^+$

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.92$ - 5.82 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 5.74 - 5.61 (m, 2H, H-1, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 5.37 - 5.34 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 4.68 - 4.56 (m, 4H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$, TCE, Hex), 4.30 (dd, 1H, H-6a), 4.26 - 4.21 (m, 1H, H-5), 4.13 (dd, 1H, H-6b), 2.17 , 2.11 (2xs, 6H, 2x- CH_3 , Ac), 2.06 (bs, 5H, $=\text{CH}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$, Ac), 2.01 (s, 3H, $-\text{CH}_3$, Ac), 1.42 (m~sex, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, Hex), 0.91 (t, 3H, $-\text{CH}_3$, Hex) ppm

$J_{1,2} = 1.5$, $J_{5,6a} = 7.6$, $J_{5,6b} = 2.0$, $J_{6a,6b} = 12.2$, $^3J_{H-1,P} = 6.6$ Hz.

^{13}C -NMR (125.77 MHz, CDCl_3): $\delta = 170.98$, 170.51 , 170.15 ($\text{C}=\text{O}$), 138.81 ($-\text{CH}=\underline{\text{CH}}-$), 123.29 (d, $-\underline{\text{CH}}=\text{CH}-$), 94.26 (d, C-1), 74.25 (d, $-\text{O}-\text{CH}_2-$ *), 72.37 (d, C-2), 71.66 (C-3), 70.60 (C-5), 70.05 (d, $-\text{O}-\text{CH}_2-$ *), 68.19 (C-4), 65.27 (C-6), 34.17 ($=\text{CH}-\underline{\text{CH}_2}-$), 20.65 ($-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_3$, Hex), 20.59 - 20.06 ($-\text{CH}_3$, Ac), 13.64 ($-\text{CH}_3$, Hex) ppm.

* keine genaue Zuordnung möglich

$^2J_{C-1,P} = 4.8$, $2 \times ^2J_{CH_2,P} = 6.1 / 7.3$, $^3J_{C-2,P} = 10.9$, $^3J_{CH=CH,P} = 6.1$ Hz.

^{13}C -gated (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 95.97$ (dd, C-1) ppm.

$^2J_{C-1,H-1} = 182.1$ Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, CDCl_3): $\delta = -3.38$ ppm.

2. Diastereomer:

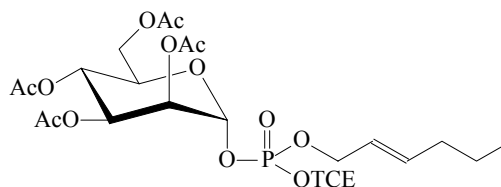
Ausbeute: 99.9 mg (44 %)

gelber Sirup

$[\alpha]_D^{20} = +26.8^\circ$ (c 0.5, CHCl_3)

berechnet: C 41.17 H 5.03

gefunden: C 41.49 H 5.43



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 663.55$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 679.87 $[\text{M}+\text{K}]^+$

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.89$ - 5.78 (m, 1H, $-\text{CH}=\underline{\text{CH}}-$), 5.67 - 5.59 (m, 1H, $-\underline{\text{CH}}=\text{CH}-$), 5.55 (dd~t, 1H, H-2), 5.50 (dd, 1H, H-1), 5.25 (dd~t, 1H, H-4), 5.12 - 5.07 (m, 1H, H-3), 4.67 - 4.52 (m, 4H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$, TCE, Hex), 4.32 - 4.17 (m, 2H, H-6a, H-6b), 3.80 (ddd, 1H, H-5), 2.19 , 2.17 , 2.10 (3xs, 9H, 3x- CH_3 , Ac), 2.07 - 2.05 (m, 2H, $=\text{CH}-\underline{\text{CH}_2}-$), 2.01 (s, 3H, $-\text{CH}_3$, Ac), 1.42 (m~sex, 2H, $-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_3$, Hex), 0.91 (t, 3H, $-\underline{\text{CH}_3}$, Hex) ppm.

$J_{1,2} = 1.5$, $J_{2,3} = 3.6$, $J_{3,4} = 9.7$, $J_{4,5} = 10.2$, $J_{5,6a} = 3.1$, $^3J_{H-1,P} = 5.1$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 170.52, 170.50 (C=O), 138.09 (-CH=CH-), 123.23 (d, -CH=CH-), 93.97 (d, C-1), 73.36 (C-5), 70.34 (C-3), 68.72-68.60 (2xd, -O-CH₂-, TCE, Hex), 68.24 (d, C-2), 65.26 (C-4), 62.19 (C-6), 34.18 (=CH-CH₂-), 21.90 (-CH₂-CH₃, Hex), 20.78-20.51 (-CH₃, Ac), 13.64 (-CH₃, Hex) ppm.

$^2J_{\text{C-1,P}} = 4.9$, $2 \times ^2J_{\text{CH}_2,\text{P}} = 6.1 / 7.3$, $^3J_{\text{C-2,P}} = 10.9$, $^3J_{\text{CH=CH,P}} = 7.3$ Hz.

^{13}C -gated (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 92.79 (dd, C-1) ppm.

$^2J_{\text{C-1,H-1}} = 184.1$ Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, CDCl_3): δ = - 3.65 ppm.

(2,3,4,6-Tetra-*O*-butyryl- α -D-mannopyranosyl)-2,2,2-trichlorethyl-farnesyl-phosphat (56)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 2.

98 mg (0.21 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-butyryl- α -D-mannopyranose (7), 0.23 mg (0.46 mmol, 2.2 Äq) 2,2,2-Trichlorethyl-farnesyl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (38), 74 mg (1.1 mmol, 5 Äq) 1*H*-Tetrazol, 0.18 mg (1.1 mmol, 5 Äq) 3-Chlorperbenzoesäure, 3 ml + 3 ml trockenes Dichlormethan, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 5 : 1).

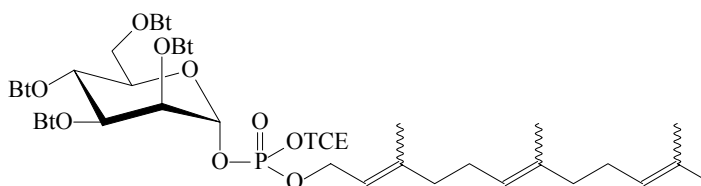
$\text{C}_{39}\text{H}_{62}\text{Cl}_3\text{O}_{13}\text{P}$ (876.25)

Ausbeute: 28 mg (15 %)

farbloser Sirup

berechnet: C 53.46 H 7.13

gefunden: C 53.70 H 6.50



MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 899.43 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 915.56 $[\text{M}+\text{K}]^+$

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 5.82 (dd, 1H, H-1), 5.59-5.47 (m, 2H, H-2, H-4), 5.45-5.36 (m, 2H, H-3, -O-CH₂-CH=), 5.28-5.23 (m, 2H, -O-CH₂-, TCE), 5.15-5.05 (m, 2H,

2x-CH=C-), 4.74-4.70 (m, 2H, -O-CH₂-, Farn), 4.30-3.97 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 2.42-2.08 (m, 16H, 4x-CO-CH₂-, Bt, 4x-CH₂-, Farn), 1.89-1.57 (m, 20H, 4x-CH₂-CH₃, Bt, 4x-CH₃, Farn), 1.03-0.83 (m, 12H, 4x-CH₃, Bt) ppm.

$J_{1,2} = 1.8$, $J_{2,3} = 3.1$, $J_{3,4} = 9.7$, $^3J_{H-1,P} = 5.9$ Hz.

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.48$, 170.40 (C=O), 139.92 (C_q, -CH=C-), 124.33 (d, -O-CH₂-CH=), 124.17 , 123.65 (-CH=C-), 96.02 (d, C-1). 76.19 , 75.95 (2xd, -O-CH₂-, TCE, Farn), 70.49 (C-5), 67.30 (C-3), 65.84 (d, C-2), 63.93 (C-4), 61.33 (C-6), 39.74 , 39.62 , 31.35 , 31.29 , 29.77 , 29.71 (-CH₂-, Farn), 35.97 , 35.84 (-CO-CH₂-, Bt), 25.68 , 24.87 , 24.10 , 23.28 (-CH₃-, Farn), 18.31 , 18.27 (-CH₂-CH₃, Bt), 13.57 (-CH₃, Bt) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 7.1$, $2x\ ^2J_{CH_2,P} = 6.1 / 6.1$, $^3J_{C-2,P} = 11.2$, $^3J_{CH=C,P} = 5.1$ Hz.

¹³C-gated (125.77 MHz, CDCl₃): $\delta = 94.73$ (dd, C-1) ppm.

$^2J_{C-1,H-1} = 181.7$ Hz.

³¹P-NMR (101.26 MHz, CDCl₃): $\delta = -5.42 / -5.44$ ppm.

(2,3,4,6-Tetra-*O*-butyryl- α -D-mannopyranosyl)-2,2,2-trichlorethyl-phytyl-phosphat (57)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 2.

142 mg (0.310 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-butyryl- α -D-mannopyranose (**7**), 401 mg (0.700 mmol, 2.2 Äq) 2,2,2-Trichlorethyl-phytyl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit (**41**), 109 mg (1.55 mmol, 5 Äq) 1*H*-Tetrazol, 270 mg (2.30 mmol, 15 Äq) 3-Chlorperbenzoesäure, 3 ml + 3 ml trockenes Dichlormethan, Reaktionsdauer: 3 Stunden bei Raumtemperatur und 2 Stunden bei 0 °C, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 5 : 1).

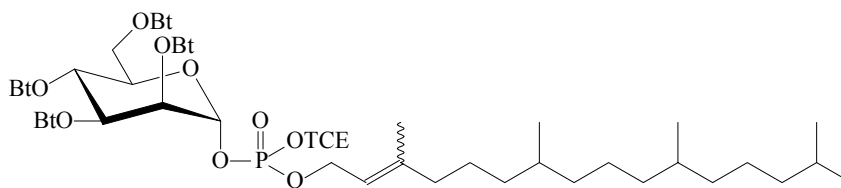
C₄₅H₇₉Cl₃O₁₃P (965.45)

Ausbeute: 110 mg (37 %)

farbloser Sirup

berechnet: C 55.98 H 8.25

gefunden: C 55.27 H 8.10

MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 988.11 [M+Na]^+$, $1003.96 [M+K]^+$

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.79$ - 5.72 (m, 1H, -O-CH₂-CH=), 5.44 - 5.33 (m, 4H, H-1, H-2, H-3, H-4), 4.73 - 4.63 (m, 2H, -O-CH₂-, TCE), 4.47 - 4.15 (m, 5H, -O-CH₂-, Phy, H-5, H-6a, H-6b), 2.43 - 2.24 (m, 8H, 4x-CO-CH₂-), 1.73 - 1.49 (m, 14H, =C-CH₃, 3x-CH-, 4x-CH₂-CH₃, Bt), 1.37 - 1.18 (m, 18H, 9x-CH₂-), 1.02 - 0.80 (m, 24H, 4x-CH₃, Bt, 4x-CH₃, Phy) ppm.

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.50$, 170.36 , 170.05 (C=O), 137.48 (C_q, -CH=C-), 121.05 (d, -O-CH₂-CH=), 94.74 (d, C-1), 73.81 , 72.77 (2xd, -O-CH₂-, TCE, Phy), 70.20 (C-5), 68.72 (d, C-2), 68.39 (C-3), 63.98 (C-4), 61.93 (C-6), 39.39 , 37.39 , 37.31 , 24.82 (-CH₂-, Phy), 36.05 , 36.01 , 35.96 (-CO-CH₂-, Bt), 32.79 , 28.00 (-CH-, Phy), 22.72 , 22.62 , 21.84 , 21.62 , 19.80 , 19.75 (-CH₃, Phy), 18.23 , 18.26 , 18.23 (-CH₂-CH₃, Bt), 13.68 (-CH₃, Bt) ppm.

 $^2J_{C-1,P} = 6.1$, $2x \ ^2J_{CH_2,P} = 7.1 / 7.1$, $^3J_{C-2,P} = 11.2$, $^3J_{CH=C,P} = 7.1$ Hz.

¹³C-gated (125.77 MHz, CDCl₃): $\delta = 94.41$ (dd, C-1) ppm.

 $^2J_{C-1,H-1} = 185.3$ Hz.

³¹P-NMR (101.26 MHz, CDCl₃): $\delta = -4.17 / -4.11 / -3.81 / -3.75$ ppm.

(2,3,4,6-Tetra-*O*-pivaloyl- α -D-mannopyranosyl)-2,2,2-trichlorethyl-phytyl-phosphat (58)

Die Umsetzung erfolgt gemäß AAV 2.

109 mg (0.210 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-pivaloyl- α -D-mannopyranose (8), 265 mg (0.460 mmol, 2.2 Äq) 2,2,2-Trichlorethyl-phytyl-*N,N*-di-*iso*-propylphosphoramidit

(41), 73.0 mg (1.05 mmol, 5 Äq) 1*H*-Tetrazol, 181 mg (1.05 mmol, 5 Äq) 3-Chlorperbenzoesäure, 3 ml + 3 ml trockenes Dichlormethan, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 5 : 1).

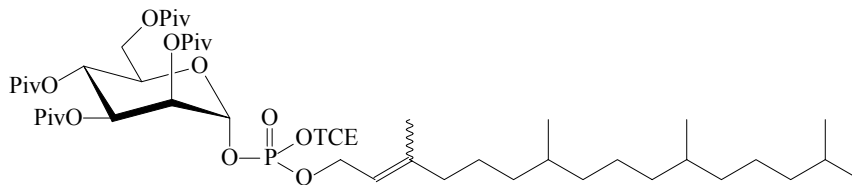
C₄₈H₈₄Cl₃O₁₃P (1006.52)

Ausbeute: 28.9 mg (14 %)

farbloser Sirup

berechnet: C 57.28 H 8.41

gefunden: C 57.10 H 8.34



MALDI-TOF (DHB, positive mode): $m/z = 1029.81 [M+Na]^+$, $1045.14 [M+K]^+$

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.76$ (dd, 1H, H-1), 5.73-5.68 (m, 1H, -CH=C-), 5.65-5.57 (m, 1H, H-4), 5.43-5.38 (m, 2H, H-2, H-3), 4.72-4.64 (m, 4H, 2x-O-CH₂-, TCE, Phy), 4.34-4.12 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 1.68 (t, 3H, =C-CH₃), 1.56-1.42 (m, 3H, 3x-CH-), 1.32-1.23 (m, 36H, 9x-CH₂-, 2x-C(CH₃)₃, Piv), 1.17, 1.12 (2xs, 18H, 2x-C(CH₃)₃, Piv), 0.88-0.83 (m, 12H, 4x-CH₃) ppm.

$J_{1,2} = 1.3$, $J_{4,5} = 10.2$, $J_{6,6} = 12.5$, $^3J_{H-1,P} = 5.3$ Hz.

¹³C-NMR (100.62 MHz, CDCl₃): $\delta = 178.27$, 177.23, 176.65, 176.10 (C=O), 137.74 (C_q, -CH=C-), 123.00 (d, -O-CH₂-C=), 95.33 (d, C-1). 76.35, 76.03 (2xd, -O-CH₂-, TCE, Phy), 69.93 (C-5), 69.14 (C-3), 68.82 (d, C-2), 65.18 (C-4), 61.94 (C-6), 39.39, 37.40, 37.31, 29.71, 24.82, 24.49 (-CH₂-, Phy), 38.92, 38.81, 38.78 (C_q, -C(CH₃)₃), 32.80, 28.00 (-CH-, Phy), 27.16, 27.13, 27.10 (-C(CH₃)₃), 22.73, 22.66, 22.46, 19.75, 19.68 (-CH₃, Phy) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 6.1$, $2x^2J_{CH_2,P} = 4.1 / 4.1$, $^3J_{C-2,P} = 11.2$, $^3J_{CH=C,P} = 9.2$ Hz.

¹³C-gated (100.62 MHz, CDCl₃): $\delta = 92.90$ (dd, C-1) ppm.

$^2J_{C-1,H-1} = 171.9$ Hz.

³¹P-NMR (101.26 MHz, CDCl₃): $\delta = -3.77 / -3.76 / -3.75 / -3.74$ ppm.

Triethylammonium-(2,3,4,6-tetra-*O*-butyryl- α -D-mannopyranosyl)-H-phosphonat (59)

Zu einer Lösung aus Imidazol (0.47 g, 6.9 mmol) in 10 ml Acetonitril werden bei 0 °C vorsichtig 0.18 ml (2.1 mmol) Phosphortrichlorid und anschließend 0.98 ml (7.1 mmol) Triethylamin zugegeben. Der Reaktionsansatz wird 15 Minuten bei 0 °C gerührt. Dann wird eine Lösung von 0.22 g (0.48 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-butyryl- α -D-mannopyranose (7) in 10 ml Acetonitril über einen Zeitraum von 30 Minuten zugetropft. Die Reaktionsmischung wird 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung wird durch Zugabe von 3.5 ml Triethylammoniumhydrogencarbonat-Lösung (TEAB, pH = 8) hydrolysiert. Die klare Lösung wird nochmals 15 Minuten gerührt, unter vermindertem Druck eingengt und nachfolgend zuerst mit einem Pyridin/Triethylamin-Gemisch (4 : 1) und anschließend mit Toluol codestilliert. Der Rückstand wird in Chloroform aufgenommen und dreimal mit Triethylammoniumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingengt. Das Rohprodukt wird anschließend säulenchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: Chloroform/Methanol + 1 % Triethylamin, 7 : 1) gereinigt.

C₂₈H₅₂NO₁₂P (625.69)

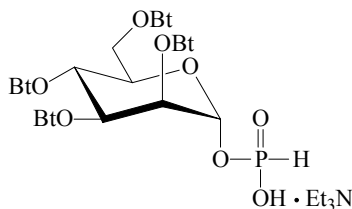
Ausbeute: 0.20 g (66 %)

gelber Sirup

[α]_D²⁰ = +20.3° (c 1.0, CHCl₃)

berechnet: C 53.75 H 8.83 N 2.24

gefunden: C 53.85 H 9.00 N 2.60



MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 547.70 [M-Et₃N+Na]⁺, 563.60 [M-Et₃N+K]⁺, 569.61 [M-Et₃N-H+Na+Na]⁺, 585.50 [M-Et₃N-H+Na+K]⁺, 601.42 [M-Et₃N-H+K+K]⁺.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.00 (d, 1H, P-H), 5.58 (dd, 1H, H-1), 5.44 (dd, 1H, H-3), 5.37 (dd~t, 1H, H-4), 5.33 (dd, 1H, H-2), 4.32-4.25 (m, 1H, H-5), 4.23 (dd, 1H, H-6a), 4.14 (dd, 1H, H-6b), 3.08 (q, 6H, 3x-CH₂-CH₃, Et₃N), 2.41-2.14 (m, 8H, 4x-CO-CH₂-), 1.73-1.52 (m, 8H, 4x-CH₂-CH₃, Bt), 1.35 (t, 9H, -CH₃, Et₃N), 1.01-0.85 (m, 12H, 4x-CH₃, Bt) ppm.

$J_{1,2}$ = 1.5, $J_{2,3}$ = 3.6, $J_{3,4}$ = 10.2, $J_{4,5}$ = 9.7, $J_{5,6a}$ = 4.6, $J_{5,6b}$ = 2.1, $J_{6a,6b}$ = 12.2, $^1J_{H,P}$ = 638.8, $^3J_{H-1,P}$ = 8.7 Hz.

^{13}C -NMR (125.77 MHz, CDCl_3): δ = 172.31, 172.49, 172.36, 172.24 (C=O), 92.97 (d, C-1), 69.76 (d, C-2), 69.54 (C-5), 69.12 (C-3), 65.56 (C-4), 62.01 (C-6), 45.64 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$, Et_3N), 36.08, 36.05, 36.01, 35.95 ($-\text{CO}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$), 18.49, 18.33, 18.30, 18.13 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$, Bt), 13.70, 13.61, 13.59, 13.57 ($-\text{CH}_3$, Bt), 8.56 ($-\text{CH}_3$, Et_3N) ppm.

$^2\text{J}_{\text{C-1,P}} = 3.6$, $^3\text{J}_{\text{C-2,P}} = 7.3$ Hz.

^{13}C -gated (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 86.34 (d, C-1) ppm.

$^1\text{J}_{\text{C-1,H-1}} = 172.9$ Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, CDCl_3): δ = 1.67 / 1.62 ppm.

Triethylammonium-(2,3,4,6-tetra-*O*-iso-propylcarbonat- α -D-mannopyranosyl)- H-phosphonat (60)

Die Umsetzung erfolgt analog zur Darstellung von Verbindung **59**.

0.47 g (6.9 mmol) Imidazol in 10 ml Acetonitril, 0.18 ml (2.1 mmol) Phosphor-trichlorid, 0.98 ml (7.1 mmol) Triethylamin, 0.23 g (0.44 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-iso-propylcarbonat- α -D-mannopyranose (**9**) in 10 ml Acetonitril, Rühren bei Raumtemperatur über Nacht, säulenchromatographische Reinigung (Laufmittel: Chloroform/Methanol + 1 % Triethylamin, 7 : 1).

$\text{C}_{28}\text{H}_{52}\text{NO}_{16}\text{P}$ (689.69)

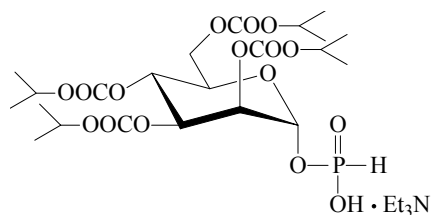
Ausbeute: 0.20 g (67 %)

gelber Sirup

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +9.0^\circ$ (c 1.0, CHCl_3)

berechnet: C 48.76 H 7.60 N 2.03

gefunden: C 48.11 H 7.69 N 2.35



MALDI-TOF (DHB, positive mode): m/z = 611.48 $[\text{M-Et}_3\text{N+Na}]^+$, 627.35 $[\text{M-Et}_3\text{N+K}]^+$, 633.30 $[\text{M-Et}_3\text{N-H+Na+Na}]^+$, 649.22 $[\text{M-Et}_3\text{N-H+Na+K}]^+$, 665.21 $[\text{M-Et}_3\text{N-H+K+K}]^+$.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.00 (d, 1H, P-H), 5.70 (dd, 1H, H-1), 5.26-5.21 (m, 2H, H-2, H-3), 5.13 (dd~t, 1H, H-4), 4.91-4.77 (m, 4H, 4x- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.33-4.20 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b), 2.95 (q, 6H, 3x- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$, Et_3N), 1.33-1.24 (m, 33H, 4x- $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, 3x- CH_3 , Et_3N) ppm.

$J_{1,2} = 1.5$, $J_{2,3} = 3.6$, $J_{3,4} = 9.7$, $J_{4,5} = 9.2$, $^1J_{\text{H,P}} = 640.87$, $^3J_{\text{H-1,P}} = 8.6$ Hz.

^{13}C -NMR (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 154.36, 153.85, 153.64, 153.35 (C=O), 92.62 (d, C-1), 73.00, 72.84, 72.75, 72.67 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 72.80 (C-3), 72.47 (d, C-2), 69.91 (C-4), 69.23 (C-5), 65.91 (C-6), 45.65 ($-\text{CH}_2\text{-CH}_3$, Et_3N), 21.78, 21.70, 21.67, 21.63 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 8.81 ($-\text{CH}_3$, Et_3N) ppm.

$^2J_{\text{C-1,P}} = 3.6$, $^3J_{\text{C-2,P}} = 8.5$ Hz.

^{13}C -gated (100.62 MHz, CDCl_3): δ = 87.70 (dd, C-1) ppm.

$^1J_{\text{C-1,H-1}} = 174.0$ Hz.

^{31}P -NMR (101.26 MHz, CDCl_3): δ = 1.66 / 1.60 ppm.

(2,3,4,6-Tetra-*O*-iso-propylcarbonat- α -D-mannopyranosyl)-trans-2-hexen-1-yl-phosphat Triethylammoniumsalz (62)

Eine Lösung von 75 mg (0.11 mmol) H-Phosphonat **60** und 12 μl (0.10 mmol) *trans*-2-Hexen-1-ol in jeweils 1 ml trockenem Pyridin wird dreimal bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird erneut in 1 ml trockenem Pyridin aufgenommen, mit 33 μl (0.27 mmol) Pivaloylchlorid versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wird auf 0 °C abgekühlt und mit einer Lösung aus 33 mg (0.13 mmol) Iod in 0.12 g (6.5 mmol) Wasser versetzt. Es wird 2.5 Stunden bei 0 °C gerührt. Anschließend wird mit Chloroform verdünnt. Die organische Phase wird gegen 1 M Natriumthiosulfat-Lösung und kalte Triethylammoniumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingeengt. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: Chloroform/Methanol + 1 % Triethylamin, 7 : 1).

$C_{34}H_{62}NO_{17}P$ (787.84)

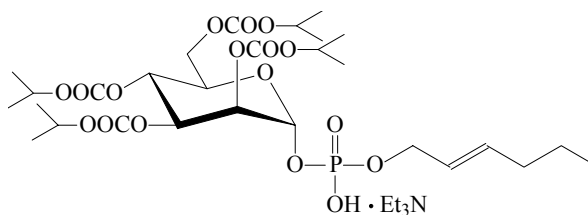
Ausbeute: 18 mg (21 %)

gelber Sirup

$[\alpha]_D^{20} = +15.6^\circ$ (c 1.0, $CHCl_3$)

berechnet: C 51.83 H 7.93 N 1.78

gefunden: C 51.99 H 7.99 N 2.00



1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 5.74 (dd, 1H, H-1), 5.70-5.56 (m, 2H, -CH=CH-), 5.34-5.10 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 4.89-4.78 (m, 4H, 4x-CH(CH₃)₂), 4.42-4.12 (m, 5H, H-5, H-6a, H-6b, -O-CH₂-), 3.10 (q, 6H, 3x-CH₂-CH₃, Et₃N), 2.04-1.98 (m, 2H, =CH-CH₂-), 1.34-1.24 (m, 35H, -CH₂-CH₃, Hex, 4x-CH(CH₃)₂, 3x-CH₃, Et₃N), 0.91 (t, 3H, -CH₃, Hex) ppm.

$J_{1,2} = 1.9$, $^3J_{H-1,P} = 8.2$ Hz.

^{13}C -NMR (125.77 MHz, $CDCl_3$): δ = 154.75, 154.68, 153.10, 153.05 (C=O), 134.18 (-CH=CH-), 126.89 (d, -CH=CH-), 93.81 (d, C-1), 73.08, 72.99, 72.90, 72.73 (-CH(CH₃)₂), 73.04 (C-3), 72.89 (d, C-2), 70.04 (C-4), 69.27 (C-5), 67.12 (d, -O-CH₂-), 66.55 (C-6), 45.97 (-CH₂-CH₃, Et₃N), 34.65 (=CH-CH₂-), 22.56 (-CH₂-CH₃, Hex), 22.51-21.97 (-CH(CH₃)₂), 14.04 (-CH₃, Hex), 8.89 (-CH₃, Et₃N) ppm.

$^2J_{C-1,P} = 4.9$, $^2J_{CH_2,P} = 6.1$, $^3J_{C-2,P} = 10.9$, $^3J_{CH=CH,P} = 8.5$ Hz.

^{13}C -gated (100.62 MHz, $CDCl_3$): δ = 91.55 (dd, C-1) ppm.

$^2J_{C-1,H-1} = 176.5$ Hz.

^{31}P -NMR (202.46 MHz, $CDCl_3$): δ = - 4.03 und - 2.27 / - 5.70 / - 9.67 ppm.

6.4. Enzymatische und biologische Arbeitsvorschriften

Einige Experimente wurden gemeinsam mit Herrn Dipl.-Biol. Christian Kranz aus der Arbeitsgruppe Marquardt in der Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde an der Universität Münster angefertigt.

Materialien

Enzyme

Esterase aus Schweineleber EC 3.1.1.1, Sigma

Rohenzym: 15 U/mg Feststoff

Reinenzym: Suspension in 3.2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung, pH 8, 260 U/mg Protein

Zellen

Fibroblasten aus der Haut

80 % konfluent

kultiviert in Earle's MEM

Earle's MEM mit Natriumcarbonat ohne Glutamin, Life Technologies

Dulbecco's MEM ohne Glucose, Life Technologies

Phosphatpuffer $[\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}/\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}]$

Markierungsmedium

Es werden DMEM und MEM im Verhältnis 9 : 1 verwendet und mit 100 μCi $[2\text{-}^3\text{H}]$ -Mannose pro Milliliter Medium versetzt. Anschließend werden dann 15 μl einer 1 M Stammlösung der Versuchssubstanz in DMSO in 15 ml Medium gelöst.

Szintillationscocktail

Ultima FlowTM AP, Packard Bioscience

Fluoreszenzstandard

Man5-2AB glycan conjugate und Man9-2AB glycan conjugate, Oxford Glyco Systems

Methoden

Die Inkubation der Enzymsätze erfolgte mit einem Eppendorf Thermomixer Comfort. pH-Messungen erfolgten an einem Metrohm 632 pH-Meter. Zentrifugiert wurde mit einer Eppendorf Tischzentrifuge 5415 und im Vakuum mit einem Bachofer Vacuum Concentrator. Die Ultraschallbehandlung wurde an einer Soniprep 150 MSE durchgeführt. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 14 Microns eine Minute lang beschallt, um sie

aufzuschließen. Die analytische Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurde mit einem Waters 2690 Alliance Separations Module, einem Waters 474 Scanning Fluorescens Detector und einem Packard Flow Scintillation Analyzer 500 TR Series an einer Varian Microsorb MV Säule (100 Å, 0.5 ml/min) mit Eluent A (Acetonitril) und Eluent B (Wasser) durchgeführt.

Standardreaktion ohne Enzym

Bis-acetoxymethyl-(2, 3, 4, 6-tetra-*O*-buturyl- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (**19**) (12 mg, 17.5 μ mol) werden in 1 ml Phosphatpuffer (pH 7.4, 0.05 M) bei 37 °C über Nacht inkubiert. Der Ansatz wird dünnschichtchromatographisch untersucht (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 1 : 1, R_f 0.29 und Chloroform/Methanol/Wasser, 6 : 3.5 : 0.3). Zur Aufarbeitung wird der Ansatz auf 2 ml Wasser gegeben und mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wird NMR-spektroskopisch untersucht. Sowohl die DC- als auch die NMR-Analyse haben gezeigt, daß die Substanz unter den gegebenen Reaktionsbedingungen stabil ist.

Enzymatische Umsetzung mit Esterase

a) Rohenzym

Bis-acetoxymethyl-(2, 3, 4, 6-tetra-*O*-buturyl- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (**19**) (10.1 mg, 14.8 μ mol) wird in 1 ml Phosphatpuffer (pH 7.4, 0.05 M) mit Schweineleberesterase (1 U, Stammlösung in Phosphatpuffer) bei 37 °C für 3 Stunden inkubiert. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 1 : 1) verfolgt. Nach Abbruch der Reaktion durch Zugabe von 2 ml Methanol wird der Rückstand zentrifugiert. Der Überstand wird unter Verwendung von ZipTip_{C18} entsalzt. Die Eluierung des Produktes erfolgt entlang eines Gradienten mit Wasser-Methanol-Gemischen (100 : 0 $\rightarrow$ 75 : 25 $\rightarrow$ 50 : 50 $\rightarrow$ 25 : 75). Die verschiedenen Eluate werden anschließend direkt auf einen MALDI-TOF-Teller gegeben und massenspektrometrisch untersucht.

MALDI-TOF (DHB, positive mode):

$m/z = 706.98 [M+Na]^+$, $722.92 [M+K]^+$;

$635.21 [M-AM+Na]^+$, $651.19 [M-AM+K]^+$, $657.27 [M-AM-H+Na+Na]^+$, $673.24 [M-AM-H+Na+K]^+$;

563.23 [M-2AM+Na]⁺, 585.24 [M-2AM-H+Na+Na]⁺,
 601.21 [M-2AM-H+Na+K]⁺;
 587.26 [M-AM-Bt-H+Na+Na]⁺, 515.31 [M-2AM-Bt-H+Na+Na]⁺;
 483.40 [M-PO₃AM₂+Na]⁺ / [M-2Bt-2Ac+2H+Na]⁺, 499.31 [M-PO₃AM₂+K]⁺ /
 [M-2Bt-2Ac+2H+K]⁺;
 413.68 [M-PO₃AM₂-Bt+Na]⁺, 429.63 [M-PO₃AM₂-Bt+K]⁺.

b) Reinenzym

Bis-acetoxymethyl-(2, 3, 4, 6-tetra-*O*-buturyl- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (**19**) (9.7 mg, 14.2 μ mol) wird in 1 ml Phosphatpuffer (pH 7.4, 0.05 M) mit Schweineleber-esterase (1 U, Stammlösung in (NH₄)₂SO₄) bei 37 °C für 3 Stunden inkubiert. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch (Laufmittel: Petrolether(50/70)/Ethylacetat, 1 : 1) verfolgt. Nach Abbruch der Reaktion durch Zugabe von 2 ml Methanol wird der Rückstand zentrifugiert. Der Überstand wird unter Verwendung von ZipTip_{C18} entsalzt. Die Eluierung des Produktes erfolgt entlang eines Gradienten mit Wasser-Methanol-Gemischen (100 : 0 $\rightarrow$ 75 : 25 $\rightarrow$ 50 : 50 $\rightarrow$ 25 : 75). Die verschiedenen Eluate werden anschließend direkt auf einen MALDI-TOF-Teller gegeben und ins ESI injiziert und massenspektrometrisch untersucht.

MALDI-TOF (DHB, positive mode):

m/z = 707.19 [M+Na]⁺, 723.09 [M+K]⁺;
 635.22 [M-AM+Na]⁺, 651.17 [M-AM+K]⁺, 657.25 [M-AM-H+Na+Na]⁺, 673.22
 [M-AM-H+Na+K]⁺;
 611.19 [M-Bt-Ac+H+K]⁺, 623.23 [M-2Ac+H+Na]⁺;
 563.21 [M-2AM+Na]⁺, 585.22 [M-2AM-H+Na+Na]⁺,
 601.11 [M-2AM-H+Na+K]⁺;
 483.44 [M-PO₃AM₂+Na]⁺ / [M-2Bt-2Ac+2H+Na]⁺, 499.22 [M-PO₃AM₂+K]⁺ /
 [M-2Bt-2Ac+2H+K]⁺.

ESI (positive mode):

m/z = 354 [M-AM-4Bt+Na]⁺, 353 [M-2AM-3Bt+Na]⁺, 283 [M-2AM-4Bt+Na].

Stabilitätstests in Plasma und Fibroblasten

Zur Herstellung einer Stammlösung wird Bis-acetoxymethyl-(2, 3, 4, 6-tetra-*O*-buturyl- α -D-mannopyranosyl)-phosphat (**19**) (10 mg, 14.6 μ mol) in 1 ml PBS (pH 7.4) gelöst.

a) Plasma

0.1 ml der Stammlösung werden in 0.5 ml Plasma aufgenommen, der Ansatz wird geteilt und bei 37 °C für 3 Stunden bzw. über Nacht inkubiert. Nach Abbruch der Reaktion durch Zugabe von 0.3 ml Methanol wird der Rückstand zentrifugiert. Der Überstand wird unter Verwendung von ZipTip_{C18} entsalzt. Die Eluierung des Produktes erfolgt entlang eines Gradienten mit Wasser-Methanol-Gemischen (100 : 0 $\rightarrow$ 75 : 25 $\rightarrow$ 50 : 50 $\rightarrow$ 25 : 75). Die verschiedenen Eluate werden anschließend direkt auf einen MALDI-TOF-Teller gegeben und massenspektrometrisch untersucht.

MALDI-TOF (DHB, positive mode):

m/z = 472.36, 647.44, 663.45, 685.49, 701.43;

563.94 [M-2AM+Na]⁺, 585.87 [M-2AM-H+Na+Na]⁺,

601.85 [M-2AM-H+Na+K]⁺;

413.55 [M-PO₃AM₂-Bt+Na]⁺, 429.34 [M-PO₃AM₂-Bt+K]⁺.

b) Fibroblasten

0.1 ml der Stammlösung werden in 0.2 ml einer Lösung von Fibroblasten (PBS, 0.33 μ g Protein/ μ l) aufgenommen, der Ansatz wird geteilt und bei 37 °C für 3 Stunden bzw. über Nacht inkubiert. Nach Abbruch der Reaktion durch Zugabe von 0.3 ml Methanol wird der Rückstand zentrifugiert. Der Überstand wird unter Verwendung von ZipTip_{C18} entsalzt. Die Eluierung des Produktes erfolgt entlang eines Gradienten mit Wasser-Methanol-Gemischen (100 : 0 $\rightarrow$ 75 : 25 $\rightarrow$ 50 : 50 $\rightarrow$ 25 : 75). Die verschiedenen Eluate werden anschließend direkt auf einen MALDI-TOF-Teller gegeben und massenspektrometrisch untersucht.

MALDI-TOF (DHB, positive mode):

m/z = 472.48, 647.57, 663.61, 685.65, 701.58;

563.88 [M-2AM+Na]⁺, 585.88 [M-2AM-H+Na+Na]⁺,

601.87 [M-2AM-H+Na+K]⁺;

413.44 [M-PO₃AM₂-Bt+Na]⁺, 429.34 [M-PO₃AM₂-Bt+K]⁺.

LLO (Lipid Linked Oligosaccharides)-Analyse

Die Zellkulturen (Gesunde als Kontrolle, Patient) werden je einmal mit 2 – 3 ml PBS (37 °C) gewaschen und anschließend radioaktiv markiert. Hierfür werden pro Platte 5 ml Markierungsmedium (mit und ohne Versuchssubstanz) zugesetzt und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert (pulse-Phase). Es wird einmal mit 3 ml MEM (37 °C) gewaschen und nach Zugabe von 10 ml MEM für weitere 10 Minuten inkubiert (chase-Phase). Es wird dreimal mit PBS (37 °C) gewaschen. Die Platten werden auf Eis gegeben und die Zellen mit 3 ml Methanol (4 °C) abgekratzt und in Glasröhrchen übergeführt. Nach Zugabe von jeweils 6 ml Chloroform und kräftigem Vortexen werden die Proben 10 Minuten bei 4 °C und 3500 Upm zentrifugiert. Die Pellets werden jeweils zweimal mit Chloroform/Methanol (2 : 1, 4 °C) gewaschen, anschließend im N₂-Strom getrocknet und in jeweils 1 ml Wasser aufgenommen. Die Proben werden im Ultraschall zerkleinert und erneut bei 4 °C und 3500 Upm zentrifugiert. Die Pellets werden im N₂-Strom getrocknet und mehrmals mit jeweils 4 ml Chloroform/Methanol/Wasser (10 : 10 : 3) extrahiert. Die Extrakte werden vereinigt, unter im N₂-Strom eingengt. Die gewonnenen Pellets enthalten hauptsächlich die proteingebundenen Oligosaccharide (PDO-Analyse). Die anderen Pellets enthalten die Dolicholpyrophosphatgebundenen Oligosaccharide. Sie werden durch milde saure Hydrolyse in n-Propanol/0.1 M HCl (1 : 2) freigesetzt. Anschließend wird im Vakuum zentrifugiert, der Rückstand in 21 µl Wasser aufgenommen und über HPLC analysiert [Eluent A (Acetonitril) / Eluent B (Wasser), 65 : 35 → 35 : 65 (60 Minuten) → 0 : 100 (61 Minuten) → 0 : 100 (70 Minuten) → 65 : 35 (71 Minuten)].

7. Literatur

- 1 E. Eichwald, *Annu. Chem. Pharmacol.* **134** (1865) 177.
- 2 A. G. Morell, R. A. Irvine, I. Sternlieb, I. H. Scheinberg, G. Ashwell, *J. Biol. Chem.* **243** (1968) 155-159.
- 3 J. Montreuil, in *Glycoproteins* (Eds. J. Montreuil, J. F. G. Vliegenthart, H. Schachter), Elsevier, Amsterdam **29a** (1995) 1-10.
- 4 N. Sharon, H. Lis, *Spektrum Wiss.* 1993 (3) 66-74.
- 5 G. M. Edelman, *Spektrum Wiss.* 1984 (6) 62-74.
- 6 G. M. Edelman, *Spektrum Wiss.* 1989 (7) 52-60.
- 7 A. Gottschalk, *Biochim. Biophys. Acta* **23** (1957) 645-646.
- 8 A. Gottschalk, *Nature* **186** (1960) 949-951.
- 9 B. M. Gesner, V. Ginsburg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52** (1964) 359-366.
- 10 L. A. Lasky, *Science* **258** (1992) 964-969.
- 11 N. Sharon, H. Lis, in *The Proteins* (Eds. H. Neurath, R. L. Hill), Academic Press, New York **5** (1982) 1-124.
- 12 J. C. Paulson, in *The Receptors* (Ed. M. Conn), Academic Press, New York **2** (1985) 131-219.
- 13 T. Feizi, *Nature* **314** (1985) 53-57.
- 14 G. Ashwell, J. Harford, *Annu. Rev. Biochem.* **51**(1982) 531-554.
- 15 W. Weis, J. H. Brown, S. Cusack, J.C. Paulson, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Nature* **333** (1988) 426-431.
- 16 A. Giannis, *Angew. Chem.* **106** (1994) 188-191; *Angew. Chem. Int. Ed.* **33** (1994) 178-181.
- 17 G. Walz, A. Aruffo, W. Kolanus, V. Bevilacqua, B. Seed, *Science* **250** (1990) 1132-1135.
- 18 G. I. Johnston, R. G. Cook, R. P. McEver, *Cell* **56** (1989) 1045-1048.
- 19 M. H. Siegelman, M. v. d. Rijn, I. L. Weissman, *Science* **243** (1989) 1165-1172.
- 20 L. A. Lasky, M. S. Singer, T. A. Yednock, D. Dowbenko, C. Fennie, H. Rodriguez, T. Nguyen, S. Stachel, S. D. Rosen, *Cell* **56** (1989) 1045-1052.
- 21 T. A. Springer, *Nature* **346** (1990) 425-434.
- 22 T. A. Springer, *Nature* **349** (1991) 196-197.
- 23 V. Ginsburg, *Adv. Enzymol.* **26** (1972) 131-149.

- 24 T. W. Rademacher, R. B. Parekh, R. A. Dwek, *Annu. Rev. Biochem.* **40** (1982) 287-379.
- 25 T. Marquardt, H. H. Freeze, *Biol. Chem.* **382** (2001) 161-177.
- 26 N. Sharon, H. Lis, *Science* **246** (1989) 227-234.
- 27 V. Wittmann, in *Glycoscience*, (Eds. B. Fraser-Reis, K. Tatsuta, J. Thiem), Springer, Berlin (2001) 2253-2303.
- 28 a) J. Montreuil, J. F. G. Vliegenthart, H. Schachter (Eds.), *Glycoproteins*, Elsevier, Amsterdam **29a** (1995). b) B. Fraser-Reis, K. Tatsuta, J. Thiem (Eds.), *Glycoscience, Chemistry and Chemical Biology*, Springer, Berlin (2001). c) T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Wiley-VCH, Weinheim (2000).
- 29 P. G. Johansen, R. D. Marshall, A. Neuberger, *Biochem. J.* **78** (1961) 518-527.
- 30 R. H. Nuenke, L. W. Cunningham, *J. Biol. Chem.* **236** (1961) 2451-2460.
- 31 I. Yamashina, M. Makino, *J. Biochem.* **51** (1962) 359-364.
- 32 S. Shibata, T. Takeda, Y. Natori, *J. Biol. Chem.* **263** (1988) 12483-12485.
- 33 F. Wieland, R. Heitzer, W. Schaefer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** (1983) 5470.
- 34 G. Paul, F. Lottspeich, F. Wieland, *J. Biol. Chem.* **261** (1986) 1020-1024.
- 35 P. Messner, U. B. Sleytr, *FEBS Lett.* **228** (1988) 317-320.
- 36 D. T. A. Lamport, D. H. Miller, *Plant Physiol.* **48** (1971) 454-467.
- 37 R. G. Spiro, *J. Biol. Chem.* **242** (1967) 4813-4821.
- 38 C. Smythe, F. G. Caudwell, M. Ferguson, P. Cohen, *EMBO J.* **7** (1988) 2681-2686.
- 39 M. G. Low, M. A. J. Ferguson, A. H. Futerman, I. Silman, *Trends Biochem. Sci.* **11** (1986) 212-215.
- 40 P. T. Eglund, *Annu. Rev. Biochem.* **62** (1993) 121-138.
- 41 G. Michal (Ed.), *Biochemical Pathways*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, (1999).
- 42 F. W. Hemming, in *Glycoproteins* (Eds. J. Montreuil, J. F. G. Vliegenthart, H. Schachter), Elsevier, Amsterdam **29a** (1995) 127-143.
- 43 A. Verbert, in *Glycoproteins* (Eds. J. Montreuil, J. F. G. Vliegenthart, H. Schachter), Elsevier, Amsterdam **29a** (1995) 145-152.
- 44 R. Kornfeld, S. Kornfeld, *Annu. Rev. Biochem.* **54** (1985) 631-661.
- 45 J. S. Schutzbach, J. W. Zimmermann, *Biochem. Cell Biol.* **70** (1992) 460-465.
- 46 Y. Hashimoto, W. Pigman, *Annu. N. Y. Acad. Sci.* **93** (1962) 541.

- 47 K. Tanaka, M. Bertolini, N. Pigman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **16** (1964) 404-409.
- 48 B. Anderson, H. Seno, P. Sampson, J. G. Riley, P. Hoffman, K. Meyer, *J. Biol. Chem.* **239** (1964) PC2716.
- 49 V. P. Bhavanandan, E. Buddecke, P. Carubelli, A. Gottschalk, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **16** (1964) 353-357.
- 50 U. Lindahl, L. Roden, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **17** (1964) 254-259.
- 51 R. J. Harris, M. W. Spellman, *Glycobiology* **3** (1993) 219-224.
- 52 G. W. Hart, *Annu. Rev. Biochem.* **66** (1997) 315-335.
- 53 D. M. Snow, G. W. Hart, *Int. Rev. Cytol.* **181** (1998) 43.
- 54 J. Jaeken, M. Vanderschueren-Lodeweyckx, P. Casaer, L. Snoeck, L. Corbeel, E. Eggermont, R. Eeckels, *Pediatr. Res.* **14** (1980) 179.
- 55 Participants of the First International Workshop on CDGS, *Glycoconjugate J.* **16** (1999) 669-671.
- 56 J. Jaeken, E. van Schaftingen, *FEBS Lett.* **377** (1995) 318-320.
- 57 J. S. Rush, K. Panneerselvam, C. J. Waechter, H. H. Freeze, *Glycobiology* **10** (2000) 829-835.
- 58 C. Kranz, J. Denecke, M. A. Lehrmann, S. Ray, P. Kienz, G. Kreissel, F. Sagi, J. Peter-Katalinic, H. H. Freeze, T. Schmid, S. Jackowski-Dohrmann, E. Harms, T. Marquardt, *J. Clin. Invest.* **108** (2001) 1613-1619.
- 59 J. Jaeken, H. G. van Eijk, C. van der Heul, L. Corbeel, R. Eeckels, E. Eggermont, *Clin. Chim. Acta* **144** (1984) 245-247.
- 60 P. Collins, R. Ferrier, *Monosaccharides*, Wiley & Sons, Chichester (1995).
- 61 H. G. Khorana, G. M. Tener, J. G. Mofatt, E. H. Pol, *Chem. & Ind.* (1956) 1523.
- 62 A. M. Michelson, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.* (1955) 2632-2638.
- 63 R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **87** (1965) 3526-3527.
- 64 F. Eckstein, I. Rizk, *Angew. Chem.* **79** (1967) 684, 939; *Angew. Chem. Int. Ed.* **6** (1967) 695, 949.
- 65 R. L. Letsinger, W. B. Lunsford, *J. Am. Chem. Soc.* **98** (1976) 3655-3661.
- 66 S. Sabesan, S. Neira, *Carbohydr. Res.* **223** (1992) 169-185.
- 67 A. Zwierzak, M. Kluba, *Tetrahedron* **27** (1971) 3163-3170.
- 68 G. Srivastava, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *Carbohydr. Res.* **245** (1992) 137-144.
- 69 T. Ogawa, A. Seta, *Carbohydr. Res.* **110** (1982) C1-C4.
- 70 J. W. Perich, R. B. Johns, *Tetrahedron Lett.* **28** (1987) 101-102.

- 71 J. W. Perich, R. B. Johns, *Synth. Commun.* (1988) 142-144.
- 72 P. Westerduin, G. H. Veeneman, J. E. Marugg, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* **27** (1986) 1211-1214.
- 73 S. Liemann, W. Klaffke, *Liebigs Ann.* (1995) 1779-1787.
- 74 S. J. Freese, W. F. Vann, *Carbohydr. Res.* **282** (1996) 313-319.
- 75 S. J. Hecker, M. L. Minich, K. Lackey, *J. Org. Chem.* **55** (1990) 4904-4911.
- 76 M. M. Sim, H. Kondo, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 2260-2267.
- 77 K. Fukase, T. Kamikawa, Y. Iwai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **64** (1991) 3267-3273.
- 78 O. Eyrisch, G. Sinerius, W.-D. Fessner, *Carbohydr. Res.* **238** (1993) 287-306.
- 79 P. Westerduin, G. H. Veeneman, J. H. van Boom, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **106** (1987) 601-606.
- 80 P. Westerduin, G. H. Veeneman, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* **27** (1986) 6271-6274.
- 81 R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **98** (1986) 213-236; *Angew. Chem. Int. Ed.* **25** (1986) 212-235.
- 82 H. Paulsen, *Angew. Chem.* **102** (1990) 851-867; *Angew. Chem. Int. Ed.* **29** (1990) 823-839.
- 83 H. Kunz, *Angew. Chem.* **99** (1987) 297-311; *Angew. Chem. Int. Ed.* **26** (1987) 294-308.
- 84 J. Niggemann, J. Thiem, *Liebigs Ann.* (1995) 535-538.
- 85 K. Adelhorst, G. M. Whitesides, *Carbohydr. Res.* **242** (1993) 69-76.
- 86 T. Furuta, H. Torigai, T. Osawa, M. Iwamura, *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* (1993) 3139-3142.
- 87 R. Roy, F. D. Tropper, C. Grand-Maître, *Can. J. Chem.* **69** (1991) 1462-1467.
- 88 K. C. Leibman, C. Heidelberger, *J. Biol. Chem.* **216** (1955) 823-830.
- 89 P. M. Roll, H. Weinfeld, E. Carroll, G. B. Brown, *J. Biol. Chem.* **220** (1956) 439-454.
- 90 D. H. W. Ho, *Biochem. Pharmacol.* **20** (1971) 35-38.
- 91 A. W. Schrecker, A. Golden, *Cancer Res.* **28** (1968) 802-803.
- 92 A. B. A. Jansen, T. J. Russell, *J. Chem. Soc.* (1965) 2127-2132.
- 93 R. Y. Tsien, *Nature* **290** (1981) 527-528.
- 94 G. Gryniewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **260** (1985) 3440-3450.
- 95 R. P. Iyer, L. R. Phillips, J. A. Biddle, D. R. Thakker, W. Egan, S. Aoki, H. Mitsuya, *Tetrahedron Lett.* **30** (1989) 7141-7144.

- 96 J. K. Sastry, P. N. Nehete, S. Khan, B. J. Nowak, W. Plunkett, R. B. Arlinghaus, D. Farquhar, *Mol. Pharmacol.* **41** (1992) 441-445.
- 97 J. J. Freed, D. Farquhar, A. Hampton, *Biochem. Pharmacol.* **38** (1989) 3193-3198.
- 98 T. Jiang, G. Sweeney, M. T. Rudolf, A. Klip, A. Traynor-Kaplan, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 11017-11024.
- 99 W. Li, C. Schultz, J. Llopis, R. Y. Tsien, *Tetrahedron* **53** (1997) 12017-12040.
- 100 D. Farquhar, D. N. Srivastva, N. J. Kuttisch, P. P. Saunders, *J. Pharm. Sci.* **72** (1983) 324-325.
- 101 D. N. Srivastva, D. Farquhar, *Bioorg. Chem.* **12** (1984) 118-129.
- 102 D. Farquhar, S. Khan, D. N. Srivastva, P. P. Saunders, *J. Med. Chem.* **37** (1994) 3902-3909.
- 103 C. Schultz, M. Vajanaphanich, H.-G. Genieser, B. Jastorff, K. E. Barrett, R. Y. Tsien, *Mol. Pharmacol.* **46** (1994) 702-708.
- 104 C. Schultz, M. Vajanaphanich, A. T. Harootunian, P. J. Sammak, K. E. Barrett, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **268** (1993) 6316-6322.
- 105 K. Dziewiszek, A. Banaszek, A. Zamojski, *Tetrahedron Lett.* **28** (1987) 1569-1572.
- 106 E. Fischer, R. Oetker, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **46** (1913) 4029-4040.
- 107 G. Excoffier, D. Gagnaire, J.-P. Utille, *Carbohydr. Res.* **39** (1975) 368-373.
- 108 K. Bock, I. Lundt, C. Pedersen, *Tetrahedron Lett.* **13** (1973) 1037-140.
- 109 K. Bock, C. Pedersen, *J. Chem. Soc., Perkin Trans II* (1974) 293-296.
- 110 H. Paulsen, F. Reck, I. Brockhausen, *Carbohydr. Res.* **236** (1992) 39-71.
- 111 A. D. Barone, J. Y. Tang, M. H. Caruthers, *Nucl. Acids Res.* **12** (1984) 4051-4061.
- 112 M. M. Sim, H. Kondo, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 2260-2267.
- 113 K. Panneerselvam, H. H. Freeze, *J. Clin. Invest.* **97** (1996) 1478-1487.
- 114 G. M. Tener, *J. Am. Chem. Soc.* **83** (1961) 159-168.
- 115 R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie, *J. Am. Chem. Soc.* **89** (1967) 4801-4803.
- 116 C. A. A. Claesen, R. P. A. M. Segers, G. I. Tesser, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **104** (1985) 119-122.
- 117 W. Gerrard, W. J. Green, R. J. Phillips, *J. Chem. Soc.* (1954) 1148-1150.
- 118 K. K. Ogilvie, N. Y. Theriault, J.-M. Seifert, R. T. Pon, M. J. Nemer, *Can. J. Chem.* **58** (1980) 2686-2693.
- 119 R. L. Letsinger, J. L. Finnan, G. A. Heavner, W. B. Lunsford, *J. Am. Chem. Soc.* **97** (1975) 3278-3279.
- 120 W. Bannwarth, A. Trzeciak, *Helv. Chim. Acta* **70** (1987) 175-186.

- 121 S. Flohr, V. Jungmann, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **5** (1999) 669-681.
- 122 J. Stawinski, in *Handbook of Organophosphorus Chemistry*, (Ed. R. Engel), Marcel Dekker, New York (1992) 377-434.
- 123 H. Iijima, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **186** (1989) 95-106.
- 124 R. W. Adamiak, E. Biala, K. Grzeskowiak, R. Kierzek, A. Kraszewski, W. T. Markiewicz, J. Stawinski, M. Wiewiorowski, *Nucl. Acids Res.* **4** (1977) 2321-2329.
- 125 J. Imai, P. F. Torrence, *J. Org. Chem.* **46** (1981) 4015-4021.
- 126 B. Hoffmann, A. Schönebaum, H. Lackner, *Liebigs Ann. Chem.* (1993) 333-342.
- 127 A. V. Nikolaev, I. A. Ivanova, V. N. Shibaev, N. K. Kochetkov, *Carbohydr. Res.* **204** (1990) 65-78.
- 128 A. V. Nikolaev, I. A. Ivanova, V. N. Shibaev, *Carbohydr. Res.* **242** (1993) 91-107.

8. Gefahrenhinweise

	R-Sätze	S-Sätze	Gefahren- symbole
Aceton	11-36-66-67	9-16-26	F, Xi
Acetonitril	11-23/24/25	16-27-45	F, T
Acetylchlorid	11-14-34	9-16-26-45	F, C
Allylbromid	11-23/35-34-50	16-26-36/37/39-45-61	F, T, N
Benzylalkohol	20/22	26	Xn
Chloroform	22-38-40-48/20/22	36/37	Xn
3-Chlorperbenzoesäure	7-36/37/38	3/37-14.10-36/37/39	O, Xi
Dibenzyl- <i>N,N</i> -di- <i>iso</i> - propylphosphoramidit	36/37/38	26-36	
Dichlormethan	40	23.2-24/25-36/37	Xn
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	61-E20/21-36	53-45	T
Ethylacetat	11-36-66-67	16-26-33	F, Xi
Allyl-bis- <i>N,N</i> -di- <i>iso</i> -propyl- phosphoramidit	36/37/38	26-36	
Brommethylacetat	36/37/38	26-36/37/39	
Buttersäurechlorid	11-34	16-23.2-26-36-45	F, C
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid	7-21/22-23-34-44- 52/53	3/7-14.11-26-36/37/39-45	O, T
Chlor-2-cyanoethyl- <i>N,N</i> -di- <i>iso</i> -propylamin	34-5	26-36/37/39	
Chlormethylpivaloat	20/21/22-36/37	16-26	
Essigsäure	10-35	23.2-26-45	C
Essigsäureanhydrid	10-34	26-45	C
Ethanol	11	7-16	F
<i>N</i> -Ethyl-di- <i>iso</i> -propylamin	11-36/38		F, X
<i>trans</i> -2-Hexen-1-ol	10		
Imidazol	22-34	22-26-36/37/39-45	C
Methanol	11-23/24/25- 39/23/24/25	7-16-36/37-45	F, T

	R-Sätze	S-Sätze	Gefahren- symbole
Natriumhydroxid	45	26-37/39-45	C
Palladium/Aktivkohle	7-36/37/38	17-26-36	F, Xi
Palladiumchlorid	36/38	26-28.1	Xi
Petrolether (50/70)	12-65	9-16-23.2-24-33-62	F+, Xn
Pivalinsäurechlorid	11-34-36/37	16-26-36/37/39-45	F, C
Phosphortrichlorid	34-37	7/8-26-45	C
Di- <i>iso</i> -propylamin	11-20/22-34	16-26-36/37/39	F, C
<i>iso</i> -Propylchlorformiat	23-24	26-36/37/39-45	F, T
Pyridin	11-20/21/22	26-28.1	F, Xn
Salzsäure	34-37	26-36/37/39-45	C
Schwefelsäure	35	26-3045	C
Tetrahydrofuran	11-19-36/37	16-29-33	F, Xi
1 <i>H</i> -Tetrazol	5-4	36	
Toluol	11-20	16-25-29-33	F, Xn
2,2,2-Trichlorethanol	22		Xn
Triethylamin	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39	F, C

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei allen bedanken, die das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht haben:

Marc, der mit seiner Ruhe meine Aufgeregtheiten kompensierte und ohne den nichts so wäre, wie es ist.

Meinen Eltern, die immer an mich glaubten, alle Höhen und Tiefen tapfer ertrugen und deren Unterstützung nie endete.

Meinen Laborkollegen Karin, die mir beim vielen Rätseln und „Hüpfen“ zu einer guten Freundin wurde und Björn, durch den Stille im Labor eine völlig neue Definition bekam.

Den 318ern: Saskia für die vielen Diskussionen und kritischen Auseinandersetzungen; Angela, die mir dank ihrer guten Englischkenntnisse immer in Erinnerung bleiben wird und Henk, dessen Gleichmut bewunderswert war.

Nico für die unzähligen MALDI-TOF-Spektren und die schnellen Hilfseinsätze bei Problemen jeglicher Art und Lars für die Durchsicht dieser Arbeit.

Swantje, die es geschafft hat, ihre anfänglichen Animositäten zu überwinden; Daniel, der den Anstoß zum Einsatz der *iso*-Propylcarbonat-Funktion gab.

Lilia und Joanna, deren hoher Schokoladeneinsatz und Hilfsbereitschaft den Laboralltag angenehmer gestaltete.

Dem gesamten Arbeitskreis Thiem für die freundliche Aufnahme und gute Zusammenarbeit.

Dr. Sinnwell, der es geschafft hat, mir die NMR-Spektroskopie näher zu bringen.

Ira und Gundel, die viele Dinge leichter gemacht haben.

Dr. Marquardt und seiner Arbeitsgruppe in Münster für die nette und erfolgreiche Zusammenarbeit, insbesondere Christian Kranz, der geduldig alle Fragen meinerseits beantwortet hat.

Synke Rutschow
geboren am 1. November 1971
in Rostock

Schulausbildung

09/78 – 07/88
07/88 Polytechnische Oberschule in Rostock
Mittlere Reife

11/89 – 06/92
06/92 Gymnasium Oberalster in Hamburg
Abitur

Hochschulausbildung

10/92 – 10/94
10/94 Grundstudium Chemie, Universität Hamburg
Vordiplom

11/94 – 07/97
08/97 – 04/98 Hauptstudium Chemie, Universität Hamburg
Diplomarbeit bei Prof. Dr. J. Thiem, Universität
Hamburg
Thema: Synthese von Kohlenhydratethern und
Untersuchungen zur Synthese von Disaccharidethern
durch konjugierte Addition
04/98 Diplom

07/98 – 06/02 Promotion bei Prof. Dr. J. Thiem, Universität Hamburg

Auslandsaufenthalte

09/95 – 04/96 Studium an der University of Southampton in
Großbritannien, ERASMUS-Forschungsstipendium

03/00 – 04/00 Forschungsaufenthalt an der Stockholm University,
Arrhenius Laboratory, in Schweden

Beruflicher Werdegang

09/88 – 10/89 Lehre, Universität Rostock

07/98 – 03/99 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im
Sonderforschungsbereich 470

04/99 – 03/02 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Assistentin im
Fortgeschrittenenpraktikum für Organische Chemie

04/02 – 06/02 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen eines
Drittmittelprojektes