

Synthese neuartiger Clustermannoside zur Inhibition bakterieller Adhäsion

**Neue Wege zu potenten Liganden für das Mannose-spezifische Lektin auf
Typ-1-Fimbrien von *E. coli***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Sven Kötter
aus Hamburg

Hamburg 2000

1. Gutachter: PD Dr. Th. K. Lindhorst

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Thiem

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 31.1.2000

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1996 bis April 1999 im Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

Frau PD Dr. Th. K. Lindhorst danke ich für die Überlassung des Themas, die zahlreichen Diskussionen und ihr stetes Interesse am Verlauf der Arbeit.

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
abs.	absolut
Ac	Acetyl
All	Allyl
Bn	Benzyl
Bu	<i>n</i> -Butyl
^t Bu	<i>tertiär</i> -Butyl
Bz	Benzoyl
CCA	α -Hydroxy-4-cyanozimtsäure
CRD	<i>Carbohydrate Recognition Domaine</i>
Da	Dalton
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyl-ethylamin
DMAc	<i>N,N</i> -Dimethylacetamid
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DME	Diethylenglycoldimethylether
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EEDQ	Ethyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin-1-carboxylat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EtOH	Ethanol
GalNAc	2-Acetamido-2-desoxy- α -D-galactopyranose
ges.	gesättigt
GPC	Gelpermeationschromatographie
HIC	<i>Hydrophobic Interaction Chromatography</i>
1-HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
Lit.	Literatur
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation</i>
Man	D-Mannopyranose

MBP	<i>Mannose Binding Protein</i>
MeOH	Methanol
Me	Methyl
mp	Schmelzpunkt
Ph	Phenyl
PTC	Phasentransferkatalyse
R _f -Wert	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
TBA	Tetrabutylammonium
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl- uroniumtetrafluoroborat
Tf	Trifluormethansulfonyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Dünnschichtchromatographie
TMS	Trimethylsilyl
TMSOTf	Trifluormethansulfonsäuretrimethylsilylester
TOF	<i>Time of Flight</i>
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Ts	4-Toluensulfonyl
U	<i>Units</i>
quant.	quantitativ
wässr.	wäßrig

Inhalt

1. EINLEITUNG	1
1.1. BEDEUTUNG DER KOHLENHYDRATE IN GLYCOKONJUGATEN	2
1.2. PRINZIPIEN MIKROBIELLER ADHÄSION - LEKTINE	4
1.3. PRINZIPIEN MIKROBIELLER ADHÄSION- DER MULTIVALENZASPEKT	6
1.4. SYNTHESZIELE UND KONZEPT	8
2. SYNTHESE DER CORE-MOLEKÜLE	9
3. SYNTHESE DER DONOREN	12
3.1. SYNTHESE DER TRICHLORACETIMIDATE.....	12
3.2. SYNTHESE 6-FUNKTIONALISIERTER MANNOSIDE.....	13
3.3. <i>p</i> -SUBSTITUIERTE BENZYL-MANNOSIDE	16
3.4. ALIPHATISCHE SPACER-MANNOSIDE.....	17
3.5. <i>p</i> -SUBSTITUIERTE PHENYL- β -D-CHITOBIOSID- UND GALNAC-DERIVATE	19
4. BIVALENTE CLUSTER-MANNOSIDE	25
5. TRIVALENTE GLYCOCLUSTER	27
5.1. CLUSTER-MANNOSIDE DURCH GLYCOSYLIERUNG	27
5.2. PEPTIDISCH-VERBRÜCKTE GLYCOCLUSTER.....	31
5.3. THIOHARNSTOFF-VERBRÜCKTE GLYCOCLUSTER.....	33
6. MARKIERUNG VON TRIANTENNÄREN GLYCOCLUSTERN	35
7. SYNTHESE SPACER-MODIFIZIERTER GLYCOCLUSTER	41
8. HÄMAGGLUTINATION UND ELISA: TESTERGEBNISSE	44
9. AUSBLICK	50
10. ZUSAMMENFASSUNG	52
11. SUMMARY	54
12. EXPERIMENTELLER TEIL	56
13. LITERATURVERZEICHNIS	121

1. Einleitung

Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen spielen für die Zell-Adhäsion¹⁻³ wie z. B. bei der Leukocyten-Rekrutierung^{4, 5} und allgemein in der Zell-Zell-Kommunikation eine wichtige Rolle. Die biologische Information, die in den verschiedenen räumlichen Anordnungen der komplexen Oligosaccharid-Strukturen verschlüsselt ist, übersteigt bei weitem die Informationsvielfalt des linearen genetischen Codes basierend auf den Nucleotidbasen. Dementsprechend gewinnt das interdisziplinäre Feld der Glycobiologie und das Interesse am therapeutischen Potential von Kohlenhydratmimetika zunehmend an Bedeutung.⁶

Auch für die Adhäsion von Mikroben an ihre Wirtszellen spielen Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen eine Rolle. Die Interaktion der auf der Zelloberfläche exprimierten Kohlenhydratstrukturen mit mikrobiellen Lektinen ist eine Voraussetzung für die Infektion. Somit ergibt sich die Möglichkeit, Infektionen durch Verhinderung des initialen Adhäsionsschritts einzudämmen. Um Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen therapeutisch zu manipulieren, wäre ein detailliertes Wissen über die Spezifität der CRDs notwendig. Gerade wegen der zunehmenden bakteriellen Multiresistenz gegenüber Antibiotika wird die Entwicklung einer antiadhäsiven Medikamentenklasse attraktiv.

Als potente Saccharidvarianten wurden in letzter Zeit häufig multivalente Glycomimetika entworfen, die oft erfolgreich als Inhibitoren in verschiedenen Adhäsionssystemen *in vitro* eingesetzt werden konnten, wie z. B. zur Kontrolle der Leukocyten-Rekrutierung bei krankhaften Entzündungsprozessen,⁷⁻¹⁰ als Antiadhäsiva¹¹ in der Adhäsion von *Influenza-Viren*¹²⁻¹⁶ oder *Streptococcus suis* mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich¹⁷. Zum einen handelt es sich dabei um Glycopolymere,^{18, 19} die durch Polymerisierung von glycosylierten Monomeren oder durch Copolymerisation z. B. von modifizierten Sialosiden mit Acrylamid^{12, 15} erhältlich sind. Andererseits finden Glycodendrimere^{20, 21} eine immer breitere Anwendung als Kohlenhydratmimetika. Während Glycopolymere eine Molekulargewichtsverteilung aufweisen, sind Glycodendrimere monodispers. Nur wenn die Kohlenhydratepitope sterisch einheitlich und definiert präsentiert werden, läßt sich aus experimentellen Meßdaten über Struktur-Wirkungsbeziehungen ein Bild der Bindungstasche rekonstruieren.

Diese Voraussetzung erfüllen z. B. auch sogenannte Glycocluster, die auf der Basis von kleinen trifunktionellen nicht-Kohlenhydrat-Kernmolekülen synthetisiert werden. Diese sind zudem relativ einfach zu synthetisieren verglichen mit Oligosacchariden und können auch schneller durch Variation der Verknüpfungsart, der Spacer und der Aglycon-Abschnitte für die in Frage kommenden Lektin-CRDs maßgeschneidert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden vornehmlich Cluster-Mannoside für die Inhibition der Mannose-spezifischen Adhäsion von *Escherichia coli*-Bakterien synthetisiert. Die Testung der inhibitorischen Potenzen dieser Verbindungen erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Forschungszentrum Borstel.

1.1. Bedeutung der Kohlenhydrate in Glykokonjugaten

Funktionell äußerst bedeutsam sind Oligosaccharideinheiten in Glycoproteinen²²,² und Glycolipiden in ihrer Beteiligung bei den feinausgeklügelten Erkennungsvorgängen in und zwischen Zellen.³ In Glycoproteinen ist der Oligosaccharidrest entweder *N*-glycosidisch mit der Amidgruppe einer Asparagin-Seitenkette oder *O*-glycosidisch mit einem Serin- oder Threonin-Rest verknüpft. Die in Zellmembranen vorkommenden Glycolipide setzen sich aus Sphingosin und Oligosacchariden zusammen. Bei den komplexesten Glycolipiden, den Gangliosiden, handelt es sich um Membranlipide mit Rezeptorfunktionen, welche Sialinsäuren wie die *N*-Acetylneuraminsäure als charakteristischen saccharidischen Baustein enthalten.

Die Saccharidanteile in Glykokonjugaten bilden auf der Zelloberfläche eine Schicht, die Glycocalix genannt wird. Bei der Zell-Zell-Erkennung und der Zell-Matrix-Erkennung spielt sie eine wichtige Rolle. Insbesondere die Adhäsion von Viren und Bakterien an Zelloberflächen, die Zell-Zell-Kommunikation,³ die Zelldifferenzierung, Immunantwort,²³ Zellwanderung, die Endocytose von Toxinen,²⁴ Fertilisation, die Funktion der Oligosaccharide als Liganden für Enzyme²⁵ und Lektine²⁶ seien hier genannt. Gestörte Zell-Zell-Erkennung aufgrund fehlerhafter Glycosylierung hat Krankheiten wie Zellentartung und Tumormetastasierungen zur Folge. Demzufolge besteht ein großes Interesse an der Entwicklung neuartiger Kohlenhydrat-basierender Modulatoren für Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen. Diese lassen sich auch als Liganden für die Affinitätschromatographie zur Lektin-Charakterisierung, zum zielgerichteten Transport von Medikamenten oder als synthetische Impfstoffe einsetzen.²⁷⁻²⁹

Die in vielen Oberflächenproteinen vorkommenden Oligosaccharidreste und die Mehrzahl der sezernierten Proteine werden im rauen endoplasmatischen Retikulum (RER) und im Golgi-Apparat posttranslational aufgebaut. Die *N*-verknüpften Kohlenhydrate enthalten alle eine einheitliche verzweigte Core-Struktur aus zwei *N*-Acetylglucosamin- und drei Mannose-Resten. Zusätzlich zu dieser Core-Struktur werden zunächst noch sechs weitere Mannose-Reste und drei terminale Glucose-Reste angefügt. Im *cis*-Kompartiment des Golgi-Apparates werden die Oligosaccharide phosphoryliert oder der Mannose-reiche Typ aufgebaut. Im mittleren Kompartiment werden bestimmte Monosaccharide durch Glycosidasen wieder abgespalten und die Rumpf-Oligosaccharide von Glycosyltransferasen wieder mit GlcNAc, Gal oder NeuAc glycosyliert, während im *trans*-Kompartiment die Glycoproteine sortiert werden. Anschließend werden die Glycoproteine von Vesikeln zu den Lysosomen oder in sekretorischen Vesikeln transportiert, mit denen sie in die extrazelluläre Matrix exocytotiert werden.

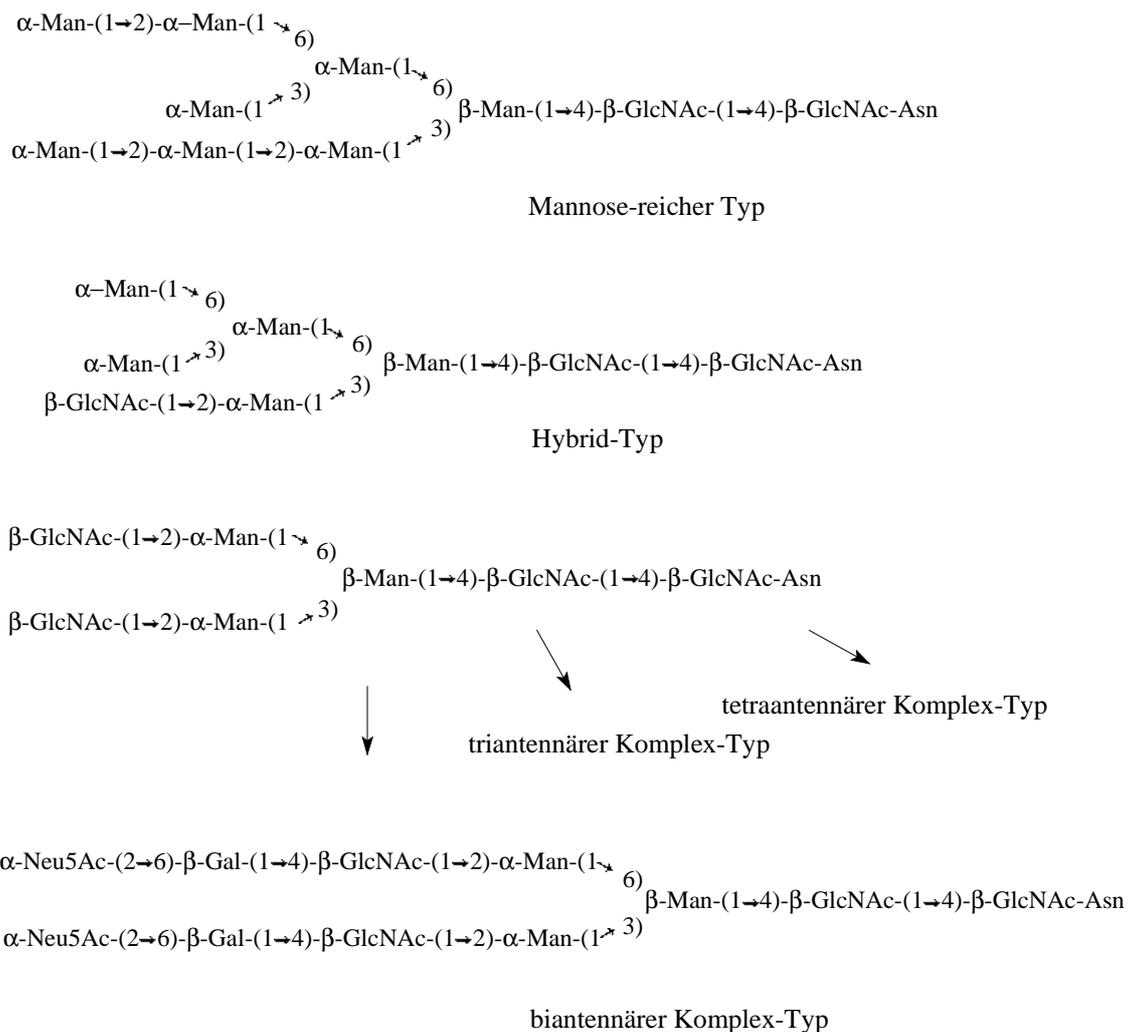


Abb. 1: Übersicht der Strukturen von *N*-verknüpften Glycoproteinen^{30, 31}

1.2. Prinzipien mikrobieller Adhäsion - Lektine

Lektine kommen als Kohlenhydrat-bindende Proteine nicht-immunogenen Ursprungs im Pflanzenreich und Tierreich vor. Tierische Lektine^{32, 33} werden in drei Hauptklassen, den C-Typ (Ca^{2+} -abhängig), P-Typ-Lektine und die Galectine (S-Typ, Thioltyp) eingeteilt. Sie nehmen als Endocytose-einleitende Lektine, als Zelladhäsionsmoleküle (CAM), sezernierte Proteine der extrazellulären Matrix und des Serums (z. B. MBPs im Serum der Säuger) eine wichtige Stellung ein.

Mikrobielle Krankheitserreger³⁴⁻³⁶ besitzen mehrere Strategien, um die Barrieren der Wirtsorganismen zu überwinden. Eine besteht in der festen Anheftung auf tierischen Schleimhäuten des Atmungs-, Verdauungs- und Harnweg-Traktes. Adherierte Organismen müssen den Scherkräften des niesenden, hustenden und peristaltischen Durchflusses standhalten und die kolonisierten Bakterien müssen der Immunantwort des Wirtes entgehen, um nicht mit den Sekreten eliminiert zu werden. Die feste Adhäsion an Wirtsoberflächen³⁴ ist eine Voraussetzung für die Infektionsprozesse durch Bakterieneinfall. *E. coli* führen normalerweise ein symbiotisches Verhältnis mit ihrem Wirt und verursachen keinen Schaden. Pathogene *E. coli*-Stämme verursachen aber Durchfallerkrankungen, Pyelonephritis, Meningitis, Septicemia und Harnwegsinfektionen.³⁷⁻³⁹

Für die Adhäsion an ihre Wirtszellen verwenden Bakterien u. a. eigene Lektine. Bakterielle Lektine⁴⁰ werden am besten über serologische Identifizierung der Oberflächenantigene klassifiziert,^{35, 41} eine einheitliche Einteilung aber fehlt. Ein Vorschlag, humanpathogene *E. coli*-Stämme³⁷ wie ETEC (enterotoxische *E. coli*), EIEC (enteroinvasive *E. coli*), EPEC (enteropathogene *E. coli*) und EHEC (enterohämorrhagische *E. coli*) in O (LPS)-, K (Kapselpolysaccharide)-, H (Flagellen)-, F (Fimbrien)-Typen zu unterteilen, stammt von Orskov und Mitarbeitern.⁴² P (pyelonephritogenisch assoziierte Pili)-Fimbrien sind spezifisch für Galabiose, Typ-1-Fimbrien für α -Mannoside, S-Typ-Fimbrien für die (NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal)-Einheit und Typ-2-Fimbrien für β -Galactoside. Fimbrien von *E. coli* werden auch aufgrund ihrer Hämagglutinationsfähigkeit mit Erythrocyten in Mannose-sensitive (MS) und Mannose-resistente (MR) unterschieden.

Typ-1-Fimbrien erhöhen im Wechselspiel mit anderen Lektinen die Virulenz von *E. coli*.³⁸ Sie sind filiamentöse Anhängsel, die in der Außenmembran der Gram-negativen Enterobakterien verankert sind. Die Heterodimere bestehen hauptsächlich aus den sich wiederholenden FimA-Proteinuntereinheiten (98%)^{43, 44} und aus FimF-, FimG- und FimH-

Domänen. Das 32 kDa FimH-Protein stellt die Lektindomäne mit α -D-Mannosid-Spezifität dar^{45, 39} und kommt an den Enden sowie entlang der ganzen Fimbrie verteilt vor.^{46, 47} Diese sind typischerweise bis zu 10 μm lang und messen ca. 7 nm im Durchmesser. FimF und FimG sind für die Integration der FimH-Domänen in die Fimbrie notwendig. Das FimC-Protein dient vermutlich zum Transfer der fimbriellen Proteine zur Außenmembran, FimD unterstützt wahrscheinlich die Polymerisation. Im Gencluster von *E. coli* regulieren die *fimB* und *fimE*-Sequenzen die Transkription der *fimA*-, *fimF*-, *fimG*- und *fimH*-Strukturgene und können wahlweise an- oder abgeschaltet werden. Das 17 kDa FimA-Protein besteht aus 158 Aminosäuren und polymerisiert zu einer rechtsdrehenden Helix. Im Gegensatz zum *fimA*- ist das *fimH*-Gen bei den Enterobakterien hochkonserviert^{35, 48-50, 41} (Abb. 2).

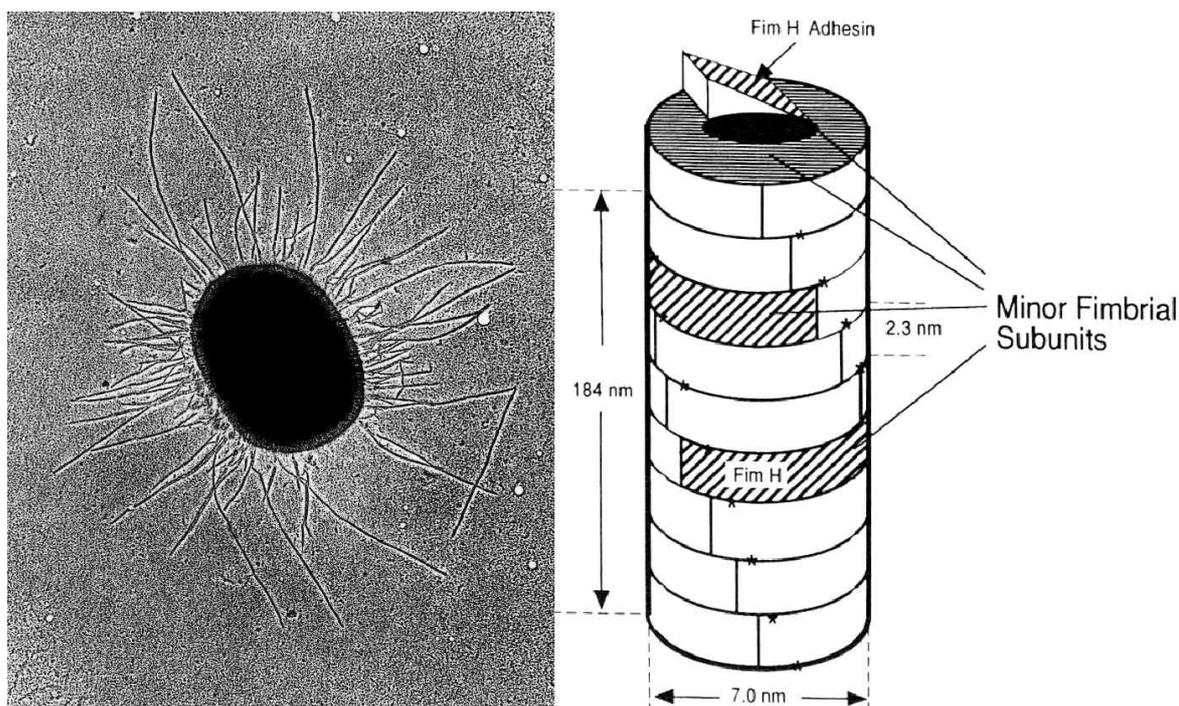


Abb. 2: Typ-1-fimbrierte *E. coli* (links) mit Modellzeichnung einer helicalen Fimbrie (rechts)

Aus früheren Untersuchungen von Ofek und Sharon⁵¹⁻⁵⁵ ist bekannt, dass die Bindungstasche der *carbohydrate recognition domaine* (CRD) auf der Oberfläche der Fimbrie die ungefähre Größe eines Trisaccharides haben könnte, da Trisaccharide wie α -D-Man-(1 \rightarrow 3)- β -D-Man-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc einundzwanzigmal besser binden als Methyl- α -D-

mannosid (MeMan). *p*-Nitrophenyl- α -D-mannosid ist ein besonders potenter Inhibitor und bindet dreißigmal besser als MeMan, so daß die Existenz einer hydrophoben Bindungsregion in oder nahe der Bindungstasche vermutet wird. Unter Berücksichtigung dieser Befunde wird in dieser Arbeit versucht, potente Liganden für die Typ-1-fimbriale CRDs als Cluster- α -Mannoside zu entwerfen und dabei das Wissen über die Bindungstasche von Typ-1-Fimbrien möglichst zu detaillieren.

1.3. Prinzipien mikrobieller Adhäsion- der Multivalenzaspekt

Wechselwirkungen zwischen Lektinen und den komplementären oligoantennären Zelloberflächensacchariden sind oft multivalent.^{56, 57} Entweder kommen mehrere CRDs verteilt auf einem Lektin vor, wie die FimH-Domänen auf Typ-1-Fimbrien, oder viele monovalente Lektine, wie z. B. im Fall der Selektine, kommen auf größeren Arealen der Zelloberfläche vor. Als dritte Alternative sind Lektinoligomere an einer multivalenten Wechselwirkung mit oligoantennären Zuckerliganden beteiligt, wie z. B. bei den Asialoglycoproteinrezeptoren der Leber. Die schwachen singulären Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen, deren Bindungskonstanten typischerweise im millimolaren Bereich liegen, werden amplifiziert und führen so z. B. zu einer festen Anbindung eines Mikroorganismus an die Wirtszelloberfläche.

Für die Adhäsion von Lymphocyten aus dem Blutkreislauf an die Endothelzellen der Gefäßwand exprimieren letztere nach Aktivierung, z. B. nach einer Verletzung das E-Selektin, welches an die Sialyl-Le^x-Oligosaccharidstrukturen der Lymphocyten bindet und diese abbremst. Das Rollen und der Übergang zur festen Adhäsion bis zur Diapedese der Lymphocyten an den Ort der Entzündung wird in der frühen Phase u. a. durch eine Vielfältigkeit der bindenden verschiedenen E-, P- und L-Selektine gesteuert.⁵⁸⁻⁶⁰

Für einige Stoffwechselprozesse, wie z. B. das Entfernen desialisierter Glycoproteine aus dem Blutkreislauf, ist die Regulation über multivalente Bindungen fein abgestimmt. Erst bei hinreichender Anzahl freiliegender terminaler Galactose-Reste wird das Glycoprotein durch Bindung an den Asialoglycoproteinrezeptor entfernt. In diesem Ligand-Rezeptor-System wurden erstmals 1978 von Y. C. Lee kleine Cluster-Galactoside als Glycomimetika eingesetzt.⁶¹⁻⁶⁴ Bei linearer Amplifizierung der Kohlenhydratepitope in den synthetischen Clustern wurde eine exponentielle Steigerung der Bindungskonstanten festgestellt. Lee interpretierte dieses Phänomen auf der Basis des trimeren Asialoglycoproteinrezeptors

und prägte dafür den Begriff „Cluster-Effekt“,⁶⁴ der heutzutage eher auf synthetische Glycokonguate angewendet wird statt auf einen Cluster kohlenhydratbindender Lektindomänen. Dieser Multivalenzeffekt kann unterschiedliche Ursachen haben, wie weiter unten näher erläutert wird.

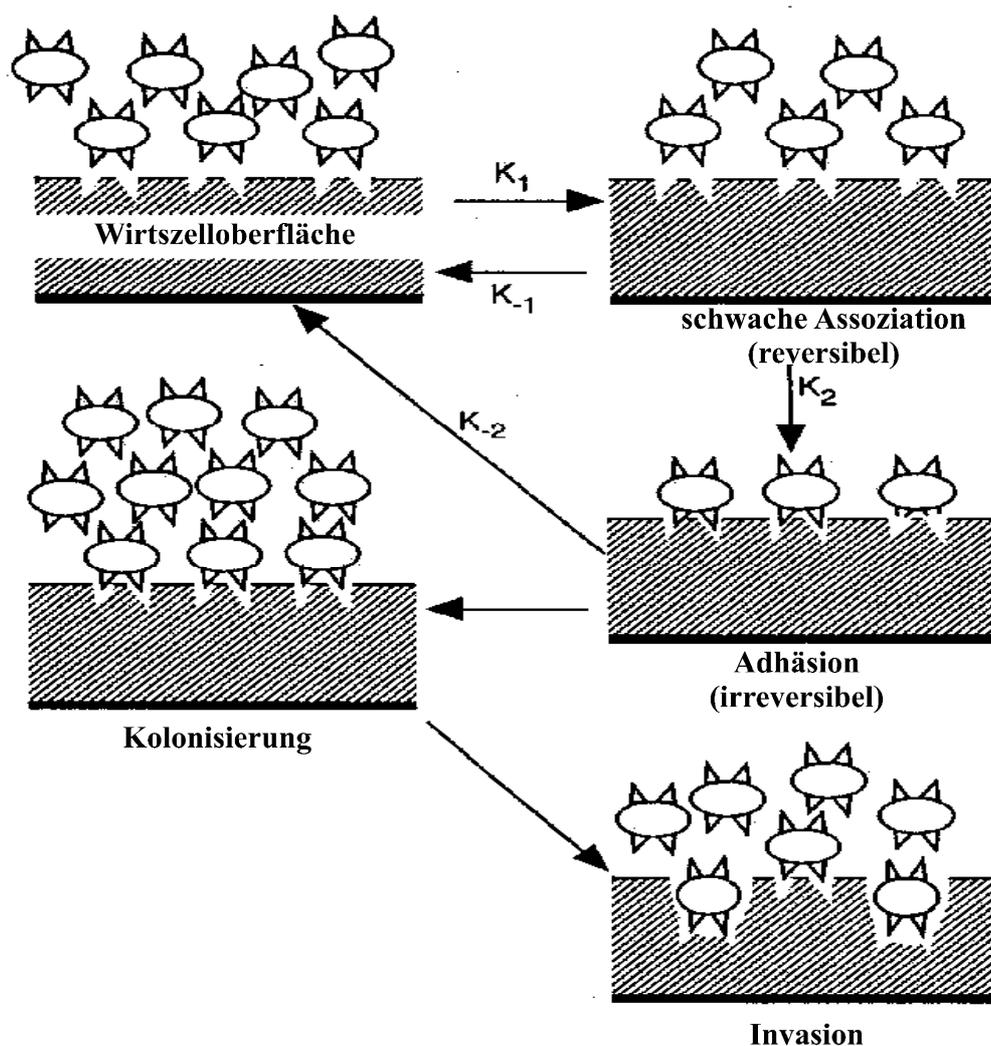


Abb. 3: Multistep-Kinetik einer formal zweistufigen Adhäsion von Mikroben an Wirtszelloberflächen

Für den Fall mikrobieller Adhäsion schematisiert Abbildung 3 die einzelnen Schritte des gesamten als zwei- oder mehrstufig angenommenen Prozesses, welcher zu einer irreversiblen Bindung von Mikroben auf einer Wirtsoberfläche führt.³⁶ Zunächst bindet ein Bakterium lose und reversibel an die Rezeptoren der Wirtsoberfläche (intermolekulare Wechselwirkung). Multiple komplementäre Adhäsion-Rezeptor-Interaktionen führen dann zur

irreversiblen Bindung (intramolekulare Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung, $k_2 \gg k_{-2}$), eine Kolonisierung mit anschließender Invasion erfolgt. Für den Grenzfall $k_{-1} \gg k_2$ wird der gesamte Adhäsionsprozess durch die Aktivierungsenergie der Bildung des irreversibel adhären Bakteriums bestimmt. Günstige sterische Ligandenanordnungen im Zusammenspiel mit multivalenten Effekten lassen k_{-2} dagegen sehr klein werden.

1.4. Synthesziele und Konzept

Es wurde in dieser Arbeit ein Synthesekonzept verfolgt, welches auf der Basis des Multivalenzaspektes beruht, bei dem Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen wichtig sind. Andererseits basiert das Synthesekonzept auf dem Glycomimetika-Ansatz, welcher die vereinfachte Synthese von Oligosaccharid-ähnlichen Verbindungen zum Ziel hat.

Der Syntheseplan, der der folgenden Arbeit zugrunde liegt, beinhaltet die Verwendung einfacher trifunktioneller nicht-Kohlenhydrat-Moleküle als Kernverbindungen für die Synthese trivalenter Cluster-Glycoside mit besonderem Hinblick auf die Inhibition der Typ-1-Fimbrien vermittelten Adhäsion von *E. coli*. Dabei sollen derartige trivalente Cluster-Mannoside so synthetisiert werden, daß sie sich strukturell leicht und vielseitig variieren lassen. Außerdem sollen sie mit einer Ankergruppe ausgestattet werden, welche die Markierung der Verbindungen mit z. B. Biotin einerseits erlaubt und andererseits deren Verwendung als „Dendrons“ für die Synthese von Kohlenhydrat-Dendrimeren prinzipiell ermöglicht (Abb. 4).

Die verwendeten Core-Moleküle lösen sich in organischen (chemische Synthese) wie auch wässrigen Lösungsmitteln (Hämagglutinationassays) und lassen sich effizient zu Amino- bzw. Carboxyfunktionen derivatisieren. Sie erlauben (als *building blocks*) in einer 1→3 Verknüpfung auch die Synthese höherer Glycocluster mit potentieller Ankergruppe.

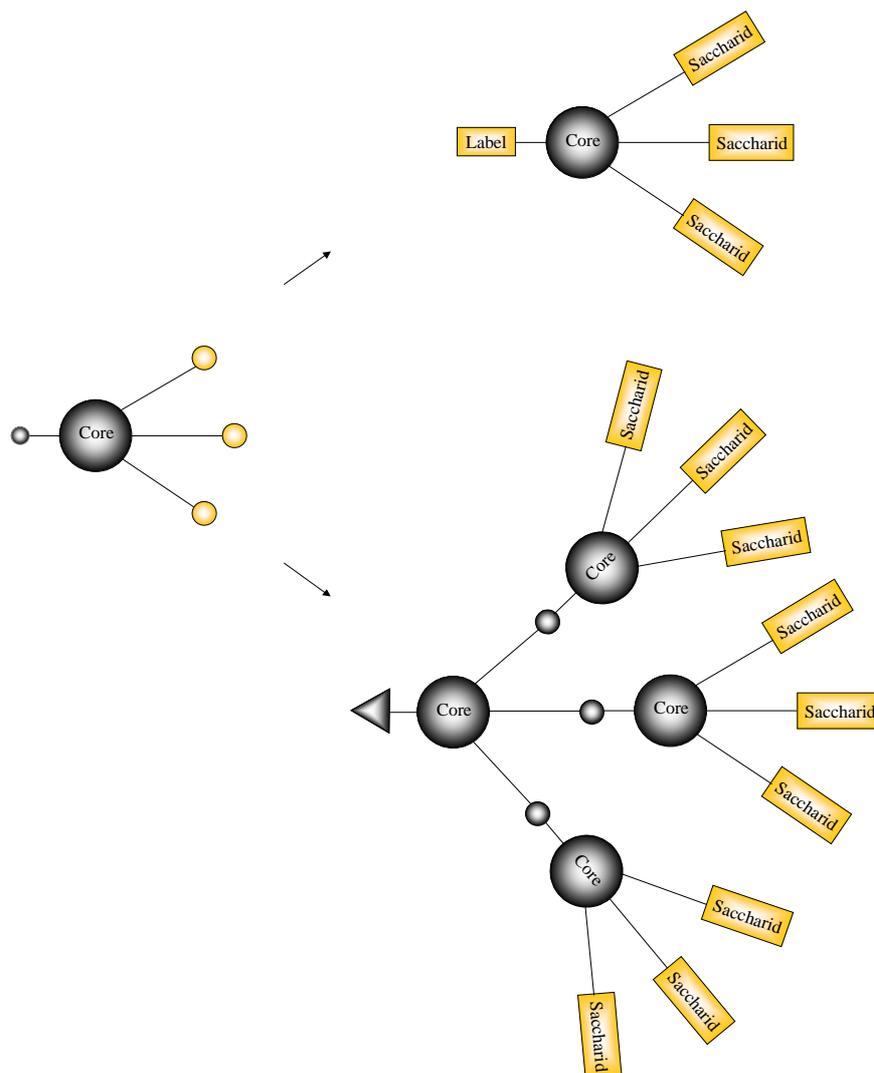


Abb. 4: Allgemeines Syntheseschema

2. Synthese der Core-Moleküle

Damit Glycomimetika als Lektinliganden wirksam sein können, müssen sie den natürlichen Vorbildern ähnlich sein. Oft ist der Verzicht auf komplizierte Strukturen möglich, wenn die für die Erkennung wichtigen Zucker als Cluster präsentiert werden. Hohe Bindungsaffinität sollte sich ohne Kenntnis der Lektinstrukturen am besten durch ein flexibles und zudem einfaches Synthesekonzept erzielen lassen. Unter Verwendung einfacher Core-Moleküle lassen sich z. B. durch die Wahl verschiedener Spacer und Verknüpfungsarten schnell geeignete Glycocluster synthetisieren und variieren. Durch die Variation der Spacer läßt sich die Flexibilität der Zuckerreste sowie eventuell deren optimale Entfer-

nungen für die Bindung in den CRDs einstellen. Bei der Herstellung von Glycoclustern können auch Synthesekonzepte verfolgt werden, die ohne Glycosylierungsschritte auskommen. So läßt sich z. B. Peptidchemie einsetzen, die nicht für jeden individuellen Zucker neu optimiert werden muß wie bei der Glycosylierung.

Zunächst werden Core-Moleküle benötigt, welche die gewünschten Funktionalitäten für den Verknüpfungsschritt mit den Zuckerliganden tragen. Am geeignetsten erscheinen Verbindungen wie Tris-(2-hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) sowie seine Derivate.⁶⁵ Insbesondere die leicht zugänglichen Derivate der Michael-analogen Addukte von Nitromethan an Acrylsäure-*t*butylester nach Newkome⁶⁶ sind aufgrund ihrer funktionellen Vielfalt attraktiv. Nach Abspaltung der *t*Butylgruppen in **1** mit Ameisensäure ließen sich die entstehenden Carboxyfunktionen in **2** mit $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ ⁶⁶ zum Triol **3** in insgesamt 68%iger Ausbeute reduzieren (Abb. 5). Die Nitrogruppe in **3** kann als maskierte Aminofunktion aufgefaßt werden.

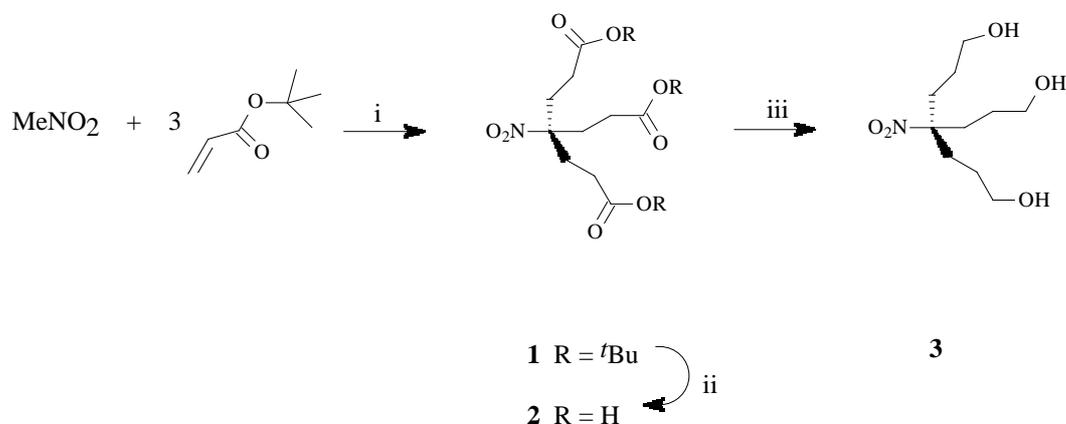


Abb. 5: Synthese der Core-Moleküle, *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*: i) Triton B, 70-80°C, DME, 74%; ii) HCO_2H , 25°C, 92%; iii) $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$, THF, 0→25°C, quant.

Ausgehend von TRIS (**4**) konnte auch Aminotris-(4-cyano-2-oxo-butyl)-methan (**5**) nach Newkome⁶⁷ in 62%iger Ausbeute hergestellt werden. Die zusätzlichen Etherbrücken in diesem Core-Molekül wären wegen der besseren Löslichkeit in wässrigen Systemen gegenüber **2** wünschenswert.

3. Synthese der Donoren

Für die Verknüpfungen mit den verschiedenen nicht-Kohlenhydrat-Core-Molekülen wurden einerseits klassische Glycosyldonoren, andererseits Amino- und Isothiocyanatofunktionalisierte Glycoside synthetisiert.

3.1. Synthese der Trichloracetimidate

Die Darstellung der acetylierten (Abb. 7) und benzylierten (Abb. 8) Trichloracetimidate erfolgte nach literaturbekannten Methoden⁶⁸⁻⁷² unter Verwendung von DBU als Base. Im Falle des benzylierten Trichloracetimidates **15** wurde 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl- α -D-mannose zur Optimierung der Ausbeute über das Allylmannosid **17** synthetisiert, welches sich in über 20% höherer Ausbeute zur Tetra-*O*-benzyl-mannose **14** umsetzen läßt, als es die Spaltung des Methylmannosids **13** erlaubt (Abb. 7). Die Allylgruppe in **17** konnte unter Pd/C-Katalyse isomerisiert und entstehendes 2-Propenylmannosid hydrolytisch gespalten werden.⁷³

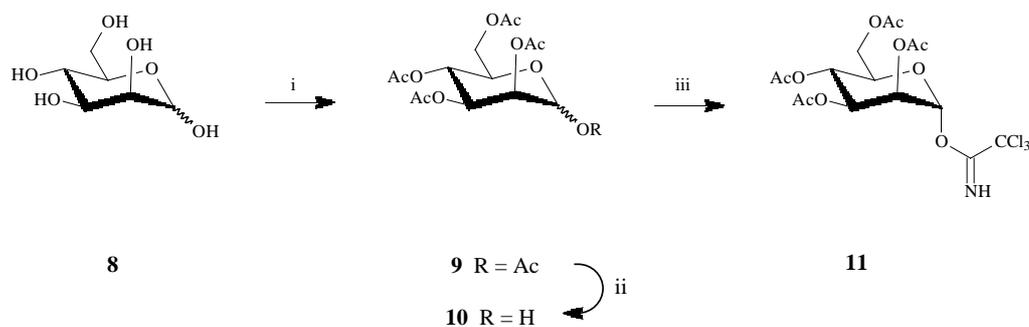


Abb. 7: Synthese acetylierter Donoren, *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*: i) Ac₂O, abs. Pyridin, RT, quant.; ii) H₂NNH₂, abs. DMF, RT, 79%; iii) Cl₃CCN, DBU, abs. CH₂Cl₂, 98%

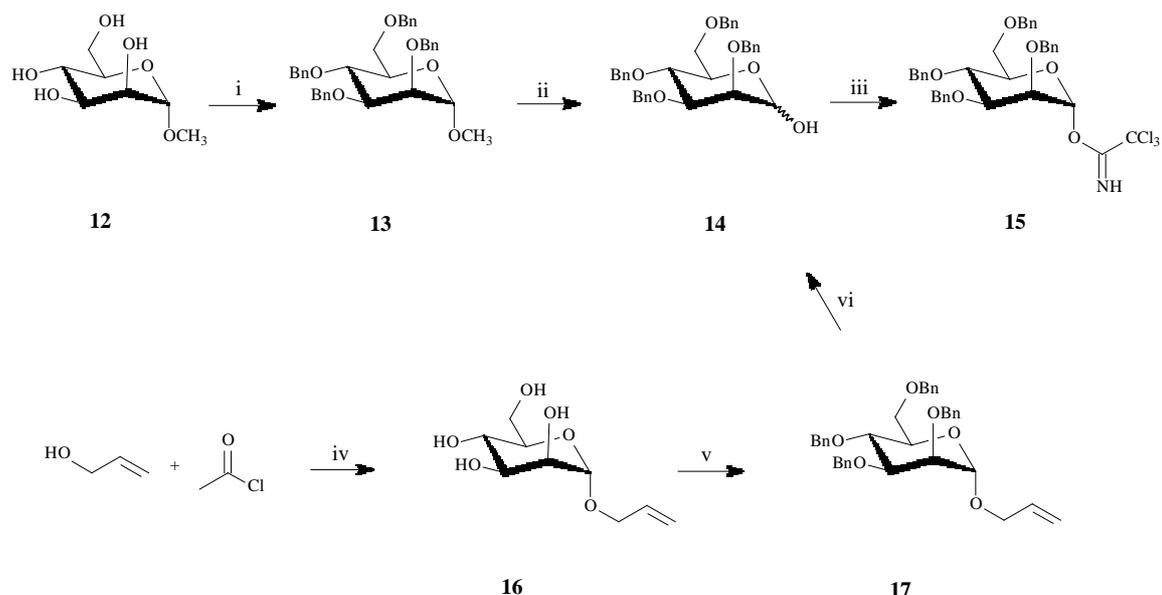


Abb. 8: Synthese benzylierter Donoren, *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*: i) (a) NaH; (b) BnBr, DMF, 93%; ii) 3 M H₂SO₄/HOAc, 3 h 85°C, 42%; iii) Cl₃CCN, DBU, abs. CH₂Cl₂, 96%; iv) 0°C, 1 h, + D-Mannose; v) BnCl, 33%ig NaOH, TBAB, 3 h 55 °C, RT, 2 Stufen (iv + v), 75%; vi) Pd/C, *p*-TsOH, 90% wässr. MeOH, 2 h 80°C, 65% unoptimiert

3.2. Synthese 6-funktionalisierter Mannoside

Zur Synthese der 6-funktionalisierten Methyl-Mannoside wurde die primäre Hydroxygruppe von Methyl- α -D-mannosid (**12**) regioselektiv tosyliert. Die Tosylgruppe des Methyl-6-tosyl- α -D-mannopyranosides (**18**) wurde nach Benzoylierung mit Natriumazid nucleophil substituiert, um das 6-Desoxy-6-azido-mannosid **20** in quantitativer Ausbeute zu erhalten. Seine katalytische Hydrierung führte ohne Benzoylgruppenwanderung zum 6-Amin **21**, das als „Mannosid-Donor“ in Peptidkupplungen eingesetzt werden kann. Weiterhin konnte das benzylierte 6-Azid **20**, welches bereits von Jacobsen beschrieben wurde,⁷⁴ effizient mit CS₂ und Triethylphosphit⁷⁵ in das 6-Desoxy-6-isothiocyanato-mannosid **22** umgewandelt werden. Das analoge acetylgruppengeschützte 6-Desoxy-6-isothiocyanat **24** wurde nach einer Zemplén-Entschützung und anschließender Acetylierung aus dem Azid **20** erhalten. Alternativ konnte auch das ungeschützte Isothiocyanat **27**⁷⁶ aus dem 6-Azid **25** nach Hydrierung zum Amin **26**⁷⁷ und Umsetzung mit Thiophosgen⁷⁶ gewonnen werden (Abb. 9).

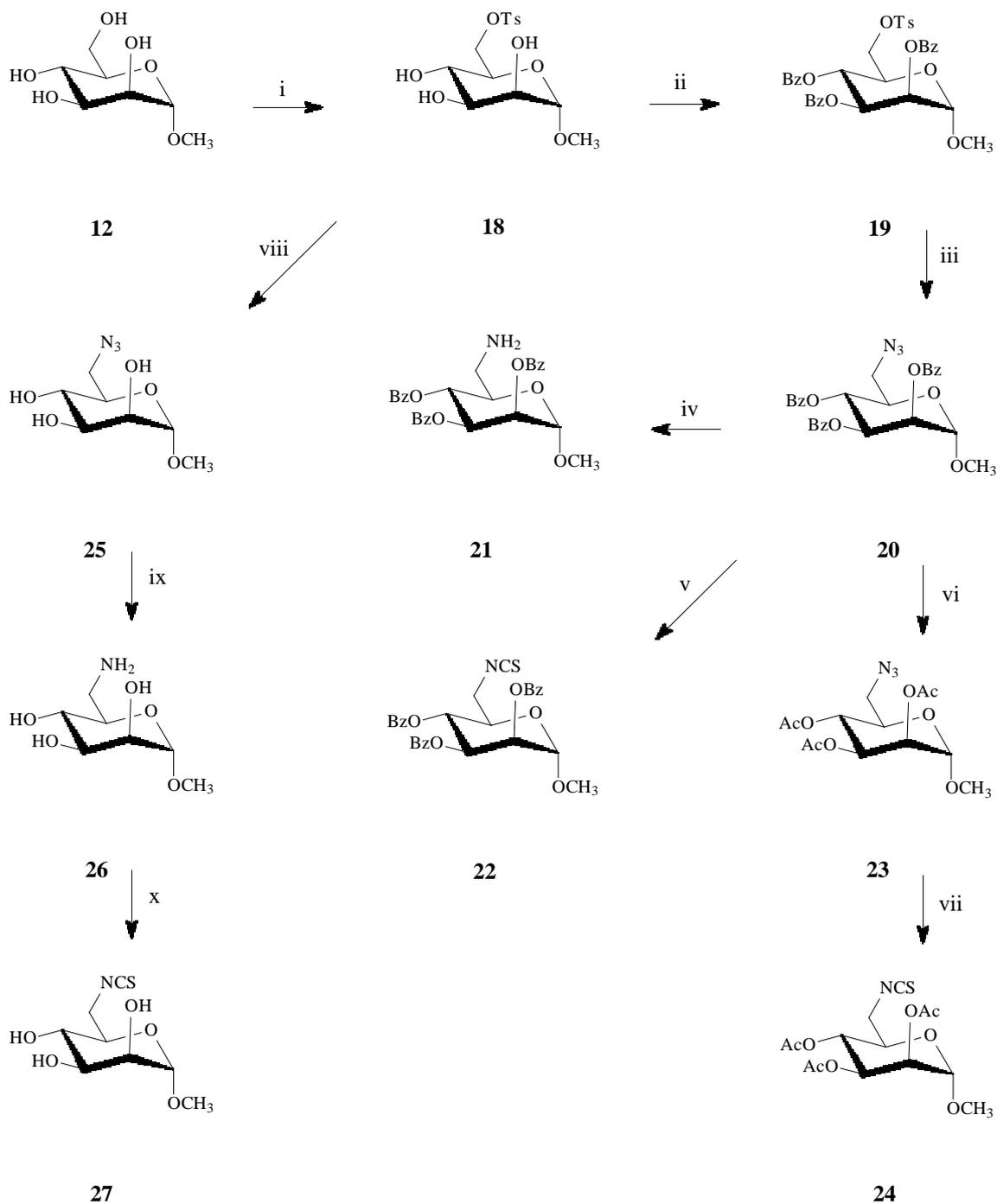


Abb. 9: Synthese 6-funktionalisierter Methylmannoside, *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*: i) TsCl, abs. Pyridin, 0°C→RT, 91%; ii) BzCl, DMAP, abs. Pyridin, 0°C→RT, 86%; iii) NaN₃, abs. DMF, 80°C, 88%; iv) H₂, Pd/C (10%), 1 : 1 Ethylacetat-EtOH, RT, 89%; v) CS₂, (EtO)₃P, abs. Toluol, 80°C, 4 h, 92%; vi) (a) NaOMe, MeOH; (b) Ac₂O, Pyridin., RT, 90%; vii) CS₂, (EtO)₃P, abs. Toluol, 80°C, 6 h, 87%; viii) NaN₃, abs. DMF, 80°C, quant.; ix) H₂, Pd/C (10%ig), 1 : 1 Ethylacetat-EtOH, 84%; x) Cl₂C(S), 4 : 1 EtOH-H₂O, DIPEA, RT, 96%

Die 6-Desoxy-6-isothiocyanato-mannoside **22**, **24** und **27** können als Donoren in der Synthese thioharnstoffverbrückter Cluster-Mannoside eingesetzt werden. Mittels der IR- ($\nu(\text{N}_3)$ bei 2104 cm^{-1} , $\nu(\text{NCS})$ bei 2114 cm^{-1}) und der ^{13}C -NMR-Spektroskopie (NCS-Kohlenstoff bei δ 134.4 ppm) kann die Bildung der NCS-Derivate einfach verfolgt werden.

Um den Einfluß bzw. den Beitrag des Aglycons zur inhibitorischen Potenz einer Verbindung zu bestimmen und auszunutzen, wurden die zu **26** und **27** analogen *p*-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid-Derivate synthetisiert. Analog der Reaktionssequenz zum ungeschützten Isothiocyanat **27** wurde *p*-Nitrophenyl-mannosid (**28**) selektiv an der 6-Position zu **29** tosyliert, die nucleophile Substitution der Tosylgruppe mit Natriumazid ergab das Azid **30**. Durch Umsetzung mit Triethylphosphit und CS_2 wurde das ungeschützte *p*-Nitrophenyl-6-desoxy-6-isothiocyanato- α -D-mannosid (**30**) in hoher Ausbeute erhalten.

Für die chemoselektive Reduktion von **30** zu **32** wurde die Staudinger-Reaktion verwendet. Die Staudinger-Reduktion⁷⁸⁻⁸⁰ von Aziden mit Triphenylphosphin verläuft über die Bildung eines Phosphazides. Dieses extrudiert N_2 unter Bildung eines relativ stabilen Triphenylphosphinimines, welches zum Amin und Triphenylphosphinoxid hydrolysiert. Bei der Synthese des *p*-Nitrophenyl-6-amino-6-desoxy- α -D-mannopyranosides (**32**) in 4 : 1 THF- H_2O bei 45°C wurde anfänglich nur das Phosphinimin gebildet, welches sich auch nach langen Reaktionszeiten und erhöhter Temperatur nicht zur 6-Aminoverbindung hydrolysieren ließ. Erst bei der Flashchromatographie an Kieselgel konnte überraschenderweise **32** in über 90% Ausbeute isoliert werden. Wiederholte Synthesen, diesmal unter Zusatz von Kieselgel zum Reaktionsansatz, ergaben das 6-Amin **32** in fast quantitativer Ausbeute (Abb. 10).

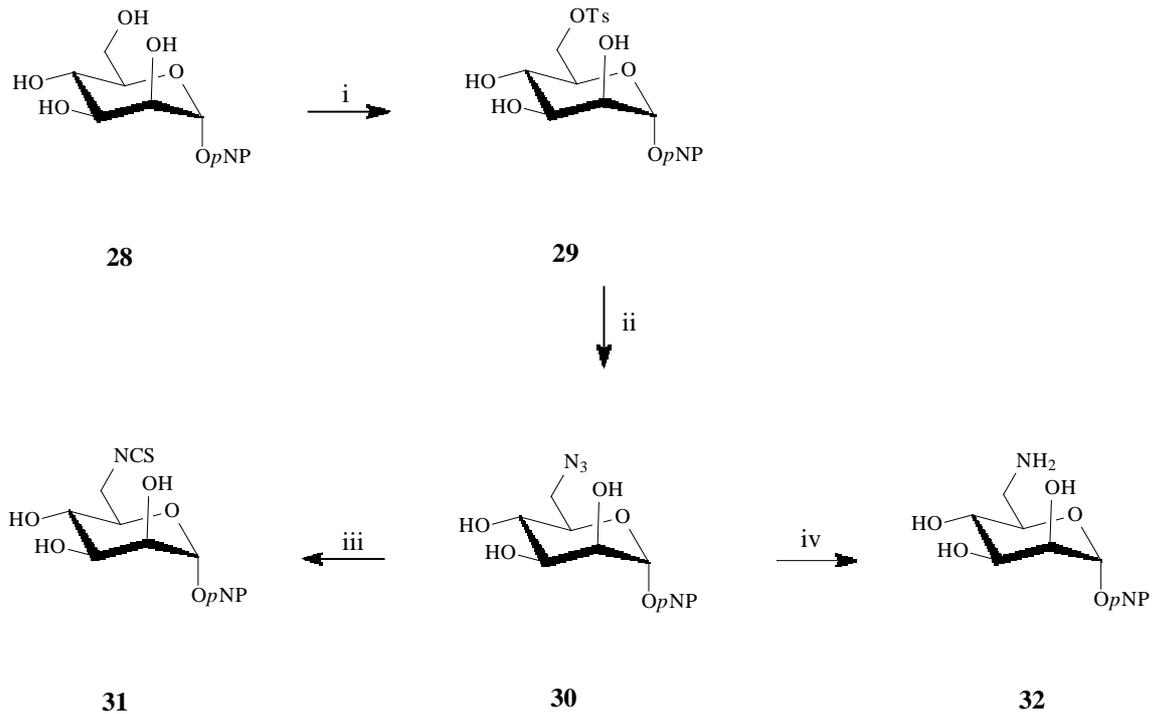


Abb. 10: Synthese von 6-modifizierten *p*NP-Mannosiden, *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*: i) TsCl, abs. Pyridin, 0°C→RT, 57%; ii) NaN₃, abs. DMF, 80°C, 91%; iii) CS₂, (EtO)₃P, DME, 80°C, 6 h, 76%; iv) Ph₃P, 4 : 1 THF-H₂O, 45°C, 98%

3.3. *p*-Substituierte Benzylmannoside

Bindungsstudien mit α -Mannosiden, die ein aromatisches Aglycon enthalten, u. a. mit unterschiedlich substituierten Phenylmannosiden, ergaben durchweg gute Bindungskonstanten.⁵⁴ Für die postulierte hydrophobe Bindungsregion in oder nahe der CRD auf Typ-1-fimbrierten *E. coli* wurden deshalb weitere *p*-substituierte Aryl- α -D-mannoside synthetisiert, wobei der Aryl-*p*-Substituent variiert und sein Einfluß auf das Inhibitionsverhalten der jeweiligen Verbindung ermittelt werden sollte.

Durch Mannosylierung von *p*-Nitrobenzylalkohol mit dem acetylierten Trichloracetimidat **11** zum Mannosid **33** und anschließender Deacetylierung wurde *p*-Nitrobenzyl- α -D-mannopyranosid (**34**) in insgesamt 86%iger Ausbeute dargestellt. Analog ließ sich *p*-Methoxy-carbonyl-benzylalkohol mit dem acetylierten Donor **11** zu **35** mannosylieren. In beiden Fällen kann bei der Mannosylierung durch TMS-OTf-Katalyse und Rühren bei RT über Nacht die Bildung von Orthoesterstrukturen vollständig vermieden werden. Eine vorsichtige Zemplén-Entschützung ergab das Benzylmannosid **36** mit intaktem *p*-Me-

thoxycarbonyl-Substituenten. Die vollständige Entschützung des Methylesters **36** mit NaOMe in MeOH-Wasser lieferte die freie Säure **37** (Abb. 11).

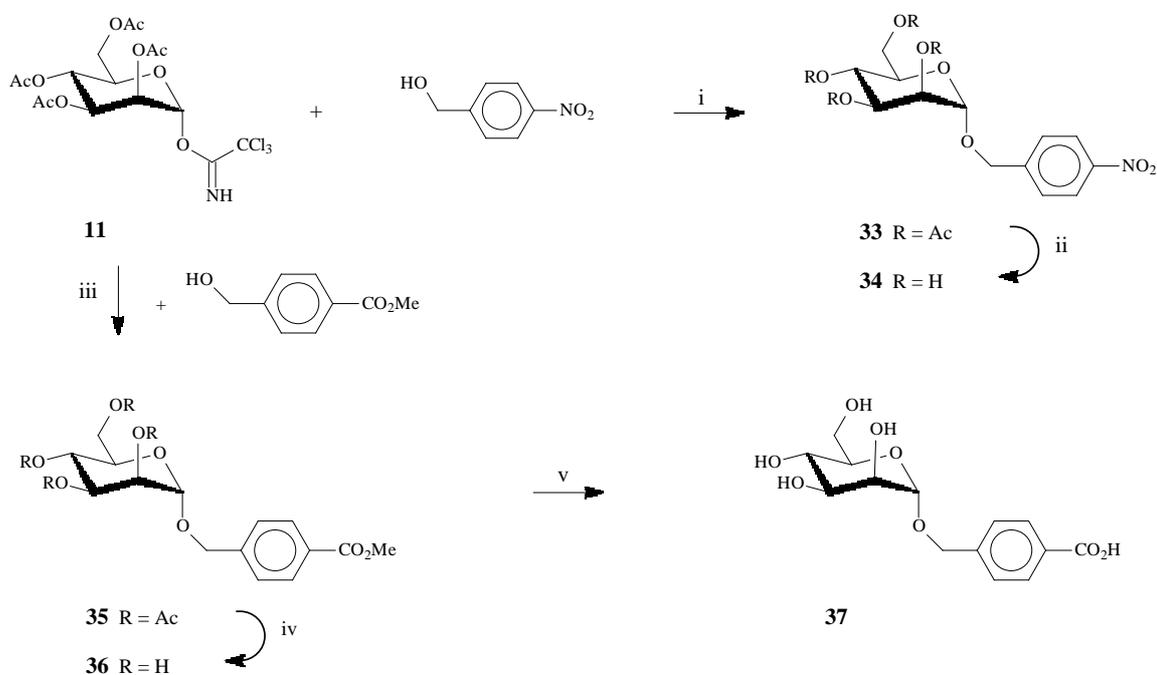


Abb. 11: Darstellung von Benzylmannosiden, *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*:
 i) TMS-OTf, N₂, abs. Acetonitril, 90%; ii) NaOMe, MeOH, 95%; iii) TMS-OTf, abs. CH₂Cl₂,
 4 Å, N₂, 89%; iv) NaOMe, MeOH, 71%; v) NaOMe, 3 : 1 MeOH-H₂O, 94%

Die chemische Natur des *p*-Substituenten wirkt sich auf die chemische Verschiebung der *m*-Arylprotonen im ¹H-NMR-Spektrum aus. Mit R = -NO₂, -CO₂CH₃, -CO₂H in den substituierten Benzylmannosiden **34**, **36** und **37** fällt sie in der angegebenen Reihenfolge von 8.25 über 8.04 auf 7.83 ppm. Mit R = α-Mannosyloxymethyl in **72** (siehe unten) ist sie an niedrigsten und beträgt 7.28 ppm.⁸¹ Die Darstellung der Inhibitoreigenschaften dieser Verbindungen folgt weiter unten.

3.4. Aliphatische Spacer-Mannoside

Mit Hilfe von spacervariierten Mannosiden als Glycosyl-Donorbausteinen können eine Vielzahl von Glycoclustern dargestellt werden. Als Verknüpfungsreaktion mit den oligovalenten Coremolekülen bietet sich die Peptidkupplung an, für die bereits viele gute

Synthesemethoden etabliert sind.⁸² Mit aminoterminierten Spacermannosiden lassen sich schnell kleine Glycocluster aufbauen, die sich eventuell in einer konvergenten Synthese zu größeren Clustern bzw. dendritischen Verbindungen vergrößern ließen.

Ausgehend vom acetylierten Trichloracetimidat **11** ließ sich 2-Bromethanol zu **39** mannosylieren, die nucleophile Substitution mit NaN_3 in DMF ergab das Azid **40**. Die Deacetylierung nach Zemplén zu **41** und die nachfolgende katalytische Hydrierung lieferten das ungeschützte Amin **42** in insgesamt 92% Ausbeute. Dieser Weg ist mit höheren Ausbeuten möglich als die Mannosylierung von 2-Chlorethanol⁸³ oder die Bromidsubstitution unter PTC-Bedingungen^{84, 85} (Abb. 12).

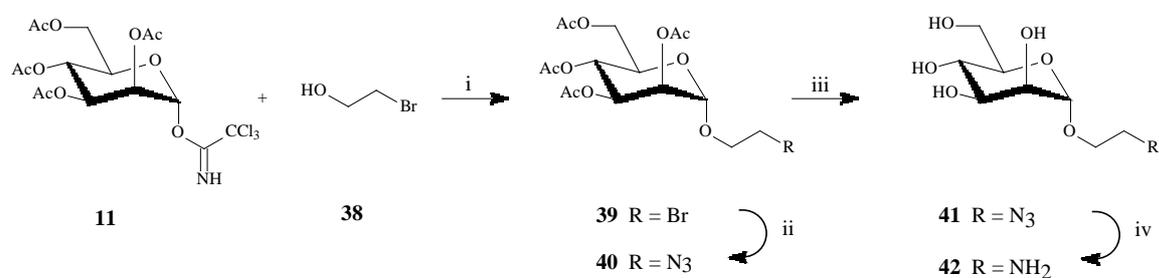


Abb. 12: Darstellung von 2-Aminoethyl- α -D-mannopyranosid (**42**), *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*: i) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, abs. CH_2Cl_2 , 2 h RT, 96%; ii) NaN_3 , abs. DMF, 60°C , 98%; iii) NaOMe, MeOH, quant.; iv) H_2 , Pd/C (10%), 1 : 1 Ethylacetat-EtOH, 98%

Mit 2-(2-Chlorethoxy)-ethanol (**43**) und 2-[2-(2-Chlorethoxy)-ethoxy]-ethanol (**48**) stehen zwei weitere Spaceralkohole für die gleiche Reaktionssequenz zur Verfügung. Deren Mannosylierung unter Lewisäure-Katalyse zu den Spacerglycosiden **44** und **49**, die nucleophile Substitution mit Natriumazid zu **45** und **50** und die anschließende Entschützung ergaben die aminoterminierten Spacer-Mannoside in insgesamt 82% (**47**) bzw. 84%iger (**52**) Ausbeute (Abb. 13, Abb. 14).

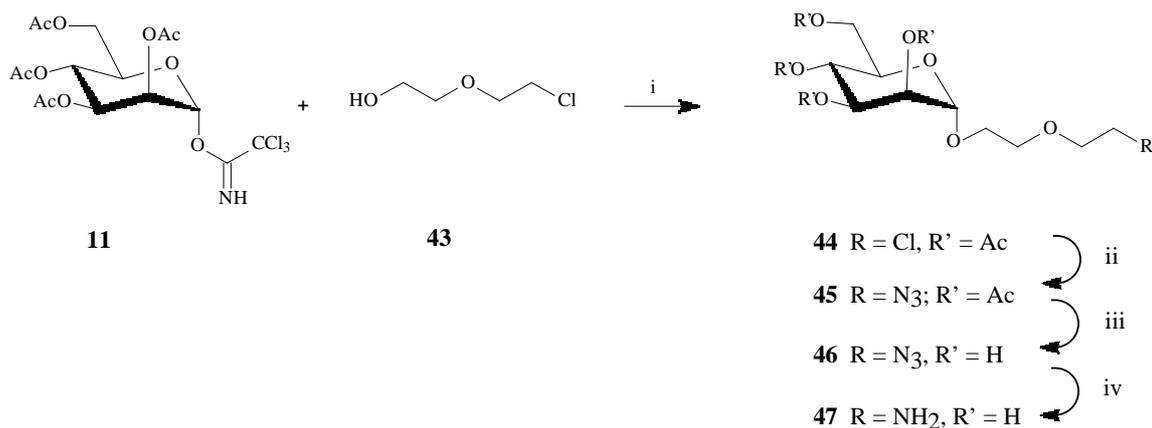


Abb. 13: Darstellung von 2-(2-Aminoethoxy)-ethyl- α -D-mannopyranosid (**47**), *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*: i) TMS-OTf, abs. CH₂Cl₂, 84%; ii) NaN₃, abs. DMF, 50°C, quant.; iii) NaOMe, MeOH, 99%; iv) H₂, Pd/C (10%), 1 : 1 Ethylacetat-EtOH, 98%

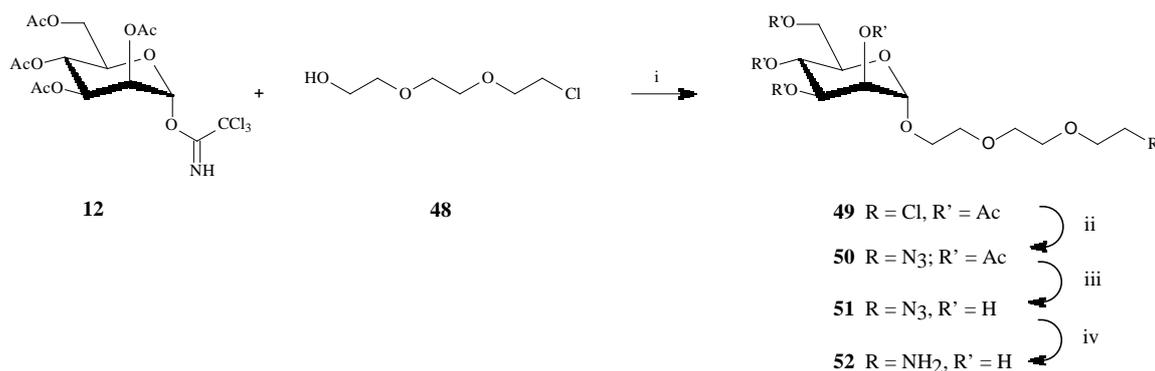


Abb. 14: Darstellung von 2-[2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]ethyl- α -D-mannopyranosid (**52**), *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*: i) TMS-OTf, abs. CH₂Cl₂, 89%; ii) NaN₃, abs. DMF, 50°C, 99%; iii) NaOMe, MeOH, 97%; iv) H₂, Pd/C (10%), 1 : 1 Ethylacetat-EtOH, 98%

3.5. *p*-substituierte Phenyl- β -D-chitobiosid- und GalNAc-Derivate

Ziel der Synthese *p*-substituierter Phenyl- β -D-chitobiosid- und GalNAc-Derivate ist deren Anwendungsmöglichkeit als hochaffine Liganden für den Hauptaktivierungsrezeptor natürlicher Killerzellen von Ratten, dem NKR-P1A-Protein. Ein schneller Zugang zu geclusterten Chitobiosyl- und GalNAc-Derivaten ist über die Synthese von *p*-Isothio-

cyanatophenyl-Sacchariden möglich, welche in hoher Ausbeute mit multifunktionellen Aminen reagieren. Viele *p*-Nitrophenyl-modifizierte Zucker sind bereits kommerziell erhältlich oder im Labor gut darstellbar.⁸⁶ Die einfache katalytische Hydrierung der *p*NP- zur *p*-Aminophenyl-Gruppe und deren Umwandlung in die *p*-NCS-Funktion eröffnet den Weg zur Darstellung thioharnstoffverknüpfter Glycocluster und Glycodendrimere.⁸⁷ Die Verbrückungsreaktion ist weitgehend unabhängig von der chemischen Natur des Zuckers und gelingt normalerweise in hohen Ausbeuten.

Durch Horton-Chlorierung⁸⁸ von *N*-Acetamido-glucosamin (**53**) wurde das acetylierte Chlorid **54** gebildet, welches in einer phasentransferkatalysierten Reaktion mit *p*-Nitrophenol zum Glycosid **55**⁸⁹ umgesetzt wurde. Die Entschützung mit Triethylamin ergab *p*-Nitrophenyl- β -*N*-acetylglucosamin (**56**) in guter Ausbeute.^{90, 86} Da die analoge chemische Synthese von *p*-Nitrophenyl-chitobiosid nur mit schlechten Ausbeuten möglich und mit diversen Schwierigkeiten verbunden ist, wurde das gewünschte Produkt in einer Transglycosylierungsreaktion mit β -*N*-Acetylhexosaminidase von *Aspergillus oryzae* enzymatisch im präparativen Maßstab dargestellt.⁹¹ Der Vorteil der enzymatischen Darstellung⁹² liegt in der regioselektiven $\beta(1\rightarrow4)$ -Verknüpfung von *p*-Nitrophenyl- β -*N*-acetylglucosamin in einer kinetisch kontrollierten Transglycosylierung, in der **56** sowohl als Donor wie auch als Akzeptor fungiert. Die Verwendung von 20% (v/v) Acetonitril erhöht die Löslichkeit von **56**, ohne die Enzymaktivität zu verschlechtern, und der Zusatz von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (60 g/l) zum Reaktionsansatz stabilisiert die Hexosaminidase.⁹³ Bei der Aufarbeitung wurden *p*-Nitrophenyl-haltige Saccharide in einer Festphasenextraktion an Amberlite XAD-4 mit Methanol eluiert und an Sephadex LH-20 (4 : 1 MeOH-H₂O) gelpermeationschromatographisch voneinander getrennt. Unter optimierten Reaktionsbedingungen wurde *p*-Nitrophenylchitobiosid (**57**) in 22%iger Ausbeute (bezogen auf umgesetztes **56**) erhalten, das $\beta(1\rightarrow6)$ -Regioisomer konnte vom Produkt **57** abgetrennt und nicht-umgesetztes Edukt **56** zurückgewonnen werden (Abb. 15). Dieses Verfahren ist auch in Multigramm-Maßstab anwendbar.

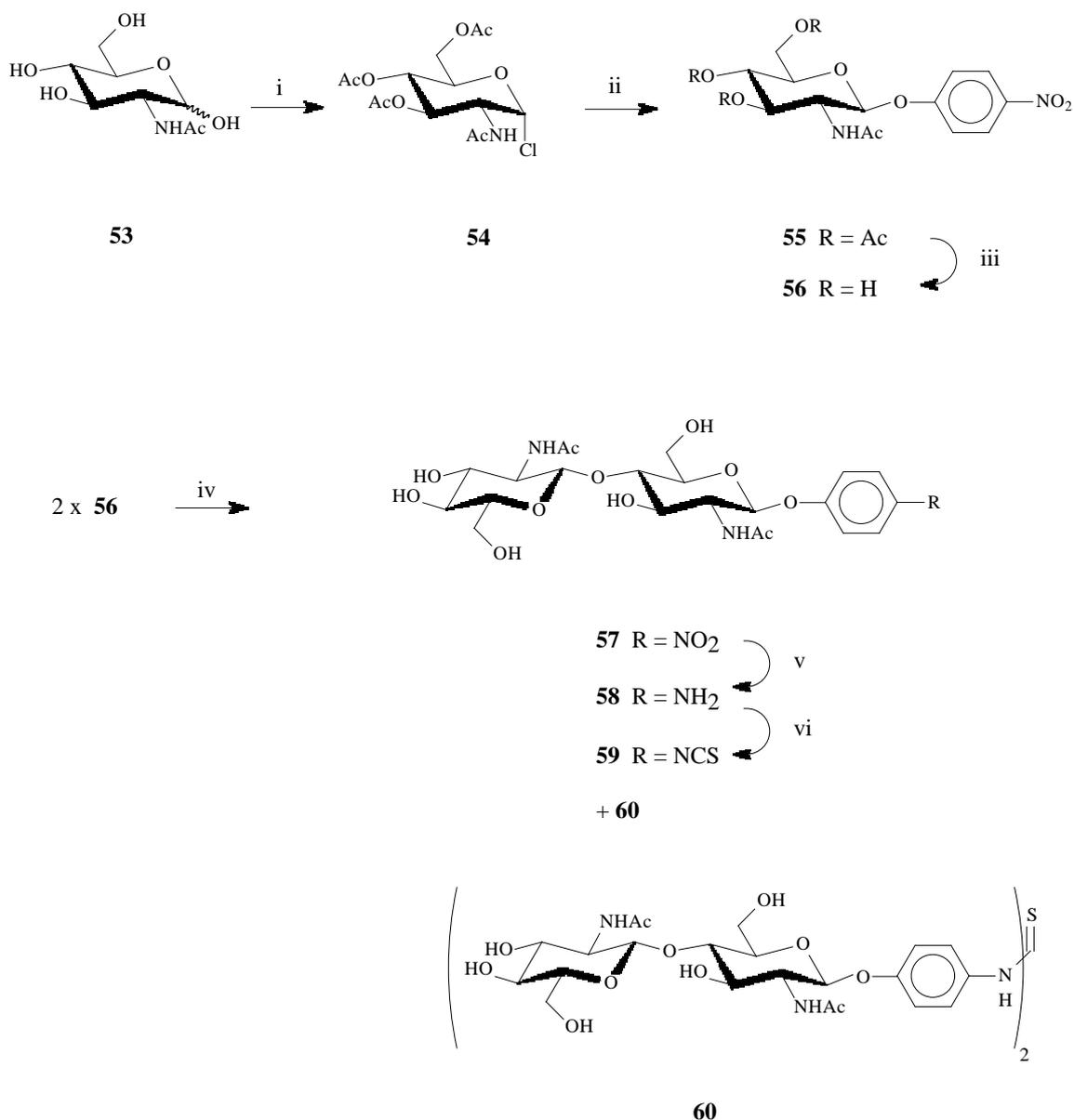


Abb. 15: Darstellung von *p*NP-Chitobiosid-Derivaten über die Transglycosylierung mit β -*N*-Acetylhexosaminidase von *A. oryzae*, *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*: i) AcCl, RT, 82%; ii) PTC: *p*-Nitrophenol, TBAS, 1 M NaOH/CH₂Cl₂, 72%; iii) 1 : 8 : 1 Et₃N-MeOH-H₂O, RT, 91%; iv) (NH₄)₂SO₄, McIlvaine Puffer (0.05 M, pH 5.5), Acetonitril, 37°C, β -*N*-Acetylhexosaminidase von *A. oryzae* (20 U), 2 h, 22.2%; v) H₂, Pd/C (10%), abs. MeOH, 98%; vi) Cl₂C(S), 3 : 1 MeOH-H₂O, DIPEA, RT, 62%

Die katalytische Hydrierung von **57** zur *p*-Amino-Verbindung **58** verläuft glatt in 30 Minuten bei RT. Bei der Umwandlung der Amino- in die Isothiocyanato-Funktion wird allerdings neben dem erwünschten *p*-NCS-Derivat **59** zunächst auch das Dimer **60** erhalten. Es scheint, als ob die normalerweise sehr schnell ablaufende Reaktion mit Thiophosgen in basischer Lösung beim Chitobiosid-Derivat **58** so langsam abläuft, daß die entstehende

p-NCS-funktionalisierte Verbindung **59** noch mit dem Amin **58** unter intermolekularer Thioharnstoffverbrückung zum Dimer **60** reagieren kann. Einen Ausweg bildet die Durchführung der Reaktion in stark verdünnter Lösung bei langsamer Aminzugabe.

Die NMR-Interpretation, insbesondere die chemischen Verschiebungen der phenylischen Protonen im $^1\text{H-NMR}$ $\delta = 7.50, 7.04$ (2 d, je 2 H, Ph, $J = 8.1$ Hz) für das *p*-NCS Derivat **59** und $\delta = 7.75, 7.29$ (2 d, je 2 H, Ph, $J = 8.1$ Hz) für das Dimer **60** und das Verschwinden des NCS-Signals bei $\delta = 133.6$ ppm sowie das Auftauchen des (NHC(S)NH)-Signals im $^{13}\text{C-NMR}$, bestätigen die Strukturen **59** und **60**. Mit Hilfe der MALDI-TOF-MS kann für $m/z = 558.3$ ($\text{M}^+ + \text{H}$, berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_{11}\text{N}_3\text{S}$ 558.2), 580.2 ($\text{M}^+ + \text{Na}$, berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{O}_{11}\text{N}_3\text{SNa}$ 580.2) und 596.3 ($\text{M}^+ + \text{K}$, berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{O}_{11}\text{N}_3\text{SK}$ 596.1) die Zielstruktur **59** zugeordnet werden. Daneben bestätigt $m/z = 1095.6$ ($\text{M}^+ + \text{Na}$, berechnet für $\text{C}_{45}\text{H}_{64}\text{NaO}_{22}\text{N}_6\text{S}$ 1095.4) die Dimer-Struktur **60**, welches durch entsprechende Parallelmessungen verifiziert werden konnte (+ESI: 1095.0 ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$; -ESI: 1107.3 ($\text{M} + \text{Cl}$) $^+$; +APCI: 1072.9 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$).

Die trimere Verbindung **63** konnte trotz erhöhter Temperatur und langer Reaktionszeit nicht dargestellt werden (Abb. 16).

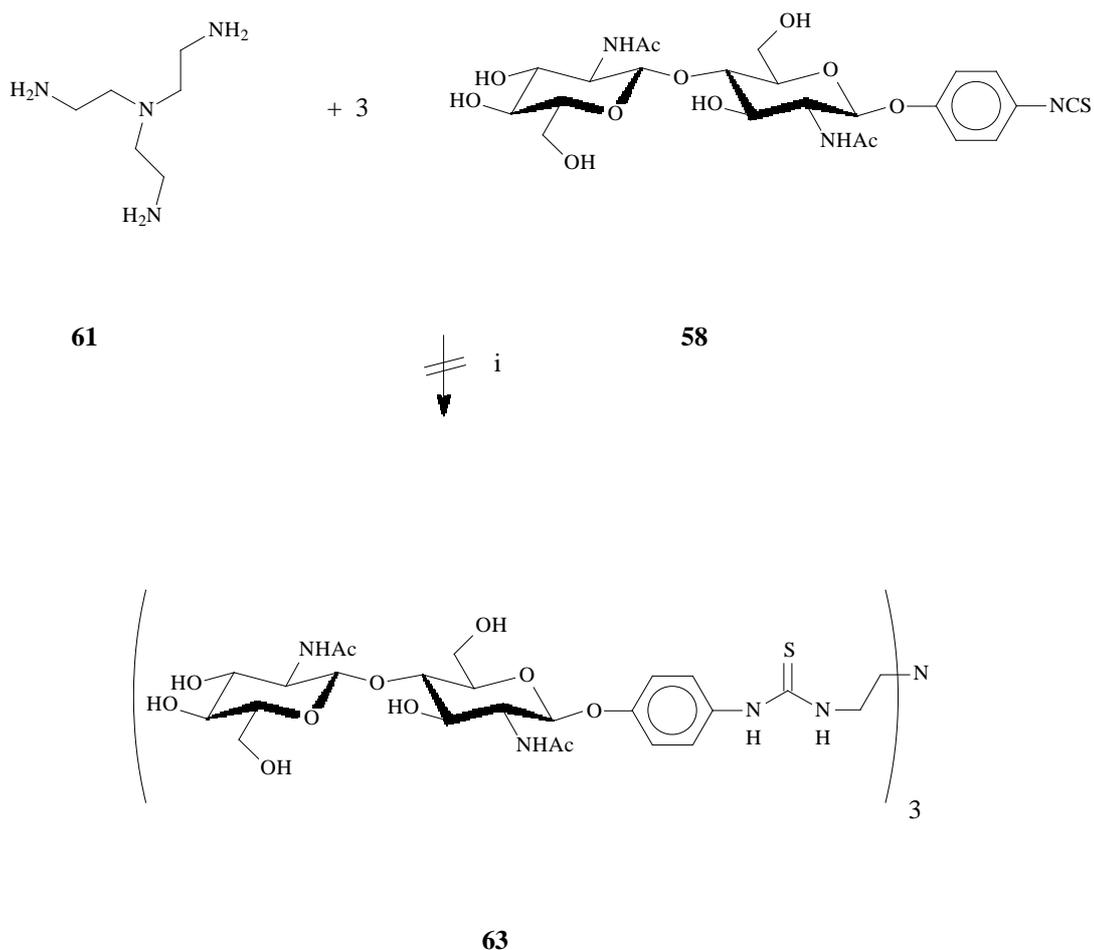


Abb. 16: Syntheseversuch des trivalenten Chitobiosidclusters **63**, *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*: i) abs. DME, 12 h, 40°C, kein Produkt nach GPC (Sephadex P2 extra fine, 15 mM wässr. NH_4HCO_3) detektierbar

Als Ausweg bietet sich die Umwandlung des kommerziell erhältlichen Tris-(2-aminoethyl)-amins **61** in die trivalente Isothiocyanat-Verbindung **62** an. Alternativ könnte Tritriplex 1 (**64**) mit der *p*-Aminoverbindung **58** peptidisch zu **65** verknüpft werden. Die Vermeidung von Thioharnstoffbrücken läßt außerdem eine bessere Löslichkeit der Zielverbindungen erwarten (Abb. 17).

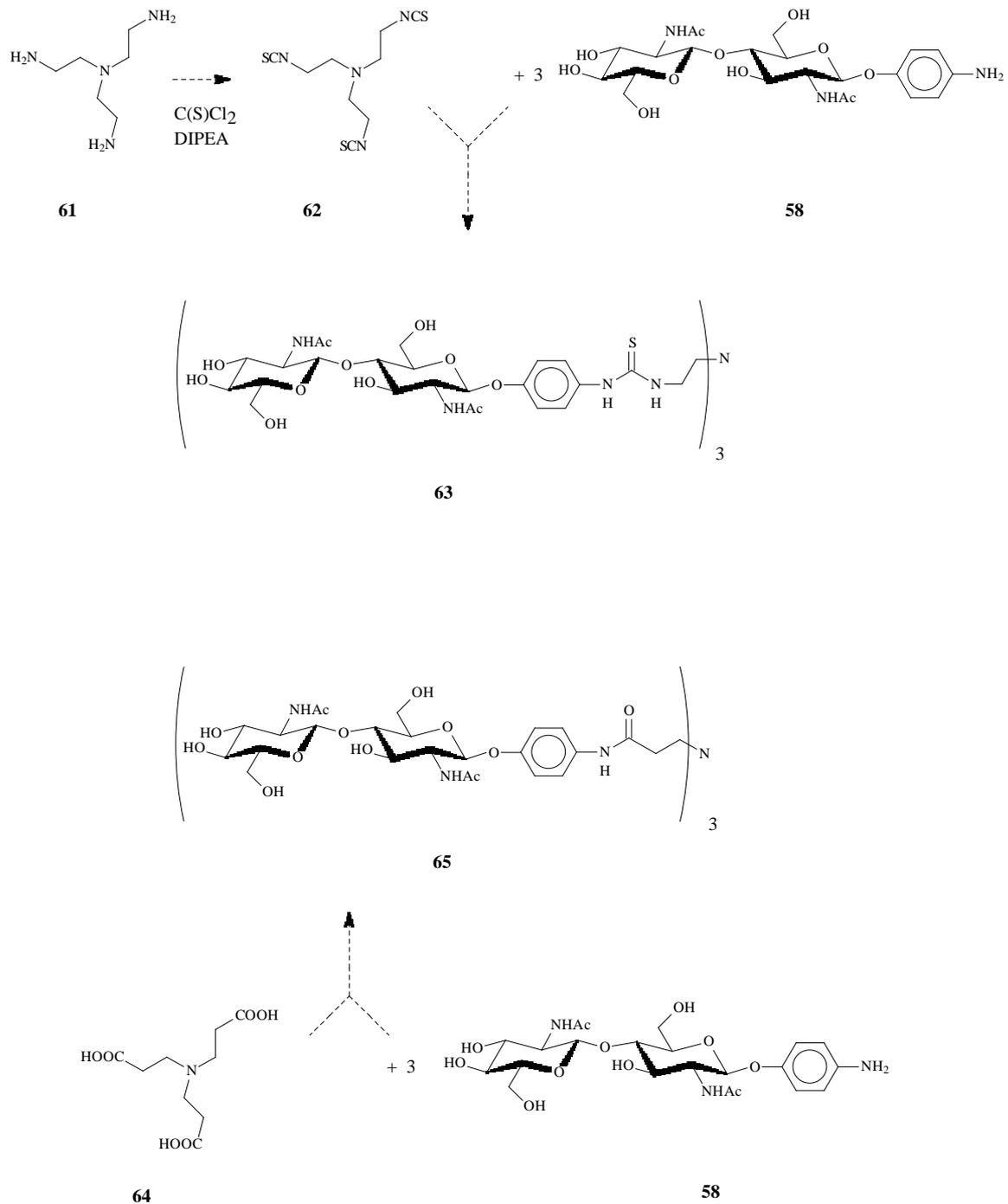


Abb. 17: Alternative Reaktionswege zu trivalenten Phenyl-Chitobiosid-Clustern

Analog zur Synthese von *p*-Isothiocyanato-2-acetamido-4-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-2-desoxy-β-D-glucopyranosid (**59**) konnte *p*-NCS-GalNAc (**68**) synthetisiert werden (Abb. 18). Bei der Abtrennung von Reagenzien in der Synthese der *p*-NCS-Verbindungen **59** und **68** erwies sich eine Festphasenextraktion mit Amberlite XAD-4 (Elution mit MeOH) als vorteilhaft.

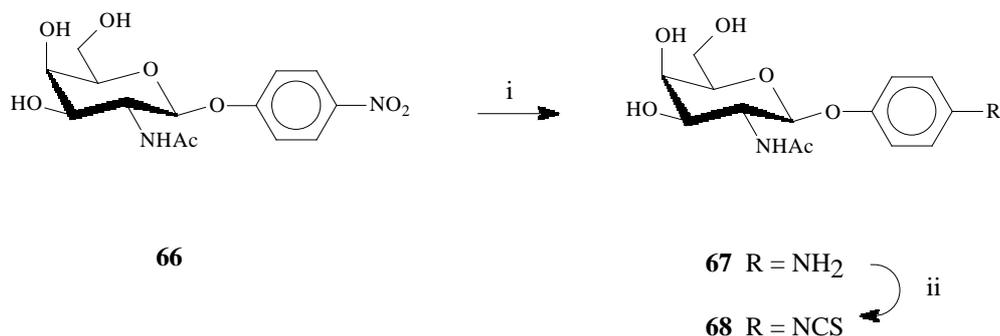


Abb. 18: Darstellung der Aryl-GalNAc-Donoren, *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*:
 i) H₂, Pd/C (10%), abs. DMAc, 97%; vi) Cl₂C(S), 3 : 1 DME-MeOH, DIPEA, RT, 99%

Wegen der schwierigen Umsetzung der Verbindung **58** und der damit verbundenen ungelösten Probleme wird die analoge Reaktion mit der sehr wertvollen Verbindung **67** auf einen Zeitpunkt verschoben, zu dem ein geeignetes Syntheseprotokoll vorliegt.

4. Bivalente Cluster-Mannoside

Das Cluster-Mannosid **72** galt als aussichtsreiche Struktur zur Inhibition der Hämagglutination Typ-1-fimbrierter *E. coli*, weil sie als bivalente Struktur neben zwei terminalen Mannoseresten zentral die hydrophobe Phenylgruppe trägt. **72** könnte daher ein gut bindender Ligand sein und Rückschlüsse über die Gestalt der Bindungstasche erlauben, insbesondere was die Lage einer hydrophoben Region anbelangt. Bei der Mannosylierung mit dem acetylierten Trichloracetimidat **11** wurden anfangs nur 1,2-Orthoesterstrukturen erhalten, wobei typischerweise H-1 tieffeld-, H-2 und H-5 dagegen hochfeldverschoben sind verglichen mit den isomeren Glycosiden. Typisch ist auch das Singulett der Orthoestermethylgruppe bei $\delta = 1.7$ im ¹H-NMR. Daher wurde 1,4-Bis-(hydroxymethyl)-benzol auch mit dem benzylierten Trichloracetimidat **15** mannosyliert, welches keine nachbargruppenaktiven Substituenten an C-2 besitzt. Struktur **70** konnte in einem einmaligen Versuch mit 20% Ausbeute bei -45°C dargestellt werden, allerdings ist **70** ohne Spaltung der glycosidischen Bindungen nicht entschützbar (Abb. 19).

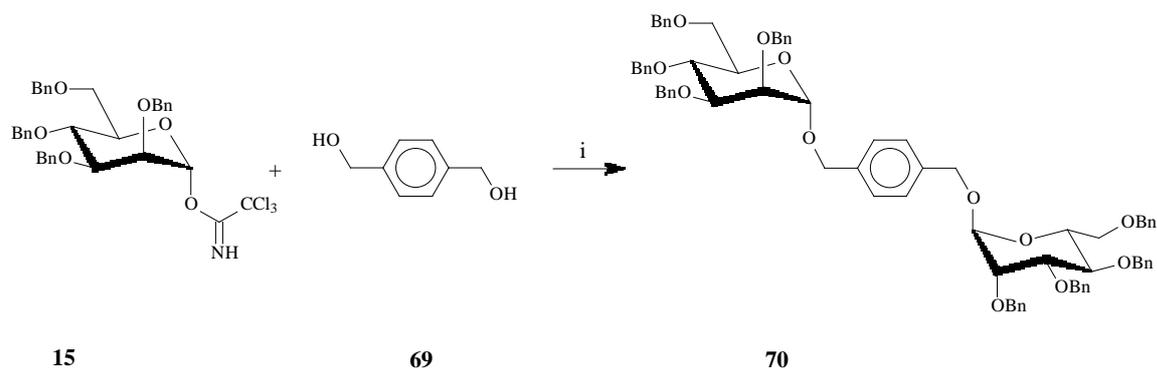


Abb. 19: Darstellung eines bivalenten Benzylmannosids zur Klärung der anfänglich schwierigen Glycosylierung von 1,4-Bis-(hydroxymethyl)-benzol, *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*: i) TMS-OTf, abs. Acetonitril, $-45^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 20%

Deutlich verlängerte Reaktionszeiten bei der Glycosylierung von 1,4-Bis-(hydroxymethyl)-benzol mit dem Donor **11** machten dann das bivalente Cluster-Mannosid **71** in 53% Ausbeute zugänglich, welches nach Zemplén zu **72** entschützt wurde (Abb. 20).⁸¹

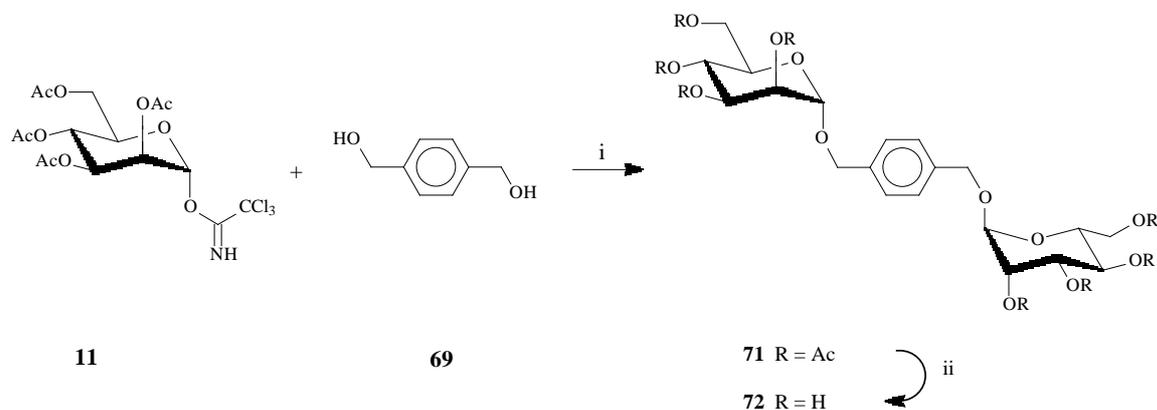


Abb. 20: Darstellung von 1,4-Bis-(α -D-mannopyranosyloxymethyl)-benzol (**72**), *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*: i) TMS-OTf, abs. Acetonitril, N_2 , $0^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 53%; ii) NaOMe, MeOH, 90%

5. Trivalente Glycocluster

Aus früheren inhibitorischen Studien⁸⁷ mit Typ-1-fimbrierten *E. coli*-Bakterien ist bekannt, daß di- und trivalente Glycocluster die Hämagglutination besonders gut inhibieren und eine weitere Steigerung der Valenz die inhibitorische Potenz wieder abfallen läßt. Deshalb wurden trivalente Cluster-Mannoside, in denen der Zucker sowohl anomer als auch über die 6-Position mit dem Core verknüpft ist, Synthesziele, bei denen außerdem eine potentielle Ankergruppe eingeplant wurde. Die Verbrückung über die 6-Position ist neu und erlaubt die Aglyconvariierung zur Optimierung der inhibitorischen Potenz der Glycocluster.⁹⁴ Dies ist von Vorteil, wenn man bedenkt, daß *p*-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid ca. 100-mal besser an das Typ-1-fimbriale Lektin bindet als Methyl- α -D-mannopyranosid.⁵¹⁻⁵⁵ Bei der 6-Verknüpfung von Mannosiden mußte allerdings auf die 6-OH-Gruppe verzichtet werden, so daß diese für die Wechselwirkung mit dem Lektin nicht mehr zur Verfügung steht. Dies war ein kalkuliertes Risiko, denn während die 2-, 3- und 4-Hydroxygruppen der Kohlenhydrate normalerweise für die Wechselwirkung mit den Lektinen essentiell sind, scheint die 6-Hydroxyfunktion in der Erkennung oft eine weniger wichtige Rolle zu spielen.⁹⁵

5.1. Cluster-Mannoside durch Glycosylierung

Mit der Trichloracetimidat-Methode⁶⁹ wurde zunächst versucht, das Triol **3** unter TMS-OTf-Katalyse mit 3.9 Äquivalenten des acetylierten Donors **11** zu mannosylieren. Das gebildete Produktgemisch **73** wies auch bei Reaktionsbedingungen, bei denen die analogen Orthoester der Mannoside **33**, **35** und **71** vollständig umgelagert werden konnten (Zugabe von mehreren ml einer 0.04 M statt 0.02 M TMS-OTf-Lösung, Reaktionszeiten bis zu 1 Woche), typische Orthoester-Signale im ¹H- und ¹³C-NMR auf. Das H-1 (δ 5.49) erscheint gegenüber der glycosidischen Struktur (δ 4.80) tieffeldverschoben, H-2 (δ 4.56) und H-5 (δ 3.69) sind hochfeldverschoben. Zusätzlich resoniert ein Singulett der Orthoestermethylgruppe bei δ = 1.73 im ¹H-NMR bzw. 24.73 ppm im ¹³C-NMR. Aus dem Integrationsverhältnis der anomeren Orthoester- und Glycosidprotonen ergab sich ein Anteil von 12% Glycosid (Abb. 21).

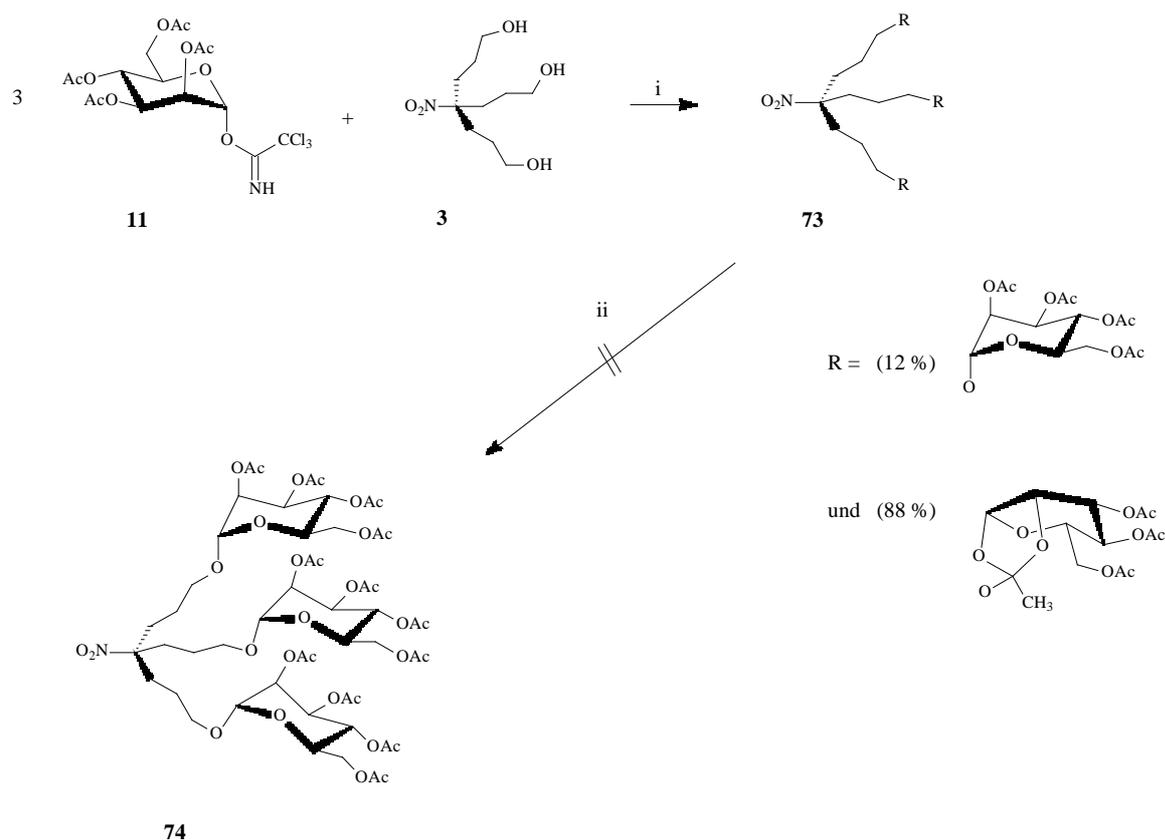


Abb. 21: Die Verwendung von acetyliertem Donor **11** ergibt hauptsächlich Orthoesterstrukturen in **74**, *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*: i) TMS-OTf, abs. Acetonitril, N₂, 0°C→RT, 72%; ii) 0.04 M TMS-OTf (4 ml), abs. CH₂Cl₂, 1 Woche RT

Auch unter Variation des Lösungsmittels und Verwendung von gepulvertem Molsieb (4Å) wurde Verbindung **74** mit dem Donor **11** nicht rein erhalten. Als Ausweg bot sich die Verwendung des benzylierten Donors **15** mit einem nicht-nachbargruppenaktiven Substituenten an C-2 an, der mit Akzeptoralkoholen in einer Tieftemperaturglycosylierung umgesetzt wird. Dabei erwies sich die Wahl des Lösungsmittels und der Temperatur als die entscheidenden Parameter. Auch die „Vorbereitung“ der Edukte durch wiederholtes Kodestillieren mit abs. Toluol und stetes Arbeiten unter Schutzgasatmosphäre trugen letztendlich zum Gelingen der Oligomannosylierung bei. Frisch destilliertes, trockenes THF wurde als Lösungsmittel verwendet und die TMS-OTf-Zugabe bei der Umsetzung von 3.9 Donor-Äquivalenten **15** mit dem Triol **3** sorgsam dosiert. Bei überhöhter Zugabe droht Polymerisierung. Die Ausbeuten an **75** steigen mit fallender Temperatur in folgender Reihenfolge: bei -30°C ergaben sich 25%, bei -45°C 39%, bei -50°C 73% und bei -65°C 74% Ausbeute des benzylierten trivalenten Mannosides **75**. Unter diesen optimierten Reaktionsbedingungen konnte auch eine Multigramm-Synthese durchgeführt werden.

Einzig bei der Aufarbeitung stört eventuell vorhandenes Hydrolyseprodukt von **15** wegen ähnlichen Laufverhaltens in der Säulenchromatographie. Als reduzierender Zucker sollte sich aber die Tetra-*O*-benzyl- α -D-mannopyranose aus dem Reaktionsgemisch entfernen lassen. Die De-*O*-benzilylierung von **75** gelingt in Gegenwart von Pd/C (10%) durch Hydrierung bei 60°C und 60 bar ($60 \cdot 10^5$ Pa) Wasserstoffatmosphäre in 77%iger Ausbeute zum ungeschützten trivalenten Cluster-Mannosid **76** (Abb. 22).

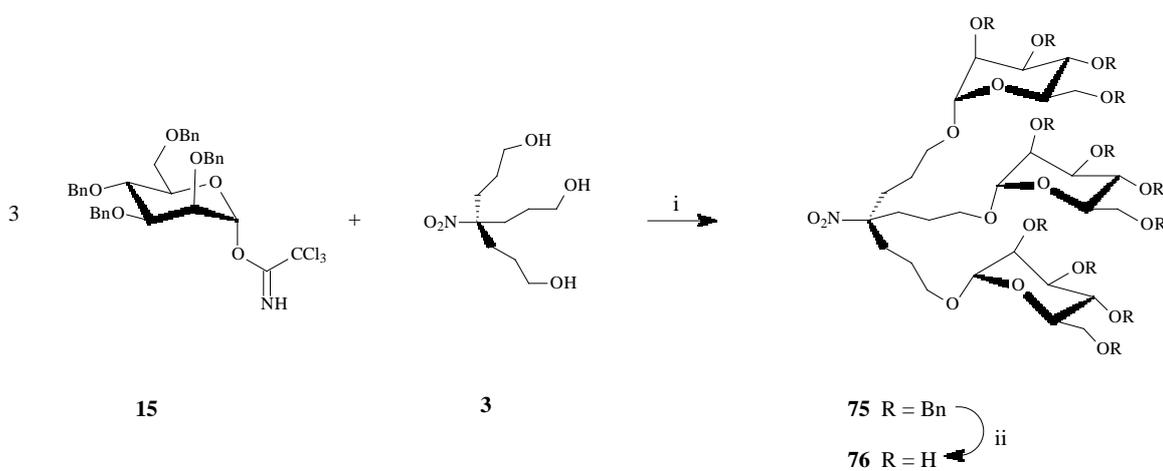


Abb. 22: Darstellung des Cluster-Mannosids **76** in einer Tieftemperatur-Mannosylierung, *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*: i) TMS-OTf, abs. THF, 4Å, N₂, -65°C→RT, 74%; ii) H₂, Pd/C, 3 : 1 EtOH-THF, 60°C, 60 bar, 77%

Die trivalente Struktur der Cluster-Mannoside **75** und **76** wird durch das korrekte Integrationsverhältnis der Core-Methylenprotonen und der Zuckerprotonen im ¹H-NMR-Spektrum bestätigt, sowie durch die MALDI-TOF-MS. Die diastereotopen Core-Methylenprotonen in α -Stellung zu C-1 spalten in zwei Multipletts auf (Abb. 23).

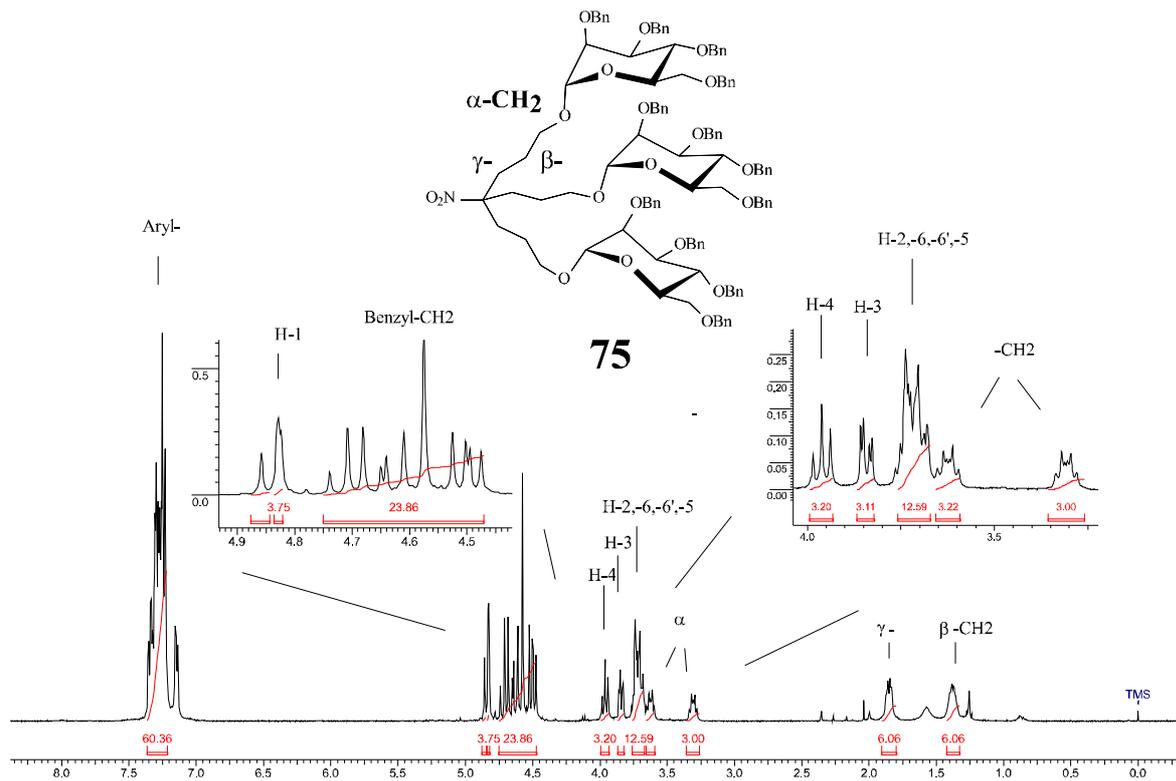


Abb. 23: $^1\text{H-NMR}$ des benzylierten Cluster-Mannosides **75**

Das entschützte trivalente Cluster-Mannosid **76** weist nur einen Zuckersignalsatz auf, Abbildung 24 zeigt das $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum.

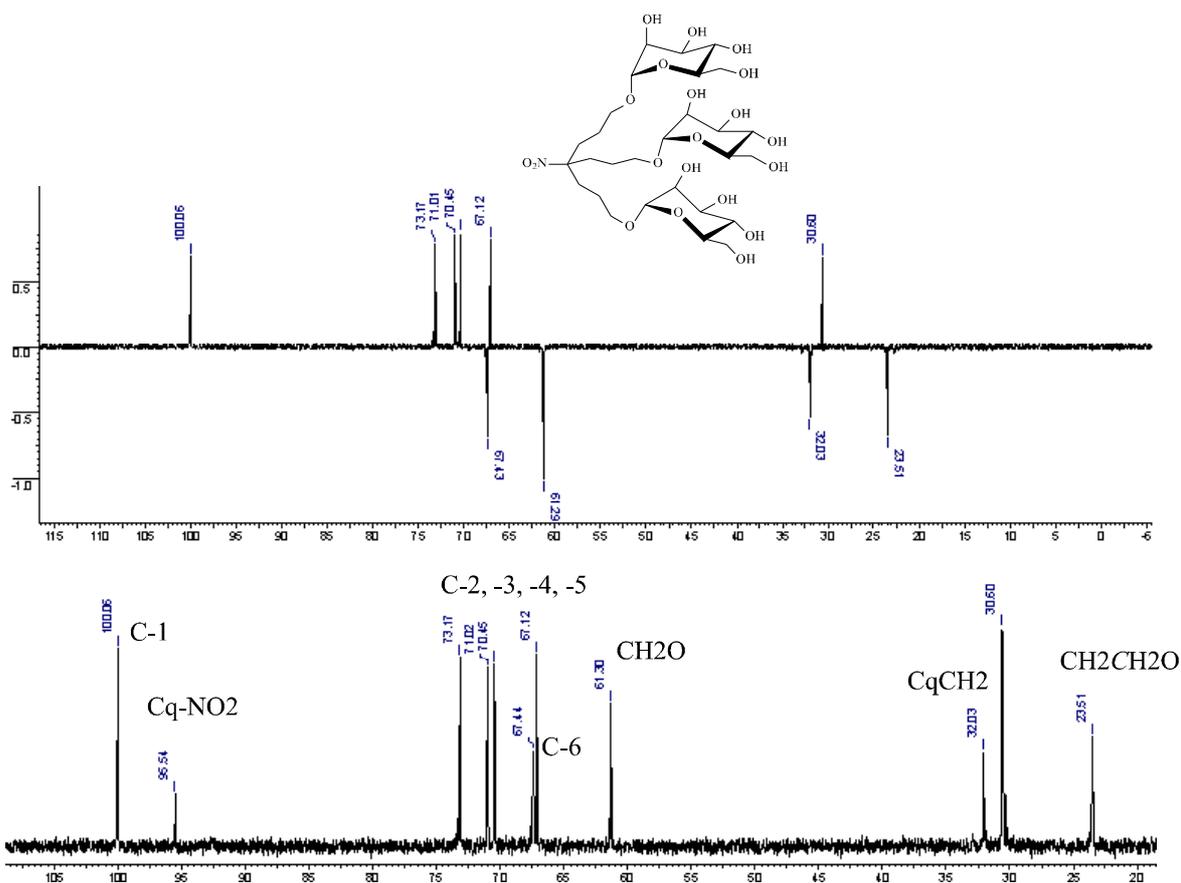


Abb. 24: ^{13}C -NMR des entschützten Cluster-Mannosides **76**

5.2. Peptidisch-verbrückte Glyocluster

Die Knüpfung von Peptidbindungen zählt zu den sehr gut etablierten Synthesemethoden.⁸² Sie ist prinzipiell unabhängig von der jeweilig vorliegenden Konfiguration und wurde zum Aufbau von trivalenten Glyoclustern genutzt. Die Aktivierung der Carbonsäure-Komponenten zu einem reaktiven Intermediat geschieht durch Überführung in gemischte Anhydride oder aktivierte Ester, die mit der Aminkomponente unter Ausbildung einer Peptidbindung reagieren. Auch heute noch wird Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), im Jahre 1955 von Sheehan und Hess^{97, 98} eingeführt, als Kupplungsreagenz genutzt. Im ersten Schritt der Addition bildet die Carboxyfunktion mit DCC ein *O*-Acylisoharnstoff, der mit der Aminkomponente direkt unter Austritt von *N,N*-Dicyclohexylharnstoff reagiert, oder unter Bildung eines symmetrischen Anhydrides, welches die Aminkomponente acyliert.⁹⁹⁻¹⁰⁴ Als häufig auftretendes Nebenprodukt ist die durch *O*→*N*-Acylwanderung entstandene unreaktive Spezies zu nennen, deren Bildung lösungsmittelabhängig ist und durch Vermeiden

von zu basischen Bedingungen und hohen Temperaturen unterdrückt werden kann. Als Additiv bei der Peptidkupplung wird 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol (1-HOBT)¹⁰⁵ verwendet, ein nucleophiles Agens, welches hochaktivierte Ester (Aktivester) bildet und sehr schnell mit der Aminokomponente reagiert.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸

Unter Standard-Peptidkupplungsbedingungen^{105, 82} wurde die Nitrotrisäure **2** mit DCC und 1-HOBT und dem 6-Amin **21** in 73%iger Ausbeute zum trivalenten 6-verbrückten Cluster-Mannosid **77** umgesetzt und quantitativ nach Zemplén zu **78** entschützt (Abb. 25). Das benzoylgeschützte Amin **21** weist keine so hohe *O*→*N*-Acylwanderungstendenz auf wie die entsprechende acetylierte Verbindung.

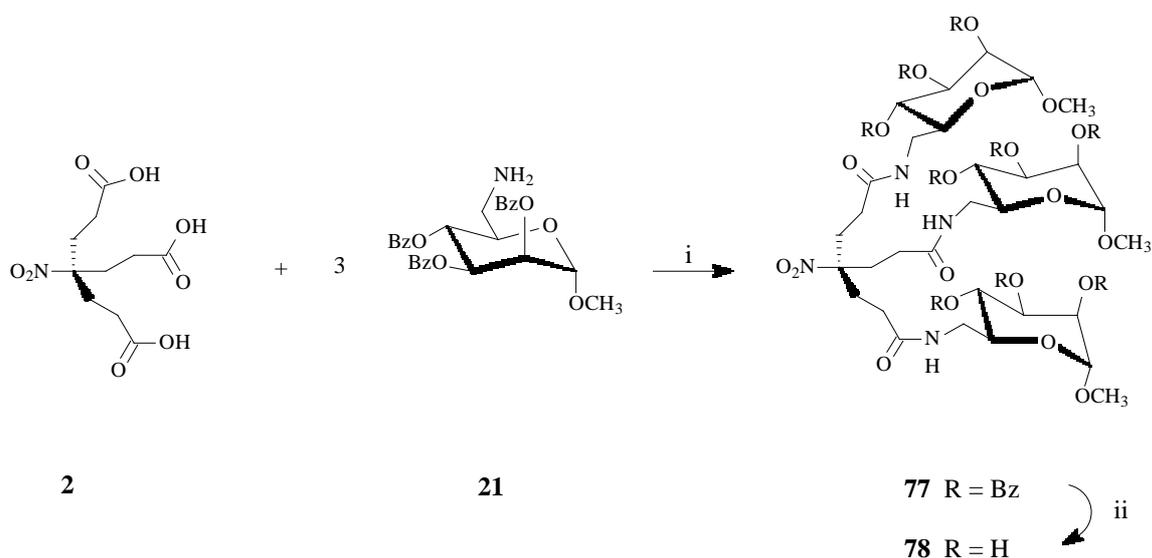


Abb. 25: Aufbau eines peptidisch verknüpften Cluster-Mannosids, *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*: i) DCC, 1-HOBT, DMF, 0°C→RT, RT, 73%; ii) NaOMe, MeOH, 98%

Da DCC Veresterungen fördert, konnte auf Schutzgruppen nicht verzichtet werden. Bei der Verwendung von 1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinolin (EEDQ)^{109, 110} als Kupplungsreagenz kann die Synthese mit dem ungeschützten Amin **26** durchgeführt werden (Abb. 26). Die Carboxylgruppe von **2** verdrängt die Ethoxygruppe aus dem EEDQ und bildet ein Intermediat, welches unter Freisetzung von Quinolin zu einem gemischten Anhydrid reagiert. Dieses wird sehr langsam gebildet und reagiert mit dem vorhandenen Amin schnell zum Peptid. CO₂ und Ethanol werden außerdem als Nebenprodukte frei.

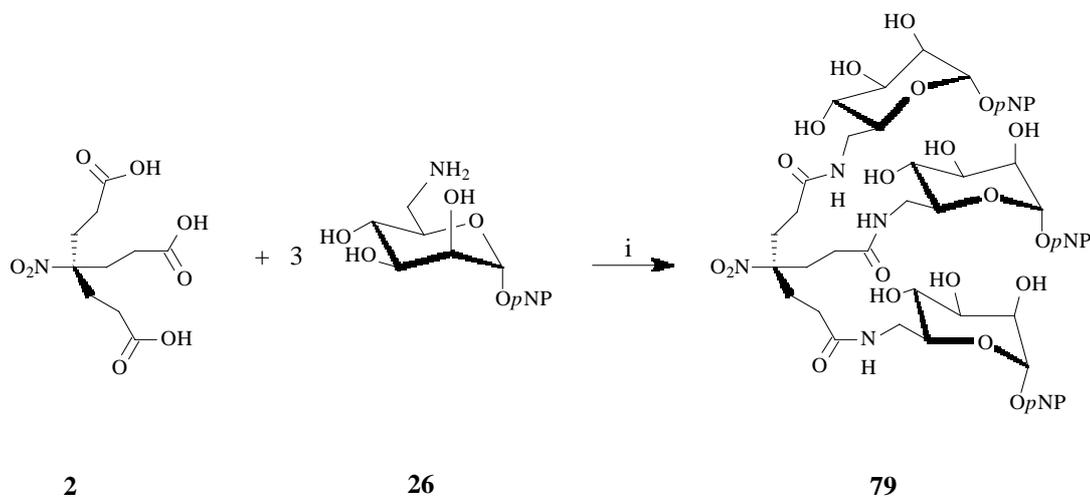


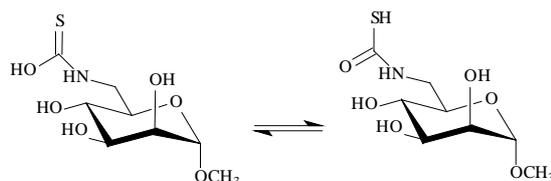
Abb. 26: Aufbau trivalenter *p*NP-Mannosid-Cluster, *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*:
i) EEDQ, abs. DMAc, 5 d, 40°C, 91%

Die drei im trivalenten Mannose-Cluster **79** vorliegenden *p*-Nitrophenylgruppen lassen auf eine hohe inhibitorische Potenz hoffen, beträgt doch der RIT von *p*-Nitrophenylmannosid (**28**) bereits 42 μ molar (siehe unten).⁸¹

5.3. Thioharnstoff-verbrückte Glycocluster

Aufgrund des elektrophilen Charakters der Isothiocyanatofunktion reagieren die 6-funktionalisierten Bausteine **22**, **24** und **27** mit dem trivalenten Coremolekül Tris-(2-aminoethyl)-amin (**61**) bereits ohne weitere basische Katalyse zu den entsprechenden thioharnstoff-verbrückten Cluster-Mannosiden. Um eine vollständige Funktionalisierung der Core-Moleküle zu erhalten und *O*→*N*-Acylgruppenwanderung auszuschließen, wird das Triamin **61** bei 40°C zu der Lösung des Isothiocyanates getropft. Mit 3.3 Äquivalenten des benzoylierten 6-Isothiocyanates **22** wird der trivalente Cluster **80** in über 90%iger Ausbeute gebildet. Allerdings erwies sich die anschließende De-*O*-benzoylierung als schwierig und der ungeschützte Cluster **82** konnte nicht in höherer als 27%iger Ausbeute isoliert werden. Die analoge Reaktion mit dem ungeschützten 6-Isothiocyanat **27** zum ungeschützten trivalenten Cluster **82** gelang nur in 23%iger Ausbeute. Zum einen sind Löslichkeits-

probleme hierfür verantwortlich, zum anderen die Hydrolyse zu Thiourethan-Derivaten bei langen Reaktionszeiten. Entgegen der kürzlich publizierten Thioharnstoffverbrückungsstrategie¹¹¹ ist die Verwendung wässrig-alkoholischer Lösungsmittel bei langsamen Reaktionen wenig sinnvoll. Überwiegend findet die Bildung von *N*-Methyl-6-desoxy- α -D-mannopyranosyl-thiourethan als Konkurrenzreaktion bei der Thioharnstoff-Verbrückung an der 6-Position statt. Der NMR-Interpretation zufolge liegen die abgebildeten Tautomere in ungefähr gleicher Konzentration vor.



Als Ausweg bietet sich die Verwendung von Diethylglycoldimethylether (DME) als aprotisch polarem Lösungsmittel an. Nun ließ sich der acetylierte Thioharnstoff-Cluster **81** bei der Reaktion des Cores **61** mit 3.3 Äquivalenten des acetylierten Glycosid-Donors **24** in über 90%iger Ausbeute synthetisieren. Auch die Deblockierung nach Zemplén zum ungeschützten Cluster **82** gelang in guter Ausbeute (Abb. 27).

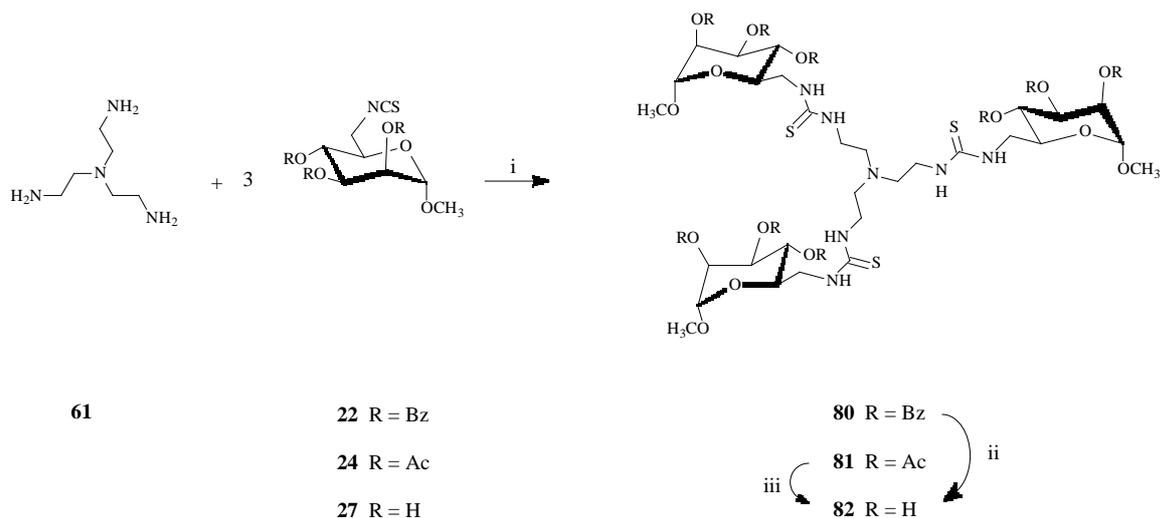


Abb. 27: Aufbau trivalenter Mannosid-Cluster durch Thioharnstoffverbrückung, *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*: i) CH_2Cl_2 , 50°C , 2 h, 92% (für **22**); CH_2Cl_2 , 50°C , 30 min, 91% (für **24**); 4 : 1 EtOH- H_2O , 50°C , 12 h, 23% (für **27**); ii) 1 M NaOMe, 5 : 1 MeOH-DMF, 3 d 50°C , 27%; iii) 1 M NaOMe, MeOH, RT, 82%

Mit dem ungeschützten 6-NCS-funktionalisierten *p*-Nitrophenyl-Mannosid **31** verlief die Thioharnstoff-Verbrückung problemlos in 89%iger Ausbeute in CH₂Cl₂ bzw. 86%ig mit dem erwähnten DME als aprotisch polarem Lösungsmittel (Abb. 28).

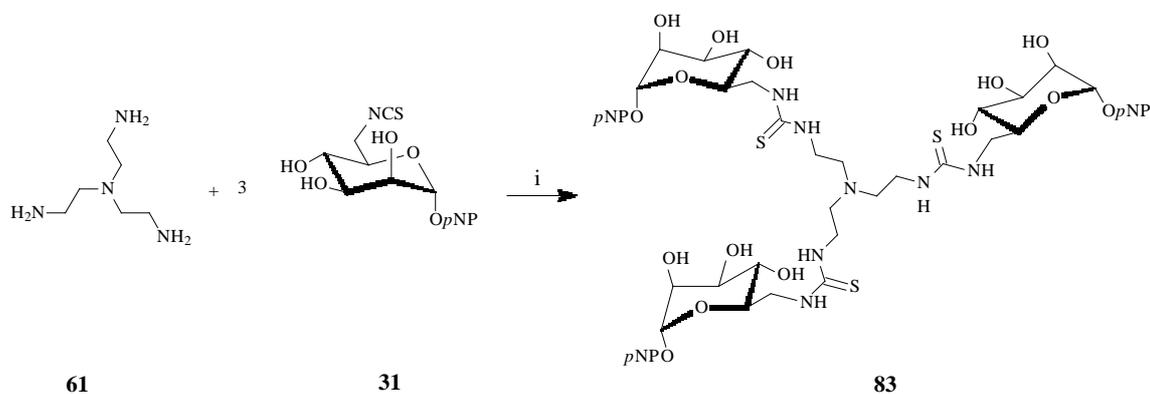


Abb. 28: Aufbau trivalenter *p*NP-Mannosid-Cluster durch Thioharnstoffverbrückung, *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*: i) CH₂Cl₂, 50°C, 4 h, 89%

Die trivalente Struktur der Mannose-Cluster **80**, **81**, **82** und **83** wird durch das korrekte Integrationsverhältnis der Aryl- zu den Core-Methylen- zu den Zuckerprotonen im ¹H-NMR bestätigt sowie durch die MALDI-TOF-MS.

6. Markierung von triantennären Glycoclustern

Die Markierung von Zuckerliganden mit z. B. Biotin erhöht deren Anwendungsmöglichkeiten beträchtlich, wenn man bedenkt, daß die Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung¹¹²⁻¹¹⁴ zu den stärksten in der Biochemie gehört. Hauptanwendungsgebiet war bisher die Molekularbiologie. Kommerziell erhältliche Biotin-Phosphoamidite erlauben die 5'-Markierung von Primern und die Amplifizierung komplementärer DNA-Abschnitte, nachdem diese mit Hilfe von Streptavidin beschichteten Magnetkügelchen aus einem Probengemisch isoliert wurden. Bei Zugabe des zweiten Primers ist so z. B. eine Sanger-Didesoxysequenzierung an fester Phase möglich. Mit Hilfe von biotinmarkierten Glycoclustern z. B. als Liganden für eine Streptavidin-Affinitätssäule könnte es möglich sein, die

entsprechenden Kohlenhydrat-spezifischen Lektine aus einem Gemisch zu isolieren und in der Folge zu analysieren. Da Streptavidin vier Bindungsstellen für Biotin besitzt,¹¹⁵ kann bei biotinylierten Spacer-Glycoclustern mit einer erheblichen biologischen Aktivität gerechnet werden. Aktuelles Beispiel ist die Identifizierung Mannose-spezifischer CRDs humaner CD66 Proteine. Typ-1-Fimbrien binden an CD66a (nach neuester Nomenklatur CEACAM 1) und diese Wechselwirkung ist mit den trivalenten Mannose-Clustern gut inhibierbar.¹¹⁶ Es kommt als Zelloberflächenmolekül auf neutrophilen Zellen vor. Ein genaueres Verständnis der Wechselwirkung von T-Zellen mit den antigenpräsentierenden Zellen, die über Adhäsionsmoleküle eingeleitet wird, hilft die Mechanismen der T-Zell-Aktivierung besser zu verstehen.

Die Synthese Biotin-markierter Glycocluster startete zunächst mit dem trivalenten Cluster **78**. Mit T1-Raney-Nickel¹¹⁷ wurde eine Reduzierung der Nitrogruppe zu **84** versucht. Die analoge Reduktion des Core-Triols **3** gelang bei 15 bar H₂-Atmosphäre bei RT. Unter diesen Reaktionsbedingungen waren bei erfolgter Transformation der Nitrogruppe in **78** allerdings auch die Mannosereste verschwunden. In dem Reaktionsansatz konnten keine Zucker detektiert werden. Alle alternativen Reduktionsmethoden (LiAlH₄, BH₃·THF) schlugen ebenfalls fehl (Abb. 29).

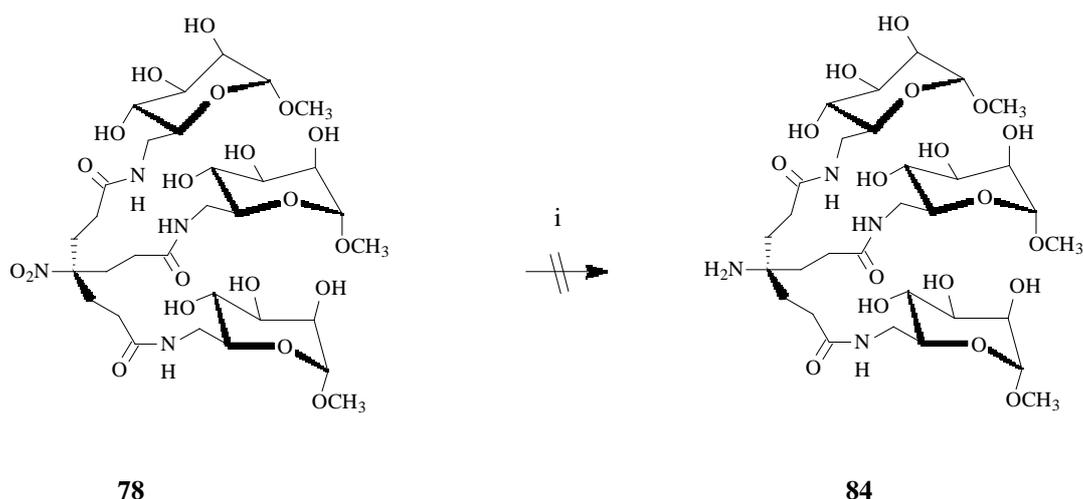


Abb. 29: Versuch der reductiven Darstellung von Aminofunktionalisierten Cluster-Bausteinen, *Reaktionen, Bedingungen*: i) a) H₂, T1-Raney-Nickel, abs. MeOH, 70 bar, 12 h, RT oder b) H₂, T1-Raney-Nickel, abs. MeOH, 15 bar, 36 h, RT oder c) LiAlH₄, THF, 80°C oder d) BH₃·THF, THF, 0°C →RT

Daher wurde ausgehend vom Nitro-tris-^tbutylester **1** die Nitrogruppe mit T1-Raney-Nickel quantitativ reduziert und der entstandene Amino-tri-^tbutylester **85** mit NHS-Biotin in fast quantitativer Ausbeute konjugiert. Die Abspaltung der ^tButylgruppen in **86** ergab die Tri-säure **87**, die mit 3.2 Äquivalenten des ungeschützten 6-Amins **26** und EDC/1-HOBT¹¹⁸ zu **88** in 91%iger Ausbeute peptidverknüpft wurde. Die Peptidkupplung unter Verwendung von TBTU verlief mit nur 15%iger Ausbeute nicht zufriedenstellend. In insgesamt 4 Stufen konnte der biotinylierte Cluster **88** in 86%iger Ausbeute dargestellt werden (Abb. 30).

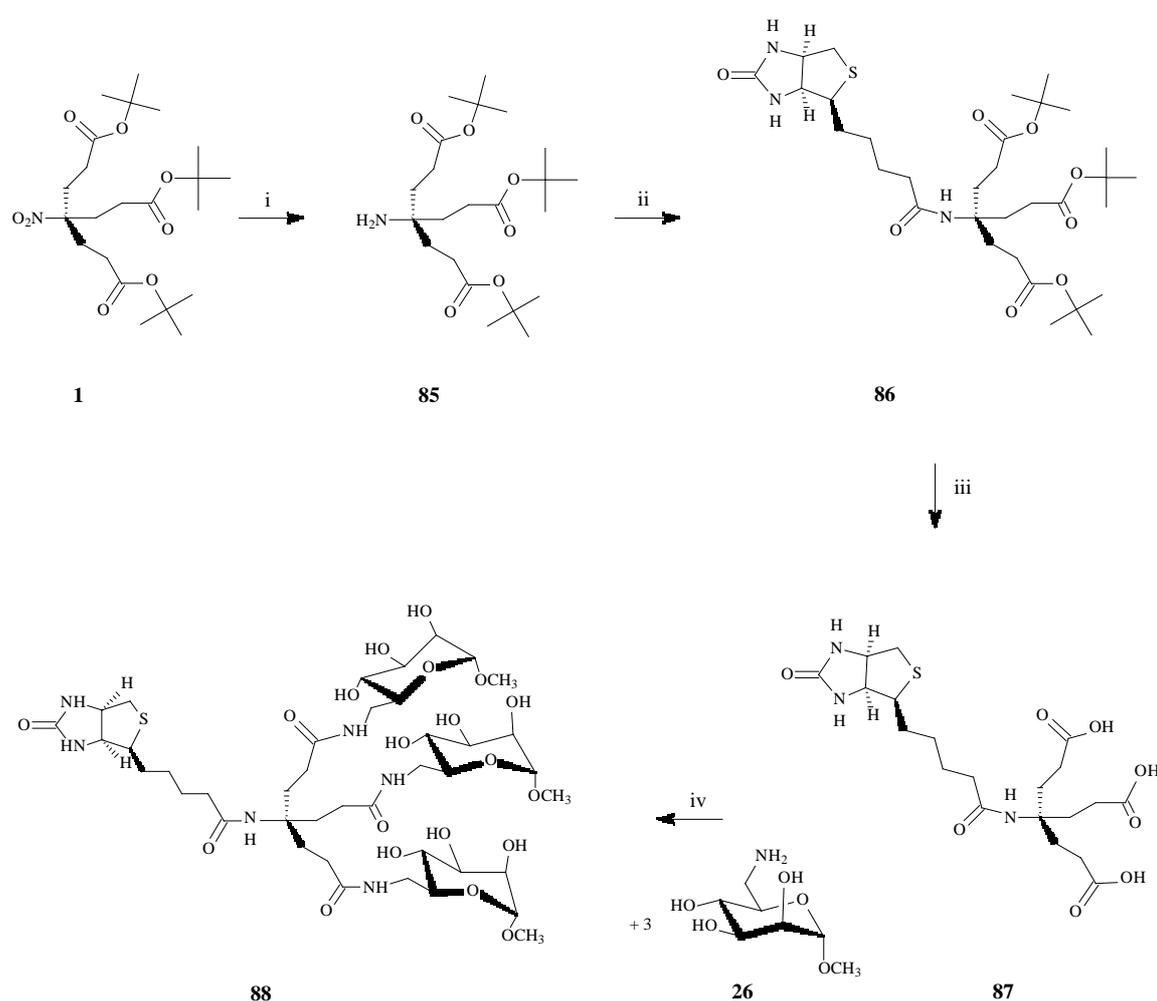


Abb. 30: Darstellung eines biotinylierten Mannose-Clusters, *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*: i) a) H₂, T1-Raney-Nickel, abs. EtOH, 3 bar, 2 d, 60°C, 99%; ii) 1 : 2 EDC-1-HOBT, DIPEA, abs. DMF, 0°C→RT, 97%; iii) HCO₂H, 99%; iv) 1 : 2 EDC-1-HOBT, DIPEA, abs. DMF, 0°C→RT, 91% (oder mit TBTU: TBTU : 1-HOBT (1 : 1), DIPEA, abs. DMAc, RT, 15%)

Die trivalente Struktur von **88** wird durch das korrekte Integrationsverhältnis der Biotinyl- zu den Core-Methylen- zu den Zuckerprotonen im $^1\text{H-NMR}$ bestätigt sowie durch die MALDI-TOF-MS.

Analog sollten Fluoreszenz-markierte Glycocluster zugänglich sein, z. B. in der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie Anwendung finden könnten. Mit dem Fluoresceinisothiocyanat **89** und dem Amino-tris- t Butylester **85** wurde **90** oder ein Isomeres erhalten. Die Reaktion wurde in DME unter Argon-Atmosphäre unter pH-Kontrolle durchgeführt. Die flashchromatographische Reinigung ergab ein Produkt, dessen NMR neben Signalen der Struktur **90** auch noch weitere nicht zuzuordnende enthielt. Die MALDI-TOF-MS deutet mit $m/z = 805.33$ ($\text{M}^+ + \text{H}$. Ber. für $\text{C}_{43}\text{H}_{53}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{S}$: 805.34), 827.28 ($\text{M}^+ + \text{Na}$. Ber. für $\text{C}_{43}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{SNa}$: 827.32) und 843.28 ($\text{M}^+ + \text{K}$. Ber. für $\text{C}_{43}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{SK}$: 843.29) auf die Verbindung **90** oder ein entsprechendes Isomeres hin. Die weiteren Versuche zur t Butylgruppenabspaltung in **90** und der Kupplung mit dem Amin **26** zum Cluster-Glycosid **91** scheiterten, möglicherweise aufgrund der uneinheitlichen Eduktzusammensetzung (Abb. 31). Die ähnlichen Laufverhalten der Produkte in der Säulenchromatographie und die Carboxyfunktion erschweren die Isolierung von **90** erheblich.

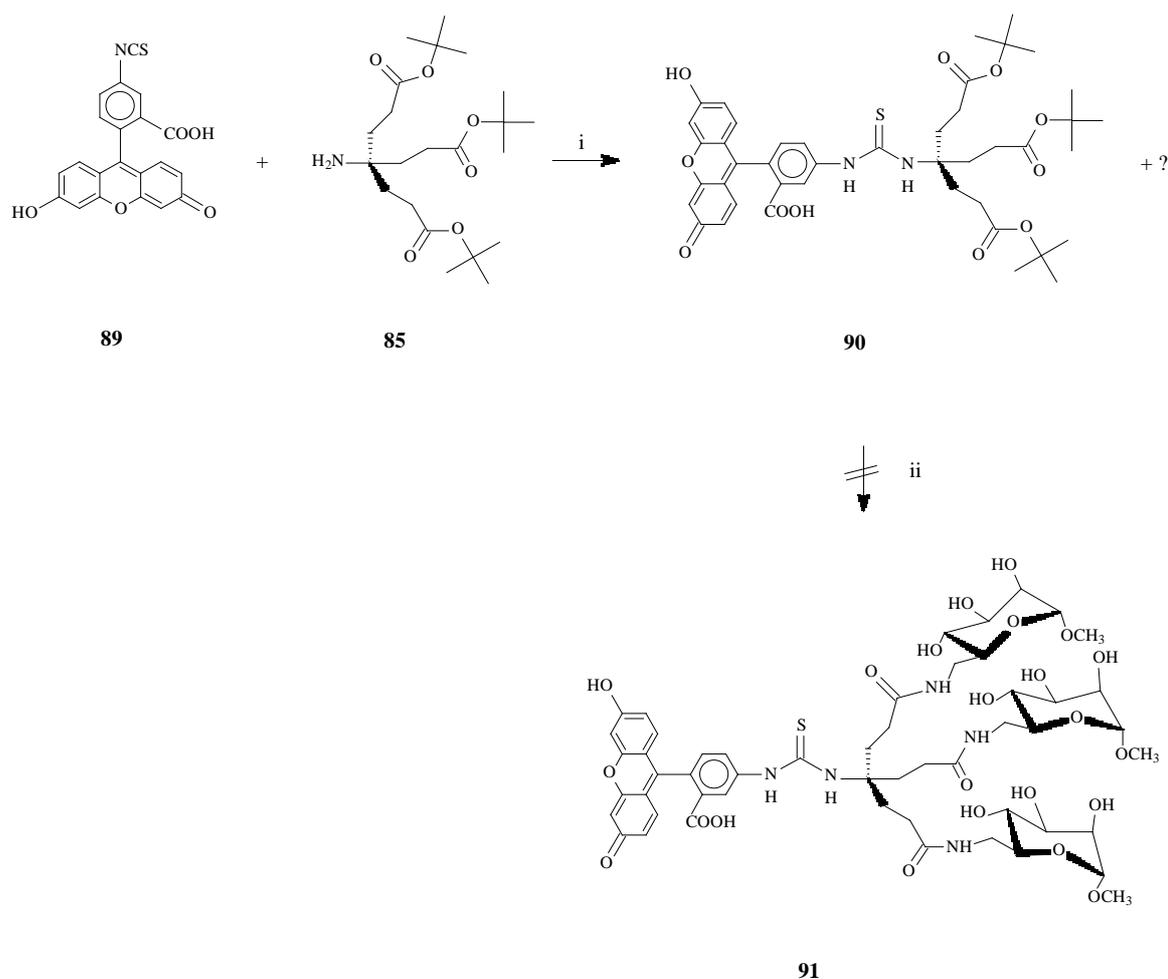


Abb. 31: Aufbau fluoreszenzmarkierter Mannose-Cluster, *Reaktionen, Bedingungen*: i) DME, Ar, RT; ii) a) HCO_2H , RT, b) + **26**, EEDQ, DMAc, 40°C

Dieses Reaktionsverhalten ist nicht überraschend, weil Fluorescein-Isothiocyanat **89** als multifunktionelle Verbindung auch Nebenreaktionen eingehen kann. Dementsprechend ist es vorteilhafter, den Fluoreszenzmarker als NHS-Aktivester erst am Ende des Syntheseweges mit einem Cluster-Mannosid wie **97** zu koppeln, der auch spacervariiert sein kann. Dadurch muß ein Cluster mit biologischer Bedeutung nicht für jede Markierung neusynthetisiert werden. Ein weiterer Vorteil ist die Verwendung von Fluoreszenzmarkern wie z. B. Oregon Green™ 488, Carbonsäuresuccinimydylester-5-isomer, bei denen die Fluoreszenz nicht pH-abhängig ist und die zudem auch höhere Quantenausbeuten bei hoher Photostabilität liefern. Dadurch sind diese Marker auch im Gegensatz zu Fluorescein in der Spurenanalytik einsetzbar.

Ein alternativer Reaktionsweg zur Darstellung spacerfunktionalisierter Cluster-Mannoside mit potentieller Ankergruppe für Marker verwendet geschützte Spacer. Die säurestabile Schutzgruppe soll während der Synthesebedingungen erhalten bleiben und nach Abspaltung der *N*-Schutzgruppe mit NHS-aktivierten Markermolekülen umsetzbar sein. Der Vorteil liegt in der Abstandsvergrößerung der Markergruppe zu den CRD-Liganden, eine unspezifische Wechselwirkung wird so vermindert. Andererseits muß der Cluster nicht für jede Markierung von neuem aufgebaut werden. Allerdings wäre der Einsatz längerer Spacer wie Polyoxyethylenglycole für diesen Anwendungszweck sinnvoller, vor allem, wenn es darum geht, die mögliche Selbstaggregation von Oligo-Glycin-Spacern auszuschalten. Für erste Versuche wurde ausgehend von Triglycin (**93**) dessen Aminofunktion in quantitativer Ausbeute Fmoc-geschützt (**94**). Mit EEDQ und der Aminokomponente **85** gelang die Peptidbildung zum Tri-*t*butylester **95**, dessen flashchromatographische Reinigung sich aufgrund der begrenzten Löslichkeit der Fmoc-Funktion als äußerst schwierig erwies. Als Reagenz zur Peptidsynthese kommt nur EEDQ in Frage, da auch nur leicht basische Bedingungen vermieden werden müssen. Entsprechend wurde dann auch das Amin **26** sehr langsam zum Reaktionsansatz gegeben, um eine partielle Fmoc-Entschützung während der Reaktion zu vermeiden. Dieses gelang leider nicht vollständig. Nach der Entschützung mit ammoniakalischer Methanol-Lösung und Extraktion wurde das Produktgemisch an Biogel P2 (extrafine) unter optimierten Bedingungen gelpermationschromatographisch aufgereinigt. Die Zielverbindung **97** ließ sich aber nicht frei von Nebenprodukten und nur mit geringer Ausbeute erhalten (Abb. 32). Abhilfe sollte die Verwendung einer weniger basenlabilen Aminoschutzgruppe wie z. B. der Boc-Gruppe schaffen, deren Löslichkeit auch eine effektive Reinigung mittels Flashchromatographie erlauben sollte.

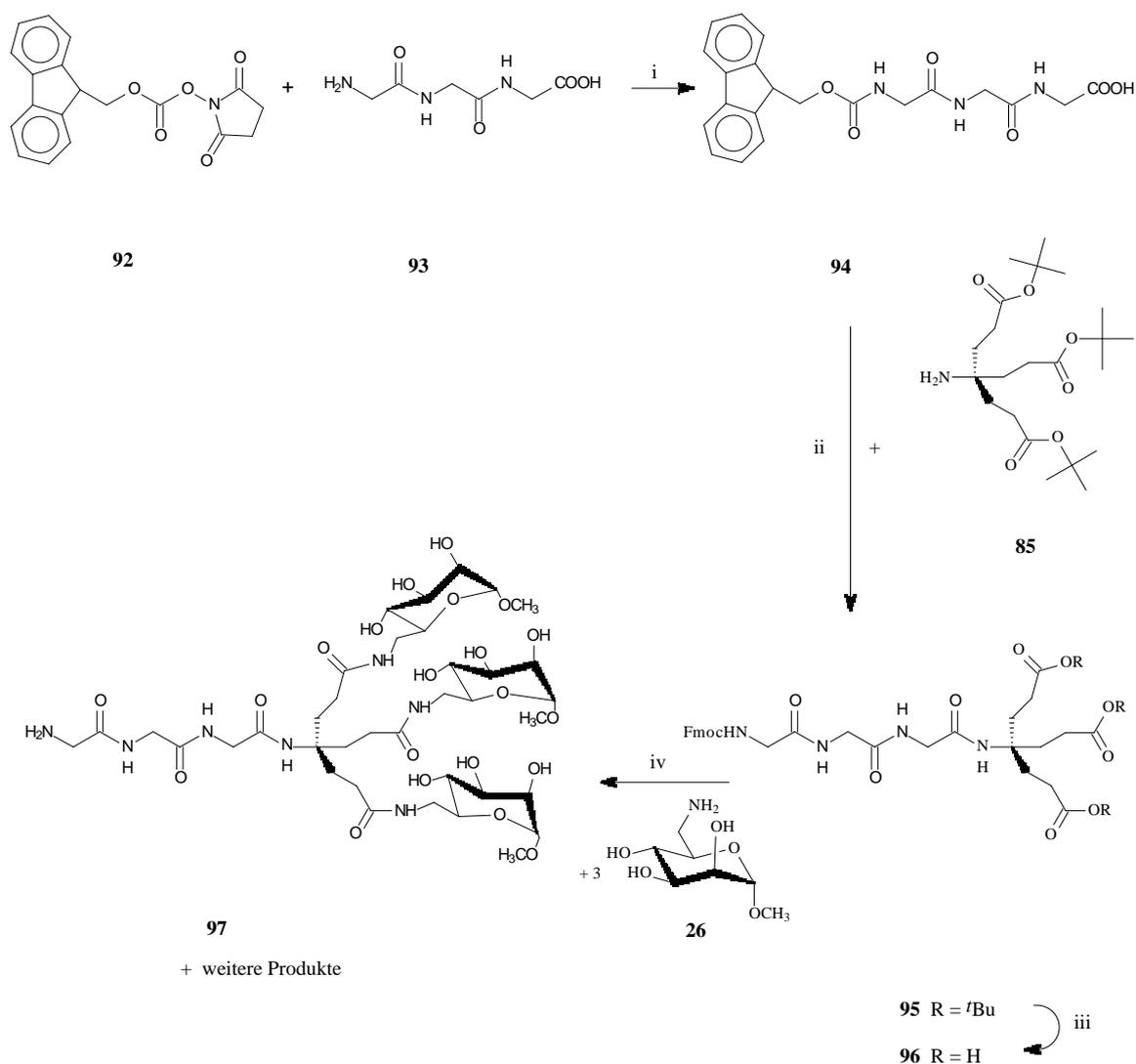


Abb. 32: Aufbau spacermodifizierter Mannose-Cluster zur nachfolgenden Markierung, *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*: i) 4 : 3 ges. wässr. NaHCO₃-DMF, 0°C → RT, 99%; ii) EEDQ, DMAc, 60°C, 63%; iii) 95% TFA, quant., oder HCO₂H, quant.; iv) a) EEDQ, abs. DMAc, 40°C, b) ges. NH₃-MeOH, ca. 42%

7. Synthese Spacer-modifizierter Glycocluster

Der flexiblen Synthesestrategie zum Aufbau kleinerer Glycocluster durch Modifizierung der Spacerlängen innerhalb der Core-Region liegt die Annahme zugrunde, daß die richtige räumliche Präsentation der endständigen Kohlenhydratreste die Affinität zu den CRDs wesentlich mitbestimmt. Unter Vernachlässigung der inneren Oligosaccharide natürlicher N-gebundener Glycostrukturen wird durch Abstandsvariation versucht, die Glycocluster

für die Bindungstasche des Lektins maßzuschneidern. Dabei bestimmt die Verknüpfungsart mit dem Core (anomer, über die 6-Position thioharnstoff- oder peptidisch-verbrückt) die Flexibilität des terminalen Zuckers mit. Eine optimale räumliche Ligandenanordnung im Bereich der Bindungstasche sollte den entropischen Term für die Wechselwirkung günstig beeinflussen. Mit Einführung von Polyoxyethylenspacern stehen lineare Spacer zur Verfügung, die bedingt durch ihre Hydrophilie die Core-Region nicht aggregieren lassen sollten. Bestärkt durch die herausragende inhibitorische Potenz des peptidisch-verbrückten Triclusters **78** (siehe weiter unten) soll diese Struktur durch Spacervariation weiter optimiert werden. Mit den aminoterminierten Spacermannosiden **42**, **47** und **52** stehen drei Bausteine für die Peptidkupplung mit der Trisäure **2** zur Verfügung. Diese Bausteine wurden mit der Trisäure **2** unter Verwendung von EEDQ als Kupplungsreagenz jeweils vier Tage bei 60°C in DMAc umgesetzt. Nach der Extraktion der Nebenprodukte wurden die drei spacermodifizierten Cluster-Mannoside **98**, **99** und **100** nach entsprechenden gel-permeationschromatographischen Reinigungen an Biogel P2 in zufriedenstellender Ausbeute von 69%, 59% bzw. 74% erhalten (Abb. 33-35).

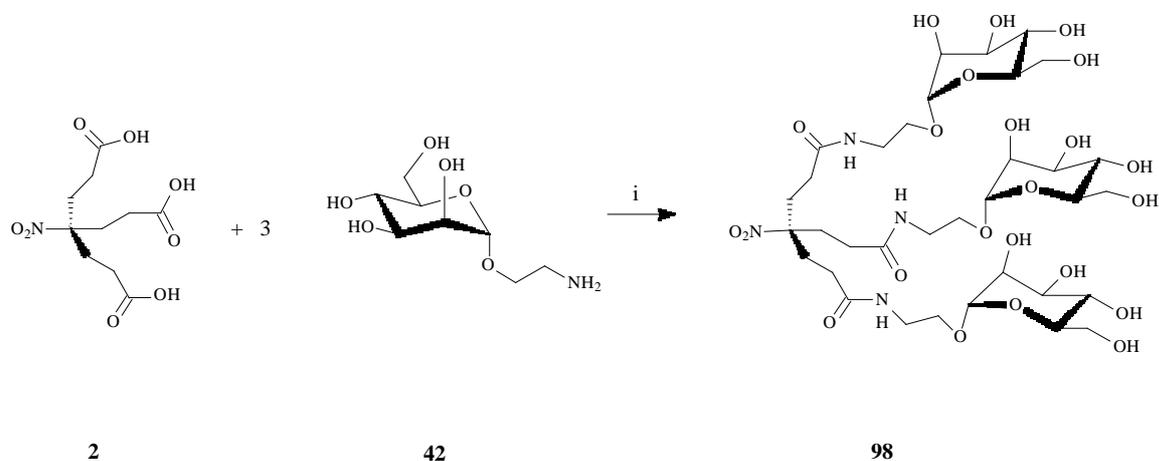


Abb. 33: Darstellung des spacermodifizierten Triclusters **98**, *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*: i) EEDQ, abs. DMAc, 60°C, 4 d, 74%

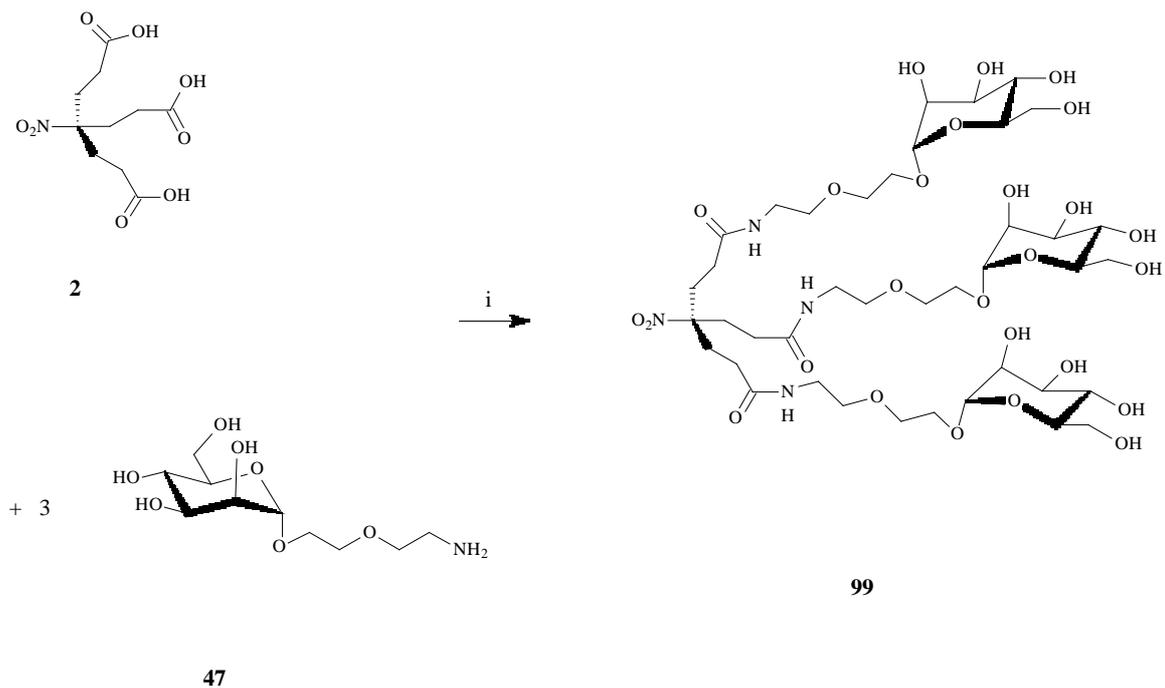


Abb. 34: Darstellung des spacermodifizierten Triclusters **99**, *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*: i) EEDQ, abs. DMAc, 60°C, 4 d, 69%

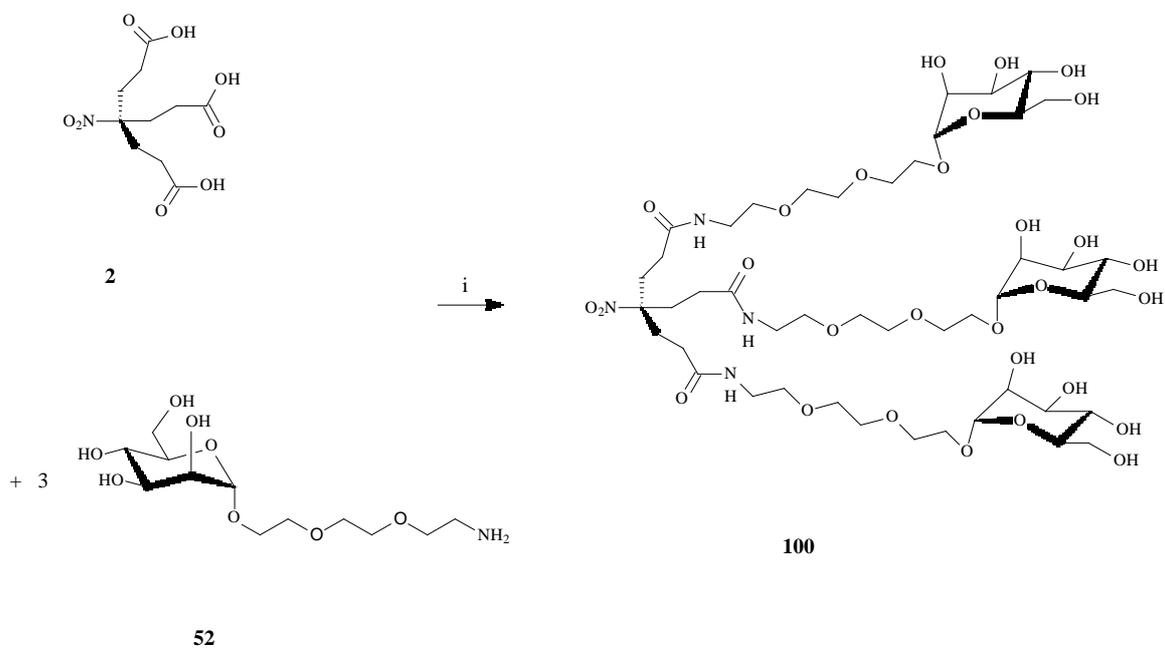


Abb. 35: Darstellung des spacermodifizierten Triclusters **100**, *Reaktionen, Bedingungen und Ausbeuten*: i) EEDQ, abs. DMAc, 60°C, 4 d, 59%

Die trivalenten Strukturen der Cluster-Mannoside **98**, **99** und **100** werden durch die korrekten Integrationsverhältnisse der Core-Methylen- zu den Zuckerprotonen im $^1\text{H-NMR}$ bestätigt sowie durch die MALDI-TOF-MS.

8. Hämagglutination und ELISA: Testergebnisse

Mit den dargestellten Mannosederivaten wurde die Inhibition der Mannose-spezifischen Adhäsion von Typ-1-fimbrierten *E. coli* HB 101 (pPK14)-Bakterien an Meerschweinchen-Erythrocyten im klassischen Hämagglutinations-Hemm-Test gemessen. Diese Arbeiten wurden von Frau Dr. Krallmann-Wenzel in der Laborgruppe von PD Dr. Ehlers am Forschungszentrum Borstel durchgeführt. Aus drei voneinander unabhängigen Experimenten wurde als Ergebnis ein Inhibitionstiter (IT) für jede getestete Verbindung erhalten, der die niedrigste Inhibitor-Konzentration angibt, bei der durch makroskopische Überprüfung keine Erythrocyten-Hämagglutination mehr feststellbar ist. Um die relative Inhibitions-potenz gegenüber Methyl- α -D-mannopyranosid auszudrücken, wird der relative Inhibitionstiter (RIT) angegeben.

Diese Testmethode ist aufgrund der experimentellen Versuchsdurchführung semi-quantitativ, liefert jedoch relative Potenzen mit hoher Reproduzierbarkeit. Die Fehlerbreite der erhaltenen IT-Werte liegt in der Größenordnung zwischen zwei benachbarten Verdünnungsstufen auf der Mikrotiterplatte. Durch das Ansetzen verschiedener Verdünnungsreihen kann der Fehler auf bis zu 10% eingegrenzt werden. Methyl- α -D-mannopyranosid wird in der Literatur^{51, 52} als Standard verwendet und weist einen typischen IT-Wert im mM Bereich auf. Alle Kohlenhydrat-Derivate werden in PBS-Puffer gelöst und in Serie je zweifach verdünnt. Bei schlechter Löslichkeit wird MeOH zugesetzt (bis zu 20%), was auf den Test keinen Einfluß hat. 5 μl der Zuckerlösung werden mit 5 μl der Bakterien-Lösung vermischt und mit 5 μl einer frischen Erythrocyten-Suspension versetzt. Die Häm-agglutination wird nach 15 min visuell ermittelt, anschließend 30 min bei 4 °C inkubiert und erneut abgelesen.¹¹⁹

Ein neu entwickelter *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)⁹⁴ erlaubt die Messung von IC_{50} -Werten, welche die Inhibitorkonzentration angibt, die zu 50%iger Hemmung der

Adhäsion von *E. coli* an Hefe-Mannan führt. Damit stellt diese Methode gegenüber der relativen Messung von IT-Werten im Hämagglutinationstest eine Quantifizierung dar und ergänzt die Hämagglutinations-Hemm-Tests darüberhinaus in sofern, als die Versuchsanordnung anders veranlagt ist. Die Versuchsanordnung des Sandwich-ELISAs ist im wesentlichen zweidimensional, dagegen spiegeln die Hämagglutinationsassays mit Erythrocyten, die eine größere Vielfalt in den Oligosaccharidstrukturen aufweisen als das Mannan der Hefezellen, ein komplexeres Inhibitions-geschehen wieder. Für die Interpretation der erhaltenen Daten ist es wichtig zu bedenken, welches Testsystem verwendet wurde, um basierend auf den Versuchsaussagen Strategien für die Optimierung von Inhibitoren zu entwickeln.

In Tabelle 1 werden die Inhibitionstiter (IT) für die einzelnen Verbindungen aufgeführt, die relativen IT (RIT) bezogen auf Methyl- α -D-mannosid **12** errechnen sich nach $RIT = IT_{MeMan} [\mu M] / IT_i [\mu M]$. Die Angabe der valenzkorrigierten RITs (basierend auf mol Man) ist wichtig für den ernsthaften Vergleich von Glycoclustern mit Monosaccharid-Derivaten. Während sich die IT- und RIT-Werte auf Ergebnisse aus den Hämagglutinations-Hemm-Tests beziehen, wurden die IC_{50} - und RIC_{50} -Werte aus ELISAs ermittelt.

<i>Verbindungen</i>	<i>IT^a</i> [μ M]	<i>RIT^a</i>	<i>RIT^c</i>	<i>IC₅₀^b</i> [μ M]	<i>RIC₅₀^b</i>	<i>RIC₅₀^c</i>
MeMan 12	3900 \pm 88	1	1	3500 \pm 462	1	1
<i>p</i> NPMan 28	42 \pm 2.4	93 \pm 5	93	49 \pm 9.8	71 \pm 12	71
<i>p</i> BnNO ₂ Man 34	87 \pm 5	45 \pm 2.4	45			
<i>p</i> BnCO ₂ MeMn 36	26 \pm 1.5	150 \pm 8.2	150			
<i>p</i> BNCO ₂ HMan 37	104 \pm 6.0	38 \pm 2.0	38			
<i>p</i> ManBnMan 72	52 \pm 3.0	75 \pm 4.1	38			
tris(<i>O</i> -Man) 76	18 \pm 1.0	217 \pm 12	72	39 \pm 2.9	90 \pm 6.2	30
tris(pept. OMe) 78	1.1 \pm 0.06	3545 \pm 194	1182	11 \pm 2.9	318 \pm 66	106
tris(TH OMe) ^d 82	6900 \pm 398	0.57 \pm 0.03	0.19	5333 \pm 1092	0.66 \pm 0.11	0.22
tris(THO <i>p</i> NP) ^d 83				429 \pm 81	8.2 \pm 1.3	2.7

Tabelle 1:

a: Inhibitionstiter (IT) und relative IT (RIT) aus dem Hämagglutinations-Hemmtest^a (RIT \equiv 1 für Methyl- α -D-mannopyranosid **12**);

b: IC₅₀- und RIC₅₀-Werte aus dem ELISA (RIC₅₀ \equiv 1 für Methyl- α -D-mannopyranosid **12**)

c: bezogen auf Mol Mannose (valenzbereinigt)

d: Thioharnstoff

Beim Vergleich der Bindungseigenschaften der getesteten Verbindungen lassen sich drei Gruppen unterscheiden: (i) die Monosaccharidderivate mit aromatischem Aglycon, die ähnlich gut wie *p*-Nitrophenyl- α -D-mannosid (**28**) die Hämagglutination inhibieren; (ii) die Gruppe der potenten Glycocluster; (iii) die Glycocluster, die schlechte Inhibitoren darstellen.

Abb. 36 zeigt in logarithmischer Auftragung die mikromolaren Inhibitionstiter der Hämagglutination bei 100%iger Hemmung für die getesteten Verbindungen. Methyl- α -D-mannosid **12** mit einem IT von 3.9 mM und der thioharnstoffverbrückte Tricluster **82** mit

einem IT von 6.9 mM stellen niedrig-affine Liganden dar, der peptidisch-verbrückte Tricluster **78** fällt aufgrund seiner sehr guten Inhibitionseigenschaften auf. Die weiteren getesteten Verbindungen gruppieren sich mit ihren ITs um *p*-Nitrophenyl- α -D-mannosid **28**, welches mit einem IT von 42 μ M ein guter Inhibitor der Mannose-spezifischen Adhäsion ist.

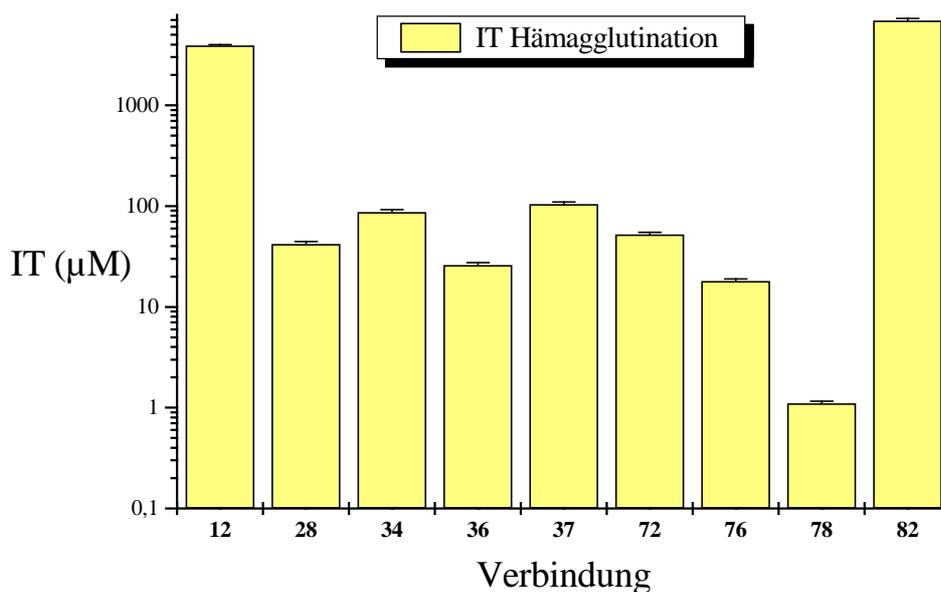


Abb. 36: Logarithmische Auftragung der mikromolaren IT aller im Hämagglutinationsinhibitionstest untersuchten Verbindungen (MeMan: Methyl- α -D-mannopyranosid **12**)

Bei der Gegenüberstellung der relativen IT-Werte, wobei der für Methyl- α -D-mannopyranosid **12** gleich eins gesetzt wird, fällt der trivalente peptidisch-verbrückte Cluster **78** mit seiner gegenüber Methyl- α -D-mannosid über 3400fach höheren Bindungsaffinität deutlich heraus. Valenzkorrigiert (bezogen Mol Mannose pro Cluster) ergibt sich für Verbindung **78** eine über 1000fach bessere inhibitorische Potenz als bei Methyl- α -D-mannosid **12** und übertrifft dabei *p*-Nitrophenyl- α -D-mannosid **28** um das 100fache. Der *O*-glycosidisch-verbrückte Tricluster **76** bindet über 200fach besser als Methyl- α -D-mannosid **12**, valenz-korrigiert liegt Cluster **76** mit seiner Affinität in der Nähe von *p*-Nitrophenyl- α -D-mannosid **28**. Der thioharnstoff-verbrückte Tricluster **82** präsentiert die

Mannoseeinheiten den CRDs der Typ-1-Fimbrien räumlich anscheinend so schlecht, daß er trotz seiner drei Mannosen fast doppelt so schlecht inhibiert wie Methyl- α -D-mannosid **12**. Der entsprechende Thioharnstoff-verbrückte *p*-Nitrophenylcluster **83** konnte wegen seiner schlechten Wasserlöslichkeit im Hämagglutinationsassay nicht untersucht werden.

Gegenüber *p*-Nitrophenyl- α -D-mannosid **28** ist Methyl- α -D-mannosid **12** ein schlechter Inhibitor. Also legt man die Meßplatte höher, wenn man die inhibitorischen Potenzen mit dem aromatischen Mannosid **28** vergleicht (Tabelle 2). Tatsächlich zeigen die trivalenten Cluster-Mannoside **76** und **78** verglichen mit *p*-Nitrophenyl- α -D-mannosid (**28**) eine höhere Affinität zu der Typ-1-fimbrialen CRD, wobei der *O*-glycosidische Cluster **76** etwa doppelt so gut und der peptidische Cluster **78** fast 40-mal so gut inhibiert.

Verbindungen	IT ^a [μ M]	RIT ^a	RIT ^c	IC ₅₀ ^b [μ M]	RIC ₅₀ ^b	RIC ₅₀ ^c
<i>p</i> NPMan 28	42 \pm 2.4	1	1	49 \pm 9.8	1	1
<i>p</i> BnNO ₂ Man 34	87 \pm 5	0.48 \pm 0.03	0.48			
<i>p</i> BnCO ₂ MeMn 36	26 \pm 1.5	1.61 \pm 0.09	1.61			
<i>p</i> BNCO ₂ HMan 37	104 \pm 6.0	0.40 \pm 0.02	0.40			
<i>p</i> ManBnMan 72	52 \pm 3.0	0.81 \pm 0.04	0.40			
tris(O-Man) 76	18 \pm 1.0	2.33 \pm 0.12	0.78	39 \pm 2.9	1.26 \pm 0.09	0.42
tris(pept. OMe) 78	1.1 \pm 0.06	38.2 \pm 1.97	12.7	11 \pm 2.9	4.45 \pm 0.93	1.48

Tabelle 2:

a: Inhibitionstiter (IT) und relative IT (RIT) aus dem Hämagglutinations-Hemmungsassay^a (RIT \equiv 1 für *p*-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid **28**);

b: IC₅₀- und RIC₅₀-Werte aus dem ELISA (RIC₅₀ \equiv 1 für *p*-Nitrophenyl- α -D-mannosid **28**)

c: bezogen auf Mol Mannose (valenzbereinigt)

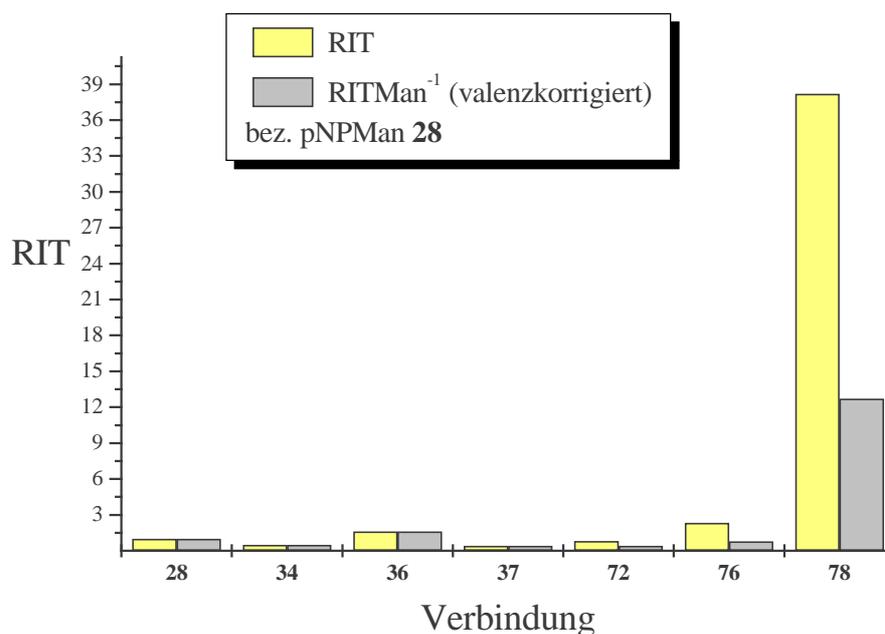


Abb. 37: Darstellung der relativen IT aus den Hämagglutinationstesten bezogen auf *p*-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid **28** (RIT \equiv 1)

Bezogen auf die Mannoseeinheiten im Cluster bewirkt der peptidisch-verbrückte Cluster **78** gegenüber *p*-Nitrophenyl- α -D-mannosid (**28**) in der Hämagglutination eine über 10fach gesteigerte Inhibitionspotenz, im ELISA dagegen eine nur 1.5fach gesteigerte Wirkung. Der valenzkorrigierte Wert für den *O*-glycosidischen Tricluster **76** beträgt ungefähr die Hälfte des RIC₅₀-Wertes von *p*-Nitrophenyl- α -D-mannosid (**28**) (Abb. 37).

Die unterschiedlichen Inhibitionsfähigkeiten der getesteten Tricluster lassen sich auf konformationelle Unterschiede sowie die Art der Verknüpfung mit dem Core zurückführen. Mit der Einführung von aromatischen Aglyconen lassen sich erheblich bessere Inhibitions-werte erhalten. Mit Spannung darf daher das Abschneiden der spacermodifizierten Cluster-Mannoside **98-100** und des *p*-Nitrophenyl-Triclusters **79** erwartet werden.

Auf Typ-1-Fimbrien sind die CRDs an den Enden sowie entlang der Fimbrie verteilt. Verstärkte Inhibition der Adhäsion ließe sich auf das gleichzeitige Binden an mehrere CRDs zurückführen. Aufgrund der Molekülgröße der getesteten Tricluster ist die gleichzeitige Bindung an mehrere CRDs allerdings kaum möglich. Wahrscheinlicher ist der unterschiedliche Fit in die Bindungstasche für die Variation der inhibitorischen Potenz der

Cluster verantwortlich. Dieses Modell stützt das Bild der Bindungstasche der CRD von Typ-1-Fimbrien, welches nach Ofek und Sharon^{51, 55} am besten Trisaccharide bindet. Verbindung **78** kann als Prototyp neuartiger Antiadhäsiva für die Mannose-spezifische Wechselwirkung gelten.

9. Ausblick

In einer konvergenten Synthese sollten dendritische Cluster-Mannoside wie z. B. **101** zugänglich sein, die an multiple CRDs binden können und daher auch einen typischen Cluster-Effekt zeigen könnten. Durch Einführung aromatischer Aglycone sollten sich die Inhibitionswerte über den μM Bereich verbessern lassen (Abb. 38).

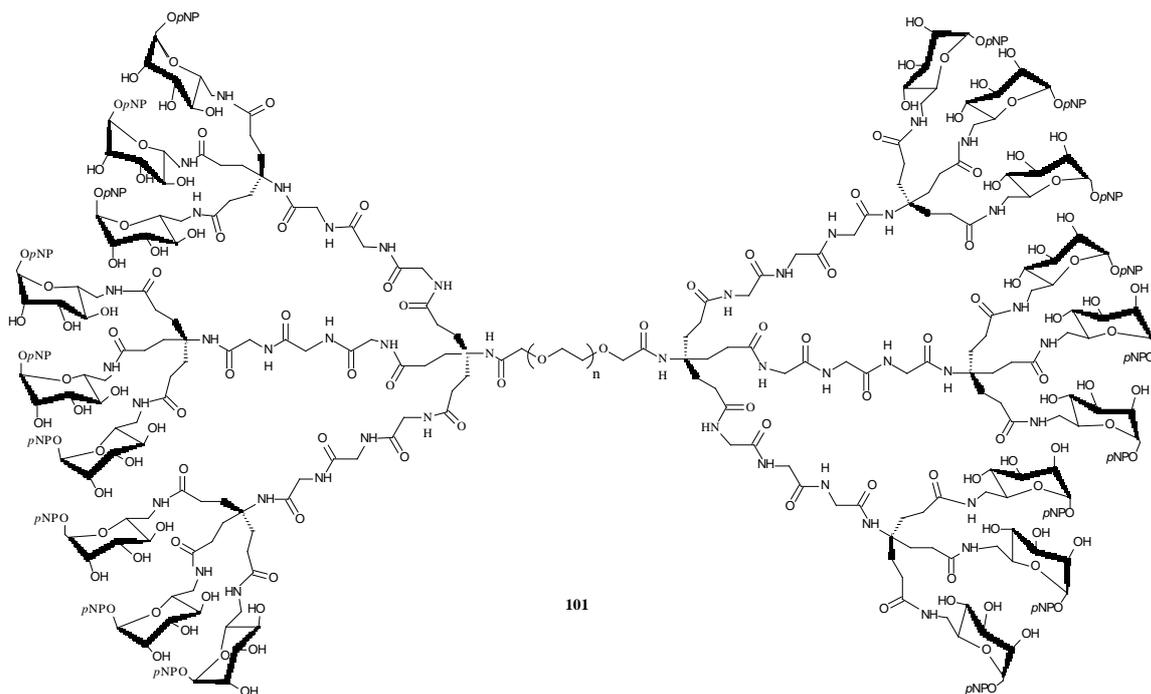


Abb. 38: Ausblick- Struktur eines "Januskopf"-Clusters basierend auf **78** mit Triglycinspacern

Liste der aus dieser Arbeit hervorgegangenen Veröffentlichungen:

- 1. Multivalent ligands for the mannose-specific lectin on type 1 fimbriae of *Escherichia coli*: Syntheses and testing of trivalent α -D-mannoside clusters,**
S. Kötter, U. Krallmann-Wenzel, S. Ehlers, Th. K. Lindhorst,
J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, **1998**, 2193-2200.
- 2. Effect of *p*-Substitution of Aryl α -D-mannosides on Inhibiting Mannose-sensitive Adhesion of *Escherichia coli*- Syntheses and Testing,**
Th. K. Lindhorst, S. Kötter, J. Kubisch, U. Krallmann-Wenzel, S. Ehlers, V. Křen,
Eur. J. Org. Chem., **1998**, 1669-1674.
- 3. Enzymatic synthesis of *p*-nitrophenyl β -chitobioside,**
J. Kubisch, L. Weignerová, S. Kötter, Th. K. Lindhorst, P. Sedmera, V. Křen,
J. Carbohydr. Chem., **1999**, **18**, 975-984.
- 4. Binding inhibition of type 1 fimbriae to human granulocytes: A novel cytometric inhibition assay using trivalent cluster mannosides,**
A. K. Horst, S. Kötter, Th. K. Lindhorst, C. Wagener, eingereicht.
- 5. Trivalent α -D-mannoside clusters: spacer variation, biotinylation and their biological effect as inhibitors of type 1 fimbriae-mediated adhesion of *Escherichia coli*,**
Th. K. Lindhorst, S. Kötter, U. Krallmann-Wenzel, S. Ehlers,
Eur. J. Org. Chem., in Vorbereitung.

10. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden eine Reihe von mono- und multivalenten Glycomimetika für die Mannose-spezifische Adhäsion von Typ-1-fimbrierten *E. coli* Bakterien an Meer-schweinchen-Erythrocyten oder Hefemannan synthetisiert. Dabei wurden verschiedene Wege zum Aufbau kleinerer Glycocluster besprochen, wobei die Chemie der Kupplungsreaktionen mit Ausnahme der glycosidisch-verbrückten Cluster unabhängig von der Konfiguration der verwendeten Kohlenhydrat-Bausteine ist. Der peptidisch-verbrückte Cluster **78** weist hervorragende Inhibitionseigenschaften mit IT-Werten im unteren μM -Bereich auf, sowohl im Hämagglutinations-Hemm-Test als auch im ELISA. Daher wurde die Struktur von Verbindung **78** durch Einführung verschiedener Spacerlängen zu den Verbindungen **98**, **99** und **100** und Austausch des Methylglycons gegen einen *p*-Nitrophenylrest zu Struktur **79** optimiert. Durch die Mannosylierung der Akzeptoralkohole **38**, **43** und **48** mit acetyliertem Trichloracetimidat **11** und nachfolgender nucleophiler Substitution mit Natriumazid wurden die erhaltenen Azide **40**, **45** und **50** entschützt und zu den Aminen **42**, **47** und **52** hydriert und anschließend mit EEDQ peptidverbrückt. Die Synthese der spacer-modifizierten Tricluster **98**, **99** und **100** gelang in 68%iger, 56%iger bzw. 49%iger Gesamtausbeute (je 5 Stufen).

Der Triclusters **78** war über Peptidkupplung mit dem benzoylgeschützten 6-Amin **21** und der Trisäure **2** nach Entschätzung in 72% Ausbeute erhältlich.

Die Oligomannosylierung des Triols **3** mit benzylgeschütztem Trichloracetimidat **15** gelang bei -65°C und nachfolgender De-*O*-benzylierung bei 60 bar/ 60°C mit Pd/C in 57%iger Ausbeute zum Trimannosid **76**. Die entsprechende Synthese mit acetylgeschütztem Trichloracetimidat ergab nicht umlagerbare Orthoesterstrukturen in **73**.

Der Thioharnstoff-verbrückte Tricluster **82** wurde mit acetylgeschütztem 6-Isothiocyanat **24** und Tris-(2-aminoethyl)-amin **61** nach Entschätzung in 75%iger Ausbeute zugänglich. Die Synthese von **82** mit benzoylgeschütztem 6-NCS-Mannosid **22** verlief mit 25%iger Ausbeute aufgrund auftretender Löslichkeitsprobleme während der Synthese. Mit ungeschütztem 6-NCS-Mannosid **27** gelang die Synthese in 23%iger Ausbeute infolge von Nebenreaktionen.

Durch die Synthese konformationell unterschiedlicher Cluster-Mannoside (*O*-glycosidisch (**76**)-, thioharnstoff- (**82** & **83**)- und peptidverbrückt (**78**)) können mit den potentesten Verbindungen konvergent dendritische Cluster aufgebaut werden, die ein *cross-linking* mit verschiedenen Lektindomänen erlauben und echte multivalente Bindungseffekte zeigen könnten. Aufgrund des flexibel gehaltenen Synthesekonzeptes ist die Einführung von Biomarkern möglich und wurde für den biotinylierten Tricluster **88** ausgehend vom Nitrotri-*t*-butylester **1** in 4 Stufen mit 86%iger Ausbeute exemplarisch durchgeführt. Durch Markierung von aminoterminierten Spacer-Cluster-Mannosiden wie **97** können auch sehr teure NHS-aktivierte Biomarker wie z. B. Oregon Green™ 488, Carbonsäuresuccinimydylester-5-isomer, eingeführt werden.

Die aromatischen Mannoside **34**, **36** und **37** gleichen in ihrer Inhibitoreigenschaft der vom *p*-Nitrophenyl- α -D-mannosid.

Für hochaffine Liganden des NKR-P1-Rezeptorproteins aus Killerzellen von Ratten konnten wichtige Vorarbeiten geleistet werden. Die problematische chemische Synthese von *p*-Nitrophenyl-chitobiose konnte durch eine neu entwickelte enzymatische Transglycosylierung mit der β -*N*-Acetylhexosaminidase von *Aspergillus oryzae* umgangen werden. *p*-Nitrophenyl- β -*N*-acetylglucosamin (**56**) dient in einer kinetisch-kontrollierten Bildung des $\beta(1\rightarrow4)$ -Regioisomers sowohl als Donor wie auch als Akzeptor (Abb. 13). Unter optimierten Bedingungen betrug die Ausbeute 22%, wobei auch Multigrammansätze möglich waren und nichtumgesetztes Edukt zurückgewonnen werden konnte. Die Transformation von *p*-Nitrophenyl-chitobiose **57** und *p*-Nitrophenyl-GalNAc **66** zu den *p*-Isothiocyanat-Verbindungen stieß auf Schwierigkeiten, die auf der Stufe der zwischenzeitlich gebildeten *p*-Amino-Derivate auftraten. Im Fall des *p*-NCS-Chitobiosides **59** erfolgte die Dimerisierung zu **60** bei der Transformation der Aminofunktion von **58** mit Thiophosgen.

11. Summary

This thesis describes the synthesis of a number of α -mannoside derivatives and various oligovalent α -mannoside clusters, which were designed as inhibitors of the mannose-specific adhesion of type 1-fimbriated *E. coli* bacteria to guinea pig erythrocytes and yeast mannan, respectively. In addition to glycosylation reactions other chemistries such as peptide coupling and thiourea bridging were used for linking the sugar moieties to an oligovalent core molecule. Peptide coupling and thiourea bridging reactions had the advantage that no optimization was needed for every particular sugar configuration used. The peptide-bridged cluster **78** showed the best inhibitory potency of all compounds tested, both in the hemagglutination inhibition assay as well as in the ELISA with an IT (inhibition titre) in the low micromolar range. Consequently cluster **78** was considered as a lead structure and was further modified by the introduction of spacers of different lengths leading to the spacer-modified clusters **98**, **99** and **100**. Furthermore, variation of the aglycon group from methyl to *p*-nitrophenyl was accomplished in order to add hydrophobic interactions to lectin binding. This led to the aglycon-modified cluster **79**.

The synthesis of cluster mannosides via oligo-glycosidation proved to be difficult. Especially mannosylation was complicated by the frequent formation of glycosyl orthoesters which could not be isomerized without degradation. Finally oligomannosylation of triol **3** was accomplished with the benzyl-protected trichloroacetimidate **15** at -65°C and subsequent de-*O*-benzylation at 60 bar/ 60°C with Pd/C leading to cluster mannoside **76** in 57% overall yield. Thiourea-bridged triclusters such as **82** were available by coupling of acetyl-protected 6-isothiocyanate **24** and tris(2-aminoethyl)amine **61** and subsequent deprotection in 75% overall yield. Other protecting groups such as *O*-benzoyl protection or no protecting groups gave low yields around 20%. The described syntheses to cluster mannosides such as the *O*-glycosidically linked cluster **76**, thiourea-bridged **82** and **83** or peptide-linked **78** are designed such that utilization of the clusters as molecular wedges and their assembly to carbohydrate-containing dendrimers in a convergent approach is possible. Moreover, due to the flexible synthetic concept the introduction of biomarkers is possible what could be demonstrated with the synthesis of biotinylated tricluster **88**.

The majority of the prepared mannosides and cluster mannosides were tested as inhibitors of mannose-specific adhesion of *E. coli* in collaboration with the research center Borstel.

The mannosides **34**, **36** and **37** containing an aromatic aglycon showed similar inhibitory potencies as *p*-nitrophenyl α -D-mannoside.

In addition to the work which was dedicated to mannose-specific inhibition, the clustering know-how collected in this thesis was also engaged to synthesize potential high affinity ligands of the NKRP-1 receptor protein from rat killer cells. The chemical synthesis of *p*-nitrophenyl chitobioside which was required in this context, was however, found to be difficult. Thus a new enzymatic transglycosylation reaction was developed using β -*N*-acetylhexosaminidase from *aspergillus oryzae* in collaboration of the laboratory of Prof. V. Křen (Prag). In the enzymatic glycosylation reaction *p*-nitrophenyl 2-deoxy-2-*N*-acetylamino-glucoside (**56**) served both as donor as well as acceptor in the kinetically controlled formation of the desired β (1 \rightarrow 4)-regioisomer. In the next chemical step, the transformation of *p*-nitrophenyl chitobioside **57** as well as *p*-nitrophenyl GalNAc (**66**) to the respective *p*-isothiocyanato-functionalized derivatives led to difficulties during its formation from the corresponding *p*-amino derivatives. In the case of *p*-NCS-phenyl chitobioside **59** dimerization to **60** occurred during the transformation of the amino function of **58** with thiophosgene. Therefore, this reaction sequence still awaits completion.

12. Experimenteller Teil

Sicherheit:	R-Sätze	S-Sätze	Gefahrensymbol
Aceton	11	9-16-23.2-33	F
DME	47-10-19	53-7/8	Xn
DMF	20/21-36	26-28-36	Xn
Ethylacetat	11	16-23.2-29-33	F
Methanol	11-23/25	2-7-16-24	T, F
Natriumazid	28-32	28.1-45	T+
Pyridin	11-20/21/22	26-28.1	Xn, F
Thiophosgen	26	7/9-24/25-45	T
Toluol	11-20	16-25-29-33	Xn, F
Tosylchlorid	36-37-38	7-8	X

Materialien

Methyl- α -D-mannopyranosid (Merck), *p*-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid (SENN Chemicals), 2-Acetamido-2-desoxy-D-glycopyranose (Avocado), TMS-OTf (Fluka), Tris-(2-aminoethyl)-amin (Aldrich), 2-Bromethanol (Merck), 2-(2-Chlorethoxy)-ethanol, 2-[2-(2-Chlorethoxy)-ethoxy]-ethanol (Aldrich) und Triglycin (Fluka) wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Allgemeine Methoden

Alle Reaktionen wurden dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel-Fertigfolie 60 F₂₅₄ (Merck) verfolgt. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht, durch Besprühen mit 20%iger ethanolischer Schwefelsäure, mit 10% acetonischer KMnO₄ oder für Amine mit einer Lösung von 5 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4 H₂O, 2 g Ce(HSO₄)₄ in 20 ml konz. H₂SO₄ und 80 ml H₂O mit anschließender Wärmebehandlung (Blaufärbung). Säulenchromatographische Trennungen erfolgten an Kieselgel 60 (230-400 mesh, 40-63 μ m, Merck) mit einem Flow von ca. 4 cm Säulenhöhe/min ausschließlich nach der Flash-Technik mit destillierten Lösungsmitteln. Gelpermeationschromatographische Trennungen wurden an Biogel P2 extra fine (Biorad), Sephadex G-15 oder Sephadex LH-20 mit den angegebenen Laufmitteln durchgeführt. Schmelzpunkte wurden auf einem Leitz-Heiztischmikroskop bestimmt und sind unkorrigiert. Die Messung der Drehwerte erfolgte bei 20°C auf einem Perkin-Elmer Polarimeter 243 oder 341 (Natrium D-Linie, 589 nm, 10 cm Küvettenlänge). IR-Spektren wurden auf einem FT-IR ATI Mattson Instruments (USA) aufgenommen. Die

Elementaranalysen wurden in der mikroanalytischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie der Universität Hamburg durchgeführt. Für Druckhydrierungen wurde ein Bergmann-Hochdruckautoklav des Typs HR 100 eingesetzt. NMR-Spektren wurden mit den Bruker Spektrometern AMX-400 (100.67 MHz bei ^{13}C) und DRX-500 (125.77 MHz bei ^{13}C) aufgenommen. Als interner Standard wurde Tetra-methylsilan verwendet oder auf die charakteristischen Lösungsmittelsignale von D_2O (4.65 ppm), $[\text{D}_6]$ -Methanol (3.35 bzw. 49.30 ppm), $[\text{D}_3]$ -Acetonitril (1.96 bzw. 1.30, 117.7 ppm), D-Chloroform (7.25 bzw. 77.0) oder $[\text{D}_6]$ -DMSO (2.49 bzw. 39.70 ppm) geeicht. Bei Messungen in D_2O wurde nach Zusatz von Aceton auf 30.60 ppm geeicht. Zur genauen Zuordnung der Signale wurden, falls erforderlich, ^1H - ^1H -COSY oder ^1H - ^{13}C -Korrelationsexperimente durchgeführt. Die Spektren wurden nach 1. Ordnung ausgewertet. Abweichend von der verwendeten Numerierung bei IPAC-Namen wurden für die Zuordnung der NMR-Signale die Ringprotonen der Monosaccharid-Strukturelemente wie gewohnt als H-1 bis H-6 bezeichnet, die Monosaccharid-Kohlenstoffatome von C-1 bis C-6. Die Atome der Spacerabschnitte werden bei der Wiedergabe von Strukturelementen spezifiziert. FAB-Massenspektren wurden auf einem VG Analytical 70-250 S und ESI-Massenspektren auf einem Finnigan MAT 95 aufgenommen. Die Messung der MALDI-TOF-Massenspektren erfolgte auf einem Bruker Biflex III im Reflektormode mit DHB (15 mg/ml 2 : 1 0.1% wässr. TFA-Acetonitril) als Matrix. Kalibriert wurde auf CCA, Angiotensin-2 und Bombesin. Die Genauigkeit der Messung beträgt ca. 0.3 Da bei externer Kalibrierung, mit internen Kalibranten läßt sich eine Genauigkeit von bis zu 0.02 Da erreichen. In den aufgetragenen Probenvolumina von 0.6 μl befanden sich ca. 5-20 pmol der zu untersuchenden Verbindung (Dünnschicht-Technik).

Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1 Acetylierung

Die Verbindung wird in trockenem Pyridin (60 ml) gelöst und mit Essigsäureanhydrid (5 Äquivalente pro OH-Funktion) versetzt. Nach vollständiger Reaktion (TLC-Kontrolle) wird das Pyridin im Vakuum abdestilliert, wiederholt mit Toluol codestilliert und die Produkte flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

AAV 2 Deacetylierung

Die zu deacetylierende Verbindung wird in abs. Methanol (80 ml) gelöst, mit einer 1 M methanolischer NaOMe-Lösung auf einen pH von 8-9 eingestellt und bei RT gerührt. Nach vollständiger Reaktion (TLC-Kontrolle) wird mit Levatit 1080 H⁺ Ionentauscherharz neutralisiert, filtriert und im Vakuum eingengt. Wegen der hohen Reinheit der Produkte kann in vielen Fällen auf eine weitere chromatographische Reinigung verzichtet werden.

AAV 3 Tosylierung

Die Verbindung wird in wenig abs. Pyridin gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend wird Tosylchlorid (1.1 eq., gelöst in Pyridin) zugegeben. Die Reaktionslösung wird langsam auf RT erwärmt. Nach beendeter Reaktion (TLC-Kontrolle) wird nach Zugabe von 150 ml H₂O dreimal mit Ethylacetat (100 ml) ausgeschüttelt, die organische Phase mit 5%iger HCl, nachfolgend mit H₂O gewaschen über MgSO₄ getrocknet. Nach Filtration wird im Vakuum konzentriert. Die flashchromatographische Reinigung erfolgt mit dem jeweils angegebenen Laufmittelgemisch.

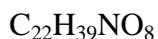
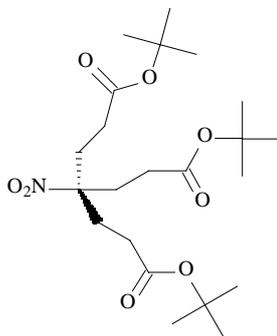
AAV 4 Nucleophile Substitution der Tosylgruppe durch Azid

Die Substanz wird mit Natriumazid (5 mol eq.) in wenig abs. DMF gelöst und bei 80°C gerührt. Nach beendeter Reaktion (TLC-Kontrolle) wird im Vakuum bis fast zur Trockene konzentriert, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen, mit Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, nach Filtration im Vakuum konzentriert und anschließend flashchromatographisch gereinigt.

AAV 5 Hydrierung von Aziden

Die Substanz wird mit 10 Gew.% (bezogen auf die eingewogene Substanz) Pd/C-Katalysator (10%ig auf Aktivkohle) in Ethylacetat-Ethanol suspendiert und bei Normaldruck hydriert. Nach beendeter Reaktion (TLC-Kontrolle) wird über Celite abfiltriert, mit Ethylacetat-Ethanol nachgewaschen und das Filtrat im Vakuum konzentriert. Die flashchromatographische Reinigung erfolgt mit dem jeweils angegebenen Eluenten.

Nitrotris-[2-(^tbutoxycarbonyl)-ethyl]-methan (1)



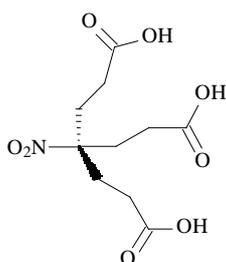
Zu einer unter Rückfluß gerührten Lösung von 6.1 g (100 mmol) Nitromethan, 1 ml Triton B (40% wässr. Trimethylbenzylammoniumhydroxid in MeOH) in 20 ml DME werden bei einer Temperatur zwischen 65-70°C tropfenweise 39.7 g (310 mmol) Acrylsäure-^tbutylester zugegeben. Die Innentemperatur wird durch Zugabe von zweimal je 1 ml Triton B zwischen 70-80°C gehalten, anschließend wird für 1 h bei 70-75°C weitergerührt. Nach dem Abdestillieren der Lösungsmittel wird in 200 ml CH₂Cl₂ aufgenommen, mit 10%iger HCl (50 ml) und dreimal mit ges. NaCl gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Rohes Nitrotris-[2-(^tbutoxycarbonyl)-ethyl]-methan (**1**) (33.16 g (74.4 mmol)) wird durch dreimaliges Umkristallisieren aus Methanol in 74%iger Ausbeute in Form weißer Mikrokristalle erhalten.

mp 97-99 °C; Lit., ¹²⁰ 98-100°C;

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.21 (m, 12 H, CH₂); 1.44 (s, 27 H, CH₃) ppm;

¹³C-NMR (100.67 MHz, CDCl₃): δ = 171.06 (C=O); 92.19 (C-NO₂); 81.13 (CCH₃); 30.36 (C_qCH₂); 29.80 (CH₂C=O); 28.02 (CH₃) ppm.

4-(2-Carboxyethyl)-4-nitro-heptan-1,7-disäure (2)



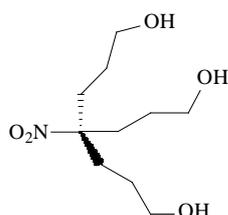
7 g (15.7 mmol) Nitrotris-[2-(*t*-butoxycarbonyl)-ethyl]-methan werden in 50 ml 98%iger Ameisensäure über Nacht bei RT gerührt. Nach der Konzentrierung im Vakuum wird fünfmal mit Toluol koevaporiert und der Rückstand fünfmal mit warmem Aceton extrahiert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert und der Rückstand in 10%iger NaOH gelöst. Ansäuern mit konz. HCl ergibt 4-(2-Carboxyethyl)-4-nitro-heptan-1,7-disäure (**2**) als Niederschlag, der mit EtOH, dann mit Et₂O gewaschen wird. Es wurden 4.0 g (14.4 mmol, 92%) 4-(2-Carboxyethyl)-4-nitro-heptan-1,7-disäure (**2**) als feiner, weiß-kristalliner Feststoff erhalten.

mp: 184 °C; Lit., ⁶⁶ 183.0-185.5°C;

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 2.36-2.20 (m 12 H, CH₂CH₂COOH) ppm;

¹³C-NMR (100.67 MHz, [D₄]-MeOH): δ = 175.80 (COOH); 94.05 (C-NO₂); 31.66 (CH₂CH₂COOH); 29.64 (CH₂CH₂COOH) ppm.

4-Nitro-4-(3-hydroxypropyl)-heptan-1,7-diol (**3**)



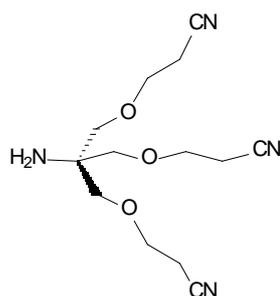
C₁₀H₂₁NO₅

MW 235.28

3.08 g (11.109 mmol, 2 Wochen im Ölpumpenvakuum bei 80-100°C getrocknet) 4-(2-Carboxyethyl)-4-nitroheptan-1,7-disäure (**2**) werden in 65 ml abs. THF unter N₂-Atmosphäre gelöst und mit Eis-Salzwasser gekühlt. Anschließend werden bei -5 bis 0°C 37 ml einer 1 M BH₃·THF-Lösung während 1.5 h portionsweise zugetropft (37 mmol, 10%iger Überschuss). Es wird auf RT erwärmt und für weitere 2 h gerührt, bevor durch Zugabe von 200-300 µl Wasser hydrolysiert wird. Das Lösungsmittel wird zu 2/3 im Vakuum abdestilliert, 90 ml ges. NaHCO₃-Lösung zugegeben und im Ölpumpenvakuum konzentriert. Der Rückstand wird fünfmal mit je 50 ml siedendem 3 : 1 *i*-PrOH-EtOH extrahiert und das erhaltende Rohprodukt wird nach Abdestillation des Lösungsmittels flashchromatographisch (3 : 2 Toluol-MeOH) gereinigt. Es konnten 2.58 g (11.0 mmol, quant.) 4-Nitro-4-(3-hydroxypropyl)-heptan-1,7-diol (**3**) als farbloser Sirup, der nach 3 Tagen kristallisiert, erhalten werden.

TLC (3 : 2 Toluol-MeOH): $R_f = 0.58$ (H_2SO_4); mp 82-84°C; Lit., ⁶⁶ Sirup;
¹H-NMR (400 MHz, D₂O): $\delta = 3.51$ (t, 6 H, CH₂OH, ³J = 6.1 Hz); 1.93 (m_c, 6 H, CH₂CH₂CH₂OH); 1.37 (m_c, 6 H, CH₂CH₂CH₂OH) ppm;
¹³C-NMR (100.67 MHz, D₂O): $\delta = 95.74$ (CNO₂); 61.60 (CH₂OH); 31.87 (CH₂CH₂CH₂OH); 26.15 (CH₂CH₂CH₂OH) ppm.

Aminotris-(4-cyano-2-oxo-butyl)-methan (5)



$C_{13}H_{20}N_4O_3$

MW 280.33

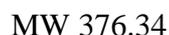
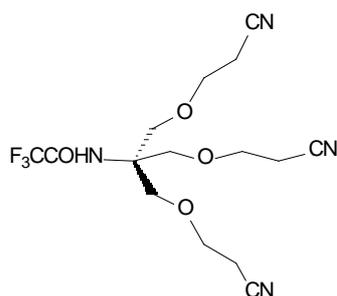
Zu einer Lösung von 630 mg NaOH (15.8 mmol) in 10 ml Wasser werden 10 g TRIS (82.6 mmol) und 6 ml Dioxan zugefügt und bei RT gerührt. Anschließend werden 14.2 g Acrylnitril (268 mmol) zugegeben (Eiswasserkühlung bei starker Erwärmung) und bei RT über Nacht gerührt. Nach Zugabe von 100 ml CH₂Cl₂ wird die organische Phase dreimal mit je 100 ml Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und die Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Nach flashchromatographischer Reinigung (Laufmittel: 1. Ethylacetat; 2. 7 : 3 Ethylacetat-MeOH) konnten 14.39 g Aminotris-(4-cyano-2-oxo-butyl)-methan (5) (51.3 mmol, 62%) als farbloser Sirup erhalten werden.

TLC: R_f (7 : 3 Ethylacetat-MeOH). = 0.30 (UV, KMnO₄);

IR: ν [cm⁻¹] 3379 (-CN); 2251 (NH₂);

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 3.70$ (t, 6 H, OCH₂CH₂, ³J = 6.1 Hz); 3.45 (s, 6 H, CH₂OCH₂CH₂); 2.62 (t, 6 H, CH₂CN); 1.74 (s, 2 H, NH₂) ppm;

¹³C-NMR (100.67 MHz, CDCl₃): $\delta = 117.86$ (CN); 72.32 (OCH₂CH₂); 65.59 (CH₂OCH₂CH₂); 55.96 (C-NH₂); 18.62 (CH₂CN) ppm.

Aminotris-(2-oxo-4-cyano-butyl)-*N*-trifluoracetyl-methan (6)

7.86 g (28.04 mmol) Aminotris-(4-cyano-2-oxo-butyl)-methan (**5**) werden mit 18.2 g (180 mmol) Et_3N in 100 ml abs. CH_2Cl_2 auf -10°C gekühlt. Während 20 min werden 12.5 ml TFA-Anhydrid (18.9 g; 90 mmol) in 50 ml abs. CH_2Cl_2 unter N_2 -Atmosphäre zutropft und 30 min bei -10°C , dann 2 h bei RT gerührt. Nach dem Quenchen mit Phosphat-Puffer pH 7 (8.3 g (60 mmol) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10.44 g (60 mmol) K_2HPO_4 in 150 ml H_2O) und Zugabe von 400 ml MeOH wird 30 min bei RT gerührt und im Vakuum konzentriert. Der Rückstand wird mit 2 N HCl (100 ml) angesäuert, mit 100 ml ges. NaCl versetzt und dreimal mit Et_2O (100 ml) ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit 100 ml 5%iger NaHCO_3 -Lösung, mit 100 ml 1 N HCl, dann mit 100 ml ges. NaCl gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum konzentriert. Flashchromatographische Reinigung (7 : 3 Ethylacetat-MeOH) ergab 10.8 g (28 mmol; quant.) Aminotris-(2-oxo-4-cyano-butyl)-*N*-trifluoracetyl-methan (**6**) als braunen Sirup.

TLC (7 : 3 Ethylacetat-MeOH): $R_f = 0.80$ (UV, KMnO_4);

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.60$ (s, 1 H, $\text{C}=\text{ONH}$); 3.87 (s, 6 H, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$);

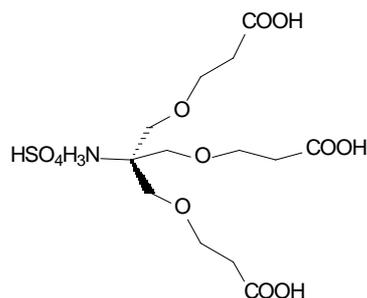
3.71 (t, 6 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, $^3J = 6.1$ Hz); 2.63 (t, 6 H, CH_2CN , $^3J = 6.1$ Hz) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.67 MHz, CDCl_3): $\delta = 156.75$ (q, F_3CCO , $^2J_{\text{C,F}} = 37$ Hz); 117.62 (CN);

115.28 (q, F_3C , $^1J_{\text{C,F}} = 289.0$ Hz); 68.19 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$); 65.67 ($\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$); 60.45

(NH-C_q); 18.60 (CH_2CN) ppm.

Eine Elementaranalyse wurde nicht angefertigt.

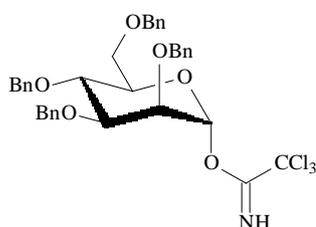
Aminotris-(4-carboxy-2-oxo-butyl)-methan·H₂SO₄ (7)C₁₃H₂₅O₁₃NS

MW 435.40

5.36 g (19.12 mmol) Aminotris-(4-cyano-2-oxo-butyl)-methan werden mit 23.53 g Ba(OH)₂·8 H₂O (74.57 mmol; 3.9 eq.) in 50 ml H₂O bei 70-80°C 3 Wochen unter Rückfluß gerührt, bis kein NH₃ mehr entweicht. Bei einer Temperatur zwischen 40-50°C werden 5 ml 50%ig konz. H₂SO₄ (90 mmol H⁺) zugefügt und 30 min gerührt. Nach der Filtration über Celite werden zur Vervollständigung der Fällung 6.66 ml 50%ig H₂SO₄ (120 mmol H⁺) zugegeben und erneut filtriert. Die Konzentrierung im Vakuum ergibt 9.13 g eines hellorangeroten Sirups, dessen Reinigung zu Aminotris-(4-carboxy-2-oxo-butyl)-methan·H₂SO₄ (7) nicht gelang. Aus dem Integrationsverhältnis im ¹H-NMR-Spektrum kann auf ein Produktanteil von ca. 30% geschlossen werden.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 3.64 (t, 6 H, OCH₂CH₂, ³J = 6.1 Hz); 3.50 (s, 6 H, CH₂OCH₂CH₂); 2.53 (t, 6 H, CH₂COOH, ³J = 6.1 Hz) ppm;

¹³C-NMR (100.67 MHz, D₂O): δ = 176.66 (COOH); 68.34 (OCH₂CH₂); 67.26 (CH₂OCH₂CH₂); 59.92 (C-NH₃⁺); 34.70 (CH₂COOH) ppm.

1-O-(2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-α-D-mannopyranosyl)-trichloracetimidat (15)C₃₆H₃₆O₆NCl₃

MW 685.04

2.13 g (3.94 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-D-mannopyranose (14) werden mit 3.99 g (27.6 mmol, 7 eq.) Trichloracetonitril in 30 ml abs. CH₂Cl₂ unter Rühren bei RT gelöst. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 Tropfen DBU gestartet. Nach 2 h erfolgt die Konzentrierung im Vakuum. Die flashchromatographische Reinigung (10 : 1 Toluol-

Ethylacetat) ergab 2.60 g (3.80 mmol, 96%) 1-*O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl- α -D-mannopyranosyl)-trichloracetimidat (**15**) als farblosen Sirup.

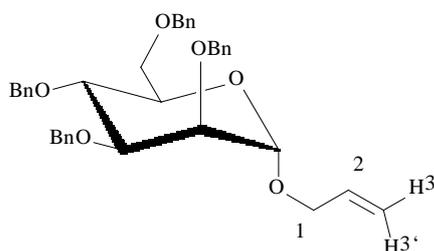
TLC (3 : 1 Toluol- Ethylacetat): $R_f = 0.77$ (UV, H_2SO_4); $[\alpha]_D^{20} = +36.3^\circ$ (c 1.38, $CHCl_3$);
Lit.,⁶⁸ $+39^\circ$,⁷² $+29.7^\circ$ (c 0.7, $CHCl_3$);

¹H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8.52$ (s, 1 H, NH); 7.41-7.19 (m, 20 H, aryl-CH); 6.37 (d, 1 H, H-1); 4.89 (d, 2 H, benzyl-CH₂); 4.77-4.51 (m, 6 H, benzyl-CH₂); 4.15 (dd \approx t, 1 H, H-4); 3.97 (ddd, 1 H, H-5); 3.93 (dd, 1 H, H-3); 3.87 (dd, 1 H, H-2); 3.82 (dd, 1 H, H-6); 3.73 (dd, 1 H, H-6') ppm;

$J_{1,2} = 2.0$; $J_{2,3} = 3.1$; $J_{3,4} = 9.7$; $J_{4,5} = 9.7$; $J_{5,6} = 4.6$; $J_{5,6'} = 2.0$; $J_{6,6'} = 11.2$ Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 160.47$ (C=NH); 138.35, 138.30, 138.14, 137.96 (4 aryl-C_q); 128.39-127.48 (m, 20 aryl-C); 96.14 (C-1); 91.03 (CCl_3); 78.95, 74.87, 74.25, 73.59 (C-2, -3, -4, -5); 75.33, 73.40, 72.66, 72.35 (4 benzyl-CH₂); 68.82 (C-6) ppm.

1-*O*-Allyl-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl)- α -D-mannopyranosid (**17**)



$C_{37}H_{40}O_6$

MW 580.72

Zu 188 ml Allylalkohol (100.3 g, 1.73 mol) werden bei 0°C portionsweise 15 ml (0.21 mol) Acetylchlorid getropft und nach 1 h 15 g (83.26 mmol) D-Mannose zugefügt. Der Ansatz wird unter Rückfluß 2 ½ h bei 70°C, dann über Nacht bei 40°C gerührt. Nach der Neutralisation mit festem $NaHCO_3$ wird über Celite filtriert und im Vakuum konzentriert. Anschließend wird mehrfach mit Toluol codestilliert, bevor 24.96 g des braunen Sirups (**16**) ohne weitere Aufreinigung benzyliert werden.

TLC (Ethylacetat : MeOH = 9 : 1 v/v): $R_f = 0.34$ (**16**, H_2SO_4)

Zur Benzylierung wird das Rohprodukt in 300 ml 33%iger NaOH (w/w, 2.48 mol, 30 eq.) bei 55°C gelöst, anschließend werden 32 g (119.2 mmol) TBAB zugegeben, 84.3 g (76.7 ml, 666 mmol, 8 eq.) Benzylchlorid über 1 h zugetropft und 4.5 h bei 55°C, dann über Nacht bei RT gerührt. Nach der Zugabe von 200 ml Toluol wird mit Wasser neutral

gewaschen und im Vakuum konzentriert. Die flashchromatographische Reinigung (35 : 1 Toluol-Ethylacetat) ergab 36.42 g (63 mmol, 75%) 1-*O*-Allyl 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- α -D-mannopyranosid (**17**) als farblosen Sirup.

TLC (35 : 1 Toluol-Ethylacetat): $R_f = 0.24$ (UV, H_2SO_4); $[\alpha]_D^{20} = +27.6^\circ$ (c 1.2, $CHCl_3$); 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.38$ -7.23 (m, 20 H, aryl-CH); 5.84 (dddd, 1 H, OCH_2CHCH_2); 5.21 (ddd, 1 H, OCH_2CHCH_2); 5.14 (ddd, 1 H, OCH_2CHCH_2); 4.93 (d, 1 H, H-1); 4.88 (d, 1 H, benzyl- CH_2 , $^2J = 10.7$ Hz); 4.76-4.49 (m, 7 H, benzyl- CH_2); 4.16 (dddd, 1 H, OCH_2CHCH_2); 4.00 (dd \approx t, 1 H, H-4); 3.95-3.92 (m, 2 H, OCH_2CHCH_2 , H-3); 3.81 (dd, 1 H, H-2); 3.79-3.71 (m, 3 H, H-6, -5, -6') ppm;

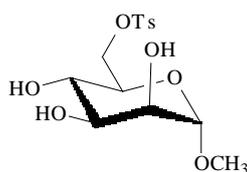
$J_{1,2} = 1.3$; $J_{2,3} = 3.2$; $J_{3,4} = 8.8$; $J_{4,5} = 8.8$ Hz;

Allylsubstituent:

$J_{1,1'} = 13.2$; $J_{1,2} = 5.7$; $J_{1,2} = 6.3$; $J_{2,3} = 17.0$; $J_{2,3'} = 10.7$; $J_{3,3'} = 1.3$ Hz;

^{13}C -NMR (100.67 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 138.54$, 138.46, 138.40, 138.35, (4 aryl- C_q); 133.78 (OCH_2CHCH_2); 128.31-127.43 (aryl-CH); 117.17 (OCH_2CHCH_2); 97.08 (C-1); 80.23 (C-3); 75.12 (benzyl- CH_2); 74.96 (C-4); 74.68 (C-2); 73.32, 72.57, 72.15 (3 benzyl- CH_2); 71.87 (C-5); 69.26 (C-6); 67.78 (OCH_2CHCH_2) ppm.

Methyl-6-tosyl- α -D-mannopyranosid (**18**)



$C_{14}H_{20}O_8S$

MW 348.37

15.2 g Methyl- α -D-mannopyranosid (77.87 mmol) werden in 60 ml abs. Pyridin nach AAV 3 tosyliert. Die flashchromatographische Reinigung (25 : 1 Toluol-Ethylacetat) ergab 24.75 g (71.1 mmol, 91%) Methyl-6-tosyl- α -D-mannopyranosid (**18**) als farblosen Sirup.

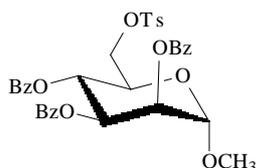
TLC (1 : 1 Aceton-Toluol): $R_f = 0.31$ (UV, H_2SO_4); $[\alpha]_D^{20} = +87.1^\circ$ (c 0.5, $CHCl_3$);

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.80$ (d, 2 H, aryl-CH, $^3J = 8.1$ Hz); 7.32 (d, 2 H, aryl-CH, $^3J = 8.1$ Hz); 4.65 (d, 1 H, H-1); 4.33 (dd, 1 H, H-6); 4.28 (dd, 1 H, H-6'); 3.91 (d, 1 H, H-2); 3.75-3.71 (m, 3 H, H-3, -5, -4); 3.28 (s, 3 H, OCH_3); 2.42 (s, 3 H, tosyl- CH_3) ppm;

$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{5,6} = 6.6$; $J_{5,6'} = 3.1$; $J_{6,6'} = 11.2$ Hz;

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.67 MHz, CDCl_3): δ = 144.95 (aryl- $\text{SO}_3\text{-C}_q$); 132.67 (aryl- CH_3); 129.87, 128.00 (2 aryl- CH); 100.94 (C-1); 71.32, 70.94, 70.00, 67.04 (C-2, -3, -4, -5), 69.59 (C-6); 55.02 (OCH_3); 21.60 (aryl- CH_3) ppm.

Methyl-2,3,4-tri-*O*-benzoyl-6-desoxy-6-tosyl- α -D-mannopyranosid (**19**)



$\text{C}_{35}\text{H}_{32}\text{O}_{11}\text{S}$

MW 660.69

Zu einer Lösung des ungeschützten Mannosides **18** (5.51 g, 15.82 mmol) und 10 mg DMAP in 100 ml abs. Pyridin werden 11 ml Benzoylchlorid (94.6 mmol) innerhalb von 30 min bei -25°C zugetropft und über Nacht bei RT gerührt. Nach der Konzentration im Vakuum wird in 200 ml Ethylacetat aufgenommen, dreimal mit 5%iger HCl, nachfolgend mit ges. NaCl gewaschen und die organische Phase über MgSO_4 getrocknet. Nach Filtration und Einengen ergab die flashchromatographische Reinigung (25 : 1 Toluol-Ethylacetat) 9.0 g (13.62 mmol, 86%) Methyl-2,3,4-tri-*O*-benzoyl-6-desoxy-6-tosyl- α -D-mannopyranosid (**19**) als weißen kristallinen Feststoff.

TLC (5 : 1 Toluol-Ethylacetat): R_f = 0.70 (UV, H_2SO_4);

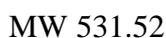
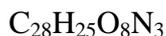
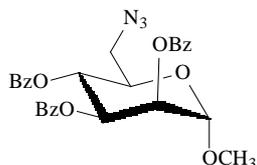
mp 195-199 $^\circ\text{C}$; Lit.,¹²¹ 205-206 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{20}$ -83.4° (c 1.0, CHCl_3); Lit.,¹²¹ -105.8° (c 2.8);

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.07, 7.88, 7.80, 7.73 (4 d, je 2 H, aryl- CH , 3J 8.14 = Hz), 7.65-7.18 (m, 11 H, aryl- CH); 5.82 (dd, 1 H, H-3); 5.76 (dd \approx t, 1 H, H-4); 5.61 (dd, 1 H, H-2); 4.90 (d, 1 H, H-1); 4.31-4.23 (m, 3 H, H-5, -6, -6'); 3.48 (s, 3 H, OCH_3); 2.33 (s, 3 H, tosyl- CH_3) ppm;

$J_{1,2}$ = 1.5; $J_{2,3}$ = 3.1; $J_{3,4}$ = 9.8; $J_{4,5}$ = 9.5 Hz; $J_{6,6'}$ = 14.2 Hz;

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.67 MHz; CDCl_3): δ = 165.43, 165.38, 165.33 (3 C=O), 144.77 ($\text{C}_q\text{-SO}_2$), 133.54-125.77 (23 C, aryl-C), 98.50 (C-1), 70.29, 69.75, 68.72 (C-2, -3, -4), 68.36 (C-6), 66.83 (C-5), 55.62 (OCH_3), 21.57 (tosyl- CH_3) ppm;

m/z (FAB MS) 661 ($\text{M}^+\text{+H}$. Ber. für $\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{O}_{11}\text{S}$: 661.17).

Methyl-6-azido-2,3,4-tri-*O*-benzoyl-6-desoxy- α -D-mannopyranosid (20)

Eine Suspension von 6.48 g (9.81 mmol) Methyl-2,3,4-tri-*O*-benzoyl-6-tosyl- α -D-mannopyranosid (**19**) und 1.70 g (26.15 mmol) NaN_3 in 50 ml abs. DMF wird 4 h bei 80°C unter Rückfluß erhitzt. Vom überschüssigem NaN_3 und NaOTs wird abfiltriert und die Lösungsmittel werden im Vakuum abdestilliert. Nach der flashchromatographischen Reinigung (5 : 1 Petrolether-Ethylacetat) konnten 4.60 g (8.65 mmol, 88%) Methyl-6-azido-6-desoxy-2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -D-mannopyranosid als weißer amorpher Feststoff isoliert werden.

TLC (5 : 1 Petrolether-Ethylacetat): $R_f = 0.21$ (UV, H_2SO_4);

mp 109-111 °C; Lit.,⁷⁴ 111-112 °C;

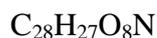
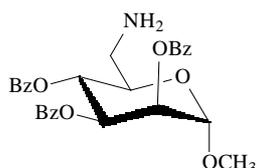
ν [cm^{-1}] 2104 (N_3); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -92.7^\circ$ (c 1.05, CHCl_3); Lit.,⁷⁴ -93° (c 1.0 in CHCl_3);

¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.11$ (d, 2H, aryl-CH, ³ J 8.1 = Hz); 7.96 (d, 2 H, aryl-CH, ³ J 8.1 = Hz); 7.82 (d, 2 H, aryl-CH, ³ J 8.1 = Hz); 7.64-7.24 (m, 9 H, aryl-CH); 5.88 (dd, 1 H, H-3); 5.85 (dd \approx t, 1 H, H-4); 5.68 (dd, 1 H, H-2); 5.00 (d, 1 H, H-1); 4.25 (ddd, 1 H, H-5); 3.56 (s, 3 H, OCH_3); 3.54 (dd, 1 H, H-6); 3.45 (dd, 1 H, H-6') ppm;

$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{3,4} = 9.7$; $J_{4,5} = 10.2$; $J_{5,6} = 6.6$; $J_{5,6'} = 2.5$; $J_{6,6'} = 13.2$ Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, CDCl_3): $\delta = 165.58, 165.49, 165.38$ (3 C=O); 133.56-128.26 (m, 18 C, aryl-C_q, aryl-CH); 98.62 (C-1); 70.34, 70.27, 69.64, 67.81 (C-2, -3, -4, -5); 55.66 (OCH_3); 51.27 (C-6) ppm;

m/z (FAB MS) 532 ($\text{M}^+ + \text{H}$. Ber. für $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{O}_8\text{N}_3$: 532.17).

Methyl-6-amino-2,3,4-tri-*O*-benzoyl-6-desoxy- α -D-mannopyranosid (21)

1.40 g (2.64 mmol) Methyl-6-azido-2,3,4-tri-*O*-benzoyl-6-desoxy- α -D-mannopyranosid werden in 20 ml 1 : 1 Ethylacetat-EtOH mit 200 mg Pd/C (10%ig) bei Normaldruck

hydriert. Nach Beendigung der Reaktion (ca. 3.5 h) wird über Celite filtriert und das Filtrat im Vakuum konzentriert. Die flashchromatographische Reinigung (5 : 1 Toluol-Aceton) ergab 1.19 g (2.35 mmol, 89%) Methyl-6-amino-2,3,4-tri-*O*-benzoyl-6-desoxy- α -D-mannopyranosid (**21**) als farblosen Sirup.

TLC (5 : 1 Toluol-Aceton): $R_f = 0.12$ (UV, H_2SO_4); $[\alpha]_D^{20} = -51.7^\circ$ (c 0.89, $CHCl_3$);

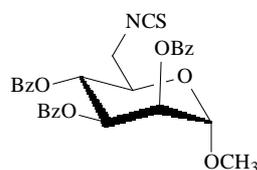
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8.13$ -7.23 (m, 15 H, aryl-CH); 5.92 (dd, 1 H, H-3); 5.83 (dd \approx t, 1 H, H-4); 5.67 (dd, 1 H, H-2); 4.97 (d, 1 H, H-1); 4.02 (ddd, 1 H, H-5); 3.52 (s, 3 H, OCH_3); 3.00-2.90 (m, 2 H, H-6, H-6'); 1.54 (br s, 1 H, NH) ppm;

$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{3,4} = 10.2$; $J_{4,5} = 10.2$; $J_{5,6'} = 3.6$; $J_{5,6''} = 6.6$ Hz;

^{13}C -NMR (100.67 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 165.96$, 165.48, 165.42 (3 C=O); 133.48, 133.43, 133.07 (3 aryl-CH); 129.93-128.19 (m, 15 C, aryl-CH, aryl- C_q); 98.58 (C-1); 71.36, 70.64, 69.84, 67.63 (C-2, -3, -4, -5); 55.35 (OCH_3); 42.54 (C-6) ppm;

m/z (FAB MS) 506.6 ($M^+ + H$. Ber. für $C_{28}H_{28}O_8N$: 506.2).

Methyl-2,3,4-tri-*O*-benzoyl-6-desoxy-6-isothiocyanato- α -D-mannopyranosid (**22**)



$C_{29}H_{25}O_8NS$

MW 547.58

0.50 g (0.9407 mmol) Methyl-6-azido-2,3,4-tri-*O*-benzoyl-6-desoxy- α -D-mannopyranosid (**20**) werden mit 3.3 ml CS_2 (4.16 g, 0.055 mmol) und 0.8 ml Triethylphosphit (0.77 g, 4.6 mmol) in 10 ml abs. Toluol gelöst und unter Rückfluß 10 h bei $80^\circ C$ gerührt. Nach Zugabe von 4 ml H_2O wird der Ansatz bei RT über Nacht belassen. Es wird dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert (50 ml), anschließend mit 2 N H_2SO_4 , nachfolgend mit ges. NaCl gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Die flashchromatographische Reinigung (4 : 1 Petrolether-Ethylacetat) ergaben 474 mg (0.87 mmol, 92%) Methyl-2,3,4-tri-*O*-benzoyl-6-desoxy-6-isothiocyanato- α -D-mannopyranosid (**22**) als weißen amorphen Feststoff.

TLC (2 : 1 Petrolether : Ethylacetat): $R_f = 0.41$ (UV, H_2SO_4);

mp $227^\circ C$; IR: ν [cm^{-1}] 2114 (NCS); $[\alpha]_D^{20} = -29.6$ (c 1.0, $CHCl_3$);

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8.15$ -7.24 (m, 15 H, aryl-CH); 5.90 (dd, 1 H, H-3); 5.82

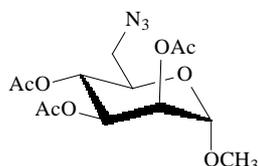
(dd \approx t, 1 H, H-4); 5.70 (dd, 1 H, H-2); 5.02 (d, 1 H, H-1); 4.25 (ddd, 1 H, H-5); 3.81 (dd, 1 H, H-6); 3.76 (dd, 1 H, H-6'); 3.58 (s, 3 H, OCH₃) ppm;

$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.1$; $J_{3,4} = 10.2$; $J_{4,5} = 10.2$; $J_{5,6} = 5.6$; $J_{5,6'} = 3.6$; $J_{6,6'} = 14.8$ Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, CDCl₃): $\delta = 165.55, 165.45, 165.36$ (3 C=O); 133.71-128.28 (18 aryl-CH, aryl-C_q); 98.85 (C-1); 70.10 (C-2); 69.45 (C-3); 69.29 (C-5); 67.73 (C-4); 56.00 (OCH₃); 46.18 (C-6) ppm (wegen der langen Relaxationszeit des NCS-Kohlenstoffes fehlt dessen Signal);

m/z (EI-MS) 548 (M⁺+H. Ber. für C₂₉H₂₆O₈NS: 548.14).

Methyl-2,3,6-tri-*O*-acetyl-6-azido-6-desoxy- α -D-mannopyranosid (**23**)



C₁₃H₁₉O₈N₃

MW 345.31

1.59 g (2.99 mmol) Methyl-6-azido-2,3,6-tri-*O*-benzoyl-6-desoxy- α -D-mannopyranosid (**20**) werden nach AAV 2 deacetyliert und nach AAV 1 acetyliert. Die flashchromatographische Reinigung (25 : 1 Toluol-Ethylacetat) ergab 930 mg (2.69 mmol, 90%) Methyl-2,3,6-tri-*O*-acetyl-6-azido-6-desoxy- α -D-mannopyranosid (**23**) als farblosen Sirup.

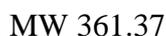
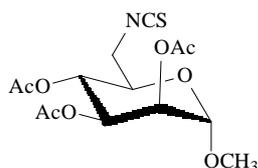
TLC (5 : 1 Toluol-Ethylacetat): R_f = 0.30 (UV, H₂SO₄);

$[\alpha]_D^{20} = +80.8^\circ$ (*c* 1.50; CHCl₃), Lit.,¹²² $+63^\circ$ (*c* 1, CHCl₃);

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.33$ (dd, 1 H, H-3); 5.31 (dd \approx t, 1 H, H-4); 5.24 (dd, 1 H, H-2); 4.73 (d, 1 H, H-1); 3.94 (ddd, 1 H, H-5); 3.45 (s, 3 H, OCH₃); 3.38 (dd, 1 H, H-6); 3.29 (dd, 1 H, H-6'); 2.16, 2.05, 2.00 (s, je 3 H, COCH₃) ppm;

$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{3,4} = 9.7$; $J_{4,5} = 10.2$; $J_{5,6} = 7.1$; $J_{5,6'} = 2.6$; $J_{6,6'} = 13.2$ Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, CDCl₃): $\delta = 169.97, 169.80, 169.77$ (3 CO); 98.36 (C-1); 69.87, 69.40, 68.75, 67.12 (C-2, -3, -4, -5); 55.37 (OCH₃); 51.02 (C-6); 20.81, 20.62, 20.59 (3 COCH₃) ppm.

Methyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-isothiocyanato- α -D-mannopyranosid (24)

898 mg (2.60 mmol) Methyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-azido-6-desoxy- α -D-mannopyranosid (**23**) werden mit 6 ml CS_2 (7.6 g, 0.10 mol) und 1.4 ml (1.34 g, 8.06 mmol) Triethylphosphit in 14 ml abs. Toluol gelöst und 6 h unter Feuchtigkeitsausschluß bei 80°C unter Rückfluß gerührt. Anschließend wird nach Zugabe von 50 ml Wasser 12 h bei RT belassen. Die wässr. Phase wird dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert, mit 2 N H_2SO_4 , dann mit ges. NaCl gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Die flashchromatographische Reinigung (5 : 1 Toluol-Ethylacetat) ergab 820 mg (2.27 mmol, 87%) Methyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-isothiocyanato- α -D-mannopyranosid (**24**) als weißen Feststoff.

TLC (2 : 1 Toluol-Ethylacetat): $R_f = 0.47$ (UV, H_2SO_4);

mp 120-121.5 °C, Lit.,⁷⁶ 114-115°C;

$[\alpha]_D^{20} = +70.1^\circ$ (c 0.95, CHCl_3); Lit.,⁷⁶ +62 °(c 1.1, CHCl_3);

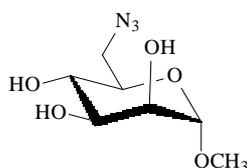
¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.35$ (dd, 1 H, H-3); 5.23 (dd, 1 H, H-2); 5.21 (dd \approx t, 1 H, H-4); 4.75 (d, 1 H, H-1); 3.95 (ddd, 1 H, H-5); 3.62 (m, 2 H, H-6, -6'); 3.46 (s, 3 H, OCH_3); 2.18, 2.07, 2.00 (3 s, je 3 H, 3 COCH_3) ppm;

$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{3,4} = 10.2$; $J_{4,5} = 9.7$ Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, CDCl_3): $\delta = 170.04, 169.85, 169.80$ (3 C=O); 98.54 (C-1); 69.32 (C-2); 69.06 (C-5); 68.61 (C-3); 67.28 (C-4); 55.79 (OCH_3); 46.18 (C-6); 20.89, 20.67, 20.64 (3 COCH_3) ppm (wegen der langen Relaxationszeit des NCS-Kohlenstoffes fehlt dessen Signal);

$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_8\text{NS}$ (361.37): Ber. C 46.53, H 5.30, N 3.88, S 8.87

Gef. C 46.55, H 5.31, N 3.86, S 8.84

Methyl-6-azido-6-desoxy- α -D-mannopyranosid (25)

Synthese nach⁷⁷,

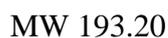
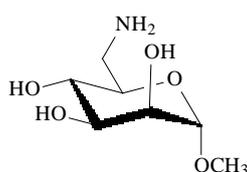
6.12 g (17.5 mmol) Methyl-6-tosyl- α -D-mannopyranosid (**18**) werden mit 5.36 g (82.5 mmol, 5 eq.) NaN_3 in 50 ml abs. DMF bei 80°C 18 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion (TLC) wird die Suspension im Vakuum bis zur Trockene eingedampft und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Vom überschüssigem NaN_3 und NaOTs wird abfiltriert, im Vakuum konzentriert und der Rückstand flashchromatographisch (19 : 1 Ethylacetat-MeOH) an Kieselgel gereinigt. Es konnten 3.85 g (17.57 mmol, quant.) Methyl-6-azido-6-desoxy- α -D-mannopyranosid (**25**) als farblosen Sirup isoliert werden.

TLC (7 : 3 *n*-PrOH-H₂O + 1% NH₃): $R_f = 0.47$ (H₂SO₄);

$[\alpha]_D^{20} = +63.4^\circ$ (*c* 1.60, CHCl₃); Lit.,¹²³ +70°;

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 4.74$ (br s, 1 H, H-1); 3.95 (br s, 1 H, H-2); 3.78 (m_c, 1 H, H-3); 3.69 (m_c, 2 H, H-4, -6); 3.56 (br s, 2 H, H-5, -6'); 3.42 (s, 3 H, OCH₃) ppm (Die Signale für H-6 und H-6' können auch vertauscht sein);

¹³C-NMR (125.77 MHz,): $\delta = 100.94$ (C-1); 71.56 (C-3); 71.28 (C-4); 70.65 (C-2); 68.08 (C-5); 55.17 (OCH₃); 51.29 (C-6) ppm.

Methyl-6-amino-6-desoxy- α -D-mannopyranosid (26)

1 g (4.25 mmol) Methyl-6-azido-6-desoxy- α -D-mannopyranosid werden mit 150 mg Pd/C (10%) in 20 ml 1 : 1 Ethylacetat- abs. EtOH suspendiert und unter H₂-Atmosphäre bei RT gerührt. Nach Beendigung der Reaktion (TLC) wird der Katalysator über Celite abfiltriert und im Vakuum konzentriert. Die säulenchromatographische Reinigung (9 : 1 MeOH-

Ethylacetat + 3% Pyridin) ergab 806 mg Methyl-6-amino-6-desoxy- α -D-mannopyranosid (**26**) (4.17 mmol, 98%) als weißen amorphen Feststoff.

TLC (7 : 3 *n*-PrOH-H₂O + 1% NH₃): R_f = 0.19 (H₂SO₄);

[α]_D²⁰ = +89.2° (*c* 1.06, MeOH), Lit.,¹²² +78° (*c* 1.2, MeOH);

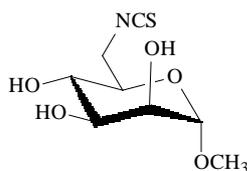
¹H-NMR (400 MHz, [D₄]-MeOH): δ = 4.67 (d, 1 H, H-1); 3.82 (dd, 1 H, H-2); 3.69 (dd, 1 H, H-3); 3.55 (dd \approx t, 1 H, H-4); 3.47 (ddd, 1 H, H-5); 3.42 (s, 3 H, OCH₃); 3.03 (dd, 1 H, H-6'); 2.83 (dd, 1 H, H-6) ppm;

J_{1,2} = 1.5; J_{2,3} = 3.6; J_{3,4} = 9.2; J_{4,5} = 9.7; J_{5,6} = 6.6; J_{5,6'} = 3.1; J_{6,6'} = 13.2 Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, [D₄]-MeOH): δ = 103.13 (C-1); 74.49 (C-5); 72.76 (C-3); 72.38 (C-2); 70.20 (C-4); 55.56 (OCH₃); 43.95 (C-6) ppm;

m/z (EI-MS) 194 (M⁺+H. Ber. für C₇H₁₆O₅N: 194.10).

Methyl-6-desoxy-6-isothiocyanato- α -D-mannopyranosid (**27**)



C₈H₁₃O₅NS

MW 235.25

Zu 280 mg (1.45 mmol) Methyl-6-amino-6-desoxy- α -D-mannopyranosid (**26**) gelöst in 20 ml 4 : 1 EtOH-H₂O werden in Gegenwart von DIPEA (3.4 ml, 2.59 g, 20 mmol) mit 1.11 ml (1.68 g, 14.5 mmol, 10 eq.) Thiophosgen zugetropft und der Ansatz 12 h bei RT gerührt. Nach der Konzentration im Vakuum wird flashchromatographisch (3 : 1 Toluol-MeOH) gereinigt, um 327 mg (1.39 mmol, 96%) Methyl-6-desoxy-6-isothiocyanato- α -D-mannopyranosid (**27**) als weißen amorphen Feststoff zu erhalten.

TLC (7 : 3 *n*-PrOH-H₂O + 1% NH₃): R_f = 0.65 (UV, H₂SO₄);

[α]_D²⁰ = +73.2° (*c* 1.06, MeOH), Lit.,⁷⁶ +71° (*c* 1.3, Aceton);

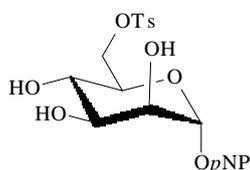
¹H-NMR (400 MHz, [D₄]-MeOH): δ = 4.71 (d, 1 H, H-1); 3.88 (dd, 1 H, H-6'); 3.84 (dd, 1 H, H-2); 3.77 (dd, 1 H, H-6); 3.68 (dd, 1 H, H-3); 3.66 (ddd, 1 H, H-5); 3.57 (dd \approx t, 1 H, H-4); 3.46 (s, 3 H, CH₃) ppm;

J_{1,2} = 1.5; J_{2,3} = 3.1; J_{3,4} = 9.2; J_{4,5} = 9.2; J_{5,6} = 7.1; J_{5,6'} = 2.5; J_{6,6'} = 14.8 Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, [D₄]-MeOH): δ = 133.91 (Cq, NCS); 103.29 (C-1); 73.12 (C-5); 72.64 (C-3); 72.21 (C-2); 69.80 (C-4); 55.92 (OCH₃); 47.83 (C-6) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 236.45 ($M^+ + H$. Ber. für $C_8H_{14}O_5NS$: 236.06), 258.44 ($M^+ + Na$. Ber. für $C_8H_{13}O_5NSNa$: 258.04), 274.39 ($M^+ + K$. Ber. für $C_8H_{13}O_5NSK$: 274.02).

***p*-Nitrophenyl-6-tosyl- α -D-mannopyranosid (29)**



$C_{19}H_{21}NO_{10}S$

MW 455.44

3.64 g (12.08 mmol) *p*-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid (**28**) werden mit 2.76 g TsCl (14.5 mmol, 1.2 mol eq.) nach AAV 3 tosyliert und das Rohprodukt flashchromatographisch (9 : 1 Ethylacetat-Toluol) gereinigt, um 3.16 g (6.94 mmol, 57%) *p*-Nitrophenyl-6-tosyl- α -D-mannopyranosid (**29**) als weißen amorphen Feststoff zu erhalten.

TLC (9 : 1 Ethylacetat-Toluol): $R_f = 0.33$ (UV, H_2SO_4);

$[\alpha]_D^{20} = +102.7^\circ$ (c 1.30, MeOH);

1H -NMR (400 MHz, $[D_4]$ -MeOH): $\delta = 8.19$ (d 2 H, *p*NP-CH, $^3J = 9.2$ Hz); 7.73 (d, 2 H, tosyl-CH, $^3J = 8.7$ Hz); 7.41 (d, 2 H, tosyl-CH, $^3J = 8.1$ Hz); 7.19 (d, 2 H, *p*NP-CH, $^3J = 9.2$ Hz); 5.58 (d, 1 H, H-1); 4.36 (dd, 1 H, H-6'); 4.24 (dd, 1 H, H-6); 4.05 (dd, 1 H, H-2); 3.86 (dd, 1 H, H-3); 3.69 (dd \approx t, 1 H, H-4); 3.64 (ddd, 1 H, H-5); 2.48 (s, 3 H, tosyl- CH_3) ppm;

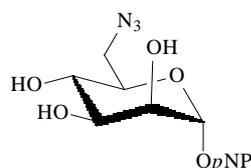
$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{3,4} = 8.7$; $J_{4,5} = 10.2$; $J_{5,6} = 6.6$; $J_{5,6'} = 1.5$; $J_{6,6'} = 11.2$ Hz;

^{13}C -NMR (100.67 MHz, $[D_4]$ -MeOH): $\delta = 162.73, 146.78, 144.22, 134.72$ (4 aryl- C_q); 131.22 (*m*-*p*NP-CH); 118.06 (*o*-*p*NP-CH); 129.30, 126.90 (2 tosyl-CH); 100.22 (C-1); 73.64, 72.43, 71.64, 68.09 (C-2, -3, -4, -5); 70.65 (C-6); 21.87 (tosyl- CH_3) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 456.23 ($M^+ + H$. Ber. für $C_{19}H_{22}NO_{10}S$: 456.096), 478.22 ($M^+ + Na$. Ber. für $C_{19}H_{21}NO_{10}SNa$: 478.078), 494.19 ($M^+ + K$. Ber. für $C_{19}H_{21}NO_{10}SK$: 494.052);

$C_{19}H_{21}O_{10}NS$ (455.44): Ber. C 50.11, H 4.65, N 3.08

Gef. C 50.14, H 4.68, N 3.04

***p*-Nitrophenyl-6-azido-6-desoxy- α -D-mannopyranosid (30)**C₁₂H₁₄O₇N₄

MW 326.27

1.67 g (3.667 mmol) *p*-Nitrophenyl-6-desoxy-6-tosyl- α -D-mannopyranosid (**29**) werden mit 1.20 g (18.3 mmol, 5 mol eq.) NaN₃ in 40 ml abs. DMF 8 h bei 70°C nach AAV 4 nucleophil substituiert. Die säulenchromatographische Reinigung (19 : 1 Ethylacetat-Toluol) ergab 1.09 g (3.34 mmol, 91%) *p*-Nitrophenyl-6-azido-6-desoxy- α -D-mannopyranosid als weißen amorphen Feststoff.

TLC (19 : 1 Ethylacetat-Toluol): R_f = 0.21 (UV, H₂SO₄);

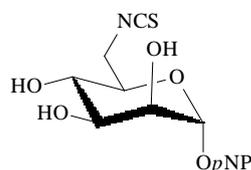
[α]_D²⁰ = +63.7 (*c* 0.87, MeOH);

¹H-NMR (400 MHz, [D₄]-MeOH): δ = 8.26, 7.32 (2 d, je 2 H, aryl-CH, ³*J* = 9.2 Hz); 5.73 (d, 1 H, H-1); 4.11 (dd, 1 H, H-2); 3.92 (dd, 1 H, H-3); 3.75 (dd \approx t, 1 H, H-4); 3.67 (ddd, 1 H, H-5); 3.47-3.46 (m, 2 H, H-6, -6') ppm;

*J*_{1,2} = 1.5; *J*_{2,3} = 3.6; *J*_{3,4} = 9.2; *J*_{4,5} = 9.2; *J*_{5,6} = 5.1; *J*_{5,6'} = 4.1; *J*_{6,6'} = 13.7 Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, [D₄]-MeOH): δ = 162.74 (*i*-aryl-C_q); 144.24 (*p*-aryl-C_q); 126.97, (*m*-aryl-CH); 117.93 (*o*-aryl-CH); 100.06 (C-1); 75.49 (C-5); 72.34 (C-3); 71.72 (C-2); 69.33 (C-4); 53.02 (C-6) ppm;

m/z (FAB MS) 327 (M⁺+H. Ber. für C₁₂H₁₅O₇N₄: 327.09).

***p*-Nitrophenyl-6-desoxy-6-isothiocyanato- α -D-mannopyranosid (31)**C₁₃H₁₄O₇N₂S

MW 342.32

800 mg (2.45 mmol) *p*-Nitrophenyl-6-azido-6-desoxy- α -D-mannopyranosid (**30**) werden mit 7.1 ml CS₂ (0.12 mol, 8.98 g) und 1.7 ml (8.51 mmol, 1.41 g) Triethylphosphit in 25 ml abs. DME bei 80°C gelöst und 5 h unter Rückfluß erhitzt. Nach der Zugabe von 100 ml H₂O wird 12 h bei RT belassen, anschließend erfolgt die dreimalige Extraktion der wässr. Phase mit CH₂Cl₂ (100 ml, 50 ml, 50 ml). Waschen der vereinigten organischen

Phasen mit 2 N H₂SO₄, nachfolgend mit ges. wässr. NaCl, Trocknen über MgSO₄, Filtration, Konzentration im Vakuum und säulenchromatographische Reinigung (1 : 1 Toluol-Ethylacetat) ergaben 395 mg (1.15 mmol, 47% bez. auf eingesetztes Edukt, 76% bez. auf umgesetztes Edukt) *p*-Nitrophenyl-6-desoxy-6-isothiocyanato- α -D-mannopyranosid (**31**) als weißen amorphen Feststoff. Es konnten 230 mg (0.71 mmol) *p*-Nitrophenyl-6-azido-6-desoxy- α -D-mannopyranosid zurückgewonnen werden.

TLC (2 : 1 Ethylacetat-Toluol): R_f = 0.74 (UV, H₂SO₄);

[α]_D²⁰ = +85.2° (c 0.86, MeOH);

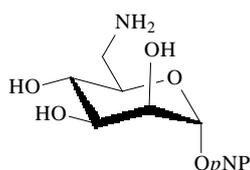
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.24 (d, 2 H, aryl-CH, ³J = 9.16 Hz); 7.20 (d, 2 H, aryl-CH, ³J = 9.16 Hz); 5.74 (d, 1 H, H-1); 4.56 (dd, 1 H, H-3); 4.24 (dd, 1 H, H-2); 4.21 (ddd, 1 H, H-5); 4.13 (dd, 2 H, H-6, -6'); 3.85 (dd \approx t, 1 H, H-4) ppm;

J_{1,2} = 1.5; J_{2,3} = 3.1; J_{3,4} = 9.7; J_{4,5} = 9.7; J_{5,6} = 7.1; J_{5,6'} = 2.5; J_{6,6'} = 12.2 Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, CDCl₃): δ = 160.32 (*i*-aryl-C_q); 143.05 (*p*-aryl-C_q); 134.09 (NCS); 126.11 (*m*-aryl-CH); 116.36 (*o*-aryl-CH); 97.08 (C-1); 75.16 (C-3); 70.12 (C-2); 69.85 (C-4); 65.89 (C-5); 65.75 (C-6) ppm;

m/z (FAB MS) 365 (M⁺+Na. Ber. für C₁₃H₁₄O₇N₂SNa: 365.04).

p-Nitrophenyl 6-amino-6-desoxy- α -D-mannopyranosid (**32**)



C₁₂H₁₆N₂O₇

MW 300.27

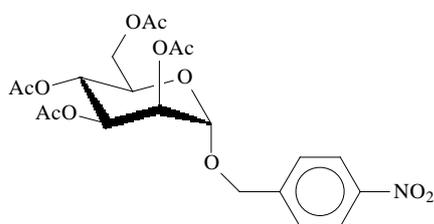
335 mg (1.03 mmol) *p*-Nitrophenyl-6-azido-6-desoxy- α -D-mannopyranosid (**30**) werden in 50 ml 4 : 1 THF-H₂O gelöst und nach Zugabe von 350 mg (1.33 mmol, 1.3 eq.) PPh₃ bei 45°C 12 h mit 1 g Kieselgel gerührt. Nach dem Einengen im Vakuum wird flashchromatographisch (1. 19:1 Ethylacetat-Toluol +3% Pyridin; 2. 2:1 Ethylacetat-MeOH + 3% Pyridin; 3. 4:1 MeOH- Ethylacetat 3% Pyridin) gereinigt, um 302 mg (1.01 mmol, 98%) *p*-Nitrophenyl-6-amino-6-desoxy- α -D-mannopyranosid (**32**) als gelblich amorphen Feststoff zu erhalten.

TLC (7 : 3 *n*-PrOH : H₂O + 1% NH₃): R_f = 0.34 (UV, H₂SO₄);

[α]_D²⁰ = +82.8° (c 0.50, MeOH);

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $[\text{D}_4]\text{-MeOH}$): δ = 8.27 (d, 2 H, *m*-aryl-CH, 3J = 9.2 Hz), 7.32 (d, 2 H, *o*-aryl-CH, 3J = 9.2 Hz); 5.71 (d, 1 H, H-1); 4.09 (dd, 1 H, H-2); 3.93 (dd, 1 H, H-3); 3.68 (dd \approx t, 1 H, H-4); 3.49 (ddd, 1 H, H-5); 2.97 (dd, 1 H, H-6'); 2.82 (dd, 1 H, H-6) ppm;
 $J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{3,4} = 9.2$; $J_{4,5} = 9.7$; $J_{5,6} = 7.1$; $J_{5,6'} = 3.1$; $J_{6,6'} = 13.2$ Hz;
 $^{13}\text{C-NMR}$ (100.67 MHz, $[\text{D}_4]\text{-MeOH}$): δ = 162.92 (*i*-aryl- C_q); 144.17 (*p*-aryl- C_q); 127.07 (*m*-aryl-CH); 117.93 (*o*-aryl-CH); 100.18 (C-1); 76.18 (C-5); 72.41 (C-3); 71.86 (C-2); 69.83 (C-4); 43.87 (C-6) ppm;
 m/z (MALDI-TOF) 301.14 (M^+ +H. Ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_7$: 301.10), 323.12 (M^+ +Na. Ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}$: 323.09), 339.10 (M^+ +K. Ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_7\text{K}$: 339.06).

p-Nitrobenzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (**33**)



$\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{O}_{12}\text{N}$

MW 483.43

1.03 g (2.08 mmol, 1.3 eq.) 1-*O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-trichloracetimidat (**11**) werden mit 245 mg (1.60 mmol) *p*-Nitrobenzylalkohol und Molsieb 4 Å in 50 ml abs. Acetonitril bei 0°C unter N_2 -Atmosphäre gelöst. Die Reaktion wird durch Zugabe von 150 μl einer 0.02 M TMS-OTf-Lösung (in abs. CH_2Cl_2) gestartet und 45 min bei 0°C, nachfolgend 1 h bei RT, dann nach Zugabe von weiteren 200 μl der TMS-OTf-Lösung über Nacht bei RT gerührt. Der Abbruch der Reaktion erfolgt durch Zufügen von 250 μl Triethylamin, anschließend wird der Ansatz nach Konzentration im Vakuum flash-chromatographisch (2 : 1 Petrolether-Ethylacetat) an Kieselgel gereinigt, um 696 mg (1.44 mmol, 90%) *p*-Nitrobenzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (**33**) als weißen amorphen Feststoff zu erhalten.

TLC (1 : 4 Petrolether-Ethylacetat): R_f = 0.60 (UV, H_2SO_4);

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +44.5^\circ$ (*c* 1.07, CHCl_3);

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.24 (d, 2 H, aryl-CH, 3J = 8.65 Hz); 7.53 (d, 2 H, aryl-CH, 3J = 8.65 Hz); 5.39 (dd, 1 H, H-3); 5.33 (dd, 1 H, H-2); 5.33 (dd \approx t, 1 H, H-4); 4.92 (d, 1 H, H-1); 4.84 (d, 1 H, benzyl-CHH, 2J = 13.23 Hz); 4.67 (d, 1 H, benzyl-CHH, 2J = 13.23 Hz); 4.29 (dd, 1 H, H-6); 4.11 (dd, 1 H, H-6'); 4.00 (ddd, 1 H, H-5); 2.16, 2.11, 2.05,

2.01 (4 s, je 3 H, COCH₃) ppm;

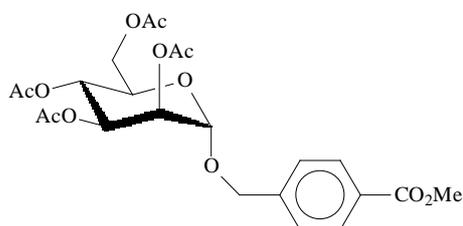
$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.1$; $J_{3,4} = 9.7$; $J_{4,5} = 9.7$; $J_{5,6} = 5.6$; $J_{5,6'} = 2.6$; $J_{6,6'} = 12.7$ Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.52, 169.99, 169.90, 169.63$ (4 C=O); 147.71 (*i*-aryl-C_q); 143.54 (*p*-aryl-C_q); 128.12 (*m*-aryl-CH); 123.83 (*o*-aryl-CH); 97.10 (C-1); 69.32 (C-4); 68.99 (C-5); 68.87 (C-3); 68.35 (benzyl-CH₂); 65.98 (C-2); 62.37 (C-6); 20.80, 20.70, 20.64, 20.63 (4 COCH₃) ppm;

C₂₁H₂₅O₁₂N (483.43): Ber. C 52.18, H 5.21, N 2.90

Gef. C 52.27, H 5.14, N 2.87

p-Methoxycarbonylbenzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (**35**)



C₂₃H₂₈O₁₂

MW 496.47

3.54 g (7.19 mmol, 1.3 mol eq.) 1-*O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-trichloracetimidat (**11**) werden mit 929 mg (5.52 mmol) Methoxycarbonyl-benzylalkohol und 1 g Molsieb (4 Å) unter N₂-Atmosphäre in 50 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst. Die Reaktion wird bei RT durch Zugabe von 2.5 ml einer 0.02 M TMS-OTf-Lösung (in abs. CH₂Cl₂) gestartet; nach 3 h werden weitere 1 ml der TMS-OTf-Lösung zugefügt und der Ansatz wird über Nacht gerührt. Der Abbruch der Reaktion erfolgt durch Zugabe von 300 μ l Triethylamin. Nach der Konzentration im Vakuum wird flashchromatographisch (1 : 1 Petrolether-Ethylacetat) an Kieselgel gereinigt, um 2.44 g (4.92 mmol, 89%) *p*-Methoxycarbonylbenzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (**35**) als farblosen Sirup zu erhalten.

TLC (1 : 1 Petrolether-Ethylacetat): R_f = 0.27 (UV, H₂SO₄);

TLC (7 : 3 *n*-PrOH-H₂O + 1% NH₃): R_f = 0.85 (UV, H₂SO₄);

$[\alpha]_D^{20} = +42.6^\circ$ (*c* 1.25, CHCl₃);

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.04$ (d, 2 H, *m*-aryl-CH, ³*J* = 8.2 Hz); 7.42 (d, 2 H, *o*-aryl-CH, ³*J* = 8.2 Hz); 5.39 (dd, 1 H, H-3); 5.31 (dd \approx t, 1 H, H-4); 5.31 (dd, 1 H, H-2); 4.90 (d, 1 H, H-1); 4.77 (d, 1 H, benzyl-CHH, ²*J* = 12.6 Hz); 4.63 (d, 1 H, benzyl-CHH, ²*J* = 12.6 Hz); 4.28 (dd, 1 H, H-6); 4.07 (dd, 1 H, H-6'); 4.00 (ddd, 1 H, H-5); 3.93 (s, 3 H,

CO₂CH₃); 2.15, 2.11, 2.04, 2.00 (4 s, je 3 H, 4 COCH₃) ppm;

$J_{1,2} = 1.6$; $J_{2,3} = 3.5$; $J_{3,4} = 10.1$; $J_{4,5} = 10.1$; $J_{5,6} = 3.6$; $J_{5,6'} = 2.5$; $J_{6,6'} = 12.3$ Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.54, 169.95, 169.85, 169.66$ (4 C_q, COCH₃);

166.68 (C_q, CO₂CH₃); 146.04 (*p*-aryl-C_q); 141.30 (*i*-aryl-C_q); 129.85 (*m*-aryl-CH); 127.59

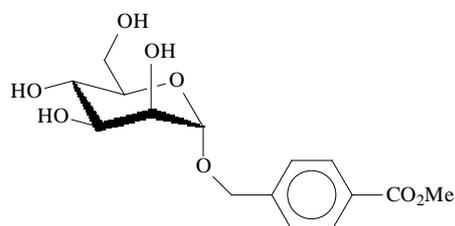
(*o*-aryl-CH); 96.98 (C-1); 69.44 (C-2); 69.09 (benzyl-CH₂); 69.01 (C-5); 68.82 (C-3);

66.06 (C-4); 62.36 (C-6); 52.11 (CO₂CH₃); 20.78, 20.76, 20.62, 20.60 (4 COCH₃) ppm;

C₂₃H₂₈O₁₂ (496.47): Ber. C 55.64, H 5.68

Gef. C 55.69, H 5.71

p-Methoxycarbonyl-benzyl- α -D-mannopyranosid (**36**)



C₁₅H₂₀O₈

MW 328.32

490 mg (0.99 mmol) *p*-Methoxycarbonylbenzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (**35**) werden nach AAV 2 deacetyliert und flashchromatographisch (10 : 1 Ethylacetat-MeOH) an Kieselgel gereinigt, um 230 mg (0.70 mmol, 71%) *p*-Methoxycarbonyl-benzyl- α -D-mannopyranosid (**36**) als weißen amorphen Feststoff zu erhalten.

TLC (7 : 3 *n*-PrOH : H₂O + 1% NH₃): R_f = 0.65 (UV, H₂SO₄);

$[\alpha]_D^{20} = +80.0^\circ$ (*c* 0.45, MeOH);

¹H-NMR (400 MHz, [D₄]-MeOH): $\delta = 8.04$ (d, 2H, *m*-aryl-CH, $J = 8.1$ Hz), 7.52 (d, 2H,

o-aryl-CH, $J = 8.7$ Hz), 4.90 (d, 1H, H-1), 4.87 (d, 1 H, benzyl-CHH, $J = 12.7$ Hz), 4.64

(d, 1H, benzyl-CHH, $J = 12.7$ Hz), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 3.91 (dd, 1H, H-2), 3.88 (dd, 1H,

H-6'), 3.79 (dd, 1H, H-3), 3.75 (dd, 1H, H-6), 3.67 (dd \approx t, 1H, H-4), 3.62 (ddd, 1H, H-5)

ppm;

$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{3,4} = 9.2$; $J_{4,5} = 9.7$; $J_{5,6} = 5.6$; $J_{5,6'} = 2.0$; $J_{6,6'} = 11.7$ Hz;

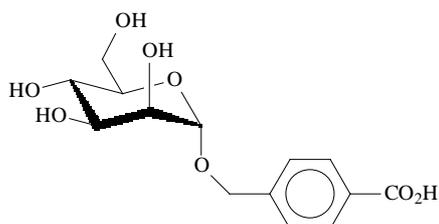
¹³C-NMR (100.67 MHz, [D₄]-MeOH): $\delta = 168.67$ (CO₂CH₃), 145.03 (*p*-aryl-C_q), 139.56

(*i*-aryl-C_q); 130.91 (*m*-aryl-CH), 128.99 (*o*-aryl-CH), 101.35 (C-1), 75.35 (C-5), 72.94

(C-3), 72.42 (C-2), 69.51 (benzyl-CH₂), 68.95 (C-4), 63.26 (C-6), 52.89 (COOCH₃) ppm;

C₁₅H₂₀O₈ (328.32): Ber. C 54.87, H 6.14

Gef. C 54.98, H 5.94

***p*-Carboxybenzyl- α -D-mannopyranosid (37)**C₁₄H₁₈O₈

MW 314.29

559 mg (1.13 mmol) *p*-Methoxycarbonylbenzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (**36**) werden in 25 ml 3 : 1 MeOH-H₂O gelöst und mit 5 ml einer 10% wässr. NaOH-Lösung versetzt und 3 h bei RT gerührt (TLC-Kontrolle). Nach Beendigung der Reaktion wird mit Ionenaustauscher Levatit SP 1080 H⁺ neutralisiert, filtriert und wiederholt mit MeOH kodestilliert, nachfolgend im Vakuum konzentriert. Die gelpermeationschromatographische Reinigung an Sephadex G-15 (Elution mit bidest. H₂O) ergab 333 mg (1.06 mmol, 94%) *p*-Carboxybenzyl- α -D-mannopyranosid (**37**) als weißes Lyophilisat.

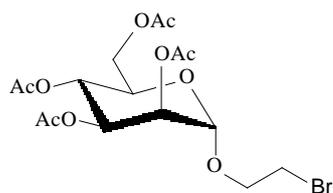
TLC (7 : 3 *n*-PrOH-H₂O + 1% NH₃): R_f = 0.53 (UV, H₂SO₄);

[α]_D²⁰ = +52.1° (*c* 1.13, DMSO);

¹H-NMR (400 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 7.83 (d, 2 H, *m*-aryl-CH, ³*J* = 7.6 Hz); 7.23 (d, 2 H, *o*-aryl-CH, ³*J* = 8.1 Hz); 4.68 (d, 1 H, H-1); 4.65 (d, 1 H, benzyl-CHH, ²*J* = 12.2 Hz); 4.40 (d, 1 H, benzyl-CHH, ²*J* = 12.2 Hz); 3.67 (dd, 1 H, H-6'); 3.64 (dd, 1 H, H-2); 3.54-3.41 (m, 3 H, H-3, -5, -6); 3.48 (dd \approx t, 1 H, H-4) ppm;

J_{1,2} = 1.5 Hz; J_{2,3} = 3.1 Hz; J_{4,5} = 9.2 Hz; J_{6,6'} = 12.2 Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 169.81 (CO₂H); 145.05 (*p*-aryl-C_q); 138.47 (*i*-aryl-C_q); 129.18 (*m*-aryl-CH), 126.74 (*o*-aryl-CH); 99.20 (C-1); 74.46, 71.23, 67.29 (C-3, -4, -5); 70.51 (C-2); 67.63 (benzyl-CH₂); 61.50 (C-6) ppm.

2-Bromomethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (39)C₁₆H₂₃O₁₀Br

MW 455.26

345 mg 2-Bromethanol (2.76 mmol) werden mit 1.63 g 1-*O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-trichloracetimidat (**11**)¹²⁴ (3.31 mmol, 1.2 eq.) in 50 ml abs. CH₂Cl₂

gelöst. Die Reaktion wird durch Zugabe von 4 Tropfen $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ gestartet und 15 h bei RT gerührt. Nach der Konzentration im Vakuum wird flashchromatographisch (4 : 1 Toluol-Ethylacetat) gereinigt, um 1.21 g (2.66 mmol, 96%) 2-Bromomethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (**39**) als weißen amorphen Feststoff zu erhalten.

TLC (1 : 2 Toluol-Ethylacetat): $R_f = 0.69$ (UV, H_2SO_4);

$[\alpha]_D^{20} = +37.3^\circ$ (c 0.75, CHCl_3);

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.32$ (dd, 1 H, H-3); 5.25 (dd \approx t, 1 H, H-4); 5.25 (dd, 1 H, H-2); 4.85 (d, 1 H, H-1); 4.24 (dd, 1 H, H-6); 4.11 (dd, 1 H, H-6'); 4.11 (m_c , 1 H, H-5); 3.91 (m_c , 2 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$); 3.49 (t, 2 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$, J 6.1 Hz); 2.13, 2.08, 2.03, 1.97 (4 s, je 3 H, COCH_3) ppm;

$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{3,4} = 9.7$; $J_{4,5} = 10.17$; $J_{5,6} = 6.1$; $J_{5,6'} = 2.04$; $J_{6,6'} = 12.7$ Hz;

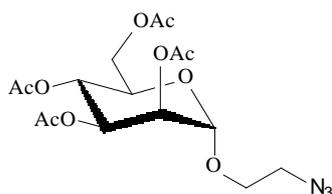
$^{13}\text{C-NMR}$ (100.67 MHz, CDCl_3): $\delta = 170.65, 170.04, 169.89, 169.78$ (4 COCH_3); 97.73 (C-1); 69.42, 69.00, 68.95, 68.48 (C-2, -3, -4, -5); 66.00 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$); 62.41 (C-6); 29.60 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$); 20.84, 20.73, 20.68, 20.65 (4 COCH_3) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 455.25 ($\text{M}^+ + \text{H}$. Ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_{10}\text{Br}$: 455.06), 477.23 ($\text{M}^+ + \text{Na}$. Ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_{10}\text{BrNa}$: 477.04); 493.18 ($\text{M}^+ + \text{K}$. Ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_{10}\text{BrK}$: 493.01);

$\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_{10}\text{Br}$ (455.26): Ber. C 42.21, H 5.09, Br 17.55

Gef. C 42.24, H 5.12, Br 17.45

2-Azidoethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (**40**)



$\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_{10}\text{N}_3$

MW 417.37

1.20 g (2.64 mmol) 2-Bromomethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (**39**) werden mit 1.37 g (21 mmol, 8 eq.) NaN_3 in 50 ml abs. DMF bei 60°C 15 h umgesetzt. Nach der Konzentration im Vakuum wird der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und filtriert. Das Filtrat wird nach der Konzentration im Vakuum flashchromatographisch (1 : 1-Petrolether-Ethylacetat) gereinigt, um 1.08 g (2.59 mmol, 98%) 2-Azidoethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (**40**) als weißen amorphen Feststoff zu erhalten.

TLC (1 : 2 Toluol-Ethylacetat): $R_f = 0.61$ (H_2SO_4);

$[\alpha]_D^{20} = +50.2^\circ$ (c 0.75, $CHCl_3$);

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.37$ (dd, 1H, H-3); 5.30 (dd \approx t, 1H, H-4); 5.28 (dd, 1 H, H-2); 4.88 (d, 1 H, H-1); 4.30 (dd, 1 H, H-6); 4.13 (dd, 1H, H-6'); 4.05 (ddd, 1 H, H-5); 3.88 (m_c , 1 H, OCHH); 3.68 (m_c , 1 H, OCHH); 3.48 (m_c , 2 H, CH_2N_3); 2.22, 2.11, 2.06, 2.00 (4 s, 3 H, 4 COCH₃) ppm;

$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.1$; $J_{3,4} = 10.2$; $J_{4,5} = 10.2$; $J_{5,6} = 5.6$; $J_{5,6'} = 2.5$; $J_{6,6'} = 12.2$ Hz;

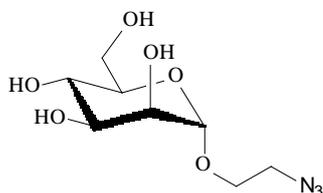
^{13}C -NMR (100.67 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 170.59, 169.98, 169.78, 169.73$ (4 COCH₃); 97.74 (C-1); 69.38 (C-2); 68.85 (C-3, -5); 67.02 (OCH₂CH₂); 66.01 (C-4); 62.45 (C-6); 50.34 (CH₂N₃); 20.83, 20.70, 20.67, 20.62 (4 COCH₃) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 418.36 ($M^+ + H$. Ber. für $C_{16}H_{24}O_{10}N_3$: 418.15), 440.37 ($M^+ + Na$. Ber. für $C_{16}H_{23}O_{10}N_3Na$: 440.13), 456.31 ($M^+ + K$. Ber. für $C_{16}H_{23}O_{10}N_3K$: 456.10);

$C_{16}H_{23}O_{10}N_3$ (417.37): Ber. C 46.04, H 5.55, N 10.07

Gef. C 46.09, H 5.58, N 10.02

2-Azidoethyl- α -D-mannopyranosid (41)



$C_8H_{15}O_6N_3$

MW 249.22

810 mg (1.94 mmol) 2-Azidoethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (40) werden nach AVV 2 deacetyliert, um 481 mg 2-Azidoethyl- α -D-mannopyranosid (41) (1.93 mmol, quant.) als weißen amorphen Feststoff zu erhalten.

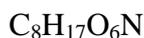
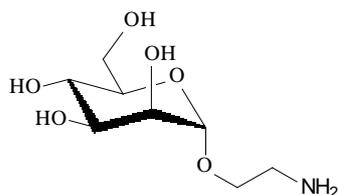
TLC (7 : 3 *n*-PrOH- H_2O + 1% NH_3): $R_f = 0.61$ (H_2SO_4);

$[\alpha]_D^{20} = +139.2^\circ$ (c 0.50, $CHCl_3$);

1H -NMR (400 MHz, MeOD): $\delta = 4.82$ (d, 1 H, H-1); 3.88 (dd, 1 H, H-3); 3.86 (dd \approx t, 1 H, H-4); 3.84 (dd, 1 H, H-2); 3.74 (dd, 1 H, H-6'); 3.71 (dd, 1 H, H-6); 3.62-3.57 (m, 3 H, OCH₂CH₂, H-5); 3.40-3.36 (m, 2 H, OCH₂N₃) ppm;

$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{3,4} = 10.7$; $J_{4,5} = 9.2$; $J_{5,6} = 5.6$; $J_{5,6'} = 2.1$; $J_{6,6'} = 12.2$ Hz;

^{13}C -NMR (100.67 MHz, $[D_4]$ -MeOH): $\delta = 102.03$ (C-1); 74.88, 72.86, 72.39, 68.88 (C-2, -3, -4, -5); 68.07 (OCH₂CH₂); 63.21 (C-6); 52.03 (CH₂N₃) ppm.

2-Aminoethyl- α -D-mannopyranosid (42)

420 mg (1.69 mmol) 2-Azidoethyl- α -D-mannopyranosid (**41**) werden mit 42 mg Pd/C (10%ig) in 50 ml 1 : 1 Ethylacetat-abs. EtOH nach AAV 5 hydriert und anschließend flashchromatographisch (6 : 4 ⁱPrOH-H₂O) an Kieselgel gereinigt, um 370.2 mg (1.66 mmol, 98%) 2-Aminoethyl- α -D-mannopyranosid (**42**) als farblosen Sirup zu erhalten.

TLC (7 : 3 ⁱPrOH-H₂O + 1% NH₃): R_f=0.04 (H₂SO₄);

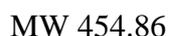
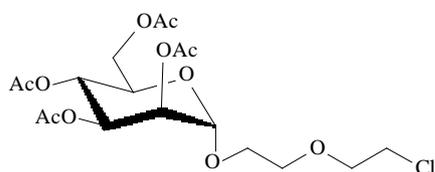
[α]_D²⁰ = +84.5° (c 1.20, MeOH);

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 4.72 (d, 1 H, H-1); 3.82 (dd, 1 H, H-2); 3.74 (dd, 1 H, H-6'); 3.68 (dd, 1 H, H-3); 3.61 (dd \approx t, 1 H, H-4); 3.61 (dd, 1 H, H-6); 3.50 (m_c, 2 H, OCH₂CH₂NH₂); 3.38 (ddd, 1 H, H-5); 2.74-2.63 (m, 2 H, OCH₂CH₂NH₂) ppm;

J_{1,2} = 1.5; J_{2,3} = 3.6; J_{3,4} = 9.7; J_{4,5} = 10.7; J_{5,6} = 6.1; J_{5,6'} = 1.5; J_{6,6'} = 12.2 Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, D₂O): δ = 100.23 (C-1); 73.08, 70.90, 70.38, 67.16 (C-2, -3, -4, -5); 67.16 (OCH₂CH₂NH₂); 61.31 (C-6); 40.29 (OCH₂CH₂NH₂) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 224.33 (M⁺+H. Ber. für C₈H₁₈O₆N: 224.11), 246.25 (M⁺+Na. Ber. für C₈H₁₇O₆NNa: 246.10), 262.18 (M⁺+K. Ber. für C₈H₁₇O₆NK: 262.07).

2-(2-Chlorethoxy)-ethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosid (44)

3.31 g (6.72 mmol, 1.2 eq.) 1-O-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-trichloracetimidat (**11**) und 698 mg (5.60 mmol) 2-(2-Chlorethoxy)-ethanol (**43**) werden in 60 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst und die Reaktion wird durch Zugabe von 0.2 ml einer 0.02 M TMS-Otf-Lösung gestartet. Der Ansatz wird 2 Tage bei RT gerührt (nach 4 h werden weitere 0.4 ml einer 0.02 M TMS-Otf-Lösung zugegeben). Nach der Konzentration im Vakuum wird

flashchromatographisch gereinigt (3 : 1 Toluol-Ethylacetat), um 2.35 g (5.16 mmol, 92%) 2-(2-Chlorethoxy)-ethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (**44**) als farbloser Sirup zu erhalten.

TLC (1 : 2 Toluol-Ethylacetat): $R_f = 0.63$ (H_2SO_4);

$[\alpha]_D^{20} = +120.5^\circ$ (c 0.75, $CHCl_3$);

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.37$ (dd, 1H, H-3); 5.29 (dd \approx t, 1H, H-4); 5.27 (dd, 1H, H-2); 4.89 (d, 1H, H-1); 4.29 (dd, 1H, H-6); 4.11 (dd, 1H, H-6'); 4.13-4.10 (m, 1H, H-5); 3.86-3.81 (m, 1H, $OCHHCH_2OCH_2CH_2Cl$); 3.77-3.75 (m, 2H, $OCH_2CH_2OCH_2CH_2Cl$); 3.71-3.69 (m, 3H, $OCHHCH_2OCH_2CH_2Cl$); 3.63 (t, 2H, $OCH_2CH_2OCH_2CH_2Cl$, $J = 5.7$ Hz); 2.16, 2.11, 2.04, 1.99 (4 s, je 3H, 4 $COCH_3$) ppm;

$J_{1,2} = 1.6$; $J_{2,3} = 3.5$; $J_{3,4} = 9.8$; $J_{4,5} = 9.8$; $J_{5,6} = 6.6$; $J_{5,6'} = 2.2$; $J_{6,6'} = 12.6$ Hz;

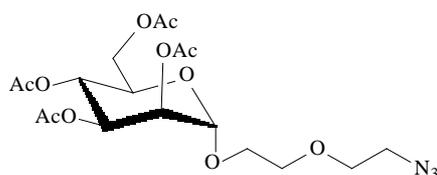
^{13}C -NMR (100.67 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 170.64, 170.02, 169.89, 169.73$ (4 $COCH_3$); 97.61 (C-1); 71.37 ($OCH_2CH_2OCH_2CH_2Cl$); 70.05 ($OCH_2CH_2OCH_2CH_2Cl$); 69.52 (C-2); 69.06 (C-3); 68.39 (C-5); 67.13 ($OCH_2CH_2OCH_2CH_2Cl$); 66.13 (C-4); 62.43 (C-6); 42.80 (OCH_2CH_2Cl); 20.85, 20.72, 20.65, 20.64 (4 $COCH_3$) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 477.04 ($M^+ + Na$. Ber. für $C_{18}H_{27}O_{11}ClNa$: 477.11), 493.02 ($M^+ + K$. Ber. für $C_{18}H_{27}O_{11}ClK$ 493.09);

$C_{18}H_{27}O_{11}Cl$ (454.86): Ber. C 47.53, H 5.98, Cl 7.79

Gef. C 47.57, H 6.04, Cl 7.72

2-(2-Azidoethoxy)-ethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (**45**)



$C_{18}H_{27}O_{11}N_3$

MW 461.43

1.60 g (3.52 mmol) 2-(2-Chloroethoxy)-ethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (**44**) werden mit 8 eq. NaN_3 (1.83 g, 28.15 mmol) in 60 ml abs. DMF bei $50^\circ C$ 16 h umgesetzt. Nach beendeter Reaktion wird im Vakuum konzentriert, der Rückstand mit Ethylacetat aufgenommen und vom überschüssigen $NaN_3/NaCl$ abfiltriert. Die flashchromatographische Reinigung (1 : 1 Petrolether-Ethylacetat) ergab 1.62 g (3.52 mmol, quant.) 2-(2-Azidoethoxy)-ethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (**45**) als farblosen Sirup.

TLC (1 : 2 Toluol-Ethylacetat): $R_f = 0.52$ (H_2SO_4);

$[\alpha]_D^{20} = +105.7^\circ$ (c 0.60, $CHCl_3$);

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.38$ (dd, 1H, H-3); 5.29 (dd \approx t, 1 H, H-4); 5.28 (dd, 1 H, H-2); 4.89 (d, 1 H, H-1); 4.29 (dd, 1 H, H-6); 4.11 (dd, 1 H, H-6'); 4.08 (ddd, 1 H, H-5); 3.88-3.81 (m, 1 H, $OCHHCH_2OCH_2CH_2Cl$); 3.69-3.67 (m, 5 H, $OCHHCH_2OCH_2CH_2Cl$); 3.40 (t, 2 H, $OCH_2CH_2OCH_2CH_2Cl$, $J = 5.1$ Hz); 2.16, 2.11, 2.04, 2.00 (4 s, je 3 H, 4 $COCH_3$) ppm;

$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{3,4} = 10.2$; $J_{4,5} = 10.2$; $J_{5,6} = 5.1$; $J_{5,6'} = 2.6$; $J_{6,6'} = 12.2$ Hz;

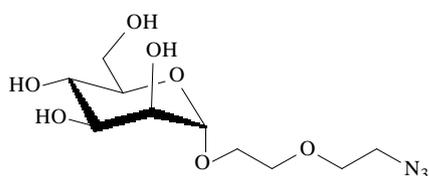
^{13}C -NMR (100.67 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 170.64, 170.02, 169.89, 169.74$ (4 $COCH_3$); 97.71 (C-1); 70.17 ($OCH_2CH_2OCH_2CH_2Cl$); 70.04 ($OCH_2CH_2OCH_2CH_2Cl$); 69.52 (C-2); 69.06 (C-3); 68.42 (C-5); 67.28 ($OCH_2CH_2OCH_2CH_2Cl$); 66.13 (C-4); 62.43 (C-6); 50.71 (OCH_2CH_2Cl); 20.85, 20.70, 20.65, 20.64 (4 $COCH_3$) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 484.05 ($M^+ + Na$. Ber. für $C_{18}H_{27}O_{11}N_3Na$: 484.15); 500.02 ($M^+ + K$. Ber. für $C_{18}H_{27}O_{11}N_3K$: 500.13);

$C_{18}H_{27}O_{11}N_3$ (461.43): Ber. C 46.85, H 5.90, N 9.11

Gef. C 46.87, H 5.96, N 9.10

2-(2-Azidoethoxy)-ethyl- α -D-mannopyranosid (46)



$C_{10}H_{19}O_7N_3$

MW 293.28

1.42 g (3.08 mmol) 2-(2-Azidoethoxy)-ethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (**45**) werden nach AAV 2 deacetyliert, um 891 mg (3.04 mmol, 99%) 2-Azidoethyl- α -D-mannopyranosid (**46**) als farblosen Sirup zu erhalten.

TLC (7 : 3 *n*-PrOH- H_2O + 1% NH_3): $R_f = 0.59$ (H_2SO_4);

$[\alpha]_D^{20} = +62.9^\circ$ (c 1.05, MeOH);

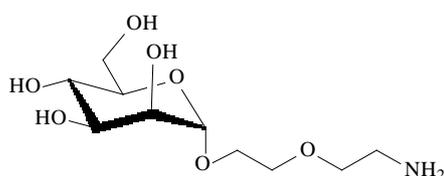
1H -NMR (400 MHz, $[D_4]$ -MeOH): $\delta = 4.84$ (d, 1 H, H-1); 3.91 (dd, 1 H, H-3); 3.88 (dd \approx t, 1 H, H-4); 3.87 (dd, 1 H, H-2); 3.75 (dd, 1 H, H-6'); 3.73 (dd, 1 H, H-6); 3.74-3.63 (m, 6 H, 3 OCH_2); 3.61 (ddd, 1H, H-5); 3.43-3.39 (m, 2 H, CH_2N_3) ppm;

$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{3,4} = 9.2$; $J_{4,5} = 9.2$; $J_{5,6} = 5.1$; $J_{5,6'} = 2.5$; $J_{6,6'} = 12.2$ Hz;

^{13}C -NMR (100.67 MHz, $[D_4]$ -MeOH): $\delta = 102.11$ (C-1); 74.90, 72.85, 72.39, 68.86 (C-2,

-3, -4, -5); 71.55, 71.47 (2 OCH₂); 68.16 (OCH₂CH₂N₃); 63.20 (C-6); 52.03 (CH₂N₃) ppm;
 m/z (MALDI-TOF) 316.18 (M⁺+Na. Ber. für C₁₀H₁₉O₇N₃Na: 316.11); 332.14 (M⁺+K. Ber.
 für C₁₀H₁₉O₇N₃Na: 332.09).

2-(2-Aminoethoxy)-ethyl- α -D-mannopyranosid (**47**)



C₁₀H₂₁O₇N

MW 267.28

521 mg (1.78 mmol) 2-(2-Azidoethoxy)-ethyl- α -D-mannopyranosid (**46**) werden nach AAV 5 hydriert. Die flashchromatographische Reinigung (8 : 2 *i*-PrOH-H₂O) an Kieselgel ergab 465 mg (1.74 mmol, 98%) 2-(2-Aminoethoxy)-ethyl- α -D-mannopyranosid (**47**) als farblosen Sirup.

TLC (7 : 3 *n*-PrOH-H₂O + 1% NH₃): R_f = 0.07 (H₂SO₄);

[α]_D²⁰ = +57.2° (*c* 0.75, H₂O);

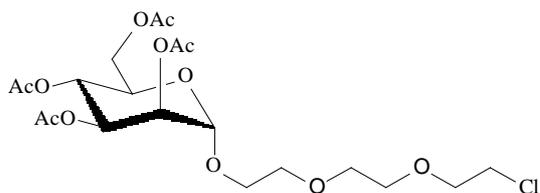
¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 4.74 (d, 1 H, H-1); 3.81 (dd, 1 H, H-2); 3.75-3.54 (m, 6 H, H-3, -4, -5, -6, -6', OCHH); 3.52-3.49 (m, 3 H, COCH₂CH₂O); 3.47-3.43 (m, 2 H, OCH₂); 2.66 (t, 2 H, CH₂NH₂, *J* = 5.6 Hz) ppm;

*J*_{1,2} = 1.5; *J*_{2,3} = 3.6 Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, D₂O): δ = 100.31 (C-1); 73.15, 70.88, 70.34, 67.12 (C-2, -3, -4, -5); 72.23(OCH₂CH₂O); 69.69 (OCH₂CH₂NH₂); 66.81(COCH₂CH₂); 61.30(C-6); 40.16 (OCH₂CH₂NH₂) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 268.29 (M⁺+H. Ber. für C₁₀H₂₂O₇N: 268.14), 290.25 (M⁺+Na. Ber. für C₁₀H₂₁O₇NNa: 290.12), 306.20 (M⁺+K. Ber. für C₁₀H₂₁O₇NK: 306.10).

2-[2-(2-Chlorethoxy)-ethoxy]-ethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (49)



$C_{20}H_{31}O_{12}Cl$

MW 498.91

2.36 g (4.79 mmol, 1.2 eq.) 1-*O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-trichloracetimidat (**11**) und 673 mg (3.99 mmol) 2-[2-(2-Chlorethoxy)-ethoxy]-ethanol (**48**) werden in 50 ml abs. CH_2Cl_2 gelöst und die Reaktion wird durch Zugabe von 50 μ l einer 0.02 M TMS-Otf-Lösung gestartet. Der Ansatz wird 12 h bei RT gerührt (nach 1 h werden weitere 300 μ l einer 0.02 M TMS-Otf-Lösung zugegeben). Stop der Reaktion durch Zugabe von 200 μ l Triethylamin. Nach der Konzentration im Vakuum wird flashchromatographisch (1 : 1 Petrolether-Ethylacetat) gereinigt, um 1.78 g (3.56 mmol, 89%) 2-[2-(2-Chlor-ethoxy)-ethoxy]-ethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (**49**) als farblosen Sirup zu erhalten.

TLC (2 : 1 Ethylacetat-Toluol): $R_f = 0.43$ (H_2SO_4);

$[\alpha]_D^{20} = +119.1^\circ$ (c 0.30, $CHCl_3$);

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.36$ (dd, 1H, H-3); 5.29 (dd \approx t, 1 H, H-4); 5.27 (dd, 1 H, H-2); 4.88 (d, 1 H, H-1); 4.30 (dd, 1 H, H-6); 4.11 (dd, 1 H, H-6'); 4.07 (ddd, 1 H, H-5); 3.86-3.76 (m, 3 H, $OCHHCH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2Cl$); 3.70-3.63 (m, 9 H, $OCHHCH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2Cl$); 2.16, 2.11, 2.06, 1.99 (4 s, 3 H, 4 $COCH_3$) ppm;

$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{3,4} = 10.2$; $J_{4,5} = 10.2$; $J_{5,6} = 5.1$; $J_{5,6'} = 2.3$; $J_{6,6'} = 12.2$ Hz;

^{13}C -NMR (100.67 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 170.65, 170.01, 169.87, 169.70$ (4 $COCH_3$); 97.69 (C-1); 71.36 ($OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2Cl$); 70.70, 70.63, 70.01 (3 C, $OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2Cl$); 69.56 (C-2); 69.04 (C-3); 68.39 (C-5); 67.36 ($OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2Cl$); 66.13 (C-4); 62.39 (C-6); 42.73 (OCH_2CH_2Cl); 20.87, 20.72, 20.67, 20.65 (4 $COCH_3$) ppm;

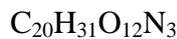
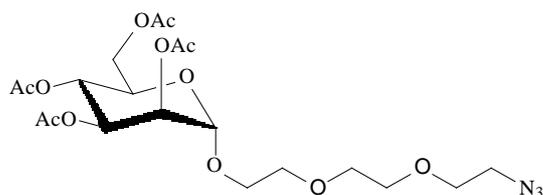
m/z (MALDI-TOF) 521.82 ($M^+ + Na$. Ber. für $C_{20}H_{31}O_{12}ClNa$: 521.14), 537.63 ($M^+ + K$.

Ber. für $C_{20}H_{31}O_{12}ClK$: 537.11);

$C_{20}H_{31}O_{12}Cl$ (498.91): Ber. C 48.15, H 6.26, Cl 7.11

Gef. C 48.13, H 6.28, Cl 7.05

2-[2-(2-Azidoethoxy)-ethoxy]-ethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (50)



1.02 g (2.05 mmol) 2-[2-(2-Chlorethoxy)-ethoxy]-ethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (**49**) werden in 70 ml abs. DMF gelöst und mit 1.06 g NaN_3 (16.4 mmol, 8 mol eq.) bei 50°C 2 Tage umgesetzt. Nach der Konzentration im Vakuum wird flash-chromatographisch (1 : 1 Petrolether-Ethylacetat) gereinigt, um 1.02 g (2.02 mmol, 99%) 2-[2-(2-Azidoethoxy)-ethoxy]-ethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (**50**) als farblosen Sirup zu erhalten.

TLC (2 : 1 Ethylacetat-Toluol): $R_f = 0.36$ (H_2SO_4);

$[\alpha]_D^{20} = +61.5^\circ$ (c 0.22, CHCl_3);

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.37$ (dd, 1H, H-3); 5.29 (dd \approx t, 1 H, H-4); 5.27 (dd, 1 H, H-2); 4.88 (d, 1 H, H-1); 4.30 (dd, 1 H, H-6); 4.10 (dd, 1 H, H-6'); 4.07 (ddd, 1 H, H-5); 3.86-3.76 (m, 1 H, $\text{OCHHCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$); 3.71-3.65 (m, 9 H, $\text{OCHHCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$); 3.40 (t, 2 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$, $J = 5.1$ Hz); 2.16, 2.11, 2.05, 1.99 (4 s, je 3 H, 4 COCH_3) ppm;

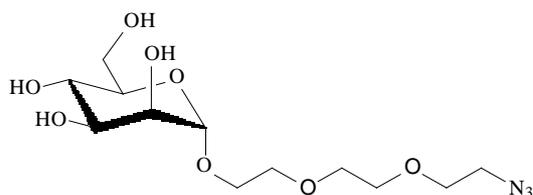
$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{3,4} = 10.2$; $J_{4,5} = 9.7$; $J_{5,6} = 4.6$; $J_{5,6'} = 2.6$; $J_{6,6'} = 12.2$ Hz;

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.67 MHz, CDCl_3): $\delta = 170.61, 169.97, 169.82, 169.67$ (4 COCH_3); 97.65 (C-1); 70.72 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$); 70.62, 70.02, 69.99 (3 C, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$); 69.498 (C-2); 69.00 (C-3); 68.34 (C-5); 67.33 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$); 66.08 (C-4); 62.339 (C-6); 50.59 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$); 20.82, 20.67, 20.62, 20.61 (4 COCH_3) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 528.18 ($\text{M}^+ + \text{Na}$. Ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_{12}\text{N}_3\text{Na}$: 528.18), 544.11 ($\text{M}^+ + \text{K}$. Ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_{12}\text{N}_3\text{K}$: 544.15);

$\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_{12}\text{N}_3$ (505.48): Ber. C 47.52, H 6.18, N 8.31

Gef. C 47.55, H 6.21, N 8.29

2-[2-(2-Azidoethoxy)-ethoxy]-ethyl- α -D-mannopyranosid (51)C₁₂H₂₃O₈N₃

MW 337.33

650 mg (1.29 mmol) 2-[2-(2-Azidoethoxy)-ethoxy]-ethyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosid (**50**) werden nach AAV 2 deacetyliert und flashchromatographisch (7 : 3-*i*PrOH/H₂O + 1%NH₃) an Kieselgel gereinigt, um 423 mg (1.25 mmol, 97%) 2-[2-(2-Azidoethoxy)-ethoxy]-ethyl- α -D-mannopyranosid (**51**) als farblosen Sirup zu erhalten.

TLC (7 : 3 *n*-PrOH-H₂O + 1% NH₃): R_f = 0.60 (H₂SO₄);

[α]_D²⁰ = +89.1° (c 0.74, MeOH);

¹H-NMR (400 MHz, [D₄]-MeOH): δ = 4.84 (d, 1H, H-1); 3.89 (dd, 1 H, H-3); 3.89 (dd \approx t, 1 H, H-4); 3.85 (dd, 1H, H-2); 3.79-3.63 (m, 12 H, H-6, -6', 5 CH₂); 3.60 (ddd, 1 H, H-5); 3.43-3.39 (m, 2 H, CH₂N₃) ppm;

J_{1,2} = 1.5; J_{2,3} = 3.6; J_{3,4} = 10.7; J_{4,5} = 9.2; J_{5,6} = 5.6; J_{5,6'} = 2.0; J_{6,6'} = 11.2 Hz;

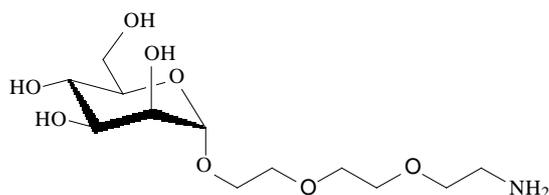
¹³C-NMR (100.67 MHz, [D₄]-MeOH): δ = 102.05 (C-1); 74.90 (C-5); 72.87 (C-2); 72.41 (C-3); 72.01, 71.85, 71.74, 71.49 (4 OCH₂); 68.90 (C-4); 68.09 (COCH₂); 63.23 (C-6); 52.06 CH₂N₃) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 338.34 (M⁺+H. Ber. für C₁₂H₂₄O₈N₃: 338.16), 360.32 (M⁺+Na. Ber. für C₁₂H₂₃O₈N₃Na: 360.14), 376.40 (M⁺+K. Ber. für C₁₂H₂₃O₈N₃K: 376.11);

C₁₂H₂₃O₈N₃ (337.33): Ber. C 42.73, H 6.87, N 12.46

Gef. C 42.75, H 6.90 N 12.42

2-[2-(2-Aminoethoxy)-ethoxy]-ethyl- α -D-mannopyranosid (52)



$C_{12}H_{25}NO_8$

MW 311.33

380 mg (1.13 mmol) 2-[2-(2-Azidoethoxy)-ethoxy]-ethyl- α -D-mannopyranosid (**51**) werden nach AAV mit 60 mg Pd/C (10%) umgesetzt, um 345 mg (1.11 mmol, 98%) 2-[2-(2-Aminoethoxy)-ethoxy]-ethyl- α -D-mannopyranosid (**52**) als farblosen Sirup zu erhalten.

TLC (7 : 3 *i*-PrOH-H₂O + 1% NH₃): R_f=0.05 (H₂SO₄); $[\alpha]_D^{20} = +32.6^\circ$ (*c* 0.60, MeOH);

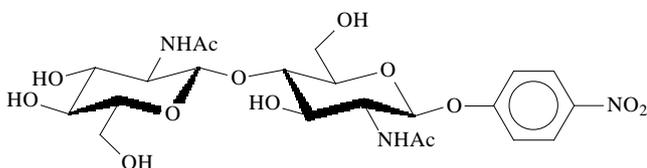
¹H-NMR (400 MHz, [D₄]-MeOH): $\delta = 4.87$ (d, 1H, H-1); 3.89 (dd, 1 H, H-3); 3.88 (dd \approx t, 1 H, H-4); 3.85 (dd, 1H, H-2); 3.79-3.62 (m, 12 H, H-6, -6', 5 CH₂); 3.58 (ddd, 1 H, H-5); 3.40 (m, 2 H, OCH₂CH₂NH₂) ppm;

$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{3,4} = 9.2$; $J_{4,5} = 10.2$; $J_{5,6} = 5.1$; $J_{5,6'} = 2.5$; $J_{6,6'} = 12.2$ Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, [D₄]-MeOH): $\delta = 102.00$ (C-1); 74.94 (C-5); 73.23 (OCH₂); 72.85 (C-2); 72.40 (C-3); 71.82, 71.61, 70.88 (3 OCH₂); 68.93 (C-4); 67.85 (COCH₂CH₂); 63.23 (C-6); 41.68 (CH₂NH₂) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 312.23 (M⁺+H. Ber. für C₁₂H₂₆NO₈: 312.17), 334.21 (M⁺+Na. Ber. für C₁₂H₂₅NO₈Na: 334.15), 350.17 (M⁺+K. Ber. für C₁₂H₂₅NO₈K: 350.12).

***p*-Nitrophenyl-2-acetamido-4-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucofuranosyl)-2-desoxy- β -D-glucofuranosid (57)**



$C_{22}H_{31}O_{13}N_3$

MW 545.50

250mg (0.77 mmol) *p*-Nitrophenyl-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glycopyranosid (**56**) werden mit 400 mg (3.03 mmol) (NH₄)₂SO₄ in 5 ml McIlvaine-Puffer (pH 5.5) bei 50°C gelöst und 1.5 ml Acetonitril werden zugefügt. Die Lösung wird bei 37°C inkubiert und bei pH 5.5 werden 15 U β -*N*-Acetylhexosaminidase von *A. oryzae*¹²⁵ zugegeben. Nach

1.5 h werden weitere 5 U β -*N*-Acetylhexosaminidase zugefügt und die Reaktion nach insgesamt 2 h durch kurzzeitiges Erhitzen im kochenden Wasserbad für 10 min gestoppt. Acetonitril wird im Vakuum abdestilliert, die Lösung mit 50 ml H₂O verdünnt und einer Festphasenextraktion an XAD-4 (15 x 4 cm) unterworfen. Nach Spülen mit bidest. H₂O werden *p*NP-haltige Verbindungen mit MeOH eluiert und nach Konzentration im Vakuum gelpermeationschromatographisch (4 : 1 MeOH-H₂O, 113 x 2.6 cm) an Sephadex LH-20 gereinigt. Die Chromatographie erbrachte 33 mg (0.061 mmol, 21% bez. auf umgesetztes Edukt **56**) *p*-Nitrophenyl-2-acetamido-4-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (**57**) und 155 mg (0.475 mmol) des Eduktes **56**.

$m_p = 224\text{--}226^\circ\text{C}$; Lit.,⁹⁰ $226\text{--}227^\circ\text{C}$ (Zers.);

TLC (7 : 3 *n*-PrOH-H₂O + 1% NH₃): $R_f = 0.53$ (UV, H₂SO₄);

$[\alpha]_D^{20} = -25^\circ$ (*c* 0.5, DMSO); Lit.,⁹⁰ -21° (*c* 0.24, 70% MeOH in H₂O);

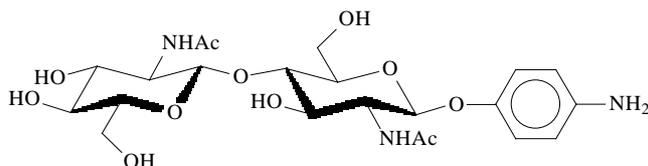
¹H-NMR (400 MHz, [D₄]-MeOH): $\delta = 7.19, 8.22$ (2 d, je 2 H, aryl-CH, $J = 9.2$ Hz); 5.23 (d, 1 H, H-1'); 4.55 (d, 1 H, H-1); 4.05 (dd, 1 H, H-2'); 3.95 (dd, 1 H, H-6b); 3.88 (dd, 1 H, H-6b'); 3.79 (dd, 1 H, H-3'); 3.758 (dd, 1 H, H-2); 3.70 (dd, 1 H, H-6a'); 3.68 (dd, 1 H, H-4'); 3.67 (dd, 1 H, H-6a); 3.61 (ddd, 1 H, H-5'); 3.48 (dd, 1 H, H-3); 3.39 (m, 1 H, H-5); 3.36 (dd, 1 H, H-4); 2.05 (s, 3 H, COCH₃); 1.99 (s, 3 H, COCH₃) ppm;

$J_{1,2} = 8.4$; $J_{2,3} = 10.3$; $J_{3,4} = 8.4$; $J_{4,5} = 8.6$; $J_{5,6a} = 5.7$; $J_{5,6b} = 2.1$; $J_{6a,6b} = 11.8$ Hz;

$J_{1;2'} = 8.4$; $J_{2;3'} = 10.4$; $J_{3;4'} = 8.2$; $J_{4;5'} = 11.2$; $J_{5;6a'} = 4.5$; $J_{5;6b'} = 1.7$; $J_{6a,6b'} = 12.3$ Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, [D₆]-DMSO): $\delta = 169.38, 169.33$ (C_q, NHCO); 162.28 (*i*-aryl-C_q); 142.05 (*p*-aryl-C_q); 125.93 (*m*-aryl-CH); 116.74 (*o*-aryl-CH); 102.31 (C-1'); 98.17 (C-1); 80.76 (C-4); 79.35 (C-5), 77.12 (C-5'); 75.33 (C-3); 74.20 (C-3'); 72.39 (C-4'); 61.26 (C-6'); 59.67 (C-6); 55.51 (C-2'); 54.50 (C-2); 23.21, 23.15 (2 COCH₃) ppm.

***p*-Aminophenyl-2-acetamido-4-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (**58**)**



C₂₂H₃₃O₁₁N₃

MW 515.52

160 mg (0.293 mmol) *p*-Nitrophenylchitobiosid (**57**) werden in 50 ml abs. MeOH gelöst und mit 40 mg Pd/C (10%ig) 1 h bei Normaldruck hydriert. Nach der Filtration über Celite

wird im Vakuum konzentriert. Die flashchromatographische Reinigung (7 : 3-*i*-PrOH-H₂O + 1% NH₃) ergab 148 mg (0.287 mmol, 98%) *p*-Aminophenyl-2-acetamido-4-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-2-desoxy-β-D-glucopyranosid (**58**) als weißen amorphen Feststoff.

TLC (7 : 3 *i*-PrOH-H₂O + 1% NH₃): R_f = 0.29 (UV, H₂SO₄);

[α]_D²⁰ = -16.6° (c 0.60, MeOH);

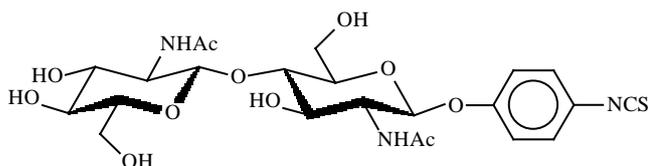
¹H-NMR (400 MHz, [D₄]-MeOH): δ = 6.89, 6.77 (2 d, je 2 H, aryl-CH, *J* = 9.2 Hz); 4.93 (d, 1 H, H-1'); 4.60 (d, 1 H, H-1); 3.99-3.94 (m, 2 H, H-2', -6b); 3.88 (dd, 1 H, H-6b'); 3.81-3.63 (m, 6 H, H-3', -2, -6a', -4', -6a, -5'); 3.57-3.39 (m, 3 H, H-3, -5, -4); 2.09, 2.05 (2 s, je 3 H, COCH₃) ppm;

*J*_{1,2} = 8.1; *J*_{1',2'} = 8.7; *J*_{5',6b'} = 2.0; *J*_{6a, 6b'} = 12.7 Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, [D₄]-MeOH): δ = 171.40, 170.63 (2 C_q, NHCO); 146.76 (*i*-aryl-C_q); 134.73 (*p*-aryl-C_q); 117.93 (*m*-aryl-CH); 115.30 (*o*-aryl-CH); 103.03 (C-1'); 97.71 (C-1); 74.48, 72.72, 72.30, 72.12, 71.63, 68.49 (C-4, -5, -5', -3, -3', -4'); 63.63 (C-6'); 62.55 (C-6); 56.25 (C-2'); 55.57 (C-2); 23.23, 21.85 (2 COCH₃) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 538.7 (M⁺+Na. Ber. für C₂₂H₃₃O₁₁N₃Na: 538.20).

***p*-Isothiocyanatophenyl-2-acetamido-4-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-2-desoxy-β-D-glucopyranosid (**59**)**



C₂₃H₃₁O₁₁N₃S

MW 557.57

101 mg (0.196 mmol) *p*-Aminophenyl-2-acetamido-4-*O*-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-2-desoxy-β-D-glucopyranosid (**58**) werden in 20 ml einer MeOH-H₂O-Mischung (3 : 1) gelöst und tropfenweise über 6 h zu einer Lösung von 225 mg CCl₄ (1.96 mmol, 150 μl), 507 mg (3.92 mmol, 667 μl) DIPEA in 180 ml 3 : 1 -MeOH-H₂O zugefügt (pH-Kontrolle). Nach der Konzentration im Vakuum wird flashchromatographisch (8 : 2 *i*-PrOH-H₂O+1% NH₃) gereinigt. Das erhaltene Produkt wird in 20 ml bidest. H₂O gelöst einer Festphasenextraktion an XAD-4 (15 x 4 cm) unterworfen. Nach Spülen mit bidest. H₂O werden 68 mg (0.122 mmol, 62%) *p*-Isothiocyanatophenyl-2-acet-

amido-4-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (**59**) durch Elution mit MeOH als weißen Feststoff erhalten.

TLC (7 : 3 *i*-PrOH-H₂O + 1% NH₃): R_f = 0.56 (UV, H₂SO₄);

[α]_D²⁰ = -5.9° (*c* 0.37, MeOH);

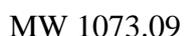
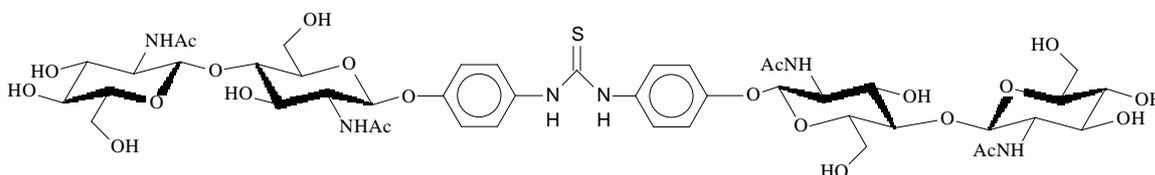
¹H-NMR (400 MHz, [D₄]-MeOH): δ = 7.50, 7.04 (2 d, je 2 H, aryl-CH, *J* = 8.1 Hz); 5.05 (d, 1 H, H-1'); 4.56 (d, 1 H, H-1); 4.08-3.86 (m 3 H, H-2', -6b, -6b'); 3.79-3.37 (m, 9 H, H-3', -2, -6a', -4', -6a, -5', -3, -5, -4); 2.06 (s, 3 H, COCH₃); 2.02 (s, 3 H, COCH₃) ppm;

*J*_{1,2} = 8.1; *J*_{1',2'} = 8.6 Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, [D₄]-MeOH): δ = 174.35, 173.76 (2 C_q, NHCO); 156.58 (*i*-aryl-C_q); 133.59 (NCS); 129.50 (*p*-aryl-C_q); 127.16 (*m*-aryl-CH); 118.64 (*o*-aryl-CH); 103.46 (C-1'); 101.04 (C-1); 81.64, 78.32, 76.69, 76.02, 74.24, 71.54 (C-4, -5, -5', -3, -3', -4'); 62.77 (C-6'); 61.77 (C-6); 57.37 (C-2'); 56.62 (C-2); 23.40, 23.29 (2 COCH₃) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 558.27 (M⁺+H. Ber. für C₂₃H₃₂O₁₁N₃S: 558.18), 580.24 (M⁺+Na. Ber. für C₂₃H₃₁O₁₁N₃SNa: 580.16), 596.26 (M⁺+K. Ber. für C₂₃H₃₁O₁₁N₃SK: 596.13).

Bis-*N,N'*-(*p*-phenyl-2-acetamido-4-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-thioharnstoff (60**)**



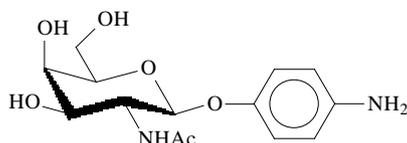
40 mg (0.072 mmol) *p*-Aminophenyl-2-acetamido-4-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (**58**) werden in 5 ml 3 : 1 MeOH-H₂O gelöst und in Gegenwart von DIPEA (1.04 mmol, 177 μ l, 134 mg, 10 eq.) mit Thiophosgen (58 mg, 0.52 mmol, 5 eq., gelöst in 2 ml 3 : 1 MeOH-H₂O) tropfenweise versetzt und 30 min bei RT gerührt. Die flashchromatographische Reinigung an Kieselgel (7 : 3 *i*-PrOH-H₂O + 1% NH₃) ergab 21 mg (19.6 μ mol, 27%) Bis-*N,N'*-(*p*-phenyl-2-acetamido-4-*O*-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-thioharnstoff (**60**) als weißen amorphen Feststoffes.

TLC (7 : 3 *n*-PrOH-H₂O + 1% NH₃): R_f = 0.23 (UV, H₂SO₄);

¹H-NMR (400 MHz, [D₄]-MeOH): δ = 7.75, 7.29 (2 d, je 4 H, aryl-CH, *J* = 8.1 Hz); 5.05 (d, 2 H, H-1'); 4.56 (d, 2 H, H-1); 4.08-3.86 (m 6 H, H-2', -6b, -6b'); 3.79-3.37 (m, 18 H, H-3', -2, -6a', -4', -6a, -5', -3, -5, -4); 2.06 (s, 6 H, COCH₃); 2.02 (s, 6 H, COCH₃) ppm; J_{1,2} = 8.1; J_{1',2'} = 8.6 Hz;

m/z (+APCI) 1072.9 (M⁺+H. Ber. für C₄₅H₆₅O₂₂N₆S: 1073.39), m/z (+ESI) 1095.0 (M⁺+Na. Ber. für C₄₅H₆₄O₂₂N₆SNa: 1095.37), m/z (-ESI) 1107.3 (M⁺+Cl. Ber. für C₄₅H₆₄O₂₂N₆SCl: 1107.35), m/z (MALDI-TOF) 1095.57 (M⁺+Na. Ber. für C₄₅H₆₄O₂₂N₆SNa: 1095.37), 1111.01 (M⁺+K. Ber. für C₄₅H₆₄O₂₂N₆SK: 1111.34).

p-Aminophenyl-2-*N*-acetamido-2-desoxy-β-D-galactopyranosid (**67**)



C₁₄H₂₀N₂O₆

MW 312.32

92 mg (0.268 mmol) *p*-Nitrophenyl-2-*N*-acetamido-2-desoxy-β-D-galactopyranosid (**66**) werden in 10 ml abs. DMAc gelöst und mit 42 mg Pd/C (10%ig) 12 h unter H₂-Atmosphäre bei Normaldruck hydriert. Nach der Filtration über Celite wird zweimal mit H₂O lyophilisiert, um 81.8 mg (0.262 mmol, 97%) *p*-Aminophenyl-2-*N*-acetamido-2-desoxy-β-D-galactopyranosid (**67**) als hellbraunen Feststoff zu erhalten.

TLC (7 : 3 *n*-PrOH-H₂O + 1% NH₃): R_f = 0.42 (UV, H₂SO₄);

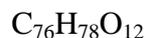
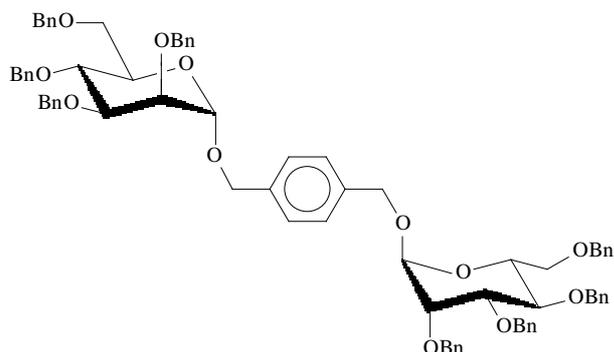
[α]_D²⁰ = +16.1° (*c* 0.3, DMSO);

¹H-NMR (400 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 7.72 (d, 1 H, NH, *J* 9.2 Hz); 6.67 (d, 2 H, aryl-CH, *J* 8.7 Hz); 6.46 (d, 2 H, aryl-CH, *J* 8.7 Hz); 4.57 (d, 1 H, H-1); 3.87 (m 1 H, H-2); 3.67 (m, 1 H, H-4); 3.56 (m, 1 H, H-3); 3.52-3.45 (m, 2 H, H-6, -6'); 3.38 (m, 1 H, H-5); 1.81 (s, 3 H, COCH₃) ppm;

J_{1,2} = 4.6 Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 169.64 (COCH₃); 149.17 (*i*-aryl-C_q); 144.02 (*p*-aryl-C_q); 118.26 (*m*-aryl-CH); 114.63 (*o*-aryl-CH); 101.58 (C-1); 75.64 (C-5); 71.46 (C-3); 67.69, (C-4); 60.65 (C-6); 52.46 (C-2); 23.32 (COCH₃) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 313.35 (M⁺+H. Ber. für C₁₄H₂₁N₂O₆: 313.14), 335.11 (M⁺+Na. Ber. für C₁₄H₂₀N₂O₆Na: 335.12).

1,4-Bis-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- α -D-mannopyranosyloxymethyl)-benzol (70)

63 mg (0.46 mmol) 1,4-Bis-(hydroxymethyl)-benzol (**69**) und 750 mg (1.1 mmol, 2.4 eq.) 1-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- α -D-mannopyranosyl)-trichloracetimidat (**15**) werden bei $-45\ ^\circ\text{C}$ in 7 ml abs. Acetonitril gelöst. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1.8 ml einer 0.02 M TMS-OTf-Lösung in abs. CH_2Cl_2 innerhalb 1 h gestartet und bei $-30\ ^\circ\text{C}$ für 2 h gerührt, bevor nach Zugabe von 1 ml der 0.02 M TMS-OTf-Lösung der Ansatz über Nacht bei RT weitergerührt wird. Nach Zugabe von 1.5 ml Triethylamin wird im Vakuum konzentriert und flashchromatographisch (4.5 : 1 Petrolether-Ethylacetat) an Kieselgel gereinigt, um 108 mg (0.09 mmol, 20%) 1,4-Bis-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- α -D-mannopyranosyloxymethyl)-benzol (**70**) als farblosen Sirup zu erhalten.

TLC (3 : 1 Petrolether-Ethylacetat): $R_f = 0.22$ (UV, H_2SO_4);

$[\alpha]_D^{22} = +35.7^\circ$ ($c\ 0.90$; CHCl_3);

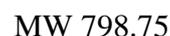
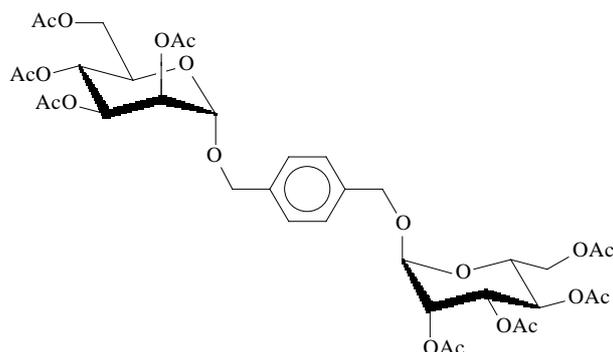
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.37\text{-}7.23$ (m, 44 H, aryl-CH); 4.96 (d, 2 H, H-1), 4.87 (d, 2 H, benzyl- CH_2 , $J = 11.2$ Hz), 4.74-4.42 (m, 18 H, benzyl- CH_2), 4.01 (dd \approx t, 2 H, H-4), 3.94 (dd, 2 H, H-3), 3.85-3.83 (m, 2 H, H-5), 3.81 (dd, 2 H, H-2), 3.79 (dd, 2 H, H-6), 3.74 (dd, 2 H, H-6') ppm;

$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.1$; $J_{3,4} = 9.2$; $J_{4,5} = 9.2$; $J_{5,6} = 5.1$; $J_{5,6'} = 2.0$; $J_{6,6'} = 10.7$ Hz;

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.89 MHz, CDCl_3): $\delta = 138.53, 138.46, 138.38, 138.24, 136.84$ (5 aryl- C_q); 128.31-127.46 (aryl-CH); 97.15 (C-1); 80.26, 74.95, 74.67, 72.19 (C-2, -3, -4, -5); 75.16, 73.38, 72.59, 72.08, 69.26, 68.59 (5 benzyl- CH_2 , C-6) ppm;

m/z (FAB MS) 1184 ($\text{M}^+\text{+H}$. Ber. für $\text{C}_{76}\text{H}_{79}\text{O}_{12}$: 1183.56).

1,4-Bis-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyloxymethyl)-benzol (71)



Bei 0°C werden 212 mg (0.44 mmol, 4.5 eq.) 1-*O*-(Tetra-2,3,4,6-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-trichloracetimidat (**11**) und 20 mg (0.14 mmol) 1,4-Bis-(hydroxymethyl)-benzol (**69**) in 2 ml abs. Acetonitril unter N₂-Atmosphäre gelöst. Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 μ l einer 0,02 M TMS-OTf-Lösung (in abs. CH₂Cl₂) innerhalb 10 min gestartet, 30 min bei 0°C und anschließend 3 d bei RT gerührt. Nach 1 h Reaktionszeit werden nochmals 100 μ l der 0.02 M TMS-OTf-Lösung zugefügt. Die Beendigung der Reaktion erfolgt durch Zugabe von 30 μ l Triethylamin, nach der wiederholten Codestillation mit Toluol wird im Vakuum konzentriert und flashchromatographisch (1 : 1 Petrolether-Ethylacetat) an Kieselgel gereinigt, um 61 mg (76.4 μ mol, 53%) 1,4-Bis-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyloxymethyl)-benzol (71) als farblosen Sirup zu erhalten.

TLC (4 : 1 Ethylacetat-Petrolether): R_f = 0.42 (Orthoester R_f: 0.34);

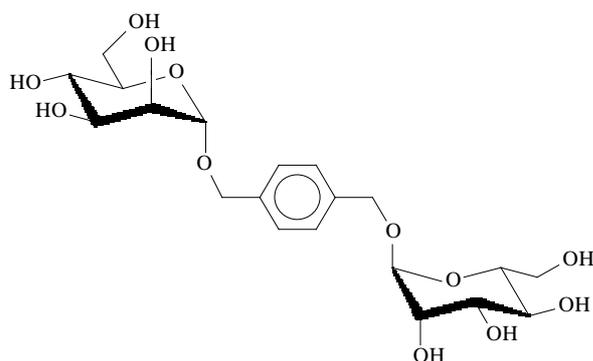
[α]_D²⁰ = +68,6° (*c* 0,48; CHCl₃);

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.35 (s, 4 H, aryl-CH); 5.38 (dd, 2 H, H-3); 5.33-5.28 (m, 4 H, H-2, H-4); 4.89 (d, 2 H, H-1); 4.73 (d, 2 H, benzyl-CH₂, *J* 11.7); 4.56 (d, 2 H, benzyl-CH₂, *J* 11.7); 4.29 (dd, 2 H, H-6); 4.08 (dd, 2 H, H-6'); 4.03 (ddd, 2 H, H-5); 2.20, 2.10, 2.04, 1.99 (4 s, je 6 H, 4 COCH₃) ppm;

J_{1,2} = 1.5; J_{2,3} = 3.1; J_{3,4} = 9.7; J_{4,5} = 10.2; J_{5,6} = 5.1; J_{5,6'} = 2.6; J_{6,6'} = 12.2 Hz;

¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 170.4, 169.8, 169.7, 169.5 (4 COCH₃); 136.0 (aryl-C_q); 128.1 (aryl-CH); 96.5 (C-1); 69.3 (C-4); 69.0 (benzyl-CH₂); 68.9 (C-3); 68.5 (C-5); 65.9 (C-2); 62.2 (C-6); 20.7, 20.6, 20.49, 20.47 (4 COCH₃) ppm;

m/z (FAB MS) 799.5 (M⁺+H. Ber. für C₃₆H₄₇O₂₀: 799.27), 821.5 (M⁺+Na. Ber. für C₃₆H₄₆O₂₀Na: 821.25).

1,4-Bis-(α -D-mannopyranosyloxymethyl)-benzol (72) $C_{20}H_{30}O_{12}$

MW 462.45

42 mg (0.052 mmol) 1,4-Bis-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyloxymethyl)-benzol (**71**) werden nach AVV 2 deacetyliert und flashchromatographisch (7 : 2 : 1 Ethylacetat-MeOH-H₂O) gereinigt, um 22 mg (0.047 mmol, 90%) 1,4-Bis-(α -D-mannopyranosyloxymethyl)-benzol (**72**) als farblosen Sirup zu erhalten.

TLC (7 : 2 : 1 Ethylacetat-MeOH-H₂O): $R_f = 0.26$ (H₂SO₄);

$[\alpha]_D^{21} = +99.5^\circ$ (c 1.0; MeOH);

¹H-NMR (400 MHz, [D₄]-MeOH): $\delta = 7.40$ (s, 4 H, aryl-CH); 4.87 (d, 2 H, H-1); 4.79 (d, 2 H, benzyl-CH₂, $J = 11.7$); 4.57 (d, 2 H, benzyl-CH₂, $J = 11.7$); 3.89 (dd, 2 H, H-6); 3.86 (dd, 2 H, H-2); 3.77 (dd, 2 H, H-3); 3.76 (dd, 2 H, H-6'); 3.67 (dd \approx t, 2 H, H-4); 3.65-3.61 (m, 2 H, H-5) ppm;

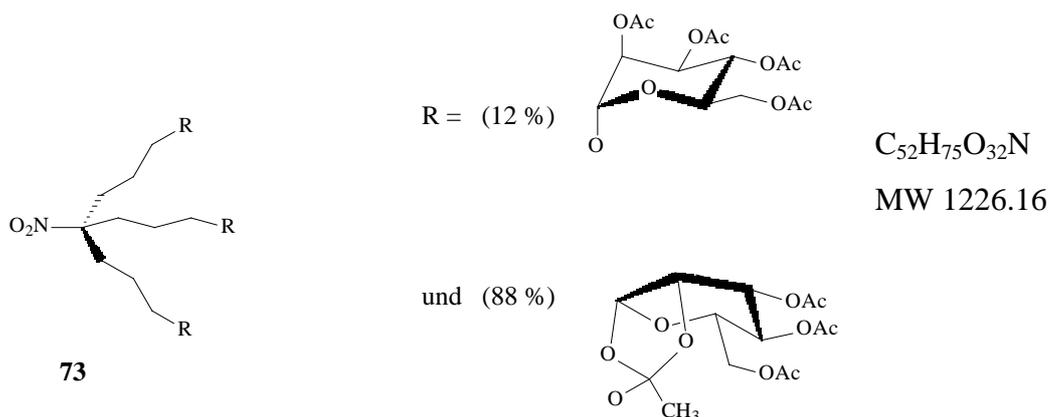
$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{3,4} = 8.1$; $J_{4,5} = 8.1$; $J_{5,6} = 2.0$; $J_{5,6'} = 5.1$; $J_{6,6'} = 12.2$ Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, [D₄]-MeOH): $\delta = 138.9$ (aryl-C_q); 129.5 (aryl-CH); 101.0 (C-1); 75.2 (C-5); 72.9 (C-3); 72.5 (C-2); 69.9 (benzyl-CH₂); 68.9 (C-4); 63.2 (C-6) ppm;

m/z (FAB MS) 485.3 (M⁺+Na. Ber. für C₂₀H₃₀O₁₂Na: 485.16).

Gemischter Glycocluster- Orthoester & Glycosid (73)

Bei der Synthese von Nitrotris-[3-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyloxy)-propyl]-methan wurde überwiegend Nitrotris-[3,4,6-tri-*O*-acetyl-1,2-*O*-(3-propyloxyethylidene)- β -D-mannopyranosyl]-methan erhalten.



1.52 g (3.085 mmol) 1-*O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-trichloracetimidat (**11**) und 186 mg (0.79 mmol, 3.9 eq.) Nitrotris-(3-hydroxypropyl)-methan (**3**) werden in 30 ml abs. Acetonitril unter N_2 -Atmosphäre bei RT gelöst. Innerhalb 1.5 h werden 600 μl einer 0.04 M TMS-OTf-Lösung zugefügt und der Ansatz 24 h bei RT gerührt. Nach Abbruch der Reaktion durch Zugabe von 30 μl Triethylamin wird im Vakuum konzentriert und die flashchromatographische Reinigung (2 : 1 Ethylacetat-Petrolether) ergab 699 mg (0.57 mmol, 72%) Nitrotris-[3,4,6-tri-*O*-acetyl-1,2-*O*-(3-propyloxyethylidene)- β -D-mannopyranosyl]-methan (**73**) als farblosen Sirup, dessen Mannosereste auch zu 12% *O*-glycosidisch gebunden vorkommen.

TLC (3 : 1 Ethylacetat-Petrolether): $R_f = 0.41$ (H_2SO_4);

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.49$ (d, 3 H, H-1); 5.29 (dd \approx t, 3 H, H-4); 5.16 (dd, 3 H, H-3); 4.56 (dd, 3 H, H-2); 4.24 (dd, 3 H, H-6); 4.14 (dd, 3 H, H-6'); 3.69 (ddd, 3 H, H-5); 3.48 (m_c , 6 H, CH_2O); 2.13, 2.08, 2.06 (3 m, je 9 H, CH_3); 1.95 (m_c , 6 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 1.73 (s, 9 H, $\text{CH}_3\text{-OE}$); 1.46 (m_c , 6 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) ppm;

Orthoester (OE):

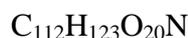
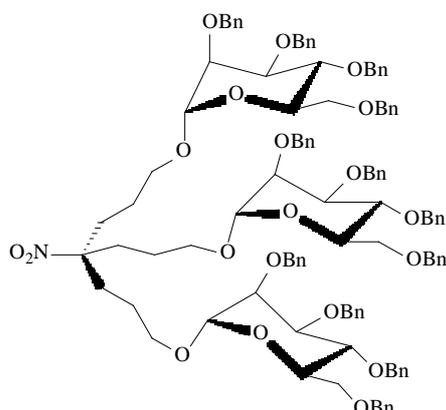
$J_{1,2} = 2.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{3,4} = 9.7$; $J_{4,5} = 9.7$; $J_{5,6} = 5.1$; $J_{5,6'} = 3.6$; $J_{6,6'} = 11.7$ Hz;

Glycosid:

4.80 (d, 3 H, H-1_{gly}, $J_{1,2} = 1.5$ Hz, bezogen auf H-1 beträgt der Anteil *O*-glycosidisch gebundener Mannose 11.5%);

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.67 MHz, CDCl_3): $\delta = 170.52, 170.25, 169.33$ (3 COCH_3); 124.16 (C_q $\text{CCH}_3\text{-OE}$); 97.21 (C-1); 93.77 ($\text{C}_q\text{-NO}_2$); 71.15 (C-2), 70.47 (C-5); 65.40 (C-3); 62.17 (C-4); 61.61 (C-6); 60.27 (CH_2O); 32.01 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 24.73 ($\text{CCH}_3\text{-OE}$); 23.70 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 20.67, 20.60, 20.56 (3 COCH_3) ppm.

Nitrotris-[3-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- α -D-mannopyranosyloxy)-propyl]-methan (75)



7.48 g (10.94 mmol, 3.9 eq.) 1-*O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl- α -D-mannopyranosyl)-trichloracetimidat (**15**) und 660 mg (2.81 mmol) 4-Nitro-4-(3-hydroxypropyl)-heptan-1,7-diol (**3**) werden unter N_2 -Atmosphäre in 100 ml abs. THF in Gegenwart von Molsieb 4 Å unter Rühren gelöst und auf -65°C gekühlt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 μl einer 0.02 M TMS-OTf-Lösung in CH_2Cl_2 während 10 min gestartet und für 2 h bei -65°C , dann 3 h bei -30°C , anschließend nach Zugabe von 150 μl der 0.02 M TMS-OTf-Lösung über Nacht bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wird mit 100 ml ges. NaHCO_3 -Lsg. versetzt und dreimal mit CH_2Cl_2 (150, 100, 50 ml) extrahiert und im Vakuum konzentriert. Die flash-chromatographische Reinigung (3 : 1 Petrolether-Ethylacetat) an Kieselgel (2 fache Menge, 25 cm Füllhöhe) ergab 3.75 g (2.08 mmol, 74%) Nitrotris-[3-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- α -D-mannopyranosyloxy)-propyl]-methan (**75**) als farblosen Sirup.

TLC (1 : 1 Petrolether-Ethylacetat): $R_f = 0.72$ (UV, H_2SO_4);

$[\alpha]_D^{20} = +16.3^\circ$ (c 1.24, CHCl_3);

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.36\text{--}7.23$ (m, 60 H, aryl-CH); 4.84 (d, 3 H, benzyl-CHH, J 11.2 Hz); 4.82 (d, 3 H, H-1); 4.74-4.47 (m, 21 H, benzyl- CH_2); 3.96 (dd \approx t, 3 H, H-4);

3.84 (dd, 3 H, H-3); 3.76-3.68 (m, 12 H, H-2, H-6, H-6', H-5); 3.62 (m_c , 3 H,

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHHO}$); 3.31 (m_c , 3 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHHO}$); 1.88-1.82 (m, 6 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$);

1.42-1.35 (m, 6 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) ppm;

$J_{1,2} = 2.0$; $J_{2,3} = 3.1$; $J_{3,4} = 9.7$; $J_{4,5} = 9.2$ Hz;

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.67 MHz, CDCl_3): $\delta = 138.35, 138.28, 138.22, 138.19$ (12 aryl- C_q); 128.29-

127.50 (m, 60 C, Benzyl- CH_2); 97.90 (C-1); 93.65 ($\text{C}_q\text{-NO}_2$); 80.04 (C-3); 75.12 (benzyl-

CH_2); 74.83 (C-4); 74.75 (C-2); 73.31, 72.65, 72.13 (2 benzyl- CH_2); 71.89 (C-5); 69.07

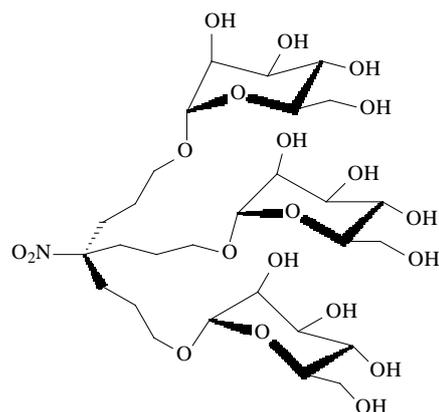
(C-6); 66.79 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 32.08 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 23.73 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) ppm;

m/z (FAB-MS) 1799.2 ($M^+ + H$. Ber. für $C_{112}H_{124}O_{20}N$: 1802.87), 1827.8 ($M^+ + Na$. Ber. für $C_{112}H_{123}O_{20}NNa$: 1824.85);

$C_{112}H_{123}O_{20}N$ (1803.20): Ber. C 74.60, H 6.88, N 0.78

Gef. C 74.57, H 6.90, N 0.78

Nitrotris-[3-(α -D-mannopyranosyloxy)-propyl]-methan (**76**)



$C_{28}H_{51}O_{20}N$

MW 721.71

750 mg (0.416 mmol) Nitrotris-[3-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- α -D-mannopyranosyloxy)-propyl]-methan (**75**) werden mit 0.80 g Pd/C (10%) in 50 ml 3 : 1 abs. EtOH-abs. THF suspendiert und bei 60°C/60 bar 6 h hydriert. Nach der Filtration über Celite und Konzentration im Vakuum wird gelpermeationschromatographisch an Sephadex G-15 (15 mM wässr. NH_4HCO_3) gereinigt und lyophilisiert, um 231 mg (0.320 mmol, 77%) Nitrotris-[3-(α -D-mannopyranosyloxy)-propyl]-methan (**76**) als weißes Lyophilisat zu erhalten.

TLC (7 : 3 *i*-PrOH- H_2O + 1% NH_3): R_f = 0.38 (H_2SO_4);

$[\alpha]_D^{20} = +44.2^\circ$ (c 0.97, H_2O);

1H -NMR (400 MHz, D_2O): δ = 4.69 (d, 3 H, H-1); 3.78 (dd, 3 H, H-2); 3.72 (dd, 3 H, H-3); 3.65-3.55 (m, 9 H, H-6, -5, -4); 3.51-3.46 (m, 6 H, H-6', *CHHO*); 3.42-3.37 (m, 3 H, *CHHO*); 1.90 (m_c , 6 H, $CH_2CH_2CH_2O$); 1.40 (m_c , 6 H, $CH_2CH_2CH_2O$) ppm;

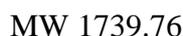
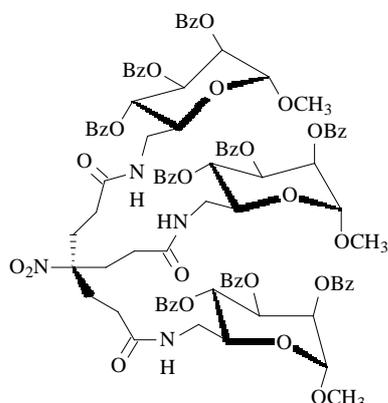
$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{3,4} = 11.7$ Hz;

^{13}C -NMR (100.67 MHz, D_2O): δ = 100.06 (C-1); 95.52 (C_q - NO_2); 73.17, 71.01, 70.45, 67.12 (C-2, -3, -4, -5); 67.43 (C-6); 61.29 ($CH_2CH_2CH_2O$); 32.02 ($CH_2CH_2CH_2O$); 23.51 ($CH_2CH_2CH_2O$) ppm;

m/z (FAB MS) 722.5 ($M^+ + H$. Ber. für $C_{28}H_{52}O_{20}N$: 722.31), 744.7 ($M^+ + H$. Ber. für

$C_{28}H_{51}O_{20}NNa$: 744.29).

Nitrotris-{2-[(2',3',4'-tri-*O*-benzoyl-6'-desoxy-1'-*O*-methyl- α -D-mannopyranos-6'-yl)-carbonylamido]-ethyl}-methan (77**)**



1.12 g (2.216 mmol) Methyl-(6-amino-6-desoxy-2,3,4-tri-*O*-benzoyl)- α -D-mannopyranosid (**21**) und 0.20 g (0.721 mmol) Nitrotris-(2-carboxyethyl)-methan (**2**) werden mit 0.60 g (4.44 mmol) 1-HOBT in 10 ml abs. DMF bei 0°C gerührt. Anschließend werden 0.46 g (2.23 mmol) DCC zugefügt und 30 min bei 0°C, dann über Nacht bei RT gerührt. Nach dem Abfiltrieren des Dicyclohexylharnstoffes wird im Vakuum konzentriert, in 80 ml Ethylacetat aufgenommen und zweimal mit 5%iger HCl, einmal mit ges. wässr. NaHCO₃ und einmal mit H₂O gewaschen. Die flashchromatographische Reinigung (3: 1 Ethylacetat-Petrolether) ergab 0.92 g (0.53 mmol, 73%) Nitrotris-{2-[(2',3',4'-tri-*O*-benzoyl-6'-desoxy-1'-*O*-methyl- α -D-mannopyranos-6'-yl)-carbonylamido]-ethyl}-methan (**77**) als weißen Feststoff.

TLC (3 : 1 Ethylacetat-Petrolether): $R_f = 0.21$ (UV, H₂SO₄);

$[\alpha]_D^{20} = -99.6^\circ$ (c 0.70, CHCl₃);

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8.07$ - 7.24 (m, 45 H, aryl-CH); 6.25 (t, 3 H, NH, $J_{\text{NH},6''} = 5.6$, $J_{\text{NH},6''} = 6.6$ Hz); 5.85 (dd, 3 H, H-3'); 5.70 (dd \approx t, 3 H, H-4'); 5.63 (dd, 3 H, H-2'); 4.92 (d, 3 H, H-1'); 4.12 (ddd, 3 H, H-5'); 3.80 (ddd, 3 H, H-6''); 3.47 (s, 9 H, OCH₃); 3.30 (ddd, 3 H, H-6'); 2.30-2.11 (m, 12 H, CH₂CH₂CO) ppm;

$J_{1',2'} = 1.5$; $J_{2',3'} = 3.6$; $J_{3',4'} = 10.2$; $J_{4',5'} = 10.2$; $J_{5',6'} = 5.6$; $J_{5',6''} = 2.5$; $J_{6',6''} = 14.2$ Hz;

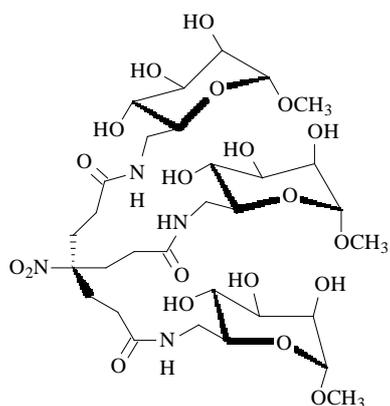
¹³C-NMR (100.67 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.94$ (NHCO); 165.98; 165.39; 165.35 (3 benzoyl-C=O); 133.69-128.27 (m, aryl-C); 98.53 (C-1'); 93.01 (C_q-NO₂); 70.51 (C-2'); 69.62 (C-3'); 69.00 (C-5'); 67.93 (C-4'); 55.58 (OCH₃); 39.81 (C-6'); 30.69 (CH₂CH₂CO), 30.56 (CH₂CH₂CO) ppm;

m/z (FAB MS) 1739.9 (M⁺+H. Ber. für C₉₄H₉₁O₂₉N₄: 1739.58);

$C_{94}H_{90}O_{29}N_4$ (1739.76): Ber. C 64.90, H 5.21, N 3.22

Gef. C 64.88, H 5.22, N 3.21

Nitrotris-{2-[(6'-desoxy-1'-O-methyl- α -D-mannopyranos-6'-yl)-carbonylamido]-ethyl}-methan (78**)**



$C_{31}H_{54}O_{20}N_4$

MW 802.78

270 mg (0.155 mmol) Nitrotris-{2-[(2',3',4'-tri-*O*-benzoyl-6'-desoxy-1'-*O*-methyl- α -D-mannopyranos-6'-yl)-carbonylamido]-ethyl}-methan (**77**) werden in 10 ml 5 : 2 MeOH-Et₂O gelöst und mit 1.5 ml einer NaOMe-Lösung (1 M) in abs. MeOH versetzt, anschließend bei RT 2 Tage gerührt. Nach der Neutralisation mit Levatit SP 1080 H⁺ wird filtriert und im Vakuum konzentriert. Das erhaltene Rohprodukt (160 mg weißer amorpher Feststoff,) wird gelpermeationschromatographisch an Sephadex G-15 (15 mM wässr. NH₄HCO₃) gereinigt, um 122 mg (0.152 mmol, 98%) Nitrotris-{2-[(6'-desoxy-1'-*O*-methyl- α -D-mannopyranos-6'-yl)-carbonylamido]-ethyl}-methan (**78**) als weißen amorphen Feststoff zu erhalten.

TLC (7 : 3 *n*-PrOH-H₂O + 1% NH₃): R_f = 0.38 (UV, H₂SO₄);

$[\alpha]_D^{20} = +64.9^\circ$ (*c* 1.02, H₂O);

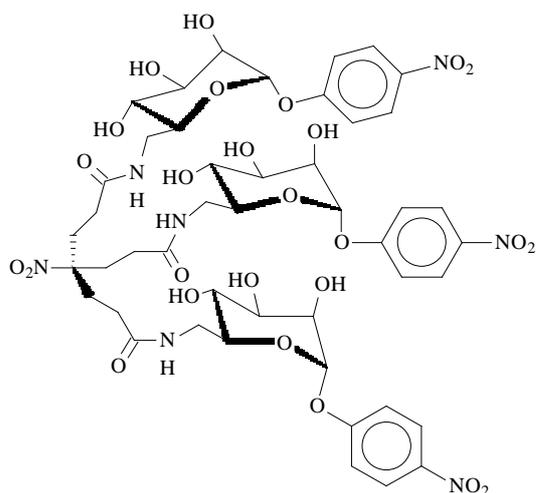
¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 4.59 (d, 3 H, H-1); 3.78 (dd, 3 H, H-2); 3.60 (dd, 3 H, H-3); 3.50-3.45 (m, 6 H, H-5, H-6'); 3.41 (dd \approx t, 3 H, H-4); 3.29 (dd, 3 H, H-6); 3.24 (s, 9 H, OCH₃); 2.16 (br s, 12 H, CH₂CH₂CO) ppm;

J_{1,2} = 1.5; J_{2,3} = 3.6; J_{3,4} = 9.2; J_{4,5} = 9.2; J_{5,6} = 7.6; J_{6,6'} = 14.8 Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, D₂O): δ = 174.97 (NHCO); 101.23 (C-1); 93.69 (C_q-NO₂); 70.99 (C-5); 70.72 (C-3); 70.23 (C-2); 68.40 (C-4); 55.01 (CH₃); 40.42 (C-6); 30.98 (CH₂CH₂CO); 30.35 (CH₂CH₂CO) ppm;

m/z (FAB MS) 803.7 ($M^+ + H$. Ber. für $C_{31}H_{54}O_{20}N_4$: 803.34), 825.45 ($M^+ + Na$. Ber. für $C_{31}H_{54}O_{20}N_4Na$: 825.32), 841.41 ($M^+ + K$. Ber. für $C_{31}H_{54}O_{20}N_4K$: 841.30).

Nitrotris-{2-[(6'-desoxy-1'-*O*-*p*-nitrophenyl- α -D-mannopyranos-6'-yl)-carbonylamido]-ethyl}-methan (79**)**



$C_{46}H_{57}N_7O_{26}$

MW 1123.99

33.3 mg (0.111 mmol) *p*-Nitrophenyl-6-amino-6-desoxy- α -D-mannopyranosid (**26**) werden mit 7.9 mg (0.029 mmol) 4-(2-Carboxyethyl)-4-nitroheptan-1,7-disäure (**2**) und 32.9 mg (0.133 mmol, 1.2 eq.) EEDQ in 12 ml abs. DMAc bei 40°C 5 d umgesetzt. Nach Lyophilisation erfolgt die Extraktion von Quinolin/ EEDQ mit 2 : 1 : 1 : 1 Et₂O-Petrol-ether-MeOH-H₂O und erneute Lyophilisation der wässr. Phase. Die flashchromatographische Reinigung (9 : 1 Ethylacetat-MeOH) an Kieselgel ergab 29.2 mg (0.026 mmol, 91%) Nitrotris-{2-[(6'-desoxy-1'-*O*-*p*-nitrophenyl- α -D-mannopyranos-6'-yl)-carbonylamido]-ethyl}-methan (**79**) als weißen amorphen Feststoff.

TLC (7 : 2 : 1 Ethylacetat-MeOH-H₂O): $R_f = 0.43$ (UV, H₂SO₄);

$[\alpha]_D^{20} = +78.6^\circ$ (c 0.40, MeOH);

¹H-NMR (400 MHz, [D₄]-MeOH): $\delta = 8.26, 7.31$ (2 d, je 6 H, aryl-CH, ³*J* 9.7 Hz); 5.69 (d, 3 H, H-1); 4.09 (dd, 3 H, H-2); 3.93 (dd, 3 H, H-3); 3.65 (dd \approx t, 3 H, H-4); 3.62 (dd, 3 H, H-6'); 3.60 (dd, 3 H, H-6); 3.59-3.55 (m, 3 H, H-5'); 2.12-1.98 (m, 12 H, CH₂CH₂CO)

ppm;

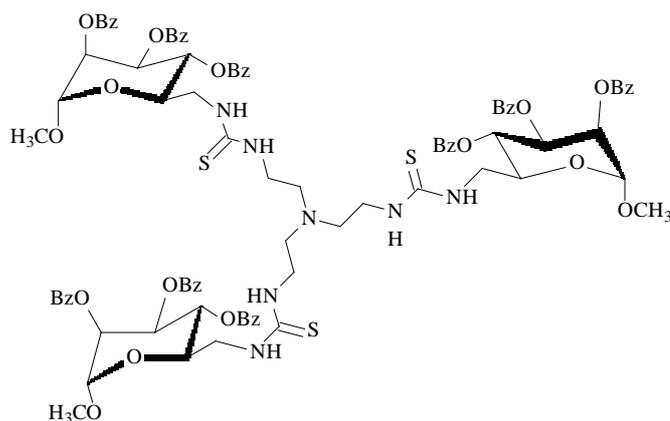
$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{3,4} = 9.2$; $J_{4,5} = 9.2$; $J_{5,6'} = 3.6$; $J_{5,6} = 6.1$; $J_{6,6'} = 12.7$ Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, [D₄]-MeOH): $\delta = 174.57$ (NHCO); 162.84 (*i*-aryl-C_q); 144.21 (*p*-aryl-C_q); 127.09 (*m*-aryl-CH), 118.00 (*o*-aryl-CH); 100.16 (C-1); 94.49 (C_q-NO₂); 74.35

(C-5); 72.24 (C-3); 71.85 (C-2); 69.66 (C-4); 41.67 (C-6); 32.19 (CH₂CH₂CO); 31.39 (CH₂CH₂CO) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 1146.34 (M⁺+Na. Ber. für C₄₆H₅₇N₇O₂₆Na: 1146.325), 1162.33 (M⁺+K. Ber. für C₄₆H₅₇N₇O₂₆K: 1162.299).

Tris-{2-[3-(2',3',4'-tri-*O*-benzoyl-6'-desoxy-1-*O*-methyl- α -D-mannopyranos-6'-yl)-thioureido]-ethyl}-amin (80**)**



C₉₃H₉₃O₂₄N₇S₃

1788.97

394 mg (0.720 mmol) Methyl-2,3,4-tri-*O*-benzoyl-6-desoxy-6-isothiocyanato- α -D-mannopyranosid (**22**) werden mit 32 mg (0.218 mmol, 0.30 eq.) Tris-(2-aminoethyl)-amin (**61**) nach AVV 6 in CH₂Cl₂ umgesetzt. Die flashchromatographische Reinigung (2 : 1 Ethylacetat-Petrolether) ergab 359 mg (0.201 mmol, 92%) Tris-{2-[3-(2',3',4'-tri-*O*-benzoyl-6'-desoxy-1-*O*-methyl- α -D-mannopyranos-6'-yl)-thioureido]-ethyl}-amin (**80**) als gelblich amorphen Feststoff.

TLC (2 : 1 Petrolether-Ethylacetat): R_f = 0.20 (UV, H₂SO₄);

[α]_D²⁰ = -92.6° (c 1.79, CHCl₃);

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.08, 7.93, 7.80 (3 d, je 6 H, aryl-CH); 7.54-7.23 (m, 27 H, aryl-CH); 7.08 (br s, 6 H, NH); 5.83 (dd, 3 H, H-3); 5.70 (dd \approx t, 3 H, H-4); 5.61 (dd, 3 H, H-2); 4.85 (d, 3 H, H-1); 4.20 (br s, 3 H, H-5); 4.11-3.94 (br s, 3 H, H-6); 3.77-3.67 (br s, 3 H, H-6'); 3.58 (br s, 6 H, CH₂NHCS); 3.42 (s, 9 H, OCH₃); 2.50 (s, 6 H, NCH₂) ppm; J_{1,2} = 2.0; J_{2,3} = 3.1; J_{3,4} = 9.7; J_{4,5} = 9.7 Hz;

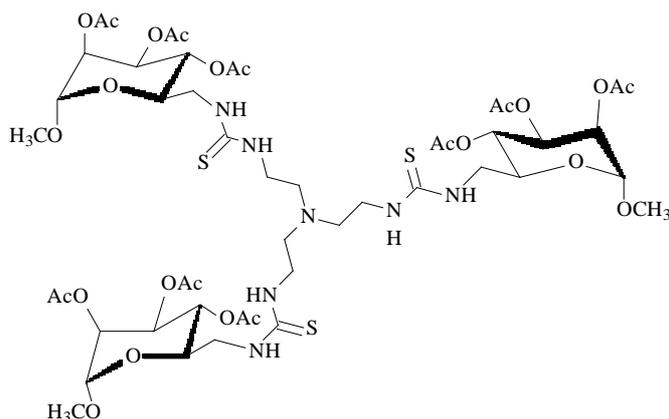
¹³C-NMR (62.89 MHz, CDCl₃): δ = 171.11, 165.89, 165.40, (3 C=O); 133.46, 133.37, 133.08 (3 aryl-C_q); 129.93-128.18 (m, aryl-CH); 98.51 (C-1); 70.26 (C-2), 69.76 (C-3), 69.51 (C-5), 68.02 (C-4); 60.35 (C-6); 55.60 (OCH₃); 53.43 (NCH₂); 45.16 (CH₂NHCS) ppm;

m/z (FAB-MS) 1788.9 ($M^+ + H$. Ber. für $C_{93}H_{94}O_{24}N_7S_3$: 1788.55);

$C_{93}H_{93}O_{24}N_7S_3$ (1788.97): Ber. C 62.44, H 5.24, N 5.48

Gef. C 62.42, H 5.25, N 5.47

Tris-{2-[3-(2',3',4'-tri-*O*-acetyl-6'-desoxy-1-*O*-methyl- α -D-mannopyranos-6'-yl)-thioureido]-ethyl}-amin (81)



$C_{48}H_{75}O_{24}N_7S_3$

MW 1230.34

317 mg (0.877 mmol, 3.3 eq.) Methyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-desoxy-6-isothiocyanato- α -D-mannopyranosid (**24**) werden in 30 ml siedendem CH_2Cl_2 gelöst mit 39 mg (0.266 mmol) Tris-(2-amino-ethyl)-amin (**61**) nach AVV 6 umgesetzt. Die flashchromatographische Reinigung (Ethylacetat) ergab 298 mg (0.242 mmol, 91%) Tris-{2-[3-(2',3',4'-tri-*O*-acetyl-6'-desoxy-1-*O*-methyl- α -D-mannopyranos-6'-yl)-thioureido]-ethyl}-amin (**81**) als weißen Feststoff.

TLC (9 : 1 Ethylacetat-EtOH): $R_f = 0.39$ (UV, H_2SO_4);

$[\alpha]_D^{20} = +43.6^\circ$ (c 0.84, $CHCl_3$);

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.18, 6.94$ (2 br s, je 3 H, NH); 5.33 (dd, 3 H, H-3); 5.23 (dd, 3 H, H-2); 5.13 (dd \approx t, 3 H, H-4); 4.71 (d, 3 H, H-1); 3.90 (br s, 3 H, H-5); 3.79-3.50 (m, 12 H, H-6, H-6', CH_2NH); 3.41 (s, 9 H, OCH_3); 2.67 (br s, 6 H, CH_2CH_2NH); 2.18, 2.09, 1.98 (3 s, je 9 H, 3 $COCH_3$) ppm;

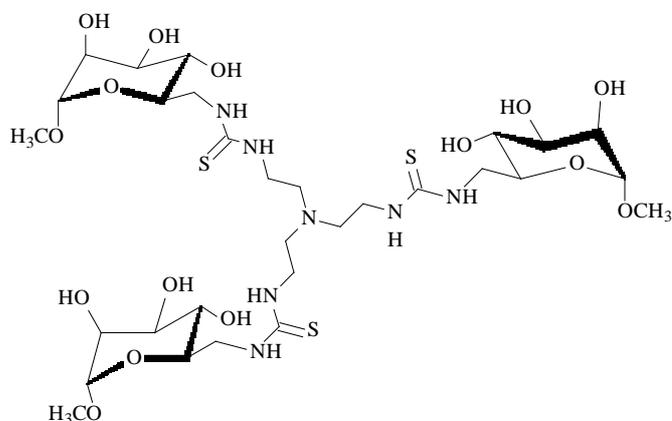
$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{3,4} = 9.7$; $J_{4,5} = 10.2$ Hz;

^{13}C -NMR (100.67 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 182.82$ ($C=S$); 170.07, 169.82, 169.67 (3 $C=O$); 98.25 (C-1); 69.36 (C-2); 69.25 (C-5); 68.77 (C-3); 67.04 (C-4); 55.28 (OCH_3); 52.62 (NCH_2); 45.05 (C-6); 42.43 (CH_2NH) 20.74, 20.73, 20.49 (3 $COCH_3$) ppm;

$C_{48}H_{75}O_{24}N_7S_3$ (1230.34): Ber. C 46.86, H 6.14, N 7.97, S 7.82

Gef. C 46.92, H 6.15, N 7.95, S 7.80

**Tris-{2-[3-(6'-desoxy-1-O-methyl- α -D-mannopyranos-6'-yl)-thioureido]-ethyl}-amin
(82)**



$C_{30}H_{57}O_{15}N_7S_3$

MW 852.00

a)

136 mg (0.578 mmol, 3.3 eq.) Methyl-6-desoxy-6-isothiocyanato- α -D-mannopyranosid (**27**), gelöst in 10 ml 4 : 1 EtOH-Ethylacetat, werden mit 25.6 mg (0.175 mmol) Tris-(2-aminoethyl)-amin (**61**) gelöst in 5 ml 4 : 1 EtOH- Ethylacetat nach AAV 6 umgesetzt. Die gelpermeationschromatographische Reinigung an Sephadex G-15 (15 mM wässr. NH_4HCO_3) ergab 35 mg (41 μ mol, 23%) Tris-{2-[3-(6'-desoxy-1-O-methyl- α -D-mannopyranos-6'-yl)-thioureido]-ethyl}-amin (**82**) als weißes Lyophilisat.

TLC (7 : 3 *n*-PrOH- H_2O + 1% NH_3): R_f = 0.37 (UV, H_2SO_4);

$[\alpha]_D^{20} = +14.0^\circ$ (*c* 1.10, MeOH);

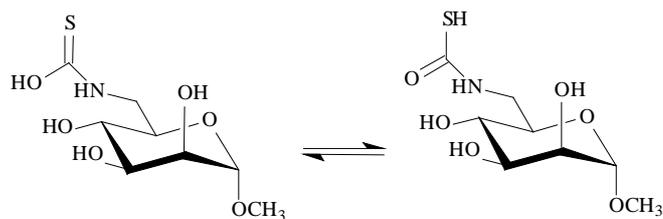
1H -NMR (400 MHz, D_2O): δ = 5.03 (d, 3 H, H-1); 4.19 (dd, 3 H, H-2); 4.01 (dd, 3 H, H-3); 4.10-3.92 (m, 15 H, CSNHCH₂, H-5, H-6, H-6'); 3.86 (dd \approx t, 3 H, H-4); 3.67 (s, 9 H, OCH₃); 3.29 (br s, 6 H, NCH₂) ppm;

$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{3,4} = 9.7$; $J_{4,5} = 9.7$ Hz;

^{13}C -NMR (100.67 MHz, D_2O , [D_3]-Acetonitril): δ = 182.76 (NCS); 101.80 (C-1); 71.76, 71.26, 70.81, 68.80 (C-2, -3, -4, -5); 55.50 (OCH₃); 53.83 (NCH₂); 45.54 (C-6); 42.00 (CSNHCH₂) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 852 ($M^+ + H$. Ber. für $C_{19}H_{22}NO_{10}S$: 852.32).

(Weiterhin wurden 102 mg eines farblosen Sirups isoliert, dessen NMR-Interpretation die Struktur nahelegt:



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.80 (br s, 1 H, NH); 7.53 (s, 0.5 H, SH); 4.70 (d, 1 H, H-1); 4.13 (dd \approx t, 1 H, H-4); 3.95-3.87 (m, 3 H, H-3, -5, -2); 3.47 (dd, 0.6 H, H-6); 3.46 (dd, 0.6 H, H-6), 3.36 (s, 3 H, OCH_3); 3.21 (dd \approx t, 1 H, H-6') ppm;

$J_{3,4} = 9.7$; $J_{4,5} = 9.7$; $J_{5,6} = 6.1$; $J_{6,6'} = 11.7$ Hz;

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.67 MHz, CDCl_3): δ = 186.13 (C=S); 100.84 (C-1); 77.51 (C-4); 69.81 (C-5); 66.73 (C-2); 59.41 (C-3); 53.93 (OCH_3); 43.82 (C-6) ppm, C-5 & C-2 können auch vertauscht sein)

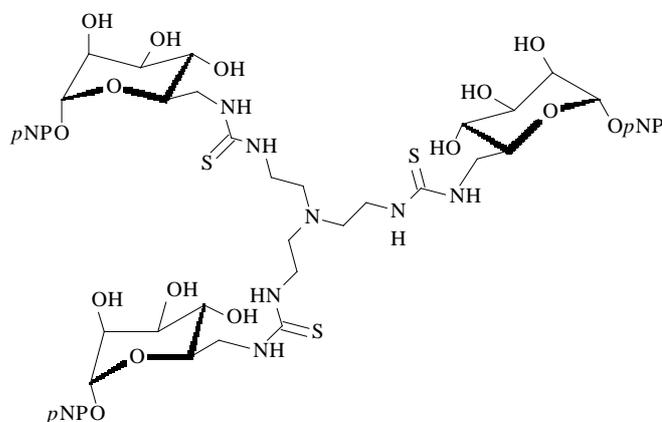
b)

236 mg (0.132 mmol) Tris-{2-[3-(2',3',4'-tri-*O*-benzoyl-6'-desoxy-1-*O*-methyl- α -D-mannopyranos-6'-yl)-thioureido]-ethyl}-amin (**80**) werden nach AVV 2 in 60 ml 5 : 1 abs. MeOH-abs. DMF 3 Tage bei 50°C de-*O*-benzoyliert. Die gelpermeationschromatographische Reinigung an Sephadex G-15 (15 mM wässr. NH_4HCO_3) ergab 30 mg (35 μmol , 27%) Tris-{2-[3-(6'-desoxy-1-*O*-methyl- α -D-mannopyranos-6'-yl)-thioureido]-ethyl}-amin (**82**) als weißes Lyophilisat.

c)

86 mg (0.07 mmol) Tris-{2-[3-(2',3',4'-tri-*O*-acetyl-6'-desoxy-1-*O*-methyl- α -D-mannopyranos-6'-yl)-thioureido]-ethyl}-amin (**81**) werden in 20 ml abs. MeOH nach AVV 2 de-*O*-acetyliert. Die gelpermeationschromatographische Reinigung an Sephadex G-15 (15 mM wässr. NH_4HCO_3) ergab 49 mg (0.06 mmol, 82%) Tris-{2-[3-(6'-desoxy-1-*O*-methyl- α -D-mannopyranos-6'-yl)-thioureido]-ethyl}-amin (**82**) als weißes Lyophilisat.

Tris-{2-[3-(6'-desoxy-1-*O*-(*p*-nitrophenyl)- α -D-mannopyranos-6'-yl)-thioureido]-ethyl}-amin (83**)**



$C_{45}H_{60}N_{10}O_{21}S_3$

MW 1173.20

291 mg (0.851 mmol, 3.3 mol eq.) *p*-Nitrophenyl-6-desoxy-6-isothiocyanato- α -D-mannopyranosid (**31**) werden mit 34.3 mg (0.234 mmol) Tris-(2-aminoethyl)-amin (**61**) 4 h nach AAV 6 umgesetzt. Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (1. 10 : 1 Ethylacetat-MeOH + 1% NH_3 ; 2. 7 : 2 : 1 Ethylacetat-MeOH- H_2O) ergab 244 mg (0.21 mmol, 89%) Tris-{2-[3-(6'-desoxy-1-*O*-(*p*-nitrophenyl)- α -D-mannopyranos-6'-yl)-thioureido]-ethyl}-amin (**83**) als weißes Lyophilisat.

TLC (7 : 2 : 1 Ethylacetat-MeOH- H_2O): $R_f = 0.77$ (UV, H_2SO_4);

$[\alpha]_D^{20} = +89.9^\circ$ (c 0.65, MeOH);

1H -NMR (400 MHz, $[D_4]$ -MeOH): $\delta = 8.23$ (d, 6 H, *o*-aryl-CH, $^3J = 9.7$ Hz); 7.30 (d, 6 H, *m*-aryl-CH, $^3J = 9.7$ Hz); 5.72 (d, 3 H, H-1); 4.10 (dd, 3 H, H-2); 3.96 (dd, 3 H, H-3); 3.87 (ddd, 3 H, H-5); 3.73 (dd, 3 H, H-6); 3.71 (dd \approx t, 3 H, H-4); 3.66 (dd, 3 H, H-6'); 3.47 (br s, 6 H, CSNHCH₂); 2.66 (br s 6 H, NCH₂) ppm;

$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{3,4} = 9.2$; $J_{4,5} = 9.7$; $J_{5,6} = 5.1$; $J_{5,6'} = 3.6$; $J_{6,6'} = 10.2$ Hz;

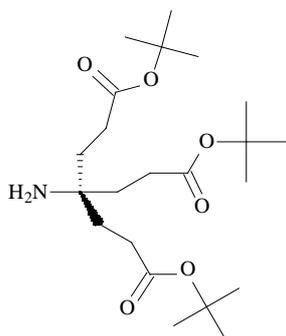
^{13}C -NMR (100.67 MHz, $[D_4]$ -MeOH): $\delta = 162.73$ (*i*-aryl-C_q); 144.10 (*p*-aryl-C_q); 127.11 (*m*-aryl-CH); 118.19 (*o*-aryl-CH); 100.16 (C-1); 74.45, 72.03, 71.78, 69.36 (C-2, -3, -4, -5); 54.55 (NCH₂); 46.39 (C-6); 43.91 (CSNHCH₂) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 1173.5 ($M^+ + H$. Ber. für $C_{45}H_{61}N_{10}O_{21}S_3$: 1173.32);

m/z (FAB-MS) 1173.2 ($M^+ + H$. Ber. für $C_{45}H_{61}N_{10}O_{21}S_3$: 1173.32);

$C_{45}H_{60}N_{10}O_{21}S_3$ (1173.21): Ber. C 46.07, H 5.15, N 11.94, S 8.20

Gef. C 46.16, H 5.16, N 11.92, S 8.18

4-Amino-di-^tbutyl-4-[2-(^tbutoxycarbonyl)-ethyl]-heptan-1,7-dioat (85)

$C_{22}H_{41}O_6N$
MW 415.57

2.5 g (5.61 mmol) Di-^tbutyl 4-nitro-4-[2-(^tbutoxycarbonyl)-ethyl]-heptandioat (**1**) werden in 50 ml abs. EtOH gelöst und mit 1 g T1-Raney-Nickel¹¹⁷, suspendiert in 15 ml abs. EtOH, versetzt und bei 25 bar/RT 3 Tage hydriert. Nach der Filtration über Celite und Konzentration in Vakuum wird das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Ethylacetat) gereinigt um 2.30 g (5.52 mmol, 99%) 4-Amino di-^tbutyl-4-[2-(^tbutoxycarbonyl)-ethyl]-heptandioat (**85**) als weißen amorphen Feststoff zu erhalten.

TLC (3 : 1 MeOH-Toluol): $R_f = 0.52$ ($KMnO_4$);

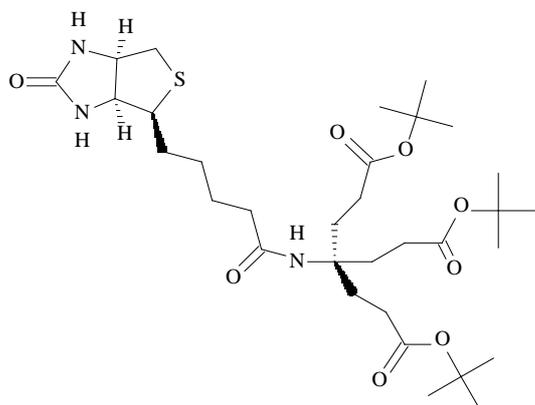
$m_p = 49-50^\circ C$; Lit.,¹²⁰ $51-52^\circ C$;

¹H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 2.31-2.28$ (m, 6 H, CH_2CH_2CO); $1.68-1.64$ (m, 6 H, CH_2CH_2CO); 1.49 (s, 27 H, CH_3); 1.22 (t, 2 H, NH_2 , $J = 7.12$ Hz) ppm.

¹³C-NMR (100.67 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 175.15$ (CO); 81.86 ($C(CH_3)_3$); 58.60 (C_q-NH_2); 35.40 (C_q-CH_2); 31.18 (CH_2CO); 28.66 (CH_3) ppm.

Anmerkung: Frisch hergestelltes T1-Raney-Nickel sollte sich bei Luftkontakt spätestens nach 30 s im Filterpapier selbst entzünden, um die notwendige Katalysatoraktivität zu gewährleisten. Die Entsorgung der Katalysatorreste erfolgte nach kontrollierter Verbrennung im Schwermetallbehälter.

4-(*N*-Biotinamido)-di-^tbutyl-4-[2-(^tbutoxycarbonyl)-ethyl]-heptan-1,7-dioat (86**)**



$C_{32}H_{55}N_3O_8S$

MW 641.86

Zu einer Lösung von 308 mg (+)-Biotin (1.26 mmol) in 12 ml abs. DMF werden in Gegenwart von 300 μ l DIPEA (pH ca. 9) 561 mg (1.26 mmol) 4-Amino-di-^tbutyl-4-[2-(^tbutoxycarbonyl)-ethyl]-heptan-1,7-dioat (**85**), gelöst in 10 ml abs. DMF, zugegeben. Bei 0°C werden 241 mg EDC (1.26 mmol) und 340 mg 1-HOBT (2.52 mmol, 2 eq.) zugefügt und der Ansatz für weitere 60 min bei 0°C, dann über Nacht bei RT gerührt. Nach der Konzentration im Vakuum wird säulenchromatographisch (4 : 1 Ethylacetat-MeOH, 2 fache Füllmenge) an Kieselgel gereinigt, um 780 mg 4-(*N*-Biotinamido)-di-^tbutyl-4-[2-(^tbutoxycarbonyl)-ethyl]-heptan-1,7-dioat (**86**) (1.22 mmol, 97%) als weißen amorphen Feststoff zu erhalten.

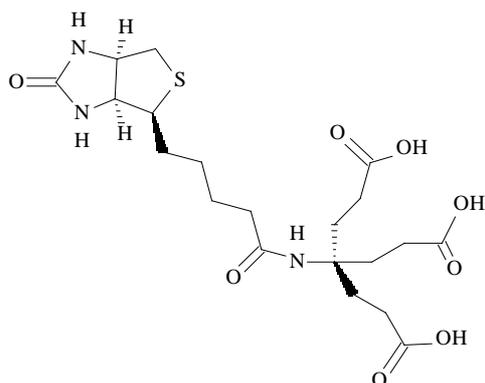
TLC (8 : 2 Ethylacetat-MeOH): $R_f = 0.58$ (5 : 2 $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O - Ce(HSO_4)_4$ in verd. H_2SO_4 , Blaufärbung);

¹H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 6.69$ (br s, $NHCONH$); 6.52 (br s, $NHCONH$); 6.21 (br s, $CONHC_q$); 4.45 (dd \approx t, 1 H, $CONHCHCH_2S$, $^3J_{cis} = 4.7$; $^3J_{trans} = 7.6$ Hz); 4.30 (dd \approx t, 1 H, $CONHCHCH(CH_2CH_2R)S$, $^3J_{cis} = 4.7$; $^3J_{trans} = 7.3$ Hz); 3.12 (m_c, 1 H, $CONHCHCH(CH_2CH_2R)S$); 2.88 (dd, 1 H, $CONHCHCHHS$, $^3J = 4.7$, $^2J = 12.6$ Hz); 2.73 (dd \approx d, 1 H, $CONHCHCHHS$, $^3J < 1$ Hz); 2.20 (m_c, 6 H, $C_qCH_2CH_2COOtBu$); 2.15 (m_c, 2 H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CONHC_q$); 1.97 (m_c, 6 H, $C_qCH_2CH_2COOtBu$); 1.71 (m_c, 1 H, $CHHCH_2CH_2CH_2CONHC_q$); 1.62 (m_c, 3 H, $CHHCH_2CH_2CH_2CONHC_q$); 1.42 (m_c, 29 H, $CH_2CH_2CH_2CH_2CONHC_q$, $(C_q(CH_3)_3)$ ppm);

¹³C-NMR (100.67 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 173.03$ (CO); 172.96 (NHCO); 162.73 (NHCONH); 91.92 (C_q , $CONHC$); 82.07 ($C_q(CH_3)_3$); 61.86 ($CONHCHCH_2S$); 60.38 ($CONHCHCH(CH_2CH_2R)S$); 57.32 ($CONHCHCH(CH_2CH_2R)S$); 40.52 ($CONHCHCH_2S$); 36.76 ($CH_2CH_2CH_2CH_2CONHC_q$); 32.08 ($C_qCH_2CH_2COOtBu$); 30.70

(CH₂CH₂CH₂CH₂CONHC_q); 30.21 (C_qCH₂CH₂COOtBu); 29.82 (CH₂CH₂CH₂CH₂CONHC_q); 28.68 (C(CH₃)₃); 27.94 (CH₂CH₂CH₂CH₂CONHC_q) ppm;
 m/z (MALDI-TOF) 664.28 (M⁺+Na. Ber. für C₃₂H₅₅N₃O₈SNa: 664.36), 680.17 (M⁺+K. Ber. für C₃₂H₅₅N₃O₈SK: 680.33).

4-(2-Carboxyethyl)-4-*N*-biotinamido-heptan-1,7-dicarbonsäure (**87**)



C₂₀H₃₁N₃O₈S

MW 473.54

200 mg (0.312 mmol) 4-(*N*-Biotinamido)-di-*t*-butyl-4-[2-(*t*-butoxycarbonyl)-ethyl]-heptan-1,7-dioat (**86**) werden mit 10 ml 98%iger Ameisensäure 5 h bei RT gerührt, im Vakuum konzentriert und wiederholt mit Toluol codestilliert, um 146 mg (0.308 mmol, 99%) 4-(2-Carboxyethyl)-4-*N*-biotinamido-heptan-1,7-dicarbonsäure (**87**) als farbloser Sirup zu erhalten.

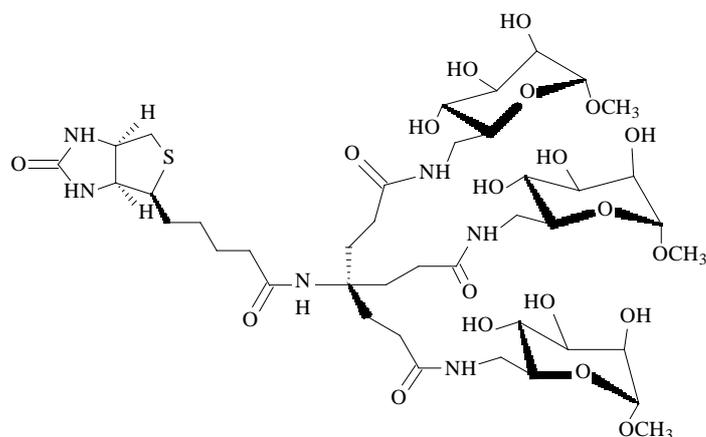
TLC (7 : 3 *n*-PrOH-H₂O + 1% NH₃): R_f = 0.35 (5 : 2 (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4 H₂O-Ce(HSO₄)₄ in verd. H₂SO₄, Blaufärbung);

¹H-NMR (500 MHz, [D₄]-MeOH): δ = 8.16 (br s, 2 H, NHCONH); 8.02 (br s, 1 H, NHCO); 4.53 (dd, 1 H, CONHCHCH₂S, ³J_{cis} = 4.41 ; ³J_{trans} = 8.20 Hz); 4.36 (dd, 1 H, CONHCHCH(CH₂CH₂R)S, ³J_{cis} = 4.41; ³J_{trans} = 7.57 Hz); 3.25 (ddd, 1 H, CONHCHCH(CH₂CH₂R)S); 2.97 (dd, 1 H, CONHCHCHHSC, ³J = 5.04, ²J = 12.61 Hz); 2.74 (dd ≈ d, 1 H, CONHCHCHHS, ³J < 1 Hz); 2.32 (m_c, 6 H, C_qCH₂CH₂COOH); 2.24 (m_c, 2 H, CH₂CH₂CH₂CH₂CONHC_q); 2.06 (m_c, 6 H, C_qCH₂CH₂COOH); 1.77 (m_c, 1 H, CHHCH₂CH₂CH₂CONHC_q); 1.68 (m_c, 3 H, CHHCH₂CH₂CH₂CONHC_q); 1.50 (m_c, 2 H, CH₂CH₂CH₂CH₂CONHC_q) ppm;

¹³C-NMR (125.77 MHz, [D₄]-MeOH): δ = 177.45 (C_q(CH₂CH₂COOH)₃); 176.01 (CH₂CONH); 166.47 (NHCONH); 91.92 (CONHC_q(CH₂CH₂COOH)₃); 63.55 (CONHCHCH₂S); 61.94 (CONHCHCH(CH₂CH₂R)S); 58.89 (CONHCHCH(CH₂CH₂R)S);

41.34 (CONHCH₂S); 37.67 (CH₂CH₂CH₂CH₂CONHC_q); 32.08 (C_qCH₂CH₂COOH);
 30.78 (CH₂CH₂CH₂CH₂CONHC_q); 30.030 (C_qCH₂CH₂COOH); 29.57
 (CH₂CH₂CH₂CH₂CONHC_q); 27.26 (CH₂CH₂CH₂CH₂CONHC_q) ppm;
 m/z (MALDI-TOF) 496.17 (M⁺+Na. Ber. für C₂₀H₃₁O₈N₃SNa: 496.17), 512.13 (M⁺+K.
 Ber. für C₂₀H₃₁O₈N₃SK: 512.15).

***N*-Biotinamido-tris-{2-[(6'-desoxy-1'-*O*-methyl- α -D-mannopyranos-6'-yl)-
 carbonylamido]-ethyl}-methan (**88**)**



C₄₁H₇₀O₂₀N₆S

MW 999.10

67 mg (0.142 mmol) 4-(2-Carboxyethyl)-4-*N*-biotinamido-heptan-1,7-dicarbonsäure (**87**)
 und 88 mg (0.455 mmol, 3.2 eq.) Methyl-6-amino-6-desoxy- α -D-mannopyranosid (**26**)
 werden in Gegenwart von 0.5 ml DIPEA in 50 ml abs. DMF gelöst. Nach Kühlung auf 0°C
 wird die Reaktion durch Zugabe von 27 mg (0.142 mmol) EDC und 38.4 mg (0.284 mmol)
 1-HOBT, gelöst in 10 ml abs. DMF, während 20 min gestartet, 1 h bei 0°C, dann 2 Tage
 bei RT gerührt. Der Ansatz wird im Vakuum konzentriert und gelpermeationschromato-
 graphisch an Sephadex LH-20 (MeOH), dann an Sephadex G-15 (15 mM wässr.
 NH₄HCO₃) gereinigt, um 129 mg (0.129 mmol, 91%) *N*-Biotinamido-tris-{2-[(6'-desoxy-
 1'-*O*-methyl- α -D-mannopyranos-6'-yl)-carbonylamido]-ethyl}-methan (**88**) als hellgelben
 amorphen Feststoff zu isolieren.

TLC (7 : 3 *n*-PrOH-H₂O + 1% NH₃): R_f = 0.27 (UV, H₂SO₄, 5 : 2 (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4 H₂O-
 Ce(HSO₄)₄ in verd. H₂SO₄, Blaufärbung);

[α]_D²⁰ = +96.7° (*c* 0.45, H₂O);

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.33 (br s, 6 H, NHCO); 4.61 (d, 3 H, H-1); 4.47 (dd,
 1 H, CONHCH₂S, ³J_{cis} = 4.6 ; ³J_{trans} = 7.6 Hz); 4.29 (dd, 1 H,

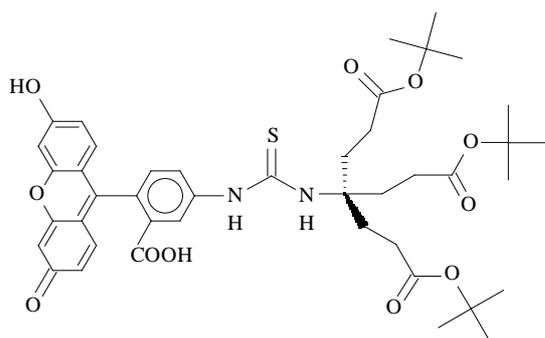
CONHCHCH(CH₂CH₂R)S, ³J_{trans} = 7.6; ³J_{cis} = 4.6 Hz); 3.79 (dd, 3 H, H-2); 3.60 (dd, 3 H, H-3); 3.51-3.46 (m, 6 H, H-5, 6'); 3.42 (dd ≈ t, 3 H, H-4); 3.30 (dd, 3 H, H-6); 3.24 (s, 9 H, OCH₃); 3.23-3.05 (m, 1 H, CONHCHCH(CH₂CH₂R)S); 2.87 (dd, 1 H, CONHCHCHHS, ³J = 4.6; ²J = 13.2 Hz); 2.65 (dd ≈ d, 1 H, CONHCHCHHS, ³J < 1 Hz); 2.22-2.05 (m, 8 H, C_qCH₂CH₂CONHCH₂, CH₂CH₂CH₂CH₂CONHC_q); 1.90-1.73 (m, 8 H, CH₂CH₂CH₂CH₂CONHC_q, C_qCH₂CH₂CONHCH₂); 1.62-1.41 (m, 2 H, CH₂CH₂CH₂CH₂CONHC_q); 1.31-1.24 (m, 2 H, CH₂CH₂CH₂CH₂CONHC_q) ppm;

J_{1,2} = 1.5; J_{2,3} = 3.6; J_{3,4} = 9.7; J_{4,5} = 9.7; J_{5,6} = 5.1; J_{6,6'} = 12.7 Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, CDCl₃): δ = 176.74 (C_q(CH₂CH₂CONH-Man)₃); 176.47 (NHCO); 165.73 (NHCONH); 101.17 (C-1); 92.92 (CONHC_q(CH₂CH₂CONH-Man)₃); 71.02 (C-5); 70.73 (C-3); 70.24 (C-2); 68.49 (C-4); 62.42 (CH, CONHCHCH(CH₂CH₂R)S); 60.61 (CH, CONHCHCH₂S); 55.69 (OCH₃); 54.99 (CONHCHCH(CH₂CH₂R)S); 40.44 (C-6); 40.09 (SCH₂); 36.61 (CH₂CH₂CH₂CH₂CONH); 31.84 (C_qCH₂CH₂CONHCH₂); 30.38 (CH₂CH₂CH₂CH₂CONH); 28.40 (C_qCH₂CH₂CONHCH₂); 28.04 (CH₂CH₂CH₂CH₂CONH); 25.61 (CH₂CH₂CH₂CH₂CONH) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 999.41 (M⁺+H. Ber. für C₄₁H₇₁O₂₀N₆S: 999.44), 1021.40 (M⁺+Na. Ber. für C₄₁H₇₀O₂₀N₆SNa: 1021.43), 1037.52 (M⁺+K. Ber. für C₄₁H₇₀O₂₀N₆SK: 1037.40).

***N*-Fluorescein-*N'*-{di-^tbutyl-4-[2-(^tbutoxycarbonyl)-ethyl]-heptan-1,7-dioat}-thioharnstoff (90)**



C₄₃H₅₂N₂O₁₁S

MW 804.95

14.8 mg (0.036 mmol) 4-Amino-di-^tbutyl-4-[2-(^tbutoxycarbonyl)-ethyl]-heptan-1,7-dioat (**85**), gelöst in 3 ml abs. DME, werden innerhalb von 2 h bei 40°C unter Argon-Atmosphäre 13.9 mg (0.036 mmol) Fluoresceinisothiocyanat Isomer 1 (**89**), gelöst in 6 ml abs DME, zugetropft. Nach 12 h Rühren bei 35°C wird im Vakuum konzentriert und der Ansatz flashchromatographisch (1. 2 : 1 Ethylacetat-Petrolether, 2. 4 : 1 Ethylacetat-Petrolether, 3. 1 : 1 Ethylacetat-MeOH) gereinigt, um 35 mg (quant.) *N*-Fluorescein-*N'*-

{di-^t-butyl-4-[2-(^t-butoxycarbonyl)-ethyl]-heptan-1,7-dioat}-thioharnstoff (**90**) als gelben Sirup zu isolieren, dessen ¹³NMR-Interpretation allerdings auf die Bildung von Isomeren hindeutet.

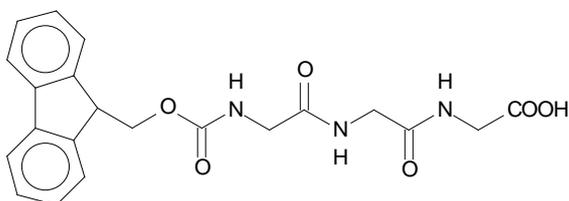
TLC (2 : 1 Ethylacetat-Petrolether): R_f = 0.16 (UV, gelb);

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.26-7.24 (m, 3 H, aryl-CH); 7.18-7.16 (m, 2 H, aryl-CH); 6.77-6.49 (m, 3 H, aryl-CH); 2.40-2.24 (m, 12 H, CH₂CH₂CO); 1.44 (s, 27 H, C(CH₃)₃) ppm;

¹³C-NMR (100.67 MHz, CDCl₃): δ = 187.99 (aryl-C=O); 180.02 (NHCSNH); 176.71 (C=OO^tBu); 172.78 (aryl-COOH); 167.38 (aryl-COCHO); 154.48 (aryl-HOCCHO); 152.69 (aryl-HOCCHO); 142.93 (aryl-COCHCH); 133.68 (aryl-C_q); 132.34 (aryl-C_q); 129.01, 128.20, 125.28 (aryl-CH); 81.01 (C_q(CH₃)₃); 59.01 (HNSNHC_q); 30.08, 29.67 (6 NHC_q(CH₂CH₂COO^tBu)₃); 28.03 (C(CH₃)₃) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 805.33 (M⁺+H. Ber. für C₄₃H₅₃N₂O₁₁S: 805.34), 827.28 (M⁺+Na. Ber. für C₄₃H₅₂N₂O₁₁SNa: 827.32), 843.28 (M⁺+K. Ber. für C₄₃H₅₂N₂O₁₁SK: 843.29).

N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-glycyl-glycyl-glycin (**94**)



C₂₁H₂₁O₆N₃

MW 411.41

1.0 g (5.286 mmol) Triglycin werden in 40 ml ges. NaHCO₃-Lösung gelöst und auf 0°C gekühlt. Zu dieser Lösung werden 1.78 g (5.28 mmol) 9-Fluorenylmethylsuccinimidylcarbonat, gelöst in 30 ml abs. DMF, innerhalb 10 min zugetropft, auf RT erwärmt und 1 h gerührt. Zur Aufarbeitung werden 125 ml H₂O zugegeben, die wässr. Phase gewaschen (100 ml Et₂O, 2x 100 ml Ethylacetat) und nach Kühlung auf 0°C mit 5 N HCl angesäuert. Das ausgefallene Produkt wird abfiltriert und umkristallisiert (2 : 1-Acetonitril-MeOH), um 2.15 g (5.226 mmol, 99%) als weißer amorpher Feststoff.

TLC (7 : 3 n-PrOH-H₂O + 1% NH₃): R_f = 0.56 (UV);

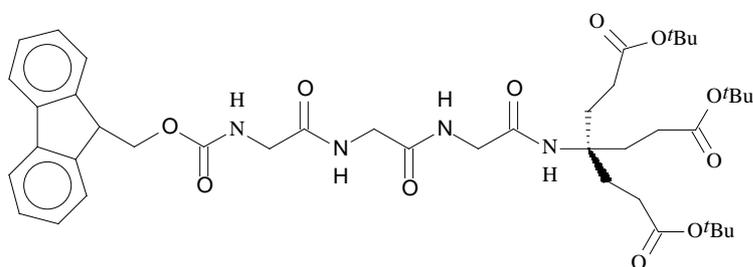
¹H-NMR (400 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 8.22 (t, 1H, NH; J = 5.6 Hz); 8.18 (t, 1 H, NH, J = 5.6 Hz); 7.88 (d, 2 H, aryl-Fmoc, J = 7.6 Hz); 7.71 (d, 2 H, aryl-Fmoc, J = 7.6 Hz); 7.59 (t, 1 H, NH, J = 6.1 Hz); 7.40 (t, 2 H, aryl-Fmoc, J = 7.6 Hz); 7.32 (t, 2 H, aryl-Fmoc, J = 7.6

Hz); 4.27 (d, 2 H, CH₂-Fmoc, *J* = 6.1 Hz); 4.21 (t, 1 H, CH-Fmoc, *J* = 6.1); 3.75-3.72 (m, 4 H, NHCH₂COO); 3.66 (d, 2 H, NHCH₂COO, *J* = 6.1 Hz) ppm;

¹³C-NMR (100.67 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 171.21, 169.59, 169.30 (3 C=O); 144.02, 140.89 (2 C_q, aryl-Fmoc); 127.82, 127.27, 125.45, 120.28 (4 aryl-Fmoc-CH); 65.93 (CH₂-Fmoc); 46.80 (CH-Fmoc); 43.68, 41.95, 40.81 (3 HNCH₂CO) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 412.16 (M⁺+H. Ber. für C₂₁H₂₂O₆N₃: 412.15), 434.13 (M⁺+Na. Ber. für C₂₁H₂₁O₆N₃Na: 434.13), 450.11 (M⁺+K. Ber. für C₂₁H₂₁O₆N₃K: 450.11).

4-(*N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-triglycylamido)-di-^tbutyl-4-[2-(^tbutoxycarbonyl)-ethyl]-heptan-1,7-dioat (**95**)



C₄₃H₆₀N₄O₁₁

MW 808.97

70 mg (0.168 mmol) 4-Amino-di-^tbutyl-4-[2-(^tbutoxycarbonyl)-ethyl]-heptan-1,7-dioat (**85**) werden zu einer Lösung von 69 mg (0.168 mmol) *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-glycyl-glycyl-glycin und 50 mg (0.202 mmol, 1.2 eq.) EEDQ in 15 ml abs. DMAc bei 60°C innerhalb 6 h portionsweise zugefügt. Nach Beendigung der Reaktion wird lyophilisiert und über Kieselgel filtriert (1. Toluol; 2. 1 : 1 Ethylacetat-Toluol, 3. DMAc), um 115 mg (0.142 mmol, 63%) 4-(*N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-triglycylamido)-di-^tbutyl-4-[2-(^tbutoxycarbonyl)-ethyl]-heptan-1,7-dioat (**95**) als weißen amorphen Feststoff zu erhalten.

TLC (7 : 3 *n*-PrOH-H₂O + 1% NH₃): R_f = 0.59 (UV);

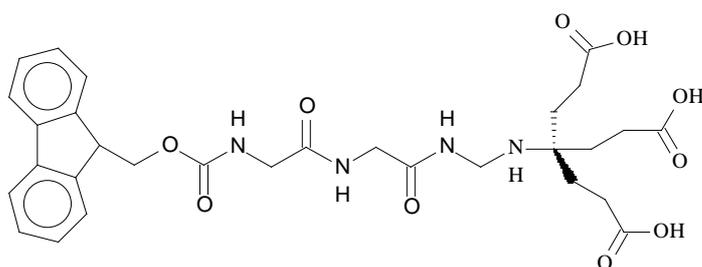
¹H-NMR (400 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 8.16 (t, 1H, NH; *J* = 5.6 Hz); 7.99 (t, 1 H, NH, *J* = 5.6 Hz); 7.88 (d, 2 H, aryl-Fmoc, *J* = 7.6 Hz); 7.71 (d, 2 H, aryl-Fmoc, *J* = 7.6 Hz); 7.61 (t, 1 H, NH, *J* = 6.6 Hz); 7.41 (t, 2 H, aryl-Fmoc, *J* = 7.6 Hz); 7.32 (t, 2 H, aryl-Fmoc, *J* = 7.6 Hz); 4.28 (d, 2 H, CH₂-Fmoc, *J* = 6.6 Hz); 4.22 (t, 1 H, CH-Fmoc, *J* = 6.6); 3.74-3.70 (m, 4 H, NHCH₂COO); 3.67-3.65 (m, 2 H, NHCH₂COO, *J* = 6.1 Hz); 2.21-2.06 (m, 6 H, CH₂CH₂CO); 1.80-1.60 (m, 6 H, CH₂CH₂CO); 1.36 (s, 27 H, CH₃) ppm;

¹³C-NMR (100.67 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 178.33 (COO^tBu); 175.88, 172.86, 172.35 (3 C=O glycyl); 144.02, 140.90 (2 C_q, aryl-Fmoc); 127.81, 127.26, 125.43, 120.29 (4 aryl-

Fmoc-CH); 79.86 (C(CH₃)₃); 65.96 (CH₂-Fmoc); 51.79, 49.34, 48.02 (3 HNCH₂CO); 46.82 (CH-Fmoc); 42.22 (C_qCH₂CH₂COO^tBu); 34.46 (C_qCH₂CH₂COO^tBu); 29.90 (C_qCH₂CH₂COO^tBu); 27.91 (CH₃) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 809.40 (M⁺+H. Ber. für C₄₃H₆₁N₄O₁₁: 809.43), 831.41 (M⁺+Na. Ber. für C₄₃H₆₀N₄O₁₁Na: 831.42), 847.38 (M⁺+K. Ber. für C₄₃H₆₀N₄O₁₁K: 847.39).

4-(2-Carboxyethyl)-4-(N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)triglycylamido)-aminoheptan-1,7-dicarbonsäure (96)



C₂₉H₃₆N₄O₁₁

MW 616.63

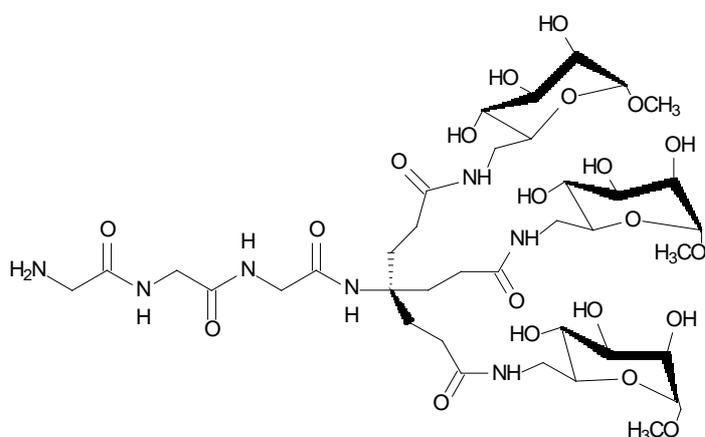
172 mg (0.213 mmol) 4-(N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-triglycylamido)-di-^tbutyl-4-[2-(^tbutoxycarbonyl)-ethyl]-heptan-1,7-dioat (**95**) werden mit 30 ml HCO₂H 2 h bei RT gerührt, konzentriert und mit Toluol, dann mit 3 : 1 Toluol-MeOH codestilliert, um 131 mg (0.212 mmol, quant.) 4-(2-Carboxyethyl)-4-(N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-triglycylamido)-aminoheptan-1,7-dicarbonsäure (**96**) als weißer amorpher Feststoff.

TLC (7 : 3 *n*-PrOH-H₂O + 1% NH₃): R_f=0.25 (UV);

¹H-NMR (400 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 8.10 (t, 1H, NH; *J* = 6.1 Hz); 7.99 (t, 1 H, NH, *J* = 6.1 Hz); 7.88 (d, 2 H, aryl-Fmoc, *J* = 7.1 Hz); 7.70 (d, 2 H, aryl-Fmoc, *J* = 7.1 Hz); 7.61 (t, 1 H, NH, *J* = 7.1 Hz); 7.40 (t, 2 H, aryl-Fmoc, *J* = 7.6 Hz); 7.33 (t, 2 H, aryl-Fmoc, *J* = 7.6 Hz); 4.23 (d, 2 H, CH₂-Fmoc, *J* = 7.12 Hz); 4.16 (t, 1 H, CH-Fmoc, *J* = 7.1); 3.78-3.70 (m, 4 H, NHCH₂COO); 3.67-3.60 (m, 2 H, NHCH₂COO); 2.22-2.08 (m, 6 H, CH₂CH₂COOH); 1.86-1.62 (m, 6 H, CH₂CH₂COOH) ppm;

¹³C-NMR (100.67 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 176.52, 175.95, 174.61 (3 C=O glycyl); 144.06, 139.60 (2 aryl-Fmoc-C_q); 129.12, 128.40, 127.48, 121.58 (4 aryl-Fmoc-CH); 65.88 (CH₂-Fmoc); 51.31, 48.74, 48.16 (3 HNCH₂CO); 46.42 (CH-Fmoc); 42.35 (C_qCH₂CH₂COOH); 34.52 (C_qCH₂CH₂COOH); 28.83 (C_qCH₂CH₂COOH) ppm.

***N*-Triglycylamido-tris-{2-[(6'-desoxy-1'-*O*-methyl- α -D-mannopyranos-6'-yl)-carbonylamido]-ethyl}-methan (**97**) im Gemisch**



$C_{37}H_{65}O_{21}N_7$

MW 943.96

144 mg (0.746 mmol, 3.7 mol eq.) Methyl-6-amino-6-desoxy- α -D-mannopyranosid (**26**) werden sehr langsam zu max. 124 mg (0.201 mmol) 4-(2-Carboxyethyl)-4-(*N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-triglycylamido)-aminoheptan-1,7-dicarbonsäure (**96**) in 10 ml abs. DMAc mit 221.3 mg (0.895 mmol, 3.3 mol eq.) EEDQ bei 40°C umgesetzt. Nach Beendigung der Reaktion wird lyophilisiert und das Rohprodukt mit ammonalkalischem MeOH in 3 : 1 Toluol-MeOH 1 h bei RT Fmoc-entschützt und mit 2 : 1 : 1 : 2 Et₂O-Petrolether-MeOH-H₂O extrahiert. Die methanolisch-wässr. Phase wird im Vakuum konzentriert und anschließend zweimal gelpermeationschromatographisch an Sephadex P2 extra fine (15 mM wr. NH₄HCO₃) gereinigt, um 79 mg eines weißen Lyophilisates zu erhalten, in dem *N*-Triglycylamido-tris-{2-[(6'-desoxy-1'-*O*-methyl- α -D-mannopyranos-6'-yl)-carbonylamido]-ethyl}-methan (**97**) zu 63% (¹H-NMR, ca. 0.08 mmol, ca. 42%) enthalten ist (2 Zuckersignalsätze). Das Nebenprodukt konnte nicht abgetrennt werden.

Spektroskopische Daten der Hauptkomponente:

TLC (7 : 3 *n*-PrOH-H₂O + 1% NH₃): R_f = 0.60 (H₂SO₄); Nebenprodukt: 0.85 (H₂SO₄);

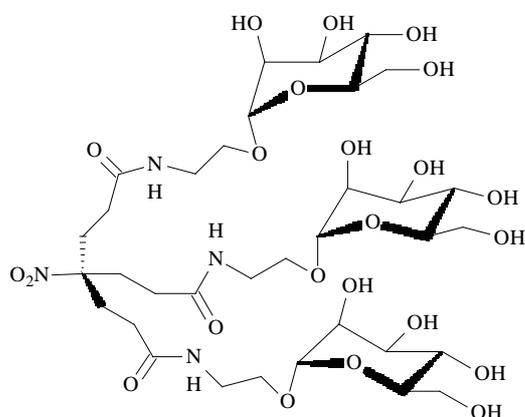
¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 4.68 (d, 3 H, H-1); 3.87-3.81 (m, 4 H, NHCH₂COO); 3.51-3.45 (m, 2 H, NHCH₂COO); 3.77 (dd, 3 H, H-2); 3.58 (dd, 3 H, H-3); 3.53-3.42 (m, 9 H, H-5, 6, H-4); 3.38 (dd, 3 H, H-6'); 3.20 (s, 9 H, OCH₃); 2.37-2.23 (m, 6 H,

C_qCH₂CH₂CONHCH₂); 1.78-1.68 (m, 6 H, C_qCH₂CH₂CONHCH₂) ppm;

J_{1,2} = 1.5; J_{2,3} = 3.6; J_{3,4} = 9.7; J_{5,6'} = 2.6; J_{6,6'} = 11.7 Hz;

m/z (MALDI-TOF) 944.36 (M⁺+H. Ber. für C₃₇H₆₆O₂₁N₇: 944.43), 966.34 (M⁺+Na. Ber. für C₃₇H₆₅O₂₁N₇Na: 966.41), 981.98 (M⁺+K. Ber. für C₃₇H₆₅O₂₁N₇K: 982.39).

Nitrotris-{2-[N-(2'-(α -D-mannopyranosyloxy)-ethyl)-carbonylamido-ethyl]-methan (98)



$C_{34}H_{60}N_4O_{23}$

MW 892.86

29 mg (0.130 mmol, 3.3 eq.) 2-Amino-ethyl- α -D-mannopyranosid (**42**), 26.7 mg (0.108 mmol) EEDQ und 11 mg (0.039 mmol) Nitrotris-(2-carboxyethyl)-methan (**2**) werden in 10 ml abs. DMAc bei 60°C 4 Tage umgesetzt. Nach Lyophilisation werden 50 ml H₂O zugegeben, dreimal mit Et₂O ausgeschüttelt und anschließend wird aus der wässr. Phase der gelöste Et₂O abdestilliert und nach Zugabe der dreifachen Menge H₂O lyophilisiert. Die gelpermeationschromatographische Reinigung an Biogel P2 extra fine (15 mM wässr. NH₄HCO₃) ergab 26 mg (0.029 mmol, 74%) Nitrotris-{2-[N-(2'-(α -D-mannopyranosyloxy)-ethyl)-carbonylamido-ethyl]-methan (**98**) als weißes Lyophilisat.

TLC (7 : 3 *n*-PrOH-H₂O + 1% NH₃): R_f = 0.11 (H₂SO₄);

$[\alpha]_D^{20} = +43.6^\circ$ (*c* 0.7, MeOH);

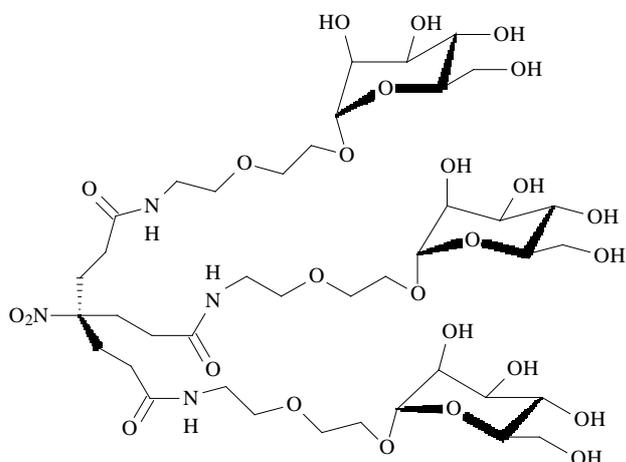
¹H-NMR (400 MHz, [D₄]-MeOH): δ = 4.86 (d, 3 H, H-1); 3.92 (dd, 3 H, H-2); 3.89 (dd, 3 H, H-6'); 3.88-3.77 (m, 3 H, OCHH); 3.79 (dd, 3 H, H-3); 3.77 (dd, 3 H, H-6); 3.67 (dd \approx t, 3 H, H-4); 3.62-3.58 (m, 6 H, CH₂N); 3.52-3.37 (m, 6 H, H-5, OCHH); 2.30 (br s, 12 H, O₂NC_qCH₂CH₂CO) ppm;

$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{3,4} = 9.2$; $J_{4,5} = 9.7$; $J_{5,6} = 5.6$; $J_{5,6'} = 2.2$; $J_{6,6'} = 12.2$ Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, [D₄]-MeOH): δ = 175.13 (C=O); 101.32 (C-1); 94.55 (C_q-NO₂); 74.49 (C-5), 72.29 (C-3), 71.77 (C-2), 68.35 (C-4); 67.16 (OCH₂CH₂NH); 62.57 (C-6); 40.48 (OCH₂CH₂NH); 32.19 (CH₂CH₂CONH); 31.41 (CH₂CH₂CONH) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 915.48 (M⁺+Na. Ber. für C₃₄H₆₀N₄O₂₃Na: 915.35), 931.46 (M⁺+K. Ber für C₃₄H₆₀N₄O₂₃K: 931.33).

Nitrotris-{2-[N-(2'-[2''-(α -D-mannopyranosyloxy)]-ethoxy)-ethyl]-carbonylamido-ethyl}-methan (99**)**



$C_{40}H_{72}N_4O_{26}$

MW 1025.02

48 mg (0.178 mmol) 2-(2'-Amino-ethoxy)-ethyl- α -D-mannopyranosid (**47**), 15 mg (0.054 mmol) Nitrotris-(2-carboxyethyl)-methan (**2**) und 53 mg (0.214 mmol) EEDQ werden in 15 ml abs. DMAc 4 Tage bei 60°C umgesetzt. Nach Lyophilisation werden 50 ml H₂O zugegeben, dreimal mit Et₂O ausgeschüttelt und anschließend wird aus der wässr. Phase der gelöste Et₂O abdestilliert und nach Zugabe der dreifachen Menge H₂O lyophilisiert. Die gelpermeationschromatographische Reinigung an Biogel P2 extra fine (15 mM wässr. NH₄HCO₃) ergab 38 mg (0.037 mmol 69%) Nitrotris-{2-[N-(2'-[2''-(α -D-mannopyranosyloxy)]-ethoxy)-ethyl]-carbonylamido-ethyl}-methan (**99**) als weißes Lyophilisat.

TLC (7 : 3 *n*-PrOH-H₂O + 1% NH₃): R_f = 0.14 (H₂SO₄);

$[\alpha]_D^{20} = +20.0^\circ$ (*c* 0.9, MeOH);

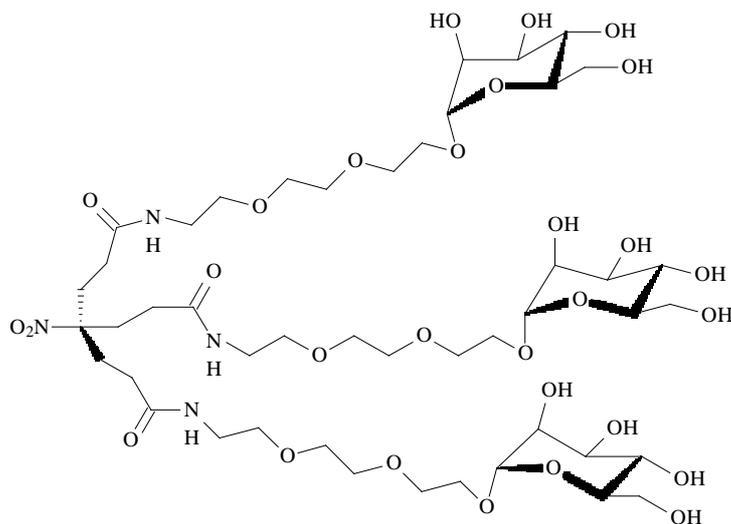
¹H-NMR (400 MHz, [D₄]-MeOH): δ = 4.85 (d, 3 H, H-1); 3.88 (dd, 3 H, H-6'); 3.86 (dd, 3 H, H-2); 3.75 (dd, 3 H, H-6); 3.75 (dd, 3 H, H-3); 3.70-3.66 (m, 12 H, CONHCH₂CH₂OCH₂); 3.65 (dd \approx t, 3 H, H-4); 3.60 (ddd, 3 H, H-5); 3.60-3.58 (m, 6 H, Man-OCH₂); 3.41 (t, 6 H, CONHCH₂, *J* = 5.4 Hz); 2.31-2.26 (m, 12 H, O₂NC_qCH₂CH₂CONH) ppm;

*J*_{1,2} = 1.9; *J*_{2,3} = 3.5; *J*_{3,4} = 9.5; *J*_{4,5} = 9.8; *J*_{5,6} = 5.7; *J*_{5,6'} = 2.2; *J*_{6,6'} = 11.7 Hz;

¹³C-NMR (100.67 MHz, [D₄]-MeOH): δ = 174.62 (C=O); 101.98 (C-1); 94.63 (C_q-NO₂); 74.94 (C-5); 72.87 (C-3); 72.41 (C-2); 71.50 (CONHCH₂CH₂OCH₂); 70.81 (CONHCH₂CH₂OCH₂); 69.00 (C-4); 68.05 (Man-OCH₂); 63.31 (C-6); 40.84 (CONHCH₂); 32.44 (O₂NC_qCH₂CH₂); 31.48 (O₂NC_qCH₂CH₂) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 1047.55 ($M^+ + Na$. Ber. für $C_{40}H_{72}N_4O_{26}Na$: 1047.43), 1063.55 ($M^+ + K$. Ber. für $C_{40}H_{72}N_4O_{26}K$: 1063.41).

Nitrotris-{2-[N-(2'-(2''-[2'''-(α -D-mannopyranosyloxy)]-ethoxy)-ethoxy)-ethyl]-carbonylamido-ethyl}-methan (100**)**



$C_{46}H_{84}N_4O_{29}$

MW 1157.18

41 mg (0.133 mmol) 2-[2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy]-ethyl- α -D-mannopyranosid (**52**), 10 mg (0.037 mmol) Nitrotris-(2-carboxyethyl)-methan (**2**) und 39 mg (0.214 mmol) EEDQ werden in 15 ml abs. DMAc 4 Tage bei 60°C umgesetzt. Nach Lyophilisation werden 50 ml H_2O zugegeben, dreimal mit Et_2O ausgeschüttelt und anschließend wird aus der wässr. Phase der gelöste Et_2O abdestilliert und nach Zugabe der dreifachen Menge H_2O lyophilisiert. Die gelpermeationschromatographische Reinigung an Biogel P2 extra fine (15 mM wässr. NH_4HCO_3) ergab 25 mg (0.022 mmol, 59%) Nitrotris-{2-[N-(2'-(2''-[2'''-(α -D-mannopyranosyloxy)]-ethoxy)-ethoxy)-ethyl]-carbonylamido-ethyl}-methan (**100**) als weißes Lyophilisat.

TLC (7 : 3 *n*-PrOH- H_2O + 1% NH_3): R_f = 0.13 (H_2SO_4);

$[\alpha]_D^{20} = +23.4^\circ$ (c 0.60, H_2O);

1H -NMR (400 MHz, D_2O): δ = 4.74 (d, 3 H, H-1); 3.81 (dd, 3 H, H-2); 3.73 (dd, 3 H, H-6);

3.72 (dd, 3 H, H-3); 3.66 (ddd, 3 H, H-5); 3.62-3.56 (m, 6 H, OCH_2); 3.60 (dd, 3 H, H-6');

3.55-3.53 (m, 15 H, 12 OCH_2 , H-4); 3.51-3.46 (m, 12 H, OCH_2); 3.24 (t, 6 H, OCH_2 ,

J 5.6 Hz); 2.13 (br s, 12 H, $C_qCH_2CH_2CONH$) ppm;

$J_{1,2} = 1.5$; $J_{2,3} = 3.6$; $J_{3,4} = 9.1$; $J_{4,5} = 9.1$; $J_{5,6} = 6.6$; $J_{5,6'} = 3.1$; $J_{6,6'} = 11.2$ Hz;

^{13}C -NMR (100.67 MHz, D_2O): δ = 174.81 (NHC=O); 100.30 (C-1); 94.43 (C_q - NO_2); 73.13

(C-5); 70.891 (C-3); 70.35 (C-2); 70.02 (CONHCH₂CH₂OCH₂); 69.88 (Man-OCH₂CH₂OCH₂); 69.79 (Man-OCH₂CH₂OCH₂); 69.15 (CONHCH₂CH₂OCH₂); 67.12 (C-4); 66.71 (C₁OCH₂CH₂); 61.31 (C-6); 39.39 (CONHCH₂CH₂); 30.90 (O₂NC_qCH₂CH₂CO); 30.38 (O₂NC_qCH₂CH₂CO) ppm;

m/z (MALDI-TOF) 1179.54 (M⁺+Na. Ber. für C₄₆H₈₄N₄O₂₉Na: 1179.51), 1195.54 (M⁺+K. Ber. für C₄₆H₈₄N₄O₂₉K: 1195.49).

13. Literaturverzeichnis

- 1) T. Feizi, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1993, **3**, 701-710.
- 2) A. Varki, *Glycobiology*, 1993, **3**, 97-130.
- 3) M. Fukuda, *Bioorg. Med. Chem.*, 1995, **3**, 207-215.
- 4) T. A. Springer, *Cell*, 1994, **76**, 301-314.
- 5) L. A. Lasky, *Ann. Rev. Biochem.*, 1995, **64**, 113-139.
- 6) R. A. Dwek, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 683-720.
- 7) A. Giannis, *Angew. Chem.*, 1994, **106**, 188-191, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1994, **33**, 178-180.
- 8) S. A. D. Frees, W. Kosch, W. Way, J. C. Paulson, S. Sabesan, R. L. Halcomb, D.-H. Huang, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 66-79.
- 9) U. Sprengard, M. Schudok, W. Schmidt, G. Kretzschmar, H. Kunz, *Angew. Chem.*, 1996, **108**, 359-362, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1996, **35**, 321-324.
- 10) U. Sprengard, G. Kretzschmar, E. Bartnik, C. Hüls, H. Kunz, *Angew. Chem.*, 1995, **107**, 1104-1107, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1995, **35**, 990-993.
- 11) I. Kahane, I. Ofek. (Eds.), *Toward anti-adhesion therapy for microbial diseases, Adv. In Experimental Medicine and Biology*, **408**, Plenum press, New York 1996.
- 12) R. Roy, C. A. Laferiere, *Carbohydr. Res.*, 1988, **177**, C1-C4.
- 13) M. N. Matrosovich, L. V. Mochalova, V. P. Marinina, N. E. Byramova, N. V. Bovin, *FEBS Letters*, 1990, **272**, 209-212.
- 14) N. E. Byramova, L. V. Mochalova, I. M. Belyanchikov, M. N. Matrosovich, N. V. Bovin, *J. Carbohydr. Chem.*, 1991, **10**, 691-700.
- 15) A. Spaltenstein, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 686-687.
- 16) R. Roy, D. Zanini, S. J. Meunier, A. Romanowska, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1993, 1869-1872.
- 17) H. C. Hansen, S. Haataja, J. Finne, G. Magnusson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 6974-6979.
- 18) K. H. Mortell, M. Gingras, L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 12053-12054.

- 19) F. D. Tropper, A. Romanowska, R. Roy, *Methods Enzymol.*, 1994, **242**, 257-271.
- 20) R. Roy, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1996, **6**, 692-702.
- 21) R. Roy, *Topics Curr. Chem.*, 1997, **187**, 241-274.
- 22) A. Kobata, *Acc. Chem. Res.*, 1993, **26**, 319-324.
- 23) S. I. Hakomori, *Annu. Rev. Immunol.*, 1984, **307**, 560-592.
- 24) T. Feizi, *Nature*, 1985, **314**, 53-57.
- 25) R. Schauer, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1982, **40**, 131-234.
- 26) M. H. Ravindranath, H. H. Higa, E. L. Cooper, J. C. Paulson, *J. Biol. Chem.*, 1985, **260**, 8850-8856.
- 27) H. J. M. Kempen, C. Hoes, J. H. v. Boom, H. H. Spanjer, J. Lange, A. Langendoen, T. J. C. Berkel, *J. Med. Chem.*, 1984, **27**, 1306-1312.
- 28) T. Toyokuni, B. Dean, S. Cai, D. Boivin, S. Hakomori, A. K. Singhal, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 395-396.
- 29) J. Beuth, H. L. Ko, G. Pulverer, G. Uhlenbruck, H. Pichlmaier, *Glycoconjugate J.*, 1995, **12**, 1-18.
- 30) H. Paulsen, *Angew. Chem.*, 1990, **102**, 851-867. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1990, **29**, 823-839.
- 31) J. Lehmann, *Chemie der Kohlenhydrate*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1996, 315.
- 32) K. Drickamer, *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**, 9557-9560.
- 33) K. Drickamer, M. E. Taylor, *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1993, **9**, 237-267.
- 34) E. H. Beachey, *J. Infect. Dis.*, 1981, **143**, 325-345.
- 35) K. A. Krogfelt, *Rev. Infect. Dis.*, 1991, **13**, 721-735.
- 36) I. Ofek, R. J. Doyle, *Bacterial Adhesion to Cells and Tissues*, Chapman and Hall, New York 1994.
- 37) J. Hacker, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1990, **151**, 1-27.
- 38) H. Conell, W. Agace, P. Klemm, M. Schembri, S. Marlid, C. Svanborg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**, 9827-9832.
- 39) E. V. Sokurenko, V. Chesuohova, R. J. Doyle, D. L. Hasky, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 17880-17886.

- 40) K.-A. Karlsson, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1995, **5**, 622-635.
- 41) K. A. Krogfelt, *Methods Enzymol.*, 1995, **253**, 50-53.
- 42) I. Orskov, F. Orskov, B. Jann, K. Jann, *Bacteriol. Rev.*, 1977, **41**, 667-710.
- 43) P. Klemm, *Eur. J. Biochem.*, 1984, **143**, 395-399.
- 44) P. Klemm, *Rev. Infect. Dis.*, 1985, **143**, 321-340.
- 45) B. R. Keith, L. Maurer, P. A. Spears, P. E. Orndorff, *Infect. Immun.*, 1986, **53**, 693-696.
- 46) K. A. Krogfelt, H. Bergman, P. Klemm, *Infect. Immun.*, 1990, **58**, 1995-1998.
- 47) P. Klemm, K. A. Krogfelt, in P. Klemm (Eds.): *Fimbriae, Adhesion, Genetics, Biogenesis and Vaccines*, CRC Press, Boca Raton 1994, 9-26.
- 48) P. Klemm, *Res. Microbiol.*, 1992, **143**, 831-838.
- 49) P. Klemm, in P. Klemm (Eds.): *Fimbriae, Adhesion, Genetics, Biogenesis and Vaccines*, CRC Press, Tokyo 1994, 57-71.
- 50) P. Klemm, *J. Bact.*, 1994, **176**, 748-755.
- 51) N. Firon, I. Ofek, N. Sharon, *Carbohydr. Res.*, 1983, **120**, 235-249.
- 52) N. Firon, I. Ofek, N. Sharon, *Infect. Immun.*, 1984, **43**, 1088-1090.
- 53) J. R. Neeser, B. Koehleutter, P. Wuersch, *Infect. Immun.*, 1986, **52**, 428-436.
- 54) N. Firon, S. Ashkenazi, D. Mirelman, I. Ofek, N. Sharon, *Infect. Immun.*, 1987, **55**, 472-476.
- 55) N. Sharon, *FEBS Lett.*, 1987, **217**, 145-157.
- 56) L. Kiessling, N. Pohl, *Chem. Biol.*, 1996, **3**, 71-77.
- 57) M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.*, 1998, **110**, 2908-2953.
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1998, **37**, 2754-2794.
- 58) S. E. Goelz, *TIGG*, 1992, **4**, 36-43.
- 59) L. A. Lasky, *Science*, 1992, **258**, 964-969.
- 60) M. S. Mulligan, J. C. Paulson, S. DeFrees, Z.-L. Zheng, J. B. Lowe, P. A. Ward, *Nature*, 1993, **364**, 149.
- 61) D. T. Connolly, R. R. Townsend, K. Kawaguchi, Y. C. Lee, *J. Biol. Chem.*, 1982, **257**, 939-945.

- 62) R. T. Lee, R. R. Townsend, M. R. Hardy, J. Lönngren, J. Arnap, M. Haraldson, H. Lönn, *J. Biol. Chem.*, 1983, **258**, 199-202.
- 63) R. T. Lee, Y. C. Lee, *Methods Enzymol.*, **138**, Academic Press 1987, 424-429.
- 64) Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.*, 1995, **28**, 321-327.
- 65) J. K. Young, G. R. Baker, G. R. Newkome, K. F. Morris, C. S. Johnson, *Macromolecules*, 1994, **27**, 3464-3471.
- 66) G. R. Newkome, C. N. Moorefield, K. J. Theriot, *J. Org. Chem.*, 1988, **53**, 5552-5554.
- 67) G. R. Newkome, X. Lin, J. Young, *Synlett*, 1992, 53-54.
- 68) P. Fügedi, A. Lipták, P. Nánási, *Carbohydr. Res.*, 1982, **107**, C5-C8.
- 69) R. R. Schmidt, J. Michel, M. Roos, *Liebigs Ann. Chem.*, 1984, 1343-1357.
- 70) R. R. Schmidt, *Angew. Chem.*, 1986, **98**, 213-236. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1986, **98**, 212-225.
- 71) R. R. Schmidt, in S. H. Khan and R. A. O'Neill (Eds.): *Modern Methods in Carbohydrate Synthesis*, **1**, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1996, 20-54.
- 72) W. Liao, D. Lu, A. Li, F. Kong, *J. Carbohydr. Chem.*, 1997, **16**, 877-890.
- 73) R. Boss, R. Scheffold, *Angew. Chem.*, 1976, **1**, 578-579. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1976, **1**, 558-559.
- 74) S. Jacobsen, *Acta Chem. Scand.*, 1984, **B 38**, 157-164.
- 75) B. Schönecker, K. Ponsold, *J. prakt. Chem.*, 1976, **318**, 483-488.
- 76) J. M. G. Fernandez, C. O. Mellet, J. Fuentes, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 5192-5199.
- 77) P. Wang, G.-J. Shen, Y.-F. Wang, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 3985-3990.
- 78) H. Staudinger, E. Hauser, *Helv. Chim. Acta*, 1921, **4**, 861-886.
- 79) W. S. Mungall, G. L. Greene, G. A. Heavner, R. L. Letsinger, *J. Org. Chem.*, 1975, **40**, 1659-1662.
- 80) S. Friedrich-Bochnitschek, H. Waldmann, H. Kunz, *J. Org. Chem.*, 1989, **54**, 751-656.
- 81) Th. K. Lindhorst, S. Kötter, U. Krallmann-Wenzel, S. Ehlers, V. Křen, *Eur. J. Org. Chem.*, 1998, 1669-1674.
- 82) Y. S. Klausner, M. Bodansky, *Synthesis*, 1972, 453-463.

- 83) A. Y. Chernyak, G. V. Sharma, L. O. Kononov, P. R. Krishna, A. B. Levinsky, N. K. Kochetkov, A. V. R. Rao, *Carbohydr. Res.*, 1992, **223**, 303-309.
- 84) W. P. Reeves, M. L. Bahr, *Synthesis*, 1976, 823-824.
- 85) F. D. Tropper, F. O. Anderson, S. Braun, R. Roy, *Synthesis*, 1992, 618-620.
- 86) R. Roy, F. Tropper, *Synth. Commun.*, 1990, **20**, 2097-2102.
- 87) Ch. Kieburg, Th. K. Lindhorst, *Tetrahedron. Lett.*, 1997, **38**, 3885-3888.
- 88) D. Horton, *Org. Synthesis*, 1966, **46**, 1.
- 89) S. Singh, J. Packwood, C. J. Samuel, P. Critchley, D. H. G. Crout, *Carbohydr. Res.*, 1995, **279**, 293-305.
- 90) T. Osawa, *Carbohydr. Res.*, 1966, **1**, 435-443.
- 91) J. Kubisch, L. Weignerová, S. Kötter, Th. K. Lindhorst, P. Sedmera, V. Křen, *J. Carbohydr. Chem.*, 1999, **18**, 975-984.
- 92) V. Křen, J. Thiem, *Chem. Soc. Rev.*, 1997, **26**, 463-474.
- 93) E. Rajnochová, J. Dvůráková, Z. Hunková, V. Křen, *Biotech. Lett.*, 1997, **19**, 869-872.
- 94) S. Kötter, U. Krallmann-Wenzel, S. Ehlers, Th. K. Lindhorst, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1998, 2193-2200.
- 95) W. I. Weiss, K. Drickamer, *Annu. Rev. Biochem.*, 1996, **65**, 441-473.
- 96) T. Ogawa, K. Beppu, S. Nakabayashi, *Carbohydr. Res.*, 1981, **93**, C 6.
- 97) J. C. Sheenan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, **77**, 1067-1068.
- 98) J. C. Sheenan, M. Goodman, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, **78**, 1367-1370.
- 99) H. G. Khorana, *Chem. Rev.*, 1953, **53**, 145-166.
- 100) H. G. Khorana, *Chem. & Ind.*, 1955, 1087-1089.
- 101) M. Smith, J. G. Moffatt, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, **80**, 6204-6212.
- 102) D. F. DeTar, R. Silverstein, *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, **88**, 1013-1019.
- 103) D. F. DeTar, R. Silverstein, *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, **88**, 1020-1023.
- 104) D. F. DeTar, R. Silverstein, F. F. Rogers, *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, **88**, 1024-1030.
- 105) W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.*, 1970, **103**, 788-798.
- 106) M. Löw, L. Kisfaludy, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, 1965, **44**, 61-73.
- 107) F. Weygand, D. Hoffmann, E. Wünsch, *Z. Naturforsch.*, 1966, **21b**, 426-442.

- 108) E. Wunsch, F. Drees, *Chem. Ber.*, 1966, **99**, 110-120.
- 109) B. Belleau, G. Malek, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, **90**, 1651-1652.
- 110) B. Belleau, R. Martel, G. Lacasse, M. Menard, N. L. Weinberg, Y. G. Perron, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, **90**, 823-824.
- 111) Th. K. Lindhorst, Ch. Kieburg, *Angew. Chem.*, 1996, **108**, 2083-2086. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1996, **35**, 1953-1956.
- 112) T. Hultman, S. Stahl, E. Hornes, M. Uhlen, *Nucl. Acid Res.*, 1989, **17**, 4937-4946.
- 113) T. Hultman, S. Bergh, T. Moks, M. Uhlen, *BioTechniques*, 1991, **10**, 84-93.
- 114) H. Kaneoka, D. R. Lee, K.-C. Hsu, G. C. Sharp, R. W. Hoffmann, *BioTechniques*, 1991, **10**, 30-34.
- 115) C. R. Bertozzi, M. Bednarski, *Carbohydr. Res.*, 1992, **223**, 243-253.
- 116) A. K. Horst, C. Wagener, S. Kötter, Th. K. Lindhorst, S. Ehlers, 1999, eingereicht.
- 117) X. A. Dominguez, I. C. Lopez, R. Franco, *J. Org. Chem.*, 1961, **26**, 1625-1627.
- 118) J. C. Sheenan, P. A. Cruickshank, G. L. Boshart, *J. Org. Chem.*, 1956, **26**, 2525-2528.
- 119) Th. K. Lindhorst, Ch. Kieburg, U. Krallmann-Wenzel, *Glycoconjugate J.*, 1998, **15**, 605-613.
- 120) G. R. Newkome, R. K. Behera, C. N. Moorefield, G. R. Baker, *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, 7162-7167.
- 121) Y. Kondo, *Carbohydr. Res.*, 1986, **154**, 305-309.
- 122) S. Cottaz, J. S. Brimacombe, M. A. J. Ferguson, *Carbohydr. Res.*, 1993, **247**, 341-345.
- 123) J.-C. Florent, C. Monneret, Q. Khuong-Huu, *Tetrahedron*, 1978, **34**, 909-914.
- 124) R. R. Schmidt, W. Kinzy, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1994, **50**, 21-123.
- 125) Z. Hunková, V. Křen, M. Icígelová, L. Weignerová, O. Scheel, J. Thiem, *Biotechn. Lett.*, 1996, **18**, 725-730.

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen, die an der Entstehung dieser Arbeit ihren Anteil hatten, insbesondere meinen Eltern, Nils und meinen Freunden außerhalb des Labores Nataly, Claudia, Karsten, Thorsten, Götz, Oliver, Ada & Stephan, Kerstin & Frank, Anke & Heiko, Gaby & Thomas.

Mein besonderer Dank gilt Christoffer Kieburg, Andreas Naundorf, Mike Boysen, Anupama Patel und Kashinath Sadalapure, Mark Walter, Ingo Aumüller, Claudia Heuer und Michael Dubber, mit denen die gemeinsamen Laborstunden wie im Fluge vergingen, Thisbe Lindhorst für ihre Unterstützung, dem gesamten AK Thiem für die freundliche Aufnahme und Integration, GG für die häufige Post und ermunternde Gespräche, Inge **Schult für den exzellenten NMR-Service, Jiri Kubisch, Jana Dvořáková, Jan Trnka, Vladimír Havlíček, Petr Sedmera, Vladimír Křen und allen anderen Prager Kollegen für die abwechslungsreiche Tätigkeit in Prag.**

Für den wissenschaftlichen Unterricht danke ich den Herren Professoren und Dozenten K. Nagorny, B. Kastening, D. Rehder, J. Thiem, H. Köster, J. Voss, A. Krebs, R. Kramolowsky, A. Knöchel, U. Behrens, W. Francke, W. König, H. tom Dieck, G. Klar, C.-W. Vogel, G. Gercken und M. Ollert.

Mein ganz besonderer Dank gilt Susanne für ihre unermüdliche Liebe und Geduld.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sven Kötter
Geburtsdatum: 20.02.1966
Geburtsort: Hamburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Schulausbildung

1972-1976 Grund-und Hauptschule Meckelfeld
1976-1985 Gymnasium Meckelfeld
Juni 1985 Abitur

Wehrdienst

Oktober 1985-Dezember 1986

Studium

April 1987-September 1989 Grundstudium der Chemie an der Universität Hamburg
September 1989 Diplomvorprüfung (sehr gut), Universität Hamburg
September 1989-September 1994 Hauptstudium der Chemie an der Universität Hamburg
Juli 1994 Diplomhauptprüfung (sehr gut), Universität Hamburg
September 1994-Juni 1995 Diplomarbeit (sehr gut) bei Prof. Dr. H. Köster, Universität Hamburg. Thema: „Untersuchungen mit festphasengebundenen Desoxyoligonucleotiden“; "Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry of immobilized duplex DNA probes", K. Tang, D. Fu, S. Kötter, R. J. Cotter, C. R. Cantor, H. Köster, *Nucleic Acids Res.*, 1995, **23**, 3126-3131.

September 1995 Beginn einer Dissertation bei Prof. Dr. H. Köster, Universität Hamburg

Januar 1996-April 1999 Dissertation bei PD Dr. Th. Lindhorst, Universität Hamburg
Thema: „Synthese neuartiger Clustermannoside zur Inhibition bakterieller Adhäsion“

Wissenschaftliche Tätigkeiten

Januar 1993-Juli 1993	Wissenschaftliche Hilfskraft zur Betreuung des Anorganischen Grundpraktikums für Chemiker
September 1994-Dezember 1994	Wissenschaftliche Hilfskraft zur Betreuung des Organischen Praktikums für Biochemiker
1996	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen eines DFG-Projektes
1997-April 1999	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen des DFG Sonderforschungsbereiches 470 „Glycostrukturen in Biosystemen-Darstellung und Wirkungsweise“
seit Juli 1999	Mitarbeiter der Hoffmann-La Roche AG

