

Note

Synthese von modifizierten Tetrasacchariden als
analoge Akzeptor–Inhibitoren der
N-Acetylglucosaminyltransferase II [☆]

Hans Paulsen ^{a,*}, Matthias Springer ^a, Folkert Reck ^b, Inka
Brockhausen ^b, Harry Schachter ^b

^a *Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, Martin-Luther-King-Platz 6, D-20146 Hamburg, Deutschland*

^b *Department of Biochemistry, University of Toronto, and the Research Institute, Hospital for Sick Children, University Avenue, Toronto, Ontario M5G 1X8, Canada*

Eingegangen am 2 November 1994; angenommen am 17 Januar 1995

Keywords: *N*-Acetylglucosaminyltransferase II; Modified tetrasaccharide substrates; Transferase inhibitor; Trichloracetimidate glycosylation; *N*-Glycopeptide biosynthesis

Die *N*-Acetylglucosaminyltransferase II (GlcNAc-T II) ist das zweite Enzym, das in der Primärphase der Biosynthese der Saccharidkette von *N*-Glycoproteinen innerhalb des Trimming-Prozesses wirksam ist [1].

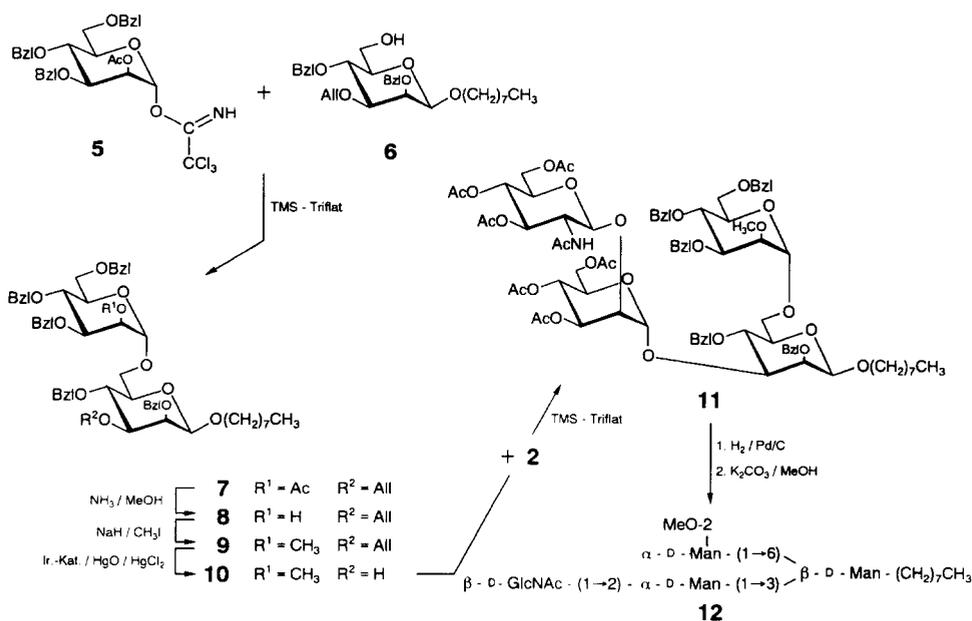
Erst nachdem durch die *N*-Acetylglucosaminyltransferase I (GlcNAc-T I) ein GlcNAc-Rest in das auf Abbildung 1 gezeigte Tetrasaccharid eingeführt wurde, folgt mit GlcNAc-T II die Glycosylierung der 2''-OH-Gruppe am Man-4'-Rest in dem in Abbildung 1 gezeigten Tetrasaccharid [2]. In vorhergehenden Veröffentlichungen hatten wir mit einer Reihe von Desoxy- und Methoxy-Analoga dieses Tetrasaccharides die Akzeptorspezifität der GlcNAc-T II untersucht [3–6]. Die Ergebnisse sind unter Einbeziehung der Befunde von Hindsgaul [2,7] auf der Abbildung 1 schematisch zusammengefaßt.

Es ist hieraus ersichtlich, daß die Hydroxylgruppen an C-3, C-4 und C-6 des α -(1 → 6)-gebundenen Mannose-Restes für die Reaktion des Enzyms nicht notwendig sind, obwohl an der 2-OH-Gruppe dieses Restes die Glycosylierung erfolgt. An C-3, C-4 und C-6 dieser Einheit modifizierte Substanzen sind gute Akzeptorsubstrate für GlcNAc-T II. Für die Reaktion des Enzyms essentiell sind offensichtlich die 3-OH-Gruppe

[☆] Prof. Dr. R.R. Schmidt mit besten Wünschen zum 60. Geburtstag gewidmet

* Corresponding author.

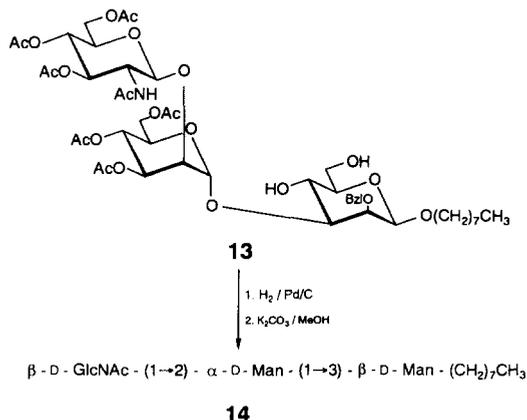
anomeren Bereich ^1H -, ^{13}C -Kopplungskonstanten von $J = 168,8$ Hz, $J = 152,6$ Hz, $J = 169,7$ Hz und $J = 156,4$ Hz gefunden. Diese Werte zeigen die beiden α - und die beiden β -glycosidischen Bindungen an [12]. Zur Deblockierung werden zunächst die *O*-Acetylgruppen mit Kaliumcarbonat in MeOH abgespalten. Die reduktive Entfernung des Iods und der Benzylether-Gruppierungen an der Verbindung **3** erfolgt durch Hydrogenolyse mit Pd/C (10%) als Katalysator. Die Hydrierung muß in zwei Stufen vorgenommen werden, da der Katalysator durch Iod vergiftet wird und die Abspaltung der Benzylgruppen unvollständig bleibt. Eine Reinigungsstufe an Sephadex LH 20 ist vor der Wiederholung der Hydrogenolyse notwendig. Gegenüber GlcNAc-T II erweist sich das so gewonnene Tetrasaccharid **4** als guter kompetitiver Inhibitor [6]. Der K_i -Wert ist mit 0,13 mM im gleichen Bereich wie der K_M -Wert = 0,13 mM des unmodifizierten Tetrasaccharides, was zeigt, daß **4** die gleiche Affinität zum Enzym besitzt.



Zur Gewinnung des in 2'''-Position methoxylierten Produktes wird der Donor **5** [13] mit dem Akzeptor **6** [9] bei Gegenwart von TMS-Triflat zum Disaccharid **7** umgesetzt. Nach Deacetylierung von Verbindung **7** läßt sich das Produkt **8** durch Methylierung der 2'-OH-Gruppe mit Methyljodid und Natriumhydrid in Verbindung **9** umwandeln. Aus Verbindung **9** entsteht nach Umlagerung der Allylgruppe mit $[\text{Ir}(\text{COD})(\text{PMePh}_2)_2]\text{PF}_6$ [14] und Entfernung der Propenylgruppe mit HgO/HgCl_2 [15] der gewünschte Glycosylakzeptor **10**.

Die Glycosylierung von **10** mit dem Donor **2** liefert das Tetrasaccharid **11**, dessen Struktur durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie gesichert wird. Hydrogenolytische Debenzylierung von Verbindung **11** mit anschließender Entacetylierung führt zu **12**, das

sich allerdings nicht als Inhibitor für GlcNAc-T II erweist [6]. Offenbar bewirkt die Methoxylgruppe in Stellung 2''' eine sterische Hinderung für die Bindung an das Enzym.



Das in Abbildung 1 gezeigte Strukturbild erläutert die Wirkungsbereiche von GlcNAc-T II. Danach bindet GlcNAc-T II im wesentlichen den (1 → 3)-Arm, weshalb eventuell dieser Arm als Trisacchrid allein als Inhibitor wirken kann. In diesem Fall wäre die verkleinerte Struktur ein idealer Inhibitor, da eine GlcNAc-Übertragung auf den fehlenden (1 → 6)-Arm nicht erfolgen kann. Für die Gewinnung des Trisaccharides konnten wir auf ein schon früher hergestelltes Zwischenprodukt **13** zurückgreifen [3]. Die Deblockierung von **13** durch Hydrogenolyse des Benzylrestes und anschließende Abspaltung der Acetylgruppen ergibt das Trisaccharid **14**. Die Verbindung **14** zeigt im enzymatischen Test in der Tat inhibitorische Eigenschaften gegenüber GlcNAc-T II [6]. Die Bindung ist mit $K_i = 0,9$ mM zwar schwächer als bei **4**. Der Befund zeigt aber, daß im wesentlichen die GlcNAc-β(1 → 2)-Man-α(1 → 3)-Man-β-R-Struktur für die Bindung der GlcNAc-T II verantwortlich ist.

1. Experimenteller Teil

Allgemeine Methoden.—Alle Reaktionen wurden dünn-schichtchromatographisch auf Kieselgel-Fertigfolien (Fa. Merck, 60 F₂₅₄) verfolgt. Die Detektion erfolgte durch UV-Absorption, Ansprühen mit 14:10:1 EtOH-H₂O-H₂SO₄ und anschließende Wärmebehandlung. Säulenchromatographische Trennungen erfolgten an Kieselgel (Fa. Merck, 230–400 mesh und ICN Silica, 12–26 mesh, 60 Å) bei Mitteldruck (2–4 bar). Die angegebenen Proportionen bei chromatographischen Lösungsmittelgemischen bedeuten Volumenverhältnisse. Petrolether bezieht sich auf die Fraktion mit Siedebereich 60–70°C. Optische Drehungen wurden mit einem Perkin-Elmer Polarimeter 241 oder 243 in 1 dm-Küvetten bei einer Wellenlänge von 589 nm gemessen. NMR-Spektren wurden an den Bruker-Geräten AC 250P (250.1 MHz bei ¹H, 62.9 MHz bei ¹³C) oder AMX 400 (400.1 MHz bei ¹H, 100.6 MHz bei ¹³C) aufgenommen. Als interner Standard diente Tetramethylsilan. Die Kopplungskonstanten wurden nach 1. Ordnung

ausgewertet. Die Zuordnung der Signale erfolgte, wenn notwendig, mit Hilfe von ^1H - ^1H -COSY-Experimenten. Die gekoppelten ^{13}C -NMR-Spektren wurden nach dem gated-decoupling-Verfahren aufgenommen. Glycosidsynthesen wurden in einer N_2 -Atmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluß durchgeführt.

Octyl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-O-(3,4,6-tri-O-acetyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-O-[(3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-iodo- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]-2,4-di-O-benzyl- β -D-mannopyranosid (3).—Disaccharid **1** [9] (14.6 mg, 0.018 mmol) und **2** [11] (20.4 mg, 0.026 mmol) in abs CH_2Cl_2 (2 mL) und Molekularsieb 3 Å (Perlforn) werden mit einer 0.02 M Lösung von TMS-Triflat in CH_2Cl_2 (100 μL) versetzt. Nach 90 min (DC 3:1 Toluol–EtOAc), wird mit Et_3N (2 Tropfen) versetzt, filtriert und eingengt. Chromatographie an Kieselgel mit 2:1 Petrolether 60/70–Aceton; Ausb. 15.6 mg (56%), Sirup, $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ –3.4 (*c* 1, CHCl_3). ^1H -NMR (400 MHz, C_6D_6): δ 7.69–7.63 (m, 2 H, Aromaten-H), 7.56–7.52 (m, 2 H, Aromaten-H), 7.45–7.33 (m, 4 H, Aromaten-H), 7.26–7.20 (m, 1 H, Aromaten-H), 7.14–7.09 (m, 1 H, Aromaten-H), 5.76 (dd, 1 H, $J_{3''',4''}$ 9.6 Hz, $J_{4''',5''}$ 10.0 Hz, H-4'''), 5.66 (dd, 1 H, $J_{3',4'}$ 10.0 Hz, $J_{4',5'}$ 10.0 Hz, H-4'), 5.65 (dd, 1 H, $J_{2'',3''}$ 10.4 Hz, $J_{3'',4''}$ 9.2 Hz, H-3''), 5.55 (dd, 1 H, $J_{2',3'}$ 3.2 Hz, H-3'), 5.36 (d, 1 H, $J_{1',2'}$ 1.2 Hz, H-1'), 5.31 (d, 1 H, J 12.6 Hz, CH_2Ph), 5.26 (bs, 1 H, H-1'''), 5.14 (dd, 1 H, $J_{4'',5''}$ 10.0 Hz, H-4''), 4.99 (d, 1 H, $J_{1'',2''}$ 8.8 Hz, H-1''), 4.98 (dd, 1 H, $J_{2'',3''}$ 4.0 Hz, H-3''), 4.95 (d, 1 H, J 12.6 Hz, CH_2Ph), 4.94 (d, 1 H, J 12.8 Hz, CH_2Ph), 4.72 (dd, 1 H, $J_{1'',2''}$ 0.8 Hz, H-2'''), 4.66 (d, 1 H, $J_{2'',\text{NH}}$ 7.4 Hz, NH), 4.53 (d, 1 H, J 12.8 Hz, CH_2Ph), 4.47 (dd, 1 H, H-2'), 4.38 (dd, 1 H, $J_{5',6a'}$ 6.4 Hz, $J_{6a',6b'}$ 12.0 Hz, H-6a'), 4.36 (dd, 1 H, $J_{5'',6a''}$ 5.2 Hz, $J_{6a'',6b''}$ 12.2 Hz, H-6a''), 4.31 (dd, 1 H, $J_{5''',6a'''}$ 2.0 Hz, $J_{6a''',6b'''}$ 12.0 Hz, H-6a'''), 4.25 (dd, 1 H, $J_{5''',6b'''}$ 4.4 Hz, H-6b'''), 4.20 (ddd, 1 H, H-5'''), 4.16 (dd, 1 H, $J_{5',6b'}$ 2.4 Hz, H-6b'), 4.07 (ddd, 1 H, H-5'), 4.05 (s, 1 H, H-1), 4.01 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ 9.6 Hz, $J_{4,5}$ 9.4 Hz, H-4), 4.00 (d, 1 H, $J_{2,3}$ 2.8 Hz, H-2), 3.95 (m_c, 1 H, OCH_2), 3.88 (dd, 1 H, $J_{5'',6b''}$ 2.0 Hz, H-6b''), 3.79 (dd, 1 H, H-3), 3.74 (dd, 1 H, $J_{5,6a}$ 5.4 Hz, $J_{6a,6b}$ 11.4 Hz, H-6a), 3.57 (dd, 1 H, $J_{5,6b}$ 1.6 Hz, H-6b), 3.35 (m_c, 1 H, OCH_2), 3.12 (ddd, 1 H, H-5), 3.08 (ddd, 1 H, H-2''), 2.84 (ddd, 1 H, H-5''), 1.91, 1.90, 1.88, 1.83, 1.78, 1.75, 1.73, 1.70, 1.66, 1.65 (10 s, 30 H, 10 COCH_3), 1.69–1.62 (m, 2 H, CH_2), 1.52–1.43 (m, 2 H, CH_2), 1.39–1.25 (m, 8 H, CH_2), 0.92 (t, 3 H, CH_3). ^{13}C -NMR (100.6 MHz, C_6D_6): δ 101.25 (d, $J_{\text{C-1}',\text{H-1}'}$ 168.8 Hz, C-1'), 101.17 (d, $J_{\text{C-1,H-1}}$ 152.6 Hz, C-1), 100.07 (d, $J_{\text{C-1''},\text{H-1''}}$ 169.7 Hz, C-1''), 98.06 (d, $J_{\text{C-1''},\text{H-1''}}$ 156.4 Hz, C-1''). Die Signale für C-1 und C-1' bzw. für C-1' und C-1'' können auch vertauscht sein. Anal. Calc. für: C 50.04; H 5.73; N 0.88; gef. C 50.08; H 5.74; N 0.82

Octyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-O-(α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-O-[(2-desoxy- α -D-arabino-hexopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)]- β -D-mannopyranosid (4).—Verbindung **3** (15.8 mg, 0.010 mmol) wird in abs MeOH (2 mL) gelöst und mit K_2CO_3 (8 mg) versetzt. Nach 3 h (DC 2:1 CHCl_3 –MeOH) wird Pd/C (10%, 20 mg) zugesetzt und unter Normaldruck hydriert. Nach 30 min wird mit Ionentauscher Amberlite CG-50I neutralisiert, filtriert und eingengt. Es wird an Sephadex LH20 mit 1:1 CHCl_3 –MeOH chromatographiert und eingengt. Der Rückstand wird in abs MeOH (3 mL) gelöst, mit Pd/C (10%, 15 mg) versetzt und erneut unter Normaldruck hydriert. Nach 30 min (DC 5:4:1 CHCl_3 –MeOH–Wasser) wird filtriert, eingengt und wieder an Sephadex LH20 mit 1:1 CHCl_3 –MeOH chromatographiert; Ausb. 7.8 mg (97%),

amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{20} + 15.0$ (c 0.5, MeOH). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 5.10 (d, 1 H, $J_{1',2'}$ 1.2 Hz, H-1'), 4.96 (dd, 1 H, $J_{1'',2ax''}$ 2.8 Hz, $J_{1'',2eq''}$ 0.8 Hz, H-1''), 4.49 (s, 1 H, H-1), 4.45 (d, 1 H, $J_{1'',2''}$ 8.2 Hz, H-1''), 4.03 (dd, 1 H, $J_{2',3'}$ 3.2 Hz, H-2'), 4.02 (d, 1 H, $J_{2,3}$ 2.8 Hz, H-2), 3.92 (m, 17 H, H-2'', H-3, H-3', H-3'', H-4, H-4'', H-5', H-5'', H-6a, H-6b, H-6a', H-6b', H-6a'', H-6b'', H-6a''', H-6b''', OCH_2), 3.52 (m_c , 1 H, OCH_2), 3.48 (dd, 1 H, $J_{3',4'}$ 9.6 Hz, $J_{4',5'}$ 9.6 Hz, H-4'), 3.46 (dd, 1 H, $J_{2'',3''}$ 10.4 Hz, $J_{3'',4''}$ 8.4 Hz, H-3''), 3.37–3.23 (m, 3 H, H-4'', H-5, H-5''), 2.12 (ddd, 1 H, $J_{2ax''',2eq''}$ 12.8 Hz, $J_{2eq''',3''}$ 5.2 Hz, H-2eq'''), 2.00 (s, 3 H, COCH_3), 1.65–1.55 (m, 3 H, H-2ax''', CH_2), 1.43–1.23 (m, 10 H, CH_2), 0.90 (t, 3 H, CH_3).

Octyl-O-(2-O-acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)-3-O-allyl-2,4-di-O-benzyl- β -D-mannopyranosid (7).—Substanz **6** [9] (60.6 mg, 0.118 mmol) und **5** [13] (112.3 mg, 0.176 mmol) in abs CH_2Cl_2 (5 mL) und Molekularsieb 3 Å (Perflorm) werden mit einer 0.02 M Lösung von TMS-Triflat in abs CH_2Cl_2 (150 μL) versetzt. Nach 30 min (DC 3:1 Toluol–EtOAc) wird mit Et_3N (3 Tropfen) versetzt, filtriert und eingeeengt. Chromatographie an Kieselgel mit 8:1 Petrolether–Aceton; Ausb. 109.1 mg (94%), Sirup, $[\alpha]_D^{20} - 7.8$ (c 1, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.45–7.40 (m, 2 H, Aromaten-H), 7.32–7.18 (m, 21 H, Aromaten-H), 7.13–7.08 (m, 2 H, Aromaten-H), 5.81 (m_c , 1 H, $\text{CH} = \text{CH}_2$), 5.40 (dd, 1 H, $J_{1',2'}$ 1.6 Hz, $J_{2',3'}$ 3.0 Hz, H-2'), 5.22 (m_c , 1 H, $\text{CH} = \text{CH}_2$), 5.11 (m_c , 1 H, $\text{CH} = \text{CH}_2$), 4.92 (d, 1 H, J 12.8 Hz, CH_2Ph), 4.87 (d, 1 H, J 11.0 Hz, CH_2Ph), 4.86 (d, 1 H, H-1'), 4.80 (d, 1 H, J 12.8 Hz, CH_2Ph), 4.79 (d, 1 H, J 11.2 Hz, CH_2Ph), 4.61 (2 d, 2 H, J 11.2 Hz, J 12.0 Hz, 2 CH_2Ph), 4.45 (d, 1 H, J 11.0 Hz, CH_2Ph), 4.41 (d, 1 H, J 11.2 Hz, CH_2Ph), 4.40 (d, 1 H, J 11.2 Hz, CH_2Ph), 4.37 (d, 1 H, J 12.0 Hz, CH_2Ph), 4.28 (s, 1 H, H-1), 3.92 (m_c , 1 H, OCH_2), 3.91 (dd, 1 H, $J_{3',4'}$ 9.0 Hz, H-3'), 3.88–3.80 (m, 4 H, H-4', H-6a, 2 OCH_2), 3.78 (ddd, 1 H, $J_{4',5'}$ 9.6 Hz, $J_{5',6a'}$ 3.2 Hz, $J_{5',6b'}$ 1.6 Hz, H-5'), 3.78 (d, 1 H, $J_{2,3}$ 3.2 Hz, H-2), 3.69 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ 9.4 Hz, $J_{4,5}$ 9.6 Hz, H-4), 3.67 (dd, 1 H, $J_{6a',6b'}$ = 10.8 Hz, H-6a'), 3.66 (dd, 1 H, $J_{5,6b}$ 2.0 Hz, $J_{6a,6b}$ 10.6 Hz, H-6b), 3.56 (dd, 1 H, H-6b'), 3.34 (dd, 1 H, H-3), 3.32 (ddd, 1 H, $J_{5,6a}$ 4.4 Hz, H-5), 3.30 (m_c , 1 H, OCH_2), 2.11 (s, 3 H, COCH_3), 1.58–1.48 (m, 2 H, CH_2), 1.34–1.20 (m, 10 H, CH_2), 0.85 (t, 3 H, CH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (100.6 MHz, CDCl_3): δ 101.07 (d, $J_{C-1,H-1}$ 155.9 Hz, C-1), 97.19 (d, $J_{C-1',H-1'}$ 172.03 Hz, C-1'). Anal. Calc. für: C 73.00; H 7.56; gef. C 72.98; H 7.58.

Octyl-O-(3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)-3-O-allyl-2,4-di-O-benzyl- β -D-mannopyranosid (8).—Substanz **7** (73.6 mg, 0.075 mmol) wird mit methanolischer Ammoniaklösung (10 mL) versetzt. Nach 15 h (DC 2:1 Petrolether–Aceton) wird eingeeengt und mehrfach mit Toluol codestilliert; Ausb. 70.4 mg (quant.), Sirup, $[\alpha]_D^{20} + 2.3$ (c 1, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.48–7.44 (m, 2 H, Aromaten-H), 7.34–7.20 (m, 21 H, Aromaten-H), 7.17–7.13 (m, 2 H, Aromaten-H), 5.89 (m_c , 1 H, $\text{CH} = \text{CH}_2$), 5.30 (m_c , 1 H, $\text{CH} = \text{CH}_2$), 5.18 (m_c , 1 H, $\text{CH} = \text{CH}_2$), 5.04 (d, 1 H, $J_{1',2'}$ 1.6 Hz, H-1'), 4.96 (d, 1 H, J 12.4 Hz, CH_2Ph), 4.91 (d, 1 H, J 11.0 Hz, CH_2Ph), 4.86 (d, 1 H, J 12.4 Hz, CH_2Ph), 4.82 (d, 1 H, J 11.0 Hz, CH_2Ph), 4.64 (d, 1 H, J 12.0 Hz, CH_2Ph), 4.62 (d, 1 H, J 11.4 Hz, CH_2Ph), 4.55 (d, 1 H, J 11.4 Hz, CH_2Ph), 4.51 (d, 1 H, J 11.0 Hz, CH_2Ph), 4.48 (d, 1 H, J 11.0 Hz, CH_2Ph), 4.46 (d, 1 H, J 12.0 Hz, CH_2Ph), 4.35 (s, 1 H, H-1), 4.13 (dd, 1 H, $J_{2',3'}$ 2.8 Hz, H-2'), 4.02 (m_c , 1 H, OCH_2), 3.94 (m_c , 1 H, OCH_2), 3.91 (m_c , 1 H, OCH_2), 3.89 (dd, 1 H, $J_{3',4'}$ 9.2 Hz, H-3'), 3.88 (dd, 1 H, $J_{5,6a}$ 4.8 Hz, $J_{6a,6b}$ 11.4 Hz, H-6a), 3.86–3.79 (m, 4 H, H-2, H-4,

H-4', H-5'), 3.77 (dd, 1 H, $J_{5,6b}$ 1.6 Hz, H-6b), 3.69 (dd, 1 H, $J_{5',6a'}$ 3.8 Hz, $J_{6a',6b'}$ 10.8 Hz, H-6a'), 3.62 (dd, 1 H, $J_{5',6b'}$ 1.8 Hz, H-6b'), 3.41 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ 3.0 Hz, $J_{3,4}$ 9.4 Hz, H-3), 3.36 (m_c, 1 H, OCH₂), 3.35 (ddd, 1 H, $J_{4,5}$ 9.6 Hz, H-5), 2.35 (bs, 1 H, 2'-OH), 1.62–1.53 (m, 2 H, CH₂), 1.37–1.22 (m, 10 H, CH₂), 0.88 (t, 3 H, CH₃). Anal. Calc. für: C 73.70; H 7.86; gef. C 73.74; H 7.82.

Octyl-O-(3,4,6-tri-O-benzyl-2-O-methyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)-3-O-allyl-2,4-di-O-benzyl- β -D-mannopyranosid (9).—Der Alkohol **8** (65.1 mg, 0.069 mmol) wird in abs *N,N*-Dimethylformamid (1.5 mL) gelöst, mit Natriumhydrid (80%ig, 5 mg, 0.17 mmol) versetzt und 10 min gerührt. Anschließend wird Methyljodid (10 μ L, 0.16 mmol) zugesetzt. Nach 30 min (DC 2:1 Petrolether–Aceton) wird Phosphatpuffer (pH 7.5, 4 mL) zugesetzt und eingeeengt. Der Rückstand wird in CH₂Cl₂ aufgenommen und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und eingeeengt. Chromatographie an Kieselgel mit 8:1 Petrolether–Aceton; Ausb. 57.2 mg (87%), Sirup, $[\alpha]_D^{20}$ -2.9° (*c* 1, CHCl₃). ¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ 7.58–7.54 (m, 2 H, Aromaten-H), 7.40–7.30 (m, 6 H, Aromaten-H), 7.25–7.05 (m, 17 H, Aromaten-H), 5.84 (m_c, 1 H, CH = CH₂), 5.29 (m_c, 1 H, CH = CH₂), 5.24 (d, 1 H, $J_{1',2'}$ 1.6 Hz, H-1'), 5.06 (m_c, 1 H, CH = CH₂), 5.05 (d, 1 H, J 12.2 Hz, CH₂Ph), 5.03 (d, 1 H, J 11.2 Hz, CH₂Ph), 5.02 (d, 1 H, J 11.4 Hz, CH₂Ph), 4.87 (d, 1 H, J 12.2 Hz, CH₂Ph), 4.59 (bd, 3 H, 3 CH₂Ph), 4.57 (d, 1 H, J 12.2 Hz, CH₂Ph), 4.51 (d, 1 H, J 12.0 Hz, CH₂Ph), 4.43 (d, 1 H, J 12.2 Hz, CH₂Ph), 4.24 (dd, 1 H, $J_{3',4'}$ 9.6 Hz, $J_{4',5'}$ = 9.6 Hz, H-4'), 4.14–4.05 (m, 5 H, H-1, H-4, H-3', H-5', H-6a'), 3.94 (m_c, 1 H, OCH₂), 3.90–3.76 (m, 5 H, 2 OCH₂, H-6a, H-2', H-6b'), 3.72 (d, 1 H, $J_{2,3}$ 3.2 Hz, H-2), 3.71 (dd, 1 H, $J_{5,6b}$ 1.6 Hz, $J_{6a,6b}$ 11.2 Hz, H-6b), 3.36 (s, 3 H, OCH₃), 3.29 (m_c, 1 H, OCH₂), 3.26 (ddd, 1 H, $J_{4,5}$ 9.8 Hz, $J_{5,6a}$ 5.2 Hz, H-5), 3.25 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ 9.2 Hz, H-3), 1.61–1.54 (m, 2 H, CH₂), 1.42–1.35 (m, 2 H, CH₂), 1.33–1.23 (m, 8 H, CH₃), 0.91 (t, 3 H, CH₃). Anal. Calcd für: C 73.88; H 7.78; gef. C 73.92; H 7.74.

Octyl-O-(3,4,6-tri-O-benzyl-2-O-methyl- α -D-mannopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)-2,4-di-O-benzyl- β -D-mannopyranosid (10).—Eine Lösung von Ir[(COD)(PMePh₂)₂][PF₆] (15 mg) in abs Oxolan (4 mL) wird für 2 min unter Wasserstoffatmosphäre gesetzt, evakuiert und mit Stickstoff begast. Verbindung **9** (75.3 mg, 0.079 mmol) in abs Oxolan (2 mL) wird mit der aktivierten Katalysatorlösung (2 mL) versetzt. Nach 5 min (DC 5:1 Toluol–EtOAc) wird mit Wasser (0.5 mL) und Quecksilber(II)oxid (26 mg, 0.12 mmol) versetzt und anschließend eine Lösung von Quecksilber(II)chlorid (30 mg, 0.11 mmol) in Aceton (2 mL) und Wasser (0.5 mL) zugetropft. Nach 30 min (DC 5:1 Toluol–EtOAc) wird eingeeengt, in CH₂Cl₂ aufgenommen und mit KJ-Lösung (10%) gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und eingeeengt. Chromatographie an Kieselgel mit 5:1 Petrolether–Aceton; Ausb. 65.5 mg (91%), Sirup, $[\alpha]_D^{20}$ $+10.0$ (*c* 1, CHCl₃). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.41–7.12 (m, 25 H, 5 Ph), 5.10 (d, 1 H, $J_{1',2'}$ 1.6 Hz, H-1'), 5.03 (d, 1 H, J 11.6 Hz, CH₂Ph), 4.88 (d, 1 H, J 10.8 Hz, CH₂Ph), 4.78 (d, 1 H, J 11.0 Hz, CH₂Ph), 4.66 (d, 1 H, J 12.0 Hz, CH₂Ph), 4.64 (d, 1 H, J 11.6 Hz, CH₂Ph), 4.62 (d, 1 H, J 12.2 Hz, CH₂Ph), 4.58 (d, 1 H, J 12.0 Hz, CH₂Ph), 4.46 (d, 1 H, J 10.8 Hz, CH₂Ph), 4.45 (d, 1 H, J 12.2 Hz, CH₂Ph), 4.43 (s, 1 H, H-1), 4.41 (d, 1 H, J 11.0 Hz, CH₂Ph), 3.90 (m_c, 1 H, OCH₂), 3.89 (dd, 1 H, $J_{5,6a}$ 3.8 Hz, $J_{6a,6b}$ 11.6 Hz, H-6a), 3.88 (dd, 1 H, $J_{3',4'}$ 9.2 Hz, $J_{4',5'}$ 9.2 Hz, H-4'), 3.84 (dd, 1 H, $J_{2',3'}$ 3.2 Hz, H-3'), 3.80 (d, 1 H, $J_{2,3}$ 3.8 Hz, H-2), 3.77 (dd, 1 H, $J_{5,6b}$ 1.8 Hz, H-6b), 3.76 (ddd, 1

H, $J_{5',6a'}$ 4.4 Hz, $J_{5',6b'}$ 1.8 Hz, H-5'), 3.68 (dd, 1 H, $J_{6a',6b'}$ 10.8 Hz, H-6a'), 3.67–3.63 (m, 2 H, H-2', H-3), 3.62 (dd, 1 H, H-6b'), 3.48 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ 9.3 Hz, $J_{4,5}$ 9.2 Hz, H-4), 3.47 (s, 3 H, OCH₃), 3.41 (m_c, 1 H, OCH₂), 3.28 (ddd, 1 H, H-5), 2.45 (d, 1 H, $J_{3,OH}$ 9.4 Hz, 3-OH), 1.63–1.54 (m, 2 H, CH₂), 1.40–1.22 (m, 10 H, CH₂), 0.88 (t, 3 H, CH₃). Anal. Calc. für: C 73.18; H 7.68; gef. C 73.15; H 7.71.

Octyl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1 → 2)-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-α-D-mannopyranosyl)-(1 → 3)-O-[(3,4,6-tri-O-benzyl-2-O-methyl-α-D-mannopyranosyl)-(1 → 6)]-2,4-di-O-benzyl-β-D-mannopyranosid (11).—Disaccharid **10** (20.4 mg, 0.022 mmol) und **2** (21.5 mg, 0.028 mmol) in abs CH₂Cl₂ (3 mL) und Molekularsieb 3 Å (Perflorm) werden mit einer 0.02 M Lösung von TMS-Triflat in abs CH₂Cl₂ (100 μL) versetzt. Nach 1 h (DC 1:1 Petrolether–Aceton) wird mit Et₃N (2 Tropfen) versetzt, filtriert und eingengt. Chromatographie an Kieselgel mit 2:1 Petrolether–Aceton; Ausb. 17.8 mg (52%), Sirup, [α]_D²⁰ –0.7 (c 1, CHCl₃). ¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ 7.56–7.52 (m, 2 H, Aromaten-H), 7.41–7.07 (m, 23 H, Aromaten-H), 5.69 (dd, 1 H, $J_{3',4'}$ 10.0 Hz, $J_{4',5'}$ 10.0 Hz, H-4'), 5.61 (dd, 1 H, $J_{2',3'}$ 3.2 Hz, H-3'), 5.58 (dd, 1 H, $J_{2'',3''}$ 10.2 Hz, $J_{3'',4''}$ 9.2 Hz, H-3''), 5.39 (s, 1 H, H-1'), 5.27 (d, 1 H, J 12.0 Hz, CH₂Ph), 5.20 (d, 1 H, $J_{1''',2''}$ 1.4 Hz, H-1'''), 5.13 (dd, 1 H, $J_{4'',5''}$ 10.2 Hz, H-4''), 5.03 (d, 1 H, J 11.2 Hz, CH₂Ph), 4.96 (d, 1 H, J 12.0 Hz, CH₂Ph), 4.89 (d, 1 H, $J_{1'',2''}$ 8.2 Hz, H-1''), 4.83 (d, 1 H, J 12.6 Hz, CH₂Ph), 4.63 (d, 1 H, J 12.0 Hz, CH₂Ph), 4.62 (d, 1 H, $J_{2'',NH}$ 7.6 Hz, NH), 4.56 (d, 1 H, J 11.2 Hz, CH₂Ph), 4.54 (d, 1 H, J 12.6 Hz, CH₂Ph), 4.53 (d, 1 H, J 12.0 Hz, CH₂Ph), 4.52 (d, 1 H, H-2'), 4.50 (d, 1 H, J 12.0 Hz, CH₂Ph), 4.38 (dd, 1 H, $J_{5',6a'}$ 6.2 Hz, $J_{6a',6b'}$ 11.8 Hz, H-6a'), 4.36 (d, 1 H, J 12.0 Hz, CH₂Ph), 4.34 (dd, 1 H, $J_{5'',6a''}$ 5.0 Hz, $J_{6a'',6b''}$ 12.0 Hz, H-6a''), 4.21 (dd, 1 H, $J_{5',6b'}$ 2.2 Hz, H-6b'), 4.19 (dd, 1 H, $J_{3''',4''}$ 9.4 Hz, $J_{4''',5''}$ 10.0 Hz, H-4'''), 4.16 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ 9.6 Hz, $J_{4,5}$ 9.6 Hz, H-4), 4.12 (ddd, 1 H, H-5'), 4.10 (dd, 1 H, $J_{2''',3''}$ 3.0 Hz, H-3'''), 4.08 (s, 1 H, H-1), 4.01 (d, 1 H, $J_{2,3}$ 2.8 Hz, H-2), 3.98–3.89 (m, 3 H, H-5''', H-6a, H-6b'''), 3.88 (m_c, 1 H, OCH₂), 3.81 (dd, 1 H, H-3), 3.76 (dd, 1 H, $J_{5''',6a''}$ 5.2 Hz, $J_{6a''',6b''}$ 10.6 Hz, H-6a'''), 3.74 (dd, 1 H, H-2'''), 3.72 (dd, 1 H, $J_{5,6b}$ 1.6 Hz, $J_{6a,6b}$ 12.2 Hz, H-6b), 3.65 (dd, 1 H, $J_{5''',6b''}$ 1.2 Hz, H-6b'''), 3.35 (s, 3 H, OCH₃), 3.27 (m_c, 1 H, OCH₂), 3.17 (ddd, 1 H, H-2''), 3.06 (ddd, 1 H, $J_{5,6a}$ 3.2 Hz, H-5), 2.83 (ddd, 1 H, $J_{5'',6b''}$ 5.0 Hz, H-5''), 1.73, 1.72, 1.68, 1.62, 1.58, 1.56, 1.51 (7 s, 21 H, 7 COCH₃), 1.62–1.49 (m, 2 H, CH₂), 1.32–1.17 (m, 10 H, CH₂), 0.91 (t, 3 H, CH₃). ¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ 101.34 (d, $J_{C-1,H-1}$ 154.5 Hz, C-1), 99.31 (d, $J_{C-1'',H-1''}$ 150.7 Hz, C-1''), 99.19 (d, $J_{C-1',H-1'}$ 166.9 Hz, C-1'), 97.57 (d, $J_{C-1''',H-1'''}$ 169.7 Hz, C-1'''). Die Signale für C-1 und C-1'' bzw. für C-1' und C-1''' können auch vertauscht sein.

Octyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1 → 2)-O-(α-D-mannopyranosyl)-(1 → 3)-O-[(2-O-methyl-α-D-mannopyranosyl)-(1 → 6)]-β-D-mannopyranosid (12).—Verbindung **11** (23.0 mg, 0.015 mmol) wird in abs EtOAc (2 mL) mit Pd/C (10%, 20 mg) versetzt und bei Normaldruck hydriert. Nach 90 min (DC 5:1 CHCl₃–MeOH) wird filtriert und eingengt. Der Rückstand wird in abs MeOH (3 mL) aufgenommen und mit K₂CO₃ (10 mg) versetzt. Nach 2.5 h (DC 5:4:1 CHCl₃–MeOH–Wasser) wird mit Ionentauscher Amberlite CG-50I neutralisiert, filtriert und eingengt. Es wird zunächst an Sephadex LH20 mit 1:1 CHCl₃–MeOH und anschließend an Kieselgel mit 10:1 → 5:1 Acetonitril–Wasser gereinigt; Ausb. 12.0 mg (96%), amorpher Feststoff, [α]_D²⁰ +11.3 (c 1.0, MeOH). ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 5.08 (bs, 1 H, H-1'),

4.98 (bs, 1 H, H-1'''), 4.47 (s, 1 H, H-1), 4.43 (d, 1 H, $J_{1'',2''}$ 8.2 Hz, H-1''), 4.06 (m, 2 H, H-2, H-2'), 3.95 (dd, 1 H, $J_{5,6a}$ 5.2 Hz, $J_{6a,6b}$ 10.8 Hz, H-6a), 3.89–3.41 (m, 20 H, H-2'', H-2''', H-3, H-3', H-3'', H-3''', H-4, H-4', H-4'', H-5', H-5'', H-6a, H-6b, H-6a', H-6b', H-6a'', H-6b'', H-6a''', H-6b''', 2 OCH₂), 3.45 (s, 3 H, OCH₃), 3.35–3.22 (m, 3 H, H-4'', H-5, H-5''), 2.00 (s, 3 H, COCH₃), 1.68–1.55 (m, 2 H, CH₂), 1.44–1.23 (m, 10 H, CH₂), 0.90 (t, 3 H, CH₃).

Octyl-O-(2-acetamido-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1 → 2)-O-(α-D-mannopyranosyl)-(1 → 3)-β-D-mannopyranosid (14).—Das Trisaccharid **13** [3] (29.3 mg, 0.029 mmol) wird in abs Ethylacetat (3 mL) gelöst, mit Pd/C (10%, 30 mg) versetzt und unter Normaldruck hydriert. Nach 90 min (DC 1:2 Petrolether–Aceton) wird filtriert und eingeengt. Der Rückstand wird in abs MeOH (2 mL) aufgenommen und mit K₂CO₃ (6 mg) versetzt. Nach 15 h (DC 5:4:1 CHCl₃–MeOH–Wasser) wird mit Ionentauscher Amberlite CG-50I neutralisiert, filtriert und eingeengt. Chromatographie an Sephadex LH20 mit CHCl₃–MeOH 1:1 (v/v); Ausb. 16.9 mg (88%), amorpher Feststoff, $[\alpha]_D^{20}$ –10.1 (c 1.0, MeOH). ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 5.10 (d, 1 H, $J_{1',2'}$ 1.0 Hz, H-1'), 4.51 (s, 1 H, H-1), 4.43 (d, 1 H, $J_{1'',2''}$ 8.2 Hz, H-1''), 4.07 (d, 2 H, $J_{2,3} = J_{2',3'}$ 2.8 Hz, H-2, H-2'), 3.90 (m_c, 1 H, OCH₂), 3.89 (m, 11 H, H-2'', H-3, H-3', H-4, H-5', H-6a, H-6b, H-6a', H-6b', H-6a'', H-6b''), 3.52 (m_c, 1 H, OCH₂), 3.47 (dd, 1 H, $J_{3',4'}$ 9.4, $J_{4',5'}$ 9.6 Hz, H-4'), 3.44 (dd, 1 H, $J_{2'',3''}$ 10.4 Hz, $J_{3'',4''}$ 8.4 Hz, H-3''), 3.32 (dd, 1 H, $J_{4'',5''}$ 10.0 Hz, H-4''), 3.26 (ddd, 1 H, $J_{5'',6a''}$ 2.0, $J_{5'',6b''}$ 5.6 Hz, H-5''), 3.24 (ddd, 1 H, $J_{4,5}$ 9.6 Hz, $J_{5,6a}$ 2.0, $J_{5,6b}$ 5.6 Hz, H-5), 2.02 (s, 3 H, COCH₃), 1.65–1.55 (m, 2 H, CH₂), 1.41–1.23 (m, 10 CH₂), 0.90 (t, 3 H, CH₃).

Dank

Wir danken dem Bundesministerium für Forschung und Technologie für die Unterstützung dieser Untersuchungen. F.R. dankt der BASF und der Studienstiftung des Deutschen Volkes für ein Stipendium.

Literatur

- [1] B. Bendiak und H. Schachter, *J. Biol. Chem.*, 262 (1987) 5784–5790.
- [2] K.J. Kaur, G. Alton, und O. Hindsgaul, *Carbohydr. Res.*, 210 (1991) 145–153.
- [3] H. Paulsen, J.A.L.M. van Dorst, F. Reck, und E. Meinjohanns, *Liebigs Ann. Chem.*, (1992) 513–521.
- [4] H. Paulsen, R. Wilkens, F. Reck, und I. Brockhausen, *Liebigs Ann. Chem.*, (1992) 1303–1313.
- [5] H. Paulsen, E. Meinjohanns, F. Reck, und I. Brockhausen, *Liebigs Ann. Chem.*, (1993) 721–735.
- [6] F. Reck, E. Meinjohanns, M. Springer, R. Wilkens, J.A.L.M. van Dorst, H. Paulsen, G. Möller, I. Brockhausen, und H. Schachter, *Glycoconjugate J.*, 11 (1994) 210–216.
- [7] G. Srivastava, G. Alton, und O. Hindsgaul, *Carbohydr. Res.*, 207 (1990) 259–276.
- [8] F. Reck, M. Springer, H. Paulsen, I. Brockhausen, M. Sarkar, und H. Schachter, *Carbohydr. Res.*, 259 (1994) 93–101.
- [9] H. Paulsen, M. Springer, F. Reck, E. Meinjohanns, I. Brockhausen, und H. Schachter, *Liebigs Ann. Chem.*, (1995) 53–66.
- [10] R.U. Lemieux und A.R. Morgan, *Can. J. Chem.*, 43 (1965) 2190–2198.
- [11] H. Paulsen und B. Helpap, *Carbohydr. Res.*, 216 (1991) 289–313.
- [12] K. Bock und C. Pedersen, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, (1974) 293–297.
- [13] F. Yamazaki, S. Sato, T. Nukuda, Y. Ito, und T. Ogawa, *Carbohydr. Res.*, 201 (1990) 31–50.
- [14] J.J. Oltvoort, C.A.A. van Boeckel, J.J. de Koning, und J.H. van Boom, *Synthesis*, (1981) 305–308.
- [15] R. Gigg und C.D. Warren, *J. Chem. Soc. (C)*, (1968) 1903–1911.