

# Synthese von Cluster-Mannosiden als multivalente Inhibitoren für den Mannose-spezifischen Makrophagen-Rezeptor



## Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Florian Thieme

aus Braunschweig

Kiel 2005

Referentin: Prof. Dr. Thisbe K. Lindhorst  
Korreferent: Prof. Dr. U. Lüning

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2005

Zum Druck genehmigt: Kiel, 11.07.2005

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine außer den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verwendet habe. Die Arbeit wurde von mir nicht an anderer Stelle eingereicht. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Florian Thieme

*„Wichtig ist, dass man nicht aufhört zu fragen.“*

Albert Einstein

*„Die Kunst des Gehens liegt im richtigen Weg;  
dort sind deine Freunde, und dort bist du stark.  
Lass dich gehen in die Richtung, wo du hinkannst,  
wenn du könntest.  
Wenn du deinen Weg findest und gehst,  
wirst du Kraft, Richtung und Ziel finden,  
kann dich nichts und niemand aufhalten.“*

Mohammed Tahir,  
Lastenträger aus Pakistan

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2000 bis März 2005 im Institut für Organische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Thisbe K. Lindhorst angefertigt.

Frau Prof. Dr. Thisbe K. Lindhorst danke ich für die interessante Themenstellung, ihre stete Förderung dieser Arbeit und für die Unterstützung meiner eigenen Vorschläge und Ideen, die neuen Projekten immer viel Raum gelassen hat und die meine Begeisterung für die Biologische Chemie weiter wachsen ließ.

*Für meine Eltern  
&  
Iris*

# Inhaltsverzeichnis

<b>I KURZDARSTELLUNG .....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>II ABSTRACT.....</b>	<b>- 2 -</b>
<b>III ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>- 3 -</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>- 7 -</b>
1.1 TUBERKULOSE .....	- 7 -
1.2 IMMUNOLOGIE DER TUBERKULOSE .....	- 8 -
1.3 STRUKTUR UND FUNKTION DES MANNOSE SPEZIFISCHEN MAKROPHAGEN-REZEPTORS .....	- 14 -
1.4 MULTIVALENZ UND GLYCOMIMETIKA .....	- 22 -
<b>2. AUFGABENSTELLUNG.....</b>	<b>- 26 -</b>
<b>3. PRÄPARATIVER TEIL .....</b>	<b>- 27 -</b>
3.1 GLYCOCLUSTER AUF BASIS VON <i>ENDO</i> -NORBORNENDICARBONSÄUREANHYDRID .....	- 32 -
3.2 GLYCOCLUSTER AUF BASIS VON <i>EXO</i> -NORBORNENDIMETHANOL .....	- 42 -
3.3 GLYCOCLUSTER AUF BASIS VON <i>EXO</i> -NORBORNENDICARBONSÄUREANHYDRID.....	- 49 -
3.4 CLUSTER-MANNOSIDE AUF BASIS VON GLYCODENDRIMEREN.....	- 54 -
3.5 GLYCOPOLYMERE DURCH ADMET .....	- 61 -
3.6 GLYCOPOLYMERE DURCH POLYESTERSYNTHESE.....	- 66 -
<b>4. BIOCHEMISCHER TEIL .....</b>	<b>- 68 -</b>
4.1 ZELLKULTUR UND PROTEINISOLIERUNG .....	- 68 -
4.2 BIACORE-MESSUNGEN (SPR) .....	- 71 -
4.3 ISOTHERME-TITRATIONS-KALORIMETRIE (ITC) .....	- 78 -
4.4 AUSBLICK: ENTWICKLUNG EINES „ELISA“-TESTS FÜR DEN MMR .....	- 82 -
4.5 BINDUNG DER CLUSTER-MANNOSIDE AN FIMH.....	- 83 -
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>- 87 -</b>
<b>6. SUMMARY .....</b>	<b>- 91 -</b>
<b>7. EXPERIMENTELLER TEIL.....</b>	<b>- 95 -</b>
7.1 ALLGEMEINE METHODEN.....	- 95 -
7.2 ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFTEN .....	- 98 -
7.3 EINZELVORSCHRIFTEN .....	- 102 -
7.4 BIOCHEMISCHE ARBEITSVORSCHRIFTEN .....	- 144 -
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>- 150 -</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>- 156 -</b>
<b>LEBENS-LAUF .....</b>	<b>- 159 -</b>

## I Kurzdarstellung

Tuberkulose, verursacht durch *Mycobacterium tuberculosis*, gehört zu den schwerwiegendsten Infektionskrankheiten und führt jedes Jahr weltweit zu ca. 2 Millionen Todesfällen.

*M. tuberculosis* ist ein intrazelluläres Bakterium, dessen Vermehrung und Ausbreitung auf Makrophagen und dendritische Zellen beschränkt ist. Nach dem Einatmen erregerehaltiger Tröpfchen wird das Bakterium von alveolaren Makrophagen phagozytiert. An diesem Prozess sind eine Reihe von Rezeptoren auf der Oberfläche der Makrophagen beteiligt, die z.B. mit Glycokonjugaten auf der Zelloberfläche des Pathogens interagieren. Einer der Rezeptoren ist der Mannose-spezifische Makrophagen-Rezeptor (MMR).

Der MMR ist ein Typ-I-Transmembran-Protein und besitzt acht sequentiell angeordnete Kohlenhydrat-erkennende Domänen (CRDs). Der MMR weist eine Spezifität für D-Man, L-Fuc, D-Glc und D-GlcNAc auf, bindet aber nicht D-Gal. Eine der CRDs kann die Monosaccharid-Bindungseigenschaften des gesamten Rezeptors nachahmen, eine hochaffine Bindung zu natürlichen Substraten wird aber nur durch multiple Interaktionen zwischen multivalenten Kohlenhydrat-Strukturen und dem gesamten Rezeptor erreicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene mono- bis octavalente Cluster-Mannoside mit unterschiedlichen Spacermolekülen hergestellt, die als Inhibitoren für den MMR dienen können. Der MMR konnte in Kooperation durch Kultivierung von CHO-Zellen und Aufreinigung des Proteins aus dem Kulturmedium mittels Affinitätschromatographie isoliert werden. Die Bindung verschiedener Mannoside an den MMR wurde mit Oberflächenplasmonenresonanz (SPR, Biacore) und Mikrokalorimetrie (ITC) untersucht. Außerdem wurden mehrere der hergestellten Cluster-Mannoside im Hämagglutinationstest und im ELISA auf ihre Bindung an das FimH-Protein von *Escherichia coli* getestet.



## II Abstract

Tuberculosis, caused by *Mycobacterium tuberculosis*, still remains one of the top fatal infectious diseases, resulting every year in nearly 2 million deaths worldwide.

*M. tuberculosis* is an intracellular bacterium whose replication and dissemination is restricted to macrophages and dendritic cells. Following the inhalation of mycobacteria loaded droplets, *M. tuberculosis* is engulfed by alveolar macrophages. A variety of host cell receptors, including the mannose macrophage receptor (MMR) which interacts with glycoconjugates on the bacterial surface, participate in the phagocytosis of the pathogen.

The MMR is a type I transmembrane protein with an extracellular domain consisting of eight different C-type carbohydrate recognition domains (CRDs) and exhibits specificity for D-mannose, L-fucose and D-N-acetylglucosamine. One of the CRDs (CRD-4) can mimic the monosaccharide binding properties of the whole receptor, but high-affinity binding of natural ligands is achieved only through multiple interactions between carbohydrate structures and the whole protein receptor.

In the course of this thesis various mono- up to octavalent cluster-mannosides with diverse spacer moieties have been prepared, which could serve as inhibitors of the MMR. In collaboration, the MMR protein was isolated by affinity chromatography from the culture medium of a cell culture of CHO cells and binding of the synthesised compounds to the MMR was examined by surface plasmon resonance (SPR, Biacore) und microcalorimetry (ITC).

Further on, several of the synthesised cluster mannosides were tested for binding to the FimH protein of *Escherichia coli* by inhibition of hemagglutination as well as ELISA.

### III Abkürzungsverzeichnis

9-BBN	9-Borabicyclo[3.3.1]nonan
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) Diammoniumsalz
ADMET	Acyclische Dien-Metathese
AIDS	aquired immunodeficiency syndrome
AM	Arabinomannan
APS	Ammoniumperoxysulfat
BCG	Bacille Calmette Guérin
BOP	Benzotriazolyl-oxo-tris-(dimethylamino)phosphoniumhexafluorosphat
BSA	bovine serum albumin
c	Konzentration
ca.	circa
CCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycimtsäure
CD	cluster of designation
CFB	cell current feedback
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CMPI	2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid
ConA	Concanavalin A
COSY	correlated spectroscopy
CR	complement receptor
CRD	carbohydrate recognition domain
Cy	Cyclohexan
d	Tag
d(NMR)	Dublett
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCE	Dichlorethan
DCM	Dichlormethan
DC-SIGN	dendritic cell specific intercellular adhesin molecule-3 grabbing nonintegrin
DEC	dendritic cell
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DHFR	Dihydrofolatreduktase

DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	4-( <i>N,N</i> -Dimethylamino)pyridin
DMP	2,2-Dimethoxypropan
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Dimethylsilapentansulfonat
DTAB	Dodecyltrimethylammoniumbromid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-diethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Ethylacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ELRA	enzyme linked receptor assay
eq	Äquivalent
ESI	elektrospray ionisation
Fc	fragment crystalline
FCS	fetal calf serum
Gal	Galactose
Glc	Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GPC	Gelpermeationschromatographie
GUS	Gemeinschaft unabhängiger Staaten
h	Stunde
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
HMBC	heteronuclear multiple bond coherence
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	high pressure liquid chromatography
HRP	horse raddish peroxidase
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
IC	inhibitory constant
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IT	Inhibitionstiter
ITC	isothermal titration calorimetry
k	Kilo
kDa	kilo-Dalton

---

l	Liter
LAM	Lipoarabinomannan
μ	Mikro, *10 <sup>-6</sup>
m	Meter
m	Milli, *10 <sup>-3</sup>
m(NMR)	Multipllett
<i>M.tb.</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
m/v	Masse pro Volumen
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ ionisation with time of flight detector
Man	Mannose
MBP	Mannose-bindendes Protein
m <sub>c</sub> (NMR)	zentriertes Multipllett
MDC	3-Chlor-2-chlormethyl-1-propen
MeCN	Acetonitril
MEM	minimum essential medium
MHC	major histocompatibility complex
MMR	Mannose Makrophagen-Rezeptor
MTX	Methotrexat
MW	molecular weight
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	nuclear magnetic resonance
NOESY	nuclear overhauser effect spectroscopy
PAMAM	Polyamidoamin
PBS	phosphate buffered saline
Pen/Strep	Penicillin/ Streptomycin
pI	pH-Wert am isoelektrischen Punkt
PIM	Phosphatidylinositol-Mannosid
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
pNP	para-Nitrophenyl
pTsOH	para-Toluolsulfonsäure
q(NMR)	Quintett
RIC	relative inhibitory concentration
RIT	relativer Inhibitionstiter
ROMP	ring opening metathesis polymerisation
ROP	ring opening polymerisation

RP	reversed phase
RT	Raumtemperatur
s(NMR)	Singulett
SC	scavenger receptor
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sp-A	surfactant protein A
SPR	surface plasmon resonance
t(NMR)	Triplet
Tab.	Tabelle
Tbc	Tuberkulose
TBDMS	<i>tert.</i> -Butyldimethylsilyl
TEMED	Tetramethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TLR	toll-like receptor
TMS	Trimethylsilyl
TMSOTf	Trifluormethansulfonsäuretrimethylsilylester
$t_r$	Retentionszeit
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen

# 1. Einleitung

## 1.1 Tuberkulose

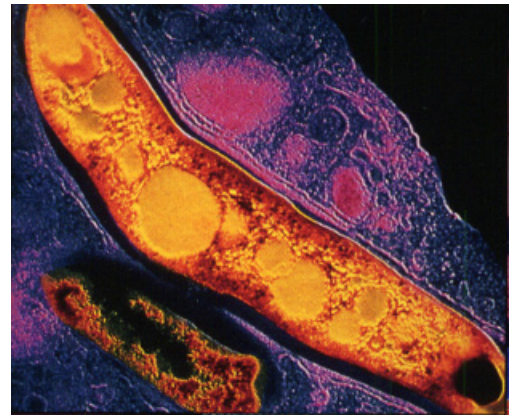
Vor 123 Jahren, am 24. März 1882, beschrieb Robert Koch während eines Vortrags das *Mycobacterium tuberculosis*, den Erreger der Tuberkulose, auch Schwindsucht genannt. Eine Entdeckung für die er 1905 den Nobelpreis in Physiologie und Medizin erhielt.

Im 19. und frühen 20. Jahrhundert spielte die Tuberkulose (kurz Tbc), bedingt durch schlechte soziale Verhältnisse (z.B. Mangelernährung), eine hohe Bevölkerungsdichte und die schlechte medizinische Versorgung in den Städten für die Sterblichkeit der Menschen eine große Rolle.

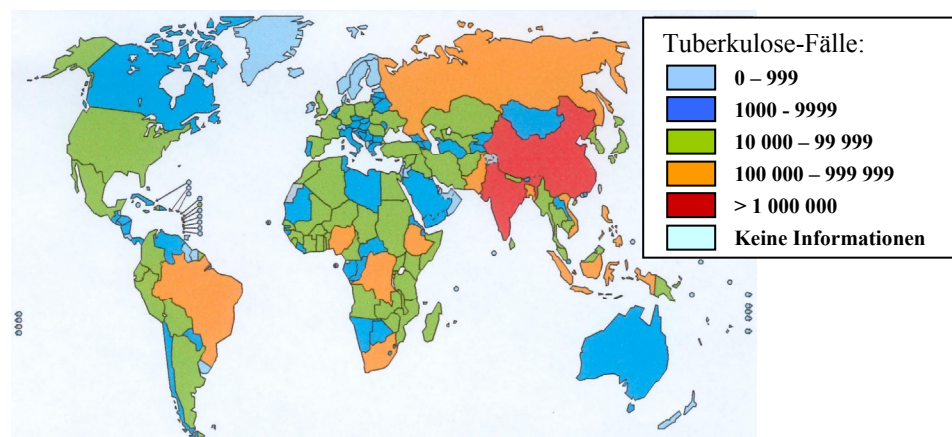
Heute wird Tuberkulose in der Bevölkerung, gerade in den westlichen Industrienationen, als geringes Problem beurteilt. Dass dem jedoch nicht so ist, zeigen die Zahlen der jährlichen Neuerkrankungen

und der Todesfälle, die mit stark steigender Tendenz bei 8 Millionen, bzw. 2 Millionen liegen. Damit steht die Tuberkulose noch vor AIDS und Malaria auf Platz 1 der Todesursachen beim Menschen durch bakterielle Infektionserkrankungen. Es wird geschätzt, dass ein Drittel der Weltbevölkerung mit dem Erreger der Tuberkulose infiziert ist.<sup>[1]</sup>

Von steigender Bedeutung ist die Tuberkulose insbesondere in den Ländern Osteuropas und der GUS. Als Ursache hierfür wird die Veränderung der politischen, wirtschaftlichen und sozialen Verhältnisse angesehen, die vielfach zu einer Verschlechterung der Infrastruktur und



**Abb. 1** Mikroskopische Aufnahme von *M. tuberculosis*.<sup>[1]</sup>



**Abb. 2** Geschätzte Zahl der Tuberkulose-Fälle nach Ländern 1997.<sup>[1]</sup>

einer medizinischen Unterversorgung breiter Bevölkerungsschichten geführt haben.<sup>[2]</sup> In Deutschland ist heute im Rahmen der EU-Osterweiterung insbesondere die Migration aus diesen Ländern von großer Relevanz, auch wenn die absolute Zahl der Tuberkulose-Fälle hierzulande rückläufig ist.

Die Problematik wird durch die gefährliche „Liaison“ zwischen Tuberkulose und HIV, dem Erreger von AIDS, und dem steigenden Auftreten von multidrug-resistenten (MDR) Stämmen von *M. tuberculosis* noch verstärkt. Aktuell sind ca. 50 Millionen Menschen mit HIV und *M. tuberculosis* coinfiziert, was das Risiko die aktive Erkrankung zu entwickeln drastisch erhöht. Eine ähnliche Zahl von Menschen ist mit multiresistenten Stämmen von *M. tuberculosis* infiziert, die Resistenzrate in einigen Staaten der GUS erreicht knapp 60%.<sup>[3,4]</sup>

## ***1.2 Immunologie der Tuberkulose***

Die Tuberkulose ist eine chronische Krankheit von der meist die Lunge betroffen ist, allerdings können auch andere Organe wie Knochen, Darm, Urogenitaltrakt oder die Haut befallen werden.<sup>[5]</sup>

Der Erreger wird in der Regel durch Tröpfcheninfektion übertragen, aber auch andere Infektionswege sind möglich. In den meisten Fällen werden die Tröpfchen bereits in den Bronchien oder Alveolen unschädlich gemacht, bzw. mechanisch durch die Flimmerhärchen der Lunge aus dem Bronchialsystem entfernt. Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion hängt stark von Umweltfaktoren, Häufigkeit und Dauer der Exposition, sowie Konzentration und Größe der erregerehaltigen Tröpfchen ab, ist insgesamt aber eher gering. Bei ca. 90 % aller Infizierten wird ein Ausbruch der Tuberkulose durch die eigene Immunantwort verhindert. Besonders ansteckend ist eine Form der offenen Lungentuberkulose, bei der im Sputum die Erreger mikroskopisch nachgewiesen werden können. Die Inkubationszeit der Tuberkulose kann bis zu mehreren Jahren oder auch Jahrzehnten betragen. Bei intaktem Immunsystem reduziert *M. tuberculosis* seine Stoffwechselaktivität und Replikationsrate stark und geht in einen Schlafzustand über (*Dormanz*, Persistenz des Erregers). Eine Reaktivierung des Erregers hängt von Faktoren ab, die das Immunsystem negativ beeinflussen können, wie z.B. Alter, Unterernährung, Infektion mit HIV oder andere Erkrankungen, sowie der Einnahme immunsuppressiver Medikamente.<sup>[6]</sup>

*M. tuberculosis* bildet nicht Sporen-formende, unbewegliche, leicht gebogene oder gerade Stäbchen mit einer Größe von 0.2 – 0.6 x 1-10 µm und typischen Färbeeigenschaften: das

Bakterium behält seine Färbung (Ziehl-Neelsen-Färbung) auch nach Behandlung mit einer sauren Lösung und wird deshalb als „säurefestes Stäbchen“ bezeichnet.<sup>[7]</sup>

Die Diagnose der Tuberkulose ist aufwendig. Eine eindeutige Bestimmung des Erregers kann nur durch Kultivierung auf Spezialmedien erfolgen, was aufgrund der geringen Replikationsrate von *M. tuberculosis* (16-18 h für einen Zellteilungszyklus) längere Zeit beansprucht. Der Erreger bildet erst nach mehreren Wochen sichtbare Kolonien auf festen Nährböden. Weitere Diagnosemöglichkeiten sind Röntgenaufnahmen der Lunge oder ein CT des Brustkorbs, DNS-Analyse von Proben nach PCR oder ein Hauttest, der jedoch auch bei geimpften Personen positiv ist.<sup>[8]</sup>

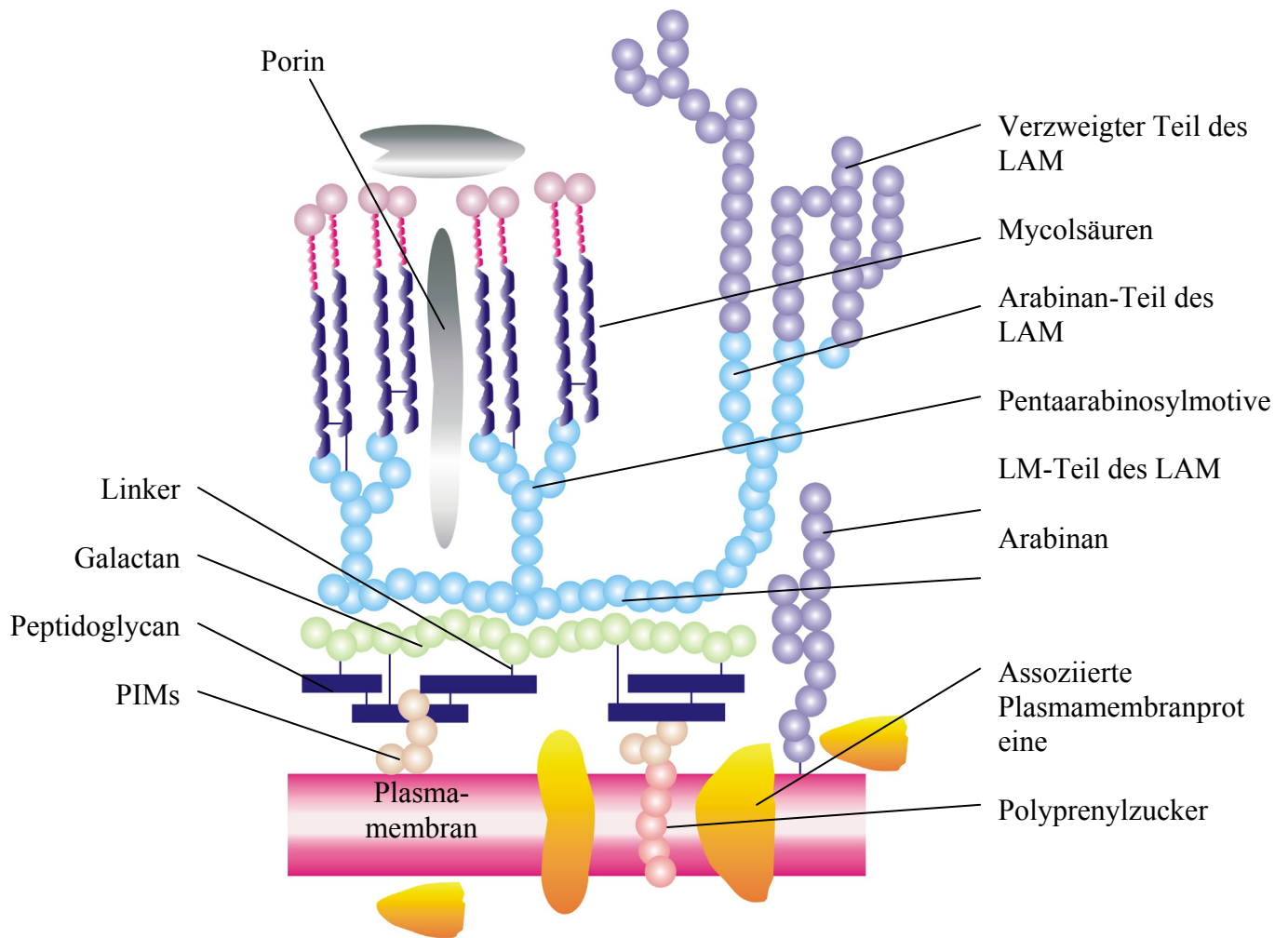
Seit 1921 steht mit BCG (Bacille Calmette Guérin) ein Impfstoff gegen die Tuberkulose zur Verfügung. Heute ist BCG der am häufigsten verabreichte Impfstoff weltweit, mit mehr als einhundert Millionen Impfungen pro Jahr, überwiegend von Neugeborenen. Ein gravierender Nachteil der BCG-Impfung ist jedoch die Unwirksamkeit gegen Lungentuberkulose bei erwachsenen Personen.<sup>[9]</sup>

Die Therapie der Tuberkulose wird durch die beschränkte Verwundbarkeit der Mykobakterien durch viele Antibiotika erschwert. Diese Widerstandsfähigkeit kommt durch die ungewöhnliche Zelloberfläche der Bakterien zustande, die, wie in Abbildung 3 dargestellt, hauptsächlich aus vier Substrukturen besteht: einer äußeren Lipidschicht, die aus dicht gepackten langen Fettsäuren, den Mycolsäuren, besteht; einem Kohlenhydrat-Polymer, bestehend aus Galactofuranose und Arabinose, an das die Fettsäuren gebunden sind; einem Protein-Rückgrat und einem weiteren Mannose- und Arabinose-enthaltendem Polymer, dem mannosyliertem Lipoarabinomannan (Man-LAM).<sup>[10]</sup>

Die Lipidschicht dieser Bakterien bildet eine starke Barriere für lipophile Antibiotika. Erschwerend kommt hinzu, dass es sich bei *M. tuberculosis* um einen intrazellulären Erreger handelt, dessen Vermehrung und Ausbreitung auf Makrophagen und dendritische Zellen beschränkt ist. Daher können Antibiotika den Wirkort, der innerhalb der Phagosomen dieser Zellen liegt, nicht in optimaler Konzentration erreichen.

Die Behandlung der Tuberkulose erfolgt durch die mindestens sechsmonatige Gabe von bis zu vier Antibiotika (Isoniazid, Rifampin, Pyrazinamid, Ethambutol) gleichzeitig. Die Behandlung mit einer Kombination aus mehreren Präparaten ist von entscheidender Wichtigkeit, um die Bildung von resistenten Erregern zu verhindern. Die Substanzen unterscheiden sich in ihren tuberkuloziden und tuberkulostatischen Eigenschaften, sowie in ihren Wirkorten.<sup>[11]</sup>





**Abb. 3** Schematischer Aufbau der Zellmembran von *M. tuberculosis*.<sup>[10]</sup>

Dies macht die Therapie schwierig und in Entwicklungsländern unbrauchbar. Denn die langwierige, komplizierte und teure Behandlung führt dort oft zu einer unregelmäßigen Einnahme der Medikamente durch die Patienten, die bereits nach kurzer Zeit beschwerde-, aber nicht Erreger-frei, sind. Hierdurch wird wiederum die Entstehung von resistenten Stämmen von *M. tuberculosis* gefördert. In Entwicklungsländern übersteigen die Kosten der Behandlung der Tuberkulose die Lebenshaltungskosten oft um bis zu das 100-fache.

Das Ziel der Therapie ist es, alle Bakterien die sich im Wirt befinden abzutöten und das Auftreten von Antibiotika-resistenten Stämmen zu verhindern. Daher ist es enorm wichtig, dass die Einnahme der Medikamente in ausreichender Dosierung, über einen ausreichenden Zeitraum und unter strenger ärztlicher Kontrolle erfolgt.

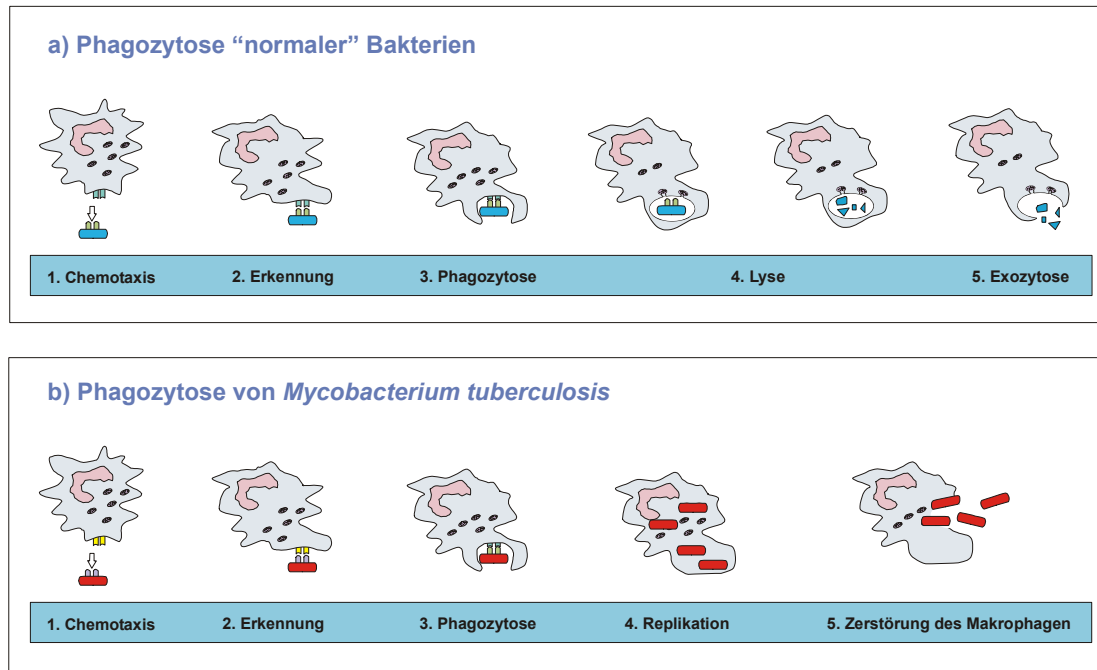
Im Falle von *M. tuberculosis* tritt die Resistenzbildung gegen Antibiotika nicht durch die Aufnahme neuer Resistenz-Gene wie für andere Bakterien beschrieben auf, sondern ist das Resultat zufälliger genetischer Mutationen. Sie ist spontan und nicht von Antibiotika abhängig.<sup>[12]</sup>

Für die Entwicklung neuer Antituberkulosemittel ist es daher wichtig den Mechanismus der Infektion von Makrophagen und dendritischen Zellen mit *M. tuberculosis* genauer zu betrachten.

Kommt es zum Eindringen eines infektiösen Erregers, setzt eine Entzündungsreaktion ein. Dabei wird die Blutzufuhr am Ort der Infektion gesteigert, die Kapillarpermeabilität wird erhöht und durch Freisetzung chemotaktischer Peptide (z.B. C5a) werden Phagozyten an den Entzündungsort gelockt. Diese erkennen und binden über eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren das Pathogen.

Diese zellulären Interaktionen sind von entscheidender Bedeutung, da durch sie mehrere intrazelluläre Signalwege gleichzeitig aktiviert werden, die zusammen die Antwort des Makrophagen definieren und darüber entscheiden, ob eine Phagozytose des Pathogens erfolgt und ob antimikrobielle Mechanismen anlaufen. Die verschiedenen Rezeptoren der Phagozyten können eine aktivierende oder aber auch inhibierende Wirkung entfalten.<sup>[13]</sup> Rezeptoren auf Phagozyten sind z.B. Fc-Rezeptoren, die IgG-opsonierte Partikel über mehrere Oberflächenrezeptoren erkennen. Andere Rezeptoren sind die Komplement-Rezeptoren (CR), z.B. CR3 auf Makrophagen, die an Komponenten des Komplementsystems binden, Scavenger-Rezeptoren (SC), die verschiedene Liganden wie z.B. Polyribonukleotide oder Lipopolysaccharide binden oder so genannte Toll-like Rezeptoren (TLR). Weiterhin finden sich verschiedene Integrine und Lektine, wie z.B. der Mannose-spezifische Makrophagen Rezeptor (MMR) und DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin, CD209) auf Makrophagen, die Kohlenhydratstrukturen auf der Zelloberfläche der Pathogene erkennen.<sup>[14]</sup>

Nach der Bindung des Pathogens an den Phagozyten bilden sich Pseudopodien, die den Erreger umschließen und ihn schließlich in ein Phagosom einschließen (Abb. 4a). Das Phagosom fusioniert nun in der Regel mit enzymhaltigen Lysosomen des Phagozyten zu einem Phagolysosom, in dem der Erreger durch verschiedene Mechanismen abgetötet wird, z.B. durch pH-Anstieg im Phagolysosom, durch Bildung von Peroxid-Ionen oder Stickstoffmonoxid-Metaboliten, durch Enzyme wie Lysozym, Defensine oder eisenbindendes Laktoferrin. Unverdaute mikrobielle Produkte können später wieder durch Exocytose nach außen abgegeben werden oder an MHC (major histocompatibility complex)-Moleküle gebunden als Antigen auf der Oberfläche des Phagozyten anderen Zellen der Immunabwehr präsentiert werden.<sup>[15]</sup>



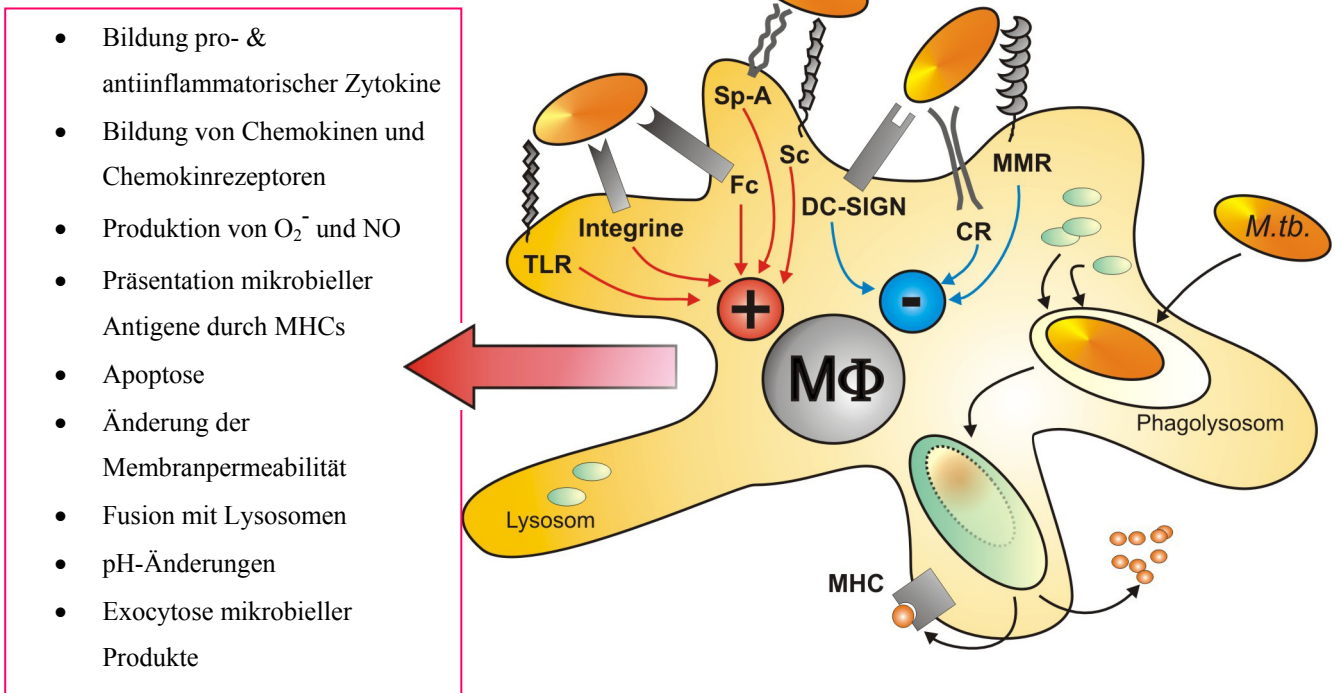
**Abb. 4** Vergleich des Ablaufs der Phagozytose „normaler“ Bakterien und von *M. tuberculosis*.

Gleichzeitig laufen weitere Prozesse ab, wie z.B. die Bildung pro- und antiinflammatorischer Zytokine, die Bildung von Chemokinen und Chemokinrezeptoren oder Änderungen der Membranpermeabilität. Unter Umständen kann auch die Apoptose des Phagozyten initiiert werden (Abb. 5).<sup>[16]</sup>

Die Immunantwort der Phagozyten nach Internalisation von *Mycobacterium tuberculosis* unterscheidet sich jedoch von der „normaler“ Erreger (Abb. 4b): Die eingedrungenen Mykobakterien werden zwar von Alveolarmakrophagen und dendritischen Zellen phagozytiert, werden aber intrazellulär **nicht** abgetötet, sondern können sich in den Phagozyten vermehren und diese durch Nekrose zerstören oder für ihre Ausbreitung missbrauchen, indem sie die Phagozyten für den Transport durch die Epithel-Schichten der Lunge nutzen. Auch weitere Phagozyten die an den Infektionsort gelockt werden sind nicht in der Lage die Erreger vollständig zu eliminieren.<sup>[17]</sup>

Auch hier wird die intrazelluläre „Aktivierung“ durch die Wahl der Rezeptoren für die Phagozytose beeinflusst. Fc-rezeptorvermittelte Aufnahme von IgG-opsonierten Mykobakterien z.B. aktiviert die antimikrobiellen Abwehrsysteme.<sup>[18]</sup> Dagegen führt die Aufnahme über den Komplementrezeptor 3 (CR3) nicht zu einer Aktivierung des Phagozyten.<sup>[19]</sup>

Weiterhin sind drei Vertreter der Toll-like-Rezeptoren an der Interaktion zwischen Makrophagen und Mykobakterien beteiligt. TLR-2 und TLR-4 erkennen LAMs und



**Abb. 5** Rezeptor- und Signalinteraktionen eines Makrophagen während der Phagozytose (schematisch). MΦ: Zellkern, TLR: Toll-like Rezeptor, Fc: Fragment-crystalline-Rezeptor, Sp-A: Surfactant-protein A-Rezeptor, Sc: Scavenger-Rezeptor, DC-SIGN: dendritic cell specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin, CR: Komplement-Rezeptor, MMR: Mannose Makrophagen-Rezeptor, M.tb.: *Mycobacterium tuberculosis*, MHC: Major histocompatibility Komplex.

Lipoproteine auf der Zellwand der Erreger, TLR-9 bindet Cytosin-Guanin-Dinukleotide (CpG) der mykobakteriellen DNA.<sup>[20]</sup> Weitere an der Phagozytose von *M. tuberculosis* beteiligte Rezeptoren sind Surfactant Protein-A-Rezeptoren (Sp-A) und der CD14-Rezeptor.<sup>[21, 22]</sup>

Eine wichtige Rolle spielen auch DC-SIGN<sup>[23]</sup>, der eine Sekretion des inhibitorisch wirkenden Zytokins Interleukin-10 (IL-10) auslöst, und der Mannose-spezifische Makrophagen Rezeptor (MMR).<sup>[24]</sup> Beide Lektine binden wahrscheinlich an mykobakterielles Lipoarabinomannan (LAM).

Nach der Phagozytose verhindern die Tuberkuloseerreger ihren lysosomalen Abbau durch Blockieren der Reifung mykobakterienhaltiger Phagosomen in einer frühen Phase, sowie durch Hemmung der Fusion von Phagosom und Lysosom.<sup>[25]</sup>

Außerdem wird durch die Internalisierung in den Makrophagen die Gen-Expression von *M. tuberculosis* verändert. Einige dieser Gene könnten eine wichtige Rolle beim Überleben, beim Wachstum und bei der intrazellulären Ausbreitung der Bakterien spielen. Es ist außerdem möglich, dass die Bakterien von Veränderungen von Oberflächenproteinen, -kohlenhydraten und -lipiden der Wirtsmakrophagen profitieren.

Die Rolle des Mannose-spezifischen Makrophagen Rezeptors (MMR) im Zusammenhang mit der Internalisierung von *M. tuberculosis* ist noch unklar. Die Expressierung des MMR ist bei jungen, nicht-aktivierten Makrophagen am höchsten. Wahrscheinlich fördert der MMR den Eintritt von *M. tuberculosis* in alveolare Makrophagen in der nicht-entzündeten Lunge. Durch Aktivierung der Makrophagen wird die Expressierung des MMR's stark herunterregelt, woraus sich schließen lässt, dass die Rolle des MMR nach dem frühen Stadium der Infektion eher gering ist.<sup>[26]</sup>

Auch ist nicht mit Sicherheit aufgeklärt, welches die Liganden für den MMR sind. Der isolierte Rezeptor bindet zwar stark an Man-LAM, aber es ist nicht klar, wo dieses auf der Bakterienoberfläche lokalisiert und ob es daher für eine Bindung überhaupt zugänglich ist. Weitere Mannose-haltige Moleküle die an den MMR binden können sind neutrales, nicht-acetyliertes Arabinomannan (AM) und Phosphatidylinositol-Mannoside (PIMs). Die Rolle des MMR bei der Internalisierung von *M. tuberculosis* soll daher in dieser Arbeit auf molekularer Ebene untersucht werden.

### ***1.3 Struktur und Funktion des Mannose spezifischen Makrophagen-Rezeptors***

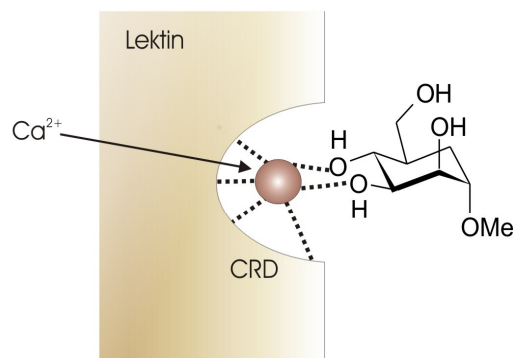
Der MMR, der auf Makrophagen und Leber-Sinusoidalzellen vorkommt, ist ein Mitglied der Mannose-Rezeptor-Familie, zu der auch der *Phospholipase A<sub>2</sub>-Rezeptor* PLA<sub>2</sub>, der *Dendritische Zell Rezeptor* DEC-205 und der *Endotheliale Zell Rezeptor* Endo-180 gehören.<sup>[27]</sup> Alle Rezeptoren vermitteln Endozytose, physiologisch relevante Liganden sind jedoch nur für den MMR und den PLA<sub>2</sub>-Rezeptor bekannt.

Die vier Mitglieder dieser Proteinfamilie haben alle eine ähnliche strukturelle Organisation, unter anderem enthalten sie mehrere Kohlenhydrat-erkennende Domänen (CRDs) vom C-Typ. Jedoch sind nur der Mannose-Rezeptor und Endo-180 echte C-Typ-Lektine, d.h. sie binden Ca<sup>2+</sup>-abhängig an Kohlenhydrate. Den CRDs der anderen beiden Mitglieder der Mannose-Rezeptor-Familie fehlen die für die Calcium-abhängige Bindung von Kohlenhydraten notwendigen Reste und daher binden diese beiden Rezeptoren auch nicht an Zuckerstrukturen.<sup>[28]</sup>

Weitere typische C-Typ-Lektine sind z.B. die Mannose-bindenden-Proteine (MBPs) im Serum<sup>[29]</sup>, DC-SIGN<sup>[30]</sup>, der Asialoglycoprotein-Rezeptor<sup>[31]</sup>, *Surfactant Protein-A* (SP-A)<sup>[32]</sup>, das FimH der Typ-1-Fimbrien von *E. coli*<sup>[33]</sup>, sowie die Selektine<sup>[34]</sup> oder das pflanzliche Lektin Concanavalin A (ConA)<sup>[35]</sup>.

Die meisten C-Typ-Lektine erkennen hauptsächlich die terminalen Monosaccharide der Oligosaccharidstrukturen von Glycoproteinen oder die von komplexen Glycanen auf den Zelloberflächen pathogener Organismen, wobei eine relativ große Vielfalt von Strukturen toleriert wird.<sup>[36]</sup> Die Mannose-bindenden Proteine zeigen z.B. Spezifität für D-Mannose, L-Fucose, D-Glucose und *N*-Acetyl-D-glucosamin, binden aber nicht an D-Galactose.<sup>[37]</sup>

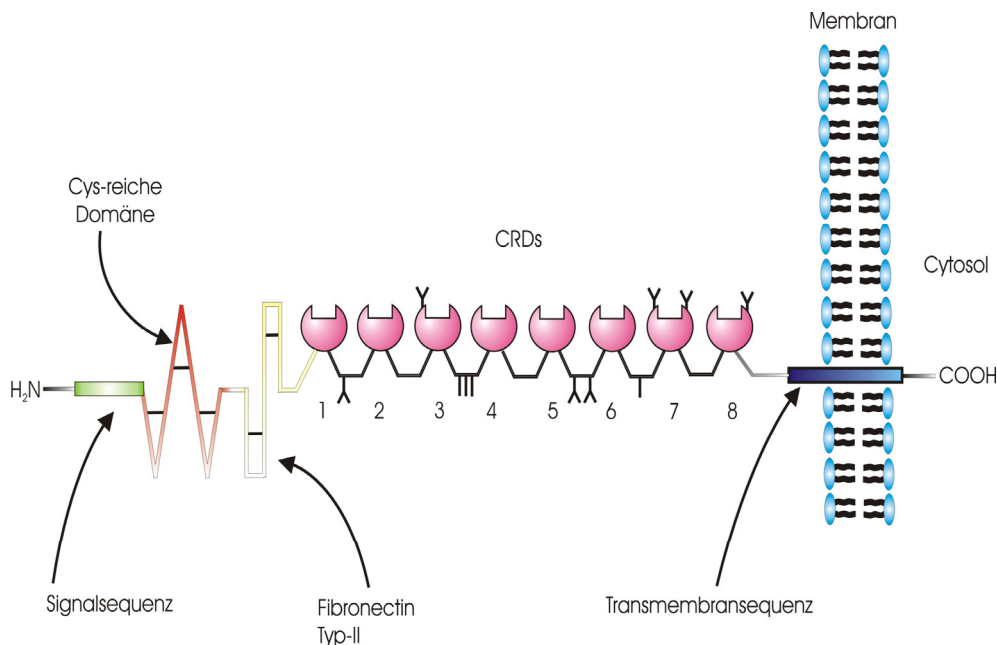
Der Grund hierfür wird sichtbar, wenn man die Bindung der Kohlenhydrate an die CRDs der Proteine genauer betrachtet: Die Bindung der Zucker erfolgt durch die direkte Koordinierung eines  $\text{Ca}^{2+}$  in der Bindungstasche und über Wechselwirkungen mit den Seitenketten von Aminosäuren der CRDs wobei sich ein ternärer Komplex aus Protein,  $\text{Ca}^{2+}$  und Zucker bildet.<sup>[38]</sup> In Abb. 6a ist exemplarisch die Bindung von  $\alpha$ -D-Methylmannosid an die CRD eines C-Typ-Lektins abgebildet. Für die Bindung des Zuckers an das Calcium-Ion sind nur die beiden vicinalen OH-Gruppen in 3- und 4-Position der Mannose von Relevanz. Reste, die an die übrigen Hydroxy-Gruppen gebunden sind, spielen für die Bindung keine oder nur eine geringe Rolle. Daher wird an diesen Positionen eine hohe Diversität von Funktionalitäten toleriert. Bis auf D-Galactose tragen auch die übrigen oben genannten Monosaccharide in 3- und 4-Position (bzw. 2 und 3 bei Fucose) geeignete äquatoriale Hydroxyfunktionen, die an das  $\text{Ca}^{2+}$  komplexieren können. Bei D-Galactose hingegen steht zwar die OH-Gruppe an Position 3 in der richtigen äquatorialen Position, die Hydroxygruppe an Position 4 steht jedoch in axialer Position. Daher wird D-Gal von MBPs nicht erkannt.



**Abb. 6:** Mechanismus der Substratfixierung in C-Typ-Lektinen.

Betrachtet man z.B. die Röntgenstruktur der CRD des C-Typ-Lektins DC-SIGN mit einem gebundenen Pentasaccharid, so kann man erkennen, dass die Bindungstasche sich nur als eine flache Furche darstellt, in die der Zucker nicht tief „eintauchen“ kann. Auch durch diesen limitierten Kontakt könnte die geringe Spezifität für bestimmte Zucker erklärt werden.<sup>[39]</sup>

Der MMR ist ein Typ-I-Transmembran-Protein, d.h. der COOH-Terminus des Polypeptids liegt auf der cytoplasmatischen Seite der Membran. Der extrazelluläre Teil des Proteins besteht aus einer N-terminalen Cystein-reichen Region, die keine Ähnlichkeit zu anderen bekannten Sequenzen hat, einer Fibronectin-Typ-II-Wiederholung und acht sequentiell angeordneten C-Typ-CRDs, jede mit einer Länge von ca. 130 Aminosäuren (Abb. 7).<sup>[40]</sup>

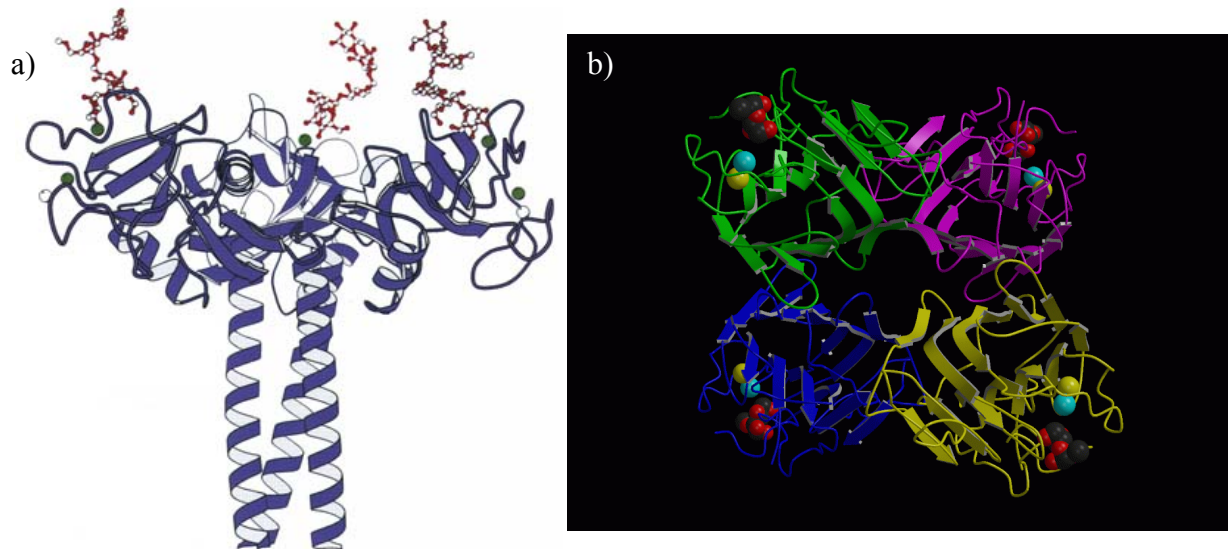


**Abb. 7:** Schematische Darstellung der Struktur des Mannose-Makrophagen-Rezeptors nach Drickamer et al.<sup>[40]</sup> Die waagerechten schwarzen Linien (-) repräsentieren Disulfidbrücken der Cys-reichen Region und der Fibronectin-Typ-II-Wiederholung, die senkrechten schwarzen Linien (|) stellen mögliche O-Glycosylierungsstellen dar und die schwarzen Y stehen für potentielle N-Glycosylierungsstellen.

Die Mitglieder der Mannose-Rezeptor-Proteine sind die einzigen bis heute bekannten Lektine, die mehr als eine CRD in einer Polypeptidkette haben. Alle übrigen Lektine erreichen eine hochaffine Bindung zu ihren natürlichen Liganden durch die Oligomerisierung von Polypeptiden, die jeweils nur eine CRD tragen und die alleine nur eine schwache Bindung zu komplexen Kohlenhydratliganden aufbauen können. Z.B. liegt das Serum-Protein MBP-A als Trimer vor (Abb. 8a) und das Pflanzen Lektin Concanavalin A (ConA) als Tetramer (Abb. 8b).<sup>[41,42]</sup>

Bisher ist nur die Aminosäuresequenz des MMR vollständig aufgeklärt. Die dreidimensionale Struktur des gesamten Proteins ist dagegen noch völlig unbekannt, lediglich von CRD-4 und der Cystein-reichen Domäne gibt es Röntgenstrukturen.<sup>[43, 47]</sup>

Die anhand der Aminosäuresequenz berechnete Masse des Proteins liegt bei 154 kDa. Da der MMR jedoch hoch glycosyliert ist, wahrscheinlich auch sialyliert, weicht die berechnete Masse von der durch MALDI-TOF-MS und Sedimentationsexperimenten bestimmten Masse



**Abb. 8:** a) MBP-A-Trimer mit gebundenen Liganden, b) ConA-Tetramer.<sup>[45,46]</sup>

ab, die ein tatsächliches Molekulargewicht von ca. 174.5 kDa ergeben.<sup>[44]</sup> Die Differenz zwischen den Werten kommt dadurch zustande, dass bei der berechneten Masse nur die reine Aminosäuresequenz berücksichtigt wird, die Masse des Glycoanteils, der durch post-translationale Glycosylierung des Proteins eingeführt wird, jedoch nicht; die genaue Zusammensetzung der gebundenen Kohlenhydrate ist auch nicht bekannt.

Durch Sedimentationsexperimente konnten Taylor et al.<sup>[45]</sup> weiterhin zeigen, dass der Rezeptor in Lösung und höchstwahrscheinlich auch membrangebunden als Monomer vorliegt. Es könnte aber durchaus möglich sein, dass der MMR auf der Zelloberfläche durch hochmolekulare Polysaccharide quervernetzt ist, falls die dafür relevanten CRDs zugänglich sind.

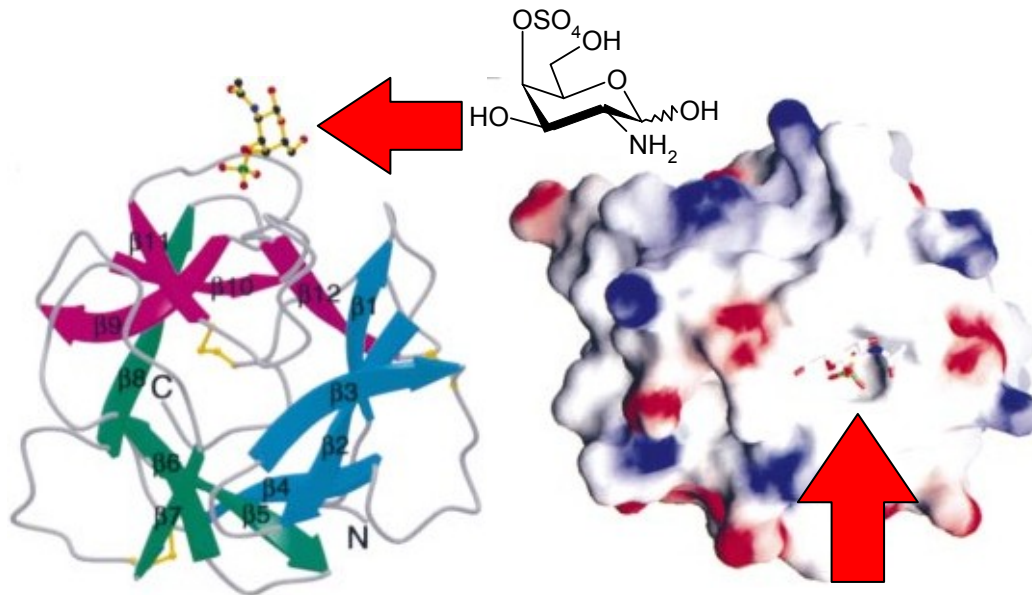
Experimente, in denen Fragmente des MMR in Fibroblasten-Zellen exprimiert wurden, haben ergeben, dass die Proteinsegmente vor den CRDs für die Endozytose und Phagozytose von neutralen Kohlenhydratstrukturen nicht relevant sind.<sup>[45]</sup>

Von Bjorkman et al.<sup>[47]</sup> konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Cystein-reiche Domäne an sulfatisierte Oligosaccharide (3-SO<sub>4</sub>-Gal, 3-SO<sub>4</sub>-GalNAc, 4-SO<sub>4</sub>-GalNAc) bindet, wie sie auf einigen Hypophysenhormonen, wie z.B. Lutropin oder Thyrotropin vorkommen. Abbildung 9 zeigt die Röntgenstruktur und die Bindungstasche der Cys-reichen Domäne des MMR mit einem gebundenem Molekül 4-SO<sub>4</sub>-GalNAc.

Die Funktion der Fibronectin-reichen Wiederholungseinheit des MMR ist weiterhin unklar.

An der Bindung und Endocytose natürlicher Kohlenhydrat-Liganden scheinen im Fall des MMR lediglich seine acht CRDs und keine weiteren Domänen des Proteins beteiligt zu sein.





**Abb. 9:** Röntgenstruktur und Modell der Bindungstasche der Cys-reichen Domäne des MMR mit darin gebundenem 4-SO<sub>4</sub>-GalNAc. Der Pfeil markiert die Bindungstasche mit dem darin gebundenen Zucker.<sup>[52]</sup>

Die Affinität zu den verschiedenen erkannten Monosacchariden nimmt in der Reihenfolge D-Man = L-Fuc > D-Glc = D-GlcNAc >> D-Gal ab.<sup>[37]</sup>

Ein Polypeptid, das nur die CRDs 1-8 enthält endozytiert <sup>125</sup>I-gelabeltes Man<sub>23</sub>-BSA genauso effizient, wie der intakte Rezeptor. Ein Peptid mit den CRDs 4-8 bindet gut an Mannose-Sepharose, eines mit den CRDs 1-3 jedoch gar nicht. Dies scheint darauf hinzudeuten, dass die Affinität zu Kohlenhydraten hauptsächlich mit den CRDs 4-8 in Zusammenhang steht. Ein Rezeptor der nur die CRDs 4-8 enthält phagozytiert mannosylierte Partikel genauso effizient wie der komplette MMR.<sup>[46]</sup>

Exprimiert man nur die CRD-4, so bindet diese als einzige CRD auch allein an Mannose, Fucose, *N*-Acetylglucosamin und Glucose. Allerdings liegen die Bindungskonstanten jedoch nur im millimolaren Bereich ( $K_D(\alpha\text{-MeMan}) = 2.4 \text{ mM}$ ).<sup>[49]</sup>

Zellen mit einem Konstrukt, das die CRDs 5-8 enthält, binden und phagozytieren mannosylierte Partikel. Jedoch geschieht dies erheblich langsamer als bei einem Peptid mit den CRDs 4-8. Zellen mit einem Rezeptor, der nur die CRDs 6-8 enthält, zeigen dagegen keine Phagozytose.<sup>[46]</sup>

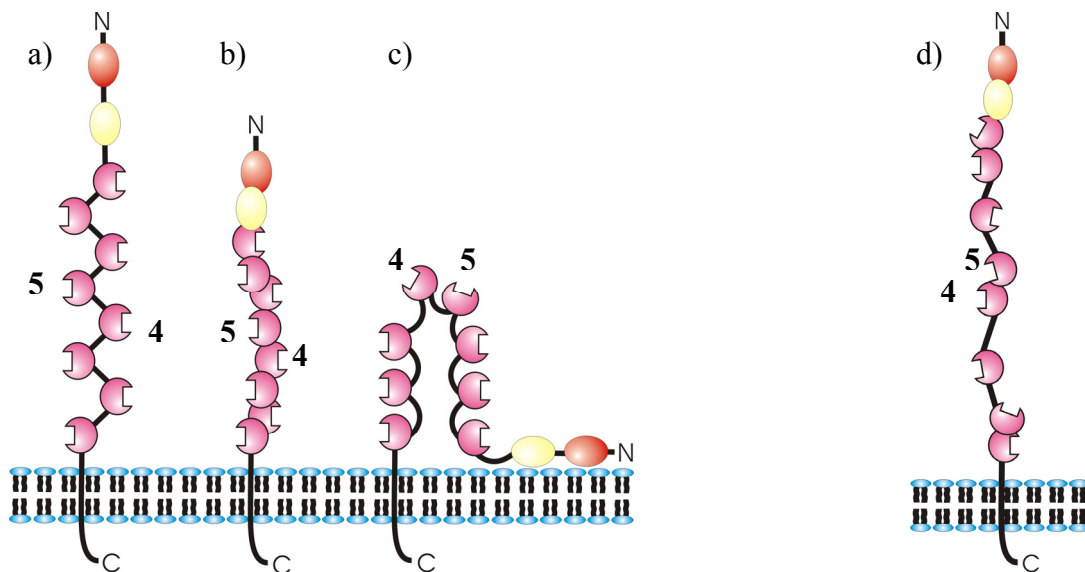
Aus diesen Ergebnissen haben Taylor et al.<sup>[46]</sup> geschlossen, dass CRD-4 für die effiziente Bindung und Internalisierung von Kohlenhydratliganden essentiell ist und dass die CRDs 1-3 dabei von untergeordneter Bedeutung sind.

Weiterhin konnte durch Expressionsexperimente gezeigt werden, dass CRD-5 alleine nicht in der Lage ist, an Kohlenhydrate zu binden. CRD-7 scheint bei der Bindung eine Rolle zu

spielen, CRD-8 aber anscheinend nicht. Die CRDs 1-3, bzw. 6-8 zeigen keine Affinitäten zu anderen Kohlenhydraten außer D-Mannose.<sup>[46]</sup>

Die Bindung von mannosyliertem Lipoarabinomannan (Man-LAM) an den MMR ist pH-abhängig, was charakteristisch ist, erlaubt es doch die Dissoziation der Liganden in sauren vorlysosomalen intrazellulären Kompartimenten. Ebenso ist die Bindung temperaturabhängig, bei 4°C nimmt sie im Vergleich zu 37°C um 70 % ab. Auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit lässt sich durch Hemmung der Kohlenhydratbindung mit EDTA oder in Calcium-freien Puffer zeigen.<sup>[50]</sup>

Interessant ist der Aspekt, dass die für die Bindung natürlicher Substrate anscheinend wichtigste CRD nicht am Ende der Polypeptidkette ist, sondern mitten darin liegt. Hieraus könnte man schließen, dass der Rezeptor keine flexible, gestreckte (Abb. 10a) oder kompakt gestreckte Struktur (Abb. 10b) hat, sondern eine U-förmige Anordnung annimmt, die die CRDs 4 und 5 am weitesten von der Zellmembran weg präsentiert (Abb. 10c).<sup>[51]</sup>



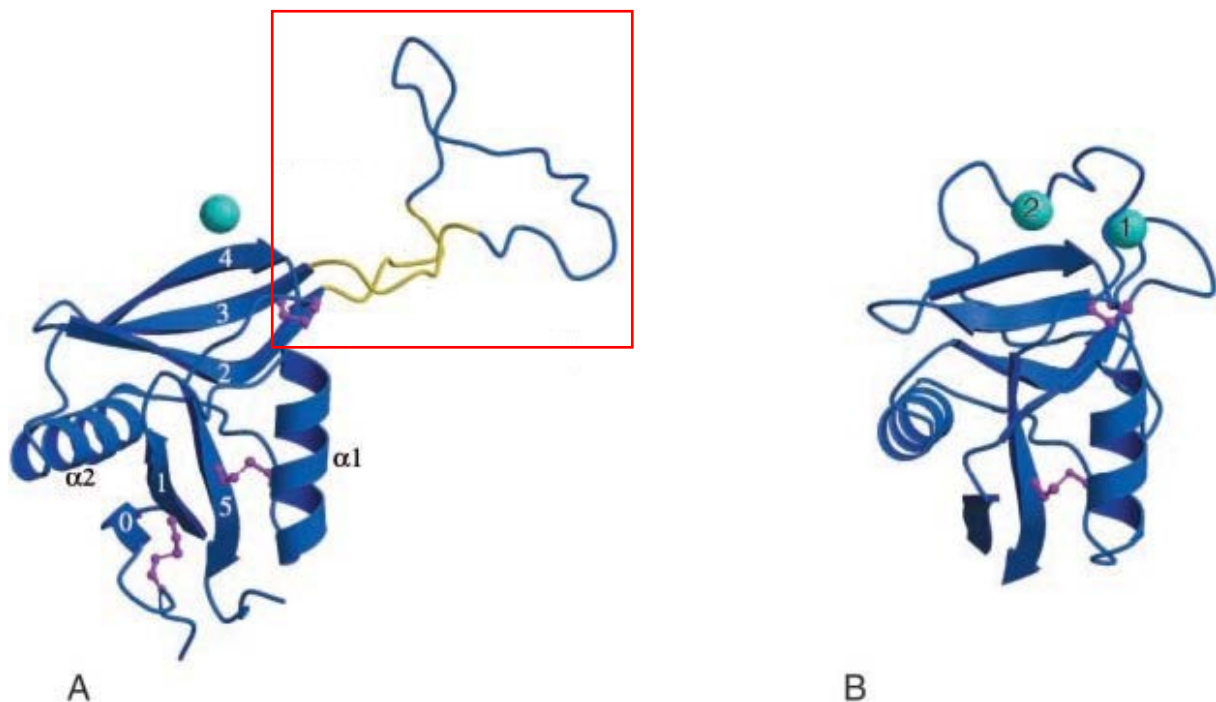
**Abb. 10:** Mögliche Überstrukturen des MMR: a) gestreckt, mit flexiblen Linkern zwischen den einzelnen CRDs, b) kompakt-gestreckt, mit engem Kontakt zwischen den CRDs, c) U-förmige Struktur, die die CRDs 4 und 5 am weitesten von der Zellmembran wegbringt, d) nach Expressions-, Sedimentations- und Proteolyseexperimenten wahrscheinlichste Struktur mit vier flexiblen Linkern und drei kompakten CRD-Paaren.

Proteolyseexperimente mit Subtilisin konnten zeigen, dass CRD 1-2, CRD-4-5, sowie CRD 7-8 jeweils eine proteolysestabile Einheit bilden, die eine kompakte Struktur der Paare mit intensivem Kontakt zwischen den jeweiligen CRDs vermuten lässt. Die CRDs 3 und 6 haben allerdings keinen engen Kontakt und sind wahrscheinlich durch flexible Linker miteinander verbunden.<sup>[51]</sup>

Durch diese Ergebnisse lässt sich dann allerdings eine U-förmige Anordnung der CRDs ausschließen, wahrscheinlich nimmt der Rezeptor eine gestreckte Form mit vier flexiblen Linkern und drei kompakten CRD-Paaren an (Abb. 10d). Anhand dieser aus den Expressions-, Proteolyse-, Diffusions- und Sedimentationsexperimenten gewonnenen Daten lässt sich abschätzen, dass der MMR wahrscheinlich 380 Å von der Zelloberfläche aufragt.<sup>[51]</sup>

Die CRDs 4 und 5 bilden vermutlich einen *Core* für die Bindung multivalenter Liganden. Dies lässt sich z.B. auch an den Dissoziationskonstanten von Invertase an CRD-4, bzw. CRD-4-5 zeigen, die bei  $K_D \approx 1 \mu\text{M}$ , bzw.  $K_D \approx 20 \text{ nM}$  liegen.<sup>[45]</sup>

Vergleicht man die Röntgenstrukturen von CRD-4 des MMR mit der CRD des Mannosebindenden Proteins A (MBP-A), die beide die gleichen mannosylierten Liganden binden, so lassen sich Gemeinsamkeiten, aber auch gravierende Unterschiede erkennen (Abb. 11).<sup>[38]</sup>



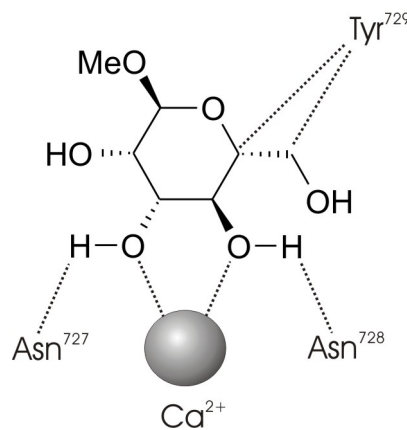
**Abb. 11:** a) Röntgenstruktur von CRD-4 des MMR, b) Röntgenstruktur der CRD von MBP-A.<sup>[38]</sup> Der rote Kasten kennzeichnet die Region der CRD des MMR, die sich besonders stark von der Struktur der CRD von MBP-A unterscheidet. Die türkisen Kugeln repräsentieren die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die violetten Strukturen stellen Disulfid-Brücken dar. Die Zahlen 0 – 5 kennzeichnen die  $\beta$ -Faltblatt-Regionen im Protein,  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  die  $\alpha$ -Helices.

Beide Kohlenhydrat-erkennenden Domänen bestehen aus zwei  $\alpha$ -Helices und zwei kleinen antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Die Struktur der CRD des MBP enthält zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, wobei ein  $\text{Ca}^{2+}$  für die Komplexierung des Zuckers zuständig ist und das andere für die Positionierung der „Loops“ um das Kohlenhydrat-bindende  $\text{Ca}^{2+}$  herum. Im Gegensatz zu den Core-Regionen von MMR und MBP unterscheidet sich der „obere“ Teil der Polypeptidkette

von CRD-4, der ungeordnete Loops enthält, stark von der Struktur der MBP-CRD. Obwohl CRD-4 in Lösung zwei  $\text{Ca}^{2+}$  bindet, kann in der Röntgenstruktur nur ein Calcium-Ion wiedergefunden werden, woraus Weis und Taylor<sup>[52]</sup> geschlossen haben, dass es sich bei dieser Struktur nicht um die Kohlenhydrat-bindende Form der CRD handelt, sondern um die Form, in der der Ligand nach der Phagozytose im Endosom wieder abgelöst wird.

Neuere Ergebnisse zeigen, dass die CRD-4 des MMR das zweite  $\text{Ca}^{2+}$  völlig anders, auf ganz eigene Weise, als die CRD von MBP-A bindet.

Neben der Bindung zum  $\text{Ca}^{2+}$  trägt auch noch eine hydrophobe Stacking-Interaktion mit dem aromatischen Ring eines Tyrosin-Rests mit 25 % zur Bindungsenergie von  $\alpha$ -D-Methylmannosid an CRD-4 bei (Abb. 12).<sup>[52]</sup>



**Abb. 12:** Bindung von  $\alpha$ -MeMan an CRD-4 des MMR.<sup>[52]</sup>

Die viel geringere Affinität von CRD-4 zu Kohlenhydraten im Vergleich zum intaktem Rezeptor legt den Schluss nahe, dass eine hoch-affine Bindung zu natürlichen Liganden nur durch multiple Interaktionen zwischen Mannosyl-Resten der komplexen Polysaccharide auf den Zelloberflächen pathogener Organismen, wie z.B. dem mannosyliertem Lipoarabinomannan (Man-LAM) oder Phosphatidylinositol-Mannosiden (PIMs) von *Mycobacterium tuberculosis*, und den CRDs 4-8 des Mannose-Rezeptors erreichen lässt.

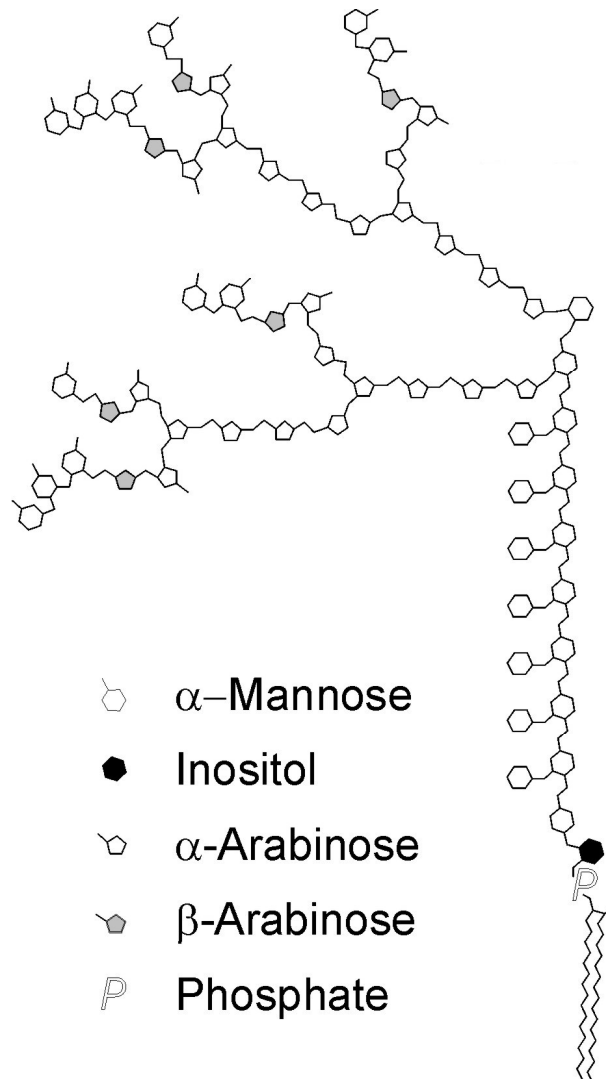
Die Struktur des MMR könnte auch erklären, warum dieser Rezeptor in der Lage ist, die Zuckerstrukturen von endogenen Glycoproteinen und die Glycane auf den Oberflächen pathogener Organismen zu erkennen. Taylor et al.<sup>[51]</sup> postulieren, dass die eng aneinander liegenden CRDs 4 und 5 wahrscheinlich die Mannoside auf Säugetierzellen erkennen und durch die weiter auseinanderliegenden CRDs die verzweigteren Zucker-Arrays von Pathogenen gebunden werden können.

### 1.4 Multivalenz und Glycomimetika

Wie bereits weiter oben erwähnt bindet der Mannose-spezifische Makrophagen-Rezeptor wahrscheinlich an mannosyliertes Lipoarabinomannan (Man-LAM) auf der Zelloberfläche von *Mycobacterium tuberculosis*.

Wie in Abb. 13 dargestellt, handelt es sich bei Man-LAM um ein komplexes Lipopolysaccharid mit verzweigten Kohlenhydratstrukturen und zahlreichen terminalen Mannose-Einheiten.

Man-LAM ist ein multivalenter Ligand, d.h. durch die Präsentation multipler Kopien eines Rezeptor-bindenden Motivs, in diesem Fall terminale Mannose, sollte die Affinität und Spezifität der Bindung zum MMR enorm erhöht werden.

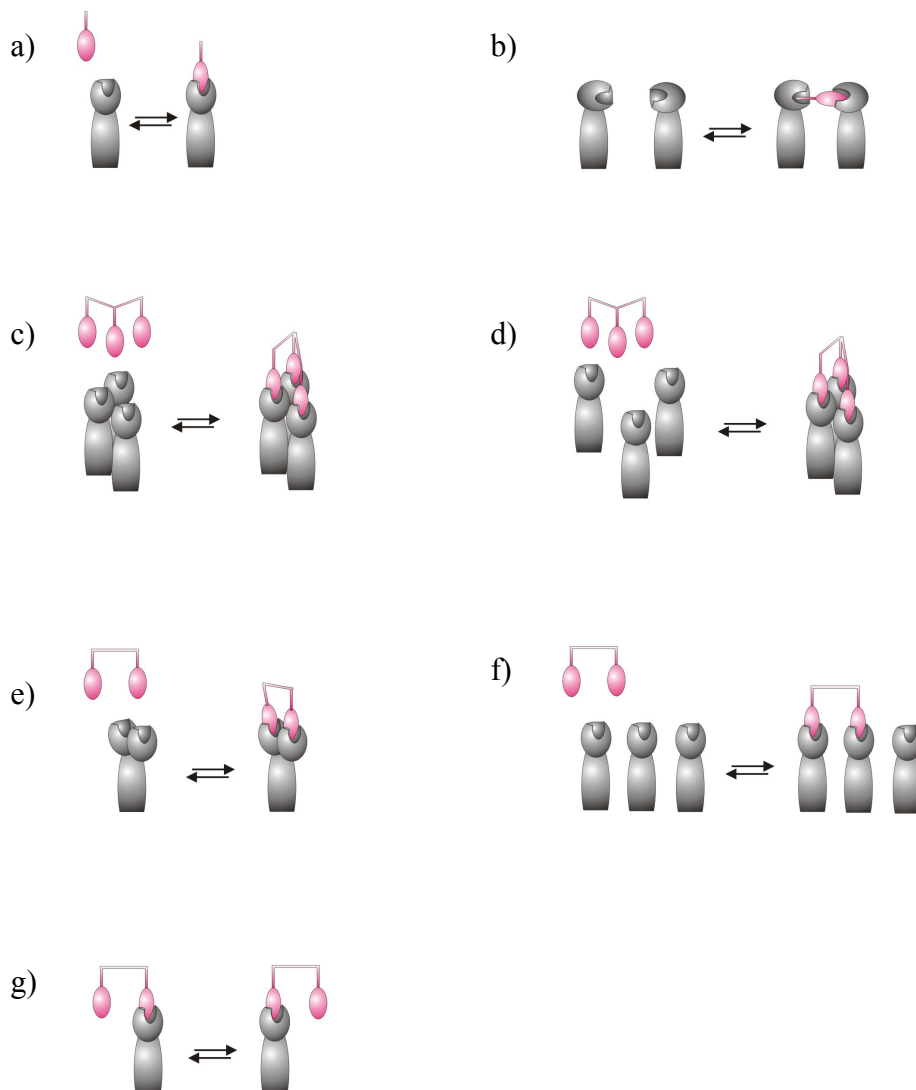


**Abb. 13:** Schema der Struktur von mannosyliertem Lipoarabinomannan (Man-LAM).

Multivalenz ist ein in der Natur weit verbreitetes Prinzip um hochaffine Bindungen zu Rezeptoren zu erreichen.<sup>[53]</sup>

Die Potenz eines multivalenten Liganden hängt dabei vom Mechanismus der Bindung an seinen Rezeptor ab. Z.B. kann die Effektivität eines multivalenten Impfstoffs durch seine Fähigkeit beeinflusst werden, Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu clustern, die Aktivität eines Inhibitors des pentameren Shiga-like-Toxins hängt von der Fähigkeit ab, mehrere Bindungsstellen gleichzeitig zu besetzen.<sup>[54,55]</sup>

Monovalente Liganden besitzen nur eine beschränkte Anzahl möglicher Bindungsmechanismen. Diese Liganden binden typischerweise an einen einzigen Rezeptor (Abb. 14a) oder, weitaus seltener, dimerisieren sie Rezeptoren über zwei verschiedene Bindungstaschen (Heterodimerisierung, Abb. 14b).



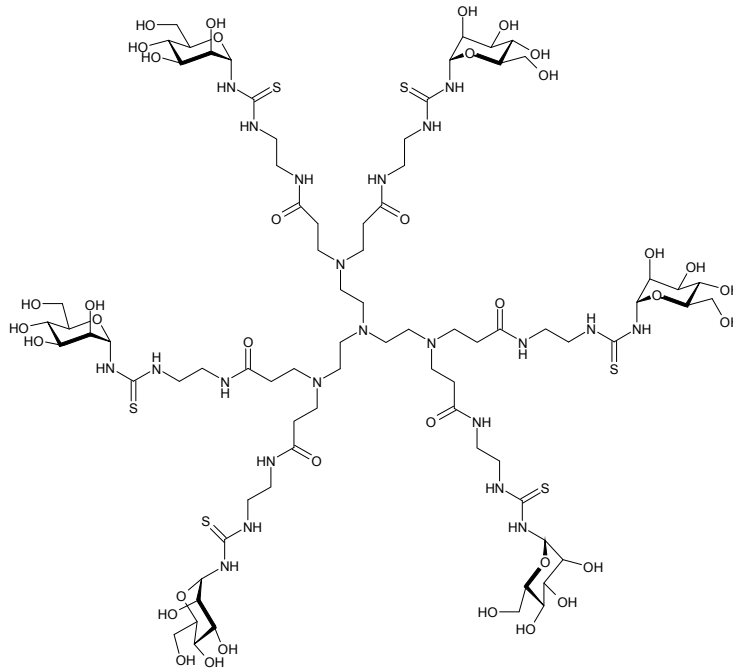
**Abb. 14:** Mögliche Mechanismen für die Bindung mono- und multivalenter Liganden an unterschiedliche Rezeptortypen nach Kiessling et al.<sup>[56]</sup>

Umgekehrt können multivalente Liganden über mehrere verschiedene Mechanismen mit Rezeptoren interagieren. Mögliche Bindungsmechanismen sind in Abb. 14 c-g visualisiert.<sup>[56]</sup> Ein multivalenter Ligand kann an einen oligomeren Rezeptor binden (Abb. 14c). Dies ist z.B. bei den MBPs der Fall, die als Trimere vorliegen, oder auch bei dem pflanzlichen Lektin Concanavalin A, welches als Tetramer vorkommt. Auch können monomere Rezeptoren durch die Bindung eines multivalenten Liganden oligomerisiert werden (Abb. 14d). Es wird vermutet, dass diese Bindungsart auch beim MMR auftreten könnte. Beim MMR könnten Aviditätseffekte auch durch die gleichzeitige Bindung der Liganden an mehrere Bindungsstellen im gleichen Rezeptor erfolgen (Abb. 14e). Weitere Effekte, die zu einer erhöhten Affinität multivalenter Substrate führen sind der Chelat-Effekt (Abb. 14f), bei der durch die Kontakte zwischen multivalentem Liganden und mehreren Rezeptoren die Off-Rate erniedrigt und die funktionelle Affinität erhöht wird, oder statistische Effekte (Abb. 14g). Hier wird die lokale Konzentration eines multivalenten Liganden durch Dissoziation einer Bindungseinheit von der Bindungstasche und Neubindung einer anderen Bindungseinheit erhöht, was ebenfalls zu einer stärkeren Nettobindung führt.

Eine Methode um die Bindung multivalenter Liganden an der MMR genauer zu untersuchen, ist die Isolierung seiner natürlichen Liganden. Die Isolierung komplexer Oligosaccharide aus natürlichen Materialien ist jedoch nur eingeschränkt sinnvoll, da diese sich oft nur in geringen Mengen rein erhalten lassen. Außerdem ist die Aufklärung der Strukturen solcher Polysaccharide äußerst schwierig. Ein weiteres Problem ist, dass das Glycosylierungsmuster von Zellen deutlichen Strukturschwankungen unterliegt (Mikroheterogenität des Glycosylierungsmusters).<sup>[57]</sup>

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, bietet sich die Vereinfachung und Variation der natürlichen Vorbildstrukturen an. Nach dem Vorbild natürlich vorkommender Verbindungen abgewandelte synthetische Kohlenhydratanaloga werden als Glycomimetika bezeichnet.<sup>[58]</sup> Durch die strukturelle Simplifizierung der komplexen Moleküle, lassen sich wesentlich einfacher neue Erkenntnisse über die Bindung von Liganden an ihre Rezeptoren gewinnen. Dabei gelingt es auch häufig gleichzeitig die biologische Wirksamkeit und Spezifität zu erhöhen, was ein wichtiger Schritt auf dem Weg zu Wirkstoffen auf Kohlenhydratbasis ist.

Multivalente Glycomimetika lassen sich nach Kiessling et al.<sup>[59]</sup> in vier generelle Klassen unterteilen. (i) *Small Molecules* mit einem Molekulargewicht von unter 1 kDa, einer definierten Struktur und nur wenigen Bindungselementen; (ii) Glycodendrimeren, z.B. PAMAM-Dendrimere wie sie von Lindhorst et al.<sup>[60]</sup> synthetisiert wurden (Abb. 15) und die bereits eine größere Anzahl von Bindungseinheiten aufweisen, aber trotzdem noch eine



**Abb. 15:** Hexavalentes mannoseummanteltes PAMAM-Dendrimer nach Lindhorst et al.<sup>[60]</sup>

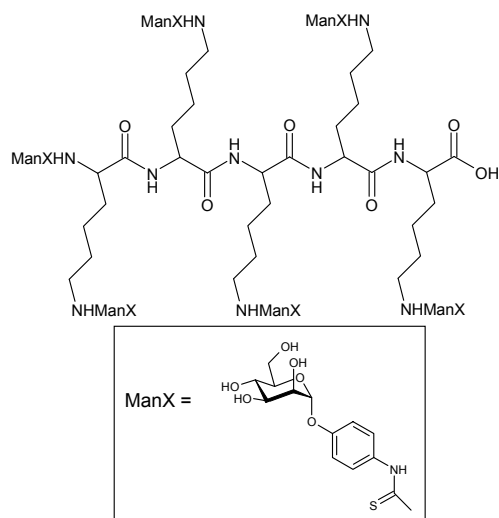
definierte Struktur haben; (iii) Globuläre Proteine, z.B. mannosyliertes BSA, die mit spezifischen Bindungseinheiten derivatisiert werden können und die eine undefinierte Epitop-Präsentation aufweisen; sowie (iv) mit Kohlenhydraten derivatisierte Polymere, die keine definierte Struktur besitzen und Molekulargewichte bis zu 100 kDa erreichen können, so genannte Glycopolymere.

Hoppe et al. und Jansen et al.<sup>[61,62]</sup> untersuchten die Affinität von mannosyliertem Albumin an den Mannose-Makrophagen-Rezeptor. Wie erwartet korreliert die Affinität zum MMR mit zunehmendem Mannosylierungsgrad des Albumins. Überraschenderweise benötigt man jedoch mindestens 22 Mannose-Gruppen, um eine hochaffine Bindung an den MMR zu erreichen.

Diese Zahl ist erheblich größer als die Zahl an Kohlenhydrat-erkennenden Domänen auf dem MMR. Auf der einen Seite kann dieser Effekt rein statistisch begründet werden, verursacht durch die höhere Wahrscheinlichkeit einer Mannose-Gruppe adäquat für eine Bindungstasche des MMR konfiguriert zu sein, auf der anderen Seite könnte dieses Ergebnis ein Hinweis darauf sein, dass mehrere Rezeptormoleküle an der Bindung beteiligt sind.

Biessen et al.<sup>[63]</sup> untersuchten die Bindung einer Reihe niedermolekularer Oligolysin-basierter Cluster-Mannoside an den MMR. Auch in dieser Studie konnte eine deutliche Erhöhung der Affinität mit jedem weiteren Zucker festgestellt werden. Ein hexavalentes Penta-Lysin (Abb. 16) zeigte sogar eine Bindungskonstante im niedrigen nanomolaren Bereich.





**Abb. 16:** Hexavalenter Mannose-Cluster aus fünf Lysin-Einheiten als nanomolarer Ligand für den MMR nach Biessen et al.<sup>[63]</sup>

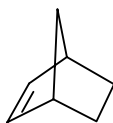
## 2. Aufgabenstellung

In dieser Arbeit sollen nun aufbauend auf den zuvor beschriebenen biologischen Sachverhalten und chemischen Ergebnissen gezielt oligovalente Liganden synthetisiert werden, die eine möglichst hohe Affinität zum MMR aufweisen. Moleküle, die stark an den MMR binden, sollten gleichzeitig auch die Bindung natürlicher Liganden des *Mycobacterium tuberculosis* an den Mannose-Rezeptor kompetitiv inhibieren. Da die Bindung von *M. tuberculosis* eine Voraussetzung für die Phagozytose des Pathogens ist und damit indirekt auch für die Vermehrung des Erregers, könnte durch diesen Ansatz die Infektion der Makrophagen gehemmt und damit die gesamte Infektion gestoppt werden.

Um neue Erkenntnisse über die molekularen Details der Bindung multivalenter Liganden an den Mannose-Rezeptor zu gewinnen, sollen Moleküle hergestellt werden, die eine unterschiedliche Dichte an Mannose-Epitopen aufweisen. Weiterhin soll der Einfluss der Länge und der Flexibilität der Spacer in den synthetisierten Liganden untersucht werden. Auch sollen unterschiedliche pharmakophore Gruppen bzw. Funktionalitäten, wie z.B. aromatische Ringe, in die Spacer der Moleküle eingebaut werden, die potentiell zusätzliche Wechselwirkungen mit dem MMR eingehen können.

Als *Core* für die Synthesen sollen in dieser Arbeit mit Mannose funktionalisierte Derivate des Norbornens **1** dienen, da sich solche oligovalenten Glycocluster leicht durch Ringöffnende-Metathese-Polymerisation (ROMP) in multivalente Glycopolymere verwandeln lassen sollten.<sup>[64]</sup> Für eine effiziente Synthese möglichst vieler unterschiedlicher Glycocluster soll

ein Baukastensystem entwickelt werden, das mit einem kleinen Satz einfacher und gut funktionierender Reaktionen eine schnelle Synthese diverser Norbornenderivate erlaubt.



1

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit soll die biologische Untersuchung der synthetisierten Verbindungen mit dem MMR-Protein sein, das aus einer kultivierten Zelllinie erhalten werden kann, welche die cDNA des MMR enthält und den Rezeptor in ein Kulturmedium exprimiert. Aus diesem Kulturmedium lässt sich das MMR-Protein durch Affinitätschromatographie isolieren.

Bindungseigenschaften der hergestellten Inhibitoren sollen mittels Oberflächenplasmonenresonanz, Isothermer Titrations-Kalorimetrie und ELISA mit dem MMR, sowie dem Mannose-spezifischen Lektin FimH aus *E. coli*. getestet werden, um den Vergleich zu einem Rezeptor zu ermöglichen, wo eine hochaffine Bindung zu natürlichen Liganden nicht durch mehrere CRDs in einem Molekül (wie im Fall des MMR), sondern durch multimere Präsentation von CRDs wie im Falle der FimH-tragenden Typ-I-Fimbrien auf Bakterien zustande kommt.

### 3. Präparativer Teil

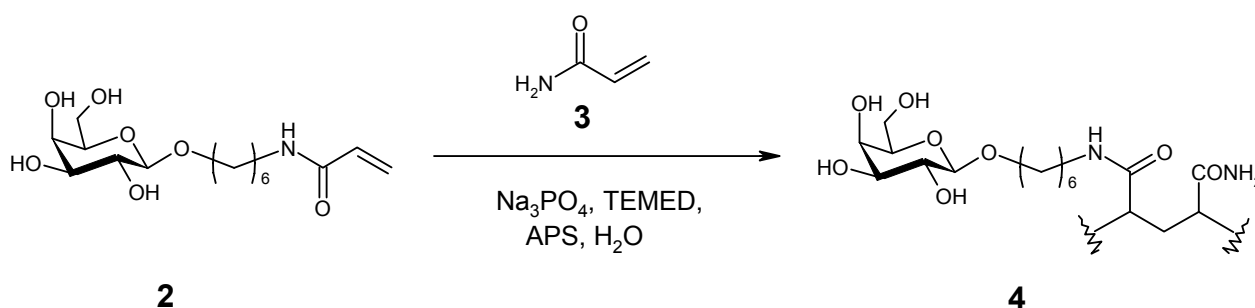
Als zentraler Baustein für die Synthesen sollte ein Molekül dienen, das über Funktionalitäten verfügt, an die sich leicht verschiedene mannosylierte Spacer anknüpfen lassen, um auf diese Weise mono-, di- und oligovalente Glycocluster herstellen zu können. Gleichzeitig sollte sich das Core-Molekül über eine Polymerisationsreaktion zu Glycopolymeren mit einer möglichst definierten Struktur umsetzen lassen, um die Avidität der oligovalenten Strukturen weiter zu erhöhen. Durch dieses Prinzip ließen sich die Vorteile von Glycoclustern, Glycodendrimer-ähnlichen Strukturen und Glycopolymeren miteinander verknüpfen.

Synthesen von biologisch aktiven Glycoclustern, Glycodendrimeren und Glycopolymeren sind in der Literatur vielfältig beschrieben. Polymerisationsreaktionen für den Aufbau multivalenter Liganden haben gegenüber den Multistep-Reaktionen, wie sie häufig zum

Aufbau von Cluster-Molekülen und Dendrimeren benötigt werden, einen entscheidenden Vorteil: komplexe Strukturen lassen sich in einem einzigen Schritt herstellen.

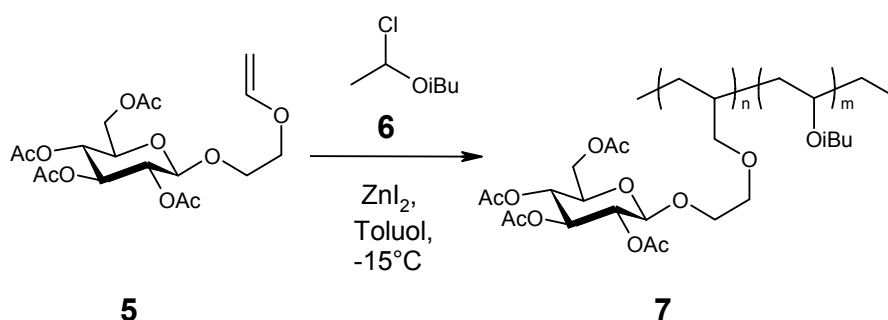
Nicht unerwähnt bleiben soll aber auch ein Nachteil vieler Polymerisationsreaktionen: Die entstehenden Substanzen haben in der Regel keine definierte Struktur, sondern zeigen eine mehr oder weniger breite Verteilung der Molmassen. Für die Synthese homogener, hochfunktionalisierter Neobiopolymere kommen daher nur so genannte lebende Polymerisationen in Frage, bei denen Kettenabbruch- und Kettenübertragungsreaktionen langsam gegenüber der Kettenfortpflanzung sind. Für die Herstellung von Polymeren mit enger Massenverteilung muss außerdem auch noch die Initiationsrate höher als die Geschwindigkeit der Kettenfortpflanzung sein. In diesem Fall entstehen Produkte mit einer sehr engen Molmassenverteilung, wobei sich die Kettenlänge der Polymere durch die Variation des Monomer-zu-Initiator-Verhältnisses steuern lässt. Ein weiterer Nachteil ist auch, dass die Reaktionsbedingungen oft keine hohe Dichte an polaren Funktionalitäten erlauben, die häufig essentiell für die Funktion biologisch aktiver Moleküle ist. Trotz der genannten Nachteile wurden kohlenhydrathaltige Neobiopolymere bereits durch eine Vielzahl von verschiedenen Polymerisations-Strategien hergestellt und erfolgreich in biologischen Systemen eingesetzt.<sup>[65]</sup>

Die erste Methode mit der Glycopolymere generiert wurden, ist die radikalische Polymerisation. Vorteile dieser Methode sind die Tolerierung von Monomeren mit polaren, funktionellen Gruppen und die Möglichkeit, die Polymerisationsreaktion in Wasser durchführen zu können. Ein Beispiel für die Anwendung der radikalischen Polymerisation ist die Synthese eines Galactose-substituierten Polyacrylamid-Gels **4** durch Y. C. Lee et al.<sup>[66]</sup> (Schema 1). Nachteil dieser Methode ist aber ganz klar die Bildung von Polymeren mit einem sehr hohen Molekulargewicht und hoher Polydispersität, wonach die radikalische Polymerisation für die Synthese von einigermaßen definierten Strukturen ungeeignet ist.



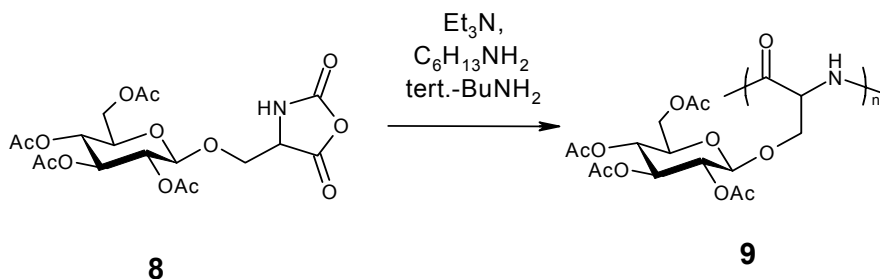
**Schema 1** Y. C. Lee's Synthese eines Galaktose-substituierten Polyacrylamid-Gels durch radikalische Polymerisation.<sup>[66]</sup>

Minoda et al.<sup>[67]</sup> stellten ein Glucose-haltiges Polymer **7** mittels einer kationischen Polymerisation dar (Schema 2). Bei dieser Methode werden aprotische oder protische Säuren bzw. stabile Karbokationen-Salze als Katalysatoren verwendet. Bei der kationischen Polymerisation treten meist keine Nebenreaktionen auf, außerdem sind lebende Polymerisationen möglich. Jedoch werden keine polaren Funktionen toleriert, so dass die Verwendung von Schutzgruppen unumgänglich ist. Diese können aber unter Umständen mit dem Katalysator wechselwirken und dessen Aktivität erniedrigen. Daher hat die kationische Polymerisation nur eine beschränkte Anwendung bei der Herstellung von Neobiopolymeren erlangt.



**Schema 2** Synthese eines Gluco-Polymers durch kationische Polymerisation nach Minoda et al.<sup>[67]</sup>

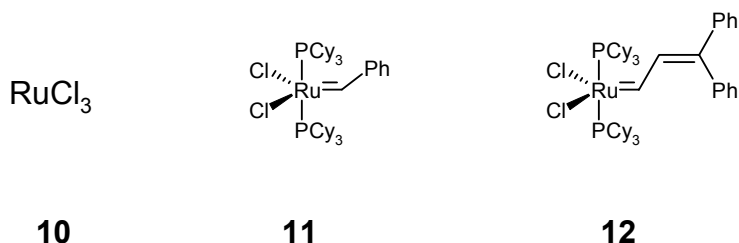
Eine weitere in der Literatur beschriebene Methode ist die ringöffnende Polymerisation (ROP), die je nach Monomer säure- oder basenkatalysiert erfolgen kann und über anionische oder kationische Intermediate verläuft. Auch hier besteht der gravierende Nachteil, dass keine freien polaren Gruppen, wie z. B. Hydroxy- oder Aminogruppen, toleriert werden und Schutzgruppen für diese Funktionalitäten nötig sind. Okada et al.<sup>[68]</sup> benutzten die ROP für die Synthese eines Gluco-Polymers mit einem Polyserin-Rückgrat (Schema 3).



**Schema. 3** Okadas Synthese eines Gluco-Polymers mit Polyserin-Rückgrat durch ROP.<sup>[68]</sup>

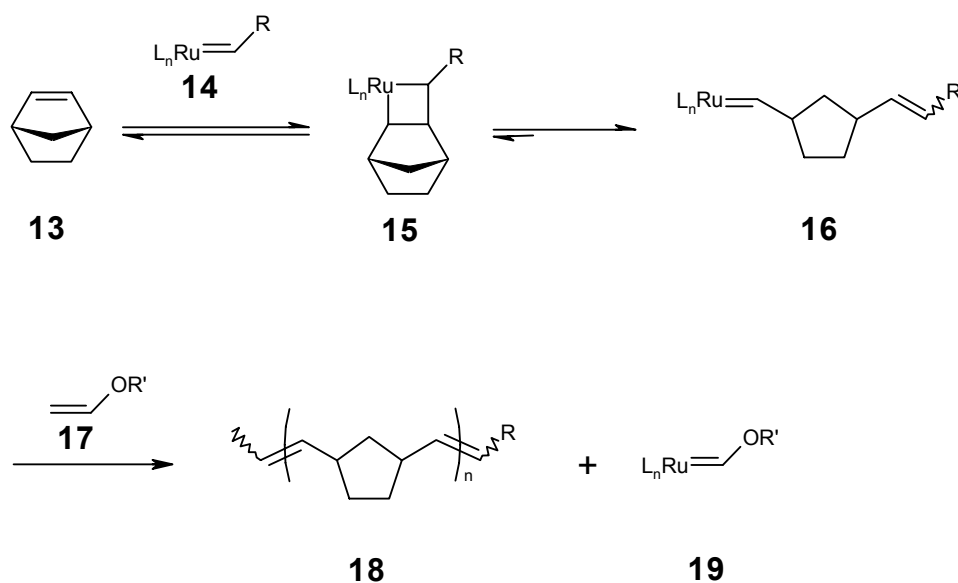
In jüngerer Zeit trat die Ringöffnende Metathese-Polymerisation (ROMP) als eine attraktive Methode für die Synthese von Neobiopolymeren vermehrt in den Vordergrund.<sup>[69]</sup> Bei dieser Reaktion, die weit verbreitet für die Synthese von Polymeren im industriellen Maßstab ist,

werden gespannte cyclische Alkene mit Ruthenium-Salzen oder metallorganischen Ruthenium-Verbindungen, wie z. B.  $\text{RuCl}_3$  **10** oder den Grubbs-Katalysatoren der ersten und zweiten Generation **11** und **12**, als Katalysator umgesetzt (Abb. 17).<sup>[70]</sup>



**Abb. 17** Strukturen von  $\text{RuCl}_3$  (**10**) und der Grubbs-Katalysatoren der ersten (**11**) und zweiten (**12**) Generation.

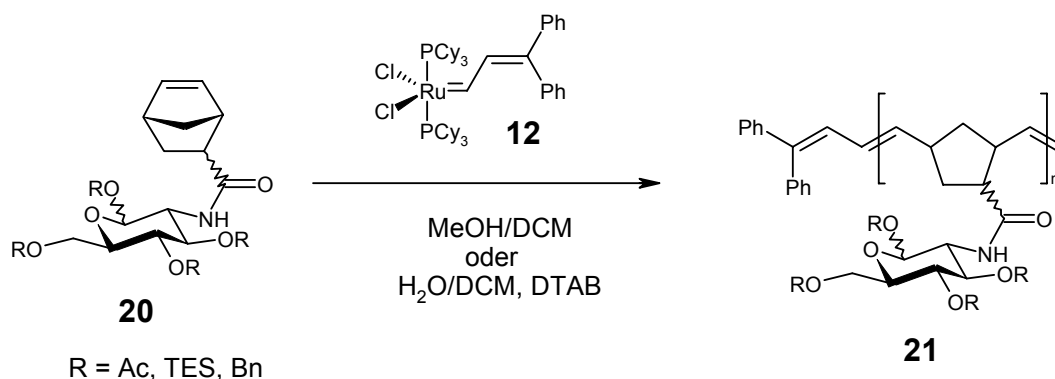
Der Mechanismus der ROMP ist in Schema 4 dargestellt.<sup>[71]</sup> Im ersten Schritt der Kettenreaktion bildet sich in einer [2+2]-Cycloaddition aus einem Monomer-Molekül **13** und einem Rutheniumalkyliden-Komplex **14** ein Metallacyclobutan **15**, welches im Anschluss unter Ringöffnung eine Retro-[2+2]-Cycloaddition zu **16** eingeht. Eine weitere [2+2]-Cycloaddition des resultierenden Metallalkylidens mit einem Monomer-Baustein, gefolgt von erneuter Ringöffnung, schließt sich an, bis alles Monomer verbraucht ist. Das Kettenwachstum kann durch ein elektronenreiches Olefin **17**, z.B. Ethylvinylether, abgebrochen werden, wobei sich ein nicht katalytisch aktives Rutheniumalkyliden **19** und das Endprodukt **18** bilden. Vorteile der ROMP mit Rutheniumverbindungen als Katalysator sind, dass es sich um eine lebende Polymerisation handelt, bei der sich Polymere mit einer engen Molmassenverteilung bilden.



**Schema 4** Mechanismus der Rutheniumalkyliden-katalysierten Ringöffnenden Metathese-Polymerisation.<sup>[71]</sup>

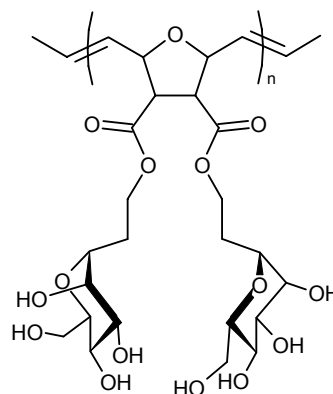
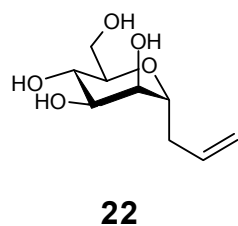
Das Molekulargewicht der Produkte lässt sich über das Monomer- zu Initiator-Verhältnis gut steuern. Ein weiterer entscheidender Vorteil im Hinblick auf die Synthese von Glycopolymeren ist die hohe Toleranz polarer Gruppen durch die Ruthenium-Katalysatoren und die Stabilität der Katalysatoren in Wasser, wodurch die Verwendung von Schutzgruppen, die vom Polymer nur selten wieder vollständig abgespalten werden können, unnötig ist.

Die ersten kohlenhydrathaltigen Neobiopolymere wurden von Fraser und Grubbs<sup>[72]</sup> synthetisiert, die Polymere wurden jedoch nicht auf ihre biologische Anwendbarkeit hin untersucht. Durch Umsetzung von Norbornen-Derivaten wie **20**, die mit geschützten Glucosaminresten substituiert waren, konnten mit dem Grubbs-Katalysator der zweiten Generation **12** in Methanol/Dichlormethan- oder Wasser/Dichlormethan-Gemischen in guten Ausbeuten Glycopolymere **21** gewonnen werden, die eine geringe Polydispersität aufwiesen (Schema 5). Jedoch führten Versuche, die Kohlenhydratreste in den Polymeren zu deblockieren, oft zu unvollständig entschützten Produkten oder zur Bildung von unerwünschten Nebenprodukten. Außerdem beeinflussten die Schutzgruppen zum Teil gravierend die Geschwindigkeit der Polymerisationsreaktion.



**Schema 5** Synthese eines Glycopolymers durch ROMP nach Fraser und Grubbs.<sup>[72]</sup>

Erste Untersuchungen zur Bioaktivität von ROMP-Glycopolymeren wurden von Kiessling et al.<sup>[73]</sup> durchgeführt. So konnte z. B. durch Hämagglutinationstests, bei denen die Inhibition der durch Concanavalin A ausgelösten Agglutination von roten Blutzellen gemessen wurde, gezeigt werden, dass das mit  $\alpha$ -C-Mannosid-Resten substituierte Polymer **23** ( $M_r \approx 10^6$ ), das durch ROMP mit  $\text{RuCl}_3$  in Wasser in 70-80 %iger Ausbeute aus dem entsprechenden 7-Oxanorbornen-Derivat hergestellt wurde, eine ungefähr einhundert mal stärkere Inhibitionswirkung zeigt als ein entsprechendes Monomer **22** (Abb. 18).<sup>[74]</sup> Allerdings sind diese Werte nicht valenzkorrigiert. Betrachtet man z.B. ein Polymer des Typs **23** mit 50 Wiederholungseinheiten, so enthält dieses bereits 100 Kohlenhydratreste. Valenzkorrigiert liegt die Inhibitionswirkung des Polymers so wieder nur im Bereich der des Monomers.



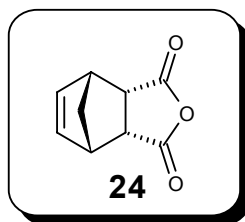
**Abb. 18** C-Glycosid als Monomer für die ROMP und biologisch aktives Glycopolymer von Kiessling et al.<sup>[74]</sup>

Weitere Untersuchungen zum Einfluss der Anzahl der Kohlenhydrat-Epitope im Polymer auf die biologische Aktivität ergaben, dass diese mit steigendem Polymerisationsgrad exponentiell bis zu einer Polymerlänge von 50 Wiederholungseinheiten zunimmt und bei noch längeren Polymeren konstant hoch bleibt.<sup>[75]</sup> Kiessling et al. erklärten diese Ergebnisse mit Hilfe des Chelat-Effekts und anderen statistischen Effekten.

### 3.1 Glyocluster auf Basis von *endo*-Norbornendicarbonsäureanhydrid

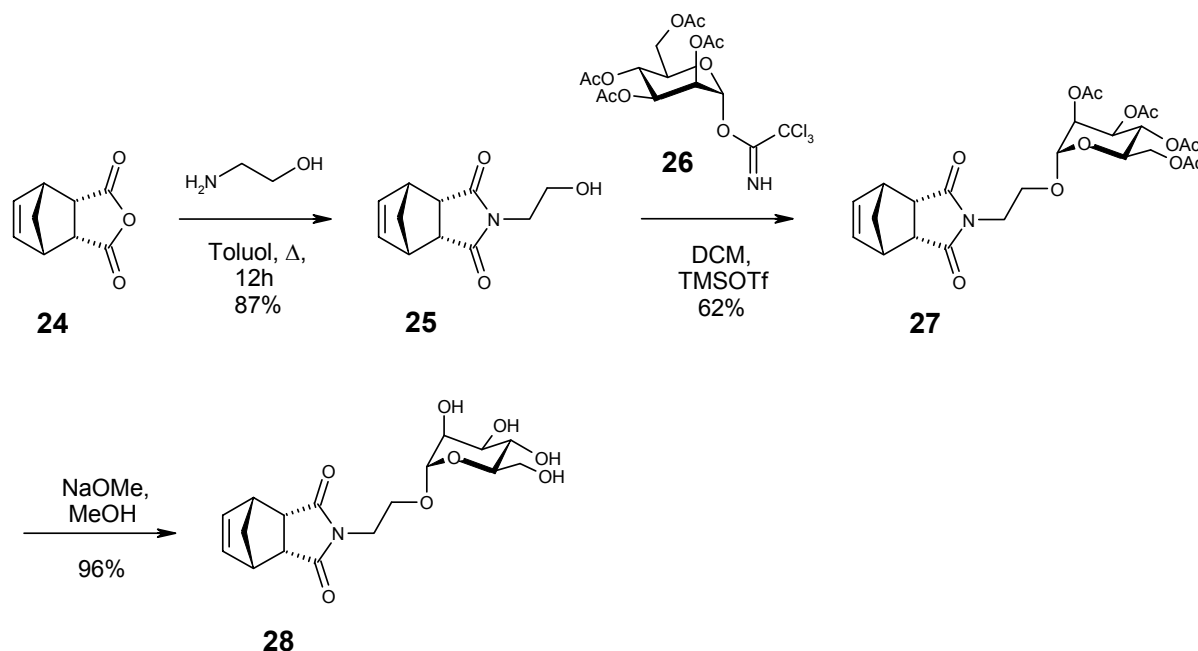
Da sich die Ringöffnende Metathese-Polymerisation als effektive Methode zum Aufbau von biologisch aktiven Glycopolymeren erwiesen hat, sollte die ROMP auch in dieser Arbeit zum Aufbau multivalenter Liganden für den Mannose-spezifischen Makrophagen-Rezeptor genutzt werden.

Als zentraler Baustein für die Synthesen der Cluster-Mannoside wurde *endo*-2,3-Norbornendicarbonsäureanhydrid **24** ausgewählt, da die ROMP von Norbornen-Derivaten in der Literatur bereits beschrieben ist. Bei diesem kommerziell erhältlichen Baustein handelt es sich um eine ungesättigte Verbindung, die eine hohe Ringspannung aufweist und die eine Polymerisation schnell und irreversibel eingehen sollte. Darüber hinaus sollte die Funktionalisierung des Moleküls mit einem oder zwei Mannose-haltigen Substituenten einfach über eine Veresterung der Säuregruppen oder über die Bildung von Amidien möglich sein.



**Abb. 19** Struktur von *endo*-Norbornendicarbonsäureanhydrid als zentraler Baustein für die Synthese von Cluster-Mannosiden.

Zum Aufbau eines Derivats mit einem einzelnen Mannose-Rest wurde dementsprechend das Anhydrid **24** mit Aminoethanol zum tricyclischen Imid **25** umgesetzt, das in einer Ausbeute von 87 % und ohne Chromatographie in guter Reinheit dargestellt werden konnte. Durch Glycosylierung der terminalen Hydroxyfunktion des Ethylspacers von **25** mit peracetyliertem Mannosetrichloracetimidat **26**<sup>[76]</sup> in DCM mit TMSOTf als Katalysator konnte anschließend der Zucker eingeführt werden. Das Produkt **27** konnte nach Chromatographie an Kieselgel in 62%iger Ausbeute isoliert werden. Abspaltung der Acetyl-Schutzgruppen der Hydroxy-Gruppen der Mannose nach Zemplén<sup>[77]</sup> lieferte schließlich die OH-freie Substanz **28** als farblosen Schaum in sehr guter Ausbeute von 96 % (Schema 6).

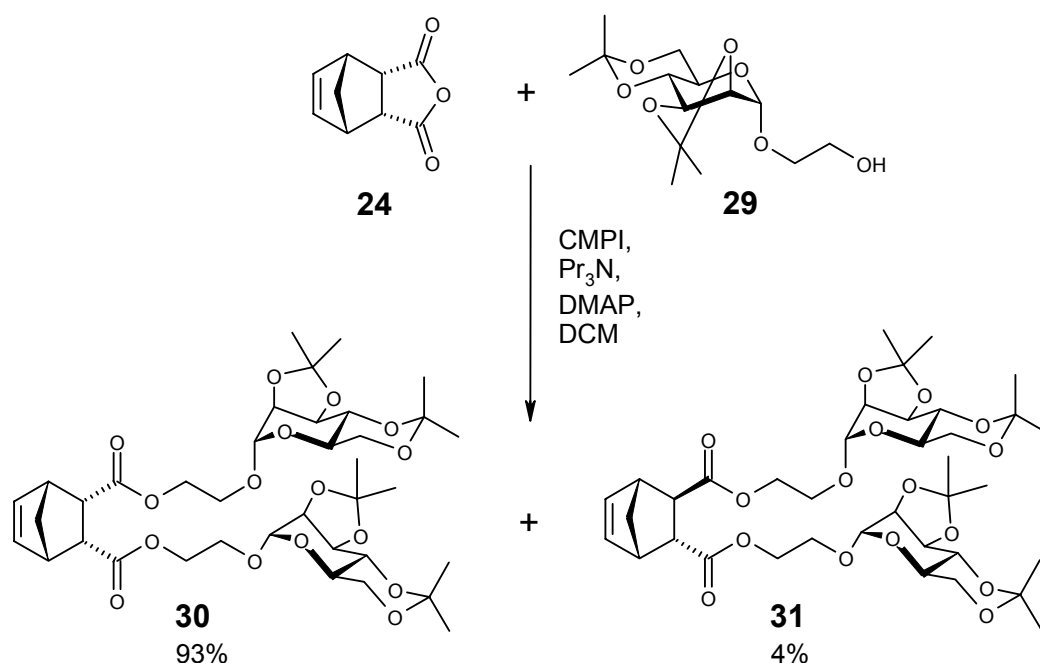


**Schema 6** Synthese eines Monomers für ROMP mit einem Mannosyl-Substituenten.



Für die Funktionalisierung von **24** mit zwei Mannosyl-Substituenten sollten beide Säure-Gruppen mit isopropylideniertem Hydroxyethylmannosid **29** verestert werden.

Das di-Isopropyl-geschützte Mannosid **29** ist mit sehr guten Ausbeuten in drei Stufen aus Mannose durch Allylierung, Isopropylidenierung und einer anschließenden Ozonisierungs-Reduktions-Sequenz der Allylfunktion zugänglich.<sup>[78]</sup> Die Isopropyl-Acetale für die Blockierung der OH-Gruppen der Mannose wurden gewählt, da sie sich später wieder gut unter schwach sauren Bedingungen abspalten lassen sollten, ohne die Spaltung der glycosidischen Bindungen oder der Ester-Bindungen befürchten zu müssen. Die Umsetzung des Anhydrids **24** mit dem Mannosid **29** in DCM in Gegenwart eines leichten Überschusses 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid (CMPI) und Tripropylamin als Base lieferte nach chromatographischer Reinigung das gewünschte Di-Mannosid **30** mit einer Ausbeute von 93 % und eine geringe Menge der Verbindung **31**, mit je einem *endo*- und einem *exo*-ständigen Rest (Schema 7), was im NOESY-NMR-Spektrum deutlich wird.

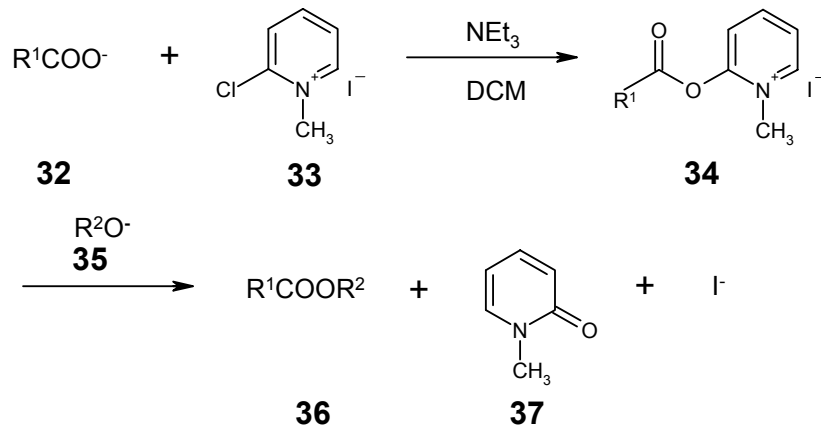


**Schema 7** Synthese eines divalenten Cluster-Mannosids durch Mukaiyama-Veresterung. Die Ausbeuten sind auf den Umsatz von **29** bezogen.

Die Isolierung eines Produkts mit einem *endo*- und einem *exo*-ständigen Substituenten lässt sich nur über eine Verunreinigung des Anhydrids **24** mit dem entsprechenden *exo*, *endo*-Isomer erklären, da die Stereochemie der Estergruppen bereits im Edukt vorgegeben ist und diese sich bei der Veresterung nicht ändert.

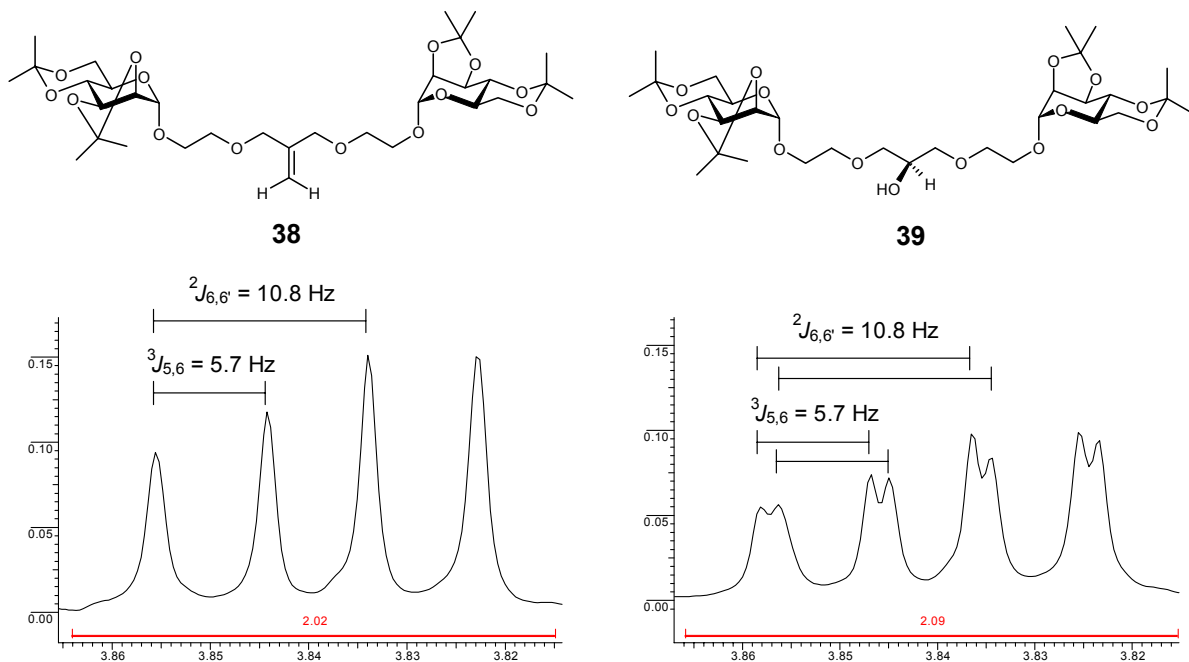
Bei der Reaktion von **24** mit **29** handelt es sich um eine Mukaiyama-Veresterung, eine Methode, die sich bei der Synthese von sterisch anspruchsvollen Estern bewährt hat. Im ersten

Schritt wird das Anhydrid durch den Angriff eines Alkoholat-Anions unter Bildung einer Ester-Bindung und eines Carboxylat-Anions geöffnet. Dieses reagiert anschließend unter Substitution des Chlor-Atoms des Chlormethylpyridiniumiodids **33** zum Aktivester **34**, der im nächsten Schritt mit einem weiteren Alkoholat-Anion zum Produkt **36** reagiert (Schema 8).<sup>[79]</sup>



**Schema 8** Mechanismus der Mukaiyama-Veresterung.

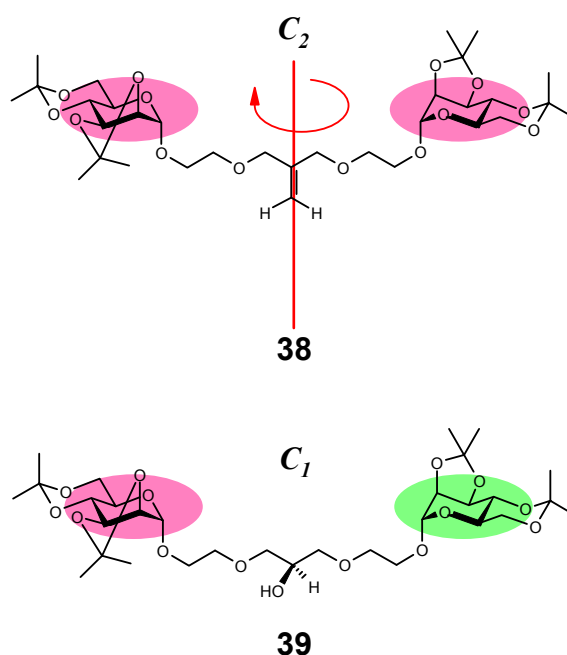
Die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von **30** und **31** weisen eine interessante Besonderheit auf: Die Signale der Protonen im Norbornenring erscheinen doppelt, wobei die Aufspaltung unterschiedlich stark auftritt. Beim Anhydrid **24** ist dagegen keine Verdopplung der Signale zu beobachten. Am deutlichsten ist der Effekt bei H<sub>A</sub> und H<sub>A'</sub>, sowie H<sub>D</sub> und H<sub>D'</sub>. Bei der *exo*, *endo*-Verbindung ist die Aufspaltung erheblich größer als bei der entsprechenden *endo*, *endo*-Verbindung.



**Abb. 20** Signale von H-6 in den <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der Glycerin-Glycol-Dendrimere **38** und **39**.<sup>[78]</sup>

Die Ursache für diesen Effekt liegt in der Symmetrie des Glycoclusters. Ein ähnlicher Effekt konnte auch von M. Boysen bei der Synthese von Glycerin-Glycodendrimeren beobachtet werden.<sup>[78]</sup> Bei der Ozonisierungs-Reduktions-Sequenz des ungesättigten Mannosids **38** zum sekundären Alkohol **39** trat eine unerwartete Veränderung am H-6 der Mannose-Reste auf, welches jetzt eine geringe Aufspaltung in zwei Signale zeigte. Auch im <sup>13</sup>C-Spektrum traten Veränderungen auf, es konnten jeweils zwei Signale für C-5, C-6 und die beiden Glycol-Spacer-Kohlenstoffatome beobachtet werden. Die Veränderung am Signal für H-6 ist in Abb. 20 dargestellt.

Die Aufspaltung ist mit einer Erniedrigung der Molekülsymmetrie zu erklären. Die ungesättigte Verbindung **38** besitzt eine  $C_2$ -Achse, die vertikal durch die C=C-Doppelbindung in der Mitte des Moleküls verläuft, das Molekül besitzt  $C_{2v}$ -Symmetrie. Dadurch können die beiden Mannosylsubstituenten mittels einer Drehung um  $180^\circ$  ineinander überführt werden. Der Alkohol **39** hingegen weist in der Molekülmitte ein tetraedrisches Kohlenstoffatom auf, das drei unterschiedliche Substituenten trägt (Abb. 21), wodurch eine Drehung um  $180^\circ$  keine zulässige Symmetrieeoperation mehr ist.

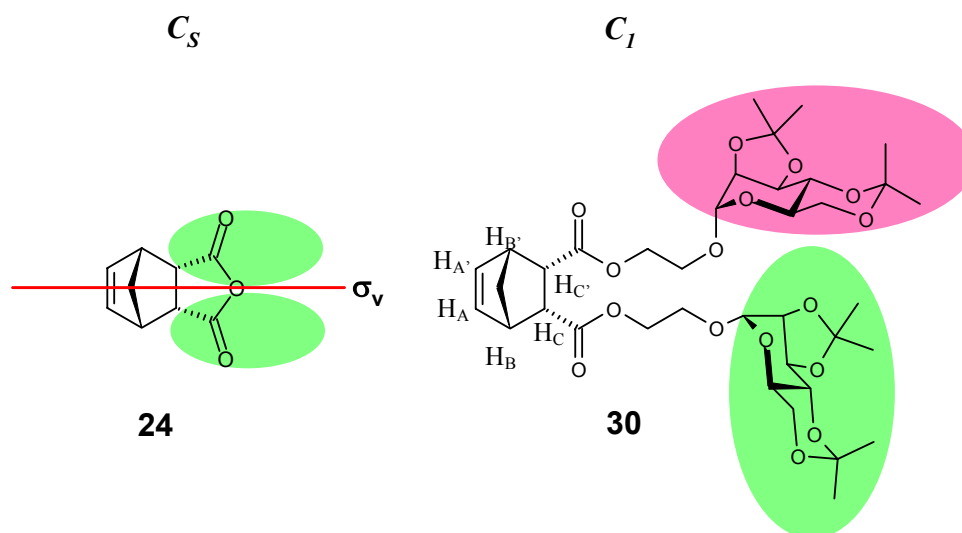


**Abb. 21** Symmetrie der Verbindungen **38** und **39**.<sup>[78]</sup>

Jedoch scheint **39** auf den ersten Blick eine Spiegelebene zu besitzen, die das Molekül in zwei gleiche Hälften teilt. Allerdings muss beachtet werden, dass es sich bei den beiden Saccharidresten um chirale Moleküle handelt, die die Symmetrie der Verbindung erniedrigen. Durch eine Spiegelung würden die D-Mannosereste in L-Mannosesubstituenten überführt werden, die Verbindung besitzt also folglich keine Spiegelebene. Da die beiden

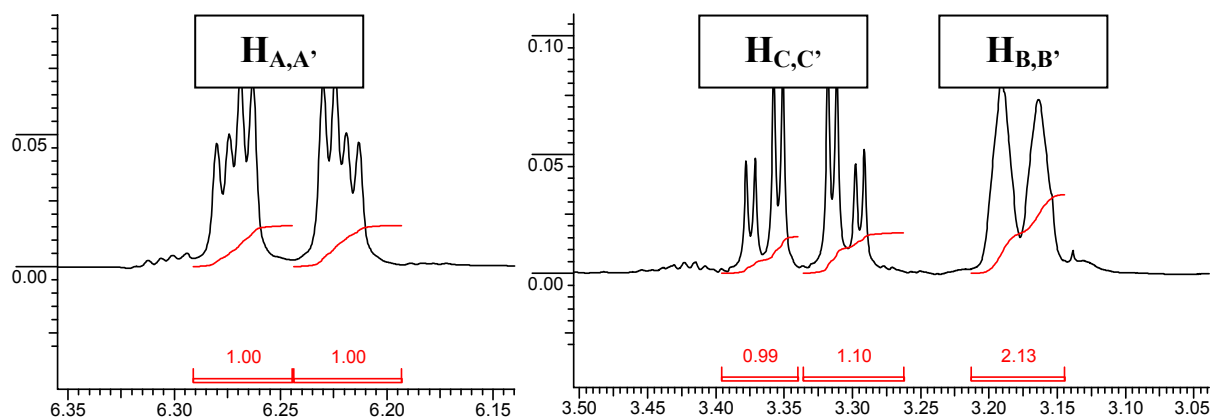
Saccharidsubstituenten nun auch nicht mehr identisch sind, besitzt die Verbindung **39** außer der Identität  $E$  kein weiteres Symmetrieelement mehr, die Symmetrie des Moleküls hat sich zu  $C_1$  erniedrigt. Folglich wird für die beiden Mannosylsubstituenten auch kein gemeinsamer Signalsatz im  $^1\text{H}$ -, bzw.  $^{13}\text{C}$ -NMR mehr erwartet.

Entsprechend verhält es sich auch bei den beiden Norbornenderivaten **30** und **31** (Abb. 22). Das Anhydrid **24** besitzt als Symmetrieelement eine Spiegelebene  $\sigma_v$  durch die Molekülmitte. Die Verbindung gehört zur Symmetriegruppe  $C_s$ . Für beide Molekülhälften erwartet man in den  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren dieser Substanz einen gemeinsamen Signalsatz, was auch tatsächlich gemessen wird. Der Di-Ester **30** enthält jedoch zwei chirale Mannosylreste als Substituenten, wodurch die beiden Hälften des Moleküls nicht mehr durch eine Spiegelung ineinander überführt werden können. Auch in diesem Fall würde hierdurch die D-Mannose in L-Mannose überführt werden.



**Abb. 22** Symmetrie der Norbornen-Derivate **24** und **30**.

Das Molekül enthält also außer der Identität  $E$  kein weiteres Symmetrieelement mehr, die Symmetrie hat sich durch die Veresterung mit den chiralen Saccharidsubstituenten auf  $C_1$  erniedrigt. Wie erwartet erhält man jetzt für die Protonen im Norbornen-Ring je einen Signalsatz für die beiden Molekülhälften. Für die Spacer- und Zuckerprotonen kann allerdings keine Aufspaltung beobachtet werden. Vermutlich ist diese trotzdem vorhanden, die Unterschiede der chemischen Verschiebungen der Wasserstoffatome in den beiden Substituenten sind wahrscheinlich aber so gering, dass die Signale zusammenfallen. Am deutlichsten ist der Effekt bei den Protonen zu beobachten, die an dem Kohlenstoff-Atom sitzen, an das die chiralen Saccharid-Substituenten gebunden sind ( $H_{C'}$ ). Für diese Protonen kann ein doppeltes Dublett-vom-Dublett (dd) beobachtet werden (Abb. 23), in dem die beiden

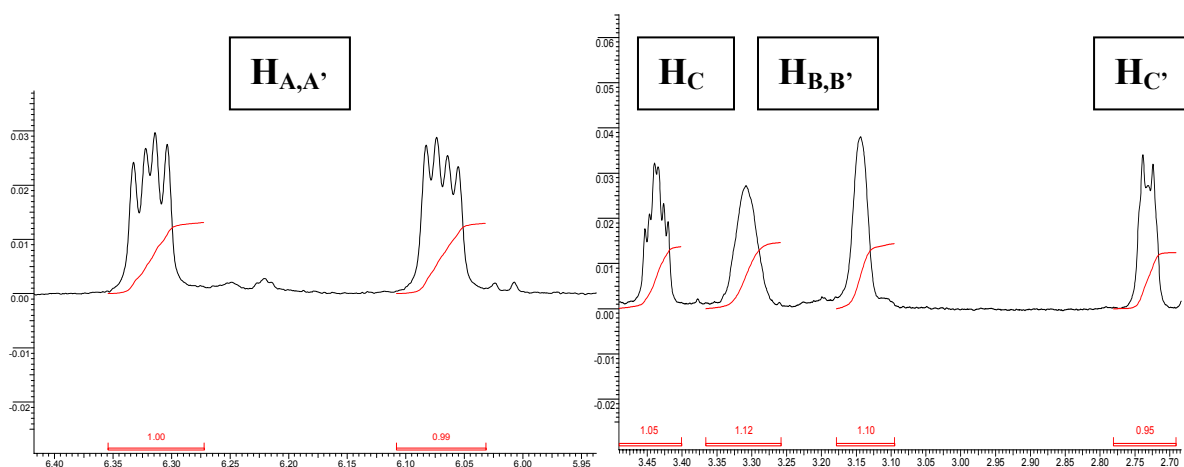


**Abb. 23** Aufspaltung der Signale von  $H_{A,A'}$ ,  $H_{B,B'}$  und  $H_{C,C'}$  im  $^1H$ -NMR-Spektrum der *endo, endo*-Verbindung **30**.

Signale 30.90 Hz (0.06 ppm) voneinander getrennt sind. Ebenfalls stark aufgespalten sind die Protonen, die an die Doppelbindung des Norbornenrings gebunden sind ( $H_{A,A'}$ , Abb. 23). Hier beträgt der Unterschied zwischen den beiden Signalsätzen 25.43 Hz (0.05 ppm).

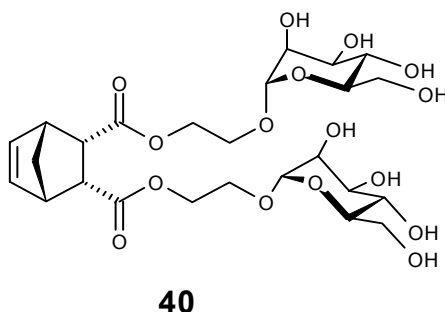
Auch für die Kohlenstoffatome des Norbornenrings lässt sich im  $^{13}C$ -NMR-Spektrum ein doppelter Signalsatz beobachten, die beiden Signale für  $C_A$  und  $C_{A'}$  in **30** liegen z. B. 0.46 ppm auseinander.

Noch weitaus stärker als bei **30** ist die Aufspaltung der Signale aber in der *exo, endo*-Verbindung **31** (Abb. 24). Die Aufspaltung für  $H_A$  und  $H_{A'}$  beträgt hier 74.63 Hz (0.25 ppm), für  $H_C$  und  $H_{C'}$  sogar 211.73 Hz (0.70 ppm). Die erheblich größere Aufspaltung lässt sich durch die unterschiedliche Stereochemie der Ester-Gruppen, an die die chiralen Mannosylreste gebunden sind, erklären. Denn hierdurch wird die Symmetrie des Moleküls noch weiter reduziert, die Aufspaltung der Peaks wird größer.



**Abb. 24** Aufspaltung der Signale von  $H_{A,A'}$ ,  $H_{B,B'}$  und  $H_{C,C'}$  im  $^1H$ -NMR-Spektrum der *exo, endo*-Verbindung **31**.

Im nächsten Schritt sollte die Abspaltung der Isopropyliden-Schutzgruppen der Mannosylreste des *endo*, *endo*-Di-Esters **30** erfolgen. Die Deblockierung Isopropylidengeschützter Verbindungen erfolgt im Allgemeinen unter Säurekatalyse, wobei hier die Bedingungen für die Abspaltung der Acetale so gewählt werden mussten, dass weder die ebenfalls säureempfindlichen glycosidischen Bindungen der Mannosyl-Substituenten, noch die Ester-Bindungen angegriffen wurden. Da Boysen<sup>[78]</sup> bei der Deblockierung der Isopropyliden-Acetale von Glycerin-Glycodendrimeren mit TFA/H<sub>2</sub>O 9:1 gute Ergebnisse erzielt hatte, wurde diese Methode auch für den Di-Ester **30** getestet. Eine Reaktionszeit von wenigen Minuten bei Raumtemperatur und anschließendes Entfernen der TFA im Ölpumpenvakuum lieferte nach Aufreinigung mittels HPLC an RP-18 Kieselgel mit Acetonitril/Wasser als Laufmittel 58 % der vollständig deblockierten Verbindung **40**.

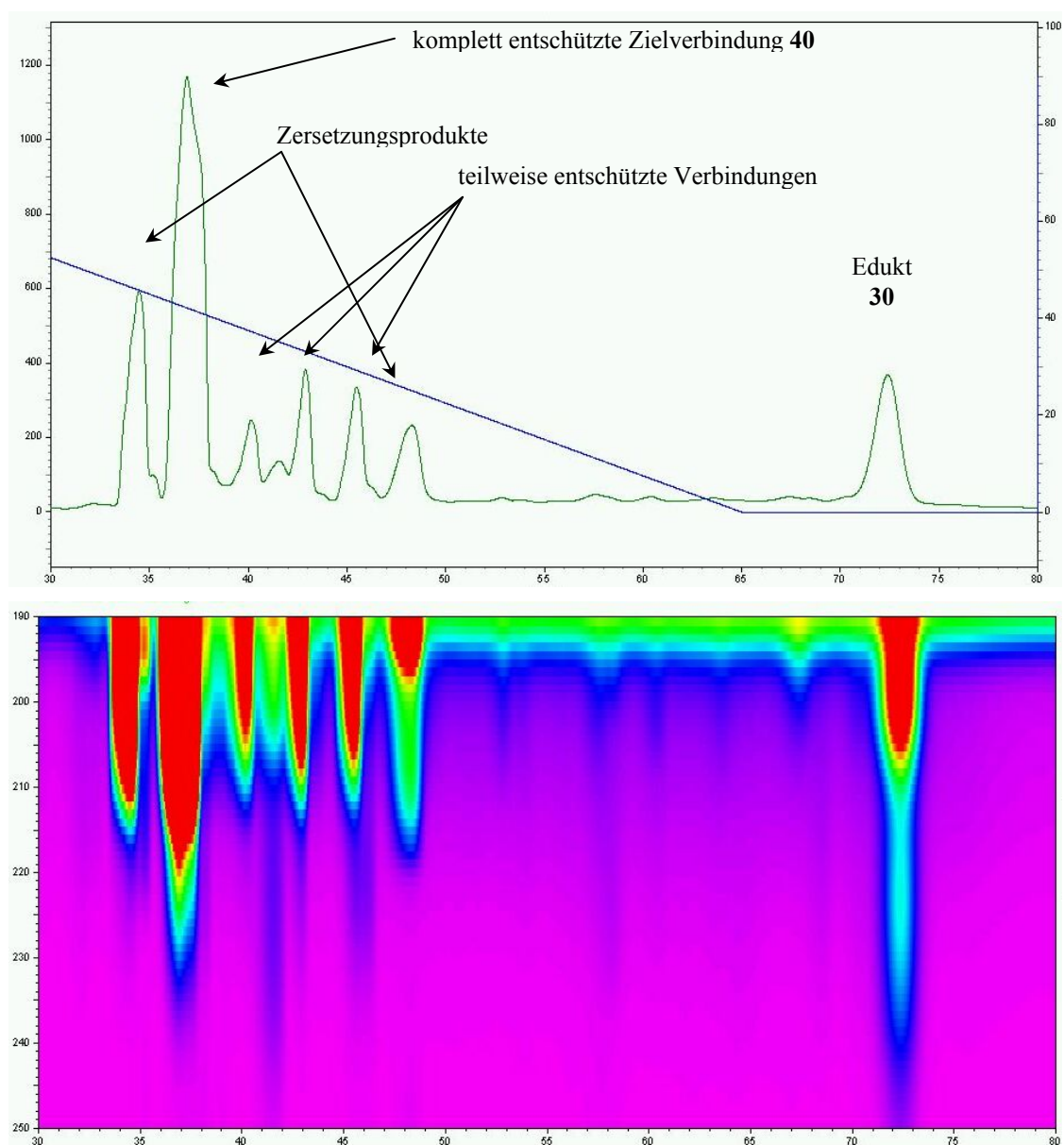


**Abb. 25** Struktur des OH-freien bivalenten Monomers **40**.

Außerdem konnten 26 % des Ausgangsmaterials **30** reisoliert werden, sowie 7 % einer Verbindung die noch zwei Isopropyliden-Schutzgruppen enthielt und Spuren von Verbindungen mit drei bzw. einer Schutzgruppe, sowie auch Spuren von Zersetzungsprodukten (Abb. 26). Längere Reaktionszeiten oder drastischere Bedingungen führten zu einer verstärkten Bildung von Zersetzungsprodukten. Optimierung der Reaktion durch Verwendung von TFA/MeOH 1:1 bei Raumtemperatur für 1-3 h führte zu einer Steigerung der Ausbeute an vollständig entschütztem Produkt **40** auf 70 %. Diese Bedingungen wurden auch für spätere Deblockierungen genutzt, geringe Mengen an unvollständig entschützten Verbindungen und Zersetzungsprodukten wurden jedoch in allen Fällen isoliert.

Nach Entfernen der Lösungsmittel konnte die Zielverbindung **40** als farbloses, stark hygroskopisches Lyophilisat isoliert und durch <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie, sowie MALDI-TOF-Massenspektrometrie charakterisiert werden. Eine Elementaranalyse der Verbindung lieferte jedoch aufgrund des hygroskopischen Charakters des Moleküls keine befriedigenden Ergebnisse. Analytische HPLC von **40** ergab aber eine Reinheit von über 98%. Da auch alle weiteren synthetisierten OH-freien Glycocluster mehr oder weniger stark

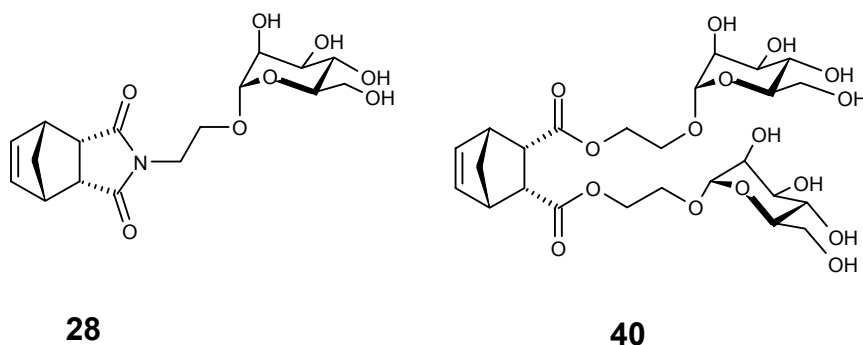
hygroskopisch sind, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit auf Elementaranalysen verzichtet und die Reinheit der Verbindungen mittels analytischer HPLC bestimmt.



**Abb. 26** Reinigung von **40**: Chromatogramm und Konturdiagramm der HPLC-Trennung nach Abspaltung der Isopropyliden-Schutzgruppen von **30** mit TFA/MeOH.

Nach Abspaltung der Schutzgruppen sollten die mono- bzw. divalenten mannosylierten Monomere **28** und **40** mittels Ringöffnender Metathese-Polymerisation zu multivalenten Verbindungen umgesetzt werden.

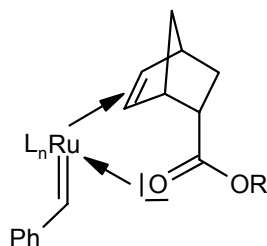
Hierzu wurden die OH-freien Verbindungen nach einer Vorschrift von Iyer et al.<sup>[80]</sup> unter Schlenk-Bedingungen in einer minimalen Menge Wasser/Dichlorethan suspendiert. Die Lösungsmittel wurden zuvor sorgfältig entgast, da die aktive Form des Ruthenium-Katalysators für die Metathese sauerstoffempfindlich ist. Nach Zugabe einer geringen Menge



**Abb. 27** Deblockierte mono- und divalente Monomere für die ROMP.

DTAB als Phasentransferkatalysator wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.05 Äquivalenten des Grubbs-Katalysators der ersten Generation **11** gestartet und das Fortschreiten der Reaktion dünnenschichtchromatographisch überwacht. Da aber auch nach einer Reaktionszeit von 72 h und zwischenzeitlicher Zugabe von weiterem Katalysator nur ein sehr geringer Umsatz stattgefunden zu haben schien, wurde die Reaktion durch Zugabe eines Überschusses Ethylvinylether abgebrochen. Eine Analyse des Rohprodukts mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie zeigte jedoch keine Bildung von Oligomeren oder Polymeren an, sondern nur niedermolekulare Zersetzungsprodukte, die aber nicht weiter charakterisiert werden konnten. Auch weitere Versuche, die Monomere unter anderen Reaktionsbedingungen zu polymerisieren, z. B. unter Verwendung von  $\text{RuCl}_3$  als Katalysator oder durch Variation von Katalysatormenge oder Lösungsmittel, führten wider Erwarten nicht zum gewünschten Erfolg.

Als Erklärung könnte die Stereochemie der Substituenten im Norbornen-Ring dienen. Beim *endo*-Isomer zeigen die Substituenten unter den Ring und befinden sich damit näher an der Doppelbindung als in einer *exo*-Konfiguration. Hierdurch wäre es möglich, dass nichtbindende Elektronenpaare der Carbonyl-Funktion der Ester-Gruppen oder der OH-Gruppen der Mannosyl-Substituenten an das Ruthenium-Atom des Katalysators koordinieren und dieser Komplex nicht mehr Metathese-aktiv ist (Abb. 28).



**Abb. 28** Negativer Nachbargruppeneffekt bei der ROMP durch Koordinierung nichtbindender Elektronenpaare an das Ruthenium-Atom des Katalysators.

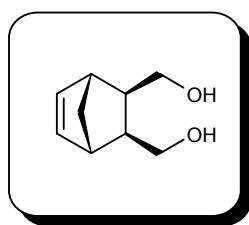
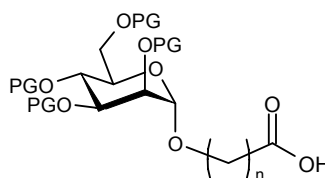


Ein ähnlicher Effekt ist in der Literatur für die Acyclische Dien-Metathese-Polymerisation (ADMET) beschrieben: Ergebnisse von Brzezinska et al.<sup>[81]</sup> zeigten, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Ruthenium-katalysierten ADMET von Dienen mit einem Heteroatom (Sauerstoff oder Schwefel) in der Kette dramatisch abnimmt oder die Reaktion völlig zum Erliegen kommt, wenn der Abstand zwischen den Doppelbindungen und dem Heteroatom kleiner wird. Diese als negativer Nachbargruppeneffekt bezeichnete Beobachtung wurde von Brzezinska et al. dadurch erklärt, dass ein Tricyclohexylphosphin-Ligand durch Sauerstoff oder Schwefel unter Bildung eines stabilen Komplexes mit dem Ruthenium-Atom ausgetauscht wurde. Dieser Komplex ist nicht weiter aktiv für eine Metathese-Reaktion und kann keine Polymere mit signifikantem Molekulargewicht mehr produzieren.

Da die Polymerisation von Norbornen-Derivaten mit *endo*-ständigen Mannosyl-Substituenten wahrscheinlich aufgrund des negativen Nachbargruppeneffekts keinen Erfolg zeigte, sollten nun im Folgenden Derivate mit *exo*-ständigen Substituenten synthetisiert werden.

### 3.2 Glycocluster auf Basis von *exo*-Norbornendimethanol

Da ein entsprechendes Norbornendicarbonsäureanhydrid mit *exo*-ständigen Carboxyl-Gruppen nicht kommerziell erhältlich war, konnte die bisherige Synthesestrategie nicht einfach weiter verfolgt werden. Die Möglichkeit, das *exo*-Anhydrid über eine Diels-Alder Reaktion zu synthetisieren wurde aufgrund der *endo*-Selektivität der Diels-Alder-Reaktion verworfen. Daher sollte das einzige käufliche Norbornen-Derivat mit zweckmäßigen *exo*-Substituenten, *exo,exo*-2,3-Bis(hydroxymethyl)norbornen **41** (Norbornendimethanol), als neues Startmolekül für die Synthesen der angestrebten Glycocluster dienen.

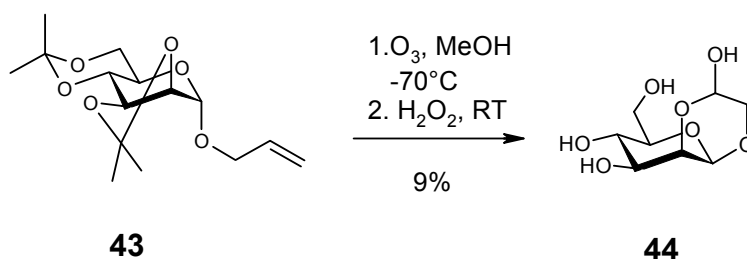
**41****42**

**Abb. 29** *exo*-Norbornendimethanol und Mannoside mit Carboxyl-Funktion im Aglykon als neue Ausgangsmaterialien.

Analog zur bisherigen Strategie für die Funktionalisierung des Norbornen-Cores muss die Säurefunktion für die Verknüpfung mit den Mannosylsubstituenten nun an den Spacern der

Saccharidreste sitzen. Dementsprechend sollten nun Substanzen der allgemeinen Struktur **42** hergestellt werden.

Um bereits vorhandene Bausteine sinnvoll weiterverwenden zu können, wurde versucht, die Allylfunktion des Isopropyliden-geschützten Allylmannosids **43** zur Säure zu oxidieren. Hierfür wurde das Allylmannosid ozonisiert und anschließend mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidativ aufgearbeitet. Anstelle der gewünschten Säure konnte jedoch neben Zersetzungsprodukten lediglich das Halbacetal **44** in 9 %iger Ausbeute isoliert werden. Dessen Bildung könnte dadurch erklärt werden, dass die Oxidation der Allylgruppe nur bis zum Aldehyd erfolgte, unter den Reaktionsbedingungen die Isopropyliden-Schutzgruppen des Zuckers abgespalten wurden und anschließend die Aldehydgruppe mit der OH-Gruppe in 2-Position der Mannose zum Acetal **44** weiterreagiert hat (Schema 9).

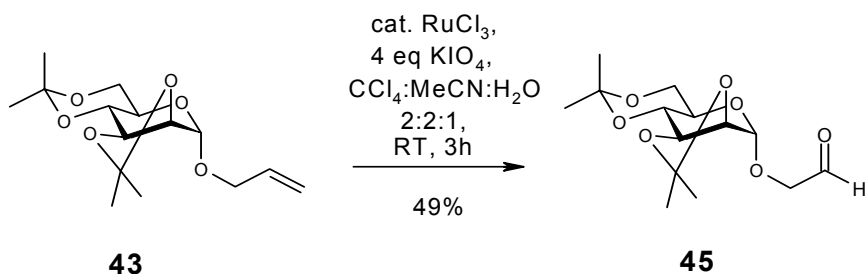


**Schema 9** Versuchte Oxidation von Allylmannosid durch Ozonisierungs-Oxidation.

Als alternative Methode für die Oxidation der Allylfunktion wurde eine Variante der Lemieux-von Rudloff-Oxidation getestet, die in der Literatur bereits erfolgreich für die Oxidation von Kohlenhydrat-gebundenen Allylfunktionen eingesetzt worden war.<sup>[82]</sup> Zu diesem Zweck wurde das geschützte Allylmannosid **43** mit einem Überschuss an Kaliumperiodat und einer katalytischen Menge  $\text{RuCl}_3$  in einem zweiphasigen Gemisch aus  $\text{CCl}_4$ , Acetonitril und Wasser umgesetzt. Unter diesen Reaktionsbedingungen wird das  $\text{RuCl}_3$  durch Periodat *in situ* zu  $\text{RuO}_4$  oxidiert, welches analog zu  $\text{OsO}_4$  oder  $\text{MnO}_4^-$  eine *cis*-Hydroxylierung der olefinischen Bindung bewirkt. Das entstandene Diol wird anschließend durch weiteres Periodat zum Aldehyd gespalten, welches dann durch  $\text{RuO}_4$  zur Säure weiter oxidiert wird. Die gebildeten Ruthenium(VI)-Verbindungen werden durch das im Überschuss vorliegende Periodat wieder zu Ruthenium(VIII) reoxidiert. Der Vorteil der *in situ*-Generierung von  $\text{RuO}_4$  liegt darin, dass anstelle des teuren Rutheniumoxids das erheblich günstigere Chlorid eingesetzt werden kann, von dem außerdem nur katalytische Mengen benötigt werden.<sup>[82]</sup>

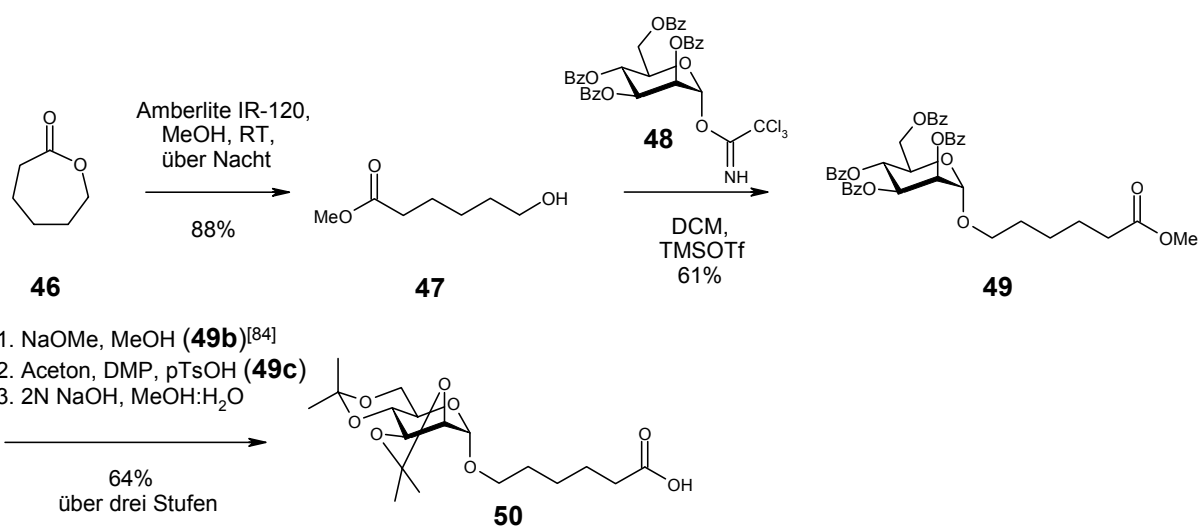
Eine Analyse des Reaktionsprodukts durch NMR und Massenspektrometrie belegte jedoch die Bildung des Aldehyds **45** mit einer Ausbeute von 49 % (Schema 10). Da also auch diese

Methode nicht zur gewünschten Säure führte und die Verwendung von drastischeren Oxidationsmethoden wahrscheinlich zur Abspaltung der Isopropyliden-Schutzgruppen oder zur Spaltung der glycosidischen Bindung geführt hätte, wurde der Versuch in **43** die Allylfunktion zur Säure zu oxidieren nicht weiter verfolgt.



**Schema 10** Versuchte Lemieux-von Rudloff-Oxidation von Allylmannosid.

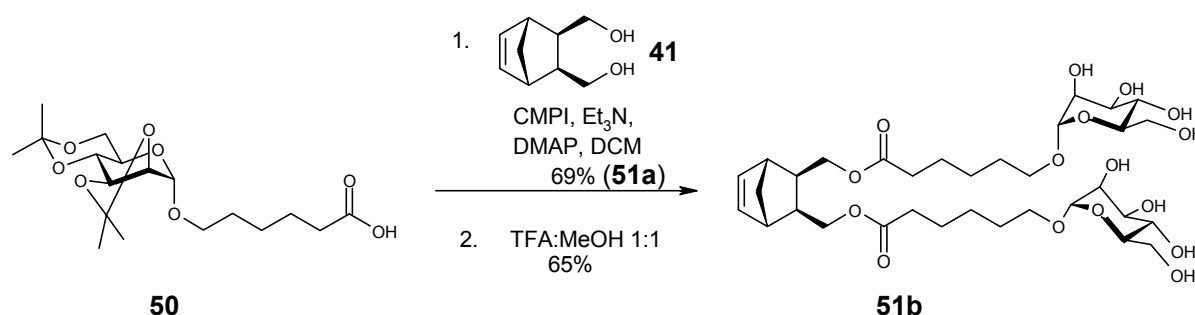
Eine alternative Strategie ist die Synthese eines Spacers, der neben einer Hydroxy-Funktion für die Glycosylierung bereits eine geschützte Säurefunktion für die spätere Veresterung enthält. Da entsprechende  $\alpha,\omega$ -Hydroxyalkylsäuren oder -ester nicht kommerziell erhältlich sind, wurde  $\epsilon$ -Caprolacton **46** durch säurekatalysierte Ringöffnung mit Amberlite IR-120 in 88 %iger Ausbeute zum 6-Hydroxyhexansäuremethylester **47**<sup>[83]</sup> umgesetzt. Glycosylierung mit perbenzoyliertem Mannosetrichloracetimidat **48**<sup>[77]</sup> und TMSOTf als Promotor lieferte nach säulenchromatographischer Aufreinigung das Glycosid **49**<sup>[84]</sup> mit einer Ausbeute von 61 % (Schema 11).



**Schema 11** Synthese eines Mannosids mit aliphatischem Aglykon mit terminaler Carboxyl-Gruppe.

Der perbenzoylierten Verbindung wurde der Vorzug gegenüber einem peracetylierten Mannosetrichloracetimidat gegeben, da der benzoylierte Zucker bei der Glycosylierung weniger zur Bildung von unerwünschten Orthoestern neigt. Da Benzoyl-Schutzgruppen aber unter basischen Bedingungen abgespalten werden, mussten diese vor der Kupplung mit Norbornendimethanol gegen Isopropyliden-Schutzgruppen ausgetauscht werden, um eine Spaltung der Esterbindung bei der Deblockierung der Mannosyl-Substituenten zu verhindern. Zu diesem Zweck wurde die perbenzoylierte Verbindung mit NaOMe in Methanol entschützt und die OH-freie Verbindung mit Aceton/DMP und *p*-TsOH als Katalysator zum Di-Isopropyliden-geschützten Mannosid umgesetzt. Deblockierung des Esters lieferte schließlich die gewünschte Säure **50** nach Chromatographie mit einer Ausbeute von 64 % über drei Stufen (Schema 11).

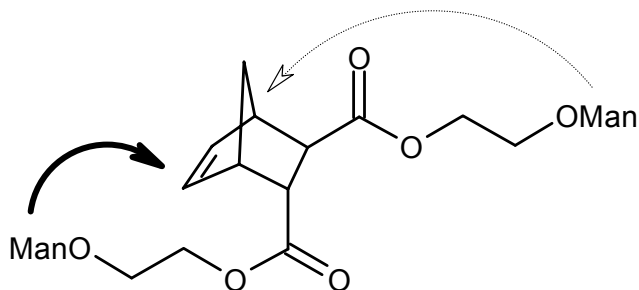
Im nächsten Schritt wurde die Säure **50** mit Norbornendimethanol **41** unter Mukaiyama-Bedingungen mit einer Ausbeute von 69 % zu dem entsprechenden Diester umgesetzt. Im Anschluss lieferte die Deblockierung der Hydroxy-Gruppen der Mannosyl-Substituenten die OH-freie Verbindung **51b** in 65 %iger Ausbeute nach Aufreinigung mit präparativer HPLC (Schema 12).



**Schema 12** Mukaiyama-Veresterung der Säure **50** mit Norbornendimethanol.

Auch in den <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren der *exo, exo*-Verbindungen **51a/b** lässt sich ein doppelter Signalsatz für die Protonen bzw. Kohlenstoffatome des Norbornen-Rings erkennen. Die Aufspaltung ist aber wesentlich geringer als bei den zuvor synthetisierten *endo, endo*- oder *exo, endo*-Norbornen-Derivaten **30** und **31**. Für die olefinischen Protonen z. B. ergibt sich als Signal anstelle von zwei Dubletts-von-Dubletts ein breites Singulett, das sich durch eine Gaussmultiplikation zu einem pseudo-Triplett verfeinern lässt. H<sub>B</sub> und H<sub>B'</sub> geben nach der Gaussmultiplikation ein pseudo-Quintett, H<sub>C</sub>, bzw. H<sub>C'</sub>, an denen die chiralen Saccharidreste hängen, ergeben ein Multiplett. Die geringere Aufspaltung der *exo*-Verbindungen lässt sich durch den größeren Abstand der chiralen Saccharidreste vom

Norbornenring erklären, wodurch diese einen erheblich kleineren Einfluss auf die Ringatome haben, als bei den vergleichbaren *endo*-Verbindungen (Abb. 30).

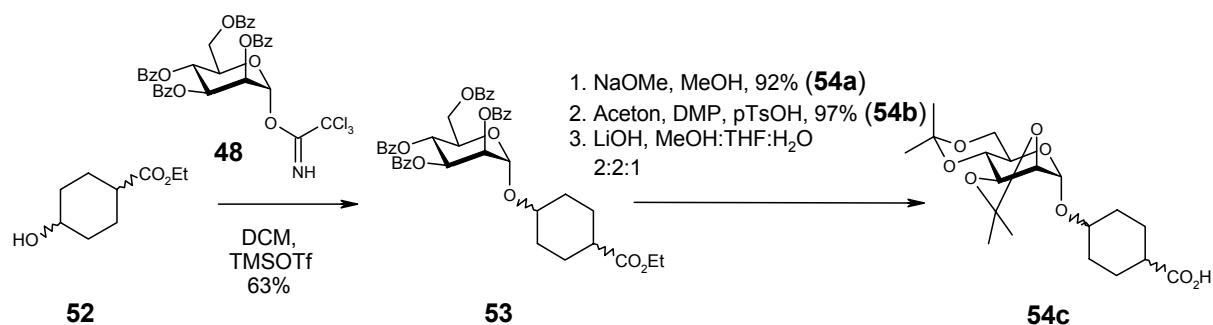


**Abb. 30** Erklärung des Einflusses chiraler Saccharid-Substituenten auf die Signalaufspaltung der Atome im Norbornen-Ring. Im NMR-Spektrum haben *endo*-ständige Substituenten aufgrund der größeren Nähe zum Ring einen stärkeren Einfluss als *exo*-ständige Substituenten.

Bisher wurden mit dem tricyclischen Imid **28** und den Estern **40** und **51b** Norbornenderivate mit einem bzw. zwei Mannosyl-Substituenten synthetisiert. Bei allen drei Verbindungen dient als Spacer zwischen Zucker und Norbornenring eine zwei oder sechs Kohlenstoff-Atome lange Alkylkette, die bei der multivalenten Bindung dieser Liganden an den Mannose-Rezeptor eine gewisse Flexibilität bei der Positionierung der Zucker gestatten soll. Für die geplanten Bindungsstudien mit dem MMR wäre es aber nicht nur interessant, den Einfluss der Kettenlänge flexibler Spacer auf die Bindung an den Rezeptor zu testen, sondern auch Linker mit einer höheren Rigidität oder Linker mit weiteren funktionellen Gruppen, die potentielle zusätzliche Wechselwirkungen mit der Bindungstasche des Proteins eingehen könnten.

Interessant ist in diesem Zusammenhang der Einbau eines aromatischen Ringes, da wie in der Einleitung beschrieben (Abb. 12) nicht nur die Bindung der 3- und 4-OH-Gruppe des Zuckers zum  $\text{Ca}^{2+}$  zur Bindungsenergie beiträgt, sondern auch noch Interaktionen mit dem aromatischen Ring von Tyrosin-729 des MMR von Bedeutung sind. Ein aromatischer Ring im Spacer könnte eventuell durch  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen mit dieser oder aber auch anderen Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten in der Bindungstasche wechselwirken und so die Bindung der Liganden zum MMR weiter verstärken. Als Spacer mit einer geringeren konformationellen Flexibilität könnte z. B. der Cyclohexylring dienen.

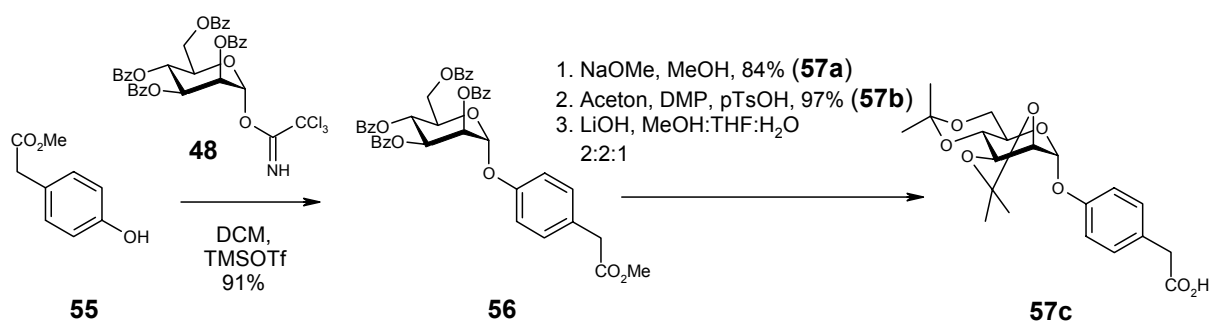
Als Ausgangsprodukt für die Synthese eines Cyclohexylspacers diente 4-Hydroxy-1-cyclohexansäureethylester **52**. Seine Umsetzung mit perbenzoyliertem Mannosetrichloracetimidat in Dichlormethan mit TMSOTf als Promotor lieferte das Glycosid **53** nach Chromatographie mit einer Ausbeute von 63 %.



**Schema 13** Synthese eines Mannosids mit Cyclohexyl-Spacer.

Wie bereits zuvor bei der Synthese des Hexansäure-Spacers mussten vor der Veresterung die Benzoylschutzgruppen gegen Isopropyliden-Schutzgruppen ausgetauscht werden. Die Umsetzung von **53** mit NaOMe in MeOH lieferte die OH-freie Verbindung in 92 % Ausbeute. Anschließende Reaktion mit Aceton, DMP und *p*-TsOH als Katalysator und Deblockierung der Säure mit Lithiumhydroxid in MeOH:THF:H<sub>2</sub>O führte mit 97 % Ausbeute zum Zielprodukt **54c**, das durch NMR und MALDI-TOF-MS charakterisiert werden konnte (Schema 13). Die Auswertung der <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren von **53** und **54a-c** erwies sich jedoch als nicht einfach, da **52** aus Kostengründen nur als racemisches Gemisch der vier möglichen Stereoisomere eingesetzt werden konnte, wodurch komplexe Spektren entstanden. Selbst durch Verwendung von zweidimensionalen NMR-Methoden konnten nicht alle Protonen in den Produkten exakt zugeordnet werden.

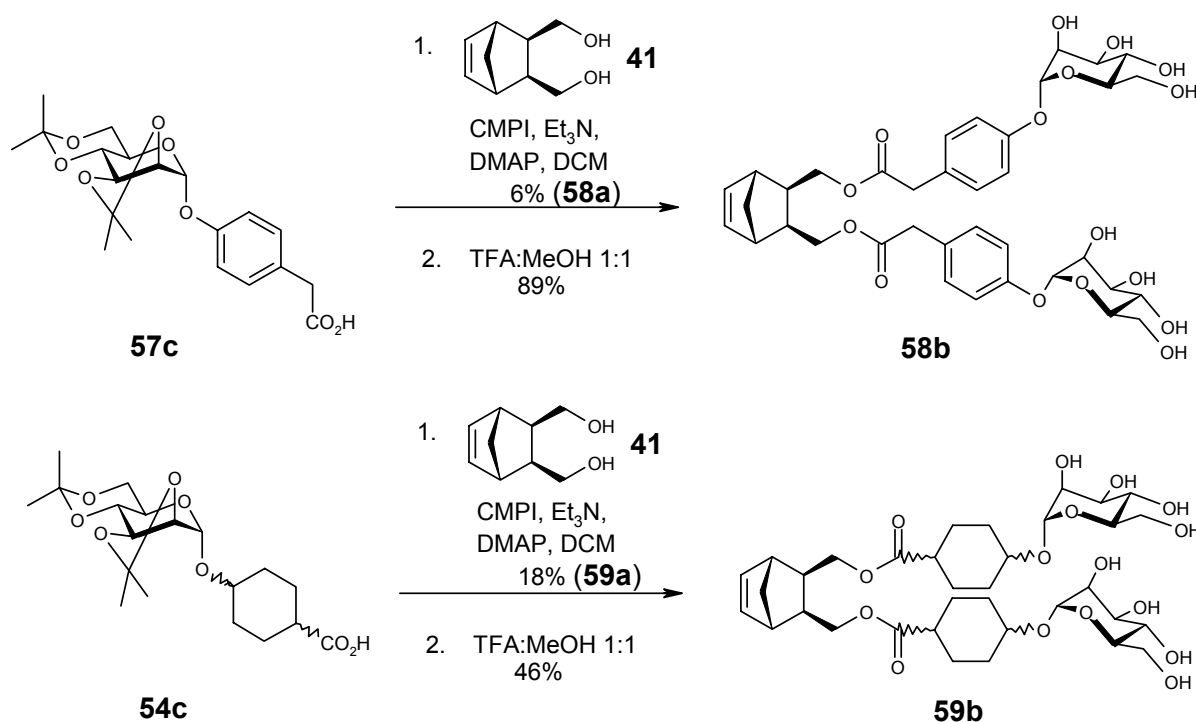
Für die Synthese eines Spacers mit einem aromatischen Ring wurde 2-(4-Hydroxyphenyl)-essigsäuremethylester **55** mit perbenzoyliertem Mannosetrichloracetimidat in sehr guter Ausbeute von 91 % zum Glycosid **56** umgesetzt. Abspaltung der Benzoyl-Gruppen, Isopropylidenierung und Verseifung des Methylesters ergab die gewünschte Verbindung **57c** in 82 % iger Ausbeute über drei Stufen (Schema 14).



**Schema 14** Synthese eines Mannosids mit aromatischen Aglycon.

Die so hergestellten Spacer **54c** und **57c** konnten nun entsprechend der vorangegangenen Mukaiyama-Veresterungen mit Norbornendimethanol umgesetzt werden (Schema 15). Die Reaktion des aromatischen Glycosids **57c** lieferte überraschenderweise nur eine enttäuschend geringe Menge des Kupplungsprodukts. Nach Chromatographie konnte lediglich eine Ausbeute von 6 % isoliert werden. Auch die Veresterung des Cyclohexyl-Derivats **54c** ergab das erwünschte Produkt nur in einer bescheidenen Ausbeute von 18 %. Diese mäßigen Resultate sind wahrscheinlich durch den erheblich größeren Raumanpruch der Substituenten im Vergleich zu den aliphatischen Spacern bedingt. Die abschließende Deblockierung der Verbindungen lieferte den OH-freien Diester **58b** mit aromatischen Spacergruppen nach Aufreinigung mit HPLC in sehr guter Ausbeute von 89 % und die OH-freie Verbindung mit Cyclohexyl-Spacern **59b** mit einem befriedigenden Ergebnis von 46 % nach HPLC.

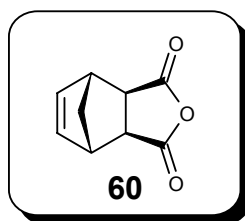
Die Verbindungen **59a/b** liegen theoretisch als Gemisch von 16 Stereoisomeren vor. Im Kernresonanzspektrum wird lediglich ein doppelter Signalsatz beobachtet, was darauf hindeutet, dass tatsächlich nur zwei stereoisomere Produkte vorliegen.



**Schema 15** Synthese der bivalenten Monomere mit Benzol- und Cyclohexyl-Spacer.

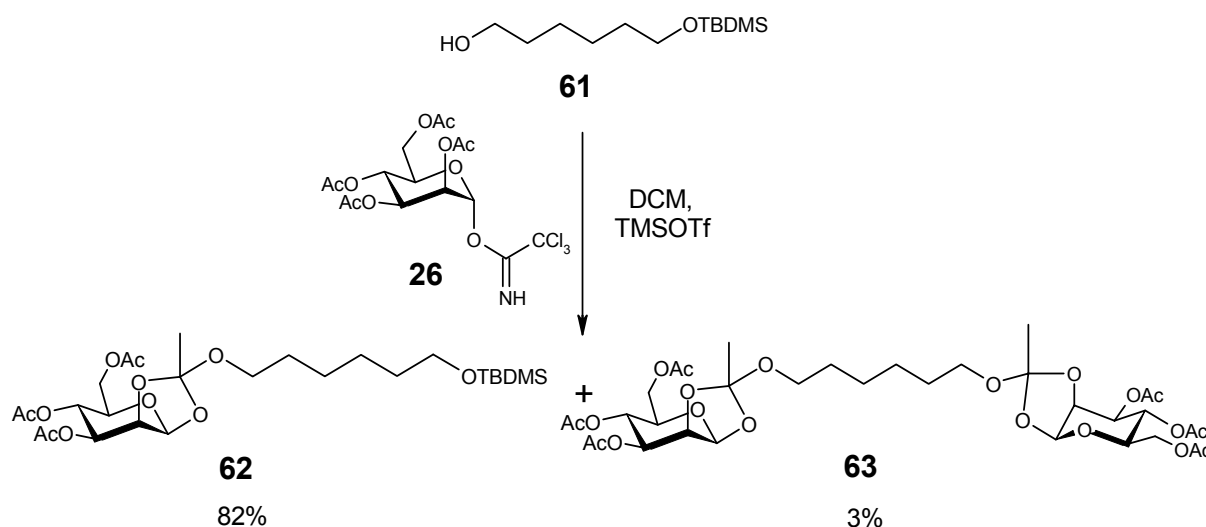
### 3.3 Glycocluster auf Basis von *exo*-Norborendicarbonsäureanhydrid

In einem fortgeschrittenen Stadium dieser Arbeit war auch *exo,exo*-2,3-Norborendicarbonsäureanhydrid **60** bei Aldrich kommerziell erhältlich. Da die Synthese von Mannosiden mit terminalen Hydroxy-Gruppen am Aglykon erheblich einfacher als die Synthese entsprechender Glykoside mit terminalen Carboxylfunktionen ist, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit nur noch **60** als Ausgangsmaterial für die Synthesen der Cluster-Mannoside verwendet.



**Abb. 31** *exo*-Norborendicarbonsäureanhydrid als neues Ausgangsmaterial für die Synthese von Glycoclustern.

Für die Einführung eines C<sub>6</sub>-Spacers wurde 1,6-Hexandiol mit TBDMSCl und NaH in THF zur monosilylierten Verbindung **61** umgesetzt, die in 40 %iger Ausbeute isoliert werden konnte. Glycosylierung mit peracetyliertem Mannosetrichloracetimidat **26** mit TMSOTf in DCM ergab jedoch anstelle des erwarteten Glycosids nur den Orthoester **62** mit einer Ausbeute von 82 %, der zweifelsfrei durch <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie charakterisiert werden konnte, und geringe Mengen des Diorthoesters **63** (Schema 16).



**Schema 16** Versuchte Glycosylierung von Mannosetrichloracetimidat mit Hexandiol.



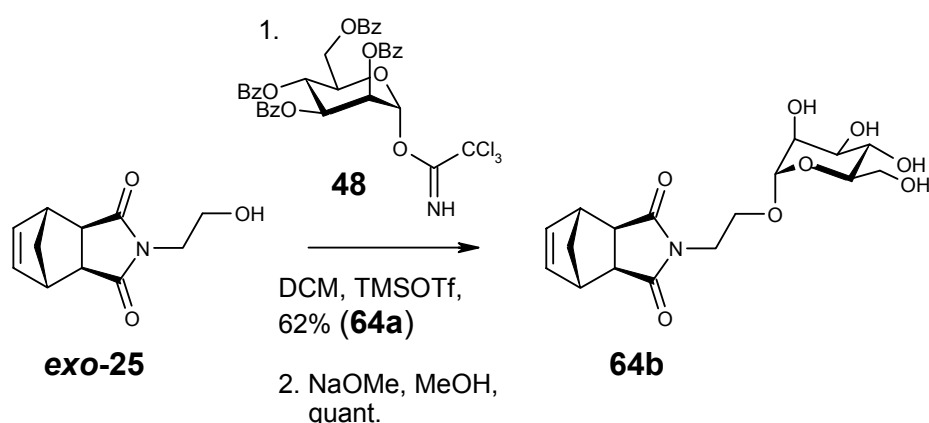
Die Bildung von Orthoestern als Hauptprodukt ist bei der Glycosylierung von Mannose ein häufig beobachtetes Phänomen, wenn Acetyl-Schutzgruppen verwendet werden, da die axiale 2-*O*-Acylgruppe durch den reversen anomeren Effekt zur Bildung eines besonders stabilisierten intermediären Acetoxonium-Ions führt und es so zur hauptsächlichlichen Bildung von Orthoestern kommen kann.<sup>[85]</sup>

Die Bildung des zweifachen Orthoesters **63** lässt sich über die Deblockierung der Silyl-Schutzgruppe unter den verwendeten Lewis-sauren Bedingungen und anschließende Orthoesterbildung mit beiden OH-Gruppen erklären.

Da mit der Verbindung **51** bereits ein Norbornenderivat mit C<sub>6</sub>-Spacer vorhanden war, wurde diese Syntheseroute nicht weiter verfolgt.

Von Interesse waren noch die Synthese der *exo*-Variante des mono-mannosylierten Norbornens **28**, da die *endo*-Verbindung keine ROMP einzugehen schien, sowie die Synthese von Verbindungen mit Spacerlängen von drei, vier und fünf Methylengruppen, da dann Norbornenderivate mit Spacerlängen von zwei bis sechs Kohlenstoffatomen für die Bindungsstudien mit dem MMR zur Verfügung stehen würden. So könnte gut der Einfluss der Spacerlänge auf die Bindungsstärke an den Rezeptor untersucht werden.

Die Synthese des tricyclischen Imids **64b** konnte mit guten Ausbeuten analog der in Kapitel 3.1 beschriebenen Synthese des Imids **28** durchgeführt werden, wobei für die Glycosylierung perbenzoyliertes Mannosetrichloracetimidat **48** anstelle der peracetylierten Verbindung verwendet wurde (Schema 17).



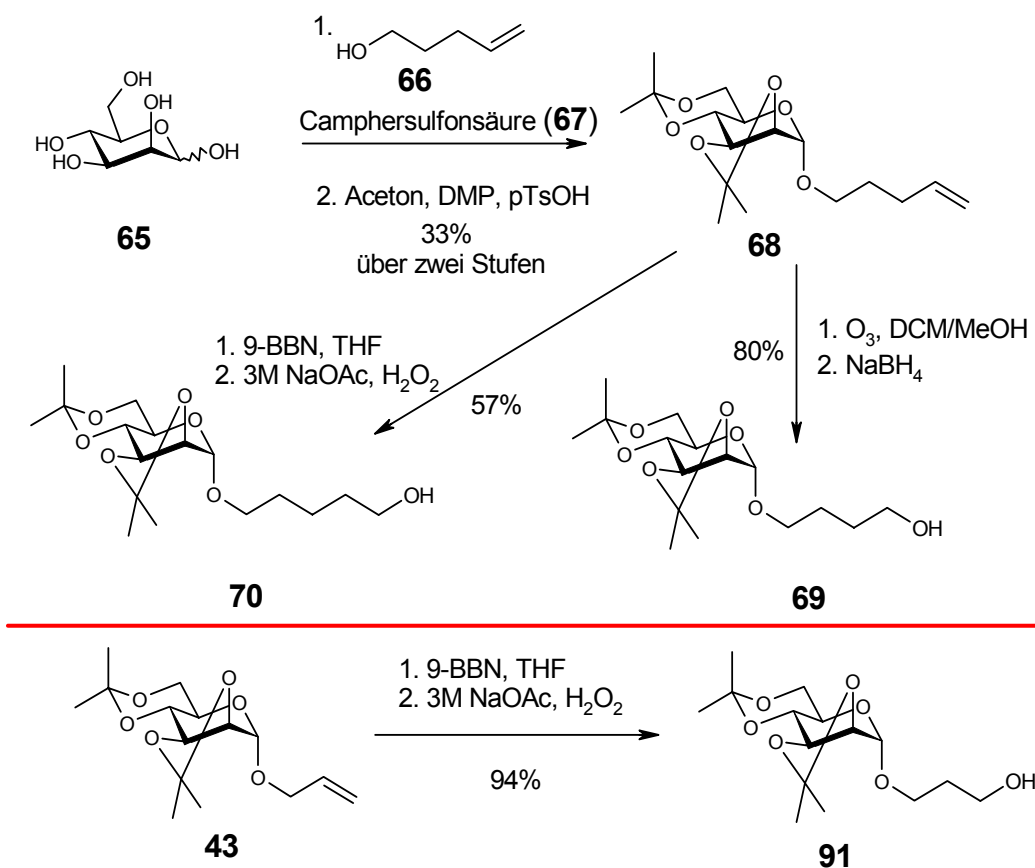
**Schema 17** Synthese des tricyclischen Imids **64b** mit *exo*-ständigem Mannosyl-Substituenten.

Für die Synthese der Mannoside mit einem C<sub>4</sub>-, bzw. C<sub>5</sub>-Spacer wurde zunächst D-Mannose in einer Fischer-Glycosylierung mit Pentenol **66** und einer katalytischen Menge Camphersulfonsäure zum Pentenylglycosid umgesetzt und anschließend mit Aceton und DMP

als Isopropyliden-Acetal geschützt. Die Glycosylierung lieferte das Mannosid **67**<sup>[86]</sup> in einer mäßigen Ausbeute von 49 %, die isopropylidenierte Verbindung **68**<sup>[115]</sup> konnte als farbloser Sirup in 68 %iger Ausbeute isoliert werden.

Eine Ozonisierungs-Reduktions-Sequenz ergab dann das geschützte Mannosid **69** mit einer guten Ausbeute von 80 % mit einem C<sub>4</sub>-Spacer und terminaler OH-Gruppe. Eine Aufreinigung des Produkts durch Chromatographie war nicht nötig, da die Substanz nach der Ozonolyse bereits in ausreichender Reinheit (nach NMR) anfiel.

Durch Hydroborierung von **68** mit 9-BBN in THF und oxidativer Aufarbeitung mit 3 M NaOAc und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konnte auch das erwünschte Glycosid **70** mit einem C<sub>5</sub>-Spacer dargestellt werden, wobei die Ausbeute mit 57 % leider nur mäßig war (Schema 18).



Schema 18 Synthese der Mannoside mit C<sub>3</sub>- bis C<sub>5</sub>-Spacer.

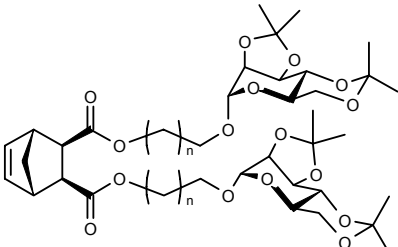
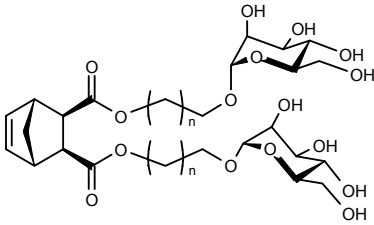
Durch Hydroborierung und oxidative Aufarbeitung konnte aus isopropylideniertem Allylmannosid **43** auch die entsprechende Verbindung **91** mit einem C<sub>3</sub>-Spacer in 94 %iger Ausbeute hergestellt werden.

Für die Veresterung mit dem *exo*-Anhydrid **60** standen so nun vier Isopropyliden-geschützte Mannoside **29**, **91**, **69** und **70** mit Spacerlängen von C<sub>2</sub> bis C<sub>5</sub> zur Verfügung. Die Ausbeuten

der Mukaiyama-Veresterungen und der Deblockierung der Isopropyliden-Schutzgruppen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Die Kupplung der Glycoside mit dem Anhydrid verlief mit guten bis sehr guten Ausbeuten von 70 % beim C<sub>4</sub>-Mannosid bis 99 % bei der C<sub>3</sub>-Verbindung. Alle Substanzen konnten nach Aufreinigung durch Säulenchromatographie als farblose Feststoffe isoliert und durch <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie, sowie MALDI-TOF-MS charakterisiert werden. Die NMR-Spektren aller Verbindungen zeigten die Aufspaltungen der Signale im Norbornenring, die bereits bei den früher synthetisierten Substanzen beobachtet werden konnte. Wie auch bei den anderen *exo*-Norbornen-Derivaten war die Aufspaltung jedoch geringer als bei den Verbindungen mit *endo*-Substituenten.

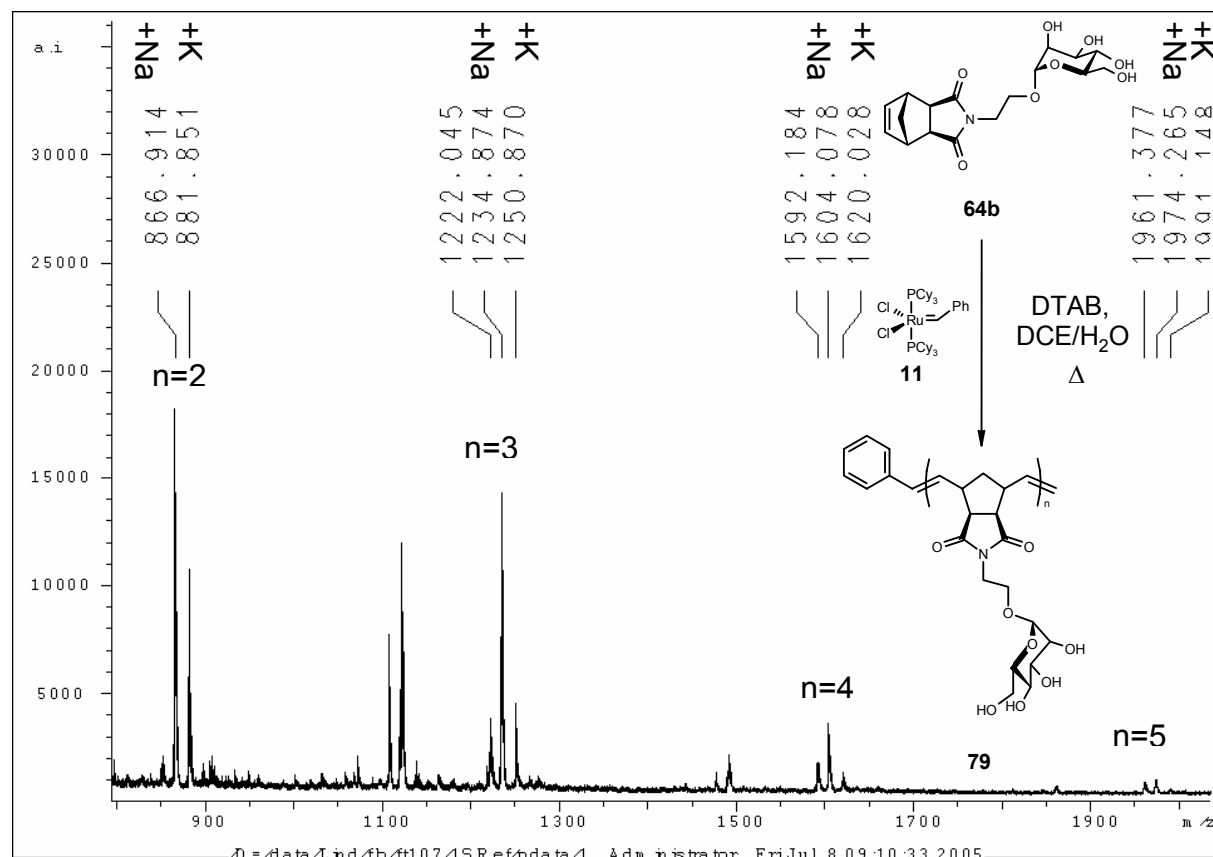
Auch die Deblockierung der Isopropyliden-Schutzgruppen verlief mit zufrieden stellenden Ausbeuten zwischen 53 % bei der Verbindung mit C<sub>5</sub>-Spacer und 76 % bei der Substanz mit C<sub>3</sub>-Spacer. Alle Verbindungen wurden durch präparative HPLC an RP-18 Kieselgel aufgereinigt und lagen als stark hygroskopische farblose Feststoffe vor, die nach kürzester Zeit selbst im abgeschlossenen Glaskolben sirupösen Charakter annahmen. Die Identität der Produkte konnte durch <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie und mittels MALDI-TOF-MS bestätigt werden.

Substanz \ n =	1	2	3	4
	93 % <b>71</b> aus <b>29</b>	99 % <b>73</b> aus <b>91</b>	70 % <b>75</b> aus <b>69</b>	84 % <b>77</b> aus <b>70</b>
↓ ↓ ↓ ↓				
	58 % <b>72</b>	76 % <b>74</b>	62 % <b>76</b>	53 % <b>78</b>

**Tabelle 1** Ausbeuten der Mukaiyama-Veresterung von **60** mit den Mannosiden mit C<sub>2</sub>- bis C<sub>5</sub>-Spacern und Ausbeuten der anschließenden Deblockierung der Isopropyliden-Schutzgruppen.

Nachdem nun verschiedene Norbornen-Derivate mit *exo*-ständigen Mannosyl-Substituenten zur Verfügung standen, sollte versucht werden, diese mittels ROMP zu polymerisieren. Hierzu wurden jeweils 50-100 mg des Monomers für mehrere Stunden im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend unter Argon-Schutzgasatmosphäre in einen Schlenkkolben gegeben. Die Substanz wurde in wenigen Millilitern DCE/H<sub>2</sub>O suspendiert, um eine möglichst hohe Konzentration an Monomer zu gewährleisten. Die verwendeten Lösungsmittel wurden vorher durch Spülen mit Argon entgast, da gelöster Sauerstoff den Metathese-Katalysator inaktiviert. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0.05 eq des Grubbs-Katalysators **11** gestartet und die Reaktionsmischung wurde für 48-72 h bei 75°C gerührt. Um die Reaktion zu stoppen wurde ein großer Überschuss Ethylvinylether zur Reaktionsmischung gegeben.

Eine Analyse der Rohprodukte durch MALDI-TOF-MS bestätigte die Bildung von Oligomeren. Abbildung 32 zeigt beispielhaft das MALDI-Spektrum der Polymerisation der Verbindung **64b**. Es lassen sich Massen bis zu einem Molekulargewicht von knapp 4 kDa erkennen, was einem Oligomer mit fünf Wiederholungseinheiten entspricht. Enttäuschenderweise konnte jedoch keine Bildung von höhermolekularen Polymeren beobachtet werden.



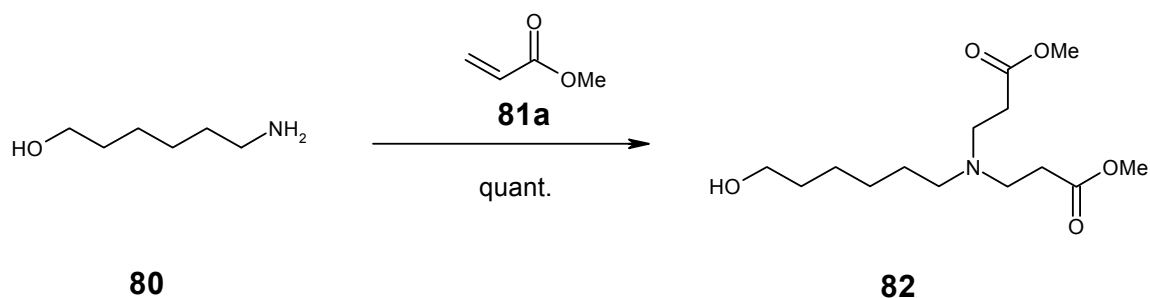
**Abb. 32** MALDI-TOF-Massenspektrum der Ringöffnenden-Metathese-Polymerisation von **64b** mit dem Grubbs-Katalysator der ersten Generation unter Emulsionsbedingungen. Es lässt sich die Bildung von Oligomeren mit bis zu fünf Wiederholungseinheiten (n) erkennen.

Aufgrund dieser wenig befriedigenden Ergebnisse, wurde die Metathese von **64b** und **72** unter anderen Bedingungen versucht. Aber auch die Polymerisation in Wasser mit  $\text{RuCl}_3$  als Katalysator oder die Verwendung des Grubbs-Katalysators der zweiten Generation **12** ergab keine besseren Ergebnisse. Die Erklärung für die geringe Reaktivität der hergestellten Monomere unter ROMP-Bedingungen bleibt unklar. Ein Grund könnte die geringere Ringspannung der *exo*-substituierten Norbornen-Derivate gegenüber den *endo*-Verbindungen sein, jedoch ist die ROMP von Norbornen mit *exo*-ständigen Kohlenhydratsubstituenten in der Literatur beschrieben.<sup>[87]</sup> Kiessling et al. berichteten aber auch von Monomeren, die sich gar nicht polymerisieren ließen.

### 3.4 Cluster-Mannoside auf Basis von Glycodendrimeren

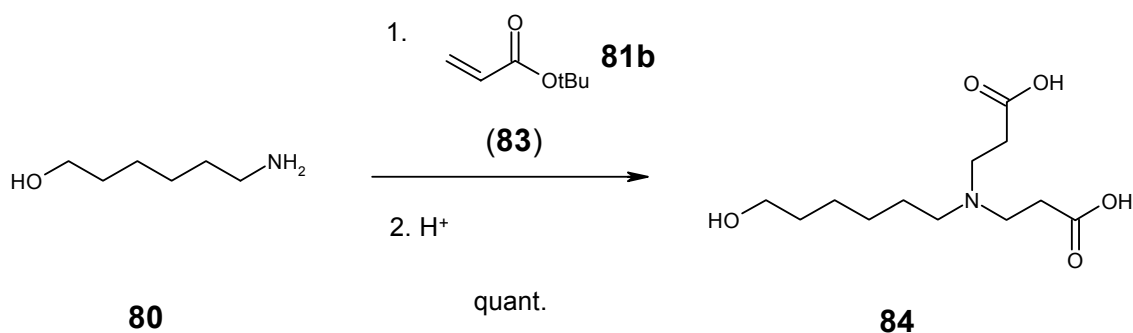
Da die bisherigen Versuche, die mono- oder divalenten Liganden durch Metathese-Polymerisation in multivalente Liganden zu überführen fehlgeschlagen waren, wurde als neue Strategie für den Aufbau polyvalenter Strukturen die Synthese von dendrimerartigen Glycoclustern verfolgt. Diese Dendrimere sollten dann wie bisher mit Norbornen als Coremolekül verknüpft werden.

Für die Synthese eines Gerüsts sollte die bereits beim Aufbau von Kohlenhydrat-Dendrimeren von Lindhorst et al. gut etablierte PAMAM-Chemie zum Einsatz kommen.<sup>[88]</sup> Dementsprechend wurde 6-Amino-1-hexanol **80** in einer Michael-Addition mit Methylacrylat **81a** zum tertiären Amin **82** umgesetzt (Schema 19a). Durch die erheblich höhere Nucleophilie der Aminofunktion musste die Hydroxy-Gruppe nicht geschützt werden. Die Reaktion verlief in quantitativer Ausbeute und lieferte das gewünschte Reaktionsprodukt ohne weitere Aufreinigung in sehr guter Reinheit.



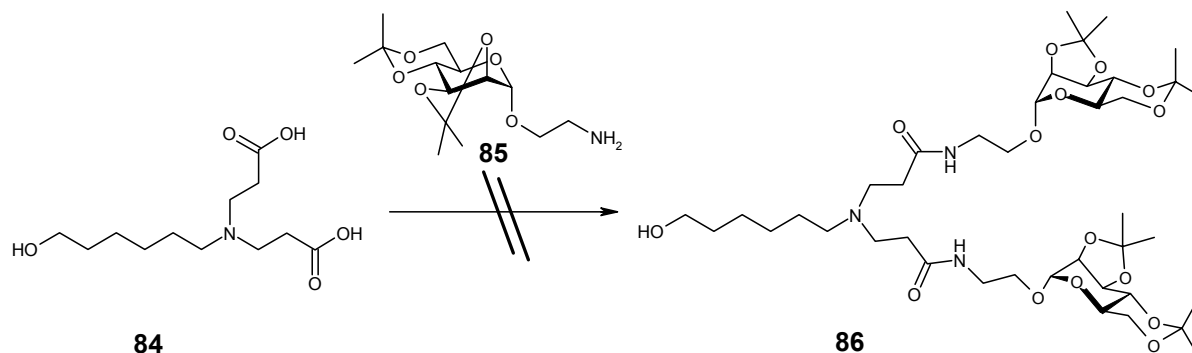
**Schema 19a** Aufbau eines PAMAM-Dendrimeres durch Michael-Addition von 6-Amino-1-hexanol mit Methylacrylat.

Alle Versuche, im nächsten Schritt die Methyl ester unter basischen Bedingungen abzuspalten, führten jedoch nicht zur gewünschten Säure **84**. Daher wurde die Michael-Addition mit tert.-Butylacrylat wiederholt. Auch in diesem Fall lieferte die Reaktion hervorragende Ausbeuten. Der tert.-Butylester **83** konnte anschließend säurekatalysiert zur gewünschten Disäure **84** umgesetzt werden (Schema 19b).



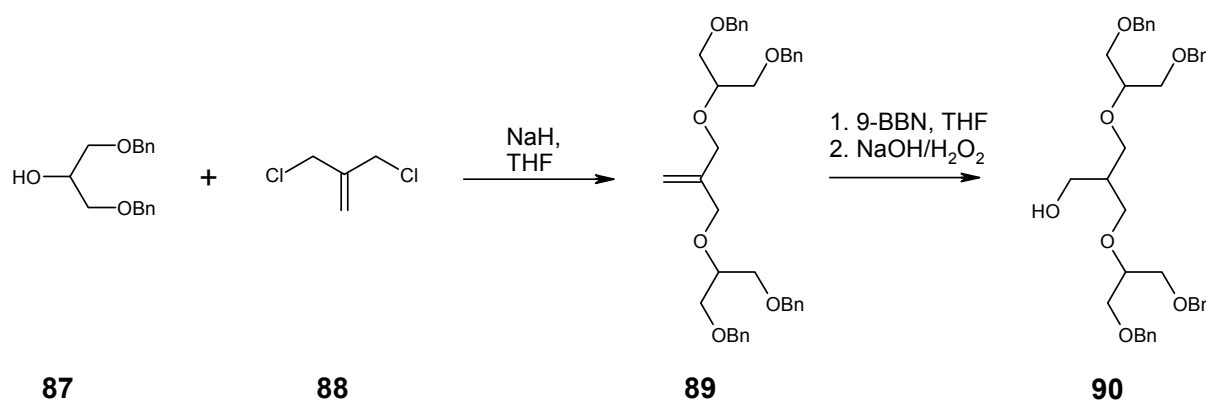
**Schema 19b** Aufbau eines PAMAM-Dendrimers durch Michael-Addition von 6-Amino-1-hexanol mit Butylacrylat und säurekatalysierte Deblockierung der Estergruppen.

Die anschließende Umsetzung der freien Säure mit einem großen Überschuss Isopropylidengeschütztem Aminoethylmannosid **85**<sup>[89]</sup> mit DIPEA als Base und BOP als Kupplungsreagenz führte jedoch nicht zum bivalenten Cluster **86** (Schema 20). Auch die Verwendung von HOBt/DCC für die Peptidkupplung ergab nicht das gewünschte Produkt.



**Schema 20** Versuchte Kupplung des PAMAM-Dendrimers mit Aminoethylmannosid.

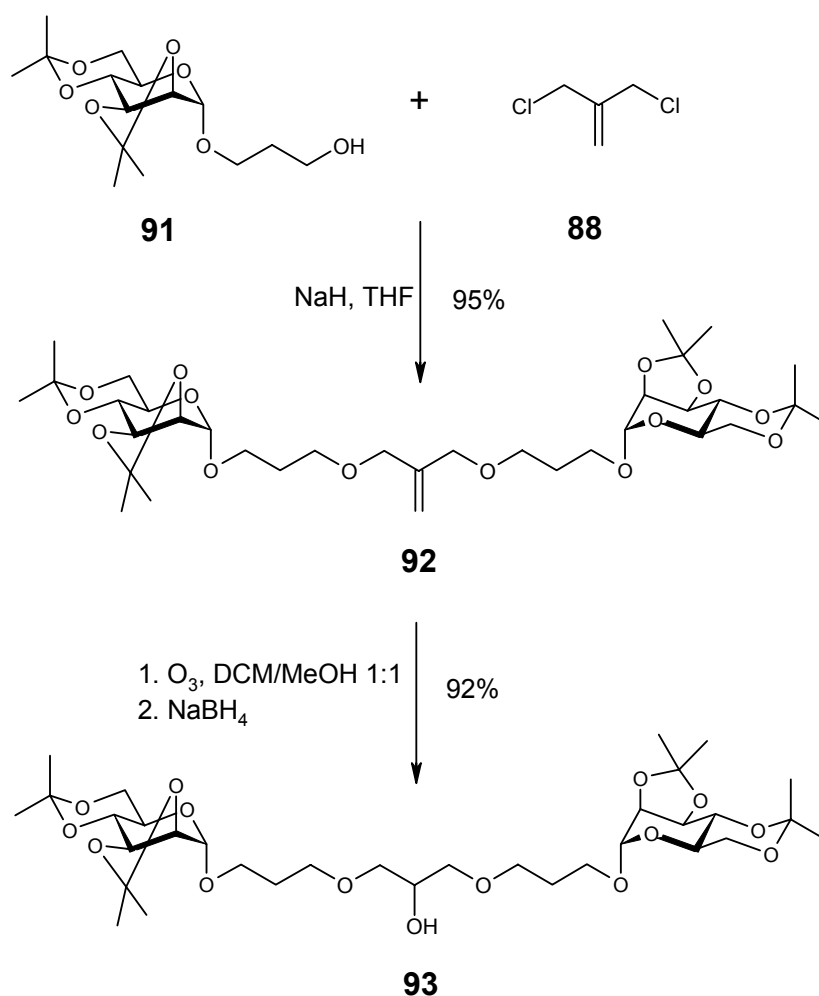
Da die PAMAM-Strategie sich als wenig erfolgreich erwiesen hatte, sollte eine Strategie von Fréchet et al.<sup>[90]</sup> für den Aufbau von Polyetherdendrimern zum Zuge kommen. Bei dieser konvergenten Synthese, die MDC (Methallyldichlorid) **88** als Verzweigungspunkt benutzt, wird ein Glycerin-Derivat **87** in einer Williamson'schen Ethersynthese mit MDC umgesetzt und das entstehende Olefin **89** durch Hydroborierung mit 9-BBN und anschließender Oxidation in einen primären Alkohol **90** überführt (Schema 21).



**Schema 21** Strategie von Fréchet zum Aufbau von Polyetherdendrimern.

Diese Methode wurde auch von Boysen<sup>[78]</sup> für die Synthese von Galactose- und Mannosehaltigen Polyether-Glycodendrimern mit bis zu acht Kohlenhydrat-Substituenten pro Dendrimer-Molekül genutzt. Hierzu wurden Isopropyliden-geschützte Hydroxyethylglycoside mit MDC in sehr guten Ausbeuten umgesetzt. Abweichend von der Fréchet-Methode wurde die olefinische Bindung anschließend nicht durch Hydroborierung zum primären Alkohol umgesetzt, sondern durch Ozonolyse zu einem sekundären Alkohol umgewandelt. Die entstandene Hydroxygruppe konnte im nächsten Schritt entweder wieder direkt mit MDC umgesetzt werden, um so die nächste Dendrimer-Generation aufzubauen, oder vorher noch mit einem aliphatischen Spacer-Molekül derivatisiert werden, um so den Abstand zwischen den Verknüpfungsstellen zu vergrößern und das Gerüst flexibler zu gestalten. Die Einführung des Spacers erfolgte dabei über Williamson-Ethersynthese mit Allylbromid und eine darauf folgende Ozonisierungs-Reduktions-Sequenz der allylischen Doppelbindung. Die Ozonisierungs-Reduktions-Sequenz hat gegenüber der von Fréchet eingesetzten Hydroborierung entscheidende Vorteile: Die Ausbeuten der Ozonolyse sind in den meisten Fällen nahezu quantitativ, jedenfalls fast immer erheblich besser als bei der Hydroborierung. Weiterhin ist die Aufarbeitung der Reaktion bei der Ozonolyse wesentlich simpler und die Reaktionsprodukte fallen meistens in so guter Reinheit an, dass eine säulenchromatographische Aufreinigung überflüssig ist.

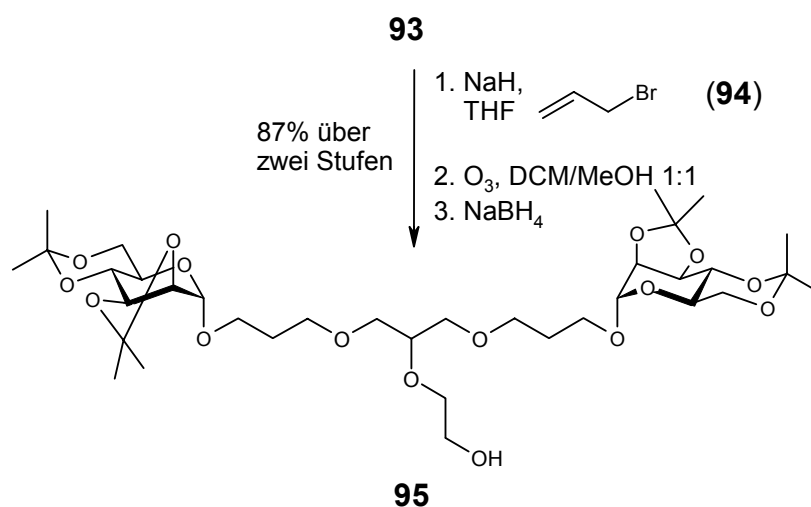
Dementsprechend wurde für den Aufbau eines Polyether-Dendrimer-Gerüsts Isopropyliden-geschütztes Hydroxypropylmannosid **91** mit einem Überschuss von MDC und NaH in THF zum Olefin **92** umgesetzt (Schema 22). Die Verwendung von Isopropyliden-Schutzgruppen erwies sich auch hier als vorteilhaft, da sie unter den Bedingungen der Ozonisierungs-Reduktions-Sequenz stabil sind und bei der späteren Deblockierung nicht mit den Ester-Gruppen im Norbornen-Derivat interferieren. Hydroxypropylmannosid wurde der Vorzug gegenüber Hydroxyethylmannosid gegeben, da der um eine Methylen-Gruppe längere Spacer



**Schema 22** Synthese des Glycerin-Glycodendrimer nach Boysen et al.<sup>[78]</sup>

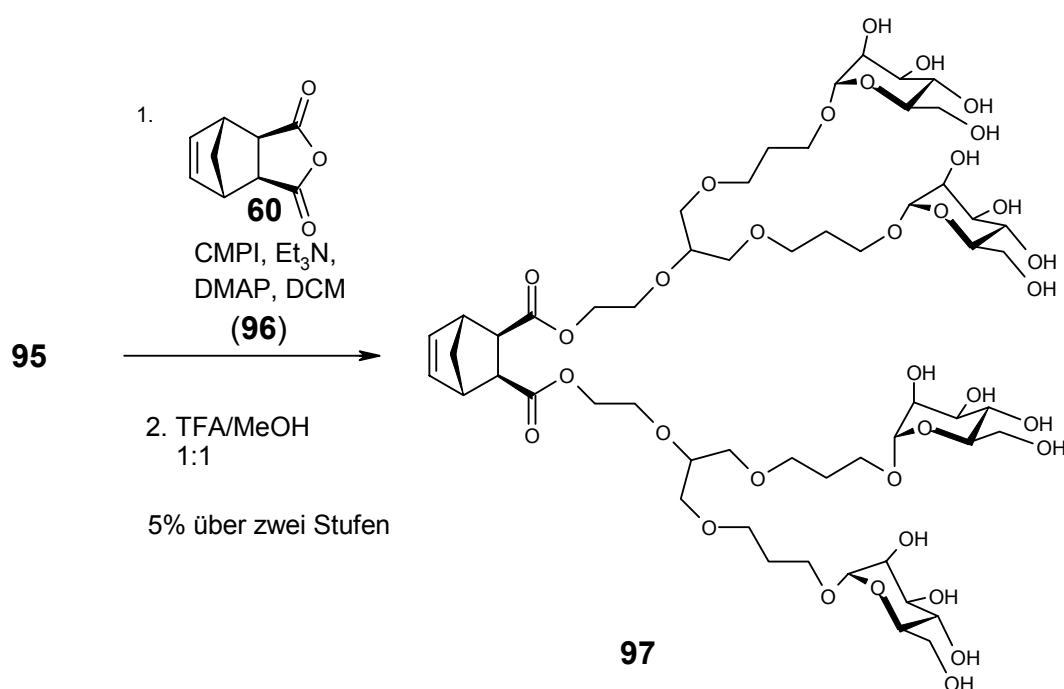
den Abstand der Saccharid-Epitope im Dendrimer weiter erhöht und auch die Flexibilität steigert. Das geschützte Glycosid **91** ist dabei in sehr gute Ausbeute von 94 % durch Hydroborierung von Allylmannosid **43** zugänglich. Das Produkt **92** der Williamson-Ethersynthese mit MDC ließ sich sehr gut durch Flash-chromatographische Reinigung in 95 %iger Ausbeute isolieren, da sich die Polaritäten der eingesetzten Edukte stark von der des Produkts unterscheiden. Die Ozonisierung-Reduktions-Sequenz von **92** lieferte ohne chromatographische Reinigung schließlich den sekundären Alkohol **93** mit 92 % Ausbeute. Um eventuelle sterische Probleme bei der Veresterung mit Norbornendicarbonsäureanhydrid **60** zu mildern, sollte zunächst ein kurzer aliphatischer Spacer eingefügt werden. Dieses wurde durch Umsetzung des Alkohols **93** mit Allylbromid durchgeführt, die die ungesättigte Verbindung **94** mit 94 % Ausbeute nach chromatographischer Aufreinigung ergab. Ozonolyse der olefinischen Bindung und reduktive Aufarbeitung mit  $\text{NaBH}_4$  lieferte dann ohne Reinigung den erwünschten primären Alkohol **95** in 93 % Ausbeute (Schema 23).





**Schema 23** Allylierung und Ozonolyse der Glycerin-Glycendrimers nach Boysen et al.<sup>[78]</sup>

Diese Hydroxyverbindung **95** konnte nun entsprechend der in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Synthese der Norbornen-Cluster-Mannoside mit *exo,exo*-Norbornendicarbonsäureanhydrid **60** unter Mukaiyama-Bedingungen umgesetzt werden (Schema 24). Auf diese Weise konnte das Cluster-Mannosid **96** mit einer mäßigen Ausbeute von 15 % nach Aufreinigung durch präparative HPLC an RP-18 Kieselgel dargestellt werden. Die finale Deblockierung der Isopropyliden-Schutzgruppen lieferte nach einer Reaktionszeit von drei Stunden im Milligramm-Maßstab die OH-freie Verbindung **97** mit vier Mannosyl-Substituenten in 32 %iger Ausbeute nach HPLC.

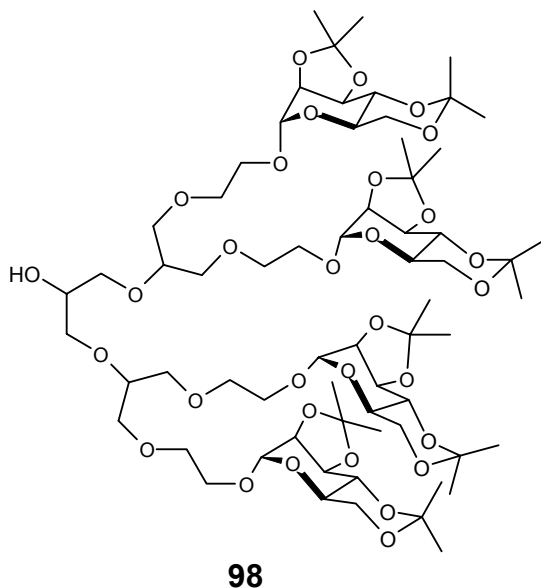


**Schema 24** Aufbau eines tetravalenten Glycoclusters.

Für die geringe Ausbeute bei der Kupplung mit dem Norbornen-Anhydrid **60** kann der große Raumbedarf der beiden Saccharid-Substituenten verantwortlich gemacht werden. Schon bei der Synthese der Norbornen-Diester mit Substituenten, die Spacer mit aromatischen Resten oder einem Cyclohexylring tragen, wurden erheblich geringere Ausbeuten isoliert, als bei der Veresterung von Substituenten mit aliphatischen Spacern.

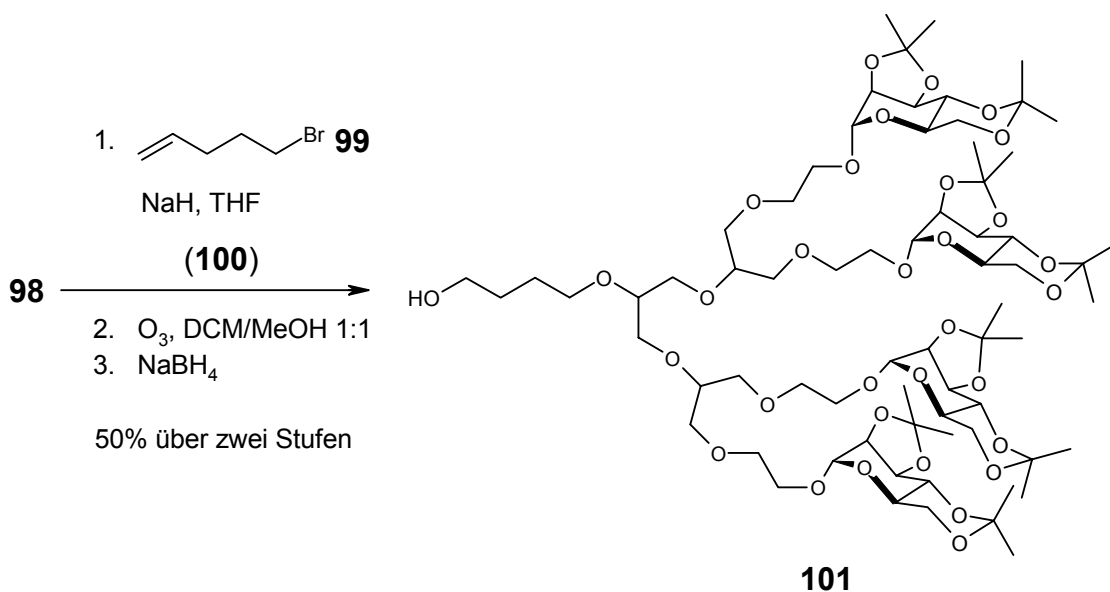
Die längere Reaktionszeit bei der Deblockierung von **96** und die kleine Ausbeute können auf die Anzahl der Mannosyl-Reste im Molekül zurückgeführt werden, die zu insgesamt acht zu entschützenden Isopropyliden-Gruppen führen.

Für den Aufbau eines Cluster-Moleküls mit acht Mannosyl-Resten im Molekül wurde zunächst analog der vorangegangenen Synthese ein Polyether-Dendrimer **98** der zweiten Generation mit vier Zucker-Resten dargestellt, das auch bereits von Boysen<sup>[78]</sup> synthetisiert werden konnte. Der Alkohol **98** konnte ausgehend von Isopropyliden-geschütztem Hydroxyethylmannosid **29** mit sehr guten Ausbeuten in einem Maßstab von 3.5 g isoliert werden.



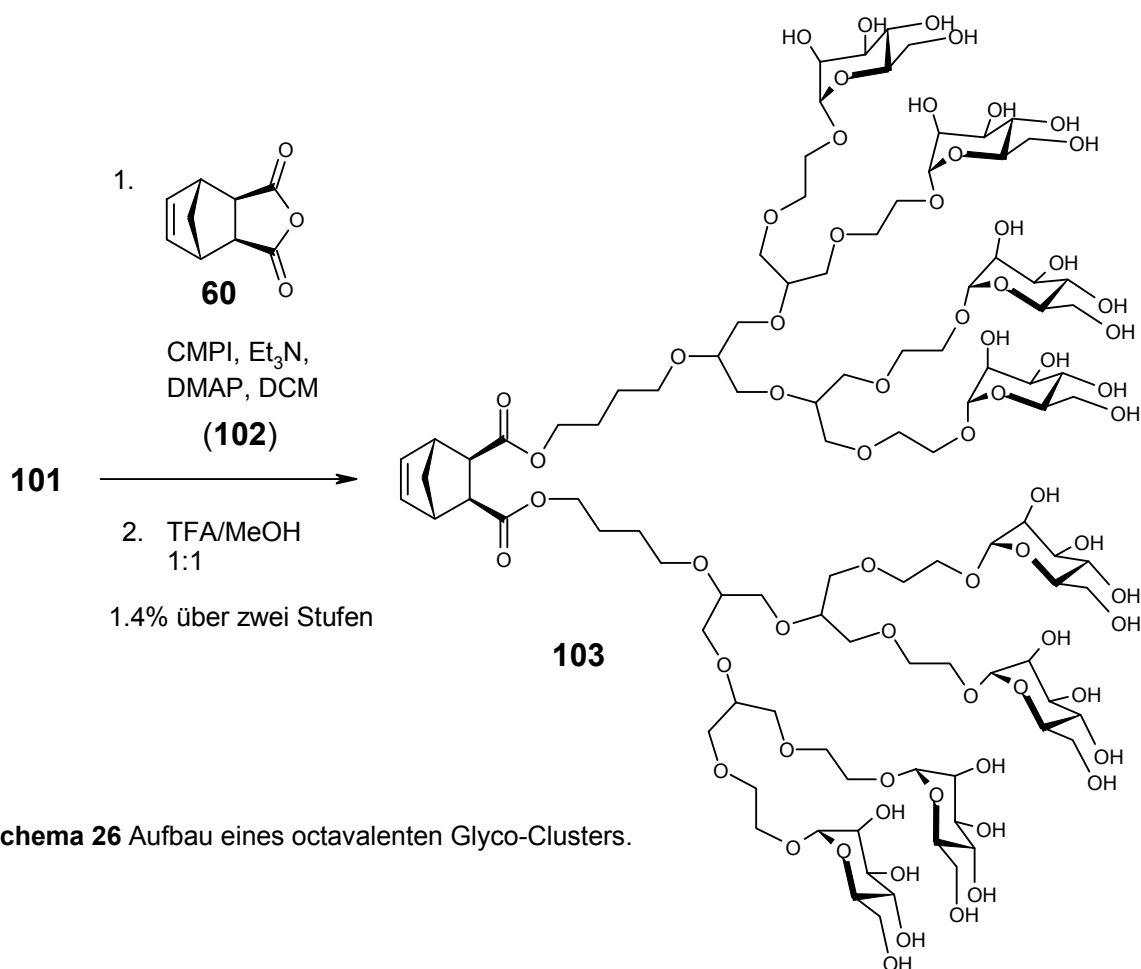
**Abb. 33** Tetraivalentes Polyether-Dendrimer.<sup>[78]</sup>

Da schon bei der Synthese des Cluster-Mannosids mit vier Saccharid-Epitopen die Veresterung durch die sterische Hinderung der großen Substituenten nur eine geringe Ausbeute an Produkt ergab, sollte nun ein C<sub>4</sub>-Spacer anstelle des kurzen Hydroxyethylspacers verwendet werden. Daher wurde der primäre Alkohol **98** mit 5-Brom-1-penten **99** in einer Williamson-Ethersynthese umgesetzt, die die ungesättigte Verbindung **100** in 88 %iger Ausbeute lieferte. Eine anschließende Ozonisierungs-Reduktions-Sequenz lieferte das Dendrimer **101** mit dem gewünschten C<sub>4</sub>-Spacer und terminaler Hydroxygruppe mit 57 % Ausbeute im 1.5 g Maßstab (Schema 25).



**Schema 25** Synthese eines mannosylierten Glycerin-Glycodendrimer der zweiten Generation mit einem C4-Spacer.

Die Veresterung des Alkohols **101** mit dem Anhydrid **60** und anschließende Deblockierung der Isopropyliden-Gruppen mit TFA/MeOH lieferte schließlich nach Aufreinigung durch HPLC 39 mg des OH-freien Cluster-Mannosids **103** mit insgesamt acht Zucker-Resten im Molekül. Trotz des längeren Spacers lag die Ausbeute der Kupplung nur bei 8 %, die der Entschützung bei 17 % (Schema 26).



**Schema 26** Aufbau eines octavalenten Glyco-Clusters.

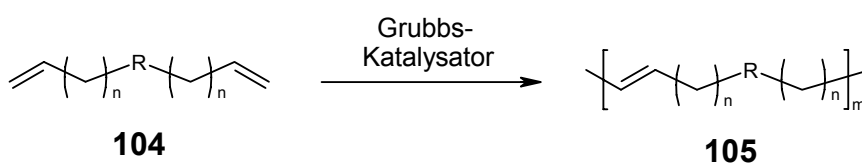
Abschließend kann gesagt werden, dass durch die Verwendung der „Boysen-Dendrimere“ Cluster-Mannoside mit vier und acht Mannosyl-Substituenten hergestellt werden konnten, wodurch nun für die biochemischen Untersuchungen mit dem MMR nicht nur mono- und bivalente Liganden, sondern nun auch tetra- bzw. octavalente Mannoside zur Verfügung stehen.

Die beiden OH-freien tetra- und octavalenten Cluster **97** und **103** konnten nach der Reinigung durch HPLC in Reinheiten von über 90 % isoliert werden und mit NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie charakterisiert werden.

### 3.5 Glycopolymere durch ADMET

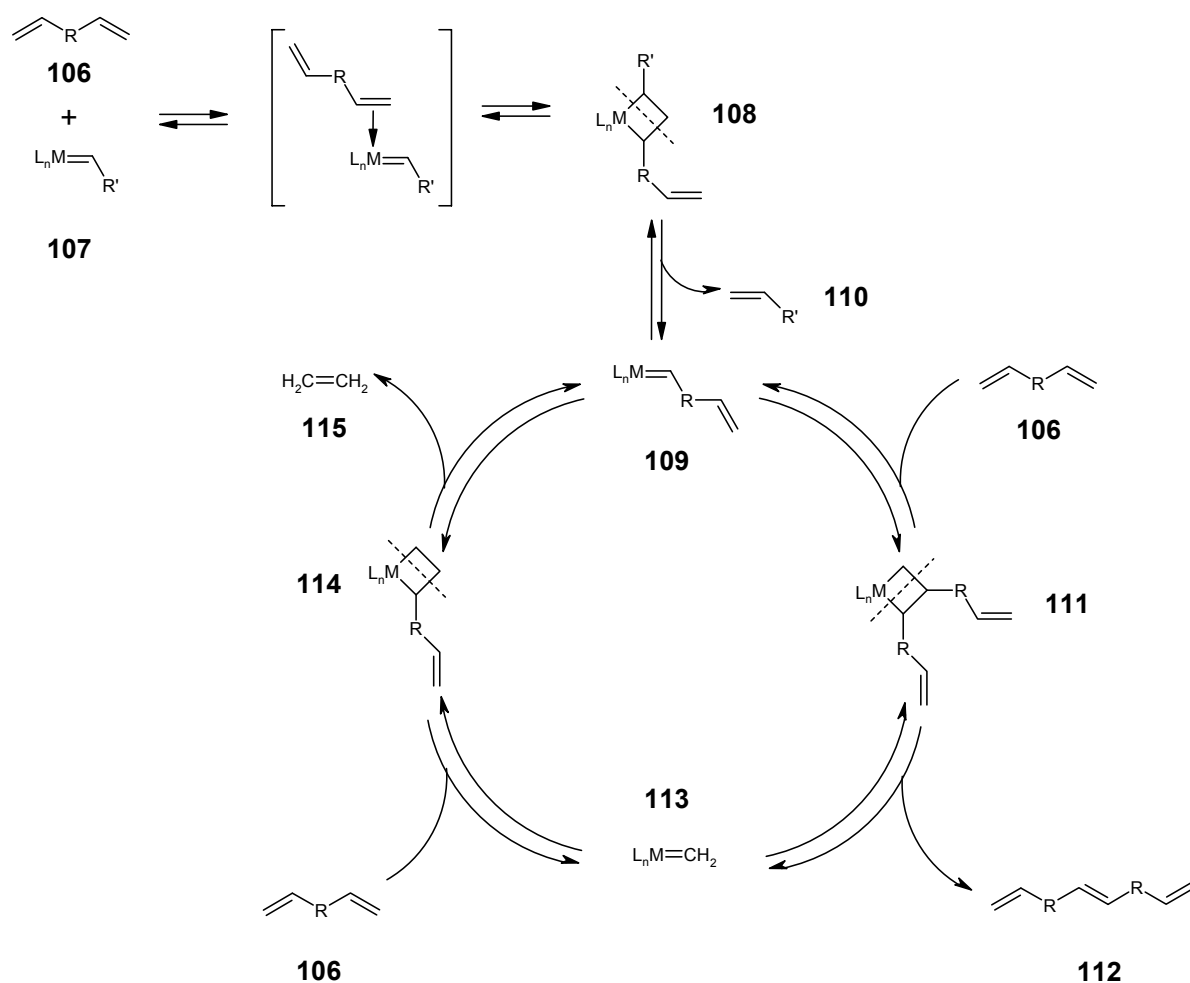
Ein Nachteil der Ringöffnenden Metathese-Polymerisation für die Synthese multivalenter Neoglycopolymere ist es, dass der Abstand der Saccharid-Substituenten im Polymer bereits durch die Struktur des polymerisierbaren Teils des Monomers, in den meisten Fällen Norbornen, festgelegt und damit nicht einfach zu variieren ist. Eine eingeschränkte Kontrolle des Abstands der bioaktiven Substituenten lässt sich höchstens durch Änderung von Länge und Flexibilität der verwendeten Spacer-Moleküle erzielen, sowie durch die Anzahl der Zuckereinheiten pro Monomer-Molekül. Allerdings lässt sich die dreidimensionale Struktur die die Spacer unter physiologischen Bedingungen annehmen und damit auch der Abstand der Kohlenhydrat-Moleküle nicht voraussagen. Um den Mechanismus der Bindung multivalenter Liganden an Rezeptoren mit mehr als einer Bindungsstelle im Protein zu untersuchen ist es aber auch von Interesse, den Abstand der bindenden Motive im Polymer definiert verändern zu können.

Eine Möglichkeit für die Synthese von Glycopolymeren, in denen sich die Motividichte kontrollieren lässt, ist die Acyclische Dien-Metathese (ADMET).<sup>[91]</sup> Bei dieser Polymerisations-Reaktion handelt es sich wie bei der ROMP ebenfalls um eine Olefin-Metathese mit Ruthenium- oder Molybdänverbindungen als Katalysator. Bei der ADMET werden acyclische Diene der allgemeinen Struktur **104** mit zwei terminalen Doppelbindungen zu linearen Polymeren der allgemeinen Struktur **105** umgesetzt (Schema 27).



Schema 27 Prinzip der ADMET-Polymerisation.

Der Mechanismus der acyclischen Dien-Metathese-Polymerisation ist in Schema 28 illustriert. Das prinzipielle Intermediat **108**, ein Metallacyclobutan, ist identisch mit dem, das auch in allen anderen Metathese-Reaktionen gefunden wird. Der ADMET-Polymerisations-Zyklus selbst unterscheidet sich jedoch erheblich von den übrigen Metathese-Reaktionen. Im Gegensatz zur ROMP, die typischerweise irreversibel ist, handelt es sich bei der ADMET um eine Gleichgewichtsreaktion. Im ersten Schritt formt der Metallalkyliden-Komplex **107** eine  $\pi$ -Bindung mit einer der terminalen Doppelbindungen des Monomers **106** und über eine Insertion wird das initiale Metallacyclobutan **108** gebildet. Durch Retro-[2+2]-Cycloaddition bildet sich jetzt ein neuer Alkyliden-Komplex **109** am Terminus des Monomer Moleküls. Der Katalysezyklus wird durch die Komplexierung eines weiteren Monomer-Bausteines unter Bildung des Metallacyclobutans **111** fortgesetzt. Der Komplex zerfällt unter Bildung eines Dimers **112** und dem Methylen-Alkyliden **113**, welches der eigentliche aktive Katalysator ist.

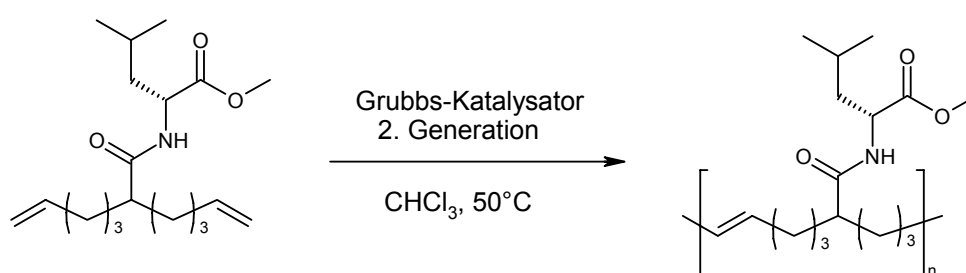


**Schema 28** Mechanismus der ADMET-Polymerisation von Olefinen.

Dieses Alkyliden setzt nun den Katalysezyklus durch Reaktion mit einem weiteren Monomer-Molekül fort, welches der Vorläufer für die Bildung des Ethylenmoleküls **115** ist. Auf diese Weise wird der Katalysezyklus unter Kondensation von zwei Monomer-Bausteinen geschlossen. Für die Bildung hochmolekularer Polymere muss der Zyklus allerdings viele Male durchlaufen werden.

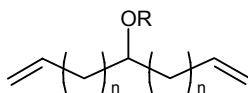
Würde man nun an der zentralen mit **R** bezeichneten CH<sub>2</sub>-Gruppe des Monomers **104** eine derivatisierbare Gruppe, z. B. eine Hydroxyfunktion, anfügen, so ließe sich diese Position mit einem Saccharidrest funktionalisieren. Durch Variation der Anzahl der Methylengruppen **n** im Monomermolekül ließe sich so der Abstand der Kohlenhydrat-Substituenten im Polymer definiert verändern.

Solche funktionalisierten Diene wurden bereits erfolgreich von Hopkins und Wagener<sup>[92]</sup> für die Synthese mit Aminosäuren und Dipeptiden abgewandelter chiraler Polyolefine durch ADMET eingesetzt: Durch Umsetzung von linearen Dienen mit terminalen Doppelbindungen und einer Aminogruppe am fokalen Kohlenstoffatom mit Aminosäuren unter Nutzung herkömmlicher Peptidsynthesechemie und anschließende ADMET-Polymerisation in THF mit einem Grubbs-Katalysator der zweiten Generation konnten Peptid-funktionalisierte Polymere mit Massen bis zu 25 kDa in sehr guten Ausbeuten erhalten werden. Ein Beispiel ist in Schema 29 gezeigt.



**Schema 29** Hopkins und Wagensers Synthese eines Peptid-funktionalisierten Polymers durch ADMET.<sup>[92]</sup>

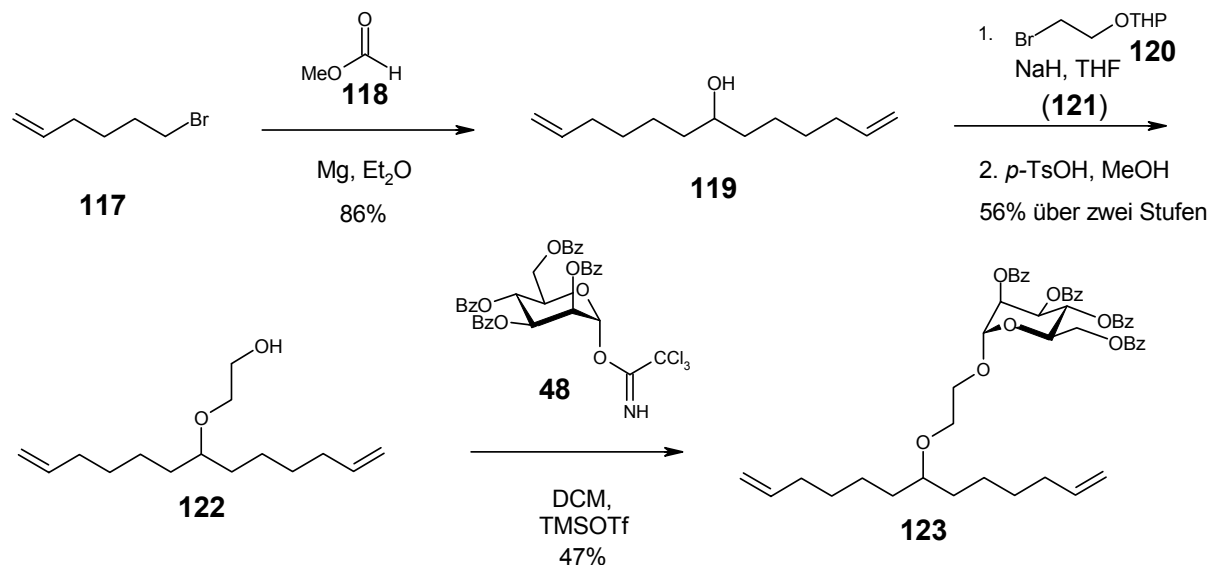
Die Synthese von Glycopolymeren durch Acyclische-Dien-Metathese ist im Gegensatz zu Peptid-funktionalisierten Polymeren noch nicht beschrieben worden. Daher sollte nun ein Monomer des Typs **116** synthetisiert werden, das am fokalen Kohlenstoffatom eine Hydroxyfunktion besitzt, über die später ein Saccharid-Substituent eingeführt werden kann.

**116**

**Abb. 34** ADMET-Monomer mit funktioneller Gruppe für die Anknüpfung von Saccharidresten.

Der Abstand zwischen dem Heteroatom der OH-Gruppe und den terminalen Doppelbindungen sollte dabei nicht zu klein sein, um störende Einflüsse durch den negativen Nachbargruppeneffekt bei der Polymerisation zu minimieren, der bei der ADMET besonders zum Tragen kommt. Studien von Brzezinska und Wagener haben gezeigt, dass ein Abstand von vier CH<sub>2</sub>-Gruppen zu einem Heteroatom ausreichend ist.<sup>[81]</sup>

Für die Synthese des Monomers wurde daher 6-Brom-1-hexen **117** in einer Grignard-Reaktion mit Magnesium und Methylformiat **118** zum Dien **119** umgesetzt, das zwei terminale Doppelbindungen und die gewünschte Hydroxyfunktion am fokalen Punkt des Moleküls trägt. Der sekundäre Alkohol **119** wurde nach chromatographischer Reinigung in einer guten Ausbeute von 86 % als farbloses Öl isoliert. Um später eine gewisse Flexibilität des Mannosyl-Rests zu gewährleisten, wurde im nächsten Schritt **119** mit THP-geschütztem 2-Bromethanol **120** und Natriumhydrid in THF umgesetzt. Das THP-geschützte Bromethanol konnte zuvor in 82 %iger Ausbeute aus OH-freiem 2-Bromethanol durch Reaktion mit DHP dargestellt werden. Die Einführung des C<sub>2</sub>-Spacers durch die Williamson-Ether Synthese ergab das Produkt **121** mit einer Ausbeute von 62 %, allerdings nach einer Reaktionszeit von sechs Tagen, in denen alle 24 h NaH und **120** nachdosiert wurden. Durch Deblockierung der THP-Schutzgruppe mit *p*-TsOH in Methanol erhielt man die OH-freie Verbindung **122** nach einer Reaktionszeit von 12 h nach Chromatographie in sehr guter Ausbeute von 90 %. Die Einführung eines Mannosyl-Rests gelang im Anschluss durch Glycosylierung von **122** mit perbenzoyliertem Mannosetrichloracetimidat **48** in DCM mit TMSOTf als Promotor. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das gewünschte Glycosid **123** mit einer mäßigen Ausbeute von 47 % als farbloser Schaum isoliert werden. Eine Deblockierung der Benzoyl-Schutzgruppen erfolgte nicht, da bei der ADMET-Polymerisation keine freien OH-Gruppen toleriert werden (Schema 30).



**Schema 30** Synthese des Monomers für die ADMET-Polymerisation.

Für die Polymerisation des Monomers wurden 200 mg der Substanz über 24 h im Ölpumpenvakuum bei 50°C getrocknet und anschließend unter Argon-Schutzgasatmosphäre in einen Schlenk-Kolben überführt. Anschließend wurden 0.1 eq Grubbs-Katalysator **11** und gerade eben soviel THF dazugegeben, dass eine homogene Lösung entstand. Unter einem stetigen leichten Argonstrom wurde die Reaktionsmischung für vier Tage auf 50°C erhitzt. Der leichte Argonstrom sollte dazu dienen, bei der Polymerisation gebildetes Ethylen abzuführen und so das Gleichgewicht der Reaktion auf die Polymerseite zu verschieben.

Eine Analyse des Rohprodukts durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie zeigte jedoch auch nach der relativ langen Reaktionsdauer von vier Tagen keine Bildung von Polymeren. Dieses enttäuschende Ergebnis könnte vielfältige Gründe haben. Zum einen werden ADMET-Polymerisationen im Allgemeinen ohne Lösungsmittel unter Bulk-Bedingungen durchgeführt, da die eingesetzten Monomere in der Regel als Flüssigkeit vorliegen. Da in diesem Fall das Monomer aber ein Feststoff ist, wurde die Reaktion in einer kleinen Menge Lösungsmittel durchgeführt. Eventuell war die Menge an THF aber zu groß, so dass die Konzentration an Monomer in der Lösung zu klein war, um die Polymerisation zu begünstigen. Eine entscheidende Rolle könnte auch der negative Nachbargruppeneffekt spielen. Da eine ADMET-Polymerisation mit Kohlenhydrat-substituierten Monomeren bisher noch nie durchgeführt worden ist, kann nicht beurteilt werden, ob in diesem Fall der Abstand von vier Methylengruppen zwischen Doppelbindung und Hydroxyfunktion ausreichend ist, um eine reibungslose Reaktion zu gewährleisten. Ebenfalls möglich ist, dass sich durch die räumliche Anordnung des Zuckers im Monomer Wechselwirkungen mit dem Katalysator ergeben haben, die die Polymerisation negativ beeinflussen haben könnten. Aus Zeitgründen konnten die

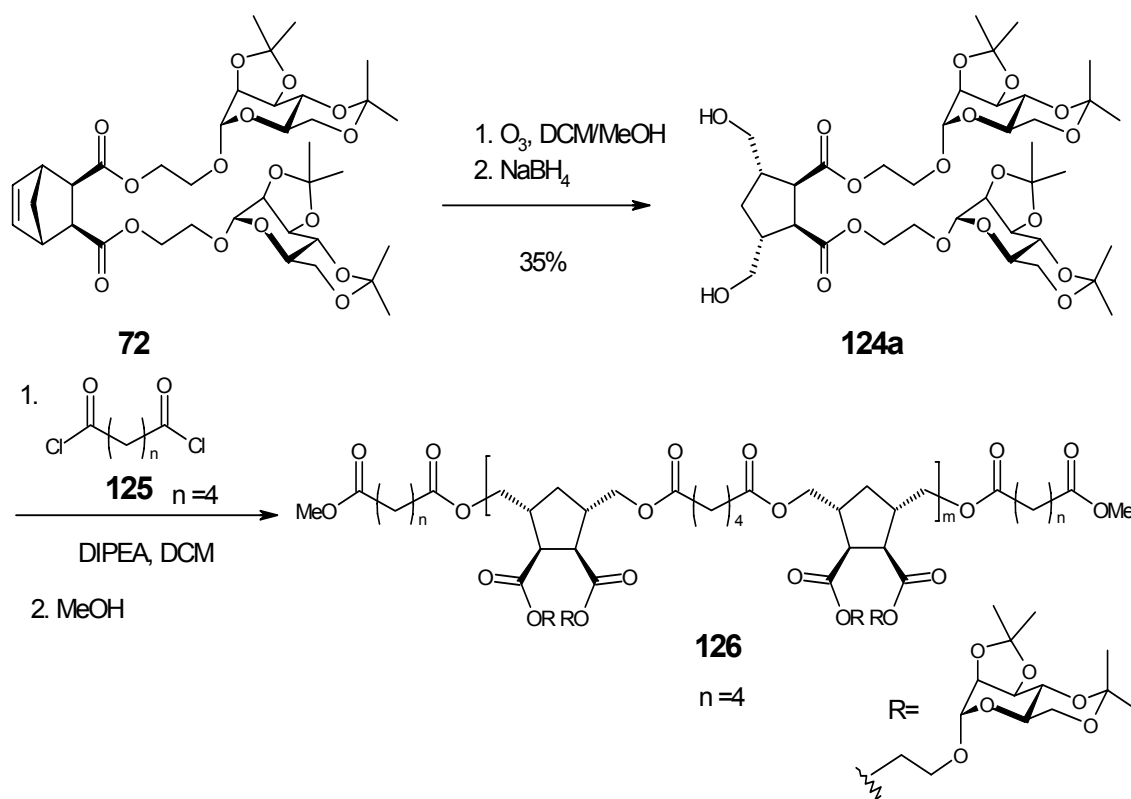


Reaktionsbedingungen für die ADMET jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter optimiert werden, weitere Experimente zur Polymerisation glycosylierter Monomere wären aber von Interesse, da diese noch nicht literaturbekannt ist und einen simplen Zugang zu multivalenten Glycopolymeren mit kontrollierbarer Epitopdichte erlauben würde.

### 3.6 Glycopolymere durch Polyestersynthese

Da alle bisherigen Versuche die in dieser Arbeit hergestellten Norbornen-Derivate zu polymerisieren zu keinem positiven Ergebnis geführt hatten, wurden Überlegungen angestellt, wie die Doppelbindung des Norbornen-Rings anderweitig funktionalisiert werden könnte, um oligomere Strukturen zu erzeugen.

Hierbei entstand die Idee, die Doppelbindung durch eine Ozonisierungs-Reduktions-Sequenz zu öffnen und das entstehende Diol mit einer Disäure mit terminalen Carboxyl-Gruppen zu einem Polyester umzusetzen. Ozonolyse des Norbornen-Derivats **72** und anschließende Reduktion mit  $\text{NaBH}_4$  ergab nach säulenchromatographischer Aufreinigung das erwünschte Diol **124a** mit einer leider nur geringen Ausbeute von 35 % als farblosen Feststoff (Schema 30).



**Schema 31** Synthese eines mannosylierten Polyesters.

Als Nebenprodukt konnten geringe Mengen einer Substanz isoliert werden, die sich durch MALDI-TOF-MS als der entsprechende Dialdehyd charakterisieren ließen. Eine kleine Menge des Diols **124a** wurde für einen Testansatz anschließend unter Schlenk-Bedingungen mit einem Äquivalent Adipinsäuredichlorid **125** und einem Überschuss DIPEA als Base in Dichlormethan umgesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 12 h bei Raumtemperatur und weiteren 2h bei 40°C wurde ein großer Überschuss Methanol zugesetzt und die Reaktionsmischung wurde noch 60 min bei Raumtemperatur gerührt, um die endständigen Säurechlorid-Gruppen im Oligomer zu Methylestern umzusetzen und eventuell nicht abreagiertes Adipinsäuredichlorid zu inaktivieren.

Eine Analyse des Rohprodukts durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie zeigte tatsächlich die Bildung von Oligomeren mit Molmassen bis zu 4 kDa an, deren genaue Struktur allerdings nicht aufgeklärt werden konnte, da die beobachteten Massen nicht genau den berechneten Massen für die oligomeren Strukturen entsprachen (Abb. 35). Alle Versuche die Verbindungen durch GPC oder HPLC für eine weitergehende Charakterisierung aufzureinigen schlugen jedoch fehl. Trotzdem lässt sich als positives Ergebnis festhalten, dass die Polyesterbildung aus ozonisierten Glyco-Norbornenderivaten zu funktionieren scheint und sich durch weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen als eine präparativ wertvolle Methode für die Synthese multivalenter Liganden mit definierter Struktur erweisen könnte.

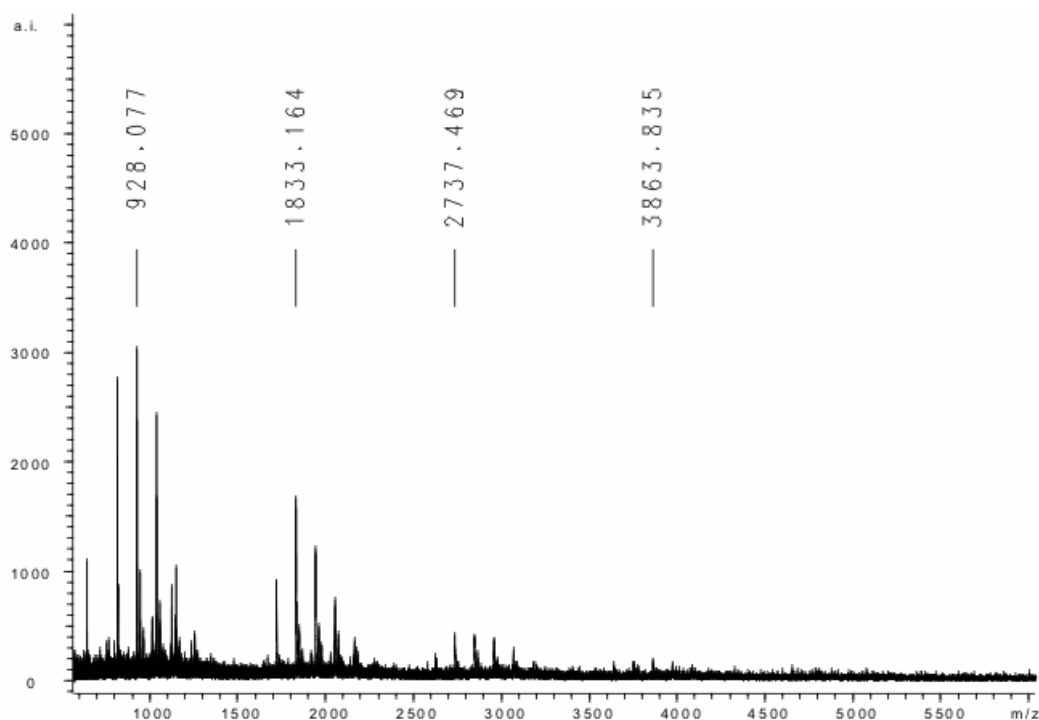


Abb. 35 MALDI-TOF-Massenspektrum des Polyesters **126**.

## 4. Biochemischer Teil

### 4.1 Zellkultur und Proteinisolierung

Für die biochemischen Untersuchung der synthetisierten Cluster-Mannoside sollte eine lösliche Form des MMR (s-MMR) isoliert werden, die den gesamten extrazellulären Teil des Rezeptors enthält.

Zu diesem Zweck sollte in Kooperation mit dem Forschungszentrum Borstel eine Zellkultur von CHO (*chinese hamster ovary*)-Zellen gezüchtet werden, die mit der cDNA des humanen Mannose-Makrophagen-Rezeptors modifiziert wurde.

CHO-Zellen eignen sich für eine stabile Expression von Proteinen mit säugetiertypischem Glykosylierungsmuster besonders gut. Sie lassen sich im großen Maßstab kultivieren, integrieren transfizierte Gene stabil in ihr Genom und können so, oft auch ohne permanenten Selektionsdruck (z.B. durch Methotrexat), das Zielgen hoch exprimieren.<sup>[93]</sup>

Für die Zellkultur wurde ein Stamm von Dihydrofolatreduktase (DHFR)-defizienten DXB11 CHO-Zellen verwendet, die mit einem entsprechenden Plasmid für den sMMR transfiziert waren. Hierzu wurde von Taylor et al.<sup>[46]</sup> die Region der MMR-cDNA entfernt, die für den Membran-Anker und den cytoplasmatischen Rest kodiert, was durch Schneiden am *Bsp*HI-Ort an Position 4210, gefolgt von Anfügen eines *Xba*I-Linkers, um ein Stop-Codon zu erzeugen, erfolgte. Die resultierende modifizierte cDNA kodiert für den gesamten extrazellulären Teil des Rezeptors, endend am Rest 1349 und wurde anschließend in den Vektor pED zwischen *Xba*I und *Eco*RI eingefügt, die der Region folgen, die für den Adenovirus späten (*major late*) Promotor (MLP) kodiert und der Region vorausgehen, die das Dihydrofolatreduktase-Gen kodieren.

Das resultierende Plasmid wurde dann in DXB11 CHO-Zellen transfiziert und mittels der DHFR-Methode wurden hochemprimierende Zellen selektiert. Bei der DHFR-Methode wird das Zielgen zusammen mit der DHFR-cDNA in DHFR-defiziente CHO-Zellen transfiziert und ermöglicht so deren Koselektion und Koamplifikation. Dihydrofolatreduktase katalysiert die Bildung von Tetrahydrofolat, das zur Synthese von Purinen, Aminosäuren und Nukleotiden benötigt wird. Mit Hilfe von Methotrexat (MTX), einem spezifischen DHFR-Inhibitor, können Zellen selektiert werden, die eine erhöhte Anzahl von Kopien des DHFR-Gens enthalten. Da Duplikationen des DHFR-Gens spontan auftreten, können über eine sukzessive Erhöhung der MTX-Konzentration im Medium Zellen selektiert werden, die durch

Amplifikation bis zu 1000 Gen-Kopien besitzen. Auch die direkte Umgebung des DHFR-Gens wird meist mit amplifiziert, so dass auch ein nicht selektierbares Gen koamplifiziert werden kann.<sup>[94]</sup>

Für die Produktion des Proteins wurden die Zellen in MEM Alpha Medium (*minimum essential  $\alpha$  medium*) ohne Nukleoside unter Zusatz von 10 % (v/v) dialysiertem fötalem Kalbs-Serum (FCS), 1 % (v/v) L-Glutamin, 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin-Stammlösung und 250  $\mu$ l Methotrexat pro 500 ml Medium bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in Sarstedt-Flaschen oder Petrischalen kultiviert.

Für alle Zellkulturarbeiten wurde dabei stets steriles Material benutzt und in partikelfreier Umgebung (Sterilwerkbank) gearbeitet. Der Umgang mit den transfizierten CHO-Zellen, die der Sicherheitsstufe 1 zugehören, erfolgte entsprechend der gesetzlichen Auflagen.

MEM Alpha Medium ist ein vollsynthetisches Medium, das hauptsächlich aus Aminosäuren, Vitaminen, anorganischen Salzen und Kohlenhydraten (*Earle's Salze*), sowie L-Glutamin besteht. Der Zusatz von FCS, das Hormone und Nährstoffe enthält, dient als zusätzlicher Wachstumsfaktor.

Bei den CHO-Zellen handelt es sich um adhärenz wachsende Zellen, die den MMR in das Kulturmedium abgeben. Für das Passagieren der Zellen wurde daher alle 3-4 Tage der Überstand abgenommen und bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden mit PBS (*phosphate buffered saline*)-Puffer gewaschen und anschließend durch Zusatz von Accutase und kurzer Inkubation bei 37°C von ihrer Unterlage abgelöst. Nach Überführung in ein Falcon-Röhrchen und Aufnehmen in PBS-Puffer erfolgte eine Verdünnung der Zellsuspension durch Zentrifugation, Aufnahme des Pellets in 3-4 ml Kulturmedium und Aussaat von 200  $\mu$ l (ca.  $2 \times 10^5$  Zellen) der Suspension in eine neue Sarstedt-Flasche mit 12 ml Medium.

Der MMR konnte aus dem Kulturmedium durch Affinitätschromatographie an Mannose-Sepharose-Gel isoliert werden. Hierfür wurde Sepharose 6B mit Divinylsulfon aktiviert und anschließend mit Mannose belegt. Eine kleine Chromatographiesäule wurde mit dem so modifizierten Material befüllt und mit Hilfe einer Peristaltikpumpe wurde das proteinhaltige Kulturmedium durch die Säule gepumpt. Zuvor wurde das Medium zur Entfernung von unlöslichen Zellbestandteilen zentrifugiert und es wurde u.a. Ca<sup>2+</sup> zugesetzt (Lade-Puffer), da die Bindung des MMR an Mannose Calcium-abhängig erfolgt. Um das Protein wieder von der Säule zu eluieren, wurde diese anschließend mit einem EDTA-haltigen Elutionspuffer gespült und die aufgefangenen Fraktionen wurden gesammelt und bei 4°C gekühlt gelagert.

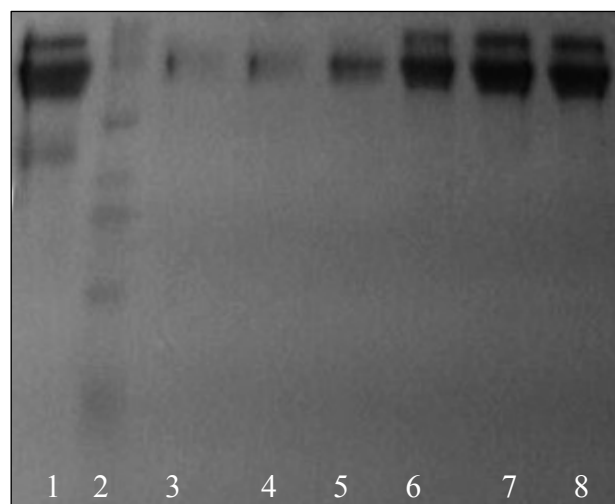
Für die Aufkonzentrierung des Proteins wurden die eluierten Fraktionen in ein Amicon Ultra Röhrchen mit einer Cellulose-Membran (*low binding regenerated cellulose*) gegeben, die Moleküle mit einem Molekulargewicht über 10 kDa zurückhält, und zentrifugiert. Anschließend wurde die Membran mit Lade-Puffer gespült und die proteinhaltige Lösung wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt.

Die Bestimmung der Menge an isoliertem Protein erfolgte nach der Methode von Bradford.<sup>[95]</sup> Hierfür wurde auf einer 96-Well Mikrotiterplatte zu den Proben das Färbereagenz, das aus Coomassie-Blau und Phosphorsäure in Ethanol/Wasser besteht, gegeben und die Absorption wurde bei 595 nm in einem ELISA-Reader gemessen.

Die Bestimmung der Protein-Menge ergab, dass sich ca. 800-1000 µg MMR-Protein aus 300-350 ml Kulturmedium isolieren ließen.

Die Reinheit des so gewonnenen Proteins wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Anfärben mit Coomassie-Blau bestimmt und zeigte neben der erwarteten Bande bei 180 kDa keine Verunreinigungen (Abb. 36).

Die zweite Spur enthält den Größenstandard, die Spuren drei bis acht die eluierten Fraktionen einer Affinitätschromatographie. Die schwache Bande über dem MMR in den Spuren sechs bis acht mit höherer Konzentration an Protein ist höchstwahrscheinlich keine Verunreinigung, sondern auf eine Überladung des Gels zurückzuführen. Die erste Spur enthält MMR, der bereits längere Zeit gelagert wurde. Hier ist unterhalb der Bande für den Rezeptor eine weitere schwache Bande zu erkennen, die wahrscheinlich von Zersetzungsprodukten herrührt.



**Abb. 36** SDS-PAGE des MMR nach Affinitätschromatographie. Spur 1: MMR, längere Zeit gelagert, Spur 2: Größenstandard, Spur 3 – 8: MMR, Fraktionen aus Affinitätschromatographie.

Das isolierte Protein sollte nun im Anschluss für Bindungsstudien mit den synthetisierten Cluster-Mannosiden durch Oberflächenplasmonenresonanz und Mikrokolorimetrie eingesetzt werden.

#### **4.2 Biacore-Messungen (SPR)**

Biacore-Systeme nutzen Oberflächenplasmonenresonanz<sup>[96]</sup> (*surface plasmon resonance*, SPR) als Prinzip, für die Messung von Interaktionen zwischen Biomolekülen.

Dabei ist einer der Reaktionspartner auf der Oberfläche eines Sensorchips immobilisiert (Ligand), während eine Probe des anderen Reaktionspartners (Analyt) über ein Mikrofluid-Kanalsystem mit konstanter Flussrate injiziert wird.

Die exakten Änderungen der Massen-Konzentrationen an der Oberfläche des Sensorchips als Folge von Assoziation und Dissoziation zwischen den Molekülen wird als SPR-Antwort gemessen und graphisch als Funktion der Zeit in einem Sensorgramm dargestellt.

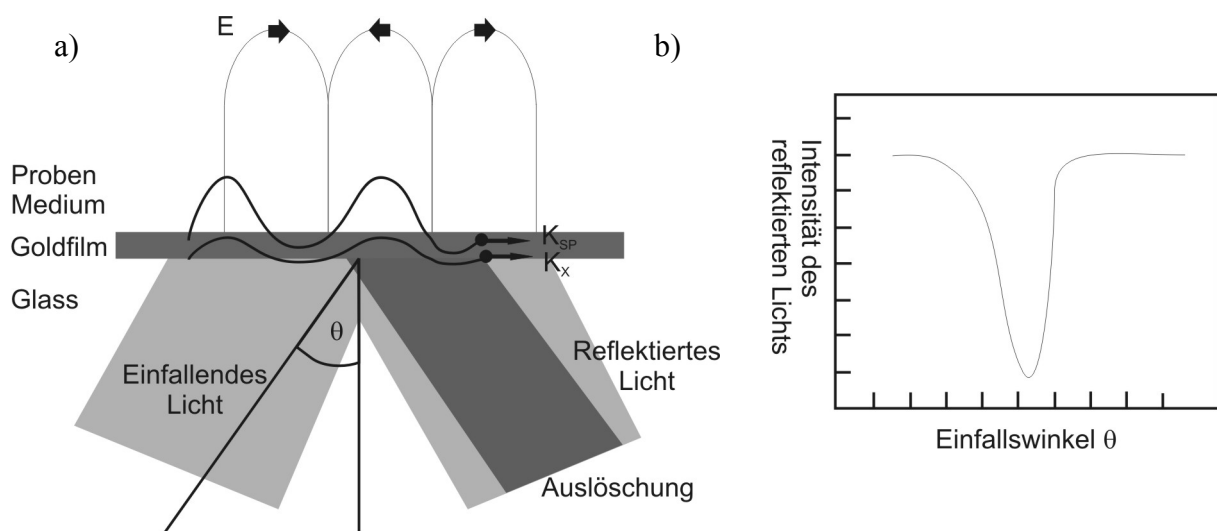
Ein Vorteil dieser Methode ist, dass die Messung der Interaktion von Biomolekülen ohne Markierung, z.B. durch ein Fluoreszenz-Label etc., in Real-Zeit erfolgen kann. Die Biacore-Technik erlaubt dabei nicht nur die Messung von Affinitäten im Gleichgewicht ( $K_D$ -, bzw.  $K_A$ -Werte), sondern auch die Messung von Geschwindigkeits-Konstanten für den Assoziations- bzw. Dissoziationsschritt ( $k_a$ , bzw.  $k_d$ ). Ein weiterer Vorteil der Methode ist, dass für die Messungen nur geringe Mengen an Probe benötigt werden.

Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) entsteht durch die Interaktion von Licht mit einer geeigneten Metall- oder Halbleiteroberfläche, durch die ein Quanten-optischer/-elektrischer Effekt ausgelöst wird. Eine umfassende Beschreibung des Prinzips der SPR findet sich bei Nagata und Handa.<sup>[97]</sup>

Unter bestimmten Bedingungen kann die Energie von Photonen auf Elektronen-Pakete der Metalloberfläche, Plasmonen genannt, übertragen werden. Dieser Energie-Transfer erfolgt bei einer spezifischen Wellenlänge des Lichts genau dann, wenn die Energie des Lichts exakt mit dem Energie-Niveau der Plasmonen übereinstimmt. Diese Resonanz-Wellenlänge kann durch Messung des von der Metalloberfläche reflektierten Lichts genau bestimmt werden, da die Metalloberfläche das einfallende Licht reflektiert. Nur das Licht mit der Wellenlänge, bei der Plasmonen angeregt werden, wird absorbiert. Die Wellenlänge, bei der ein Maximum des einfallenden Lichts absorbiert wird, wird als Resonanz Wellenlänge bezeichnet.

Eine alternative Methode für die Erzeugung von Oberflächenplasmonen ist die Nutzung von Licht mit einer einzigen Wellenlänge und Änderung des Einfallswinkels des Lichts auf die Metalloberfläche, wobei die maximale Absorption bei einem ganz bestimmten Einfallswinkel auftritt.

Plasmonen sind Elektronenwolken, die sich wie ein einziges geladenes Partikel verhalten. Ein Teil ihrer Energie drückt sich in Form von Schwingungen in der Ebene der Metalloberfläche aus, wodurch ein elektrisches Feld im Bereich von ca. 100 nm unter und über der Metalloberfläche induziert wird. Die Feldstärke nimmt dabei exponentiell mit der Entfernung zur Oberfläche ab. Dieses Feld wird als evaneszente Welle bezeichnet (Abb. 37a).



**Abb. 37** a) SPR-Anregung durch Totalreflexion von polarisiertem Licht, wenn die Moment-Vektoren des einfallenden Lichts in der Ebene der Metalloberfläche  $k_x$  und der Oberflächenplasmonen  $k_{SP}$  übereinstimmen.  $\theta$ : Einfallswinkel des Lichts;  $E$ : durch Plasmonen induziertes elektr. Feld. b) Abfall der Intensität des reflektierten Lichts durch SPR-Anregung.

Die Wechselwirkung zwischen dem elektrischen Feld und der Materie, die sich darin befindet, bestimmt die Wellenlänge, bzw. den Einfallswinkel, bei der das Licht mit den Plasmonen in Resonanz tritt. Jede Änderung der Zusammensetzung der Oberfläche ändert die Wellenlänge oder den Einfallswinkel, den SPR-Shift, und ist direkt und linear proportional zur Änderung der Oberflächenzusammensetzung.

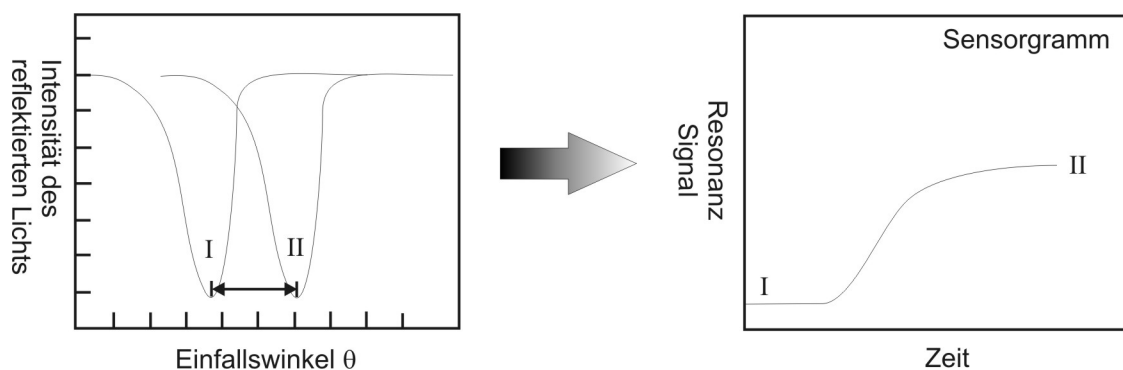
Drei Faktoren bestimmen die Resonanz-Wellenlänge, bzw. den Einfallswinkel: a) das Metall, b) die Struktur der Metalloberfläche und c) das Medium, das in Kontakt mit der Metalloberfläche steht.

Wie bereits beschrieben, hängt die Resonanzbedingung, die einen Energie-Transfer von den Photonen auf Plasmonen erlaubt, von der exakten Übereinstimmung der Energie-Momente von Photonen und Plasmonen ab. Jedoch findet sich keine Wellenlänge, die diese Bedingung für eine flache Metalloberfläche erfüllt.

Allerdings lässt sich das Moment von Photonen auf einfache Weise durch die Benutzung eines Prismas, das mit der Metalloberfläche in Kontakt gebracht wird, verändern. Überschreitet der Winkel  $\theta$  des einfallenden Lichts einen kritischen Winkel  $\theta_c$ , so tritt Totalreflexion auf und das Licht breitet sich entlang der Oberfläche des Prismas aus und kann mit der Metalloberfläche in Wechselwirkung treten.

Die Anregung von Oberflächenplasmonen an einer Grenzschicht zwischen einem Metall und einem Dielektrikum kann durch Messung des Reflexionsvermögens des Prismas als Funktion des Einfallswinkels von polarisiertem Licht gemessen werden. Bei einem bestimmten Winkel beobachtet man ein starkes Abfallen des Reflexionsvermögens, das mit der Anregung von Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche einhergeht (siehe auch Abb. 37b).

Bilden sich nun makromolekulare Komplexe an der Metall-Flüssigkeitsgrenzfläche, z.B. durch Immobilisierung eines Proteins oder Bindung eines Liganden an ein bereits immobilisiertes Protein, so kommt es zu einer Änderung des Brechungsindex, wodurch die evaneszente Welle gestört und die Ausbreitungs-Charakteristik der Plasmonen verändert wird. In Folge dessen ändert sich auch der Einfallswinkel des Lichts, bei der die Oberflächenplasmonen angeregt werden. So kann auf diese Weise die Änderung der Zusammensetzung der Oberfläche detektiert und quantifiziert werden (Abb. 38).



**Abb. 38** Änderung des Einfallswinkels  $\theta$  bei der SPR erfolgt durch Änderung der Zusammensetzung der Oberfläche und daraus resultierendes Sensorgramm.

Die Maßeinheit für das SPR-Signal ist die Resonanz-Einheit (*resonance unit*, RU), wobei 1000 RU eine Veränderung des Resonanzwinkels um  $0.1^\circ$  repräsentieren. Bei Proteinen entspricht eine Änderung von 1000 RU einer Änderung der Oberflächen-Konzentration von ca.  $1 \text{ ng/mm}^2$ . Das Detektionslimit liegt bei ca. 10 RU ( $10 \text{ pg/mm}^2$ ).

Ein typisches Sensorgramm ist in Abb. 39 dargestellt. Nach Immobilisierung des Liganden, z.B. einem Protein, wird der Analyt injiziert. Der starke Anstieg der Kurve im Sensorgramm zu Beginn der Messung kann durch den Bulk-Effekt erklärt werden, der durch die Änderung des Brechungsindex der durchströmenden Lösung entsteht. Durch Bindung des Analyten an



den Liganden ändert sich der Brechungsindex an der Sensoroberfläche und dadurch auch der Einfallswinkel  $\theta$  des Lichts um Oberflächenplasmonenresonanz zu erzeugen. Das Resonanzsignal steigt an, bis der Gleichgewichtszustand erreicht ist. Wird der Analyt jetzt durch Puffer-Lösung ersetzt, kommt es zur Dissoziation und das SPR-Signal sinkt wieder ab. Der nahezu senkrechte Teil der Kurve zu Beginn der Dissoziationsphase ist wiederum durch den Bulk-Effekt beim Wechsel des Lösungsmittels zu erklären. Nach der Messung wird der Sensorchip regeneriert und steht für eine neue Messung zur Verfügung.

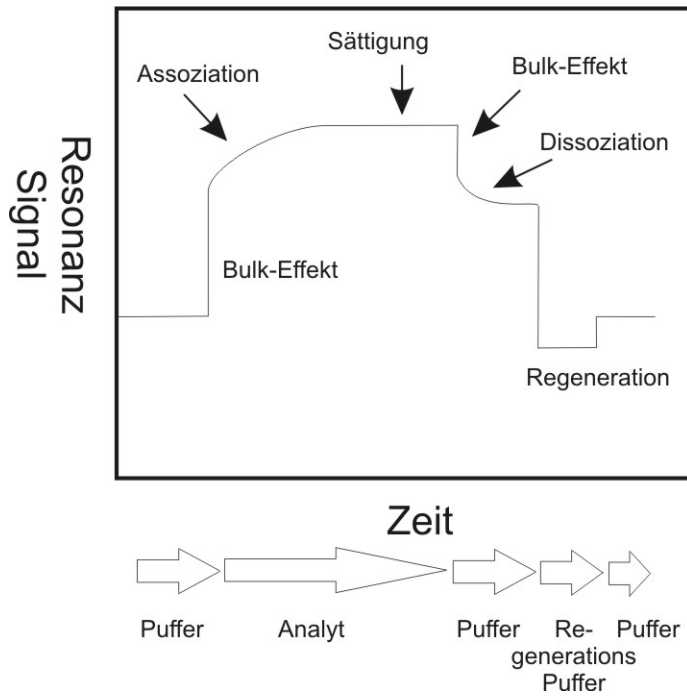


Abb. 39 SPR-Sensorgramm.

Die SPR-Messungen mit dem Mannose-Makrophagen-Rezeptor wurden an einem Biacore 3000-Gerät der Firma Biacore AB durchgeführt. Für die Immobilisierung des Rezeptors wurde ein Sensor-Chip vom Typ CM5 benutzt. Bei diesem häufig verwendeten Chip ist die Goldoberfläche mit einer Carboxymethyl-dextran-Schicht modifiziert (Abb. 40).

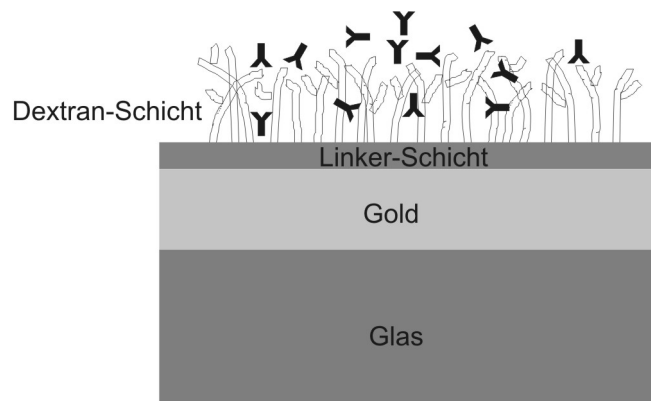
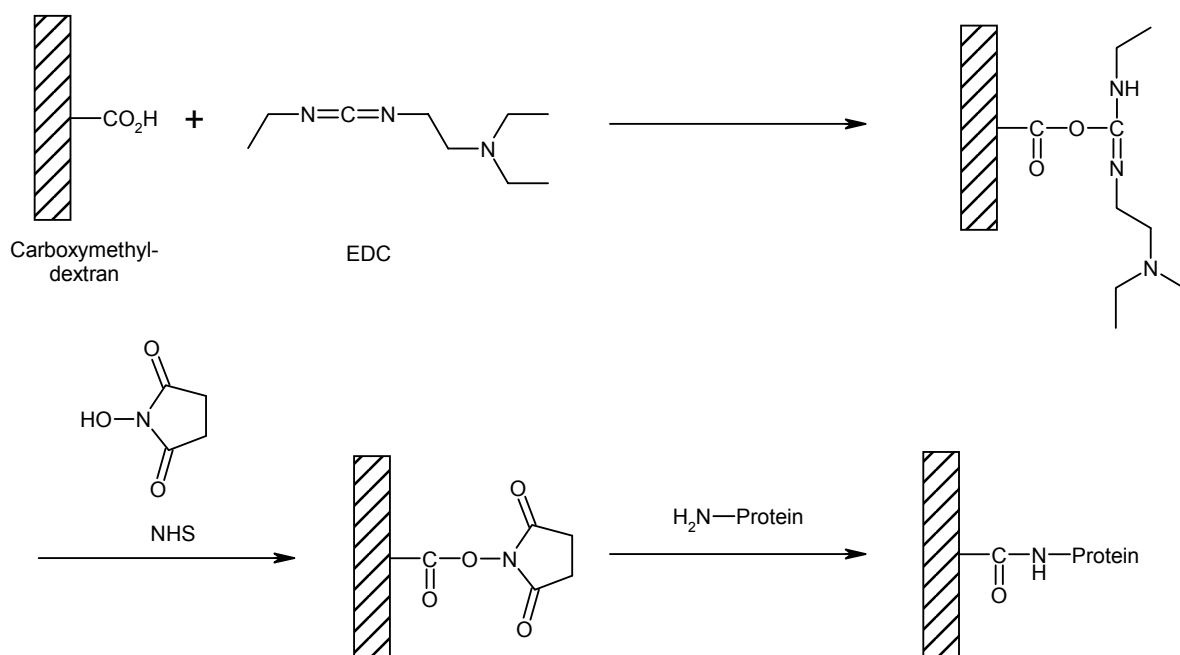


Abb. 40 Schematischer Aufbau eines Biacore-Sensorchips vom Typ CM5.

Die Immobilisierung des MMR auf dem Chip erfolgte durch Aktivierung der Carboxyl-Gruppen auf der Dextranoberfläche mit *N*-Ethyl-*N'*-(3-diethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS). Durch die Aktivierung bildet sich ein Aktivester, der dann mit primären Aminofunktionen des MMR-Proteins unter Bildung von kovalenten Amid-Bindungen reagieren kann (Schema 32).



**Schema 32** Aktivierung der Carboxyl-Gruppen des CM5-Chips mit EDC/NHS und Immobilisierung eines Proteins über primäre Aminofunktionen.

Anschließend wurden 20-100  $\mu\text{l}$  einer Lösung des MMR (100  $\mu\text{g/ml}$ ) in Acetat-Puffer (pH 4.5) über den aktivierten Sensorchip geleitet. Acetat-Puffer mit einem pH von 4.5 wurde verwendet, da bei diesem pH-Wert der MMR protoniert vorliegt ( $pI \approx 6$ ) und dadurch erheblich schneller mit der negativ geladenen Carboxymethyl-Dextran Oberfläche reagiert. Die Immobilisierung des MMR erfolgte bei 25°C und mit einer Flussrate von 5  $\mu\text{l/min}$ . Als Flussmittel wurde HEPES-Puffer mit 0.005% (v/v) Polysorbat unter Zusatz von 1 mM Ca<sup>2+</sup> verwendet. Nach der Belegung des Rezeptors wurden noch aktive Carboxyl-Funktionen durch Injektion von 150  $\mu\text{l}$  1M Ethanolamin abgesättigt. Da der CM5-Chip vier Messzellen besitzt, wurde die erste Zelle als Referenzzelle ohne Protein benutzt, die übrigen drei Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen an Rezeptor belegt, wodurch Belegungsdichten zwischen 6000 und 17500 RU realisiert werden konnten, was einer Menge von 6-17.5  $\text{ng/mm}^2$  an immobilisiertem Protein entspricht.

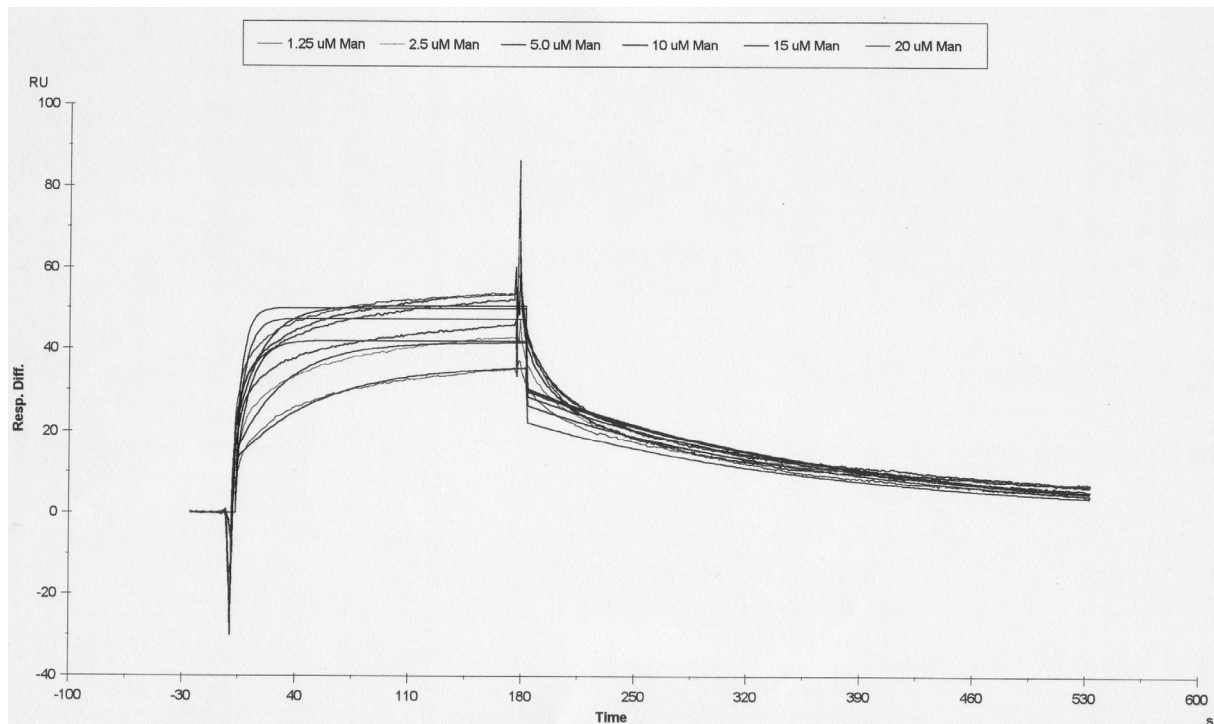
Der MMR ließ sich mittels der Carbodiimid-Methode gut immobilisieren, blieb bei hohen Konzentrationen jedoch nicht vollständig auf der Chip-Oberfläche gebunden, was an einer stetig abfallenden Basislinie im Sensorgramm zu erkennen war. Bei der mittleren und der niedrigen Belegungsdichte dagegen ist der MMR fest gebunden. Das „Ausbluten“ des Rezeptors bei hoher Belegung des Sensors ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass das Protein zum Teil nicht kovalent gebunden war, sondern nur mechanisch mit der Membran „verfilzt“ vorlag.

Für die Bindungsstudien mit dem MMR sollten zunächst D-Mannose als Positivkontrolle und D-Galactose als Negativkontrolle untersucht werden und später mannosyliertes Lipoarabinomannan (Man-LAM) als multivalenter Ligand.

Für die Messungen mit D-Mannose wurden bei einer Flussrate von 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  jeweils 30  $\mu\text{l}$  einer Lösung des Zuckers in HEPES-P mit 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  bei Konzentrationen zwischen 100  $\mu\text{M}$  und 5 mM injiziert. Überraschenderweise zeigten sowohl die Referenzzelle, wie auch die Messzellen eine Änderung des Brechungsindex, wobei die Referenzsignale sogar über den Werten der Messzellen lagen. Daraus resultierten sehr schwache bis negative Signale für die Messzellen nach Subtraktion der Referenz, die eine Weiterverarbeitung nicht als sinnvoll erschienen ließen. Bei der hohen Konzentration von 5 mM Mannose konnte nur ein unspezifisches Signal beobachtet werden, dessen Interpretation nicht möglich war.

Eine Wiederholung der Versuche unter Verwendung eines Calcium-freien HEPES-P Puffers mit Mannose-Konzentrationen zwischen 1.25 mM und 20 mM ergab geringfügig bessere Sensorgramme. Das  $\text{Ca}^{2+}$  im Puffer scheint die Messungen negativ zu beeinflussen, allerdings erfolgt die Bindung von Kohlenhydraten an den MMR Calcium-abhängig, so dass es nicht sicher ist, ob die gemessenen Änderungen des Brechungsindex von der Bindung der Mannose an den Rezeptor herrühren. Aus dem aufgezeichneten Sensorgramm (Abb. 41) lässt sich vermuten, dass die Mannose wahrscheinlich an den Rezeptor bindet, die Signale liegen aber nur knapp über der Rauschgrenze des Systems (4-9 RU). Aus den gemessenen Werten lässt sich daher weder eine Bindungskonstante ( $K_D$ ), noch die Reaktionskinetik ( $k_D$ ) bestimmen. Die Form der gemessenen Kurve („Blockdiagramme“) lässt jedoch eine schnelle Kinetik vermuten.

Die Untersuchung von D-Galactose in entsprechenden Konzentrationen zeigte wie erwartet ein noch schwächeres Signal unterhalb des Geräterauschens.

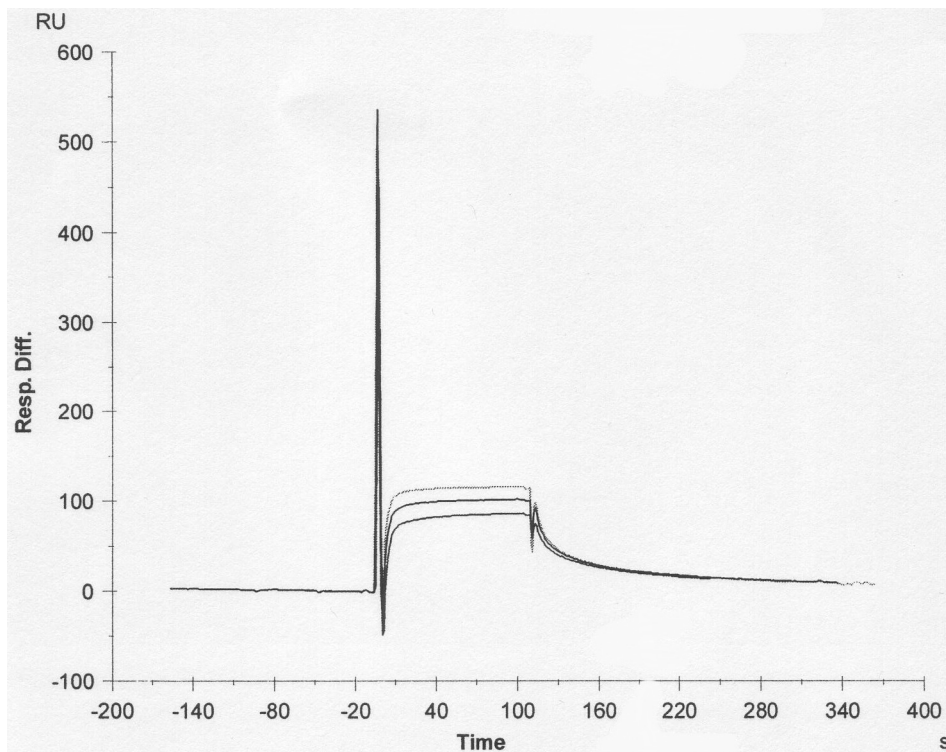


**Abb. 41** Sensorgramm der Injektionen von 1.25-20 mM D-Mannose in HEPES-P Puffer ohne  $\text{Ca}^{2+}$  mit einer Flussrate von  $10 \mu\text{l}/\text{min}$  bei  $25^\circ\text{C}$ .

Messungen mit Man-LAM ( $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; 1:1 Verdünnung der Stammlösung mit HEPES-P) ergaben nur eine unspezifische Bindung und waren stark verzerrt (Abb. 42). Diese Ergebnisse lassen sich wahrscheinlich durch Puffereffekte der für die Stammlösung verwendeten Puffer erklären, die das System stark beeinflussten. Da das Man-LAM jedoch nicht als Trockensubstanz vorlag, konnte die Messung nicht mit einem anderen Puffersystem wiederholt werden. Auch in diesem Fall ließen sich keine  $K_D$ -, bzw.  $k_D$ -Werte bestimmen, aus den erheblich stärkeren Signalen wurde aber geschlossen, dass Man-LAM gut an den MMR bindet, was auch zu erwarten war, da Man-LAM wahrscheinlich einer der natürlichen Liganden für den Rezeptor ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Untersuchung der Bindung von Liganden mit einem niedrigen Molekulargewicht an den MMR mit der verwendeten Versuchsanordnung nicht sinnvoll ist, da das Molekulargewicht des Proteins mit  $180 \text{ kDa}$  sehr groß ist und aufgrund der geringen Masseänderungen bei der Bindung die gemessenen Signale in der Folge zu klein werden. Liganden mit einem hohen Molekulargewicht, wie z.B. Man-LAM ( $M_w > 62 \text{ kDa}$ ) lassen sich dagegen gut untersuchen, wenn auch die Messbedingungen für die Bestimmung von Bindungskonstanten oder Kinetiken noch weiter optimiert werden müssen.

Eine Bestimmung von  $K_D$ -Werten niedermolekularer Substanzen mit Biacore ließe sich wohl über die Immobilisierung der zu untersuchenden Kohlenhydrate und Injektion des Proteins



**Abb. 42** Sensorgramm der Injektion von 6.25, 12.5 und 25 mM Man-LAM.

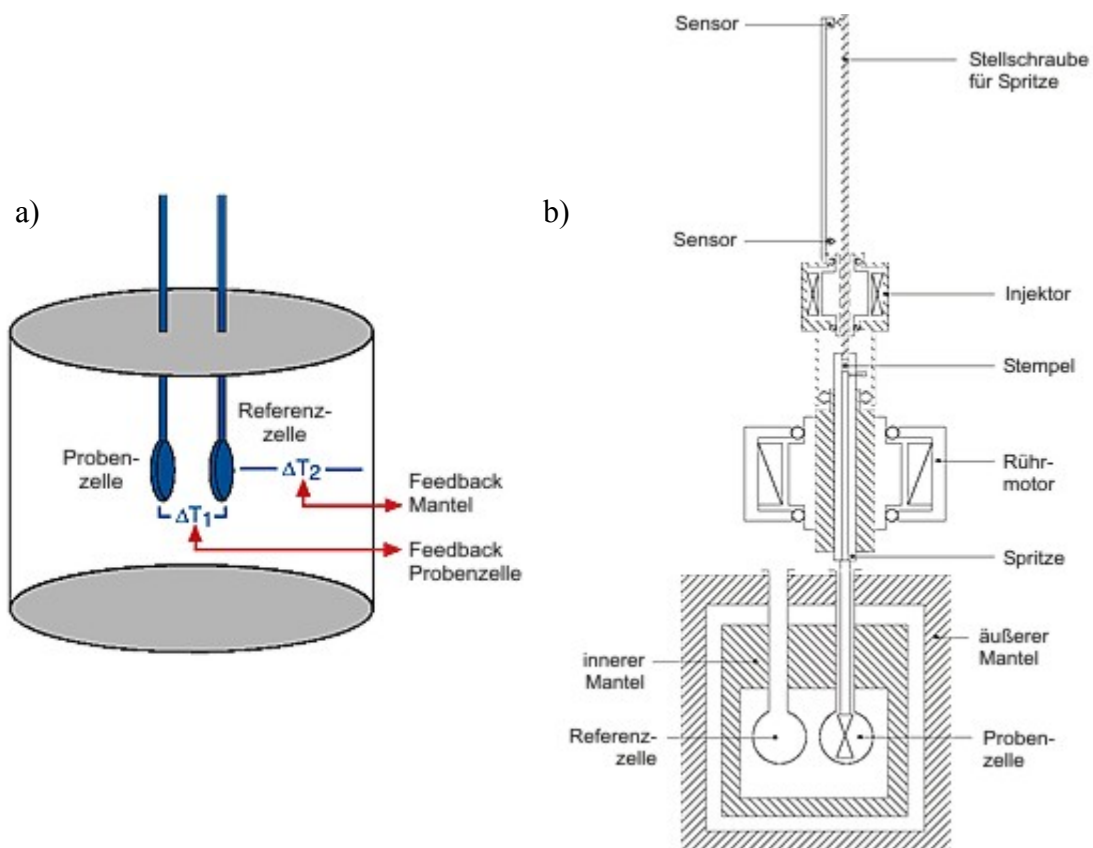
realisieren. Hierfür müssten die Liganden aber biotinyliert werden, um sie anschließend auf einem Streptavidin-modifizierten Sensorchip zu immobilisieren. Aufgrund fehlender Anknüpfungspunkte für Biotin an den in dieser Arbeit synthetisierten Cluster-Mannosiden und der sehr hohen Kosten für Streptavidin-Chips, wurde hiervon aber abgesehen.

### ***4.3 Isotherme-Titrationskalorimetrie (ITC)***

Jede chemische Reaktion ist mit der Aufnahme oder Abgabe von Wärme (freie Enthalpie  $\Delta H$  der Reaktion) verbunden. Diese Wärmeabgabe oder -aufnahme kann als Temperaturveränderung gemessen werden und wird bei der Isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) als Meßgröße für die Untersuchung der Interaktionen biologischer Makromoleküle genutzt.<sup>[98]</sup>

Wie auch bei den Biacore-Messungen ist bei der ITC keine Markierung der Probe nötig. Ein Vorteil der ITC gegenüber der Plasmonenresonanz ist, dass keiner der Reaktionspartner immobilisiert werden muss und prinzipiell beide Substanzen nach der Messung wieder zurückgewonnen werden können. Außerdem muss die Probe weder homogen noch optisch klar sein.

Für die Versuche wurde ein MCS-ITC der Firma MicroCal Inc. benutzt, das im Wesentlichen aus einer Referenzzelle, einer Probenzelle und einer Titrationspritze besteht. Die beiden Zellen besitzen eine sehr gute Wärmeleitfähigkeit und haben ein Volumen von 1.346 ml. Sie sind von einer isothermen Ummantelung umgeben und verfügen über Heizelemente zur Temperaturregelung und Wärmesensoren. Der gesamte Aufbau ist in einem gegen Außen isoliertem Mantel untergebracht (adiabatischer Schild). Über lange Röhren können beide Zellen befüllt werden. Mit einer Titrationsvorrichtung, bestehend aus einer Spritzenhalterung und einem Motor, der den Stempel der Spritze sehr präzise hinunterdrücken kann, können genau festgelegte Flüssigkeitsvolumina in die Probenzelle injiziert werden. Die Kanüle der Spritze ist lang ausgezogen und am unteren Ende als Rührer geformt, so dass durch kontinuierliches Drehen der Spritze eine gute Durchmischung der Reaktanden gewährleistet ist. Der schematische Aufbau eines Mikrokalorimeters ist in Abb. 43b dargestellt.



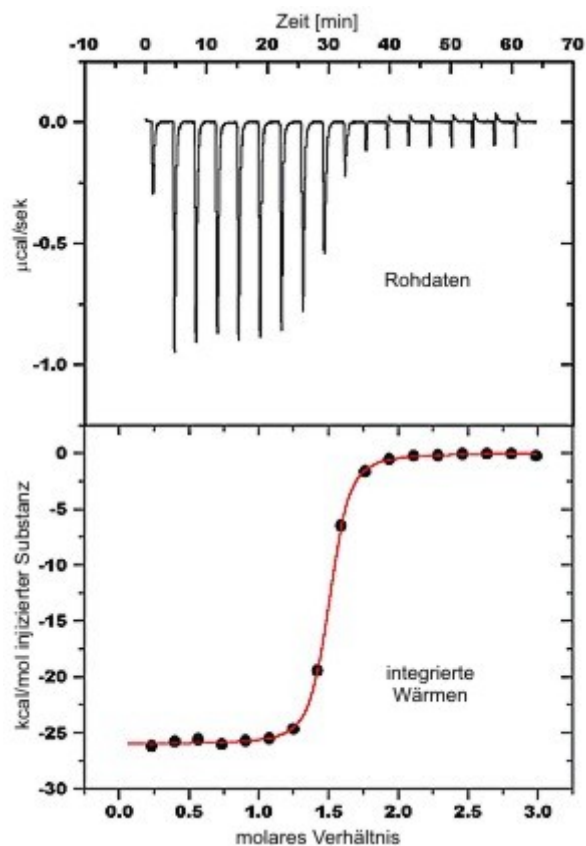
**Abb. 43** a) Prinzip der Isothermen Titrationskalorimetrie, b) Schematischer Aufbau eines Mikrokalorimeters.<sup>[100]</sup>

Das Messprinzip des ITC-Geräts beruht auf der ständigen Überwachung der Temperaturdifferenz zwischen Proben- und Messzelle. Die Probenzelle wird mit einer Lösung des einen Reaktanden, z.B. einem Protein, befüllt, die Referenzzelle in der Regel mit dem gleichen reinen Lösungsmittel. Anschließend wird eine Lösung des zweiten Reaktionspartners

in die Probenzelle titriert. Kommt es zu einer Auslenkung aus dem thermischen Gleichgewicht der beiden Zellen, d.h. findet eine Reaktion in der Probenzelle statt, wird dieser ein zur Temperaturdifferenz proportionaler Heizstrom zugeführt. Diese Regelleistung (*cell current feedback*, CFB) wird in Abhängigkeit von der Zeit gemessen und gibt die Wärmeänderung der Reaktion wieder. Eine exotherme Reaktion bewirkt eine Verringerung des CFB, bei einer endothermen Reaktion wird der Heizstrom verstärkt und jeweils als negativer oder positiver Peak registriert.<sup>[99]</sup>

Um sowohl exo- als auch endotherme Reaktionen kompensieren zu können, wird daher der Referenzzelle ein permanenter Heizstrom zugeführt.

Abbildung 44 zeigt den typischen Verlauf einer ITC-Messung. Im oberen Teil der Abbildung ist der zeitliche Verlauf der Leistung des Heizstroms gezeigt, die im Laufe der Reaktion zugeführt oder heruntergeregelt wird. Bei dem abgebildeten Beispiel handelt es sich um eine exotherme Reaktion, es muss weniger Leistung zugeführt werden und es entstehen negative Peaks. Durch Integration der Fläche unter den Peaks kann die bei jeder Zugabe eines Aliquots freigewordene Wärme bestimmt werden und man erhält die typische Bindungsisotherme, die im unteren Teil abgebildet ist. Durch Anpassen an Modelle lassen sich aus dieser Isotherme Bindungskonstanten für die Interaktion der Reaktionspartner ermitteln.



**Abb. 44** Beispiel für den zeitlichen Verlauf einer ITC-Messung und integrierte Bindungsisotherme für eine exotherme Reaktion.<sup>[100]</sup>

Als Testsystem für die Untersuchung der Interaktion zwischen dem MMR und Kohlenhydraten wurde  $\alpha$ -D-Methylmannosid verwendet.

Für die Messung wurde die Referenzzelle mit 1.5 ml entgastem Millipore-Wasser und die Probenzelle mit 1.5 ml einer ebenfalls entgasten 2.22  $\mu$ M Lösung des MMR (Lade-Puffer: 20 mM TRIS/HCl pH 7.8, 500 mM NaCl und 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ) befüllt.

Nachdem die kalorimetrische Einheit im thermischen Gleichgewicht war (in der Regel nach ca. 30 min) wurde die mit 100  $\mu$ l einer 75  $\mu$ M Lösung von  $\alpha$ -D-Methylmannosid (in Lade-Puffer) befüllten Spritze in die Probenzelle eingeführt. Nachdem erneut das thermische Gleichgewicht erreicht worden war, wurde die Reaktion gestartet. Die Zugabe des Methylmannosids erfolgte bei 27°C in 30 Aliquots zu je 3  $\mu$ l. Nach jeder Zugabe von Zucker wurde der entsprechende CFB aufgezeichnet und nach einer kurzen Relaxationszeit wurde die Titration wiederholt, bis die gesamte Mannosidlösung verbraucht war.

Zur Kontrolle wurde das Experiment ohne Protein in der Messzelle wiederholt, um Lösungsmittelleffekte ausschließen zu können. Hierfür wurde die Probenzelle nur mit der reinen Pufferlösung beschickt.

Die gemessenen Wärmesignale wurden im Anschluss mit Hilfe des Programms Origin 6.0 integriert und graphisch als Bindungsisotherme dargestellt.

Bei der Auswertung der Isothermen zeigte sich, dass die bei der Bindung des Kohlenhydrats an den MMR freigesetzten Wärmemengen nur sehr klein waren und im Bereich der Empfindlichkeitsgrenze des Geräts lagen. Außerdem konnte bei den Kontrollexperimenten wider Erwarten doch ein starker Lösungsmittelleffekt beobachtet werden, der jedoch nicht erklärt werden kann und der in den Messungen mit Protein die Bindungswärme überdecken könnte. Eventuell könnte es bei höheren Konzentrationen an Methylmannosid zur Bildung von Micellen kommen. Allerdings konnte beim Durchleuchten einer konzentrierten Lösung von Methylmannosid mit einem Laser keine Lichtstreuung infolge eines Tyndall-Effekts beobachtet werden, was gegen die Bildung von Micellen spricht.

Um den Lösungsmittelleffekt vielleicht überdecken zu können, wurde eine Messung mit wesentlich höheren Konzentrationen an Reaktionspartnern durchgeführt, wobei die freiwerdenden Wärmemengen größer sein sollten. Zu 1.5 ml einer 37  $\mu$ M Lösung des MMR wurden bei 27°C 30x 3  $\mu$ l einer 5.55 mM Lösung von  $\alpha$ -D-Methylmannosid titriert. Jedoch konnte auch bei dieser Messung keine brauchbare Bindungsisotherme erhalten werden.

Als weiterer Versuch, den Lösungsmittelleffekt zu umgehen, wurde ein reverses ITC-Experiment durchgeführt, bei dem eine Lösung des MMR in eine Lösung von



Methylmannosid titriert wurde. Aber auch dieses Experiment führte nicht zum gewünschten Erfolg.

Da sich bei den Versuchen keine reproduzierbaren und auswertbaren Isothermen gemessen werden konnten und sich die bei der Bindung des Methylmannosids an den MMR freiwerdenden Wärmemengen an der Nachweisgrenze des Geräts bewegten, wurden die ITC-Experimente nicht weiter fortgesetzt.

#### ***4.4 Ausblick: Entwicklung eines „ELISA“-Tests für den MMR***

Als günstige und empfindliche Alternative zu den durchgeführten Biacore- und ITC-Experimenten könnte ein abgewandelter kompetitiver ELISA-Test<sup>[101]</sup> zum Einsatz kommen.

Bei einem kompetitiven ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) wird, meist auf einer Mikrotiterplatte, ein Antikörper immobilisiert. Anschließend wird dann ein Gemisch aus dem zu testenden Antigen (Tracer) und einem weiteren niedermolekularen Antigen (Hapten), das z.B. mit einer Peroxidase oder alkalischen Phosphatase modifiziert ist, zugegeben. Beide Antigene konkurrieren um die Bindung an die immobilisierten Antikörper. Nach einem Waschschrift ist je nach Affinität des Tracers auch noch mehr oder weniger Hapten an die Antikörper gebunden. Diese gebundenen Antigene werden durch Zugabe eines Chromogens sichtbar gemacht: das zunächst farblose Substrat wird durch die Peroxidase oder Phosphatase in ein farbiges Endprodukt umgesetzt, das photometrisch mit einem ELISA-Reader quantifiziert werden kann.<sup>[102]</sup>

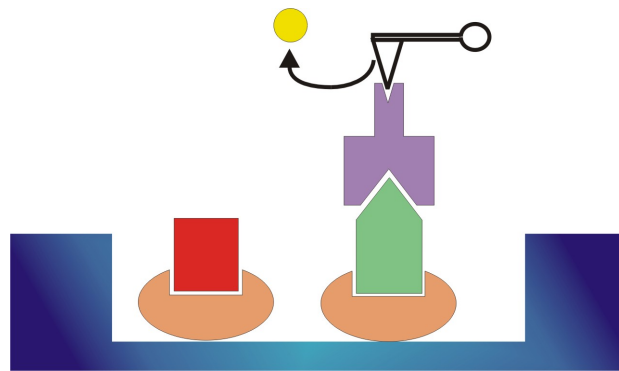
Ein ähnlicher Test ließe sich für die Untersuchung der Interaktion von Kohlenhydraten mit dem MMR etablieren. Das Prinzip des Tests mit dem relative Bindungskonstanten gemessen werden könnten, ist in Abb. 45 dargestellt.

Der MMR wird auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit einem Gemisch aus dem zu testenden Kohlenhydrat-Liganden und biotinylierter Ribonuklease B inkubiert. Ribonuklease B<sup>[103]</sup> ist ein Glycoprotein, von dem bekannt ist, dass es gut an den MMR bindet. Beide Substanzen konkurrieren um die Bindung an den MMR. Nach einem Waschschrift sind je nach Affinität des Test-Liganden noch unterschiedliche Mengen an biotinylierter Ribonuklease gebunden. Inkubation mit einem Konjugat aus Streptavidin und alkalischer Phosphatase führt zur Bindung des Komplexes an das Biotin. Gibt man nun farbloses p-Nitrophenolphosphat als chromogenes Substrat hinzu, so wird dieses von der Phosphatase

gespalten und es bildet sich in unterschiedlichen Intensitäten, je nach Menge der gebundenen Phosphatase, gelbes p-Nitrophenol. Die Intensität der Färbung kann dann photometrisch im ELISA-Reader gemessen werden und daraus für verschiedene Liganden (relative) Bindungskonstanten bestimmt werden.

Bei einem solchen Test handelt es sich streng betrachtet nicht um einen ELISA, da keine Antikörper verwendet werden. Genau genommen würde es sich um einen *enzyme linked receptor assay*, ELRA, handeln.

Leider blieb im Rahmen dieser Arbeit keine Zeit für die Etablierung eines solchen Testsystems, mit dem einfach, schnell und kostengünstig die Bindung einer großen Zahl von Liganden an den MMR getestet werden könnte.



**Abb. 45** Prinzip eines ELRA-Test für Bindungsuntersuchungen mit dem MMR. Blau: ELISA-Well, orange: MMR, rot: zu testender Ligand, grün: biotinylierte Ribonuklease B, lila: Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat, weiß: p-Nitrophenolphosphat, gelb: p-Nitrophenol.

#### 4.5 Bindung der Cluster-Mannoside an *FimH*

Ein Teil der in dieser Arbeit synthetisierten Cluster-Mannoside wurde an einem weiteren Lektin, dem FimH-Protein mittels Hämagglutinationstest und ELISA getestet.

Eine Reihe uropathogener *E. coli*-Stämme exprimiert Typ-I-Fimbrien<sup>[104]</sup>, die ein Hauptfaktor für die Virulenz dieser Bakterien sind.

Bei den Fimbrien handelt es sich um Proteinoligomere, die ein Mannose-spezifisches Lektin beinhalten. Sie bestehen aus vier Proteinen: FimA, einem Gerüstprotein, das mit 98% den größten Anteil im Oligomer hat und stabförmige Anhängsel an der äußeren Membran der Bakterien bildet, sowie FimG und FimF, zwei kleineren Proteinen, zwischen denen das eigentliche Lektin FimH verankert ist.<sup>[105]</sup>

FimH besitzt neben einer tiefen Bindungstasche höchstwahrscheinlich noch weitere Bindungstaschen und ist in der Lage multivalente mannosylierte Liganden mit hoher Affinität zu binden. In direkter Nähe der tiefen Bindungstasche befindet sich außerdem ein Tyrosin-„Tor“, das von zwei Tyrosin-Resten gebildet wird und das mit aromatischen Liganden zusätzliche  $\pi$ -Stacking-Interaktionen eingehen kann.<sup>[106]</sup>

Aufgrund dieser Voraussetzungen ist es interessant, die in dieser Arbeit hergestellten multivalenten Cluster-Mannoside auch an diesem Rezeptor zu testen.

In der Folge wurden fünf der synthetisierten Mannoside von O. Sperling mit einem Hämagglutinationstest mit Meerschweinchenerythrozyten und einem kompetitiven Sandwich-ELISA-Test auf ihre Bindung an das FimH-Protein untersucht.<sup>[107]</sup>

Für den Hämagglutinationstest<sup>[108]</sup> wurden die Meerschweinchenerythrozyten, die eine hohe Zahl von Mannosyl-Resten auf ihrer Oberfläche präsentieren, mit den zu testenden Inhibitoren und Fimbrien-exprimierenden Bakterien vermischt. Ohne Zugabe eines Inhibitors kommt es zu einer Vernetzung der Erythrozyten über die Fimbrien und dadurch zur Ausbildung eines Präzipitats. Gibt man eine inhibierende Substanz hinzu, so erfolgt keine Agglutination. Der Grad der Agglutination kann auf optischem Weg gemessen werden und aus diesen Daten lässt sich der Inhibitionstiter (IT in mol/l) bestimmen. Der IT gibt diejenige Konzentration an Ligand an, die gerade noch eine Agglutination erfolgreich inhibiert. Besser reproduzierbar ist jedoch der relative Inhibitionstiter RIT, der sich durch Beziehen auf einen Standard (hier  $\alpha$ -D-Methylmannosid, RIT = 1) erhalten lässt.

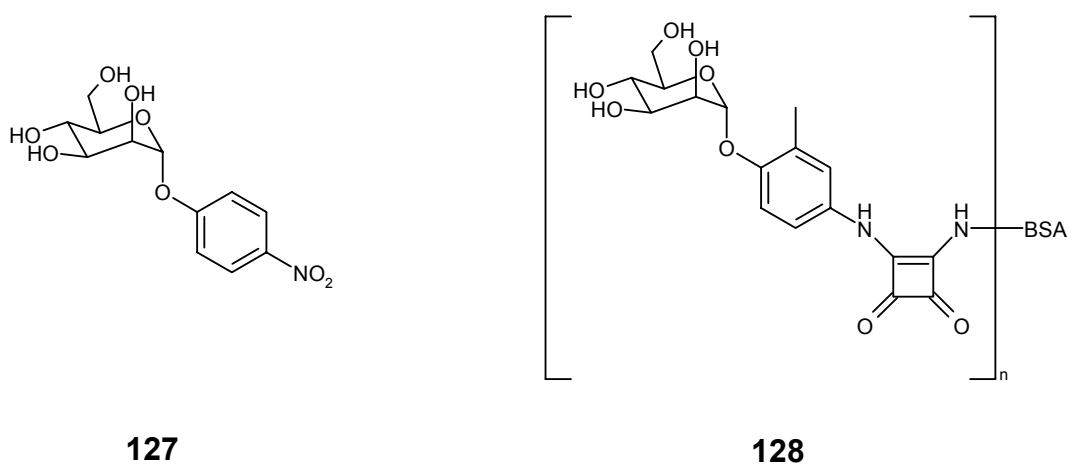
Für den kompetitiven ELISA wurde eine Mikrotiterplatte mit Mannan beschichtet und mit einem Gemisch aus Testsubstanz und Fimbrien-exprimierenden Bakterien inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde ein Antikörper gegen die Fimbrien zugegeben und anschließend ein weiterer Antikörper, der spezifisch gegen den ersten war und außerdem mit *horse raddish peroxidase* HRP modifiziert wurde. Zugabe von ABTS als chromogenem Substrat und  $H_2O_2$  führte dann zur Bildung eines grünen Farbstoffs, dessen Intensität photometrisch in einem ELISA-Reader gemessen wurde. Felder mit schwacher Inhibition wurden dabei intensiv grün gefärbt. Durch Auswertung der so gewonnenen Daten konnten  $IC_{50}$ -Werte, bzw.  $RIC_{50}$ -Werte für die Bindung der Cluster-Mannoside an FimH bestimmt werden. Als Bezugssubstanz für den  $RIC_{50}$  diente wieder  $\alpha$ -D-MeMan ( $RIC_{50}=1$ ).

Auf diese Weise wurden die divalenten Mannoside **51b**, **58b** und **59b**, mit einem aliphatischen C<sub>6</sub>-Spacer, einem aromatischen Spacer und einem wenig flexiblen Cyclohexyl-Spacer getestet, sowie die tetra-, bzw. octavalenten Cluster **97** und **103**. Die Ergebnisse der Hämagglutinationstests und des Sandwich-ELISAs sind in Tabelle 2 dargestellt.

Substanz	IT [μmol/l]	SD [μmol/l]	RIT	IC <sub>50</sub> [μmol/l]	SD [μmol/l]	RIC <sub>50</sub>	RIC <sub>50</sub> valenz- korrigiert
<b>51b</b>	2.1	1.3	232.5	51.3	39.5	111.6	55.8
<b>58b</b>	9.8	8.5	48.6	329	317	24.9	12.5
<b>59b</b>	5.2	4.6	91.8	24.0	9.3	205.1	102.6
<b>97</b>	2.8	1.8	169.8	89.6	67.1	65.0	16.3
<b>103</b>	3.8	1.3	124.8	-	-	-	-
<b>pNP-Man</b>	2.6	-	50	23	-	50	50

**Tabelle 2** Messung der RIT und RIC<sub>50</sub>-Werte der oligovalenten Cluster-Mannoside **51**, **58**, **59**, **97** und **103** für FimH durch Hämagglutinationstest und kompetitiven ELISA (bezogen auf α-D-MeMan: RIT/RIC<sub>50</sub> = 1). SD: Standardabweichung.

Von den getesteten Substanzen scheinen die beiden divalenten Cluster **51b** und **59b** am stärksten an FimH zu binden. Dieses Ergebnis ist insofern interessant, da es sich bei **51b** um eine Verbindung mit einem sehr flexiblen aliphatischen Spacer handelt, Verbindung **59b** aber einen starren Cyclohexyl-Spacer besitzt. Die beiden Substanzen binden ca. doppelt, bzw. viermal so stark an das FimH-Protein wie der literaturbekannte Standard-Inhibitor p-Nitrophenyl-mannosid **127**, der einen RIC<sub>50</sub> von 50 hat. Valenzbereinigt bindet die Verbindung **59b** doppelt so stark wie pNP-Man. Im Vergleich zu dem von Sperling synthetisierten Mannosyl-BSA-Konjugat **128**<sup>[107]</sup>, das einen RIC<sub>50</sub> von 58000 besitzt, relativiert sich die inhibitorische Potenz der beiden Substanzen jedoch schnell wieder. Der RIC<sub>50</sub>-Wert ist jedoch nicht valenzkorrigiert, da das Konjugat keine definierte Struktur besitzt.



**Abb. 46** pNP-Mannosid und Sperlings Mannosyl-BSA-Konjugat als FimH-Inhibitoren.

Überraschenderweise ist die Substanz **58b** mit einem aromatischen Spacer der schwächste der untersuchten Inhibitoren und bindet mit einem  $RIC_{50}$  von ca. 25 nur halb so gut wie pNP-Man, obwohl beide Substanzen an der anomeren OH-Gruppe der Mannose einen aromatischen Ring besitzen, der mit dem Tyrosin-Gate in Wechselwirkung treten kann. Eine weitere Ähnlichkeit besteht darin, dass beide Substanzen in geringer Entfernung zum aromatischen Rest funktionelle Gruppen besitzen, die über nichtbindende Elektronenpaare verfügen und die ebenfalls eine Rolle bei der Bindung an FimH spielen könnten. Die geringere Inhibition von **58b** gegenüber pNP-Man ist aber wahrscheinlich auf sterische Gründe zurückzuführen. Durch den Norbornenring und den zweiten Mannosyl-Substituenten von **58b** kann das Molekül eventuell keine günstige Position einnehmen, die eine gleichzeitige Bindung der Mannose in der tiefen Bindungstasche des Rezeptors und der Wechselwirkung des Aromaten mit dem Tyrosin-Gate erlaubt.

Auch die tetra- und octavalenten Cluster-Mannoside **97** und **103** besitzen enttäuschenderweise nur eine inhibitorische Potenz, die in der Größenordnung von pNP-Man liegt. Die schwache Bindung an das FimH-Protein könnte durch sterische Hinderung der sperrigen Cluster erklärt werden. Andererseits könnte aber auch die Hypothese über mehrere Bindungstaschen auf dem FimH nicht korrekt sein. Diese Vermutung müsste aber durch Molecular-Modelling-Studien und weitere Tests genauer untersucht werden.

## 5. Zusammenfassung

Tuberkulose, verursacht durch *Mycobacterium tuberculosis*, gehört zusammen mit HIV und Malaria zu den drei schwerwiegendsten Infektionskrankheiten weltweit. Es wird geschätzt, dass ein Drittel der Weltbevölkerung mit *M. tuberculosis* infiziert ist. In der Folge kommt es jedes Jahr zu ca. 8 Millionen Neuerkrankungen und 2 Millionen Todesfällen, mit stark steigender Tendenz. Auch treten immer häufiger Stämme von *M. tuberculosis* auf, die gegen alle bekannten Antibiotika resistent sind.

*M. tuberculosis* ist ein intrazelluläres Bakterium, dessen Vermehrung und Ausbreitung auf Makrophagen und dendritische Zellen beschränkt ist. Nach dem Einatmen erregerehaltiger Tröpfchen wird das Bakterium von alveolaren Makrophagen umschlossen und phagozytiert. Jedoch kommt es nicht zur Aktivierung der Makrophagen und zur Abtötung des Pathogens, sondern *M. tuberculosis* ist in der Lage innerhalb der Phagosomen im Makrophagen zu überleben und sich dort zu vermehren.

An der Phagocytose von *M. tuberculosis* ist eine Reihe von Rezeptoren auf der Oberfläche der Makrophagen beteiligt, die z.B. mit Glycokonjugaten auf der Zelloberfläche des Pathogens interagieren.

Einer dieser Rezeptoren ist der Mannose-spezifische Makrophagen-Rezeptor (MMR), der ein Typ-I-Transmembran-Protein ist und zur Mannose-Rezeptor-Familie gehört. Der MMR ist ein C-Typ-Lektin mit einem Molekulargewicht von 180 kDa, das Kohlenhydrate in Calcium-abhängiger Weise bindet. Der Rezeptor besitzt acht sequentiell angeordnete Kohlenhydrat-erkennende Domänen (CRDs), die eine hochaffine Bindung zu natürlichen Substraten, wie z.B. Man-LAM, durch eine multivalente Bindung der Liganden erreichen. Der MMR besitzt eine Spezifität für D-Man, L-Fuc, D-Glc und D-GlcNAc, bindet aber nicht D-Gal.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene mono- bis octavalente Cluster-Mannoside hergestellt, die als Inhibitoren für den MMR dienen können. Der MMR konnte in Kooperation durch Kultivierung von CHO-Zellen und Aufreinigung des Proteins aus dem Kulturmedium isoliert werden. Die Bindung verschiedener Mannoside an den MMR wurde mit Oberflächenplasmonenresonanz (SPR, Biacore) und Mikrokalorimetrie (ITC) untersucht.

Außerdem wurden mehrere der hergestellten Cluster-Mannoside mit einem Hämagglutinationstest und einem ELISA auf ihre Bindung an das FimH-Protein von *E. coli* getestet.

Als Core-Molekül für die Synthese der Glycocluster wurden drei verschiedene Norbornen-Derivate, **24**, **41** und **60**, mit passenden funktionellen Gruppen für die Anknüpfung von Mannosylresten verwendet. Da sich Norbornen mittels ringöffnender Metathese polymerisieren lässt (ROMP), sollte versucht werden, auf diese Weise die Avidität der oligovalenten Cluster zu erhöhen.

Über eine konvergente Synthese konnten durch Glycosylierung von Mannose mit verschiedenen Spacermolekülen und anschließender Mukaiyama-Veresterung mit den Norbornenderivaten unterschiedliche mono- und divalente Glycocluster in guten bis sehr guten Ausbeuten hergestellt, mittels präparativer HPLC aufgereinigt und durch NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie charakterisiert werden.

Die beiden tricyclischen Imide **28** und **64b** mit einem Mannosyl-Substituenten wurden durch Umsetzung von Norbornendicarbonsäureanhydrid mit Aminoethanol und anschließende Glycosylierung dargestellt.

Die erfolgreiche Synthese divalenter Mannoside mit aliphatischen Spacern mit Kettenlängen zwischen zwei und fünf Methylengruppen gelang durch ein simples Baukastensystem über eine Ozonisierungs-Reduktions-Sequenz, bzw. Hydroborierungs-Oxidations-Sequenz von Isopropyliden-geschütztem Allylmannosid oder Pentenylmannosid und anschließender Veresterung mit Norbornendicarbonsäureanhydrid. Deblockierung der Schutzgruppen lieferte die OH-freien Verbindungen **40**, **72**, **74**, **76** und **78** in überwiegend guten Ausbeuten.

Ein divalenter Ligand mit einem aliphatischen C<sub>6</sub>-Spacer wurde durch Ringöffnung von  $\epsilon$ -Caprolacton, Glycosylierung und Veresterung mit Norbornendimethanol dargestellt. Deblockierung der Verbindung ergab die OH-freie Substanz **51b**.

Neben den Verbindungen mit flexiblen aliphatischen Spacern wurden zwei weitere divalente Substanzen mit einem rigiden Cyclohexyl-Spacer und einem aromatischen Ring im Spacer synthetisiert. Die beiden entschützten Verbindungen **58b** und **59b** konnten durch eine Sequenz von Glycosylierung, Veresterung mit Norbornendimethanol und Deblockierung in befriedigenden Ausbeuten gewonnen werden.

Mit den Verbindungen **97** und **103** wurden durch Synthese von mannosylierten Glycerin-Glycodendrimeren der ersten und zweiten Generation und Mukaiyama-Veresterung der Dendrimere mit Norbornendicarbonsäureanhydrid auch zwei OH-freie tetra-, bzw.

octavalente Glycocluster hergestellt und mit HPLC aufgereinigt. Die beiden Dendrimer-Bausteine **95** und **101** konnten im Gramm-Maßstab mit sehr guten Ausbeuten synthetisiert werden.

Versuche, die hergestellten Substanzen durch ROMP mit RuCl<sub>3</sub> oder Grubbs-Katalysatoren der ersten oder zweiten Generation unter verschiedenen Reaktionsbedingungen umzusetzen, ergaben leider nicht die erhofften Glycopolymere. Lediglich bei der ROMP von **64** ließ sich die Bildung von oligomeren Strukturen im MALDI-TOF-MS nachweisen. Die Oligomere konnten jedoch weder durch HPLC noch durch GPC isoliert oder näher charakterisiert werden.

Eine Ozonisierungs-Reduktions-Sequenz der Doppelbindung des Norbornen-Rings der divalenten Verbindung **72** lieferte den bifunktionellen Alkohol **124a**, der mit Adipinsäuredichlorid zu einem Polyester umgesetzt wurde. Die Bildung von Oligomeren konnte im MALDI-TOF-MS beobachtet werden, die Substanzen ließen sich jedoch nicht weiter aufreinigen.

Neben den Monomeren für die ROMP wurde im Rahmen der Arbeit ein mannosyliertes Monomer für die acyclische Dien-Metathese (ADMET) hergestellt. Die Synthese von Glycopolymeren durch ADMET ist bisher in der Literatur noch nicht beschrieben worden. Versuche, die Verbindung **123** zu polymerisieren schlugen jedoch leider fehl, was eventuell durch einen negativen Nachbargruppeneffekt erklärt werden kann. Die ADMET von glycosylierten Dienen ist aber dennoch ein interessanter Ansatz für die Darstellung von Glycopolymeren mit einem definierten Abstand der Kohlenhydrat-Epitope.

Für die Testung der synthetisierten Substanzen wurde eine Zellkultur von CHO-Zellen (*chinese hamster ovary cells*) angelegt, die mit der cDNA des MMR transfiziert waren und den Rezeptor in das Kulturmedium exprimierten. Die Aufreinigung des Proteins gelang durch Affinitätschromatographie an Mannose-Sepharose im 1000 µg-Maßstab.

Für Bindungsstudien mit Oberflächenplasmonenresonanz (SPR, Biacore) wurde der MMR erfolgreich mit der EDC/NHS-Methode auf Carboxymethyldextran-Sensorchips des Typs CM5 immobilisiert. Die Untersuchung niedermolekularer Liganden war jedoch aufgrund der geringen Massenzunahme bei der Bindung an den MMR nicht erfolgreich, da die gemessenen Signale an der Rauschgrenze des Systems lagen. Bei Messungen mit Man-LAM wurden



bessere Sensorgramme gemessen, aus denen sich aber leider keine  $K_D$ -Werte bestimmen ließen. Für Biacore-Untersuchungen mit einem schweren Protein wie dem MMR wäre es besser, die Liganden zu immobilisieren und eine Lösung des Proteins zu injizieren, was aber aufgrund der Struktur der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen nicht möglich war.

Auch Versuche, Bindungskonstanten durch isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) zu bestimmen, waren durch die zu geringe Empfindlichkeit des Geräts und durch auftretende starke Lösungsmittelleffekte nicht erfolgreich.

Testung der Verbindungen **51b**, **58b**, **59b**, **97** und **103** mit FimH-Protein durch einen Hämagglutinationstest und Sandwich-ELISA ergab  $RIC_{50}$ -Werte, die in der Größenordnung von pNP-Mannosid liegen. Die divalente Verbindung **59b** mit einem rigiden Cyclohexyl-Spacer besitzt überraschenderweise den höchsten  $RIC_{50}$  der getesteten Verbindungen und inhibiert besser als die tetra- oder octavalenten Substanzen.

Abschließend lässt sich sagen, dass erfolgreich verschiedene OH-freie Cluster-Mannoside mit unterschiedlichen Spacer-Systemen dargestellt werden konnten, die nun für weitere Tests mit dem MMR oder anderen Lektinen zur Verfügung stehen.

Als empfindliches, einfaches Testsystem für die Zukunft könnte dabei z.B. ein Enzymgekoppelter Rezeptor-Assay (ELRA) entwickelt werden.

## 6. Summary

Tuberculosis, caused by *Mycobacterium tuberculosis*, still remains one of the top three fatal infectious diseases together with HIV and Malaria. One third of the whole human population is thought to be infected with *M. tuberculosis*, resulting every year in approximately 8 million new cases of tuberculosis and nearly 2 million deaths worldwide, with a growing tendency. Further on increasing incidences of multi-drug resistant strains of *M. tuberculosis* are worsening the problem.

*M. tuberculosis* is an intracellular bacterium whose replication and dissemination is restricted to macrophages and dendritic cells. Following the inhalation of mycobacteria loaded droplets, *M. tuberculosis* is engulfed by alveolar macrophages and internalised afterwards. However the macrophage's pathogen-killing mechanisms are not activated and *M. tuberculosis* is able to survive and replicate within the phagosomes of the macrophage.

A variety of host cell receptors, interacting e.g. with glycoconjugates on the outer bacterial cell wall, participate in the phagocytosis of the pathogen. One of these receptors is the mannose macrophage receptor (MMR). The MMR is a type-I transmembrane protein belonging to the mannose receptor family. The MMR is a 180 kDa C-type lectin, binding carbohydrates in a calcium-dependent manner. The receptor comprises a sequential array of eight carbohydrate recognition domains (CRDs), enabling high-affinity binding of natural ligands, e.g. Man-LAM, through multiple interactions between carbohydrate structures and the protein. The MMR exhibits specificity for D-Man, L-Fuc, D-Glc and D-GlcNAc, but does not bind D-Gal.

In the course of this thesis the synthesis of various mono- up to octavalent cluster-mannosides has been targeted, which could serve as inhibitors of the MMR.

In collaboration, the MMR protein was isolated by affinity-chromatography from the culture-medium of a cell-culture of CHO cells and binding of the synthesised compounds to the MMR was examined by surface plasmon resonance (SPR, Biacore) und microcalorimetry.

Further on several of the synthesised cluster mannosides were tested for binding to the FimH-protein of *E. coli* by hemagglutination and ELISA.

As core molecule for the synthesis of glycoclusters three different norbornen derivatives **24**, **41** and **60** have been chosen, possessing adequate functionality for attachment of mannosyl moieties. Norbornen can be polymerised via ring opening metathesis and thus it should be tried to increase the avidity of the oligovalent clusters using this method.

Different mono- and divalent glycoclusters were prepared in good to very good yields by a convergent synthesis strategy including the glycosidation of mannose with diverse spacer molecules and subsequent Mukaiyama esterification with the norbornen derivatives. The target compounds were purified using preparative HPLC and could be characterised with NMR spectroscopy and mass spectrometry.

The tricyclic imides **28** and **64b** bearing a single mannosyl substituent were synthesised by reaction of norbornendicarboxylic acid anhydride with aminoethanol and subsequent glycosidation with protected mannosyl trichloroacetimidate.

The synthesis of divalent mannosides with aliphatic spacer molecules possessing chain lengths between two and five methylene groups succeeded using a simple construction kit with an ozonolysis-reduction-sequence or a hydroboration-oxidation-sequence of isopropylidene-protected allylmannoside or n-pentenyl mannoside and following esterification with norbornen-dicarboxylic acid anhydride. Release of the carbohydrate protecting groups delivered the deprotected compounds **40**, **72**, **74**, **76** and **78** with more or less good yields.

The preparation of a divalent compound bearing a flexible aliphatic C<sub>6</sub>-spacer proceeded smoothly by ring opening of  $\epsilon$ -caprolacton, glycosidation and subsequent esterification with norbornendimethanol. Deprotection of the compound gave the substance **51b** with free OH-groups after HPLC purification.

Beside the compounds with flexible aliphatic spacer molecules two further divalent compounds have been prepared, one with a rigid cyclohexyl spacer and one with an aromatic ring system within the spacer. Both deprotected substances **58b** and **59b** could be synthesised with moderate yields by a reaction sequence of glycosidation, esterification with norbornendimethanol und deprotection of the carbohydrates.

With compounds **97** and **103** two deprotected tetra- and octavalent mannosylated glycoclusters have been prepared by synthesis of first and second generations of mannosylated glycerine glycodendrimers and Mukaiyama esterification of the dendrimers with norbornendicarboxylic acid anhydride. Both dendrimer building-blocks **95** and **101** were obtained with excellent yields on a multi-gram scale.

Unfortunately, all attempts to polymerise the synthesised compounds by ROMP using  $\text{RuCl}_3$  or first and second generation Grubb's catalysts under various reaction conditions failed and did not yield the expected glycopolymers. Solely ROMP of compound **64** showed formation of oligomeric structures using MALDI-TOF MS. However, no oligomers could be isolated by GPC or HPLC or characterised into detail.

By an ozonolysis-reduction-sequence of the olefinic bond of the norbornen ring in compound **72** the bifunctional alcohol **124a** was obtained and converted to an polyester with adipic acid dichloride. Using MALDI-TOF MS the formation of high molecular weight structures was observed but no oligomers could be isolated.

Beneath the ROMP-monomers a monomeric compound for acyclic dien metathesis polymerisation (ADMET) was prepared in the course of this thesis. The synthesis of glycopolymers using ADMET is not yet described in literature. Unfortunately, all efforts to polymerise monomer **123** failed, possibly due to negative neighbouring group effects (NGE). Nevertheless, ADMET of glycosylated diens is an interesting approach for the preparation of glycopolymers with defined distances between the carbohydrate epitopes.

For biological testing of the prepared compounds a cell culture of CHO-cells (*chinese hamster ovary cells*) transfected with MMR-cDNA was cultivated. Purification of the receptor protein from the cell culture medium was achieved by affinity chromatography with mannose-sepharose at a 1000  $\mu\text{g}$  scale.

The MMR was successfully immobilized for surface plasmon resonance (SPR, Biacore) measurements on CM5-type sensorchips with a carboxymethyl-dextran surface using the EDC/NHS-method. Although the immobilisation of the MMR proceeded without problems, measurements with low molecular weight ligands resulted in dissatisfying results, probably due to too-small mass changes at the sensor surface. The obtained signals were below the sensitivity of the Biacore system. Using Man-LAM as analyte, slightly better sensorgrams were obtained, but no  $K_D$  values could be calculated from the data. For Biacore measurements with high molecular weight proteins like the MMR, reverse-Biacore seems to be the better choice: by immobilisation of the ligand and injection of a protein-solution greater mass changes should be obtained. However, the structures of the synthesised compounds during

this thesis did not have adequate functionality to do so and therefore no attempts have been made to make reverse SPR experiments.

Efforts in determining  $K_D$  values with isothermal titration calorimetry (ITC) were inhibited by low sensitivity of the method and by the appearance of strong solvent effects.

Biological testing of compounds **51b**, **58b**, **59b**, **97** and **103** for binding to FimH protein using hemagglutination and sandwich ELISA gave  $RIC_{50}$  values in the range of pNP-Man. The divalent compound **59b** possessing a rigid cyclohexyl spacer surprisingly showed the highest  $RIC_{50}$  of the tested substances and shows higher inhibition than the tetra- and octavalent clusters.

In conclusion, a variety of deprotected cluster mannosides with diverse spacer moieties has been prepared. These compounds are now available for biological testing with the MMR or other lectins.

As a sensitive and simple test system an enzyme coupled receptor assay (ELRA) could be developed eventually.

## 7. Experimenteller Teil

### 7.1 Allgemeine Methoden

Alle Reaktionen wurden, falls nicht anders angegeben, unter normaler Laboratmosphäre durchgeführt. Für Reaktionen, die den Einsatz von Schlenk-Techniken erforderten, wurde über Calciumchlorid getrocknetes Argon als inertes Schutzgas verwendet und die verwendeten Apparaturen wurden gründlich im Ölpumpenvakuum ausgeheizt. Alle Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und wasserfreie Lösungsmittel wurden nach den üblichen Laboratoriumsmethoden getrocknet.<sup>[109]</sup> Dimethylformamid (DMF) wurde in wasserfreier Qualität von der Firma Fluka bezogen. Acetonitril (MeCN) für HPLC-Trennungen wurde in „HPLC Gradient-Grade“ von der Firma Acros bezogen. Entionisiertes Wasser wurde durch Behandlung von demineralisiertem Wasser in einer USF-ELGA Purelab Anlage gewonnen (Endwiderstand 18.2 MΩ/cm).

Ozonolysen wurden mit einem Niederdruckozonisator der Firma Sander Typ 301 mit  $I = 600$  mA durchgeführt.

Alle Reaktionen wurden dünnschichtchromatographisch auf Kieselgelfolie 60 F<sub>254</sub> der Firma Merck verfolgt. Die Detektion erfolgte abhängig von der Substanz unter UV-Licht oder durch Eintauchen in 10 %ige ethanolische Schwefelsäure oder schwefelsaure ethanolische Anisaldehydlösung (6 g Anisaldehyd in 250 ml Ethanol und 2.5 ml Schwefelsäure) und anschließende Wärmebehandlung.

Säulenchromatographische Trennungen erfolgten nach der Flash-Technik unter leichtem Überdruck mit Kieselgel 60 (230 – 400 mesh, Korngröße 40 – 63 μm) der Firma Merck.

Gelpermeationschromatographie wurde an Sephadex LH-20 der Firma Amersham-Pharmazia-Biotech mit Methanol als Lösungsmittel durchgeführt.

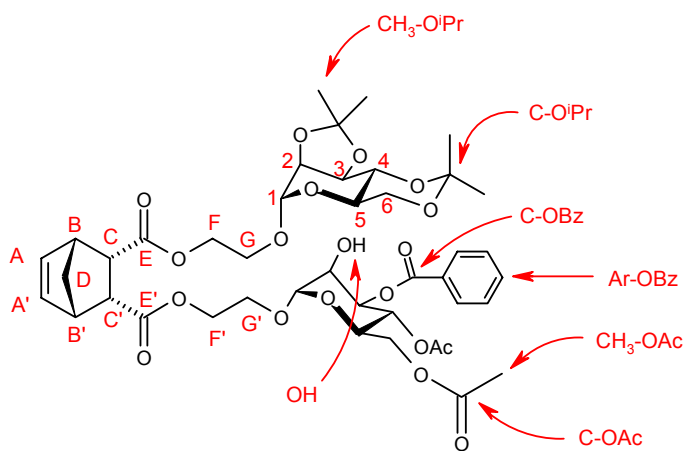
Analytische HPLC-Trennungen wurden mit einer Anlage der Firma Merck-Hitachi durchgeführt, bestehend aus einer Pumpe L-7100, einem Interface D-7000, einem Autosampler L-7200, einem Säulenumschaltventil Besta, einem Säulenofen L-7350, einem Dioden-Array-Detektor L-7455 und einem Brechungsindexdetektor L-7490. Für die Methodenentwicklung und Reinheitsüberprüfungen wurde eine LiChroCART 250-4 Säule, gepackt mit LiChrosorb RP-8 (7 μm), verwendet. Bei allen Messungen wurde der Säulenofen auf 30°C thermostatisiert. Als Software wurde die D-7000 Chromatography Data Station Software Version 4.1 eingesetzt.

Präparative HPLC-Trennungen wurden mit einer Anlage der Firma Shimadzu durchgeführt, bestehend aus einem Degasser DGU-14A, zwei Pumpen LC-8A mit nachgelagertem statischem Gradientenmischer, einem SPD-10A Dioden-Array Detektor, einem RID-10A Brechungsindexdetektor und einem SCL-10A Systemcontroller. Die Steuerung der Anlage erfolgte mit Hilfe der Shimadzu Class VP Software Version 6.12 SP2. Für die präparativen Trennungen wurde eine Hibar RT 250-25 Säule, gepackt mit LiChrosorb RP-8 (7  $\mu\text{m}$ ), verwendet.

Alle analytischen HPLC-Messungen wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt, alle präparativen Trennungen mit einer Flussrate von 10 ml/min. Die Detektion erfolgte in allen Fällen bei 210 nm. Präparative HPLC-Trennungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Messung von NMR-Spektren erfolgte an einem Bruker ARX 300 (300.13 MHz bei  $^1\text{H}$ , 75.47 MHz bei  $^{13}\text{C}$ ) und einem Bruker DRX 500 (500.13 MHz bei  $^1\text{H}$ , 125.75 MHz bei  $^{13}\text{C}$ ). In  $\text{CDCl}_3$  wurde TMS als interner Standard und in  $\text{D}_2\text{O}$  wurde DSS als externer Standard verwendet. In  $\text{D}_4$ -Methanol wurde auf die charakteristischen Lösungsmittelsignale (3.35 ppm für  $^1\text{H}$  und 49.3 ppm für  $^{13}\text{C}$ ) kalibriert. Zur genauen Zuordnung der Signale wurden, falls erforderlich, zweidimensionale NMR-Messungen vorgenommen ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY, HSQC, HMBC, NOESY).

Die Benennung der Protonen und Kohlenstoffatome der Norbornen-Cluster-Mannoside erfolgte nach folgendem Schema (Abbildung 47): Die Atome des Norbornen-Cores und der Linker wurden alphabetisch mit Großbuchstaben bezeichnet, beginnend mit der Doppelbindung des Norbornens.



**Abb. 47** Benennung der Atome für die Zuordnung im NMR-Spektrum.

Die Kohlenhydratatomen wurden mit Ziffern beginnend am anomeren Zentrum durchnummeriert. Atome von Schutzgruppen wurden mit den entsprechenden Kürzeln bezeichnet (z.B. O<sup>i</sup>Pr für Isopropyliden-Acetale), freie Hydroxygruppen mit OH und aromatische Atome mit Ar. Mit \* gekennzeichnete Atome sind nicht genau zuzuordnen und sind gegeneinander austauschbar.

Die Benennung der mannosylierten Glycerin-Glycodendrimere erfolgte analog der von Boysen entwickelten Nomenklatur.<sup>[78]</sup>

Bei einfachen Mannosiden wurden die Kohlenstoffatome des Kohlenhydratrings beginnend am anomeren Zentrum von 1-6 durchnummeriert und die Kohlenstoffatome des Aglykons mit Buchstaben von A-Z bezeichnet, beginnend mit dem Kohlenstoffatom, das am anomeren Zentrum des Zuckers sitzt.

CI- und EI-Massenspektren wurden auf einem Massenspektrometer MAT 8200 der Firma Finnigan aufgenommen. Als Kollisionsgas (CI) wurde Isobutan verwendet.

MALDI-TOF-Massenspektren wurden an einem Biflex III-Gerät der Firma Bruker mit 19 kV Beschleunigungsspannung aufgenommen. Als Matrices wurden Norharman (ges. Lösung in THF), DHB (c=10 µg/µl in MeCN/H<sub>2</sub>O 1:2 mit einem Zusatz von 0.1% TFA) oder CCA (c=20 µg/µl in MeCN/H<sub>2</sub>O 7:3 mit einem Zusatz von 0.1% TFA) verwendet. Die Ionisierung erfolgte mit einem Stickstofflaser bei 337 nm.

ESI-Massenspektren wurden auf einem Mariner ESI-TOF 5280 der Firma Applied Biosystems gemessen.

Die Reinheit der geschützten Endstufen wurde mittels analytischer HPLC bestimmt, da aufgrund des hygroskopischen Charakters der Verbindungen die Elementaranalysen nicht aussagekräftig waren.



## **7.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften**

### **AAV 1: Glycosylierung nach der Trichloracetimidat-Methode**

Zu einer Lösung des Akzeptoralkohols (1 eq) und des Trichloracetimidats (1.2 eq) in trockenem Dichlormethan (50 ml DCM/g TCI) werden bei 0°C 100-150 µl einer 0.02 M Lösung von TMSOTf in trockenem DCM gegeben. Anschließend wird die Reaktionsmischung solange bei Raumtemperatur gerührt, bis Dünnschichtchromatographie den vollständigen Umsatz des Alkohols anzeigt. Gegebenenfalls werden im Verlauf der Reaktion noch 100-150 µl TMSOTf-Lösung nachdosiert. Zur Aufarbeitung wird durch Zugabe von festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert, filtriert, eingeeengt und durch Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt.

### **AAV 2: Deacetylierung oder Debenzoylierung unter Zemplén-Bedingungen**

Die acetylierte oder benzoyleierte Verbindung wird in Methanol gelöst, mit 1 ml 0.1 M Natriummethanolatlösung in Methanol versetzt und über Nacht gerührt. Anschließend wird mit Amberlite IR-120 neutralisiert, filtriert und eingeeengt. Deacetylierte Verbindungen fallen in der Regel in guter Reinheit an, debenzoylierte Verbindungen werden mit Methanol an Sephadex LH-20 von dem Benzoessäuremethylester getrennt.

### **AAV 3: Schützen von $\alpha$ -D-Mannopyranosyl-haltigen Verbindungen als 2,3:4,6-Di-O-isopropyliden-Acetal<sup>[78]</sup>**

Eine Lösung des zu schützenden Mannosids in trockenem Aceton (10 ml pro g Mannosid) wird mit 2,2-Dimethoxypropan (10 ml pro g Mannosid) und *p*-Toluolsulfonsäure (50 mg pro g Mannosid) versetzt und bei Raumtemperatur für 8-12 h gerührt. Zur Aufarbeitung wird nach dem Zusatz von gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (2 ml pro g Mannosid) bis zur Trockene eingeeengt. Anschließend wird der Rückstand in Wasser aufgenommen und dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, eingeeengt und das Rohprodukt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt.

**AAV 4: Ozonolyse und Reduktion der Doppelbindung von Alkenylmannosiden zu Hydroxyfunktionen<sup>[78]</sup>**

Das Alkenylmannosid wird in trockenem MeOH/DCM 1:1 ( $c = 0.13 \text{ mol/l}$ ) gelöst und im EtOH/Trockeneisbad auf  $-78^\circ\text{C}$  gekühlt. Anschließend wird ein ozonhaltiger Gasstrom durch die Lösung geleitet, bis sie durch das Ozon eine blaue Farbe annimmt und Reaktionskontrolle durch DC den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigt. Überschüssiges Ozon wird durch 5-minütiges Spülen mit Sauerstoff sowie anschließendes 5-minütiges Einleiten eines kräftigen Argonstroms vertrieben. Danach wird die Reaktionsmischung mit 10 eq Natriumborhydrid versetzt und ca. 12 h gerührt, wobei ein langsames Erwärmen auf Raumtemperatur zugelassen wird. Zur Aufarbeitung wird gesättigte Ammoniumchloridlösung zugesetzt und für 1 h gerührt. Nach Trennung der Phasen wird die wässrige Phase drei mal mit DCM extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert, eingengt und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Die Zielverbindung fällt in der Regel rein an, so dass weitere Reinigungsschritte nicht nötig sind.

**AAV 5: Veresterung nach Mukaiyama<sup>[79]</sup>**

Zu einer Suspension des Anhydrids, 1.2 eq 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid (CMPI) und 0.4 eq DMAP in trockenem DCM (1.5 ml pro mmol Anhydrid) wird unter Argon eine Lösung von 2.5 eq des Alkohols in trockenem DCM (1 ml pro mmol) gegeben. Anschließend wird mit 3 eq Triethylamin versetzt und für 48-72 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird nach dem Zusatz von 50 ml Diethylether zweimal mit gesättigter Ammoniumchloridlösung und zweimal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, eingengt und das Rohprodukt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt.

**AAV 6: Entschützen von 2,3:4,6-Di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-haltigen Verbindungen**

Das Isopropyliden-geschützte Mannosid wird mit 10 ml MeOH/TFA 1:1 versetzt und bei Raumtemperatur für 1-3 h gerührt. Das Lösungsmittelgemisch wird anschließend bei Raumtemperatur am Rotationsverdampfer im Ölpumpenvakuum entfernt, der verbleibende Rückstand dreimal mit Toluol codestilliert, im Ölpumpenvakuum getrocknet und mittels präparativer HPLC an RP-8 Kieselgel gereinigt.

**AAV 7: Ringöffnende Metathese-Polymerisation (ROMP) mit  $\text{RuCl}_3$ <sup>[110]</sup>**

Zu einer Lösung von 100 mg Monomer in 2 ml sorgfältig entgastem entionisiertem Wasser werden unter Schlenk-Bedingungen 0.05-0.1 eq  $\text{RuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  gegeben und die dunkelbraune bis schwarze Lösung wird unter Schutzgas für 12-72 h bei 60°C gerührt. Die Reaktion wird dann durch Zugabe von 1 ml Ethylvinylether abgebrochen und die Reaktionsmischung wird durch einen Spritzenfilter filtriert. Es wurde versucht, gebildetes Polymer durch HPLC an RP-18 Kieselgel mit MeCN/H<sub>2</sub>O oder GPC an Sephadex LH-20 mit Methanol zu isolieren.

**AAV 8: Ringöffnende Metathese-Polymerisation (ROMP) mit Grubbs-Katalysator<sup>[111]</sup>**

Zu einer Lösung von 100 mg Monomer und 1.6 eq DTAB in 1 ml sorgfältig entgastem entionisiertem Wasser wird unter Schlenk-Bedingungen eine Lösung von 0.05-0.1 eq Grubbs-Katalysator **11** in 1 ml Dichlorethan gegeben und die dunkelviolette Emulsion wird unter Schutzgas für 12-72 h unter starkem Rühren auf 60°C erhitzt. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Ethylvinylether abgebrochen, die Reaktionsmischung wird durch einen Spritzenfilter filtriert und es wurde versucht, gebildetes Polymer durch HPLC an RP-18 Kieselgel mit MeCN/H<sub>2</sub>O oder GPC an Sephadex LH-20 mit Methanol zu isolieren.

**AAV 9: Hydroborierung der Doppelbindung von Alkenylmannosiden und Oxidation mit Hydroperoxid zur Hydroxyfunktion**

Eine Lösung des Alkenylmannosids in trockenem THF (30 ml pro 1 g Mannosid) wird mit 2 eq einer 0.5 M Lösung von 9-BBN in THF versetzt und für 1.5-4 h bei Raumtemperatur gerührt (Reaktionskontrolle durch DC). Nach Ende der Reaktion wird der Ansatz im Eisbad auf 0°C heruntergekühlt und überschüssiges 9-BBN durch Zugabe von Wasser (10 ml pro g Mannosid) zerstört. Anschließend werden bei gleicher Temperatur tropfenweise 7 eq einer 3 M Natriumacetatlösung und das gleiche Volumen einer Wasserstoffperoxidlösung (30 % in Wasser) zugegeben und der Ansatz für ca. 12 h Stunden gerührt, wobei ein langsames Erwärmen auf Raumtemperatur zugelassen wird. Zur Aufarbeitung wird zum Aussalzen des THFs bis zur Sättigung mit festem Natriumcarbonat versetzt. Anschließend werden die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit THF extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert, eingeeengt und das Rohprodukt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt.

**AAV 10: Williamsonsche Ethersynthese mit Methallyldichlorid (MDC)<sup>[78]</sup>**

Der zu verethernde Alkohol (3 eq) wird unter Schlenk-Bedingungen in abs. THF gelöst (c = 1 mol/l) und mit 3.13 eq Natriumhydrid (benutzt wird die entsprechende Menge einer 60 %igen Suspension von NaH in Mineralöl) versetzt. Anschließend wird langsam 1 eq MDC zugegeben und der Ansatz unter Schutzgas für 12-24 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird zum Abbruch der Reaktion Wasser zugegeben und die Mischung zum Aussalzen des THFs bis zur Sättigung mit festem Kaliumcarbonat versetzt. Anschließend werden die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert, eingengt und das Rohprodukt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt.

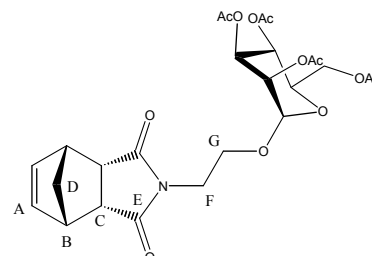
**AAV 11: Allylierung der Hydroxyfunktion<sup>[78]</sup>**

Die Hydroxyverbindung wird unter Schlenkbedingungen in abs. THF gelöst (c = 1 mol/l) und mit 1.11 eq Natriumhydrid (benutzt wird die entsprechende Menge einer 60 %igen Suspension von NaH in Mineralöl) versetzt. Anschließend werden 3 eq Allylbromid zugegeben und die Reaktionsmischung wird unter Schutzgas für 12-24 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird zum Abbruch der Reaktion Wasser hinzugegeben und die Mischung zum Aussalzen des THFs bis zur Sättigung mit festem Kaliumcarbonat versetzt. Anschließend werden die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingengt. Das reine Produkt wird nach Trocknen im Ölpumpenvakuum erhalten.

### 7.3 Einzelvorschriften

#### (2-endo,6-endo)-4-(2-[2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy]ethyl)-4-azatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]dec-8-en-3,5-dion (27)

Eine Lösung von 1.00 g (4.83 mmol) des Alkohols **25** und 5.77 g (12.06 mmol, 2.5 eq) peracetyliertem Mannosetrichloracetimidat **26** in 10 ml trockenem DCM wurde nach AAV 1 unter Schutzgas mit drei Tropfen TMSOTf versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 5 g festem Natriumhydrogencarbonat wurde abfiltriert und eingengt. Die Reinigung des Rückstands durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit EE:Cy 1:1  $\rightarrow$  2:1 lieferte das Produkt als farblosen Schaum.



Ausbeute: 1.61 g (2.30 mmol, 62%)

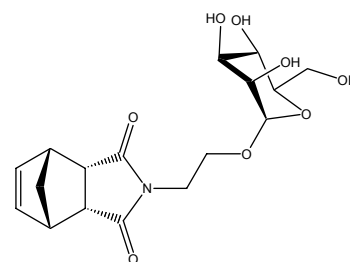
<sup>1</sup>H-NMR (300.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.56 (d, 1H, H-D), 1.76 (dt, 1H, H-D'), 1.99, 2.05, 2.11, 2.15 (je s, je 3H, OAc), 3.30 (dd, 2H, H-C,C'), 3.41 (m, 2H, H-B,B'), 3.55 – 3.74 (m, 4H, H-F,F', H-G,G'), 3.94 – 4.05 (ddd, 1H, H-5), 4.12 (dd, 1H, H-6), 4.27 (dd, 1H, H-6'), 4.83 (d, 1H, H-1), 5.19 (dd, 1H, H-2), 5.24 – 5.31 (m, 2H, H-3,4), 6.16 (dd  $\approx$  t, 2H, H-A,A') ppm; <sup>3</sup>J<sub>A,A'</sub> = 1.72 Hz, <sup>3</sup>J<sub>B,C</sub> = 1.50 Hz, <sup>3</sup>J<sub>B,D</sub> = 1.44 Hz, <sup>3</sup>J<sub>C,C'</sub> = 2.83 Hz, <sup>2</sup>J<sub>D,D'</sub> = 8.74 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 1.54 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2,3</sub> = 2.99 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4,5</sub> = 9.62 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5,6</sub> = 2.38 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5,6'</sub> = 5.36 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6,6'</sub> = 12.23 Hz;

<sup>13</sup>C-NMR (125.76 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 20.67, 20.73, 20.86 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-OAc), 37.19 (CH<sub>2</sub>, C-F), 44.94, 44.97 (CH, C-B,B'), 45.84, 45.88 (CH, C-C,C'), 52.28 (CH<sub>2</sub>, C-D), 62.46 (CH<sub>2</sub>, C-6), 63.67 (CH<sub>2</sub>, C-G), 65.97 (CH, C-4), 68.84 (CH, C-5), 68.99 (CH, C-3), 69.30 (CH, C-2), 96.93 (CH, C-1), 134.40, 134.48 (CH, C-A,A'), 169.72, 169.84, 169.90 (Cq, C-Carbonyl<sub>OAc</sub>), 177.47, 177.52 (Cq, C-E,E') ppm;

MALDI-TOF-MS:  $m/z$  = 560.4 [M+Na]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 560.51 für C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>12</sub>Na).

**(2-endo,6-endo)-4-(2-[ $\alpha$ -D-Mannopyranosyloxy]ethyl)-4-azatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]dec-8-en-3,5-dion (28)**

Eine Lösung von 3.78 g (7.03 mmol) der peracetylierten Verbindung **27** in 25 ml Methanol wurde mit 1.8 ml (1.8 mmol) Natriummethanolatlösung nach AAV 1 umgesetzt. Nach Aufarbeitung erhielt man das Produkt als farblosen Schaum.



Ausbeute: 2.51 g (6.77 mmol, 96%)

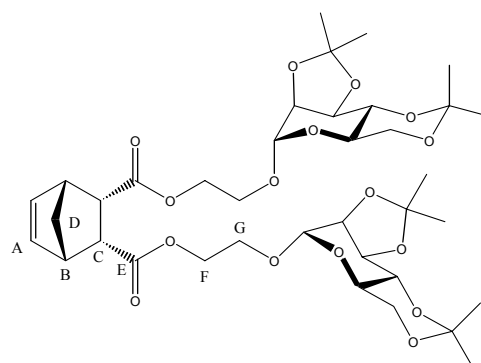
<sup>1</sup>H-NMR (500.13 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 1.65 (m, 1H, H-D), 1.74 (dt, 1H, H-D'), 3.35 (pseudo-q, 2H, H-B,B'), 3.40 (dd, 2H, H-C,C'), 3.45 – 3.50 (ddd, 1H, H-5), 3.51 – 3.74 (m, 7H, H-F,F', H-G,G', H-3, H-4, H-6'), 3.77 (dd, 1H, H-2), 3.85 (dd, 1H, H-6), 4.77 (d, 1H, H-1), 6.13 (dd, 2H, H-A,A') ppm; <sup>3</sup>J<sub>A,A'</sub> = 1.52 Hz, <sup>3</sup>J<sub>A,B</sub> = 3.58 Hz, <sup>3</sup>J<sub>B,C</sub> = 2.29 Hz, <sup>3</sup>J<sub>B,D</sub> = 1.63 Hz, <sup>3</sup>J<sub>C,C'</sub> = 4.53 Hz, <sup>2</sup>J<sub>D,D'</sub> = 8.69 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 1.77 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2,3</sub> = 3.23 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub> = 9.43 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4,5</sub> = 9.45 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5,6</sub> = 2.38 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5,6'</sub> = 5.72 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6,6'</sub> = 11.78 Hz Hz;

<sup>13</sup>C-NMR (125.76 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  = 38.62 (CH<sub>2</sub>, C-F), 46.02, 46.05 (CH, C-B,B'), 46.95, 47.02 (CH, C-C,C'), 53.07 (CH<sub>2</sub>, C-D), 62.83 (CH<sub>2</sub>, C-6), 64.35 (CH<sub>2</sub>, C-G), 68.44 (CH, C-4), 71.95 (CH, C-2), 72.41 (CH, C-3), 74.83 (CH, C-5), 100.19 (CH, C-1), 135.50, 135.52 (CH, C-A,A'), 179.79, 179.84 (Cq, C-E,E') ppm;

MALDI-TOF-MS:  $m/z$  = 392.3 [M+Na]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 392.36 für C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>8</sub>Na).

**(2-endo,3-endo)-Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarbonsäure-bis(2-[2,3:4,6-di-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy]ethyl)ester (30)**

Nach AAV 5 für die Veresterung nach Mukaiyama wurde zu einer Suspension von 491 mg (2.99 mmol) *endo*-Norbornendicarbonsäureanhydrid **24**, 917 mg (3.59 mmol) 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid und 147 mg (1.20 mmol) DMAP in 5 ml trockenem DCM unter Argon eine Lösung von 2.28 g (7.49 mmol) Isopropyliden-geschütztem Hydroxyethylmannosid **29**<sup>[78]</sup> in 5 ml trockenem DCM gegeben. Nach Zugabe von 1.7 ml (8.9 mmol) Tripropylamin



wurde über Nacht gerührt und anschließend wie angegeben aufgearbeitet. Die Reinigung des Rückstands durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit EE: Cy 1:4 → 1:1 lieferte drei Produkte.

Fraktion 1: 1.01 g (3.29 mmol) reisoliertes Edukt **29**, 44% der Ausgangsmenge

Fraktion 2: 94 mg (0.13 mmol, 4%) farbloser Schaum, isomere Zielverbindung **31**

Fraktion 3: 969 mg (1.29 mmol, 93%) farbloser Schaum, Zielverbindung **30**

(Die Ausbeuten von **30** und **31** sind auf den Umsatz von **29** bezogen.)

$^1\text{H-NMR}$  (500.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.33$  (s, 7H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ , H-D'\*), 1.39 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.46 (m, 1H, H-D\*), 1.49, 1.52 (s, je 6H  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 3.16, 3.19 (bs, je 1H, H-B,B'), 3.30, 3.36 (dd, je 1H, H-C,C'), 3.55 – 3.63, 3.69 – 3.75, 3.79 – 3.88 (m, 12H, H-G,G', 2x H-4,5,6,6'), 4.03 – 4.07, 4.09 – 4.19, 4.22 – 4.26 (m, 8H, H-F,F', 2x H-2,3), 5.02 (s, 2H, 2x H-1), 6.22, 6.27 (dd, je 1H, H-A,A') ppm;  $^3J_{A,A'} = 2.94$  Hz,  $^3J_{A,B} = 5.50$  Hz,  $^3J_{B,C} = 10.08$  Hz,  $^3J_{F,G} = 3.12$  Hz,  $^3J_{F,G'} = 6.42$  Hz,  $^2J_{F,F'} = 12.10$  Hz;

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 18.74$ , 26.12, 26.14, 28.13, 29.02 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 46.26, 46.45 (CH, C-B,B'), 47.98, 48.07 (CH, C-C,C'), 48.63 ( $\text{CH}_2$ , C-D), 61.36, 61.38 (CH, 2x C-5), 61.96, 61.98 ( $\text{CH}_2$ , 2x C-6), 63.06, 63.12 ( $\text{CH}_2$ , C-F,F'), 65.12, 65.33 ( $\text{CH}_2$ , C-G,G'), 72.64, 72.68 (CH, 2x C-4), 74.79 (CH, 2x C-3), 75.87, 75.89 (CH, C-2), 97.68, 97.83 (CH, C-1), 99.66 (Cq, C-O<sup>i</sup>Pr), 109.42, 109.43 (Cq, C-O<sup>i</sup>Pr), 134.69, 135.15 (CH, C-A,A'), 172.17, 172.30 (Cq, C-E,E') ppm;

MALDI-TOF-MS:  $m/z = 778.0$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup> (ber.  $m/z = 777.82$  für  $\text{C}_{37}\text{H}_{54}\text{O}_{16}\text{Na}$ ),  $m/z = 794.0$  [ $\text{M}+\text{K}$ ]<sup>+</sup> (ber.  $m/z = 793.92$  für  $\text{C}_{37}\text{H}_{54}\text{O}_{16}\text{K}$ ).

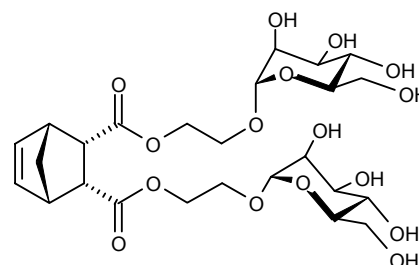
### Isomere Zielverbindung (*endo*, *exo*) **31**:

$^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.34$ , 1.41 (s, je 6H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.46 (m<sub>c</sub>, 1H, H-D\*), 1.50 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.54 (s, 7H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ , H-D'\*), 2.71-2.76 (m, 1H, H-C\*), 3.14, 3.31 (bs, je 1H, H-B,B'), 3.42 – 3.45 (m, 1H, H-C'\*), 3.52 – 3.91 (m, 12H, H-G,G', 2x H-4,5,6,6'), 4.12 – 4.38 (m, 8H, H-F,F'), 5.04 (d  $\approx$  s, 2H, H<sub>1</sub>), 6.07, 6.32 (dd, je 1H, H-A,A') ppm;  $^3J_{A,A'} = 3.09$  Hz,  $^3J_{A,B} = 5.53$  Hz;

MALDI-TOF-MS:  $m/z = 777.8$   $[M+Na]^+$  (ber.  $m/z = 777.82$  für  $C_{37}H_{54}O_{16}Na$ ),  $m/z = 793.8$   $[M+K]^+$  (ber.  $m/z = 793.92$  für  $C_{37}H_{54}O_{16}K$ ).

**(2-endo,3-endo)-Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarbonsäure-bis(2-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy]ethyl)ester (**40**)**

Nach AAV 6 wurden 470 mg (0.62 mmol) der Verbindung **30** umgesetzt und aufgearbeitet. Die Reinigung des Rückstands durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit EE:MeOH 9:1  $\rightarrow$  5:1 lieferte drei Produkte.



Fraktion 1: 120 mg (160  $\mu$ mol) reisoliertes Edukt **30**, 26% der Ausgangsmenge

Fraktion 2: 29 mg (43  $\mu$ mol, 7%) Verbindung mit zwei Isopropyliden-Gruppen

Fraktion 3: 213 mg (358  $\mu$ mol, 58%) farbloser hygroskopischer Feststoff, Zielverbindung **40**

$^1H$ -NMR (500.13 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 1.34$  ( $m_c$ , 1H, H-D'), 1.49 ( $m_c$ , 1H, H-D), 3.18, 3.21 (bs, je 1H, H-B,B'), 3.34, 3.36 (dd, je 1H, H-C,C'), 3.55 – 3.96 (m, 16H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6,6', H-G,G'), 4.18 ( $m_c$ , 2H, H-F'), 4.32 ( $m_c$ , 2H, H-F), 5.00 (d  $\approx$  s, H-1), 6.24 (dd  $\approx$  t, 2H, H-A,A') ppm;

$^{13}C$ -NMR (125.76 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 47.36$  ( $CH_2$ , C-D), 47.78, 47.96 (CH, C-B), 49.83, 49.94 (CH, C-C), 63.28, 63.30 ( $CH_2$ , C-6), 67.88, 67.94 ( $CH_2$ , C-F), 69.12, 69.16 (CH, C-4), 69.62, 69.83 ( $CH_2$ , C-G), 72.48, 72.50 (CH, C-2), 73.10 (CH, C-3), 75.11, 75.13 (CH, C-5), 99.89, 100.04 (CH, C-1), 132.87, 134.21 (CH, C-A), 172.34, 172.46 (Cq, C-E) ppm;

MALDI-TOF-MS:  $m/z = 617.65$   $[M+Na]^+$  (ber.  $m/z = 617.56$  für  $C_{25}H_{38}O_{16}Na$ ).

**Versuchte Ringöffnende Metathese-Polymerisation der Monomere **28** und **40****

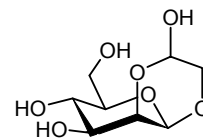
Je 100 mg der Monomere **28** bzw. **40** wurden nach AAV 7 oder AAV 8 umgesetzt und aufgearbeitet.

Die Untersuchung der Rohprodukte mit MALDI-TOF-MS zeigte keine Bildung von Polymeren.



### Versuchte Ozonisierungs-Oxidations-Sequenz von Isopropyliden-geschütztem Allylmannosid **43** zur Säure; Herstellung von **44**

Durch eine Lösung von 992 mg (3.30 mmol) Isopropyliden-geschütztem Allylmannosid **43** wurde bei  $-78^{\circ}\text{C}$  ein ozonhaltiger Gasstrom geleitet, bis die Lösung eine blaue Farbe angenommen hatte und Reaktionskontrolle durch DC den vollständigen Umsatz des Edukts



anzeigte. Überschüssiges Ozon wurde durch 5-minütiges Spülen mit Sauerstoff, sowie anschließendes 5-minütiges Einleiten eines kräftigen Argonstroms vertrieben. Danach wurde die Reaktionsmischung bei  $-78^{\circ}\text{C}$  mit 10 ml einer 33 %igen Wasserstoffperoxidlösung versetzt und über Nacht gerührt, wobei langsam auf Raumtemperatur erwärmt wurde. Nach Zugabe eines Tropfens Eisessig wurde die Reaktionsmischung 5 Minuten kräftig gerührt. Im Anschluss wurde weiteres Wasser hinzugegeben und nach Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase zweimal mit EE extrahiert, die vereinigten organischen Phasen zweimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingeeengt. Die Reinigung des Rückstands durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit DCM:MeOH 4:1 lieferte jedoch nicht die gewünschte Säure, sondern das Acetal **44** als gelbliches Öl.

Ausbeute: 75 mg (0.3 mmol, 9%)

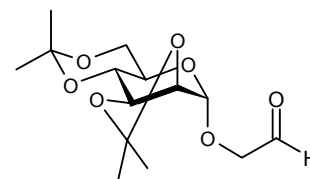
$^1\text{H-NMR}$  (500.13 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 3.47 (dd, 1H, H-6'), 3.59 – 3.68 (m, 3H, H-4, H-5, H-6), 3.71 (dd, 1H,  $\text{CH}_2$ -Acetal), 3.81 (dd, 1H, H-3), 3.87 (dd, 1H,  $\text{CH}_2$ '-Acetal), 3.96 (dd, 1H, H-2), 4.87 (d, 1H, H-1), 5.17 (dd, 1H,  $\text{CHOH}$ -Acetal) ppm;  $^3\text{J}_{1,2}$  = 1.79 Hz,  $^3\text{J}_{2,3}$  = 3.49 Hz,  $^3\text{J}_{3,4}$  = 9.34 Hz,  $^3\text{J}_{5,6}$  = 5.27 Hz,  $^2\text{J}_{6,6'}$  = 10.67 Hz,  $^3\text{J}_{\text{CHOH},\text{CH}_2}$  = 1.89 Hz,  $^3\text{J}_{\text{CHOH},\text{CH}_2'}$  = 5.81 Hz,  $^2\text{J}_{\text{CH}_2,\text{CH}_2'}$  = 12.17 Hz;

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.76 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 63.3 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2$ -Acetal), 69.1 (CH, C-4), 72.3 (CH, C-2), 72.5 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 72.8 (CH, C-3), 75.2 (CH, C-5), 90.7 (CH,  $\text{CHOH}$ -Acetal), 102.6 (CH, C-1) ppm;

MALDI-TOF-MS:  $m/z$  = 245.1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z$  = 245.18 für  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_7\text{Na}$ ),  $m/z$  = 261.3  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (ber.  $m/z$  = 261.29 für  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_7\text{K}$ ).

### Versuchte Lemieux-von Rudloff-Oxidation von Isopropyliden-geschütztem Allylmannosid **43** zur Säure; Herstellung von **45**

Zu einer Lösung von 992 mg (3.30 mmol) Isopropyliden-geschütztem Allylmannosid **43** in 7 ml Tetrachlorkohlenstoff, 7 ml MeCN und 10 ml Wasser wurden 3.04 g (13.20 mmol, 4 eq) Kaliumperiodat und 30 mg RuCl<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O (0.13 mmol, 0.04 eq)



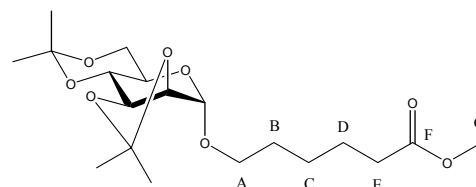
gegeben und die zweiphasige Reaktionsmischung wurde für 3 h bei Raumtemperatur kräftig gerührt. Anschließend wurde mit Dichlormethan verdünnt und über Celite filtriert. Das Filtrat wurde mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingengt. Die Reinigung des Rückstands durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Cy:EE 3:1 lieferte jedoch nicht die gewünschte Säure, sondern den Aldehyd **45**<sup>[112]</sup> als gelbliches Harz.

Ausbeute: 489 mg (1.62 mmol, 49%)

MALDI-TOF-MS:  $m/z = 325.39$  [M+Na]<sup>+</sup> (ber.  $m/z = 325.31$  für C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>Na),  $m/z = 341.40$  [M+K]<sup>+</sup> (ber.  $m/z = 341.42$  für C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>K).

### (5-Methoxycarbonyl)pentyl-2,3:4,6-di-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**49c**)

Nach AAV 3 wurden 1.08 g (3.50 mmol) des OH-freien Mannosids **49b**<sup>[113]</sup> über Nacht umgesetzt und wie angegeben aufgearbeitet. Die Reinigung des Rückstands durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit EE:Cy 1:2 lieferte das Produkt als farblosen Sirup.



Ausbeute: 873 mg (2.25 mmol, 64%)

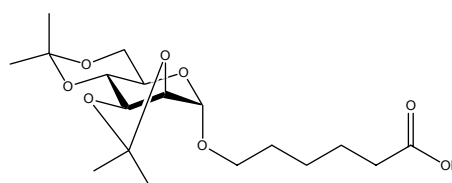
<sup>1</sup>H-NMR (500.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1.36$  (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 1.37 – 1.42 (m, 2H, H-A), 1.43 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 1.52 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 1.55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 1.57 -1.70 (m, 4H, H-3, H-D), 2.33 (t, 2H, H-E), 3.41 (m<sub>c</sub>, 1H, H-A'), 3.56 (m<sub>c</sub>, 1H, H-6'), 3.65 – 3.77 (m, 6H, H-4, H-5, H-A, H-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.86 (dd, 1H, H-6'), 4.15 (m<sub>c</sub>, 2H, H-2, H-3), 4.99 (s, 1H, H-1) ppm; <sup>3</sup>J<sub>5,6'</sub> = 5.65 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6,6'</sub> = 10.85 Hz, <sup>3</sup>J<sub>D,E</sub> = 7.49 Hz;

$^{13}\text{C}$ -NMR (125.76 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 18.79$  ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 24.66 ( $\text{CH}_2$ , C-D), 25.71 ( $\text{CH}_2$ , C-C), 26.13 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 28.17 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 29.06 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 29.07 ( $\text{CH}_2$ , C-B), 33.91 ( $\text{CH}_2$ , C-E), 51.44 ( $\text{CH}_3$ , C-G), 61.34 ( $\text{CH}$ , C-5), 61.12 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 67.58 ( $\text{CH}_2$ , C-A), 72.80 ( $\text{CH}$ , C-4), 74.93 ( $\text{CH}$ , C-3), 76.20 ( $\text{CH}$ , C-2), 97.83 ( $\text{CH}$ , C-1), 99.66 (Cq, C-O $^i$ Pr), 109.36 (Cq, C-O $^i$ Pr), 173.95 (Cq, C-F) ppm;

ESI-MS:  $m/z = 411.1968$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  (ber.  $m/z = 411.1995$  für  $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{NaO}_8$ ).

### 6-Carboxypentyl-2,3:4,6-di-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-mannopyranosid (50)

Zu einer Lösung von 800 mg (2.06 mmol) des Methylesters **49c** in 20 ml Wasser/MeOH 1:1 wurden 5 ml 2 N NaOH gegeben und es wurde 0.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 1 N



HCl vorsichtig neutralisiert und das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt. Gefrier-trocknung lieferte das Rohprodukt als farbloses Lyophilisat, das ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt wurde.

Ausbeute: 825 mg farbloser Feststoff (Gemisch aus Produkt und NaCl)

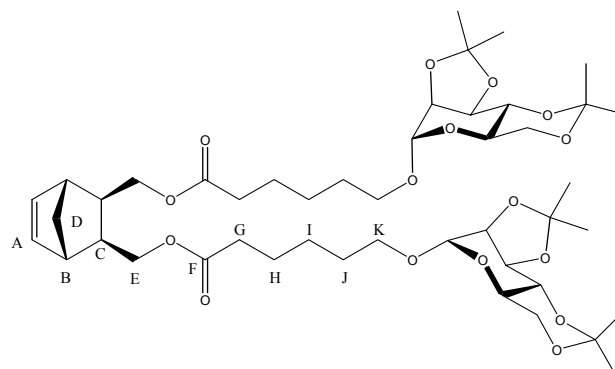
$^1\text{H}$ -NMR (500.13 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 1.36$  (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.39 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.45 (m, 2H, H-C,C'), 1.52 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.67 (m, 4H, H-B,B', H-D,D'), 2.27 (t, 2H, H-E,E'), 3.45 – 3.56 (m, 2H, H-5, H-A oder H-A'), 3.69 – 3.80 (m, 3H, H-4, H-6, H-A oder H-A'), 3.85 (dd, 1H, H-6'), 4.07 (dd, 1H, H-3), 4.19 (dd  $\approx$  d, 1H, H-2), 5.01 (d  $\approx$  s, 1H, H-1) ppm;  $^3\text{J}_{1,2} = 0.60$  Hz,  $^3\text{J}_{2,3} = 5.59$  Hz,  $^3\text{J}_{3,4} = 7.96$  Hz,  $^3\text{J}_{4,5} = 10.27$  Hz,  $^3\text{J}_{5,6'} = 5.75$  Hz,  $^2\text{J}_{6,6'} = 10.74$  Hz,  $^3\text{J}_{D,E} = 7.52$  Hz;

$^{13}\text{C}$ -NMR (125.76 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 19.17$  ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 26.49 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 26.80 ( $\text{CH}_2$ , C-D), 27.15 ( $\text{CH}_2$ , C-C), 28.43 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 29.47 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 30.67 ( $\text{CH}_2$ , C-B), 37.36 ( $\text{CH}_2$ , C-E), 62.62 ( $\text{CH}$ , C-5), 63.11 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 68.82 ( $\text{CH}$ , C-A), 74.18 ( $\text{CH}$ , C-4), 76.32 ( $\text{CH}$ , C-3), 77.58 ( $\text{CH}$ , C-2), 99.12 ( $\text{CH}$ , C-1), 100.83 (Cq, C-O $^i$ Pr), 110.45 (Cq, C-O $^i$ Pr), 180.58 (Cq, C-F) ppm;

ESI-MS:  $m/z = 397.1890$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  (ber.  $m/z = 397.1259$  für  $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_8\text{Na}$ ).

**6-(2,3:4,6-Di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy)hexansäure-((2-*exo*,3-*exo*)-3-  
 ({6-(2,3:4,6-di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy)hexanoyl}  
 oxy)methyl)bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-yl)ester (51a)**

Nach AAV 5 für die Veresterung nach Mukaiyama wurde zu einer Suspension von 500 mg (1.34 mmol) der Säure **50c**, 411 mg (1.61 mmol) 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid und 69 mg (1.2 mmol) DMAP in 5 ml trockenem DCM unter Argon eine Lösung von 94 mg (0.6 mmol) Norbornen-



dimethanol **41** in 5 ml trockenem DCM gegeben. Nach Zugabe von 0.6 ml (4.0 mmol) Triethylamin wurde über Nacht gerührt und anschließend wie angegeben aufgearbeitet. Die Reinigung des Rückstands durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit EE:Cy 1:2 lieferte das Produkt als farblosen Sirup.

Ausbeute: 364 mg (0.42 mmol, 69%)

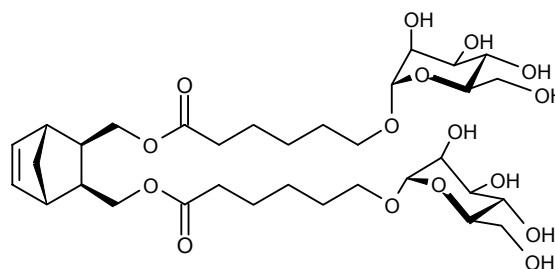
$^1\text{H-NMR}$  (500.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.35 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.36 -1.42 (m, 4H, H-I,I'), 1.43 (s, 7H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ , H-D\*), 1.52 (s, 7H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ , H-D'\*), 1.55 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.60 ( $m_c$ , 4H, H-J,J'), 1.67 ( $m_c$ , 4H, H-H,H'), 1.86 ( $m_c$ , 2H, H-C,C'), 2.34 (t, 4H, H-G,G'), 2.73 (pseudo-q, 2H, H-B,B'), 3.41 ( $m_c$ , 2H, H-K\*), 3.56 ( $m_c$ , 2H, H-6), 3.68 ( $m_c$ , 2H, H-K'\*), 3.73 – 3.77 (m, 4H, H-4, H-5), 3.87 (dd, 2H, H-6'), 4.02 (dd, 2H, H-E'\*), 4.11 – 4.17 (m, 4H, H-2, H-3), 4.24 (dd, 2H, H-E\*), 5.00 (d  $\approx$  s, 2H, H-1), 6.18 (dd  $\approx$  t, 2H, H-A,A') ppm;  $^3J_{5,6'}$  = 5.63 Hz,  $^2J_{6,6'}$  = 10.73 Hz,  $^3J_{A,A'}$  = 1.88 Hz,  $^3J_{C,E}$  = 5.74 Hz,  $^3J_{C,E'}$  = 8.71 Hz,  $^2J_{E,E'}$  = 1.02 Hz,  $^3J_{G,H}$  = 7.54 Hz;

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.76 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 18.80 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 24.71 ( $\text{CH}_2$ , C-H), 25.75 ( $\text{CH}_2$ , C-I), 26.17 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 26.92 ( $\text{CH}_2$ , C-J), 28.21 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 29.08 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 34.23 ( $\text{CH}_2$ , C-G), 39.77 (CH, C-C), 42.61 (CH, C-D), 44.79 (CH, C-D), 61.32 (CH, C-5), 62.13 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 65.30 ( $\text{CH}_2$ , C-E), 67.60 ( $\text{CH}_2$ , C-K), 72.80 (CH, C-4), 74.92 (CH, C-3), 76.19 (CH, C-2), 97.81 (CH, C-1), 99.69 (Cq, C-O<sup>i</sup>Pr), 109.40 (Cq, C-O<sup>i</sup>Pr), 137.30 (CH, C-A), 173.44 (Cq, C-F) ppm;

ESI-MS:  $m/z$  = 889.4617 [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 889.4556 für  $\text{C}_{45}\text{H}_{70}\text{O}_{16}\text{Na}$ ).

**6-( $\alpha$ -D-Mannopyranosyloxy)hexansäure-((2-*exo*,3-*exo*)-3-({6-( $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy)hexanoyl}oxy)methyl)bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-yl)ester (51b)**

Nach AAV 6 wurden 224 mg (0.26 mmol) der Isopropyliden-geschützten Verbindung **51a** umgesetzt und aufgearbeitet. Nach präparativer HPLC an RP-18 Kieselgel mit MeCN/H<sub>2</sub>O und Gefriertrocknung erhielt man die deblockierte Verbindung **51b** als farbloses, hygroskopisches Lyophilisat.



$t_r = 36.90$  min

Gradient: 10 % MeCN für 5 min, 10 %  $\rightarrow$  100 % MeCN in 60 min, 100% MeCN für 15 min

Ausbeute: 118 mg (0.17 mmol, 65%)

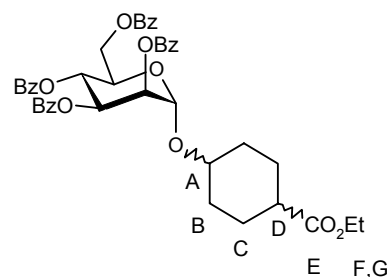
<sup>1</sup>H-NMR (500.13 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta = 1.31$  (m<sub>c</sub>, 1H, H-D\*), 1.39 (m<sub>c</sub>, 4H, H-I,I'), 1.54 – 1.67 (m, 9H, H-D'\*), H-H,H', H-J,J'), 1.83 (bs, 2H, H-C,C'), 2.37 (t, 4H, H-G,G'), 2.72 (bs, 2H, H-B,B'), 3.48 (m<sub>c</sub>, 2H, H-K'\*), 3.56 (m<sub>c</sub>, 2H, H-5), 3.66 – 3.79 (m, 8H, H-3, H-4, H-6, H-K\*), 3.83 (dd, 2H, H-6'), 3.89 (dd, 2H, H-2), 4.06 (m<sub>c</sub>, 2H, H-E'\*), 4.26 (m<sub>c</sub>, 2H, H-E\*), 4.84 (d, 2H, H-1), 6.18 (bs, 2H, H-A,A') ppm; <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 1.68 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2,3</sub> = 3.36 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5,6'</sub> = 3.55 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6,6'</sub> = 12.16 Hz, <sup>3</sup>J<sub>G,H</sub> = 7.40 Hz;

<sup>13</sup>C-NMR (125.76 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta = 26.90$  (CH<sub>2</sub>, C-J), 27.71 (CH<sub>2</sub>, C-I), 30.99 (CH<sub>2</sub>, C-H), 36.40 (CH<sub>2</sub>, C-G), 42.00 (CH, C-C), 45.00 (CH<sub>2</sub>, C-D), 47.19 (CH-B), 63.24 (CH<sub>2</sub>, C-6), 67.99 (CH<sub>2</sub>, C-E), 68.99 (CH, C-4), 69.73 (CH<sub>2</sub>, C-K), 72.65 (CH, C-2), 73.22 (CH, C-3), 75.13 (CH, C-5), 101.21 (CH, C-1), 139.85 (CH, C-A), 177.42 (Cq, C-F) ppm;

ESI-MS:  $m/z = 729.3407$  [M+Na]<sup>+</sup> (ber.  $m/z = 729.3304$  für C<sub>33</sub>H<sub>46</sub>O<sub>16</sub>Na),  $m/z = 1435.6867$  [M<sub>2</sub>+Na]<sup>+</sup> (ber.  $m/z = 1435.6716$  für C<sub>66</sub>H<sub>92</sub>O<sub>32</sub>Na).

**(4-Ethoxycarbonyl)cyclohexyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (53)**

Nach AAV 1 wurden 500 mg (2.82 mmol) 4-Hydroxy-1-cyclohexansäureethylester **52** mit 2.51 g (3.39 mmol; 1.2 eq) perbenzoyliertem Mannosetrichloracetimidat **48** in 5 ml DCM umgesetzt und aufgearbeitet. Die Reinigung des Rückstands durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit PE:EE 3:1 lieferte das Produkt als farbloses Öl.



Ausbeute: 1.33 g (1.77 mmol, 63%), Gemisch aus den Stereoisomeren

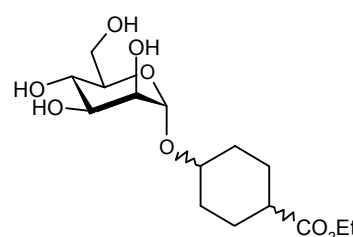
$^1\text{H-NMR}$  (500.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.21 - 1.31$  (m, 6H, 2x H-G), 1.36 -2.45 (m, 18H, 2x H-B, B', 2x H-C, C', 2x H-D), 3.71, 3.91 ( $m_c$ , 2H, 2x H-A), 4.10 - 4.21 (m, 4H, 2x H-F), 4.50 ( $m_c$ , 4H, 2x H-5, 2x H-6'), 4.68 ( $m_c$ , 2H, 2x H-6), 5.21 (d, 1H, H-1), 5.25 (d, 1H, H-1), 5.64 (dd, 1H, H-2), 5.66 (dd, 1H, H-2), 5.93 (dd, 2H, 2x H-3), 6.08 ( $m_c$ , 2H, 2x H-4), 7.23 - 7.29, 7.34 - 7.45, 7.48 - 7.62, 7.80 - 7.86, 7.95 - 8.00, 8.04 -8.11 (m, 40H, 8x H-Benzoyl) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.76 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 14.22, 14.28$  ( $\text{CH}_3$ , 2x C-G), 24.01, 24.23, 26.88, 27.01, 28.62, 30.49, 30.64, 32.32 ( $\text{CH}_2$ , 2x C-B, 2x C-C), 42.13 (CH, C-D), 60.32, 60.35 ( $\text{CH}_2$ , 2x C-F), 63.01, 63.11 ( $\text{CH}_2$ , 2x C-6), 67.08, 67.14 (CH, 2x C-4), 69.01, 69.10 (CH, 2x C-5), 70.07 (CH, C-3), 71.08, 71.15 (CH, C-2), 76.53 (CH, C-A), 96.07, 96.29 (CH, C-1), 128.29, 128.43, 128.58, 129.72, 129.83, 133.04, 133.13, 133.17, 133.44 (CH, CH-Benzoyl), 165.46, 165.53, 166.15 (Cq, C-Benzoyl), 174.96, 175.25 (Cq, 2x C-E) ppm;

MALDI-TOF-MS:  $m/z = 773.79$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z = 773.79$  für  $\text{C}_{43}\text{H}_{42}\text{O}_{12}\text{Na}$ ),  $m/z = 789.79$   $[\text{M}+\text{K}]^+$  (ber.  $m/z = 789.90$  für  $\text{C}_{43}\text{H}_{42}\text{O}_{12}\text{K}$ ).

**(4-Ethoxycarbonyl)cyclohexyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (54a)**

Nach AAV 2 wurden 1.33 g (1.77 mmol) des benzoylierten Mannosids **53** mit Natriumethanolat umgesetzt und aufgearbeitet. Nach Flash-chromatographischer Aufreinigung mit EE:MeOH 9:1 wurde die deblockierte Verbindung **54a** als farbloser Schaum isoliert.



Ausbeute: 545 mg (1.63 mmol, 92%), Gemisch aus den Stereoisomeren

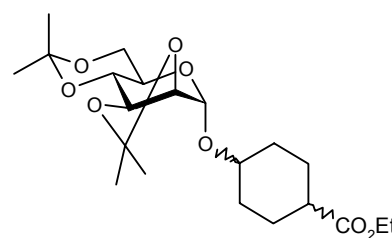
$^1\text{H-NMR}$  (500.13 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 1.28$  (2x dd, 6H, 2x H-G), 1.30 – 1.75, 1.82 – 1.95, 2.01 – 2.13, 2.29 – 2.35, 2.40 – 2.46 (m, 18H, 2x H-B,B', 2x H-C,C', 2x H-D), 3.64 (m, 4H, 2x H-6,6'), 3.67 – 3.76 (m, 4H, 2x H-4, 2x H-5), 3.77 (dd, 1H, H-2), 3.82 (dd, 1H, H-2), 3.85, 3.87 (dd, 2H, 2x H-3), 3.92 ( $m_c$ , 2H, 2x H-A), 4.17 ( $m_c$ , 4H, 2x H-F), 4.91 (d  $\approx$  s, 1H, H-1), 4.95 (d, 1H, H-1) ppm;  $^3J_{1,2} = 1.83$  Hz,  $^3J_{2,3} = 3.30$  Hz,  $^3J_{3,4} = 11.56$  Hz;

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.76 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 14.49, 14.52$  ( $\text{CH}_3$ , 2x C-G), 24.77, 25.12 ( $\text{CH}_2$ , 2x C-C), 28.03, 28.26 ( $\text{CH}_2$ , 2x C-B), 42.94, 43.53 ( $\text{CH}_2$ , 2x C-D), 61.41, 61.45 ( $\text{CH}_2$ , 2x C-F), 62.98, 63.01 ( $\text{CH}_2$ , 2x C-5), 72.37 (CH, C-A), 72.57, 72.64 (CH, 2x C-4), 72.67, 72.75 (CH, 2x C-2), 74.79, 74.89 (CH, 2x, C-3), 75.69 (CH, C-6), 99.61, 99.62 (CH, 2x C-1), 177.24, 177.29 (Cq, 2x C-E) ppm;

MALDI-TOF-MS:  $m/z = 357.31$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z = 357.36$  für  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_8\text{Na}$ ),  $m/z = 373.54$   $[\text{M}+\text{K}]^+$  (ber.  $m/z = 373.46$  für  $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_8\text{K}$ ).

#### (4-Ethoxycarbonyl)cyclohexyl-2,3:4,6-di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**54b**)

Nach AAV 3 wurden 531 mg (1.59 mmol) des OH-freien Mannosids **54a** umgesetzt und aufgearbeitet. Die Reinigung des Rückstands durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit EE: Cy 1:2 lieferte die Zielverbindung **54b** als hellgelben Sirup.



Ausbeute: 642 mg (1.54 mmol, 97%), Gemisch aus den Stereoisomeren

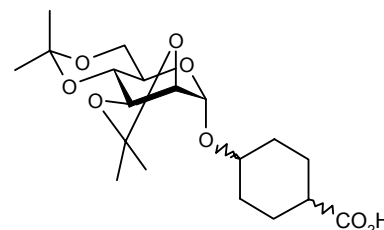
$^1\text{H-NMR}$  (500.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.21 - 1.26$  (m, 6H, 2x H-G), 1.32, 1.33 1.35, 1.41, 1.50, 1.53 (s, 24H, 8x  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.59 – 2.36 (m, 18H, 2x H-B,B', 2x H-C,C', 2x H-D), 3.53 -3.36, 3.70 – 3.75, 3.81 – 3.86 (m, 10H, 2x H-3, 2x H-4, 2x H-5, 2x H-6,6'), 4.08 -4.15 (m, 8H, 2x H-2, 2x H-A, 2x H-F), 5.11 (s, 1H, H-1), 5.15 (s, 1H, H-1) ppm;

$^{13}\text{C}$ -NMR (125.76 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 14.21 ( $\text{CH}_3$ , C-G), 18.78 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 23.60, 23.96 ( $\text{CH}_2$ , 2x C-C), 26.17, 26.23, 28.24, 28.21, 29.07 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 30.35, 30.70 ( $\text{CH}_2$ , 2x C-B), 42.23 ( $\text{CH}$ , C-D), 60.26, 60.03 ( $\text{CH}_2$ , 2x C-F), 61.41 ( $\text{CH}$ , C-5), 62.06, 62.07 ( $\text{CH}_2$ , 2x C-6), 72.85, 72.89 ( $\text{CH}$ , 2x C-A), 74.61 ( $\text{CH}$ , C-2\*), 74.88 ( $\text{CH}$ , C-3\*), 76.54, 76.59 ( $\text{CH}$ , 2x C-4\*), 95.67, 95.83 ( $\text{CH}$ , 2x C-1), 99.70 (Cq, C- $\text{O}^i\text{Pr}$ ), 109.38 (Cq, C- $\text{O}^i\text{Pr}$ ), 175.34, 175.36 (Cq, 2x C-E) ppm;

MALDI-TOF-MS:  $m/z$  = 451.50  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z$  = 451.51 für  $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_8\text{Na}$ ),  $m/z$  = 467.32  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (ber.  $m/z$  = 467.62 für  $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_8\text{K}$ ).

#### (4-Carboxycyclohexyl)-2,3:4,6-di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-mannopyranosid (54c)

Eine Suspension von 800 mg (1.96 mmol) des Ethylesters **54b** in 25 ml  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{THF}$  1:2:2 wurde mit 235 mg (9.80 mmol, 5 eq) Lithiumhydroxid versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 1 N HCl vorsichtig neutralisiert und Methanol/THF am Rotationsverdampfer i. Vak. entfernt. Gefriertrocknung lieferte das Rohprodukt als farbloses Lyophilisat im Gemisch mit Lithiumchlorid, das ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt wurde.

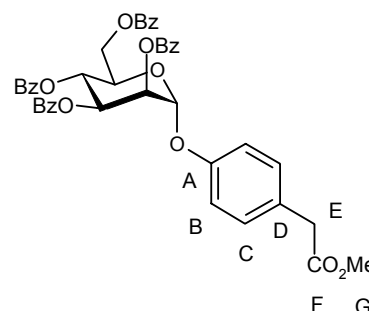


Ausbeute: 833 mg farbloser Feststoff (Gemisch aus Produkt und  $\text{LiCl}$ ), Gemisch aus den Stereoisomeren

MALDI-TOF-MS:  $m/z$  = 423.03  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z$  = 423.46 für  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{Na}$ ).

#### 1-(4-({Methoxycarbonyl}methyl]phenyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (56)

Nach AAV 1 wurden 500 mg (3.01 mmol) 2-(4-Hydroxyphenyl)essigsäuremethylester **55** mit 2.68 g (3.61 mmol; 1.2 eq) perbenzoyliertem Mannosetrichloracetimidat **48** in 5 ml DCM umgesetzt und aufgearbeitet. Die Reinigung des





Rückstands durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Toluol:EE 95:5 lieferte das Produkt als farbloses Öl.

Ausbeute: 2.04 g (2.90 mmol, 91%)

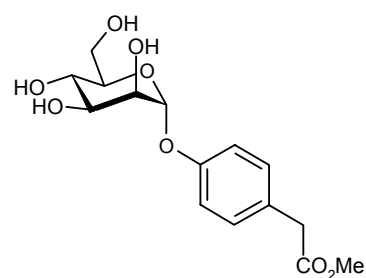
$^1\text{H-NMR}$  (500.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 3.58 (s, 2H, H-E), 3.70 (s, 3H, H-G), 4.48 (dd, 1H, H-6), 4.56 (m<sub>c</sub>, 1H, H-5), 4.65 (dd, 1H, H-6'), 5.79 (d, 1H, H-1), 5.90 (dd  $\approx$  t, 1H, H-4), 6.11 – 6.22 (m, 2H, H-2, H-3), 7.16 – 7.64, 7.86 -8.10 (m, 24H, H-Benzoyl, H-B, H-C) ppm;  $^3J_{1,2}$  = 1.66 Hz,  $^3J_{5,6}$  = 1.99 Hz,  $^3J_{5,6'}$  = 4.86 Hz,  $^2J_{6,6'}$  = 11.83 Hz;

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.76 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 40.36 ( $\text{CH}_2$ , C-E), 52.05 ( $\text{CH}_3$ , C-G), 62.73 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 66.70 (CH, C-3), 69.46 (CH, C-5), 69.88 (CH, C-2), 70.27 (CH, C-4), 95.97 (CH, C-1), 116.72 (CH, C-B), 128.12 – 133.60 (Cq/CH, C-C, C-D, 24x CH-Benzoyl), 154.94 (Cq, C-A), 165.34, 165.44, 165.55, 166.05 (Cq, 4x C-Benzoyl), 171.99 (Cq, C-F) ppm;

MALDI-TOF-MS:  $m/z$  = 767.75  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z$  = 767.74 für  $\text{C}_{43}\text{H}_{36}\text{O}_{12}\text{Na}$ ),  $m/z$  = 783.75  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (ber.  $m/z$  = 783.35 für  $\text{C}_{43}\text{H}_{36}\text{O}_{12}\text{K}$ ).

#### (4-[[Methoxycarbonyl]methyl]phenyl)- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**57a**)

Nach AAV 2 wurden 1.78 g (2.39 mmol) des benzoylierten Mannosids **56** umgesetzt und aufgearbeitet. Nach Flash-chromatographischer Aufreinigung mit EE:MeOH 9:1 wurde die deblockierte Verbindung **57a** als farbloser Schaum isoliert.



Ausbeute: 659 mg (2.01 mmol, 84%)

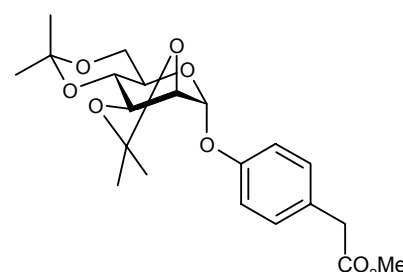
$^1\text{H-NMR}$  (500.13 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 3.58 (s, 2H, H-E), 3.60 (ddd  $\approx$  q, 1H, H-5), 3.66 (s, 3H, H-G), 3.69 – 3.77 (m, 3H, H-4, H-6,6'), 3.89 (dd, 1H, H-3), 3.99 (dd, 1H, H-2), 5.45 (d, 1H, H-1), 7.06, 7.19 (je m, 4H, H-B,B', H-C,C') ppm;  $^3J_{1,2}$  = 1.83 Hz,  $^3J_{2,3}$  = 3.30 Hz,  $^3J_{3,4}$  = 9.36 Hz;

$^{13}\text{C}$ -NMR (125.76 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 40.85$  ( $\text{CH}_2$ , C-E), 52.43 ( $\text{CH}_3$ , C-G), 62.64 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 68.30 ( $\text{CH}$ , C-4), 71.99 ( $\text{CH}$ , C-2), 72.37 ( $\text{CH}$ , C-3), 75.33 ( $\text{CH}$ , C-5), 100.20 ( $\text{CH}$ , C-1), 117.78 ( $\text{CH}$ , C-B), 129.43 (Cq, C-D), 131.45 ( $\text{CH}$ , C-C), 157.04 (Cq, C-A), 174.17 (Cq, C-F) ppm;

MALDI-TOF-MS:  $m/z = 350.907$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z = 351.31$  für  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_8\text{Na}$ ),  $m/z = 366.832$   $[\text{M}+\text{K}]^+$  (ber.  $m/z = 367.42$  für  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_8\text{K}$ ).

#### (4-**[Methoxycarbonylmethyl]phenyl**)-2,3:4,6-di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**57b**)

Nach AAV 3 wurden 647 mg (1.97 mmol) des OH-freien Mannosids **57a** umgesetzt und aufgearbeitet. Die Reinigung des Rückstands durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit EE:Cy 1:2 lieferte die Zielverbindung **57b** als hellgelben Sirup.



Ausbeute: 642 mg (1.54 mmol, 97%)

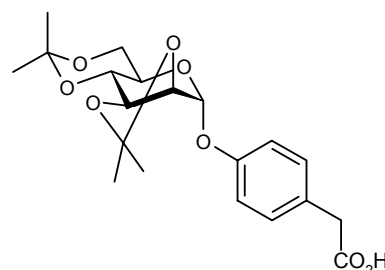
$^1\text{H}$ -NMR (500.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.38$  (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.41 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.51 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.57 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 3.56 (s, 2H, H-E), 3.68 (s, 3H, H-G), 3.70 – 3.83 (m, 4H, H-4, H-5, H-6,6'), 4.30 (dd, 1H, H-3), 4.38 (dd  $\approx$  d, 1H, H-2), 5.73 (dd  $\approx$  s, 1H, H-1), 6.97 (m<sub>c</sub>, 2H, H-B,B'\*), 7.19 (m<sub>c</sub>, 2H, H-C,C'\*) ppm;

$^{13}\text{C}$ -NMR (125.76 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 18.75$  ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 26.20 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 28.17 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 28.99 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 40.28 ( $\text{CH}_2$ , C-E), 52.07 ( $\text{CH}_3$ , C-G), 61.86 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 62.22 ( $\text{CH}$ , C-4), 72.53 ( $\text{CH}$ , C-2), 74.83 ( $\text{CH}$ , C-3), 75.97 ( $\text{CH}$ , C-5), 95.98 ( $\text{CH}$ , C-1), 99.73 (Cq, C- $\text{O}^i\text{Pr}$ ), 109.76 (Cq, C- $\text{O}^i\text{Pr}$ ), 116.52 ( $\text{CH}$ , C-B), 127.99 (Cq, C-D), 130.42 ( $\text{CH}$ , C-C), 154.96 (Cq, C-A), 172.16 (Cq, C-F) ppm;

MALDI-TOF-MS:  $m/z = 430.86$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z = 431.44$  für  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_8\text{Na}$ ),  $m/z = 447.22$   $[\text{M}+\text{K}]^+$  (ber.  $m/z = 447.55$  für  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_8\text{K}$ ).

**(4-Carboxymethylphenyl)-2,3:4,6-di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-mannopyranosid (57c)**

Eine Suspension von 600 mg (1.45 mmol) des Ethylesters **57b** in 25 ml H<sub>2</sub>O/MeOH/THF 1:2:2 wurde mit 173 mg (7.24 mmol, 5 eq) Lithiumhydroxid versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 1 N HCl vorsichtig neutralisiert und Methanol/THF am Rotationsverdampfer entfernt. Gefriertrocknung lieferte das Rohprodukt als farbloses Lyophilisat im Gemisch mit Lithiumchlorid, das ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt wurde.

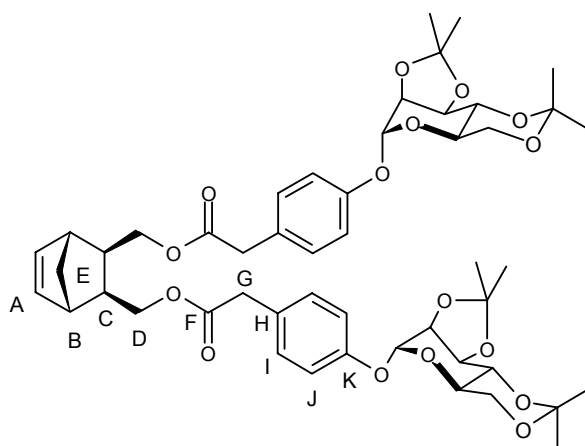


Ausbeute: 969 mg farbloser Feststoff (Gemisch aus Produkt und LiCl)

MALDI-TOF-MS:  $m/z = 417.05$   $[M+Na]^+$  (ber.  $m/z = 417.41$  für C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>8</sub>Na).

**[(2-*exo*,3-*exo*)-3-({(4-[2,3:4,6-Di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy]phenyl)acetyl}oxy)methyl)bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-yl)methyl-2-(4-[2,3:4,6-di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy]phenyl)acetat (58a)**

Nach AAV 5 für die Veresterung nach Mukaiyama wurde zu einer Suspension von 969 mg (2.46 mmol) der Säure **57c**, 652 mg (2.55 mmol) 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid und 239 mg (1.96 mmol) DMAP in 5 ml trockenem DCM unter Argon eine Lösung von 151 mg (0.98 mmol) Norbornendimethanol **41** in 5 ml trockenem DCM gegeben. Nach Zugabe von 1 ml (6.68 mmol)



Triethylamin wurde über Nacht gerührt und anschließend wie angegeben aufgearbeitet. Die Flash-chromatographische Reinigung des Rückstands mit EE: Cy 1:3 lieferte das Produkt als farblosen Schaum.

Ausbeute: 51 mg (56  $\mu$ mol, 6%)

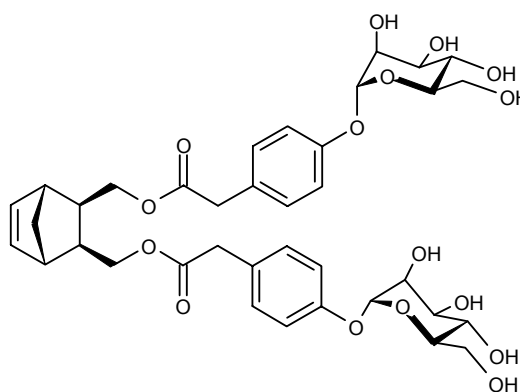
$^1\text{H-NMR}$  (500.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.38 (s, 7H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ , H-D'), 1.41 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.51 (s, 7H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ , H-D), 1.57 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.86 ( $m_c$ , 2H, H-C,C'), 2.73 (pseudo-q, 2H, H-B,B'), 3.70 – 3.83 (m, 12H, H-4, H-5, H-6,6', H-G,G'), 4.02 ( $m_c$ , 2H, H-E'), 4.22 – 4.38 (m, 6H, H-2, H-3, H-E), 5.73 (dd  $\approx$  s, 2H, H-1), 6.18 (dd  $\approx$  t, 2H, H-A,A'), 6.79 ( $m_c$ , 4H, H-H,H'), 7.19 ( $m_c$ , 4H, H-I,I') ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.76 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  = 18.75 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 26.20 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 28.17 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 28.99 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 39.01 (CH, C-C), 40.28 ( $\text{CH}_2$ , C-G), 42.71 ( $\text{CH}_2$ , C-D), 44.79 (CH, C-B), 61.86 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 62.22 (CH, C-4), 65.30 ( $\text{CH}_2$ , C-E), 72.53 (CH, C-2), 74.83 (CH, C-3), 75.79 (CH, C-5), 95.98 (CH, C-1), 99.73 (Cq, C-O $^i$ Pr), 109.76 (Cq, C-O $^i$ Pr), 116.52 (CH, C-J), 127.99 (Cq, C-K), 130.42 (CH, C-I), 137.31 (CH, C-A), 154.96 (Cq, C-H), 172.16 (Cq, C-F) ppm;

ESI-MS:  $m/z$  = 929.4078 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  (ber.  $m/z$  = 929.3930 für  $\text{C}_{49}\text{H}_{62}\text{O}_{16}\text{Na}$ ).

**[(2-*exo*,3-*exo*)-3-({[(4- $\alpha$ -D-Mannopyranosyloxy]phenyl)acetyl]oxy}methyl)bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-yl]methyl-2-(4- $\alpha$ -mannopyranosyloxy]phenyl)acetat (58b)**

Nach AAV 6 wurden 51 mg (56  $\mu\text{mol}$ ) der Isopropyliden-geschützten Verbindung **58a** umgesetzt und aufgearbeitet. Nach präparativer HPLC an RP-18 Kieselgel mit MeCN/ $\text{H}_2\text{O}$  und Gefriertrocknung erhielt man die deblockierte Verbindung **58b** als farbloses, hygroskopisches Lyophilisat.



$t_r$  = 42.44 min

Gradient: 10 % MeCN für 10 min, 10 %  $\rightarrow$  100 % MeCN in 60 min, 100% MeCN für 15 min

Ausbeute: 37 mg (50  $\mu\text{mol}$ , 89%)

$^1\text{H-NMR}$  (500.13 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 1.32 ( $m_c$ , 1H, H-D'), 1.48 ( $m_c$ , 1H, H-D), 1.85 (bs, 2H, H-C,C'), 2.70 ( $m_c$ , 2H, H-B,B'), 3.56 – 3.62 (m, 6H, H-5, H-G,G'), 3.69 – 3.75 (m, 6H, H-4, H-

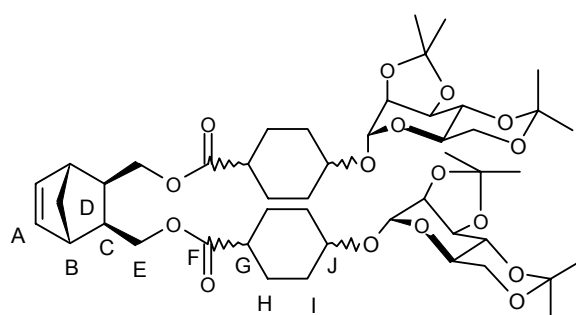
6,6'), 3.86 – 4.01 (m, 4H, H-2, H-3), 4.06 (m<sub>c</sub>, 2H, H-E'), 4.26 (m<sub>c</sub>, 2H, H-E), 5.45 (d ≈ s, 2H, H-1), 6.15 (dd ≈ t, 2H, H-A,A'), 7.05, 7.16 (m<sub>c</sub>, 8H, H-I,I', H-J,J') ppm;

<sup>13</sup>C-NMR (125.76 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 33.89 (CH, C-C), 40.63 (CH<sub>2</sub>, C-G), 42.01 (CH<sub>2</sub>, C-D), 47.28 (CH, C-B), 62.58 (CH<sub>2</sub>, C-6), 67.99 (CH<sub>2</sub>, C-E), 68.35 (CH, C-4), 72.12 (CH, C-2), 72.35 (CH, C-3), 74.98 (CH, C-5), 100.09 (CH, C-1), 117.76 (CH, C-I), 129.35 (C<sub>q</sub>, C-K), 130.87 (CH, C-J), 139.74 (CH, C-A), 157.14 (C<sub>q</sub>, C-H), 174.15 (C<sub>q</sub>, C-F) ppm;

ESI-MS:  $m/z = 769.2960$  [M+Na]<sup>+</sup> (ber.  $m/z = 769.2678$  für C<sub>37</sub>H<sub>46</sub>O<sub>16</sub>Na).

**[(2-*exo*,3-*exo*)-3-({[(4-[2,3:4,6-Di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy]cyclohexyl)carbonyl]oxy}methyl)bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-yl]methyl-4-(2,3:4,6-di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy)-1-cyclohexansäureester (59a)**

Nach AAV 5 für die Veresterung nach Mukaiyama wurde zu einer Suspension von 634 mg (1.64 mmol) der Säure **54c**, 439 mg (1.72 mmol) 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid und 161 mg (1.32 mmol) DMAP in 5 ml trockenem DCM unter Argon eine Lösung von 102 mg (0.66 mmol) Norbornendimethanol **41** in 5 ml



trockenem DCM gegeben. Nach Zugabe von 0.7 ml (4.62 mmol) Triethylamin wurde über Nacht gerührt und anschließend wie angegeben aufgearbeitet. Die Reinigung des Rückstands durch Flashchromatographie mit EE:Cy 1:2 lieferte das Produkt als farblosen Schaum.

Ausbeute: 108 mg (121  $\mu$ mol, 18%), Gemisch aus den Stereoisomeren

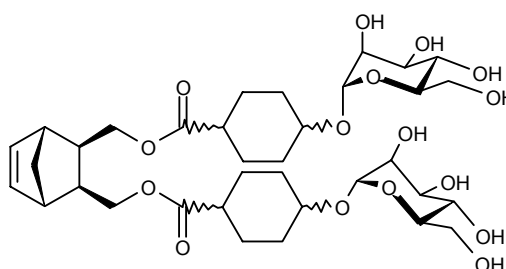
<sup>1</sup>H-NMR (500.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.36 (s, 7H, 2x CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr, H-D\*), 1.43 (s, 6H, 2x CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 1.52 (s, 7H, 2x CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr, H-D'\*), 1.55 (s, 6H, 2x CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 1.66 – 1.95, 1.99 – 2.13, 2.25 – 2.32, 2.36 – 2.42 (m, 20H, H-C,C', 2x H-G,G', 2x H-H,H', 2x H-I,I'), 2.72 (m<sub>c</sub>, 2H, H-B,B'), 3.55 – 3.65, 3.72 – 3.77, 3.83 – 3.88 (m, 10H, 2x H-4, 2x H-5, 2x H-6,6', 2x H-J), 4.03 (m<sub>c</sub>, 2H, H-E\*), 4.12 – 4.18 (m, 4H, 2x H-2, 2x H-3), 4.32 (m<sub>c</sub>, 2H, H-E'\*), 5.12 (s, 1H, H-1), 5.17 (s, 1H, H-1), 6.18 (dd, 2H, H-A;A') ppm; <sup>3</sup>J<sub>A,A'</sub> = 1.89 Hz, <sup>3</sup>J<sub>A,B</sub> = 3.94 Hz;

$^{13}\text{C}$ -NMR (125.76 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 18.79, 26.24, 27.87, 29.07$  ( $\text{CH}_3, \text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 30.37, 30.71 ( $\text{CH}_2, 2x \text{ C-I}$ ), 39.81 ( $\text{CH}, \text{C-C}$ ), 41.68 ( $\text{CH}, \text{C-G}$ ), 42.71 ( $\text{CH}_2, \text{C-D}$ ), 44.79 ( $\text{CH}, \text{C-B}$ ), 61.44 ( $\text{CH}, \text{C-5}$ ), 62.08 ( $\text{CH}_2, \text{C-6}$ ), 65.30, 65.39 ( $\text{CH}_2, 2x \text{ C-E}$ ), 70.88 ( $\text{CH}, \text{C-J}$ ), 72.88 ( $\text{CH}, \text{C-4}$ ), 74.55, 74.88 ( $\text{CH}, 2x \text{ C-3}$ ), 76.54, 76.59 ( $\text{CH}, 2x \text{ C-2}$ ), 95.66, 95.85 ( $\text{CH}, 2x \text{ C-1}$ ), 99.69 ( $\text{Cq}, \text{C-O}^i\text{Pr}$ ), 109.37 ( $\text{Cq}, \text{C-O}^i\text{Pr}$ ), 137.31 ( $\text{CH}, \text{C-A}$ ), 175.15 ( $\text{Cq}, \text{C-F}$ ) ppm;

ESI-MS:  $m/z = 913.4637$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  (ber.  $m/z = 913.4556$  für  $\text{C}_{47}\text{H}_{70}\text{O}_{16}\text{Na}$ ).

**[(2-exo,3-exo)-3-({[(4-[ $\alpha$ -D-Mannopyranosyloxy]cyclohexyl)carbonyl]oxy}methyl)bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-yl)methyl-4-( $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy)-1-cyclohexansäureester (59b)**

Nach AAV 6 wurden 108 mg (121  $\mu\text{mol}$ ) der Isopropyliden-geschützten Verbindung **59a** umgesetzt und aufgearbeitet. Nach präparativer HPLC an RP-18 Kieselgel mit  $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$  und Gefriertrocknung erhielt man die deblockierte Verbindung **59b** als farbloses, hygroskopisches Lyophilisat.



$t_r = 40.95$  min

Gradient: 10 %  $\text{MeCN}$  für 10 min, 10 %  $\rightarrow$  100 %  $\text{MeCN}$  in 60 min, 100%  $\text{MeCN}$  für 15 min

Ausbeute: 40 mg (55  $\mu\text{mol}$ , 46%), Gemisch aus den Stereoisomeren

$^1\text{H}$ -NMR (500.13 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 1.21 - 2.18, 2.86 - 2.36, 2.41 - 2.50$  (m, 22H, H-C,C', H-D,D', H-G, H-H,H', H-I,I'), 2.72 ( $m_c$ , 2H, H-B,B'), 3.59 - 3.90 (m, 14H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6,6', H-J), 4.08 ( $m_c$ , 2H, H-E'), 4.27 ( $m_c$ , 2H, H-E), 4.96 (s, 1H, H-1), 5.01 (s, 1H, H-1), 6.18 ( $m_c$ , 2H, H-A,A') ppm;

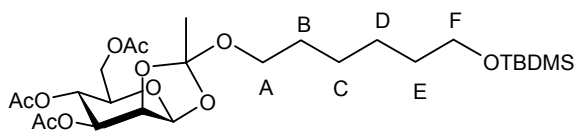
$^{13}\text{C}$ -NMR (125.76 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 26.02, 26.30$  ( $\text{CH}, \text{C-H}^*$ ), 29.19, 29.37 ( $\text{CH}_2, \text{C-I}^*$ ), 32.37, 32.46 ( $\text{CH}, \text{C-G}$ ), 34.18 ( $\text{CH}, \text{C-C}$ ), 42.00 ( $\text{CH}_2, \text{C-D}$ ), 47.28 ( $\text{CH}, \text{C-B}$ ), 63.31 ( $\text{CH}_2, \text{C-6}$ ), 69.05, 69.20 ( $\text{CH}, \text{C-5}$ ), 72.97, 73.15 ( $\text{CH}, \text{C-J}$ ), 74.12 ( $\text{CH}, \text{C-4}^*$ ), 75.29 ( $\text{CH}, \text{C-2}^*$ ), 77.19 ( $\text{CH}, \text{C-3}^*$ ), 100.26, 100.40 ( $\text{CH}, \text{C-1}$ ), 139.95 ( $\text{CH}, \text{C-A}$ ), 179.30, 179.37 ( $\text{Cq}, \text{C-F}$ ) ppm;

ESI-MS:  $m/z = 753.3557$   $[M+Na]^+$  (ber.  $m/z = 753.3304$  für  $C_{35}H_{54}O_{16}Na$ ).

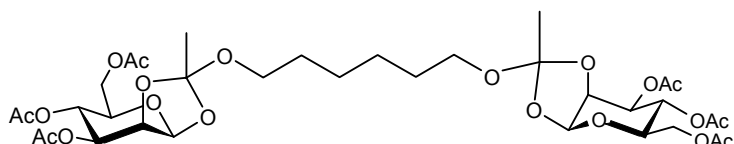
### Versuchte Mannosylierung von monosilyliertem 1,6-Hexandiol

Nach AAV 1 wurden 750 mg (3.23 mmol) 6-*O*-TBDMS-1,6-hexandiol **61**<sup>[114]</sup> mit 2.09 g (4.24 mmol, 1.3 eq) peracetyliertem Mannosetrichloracetimidat **26** umgesetzt und aufgearbeitet. Die Reinigung des Rückstands durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Toluol:EE 7:1 → 1:2 lieferte zwei Produkte.

Fraktion 1: 1.50 g (2.72 mmol, 82%) farbloser Schaum, Orthoester **62**



Fraktion 2: 37 mg (85 μmol, 3%) farbloser Schaum, Diorthoester **63**



### Orthoester **62**:

$^1H$ -NMR (500.13 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 0.01$  (s, 3H, Si- $CH_3$ ), 0.86 (s, 9H,  $CH_3$ - $t$ Bu), 1.29 (m, 4H, H-C, H-D), 1.50 (m, 4H, H-B, H-E), 1.71 (s, 3H,  $CH_3$ -Orthoester), 2.03, 2.05, 2.09 (je s, je 3H,  $CH_3$ -OAc), 3.45 (m, 2H, H-A), 3.56 (t, 2H, H-F), 3.66 (ddd, 1H, H-5), 4.11 (dd, 1H, H-6'), 4.21 (dd, 1H, H-6), 4.56 (dd, 1H, H-2), 5.13 (dd, 1H, H-3), 5.26 (dd  $\approx$  t, 1H, H-4), 5.45 (d, 1H, H-1) ppm;  $^3J_{1,2} = 2.57$  Hz,  $^3J_{2,3} = 4.03$  Hz,  $^3J_{3,4} = 9.90$  Hz,  $^3J_{4,5} = 9.53$  Hz,  $^3J_{5,6} = 4.95$  Hz,  $^3J_{5,6'} = 2.67$  Hz,  $^2J_{6,6'} = 12.29$  Hz,  $^3J_{E,F} = 6.60$  Hz;

$^{13}C$ -NMR (125.76 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = -5.30$  ( $CH_3$ ,  $CH_3$ - $t$ Bu), 18.32 (Cq, C- $t$ Bu), 20.65 ( $CH_3$ ,  $CH_3$ -OAc), 20.70 ( $CH_3$ ,  $CH_3$ -OAc), 20.74 ( $CH_3$ ,  $CH_3$ -OAc), 24.54 ( $CH_3$ ,  $CH_3$ -OAc), 25.52 ( $CH_2$ , C-C\*), 25.83 ( $CH_2$ , C-D\*), 25.93 ( $CH_3$ , Si- $CH_3$ ), 29.42 ( $CH_2$ , C-B\*), 32.70 ( $CH_2$ , C-E\*), 63.32 ( $CH_2$ , C-A), 62.57 ( $CH_2$ , C-6), 65.13 ( $CH_2$ , C-F), 65.61 (CH, C-4), 70.53 (CH, C-3), 71.26 (CH, C-5), 76.29 (CH, C-2), 97.28 (CH, C-1), 163.62 (Cq, C-OAc), 169.48 (Cq, C-OAc), 170.36 (Cq, C-OAc), 170.70 (Cq, C-OAc) ppm;

MALDI-TOF-MS:  $m/z = 585.56$   $[M+Na]^+$  (ber.  $m/z = 585.72$  für  $C_{26}H_{46}O_{11}NaSi$ ),  $m/z = 601.52$   $[M+K]^+$  (ber.  $m/z = 601.83$  für  $C_{26}H_{46}O_{11}KSi$ ).

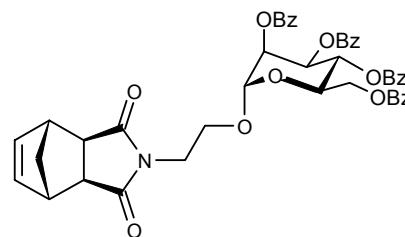
**Diorthoester 63:**

$^1\text{H-NMR}$  (500.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.30 - 1.37$  (m, 4H, H-C, H-D), 1.51 – 1.63 (m, 4H, H-B, H-E), 1.74 (2x s, 6H, 2x  $\text{CH}_3$ -Orthoester), 2.01, 2.06, 2.08, 2.11, 2.12, 2.17 (je s, je 3H,  $\text{CH}_3$ -OAc), 3.43 – 3.51 (m, 4H, H-A, H-F), 3.69 ( $m_c$ , 2H, 2x H-5), 4.09 -4.16 (m, 4H, 2x H-6,6'), 4.59 (2x dd, 2H, 2x H-2), 5.15 (2x dd, 2H, 2x H-3), 5.42 (2x dd, 2H, 2x H-4), 5.48 (2x d, 2H, 2x H-1) ppm;  $^3J_{1,2} = 2.57$  Hz,  $^3J_{2,3} = 4.04$  Hz,  $^3J_{3,4} = 9.90$  Hz;

MALDI-TOF-MS:  $m/z = 801.75$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z = 801.75$  für  $\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{O}_{20}\text{Na}$ ),  $m/z = 817.76$   $[\text{M}+\text{K}]^+$  (ber.  $m/z = 817.86$  für  $\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{O}_{20}\text{K}$ ).

**(2-*exo*,6-*exo*)-4-(2-[2,3,4,6-Tetra-*O*-benzoyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy]ethyl)-4-azatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]dec-8-en-3,5-dion (64a)**

Eine Lösung von 1.11 g (5.36 mmol) des Alkohols *exo*-**25** und 9.93 g (13.40 mmol, 2.5 eq) perbenzoyliertem Mannosetrichloracetimidat **48** in 10 ml trockenem DCM wurde nach AAV 1 umgesetzt und aufgearbeitet. Die Reinigung des Rückstands durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit EE:Cy 2:3  $\rightarrow$  3:2 lieferte das Produkt als farblosen Schaum.



Ausbeute: 3.27 g (4.18 mmol, 78%)

$^1\text{H-NMR}$  (500.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.54$  (d, 1H, H-D), 1.74 (dt, 1H, H-D'), 3.28 (dd, 2H, H-C,C'), 3.39 ( $m_c$ , 2H, H-B,B'), 3.62 – 3.74 (m, 4H, H-F,F', H-G,G'), 3.90 – 4.02 (ddd, 1H, H-5), 4.13 (dd, 1H, H-6), 4.31 (dd, 1H, H-6'), 4.89 (d, 1H, H-1), 5.17 (dd, 1H, H-2), 5.23 – 5.32 (m, 2H, H-3,4), 6.12 (dd  $\approx$  t, 2H, H-A,A') 7.16 – 7.21, 7.25 – 7.31, 7.42 – 7.44, 7.48 – 7.53, 7.74 – 7.78, 7.85 – 7.89, 7.98 – 8.01, 8.02 – 8.07 (je  $m_c$ , 20H, H-Benzoyl) ppm;  $^3J_{A,A'} = 1.84$  Hz,  $^3J_{B,C} = 1.47$  Hz,  $^3J_{C,C'} = 2.94$  Hz,  $^2J_{D,D'} = 8.71$  Hz,  $^3J_{1,2} = 1.83$ ,  $^3J_{2,3} = 3.30$ ,  $^3J_{3,4} = 10.09$  Hz;

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.76 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 36.43$  ( $\text{CH}_2$ , C-F), 45.60 (CH, C-B,B'), 47.32 (CH, C-C,C'), 54.01 ( $\text{CH}_2$ , C-D), 62.39 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 63.67 ( $\text{CH}_2$ , C-G), 65.97 (CH, C-4), 68.84 (CH, C-5), 68.99 (CH, C-3), 69.30 (CH, C-2), 96.93 (CH, C-1), 124.02 – 133.39 (div. CH/Cq, C-

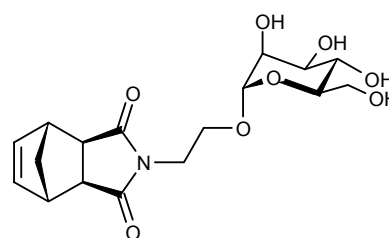


Benzoyl), 134.40, 134.41 (CH, C-A,A'), 165.33, 165.40, 165.48, 166.08 (Cq, C-Carbonyl<sub>Benzoyl</sub>), 178.47 (Cq, C-E) ppm;

ESI-MS:  $m/z = 808.2214$   $[M+Na]^+$  (ber.  $m/z = 808.2364$  für  $C_{45}H_{39}NO_{12}Na$ ),  $m/z = 1593.4701$   $[M_2+Na]^+$  (ber.  $m/z = 1593.4837$  für  $C_{90}H_{78}N_2O_{24}Na$ ).

**(2-*exo*,6-*exo*)-4-(2-[ $\alpha$ -D-Mannopyranosyloxy]ethyl)-4-azatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]dec-8-en-3,5-dion (64b)**

Eine Lösung von 2.00 g (2.55 mmol) der perbenzoylierten Verbindung **64a** in Methanol wurde nach AAV 2 umgesetzt. Nach Aufarbeitung und GPC erhielt man das Produkt als farblosen Schaum.



Ausbeute: 958 mg (2.59 mmol, quant.)

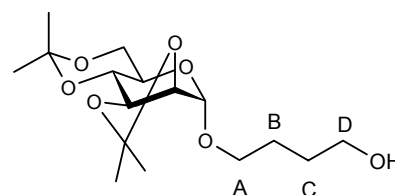
$^1H$ -NMR (500.13 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta = 1.55$  (m, 1H, H-D), 1.74 (dt, 1H, H-D'), 3.30 (dd  $\approx$  d, 2H, H-C,C'), 3.37 (pseudo-q, 2H, H-B,B'), 3.47 (ddd, 1H, H-5), 3.50 – 3.71 (m, 7H, H-F,F', H-G,G', H-3, H-4, H-6'), 3.77 (dd, 1H, H-2), 3.85 (dd, 1H, H-6), 4.77 (d, 1H, H-1), 6.15 (dd  $\approx$  t, 2H, H-A,A') ppm;  $^3J_{1,2} = 1.78$  Hz,  $^3J_{2,3} = 3.23$  Hz,  $^3J_{3,4} = 9.43$  Hz;

$^{13}C$ -NMR (125.76 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta = 37.54$  ( $CH_2$ , C-F), 46.09 (CH, C-B,B'), 47.83, (CH, C-C,C'), 53.55 ( $CH_2$ , C-D), 62.83 ( $CH_2$ , C-6), 64.35 ( $CH_2$ , C-G), 68.44 (CH, C-4), 71.95 (CH, C-2), 72.41 (CH, C-3), 74.83 (CH, C-5), 101.21 (CH, C-1), 133.37 (CH, C-A,A'), 178.62, (Cq, C-E,E') ppm;

ESI-MS:  $m/z = 392.0998$   $[M+Na]^+$  (ber.  $m/z = 392.1316$  für  $C_{17}H_{23}NO_8Na$ ),  $m/z = 761.2004$   $[M_2+Na]^+$  (ber.  $m/z = 761.2740$  für  $C_{34}H_{46}N_2O_{16}Na$ ).

**(4-Hydroxybutyl)-2,3:4,6-di-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-mannopyranosid (69)**

Nach AAV 4 wurden 1.50 g (4.57 mmol) Isopropylidengeschütztes *n*-Pentenylmannosid **68**<sup>[115]</sup> umgesetzt und aufgearbeitet. Man erhielt die Titelverbindung **69** als farblosen Schaum.



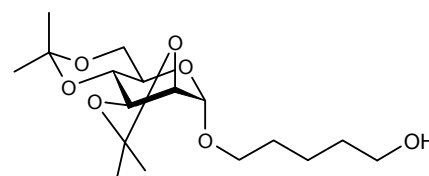
Ausbeute: 1.26 g (3.65 mmol, 80%)

<sup>1</sup>H-NMR (500.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 1.45 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 1.56 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 1.58 (d, 3H, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 1.78 (m<sub>c</sub>, 4H, H-B, H-C), 3.44 (m<sub>c</sub>, 1H, H-6'), 3.58 (ddd, 1H, H-5), 3.63 – 3.80 (m, 5H, H-4, H-A, H-D), 3.88 (dd, 1H, H-6), 4.13 (m<sub>c</sub>, 2H, H-2, H-3), 5.00 (s, 1H, H-1) ppm;

CI-MS:  $m/z$  = 333.3 [M+H]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 333.40 für C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>O<sub>7</sub>).

**(5-Hydroxypentyl)-2,3:4,6-di-O-isopropyliden- $\alpha$ -D-mannopyranosid (70)**

Nach AAV 9 wurden 3.10 g (9.45 mmol) Isopropylidengeschütztes Pentenylmannosid **68** umgesetzt und aufgearbeitet. Man erhielt die Zielverbindung **70** als farblosen Schaum nach Flash-chromatographischer Reinigung mit EE:Cy 1:1.



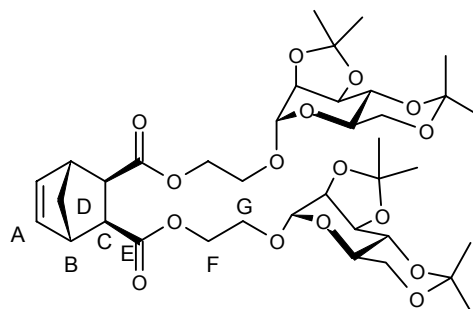
Ausbeute: 1.87 g (5.39 mmol, 57%)

<sup>1</sup>H-NMR (500.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 1.42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 1.52 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 1.56 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 1.57 – 1.69 (m, 6H, H-B, H-C, H-D), 3.43 (m<sub>c</sub>, 1H, H-6'), 3.58 (ddd, 1H, H-5), 3.64 – 3.81 (m, 5H, H-4, H-A, H-E), 3.88 (dd, 1H, H-6), 4.13 (m<sub>c</sub>, 2H, H-2, H-3), 5.01 (s, 1H, H-1) ppm;

ESI-MS:  $m/z$  = 369.1641 [M+Na]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 369.1884 für C<sub>17</sub>H<sub>30</sub>O<sub>7</sub>Na).

**(2-*exo*,3-*exo*)-Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarbonsäure-bis(2-[2,3:4,6-di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy]ethyl)ester (71)**

Nach AAV 5 wurden 2.32 g (7.62 mmol, 2.5 eq) Isopropyliden-geschütztes Hydroxyethylmannosid **29** und 500 mg (3.05 mmol, 1 eq) *exo*-Norborendicarbonsäureanhydrid **60** mit 930 mg (3.64 mmol, 1.2 eq) CMPI, 150 mg (1.22 mmol, 0.4 eq) und 2 ml Triethylamin in 10 ml DCM umgesetzt und aufgearbeitet. Die Reinigung des Rückstands durch



Flash-Chromatographie an Kieselgel mit EE:Cy 1:4  $\rightarrow$  1:1 lieferte das Produkt als farblosen Schaum.

Ausbeute: 2.14 g (2.84 mmol, 93%)

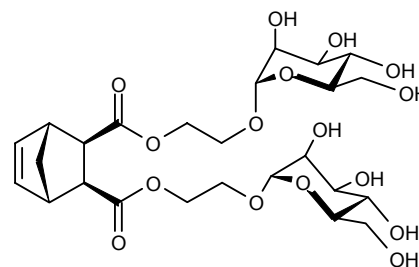
$^1\text{H-NMR}$  (500.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.34 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.40 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.50 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.53 (s, 7H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ , H-D'), 2.06 ( $m_c$ , 1H, H-D), 2.68 ( $m_c$ , 2H, H-C,C'), 3.11 ( $m_c$ , 2H, H-B,B'), 3.55 – 3.67 (m, 4H, H-G, H-6'), 3.70 – 3.76 (m, 4H, H-4, H-5), 3.82 – 3.89 (m, 4H, H-G', H-6), 4.07 (ddd, 1H, H-F), 4.11 – 4.17 (m, 3H, H-3, H-F), 4.18 (dd  $\approx$  d, 2H, H-2), 4.24 (ddd, 2H, H-F'), 5.03 (d, 2H, H-1), 6.22 (dd  $\approx$  s, 2H, H-A,A') ppm;  $^3J_{1,2} = 1.47$  Hz,  $^3J_{F,F'} = 11.92$  Hz,  $^3J_{F,G} = 3.12$  Hz,  $^3J_{F,G'} = 6.60$  Hz,  $^3J_{F',G'} = 6.78$  Hz,  $^3J_{F',G'} = 3.30$  Hz;

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.76 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 18.75 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 26.16 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 28.17 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 29.05 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 45.31 ( $\text{CH}_2$ , C-D), 45.79 (CH, C-B), 47.21, 47.31 (CH, C-C), 61.42 (CH, C-4), 61.93, 61.97 ( $\text{CH}_2$ , C-G), 63.23, 63.39 ( $\text{CH}_2$ , C-F), 65.13, 65.32 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 72.36, 72.66 (CH, C-5), 74.76 (CH, C-3), 75.84 (CH, C-2), 97.70, 97.90 (CH, C-1), 109.47 (Cq, C-O $^i$ Pr), 137.88 (Cq, C-O $^i$ Pr), 137.95 (CH, C-A), 173.36, 173.42 (Cq, C-E) ppm;

MALDI-TOF-MS:  $m/z = 777.75$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  (ber.  $m/z = 777.82$  für  $\text{C}_{37}\text{H}_{54}\text{O}_{16}\text{Na}$ ),  $m/z = 793.72$  [ $\text{M}+\text{K}$ ] $^+$  (ber.  $m/z = 793.92$  für  $\text{C}_{37}\text{H}_{54}\text{O}_{16}\text{K}$ ).

**(2-*exo*,3-*exo*)-Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarbonsäure-bis(2-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy]ethyl)ester (72)**

Nach AAV 6 wurden 420 mg (0.56 mmol) der Verbindung **71** umgesetzt und aufgearbeitet. Die Reinigung des Rückstands durch HPLC an RP-18 Kieselgel mit MeCN/H<sub>2</sub>O lieferte das Produkt als farbloses, hygroskopisches Lyophilisat.



$t_r$  = 28.13 min

Gradient: 10 % MeCN für 10 min, 10 % → 25 % MeCN in 30 min, 100% MeCN für 5 min

Ausbeute: 192 mg ( 322  $\mu$ mol, 58%)

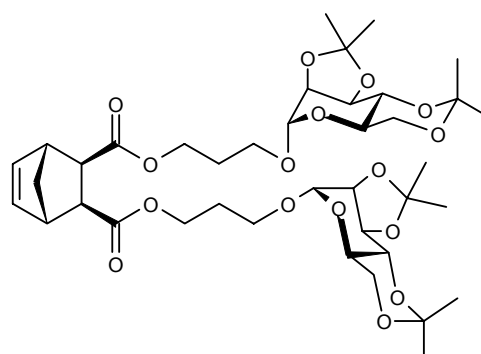
<sup>1</sup>H-NMR (500.13 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 1.49 (ddd  $\approx$  d, 1H, H-D'), 2.12 (ddd  $\approx$  d, 1H, H-D), 2.72 (dd  $\approx$  d, 2H, H-C,C'), 3.11 (m<sub>c</sub>, 2H, H-B,B'), 3.58 – 3.96 (m, 16H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6,6', H-G,G'), 4.18 (m<sub>c</sub>, 2H, H-F'), 4.33 (m<sub>c</sub>, 2H, H-F), 4.89 (s, 2H, H-1), 6.29 (dd  $\approx$  t, 2H, H-A,A') ppm;

<sup>13</sup>C-NMR (125.76 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 46.53 (CH<sub>2</sub>, C-D), 47.02 (CH, C-B), 50.21 (CH, C-C), 63.47 (CH<sub>2</sub>, C-6), 67.70 (CH<sub>2</sub>, C-F), 69.20 (CH, C-4), 69.61 (CH<sub>2</sub>, C-G), 73.04 (CH, C-2), 73.96 (CH, C-3), 75.72 (CH, C-5), 100.59 (CH, C-1), 139.74 (CH, C-A), 179.28 (C<sub>q</sub>, C-E) ppm;

MALDI-TOF-MS:  $m/z$  = 617.82 [M+Na]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 617.56 für C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>O<sub>16</sub>Na),  $m/z$  = 633.53 [M+K]<sup>+</sup> (ber.  $m/z$  = 633.67 für C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>O<sub>16</sub>K).

**(2-*exo*,3-*exo*)-Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarbonsäure-bis(2-[2,3:4,6-di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy]propyl)ester (73)**

Nach AAV 5 wurden 2.42 g (7.60 mmol, 2.5 eq) Isopropyliden-geschütztes Hydroxypropylmannosid **91** und 500 mg (3.05 mmol, 1 eq) *exo*-Norbornendicarbonsäureanhydrid **60** mit 930 mg (3.64 mmol, 1.2 eq) CMPI, 150 mg (1.22 mmol, 0.4



eq) und 2 ml Triethylamin in 10 ml DCM umgesetzt und aufgearbeitet. Die Reinigung des Rückstands durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit EE: Cy 1:3 lieferte das Produkt als farblosen Schaum.

Ausbeute: 2.36 g (3.02 mmol, 99%)

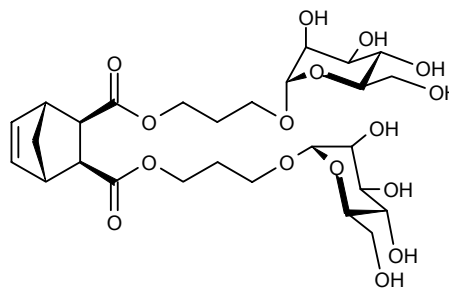
$^1\text{H-NMR}$  (500.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.36 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.43 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.52 (s, 7H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ , H-D'), 1.55 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.91 ( $m_c$ , 4H, H-G,G'), 2.10 ( $m_c$ , 1H, H-D), 2.62 (dd, 2H, H-C,C'), 3.09 ( $m_c$ , 2H, H-B,B'), 3.48 ( $m_c$ , 2H, H-H'), 3.56 ( $m_c$ , 2H, H-6'), 3.72 – 3.78 (m, 6H, H-4, H-5, H-H,H'), 3.87 (dd, 2H, H-6), 4.07 – 4.22 (m, 8H, H-2, H-3, H-F,F'), 5.01 (dd  $\approx$  s, 2H, H-1), 6.22 (dd  $\approx$  t, 2H, H-A,A') ppm;  $^3J_{5,6}$  = 5.64 Hz,  $^2J_{6,6'}$  = 10.71 Hz,  $^3J_{A,B}$  = 1.88 Hz,  $^3J_{B,C}$  = 1.87 Hz,  $^3J_{C,C'}$  = 0.62 Hz;

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.76 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 18.77 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 26.16 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 28.18 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 28.65 ( $\text{CH}_2$ , C-G), 29.04 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 45.38 ( $\text{CH}_2$ , C-D), 45.68, 47.71 (CH, C-B), 47.27, 47.38 (CH, C-C), 61.38 (CH, C-4), 61.60, 61.62 ( $\text{CH}_2$ , C-H), 62.04 ( $\text{CH}_2$ , C-F), 64.18, 64.28 (CH, C-6), 72.71 (CH, C-5), 74.84 (CH, C-3), 76.03 (CH, C-2), 97.83, 97.89 (CH, C-1), 99.69 (Cq, C-O $^i$ Pr), 109.43 (Cq, C-O $^i$ Pr), 137.93, 137.97 (CH, C-A), 173.43, 173.48 (Cq, C-E);

MALDI-TOF-MS:  $m/z$  = 778.06  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z$  = 777.82 für  $\text{C}_{37}\text{H}_{54}\text{O}_{16}\text{Na}$ ),  $m/z$  = 754.67  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (ber.  $m/z$  = 754.83 für  $\text{C}_{37}\text{H}_{54}\text{O}_{16}\text{K}$ ).

**(2-*exo*,3-*exo*)-Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarbonsäure-bis(2-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy]propyl)ester (74)**

Nach AAV 6 wurden 250 mg (0.32 mmol) der Verbindung **73** umgesetzt und aufgearbeitet. Die Reinigung des Rückstands durch HPLC an RP-18 Kieselgel mit MeCN/ $\text{H}_2\text{O}$  lieferte das Produkt als farbloses, hygroskopisches Lyophyllisat.



$t_r$  = 44.50 min

Gradient: 10 % MeCN für 5 min, 10 %  $\rightarrow$  40 % MeCN in 30 min, 100% MeCN für 15 min

Ausbeute: 151 mg ( 243  $\mu\text{mol}$ , 76%)

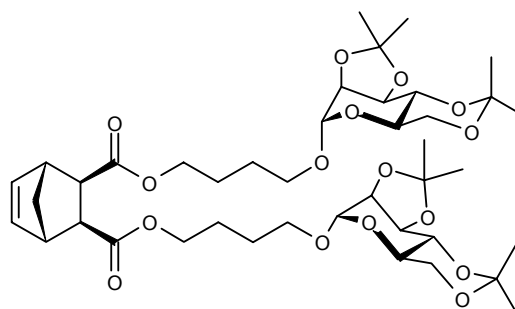
$^1\text{H-NMR}$  (500.13 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 1.32$  ( $m_c$ , 1H, H-D'), 1.67 ( $m_c$ , 4H, H-G,G'), 1.91 ( $m_c$ , 1H, H-D), 2.67 (dd  $\approx$  d, 2H, H-C,C'), 3.04 (pseudo-q, 2H, H-B,B'), 3.49 – 3.68 (m, 6H, H-5, H-6', H-H'), 3.73 – 3.80 (m, 6H, H-4, H-6, H-H), 3.89 (dd, 2H, H-3), 3.94 ( $m_c$ , 2H, H-2), 4.07 ( $m_c$ , 2H, H-F'), 4.21 ( $m_c$ , 2H, H-F), 4.92 (d, 2H, H-1), 6.34 (dd  $\approx$  t, 2H, H-A,A') ppm;  $^3J_{1,2} = 1.76$  Hz,  $^3J_{2,3} = 2.25$  Hz,  $^3J_{3,4} = 11.93$  Hz;

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.76 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 27.63$  ( $\text{CH}_2$ , C-G), 47.33 ( $\text{CH}_2$ , C-D), 47.86 (CH, C-B), 49.81 (CH, C-C), 63.29 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 67.04 ( $\text{CH}_2$ , C-F), 69.05 (CH, C-4), 69.62 ( $\text{CH}_2$ , C-I), 72.57 (CH, C-2), 73.12 (CH, C-3), 75.14 (CH, C-5), 102.16 (CH, C-1), 140.41 (CH, C-A), 178.91 (Cq, C-E) ppm;

MALDI-TOF-MS:  $m/z = 617.24$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  (ber.  $m/z = 617.56$  für  $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_{16}\text{Na}$ ),  $m/z = 633.56$  [ $\text{M}+\text{K}$ ] $^+$  (ber.  $m/z = 633.67$  für  $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_{16}\text{K}$ ).

**(2-*exo*,3-*exo*)-Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarbonsäure-bis(2-[2,3:4,6-di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy]butyl)ester (75)**

Nach AAV 5 wurden 2.53 g (7.60 mmol, 2.5 eq) Isopropyliden-geschütztes Hydroxybutylmannosid **69** und 500 mg (3.05 mmol, 1 eq) *exo*-Norbornendicarbonsäureanhydrid **60** mit 930 mg (3.64 mmol, 1.2 eq) CMPI, 150 mg (1.22 mmol, 0.4 eq) und 2 ml Triethylamin in 10 ml DCM umgesetzt und aufgearbeitet. Die Reinigung des



Rückstands durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit EE:Cy 1:4 lieferte das Produkt als farblosen Schaum.

Ausbeute: 1.73 g (2.14 mmol, 70%)

$^1\text{H-NMR}$  (500.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.36$  (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.42 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.52 (s, 7H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ , C-D'), 1.55 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.61 – 1.73 (m, 8H, H-G,G', H-H,H'), 2.11

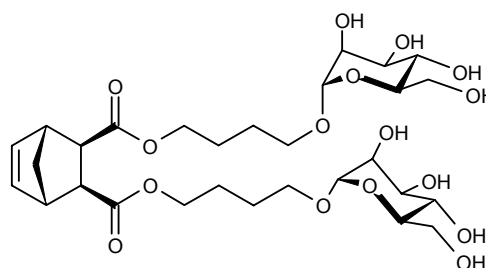
(m<sub>c</sub>, 2H, H-D), 2.62 (dd ≈ d, 2H, H-C,C'), 3.09 (ddd ≈ q, 2H, H-B,B'), 3.44 (m<sub>c</sub>, 2H, H-I'), 3.55 (m<sub>c</sub>, 2H, H-6'), 3.69 – 3.77 (m, 6H, H-4, H-5, H-I), 3.87 (dd, 2H, H-6), 4.00 (m<sub>c</sub>, 2H, H-F'), 4.10 – 4.17 (m, 6H, H-2, H-3, H-F), 5.00 (dd ≈ s, 2H, H-1), 6.22 (dd ≈ t, 2H, H-A,A') ppm; <sup>3</sup>J<sub>5,6</sub> = 5.70 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6,6'</sub> = 10.95 Hz;

<sup>13</sup>C-NMR (125.76 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 18.80 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 25.56, 25.48 (CH<sub>2</sub>, C-G), 26.08 (CH<sub>2</sub>, C-H), 26.19 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 29.08 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 45.43 (CH<sub>2</sub>, C-D), 45.70 (CH, C-B), 47.36 (CH, C-C), 61.39 (CH, C-4), 62.10 (CH<sub>2</sub>, C-6), 64.34 (CH<sub>2</sub>, C-F), 62.27, 67.30 (CH<sub>2</sub>, C-I), 72.77 (CH, C-5), 74.90 (CH, C-3), 76.15 (CH, C-2), 97.86 (CH, C-1), 99.70 (C<sub>q</sub>, C-O<sup>i</sup>Pr), 109.42 (C<sub>q</sub>, C-O<sup>i</sup>Pr), 137.98 (CH, C-A), 173.54 (C<sub>q</sub>, C-E);

ESI-MS: *m/z* = 833.4048 [M+Na]<sup>+</sup> (ber. *m/z* = 833.3930 für C<sub>41</sub>H<sub>62</sub>O<sub>16</sub>Na).

**(2-*exo*,3-*exo*)-Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarbonsäure-bis(2-[α-D-mannopyranosyloxy]butyl)ester (76)**

Nach AAV 6 wurden 250 mg (0.31 mmol) der Verbindung **75** umgesetzt und aufgearbeitet. Die Reinigung des Rückstands durch HPLC an RP-18 Kieselgel mit MeCN/H<sub>2</sub>O lieferte das Produkt als farbloses, hygroskopisches Lyophilisat.



*t<sub>r</sub>* = 36.22 min

Gradient: 10 % MeCN für 5 min, 10 % → 50 % MeCN in 40 min, 100% MeCN für 15 min

Ausbeute: 125 mg (192 μmol, 62%)

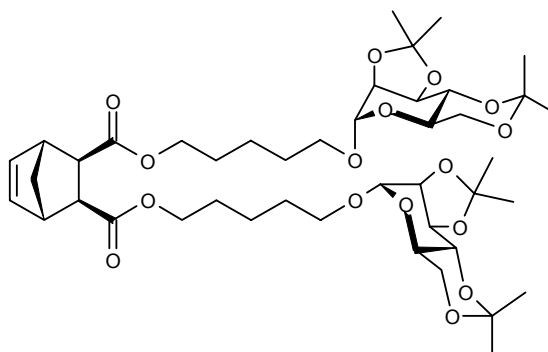
<sup>1</sup>H-NMR (500.13 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 1.49 (m<sub>c</sub>, 1H, H-D'), 1.62 – 1.77 (m, 8H, H-G,G', H-H,H'), 1.93 (m<sub>c</sub>, 1H, H-D), 2.75 (dd ≈ d, 2H, H-C,C'), 3.10 (pseudo-q, 2H, H-B,B'), 3.52 – 3.66 (m, 6H, H-5, H-6', H-I'), 3.71 – 3.78 (m, 6H, H-4, H-6, H-I), 3.86 (dd, 2H, H-3), 3.92 (m<sub>c</sub>, 2H, H-2), 4.05 (m<sub>c</sub>, 2H, H-F'), 4.13 (m<sub>c</sub>, 2H, H-F), 4.84 (d, 2H, H-1), 6.28 (dd ≈ t, 2H, H-A,A') ppm; <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 1.78 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2,3</sub> = 2.17 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub> = 12.13 Hz;

$^{13}\text{C}$ -NMR (125.76 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 27.18$  ( $\text{CH}_2$ , C-H), 27.72 ( $\text{CH}_2$ , C-G), 47.14 ( $\text{CH}_2$ , C-D), 47.77 (CH, C-B), 49.86 (CH, C-C), 63.30 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 67.90 ( $\text{CH}_2$ , C-F), 69.13 (CH, C-4), 69.64 ( $\text{CH}_2$ , C-I), 72.50 (CH, C-2), 73.05 (CH, C-3), 75.14 (CH, C-5), 102.11 (CH, C-1), 140.40 (CH, C-A), 178.66 (Cq, C-E) ppm;

ESI-MS:  $m/z = 673.2489$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z = 673.2678$  für  $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_{16}\text{Na}$ ),  $m/z = 1323.5012$   $[\text{M}_2+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z = 1323.5464$  für  $\text{C}_{58}\text{H}_{92}\text{O}_{32}\text{Na}$ ).

**(2-*exo*,3-*exo*)-Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarbonsäure-bis(2-[2,3:4,6-di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy]pentyl)ester (77)**

Nach AAV 5 wurden 2.63 g (7.60 mmol, 2.5 eq) Isopropyliden-geschütztes Hydroxypentylmannosid **70** und 500 mg (3.05 mmol, 1 eq) *exo*-Norborendicarbonsäureanhydrid **60** mit 930 mg (3.64 mmol, 1.2 eq) CMPI, 150 mg (1.22 mmol, 0.4 eq) und 2 ml Triethylamin in 10 ml DCM umgesetzt und aufgearbeitet. Die



Reinigung des Rückstands durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit EE:Cy 1:3 → EE:Cy 1:1 lieferte das Produkt als farblosen Sirup.

Ausbeute: 2.15 g (2.56 mmol, 84%)

$^1\text{H}$ -NMR (500.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.35$  (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.43 (bs, 10H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ , 4H von H-G,G', H-H,H', H-I,I'), 1.52 (s, 7H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ , H-D'), 1.55 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.59 – 1.67 (m, 8H, H-G,G', H-H,H', H-I,I'), 2.12 ( $m_c$ , 1H, H-D), 2.62 (dd  $\approx$  d, 2H, H-C,C'), 3.09 (pseudo-t, 2H, H-B,B'), 3.41 (pseudo-dt, 2H, H-J'), 3.56 ( $m_c$ , 2H, H-6'), 3.66 – 3.77 (m, 6H, H-4, H-5, H-J), 3.87 (dd, 2H, H-6), 3.99 ( $m_c$ , 2H, H-F'), 4.08 – 4.17 (m, 6H, H-2, H-3, H-F), 5.00 (d  $\approx$  s, 2H, H-1), 6.21 (dd  $\approx$  t, 2H, H-A,A') ppm;  $^3J_{5,6} = 5.65$  Hz,  $^2J_{6,6'} = 10.79$  Hz,  $^3J_{1,I'} = 6.48$  Hz,  $^3J_{I',J} = 3.19$  Hz;

$^{13}\text{C}$ -NMR (125.76 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 18.79$  ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 22.67 ( $\text{CH}_2$ , C-H), 26.17 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 28.20 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 28.36 ( $\text{CH}_2$ , C-I), 29.08 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 45.43 ( $\text{CH}_2$ , C-

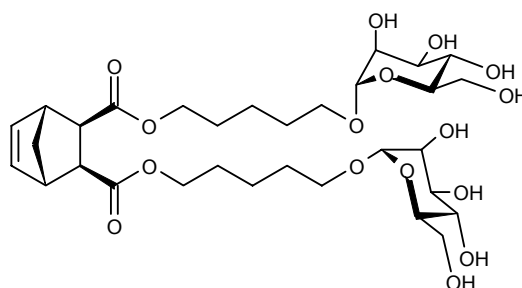


D), 45.65 (CH, C-B), 47.35 (CH, C-C), 61.33 (CH, C-4), 62.11 (CH<sub>2</sub>, C-6), 64.52 (CH<sub>2</sub>, C-F), 67.57 (CH<sub>2</sub>, C-J), 72.78 (CH, C-5), 74.90 (CH, C-3), 76.17 (CH, C-2), 97.81 (CH, C-1), 99.70 (Cq, C-O<sup>i</sup>Pr), 109.41 (Cq, C-O<sup>i</sup>Pr), 137.97 (CH, C-A), 173.56 (Cq, C-E);

ESI-MS:  $m/z = 861.4412$  [M+Na]<sup>+</sup> (ber.  $m/z = 861.4243$  für C<sub>43</sub>H<sub>66</sub>O<sub>16</sub>Na).

**(2-*exo*,3-*exo*)-Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarbonsäure-bis(2-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy]pentyl)ester (78)**

Nach AAV 6 wurden 250 mg (298  $\mu$ mol) der Verbindung **77** umgesetzt und aufgearbeitet. Die Reinigung des Rückstands durch HPLC an RP-18 Kieselgel mit MeCN/H<sub>2</sub>O lieferte das Produkt als farbloses, hygroskopisches Lyophilisat.



$t_r = 40.99$  min

Gradient: 10 % MeCN für 5 min, 10 %  $\rightarrow$  53 % MeCN in 43 min, 100% MeCN für 5 min

Ausbeute: 85 mg (158  $\mu$ mol, 53%)

<sup>1</sup>H-NMR (500.13 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta = 1.37 - 1.49$  (m, 5H, H-D', H-I,I'), 1.60 - 1.68 (m, 8H, H-G,G', H-H,H'), 1.99 (ddd  $\approx$  d, 1H, H-D), 2.69 (dd  $\approx$  d, 2H, H-C,C'), 3.07 (pseudo-q, 2H, H-B,B'), 3.51 (m<sub>c</sub>, 2H, H-J'), 3.58 (ddd, 2H, H-5), 3.66 (dd  $\approx$  t, 2H, H-6'), 3.70 - 3.78 (m, 6H, H-4, H-6, H-J), 3.85 (dd, 2H, H-3), 3.90 (dd, 2H, H-2), 4.02 (m<sub>c</sub>, 2H, H-F'), 4.09 (m<sub>c</sub>, 2H, H-F), 4.83 (d, 2H, H-1), 6.26 (dd  $\approx$  t, 2H, H-A,A') ppm; <sup>3</sup>J<sub>1,2</sub> = 1.70 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2,3</sub> = 3.41 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub> = 12.15 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4,5</sub> = 2.30 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5,6</sub> = 5.56 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5,6'</sub> = 9.96 Hz;

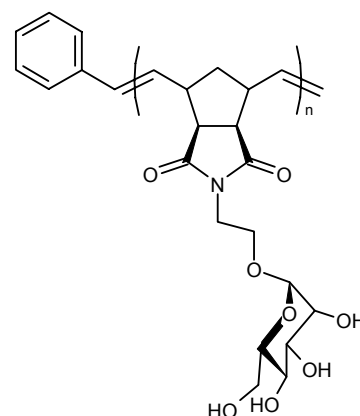
<sup>13</sup>C-NMR (125.76 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta = 24.58$  (CH<sub>2</sub>, C-I), 30.14 (CH<sub>2</sub>, C-H), 30.76 (CH<sub>2</sub>, C-G), 47.34 (CH<sub>2</sub>, C-D), 47.81, 47.86 (CH, C-B), 49.80 (CH, C-C), 63.27 (CH<sub>2</sub>, C-6), 66.91 (CH<sub>2</sub>, C-F), 69.05 (CH, C-4), 69.85 (CH<sub>2</sub>, C-J), 72.59 (CH, C-2), 73.15 (CH, C-3), 75.13 (CH, C-5), 102.17 (CH, C-1), 140.43 (CH, C-A), 177.89 (Cq, C-E) ppm;

ESI-MS:  $m/z = 701.2920$   $[M+Na]^+$  (ber.  $m/z = 701.2991$  für  $C_{31}H_{50}O_{16}Na$ ),  $m/z = 1379.6034$   $[M_2+Na]^+$  (ber.  $m/z = 1379.6090$  für  $C_{62}H_{100}O_{32}Na$ ).

### Ringöffnende Metathese-Polymerisation von (2-*exo*,6-*exo*)-4-(2-[ $\alpha$ -D-Mannopyranosyl oxy]ethyl)-4-azatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]dec-8-en-3,5-dion (79)

Nach AAV 8 wurden 100 mg Monomer **64b** unter Emulsionsbedingungen mit 0.1 eq des Grubb's-Katalysators der ersten Generation **11** umgesetzt und aufgearbeitet.

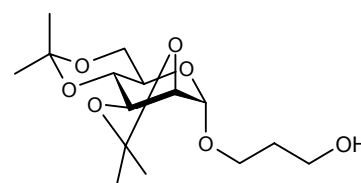
Analyse des Rohprodukts mit MALDI-TOF-MS zeigte die Bildung von Oligomeren mit bis zu fünf Wiederholungseinheiten (siehe Abb. 32). Versuche, die Oligomere durch GPC oder HPLC zu isolieren waren jedoch nicht erfolgreich.



MALDI-TOF-MS:  $m/z = 866.94$   $[M+Na]^+$  (ber. 865.88 für  $C_{42}H_{54}N_2O_{16}Na$ ,  $n=2$ ), 881.85  $[M+K]^+$  (ber. 881.99 für  $C_{42}H_{54}N_2O_{16}K$ ,  $n=2$ ), 1234.87  $[M+Na]^+$  (ber. 1235.26 für  $C_{59}H_{77}N_3O_{24}Na$ ,  $n=3$ ), 1250.87  $[M+K]^+$  (ber. 1251.36 für  $C_{59}H_{77}N_3O_{24}K$ ,  $n=3$ ), 1604.08  $[M+Na]^+$  (ber. 1604.63 für  $C_{76}H_{100}N_4O_{32}Na$ ,  $n=4$ ), 1620.03  $[M+K]^+$  (ber. 1620.74 für  $C_{76}H_{100}N_4O_{32}K$ ,  $n=4$ ), 1974.27  $[M+Na]^+$  (ber. 1974.00 für  $C_{93}H_{123}N_5O_{40}Na$ ,  $n=5$ ), 1991.15  $[M+K]^+$  (ber. 1990.11 für  $C_{93}H_{123}N_5O_{40}K$ ,  $n=5$ ).

### (3-Hydroxypropyl)-2,3:4,6-di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-mannopyranosid (91)

Nach AAV 9 wurden 9.9 g (33 mmol) Isopropylidengeschütztes Allylmannosid **43** umgesetzt und aufgearbeitet. Man erhielt die Zielverbindung **91** als farblosen Schaum nach Flash-chromatographischer Reinigung mit EE:Cy 1:1.



Ausbeute: 9.8 g (31 mmol, 94%)

MALDI-TOF-MS:  $m/z = 340.99$   $[M+Na]^+$  (ber.  $m/z = 341.36$  für  $C_{15}H_{26}O_7Na$ ),  $m/z = 357.45$   $[M+K]^+$  (ber.  $m/z = 357.47$  für  $C_{15}H_{26}O_7K$ ).

**Di-(i<sub>pr</sub>-C<sub>3</sub>-manno)-C=C (92)**

Nach AAV 10 wurden

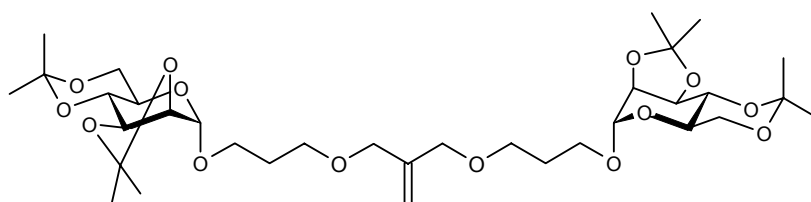
5.00 g (15.71 mmol, 3 eq)

Iso-propyliden-

geschütztes Hydroxypro-

pylmannosid **91** mit 601

μl (655 mg, 5.24 mmol, 1 eq) **88** und 656 mg NaH (16.4 mmol, 3.13 eq) in 20 ml THF umgesetzt und aufgearbeitet. Die Reinigung des Rückstands durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit EE: Cy 1:2 lieferte das Produkt als farbloses Öl.



Ausbeute: 3.41 g (4.95 mmol, 95%)

MALDI-TOF-MS:  $m/z = 617.82$   $[M+Na]^+$  (ber.  $m/z = 618.53$  für  $C_{34}H_{56}O_{14}Na$ ),  $m/z = 729.90$   $[M+K]^+$  (ber.  $m/z = 729.91$  für  $C_{34}H_{56}O_{14}K$ ).

**Di-(i<sub>pr</sub>-C<sub>3</sub>-manno)-OH (93)**

Nach AAV 4 wurden 3.00

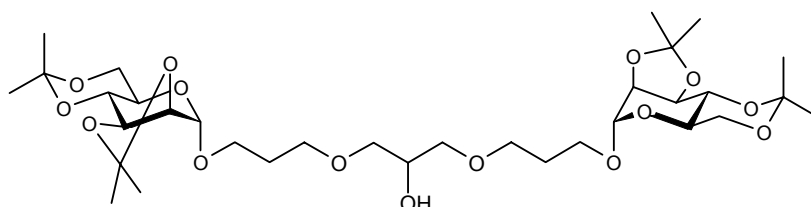
g (4.36 mmol) der

ungesättigten Verbindung

**92** umgesetzt und auf-

gearbeitet. Die Titelver-

bindung konnte ohne weitere Aufreinigung als farbloser Schaum isoliert werden.

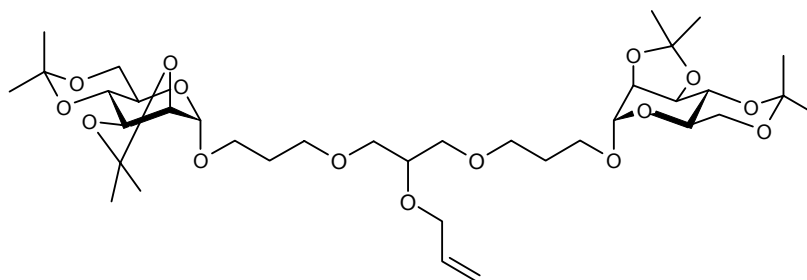


Ausbeute: 2.78 g (4.01 mmol, 92%)

MALDI-TOF-MS:  $m/z = 716.83$   $[M+Na]^+$  (ber.  $m/z = 715.79$  für  $C_{33}H_{56}O_{15}Na$ ),  $m/z = 732.21$   $[M+K]^+$  (ber.  $m/z = 731.90$  für  $C_{33}H_{56}O_{15}K$ ).

**Di-(ipr-C<sub>3</sub>-manno)-O-allyl (94)**

Nach AAV 11 wurde 1.00 g (1.44 mmol, 1 eq) des sekundären Alkohols **93** mit 64 mg (1.6 mmol, 1.11 eq) NaH und 0.37 ml (522 mg, 4.32 mmol, 3 eq)



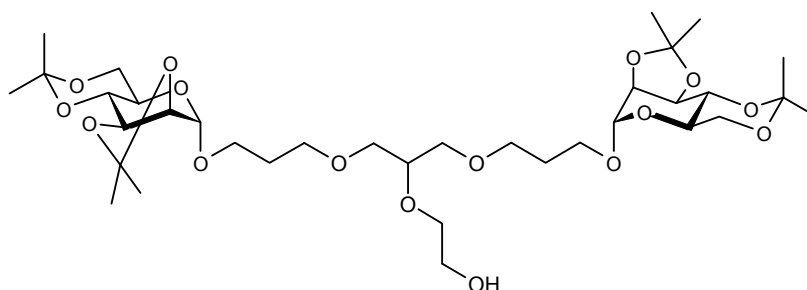
Allylbromid in 10 ml THF umgesetzt und aufgearbeitet. Die Zielverbindung **94a** fiel als hellgelbes Öl an.

Ausbeute: 998 mg (1.36 mmol, 94%)

MALDI-TOF-MS:  $m/z = 755.83$   $[M+Na]^+$  (ber.  $m/z = 755.85$  für  $C_{36}H_{60}O_{15}Na$ ),  $m/z = 771.65$   $[M+K]^+$  (ber.  $m/z = 771.96$  für  $C_{36}H_{60}O_{15}K$ ).

**Di-(ipr-C<sub>3</sub>-manno)-O-ethylen-OH (95)**

Nach AAV 4 wurden 1.80 g (2.46 mmol) der allylierten Verbindung **94** umgesetzt und aufgearbeitet. Der primäre Alkohol **95** konnte ohne



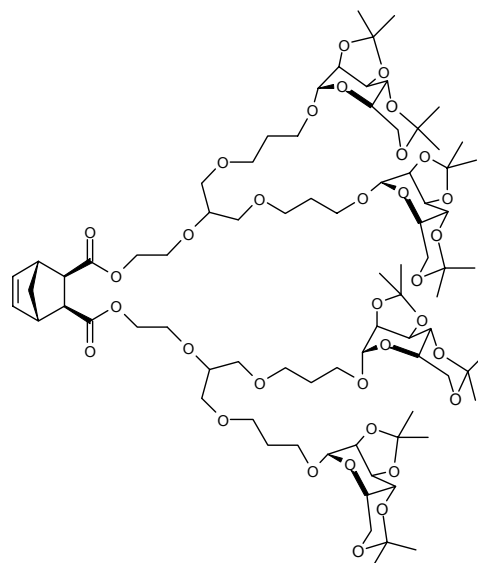
Aufreinigung als farbloser Schaum isoliert werden.

Ausbeute: 1.68 g (2.28 mmol, 93%)

MALDI-TOF-MS:  $m/z = 758.71$   $[M+Na]^+$  (ber.  $m/z = 759.84$  für  $C_{35}H_{60}O_{16}Na$ ),  $m/z = 776.03$   $[M+K]^+$  (ber.  $m/z = 775.95$  für  $C_{35}H_{60}O_{16}K$ ).

### Mukaiyama-Veresterung von Di-(*ipr*-C<sub>3</sub>-manno)-O-ethylen-OH zu **96**

Nach AAV 5 wurden 147 mg (869  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) *exo*-Norbornendicarbonsäureanhydrid **60** und 1.65 g (2.24 mmol, 2.5 eq) des Alkohols **95** mit 276 mg (1.08 mmol, 1.2 eq) CMPI, 44 mg (358  $\mu\text{mol}$ , 0.4 eq) DMAP und 372  $\mu\text{l}$  (270 mg, 2.67 mmol, 3 eq) Triethylamin in 10 ml DCM umgesetzt und aufgearbeitet. Aufreinigung des Rohprodukts durch präparative HPLC an RP-18 Kieselgel mit MeCN/H<sub>2</sub>O gab das gewünschte Produkt **96** als farbloses Lyophyllisat.



$t_r = 18.92$  min

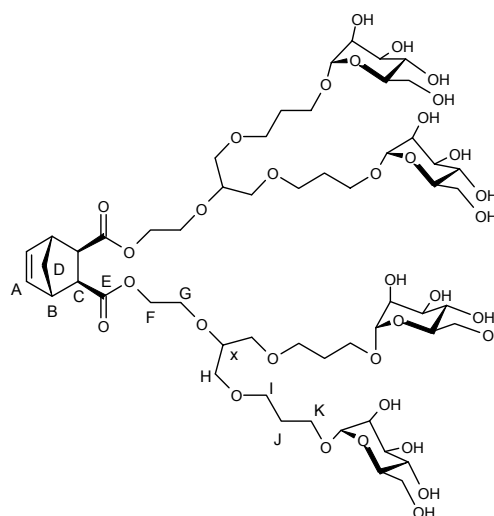
Gradient: 70 %  $\rightarrow$  90 % MeCN in 50 min, 100% MeCN für 5 min

Ausbeute: 223 mg (138  $\mu\text{mol}$ , 15%)

ESI-MS:  $m/z = 832.3634$   $[\text{M}+\text{Na}_2]^{2+}$  (ber.  $m/z = 832.3975$  für  $\text{C}_{79}\text{H}_{126}\text{O}_{34}\text{Na}_2$ ),  $m/z = 1641.8520$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z = 1641.8023$  für  $\text{C}_{79}\text{H}_{126}\text{O}_{34}\text{Na}$ ).

### Deblockierung des Cluster-Mannosids **96** zu **97**

Nach AAV 6 wurden 105 mg (65  $\mu\text{mol}$ ) des Isopropyliden-geschützten Cluster-Mannosids **96** umgesetzt und aufgearbeitet. Aufreinigung des Rohprodukts durch präparative HPLC an RP-18 Kieselgel mit MeCN/H<sub>2</sub>O gab das gewünschte Produkt **97** als farbloses, stark hygroskopisches Lyophyllisat.



$t_r = 33.25$  min

Gradient: 10 % MeCN für 5 min, 10 %  $\rightarrow$  100% MeCN in 30 min, 100% MeCN für 15 min

Ausbeute: 27 mg (21  $\mu\text{mol}$ , 32%)

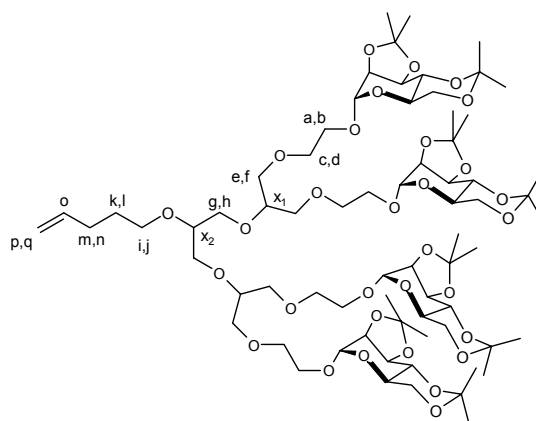
$^1\text{H-NMR}$  (500.13 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 1.32$  (s, 12H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.39 (s, 12H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.49 (s, 13H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ , H-D'), 1.82 ( $m_c$ , 8H, H-J), 2.06 (ddd  $\approx$  d, 1H, H-D), 2.60 (dd  $\approx$  d, 2H, H-C,C'), 3.08 ( $m_c$ , 2H, H-B,B'), 3.44 – 3.60 (m, 40H, H-4,5,6', H-G,I,K), 3.59 ( $m_c$ , 2H, H-x), 3.83 ( $m_c$ , 4H, H-6), 4.04 ( $m_c$ , 2H, H-F'), 4.12 ( $m_c$ , 8H, H-2, H-3), 4.26 ( $m_c$ , 2H, H-F), 4.97 (d  $\approx$  s, 4H, H-1), 6.18 (dd  $\approx$  t, 2H, H-A,A') ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.76 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 18.76$  ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 26.15 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 28.17 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 29.05 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 29.63, 29.65 ( $\text{CH}_2$ , C-J), 45.37 ( $\text{CH}_2$ , C-D), 45.71 ( $\text{CH}$ , C-C), 47.25 ( $\text{CH}$ , C-B), 61.29 ( $\text{CH}$ , C-5), 62.05 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 64.02 ( $\text{CH}_2$ , C-F), 64.63 ( $\text{CH}_2$ , C-G\*), 68.16 ( $\text{CH}_2$ , C-H\*), 68.33 ( $\text{CH}_2$ , C-I\*), 70.93, 71.02 ( $\text{CH}_2$ , C-K\*), 72,74 ( $\text{CH}$ , C-4), 74.86 ( $\text{CH}$ , C-3), 76.10 ( $\text{CH}$ , C-2), 78.41 ( $\text{CH}$ , C-x), 97.76 ( $\text{CH}$ , C-1), 99.65 (Cq, C-O<sup>i</sup>Pr), 109.65 (Cq, C-O<sup>i</sup>Pr), 137.96 ( $\text{CH}$ , C-A), 173.36 (Cq, C-E) ppm;

ESI-MS:  $m/z = 672.2821$  [ $\text{M}+\text{Na}_2$ ]<sup>2+</sup> (ber.  $m/z = 672.2705$  für  $\text{C}_{55}\text{H}_{94}\text{O}_{34}\text{Na}_2$ ),  $m/z = 1321.5655$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup> (ber.  $m/z = 1321.5519$  für  $\text{C}_{55}\text{H}_{94}\text{O}_{34}\text{Na}$ ).

### Tetra-(*ipr*-C<sub>2</sub>-manno)-O-pentenyl (**100**)

Nach AAV 11 wurden 2.00 g (1.44 mmol, 1 eq) Tetra-(*ipr*-C<sub>2</sub>-manno)-OH **98**<sup>[78]</sup> mit 87 mg (2.2 mmol, 1.5 eq) NaH und 510  $\mu\text{l}$  (644 mg, 4.32 mmol, 3 eq) 5-Brom-1-penten **99** in 5 ml THF umgesetzt und aufgearbeitet. Die ungesättigte Titelverbindung **100** konnte nach Flash-chromatographischer Aufreinigung mit Cy:Aceton 2:1 als farbloser Schaum isoliert werden.



Ausbeute: 1.78 g (1.22 mmol, 88%)

$^1\text{H-NMR}$  (500.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.28$  (s, 12H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.35 (s, 12H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.44 (s, 12H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.48 (s, 12H,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 1.58 ( $m_c$ , 2H, H-k,l), 2.04 ( $m_c$ , 2H, H-m,n), 3.44

– 3.72 (m, 47H, H-4,5,6,6', H-a,b, H-c,d, H-e,f, H-x<sub>1</sub>, H-x<sub>2</sub>, H-i,j), 3.79 (dd, 4H, H-6), 4.07 (m<sub>c</sub>, 4H, H-3), 4.13 (dd ≈ d, 4H, H-2), 4.87 – 4.97 (m, 2H, H-p,q), 4.98 (d ≈ s, 4H, H-1), 5.74 (m<sub>c</sub>, 1H, H-o) ppm; <sup>3</sup>J<sub>2,3</sub> = 5.65 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5,6</sub> = 5.70 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6,6'</sub> = 10.81 Hz;

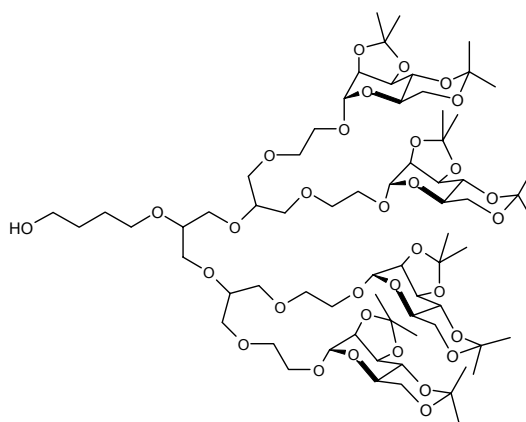
<sup>13</sup>C-NMR (125.76 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 18.76 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 26.16 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 28.17 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 29.05 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 29.25 (CH<sub>2</sub>, C-kl), 30.23 (CH<sub>2</sub>, C-mn), 61.31 (CH, C-5), 62.01 (CH<sub>2</sub>, C-6), 66.58 (CH<sub>2</sub>, C-ab\*), 69.67 (CH<sub>2</sub>, C-gh\*), 70.35, 70.38 (CH<sub>2</sub>, C-cd\*), 70.98 (CH<sub>2</sub>, C-ef\*), 72.71 (CH, C-4), 74.80 (CH, C-3), 75.98 (CH, C-2), 78.38 (CH, C-x<sub>1</sub>), 78.53 (CH<sub>2</sub>, C-i,j), 97.82, 97.84 (CH, C-1), 99.63 (Cq, C-O<sup>i</sup>Pr), 109.36 (Cq, C-O<sup>i</sup>Pr), 114.69 (CH<sub>2</sub>, C-pq), 138.34 (CH, C-o) ppm;

ESI-MS: *m/z* = 749.3649 [M+Na<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> (ber. *m/z* = 749.3643 für C<sub>70</sub>H<sub>116</sub>O<sub>31</sub>Na<sub>2</sub>), *m/z* = 1475.7303 [M+Na]<sup>+</sup> (ber. *m/z* = 1475.7393 für C<sub>70</sub>H<sub>116</sub>O<sub>31</sub>Na).

#### Tetra-(*i*pr-C<sub>2</sub>-manno)-O-butylen-OH (**101**)

Nach AAV 4 wurden 1.61 g (1.08 mmol) des ungesättigten Dendrimers **100** umgesetzt und aufgearbeitet. Der primäre Alkohol **101** konnte ohne Aufreinigung als farbloser Schaum isoliert werden.

Ausbeute: 898 mg (616 μmol, 57%)



<sup>1</sup>H-NMR (500.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.34 (s, 12H, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 1.42 (s, 12H, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 1.51 (s, 12H, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 1.54 (s, 12H, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 1.65 (m<sub>c</sub>, 4H, H-k,l, H-m,n), 3.52 – 3.66, 3.68 – 3.80 (m, 47H, H-4,5,6,6', H-a,b, H-c,d, H-e,f, H-x<sub>1</sub>, H-g,h, H-x<sub>2</sub>, H-i,j, H-o,p), 3.86 (m<sub>c</sub>, 4H, H-6), 4.14 (m<sub>c</sub>, 4H, H-3), 4.20 (dd ≈ d, 4H, H-2), 5.05 (d ≈ s, 4H, H-1) ppm;

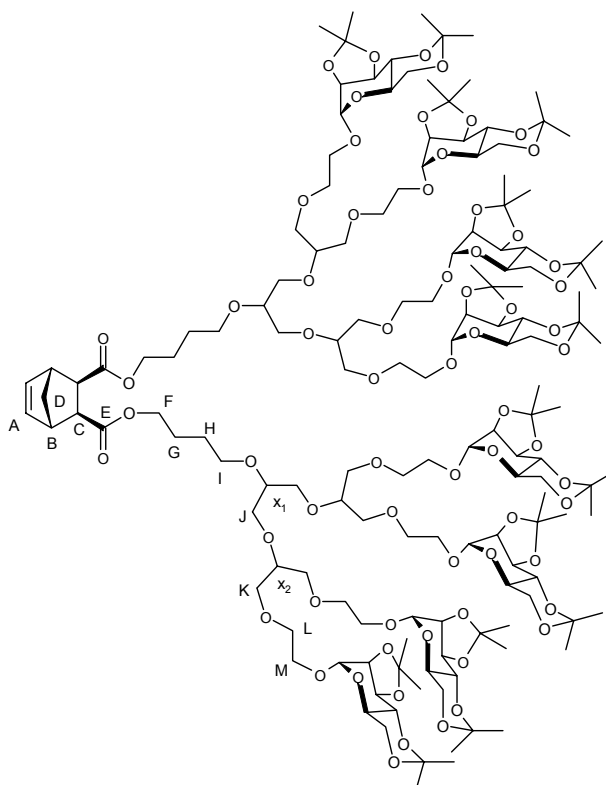
<sup>13</sup>C-NMR (125.76 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 18.79 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 26.20 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 26.94 (CH<sub>2</sub>, C-kl), 28.20 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 29.08 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 30.17 (CH<sub>2</sub>, C-mn), 61.35 (CH, C-5), 62.05 (CH<sub>2</sub>, C-6), 66.62 (CH<sub>2</sub>, C-ab\*), 70.40 (CH<sub>2</sub>, C-cd\*), 70.41 (CH<sub>2</sub>, C-ef\*), 71.03

(CH<sub>2</sub>, C-jh\*), 72.75 (CH, C-4), 74.83 (CH, C-3), 76.01 (CH, C-2), 78.52 (CH, C-x<sub>1</sub>\*), 78.53 (CH, C-x<sub>2</sub>\*), 97.88 (CH, C-1), 99.70 (C<sub>q</sub>, C-O<sup>i</sup>Pr), 109.42 (C<sub>q</sub>, C-O<sup>i</sup>Pr) ppm;

ESI-MS:  $m/z = 751.3700$  [M+Na<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> (ber.  $m/z = 751.3617$  für C<sub>69</sub>H<sub>116</sub>O<sub>32</sub>Na<sub>2</sub>),  $m/z = 1479.7512$  [M+Na]<sup>+</sup> (ber.  $m/z = 1479.7342$  für C<sub>69</sub>H<sub>116</sub>O<sub>32</sub>Na).

### Mukaiyama-Veresterung von Tetra-(*ipr*-C<sub>2</sub>-manno)-O-butylen-OH zu **102**

Nach AAV 5 wurden 60 mg (365 μmol, 1 eq) *exo*-Norbornendicarbonsäureanhydrid **60** und 1.33 g (912 μmol, 2.5 eq) des Alkohols **101** mit 112 mg (438 μmol, 1.2 eq) CMPI, 18 mg (146 μmol, 0.4 eq) DMAP und 150 μl (1.09 mmol, 3 eq) Triethylamin in 5 ml DCM umgesetzt und aufgearbeitet. Aufreinigung des Rohprodukts durch präparative HPLC an RP-18 Kieselgel mit MeCN/H<sub>2</sub>O gab das gewünschte Produkt **102** als farbloses Lyophyllisat.



$t_r = 60.81$  min

Gradient: 10 % MeCN für 10 min, 10 % → 100% MeCN in 60 min, 100% MeCN für 30 min

Ausbeute: 93 mg (30 μmol, 8%)

<sup>1</sup>H-NMR (500.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.28 (s, 24H, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 1.35 (s, 24H, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 1.44 (s, 25H, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr, H-D'), 1.47 (s, 24H, CH<sub>3</sub>-O<sup>i</sup>Pr), 1.49 – 1.65 (m, 8H, H-G, H-H), 2.01 (≈ d, 1H, H-D), 2.51 (≈ d, 2H, H-C,C'), 2.99 (m<sub>c</sub>, 2H, H-B,B'), 3.39 – 3.73 (m, 96H, H-4,5,6,6', H-I',K,M,N,O, H-x<sub>1</sub>,x<sub>2</sub>), 3.79 (m<sub>c</sub>, 8H, H-6), 3.88 (m<sub>c</sub>, 2H, H-I), 4.06 (m<sub>c</sub>, 12H, H-3, H-F,F'), 4.13 (dd ≈ d, 8H, H-2), 4.99 (d ≈ s, 8H, H-1), 6.12 (dd ≈ s, 3H, H-A,A') ppm;



$^{13}\text{C}$ -NMR (125.76 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 18.81 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 25.43 ( $\text{CH}_2$ , C-H), 26.22 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 28.22 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 29.10 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-O}^i\text{Pr}$ ), 45.62 ( $\text{CH}_2$ , C-D), 45.71 ( $\text{CH}$ , C-B), 47.39 ( $\text{CH}$ , C-C), 61.36 ( $\text{CH}$ , C-5), 62.05 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 64.55, 66.61 ( $\text{CH}_2$ , C-F\*), 69.81 ( $\text{CH}_2$ , C-I\*), 70.27 ( $\text{CH}_2$ , C-K\*), 70.39, 70.42 ( $\text{CH}_2$ , C-M\*), 70.99, 72.76 ( $\text{CH}_2$ , C-N\*), 74.84, 76.02 ( $\text{CH}_2$ , C-O\*), 78.34 ( $\text{CH}$ , C- $x_1$ \*), 78.52 ( $\text{CH}$ , C- $x_2$ \*), 97.86, 97.88 ( $\text{CH}$ , C-1), 99.67 (Cq, C- $\text{O}^i\text{Pr}$ ), 109.41 (Cq, C- $\text{O}^i\text{Pr}$ ), 137.99 ( $\text{CH}$ , C-A), 173.46 (Cq, C-E) ppm;

ESI-MS:  $m/z$  = 1553.2501  $[\text{M}+\text{Na}_2]^{2+}$  (ber.  $m/z$  = 1553.2546 für  $\text{C}_{147}\text{H}_{238}\text{O}_{66}\text{Na}_2$ ),  $m/z$  = 3084.5651  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z$  = 3084.5219 für  $\text{C}_{147}\text{H}_{238}\text{O}_{66}\text{Na}$ ).

### Deblockierung des Cluster-Mannosids **102** zu **103**

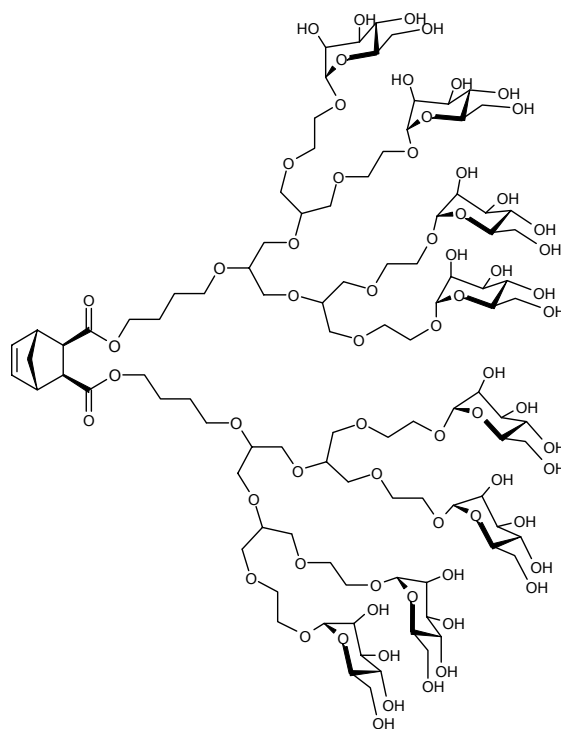
Nach AAV 6 wurden 93 mg (30  $\mu\text{mol}$ ) des Isopropyliden-geschützten Cluster-Mannosids **102** umgesetzt und aufgearbeitet. Aufreinigung des Rohprodukts durch präparative HPLC an RP-18 Kieselgel mit  $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$  gab das gewünschte Produkt **103** als farbloses, stark hygroskopisches Lyophilisat.

$t_r$  = 13.79 min

Gradient: 10 %  $\text{MeCN}$  für 10 min, 10 %  $\rightarrow$  25%  $\text{MeCN}$  in 30 min, 100%  $\text{MeCN}$  für 20 min

Ausbeute: 12 mg (5.1  $\mu\text{mol}$ , 17%)

$^1\text{H}$ -NMR (500.13 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 1.51 ( $m_c$ , 1H, H-D'), 1.95 ( $m_c$ , 1H, H-D), 2.76 (dd  $\approx$  d, 2H, H-C,C'), 3.11 ( $m_c$ , 2H, H-B,B'), 3.61 – 3.89 (m, 106H, H-3,4,5,6,6', H- $x_1$ , $x_2$ , H-I,K,M,N,O), 3.94 (dd, 8H, H-2), 4.04 ( $m_c$ , 2H, H-F'), 4.16 ( $m_c$ , 2H, H-F), 4.88 (d  $\approx$  s, 8H, H-1), 6.30 (dd  $\approx$  t, 2H, H-A,A') ppm;  $^3J_{1,2}$  = 1.77 Hz,  $^3J_{2,3}$  = 3.47 Hz;

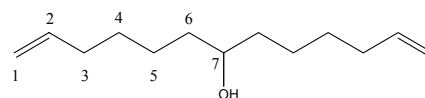


$^{13}\text{C}$ -NMR (125.76 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 27.09$  ( $\text{CH}_2$ , C-G), 28.21 ( $\text{CH}_2$ , C-H), 47.26 ( $\text{CH}_2$ , C-D), 47.82 ( $\text{CH}$ , C-B), 49.95 ( $\text{CH}$ , C-C), 63.33 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 67.91 ( $\text{CH}_2$ , C-F), 68.75 ( $\text{CH}_2$ , C-I\*), 69.12 ( $\text{CH}$ , C-H), 71.61 ( $\text{CH}_2$ , C-K\*), 71.94 ( $\text{CH}_2$ , C-M\*), 72.37 ( $\text{CH}_2$ , C-N\*), 72.45 ( $\text{CH}_2$ , C-O\*), 72.98 ( $\text{CH}$ , C-2), 75.16 ( $\text{CH}$ , C-3), 80.19, 80.32 ( $\text{CH}$ , C-5), 102.29 ( $\text{CH}$ , C-1), 140.46 ( $\text{CH}$ , C-A), 178.52 (Cq, C-E) ppm;

ESI-MS:  $m/z = 1233.0028$   $[\text{M}+\text{Na}_2]^{2+}$  (ber.  $m/z = 1233.0039$  für  $\text{C}_{99}\text{H}_{174}\text{O}_{66}\text{Na}_2$ ),  $m/z = 2444.0402$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z = 2444.0215$  für  $\text{C}_{99}\text{H}_{174}\text{O}_{66}\text{Na}$ ).

### 1,12-Tridecadien-7-ol (119)

1.1 g (45 mmol) Magnesiumspäne wurden mit 10 ml trockenem Diethylether übergossen und mit 0.5 ml (3.7 mmol) 6-Brom-1-hexen sowie einer Spatelspitze Iod



versetzt. Nach dem Anspringen der Reaktion (erkennbar durch eine leichte Trübung und durch Erwärmung der Reaktionsmischung) wurde eine Lösung von 5.65 ml (42.19 mmol) 6-Brom-1-hexen in 50 ml trockenem Diethylether so zugetropft, dass der Ether leicht siedete. Der Ansatz wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt und dann für 3 h unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde eine Lösung von 0.95 ml (15.3 mmol) Methylformiat (frisch destilliert von Kaliumcarbonat auf 4 Å Molsieb) zugetropft und die Mischung wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurde mit einer 1 M Ammoniumchloridlösung versetzt und die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, eingengt und der Rückstand wurde durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit EE:Cy 1:4 gereinigt.

Ausbeute: 2.59 g (13.2 mmol, 86%) farbloses Öl

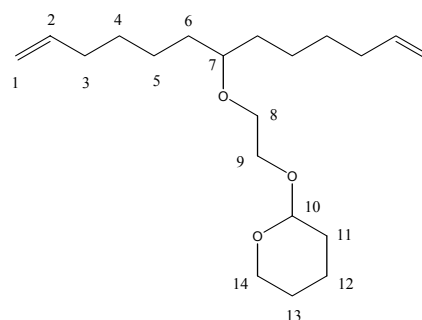
$^1\text{H}$ -NMR (500.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.32 - 1.49$  (m, 12H, H-4,4', H-5,5', H-6,6'), 2.07 ( $m_c$ , 4H, H-3,3'), 3.59 ( $m_c$ , 1H, H-7), 4.94 ( $m_c$ , 2H, H-1), 5.00 ( $m_c$ , 2H, H-1'), 5.81 ( $m_c$ , 2H, H-2,2') ppm;

$^{13}\text{C}$ -NMR (125.76 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 25.12$  ( $\text{CH}_2$ , C-5), 28.96 ( $\text{CH}_2$ , C-4), 33.73 ( $\text{CH}_2$ , C-3), 37.30 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 71.85 ( $\text{CH}$ , C-7), 114.37 ( $\text{CH}_2$ , C-1), 138.90 ( $\text{CH}$ , C-2) ppm;

ESI-MS:  $m/z = 219.1716$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  (ber.  $m/z = 219.1719$  für  $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{ONa}$ ).

### 2-({[1-(5-Hexenyl)-6-heptenyl]oxy}ethoxy)tetrahydro-2H-pyran (**121**)

Zu einer Suspension von 276 mg (11.5 mmol) reinem Natriumhydrid (erhalten durch Waschen einer 60proz. Suspension in Paraffinöl mit absolutem *n*-Hexan) in 25 ml trockenem DMF wurden bei Raumtemperatur unter Argon 1.5 g (7.6 mmol) 1,12-Tridecadien-7-ol **119**, 2.4 g (11.5 mmol) THP-geschütztes Bromoethanol **120**<sup>[108]</sup> und 565



mg (1.75 mmol) Tetrabutylammoniumbromid gegeben und der Ansatz wurde über Nacht gerührt. Da nach DC-Kontrolle kein vollständiger Umsatz des Alkohols **119** zu erkennen war, wurden noch einmal die gleichen Mengen an Natriumhydrid und Bromoethanol **120** zugegeben und es wurde für weitere 12 h bei Raumtemperatur und nach erneuter Zugabe von 1 eq Natriumhydrid und Bromoethanol **120** für 24 h bei 60°C gerührt. Zur Aufarbeitung wurde mit einer 1 M Ammoniumchloridlösung versetzt und die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, eingengt und der Rückstand wurde durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit EE:Cy 1:4 gereinigt.

Ausbeute: 2.24 g (6.90 mmol, 62%) farbloses Öl

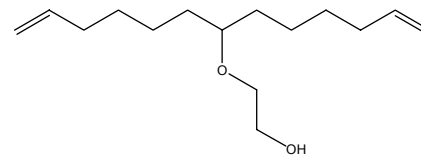
$^1\text{H}$ -NMR (500.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.78 - 0.92$ , 1.17 - 1.66, 1.67 - 1.74, 1.79 - 1.89 (m, 18H, H-4,4', H-5,5', H-6,6', H-11, H-12, H-13), 2.05 ( $m_c$ , 4H, H-3,3'), 3.27 ( $m_c$ , 1H, H-7), 3.47 - 3.53 (m, 1H, H-14), 3.55 - 3.63, 3.79 - 3.84 (m, 4H, H-8, H-9), 3.86 - 3.90 (m, 1H, H-14'), 4.65 (t, 1H, H-10), 4.89 - 5.02 (m, 4H, H-1), 5.76 - 5.86 (m, 2H, H-2) ppm;  $^3J_{10,11} = 3.62$  Hz;

$^{13}\text{C}$ -NMR (125.76 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 19.45$ , 24.94, 25.52, 29.18, 29.72, 30.63 ( $\text{CH}_2$ , C-4,4', C-5,5', C-6,6', C-11, C-12, C-13), 33.83, 33.87 ( $\text{CH}_2$ , C-3,3'), 62.13 ( $\text{CH}_2$ , C-14), 66.91 ( $\text{CH}_2$ , C-9), 68.06 ( $\text{CH}_2$ , C-8), 79.91 ( $\text{CH}$ , C-7), 98.83 ( $\text{CH}$ , C-10), 114.27 ( $\text{CH}_2$ , C-1,1'), 139.04 ( $\text{CH}$ , C-2,2') ppm;

ESI-MS:  $m/z = 347.2005$   $[M+Na]^+$  (ber.  $m/z = 347.2557$  für  $C_{20}H_{36}O_3Na$ ).

### 2-(Trideca-1,12-dien-7-oxy)-1-ethanol (122)

Eine Lösung von 800 mg (2.47 mmol) des geschützten Alkohols **121** in 5 ml Methanol wurde mit einer Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure versetzt und der Ansatz wurde für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde eingengt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit EE:Cy 1:2 gereinigt.



Ausbeute: 534 mg (2.22 mmol, 90%) farbloses Öl

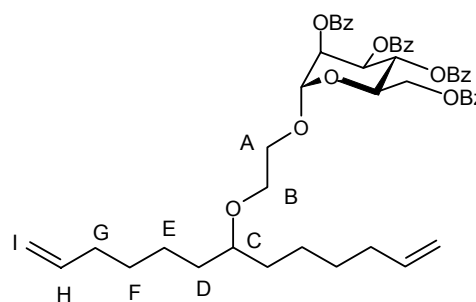
$^1H$ -NMR (500.13 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 1.25 - 1.55$  (m, 2H, H-2,2'), 2.05 ( $m_c$ , 4H, H-3,3'), 3.27 ( $m_c$ , 1H, H-7), 3.52 ( $m_c$ , 2H, H-8), 3.69 ( $m_c$ , 2H, H-9), 4.90 – 5.04 (m, 4H, H-1,1'), 5.74 – 5.86 (m, 2H, H-2,2') ppm;

$^{13}C$ -NMR (125.76 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = 24.83$  ( $CH_2$ , C-5,5'), 29.07 ( $CH_2$ , C-4,4'), 33.67, 33.72 ( $CH_2$ , C-3,3', C-6,6'), 62.21 ( $CH_2$ , C-9), 68.89 ( $CH_2$ , C-8), 79.89 (CH, C-7), 114.37 ( $CH_2$ , C-1,1'), 138.88 (CH, C-2,2') ppm;

ESI-MS:  $m/z = 239.2092$   $[M]^+$  (ber.  $m/z = 239.2006$  für  $C_{15}H_{27}O_2$ ).

### (2-{{1-(5-Hexenyl)-6-heptenyl}oxy}ethyl)- $\alpha$ -D-mannopyranosid (123)

Nach AAV 1 wurden 500 mg (2.55 mmol, 1 eq) des Alkohols **122** mit 4.72 g (6.37 mmol, 2.5 eq) perbenzoyliertem Mannosetrichloracetimidat **48** umgesetzt und aufgearbeitet. Die Reinigung des Rückstands durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit EE:Cy 1:2 lieferte das Produkt als farblosen Schaum.



Ausbeute: 923 mg (1.20 mmol, 47%)

$^1\text{H-NMR}$  (500.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.26 – 1.53 (m, 12H, H-D,D', H-E,E', H-F,F'), 1.95 – 2.02 (m, 4H, H-G,G'), 3.25 ( $m_c$ , 1H, H-C), 3.62, 3.70, 3.87 (je  $m_c$ , 4H, H-A, H-B), 4.41 ( $m_c$ , 1H, H-6'), 4.48 ( $m_c$ , 1H, H-5), 4.62 ( $m_c$ , 1H, H-6), 4.84, 4.90 (je  $m_c$ , 2H, H-I,I'), 5.09 (d  $\approx$  s, 1H, H-1), 5.34 ( $m_c$ , 1H, H-H'), 5.65 (dd, 1H, H-2), 5.68 – 5.75 (m, 1H, H-H), 5.86 (dd, 1H, H-3), 6.05 (pseudo-t, 1H, H-4), 7.16 – 7.21, 7.26 – 7.36, 7.41 – 7.44, 7.48 – 7.53, 7.74 – 7.77, 7.85 – 7.89, 7.97 – 8.00, 8.02 – 8.05 (je m, 20 H,  $H_{Ar}$ ) ppm;  $^3J_{1,2}$  = 1.84 Hz,  $^3J_{2,3}$  = 3.35 Hz,  $^3J_{3,4}$  = 10.11 Hz;

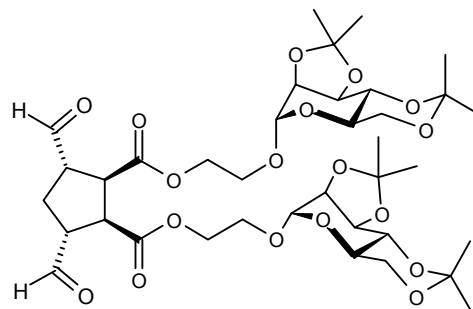
$^{13}\text{C-NMR}$  (125.76 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 17.88, 24.85, 29.13 ( $\text{CH}_2$ , C-D, C-E, C-F), 33.72 ( $\text{CH}_2$ , C-G), 62.87 ( $\text{CH}_2$ , C-6), 66.99 (CH, C-4), 67.55 ( $\text{CH}_2$ , C-B), 67.79 ( $\text{CH}_2$ , C-A), 68.74 (CH, C-5), 70.10 (CH, C-3), 70.51 (CH, C-2), 80.01 (CH, C-C), 95.68 (CH, C-1), 114.29 ( $\text{CH}_2$ , C-I), 124.02 – 133.39 (div. CH, Cq, C-Benzoyl), 139.02, (CH, C-H), 165.34, 165.38, 165.48, 166.19 (Cq, C-Carbonyl) ppm;

MALDI-TOF-MS:  $m/z$  = 842.2  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.  $m/z$  = 841.95 für  $\text{C}_{49}\text{H}_{54}\text{O}_{11}\text{Na}$ ),  $m/z$  = 858.1  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (ber.  $m/z$  = 858.06 für  $\text{C}_{49}\text{H}_{54}\text{O}_{11}\text{K}$ ).

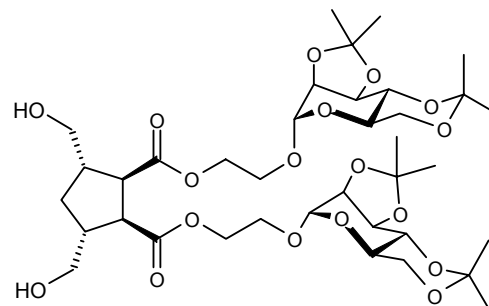
### Ozonisierungs-Reduktions-Sequenz von (2-*exo*,3-*exo*)-Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2,3-dicarbonsäure-bis(2-[2,3:4,6-di-*O*-isopropyliden- $\alpha$ -D-mannopyranosyloxy]ethyl)ester zu **124a**

Nach AAV 4 wurden 500 mg (0.66 mmol) des divalenten Mannosids **72** umgesetzt und aufgearbeitet. Die Reinigung des Rückstands durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit EE:Cy 1:1 lieferte zwei Produkte.

Fraktion 1: 100 mg (0.13 mmol, 20%) farbloses Öl,  
Dialdehyd **124b**



Fraktion 2: 180 mg (0.23 mmol, 35%) farbloser Schaum, Zielverbindung **124a**



### Zielverbindung **124a**:

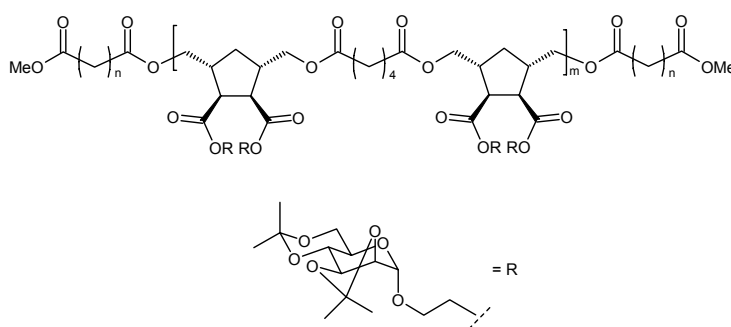
MALDI-TOF-MS:  $m/z = 813.7$   $[M+Na]^+$  (ber.  $m/z = 813.85$  für  $C_{37}H_{58}O_{18}Na$ ),  $m/z = 829.6$   $[M+K]^+$  (ber.  $m/z = 829.96$  für  $C_{37}H_{58}O_{18}K$ ).

### Aldehyd **124b**:

MALDI-TOF-MS:  $m/z = 809.6$   $[M+Na]^+$  (ber.  $m/z = 809.81$  für  $C_{37}H_{54}O_{18}Na$ ),  $m/z = 825.9$   $[M+K]^+$  (ber.  $m/z = 825.92$  für  $C_{37}H_{54}O_{18}K$ ).

### Polyestersynthese aus Diol **124a** und Adipinsäuredichlorid (**126**)

Eine Lösung von 100 mg (126  $\mu\text{mol}$ , 1 eq) des Diols **124a** in 3 ml DCM wurde unter Schlenk-Bedingungen mit 18  $\mu\text{l}$  (23 mg, 1 eq) Adipinsäuredichlorid **125** und 88 ml (65 mg, 506 mmol, 4 eq) DIPEA versetzt und über Nacht



bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von 5 ml Methanol wurde die Reaktion abgebrochen.

Analyse des Rohprodukts mit MALDI-TOF-MS zeigte die Bildung von Oligomeren mit bis zu fünf Wiederholungseinheiten (siehe Abb. 37). Versuche, die Oligomere durch GPC oder HPLC zu isolieren waren jedoch nicht erfolgreich.

## **7.4 Biochemische Arbeitsvorschriften**

### **7.4.1 Zellkultur & Affinitätschromatographie**

#### Verwendete Geräte und Materialien:

- Brutschrank: Heraeus Hera Cell
- Zentrifuge: Hettich Rotana 460R
- Ultrazentrifuge: Beckmann Avanti J-20 mit Rotor JA-20
- Affinitätssäule: Glass Econo-Column,  $\varnothing = 1$  cm, l = 5 cm, Bio-Rad
- Peristaltikpumpe: 2232 Microperpex S, LKB Bromma
- ELISA-Reader: Tecan, Modell Sunrise
- Zentrikon-Filter: Amicon Ultra, Millipore

#### Verwendete Pufferlösungen und Kulturmedien:

##### Kulturmedium für CHO-Zellen:

- MEM Alpha Medium (Earle's MEM, 1-fach, PAA Laboratories)
- 10 % (v/v) FCS dialysiert
- 1 % L-Glutamin (Sigma)
- 1 % Penicillin/ Streptomycin (PAA Laboratories, 10000  $\mu\text{g/ml}$ )
- 250 ml pro 500 ml Methotrexat (Sigma)

##### PBS-Puffer für die Zellkultur:

- Dulbecco's PBS 10-fach, steril, PAA Laboratories

##### Lade-Puffer für die Affinitätschromatographie:

- TRIS/ HCl pH 7.8                      20 mM
- NaCl    500 mM
- CaCl<sub>2</sub>    10 mM

##### Elutions-Puffer für die Affinitätschromatographie:

- TRIS/ HCl pH 7.8                      20 mM
- NaCl    500 mM
- EDTA    2 mM

Zellkultur:

Die CHO<sub>MMR</sub>-Zelllinie (DXB11) wurde ursprünglich von Taylor et al.<sup>[46]</sup> hergestellt und für diese Arbeit von der Laborgruppe *Molekulare Infektiologie* des Forschungszentrums Borstel zur Verfügung gestellt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in MEM Alpha Medium (s. o.) im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Um die adhärent wachsenden Zellen zu propagieren, erfolgte alle fünf Tage eine Subkultivierung, wobei das MMR-haltige Kulturmedium gesammelt und eingefroren wurde.

Passagieren der Zellen:

- Überstand abnehmen und sammeln (bei -20°C einfrieren)
- 1x mit gleicher Menge PBS waschen
- 5 ml Accutase (Accutase II, PAA Laboratories) zugeben
- bei 37°C für ca. 10 min im Brutschrank inkubieren
- Zellen durch leichtes Stoßen von der Unterlage ablösen
- Zellen in ein Falcon-Röhrchen überführen und mit PBS auf 50 ml auffüllen
- 10 min bei 4°C mit 1200 rpm zentrifugieren
- Überstand absaugen
- Pellet in 3-4 ml MEM aufnehmen
- 200 ml (ca.  $2 \times 10^5$  Zellen) in einer neuen Zellkulturflasche (Sarstedt) in 12 ml MEM animpfen

Aufreinigung des MMR:Herstellung der Mannose-Sepharose:

- Die Sepharose 6B (Sigma) unter Vakuumfiltration („Steritop“-Einmalfilter, 0.22 µm, Millipore) mit zwei Litern Millipore-Wasser waschen.
- Die leicht feuchte Sepharose in ein Becherglas überführen, 100 ml 0.5 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (pH 11.0) und 10 ml Divinylsulfon (Fluka) zugeben und anschließend abgedeckt 70 min rühren.
- Die nun aktivierte Sepharose wie oben beschrieben mit zwei Litern Millipore-Wasser waschen.



- Das feuchte Gel wieder in ein Becherglas geben und 100 ml 20 % (m/v) D-Mannose (Sigma) in 0.5 M NaHCO<sub>3</sub>-Puffer (pH 10.0) dazugeben und über Nacht bei Raumtemperatur rühren.
- Waschen mit Wasser.
- Gel in ein neues Becherglas mit 100 ml 0.5 M NaHCO<sub>3</sub>-Puffer (pH 8.5) überführen, mit 2 ml Mercaptoethanol versetzen und für 2 h bei Raumtemperatur rühren.
- Waschen mit Wasser.
- Mannose-Sepharose bei 4°C unter Millipore-Wasser aufbewahren.

#### Affinitätschromatographie:

- Säule für 1 h in 70 % (v/v) Ethanol desinfizieren und anschließend einmal mit 10 ml Braun-Wasser und zweimal mit 10 ml PBS-Puffer spülen
- Säule mit 8 ml Mannose-Sepharose packen (zur Aufbewahrung wird die Säule mit 20 % (v/v) Ethanol gespült und überschichtet)
- MMR-haltiges Kulturmedium auftauen und 10 Minuten bei 15000 rpm/ 20°C zentrifugieren (Beckmann-Zentrifuge)
- Überstand vom Pellet abnehmen und Zugabe von TRIS/ HCl (pH 7.8, Endkonzentration 20 mM), NaCl (Endkonzentration 500 mM) und CaCl<sub>2</sub> (Endkonzentration 10 mM)
- Säule mit 20 ml Lade-Puffer spülen
- Überstand auf die Säule geben und die Tropfgeschwindigkeit mit der Peristaltikpumpe auf 1 ml/min einstellen
- Durchfluss verwerfen bis Medium zu sehen ist
- 300 ml Überstand durch die Säule laufen lassen
- Säule mit 20 ml Lade-Puffer spülen und Durchbrüche sammeln
- 10 ml Elutionspuffer auf die Säule geben
- 8 Fraktionen mit je 1 ml sammeln (MMR-haltig) und bei 4°C aufbewahren
- Säule mit 20 ml Braun-Wasser und 20 ml 70 % (v/v) Ethanol spülen

#### Proteinbestimmung nach Bradford:

Die Proteinbestimmung erfolgte auf 96-Well Mikrotiterplatten (Maxisorb, Nunc), als Standard diente BSA (1 mg/ml) und als Blindprobe reines Braun-Wasser.

**Belegung der Mikrotiterplatte:**

- A<sub>1</sub> – A<sub>8</sub> und B<sub>1</sub> – B<sub>8</sub>: je 10 µl einer seriellen Verdünnung des BSA-Standards mit Braun-Wasser
- A<sub>9</sub> – A<sub>12</sub> und B<sub>9</sub> – B<sub>12</sub>: 10 µl Blindprobe
- C<sub>1</sub> – C<sub>12</sub> und D<sub>1</sub> – D<sub>4</sub>: jeweils zweimal 10 µl der Fraktionen aus der Affinitätschromatographie

**Durchführung der Proteinbestimmung:**

- Zugabe von 200 µl Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay)
- Messung der Absorption bei 595 nm im ELISA-Reader

**Aufkonzentrierung und Umpufferung des MMR:**

- 4 ml der Protein-Lösung in Elutionspuffer aus der Affinitätschromatographie in ein Zentrikon-Röhrchen geben
- 20 min mit 2500 rpm bei Raumtemperatur zentrifugieren (Hettich-Zentrifuge), Durchflüsse verwerfen
- die ersten beiden Schritte so oft wiederholen, bis alle Fraktionen verbraucht sind
- 2x mit 3 ml Lade-Puffer beladen und für 20 min bei 2500 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- Membran des Röhrchens mit der restlichen im Röhrchen verbliebenen Lösung spülen (ca. 1000 µl) und in ein 1.25 ml Eppendorf-Gefäß überführen
- Protein bei 4°C lagern

**7.4.2 Biacore**

Gerät: Biacore 3000, Biacore AB

Software: BIAevaluation V. 3.0.2

Sensorchip: CM5, Biacore AB

**Verwendete Pufferlösungen:**

- HEPES-P: HEPES (Biacore) mit 0.005 % (v/v) Polysorbat 20 (Biacore)
- HEPES-P-Ca: HEPES (Biacore) mit 0.005 % (v/v) Polysorbat 20 (Biacore) und 1 mM Ca<sup>2+</sup> (CaCl<sub>2</sub>, Merck)

- Acetat-Puffer: pH 4.5, (Biacore)

Alle Puffer und Lösungen wurden vor der Verwendung sorgfältig entgast.

Aktivierungslösungen: EDC, NHS

Ethanolamin: 1 M

MMR-Stammlösung: 2 mg/ml MMR in PBS-Puffer (siehe 7.4.1)

MMR-Arbeitslösung: 100 µg/ml in Acetat-Puffer pH 4.5

Aktivierung des CM5-Chips und Immobilisierung des MMR:

- Temperatur: 25°C
- Flussrate: 5 µl/min
- 80 µl einer 1:1 Mischung von EDC und NHS über Flusszelle 1 & 2 leiten
- 20 µl – 100 µl MMR-Arbeitslösung über Flusszelle 2 leiten
- 30 min mit 150 µl Ethanolamin deaktivieren

SPR-Messungen:

- Temperatur: 25°C
- Flussrate: 10 µl/min
- Injektion von 30 µl einer Lösung des Analyten in HEPES-P oder HEPES-P-Ca

### 7.4.3 ITC

Kalorimeter: MSC-ITC, MicroCal Inc.

Software: MCS Observer

Auswertungssoftware: Origin V. 6.0

Durchführung der ITC-Messungen:

- Referenzzelle mit 1.5 ml entgastem Millipore-Wasser befüllen
- Messzelle mit 1.5 ml einer 2.22 µM Lösung des MMR in Lade-Puffer (siehe 7.4.1) befüllen
- ca. 30 min warten, bis das thermische Gleichgewicht erreicht ist
- Spritze mit 100 µl einer Lösung des Analyten in Lade-Puffer befüllen und in das Kalorimeter einsetzen (90 µl werden für die Injektionen benötigt)
- ca. 30 min warten, bis das thermische Gleichgewicht erreicht ist

- Injektion des Analyten in 30 Aliquots mit je 3  $\mu\text{l}$ , Relaxationszeit zwischen den Injektionen ca. zwei Minuten
- alle Messungen wurden bei 27°C durchgeführt

Durchführung der reversen ITC-Messungen:

- Messzelle mit 1.5 ml einer 3.55  $\mu\text{M}$  Lösung von  $\alpha\text{-D-MeMan}$  in Lade-Puffer befüllen
- Spritze mit 100  $\mu\text{l}$  einer 37  $\mu\text{M}$  Lösung des MMR in Lade-Puffer befüllen
- alle weiteren Schritte entsprechen der Durchführung der normalen Messung

## 8. Literaturverzeichnis

- [1] C. Dye, S. Scheele, P. Dolin, V. Pathania, M. C. Raviglione, *J. Am. Med. Assoc.* **1999**, 282, 677 – 686; [www.worldpress.org/europe/944.cfm](http://www.worldpress.org/europe/944.cfm).
- [2] Robert Koch Institut, *Epidemiologisches Bulletin* **2004**, 12, 95 – 101.
- [3] C. R. Horsburgh, *J. Am. Med. Assoc.* **2000**, 283, 2575 – 2576.
- [4] S. J. Heymann, T. F. Brewer, M. E. Wilson, H. V. Fineberg, *J. Am. Med. Assoc.* **1999**, 281(22), 2138 – 2140.
- [5] *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, 259. Aufl., de Gruyter, Berlin, **2002**, S. 1701–1702.
- [6] S. H. E. Kaufmann, H. Hahn in *Issues in Infectious Diseases*, Vol. 2 (Hrsg. H. Zeichhardt, B. W. J. Mahy), Karger, Basel, **2003**, S. 112 – 127.
- [7] H. D. Isenberg, *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 1. Aufl., American Society for Microbiology, Washington, **1992**, S. 3.1.1 – 3.10.1.
- [8] G. E. Pfyffer in *Issues in Infectious Diseases*, Vol. 2 (Hrsg. H. Zeichhardt, B. W. J. Mahy), Karger, Basel, **2003**, S. 67 – 83.
- [9] G. A. Colditz, *J. Am. Med. Assoc.* **1994**, 271, 698 – 702.
- [10] M. W. Ehlers, M. Daffé, *Trends in Microbiology* **1998**, 6, 328 – 335; D. E. Minnikin, L. Kremer, L. G. Dover, G. S. Besra, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 545 – 553.
- [11] D. A. Mitchinson, *Tubercle* **1985**, 66, 219 – 225.
- [12] M. Goble in *Tuberculosis – Current Concepts and Treatment* (Hrsg. L. N. Friedman), CRC Press, Boca Raton, **2001**, S. 333 – 336.
- [13] D. M Underhill, A. Ozinsky, *Annu. Rev. Immunol.* **2002**, 20, 825 – 852.
- [14] J. D. Ernst, *Infect. Immun.* **1998**, 66, 1277 – 1281.
- [15] I. M. Roitt, J. Brostoff, D. K. Male, *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*, 2. Aufl., Thieme, Stuttgart, **1991**, S. 204 – 208.
- [16] D. Kusner in *Tuberculosis: The Microbe Host Interface*, Kap. 3 (Hrsg. L. S. Schlesinger, L. E. DesJardin), Horizon Bioscience, Norwich, **2004**, S. 77 – 101.
- [17] S. B. Lucas in *The Biology of the Mycobacteria*, Vol. 3 (Hrsg. C. Ratledge, J. Stanford, J. M. Grange), Academic Press, London, **1989**, S. 107 – 166.
- [18] J. A. Armstrong, P. D. Hart, *J. Exp. Med.* **1975**, 142, 1 – 16.
- [19] F. Biet, L. Kremer, I. Wolowczuk, M. Delacre, C. Loch, *Infect. Immun.* **2002**, 70, 6549 – 6557.
- [20] F. Takeshita, C. A. Leifer, I. Gursel, *J. Immunol.* **2001**, 167, 3555 – 3558.

- [21] J. F. Downing, R. Pasula, J. R. Wright, H. L. Twigg III, W. J. Martin II, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 4848 – 4852.
- [22] J. Pugin, I. D. Heumann, A. Tomasz, V. V. Kravchenko, Y. Akamatsu, M. Nishijima, M. P. Glauser, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch, *Immunity* **1994**, *1*, 509 – 516.
- [23] L. Tailleux, O. Schwartz, J.-L. Herrmann, E. Pivert, M. Jackson, A. Amara, L. Legres, D. Dreher, L. P. Nicod, J. C. Gluckman, P. H. Lagrange, B. Gicquel, O. Neyrolles, *J. Exp. Med.* **2003**, *197*, 121 – 127.
- [24] P. D. Stahl, R. A. B. Ezekowitz, *Curr. Opin. Immunol.* **1998**, *10*, 50 – 55.
- [25] D. L. Clemens, M. A. Horwitz, *J. Exp. Med.* **1995**, *181*, 257 – 270.
- [26] T. Mokoena, S. Gordon, *J. Clin. Invest.* **1985**, *75*, 624 – 631.
- [27] L. East, S. Rushton, M. E. Taylor, C. M. Isacke, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 50469 – 50475.
- [28] G. Lambeau, P. Ancian, J. Barhanin, M. Lazdunski, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 1575 – 1578; J. Ishizaki, K. Hanasaki, K. Higashino, J. Kishino, N. Kikuchi, O. Ohara, H. Arita, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 5897 – 5904; W. Jiang, W. J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, M. Steinmann, M. C. Nussenzweig, *Nature* **1995**, *375*, 151 – 155.
- [29] J. Summerfield, *Biochem. Soc. Trans.* **1993**, *21*, 473 – 477.
- [30] R. M. Steinman, *Cell* **2000**, *100*, 491 – 494.
- [31] G. Ashwell, J. Harford, *Annu. Rev. Biochem.* **1982**, *51*, 531 – 554.
- [32] A. J. Tenner, S. L. Robinson, J. Borchelt, J. R. Wright, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 13923 – 13928.
- [33] N. Sharon, *FEBS Letters* **1987**, *217*, 145 – 257.
- [34] G. S. Kansas, *Blood* **1996**, *88*, 3259 – 3287.
- [35] B. Williams, M. Chervenack, E. Toone, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 22907 – 22911.
- [36] H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637 – 674.
- [37] S. Zamze, L. Martinez-Pomares, H. Jones, P. R. Taylor, R. J. Stillion, S. Gordon, S. Y. C. Wong, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 41613 – 41623.
- [38] K. K.-S. Ng, A. R. Kolatkar, S. Park-Snyder, H. Feinberg, D. A. Clark, K. Drickamer, W. I. Weis, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 16088 – 16095.
- [39] H. Feinberg, D. A. Mitchell, K. Drickamer, W. I. Weis, *Science* **2001**, *294*, 2163 – 2166.
- [40] M. E. Taylor, J. T. Conary, M. R. Lennartz, P. D. Stahl, K. Drickamer, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 12156 – 12162.
- [41] W. I. Weis, K. Drickamer, *Structure* **1994**, *2*, 1227 – 1240.

- [42] P. N. Kanellopoulos, P. A. Tucker, *J. Struct. Biol.* **1996**, *117*, 16 – 23.
- [43] H. Feinberg, S. Park-Snyder, A. R. Kolatkar, C. T. Heise, M. E. Taylor, W. I. Weis, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21539 – 21548.
- [44] M. R. Lennartz, F. S. Cole, V. Shephard, T. E. Wileman, P. D. Stahl, *J. Biol. Chem.* **1988**, *262*, 9942 – 9944.
- [45] M. E. Taylor, K. Drickamer, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 399 – 404.
- [46] M.E. Taylor, K. Bezouška, K. Drickamer, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 1719-1726.
- [47] B. Y. Liu, A. J. Chirino, Z. Misulovin, C. Leteux, T. Feizi, M. C. Nussenzweig, P. J. Bjorkman, *J. Exp. Med.* **2000**, *191*, 1105 – 1115.
- [48] W. I. Weis, M. E. Taylor, K. Drickamer, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 399 – 404.
- [49] N. P. Mullin, P. G. Hitchen, M. E. Taylor, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 5668 – 5681.
- [50] B. K. Kang, L. S. Schlesinger, *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 2769 – 2777.
- [51] C. E. Napper, M. H. Dyson, M. E. Taylor, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 14759 – 14766.
- [52] P. G. Hitchen, N. P. Mullin, M. E. Taylor, *Biochem. J.* **1998**, *333*, 601 – 608.
- [53] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908 – 2953; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *37*, 2754 – 2794.
- [54] R. N. Germain, *Int. J. Technol. Assessment Health Care* **1994**, *10*, 81 – 92.
- [55] P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle, *Nature* **2000**, *403*, 669 – 672; E. Fan, Z. Zhang, W. E. Minke, Z. Hou, C. L. M. J. Verlinde, W. G. J. Hol, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2663 – 2664.
- [56] J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922 – 14933.
- [57] H. Lis, N. Sharon, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *218*, 1 – 27.
- [58] P. Sears, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2446 – 2471; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2300 – 2323.
- [59] L. L. Kiessling, N. L. Pohl, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 71 – 77.
- [60] T. K. Lindhorst, C. Kieburg, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2083 – 2086; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 1953 – 1956.
- [61] C. A. Hoppe, Y. C. Lee, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 14193 – 14199.
- [62] R. W. Jansen, G. Molema, T. L. Ching, R. Oosting, G. Harms, F. Moolenaar, M. J. Hardonk, D. K. F. Mijer, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 3343 – 3348.

- [63] E. A. L. Biessen, F. Noorman, M. E. van Teijlingen, J. Kuipert, M. Barrett-Bergshoeff, M. K. Bijsterbosch, D. C. Rijken, T. J. C. Berkel, *J. Biol. Chem.* **1996**, *45*, 28024 – 28030.
- [64] K. J. Ivin, J. C. Mol, *Olefin Metathesis and Metathesis Polymerization*, Academic Press, London, **1997**.
- [65] L. L. Kiessling, L. E. Strong in *Topics in Organometallic Chemistry*, Vol. 1 (Hrsg. A. Fürstner), Springer, Berlin, **1998**, 199 – 231.
- [66] R. L. Schnaar, Y. C. Lee, *Biochemistry* **1975**, *14*, 1535 – 1541.
- [67] K. Yamada, M. Minoda, T. Miyamoto, *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* **1997**, *35*, 751 – 757.
- [68] K. Tsutsumiuchi, K. Aoi, M. Okada, *Macromolecules* **1997**, *30*, 4013 – 4017.
- [69] R. G. Davies, V. C. Gibson, M. B. Hursthouse, M. E. Light, E. L. Marshall, M. North, D. A. Robson, I. Thompson, A. J. P. White, D. J. Williams, P. J. Williams, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2001**, *24*, 3365 – 3381; N. L. Pohl, L. L. Kiessling, *Synthesis* **1999**, *SI*, 1515 – 1519.
- [70] D. M. Lynn, S. Kanaoka, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 784 – 790.
- [71] T. Laue, A. Plagens, *Namen- und Schlagwort-Reaktionen der Organischen Chemie*, 2. Aufl., Teubner, Stuttgart, **1995**, S. 13 – 15.
- [72] C. Fraser, R. H. Grubbs, *Macromolecules* **1995**, *28*, 7248 – 7255.
- [73] K. H. Mortell, M. Gingras, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 12053 – 12054.
- [74] K. H. Mortell, R. V. Weatherman, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2297 – 2298.
- [75] M. C. Schuster, K. H. Mortell, A. D. Hegeman, L. L. Kiessling, *J. Mol. Cat. A: Chemical* **1997**, *116*, 209 – 216.
- [76] M. Upreti, D. Ruhela, R. A. Vishwarkama, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6577 – 6584.
- [77] M. Dubber, Dissertation, Universität Hamburg, 2001.
- [78] M. M. K. Boysen, Dissertation, Universität Kiel, 2003; M. M. K. Boysen, K. Elsner, O. Sperling, T. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 4376 – 4386.
- [79] T. Mukaiyama, M. Usui, K. Saigo, *Chem. Lett.* **1976**, 49 – 50.
- [80] S. Iyer, S. Rele, G. Grasa, S. Nolan, E. L. Chaikof, *Chem. Comm.* **2003**, *13*, 1518 – 1519.
- [81] K. B. Wagener, K. Brzezinska, J. D. Anderson, T. R. Younkin, W. DeBoer, *Macromolecules* **1997**, *30*, 7363 – 7369.



- [82] M. Gosh, R. G. Dulina, R. Kakarla, M. J. Sofia, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8387 – 8390.
- [83] R. C. Anand, S. Selvapalam, *Synth. Commun.* **1994**, *24*, 2743 – 2748.
- [84] R. H. Furneaux, Z. Pakulski, P. C. Tyler, *Can. J. Chem.* **2002**, *80*, 964 – 972.
- [85] T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 1. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 81 – 82.
- [86] I. Cumpstey, T. D. Butters, R. J. Tennant-Eyler, A. J. Fairbanks, R. R. France, M. R. Wormald, *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 1937 – 1950.
- [87] L. E. Strong, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6193 – 6196.
- [88] P. Krist, L. Vannucci, M. Kuzma, P., K. Sadalapure, A. Patel, K. Bezouška, M. Pospíšil, L. Petruš, T. K. Lindhorst, V. Kren, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 445 – 452.
- [89] W. Hayes, H. M. I. Osborn, S. D. Osborne, R. A. Rastall, B. Romagnoli, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 7983 – 7996.
- [90] M. Jayaraman, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12996 – 12997.
- [91] M. Lindmark-Hamberg, K. B. Wagener, *Macromolecules* **1987**, *20*, 2949 – 2951.
- [92] T. E. Hopkins, K. B. Wagener, *Macromolecules* **2004**, *37*, 1180 – 1189.
- [93] E. Grabenhorst, P. Schlenke, S. Pohl, N. Nimtz, H. S. Conradt, *Glycoconjugate J.* **1999**, *16*, 81 – 97.
- [94] R. J. Kaufman, P. A. Sharp, *J. Mol. Biol.* **1982**, *159*, 601 – 621.
- [95] M. Holtzhauer, *Biochemische Labormethoden*, 3. Aufl., Springer, Berlin, **1997**, S. 6 – 7.
- [96] E. Kretchmann, *Z. Physik* **1971**, *241*, 313 – 324.
- [97] K. Nagata, H. Handa, *Real-Time Analysis of Biomolecular Interactions: Applications of Biacore*, 1. Aufl., Springer, Tokyo, **2000**, S. 13 – 22.
- [98] M. J. Blandamer, P. M. Cullis, J. B. F. N. Engberts, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1998**, *94*, 2261 – 2267.
- [99] T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts, L. N. Lin, *Anal. Biochem.* **1989**, *179*, 131 – 137.
- [100] www.microcalorimetry.com; G. A. Holdgate, *BioTechniques* **2001**, *31*, 164 – 184.
- [101] K. E. Doucette, F. Y. Aoki, *Expert Opin. Pharmacother.* **2001**, *2*, 1671 – 1683.
- [102] J. Hallbach, *Klinische Chemie für den Einstieg*, 1. Aufl., Thieme, Stuttgart, **2001**, S. 67 – 73.
- [103] P. M. Rudd, I. G. Scragg, E. C. Coghill, R. A. Dwek, *Glycoconjugate J.* **1992**, *9*, 86 – 91.

- [104] C. S. Hung, J. Bouckaert, D. Hung, J. Pikner, C. Widberg, A. DeFusco, C. G. Auguste, R. Strouse, S. Langermann, G. Waksman, S. J. Hultgren, *Mol. Biol.* **2002**, *44*, 903 – 915.
- [105] M. Vetsch, C. Pourger, T. Spirig, U. Grauschopf, E.-U. Weber-Ban, R. Glockshuber, *Nature* **2004**, *431*, 330 – 332.
- [106] D. Coudhury, A. Thompson, V. Stojanoff, S. Langermann, J. Pickner, S. J. Hultgren, S. D. Knight, *Science* **1999**, *285*, 1061 – 1066; F. G. Sauer, M. Barnhart, D. Choudhury, S. D. Knight, G. Wacksmann, S. J. Hultgren, *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **2000**, *5*, 548 – 556; S. D. Knight, J. Berglund, D. Choudhury, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *6*, 653 – 660.
- [107] O. Sperling, Dissertation, Universität Kiel, **2004**.
- [108] K. Dörner, *Klinische Chemie und Hämatologie*, 5. Aufl., Thieme, Stuttgart, **2003**, S. 59 – 61.
- [109] J. Leonard, B. Lygo, G. Procter, *Advanced Practical Organic Chemistry*, 2. Aufl., Chapman & Hall, London, **1995**, S. 54 – 69.
- [110] R. M. Owen, J. E. Gestwicki, T. Young, L. L. Kiessling, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2293 – 2296.
- [111] M. Kanai, K. H. Mortell, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9931 – 9932.
- [112] J. J. Pappas, W. P. Keaveney, M. Berger, R. V. Rush, *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 787 – 792.
- [113] I. L. Scott, R. V. Market, R. J. DeOrazio, H. Meckler, T. P. Kogan, *Carbohydr. Res.* **1999**, *317*, 210 – 216.
- [114] P. G. McDougal, J. G. Rico, Y.-I. Oh, B. D. Condon, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3388 – 3390.
- [115] C. Andrews, R. Rodebaugh, B. Fraser-Reid, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5280 – 5289.

## Danksagung

Ich möchte den Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern meines Arbeitskreises danken, die weit mehr als nur Kollegen sind und die meine Zeit in Kiel nie langweilig werden ließen:

- **Mike Boysen** für die vielen hilfreichen Diskussionen, Tipps & Tricks bei kniffligen Synthesen und komplizierten NMR-Auswertungen, viele lustige Abende im Strongbow's, etliche lange Nächte bei Ü30-Partys im Max und einen sehr schrägen Schlager-Move in Hamburg.
- **Kathrin Doege**, die inzwischen an der Uni Lübeck ist, für ihr Lachen im Labor, eine tolle Silvester-Feier und ihrem Freund **Andreas Brügge** noch für einige nette ‚Herrenabende‘.
- **Katharina Elsner** für ihre Freundschaft, ihre Fröhlichkeit, ihre Unterstützung beim Korrekturlesen von Poster-Abstracts und anderen Dokumenten, einem sehr kurzfristigem Spargelessen und den vielen McFlurrys vor und nach Kinovorstellungen.
- **Andreas Fuchs** für seine Hilfe beim Molecular Modelling, den bayrischen Abenden mit gutem Bier und leckerem Geselchtem und dass er mich zu meiner großen Leidenschaft, dem Sportklettern, gebracht hat.
- **Christine Haug**, unserer Sekretärin, für die Bearbeitung von Dienstreiseanträgen, auch wenn ich sie mal wieder viel zu spät eingereicht habe, und ihrer Hilfe bei vielen anderen organisatorischen Dingen.
- **Christoph Heidecke** für viele interessante & hilfreiche Diskussionen im Labor, seine nette Gesellschaft bei unserem Kurztrip zu Mike nach Schweden und den geteilten Fritten-Portionen beim Chemiker-Stammtisch im Strongbow's.
- **Mike Kleinert** für einige tolle Segeltörns mit der *Peter von Danzig* bei Sturm und Regen auf der Kieler Förde, inklusive Segelriss, und mit dem Kutter auf der Schlei.
- **Elwira Klima-Bartczak**, unserer CTA, für ihre unermüdliche Unterstützung bei unzähligen Synthesen und langwierigen chromatographischen Trennungen, für ihre stets gute Laune und ihr freundliches Wesen, der Organisation vieler Dinge für den Arbeitskreis und ganz besonders dafür, dass sie immer ein offenes Ohr und ein freundliches Wort übrig hat.
- **Edda Kettler**, inzwischen an der RWTH Aachen, für viele lustige Abende in Kiel und dafür, dass sie auch in nicht so tollen Zeiten immer da war.
- **Marco Kühne**, für seine Ruhe und Gelassenheit.

- **Sonja Lüthje**, die leider auch nicht mehr im Arbeitskreis ist, für ihr fröhliches Wesen und für die vielen netten Unterhaltungen mit ungezählten Karamel-Macchiattos.
- **Niels Röckendorf** für seine ruhige Art, Tipps & Tricks bei kniffligen Synthesen, streikenden Computern und schwierigen GPC-Trennungen, der Hilfe beim Schrauben an zickenden HPLC-Anlagen, für etliche tolle gemeinsam absolvierte Halbmarathons und Triathlons, sowie für seine Gastfreundschaft und die seiner Frau **Conny Röckendorf** an mehreren schönen Abenden in Oering und besonders Conny für die Möglichkeit zum ersten mal im Sattel eines Pferdes Platz zu nehmen.
- **Harun Shaik** for some nice conversations training my English-skills and for not-playing indian music too loud in the lab.
- **Oliver Sperling** für seine Freundschaft, den 'köstlichen' Abenden mit dem 'Kieler-Koch-Kollektiv' und dem Import kubanischer Zigarren von Helgoland, sowie seiner Freundin **Kathleen Hornke** für ihre liebenswerte Art.
- **Mark Walter** für interessante wissenschaftliche Diskussionen und seine Tipps für das Zusammenschreiben dieser Arbeit.
- **Michaela Wiegand** für ihre Freundschaft, ihre Unterstützung und Motivation seit sie in Kiel ist und ebenso für die netten Treffen des 'Kieler-Koch-Kollektivs', zu dem auch ihr Freund **Stefan Märten** gehört.

Des Weiteren möchte ich den Angestellten des Instituts für Organische Chemie der Universität Kiel für ihre Unterstützung danken: der Spektroskopischen Abteilung mit **Dr. Christian Wolff**, **Ulrike Drieling**, **Holger Franzen**, **Marion Höftmann**, **Gitta Kohlmeyer-Yilmaz**, **Dirk Meyer**, **Rolf Schmied** und **Elmar Schneider** (ihm ganz besonders dafür, dass er mich zu meinem zweiten großen Hobby, dem Segelfliegen, gebracht hat), unserer Institutssekretärin **Regina Meinschmidt**, **Andreas Wilms** (Chemikalienausgabe), den Mitarbeiterinnen und ehemaligen Mitarbeiterinnen der Bibliothek **Manuela Krannich**, die auch Artikel aus den ungewöhnlichsten Zeitschriften in Rekordzeit besorgt hat, sowie **Katrin Wagener** und **Celina Ahrens** und nicht zuletzt den Mitarbeitern der Technik & Versorgung **Rüdiger Kargoll** und **Monika Bänsch**.

Weiterhin gilt mein Dank den Mitarbeitern des Forschungszentrums Borstel:

Der Laborgruppe *Molekulare Infektiologie* für die Unterstützung bei der Isolierung des MMR: **Prof. Dr. Stefan Ehlers** für die Möglichkeit in seiner Laborgruppe zu arbeiten, **Dr. Norbert Reiling** für seine organisatorische Unterstützung, die interessanten Erläuterungen über Tbc und den MMR, viele nützliche Tipps & Hinweise und für die Möglichkeit, die Laboratorien

und Ressourcen seiner Gruppe zu nutzen, **Svenja Kröger** für ihre unermüdliche Unterstützung bei den biochemischen Arbeiten und für ihre unglaubliche Geduld bei dem Unterfangen mir diverse biochemische Arbeitsmethoden in kürzester Zeit beizubringen, sowie Norbert, Svenja und **Dr. Artur Malzan** für ihre Dienste als „Taxi“ von oder nach Bad Oldesloe bzw. Bad Segeberg.

Der Abteilung *Biophysik* für die Unterstützung bei den ITC-Messungen: **Prof. Dr. Ulrich Seydel**, für die Möglichkeit, die Messungen in seiner Abteilung durchzuführen, **Gerold von Busse** für seine Einweisung am Kalorimeter und ganz besonders **Dr. Alexander David** und **Jörg Howe** für die unentwegte Hilfe bei der Durchführung & Auswertung der Messungen und dafür, dass sie mir die Zeit in Borstel durch ihre kameradschaftliche Aufnahme bei etlichen netten Koch-, Video- und Herrenabenden sehr kurzweilig gemacht haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei **PD Dr. Thomas Weimar** (Institut für Chemie, MU Lübeck) für die Möglichkeit, die SPR-Messungen in seinem Labor durchzuführen und bei den Mitarbeitern des Instituts für Biochemie der CAU Kiel: **Prof. Dr. Rose-John** für die Möglichkeit, die Ressourcen seines Instituts zu nutzen, **Dr. Radislav Sedlacek** für Tipps zur Kultivierung der CHO-Zellen und ganz besonders **Inken Beck**, die mich tatkräftig & geduldig bei den zellbiologischen Arbeiten unterstützt hat.

Auch außerhalb der Chemie gibt es Menschen, die durch ihre Freundschaft maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und denen ich danken möchte: **Jelka Meyer**, für einen tollen Uni-Ball, einige lustige Abende im Max und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr hat, **Stefanie Guette** dafür, dass sie immer für mich da ist und für die Einladung zu einer schicksalhaften Geburtstagsparty im Herbst letzten Jahres, sowie den Mitgliedern der **Akademischen Fliegergruppe Kiel (Akaflieg)** und den Mitgliedern der **Uni-Mannschaft im Sportklettern**.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern **Gisela und Dieter Thieme**, die mich während meines gesamten Studiums und der Dissertation in jeglicher Hinsicht unterstützt haben, sowie meiner Schwester **Melanie Thieme**.

**Und zum Schluss möchte ich einem ganz besonderen Menschen danken:**

meiner Freundin **Iris Martensen** für ihre Liebe und für die wunderschöne Zeit mit ihr seit Herbst letzten Jahres, sowie für ihr Verständnis & ihre Unterstützung während des Zusammenschreibens meiner Dissertation.

## Lebenslauf

### Dipl.-Chem. Florian Thieme

Geboren am 23.08.1973 in Braunschweig,  
deutsche Staatsangehörigkeit

### Schulbildung

08 / 1980 – 06 / 1993  
Grundschule, Orientierungsstufe und Gymnasium in Braunschweig  
Abschluss: Abitur

### Hochschulbildung

10 / 1993 – 04 / 2000  
Studium der Chemie, Technische Universität Braunschweig  
09 / 1996 – 04 / 1997  
Studienaufenthalt am Department of Chemistry, University of Leicester,  
Großbritannien  
07 / 1999 – 04 / 2000  
Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig und  
bei der Merck KGaA Darmstadt  
*Festphasengebundene Reagenzien: Untersuchungen zur katalytischen  
Reduktion von polymergebundenen Nitroaromaten und zur Immobilisierung  
von Enzymen auf anorganischen Trägern*  
(universitäre Betreuung: Prof. Dr. Burkhard König)  
17.04.2000  
Chemie-Diplom an der TU Braunschweig  
10 / 2000  
Beginn der Dissertation in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Thisbe K.  
Lindhorst am Institut für Organische Chemie der Universität Kiel  
*Synthese von Cluster-Mannosiden als multivalente Inhibitoren für den  
Mannose-spezifischen Makrophagen-Rezeptor*

### Wissenschaftliche Tätigkeiten

07 / 1995 – 05 / 1996  
Wissenschaftliche Hilfskraft in der Gesellschaft für Biotechnologische  
Forschung mbH (GBF) in Braunschweig-Stöckheim im Bereich Zell- und  
Immunbiologie (AG Molekulare Erkennung)  
04 / 2000 – 09 / 2000  
Forschungsprojekt bei der Merck KGaA Darmstadt  
*Synthese von Coumaranon- und Auron-Derivaten für kosmetische  
Anwendungen*  
11 / 2000 – 03 / 2004  
Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Organische Chemie der  
Universität Kiel  
07 / 2004 – 12 / 2004  
Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Sonderforschungsbereich 470  
*Glycostructures in Biological Systems*

09 / 2001

**Vorträge & Posterbeiträge**

11<sup>th</sup> European Carbohydrate Symposium, Lissabon (Poster)

06 / 2002

CarbLink III, Kiel (Poster, Kurzvortrag)

09 / 2002

Summer School of Medicinal Chemistry, Regensburg (Poster)

**Veröffentlichungen**

M. Rödel, F. Thieme, H. Buchholz, B. König, *Synth. Commun.* **2002**, 32(8),  
1181 – 1187.