

## SYNTHESE VON UNSYMMETRISCHEN PENTASACCHARID-SEQUENZEN DER *N*-GLYCOPROTEINE\*

HANS PAULSEN, WOLFGANG RAUWALD UND ROLF LEBUHN

*Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, Martin-Luther-King-Platz 6, D-2000 Hamburg 13 (Bundesrepublik Deutschland)*

(Eingegangen am 6. Juni 1984; angenommen am 10. Juli 1984)

### ABSTRACT

The two pentasaccharides *O*-(2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-*O*-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]-*O*- $\beta$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose and *O*-(2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[*O*- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-*O*- $\beta$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose which represent unsymmetrical sequences of the carbohydrate chain of *N*-glycoproteins of the lactosamine type and, thus, are useful compounds for studying the biosynthesis of *N*-glycoproteins, were synthesized by glycosidation of partially deprotected tetrasaccharides.

### ZUSAMMENFASSUNG

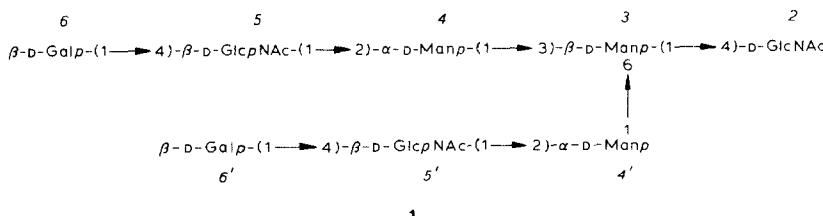
Es wurden die beiden Pentasaccharide *O*-(2-Acetamido-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-*O*-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]-*O*- $\beta$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-desoxy-D-glucopyranose und *O*-(2-Acetamido-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[*O*- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-*O*- $\beta$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-desoxy-D-glucopyranose synthetisiert, die beide unsymmetrische Teilstücke der Kohlenhydrat-Kette von *N*-Glycoproteinen des Lactosamin-Typs darstellen. Sie sind für Biosynthese-Studien der *N*-Glycoproteine geeignet. Der Glycosidierungs-schritt zu den Pentasacchariden erfolgt mit partiell entblockierten Tetrasacchariden.

### EINFÜHRUNG

Vor kurzem haben wir über die Synthese des Basis-Octasaccharides **1** der *N*-Glycoproteine vom lactosaminischen Typ berichtet<sup>2,3</sup>. Diese Verbindung enthält zwei Lactosamin-Ketten (Antennen). Weiterhin wurde von uns die invariable Pentasaccharid-“Core”-Struktur synthetisiert<sup>4</sup>, die gleichermaßen im oligo-

\*LXI. Mitteilung der Serie "Bausteine von Oligosacchariden" LX. Mitteil., siehe Zit. 1.

mannosidischen, lactosaminischen und hybridischen Typ der N-Glycoprotein-Strukturen vorkommt. Auch wurden eine Reihe von Teilsegmenten der genannten Oligosaccharide dargestellt<sup>3</sup>. Diese Teilssegmente sind von erheblicher Bedeutung für die Aufklärung der Biosynthese der Oligosaccharid-Ketten der N-Glycoproteine<sup>5</sup>. So haben Harpaz und Schachter<sup>6</sup> in einer umfangreichen Studie untersucht, welche Teilssegmente von den verschiedenen von ihnen isolierten N-Acetylglucosaminyl-Transferasen<sup>7</sup> glycosidiert werden. Mit diesen Segmenten läßt sich ebenfalls studieren, welche Minimalstruktur notwendig ist, damit eine Glycosidierung mit bestimmten Glycosyltransferasen erfolgen kann. Auf diesem Wege haben Schachter *et al.*<sup>8</sup> ein relativ übersichtliches Reaktionsschema entwickelt, aus dem sich die Hauptwege des Aufbaus der Oligosaccharid-Ketten ergeben. Aus dem Schema wird ebenfalls erkennbar, welche Glycosidierungsschritte nicht ablaufen können.



Zur Vervollständigung dieses Biosynthese-Schemas ist die Prüfung der beiden unsymmetrisch substituierten Pentasaccharid-Segmente **10** und **14** von Interesse. Beide Verbindungen sollen daraufhin untersucht werden, ob mit ihnen eine Glycosidierung mit N-Acetylglucosaminyl-Transferasen möglich ist. Es muß erwähnt werden, daß für eine Glycosidierung die Anwesenheit der  $\beta$ -glycosidisch gebundenen 2-Amino-2-desoxy-D-glucose-Einheit am reduzierenden Ende unbedingt notwendig ist<sup>8</sup>. In der vorliegenden Veröffentlichung wird die Synthese der beiden unsymmetrisch substituierten Sequenzen **10** und **14** beschrieben.

#### DISKUSSION UND ERGEBNISSE

Ausgangsprodukt der Synthese ist das von uns bereits dargestellte verzweigte Tetrasaccharid<sup>9,10</sup> **2**. Dieses enthält  $\beta$ -glycosidisch verknüpft am reduzierenden Ende eine 2-Azido-2-desoxy-D-glucose-Einheit, die später in die essentielle  $\beta$ -glycosidisch verknüpfte 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose-Einheit umgewandelt werden kann. Die beiden  $\alpha$ -glycosidisch verknüpften D-Mannosereste enthalten jeweils an C-2" und C-2'" eine selektiv abspaltbare *O*-Acetylgruppierung. Um eine unsymmetrische Substitution an diesen beiden Positionen zu erreichen, wurde die Hydrolysegeschwindigkeit dieser beiden *O*-Acetylgruppen untersucht.

Für eine Partialhydrolyse der *O*-Acetylgruppen in **2** erwiesen sich sehr milde Bedingungen mit Kaliumcarbonat in Dichlormethan-Methanol 3:1, am günstigsten. Unter diesen Bedingungen liegen neben dem Ausgangsprodukt **2** die Mono-

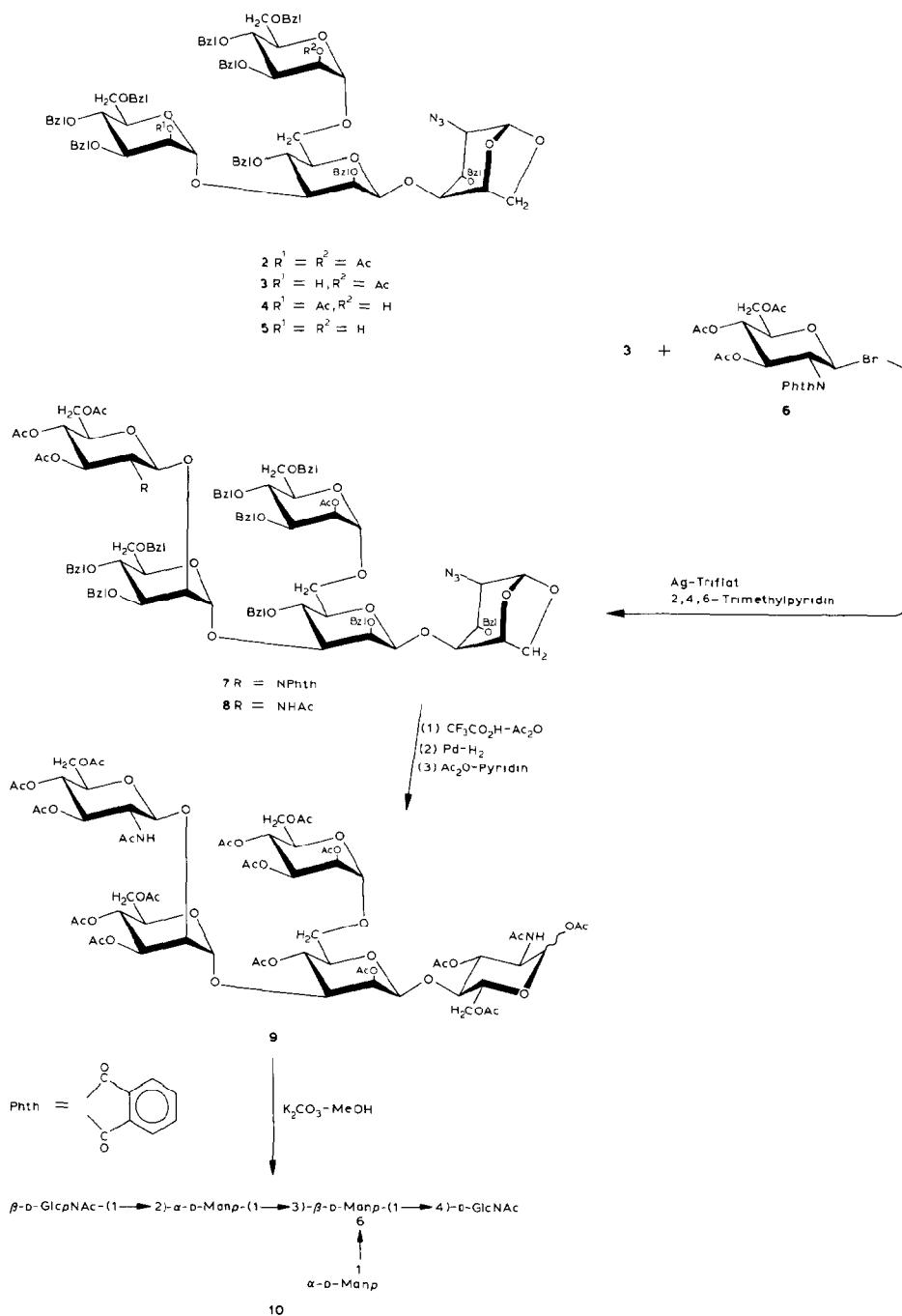


TABELLE I

<sup>1</sup>H-NMR-DATEN DER OLIGOSACCHARIDE (PYRANOSERING-PROTONEN)<sup>a</sup>

Einheit	Verbindung	Chemische Verschiebung ( $\delta$ ), Multiplicität						Kopplungskonstanten (Hz)						
		H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a	J <sub>1,2</sub>	J <sub>2,3</sub>	J <sub>3,4</sub>	J <sub>4,5</sub>	J <sub>5,6a</sub>	J <sub>5,6b</sub>	
2	3	5.48s	3.08s	3.66s	3.79s	4.53m	4.02dd	3.66dd	0.5	0.5	0.5	0.8	6.0	7.2
	4	5.47s	3.15s	3.67s	3.79s	4.53m	4.07dd	3.86dd	0.5	0.5	0.5	1.0	6.0	7.3
7	5.45s	3.09s	3.65s	3.77s	4.47m	4.03dd	3.65dd	0.5	0.5	0.5	0.8	6.1	7.1	
8	5.48s	3.12s	3.69s	3.85s	4.59m	4.07dd	3.70dd	0.5	0.5	0.5	1.2	6.2	6.8	
10 <sup>b</sup>	5.06d	3.48m	3.24s	3.80s	3.85s	4.55m	4.14dd	3.71dd	0.5	0.5	0.5	0.9	6.4	7.1
11	5.51s	3.22s	3.73s	3.80s	4.56m	4.12dd	3.70dd	0.5	0.5	0.5	1.0	6.3	7.3	
12	5.52s	3.75m	4.09m	3.61m	3.61m									
14 <sub>a</sub>	$\beta$													
3	3	4.62s	3.96dd	3.81m <sup>c</sup>	3.82m <sup>c</sup>	3.38ddd	3.74dd	3.82dd	0.5	2.8	9.4	1.5	5.2	11.3
	4	4.65s	3.96d	3.76dd	3.93dd	3.34ddd	3.86dd	3.86dd	0.5	2.9	9.6	9.0	2.0	11.8
7	4.61s	3.84d	3.51dd	3.82dd	3.41ddd	3.82d	3.75dd	0.5	3.0	10.1	9.5	1.8	5.1	11.5
8	4.73s	3.90d	3.82dd	3.87m	3.43ddd	3.84dd	3.66dd	0.5	2.9	8.4	9.0	1.7	4.4	12.0
10 <sup>b</sup>	4.59s	3.95d	3.45dd	3.74dd	3.24m	3.85m <sup>c</sup>	3.85m <sup>c</sup>	0.5	2.9	10.1	10.0			
11	4.67s	3.96d	3.30dd	3.90dd	3.62ddd	3.76dd	3.85dd	0.5	2.9	9.5	10.1	2.2	5.0	11.2
12	4.64s	4.62s												
4	3	5.18d	3.76dd	3.80dd	3.74ddd	3.58dd	3.64dd	1.0	2.8	10.0	9.4	2.0	6.3	11.0
	4	5.19d	5.51dd	3.96dd	3.81m	3.75m	3.61dd	3.68dd	1.7	3.3	8.8	1.4	4.2	10.7
7	5.01dd	3.95dd	3.83dd	3.65m <sup>c</sup>	3.65m <sup>c</sup>	3.74ddd	3.62dd	3.51dd	1.5	2.6	8.9	1.7	4.4	10.7
8	5.05d	3.90dd	3.90dd	3.88dd	3.74ddd	3.60m	3.68m	1.5	2.9	9.2	9.4	2.2	4.2	
10 <sup>b</sup>	4.96	4.03dd	5.51dd	3.92dd	3.76m	3.56dd	3.63dd	1.6	2.8					
11	5.18d	5.52dd	3.93dd	3.57dd	3.79ddd	3.57dd	3.65dd	1.4	3.3	9.2	10.2	1.8	4.8	10.8
12	5.20d	4.93d	3.90dd	3.76m						8.9	9.7	1.8	6.2	
14 <sup>b</sup>												3.4		

<b>4'</b>	<b>3</b>	4.94d	5.40dd	3.86ddd	3.80ddd	3.74dddd	3.55dd	3.60ddd	1.6	3.2	8.9	9.6	2.0	4.0	10.6
	<b>4</b>	5.05d	4.09dd	3.75dd	3.81m <sup>c</sup>	3.81 <sup>c</sup>	3.63dd	3.57dd	1.5	2.8	9.2	9.9	1.8	4.4	10.6
	<b>7</b>	4.91d	5.40dd	3.85ddd	3.62m	3.61ddd	3.27dd	2.85dd	1.5	3.0	9.0	9.9	1.5	5.9	10.7
	<b>8</b>	4.93d	5.42dd	3.85dd	3.83dd	3.65ddd	3.51dd	3.61dd	1.8	2.9	9.0	9.4	1.9	4.2	10.8
	<b>10<sup>b</sup></b>	4.78d	3.78m												
	<b>11</b>	5.51d	4.26dd	3.78dd	3.55dd	3.42ddd	3.24dd	2.95dd	1.4	3.0	9.2	10.0	1.9	5.8	11.1
	<b>12</b>	4.82d	4.24dd	3.83dd	3.93dd	3.56ddd	3.47m <sup>c</sup>	3.53m <sup>c</sup>	1.5	2.9	8.7	9.8	1.6	6.2	
	<b>14<sup>b</sup></b>	4.75d	3.94dd	3.76m											
<b>5</b>	<b>7</b>	5.15d	4.37ddd	5.58dd	5.05dd	2.54ddd	3.97dd	3.83dd	8.5	10.8	9.0	10.0	2.8	6.4	12.4
	<b>8</b>	4.47d	3.41ddd	5.26dd	4.90dd	2.81ddd	3.90dd	4.05dd	8.4	10.4	9.3	9.7	2.2	4.3	12.4
	<b>10<sup>b</sup></b>	4.39d	3.74m												
<b>5'</b>	<b>11</b>	4.67d	4.48dd	5.78dd	5.18dd	3.79ddd	4.12dd	4.26dd	8.3	10.8	9.1	10.0	2.4	5.5	12.1
	<b>12</b>	5.06d	3.32ddd	5.64dd	5.00dd	3.62ddd	4.04dd	4.20dd	8.4	10.6	9.3	10.1	2.0	4.8	12.1
	<b>14<sup>b</sup></b>	4.39d	3.57m												

<sup>a</sup>Die Numerierung der Einheiten erfolgte nach Formel 1. Die <sup>1</sup>H-N.m.r.-Spektren wurden bei 400 MHz aufgenommen. Die Verbindungen **10** und **14** wurden in D<sub>2</sub>O, alle anderen Substanzen wurden in CDCl<sub>3</sub> vermessen. Die Kopplungen wurden nach 1. Ordnung bestimmt. Fernkopplungen der 1,6-Anhydro-Einheit wurden nicht berücksichtigt. <sup>b</sup>Die angegebenen Daten gelten für das  $\alpha$ -Anomere. <sup>c</sup>Die Protonen waren nicht 1. Ordnung auswertbar.

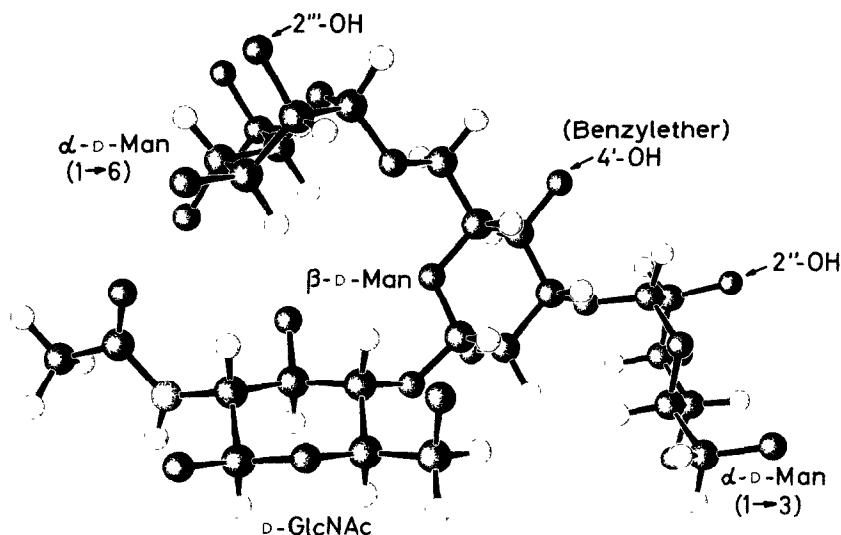


Abb. 1. Energiearmste Konformation der entblockierten Verbindung **2** nach einer Berechnung mit dem g.e.s.a.-Programm<sup>11</sup>

acetate **3**, **4** und das vollständig hydrolysierte Produkt **5** vor. Alle vier Produkte weisen erhebliche Unterschiede in ihren chromatographischen Laufzeiten auf, so daß sie leicht zu trennen sind. Nach zwei Stunden ist bei 20° mit anteilen von 34% **2**, 15% **3**, 35% **4** und 10% **5** ein Optimum an Monoacetyl-Verbindungen zu erreichen. Das leicht abtrennbare **5** ist durch Nachacetylierung wieder in das ebenfalls leicht abtrennbare **2** zu überführen, so daß praktisch kein Verlust bei der Darstellung der Monoacetate entsteht, denn **2** kann erneut für eine partielle Hydrolyse eingesetzt werden.

Eine Zuordnung der Struktur der Monoacetate **3** und **4** war nur durch 2D-N.m.r.-Spektren möglich. Von **3** und **4** wurden <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-korrelierte Spektren hergestellt. Aus den c.o.s.y.-Spektren ließ sich eine vollständige Zuordnung der Protonen der verschiedenen Pyranoseringe durchführen. Bei **3** wurde für H-2'' und bei **4** für H-2''' eine Hochfeldverschiebung im Vergleich mit den entsprechenden Signalen von **2** gefunden. Umgekehrt ist bei **3** das H-2'''-Signal und bei **4** das H-2''-Signal in seiner chemischen Verschiebung mit den korrespondierenden Werten in **2** vergleichbar. Dieses entspricht der angegebenen Zuordnung. Die Daten der N.m.r.-spektren sind in Tabelle I enthalten. Die dort angegebene Numerierung der einzelnen Oligosaccharid-Einheiten ist Formel **1** zu entnehmen.

Bemerkenswert ist, daß die Hydrolyse der *O*-Acetylgruppe in der (1→3)- und der (1→6)-glycosidisch gebundenen D-Mannose-Einheit mit unterschiedlicher Reaktionsgeschwindigkeit erfolgt. So ist die Spaltungsgeschwindigkeit im (1→6)-gebundenen Ring etwa doppelt so groß. Von dem allerdings vollständig entblockierten Tetrasaccharid **2** haben wir die bevorzugte Konformation durch h.s.e.a.-Berechnungen und n.O.e.-N.m.r.-Experimente bestimmt<sup>11</sup>. Die bevorzugt vor-

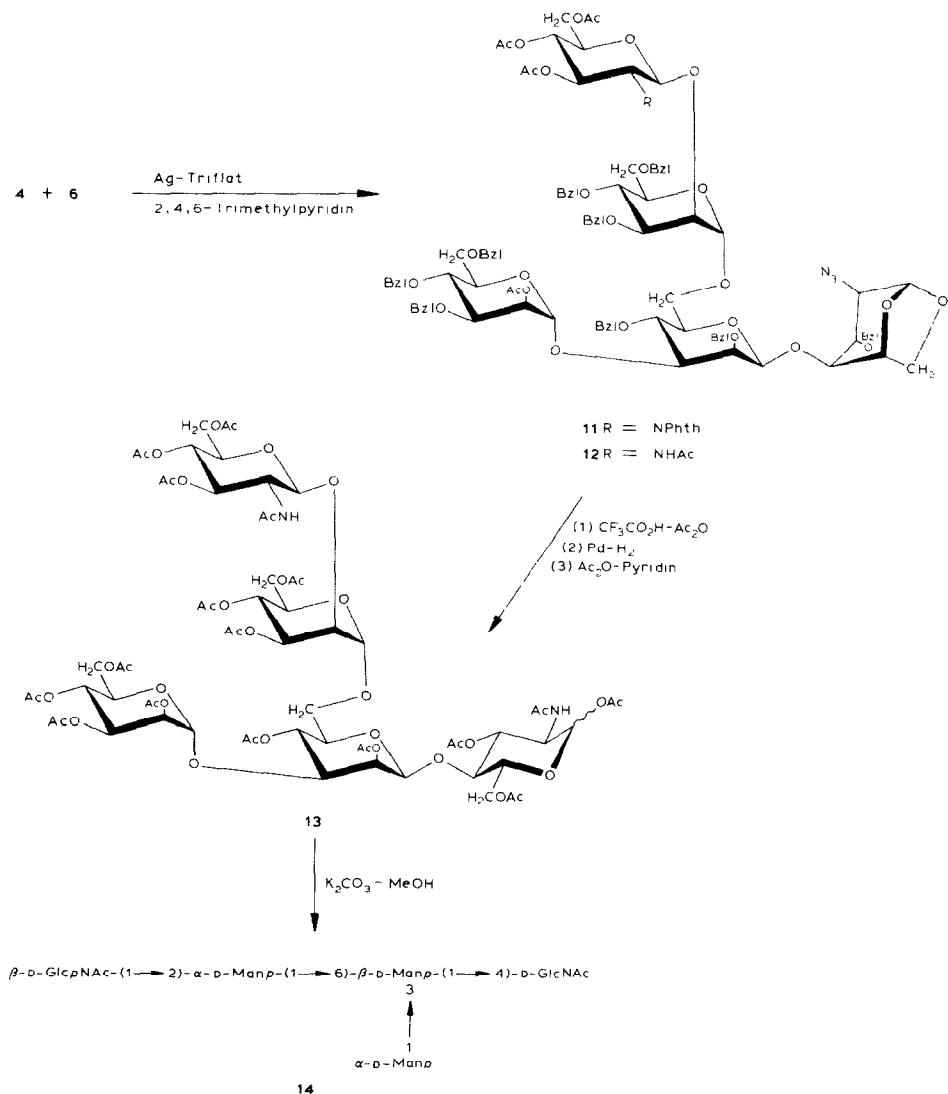
liegende *gt*-Konformation ist auf Abb. 1 wiedergegeben. Nimmt man für die blockierte Verbindung **2**, zumindest in dem aus drei D-Mannoseresten bestehenden Teil, eine vergleichbare Konformation an, so ist erkennbar, daß die Benzylether-Gruppierung an C-4' der mittleren D-Mannose-Einheit die *O*-Acetylgruppe der (1→3)-gebundenen D-Mannose abschirmt. Hier wäre somit eine geringere Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber der relativ freistehenden *O*-Acetylgruppe der (1→6)-gebundenen D-Mannose zu erwarten.

Für die Glycosidsynthese mit **3** und **4** wird als bewährter Glycosyldonator die Phthalimido-Verbindung<sup>12</sup> **6** eingesetzt. Bei Gegenwart von Silbertriflat-2,4,6-Tri-methylpyridin ist **3** mit **6** zum Pentasaccharid **7** umzusetzen. Die Hydroxylgruppe der (1→3)-verknüpften D-Mannose-Einheit reagiert auch hier etwas schwieriger, und es muß ein größerer Überschuß an **6** eingesetzt werden. Von **7** läßt sich durch 2D-N.m.r.-Spektroskopie das <sup>1</sup>H-N.m.r.-Spektrum weitgehend lösen (siehe Tabelle I). Die Diaxialkopplung von  $J_{1'',2''}$  8.4 zeigt die  $\beta$ -glycosidische Bindung der neu angeknüpften Einheit an.

Zur Entblockierung werden in **7** zunächst mit katalytischen Mengen Natriummethoxid in Methanol die *O*-Acetylgruppen entfernt. Die Abspaltung der Phthalimido-Gruppe erfolgt durch Behandeln mit Hydrazinhydrat in Ethanol. Die anschließenden Acetylierung ergibt dann **8**. Durch vorsichtige Acetolyse mit Trifluoressigsäure-Acetanhydrid wird der 1,6-Anhydroring der reduzierenden Einheit geöffnet. Daran schließt sich unmittelbar die hydrogenolytische Abspaltung der Benzylethergruppen an, da bei der Acetolyse schon teilweise Benzylether an den primären OH-Gruppen der  $\alpha$ -D-Mannose-Einheiten abgespalten werden<sup>3</sup>. Die anschließende Acetylierung ergibt das vollständig peracetylierte Produkt **9**. Das Acetat **9** liegt als Anomerengemisch im Verhältnis  $\alpha:\beta$  wie 4:1 vor. Im letzten Schritt wird aus **9** durch milde alkalische Spaltung mit Kaliumcarbonat in Methanol<sup>13</sup> das gewünschte Pentasaccharid freigesetzt. In wäßriger Lösung wird ein Anomerenverhältnis  $\alpha:\beta$  wie 2:3 gefunden.

Die Darstellung des Pentasaccharides **14** erfolgt in entsprechender Weise. Die partiell entacetylierte Verbindung **4** ergibt mit dem Glycosyldonator **6** bei Gegenwart von Silbertriflat in noch besserer Ausbeute das Pentasaccharid **11**. Auch hier ließ sich das <sup>1</sup>H-N.m.r.-Spektrum durch ein 2D-c.o.s.y.-Spektrum weitgehend analysieren. Das Spektrum ist mit der Struktur gut vereinbar (siehe Tabelle I).

Zur Entblockierung von **11** werden wiederum alkalisch zunächst die *O*-Acetylgruppen abgespalten und dann mit Hydrazin die Phthalimido-Gruppe entfernt. Die Nachacetylierung ergibt **12**. Durch Acetolyse mit Trifluoressigsäure-Acetanhydrid wird der 1,6-Anhydroring geöffnet. Die anschließende Hydrogenolyse und Acetylierung führt zu **13**, das im Anomerengemisch  $\alpha:\beta$  wie 5:3 vorliegt. Die Spaltung mit Kaliumcarbonat in Methanol liefert das vollständig entblockierte Produkt **14**. In wäßriger Lösung findet man hier ein Anomerenverhältnis von  $\alpha:\beta$  wie 1:1. Damit stehen beide Pentasaccharide **10** und **14** für biologische Untersuchungen zur Verfügung.



## EXPERIMENTELLER TEIL

*Allgemeine Methoden.* — Alle Reaktionen wurden dünnenschichtchromatographisch an Kieselgel-Fertigfolie (Merck, GF<sub>254</sub>) verfolgt. Detektion U.v.-Adsorption, Ansprühen mit Ethanol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  10:1 oder mit Ninhydrin-Lösung mit anschließender Wärmebehandlung (180°). Säulenchromatographische Trennungen: Kieselgel 60 (Merck). Die Feinreinigung der entblockierten Verbindungen erfolgt an Kieselgel LiChroprep NH<sub>2</sub> (Merck). Optische Drehungen: Perkin-Elmer Polariometer 241 in 1 dm Küvetten bei 589 nm. N.m.r.-Spektren: Bruker WH 270 und WM 400, innerer Standard Me<sub>4</sub>Si.

Alle Glycosidsynthesen wurden in Braunglaskolben unter Stickstoffatmosphäre und mit absolut wasserfreien Lösungsmitteln durchgeführt.

*O-(3,4,6-Tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-O-[(2-O-acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 6)]-O-(2,4-di-O-benzyl- $\beta$ -D-mannopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-1,6-anhydro-2-azido-3-O-benzyl-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranose (**3**) und O-(2-O-Acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-O-[(3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 6)]-O-(2,4-di-O-benzyl- $\beta$ -D-mannopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-1,6-anhydro-2-azido-3-O-benzyl-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranose (**4**). — Tetrasaccharid<sup>10</sup> **2** (1.6 g, 2.52 mmol) wird in Dichlormethan (15 mL) und Methanol (5 mL) gelöst. Unter Rühren gibt man wasserfreies, gepulvertes K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (40 mg) zu. Nach Beendigung der Reaktion (2 h, D.c.: Toluol-Aceton 3:1, v/v; *R*<sub>F</sub> 0.70 für **4**, 0.55 für **3**, 0.45 für **2** und 0.30 für **5**) wird mit Ionenaustauscher Dowex 50 WX-8 (H<sup>+</sup>) neutralisiert, filtriert und an Kieselgel (Toluol-Aceton 9:1, v/v) getrennt.*

**3.** Ausb. 240 mg (15%), Sirup,  $[\alpha]_D^{20} +20.6^\circ$  (c 1.5, Chloroform); <sup>1</sup>H-N.m.r. (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>; Protonen der Pyranoseringe siehe Tabelle I):  $\delta$  7.45–7.10 (m, 45 H, 9 Ph), 4.99–4.40 (18 d, 18 H, 9 CH<sub>2</sub>-Ph), 2.35 (d, 1 H, OH), 2.07 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>CO).

*Anal.* Ber. für C<sub>89</sub>H<sub>95</sub>N<sub>3</sub>O<sub>20</sub> (1526.8): C, 70.02; H, 6.27; N, 2.75. Gef.: C, 70.11; H, 6.23; N, 2.81.

**4.** Ausb. 560 (35%), Sirup,  $[\alpha]_D^{20} +19.0^\circ$  (c 1.0, Chloroform); <sup>1</sup>H-N.m.r. (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, Protonen der Pyranoseringe siehe Tabelle I):  $\delta$  7.45–7.10 (m, 45 H, 9 Ph), 5.01–4.34 (18 d, 18 H, 9 CH<sub>2</sub>-Ph), 2.06 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>CO).

*Anal.* Ber. für C<sub>89</sub>H<sub>95</sub>N<sub>3</sub>O<sub>20</sub> (1526.8): C, 70.02; H, 6.27; N, 2.75. Gef.: C, 69.88; H, 6.27; N, 2.75.

Ferner werden isoliert an **2**: 540 mg (34%) und an **5**: 160 mg (11%).

*O-(3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 2)-O-(3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-O-[(2-O-acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 6)]-O-(2,4-di-O-benzyl- $\beta$ -D-mannopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-1,6-anhydro-2-azido-3-O-benzyl-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranose (**7**). — Die Hydroxylkomponente **3** (270 mg, 0.18 mmol) wird in Dichlormethan (10 mL) gelöst. Man setzt pulverisiertes Molekularsieb 4A (1.5 g), Silbertrifluormethansulfonat (0.7 g, 2.76 mmol) und 2,4,6-Trimethylpyridin (0.35 mL, 2.63 mmol) zu und kühlt unter Rühren auf –40°. Danach tropft man innerhalb 1 h das Glycosylhalogenid **6** (0.1 g, 0.2 mmol), gelöst in Dichlormethan (5 mL) zu und lässt anschließend innerhalb 5 h auf Raumtemp. erwärmen. Es wird wieder auf –40° abgekühlt und die gleiche Menge Glycosylhalogenid **6** (0.1 g, 0.2 mmol) in Dichlormethan (5 mL) nochmals eingetropft. Nach dem Erwärmen auf Raumtemp. (5 h) wird mit Dichlormethan (100 mL) verdünnt, über Celite filtriert und das Filtrat mit Eiswasser, eiskalter 3%iger HCl, wäßriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und Wasser gewaschen. nach dem Trocknen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Einengen wird der Rohsirup an Kieselgel (Toluol-Aceton 10:1, v/v) gereinigt; Ausb. 210 mg (61%), Sirup,  $[\alpha]_D^{20} +8.6^\circ$  (c 0.6, Chloroform); <sup>1</sup>H-N.m.r. (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>; Protonen der Pyranoseringe siehe Tabelle I):  $\delta$  7.40–7.10 (m, 49 H, 9 Ph, 1 Phth), 5.00–4.35 (18 d, 18 H, 9 CH<sub>2</sub>-Ph), 2.19, 2.04, 2.00, 1.86 (4 s, 12 H, 4 CH<sub>3</sub>CO).*

*Anal.* Ber. für  $C_{109}H_{114}N_4O_{29}$  (1944.1): C, 67.34; H, 5.91; N, 2.88. Gef.: C, 67.37; H, 5.90; N, 2.90.

O-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 2)-O-(3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-O-[(2-O-acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 6)]-O-(2,4-di-O-benzyl- $\beta$ -D-mannopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-1,6-anhydro-2-azido-3-O-benzyl-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranose (**8**). — Pentasaccharid **7** (210 mg, 0.11 mmol) wird in Methanol (5 mL) gelöst und mit methanolischer Methanolat-Lösung (0.5 mL, 1%) innerhalb 3 h deacetyliert. Nach dem Neutralisieren mit Ionenaustauscher Dowex 50 WX-8 ( $H^+$ ) wird filtriert und eingeengt. Der Sirup wird in Ethanol-Wasser (5 mL, 19:1) gelöst und nach Zugabe von Hydrazinhydrat (0.8 mL, 80%) 1.5 h unter Rückfluß erhitzt (D.c.: Chloroform-Methanol 4:1, v/v). Die abgekühlte Lösung versetzt man mit 1-Butanol (3 mL), engt am Hochvakuum zur Trockene ein, nimmt mit Pyridin-Acetanhydrid (5 mL, 2:1, v/v) auf und läßt 12 h bei Raumtemp. stehen (D.c.: Toluol-Aceton 3:1, v/v). Nach Entfernen des Lösungsmittels am Hochvakuum wird an Kieselgel (Toluol-Aceton 7:1 $\rightarrow$ 3:1, v/v) gereinigt; Ausb. 137 mg (68%), Sirup,  $[\alpha]_D^{20} +11.1^\circ$  (*c* 1.4, Chloroform);  $^1H$ -N.m.r. (400 MHz,  $CDCl_3$ ; Protonen der Pyranoseringe siehe Tabelle I):  $\delta$  7.35–7.10 (m, 45 H, 9 Ph), 5.19 (d,  $J_{2''\text{--NH}}$  8.0 Hz, 1 H, NH), 5.01–4.32 (18 d, 18 H, 9  $CH_2$ -Ph), 2.34, 2.12, 2.07, 1.96, 1.94 (5 s, 15 H, 5  $CH_3CO$ ).

*Anal.* Ber. für  $C_{103}H_{114}N_4O_{28}$  (1856.0): C, 66.66; H, 6.19; N, 3.02. Gef.: C, 66.59; H, 6.25; N, 2.98.

O-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 2)-O-(3,4,6-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-O-[(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 6)]-O-(2,4-di-O-acetyl- $\beta$ -D-mannopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-1,3,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ , $\beta$ -D-glucopyranose (**9**). — Pentasaccharid **8** (70 mg, 38  $\mu$ mol) wird in einer Lösung aus Acetanhydrid-Trifluoressigsäure (8 mL, 15:1, v/v) 6 Tage bei Raumtemp. stehengelassen (D.c.: Toluol-Aceton 3:1, v/v). Es wird mit Toluol am Hochvakuum eingeengt und über Kieselgel (Toluol-Aceton 7:1, v/v) gereinigt. Den erhaltenen Sirup löst man in Methanol (10 mL), setzt 1,4-Dioxan (1 mL), Acetanhydrid (0.1 mL) und Pd-C (120 mg, 10%) zu und hydriert 5 h bei 4.5 MPa Wasserstoffdruck. Danach wird filtriert und nach dem Einengen mit Pyridin-Acetanhydrid (3 mL, 2:1, v/v) 12 h bei Raumtemp. acetyliert. Dann wird mit Toluol am Hochvakuum abgezogen und der Rückstand an Kieselgel (Toluol-Ethanol 8:1 $\rightarrow$ 5:1, v/v) gereinigt; Ausb. 30.5 mg (52%);  $[\alpha]_D^{20} +16.7^\circ$  (*c* 0.8, Chloroform). Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomeren (Verhältnis  $\alpha$ : $\beta$  wie 4:1) lassen sich nicht trennen.

*Anal.* Ber. für  $C_{64}H_{88}N_2O_{41}$  (1541.4): C, 49.87; H, 5.75; N, 1.82. Gef.: C, 49.81; H, 5.80; N, 1.86.

O-(2-Acetamido-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O-[ $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]-O- $\beta$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ , $\beta$ -D-glucopyranose (**10**). — Das Anomerengemisch **9** (20 mg, 13  $\mu$ mol) wird in Methanol (5 mL) gelöst und nach Abkühlung auf 0° mit  $K_2CO_3$  (5 mg) versetzt und 3 Tage gerührt. Es wird mit Ionenaustauscher Dowex 50 WX-8

(H<sup>+</sup>) neutralisiert, filtriert und zur Trockene eingedampft. (D.c.: Chloroform-Methanol-Wasser, 5:4:1, v/v/v). Die Substanz wird mit Wasser säulenchromatographisch an Sephadex G25 gereinigt; Ausb. 8 mg (65%), Sirup,  $[\alpha]_D^{20} -7.7^\circ$  (*c* 0.35, Wasser); <sup>1</sup>H-N.m.r. (400 MHz, D<sub>2</sub>O, bezogen auf HOD,  $\delta$  4.64; Protonen der Pyranoseringe siehe Tabelle I):  $\delta$  1.90 (s, 6 H, 2 CH<sub>3</sub>CO); in wäßriger Lösung wird ein Anomerieverhältnis  $\alpha:\beta$  von 2:3 beobachtet.

*Anal.* Ber. für C<sub>34</sub>H<sub>58</sub>N<sub>2</sub>O<sub>26</sub> (910.8): C, 44.84; H, 6.42; N, 3.08. Gef.: C, 44.81; H, 6.45; N, 3.11.

O-(3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1→2)-O-(3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-(1→6)-O-[(2-O-acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-(1→3)]-O-(2,4-di-O-benzyl- $\beta$ -D-mannopyranosyl)-(1→4)-1,6-anhydro-2-azido-3-O-benzyl-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranose (**11**). — Das Tetrasaccharid **4** (465 mg, 0.3 mmol) wird in Dichlormethan (10 mL) gelöst. Man setzt pulverisiertes Molekularsieb 4A (2 g), Silbertrifluormethansulfonat (880 mg, 3.41 mmol) und 2,4,6-Trimethylpyridin (0.4 mL, 2.91 mmol) hinzu und kühl unter Rühren auf -40°. Danach tropft man innerhalb einer Stunde die Glycosylhalogenid **6** (0.3 g, 0.6 mmol), gelöst in Dichlormethan (5 mL), zu. Nach beendeter Zugabe wird langsam (6 h) auf Raumtemp. erwärmt und, wie bei Verbindung **7** beschrieben, aufgearbeitet; Ausb. 427 mg (73%), Sirup,  $[\alpha]_D^{20} +3.0^\circ$  (*c* 0.8, Chloroform); <sup>1</sup>H-N.m.r. (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>; Protonen der Pyranoseringe siehe Tabelle I):  $\delta$  7.40–7.10 (m, 49 H, 9 Ph, 1 Phth), 4.93–4.32 (18 d, 18 H, 9 CH<sub>2</sub>-Ph), 2.07, 2.03, 1.93, 1.80 (4 s, 12 H, 4 CH<sub>3</sub>CO).

*Anal.* Ber. für C<sub>109</sub>H<sub>114</sub>N<sub>4</sub>O<sub>29</sub> (1944.1): C, 67.34; H, 5.91; N, 2.88. Gef.: C, 67.38; H, 5.99; N, 2.92.

O-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1→2)-O-(3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-(1→6)-O-[(2-O-acetyl-3,4,6-tri-O-benzyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-(1→3)]-O-(2,4-di-O-benzyl- $\beta$ -D-mannopyranosyl)-(1→4)-1,6-anhydro-2-azido-3-O-benzyl-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranose (**12**). — Substanz **11** (320 mg, 0.18 mmol) wird wie bei **8** beschrieben der Hydrazinolyse unterzogen und nachacetyliert; Ausb. 188 mg (65%), Sirup,  $[\alpha]_D^{20} +7.9^\circ$  (*c* 1.3, Chloroform); <sup>1</sup>H-N.m.r. (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>; Protonen der Pyranoseringe siehe Tabelle I):  $\delta$  7.35–7.10 (m, 45 H, 9 Ph), 5.51 (d, *J*<sub>2'',NH</sub> 7.0 Hz, 1 H, NH), 5.01–4.31 (18 d, 18 H, 9 CH<sub>2</sub>-Ph), 2.36, 2.07, 2.02, 1.98, 1.97 (5 s, 15 H, 5 CH<sub>3</sub>CO).

*Anal.* Ber. für C<sub>103</sub>H<sub>114</sub>N<sub>4</sub>O<sub>28</sub> (1856.0): C, 66.66; H, 6.19; N, 3.02. Gef.: C, 66.65; H, 6.20; N, 3.09.

O-(2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1→2)-O-(3,4,6-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-(1→6)-O-[(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyl)-(1→3)]-O-(2,4-di-O-acetyl- $\beta$ -D-mannopyranosyl)-(1→4)-2-acetamido-1,3,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ , $\beta$ -D-glucopyranose (**13**). — Das Pentasaccharid **12** (180 mg, 0.1 mmol) wird wie bei **9** beschrieben weiter umgesetzt. Allerdings benötigte die Acetolyse nur 1 Tage Reaktionszeit; die Hydrogenolyse dauerte bei Normaldruck 4 Tage; Ausb. 58 mg (39%), Sirup,  $[\alpha]_D^{20} +12.4^\circ$  (*c* 0.8, Chloroform); die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomeren (Verhältnis  $\alpha:\beta$  wie 5:3) lassen sich nicht trennen.

*Anal.* Ber. für C<sub>64</sub>H<sub>88</sub>N<sub>2</sub>O<sub>41</sub> (1541.4): C, 49.87; H, 5.75; N, 1.82. Gef.: C, 49.89; H, 5.70; N, 1.78.

O-(2-Acetamido-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[O- $\alpha$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-O- $\beta$ -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ , $\beta$ -D-glucopyranose (**14**). — Substanz **13** (55 mg, 0.036 mmol) wird wie bei **10** beschrieben entblockiert; Ausb. 31 mg (94%), Sirup. Zur Feinreinigung wird eine Probe (22 mg) zusätzlich über LiChroprep NH<sub>2</sub> (Merck) (4.5 g) getrennt (Chloroform-Methanol-Wasser, 3:3:1, v/v);  $[\alpha]_D^{20} -4.3^\circ$  (c 1.5, Wasser); <sup>1</sup>H-N.m.r. (400 MHz, D<sub>2</sub>O, bezogen auf HOD,  $\delta$  4.64; Protonen der Pyranoseringe siehe Tabelle I):  $\delta$  1.90 (2 s, 6 H, 2 CH<sub>3</sub>CO). In wäßriger Lösung wird ein Anomerengemisch  $\alpha$ : $\beta$  von 1:1 beobachtet.

*Anal.* Ber. für C<sub>34</sub>H<sub>58</sub>N<sub>2</sub>O<sub>26</sub> (910.8): C, 44.84; H, 6.42; N, 3.08. Gef.: C, 44.78; H, 6.46; N, 3.04.

#### DANK

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie sind wir für die finanzielle Unterstützung dieses Forschungsvorhabens zu großem Dank verpflichtet. Der Fa. Merck danken wir für die Bereitstellung von Trennphasen für die Reinigung entblockierter Verbindungen.

#### LITERATUR

- 1 H. PAULSEN, U. VON DEESSEN UND H. TIETZ, *Carbohydr. Res.*, 137 (1985) 68–77.
- 2 H. PAULSEN UND R. LEBUHN, *Angew. Chem.*, 94 (1982) 933–934; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 21 (1982) 926–927.
- 3 H. PAULSEN UND R. LEBUHN, *Carbohydr. Res.*, 125 (1984) 21–45.
- 4 H. PAULSEN UND R. LEBUHN, *Carbohydr. Res.*, 130 (1984) 85–101.
- 5 G. VELLA, H. PAULSEN UND H. SCHACHTER, *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, 62 (1984) 409–417.
- 6 N. HARPAZ UND H. SCHACHTER, *J. Biol. Chem.*, 255 (1980) 4885–4893; 255 (1980) 4894–4902.
- 7 S. NARASIMHAM, S. STANLEY UND H. SCHACHTER, *J. Biol. Chem.*, 252 (1977) 3926–3933.
- 8 H. SCHACHTER, S. NARASIMHAM, P. GLEESON UND G. VELLA, *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, 61 (1983) 1049–1066.
- 9 H. PAULSEN, R. LEBUHN UND O. LOCKHOFF, *Carbohydr. Res.*, 103 (1982) c7–c11.
- 10 H. PAULSEN UND R. LEBUHN, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, (1983) 1047–1072.
- 11 H. PAULSEN, T. PETERS, V. SINNWEIL, R. LEBUHN UND B. MEYER, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, (1984) 951–976.
- 12 R. U. LEMIEUX, T. TAKEDA UND B. Y. CHUNG, *ACS Symp. Ser.*, 39 (1976) 90–115.
- 13 B. FRASER-REID, D. L. WALKERS, S. Y. K. TAM UND N. L. HOLDER, *Can. J. Chem.*, 51 (1973) 3950–3954.