



# Synthetische Oligosaccharide belegen die immunologische Bedeutung der Pyruvatmodifikation im Kapselpolysaccharid von Serotyp 4 *Streptococcus pneumoniae*

Claney L. Pereira,\* Andreas Geissner, Chakkumkal Anish und Peter H. Seeberger\*

**Abstract:** Nach allgemeiner Annahme wird die Immunogenität von Kohlenhydraten stark von deren Modifikationen beeinflusst. Kapselpolysaccharide (KPS) von pathogenen Bakterien enthalten häufig ein Pyruvat, das als Acetal die 4,6-, 3,4- oder 2,3-Positionen überbrücken kann. Das KPS von Serotyp 4 *Streptococcus pneumoniae* (ST4) ist mit einem trans-2,3-verknüpften Pyruvat modifiziert. Um die immunologische Bedeutung dieser Modifikation zu untersuchen, wurde die Wiederholungseinheit dieses Polysaccharids erstmals chemisch synthetisiert. Bei der Analyse von Antikörpern gegen ST4-KPS mithilfe eines Kohlenhydratmikroarrays, der verschiedene Substrukturen des KPS enthält, konnte eine exklusive Bindung an die Wiederholungseinheit mit Pyruvat festgestellt werden. Das Pyruvatacetal ist somit ein Schlüsselmotiv für die Entwicklung minimaler synthetischer Kohlenhydratimpfstoffe gegen ST4.

Kohlenhydrat-Konjugatimpfstoffe gegen Infektionen durch *Streptococcus pneumoniae* haben das Leben hunderttausender Kinder gerettet und sind ein herausragender kommerzieller Erfolg.<sup>[1]</sup> Da jedoch mehr als neunzig Serotypen (ST) von *S. pneumoniae* anhand der chemischen Struktur des Kapselpolysaccharids (KPS) unterschieden werden können, ist der Kampf gegen diesen Krankheitserreger nicht gewonnen.<sup>[2]</sup> Auf dem Markt befindliche Pneumokokken-Konjugatimpfstoffe enthalten 10–13 Serotypen. Die Zahl der Infektionen mit nicht abgedeckten Serotypen nimmt seit Einführung dieser Impfstoffe zu.<sup>[3]</sup> Die verbreitete Resistenz gegen Antibiotika sorgt für zusätzliche Bedenken. Derzeit ist die Impfung mit kommerziell erhältlichen Konjugatimpfstoffen für einige Serotypen nur beschränkt effektiv.<sup>[4]</sup> Um der erwähnten zeitlichen Fluktuation sowie der orts- und altersabhängigen Verteilung der Serotypen Herr zu werden, müssen neue Impfstoffe eine immer größere Anzahl an Serotypen abdecken.<sup>[5]</sup> Semisynthetische Kohlenhydrat-Konju-

gatimpfstoffe könnten eine vielversprechende Alternative zur klassischen Produktion bieten.

Um Methoden der medizinischen Chemie beim Design von Kohlenhydratimpfstoffen anwenden zu können, ist ein grundlegendes Verständnis jener minimalen Epitope von Kohlenhydraten nötig, die dennoch eine robuste und spezifische Immunantwort gegen den Erreger induzieren. Vergleichsweise kurze Oligosaccharidfragmente verschiedener KPS von Pneumokokken wurden bereits synthetisiert. Diese riefen eine Immunantwort gegen das Pathogen hervor, die jener des Polysaccharids gleichwertig ist.<sup>[6]</sup>

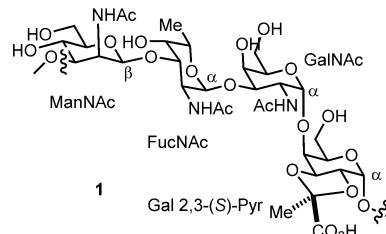


Abbildung 1. Struktur der Wiederholungseinheit des ST4-KPS.

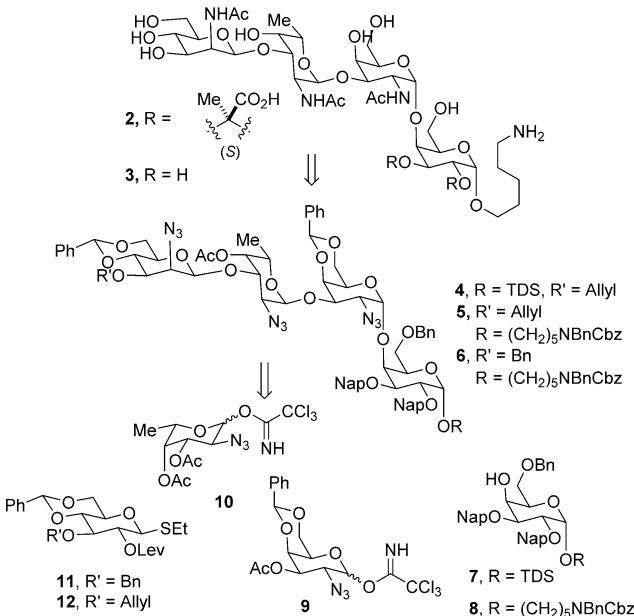


Abbildung 2. Retrosynthese der ST4-Wiederholungseinheit. Ac = Acetyl; Bn = Benzyl; Cbz = Benzyloxycarbonyl; Lev = Lävulinoyl, Nap = 2-Naphthylmethyl; Ph = Phenyl; TDS = Thexydimethylsilan.

[\*] Dr. C. L. Pereira, A. Geissner, Dr. C. Anish, Prof. Dr. P. H. Seeberger  
Biomolekulare Systeme  
Max Planck Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung  
Am Mühlenberg 1, 14424 Potsdam (Deutschland)  
und  
Institut für Chemie und Biochemie  
Freie Universität Berlin  
Arnimallee 22, 14195 Berlin (Deutschland)  
E-Mail: Claney.pereira@mpikg.mpg.de  
Seeberger@mpikg.mpg.de  
Homepage: <http://www.mpikg.mpg.de/bs>

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201504847> zu finden.

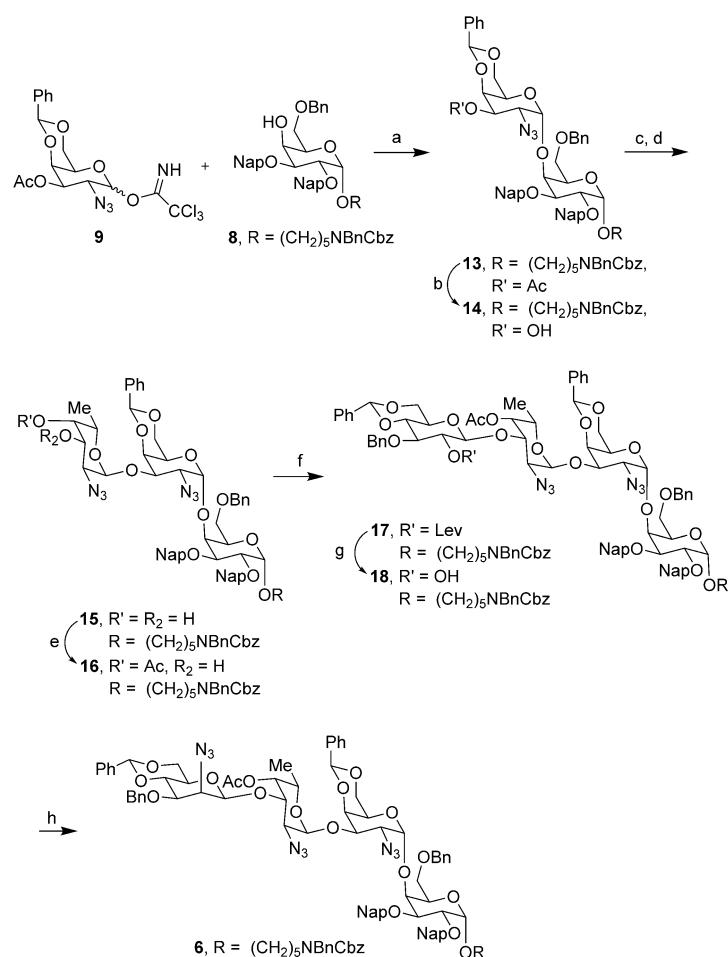
Ein wichtiger Schritt bei Entwicklung synthetischer Kohlenhydrat-Konjugatimpfstoffe ist die Identifizierung von Schlüsselepitopen, die eine robuste Immunantwort gegen das natürliche Polysaccharid hervorrufen. Die Spezifität der Antikörper hängt stark von verschiedenen Eigenschaften des Oligosaccharid-Antigens ab: Länge, endständiger Zucker, Sequenz sowie Leseraster bei repetitiven Polysacchariden bestimmen die Immunogenität und Kreuzreaktivität mit der natürlichen Struktur. Auch die verwendete Konjugationsmethode, das Trägerprotein und die Haptendichte beeinflussen die Immunantwort.<sup>[7]</sup> Modifikation der Zucker mit Gruppen wie Pyruvaten und Acetaten können ebenfalls wichtige immunologische Determinanten sein.

Das KPS von Serotyp 4 *S. pneumoniae* (ST4) ist im Blockbuster-Impfstoff Prevenar 13 enthalten. Der Serotyp wurde 1931 entdeckt, die Struktur des KPS jedoch erst 1988 beschrieben.<sup>[8]</sup> Die Wiederholungseinheit (WE) ist das Tetrasaccharid [3]- $\beta$ -D-ManpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-FucpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Galp 2,3-(S)-Pyr-(1 $\rightarrow$ )] (Abbildung 1). Die N-Acetylzucker, die anspruchsvollen  $\beta$ -mannosidischen und  $\alpha$ -glykosidischen Verknüpfungen und besonders das säurelabile *trans*-2,3-(S)-Pyruvat, dessen Bedeutung noch nicht im Detail geklärt ist, machen dieses Moleköl zu einem interessanten Ziel für chemische und immunologische Studien. Bislang war es nur gelungen, das Trisaccharid  $\beta$ -D-ManpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-FucpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-GalpNAc chemisch zu synthetisieren.<sup>[9]</sup>

Die Schlüsselepitope der WE sind noch unbekannt, und bislang wurden keine Studien durchgeführt, um die immunologische Bedeutung des Pyruvatmodifikation im Detail aufzuklären. Um diese Fragen detailliert untersuchen zu können, berichten wir hier von der ersten chemischen Synthese der gesamten WE gemeinsam mit dem Derivat ohne Pyruvat und weiteren Abbruchsequenzen.

Bei der Retrosynthese der WE 2 wurde Augenmerk auf eine divergente Synthesestrategie gelegt, damit verschiedene Oligosaccharide inklusive kürzerer Fragmente erhalten werden können. Die Synthese sollte außerdem die Verknüpfung mehrerer Wiederholungseinheiten, die Anbringung eines orthogonalen Linkers am reduzierenden Ende zur Konjugation an Trägerproteine und die Anbringung des *trans*-2,3-(S)-Pyruvatacetals ermöglichen. Eine tiefgreifende immunologische Analyse sollte durch den Zugang zu Abbruchsequenzen und Leserasterverschiebungen ermöglicht werden. Die Anbringung des Pyruvats im letzten Syntheseschritt gestattet die Synthese der WE mit und ohne Pyruvat ausgehend vom vollständig geschützten Tetrasaccharid 6 (Abbildung 2). Ein linearer Glykosylierungsansatz unter Verwendung der Bausteine 7 oder 8 sowie 9, 10 und 12 eröffnet den Zugang zu den Tetrasacchariden 4 und 5, die für Kettenverlängerungen nötig sind. Die lineare Kombination von 8, 9, 10 und 11 ergibt Tetrasaccharid 6.

Die Synthese der Galactose 8 am reduzierenden Ende erfolgte in vier Stufen beginnend mit einem bekannten

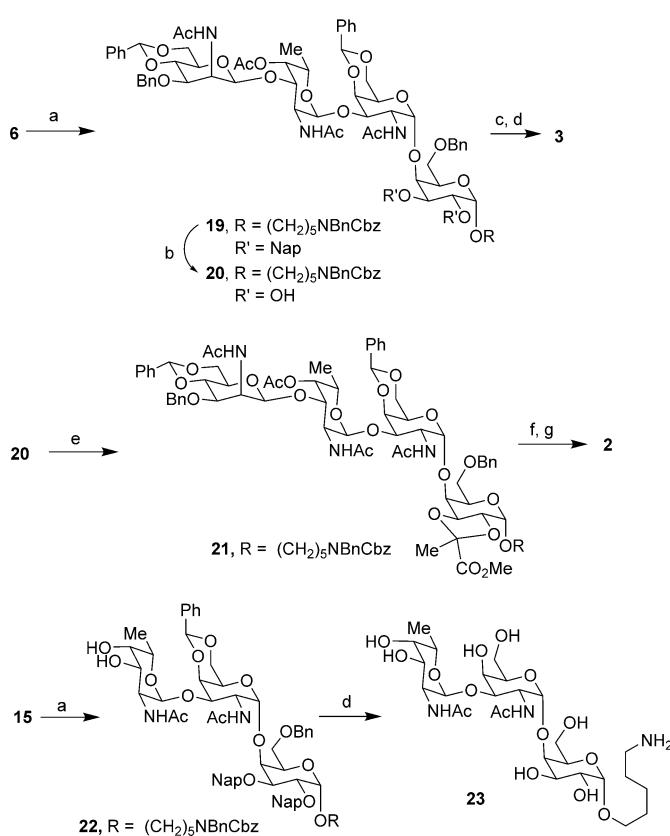


**Schema 1.** Synthese von Tetrasaccharid 6. Reaktionsbedingungen: a) TMSOTf,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Diethylether (1:1), 90% ( $\alpha/\beta = 7:1$ ); b) NaOMe, MeOH, 98%; c) 10, TMSOTf,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-20^\circ\text{C}$ , d) NaOMe, MeOH, 72% ( $\alpha/\beta = 6:1$ ) über zwei Stufen; e) 1. Trimethylorthoacetat, CSA, DMF; 2. 80% wässr. ACOH, 92% über zwei Stufen; f) 11, NIS, TfOH,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 66%, ausschließlich  $\beta$ ; g)  $\text{N}_2\text{H}_2\cdot\text{HOAc}$ , EtOH/Toluol/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2:4:1), 70%; h)  $\text{Tf}_2\text{O}$  in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Pyridin, 30 min, dann  $\text{NaN}_3$ , DMF,  $80^\circ\text{C}$  für 1.5 h, 61%. CSA = Camphersulfonsäure, DMF = Dimethylformamid, Et = Ethyl, Me = Methyl, NIS = N-Iodsuccinimid, TfOH = Trifluormethansulfosäure.

Thioglykosid, während die Synthese des Fucosaminbausteins 10 von L-Fucose ausgehend entwickelt wurde (siehe Hintergrundinformationen). Galactosamin 9 und Glucose 11 wurden nach Literaturvorgaben synthetisiert.<sup>[10]</sup> Disaccharid 13 entstand durch Verknüpfung von Galactose 8 und Galactosamin 9 und wurde desacetyliert, um Akzeptor 14 zu erhalten (Schema 1). Glykosylierung von 14 mit Fucosamin 10 und folgende Desacetylierung, Orthoesterbildung und selektive Orthoesteröffnung resultierten im Trisaccharidakzeptor 16.<sup>[11]</sup> Die abschließende  $\beta$ -mannosidische Verknüpfung erfolgte nach einer bekannten Strategie an einem komplexen Substrat: Glucosylierung erfolgte exklusiv als  $\beta$ -Anomer bei Aktivierung des Bausteins 11 mit NIS und TfOH, um Tetrasaccharid 17 zu erhalten. Um das erwünschte Stereozentrum im Tetrasaccharid 6 durch Inversion und Aminierung an der C2-Position aufzubauen, mussten der 2-O-Lävulinylester gespalten, die 2-O-Hydroxygruppe in das Triflat umgewandelt und dieses nachfolgend in axialer Position durch ein Azid

nukleophil ersetzt werden.<sup>[12]</sup> Die Kopplungskonstanten im vollständig geschützten Tetrasaccharid vor ( $J=7.2$  Hz) und nach Inversion ( $J=1.2$  Hz) belegen eindeutig die Bildung der gewünschten  $\beta$ -mannosidischen Bindung.

Das geschützte Intermediat **6** ermöglichte die Synthese der vollständig geschützten WE sowie einfacherer Fragmente, die für immunologische Struktur-Funktions-Studien verwendet werden können. Die Synthese von **3**, der WE ohne Pyruvatacetal, wurde in drei aufeinander folgenden Entschützungen abgeschlossen: Der Umwandlung der Azide in **6** zum *N*-Acetyl derivat **19** mittels Thioessigsäure und Pyridin folgte die Abspaltung der 4-*O*-Acetylgruppe am FucNAc (Schema 2).<sup>[13]</sup> Vollständige Entschützung des Tetrasaccharids ergab schließlich Kohlenhydrat **3**, die WE ohne Pyruvat mit einem Aminopentyl linker am reduzierenden Ende.<sup>[10a]</sup> Fragmente von **3** (beispielsweise **23**) wurden für Epitopkartierungsstudien synthetisiert (Schema 2 und Hintergrundinformationen für weitere verkürzte Glykane). Die Synthese von Tetrasaccharid **2**, der vollständigen WE mit *trans*-2,3-(*S*)-Pyruvat, begann mit der Entfernung der 2-Naphthylmethyl-(Nap)-Schutzgruppen von **19** mittels DDQ, um das Diol **20** zu

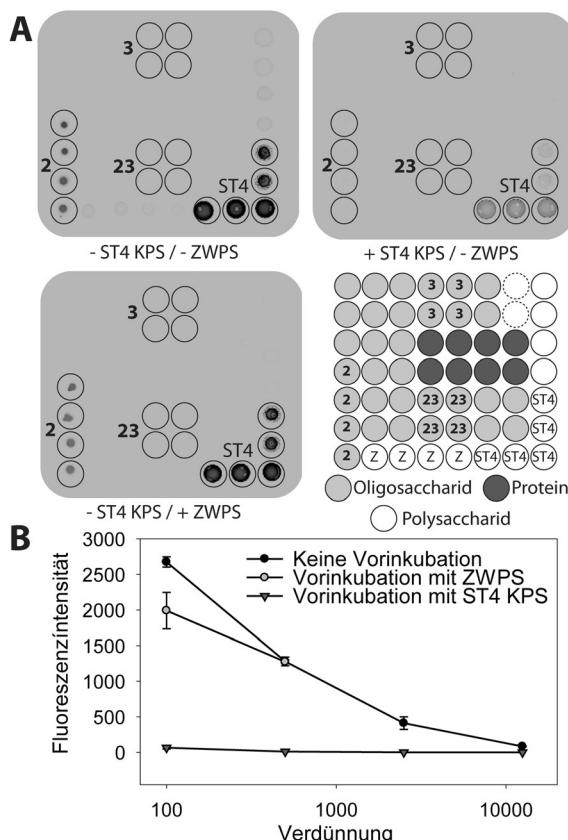


**Schema 2.** Synthese der ST4-KPS-Tetrasaccharid-WE **2**. Reaktionsbedingungen: a) Thioessigsäure, Pyridin, 96 h, 81 % für **19**, 72 % für **22**; b) DDQ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$  (18:1), 3 h, 71%; c) NaOMe in MeOH, 2.5 h, 94%; d) 1. Zyklus  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ ,  $\text{H}_2$ , EtOAc/MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$ /AcOH (1:3:1:0.1), 24 h, dann 2. Zyklus  $\text{Pd}/\text{C}$ ,  $\text{H}_2$ , EtOAc/MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$ /AcOH (1:3:1:0.1), 79 % für **3**, 88 % für **23**; e) Methyl-2,2-Bis(ethylthio)propionat, DMTST, TTBP, 4-Å-MS,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0 °C, 2 h, 47%; f) wässr. NaOH, MeOH, 12 h, quant.; g)  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ ,  $\text{H}_2$ , EtOAc/MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (2:3:1), 48 h, 33 % für *S*-Isomer. DMTST = Dimethyl(methylthio)sulfoniumtriflat, TTBP: 2,4,6-Tri-*tert*-butylpyridin, DDQ = 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-1,4-benzochinon.

erhalten (Schema 2). Die Funktionalisierung mit dem *trans*-2,3-Pyruvatacetal erwies sich als anspruchsvoll, da die einzigen für diese Reaktion bisher beschriebenen Bedingungen sowie alle Bedingungen für *trans*-4,6-Pyruvatacetale nicht zur Bildung des gewünschten Produkts, sondern zur Spaltung aller Ester und Acetale führten.<sup>[14]</sup> Schließlich gelang die Anbringung des *trans*-2,3-Pyruvats an das Tetrasaccharid **20** durch Verwendung von 2,2-Bis(ethylthio)propionat<sup>[15]</sup> in Gegenwart des Aktivators DMTST, wodurch **21** als Gemisch der *R*- und *S*-Isomere erhalten wurde. Die Reaktion war nicht vollständig selektiv, und der stereochemische Verlauf konnte zu diesem Zeitpunkt nicht ermittelt werden. Die Entfernung der Ester und permanenten Schutzgruppen ergab **2** nach einer HPLC-Aufreinigung. Die *S*-Konfiguration am Pyruvat wurde durch 2D-NMR-Spektroskopie bestätigt (Hintergrundinformationen).

Um die Eigenschaften der ST4-WE als Antigen zu untersuchen, wurden die synthetischen Glykane mithilfe des Aminopentyllinkers selektiv durch Bindung an aktivierte Carboxygruppen auf Mikroarrayträgern immobilisiert (siehe Hintergrundinformationen).<sup>[16]</sup> Als Kontrollen wurden isolierte Polysaccharide wie das ST4-KPS und das Zellwandpolysaccharid (ZWPS) gedruckt. Der Mikroarray wurde mit einem kommerziellen, ST4-spezifischen Typierungs serum inkubiert, das durch Immunisierung von Kaninchen mit dem KPS erhalten wurde. Wie erwartet ergab sich eine starke Antikörperbindung an das natürliche ST4-KPS, nicht aber an ZWPS oder KPS anderer Serotypen (Abbildung 3). Bei den synthetischen Oligosacchariden zeigte sich eine hochspezifische und ausschließliche Bindung an die vollständige WE **2**, und es wurden keine Signale für **3** und die restlichen Abbruchsequenzen erhalten. Diese Beobachtungen verdeutlichen die herausragende Rolle, die das Pyruvat bei der Immunreaktion gegen das natürliche ST4-KPS spielt. Dies bestätigt die in den 1970er Jahren aufgestellte Hypothese, dass diese Kohlenhydratmodifikation ein Schlüssel für die Entwicklung neuer Impfstoffe ist.<sup>[17]</sup> Die Spezifität der bindenden Antikörper wurde durch Inhibitionsstudien mit isoliertem ST4-KPS überprüft. Hierzu wurden die Serumverdünnungen vor dem Auftragen auf den Kohlenhydratmikroarray mit Polysacchariden inkubiert, um die entsprechenden Antikörper durch Bindung zu neutralisieren. ZWPS, ein Polysaccharid, das als Kontamination unumgänglich in jeder KPS-Präparation enthalten ist, hatte keinen Einfluss auf das Signal für die Bindung an **2**, wohingegen ST4-KPS dieses vollständig unterdrückte. Diese Inhibitionsstudien bestätigen die Spezifität und Kreuzreaktivität der an **2** bindenden Antikörper bezüglich natürlichem ST4-KPS und die Bedeutung des Pyruvats bei der Immunantwort.

Zusammenfassend gelang die Synthese der ein *trans*-2,3-(*S*)-Pyruvatacetal enthaltenden WE **2** des ST4-KPS sowie des Tetrasaccharids **3** ohne Pyruvat. Auf dieser Grundlage wurde die Bedeutung der Kohlenhydratmodifikation für eine Immunantwort gegen Serotyp 4 *Streptococcus pneumoniae* aufgezeigt. Diese Erkenntnis ist ein Schlüssel zur weiteren Optimierung der Strukturen auf dem Weg zu einem synthetischen Kohlenhydrat-Konjugatimpfstoff gegen ST4.



**Abbildung 3.** Bindungsstudien an Antikörpern aus Kaninchenserum gegen ST4-KPS auf Kohlenhydratmikroarrays mit SP4-KPS-basierten Oligosacchariden und diversen Polysacchariden von Pneumokokken. Bei Inhibitionen wurde die Serumverdünnung mit dem jeweiligen isolierten Polysaccharid vorinkubiert. A) Repräsentative Scans der verschiedenen Felder. Unten rechts: Druckschema mit den Positionen der diskutierten Strukturen (Z: natürliches ZWPS; ST4: natürliches ST4-KPS; siehe Hintergrundinformationen für detailliertes Druckmuster). B) Vergleich der Intensitäten zwischen Punkten von 2 (Druckkonzentration: 50  $\mu$ M) in Feldern mit und ohne Inhibitor.

## Danksagung

Wir danken der Max-Planck-Gesellschaft und der Körber-Stiftung für die großzügige finanzielle Unterstützung. Wir danken Dr. M. Schlegel für die HPLC-Aufreinigung und Dr. A. Schäfer für NMR-Analysen sowie Dr. S. Götze für die Korrektur des Manuskripts.

**Stichwörter:** Antigene · Oligosaccharide · Pyruvatacetal · *Streptococcus pneumoniae* · Synthetische Impfstoffe

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10016–10019  
*Angew. Chem.* **2015**, *127*, 10154–10157

- [1] a) S. Obaro, *Expert Rev. Vaccines* **2009**, *8*, 1051–1061; b) E. C. Dinleyici, Z. A. Yargic, *Expert Rev. Vaccines* **2009**, *8*, 977–986; c) M. M. Darkes, G. Plosker, *Pediatr. Drugs* **2002**, *4*, 609–630.
- [2] A. E. Bridy-Pappas, M. B. Margolis, K. J. Center, D. J. Isaacman, *Pharmacotherapy* **2005**, *25*, 1193–1212.
- [3] a) E. D. G. McIntosh, R. R. Reinert, *Expert Rev. Vaccines* **2010**, *10*, 109–129; b) J. P. I. Lynch, G. G. Zhan, *Curr. Opin. Pulm. Med.* **2010**, *16*, 217–225.

- [4] a) A. S. Ginsburg, M. R. Alderson, *Drugs Today* **2011**, *47*, 207–214.
- [5] a) W. P. Hausdorff, J. Bryant, P. R. Paradiso, G. R. Siber, *Clin. Infect. Dis.* **2000**, *30*, 100–121; b) W. P. Hausdorff, J. Bryant, C. Kloek, P. R. Paradiso, G. R. Siber, *Clin. Infect. Dis.* **2000**, *30*, 122–140; c) H. L. Johnson, M. Deloria-Knoll, O. S. Levine, S. K. Stoszek, L. Freimanis Hance, R. Reithinger, L. R. Muenz, K. L. O'Brien, *PLoS Med.* **2010**, *7*, e1000348.
- [6] a) B. Benaissa-Trouw, D. J. Lefever, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegenthart, K. Kraaijeveld, H. Snippe, *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 4698–4701; b) W. T. M. Jansen, S. Hogenboom, M. J. L. Thijssen, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegenthart, J. Verhoef, H. Snippe, A. F. M. Verheul, *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 787–793; c) F. Mawas, J. Niggemann, C. Jones, M. J. Corbel, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegenthart, *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 5107–5114; d) D. Safari, H. A. T. Dekker, J. A. F. Joosten, D. Michalik, A. C. de Souza, R. Adamo, M. Lahmann, A. Sundgren, S. Oscarson, J. P. Kamerling, H. Snippe, *Infect. Immun.* **2008**, *76*, 4615–4623; e) D. Safari, G. Rijkers, H. Snippe, *The Complex World of Polysaccharides* (Hrsg.: D. N. Karunaratne), InTech, Rijeka, **2012**.
- [7] a) V. Pozsgay, *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 126–140; b) C. Anish, B. Schumann, C. L. Pereira, P. H. Seeberger, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 38–50; c) B. Schumann, C. Anish, C. L. Pereira, P. H. Seeberger, *Biotherapeutics: Recent Developments using Chemical and Molecular Biology* (Hrsg.: L. Jones, A. J. McKnight), RSC Publishing, Cambridge, **2013**, S. 68–104.
- [8] a) P.-E. Jansson, B. Lindberg, U. Lindquist, *Carbohydr. Res.* **1981**, *95*, 73–80; b) C. Jones, F. Currie, *Carbohydr. Res.* **1988**, *184*, 279–284; c) J. D. Higginbotham, M. Heidelberger, *Carbohydr. Res.* **1972**, *23*, 165–173; d) J. Y. Lew, M. Heidelberger, *Carbohydr. Res.* **1976**, *52*, 255–258; e) C. Jones, *Carbohydr. Res.* **1990**, *198*, 353–357; f) C. Jones, F. Currie, M. J. Forster, *Carbohydr. Res.* **1991**, *221*, 95–121.
- [9] S. Horito, J. P. Lorentzen, H. Paulsen, *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, *1986*, 1880–1890.
- [10] a) S. Arungundram, K. Al-Mafraji, J. Asong, F. E. Leach, I. J. Amster, A. Venot, J. E. Turnbull, G.-J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17394–17405; b) T. W. D. F. Rising, T. D. W. Claridge, N. Davies, D. P. Gamblin, J. W. B. Moir, A. J. Fairbanks, *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 1574–1596; c) E. Bedini, L. Cirillo, M. Parrilli, *Carbohydr. Res.* **2012**, *349*, 24–32.
- [11] R. E. J. N. Litjens, R. den Heeten, M. S. M. Timmer, H. S. Overkleft, G. A. van der Marel, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1010–1016.
- [12] M. Vasan, J. Rauvolfova, M. A. Wolfert, C. Leoff, E. L. Kannenberg, C. P. Quinn, R. W. Carlson, G.-J. Boons, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1716–1720.
- [13] T. Rosen, I. M. Lico, D. T. W. Chu, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1580–1582.
- [14] a) H. Hashimoto, K. Hiruma, J. Tamura, *Carbohydr. Res.* **1988**, *177*, C9–C12; b) A. Lipták, L. Szabo, *Carbohydr. Res.* **1988**, *184*, C5–C8; c) T. Ziegler, E. Eckhardt, G. Herold, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4413–4416; d) K. Hiruma, J. Tamura, S. Horito, J. Yoshimura, H. Hashimoto, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 12143–12158; e) K. Hiruma, J. Tamura, H. Hashimoto, *Carbohydr. Res.* **1996**, *282*, 299–306; f) G. Agnihotri, A. K. Misra, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 8493–8497; g) A. K. Misra, S. K. Das, N. Roy, *Synth. Commun.* **1998**, *28*, 1471–1480.
- [15] a) I. Bajza, J. Kerékgyártó, J. Hajkó, L. Szilágyi, A. Lipták, *Carbohydr. Res.* **1994**, *253*, 111–120.
- [16] a) A. Geissner, C. Anish, P. H. Seeberger, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *18*, 38–45.
- [17] a) J. D. Higginbotham, M. Heidelberger, E. C. Gotschlich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1970**, *67*, 138–142.

Eingegangen am 28. Mai 2015

Online veröffentlicht am 24. Juli 2015