

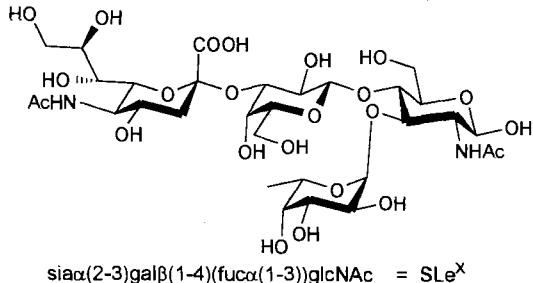
- [12] a) R. D. Stephens, C. E. Castro, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 3313–3315; b) K. Sonogashira, Y. Tohada, N. Hagiwara, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 4467–4470; c) V. Ratovelomanana, G. Linstrumelle, *ibid.* **1981**, *22*, 315–318.
- [13] Transanulare [2,3]-Wittig-Umlagerung: a) T. Takahashi, H. Nemoto, Y. Kanda, J. Tsuji, Y. Fujise, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4315–4316; b) J. A. Marshall, T. M. Jensoin, B. S. DeHoff, *ibid.* **1986**, *51*, 4316–4319; c) Übersichtsartikel über die acyclische [2,3]-Wittig-Umlagerung: T. Nakai, K. Mikami, *Chem. Rev.* **1986**, *86*, 885–902.
- [14] Die *cis*-Konfiguration zwischen der C(4)-Vinyl- und der C(5)-Hydroxygruppe wurde durch NOE-NMR-Messungen nachgewiesen. Die relative Konfiguration zwischen der C(5)- und der C(11)-Hydroxygruppe wurde nach einer modifizierten Methode durch Veresterung zum α -Methoxy- α -(trifluoromethyl)-phenylacetat bestimmt [15]. Weitere Einzelheiten zur Strukturbestimmung von **13**: T. Takahashi, H. Tanaka, Y. Sakamoto, H. Yamada, *Heterocycles* **1996**, *43*, 945–948.
- [15] I. Ohtani, T. Kusumi, Y. Kashman, H. Kakisawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092–4096.
- [16] 3: $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 7.6–7.8 (m, 4H), 5.84 (ddd, 1H, J = 6.9, 9.9, 17.2 Hz), 5.76 (d, 1H, J = 2.0 Hz), 5.47 (dd, 1H, J = 2.6, 6.6 Hz), 5.45 (br, 1H, J = 17.2 Hz), 5.20 (br, 1H, J = 9.9 Hz), 4.14–4.24 (m, 1H), 3.98 (br, 1H, J = 6.6, 6.9 Hz), 3.75–3.84 (m, 1H), 2.41 (d, 1H, J = 17.5 Hz), 2.34 (dd, 1H, J = 2.6, 17.5 Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (67.8 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 170.2, 167.7, 133.9, 132.3, 132.0, 131.3, 131.3, 129.5, 128.8, 128.3, 118.7, 97.6, 94.3, 91.1, 87.4, 84.8, 81.2, 76.9, 69.0, 43.1, 26.6; IR (KBr): 3402, 2212, 1719, 1259, 1118, 1069, 1038, 789, 744, 712 cm^{-1} ; MS (FAB): m/z : 417 [$M^+ + \text{Na}$], 433 [$M^+ + \text{K}$], 471 [$M^+ - \text{H} + 2\text{K}$].
- [17] 5b: $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CD_2Cl_2): δ = 7.59 (d, 1H, J = 1.7 Hz), 7.39 (dd, 1H, J = 1.7, 7.9 Hz), 7.26 (d, 1H, J = 7.9 Hz), 6.74 (dd, 1H, J = 10.9, 17.5 Hz), 6.23 (d, 1H, J = 3.3 Hz), 5.78 (d, 1H, J = 17.5 Hz), 5.52 (d, 1H, J = 3.3 Hz), 5.44 (s, 1H), 5.28 (d, 1H, J = 10.9 Hz), 3.36 (d, 1H, J = 18.1 Hz), 3.24 (d, 1H, J = 18.1 Hz), 2.08 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.99 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (67.8 MHz, CD_2Cl_2): δ = 171.0, 170.2, 169.3, 156.1, 148.1, 137.6, 136.6, 133.8, 128.6, 126.6, 121.1, 120.8, 114.4, 97.2, 85.7, 76.7, 35.3, 22.1, 21.2; IR (Film): 2926, 2250, 1735, 1429, 1368, 1226, 1025, 929, 827, 732, 608 cm^{-1} ; MS (FAB): m/z : 379 [$M^+ + \text{Na}$].

Chemo-enzymatische Synthese von Sialyl-Lewis^x-Glycopeptiden**

Gabi Baisch und Reinholt Öhrlein*

Bei akuten und chronischen Entzündungen spielen invasive Leukozyten eine entscheidende Rolle^[1]. Sie gelangen in einem mehrstufigen Prozeß, der durch das „Leukozyten-Rolling“^[2, 3] eingeleitet wird, an den Ort der Entzündung. Das „Rolling“ beruht auf der Wechselwirkung von Glycoproteinen, den E- und P-Selectinen, welche auf der Oberfläche von aktivierte Endothelzellen exprimiert werden, mit Kohlenhydrat-Liganden auf der Leukozytenoberfläche^[4]. Ein eleganter therapeutischer Ansatz beruht darauf, diese Interaktionen zu blockieren^[5].

Als Ligand für die Selektine wurde unter anderem das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis^x (SLe^x) identifiziert^[6]. Monovalentes



[*] Dr. R. Öhrlein, G. Baisch
CIBA Zentrale Forschungslaboratorien
Schwarzwaldallee 211, CH-4002 Basel (Schweiz)
Telefax: Int. + 61/6978975

[**] Die Autoren danken Dr. A. Katopodis und Dr. M. Streiff für die Bereitstellung von biotechnologisch erzeugter α (2-3)Sialyltransferase und Fucosyltransferase VI.

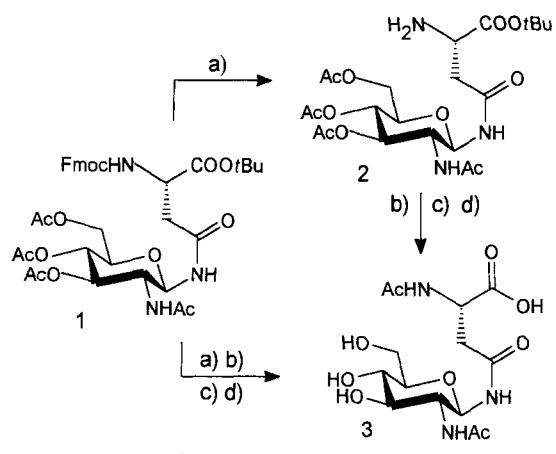
SLe^x zeigt in vitro allerdings nur eine relativ schwache Wechselwirkung mit E-Selectin ($\text{IC}_{50} = 0.75 \text{ mM}$)^[7]. Man vermutet deshalb, daß die E-Selectin-SLe^x-Interaktion in vivo durch „Clustering“ (Multivalenz) zwischen E-Selectin und SLe^x verstärkt wird^[8]. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurden zunächst bis zu 18 chemisch vorgefertigte SLe^x-Einheiten über einen Spacer mit Rinderserumalbumin^[9] verknüpft. Die positiven Assay-Daten dieser künstlichen Glycoproteine stimulierten die Suche nach Methoden zur definierteren Synthese oligovalenter SLe^x-Konjugate. So verknüpfte man drei chemisch vorgefertigte SLe^x-Einheiten mit Nitromethantricarbonsäuren^[10] oder Cyclopeptidtemplaten^[11]. Relativ starre, divalente SLe^x-Konjugate erhielt man chemo-enzymatisch mit Trisaccharidtemplaten^[12].

Bislang ist aber weder die Größe noch die räumliche Anordnung der E-Selectin-SLe^x-Cluster bekannt. Eine rasche Bestimmung dieser Parameter ermöglicht die folgende Strategie zur Synthese oligovalenter SLe^x-Konjugate. Als Kohlenhydrat-tragendes Rückgrat wählten wir Oligopeptidketten. Je nach Wahl der monomeren Bausteine kann durch Rigidisierung oder Flexibilisierung der Kette die Präsentation der SLe^x-Einheiten beeinflußt werden. Zusätzlich kann die Peptidkette nach ausgearbeiteten Synthesetechniken^[13] optimiert werden^[14].

Als Methode der Wahl zum Aufbau solcher Kohlenhydrat-Cluster mit natürlichen Zuckerbausteinen erweist sich die enzymatische Glycosylierung. Glycosyltransferasen haben folgende Vorteile: a) Die Glycosylierungen verlaufen auf vorhersagbare Weise mit exzellenter Stereo- und Regioselektivität^[15], wobei man die äußerst anspruchsvolle chemische Synthese des SLe^x-Tetrasaccharids^[16] umgeht. b) Man vermeidet weitgehend aufwendige Schutzgruppenmanipulationen, wie sie üblicherweise in der chemischen Glycopeptidsynthese notwendig sind^[17]. c) Man kann in wässrigen Puffersystemen ohne organische Lösungsmittel arbeiten. d) Es fallen keine giftigen Schwermetallsalzabfälle an, wie sie bei chemischen Glycosylierungen entstehen.

Eingeschränkt wird die enzymatische Methode durch die noch limitierte Zugänglichkeit der Glycosyltransferasen^[18]. Die benötigten aktivierten Zuckermonomere sind zwar prinzipiell kommerziell erhältlich, ein größerer Bedarf jedoch muß durch Synthese^[19] gedeckt werden; alternativ lassen sich bestimmte aktivierte Donoren *in situ* generieren^[20].

Ausgangspunkt unserer Synthesen waren die *N*-Acetylglucosamin-Asparagin-Bausteine **2** und **3** (Schema 1). Aus dem *N*-

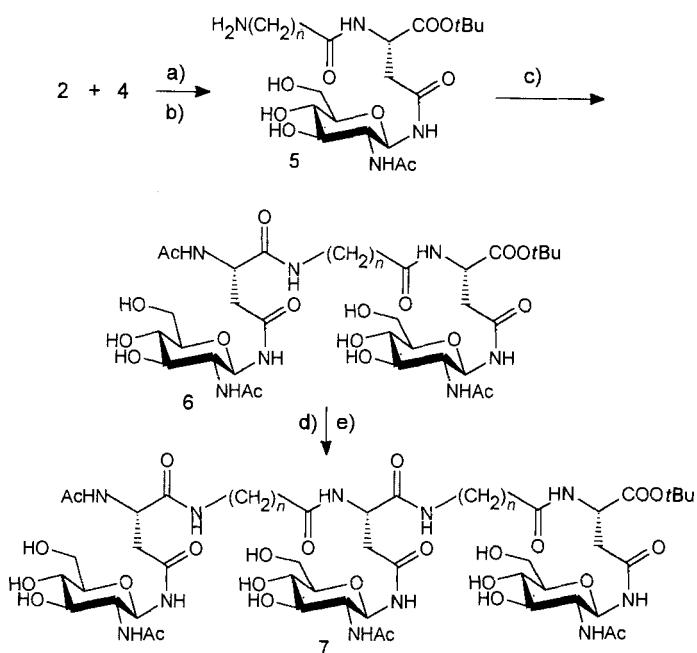


$\text{ZNH}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ **4**, $n = 1-7$

Schema 1. a) Morphilin, 77%; b) CH_2Cl_2 , Ac_2O , py, 96%; c) CF_3COOH , 94%; d) MeOH , MeONa , 76%; Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl, Z = Benzyl-oxy carbonyl VI.

Glycosid **1**^[21] wird durch Abspaltung der Aminoschutzgruppe mit Morpholin^[22] der Aminobaustein **2** gewonnen, aus welchem wiederum nach N-Acetylierung, Entschützen der Säurefunktion mit Trifluoressigsäure und Behandlung mit Natrium-methanolat der Säurebaustein **3** zugänglich wird.

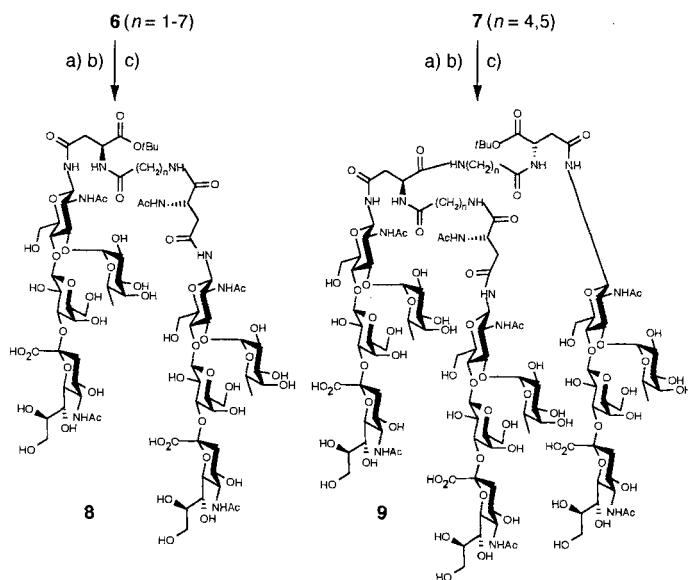
Die in der Länge variablen Aminosäuren **4** – flexible Abstandshalter – lassen sich unter Schotten-Baumann-Bedingungen aus den entsprechenden freien Aminosäuren und Benzyl-oxycarbonylchlorid in fast quantitativer Ausbeute herstellen^[13]. Die Bausteine **2** und **4** werden mittels EDCl kondensiert^[23] und anschließend desacetyliert und hydriert (Schema 2). Die resultierenden Verbindungen **5** werden wiederum mit



Schema 2. a) THF, EDCl, 62–94%; b) 1% NaOMe in Methanol, dann MeOH, $H_2/Pd/C$, 93–97%; c) DMF, **3** + DCC/HOBt oder **3** + BBC (56% ($n=1$), 47% (2), 54% (3), 80% (4), 67% (5), 84% (6), 97% (7)); d) gilt für $n=4–7$; CF_3COOH , 0°C (43% ($n=4$), 82% (5), 53% (6), 55% (7)); e) DMF, **5** + DCC/HOBt oder **5** + BBC, 43–53%; EDCl = 3-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-ethylcarbodiimid-hydrochlorid, DCC = Dicyclohexylcarbodiimid, HOBt = Hydroxybenzotriazol, BBC = Benzotriazol-1-yl-oxy-bis(pyrrolidino)carbonium-hexafluorophosphate.

dem Baustein **3** kondensiert, wobei sich DDC in Verbindung mit HOBt oder BBC als Hilfsreagentien bewährte^[24]. Erneutes Entschützen der Säurefunktion in **6** und Kondensation mit den Bausteinen **5** ergibt die trimeren Strukturen **7**^[25]. Die Flexibilität der Synthesestrategie zeigt sich darin, daß durch Wiederholung der Schritte (d) und (e) von Schema 2 gezielt auch „tetravalente“ und höhere Strukturen gewonnen werden können.

Die Substrate **6** und **7** werden zunächst mit Uridindiphospho-Galactose (UDP-gal)^[26] als Donorsubstrat und käuflicher Galactosyltransferase (EC 2.4.1.22)^[27] in einem Natriumcacodylatpuffer (pH 7.5) in Gegenwart von alkalischer Phosphatase aus Rinderdarm (CIAP, EC 3.1.3.1)^[28], zur Zerstörung des inhibierenden Nebenproduktes Uridindiphosphat, inkubiert^[29] (Schema 3). Die vollständige Umsetzung kann auf dieser Stufe dünnenschichtchromatographisch oder besser durch MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization time of flight)-Massenspektrometrie einer kleinen Probe des Reaktionsgemisches ermittelt werden (siehe Abb. 1).



Schema 3. a) 2.2 bzw. 3.3 Äquiv. UDP-gal, gal-t, für **8** (75%, 85%, 92%, 70%, 81%, 96%, 64%), für **9** (88%, 75%); b) 2.2 bzw. 3.3 Äquiv. CMP-sia, α (2-3)sia-t, für **8** (73%, 97%, 73%, 99%, 64%, 77%, 77%), für **9** (85%, 99%); c) 2.2 bzw. 3.3 Äquiv. GDP-fuc, fuc-t VI, für **8** (99%, 85%, 95%, 77%, 73%, 74%, 67%), für **9** (68%, 67%).

Die galactosylierten Zwischenstufen werden durch Filtration über Sephadex (G-25 superfine (Pharmacia)) gereinigt sowie 1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopisch charakterisiert. Die Sialinsäure wird anschließend mit Cytidinmonophosphosialinsäure (CMP-sia) als Sialinsäuredonor^[30] und molekularbiologisch erzeugter α (2-3)Sialyltransferase (EC 2.4.99.6)^[31] ebenfalls in Gegenwart von CIAP (pH 6.5) eingeführt^[29]. Filtration der Reaktionsgemische über Sephadex ergibt die sialidierten Zielstrukturen, die erneut 1H -NMR-spektroskopisch und MALDI-TOF-massenspektrometrisch charakterisiert werden. Das SLe α -Tetrasaccharid wird schließlich mit Guanosindiphosphofucose (GDP-fuc)^[32] als Fucosederivat und ebenfalls biotechnologisch amplifizierter Fucosyltransferase VI^[33] in einem Cacodylatpuffer (pH 6.5) in Gegenwart von CIAP vervollständigt^[29]. Die Endstufen **8** und **9** standen so in 6–20 mg Mengen für biologische Assays^[34] zur Verfügung.

Alle IC_{50} -Werte wurden auf eine SLe α -Einheit normiert. Die divalenten Verbindungen **8** zeigen zwar untereinander Abweichungen der Bindungsaffinitäten um den Faktor drei, weisen aber keine höheren Bindungsaffinitäten zu E-Selectin auf als monomeres SLe α , welches analog β -N-glycosidisch an das Aglycon (N-acetylierte, O-*tert*-butyl-geschützte Asparaginsäure) gebunden ist. Demgegenüber zeigt das Trimer **9** ($n=4$) eine viermal höhere Affinität zu E-Selectin als das Monomer und eine fast neunmal höhere Affinität als das entsprechende Dimer **8** ($n=4$) (Tabelle 1).

Tabelle 1. IC_{50} -Werte der Octa- und Dodecasaccharide **8** bzw. **9** [34].

Verbindung	IC_{50} [nM]
SLe α -Aglycon	0.60
8 ($n=1$)	0.46
8 ($n=2$)	–
8 ($n=3$)	0.64
8 ($n=4$)	1.20
8 ($n=5$)	0.47
8 ($n=6$)	0.80
8 ($n=7$)	0.48
9 ($n=4$)	0.14
9 ($n=5$)	0.39

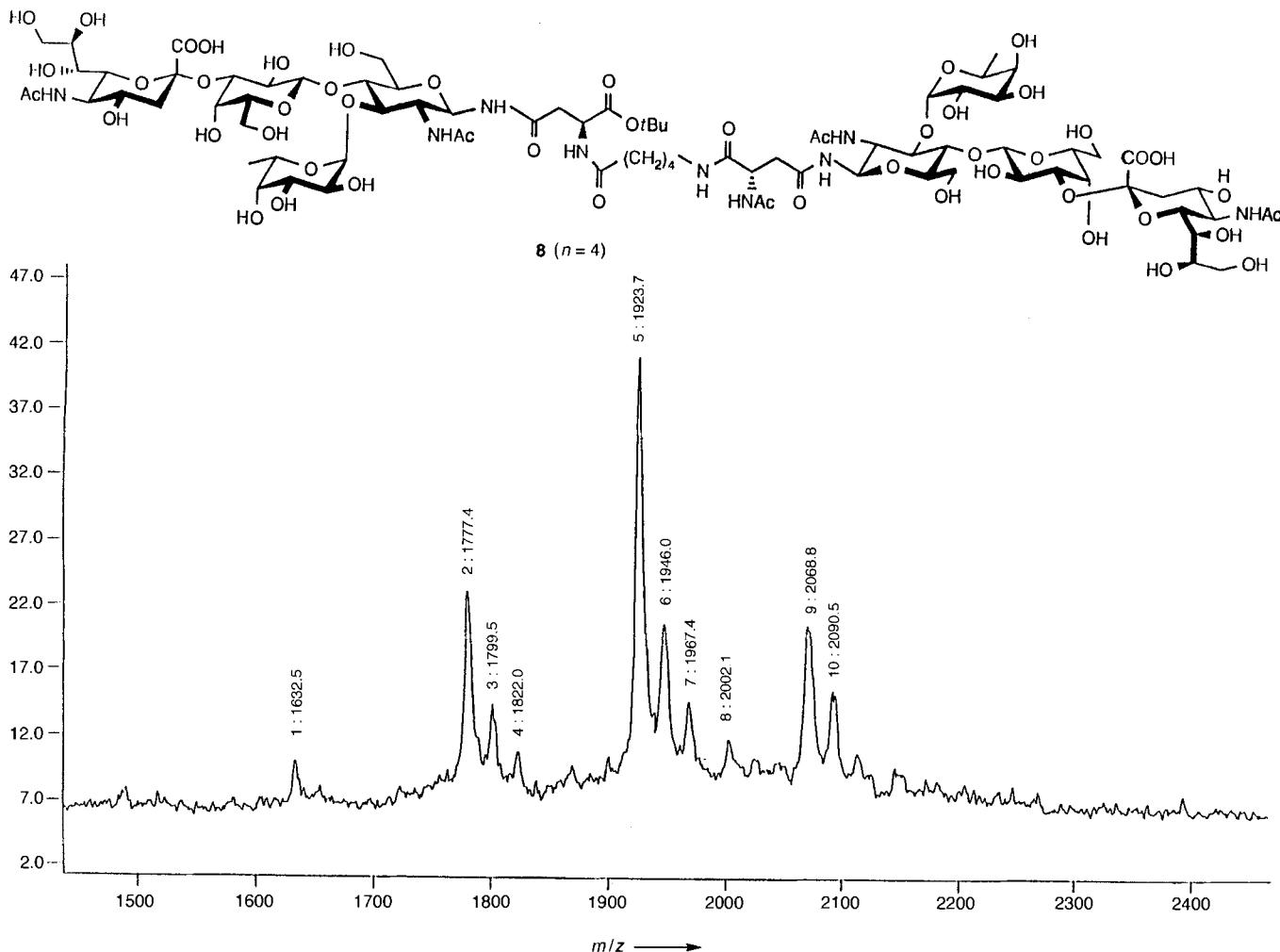


Abb. 1. MALDI-TOF-Massenspektrum der Reaktionslösung der Fucosylierung von **6** ($n = 4$); Matrix: 0.1 M 2,4,6-Trihydroxyacetophenon in Ethanol.

Während der Synthese der komplexen Endstufen zeigte sich die hohe Effizienz der MALDI-TOF-Massenspektrometrie^[35] als analytische Methode zur Kontrolle des Reaktionsverlaufs. Abbildung 1 zeigt exemplarisch das Spektrum einer Probe der Reaktionslösung aus der Fucosylierung von **6** ($n = 4$). Alle Endstufen wurden zusätzlich ¹H-NMR-spektroskopisch charakterisiert^[36].

Die Signale 2–4 stammen von nichtfucosyliertem Ausgangsmaterial ($M = 1756.7$) als Addukt mit Na^+ , 2Na^+ und 3Na^+ , die Signale 5–7 von monofucosylierten Zwischenstufen ($M = 1902.8$) ebenfalls als Na^+ -Assoziat und die Signale 9 und 10 schließlich vom difucosylierten Endprodukt ($M = 2047.0$), wiederum als Na^+ -Addukt. Wenn sich keine Signale von Ausgangsmaterial oder Zwischenstufen mehr nachweisen lassen, wird die Reaktion abgebrochen, und die Produkte werden über Sephadex aufgereinigt. Gleichzeitig ist das MALDI-TOF-Massenspektrum ein erstes Reinheitskriterium der Endstufe.

Die Verfügbarkeit der Transferasen und der aktivierte Zuckerkomplexe vorausgesetzt, ermöglicht die vorgestellte Methode eine rasche Herstellung von oligovalenten SLe^x-Konjugaten. Die Rigidität des Peptidrückgrats (→ Präsentation der SLe^x-Einheiten) und die individuellen Abstände der einzelnen SLe^x-Einheiten können durch geeignete Aminosäuremonomere beeinflußt werden. Der sequentielle Aufbau höhervalenter SLe^x-Analoga ist über die Peptidchemie möglich.

Die enzymatische Methodik ist nicht auf den Aufbau der natürlichen SLe^x-Struktur beschränkt^[37]; so zeigten mehrere

Untersuchungen, daß selbst stark entfremdete Substrate (Donoren wie Akzeptoren) von einigen Glycosyltransferasen hoch regio- und stereoselektiv übertragen werden^[38]. Die Substratbreite der Transferasen ist bei weitem noch nicht ausgelotet. Selbst Pseudozucker lassen sich mit Transferasen stereospezifisch und ohne Schutzgruppenmanipulationen effizient darstellen^[38, 39], so daß auch SLe^x-Mimetica^[37], von denen einige erstaunliche Affinitäten zu E-Selectin aufweisen^[40], auf diese Weise hergestellt werden können.

Eingegangen am 7. Dezember 1995,
veränderte Fassung am 4. März 1996 [Z 8621]

Stichworte: Glycopeptide · Glycosyltransferasen · Massenspektrometrie · Sialyl-Lewis^x

- [1] J. B. Lowe in *Molecular Glycobiology* (Hrsg.: M. Fukuda, O. Hindsgaul), IRL-Press, 1994, S. 163, zit. Lit.
- [2] M. B. Lawrence, T. A. Springer, *Cell* **1991**, *65*, 859.
- [3] K. Ley, P. Gaethgens, C. Fennie, M. S. Singer, L. A. Lasky, S. D. Rosen, *Blood* **1991**, *77*, 2553.
- [4] L. A. Lasky, *Ann. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 113.
- [5] C. R. Bertozzi, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 703.
- [6] M. Edwards, *Curr. Opin. Therap. Pat.* **1991**, 1617.
- [7] R. M. Nelson, S. Dolich, A. Aruffo, O. Cecconi, M. P. Bevilacqua, *J. Clin. Invest.* **1993**, *91*, 1157.
- [8] T. Feizi, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 701.
- [9] J. K. Welply, S. Z. Abbas, P. Scudder, J. L. Keene, K. Broschat, S. Casnoba, C. Gorka, C. Steiniger, S. C. Howard, J. J. Schmuck, M. Graneto, J. M. Rotstein, J. D. Manger, G. S. Jacob, *Glycobiology* **1994**, *4*, 259.

- [10] G. Kretzschmar, U. Sprengard, H. Kunz, E. Bartnik, W. Schmidt, A. Töpfer, B. Hörsch, M. Krause, D. Seiffge, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 13015.
- [11] Nach Einreichen unserer Arbeit wurde die Synthese eines trivalenten SLE⁺-Konjugates an einem Cyclopeptidtemplat publiziert: U. Sprengard, M. Schudok, W. Schmidt, G. Kretzschmar, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 359; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 321.
- [12] S. A. DeFrees, W. Kosch, W. Way, J. C. Paulson, S. Sabesan, R. R. Halcomb, D.-H. Huang, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 66.
- [13] H. Benz, *Synthesis* **1994**, 337.
- [14] C. Unverzagt, S. Kelm, J. C. Paulson, *Carbohydr. Res.* **1994**, *251*, 285.
- [15] C.-H. Wong, R. R. Halcomb, Y. Ichikawa, T. Kajimoto, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 569; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 521.
- [16] O. Hindsgaul, *Sem. Cell Biol.* **1991**, *2*, 319.
- [17] K. von dem Bruch, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 87; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 101.
- [18] Die cDNA-Sequenzen einer sehr großen Zahl von Transferasen sind hinterlegt, und meist lassen sich Zelleclone, die die gewünschte Transferase exprimieren, erhalten; siehe hierzu M. C. Field, L. J. Wainwright, *Glycobiology* **1995**, *5*, 463.
- [19] J. E. Heidlas, K. J. Williams, G. M. Whitesides, *Acc. Chem. Res.* **1992**, *25*, 307.
- [20] Y. Ichikawa, J. L. Liu, G.-J. Shen, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6300.
- [21] T. Inazu, K. Kobayashi, *Synlett* **1993**, 869.
- [22] P. Schultheiß-Reimann, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 64; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, *22*, 62.
- [23] D. Seghal, I. K. Vijay, *Anal. Biochem.* **1994**, *218*, 87.
- [24] S. Chen, J. Xu, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 647.
- [25] Die Verbindungen **1–5** können leicht in ¹H-NMR-spektroskopisch reiner Form über Kieselgelchromatographie im Grammstab erhalten werden. Die Substanzen **6** und **7** werden durch Chromatographie über RP-18-Gel in 100–250 mg Mengen rein erhalten.
- [26] J. E. Heidlas, W. J. Lees, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 152; kommerziell erhältlich von Sigma (U-4500).
- [27] Sigma G-5507.
- [28] Boehringer Nr. 108146.
- [29] M. M. Palcic, *Methods Enzymol.* **1994**, *230*, 300.
- [30] M. Kittelmann, T. Klein, U. Kragl, C. Wandrey, O. Ghisalba, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *44*, 59.
- [31] S. Gosselin, M. Alhussaini, M. Streiff, K. Takabayashi, M. M. Palcic, *Anal. Biochem.* **1994**, *220*, 92.
- [32] U. B. Gokhale, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *Can. J. Chem.* **1990**, *68*, 1063; Grammengen dieses aktivierten Donors sowie mehrere Derivate lassen sich auch leicht chemo-enzymatisch herstellen: R. Öhrlein, G. Baisch, noch unveröffentlicht.
- [33] Lösliche Fucosyltransferase VI wurde aus dem Überstand einer hochproduktiven, transfizierten CHO-Zelllinie isoliert: A. Katopodis, B. Bowen, noch unveröffentlicht.
- [34] Die Inhibitionskonstanten (IC_{50}) wurden über einen statischen Assay mit recombinantem menschlichem E-Selectin gewonnen. Die Untersuchungen wurden von Dr. J. Magnani (GlycoTech Corp., 14915 Broschart Rd., Rockville, MD 20850, USA) durchgeführt.
- [35] Diese äußerst empfindliche und schonende Methode wurde ursprünglich für die Analytik von Oligonukleotiden entwickelt (U. Pieles, W. Zürcher, M. Schär, H. E. Moser, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 3191). Wir konnten sie aber auch sehr zuverlässig zum Nachweis komplexer Glycoproteide anwenden.
- [36] Auswahl von ¹H-NMR-Daten (D_2O , 500 MHz, interner Standard D_2O , 4.80 ppm): **8** ($n = 4$): $\delta = 1.27$ (d, $J = 7.0$ Hz, 6H, 6-H (fuc)), 1.54 und 1.68 (jeweils m und 2H, $O_2CCH_2CH_2CH_2CH_2N$), 1.76 (t, $J = 11$ Hz, 2H, 3-H_{ax} (sia)), 1.94 und 1.96 (jeweils s und 3H, NHAc), 2.00 (s, 9H, NHAc), 2.25 (m, 2H, $O_2CCH_2CH_2CH_2CH_2N$), 2.75 (m, 6H, 3-H_{aq} (sia) und β -H (asn)), 4.51 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, 1-H (gal)), 4.60 (m, 2H, α -H (asn)), 5.14 (m, 4H, 1-H (fuc) und 1-H" (glcNAc)), –9 ($n = 4$): $\delta = 1.31$ (d, $J = 7.0$ Hz, 9H, 6-H (fuc)), 1.68 (m, 8H, $O_2CCH_2CH_2CH_2CH_2N$), 1.94 (t, $J = 11$ Hz, 3H, 3-H_{ax} (sia)), 2.15 (s, 9H, NHAc), 2.20 (s, 12H, NHAc), 2.46 (m, 4H, $O_2CCH_2CH_2CH_2CH_2N$), 2.92 (m, 9H, 3-H_{aq} (sia) und β -H (asn)), 3.48 (m, 4H, $O_2CCH_2CH_2CH_2CH_2N$), 4.71 (d, $J = 7.5$ Hz, 3H, 1-H (gal)), 4.79 (m, 3H, α -H (asn)), 5.25 (m, 6H, 1-H (fuc) und 1-H (glcNAc)).
- [37] Kürzlich konnten wir zeigen, daß die hier verwendeten Transferasen eine ganze Reihe nichtnatürlicher Acceptor bereitwillig in vitro umsetzen: G. Baisch, R. Öhrlein, B. Ernst, *Biorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, im Druck; G. Baisch, R. Öhrlein, B. Ernst, M. Streiff, *ibid.*, im Druck; G. Baisch, R. Öhrlein, B. Ernst, A. Katopodis, *ibid.*, im Druck.
- [38] Eine aktuelle Übersicht findet sich in: M. M. Palcic, O. Hindsgaul, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **1996**, *8*, 37.
- [39] L. Yu, R. Cabrera, J. Ramirez, V. A. Malinoski, K. Brew, P. G. Wang, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2897; C.-H. Wong, Y. Ichikawa, T. Krach, C. Gauthron-LeNarvor, D. P. Dumas, G. C. Look, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8137; R. Öhrlein, noch unveröffentlicht.
- [40] N. M. Allanson, A. H. Davidson, C. D. Floyd, F. M. Martin, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 2061; A. Töpfer, G. Kretzschmar, E. Bartnik, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 9161.

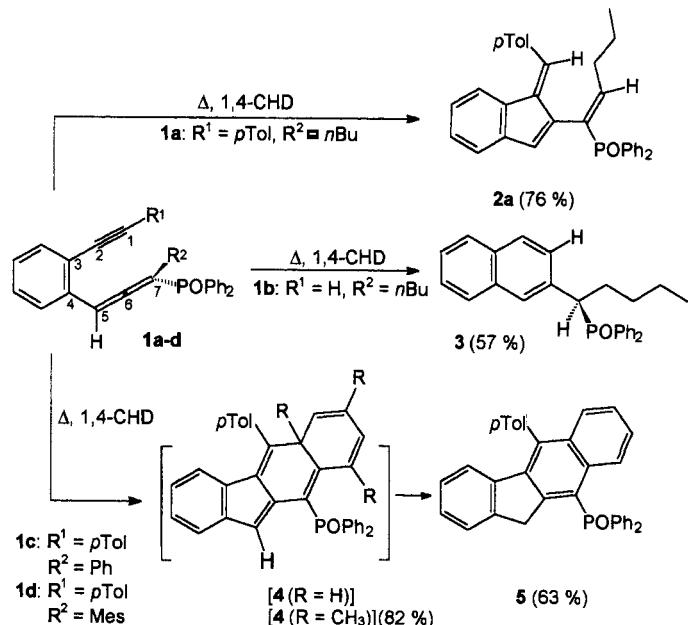
Eine neue Diradikal-Cyclisierung als Alternative zur Myers-Saito-Cycloaromatisierung bei der thermischen Umsetzung von Eninallenen**

Michael Schmittel*, Marc Strittmatter und Susanne Kiau

Professor Horst Prinzbach zum 65. Geburtstag gewidmet

Seit einigen Jahren kann eine rege Forschungsaktivität auf dem Gebiet der thermischen Diradikal-Cyclisierungen^[1] von Endiinen, Enincumulen und Eninallenen verzeichnet werden. Inspiriert wurde diese Entwicklung einerseits durch die faszinierenden Wirkmechanismen solcher Systeme in tumorhemmenden Naturstoffen^[2], andererseits durch das Potential, das für die Synthese carbocyclischer Systeme^[3] gegeben ist. Folgerichtig wurden auch bei Eninallenen^[4], deren thermische Reaktion im allgemeinen zu den erwarteten Myers-Saito-Cyclisierungsprodukten führt^[1b, d], bereits unterschiedlichst substituierte Verbindungen untersucht. Völlig unerwartet tritt jedoch, wie wir kürzlich zeigen konnten, bei Anwesenheit einer Arylgruppe am Alkinterminus der Eninallene (Schema 1) ein Reaktionswechsel zu einer C²-C⁶-Cyclisierung auf, die zur Bildung der formalen En-^[5] und Diels-Alder-Reaktionsprodukte^[6] führt.

Um die überraschende C²-C⁶-Cyclisierung in **1a, c, d** zu erklären, postulierten wir^[5, 6] die Diradikalzwischenstufe **B^{2, 6}** (Schema 2), obwohl die Bildung von **2a**, **4** ($R = CH_3$) und **5** prinzipiell auch über eine konzertierte Reaktion möglich wäre. Da aber die Stabilisierung von Vinylradikalen durch Arylgruppen hinlänglich bekannt ist^[7], wurde vorgeschlagen, daß die



Schema 1. Wechsel der thermischen Reaktion von Eninallenen von der Myers-Saito- zu einer C²-C⁶-Cyclisierung (1,4-CHD = 1,4-Cyclohexadien, Mes = 2,4,6-Tri-methylphenyl).

[*] Prof. Dr. M. Schmittel, Dipl.-Chem. M. Strittmatter, Dipl.-Chem. S. Kiau
Institut für Organische Chemie der Universität
Am Hubland, D-97074 Würzburg
Telefax: Int. + 931/888-4606
E-mail: mjs@chemie.uni-wuerzburg.de

[**] Thermische und elektronentransferinduzierte Reaktionen von Endiinen und Eninallenen, 4. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der Volkswagen-Stiftung und dem Fonds der chemischen Industrie gefördert. Prof. Dr. C. Rüchardt und E. Hickl (Freiburg) danken wir für ihre große Hilfe bei den DSC-Experimenten. – 3. Mitteilung: [6].