

herstellen. Die durchweg in hohen Ausbeuten erhaltenen Verbindungen wurden von einem Großteil der Schutzgruppen befreit und sind somit für eine Funktionalisierung des anomeren Zentrums sowie einer enzymatischen Verlängerung des Oligosaccharidteils zugänglich.

Eingegangen am 27. Januar 1997 [Z10037]

Stichworte: Glycane • Glycoside • Glycosylierungen • Kohlenhydrate • Polysaccharide

- [1] Übersicht: E. G. Berger, E. Buddecke, J. P. Kamerling, A. Kobata, J. C. Paulson, J. F. G. Vliegthart, *Experientia* **1982**, *38*, 1129–1162.
- [2] Übersichten: a) R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683–720; b) A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130; c) H. Schachter, *Biochem. Cell. Biol.* **1984**, *64*, 163–181.
- [3] M. Takeuchi, N. Inoue, T. W. Strickland, M. Kobuta, M. Wada, R. Shimizu, S. Hoshi, H. Kozutsumi, S. Takasaki, A. Kobata, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 7819–7822.
- [4] a) Übersicht: H. Paulsen, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 851–857; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 823–839.
- [5] a) T. Ogawa, M. Sugimoto, T. Kitajima, K. K. Sadozai, T. Nukada, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5739–5742; b) Y. Nakahara, S. Shibayama, Y. Nakahara, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1996**, *280*, 67–84; c) C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2507–2510; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2350–2353.
- [6] a) H. Paulsen, B. Helpap, *Carbohydr. Res.* **1991**, *216*, 289–313; b) J. Kerekgyarto, J. P. Kamerling, J. B. Bouwstra, J. F. G. Vliegthart, A. Liptak, *ibid.* **1989**, *186*, 51–62; c) K. K. Sadozai, Y. Ito, T. Nukada, T. Ogawa, A. Kobata, *ibid.* **1986**, *150*, 91–101; d) K. K. Sadozai, T. Nukada, Y. Ito, Y. Nakahara, T. Ogawa, A. Kobata, *ibid.* **1986**, *157*, 101–123; e) J. Arnarp, M. Haraldsson, J. Lönngren, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1982**, 1841–1844; f) *Carbohydr. Res.* **1981**, *97*, 307–313; g) J. Arnarp, J. Lönngren, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1981**, 2070–2074.
- [7] a) S. W. Homanns, R. A. Dwek, D. L. Fernandes, T. W. Rademacher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 6286–6289; b) T. Endo, *J. Chromatogr. A* **1996**, *720*, 251–261; c) K. G. Rice, M. L. Corradi Da Silva, *ibid.* **1996**, *720*, 235–249.
- [8] a) M. H. Chiu, T. Tamura, M. S. Wadhwa, K. G. Rice, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 16195–16202; b) M. H. Chiu, V. H. Thomas, H. J. Stubbs, K. G. Rice, *ibid.* **1995**, *270*, 24024–24031; c) C.-H. Lin, M. Shimazaki, C.-H. Wong, M. Koketsu, R. R. Juneja, M. Kim, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1625–1630; d) J. Helin, H. Maaheimo, A. Seppo, A. Keane, O. Renkonen, *Carbohydr. Res.* **1995**, *266*, 191–209.
- [9] C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1170–1173; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1102–1104.
- [10] Der Donor **C** wurde durch folgende Reaktionssequenz erhalten: a) Benzyl-3,6-di-O-allyl- α -D-mannopyranosid [11] und 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- α , β -D-glucopyranosylfluorid [12], CH_2Cl_2 , 4- \AA -Molekularsieb, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (81%); b) 1. PdCl_2 , NaOAc , AcOH ; 2. Ac_2O /Pyridin, 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) (77%); c) 1. Pd/H_2 , MeOH ; 2. Cl_3CCN , 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU), CH_2Cl_2 (80%).
- [11] J. Arnarp, J. Lönngren, *Acta Chem. Scand. B* **1978**, *32*, 696–697.
- [12] b) C. Unverzagt, H. Kunz, *J. Prakt. Chem.* **1992**, *334*, 570–578.
- [13] Der Donor **D** wurde durch folgende Reaktionssequenz erhalten: a) Benzyl-3,4-di-O-benzyl- α -D-mannopyranosid [14] und 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyltrichloracetimidat [15], CH_2Cl_2 , 4- \AA -Molekularsieb, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (53%); b) 1. Pd/H_2 , MeOH ; 2. Ac_2O /Pyridin (70%); c) 1. Hydraziniumacetat, DMF; 2. Cl_3CCN , DBU, CH_2Cl_2 (68%).
- [14] J. Arnarp, M. Haraldsson, J. Lönngren, *Carbohydr. Res.* **1981**, *97*, 307–313.
- [15] R. R. Schmidt, W. Kinzy in *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. Vol. 50* (Hrsg.: D. Horton), Academic Press, New York, **1994**, S. 21–123.
- [16] Die Numerierung der Reste entspricht der von 6.
- [17] a) K. Bock, C. Pedersen, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1974**, 293–297; b) S. Wolfe, B. M. Pinto, V. Varma, R. Y. N. Leung, *Can. J. Chem.* **1990**, *68*, 1051–1062.
- [18] a) Y.-M. Zhang, A. Brodzky, P. Sinai, G. Saint-Marcoux, B. Perly, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1195–1216; b) P. Grice, S. V. Ley, J. Pietruszka, H. W. M. Priepke, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 206–208; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 197–200.
- [19] F. Cramer, N. Hennrich, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 976–989.
- [20] a) H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 507–554; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 490–536; b) H. Kessler, P. Schmieder, M. Kurz, *J. Magn. Reson.* **1989**, *65*, 400–405.
- [21] O. Kanie, S. C. Crawley, M. M. Palcio, O. Hindsgaul, *Carbohydr. Res.* **1993**, *243*, 139–164.
- [22] J. Seifert, C. Unverzagt, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6527–6530.
- [23] a) C. Unverzagt, *Abstr. Pap. 17th Int. Carbohydr. Symp.* (Ottawa, Kanada), **1994**, B1.66; b) C. Unverzagt, J. Seifert, noch unveröffentlichte Ergebnisse.

Eine effiziente Synthese von Gangliosid GM2 für die Verwendung in Tumorimpfstoffen**

Julio C. Castro-Palomino, Gerd Ritter,*
Sheila R. Fortunato, Stefan Reinhardt,
Lloyd J. Old und Richard R. Schmidt*

Menschliche Krebszellen exprimieren Kohlenhydratantigene an ihrer Zelloberfläche, die als Zielmoleküle für eine spezifische Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern oder Impfstoffen dienen können.^[1] Beispiele für diese Antigene sind die Ganglioside GM2, GD2, GD3, O-Acetyl-GD3 und Fucosyl-GM1, das neutrale Glycosphingolipid globo-H, die T-, Tn- und sTn-Epitope auf Glycoproteinen sowie das Le^y-Epitop, das in Glycolipiden und Glycoproteinen vorkommt. Von diesen ist das Gangliosid GM2 von besonderem Interesse: a) GM2 kommt auf der Zelloberfläche von zahlreichen Krebsarten beim Menschen vor, z. B. Melanom, Sarkom und Nierenkrebs.^[2] b) GM2-reaktive Antikörper (poly- und monoklonale Antikörper von Mäusen und Menschen) sind „in vitro“ cytotoxisch für humane GM2⁺-Krebszellen.^[3,4] c) GM2 ist im Menschen wegen der gelegentlich natürlich vorkommenden niedrigtitrigen IgM-Antikörper gegen GM2,^[4] wegen der beim Menschen relativ leicht isolierbaren monoklonalen Antikörpern gegen GM2^[5] und wegen der Bildung von Antikörpern gegen GM2 nach Immunisierung mit GM2 enthaltenden Impfstoffen^[3,4,6–8] immunogen. d) Das Vorkommen von GM2-Antikörpern scheint bei Melanompatienten mit höheren Überlebenschancen und längeren krankheitsfreien Intervallen in Zusammenhang zu stehen.^[4] e) Keine toxischen Nebenwirkungen werden bei einer Immunreaktion auf GM2 beobachtet.^[4]

Es wurden bisher mehrere Ansätze untersucht, eine Immunantwort gegen GM2⁺-Krebszellen in Melanompatienten hervorzurufen, beispielsweise durch Immunisierung mit GM2⁺-Tumorzellen^[7] oder mit GM2, das aus Geweben aufgereinigt und mit immunologischen Adjuvantien gemischt verabreicht wurde.^[3,4] Neuere Impfstoffe in der klinischen Prüfung bestehen aus aufgereinigtem GM2, das chemisch an ein immunogenes Trägermolekül gekoppelt ist, und einem Adjuvans.^[6] Mit Impfstoffen, bestehend aus GM2⁺-Krebszellen oder an Bacillus Calmette Guerin (BCG) adsorbiertem GM2, wurden im allgemeinen Antikörper des IgM-Isotyps mit nur relativ niedrigen Serumtitern induziert. Diese Antikörper waren meist nur kurze Zeit im Serum nachweisbar, und eine sekundäre Immunantwort konnte nicht hervorgerufen werden. Die Eigenschaften der durch GM2 hervorgerufenen Immunantwort sind typisch für eine T-Zell-unabhängige Immunantwort.^[3,4] Es wurde gezeigt, daß nach Verabreichung eines Impfstoffes, der aus chemisch an das Trägermolekül KLH (keyhole hemocyanin) gekoppeltem und mit dem zu den Saponinen gehörenden Adjuvans QS21 besteht, die IgM-Antikörperantwort verstärkt und IgG-Antikörper gebildet werden.^[6] Die IgG-Antikörper waren im ELISA (enzym-linked immuno sorbent assay) nachweisbar, in dem als Antigen aufgereinigtes GM2 verwendet wurde. Allerdings reagierten diese IgG-Antikörper nicht mit humanen Krebszellen, die GM2 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren.^[8]

*] Prof. Dr. R. R. Schmidt, J. C. Castro-Palomino, S. Reinhardt
Fakultät für Chemie der Universität
D-78457 Konstanz
Dr. G. Ritter, S. R. Fortunato, Dr. L. J. Old
Ludwig Institute for Cancer Research
New York Branch at Memorial Sloan Kettering Cancer Center
1275 York Avenue, New York, NY 10021 (USA)

**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

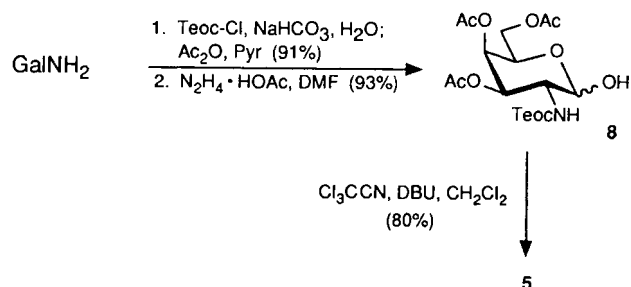
Unter anderem könnte der Grund hierfür darin liegen, daß eine Induktion von IgG-Antikörpern gegen solche GM2-Epitope stattfindet, die auf der Zelloberfläche verdeckt oder kryptisch sind. Diese IgG-Antikörper sind möglicherweise das Produkt einer suboptimalen GM2-KLH/QS21-Formulierung.

Das in diesen Untersuchungen verwendete GM2 stammt aus Geweben von Säugetieren (z. B. aus Rinderhirn, Tay-Sachs-Gehirn von Katzen, humanem Melanom). Allerdings birgt die Extraktion und Reinigung von GM2 aus Geweben die Gefahr biologischer Kontamination. Außerdem besteht GM2, das aus Gewebe von Säugetieren gewonnen wurde, aus einer Mischung von GM2-Verbindungen, die sich im Ceramidteil unterscheiden. Für die systematische klinische Entwicklung von Impfstoffen wäre eine definierte Quelle für eine einzelne, genau charakterisierte GM2-Verbindung wünschenswert, insbesondere für Impfstoffe, die für eine größere Patientengruppe verwendet werden sollen. Aus diesen Gründen entwickelten wir eine Methode zur chemischen Synthese von ausreichenden Mengen sowohl an GM2-Oligosaccharid-Synthesebausteinen als auch an GM2-Gangliosid, die als Immunogene in Impfstoffen gegen GM2⁺-Krebsarten eingesetzt werden können.

Die Strategie von früheren GM2-Synthesen^[9-11] folgt dem GA2- oder GM3-Weg,^[12] der auch hier angewendet wird (Schema 1). Die wichtigsten Syntheseprobleme auf diesem Weg sind a) die einfache Herstellung eines geeigneten Lactosebausteins, b) die α -selektive Anknüpfung eines Sialyldonors an die 3b-Hydroxygruppe der Lactose, c) die β -selektive Anknüpfung eines N-geschützten Galactosamins in hoher Ausbeute an die wenig reaktive 4b-Hydroxygruppe der GM3-Trisaccharid-Zwischenstufe und d) die Umwandlung der N-geschützten in die N-Ace-

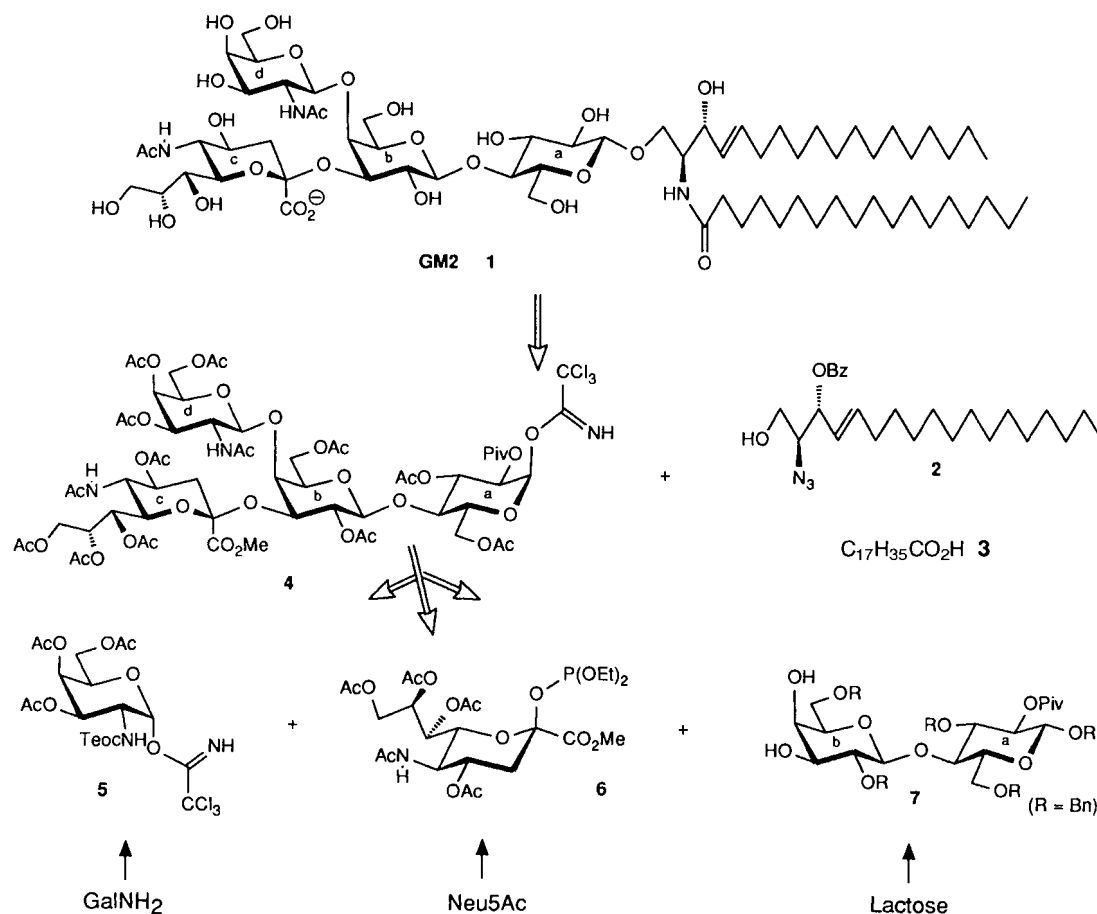
tylgalactosamineinheit. Die Probleme a)–d) können mit den Bausteinen **2**^[13] und **3** sowie **5**–**7**, aus denen die Tetrasaccharid-Zwischenstufe **4** aufgebaut wird, gelöst werden.

Nach Untersuchung mehrerer Galactosamindonoren wurde das *N*-Trichlorethoxycarbonyl(Teoc)-geschützte Trichloracetimidat **5** gewählt,^[13] welches aus Galactosamin in drei Schritten über das 1-O-ungeschützte Zwischenprodukt **8** leicht und in sehr guter Ausbeute erhalten wurde (Schema 2). Damit wurde



Schema 2. Synthese des Trichloracetimidats **5**. Pyr = Pyridin.

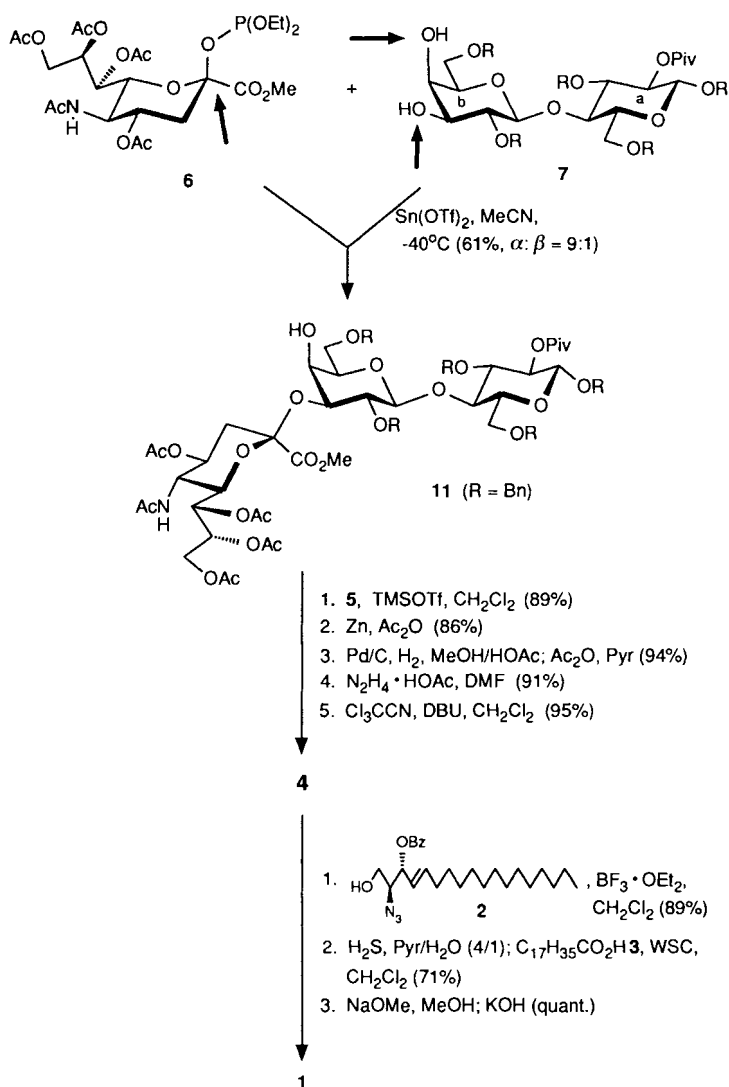
die bei früheren GM2-Synthesen^[9, 10] notwendige langwierige Azidogalactose-Herstellung^[11, 12] sowie die in Gegenwart von *N*-Acetylneuraminsäure(Neu5Ac)-Resten schwierige Abspaltung der *N*-Phthaloylschutzgruppe vermieden: Durch einfache Behandlung von *N*-Teoc-enthaltenden Verbindungen mit Zn/Ac₂O kann in einem Schritt die *N*-Teoc-Gruppe durch die Acetylgruppe ersetzt werden. Als Neu5Ac-Donor wurde das bekannte Diethylphosphit **6**^[16] verwendet.



Schema 1. Retrosynthese von GM2 **1**.

Die 3b,4b-O-ungeschützte 2a-O-Pivaloyllactose **7**^[17] ermöglicht wegen der sehr unterschiedlichen Reaktivitäten nacheinander regioselektiv an der 3b- und anschließend an der 4b-Hydroxygruppe umgesetzt werden. Die Zahl der bei der bekannten Synthese von **7**^[17] notwendigen Schritte konnte durch 1a,2a-O-Silylwanderung^[18] zur regioselektiven Einführung der 2a-O-Pivaloylgruppe wesentlich verringert werden. Isopropylidenierung von Lactose^[19] und Silylierung mit Thexyldimethylsilylchlorid (TDS-Cl) in Gegenwart von Base führte zur 1-O-silylierten 3b,4b-O-Isopropylidenlactose **9** (Scheme 3), welche auch bequem über die per-O-acetylierte 3b,4b-O-Isopropylidenlactose^[20] erhalten werden kann. Benzylierung von **9** mit Benzylbromid und NaH als Base in DMF führte zu einer reversiblen Silylwanderung zwischen den 1a- und 2a-Sauerstoffatomen; aus diesen Intermediaten wurde durch irreversible anomere O-Alkylierung^[18,21] wegen der höheren Nucleophilie des Oxidationsstoffatoms des β -Anomers in hoher Ausbeute direkt **10** gebildet. Durch Abspaltung der 2a-O-Silylgruppe mit *n*-Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) in THF, Pivaloylierung und säurekatalysierte Abspaltung der Isopropylidengruppe wurde **7** in hoher Ausbeute erhalten.

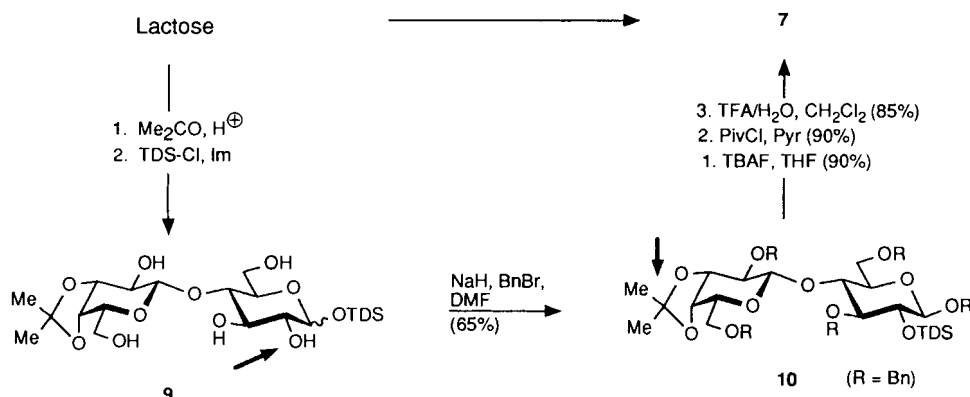
Die Reaktion von Sialyldonoren liefert im allgemeinen mit 2,3,4-O-ungeschützten, nicht aber mit 3,4-O-ungeschützten Galactosederivaten^[16,22] gute α -Glycosylierungsergebnisse. Untersuchungen mit dem Donor **6**, dem Acceptor **7** und mehreren Katalysatoren ergaben, daß Zinn(II)-triflat in Acetonitril bei -40°C mit hoher α -Selektivität ($\alpha:\beta = 9:1$) die GM3-Zwischenstufe **11** in guter Ausbeute gibt (Schema 4); bei Raumtemperatur wurden bis zu 80% Ausbeute bei nur geringfügig höherem Gehalt an β -Anomer ($\alpha:\beta = 4:1$) erhalten; das α -Anomer **11** kann Flash-chromatographisch in hoher Reinheit erhalten werden. Die nachfolgende Glycosylierung mit dem Donor **5** lieferte das gewünschte Tetrasaccharid in nahezu quantitativer Ausbeute. Der Ersatz der Teoc-Gruppe durch die Acetylgruppe gelang unter milden Bedingungen mit Zn/Ac₂O. Durch Hydrierung mit Pd/C in MeOH/AcOH und anschließende Umsetzung mit Ac₂O in Pyridin wurden alle Benzylgruppen durch Acetylgruppen ersetzt. Alle folgenden Umsetzungen entsprechen unserem bereits eingeführten Verfahren:^[12] Regioselektive Abspaltung der anomeren O-Acetylgruppe mit N₂H₄·HOAc und anschließende Umsetzung mit Cl₃CCN und 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) als Base lieferten den Tetrasacchariddonor **4**. Durch Anwendung des „Azidosphingosin-Glycosylierungsverfahrens“^[13] auf das Azidosphingosin **2**,^[13] Umwandlung der Azido- in die Aminogruppe, Anknüpfung der Stearinsäure (oder einer anderen Fettsäure, siehe oben), und schließlich Abspaltung aller Schutzgruppen unter basischen Be-



Scheme 4. Synthese von GM2 **1** aus den Bausteinen **6**, **7**, **5** und **2**. Tf = F₃CSO₂, TMS = Trimethylsilyl, WSC = "water soluble carbodiimide" (*N*-3-Dimethylaminopropyl-*N'*-ethylcarbodiimid-hydrochlorid).

dingungen wurde **1** erhalten, welches identisch mit früher synthetisiertem Material war.^[8,9]

Die Zugänglichkeit eines GM2-Synthesebausteins in großer Menge durch chemische Synthese ermöglicht die Herstellung von GM2-Gangliosiden mit unterschiedlichen, genau definierten Ceramid-Bestandteilen sowie von neuartigen GM2-Neoglykokonjugaten zur Verwendung als Immunogene in GM2-Impfstoffen. Beispielsweise wurde nach dieser „Methode“ GM2 mit Fettsäuren unterschiedlicher Länge (Caprinsäure, Stearinsäure und Lignocerinsäure) im Ceramidteil sowie ein an einen kurzen lipophilen Spacer (Azidohexanol) angeknüpftes GM2-Oligosaccharid synthetisiert, um eine direkte Konjugation an Trägerverbindungen zu ermöglichen. Um potentielle serologische Unterschiede in Abhängigkeit von der



Scheme 3. Synthese der Pivaloyllactose **7**. Im = Imidazol, Piv = Pivaloyl, TFA = Trifluoressigsäure. Zur Synthese von **7** aus Lactose siehe auch Lit.^[17].

Zusammensetzung des Lipidteils festzustellen, wurden diese Substanzen sowie GM2 aus Rinderhirn auf ihre Reaktivität mit zahlreichen serologischen Reagentien (beispielsweise murine und humane monoklonale GM2-Antikörper, Immunsereum mit GM2-Reaktivität von Kaninchen sowie Serum von Melanomapatienten, welche mit Rinderhirn-GM2-haltigen Impfstoffen immunisiert wurden) durch ELISA, ELISA-Spot-Immunanfärbung und Immun-Dünnschichtchromatographie untersucht. Wir stellten fest, daß synthetisches GM2 mit Stearinsäure oder Lignocerinäure im Ceramidteil von GM2 aus Rinderhirn serologisch nicht zu unterscheiden ist (Abb. 1, 2). Allerdings sind

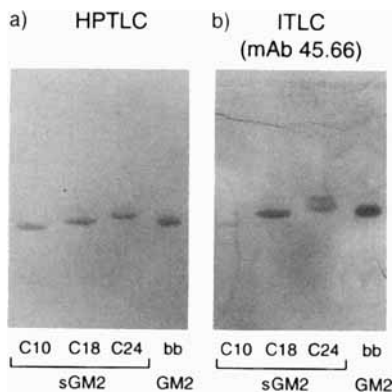


Abb. 1. Reaktion eines humanen monoklonalen GM2-Antikörpers (mAb 45.66) von einem Patienten mit malignem Melanom mit synthetischem GM2, welches Caprinsäure (C10-sGM2), Stearinsäure (C18-sGM2) oder Lignocerinäure (C24-sGM2) im Ceramidteil enthält, sowie mit Rinderhirn-GM2 (bbGM2). 1 mg Gangliosid wurde jeweils aufgetragen. Das Dünnschichtchromatogramm wurde mit Chloroform/Methanol/0.2proz. CaCl_2 in H_2O (55/45/10, v/v/v) entwickelt und mit auf das Zehnfache verdünntem Überstand der Hybridomkultur 45.66 überschichtet. Die spezifische Reaktivität wurde sichtbar gemacht mit einem Konjugat von Peroxidase-Anti-Human-IgM-Antikörper und Diaminobenzidin (b). Die Ganglioside wurden gegengefärbt mit Orcin/ H_2SO_4 nach vorheriger Immunanfärbung (a).

GM2 mit kürzeren Fettsäuren, z. B. Caprinsäure, im Ceramidteil sowie an Azidohexanol angeknüpftes GM2-Oligosaccharid wesentlich weniger reaktiv gegenüber GM2-reaktiven Antikörpern, woraus folgt, daß das Ceramid eine Fettsäure mit einer Länge von mehr als zehn Kohlenstoffatomen zur vollständigen und spezifischen Immunerkennung von GM2 erfordert. Nach diesem Befund wurden jetzt Impfstoffe mit GM2-KLH-Konjugaten unter Verwendung von synthetischem GM2 mit Stearinsäure im Ceramidteil hergestellt. Klinische Studien mit diesen Impfstoffen werden bei Patienten mit fortgeschrittenem malignem Melanom in naher Zukunft beginnen. Durch Verwendung von totalsynthetischem GM2, dessen Struktur genau definiert und das frei von biologischen Verunreinigungen ist, sollten wir dem Ziel, einen sicheren und effizienten Impfstoff zu entwickeln, der im Krebspatienten eine hochtitrige und langlebige cytotoxische Antikörperantwort induziert, einen Schritt näher kommen.

Eingegangen am 16. Dezember 1996,
veränderte Fassung am 15. Mai 1997 [Z9886]

Stichworte: Antigene · Cytostatica · Ganglioside · Glycosid-synthesen

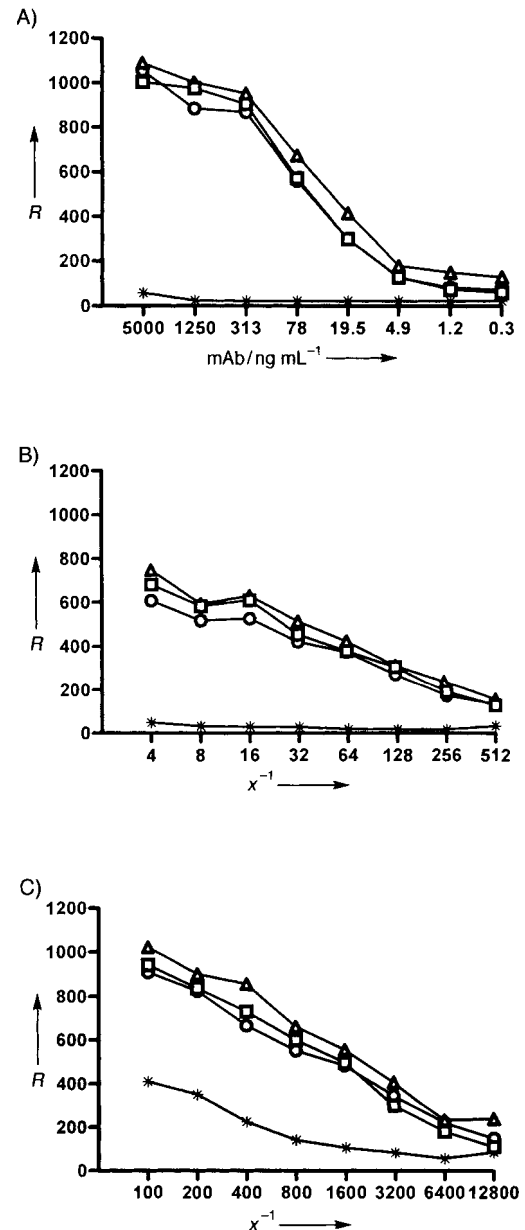


Abb. 2. ELISA-Reaktivität R von GM2-Antikörpern mit synthetischem GM2, welches C10:0 (*), C18:0 (o) oder C24:0 (Δ) Fettsäuren im Ceramidteil enthält, sowie mit Rinderhirn-GM2 (\square) in Abhängigkeit von der Konzentration des Antikörpers (in B und C als reziproker Titer x^{-1}). A) Monoklonaler Antikörper 45.66 (Zellkulturüberstand, IgM), B) Serum eines Melanomapatienten, immunisiert mit Rinderhirn-GM2-KLH/QS21-Impfstoff (IgG). Mit Kontrollantikörpern oder anderen Gangliosiden wurde keine Reaktion beobachtet. Methode: Jeweils 200 pmol GM2 wurden mit unterschiedlichen Mengen an GM2-Antikörpern inkubiert, und die Reaktivität wurde nach Reaktion mit Fluoresceinisothiocyanat(FITC)-konjugierten spezifischen sekundären Antikörpern mit einem Microplate-Fluorospektrometer quantifiziert.

- [1] H. F. Oettgen, L. J. Old in *Biologic Therapy of Cancer* (Hrsg.: V. DeVita, S. Hellmann, S. A. Rosenberg), J. B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, 1991; G. Ritter, P. O. Livingston, *Seminars Cancer Biol.* 1991, 2, 401–409.
- [2] W. B. Hamilton, F. Helling, K. O. Lloyd, P. O. Livingston, *Int. J. Cancer* 1993, 53, 566–573.
- [3] P. O. Livingston, E. J. Natoli, M. Jones Calves, E. Stockert, H. F. Oettgen, L. J. Old, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1987, 84, 2911–2915.

- [4] P. O. Livingston, G. Y.C. Wong, S. Adluri, Y. Tao, M. Padavan, R. Parente, C. Hanlon, M. Calves, F. Helling, G. Ritter, H. F. Oettgen, L. J. Old, *J. Clin. Oncol.* 1994, 12, 1036–1044.
- [5] H. Yamaguchi, K. Furukawa, S. R. Fortunato, P. O. Livingston, K. O. Lloyd, H. F. Oettgen, L. J. Old, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1990, 87, 3333–3337; Y. Nishinaka, M. H. Ravindranath, R. F. Irie, *Cancer Res.* 1996, 56, 5666–5671.
- [6] F. Helling, S. Zhang, A. Shang, S. Adluri, M. Calves, R. Koganty, B. M. Longenecker, T.-H. Tao, H. F. Oettgen, P. O. Livingston, *Cancer Res.* 1995, 55, 2783–2788.
- [7] T. Tai, L. D. Cahan, T. Tsuchida, R. E. Saxton, R. F. Irie, D. L. Morton, *Int. J. Cancer* 1985, 35, 607–612.

- [8] K. Kitamura, P. O. Livingston, S. R. Fortunato, E. Stockert, F. Helling, G. Ritter, H. F. Oettgen, L. J. Old, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 2805–2809.
- [9] M. Sugimoto, M. Numata, K. Koike, Y. Nakahara, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1986**, *156*, C1–C5.
- [10] A. Hasegawa, T. Nagahama, H. Ohki, M. Kiso, *J. Carbohydr. Chem.* **1992**, *11*, 699–714.
- [11] T. Stauch, Dissertation, Universität Konstanz, **1995**; R. R. Schmidt in *Synthetic Oligosaccharide—Indispensable Probes for Life Sciences* (Hrsg.: P. Kovac), Washington DC, **1994**, S. 276–296 (*ACS Symp. Ser.* **1994**, 560).
- [12] T. Stauch, U. Greilich, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann.* **1995**, 2101–2111; U. Greilich, R. Brescello, K.-H. Jung, R. R. Schmidt, *ibid.* **1996**, 663–672, zit. Lit.
- [13] R. R. Schmidt, P. Zimmermann, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 481–484; *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 722–723; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 725–726.
- [14] Entsprechende Glucosamininderivate wurden schon für Glycosylierungen verwendet: H. Paulsen, B. Helpap, *Carbohydr. Res.* **1991**, *216*, 289–313; Lit. [15].
- [15] W. Dullenkopf, J. C. Castro-Palomino, L. Manzoni, R. R. Schmidt, *Carbohydr. Res.* **1996**, *296*, 135–147.
- [16] T. J. Martin, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6123–6126; T. J. Martin, R. Brescello, A. Toepfer, R. R. Schmidt, *Glycoconj. J.* **1993**, *10*, 16–25, zit. Lit.
- [17] Y. Ito, M. Numata, M. Sugimoto, T. Ogawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8508–8510; N. Numata, M. Sugimoto, Y. Ito, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1990**, *203*, 205–217.
- [18] J. M. Lassaletta, R. R. Schmidt, *Synlett* **1995**, 925–927; J. M. Lassaletta, M. Meichle, S. Weiler, R. R. Schmidt, *J. Carbohydr. Chem.* **1996**, *15*, 241–254.
- [19] H. H. Baer, S. A. Abbas, *Carbohydr. Res.* **1980**, *84*, 53–60.
- [20] L. Lay, R. Windmüller, S. Reinhardt, R. R. Schmidt, *Carbohydr. Res.*, im Druck.
- [21] R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 213–236; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 212–235.
- [22] T. Murase, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *Carbohydr. Res.* **1988**, *184*, C1–C4.

Phosphor(v)-nitridimid HP_4N_7 : Synthese aus einem molekularen Precursor und Pulver-Röntgenstrukturanalyse mit Synchrotronstrahlung**

Stefan Horstmann, Elisabeth Irran und
Wolfgang Schnick*

Die Ammonolyse von Phosphor(v)-chlorid PCl_5 führt je nach der Temperatur und dem Konzentrationsverhältnis NH_3/PCl_5 zu chlorreicheren Verbindungen wie $[\text{NPCl}(\text{NH}_2)]_x$ oder solchen mit vollständiger Substitution wie $[\text{NP}(\text{NH}_2)_2]_x$.^[1] Als ein Endprodukt von Substitution und Kondensation wurde bereits im letzten Jahrhundert eine polymere Verbindung HPN_2 postuliert.^[2–4] Die Ammonolyse von PCl_5 führt jedoch zu einer unüberschaubaren Anzahl oligomerer und polymerer Phosphazene; ein einphasiges und definiertes Produkt HPN_2 wird nicht erhalten. Reines und kristallines HPN_2 wurde erst kürzlich durch heterogene Druckammonolyse [Gl. (a)] von Phosphor-

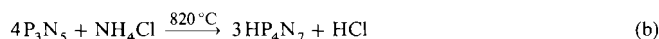


[*] Prof. Dr. W. Schnick, Dr. S. Horstmann, Mag. E. Irran
Laboratorium für Anorganische Chemie der Universität
D-95440 Bayreuth
Telefax: Int. +921/55-2788
E-mail: wolfgang.schnick@uni-bayreuth.de

[**] Diese Arbeit wurde gefördert vom Fonds der Chemischen Industrie, von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Projekt SCHN 377/2-2 und Gottfried-Wilhelm-Leibniz-Programm) sowie vom Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie im Verbundprojekt „Erforschung kondensierter Materie“ (Projekt 03-SC4 BAY). Die Autoren danken Dr. D. E. Cox und Dr. Q. Zhu (NSLS Brookhaven) für ihre Unterstützung bei der Synchrotronmessung und Dr. R. Dinnebie (Lehrstuhl Kristallographie, Universität Bayreuth) für Diskussionen bei der Strukturverfeinerung.

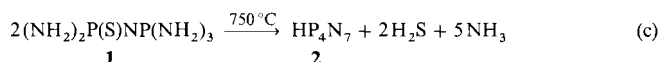
(v)-nitrid P_3N_5 synthetisiert.^[5] Phosphor(v)-nitridimid HPN_2 hat ebenso wie LiPN_2 ^[6] eine Gerüststruktur $^{3/2}[(\text{PN}_{4/2})^-]_\infty$ aus allseitig eckenverknüpften PN_4 -Tetraedern, die sich vom isosteren β -Cristobalit-Typ ableiten.^[5] Die H-Atome sind geordnet an die Hälfte der N-Atome gebunden.^[7]

Als neuartiges Phosphor(v)-nitridimid erhielten wir kürzlich HP_4N_7 ^[8] durch Umsetzung von P_3N_5 mit Ammoniumchlorid in geschlossenen, dickwandigen Quarzampullen [Gl. (b)]. Pulver-



Röntgenbeugungsuntersuchungen zeigten jedoch, daß HP_4N_7 bei dieser Reaktion nicht einphasig entsteht. Da es außerdem nicht gelang, HP_4N_7 in Form von Einkristallen zu erhalten, konnte dessen Kristallstruktur bislang nicht aufgeklärt werden. Diese ist jedoch von besonderem Interesse, da HP_4N_7 neben P_3N_5 eines der wenigen hochkondensierten Phosphor(v)-nitride (molares Verhältnis P:N > 1:2) ist und somit keine silicatanaloge Struktur zu erwarten ist.

Im Rahmen systematischer Untersuchungen zur Entwicklung molekularer Precursor, deren Pyrolyse zu definierten, kristallinen Nichtmetallnitriden führt (molekulare Präorganisation)^[9,10], stießen wir auf $(\text{NH}_2)_2\text{P}(\text{S})\text{NP}(\text{NH}_2)_3$ **1**.^[11] Nach thermoanalytischen Untersuchungen spaltet das Diphosphazen **1** bereits ab 145°C H_2S ab, wobei sich röntgenamorphe Polyaminoiminophosphazene bilden. Die in geschlossenen Druckampullen bei 750°C durchgeführte Pyrolyse von **1** (siehe Experimentelles) führt dagegen zu kristallinem und phasenreinem HP_4N_7 **2** [Gl. (c)]. Phosphor(v)-nitridimid **2** fällt bei diesem



Verfahren als mikrokristallines, farbloses Pulver an. Die Verbindung ist in nichtoxidierender Atmosphäre bis etwa 800°C stabil; bei weiterer Temperaturerhöhung spaltet sich NH_3 ab, und es entsteht P_3N_5 . HP_4N_7 ist unlöslich in allen Lösungsmitteln sowie in heißen Säuren und Basen.

Die Aufklärung und Verfeinerung der Kristallstruktur von HP_4N_7 wurde auf der Basis von Pulver-Röntgenbeugungsdaten vorgenommen. Die Messungen wurden an der National Synchrotron Light Source in Brookhaven/USA (Beamline X7A) durchgeführt. Das erhaltene Pulverdiffraktogramm (Abb. 1) ließ sich eindeutig indizieren, und es gelang die Strukturaufklärung mit Direkten Methoden sowie eine anschließende Verfeinerung mit dem Rietveld-Verfahren (siehe Experimentelles).

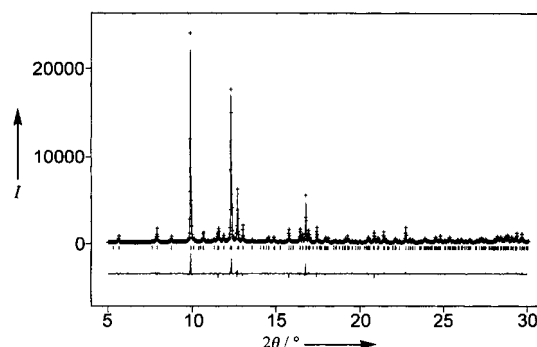


Abb. 1. Beobachtetes (Kreuze) und berechnetes Röntgen-Pulverdiffraktogramm (Linie) sowie Differenz-Profil der Rietveld-Verfeinerung von HP_4N_7 (nur Ausschnitt abgebildet bis $2\theta = 30^\circ$). Erlaubte Positionen der Reflexe sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet. Das Diffraktogramm wurde an der National Synchrotron Light Source (NSLS) in Brookhaven/USA an der Beamline X7A erhalten ($\lambda = 69.906 \text{ pm}$). I = Intensität (in counts).