

den Metallzentren spontan zu zweidimensionalen Strukturen organisieren können und das Vorzeichen der magnetische Wechselwirkungen in Übereinstimmung mit dem Spinpolarisierungsmechanismus kontrollieren.

Experimentelles

Synthese von **1 und **2**:** Die Verbindungen wurden durch Umsetzen methanolischer Lösungen (50 mL) von $\text{Co}(\text{NCS})_2$ und dem entsprechenden Diazin (stöchiometrische Mengen, 2 mmol) erhalten. **1** fiel sofort als orangefarbenes, polykristallines Pulver aus, während sich **2** nach einigen Tagen bei Raumtemperatur in Form oktaedrischer rosa Einkristalle abschied. Prismatische Einkristalle von **1** wurden durch langsames Diffundieren der beiden Lösungen in Methanol in der Querverbindung eines H-förmigen Rohrs erhalten.

Synthese von **3:** Oktaedrische Einkristalle von **3** wurden bei Raumtemperatur durch langsames Verdunsten einer methanolischen Lösung (50 cm³) aus $\text{Co}(\text{NCS})_2$ (1 mmol) und pyd (6 mmol) erhalten.

1–3 gaben zufriedenstellende Elementaranalysen. Die Ausbeuten lagen bei 60 %.

Röntgenstrukturanalysen von **2 and **3**:** Automatisches Siemens-R3m/V-Diffraktometer, MoK_{α} , $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$, Graphitmonochromator, 295 K. Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung: ω - 2θ , Standard-Patterson-Methoden mit anschließender Fourier-Verfeinerung (SHELXTL-PLUS^[7]). – **2:** $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{CoN}_6\text{S}_2$, orthorhomatisch, Raumgruppe *Cmca*, $a = 9.477(2)$, $b = 16.284(2)$, $c = 8.487(2) \text{ \AA}$, $V = 1309.7(4) \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.700 \text{ g cm}^{-3}$, $3 < 2\theta < 55^\circ$, Kristallabmessungen $0.38 \times 0.21 \times 0.10 \text{ mm}^3$. 811 unabhängige Reflexe, davon 661 beobachtet mit $I > 3\sigma(I)$. Verfeinerung der 51 Variablen mit anisotropen thermischen Parametern für alle Nichtwasserstoffatome ergab $R = 0.028$, $R_w = 0.031$ und $S = 1.22$. – **3:** $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{CoN}_{10}\text{S}_2$, monoklin, Raumgruppe *C2c*, $a = 12.341(5)$, $b = 12.950(5)$, $c = 14.322(5) \text{ \AA}$, $\beta = 109.21(3)^\circ$, $V = 2161(1) \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.523 \text{ g cm}^{-3}$, $3 < 2\theta < 54^\circ$, Kristallabmessungen $0.42 \times 0.37 \times 0.32 \text{ mm}^3$. 2380 unabhängige Reflexe, davon 1924 beobachtet mit $I > 3\sigma(I)$. Verfeinerung der 142 Variablen mit anisotropen thermischen Parametern für alle Nichtwasserstoffatome ergab $R = 0.031$, $R_w = 0.038$ und $S = 1.23$. – Die kristallographischen Daten (ohne Strukturfaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Strukturen wurden als „supplementary publication no. CCDC-100411“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ (Telefax: Int. + 1223/336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

Eingegangen am 9. Juni,
ergänzte Fassung am 26. September 1997 [Z10521]

Stichwörter: Cobalt • Magnetische Eigenschaften • N-Liganden • Schichtverbindungen • Spinpolarisierung

- [1] a) H. M. McConnell, *J. Chem. Phys.* **1963**, *39*, 1910; b) N. Mataga, *Theor. Chim. Acta* **1968**, *10*, 372; c) O. Kahn, *Molecular Magnetism*, VCH, New York, **1993**.
- [2] H. Iwamura, *Adv. Phys. Org. Chem.* **1990**, *26*, 179.
- [3] a) F. Kanno, K. Inoue, N. Koga, H. Iwamura, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 13267; b) M. Kitano, Y. Ishimaru, K. Inoue, N. Koga, H. Iwamura, *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 6012.
- [4] N. Koga, H. Ishimaru, H. Iwamura, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 815; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 755, zit. Lit.
- [5] a) H. Oshio, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, *240*; b) A. M. W. Cargill Thompson, D. Gatteschi, J. A. McCleverty, J. A. Navas, E. Rentschler, M. D. Ward, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 2701.
- [6] Die Struktur von **1** wurde während der Arbeiten an diesem Manuskript veröffentlicht (J. Lu, T. Paliwala, S. C. Lim, C. Yu, T. Niu, A. J. Jacobson, *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 923). Da unsere Strukturdaten mit den veröffentlichten vollständig übereinstimmten, wurden nur wenige Parameter von **1** angegeben, um den Vergleich mit **2** zu erleichtern.
- [7] SHELXTL-PLUS-Version-4.21/V: Siemens Analytical X-Ray Instruments Inc., Madison, WI (USA), **1990**.

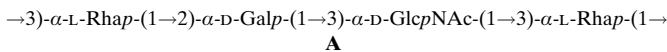
Synthetische *Shigella*-Impfstoffe: ein Kohlenhydrat-Protein-Konjugat mit vollständig synthetischen Hexadecasaccharid-Hapteten**

Vince Pozsgay*

Antibakterielle Impfstoffe auf Kohlenhydratbasis gehören zu den erfolgreichsten Kohlenhydrat-Pharmazeutica.^[1] Kohlenhydrate lassen sich als Impfstoffe einsetzen, weil die Capselpolysaccharide (CPs) und die O-spezifischen Polysaccharide (O-SPs) auf der Oberfläche pathogener Bakterien notwendige Virulenzfaktoren und protektive Antigene sind und weil Serumantikörper gegen diese Polysaccharide Immunität verleihen können, indem sie das Inoculum abtöten.^[1] Nach diesem Prinzip wurden CP-Impfstoffe gegen Pneumococcen und andere Gram-positive Bakterien entwickelt. Bei Kindern lassen sich mit Kohlenhydraten keine für einen Impfschutz ausreichend hohen Antikörperkonzentrationen erreichen, doch kann man dieses Problem überwinden, indem man die Kohlenhydrate kovalent an Proteine knüpft, die diesen Konjugaten T-Zell-abhängige Eigenschaften verleihen.^[2] Darauf basierend wurden Impfstoffe gegen *Haemophilus influenzae* b (Hib) entwickelt,^[3] und in Ländern, wo diese Seren routinemäßig eingesetzt werden, sind Meningitis und andere von Hib verursachte Krankheiten nahezu ausgerottet.^[4] Die Ausdehnung der Konjugat-Technik auf die O-SPs Gram-negativer Bakterien führte zu einer neuen Generation von Glykokonjugat-Impfstoffen, die bereits klinisch getestet werden.^[5]

Während die Immunogenität und die Wirksamkeit der Glykokonjugat-Impfstoffe gesichert sind, ist über die strukturellen Erfordernisse noch wenig bekannt. Für weitere Verbesserungen der immunologischen Eigenschaften muß man mehr über die optimale Größe des Saccharids, die günstigste Art der Verknüpfung mit dem Protein sowie über das für die optimale Immunogenität nötige Kohlenhydrat/Protein-Verhältnis wissen. Fortschritte auf diesem Gebiet hängen von der Verfügbarkeit gut definierter Saccharide ab, die für die nativen Polysaccharide repräsentativ sind.^[6]

Wir berichten hier über die Synthese eines Hexadecasaccharid-Fragments^[7] des O-SP **A** von *Shigella dysenteriae*



Typ 1,^[8] einem humanpathogenen Organismus, der weltweit ein Hauptverursacher der endemischen und epidemischen Ruhr ist.^[9]

Mit dem als Hapten wirkenden Saccharid ist ein Spacer als Aglycon verknüpft. Daran schließt sich ein heterodifunktioneller Linker an, über den der Saccharidkomplex kovalent an humanes Serumalbumin (HSA) – als Modell für ein

[*] Dr. V. Pozsgay

Laboratory of Developmental and Molecular Immunity
National Institute of Child Health and Human Development
National Institutes of Health
6 Center Drive MSC 2720, Bethesda, MD 20892-2720 (USA)
Telefax: Int. + 301/402-9108
E-mail: vipo@helix.nih.gov

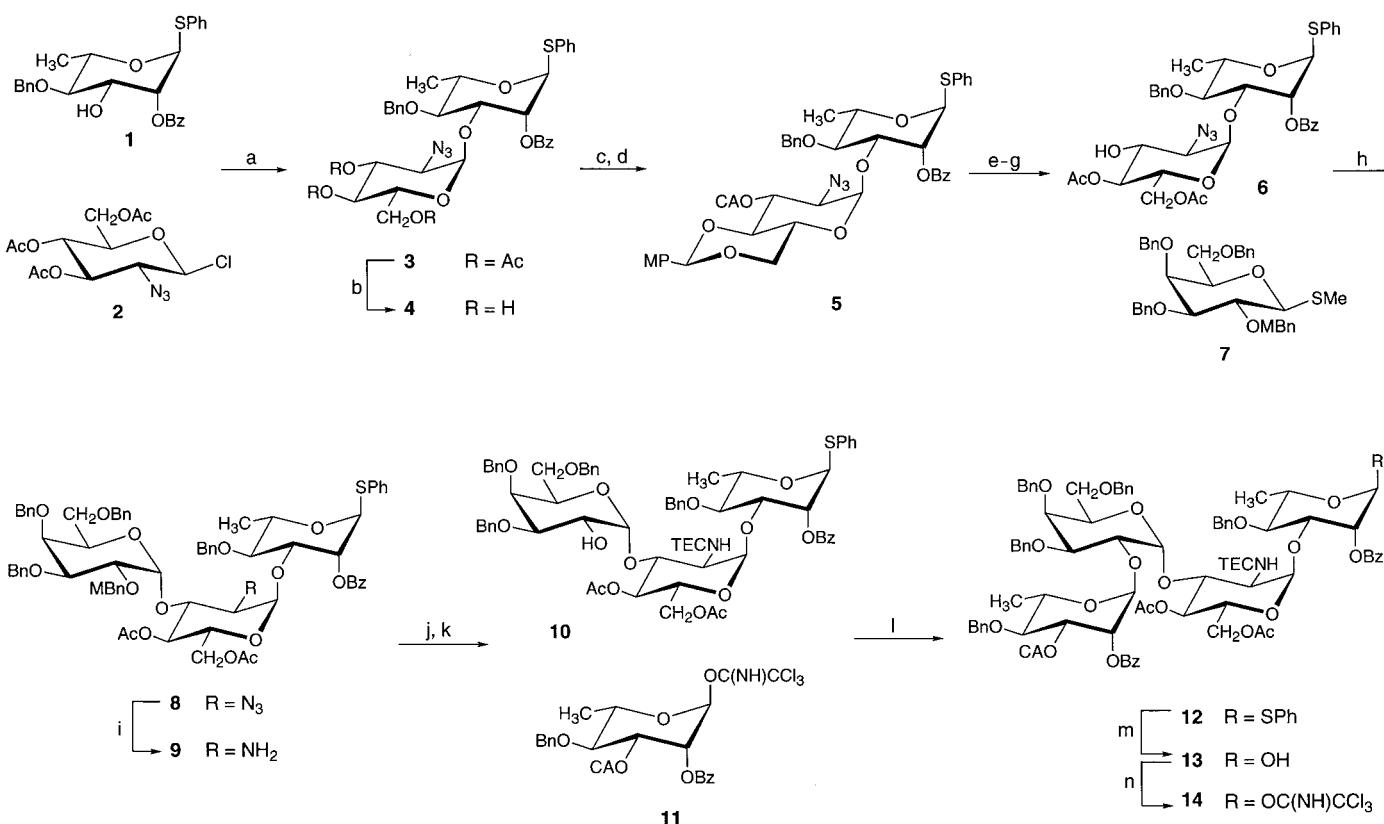
[**] Der Autor dankt Dr. John B. Robbins und Dr. Rachel Schneerson für hilfreiche Diskussionen sowie Dr. Lewis Pannell und Noel Whittaker für die Aufnahme der Massenspektren.

Carrierprotein – gebunden wird. Diese Bindung über nur eine Position hat zur Folge, daß die gesamte Saccharidkette mit B-Zell-Rezeptoren wechselwirken kann. Die durchschnittliche Zahl von Saccharidketten, die an ein HSA-Molekül gebunden ist, wurde mit matrixassistierter Laserdesorptions/ionisations-Flugzeit(MALDI-TOF)-Massenspektrometrie bestimmt.

Als Gesamtstrategie zur Herstellung der Zielverbindung **21** (siehe unten) bot sich die Verknüpfung von Tetrasaccharid-Wiederholungseinheiten (**12**, **14**, siehe Schema 1) an, die hinsichtlich ihrer Funktionsgruppen für den blockweisen Aufbau höherer Oligosaccharide in aufeinanderfolgenden Schritten geeignet sind.^[10] Hierbei nutzten wir unsere Erfahrungen aus der Synthese verwandter Verbindungen.^[7,11] Besonders wichtig war die Erkenntnis, daß für den schrittweisen Aufbau eines Saccharids dieser Größe das Tetrasaccharidraster entlang der Polysaccharidkette der Wiederholungseinheit **A** entsprechen sollte. Außerdem fanden wir heraus, daß 1) die Tetrasaccharideinheit sehr bequem schrittweise hergestellt werden kann, 2) die Gal- und Rha-Synthone in einer Form eingeführt werden sollten, in der die nächste Einheit nach nur einer Schutzgruppenabspaltung angeknüpft werden kann, und 3) die Verwendung eines vorgefertigten GlcN-Synthesebausteins keine Vorteile für die Gesamtausbeute bietet.

Außerdem folgerten wir, daß keine Zwischenprodukte mit mehreren Azidogruppen auftreten sollten, weil es bei deren Umwandlung in Acetamidogruppen Probleme geben kann.^[12]

Nach den aus früheren Untersuchungen abgeleiteten Grundsätzen wählten wir die vier Monosaccharid-Bausteine **1**, **2**, **7** und **11** aus, die wir wie für verwandte Synthesebausteine beschrieben herstellten.^[7,11,13] Der Aufbau des Tetrasaccharids **12** begann mit der Kondensation zwischen der Rhamnose **1** mit dem Chlorid **2** (Schema 1, Tabelle 1). Die nicht beteiligte Azidogruppe in **2** sicherte eine ausreichende sterische Kontrolle, so daß das Disaccharid **3** in annehmbarer Ausbeute entsteht. Durch Umsetzung von **3** mit $\text{HBF}_4^{[11c]}$ wurden die Acetylgruppen chemoselektiv abgespalten (\rightarrow **4**), während der 2-O-Benzoylrest der Rhamnose nicht reagierte. Danach wurde das Triol **4** in das Diacetat **6** überführt. Dazu wurden die 4-OH- und die 6-OH-Gruppe von GlcN vorübergehend geschützt, um an O-3 dieses Restes eine Monochloracetylgruppe einzuführen (\rightarrow **5**). Nach milder Säurehydrolyse, O-Acetylierung und selektiver Abspaltung der Chloracetylgruppe wurde **6** in einer Gesamtausbeute von 71 % ausgehend von **5** erhalten. Zur Synthese des Gal-GlcN-Rha-Trisaccharids wurde das Methylthiogalactosid **7**^[11c,d] in Gegenwart des Phenylthioglycosids **6** selektiv mit $\text{MeOTf}^{[14]}$ ($\text{Tf} = \text{F}_3\text{CSO}_2$) aktiviert; dabei bildete sich **8** in einer hochstereoselektiven



Schema 1. a) 1.6 Äquiv. **1**, 1.5 Äquiv. $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{OAg}$, 0.9 Äquiv. 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylpyridin, CH_2Cl_2 , 0°C , 2 h, 64 %; b) $\text{HBF}_4 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, MeOH , 23°C , 72 h, 79 %; c) 5.4 Äquiv. 4-Methoxybenzaldehyddimethylacetal, 10-Camphersulfonsäure (CSA)(kat.), CH_2Cl_2 , 23°C , 20 min; d) 2.2 Äquiv. $(\text{ClCH}_2\text{CO})_2\text{O}$, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 0°C , 10 min, 92 % über zwei Stufen; e) $\text{HBF}_4 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, $0-23^\circ\text{C}$, 30 min; f) Ac_2O , $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 4-Dimethylaminopyridin (kat.), $0-23^\circ\text{C}$, 1 h; g) 5.5 Äquiv. Thioharnstoff, $\text{DMF}/\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, 23°C , 24 h, 71 % über drei Stufen; h) 1.4 Äquiv. **7**, 1.7 Äquiv. $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{OMe}$, 2.6-Di-*tert*-butyl-4-methylpyridin, Et_2O , 23°C , 66 h; i) 2.2 Äquiv. PPh_3 , CH_2Cl_2 , $35-40^\circ\text{C}$, 48 h, dann H_2O , $35-40^\circ\text{C}$, 24 h, 58 % über drei Stufen; j) 5.8 Äquiv. $\text{CCl}_3\text{CH}_2\text{OC(O)Cl}$, NaHCO_3 , Aceton/ H_2O , 0°C , 3 min; k) 2.0 Äquiv. 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-1,4-benzochinon, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$, 23°C , 3 h, 82 % über zwei Stufen; l) 3.5 Äquiv. **11**, 0.33 Äquiv. $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , 0°C , 2 h, 89 %; m) 2.0 Äquiv. $\text{Hg(OCOCF}_3)_2$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$, 30 min, 93 %; n) 9.7 Äquiv. CCl_3CN , 0.5 Äquiv. DBU, CH_2Cl_2 , 23°C , 1 h, 85 %. - Bn = Benzyl, Bz = Benzoyl, CA = Monochloracetyl, MBn = 4-Methoxybenzyl, MP = 4-Methoxyphenyl.

Tabelle 1. Ausgewählte ^1H - (300 MHz) und ^{13}C -NMR-Daten (75 MHz) von **1**, **3–6**, **9–14**, **16–19** (in CDCl_3) und **21** (in D_2O).

- 1:** ^1H -NMR: $\delta = 5.60$ (d, 1H, $J = 3.4$ Hz), 5.54 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz), 4.88, 4.75 (2d, 2H, $J \approx 11$ Hz), 4.29 (dq, 1H), 4.20 (ddd, 1H), 3.56 (t, 1H, $J = 9.4$ Hz), 1.40 (d, 3H, $J = 6.2$ Hz); ^{13}C -NMR: $\delta = 85.8$, 81.6, 75.1, 74.8, 70.9, 68.7, 18.0
- 3:** ^1H -NMR: $\delta = 5.88$ (dd, 1H), 5.57 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz), 5.44 (dd, 1H, $J = 10.5$, $J = 9.3$ Hz), 5.36 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz), 5.00 (dd, 1H, $J = 9.6$), 4.93, 4.81 (2d, 2H), 4.37 (dq, 1H), 3.72 (t, 1H, $J = 9.6$), 3.31 (dd, 1H), 2.10, 2.02, 1.89 (3s, 9H), 1.45 (d, 1H); ^{13}C -NMR: $\delta = 93.1$, 86.1, 79.6, 75.9, 70.1, 69.3, 68.9, 68.0, 67.5, 61.6, 60.5, 20.7, 20.6, 20.5, 17.9
- 4:** ^1H -NMR: $\delta = 5.84$ (d, 1H, $J = 3.1$ Hz), 5.53 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz), 5.20 (d, 1H, $J = 3.8$ Hz), 4.81, 4.62 (2d, 2H, $J \approx 11$ Hz), 4.30 (dq, 1H), 4.20 (dd, 1H), 3.12 (dd, 1H, $J = 10.3$ Hz), 1.32 (d, 1H, $J = 6.2$ Hz); ^{13}C -NMR: $\delta = 93.7$, 85.8, 79.5, 75.8, 73.2, 71.3 (2C), 69.9, 69.3, 69.0, 62.2, 61.0, 17.8
- 5:** ^1H -NMR: $\delta = 5.90$ (d, 1H, $J = 3.2$ Hz), 5.63 (t, 1H, $J = 10.0$ Hz), 5.56 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz), 5.43 (s, 1H), 5.38 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz), 4.97, 4.70 (2d, 2H, $J \approx 11$ Hz), 4.37 (dq, 1H), 3.22 (dd, 1H, $J = 10.3$ Hz), 1.30 (d, 1H, $J = 6.2$ Hz); ^{13}C -NMR: $\delta = 101.6$, 93.9, 85.9, 79.8, 78.7, 76.6, 73.0, 70.6, 69.3, 68.8, 68.4, 62.9, 61.0, 55.3, 40.5, 17.8
- 6:** ^1H -NMR: $\delta = 5.87$ (dd, 1H), 5.56 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz), 5.29 (d, 1H, $J = 3.9$ Hz), 4.84 (dd, 1H, $J = 9.3$ Hz), 4.83, 4.75 (2d, 2H), 4.35 (dq, 1H), 4.26 (dd, 1H, $J = 3.2$, 9.5 Hz), 4.18–3.93 (m, 4H), 3.69 (t, 1H), 3.24 (dd, 1H, $J = 10.2$ Hz), 2.11, 1.99 (2s, 6H), 1.41 (d, 1H, $J = 6.2$ Hz); ^{13}C -NMR: $\delta = 93.0$, 86.0, 79.7, 75.5, 73.0, 70.8, 70.2, 69.2, 69.0, 67.5, 63.0, 61.7, 20.8, 20.7, 17.9
- 9:** ^1H -NMR: $\delta = 5.83$ (dd, 1H), 5.55 (d, 1H, $J = 1.4$ Hz), 5.13 (d, 1H, $J = 3.7$ Hz), 5.06 (dd, 1H, $J = 9.1$, 9.4 Hz), 4.88 (2H), 4.75, 4.70, 4.65, 4.58, 4.53, 4.48 (7d, 8H), 3.72 (s, 3H), 2.93 (dd, 1H, $J = 9.5$ Hz), 2.10, 1.74 (2s, 6H), 1.44 (d, 1H, $J = 6.2$ Hz); ^{13}C -NMR: $\delta = 99.2$, 95.5, 86.1, 83.0, 79.8, 78.7, 76.3, 75.7, 75.3, 74.6, 73.3 (3C), 72.8, 70.3, 69.8, 69.2, 68.9, 68.8, 67.7, 62.0, 55.5, 55.2, 20.8, 18.0
- 10:** ^1H -NMR: $\delta = 6.05$ (m, 1H), 5.80 (dd, 1H, $J = 3.2$ Hz), 5.46 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz), 5.30 (d, 1H, $J = 3.2$ Hz), 5.11 (dd, 1H, $J \approx 9.2$ Hz), 4.34 (dq, 1H), 2.92 (dd, 1H, $J = 9.8$ Hz), 2.11, 1.92 (2s, 6H), 1.43 (d, 1H, $J = 6.1$ Hz); ^{13}C -NMR: $\delta = 99.4$, 95.8, 92.9, 86.2, 79.8, 79.5, 75.4, 74.2, 73.9, 73.5, 73.2, 73.1, 73.0, 72.4, 70.6, 69.8, 69.4, 69.3, 68.9, 68.1, 61.6, 54.2, 20.8, 20.7, 17.9
- 11:** ^1H -NMR: $\delta = 6.32$ (d, 1H, $J = 1.4$ Hz), 5.72 (dd, 1H), 5.52 (dd, 1H, $J = 3.1$, 9.7 Hz), 4.74, 4.68 (2d, 2H, $J \approx 11$ Hz), 4.13 (dq, 1H), 3.94, 3.85 (2d, 2H, $J \approx 15$ Hz), 3.73 (t, 1H), 1.45 (d, 3H); ^{13}C -NMR: $\delta = 94.8$, 77.8, 75.5, 73.6, 70.7, 68.7, 40.6, 18.0
- 12:** ^{13}C -NMR: $\delta = 170.8$, 168.9, 165.8, 165.2, 165.0, 153.6, 98.1, 97.4, 95.9, 92.2, 86.1, 79.8, 79.6, 78.5, 75.5, 74.9, 74.1, 73.7, 73.5, 73.3, 72.9, 72.5, 72.3, 71.6, 71.3, 71.0, 70.3, 70.2, 69.4, 69.3, 68.0, 67.9, 62.0, 53.8, 40.6, 20.8, 17.9
- 13:** ^1H -NMR: $\delta = 5.94$ (d, 1H, $J \approx 10$ Hz), 5.62, 5.58 (2dd, 2H), 5.47 (dd, 1H, $J = 3.2$ Hz, $J = 9.6$ Hz), 5.42 (br, s, 1H), 5.28, 5.13 (2br, d, 2H), 5.24 (t, 1H), 2.06, 1.82 (2s, 6H), 1.41, 1.27 (2d, 2H, $J \approx 6.3$ Hz)
- 14:** ^1H -NMR: $\delta = 6.26$ (d, 1H, $J = 2.0$ Hz), 5.99 (d, 1H, $J \approx 9.9$ Hz), 5.74, 5.63 (2dd, 2H), 5.50 (dd, 1H, $J = 3.3$, 9.7 Hz), 5.43 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz), 5.32 (t, 1H, $J \approx 9$ Hz), 5.29, 5.14 (2d, 2H, $J \approx 3.5$ Hz), 2.06, 1.82 (2s, 6H), 1.41, 1.27 (2d, 2H, $J \approx 6.3$ Hz)
- 16:** ^1H -NMR: $\delta = 5.90$ (d, 1H, $J \approx 9$ Hz), 5.62 (dd, 1H, $J = 1.8$, 3.3 Hz), 5.52 (dd, 1H, $J = 9.6$ Hz), 5.48 (dd, 1H, $J = 9.6$ Hz), 5.41 (d, 1H), 5.29 (t, 1H, $J \approx 9$ Hz), 5.23, 5.12 (2d, 2H, $J \approx 3.5$ Hz), 4.99, 4.75, 4.70, 4.62, 4.55, 4.49 (6d, 6H), 4.77 (br, s, 1H), 2.32 (t, 2H), 2.06, 1.81 (2s, 6H), 1.36, 1.26 (2d, 6H); ^{13}C -NMR: $\delta = 174.0$, 170.7, 168.7, 165.7, 165.2, 153.6, 98.1, 97.5, 97.4, 95.8, 92.5, 79.8, 79.6, 78.5, 75.4, 74.81, 74.0, 73.7, 73.5, 73.2, 72.9, 72.4, 72.2, 71.9, 71.4, 70.7, 70.3, 69.9, 69.3, 68.0, 67.9, 67.8, 67.6, 61.6, 54.0, 51.5, 40.5, 33.8, 28.9, 25.5, 24.5, 20.7, 20.6, 17.9, 17.8
- 17:** ^1H -NMR: $\delta = 5.89$ (d, 1H, $J \approx 9$ Hz), 3.66 (s, 3H), 2.31 (t, 2H), 2.05, 1.82 (2s, 6H), 1.36, 1.29 (2d, 6H); ^{13}C -NMR: $\delta = 97.94$, 97.86, 97.6, 95.8, 92.5, 81.2, 79.8 (2C), 75.5, 75.1, 74.1, 73.7, 73.3, 73.0, 72.9, 72.6, 72.1, 71.8, 70.9, 70.3, 70.1, 70.0, 69.4, 68.1, 67.9 (3C), 67.7, 61.6, 54.0, 51.5, 33.9, 29.0, 25.6, 24.6, 20.9, 20.8, 18.1, 18.0
- 18:** ^{13}C -NMR: $\delta = 170.7$, 170.5 (2C), 170.43, 170.40, 169.83, 169.80, 169.6, 169.4, 168.87, 168.83 (2C), 165.8, 165.5, 165.4, 165.3, 165.2, 165.1, 164.81, 164.77, 99.5, 99.3 (3C), 98.1, 98.0 (5C), 97.4, 96.1, 94.32, 94.27, 93.9, 61.0, 60.8, 60.7 (2C), 51.6, 51.3, 51.1 (2C), 40.4, 33.8, 28.9, 25.5, 24.5, 23.1, 22.8 (2C), 22.6, 20.92, 20.86 (3C), 20.7, 20.4 (3C)

19: ^1H -NMR: $\delta = 5.77$, 5.75 (2H), 5.74 (3d, 4H, $J \approx 9$ Hz), 2.32 (t, 2H, $J \approx 7.5$ Hz), 1.98, 1.84, 1.81, 1.79, 1.72 (9H), 1.71 (6H), 1.59, 1.58, 1.47 (9s, 36H); ^{13}C -NMR: $\delta = 174.0$, 170.7, 170.53 (2C), 170.50, 170.3, 169.9, 169.8, 169.7, 169.0, 168.9 (3C), 166.1, 165.5, 165.46, 165.4, 165.3, 165.1, 164.9, 164.8, 99.3 (4C), 98.4, 98.2, 98.1 (5C), 97.5, 95.4, 94.4, 94.3, 94.0, 61.1, 60.7, 60.0 (2C), 51.5, 51.3, 51.2 (2C), 33.9, 29.7, 25.6, 24.6, 23.1, 22.9 (2C), 22.7, 20.98, 20.94, 20.93 (2C), 20.8, 20.4 (3C), 18.1, 18.0 (2C), 17.95, 17.90, 17.74 (2C), 17.7

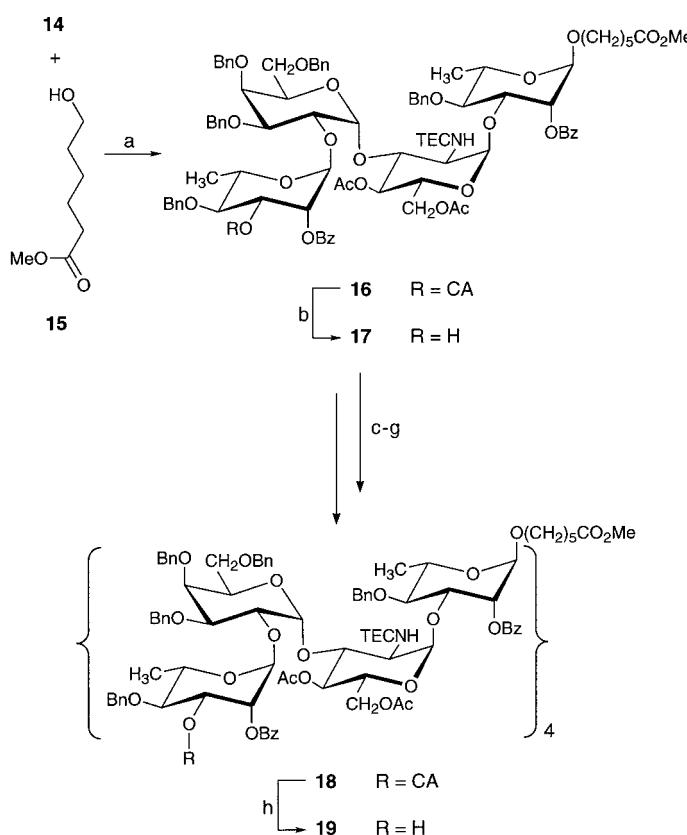
21: ^1H -NMR: $\delta = 5.59$ (d, 4H, $J \approx 3.4$ Hz), 5.11 (d, 3H, $J \approx 1.6$ Hz), 5.08 (d, 1H, $J \approx 1.7$ Hz), 5.06 (d, 3H, $J \approx 1.6$ Hz), 5.04 (d, 3H, $J \approx 3.6$ Hz), 5.00 (d, 1H, $J \approx 3.5$ Hz), 4.80 (d, 1H, $J \approx 1.7$ Hz), 2.06 (s, 9H), 2.05 (s, 3H), 1.34 (d, 9H, $J \approx 6.1$ Hz), 1.31 (d, 3H, $J \approx 6.3$ Hz), 1.30 (d, 12H, $J \approx 6.1$ Hz); ^{13}C -NMR: $\delta = 102.6$ (3C), 102.2, 102.1 (3C), 98.4 (4C), 94.9 (4C), 61.4 (4C), 61.0 (3C), 60.9, 52.7 (4C), 28.8, 26.1, 25.6, 22.8 (4C), 17.6 (3C), 17.4 (4C), 17.3

Reaktion. Die Umwandlung dieser Verbindung in das Aminoderivat **9** erfolgte in einer Staudinger-Reaktion mit PPh_3 und anschließender Hydrolyse in 58 % Ausbeute über drei Stufen. Als nächstes wurde die freie Aminogruppe von **9** mit einer 2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl(TEC)-Gruppe^[15] geschützt und die 4-Methoxybenzylgruppe oxidativ entfernt;^[16] dabei entstand das Trisaccharid **10** in 82 % Ausbeute über die beiden Stufen. Abgeschlossen wurde die Synthese der vollständig geschützten Tetrasaccharid-Wiederholungseinheit durch die Umsetzung von **10** mit dem Rhamnose-Donor **11** durch Aktivierung mit $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ unter Bildung von **12** in 89 % Ausbeute.

Aus den Erfahrungen mit einem der Verbindung **12** ähnlichen Tetrasaccharid-Donor, der am anomeren Zentrum eine Phenylthiogruppe als Abgangsgruppe trägt, ließ sich ableiten, daß eine solche Verbindung bei Aktivierung mit I_2/TfOH an einen reaktiven primären Alkohol gekuppelt werden kann,^[17] diese Methode aber für die geplante iterative Kettenverlängerung nicht brauchbar ist. Aussichtsreichere Ergebnisse wurden mit der Imidat-Methode erhalten.^[18] Das Phenylthioglycosid **12** wurde daher mit $\text{Hg}(\text{OCOCF}_3)_2$ zum Hemiacetal **13** hydrolysiert.^[19] Dieses fiel als Gemisch aus α -und β -Anomer in 93 % Ausbeute an und wurde mit CCl_3CN und katalytischen Mengen 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU)^[18b] zum α -Anomer des Imidats **14** in 85 % Ausbeute umgesetzt.

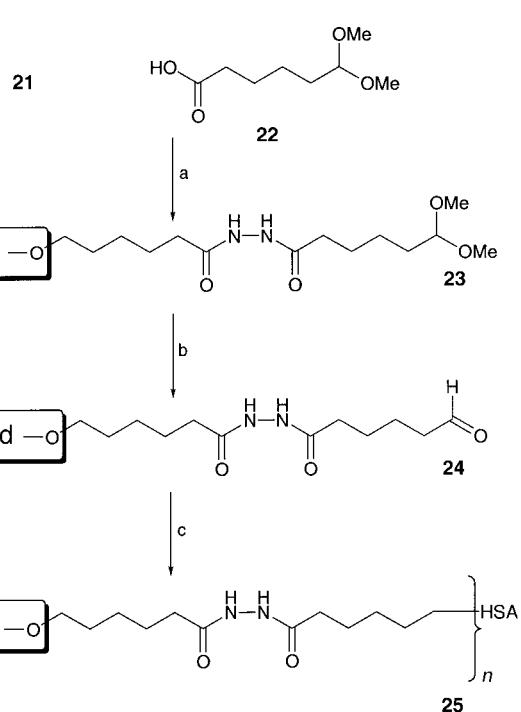
Erster Schritt der iterativen Kondensationssequenz war die Reaktion des Tetrasaccharid-Donors **14** mit dem Aglycon **15** im Überschuß unter den Bedingungen der Schmidt-Reaktion^[18] zum Tetrasaccharid-Glycosid **16** (68 % Ausbeute; Schema 2, Tabelle 1). Im folgenden Schritt wurde die Chloracetylgruppe unter neutralen Bedingungen abgespalten, und man erhielt den Acceptor **17** für die nächsten Cyclen in 96 % Ausbeute. Nach drei Wiederholungen des Reaktionsszyklus – Glycosylierung mit **14** und Abspaltung der Chloracetylgruppe – wurde die geschützte Verbindung **19** erhalten. Zur Freisetzung des gewünschten Hexadecasaccharids als Methylester **20** wurden die TEC-Gruppen durch Acetylgruppen ersetzt (Cd/AcOH , dann Ac_2O), die Acetylschutzgruppen in einer Zemplén-Reaktion entfernt und die Benzylgruppen hydrolytisch abgespalten. Aus **20** wurde mit Hydrazin das Hydrazid **21** (Tabelle 1) in einer Gesamtausbeute von 26 % über vier Stufen (ausgehend von **19**) erhalten.

Die 1,2-Dicyclohexylcarbodiimid(DCC)-vermittelte Acylierung des Saccharid-Hydrazids **21** mit dem Linker **22**^[20] lieferte das Acetal **23**, woraus mit AcOH unter milden



Schema 2. a) 3.5 Äquiv. **15**, 1.4 Äquiv. $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , 0°C , 2 h, 68%; b) 45 Äquiv. Thioharnstoff, $\text{DMF/C}_5\text{H}_5\text{N}$, 23°C , 24 h, 96%; c) 1.5 Äquiv. **14**, 3.1 Äquiv. $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , 0°C , 15 min, 91%; d) 24 Äquiv. Thioharnstoff, $\text{DMF/C}_5\text{H}_5\text{N}$, 23°C , 24 h, 82%; e) 2 Äquiv. **14**, 4 Äquiv. $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , 0°C , 3 h; f) 33 Äquiv. Thioharnstoff, $\text{DMF/C}_5\text{H}_5\text{N}$, 23°C , 24 h, 62% über zwei Stufen; g) 3 Äquiv. **14**, 10 Äquiv. $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , 0°C , 3 h, 48%; h) 120 Äquiv. Thioharnstoff, $\text{DMF/C}_5\text{H}_5\text{N}$, 23°C , 24 h, 82%.

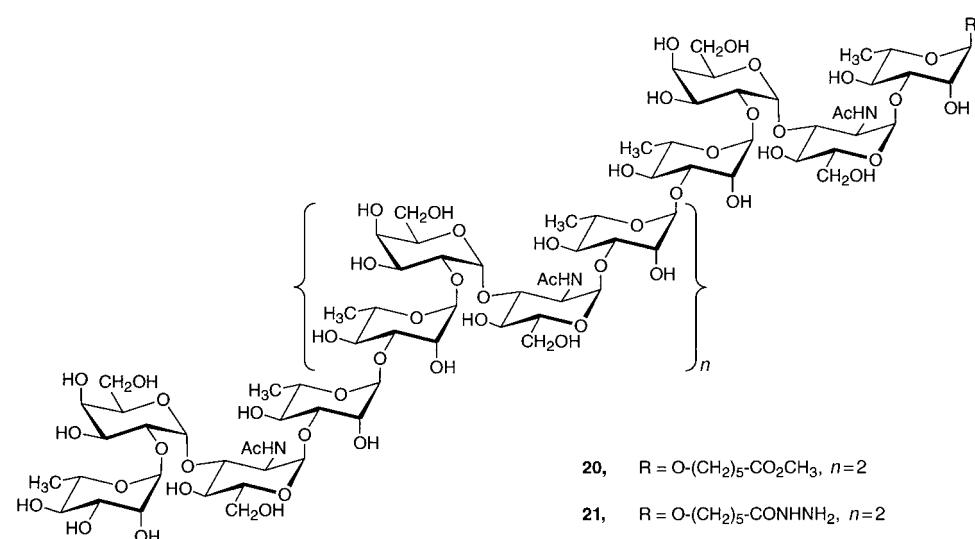
Bedingungen der Aldehyd **24** freigesetzt wurde (Schema 3).^[21] Wurde eine Lösung von dem an den Linker geknüpften Hexadecasaccharid und humanem Serumalbumin mit $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$ bei pH 7 umgesetzt,^[22] entstand das Glykonjugat **25**, dessen mittleres Molekulargewicht MALDI-



Schema 3. a) 50 Äquiv. **22**, 50 Äquiv. DCC, MeOH , 23°C , 24 h; b) $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$, pH 2.7, 23°C , 4 h; c) HSA, Borat-Phosphat-Puffer (pH=7), 15 Äquiv. $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$, 23°C , 3 d, 32% über drei Stufen.

TOF-massenspektrometrisch zu 93 kDa bei einer Molekulargewichtsverteilung von 83–103 kDa bestimmt wurde.^[23] Dies entspricht im Mittel einem Einbau von elf Saccharidketten pro Albuminmolekül und einer durchschnittlichen Kupplungseffizienz von 32 %. In ähnlicher Weise wurden die Tetra-, Octa- und Dodecasaccharid-Zwischenprodukte entschützt, mit dem Linker versehen und an HSA gekuppelt, so daß wir eine Serie von Glykonjugaten ähnlicher Zusammensetzung für immunologische Untersuchungen erhielten.

Die Herstellung des bislang komplexesten, strukturell definierten synthetischen Kohlenhydrat-Protein-Konjugats beruhte wesentlich auf der Glycosylierung nach Schmidt,



die sich als sehr effizient erwiesen hat. Die hier getestete Methode ist ein Prüfstein, an dem sich neue Glycosylierungsverfahren messen lassen müssen. Weitere Untersuchungen zu Verbesserungen bei der Herstellung der Konjugate sowie präklinische Studien mit den synthetischen Glycokonjugaten sind derzeit im Gange.

Eingegangen am 9. Juni 1997 [Z10526]

Stichwörter: Antigene • Impfstoffe • Kohlenhydrate • Oligosaccharide • Schutzgruppen

- [1] Übersichtsartikel: a) J. B. Robbins, R. Schneerson, S. Szu, V. Pozsgay in *Vaccinia, Vaccination and Vaccinology: Jenner, Pasteur and their Successors* (Hrsg.: S. Plotkin, B. Fantini), Elsevier, Paris, **1996**, S. 135–143; b) R. K. Sood, A. Fattom, V. Pavliak, R. B. Naso, *Drug Discovery Today* **1996**, *1*, 381–387; c) A. Fattom, *Adv. Expt. Med. Biol.* **1995**, *383*, 131–139; d) U. B. S. Sørensen, *Danish Med. Bull.* **1995**, *42*, 47–53; e) H. J. Jennings, R. K. Sood in *Neoglycoconjugates. Preparation and Applications* (Hrsg.: Y. C. Lee, R. T. Lee), Academic Press, New York, **1994**, S. 325–371; f) W. Egan, *Ann. Rep. Med. Chem.* **1993**, *28*, 257–265; g) P. R. Paradiso, K. Dermody, S. Pillai, *Vaccine Res.* **1993**, *2*, 239–248; h) H. J. Jennings, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1990**, *150*, 97–127.
- [2] Zur Entwicklung dieses Konzepts siehe: a) K. Landsteiner, *The specificity of serological reactions*, Harvard University Press, Cambridge, **1970**; b) W. F. Goebel, O. T. Avery, *J. Exp. Med.* **1929**, *50*, 521–531.
- [3] R. Schneerson, O. Barrera, A. Sutton, J. B. Robbins, *J. Exp. Med.* **1980**, *152*, 361–376.
- [4] J. B. Robbins, R. Schneerson, P. Anderson, D. H. Smith, *J. Am. Med. Assoc.* **1996**, *276*, 1181–1185.
- [5] Siehe z. B.: a) D. Cohen, S. Ashkenazi, M. S. Green, M. Gdalevich, G. Robin, R. Slepov, M. Yavzori, N. Orr, C. Block, Y. Ashkenazi, J. Shemer, D. N. Taylor, T. L. Hale, J. D. Sadoff, D. Pavliakova, R. Schneerson, J. B. Robbins, *Lancet* **1997**, *349*, 155–159; b) D. Cohen, S. Ashkenazi, M. S. Green, Y. Lerman, R. Slepov, G. Robin, N. Orr, D. N. Taylor, J. C. Sadoff, C. Chu, J. Shiloach, R. Schneerson, J. B. Robbins, *Infect. Immun.* **1997**, *64*, 4074–4077.
- [6] Frühere Versuche mit Glycokonjugat-Impfstoffen gegen humanpathogene Bakterien: a) E. Alonso de Velasco, A. F. M. Verheul, A. M. P. van Stein, H. A. T. Dekker, R. G. Feldman, I. M. Fernández, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegenthart, J. Verhoef, H. Snippe, *Infect. Immun.* **1994**, *62*, 799–808; b) C. C. A. M. Peeters, D. Evenberg, P. Hoogerhout, H. Käyhty, L. Saarinen, C. A. A. van Boeckel, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, J. T. Poolman, *ibid.* **1992**, *60*, 1826–1833; c) A. F. M. Verheul, G. J. P. H. Boons, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, H. J. Jennings, H. Snippe, J. Verhoef, P. Hoogerhout, J. T. Poolman, *ibid.* **1991**, *59*, 3566–3573; d) H. J. A. Jörbeck, S. B. Svenson, A. A. Lindberg, *ibid.* **1981**, *32*, 497–502.
- [7] V. Pozsgay, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6673–6681.
- [8] B. A. Dmitriev, Y. A. Knirel, N. K. Kochetkov, I. Hofman, *Eur. J. Biochem.* **1976**, *66*, 559–566.
- [9] New Vaccine Development: Establishing Priorities. Vol. 2. Diseases of Importance in Developing Countries, National Academy Press, Washington, DC, **1986**, S. 329–337.
- [10] Der Begriff „Oligosaccharid“ wird hier großzügig ausgelegt, wir sind uns jedoch bewußt, daß nach der strengen Definition der Joint Commission on Biological Nomenclature (*Eur. J. Biochem.* **1982**, *126*, 433–437) Oligosaccharide nur bis zu zehn Monosaccharideinheiten enthalten.
- [11] a) V. Pozsgay, B. Coxon, *Carbohydr. Res.* **1995**, *277*, 171–178; b) V. Pozsgay, L. Pannell, *ibid.* **1994**, *258*, 105–122; c) V. Pozsgay, B. Coxon, *ibid.* **1994**, *257*, 189–215; d) V. Pozsgay, B. Coxon, H. Yeh, *Bioorg. Med. Chem.* **1993**, *1*, 237–257; e) V. Pozsgay, C. P. J. Glaudemans, J. B. Robbins, R. Schneerson, *Carbohydr. Res.* **1993**, *244*, 259–273; f) V. Pozsgay, C. P. J. Glaudemans, J. B. Robbins, R. Schneerson, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 10249–10264.
- [12] In einem nicht veröffentlichten Versuch wurde ein Pentamer eines Tetrasaccharids, das **14** ähnelt, hergestellt; dieses Pentamer trägt allerdings an C-2 der Glucoseeinheit eine Azidogruppe. Versuche, dieses geschützte Eicosasaccharid in das entsprechende Acetamid umzuwandeln, führten zu komplexen, nicht trennbaren Gemischen.
- [13] Von allen neuen Verbindungen wurden korrekte Elementaranalysen und passende Massenspektren erhalten. Die Ausbeuten beziehen sich auf chromatographisch homogene Substanzen.
- [14] H. Lönn, *Carbohydr. Res.* **1985**, *139*, 105–113.
- [15] a) V. Pozsgay in *Carbohydrates, Synthetic Methods and Applications in Medicinal Chemistry* (Hrsg.: H. Ogura, A. Hasegawa, T. Suami), Kodansha-VCH, Tokyo, Weinheim, **1992**, S. 188–227; b) H. Paulsen, C. Krogmann, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, *1203*–1213; c) M. Imoto, H. Yoshimura, T. Shimamoto, N. Sakaguchi, T. Shiba, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 2205–2214; d) T. B. Windholz, D. B. R. Johnston, *Tetrahedron Lett.* **1967**, 2555–2557.
- [16] Y. Oikawa, T. Yoshioko, O. Yonemitsu, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 885–888.
- [17] a) P. Konradsson, U. E. Udodong, B. Fraser-Reid, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4313–4316; b) G. H. Veeneman, S. H. van Leeuwen, J. H. van Boom, *ibid.* **1990**, *31*, 1331–1334.
- [18] a) R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 763–764; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, *19*, 731–732; b) M. Numata, M. Sugimoto, K. Koike, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1987**, *163*, 209–225; c) Übersichtsartikel: R. R. Schmidt, W. Kinzy, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 21–123.
- [19] L. Yan, D. Kahne, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9239–9248.
- [20] Verbindung **22** wurde aus **15** (S. Sabesan, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2068–2080) durch Oxidation (A. J. Mancuso, S. L. Huang, D. Swern, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2480–2482), Acetalisierung ((MeO)₂CMe₂, CSA), Esterhydrolyse (LiOH) und Ansäuern mit Zitronensäure in 78 % Gesamtausbeute hergestellt.
- [21] Zu früheren Versuchen, einen terminalen Linker einzuführen, der eine Aldehydgruppe enthält, siehe: a) V. Pozsgay, L. Trinh, J. Shiloach, J. B. Robbins, A. Donahue Rolfe, S. B. Calderwood, *Bioconj. Chem.* **1996**, *7*, 45–55; b) V. Pozsgay, *Glycoconj. J.* **1993**, *10*, 133–141.
- [22] G. R. Gray, *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *163*, 426–428. Bei der reduktiven Aminierung wird der ω -Formylalkylrest an die ϵ -Aminogruppe des Lysinrests der Proteine gebunden, so daß eine ϵ -N-alkylierte Verbindung entsteht, in der die ursprüngliche Nettoladung des Proteins erhalten geblieben ist: C. P. Stowell, Y. C. Lee, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1981**, *37*, 225–281.
- [23] Die MALDI-TOF-Massenspektren wurden auf einem KRATOS-MALDI-III-Gerät mit einer Beschleunigungsspannung von 22 kV aufgenommen. Die Probe wurde in einer 1:1-Mischung aus Wasser und Acetonitril gelöst, die 0.1 % Trifluoressigsäure enthält, und in einer Sinapinsäurematrix appliziert. Das Molekulargewicht von HSA wurde zu 66350 Da bestimmt.