

1978, 1119–1120; j) B. D. Vineyard, W. S. Knowles, M. J. Sabacky, G. L. Bachmann, D. J. Weinkauff, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 5946–5952.

- [3] Die vollständige Charakterisierung und Röntgenstrukturanalyse dieser erstmals beschriebenen Verbindung findet sich in den Hintergrundinformationen.
- [4] Die Hydrierung eines „E“/Z-Gemisches unter Normaldruck bei Raumtemperatur in MeOH mit [Rh(Me-DuPHOS)(cod)]BF₄^[13] führt nur zur Hydrierung des Z-Isomers, das „E-Isomer“ bleibt unverändert. Im Unterschied zu den Ausgangsstoffen, die nur schwierig zu trennen sind, ist das Hydrierprodukt einfach durch Säulenchromatographie vom unveränderten „E-Isomer“ zu trennen, womit letzteres sauber zu erhalten ist.
- [5] CCDC-194044 ((E)-3-Acetylamino-3-phenylacrylsäuremethylester), CCDC-194047 (3-Diacetylamino-3-phenylacrylsäuremethylester), CCDC-194046 ((S)-3-Acetylamino-3-p-chlorphenylpropionsäuremethylester), CCDC-194045 ([Rh]((R,R)-(Et-FerrotANE)))(nbd)]BF₄ und CCDC-194043 ([Rh]((S,S)-(Me-DuPHOS)))(nbd)]BF₄ enthalten die ausführlichen kristallographischen Daten zu dieser Veröffentlichung. Die Daten sind kostenlos über www.ccdc.cam.ac.uk/contents/retrieving.html erhältlich (oder können bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ; Fax: (+44) 1223-336-033; oder deposit@ccdc.cam.ac.uk).
- [6] Vergleiche ähnliche Befunde zur Herstellung analoger, aber β -alkylsubstituierter Substrate: a) D. J. Aberhardt, H.-J. Lin, *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 3749–3751; b) P. deMayo, A. C. Weedon, R. W. Zabel, *Can. J. Chem.* **1981**, 59, 2328–2333; c) C. A. Grob, *Helv. Chim. Acta* **1950**, 33, 1787–1796.
- [7] a) H.-J. Drexler, W. Baumann, A. Spannenberg, D. Heller, *J. Organomet. Chem.* **2001**, 621, 89–102; b) A. Börner, D. Heller, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 223–225; c) C. J. Cobley, I. C. Lennon, R. McCague, J. A. Ramsden, A. Zanotti-Gerosa, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 7481–7483.
- [8] a) H. B. Kagan, T.-P. Dang, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 6429–6433; b) W. S. Knowles, M. J. Sabacky, B. D. Vineyard, D. J. Weinkauff, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 2567–2568; c) M. J. Burk, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 8518–8519; d) M. J. Burk, J. E. Feaster, W. A. Nugent, R. L. Harlow, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 10125–10138; e) A. Marinetti, F. Labrue, J.-P. Genet, *Synlett* **1999**, 12, 1975–1977; f) U. Berens, M. J. Burk, A. Gerlach, W. Hems, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 2057–2060; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1981–1984.
- [9] Die Hydrierung der entsprechenden Z-Isomere mit dem Et-FerrotANE-System führt, wie erwartet, nur zu Enantioselektivitäten von 25 bis 80% ee. Orientierende Versuche mit Me-DuPHOS zeigen für die E-isomeren Substrate durchweg schlechtere Enantioselektivitäten und Aktivitäten.
- [10] Im Falle des p-chlorphenylsubstituierten Produktes gelang die Bestimmung der absoluten (S)-Konfiguration durch eine Röntgenstrukturanalyse (siehe Hintergrundinformationen). Da alle anderen Hydrierprodukte ebenfalls einen negativen Drehwert haben, sollten sie ebenso (S)-konfiguriert sein, was den Literaturangaben entspricht.
- [11] P. Dierkes, P. W. N. M. van Leeuwen, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1999**, 1519–1529.
- [12] B. Guzel, M. A. Omary, J. P. Fackler, A. Akgerman, *Inorg. Chim. Acta* **2001**, 325, 45–50.
- [13] Verwendete Abkürzungen: binapo = 2,2'-Bis(diphenylphosphanyl)-1,1'-binaphthyl, dipamp = 1,2-Ethandiyldis[(2-methoxyphenyl)phenylphosphan], diop = 2,3-O-Isopropyliden-2,3-dihydroxy-1,4-bis(diphenylphosphanyl)butan, Me-DuPHOS = 1,2-Bis-(2,5-dimethylphospholanyl)benzol, Et-FerrotANE = 1,1'-Bis-(2,4-diethylphosphetanyl)ferrocen, nbd = 3,5-Norbornadien, cod = 1,5-Cyclooctadien.

Synthese einer Lipoteichonsäure

Synthese der ersten aktiven Lipoteichonsäure**

Andreas Stadelmaier, Siegfried Morath,
Thomas Hartung und Richard R. Schmidt*

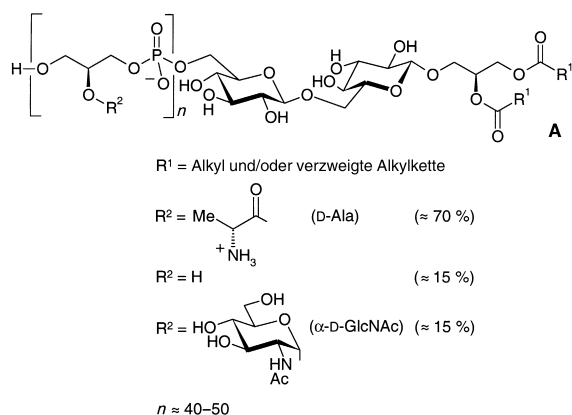
Professor Ewald Daltrozso zum 65. Geburtstag gewidmet

Entzündungsreaktionen nach Infektionen durch Gram-negative oder Gram-positive Bakterien können nur sehr schwer unterschieden werden. Obwohl die meisten Reaktionen auf Gram-negative Bakterien prinzipiell Lipopolysacchariden (LPS) und deren Lipidanker Lipid A zugerechnet werden können,^[1–3] wurden in den letzten Jahrzehnten keine entsprechenden Prinzipien bei Gram-positiven Bakterien eindeutig identifiziert.^[4,5] Lipoteichonsäuren (LTS) werden in den meisten Gram-positiven Bakterien gefunden. Sie sind wie LPS amphiphil, negativ geladene Glycolipide.^[5] Oft konnten Effekte von handelsüblichen LTS-Präparaten, die signifikante Aktivität aufwiesen, auf LPS-Verunreinigungen zurückgeführt werden.^[6–8] Des Weiteren stellte sich nach intensiver Reinigung von LTS-Phenolextrakten aus verschiedenen Bakterienspezies heraus, dass diese Extrakte inaktiv sind und z. B. keine Cytokinfreisetzung als Maßstab für immunstimulatorische Aktivität gemessen werden kann.^[9–11] Erst kürzlich wurde gezeigt, dass diese Ergebnisse auf die verwendete Präparationsmethode zurückzuführen sind.^[12] Eine neuartige mildere Präparationsmethode ergab reine und biologisch aktive LTS.^[6–8] Durch Strukturanalyse konnte den D-Alaninresten am Polyglycerinphosphat-Rückgrat der LTS, die beispielsweise aus *Staphylococcus aureus* isoliert werden kann, eine entscheidende Rolle zugeordnet werden.^[12–14]

Um die biologische Aktivität von D-Alanin-haltiger LTS zu zeigen und eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung aufzustellen, wurde LTS von *S. aureus* (Schema 1, **A**) chemisch synthetisiert. Die dazu erforderliche Kombination von Glycolipidsynthese und Glycerinphosphatdiester-Bildung mit variablen Seitenketten ist eine besondere Herausforderung, da die D-Alaninreste bereits bei pH 8.5 leicht abgespalten werden. In dieser Arbeit wird die erste Synthese einer solchen

[*] Prof. Dr. R. R. Schmidt, A. Stadelmaier
Fachbereich Chemie
Universität Konstanz, Fach M 725
78457 Konstanz (Deutschland)
Fax: (+49) 7531-883-135
E-mail: richard.schmidt@uni-konstanz.de
Dr. S. Morath, Dr. T. Hartung
Fachbereich Biologie
Universität Konstanz
78457 Konstanz (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Wir danken S. Deininger und J. Kley für die technische Unterstützung, L. Cobianchi für die Hilfe bei der Trennung der Endprodukte durch HPLC-Chromatographie und Prof. Dr. A. Geyer und A. Friemel für die Hilfe bei der strukturellen Zuordnung der Endprodukte durch NMR-Experimente.



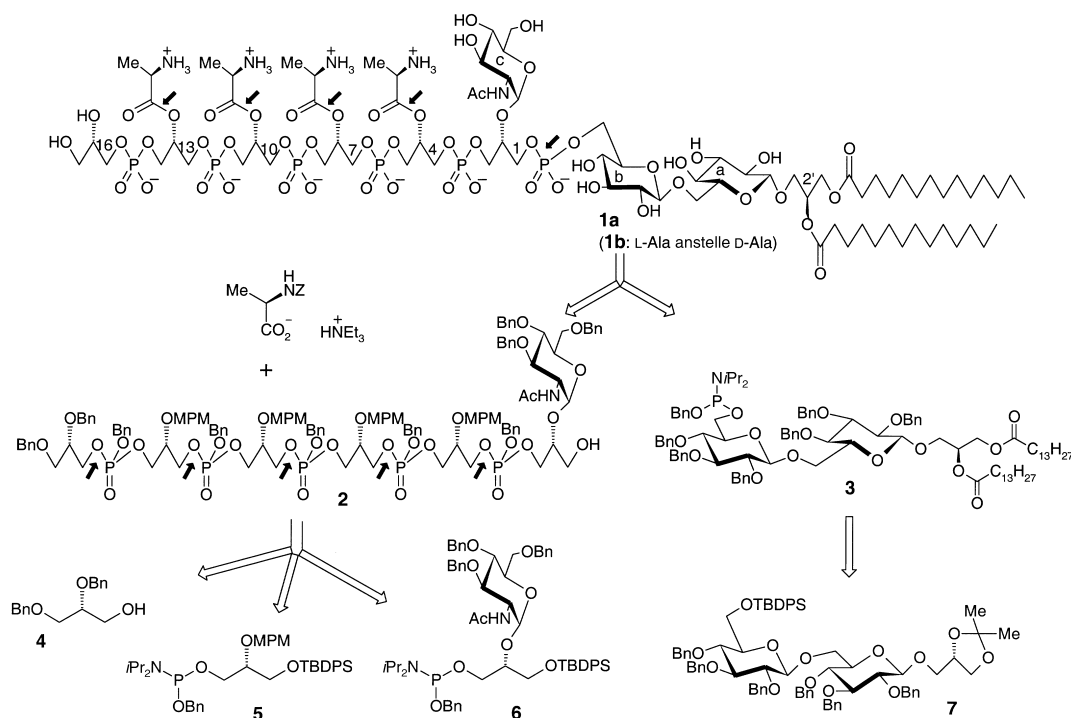
Schema 1. Allgemeine Formel der Lipoteichonsäure (LTS) von *Staphylococcus aureus*.

Verbindung beschrieben (Schema 1, mit $n = 6$).^[15] Die Vielseitigkeit des Synthesekonzepts wird durch seine Tauglichkeit für Strukturvarianten unterstrichen. Bei vorangegangenen Synthesen von LTS-Teilstrukturen fehlten Alaninreste, weshalb keine biologisch aktiven Substanzen erhalten wurden.^[16–18]

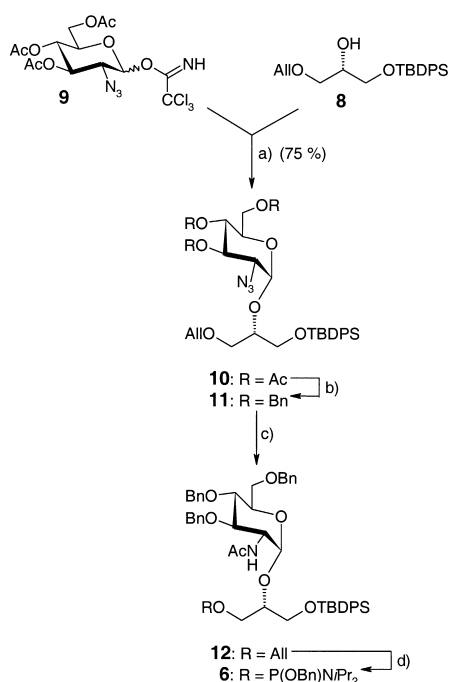
Das ungefähre Verhältnis der Glycerinphosphat-2-O-Substituenten in **A** (Schema 1) von 70 % D-Alanin, 15 % α -verknüpftem *N*-Acetylglucosamin (α -D-GlcNAc) und 15 % H-Atom^[12] führte zur Synthese von **1a** (Schema 2), das mit einem 4:1:1-Verhältnis dieser Reste eine ähnliche Zusammensetzung wie die natürliche LTS aufweist. Die Spaltung von **1a** zwischen dem Glycerinphosphat-Rückgrat und dem Gentiobiosyldiacylglycerinrest (mit Pfeilen angedeutet in

Schema 2), wodurch die Zwischenprodukte **2** und **3** und *N*-Benzyloxycarbonyl(Z)-geschütztes D-Alanin entstehen, sollte einen gangbaren Weg zur Synthese des Zielmoleküls eröffnen. Somit sollte **2** aus den Glycerinderivativen **4**, **5** und **6** als Bausteinen und **3** aus dem leicht verfügbaren Gentiobiosyldiacylglycerinderivat **7** erhalten werden können. Die Wahl von permanenten und temporären orthogonalen Schutzgruppen war offensichtlich entscheidend für den Erfolg: Zur Kettenverlängerung des Glycerinphosphat-Rückgrats und letztlich die Verknüpfung der Intermediate **2** und **3** wurde die *tert*-Butyldiphenylsilylgruppe (TBDPS) und für die Durchführung der Synthese von **3** die Isopropylidengruppe gewählt. Die selektive Anknüpfung der Alaninreste beruhte auf der milden oxidativen Entfernung der Methoxybenzylgruppe (MPM) und führte so zum komplett geschützten Zielmolekül, welches nur Benzyl- und Z-geschützte Gruppen aufweist, die schließlich durch Hydrogenolyse entfernt sein sollten. Die Vielseitigkeit dieses Konzepts in Bezug auf verschiedene Kombinationen der Bausteine **4**, **5** und **6**, die Anbindung verschiedener Aminosäurereste und die Variation des Diacylglycerinrestes führte bereits zu verschiedenen Derivaten von **1a**, beispielsweise **1b** mit L-Alaninresten.^[19]

Der erforderliche Baustein **4** wurde aus handelsüblichem 1,2-*O*-Isopropyliden-sn-glycerol^[20] gewonnen. Die *O*-Allylierung, Entfernung der Isopropylidengruppe^[21] und regioselektive Einführung der TBDPS-Gruppe führten zum Zwischenprodukt **8** (Schema 3), das für die Anbindung der MPM-Gruppe genutzt wurde. Die Entfernung der Allylgruppe dieses MPM-geschützten Zwischenprodukts und nachfolgende Reaktion mit Benzyloxybis(diisopropylamino)phosphan^[22] bei gleichzeitiger Anwesenheit von Tetrazol lieferte Baustein **5** (Schema 2).



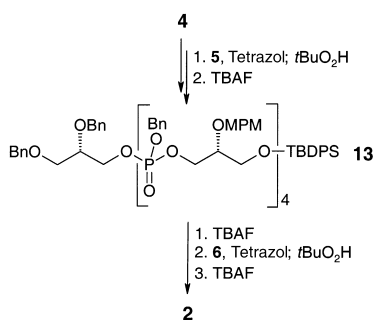
Schema 2. Strukturformel des Zielmoleküls **1a** und seine Retrosynthese. Bn = Benzyl.



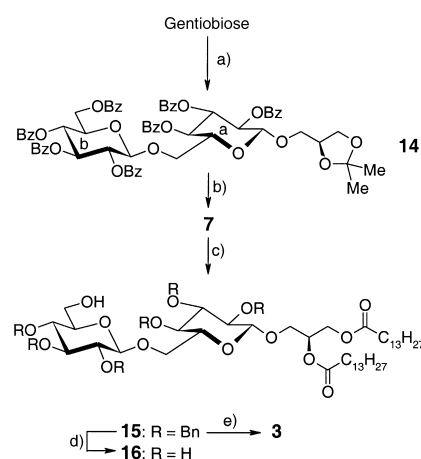
Scheme 3. Synthese des Bausteins **6**. a) TMSOTf, CH₂Cl₂, RT, 75%; b) 1. NaOMe, MeOH, 24 h; 2. BnBr, NaH, DMF, 24 h (74%); c) 1. 1,3-Propandithiol, Pyridin, H₂O, RT, 24 h; 2. Pyridin/Ac₂O, 2 h, 85%; d) 1. [(PPh₃)₃RhCl], DBU, EtOH, 90 °C; 2. 1 M HCl/Aceton (1:9), 77%; 3. Benzyloxybis(diisopropylamino)phosphan, CH₂Cl₂, 85%. DBU = 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en, All = Allyl.

Die Glycosylierung des Intermediats **8** mit dem bekannten Azidoglucosylidonor **9**^[23] und Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf) als Katalysator führte zum α -verknüpften Glucosid **10** in 75 % Ausbeute (Schema 3). Der Austausch der O-Acetylgruppen durch Benzylgruppen (\rightarrow **11**) und die folgende Reduktion der Azidogruppe sowie die N-Acetylierung unter Standardbedingungen^[24] lieferte **12**. Die Entfernung der Allylgruppe und die anschließende Phosphitylierung ergab Baustein **6**.

Mit den Bausteinen **4–6** konnte nun das Zwischenprodukt **2** hergestellt werden (Schema 4). Die Reaktion von **4** mit **5** in Gegenwart von Tetrazol und anschließender Zugabe von *tert*-Butylhydroperoxid als Oxidationsmittel lieferte ein Phosphortriesterintermediat, welches durch sukzessive Behandlung mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) und Reaktion



Scheme 4. Synthese des Zwischenprodukts **2**.

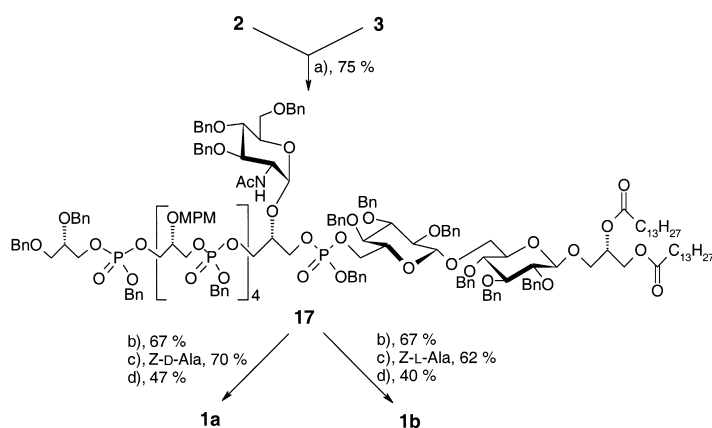


Scheme 5. Synthese des Zwischenprodukts **3** und des Gentiobiosyldiacylglycerins **16**. a) 1. BzCl, Pyridin, 40 °C, 24 h, 98%; 2. N₂H₄·HOAc, DMF, 50 °C, 3.5 h, 78%; CCl₃CN, DBU, CH₂Cl₂, 2 h, 97%; 3. 0.2 Äquiv. BF₃·OEt₂, 3 Å MS, –30 °C, CH₂Cl₂, 1,2-O-Isopropyliden-sn-glycerin, 80%; b) 1. NaOMe, MeOH, 24 h; 2. TBDPS-Cl, Pyridin, –15 °C, 2 d, 91%; 2. BnBr, NaH, DMF, 66%; c) 1. HOAc (75%), 80 °C, 1.5 h, 78%; 2. Myristoylchlorid, NEt₃, THF, 50 °C, 4 h, 81%; 3. TBAF, HOAc, THF, 40 °C, 3 d, 76%; d) Pd/C, H₂, CH₂Cl₂/MeOH (2:5), 24 h, 71%; e) Benzyloxybis(diisopropylamino)phosphan, CH₂Cl₂, 79%. Bz = Benzoyl.

mit **5** zum Glycerinphosphatintermediat **13** führte. Dessen Reaktion mit TBAF, dann Reaktion mit **6** statt mit **5** und erneute Behandlung mit TBAF lieferte das gewünschte Zwischenprodukt **2** in guter Gesamtausbeute.

Für die Synthese von **3** wurde Gentiobiose unter Standardbedingungen (vier Schritte) zum Glycosid **14** (Schema 5) umgewandelt. Die Entfernung der O-Benzoylgruppen unter Zemplén-Bedingungen, anschließende regioselektive Silylierung am 6b-Sauerstoffatom und Peroxobenzoylierung lieferte Baustein **7**. Die Säure-katalysierte Entfernung der Isopropylidengruppe, die Acylierung mit Myristoylchlorid in Gegenwart von Triethylamin und die Desilylierung führten zum Zwischenprodukt **15**, welches nach der Phosphitylierung das erwünschte Molekül **3** lieferte; durch die hydrogenolytische Entfernung der Benzylgruppen wurde das Gentiobiosyldiacylglycerin **16** erhalten. Letzteres wurde genutzt, um den biologischen Effekt des an die Gentiobiose gebundenen Lipidankers zu untersuchen.

Die Verknüpfung der Zwischenprodukte **2** und **3** konnte mit Tetrazol als Katalysator durchgeführt werden; die Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid lieferte **17**, welches das Rückgrat des Zielmoleküls enthält (Schema 6). Die Behandlung mit Cer(IV)ammoniumnitrat (CAN) setzte vier der Glycerinhydroxygruppen frei, welche sofort mit den Z-geschützten D-Alaninresten mit (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP)/N-Methylimidazol als Kondensationsmittel verknüpft wurden. Die Hydrogenolyse dieses Zwischenprodukts mit Pearlmans Katalysator^[25] in einer Mischung aus CH₂Cl₂/MeOH/H₂O (5:5:1) führte nach hydrophober Austauschchromatographie an Octylsepharose zum gewünschten Endprodukt **1a** in 47 % Ausbeute. Die Strukturermittlung konnte auf MS- und NMR-Daten^[26] und den Vergleich mit natürlich vorkommendem



Schema 6. Synthese des Zielmoleküls **1a** und seines Diastereoisomers **1b**.

a) Tetrazol, CH_2Cl_2 ; $t\text{BuO}_2\text{H}$, 75 %; b) CAN, MeCN/Toluol/ H_2O (60:3:4), 45–60 min, 67 %. c) 1. 20 Äquiv. PyBOP, 40 Äquiv. *N*-Methylimidazol, 20 Äquiv. Z-geschütztes D/L-Ala ($[\text{HNEt}_3]^+\text{-Salz}$), CH_2Cl_2 , 3 h; d) $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, H_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = (5:5:1)$, 24 h; hydrophobe Austauschchromatographie.

Material gestützt werden. Verbindung **17** wurde auf gleiche Weise mit Z-geschütztem L-Alanin in **1b** umgewandelt.

Die Untersuchung der biologischen Aktivität der Verbindungen **1a**, **b** und **16** ergab, dass **1a** mit D-Alaninresten (Abbildung 1) nahezu die gleiche Aktivität wie natürliche LTS bezüglich der Cytokinausschüttung bei Leukozyten im menschlichen Blut aufweist. Während der mit Gentiobiose verknüpfte Lipidanker (Verbindung **16**) praktisch keine

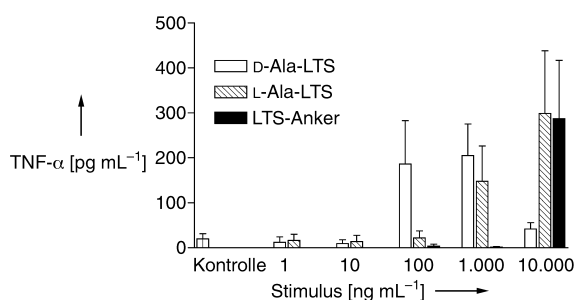


Abbildung 1. Konzentrationsabhängigkeit der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung in verdünntem Human-Vollblut (20 %) in der Reaktion auf **1a**, **1b** und **16**. $\text{TNF}\alpha$ wurde durch einen ELISA-Test gemessen. Die Daten sind Mittelwerte ($\pm \text{SEM}$) von zwölf Spendern. SEM = Standardfehler des Mittelwerts.

Aktivität zeigt, ist L-Alanin-haltiges **1b** ungefähr zehn bis hundert Mal weniger aktiv als **1a**.^[13,14]

Damit konnte erstmals mithilfe synthetisch hergestellter Substanzen das aktive Prinzip der LTS-Stimulation des Immunsystems untersucht werden. Das vorgestellte Synthesedesign berücksichtigt das variable Substitutionsmuster und die hydrolytische Labilität des Alaninrestes des Glycerinphosphat-Rückgrats. Es ist auch auf die kombinatorische Synthese von vielen unterschiedlichen LTS-Molekülen anwendbar.

Eingegangen am 20. September 2002 [Z50223]

- [1] J. B. Zivot, W. D. Hoffmann, *New Horiz.* **1995**, 3, 267–275.
- [2] E. T. Rietschel, H. Brade, O. Holst, L. Brade, S. Müller-Loennies, U. Mamat, U. Zähringer, F. Beckmann, U. Seydel, K. Brandenburg, A. Ulmer, T. Mattern, H. Heine, J. Schletter, S. Hauschildt, H. Loppnow, U. Schönbeck, H.-D. Flad, U. F. Schade, F. DiPadova, S. Kusumoto, R. R. Schumann, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1996**, 216, 39–81.
- [3] U. Seydel, M. Oikawa, K. Fukase, S. Kusumoto, K. Brandenburg, *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 3032–3039, zit. Lit.
- [4] S. M. Opal, J. Cohen, *Crit. Care Med.* **1999**, 27, 1608–1616.
- [5] W. Fischer, *Med. Microbiol. Immunol.* **1994**, 183, 61–76.
- [6] J. J. Gao, Q. Xue, E. G. Zuvanich, K. R. Haghi, D. C. Morrison, *Infect. Immun.* **2001**, 69, 751–757.
- [7] N. Kawamura, N. Imanishi, H. Koike, H. Nakahara, L. Phillips, S. Morooka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 217, 1208–1215.
- [8] A. Sugiyama, R. Arakaki, T. Ohnishi, N. Arakaki, Y. Daikuhara, H. Takada, *Infect. Immun.* **1996**, 64, 1426–1431.
- [9] R. Keller, W. Fischer, R. Keist, S. Bassetti, *Infect. Immun.* **1992**, 60, 3664–3672.
- [10] T. Kusunoki, E. Hailman, T. S. Juan, H. S. Lichenstein, S. D. Wright, *J. Exp. Med.* **1995**, 182, 1673–1682.
- [11] Y. Suda, H. Tochio, K. Kawano, H. Takada, T. Yoshida, S. Kotani, S. Kusumoto, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **1995**, 12, 97–112.
- [12] S. Morath, A. Geyer, T. Hartung, *J. Exp. Med.* **2001**, 193, 393–397.
- [13] S. Morath, A. Stadelmaier, A. Geyer, R. R. Schmidt, T. Hartung, *J. Exp. Med.* **2002**, 195, 1635–1640.
- [14] S. Deininger, A. Stadelmaier, S. von Aulock, S. Morath, R. R. Schmidt, T. Hartung, *J. Immunol.* eingereicht.
- [15] Über einige biologische Daten dieser Untersuchungen wurde bereits berichtet: siehe Lit. [13].
- [16] J. J. Oltvoort, C. A. A. van Boeckel, J. H. De Koning, J. H. van Boom, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1982**, 101, 87–91; J. J. Oltvoort, M. Kloosterman, C. A. A. van Boeckel, J. H. van Boom, *Carbohydr. Res.* **1984**, 130, 147–163.
- [17] K. Fukase, T. Matsumoto, N. Ito, T. Yoshimura, S. Kotani, S. Kusumoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1992**, 65, 2643–2654; K. Fukase, T. Yoshimura, S. Kotani, S. Kusumoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1994**, 67, 473–482; S. Kusumoto, K. Fukase, Y. Suda, M. Oikawa, *J. Synth. Org. Chem. Jpn.* **1996**, 54, 976–987.
- [18] I. Jerić, L. Šimičić, M. Stipetić, Š. Horvat, *Glycoconjugate J.* **2000**, 17, 273–282.
- [19] A. Stadelmaier, Dissertation, Universität Konstanz, **2003**.
- [20] B. Wickberg, *Acta Chem. Scand.* **1958**, 12, 1187–1201.
- [21] P. A. Gent, R. Gigg, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1975**, 364–370.
- [22] W. Bannwarth, A. Trzeciak, *Helv. Chim. Acta* **1987**, 70, 175–186.
- [23] G. Grundler, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 1826–1847.
- [24] H. Bayley, D. N. Standring, J. R. Knowles, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 3633–3634.
- [25] L. F. Fieser, M. Fieser, *Reagents for Organic Synthesis*, Vol. 1, Wiley, New York, **1967**, S. 782.
- [26] Die NMR-Untersuchungen wurden mit einem 600-MHz-NMR-Gerät bei 300 K durchgeführt. Die NMR-Spektren der Endprodukte wurden mit dem Natriumsalz der 3-(Trimethylsilyl)-3,3,2,2-tetradeteropropionsäure ($[\text{D}_4]\text{TSPA}$) als Standard aufgenommen. ^{13}C -Zuordnungen basieren auf der heteronuclearen Multiple-Quanten-Korrelation (HMQC). Das Proton am anomeren Zentrum von *N*-Acetylglucosamin in Verbindung **10** weist ein Dublett mit einer Kopplungskonstanten von 3.6 Hz aus, wie für eine α -glycosidische Bindung erwartet. Die Protonen am anomeren Zentrum der Gentiobiosezwischenstufe **14** ergaben ein Dublett-Signal mit Kopplungskonstanten von

7.9 Hz und 7.8 Hz, wie für β -glycosidische Bindungen erwartet. **17:** TLC (Toluol/Aceton 1:1): $R_f = 0.4$; $[\alpha]_D^{20} = +12.1$ ($c = 1$, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 0.81\text{--}0.92$ (t, 6H; CH_3), 1.11–1.35 (m, 40H; $\text{CH}_2(\gamma\text{--}\omega)$), 1.44–1.61 (m, 4H; $\text{CH}_2(\beta)$), 1.84–1.98 (m, 3H; NHAc), 2.09–2.25 (m, 4H; $\text{CH}_2(\alpha)$), 3.32 (m, 1H; 5a/b-H), 3.33 (m, 1H; 2a-H), 3.35 (m, 1H; 1'-H), 3.37 (m, 1H; 5a/b-H), 3.38 (m, 1H; 2b-H), 3.43, 3.44 (m, 2H; 4a, 4b-H), 3.49 (m, 2H; 18-H), 3.57 (m, 2H; 3a, 3b-H), 3.58–3.60 (m, 3H; 6c, 6a-H), 3.63 (m, 4H; 5, 8, 11, 14-H), 3.64 (m, 1H; 4c-H), 3.67 (m, 12H; OMe), 3.68 (m, 1H; 3c-H), 3.69 (m, 1H; 2-H), 3.72 (m, 1H; 17-H), 3.75 (m, 1H; 5c-H), 3.83 (m, 1H; 1'-H), 3.96, 4.04 (m, 18H; 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15-H), 4.06, 4.15 (m, 2H; 3'-H), 4.08 (m, 1H; 6a-H), 4.07, 4.17 (m, 4H; 16, 6b-H), 4.20 (m, 1H; 1a-H), 4.35 (m, 1H; 2c-H), 4.41 (m, 1H; 1b-H), 4.74 (m, 1H; 1c-H), 4.29–4.91 (m, 30H; CH_2Ph), 4.93 (m, 12H; POCH_2Ph), 5.06 (m, 1H; 2'-H), 6.69–6.80 (m, 8H; Ph_{MPM}), 7.03–7.34 ppm (m, 93H; Ph); $^{13}\text{C-NMR}$ (150.8 MHz, CDCl_3 , TMS): $\delta = 14.11$ (2C; CH_3), 23.1 (1C; NHAc), 24.84 (2C; $\text{CH}_2(\beta)$), 22.68/29.14–31.91 (20C; $\text{CH}_2(\gamma\text{--}\omega)$), 34.04, 34.22 (2C; $\text{CH}_2(\alpha)$), 52.8 (1C; 2c-C), 55.17 (4C; OCH_3), 63.2 (1C; 3'-C), 65.5–67.2 (12C; $\text{CH}_2\text{--Glyc.}$, 6b-C), 68.1 (1C; 1'-C), 68.5 (1C; 6c-C), 68.6 (1C; 6a-C), 69.0 (1C; 18-C), 69.5 (6C; POCH_2Ph), 69.8 (1C; 2'-C), 72 (1C; 5c-C), 73.5 (1C; 5a/b-C), 75 (1C; 4a/b-C), 75.4 (4C; 5, 8, 11, 14-C), 72–77.0 (15C; CH_2Ph), 76.8 (1C, 17-C), 77.5 (1C; 4c-C), 78.2 (1C; 2-C), 81.2 (1C; 3c-C), 81.8 (2C; 2a, 2b-C), 84.6 (2C; 3a, 3b-C), 100.05 (1C; 1c-C), 103.1 (1C; 1a-C), 103.6 (1C; 1a-C), 103.6 ppm (1C; 1b-C); Zuordnung gemäß **1a** in Schema 2; MALDI-TOF-MS (positiver Modus, Matrix: *p*-Nitroanilin + NaI, THF): $[M+\text{Na}]^+$, m/z : ber.: 4002.3; gef.: 4000.0; $\text{C}_{220}\text{H}_{271}\text{NO}_{34}\text{P}_6$ (3979.3): ber.: C 66.40, H 6.86, N 0.35; gef.: C 66.40, H 7.09, N 0.36. **1a:** $[\alpha]_D^{20} = +6.9$ ($c = 0.1$, H_2O); $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): $\delta = 0.82\text{--}0.94$ (m, 6H; CH_3), 1.16–1.43 (m, 40H; $\text{CH}_2(\gamma\text{--}\omega)$), 1.55–1.69 (m, 16H; Ala- βH , $\text{CH}_2(\beta)$), 2.11 (s, 3H; NHAc), 2.29–2.47 (m, 4H; $\text{CH}_2(\alpha)$), 3.27–3.73, 3.75–4.34, 4.36–4.59 (m, 54H), 5.10 (bs, 1H; 1c-H), 5.31–5.43 ppm (m, 5H; 5, 8, 11, 14-H, 2'-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (150.8 MHz, D_2O): $\delta = 14.2$ (CH_3), 15.9 (Ala- CH_3), 22.6 (NHAc), 25.4 ($\text{CH}_2(\beta)$), 30.5 ($\text{CH}_2(\gamma\text{--}\omega)$), 34.5 ($\text{CH}_2(\alpha)$),

49.2 (CHNH_3^+), 54.0 (2c-C), 60.9 (6c-C), 62.4 (18-C), 64.0 ($\text{CH}_2\text{--Glyc.}$, 3'-C), 65.5 (1, 3-C), 66.8 (16-C), 68.2 (1'-C), 70.3 (4c-C), 71.1 (17-C), 71.4 (3c-C), 72.4 (5c-C), 73.4 (2a, 2b-C), 74.4 (5, 8, 11, 14-C), 75.9 (3a, 3b-C), 76.2 (2-C), 97.2 ppm (1c-C); MALDI-TOF-MS (negativer Modus, Matrix: Trihydroxyacetophenon/Diammoniumcitrat 2:1): $[M-\text{H}]^-$, m/z : ber.: 2247.9, gef.: 2248.5; $[M-\text{Ala}]^-$, m/z : ber.: 2176.9, gef.: 2177.6. **1b:** $[\alpha]_D^{20} = +5.1$ ($c = 0.2$, H_2O); die NMR-Daten sind nahezu identisch mit denen des Diastereomers **1a**; MALDI-TOF-MS (negativer Modus, Matrix: Trihydroxyacetophenon/Diammoniumcitrat 2:1): $[M-\text{H}]^-$, m/z : ber.: 2247.9, gef.: 2245.5; $[M-\text{Ala}]^-$, m/z : ber.: 2176.9, gef.: 2174.8; (positiver Modus, Matrix: DHB): $[M+\text{H}]^+$, m/z : ber.: 2249.9, gef.: 2249.9.

- [27] Vollblut-Cytokin-Reaktion: Das Differenzial-Blutbild wurde routinemäßig mit einem Pentra-60-Analysator (ABX Diagnostics, Montpellier, Frankreich) geprüft, um akute Infektionen der Blutspender auszuschließen. 200 μL frisch gewonnenes heparinisiertes Blut von gesunden Probanden wurde mit der fünffachen Menge isotonischer Natriumchlorid-Lösung (0.9%, Boehringer Ingelheim, Deutschland) verdünnt. Die LTS wurde vor ihrer Verwendung mit Ultraschall behandelt, um Mizellen aufzulösen. Nach der Zugabe der LTS-Stimulantien in 10 μL Probenvolumen wurden die Proben in Polypropylen-Reagenzglasern (Eppendorf, Hamburg) in Gegenwart von 5% CO_2 bei 37°C über Nacht inkubiert. Zell-freie Überstände wurden durch Zentrifugieren bei $400 \times g$ nach 2 min erhalten und bei -70°C für die Cytokin-Bestimmung aufbewahrt. Cytokine wurden durch einen Sandwich-ELISA (Enzym-gekoppelter Immun-Assay) bestimmt, der auf einem Antikörperpaar gegen menschliches $\text{TNF}\alpha$ basiert (Endogen, Eching, Deutschland). Das als Standard eingesetzte rekombinante menschliche $\text{TNF}\alpha$ war ein Geschenk von Dr. S. Poole, National Institute for Biological Standards and Controls, London, Großbritannien. Die Anbindung von biotinylierten Antikörpern wurde durch Streptavidin-Peroxidase (Biosource, Camarillo, CA, USA) und TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) als Substrat quantifiziert.