

Totalsynthese der Glycopeptid-Erkennungsregion des P-Selektin-Glycoprotein-Liganden 1**

Katharina Baumann, Danuta Kowalczyk und Horst Kunz*

Kohlenhydrat erkennende Rezeptoren (das P- und das E-Selektin auf dem aktivierten Endothel in den Adern und das L-Selektin auf den Leukozyten) spielen bei akuten und chronischen Entzündungen eine herausragende Rolle während der Rekrutierung von Leukozyten in das entzündete Gewebe.^[1] Ähnliches gilt für die Metastasierung von Tumorzellen.^[2] Das Eindringen von malignen T-Zellen in die Haut ließ sich über den P-Selektin-Liganden leichter beeinflussen als über den E-Selektin-Liganden, weshalb sich in diesem Fall die Inhibierung von P-Selektin als die aussichtsreichere Antitumor-Strategie erwies.^[3] Anders als beim natürlichen Liganden des E-Selektins^[4] bildet beim P-Selektin-Liganden „P-Selektin-Glycoprotein-Ligand 1“ (PSGL-1) neben der essenziellen Tetrasaccharid-Einheit Sialyl-Lewis^x auch die N-terminale Peptidsequenz einen wesentlichen Teil des Erkennungssepitops.^[5] In biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen ist die Bindungsstelle in PSGL-1 für die Bindung an P-Selektin identifiziert worden (Abbildung 1): Sie liegt im N-Terminus, der nach Abspaltung eines Signal-

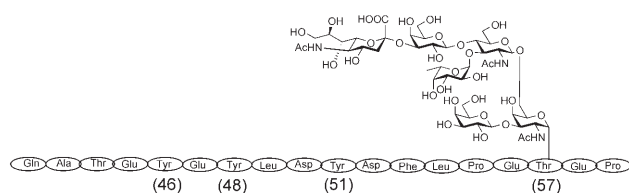


Abbildung 1. Bindungsregion im P-Selektin-Glycoprotein-Liganden 1 für P-Selektin.

peptids mit Gln⁴² beginnt. Mindestens einer der Tyrosinreste Tyr⁴⁶, Tyr⁴⁸ und Tyr⁵¹ soll *O*-sulfatiert sein. Das Threonin in Position 57 trägt die *O*-Glycan-Seitenkette, die einer Kombination aus dem Sialyl-Lewis^x-Liganden und der core2-Struktur entspricht.^[5]

Chemoenzymatische Synthesen von Teilen^[6] oder der gesamten Bindungsregion des PSGL-1^[7] wurden beschrieben. Wong et al.^[6] synthetisierten das Glycooctapeptid Tyr⁵¹–Glu⁵⁸, das an Thr⁵⁷ das GlcNAcβ(1–6)-αGalNAc-Disaccharid

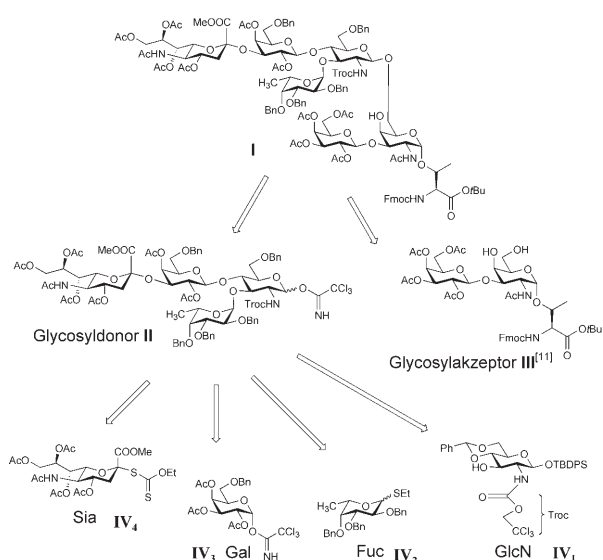
trägt. Nach chemischer Sulfatierung des Tyrosins wurde enzymatisch am GlcNAc-Rest die Sialyl-Lewis^x-Struktur aufgebaut. Cummings et al.^[7] führten die chemische Festphasensynthese des Glycopeptids Gly⁴¹–Leu⁶³ mit einem αGalNAc-Rest aus und unternahmen alle Glycosylierungen und die abschließende Sulfatierung enzymatisch. Sie berichten über eine hohe Affinität des in einigen Mikrogramm erhaltenen Glycopeptid-Liganden gegenüber P-Selektin ($K_d = 350$ nM), die nahezu der des aus Neutrophilen isolierten PSGL-1 (300 nM) entspricht. Diese Befunde weisen die Erkennungsregion des PSGL-1 als eine interessante Struktur für gezielte Modelluntersuchungen von Zelladhäsionsphänomenen aus. Das gilt umso mehr, als jüngst gefunden wurde, dass das Bakterium *Anaplasmosis phagocytophilum*, das die menschliche Granulozytenplasmose (Ehrlichiose) auslöst, einen dem P-Selektin analogen Rezeptor exprimiert, der PSGL-1 in der am Tyrosin nicht *O*-sulfatierten Form bindet.^[8] Auch wurde gezeigt, dass die getrennte Präsentation von Strukturteilen des PSGL-1 (Sialyl-Lewis^x und *O*-Sulfatyltyrosin) in Polyacrylamid-Konjugaten eine starke Affinität gegenüber L-Selektin bewirken kann.^[9] Angesichts der Bedeutung der Funktionen des natürlichen Liganden von P-Selektin bei der Regulierung der Zelladhäsion sowie ihrer aberranten Formen bei schweren Erkrankungen ist eine chemische Synthese der Erkennungsregion des PSGL-1 in präparativen Mengen erstrebenswert. Dies würde genügende Mengen für Modelluntersuchungen der Zelladhäsionsvorgänge sowie des enzymatischen Ausbaus, z. B. der Tyrosin-*O*-Sulfatierung, und für Strukturuntersuchungen liefern. Außerdem würde die chemische Synthese den Weg zur Gewinnung von Strukturmimetika bahnen, die resistenter gegen biologischen Abbau sind, wie dies schon für Glycopeptid-Liganden des E-Selektins demonstriert wurde.^[10]

Die anspruchsvollste Aufgabe bei einer solchen chemischen Synthese der PSGL-1-Erkennungsregion ist es, den geschützten Sialyl-Lewis^x-core2-Threonin-Baustein **I** herzustellen. Gemäß der Retrosynthese (Schema 1) sollte dieser aus dem Sialyl-Lewis^x-Donor **II** und dem partiell deblockierten T-Antigen-Threonin-Konjugat **III** zu gewinnen sein. **III** ist aus den Synthesen der tumorassoziierten Glycopeptid-Antigene bekannt.^[11]

Entscheidend für die β-selektive Block-Glycosylierung von **III** mit dem Donor **II** ist die *N*-Schutzgruppe am Glucosamin. Ausgehend von früheren Erfahrungen^[12] wurde die 2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl(Troc)-Gruppe gewählt; sie sollte das Absinken der Reaktivität durch Oxazolin-Bildung vermindern. Für genügende Reaktivität des Donors sollte das Trichloracetimidat nach Schmidt und Michel^[13a] sorgen. Die regioselektive Glycosylierung an 6-OH von **III** ist nach allen bisherigen Erfahrungen^[11,14] zu erwarten, da die axiale 4-OH-

[*] Dr. K. Baumann, D. Kowalczyk, Prof. Dr. H. Kunz
Institut für Organische Chemie
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Duesbergweg 10–14, 55128 Mainz (Deutschland)
Fax: (+49) 6131-392-4786
E-Mail: hokunz@mail.uni-mainz.de

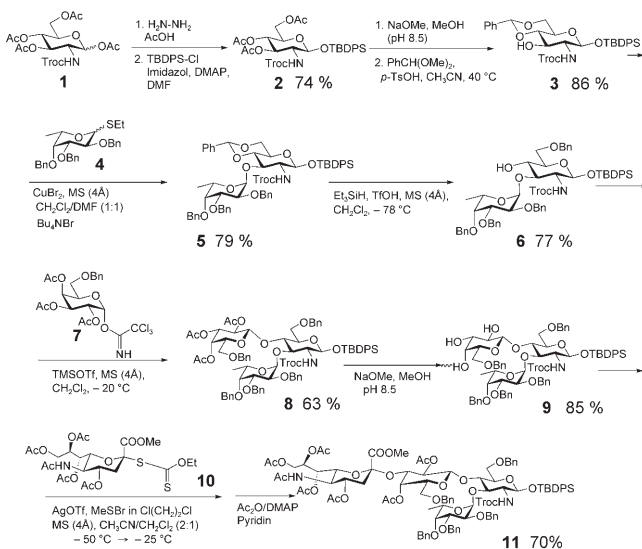
[**] Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. K.B. dankt für ein Promotionsstipendium des Fonds der Chemischen Industrie.



Scheme 1. Retrosynthese des Sialyl-Lewis^x-T-Antigen-Threonin-Bausteins **I**. Bn = Benzyl, Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl, Troc = Trichlorethoxycarbonyl, TBDPS = *tert*-Butyldiphenylsilyl.

Gruppe bei Molekülen mit großen Substituenten an O-3 wenig reaktiv ist. Wichtig ist auch der Schutz des anomeren Zentrums des Glucosamin-Bausteins **IV₁**. Diese Gruppe muss unter sauren (bei Glycosylierungen) und basischen Bedingungen (bei Desacetylierungen) stabil bleiben, aber schlussendlich selektiv abzuspalten sein, um die Einführung des Trichloracetimidats (zu **II**) zu ermöglichen. Die *tert*-Butyldiphenylsilyl-Gruppe^[15] sollte diese Anforderungen erfüllen. Die anderen Monosaccharid-Bausteine **IV₂–IV₄** wurden bereits bei Synthesen von Sialyl-Lewis^x-Bausteinen eingesetzt.^[10]

Zum Aufbau des Sialyl-Lewis^x-Donors **II** (Schema 2) wurde das peracetylierte *N*-Trichlorethoxycarbonylglucosamin **1** mit Hydrazinacetat an der O-1-Position desacety-

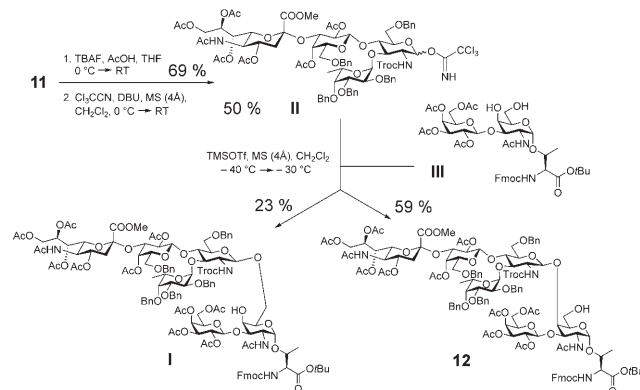


Scheme 2. Synthese des Sialyl-Lewis^x-Glycosyldonors. DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, TMSOTf = Trimethylsilyltrifluormethansulfonat.

liert^[12,16] und mit *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (TBDPS-Cl)^[15] zu **2** silyliert. Nach Entfernung der *O*-Acetyl-Gruppen durch milde Umesterung mit katalytischem NaOMe in Methanol wurde die 4,6-*O*-Benzyliden-Schutzgruppe eingeführt. Das Produkt **3** diente als Glycosylakzeptor für die Reaktion mit dem Thiofucosid^[17] **4** unter modifizierten In-situ-Anomerisierungsbedingungen.^[18] Eine regioselektive Acetalöffnung an **5** erfolgte mit Triethylsilan/Trifluormethansulfonsäure^[19] zu **6**, das mit dem Galactosyltrichloracetimidat^[13] **7** zum Lewis^x-Trisaccharid **8** verknüpft wurde.

Durch milde Umesterung in Methanol wurden die *O*-Acetyl-Gruppen entfernt (siehe oben). In das so erhaltene Lewis^x-Derivat **9** wurde nach einem früher beschriebenen Verfahren^[10,11,20] der Sialinsäurerest über das Xanthogenat **10**^[21] regio- und stereoselektiv eingeführt. Durch Acetylierung der 2- und 4-OH-Gruppe am Galactoseteil entstand das Sialyl-Lewis^x-Tetrasaccharid **11**. Die TBDPS-Gruppe blieb während aller Reaktionsschritte stabil (Schema 2).

Zur Überführung des Tetrasaccharids **11** in einen Glycosyldonor wurde die TBDPS-Gruppe mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) in Tetrahydrofuran/Essigsäure (100:1) abgespalten und anschließend das Sialyl-Lewis^x-Trichloracetimidat **II** durch Reaktion mit Trichloracetoni-^[13] in Gegenwart von 1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-en (DBU) gebildet (Schema 3). Beide Reaktionen verliefen an dem anspruchsvollen Substrat langsam.

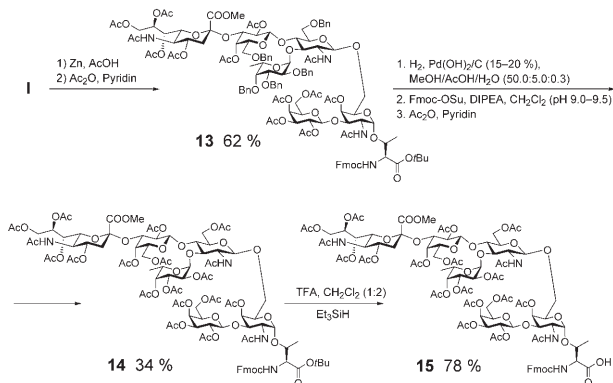


Scheme 3. Block-Glycosylierung eines T-Antigen-Threonin-Konjugats mit einem Sialyl-Lewis^x-Trichloracetimidat.

Die Block-Glycosylierung des partiell deblockierten Galβ(1–3)αGalNAc-Threonin-Derivats **III**,^[11] das die Fmoc/*tert*-Butylester-Schutzgruppenkombination trägt, mit dem SLe^x-Trichloracetimidat **II** ist die Schlüsselreaktion der Synthese. Sie ergab in einer Gesamtausbeute von über 80% die beiden Produkte **I** und **12** von gleicher Molekülmasse, die durch Flash-Chromatographie getrennt werden konnten. Durch zweidimensionale NMR-Spektroskopie (HSQC- und HMQC-Spektren) konnte, speziell anhand der Lage des jeweiligen ¹³C-Signals von C-6 des GalNAc-Teils (δ = 69.2 ppm bei **I**, δ = 59.2 ppm bei **12**), nachgewiesen werden, dass das Hauptprodukt **12** durch eine unerwartete Glycosylierung an der axialen 4-OH-Gruppe des T-Antigen-Threonin-Derivats **III** entstanden war. Diese allen bisherigen Erfahrungen^[11,14,20] widersprechende Regioselektivität zeigt, dass bei langsam

ablaufenden Glycosylierungen zwischen größeren Blöcken unerwartete Effekte auftreten können. Glücklicherweise ließ sich die gewünschte Verbindung **1** in genügender Menge isolieren (0.66 g), sodass die Synthese des Glycopeptids aus der Erkennungsregion (Abbildung 1) fortgesetzt werden konnte.

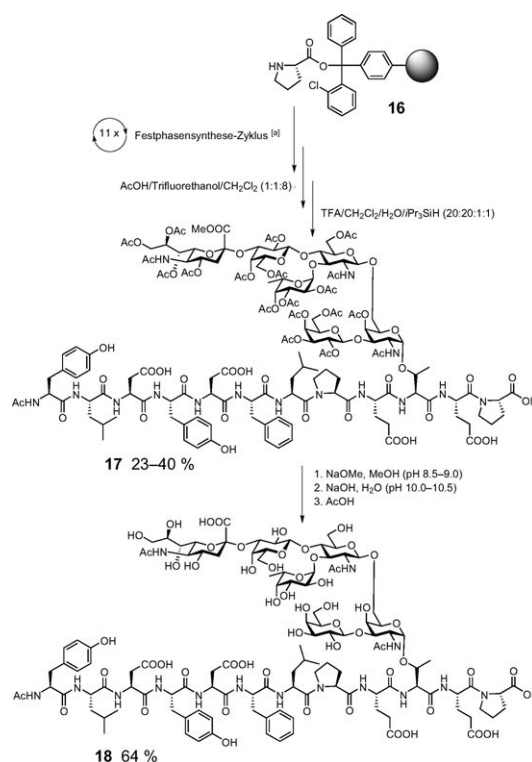
Aus **1** kann direkt kein Fmoc-geschützter Glycosylthreonin-Baustein gewonnen werden, weil dessen α -Fucosid-Struktur sehr empfindlich gegen verdünnte Trifluoressigsäure in Dichlormethan ist. Vielmehr muss durch Austausch der Benzylether- gegen Acetyl-Schutzgruppen für eine Stabilisierung dieser Struktur gegen Säuren gesorgt werden.^[10,22] Zuvor war jedoch die Entfernung der *N*-Troc-Gruppe durch reduktive Eliminierung mit Zink^[12] nötig, da die Troc-Gruppe bei der Hydrierung Chlor-Substituenten verloren hätte. Nach *N*-Acetylierung wurden am Produkt **13** die Benzylether hydrolytisch gespalten. Die Produktkontrolle zeigte jedoch auch einen Verlust der Fmoc-Schutzgruppe an. Erst nach selektiver Wiedereinführung der Fmoc-Gruppe mit Fmoc-*O*-Hydrosuccinimid (Fmoc-OSu) konnte die *O*-Acetylierung zu **14**^[23] durchgeführt werden (Schema 4).



Schema 4. Schutzgruppen-Austauschreaktionen zur Gewinnung eines säurestabilen Fmoc-Glycosylthreonin-Bausteins für die Festphasensynthese.

Die Verbindung ist nun so säurestabil, dass der *tert*-Butylester mit Trifluoressigsäure (TFA) gespalten werden kann und der Fmoc-(Sialyl-Lewis^x-T-Antigen)-Threonin-Baustein **15** für die Festphasen-Glycopeptidsynthese sauber erhalten wird. Der Baustein **15** wurde in der Festphasensynthese der Sequenz Tyr⁴⁸ bis Pro⁵⁹ des PSGL-1 eingesetzt, die nach Fmoc-Strategie an Polystyrolharz **16** ausgeführt wurde,^[24] das über den Barlos-Anker^[25] gebundenes Prolin trug.

Als Kupplungsreagentien dienten für Fmoc-Aminosäuren *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU), 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)^[26] und Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF, für das anspruchsvolle Fmoc-Glycosylthreonin **15** das reaktivere *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU)/7-Aza-1-hydroxybenzotriazol (HOAt)^[27] und *N*-Methylmorpholin (NMM) in *N*-Methylpyrrolidinon (NMP) (Schema 5). Die Kupplung von **15** erforderte eine Reaktionszeit von acht Stunden. Die auf das Glycosylthreonin folgenden Aminosäuren Glu, Pro und Leu wurden in Doppelkupplungen angebunden. Nach Aufbau der



Schema 5. Festphasensynthese des *O*-Glycopeptids aus der P-Selektin-Bindungsstelle des PSGL-1. [a] Festphasensynthese-Zyklus: 1) Fmoc-Abspaltung: Piperidin/NMP (1:4); 2) Aminosäure-Kupplung: Fmoc-AS-OH, HBTU, HOBt, DIPEA, DMF; im Fall von **15**: HATU, HOAt, NMM, NMP; 3) Schützen: Ac₂O, DIPEA, HOBt, NMP.

Glycopeptidsequenz und abschließender *N*-Acetylierung wurde Essigsäure/Trifluorethanol in Dichlormethan^[25] zur Spaltung des Ankers eingesetzt, wobei die *tert*-Butylester und -ether erhalten blieben. Diese wurden nachfolgend mit Trifluoressigsäure entfernt, wodurch das Glycopeptid **17** entstand. Durch präparative HPLC wurden das C-terminale Dipeptid und das Glycosyltripeptid als Nebenprodukte abgetrennt und **17** als Hauptfraktion (23 %) neben massengleichen Verbindungen mit sehr ähnlichen Retentionszeiten (17 %) isoliert. Da letztere bei der Reinjektion in der analytischen HPLC wieder ein ähnliches Profil ergaben, könnte es sich um Konformere oder unterschiedliche Salzformen handeln. Die Hauptfraktion wurde mit katalytischem Natriummethanolat in Methanol (pH > 9) behandelt, was allerdings nicht zur vollständigen Abspaltung der *O*-Acetyl-Gruppen führte. Bei der nachfolgenden Hydrolyse des Sialinsäuremethylesters mit NaOH in Wasser bei pH 10.5^[20] (der pH-Wert muss sorgfältig kontrolliert werden, weil sonst β -Eliminierung des gesamten Glycans eintritt) wurden die verbliebenen *O*-Acetyl-Gruppen abgelöst. Nach Neutralisieren mit Essigsäure wurde durch präparative HPLC an reverser Phase (RP-HPLC) das reine Sialyl-Lewis^x-Antigen-Glycopeptid **18**^[28] aus der Bindungsregion des P-Selektin-Liganden PSGL-1 in einer Menge von 31 mg erhalten.

Bei der Totalsynthese des PSGL-1-Bindungsseptops **18** findet sich eine Reihe von Problemen, die die chemische Glycopeptidsynthese erschweren. Zur Herstellung der α -Fucosid-Struktur muss ein als Benzylether geschützter Fu-

cosylldonor eingesetzt werden. Die so eingeführte Fucosid-Bindung ist aber säurelabil und nicht kompatibel mit Bedingungen der Spaltung von *tert*-Butyl-Gruppen in der Festphasensynthese. Der nötige Austausch der *O*-Benzyl- gegen *O*-Acetyl-Schutzgruppen ermöglicht es als Folge nicht, die Sialinsäure, deren chemische Eigenschaften selbst schon viele Probleme bereiten, als Benzylester^[29] zu schützen. So muss nach der langen Synthese der Sialinsäuremethylester alkalisch hydrolysiert werden, ohne dass die β -Eliminierung des gesamten Glycans^[30] eintritt.

Der Nutzen der Synthese einer solch komplexen und empfindlichen Verbindung wie **18** liegt nicht nur darin, dass so deren Strukturermittlung und Einsatz in biologischen Modelluntersuchungen möglich wird – der Syntheseweg legt auch die Strategie offen, nach der Strukturanaloga, die modifizierte Wirkungen und höhere biologische Stabilität haben können, präparativ zugänglich werden. Solche Optionen eröffnen enzymatische Synthesen in der Regel nicht. In zukünftigen Arbeiten wollen wir die PSGL-1-Bindungsregion als Substrat für Tyrosin-Sulfatyltransferasen einsetzen und sie selbst wie auch die sulfatierten Produkte als P-Selektin-Inhibitoren prüfen.

Eingegangen am 17. Dezember 2007

Online veröffentlicht am 20. März 2008

Stichwörter: Festphasensynthesen · Glycopeptide · Glycosylierungen · T-Antigen · Totalsynthesen

- [1] Übersichten: a) M. Sperandio, *FEBS J.* **2006**, 273, 4377; b) D. Vestweber, J. E. Blanks, *Physiol. Rev.* **1999**, 79, 181; c) F. M. Unger, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2001**, 57, 207.
- [2] Übersicht: S. Chen, M. Fukuda, *Methods Enzymol.* **2006**, 416, 371.
- [3] L. Descheny, M. E. Gainers, B. Walcheck, C. J. Dimitroff, *J. Invest. Dermatol.* **2006**, 126, 2065.
- [4] M. Steegmaler, A. Levinovitz, S. Isenmann, E. Borges, M. Lenter, H. P. Kocher, B. Kleuser, D. Vestweber, *Nature* **1995**, 373, 615.
- [5] a) Übersicht: R. D. Cummings, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1999**, 32, 519; b) D. Sako, K. M. Comess, K. M. Barone, R. T. Camphausen, D. A. Cumming, G. D. Shaw, *Cell* **1995**, 83, 323; c) T. Pouyani, B. Seed, *Cell* **1995**, 83, 333; d) F. Li, P. P. Wilkins, S. Crawley, J. Weinstein, R. D. Cummings, R. P. McEver, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 3255; e) R. Kumar, R. T. Camphausen, F. X. Sullivan, D. A. Cumming, *Blood* **1996**, 88, 3872; f) V. Ramachandran, M. U. Nollert, H. Qiu, W.-J. Liu, R. D. Cummings, C. Zhu, R. P. McEver, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 13771; g) W. S. Somers, J. Tang, G. D. Shaw, R. T. Camphausen, *Cell* **2000**, 103, 467.
- [6] a) K. M. Koeller, M. E. Smith, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 742; b) K.-T. Huang, B.-C. Wu, C.-C. Lin, S.-C. Luo, C. Chen, C.-W. Wong, C.-C. Lin, *Carbohydr. Res.* **2006**, 341, 2151.
- [7] A. Leppänen, P. Mehta, Y. B. Ouyang, T. Ju, J. Helin, K. L. Moore, I. van Die, W. M. Canfield, R. P. McEver, R. D. Cummings, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 24838.
- [8] T. Yago, A. Leppänen, J. A. Carlyon, M. Akkoyunlu, S. Karmakar, E. Fikrig, R. D. Cummings, R. P. McEver, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 37987.
- [9] S. Enders, G. Bernhard, A. Zakrzewicz, R. Tauber, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2007**, 1770, 1441.
- [10] a) C. Filser, D. Kowalczyk, C. Jones, M. K. Wild, U. Ipe, D. Vestweber, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 2155; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 2108; b) U. Sprengard, G. Kretzschmar, E. Bartnik, C. Hüls, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 1104; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 990.
- [11] a) C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, 525; b) S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 7798; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7624.
- [12] a) M. Schultz, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 5319; b) M. Schultz, H. Kunz, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, 4, 1205; c) P. Boullanger, M. Jouineau, B. Bouammali, D. Lafont, G. Descotes, *Carbohydr. Res.* **1990**, 202, 151.
- [13] a) R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem.* **1980**, 92, 763; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, 19, 731; b) W. Stahl, U. Sprengard, G. Kretzschmar, D. W. Schmidt, H. Kunz, *J. Prakt. Chem.* **1995**, 337, 441.
- [14] a) A. Kuhn, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 458; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 454; b) B. Liebe, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 8777.
- [15] S. Hanessian, P. Lavalley, *Can. J. Chem.* **1975**, 53, 2975.
- [16] W. Dullenkopf, J.-C. Castro-Palomino, L. Manzoni, R. R. Schmidt, *Carbohydr. Res.* **1996**, 296, 135.
- [17] H. Lönn, *Carbohydr. Res.* **1985**, 139, 105.
- [18] a) R. U. Lemieux, K. B. Hendriks, R. V. Stick, K. James, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 4056; b) S. Sato, M. Mori, Y. Ito, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1986**, 155, C6.
- [19] M. Sakagami, H. Hamana, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 5547.
- [20] B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 629; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 618.
- [21] A. Marra, P. Sina, *Carbohydr. Res.* **1990**, 195, 303.
- [22] H. Kunz, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 1763; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, 27, 1697.
- [23] **14**: Ausb.: 165 mg (34% bezogen auf **13**); farbloser amorpher Feststoff; $[\alpha]_D^{25} = -16$ ($c = 1.0$, CHCl_3); $R_f = 0.54$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 25:2), $R_f = 0.19$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 50:3); analyt. HPLC: $R_t = 35$ min (Phenomenex Luna C18, Gradient: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 5:95 \rightarrow 100:0 in 40 min; $\lambda = 214$ nm). $^1\text{H-NMR}$ [^1H - ^1H -COSY, TOCSY] (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.69$ (d, 1H, $^3J_{\text{NH, Thr}^a} = 8.6$ Hz, NH-Thr), 5.50 (m_c , 1H, H8-Sia), 5.44 (dd, 1H, $^3J_{\text{H7, H6}} = 2.7$ Hz, $^3J_{\text{H7, H8}} = 9.7$ Hz, H7-Sia), 5.36–5.34 (m , 2H, H1-Fuc {5.36, d, $^3J_{\text{H1, H2}} = 3.9$ Hz}, H4-Gal' {5.34, d, $^3J_{\text{H4, H3}} = 3.1$ Hz}), 5.31 (d, 1H, $^3J_{\text{H4, H3}} = 2.4$ Hz, H4-Fuc), 5.25 (s_b , 1H, H4-GalN), 5.20 (dd, 1H, $^3J_{\text{H3, H2}} = 10.9$ Hz, $^3J_{\text{H3, H4}} = 3.2$ Hz, H3-Fuc), 5.12 (d, 1H, $^3J_{\text{NH, H5}} = 10.2$ Hz, NH-Sia), 5.06 (dd, 1H, $^3J_{\text{H2, H1}} = 7.7$ Hz, $^3J_{\text{H2, H3}} = 10.5$ Hz, H2-Gal'), 5.00–4.84 (m , 6H, H2-Fuc {4.98}, H4-Gal {4.94}, H5-Fuc {4.93}, H3-Gal' {4.92}, H2-Gal {4.89}, H4-Sia {4.87}), 4.80 (d, 1H, $^3J_{\text{H1, H2}} = 2.9$ Hz, H1-GalN), 4.70 (d, 1H, $^3J_{\text{H1, H2}} = 8.0$ Hz, H1-Gal), 4.63 (d, 1H, $^2J_{\text{H6a, H6b}} = 11.1$ Hz, H6a-GlcN), 4.56–4.43 (m , 6H, H1-GlcN {4.55}, H1-Gal' {4.55}, H3-Gal {4.53}, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ {4.53}, H2-GalN {4.48}, $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ {4.45}), 4.36 (dd, 1H, $^3J_{\text{H6a, H5}} = 6.7$ Hz, $^2J_{\text{H6a, H6b}} = 11.5$ Hz, H6a-Gal), 3.43 (m_c , 1H, H6b-GalN), 2.57 (dd, 1H, $^2J_{\text{H3eq, H3ax}} = 12.6$ Hz, $^3J_{\text{H3eq, H4}} = 4.6$ Hz, H3 $_{\text{eq}}$ -Sia), 1.27 (d, 3H, $^3J_{\text{Thr}^a, \text{Thr}^b} = 5.9$ Hz, Thr'), 1.16 ppm (d, 3H, $^3J_{\text{H6abc, H5}} = 6.2$ Hz, H6a,b,c-Fuc). $^{13}\text{C-NMR}$ [BB, HSQC, HMBC] (100.6 MHz, CDCl_3): $[\delta = 100.67$ (C1-GlcN, C1-Gal'), 99.84 (C1-Gal), 99.25 (C1-GalN), 96.72 (C2-Sia), 95.22 (C1-Fuc), 83.08 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 75.60 (Thr b), 67.79 (C6-GalN), 58.92 (Thr a), 18.58 (Thr'), 15.80 ppm (C6-Fuc). ESI-MS (positiv): $[m/z] = 1148.5$ ($[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$, ber.: 1148.4), 2273.9 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 2273.8).
- [24] Rapp Polymere, Tübingen.
- [25] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriu, Y. Wenqing, W. Schäfer, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 3943.
- [26] a) R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927; b) V. Dourtoglou, B. Gross, *Synthesis* **1984**, 572.

- [27] a) L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 201; L. A. Carpino, H. Imaizumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. H. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 457; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 441.
- [28] **18**: Ausb.: 31 mg (64 %); farbloses Lyophilisat: $[\alpha]_D^{23} = -23$ ($c = 0.96$, DMSO); analyt. HPLC: $R_t = 13$ min (Phenomenex Jupiter C18, Gradient: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O} + 0.1\%$ TFA 10:90 \rightarrow 100:0 in 40 min; $\lambda = 214$ nm). ^1H -NMR [D_6]DMSO: $[\delta = 8.32$ (db, 1 H, $^3J_{\text{NH,Glu1}\alpha} = 6.0$ Hz, NH-Glu1), 8.23–8.19 (m, 2 H, NH-Leu1 {8.22, d, $^3J_{\text{NH,Leu1}\alpha} = 8.4$ Hz}, NH-Asp1 {8.20, d, $^3J_{\text{NH,Asp1}\alpha} = 7.8$ Hz}), 8.14 (d, 1 H, $^3J_{\text{NH,Asp2}\alpha} = 7.4$ Hz, NH-Asp2), 8.07 (d, 1 H, $^3J_{\text{NH,Glu2}\alpha} = 7.4$ Hz, NH-Glu2), 8.03–7.93 (m, 4 H, NH-GlcN {8.02, d, $^3J_{\text{NH,H2}} = 8.8$ Hz}, NH-Tyr1 {7.98, d, $^3J_{\text{NH,Tyr1}\alpha} = 8.2$ Hz}, NH-Leu2 {7.98, d, $^3J_{\text{NH,Leu2}\alpha} = 8.2$ Hz}, NH-Sia {7.94, d, $^3J_{\text{NH,H5}} = 7.6$ Hz}), 7.85 (d, 1 H, $^3J_{\text{NH,Thr}\alpha} = 8.2$ Hz, NH-Thr), 7.70–7.64 (m, 2 H, NH-Tyr2 {7.69, d, $^3J_{\text{NH,Tyr2}\alpha} = 7.6$ Hz}, NH-Phe {7.65, d, $^3J_{\text{NH,Phe}\alpha} = 7.2$ Hz}), 4.80 (d, 1 H, $^3J_{\text{H1,H2}} = 2.9$ Hz, H1-Fuc), 4.71–4.65 (m, 2 H, H1-GalN {4.70, d, $^3J_{\text{H1,H2}} = 3.3$ Hz}, H5-Fuc {4.67}), 1.07 (d, 3 H, $^3J_{\text{Thr}\gamma,\text{Thr}\beta} = 5.6$ Hz, Thr $^\gamma$), 0.97 (d, 3 H, $^3J_{\text{H6abc,H5}} = 6.2$ Hz, H6a,b,c-Fuc), 0.88–0.81 ppm (m, 12 H, Leu1 $^{\text{abc}}$, Leu2 $^{\text{abc}}$). ^{13}C -NMR [BB, HSQC] (100.6 MHz, [D_6]DMSO): $[\delta = 104.79$ (C1-Gal'), 102.52 (C1-Gal), 100.92 (C1-GlcN), 99.06 (C1-Fuc), 98.98 (C1-GalN), 98.61 (C2-Sia), 76.00 (Thr $^\beta$), 59.25 (Pro1 $^\alpha$), 58.56 (Pro2 $^\alpha$), 56.09 (Thr $^\alpha$), 55.21 (C2-GlcN), 54.50 (Tyr1 $^\alpha$), 54.25 (Tyr2 $^\alpha$), 53.45 (Phe $^\alpha$), 52.22 (C5-Sia), 51.78 (Glu1 $^\alpha$ /Glu2 $^\alpha$), 51.05 (Leu2 $^\alpha$), 49.85, 49.77, 48.79 (Asp1 $^\alpha$, Asp2 $^\alpha$, Leu1 $^\alpha$, Glu1 $^\alpha$ /Glu2 $^\alpha$), 18.80 (Thr $^\gamma$), 16.64 ppm (C6-Fuc). HR-ESI-MS (positiv, + 0.1 % TFA): $[m/z] = 1356.5509$ ($[M+1+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 1356.5550).
- [29] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 379; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 366.
- [30] R. Kuhn, I. Löw, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1941**, *74*, 219.