

Sulfatierte und nicht sulfatierte Glycopeptid-Erkennungsdomänen des P-Selektin-Glycoprotein-Liganden 1 und ihre Bindung an P- und E-Selektin**

Katharina Baumann, Danuta Kowalczyk, Tobias Gutjahr, Markus Pieczyk, Claire Jones, Martin K. Wild, Dietmar Vestweber und Horst Kunz*

Für die Behandlung postoperativer Entzündungen wäre eine Hemmung der Infiltration von Leukozyten in das entzündete Gewebe wünschenswert. Bei der Rekrutierung der Leukozyten spielen Adhäsionsprozesse auf den Endothelzellen der Blutgefäße eine große Rolle, an deren Beginn die Kohlenhydrat erkennenden Rezeptoren P- und E-Selektin in Wechselwirkung mit ihren Liganden auf den Leukozyten treten.^[1] Es ist daher erstrebenswert, die Bindung des P-Selektins an seinen Liganden P-Selektin-Glycoprotein-Ligand 1 (PSGL-1)^[2] und des E-Selektins an dessen Liganden ESL-1^[3] zu inhibieren sowie die Struktur wirksamer Inhibitoren dieser Selektine zu ermitteln. Dies gilt umso mehr, als Selektine bei der Metastasierung von Tumorzellen eine ähnliche Rolle spielen.^[4] Das auf Leukozyten exprimierte PSGL-1^[5] spielt auch bei der bakteriell ausgelösten Granulozytenplasmose (Ehrlichiose)^[6] und den akuten Phasen der Multiplen Sklerose^[7] eine Rolle. Die Bindungsregion des humanen PSGL-1^[5] (Abbildung 1) wurde bereits chemoenzymatisch in Mi-

krogramm-Mengen hergestellt.^[8] Eine hohe Affinität zum P-Selektin zeigte das Glycopeptid nur, wenn die Tyrosinreste im N-terminalen Peptidteil *O*-sulfatiert waren.^[8]

Wir haben eine chemische Totalsynthese der Erkennungsregion von PSGL-1 entwickelt,^[9] die das Glycopeptid **1** in Milligramm-Mengen liefert und so für weitere Untersuchungen zugänglich macht. Der Wert der chemischen Totalsynthese liegt jedoch darin, dass auf diesem Weg auch Mimetika der natürlichen Struktur synthetisiert werden können, die enzymatisch nicht zu gewinnen sind. In diesem Sinne beschreiben wir hier die chemische Synthese der Mimetika **2** der PSGL-1-Bindungsregion (Abbildung 2), in denen die enzymatisch abspaltbare *N*-Acetylneuraminsäure in **1** durch das Mimetikum (*S*)-Cyclohexylmilchsäure^[10] ersetzt ist, und erstmals auch die rein chemische Synthese *O*-sulfaterter Glycopeptide dieser komplexen Art.

Grundlage ist die in der Totalsynthese^[9] erprobte Strategie für die Herstellung des Glycosylthreonin-Bausteins **A**

(Schema 1). Baustein **A** soll durch Blockglycosylierung des aus Synthesen tumorassozierter Glycopeptide bekannten T-Antigen-Threonin-Konjugats **III**^[11] mit dem Cyclohexyllactyl-Lewis^x-Trichloracetimidat **B** gewonnen werden. Der Donor **B** wird aus dem Lewis^x-Trisaccharid **3**^[9] durch S_N^2 -Reaktion mit dem *O*-Triflat des (*R*)-Cyclohexylmilchsäureesters^[10] erhalten. Das Lewis^x-Trisaccharid **3**

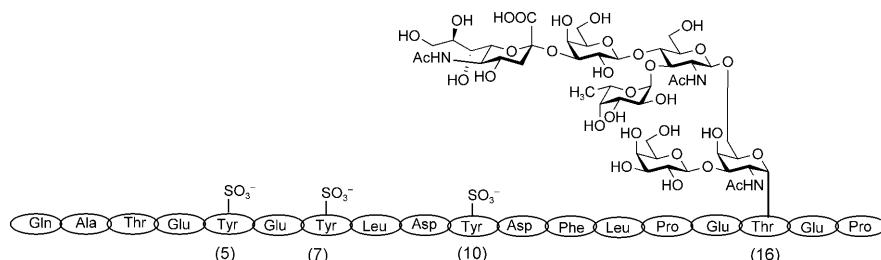


Abbildung 1. Erkennungsdomäne des P-Selektin-Glycoprotein-Liganden 1.

[*] Dr. K. Baumann, D. Kowalczyk, Dipl.-Chem. T. Gutjahr, Prof. Dr. H. Kunz

Institut für Organische Chemie
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Duesbergweg 10–14, 55128 Mainz (Deutschland)

Fax: (+49) 6131-39-24786
E-Mail: hokunz@uni-mainz.de

M. Pieczyk, Dr. C. Jones, Priv.-Doz. Dr. M. K. Wild, Prof. Dr. D. Vestweber
Max-Planck-Institut für Molekulare Biomedizin
Röntgenstraße 20, 48149 Münster (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. K.B. dankt für ein Doktorandenstipendium des Fonds der Chemischen Industrie. M.K.W. und D.V. wurden vom SFB 293 und der Max-Planck-Gesellschaft unterstützt.

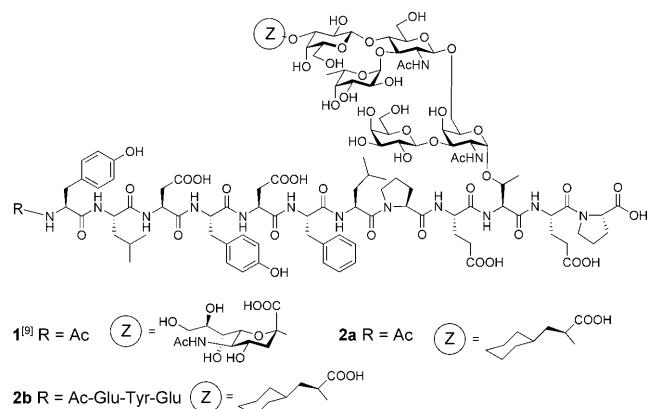
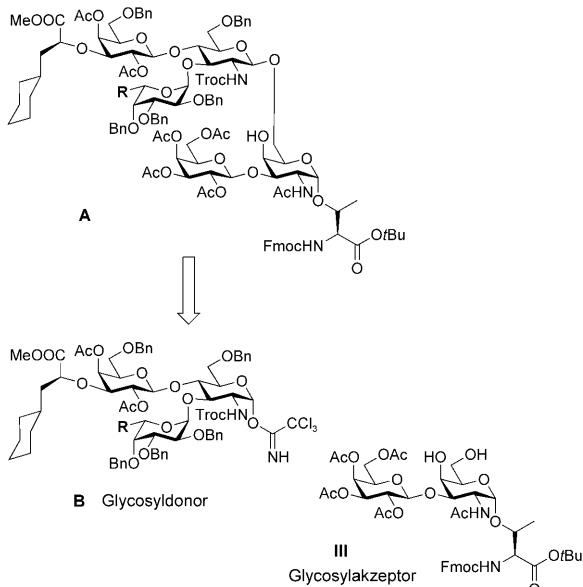


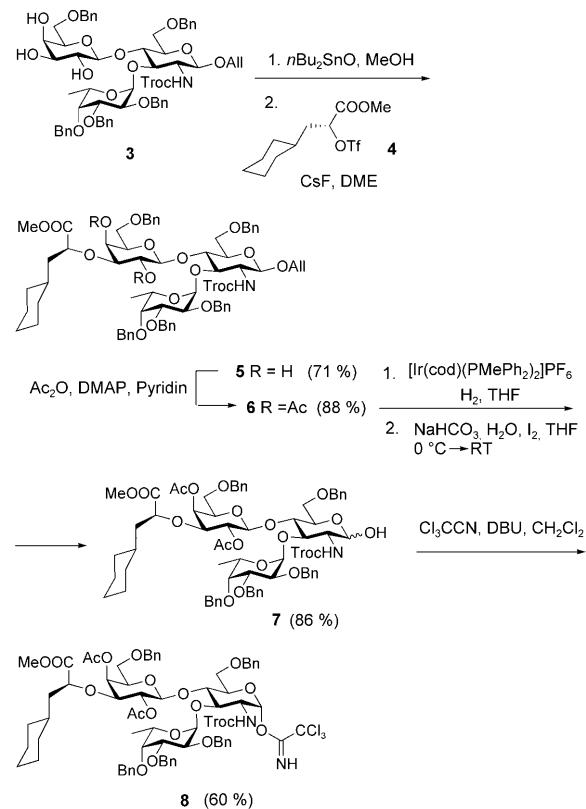
Abbildung 2. Synthetische Glycopeptide aus der PSGL1-Bindungsregion.



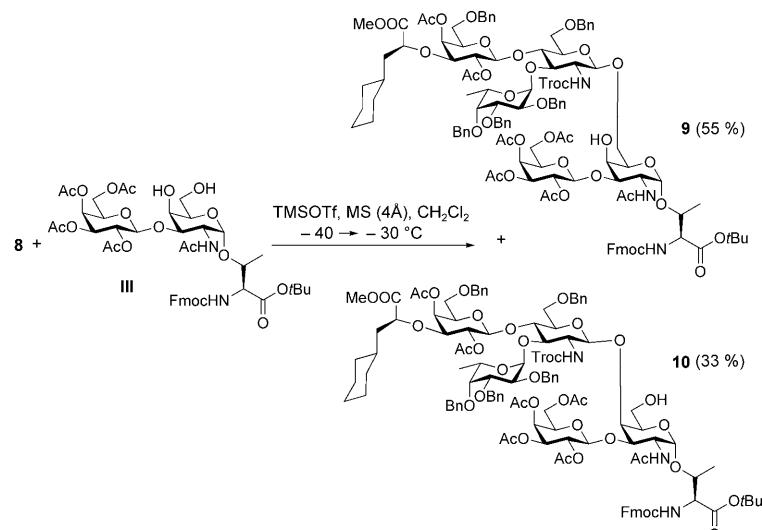
Schema 1. Retrosynthese des (*S*)-Cyclohexylactyl-Lewis^x-Threonin-Bausteins **A**. Bn = Benzyl, Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl, Troc = Trichlorethoxycarbonyl.

wurde bereits hergestellt,^[9] ist jedoch an der anomeren OH-Gruppe nicht als *tert*-Butyldiphenylsilyl-, sondern als Allyl-ether^[12] geschützt. Die N-Trichlorethoxycarbonyl(Troc)-Gruppe ermöglicht durch den Nachbargruppeneffekt die stereoselektive Knüpfung der β -Glycosidbindung in **A**. Zunächst wurde **3** mit dem *O*-Triflat **4**^[14] nach dem Stannylenverfahren^[13] zum geschützten Sialyl-Lewis^x-Mimetikum **5** umgesetzt (Schema 2). Nach Acetylierung der 2- und 4-OH-Gruppen im Galactoseteil wurde das Allylglycosid **6** durch Iridium-katalysierte^[15] Isomerisierung^[16] zum Propenylglycosid und dessen Oxidation mit Iod gespalten. Reaktion des so erhaltenen **7** mit Trichloracetonitril ergab das Trichloracetimidat^[17] **8** für die Blockglycosylierung.^[9]

Die Blockglycosylierung des partiell deblockierten Konjugats **III**^[11] mit dem Sialyl-Lewis^x-Mimetikum **8** ist der Schlüsselprozess der gesamten Synthese. Nach Aktivierung von **8** mit Trimethylsilyltriflat bei -40°C entstanden, wie bei der Synthese des Sialyl-Lewis^x-Analogs,^[9] mit hoher β -Selektivität beide regiosomeren Mimetika der Hexasaccharid-Threonin-Konjugate **9** und **10** in hoher Ausbeute von 88 % (Schema 3). Wieder gelang die flash-chromatographische Trennung der beiden ähnlichen Verbindungen. Anders als bei der Synthese des Sialyl-Lewis^x-Core2-Threonin-Bausteins^[9] ist das Hauptprodukt (55 % Ausbeute) laut C-6-GalNAc-Signal im HSQC-NMR-Spektrum ($\delta = 69.5$ ppm) das gewünschte Regiosomer **9**. Dennoch ist auch hier der Anteil (33 %) des unerwarteten Regiosomers **10** ($\delta = 59.2$ ppm) erstaunlich hoch, wenn man ihn mit den Verhältnissen bei Reaktionspartnern geringerer Komplexität^[18] vergleicht. Die Umwandlung von **9** in einen Baustein mit

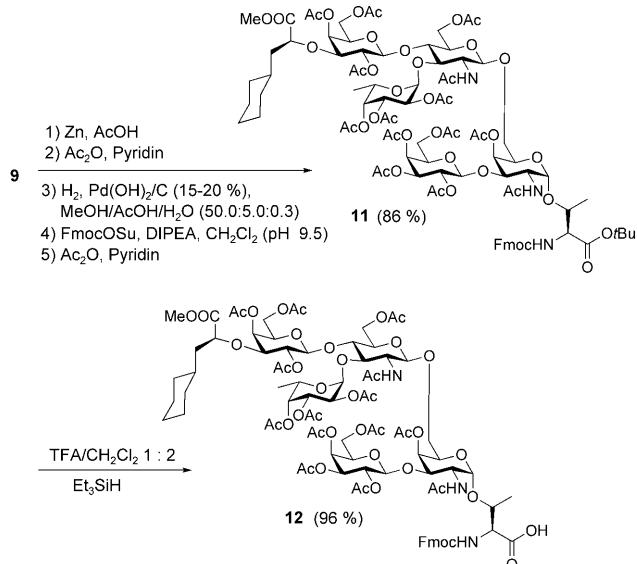


Schema 2. Synthese des Sialyl-Lewis^x-Tetrasaccharid-Mimetikums. cod = 1,5-Cyclooctadien, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, DME = 1,2-Dimethoxyethan, DBU = 1,8-Diazabicycloundecen-7.



Schema 3. Blockglycosylierung des T-Antigen-Threonin-Konjugats mit dem Tetrasaccharid-Mimetikum.

ausreichender Säurestabilität für die Festphasensynthese erforderte nach reduktiver Eliminierung der *N*-Troc-Gruppe und *N*-Acetylierung die Hydrogenolyse der *O*-Benzylschutzgruppen (Schema 4) und, nach Wiedereinführung der *N*-Fmoc-Gruppe, deren Ersatz durch *O*-Acetylgruppen. Dadurch wird die α -Fucosidbindung gegen Säuren stabilisiert.



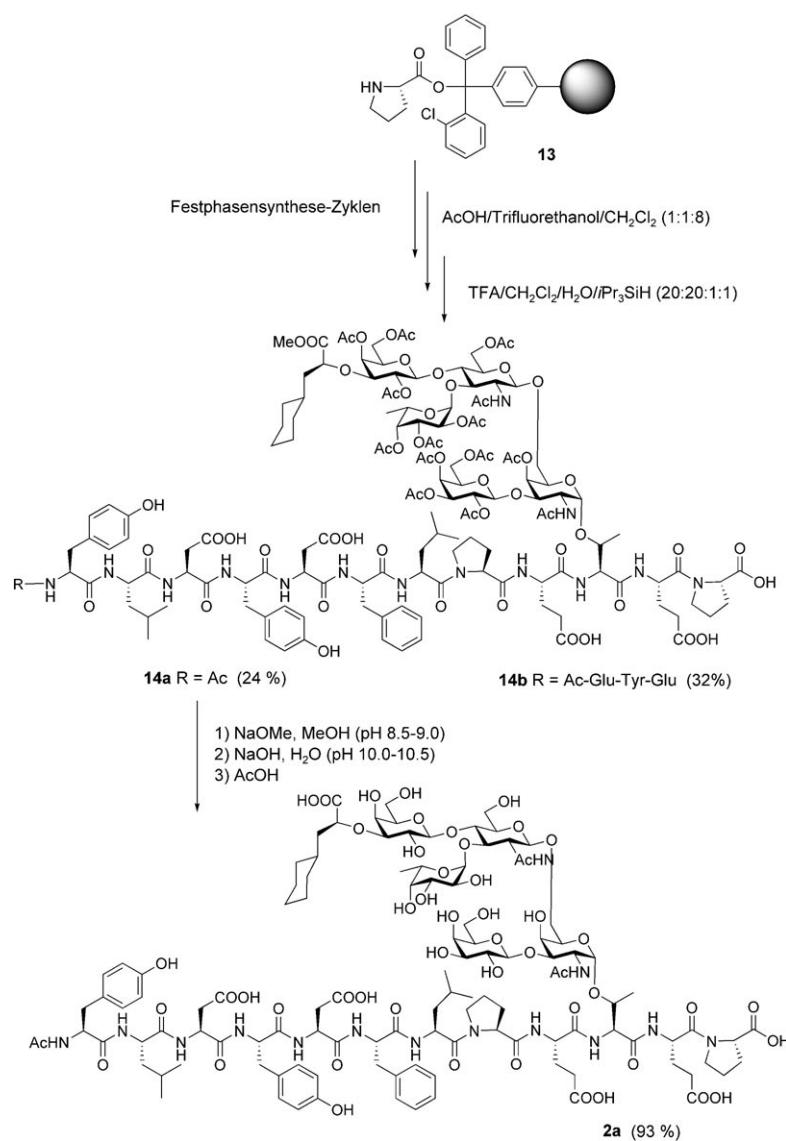
Schema 4. Schutzgruppenaustausch zur Gewinnung des Fmoc-Glycosyl-Threonin-Bausteins. DIPEA = *N,N*-Diisopropylethylamin, TFA = Trifluoressigsäure.

Der *tert*-Butylester **11** konnte mit Trifluoressigsäure zum Pseudo-Hexasaccharid-Threonin-Baustein **12** gespalten werden.

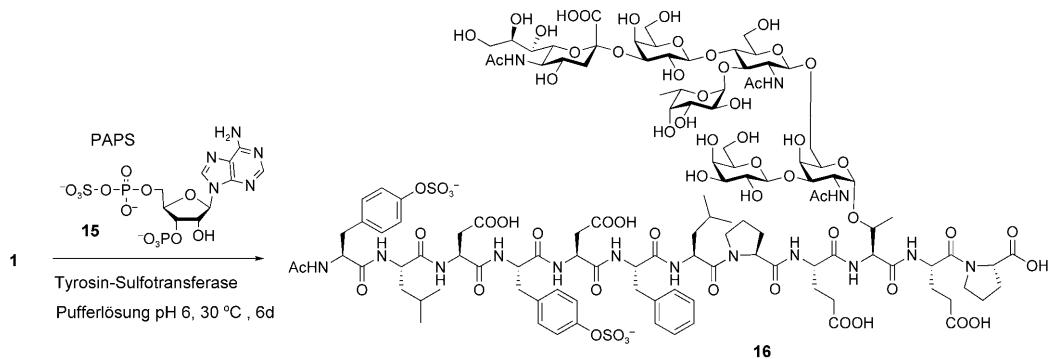
Die Festphasensynthesen der Glycopeptide **2** aus der Bindungsregion von PSGL-1 wurden nach Fmoc-Strategie an über den Barlos-Anker^[19] an Polystyrolharz^[20]-gebundenem Prolin **13** nach der beschriebenen Vorschrift^[9] ausgeführt (Schema 5). Abschließend wurde der Anker mit Essigsäure in Trifluorethanol/Dichlormethan gespalten. Die *tert*-Butylschutzgruppen der gewonnenen Glycopeptide wurden mit Trifluoressigsäure entfernt. Das in der Kohlenhydrateinheit noch geschützte Glycopeptid **14a** wurde nach Abtrennung von Abbruchsequenzen durch präparative HPLC an reverser Phase (RP-HPLC) in einer Ausbeute von 24 % isoliert. Bei dem N-terminal um Glu-Tyr-Glu verlängerten, alle drei Tyrosine enthaltenden PSGL-1-Glycopeptid **14b** lag die Gesamtausbeute bei 32 %. Zur Entfernung der *O*-Acetylgruppen wurde **14a** bei pH 9 in Methanol mit katalytischen Mengen an NaOMe umgesetzt. Verbliebene *O*-Acetate und der Methylester wurden mit wässriger NaOH bei pH 10–10.5^[21] binnen 36 h hydrolysiert. Der pH-Wert muss sorgfältig eingehalten werden, um eine β-Eliminierung des Glycans zu vermeiden. Eine Neutralisation mit Essigsäure und Isolierung durch präparative RP-HPLC ergaben das reine Glycopeptid **2a**^[22] aus der Bindungsregion des PSGL-1 mit mimetisch abgewandelter Sialyl-Lewis^x-Struktur (45 mg).

Um Glycopeptide wie **1**^[9] selektiv an den OH-Gruppen der Tyrosine zu sulfatieren, müssen

enzymatische Verfahren angewendet werden.^[8] In diesem Sinne wurde das Sialyl-Lewis^x-PSGL-1-Peptid **1** sechs Tage bei 30 °C und pH 6 in Gegenwart einer rekombinanten Tyrosin-Sulfotransferase^[23] als Katalysator mit Phosphoadenosylphosphosulfat (PAPS, **15**) umgesetzt (Schema 6). Das Problem bei der enzymatischen Sulfatierung ist, dass die Sulfotransferase und auch PAPS in Wasser oberhalb von 20 °C instabil sind, die Reaktion aber bei 30 °C ausgeführt werden soll. Zudem ist PAPS ausgesprochen teuer, nur in kleinen Ansätzen (3 mg **1**) und kaum im Überschuss (5 mg **15**, 60-proz.) einsetzbar. Dennoch gelang es, das an beiden Tyrosinen *O*-sulfatierte PSGL-1-Sialyl-Lewis^x-Glycopeptid **16**^[24] (3 mg) durch RP-HPLC zu isolieren.



Schema 5. Festphasensynthese: Zyklus: 1) Fmoc-Abspaltung: Piperidin/NMP (1:4); Aminosäure-Kupplung: Fmoc-Xaa-OH, HBTU, HOAt, NMM, NMP; bei **12** HATU, HOAt, NMM, NMP; 3) Capping: Ac₂O, DIPEA, HOAt, NMP. HATU = O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluorophosphat, HOAt = 7-Aza-1-hydroxy-1H-benzotriazol, HOAt = 1-Hydroxy-1H-benzotriazol, NMM = *N*-Methylmorpholin, NMP = *N*-Methylpyrrolidin.



Schema 6. Enzymatische Tyrosin-O-Sulfatierung des PSGL1-Glycopeptids **1**.

Der präparative Aufwand und die Unsicherheit dieses enzymatischen Verfahrens gaben Anlass, als Alternative ein chemisches Verfahren zu prüfen. Dafür kommen allerdings keine Glycopeptide wie **1** oder **2a** mit deblockiertem Kohlenhydratteil in Betracht. Deshalb wurde das im Kohlenhydratteil geschützte Glycopolypentadecapeptid **14b** vorsichtig mit Pyridin-SO₃-Komplex in Pyridin/DMF umgesetzt.^[25] Nach 18 h unter sorgfältiger Kontrolle durch analytische HPLC, die die zwischenzeitliche Bildung zweier polarer Produkte anzeigen, und Aufarbeitung nach Zugabe von Natriumcarbonatlösung (pH 6.5) wurde das Sulfatierungsprodukt erhalten. Das Produkt wurde vorsichtig mit katalytischem NaOMe in Methanol (pH 9) und danach mit wässrigem NaOH bei pH 10.5^[21] (42 h) umgesetzt. Nach Neutralisieren mit Essigsäure wurde durch präparative RP-HPLC das PSGL-1-Sulfoglycopolypentadecapeptid-Mimetikum **17** rein isoliert (6 mg), in dem alle drei Tyrosine selektiv O-sulfatiert sind (Schema 7).^[26] Indikativ für die O-Sulfatierung sind im ¹H-NMR-Spektrum von **17** die Signale der Tyrosin-Arylprotonen ($\delta = 7.12$ ppm), die gegenüber den Aryl-2,6- ($\delta = 6.95$ ppm) und Aryl-3,5-Protonen ($\delta = 6.65$ ppm) der Tyrosinreste in **2a** markant nach tiefem Feld verschoben sind.

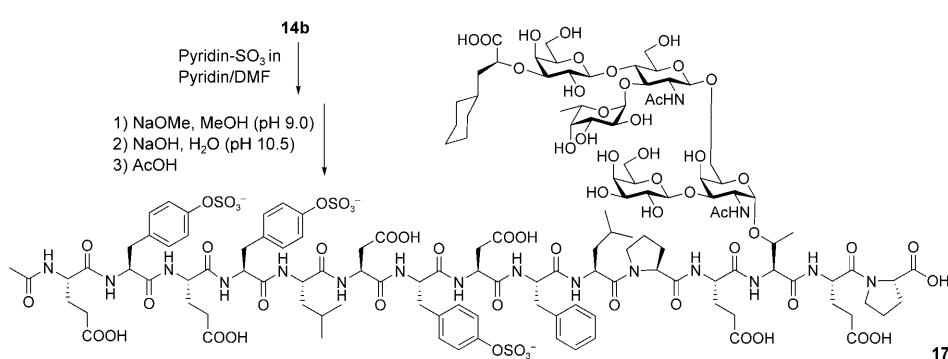
Mit dem Sialyl-Lewis^x-Glycopeptid **1**, seinem an den Tyrosinen sulfatierten Derivat **16**, dem Cyclohexyl-Lewis^x-Glycopeptid **2a** und dessen an drei Tyrosinen O-sulfatiertem Analogon **17** wurde die Inhibition der Leukozytenadhäsion über P-Selektin untersucht. Durchflusszytometrische Messungen^[3d,27] zeigten bis zur Konzentration von 1 mM keine Inhibition der Adhäsion von Maus-Neutrophilen (32Dcl3-

Zell-Linie) und aus Mäusen frisch isolierten Granulozyten an ein murines P-Selektin-IgG-Konstrukt durch das Sialyl-Lewis^x-PSGL-1-Glycopeptid **1**, dessen Cyclohexylmilkäse-Mimetikum sowie das Sialyl-Lewis^x-Sulfo-Glycopeptid **16**. Die Glycopeptide **1** und **2a** unterbinden auch nicht die Adhäsion humaner Granulozyten an das P-Selektin-IgG-Konstrukt. Ebenso verhält sich das Sialyl-Lewis^x-Tetrasaccharid als Standard. Das zweifach O-sulfatierte Sialyl-Lewis^x-PSGL-1-Glycopeptid **16** hemmt die Adhäsion von humanen Granulozyten an das murine P-Selektin-IgG-Konstrukt schwach ($IC_{20} = 0.75$ mM). Die geringe Wirkung der Glycopeptide in diesen Experimenten mag darauf zurückzuführen sein, dass sich die Bindungsregion von humanem PSGL-1 von der des murinen PSGL-1 in der Aminosäuresequenz^[28] unterscheidet. Erstaunlicherweise inhibiert das rein chemisch hergestellte PSGL-1-Sulfoglycopolypentadecapeptid **17**, mit drei O-sulfatierten Tyrosinen und dem (S)-Cyclohexylmilkäserest anstelle des Sialinsäurerestes, die Bindung der 32Dcl3-Neutrophile ($IC_{50} = 39$ μ M), der murinen Granulozyten ($IC_{50} = 20$ μ M) wie auch der humanen Granulozyten, letztere besonders stark ($IC_{50} = 5$ μ M).

Die Wirkung der PSGL-1-Glycopeptide auf die Bindung von murinen Granulozyten an ein E-Selektin-IgG-Konstrukt^[27] wurde ebenfalls geprüft. Das nicht sulfatierte Sialyl-Lewis^x-PSGL-1-Glycopeptid **1** erwies sich als starker Inhibitor des E-Selektins ($IC_{50} = 40$ μ M). Sialyl-Lewis^x wirkt ca. 25-mal schwächer ($IC_{50} \approx 1$ mM). Noch stärker inhibiert jedoch das PSGL-1-Glycopeptid **2a** mit dem Cyclohexylmilkäse-Mimetikum die E-Selektin-Bindung ($IC_{50} = 10$ μ M), das die

Potenz der nach dem natürlichen E-Selektin-Liganden ESL-1 konstruierten Sialyl-Lewis^x-Glycopeptide^[3d] erreicht. Dessen Affinität zu E-Selektin wird durch O-Sulfatierung der Tyrosine nicht erhöht, aber auch kaum gemindert, wie die hohe Inhibitorwirkung des PSGL-1-Sulfoglycopolypentadecapeptids **17** ($IC_{50} = 15$ μ M) belegt.

Diese Experimente mit vollsynthetischen Selektin-Glycopeptidliganden geben detaillierte Einblicke in die Rolle von



Schema 7. Chemische Tyrosin-O-Sulfatierung des PSGL1-Glycopeptid-Mimetikums.

Glycan, Aminosäuresequenz und Sulfatierung bei der Bindung und Selektivität der Selektinliganden. Sie ermöglichen es, hochaffine Mimetika und Unterschiede in den Erkennungsprozessen bei den verschiedenen Spezies zu finden und sollen nun auf Bindungsstudien an humanem P- und E-Selektin ausgedehnt werden.

Eingegangen am 9. Dezember 2008
Online veröffentlicht am 25. März 2009

Stichwörter: Sulfatierungen · Totalsynthesen · Glycopeptide · Peptidmimetika · Sialyl-Lewis^x-Mimetika

- [1] Übersichten: a) D. Vestweber, J. E. Blanks, *Physiol. Rev.* **1999**, 79, 181; b) F. M. Unger, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2001**, 57, 207; c) R. P. McEver, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, 14, 581; d) M. Sperandio, *FEBS J.* **2006**, 273, 4377.
- [2] Übersicht: R. D. Cummings, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1999**, 32, 519.
- [3] a) M. Lenter, A. Levinovitz, S. Isenmann, D. Vestweber, *J. Cell Biol.* **1994**, 125, 471; b) W. S. Somers, T. Tang, G. D. Shaw, R. T. Camphausen, *Cell* **2000**, 103, 467; c) M. Rinnbauer, B. Ernst, B. Wagner, J. Magnani, A. Benie, T. Peters, *Glycobiology* **2003**, 13, 435; d) 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.
- [4] Übersicht: S. Chen, M. Fukuda, *Methods Enzymol.* **2006**, 416, 371.
- [5] a) Übersicht: R. D. Cummings, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1999**, 32, 519; b) W. S. Somers, J. Tang, G. D. Shaw, R. T. Camphausen, *Cell* **2000**, 103, 467.
- [6] T. Yago, A. Leppänen, J. A. Carlyon, M. Akkoyunlu, S. Karimkar, E. Fikrig, R. D. Cummings, R. P. McEver, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 37987.
- [7] L. Battistini, L. Piccio, B. Rossi, S. Bach, S. Galgani, C. Gasperi, L. Ottoboni, D. Cianini, M. D. Caramia, G. Bernardi, C. Laudanna, E. Scarpini, R. P. McEver, E. C. Butcher, G. Borsellino, G. Constantin, *Blood* **2003**, 101, 4775.
- [8] 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.
- [9] K. Baumann, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 3494; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 3445.
- [10] H. C. Kolb, B. Ernst, *Chem. Eur. J.* **1997**, 3, 1571.
- [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] H. Kunz, C. Unverzagt, *J. Prakt. Chem.* **1992**, 334, 579; die All-glycosid-Schutzgruppe ist während der Synthese von **3** ebenso stabil wie die *tert*-Butyldiphenylsilyl-Schutzgruppe, wird aber im Stannylen-Verfahren^[13] nicht durch das zur Aktivierung verwendete Caesiumfluorid angegriffen.
- [13] S. David, S. Hanessian, *Tetrahedron* **1985**, 41, 643.
- [14] a) R. V. Hoffman, J. Tao, *Tetrahedron* **1997**, 53, 7119; b) R. Bänteli, B. Ernst, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 4059; c) B. Ernst, Z. Dragic, S. Marti, C. Müller, B. Wagner, W. Jahnke, J. L. Magnani, K. E. Norman, R. Oehrlein, T. Peters, H. C. Kolb, *Chimia* **2001**, 55, 266.
- [15] D. Baudry, M. Ephritikhine, H. Felkin, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1978**, 694.
- [16] a) J. J. Oltvoort, C. A. A. van Boeckel, J. H. de Koning, J. H. van Boom, *Synthesis* **1981**, 305; b) M. Imoto, H. Yoshimura, N. Sakaguchi, S. Kusumoto, T. Shiba, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 1545; c) S. Numomura, M. Iida, M. Numata, M. Sugimoto, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1994**, 263, C1.
- [17] a) R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem.* **1980**, 92, 763; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, 19, 731; b) R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 213; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 212.
- [18] a) B. Liebe, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 34, 8777; b) C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, 525; c) S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 7798; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7624; d) A. Kuhn, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 458; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 454.
- [19] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotou, P. Sotiriou, J. Wenqing, W. Schäfer, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 3943.
- [20] Rapp-Polymer, Tübingen, Deutschland.
- [21] B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 629; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 618.
- [22] **2a:** $[\alpha]_D^{23} = -28$ ($c = 0.86$, DMSO); Analyt. HPLC: $R_t = 16$ min (Jupiter-C 18, Gradient: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ [$+0.1\%$ TFA] 10:90 → 100:0 in 40 min, $\lambda = 214$ nm). $^1\text{H-NMR}$ [$^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, TOCSY] (400 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 7.21\text{--}7.11$ (m, 5H, $\text{H}_{\text{Ar}}\text{-Phe}$), 7.01, 6.96 (2 × d, 4H, $2 \times ^3J = 8.4$ Hz, $\text{H}_{\text{Ar-3,5}}\text{-Tyr}_1$, $\text{H}_{\text{Ar-3,5}}\text{-Tyr}_2$), 6.84 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},\text{H}_2} = 8.4$ Hz, NH-GalN), 6.62–6.59 (m, 4H, $\text{H}_{\text{Ar-2,6}}\text{-Tyr}_1$, $\text{H}_{\text{Ar-2,6}}\text{-Tyr}_2$), 4.80 (d, 1H, $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.2$ Hz, H1-Fuc), 4.71–4.63 (m, 2H, H1-GalN {4.70, d, $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.3$ Hz}, H5-Fuc {4.65}), 4.52–3.12 (m, Phe^a {4.52}, Leu^a {4.51}, Asp^a {4.51}, Asp₂^a {4.49}, Glu^a {4.48}, Glu₁^a {4.47}, Pro₁^a {4.42}, Thr^a {4.41}, Tyr^a {4.39}, H1-GlcN {4.37}, Tyr^a {4.34}, CHCOOH {4.32}, H1-Gal {4.28}, Leu₂^a {4.28}, H1-Gal' {4.19}, Pro₂^a {4.14}, H2-GalN {4.08}, Thr^b {4.05}, H6a-GalN {3.85}, H4-GalN {3.80}, H4-Gal {3.78}, H2-GlcN {3.66}, Pro₁^b, Pro₂^b, Pro₂^a, Pro₂^b {3.63–3.54, 3.46}, H3-GlcN {3.58}, H3-Gal' {3.58}, H3-GalN {3.56}, H3-Fuc {3.52}, H4-Fuc {3.45}, H6b-GalN {3.45}, H2-Gal {3.42}, H2-Fuc {3.37}, H2-Gal' {3.30}, H3-Gal {3.13}), 1.23–1.06 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{-Cyclo}$, Thr^a {1.07, d, $^3J_{\text{Thr}^a,\text{Thr}^b} = 5.9$ Hz}), 0.98 (d, 3H, $^3J_{\text{H}_6\text{abc},\text{H}_5} = 6.1$ Hz, H6a,b,c-Fuc), 0.90–0.78 ppm (m, 14H, $\text{CH}_2\text{-Cyclo}$ {0.89, 0.81}, Leu₁^b abc, Leu₂^b abc). $^{13}\text{C-NMR}$ [BB, HSQC] (100.6 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 176.57$ (CHCOOH), 174.47, 174.23 (Glu₁^b, Glu₂^b), 173.53 (COOH-Pro), 172.30, 172.05 (Asp^a, Asp₂^a), 26.30, 26.09, 25.87 ($\text{CH}_2\text{-Cyclo}$), 24.79, 24.57 (Pro₁^a, Pro₂^a), 24.28, 24.16 (Leu^a, Leu^b), 23.37, 23.28 (Leu₁^b, Leu₂^b, CH₃-Ac), 22.01, 21.73 (Leu₁^a, Leu₂^a), 18.81 (Thr^a), 16.62 ppm (C6-Fuc). HR-ESI-MS (positiv, + 0.1% TFA): $m/z = 1288.0548$ ($[M+1+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 1288.0570).
- [23] Wir danken Dr. K. L. Moore, University of Oklahoma, USA, für das Tyrosin-Sulfotransferase codierende Plasmid; a) Y. Ouyang, W. S. Lane, K. L. Moore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 2896.
- [24] RP-HPLC in MeCN/0.1N NH_4OAc (Gradient 5–15–50 in 30–40–45 min): $R_t = 4.1$ min. ESI-MS (positiv, + 0.1% TFA): $m/z = 1437.17$ ($[M+1+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 1435.91).
- [25] 122 mg Pyridin/SO₃ in Pyridin/DMF (2:1, 6 mL) werden bei 0 °C mit 50 mg **14b** versetzt. Nach 18 h Rühren bei Raumtemperatur wird mit 0.5 mL MeOH abgebrochen. Nach Entfernen der Lösungsmittel im Hochvakuum wird mit Na_2CO_3 -Lösung auf pH 6.5 eingestellt, 1 h gerührt und lyophilisiert. Die Reinigung erfolgt durch präparative RP-HPLC in MeCN/0.1N NH_4OAc (Gradient 5–35–50 in 100–120–140 min), $R_t = 66.5$ min; $[\alpha]_D^{23} = -52.8$ ($c = 0.11$, H_2O). Sulfatierung eines GlcNAc-GalNAc-Octapeptides: K. M. Koeller, M. E. B. Smith, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 742.
- [26] ESI-MS (positiv, + 0.1% TFA): $m/z = 1077.87$ ($[M+1+3\text{H}]^{3+}$, ber.: 1078.03).
- [27] a) M. Hahne, U. Jäger, S. Isenmann, R. Hallmann, D. Vestweber, *J. Cell Biol.* **1993**, 121, 655; b) Y. Helmus, S. Yakuena, P. Robinson, K. Lühn, D. L. Watson, P. J. McGrogan, D. Vestweber, T. Marquardt, M. K. Wild, *Blood* **2006**, 107, 3959.
- [28] L. Xia, V. Ramachandran, J. M. McDaniel, K. N. Nguyen, R. D. Cummings, R. P. McEver, *Blood* **2003**, 101, 552.