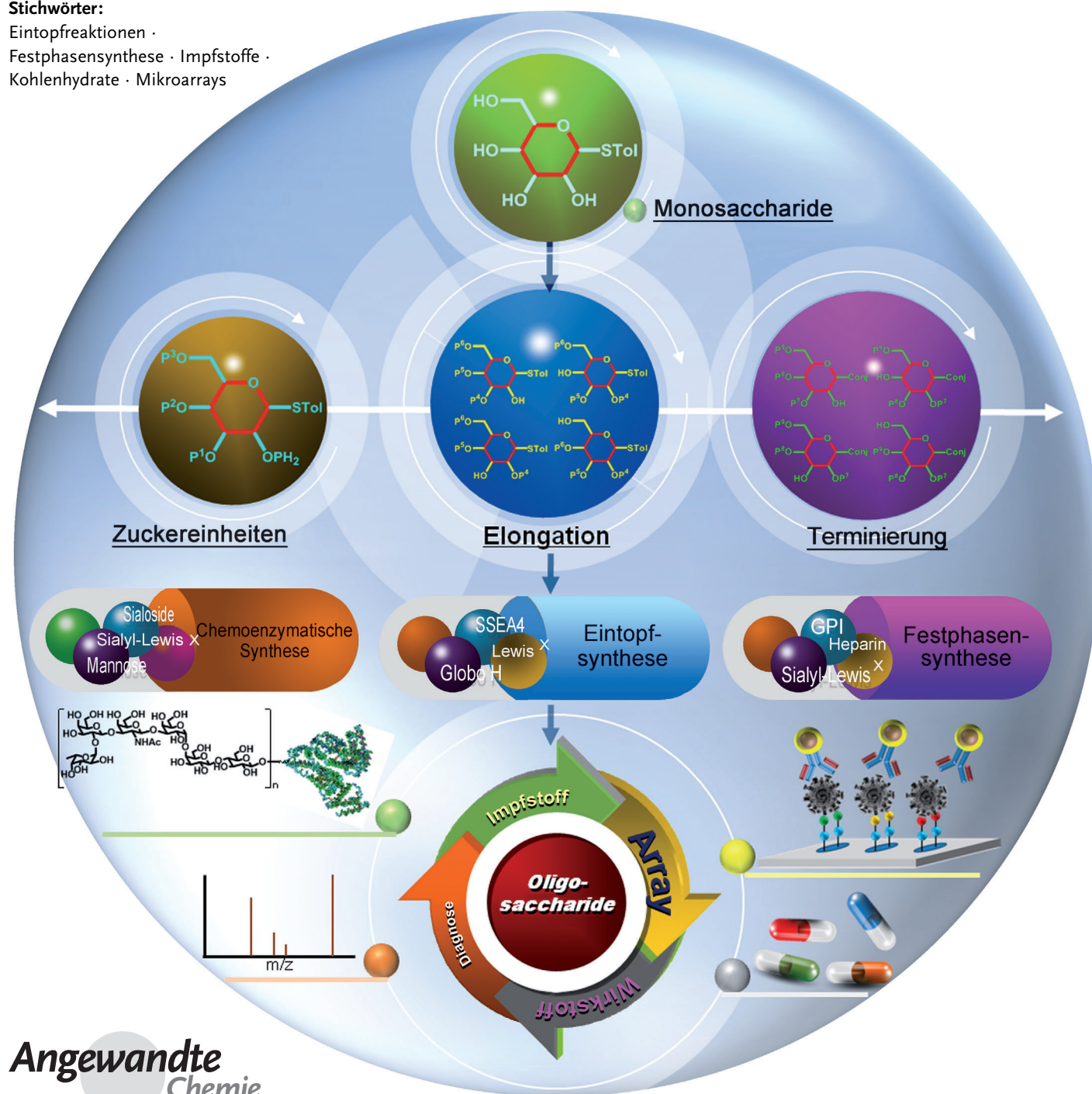


Auf dem Weg zur automatisierten Oligosaccharid-Synthese

Che-Hsiung Hsu, Shang-Cheng Hung,* Chung-Yi Wu* und Chi-Huey Wong*

Stichwörter:

Eintopfreaktionen ·
Festphasensynthese · Impfstoffe ·
Kohlenhydrate · Mikroarrays



Kohlenhydrate spielen eine wichtige Rolle bei biologischen Vorgängen. Das Fortschritts-tempo der Kohlenhydratforschung ist jedoch relativ langsam, was unter anderem mit der Komplexität der Kohlenhydratstrukturen und dem Fehlen allgemein anwendbarer Synthesemethoden und Verfahren zur Untersuchung dieser Klasse von Biomolekülen zusammenhängt. Jüngste Fortschritte in der Synthese haben ergeben, dass viele dieser Probleme umgangen werden können. In diesem Aufsatz beschreiben wir die Methoden, die entwickelt wurden, um mit den Herausforderungen kohlenhydratvermittelter biologischer Vorgänge umzugehen. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die Entwicklung der automatisierten Synthese von Oligosacchariden gerichtet. Darüber hinaus werden auch Kohlenhydrat-Mikroarrays und Impfstoffe auf Kohlenhydratbasis behandelt.

1. Einleitung

Außer den traditionell bekannten Funktionen als Energiequellen und strukturbildenden Polymere ist inzwischen gesichert, dass Kohlenhydrate als eine der drei großen Biopolymerklassen bei zahlreichen biologischen Vorgängen eine entscheidende Rolle spielen, darunter bei viralen und bakteriellen Infektionen, bei Angiogenese und Tumormetastasierung, Toxinwirkung, Entzündung und Immunantwort, Zellwachstum und Proliferation und vielen Arten der Zell-Zell-Kommunikation.^[1] Im Vergleich zu Proteinen und Nucleinsäuren sind die natürlich vorkommenden Oligo- und Polysaccharide, Glycoproteine, Glycolipide und glycosylierten Antibiotika und Naturstoffe strukturell divers und komplex und können die erforderliche Information für spezifische molekulare Erkennungen tragen. Die Information, die in diese Strukturen eingebettet ist, insbesondere bei posttranslationaler Modifikation von Proteinen, hat großes Interesse hervorgerufen und das sich entwickelnde Feld der Glycomics beflügelt.^[2] Alle Untersuchungen der biologischen Funktionen und der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR; structure-activity relationship) sind auf homogenes Material mit genau definierter Kohlenhydratstruktur angewiesen. Die komplexen Kohlenhydrate, die meistens in mikroheterogener Form vorliegen, können nicht leicht in der erforderlichen Reinheit und Menge aus natürlichen Quellen isoliert werden. Daher wurden erhebliche Anstrengungen darauf gerichtet, chemische und enzymatische Methoden zur Synthese strukturell genau definierter Kohlenhydrate und Konjugate zu entwickeln.^[3]

Von den Methoden, die für die Synthese der drei Hauptbiopolymere verfügbar sind, sind diejenigen für die Herstellung von Kohlenhydraten schwieriger und komplexer als die für Peptide/Proteine und Nucleotide/DNA und RNA. Nucleinsäuren können mit chemischen und biologischen Verfahren mithilfe der Polymerasekettenreaktion synthetisiert werden, und Proteinsequenzen lassen sich mit rekombinanten DNA-Techniken leicht bestimmen, herstellen und verändern. Da bei den sequenziellen Kupplungsschritten für die Knüpfung von Amid- oder Phosphodiesterbindungen keine Probleme in Bezug auf Regio- und Stereochemie auf-

treten, lässt sich die Synthese für diese linearen Polymere (Polynucleotide und Polypeptide) automatisieren, indem man eine einzelne Schutzgruppen iterativ anwendet. Saccharide dagegen werden durch die stereospezifische Bindung von Monomeren aufgebaut, sind oft verzweigt und werden mit einer diversen Sammlung von Enzymen hergestellt. Es gibt somit keinen Informationsträger, der für eine spezielle Saccharidsequenz codieren würde.^[4] Mit zwei zentralen Herausforderungen, nämlich der regioselektiven Bindung und Abspaltung von Schutzgruppen an Polyhydroxygruppen und

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	12077
2. Regioselektive Schützungen von Monosacchariden	12078
3. Programmierbare Eintopf-Oligosaccharidsynthese	12083
4. Automatisierte Festphasen-Oligosaccharidsynthese	12097
5. Effiziente Strategien zur Beschleunigung der enzymatischen Oligosaccharidsynthese	12101
6. Die Anwendung von Glycanmikroarrays zur Untersuchung menschlicher Krankheiten	12107
7. Nutzung synthetischer Kohlenhydrate für die Impfstoffentwicklung	12111
8. Zusammenfassung und Ausblick	12120

[*] C.-H. Hsu, Prof. S.-C. Hung, Prof. C.-Y. Wu, Prof. C.-H. Wong
The Genomics Research Center, Academia Sinica, Taiwan
128 Academia Road, Section 2, Nankang, Taipei 115 (Taiwan)
E-Mail: schung@gate.sinica.edu.tw
cyiwu@gate.sinica.edu.tw
chwong@gate.sinica.edu.tw

Prof. C.-H. Wong
Department of Chemistry, The Scripps Research Institute
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)
E-Mail: wong@scripps.edu

C.-H. Hsu
Chemical Biology and Molecular Biophysics
Taiwan International Graduate Program, Academia Sinica (Taiwan)
C.-H. Hsu
Institute of Bioinformatics and Structural Biology
National Tsing-Hua University, Hsin-Chu (Taiwan)

der stereoselektiven Knüpfung von Glycosidbindungen, sieht man sich bei der Kohlenhydratsynthese häufig konfrontiert, vor allem, wenn man als letztendliches Ziel die Entwicklung einer automatisierten Methode verfolgt. Obwohl bereits schrittweise Festphasensynthesen von Oligosacchariden entwickelt wurden, ist die Komplexität der Schutzgruppenstrategie noch immer eine große Herausforderung. Andererseits ist eine automatisierte Oligosaccharidsynthese durch die Verfügbarkeit, Spezifität und Stabilität von Enzymen eingeschränkt. Daher wurde eine Strategie entwickelt, die eine regioselektive Eintopfschätzung mit einer automatisierten und programmierbaren Glycosylierung verbindet und so einige dieser Probleme umgeht (Abbildung 1). In diesem Aufsatz konzentrieren wir uns auf aktuelle Fortschritte bei der regioselektiven Schätzung von Monosacchariden und der automatisierten und programmierbaren chemischen und enzymkatalysierten Glycosylierung für den schnellen Zugang zu komplexen Oligosacchariden sowie auf die Anwendung dieser Methoden zur Entwicklung von Mikroarrays und Impfstoffen.

2. Regioselektive Schätzung von Monosacchariden

Der Entwurf einer Schutzgruppenstrategie ist ein kritischer Schritt zu Beginn jeder Zuckersynthese. Ein häufiges Problem betrifft die regioselektive Einführung eines orthogonalen Satzes von Schutzgruppen in die Saccharidbausteine, um einerseits die größtmögliche Flexibilität zu erhalten und andererseits die übrigen Bausteine nicht zu beeinträchtigen.

Zu beachten ist, dass die Schutzgruppen eine Reihe von Eigenschaften beeinflussen können, nämlich 1) die Reaktivität von Glycosyldonoren und -akzeptoren, 2) die Stereoselektivität der Knüpfung einer Glycosidbindung und 3) die Effizienz der abschließenden Entschätzung. Da es bereits mehrere Veröffentlichungen zu diesen Themen gibt,^[5] konzentrieren wir uns in diesem Aufsatz auf neue regioselektive Schutzgruppenstrategien aus den letzten Jahren.

2.1. Schrittweise Schätzung

Die Differenzierung aller Hydroxygruppen eines Zuckermoleküls ist eine schwierige Aufgabe. Der Entwurf von Monosaccharidbausteinen mit einer effizienten orthogonalen Schutz- und Entschätzungsstrategie zum Aufbau von Oligosaccharidbibliotheken wurde schon früher beschrieben (Schema 1).^[6] So ergab beispielsweise die regioselektive Silylierung des Thiogalactopyranosids **1** mit *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (TBDPSCI) und Imidazol das 2,3,4-Triol **2** (100 %), in das regioselektiv eine *p*-Methoxybenzyl(PMB)-Gruppe an der 3-O-Position durch Zinnether-vermittelte Benzilylierung eingeführt wurde. In zwei Schritten entstand so das 2,4-Diol **3** in 49 % Ausbeute. Die 2-*O*-Chloracetylierung von **3** ergab das gewünschte acylierte Produkt **4** (52 %) mit guter Regioselektivität. Durch Behandlung des 4-Alkohols **4** mit Lävulinsäure, Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 4-(*N,N*-Dimethylamino)pyridin (DMAP) entstand der vollständig geschützte Glycosyldonor **5** (83 %), der mit Methyl-6-hydroxyhexanoat zum β -verknüpften Derivat **6** mit 85 %



Chi-Huey Wong ist Präsident der Academia Sinica und Professor für Chemie am Scripps Research Institute. Seine Forschungen gelten der bioorganischen und Synthesechemie, insbesondere der Entwicklung chemischer Synthesen auf der Basis enzymatischer und chemoenzymatischer Reaktionen, der Synthese komplexer Kohlenhydrate, Glycoproteine und niedermolekularer Sonden zur Untersuchung kohlenhydratvermittelter biologischer Erkennungsprozesse, der Entwicklung von Kohlenhydrat-Mikroarrays für Hochdurchsatz-Analysen der Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung und der Wirkstoffsuche.



Chung-Yi Wu promovierte im Jahr 2000 an der National Chiao-Tung University, Taiwan. Nach einem Postdoktorat bei Prof. Chi-Huey Wong am Institute of Chemistry der Academia Sinica und am Scripps Research Institute schloss er sich 2006 als Assistant Research Fellow dem Genomics Research Center der Academia Sinica an. Seine Forschungen gelten der Entwicklung von Glycanarrays und kohlenhydratbasierten Impfstoffen.



Shang-Chen Hung promovierte 1992 an der National Tsing Hua University, Taiwan. Nach Postdoktoraten bei Prof. Andrew Streitwieser an der University of California in Berkeley und bei Prof. Chi-Huey Wong am Scripps Research Institute begann er 1998 seine unabhängige Laufbahn am Institute of Chemistry der Academia Sinica, bevor er 2005 an das Department of Chemistry der National Tsing Hua University wechselte. Seine Forschungen gelten der Kohlenhydratchemie und chemischen Biologie, einschließlich der Entwicklung regioselektiver Eintopfsreaktionen zur Schutzgruppeneinführung sowie der Synthese von Heparin-Oligosacchariden und Zellhüllkomponenten von Mycobakterien.



Che-Hsiung Hsu studierte Chemical Engineering an der Cheng Kung University (BSc 2002) sowie Strukturbiochemie an der National Tsing Hua University (MSc 2005) und ist seit 2006 Doktorand an der Academia Sinica in Taipei bei Prof. Chi-Huey Wong. In seiner Doktorarbeit befasst er sich mit der Entwicklung synthetischer Sialosidmikroarrays zur Untersuchung glycanbindender Proteine.

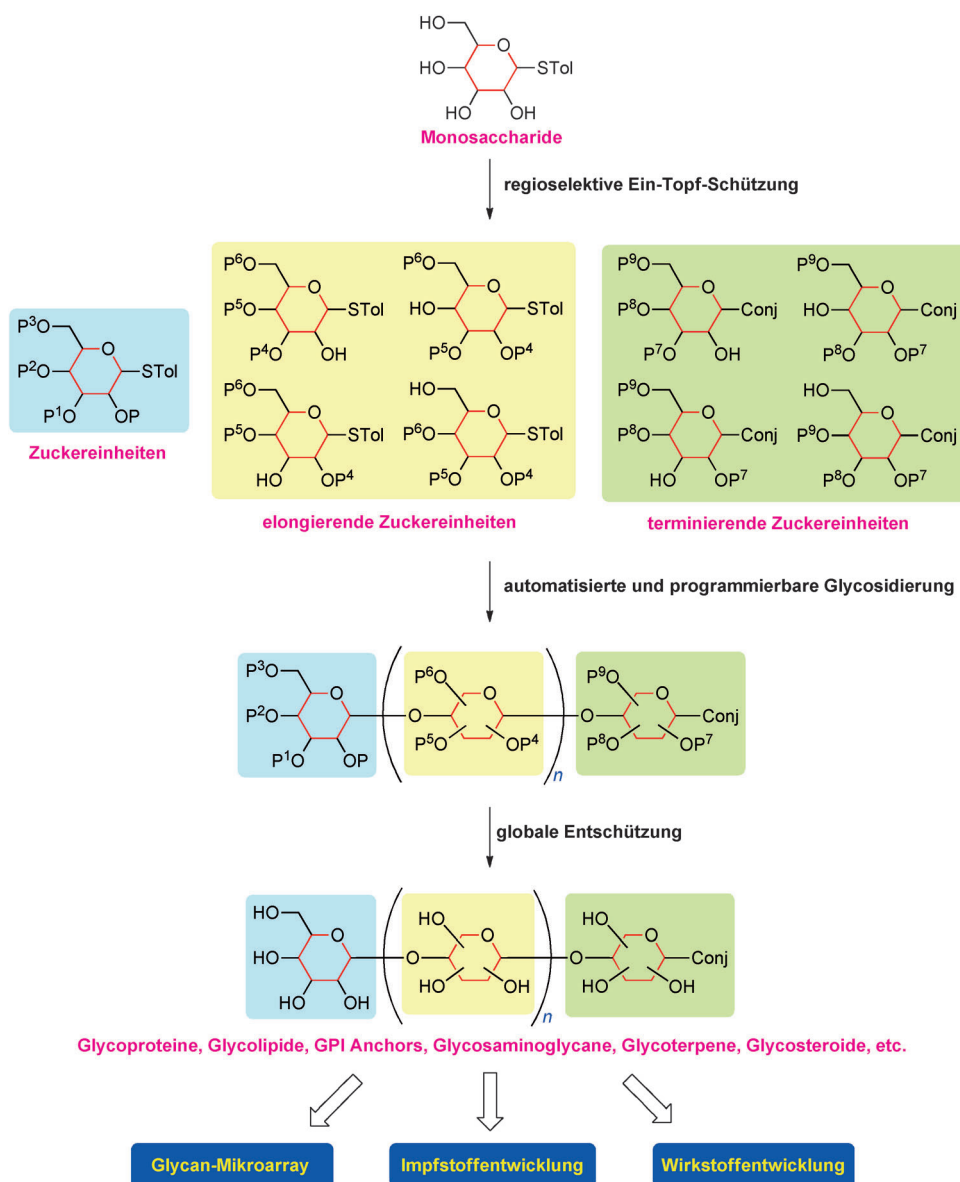
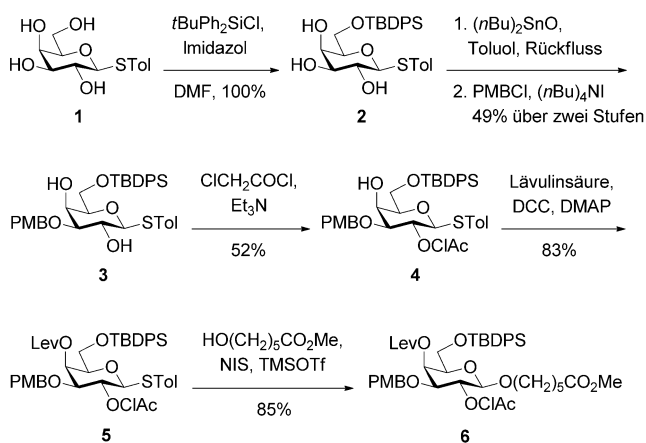


Abbildung 1. Ein geradliniger Weg für die Synthese von Kohlenhydraten durch eine Kombination aus regio-selektiver Eintopf-Schutzung und automatisierter und programmierbarer Glycosylierung zur Anwendung für den Aufbau von Glycanmikroarrays sowie für die Impfstoff- und Wirkstoffentwicklung.

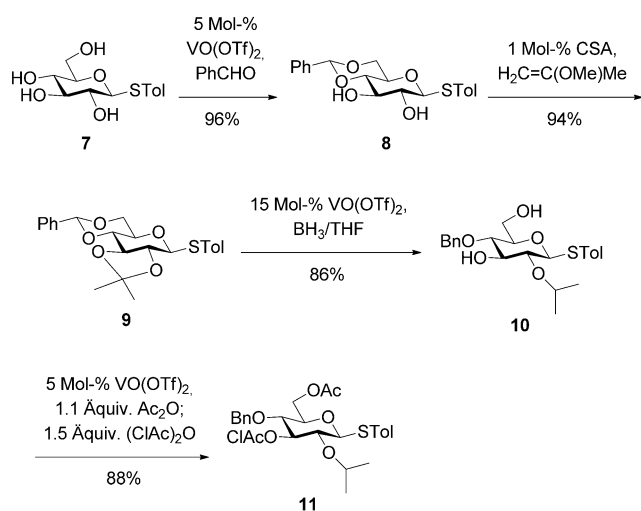


Schema 1.

Ausbeute gekuppelt wurde. Verbindung **6** konnte regioselektiv von den orthogonalen Schutzgruppen durch verschiedene Reaktionsbedingungen befreit werden, um die benötigten freien Hydroxygruppen für den Aufbau der Oligosaccharidbibliothek zu erhalten.

Chen et al.^[7] beschrieben die direkte 4,6-*O*-Benzylidenacetalbildung aus dem Tetraol **7** mit Benzaldehyd durch wassertolerantes und rückgewinnbares VO(OTf)₂ bei Raumtemperatur zum 2,3-Diol **8** in ausgezeichneter Ausbeute (96 %) (Schema 2). Die Reaktionsbedingungen lassen sich bei zahlreichen Zuckersubstraten anwenden. Die Ketalisierung des Alkohols **8** mit 2-Methoxypropen in Gegenwart von 1 % Camphersulfonsäure (CSA) ergab das 2,3-*O*-Isopropylidenderivat **9** (94 %), das sich durch VO(OTf)₂-katalysierte regioselektive reduktive Ringöffnung des Benzylidenacetals und des Isopropylidenketals mit Boran zum 3,6-Diol **10** (94 %) umsetzen ließ. Der gleiche Katalysator wurde für die regioselektive Acylierung von Verbindung **10** mit verschiedenen Säureanhydriden eingesetzt; der entsprechende Ester **11** wurde mit 88 % Ausbeute in einer Eintopfreaktion erhalten. So gelingt es, das Thioglycosid **7** regioselektiv mit Isopropyl-, Chloracetyl-, Benzyl- und Acetylgruppen an den Positionen 2-O, 3-O, 4-O und 6-O zu schützen.

Viele neue Methoden wurden entwickelt, um eine oder mehrere Schutzgruppen selektiv an einem Monosaccharid zur Weiterverwendung einzuführen. Dazu gehören z.B. die organokatalytische 4-*O*-Acylierung von *n*-Octyl-β-D-glucopyranosid,^[8] die Me₂SnCl₂-katalysierte regioselektive Benzoylierung von Methyl-α-D-glucopyranosid,^[9] die Iridium-katalysierte regioselektive Trisilylierung von Methyl-α-glycosiden,^[10] die selektive Tandem-Chlorierung/*O*-Formylierung von Zuckern mit dem Vilsmeier-Reagens^[11] und die Tandem-Acetalisierung/Acetylierung von Zuckern zur simultanen Einführung von Isopropyliden- und Acetylgruppen unter lösmittelfreien Bedingungen.^[12]

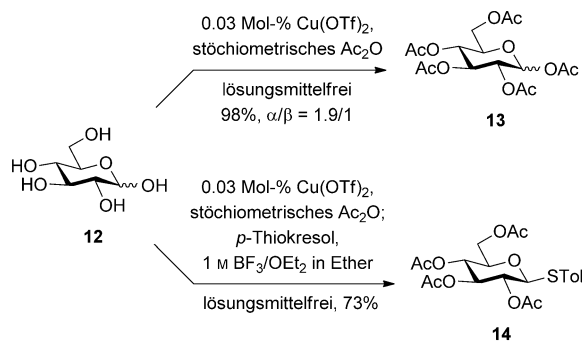


Scheme 2.

2.2. Eintopfschätzung

2.2.1. Anomere Per-O-acetylierung

Die Per-O-acetylierung von Zuckern ist eine grundlegende Reaktion zur Herstellung von Zuckersynthons. Meist werden große Mengen an Acetanhydrid und Pyridin für diese Reaktion eingesetzt. Im Sinne einer ressourcenschonenden Chemie wurde eine alternative Methode entwickelt, bei der nur 0.03 Mol-% $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ als Katalysator mit stöchiometrischen Mengen Acetanhydrid unter lösungsmittelfreien Bedingungen für die Per-O-acetylierung von D-Glucose **12** zum Pyranosylpentaacetat **13** (98%, $\alpha/\beta = 1.9/1$) eingesetzt

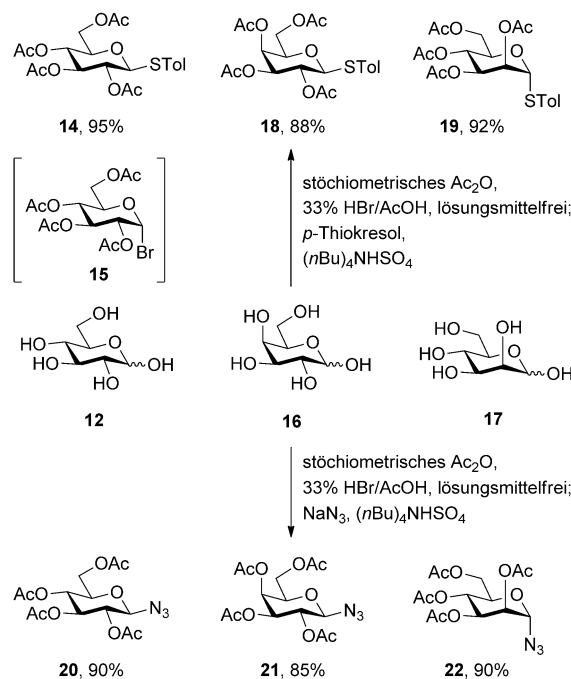


Scheme 3.

wurden (Schema 3).^[13] Diese Lewis-Säure-aktivierte Veresterung ist für eine Reihe von Hexosen geeignet, und die entsprechenden Derivate entstehen in ausgezeichneten Ausbeuten. Anders als bei der konventionellen Per-O-acetylierung, die einen großen Überschuss an Ac_2O und eine anschließende Neutralisierung mit umfangreicher Aufarbeitung und Reinigung erfordert, wird in dieser Methode nur eine stöchiometrische Menge an Ac_2O eingesetzt, um die lösungsmittelfreie sequenzielle Per-O-acetylierung und anomere Substitution von Hexosen als Eintopfreaktion durch-

zuführen. Wenn bei der Per-O-acetylierung von D-Glucose **12** (oder anderen Hexosen) nacheinander *p*-Thiokresol und 1 M BF_3/OEt_2 in Ether zur Reaktionslösung bei Raumtemperatur ohne zusätzliches Lösungsmittel zugegeben wurden, erhielt man das gewünschte Thioglycosid **14** in 73 % Ausbeute.

Eine allgemeine Vorschrift für eine Eintopfsynthese von Thioglycosiden und Glycosylaziden direkt aus ungeschützten reduzierenden Zuckern unter Phasentransferbedingungen beginnt mit der Umsetzung von D-Glucose **12** mit einer stöchiometrischen Menge Ac_2O und 33 % HBr in AcOH, gefolgt von der Zugabe von *p*-Thiokresol und $(n\text{Bu})_4\text{NHSO}_4$; es entsteht das Thioglycosid **14** in 95 % Ausbeute (Schema 4).^[14a] Die Reaktion verläuft über α -Glycosylbromid **15** als Zwischenprodukt, das nach nucleophilem Angriff von *p*-

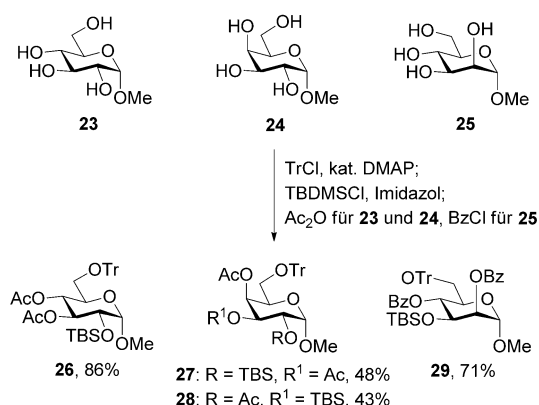


Scheme 4.

Thiokresol das β -anomere Produkt ergibt. Anwendungen dieser Reaktionsbedingungen auf D-Galactose **16** und D-Mannose **17** ergab das entsprechende β -Thiogalactosid **18** (88 %) bzw. α -Thiomannosid **19** (92 %). Um die Auswahl an Nucleophilen zu erweitern, wurde *p*-Thiokresol durch Natriumazid ersetzt; die entsprechenden 2,3,4,6-tetra-O-acetylierten Glycosylazide **20–22** entstanden in 90 %, 85 % und 90 % Ausbeute. Ein ähnlicher Syntheseweg zur Eintopfsynthese von Thioglycosiden aus den entsprechenden Hexosen über die Glycosyliodide als Zwischenprodukte wurde auch von Field und Mitarbeitern veröffentlicht.^[14b]

2.2.2. Eintopf-Tritylierung-Silylierung-Acylierung

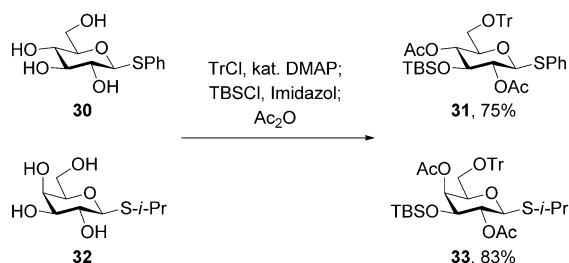
Eine Eintopfreaktion zur kombinierten Tritylierung, Silylierung und Acylierung von Glycosiden wurde durch eine DMAP-katalysierte 6-O-Tritylierung von D-Glucopyranosid **23** mit Tritylchlorid, anschließende regioselektive 2-O-Sily-



Schema 5.

lierung und dann 3,4-Diacetylierung zum vollständig geschützten Derivat **26** (86 %) realisiert (Schema 5).^[15] Setzt man allerdings Methyl-D-galactopyranosid **24** nach einer ähnlichen Schutzgruppenstrategie um, erhält man zwei Produkte **27** (48 %) und **28** (43 %), verursacht durch die geringe Regioselektivität an 2-O und 3-O während des Silylierungsschritts. Im Falle von Methyl-D-mannopyranosid **25** wird bei der regioselektiven Silylierung die weniger gehinderte 3-O-Position bevorzugt, und das 2,4-Dibenzoat **29** entsteht mit 71 % Ausbeute.

Im Vergleich zu den α -Methylglycosiden **23** und **24** ergab die dreistufige Eintopfreaktion mit den β -Thioglycosiden **30** und **32** (Schema 6)^[15] ein völlig anderes Ergebnis. In diesem Fall wurde in einem stark regioselektiven Verlauf nach An-

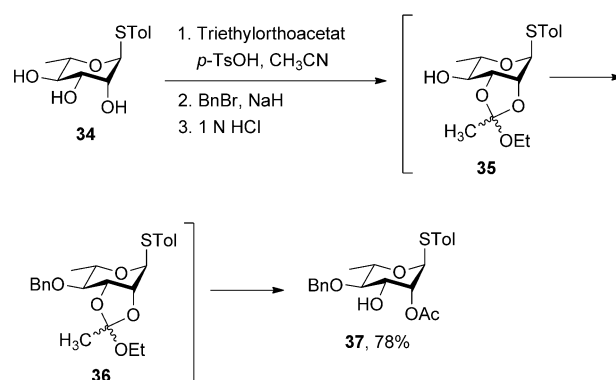


Schema 6.

bringen der Tritylgruppe an 6-O die 3-O-Silylierung bevorzugt, und die 2,4-Diacetate **31** und **33** fielen in Ausbeuten von 75 % bzw. 83 % an.

2.2.3. Eintopf-Orthoveresterung-Benzylierung-Orthoesterumlagerung

Eine einfache Eintopfreaktion wurde entwickelt, um teilgeschützte Mono- und Disaccharidbausteine durch Orthoveresterung, Benzylierung und Orthoesterumlagerung zu synthetisieren.^[16] Wie in Schema 7 dargestellt, wurde das L-Rhamnopyranosid **34** zuerst mit Triethylorthoacetat in Gegenwart von *p*-TsOH als Katalysator zum 4-Hydroxy-Zwischenprodukt **35** umgesetzt, aus dem durch Benzylierung das



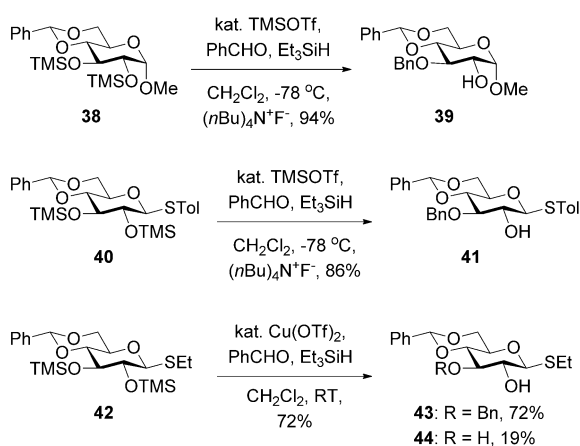
Schema 7.

voll geschützte Intermediat **36** entstand. Ohne die Reaktion zu beeinträchtigen, wurde 1N HCl im gleichen Gefäß zugegeben und der Orthoester durchlief eine Umlagerung zum 3-OH-Derivat **37** mit 78 % Ausbeute. Dieses dreistufige Protokoll ist besonders für Zucker geeignet, die eine *cis*-Dihydroxygruppierung enthalten, wie D-Mannopyranosid, D-Galactopyranosid, L-Fucopyranosid und Lactosylderivate.

2.2.4. Kombinatorische und regioselektive Eintopfgeschützungen

Die Herstellung voll geschützter Hexopyranoside mit einer freien Hydroxygruppe an C2, C3, C4 oder C6 aus einem Hexapyranosyl-2,3,4,6-tetraol als Ausgangsverbindung ist oft mit einer Reihe von Nachteilen verbunden: 1) entkoppelte und mehrstufige (vier bis sechs Stufen) Schützungs- und Entschützungssequenz für jede einzelne Verbindung, 2) mühsame Aufarbeitung nach jedem präparativen Schritt, 3) zeitaufwändige Reinigungsprozesse zur Trennung der Regioisomere und 4) niedrige Produktausbeuten bei schlechter Regioselektivität. Eine neue Idee ist, diese Punkte in einem kombinatorischen, regioselektiven und sequenziellen Eintopfverfahren anzugehen und dabei die 2-, 3-, 4- und 6-Hydroxygruppe eines Hexopyranosids mit einem anomeren α -OMe oder β -STol einzeln zu schützen. Eine solche Methode wäre von enormer Bedeutung, um den Syntheseprozess insgesamt zu beschleunigen und die Laborarbeit, die mit der Saccharidpräparation verbunden ist, zu verringern.

Um dieses Konzept zu testen, wurde zunächst die Differenzierung zwischen zwei äquatorialen Hydroxygruppen an den Positionen 2-C und 3-C von Glycosiden untersucht, weil die Hydroxygruppen an 4-C und 6-C leicht als Benzylidenacetal blockiert werden können (Schema 8). Eine TMSOTf-katalysierte, hoch regioselektive Et₃SiH-reduktive 3-O-Benzylierung der Bis(TMS)-Ether **38** und **40** mit Benzaldehyd bei -78 °C ergab die 2-Hydroxyderivate **39** (94 %) und **41** (86 %).^[17] Die katalytischen Eigenschaften verschiedener Lewis-Säuren wurden am Thioglucosid **42** untersucht, und die entsprechenden 2-Hydroxyzucker **43** (72 %) zusammen mit dem TMS-hydrolysierten 2,3-Diol **44** (19 %) wurden einzeln nach Katalyse mit Cu(OTf)₂ isoliert.^[18] Die aus diesen Experimenten gewonnenen Informationen wurden zusammengefasst, und TMSOTf wurde für weitere Untersuchungen einer regioselektiven Eintopf-Schutzstrategie ausgewählt.

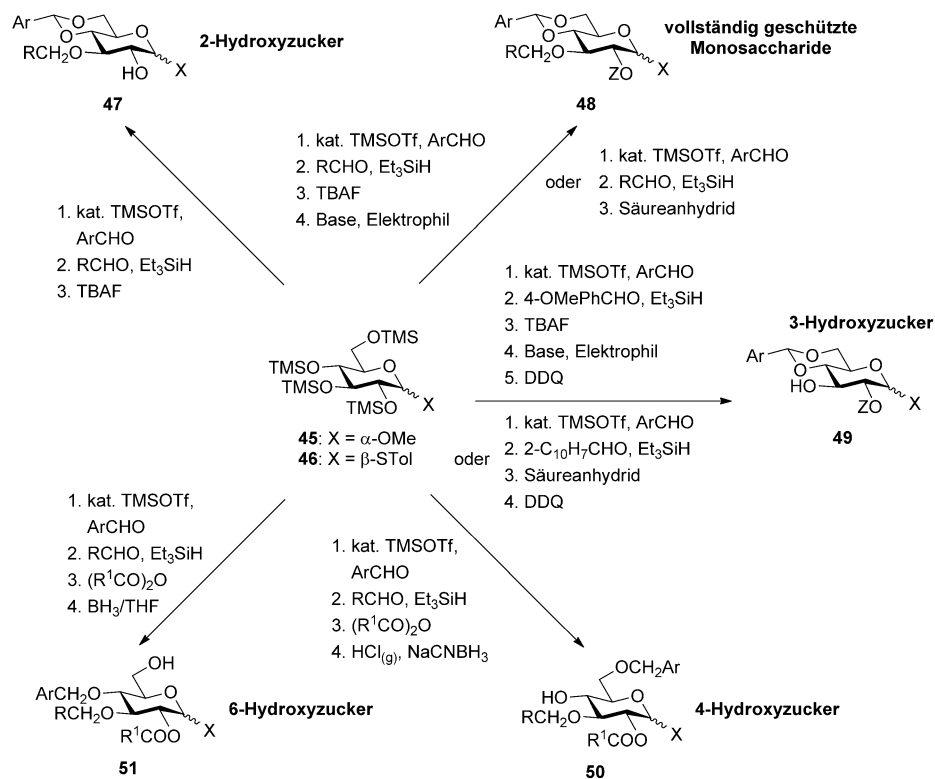


Scheme 8.

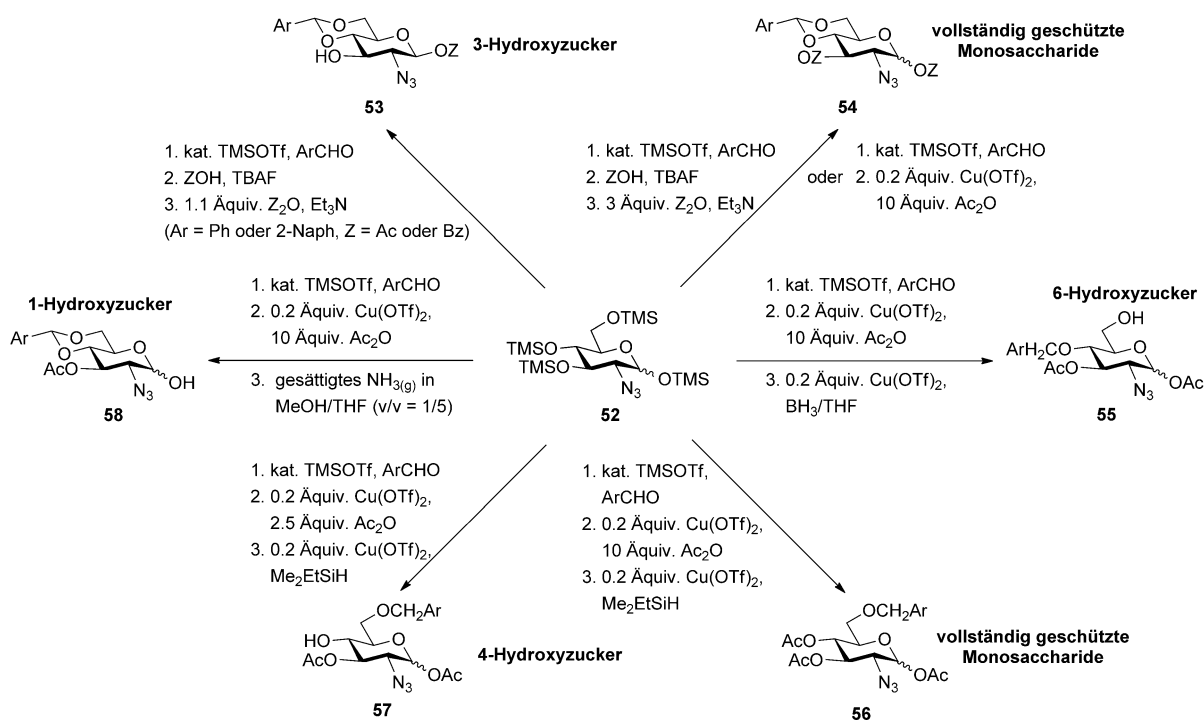
Die allgemeinen Vorschriften, die aus den obigen Experimenten abgeleitet wurden, beinhalten: 1) die selektive Schützung von 4-O und 6-O als Arylidenacetal, gefolgt von einer regioselektiven reduktiven Arylmethylierung am 3-O zum 2-Hydroxyzucker; 2) 4,6-*O*-Arylidenierung, 3-*O*-Arylmethylierung und anschließende Veretherung oder Acylierung am 2-O zum vollständig geschützten Monosaccharid; 3) 4,6-*O*-Arylidenierung, vorübergehende Derivatisierung von 3-O mit PMB oder 2-NAP, Veretherung oder Acylierung von 2-O und abschließende Abspaltung der PMB- oder 2-NAP-Gruppe zu 3-Hydroxyzuckern; und 4) 4,6-*O*-Arylidenierung, 3-*O*-Arylmethylierung, 2-*O*-Acylierung, eine regioselektive Ringöffnung der Arylidenacetale am 4-O und 6-O, um die 4- bzw. 6-Hydroxyzucker zu erhalten.^[19] Wie in Schema 9 zusammengefasst ist, wurde ausgehend von den 2,3,4,6-tetra-*O*-trimethylsilylierten Glucosiden **45** oder **46** zunächst TMSOTf-katalysiert das 4,6-*O*-Arylidenacetal gebildet. Die Et₃SiH-reduktive 3-*O*-Arylmethylierung mit dem gleichen oder einem anderen Arylaldehyd (RCHO) ergibt eine Bibliothek von 2-Hydroxyzuckern **47**, nachdem mit einer stöchiometrischen Menge von TBAF die 2-*O*-TMS-Gruppe entfernt wurde. In einer anderen Versuchsreihe wurden die ersten drei Schritte wiederholt, und geeignete Elektrophile wurden unter basischen Bedingungen zugegeben, worauf die vollständig geschützten Glycoside **48** einschließlich der Einführung von Benzyl-, Allyl- oder Acylgruppen (Z) in Position 2-O entstanden. Weil TMSOTf auch als Katalysator für Acylierungsreak-

tionen eingesetzt werden kann, ergab die Zugabe von verschiedenen Säureanhydriden zu dem 2-OTMS-Zwischenprodukt, das nach den ersten beiden Schritten gebildet wurde, die voll geschützten Monosaccharide **48**. Für die Synthese der 3-Hydroxyzucker **49** wurden PMB und 2-NAP als temporäre Schutzgruppen für Position 3-O vorgesehen. Das gleiche Verfahren wurde wiederholt, um die voll geschützten Glucoside **48** herzustellen; schließlich wurde ins gleiche Gefäß noch DDQ gegeben, um die gewünschten Produkte **49** zu erhalten. Die voll geschützten Glycoside **48**, die durch Tandem-4,6-Arylidenierung, 3-*O*-Arylmethylierung und saure 2-*O*-Acylierung von **45** und **46** erzeugt wurden, konnten auch zur Synthese der 4-Hydroxyzucker **50** und 6-Hydroxyzucker **51** verwendet werden. Die regioselektive Ringöffnung von Arylidenacetale am 4-O und 6-O im gleichen Reaktionsgefäß mit HCl_(g)/NaBH₃CN und BH₃/THF^[20] als Reduktionsmittel ergaben die erwarteten Verbindungen **50** und **51**. So lassen sich die einfachen per-*O*-trimethylsilylierten Pyranoside mit anomerem α-OMe (**45**) und β-STol (**46**) effizient in Hunderte von Bausteinen mit unterschiedlichen Schutzgruppen einführen.

D-Glucosamin und seine *N*-acetylierten und *N*-sulfonylierten Derivate finden sich in zahlreichen biologisch wirksamen Molekülen wie den Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-Ankern an der Zelloberfläche, Glycosphingolipiden (Lewis a/x), *N*-Glycoproteinen, Proteoglycanen (Heparansulfat und Heparin), Hyaluronsäure, Blutgruppen-Antigenen, Lipopolysacchariden, Chitin/Chitosan sowie an bakteriellen Zellwänden. Hier wurde die oben beschriebene regioselektive Eintopf-Schutzstrategie fortgesetzt, indem der anomersich



Scheme 9.



Schema 10.

unfixierte, von D-Glucosamin abgeleitete TMS-Ether **52** eingesetzt wurde, um eine Serie von Synthons zu synthetisieren, darunter die vollständig geschützten Monosaccharide und die 1-, 3-, 4- und 6-Hydroxyverbindungen. Die Azidogruppe wurde ausgewählt, um die 2-C-Position des Glucosamins zu maskieren, da diese nicht nur verwendet werden kann, um die α - oder β -glycosidische Bindung zu kontrollieren, sondern auch in das N-Acetylderivat oder die Verbindung mit freier Aminogruppe überführbar ist. Wie in Schema 10 gezeigt,^[21] wurde die 3-Hydroxyverbindung **53** hergestellt, indem der TMS-Ether **52** TMSOTf-katalysiert 4,6-O-benzilydiert wurde, gefolgt von der Entfernung der TMS-Gruppen mit TBAF und einer regioselektiven 1-O-Acylierung^[22] mit Et₃N und 1.1 Äquiv. Säureanhydrid. Steigerte man den Anteil der Säureanhydride bis auf 3 Äquiv., erhielt man die 1,3-di-O-acylierten Produkte **54** in guten Ausbeuten. Ohne die TMS-Gruppen im zweiten Schritt abzuspalten, wurden die 4,6-O-Benzylidenacetal-Zwischenprodukte direkt diacetyliert, indem man 20 Mol-% Cu(OTf)₂ und 10 Äquiv. Ac₂O zugab, wobei das voll geschützte Monosaccharid **54** entstand. Im gleichen Gefäß kann in den Diacetaten der Ring des Benzylidenacetals mit BH₃ und Me₂EtSiH reduktiv zu 6-Hydroxyzuckern **55** und 4-Hydroxyzuckern **57** geöffnet werden. Bei der 4-O-Ringspaltung bestimmt die Menge an Ac₂O, die im zweiten Schritt eingesetzt wird, die erhaltenen Produkte. Die 4-Hydroxyverbindungen **57** erhielt man mit 2.5 Äquiv. Ac₂O, während mit 10 Äquiv. überwiegend das 4-O-acetylierte Produkt **56** entstand. Die gleiche zweistufige Umsetzung wurde mit **52** vorgenommen, und das zwischenzeitlich entstehende Diacetat wurde mit gesättigtem NH_{3(g)} in MeOH/THF zur gewünschten 1-Hydroxy-Verbindung **58** in einer Eintopfreaktion umgewandelt. So kann der einfache Tetra-

TMS-Ether **52** mit diesem regioselektiven Eintopf-Schutzgruppenprotokoll effizient in verschiedene Synthone umgesetzt werden, die chemisch unterscheidbare Schutzgruppen enthalten.

3. Programmierbare Eintopf-Oligosaccharidsynthese

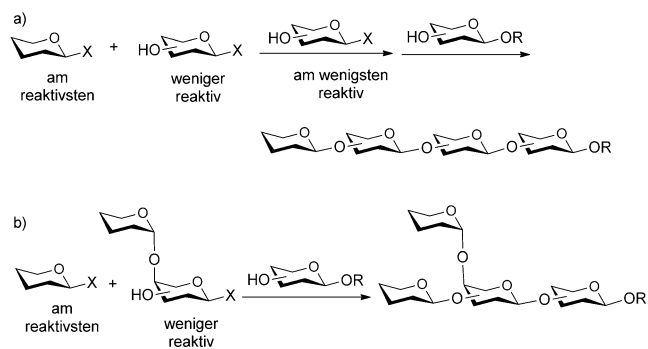
3.1. Eintopf-Glycosylierung

Die aktuellen Fortschritte bei der Kohlenhydratsynthese haben den Arbeitsaufwand zur Herstellung von Glycanen deutlich verringert. Zu diesen Fortschritten gehört die Entwicklung der Eintopf-Glycosylierung, bei der die Oligosaccharide ohne Isolierung oder Reinigung von Zwischenprodukten synthetisiert werden. Dabei werden drei allgemeine Strategien verfolgt: 1) die chemoselektive Strategie,^[23] bei der der reaktivere Donor selektiv aktiviert wird und mit dem weniger reaktiven Donor zu einem neuen Glycosid umgesetzt wird, das dann mit dem am wenigsten reaktiven Donor reagiert; 2) die Präaktivierungsstrategie,^[24] hier wird der Donor nur aktiviert, um ein Zwischenprodukt zu erzeugen, das dann mit dem zweiten Donor gekuppelt wird, der ein identisches Aglycon am reduzierenden Ende trägt; 3) die orthogonale Strategie,^[25] bei der die Abgangsgruppe des einen Donors gegenüber einer anderen selektiv aktiviert wird. Es gibt mehrere ausgezeichnete aktuelle Übersichtsartikel, in denen die Eintopf-Glycosylierungsmethoden beschrieben werden.^[26] In diesem Teil des Aufsatzes konzentrieren wir uns auf programmierbare Eintopf-Oligosaccharidsynthesen auf der Basis chemoselektiver Strategien, da diese das Potential zu einem automatisierten Prozess haben.

3.2. Strategien und relative Reaktivitätswerte (RRVs)

Für Kohlenhydratchemiker ist der Umgang mit Schutzgruppen schwierig, wenn sie ein Oligosaccharid aus mehreren Monosaccharideinheiten synthetisieren wollen. Andererseits kann die Reaktivität von Glycosyldonor und -akzeptor auch durch die Schutzgruppenstrategie differenziert werden, die dann zu einer chemoselektiven Glycosylierung führt, bei der nur der reaktivere Glycosyldonor in Gegenwart des weniger reaktiven mit gleicher Abgangsgruppe aktiviert wird. Das Reaktionsprodukt kann daher im Verlauf der Eintopfreaktion direkt als Zwischenprodukt verbraucht werden, ohne dass weitere Veränderungen am Aglycon notwendig wären. Die Gruppe um Fraser-Reid beschrieb als erste das Konzept „bewaffneter/entwaffneter“ Reaktanten, gemäß dem Zucker, die 2-*O*-Ether als Schutzgruppen tragen („bewaffnet“), bevorzugt gegenüber solchen reagieren, die 2-*O*-Estergruppen („entwaffnet“) tragen.^[27] Später entwickelten Ley et al. einen neuen Ansatz, in dem mit diacetalgeschützten Thio-glycosidglycosyldonoren ein „halbentwaffneter“ Zustand erreicht werden konnte, sodass in der Reaktivitätskontrolle eine Zwischenstufe zur Verfügung stand.^[28] Sie zeigten auch erstmals, dass die Reaktivität des Glycosyldonors durch Manipulation der Schutzgruppen quantitativ angepasst werden kann.

Bevor man eine programmierbare, automatisierte Hochgeschwindigkeitssynthese mit einem Minimum an Schutzgruppeneinsatz entwickeln kann, benötigt man einen größeren Vorrat an Saccharideinheiten mit gut definierter Reaktivität und Bausteine zur Herstellung einfacher verzweigter Kohlenhydrate mit α - und β -Verknüpfungen.^[29] Typische Eintopfreaktionen beginnen am nichtreduzierenden Ende und schreiten zum reduzierenden Ende fort, wobei ein Reaktionsprofil zur Anwendung kommt, bei dem der reaktivste Donor zuerst und der am wenigsten reaktive als letzter zugegeben wird (Schema 11). Entscheidend für den Erfolg dieser Strategie ist die Kenntnis der „relativen Reaktivitäten“ einer Serie von Glycosiden. Anfangs wurden die meisten Eintopfsynthesen basierend auf einer allgemeinen Kenntnis der Reaktionsunterschiede zwischen Ether- und Ester-schutzgruppen durchgeführt. Strategisch könnte eine größere Diversität von Verbindungen mit einer Bibliothek von Reaktivitätswerten erzielt werden. Daher wurde ein kompetiti-



Schema 11. Die chemische Strategie für die programmierbare Eintopfsynthese von a) linearen und b) verzweigten Oligosacchariden.

ves HPLC-Experiment entworfen, um die Reaktivitäten verschiedener Glycosyldonoren messen und miteinander vergleichen zu können.^[29] In diesem System wurden die *p*-Methylphenylthioglycoside (STol) ausgewählt, denn sie sind leicht zu synthetisieren, sind für alle Monosaccharide geeignet, sind stabil bei Schutzgruppenreaktionen und haben gute spektroskopische Eigenschaften, um ihre Reaktivität mit HPLC zu bestimmen.^[30] Die relativen Reaktivitätswerte (RRVs) wurden durch Normalisierung auf den am wenigsten reaktiven Donor (peracetyliertes Tolythiomannosid, RRV = 1.0) berechnet. Größere RRV-Werte bedeuten also höhere Reaktivität.^[29] Gegenwärtig befinden sich mehr als 400 Bausteine in der Datenbank. Ausgewählte Daten sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Mehrere interessante Trends können aus den RRVs der Thioglycosidbausteine in Tabelle 1 abgeleitet werden:^[29]

1. *Die Reaktivitäten der Pyranoside variieren in Abhängigkeit vom Zucker.* Zwischen auf gleiche Weise geschützten Pyranosiden (d.h. perbenzyliert) nimmt die Reaktivität in folgender Reihenfolge ab: Fucose > Galactose > Mannose > Glucose > Sialinsäure. Fucose ist etwa viermal reaktiver als Galactose, diese etwa sechsmal reaktiver als Glucose. Außerdem sind 2-Hydroxymannosethioglycoside allgemein viel reaktiver als die entsprechenden 2-*O*-geschützten Derivate.^[29] Diese Beobachtungen stimmen mit den Hydrolysegeschwindigkeiten der entsprechenden Glycosylhalogenide und Glycoside überein.^[31]

2. *Die Reaktivität von Aminozuckern kann durch die N-Schutzgruppen eingestellt werden.* Bei D-Glucosamin und D-Galactosamin nimmt die Reaktivität in der Reihenfolge NHCBz > NHTroc > NHPht > N₃ > NHAc ab. Aminozucker mit Phthalimidgruppen zeigen sehr niedrige Reaktivität (RRV = 1.0–3.5) im Vergleich zu den Troc-tragenden Verbindungen (28.6). Allerdings ist der Bereich für die Reaktivitäten mit 1–28.6 klein im Vergleich zu dem großen Effekt, den die C2-Gruppe auf die Gesamtreaktivität eines Donors hat.

3. *Die Schutzgruppen beeinflussen die Reaktivitätseigenschaften stark.* Bei Galactose spielt die Substitution an C2 eine wichtige Rolle bei der Deaktivierung der Pyranose. Die Reaktivität wird am stärksten verringert durch OCIAc > OBz > OAc > OBn > OH > OSilyl > H. Diese Erscheinung wird hauptsächlich durch elektronische Effekte verursacht. In einem eleganten Aufsatz beschreiben Fraser-Reid et al. die Schutzgruppeneffekte sehr detailliert.^[32] Eine allgemein akzeptierte Auffassung ist, dass benzylierte Derivate immer deutlich reaktiver sind als ihre benzylierten Gegenstücke. Außerdem wird angenommen, dass die Gesamtreaktivität des Glycosyldonors in direktem Zusammenhang mit der Gesamtzahl der Benzylsubstituenten steht.^[31a] Neuere Untersuchungen ergaben jedoch, dass die Reaktivität eines 2-*O*-benzylierten *S*-Benzoxazolyglycosids als Donor beträchtlich höher ist als die des entsprechenden 2-*O*-benzylierten Gegenstücks (Abbildung 2).^[33]

4. *Die Position, die die Reaktivität der Pyranoside am meisten beeinflusst, ist nicht bei allen Zuckern dieselbe.* So berichtete Ley's Arbeitsgruppe, dass die C2-Position den größten Effekt auf die Reaktivität von Mannose hat (gefolgt

Tabelle 1: Relative Reaktivitätswerte (RRVs) der Thioglycoside für die programmierbare Eintopf-Oligosaccharidsynthese.

von C6 > C4 > C3), während die Reihenfolge bei Galactose nach den RRVs lautet C4 > C3 > C2 > C6.

5. Die Größenordnung des Effekts der Schutzgruppen auf die Reaktivität wird durch ihre Position am Pyranosid beeinflusst. Während Schutzgruppen die Reaktivität beeinflussen, hängt die Größe des Effekts in den meisten Fällen von der Position der Gruppe ab.^[28] Dies kann gezeigt werden, indem man die Reaktivität eines Thiogalactosids mit einer Benzoyl-

schutzgruppe mit der der gleichen Verbindung mit einer Hydroxygruppe an derselben Position vergleicht. Die Reaktivität steigt mit der Position der freien Hydroxygruppe in der Reihe C6 (13.1) < C2 (17.6) < C3 (28.9) < C4 (67.1) verglichen mit dem per-O-benzoylierten Thiogalactosid (5.7). Die stärkste Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit, die durch die Entfernung der Benzoylgruppe von der 4-O-Position verursacht wird, könnte durch die Beteiligung des Sauerstoffs

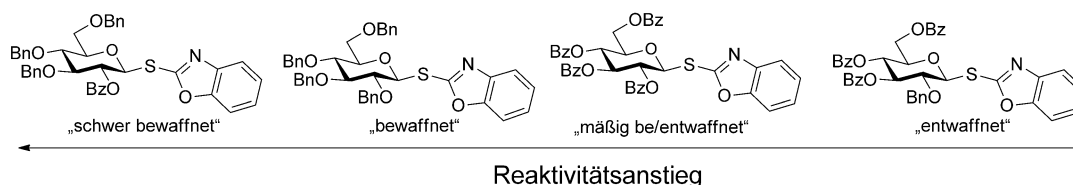


Abbildung 2. Reaktivitätserhöhung durch Einführung einer Benzoylgruppe an C2.

in Position 4 an der Destabilisierung des vermuteten kationischen Übergangszustands erklärt werden.^[31a] Da die Auswirkungen der einzelnen Schutzgruppen an einem Zucker nicht additiv sind, ist es schwierig, die Reaktivität eines Bausteins mit mehreren Schutzgruppen vorherzusagen.

6. Konformationseffekte (Torsionseffekte). Mehr *O*-Substituenten in axialer Position steigern die Reaktivität von Thioglycosid-Donoren. Vor kurzem setzten die Gruppen von Bols^[34] und Yamada^[35] unabhängig voneinander die sperrigen Silylschutzgruppen ein, um eine verdrehte Bootkonformation zu erzwingen, in der die Glycosyldonoren „bewaffnet“ werden, indem der Sauerstoffs substituent in eine axiale Position gezwungen wird (Abbildung 3). Bols und seine Mitarbeiter berechneten auch die Reaktivität dieser „schwerbewaffneten“ Donoren und gliederten sie in die reaktivitätsbasierte Synthese des Trisaccharids **62** in 64 % Ausbeute ein (Schema 12).

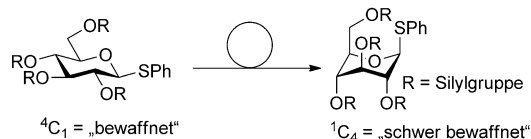
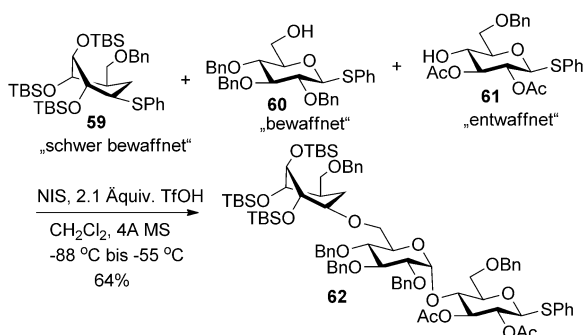


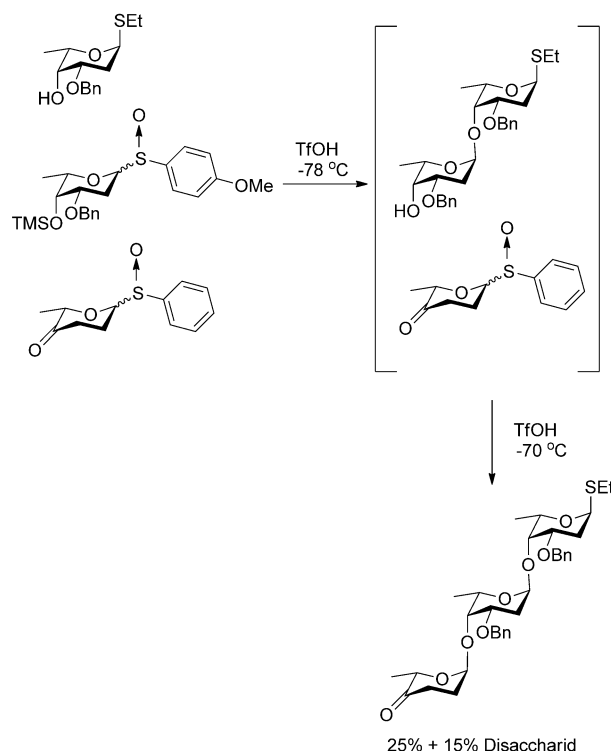
Abbildung 3. Zusätzliche *O*-Substituenten in axialer Position steigern die Reaktivität von Thioglycosid-Donoren.



Schema 12. Einführung eines „schwerbewaffneten“ Donors in die reaktivitätsgesteuerte Eintopfglycosylierung.

7. Einfluss der Abgangsgruppen. a) Sterische Effekte: Ändert man die Größe der anomeren Gruppe, kann man damit die Reaktivität des Glycosyldonors anpassen. Boons et al.^[36] entdeckten den Einfluss von sterischen Effekten von Thioglycosiden auf die Glycosylierungsreaktivität und zeigten, dass die anomere Reaktivität des Glycosyldonors oder -akzeptors durch den Raumbedarf der Abgangsgruppe beeinflusst

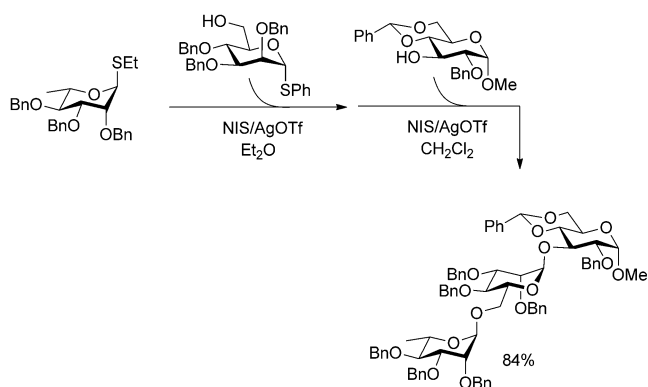
werden kann. b) Elektronische Effekte: Die Reaktivität des Glycosyldonors kann auch durch die *para*-Substitution des Phenylrings in der Reihenfolge OMe > H > NO₂ beeinflusst werden. Der Reaktivitätsunterschied zwischen OMe und H reicht aus für die Eintopfglycosylierung bei der Synthese des Ciclamycin-*O*-trisaccharids (Schema 13).^[23a]



Schema 13. Eintopfglycosylierung des Ciclamycin-*O*-trisaccharids.

In jüngerer Zeit untersuchten Huang und Mitarbeiter systematisch die Reaktivität von Thioarylglycosiden mit verschiedenen *para*-Substituenten am Aglycon.^[37] Die Reaktivität nimmt bei Thioglycosiden in folgender Reihe ab: OMe > NHAc > N₃ > Br > NO₂.

8. Lösungsmittelleffekte: Die Reaktivität von Donor und Akzeptor kann durch Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittelsysteme eingestellt werden. Oscarson und Mitarbeiter führten eine zweistufige Eintopfsynthese eines Trisaccharids ein, die über eine erste Glycosylierung in Et₂O zur Aktivierung des Donors (niedrige Glycosylierungsgeschwindigkeit) und eine zweite in CH₂Cl₂/Et₂O (höhere Glycosylierungsgeschwindigkeit) abläuft (Schema 14).^[38]



Schema 14. Lösungsmittelleffekt auf die Eintopfglycosylierung.

3.3. OptiMer-Software

Die Reaktivitätsdifferenz zwischen den Kupplungen sollte größer als 100 sein, um hohe Ausbeuten zu erzielen und die Nebenproduktbildung zu minimieren. Wong et al. entwickelten ein Computerprogramm, um die relativen Reaktivitätswerte vieler Donor- und Donor-/Akzeptorverbindungen (z. B. Bausteinen mit einer ungeschützten Hydroxygruppe) zu tabellieren.^[29] Die Datenbank enthält den Namen des Restes, die Position der ungeschützten Hydroxygruppen und Angaben, ob der C2-Substituent die Glycosylierung in α - oder β -Orientierung dirigiert. Die relative Reaktivität jedes Bausteins dient als Identifizierungsmarke zur Identifizierung oder Decodierung der Struktur des Zieloligosaccharids. Außerdem sind das Literaturzitat für die Herstellung der Verbindung und eine Strukturabbildung hinterlegt. Hat der Nutzer eine Oligosaccharidstruktur ausgewählt, listet das Programm die beste Kombination von Bausteinen für die Synthese auf.

3.4. Reaktivitätsbasierte programmierbare Eintopf-Oligosaccharidsynthese

Die programmierbare Eintopfsynthese von Oligosacchariden hat das Potenzial, viele Bereiche der Wirkstoffsuche zu beeinflussen, denn sie eröffnet den Zugang zu komplexen Kohlenhydratstrukturen. Mit den Informationen aus der OptiMer-Datenbank können Oligosaccharide aus drei bis sechs Monosacchariden innerhalb von Minuten bis Stunden ohne die Aufarbeitung der Zwischenprodukte oder Reinigungsverfahren aufgebaut werden. So kann das Hexasaccharid von Globo H, einem Glycosylceramid, das auf Tumoren verschiedener Epithelgewebe wie Dickdarm, Eierstock, Magen, Bauchspeicheldrüse, Uterusschleimhaut, Lunge, Prostata und Brust vorkommt,^[39] einfach nach der programmierbaren Eintopfmethode synthetisiert werden (Abbildung 4).^[40] Um ausreichende Reaktivitätsunterschiede zwischen den Thioglycosiden zu erzeugen und die Stereoselektivität jeder Glycosylierung zu kontrollieren, umfasst die Strategie für die Globo-H-Saccharidsynthese die Verwendung der drei Bausteine **63** ($\text{RRV} = 7.2 \times 10^4$), **64** ($\text{RRV} = 6$) und **65** ($\text{RRV} = 0$). Die Reaktivitäten wurden hauptsächlich durch elektronenschiebende (Benzylether und 2,2,2-Trichloräthylcarbamate) und elektronenziehende Gruppen (Benzoyl-, *p*-Nitrobenzoyl- und *o*-Chlorbenzylether) abgestimmt. In der ersten Stufe wurde das Trisaccharid-Zwischenprodukt **64** mit zwei β -glycosidischen Bindungen in einer Eintopfreaktion hergestellt.^[40] In einer weiteren Eintopfsynthese wurden die verbleibenden zwei α -glycosidischen Bindungen durch die sequenzielle Reaktion von **63**, **64** und **65** in Gegenwart von NIS/TfOH als Reaktionsbeschleuniger eingeführt. Das gewünschte Hexasaccharid **66** fiel in einer Ausbeute von 62 % an.

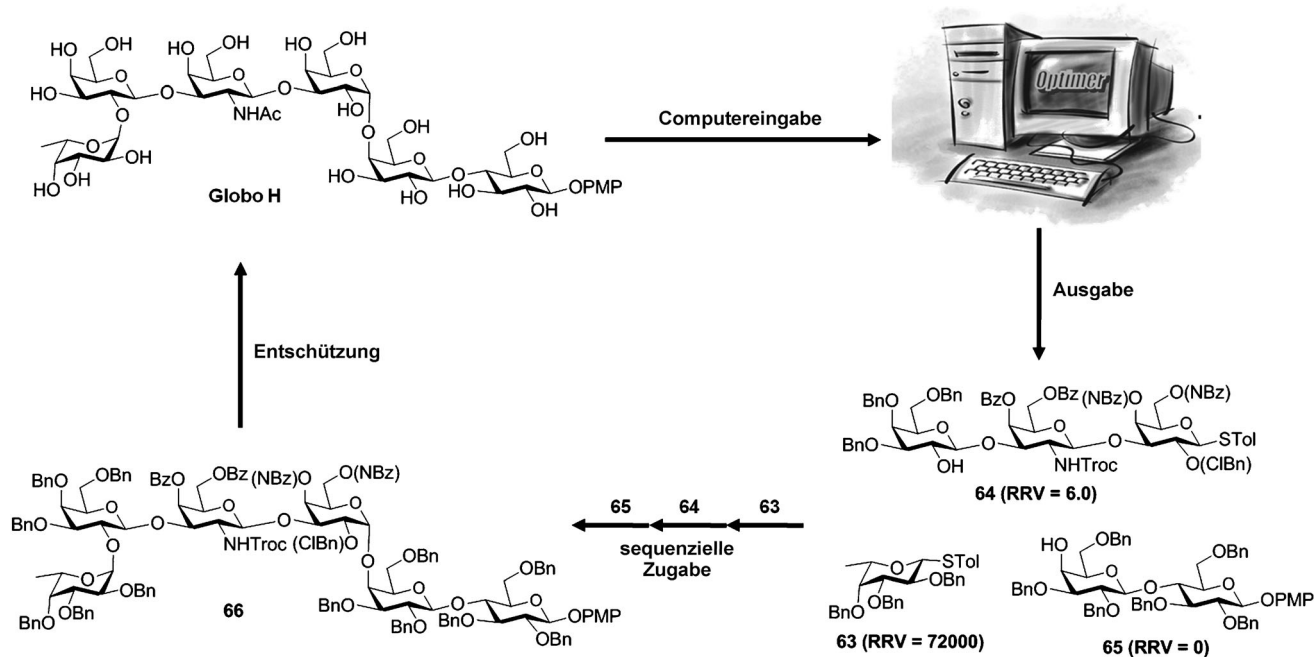
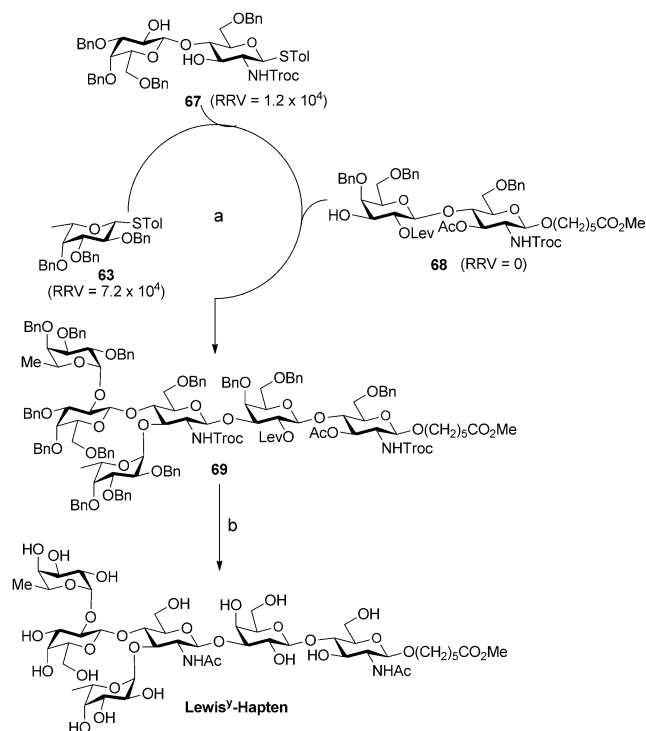


Abbildung 4. Programmierbare Eintopf-Oligosaccharidsynthese

Die besonders hohe Reaktivität des perbenzylierten Fucosyl donors **63** prädestiniert ihn als Ausgangsverbindung für die programmierbare Eintopfssynthese fucosehaltiger Oligosaccharide. Beispielsweise kann das kohlenhydratassoziierte Tumorantigen Lewis^x, das auf den Oberflächen von kolorektalen Adenokarzinomen und Leberzellkarzinomen exprimiert wird, mit dem programmierbaren Eintopfansatz hergestellt werden (Schema 15). Drei Bausteine mit geeigneten Reaktivitätsprofilen, eine Fucosyleinheit **63** (RRV = 7.2×10^4)



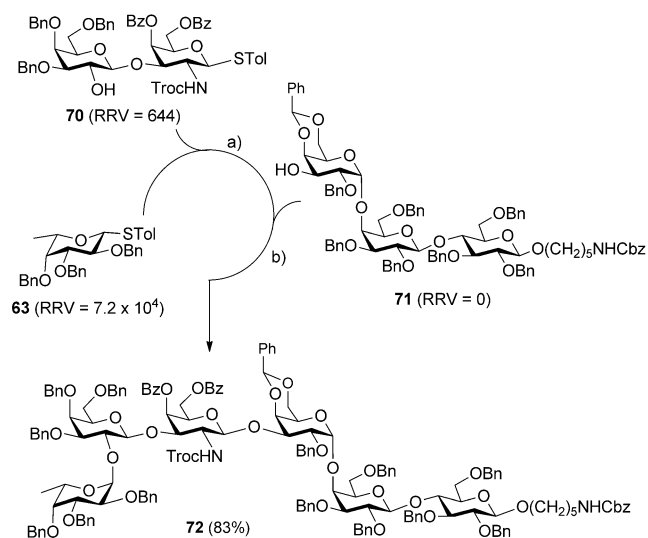
Schema 15. Programmierbare Eintopfssynthese des Lewis^x-Haptens **69** und seiner entschützten Komponenten. Reaktionsbedingungen: a) 1. NIS, TfOH, MS AW-300, -70°C ; 2. **68**, NIS, TfOH, -25°C , 44%; b) 1. Zn-Staub, Ac_2O ; 2. NaOMe, MeOH/ CH_2Cl_2 ; 3. Pd-Schwarz, H_2 , MeOH/ AcOH , 25% über drei Stufen.

10^4) und zwei Lactosaminyleinheiten **67** ($\text{RRV} = 1.2 \times 10^4$) und **68** ($\text{RRV} = 0$), wurden von OptiMer vorgeschlagen.^[41] Die Eintopfssynthese wurde ebenfalls mit NIS/TfOH als Reaktionsbeschleuniger durchgeführt (Schema 15). Die erste Glycosylierung zwischen dem Fucosyl donor **63** und der Lactosaminyl-Brückeneinheit **67** wurde bei -70°C ausgeführt, während die zweite Glycosylierung eine höhere Temperatur benötigte (-25°C). Die niedrige Temperatur im ersten Schritt unterdrückte nicht nur die Bildung des unerwünschten Nebenprodukts Succinimid, sondern begünstigte auch die Bildung der α -glycosidischen Bindung. Bei der zweiten Glycosylierung werden zwei große Zuckerfragmente gekuppelt, was für eine praktikable Durchführung eine höhere Temperatur erfordert. Die Gesamtausbeute an vollständig geschützter Verbindung **69** betrug 44%, was einer Ausbeute von 81% pro Glycosylierung entspricht.

Der programmierbare Eintopfansatz bietet auch eine effiziente Methode, um mit kombinatorischer Chemie eine

Saccharidbibliothek aufzubauen.^[26c] Die Methode wurde erfolgreich eingesetzt, um vorgeplante lineare und verzweigte Oligosaccharidstrukturen aufzubauen, eine Oligosaccharidbibliothek aus 33 Verbindungen herzustellen^[29,42] und um die Strukturen von Naturstoffen wie Aminoglycosiden oder Vancomycinderivaten, die verschiedene Zuckersubstituenten tragen, zu diversifizieren.^[43]

Der Eintopfansatz war auch bei der Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen komplexer Oligosaccharide wie Globo H anwendbar. Eine verfeinerte [1+2+3]-Eintopfstrategie, bei der die problematische $\text{Gal}\alpha(1\rightarrow4)\text{Gal}$ -Bindung vorab bei der Bereitstellung der Bausteine geknüpft wurde, verbesserte die Ausbeute der Eintopfssynthese von Globo H von 62% auf 83% (Schema 16).^[44] Ausgehend von dem Trisaccharid-Baustein **71**, der für die Synthese aller Oligosac-



Schema 16. Programmierbare Eintopfssynthese des Globo-H-Hexasaccharids nach der [1+2+3]-Strategie. Reaktionsbedingungen: a) NIS, TfOH, -40°C ; b) NIS, TfOH, -30°C , 83% Gesamtausbeute.

charide der Globo-Familie geeignet ist, wurde ein Satz von verkürzten Globo-H-Sequenzen konstruiert und dann kovalent auf Glasplättchen fixiert, um in einem Fluoreszenztest eine Spezifitätsanalyse mit zwei monoklonalen Antikörpern VK9 und Mbr1 durchzuführen.^[44] Die Glycane wären auch hilfreich, um die optimale Struktur für eine Impfstoffentwicklung zu finden.

Des Weiteren können die Produkte einer programmierbaren Eintopfssynthese als Substrate für die chemoenzymatische Synthese ausgedehnter Strukturen wie des Poly-*N*-acetyllactosamin-Oligomers, das ein Vorläufer einer Reihe von Blutgruppenantigenen ist, dienen.^[45]

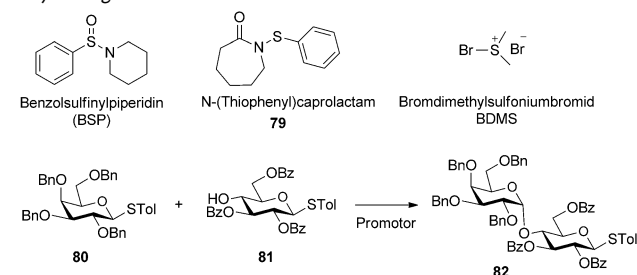
3.5. Katalysatoren für die programmierbare Eintopfglycosylierung

Für die programmierbare Eintopfglycosylierung ist meistens *N*-Iodsuccinimid/ Trifluormethansulfonsäure (NIS/TfOH) als Reaktionsbeschleuniger gut geeignet. Weil aller-

dings in Eintopfglycosylierungsreaktionen meist mehrere Glycosylierungsschritte ablaufen, reichert sich das Succinimid, das aus den stöchiometrischen Mengen an NIS entsteht, unweigerlich im Reaktionsgemisch an. Auch wenn das Stickstoffatom des Succinimids ein schwaches Nucleophil ist, kann es im Fall eines sehr reaktionsträgen Akzeptors effizient um die verbleibenden aktivierten Glycosyldonoren konkurrieren. Dies ist besonders störend, wenn die Hydroxygruppe des Akzeptors sterisch stark abgeschirmt oder nur schwach nucleophil ist. Bei einem anderen thiophilen Reaktionsbeschleuniger, dem Dimethyl(thiomethyl)sulfonium-trifluormethansulfonat (DMTST), ist die Effizienz bei der Aktivierung des Thioglycosiddonors sogar noch schlechter als bei NIS/TfOH.^[29]

Um diese Probleme zu lösen, wurde ein anderes thiophile Reagens, 1-(Benzolsulfinyl)piperidin/Trifluormethansulfonsäureanhydrid (BSP/Tf₂O), das von Crich und Mitarbeitern entwickelt wurde,^[46] verwendet. Mit einer substöchiometrischen Menge an BSP/Tf₂O als Reaktionsbeschleuniger konnte **81** in hohen Ausbeuten mit **63** glycosyliert werden (Tabelle 2), da die Entstehung von Succinimid-Nebenpro-

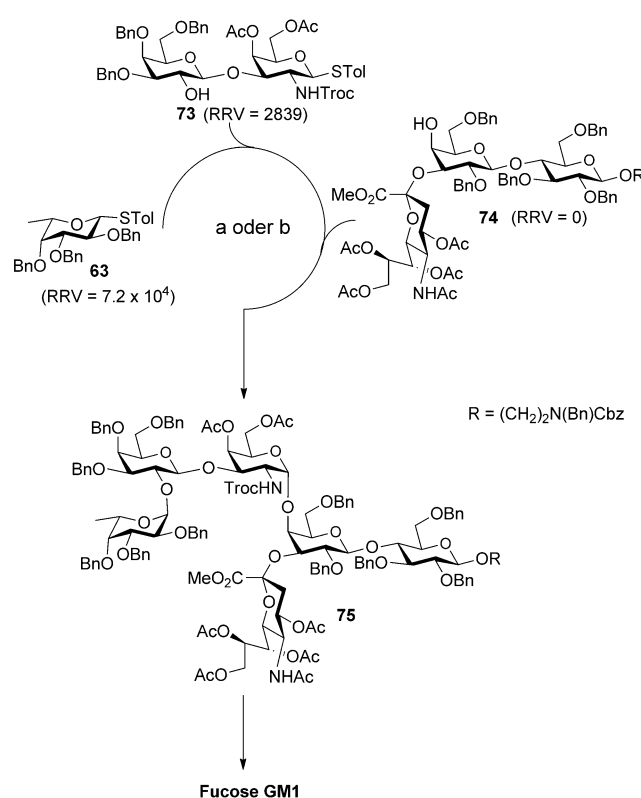
Tabelle 2: Wirkung verschiedener Reaktionsbeschleuniger auf die Glycosylierung von **81** und **82**.



Eintrag	Reaktionsbeschleuniger	Ausbeute
1	<i>N</i> -(Thiophenyl)caprolactam/Tf ₂ O	93 % ^[a]
2	<i>N</i> -(Thiophenyl)caprolactam/Tf ₂ O	83 % ^[b,c]
3	Benzolsulfinylpiperidin/Tf ₂ O	< 15 % ^[b,d]
4	<i>N</i> -Iodosuccinimid/TfOH	75 % ^[b]
5	Bromodimethylsulfoniumbromid/AgOTf	92 % ^[e]

Reaktionsbedingungen: [a] Donor (1.1 Äquiv.), Akzeptor (1.0 Äquiv.), Reaktionsbeschleuniger (1.35 Äquiv.), CH₂Cl₂, –78 °C bis –10 °C. [b] 1:1:1 Donor/Akzeptor/Beschleuniger, RT, 10 min. [c] Pufferung der Reaktion mit TTBP ergab vergleichbare Ausbeuten. [d] Eine Erklärung ist, dass BSP elektrophile Nebenprodukte bildet, die die Produkte weiter aktivieren. Mit 0.5 Äquiv. BSP betrug die Ausbeute 63 %. [e] Donor (1.2 Äquiv.), Akzeptor (1.0 Äquiv.), BDMS (1.4 Äquiv.), AgOTf (3.2 Äquiv.), DCM/Et₂O 1:1, –35 °C bis RT.

dukten aus NIS/TfOH umgangen wurde.^[47] Eine weitere Erklärung für die Wirksamkeit kann auch sein, dass im Verlauf der Reaktion Sulfonium-Nebenprodukte entstehen, die die weitere Glycosylierung fördern. Der Nutzen von BSP/Tf₂O für die programmierbare Eintopfglycosylierung wurde anhand der Eintopfsynthese von Fucosyl-GM1 gezeigt (Schema 17). Wenn BSP/Tf₂O als Reaktionsbeschleuniger eingesetzt wurde, nahm die Gesamtausbeute von 13 % auf 22 % zu, und die erforderliche Reaktionszeit wurde im Ver-

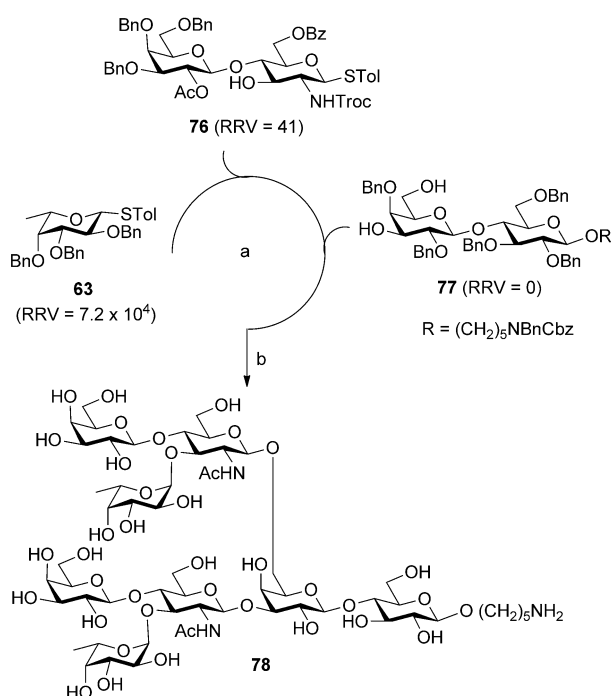


Schema 17. Programmierbare Eintopfsynthese von Fucosyl-GM1. Reaktionsbedingungen für die mit NIS/Tf₂O und DMTST beschleunigte Eintopfreaktion: Weg a) 1. NIS, TfOH, CH₂Cl₂, –70 °C, 36%; 2. **74**, DMTST, 0 °C, 36%. Für die durch BSP/Tf₂O beschleunigte Eintopfreaktion: Weg b) 1. BSP, Tf₂O, CH₂Cl₂, –70 °C bis –10 °C, 47%; 2. **74**, BSP, Tf₂O, CH₂Cl₂, –70 bis 0 °C, 47%.

gleich zu den Reaktionssystemen mit NIS/TfOH und DMTST von einem Tag auf 5 h verringert.^[47]

Weiterhin wurde der Nutzen des BSP/Tf₂O-Systems an den programmierbaren Eintopfsynthesen des biologisch wichtigen α -Gal-Pentasaccharidderivats^[48] und des tumorassoziierten Octasaccharid-Antigens N3-minor **78** (Schema 18)^[49] gezeigt.

Um die programmierbare Eintopfglycosylierung weiter zu verbessern, besteht noch Bedarf für einen besseren Reaktionsbeschleuniger. Dieser muss thiophil sein, er muss an die reaktivitätsgesteuerte Eintopfstrategie adaptierbar sein, er muss in einem größeren Temperaturbereich eingesetzt werden können, und er darf – was am wichtigsten ist – keine Nebenprodukte erzeugen, die die Reaktion stören. Benzolsulfonyltriflat ist als ein extrem kräftiges thiophiles Reagens bekannt,^[50] sein Einsatz ist jedoch problematisch, weil es instabil ist und daher in situ aus Benzolsulfinylchlorid und Silbertrifluormethansulfonat hergestellt werden muss. Ein neues Reagens wird benötigt, um Benzolsulfonyltriflat zu ergänzen; es muss hinreichend stabil und bequem zugänglich sein. Vor kurzem wurde *N*-(Phenylthio)caprolactam **79** als neuer Reaktionsbeschleuniger für die selektive Aktivierung von Thioglycosiddonoren für die Glycosylierung gefunden (Tabelle 2).^[51] Phenylthioamid **79** könnte mit Tf₂O reagieren und dabei in situ einen aktivierten Reaktionsbeschleuniger ge-

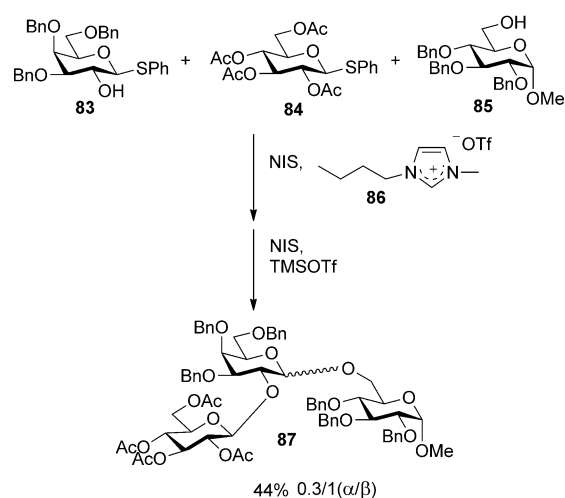


Schema 18. Programmierbare Eintopfsynthese des N3-minor-Antigens **78**. a) 1. BSP, TiF_2O , MS AW-300, CH_2Cl_2 , -70 bis -10°C ; 2. NIS, TfOH , 0°C bis RT; b) 1. Zn, AcOH , RT; 2. Ac_2O , DMAP, Pyridin, 0°C bis RT; 3. NaOMe, MeOH, RT; 4. Pd-Schwarz, H_2 (1 atm), MeOH mit 5 % Ameisensäure, 11 % ab Schritt (a).

nerieren, der anschließend das Thioglycosid für die Knüpfung der Glycosidbindung aktiviert.^[51] Dieses Reagens wirkt ausgesprochen gut; verschiedene Disaccharide, darunter Thioglycosid **82**, wurden damit in Ausbeuten bis zu 93 % hergestellt (Tabelle 2, Eintrag 1). Bemerkenswert war, dass Glycosylierungsreaktionen bei Raumtemperatur mit diesem Reaktionsbeschleuniger sauber und schnell abliefen (Tabelle 2, Eintrag 2). Dies war eine Verbesserung gegenüber anderen Reaktionsbeschleunigern bei Raumtemperatur (Tabelle 2, Einträge 3 und 4), während BSP/ TiF_2O ein ausgezeichnetes System für die Glycosylierung bei niedriger Temperatur ist. Der Reaktionsbeschleuniger **79** kann an die reaktivitätsbasierte Eintopf-Oligosaccharidsynthesen angepasst werden, wie anhand der Synthesen von Gb3 und *iso*GB3 mit 47 % bzw. 50 % Ausbeute gezeigt wurde.^[52]

Ye und Mitarbeiter setzten vor kurzem Bromdimethylsulfoniumbromid (BDMS) als neuen thiophilen Reaktionsbeschleuniger für die Glycosylierung ein. BDMS wirkt effizient aktivierend auf „bewaffnete“ und „entwaffnete“ Thioglycoside.^[53] Mit BDMS/ AgOTf lässt sich das Disaccharid **82** in hohen Ausbeuten und fast ohne Nebenprodukte herstellen (Tabelle 2, Eintrag 5). Diese Reagenzkombination zur Reaktionsbeschleunigung lässt sich ebenfalls auf eine reaktivitätsbasierte Eintopf-Oligosaccharidsynthese anwenden, wie mit der Herstellung des Trisaccharids $\text{Glc}\alpha(1\rightarrow4)\text{Glc}\beta(1\rightarrow4)\text{Glc}$ gezeigt wurde.^[53] Aus der Gruppe von Galan et al. wurde über den Einsatz einer ionischen Flüssigkeit, 1-Butyl-3-methylimidazoliumtriflat ([*bmin*][OTf]) (**86**), als Cosolvens und mildem Reaktionsbeschleuniger für Thiophenyl- und

Trichlorimidatglycoside bei Raumtemperatur berichtet.^[54] Das Potenzial dieser ionischen Flüssigkeit zur Beschleunigung reaktionsbasierter Eintopfreaktionen wurde an der Eintopfsynthese eines verzweigten Trisaccharides (Schema 19) verdeutlicht.^[55] Mit der Mischung der Donoren



Schema 19. Eintopfglycosylierung von verzweigten Trisacchariden mit ([*bmin*][OTf]) als Reaktionsbeschleuniger.

83 und **84** und dem Akzeptor **85** wurde der „bewaffnete“ Donor **83** selektiv aktiviert und mit dem Akzeptor **85** zu einem Disaccharid als Zwischenprodukt zur Reaktion gebracht, indem **86** und NIS als Reaktionsbeschleuniger und Cosolvens eingesetzt wurden. Das „entwaffnete“ Thioglycosid **84** erforderte als Donor die Anwesenheit einer katalytischen Lewis-Säure.^[55] Nach Zugabe von NIS und katalytischen Mengen an TMSOTf ins selbe Gefäß wurde **84** mit dem Disaccharid zu **87** in 44 % Ausbeute glycosyliert.

3.6. Die Synthese heparinähnlicher Oligosaccharide

Heparin und Heparansulfat sind strukturell verwandte lineare polyanionische Polysaccharide, die zur Familie der Glycosaminoglycane gehören. Beide Verbindungen sind unterschiedlich sulfatiert und zeichnen sich durch eine extreme Heterogenität innerhalb der Primärstruktur des Rückgrats aus alternierend 1→4-verbundenen Uronsäuren (entweder D-Glucuronsäure oder L-Iduronsäure) und D-Glucosamin aus.^[56] Spezifische Muster entlang der Zuckersequenz werden von zahlreichen Proteinen erkannt, wodurch lokale Verfügbarkeiten sichergestellt oder der Aktivitätszustand der Proteine verändert werden kann.^[57] Durch diese Wechselwirkungen spielen Heparin und Heparansulfat entscheidende Rollen bei einer Reihe biologischer Vorgänge, von denen viele auch biomedizinisch wichtig sind.^[58] Heparin, das hauptsächlich in Mastzellen vorkommt, wird klinisch vielfach als Gerinnungshemmer eingesetzt, weil es mit hoher Affinität Antithrombin III bindet, das seinerseits ein wichtiger Hemmstoff der Blutgerinnungskaskade ist.^[59] Heparansulfat dagegen ist überall auf der Zelloberfläche zu finden, wo es ein

Bestandteil von Proteoglycanen ist und viele physiologische und pathophysiologische Prozesse wie Wachstumsfaktorregulation, virale und bakterielle Infektionen, Entzündungsreaktionen, Angiogenese, Tumormetastase, Zelladhäsion und Fettstoffwechsel vermittelt.^[60]

Eine große Zahl präparativer Ansätze zur Gewinnung chemisch definierter heparinähnlicher Oligosaccharide für Struktur-Wirkungs-Analysen wurde von vielen Forschungsgruppen ausprobiert. Die Mehrzahl dieser Synthesen waren rein chemisch; die jüngsten Fortschritte wurden allerdings mit chemoenzymatischen Synthesen als attraktiver Alternative erzielt. In den frühen Untersuchungen dominierten die Versuche, das antithrombinbindende Heparinpentasaccharid^[61] und Oligosaccharide, die aus der wichtigsten repetitiven Einheit von Heparin^[62] bestehen, chemisch herzustellen. Später bestimmte der Bedarf an heparinähnlichen Oligosaccharid-Bibliotheken den Fortschritt bei Strategien zum modularen Molekülaufbau.^[63] Ständige Weiterentwicklungen der Kohlenhydratchemie trieben auch die Länge der herstellbaren Oligosaccharide immer weiter voran; dennoch war der Fortschritt auf diesem schwierigen Feld zäh. Mit homogen repetitiven Einheiten (z.B. dem wichtigsten trisulfonylierten Disaccharid aus Heparin) konnte eine aktuelle Veröffentlichung zufolge ein Dodecasaccharid aufgebaut werden^[64] – das längste bisher synthetisierte Polymer. Die Synthese eines Hexasaccharids erscheint gegenwärtig als Obergrenze, wenn die repetitiven Disaccharide variiert werden sollen. Demgegenüber haben chemoenzymatische Synthesen das Potenzial zur Herstellung längerer Strukturen.^[65] Dank der Erschließung einer ausgezeichneten Quelle für polymeres Heparosan aus dem Kapselpolysaccharid K5 aus *E. coli*^[66] verringerten sich Kosten für enzymatische Sulfonierungen durch die erhöhte spezifische Aktivität funktioneller rekombinanter Enzyme^[67] und die Arylsulfotransferase-gekoppelte Regeneration von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS).^[68] Mit einer strategischen Serie enzymatischer Umsetzungen können an den gewünschten Stellen des Polymergerüsts funktionelle Gruppen eingeführt werden. Diese Transformationen sind in Lösung,^[69] auf Sensorchips^[70] und in einem digitalen Mikrofluidikchip analog zu den Golgifeldern in der Zelle durchgeführt worden.^[71] Aktuell berichteten Liu et al.^[72] auch über eine chemoenzymatische Methode, mit der kontrollierte Kettenverlängerungen, selektive *N*-Sulfonierungen und selektive C5-Epimerisierungen möglich sind. Problematisch bei diesem enzymatischen Ansatz ist allerdings, dass Produktisolierung, -reinigung und Analyse der Zwischenprodukte erforderlich sind.

Die chemische Synthese heparinähnlicher Oligosaccharide steht vor einigen technischen Hürden, die sie von der anderen Zucker unterscheidet. Weil L-Idose und die entsprechende Uronsäure aus natürlichen Quellen nicht zur Verfügung stehen, wurden Methoden wie die stereochemische 5-C-Inversion einfach zugänglicher D-Glucose-basierter Verbindungen^[62c,73] und die De-novo-Synthese^[74] aus 1,2-Isopropyliden- α -D-xylofuranose entwickelt. Die zahlreichen *O*-Sulfonierungs- und *N*-Substitutionsstellen und die regio- und stereochemischen Erfordernisse für die glycosidischen Bindungen müssen bei der Auswahl orthogonaler Schutzgruppen beachtet werden. Um Probleme mit der Oxidation der D-

Glucose- oder L-Idosekomponenten nach der Elongation zu vermeiden, wurden die Uronsäurederivate oft bereits in einem frühen Stadium der Synthese eingefügt. Weil andererseits das die Carboxygruppe tragende C5 leicht der Epimerisierung unterliegt und Uronsäureendonoren zu niedrigen Reaktivitäten tendieren, wurde bei neueren Syntheseentwicklungen^[63b,c,75] oft die Oxidation der 6-Hydroxygruppe von D-Glucosid oder L-Idosid vorgenommen, nachdem die empfindlichen Glycosidbindungen geknüpft waren. Die 1,2-*trans*-glycosidische Bindung am anomeren Zentrum der Uronsäurevorstufe lässt sich mithilfe des benachbarten C2-Esters leicht gewinnen. Im Falle des D-Glucosamins (des α -Isomeren) wurde die 1,2-*cis*-Orientierung dagegen durch den weniger effizienten anomeren Effekt erreicht, während die Aminogruppe durch eine Azidgruppe maskiert war; diese konnte später in eine andere funktionelle Gruppe umgewandelt werden. Glücklicherweise fördert eine axial orientierte freie Hydroxygruppe im Glycosylakzeptor die Bildung einer α -stereoselektiven glycosidischen Bindung.^[76] Dieses Phänomen wurde von Seeberger et al. durch den Einsatz von Akzeptoren ausgenutzt, die in der ¹C₄-Konformation fixiert sind.^[77]

Mit Blick auf den Aufbau des Heparinrückgrats aus repetitiven Disaccharideinheiten wird die Kettenverlängerung meist mithilfe von Disaccharidbausteinen nach einem konvergenten [*n* + 2]-Bausteinansatz durchgeführt. Es gibt allerdings auch Berichte über die Kupplung längerer Bausteine.^[62b,63a] Einzelne repetitive Disaccharidbausteine, wie die in Abbildung 5 (**88**, **89** und **90**), könnten zur Synthese von Oli-

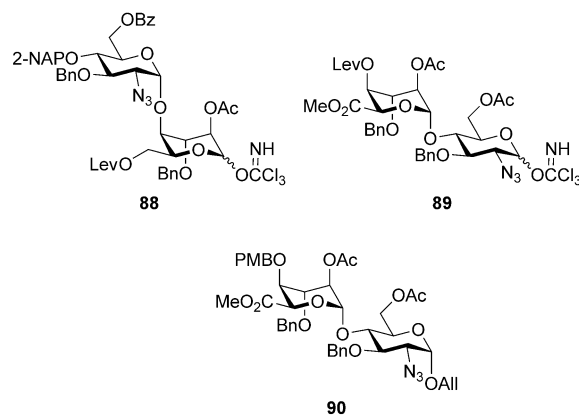
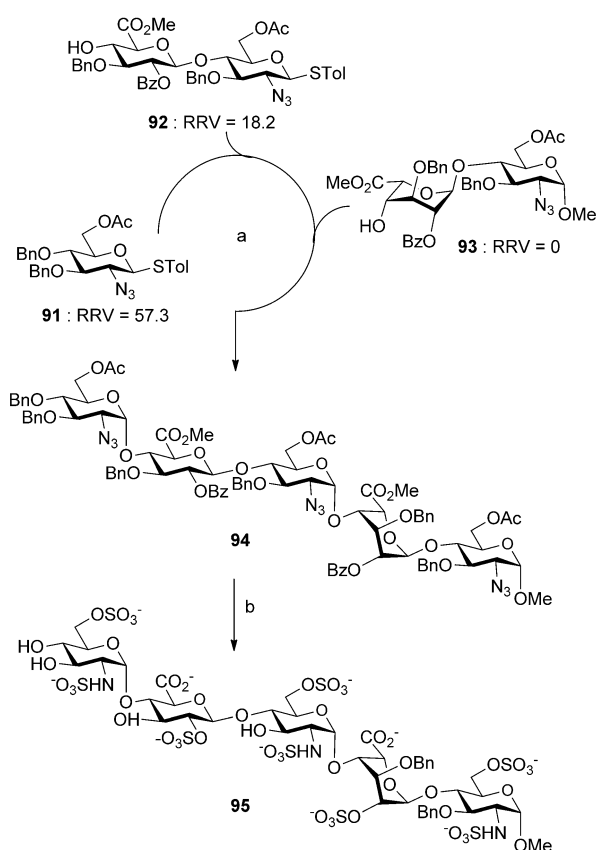


Abbildung 5. Beispiele für Disaccharidbausteine, die für die Herstellung von Oligosacchariden aus den wichtigsten repetitiven Einheiten von Heparin Verwendung finden.

gosacchariden verschiedener Längen verwendet werden, wenn diese aus der zentralen repetitiven Einheit von Heparin bestehen. Kettenverlängerungen aus den Bestandteilen **88**^[62c] und **89**^[62d] konnten nur vom reduzierenden zum nichtreduzierenden Ende durchgeführt werden. Baustein **90**^[78] kann demgegenüber problemlos in einen Donor oder einen Akzeptor für Glycosylierungen in beide Richtungen mit verschiedenen Donor- und Akzeptorlängen umgewandelt werden.

Die Kette des Heparinrückgrats wurde mit einer programmierbaren Eintopfglycosylierung aufgebaut, in der Thioglycosidbausteine mit genau definierter Reaktivität eingesetzt wurden.^[75a] In diesen wurden die Hydroxygruppen, die später Sulfonatgruppen tragen sollten, als Acetyl- und Benzoylgruppen geschützt, während die späteren freien Hydroxygruppen als Benzylether geschützt wurden. Die primären Hydroxygruppen, die selektiv oxidiert werden mussten, wurden mit der TBDPS-Gruppe (*tert*-Butyldiphenylsilyl) blockiert. Nach den einleitenden Glycosylierungen, in denen die Disaccharidderivate entstanden, wurden die Uronsäurederivate erzeugt und als Methylester geschützt, um die Disaccharide **92** und **93** zu erhalten. Im Verlauf der Eintopf-Pentasaccharidsynthese (Schema 20) wurde zunächst der



Schema 20. Programmierbare Eintopfsynthesen der Heparin-Pentasaccharide. a) 1. NIS, TfOH, CH₂Cl₂, –45 °C bis RT; 2. NIS, TfOH, CH₂Cl₂, –45 °C bis RT, 20%; b) 1. LiOH, THF; 2. SO₃·Et₃N, DMF; 3. H₂, Pd/C; 4. SO₃·Pyridin, H₂O, 33 %.

Azidoglucosyldonor **91** (RRV = 53.7) mit dem Disaccharidakzeptor **92** (RRV = 18.2) gekuppelt. Dann wurde der α -Methylidisaccharidakzeptor **93** zu der Reaktionsmischung hinzugegeben. Unter diesen Bedingungen entstand das vollständig geschützte Pentasaccharid **94** in 20 % Ausbeute. Abschließend fiel das heparinähnliche Pentasaccharid **95** nach *O*- und *N*-Sulfonierungen und globaler Schutzgruppenabspaltung an.

Oligosaccharidbibliotheken sind hilfreich, um Zuckerstrukturen zu identifizieren, die mit Proteinen wechselwirken

und dadurch ein bestimmtes biologisches Ereignis auslösen. Obwohl nicht von allen bekannt ist, ob sie existieren, bedingen die Strukturvariationen im Heparin- und Heparansulfat 48 mögliche Disaccharid-Bausteine.^[79] Hung und Mitarbeiter synthetisierten den kompletten Satz von 48 Disaccharid-Bausteinen (Abbildung 6), die dann direkt für den Aufbau von Oligosaccharid-Bibliotheken eingesetzt werden konnten.^[80] Kettenverlängerungen wurden durch die Abspaltung der 2-Naphthylmethyl(2-NAP)-Schutzgruppe unter Bildung des Glycosylakzeptor und durch Umwandlung des 1,6-Anhydridrings der Idose in einen Glycosyldonor erreicht. Ansonsten wurden Standardmuster für den Einsatz der Schutzgruppen gewählt, wobei die Acetyl- und Benzoyloxycarbonylschutzgruppen für die Aminoreste aus der Azidogruppe einfach zugänglich sind. Andere Arbeitsgruppen wie die von Seeberger,^[63a] Boons^[63b] und Huang^[63c] entwickelten weitere modulare Zusammenstellungen für spezialisierte Sammlungen von Oligosacchariden mit kleineren Serien von Disaccharidbausteinen (Abbildung 7). Seeberger und Mitarbeiter beschrieben den Aufbau verschiedener Tetrasaccharide aus Disacchariden, allerdings erforderte die Elongation zu Hexasacchariden den Einsatz von Trisaccharidmodulen. Boons und Mitarbeiter stellten 11 Tetrasaccharide und ein Hexasaccharidkonstrukt mit dem modularen Ansatz her. Diese Oligosaccharide wurden bei einer Inhibierungsstudie von BACE-1 eingesetzt, einer am Fortschreiten der Alzheimerischen Demenz beteiligten Protease. Bonaffé und Mitarbeiter schlugen einen Ansatz vor,^[81] bei dem ein einzelner Disacchariddonor in Gegenwart verschiedener Akzeptoren aktiviert wird. Die entstehende Mischung von Oligosacchariden wurde einer Umwandlung der funktionellen Gruppen unterworfen, und anschließend wurden die Oligosaccharide über eine Umkehrphasensäule für weitere Umsetzungen aufgetrennt.

Im Gegensatz zu früheren Versuchen führten Huang und Mitarbeiter eine Präaktivierungstechnik in ihren modularen Ansatz ein (Schema 21). Diese Methode ermöglichte die Eintopfsynthese verschiedener Hexasaccharidgerüste ohne die relative Reaktivität der Bausteine beachten zu müssen. Das Modul für das nichtreduzierende Ende (Modul **A**) wurde vorab mit *p*TolSCI/AgOTf als Reaktionsbeschleuniger gemischt und damit gleichzeitig aktiviert. Modul **B** wurde dann zugegeben. Mit 2,4,6-Tri-*tert*-butylpyrimidin (TTBP) als Säurefänger entstand wahrscheinlich das Tetrasaccharid, das beim Mischen mit Modul **C** (als Baustein für das reduzierende Ende) und TTBP aktiviert wurde. Dieses Eintopfverfahren war in weniger als 5 h abgeschlossen und lieferte das voll geschützte Hexasaccharid in 50–62 % Ausbeute. Für die gewünschten Oligosaccharide wurden die funktionellen Gruppen in sieben Stufen mit einer Gesamtausbeute von 26–55 % umgewandelt. Obwohl bei vielen der modularen oder Eintopfsynthesen die quantitative Bestimmung der Bausteine für den Einsatz in der automatisierten Synthesepipeline fehlt, könnten die beschriebenen Prinzipien hilfreich sein, um dieses Ziel zu erreichen.

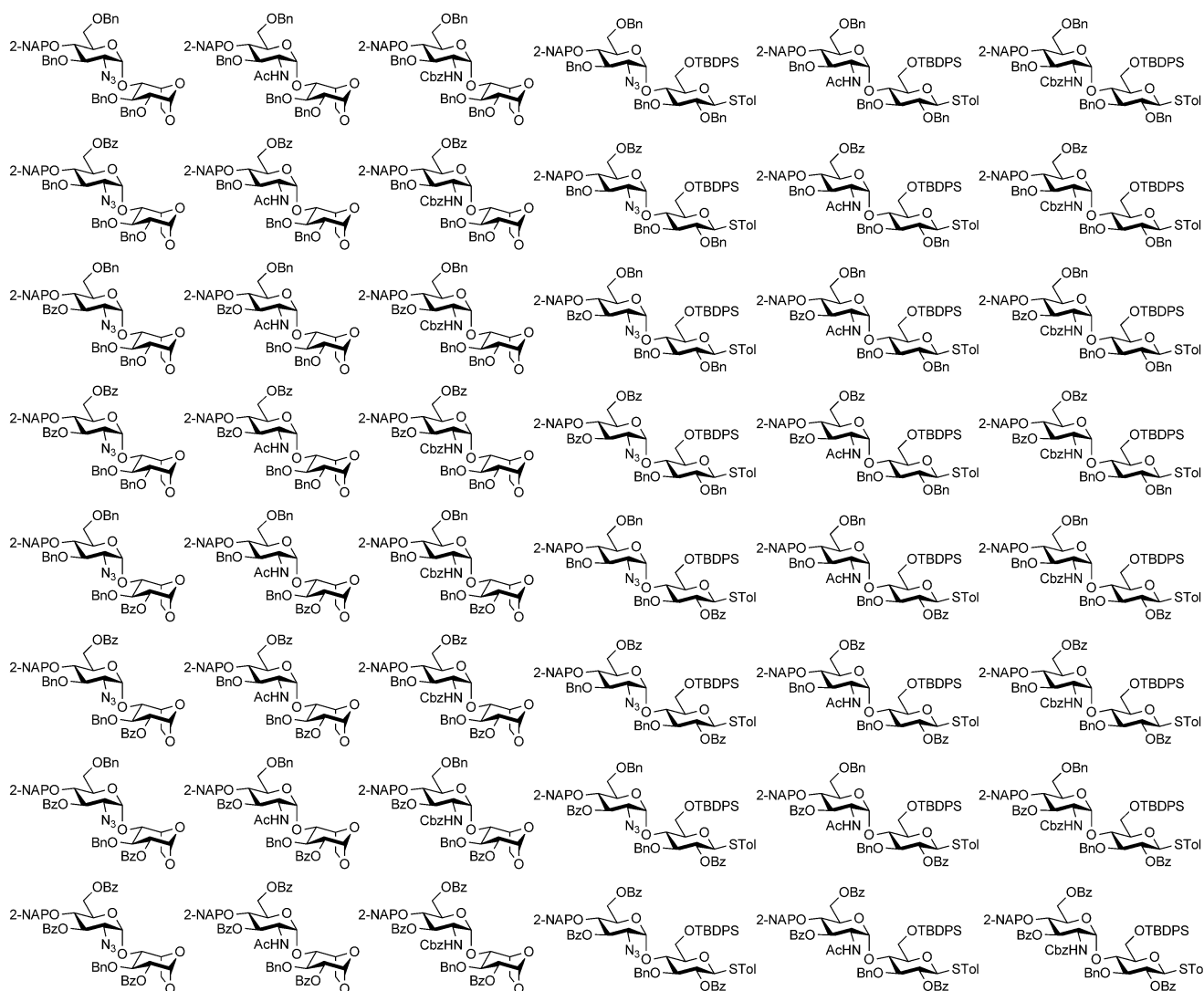


Abbildung 6. 48 Disaccharid-Bausteine, die von Hung et al. zum Aufbau der Heparin- und Heparansulfat-Oligosaccharidbibliotheken synthetisiert wurden.

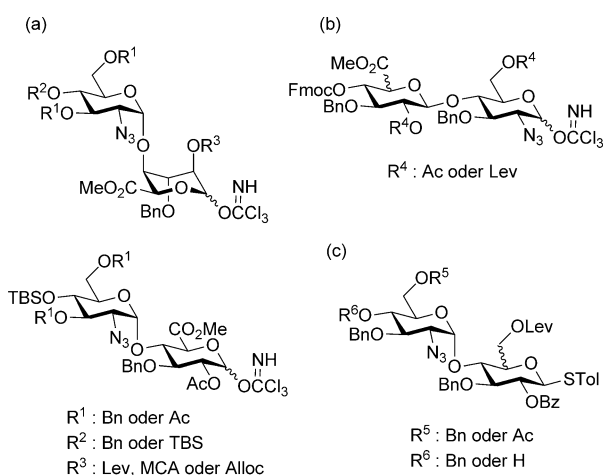
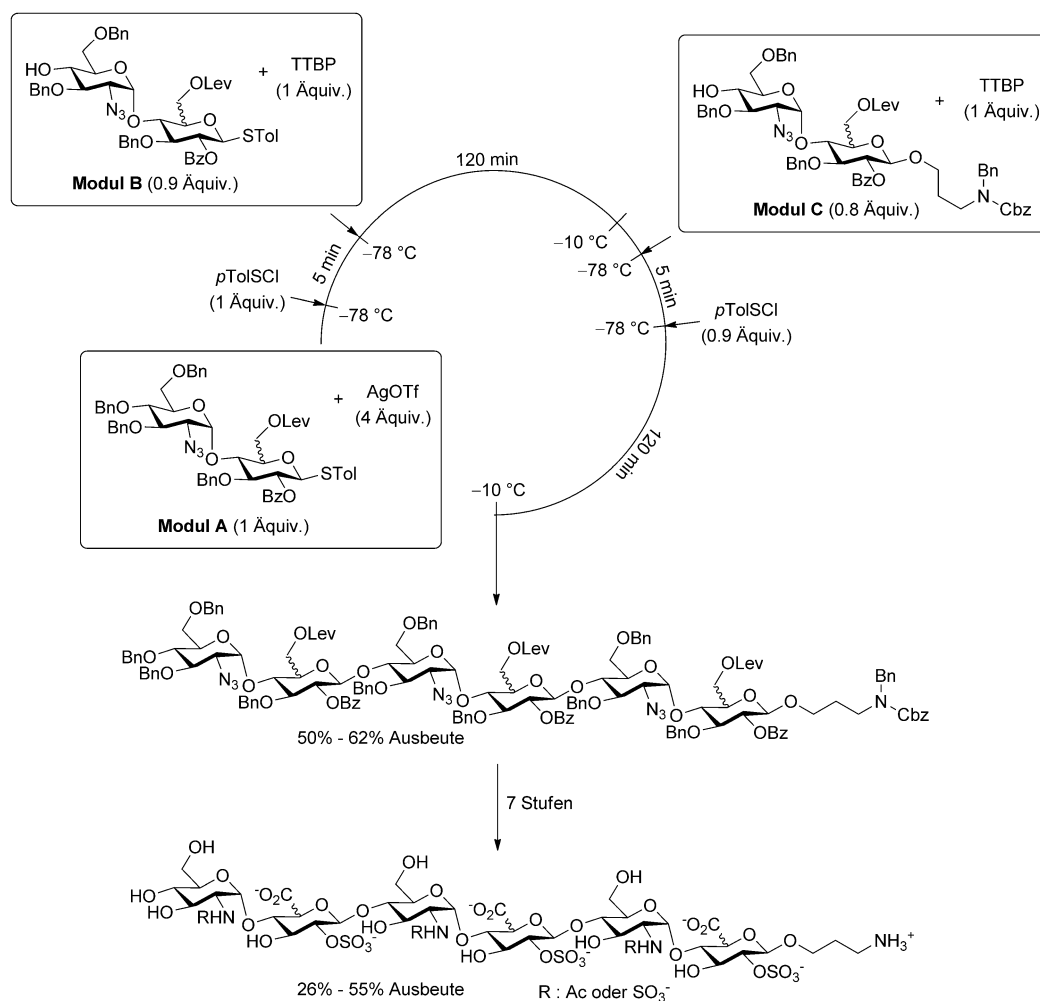


Abbildung 7. Disaccharidmodule für die Synthese heparinähnlicher Oligosaccharide mit variablem Muster aus repetitiven Einheiten entsprechend den Veröffentlichungen aus den Arbeitsgruppen von a) Seeberger, b) Boon und c) Huang.

3.7. 4,5-Oxazolidinon-geschützte Sialyldonoren für effiziente Synthesen von α -Sialosiden

Sialinsäuren sind eine Familie natürlich vorkommender Derivate der Neuraminsäure (5-Amino-3,5-didesoxy-D-*glycero*-D-*galacto*-non-2-ulosonsäure), die meist in höheren Tieren und bestimmten Mikroorganismen vorkommen. Unter den mehr als 50 bislang bekannten Verbindungen sind die C5-Aminoderivate die wichtigste Strukturvariante, bei der die Aminofunktion acetyliert (Neu5Ac), glycosyliert (Neu5Gc) oder mit einer Hydroxygruppe substituiert (KDN) sein kann.^[82] Es gibt auch weitere Substitutionen (z.B. *O*-Acetyl) an den C4-, C7-, C8- oder C9-Hydroxygruppen. Sialinsäuren finden sich meist gebunden an Galactoside über eine $\alpha(2\rightarrow3)$ - oder $\alpha(2\rightarrow6)$ -Bindung, an *N*-Acetylgalactosamin über eine $\alpha(2\rightarrow6)$ -Bindung und an andere Sialinsäuren über eine $\alpha(2\rightarrow8)$ - oder $\alpha(2\rightarrow9)$ -Bindung an den äußersten Positionen von Glycoproteinen und Glycolipiden. Aufgrund der terminalen exponierten Position auf der Zelloberfläche werden sialinsäurehaltige Konjugate von Viren und Bakterien als Rezep-



Schema 21. Modulare Eintopfsynthese der heparinähnlichen Hexasaccharide nach dem kombinatorischen Präaktivierungsansatz.

toren genutzt. Außerdem regulieren sie zahlreiche wichtige biologische, pathologische und immunologische Prozesse.^[83] Die chemische Synthese von Sialinsäureglycosiden kann durch die Reaktion eines Oxocarbenium-Ions erreicht werden, das an einem passend geschützten Sialinsäuredonor erzeugt wurde, dem ein Zucker mit einer oder mehreren freien Hydroxygruppen als Akzeptor zur Verfügung steht. Die Verwendung von Sialinsäure als Donor wird jedoch durch die speziellen strukturellen Eigenschaften verkompliziert. Die elektronenziehende Carboxygruppe an C1 vermindert die Reaktivität des anomeren Zentrums bei der Glycosylierung. Obwohl der Sialyldonor mit einer geschützten Hydroxymethylgruppe am anomeren Zentrum etwa 1000-mal reaktiver ist als die normale esterhaltige Verbindung (Tabelle 1),^[84] entstehen nur β -Sialoside bei der Glycosylierung. Inzwischen ist die stereochemische Kontrolle der α -Selektivität die große Herausforderung, denn das Fehlen einer C3-Funktionalität, die man zur Steuerung des stereochemischen Verlaufs direkt nutzen könnte, macht die Reaktion anfällig für Eliminierungen.

In den letzten Jahren wurden erhebliche Anstrengungen unternommen, um Sialinsäuredonoren für eine effiziente α -

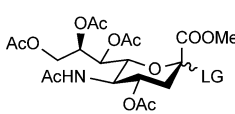
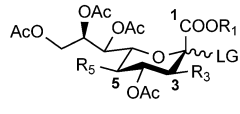
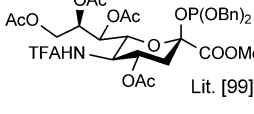
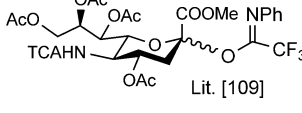
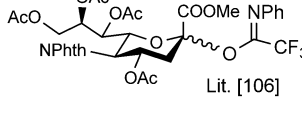
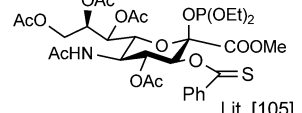
Sialylierung zu entwickeln. Die Ergebnisse sind in mehreren ausgezeichneten Übersichtsartikeln zusammengefasst.^[85] Kurzgefasst bieten die chemisch bearbeiteten Sialinsäuredonoren die folgenden drei Charakteristika: optimierte Abgangsgruppen, modifizierte Struktur und eine optimierte Kombination beider (Tabelle 3).

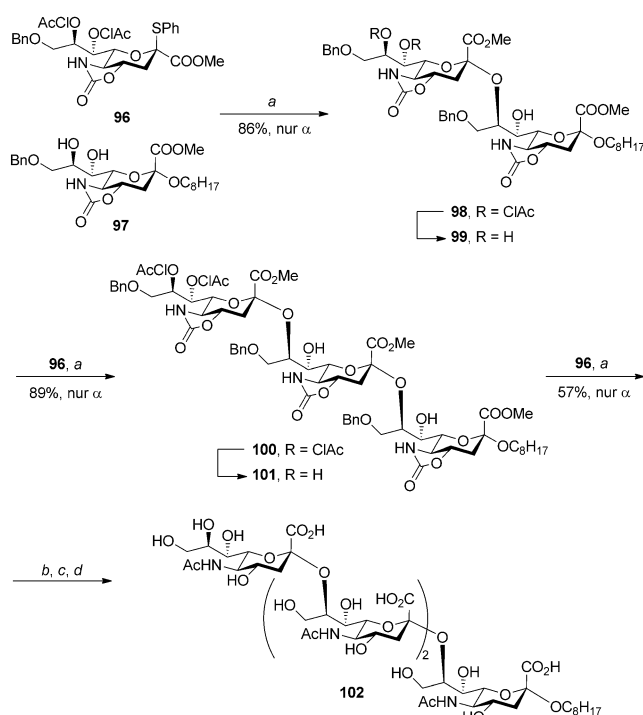
Die Optimierung der Abgangsgruppe wird hauptsächlich an der anomeren Position vorgenommen und dort vor allem mit Halogeniden, Phosphiten, Sulfiden und *N*-Phenyltrifluoracetimidat. Für diese Donoren ist die Anwesenheit von Acetonitril im Allgemeinen unabdingbar, um die α -Selektivität zu verstärken, doch die Ausbeute an α -anomeren Produkt ist normalerweise nicht höher als 70%. Am häufigsten werden

Thioglycoside wie SMe und SPh in Verbindung mit dem Nitril-Lösungsmittel verwendet. Die nächste Strategie ist, an C1 oder C3 eine Hilfsgruppe und an C5 Strukturmodifikationen einzuführen. C1-Hilfsgruppen sind meist weniger effektiv dabei, α -selektive Sialylierungsreaktionen zu dirigieren. Die C3-modifizierten Sialyldonoren weisen meist eine hohe α -Selektivität auf; allerdings sind zum Einführen und Entfernen solcher Hilfsgruppen zusätzlich mehrstufige Reaktionsfolgen notwendig. Die dritte Strategie ist, eine optimierte Kombination aus Abgangsgruppe (z. B. Phosphit oder *N*-Phenyltrifluoracetimidat) und Modifikation einzelner Positionen (z. B. C3 oder C5) zu suchen, um neue Sialyldonoren für eine selektive α -Sialylierung herzustellen.

Im vergangenen Jahrzehnt wurde nachgewiesen, dass die Modifikation der *N*-Acetylgruppe an der C5-Position des Neu5Ac-Donors besonders hilfreich für eine α -selektive Sialylierung ist (Tabelle 3).^[110] Eine aktuelle vielversprechende Entwicklung ist der Einsatz cyclischer Schutzgruppen, darunter Carbamate und Carbonate, für die schon früher stereodirigierende Effekte bei der Glycosylierung von Glucose und *N*-Acetylglucosamin nachgewiesen wurden.^[111] 2006 berichteten Takahashi und Mitarbeiter erstmals über den Ein-

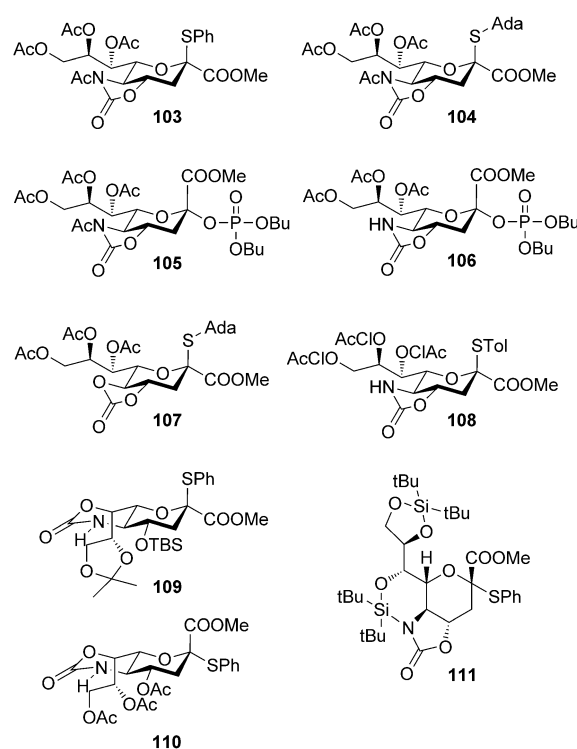
Tabelle 3: Verbreitete Sialinsäurendonoren für die chemische Sialylierung.

A) Optimierung der Abgangsgruppe (LG)	B) Strukturmodifikation	C) Optimierte Kombination
 LG= 1. Halogenide: Cl, ^[86] Br ^[86a] 2. Phosphite, Phosphate: O(P)(OEt) ₂ , ^[87] O(P)(OBn) ₂ , ^[88] O(P)(OBu) ₂ , ^[89] 3. Sulfide: SMe, ^[90] S(C)SOEt, ^[50b,91] SPh, ^[92] SBox ^[93] 4. <i>N</i> -Phenyltrifluoracetimidat: OC(NPh)CF ₃ ^[94]	 Modifikation an C1: R ¹ =C ₂ H ₄ SMe, ^[95] CH ₂ CONMe ₂ , ^[96] CH ₂ CN ^[97] Modifikation an C3: R ³ =OH, ^[98] Br, ^[99] O(C)SPh, ^[99] SPh, ^[100] SePh ^[101] Modifikation an C5: R ⁵ =NAC ₂ , ^[102] NHTFA, ^[103] NHTroc, ^[104] N ₃ , ^[84a] NPhth, ^[105] NHTCA, ^[104b,106] 4,5-Carbat, ^[89,107] 4,5-Carbonat ^[108]	 Lit. [99]  Lit. [109]  Lit. [106]  Lit. [105]

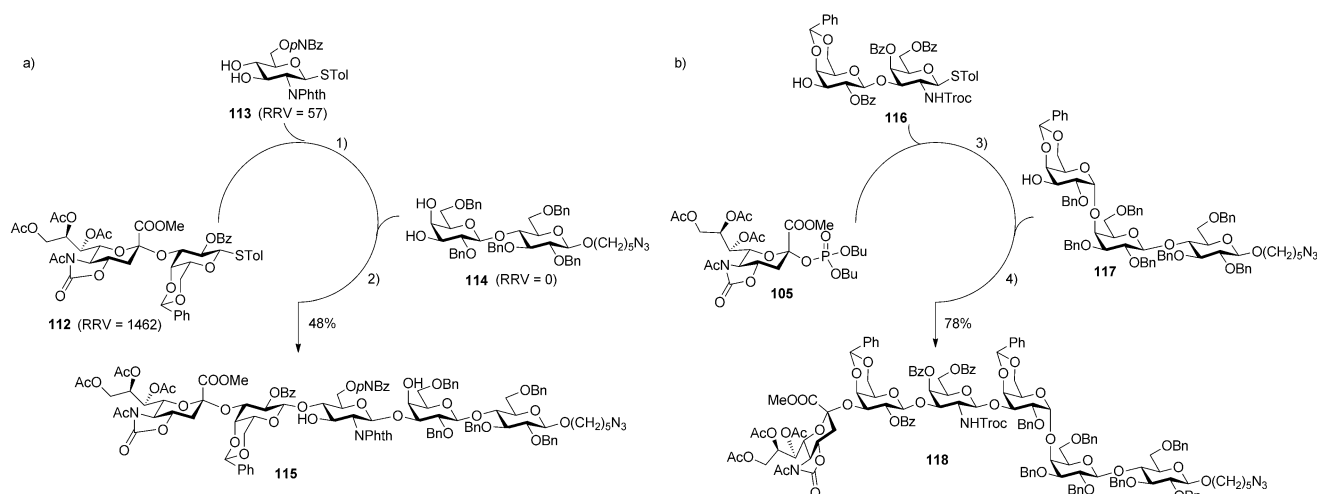

Scheme 22. Synthese von $\alpha(2\rightarrow8)$ -verknüpfter Tetrasialinsäure mit einem 5-*N*,4-*O*-Oxazolidinon-geschützten Thiosialosid-Donor und -Akzeptor. Reaktionsbedingungen: a) NIS, TFOH, MS 3 Å, CH₂Cl₂, -78 °C. b) Thioharnstoff, 2,6-Lutidin, DMF, 70 °C. c) LiOH·H₂O, H₂O, EtOH, 80 °C, 88 %. d) Ac₂O, NaHCO₃, H₂O, 0 °C, dann NaOMe, MeOH, 64 %. e) Pd(OH)₂, H₂ (1 atm), MeOH, H₂O, 70 %.

satz des 5-*N*,4-*O*-Oxazolidinon-geschützten Thioglycosids von Neu5Ac **96**^[107a] in der hocheffizienten Synthese von $\alpha(2\rightarrow8)$ -verknüpfter Oligosialinsäure (Schema 22). In diesem

Ansatz beginnt der erste Reaktionsschritt mit der Kupplung des 5-*N*,4-*O*-Carbonyl-geschützten Donors **96** mit Akzeptor **97**, gefolgt von der selektiven Abspaltung der Chloracetylgruppen an C7 und C8 der entstandenen Disialinsäure **98** zum Diol **99**. Dieses wurde anschließend mit dem Donor **96** zum Trimer **100** gekuppelt. Das gewünschte $\alpha(2\rightarrow8)$ -verknüpfte Tetrasialinsäurederivat **102** entstand nach Wiederholung der Kupplung und Entschützung. In jeder Kupplungsreaktion wurde eine vollständige α -Selektivität erreicht. Dies gelang in Dichlormethan allein ohne Unterstützung des Nitril-Lösungsmittels. Der Ansatz wurde auch auf die konvergente Synthese des GP1c-Glycolipidepitops angewendet, das eines der komplexesten Ganglioside aus der C-Reihe ist.^[112]


Abbildung 8. Moderne 5-*N*,4-*O*-Carbonyl-, 5-*O*,4-*O*-Carbonyl- und 5-*N*,7-*O*-geschützte Sialyldonoren.

Kurz nach Takahashis bahnbrechender Entdeckung führten Crich und Mitarbeiter eine *N*-acetylierte Variante **103** ein (Abbildung 8).^[107c] Die zusätzliche *N*-Acetylgruppe hatte keine negativen Effekte auf die α -Selektivität und Glycosylierungsausbeute^[110b] und ermöglichte außerdem die Abspal-



Schema 23. a) Programmierbare Eintopfsynthese mit dem sialylierten Disaccharid **112**. b) Orthogonale Eintopfsynthese des entwicklungsstadienspezifischen embryonalen Antigens-4 (SSEA-4). Reaktionsbedingungen: 1) NIS, TFOH, MS 4 Å, CH₂Cl₂, –78 °C. 2) NIS, TFOH, –20 °C bis RT; 48 % über zwei Stufen. 3) TMSOTf (1 Äquiv.), CH₂Cl₂, –78 °C. 4) NIS, –40 °C; 78 % über zwei Stufen.

tung der Oxazolidinongruppe unter milden basischen Bedingungen. So ist das gewünschte *N*-Acetamido-Produkt leicht zugänglich. Weiter wurde gefunden, dass das Nitril-Lösungsmittel entscheidend für die Glycosylierung sterisch gehinderter sekundärer Akzeptoren wie der 3-OH-Gruppe von Galactosiden ist. Der Einsatz des reaktiveren Donors **104** (Abbildung 8), der mit der elektronenschiebenden Adamantanylgruppe als Abgangsgruppe substituiert war, in MeCN/CH₂Cl₂ (1:2) bei –78 °C steigerte die α -Selektivität im Vergleich zur Glycosylierung mit Donor **103** erheblich.^[107b]

Das Grundprinzip des programmierbaren Eintopfansatzes ist es, Oligosaccharide vom nichtreduzierenden zum reduzierenden Ende hin aufzubauen, wobei der reaktivste Baustein als erstes zugegeben wird. Weil sich Sialinsäuren also oft am nichtreduzierenden Ende befinden, sollte die Synthese von Sialosiden nach dieser Eintopfvorschrift zu einem frühen Zeitpunkt stattfinden. Allerdings sind Sialinsäurethioglycoside viel reaktionsträger und viel weniger durch die Schutzgruppen beeinflussbar als andere Glycoside.^[84] So betragen die berechneten RRVs von Thiosialosiden einschließlich zweier C5-modifizierter Donoren (Azido- und *N,N*-Diacetylverbindungen) weniger als 20, und sogar durch eine Per-*O*-benzilylierung lassen sich diese RRVs nur wenig steigern (Tabelle 1). Eine mögliche Lösung ist, sialylierte Thioglycoside zu verwenden, bei denen die problematische α -Sialosylbindung im Stadium der Bausteinsynthese eingeführt wurde. Diese Strategie erfordert einen stereoselektiven Sialyldonor mit einer Abgangsgruppe, die orthogonal zu den Thioglycosiden ist, um die Sialyloligosaccharid-Bausteine effizient herstellen zu können. Frühe Versuche mit Dibenzylsialylphosphit-Donoren erbrachten jedoch keine zufriedenstellenden Glycosylierungen.^[113]

Weniger Aufmerksamkeit wurde dem Sialylphosphatdonor wegen seiner geringen Ausbeuten und der schlechten α -Selektivität in Glycosylierungsreaktionen geschenkt.^[87b,88a] Angeregt durch die vorher erwähnte ausgezeichnete α -Selektivität von Oxazolidinon-geschützten Neu5Ac-Donoren

entwickelten Hsu et al. zwei reaktive 4,5-Oxazolidinon-geschützte Neu5Ac-Donoren **105** und **106** (Abbildung 8), die Dibutylphosphat als Abgangsgruppe tragen.^[89] In dieser Untersuchung ergab die Glycosylierung von **105** mit einer Reihe von Thioglycosidakzeptoren, darunter 6-OH- und 3-OH-Galactosiden und 8-OH- und 9-OH-Neu5Ac, nur α -verknüpfte Thiodisaccharide in hohen Ausbeuten.^[89] Ohne Nachjustierung des Aglycons konnte in der programmierbaren Eintopfsynthese von linearem $\alpha(2\rightarrow3)$ -verknüpftem sialyliertem Pentasaccharid **115** eines der Thiodisaccharide, nämlich Neu5Aca(2 \rightarrow 3)Gal **112** (RRV = 1462, Tabelle 1), erfolgreich als Ausgangsverbindung eingesetzt werden (Schema 23a).^[89] Die Effizienz des Phosphatdonors **105** wurde in einer Reihe weiterer Eintopfreaktionen mit orthogonaler Strategie gezeigt, darunter der ersten Eintopfsynthese eines Derivats **118** des stadienspezifischen embryonalen Antigens 4 (SSEA-4)^[114] mit ausgezeichneter Ausbeute und α -Selektivität (Schema 23b).^[89] Bemerkenswert sind die kurze Zeit (weniger als 4 h) und die hohe Ausbeute, mit der diese Eintopfreaktionen abgeschlossen werden können.

Noch aktueller ist die Einführung der stereoselektiven Synthese von KDN mit einem ähnlichen 4,5-*O*-Carbonatgeschützten Sialinsäuredonor **107** durch Crich et al. (Abbildung 8).^[108] In diesem Ansatz wurden die üblichen Eliminierungsnebenprodukte der Sialylierungschemie weitgehend vermieden. Man könnte vermuten, dass das verstärkte Dipolmoment der Carbonatschutzgruppe die positive Ladung des intermediären Acetonitriladdukts stabilisiert und dadurch die Eliminierungsreaktion zurückdrängt.

Die 4,5-Oxazolidinon-geschützten Sialosyldonoren sind sehr nützlich und haben großes Einsatzpotenzial, wie anhand der hocheffizienten chemoselektiven Eintopfsynthese von Sialosiden^[89,115] und der Herstellung von Sialyloligosaccharid-Bausteinen mit definierter Stereochemie für modulare Synthesen,^[89] einer alternativen Strategie zur Sialosidsynthese,^[116] sichtbar wird. Andere Carbamatschutzgruppen für Sialyldonoren finden sich in dem 5-*N*,4-*O*-Carbonyl-7,8,9-tri-*O*-

chloracetyl-geschützten Donor **108**,^[107] den 5-*N*,7-*O*-Oxazinanon **109**^[117] und **110**^[118] und der doppelt Silylen-/Oxazolidinon-geschützten Verbindung **111**^[119] (Abbildung 8).

Insgesamt eröffnet die Methode der programmierbaren Synthese einen schnellen Zugang zu Oligosacchariden und stellt ein effizientes Verfahren zur Modifikation des Glycanrestes in Naturstoffen zur Verfügung. Die eingesetzten Bausteine müssen optimiert werden, um so allgemein verwendbare Verbindungen, die für verschiedene Strukturen einsetzbar sind, zu erhalten.

4. Automatisierte Festphasen-Oligosaccharidsynthese

Festphasen-Oligosaccharidsynthesen (SPOS; solid-phase oligosaccharide synthesis) bieten vor allem zwei Vorteile: 1) In den meisten Fällen ist nur am Ende der Reaktion ein Chromatographieschritt erforderlich und 2) unerwünschte Reagentien und Nebenprodukte können einfach durch Waschen und Filtern entfernt werden, sodass große Mengen des Glycosyldonors eingesetzt werden können, um hohe Produktionsausbeuten sicherzustellen. Die Entwicklung der Festphasen-Oligosaccharidsynthese stagnierte bis vor einigen Jahren, bevor Fortschritte bei den Glycosylierungsmethoden sowie eine größere Auswahl an Schutzgruppen, Linkern und Festphasen die Entwicklung zügig vorangetrieben haben.^[120] Beispiele nützlicher Entwicklungen sind die glycosylbasierte SPOS von Danishefsky et al.,^[121] die *O*-trichloracetimidatbasierte SPOS von Schmidt et al.^[122] und die thioglycosidbasierte SPOS von Nicolaou et al.^[123] Darüber hinaus führten Seeberger et al. einen automatisierten Oligosaccharid-Synthesizer ein, der von einem Peptid-Synthesizer abgeleitet und an eine automatisierte Oligosaccharidsynthese angepasst wurde (Abbildung 9).^[124]

Die allgemeine Anwendbarkeit der automatisierten SPOS wurde an der Synthese eines Nonasaccharids, des Le^y-Le^x(KH-1)-Antigenderivats **124** gezeigt (Schema 24).^[125] Die Glycosylphosphate^[126] **119–123** dienen als glycosylierende Verbindungen zum Aufbau von fünf verschiedenen Glycosidbindungen innerhalb der Zielsequenz von KH-1. In Betracht der Stabilität olefinischer Linker gegenüber den Bedingungen des Kupplungszyklus wurde Octendiol ausgewählt und an einem Polystyrolharz mit freien Carboxygruppen verestert. Diese Bindung kann am Ende der Synthese mit einer starken Base schnell abgespalten werden. Die 9-Fluorenylmethoxycarbonylgruppe (Fmoc) wurde wegen ihrer ausgezeichneten Stabilität gegenüber den sauren Glycosylierungsbedingungen und der leichten Abspaltbarkeit mit nichtnucleophilen Aminen als temporäre Schutzgruppe ausgewählt. Außerdem kann man die Entschützungs-effizienz durch Verfolgen des bei der Abspaltung von Fmoc entstehenden Dibenzofluorens durch UV/Vis-Spektroskopie bestimmen. Lävulinylester wurde als weitere intermediäre Schutzgruppe für einen Verzweigungspunkt gewählt. Er kann leicht mit Hydrazin entfernt werden. Das automatisierte Syntheseverfahren umfasst folgende Schritte: 1) Kupplung: TMSOTf (5 Äquiv.) zur Aktivierung des Glycosylphosphatdonors wurde zweimal zugegeben, um eine

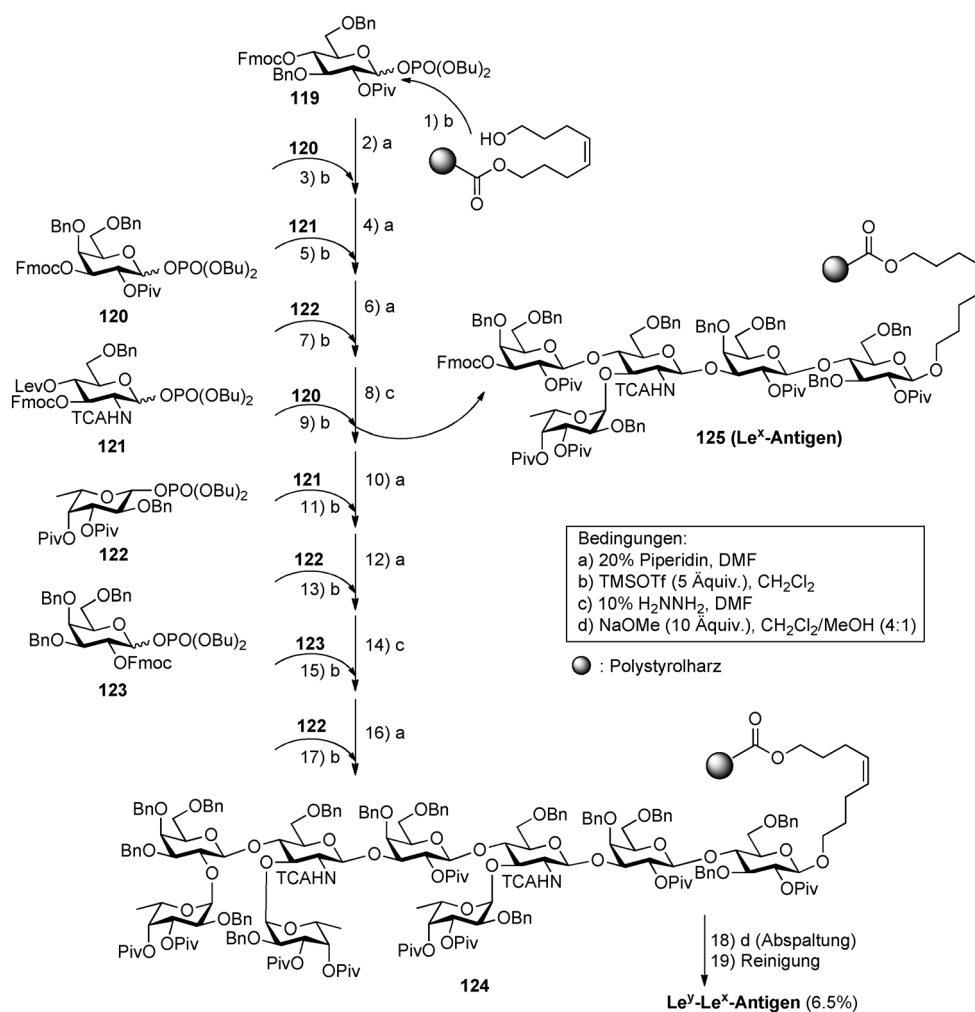


Abbildung 9. Automatisierter Oligosaccharid-Synthesizer nach Seeberger; Abdruck nach: *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 3194–3206.

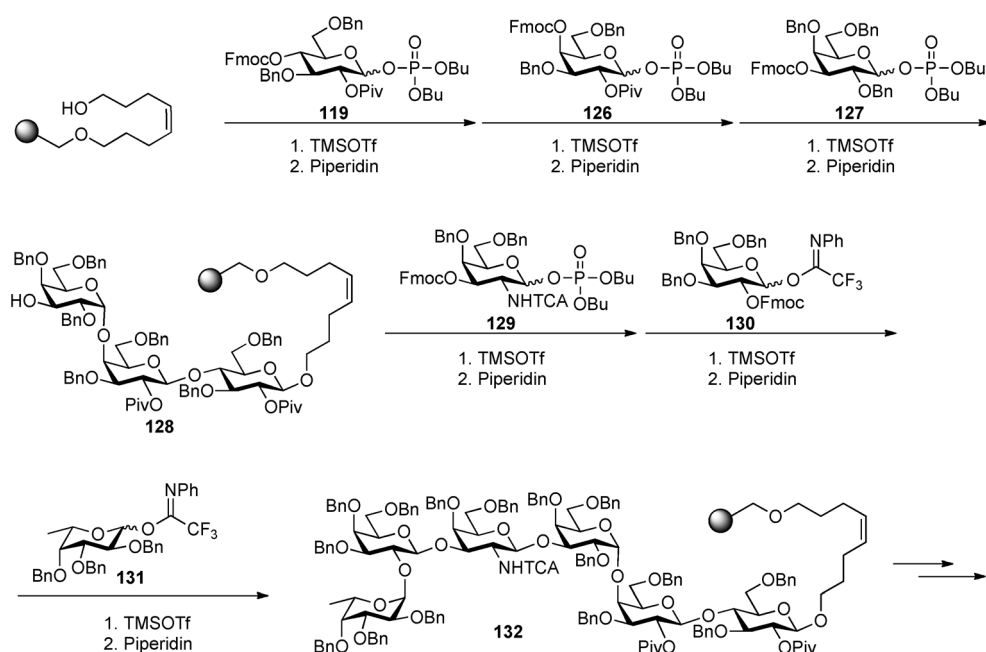
hohe Kupplungsausbeute sicherzustellen und die Kupplungsreaktion auf einen vollständigen Umsatz hin voranzutreiben. 2) Entschützung: Die temporäre Fmoc-Schutzgruppe wurde selektiv mit 20 % Piperidin in DMF entfernt; der Lävulinylester wurde mit 10 % Hydrazin in DMF entfernt. 3) Die Abspaltung des gewünschten Oligosaccharids mit Natriummethoxid; auch eine Kreuzmetathese mit Ethylen mit Grubbs-Katalysator findet Anwendung zur Erzeugung von *n*-Pentenylglycosiden, die zu biologischen Zwecken in andere funktionelle Gruppen wie eine Thiogruppe umgewandelt werden können.^[127] Ein HPLC-Lauf war der einzige Reinigungsschritt nach der Abspaltung aller Schutzgruppen. Das (Le^y-Le^x)-KH-1-Nonasaccharid wurde in 23 h mit einer Gesamtausbeute von 6.5 % synthetisiert. Nach dem gleichen Schema konnte auch das Le^x-Antigen **125** synthetisiert werden (Schema 24).

Mit der automatisierten Oligosaccharidsynthese wurden verschiedene wichtige Kohlenhydrate synthetisiert, darunter das Globo-H-Hexasaccharid **133** (Schema 25),^[128] das Kernpentasaccharid N-verknüpfter Glycane,^[129] β -Mannosid,^[130] Oligomannoside,^[131] Oligorhamnoside,^[132] die Phytoalexin-Elicitorfamilie aus Glucan^[124a] und die parasitischen Impfstoffkandidaten gegen Malaria und Leishmaniose (siehe Abschnitt 7).

Die stereoselektive Gewinnung von 1,2-*cis*-Glycosiden bleibt eine der Hauptherausforderungen für die SPOS, obwohl es bei α -galactosidischen^[128] (Schema 25) und β -mannosidischen^[130] Bindungen einige Fortschritte gegeben hat. Boons et al. gingen dieses Problem auf elegante Art mit einer durch ein chirales Auxiliar vermittelten 1,2-*cis*-Gly-



Schema 24. Automatisierte Festphasensynthese von Le^x und Le^y-Le^x (KH-1).



Schema 25. Automatisierte Festphasensynthese des Globo-H-Hexasaccharids.

cosylierung an.^[133] Sie zeigten, dass (*S*)-(Phenylthiomethyl)benzyl als chirale Hilfsgruppe an C2 des Glycosyldonors an der Glycosylierungsreaktion teilnimmt, indem es ein anomeres äquatoriales Sulfoniumion als *trans*-Decalinring bildet, der anschließend durch den Zuckeralkohol ersetzt wird, wobei stereoselektiv das 1,2-*cis*-Glycosid entsteht (Abbildung 10).^[134] Mit diesem Verfahren wurde eine Reihe verzweigter Oligoglycoside, die viele 1,2-*cis*-glycosidische Bindungen enthalten, erfolgreich auf fester Phase mit hoch stereoselektiver Kontrolle und hohen Ausbeuten zusammengefügt (Schema 26).^[133] Das chirale Auxiliar (*S*)-(Phenylthiomethyl)benzyl kann auf der Festphase einfach in eine Acylgruppe umgewandelt werden und ist mit den Bedingungen für die selektive Abspaltung der temporären Fmoc- und Alloc-Schutzgruppen kompatibel.

Doch trotz der Erfolge bei der automatisierten Festphasen-Oligosaccharidsynthese macht der Bedarf an großen Überschüssen an Zuckerdonoren (z. B. 10 Äquivalente für jeden Kupplungsschritt, um einen vollständigen Reaktionsablauf zu erzwingen) zusätzliche Schritte zur Herstellung der Bausteine nötig. Eine alternative Methode beruht auf der Verwendung leichter perfluorierter Kohlenstoffketten. Bei diesem Ansatz wird die gewünschte markierte Verbindung durch Extraktion an einer fluorigen Festphase (FSPE; fluoruous solid-phase

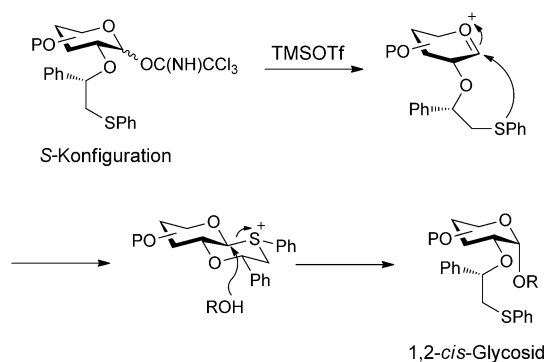
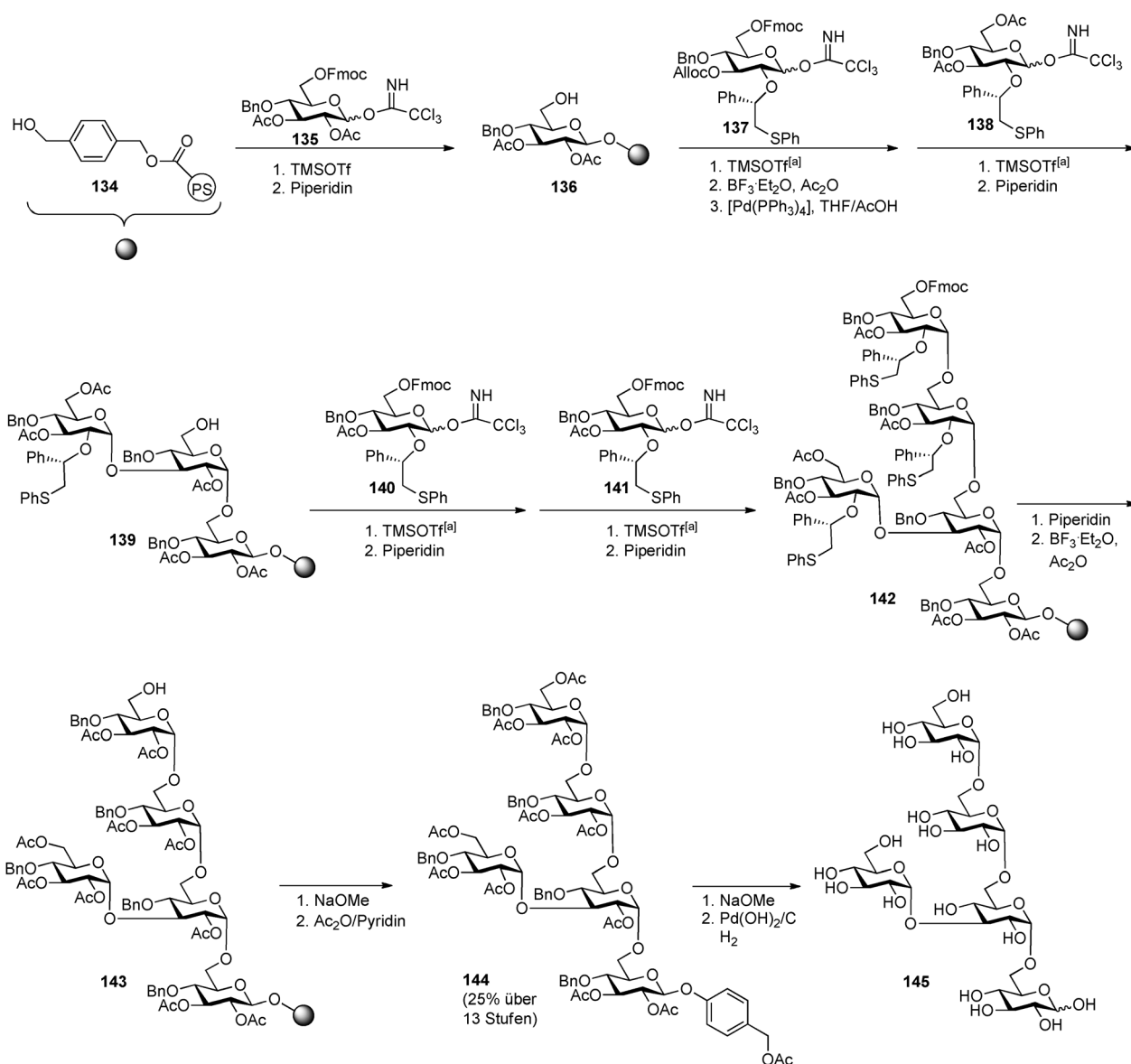
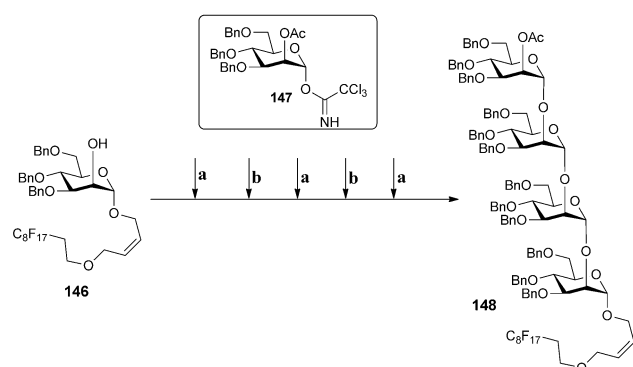


Abbildung 10. Knüpfung einer 1,2-*cis*-glycosidischen Bindung mithilfe eines chiralen Auxiliars.

extraction)^[135] über spezifische solvophobe Wechselwirkungen aus dem Reaktionsgemisch entfernt. Die Methode hat sich als attraktive Strategie für die automatisierte Kohlenhydratsynthese erwiesen.^[136] Die leichte Fluorkohlenwasserstoffmarkierung (C_8F_{17}) war inert gegenüber den üblichen Glycosylierungs- und Schutzgruppenbedingungen und ermöglichte eine einfache NMR-Charakterisierung der Kohlenhydratzwischenprodukte.^[136,137] Pohl und Mitarbeiter verwendeten diese Technik, um Tetra- und Pentamannoseoligosaccharide zu synthetisieren, indem sie eine perfluorierte Gruppe über einen Sauerstoff-Abstandhalter einbauten (Schema 27),^[136] der die Löslichkeit von Oligosaccharid und Linker in organischen Lösungsmitteln, wie sie meist für die Glycosylierungsreaktion verwendet werden, deutlich verbessert. Durch iterative Kupplung, Filtrierung und Entschützung kann das $\alpha(1\rightarrow2)$ -verknüpfte Tetramannosid **148** mit 79 %



Schema 26. Stereoselektive Festphasensynthese des $\alpha(1\rightarrow6)$ -verknüpften Tetraglucosids mit einer $\alpha(1\rightarrow3)$ -verknüpften Glucoseverzweigung. [a] Die verwendeten Donoren **137**, **138**, **140** und **141** wurden mit TMSOTf bei -40°C in einem getrennten Reaktionsgefäß voraktiviert.



Schema 27. Iterative Synthese von $\alpha(1\rightarrow2)$ -verknüpftem Tetramannosid. Reaktionsbedingungen: a) 1. Kupplung (**147**, TMSOTf, CH_2Cl_2); 2. Filtrierung (FSPE). b) 1. Entschützung (NaOMe, MeOH); 2. Filtrierung (FSPE), 79 % Gesamtausbeute.

Gesamtausbeute synthetisiert werden (Schema 27). Dazu wurden nur 6 Äquivalente **147** eingesetzt, was viel weniger ist als bei der automatisierten Festphasensynthese.^[124a] Diese Fluormarkierungsmethode lässt sich auch bei der Synthese eines verzweigten Mannoseptasaccharids einsetzen.^[136] Lävulinsäureester und/oder *tert*-Butyldiphenylsilylether wurden als temporäre Schutzgruppen für die Verzweigungspunkte benutzt. Bemerkenswert ist, dass diese verzweigten oder linearen Mannosestrukturen leicht löslich in der wässrig-organischen Mischung sind, mit der die FSPE-Säule beladen wird.

Die Fluorkohlenstoffmarkierung ist auch interessant, weil sie eine Alkengruppe enthält, die in eine andere funktionelle Gruppe umgewandelt werden kann. Auf diese Weise lassen sich synthetische Oligosaccharide in multivalente Strukturen einbinden.^[138] Daneben können Zucker mit einer einzigen C_8F_{17} -Gruppe nichtkovalent an perfluorierte Glasplättchen adsorbiert werden, die als Kohlenhydratmikroarray zum Screening auf kohlenhydratbindende Proteine verwendet werden können.^[139] Schließlich kann die Fluormarkierung auch in Eintopf-Oligosaccharidsynthesen eingesetzt werden, um die Reinigung der gesuchten Oligosaccharide zu erleichtern.^[140]

Festphasen-Oligosaccharidsynthesen haben trotz ihres großen Potenzials auch ihre Grenzen, insbesondere bei Schutzgruppenmanipulationen, wegen des großen Überschusses an Glycosylierungsreagentien und bei der Erzeugung molekularer Diversität. Die Komplexität selektiver Entschützens nimmt mit wachsender Kettenlänge zu. Außerdem ist die Methode zur schnellen Erzeugung molekularer Diversität kompliziert, obwohl sie die Synthese des gewünschten Glycans beschleunigen und die Reinigung der Zwischenprodukte erleichtern kann. Weitere Verbesserungen sind nötig, um SPOS anwenderfreundlicher zu machen: 1) eine sehr präzise Kontrolle von Stereoselektivität und Regioselektivität und 2) eine quantitative Glycosylierung bei jedem Kupplungsschritt. Ansonsten werden die zunehmende Anzahl gemischter α/β -Bindungen in der wachsenden Oligosaccharidkette sowie Deletionssequenzen den abschließenden Reinigungsschritt stark verlangsamen.

4.2. Festphasen-Glycopeptidsynthese

Unter den posttranslationalen Modifikationen ist die Glycosylierung eine verbreitete und komplexe Modifikation, die schätzungsweise an mehr als 50 % aller humanen Proteine vorkommt. Die Glycosylierung von Proteinen erfolgt gewöhnlich an Ser, Thr und Tyr (O-Glycoside) oder an Asn (N-Glycoside) und ist für eine Reihe biologischer Funktionen verantwortlich.^[1c] Zugang zu homogenen Glycoproteinen und Glycopeptiden ist von entscheidender Bedeutung, um die Rolle der Glycosylierung auf molekularer Ebene zu verstehen. Aufgrund der verbreitet vorkommenden heterogenen Glycoformen sind homogene Präparationen nur schwer zugänglich, und es wurden chemische und chemoenzymatische Synthesen eingeführt, um die notwendigen Glycopeptide und Glycoproteine für biologische und Strukturuntersuchungen zu erhalten.^[141] Um Glycopeptide mit Festphasensynthesen herzustellen, werden folgende drei Strategien am häufigsten verfolgt (Abbildung 11):^[142]

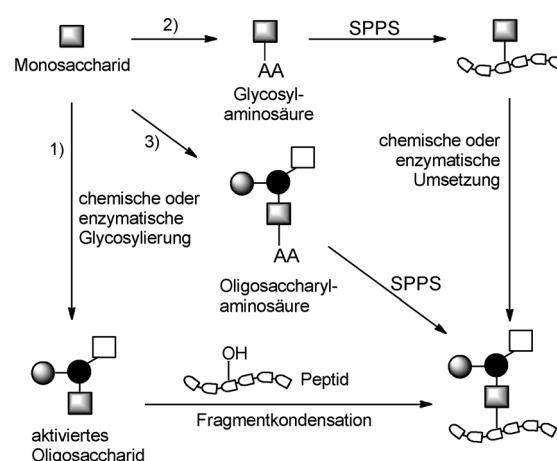


Abbildung 11. Drei Strategien zur Herstellung von Glycopeptiden mit komplexen Glycanen.

1. Konvergente Fragmentkondensation aktivierter Oligosaccharide mit passend geschützten Vollängenpeptiden;
2. Schrittweise Festphasenpeptidsynthese eines einfachen Glycopeptids, gefolgt von einer Verlängerung der Glycane;
3. Schrittweise Festphasenpeptidsynthese mit vollständig glycosylierten Aminosäurebausteinen.

Die direkte Fragmentkondensation zwischen Saccharid und Peptid stellt einen hochkonvergenten Ansatz zur Synthese von Glycopeptiden dar. Die komplexe Glycodomäne kann zunächst mit Verfahren wie der Eintopfmethode oder der Festphasenstrategie wie oben beschrieben aufgebaut und das Endprodukt dann mit aktivierter anomerer Position direkt mit dem geeignet geschützten Peptid kondensiert werden. Eine direkte O-Glycosylierung der freien Hydroxygruppen von Thr oder Ser in Peptiden an fester Phase ist prinzipiell möglich,^[143] scheitert aber oft an der schlechten Löslichkeit der Peptide unter üblichen Glycosylierungsbe-

dingungen, sodass die Ausbeuten schlecht werden. Im Falle N-glycosylierter Peptide ist die Reaktion eines Glycosylamins mit der Aspartatseitenkette ein beliebter Ansatz. Die Leistungsfähigkeit dieser Methode wurde elegant durch Danishefskys Synthesen von N-Glycopeptiden verdeutlicht, die alle Arten komplexer N-Glycane umfassen, darunter solche vom High-Mannose-Typ,^[144] vom Hybridtyp^[145] und vom Komplextyp.^[146] In ihrem Ansatz wurden die glycosamintragenden komplexen N-Glycane üblicherweise mit dem Glycal-Aufbausystem synthetisiert, danach wurden die reduzierenden Zucker durch Kochetkov-Reaktion^[147] in Glycosylamine umgewandelt. Das Verfahren ist zwar nützlich, zu seinen Nachteilen gehört jedoch die Anomerisierung des Glycosylamins unter reduzierenden Bedingungen und die Bildung intramolekularer Aspartimide während der Aminolyse. Es gibt noch immer Bedarf für alternative Strategien zur Herstellung von N-Glycosylamiden,^[148] so den Einsatz von Glycosylaziden für die stereoselektive N-Glycosylierung mit der Staudinger-Ligation.^[149]

Fast immer werden Glycosylaminosäure-Bausteine, die entweder Mono- oder Oligosaccharid-Seitenketten tragen, zur schrittweisen Festphasenpeptidsynthese (SPPS) eingesetzt. Der Syntheseweg zu den Saccharidkomponenten und die Glycosylierungsreaktionen zur Präparation der O- und N-Glycosylaminosäurebausteine sind an anderer Stelle ausführlich beschrieben worden.^[150] Der Einbau von Glycosylaminosäuren mit voluminösen Saccharidkomponenten verläuft bei der SPPS oft mit niedriger Ausbeute. Daher ist es manchmal strategisch günstiger, eine Glycosylaminosäure mit einfachen Glycanen in der Peptidsynthese einzusetzen und die Glycopeptide dann enzymatisch weiter aufzubauen. Die einfachen O- oder N-verknüpften Glycopeptide können dann entweder als Akzeptoren für die schrittweise Addition von Monosacchariden durch spezifische Glycosyltransferasen dienen, wie bei der Synthese von O-Glycopeptid-Fragmenten des Zelladhäsionsmoleküls PSGL-1 (P-Selektinligand-1),^[151] oder bei der Transglycosylierung, bei der ein Enzym wie die *endo*- β -N-Acetylglucosaminidase (ENGase) ein vollständig zusammengesetztes Oligosaccharid in einem einzigen Schritt überträgt.^[152] Das Problem der Zugänglichkeit von Glycosylaminosäuren, die große und komplexe Glycane tragen, kann auch durch direkte Isolierung aus natürlichen Glycoproteinen gelöst werden. In verschiedenen Beispielen hat sich der Einbau aus der Natur stammender Oligosaccharid-Aminosäuren in der SPPS zur Synthese von N-Glycopeptiden als nützlich erwiesen.^[153]

Die Festphasensynthese erlaubt zwar die Automatisierung des hochrepetitiven Vorgangs der Kupplung der einzelnen Bausteine, die Routinesynthese von Peptiden im Bereich von > 50 Aminosäuren ist jedoch nur noch eingeschränkt möglich. Allerdings lassen sich Glycopeptidsegmente für weitergehende Ligrationsreaktionen einsetzen, um kurze glycosylierte Peptide zu Glycoproteinen zusammenzusetzen.^[154]

5. Effiziente Strategien zur Beschleunigung der enzymatischen Oligosaccharidsynthese

Enzyme besitzen ein großes Potenzial als Katalysatoren für eine Reihe synthetischer Probleme.^[3h,155] So zeichnen sich enzymkatalysierte Glycosylierungen durch ausgezeichnete Regio- und Stereoselektivität unter sehr milden Bedingungen aus und machen umfangreiche Schutzgruppenreaktionen überflüssig.^[156] Der folgende Abschnitt befasst sich hauptsächlich mit Strategien zur Beschleunigung der enzymkatalysierten Oligosaccharidsynthese. Aktuelle Übersichtsartikel seien zum weiterführenden Studium empfohlen.^[70,156c,157]

5.1. Regeneration von Zuckernucleotiden

Die Glycosyltransferasen,^[158] die die Übertragung eines Saccharids von einem Zuckernucleotid-Donor auf einen Akzeptor katalysieren, wurden bereits für die Synthese komplexer Glycokonjugate eingesetzt.^[156c,157b,d,159] Dennoch engen die schmale Substratspezifität, hohe Kosten für Enzyme und Zuckernucleotide und die begrenzte Verfügbarkeit der Enzyme ihre Anwendbarkeit ein. Außerdem kann das Fortschreiten der Glycosylierung durch eine Rückkopplungshemmung durch die entstehenden Nucleosidphosphate beeinträchtigt werden. Die Regeneration der Zuckernucleotide *in situ* kann die Konzentration der Nucleotidphosphat-Nebenprodukte unter Einsatz von weniger als einer stöchiometrischen Menge an Zuckernucleotid vermindern. So werden der Zuckernucleotidverbrauch und die Produkt-hemmung gleichzeitig verringert.^[160] Viele Glycosyltransferasen, die an der Biosynthese von Oligosacchariden beteiligt sind, nutzen nur neun Zuckernucleotide als Donorsubstrate in Säugersystemen, darunter α -UDP-Glucose (UDP-Glc), α -UDP-N-Acetylgalactosamin (UDP-GalNAc), α -UDP-Glucuronsäure (UDP-GlcA), α -UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc), α -UDP-Galactose (UDP-Gal), α -UDP-Xylose (UDP-Xyl), β -GDP-Fucose (GDP-Fuc), α -GDP-Mannose (GDP-Man) und β -CMP-N-Acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac).

Vor beinahe 30 Jahren berichteten Whiteside und Wong zum ersten Mal über ein Multienzymsystem für die Synthese von N-Acetylglucosamin (LacNAc) in großem Maßstab mit *In-situ*-Regeneration von UDP-Gal (Abbildung 12a).^[161] Dieses Multienzymsystem integrierte die Regeneration von UDP-Glc, die zur Gewinnung von UDP-Gal durch die UDP-Gal-4-Epimerase eingesetzt wurde. Die nachfolgende Umsetzung von UDP-Gal durch β 1 \rightarrow 4GalT ergab LacNAc im Multigramm-Maßstab. Während der letzten beiden Jahrzehnte wurde versucht, ein Regenerationssystem für alle üblichen Zuckernucleotide zu entwickeln.^[156c,d,162] So kann UDP-Gal außer über das beschriebene Regenerationssystem auch aus Gal-1-phosphat (Gal-1-P), das mit Galactokinase aus Galactose gewonnen werden kann,^[163] oder durch den Einbau von Saccharose-Synthetase in das Recycling-Schema rückgebildet werden.^[164] Meistens ist es besser, das Zucker-1-phosphat mit einer Kinase herzustellen und anschließend mit UTP zum UDP-Zucker umzusetzen. Mit Sialyltransferase kann CMP-Neu5Ac einfach aus Neu5Ac zurückgewonnen

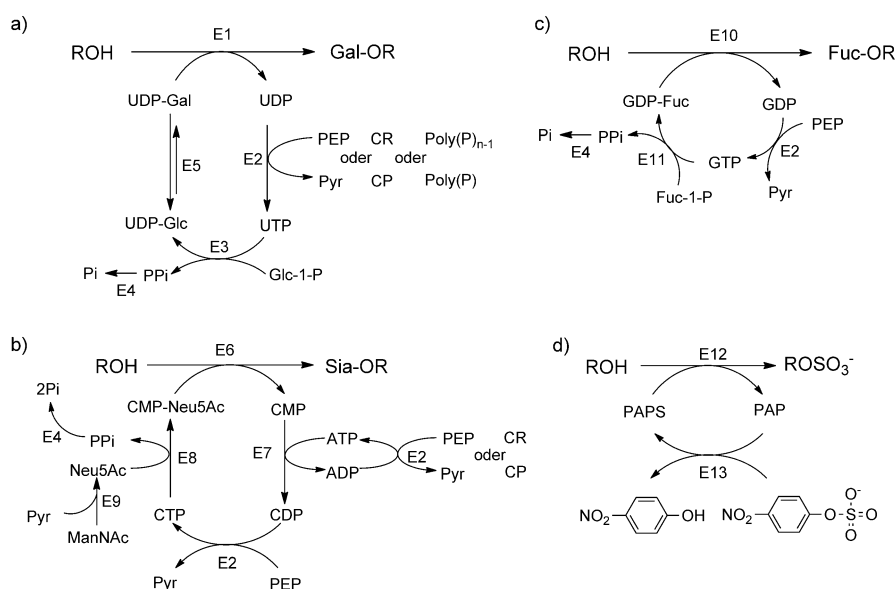


Abbildung 12. Recyclingsystem zur Regeneration von a) UDP-Gal, b) CMP-Neu5Ac, c) GDP-Fuc und d) PAPS. E1 = Galactosyltransferase, E2 = Pyruvatkinase (PK) oder Kreatinkinase (CK) oder *E. coli*-Polyphosphatkinase, E3 = Glucose-1-phosphaturidylyltransferase, E4 = Pyrophosphatase (PPase), E5 = UDP-Gal-4-Epimerase, E6 = Sialyltransferase, E7 = Nucleosidmonophosphatkinase (NMK), E8 = CMP-Neu5Ac-Synthetase, E9 = Neu5Ac-Aldolase, E10 = Fucosyltransferase, E11 = GDP-Fuc-Pyrophosphorylase, E12 = Sulfotransferase und E13 = Arylsulfotransferase, PEP = Phosphoenolpyruvat, Pyr = Pyruvat, CP = Kreatinphosphat, CR = Kreatin, PAPS = Phosphoadenosylphosphosulfat, PAP = Phosphoadenosylphosphat, PPi = anorganisches Pyrophosphat.

werden.^[165] Um Kosten zu sparen, kann man auf ManNAc als alternatives billigeres Ausgangsmaterial zurückgreifen; dieses kann von der Neu5Ac-Aldolase in Neu5Ac umgewandelt werden (Abbildung 12b).^[166]

Glycosyltransferasebasierte Systeme zur Regeneration von Zuckernucleotiden wurden zur Synthese komplexer Oligosaccharide entwickelt.^[156c,157e,162a] Mit der Kombination aus UDP-Regeneration und verschiedenen Galactosyltransferasen gelangen die Synthesen von α -Gal-Epitopen^[164,167] und LacNAc.^[161,163,168] Ein mehrere Enzyme umfassendes Regenerationssystem für UDP-GalNAc mit β 1,3-*N*-Acetylgalactosaminyltransferase aus *Haemophilus influenza* wurde für die Synthese der wichtigen Verbindungen Globotetraose und Isoglobotetraose eingesetzt.^[169] Das Hyaluronsäure(HA)-Polymer konnte effizient mit einer rekombinanten HA-Synthase mit In-situ-Regenerationssystemen für UDP-GlcA und UDP-GlcNAc synthetisiert werden.^[170] Solche Methoden, in denen der sequenzielle Einsatz von Glycosyltransferasen mit der Regeneration der Zuckernucleotide kombiniert wird, wurden auch auf die Möglichkeit hin untersucht, komplexe Oligosaccharide wie Sialyl-Lewis x (sLe^x) zu synthetisieren und gleichzeitig in situ CMP-Neu5Ac, UDP-GlcNAc, UDP-Gal und GDP-Fuc zu regenerieren.^[168a]

Phosphoenolpyruvat (PEP)^[155] wird bei der Zuckernucleotidregeneration wegen der Hydrolysestabilität und des hohen Phosphorylierungspotenzials häufig als Phosphatquelle zugesetzt. Es sind aber auch verschiedene andere Systeme untersucht worden. So berichteten Wang und Mitarbeiter vor kurzem über Kreatinphosphat-Kreatinkinase (CP-KP) als alternatives Energieversorgungssystem bei der Oligosaccharidsynthese.^[171] Weil die freie Standardenergie

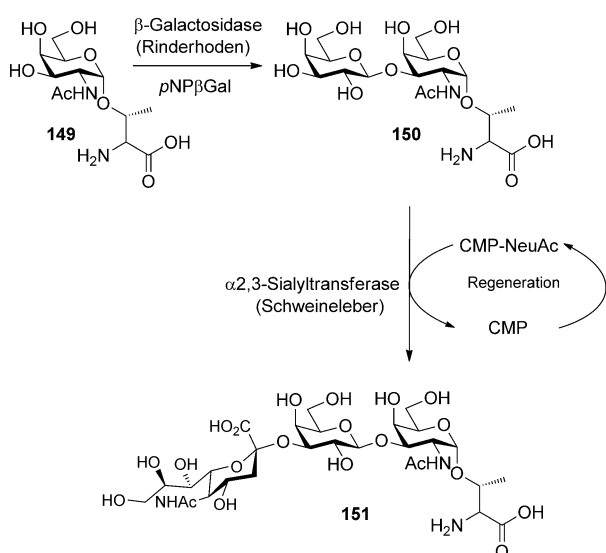
der Hydrolyse von CP ($-43.1 \text{ kJ mol}^{-1}$) höher als die von ATP ($-30.6 \text{ kJ mol}^{-1}$) ist, lassen sich CDP oder ADP leicht mithilfe des CP-CK-Systems in ihre entsprechenden Triphosphate überführen. Als man dieses System mit den bekannten Regenerationssystemen wie UDP-Gal und CMP-Neu5Ac kopelte (Abbildung 12a,b), ließen sich mehrere Oligosaccharide wie Globotriose in Ausbeuten herstellen, die mit denen des PEP-PK-Systems vergleichbar waren.^[171] Auch die Polyphosphatkinase aus *E. coli* zusammen mit Polyphosphat konnte als günstiges Nucleotidtriphosphat-Regenerationssystem für UDP-Gal bei der Synthese von LacNAc eingesetzt werden.^[172]

Die Regeneration von Phosphoadenosylphosphosulfat (PAPS) aus dem Nebenprodukt Phosphoadenosylphosphat (PAP) mit der Arylsulfotransferase wurde für die Synthese sulfatierter Glycane und Glycopeptide entwickelt (Abbildung 12 d).^[68]

5.1.1. Eintopf-Multienzymsynthese mit In-situ-Regeneration des Zuckernucleotids

Da die Glycosyltransferasen vielfach in einer Reaktionssequenz mit anderen Glycosyltransferasen oder Enzymen wie Glycosidasen, Sulfotransferasen und Proteasen eingesetzt werden,^[156c] ist es praktisch, komplizierte multienzymkatalysierte Reaktionen in Eintopfreaktionen umzuwandeln, vor allem solche, die auf Glycosyltransferasen in Verbindung mit einer Zuckernucleotidregeneration aufgebaut sind. Diese Strategie wurde bei der multienzymkatalysierten Eintopfsynthese von 6'-Sialyllactosamin mit In-situ-Regeneration von CMP-Neu5Ac und UDP-Gal verfolgt,^[166] ebenso wie in der Synthese des Trisaccharids Gal α 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1-OR mit β 1 \rightarrow 3GalT und β 1 \rightarrow 4GalT in Gegenwart des UDP-Gal-regenerierenden Systems.^[164]

Glycosidasekatalysierte Transglycosylierung in Kombination mit einem glycosyltransferasekatalysierten System und die Regeneration von Zuckernucleotiden wurden ebenfalls zusammen in Eintopfsynthesen verwendet.^[173] In einem eleganten Beispiel nutzten Thiem et al. β -Glycosidase, um das Disaccharid **150** des TF-Antigens (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow OThr) aus GalNAc α 1 \rightarrow OThr **149** zu bilden, das sofort mit α 2 \rightarrow 3-Sialyltransferase zum Sialyl-TF-Antigen **151** mit In-situ-Regeneration von CMP-Neu5Ac umgesetzt wurde (Schema 28).^[174] In diesem Fall kann die Hydrolyse des zwischenzeitlich entstehenden Disaccharides durch Glycosidase durch seine glycosyltransferasevermittelte Umwandlung in das nichthydrolysierbare Produkt blockiert werden.



Schema 28. Eintopf-Multienzymsynthese des Sialyl-TF-Antigens mit einem gemischten katalytischen System.

5.1.2. Oligosaccharidsynthese mit Zuckernucleotidregeneration an Festphasenkügelchen oder klonierten ganzen Zellen

Auch wenn sich die Kopplung von glycosyltransferase-basierten Synthesen mit der In-situ-Regeneration der Zuckernucleotide als nützlich erwiesen hat, besteht ein wichtiger Nachteil darin, dass die verschiedenen Enzyme für die Synthesen vorab gereinigt werden müssen, was sich als zeitaufwändig herausstellen kann. Um dies zu vermeiden, führten Wang und Mitarbeiter die „Superbead“-Technologie ein, in der rekombinante, mit einem His₆-Ende markierte Enzyme für die Regeneration von UDP-Gal auf Nickelnitrilotriacetat-Agarosekügelchen immobilisiert wurden.^[175] Die Agarosekügelchen wurden wie ein normales Reagens in Kombination mit unterschiedlichen Galactosyltransferasen, darunter α 1 \rightarrow 3GalT, α 1 \rightarrow 4GalT und β 1 \rightarrow 4GalT, eingesetzt, um Oligosaccharide wie Globotriose (Gb3) und Isoglobotriose (iGb3) zu synthetisieren. Sie konnten mehrfach wiederverwendet werden, wobei die Enzymaktivität nur leicht abnahm. Ein einfacheres UDP-Gal-Regenerationskügelchen mit drei Enzymen, das günstig käufliches UTP umsetzt, wurde kürzlich zur Synthese von Gb3 und iGb3 benutzt.^[176] Der Nachteil dieses Ansatzes besteht darin, dass es problematisch ist nachzuweisen, wenn ein oder zwei der immobilisierten Enzyme inaktiviert werden, und diese dann zu ersetzen.

Eine andere Möglichkeit ist, alle Gene für die enzymatische Synthese eines Oligosaccharids in ein Bakterium zu klonieren, um das Produkt in großem Maßstab in einem Fermentations- oder Zellsystem ohne Isolierung der Enzyme herzustellen.^[177] Mit dieser Strategie entwickelten Koizumi et al. bei Kyowa Hakko Kogyo Co. ein System zur Produktion von Oligosacchariden in großem Maßstab mit gentechnisch modifizierten Bakterien.^[178] Ausgehend von einer Schlüsseltechnologie, bei der *Corynebacterium ammoniagenes* eine große Menge an UTP aus preisgünstiger Orotsäure produziert, und in Kombination mit *E.-coli*-Zellen,

die gentechnisch so verändert waren, dass sie die Gene des entsprechenden Biosyntheseweges überexprimieren, ließen sich große Mengen an Zuckernucleotiden und Oligosacchariden produzieren. Diese innovative Technologie wurde auf einen größeren Gramm-Maßstab übertragen, um Oligosaccharide wie Globotriose^[178] und 3'-Sialyllactose^[179] sowie verschiedene Zuckernucleotide wie UDP-Gal,^[178] GDP-Fuc^[180] und CMP-Neu5Ac^[179] herzustellen.

Eine attraktive Alternative zu den zuvor beschriebenen Strategien ist der Ansatz einer „lebenden Fabrik“, eine Methode, bei der Oligosaccharide in einer lebenden Bakterienzelle synthetisiert werden. Die Zelle ist so konstruiert, dass sie die erforderlichen Glycosyltransferasen exprimiert und die zelluläre Maschinerie besitzt, um die Zuckernucleotide zu bilden.^[181] Auf diesem Weg wurden verschiedene elegante Beispiele für die Produktion von Oligosacchariden wie sialylierte (GM2^[182] und GD3^[183]) und fucosylierte Oligosaccharide (Le^x,^[181c] H-Antigen^[181b]) im Gramm-Maßstab etabliert.

5.2. Enzymatische Oligosaccharidsynthese an fester Phase oder auf Polymerträgern

Analog zur automatisierten Festphasensynthese von Oligosacchariden ist auch für enzymatische Synthesen der Einsatz von Festphasenmethoden erstrebenswert. In diesem Fall könnte der Ansatz eine wirkliche Vereinfachung darstellen, indem er die Vorteile der enzymatischen Synthese mit denen von Festphasenmethoden verbindet. Diese Vorteile sind: einfache Reinigung des Produkts, Stereo- und Regiokontrolle und die Vermeidung von Zwischenreaktionen an Schutzgruppen.^[184]

Die Integration von Enzymen in Festphasenstrategien bringt Vorteile mit sich, z. B. die größere Stabilität gegenüber Denaturierung und die einfache Produktabtrennung und Enzymrückgewinnung. Die Fixierung der Reaktionspartner an der Festphase kann linear vom reduzierenden Ende her erfolgen, indem man entweder das Akzeptorsaccharid oder das Enzym immobilisiert. Entscheidend dabei ist, eine geeignete Festphase zu finden, die hydrophil genug sein sollte, um in Wasser gut zu quellen, die aber auch geeignet sein sollte für den Einsatz in organischen Lösungsmitteln wie DMF. Auch die Länge des Linkers, mit dem das Akzeptorsaccharid an die Festphase gekuppelt wird, ist entscheidend.^[185] Ein längerer Linker kann die Flexibilität der Konformation erhöhen und die sterische Wechselwirkung zwischen Enzym und Festphase reduzieren, sodass die Enzyme für die Akzeptorstellen zugänglicher werden. Viele Harze wurden ausprobiert, darunter auch Glas mit kontrollierter Porengröße (CPG, controlled pore glass),^[186] derivatisierte Kieselsäure,^[187] Sepharose^[185] und Polyethylenglycol/Polyacrylamid-Polymer (PEGA).^[188] Die kovalente Immobilisierung der Glycosyltransferase auf Sepharose konnte ebenfalls erfolgreich für die Enzymtransferreaktion eingesetzt werden.^[189]

Wasserlösliche Polymerträger, die die Vorteile der Festphasenmethodik mit einer einfachen Produktisolierung verbinden, wurden ebenfalls schon für die enzymatische Oligosaccharidsynthese eingesetzt. Es wurde nachgewiesen, dass

die Immobilisierung des Zuckerakzeptors auf dem Polymer manchmal einen „polymeren Zucker-Clustereffekt“ verursacht, der die Affinität der Zuckersubstrate für die Glycosyltransferase erhöht und dadurch das Glycosylierungsergebnis verbessert.^[190] Außerdem kann die Glycosylierung mit NMR- und Fluoreszenzspektroskopie verfolgt und analysiert werden. Nishimura und Mitarbeiter haben wichtige Beiträge zum Einsatz von Polyacrylamid als wasserlösliches Polymer für die enzymatische Synthese von Sialyl-*N*-acetylactosamin,^[189–191] sLe^x^[190b] und das Gangliosid GM3 geleistet.^[192] Sie entwickelten auch eine effiziente Recyclingstrategie für die Enzyme: Die Glycosyltransferase wurde als Fusionsprotein mit maltosebindendem Protein (das als Affinitätsmarkierung für die Immobilisierung des Biokatalysators auf der Festphase z.B. aus Amylose dient) produziert.^[190b] Die Kombination einer immobilisierten Glycosyltransferase mit einem wasserlöslichen Polymer als Akzeptorsubstrat hat sich im glycosynthetischen System als erfolgreich erwiesen.^[189, 190b] Der Prototyp eines „automatisierten Glycosynthesizers“ wurde nach dieser Strategie entwickelt (Abbildung 13).^[193] Andere wasserlösliche Polymere wie thermoresponsives Po-



Abbildung 13. Automatischer Glycosynthesizer (Abdruck nach Lit. [193]).

lyacrylamid sind im Zusammenhang mit der Synthese des sLe^x-Tetrasaccharids beschrieben worden;^[194] hier ist das Polymer, das den Akzeptor trägt, bei niedriger Temperatur löslich und bei hoher Temperatur unlöslich.

Die Strategie, die eine Kombination aus Festphasenpeptidsynthese und enzymatischer Flüssigphasensynthese umfasst, wurde mit Erfolg bei der Herstellung von Glykokonjugaten wie Glycopeptiden eingesetzt. In einem üblichen Ansatz wird ein Glycosylaminosäure-Baustein in das Syntheschema der Festphasenpeptidsynthese integriert, wo er als Primer für die nachfolgende enzymatische Kettenverlängerung dient. Nach diesem Schema wurden beispielsweise PSGL-1-Glycopeptide, die für die hochaffine Bindung an P-Selectin benötigt werden,^[151a,b, 195] oder O-Glycopeptide der Mucindomäne des L-Selectin-Liganden MAdCAM-1 synthetisiert.^[188b] Die Strategie wurde dann von Nishimura und Mitarbeitern ausgeweitet, die den molekularen Transporter entwarfen, mit dem Glycopeptide nach der Freisetzung von

der Festphase auf das wasserlösliche Polymer zur weiteren enzymatischen Verlängerung übertragen werden.^[196] Dieser Transporter ist ein multifunktionaler Linker, der entweder als Markierungsgruppe dient, um das Glycopeptid am Polymer anzuheften, oder als Spaltstelle, die die Freisetzung des Produkts vom Polymer erleichtert. Diese Technik ließ sich auf die kombinatorische Synthese einer MUC1-Glycopeptidbibliothek mit 36 Strukturvarianten anwenden.^[196b]

Die Technik ist zwar vielversprechend, doch die Anzahl der Enzyme, die für die Festphasensynthese zur Verfügung stehen, ist noch sehr begrenzt und es bedarf weiterer Anstrengungen, hier die Auswahl zu vergrößern.

5.3. Chemoenzymatische Oligosaccharidsynthese

Chemoenzymatische Synthesen, die die Regio- und Stereoselektivität von Enzymen mit der Flexibilität der chemischen Synthese verbinden, wurden in jüngster Zeit als mögliche Verfahren zur Kohlenhydratsynthese in die Diskussion gebracht.^[3h, 156, 157b, 159a,b, 184, 197] Enzyme wie Glycosyltransferasen oder Glycosidasen können dazu dienen, Saccharidreste von einem geeigneten Donor auf die chemisch bereitgestellten Oligosaccharide oder Glykokonjugate zu übertragen.^[152b, 198] Aufgrund ihrer strengen Regio- und Stereospezifität sind sie besonders geeignet für die Bildung von Glycosidbindungen, die anders schwierig zu knüpfen sind, so wie im Fall der Synthese von α -Sialosiden. Um dieses Problem chemisch zu lösen, müssen eigene Strategien (z.B. Synthese von sialylierten Oligosaccharidbausteinen) entwickelt werden, was die Komplexität des Entwurfs von Bausteinen vergrößert. Die Reaktionssequenz bei der chemoenzymatischen Oligosaccharidsynthese kann auch umgekehrt werden, sodass enzymatisch synthetisierte Produkte chemisch weiterverarbeitet werden.^[176, 199] Diese beiden Typen von Reaktionssequenzen können maßgeschneidert eingesetzt werden, um die geeignetste Kombination zur Ableitung spezifisch glycosylierter Verbindungen zu finden.

5.3.1. Chemoenzymatische Oligosaccharidsynthese mit Glycosyltransferasen

Glycosyltransferasen aus Bakterien wurden für die chemoenzymatische Oligosaccharidsynthese als geeigneter erachtet als ihre Gegenstücke aus Säugern, da diese meist weniger „promiskuitiv“ und in *E. coli* schwierig zu exprimieren sind. Daher sind sie kaum in ausreichender Menge für Synthesen in großem Maßstab zu gewinnen.^[177c, 200] Die steigende Zahl klonierter bakterieller Glycosyltransferasen^[201] mit breiterer Substratspezifität ermöglichte die parallele und kombinatorische chemoenzymatische Synthese verschiedener natürlicher und nichtnatürlicher Oligosaccharide.

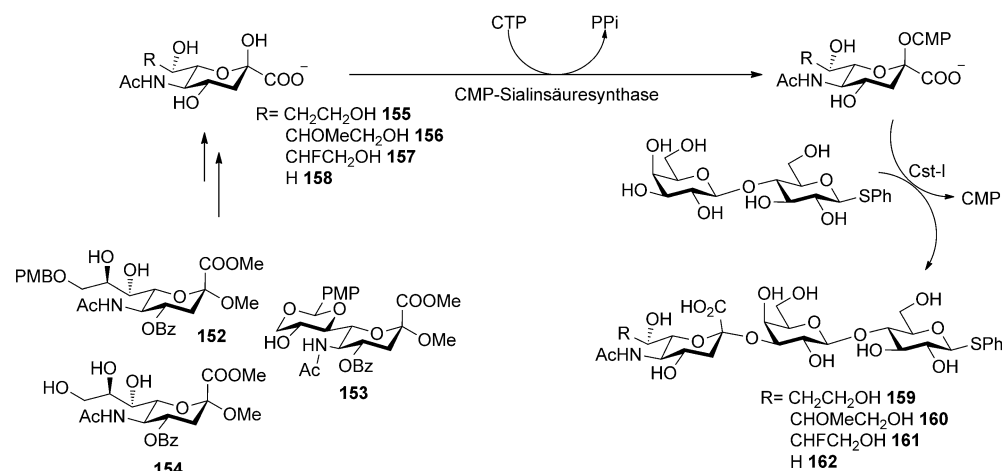
Chen et al. haben jüngst ein Multienzym-Eintopfssystem zur effizienten Synthese von Sialosiden entwickelt (Tabelle 4).^[85a, 202] In diesem System katalysiert eine rekombinante K-12-Sialinsäurealdolase aus *E. coli* die Synthese von Sialinsäurevorläufern für CMP-Neu5Ac aus den entsprechenden Hexosederivaten (Mannose, *N*-Acetylmannosamin und anderen). CMP-Sia-Derivate wurden dann in situ aus Sialin-

Tabelle 4: Eintopf-Multienzymansatz nach Chen et al. zur Synthese von Sialosiden mit flexiblen Strukturmodifikationen.

Enzym	Quelle	Funktion
Aldolase ^[207]	<i>E. coli</i> K-12	Sialinsäurealdolase
NmCSS ^[207]	<i>Neisseria meningitidis</i>	CMP-Sialinsäuresynthase
Pm0188Ph(PmST1) ^[202a]	<i>Pasteurella multocida</i>	$\alpha(2 \rightarrow 3)$ -Sialyltransferase
Pd2,6ST ^[203]	<i>Photobacterium damsela</i>	$\alpha(2 \rightarrow 6)$ -Sialyltransferase
CstIIA32 ^[153] [204, 208]	<i>Campylobacter jejuni</i>	$\alpha(2 \rightarrow 8)$ -Sialyltransferase

säurevorläufern durch eine rekombinante CMP-Sialinsäuresynthase NmCSS erzeugt. Anschließend wurde der Sialinsäurerest durch eine Sialyltransferase zur Bildung natürlicher Sialoside auf einen Zuckerakzeptor übertragen. Diese drei Schritte können in einer Eintopfsequenz kombiniert werden, ohne die Zwischenprodukte zu reinigen. Mit diesem Ansatz ließen sich hocheffizient systematisch Sialosidbibliotheken mit hoher Diversität herstellen. Eine Reihe natürlicher oder nichtnatürlicher Sialosidderivate mit $\alpha(2 \rightarrow 3)$ -,^[202a] $\alpha(2 \rightarrow 6)$ -^[203] und $\alpha(2 \rightarrow 8)$ - Bindungen^[204] wurde in großen Mengen und guter Ausbeute synthetisiert, wobei die Strukturen an den Positionen C5 und C9 der Sialinsäurereste flexibel angepasst werden konnten. Bedeutsam ist auch, dass 3-Fluor-Neu5Ac- und Neu5Gc-haltige Sialyllactose-Trisaccharide, die chemisch besonders schwer zu synthetisieren sind, mit NmCSS und der multifunktionellen Sialyltransferase PmST1 in einer Eintopfsynthese mit zwei Enzymen hergestellt werden konnten.^[205] Die 3-fluorierten Sialinsäurederivate sind als kompetitive Hemmstoffe von viralen Sialidasen geeignet.^[206]

Eine Strategie für die chemoenzymatische Synthese von in Position 8 modifizierten Sialinsäureanaloga wurde kürzlich von Withers et al. veröffentlicht (Schema 29).^[209] Die modifizierten Sialinsäurevorläufer **155–158** wurden aus den Verbindungen **152–154** hergestellt und je mit einer bakteriellen CMP-Sialinsäuresynthase in die entsprechenden Cytidinmonophosphatdonoren umgewandelt. Cst-1, eine $\alpha(2,3)$ -Sialyltransferase aus *Campylobacter jejuni*, wurde zur Synthese der Sialylthiolactoside **159–162** genutzt. Außerdem



Schema 29. Chemoenzymatische Synthese des Sialyllactose-Trisaccharids mit C8-Modifikationen.

ergab in dieser Untersuchung der Vergleich zwischen der Hydrolyseaktivität von Cst-1 und einer anderen Sialyltransferase, PM0188h, dass Cst-1 geeigneter ist für die Synthese 8''-modifizierter Sialyllactose, während PM0188h eine größere Hydrolyseaktivität gegenüber natürlichen Substraten besitzt.^[209]

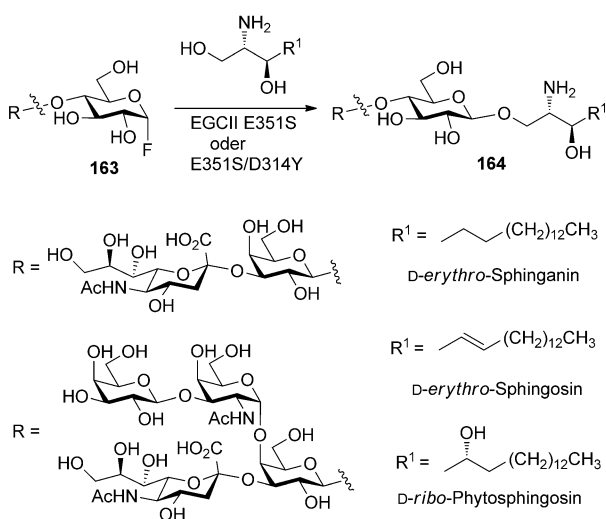
In einer anderen Arbeit von Chen und Mitarbeitern wurden zwei bakterielle β -1,4-Galactosyltransferasen, NmLgtB und Hp1-4GalT, charakterisiert. Sie akzeptieren ein breites Substratspektrum und haben komplementäre

Spezifitäten für GlcNAc-Monosaccharidsubstrate mit 6-O- oder N-Sulfatgruppe.^[210] Mit diesen Enzymen in einer Eintopf-Multienzymsynthese erzeugt man effizient eine Auswahl von LacNAc- und Lactose-Derivaten.^[210] Die chemoenzymatische Synthese von schwefelgebundenen Sacchariden wurde ebenfalls untersucht.^[211] So berichteten Withers et al. kürzlich über eine effiziente Synthese der schwefelgebundenen Disaccharide Gal- β -S-1,4-GlcNAc-pNP und dem ungewöhnlichen Gal- β -1,4-Man-pNP durch die β 1,4-Galactosyltransferase HP0826 aus *Helicobacter pylori*.^[212]

5.3.2. Chemoenzymatische Oligosaccharidsynthese mit Glycosidasen und Glycosynthasen

Glycosidasekatalysierte Transglycosylierungen haben gegenüber Glycosyltransferasen einige Vorteile, so die einfach verfügbaren Donorsubstrate, die leichte Zugänglichkeit der Enzyme und die Möglichkeit, Oligosaccharide in einem Schritt zu übertragen. Doch obwohl einige Glycosidasen wertvolle Biokatalysatoren für den Aufbau von regio- und

stereospezifischen Glycosidbindungen in Saccharidstrukturen sind,^[157a,c,159b–d] trifft man häufig auf zwei wichtige Einschränkungen: die niedrige Glycosylierungsausbeute und die Hydrolyse des Produkts. Diese Probleme lassen sich überwinden durch die Mutation der nucleophilen Reste im katalytischen Zentrum, um mutierte Glycosidasen, vor allem Glycosynthasen zu erzeugen, die bei Erhaltung der Glycosylierungsaktivität keine Hydrolaseaktivität mehr besitzen. Weitere Verbesserungen können durch gerichtete Evolution erreicht werden.^[157a,213] Beispielsweise gelang eine effiziente chemoenzymatische Synthese der *lyso*-GM1- und *lyso*-GM3-Antigene mit der Glycosynthase E351S, die aus der Endoglycoceramidase II (EGC II) entwickelt wurde; sie konnte das synthetische Glycosylfluorid **163** als Donorzucker umsetzen, um Sphingarin- und Sphingosinderivate mit hoher Ausbeute zu glycosylieren (Schema 30).^[214] Der Katalysator der ersten Generation zeigte allerdings nur geringe Promis-

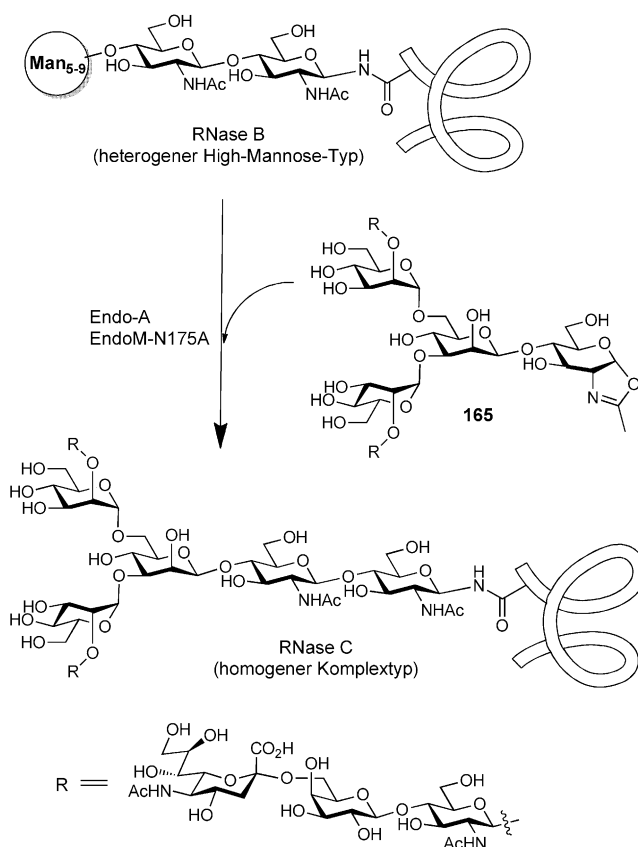


Schema 30. Synthese von Glycosphingolipidderivaten mit EGC-Glycosynthasen.

kuität gegenüber Lipidakzeptoren, einschließlich dem Phytosphingosinderivat. Ein neuer Katalysator, die D314Y/E351S-Mutante von EGC II, die mit gerichteter Evolution gefunden wurde, zeigte die gewünschte hohe Promiskuität.^[215]

Eine interessante Anwendung von Glycosynthasen, die in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit erregt hat, ist die endoglycosidasekatalysierte Transglycosylierung zur Synthese homogener Glycopeptide und Glycoproteine.^[216] Die *endo*- β -N-Acetylglucosaminidasen (ENGasen), die die Hydrolyse der Glycosidbindung im Chitobioserückgrat (GlcNAc1-4GlcNAc) katalysieren, zeigen auch Transglycosylierungsaktivität, können also verschiedene Typen von N-Glycanen im Ganzen auf verschiedene Akzeptoren übertragen. Zwei ENGasen, Endo-A aus *Arthrobacter protophormiae* und Endo-M aus *Mucor hiemalis*, wurden vielfach verwendet, um einen großen Oligosaccharidrest in einem Schritt regio- und stereoselektiv an ein vorgeformtes GlcNAc-Peptid anzuknüpfen.^[152,217] Die relativ niedrige Transglycosylierungsaktivität der ENGasen trieb die Optimierung der Methode voran,

unter anderem durch den Gebrauch synthetischer Zucker-oxazoline als sehr aktive Donorsubstrate.^[152b,217c,218] Um dem Problem der Produkthydrolyse zu entgehen, wurden speziell für die Umsetzung großer vollständiger N-Glycane verschiedene Mutanten von Endo-A und Endo-M entwickelt, deren Hydrolyseaktivität vollständig ausgeschaltet war und die stattdessen eine erhöhte Transglycosylierungsaktivität besaßen.^[217a,219] So beschrieben Yamamoto und Wang in einer aktuellen Arbeit eine erhöhte Aktivität der Endo-M-Mutante N175Q zur Synthese von Glycopeptiden und Glycoproteinen vom Sialokomplexyp.^[220] In einer Veröffentlichung von Wang et al. ist eine interessante enzymatische Eintopfmethode beschrieben, mit der die Ribonuclease B vom High-Mannose-Typ in die Ribonuclease C vom Komplexyp umgewandelt wird (Schema 31).^[221] In diesem Ansatz wurde das sialylierte N-Glycanoxazolin semisynthetisch hergestellt, indem das freie N-Glycan aus isoliertem Sialoglycopeptid (SGP) freigesetzt und dann mit 2-Chlor-1,3-dimethylimidazoliniumchlorid (DMC) quantitativ zum Oxazolin umgesetzt wurde.^[221] Mit der ausgesprochenen Substratspezifität von Endo-A und Endo-M wurde das High-Mannose-N-Glycan von RNase B zuerst mit Endo-A hydrolysiert und dann mit Endo-M-N175A und **165** als Donorsubstrat zu RNase C glycosyliert, und das in einer Eintopfreaktion mit 70 % Ausbeute.



Schema 31. Eintopfumwandlung von RNase B in sialylierte RNase C durch Endo-A-katalysierte Hydrolyse und EndoM-N175A-katalysierte Transglycosylierung.

6. Die Anwendung von Glycanmikroarrays zur Untersuchung menschlicher Krankheiten

Vergegenwärtigt man sich die ubiquitäre Präsenz diverser Glycane auf Zelloberflächen, so ist offensichtlich, dass die molekulare Erkennung zwischen Kohlenhydraten und glycanbindenden Proteinen (GBPs) an vielen biologischen Prozessen beteiligt ist. Die Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen wird jedoch durch die niedrige Affinität der Kohlenhydrate für die glycanbindenden Proteine, deren K_D -Werte für die Monomeren typischerweise im mikro- bis millimolaren Bereich liegen, erschwert.^[222] Glycanmikroarrays entstehen durch die Immobilisierung von Glycanen auf einer Oberfläche; sie ahmen damit die multivalente Präsentation von Kohlenhydratepitopen auf der Zelloberfläche nach.^[223] Inzwischen ist nur noch eine kleine Menge der Glycane (wenige nL von Lösungen mit Konzentrationen von 1–100 μM) erforderlich, sodass sich hier ein einfacherer Zugang zur Herstellung von Glycanbibliotheken anbietet.

Dennoch bleibt die Herstellung einer umfangreichen Glycanbibliothek eine zentrale Herausforderung für die Entwicklung eines Glycanmikroarrays. Im Allgemeinen kann man Glycane auf zwei Arten erhalten, durch Isolierung aus natürlichen Quellen oder durch Synthese. Die Isolierung von Glycanen aus natürlichen Quellen ist ein gutes Verfahren, um das gesamte Glycom effizient zu verwerten, obwohl die Verfügbarkeit spezieller Glycane oft begrenzt und daher die genaue Strukturaufklärung jeder Komponente ein Problem ist. Turnbull und Mitarbeiter berichteten über eine effiziente Methode, mit der sie Heparansulfat (HS) durch partiellen Verdau von HS-Polysaccharidketten aus Geweben und nachfolgende chromatographische Fraktionierung gewinnen konnten.^[224] So können innerhalb kurzer Zeit strukturell diverse natürliche Saccharidbibliotheken von HS-Varianten hergestellt werden. Synthetische Methoden sind eine andere Möglichkeit, strukturell wohldefinierte Glycane zu erhalten. Die Fortschritte der modernen Kohlenhydratsynthese wie die oben beschriebene programmierbare Eintopfglycosylierung und die Einführung der Festphasen-Oligosaccharidsynthese (SPOS),^[225] insbesondere die automatisierte Festphasensynthese,^[124a] haben den Aufwand bei der Glycanherstellung stark vermindert. Dennoch bleibt festzuhalten, dass die vollautomatische Synthese von Oligosacchariden mit sehr komplexen Strukturen noch eine große Herausforderung darstellt.^[3]

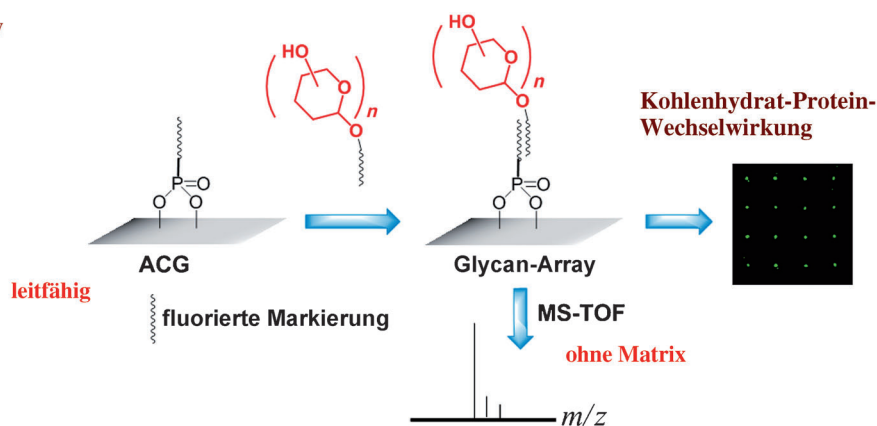
Durch die Kombination chemischer und enzymatischer Synthesen lassen sich gut Glycane mit großer Diversität bereitstellen. Mit dieser Strategie wurden Glycanstrukturen durch Einwirkung unterschiedlicher Glycosyltransferasen auf die Chipoberfläche verlängert.^[226] Es ist allerdings schwierig, die verlängerten Glycane direkt auf der Array-Oberfläche zu charakterisieren und zu quantifizieren. Daher fehlt bei Glycan-Mikroarrays, die auf diese Art hergestellt wurden, meist eine Qualitätskontrolle. Um dieses Problem zu beheben, entwickelten Mrksich und Mitarbeiter eine Methode, die selbstorganisierende Monoschichten mit MALDI-TOF-MS kombiniert,^[227] um Glycanstrukturen auf der Goldoberfläche beobachten und optimieren zu können. Diese Strategie wurde

auch von der Gruppe um Flitsch eingesetzt, um die Glycosyltransferasen zu verfolgen, die an der Protein-O-Glycosylierung beteiligt sind.^[228] Wong und Mitarbeiter entwickelten eine massenspektrometrische Methode mit Desorption/Ionisation auf Silicium (DIOS-MS), die eine poröse Siliciumoberfläche verwendet, um in der Gasphase Ionen kleiner Moleküle (< 3000 Da) ohne Matrix zu erzeugen,^[229] anhand derer sich die kovalent über einen photospaltbaren Linker am Silicium gebundenen Oligosaccharide charakterisieren lassen.^[47b] Es ist allerdings ziemlich mühsam, diesen Linker in die einzelnen Glycane einzubauen. Als Alternative wurde daher eine neue Technik auf Grundlage der nanostrukturinierten Massenspektrometrie (NIMS) zur Charakterisierung nichtkovalent gebundener Glycanarrays entwickelt. In diesem Aufbau sind die Glycane über perfluorierte Kohlenstoffketten physikalisch an die Fluorkohlenwasserstoff-beschichtete poröse Siliciumoberfläche gebunden.^[230] Allerdings sind für die Herstellung der porösen Siliciumplatten korrosive Säuren erforderlich, mit denen nicht immer gleichmäßige Ergebnisse erzielt werden. Daher entwickelten Wong und Wu unter Anwendung von Phosphonatreaktionen stabile polyfluorierte aluminiumbeschichtete Glasplättchen (ACG), die dann mit mit perfluorierten Kohlenstoffketten versehenen Glycanen zu einem nichtkovalenten Array beschickt wurden (Abbildung 14).^[231] Da die ACG-Plättchen eine leitende Oberfläche besitzen,^[232] kann der nichtkovalente Array massenspektrometrisch durch Ionisation/Desorption mit niedriger Laserenergie ohne Zugabe einer Matrix analysiert werden. Dieser Arraytyp ist besonders geeignet für Aktivitäts- und Spezifitätsuntersuchungen. Ein repräsentativer Cellotetraosearray wurde entwickelt, um die Aktivität und Spezifität verschiedener Cellulasen zu testen und die Exo- und Endoglucanaseaktivitäten zu unterscheiden.^[231] Auf ähnliche Weise wurde ein kovalent gebundener Glycanarray auf ACG entwickelt (Abbildung 14), indem das Glycanphosphonat direkt auf die ACG-Oberfläche aufgebracht wurde.

Ein anderer ausgezeichneter kombinatorischer chemo-enzymatischer Ansatz wurde von Chen und Mitarbeitern eingeführt.^[233] Mit einer Kombination von 18 ManNAc/Mannose-Substraten und vier verschiedenen biotinylierten Akzeptoren wurde in einer Eintopfsynthese mit drei Enzymen ein Array aus 72 Sialosiden systematisch synthetisiert. Die Produkte wurden auf eine NeutrAvidin-Mikrotiterplatte übertragen und ohne weitere Reinigung zur Untersuchung sialinsäurebindender Lektine eingesetzt; damit wurde eine Plattform für Hochdurchsatz-Screenings eröffnet.

Glycan-Mikroarrays werden mittlerweile für viele Anwendungen eingesetzt, darunter Untersuchungen von Enzymaktivitäten,^[234] Forschungen über die Spezifität von Lektinen^[235] und Antikörpern,^[236] zum Verfolgen von Antikörpern nach der Immunisierung zur Impfstoffentwicklung,^[237] zur Wirkstoffentwicklung,^[238] zur Profilierung von Serumantikörpern^[239] und zur Überwachung von Infektionskrankheiten. Das Fernziel ist es, diagnostische und therapeutische Ansätze gegen humane Erkrankungen zu entwickeln.

nichtkovalenter Array



kovalenter Array

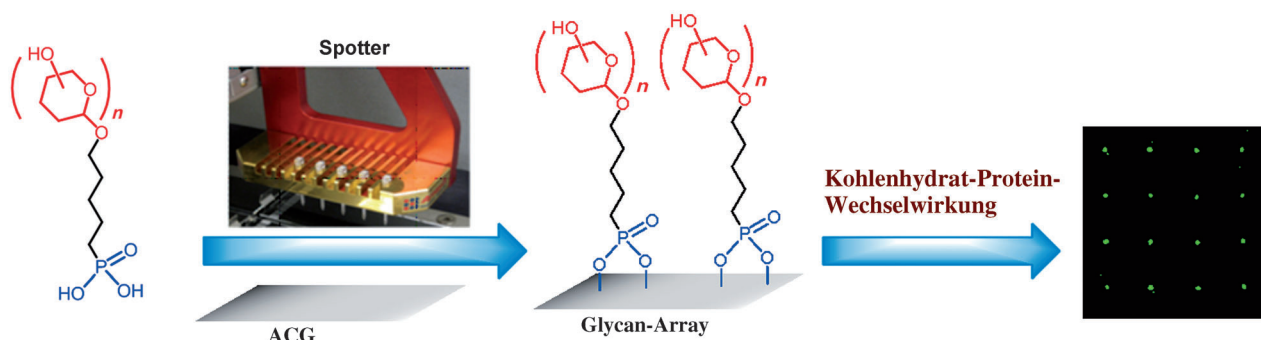


Abbildung 14. Glycanarray auf aluminiumbeschichteten Glasplättchen (ACGs).

6.1. Glycanmikroarrays zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Sialosiden und Influenza-Hämagglutinin

Die Infektion durch ein Influenzavirus wird eingeleitet durch die Anheftung des Virus an Zelloberflächen-Sialosidrezeptoren über eines der Influenza-Oberflächenglycoproteine, das Hämagglutinin (HA). Abhängig von der Rezeptorspezifität kann man Influenza-HA allgemein in zwei Typen einteilen: humanadaptiertes Virus-HA, das eine Präferenz für Neu5Ac α (2 \rightarrow 6)Gal-Reste hat, und affenadaptiertes Virus-HA, das Neu5Ac α (2 \rightarrow 3)Gal-Reste präferiert. Ein solch winziger Unterschied in der Rezeptorspezifität trägt zu einer Artenbarriere bei, die den Menschen vor einer Infektion durch Affen-Influenzaviren schützt. Mutationen des HA können allerdings zu einer artübergreifenden Infektion von Menschen durch affenadaptierte Viren führen. Daher besteht großes Interesse in der Erforschung der HA-Rezeptorspezifitäten, mit dem Ziel der Entwicklung von Überwachungsverfahren, um vor allem bei pandemischen Stämmen die Viren früh entdecken zu können.^[240]

Glycanmikroarrays haben sich als sehr nützlich zur Untersuchung von HA-Spezifitäten erwiesen.^[223b] Im Jahr 2006 führten Wilson und Paulson eine Serie von Influenza-H1-, -H3- und -H5-Glycanmikroarrays ein, wobei sie auf eine Bibliothek aus mehr als 260 Glycanen zurückgriffen, die vom Consortium of Functional Glycomics (CFG) am Scripps Research Institute entwickelt worden waren.^[241] In diesen Studien wurden hervorragende Unterschiede bei den Rezep-

torbindungsspezifitäten zwischen den verschiedenen HA-Subtypen sichtbar, die sich in Struktureigenschaften der Oligosaccharide, darunter Modifikationen in der Sialylierung, der Sulfatierung und Fucosylierung der benachbarten Glycanstrukturen über die anomere Bindung der terminalen Sialinsäure hinaus niederschlagen. Die Ergebnisse zeigen die Sensitivität und Hochdurchsatz-Eignung im Vergleich zu Inhibitionstests der Hämasorption und Hämagglutininierung.^[240] Glycanmikroarrays sind unverzichtbar geworden für die Untersuchung der Influenzavirus-Rezeptorspezifität saisonaler und pandemischer Stämme, zu denen auch der letzte Ausbruch des aus Schweinen stammenden H1N1-Virusstammes im Jahr 2009 gehört.^[242]

Die Bestimmung der Affinität von kohlenhydratbindenden Strukturen ist meist schwierig, weil die Glycane nur begrenzt zur Verfügung stehen. Um Rezeptorspezifitäten zu untersuchen, ist es erforderlich, eine genaue quantitative Methode für die Glycanmikroarrays zu entwickeln. Wong et al. publizierten aktuell eine quantitative Glycanmikroarray-Methode,^[243] in der die Bestimmung der Oberflächen-Dissoziationskonstanten ($K_{D,surf}$) beschrieben wird. Sie kann auch ausgeweitet werden, um die Gibbs-Energie der Protein-Glycan-Bindung zu bestimmen. Dieser quantitative Glycanmikroarray wurde eingesetzt, um $K_{D,surf}$ des Hämagglutinins von Influenza H5 und seiner Liganden zu bestimmen (Abbildung 15).^[244] Bestimmt man die Änderung in ΔG ($\Delta\Delta G$) bei der Bindung von HA an das Neu5Ac α (2 \rightarrow 3)Gal-Disaccharid und vier verschiedene Neu5Ac α (2 \rightarrow 3)Gal-Trisaccha-

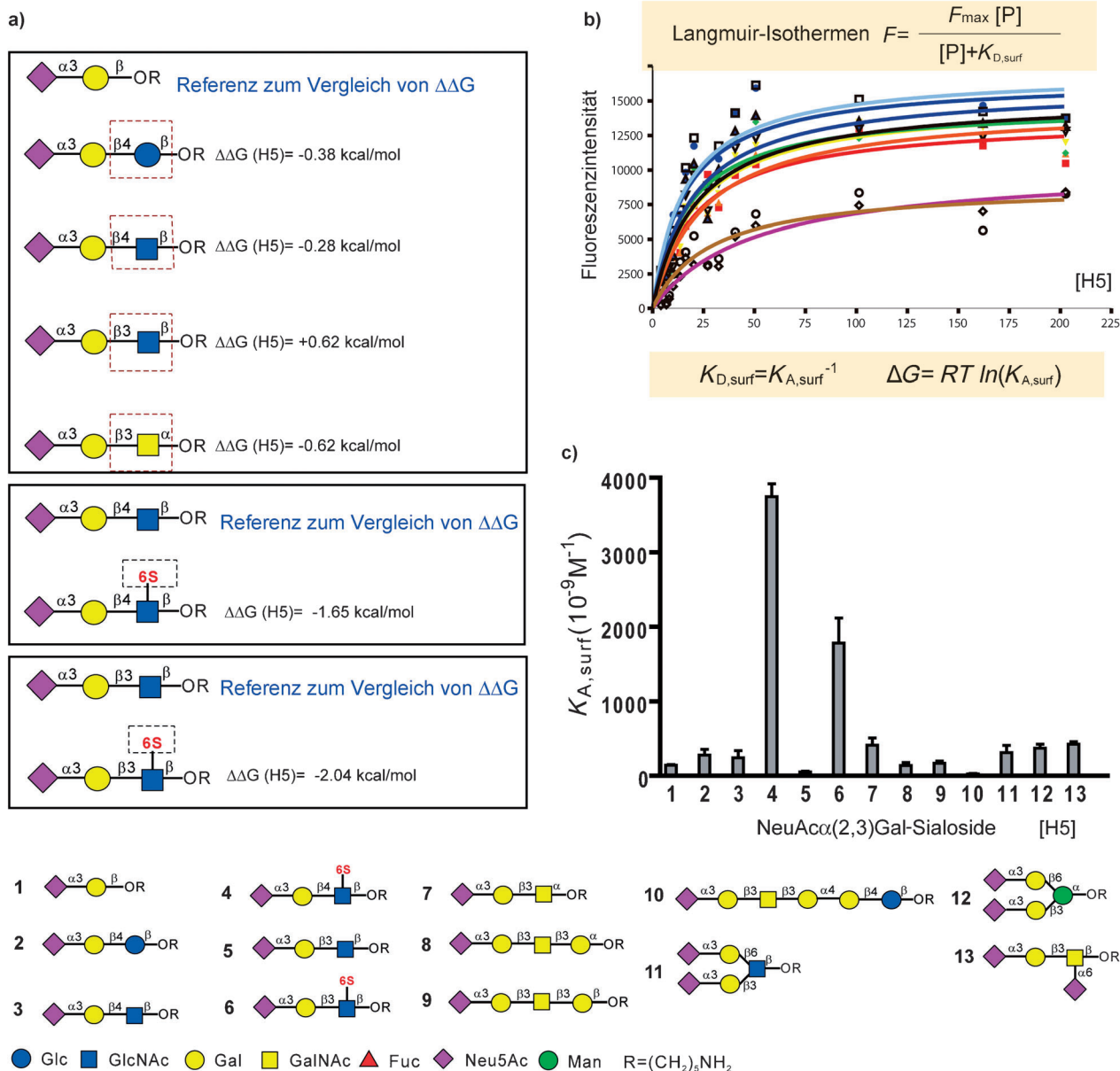


Abbildung 15. a) Beiträge zur Bindungsenergie von Zuckern oder Modifikationen zu H5HA-Glycan-Wechselwirkungen. b) Langmuir-Isothermen zur Berechnung von $K_{D,surf}$. c) Assoziationskonstanten von H5 mit den $\alpha(2\rightarrow3)$ -verknüpften Sialosiden Nr. 1–13.

ride ($\beta 4$ - und $\beta 3$ GlcNAc, $\beta 4$ -Glc und $\beta 3$ -GalNAc), so lässt sich die Bindungsenergie verschiedener Sialoside berechnen und vergleichen, um so die Anteile an der Bindungsenergie zu errechnen, die von den verschiedenen Bestandteilen der Glycanstrukturen beigesteuert werden und um den besten Liganden zu identifizieren (Abbildung 15 a).

Um schnell auf einen möglichen Ausbruch zu reagieren, muss man ein leistungsfähiges Diagnoseverfahren entwickeln, das gleichzeitig eine Typisierung und Subtypisierung von Influenzaviren durchführt. Dazu begannen Wong und Mitarbeiter eine Studie, um Influenzaviren mithilfe eines Glycan-mikroarrays mit 27 synthetischen Sialosiden zu subtypisieren.^[242b] Die Glycanbindungsergebnisse rekombinanter HAS aus saisonalen oder pandemischen Viren deuteten auf eine

Auswahl von Glycanen, darunter die Nummern 24, 29 und 30, die sich als nützlich für die Subtypisierungen von H1 und H3 erweisen könnten (Abbildung 16). Alle H1-HAs von pandemischen oder saisonalen Stämmen zeigten eine längenabhängige Präferenz für längere $\alpha(2\rightarrow6)$ -Glycane (Abbildung 16 a–c). Wie die H1-HAs banden auch die H3-HAs von saisonalen Stämmen am stärksten an das längste Glycan 30, das drei LacNAc-Wiederholungen enthält (Abbildung 16 d). Mit Glycan 29, das nur zwei LacNAc-Einheiten enthält, war dagegen nur eine sehr schwache Bindung nachweisbar. Eine ähnliche Tendenz war bei der Profilierung echter Virusisolate der entsprechenden Stämme zu beobachten.^[242b] Auf dieser Basis lässt sich möglicherweise ein diagnostisches Hilfsmittel zur Unterscheidung von Influenza-Subtypen entwickeln.

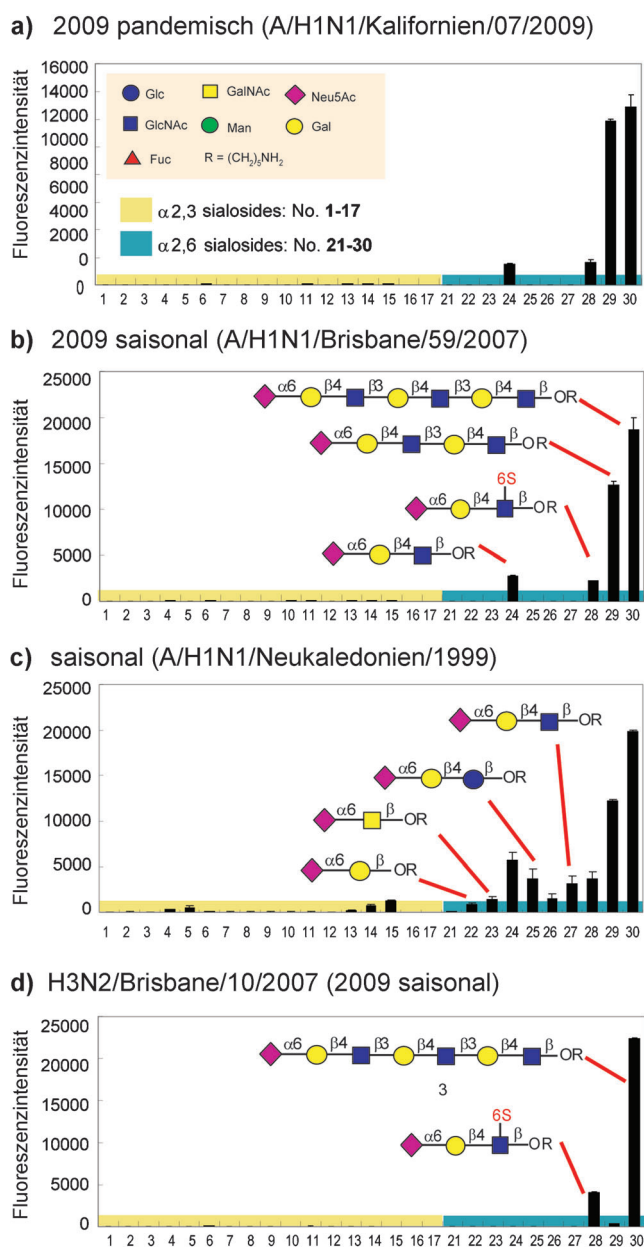


Abbildung 16. Differenzielle Bindungsmuster von HAs von H1N1 und H3N2.

Neben dem Nachweis von Influenzaviren können Glycanmikroarrays auch dazu dienen, verschiedene Mikroorganismen wie *Bacillus anthracis*, *Burkholderia pseudomallei* und *Francisella tularensis* nachzuweisen,^[245] da sie bekanntermaßen eine große Zahl glycanbindender Proteine auf der Zelloberfläche tragen.

6.2. Glycanmikroarrays in der Tumordiagnostik und Impfstoffentwicklung

Abweichende Glycosylierungsmuster sind ein Kennzeichen von Tumoren; daher wurde die Identifizierung spezifisch exprimierter tumorassoziierter Kohlenhydratantigene

(TACAs; tumor-associated carbohydrate antigens) ein attraktiver Ansatz für die Entwicklung neuer Therapeutika und Diagnostika für Krebserkrankungen (siehe Abschnitt 7.3). Gegenwärtig beruht die Diagnose von Krebs meist auf genetischen Test, serologischen Methoden oder anderen invasiven Nachweisverfahren wie Endoskopie. Andererseits wird das prostataspezifische Antigen (PSA) verbreitet als Biomarker für die Früherkennung von Prostatakrebs genutzt. Es wird interessant sein zu sehen, ob TACAs als Arrays für die Krebsdiagnostik eingesetzt werden können. Um diese Hypothese zu testen, setzten Wong et al. beispielsweise eine Bibliothek von synthetischem Globo H und Fragmenten davon als Array ein, um die Menge an Globo-H-Antikörper im Serum von Brustkrebspatientinnen zu bestimmen.^[237a] Es ergab sich, dass die Bindungsspezifität der Seren von Patientinnen und von Kontrollpersonen sich statistisch signifikant unterschieden. Da allerdings die Immunantworten zwischen einzelnen Individuen schwanken, ergaben sich in einigen Fällen nur geringfügige Unterschiede. Für die künftige Entwicklung kann man die Kombination von anderen TACAs mit Globo H und Derivaten auf einem einzigen Glycanmikroarray in Erwägung ziehen. Die Hochdurchsatzprofilierung menschlicher Seren mit auf Glycanmikroarrays gestützten Verfahren ist ebenso entwickelt worden; dabei wurde ein neuer humaner cellulosebindender Antikörper identifiziert.^[246] Das Repertoire an Antikörpern, die gegen Kohlenhydrate gerichtet sind, wurde in Patienten, denen man fetale Schweineinseln transplantiert hatte, ebenfalls mit einem Glycanmikroarray charakterisiert.^[239a]

Glycanmikroarrays lassen sich auch bei der Impfstoffentwicklung einsetzen. Seeberger und Mitarbeiter entwarfen einen Glycanmikroarray bestehend aus synthetischen *Plasmodium*-Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-Glycanen.^[239b] Mit diesem Array wurden die Anti-GPI-IgG-Titer in Donoren aus endemischen Malariaegebieten mit nichtexponierten Personen verglichen. Die Ergebnisse zeigten tiefgreifende Auswirkungen der Malariaexposition auf die Anti-GPI-IgG-Titer. Mit einem Array mit 46 Oligosacchariden wurden die Liganden des Antikörpers MG96 identifiziert, der als Übertragungshemmstoff eingesetzt wird, um die Entwicklung der Parasiten im Moskito zu blockieren.^[247] Verschiedene Liganden wurden identifiziert, die als Bestandteile möglicher Antigen-Epitope dienen können.

Obwohl Glycanmikroarrays sich als wichtiges Werkzeug für Glycobiologen erwiesen haben, bleiben noch wichtige Herausforderungen, so die Dichte der immobilisierten Glycane, die die Kohlenhydrat-Protein-Erkennung stark beeinflussen kann. Gildersleeve et al. evaluierten die Dichteabhängigkeit der Bindung von Lektinen und Antikörpern und fanden heraus, dass verschiedene Antikörper verschiedene Dichten des gleichen Glycanantigens erkannten.^[248] Wu et al. stellten fest, dass die Antikörperbindungsprofile durch die Dichte und Strukturen benachbarter Glycane bei der Kohlenhydrat-Antigen-Erkennung beeinflusst wurden.^[249] Außerdem können Antikörper multivalente Wechselwirkungen mit verschiedenen Glycanen gleichzeitig eingehen, und die Gesamtbindungsaffinität stieg in Gegenwart heterogener Glycane.^[249] Der Befund der Heteroligandenbindung gibt dem Entwurf kohlenhydratbasierter Impfstoffe eine neue

Richtung, bei der Antigengemische in kombinatorischer Weise verwendet werden. Die Entwicklung von Glycanarrays, die das natürliche System nachahmen, wird in naher Zukunft mehr Aufmerksamkeit erlangen.

6.3. Das Consortium for Functional Glycomics (CFG)

Das CFG, eine der größten Ressourcen für Glycanmikroarrays (<http://www.functionalglycomics.org>), wurde von den National Institutes of General Medical Sciences gegründet. Forscher haben Zugang zur CFG-Datenbank, um die Rohdaten und die Zusammenfassungen der CFG einzusehen. Der aktuelle CFG-Array (Version 5.0) trägt 611 stark unterschiedliche Glycane, die an NHS-derivatisierte Träger über aminofunktionalisierte Linker gebunden sind. Einige aktuelle Beispiele für die Anwendung des Arrays sind die Suche nach Liganden des mAb KEN-5,^[250] nach dem Siglec-8-Liganden,^[251] der Glycosyltransferase- und Sulfotransferase-Genexpression^[252] und nach Galectin-1, das mannosereiche Kohlenhydrate auf HIV-1 erkennt.^[253] Ein Vergleich der Fähigkeit zur Rezeptorbindung von natürlichen und mutierten humanen und Affen-Influenzaviren wurde ebenfalls mit dem CFG-Array durchgeführt.^[254] Die CFG-Arrays sind zu wichtigen Hilfsmitteln beim Antigennachweis und in der Impfstoffentwicklung geworden und bieten reiche Informationen über Ligandenspezifitäten glycanbindender Proteine.

7. Nutzung synthetischer Kohlenhydrate für die Impfstoffentwicklung

Die unverwechselbaren Kohlenhydratstrukturen auf der Oberfläche invasiver Pathogene und die anomale Glycosylierung auf entarteten Zellen machen solche Kohlenhydratreste zu attraktiven Zielstrukturen für eine Immuntherapie. Dieses Konzept datiert zurück auf das Jahr 1923, als Heidelberger und Avery berichteten, dass die Pneumokokkenantigene, die vom Immunsystem angegriffen werden, Polysaccharide sind.^[255] Auf Grundlage dieser Untersuchung beobachteten 1930 Francis und Tillet, dass intradermale Injektionen typspezifischer Kapselpolysaccharide (CPS) von Pneumokokken die polysaccharidspezifischen Serumantikörpertiter bei gesunden Erwachsenen erhöhen.^[256] Außerdem bemerkten Heidelberger und Mitarbeiter, dass man Kapselpolysaccharide von Pneumokokken als Immunogene verwenden kann, die eine typspezifische langanhaltende Immunität gegen Pneumokokkeninfektionen vermitteln.^[257] Diese Entwicklungen bilden die Basis für die mögliche Nutzung von Kohlenhydraten wie den bakteriellen Kapselpolysacchariden als Impfstoffe. Das therapeutische Potenzial wird weiter betont durch eine Reihe kommerziell erhältlicher kohlenhydratbasierter Impfstoffe gegen Bakterieninfektionen (Tabelle 5) und durch zahlreiche vielversprechende Impfstoffkandidaten gegen humane Infektionskrankheiten und verschiedene Krebsarten.^[258]

Leider sind Kohlenhydrate selbst nur schwach immunogen, vor allem weil die kohlenhydratvermittelte Antikörperbildung T-Zell-unabhängig ist (TI). Daher entstehen hauptsächlich niedrigaffine IgM-Antikörper, die die Klasse nicht

Tabelle 5: Auf dem Markt befindliche Polysaccharid- und Konjugatimpfstoffe.^[a]

Organismus	Handelsname	Impfstofftyp (Komponente)	Hersteller
<i>Haemophilus influenzae</i> Typ b (Hib)	HibTiter (1990)	C (Hib CPS mit CRM197)	Wyeth
	PedvaxHIB (1990)	C (Hib CPS mit OMPC)	Merck & Co.
	ActHib (1993)	C (Hib CPS mit TT)	Sanofi Pasteur
	QuimiHib (2004)	C (synthetisches Hib CPS mit TT)	Vabiotech
	Hiberix (2009)	C (Hib CPS mit TT)	GSK
	Pentacel (2008)	C (DT, TT, Konjugatimpfstoff gegen Pertussis azellulär, inaktiviertes Poliovirus und Hib-TT)	Sanofi Pasteur
	Comvax (1996)	C (Hib-OMPC, Konjugat- und Hepatitis-B-Impfstoff)	Merck & Co.
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Pn)	Pneumovax (1983)	P (CPS von 23 Pn-Serotypen, 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F, 33F)	Merck & Co.
	Prevnar (2000)	C (CPS von 7 Pn-Serotypen, 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F mit CRM197)	Wyeth
	Prevnar 13 (2009)	C (CPS von 13 Pn-Serotypen, 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F mit CRM197)	Pfizer
<i>Neisseria meningitidis</i> (Nm)	Menomune-A/C/Y/W-135 (2009)	P (Gruppe A, C, Y, W-135 CPS)	Sanofi Pasteur
	Menactra (2008)	C (Gruppe A, C, Y, W-135 CPS mit DT)	Sanofi Pasteur
	Menveo (2010)	C (Gruppe A, C, Y, W-135 CPS mit CRM197)	Novartis
<i>Neisseria meningitidis</i> Gruppe C (NmC)	Menjugate (2000)	C (Gruppe-C-CPS mit CRM197)	Novartis (Chiron)
	Meningitec (1999)	C (Gruppe-C-CPS mit CRM197)	Wyeth
	NeisVac C (1999)	C (de-O-acetyliertes Gruppe-C-CPS mit TT)	Baxter
<i>Salmonella typhi</i>	Typhim Vi (1994)	P (Vi CPS)	Sanofi Pasteur

[a] P: Polysaccharidimpfstoff; C: Konjugatimpfstoff; CPS = Kapselpolysaccharid; OMPC = Proteinkomplex aus der äußeren Membran (isoliert aus *Neisseria meningitidis*); DT = Diphtherietoxin; CRM197 = Diphtherietoxin-Mutante; TT = Tetanustoxin.

wechseln, und es fehlt das immunologische Gedächtnis.^[259] Außerdem reagieren Säuglinge und Kinder unter zwei Jahren kaum auf TI-Antigene. Die Immunität gegen TI-Antigene entwickelt sich normalerweise erst zwei bis drei Jahre nach der Geburt. Im Gegensatz dazu sind Proteine von früher Kindheit an immunogen. Daher könnte die Konjugation von Oligosacchariden an ein immunogenes Trägerprotein die nichtimmunogenen Kohlenhydratantigene in Immunogene umwandeln. In dieser Form können Kohlenhydrat-Protein-Konjugate von antigenpräsentierenden Zellen verdaut werden, und die Glycopeptidfragmente werden dann dem MHC-II-Komplex präsentiert. Dieser Antigenkomplex stimuliert eine Antwort der T-Helferzellen, die die B-Zellreifung in antikörpersezernierende Plasmazellen und immunologische Gedächtniszellen erleichtert.^[260] Tatsächlich hatten Avery und Goebel schon 1930 gezeigt, dass die Kupplung von Kapselpolysacchariden von Pneumokokken an ein Trägerprotein eine typspezifische Antipneumokokken-Reaktion hervorruft, die keine der Komponenten alleine auslösen kann.^[261] Auch einige der kommerziell erhältlichen antibakteriellen Impfstoffe, die vorher erwähnt wurden, beruhen auf Konjugaten.^[258a]

Obwohl natürliche Polysaccharide bereits mit Erfolg als Impfstoffe eingesetzt wurden,^[262] verstärkt ihre Heterogenität die Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit. Dem lässt sich durch synthetische Verfahren begegnen, durch die spezifische Kohlenhydratantigene in Reinform und in relativ großen Mengen verfügbar sind.^[3] Da die immunogenen Epitope oft nur einen Teil der Saccharidstruktur ausmachen (so erkennen Antikörper Epitope, die nicht länger als ein Hexasaccharid sind), kann man mit effizienten Syntheseverfahren auch die relevanten Strukturmerkmale (z. B. die Oligosaccharidlänge) für die Konstruktion von Impfstoffkandidaten kartieren. Der erste synthetische Oligosaccharid-Konjugatimpfstoff, **166** (Quimi Hib), der im Jahr 2004 auslizenziert wurde, verdeutlicht den möglichen Nutzen der organischen Synthese zur Herstellung von kohlenhydratbasierten Impfstoffen (Abbildung 17).^[263] Diese Impfstoffe gewähren einen vergleichbaren Impfschutz gegen das Bakterium *Haemophilus influenzae* Typ b (Hib) wie bereits früher lizenzierte Impfstoffe mit natürlichem Kapsel-Polysaccharid.

Neben der Kohlenhydratchemie ist der kritische Schritt bei der Synthese von Glykokonjugat-Impfstoffen die Kuppelung der Kohlenhydratantigene an die immunogenen Träger. Es ist von großer Bedeutung für die synthetisierten Oligosaccharide, dass sie mit Linkern ausgestattet sind, die geeignete funktionelle Gruppen zur selektiven Konjugation tragen,

ohne die Hydroxygruppen des Saccharids zu beeinträchtigen.^[148,264] So greift man beim Entwurf kohlenhydratbasierter Impfstoffe im Allgemeinen als Linker für die Biokonjugation auf das endständige Olefin zurück, das in Allyl- oder Pentenylglycosiden vorkommt.^[265] Es ist praktisch, dass Oligosaccharide, die eine solche Funktionalität tragen, mit der üblichen automatisierten Oligosaccharidsynthese hergestellt werden können.^[124a] Außer den Konjugationsmethoden müssen beim Entwurf von Glykokonjugat-Impfstoffen auch weitere Gegebenheiten berücksichtigt werden, die die Immunreaktion auf den Kohlenhydratrest beeinflussen können, so die Natur der terminalen Bindungen zwischen Saccharid und Aglycon, die Dichte und Länge der Saccharidketten und die Geometrie und Immunogenität des Linkers.^[264a]

Im folgenden Teil des Aufsatzes werden wir versuchen, die biologische Anwendung der zuvor beschriebenen Syntheseverfahren auf kohlenhydratbasierte Impfstoffe zusammenzufassen. Anstatt dabei alle Aspekte dieses sich rasch entwickelnden Gebietes zu betrachten, werden wir uns auf kohlenhydratbasierte Impfstoffe gegen Parasiten, HIV und Krebserkrankungen konzentrieren. Für die Darstellung kohlenhydratbasierter antibakterieller Impfstoffe sei der Leser auf andere spezifische Übersichtsartikel verwiesen.^[266]

7.1. Antiparasitische Impfstoffkandidaten

Ähnlich wie Bakterien synthetisieren auch viele Parasiten ungewöhnliche Glykokonjugate auf ihrer Oberfläche; diese sind oft immunogen und können als Zielstruktur für die Entwicklung antiparasitischer Impfstoffe dienen.^[267] *Plasmodium falciparum* ist ein protozoischer Parasit, der für etwa 95 % der Malariafälle weltweit verantwortlich ist.^[268] Die Proteinglycosylierung in *Plasmodium* geschieht zu 90 % hochkonserviert über die Kupplung eines GPI-Ankers, der als zentrales Parasitentoxin angesehen wird, da er die Produktion von proinflammatorischen Cytokinen und Stickoxid durch Makrophagen induziert und so zur Pathogenese von Malaria beiträgt.^[269] Seeberger et al. untersuchten die Möglichkeit, GPI als Zielstruktur zu verwenden, indem sie den Impfstoffkandidaten **172** synthetisierten, der ein Hexasaccharid des *P. falciparum*-GPI-Glycans, konjugiert an ein Trägerprotein, enthält (Schema 32).^[270] Das Tetramannosylfragment **168** von GPI kann automatisiert an der Festphase synthetisiert werden^[271] und wird anschließend mit dem zentralen Disaccharid **169** in Lösung gekuppelt. Das entstehende Hexasaccharid wurde mit dem Malariatoxin **171** konjugiert und mit 2-Iminoethanol umgesetzt, um eine Sulfhydrylgruppe am Ethanolamin einzuführen. Dies dient dann der Konjugation an maleimidaktiviertes Keyhole-Limpet-Hämocyanin (KHL), ein großes immunogenes Protein aus der Hämolymphe der Großen Kalifornischen Schlüssellochschnecke. Das Konjugat **172** wurde dann Mäusen injiziert. So konnte ein signifikanter Impfschutz gegen *P. berghiei*-induzierte Erkrankungserscheinungen wie Malariaacidose, Lungenödem und Zerebralsyndrom erzielt werden. Obwohl die Mortalität zurückging, war die Anzahl der Parasiten im Blut der geimpften Tiere unverändert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies deutet darauf hin, dass der GPI-Antikörper die Parasi-

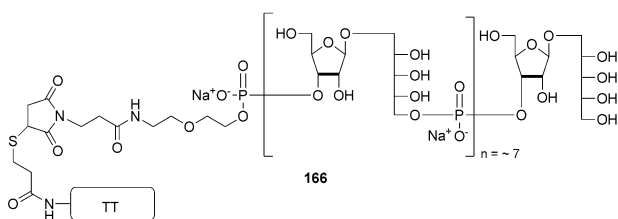


Abbildung 17. Synthetischer Impfstoff gegen *Haemophilus influenzae* Typ b (Hib).

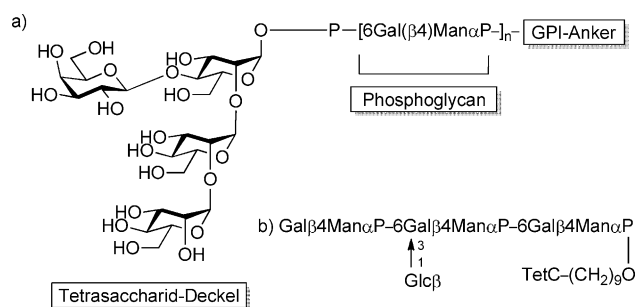


Abbildung 18. a) Allgemeine Struktur des Lipophosphoglycans (LPG) von *Leishmania donovani*. b) Chemische Struktur des Glyco-Impfstoffs, der die repetitive Phosphoglycanstruktur von *L. mexicana* in Verbindung mit dem rekombinanten Fragment C des Tetanustoxins (TetC) enthält. P = Phosphat.

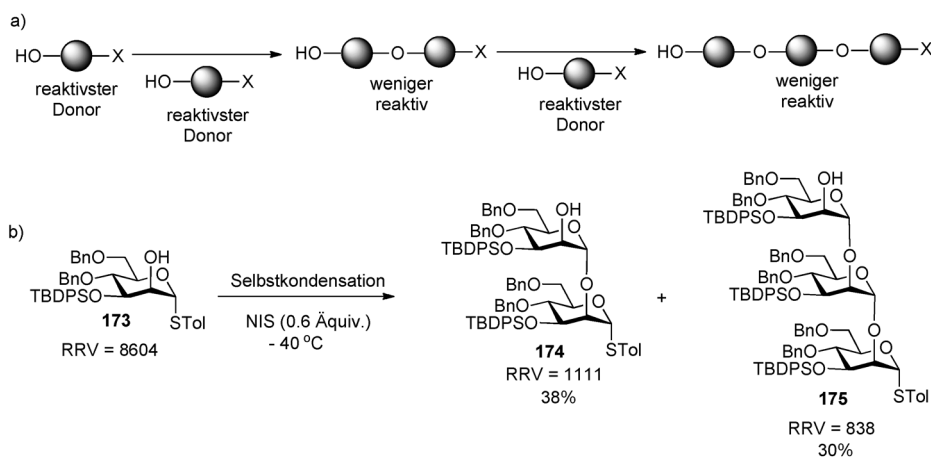
these wurde von Seeberger et al. beschrieben.^[282] Auch wenn die immunologischen Studien über automatisiert hergestellte Kohlenhydratimpfstoffe gegen Leishmaniose noch nicht abgeschlossen sind, wurden bereits mehrere synthetische Impfstoffkandidaten auf der Basis der LPG-Strukturen beschrieben.^[283] So synthetisierten Seeberger et al. den Tetrasaccharid-Deckel von *L. donovani*, der mit einem Thiol-Linker ausgestattet ist, um den Oligosaccharidrest an das maleimidaktivierte Influenza-Hüllprotein Hämagglutinin kuppeln zu können.^[283b] Das entstehende HA-Glykokonjugat wurde in ein Virosom eingebaut,^[284] sodass ein HA-Glycan-beladenes immunstimulierendes rekonstituiertes Influenzavirosomenkonstrukt (IRIV) entsteht. Mit den virosomalen Formulierungen wurden IgM- und IgG-Antiglycan-Antikörper in immunisierten Mausmodellen gebildet, die in vitro mit dem natürlichen, von *L. donovani* exprimierten Kohlenhydratan-tigen kreuzreagierten. Dieses Ergebnis deutet auf das große Potenzial hin, das IRIVs für die Entwicklung von kohlenhydratbasierten Impfstoffen haben, denn sie sind geeignet, T-Zell-abhängige Antikörperantworten gegen Oligosaccharidantigene zu induzieren.

Eine andere Untersuchung wurde von Rogers et al. veröffentlicht; er verwendete die chemisch synthetisierten Phosphoglycane verschiedener Strukturen von *L. major*, *L. mexicana* und *L. donovani* in Verbindung mit dem TetC-Peptid des Tetanustoxoids, um vier Glycoimpfstoffe herzustellen. Mit diesen wurden Mäuse immunisiert, die anschließend mit *L. mexicana* infizierten Sandfliegen ausgesetzt wurden (Abbildung 18b).^[283c] Keiner der Impfstoffe konnte zwar gegen eine künstliche Infektion per Injektion schützen; das Glycan von *L. mexicana* erwies sich aber als schützend gegen den Biss infizierter Sandfliegen. Es sieht also so aus, als könnten diese Glykokonjugatimpfstoffe eine spezies- und glycanspezifische Schutzwirkung induzieren. Dies war das erste Mal, dass mit einem synthetischen Glykokonjugatimpfstoff ein direkter antiparasitärer Effekt gegen Leishmaniose erzielt werden konnte.

7.2. Impfstoffkandidaten gegen HIV

Die weltweite Pandemie des erworbenen Immundefizienzsyndroms (AIDS), die hauptsächlich durch Infektion mit

dem hochvirulenten humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) verursacht wird, fordert schätzungsweise 2 Millionen Tote jährlich. Gegenwärtig leben mehr als 30 Millionen Menschen mit der Krankheit. Es gibt jedoch erhebliche Schwierigkeiten bei der Entwicklung effektiver protektiver Impfstoffe gegen AIDS, weil die HI-1-Viren verschiedene Verteidigungsmechanismen entwickelt haben, um der Immunüberwachung durch das Immunsystem des Wirts zu entgehen.^[285] Eines dieser Hindernisse ist, dass der dichte „Glycanschild“ auf dem Glycoprotein gp120 der Hülloberfläche das antigene Polypeptid abschirmt und so Immuntoleranz erzeugt. Interessanterweise konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die hochkonservierten N-Glycan-Cluster vom High-Mannose-Typ auf der Oberfläche von gp120 als alternatives Ziel für die Impfstoffentwicklung gegen HIV-1 eignen.^[285a, 285, 286] Diese Auffassung stützt sich auf die erfolgreiche Isolierung des breit neutralisierenden IgG 2G12 aus HIV-infizierten Personen. Der Antikörper bindet ausschließlich an die Oberflächenkohlenhydrate von gp120 und ist in der Lage, eine Reihe von HIV-1-Stämmen zu neutralisieren.^[287] Mutations-, biochemische und Strukturuntersuchungen von Antikörper-Antigen-Komplexen ergaben, dass das Epitop von 2G12 mannoseabhängig ist, insbesondere mit Spezifität für endständige Man α (1 \rightarrow 2)Man-Reste an den Armen D1 und D3 der N-Glycane.^[236b, 287b, c, 288] Inzwischen fand sich bei 2G12 eine ungewöhnliche Struktur mit vertauschten V_H-Domänen, die eine multivalente antigenbindende Oberfläche bilden, die einzigartig im Vergleich zu den bivalenten Wechselwirkungen typischer Immunglobuline ist.^[236b, 288] Diese Untersuchungen zur Spezifität von 2G12 förderten eine neue Impfstoffentwicklung, bei der der Entwurf des Immunogens hauptsächlich bestimmt war durch eine Nachahmung des 2G12-Epitops, mit dem Ziel, „2G12-ähnliche“ Antikörper zu induzieren. Der klassische Entwurf der Immunogene ist, Oligomannose-Cluster herzustellen, die durch eine regioselektive Kupplung chemisch reiner Oligomannose mit Gerüststrukturen erzeugt werden, die eine Multivalenz ermöglichen; einige dieser Glykokonjugate werden dann an Trägerproteine gebunden.^[286b] Biochemische Untersuchungen lassen vermuten, dass Man₉GlcNAc₂ und Man₄ zwei geeignete Liganden für 2G12 sind.^[236b, 289] Für die Synthese dieser High-Mannosehaltigen Glycane wurden verschiedene chemische Verfahren publiziert.^[131b, 136, 290] So führten Wong und Mitarbeiter eine chemoselektive Eintopfstrategie ein, in der eine Selbstkondensation von Thiomannosid-Monosaccharid zu Man α (1 \rightarrow 2)Man-Oligomannose von Man₄ abläuft (Schema 33).^[291] In diesem Eintopfverfahren durchläuft das reaktivste Monomer eine Selbstkondensation zu einem weniger reaktiven Dimer. Das Dimer dient dann als Akzeptor für ein anderes Monomer, wodurch ein Trimer entsteht (Schema 33a). Das beste Ergebnis für eine optimale Glycosylierung wurde mit **173** mit der unpolaren *tert*-Butyldimethylsilyl-Schutzgruppe an C3 und 0.6 Äquivalenten des Reaktionsbeschleunigers NIS bei -40°C erzielt (Schema 33b). Mit dem Disaccharid **174** oder dem Trisaccharid **175** als Glycosylierungsdonoren ließen sich verschiedene mannosereiche Strukturen wie Man₄, Man₅, Man₇, Man₈ und Man₉ einfach synthetisieren.^[236b] Danishefsky und Mitarbeiter beschrieben außerdem eine Totalsynthese von Man₉GlcNAc₂, um einen direkten Zugang zu einer



Schema 33. Synthese von Di- und Trimannosendonoren durch Eintopfselfkondensation.

Verbindung zu haben, die das Epitop von 2G12 nachahmt.^[144,292]

Zu neu entworfenen Immunogenen gehören Konstrukte, bei denen Oligomannoseliganden an den Bakteriophagen Q β ,^[293] an Rinderserumalbumin (BSA),^[294] an cyclische Peptide^[295] oder an Dendrimere^[236c,296] gekoppelt wurden (Abbildung 19). Einige dieser Immunogene haben tatsächlich eine hohe Affinität zu 2G12. So zeigten z.B. multivalente Man $_9$ -Glycodendrons (9mere, Abbildung 19b), die mit einer Kupfer(I)-katalysierten Cycloaddition hergestellt wurden, eine außergewöhnlich gute Hemmung der gp120-2G12- und gp120-DC-SIGN-Bindung im nanomolaren Bereich. Auch

1-Virus zu neutralisieren.^[258a] Diese Ergebnisse könnten auf eine unkorrekte Präsentation dieser Immunogentypen hinweisen und auf die Unfähigkeit, den Domänen austausch in den produzierten Antikörpern zu induzieren, welcher die einzigartige Architektur von 2G12 ausmacht. Weil frühere Untersuchungen ergeben haben, dass das Polypeptid von gp120 als starres Gerüst dienen könnte, um die Integrität der räumlichen Anordnung der 2G12-spezifischen Oligomannose-Cluster aufrechtzuerhalten, ist ein ebenfalls wichtiger Gesichtspunkt die Art und Flexibilität der Verbindung zwischen Oligosaccharid und Gerüst.^[293] Dazu berichteten Scanlan et al., dass die Antisera, die mit $\alpha(1\rightarrow3)$ -mannosyltransferasedefizienten *S.cerevisiae*-Zellen induziert worden waren, eine bemerkenswerte Ähnlichkeit in der Kohlenhydratspezifität mit 2G12 hatten und dass sie statistisch signifikant, wenn auch sehr schwach HI-1-Viren im Vergleich zu Kontrollseren neutralisierten.^[298] Außerdem zeigten einige der Glycoproteine, die von *S.cerevisiae*-Stämmen exprimiert werden, denen bestimmte kohlenhydratumsetzende Enzyme fehlen und die eine spezifische Man $_8$ GlcNAc $_2$ -Glycosylierung aufweisen, eine hohe Affinität für 2G12 und hemmten die Wechselwirkung zwischen gp120 und 2G12 und DC-SIGN.^[299] Wahrscheinlich ist die genetische Veränderung mikrobieller Kohlenhydrate ein alternativer Weg zu Immunogenen, die Antikörperreaktionen gegen die Glycane von HIV-1 hervorrufen können.

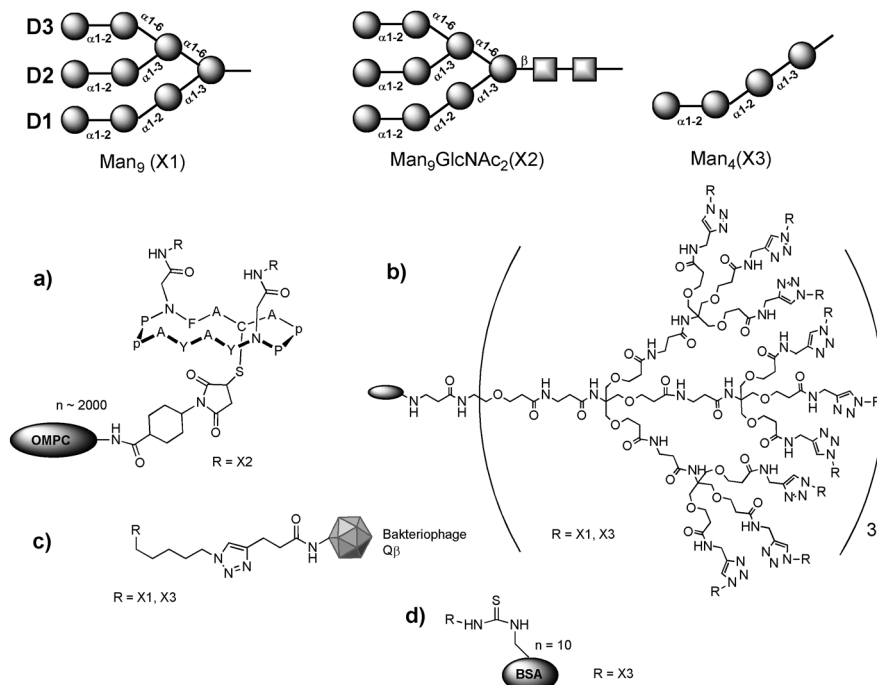


Abbildung 19. Synthetische Oligomannosekonjugate. a) Divalentes Glycopeptid-OMPC-Konjugat mit GlcNAc $_2$ Man $_9$ als Zuckerkomponente; b) Man $_4$ -, Man $_9$ -Glycodendron-BSA-Konjugat; c) Man $_4$ -, Man $_9$ -Q β -Bakteriophagenkonjugat. BSA = Rinderserumalbumin; OMPC = Proteinkomplex aus der äußeren Membran (outer membrane protein complex).

7.3. Impfstoffkandidaten gegen Krebs

Es ist seit mehreren Jahrzehnten bekannt, dass die Entwicklung von

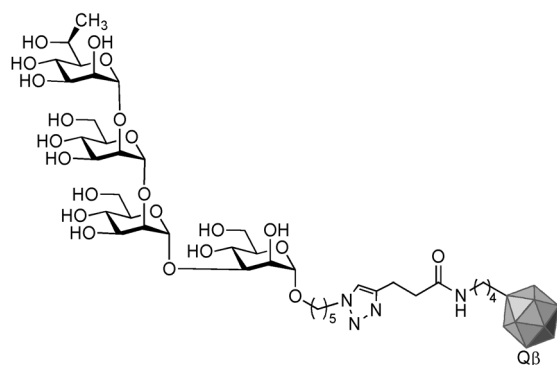


Abbildung 20. Man₄-Glycokonjugat mit Nonsel-α(1→2)-Verknüpfung.

Tumoren normalerweise mit Veränderungen von Kohlenhydraten der Zelloberfläche einhergeht.^[300] Die im Allgemeinen beobachtete abweichende Glycosylierung in humanen Tumorzellen umfasst die verstärkte Expression und veränderte Kohlenhydratstrukturen von Glycoproteinen und Glycolipiden, z. B. die Zunahme von α(1→6)-Verzweigungen von N-Glycanen und erhöhte Sialylierung und Fucosylierung.^[1a,301] Eine Bandbreite von Saccharidstrukturen wurden als mögliche tumorassoziierte Kohlenhydratantigene (TACAs) charakterisiert.^[302] Diese lassen sich in drei Kategorien einteilen: 1) Mucin-ähnliche O-Glycane, darunter Tn (GalNAcα-O-Ser/Thr), TF (Galβ1-3GalNAcα-O-Ser/Thr) und STn (Neu5Acα2-6GalNAcα-O-Ser/Thr); 2) Glycosphingolipide, darunter die Ganglioside GM2, GD2, GD3, Fucosyl-GM1 und das neutrale Globosid Globo H; und 3) Blutgruppenantigene, darunter SLe^x, Le^y-Le^x, SLe^a, Le^y in N-, O- oder Lipid-verknüpften Strukturen (Abbildung 21).

Die Krebsimmuntherapie zielt darauf ab, das eigene Immunsystem der Patienten anzuregen, um damit Krebs-erkrankungen entweder zu behandeln (therapeutische Impfungen) oder um Rezidive zu verzögern (prophylaktische Impfungen). Weil TACAs exklusiv oder überwiegend auf der Tumorzelloberfläche exponiert werden, besteht großes Interesse daran, diese TACAs therapeutisch zu nutzen, um mit Antikörpern gegen diese Strukturen spezifisch maligne Zellen abzutöten.^[303] Verschiedene Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass TACAs in normalem Gewebe während spezifischer Entwicklungsstadien

vorkommen und dass sie normalen Antigenen strukturell ähneln.^[302a,b] Daher ist es schwierig, die Toleranz gegenüber diesen Strukturen zu brechen, die für eine unzureichende Immunantwort zur Ausschaltung des Tumors verantwortlich ist. Ein weiteres ernstes Problem in Verbindung mit den Kohlenhydratantigenen ist ihre schlechte Immunogenität und die T-Zell-unabhängige Immunantwort. Darüber hinaus muss man noch die insgesamt schlechte Verfügbarkeit solcher Antigene berücksichtigen.

Die besonders schlechte Immunogenität der TACAs kann allerdings gut durch die chemische Konjugation an einen geeigneten Träger in Gegenwart eines passenden Adjuvans überwunden werden. Es gibt Hinweise aus präklinischen und klinischen Studien darauf, dass eine Anzahl von Glycokonjugaten von TACAs Antikörper gegen die entsprechenden Kohlenhydratreste induzieren, die in der Lage sind, zirkulierende Tumorzellen und Mikro- und Metastasen auszuschalten.^[304] Außerdem ist die Entwicklung effizienter Methoden zur Synthese von TACAs von besonderer Bedeutung für die Impfstoffentwicklung, da dies saubere und verlässliche Produkte sichert.^[305]

Gegenwärtig werden zwei Strategien verfolgt, um kohlenhydratbasierte Tumorigenstoffe zu entwickeln: a) semi-synthetische Glycokonjugate und b) vollsynthetische Glycokonjugate (Abbildung 22). Je nach Zahl und Art der Kohlenhydratpitope, die an ein Trägerprotein gekuppelt werden, kann man Strategie (a) weiter unterteilen in 1) monovalente

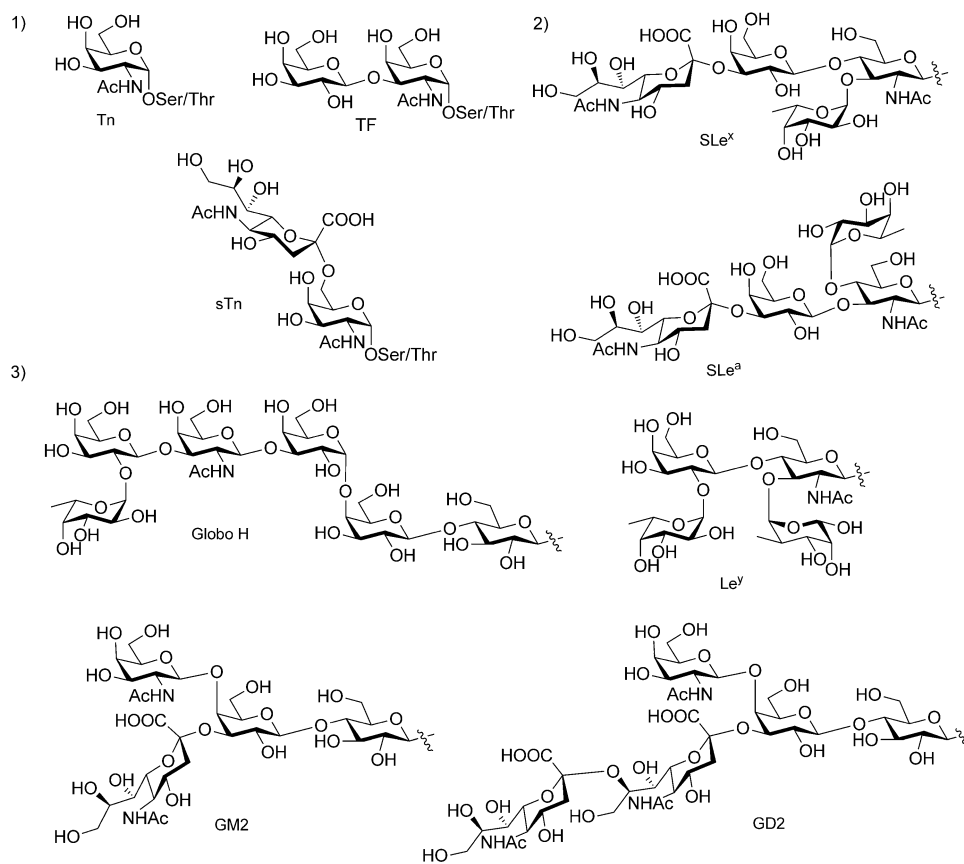
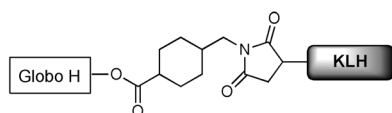


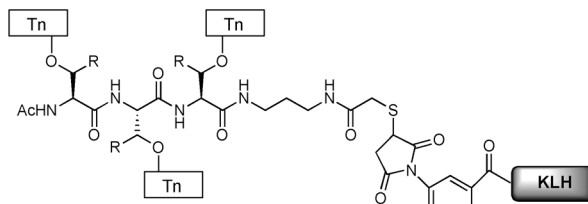
Abbildung 21. Strukturen ausgewählter tumorassoziiierter Kohlenhydratantigene (TACAs).

a) Semisynthetische Impfstoffe

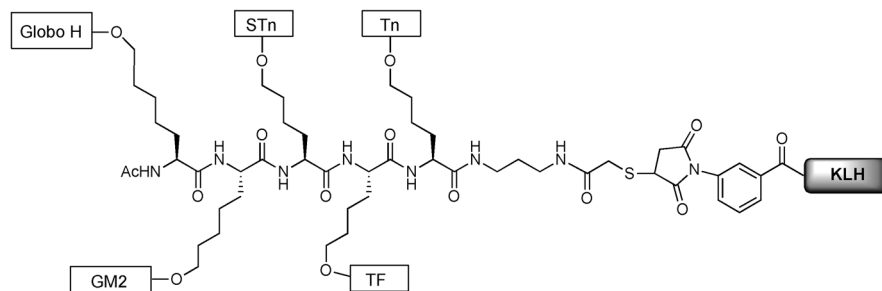
1) monovalent mit singulärem TACA



2) monovalenter Cluster mit singulärem TACA

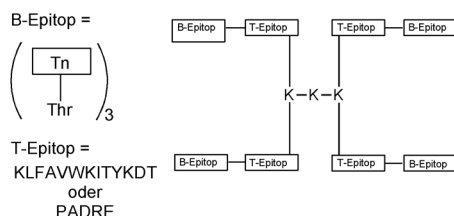


3) multivalent mit verschiedenen TACA-Typen (unimolekular pentavalent)

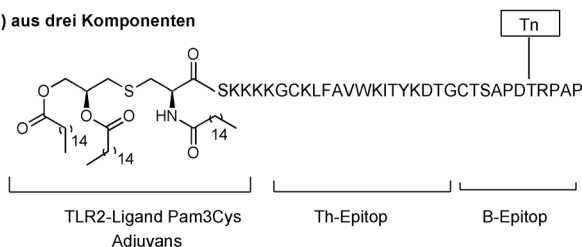


b) Vollsynthetische Impfstoffe

4) aus zwei Komponenten



5) aus drei Komponenten



6) aus vier Komponenten

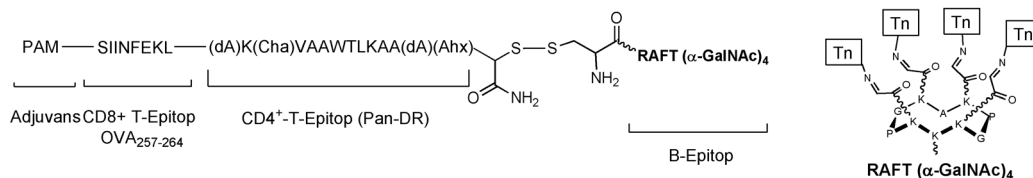


Abbildung 22. Verschiedene Typen kohlenhydratbasierter Tumorimpfstoffkandidaten. a) Semisynthetische Impfstoffe aus einem einzelnen oder mehreren TACAs, gekuppelt an ein immunogenes Trägerprotein; b) vollsynthetische Impfstoffe aus zwei oder mehr kovalent verknüpften Epitopen, darunter ein B-Epitop, ein CD4⁺-Epitop, ein CD8⁺-Epitop oder eingebaute Adjuvantien.

Impfstoffe mit einem Typ von TACAs, 2) monovalente Cluster mit einem Typ von TACAs und 3) unimolekulare polyvalente Konstrukte mit mehreren Typen von TACAs.^[306] Vollsynthetische Konjugate tragen Epitope aus 4) zwei Komponenten, 5) drei Komponenten und 6) vier Komponenten. In diesem Teil des Aufsatzes werden wir den erfolgreichsten kohlenhydratbasierten Tumorimpfstoff mit ausgewählten TACAs zusammenfassen. Aktuelle Übersichtsartikel über dieses Thema von Boons,^[307] Guo,^[308] Danishefsky,^[306] Ragupathi^[309] und Wu^[183c] seien zur weiteren Information empfohlen.

7.3.1. *Glycosphingolipidbasierte Impfstoffkandidaten*

Nachdem man in den 1990er Jahren die verbesserte Immunogenität von bakteriellen Polysacchariden durch Konjugation an ein immunologisch aktives Protein nachgewiesen hatte, konzentrierte sich die Forschung auf den Entwurf kohlenhydratbasierter Impfstoffe durch Kupplung von TACAs an geeignete Trägerproteine. In den entscheidenden Untersuchungen etablierten Livingstone et al. systematisch den immunologischen Effekt dieser Konjugation.^[310] Von den verschiedenen Polypeptidträgern und Adjuvantien erwies sich die kovalente Kupplung von Antigenen an KLH bei gleichzeitiger Verabreichung des Immunadjuvans QS-21 (eine Saponinfraktion aus der Rinde des südamerikanischen

Baumes *Quillaja saponaria molina*)^[311] als wirksamste Kombination aus Träger und Adjuvans zur Verstärkung der Immunantwort. Auch in einer anderen vergleichenden Studie in Patienten stellte sich GM2-KLH + QS-21 als am wirksamsten heraus.^[312] Diese Präparation induzierte höhere Titer und geeignetere Antikörper in Patienten als das reine Antigen zusammen mit dem Adjuvans.^[313] Ausgehend von diesem beachtlichen Ergebnis wurden intensive Anstrengungen unternommen, um verschiedene Gangliosid-KLH-Immunkongugate, darunter Le^y-KLH, Fucosyl-GM1-KLH, GD2-KLH, GM2-KLH, GD3-KLH und Globo H-KLH, herzustellen.^[309,314]

7.3.1.1. Globo H

Globo H ist ein tumorassoziiertes Antigen, das selektiv auf einer Anzahl von Tumoren exprimiert wird, darunter Brust-, Dickdarm-, Eierstock-, Bauchspeicheldrüsen- und Prostatakrebs.^[39] Während Globo H in Tumorzellen überexprimiert wird, wird es nur schwach in gesunden Geweben auf apikalen Epithelzellen an der Grenze zu inneren Hohlräumen exprimiert, also an einer Stelle, die für das Immunsystem unzugänglich zu sein scheint. Diese differenzielle Expression bot eine vielversprechende Möglichkeit, um Globo H als Zielstruktur für einen Tumorfimpfstoff zu prüfen.^[302b] Weil eine geeignete natürliche Quelle fehlte, war Globo H auch Gegenstand vieler Totalsynthesen mit unterschiedlichen Methoden. Danishefsky et al. berichteten als erste über die Synthese einer solch komplexen Struktur mithilfe der Glycalassemblierung.^[315] Inzwischen wurde eine Reihe effizienter Methoden entwickelt, darunter sequenzielle Synthesen,^[316] automatisierte Festphasensynthesen (Schema 25,^[128] Eintopfreaktionen (Abbildung 4 und Schema 16),^[40,44,317] enzymatische^[318] und chemoenzymatische Methoden,^[319] sodass das Globo-H-Antigen inzwischen relativ leicht zugänglich ist. Das erste (Globo-H)-KLH-Glykokongugat wurde durch Ozonolyse eines vollständig ungeschützten Allylglycosids und anschließende reduktive Aminierung mit KLH hergestellt.^[320] Eine spätere Verbesserung des Konjugationsprotokolls beruhte auf der Einführung der Maleimid-Thiol-Kupplung (Abbildung 22a1).^[321] In präklinischen Untersuchungen mit (Globo-H)-KLH + QS-21 konnten in Mäusen hohe Titer an IgM und IgG gegen Globo H induziert werden, wie mit ELISA nachgewiesen wurde.^[322] Tests an Patienten, die nach der Ersttherapie von Prostatakrebs ein Rezidiv erlitten hatten, ergaben, dass der Impfstoff sicher und ohne nennenswerte Toxizität ist.^[323] Der klinische Befund ergab, dass die Konzentration des prostataspezifischen Antigens (PSA) bei einem Drittel der Patienten im Vergleich zur Situation vor der Behandlung abnahm. Unter-

suchungen an Brustkrebspatientinnen ergaben ähnliche Resultate.^[321]

Kürzlich wurde gezeigt, dass das Diphtherietoxin (DT) CRM197, das seit Jahrzehnten verbreitet für Diphtherieimpfungen beim Menschen verwendet wird und von der FDA in verschiedenen Glykokongugatimpfstoffen zugelassen ist, ein aussichtsreiches Trägerprotein für Globo-H-basierte Tumorfimpfstoffe ist.^[324] Ein neuer Impfstoffkandidat aus dem Globo-H-Hexasaccharid, konjugiert an DT CRM197 und zusammen mit einem Glycolipidadjuvans verabreicht, ruft eine effektive Immunantwort hervor, indem er mehr IgG-Antikörper gegen Globo H induziert als andere Trägerproteine oder Glycolipidadjuvantien.^[324] Überraschend war, dass die induzierten Antikörper nicht nur Globo H neutralisierten, sondern auch Gb5 und SSEA-4, die beide spezifisch auf Brustkrebszellen und Tumorstammzellen exprimiert werden (Abbildung 23).

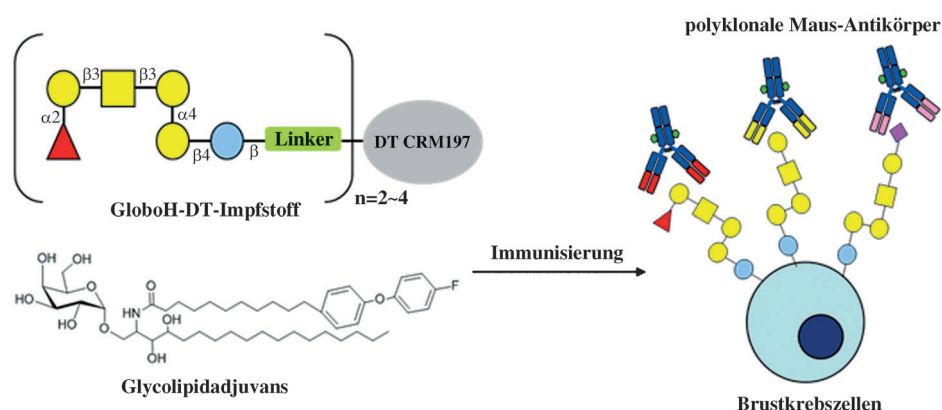


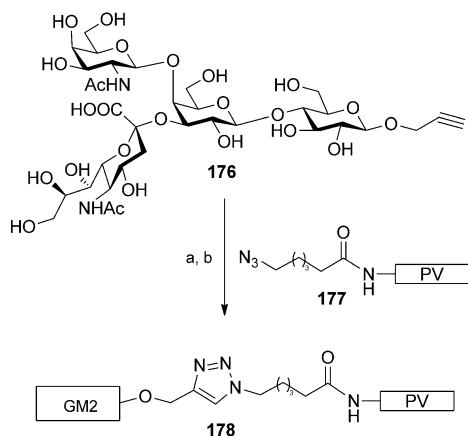
Abbildung 23. Neuer Tumorfimpfstoff bestehend aus Globo H, Diphtherietoxin CRM197 und einem Glycolipidadjuvans.

Auch wenn es einige erfolgreiche Beispiele semisynthetischer Konjugatimpfstoffe gibt, bleiben doch auch Limitierungen bestehen. Erstens ist die Kohlenhydratdichte, die man auf Proteinglykokongugaten erreicht, stark variabel. Die resultierenden Schwankungen zwischen den Produktionschargen können daher die klinische Beurteilung und die Impfstoffwirksamkeit beeinflussen. Außerdem kann die Bildung irrelevanter Antikörper gegen das Trägerprotein oder den Linker zu einer trägerinduzierten Epitopsuppression führen.^[325] Daher ist die vollständige chemische Synthese von Immunogenen mit der Möglichkeit einer genauen molekularen Definition der Glykokongugate in Bezug auf Struktur und Zusammensetzung zu einer Alternative für die Entwicklung von Tumorfimpfstoffen geworden.

7.3.1.2. GM2

Es ist bekannt, dass das Gangliosid GM2 auf vielen Tumorzellen exprimiert wird, darunter Brust-, Eierstock-, Prostata-, kleinzelligen Lungentumorzellen und Melanomzellen.^[302b] In einer Serie von Untersuchungen mit dem GM2-KLH an Patienten mit malignem Melanom zeigten Livings-

ton et al., dass die Impfung mit dem GM2-Neoglycoprotein verlässlich hohe GM2-spezifische IgM-Titer und dauerhafte IgG-Antikörper induziert.^[312] Außerdem induzierten diese Antikörper eine komplementvermittelte Lyse GM2-positiver Tumorzellen.^[326] Die Versuche verdeutlichten, dass ein erhöhter Antikörpertiter gegen GM2 einen klinischen Vorteil mit sich bringt. Lo-Man et al. publizierten als Alternative Glykokonjugate von synthetischen, strukturell genau definierten GM2-Neoglycopeptiden **178** (Schema 34).^[327] Prak-



Schema 34. Synthese des Glycopeptids **178** mit propargyliertem GM2, das von einem gentechnisch veränderten *E. coli* gebildet wurde. Reaktionsbedingungen: a) CuSO_4 , Natriumascorbat, $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ (1:1); b) Umkehrphasen-HPLC.

tisch ist, dass die konjugierbare Form des GM2-Oligosaccharids **176** mit gentechnisch veränderten *E. coli* in Grammengen hergestellt werden kann. Das so erhaltene propargylierte GM2 **176** wurde mit dem Monoazido-PV-Peptid **177** durch Kupfer(I)-katalysierte 1,3-dipolare Huisgen-Cycloaddition zum gewünschten GM2-Glycopeptid **178** verbunden. Die Mäuse, die mit solch kurzen Glycopeptiden wie **178** immunisiert wurden, bildeten IgG- und IgM-Antikörper gegen GM2-Ganglioside. Die Seren dieser Mäuse konnten humane Tumorzellen erkennen, die GM2 auf der Oberfläche tragen. Dieses Glycopeptid ist ein aussichtsreicher Kandidat für eine Tumorimpfung, denn das GM2-Oligosaccharid kann effizient hergestellt und dann direkt mit dem Trägerpeptid konjugiert werden.

Mit gentechnisch veränderten *E. coli*-Stämmen konnten erfolgreich (in manchen Fällen im Multigramm-Maßstab) konjugierbare Saccharidreste von GM2 und GM3,^[182] die Kohlenhydratreste verschiedener tumorassoziierter Oligosaccharide wie GD3^[183] und SLe^x^[181c] und Globoside wie Globotetraose,^[328] Globopentaose^[329] und Globo H^[330] synthetisiert werden.

7.3.2. Impfstoffkandidaten auf O-Glycanbasis

Das humane Mucin MUC1 ist ein membrangebundenes Glycoprotein. Seine große extrazelluläre Domäne enthält zahlreiche Tandem-Repeats der 20 Aminosäuren langen Sequenz HGVTSAPDTRPAGSTAPPA mit fünf möglichen

Stellen für eine O-Glycosylierung.^[331] In vielen Epitheltumoren (Brust, Eierstöcke, Bauchspeicheldrüse, Prostata) wird MUC1 überexprimiert, und die O-Glycane werden unvollständig prozessiert, sodass abweichende Glycosylierungsmuster entstehen, die auf kurze Kohlenhydratketten wie Tn, TF und die entsprechenden sialylierten Derivate dTn und sTF beschränkt sind (Abbildung 21).^[332] Diese kurzen Kohlenhydrat-Seitenketten sind nicht nur selbst tumorassoziierte Antigene, sondern exponieren auch vorher maskierte Peptidmotive. Damit werden MUC1-Glycopeptide als neue Antigen-Zielstrukturen verfügbar.

7.3.2.1. Tumorassoziierte O-Glycane vom Mucintyp

Um der Expression von Tn-Clustern (c) auf Tumormucinen möglichst nahe zu kommen, wurden Glykokonjugate aus dimeren Tn-Einheiten mit KLH (Abbildung 22 a2) und PAM (Palmitinsäure) synthetisiert^[333] und mit QS-21 in einer klinischen Phase-I-Studie an Patienten mit einem Prostata-Tumor-Rezidiv getestet.^[334] Die Verwendung des Lipidrestes PAM ergab eine chemisch definierte Struktur und konnte die Immunogenität von Peptid und Kohlenhydraten verstärken. Das KLH-Konjugat induzierte spezifische humorale Immunantworten (IgM und IgG); demgegenüber induzierte das vollsynthetische Tn(c)-PAM zwar IgM, konnte aber keine IgG-Antikörper induzieren. Der Tri-Tn-Rest wurde ebenfalls zur Konstruktion eines vollsynthetischen multiplen Antigen-Glycopeptids (MAG) verwendet, das einen vierarmigen nichtimmunogenen Polylysinkern besitzt. Jeder Arm wird durch ein T-Epitop und ein B-Epitop verlängert. Als T-Epitop fungiert ein durch murines MHC II restringiertes Poliovirus(PV)-Peptid, als B-Epitop das Tri-Tn-Glycotop (Abbildung 22 b4).^[335] Eine Immunisierung mit diesem Impfstoffkandidaten im Gemisch mit dem milden Adjuvans Alum induzierte in Mäusen Tn-spezifische IgM- und IgG-Antikörper, deren Titer über mehr als 6 Monate aufrechterhalten wurden. Um den klinischen Effekt von MAG im Vergleich zu KLH besser zu verstehen, wurde die Immunogenität von Tn(c)-KLH im Vergleich zu Tn(c)-MAG mit verschiedenen Adjuvantien untersucht.^[336] Im Gegensatz zu Tn(c)-MAG wurde mit KLH eine starke Antikörperreaktion hervorgerufen, wenn Alum mit verabreicht wurde. Außerdem waren die Antikörpertiter gegen Tn, die durch das MAG-Konjugat induziert wurden, deutlich höher als die durch das KLH-Konstrukt mit dem gleichen Tri-Tn-Glycotop induzierten. Kein Immungedächtnis konnte aktiviert werden, wenn KLH- oder MAG-Konjugate in einer Verstärkungsinjektion an Mäuse verabreicht wurden, die zunächst Tn(c)-KLH in QS-21 erhalten hatten. War die Erstimmunisierung dagegen mit Tn(c)-MAG vorgenommen worden, konnte durch die Zweitinjektion eine Gedächtnisreaktion hervorgerufen werden. Ein ähnliches MAG-Konstrukt, in dem das PV-Peptid durch ein durch humanes MHC II restringiertes PADRE-T_H-Epitop ersetzt wurde, wurde in nichthumanen Primaten getestet und induzierte Tn-IgG-Antikörper, die eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) gegen Tumorzellen in Gegenwart humaner NK-Zellen hervorrufen konnten.^[336]

Renaudet et al. nutzten die präparative Vielseitigkeit regioselektiv adressierbarer funktionalisierter Matrizen

(RAFT; regioselectively addressable functionalized template), um einen Impfstoffkandidaten mit einem Tn-Cluster herzustellen.^[337] Später führten sie den ersten vollsynthetischen Glycolipidimpfstoff aus vier Bestandteilen ein: PAM-OVA₂₅₇₋₂₆₄-PADRE-RAFT(α -GalNAc)₄ enthält ein geclustertes Tn-B-Zellepitop, ein CD4⁺-Th-Epitop, ein CD8⁺-CTL-Peptid-Epitop und einen Palmitinsäurerest, der als eingebautes Adjuvans wirkt (Abbildung 22b6).^[338] Dieser Impfstoff provozierte erfolgreich die Bildung starker Tn-spezifischer IgG/IgM-Antikörper. Die eingebauten PADRE- und OVA₂₅₇₋₂₆₄-Epitope induzierten spezifische CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Antworten und bestätigten damit die korrekte Antigenprozessierung und -präsentation der Th- und CTL-Epitope. Außerdem zeigte der Impfstoff eine außergewöhnliche vorbeugende Wirkung. In keiner der geimpften Mäuse entwickelte sich während der Beobachtungszeit von 90 Tagen ein Tumor aus den murinen MO5-Melanomzellen, die den Mäusen injiziert wurden.

7.3.2.2. MUC1-Glycopeptide

Strategien für eine aktive Tumormimmuntherapie auf der Grundlage von synthetischen MUC1-basierten Glycopeptiden wurden in der beeindruckenden Arbeit von Kunz^[141d,339] und anderen^[340] entwickelt. Boons et al. führten vor kurzem einen neuen vollsynthetischen Impfstoff aus drei Komponenten ein: dem Glycoundecapeptid des Tandem-Repeats von MUC1, das die Monosaccharid-Tn-Seitenkette trägt, außerdem das PV-Th-Epitop und einen Agonisten (Pam₂CysSK₄ oder Pam₃CysSK₄) des Toll-like-Rezeptors 2 (TLR2), der als eingebautes Adjuvans wirkt (Abbildung 22b5).^[341] Der Lipidrest des Impfstoffs unterstützt die liposomale Freisetzung, die die multivalente Antigenpräsentation begünstigt, verstärkt die Aufnahme durch APCs und führt zur Aktivierung von T- und B-Zellen.^[342] Dieser Impfstoff induzierte außergewöhnlich hohe Titer von MUC1-IgG-Antikörpern, die MUC1-exprimierende Tumorzellen erkennen können. Die niedrigen Antikörpertiter gegen das Th-Epitop deuten außerdem darauf hin, dass dieses sich selbst verstärkende Mehrkomponenten-Impfstoffkonstrukt Immunreaktionen gegen den Träger unterdrücken kann. Von diesen Ergebnissen angeregt führten Kunz et al. einen vollsynthetischen Impfstoff aus tumorassoziierten MUC1-Glycopeptiden und einem Lipopeptidliganden von TLR2 ein.^[343] Obwohl die induzierten Antikörpertiter nicht so hoch waren wie die beim entsprechenden MUC1-TT-Impfstoff,^[344] kann die Synthese dieses Konjugats durch Fragmentkondensation mit ungeschützten aminofunktionalisierten Glycopeptiden auf die Synthese von Sialinsäure tragenden Glycopeptiden angewendet werden. So synthetisierten Payne und Mitarbeiter den ersten Impfstoff, der den TLR2-Liganden Pam₃Cys-Ser und eine vollständige Kopie des 20 Aminosäuren langen MUC1-Peptids VNTR, in dem alle fünf O-Glycosylierungsstellen mit Tn- und TF-Antigenen derivatisiert sind, umfasst.^[345] Eine immunologische Evaluierung dieser Konstrukte läuft gegenwärtig.

7.3.3. Multivalente Impfstoffkandidaten

Alle transformierten Zellen können eine definierte Vielfalt von TACAs auf der Zelloberfläche tragen und ihre Variabilität und Quantität kann sich mit den unterschiedlichen Stadien der Zellentwicklung ändern; daher ist es erstrebenswert, multiantigene Tumorigenimpfstoffe zu entwerfen, um eine bestmögliche Beziehung zu einem bestimmten Tumortyp herzustellen.^[346] Eine Folgerung aus dieser Idee sind polyvalente Impfstoffe, die auf der Verabreichung von Mischungen monomerer Konjugatimpfstoffe beruhen.^[347] Eine andere attraktive Alternative besteht in einem unimolekularen pentavalenten Konstrukt, das aus verschiedenen Tumorantigenen besteht; diese werden auf einem einzelnen Molekül (meist einem Peptid) präsentiert, das in einem Konjugationsschritt an ein Trägerprotein oder eine andere Plattform zu Immunisierung gekuppelt wird. Die KLH-Konjugate von Tn, Le^x und Globo H, die IgM- und IgG-Antikörper in Mäusen induzieren, dienten als Nachweis für die Richtigkeit des Konzepts.^[348] Vor kurzem beschrieben Danishefsky und Mitarbeiter die Herstellung und biologische Evaluierung eines unimolekularen pentavalenten KLH-Konjugats mit Globo-H, GM2, sTn, Tn und Tf in Mäusen (Abbildung 22a3).^[349] Mit einem verbesserten Biokonjugationsprotokoll erwies sich dieser Impfstoffkandidat als vielversprechend, IgG- und IgM-Antikörper gegen jedes der fünf individuellen Kohlenhydratantigene zu induzieren. Andere KLH-Konjugate von Gb3 mit dem Peptid MUC5Ac, wenn sie als Cluster präsentiert wurden, waren auch in der Lage, Eierstockkrebszellen anzugreifen.^[350] Von diesem Impfstoff wurde auch die Induktion einer starken Immunreaktion gegen Gb3 und MUC5Ac erwartet. Die immunologische Evaluierung läuft gegenwärtig noch.

8. Zusammenfassung und Ausblick

Umfangreiche Fortschritte in der Glycobiologie und Glycomedizin haben die enorme Entwicklung der Oligosaccharid-Synthese mit vorangetrieben. Neue Fortschritte der Syntheseverfahren, wie sie in diesem Aufsatz zusammengefasst sind, darunter programmierbare Eintopfglycosylierungen und automatisierte Festphasensynthesen, ermöglichten die Entwicklung eines bequemen und effektiven automatisierbaren Systems zur Synthese von Oligosacchariden und Glykokonjugaten. Dennoch bleiben viele technische Probleme, die die Entwicklung der Kohlenhydratforschung behindern, noch immer bestehen. So ist beispielsweise die arbeitsintensive Herstellung von Bausteinen noch immer notwendig und unvermeidbar. Es ist also wichtig, methodische Forschungen zu betreiben, um diese Prozesse voranzutreiben. So wird durch Innovationen in der regioselektiven Schutzgruppenchemie die Differenzierung von Zuckerpolyolen in einem einzelnen Gefäß möglich. Die chemoenzymatische Synthese, die auf der regio- und stereoselektiven Glycosylierung chemisch abgeleiteter Substrate durch Enzyme (darunter Glycosyltransferasen, Glycosidasen und Glycosynthasen) beruht, öffnet einen Weg zur parallelen und kombinatorischen Synthese biologisch bedeutsamer natürlicher und

nichtnatürlicher Kohlenhydrate. Fortschritte bei der Synthese komplexer Kohlenhydrate erleichtern auch die Entwicklung neuer Methoden für die Synthese homogener Glycoproteine.^[154b] Tatsächlich hängen Fortschritte in den Glycowissenschaften stark von strukturell genau definierten synthetischen Kohlenhydraten ab, die sich als wertvolle Werkzeuge zur Entwicklung von Glycoarrays und Impfstoffen erwiesen haben. Für die Zukunft wird erwartet, dass die automatisierte Kohlenhydratsynthese verwirklicht wird und dass unterschiedliche Strukturen für biologische Untersuchungen einfach zugänglich werden.

Abkürzungen

Ac	Acetyl
AcP	Acetylphosphat
Ada	Adamantanyl
Alloc	Allyloxycarbonyl
BDMS	Bromdimethylsulfoniumbromid
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BOM	Benzyloxymethyl
BSP	1-Benzolsulfinylpiperidin
Bz	Benzoyl
Cbz	Benzyloxycarbonyl
ClAc	Chloracetyl
ClBn	<i>ortho</i> -Chlorbenzyl
CMP	Cytidinmonophosphat
CSA	Camphersulfonsäure
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyanobenzochinon
DMAP	4-(<i>N,N</i> -Dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMTST	Dimethyl(methylthio)sulfoniumtriflat
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GDP	Guanosindiphosphat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
<i>i</i> Pr	Isopropyl
Lev	Lävulinoyl
MS	Molekülsieb
2-NAP	2-Naphthylmethyl
NBz	<i>para</i> -Nitrobenzoyl
NIS	<i>N</i> -Iodsuccinimid
Phth	Phthalimido
Piv	Pivaloyl
PMB	<i>para</i> -Methoxybenzyl
PMP	<i>para</i> -Methoxyphenyl
SBox	<i>S</i> -Benzoxazolyl
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TCA	Trichloracetyl
Tf	Trifluormethansulfonyl
TFA	Trifluoracetyl
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl
TMSOTf	Trimethylsilyltrifluormethansulfonat
Tol	Toluol

Troc	2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl
Tr	Trityl
UDP	Uridindiphosphat

Eingegangen am 7. Januar 2011

Online veröffentlicht am 30. November 2011

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] a) A. Varki, D. C. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler, *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Press, New York, **2009**; b) R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683–720; c) A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130.
- [2] a) J. C. Paulson, O. Blixt, B. E. Collins, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 238–248; b) Z. Shriver, S. Raguram, R. Sasisekharan, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 863–873.
- [3] a) X. M. Zhu, R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1932–1967; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1900–1934; b) T. J. Boltje, T. Buskas, G. J. Boons, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 611–622; c) B. O. Fraser-Reid, K. Tatsuta, J. Thiem, *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology*, 2. Aufl., Springer, New York, **2008**; d) J. P. Kamerling, *Comprehensive Glycoscience*, Bd. 1–4, Elsevier, Dordrecht, **2007**; e) C.-H. Wong, *Carbohydrate-Based Drug Discovery*, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**; f) B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinaý, *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**; g) K. C. Nicolaou, H. J. Mitchell, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1624–1672; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1576–1624; h) K. M. Koeller, C.-H. Wong, *Nature* **2001**, *409*, 232–240; i) P. H. Seeberger, D. B. Werz, *Nature* **2007**, *446*, 1046–1051; j) C. R. Bertozzi, L. L. Kiessling, *Science* **2001**, *291*, 2357–2364.
- [4] C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4219–4225.
- [5] a) K. Jarowicki, P. Kocienski, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2001**, 2109–2135; b) M. Filice, J. M. Guisan, J. M. Palomo, *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 516–532; c) P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, Thieme, Stuttgart, **2005**; d) S. Oscarson in *The Organic Chemistry of Sugars* (Hrsg.: D. E. Levy, P. Fügedi), Taylor & Francis, Boca Raton, **2006**, S. 53–87; e) P. G. M. Wuts in *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4. Aufl., Wiley, New York, **2007**, S. 16–366; f) A. Liptak, A. Borbas, I. Bajza in *Comprehensive Glycosciences: From Chemistry to Systems Biology* (Hrsg.: J. P. Kamerling), Elsevier, Amsterdam, **2007**, S. 203–259.
- [6] C.-H. Wong, X.-S. Ye, Z.-Y. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7137–7138.
- [7] C.-T. Chen, S.-S. Weng, J.-Q. Kao, C.-C. Lin, M.-D. Jan, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3343–3346.
- [8] a) W. Muramatsu, K. Mishiro, Y. Ueda, T. Furuta, T. Kawabata, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 827–831; b) Y. Ueda, W. Muramatsu, K. Mishiro, T. Furuta, T. Kawabata, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8802–8805.
- [9] Y. Demizu, Y. Kubo, H. Miyoshi, T. Maki, Y. Matsumura, N. Moriyama, O. Onomura, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5075–5077.
- [10] M.-K. Chung, M. Schlaf, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18085–18092.
- [11] N. Thota, D. Mukherjee, M. V. Reddy, S. K. Yousuf, S. Koul, S. C. Taneja, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1280–1283.
- [12] D. Mukherjee, B. A. Shah, P. Gupta, S. C. Taneja, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 8965–8968.
- [13] C.-A. Tai, S. S. Kulkarni, S.-C. Hung, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8719–8722.
- [14] a) R. Kumar, P. Tiwari, P. R. Maulik, A. K. Misra, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 74–79; b) B. Mukhopadhyay, K. P. R. Kartha, D. A. Russell, R. A. Field, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7758–7760.
- [15] Y. Du, M. Zhang, F. Kong, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3797–3800.

- [16] B. Mukhopadhyay, R. A. Field, *Carbohydr. Res.* **2003**, 338, 2149–2152.
- [17] C.-C. Wang, J.-C. Lee, S.-Y. Luo, H.-F. Fan, C.-L. Pai, W.-C. Yang, L.-D. Lu, S.-C. Hung, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2466–2468; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2360–2362.
- [18] W.-C. Yang, X.-A. Lu, S. S. Kulkarni, S.-C. Hung, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 7837–7840.
- [19] a) C.-C. Wang, J.-C. Lee, S.-Y. Luo, S.-S. Kulkarni, Y.-W. Huang, C.-C. Lee, K.-L. Chang, S.-C. Hung, *Nature* **2007**, 446, 896–899; b) C.-C. Wang, S.-S. Kulkarni, J.-C. Lee, S.-Y. Luo, S.-C. Hung, *Nat. Protoc.* **2008**, 3, 97–113.
- [20] a) C.-R. Shie, Z.-H. Tzeng, S. S. Kulkarni, B.-J. Uang, C.-Y. Hsu, S.-C. Hung, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 1693–1696; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 1665–1668; b) C.-C. Wang, S.-Y. Luo, C.-R. Shie, S.-C. Hung, *Org. Lett.* **2002**, 4, 847–849.
- [21] K.-L. Chang, M. M. L. Zulueta, X.-A. Lu, Y.-Q. Zhong, S.-C. Hung, *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 7424–7427.
- [22] a) S.-Y. Luo, S. S. Kulkarni, C.-H. Chou, W.-M. Liao, S.-C. Hung, *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 1226–1229; b) X.-A. Lu, C.-H. Chou, C.-C. Wang, S.-C. Hung, *Synlett* **2003**, 1364–1366.
- [23] a) S. Raghavan, D. Kahne, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 1580–1581; b) S. V. Ley, H. W. M. Priepe, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 2412–2414; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 2292–2294; c) H. Yamada, T. Harada, T. Takahashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7919–7920.
- [24] a) D. Crich, S. X. Sun, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 435–436; b) J. D. C. Codée, R. E. J. N. Litjens, R. den Heeten, H. S. Overkleef, J. H. van Boom, G. A. van der Marel, *Org. Lett.* **2003**, 5, 1519–1522; c) X. Huang, L. Huang, H. Wang, X.-S. Ye, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 5333–5336; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5221–5224.
- [25] a) O. Kanie, Y. Ito, T. Ogawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 12073–12074; b) H. Yamada, T. Harada, H. Miyazaki, T. Takahashi, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 3979–3982.
- [26] a) H. Tanaka, H. Yamada, T. Takahashi, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2007**, 19, 183–193; b) Y. H. Wang, X. S. Ye, L. H. Zhang, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 2189–2200; c) Y. H. Wang, L. H. Zhang, X. S. Ye, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2006**, 9, 63–75; d) B. Yu, Z. Y. Yang, H. Z. Cao, *Curr. Org. Chem.* **2005**, 9, 179–194.
- [27] B. Fraser-Reid, Z. F. Wu, U. E. Udodong, H. Ottosson, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 6068–6070.
- [28] N. L. Douglas, S. V. Ley, U. Lucking, S. L. Warriner, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1998**, 51–65.
- [29] Z. Y. Zhang, I. R. Ollmann, X.-S. Ye, R. Wischnat, T. Baasov, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 734–753.
- [30] B. G. Wilson, B. Fraser-Reid, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 317–320.
- [31] a) H. Paulsen, *Angew. Chem.* **1982**, 94, 184–201; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, 21, 155–173; b) M. Miljkovic, D. Yeagley, P. Deslongchamps, Y. L. Dory, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7597–7604.
- [32] B. Fraser-Reid, K. N. Jayaprakash, J. C. Lopez, A. M. Gomez, C. Uriel in *Frontiers in Modern Carbohydrate Chemistry*, Vol. 960 (Hrsg.: A. V. Demchenko), ACS, Washington, **2007**, S. 91–117.
- [33] a) M. N. Kamat, A. V. Demchenko, *Org. Lett.* **2005**, 7, 3215–3218; b) L. K. Mydock, A. V. Demchenko, *Org. Lett.* **2008**, 10, 2103–2106; c) L. K. Mydock, A. V. Demchenko, *Org. Lett.* **2008**, 10, 2107–2110; d) H. D. Premathilake, L. K. Mydock, A. V. Demchenko, *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 1095–1100.
- [34] a) H. H. Jensen, C. M. Pedersen, M. Bols, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 7577–7582; b) C. M. Pedersen, L. G. Marinescu, M. Bols, *Chem. Commun.* **2008**, 2465–2467; c) C. M. Pedersen, L. U. Nordstrom, M. Bols, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 9222–9235.
- [35] Y. Okada, O. Nagata, M. Taira, H. Yamada, *Org. Lett.* **2007**, 9, 2755–2758.
- [36] a) G. J. Boons, R. Geurtsen, D. Holmes, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 6325–6328; b) R. Geurtsen, D. S. Holmes, G. J. Boons, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 8145–8154.
- [37] X. N. Li, L. J. Huang, X. C. Hu, X. F. Huang, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 117–127.
- [38] M. Lahmann, S. Oscarson, *Org. Lett.* **2000**, 2, 3881–3882.
- [39] a) R. Kannagi, S. B. Levery, F. Ishigami, S. I. Hakomori, L. H. Shevinsky, B. B. Knowles, D. Solter, *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 8934–8942; b) S. Hakomori, Y. Zhang, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 97–104.
- [40] F. Burkhart, Z. Y. Zhang, S. Wacowich-Sgarbi, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 1314–1317; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 1274–1277.
- [41] K.-K. T. Mong, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 4261–4264; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 4087–4090.
- [42] X.-S. Ye, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 2410–2431.
- [43] T. K. Ritter, K.-K. T. Mong, H.-T. Liu, T. Nakatani, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 4805–4808; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4657–4660.
- [44] C.-Y. Huang, D. A. Thayer, A.-Y. Chang, M. D. Best, J. Hoffmann, S. Head, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 15–20.
- [45] T. K. K. Mong, C.-Y. Huang, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 2135–2142.
- [46] D. Crich, M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 9015–9020.
- [47] a) T. K.-K. Mong, H.-K. Lee, S. G. Duron, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 797–802; b) J.-C. Lee, W. A. Greenberg, C.-H. Wong, *Nat. Protoc.* **2007**, 1, 3143–3152.
- [48] Y. H. Wang, X. F. Huang, L. H. Zhang, X. S. Ye, *Org. Lett.* **2004**, 6, 4415–4417.
- [49] J.-C. Lee, C.-Y. Wu, J. V. Apon, G. Siuzdak, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 2819–2823; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 2753–2757.
- [50] a) F. Effenberger, W. Russ, *Chem. Ber. Recl.* **1982**, 115, 3719–3736; b) V. Martichonok, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 1702–1706.
- [51] a) G. Sosnovsky, J. A. Krogh, *Synthesis* **1979**, 228–230; b) S. G. Durón, T. Polat, C.-H. Wong, *Org. Lett.* **2004**, 6, 839–841.
- [52] C. N. Wang, Q. Li, H. S. Wang, L. H. Zhang, X. S. Ye, *Tetrahedron* **2006**, 62, 11657–11662.
- [53] D. C. Xiong, L. H. Zhang, X. S. Ye, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, 350, 1696–1700.
- [54] M. C. Galan, C. Brunet, M. Fuensanta, *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 442–445.
- [55] M. C. Galan, A. T. Tran, S. Whitaker, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 2106–2108.
- [56] D. L. Rabenstein, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, 19, 312–331.
- [57] J. Kreuger, D. Spillmann, J. P. Li, U. Lindahl, *J. Cell Biol.* **2006**, 174, 323–327.
- [58] I. Capila, R. J. Linhardt, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 426–450; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 390–412.
- [59] M. Petitou, C. A. A. van Boeckel, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 3180–3196; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3118–3133.
- [60] J. R. Bishop, M. Schuksz, J. D. Esko, *Nature* **2007**, 446, 1030–1037.
- [61] U. Lindahl, *Glycoconjugate J.* **2000**, 17, 597–605.
- [62] a) C. Tabour, J. M. Mallet, F. Bono, J. M. Herbert, M. Petitou, P. Sinay, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 2003–2012; b) A. Lubineau, H. Lortat-Jacob, O. Gavard, S. Sarrazin, D. Bonnaffé, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 4265–4282; c) J. C. Lee, X. A. Lu, S. S. Kulkarni, Y. S. Wen, S. C. Hung, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 476–477; d) C. Noti, J. L. de Paz, L. Polito, P. H. Seeberger, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 8664–8686.
- [63] a) H. A. Orgueira, A. Bartolozzi, P. Schell, R. E. J. N. Litjens, E. R. Palmacci, P. H. Seeberger, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 140–169; b) S. Arungundram, K. Al-Mafraji, J. Asong, F. E. Leach, I. J. Amster, A. Venot, J. E. Turnbull, G. J. Boons, *J. Am. Chem.*

- Soc.* **2009**, *131*, 17394–17405; c) Z. Wang, Y. M. Xu, B. Yang, G. Tiruchinapally, B. Sun, R. P. Liu, S. Dulaney, J. A. Liu, X. F. Huang, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 8365–8375.
- [64] F. Baleux, L. Loureiro-Morais, Y. Hersant, P. Clayette, F. Arenzana-Seisdedos, D. Bonnaffe, H. Lortat-Jacob, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 743–748.
- [65] S. Peterson, A. Frick, J. Liu, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 610–627.
- [66] U. Lindahl, J. P. Li, M. Kusche-Gullberg, M. Salmivirta, S. Alaranta, T. Veromaa, J. Emeis, I. Roberts, C. Taylor, P. Oreste, G. Zoppetti, A. Naggi, G. Torri, B. Casu, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 349–352.
- [67] J. H. Chen, F. Y. Avcı, E. M. Munoz, L. M. McDowell, M. Chen, L. C. Pedersen, L. J. Zhang, R. J. Linhardt, J. Liu, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 42817–42825.
- [68] a) M. D. Burkart, M. Izumi, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2912–2915; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2747–2750; b) E. Chapman, M. D. Best, S. R. Hanson, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3610–3632; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3526–3548; c) M. D. Burkart, M. Izumi, E. Chapman, C.-H. Lin, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5565–5574.
- [69] a) B. Kuberan, D. L. Beeler, R. Lawrence, M. Lech, R. D. Rosenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12424–12425; b) B. Kuberan, D. L. Beeler, M. Lech, Z. L. L. Wu, R. D. Rosenberg, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 52613–52621; c) J. Chen, C. L. Jones, J. Liu, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 986–993.
- [70] E. Munoz, D. Xu, F. Avcı, M. Kemp, J. Liu, R. J. Linhardt, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *339*, 597–602.
- [71] J. G. Martin, M. Gupta, Y. M. Xu, S. Akella, J. Liu, J. S. Dordick, R. J. Linhardt, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11041–11048.
- [72] R. P. Liu, Y. M. Xu, M. A. Chen, M. Weiwer, X. X. Zhou, A. S. Bridges, P. L. DeAngelis, Q. S. Zhang, R. J. Linhardt, J. A. Liu, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 34240–34249.
- [73] a) C. A. A. Van Boeckel, T. Beetz, J. N. Vos, A. J. M. Dejong, S. F. Vanaelst, R. H. Vandenbosch, J. M. R. Mertens, F. A. Vandervlugt, *J. Carbohydr. Chem.* **1985**, *4*, 293–321; b) R. Ojeda, J. L. de Paz, H. Martin-Lomas, J. M. Lassaletta, *Synlett* **1999**, 1316–1318.
- [74] a) P. Bindschädl, A. Adibekian, D. Grunstein, P. H. Seeberger, *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, 948–955; b) A. Adibekian, P. Bindschädl, M. S. M. Timmer, C. Noti, N. Schutzenmeister, P. H. Seeberger, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4510–4522.
- [75] a) T. Polat, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12795–12800; b) J. F. Chen, Y. Zhou, C. Chen, W. C. Xu, B. Yu, *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 2853–2862.
- [76] M. B. Cid, F. Alfonso, M. Martin-Lomas, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 928–938.
- [77] H. A. Orgueira, A. Bartolozzi, P. Schell, P. H. Seeberger, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2232–2235; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2128–2131.
- [78] O. Gavard, Y. Hersant, J. Alais, V. Duverger, A. Dilhas, A. Bascou, D. Bonnaffe, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 3603–3620.
- [79] C. Noti, P. H. Seeberger, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 731–756.
- [80] L. D. Lu, C. R. Shie, S. S. Kulkarni, G. R. Pan, X. A. Lu, S. C. Hung, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5995–5998.
- [81] A. Dilhas, R. Lucas, L. Loureiro-Morais, Y. Hersant, D. Bonnaffe, *J. Comb. Chem.* **2008**, *10*, 166–169.
- [82] T. Angata, A. Varki, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 439–469.
- [83] a) R. Schauer, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 507–514; b) A. Varki, *Trends Mol. Med.* **2008**, *14*, 351–360; c) A. Varki, *Nature* **2007**, *446*, 1023–1029.
- [84] a) C.-S. Yu, K. Niikura, C.-C. Lin, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2984–2987; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2900–2903; b) X.-S. Ye, X. F. Huang, C.-H. Wong, *Chem. Commun.* **2001**, 974–975.
- [85] a) X. Chen, A. Varki, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 163–176; b) M. J. Kiefel, M. von Itzstein, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 471–490; c) G. J. Boons, A. V. Demchenko, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4539–4566; d) H. Ando, M. Kiso in *Glycoscience Chemistry and Chemical Biology* (Hrsg.: B. O. Fraser-Reid, K. Tatsuta, J. Thiem), Springer, Berlin, **2008**, S. 1313–1360; e) R. L. Halcomb, M. D. Chappell, *J. Carbohydr. Chem.* **2002**, *21*, 723–768; f) D. K. Ress, R. J. Linhardt, *Curr. Org. Synth.* **2004**, *1*, 31–46.
- [86] a) H. Paulsen, H. Tietz, *Carbohydr. Res.* **1984**, *125*, 47–64; b) A. Y. Khorlin, I. M. Privalova, I. B. Bystrova, *Carbohydr. Res.* **1971**, *19*, 272–275.
- [87] a) T. J. Martin, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6123–6126; b) T. J. Martin, R. Brescello, A. Toepfer, R. R. Schmidt, *Glycoconjugate J.* **1993**, *10*, 16–25.
- [88] a) H. Kondo, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8748–8750; b) M. M. Sim, H. Kondo, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2260–2267.
- [89] C.-H. Hsu, K.-C. Chu, Y.-S. Lin, J.-L. Han, Y.-S. Peng, C.-T. Ren, C.-Y. Wu, C.-H. Wong, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 1754–1760.
- [90] A. Hasegawa, H. Ohki, T. Nagahama, H. Ishida, M. Kiso, *Carbohydr. Res.* **1991**, *212*, 277–281.
- [91] A. Marra, P. Sinay, *Carbohydr. Res.* **1990**, *195*, 303–308.
- [92] A. Hasegawa, T. Nagahama, H. Ohki, K. Hotta, H. Ishida, M. Kiso, *J. Carbohydr. Chem.* **1991**, *10*, 493–498.
- [93] C. De Meo, O. Parker, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 303–307.
- [94] S. Cai, B. Yu, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3827–3830.
- [95] T. Takahashi, H. Tsukamoto, H. Yamada, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8223–8226.
- [96] a) J. M. Haberman, D. Y. Gin, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1665–1668; b) J. M. Haberman, D. Y. Gin, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2539–2541.
- [97] A. Ishiwata, Y. Ito, *Synlett* **2003**, 1339–1343.
- [98] K. Okamoto, T. Kondo, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5233–5236.
- [99] J. C. Castro-Palomino, Y. E. Tsvetkov, R. R. Schmidt, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5434–5440.
- [100] Y. Ito, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 3987–3990.
- [101] Y. Ito, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 6221–6224.
- [102] A. V. Demchenko, G. J. Boons, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3065–3068.
- [103] C. De Meo, A. V. Demchenko, G. J. Boons, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5490–5497.
- [104] a) H. Ando, Y. Koike, H. Ishida, M. Kiso, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6883–6886; b) H. Tanaka, M. Adachi, T. Takahashi, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 849–862.
- [105] K. Tanaka, T. Goi, K. Fukase, *Synlett* **2005**, 2958–2962.
- [106] B. Sun, B. Srinivasan, X. Huang, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7072–7081.
- [107] a) H. Tanaka, Y. Nishiura, T. Takahashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7124–7125; b) D. Crich, W. J. Li, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 7794–7797; c) D. Crich, W. J. Li, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2387–2391; d) M. D. Farris, C. De Meo, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1225–1227; e) F.-F. Liang, L. Chen, G.-W. Xing, *Synlett* **2009**, 425–428; f) C.-C. Lin, N.-P. Lin, L. S. Sahabuddin, V. R. Reddy, L.-D. Huang, K.-C. Hwang, C.-C. Lin, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4921–4928.
- [108] D. Crich, C. Navuluri, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3113–3116; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3049–3052.
- [109] C.-C. Lin, K. T. Huang, C.-C. Lin, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4169–4172.
- [110] a) C. D. Meo in *Frontiers in modern carbohydrate chemistry* (Hrsg.: A. V. Demchenko), ACS, Washington, **2007**, S. 118–131; b) C. De Meo, U. Priyadarshani, *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 1540–1552.
- [111] R. E. Litjens, L. J. van den Bos, J. D. Codee, H. S. Overkleef, G. A. van der Marel, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 419–429.
- [112] H. Tanaka, Y. Nishiura, T. Takahashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17244–17245.
- [113] Z. Y. Zhang, K. Niikura, X. F. Huang, C.-H. Wong, *Can. J. Chem.* **2002**, *80*, 1051–1054.

- [114] Zur Synthese von SSEA-4, siehe: a) H. Ishida, R. Miyawaki, M. Kiso, A. Hasegawa, *J. Carbohydr. Chem.* **1996**, *15*, 163–182; b) J. M. Lassaletta, K. Carlsson, P. J. Garegg, R. R. Schmidt, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6873–6880.
- [115] a) H. Tanaka, Y. Tateno, Y. Nishiura, T. Takahashi, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5597–5600; b) D. Crich, B. Wu, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4033–4035.
- [116] a) Y. Liu, X. Ruan, X. Li, Y. Li, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4287–4290; b) S. Hanashima, P. H. Seeberger, *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 1447–1459; c) S. Hanashima, B. Castagner, D. Esposito, T. Nokami, P. H. Seeberger, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1777–1779.
- [117] D. Crich, B. L. Wu, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 2042–2047.
- [118] H. Tanaka, H. Ando, H. Ishihara, M. Koketsu, *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 1585–1593.
- [119] S. Hanashima, K. Sato, Y. Ito, Y. Yamaguchi, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 4215–4220.
- [120] a) P. H. Seeberger, W. C. Haase, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4349–4393; b) P. H. Seeberger, *Solid Support Oligosaccharide Synthesis and Combinatorial Carbohydrate Libraries*, Wiley, New York, **2001**.
- [121] a) S. J. Danishefsky, K. F. McClure, J. T. Randolph, R. B. Ruggeri, *Science* **1993**, *260*, 1307–1309; b) J. T. Randolph, K. F. McClure, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5712–5719.
- [122] a) J. Rademann, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3989–3990; b) F. Roussel, L. Knerr, M. Grathwohl, R. R. Schmidt, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3043–3046; c) S. Jonke, K. G. Liu, R. R. Schmidt, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1274–1290.
- [123] a) K. C. Nicolaou, N. Winssinger, J. Pastor, F. DeRoos, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 449–450; b) K. C. Nicolaou, N. Watanabe, J. Li, J. Pastor, N. Winssinger, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1636–1638; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1559–1561.
- [124] a) O. J. Plante, E. R. Palmacci, P. H. Seeberger, *Science* **2001**, *291*, 1523–1527; b) P. H. Seeberger, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 19–28.
- [125] K. Routenberg Love, P. H. Seeberger, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 612–615; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 602–605.
- [126] a) S. Hashimoto, T. Honda, S. Ikegami, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 685–687; b) O. J. Plante, R. B. Andrade, P. H. Seeberger, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 211–214.
- [127] J. L. de Paz, C. Noti, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2766–2767.
- [128] D. B. Werz, B. Castagner, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2770–2771.
- [129] D. M. Ratner, E. R. Swanson, P. H. Seeberger, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4717–4720.
- [130] J. D. C. Codée, L. Krock, B. Castagner, P. H. Seeberger, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 3987–3994.
- [131] a) X. Liu, R. Wada, S. Boonyarattanakalin, B. Castagner, P. H. Seeberger, *Chem. Commun.* **2008**, 3510–3512; b) R. B. Andrade, O. J. Plante, L. G. Melean, P. H. Seeberger, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1811–1814.
- [132] E. R. Palmacci, O. J. Plante, M. C. Hewitt, P. H. Seeberger, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 3975–3990.
- [133] T. J. Boltje, J. H. Kim, J. Park, G. J. Boons, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 552–557.
- [134] a) J. H. Kim, H. Yang, G. J. Boons, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 969–971; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 947–949; b) J. H. Kim, H. Yang, J. Park, G. J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12090–12097.
- [135] D. P. Curran, Z. Y. Luo, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9069–9072.
- [136] F. A. Jaipuri, N. L. Pohl, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2686–2691.
- [137] a) F. Zhang, W. Zhang, Y. Zhang, D. P. Curran, G. Liu, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2594–2597; b) F. R. Carrel, K. Geyer, J. D. C. Codee, P. H. Seeberger, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2285–2288; c) L. Manzoni, *Chem. Commun.* **2003**, 2930–2931; d) L. Manzoni, R. Castelli, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4195–4198.
- [138] T. Buskas, E. Soderberg, P. Konradsson, B. Fraser-Reid, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 958–963.
- [139] a) K. S. Ko, F. A. Jaipuri, N. L. Pohl, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13162–13163; b) N. L. Pohl, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3930–3932; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3868–3870.
- [140] B. Yang, Y. Q. Jing, X. F. Huang, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1290–1298.
- [141] a) T. Buskas, S. Ingale, G. J. Boons, *Glycobiology* **2006**, *16*, 113R–136R; b) M. R. Pratt, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 58–68; c) M. Pudielko, J. Bull, H. Kunz, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 904–930; d) T. Becker, S. Dziadek, S. Wittrock, H. Kunz, *Curr. Cancer Drug Targets* **2006**, *6*, 491–517.
- [142] N. Bezay, H. Kunz in *Solid Support Oligosaccharide Synthesis and Combinatorial Carbohydrate Libraries* (Hrsg.: P. H. Seeberger), Wiley, New York, **2001**, S. 257–281.
- [143] a) A. Schleyer, M. Meldal, R. Manat, H. Paulsen, K. Bock, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2064–2067; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1976–1978; b) H. Paulsen, A. Schleyer, N. Mathieux, M. Meldal, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 281–293.
- [144] X. Geng, V. Y. Dudkin, M. Mandal, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2616–2619; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2562–2565.
- [145] M. Mandal, V. Y. Dudkin, X. Geng, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2611–2615; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2557–2561.
- [146] a) V. Y. Dudkin, J. S. Miller, A. S. Dudkina, C. Antczak, D. A. Scheinberg, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13598–13607; b) P. Wang, J. L. Zhu, Y. Yuan, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16669–16671.
- [147] S. T. Cohen-Anisfeld, P. T. Lansbury, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10531–10537.
- [148] a) B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 579–602; b) D. P. Gambelin, E. M. Scanlan, B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 131–163.
- [149] Y. He, R. J. Hinklin, J. Y. Chang, L. L. Kiessling, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4479–4482.
- [150] a) O. Seitz, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 214–246; b) H. Herzner, T. Reipen, M. Schultz, H. Kunz, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4495–4537; c) C. Brocke, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3085–3112; d) C. Haase, O. Seitz, *Glycopept. Glycoproteins* **2007**, *267*, 1–36.
- [151] a) A. Leppanen, P. Mehta, Y. B. Ouyang, T. Z. Ju, J. Helin, K. L. Moore, I. van Die, W. M. Canfield, R. P. McEver, R. D. Cummings, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 24838–24848; b) A. Leppanen, S. P. White, J. Helin, R. P. McEver, R. D. Cummings, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 39569–39578; c) K. M. Koeller, M. E. B. Smith, R. F. Huang, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4241–4242.
- [152] a) W. Huang, C. Li, B. Li, M. Umekawa, K. Yamamoto, X. Zhang, L. X. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2214–2223; b) B. Li, Y. Zeng, S. Hauser, H. Song, L. X. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9692–9693; c) M. Mizuno, K. Haneda, R. Iguchi, I. Muramoto, T. Kawakami, S. Aimoto, K. Yamamoto, T. Inazu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 284–290.
- [153] a) E. Meinjohanns, M. Meldal, H. Paulsen, R. A. Dwek, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1998**, 549–560; b) Y. Kajihara, N. Yamamoto, R. Okamoto, K. Hirano, T. Murase, *Chem. Rec.* **2010**, *10*, 80–100.
- [154] a) L. Liu, C. S. Bennett, C.-H. Wong, *Chem. Commun.* **2006**, 21–33; b) R. J. Payne, C.-H. Wong, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 21–43; c) H. Hojo, H. Katayama, Y. Nakahara, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2010**, *22*, 269–279; d) C. S. Bennett, C.-H. Wong, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1227–1238.

- [155] G. M. Whitesides, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 617–638; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 617–638.
- [156] a) C.-H. Wong, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa, T. Kajimoto, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 569–593; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 521–546; b) C.-H. Wong, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa, T. Kajimoto, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 453–474; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 412–432; c) K. M. Koeller, C.-H. Wong, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4465–4493; d) H. J. M. Gijzen, L. Qiao, W. Fitz, C. H. Wong, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 443–473.
- [157] a) S. M. Hancock, M. D. Vaughan, S. G. Withers, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 509–519; b) A. M. Daines, B. A. Maltman, S. L. Flitsch, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 106–113; c) L. X. Wang, W. Huang, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 592–600; d) O. Blixt, N. Razi in *Glycoscience Chemistry and Chemical Biology* (Hrsg.: B. O. Fraser-Reid, K. Tatsuta, J. Thiem), Springer, Berlin, **2008**, S. 1361–1385; e) H. A. Chokhawala, X. Chen in *Comprehensive Glycosciences: From Chemistry to Systems Biology* (Hrsg.: J. P. Kamerling), Elsevier, Amsterdam, **2007**, S. 415–451; f) P. Bojarova-Fialova, V. Kren in *Comprehensive Glycosciences: From Chemistry to Systems Biology* (Hrsg.: J. P. Kamerling), Elsevier, Amsterdam, **2007**, S. 453–488.
- [158] L. L. Lairson, B. Henrissat, G. J. Davies, S. G. Withers, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 521–555.
- [159] a) S.-I. Nishimura, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 325–335; b) T. Murata, T. Usui, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70*, 1049–1059; c) D. H. G. Crout, G. Vic, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 98–111; d) N. Wymer, E. J. Toone, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 110–119; e) M. M. Palcic, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 616–624.
- [160] Y. Ichikawa, R. Wang, C.-H. Wong, *Methods Enzymol.* **1994**, *247*, 107–127.
- [161] C.-H. Wong, S. L. Haynie, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 5416–5418.
- [162] a) J. Zhang, J. Shao, P. Kowal, P. G. Wang, in *Carbohydrate-based Drug Discovery* (Hrsg.: C.-H. Wong), Wiley-VCH, Weinheim, **2003**, S. 137–168; b) D. M. Su, H. Eguchi, C. Xia, J. Song, W. Yi, R. L. Woodward, P. G. Wang in *Carbohydrate Chemistry, Biology, and Medical Applications* (Hrsg.: H. G. Garg, M. K. Cowman, C. A. Hales), Elsevier, Dordrecht, **2008**, S. 85–111.
- [163] C.-H. Wong, R. Wang, Y. Ichikawa, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4343–4344.
- [164] C. H. Hokke, A. Zervosen, L. Elling, D. H. Joziassse, D. H. VandenEijnden, *Glycoconjugate J.* **1996**, *13*, 687–692.
- [165] Y. Ichikawa, G. J. Shen, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4698–4700.
- [166] Y. Ichikawa, J. L. C. Liu, G. J. Shen, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6300–6302.
- [167] J. W. Fang, J. Li, X. Chen, Y. N. Zhang, J. Q. Wang, Z. M. Guo, W. Zhang, L. B. Yu, K. Brew, P. G. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6635–6638.
- [168] a) Y. Ichikawa, Y. C. Lin, D. P. Dumas, G. J. Shen, E. Garcia-junceda, M. A. Williams, R. Bayer, C. Ketcham, L. E. Walker, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9283–9298; b) A. Zervosen, L. Elling, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1836–1840.
- [169] J. Shao, J. B. Zhang, P. Kowal, P. G. Wang, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 5634–5640.
- [170] C. De Luca, M. Lansing, I. Martini, F. Crescenzi, G.-J. Shen, M. Oregan, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5869–5870.
- [171] J. B. Zhang, B. Y. Wu, Y. X. Zhang, P. Kowal, P. G. Wang, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2583–2586.
- [172] T. Noguchi, T. Shiba, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, *62*, 1594–1596.
- [173] a) G. F. Herrmann, Y. Ichikawa, C. Wandrey, F. C. A. Gaeta, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3091–3094; b) V. Křen, J. Thiem, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 979–981; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 893–895.
- [174] U. Gambert, J. Thiem, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 107–110.
- [175] X. Chen, J. W. Fang, J. B. Zhang, Z. Y. Liu, J. Shao, P. Kowal, P. Andreana, P. G. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2081–2082.
- [176] Q. J. Yao, J. Song, C. F. Xia, W. P. Zhang, P. G. Wang, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 911–914.
- [177] a) X. Chen, J. B. Zhang, P. Kowal, Z. Liu, P. R. Andreana, Y. Q. Lu, P. G. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8866–8867; b) G. F. Herrmann, P. Wang, G. J. Shen, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1346–1347; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1241–1242; c) T. Endo, S. Koizumi, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 536–541.
- [178] S. Koizumi, T. Endo, K. Tabata, A. Ozaki, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 847–850.
- [179] T. Endo, S. Koizumi, K. Tabata, A. Ozaki, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *53*, 257–261.
- [180] S. Koizumi, T. Endo, K. Tabata, H. Nagano, J. Ohnishi, A. Ozaki, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *25*, 213–217.
- [181] a) B. Priem, M. Gilbert, W. W. Wakarchuk, A. Heyraud, E. Samain, *Glycobiology* **2002**, *12*, 235–240; b) S. Drouillard, H. Driguez, E. Samain, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1810–1812; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1778–1780; c) C. Dumon, C. Bosso, J. P. Utile, A. Heyraud, E. Samain, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 359–365.
- [182] S. Fort, L. Birikaki, M. P. Dubois, T. Antoine, E. Samain, H. Driguez, *Chem. Commun.* **2005**, 2558–2560.
- [183] T. Antoine, A. Heyraud, C. Bosso, E. Samain, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1374–1376; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1350–1352.
- [184] P. Sears, C.-H. Wong, *Science* **2001**, *291*, 2344–2350.
- [185] O. Blixt, T. Norberg, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2705–2710.
- [186] R. L. Halcomb, H. M. Huang, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11315–11322.
- [187] M. Schuster, P. Wang, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1135–1136.
- [188] a) M. Meldal, F. I. Auzanneau, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 1849–1850; b) O. Seitz, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8766–8776.
- [189] S. Nishiguchi, K. Yamada, Y. Fuji, S. Shibata, A. Toda, S. I. Nishimura, S. I. Nishimura, *Chem. Commun.* **2001**, 1944–1945.
- [190] a) K. Yamada, E. Fujita, S. I. Nishimura, *Carbohydr. Res.* **1997**, *305*, 443–461; b) A. Toda, K. Yamada, S. I. Nishimura, *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 61–69.
- [191] a) S. I. Nishimura, K. B. Lee, K. Matsuoka, Y. C. Lee, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *199*, 249–254; b) K. Yamada, S. I. Nishimura, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 9493–9496.
- [192] S. Nishimura, K. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10555–10556.
- [193] S.-I. Nishimura in *Carbohydrate-based Drug Discovery* (Hrsg.: C.-H. Wong), Wiley-VCH, Weinheim, **2003**, S. 129–136.
- [194] X. F. Huang, K. L. Witte, D. E. Bergbreiter, C.-H. Wong, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 675–681.
- [195] a) K. M. Koeller, M. E. B. Smith, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 742–743; b) K. M. Koeller, M. E. B. Smith, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1017–1025.
- [196] a) M. Fumoto, H. Hinou, T. Matsushita, M. Kuroguchi, T. Ohta, T. Ito, K. Yamada, A. Takimoto, H. Kondo, T. Inazu, S. I. Nishimura, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2590–2593; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2534–2537; b) M. Fumoto, H. Hinou, T. Ohta, T. Ito, K. Yamada, A. Takimoto, H. Kondo, H. Shimizu, T. Inazu, Y. Nakahara, S. I. Nishimura, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11804–11818.

- [197] S. Hanson, M. Best, M. C. Bryan, C.-H. Wong, *Trends Biochem. Sci.* **2004**, 29, 656–663.
- [198] a) K. M. Koeller, C.-H. Wong, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 1243–1251; b) M. R. Pratt, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2004**, 6, 2345–2348.
- [199] H. Cao, S. Huang, J. Cheng, Y. Li, S. Muthana, B. Son, X. Chen, *Carbohydr. Res.* **2008**, 343, 2863–2869.
- [200] M. Izumi, C.-H. Wong, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2001**, 13, 345–360.
- [201] K. F. Johnson, *Glycoconjugate J.* **1999**, 16, 141–146.
- [202] a) H. Yu, H. Chokhawala, R. Karpel, B. Wu, J. Zhang, Y. Zhang, Q. Jia, X. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 17618–17619; b) S. Muthana, H. Cao, X. Chen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, 13, 573–581.
- [203] H. Yu, S. S. Huang, H. Chokhawala, M. C. Sun, H. J. Zheng, X. Chen, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 4042–4048; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 3938–3944.
- [204] H. Yu, J. Cheng, L. Ding, Z. Khedri, Y. Chen, S. Chin, K. Lau, V. K. Tiwari, X. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 18467–18477.
- [205] H. A. Chokhawala, H. Z. Cao, H. Yu, X. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 10630–10631.
- [206] a) X.-L. Sun, Y. Kanie, C.-T. Guo, O. Kanie, Y. Suzuki, C.-H. Wong, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2643–2653; b) C.-T. Guo, X.-L. Sun, O. Kanie, K. F. Shortridge, T. Suzuki, D. Miyamoto, K. I. Hidari, C.-H. Wong, Y. Suzuki, *Glycobiology* **2002**, 12, 183–190.
- [207] H. Yu, H. Yu, R. Karpel, X. Chen, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 6427–6435.
- [208] J. S. Cheng, H. Yu, K. Lau, S. S. Huang, H. A. Chokhawala, Y. H. Li, V. K. Tiwari, X. Chen, *Glycobiology* **2008**, 18, 686–697.
- [209] T. J. Morley, S. G. Withers, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 9430–9437.
- [210] K. Lau, V. Thon, H. Yu, L. Ding, Y. Chen, M. M. Muthana, D. Wong, R. Huang, X. Chen, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 6066–6068.
- [211] A. Aharoni, K. Thieme, C. P. C. Chiu, S. Buchini, L. L. Lairson, H. M. Chen, N. C. J. Strynadka, W. W. Wakarchuk, S. G. Withers, *Nat. Methods* **2006**, 3, 609–614.
- [212] D. J. Namdjou, H. M. Chen, E. Vinogradov, D. Brochu, S. G. Withers, W. W. Wakarchuk, *ChemBioChem* **2008**, 9, 1632–1640.
- [213] R. Kittl, S. G. Withers, *Carbohydr. Res.* **2010**, 345, 1272–1279.
- [214] M. D. Vaughan, K. Johnson, S. DeFrees, X. P. Tang, R. A. J. Warren, S. G. Withers, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6300–6301.
- [215] S. M. Hancock, J. R. Rich, M. E. C. Caines, N. C. J. Strynadka, S. G. Withers, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 508–514.
- [216] L. X. Wang, *Carbohydr. Res.* **2008**, 343, 1509–1522.
- [217] a) M. Umekawa, W. Huang, B. Li, K. Fujita, H. Ashida, L. X. Wang, K. Yamamoto, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 4469–4479; b) Y. D. Wei, C. S. Li, W. Huang, B. Li, S. Strome, L. X. Wang, *Biochemistry* **2008**, 47, 10294–10304; c) T. W. D. F. Rising, T. D. W. Claridge, N. Davies, D. P. Gamblin, J. W. B. Moir, A. J. Fairbanks, *Carbohydr. Res.* **2006**, 341, 1574–1596.
- [218] T. W. D. E. Rising, C. D. Heidecke, J. W. B. Moir, Z. L. Ling, A. J. Fairbanks, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 6444–6464.
- [219] C. D. Heidecke, Z. L. Ling, N. C. Bruce, J. W. B. Moir, T. B. Parsons, A. J. Fairbanks, *ChemBioChem* **2008**, 9, 2045–2051.
- [220] a) M. Umekawa, T. Higashiyama, Y. Koga, T. Tanaka, M. Noguchi, A. Kobayashi, S. Shoda, W. Huang, L. X. Wang, H. Ashida, K. Yamamoto, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2010**, 1800, 1203–1209; b) M. Umekawa, C. S. Li, T. Higashiyama, W. Huang, H. Ashida, K. Yamamoto, L. X. Wang, *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 511–521.
- [221] W. Huang, Q. A. Yang, M. Umekawa, K. Yamamoto, L. X. Wang, *ChemBioChem* **2010**, 11, 1350–1355.
- [222] W. I. Weis, K. Drickamer, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, 65, 441–473.
- [223] a) T. Feizi, F. Fazio, W. C. Chai, C. H. Wong, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, 13, 637–645; b) O. Blixt, S. Head, T. Mondala, C. Scanlan, M. E. Huflejt, R. Alvarez, M. C. Bryan, F. Fazio, D. Calarese, J. Stevens, N. Razi, D. J. Stevens, J. J. Skehel, I. van Die, D. R. Burton, I. A. Wilson, R. Cummings, N. Bovin, C.-H. Wong, J. C. Paulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 17033–17038; c) C.-H. Liang, C.-Y. Wu, *Expert Rev. Proteomics* **2009**, 6, 631–645; d) P.-H. Liang, C.-Y. Wu, W. A. Greenberg, C.-H. Wong, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12, 86–92; e) O. Oyelaran, J. C. Gildersleeve, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, 13, 406–413; f) C.-Y. Wu, P.-H. Liang, C.-H. Wong, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 2247–2254; g) Y. Liu, A. S. Palma, T. Feizi, *Biol. Chem.* **2009**, 390, 647–656.
- [224] A. K. Powell, Y. A. Ahmed, E. A. Yates, J. E. Turnbull, *Nat. Protoc.* **2010**, 5, 821–833.
- [225] K. Tanaka, K. Fukase in *Glycoscience Chemistry and Chemical Biology* (Hrsg.: B. O. Fraser-Reid, K. Tatsuta, J. Thiem), Springer, Berlin, **2008**, S. 1241–1278.
- [226] a) I. J. Shin, J. W. Cho, D. W. Boo, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2004**, 7, 565–574; b) J. Voglmeir, R. Sardzik, M. J. Weissenborn, S. L. Flitsch, *Omic* **2010**, 14, 437–444; c) F. Fazio, M. C. Bryan, O. Blixt, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14397–14402.
- [227] a) L. Ban, M. Mrksich, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 3444–3447; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 3396–3399; b) Z. A. Gurard-Levin, M. Mrksich, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, 1, 767–800.
- [228] N. Laurent, J. Voglmeir, S. L. Flitsch, *Chem. Commun.* **2008**, 4400–4412.
- [229] a) J. Wei, J. M. Buriak, G. Siuzdak, *Nature* **1999**, 399, 243–246; b) Z. X. Shen, J. J. Thomas, C. Averbuj, K. M. Broo, M. Engelhard, J. E. Crowell, M. G. Finn, G. Siuzdak, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 612–619; c) S. A. Trauger, E. P. Go, Z. X. Shen, J. V. Apon, B. J. Compton, E. S. P. Bouvier, M. G. Finn, G. Siuzdak, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 4484–4489.
- [230] T. R. Northen, J.-C. Lee, L. Hoang, J. Raymond, D. R. Hwang, S. M. Yannone, C.-H. Wong, G. Siuzdak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 3678–3683.
- [231] S.-H. Chang, J.-L. Han, S.-Y. Tseng, H.-Y. Lee, C.-W. Lin, Y.-C. Lin, W.-Y. Jeng, A.-H. Wang, C.-Y. Wu, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 13371–13380.
- [232] S.-Y. Tseng, C.-C. Wang, C.-W. Lin, C.-L. Chen, W.-Y. Yu, C.-H. Chen, C.-Y. Wu, C.-H. Wong, *Chem. Asian J.* **2008**, 3, 1395–1405.
- [233] H. A. Chokhawala, S. Huang, K. Lau, H. Yu, J. Cheng, V. Thon, N. Hurtado-Ziola, J. A. Guerrero, A. Varki, X. Chen, *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 567–576.
- [234] M. C. Bryan, L.-V. Lee, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 3185–3188.
- [235] a) B. S. Bochner, R. A. Alvarez, P. Mehta, N. V. Bovin, O. Blixt, J. R. White, R. L. Schnaar, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 4307–4312; b) Y. Guo, H. Feinberg, E. Conroy, D. A. Mitchell, R. Alvarez, O. Blixt, M. E. Taylor, W. I. Weis, K. Drickamer, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, 11, 591–598.
- [236] a) D. M. Ratner, P. H. Seeberger, *Curr. Pharm. Des.* **2007**, 13, 173–183; b) D. A. Calarese, H.-K. Lee, C.-Y. Huang, M. D. Best, R. D. Astronomo, R. L. Stanfield, H. Kattinger, D. R. Burton, C.-H. Wong, I. A. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 13372–13377; c) S.-K. Wang, P.-H. Liang, R. D. Astronomo, T.-L. Hsu, S.-L. Hsieh, D. R. Burton, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 3690–3695.
- [237] a) C.-C. Wang, Y.-L. Huang, C.-T. Ren, C.-W. Lin, J.-T. Hung, J.-C. Yu, A.-L. Yu, C.-Y. Wu, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 11661–11666; b) H. H. Wandall, O. Blixt, M. A. Tarp, J. W. Pedersen, E. P. Bennett, U. Mandel, G. Ragupathi, P. O. Livingston, M. A. Hollingsworth, J. Taylor-

- Papadimitriou, J. Burchell, H. Clausen, *Cancer Res.* **2010**, *70*, 1306–1313.
- [238] M. C. Bryan, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3639–3642.
- [239] a) O. Blixt, M. Kumagai-Braesch, A. Tibell, C. G. Groth, J. Holgersson, *Am. J. Transplant.* **2009**, *9*, 83–90; b) F. Kamena, M. Tamborini, X. Liu, Y. U. Kwon, F. Thompson, G. Pluschke, P. H. Seeberger, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 238–240.
- [240] J. Stevens, O. Blixt, J. C. Paulson, I. A. Wilson, *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 857–864.
- [241] a) J. Stevens, O. Blixt, L. Glaser, J. K. Taubenberger, P. Palese, J. C. Paulson, I. A. Wilson, *J. Mol. Biol.* **2006**, *355*, 1143–1155; b) J. Stevens, O. Blixt, T. M. Tumpey, J. K. Taubenberger, J. C. Paulson, I. A. Wilson, *Science* **2006**, *312*, 404–410.
- [242] a) C. Pappas, K. Viswanathan, A. Chandrasekaran, R. Raman, J. M. Katz, R. Sasisekharan, T. M. Tumpey, *Plos One* **2010**, *5*, e11158; b) H.-Y. Liao, C.-H. Hsu, S.-C. Wang, C.-H. Liang, H.-Y. Yen, C.-Y. Su, C.-H. Chen, J.-T. Jan, C.-T. Ren, T.-J. Cheng, C.-Y. Wu, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14849–14856; c) T. R. Maines, A. Jayaraman, J. A. Belser, D. A. Wadford, C. Pappas, H. Zeng, K. M. Gustin, M. B. Pearce, K. Viswanathan, Z. H. Shriver, R. Raman, N. J. Cox, R. Sasisekharan, J. M. Katz, T. M. Tumpey, *Science* **2009**, *325*, 484–487; d) R. A. Childs, A. S. Palma, S. Wharton, T. Matrosovich, Y. Liu, W. Chai, M. A. Campanero-Rhodes, Y. Zhang, M. Eickmann, M. Kiso, A. Hay, M. Matrosovich, T. Feizi, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 797–799; e) A. Chandrasekaran, A. Srinivasan, R. Raman, K. Viswanathan, S. Raguram, T. M. Tumpey, V. Sasisekharan, R. Sasisekharan, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 107–113; f) K. Kumari, S. Gulati, D. F. Smith, U. Gulati, R. D. Cummings, G. M. Air, *Viol. J.* **2007**, *4*, 42.
- [243] P.-H. Liang, S.-K. Wang, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11177–11184.
- [244] C.-C. Wang, J.-R. Chen, Y.-C. Tseng, C.-H. Hsu, Y.-F. Hung, S.-W. Chen, C.-M. Chen, K.-H. Khoo, T.-J. Cheng, Y.-S. Cheng, J.-T. Jan, C.-Y. Wu, C. Ma, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 18137–18142.
- [245] a) N. Parthasarathy, R. Saksena, P. Kovac, D. DeShazer, S. J. Peacock, V. Wuthiekanun, H. S. Heine, A. M. Friedlander, C. K. Cote, S. L. Welkos, J. J. Adamovicz, S. Bavari, D. M. Waag, *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 2783–2788; b) D. Wang, G. T. Carroll, N. J. Turro, J. T. Koberstein, P. Kovac, R. Saksena, R. Adamo, L. A. Herzenberg, L. Steinman, *Proteomics* **2007**, *7*, 180–184.
- [246] M. Schwarz, L. Spector, A. Gargir, A. Shtevi, M. Gortler, R. T. Altstock, A. A. Dukler, N. Dotan, *Glycobiology* **2003**, *13*, 749–754.
- [247] a) R. R. Dinglasan, I. Fields, M. Shahabuddin, A. F. Azad, J. B. Sacci, *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 6995–7001; b) R. R. Dinglasan, J. G. Valenzuela, A. F. Azad, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *35*, 1–10.
- [248] O. Oyelaran, Q. Li, D. Farnsworth, J. C. Gildersleeve, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 3529–3538.
- [249] C.-H. Liang, S.-K. Wang, C.-W. Lin, C.-C. Wang, C.-H. Wong, C.-Y. Wu, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1646–1650; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1608–1612.
- [250] R. Pospisil, J. Kabat, R. G. Mage, *Mol. Immunol.* **2009**, *46*, 2456–2464.
- [251] S. A. Hudson, N. V. Bovin, R. L. Schnaar, P. R. Crocker, B. S. Bochner, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *330*, 608–612.
- [252] F. Trottein, L. Schaffer, S. Ivanov, C. Paget, C. Vendeville, A. Cazet, S. Groux-Degroote, S. Lee, M. A. Krzewinski-Recchi, C. Faveeuw, S. R. Head, P. Gosset, P. Delannoy, *Glycoconjugate J.* **2009**, *26*, 1259–1274.
- [253] L. Krishnamoorthy, J. W. Bess, A. B. Preston, K. Nagashima, L. K. Mahal, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 244–250.
- [254] H. L. Yen, J. R. Aldridge, A. C. M. Boon, N. A. Ilyushina, R. Salomon, D. J. Hulse-Post, H. Marjuki, J. Franks, D. A. Boltz, D. Bush, A. S. Lipatov, R. J. Webby, J. E. Rehg, R. G. Webster, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 286–291.
- [255] O. T. Avery, M. Heidelberger, *J. Exp. Med.* **1923**, *38*, 81–85.
- [256] T. Francis, W. S. Tillett, *J. Exp. Med.* **1930**, *52*, 573–585.
- [257] a) C. M. Macleod, R. G. Hodges, M. Heidelberger, W. G. Bernhard, *J. Exp. Med.* **1945**, *82*, 445–465; b) M. Heidelberger, M. M. Dilapi, M. Siegel, A. W. Walter, *J. Immunol.* **1950**, *65*, 535–541.
- [258] a) R. D. Astronomo, D. R. Burton, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9*, 308–324; b) Z. Guo, G. J. Boons, *Carbohydrate-Based Vaccines and Immunotherapies*, Wiley, Hoboken, **2009**; c) Y.-L. Huang, C.-Y. Wu, *Expert Rev. Vaccines* **2010**, *9*, 1257–1274.
- [259] J. J. Mond, A. Lees, C. M. Snapper, *Annu. Rev. Immunol.* **1995**, *13*, 655–692.
- [260] D. M. Jelley-Gibbs, T. M. Strutt, K. K. McKinstry, S. L. Swain, *Immunol. Cell Biol.* **2008**, *86*, 343–352.
- [261] O. T. Avery, W. F. Goebel, *J. Exp. Med.* **1931**, *54*, 437–447.
- [262] G. Torano, M. E. Toledo, A. Baly, V. Fernandez-Santana, F. Rodriguez, Y. Alvarez, T. Serrano, A. Musachio, I. Hernandez, E. Hardy, A. Rodriguez, H. Hernandez, A. Aguilar, R. Sanchez, M. Diaz, V. Muzio, J. Dfana, M. C. Rodriguez, L. Heynngnezz, V. Verez-Bencomo, *Clin. Vaccine Immunol.* **2006**, *13*, 1052–1056.
- [263] V. Verez-Bencomo, V. Fernandez-Santana, E. Hardy, M. E. Toledo, M. C. Rodriguez, L. Heynngnezz, A. Rodriguez, A. Baly, L. Herrera, M. Izquierdo, A. Villar, Y. Valdes, K. Cosme, M. L. Deler, M. Montane, E. Garcia, A. Ramos, A. Aguilar, E. Medina, G. Torano, I. Sosa, I. Hernandez, R. Martinez, A. Muzachio, A. Carmenates, L. Costa, F. Cardoso, C. Campa, M. Diaz, R. Roy, *Science* **2004**, *305*, 522–525.
- [264] a) V. Pozsgay, J. Kubler-Kielb in *Carbohydrate-Based Vaccines* (Hrsg.: R. Roy), American Chemical Society, Washington, **2008**, S. 36–70; b) G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Elsevier, Amsterdam, **2008**.
- [265] S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 882–912; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 836–863.
- [266] a) V. Pozsgay, *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 126–140; b) R. A. Pon, H. J. Jennings in *Carbohydrate-Based Vaccines and Immunotherapies* (Hrsg.: Z. Guo, G. J. Boons), Wiley, Hoboken, **2009**, S. 117–166.
- [267] L. Mendonça-Previano, A. R. Todeschini, N. Heise, J. O. Previano, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 499–505.
- [268] B. M. Greenwood, D. A. Fidock, D. E. Kyle, S. H. I. Kappe, P. L. Alonso, F. H. Collins, P. E. Duffy, *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 1266–1276.
- [269] a) L. Schofield, F. Hackett, *J. Exp. Med.* **1993**, *177*, 145–153; b) D. C. Gowda, *Trends Parasitol.* **2007**, *23*, 596–604.
- [270] L. Schofield, M. C. Hewitt, K. Evans, M. A. Siomos, P. H. Seeberger, *Nature* **2002**, *418*, 785–789.
- [271] M. C. Hewitt, D. A. Snyder, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13434–13436.
- [272] W. Wolfson, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 689–691.
- [273] a) X. Liu, Y. U. Kwon, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5004–5005; b) J. Lu, K. N. Jayaprakash, U. Schlueter, B. Fraser-Reid, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7540–7547.
- [274] Y. Sukthana, *Trends Parasitol.* **2006**, *22*, 137–142.
- [275] B. Striepen, C. F. Zinecker, J. B. Damm, P. A. Melgers, G. J. Gerwig, M. Koolen, J. F. Vliegthart, J. F. Dubremetz, R. T. Schwarz, *J. Mol. Biol.* **1997**, *266*, 797–813.
- [276] F. Debierre-Grockieo, N. Azzouz, J. Schmidt, J. F. Dubremetz, H. Geyer, R. Geyer, R. Weingart, R. R. Schmidt, R. T. Schwarz, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 32987–32993.
- [277] P. Desjeux, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2004**, *27*, 305–318.

- [278] F. Chappuis, S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R. W. Peeling, J. Alvar, M. Boelaert, *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 873–882.
- [279] G. F. Spath, L. Epstein, B. Leader, S. M. Singer, H. A. Avila, S. J. Turco, S. M. Beverley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9258–9263.
- [280] T. Naderer, J. E. Vince, M. J. McConville, *Curr. Mol. Med.* **2004**, *4*, 649–665.
- [281] A. Descoteaux, S. J. Turco, *Microbes Infect.* **2002**, *4*, 975–981.
- [282] M. C. Hewitt, P. H. Seeberger, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3699–3702.
- [283] a) F. H. Routier, A. V. Nikolaev, M. A. Ferguson, *Glycoconjugate J.* **1999**, *16*, 773–780; b) X. Y. Liu, S. Siegrist, M. Amacker, R. Zurbriggen, G. Pluschke, P. H. Seeberger, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 161–164; c) M. E. Rogers, O. V. Sizova, M. A. Ferguson, A. V. Nikolaev, P. A. Bates, *J. Infect. Dis.* **2006**, *194*, 512–518.
- [284] R. Zurbriggen, *Vaccine* **2003**, *21*, 921–924.
- [285] a) J. A. Hoxie, *Annu. Rev. Med.* **2010**, *61*, 135–152; b) C. N. Scanlan, J. Offer, N. Zitzmann, R. A. Dwek, *Nature* **2007**, *446*, 1038–1045; c) R. C. Gallo, *Lancet* **2005**, *366*, 1894–1898; d) S. Zolla-Pazner, *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 199–210; e) D. R. Burton, R. C. Desrosiers, R. W. Doms, W. C. Koff, P. D. Kwong, J. P. Moore, G. J. Nabel, J. Sodroski, I. A. Wilson, R. T. Wyatt, *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 233–236; f) J. F. Hutchinson, *Annu. Rev. Anthropol.* **2001**, *30*, 85–108.
- [286] a) D. C. Dunlop, A. Ulrich, B. J. Appelmelk, D. R. Burton, R. A. Dwek, N. Zitzmann, C. N. Scanlan, *AIDS* **2008**, *22*, 2214–2217; b) L. X. Wang, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2006**, *9*, 194–206.
- [287] a) J. M. Binley, T. Wrin, B. Korber, M. B. Zwick, M. Wang, C. Chappey, G. Stiegler, R. Kunert, S. Zolla-Pazner, H. Katinger, C. J. Petropoulos, D. R. Burton, *J. Virol.* **2004**, *78*, 13232–13252; b) C. N. Scanlan, R. Pantophlet, M. R. Wormald, E. Ollmann Saphire, R. Stanfield, I. A. Wilson, H. Katinger, R. A. Dwek, P. M. Rudd, D. R. Burton, *J. Virol.* **2002**, *76*, 7306–7321; c) R. W. Sanders, M. Venturi, L. Schiffner, R. Kalyanaraman, H. Katinger, K. O. Lloyd, P. D. Kwong, J. P. Moore, *J. Virol.* **2002**, *76*, 7293–7305; d) J. R. Mascola, G. Stiegler, T. C. Vancott, H. Katinger, C. B. Carpenter, C. E. Hanson, H. Beary, D. Hayes, S. S. Frankel, D. L. Birx, M. G. Lewis, *Nat. Med.* **2000**, *6*, 207–210; e) A. Trkola, M. Purtscher, T. Muster, C. Ballaun, A. Buchacher, N. Sullivan, K. Srinivasan, J. Sodroski, J. P. Moore, H. Katinger, *J. Virol.* **1996**, *70*, 1100–1108.
- [288] D. A. Calarese, C. N. Scanlan, M. B. Zwick, S. Deechongkit, Y. Mimura, R. Kunert, P. Zhu, M. R. Wormald, R. L. Stanfield, K. H. Roux, J. W. Kelly, P. M. Rudd, R. A. Dwek, H. Katinger, D. R. Burton, I. A. Wilson, *Science* **2003**, *300*, 2065–2071.
- [289] a) L. X. Wang, J. Ni, S. Singh, H. Li, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 127–134; b) E. W. Adams, D. M. Ratner, H. R. Bokesch, J. B. McMahon, B. R. O'Keefe, P. H. Seeberger, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 875–881.
- [290] a) R. Blattner, R. H. Furneaux, M. Ludewig, *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 299–321; b) M. Grathwohl, R. R. Schmidt, *Synthesis* **2001**, 2263–2272; c) P. Grice, S. V. Ley, J. Pietruszka, H. W. M. Priepe, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 206–208; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 197–200; d) D. M. Ratner, O. J. Plante, P. H. Seeberger, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 826–833; e) Y. Zeng, J. Zhang, J. Ning, F. Kong, *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 5–9.
- [291] H.-K. Lee, C. N. Scanlan, C.-Y. Huang, A.-Y. Chang, D. A. Calarese, R. A. Dwek, P. M. Rudd, D. R. Burton, I. A. Wilson, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1018–1021; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1000–1003.
- [292] V. Y. Dudkin, M. Orlova, X. Geng, M. Mandal, W. C. Olson, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9560–9562.
- [293] R. D. Astronomo, E. Kaltgrad, A. K. Udit, S.-K. Wang, K. J. Doores, C.-Y. Huang, R. Pantophlet, J. C. Paulson, C.-H. Wong, M. G. Finn, D. R. Burton, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 357–370.
- [294] R. D. Astronomo, H.-K. Lee, C. N. Scanlan, R. Pantophlet, C.-Y. Huang, I. A. Wilson, O. Blixt, R. A. Dwek, C.-H. Wong, D. R. Burton, *J. Virol.* **2008**, *82*, 6359–6368.
- [295] a) J. G. Joyce, I. J. Krauss, H. C. Song, D. W. Opalka, K. M. Grimm, D. D. Nahas, M. T. Esser, R. Hrin, M. Feng, V. Y. Dudkin, M. Chastain, J. W. Shiver, S. J. Danishefsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 15684–15689; b) J. Wang, H. Li, G. Zou, L. X. Wang, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1529–1540; c) I. J. Krauss, J. G. Joyce, A. C. Finnefrock, H. C. Song, V. Y. Dudkin, X. Geng, J. D. Warren, M. Chastain, J. W. Shiver, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11042–11044.
- [296] A. Kabanova, R. Adamo, D. Proietti, F. Berti, M. Tontini, R. Rappuoli, P. Costantino, *Glycoconj. J.* **2010**, *27*, 501–513.
- [297] K. J. Doores, Z. Fulton, V. Hong, M. K. Patel, C. N. Scanlan, M. R. Wormald, M. G. Finn, D. R. Burton, I. A. Wilson, B. G. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 17107–17112.
- [298] D. C. Dunlop, C. Bonomelli, F. Mansab, S. Vasiljevic, K. J. Doores, M. R. Wormald, A. S. Palma, T. Feizi, D. J. Harvey, R. A. Dwek, M. Crispin, C. N. Scanlan, *Glycobiology* **2010**, *20*, 812–823.
- [299] a) R. J. Luallen, H. Fu, C. Agrawal-Gamse, I. Mboudjeka, W. Huang, F. H. Lee, L. X. Wang, R. W. Doms, Y. Geng, *J. Virol.* **2009**, *83*, 4861–4870; b) R. J. Luallen, J. Lin, H. Fu, K. K. Cai, C. Agrawal, I. Mboudjeka, F. H. Lee, D. Montefiori, D. F. Smith, R. W. Doms, Y. Geng, *J. Virol.* **2008**, *82*, 6447–6457.
- [300] a) S. Hakomori, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 10231–10233; b) S. Hakomori, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2001**, *491*, 369–402; c) M. M. Fuster, J. D. Esko, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 526–542.
- [301] J. W. Dennis, S. Laferte, C. Waghorne, M. L. Breitman, R. S. Kerbel, *Science* **1987**, *236*, 582–585.
- [302] a) S. Zhang, H. S. Zhang, C. Cordon-Cardo, V. E. Reuter, A. K. Singhal, K. O. Lloyd, P. O. Livingston, *Int. J. Cancer* **1997**, *73*, 50–56; b) S. Zhang, C. Cordon-Cardo, H. S. Zhang, V. E. Reuter, S. Adluri, W. B. Hamilton, K. O. Lloyd, P. O. Livingston, *Int. J. Cancer* **1997**, *73*, 42–49; c) S. Hakomori, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1999**, *1473*, 247–266.
- [303] D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 477–488.
- [304] a) T. Buskas, P. Thompson, G. J. Boons in *Carbohydrate-Based Vaccines and Immunotherapies* (Hrsg.: Z. Guo, G. J. Boons), Wiley, Hoboken, **2009**, S. 263–311; b) H. H. Wandall, M. A. Tarp in *Carbohydrate-Based Vaccines and Immunotherapies* (Hrsg.: Z. Guo, G. J. Boons), Wiley, Hoboken, **2009**, S. 333–366.
- [305] D. P. Galonić, D. Y. Gin, *Nature* **2007**, *446*, 1000–1007.
- [306] J. L. Zhu, J. D. Warren, S. J. Danishefsky, *Expert Rev. Vaccines* **2009**, *8*, 1399–1413.
- [307] T. Buskas, P. Thompson, G. J. Boons, *Chem. Commun.* **2009**, 5335–5349.
- [308] Z. W. Guo, Q. L. Wang, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 608–617.
- [309] S. F. Slovin, S. J. Keding, G. Ragupathi, *Immunol. Cell Biol.* **2005**, *83*, 418–428.
- [310] F. Helling, A. Shang, M. Calves, S. Zhang, S. Ren, R. K. Yu, H. F. Oettgen, P. O. Livingston, *Cancer Res.* **1994**, *54*, 197–203.
- [311] C. R. Kensil, U. Patel, M. Lennick, D. Marciani, *J. Immunol.* **1991**, *146*, 431–437.
- [312] F. Helling, S. Zhang, A. Shang, S. Adluri, M. Calves, R. Koganty, B. M. Longenecker, T. J. Yao, H. F. Oettgen, P. O. Livingston, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2783–2788.
- [313] P. O. Livingston, E. J. Natoli, M. J. Calves, E. Stockert, H. F. Oettgen, L. J. Old, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 2911–2915.
- [314] C. Musselli, P. O. Livingston, G. Ragupathi, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2001**, *127 Suppl 2*, R20–26.

- [315] M. T. Bilodeau, T. K. Park, S. H. Hu, J. T. Randolph, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston, S. L. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7840–7841.
- [316] a) T. Zhu, G. J. Boons, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3704–3707; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3495–3497; b) J. M. Lassaletta, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann.* **1996**, 1417–1423; c) I. Jeon, K. Iyer, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8452–8455.
- [317] Z. Wang, L. Zhou, K. El-Boubbou, X. S. Ye, X. Huang, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6409–6420.
- [318] D. M. Su, H. Eguchi, W. Yi, L. Li, P. G. Wang, C. Xia, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1009–1012.
- [319] Z. Wang, M. Gilbert, H. Eguchi, H. Yu, J. Cheng, S. Muthana, L. Zhou, P. G. Wang, X. Chen, X. Huang, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 1717–1728.
- [320] G. Ragupathi, T. K. Park, S. L. Zhang, I. J. Kim, L. Graber, S. Adluri, K. O. Lloyd, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 66–69; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 125–128.
- [321] T. Gilewski, G. Ragupathi, S. Bhuta, L. J. Williams, C. Musselli, X. F. Zhang, W. G. Bornmann, M. Spassova, K. P. Bencsath, K. S. Panageas, J. Chin, C. A. Hudis, L. Norton, A. N. Houghton, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 3270–3275.
- [322] G. Ragupathi, S. F. Slovin, S. Adluri, D. Sames, I. J. Kim, H. M. Kim, M. Spassova, W. G. Bornmann, K. O. Lloyd, H. I. Scher, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 590–594; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 563–566.
- [323] S. F. Slovin, G. Ragupathi, S. Adluri, G. Ungers, K. Terry, S. Kim, M. Spassova, W. G. Bornmann, M. Fazzari, L. Dantis, K. Olkiewicz, K. O. Lloyd, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, H. I. Scher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 5710–5715.
- [324] Y.-L. Huang, J.-T. Hung, Y.-C. Lin, C.-T. Ren, H.-Y. Lee, C.-W. Lin, C.-C. Wang, T.-J. Cheng, A.-L. Yu, C.-Y. Wu, C.-H. Wong, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [325] T. Buskas, Y. H. Li, G. J. Boons, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 3517–3524.
- [326] a) K. Kitamura, P. O. Livingston, S. R. Fortunato, E. Stockert, F. Helling, G. Ritter, H. F. Oettgen, L. J. Old, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 2805–2809; b) P. Livingston, S. Zhang, S. Adluri, T. J. Yao, L. Graeber, G. Ragupathi, F. Helling, M. Fleisher, *Cancer Immunol. Immunother.* **1997**, *43*, 324–330.
- [327] S. Bay, S. Fort, L. Birikaki, C. Ganneau, E. Samain, Y. M. Coic, F. Bonhomme, E. Deriaud, C. Leclerc, R. Lo-Man, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 582–587.
- [328] T. Antoine, C. Bosso, A. Heyraud, E. Samain, *Biochimie* **2005**, *87*, 197–203.
- [329] M. Randrianatsoa, S. Drouillard, C. Breton, E. Samain, *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 2652–2656.
- [330] M. Randrianatsoa, S. Drouillard, E. Samain, *Glycobiology* **2009**, *19*, 1333–1333.
- [331] a) F. G. Hanisch, S. Muller, *Glycobiology* **2000**, *10*, 439–449; b) S. Patton, S. J. Gendler, A. P. Spicer, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr.* **1995**, *1241*, 407–423.
- [332] a) F. G. Hanisch, *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 143–149; b) J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, D. W. Miles, M. Dalziel, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1999**, *1455*, 301–313.
- [333] S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, X. T. Chen, P. W. Glunz, D. Sames, G. Ragupathi, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12474–12485.
- [334] S. F. Slovin, G. Ragupathi, C. Musselli, K. Olkiewicz, D. Verbel, S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, D. Sames, S. Danishefsky, P. O. Livingston, H. I. Scher, *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 4292–4298.
- [335] R. Lo-Man, S. Vichier-Guerre, S. Bay, E. Deriaud, D. Cantacuzene, C. Leclerc, *J. Immunol.* **2001**, *166*, 2849–2854.
- [336] R. Lo-Man, S. Vichier-Guerre, R. Perraut, E. Deriaud, V. Huteau, L. BenMohamed, O. M. Diop, P. O. Livingston, S. Bay, C. Leclerc, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 4987–4994.
- [337] S. Grigalevicius, S. Chierici, O. Renaudet, R. Lo-Man, E. Deriaud, C. Leclerc, P. Dumy, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1149–1159.
- [338] a) O. Renaudet, L. BenMohamed, G. Dasgupta, I. Bettahi, P. Dumy, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 737–741; b) I. Bettahi, G. Dasgupta, O. Renaudet, A. A. Chentoufi, X. Zhang, D. Carpenter, S. Yoon, P. Dumy, L. BenMohamed, *Cancer Immunol. Immunother.* **2009**, *58*, 187–200.
- [339] S. Dziadek, H. Kunz, *Chem. Rec.* **2004**, *3*, 308–321.
- [340] a) E. Kagan, G. Ragupathi, S. S. Yi, C. A. Reis, J. Gildersleeve, D. Kahne, H. Clausen, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston, *Cancer Immunol. Immunother.* **2005**, *54*, 424–430; b) A. L. Sorensen, C. A. Reis, M. A. Tarp, U. Mandel, K. Ramachandran, V. Sankaranarayanan, T. Schwientek, R. Graham, J. Taylor-Papadimitriou, M. A. Hollingsworth, J. Burchell, H. Clausen, *Glycobiology* **2006**, *16*, 96–107.
- [341] S. Ingale, M. A. Wolfert, J. Gaekwad, T. Buskas, G. J. Boons, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 663–667.
- [342] S. Ingale, T. Buskas, G. J. Boons, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5785–5788.
- [343] A. Kaiser, N. Gaidzik, T. Becker, C. Menge, K. Groh, H. Cai, Y. M. Li, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3772–3776; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3688–3692.
- [344] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7688–7692; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7551–7555.
- [345] B. L. Wilkinson, L. R. Malins, C. K. Y. Chun, R. J. Payne, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 6249–6251.
- [346] P. Livingston, *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 1837–1838.
- [347] a) G. Ragupathi, S. Cappello, S. S. Yi, D. Canter, M. Spassova, W. G. Bornmann, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston, *Vaccine* **2002**, *20*, 1030–1038; b) P. J. Sabbatini, G. Ragupathi, C. Hood, C. A. Aghajanian, M. Juertzka, A. Lasonos, M. L. Hensley, M. K. Spassova, O. Ouerfelli, D. R. Spriggs, W. P. Tew, J. Konner, H. Clausen, N. Abu Rustum, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston, *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 4170–4177; c) S. F. Slovin, G. Ragupathi, C. Fernandez, M. Diani, M. P. Jefferson, A. Wilton, W. K. Kelly, M. Morris, D. Solit, H. Clausen, P. Livingston, H. I. Scher, *Cancer Immunol. Immunother.* **2007**, *56*, 1921–1930.
- [348] G. Ragupathi, D. M. Coltart, L. J. Williams, F. Koide, E. Kagan, J. Allen, C. Harris, P. W. Glunz, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 13699–13704.
- [349] J. Zhu, Q. Wan, D. Lee, G. Yang, M. K. Spassova, O. Ouerfelli, G. Ragupathi, P. Damani, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9298–9303.
- [350] J. Zhu, Q. Wan, G. Ragupathi, C. M. George, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4151–4158.