

## Note

---

### Synthese von 8-Methoxycarboxyloctyl-2-acetamido-2-desoxy-3-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid\*

HANS PAULSEN UND KNUT ADERMANN

Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, Martin-Luther-King-Platz 6, D-2000 Hamburg 13 (Bundesrepublik Deutschland)

(Eingegangen am 9. April 1987; angenommen am 15. Mai 1987)

Die Einheit  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-GalpNAc kommt als Basis-Core-Struktur in den meisten O-Glycoproteinen vor<sup>2</sup>. In der Regel sind an diese Kette zusätzliche N-Acetylneuraminsäure-Reste gebunden. Finne<sup>3</sup> hat entdeckt, daß auch die alternative Verknüpfungsart  $\alpha$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-GalpNAc an L-Serin oder L-Threonin gebunden in O-Glycoproteinen des Nervensystemes vorkommt. Es handelt sich hier offensichtlich um eine erste bekannte gehirnspezifische Kohlenhydrateinheit. Sie wurde nur im Gehirn von Ratten, Kaninchen und Hühnern gefunden<sup>4</sup>. Inzwischen liegen weitere Ergebnisse vor, daß sie auch in den Glycoproteinen von menschlichen Teratocarcinomzellen anzutreffen ist<sup>5</sup>. Die Disaccharideinheit enthält in der Regel keine zusätzlich gebundene Neuraminsäure<sup>4,5</sup>.

Wir haben jetzt diese  $\alpha$ -D-glycosidisch verknüpfte Einheit gebunden an einen Spacer synthetisiert. Sie kann damit an ein Protein oder einen anderen Träger geknüpft werden, um damit Immunisierungen durchzuführen<sup>6</sup>. Mit auf diese Weise gewonnenen spezifischen Antikörpern ließe sich das weitere Vorkommen dieser ungewöhnlichen Disaccharideinheit untersuchen.

Für die Herstellung der  $\alpha$ -glycosidischen Bindung der D-Galactose kommt nur eine Reaktion ohne Nachbargruppenbeteiligung in Frage, die möglichst nach dem Typ der *in situ*-Anomerisierung ablaufen müßte<sup>7</sup>. Als Glycosyldonatoren stehen 2,4,6-Tri-O-acetyl-2-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranosylbromid<sup>8</sup> (**1**) und 2,4,6-Tri-O-acetyl-2-O-trichloroacetyl- $\beta$ -D-galactopyranosylbromid<sup>9</sup> (**2**) zur Verfügung. Die 2-O-Benzyl-Verbindung **1** dürfte sehr reaktiv, die 2-O-Trichloroacetyl-Verbindung **2** dagegen recht stabil und daher wenig reaktiv sein. Auch das als Glycosyldonor geeignete 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-O-trichloroacetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosylchlorid<sup>9</sup> (**5**) dürfte eine geringe Reaktivität aufweisen. Als Glycosylakzeptor kommen die

\* LXXXIV. Mitteilung der Serie "Bausteine von Oligosacchariden". LXXXIII. Mitteil., siehe Zit. 1.

bekanntem Methyl- (3) und Allyl-2-azido-4,6-di-*O*-benzoyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranoside (4) in Frage<sup>10</sup>. Sie sind für eine sich anschließende  $\alpha$ -Glycosidsynthese geeignet und lassen sich später leicht in 2-Acetamido-2-desoxy-D-galactose-Einheiten umwandeln<sup>11</sup>.

Am günstigsten erweist es sich, das Halogenid **1** bei Gegenwart von Silbercarbonat-Silberperchlorat bei Raumtemperatur in Dichlormethan mit **3** oder **4** umzusetzen. Man erhält dann in etwa 80% Ausbeute die  $\alpha$ -glycosidisch verknüpften Disaccharide **6** und **7**. Das  $\alpha$ : $\beta$ -Verhältnis liegt bei etwa 10:1. Die  $\alpha$ -glycosidische Bindung ist durch <sup>1</sup>H-N.m.r.-Spektroskopie leicht aus der kleinen Kopplungskonstanten  $J_{1',2'}$  3,6 Hz nachzuweisen.

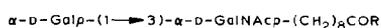
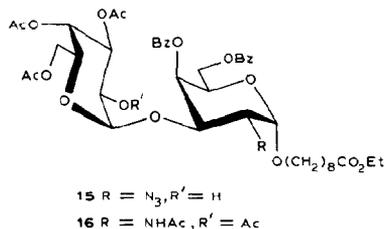
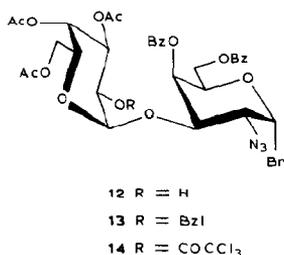
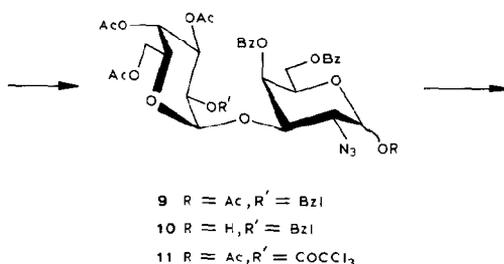
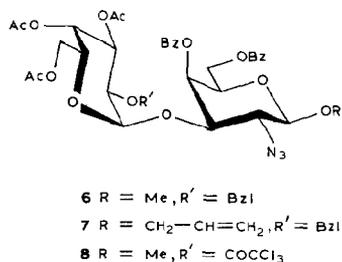
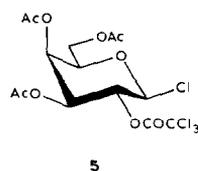
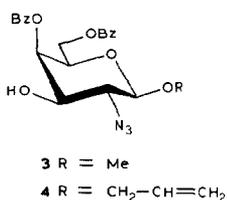
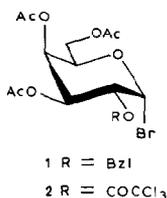
Durch Acetolyse mit Acetanhydrid-Schwefelsäure<sup>12</sup> ist **6** in 88% in das 1-Acetat **9** überführbar. Das Acetat **9** liegt als Anomerengemisch  $\alpha$ : $\beta$  wie 5:1 vor und kann direkt der Bromierung mit Titan-tetrabromid<sup>13</sup> unterworfen werden. Überraschenderweise wird hierbei jedoch nicht das erwartete Bromid **13** erhalten. Die 2'-*O*-Benzylgruppe zeigt eine unerwartete Säurelabilität. Bei Einwirkung von Titan-tetrabromid wird primär diese Benzylgruppe abgespalten und anschließend erfolgt die Bromierung zum Halogenid **12** mit freier 2'-OH-Gruppe.

Das Halogenid **13** ist aber aus dem Disaccharid **7** erhältlich. Die Allylabspaltung unter Bildung von **10** ist am günstigsten durch Umlagerung mit 1,5-Cyclooctadienbis(methyldiphenylphosphin)iridium-hexafluorophosphat<sup>14</sup> zur Propenylverbindung und anschließender Spaltung mit HgO-HgCl<sub>2</sub> durchzuführen<sup>15</sup>. Die darauffolgende Bromierung von **10** mit *N,N*-Dimethylbromoforniumbromid<sup>16</sup> in Dichlormethan bei Gegenwart von 2,4,6-Trimethylpyridin ergibt dann das gewünschte  $\alpha$ -Bromid **13**.

Das Bzl-2'-geschützte  $\alpha$ -Bromid **13** läßt sich jedoch nicht selektiv mit dem Spacer 8-Ethoxycarboonyloctanol<sup>17</sup> zum  $\alpha$ -Glycosid umsetzen. Man erhält in etwa 70–80% ein Gemisch von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glycosid (1:1 bis 2:1), das nicht getrennt werden kann. Günstiger ist es, das OH-2' unsubstituierte Halogenid **12** einzusetzen. Bei Gegenwart von Quecksilbersalzen liefert die Reaktion von **12** mit 8-Ethoxycarboonyloctanol ein Verhältnis von  $\alpha$ : $\beta$ -Form von 7:2. Das  $\alpha$ -Glycosid **15** ist in 42% rein zu isolieren. Für **15** findet man wie erwartet im <sup>1</sup>H-N.m.r.-Spektrum für die anomeren Protonen nur kleine Kopplungskonstanten.

Zur Entblockierung wird die Azidogruppe in **15** mit Schwefelwasserstoff reduziert und anschließend zu **16** *N*-acetyliert<sup>12</sup>. Alle *O*-Acylgruppen können dann mit Natriummethoxid entfernt werden<sup>18</sup>. Hierbei wird der Ester der Spacer-Gruppe zum Methylester umgeestert, so daß man das gewünschte Endprodukt **17** erhält. Die Verbindung wird durch ein 2D-N.m.r.-Spektrum charakterisiert.

Die Kupplung von **17** mit Rinderserumalbumin (BSA) erfolgt nach bekannten Methoden<sup>6</sup>. Der Ester **17** wird zunächst mit Hydrazin in das Hydrazid **18** überführt, das mit Distickstofftetroxid nach Pinto und Bundle<sup>19</sup> das Azid **19** liefert, das direkt mit BSA gekuppelt werden kann. Im Kupplungsprodukt **20** wird ein Belegungsgrad der  $\epsilon$ -Aminogruppen des Lysins des Proteins von 14% erreicht. Das Antigen **20** kann direkt zur Immunisierung eingesetzt werden<sup>6</sup>. Kuppelt man **19** in analoger Weise an Aminosepharose, so wird das Disaccharid an einen unlöslichen Träger



- 17 R = OMe  
18 R = NHNH<sub>2</sub>  
19 R = N<sub>3</sub>



20



21

gebunden. Das Produkt **21** ist zur Reinigung der gegen das Disaccharid gerichteten Antikörper geeignet.

Es sei erwähnt, daß auch die vielversprechenden Glycosyldonoren mit der 2-O-Trichloracetylgruppe **2** und **5** untersucht wurden. Die Ergebnisse waren jedoch weniger befriedigend. Die Umsetzung von **5** mit **3** liefert **8** nur in 52% Ausbeute, wobei das Anomerenverhältnis  $\alpha$ : $\beta$  wie 5:1 beträgt. Das Halogenid **2** ist wegen seiner

Unreaktivität nicht geeignet. Aus **8** ist durch Acetolyse<sup>12</sup> das Acetat **11** darstellbar, das mit Titan-tetrabromid<sup>13</sup> das Halogenid **14** liefert. Die Umsetzung von **14** mit 8-Ethoxycarboxyloctanol verläuft jedoch ebenfalls unbefriedigend. Das erhaltene Anomerenverhältnis beträgt  $\alpha:\beta$  wie 1:5. Dies zeigt, daß die Glycosidierungsreaktion hier weitgehend unter Inversion zum unerwünschten Anomeren abläuft. Eine Reinabtrennung der  $\beta$ -Form gelingt nicht.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

Allgemeine Methoden. — Optische Drehungen: Perkin-Elmer-Polarimeter 241 oder 243 in 1 dm Küvetten (589 nm, Na-D-Linie). <sup>1</sup>H-N.m.r.-Spektren: Bruker WH 270 oder WM 400, innerer Standard Tetramethylsilan. Alle Reaktionen wurden dünn-schichtchromatographisch (Aluminium-fertigfolien, Merck, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) verfolgt. Detektion: U.v.-Absorption, 10%ige ethanolische H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Wärmebehandlung. Alle verwendeten Lösungsmittel waren destilliert und absolutiert. Säulentrennungen: Kieselgel 60 (70-230 mesh, Merck). Dialysen: Amicon-Ultrafiltrationszelle gegen eine PM-10-Membran bei 0.35 MPa. Glycosidsynthesen wurden im Braunnhalskolben unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre durchgeführt.

*Methyl-2-azido-4,6-di-O-benzoyl-2-desoxy-3-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-O-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (6).* — Verbindung **3** (4.85 g, 11.35 mmol) Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.67 g) und Molsieb 4A (pulv., 8 g) werden 3 h im Hochvakuum getrocknet. Es werden abs. Dichlormethan (300 mL) zugegeben, 1 h gerührt, AgClO<sub>4</sub> (500 mg) zugesetzt und weitere 2 h gerührt. Man tropft eine Lösung von **1** (8.0 g, 17.44 mmol) in abs. Dichlormethan (50 mL) zu. Nach 22 h gibt man weiteres Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-AgClO<sub>4</sub>; (10:1; 1:1 g) zu. Nach 42 h ist die Reaktion beendet. Es wird mit Chloroform verdünnt, filtriert, mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und Wasser gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft. Die Trennung der Anomeren erfolgt säulenchromatographisch mit Toluol-Ethylacetat 8:1; Ausb. 7.82 g (85%),  $[\alpha]_D^{20} + 59^\circ$  (*c* 1.0 Chloroform); <sup>1</sup>H-N.m.r. (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.15–7.10 (m, 15 H, Ph), 5.82 (dd, 1 H, *J*<sub>3,4</sub> 3.3, *J*<sub>4,5</sub> 0.8 Hz, H-4), 5.43 (dd, 1 H, *J*<sub>3',4'</sub> 3.3, *J*<sub>4',5'</sub> 1.2 Hz, H-4'), 5.38 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> 3.6 Hz, H-1'), 5.24 (dd, 1 H, *J*<sub>2',3'</sub> 10.6 Hz, H-3'), 4.55 (dd, 1 H, *J*<sub>5,6a</sub> 6.1, *J*<sub>6a,6b</sub> 11.3 Hz, H-6a), 4.48 (d, 1 H, *J* 12.6 Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 4.47 (ddd, 1 H, *J*<sub>5',6'a</sub> 6.9, *J*<sub>5',6'b</sub> 6.3 Hz, H-5'), 4.36 (dd, 1 H, *J*<sub>5,6b</sub> 6.7 Hz, H-6b), 4.23 (d, 1 H, *J*<sub>1,2</sub> 7.9 Hz, H-1), 4.30 (d, 1 H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.11 (dd, 1 H, *J*<sub>6'a,6'b</sub> 11.4 Hz, H-6'a), 4.02 (dd, 1 H, H-6'b), 4.00 (ddd, 1 H, H-5), 3.88 (dd, 1 H, *J*<sub>2,3</sub> 10.6 Hz, H-2), 3.79 (dd, 1 H, H-2'), 3.76 (dd, 1 H, H-3), 3.65 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 2.06, 2.03, 1.79 (3 s, 9 H, 3 Ac).

*Anal.* Ber. für C<sub>40</sub>H<sub>43</sub>N<sub>3</sub>O<sub>15</sub> (805.9): C, 59.61; H, 5.39; N, 5.22. Gef.: C, 59.82; H, 5.16; N, 4.75.

*Allyl-2-azido-4,6-di-O-benzoyl-2-desoxy-3-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-O-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (7).* — Verbindung **4** (1.53 g, 3.22 mmol), Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.2 g), AgClO<sub>4</sub> (120 mg) und Molsieb (3 g, pulv., 4A) werden wie bei **6** beschrieben getrocknet. Man gibt abs. Dichlormethan (80 mL) und abs. Toluol (5 mL) zu. Es wird **1** (1.90 g, 4.14 mmol) in abs. Dichlormethan (10 mL)

langsam zugetropft. Nach 30 h wird wie bei **6** beschrieben aufgearbeitet. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch mit Toluol-Ethylacetat 10:1  $\rightarrow$  4:1; Ausb. 2.17 g (81%),  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 47^\circ$  (c 1.0, Chloroform);  $^1\text{H-N.m.r.}$  (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.15–7.10 (m, 15 H, Ph), 5.99 (m, 1 H, All), 5.82 (dd, 1 H,  $J_{3,4}$  3.2,  $J_{4,5}$  0.8 Hz, H-4), 5.43 (dd, 1 H,  $J_{3',4'}$  3.3,  $J_{4',5'}$  1.1 Hz, H-4'), 5.38 (d, 1 H,  $J_{1',2'}$  3.6 Hz, H-1'), 5.35, 5.25 (m, 2 H, All), 5.24 (dd, 1 H,  $J_{2',3'}$  10.6 Hz, H-3'), 4.54 (dd, 1 H,  $J_{5,6a}$  6.9,  $J_{6a,6b}$  11.4 Hz, H-6a), 4.49 (m, 1 H, H-5'), 4.48 (d, 1 H,  $J_{1,2}$  8.0 Hz, H-1), 4.47 (d, 1 H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.36 (dd, 1 H,  $J_{5,6b}$  6.0 Hz, H-6b), 4.30 (d, 1 H,  $J$  12.4 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.22 (m, 1 H, All), 4.12 (dd, 1 H,  $J_{5',6'a}$  6.0,  $J_{6'a,6'b}$  11.4 Hz, H-6'a), 4.01 (dd, 1 H,  $J_{5',6'b}$  6.6 Hz, H-6'b), 3.99 (m, 1 H, H-5), 3.93 (dd, 1 H,  $J_{2,3}$  10.6 Hz, H-2), 3.80 (dd, 1 H, H-2'), 3.75 (dd, 1 H, H-3), 2.06, 2.03, 1.76 (3 s, 9 H, 3 Ac).

*Anal.* Ber. für  $\text{C}_{42}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_{15}$  (831.9): C, 60.63; H, 5.46; N, 5.05. Gef.: C, 60.71; H, 5.50; N, 4.96.

*Methyl-2-azido-4,6-di-O-benzoyl-2-desoxy-3-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-O-trichloroacetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)- $\beta$ -D-galactopyranosid (8).* — Verbindung **3** wird (116 mg, 0.27 mmol) mit  $\text{AgClO}_4$  (250 mg) und Molsieb (200 mg, pulv., 4A) 2 h im Hochvakuum getrocknet. Nach Zugabe von abs. Dichlormethan (5 mL) und 1 h Rühren bei  $-20^\circ$  wird eine Lösung von **5** (310 mg, 0.66 mmol) in Dichlormethan (5 mL) zugetropft. Nach 2 d wird mit Ethylacetat verdünnt, über Celite filtriert, mit Wasser gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, eingeengt und mit Petrolether-Ethylacetat 4:1 chromatographisch gereinigt; Ausb. 121 mg (52%),  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 43^\circ$  (c 1.0, Chloroform);  $^1\text{H-N.m.r.}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.16–7.40 (m, 10 H, Ph), 5.73 (dd, 1 H,  $J_{3,4}$  2.8,  $J_{4,5}$  0.9 Hz, H-4), 5.63 (d, 1 H,  $J_{1',2'}$  3.6 Hz, H-1'), 5.51 (dd, 1 H,  $J_{4',5'}$  1.2 Hz, H-4'), 5.46 (dd, 1 H,  $J_{2',3'}$  10.6,  $J_{3',4'}$  3.4 Hz, H-3'), 5.31 (dd, 1 H, H-2'), 4.55 (ddd, 1 H,  $J_{5',6'}$  6.5,  $J_{5',6'b}$  6.6 Hz, H-5'), 4.54 (dd, 1 H,  $J_{5,6a}$  6.2,  $J_{6a,6b}$  11.4 Hz, H-6a), 4.34 (d, 1 H,  $J_{1,2}$  7.4 Hz, H-1), 4.26 (dd, 1 H,  $J_{5,6b}$  6.6 Hz, H-6b), 4.16 (dd, 1 H,  $J_{6'a,6'b}$  11.4 Hz, H-6'a), 4.08 (dd, 1 H, H-6'b), 3.99 (ddd, 1 H, H-5), 3.87 (dd, 1 H,  $J_{2,3}$  10.8 Hz, H-2), 3.79 (dd, 1 H, H-3), 3.66 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.16, 2.08, 1.91 (3 s, 9 H, 3 Ac).

*Anal.* Ber. für  $\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}_{16}$  (861.1): C, 48.82; H, 4.22; Cl, 12.35; N, 4.88. Gef.: C, 48.84; H, 4.02; Cl, 11.98; N, 4.49.

*1-O-Acetyl-2-azido-4,6-di-O-benzoyl-2-desoxy-3-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-O-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-D-galactopyranose (9).* — Verbindung **6** wird in (6.20 g, 7.7 mmol) Acetanhydrid (40 mL) gelöst und auf  $-10^\circ$  gekühlt. Man gibt tropfenweise eine auf  $-10^\circ$  gekühlte Acetolysemischung (20 mL, Acetanhydrid- $\text{H}_2\text{SO}_4$  100:1) zu und rührt 24 h. Dann wird mit Chloroform verdünnt, mit  $\text{NaHCO}_3$  neutralisiert, mit Wasser gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und einige Male mit Toluol codestilliert. Die Anomeren werden säulen chromatographisch mit Toluol-Ethylacetat 6:1 getrennt; Ausb. 5.66 g (88%,  $\alpha$ : $\beta$  5:1);  $\alpha$ -Acetat:  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 102^\circ$  (c 1.0, Chloroform);  $^1\text{H-N.m.r.}$  (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;  $\alpha$ -Anomer):  $\delta$  8.04–7.03 (m, 15 H, Ph), 6.51 (d, 1 H,  $J_{1,2}$  3.7 Hz, H-1), 5.97 (dd, 1 H,  $J_{3,4}$  2.8,  $J_{4,5}$  0.9 Hz, H-4), 5.44 (dd, 1 H,  $J_{3',4'}$  3.3,  $J_{4',5'}$  1.4 Hz, H-4'), 5.43 (d, 1 H,  $J_{1',2'}$  3.8 Hz, H-1'), 5.27 (dd, 1 H,  $J_{2',3'}$  10.6 Hz, H-3'), 4.51–4.39 (m, 3 H, H-5,6a,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.38–4.26 (m, 4 H, H-3,6b,5',  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.19 (dd, 1 H,  $J_{2,3}$  10.8 Hz, H-2), 4.10 (d, 2 H, H-6'a,6'b), 3.82

(dd, 1 H, H-2'), 2.16, 2.06, 2.04, 1.77 (4 s, 12 H, 4 Ac).

*Anal.* Ber. für  $C_{41}H_{43}N_3O_{16}$  (833.9): C, 59.09; H, 5.21; N, 5.04. Gef.: C, 58.67; H, 5.29; N, 4.65.

*2-Azido-4,6-di-O-benzoyl-2-desoxy-3-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-O-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-galactopyranose (10).* — Zu einer Lösung von **7** (855 mg, 1.0 mmol) in frisch destilliertem Oxolan (50 mL) wird unter  $N_2$  [Ir-1,5-cyclooctadien-(PMePh<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub> (eine Spatelspitze) gegeben. Die Lösung wird entgast, 2 min unter  $H_2$ -Atmosphäre gesetzt, wiederum entgast und unter  $N_2$ -Atmosphäre gesetzt. Nach 4 h wird eingedampft und der Rückstand in Aceton-Wasser 9:1 (50 mL) aufgenommen. Nach einander werden HgO (260 mg) und HgCl<sub>2</sub> (300 mg) zugegeben. Nach 1 h wird filtriert, eingedampft, in Dichlormethan aufgenommen und die überschüssigen Hg-Salze mit KI ausgeschüttelt. Man wäscht mit Wasser, trocknet über MgSO<sub>4</sub>, engt ein und reinigt säulenchromatographisch mit Toluol-Ethylacetat 3:1; Ausb. 688 mg (87%,  $\alpha$ : $\beta$  1:1). Die Verbindung wird direkt zu **13** umgesetzt.

*1-O-Acetyl-2-azido-4,6-di-O-benzoyl-2-desoxy-3-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-O-trichloroacetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-D-galactopyranose (11).* — Verbindung **8** (70 mg, 85  $\mu$ mol) wird in Acetanhydrid (1 mL) gelöst und bei 0° mit Acetanhydrid-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50:1 (1 mL) versetzt. Nach 20 h wird mit Chloroform verdünnt, mit NaHCO<sub>3</sub> neutralisiert, mit Wasser gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und eingeengt. Die Trennung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Acetat erfolgt säulenchromatographisch mit Toluol-Ethylacetat 5:1; Ausb. 49 mg (65%,  $\alpha$ : $\beta$  3:1);  $\alpha$ -Acetat:  $[\alpha]_D^{20} + 91^\circ$  (c 1.0, Chloroform); <sup>1</sup>H-N.m.r. (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.10–7.40 (m, 10 H, Ph), 6.52 (d, 1 H,  $J_{1,2}$  3.6 Hz, H-1), 5.89 (dd, 1 H,  $J_{3,4}$  2.8,  $J_{4,5}$  0.8 Hz, H-4), 5.73 (d, 1 H,  $J_{1',2'}$  3.7 Hz, H-1'), 5.55 (dd, 1 H,  $J_{3',4'}$  3.3,  $J_{4',5'}$  1.2 Hz, H-4'), 5.51 (dd, 1 H,  $J_{2',3'}$  10.6 Hz, H-3'), 5.34 (dd, 1 H, H-2'), 4.50–4.37 (m, 3 H, H-5,5',6a), 4.32 (dd, 1 H,  $J_{2,3}$  10.8 Hz, H-3), 4.25–4.19 (m, 3 H, H-2,6b,6'a), 4.13 (dd, 1 H,  $J_{5',6'b}$  6.6,  $J_{6'a,6'b}$  11.4 Hz, H-6'b), 2.18, 2.08, 1.92 (4 s, 12 H, 4 Ac).

*Anal.* Ber. für  $C_{36}H_{36}Cl_3N_3O_{17}$  (889.1): C, 48.63; H, 4.09; Cl, 11.96; N, 4.73. Gef.: C, 48.42; H, 3.99; Cl, 11.51; N, 4.63.

*2-Azido-4,6-di-O-benzoyl-2-desoxy-3-O-(3,4,6-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-galactopyranosylbromid (12).* — Verbindung **9** (2.18 g, 2.61 mmol) wird in abs. Dichlormethan-Ethylacetat 10:1 (77 mL) gelöst und mit TiBr<sub>4</sub> (1.9 g, 5.2 mmol) versetzt. Nach 3.5 d wird mit dem fünffachen Volumen Toluol-Acetonitril 25:1 verdünnt und bis zur Entfärbung mit wasserfreiem Natriumacetat gerührt. Es wird filtriert, eingeengt und säulenchromatographisch mit Toluol-Ethylacetat 5:1 gereinigt (D.c.: Toluol-Ethylacetat 2:1); Ausb. 1.05 g (53%),  $[\alpha]_D^{20} + 148^\circ$  (c 1.0, Chloroform); <sup>1</sup>H-N.m.r. (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.11–7.36 (m, 10 H, Ph), 6.70 (d, 1 H,  $J_{1,2}$  3.8 Hz, H-1), 5.94 (dd, 1 H,  $J_{3,4}$  2.8,  $J_{4,5}$  0.8 Hz, H-4), 5.41 (dd, 1 H,  $J_{3',4'}$  3.3,  $J_{4',5'}$  1.0 Hz, H-4'), 5.38 (d, 1 H,  $J_{1',2'}$  3.9 Hz, H-1'), 5.06 (dd, 1 H,  $J_{2',3'}$  10.7 Hz, H-3'), 4.70 (ddd, 1 H,  $J_{5,6a}$  6.8,  $J_{5,6b}$  6.2 Hz, H-5), 4.57 (dd, 1 H,  $J_{6a,6b}$  11.4 Hz, H-6a), 4.42 (dd, 1 H,  $J_{2,3}$  10.5 Hz, H-3), 4.41 (dd, 1 H, H-6b), 4.36 (ddd, 1 H,  $J_{5',6'a}$  4.9,  $J_{5',6'b}$  7.5 Hz, H-5'), 4.16 (dd, 1 H,  $J_{6'a,6'b}$  11.5 Hz, H-6'a), 4.13 (dd, 1 H, H-2), 4.07 (dd, 1 H, H-6'b), 4.01 (dd, 1 H, H-2'), 2.13, 2.08, 1.99 (3 s, 9 H, 3

Ac).

*Anal.* Ber. für  $C_{32}H_{34}BrN_3O_{14}$  (764.6): C, 50.26; H, 4.49; Br, 10.45; N, 5.50. Gef.: C, 50.36; H, 4.73; Br, 10.15; N, 5.38.

*2-Azido-4,6-di-O-benzoyl-2-desoxy-3-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-O-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-galactopyranosylbromid (13).* — Verbindung **10** (688 mg, 0.87 mmol) wird in abs. Dichlormethan–Acetonitril 10:1 (20 mL) gelöst und auf 0° gekühlt. Im  $N_2$ -Gegenstrom werden 2,4,6-Trimethylpyridin (1 mL) und *N,N*-Dimethylbromoforminiumbromid (560 mg, 2.6 mmol) zugegeben. Die rote Lösung wird nach 4 h mit Toluol verdünnt, filtriert, eingedampft und zweimal mit Toluol codestilliert. Die Säulenchromatographie erfolgt mit Toluol–Ethylacetat 7:1; Ausb. 546 mg (73%),  $[\alpha]_D^{20} + 135^\circ$  (*c* 1.0, Chloroform);  $^1H$ -N.m.r. (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.04–7.04 (m, 15 H, Ph), 6.68 (d, 1 H,  $J_{1,2}$  3.8 Hz, H-1), 6.00 (dd, 1 H,  $J_{3,4}$  2.4,  $J_{4,5}$  0.8 Hz, H-4), 5.47–5.44 (m, 2 H, H-1', 4'), 5.29 (dd, 1 H,  $J_{2',3'}$  10.6,  $J_{3',4'}$  3.3 Hz, H-3'), 4.65 (ddd, 1 H,  $J_{5,6a}$  7.0,  $J_{5,6b}$  5.4 Hz, H-5), 4.50 (dd, 1 H,  $J_{6a,6b}$  11.6 Hz, H-6a), 4.48 (d, 1 H,  $J$  12.6 Hz,  $CH_2Ph$ ), 4.44–4.36 (m, 3 H, H-3,6b,5'), 4.31 (d, 1 H,  $CH_2Ph$ ), 4.24 (dd, 1 H,  $J_{2,3}$  10.5 Hz, H-2), 4.12 (dd, 1 H,  $J_{5',6'a}$  7.0,  $J_{6'a,6'b}$  11.6 Hz, H-6'a), 4.07 (dd, 1 H,  $J_{5',6'b}$  5.4 Hz, H-6'b), 3.83 (dd, 1 H,  $J_{1',2'}$  3.6 Hz, H-2'), 2.09, 2.04, 1.79 (3 s, 9 H, 3 Ac).

*Anal.* Ber. für  $C_{39}H_{40}BrN_3O_{14}$  (854.7): C, 54.80; H, 4.73; Br, 9.35; N, 4.92. Gef.: C, 55.11; H, 4.87; Br, 9.33; N, 4.75.

*2-Azido-4,6-di-O-benzoyl-2-desoxy-3-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-O-trichloroacetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-galactopyranosylbromid (14).* — Verbindung **11** (43 mg, 48  $\mu$ mol) wird in abs. Dichlormethan–Ethylacetat 10:1 (2 mL) gelöst, mit  $TiBr_4$  (50 mg, 0.136 mmol) versetzt und 4 h gerührt. Es wird mit Toluol verdünnt, mit wasserfreiem Natriumacetat bis zur Entfärbung kräftig gerührt, filtriert und eingedampft; Ausb. 39 mg (89%),  $[\alpha]_D^{20} + 98^\circ$  (*c* 1.8, Chloroform);  $^1H$ -N.m.r. (270 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.08–7.39 (m, 10 H, Ph), 6.68 (d, 1 H,  $J_{1,2}$  3.8 Hz, H-1), 5.91 (dd, 1 H,  $J_{3,4}$  2.4,  $J_{4,5}$  0.9 Hz, H-4), 5.73 (d, 1 H,  $J_{1',2'}$  3.7, H-1'), 5.66 (dd, 1 H,  $J_{3',4'}$  3.2,  $J_{4',5'}$  1.2 Hz, H-4'), 5.52 (dd, 1 H,  $J_{2',3'}$  10.4 Hz, H-3'), 5.34 (dd, 1 H, H-2'), 4.63 (ddd, 1 H,  $J_{5',6'a}$  6.6,  $J_{5',6'b}$  7.2 Hz, H-5'), 4.55–4.42 (m, 3 H, H-3,5,6a), 4.32 (dd, 1 H,  $J_{5,6b}$  5.9,  $J_{6a,6b}$  11.4 Hz, H-6b), 4.25 (dd, 1 H,  $J_{2,3}$  10.5 Hz, H-2), 4.17 (dd, 1 H,  $J_{6'a,6'b}$  11.6 Hz, H-6'a), 4.14 (dd, 1 H, H-6'b), 2.17, 2.11, 1.91 (3 s, 9 H, 3 Ac).

*Anal.* Ber. für  $C_{34}H_{33}BrCl_3N_3O_{15}$  (910.0): C, 44.87; H, 3.66; Hal, 20.47; N, 4.62. Gef.: C, 44.69; H, 3.62; Hal, 19.89; N, 4.58.

*8-Ethoxycarbonyloctyl-[2-azido-4,6-di-O-benzoyl-2-desoxy-3-O-(3,4,6-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-galactopyranosid] (15).* — 8-Ethoxycarbonyloctanol (251 mg, 1.24 mmol),  $HgBr_2$  (800 mg) und Molsieb (pulv., 4A 1.5 g) werden 1 h im Hochvakuum getrocknet. Nach Zugabe von abs. Dichlormethan (50 mL) und 2 h Rühren wird **12** (948 mg, 1.24 mmol) in abs. Dichlormethan (50 mL) sehr langsam zugetropft (2 h). Nach 40 h wird weiter  $HgBr_2$  (400 mg) hinzugefügt. Nach 62 h ist die Reaktion beendet. Es wird mit Chloroform verdünnt, filtriert, dreimal mit KI-Wasser und mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung über  $MgSO_4$  wird eingedampft und säulenchromatographisch mit Toluol–Ethylacetat 8:1  $\rightarrow$  5:1 gereinigt;

Ausb. 588 mg, (54%),  $[\alpha]_D^{20} + 139^\circ$  (*c* 1.0, Chloroform);  $^1\text{H-N.m.r.}$  (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.15–7.39 (m, 10 H, Ph), 5.84 (dd, 1 H,  $J_{3,4}$  2.8,  $J_{4,5}$  0.8 Hz, H-4), 5.35 (dd, 1 H,  $J_{3',4'}$  3.3,  $J_{4',5'}$  1.2 Hz, H-4'), 5.30 (d, 1 H,  $J_{1',2'}$  3.8 Hz, H-1'), 5.17 (d, 1 H,  $J_{1,2}$  3.6 Hz, H-1), 4.96 (dd, 1 H,  $J_{2',3'}$  10.7 Hz, H-3'), 4.55 (dd, 1 H,  $J_{5,6a}$  6.4,  $J_{6a,6b}$  11.4 Hz, H-6a), 4.43 (ddd, 1 H,  $J_{5,6b}$  5.6 Hz, H-5), 4.39 (dd, 1 H,  $J_{2,3}$  10.8 Hz, H-3), 4.38, 4.31 (m, 2 H, H-6b,5'), 4.17 (dd, 1 H,  $J_{5',6'a}$  6.3,  $J_{6'a,6'b}$  11.2 Hz, H-6'a), 4.13 (q, 2 H, Spacer), 4.03 (dd, 1 H,  $J_{5',6'b}$  6.8 Hz, H-6'b), 3.97 (dd, 1 H, H-2'), 3.76, 3.58 (2 dt, 2 H, Spacer), 3.57 (dd, 1 H, H-2), 2.28 (t, 2 H, Spacer), 2.12, 2.04, 2.02 (3 s, 9 H, 3 Ac), 1.61, 1.29, 1.26 (m, 15 H, Spacer).

*Anal.* Ber. für  $\text{C}_{43}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_{17}$  (886.0): C, 58.29; H, 6.27; N, 4.74. Gef.: C, 58.02; H, 6.06; N, 4.74.

*8-Ethoxycarbonyloctyl-[2-acetamido-4,6-di-O-benzoyl-2-desoxy-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)- $\alpha$ -D-galactopyranosid]* (**16**). — Verbindung **15** wird (904 mg, 1.02 mmol) in Pyridin–Wasser 3:1 (60 mL) gelöst und auf  $0^\circ$  gekühlt. Man leitet 3 h einen  $\text{H}_2\text{S}$ -Strom durch die Lösung, erwärmt auf Raumtemp. und läßt 24 h stehen (D.c.: Toluol–Ethylacetat 1:1). Es wird dreimal mit Toluol codestilliert und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wird in abs. Pyridin–Acetanhydrid 2:1 (45 mL) aufgenommen und 2 h gerührt. Der Ansatz wird durch Codestillation mit Toluol getrocknet, in Dichlormethan aufgenommen, mit Wasser gewaschen und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Die Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie, wobei schwefelhaltige Nebenprodukte zuerst mit Toluol ausgewaschen werden. Anschließend wird mit Toluol–Ethylacetat 2:1 eluiert; Ausb. 805 mg (84%),  $[\alpha]_D^{20} + 78^\circ$  (*c* 1.2, Chloroform);  $^1\text{H-N.m.r.}$  [400 MHz, ( $^2\text{H}_6$ )Benzol]:  $\delta$  8.27–6.94 (m, 10 H, Ph), 6.08 (d, 1 H,  $J_{2,\text{NH}}$  9.9 Hz, NH), 5.81 (dd, 1 H,  $J_{3',4'}$  3.0,  $J_{4',5'}$  1.0 Hz, H-4'), 5.75 (dd, 1 H,  $J_{1',2'}$  3.4,  $J_{2',3'}$  11.0 Hz, H-2'), 5.74 (dd, 1 H,  $J_{3,4}$  3.0,  $J_{4,5}$  0.8 Hz, H-4), 5.60 (d, 1 H, H-1'), 5.56 (dd, 1 H, H-3'), 5.40 (ddd, 1 H,  $J_{1,2}$  3.6,  $J_{2,3}$  11.0 Hz, H-2), 4.98 (d, 1 H, H-1), 4.74 (ddd, 1 H,  $J_{5',6'a}$  6.8,  $J_{5',6'b}$  6.8 Hz, H-5'), 4.52 (dd, 1 H,  $J_{5,6a}$  7.2,  $J_{6a,6b}$  11.4 Hz, H-6a), 4.41 (dd, 1 H,  $J_{5,6b}$  5.0 Hz, H-6b), 4.31 (dd, 1 H,  $J_{6'a,6'b}$  11.3 Hz, H-6'a), 4.18 (dd, 1 H, H-3), 4.13 (ddd, 1 H, H-5), 4.00 (dd, 1 H, H-6'b), 4.00, 3.53, 3.20, 2.16 (6 H, Spacer), 2.06, 1.67, 1.63, 1.61, 1.47 (5 s, 15 H, 5 Ac), 1.18, 1.04, 1.00 (15 H, Spacer).

*Anal.* Ber. für  $\text{C}_{47}\text{H}_{61}\text{NO}_{19}$  (944.1): C, 59.79; H, 6.53; N, 1.48. Gef.: C, 59.64; H, 6.52; N, 1.49.

*8-Methoxycarbonyloctyl-2-acetamido-2-desoxy-3-O- $\alpha$ -D-galactopyranosyl- $\alpha$ -D-galactopyranosid* (**17**). — Verbindung **16** (718 mg, 0.76 mmol) wird in abs. Methanol (50 mL) gelöst und bei  $0^\circ$  mit Natriummethoxid-Lösung bis pH 10 versetzt. Nach 2 d wird mit Ionenaustauscher Amberlite IR-120 ( $\text{H}^+$ ) neutralisiert, filtriert und eingedampft. Anschließende Gelfiltration über Sephadex G-10 mit Wasser zur Abtrennung niedermolekularer Verunreinigungen und Gefriertrocknung ergibt das Hapten (D.c.: Chloroform–Methanol–Wasser 5:4:1); Ausb. 385 mg (91%),  $[\alpha]_D^{20} + 160^\circ$  (*c* 0.8, Methanol);  $^1\text{H-N.m.r.}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  4.98 (d, 1 H,  $J_{1',2'}$  3.8 Hz, H-1'), 4.73 (d, 1 H,  $J_{1,2}$  3.8 Hz, H-1), 4.21 (dd, 1 H,  $J_{2,3}$  11.0 Hz, H-2), 4.07 (dd, 1 H,  $J_{3,4}$  2.8,  $J_{4,5}$  0.8 Hz, H-4), 3.86 (dd, 1 H, H-3), 3.82 (dd, 1 H,  $J_{3',4'}$  3.4,  $J_{4',5'}$  0.8

Hz, H-4'), 3.79 (ddd, 1 H, H-5), 3.71 (ddd, 1 H, H-5'), 3.66 (dd, 1 H,  $J_{2',3'}$  10.4 Hz, H-2'), 3.53, 3.35, 2.23 (6 H, Spacer), 1.90 (s, 3 H, Ac), 1.44, 1.15 (12 H, Spacer).

*Anal.* Ber. für  $C_{24}H_{43}NO_{13}$  (553.7): C, 52.06; H, 7.84; N, 2.53. Gef.: C, 50.54; H, 7.53; N, 2.43.

*Darstellung des Antigens (20).* — Zur Synthese des Hydrazids **18** wird **17** (27 mg, 48  $\mu$ L) in Ethanol (1.5 mL) und Hydrazinhydrat (80%, 0.25 mL) gelöst und 20 h bei Raumtemp. gerührt. Es wird eingedampft (D.c.: Ethylacetat-Methanol-Wasser 6:3:1); Ausb. 25 mg (93%). Das Produkt wird ohne weitere Reinigung zum Azid **19** umgesetzt. Verbindung **18** (25 mg, 45  $\mu$ mmol) wird unter  $N_2$  in frisch destilliertem abs. *N,N*-Dimethylformamid (680  $\mu$ L) gelöst und auf  $-40^\circ$  gekühlt. Man gibt 0.46m  $N_2O_4$  in Dichlormethan (128  $\mu$ L, 58  $\mu$ mol) hinzu. In 15 min. wird auf  $-10^\circ$  erwärmt und in eine Lösung von Rinderserumalbumin (63 mg, 0.97  $\mu$ mol) in Pufferlösung (0.35M  $KHCO_3$ , 0.08M  $Na_2B_4O_7$ , pH 9.2; 6.3 mL) bei  $0^\circ$  gegeben. Nach 18 h wird bei maximal  $30^\circ$  eingedampft und an der Quecksilberdiffusionspumpe getrocknet. Das *N,N*-Dimethylformamid muß vollständig entfernt werden. Das Antigen **20** wird durch fünfmalige Dialyse mit Wasser (40 mL) gegen eine PM-10-Membran in einer Amicon-Ultrafiltrationszelle und Gefriertrocknung isoliert; Ausb. 67 mg. Der Belegungsgrad beträgt 14% der  $\epsilon$ - $NH_2$ -Gruppen von BSA.

*Kupplung von 17 an Aminosepharose zu 21.* — Eine Lösung des wie bei **20** beschrieben dargestellten Azids **19** wird bei  $0^\circ$  zu AH-Sepharose 4B (Pharmacia, 4.03 g) in Pufferlösung (0.08M  $Na_2B_4O_7$ , 0.35M  $KHCO_3$ ; 25 mL) gegeben. Nach 20 h bei der angegebenen Temp. wird die gesamte Mischung in eine Säule gegeben. Das Gel wird mit Wasser (100 mL) und physiologischer Kochsalzlösung (0.9% 30 mL), die Natriumazid (0.02%) enthält, gewaschen und bei  $0^\circ$  in gequollenem Zustand aufbewahrt. In der wäßrigen Phase ist kein Edukt nachweisbar; Belegungsgrad 4.3  $\mu$ mol Disaccharideinheiten pro g Sepharose.

#### DANK

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der chemischen Industrie sind wir für die Unterstützung der Untersuchungen dankbar.

#### LITERATUR

- 1 H. PAULSEN UND J. P. LORENTZEN, *Justus Liebig's Ann. Chem.*, (1987) 431-437.
- 2 J. MONTREUIL, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 37 (1980) 157-223.
- 3 J. FINNE, *Biochim. Biophys. Acta*, 412 (1975) 317-325.
- 4 J. FINNE UND T. KRUSIUS, *FEBS Lett.*, 66 (1976) 94-97.
- 5 A. LEPPÄNEN, A. KORVUO, K. PURO UND O. RENKONEN, *Carbohydr. Res.*, 153 (1986) 87-95.
- 6 R. U. LEMIEUX, D. A. BAKER UND D. R. BUNDLE, *Can. J. Biochem.*, 55 (1977) 507-512.
- 7 H. PAULSEN, *Angew. Chem.*, 94 (1982) 184-201.
- 8 H. PAULSEN UND O. LOCKHOFF, *Chem. Ber.*, 114 (1979), 3079-3101.
- 9 B. HELFERICH, W. M. MÜLLER UND S. KARBACH, *Justus Liebig's Ann. Chem.*, (1974) 1514-1521.
- 10 H. PAULSEN UND M. PAAL, *Carbohydr. Res.*, 135 (1984) 53-69.
- 11 T. ADACHI, Y. YAMADA UND J. INOUE, *Synthesis*, (1977) 45-46.

- 12 H. PAULSEN UND M. PAAL, *Carbohydr. Res.*, 135 (1984) 71-84.
- 13 H. PAULSEN, A. RICHTER, V. SINNWELL UND W. STENZEL, *Carbohydr. Res.*, 64 (1978) 339-364.
- 14 J. J. OLTVOORT, C. A. A. VAN BOECKEL, J. H. DE KONING UND J. H. VAN BOOM, *Synthesis* (1981) 305-308.
- 15 R. GIGG UND C. D. WARREN, *J. Chem. Soc., C*, (1968) 1903-1911.
- 16 T. IVERSEN UND D. R. BUNDLE, *Carbohydr. Res.*, 103 (1982) 29-40.
- 17 R. U. LEMIEUX, D. R. BUNDLE UND D. A. BAKER, *J. Am. Chem. Soc.*, 97 (1975) 4076-4083.
- 18 G. ZEMPLÉN UND E. PASCU, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 62 (1929) 1613-1614.
- 19 B. M. PINTO UND D. R. BUNDLE, *Carbohydr. Res.*, 124 (1983) 313-318.