

An Vitamin-A-acetat-Isomeren konnte gezeigt werden, daß selbst unter chromatographisch ungünstigen Bedingungen wie hohe Konzentration^[19] und langsame Fließgeschwindigkeit sich innerhalb kurzer Zeit selbst coeluiierende Substanzen eindeutig charakterisieren lassen. Hiermit wird der große Vorteil der direkten HPLC-NMR-Kopplung erkennbar: Durch die Einführung einer zweiten Dimension, der ¹H-NMR-Frequenzen (Verschiebungen und Kopplungen), ist auch bei überlappenden HPLC-Peaks der herkömmlichen UV-Registrierung eine sichere und eindeutige Strukturzuordnung möglich.

Experimentelles

Zur Trennung der Vitamin-A-acetat-Isomere wurden zwei analytische Nucleosil-5-CN-Säulen in Serie geschaltet. Die ursprüngliche Trennung [20] erfolgte mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL min⁻¹. Aus Sicht der NMR-Spektroskopie ist jedoch eine niedrigere Fließgeschwindigkeit vorteilhaft: Durch die Erniedrigung der Fließgeschwindigkeit können entweder mehr Transienten bei gegebenem Probenvolumen akkumuliert werden, was zu einer Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses (S/N) führt, oder es können bei gleichem S/N und bei gleichbleibender Zahl von Transienten mehr Spektren pro Peak-Elutionsvolumen aufgenommen werden. Solche erniedrigten Fließgeschwindigkeiten liegen jedoch unter den Werten, die nach der van-Deemter-Gleichung optimal wären. Daher wurde als praktikabler Kompromiß die normale Fließgeschwindigkeit von 1 mL min⁻¹ zunächst beibehalten und erst kurz vor Erscheinen der Peaks im UV-Detektor die für die NMR-Detektion günstigere Flußrate von 0.2 mL min⁻¹ gewählt, die wiederum zu einer Verlängerung der Retentionszeiten führte.

Für länger dauernde NMR-Messungen (wie Stopped-flow-Experimente zur Aufnahme von homonuclear oder invers korrelierten Spektren) wird zur Feldfrequenzstabilisierung ein Deuteriumsignal empfohlen, welches normalerweise vom deuterierten Lösungsmittel stammt. Aus Kostengründen ist es aber nicht möglich, den Eluenten in seiner deuterierten Form zuzumischen, um ein ausreichend intensives Deuteriumsignal zu erhalten. Es wurde daher [D₆]Benzol zugesetzt, da es einerseits die herrschenden Chromatographiebedingungen nur unwesentlich verändert, bei einer detektierten Wellenlänge von 325 nm die Absorption des olefinischen Systems nicht beeinträchtigt und andererseits auch bei Konzentrationen von nur 1% ein ausreichendes Locksignal liefert.

Chromatographie-Parameter:

Pumpe: Bruker LC 22; zwei Säulen: Macherey-Nagel; 250 × 4,6 mm, Nucleosil 5CN, 5 µm, Laufmittel: *n*-Heptan (getrocknet über Molsieb 0.3 nm); Fließgeschwindigkeit: 20 min lang 1.0 mL min⁻¹ (130 bar), dann 0.2 mL min⁻¹ (30 bar); UV-Detektor: Hewlett Packard 1050, Meßwellenlänge 325 nm. Zur Trennung wurden 5 mg Vitamin-A-acetat-Isomerenmischung, gelöst in 50 µL *n*-Heptan (zehnproz. Lösung) chromatographiert.

NMR-Parameter:

Bruker-ARX-400-Spektrometer, 120-µL-Durchflußprobenkopf mit HF-Spulenordnung für Inverse-¹³C/¹H-Spektroskopie; 48 Transienten pro FID; 8-K-Datenpunkte (TD2) mit Spektralbreite (SW2) = 5618 Hz, Akquisitionszeit (AQ) = 0.73 s pro Transient, Pulswinkel 90° und Lösungsmittelvorsättigung für 0.5 s (abwechselnde Einstrahlung auf den Heptansignalen bei δ = 0.82 und 1.22 für jeweils 5 ms); 128 FIDs (TD1) mit einer Aufnahmezeit pro FID von 60 s wurden während der Trennung aufgenommen.

Die Daten wurden wie eine 2D-NMR-Matrix (*t*₁-Richtung = Retentionszeit) behandelt und mit der UXNMR-Software [21] verarbeitet; eine phasenempfindliche Fourier-Transformation wurde nur in der *t*₂-Richtung durchgeführt: Zero-filling in *t*₂ auf 32-K-Datenpunkte; Multiplikation mit einer Sinusquadrat-Apodisierungsfunktion.

Eingegangen am 6. Dezember 1994 [Z 7525]

Stichworte: Chromatographie · HPLC-¹H-NMR-Kopplung · NMR-Spektroskopie · Vitamin A

- [11] K. Albert, E. Bayer, *TrAC Trends Anal. Chem. (Pers. Ed.)* **1988**, 7, 288–293.
- [12] K. Albert, Habilitationsschrift, Universität Tübingen, **1988**.
- [13] K. Albert, E. Bayer in *HPLC Detection Newer Methods* (Hrsg.: G. Patonay), VCH, New York, **1992**, S. 197.
- [14] M. Spraul, M. Hofmann, P. Dvortsak, J. K. Nicholson, I. D. Wilson, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 327–330.
- [15] J. K. Roberts, R. J. Smith, *J. Chromatogr. A* **1994**, 667, 385–389.
- [16] W. Vetter, G. Englert, N. Rigassi, U. Schwietel in *Carotenoids* (Hrsg.: O. Isler), Birkhäuser, Basel, **1971**, S. 218–225.
- [17] R. W. Curley, W. Fowble, *Magn. Res. Chem.* **1989**, 27, 707–709.
- [18] WIN-DAISY, Bruker Analytische Meßtechnik GmbH.
- [19] Eine Trennung und Strukturzuordnung gelingt selbst bei Konzentrationen, bei denen keine Detektion durch UV-Spektroskopie mehr möglich ist. Eine Bestimmung des Detektionslimits im Stopped-flow-Meßverfahren, durchgeführt am all-*trans*-Vitamin-A-acetat, ergibt für das Dublett von H15 bei δ = 4.8 bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von 4:1 eine detektierbare Substanzkonzentration von 1.2 µg Substanz im Probenkopf. Es wurden Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen direkt in die Durchflußzelle eingebracht und jeweils 512 Transienten akkumuliert. Zur Unterdrückung der Heptansignale wurde die zuvor beschriebene Vorsättigungssequenz gewählt. Die Spektren wurden ohne Filterfunktion prozessiert.
- [20] H. Steuerle, *J. Chromatogr.* **1981**, 206, 319–326.
- [21] UXNMR, Bruker Analytische Meßtechnik GmbH.

Synthese eines RGD-Sialyl-Lewis^x-Glykokonjugats: ein neuer, hochwirksamer Ligand für P-Selektin

Ulrich Sprengard, Gerhard Kretzschmar*, Eckart Bartnik, Christoph Hüls und Horst Kunz*

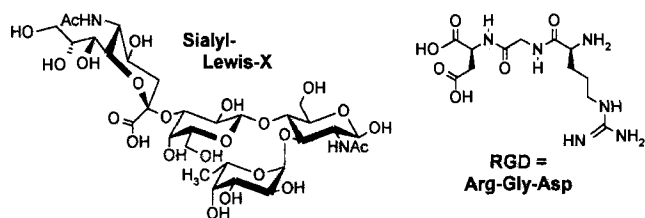
Professor Richard R. Schmidt zum 60. Geburtstag gewidmet

Die Zirkulation von Blutzellen wie den Leukozyten, Neutrophilen, Granulozyten und Monozyten ist auf molekularer Ebene ein vielstufiger, komplexer Prozeß, der nur in Teilschritten bekannt ist^[1]. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, daß die in der Immunüberwachung entscheidende Zirkulation der Lymphozyten sowie die Lokalisation der Neutrophilen und Monozyten an Entzündungsherden nach sehr ähnlichen molekularen Mechanismen ablaufen. So kommt es bei akuten und chronischen Entzündungsprozessen zur Adhäsion der Leukozyten an Endothelzellen und zur Auswanderung in den Entzündungsherd oder in die sekundären lymphatischen Organe.

An diesen Vorgängen sind zahlreiche, spezifische Signalmoleküle wie Interleukine, Leukotriene, der Tumornekrosefaktor (TNF-α) und insbesondere gewebespezifische Zelladhäsionsmoleküle beteiligt, die von Rezeptoren erkannt werden. Zu den wichtigsten Adhäsionsmolekülen neben Integrinen und Glycoproteinen der Immunglobulin-Superfamilie gehören die Selektine (E-, P- und L-Selektin)^[2], die in den Anfangsphasen der Leukozytenadhäsion eine entscheidende Rolle spielen. Es ist heute allgemein anerkannt, daß das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis^x^[3], das als Teilstruktur von Glycosphingolipiden und Glycoproteinen auf Zellmembranen vorkommt, in Zellkultur-Assays als schwach affiner Ligand aller drei Selektine fungieren kann^[4].

[*] Dr. G. Kretzschmar, Dipl.-Chem. U. Sprengard
Zentralforschung der Hoechst AG
D-65926 Frankfurt am Main
Telefax: Int. + 69/33 13 20
Prof. Dr. H. Kunz, Dipl.-Chem. U. Sprengard
Institut für Organische Chemie der Universität
D-55099 Mainz
Telefax: Int. + 6131/39-47 86
Dr. E. Bartnik, Dr. C. Hüls
Werk Kalle-Albert der Hoechst AG

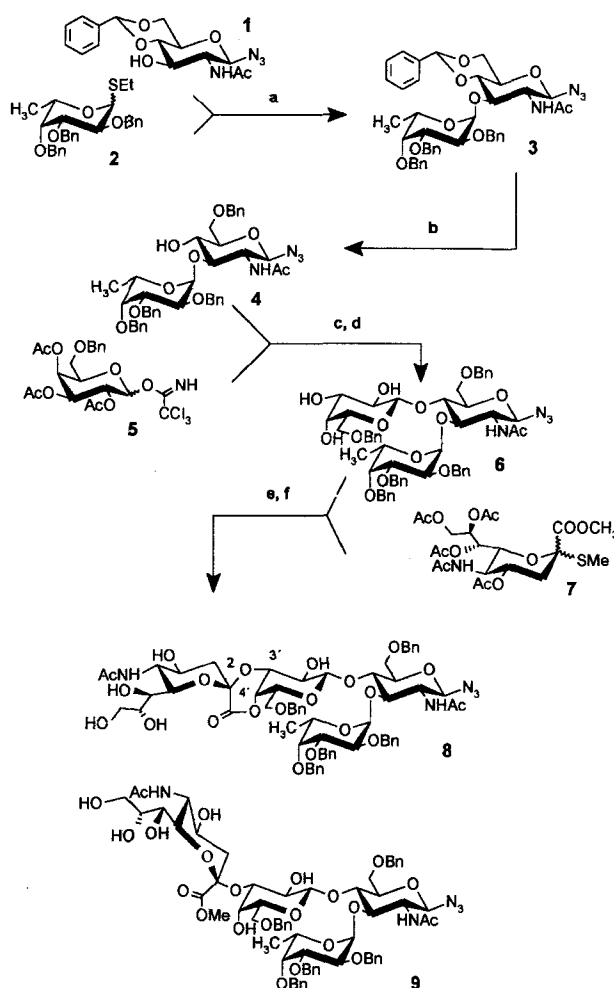
- [1] B. Stancher, F. Zonta, *J. Chromatogr.* **1982**, 238, 217–225.
- [2] M. E. Cullum, M. H. Zile, *Anal. Biochem.* **1986**, 153, 23–32.
- [3] M. Hiramatsu, L. Packer, *Methods Enzymol.* **1990**, 190, 273–280.
- [4] R. Lotan, D. Lotan, P. G. Sacks, *Methods Enzymol.* **1990**, 190, 100–110.
- [5] B. Stancher, F. Zonta, *J. Chromatogr.* **1982**, 234, 244–248.
- [6] J. Deli, Z. Matus, P. Molnár, G. Tóth, *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 952.
- [7] L. C. Sander, K. E. Sharpless, N. E. Craft, S. A. Wise, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1667–1674.
- [8] F. Derguini, K. Nakanishi, J. Buck, U. Hämmerling, F. Grün, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 1954–1956; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1837–1839.
- [9] H. C. Dorn, *Anal. Chem.* **1984**, 56, 747A–758A.
- [10] D. A. Laude, Jr., C. L. Wilkins, *TrAC Trends Anal. Chem. (Pers. Ed.)* **1986**, 5, 230–235.



Das Tripeptid Arg-Gly-Asp (RGD) entspricht der Minimalsequenz der an den Integrinrezeptor GpIIb/IIIa bindenden α -Kette von Fibrinogen sowie zahlreicher anderer Adhäsionsmoleküle und dient vielfach als Leitstruktur für antiadhäsive Peptidmimetika^[5]. Mit hoher Affinität an Selektine bindende Peptid- oder Glycomimetica sind dagegen noch unbekannt. Wir beschreiben hier die Synthese des Adhäsions-Hybrids **14**, das die Strukturelemente des RGD-Motivs mit denen des Sialyl-Lewis^x-Liganden vereint und im Zell-Assay ein hochwirksamer Ligand für P-Selektin ist.

Bei der Synthese von **14** wird mit einem abgestimmten Schutzgruppenkonzept zuerst im Multigramm-Maßstab ein partiell blockierter Sialyl-Lewis^x-Baustein hergestellt, der schließlich mit dem vorgefertigten Peptid umgesetzt wird^[6]: a) In der Saccharidsynthese fungiert die Azidofunktion als anomere Schutzgruppe des Glucosamin-Bausteins. Sie läßt sich selektiv zum β -Glycosylamin reduzieren. b) Die Kondensation von nur partiell O-geschützten Oligosaccharidaminen mit C-terminal deblockierten Peptiden ermöglicht eine effiziente Synthese der Konjugate, wobei die anomere Aminogruppe in Gegenwart freier OH-Funktionen nach modernen Kupplungsmethoden der Peptidchemie selektiv acyliert werden soll. c) Das Lacton der Neuraminsäure **8** wird zur Maskierung der Carboxyfunktion als interne Schutzgruppe genutzt, was die Blockierung als Methylester überflüssig macht. d) Das abgestimmte Schutzgruppenkonzept ermöglicht die schonende terminale Deblockierung des Glycopeptids durch katalytische Hydrierung.

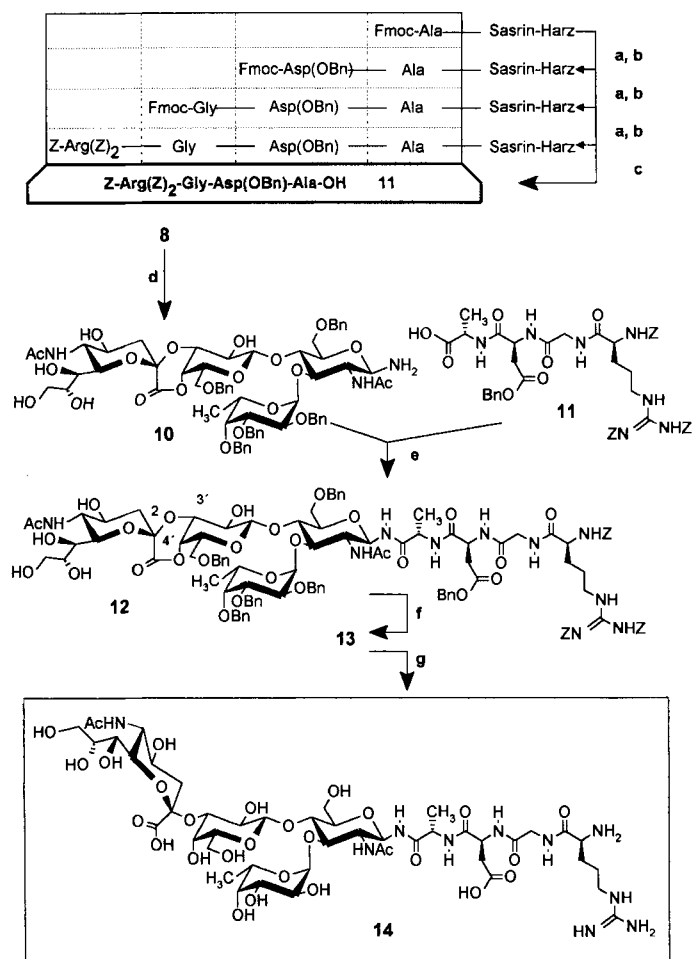
Die Glycosylierung des 4,6-(Benzyliden)-geschützten *N*-Acetylglucosaminylazids **1**^[7,8] mit dem perbenzylierten Thiofucosid **2** und Tetrabutylammoniumbromid/Kupfer(II)-bromid^[9] führt in 92% Ausbeute stereoselektiv zum α -Glycosid **3** (Schema 1). Die regioselektive Öffnung des Benzylidenacetal-Rings gelingt mit Natriumcyanborhydrid/HCl^[10], wobei die Ausbeute von 81% wegen der Säurelabilität der Fucose nur bei titrimetrischer Zugabe von HCl in Ether erreicht wird. Die Kupplung des Disaccharids **4** an der reaktionsträgen, sterisch abgeschirmten 4-OH-Funktion mit dem Galactosyltrichloracetimidat **5**^[11] führt nach Zemplen-Verseifung in 44% Ausbeute zum β -Glycosid **6**. Wegen der Acetamidgruppe ist eine größere Menge an Lewis-Säure nötig, was Nebenreaktionen begünstigt. Das Trisaccharid **6** läßt sich alternativ aus **4** und Methylthiogalactosid unter der Einwirkung von *N*-Iodosuccinimid (NIS)/Trifluormethansulfonsäure (TfOH) in 16% Ausbeute herstellen. Nach der Desacetylierung kann das Lewis^x-Trisaccharid **6** an der Galactoseeinheit derivatisiert werden. Die Sialylierung gelingt mit dem Methylthioglycosid der Neuraminsäure **7**^[12] (1.8 Äquiv.) bei -40°C in Dichlormethan/Acetonitril in Gegenwart von Methylsulfenylbromid (MSB)/Silbertrifluormethansulfonat als Promotor^[13,14]. Die Sialylierungsprodukte können unter Zurückgewinnung des nicht umgesetzten Trisaccharids nach der Desacetylierung der Rohprodukte im Multigramm-Maßstab chromatographisch getrennt werden. Dabei wird durch intramolekulare Umesterung das 1-4'-Lacton des partiell deblockierten Sialyl-Lewis^x **8** gebildet und in 42% Ausbeute (bezogen auf **6**) als Hauptprodukt isoliert^[15]. Das 1-2'-Lacton und der Methylester **9** des Tetrasaccharids lassen sich nur in Spuren



Schema 1. a) **2** (1.4 Äquiv.), $\text{Bu}_4\text{NBr}/\text{CuBr}_2$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (1:1), Molekularsieb 3 Å, **3**: 92%; b) NaCNBH_3 , $\text{HCl}/\text{Et}_2\text{O}$, Molekularsieb 4 Å, **4**: 81%; c), d) **5** (1.5 Äquiv.), TMSOTf (0.15 Äquiv.), CH_2Cl_2 ; NaOCH_3 in MeOH, Amberlite IR 120, **6**: 44%; e), f) MSB/AgOTf, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$ (5:1), Molekularsieb 3 Å, -40°C ; NaOCH_3 in MeOH, Amberlite H⁺ IR 120, **8**: 42% bezogen auf **6**.

nachweisen^[16]. Das Lacton bleibt gleichzeitig als interne Schutzgruppe zur Maskierung der Carboxyfunktion während der nachfolgenden Synthese des Saccharid-Peptid-Konjugats erhalten. Es läßt sich unter milden Bedingungen hydrolysieren, was das Risiko der Racemisierung bei der abschließenden Deblockierung reduziert^[14,17,18]. Die Hydrierung des anomeren Azids über neutral gewaschenen Raney-Nickel in Isopropylalkohol/Wasser (9:1) ergibt den entsprechenden Sialyl-Lewis^x-Aminbaustein **10**^[19] (Schema 2). Alternative Verfahren, nach denen aus dem anomer ungeschützten Oligosaccharid das Glycosylamin generiert wird, führen häufig zu salzhaltigen Produkten^[20].

Als zweiter Synthesebaustein wird das RGDA-Peptid in Form des C-terminal deblockierten Z-Arg(Z₂)-Gly-Asp(OBn)-Ala-OH **11** mit der Fmoc-Festphasenstrategie^[22] an säurelabilem Sasrin-Harz hergestellt^[22] (Schema 2). Die Fragmentkondensation des Sialyl-Lewis^x-Aminbausteins **10** mit dem RGDA-Peptid **11** führt unter dem Einfluß von TBTU/HOBT/DIPEA^[23] in 65% Ausbeute zum *N*-Glycosyl-RGDA-Konjugat **12**^[24]. Dieses Verfahren eröffnet den Zugang zu komplexen Saccharid-Peptid-Konjugaten, wobei sich für Sialinsäure-Derivate das 4'-Lacton als stabile interne Schutzgruppe bewährt. Nach hydrogenolytischer Spaltung der Benzylethergruppen über Pd/C zum 4'-Lacton **13**^[25] folgt schließlich Lac-



Schema 2. a) 20% Piperidin in DMF; b) 3 Äquiv. Aminosäure, TBTU/HOBT/DIPEA (jeweils 3 Äquiv.), DMF; c) 1% TFA in CH_2Cl_2 , Ausbeute nach Abspaltung vom Sasrin-Harz und Reinigung: 49%; d) Raney-Nickel (neutral gewaschen), 2-Propanol (10% H_2O), 1 h, 95%; e) **11** (1.25 Äquiv.), TBTU/HOBT/DIPEA (3:1.25:0.25 Äquiv.), DMF, **12**: 65%; f) H_2 , Pd-Aktivkohle, Methanol/Dioxan/Essigsäure (2:1:1); g) NaOH in Methanol/Wasser pH 10, Amberlite H⁺ IR 120, **14**: 66%.

tonöffnung durch schonende Verseifung mit Natronlauge. Das Sialyl-Lewis^x-RGDA-Glycopeptid **14** wurde mit Gel-permeationschromatographie an Biogel P2 gereinigt und durch NMR- sowie FAB-Massenspektren charakterisiert^[26].

In einem Zelladhäsionstest, bei dem die kompetitive Bindung von **14** an rekombinante, humane P-Selektin-Immunglobulin-Fusionsproteine (P-Selektin-IgG^[27]) gegenüber Tumorzellen (HL 60) gemessen wird, erweist sich **14** mit einem $\text{IC}_{50} = 26 \mu\text{M}$ als der bisher wirksamste, synthetische Ligand in diesem Testsystem^[28]. Für die Bindung von Kohlenhydrat-Liganden an Selektine werden in der Literatur drei alternative Erkennungsmodelle diskutiert^[21]. Im Kohlenhydraterkennungs-Modell (carbohydrate recognition model) werden diskrete Saccharidstrukturen als Erkennungsregion angenommen. Das Cluster-Modell nimmt polyvalente Kohlenhydratcluster als Liganden an, die mit größerer Avidität an benachbarte Selektine binden. Bei Glycoproteinliganden kann das bindende Epitop aus einem Kohlenhydrat- und einem Proteinanteil bestehen, was im Kohlenhydrat-Protein-Erkennungs-Modell berücksichtigt wird. Der im submillimolaren Bereich beobachtete IC_{50} -Wert für **14** bezüglich P-Selektin legt die Beteiligung des N-glycosidisch verknüpften Peptids bei der Bindung von Sialyl-Lewis^x an P-Selektin nahe. Die Untersuchung weiterer Varianten von Glycopeptid-Ligan-

den sollte zu noch wirksameren und selektiveren Inhibitoren der Leukozytenadhäsion führen.

Eingegangen am 12. Januar 1995 [Z 7630]

Stichworte: Biochemie · Glycopeptide · Selektine · Sialyl-Lewis-X

- [1] T. A. Springer, *Cell* **1994**, 76, 301–314.
- [2] R. B. Parekh, C. J. Edge, *Tibtech* **1994**, 339–345.
- [3] Synthesen von Sialyl-Lewis^x: a) A. Kameyama, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *Carbohydr. Res.* **1991**, 209, C1–C4; b) K. C. Nicolaou, C. W. Hummel, N. J. Bockovich, C.-H. Wong, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 870–872; c) S. J. Danishefsky, J. Gervay, J. M. Peterson, F. E. McDonald, K. Koseki, T. Oriyama, D. A. Griffith, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8329–8331; d) A. Hasegawa, T. Ando, A. Kameyama, M. Kiso, *J. Carbohydr. Chem.* **1992**, 11, 645–658; e) A. Hasegawa, K. Fushimi, H. Ishida, M. Kiso, *ibid.* **1993**, 12, 1203–1216.
- [4] A. Giannis, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 188–191; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 188–191.
- [5] J. Gante, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 1780–1802; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1699–1720.
- [6] Die Verbindung **8** wurde im Maßstab von 13 g als stabile, lagerbare Substanz hergestellt.
- [7] H. Kunz, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 1763–1765; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 1697–1699.
- [8] C. Unverzagt, H. Kunz, *J. Prakt. Chem.* **1992**, 334, 570–578.
- [9] S. Sato, M. Mori, Y. Ito, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1986**, 155, C6–C10.
- [10] a) H. Ohle, H. Hultberg, S. Wallin, *Carbohydr. Res.* **1982**, 108, 97; b) R. Johansson, B. Samuelsson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1984**, 2371–2074; c) P. J. Garreg, H. Hultberg, S. Wallin, *Carbohydr. Res.* **1982**, 108, 97–101.
- [11] R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem.* **1980**, 92, 763–764; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, 19, 731–732.
- [12] A. Hasegawa, H. Ohki, T. Nagahama, H. Ishida, M. Kiso, *Carbohydr. Res.* **1991**, 212, 277–281.
- [13] Dabei wird nach F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1988**, 177, C13–C17, aus MSB/AgOTf in situ Methylensulfenyltriflat (MST) gebildet, das die Thioglycoside aktiviert.
- [14] W. Stahl, U. Sprengard, G. Kretschmar, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 2186–2188; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 2096–2098.
- [15] **8**: ¹H-NMR (300 MHz, CD_3OD): $\delta = 1.06$ (d, $J_{6,5} = 6.64$ Hz, 3H, 6-H^{Fuc}), 1.78 (dd, $J_{3ax,3aq} = 13.05$, $J_{3ax,4} = 11.22$ Hz, 1H, 3-H^{NeuNAc}), 1.94, 2.00 (s, 6H, NHAc), 2.49 (dd, $J_{3aq,3ax} = 13.05$, $J_{3aq,4} = 5.49$ Hz, 1H, 3-H^{NeuNAc}), 3.32 (dd, 1H, 2-H^{Gal}), 4.02 (dd, 1H, 3-H^{Gal}), 4.37 (m, 2H, 4-H^{NeuNAc}), 4.68 (d, $J_{1,2} = 12.36$ Hz, 1H, 1-H^{Gal}), 5.28 (d, $J_{1,2} = 3.66$ Hz, 1H, 1-H^{Fuc}), 5.32 (dd, $J = 4.17$ Hz, 1H, 4-H^{Gal}); ¹³C-NMR (75.4 MHz, CD_3OD): $\delta = 17.12$ (6-C^{Fuc}), 22.89, 23.55 (NHAc), 42.19 (3-C^{NeuNAc}), 90.51 (1-C^{GluNAc}), 97.59 (2-C^{NeuNAc}), 98.29 (1-C^{Fuc}), 102.67 (1-C^{Gal}).
- [16] Der Methylester **9** und das 2'-Lacton konnten durch FAB-Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden.
- [17] Die Verseifung des 4'-Lactons erfolgt nach Zugabe von Natronlauge innerhalb weniger Minuten bei pH 10.
- [18] Zur Synthese des antigenen Glycopeptids der humanen M-Blutgruppe setzten Ogawa et al. ebenfalls ein geschütztes 4'-Lacton ein: Y. Nakahara, H. Iijima, T. Ogawa, *Tetrahedron* **1994**, 35, 3321–3324.
- [19] H. Kunz, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 1763–1765; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 1697–1699.
- [20] L. Likhoshortov, O. Novikova, V. Derevitskaja, N. Kochtekov, *Carbohydr. Res.* **1986**, 146, C1–C5; S. Y. C. Wong, G. R. Guile, T. W. Rademacher, R. A. Dwek, *Glycoconjugate J.* **1993**, 10, 227–234.
- [21] Die Kupplung der geschützten Aminosäurederivate (Z-Arg(Z₂)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asp(Bn)-OH, Fmoc-Ala-OH, 3 Äquiv.) wird in DMF unter dem Einfluß von TBTU, HOBT, DIPEA [23] (jeweils 3 Äquiv.) durchgeführt. Die Deblockierung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt mit Piperidin (20% in DMF). Eine schonende Abspaltung des partiell geschützten Peptids gelingt mit 1% TFA in Dichlormethan.
- [22] M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4005–4008.
- [23] HOBT = 1-Hydroxybenzotriazol; TBTU = O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-Tetrafluoroborat; DIPEA = N-Ethyl-diisopropylamin; TSTU = O-(N-Succinimidyl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-Tetrafluoroborat.
- [24] Die Verwendung von TSTU/DIPEA führte bei langsamer Reaktion zu unbefriedigenden Ausbeuten.
- [25] **13**: ¹H-NMR (300 MHz, D_2O): $\delta = 1.11$ (d, $J_{6,5} = 6.9$ Hz, 3H, 6-H^{Fuc}), 1.37 (d, $J_{6,5} = 7.2$ Hz, 3H, β -H^{Ala}), 1.69 (m, 1H, γ -H^{Arg}), 1.79 (m, 1H, β -H^{Arg}), 1.82 (dd, 1H, 3-H^{NeuNAc}), 2.0, 2.05 (s, 6H, NHAc), 2.58 (dd, $J_{3ax,3aq} = 13.1$, $J_{3aq,4} = 5.6$ Hz, 1H, 3-H^{NeuNAc}), 2.66 (m, 2H, β -H^{Arg}), 3.23 (dd, $J = 6.7$ Hz, 2H, δ -H^{Arg}), 3.37 (dd, $J_{2,1} = 8.0$, $J_{2,3} = 9.5$ Hz, 1H, 2-H^{Gal}), 3.81 (m, 1H,

- 5-H^{NeuNac}), 4.24 (d, $J_{1,2} = 7.3$ Hz, 1H, α -H^{Ala}), 4.29 (m, 1H, 4-H^{NeuNac}), 4.34 (dd, $J_{3,2} = 9.5$, $J_{3,4} = 3.9$ Hz, 1H, 3-H^{Gal}), 4.59 (d, 1H, 1-H^{Gal}), 4.62 (dd, 1H, α -H^{Asp}), 5.1 (d, $J_{1,2} = 4$ Hz, 1H, 1-H^{Fuc}), 5.13 (d, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, 1H, 1-H^{GluNac}), 5.35 (dd, $J_{4,3} = 4.2$ Hz, 1H, 4-H^{Gal}); ¹³C-NMR (75.4 MHz, D₂O): $\delta = 17.99$ (6-C^{Fuc}), 19.93 (β -H^{Ala}), 24.9, 25.04 (NHAc), 101.53 (1-C^{Fuc}), 103.67 (1-C^{Gal}).
- [26] **14**: ¹H-NMR (300 MHz, D₂O): $\delta = 1.19$ (d, $J_{6,5} = 6.56$ Hz, 3H, 6-H^{Fuc}), 1.37 (d, $J_{6,4} = 6.72$ Hz, 3H, β -H^{Ala}), 1.71 (m, 1H, γ -H^{Arg}), 1.8 (dd, $J_{3ax,3aq} = 12.3$ Hz, 1H, 3-H^{NeuNac}), 1.97 (m, 1H, β -H^{Arg}), 1.99, 2.04 (2s, 6H, NHAc), 2.68 (m, 2H, β -H^{Asp}), 2.76 (dd, $J_{3aq,3ax} = 12.3$, $J_{3aq,4} = 4.35$ Hz, 1H, 3-H^{NeuNac}), 3.25 (dd, $J = 6.6$ Hz, 2H, δ -H^{Arg}), 3.54 (dd, $J_{2,1} = 7.8$, $J_{2,3} = 9.6$ Hz, 1H, 2-H^{Gal}), 3.71 (m, 1H, 4-H^{NeuNac}), 4.09 (dd, 1H, 3-H^{Gal}), 4.12 (dd, 1H, α -H^{Arg}), 4.25 (d, $J_{1,2} = 7.2$ Hz, 1H, α -H^{Ala}), 4.58 (dd, 1H, α -H^{Asp}), 5.11 (d, $J_{1,2} = 4.21$ Hz, 1H, 1-H^{Fuc}); ¹³C-NMR (75.4 MHz, D₂O): $\delta = 18.15$ (6-C^{Fuc}), 19.34 (β -H^{Ala}), 101.48 (1-C^{Fuc}), 102.56 (2-C^{NeuNac}), 104.55 (1-C^{Gal}); FAB-MS: $m/z = 1219.5$ ($M + H^+$).
- [27] A. Aruffo, W. Kolanus, G. Walz, P. Fredman, B. Seed, *Cell* **1991**, *67*, 35–44; Testsystem in Analogie zu: B. M. C. Chan, M. J. Elices, E. Murthy, M. E. Hemler, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 8366–8370.
- [28] Ein analoges, nicht glycosyliertes RGD-Peptid, das als Kontrolle im Zelladhäsionstest untersucht wurde, lieferte IC₅₀-Werte > 800 μ M für P- und E-Selektin.

Siliciumanaloga von Grignard-Verbindungen: Direktsynthese und Strukturen aminstabilisierter Trimethylsilylmagnesiumhalogenide**

Richard Goddard, Carl Krüger, Nazmi A. Ramadan und Alfred Ritter*

Professor Hubert Schmidbaur zum 60. Geburtstag gewidmet

Schon seit längerem wird vermutet^[1], daß bei der Umsetzung von Halogen(triorgano)silanen mit elementarem Magnesium zu Hexaorganodisilanen Triorganosilyl-Grignard-Verbindungen als Zwischenprodukte eine Rolle spielen. Sämtliche Versuche, Mitglieder dieser Verbindungsklasse in Analogie zur klassischen Herstellungsweise von Kohlenstoff-Grignard-Verbindungen zu synthetisieren, sind jedoch bislang fehlgeschlagen.

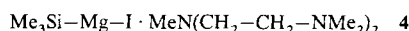
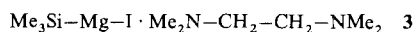
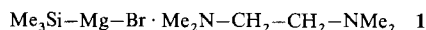
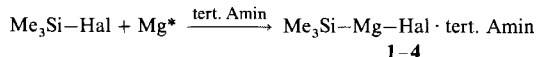
Ein indirekter Nachweis für die Existenz von Triorganosilylmagnesiumhalogeniden in Ether gelang vor kurzem Oehme et al.^[2] bei der Ummetallierung von Tris(trimethylsilyl)silyllithium (Me₃Si)₃SiLi · 3 THF mit Magnesiumbromid. Das hierbei als Zwischenprodukt vermutete Tris(trimethylsilyl)silylmagnesiumbromid (Me₃Si)₃SiMgBr wurde jedoch nicht isoliert, sondern in Ether unmittelbar weiter umgesetzt.

Wir konnten nunmehr Grignard-analoge Trimethylsilylmagnesiumverbindungen als Komplexe mit Aminchelatligenanden leicht durch Direktsynthese aus Halogen(trimethyl)silanen und Magnesium synthetisieren. Hierbei verwendeten wir hochreaktives pyrophores Magnesium (Mg*) nach Bogdanović et al.^[3]

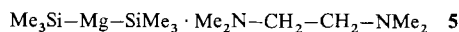
Nach unseren bisherigen Untersuchungen lassen sich unter den von uns gewählten Reaktionsbedingungen nur Brom(trimethyl)silan Me₃SiBr und Iod(trimethyl)silan Me₃SiI, nicht jedoch das gebräuchlichere Chlor(trimethyl)silan zu Trimethylsilyl-

Grignard-Verbindungen umsetzen. Im Gegensatz zur klassischen Grignard-Synthese sind sauerstoffhaltige Lösungsmittel wie Tetrahydrofuran oder Diethylether wegen quantitativer Etherspaltung im Reaktionsverlauf nicht geeignet. Aus diesem Grunde wurden die Umsetzungen in wasserfreiem Toluol unter Zugabe von Tetramethylethylendiamin oder Pentamethyldiethylentriamin als Komplexliganden durchgeführt.

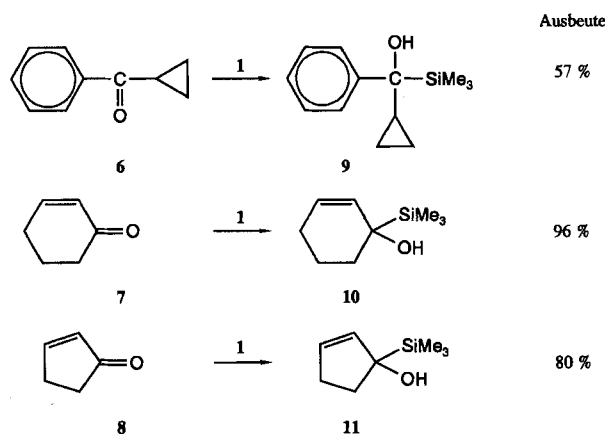
Unter diesen Bedingungen gelang es, die Trimethylsilylmagnesiumverbindungen **1–4** als Festkörper zu synthetisieren und zu isolieren. Von **1** und **2** ließen sich für eine Kristallstrukturanalyse brauchbare Kristalle erhalten.



Bei der Synthese von **1** trat als alleiniges Nebenprodukt das bereits bekannte, an der Luft selbstentzündliche Bis(trimethylsilyl)magnesium · Tetramethylethylendiamin **5** auf^[4]. Auch mit anderen Komplexliganden war Bis(trimethylsilyl)magnesium bereits erhalten worden^[5]. **5** entsteht hier offensichtlich als Folge eines Schlenk-Gleichgewichtes^[6].



Als erste Anwendungsbeispiele von **1–4** sind Umsetzungen von **1** mit dem Keton **6** und den Enonen **7** und **8** in Toluol bei –70 °C durchgeführt worden; bei der Hydrolyse resultieren die Verbindungen **9**, **10**^[7] bzw. **11**. Beim Ersatz von **1** durch Trimethylsilyllithium Me₃SiLi wird **7** nicht in **10**, sondern ausschließlich in 3-(Trimethylsilyl)cyclohexanon überführt^[8].



Die Ergebnisse der Kristallstrukturanalyse von **1** sind in Abbildung 1 zusammengefaßt^[15]. Besonders auffallend ist, daß **1** im Kristall weder monomer noch als symmetrisch Br-verbrücktes Dimer, sondern als Assoziationskomplex vorliegt. Der Komplex hat ein kristallographisches Inversionszentrum; im Gegensatz zu anderen bisher untersuchten Strukturen von Br-verbrückten Grignard-Verbindungen im Kristall^[9–13] weichen die beiden unabhängigen Mg-Br-Abstände in **1** jedoch wesentlich voneinander ab. Während eine der Mg-Br-Bindungslängen mit 2.534(4) Å zwischen dem Wert in der monomeren Verbindung Ethyl((–)α-isosparteine)magnesiumbromid (2.506 Å)^[14] und

[*] Dr. A. Ritter, Prof. Dr. N. A. Ramadan
Max-Planck-Institut für Strahlenchemie
Postfach 10 13 65, D-45413 Mülheim an der Ruhr
Telefax: Int. + 208/306-3951

Dr. R. Goddard, Prof. Dr. C. Krüger
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung
D-45470 Mülheim an der Ruhr

[**] Wir danken Herrn Prof. Dr. M. Demuth und Herrn Dr. J. Leitch für wertvolle Diskussionen, Herrn P. Bayer und Herrn K. H. Claus für die experimentelle Mithilfe sowie Herrn Prof. Dr. K. Schaffner für seine freundliche Unterstützung. N. A. R. dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Zuwendung für seine Gastaufenthalte.