Universität Potsdam

Martin G. Peter, Peter C. Boldt, Yvonne Niederstein,
Jasna Peter-Katalinić

Synthesen von Galactose-Cluster-haltigen Steroid-Derivaten

first published in:

Liebigs Annalen der Chemie - 9 (1990), p. 863 - 869

ISSN (print): 1434-193X

ISSN (online): 1099-0690

DOI: 10.1002/jlac.1990199001162

Postprint published at the institutional repository of Potsdam University:

In: Postprints der Universität Potsdam :

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Reihe ; 42

<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2008/1678/>

<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-16783>

Postprints der Universität Potsdam

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Reihe ; 42

Synthesen von Galactose-Cluster-haltigen Steroid-Derivaten ^{≠)}

Martin G. Peter^{*a}, Peter C. Boldt^{**a}, Yvonne Niederstein^{***a} und Jasna Peter-Katalinić^b

Institut für Organische Chemie und Biochemie^a der Universität Bonn,
Gerhard-Domagk-Straße 1, D-5300 Bonn 1, F.R.G.

Institut für Physiologische Chemie^b der Universität Bonn,
Nußallee 11, D-5300 Bonn, F.R.G.

Eingegangen am 23. März 1990

Key Words: Glycoconjugates / Galactosides / Steroid esters / Amphiphiles / Glycopeptides

Synthesis of Galactose-Cluster-Containing Steroid Derivatives

The synthesis of galactose clusters that are linked to a steroid moiety by a peptide-like spacer unit is described. The galactose cluster is obtained by Koenigs-Knorr glycosylation of TRIS-Gly-Fmoc (**2b**) under Helferich conditions. Peptide and ester bonds are formed after activation of carboxylic acids as diphenylthiophene dioxide (TDO) esters. **6a** is synthesized in a convergent way by coupling of (Ac₄Gal)₃-TRIS-Gly (**3e**) with

cholesteryl TDO succinate (**5b**). Coupling of (Ac₄Gal)₃-TRIS-Gly hydrogen succinate (**3f**) with Gly-O-Chol (**5d**) by means of EEDQ yields **6d**. Reaction of (Ac₄Gal)₃-TRIS-Gly-SUCC-O-TDO (**3g**) with 25-hydroxycholesterol leads in a linear sequence to the oxysterol derivative **6f**. Selective cleavage of the acetyl groups from galactose units yields the known compound **6b** and the new derivatives **6e** and **6g**.

Neoglycokonjugate sind synthetische Analoga von natürlich vorkommenden Glycolipiden und Glycoproteinen. Als charakteristische Strukturmerkmale enthalten sie glycosidisch gebundene Zucker-Reste, die von spezifischen, auf der Außenseite der Plasmamembran von Zellen lokalisierten Rezeptoren erkannt werden¹⁾. In letzter Zeit beanspruchen solche Neoglycokonjugate besonderes Interesse, bei denen Rezeptor-affine Kohlenhydrate mit Wirkstoffen verknüpft sind. Die Internalisierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes läßt sich zum zellspezifischen Drug-Targeting und zur intrazellulären Freisetzung von Pharmakophoren ausnutzen. So gelingt es, in mannosylierte Liposomen verpackte Wirkstoffe gezielt in Makrophagen einzuschleusen²⁾. Galactosyliertes und mit Acyclovir verknüpftes Polylysin³⁾, galactosylierte Liposomen⁴⁾, lactosylierte Lipoproteine⁵⁾ oder Asialoglycoproteine werden dagegen hauptsächlich über einen Galactose/*N*-Acetylgalactosamin-spezifischen Rezeptor, den sog. Asialoprotein- oder Ashwell-Rezeptor^{1,6)}, in Leberzellen aufgenommen.

Detaillierte Studien von Lee et al.⁷⁾ zur Liganden-Spezifität dieses Rezeptors zeigen, daß die Bindungsstellen für Galactose an den Spitzen eines Dreiecks mit den Seitenlängen 1.5, 2.2 und 2.5 nm lokalisiert sind. Infolgedessen beobachtet man hohe Bindungsaffinität für Verbindungen, die Kohlenhydrat-Cluster aus mindestens drei Galactose-Einheiten enthalten und somit die Strukturmerkmale von tri-antennären *N*-Glycanen der Asialoproteine tragen. Im Gegensatz dazu besitzt das Galactose-Erkennungssystem von Makrophagen höchste Affinität für tetra-antennäre Asialo-*N*-Glycan-Strukturen⁸⁾.

Abkürzungen

Ac₄Gal: 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-galactopyranosyl-; Chol: Cholesterin; EEDQ: 2-Ethoxy-1-(ethoxycarbonyl)-1,2-dihydrochinolin; Fmoc: (9-Fluorenyl)methoxycarbonyl-; Gal: D-Galactopyranosyl-; SUCC: Succinyl-; TDO: 1,1,3-Trioxo-2,5-diphenyl-2,3-dihydrothiophen-4-yl-; TRIS: 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol.

^{≠)} Auszugweise vorgetragen auf der Chemiedozenten-Tagung, Bielefeld, 7. März 1989.

^{**a)} Teil der Diplomarbeit, Universität Bonn 1988.

^{***a)} Teil der geplanten Dissertation, Universität Bonn.

Kempen et al.⁹⁾ beschrieben kürzlich das amphiphile Cholesterin-Derivat **6b**, bei dem der lipophile Rest über einen Peptid-ähnlichen Spacer mit einem Cluster von drei Galactose-Einheiten verknüpft ist. Infusion von **6b** in Ratten führt zu einer Senkung des Cholesterin-Spiegels¹⁰⁾, die letztlich auf die feed-back-Hemmung der Cholesterin-Biosynthese aufgrund der vermehrten Einschleusung von Lipoproteinen in Leberzellen über den Asialoprotein-Rezeptor zurückgeführt werden kann^{10,11)}.

Verbindungen des Typs **6** eignen sich nicht nur zur Untersuchung von zellbiologischen Phänomenen. Die Herstellung von glycosidischen Clustern und deren Verknüpfung mit Wirkstoffen bietet auch eine reizvolle präparative Aufgabe. Vor diesem Hintergrund berichten wir nun über eine neue Synthese von **6b** sowie über die Herstellung der bisher nicht beschriebenen Galactose-Cluster-haltigen Steroid-Derivate **6e** und **6g**. Letztere unterscheiden sich von **6b** durch Variation des Peptid-ähnlichen Spacers bzw. der Steroid-Einheit. Laut Molekülmodell-Berechnungen des Galactose-TRIS-Clusters¹²⁾ lassen sich die für die Rezeptor-Spezifität primär verantwortlichen OH-Gruppen an C-4 der Galactose-Reste⁸⁾ an den Spitzen eines Dreiecks mit den Seitenlängen 1.01, 0.91 und 0.84 nm anordnen. Diese Abstände sind etwa nur halb so groß wie die von Lee et al.⁷⁾ postulierten optimalen Werte; da **6b** jedoch biologische Aktivität *in vivo* zeigt^{10,11)}, haben wir die Kohlenhydrat-Kopfgruppe vorerst nicht variiert.

Zur Synthese von Galactose-Clustern des Typs **6** ist es zunächst erforderlich, ein TRIS-Derivat möglichst vollständig zu galactosidieren. Gemäß Literaturangaben⁹⁾ entsteht bei der Helferich-Variante der Koenigs-Knorr-Reaktion¹³⁾ von TRIS-Gly-Z (**2a**) mit Acetobromgalactose (Schema 1) in 32proz. Ausbeute eine Mischung von (Ac₄Gal)₃-TRIS-Gly-Z (**3a**) und des bis-galactosylierten (Ac₄Gal)₂-TRIS-Gly-Z (**3b**) im Verhältnis ca. 5:1 (vgl. Lit.¹⁴⁾). Nach unseren Erfahrungen liefert die Umsetzung von Acetobromgalactose mit **2a** das gewünschte **3a** in nur geringer Ausbeute.

Wesentliche Verbesserungen ergeben sich bei Verwendung der Fmoc-Schutzgruppe. TRIS-Gly-Fmoc (**2b**) wird in

Schema 1

	R ¹		R ¹	R ²
1a	Z	3a	Z	Ac ₄ Gal
1b	Fmoc	3b	Z	OH
2a	Z	3c	Fmoc	Ac ₄ Gal
2b	Fmoc	3d	Fmoc	Ac
		3e	H	Ac ₄ Gal
		3f	COCH ₂ CH ₂ CO ₂ H	Ac ₄ Gal
		3g	COCH ₂ CH ₂ CO ₂ TDO	Ac ₄ Gal

55proz. Ausbeute hergestellt. Die nachfolgende Glycosidierung mit Acetobromogalactose¹³⁾ liefert ein gemäß DC einheitliches Produkt der Summenformel C₆₃H₇₈N₂O₃₃ · 2.5 H₂O in 38proz. Ausbeute. Die ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren zeigen die für 3c erwarteten Signale (siehe Exp. Teil). Die β-Konfiguration der glycosidischen Bindung folgt im ¹H-NMR Spektrum aus der Kopplungskonstanten von 1'-H (*J* = 7.7 Hz) und im ¹³C-NMR Spektrum aus der Verschiebung von C-1' (δ = 101.16) der Galactosyl-Reste. Das FAB-Massenspektrum liefert die Nominalmasse *m/z* = 1413 [M + Na⁺] bzw. 1391 [M + H⁺], sowie die nach Abspaltung von Tetraacetylgalactose bzw. Ketten entstandenen Fragment-Ionen *m/z* = 1043 bzw. 1371 und 1001 (Abb. 1). Daneben deutet jedoch die Serie der Peaks bei *m/z* = 1125 und 755 sowie 1083, 1061 und 713 auf die Anwesenheit des zweifach glycosidierten Acetats 3d (Abb. 1) hin. Somit beweist das Massenspektrum, daß bei der Umsetzung von 2b mit Acetobromogalactose eine primäre Hydroxy-Gruppe des TRIS-Rests partiell acetyliert wird. Vermutlich reagiert hierbei das aus Acetobromogalactose unter Nachbargruppenbeteiligung entstehende Acyloxonium-Ion unter Bildung des Acetats (vgl. Lit.¹⁵⁾). Anhand der ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren und der Elementaranalyse läßt sich abschätzen, daß der relative Anteil von 3d weniger als 10% beträgt. Die Umsetzung von 2b mit Pentaacetylgalactose in Gegenwart von TMS-Triflat führt ebenfalls zur Mischung von 3c und 3d,

wobei die Produktzusammensetzung jedoch wesentlich höhere Anteile von 3d aufweist (MS-Evidenz). Nach chromatographischer Trennung von 3c und 3d an Kieselgel behandelt man 3c mit Piperidin. Das freie Amin 3e wird in 93proz. Ausbeute isoliert.

Abb. 1. FAB-MS-Zerfallsmuster von 3c und 3d

Die zur Synthese der peracetylierten Galactose-Cluster vom Typ 6 angewendeten Synthesestrategien sind nachfolgend jeweils anhand von Abb. 2 erläutert. Zur Herstellung von 6a wird der Block (A + B) ≅ 3e mit dem Block (C + E) ≅ 5a verknüpft. Dazu stellt man zunächst das aus der Literatur¹⁶⁾ bekannte Hydrogensuccinat 5a aus Bernstein-säureanhydrid (≅ C) und Cholesterin (≅ E) her. Die Aktivierung von 5a erfolgt mit dem von Steglich et al.¹⁷⁾ in die Peptid-Synthese eingeführten cyclischen Carbonat 4 (siehe Schema 1). Die Kopplung von 3e mit 5b (vgl. Lit.¹⁸⁾) liefert 6a in 87proz. Ausbeute.

Abb. 2. Synthesebausteine zur Darstellung von 6

	R ¹	R ²	R ³	X
6a	Ac	Ac ₄ Gal	H	CO
6b	H	Gal	H	CO
6c	H	AcGal	H	CO
6d	Ac	Ac ₄ Gal	H	CONHCH ₂ CO
6e	H	Gal	H	CONHCH ₂ CO
6f	Ac	Ac ₄ Gal	OH	CO
6g	H	Gal	OH	CO

Sowohl die ¹H- als auch die ¹³C-NMR-Spektren von **6a** zeigen die erwarteten Signale. Die 6'-H-Protonen der Tetraacetylgalactosid-Reste werden als Multipllett zusammen mit einem der diastereotopen Methylen-Protonen der Oxy-methylen-Gruppe des TRIS-Rests beobachtet. Im FAB-Massenspektrum erscheint der [M+H⁺]-Peak bei *m/z* = 1637. Im übrigen steht das Fragmentmuster in Einklang mit der Struktur **6a**. Der bei *m/z* = 331 beobachtete Basispeak resultiert aus der Fragmentierung der glycosidischen Bindung.

Auch bei der Synthese des im Vergleich zu **6a** um eine Glycin-Einheit verlängerten **6d** wird der konvergente Weg beschritten. Zunächst baut man durch Umsetzung von **3e** mit Bernsteinsäureanhydrid den Block (A + B + C) ≡ **3f** in 84proz. Ausbeute auf. Die Ester-Bindung des Blocks (D + E) ≡ **5c** wird bei der Reaktion von Cholesterin mit Boc-Gly-TDO geknüpft. Nach Schutzgruppen-Abspaltung von **5c** mittels Trifluoressigsäure erfolgt die Kopplung von **3f** mit **5d** in Gegenwart von EEDQ mit 94proz. Ausbeute.

Der leichte Zugang zu **3f** und die Möglichkeit, Ester-Bindungen über TDO-aktivierte Carbonsäuren herzustellen¹⁸, legt einen linearen Syntheseweg (A + B + C + E) für den acetylierten Galactose-Cluster **6f** nahe. Der aus **3f** entstandene TDO-Ester **3g** wird nicht isoliert. In einer Eintopfreaktion setzt man mit 25-Hydroxycholesterin (**5e**) um und isoliert anschließend **6f** in 53proz. Ausbeute. Die selektive Veresterung an C-3 von **5e** folgt aus den ¹³C-NMR-Spektren von 25-Hydroxycholesterin (**5e**) und **6f** aus der Tieffeldverschiebung der Resonanz von C-3 in **6f** (δ = 74.23) gegenüber der in **5e** (δ = 70.20).

Die Anwesenheit der Acetyl-Gruppen in den Galactose-Resten schließt bei der Umsetzung von aktivierten Acyl-Komponenten Konkurrenzreaktionen mit freien OH-Gruppen an den Zucker-Resten aus. Außerdem zeigen die per-acetylierten Derivate günstige Löslichkeitseigenschaften, was sowohl die Reaktionsführung, als auch die Aufarbeitung und die NMR-spektroskopische Charakterisierung der Verbindungen erleichtert. Diesen Vorteilen steht die Notwendigkeit der Abspaltung der Acetyl-Gruppen in Gegenwart anderer Ester-Funktionen im letzten Schritt der Synthese gegenüber. Die üblichen Methoden, z.B. Einwirkung von Methanolat, Kaliumcarbonat, Kaliumcyanid oder Hydrazinhydrat in Methanol, führen zur raschen Abspaltung des Steroids. Eine selektive Hydrazinolyse der Acetyl-Gruppen gelingt jedoch mit akzeptabler Ausbeute (33–36%) bei tiefen Temperaturen mit 0.1–0.6proz. wasserfreiem Hydrazin in absol. Methanol (vgl. Lit.¹⁹). So erhält man aus **6a** in 33proz. Ausbeute den Galactose-Cluster (Gal)₃-TRIS-Gly-SUCC-Chol (**6b**) und aus **6d** bzw. **6f** die entsprechenden Verbindungen (Gal)₃-TRIS-Gly-SUCC-Gly-Chol (**6e**) bzw. (Gal)₃-TRIS-Gly-SUCC-(25-OH-Chol) (**6g**) in 36proz. Ausbeute. Bei der Hydrazinolyse entstehen außerdem partiell acetylierte Derivate, wie im Falle der Reaktion von **6a** durch Isolierung des Monoacetats (AcGal) (Gal)₂-TRIS-Gly-SUCC-Chol (**6c**) in 25proz. Ausbeute gezeigt wird. Bei erneuter Durchführung der Hydrazinolyse entsteht **6b** aus **6c** in 45proz. Ausbeute. Bemerkenswert erscheint, daß die Galactose-Cluster-haltigen Verbindungen als Hydrate anfallen.

Die Resultate dieser Arbeit zeigen, daß komplexe Galactose-Cluster des Typs **6** sowohl konvergent als auch linear aufgebaut werden können. Die Wahl der Synthesestrategie wird im Einzelfall von ökonomischen Überlegungen unter Berücksichtigung der Verfügbarkeit der Wirkstoff-Komponente oder der Einführung einer Isotopenmarkierung bestimmt werden. Über Ergebnisse von derzeit laufenden zellbiologischen Stoffwechseluntersuchungen mit den Galactose-Clustern **6b**, **6e** und **6f** werden wir an anderer Stelle berichten.

Wir danken der Fa. Merz + Co. GmbH & Co., Frankfurt, für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit und dem Fonds der Chemischen Industrie für eine Forschungsbeihilfe.

Experimenteller Teil

Eindampfoperationen im Rotationsverdampfer mit Wasserstrahlpumpenvakuum; Badtemp. ca. 30°C. — DC: Aluminium-Folien mit Kieselgel Si-60 HF₂₅₄ (Merck); Laufmittel: DC-A: Chloroform/MeOH (9:1); DC-B: Chloroform/Aceton (8:2); DC-C: Chloroform/MeOH/Wasser (54:40:6); DC-D: Benzol/EtOH (8:2); DC-E: Cyclohexan/Ethylacetat (8:2); DC-F: Chloroform/MeOH/Wasser/25proz. Ammoniak (75:25:3:1); DC-G: Toluol/EtOH (9:1); DC-H: Chloroform/Aceton (3:1); DC-I: Ethylacetat/Cyclohexan (2:1); Detektion mittels Fluoreszenzlösung bei 254 nm oder nach Anfärben mit 30proz. methanolischer Schwefelsäure bzw. alkoholischer Ninhydrin-Lösung und nachfolgendem Erhitzen. — SC: Kieselgel Si-60 (Merck), Korngröße 40–60 µm. — Schmelzpunkte: Büchi-SMP-20-Apparat. — NMR: Bruker WM 200 oder WM 400; interner Standard bei ¹H-NMR Messungen: Tetramethylsilan; bei ¹³C-NMR Messungen: Lösungsmittel-Signale. Soweit erforderlich,

wurden die Zuordnungen der Signale in ^1H -NMR-Spektren mit Hilfe von 2D-COSY- und in ^{13}C -NMR-Spektren mit DEPT-90- und DEPT-135-Experimenten abgeleitet; exemplarisch ist die vollständige Zuordnung für das ^{13}C -NMR-Spektrum von **6a** (Abschnitt 8) angegeben. — FAB-MS: ZAB-HF-Massenspektrometer umgekehrter Geometrie (VG Analytical, Manchester); methanolische Lösungen der Proben wurden mit Thioglycerin (2,3-Dihydroxy-1-propanthiol) vermischt und mit Xenon-Atomen der kinetischen Energie äquivalent 9 keV bombardiert²⁰; Positiv-Ionen-Spektren wurden im massenkontrollierten Scan von 300–500 s Dauer registriert; die Auswertung der Spektren erfolgte durch Auszählen der Spektrallinien. Bei den Massenangaben handelt es sich daher um Nominalmassen. — TMS-Triflat und TRIS wurden von Merck, Pentacetylgalactose von Sigma bezogen. Acetobromgalactose⁹, Boc-Gly-O-TDO²¹, Cholesterylhydrogensuccinat⁹, EEDQ²², Fmoc-Glycin²³, und **4**¹⁷ wurden nach Literaturangaben hergestellt. 25-Hydroxycholesterin wurde aus Stigmasterin synthetisiert²⁴.

1) N^{α} -[(9-Fluorenyl)methoxycarbonyl]- N -[2-hydroxy-1,1-bis-(hydroxymethyl)ethyl]glycinamid (TRIS-Gly-Fmoc, **2b**): Eine Lösung von 2.24 g (18.5 mmol) TRIS, 5.02 g (16.9 mmol) **1b** und 5.1 g (20.8 mmol) EEDQ in 165 ml absol. EtOH wird unter Argon 5 h unter Rückfluß erhitzt. Danach wird eingengt und der Rückstand mit 150 ml Diethylether versetzt. Man saugt ab und wäscht die Kristalle mehrmals mit absol. Ether. Das Rohprodukt wird in MeOH aufgenommen und bis zur Neutralreaktion mit Dowex 50W X-200 ($\text{H}^{\oplus}$ -Form) versetzt. Nach dem Filtrieren wird die Lösung zur Trockene eingengt. **2b** kristallisiert nach Vermischen des Rückstandes mit Diethylether aus. Man läßt noch 12 h bei -20°C stehen, filtriert durch eine Glasfritte und trocknet über Kaliumhydroxid und Paraffin bei 0.2 Torr. — Ausb. 3.72 g (55%), Schmp. $85-87^{\circ}\text{C}$. — DC-A: $R_f = 0.31$. — ^1H -NMR (200 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 7.90$ (d, $J = 7.2$ Hz, 2 arom. H), 7.71 (d, $J = 7.2$ Hz, 2 arom. H), 7.56 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H, NH), 7.47–7.28 (m, 4 arom. H), 7.19 (br. s, 1H, NH), 4.72 (t, $J = 5.8$ Hz, 3H, OH), 4.33–4.16 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 3.66 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H, COCH_2NH), 3.54 (d, $J = 5.8$ Hz, 6H, $\equiv\text{CCH}_2\text{O}$). — ^{13}C -NMR (50.3 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO): $\delta = 170.00$ (NCOC), 156.48 (NCOO), 143.85, 140.75, 127.67, 127.12, 125.28, 120.13 (aromat. C), 63.32 ($\equiv\text{C}$), 62.16 ($\equiv\text{CCH}_2\text{O}$), 60.34 ($\text{OCH}_2\text{CH}=\text{}$), 46.62 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 43.90 (NCH_2CO).

$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6 \cdot 0.5 \text{ H}_2\text{O}$ (409.4) Ber. C 61.60 H 6.15 N 6.84
Gef. C 61.57 H 6.29 N 6.33

2) N^{α} -[(9-Fluorenyl)methoxycarbonyl]- N -[tris(2,3,4,6-tetra- O -acetyl- β - D -galactopyranosyloxymethyl)methyl]glycinamid [(Ac₄Gal)₃-TRIS-Gly-Fmoc, **3c**]: Zu einer unter Argon kräftig gerührten Suspension von 2.8 g (6.9 mmol) **2b** sowie 2.9 g (10.6 mmol) $\text{Hg}(\text{CN})_2$ und 3.8 g (10.6 mmol) HgBr_2 in 80 ml Acetonitril wird innerhalb von 60 min bei Raumtemp. eine Lösung von 8.75 g (21.3 mmol) 2,3,4,6-Tetra- O -acetyl-1-brom-1-desoxy- α - D -galactose in 80 ml Acetonitril getropft. Nach weiteren 30 min fügt man zu der klaren Lösung nochmals 0.9 g (3.5 mmol) $\text{Hg}(\text{CN})_2$, 1.3 g (3.5 mmol) HgBr_2 und 2.9 g (7.1 mmol) Acetobromgalactose. Anschließend läßt man 24 h bei 20°C rühren. Dann wird zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 250 ml Chloroform aufgenommen. Nach dem Waschen mit 12proz. Kaliumbromid-Lösung (5×100 ml) und Wasser (5×100 ml) wird mit Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft. Das sirupöse Rohprodukt (13.9 g) liefert nach SC [Etylacetat/Cyclohexan (2:1)] und Trocknen über P_4O_{10} **3c** als farbloses Pulver. — Ausb. 3.75 g (38%), Schmp. $126-129^{\circ}\text{C}$. — DC-B: $R_f = 0.36$. — DC-D: $R_f = 0.65$. — DC-I: $R_f = 0.21$. — $[\alpha]_D^{20} = -9.3$ ($c = 1$ in CHCl_3). — ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.68$ (d, $J = 7.5$ Hz, 2 arom. H), 7.55 (ddd, $J_o = 7.5$ Hz, $J_m = 2$ Hz, $J_p = 0.8$ Hz, 2 arom. H), 7.32 (dt, $J_o = 7.0$ Hz, $J_p =$

0.8 Hz, 2 arom. H), 7.24 (m, 2 arom. H), 6.19 (s, 1H, NH), 5.71 (br. t, $J = 6.0$ Hz, 1H, NH), 5.31 (dd, $J_{3',4'} = 2.8$ Hz, $J_{4',5'} = 0.7$ Hz, 3H, 4'-H), 5.07 (dd, $J_{2',3'} = 10.5$ Hz, $J_{1',2'} = 7.7$ Hz, 3H, 2'-H), 4.96 (dd, $J_{2',3'} = 10.5$ Hz, $J_{3',4'} = 3.3$ Hz, 3H, 3'-H), 4.36 (d, $J_{1',2'} = 7.7$ Hz, 3H, 1'-H), 4.32 (dd, $J_{\text{gem.}} = 7.5$ Hz, $J_{\text{vic.}} = 4.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 4.16 (t, $J_{\text{vic.}} = 7.5$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 4.12–4.01 (m, 9H, 6'-H und $\equiv\text{CCH}_2\text{HO}$), 3.86 (t, $J_{5',6'} = 7.0$ Hz, 3H, 5'-H), 3.76 (dd, $J = 10.8$ Hz, $J = 6.0$ Hz, 2H, NHCH_2), 3.72 (d, $J = 10.5$ Hz, 3H, $\equiv\text{CCH}_2\text{HO}$), 2.11, 2.03, 2.02, 1.94 (4 s, 36H, CH_3CO). — ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 170.25, 170.02, 169.81, 169.36, 168.77$ ($\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$ und NCOCH_2), 156.29 (NCO_2), 143.69, 141.07, 127.56, 126.95, 124.98, 119.84 (aromat. C), 101.16 (C-1'), 70.65, 70.35 (C-3' und C-5'), 68.87 (C-2'), 68.06 (OCH_2), 66.82 (C-4'), 61.02 (C-6') und $\text{COCH}_2\text{CH}=\text{}$), 59.04 ($\equiv\text{C}$), 46.92 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 44.09 (NHCH_2CO), 20.63, 20.50, 20.44, 20.38 (CH_3CO). — FAB-MS: m/z (%) = 1413 (9.5) [$\text{M} + \text{Na}^+$], 1391 (1) [$\text{M} + \text{H}^+$], 1371 (2), 1353 (1), 1311 (0.3), 1191 (1), 1125 (2), 1112 (1), 1083 (1), 1061 (1), 1043 (5), 1001 (1), 865 (0.3), 771 (1), 755 (1), 713 (1), 331 (54), 289 (8), 229 (11), 178 (87), 169 (100).

$\text{C}_{63}\text{H}_{78}\text{N}_2\text{O}_{33} \cdot 2.5 \text{ H}_2\text{O}$ (1427.3) Ber. C 52.68 H 5.82 N 1.95
Gef. C 52.70 H 5.55 N 1.96

3) N -[Tris(2,3,4,6-tetra- O -acetyl- β - D -galactopyranosyloxymethyl)methyl]glycinamid [(Ac₄Gal)₃-TRIS-Gly, **3e**]: Man rührt 2.1 g (1.5 mmol) **3c** in 50 ml einer 10proz. Lösung von Piperidin in absol. Dichlormethan unter Argon 90 min bei 20°C . Anschließend wird mit Dichlormethan auf 100 ml verdünnt und mit 0.75 N HCl (3×50 ml) gewaschen. Die mit MgSO_4 getrocknete organische Phase wird bis auf etwa 0.5 ml eingengt und anschließend mit 10 ml Diethylether vermischt. Man läßt ca. 12 h bei -20°C stehen und saugt ab. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung für die anschließende Reaktion verwendet. — Ausb. 1.6 g (93%), Schmp. $124-126^{\circ}\text{C}$ (Zers.). — DC-A: $R_f = 0.44$. — Zur Analyse wird eine Probe der SC [Chloroform/MeOH (9:1)] unterworfen und aus Diethylether/Pentan kristallisiert. — $[\alpha]_D^{20} = -14.1$ ($c = 1$ in MeOH). — ^1H -NMR (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.39$ (d, $J_{3',4'} = 3.8$ Hz, 3H, 4'-H), 5.15 (dd, $J_{2',3'} = 10.4$ Hz, $J_{2',1'} = 7.7$ Hz, 3H, 2'-H), 5.01 (dd, $J_{2',3'} = 10.5$ Hz, $J_{3',4'} = 3.8$ Hz, 3H, 3'-H), 4.44 (d, $J_{1',2'} = 7.8$ Hz, 3H, 1'-H), 4.41 (m, 9H, 6'-H und $\equiv\text{CCH}_2\text{HO}$), 3.92 (t, $J = 7$ Hz, 3H, 5'-H), 3.83 (d, $J = 10.4$ Hz, 3H, $\equiv\text{CCH}_2\text{HO}$), 3.26 (s, 2H, COCH_2NH_2), 2.17, 2.07, 2.06, 1.99 (4s, 36H, CH_3CO). — FAB-MS: m/z (%) = 1191 (1) [$\text{M} + \text{Na}^+$], 1169 [11] [$\text{M} + \text{H}^+$], 1127 (3), 1112 (2), 839 (2), 821 (7), 779 (2), 491 (1), 331 (88), 289 (12), 265 (18), 229 (14), 169 (100).

$\text{C}_{48}\text{H}_{68}\text{N}_2\text{O}_{31}$ (1169.1) Ber. C 49.32 H 5.86 N 2.40
Gef. C 49.41 H 5.87 N 2.22

4) N^{α} -Succinyl- N -[tris(2,3,4,6-tetra- O -acetyl- β - D -galactopyranosyloxymethyl)methyl]glycinamid [(Ac₄Gal)₃-TRIS-Gly-SUCC, **3f**]: 2.0 g (1.7 mmol) **3e** und 1.7 g (17 mmol) Bernsteinsäureanhydrid werden in 50 ml Dichlormethan suspendiert und mit 0.29 ml N -Ethyldiisopropylamin (1.7 mmol) versetzt. Anschließend rührt man 24 h bei 20°C . Die Suspension wird mit 150 ml Dichlormethan verdünnt und mit 1 N HCl (3×100 ml) gewaschen. Die mit Magnesiumsulfat getrocknete organische Phase wird zur Trockne eingedampft und der sirupöse Rückstand mit 10 ml Pentan verrührt. Nach Absaugen des Niederschlages wird mittels SC [Chloroform/MeOH (9:1)] gereinigt und über P_4O_{10} getrocknet. Man erhält **3f** als farblose Kristalle. — Ausb. 1.9 g (84%), Schmp. $107-110^{\circ}\text{C}$. — DC-F: $R_f = 0.36$. — $[\alpha]_D^{20} = -18.3$ ($c = 1$ in CHCl_3). — ^1H -NMR (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.97$ (br. s, 1H, NH), 6.38 (br. s, 1H, NH), 5.31 (d, $J = 2.5$ Hz, 3H, 4'-H), 5.12–4.90 (m, 6H, 2'- und 3'-H), 4.40 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, 1'-H), 4.21–3.58 (m, 17H, $\equiv\text{CCH}_2\text{O}$, 5'- und 6'-H und NHCH_2CO), 2.67–2.40 (m, 4H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.11, 2.01, 1.91 (3 s, 36H, H_3CCO). — ^{13}C -NMR (50.3 MHz, CDCl_3):

$\delta = 172.83, 170.51, 170.19, 170.02, 169.63, 169.39$ (C=O), 101.29, 70.67, 70.47, 69.03, 67.89, 66.94, 61.06, 59.46, 42.88, 30.71, 30.25, 20.75, 20.64, 20.58, 20.51.

$C_{52}H_{72}N_2O_{34} \cdot 3 H_2O$ (1323.2) Ber. C 47.20 H 5.94 N 2.12
Gef. C 47.30 H 5.51 N 1.61

5) (*5-Cholesten-3 β -yl*)(TDO)succinat (**5b**): Zu einer Lösung von 1.39 g (4.26 mmol) **4** und 2.08 g (4.26 mmol) **5a** in 25 ml Dichlormethan fügt man bei 20°C 0.312 ml (4 mmol) Pyridin. Nach 24 h wird mit 75 ml Dichlormethan verdünnt und wie folgt extrahiert (vgl. Lit.¹⁷): 20proz. wäßrige Citronensäure-Lösung (3 $\times$ 50 ml), ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (10 $\times$ 50 ml), 20proz. wäßrige Citronensäure-Lösung (1 $\times$ 50 ml) und Wasser (3 $\times$ 50 ml). Die mit Magnesiumsulfat getrocknete organische Phase wird eingedampft. — Ausb. 2.1 g (64%), Schmp. 136–138°C (Zers.). — DC-E: $R_f = 0.26$. — $[\alpha]_D^{20} = -27.5$ ($c = 1$ in $CHCl_3$). — 1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.97$ (m, 2 arom. H), 7.55 (m, 3 arom. H), 7.44 (m, 3 arom. H), 7.33 (m, 2 arom. H), 5.36 (m, 1 H, 6-H von Chol), 5.21 (s, 1 H, H von Thiophen), 4.63 (br. m, 1 H, 3-H von Chol), 2.98 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, $COCH_2CH_2CO$), 2.70 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, $COCH_2CH_2CO$), 2.31 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, 4-H von Chol), 2.1–0.7 (m, 41 H). — ^{13}C -NMR (50.3 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 184.54, 170.79, 168.67$ (C=O), 148.23, 145.35 (aromat. C), 139.39 (C-5 von Chol), 132.71, 130.84, 129.91, 129.58, 129.43, 129.25 (aromat. C), 127.13, 123.76 (C=C von Thiophen), 122.78, 74.77, 56.65, 56.10, 49.95, 43.02, 42.27, 39.69, 39.5, 37.96, 36.89, 36.52, 36.17, 35.78, 31.87, 31.79, 28.98, 28.79, 28.23, 27.99, 27.63, 24.27, 24.83, 22.85, 22.59, 21.00, 19.28, 18.72, 11.86.

$C_{47}H_{60}O_7S$ (796.1) Ber. C 73.40 H 7.86
Gef. C 72.85 H 8.06

6) *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)glycin-(*5-cholesten-3 β -ylester*) (**5c**) (vgl. Lit.²⁵): 1.03 g (2.2 mmol) Boc-Gly-O-TDO und 1.2 g (3.1 mmol) Cholesterin in 50 ml trockenem Dichlormethan werden mit 0.25 ml (2.24 mmol) *N*-Ethyl-diisopropylamin versetzt. Man rührt 7 h bei 20°C (Farbumschlag von Rot nach Orange), verdünnt mit 50 ml Dichlormethan und arbeitet wie in Abschnitt 5 beschrieben auf. SC [Cyclohexan/Essigester (1:1)] liefert **5c**. — Ausb. 1.7 g (70%), Schmp. 112–114°C. — DC-E: $R_f = 0.52$. — 1H -NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): $\delta = 5.36$ (m, 1 H, 6-H), 5.15 (t, $J = 3$ Hz, 1 H, NH), 4.6 (m, 1 H, 3-H), 3.81 (d, $J = 3$ Hz, 2 H, $NHCH_2CO$), 2.31 (m, 2 H, 4-H), 2.04–0.83 (m mit s bei $\delta = 1.41, 1.00$ und 0.67, 50 H). — ^{13}C -NMR (50.3 MHz, CD_2Cl_2): $\delta = 170.13, 156.04$ (C=O), 139.92, 132.15, 79.86, 75.37, 57.14, 56.61, 50.48, 43.02, 42.7, 40.18, 39.92, 38.42, 37.35, 36.95, 36.1, 36.25, 32.31, 32.25, 28.63, 28.47 [$(CH_3)_3C$], 28.43, 28.09, 24.66, 24.27, 23.01, 22.77, 21.44, 19.52, 18.96, 12.07.

7) Glycin-(*5-cholesten-3 β -ylester*)-hydrotrifluoracetat [**5d** (Hydrotrifluoracetat)] (vgl. Lit.²⁵): 1.0 g (1.8 mmol) **5c** werden mit 2.5 ml Trifluoressigsäure vermischt. Es setzt sofort eine Gasentwicklung ein. Man rührt 1 h bei 20°C und entfernt die Trifluoressigsäure bei 1 Torr. Das zurückbleibende bräunliche Pulver wird ohne weitere Reinigung weiterverarbeitet. — Ausb. 0.98 g (96%), Schmp. 185°C (Zers.). — DC-D: $R_f = 0.35$. — 1H -NMR (90 MHz, $CDCl_3$, $[D_6]DMSO$): $\delta = 5.13$ (m, 1 H, 6-H), 4.4 (m, 1 H, 3-H), 3.5 (s, 2 H, NCH_2CO), 2.5–0.5 (43 H).

8) *N*-[4-(*5-Cholesten-3 β -yloxy*)succinyl]-*N*-[tris(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyloxymethyl)methyl]glycinamid [(Ac₄Gal)₃-TRIS-Gly-SUCC-Chol, **6a**]: 1.35 g (1.15 mmol) **3e** und 0.86 g (1.11 mmol) **5b** werden in 100 ml trockenem Dichlormethan gelöst und mit 0.39 ml (2.24 mmol) *N*-Ethyl-diisopropylamin versetzt. Die Farbe der bei 20°C gerührten Reaktionsmischung wechselt innerhalb 6 h von zunächst Tiefrot nach Orange gelb. Man verdünnt mit 100 ml Dichlormethan und extrahiert wie in Ab-

schnitt 5 beschrieben. Die mit $MgSO_4$ getrocknete organische Phase wird eingedampft und der Rückstand in 10 ml Diethylether/Hexan (1:1) aufgenommen. Der nun erhaltene Feststoff wird abfiltriert und der SC [Chloroform/Aceton (4:1)] unterworfen. Nach dem Trocknen über P_4O_{10} erhält man **6a**. — Ausb. 1.61 g (87%), Schmp. 129–132°C. — DC-B: $R_f = 0.39$. — DC-D: $R_f = 0.68$. — $[\alpha]_D^{20} = -23.1$ ($c = 1$ in $CHCl_3$). — 1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 6.53$ (t, $J = 5.0$ Hz, 1 H, NH), 6.21 (s, 1 H, NH), 5.39 (dd, $J_{3,4} = 3.1$ Hz, $J_{4,5} = 1$ Hz, 3H, 4'-H), 5.34 (m, 1 H, 6-H von Chol), 5.13 (dd, $J_{2,3} = 10.5$ Hz, $J_{1,2} = 7.5$ Hz, 3H, 2'-H), 5.02 (dd, $J_{2,3} = 10.5$ Hz, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, 3H, 3'-H), 4.6 (m, 1 H, 3-H von Chol), 4.42 (d, $J_{1,2} = 7.5$ Hz, 3H, 1'-H), 4.28–4.10 (m mit d bei $\delta = 4.18$, $J = 10.4$ Hz, 9H, 6'-H und $\equiv CCH_2HO$), 3.94 (t, $J_{5,6} = 7.1$ Hz, 3H, 5'-H), 3.86 (d, $J = 5$ Hz, 2H, $NHCH_2$), 3.76 (d, $J = 10.4$ Hz, 3H, $\equiv CCH_2HO$), 2.61 (m, 4H, $COCH_2CH_2CO$), 2.31 (m, 2H, 4-H von Chol), 2.2–0.7 (m mit s bei $\delta = 2.17, 2.07, 2.06$ und 1.89, 77H, CH_3CO und H von Chol). — ^{13}C -NMR (50.3 MHz, $CDCl_3$) (Zuordnung: vgl. Lit.²⁶): $\delta = 172.20$ ($CH_2NHCOCH_2$), 171.57 ($CH_2CO_2CH=$), 170.15, 169.95, 169.44 (CH_3CO_2), 168.70 ($\equiv CNHCOCH_2$), 139.56 (C-5 von Chol), 122.57 (C-6 von Chol), 101.29 (C-1'), 74.24 (C-3 von Chol), 70.76 (C-5'), 70.47 (C-3'), 68.97 (C-2'), 68.13 ($OCH_2C\equiv$), 66.89 (C-4'), 61.06 (C-6'), 59.17 (C $\equiv$), 56.60 (C-14 von Chol), 56.02 (C-17 von Chol), 49.92 (C-9 von Chol), 42.81 ($NHCOCH_2CO$), 42.23 (C-13 von Chol), 39.63 (C-16 von Chol), 39.44 (C-24 von Chol), 37.99 (C-4 von Chol), 36.89 (C-1 von Chol), 36.51 (C-10 von Chol), 36.10 (C-22 von Chol), 35.72 (C-20 von Chol), 31.83 (C-12 von Chol), 31.76 (C-8 von Chol), 31.52 (C-7 von Chol), 30.58 ($COCH_2CH_2CO$), 29.59 ($COCH_2CH_2CO$), 28.17 (C-2 von Chol), 27.94 (C-25 von Chol), 24.21 (C-15 von Chol), 23.74 (C-23 von Chol), 22.78 (C-27 von Chol), 22.51 (C-26 von Chol), 20.96 (C-11 von Chol), 20.76, 20.67, 20.62, 20.52 (CH_3CO), 19.25 (C-19 von Chol), 18.65 (C-21 von Chol), 11.80 (C-18 von Chol). — FAB-MS: m/z (%) = 1637 (2) [$M + H^+$], 1307 (2), 1289 (21), 1112 (17), 1070 (1.5), 1052 (1.5), 921 (14), 782 (2.5), 750 (2), 591 (6), 331 (100).

$C_{79}H_{116}N_2O_{34} \cdot 2 H_2O$ (1673.8) Ber. C 56.69 H 7.23 N 1.67
Gef. C 56.87 H 7.29 N 1.36

9) *N*-[4-(*5-Cholesten-3 β -yloxy*)succinyl]-*N*-[tris(β -D-galactopyranosyloxymethyl)methyl]glycinamid [(Gal)₃-TRIS-Gly-SUCC-Chol, **6b**] (vgl. Lit.⁹): Zu einer auf –20°C gekühlten, gut gerührten Lösung von 1.47 g (0.89 mmol) **6a** in 147 ml MeOH gibt man aus einer Spritze unter Argon langsam 0.74 ml (743 mg, 23.2 mmol) wasserfreies Hydrazin zu. Nach weiterem 6stdg. Rühren bei –20°C läßt man 5 d bei –20°C stehen. Danach wird mit 1 ml Aceton versetzt und zur Trockne eingedampft. Der sirupöse Rückstand wird mit 0.2 ml MeOH und 10 ml Pentan vermischt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und mittels SC [Chloroform/MeOH/Wasser (54:40:6)] aufgetrennt. Man erhält zwei Fraktionen. Die erste liefert nach Trocknen über P_4O_{10} **6b**. — Ausb. 340 mg (33%), Schmp. 220°C (Zers.). — DC-C: $R_f = 0.21$. — $[\alpha]_D^{20} = -12.2$ ($c = 0.5$ in DMSO) (Lit.⁹): $[\alpha]_D^{20} = -9.7$ [$c = 1$ in $CHCl_3$ /DMSO (1:1)]. — 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$ /[D_6]DMSO): $\delta = 8.02$ (t, $J = 3.5$ Hz, 1 H, NH), 7.07 (s, 1 H, NH), 5.3 (m, 1 H, 6-H von Chol), 4.85 (br. s, 3H, OH), 4.65 (br. s, 3H, OH), 4.55 (br. s, 3H, OH), 4.40 (m, 1 H, 3-H von Chol), 4.36 (br. s, 3H, OH), 4.13 (d, $J_{1,2} = 7.5$ Hz, 3H, 1'-H), 4.07 (d, $J = 10.5$ Hz, 3H, $\equiv CCH_2HO$), 3.78 (d, $J = 10.5$ Hz, 3H, $\equiv CCH_2HO$), 3.66 (m, 5H, 4'-H und $COCH_2NH$), 3.53 (m, 6H, 6'-H), 3.33 (m, 9H, 2'-, 3'- und 5'-H), 2.48 (m, 4H, $COCH_2CH_2CO$), 2.25–0.63 (43H). — ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$ /[D_6]DMSO): $\delta = 171.53, 171.25, 168.98, 139.27, 121.94, 104.23, 75.04, 73.24, 73.16, 70.69, 68.20, 67.46, 60.48, 59.50, 56.06, 55.46, 49.35, 42.47, 41.74, 37.58, 36.42, 36.00, 35.56, 35.12, 31.27, 29.68, 29.13, 27.68, 27.34, 27.23, 23.75, 23.13, 22.52, 22.25, 20.46, 18.86, 18.37, 11.51$. — FAB-MS: m/z (%) = 1155 (5) [$M + Na^+$],

1133 (20) [M + H⁺], 1079 (2), 1061 (2), 971 (6), 953 (6), 899 (1), 809 (3), 791 (3), 737 (1), 369 (100), 279 (36), 261 (65).

C₃₅H₉₂N₂O₂₂ · 3 H₂O (1187.4) Ber. C 55.64 H 8.32 N 2.36
Gef. C 55.63 H 8.10 N 2.45

Aus der zweiten Fraktion isoliert man die Monoacetyl-Verbindung **6c**. — Ausb. 274 mg (25%), Schmp. 260°C (Zers.). — DC-C: R_f = 0.41. — FAB-MS: *m/z* = 1197 [M + Na⁺].

Die Abspaltung der Acetyl-Gruppe erfolgt ähnlich wie voranstehend für **6a** beschrieben: Zu 200 mg **6c** (0.17 mmol) in 5 ml absol. MeOH gibt man bei –20°C 5 µl (5.1 mg, 0.16 mmol) Hydrazin. Nach 3tägigen Stehenlassen bei –20°C arbeitet man wie voranstehend (Abschnitt 9) beschrieben auf. SC [Chloroform/MeOH/Wasser (54:40:6)] liefert **6b**, dessen Eigenschaften (Schmp., R_f) mit denen des zuvor aus **6a** erhaltenen **6b** übereinstimmen. — Ausb. 87 mg (45%).

10) *N*′-[4-(5-Cholesten-3β-yloxy-carbonylmethylamino)succinyl]-*N*-[tris(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-galactopyranosyloxymethyl)-methyl]glycinamid [(Ac₄Gal)₃-TRIS-Gly-SUCC-Gly-O-Chol, **6d**]: Zu einer Lösung von 440 mg (0.33 mmol) **3f** und 222 mg (0.40 mmol) **5d** (Hydrotrifluoracetat) in 50 ml Dichlormethan gibt man 0.1 ml (0.5 mmol) *N*-Ethyl-diisopropylamin und 130 mg (0.5 mmol) EEDQ. Nach 24stdg. Rühren bei 20°C wird eingedampft und der Rückstand mit Pentan vermischt. Das farblose Produkt wird mittels SC [Toluol/EtOH (9:1)] gereinigt und über P₄O₁₀ getrocknet. — Ausb. 0.54 g (94%), Schmp. 127–130°C. — DC-G: R_f = 0.28. — [α]_D²⁰ = –22.9 (*c* = 1 in CHCl₃). — ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.76 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H, NH), 6.72 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, NH), 6.26 (s, 1H, NH), 5.31 (dd, *J*_{3,4} = 3.2 Hz, *J*_{4,5} = 1.1 Hz, 3H, 4′-H), 5.29 (m, 1H, 6-H von Chol), 5.04 (dd, *J*_{2,3} = 10.3 Hz, *J*_{1,2} = 7.5 Hz, 3H, 2′-H), 4.97 (dd, *J*_{2,3} = 10.3 Hz, *J*_{3,4} = 3.4 Hz, 3H, 3′-H), 4.58 (m, 1H, 3-H von Chol), 4.38 (d, *J*_{1,2} = 7.5 Hz, 3H, 1′-H), 4.12 (dd, *J*_{gem} = 10.4 Hz, *J*_{5,6A} = 6.5 Hz, 6′-H_A), 4.08 (d, *J* = 10.3 Hz, ≡CCH_AHO), 4.05 (dd, *J*_{gem} = 10.4 Hz, *J*_{5,6B} = 6.5 Hz, 6′-H_B, 9H zusammen mit den Signalen bei δ = 4.12 und 4.08), 3.91 (t-artiges m, *J*_{5,6} = 6.5 Hz, 5H, 5′-H und NHCH₂CO), 3.78 (br. d, *J* = 5.1 Hz, 2H, NHCH₂CO), 3.69 (d, *J* = 10.3 Hz, 3H, ≡CCH_BHO), 2.55 (s, 4H, COCH₂CH₂CO), 2.4–0.6 [m mit s bei δ = 2.08, 1.99, 1.98, 1.89, 0.94 und 0.60 sowie d bei δ = 0.74 (*J* = 7.0 Hz), 0.69 (*J* = 7.0 Hz) und 0.68 (*J* = 7.0 Hz), 79 H, CH₃CO und H von Chol]. — ¹³C-NMR (50.3 MHz, CDCl₃): δ = 172.37, 172.29, 170.38, 170.15, 169.97, 169.48, 169.35, 169.05, 139.22, 122.85, 101.27, 75.19, 70.68, 70.47, 68.99, 68.02, 66.92, 61.08, 59.33, 56.57, 56.01, 49.88, 43.13, 42.20, 41.52, 39.60, 39.40, 37.88, 36.79, 36.51, 36.07, 35.68, 31.79, 31.72, 31.06, 30.1, 28.13, 27.91, 28.17, 23.71, 22.74, 22.48, 20.92, 20.73, 20.63, 20.58, 20.47, 19.19, 18.62, 11.76.

C₈₁H₁₁₉N₃O₃₅ · 3 H₂O (1748.9) Ber. C 55.63 H 7.20 N 2.40
Gef. C 55.93 H 7.13 N 1.87

11) *N*′-[4-(5-Cholesten-3β-yloxy-carbonylmethylamino)-*N*-[tris(β-*D*-galactopyranosyloxymethyl)methyl]succinyl]glycinamid [(Gal)₃-TRIS-Gly-SUCC-Gly-O-Chol, **6e**]: Zu einer auf –20°C gekühlten Lösung von 316 mg (0.18 mmol) **6d** in 20 ml MeOH werden unter starkem Rühren langsam 75 µl (75.8 mg, 2.37 mmol) wasserfreies Hydrazin gegeben. Man rührt 6 h bei –20°C und läßt dann 24 h bei –20°C und 72 h bei 20°C stehen und arbeitet wie in Abschnitt 9 beschrieben auf. — Ausb. 80 mg (36%), Schmp. 220°C (Zers.). — DC-C: R_f = 0.17. — [α]_D²⁰ = –14.8 (*c* = 0.25 in DMSO). — ¹H-NMR (200 MHz, [D₆]DMSO): δ = 8.29 (s, 1H, NH), 8.06 (s, 1H, NH), 7.05 (s, 1H, NH), 5.35 (br. s, 1H, 6-H von Chol), 4.89 (br. s, 3H, OH), 4.75 (br. s, 3H, OH), 4.63 (br. s, 3H, OH), 4.41 (m, 4H, 3-H von Chol und OH), 4.20–3.95 (m, 6H, 1′-H und ≡CCH_AHO), 3.76 (s, 3H, ≡CCH_BHO), 3.63 (m, 7H, 4′-H und NHCH₂CO), 3.48 (s, 6′-H), 3.4–3.2 (m, 9H, 2′-, 3′- und 5′-H),

2.37 (s, 4H, COCH₂CH₂CO), 2.3–0.6 (m, 43H). — ¹³C-NMR (100 MHz, [D₆]DMSO): δ = 172.24, 172.02, 169.14, 169.03, 138.96, 122.10, 104.04, 74.93, 73.87, 73.16, 70.69, 68.33, 67.53, 60.69, 59.33, 56.02, 55.42, 49.30, 42.88, 41.69, 40.69, 39.09, 38.81, 37.51, 36.32, 35.95, 35.53, 35.09, 31.26, 31.21, 30.51, 30.40, 27.64, 27.32, 27.16, 23.70, 23.12, 22.44, 22.17, 20.41, 18.79, 18.29, 11.43. — FAB-MS: *m/z* (%) = 1212 (1) [M + Na⁺], 1028 (0.4), 1010 (1), 866 (1), 848 (2), 794 (3), 704 (4), 686 (6), 608 (2), 369 (100).

12) *N*′-[4-(25-Hydroxy-5-cholesten-3β-yloxy)succinyl]-*N*-[tris(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-galactopyranosyloxymethyl)methyl]glycinamid [(Ac₄Gal)₃-TRIS-Gly-SUCC-25-OH-Chol, **6f**]: Zu einer Lösung von 150 mg (0.11 mmol) **3f** in 2 ml Dichlormethan gibt man 41 mg (0.125 mmol) **4** und 10 µl (9.8 mg, 0.12 mmol) Pyridin. Nach 18stdg. Rühren bei 20°C wird mit 12 mg (0.03 mmol) 25-Hydroxy-5-cholesten-3β-ol und 10 µl (7.4 mg, 60 µmol) *N*-Ethyl-diisopropylamin versetzt und 20 h bei 20°C gerührt. Anschließend wäscht man mehrmals mit 20proz. Citronensäure-Lösung, ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser (vgl. Abschnitt 5), trocknet mit MgSO₄ und dampft zur Trockne ein. Der Rückstand wird mittels SC [CHCl₃/Aceton (3:1)] gereinigt und anschließend über P₄O₁₀ getrocknet. — Ausb. 27 mg (53%), Schmp. 115–118°C. — DC-H: R_f = 0.34. — [α]_D²⁰ = –24.7 (*c* = 1 in CHCl₃). — ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 6.50 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H, NH), 6.17 (s, 1H, NH), 5.32 (dd, *J*_{3,4} = 3.3 Hz, *J*_{4,5} = 1.0 Hz, 3H, 4′-H), 5.18 (m, 1H, 6-H von 25-HO-Chol), 5.07 (dd, *J*_{2,3} = 10.5 Hz, *J*_{1,2} = 7.7 Hz, 3H, 2′-H), 4.96 (dd, *J*_{2,3} = 10.5 Hz, *J*_{3,4} = 3.3 Hz, 3H, 3′-H), 4.53 (br. m, 1H, 3-H von 25-HO-Chol), 4.37 (d, *J* = 7.7 Hz, 3H, 1′-H), 4.18–4.02 (m, 9H, 6′-H und ≡CCH_AHO), 3.95–3.75 (m, 5H, 5′-H und NHCH₂CO), 3.70 (d, *J* = 10.5 Hz, 2H, ≡CCH_BHO), 2.62–2.47 (m, 4H, COCH₂CH₂CO), 2.24 (br. d, *J* = 7.5 Hz, 2H, 4-H von 25-HO-Chol), 2.17–0.9 (m mit s bei δ = 2.10, 2.02, 1.93, 1.13, 0.94, 70H, CH₃CO und H von 25-HO-Chol), 0.87 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, 21-H von 25-HO-Chol), 0.61 (s, 3H, 19-H von 25-HO-Chol). — ¹³C-NMR (50.3 MHz, CDCl₃): δ = 172.21, 171.60, 170.41, 170.17, 169.97, 169.46, 168.73, 139.56, 122.56, 101.28, 74.23, 70.96, 70.74, 70.46, 68.96, 68.10, 66.88, 61.04, 59.18, 56.58, 55.97, 49.89, 44.34, 42.80, 42.24, 39.62, 37.98, 36.88, 36.50, 36.37, 35.70, 31.81, 31.75, 30.56, 29.58, 29.25, 29.11, 28.18, 27.64, 24.20, 20.94, 20.76, 20.67, 20.62, 20.52, 19.24, 18.61, 11.79. — FAB-MS: *m/z* (%) = 1676 (8) [M + Na⁺], 1654 (4) [M + H⁺], 1323 (3), 1305 (23), 1169 (2), 1112 (31), 1070 (9), 1052 (27), 921 (25), 782 (12), 750 (12), 367 (12), 331 (73), 109 (100).

C₇₉H₁₁₆N₂O₃₅ · 2 H₂O (1689.8) Ber. C 56.15 H 7.16 N 1.66
Gef. C 56.42 H 7.15 N 1.66

13) *N*′-[4-(25-Hydroxy-5-cholesten-3β-yloxy)succinyl]-*N*-[tris(β-*D*-galactopyranosyloxymethyl)methyl]glycinamid [(Gal)₃-TRIS-Gly-SUCC-25-HO-Chol, **6g**]: Zu einer Lösung von 20 mg (12 µmol) **6f** in 5 ml MeOH gibt man aus einer Spritze bei 0°C 30 µl (30.3 mg, 0.95 mmol) wasserfreies Hydrazin. Nach 4tägigem Stehenlassen bei –20°C wird zweimal nacheinander mit je 2 ml Aceton versetzt und eingedampft. Man reinigt den farblosen Rückstand mittels SC [CHCl₃/MeOH/Wasser (54:40:6)] und erhält farbloses, glasartiges **6g**. — Ausb. 5.0 mg (36%). — DC-C: R_f = 0.48. — [α]_D²⁰ = –10.12 (*c* = 1 in DMSO). — ¹H-NMR (400 MHz, [D₆]DMSO): δ = 8.07 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, NH), 7.08 (s, 1H, NH), 5.34 (m, 1H, 6-H von 25-HO-Chol), 4.91 (d, *J* = 3.8 Hz, 3H, OH), 4.77 (br. s, 3H, OH), 4.64 (t, *J* = 5.5 Hz, 3H, OH), 4.43 (m mit d, *J* = 4.8 Hz, 4H, OH und 3-H von 25-HO-Chol), 4.16–4.01 [m mit d bei δ = 4.11, *J* = 7.0 Hz, s bei δ = 4.06 und d bei δ = 4.04 (*J* = 10.5 Hz), 10H, 1′-H, ≡CCH_AHO und OH von 25-HO-Chol], 3.73 (d, *J* = 10.5 Hz, 3H, ≡CCH_BHO), 3.67 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, NHCH₂CO), 3.61 (t-artiges m, 3H, 4′-H), 3.56–3.42 (m, 6H, 6′-H), 3.42–3.15 (m, 9H, 2′-, 3′- und 5′-H), 2.47–2.39 (m, 4H,

COCH₂CH₂CO), 2.25 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, 4-H von 25-HO-Chol), 2.1–0.9 [m mit s bei $\delta = 1.02$, 0.98 und d bei $\delta = 0.90$ ($J = 6.5$ Hz), 37H, H von 25-HO-Chol], 0.65 (s, 3H, H von 25-HO-Chol). — ¹³C-NMR (100 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 171.81$, 171.22, 169.02, 139.59, 122.08, 104.49, 75.18, 73.31, 73.27, 70.73, 68.80, 68.16, 67.38, 60.34, 59.68, 56.15, 55.62, 49.44, 48.62, 44.16, 42.37, 41.88, 39.20, 37.66, 36.51, 36.21, 36.12, 35.26, 31.39, 31.30, 29.70, 29.43, 29.25, 29.19, 27.83, 27.34, 23.90, 20.59, 20.27, 19.01, 18.59, 11.71. — FAB-MS: m/z (%) = 1171 (6) [M+Na⁺], 1149 (4) [M+H⁺], 987 (2), 969 (2), 807 (2), 753 (2), 691 (4), 663 (2), 645 (3), 551 (5), 423 (2), 385 (3), 367 (22), 279 (10), 261 (19), 239 (13), 237 (10), 217 (40), 215 (14), 181 (17), 131 (48), 109 (37), 93 (20), 91 (100).

CAS-Registry-Nummern

1b: 29022-11-5 / **2b**: 127619-22-1 / **3c**: 127619-23-2 / **3e**: 127619-24-3 / **3f**: 127645-43-6 / **3g**: 127619-25-4 / **4**: 54714-11-3 / **5a**: 1510-21-0 / **5b**: 127619-26-5 / **5c**: 73670-11-8 / **5d**: 73670-26-5 / **5e**: 2140-46-7 / **6a**: 127619-21-0 / **6b**: 91202-79-8 / **6c**: 127619-27-6 / **6d**: 127645-28-7 / **6e**: 127619-28-7 / **6f**: 127619-29-8 / **6g**: 127619-30-1 / TRIS: 77-86-1 / Boc-Gly-O-TDO: 69668-06-0 / Acetobrom-galactose: 3068-32-4 / Cholesterin: 57-88-5

- ¹⁾ G. Ashwell, J. Harford, *Annu. Rev. Biochem.* **51** (1982) 531.
- ²⁾ G. Barratt, J.-P. Tenu, A. Yapo, J.-F. Petet, *Biochim. Biophys. Acta* **862** (1986) 153.
- ³⁾ L. Fiume, B. Bassi, C. Busi, A. Mattioli, G. Spinosa, H. Faulstich, *FEBS Lett.* **203** (1986) 203.
- ⁴⁾ P. R. Dragsten, D. B. Mitchell, G. Covert, T. Baker, *Biochim. Biophys. Acta* **926** (1987) 270.
- ⁵⁾ A. D. Attie, R. C. Pittman, D. Steinberg, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77** (1980) 5923.
- ⁶⁾ J. Hartford, G. Ashwell, *Glycoconjugates* **4** (1982) 27.
- ⁷⁾ R. T. Lee, P. Lin, Y. C. Lee, *Biochemistry* **23** (1984) 4255.
- ⁸⁾ H. Lee, S. Kelm, T. Yoshino, R. Schauer, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369** (1988) 705.

- ⁹⁾ H.-J. M. Kempen, C. Hoes, J. H. van Boom, H. H. Spanjer, J. de Lange, A. Langendoen, T. J. C. van Berkel, *J. Med. Chem.* **27** (1984) 1306.
- ¹⁰⁾ H.-J. M. Kempen, F. Kuipers, T. J. C. van Berkel, R. J. Vonk, *J. Lipid Res.* **28** (1987) 659.
- ¹¹⁾ T. J. C. van Berkel, J. K. Kruit, H. H. Spanjer, J. F. Nagelkerke, L. Harkes, H.-J. M. Kempen, *J. Biol. Chem.* **260** (1985) 2694; T. J. C. van Berkel, J. K. Kruijt, H.-J. M. Kempen, *J. Biol. Chem.* **260** (1985) 12203.
- ¹²⁾ Durchführung der Berechnungen mit dem Programm: M. J. C. Crabbe, J. R. Appleyard, *Desktop Molecular Modeller*, Oxford University Press, Oxford 1988.
- ¹³⁾ B. Helferich, B. Zirner, *Chem. Ber.* **95** (1962) 2604.
- ¹⁴⁾ Y. C. Lee, *Carbohydr. Res.* **67** (1978) 509.
- ¹⁵⁾ G. Wulff, G. Röhle, *Angew. Chem.* **86** (1974) 173; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **13** (1974) 157; G. Wulff, W. Schmidt, *Carbohydr. Res.* **53** (1977) 33.
- ¹⁶⁾ E. Battyka, *Mag. Biol. Kutatintez. Munkai* **13** (1941) 334 [*Chem. Abstr.* **36** (1942) 484].
- ¹⁷⁾ O. Hollitzer, A. Seewald, W. Steglich, *Angew. Chem.* **88** (1976) 480; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **15** (1976) 444.
- ¹⁸⁾ W. Steglich, U. Hamacher, H. Rehwinkel, Publikation in Vorbereitung.
- ¹⁹⁾ H. Kunz, S. Birnbach, *Angew. Chem.* **98** (1986) 354; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **25** (1986) 360; N. V. Bovin, S. E. Zurabyan, A. Y. Khorlin, *J. Carbohydr. Chem.* **2** (1983) 249; Y. Ishido, N. Sakairi, M. Sekiya, N. Nakazaki, *Carbohydr. Res.* **97** (1981) 51.
- ²⁰⁾ H. Egge, J. Peter-Katalinić, *Mass Spectrom. Rev.* **6** (1987) 331.
- ²¹⁾ G. Schnorrenberg, W. Steglich, *Angew. Chem.* **91** (1979) 326; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **18** (1979) 307.
- ²²⁾ M. Fieser, L. F. Fieser, *Reagents for Organic Synthesis*, Bd. 2, S. 191, Wiley, New York 1969.
- ²³⁾ L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **37** (1972) 3403.
- ²⁴⁾ W. G. Salmond, M. C. Sobola, *Tetrahedron Lett.* **1977**, 1695; J. J. Partridge, S. Faber, M. R. Uskoković, *Helv. Chim. Acta* **57** (1974) 764.
- ²⁵⁾ L. Lapatsanis, C. Profilis, P. Catsoulacos, *J. Chem. Eng. Data* **25** (1980) 287 [*Chem. Abstr.* **93** (1980) 11495n].
- ²⁶⁾ H. J. Reich, M. Jautelat, M. T. Messe, F. J. Weigert, J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* **91** (1969) 7445.

[51/90]