



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 23 926 T2** 2004.07.15

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 821 691 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 23 926.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/01944**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 904 258.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/030061**

(86) PCT-Anmeldetag: **05.02.1997**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **21.08.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **04.02.1998**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **06.08.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.07.2004**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **C07H 1/00**  
**C07H 15/10**

(30) Unionspriorität:

**602580 16.02.1996 US**

(73) Patentinhaber:

**Ludwig Institute for Cancer Research, New York,  
N.Y., US**

(74) Vertreter:

**LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,  
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**SCHMIDT, Richard, D-78464 Konstanz, DE;  
CASTRO-PALOMINO, Julio C., D-78464 Konstanz,  
DE; DOLL, Andreas, D-78464 Konstanz, DE;  
RITTER, Gerd, New York, US; OLD, Lloyd J., New  
York, US**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR SYNTHESE VON GM2**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung****GEBIET DER ERFINDUNG**

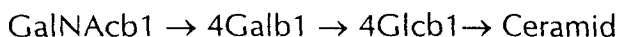
[0001] Diese Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung von synthetischen GM2s. Die durch die Verfahren gemäß vorliegender Erfindung hergestellten GM2s weisen eine Reinheit von über 95% auf und besitzen dieselbe Immunreaktivität mit Anti-GM2-Antikörpern wie von Rinderhirn herrührende GM2s.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

[0002] Ganglioside gehören zur Molekülklasse der Glykolipide. Verschiedene Ganglioside wurden als markante Zelloberflächenbestandteile von verschiedenen transformierten Zellen, einschließlich Melanomen, sowie anderen Tumoren neuroektodermalen Ursprungs identifiziert. Siehe beispielsweise Ritter und Livingston et al., Sem. Canc. Biol. 2, 401–409 (1991), und Oettgen, VCH Verlagsgesellschaft (Weinheim, Deutschland (1989)).

[0003] Ganglioside sind als Mono-, Di-, Tri- oder Polysialoganglioside bekannt, je nach dem Glykosylierungsgrad mit Sialsäureresten. Abkürzungen zur Identifizierung dieser Moleküle umfassen "GM1", "GD3", "GT1" usw., wobei "G" für Gangliosid steht und "M", "D" oder "T" usw. sich auf die Zahl von Sialsäureresten bezieht, und die Zahl oder Zahl plus Buchstabe "z. B. "GT1a") sich auf das beobachtete Bindungsmuster des Moleküls bezieht. Siehe Lehninger, Biochemistry, S. 294–296, Worth Publishers (1981); Wigandt, Glycolipids: New Comprehensive Biochemistry, S. 199–260, Neuberger et al., Hrsg., Elsevier (1985).

[0004] Das Monosialogangliosid GM2 weist die folgenden Struktur auf:



$$3$$

$$\uparrow$$

$$2\alpha\text{NeuAc}$$

[0005] Die Ganglioside sind vorherrschende Zelloberflächenmarker auf transformierten Zellen, wie z. B. Melanomen. Das hat sich zu attraktiven Zielen der Krebsforschung gemacht. Livingston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 2911–2915 (1987), beschreiben Ergebnisse eines Versuchs auf Vakzinenbasis, worin von Melanomen befallenen Probanden entweder ganze Zellen, die hohe Gehalte an GM2, reinem GM2 oder reinem GM2 plus bakteriellen Adjuvantien aufweisen, als Vakzine verabreicht werden. Siehe auch Livingston et al., J. Clin. Oncol. 12/5, 1036–1044 (1994), und Irie et al., US-Patent Nr. 4.557.931, die sich mit der Verwendung von GM2 als Vakzine beschäftigen.

[0006] In Zusammenhang mit der Immunologie von Gangliosiden treten einzigartige Schwierigkeiten auf, auf die hierin im Folgenden kurz eingegangen wird. Erstens sind, weil diese Moleküle auf transformierten Zellen vorherrschen, sie auch auf bestimmten normalen Zellen, wie z. B. Nervenzellen, häufig. Bei der Verabreichung von Gangliosiden an einen Probanden besteht das Risiko, dass die resultierende Antikörperreaktion normale Zellen schädigt. Tatsächlich sind bestimmte Autoimmunpathologien, wie z. B. das Guillain-Barre-Syndrom, durch Autoimmunantikörper charakterisiert, die mit GM1 oder GQ1b reaktiv sind. Siehe beispielsweise Yuki et al., J. Exp. Med. 178, 1771–1775 (1993); Aspinall et al., Infect & Immun. 6295, 2122–2125 (1994).

[0007] Darüber hinaus besteht das praktische Problem, dass hochreine Ganglioside extrem schwierig in für Immunisierungsprotokolle ausreichenden Mengen zu erhalten sind. Derzeit ist kein praktisches Syntheseverfahren verfügbar. Als Folge werden Ganglioside durch Reinigung von Gewebe, wie z. B. bovinem Schädelgewebe, erhalten. Sogar unter optimalen Bedingungen sind die Ausbeuten an reinen Gangliosiden, insbesondere GM2, verschwindend gering. Außerdem bringt die Reinigung von Säugetiergewebe das Risiko der Übertragung von Kontaminanten, wie z. B. Viren, Prionenteilchen usw., mit sich. Alternative Verfahren zum Erhalt von gangliosidspezifischen Antikörpern sind daher äußerst wünschenswert.

[0008] Aufgrund der Bedeutung von Gangliosiden ist es wünschenswert, ein Verfahren zur Synthese hoher Ausbeuten an reinen Gangliosiden zu entwickeln. Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben neue Verfahren zur Synthese von reinen GM2s in hohen Ausbeuten entwickelt. Andere Verfahren zur Entwicklung synthetischer GM2s werden von Hasegawa et al., J. Carbohydrate Chemistry 11(6), 699–714 (1992), und Sugimoto et al., Carbohydrate Research 156, C1–C5 (1986), beschrieben. Die hierin beschriebene Erfindung stellt eine Weiterentwicklung des Stands der Technik dar, da die hierin beschriebenen Verfahren in diesen Literaturangaben nicht vorgeschlagen werden.

## ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0009] Diese Erfindung betrifft Verfahren zur Synthese von GM2. Beim ersten Verfahren werden eine Trisaccharidverbindung IIIa oder IIIb und eine Glykosyl-Donorverbindung IV in Gegenwart eines Katalysators glykosyliert, um eine Tetrasaccharidverbindung Va oder Vb zu erhalten. Die N-Trichlorethoxycarbonylgruppe wird entfernt, und die Acetamidogruppe wird von Verbindung Va oder Vb freigesetzt, um eine Acetamino-Derivatverbindung VIa oder VIb zu erhalten. Die Verbindung VIa oder VIb wird debenzyliert und O-acetyliert, um eine Verbindung VIIa oder VIIb zu erhalten, die dann in GM2 übergeführt wird.

[0010] Beim zweiten Verfahren werden eine Trisaccharidverbindung IIIa oder IIIb und eine Glykosyl-Donorverbindung VIII in Gegenwart eines Katalysators glykosyliert, um eine Verbindung IXa oder IXb zu erhalten. Die Verbindung IXa oder IXb wird in eine Acetamino-Derivatverbindung VIa oder VIb umgewandelt. Die Verbindung VIa oder VIb wird debenzyliert und O-acetyliert, um eine Verbindung VIIa oder VIIb zu erhalten, die dann in GM2 überführt wird.

[0011] Beim dritten Verfahren werden eine Trisaccharidverbindung IIIa oder IIIb und eine Glykosyl-Donorverbindung X in Gegenwart eines Katalysators glykosyliert, und das Glykosylierungsprodukt wird in situ mit Zink in einem Essigsäureanhydrid behandelt, um eine Verbindung VIa oder VIb zu erhalten. Die Verbindung VIa oder VIb wird debenzyliert und O-acetyliert, um eine Verbindung VIIa oder VIIb zu erhalten, die dann in GM2 übergeführt wird.

## KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0012] Die obige kurze Beschreibung sowie weitere Ziele und Merkmale der folgenden Erfindung werden durch die folgende detaillierte Beschreibung der Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung und die beiliegenden Zeichnungen klarer verständlich, wobei:

[0013] **Fig. 1** aus **Fig. 1A, 1B** und **1C** besteht und eine schematische Darstellung von Verfahren und Verbindungen darstellt, die zur Herstellung von GM2 gemäß vorliegender Erfindung eingesetzt werden;

[0014] **Fig. 2** eine Dünnschichtchromatographie des synthetischen GM2 der Erfindung darstellt, die mit Resorcin für eine Sialsäure enthaltende Verbindungen gefärbt ist;

[0015] **Fig. 3** eine Dünnschichtchromatographie des synthetischen GM2 der Erfindung darstellt, die mit Iodampf für ein Lipid enthaltende Verbindungen gefärbt ist;

[0016] **Fig. 4** die Immunreaktivität des synthetischen GM2 der Erfindung und von Rinderhirn stammendem GM2 mit mAb 10, 11 durch ELISA darstellt;

[0017] **Fig. 5** die Immunreaktivität des synthetischen GM2 der Erfindung und von Rinderhirn stammendem GM2 mit mAb 45, 114 durch ELISA darstellt;

[0018] **Fig. 6** die Immunreaktivität des synthetischen GM2 der Erfindung und von Rinderhirn stammendem GM2 mit Seren darstellt, die von einem Melanom-Patienten stammen, der mit von Rinderhirn stammendem GM2 vakziniert worden war; und

[0019] **Fig. 7** die Immunreaktivität des synthetischen GM2 der Erfindung und von Rinderhirn stammendem GM2 mit mAb 10, 11 mittels Immun-Dünnschichtchromatographie darstellt.

## DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0020] Diese Erfindung betrifft Verfahren zur Synthese von GM2. Beim ersten Verfahren werden mit GM3 verwandte Trisaccharide (Verbindung IIIa und IIIb, **Fig. 1A**, worin R = Benzyl oder R = Pivaloyl ist) erhalten. Diese Verbindungen können erhalten werden, indem bekannte Sialyl-Donoren (Verbindung I (**Fig. 1A**) worin R = Ethyl ist) und bekannte Glykosyl-Akzeptoren (Verbindung II, **Fig. 1A**, worin R = Benzyl oder Pivaloyl ist) eingesetzt werden. (Siehe T. J. Martin et al., Glycoconjugate J., Bd. 10, S. 16–28 (1993), und Murase et al., Carbohydr. Res., Bd. 184, S. C1–C4 (1984)). Zinn(II)-trifluormethansulfonat, Ytterbium(III)-trifluormethansulfonat, Kupfer(II)-trifluormethansulfonat, Silber(I)-trifluormethansulfonat und verwandte Metalltrifluormethansulfonate werden hierin als Katalysatoren eingesetzt. Diese Katalysatoren sind besser als der herkömmliche Katalysator Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (T. J. Martin et al., w. o.). So werden höhere Ausbeuten der gewünschten  $\alpha$ -Produktverbindung III erhalten.

[0021] Eine direkte Umsetzung von Ethyl-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-(N-trichlorethoxycarbonyl)-acetamido-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranosid (Verbindung IV, **Fig. 1A**) mit Verbindung III in Gegenwart von N-Iodsuccinimid (NIS) und Trifluormethansulfonsäure als Promotorsystem führt zu Benzyl-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-(N-trichlorethoxycarbonyl)acetamido- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-(1-4)-[methyl(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy-D-glycero- $\alpha$ -D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]-(2-3)-2,6-di-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzyl- (Verbindung Va, **Fig. 1A**) bzw. -3,6-di-O-benzyl-2-O-pivaloyl- $\alpha/\beta$ -D-glucopyranosid (Verbindung Vb, **Fig. 1A**). Von Verbindung Va oder Vb wird dann die N-Trichlorethoxycarbonylgruppe mithilfe von Zink in Essigsäure entfernt, wodurch die Acetamidogruppe frei-

gesetzt

und

Benzyl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-(1-4)-[methyl(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- $\alpha$ -D-galacto-2-nonulopyranosyl)onatel]-(2,3)}-(2,6-di-O-benzyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-(1,4)-2,3,6-tri-O-benzyl (Verbindung VIa, **Fig. 1A**) bzw. -3,6-di-O-benzyl-2-O-pivaloyl- $\alpha/\beta$ -D-glucopyranosid (Verbindung VIb, **Fig. 1A**) erhalten wird.

[0022] Als Nächstes führt das Entfernen der O-Benzylgruppen und eine darauffolgende Behandlung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin unter Standardbedingungen zu den Syntheseprodukten VIIa und VIIb (**Fig. 1A**), die dann unter Einsatz bekannter Verfahren in GM2 übergeführt werden (siehe R. R. Schmidt et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, Bd. 25, S. 725–726 (1986) und Liebigs Ann. Chem, S. 449–464 (1994). Umsetzungen von IIIa und IIIb mit bekanntem Methyl-3,4,6-tri-O-acetyl-2-(N-acetyl)acetamido-2-desoxy-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranosid, das mehr als eine reaktive N-Acylgruppe aufweist, als Glykosyl-Donor (siehe J. C. Castro-Palomino et al., *Tetrahedron Lett.*, Bd. 36, S. 6871–6874 (1985)) führte hauptsächlich zu einer N/O-Acetyl-Übertragung, wodurch hohe Produktausbeuten der Verbindungen Va und Vb verhindert werden. Daher sind die Verbindungen IVa und IVb und strukturell verwandte Verbindungen, die selektiv entfernbare N-Carbonylgruppierungen (beispielsweise Benzyloxycarbonyl, Allyloxycarbonyl, usw.) aufweisen, ideale Glykosyl-Donoren für hohe Glykosid-Ausbeuten an dieser sterisch gehinderten 4-Hydroxygruppe der Galactosegruppierung. Außerdem sind sie für direkte Freisetzung der 2-Acetamidogruppe an der gewünschten N-Acetylgalactosamingruppierung zugänglich, ohne zur zwischenzeitlichen Bildung einer freien Aminogruppe zu führen.

[0023] Ein zweites Verfahren zur Synthese von GM2 erfordert die Überführung der Verbindung III in Verbindung VI. Dieses Verfahren basiert auf der Verwendung von O-(3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-trichloracetamido- $\alpha$ -galactopyranosyl)trichloracetimidat (Verbindung VIII, **Fig. 1B**) als Glykosyl-Donor, beispielsweise mit IIIa oder IIIb als Glykosyl-Akzeptoren, welche die schwach reaktive 4-Hydroxygruppe der Galactose-Gruppierung aufweisen.

So werden Benzyl-O-(3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-2-trichloracetamido- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-(1-4)-[methyl(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-D-glycero- $\alpha$ -D-galacto-2-nonulopyranosyl)-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzyl- (Verbindung IXa, **Fig. 1B**) bzw. -3,6-di-O-benzyl-2-O-benzyl-2-O-pivaloyl- $\alpha,\beta$ -D-glucopyranosid (Verbindung IXb, **Fig. 1B**) in guten Ausbeuten erhalten. Eine reduktive Entfernung der Chloratome in der Trichloracetamido-Gruppe, beispielsweise mit Tributylzinnhydrid, führt direkt zu den gewünschten Acetamido-Derivaten VIa und VIb. So zeigt sich, dass jede stark Elektronen anziehende Gruppe an der Aminogruppe der Galactosamingruppierung, die nach dem Glykosylierungsschritt direkt in eine N-Acetylgruppe überführt werden kann, für diesen Zweck geeignet ist. Das wird in einem dritten Verfahren aufgezeigt, bei dem die Elektronen anziehende N-Trichlorethoxycarbonylgruppe eingesetzt wird, um die Glykosylierungsreaktion zu unterstützen, und dann in situ durch eine N-Acetylgruppe mit Zink in Essigsäureanhydrid ersetzt wird.

[0024] Bei der vorliegenden Erfindung werden neue Katalysatoren für die Anbindung des Neu-5Ac-Rests an die Lactose-Gruppierung eingesetzt, wodurch  $\alpha$ (2-3)-gebundene Zwischenprodukte vom GM3-Typ bereitgestellt werden. Der GalNAc-Rest wird an die schwach reaktive 4-OH-Gruppe der Gal-Gruppierung gebunden, um ein GM2-Tetrasaccharid zu erhalten. Verfahren mit Blei in den Deprotektionsschritten, um Aminogruppen freizusetzen (beispielsweise die Azido- oder die Phthalimidogruppe), führen aufgrund von Schwierigkeiten beim Entfernen der Schutzgruppen häufig zu geringen Ausbeuten und/ oder zu Nebenreaktionen (Lactam-Bildung mit der Estergruppe der Neu5Ac-Rests). Die hierin beschriebene Erfindung stellt Verfahren bereit, die eine leicht entfernbare Hilfsgruppe an der 2-Acetamidogruppe oder einen Ersatz für die 2-Acetamidogruppe des GalNAc-Rests ermöglichen. So wird die erforderliche Förderung der Glykosyl-Donoreigenschaften mit der direkten Freisetzung der 2-Acetamidogruppe erzielt, ohne auf das freie Amin und seine spätere N-Acetylierung zurückzugreifen.

#### Beispiel 1

[0025] Um  $\text{II}^3\text{NeuAcGgOse}_3\text{Cer}$ , hierin als GM2, I bezeichnet, herzustellen, wurden Verbindung I (R = Ethyl) und Verbindungen IIa und IIb wie von T. J. Martin et al., *Glycoconjugate J.* 1993, w. o. beschrieben hergestellt. Um die Verbindungen IIa und IIb zu erhalten, wurde eine Lösung des Donors I (1 mMol) und des Akzeptors III (1,5 mMol) in trockenem Acetonitril (5 ml) auf  $-40^\circ\text{C}$  abgekühlt. Unter Stickstoffatmosphäre wurde der Katalysator (0,15 mMol) Zinn(II)-trifluormethansulfonat zugesetzt. Nach 1 Stunde wurde die Lösung mit Triethylamin neutralisiert und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde durch Flashchromatographie auf Kieselgel mit Toluol-Aceton (3 : 1) als Eluent gereinigt, um die Verbindung III mit einer Ausbeute von 65% zu erhalten. Für NMR-Daten siehe T. J. Martin et al., *Glycoconjugate J.* 1993, w. o.

[0026] In Verbindung IV kann y jedes leicht entfernbare Oxycarbonyl-, Thiocarbonyl- oder Aminocarbonyl-Derivat, einschließlich, aber nicht ausschließlich, 2,2,2-Tribromethoxycarbonyl, Allyloxycarbonyl, Benzyloxycarbonyl, 4-Nitrophenylethoxycarbonyl oder Trichlormethylthiocarbonyl, sein. Die Glykosyl-Donorverbindung IV (R = Methyl, Y = Trichlorethoxycarbonyl) wurde mithilfe des folgenden Verfahrens erhalten:

[0027] 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-amino-2-desoxy- $\beta$ -D-galactopyranose wurde wie von R. Bergmann et al.,

Chem. Ber., Bd. 64, S. 977–979 (1991) beschrieben hergestellt. Dieses kristalline Amin (3,2 g, 9,21 mMol) wurde bei 0 °C in wasserfreiem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 ml) gelöst, und Hünig-Base (1,7 ml, 18,8 mMol) und Trichlorethoxycarbonylchlorid (1,5 ml, 11,05 mMol) wurden nacheinander zugesetzt. Das Gemisch wurde 30 Minuten lang gerührt und dann mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 ml) verdünnt, mit Wasser, einer gesättigten wässrigen  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und Wasser gewaschen, mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wurde aus einer Kieselgel-Säule mit 2 : 1 Hexan : Ethylacetat eluiert, um 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-trichlorethoxycarbonylamino- $\beta$ -D-galactopyranosid (4,9 g, 97%) zu erhalten. Die Ethylthiogruppe wurde mithilfe eines Verfahrens nach M. Schultz et al. Tetrahedron Asymmetry, Bd. 4, 1205–1250 (1993) in diese Verbindung eingeführt, um Ethyl-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-1-thio-2-trichlorethoxycarbonylamino-B-D-galactopyranosid zu erhalten.

[0028] Für seine Überführung in Verbindung IV wurde das folgende Verfahren eingesetzt: Ein Gemisch aus Ethyl-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-1-thio-2-trichlorethoxycarbonylamino- $\beta$ -D-galactopyranosid (1,74 g, 3,31 mMol),  $\text{Ac}_2\text{O}$  (0,78 ml, 8,28 mMol), Hünig-Base (0,56 ml, 3,31 mMol) und N,N-Dimethylaminopyridin (0,4 g, 3,31 mMol) wurde zwei Tage lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, und der Rückstand wurde durch Flashchromatographie mit Toluol/Ethylacetat (6 : 1) gereinigt, um Verbindung IV (1,70 g, 3,00 mMol, 91%) zu erhalten.  $[\alpha]_D^{22} -51,2$  ( $c = 1$ ,  $\text{CHCl}_3$ );  $R_f$  0,42 (Toluol/Ethylacetat, 4 : 1).

[0029] Für die Glykosylierung von III mit IV, um die Tetrasaccharidverbindungen Va und b zu erhalten, wurde das folgende allgemeine Verfahren eingesetzt: Verbindung III (0,34 mMol) und Verbindung IV (401 mg, 0,68 mMol) wurden in Dichlormethan (5 ml) gelöst. N-Iodsuccinimid (168 mg, 0,75 mMol) und Trifluormethansulfonsäure (0,67  $\mu\text{l}$ , 0,075 mMol) wurden nacheinander zugesetzt, und das Gemisch wurde 30 Minuten lang gerührt, bis ein DC (Toluol/Aceton, 3 : 1) eine vollständige Umsetzung aufzeigte. Das Gemisch wurde mit Dichlormethan verdünnt und mit gesättigtem wässrigem  $\text{NaHCO}_3$ , 1 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung und Wasser gewaschen, mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wurde durch Kieselgel-Säulenchromatographie (Toluol/Aceton, 3 : 1) gereinigt, um Verbindung V (61%) zu erhalten.

[0030] Für die sofortige Überführung in die Acetamido-Derivatverbindungen VIa und b wurde das folgende Verfahren eingesetzt: Eine Lösung der Tetrasaccharidverbindung V (0,18 mMol) in Essigsäure (10 ml) wurde 4 Stunden lang heftig mit 150 mg frisch aktiviertem Zinkpulver gerührt. Die Suspension wurde durch Celite filtriert und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde durch Kieselgel-Säulenchromatographie mit Toluol/Aceton, 3 : 1, gereinigt, um Verbindung VI (90%) zu erhalten.

[0031] Die Strukturen dieser Verbindungen konnten eindeutig zugeordnet werden: Verbindung VIa weist physikalische Daten auf, die mit einem Material übereinstimmen, das auf einem unterschiedlichen Weg erhalten wurde (siehe M. Sugimota et al., Carbohydr. Res., S. 56, C1–C5 (1986)). Die Struktur der Verbindung VIb ergab sich aus den  $^1\text{H}$ -NMR-Daten (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ );  $\delta = 1.73\text{--}2.19$  ( $9 \times \text{s}$ , 27H,  $9 \times \text{CH}_3$ ), 1.18 (s, 9H, tBu), 2.11 (dd, 1H,  $3c_a\text{-H}$ ), 2.22 (dd, 1H,  $3c_a\text{-H}$ ), 3.15 (m, 1H, 6a-H), 3.29 (m, 1H, 6a-H), 3.39–3.47 (m, 3H, 5A-H + 2b-H + 6b-H), 3.66 (dd, 1H,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 10$  Hz, 3a-H), 3.72 (m, 2H, 6b-H + 4b-H), 3.79 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 9.8$  Hz,  $J_{3,4} = 1.4$  Hz, 3b-H), 3.89 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.90–4.70 (m, 14H,  $5 \times \text{CH}_2\text{Bn} + 2 \times 6d\text{-H} + 2 \times 9c\text{-H}$ ), 4.02 (dd, 1H, 5c-H), 4.37 (d, 1H,  $J_{1,2} = 9.8$  Hz, 1b-H), 4.47 (d, 1H,  $J_{1,2} = 10$  Hz, 1a-H), 4.50 (dd, 1H, 2d-H), 4.89 (d, 1H,  $J_{1,2} = 9.3$  Hz, 1d-H), 5.08 (dd,  $J_{1,2} = J_{2,3} = 10$  Hz, 1H, 2a-H), 5.13 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 9.3$  Hz,  $J_{3,4} = 1.8$  Hz, 3d-H), 5.40 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 1.8$  Hz,  $J_{4,5} = 0.8$  Hz, 4d-H), 5.15–5.32 (m, 2H, 7c-H + 8c-H).

[0032] Debenzylierung der Verbindungen VIa und b und die darauf folgende O-Acetylierung zur Herstellung der Verbindungen VIIa und b wurden unter Einsatz von Standardverfahren durchgeführt. Ein Gemisch aus Verbindung VIa (85 mg, 51  $\mu\text{Mol}$ ) und 10% Pd-C (15 mg) in  $\text{MeOH-CH}_3\text{COOH}$  (8 ml, 5 : 1) wurde 2 Stunden lang bei Raumtemperatur unter  $\text{H}_2$  gerührt. Nach Filtration wurde die Lösung eingeeengt. Ohne Reinigung wurde ein Gemisch aus dem Rückstand, Essigsäureanhydrid (1 ml), Pyridin (1 ml) und 4-Dimethylaminopyridin (12 mg, 0,10 mMol) über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und dann eingeeengt. Der Rückstand wurde auf Kieselgel mit 5 : 1 Toluol-Aceton chromatographiert, um Verbindung VIIa erhalten (66 mg, 94%) zu erhalten.  $[\alpha]_D +1,6^\circ$  ( $c = 1$ ,  $\text{CHCl}_3$ );  $R_f$  0,32, 95 : 5,  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ . Verbindung VIIa ist mit einem Material ident, das auf einem anderen Weg erhalten wurde. Verbindung VII kann dann unter Einsatz von Standardverfahren, die Fachleuten auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, in GM2 übergeführt werden (siehe beispielsweise Schmidt et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., Bd. 25, S. 725–726 (1986) und Liebigs Ann. Chem, S. 449–464 (1994).

#### Beispiel 2

[0033] Ein zweites Verfahren zur Synthese der Verbindung VI wird bereitgestellt. Dieses Verfahren erfordert die Herstellung einer Glykosyl-Donorverbindung VIII. Dies wurde mithilfe des folgenden Verfahrens ausgehend von Galactosamin hergestellt: Trichloracetylchlorid (3,88 ml, 34,8 mMol) wurde bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 30 Minuten zu einer heftig gerührten Lösung von D-Galactosaminhydrochlorid (5 g, 23,4 mMol) und  $\text{NaHCO}_3$  (5,84 g, 69 mMol) in Wasser (46 ml) zugetropft. Das Gemisch wurde 1 Stunde lang gerührt, mit 1 M HCl neutralisiert, eingeeengt und im Vakuum getrocknet. Der Rückstand wurde 3 Stunden lang bei 0 °C mit MeOH (50 ml) gerührt. Die Salze wurden abfiltriert, und das Filtrat wurde eingeeengt, um ein Gemisch aus N-Trichloracetyl-D-galactosamin und D-Galactosamin (quantitative Ausbeute) zu erhalten;  $R_f$  0,20

(Toluol/Aceton, 4 : 6).

[0034] Eine Lösung dieses Rohprodukts (10 g) in Essigsäureanhydrid (25 ml) und Pyridin (1 ml) wurde 3 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt und dann eingeeengt. Der Rückstand wurde auf Kieselgel mit 7 : 1 Toluol-Aceton chromatographiert, um 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-trichloracetamido- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranose als weißen Feststoff (1,85 g, 30 %) zu erhalten.  $\beta$ -Isomer:  $[\alpha]_D + 3,9^\circ$  (c = 1,  $\text{CHCl}_3$ );  $R_f$  0,85 in 95 : 5  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ .

[0035] Das folgende Verfahren ergab eine viel höhere Ausbeute an diesem Material: Eine Lösung von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-amino- $\beta$ -D-galactopyranose (150 mg, 0,43 mMol) und 4-Dimethylaminopyridin (5 mg, 0,04 mMol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  wurde auf  $0^\circ\text{C}$  abgekühlt. Trichloracetylchlorid (53  $\mu\text{l}$ , 0,48 mMol) und N,N-Diisopropylamin (83  $\mu\text{l}$ , 0,48 mMol) wurden zugesetzt. Das Gemisch wurde 3 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt und dann eingeeengt. Der Rückstand wurde auf Kieselgel mit 7 : 1 Toluol/Aceton chromatographiert, um 170 mg, 80% zu erhalten.  $\beta$ -Isomer  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2.16, 2.10, 2.03, 1.97 (4s, 12H, 4Ac), 4.04 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 3.5$  Hz, 5-H), 4.13 (dd, 2H,  $J_{6a,6b} = 11.2$  Hz, 6A-H, 6B-H), 4.42 (ddd, 1H, 2-H), 5.25 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 11.2$  Hz,  $J_{3,4} = 1.3$  Hz, 3-H), 5.37 (d, 1H,  $J_{4,5} = 2.9$  Hz, 4-H), 5.84 (d, 1H,  $J_{1,2} = 8.8$  Hz, 1-Hb), 7.08 (d, 1H, J = 9.6 Hz, NH).

[0036] Die Überführung in die Verbindung VIII wurde wie folgt durchgeführt: Eine Lösung von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-trichloracetamid- $\alpha,\beta$ -D-galactopyranose (1,73 g, 3,5 mMol) und Hydrazinacetat (355 mg, 3,9 mMol) in DMF (20 ml) wurde 2 Stunden lang bei  $0^\circ\text{C}$  gerührt und dann mit EtOAc (60 ml) verdünnt, mit gesättigtem, wässrigen NaCl und Wasser gewaschen, mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und eingeeengt. Ein Gemisch aus dem Rückstand, Trichloracetonitril (3,35 ml, 33,4 mMol) und DBU (0,1 ml, 0,7 mMol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 ml) wurde 30 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt und dann eingeeengt. Der Rückstand wurde mit 2 : 1 Petrolether/Ethylacetat, das 0,1% Triethylamin enthielt, chromatographiert, um Verbindung VIII (1,04 g, 50%) zu erhalten.  $[\alpha]_D + 63^\circ$  (c = 1,  $\text{CHCl}_3$ );  $R_f$  0,62 in 2 : 1 Petrolether/Ethylacetat und 0,1%  $\text{Net}_3$ .  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 2.19, 2.02, 2.01 (3s, 9H, 3Ac), 4.06 (dd, 1H, 6B-H), 4.17 (dd, 1H,  $J_{6a,6b} = 11.3$  Hz, 6A-H), 4.35 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 6.9$  Hz, 5-H), 4.70 (ddd, 1H, 2-H), 5.39 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 11.3$  Hz,  $J_{3,4} = 3.1$  Hz, 3-H), 5.51 (dd, 1H,  $J_{4,5} < 1$  Hz, 4-H), 6.49 (d, 1H,  $J_{1,2} = 3.6$  Hz, 1-Ha), 6.81 (d, 1H,  $J_{9,1}$  Hz, NH), 8.81 (s, 1H, C = NH).

[0037] Verbindung VIII enthält eine Trichloracetylgruppe, die durch Tribromacetyl oder Trifluoracetyl ersetzt werden kann.

[0038] Umsetzung einer Glykosyl-Donorverbindung VIII mit einer Akzeptorverbindung IIIa oder b, um Verbindung IX zu erhalten, wurde wie in Beispiel 1 beschrieben für Verbindung IIIa durchgeführt. Ein Gemisch aus Verbindung VIII (200 mg, 0,34 mMol), Verbindung IIIa (228, 0,17 mMol) und 4-Ä-Molekularsieben in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8 ml) wurde 1 Stunde lang bei Raumtemperatur unter Ar gerührt und dann auf  $0^\circ\text{C}$  abgekühlt. Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (15  $\mu\text{l}$ , 84  $\mu\text{Mol}$ ) wurde zugesetzt, und das Gemisch wurde 2 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Triethylamin (0,1 ml) wurde zugesetzt, und das Gemisch wurde mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  verdünnt, filtriert und eingeeengt. Der Rückstand wurde auf Kieselgel mit 7 : 1 Toluol/Aceton chromatographiert, um Verbindung IXa (222 mg, 74 %) zu erhalten.  $[\alpha]_D + 3^\circ$  (c = 0,33,  $\text{CHCl}_3$ );  $R_f$  0,27 Toluol/Aceton, 4 : 1.

[0039] Die Überführung in die bekannte Verbindung VIa wurde wie folgt durchgeführt: Eine Lösung der Verbindung IXa (130 mg, 73  $\mu\text{Mol}$ ), Tributylstannan (0,29 ml, 1,09 mMol) und Azoisobutyronitril (3 mg) in Benzol (8 ml) wurde 1 Stunde lang unter Ar gerührt und dann 2 Stunden lang rückflusserhitzt, abgekühlt und eingeeengt. Der Rückstand wurde auf Kieselgel mit 7 : 1 Toluol/Aceton chromatographiert, um Verbindung VIa (100 mg, 81%) zu erhalten, die mit dem oben beschriebenen Material ident war;  $[\alpha]_D - 6,8^\circ$  (c = 1,  $\text{CHCl}_3$ );  $R_f$  0,48 95 : 5  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ . Verbindung VIa oder VIb wird dann eingesetzt, um Verbindung VIIa oder VIIb herzustellen, die dann mithilfe von Standardverfahren, die Fachleuten auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, in GM2 übergeführt wird.

### Beispiel 3

[0040] Ein drittes Verfahren zur Synthese der Verbindung VI wird bereitgestellt. Dieses Verfahren erfordert die Herstellung des Glykosyl-Donors X (**Fig. 1C**). Dieser wurde wie folgt erhalten: Eine Lösung von 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-desoxy-2-trichlorethoxycarbonylamino- $\beta$ -D-galactopyranosid (siehe Beispiel 1) (3 g, 5,73 mMol) und Hydrazinacetat (0,6 g, 6,31 mMol) wurde 20 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt und dann mit EtOAc (100 ml) verdünnt, mit Wasser, gesättigtem wässrigem  $\text{NaHCO}_3$  und Wasser gewaschen, getrocknet ( $\text{MgSO}_4$ ) und eingeeengt. Ein Gemisch aus dem Rückstand, Trichloracetonitril (4 ml, 40 mMol) und DBU (0,15 ml, 1 mMol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 ml) wurde 45 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt und dann eingeeengt. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie auf Kieselgel (80 g) mit 3 : 1 Hexan-EtOAc, das 0,1%  $\text{Et}_3\text{N}$  enthielt, gereinigt, um Verbindung X (3,05 g, 93,1%) zu erhalten.  $[\alpha]_D + 64$  (c1,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 6.45 (d, 1H,  $J_{1,2} = 3.8$  Hz, H-1), 8.81 (s, 1H, C=NH), 5.51 (dd, 1H,  $J_{3,4} = J_{4,5}$ , 1.1 Hz, H-4), 5.42 (d, 1H, J = 8.5 Hz, NH), 5.28 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 10$  Hz,  $J_{3,4} = 1.1$  Hz, H-3), 4.72 (dd, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CCl}_3$ ), 4.53 (m, 1H, H-6'), 4.38 (m, 1H, H-6), 4.00–4.25 (m, 2H, H-2 + H-5), 2.00–2.13 (3  $\times$  s, 9H, 3  $\times$   $\text{CH}_3\text{-C}$ ).

[0041] Die Verbindung X enthält eine 2,2,2-Trichlorethoxycarbonylgruppe, die durch 2,2,2-Tribromethoxycar-

bonyl, 2,2,2-Trifluorethoxycarbonyl oder 4-Nitrophenylethoxycarbonyl ersetzt werden kann.

[0042] Ein Gemisch aus Imidat X (120 mg, 0,192 mMol), Akzeptor IIIb (150 mg, 0,128 mMol) und aktivierten 4-Ä-Molekularsieben (200 mg) in wasserfreiem Dichlormethan (5 ml) wurde 1 Stunde lang bei Raumtemperatur unter trockenem Ar gerührt. Trimethylsilyltriflat (0,35 µl, 0,0192 mMol) wurde zugesetzt, und das Gemisch wurde 4 Stunden lang gerührt. Et<sub>3</sub>N (0,1 ml) wurde zugesetzt, und das Gemisch wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 ml) verdünnt, filtriert und eingeeengt. Der Rückstand wurde in einem Gemisch von Ac<sub>2</sub>O : AcOH (5 : 1, 6 ml) gelöst, und Zinkpulver (200 mg) wurde zugesetzt. Das Gemisch wurde 16 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt und dann filtriert und im Vakuum eingeeengt. Säulenchromatographie des Rückstandes ergab VIb (152,7 mg, 78%). Vereinigtes VIb kann verwendet werden, um wie oben beschrieben GM2 herzustellen.

#### Beispiel 4

[0043] Die Reinheit des durch das in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren erhaltenen synthetischen GM2 wurde analysiert. Das GM2 wurde Dünnschichtchromatographie unterzogen, wobei Verfahren eingesetzt wurden, die Fachleuten auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind. Das GM2 wurde mit Resorcin/HCl und Ioddampf sichtbar gemacht, wie in den Kurzbeschreibungen der Figuren erwähnt wurde.

[0044] Das synthetische GM2 enthielt eine Hauptbande, die für Resorcin und Orcinol positiv war. Das synthetische GM2 wandert gemeinsam mit von Rinderhirn stammendem GM2. Außerdem waren nach dem Färben mit Orcinol und Resorcin in den Spuren, die 5 und 10 µg synthetisches GM2 enthielten, drei Hauptbanden detektierbar. Eine Bande wanderte etwas schneller, und zwei Banden wanderten etwas langsamer als die Haupt-GM2-Bande (siehe **Fig. 2**).

[0045] Diese Banden waren auch nach einer Behandlung des synthetischen GM2 mit schwacher Base vor der dünnschichtchromatographischen Trennung detektierbar. Die Basenbehandlung umfasste eine einstündige Behandlung mit 0,05 M NaOH in MeOH bei 50 °C. Außerdem war nach Färbung mit Ioddampf nur die Haupt-GM2-Bande detektierbar (siehe **Fig. 3**).

[0046] Die Reinheit des durch das in Beispiel 1 beschriebene Verfahren synthetisierten GM2 war höher als 95%, wie durch Dünnschichtchromatographie bestimmt wurde.

[0047] In Bezug auf die Bestimmung der Reinheit hängt die Reinheit des Endprodukts im beschriebenen Verfahren von der Reinheit der Ausgangsmaterialien ab. In den hierin beschriebenen Daten würden die 95% erhöht, vielleicht auf 99%, wenn praktische Ausgangsmaterialien mit höherer Reinheit, z. B. Fettsäuren mit 99%iger oder höherer Reinheit, verfügbar wären. Außerdem bezieht sich der Begriff "GM2" eigentlich auf eine Rückgratstruktur, und während die beschriebenen Glykosidketten konstant sind, ist aufgrund der natürlichen Veränderlichkeit in einer Fettsäurezusammensetzung der Moleküle eine bestimmte Veränderlichkeit möglich. Daher ist es besser, sich auf GM2 im Plural (GM2s) zu beziehen oder von "einer Gruppe von Molekülen, die alle die GM2-Rückgratstruktur enthalten" zu sprechen.

#### Beispiel 5

[0048] Die Antigenität des durch das in Beispiel 1 beschriebene Verfahren synthetisierten GM2 wurde mit der Antigenität von Rinderhirn stammendem GM2 verglichen. Dafür wurde das synthetische GM2 durch einen ELISA auf seine Reaktivität mit verschiedenen GM2-Antiseren getestet.

[0049] Um den ELISA durchzuführen, wurden eine Antikörper-Titration und eine GM2-Antigen-Titration (sowohl synthetisches GM2 als auch von Rinderhirn stammendes GM2) vorgenommen. Das synthetische GM2 wurde von drei verschiedenen GM2-reaktiven Antiseren erkannt. Diese Antiseren umfassten einen murinen monoklonalen Antikörper 10,11 (**Fig. 4**), einen humanen monoklonalen Antikörper 45,114 (**Fig. 5**) und Seren von einem Melanom-Patienten, der mit einer Vakzine immunisiert worden war, die von Rinderhirn stammendes GM2 umfasste (**Fig. 6**).

[0050] Die folgende Tabelle 1 zeigt, dass das synthetische GM2 und das von Rinderhirn stammende GM2 im ELISA von denselben Antikörpern erkannt wurden. Im Detail wurden sowohl das synthetische als auch das von Rinderhirn stammende GM2 vom monoklonalen Antikörper 10,11, vom Antikörper 45,114 und von Patienten-Seren, die mit einer von Rinderhirn stammendes GM2 enthaltenden Vakzine immunisiert worden waren, erkannt. Weder das synthetische GM2 noch das von Rinderhirn stammende GM2 wurde von monoklonalen Antikörpern R24 (monoklonale Anti-GD3-Antikörper) oder F31, einem Glykolipide erkennenden Antikörper, erkannt. Auf ähnliche Weise wurden weder das synthetische GM2 noch das von Rinderhirn stammende GM2 von Seren von einem Patienten erkannt, die vorher nicht mit einer von Rinderhirn stammendes GM2 enthaltenden Vakzine immunisiert worden war.

TABELLE 1

Reaktivität von synthetischem und von Rinderhirn stammendem GM2 mit verschiedenen Antiseren durch ELISA

ANTISERUM	VON RINDERHIRN STAMMENDES GM2	SYNTHETISCHES GM2 (C18:0)
	TITER	
Anti-GM2		
mAb 10,11 (mIgM)	> 0,39 $\mu\text{g/ml}$	> 0,39 $\mu\text{g/ml}$
mAb 45,114 (hIgM)	1:4	1:8
Patienten-Serum (von Rinderhirn stammendes GM2 umfassende Vakzine)	1:3200	1:3200
Anti-GD3		
mAbR24 (mIgG)	-	-
sonstige		
mAb F31 (mIgM)	-	-
Patientenserum neg. Pool (IgG)	-	-

## Beispiel 6

[0051] Die Antigenität von synthetischem GM2 wurde unter Einsatz von Immun-Dünnschichtchromatographieverfahren, die Fachleuten auf dem Gebiet der Erfindung bekannt sind, mit der Antigenität von GM2, das von Rinderhirn stammt, verglichen. Ein monoklonaler Antikörper 10,11 (**Fig. 7**) wurde für die Chromatographie verwendet.

[0052] Bei der Herstellung von synthetischem GM2 waren eine Hauptbande und zwei kleinere Banden mit dem monoklonalen Antikörper 10,11 immunreaktiv. Die Hauptbande wanderte gleichzeitig mit dem von Rinderhirn stammenden GM2, während beide kleinere Banden etwas schneller wanderten als die Haupt-GM2-Bande (siehe **Fig. 7**). Die zwei kleineren Banden, die mit den monoklonalen Anti-GM2-Antikörpern immunreaktiv waren, sind wahrscheinlich GM2-Arten, die sich in der Ceramid-Position von der Hauptbande unterscheiden, die C18:0 und d18:1 aufweist. Keine Bande, die unter der Haupt-GM2-Bande wanderte, wurde spezifisch mit dem monoklonalen Antikörper 10,11 gefärbt.

## Beispiel 7

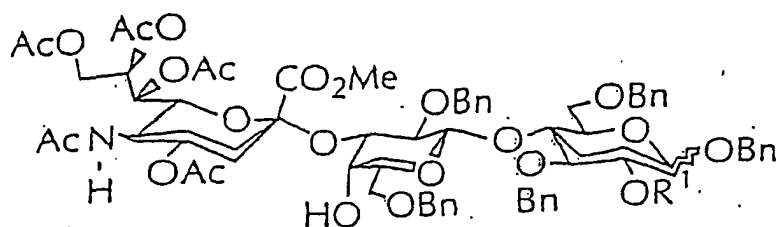
[0053] Kaninchen wurden entweder mit synthetischem GM2, das durch das in Beispiel 1 beschriebene Verfahren erhalten wurde, oder mit von Rinderhirn stammendem GM2 immunisiert, um den Schutz von Anti-GM2-Antikörpern auszulösen. Die Kaninchen wurden vier Mal im Abstand von 3 Wochen mit 200  $\mu\text{g}$  GM2 bei den ersten beiden Immunisierungen und mit 100  $\mu\text{g}$  GM2 bei den darauffolgenden Injektionen immunisiert. Das Freundsche Adjuvans wurde eingesetzt. Nach drei Monaten wurden in Abständen von drei Wochen weitere zwei Immunisierungen vorgenommen.

[0054] Seren von den immunisierten Tieren wurde auf ihre Immunreaktivität getestet. Es zeigte sich, dass sowohl Seren von mit synthetischem GM2 immunisierten Kaninchen als auch Seren von mit von Rinderhirn stammendem GM2 immunisierten Kaninchen niedrige Titer von IgM- und IgG-Anti-GM2-Antikörpern aufwiesen. Beide Seren wiesen denselben geringen Grad an Immunogenität auf. Das weist darauf hin, dass das synthetische GM2 und das von Rinderhirn stammende GM2 vom Immunsystem nicht unterschieden werden können.

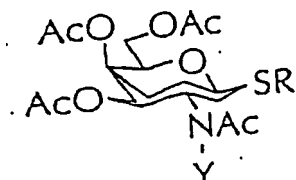
## Patentansprüche

1. Verfahren zum Synthetisieren von GM2, umfassend:

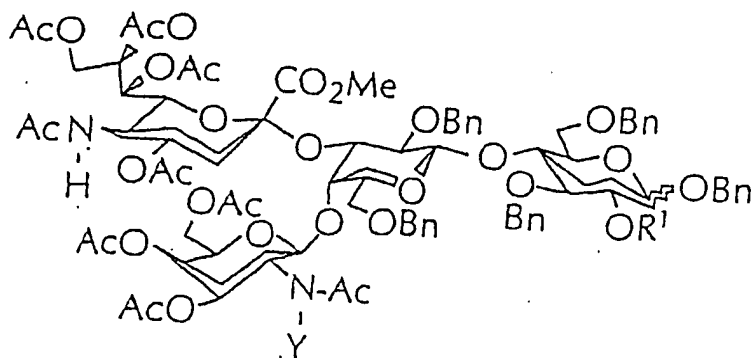
(a) das Erhalten von Trisaccharidverbindung IIIa (worin R<sup>1</sup> Benzyl ist) oder IIIb (worin R<sup>1</sup> Pivaloyl ist):



(b) das Erhalten von Glykosyl-Donorverbindung IV:

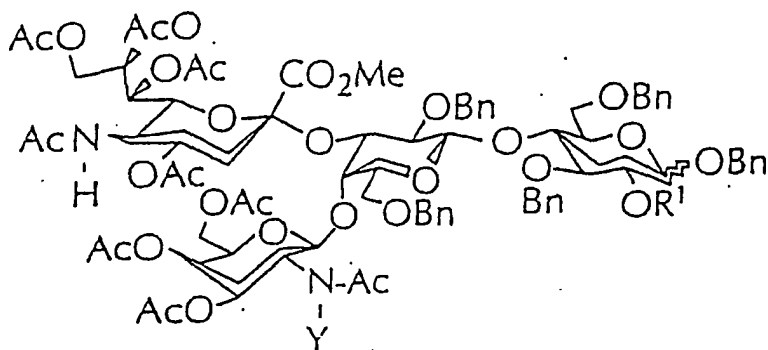


worin R Ethyl ist und Y ein leicht entfernbare Oxycarbonyl-, Thiocarbonyl- oder Aminocarbonyl-Derivat ist;  
(c) das Glykosylieren von Trisaccharidverbindung III mit Verbindung IV in Gegenwart eines Katalysators, um Tetrasaccharidverbindung Va (worin R<sup>1</sup> Benzyl ist) oder Vb (worin R<sup>1</sup> Pivaloyl ist) zu erhalten:



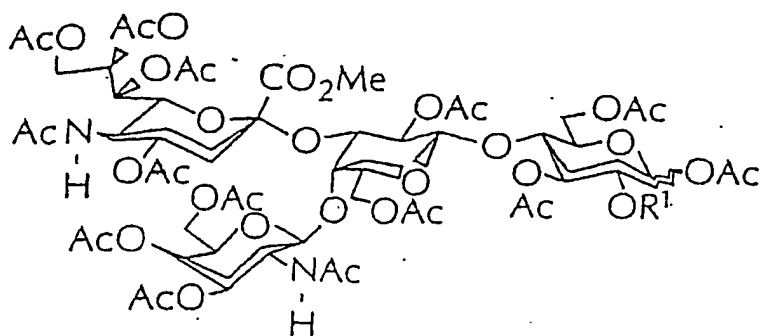
worin Y C(O)OCH<sub>2</sub>C(Cl)<sub>3</sub> ist,

(d) das Entfernen der N-Trichlorethoxycarbonylgruppe und das Freisetzen der Acetamidogruppe der Verbindung Va (worin R<sup>1</sup> Benzyl ist) oder Vb (worin R<sup>1</sup> Pivaloyl ist), um Acetamino-Derivat VIa (worin R<sup>1</sup> Benzyl ist) oder VIb (worin R<sup>1</sup> Pivaloyl ist) zu erhalten:



worin Y Wasserstoff ist;

(e) das Entfernen der O-Benzylgruppe von Verbindung VIa oder VIb, um eine debenzylierte Verbindung zu erhalten, und das O-Acetylieren der debenzylierten Verbindung, um Verbindung VIIa (worin R<sup>1</sup> Acetyl ist) oder VIIb (worin R<sup>1</sup> Pivaloyl ist) zu erhalten; und

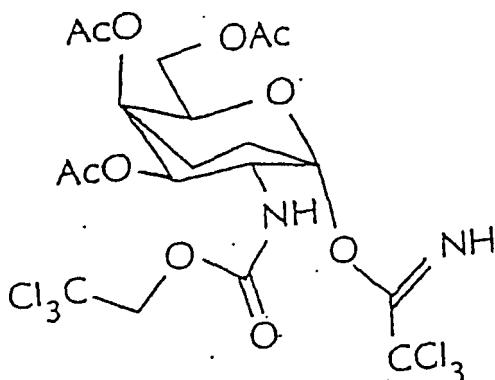


(f) das Überführen von Verbindung VIIa oder VIIb in GM2.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin Y in Glykosyl-Donorverbindung IV aus der aus 2,2,2-Tribromethoxycarbonyl, Allyloxycarbonyl, Benzyloxycarbonyl, 4-Nitrophenylethoxycarbonyl und Trichlormethylthiocarbonyl bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

3. Verfahren zum Synthetisieren von GM2, umfassend:

- (a) das Erhalten von Trisaccharidverbindung IIIa oder IIIb, wie in Anspruch 1 definiert;
- (b) das Erhalten von Glykosyl-Donorverbindung X:



(c) das Glykosylieren von Trisaccharidverbindung IIIa oder IIIb mit Glykosyl-Donor X in Gegenwart eines Katalysators, um nach dem In-situ-Ersetzen der N-Trichlorethoxycarbonylgruppe durch eine Acetylgruppe Verbindung VIa bzw. VIb, wie in Anspruch 1 definiert, zu erhalten;

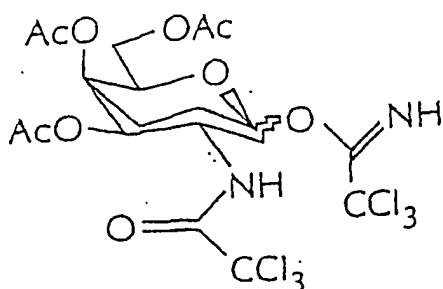
(d) das Entfernen der O-Benzylgruppe von Verbindung VIa oder VIb, um eine debenzylierte Verbindung zu erhalten, und das O-Acetylieren der debenzylierten Verbindung, um Verbindung VIIa oder VIIb, wie in Anspruch 1 definiert, zu erhalten; und

(e) das Überführen von Verbindung VIIa oder VIIb in GM2.

4. Verfahren nach Anspruch 3, worin die 2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl-Gruppe von Glykosyl-Donorverbindung X durch eine Gruppe ersetzt wird, die aus der aus 2,2,2-Tribromethoxycarbonyl, 2,2,2-Trifluorethoxycarbonyl und 4-Nitrophenylethoxycarbonyl bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

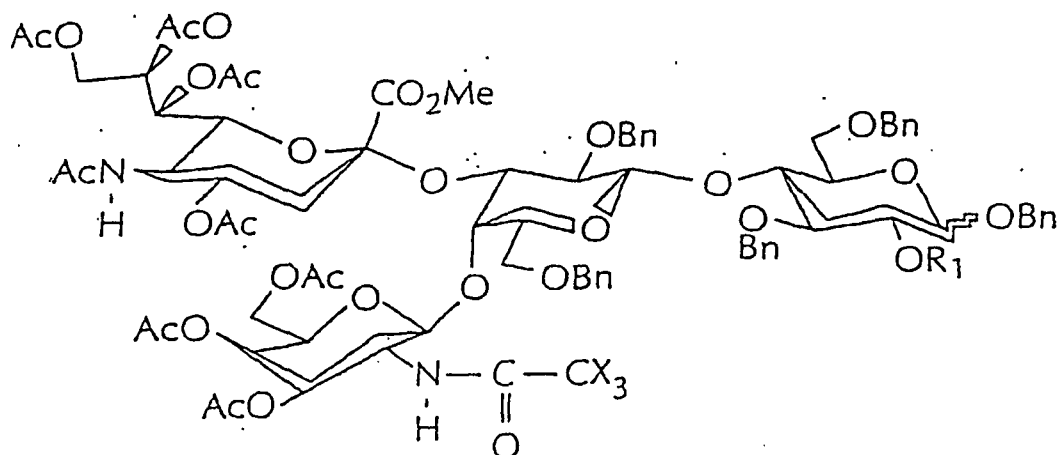
5. Verfahren zum Synthetisieren von GM2, umfassend:

- (a) das Erhalten von Trisaccharidverbindung IIIa oder IIIb, wie in Anspruch 1 definiert;
- (b) das Erhalten von Glykosyl-Donorverbindung VIII:



(c) das Glykosylieren von Trisaccharidverbindung IIIa oder IIIb mit Glykosyl-Donorverbindung VIII in Gegen-

wart eines Katalysators, um Verbindung IXa (worin  $R^1$  Benzyl ist) oder IXb (worin  $R^1$  Pivaloyl ist) zu erhalten:



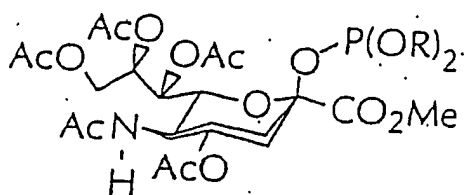
worin X Chlor ist;

(d) das Umwandeln von Verbindung IXa oder IXb in die Acetaminoderivat-Verbindung VIa oder VIb, wie in Anspruch 1 definiert;

(e) das Entfernen der O-Benzylgruppe von Verbindung VIa oder VIb, um eine debenzylierte Verbindung zu erhalten, und das O-Acetylieren der debenzylierten Verbindung, um Verbindung VIIa oder VIIb, wie in Anspruch 1 definiert, zu erhalten; und

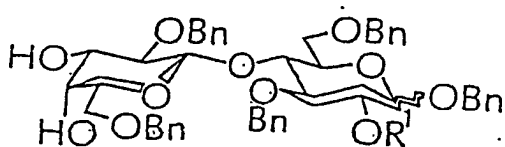
(f) das Überführen von Verbindung VIIa oder VIIb in GM2.

6. Verfahren nach Anspruch 1 oder 5, worin die Trisaccharidverbindung IIIa oder IIIb durch Glykosylieren von Sialyl-Donor I:



worin R Ethyl ist;

und Glykosyl-Akzeptor IIa (worin  $R^1$  Benzyl ist) oder Glykosyl-Akzeptor IIb (worin  $R^1$  Pivaloyl ist):



unter Verwendung eines Katalysators erhalten wird.

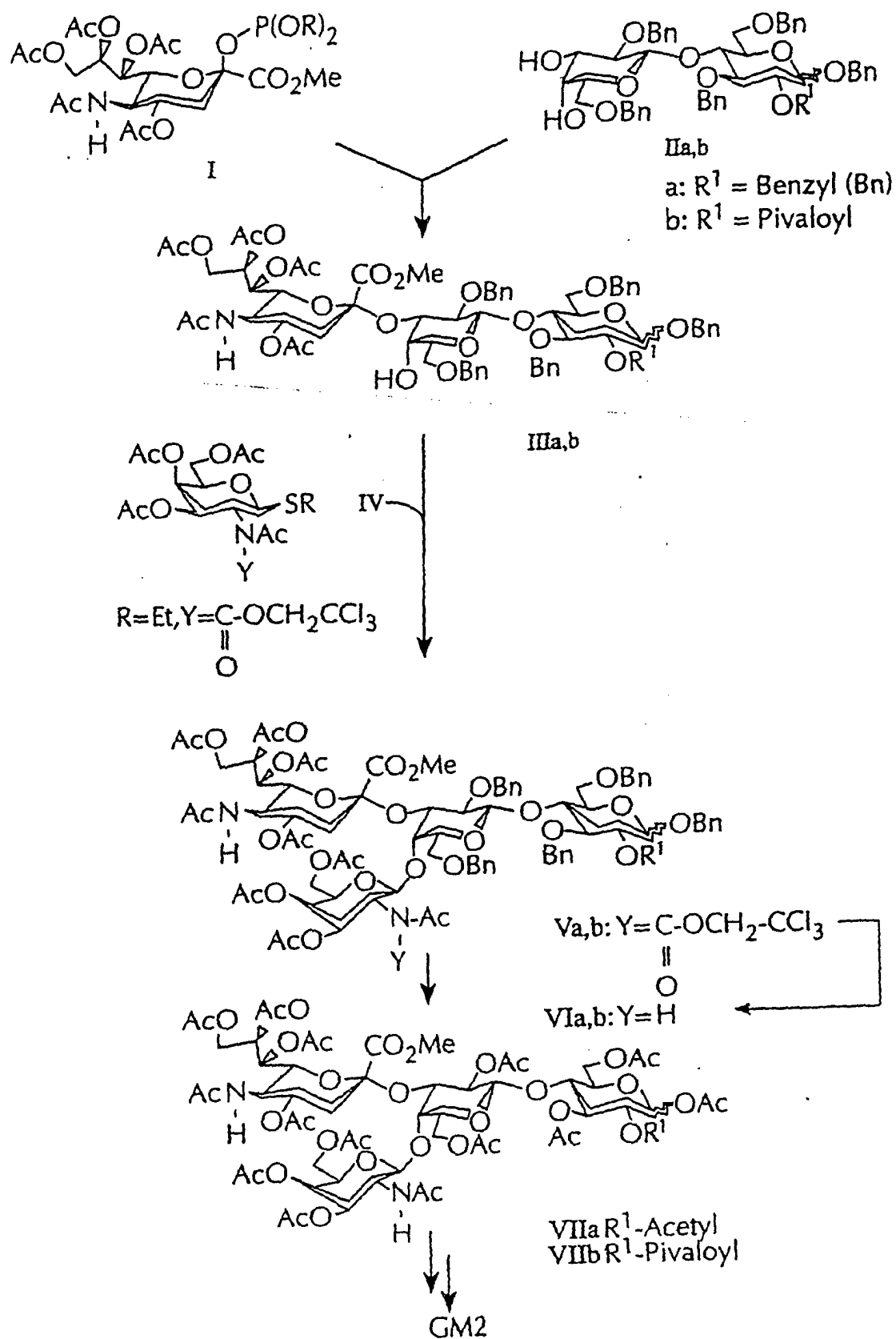
7. Verfahren nach Anspruch 6, worin der Katalysator Trifluormethansulfonat ist.

8. Verfahren nach Anspruch 5, worin die Trichloracetyl-Gruppe von Glykosyl-Donorverbindung VIII durch eine Gruppe ersetzt wird, die aus der aus Tribromacetyl und Trifluoracetyl bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

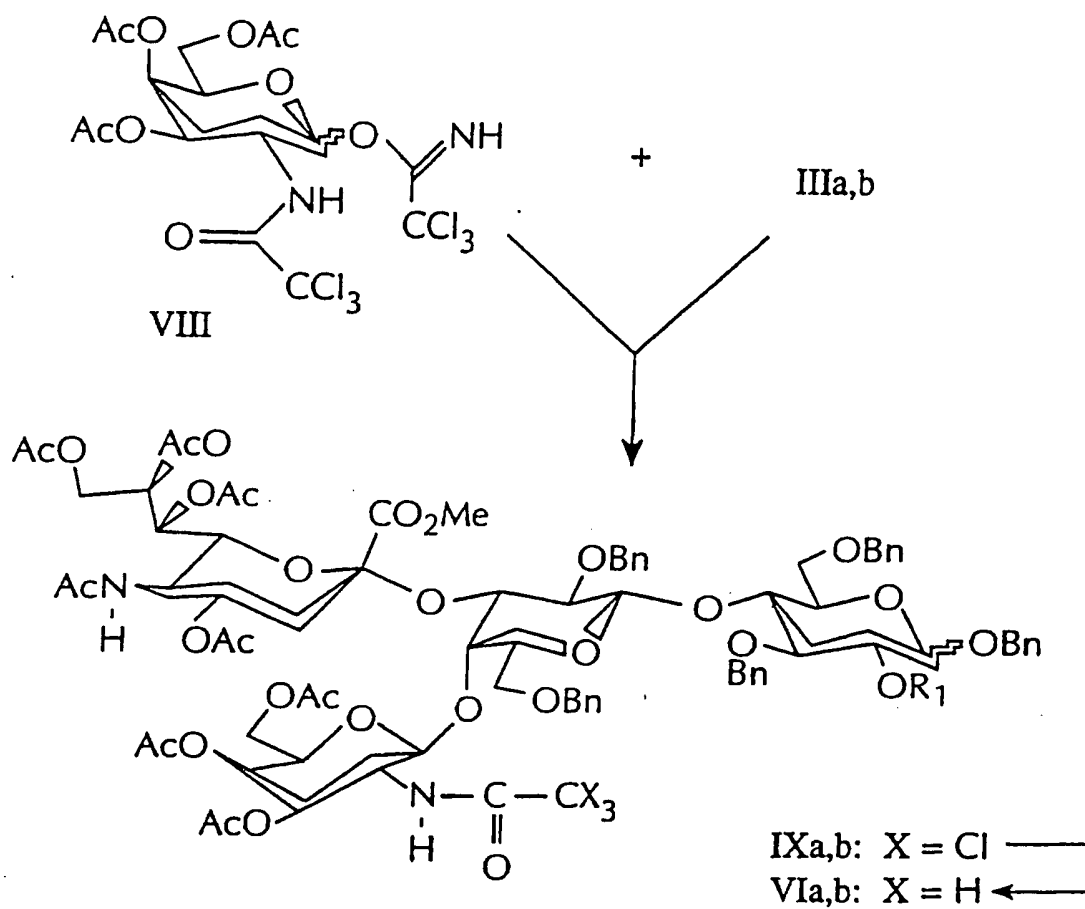
9. Verfahren nach Anspruch 6, worin der Katalysator aus der aus Zinn(II)-trifluormethansulfonat, Ytterbium(III)-trifluormethansulfonat, Kupfer(II)-trifluormethansulfonat, Silber(I)-trifluormethansulfonat und anderen Trifluormethansulfonaten bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

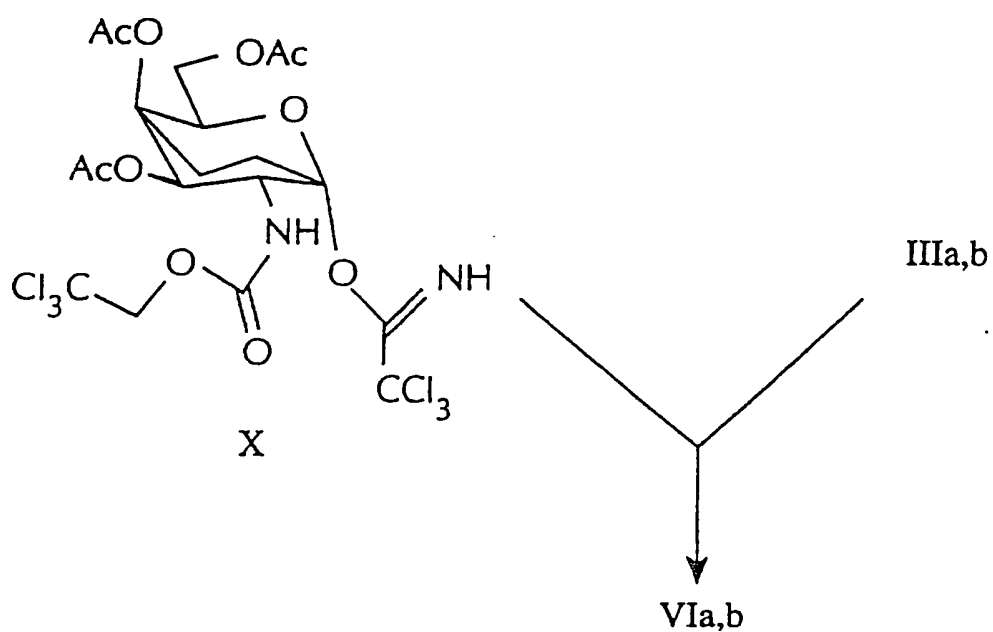
FIG. 1A



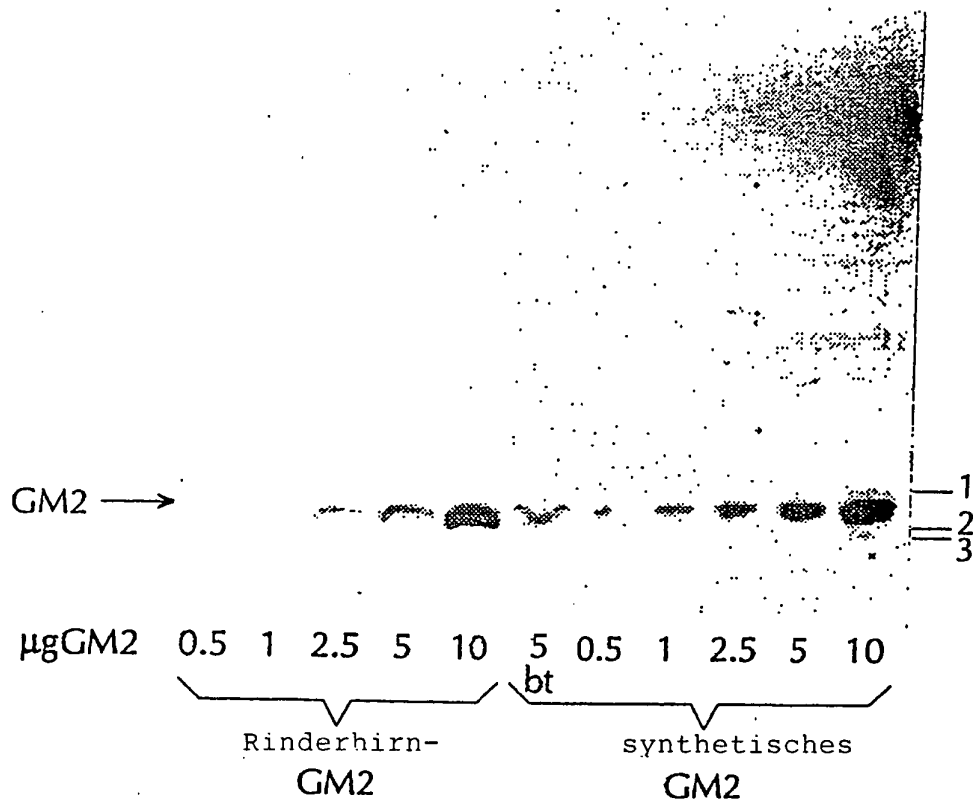
**FIG. 1B**



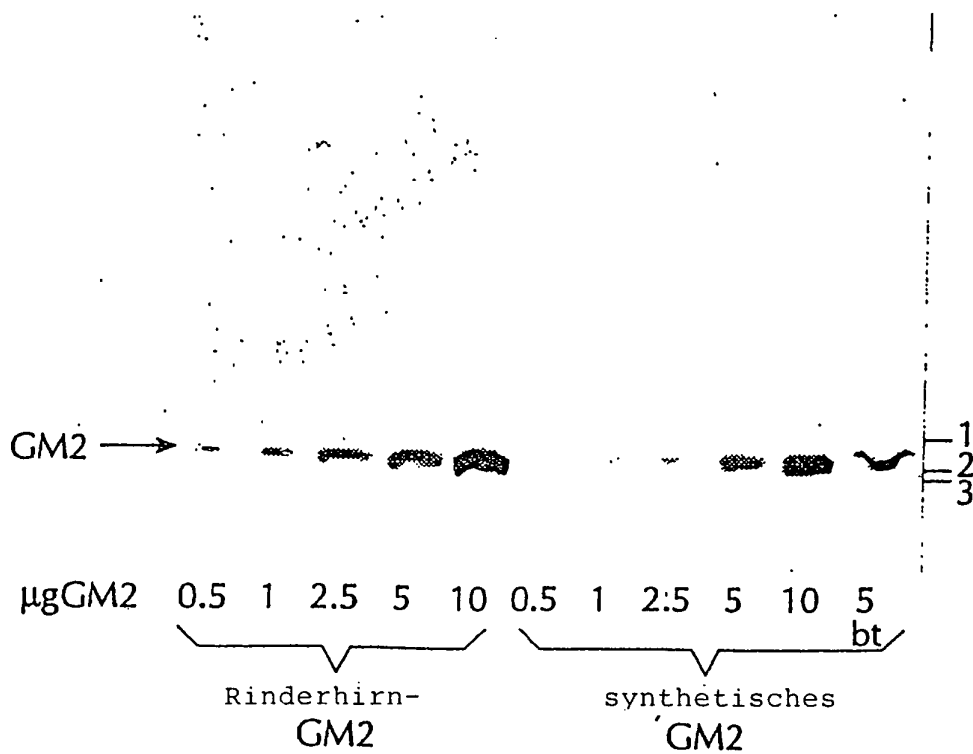
**FIG. 1C**

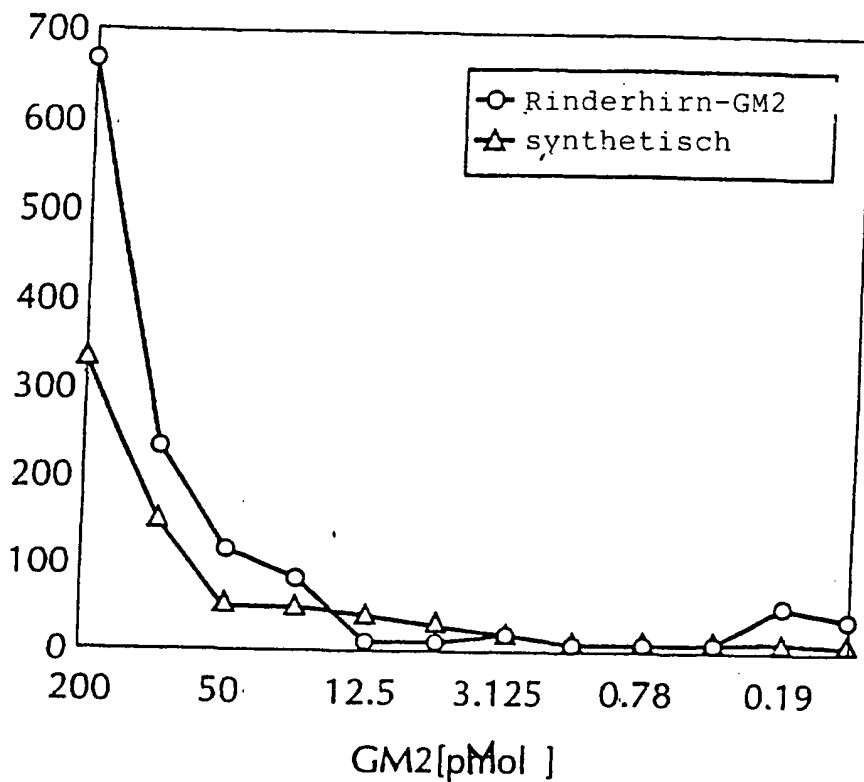
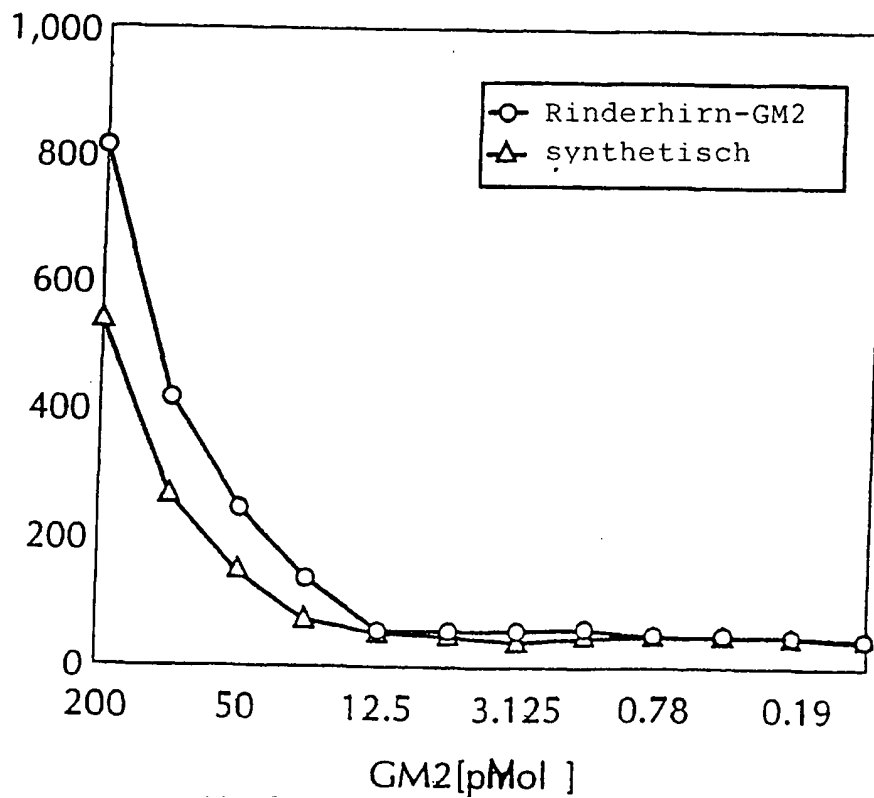


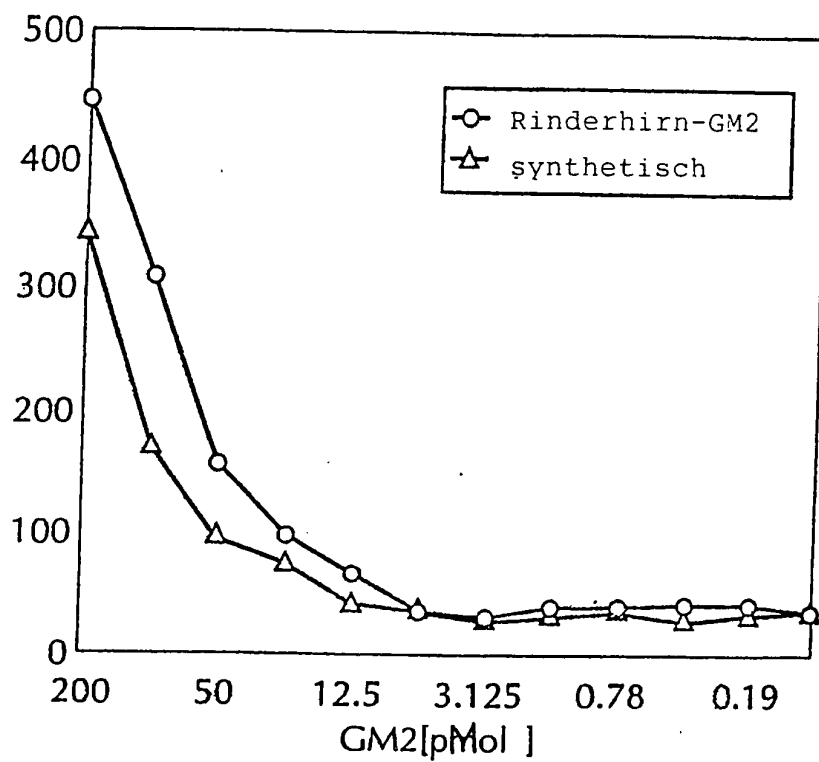
**FIG. 2**



**FIG. 3**



**FIG. 4****FIG. 5**

**FIG. 6****FIG. 7**