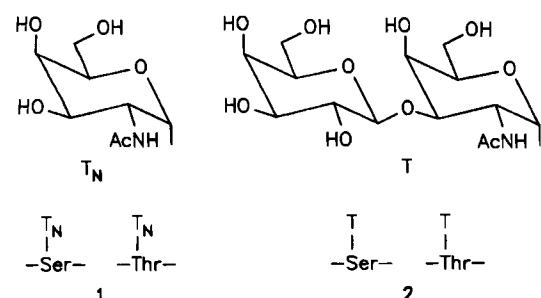


Synthese von *O*-Glycopeptiden des tumorassoziierten T_N - und T-Antigen-Typs und deren Anknüpfung an Rinderserumalbumin**

Von Horst Kunz* und Stefan Birnbach

Professor Siegfried Hüning zum 65. Geburtstag gewidmet

Nach zellbiologischen und biochemischen Untersuchungen über Glycoproteine bei der Zelldifferenzierung und bei der Regulierung des Zellwachstums wichtige Funktionen aus^[1]. Normale Zellen und unreguliert wachsende Tumorzellen unterscheiden sich stark im Glycolipid- und Glycoproteinprofil ihrer Zellmembranen^[2]. Die Glycoproteine der Tumorzellmembranen werden als tumorassoziierte Antigene angesehen. Nachgewiesen wurde diese Eigenschaft besonders für das T-Antigen, ein *O*-Glycoprotein, das in enger Beziehung zu Glycophorin A steht und als typisches Strukturelement 2 die α -glycosidisch an Serin oder Threonin gebundene Disaccharideinheit β Gal(1-3)GalNAc enthält^[3]. Dabei sind häufig mehrere solchermaßen glycosyierte Aminosäuren unmittelbar miteinander verknüpft. Auch das monosaccharidische Strukturelement 1, das T_N -Antigen, findet sich in den Membranen menschlicher Epitheltumorzellen^[3] und in den Erythrocytenmembranen von Leukopenie- und Thrombopenie-Patienten^[4].



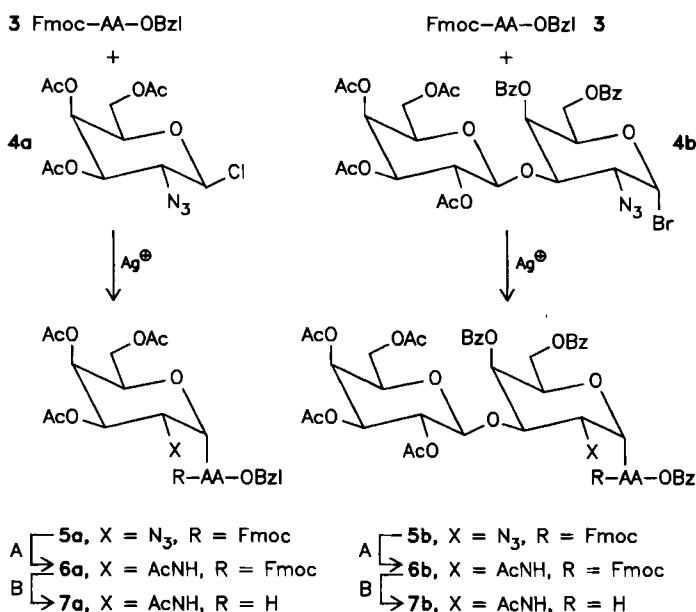
Entsprechend der immunologischen Bedeutung der Strukturen 1 und 2 sind Glycopeptide vom T_N -^[5] und T-Antigen-Typ^[6,7] schon mehrfach hergestellt worden. Für die immunologische Anwendung synthetischer Antigene ist jedoch deren Fixierung auf einem biologisch sinnvollen Träger nötig. Während das Disaccharid β -Gal(1-3)GalNAc des T-Antigens über künstliche Ankergruppen (Spacer) an Rinderserumalbumin gebunden werden konnte^[8], war die Verknüpfung von Glycopeptiden vom Typ 1 und 2 mit biologischem Material bisher noch nicht gelungen.

Wir beschreiben die Synthese von Glycotripeptiden des tumorassoziierten T_N - und T-Antigen-Typs, die dem *N*-Terminus von Glycophorin A mit M-Blutgruppenaktivität^[9] entsprechen, und erstmals deren Aufpfpfung auf Rinderserumalbumin. Dabei kommen wir ohne Spacer aus, das heißt wir erreichen eine „natürliche“ Verknüpfung der Antigenstrukturen mit dem biologischen Trägermolekül.

Als Schutzgruppen verwenden wir im Glycosylierungsschritt die erprobte Kombination^[10] aus *N*-terminaler 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Gruppe^[11] und *C*-terminalem Benzylester und bei den Kettenverlängerungen die löslichkeitsfördernde 2-(4-Pyridyl)ethoxycarbonyl(Pyoc)-Gruppe^[12].

[*] Prof. Dr. H. Kunz, Dipl.-Chem. S. Birnbach
Institut für Organische Chemie der Universität
Johann-Joachim-Becher-Weg 18-20, D-6500 Mainz

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert.



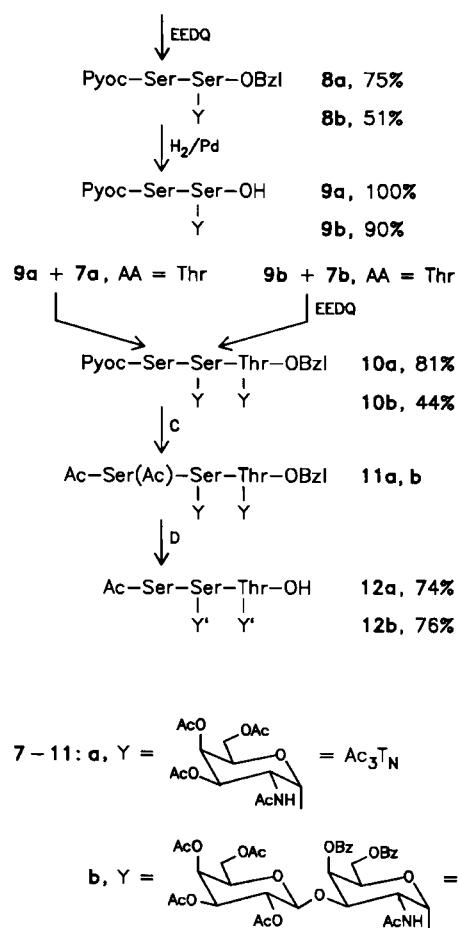
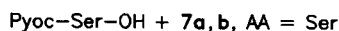
Schema 1. AA = Ser oder Thr. Bzl = Benzyl, Bz = Benzoyl. A: 1) $\text{NaBH}_4/\text{NiCl}_2$, 2) $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pyridin}$; B: Morpholin.

Tabelle 1. Ausbeuten der Verbindungen 5 und 6.

Verb.	AA	Ausb. [%]	Verb.	AA	Ausb. [%]
5a	Ser	65 + 9% β	6a	Ser	86
5a	Thr	60 + 4% β	6a	Thr	85
5b	Ser	51 + 20% β	6b	Ser	70
5b	Thr	30 + 21% β	6b	Thr	60

Schema 1 zeigt die Synthese der partiell geschützten Serin- und Threonin-Derivate mit T_N - 7a oder T-Antigenstruktur 7b (siehe auch Tabelle 1). Fmoc-Serin-benzylester 3, AA = Ser^[10], und Fmoc-Threonin-benzylester 3, AA = Thr, werden mit den Glycosyldonoren 4a^[13] und 4b^[6] überwiegend zu den α -Glycosiden 5 umgesetzt. Die insbesondere bei den Disaccharid-Derivaten 5b auftretenden β -Glycoside werden chromatographisch abgetrennt. Nach Reduktion der Azidofunktion^[13, 14] und sofortiger Acetylierung werden die vollgeschützten *O*-Glycosylaminoäure-Derivate 6 erhalten. Von diesen empfindlichen Verbindungen kann die Fmoc-Gruppe in Morpholin^[10] selektiv abgelöst werden. Für den Erfolg der weiteren Synthese ist entscheidend, daß die so erhaltenen *N*-ungegeschützten Verbindungen 7 mit ausreichender Geschwindigkeit weiter umgesetzt werden können, da sie sich sonst durch intramolekulare β -Eliminierung des Glycanteils zersetzen. Fmoc-geschützte Carboxykomponenten reagieren zu träge.

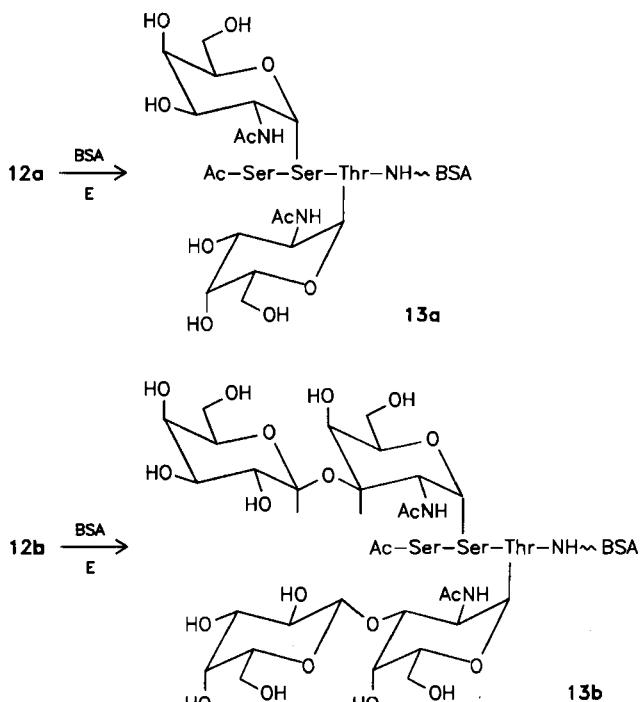
Die kettenverlängernden Schritte (Schema 2) unter Bildung von 8 und 10 gelingen dagegen effektiv mit Pyoc-Serin^[15] bzw. mit den Pyoc-geschützten Glycodipeptiden 9 in Gegenwart von Ethyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin-1-carboxylat (EEDQ)^[16]. Bei der selektiven Deblockierung der Carboxyfunktion an den vollgeschützten Glycodipeptiden 8 zeigt sich ein weiterer Vorteil der Pyoc-Gruppe: Sie ist im Gegensatz zur Fmoc-Gruppe^[17] stabil gegen Hydrogenolyse. Zur Vorbereitung der Verknüpfung mit dem Albumin wird aus den vollgeschützten Glycopeptiden 10 selektiv der Pyoc-Rest entfernt, indem er zur Pyridiniumform methyliert und mit Morpholin in Dichlormethan^[12] ohne Beeinträchtigung der baseempfindlichen *O*-glycosidischen



Schema 2. C: 1) $\text{CH}_3\text{I}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 2) Morphinol/ CH_2Cl_2 , 3) $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pyridin}$ D: 1) H_2/Pd , 2) Hydrazinhydrat/Methanol. Die Ausbeute an 12 bezieht sich auf 10.

Bindungen von Serin und Threonin zerlegt wird. Der freie terminale Serinrest wird zu 11 acetyliert, damit die freien Aminofunktionen keine basekatalysierte Zerstörung der O -glycosidischen Bindungen bewirken und später auch nicht die immunologische Erkennung der Kohlenhydrat-Peptid-Verknüpfungsregion beeinträchtigen können^[18]. Nach Hydrogenolyse der C-terminalen Benzylester und schonender Spaltung aller Ester^[10] werden die im Kohlenhydratteil deblockierten Glycopeptide mit T_n - 12a und T-Antigenstruktur 12b in hoher Ausbeute erhalten. Ihre Struktur und Reinheit wird durch ^{13}C -NMR-Spektren^[20] eindeutig belegt.

Die Verknüpfung der synthetischen Antigen-Glycopeptide 12 mit Rinderserumalbumin (BSA) – vermutlich an den ϵ -Aminofunktionen der Lysinbausteine –, kann nur in wässriger Lösung durchgeführt werden (Schema 3). Die Konjugate 13a und 13b werden durch Dialyse gegen Wasser von niedermolekularen Verunreinigungen befreit. Sie enthalten nach photometrischer Kohlenhydratbestimmung^[18] (N -Acetylgalactosamin/Galactose als Standard) ca. 130 μg Kohlenhydrat/1 mg Konjugat (13a) bzw. 280 μg Kohlenhydrat/1 mg Konjugat (13b). Das bedeutet, daß von den etwa 60 Lysinresten von BSA 25 bzw. 38 mit den synthetischen tumorassoziierten T_n - bzw. T-Antigenstrukturen belegt sind. Die Konjugate 13 sind somit die ersten immunologisch relevant gebundenen synthetischen Glycopeptide mit den tumorspezifischen Kennstrukturen 1 und



Schema 3. E: Rinderserumalbumin (BSA), (wasserlösliches) $\text{EtN}-\text{C}=\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NMe}_2$, 1-Hydroxybenzotriazol, 4°C [21].

2, die darüber hinaus nur über natürliche Peptid- und Amidbindungen an das biologische Trägermolekül gebunden sind. Mit 13a und 13b sollte sich die Bildung von Antikörpern gegen die für Tumorzellmembranen typischen Strukturen induzieren lassen.

Ein eingegangen am 19. November 1985 [Z 1541]

- [1] Übersicht: R. T. Schwarz, R. Datema, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 40 (1982) 287.
- [2] Vgl. beispielsweise W. W. Young Jr., S. Hakomori, *ACS Symp. Ser.* 80 (1978) 357.
- [3] G. F. Springer, P. R. Desai, M. S. Murthy, E. F. Scanlon, *ACS Symp. Ser.* 80 (1978) 311.
- [4] J. P. Carton, A. T. Nurden, *Nature (London)* 282 (1978) 621.
- [5] B. Ferrari, A. A. Pavia, *Tetrahedron* 41 (1985) 1939.
- [6] H. Paulsen, M. Paal, M. Schultz, *Tetrahedron Lett.* 24 (1983) 1759.
- [7] V. Veréz Bencomo, P. Sinay, *Glycoconjugate J.* 1 (1984) 1.
- [8] H. Paulsen, M. Paal, *Carbohydr. Res.* 113 (1983) 203.
- [9] M. Tomita, V. F. Marchesi, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 2964.
- [10] P. Schultheiß-Reimann, H. Kunz, *Angew. Chem.* 95 (1983) 64; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983) 62; *Angew. Chem. Suppl.* 1983, 39.
- [11] L. A. Carpinò, N. Y. Han, *J. Org. Chem.* 37 (1972) 3404.
- [12] H. Kunz, S. Birnbach, *Tetrahedron Lett.* 25 (1984) 3567.
- [13] H. Paulsen, J.-P. Höglk, *Carbohydr. Res.* 101 (1982) 89.
- [14] K. Heyns, D. Feldmann, D. Hadamczyk, J. Schwentner, J. Thiem, *Chem. Ber.* 114 (1981) 232.
- [15] Hergestellt nach in Lit. [12] angegebenen Verfahren: $\text{Fp} = 145^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D^{22} = -4.0$ ($c = 1$, DMF).
- [16] G. Malek, B. Belleau, *J. Am. Chem. Soc.* 90 (1968) 1651.
- [17] J. Martinez, J. C. Tolle, M. Bodansky, *J. Org. Chem.* 44 (1979) 3596.
- [18] Wir danken Herrn Dr. R. Wieser, Institut für Toxikologie der Universität Mainz, für wertvolle Diskussionen und Ratschläge in immunologischen Fragen sowie für die Kohlenhydratanalysen an den Konjugaten 22 und 23 nach [19].
- [19] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350.
- [20] 12a: $[\alpha]_D^{22} + 122.8$ ($c = 1.2$, H_2O); 12b: $[\alpha]_D^{22} + 80.8$ ($c = 0.8$, H_2O). 100.6 MHz- ^{13}C -NMR (D_2O , CS_2 , int.): 12a: $\delta = 174.54, 174.44, 173.72, 171.99, 171.12$, ($5 \times \text{C}=\text{O}$); 98.90 (C-1 an Thr), 97.92 (C-1, gebunden an Ser²); 57.86, 55.53, 53.49 (C- α von Ser^{1,2}, Thr); 22.27, 22.12, 21.82 (CH_3 , NAc), 17.90 (CH_3 , NAc); 12b: $\delta = 174.78, 174.30, 174.17, 173.92, 171.60, 170.28$, ($6 \times \text{C}=\text{O}$); 104.32, 104.24, ($\beta\text{Gal-C-1}'$), 98.58 (C-1 an Thr) 97.58 (C-1 an Ser), 58.63, 55.13, 53.21, (C- α von Ser^{1,2}, Thr), 22.05, 21.78, 21.44, (CH_3 , NAc), 17.49 (CH_3 , Thr).
- [21] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* 103 (1970) 788.