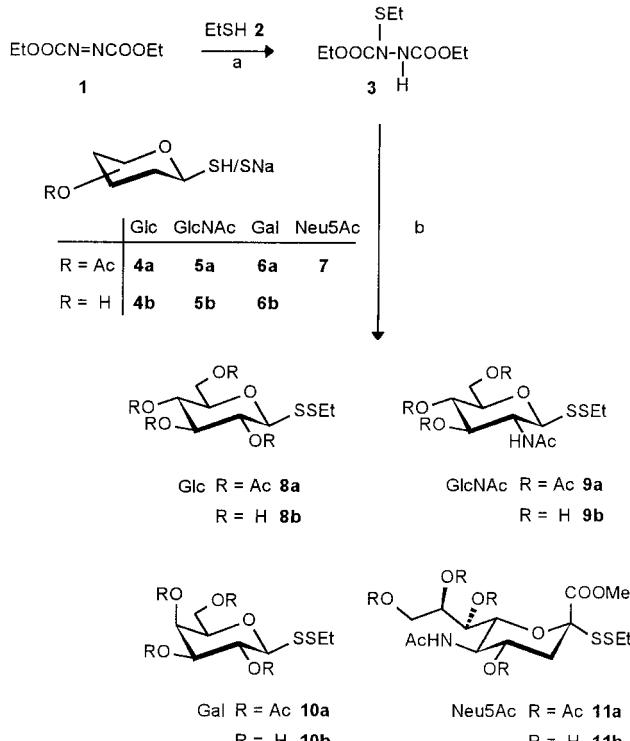


Festphasensynthese von Thiooligosacchariden**

Gerd Hummel und Ole Hindsgaul*

Thioglycoside sind von besonderer Bedeutung für Untersuchungen zur Enzyminhibition, denn sie sind gegenüber Glycosidasen viel stabiler als O-Glycoside und können somit enzymatische Hydrolyse inhibieren.^[1] Thiooligosaccharide können durch eine Vielzahl von Methoden synthetisiert werden, z.B. durch anomere S-Alkylierung,^[2] S_N2-Reaktion von Halogenosen mit Thiolaten,^[3] Glycosylierung von Glycosyldonoren mit Thiolen unter Säure- oder Lewis-Säure-Katalyse^[4] oder Michael-Addition von 1-Thioaldosen an α,β -ungesättigte Verbindungen.^[5] Alle bisherigen Methoden sind jedoch mehrstufige Synthesen mit geringen Gesamtausbeuten. Darüber hinaus erschweren ungesättigte Nebenprodukte, Anomerisierung und Thiol-Oxidationsprodukte die Produktisolierung.^[6] Wir stellen hier eine neue, äußerst effiziente Methode für die Festphasensynthese von Thiooligosacchariden vor. Hierzu dient als Nucleophil ein hochreaktives, *ungeschütztes* Zucker-1-Thiolat, das mit Trifluormethansulfonat(Triflat)-aktivierten Glycosiden umgesetzt wird. Die benötigten Thiolate werden auf der Festphase aus den entsprechenden unsymmetrischen Ethyldisulfiden hergestellt.



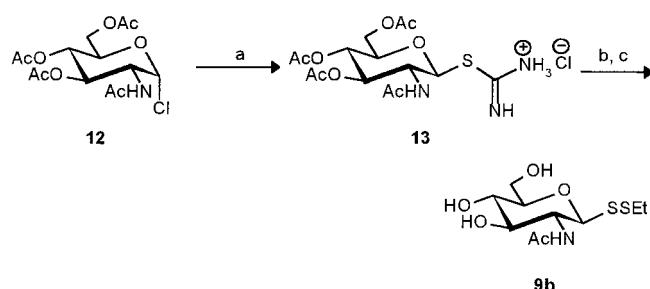
Schema 1. a) CH_2Cl_2 , 20°C, 2 h, 75%; b) für R = Ac: CH_2Cl_2 , THF oder CH_3CN ; für R = H: MeOH oder MeOH/ H_2O , 20°C, 5 min, 100%. Ac = Acetyl.

[*] Prof. O. Hindsgaul, Dr. G. Hummel
Department of Chemistry, University of Alberta
Edmonton, AB, T6G 2G2 (Kanada)
Fax: (+1) 403-492-8231
E-mail: ole.hindsgaul@ualberta.ca

[**] Diese Arbeit wurde durch die Firma Synsorb Biotech. Inc. finanziell unterstützt.

Das verwendete Diethyl-N-(ethysulfanyl)hydrazodicarboxylat **3** ist durch Reaktion von Diethylazodicarboxylat **1** mit Ethanethiol **2** in Dichlormethan einfach zugänglich (Schema 1).^[7] **3** lässt sich nach Säulenchromatographie als farbloses Öl in 76% Ausbeute isolieren. Die freien Thiolfunktionen der leicht zugänglichen geschützten und ungeschützten 1-Thioaldosen (Glc, GlcNAc, Gal, Neu5Ac)^[8] wurden selektiv mit **3** entweder in Dichlormethan (**4a**, **5a**, **6a**, **7**) oder in Methanol (**4b**, **5b**, **6b**) geschützt. Die entsprechenden Zuckerdisulfide konnten in quantitativer Ausbeute erhalten werden. Die direkt erhältlichen Disulfide **4b**–**6b** sowie die durch Desacetylierung mit Natriummethanolat in Methanol erhaltenen Disulfide **8a**–**11a** wurden direkt für die Immobilisierung an der Festphase verwendet.

Zur Synthese größerer Mengen von 1-Dithioethylglycosiden wurde eine alternative Synthesesequenz entwickelt (Schema 2, gezeigt für GlcNAc). Hierzu wurde 2-Acetami-

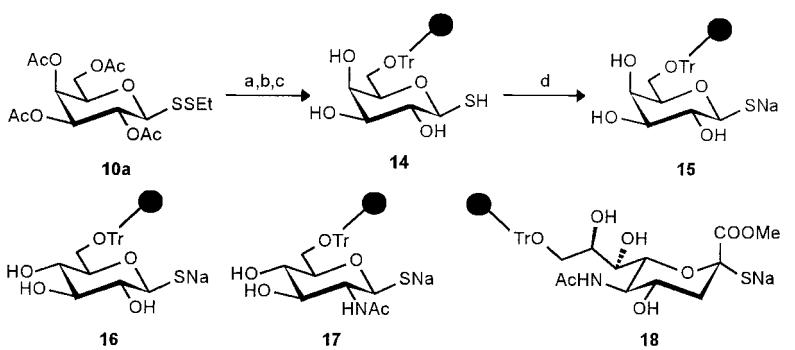


Schema 2. a) $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$, Aceton, Rückfluß, 15 min, 82%; b) EtSSEt , MeOH , NEt_3 , 20°C, 2 h, 89%; c) NaOMe , MeOH , 20°C, 2 h, dann H^+ , IR-120, 96%.

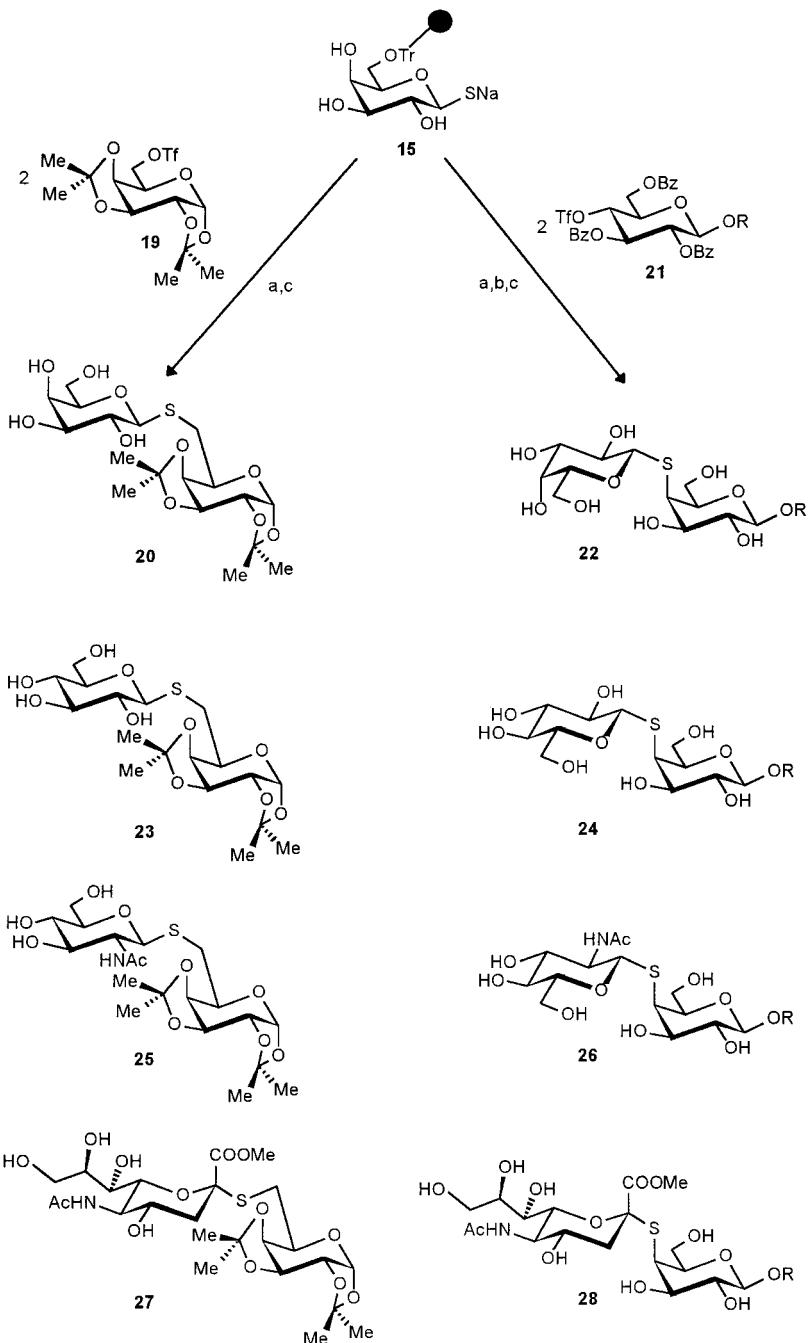
do-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosylchlorid^[9] **12** mit Thioharnstoff in Aceton unter Rückfluß erhitzt. Nach 15 min erhielt man **13** in 89% Ausbeute. Durch Umsetzung von **13** mit Diethyldisulfid in Methanol und Triethylamin und anschließende Desacetylierung wurde das ungeschützte Disulfid **9b** in 85% Ausbeute erhalten.

Alle ungeschützten Disulfide (**8b**–**10b** und **11b**) konnten an mit Tritylchlorid funktionalisiertem Polystyrol-Harz (0.95 mmol g⁻¹) immobilisiert werden (gezeigt für Gal, Schema 3).^[10] Die chemische Beladung der einzelnen Disulfide an der Festphase wurde durch Elementaranalyse (Schwefelgehalt) bestimmt und lag zwischen 0.56 und 0.70 mmol g⁻¹, abhängig vom jeweiligen Glycosid. Durch Reduktion mit Dithiothreit (DTT) in einem Gemisch aus THF, MeOH und Et_3N (10:2:1) konnten die freien Thiole erhalten werden. Dabei lässt sich die Reaktion leicht durch IR-Spektroskopie an pulverisierten Harzkügelchen ($\tilde{\nu}(\text{S}-\text{H}) \approx 2555 \text{ cm}^{-1}$) verfolgen. Die anschließende Reaktion des immobilisierten Thiols **14** mit dem Triflat **19** (Schema 4) führte zunächst jedoch nicht zum gewünschten Thioglycosid, daher wurde die Nucleophilie von **14** durch Deprotonierung mit NaOMe in THF weiter erhöht (Schema 3).

Das so erhaltene Thiolat **15** wurde unter Zusatz von Kronenether mit dem Triflat **19** ([15]Krone-5 oder Kryptofix 221) in THF umgesetzt (Schema 4, gezeigt für Galactose). Nach 16 h wurde das Harz gewaschen und das Thioglycosid **20** nach Abspaltung mit 2proz. TFA in CH_2Cl_2 erhalten (76%



Schema 3. a) NaOMe, MeOH, 20 °C, 2 h; b) Tritylchlorid-Harz, Pyridin, 4-Dimethylaminopyridin (DMAP), 60 °C, 48 h; c) DTT, THF, MeOH, Et₃N, 20 °C, 18 h; d) NaOMe, THF, 20 °C, 2 h. Tr = Trityl = Triphenylmethyl.



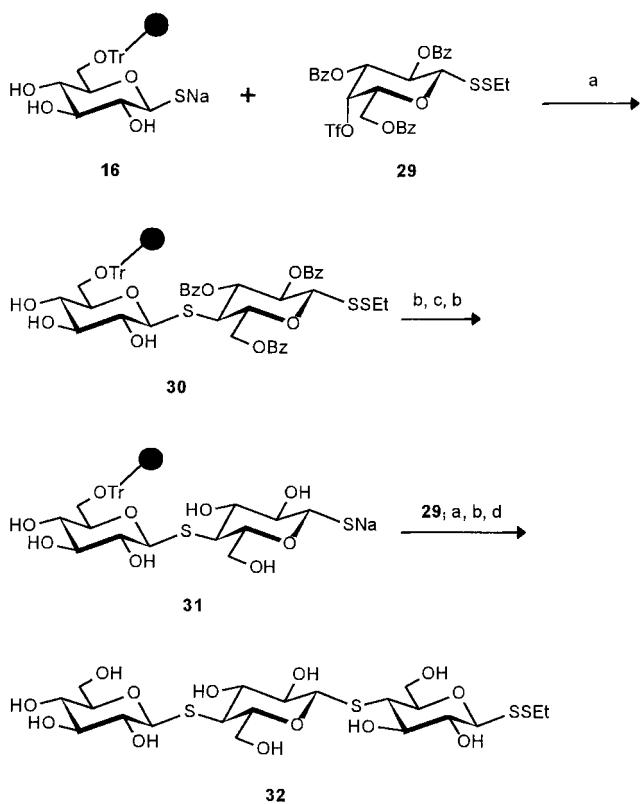
Schema 4. a) [15]Krone-5, THF, 20 °C, 16 h; b) NaOMe, MeOH, THF; c) Trifluoressigsäure (TFA), CH₂Cl₂, 20 °C. **21, 22, 24, 26, 28:** R = Octyl. Bz = Benzoyl. Tf = Trifluormethylsulfonyl.

Ausbeute; für NMR- und MS-Daten siehe Tabelle 1).^[11] Die gleiche Reaktion mit dem Triflat **21** lieferte das entsprechende Thioglycosid **22** in 64 % Ausbeute;^[11] Reaktionen der Triflate **19** und **21** mit den Thiolaten **16–18** führten zu den entsprechenden Glc-, GlcNAc- und Neu5Ac-Thioglycosiden **23–28** in ähnlichen Ausbeuten. Die Strukturen aller Thioglycoside konnten nach Adsorption an RP18-Kieselgel, Waschen mit Wasser und Eluieren mit Methanol ¹H-NMR-spektroskopisch und massenspektrometrisch bestätigt werden.^[11]

Um die Eignung dieser Methode für den Aufbau größerer Thiooligosaccharide zu prüfen, wurde **29** in fünf Stufen ausgehend von **10b** hergestellt. Die Glycosylierung wurde unter gleichen Bedingungen, wie in Schema 4 bereits gezeigt, mit dem Triflat **29** und dem immobilisierten Thiolat **16** durchgeführt (Schema 5). Das erhaltene immobilisierte Disaccharid **30** wurde nach Abspaltung der Benzoylschutzgruppen mit Natriummethanolat in THF mit DTT reduziert, deprotoniert (NaOMe/THF) und erneut mit dem Triflat **29** in Gegenwart von [15]Krone-5 umgesetzt. Nach Debenzoylierung mit Natriummethanolat in THF und Abspaltung vom Harz konnte das Trisaccharid **32** in 92 % Ausbeute bezogen auf **16** erhalten werden (NMR- und MS-Daten siehe Tabelle 1). Die hohe Ausbeute bestätigt,

Tabelle 1. Ausgewählte ¹H-NMR-Signale (360 MHz, CD₃OD) und MS-Daten von **20, 22–28** und **32**.

20: $\delta = 4.35$ (d, 1H, $J_{1,2} = 9.7$ Hz; 1b-H, 1c-H), 5.45 (d, 1H, $J_{1,2} = 5.0$ Hz; 1a-H); MS: <i>m/z</i> : 461.2 [$M^+ - Na$]
22: $\delta = 4.18$ (d, 1H, $J_{1,2} = 7.6$ Hz; 1b-H), 4.42 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.6$ Hz; 1a-H); MS: <i>m/z</i> : 493.2 [$M^+ - Na$]
23: $\delta = 4.40$ (d, 1H, $J_{1,2} = 9.6$ Hz; 1b-H), 5.45 (d, 1H, $J_{1,2} = 5.0$ Hz; 1a-H); MS: <i>m/z</i> : 461 [$M^+ - Na$]
24: $\delta = 4.18$ (d, 1H, $J_{1,2} = 7.6$ Hz; 1a-H), 4.48 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.7$ Hz; 1b-H); MS: <i>m/z</i> : 493.2 [$M^+ - Na$]
25: $\delta = 4.55$ (d, 1H, $J_{1,2} = 10.3$ Hz; 1b-H), 5.45 (d, 1H, $J_{1,2} = 5.0$ Hz; 1a-H); MS: <i>m/z</i> : 502.2 [$M^+ - Na$]
26: $\delta = 4.16$ (d, 1H, $J_{1,2} = 7.6$ Hz; 1a-H), 4.70 (d, 1H, $J_{1,2} = 10.4$ Hz; 1b-H); MS: <i>m/z</i> : 534.3 [$M^+ - Na$]
27: $\delta = 1.31, 1.33, 1.39, 1.49$ (4 × s, 12H; CH ₃), 1.80 (dd, 1H, $J_{3a,4} = 11.3$, $J_{3a,3e} = 12.8$ Hz; 3b-H _a), 1.98 (s, 3H; NCOCH ₃), 2.75 (dd, 1H, $J_{3e,4} = 4.6$, $J_{3e,3a} = 12.8$ Hz; 3b-H _e), 3.67 (s, 3H; COOCH ₃), 4.31 (dd, 1H, $J_{2,3} = 5.0$, $J_{2,3} = 2.4$ Hz; 2a-H), 4.61 (dd, 1H, $J_{2,3} = 2.4$, $J_{3,4} = 7.9$ Hz; 3a-H), 5.42 (d, 1H, $J_{1,2} = 5.0$ Hz; 1a-H); MS: <i>m/z</i> : 604.2 [$M^+ - Na$]
28: $\delta = 0.88$ (m, 3H; CH ₃), 1.28 (m, 10H; Octyl), 1.56 (m, 2H; OCH ₂ CH ₂), 1.99 (s, 3H; NCOCH ₃), 1.79 (dd, 1H, $J_{3a,4} = 11.3$, $J_{3a,3e} = 12.8$ Hz; 3b-H _a), 1.97 (s, 3H; NCOCH ₃), 2.75 (dd, 1H, $J_{3e,4} = 4.6$, $J_{3e,3a} = 12.8$ Hz; 3b-H _e), 3.67 (s, 3H; COOCH ₃), 4.20 (d, 1H, $J_{1,2} = 7.6$ Hz; 1a-H); MS: <i>m/z</i> : 636.3 [$M^+ - Na$]
32: $\delta = 1.30$ (t, 3H, $J = 7.4$ Hz; CH ₃), 2.83 (q, 2H, $J = 7.4$ Hz; SCH ₂), 4.31 (d, 2H, $J_{1,2} = 9.3$ Hz; 1b-H, 1c-H), 4.40 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.5$ Hz; 1a-H); MS: <i>m/z</i> : 635.1 [$M^+ - Na$]



Schema 5. a) [15]Krone-5, THF, 20°C, 16 h; b) NaOMe, MeOH, THF; c) DTT, THF, MeOH, Et₃N; d) TFA, CH₂Cl₂, 20°C.

daß eine teilweise Spaltung der O-glycosidischen Bindung für die geringere Ausbeute von ca. 70% bei den Verbindungen **20–28** verantwortlich war.

Wir haben hiermit eine hocheffiziente Methode zur Synthese von Schwefel-verknüpften Oligosacchariden an fester Phase beschrieben. Alle Glycoside konnten stereoselektiv und in hohen Ausbeuten erhalten werden. Nebenprodukte, die von Eliminierungsreaktionen der Triflate herrühren, konnten durch Waschen des Harzes nach erfolgter Glycosylierung vollständig entfernt werden. Weiterhin erwies sich die Verwendung unsymmetrischer Disulfide als Schutzgruppe der anomeren Thiolfunktion als kompatibel mit allgemein üblichen Reaktionsbedingungen in der Kohlenhydratchemie.

Eingegangen am 6. November 1998 [Z12628]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1782–1784

Stichwörter: Festphasensynthesen • Oligosaccharide • Thioglycoside • Thiolate • Thiooligosaccharide

- [1] a) Z. J. Witzak, R. Chhabra, H. Chen, X.-Q. Xie, *Carbohydr. Res.* **1997**, *301*, 167–175; b) F. Shafizadeh, R. H. Furneaux, T. T. Stevenson, *Carbohydr. Res.* **1979**, *71*, 169–191.
- [2] L. A. Reed, L. Goodman, *Carbohydr. Res.* **1979**, *94*, 91–99.
- [3] L. X. Wand, N. Sakari, H. Kuzuhara, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1990**, 1677–1682.
- [4] T. Eisele, A. Toepfer, G. Kretzschmar, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1389–1392.
- [5] Z. J. Witzak, J. M. Sun, R. Mielgij, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2169–2174.
- [6] V. Moreau, J. C. Norrild, H. Driguez, *Carbohydr. Res.* **1997**, *300*, 271–277.

- [7] T. Mukaiyama, K. Takahashi, *Tetrahedron Lett.* **1968**, 5907–5908.
- [8] a) D. Horton, *Methods Carbohydr. Chem.* **1963**, *2*, 433–437; b) D. Zanini, W. K. C. Park, R. Roy, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7383–7386; c) W. K. C. Park, S. J. Meunier, D. Zanini, R. Roy, *Carbohydr. Lett.* **1995**, *1*, 179–184; R. Roy, D. Zanini, S. J. Meunier, A. Romanowska, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1869–1872.
- [9] D. Horton, *Methods Carbohydr. Chem.* **1972**, *6*, 282–285.
- [10] Das Harz wurde von der Firma Novabiochem bezogen. Zur Immobilisierung wurde 48 h in Pyridin in Gegenwart von DMAP bei 60°C erhitzt.
- [11] Ausbeute an isoliertem Produkt. Die Isopropyliden-Schutzgruppen der Verbindungen **20, 23, 25, 27** sowie die O-glycosidischen Bindungen der ungeschützten Verbindungen **22, 24, 26, 28** wurden teilweise unter den sauren Abspaltungsbedingungen gespalten. Die Abspaltung der Benzoyl-geschützten Thiosaccharide von der Festphase hingegen ergab die entsprechenden Disaccharide in quantitativen Ausbeuten, da die elektronenziehenden Estergruppen glycosidische Bindungen stabilisieren. Der Einsatz säurelabilerer Linkersysteme wird zur Zeit untersucht.

Charakterisierung von Ligandenbindung durch Sättigungstransfer-Differenz-NMR-Spektroskopie**

Moriz Mayer und Bernd Meyer*

Die hier vorgestellte Differenzbildung zwischen Sättigungstransfer- und normalem NMR-Spektrum (STD-Methode) ermöglicht das schnelle Testen von Substanzbibliotheken auf Bindungsaktivität gegenüber makromolekularen Rezeptoren. Mit dieser Methode erhält man 1D- und 2D-Spektren, die nur Signale bindender Moleküle enthalten. Die hohe Empfindlichkeit des Verfahrens macht die Aufnahme von STD-Spektren ab 1 nmol Protein möglich. Zudem lässt sich das Bindungsepitop des Liganden leicht bestimmen, da mit dem Protein in direktem Kontakt stehende Ligandenreste intensivere STD-Signale liefern. Beispielsweise konnten wir zeigen, daß die beiden Fucosereste des Lewis^b-Hexasaccharids für die Bindung an das *Aleuria-aurantia*-Agglutinin (AAA) verantwortlich sind.

Identifizierung von Bindungsaktivität und Charakterisierung des Bindungsepitops von Liganden sind für die biochemische und pharmazeutische Industrie von entscheidender Bedeutung. Anders als bei Screening-Methoden wie ELISA, RIA, Biacore oder Immunoblotting besteht bei auf der NMR-Spektroskopie basierenden Techniken die Möglichkeit, bindende Substanzen direkt in einem Gemisch potentieller Liganden zu identifizieren. Kleine Moleküle,

[*] Prof. Dr. B. Meyer, Dipl.-Chem. M. Mayer
Institut für Organische Chemie der Universität
Martin-Luther-King-Platz 6, D-20146 Hamburg
Fax: (+49) 40-42838-2878
E-mail: Bernd.Meyer@sg1.chemie.uni-hamburg.de
Moriz.Mayer@sg1.chemie.uni-hamburg.de

[**] Wir danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung, der Bruker Analytik GmbH und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 470 und Graduiertenkolleg 464) für Projektförderung.