

Antennäre Oligosaccharide**Hochverzweigte Oligosaccharide: eine allgemeine Synthesestrategie für multiantennäre N-Glycane vom „Bisecting“-Typ*****Harald Weiss und Carlo Unverzagt***Professor Peter Welzel**zum 65. Geburtstag gewidmet*

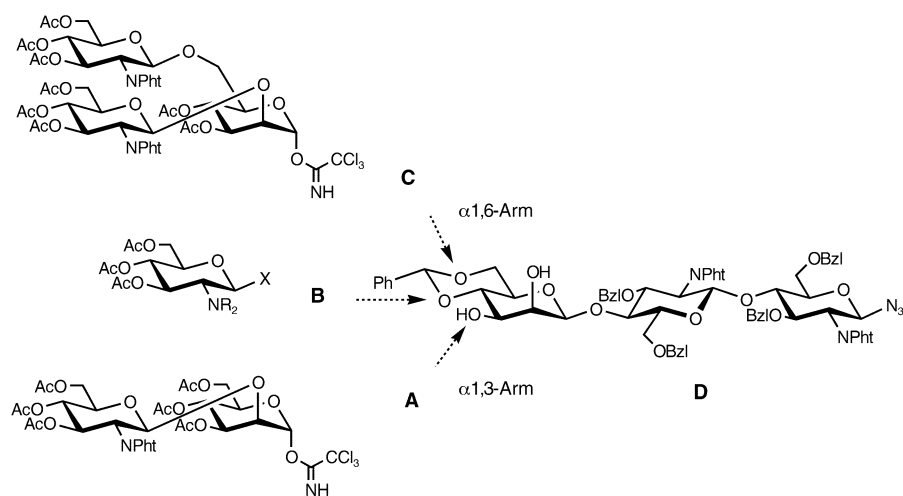
Ein Großteil der eukaryotischen Proteine auf Zelloberflächen und im Blutserum liegt glycosyliert vor, am häufigsten in Form Asparagin-gebundener Oligosaccharide.^[1] Diese N-Glycane beeinflussen die Funktion von Glycoproteinen in besonderem Maße; allerdings gibt es nur wenige aussagekräftige Struktur-Wirkungs-Untersuchungen.^[2] Da N-Glycane, deren Homogenität für biologische Studien ausreicht, aus natürlichen Quellen meist nur in kleinen Mengen verfügbar sind, haben verschiedene Arbeitsgruppen Synthesemethoden für diese wichtige Verbindungsklasse entwickelt.^[3] Am schwierigsten ist die Synthese von N-Glycanen, die über eine β -1,4-verknüpfte GlcNAc-Einheit^[4–7] an ein sterisch stark überfrachtetes zentrales β -Mannosid gebunden sind. N-Glycane vom „Bisecting“-Typ sind nachweislich

[*] Prof. Dr. C. Unverzagt, H. Weiss
Bioorganische Chemie, Gebäude NW1
Universität Bayreuth
95440 Bayreuth (Deutschland)
Fax: (+49) 921-555-365
E-mail: carlo.unverzagt@uni-bayreuth.de

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für ihre Unterstützung.

beteiligt an der Tumorphprogression,^[8–10] der Zellentwicklung^[11] und der Wirkung von Rezeptoren.^[12] Wir haben ein System von Synthesebausteinen entwickelt, das einen allgemeinen Zugang zu diesen N-Glycanen eröffnet. Mit dieser Strategie ist auch die Synthese von bisher nicht zugänglichen tri- und tetraantennären Verbindungen möglich.

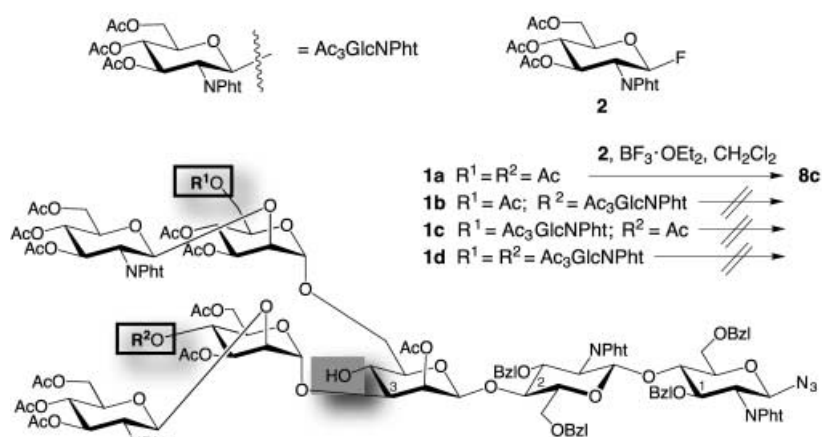
Der Trisaccharidbaustein **D**^[13] enthält eine β -Mannosid-Einheit mit nur einer Benzyliden-Schutzgruppe. Durch eine Sequenz von zwei regio- und stereoselektiven Glycosylierungen können multiantennäre N-Glycane an diesem zentralen Baustein direkt zusammengefügt werden (Schema 1).^[14] Die Synthese von N-Gly-



Schema 1. Regioselektive Verknüpfung der Bausteine **A–D** zur Synthese von N-Glycanen vom „Bisecting“-Typ. Baustein **B** dient zur Einführung der „Bisecting“-GlcNAc-Einheit. Bzl = Benzyl, PhT = Phthaloyl.

canen vom „Bisecting“-Typ nach dieser Strategie erfordert eine effiziente Kupplung der drei Substituenten **A–C** an die β -Mannosid-Einheit des Acceptors **D**. Je nach der Reihenfolge, in der die Substituenten eingeführt werden, sind sechs verschiedene Wege denkbar.

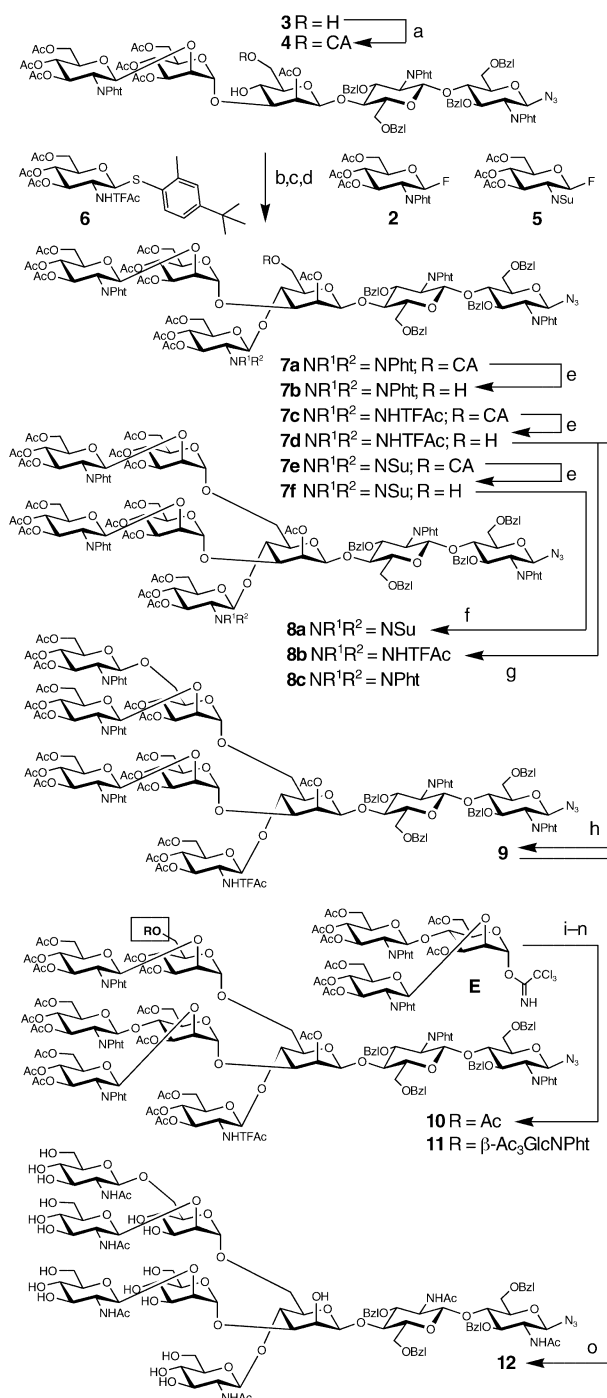
Bei unseren ersten Versuchen zur Synthese multiantennärer N-Glycane sollte der „Bisecting“-GlcNAc-Baustein **2** im abschließenden Schritt an das triantennäre N-Glycan **1c** gekuppelt werden, das aus den Vorstufen **A**, **C** und **D** erhalten werden kann (Schema 2).^[14] Diese Strategie konnte zuvor bei biantennären Verbindungen erfolgreich angewandt werden.^[7] Der triantennäre Acceptor **1c** enthält bereits die freie OH-4³-Gruppe, die für die Reaktion mit **2** erforderlich ist. Bei der Umsetzung mit 10 Äquivalenten des Donors **2** verlief die Reaktion an OH-4³ jedoch sehr langsam und in niedrigen Ausbeuten; das Produktgemisch konnte überdies nicht chromatographisch aufgetrennt werden. Ein ähnliches Ergebnis wurde bei der Umsetzung der tri- bzw. tetraantennären N-Glycane **1b** und **1d** erhalten.



Schema 2. Nur am biantennären Acceptor **1a** konnte ein „Bisecting“-Substituent durch Umsetzung mit **2** im letzten Reaktionsschritt eingeführt werden (Ausbeute an **8c**: 56%).

Um diese Probleme bei der späten Einführung eines „Bisecting“-GlcNAc-Restes zu überwinden, wurde die Reaktivität des Donors **2** erhöht und der sterische Anspruch verringert; außerdem wurde der biantennäre Acceptor **1a** anstelle von **1c** eingesetzt. Der Austausch der Phthaloylgruppe des Donors gegen eine Succinyl- oder 2,2,2-Trichlor-ethoxycarbonyl-Gruppe^[15] sowie von Acetaten gegen Benzylether steigerte die Ausbeute nicht über 56%, den Wert, der bereits mit dem Donor **2** erhalten wurde.^[7] Die Einführung des „Bisecting“-Substituenten in einem späten Syntheseschritt ist demnach wenig erfolgversprechend.

Wir führten im nächsten Syntheserversuch den „Bisecting“-Substituenten vor dem α -1,3-Arm ein, um so die sterische Hinderung zu verringern. Bei dieser Strategie muss jedoch nach Entfernen der Benzylidenacetal-Funktion temporär eine Schutzgruppe selektiv an der primären OH-6³-Gruppe eingeführt werden. Die erforderlichen Reaktionen wurden mit dem Pentasacchariddiol **3** als Modellverbindung durchgeführt (Schema 3), das durch eine Sequenz aus regioselektiver α -1,3-Glycosylierung des zentralen Trisaccharids **D** mit dem Donor **A**, Acetylierung und Entfernen der Benzylidenacetal-Funktion erhalten wurde.^[16] Zunächst wurde die primäre Hydroxyfunktion von **3** mit einer *tert*-Butyldimethylsilylgruppe geschützt. Diese Verbindung konnte in Reaktionen mit den Donoren **2** oder **6** jedoch nicht mit einem „Bisecting“-GlcNAc-Substituenten versehen werden, vermutlich aufgrund der sterischen Hinderung durch die sperrige Schutzgruppe. Die wesentlich kleinere Chloracetyl-Schutzgruppe^[17] kann leicht regioselektiv eingeführt werden; die Reaktion von **3** mit einem geringen Überschuss an Chloressigsäureanhydrid bei 0°C unter starker Verdünnung liefert **4** in 98% Ausbeute. Die Einführung des „Bisecting“-GlcNAc-Substituenten erfolgte anschließend mit mehreren Donoren mit unterschiedlichen Schutzgruppen



Schema 3. a) Chloressigsäureanhydrid, Pyridin, CH₂Cl₂, 98%; b) **4**, CH₂Cl₂, BF₃·OEt₂, 79%; c) **4**, **6**, CH₂Cl₂, N-Iodsuccinimid, Trifluormethansulfonsäure, 71%; d) **4**, **5**, CH₂Cl₂, BF₃·OEt₂, 55%; e) K₂CO₃, MeOH/CH₂Cl₂ (1:10); **7b** 70%; **7d** 74%; **7f** 83%; f) **A**, CH₂Cl₂, BF₃·OEt₂, 43%; g) **A**, CH₂Cl₂, BF₃·OEt₂, 76%; h) **C**, CH₂Cl₂, BF₃·OEt₂, 16%; i) **1**, **D**, CH₂Cl₂, BF₃·OEt₂; 2. Essigsäureanhydrid, Pyridin; 3. *p*-TosOH, CH₃CN (75%, Schritte 1–3); k) Chloressigsäureanhydrid, Pyridin, CH₂Cl₂, 85%; l) **6**, CH₂Cl₂, N-Iodsuccinimid, Trifluormethansulfonsäure 34%; m) K₂CO₃, MeOH/CH₂Cl₂ (1:10), 87%; n) **A**, CH₂Cl₂, BF₃·OEt₂, 20%; o) 1. Ethylendiamin, *n*BuOH, 80°C; 2. Essigsäureanhydrid, Pyridin; 3. MeNH₂ (41%) in H₂O (75%, Schritte 1–3). CA = Chloracetyl, NSu = Succinimido, TFAc = Trifluoracetyl.

an der Aminofunktion. Mit dem Donor **2** wurde die beste Ausbeute (79%) erzielt, gefolgt vom Trifluoracetyl-geschützten^[18] Thioglycosid **6** (70%) und dem Succinimiderivat **5** (55%). Selektives Entfernen der Chloracetyl-Schutzgruppe der Hexasaccharide **7a**, **7c** und **7e** durch Verseifung mit K₂CO₃ in MeOH/CH₂Cl₂ lieferte unter milden Bedingungen die Acceptoren **7b**, **7d** bzw. **7f**.

Die Einführung des α-1,6-Arms durch Glycosylierung dieser Acceptoren mit dem Disacchariddonor **A** wurde untersucht. Die Ausbeuten dieser Reaktionen waren stark abhängig von der Schutzgruppe an der Aminofunktion des „Bisecting“-Substituenten. Mit dem Phthalimiderivat **7b** erfolgte keine Reaktion, wohingegen **7f** mit der kleineren Succinimidfunktion und das Trifluoracetamid **7d** die entsprechenden Octasaccharide **8a** (43%) bzw. **8b** (76%) ergaben. Dies bestätigt frühere Ergebnisse von Paulsen et al.^[5] zur blockierenden Wirkung einer Phthalimidofunktion in 2-Position des „Bisecting“-Substituenten. Um dieses sterische Problem beheben und schließlich den α-1,6-Arm anbringen zu können, mussten die Phthalimidogruppen früher in einer Reihe von Reaktionen in Acetamidgruppen umgewandelt werden.^[5] Diese Schutzgruppentransformation wird durch Verwendung des trifluoracetylierten Donors **6** vermieden, und die üblicherweise bei Glucosamin verwendeten Phthaloyl-Schutzgruppen können beibehalten werden. Dies ist vorteilhaft, denn Phthaloyl-geschützte N-Glycan-Bausteine liefern höhere Glycosylierungsausbeuten und gehen weniger Nebenreaktionen ein als N-acetylierte Derivate.^[16]

Die Reaktion des Acceptors **7d** mit dem verzweigten Donor **C** zeigt, dass die neue Methode auch zum Aufbau triantennärer Verbindungen vom „Bisecting“-Typ geeignet ist: Es gelang uns, das triantennäre N-Glycan **9** rein zu erhalten (16% Ausbeute).^[19] Die Struktur von **9** wurde durch 2D-NMR-Experimente^[20] (COSY, NOESY, HMQC, HMQC-COSY^[21]) und durch Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie bestätigt. Mit dieser Glycosylierungsstrategie wurde ein weiteres triantennäres N-Glycan vom „Bisecting“-Typ erhalten. Das Nonasaccharid **10** wurde schrittweise aus den Bausteinen **D** und **E**, dem „Bisecting“-GlcNAc-Donor **6** (34% Ausbeute) sowie dem Baustein **A** aufgebaut (20% Ausbeute, Schema 3). Setzt man im letzten Glycosylierungsschritt den Donor **C** anstelle von **A** ein, so erhält man die tetraantennäre Verbindung **11** in 12% Ausbeute. Die Ausbeuten bei der Einführung des α-1,6-Arms in multiantennäre N-Glycane vom „Bisecting“-Typ sind deutlich geringer als bei analogen Verbindungen (70–90%).^[14] In der starken Beeinträchtigung, die dieser abschließende Glycosylierungsschritt durch sterische Hinderung erfährt, zeigen sich die Einschränkungen der chemischen Oligosaccharidsynthese mit extensiver Verwendung von Schutzgruppen.

Die N-Glycane vom „Bisecting“-Typ mit N-Trifluoracetylgruppe können in einer dreistufigen Eintopfreaktion entschützt werden: Umsetzung von **9** mit Ethylendiamin,^[22] Peracetylierung und abschließende O-Desacetylierung führten zu **12**, das nach Festphasenextraktion rein in 75% Ausbeute erhalten wurde.

Durch unsere vielseitige Baukasten-Strategie konnten wir erstmals N-Glycane erhalten, deren „Bisecting“-Substituenten von drei oder vier Antennen-Einheiten flankiert sind. Der

sterische Anspruch der einzelnen Synthesebausteine und die Reihenfolge ihrer Einführung sind entscheidend für die Synthese dieser hoch substituierten Oligosaccharide. Nur die Kombination aus einer kleinen Schutzgruppe an der Aminofunktion des „Bisecting“-Substituenten und der Einführung des α -1,6-Arms im abschließenden Schritt ermöglichte die Synthese dieser komplexen Oligosaccharide.

Eingegangen am 10. April 2003 [ZS1625]

Stichwörter: Glycosylierungen · Kohlenhydrate · N-Glycane · Polysaccharide

- [1] B. Lowe, A. Varki, *Essentials in Glycobiology*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, **1999**.
- [2] P. M. Rudd, H. C. Joao, E. Coghill, P. Fiten, M. R. Saunders, G. Opdenakker, R. A. Dwek, *Biochemistry* **1994**, *33*, 17–22.
- [3] B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 579–602.
- [4] F. Yamazaki, T. Kitajima, T. Nukada, Y. Ito, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1990**, *201*, 15–30.
- [5] H. Paulsen, M. Heume, H. Nürnberger, *Carbohydr. Res.* **1990**, *200*, 127–166.
- [6] S. Weiler, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2299–2302.
- [7] C. Unverzagt, J. Seifert, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 4549–4553.
- [8] A. Rebbaa, P. M. Chou, I. Vucic, B. L. Mirkin, T. Tomita, E. G. Bremer, *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 3661–3668.
- [9] J. J. Priatel, M. Sarkar, H. Schachter, J. D. Marth, *Glycobiology* **1997**, *7*, 45–56.
- [10] X. Yang, M. Bhaumik, R. Bhattacharyya, S. Gong, C. E. Rogler, P. Stanley, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3313–3319.
- [11] M. Yoshimura, Y. Ihara, T. Nishiura, Y. Okajima, M. Ogawa, H. Yoshida, M. Suzuki, K. Yamamura, Y. Kanakura, Y. Matsuzawa, N. Taniguchi, *Biochem. J.* **1998**, *331*, 733–742.
- [12] Y. Ihara, Y. Sakamoto, M. Mihara, K. Shimizu, N. Taniguchi, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 9629–9634.
- [13] a) C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1170–1173; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1102–1104; b) C. Unverzagt, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 1369–1376.
- [14] C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2078–2081; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1989–1992.
- [15] T. B. Windholz, D. B. R. Johnston, *Tetrahedron Lett.* **1967**, 2555–2557.
- [16] C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2507–2510; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2350–2353.
- [17] C. P. J. Glaudemans, M. J. Bertolini, *Methods Carbohydr. Chem.* **1980**, *8*, 271–275.
- [18] D. J. Silva, H. Wang, N. M. Allanson, R. K. Jain, M. J. Sofia, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5926–5929.
- [19] Verbindung **9**: $R_f = 0.24$ (Kieselgel, Hexan/Aceton 1:1); $[\alpha]_D^{25} = +1.9^\circ$ ($c = 0.5$ in CH_2Cl_2); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 298 K): $\delta = 9.78$ (d, $J_{\text{NH}_2} = 7.8$ Hz, 1 H, NH), 8.13–7.70 (m, 20 H, Pht), 7.35–7.10 (m, 10 H, Bzl), 6.87–6.74 (m, 10 H, Bzl), 5.65 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 10.1$ Hz, 1 H, H-3⁵), 5.52 (m, 2 H, H-3⁵, H-3⁷), 5.48 (m, 2 H, H-3¹, H-3²), 5.42 (d, $J_{1,2} = 8.3$ Hz, 1 H, H-1⁵ β), 5.37 (d, $J_{1,2} < 1.0$ Hz, 1 H, H-1⁴), 5.24 (d, $J_{1,2} = 9.9$ Hz, 1 H, H-1¹ β), 5.16 (d, $J_{1,2} = 8.4$ Hz, 1 H, H-1⁵ β), 5.05–5.02 (m, 4 H, H-4², H-4¹, H-1⁷, H-3⁵), 4.83 (dd, $J_{2,3} = J_{3,4} = 10.3$ Hz, 1 H, H-3⁶), 4.83–4.78 (m, 4 H, H-3³, H-4⁵, CH_2O), 4.76 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.6$ Hz, 1 H, H-4⁴), 4.72 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 9.9$ Hz, 1 H, H-4⁴), 4.68–4.65 (m, 2 H, H-1⁶, H-1³), 4.63 (d, $J_{1,2} < 1.0$ Hz, H-1⁴), 4.35 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} = 8.9$ Hz, 1 H, H-1²), 4.33 (dd, $J_{1,2} = J_{2,3} = 9.1$ Hz, 1 H, H-2⁴), 4.31–4.25 (m, 5 H, H-6a⁵, H-2⁴, H-4⁶, CH_2O), 4.21–4.19 (m, 3 H, H-6b⁵, CH_2O), 4.17 (dd, $J_{3,4} = J_{4,5} = 7.3$ Hz, 1 H, H-2⁴), 4.11–3.95 (m, 7 H, H-3⁴, H-2², H-2¹, H-5⁴, H-5⁶, CH_2O), 3.86–3.76 (m, 10 H, H-4⁷, H-6a,b⁷, H-5⁵, H-6a², H-5¹, H-6 a/b³, H-2³), 3.64 (m, 1 H, H-5⁵), 3.52–3.42 (m, 5 H,
- H-5⁵, H-6a⁴, H-6a⁴, H-5⁴, H-6a¹), 3.32–3.25 (m, 2 H, H-6b⁴, H-6a⁵), 3.24–3.17 (m, 3 H, H-6b⁴, H-5⁷, H-6b¹), 2.99–2.88 (m, 2 H, H-5³, H-6b⁵), 2.04, 2.03, 2.02, 2.01, 2.004, 2.003, 1.99, 1.98, 1.96, 1.94, 1.91, 1.89, 1.80, 1.78, 1.76, 1.75, 1.69 ppm (17 s, 54 H, OAc); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 298 K): $\delta = 170.16$, 170.03, 169.95, 169.82, 169.66, 169.52, 169.22, 169.12, 169.01, 167.64, 167.15, 166.32 (C=O), 156.43 (q, C=O, NTFac), 139.44, 139.14, 138.52, 138.45 (C_i-Ar), 128.34–126.66 (C-Ar), 117.43 (q, CF₃), 100.98 (C-1⁶, $J_{\text{C-1,H-1}} = 171.3$ Hz aus dem gekoppelten HMQC-Spektrum), 97.46 (C-1⁵), 97.45 (C-1³), 96.70 (C-1⁷), 96.15 (C-1⁵), 95.44 (C-1⁴ α , $J_{\text{C-1,H-1}} = 172$ Hz aus dem gekoppelten HMQC-Spektrum), 95.06 (C-1⁴ α , $J_{\text{C-1,H-1}} = 172$ Hz aus dem gekoppelten HMQC-Spektrum), 92.01 (C-1²), 84.83 (C-1¹), 76.33 (C-5⁵), 75.95 (C-5⁴), 73.90 (C-5⁷), 73.81 (C-2⁴), 72.38 (C-6⁶), 72.19 (C-4⁶), 71.85 (C-6³), 71.84 (C-4⁵), 71.83 (C-5⁵), 71.72 (C-3²), 71.71 (C-3¹), 70.51 (C-3⁴), 70.44 (C-3⁷), 70.17 (C-3⁵), 69.25 (C-4³), 68.65 (C-4⁵), 68.63 (C-3³), 68.57 (C-3⁶), 68.53 (C-4⁴), 68.47 (C-4¹), 68.43 (C-3⁵), 67.83 (C-6⁷), 67.63 (C-4²), 67.58 (C-6¹), 67.56 (C-6⁴), 67.55 (C-6⁴), 67.46 (C-4⁷), 67.37 (C-6⁵), 67.17 (C-2²), 62.14 (C-6³), 62.04 (C-6²), 62.03 (C-4⁴), 62.01 (C-5²), 61.94 (C-5³), 61.76 (C-5⁶), 61.73 (C-3⁴), 61.72 (C-5⁴), 55.73 (C-2⁵), 54.70 (C-2¹), 54.62 (C-2⁵), 54.19 (C-2⁴), 53.98 (C-2⁷), 53.88 (C-2⁶), 53.84 (C-2³), 20.55, 20.42, 20.35, 20.01, 19.96, 19.82 ppm (OAc); $\text{C}_{160}\text{H}_{166}\text{F}_3\text{N}_9\text{O}_{68}$, $M_r = 3360.05$; ESI-MS: m/z : ber. 3357.98 $[M^+]$, gef. 3380.9 $[M+\text{Na}^+]$.
- [20] H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 507–554; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 490–536.
- [21] H. Kessler, P. Schmieder, M. Kurz, *J. Magn. Reson.* **1989**, *85*, 400–405.
- [22] O. Kanie, S. C. Crawley, M. M. Palcic, O. Hindsgaul, *Carbohydr. Res.* **1993**, *243*, 139–164.