

Kohlenhydratsynthese (1)

Automatisierte Festphasensynthese von Chondroitinsulfat-glycosaminoglycanen**

Steffen Eller, Mayeul Collot, Jian Yin, Heung Sik Hahm und Peter H. Seeberger*

Kohlenhydrate bilden die Stoffklasse, die den größten Anteil an allen Biomolekülen auf der Erde ausmacht. Gebunden an Proteine und Lipide bilden Kohlenhydrate vier Glycoconjugatklassen mit charakteristischen strukturellen und biologischen Eigenschaften: Glycoproteine, Glycolipide, Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-Anker und Glycosaminoglycane (GAGs; Abbildung 1). Diese strukturell sehr unterschiedlichen Makromoleküle kommen in der extrazellulären Matrix vor und sind dort für viele essentielle biologische Prozesse zuständig.^[1]

GAGs sind negativ geladene Polysaccharide mit Carbonsäurefunktionen. Lokalisiert in der extrazellulären Matrix durch die Bindung an membran durchspannende Proteine leiten sie als Proteoglycane Signale ins Zellinnere (Abbildung 1).^[2] GAGs variieren in der Länge der Kohlenhydratkette (zwischen 20 und 200 Disaccharideinheiten) und deren Zusammensetzung. Außerdem sorgen verschiedene Sulfatierungsmuster und -grade für eine sehr große Vielfalt dieser Biomoleküle.^[2d] Chondroitinsulfat besteht aus abwechselnd miteinander verknüpften N-Acetyl-β-D-galactosamin- und β-D-Glucuronsäureresten, die sich zusätzlich durch Sulfatierung bestimmter Hydroxygruppen unterscheiden. Diese Modifikationen beeinflussen die biologische Aktivität und erschweren die Erforschung von Struk-

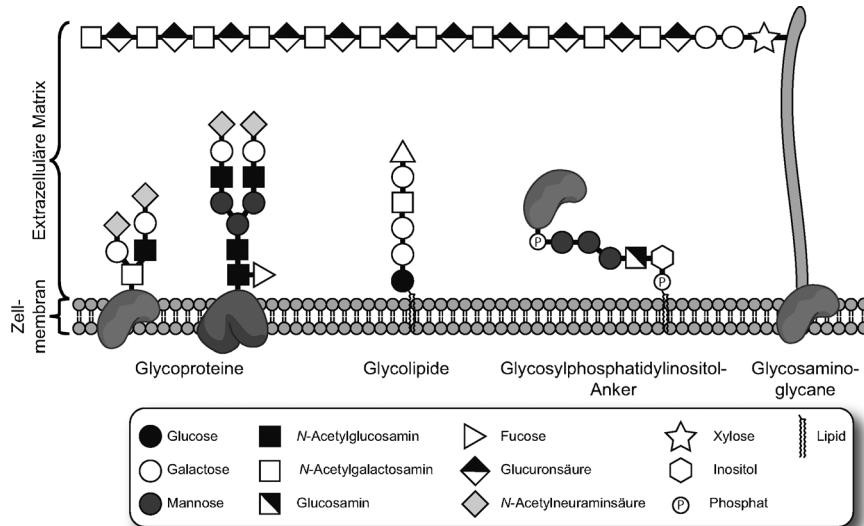


Abbildung 1. Glycoconjugate in der extrazellulären Matrix. O- und N-Glycane sind über die Seitenketten von Serin, Threonin oder Asparagin mit Proteinen verknüpft. Glycolipide bestehen aus Kohlenhydraten und Lipiden und spielen eine wichtige Rolle in zellulären Erkennungsprozessen. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) verankert Proteine über zwei Fettsäuren in der Zellmembran. Glycosaminoglycane treten als Seitenketten von Proteoglycanen auf.

tur-Wirkungs-Zusammenhängen durch den limitierten Zugang zu diesen Molekülen mit definierten Sulfatierungsmustern.^[2d]

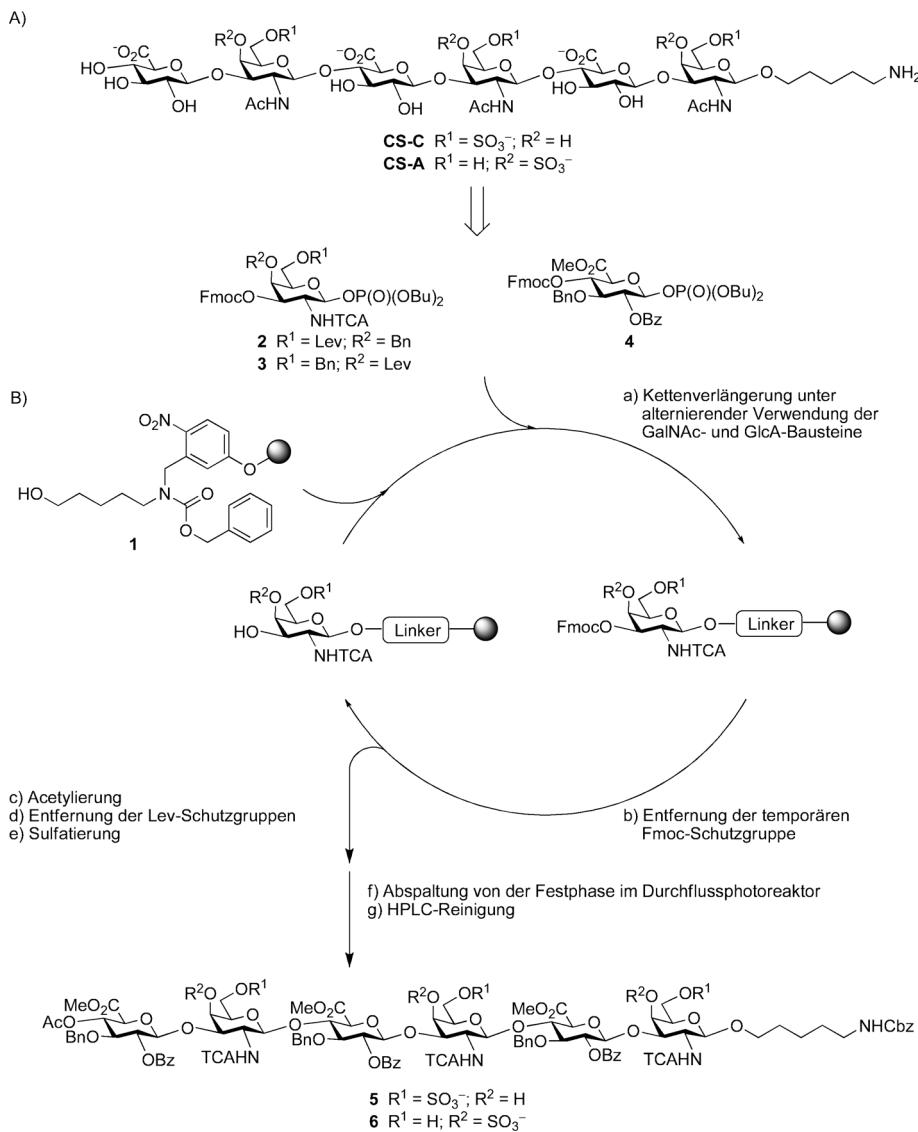
Maßgeschneiderte GAG-Oligosaccharide können chemisch^[3] oder enzymatisch^[4] hergestellt werden und stellen wertvolle Instrumente dar, um deren genaue biologische Funktion analysieren zu können. Allerdings erhöht die regioselektive Einführung von Sulfatgruppen zusätzlich die Komplexität der Synthese. Deshalb lassen viele derzeitige Synthesemethoden einen generellen Zugang zu den verschiedenen Verbindungen dieser Stoffklasse vermissen, sind sehr zeitaufwendig und beinhalten viele sequenztypische Schwierigkeiten.

Hier beschreiben wir einen neuen Ansatz für die automatisierte Festphasensynthese von GAG-Oligosacchariden, basierend auf der bereits etablierten Synthese der Kohlenhydrateinheiten von Glycoproteinen und -lipiden.^[5] Es wurde eine Strategie entwickelt, die die Synthese unter der Verwendung orthogonal geschützter Bausteine und eines stabilen, aber dennoch einfach abspaltbaren Linkers für die Anbindung der wachsenden Zuckerkette an die Festphase^[6] ermöglicht. Für diese Synthese wurde ein Kohlenhydratsynthesizer, der Glycosylierungszyklen vollständig automatisiert ausführen kann,^[5b] für die Einführung der Sulfatgruppen an der Festphase weiterentwickelt.

[*] Dr. S. Eller, Dr. M. Collot, Dr. J. Yin, H. S. Hahm, Prof. Dr. P. H. Seeberger
Abteilung für Biomolekulare Systeme
Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung
Am Mühlenberg 1, 14476 Potsdam (Deutschland)
und
Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin
Arnimallee 22, 14195 Berlin (Deutschland)
E-Mail: peter.seeberger@mpikg.mpg.de
Homepage: http://www.mpikg.mpg.de/Biomolekulare_Systeme/index.html

[**] Wir danken der Max-Planck-Gesellschaft und dem European Research Council (ERC Advanced Grant AUTOHEPARIN für PHS) für die Unterstützung dieser Arbeit sowie Dr. D. Kolarich, Dr. M. Hurevich, Dr. M. Schlegel und O. Calin für hilfreiche Diskussionen und Dr. Y.-H. Tsai für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201210132> zu finden.



Schema 1. A) Retrosynthese der Chondroitinoligosaccharide mit verschiedenen Sulfatierungsmustern. B) Automatisierte Synthese von Chondroitinhexasacchariden. Reaktionen und Bedingungen:
a) 3×3 Äquiv. Baustein, TMSOTf, CH_2Cl_2 , $-15^\circ C$ (45 min) $\rightarrow 0^\circ C$ (15 min); b) $3 \times 20\%$ Piperidin in DMF, $25^\circ C$ (5 min); c) $3 \times Ac_2O$, Pyridin $25^\circ C$ (30 min); d) $3 \times H_2NNH_2 \cdot H_2O$, Pyridin, AcOH, CH_2Cl_2 , $25^\circ C$ (60 min); e) $3 \times SO_3^-$, Pyridin, Pyridin, DMF, $50^\circ C$ (3 h); f) $h\nu$, CH_2Cl_2 , $25^\circ C$ (5: 13% über 16 Stufen; 6: 8% über 16 Stufen). TCA = Trichloracetyl.

Aufgrund ihrer biologischen Rolle bei der Infektion durch *Plasmodium falciparum*^[7] wurden die beiden Chondroitinsulfathexasaccharide **CS-C** und **CS-A** (Schema 1 A) als Zielverbindungen für die automatisierte Festphasensynthese gewählt. Zusätzlich stellt die hohe negative Ladung dieser Hexasaccharide eine große präparative Herausforderung dar. Die retrosynthetische Analyse zeigte, dass die Kohlenhydratkette der Hexasaccharide **5** und **6** aus zwei selektiv geschützten Galactosamin- (GalNAc) und einem Glucuronsäurebaustein (GlcA) aufgebaut werden kann (Schema 1).

Es wurde eine Schutzgruppenstrategie entwickelt, die bereits in der Synthese von Heparin erfolgreich eingesetzt wurde:^[3d] Hydroxygruppen, die während der Synthese nicht modifiziert werden, wurden permanent mit Benzylethern

(Bn) versehen, wohingegen Positionen für die spätere Sulfatierung orthogonal mit Lävulinsäureestern (Lev) geschützt wurden, da diese unter milden Reaktionsbedingungen selektiv entfernt werden. Die Hydroxygruppen, die während der Kettenverlängerung als Nucleophil dienen sollten, wurden mit Fluorenylmethoxykarbonyl (Fmoc) geschützt, da sich diese selektiv mit Piperidin entfernen lassen. Unter Berücksichtigung dieser Strategie wurden die beiden funktionalisierten Galactosaminphosphate (**2** und **3**) und der Glucuronsäurebaustein (**4**) entworfen und aus kommerziell erhältlicher Galactose und Glucose im Multigrammstab hergestellt (Schema 1 A sowie Abbildungen S2 und S3 in den Hintergrundinformationen).

Bei der Auswahl des Linkers mussten die breiten Reaktionsbedingungen während der GAG-Synthese berücksichtigt werden. Der ideale Linker kann nach der Synthese einfach von der Festphase abgespalten werden und enthält eine funktionelle Gruppe für die chemoselektive Synthese von Glycoarrays oder Glykonjugaten.^[8] Zusätzlich muss der Linker neben den stark basischen Reaktionsbedingungen, die für die Entfernung der Fmoc-, Lev- und Bz-Schutzgruppen notwendig sind, auch den sauren Bedingungen in den Glycosylierungen standhalten. Die stark sauren Reaktionsbedingungen für die Phosphatkupplungen würden den bifunktionellen Linker,^[5b] der für die automatisierte Synthese für N- und O-gebundene Kohlenhydrate erfolgreich verwendet

wurde, abspalten. Außerdem können die stark basischen Abspaltungsbedingungen für diesen Linker zu β -Eliminierungen in den Glucuronsäureresten und somit zu verkürzten Ketten führen. Der für die Festphasensynthese von Kohlenhydraten bereits verwendete Octendiol-Linker macht nach der Abspaltung durch Olefinmetathese weitere Modifikationsschritte in Lösung nötig und wurde deshalb für die labilen Sulfatgruppen ausgeschlossen.^[3d]

Dementsprechend wurde ein neuer orthogonaler Linker entworfen. Ein photolabiler Nitrobenzylether-basierender Linker wurde hierfür an die Festphase (**1**, Schema 1 B) geknüpft und in einer Modellstudie mit verschiedenen Zuckerbaustein getestet. Licht wurde bereits als sehr selektives „Reagens“ für die Abspaltung von Oligosacchariden und

Oligopeptiden von der Festphase erfolgreich eingesetzt.^[9] Allerdings wird die Intensität des Lichts durch Lösungsmittel mit wachsender Distanz von der Lichtquelle durch Absorption stark vermindert, was die Effektivität der Photoreaktion zur Abspaltung in herkömmlichen Reaktionsgefäßern stark beeinträchtigt (Abbildung 2 A).^[10]

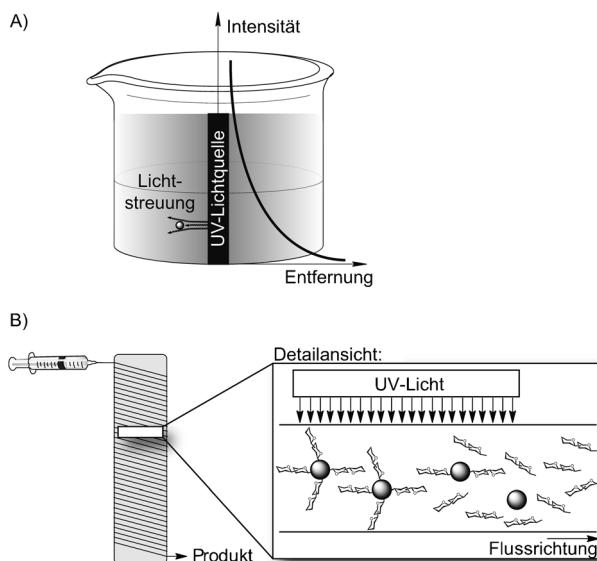


Abbildung 2. Photoabspaltung von der Festphase. A) In Suspensionen nimmt die Lichtintensität mit wachsender Entfernung von der Lichtquelle ab. Zusätzlich mindert Lichtstreuung die Effektivität bei der Abspaltungsreaktion in einem normalen Reaktionsgefäß. B) Photoabspaltung in einem Durchflussreaktor: Die festphasengebundenen Hexasaccharide werden nahe der Lichtquelle durch einen Schlauch transportiert und somit effektiv bestrahlt, was eine hohe Abspaltungsrate zur Folge hat.

Dieser Effekt wird zusätzlich durch Lichtstreuungseffekte durch das suspendierte Harz der Festphasensynthese in einem separaten Schritt in einem Durchflussphotoreaktor durchgeführt. Hier erfolgt die Reaktion in einem Schlauch mit engem Durchmesser, der eine hohe Bestrahlungseffektivität sichert (Abbildung 2B).^[11] Dieser Reaktor enthält eine Quecksilberlampe mit einem UV-Filter (Pyrex, 50% Durchlässigkeit bei 305 nm), die von einem Kühlsystem umgeben ist. Die Abspaltung findet in einem Schlauch aus fluoriertem Ethylenpropylen (FEP) statt, der um die Lichtquelle gewickelt ist. Die festphasengebundenen Produkte wurden aus dem Reaktor des Synthesizers entnommen und mithilfe von Einwegspritzen und einer Spritzenpumpe durch den Durchflussreaktor gepumpt.

Die in der austretenden Suspension gelösten Produkte wurden nach der Abspaltung durch Filtration vom Harz getrennt und werden nach Entfernung des Lösungsmittels ohne weitere Aufarbeitungsschritte erhalten. Dies stellt nach unserem Wissen erstmals die Kombination einer hocheffektiven Photoreaktion an der Festphase in einem kontinuierlichen Flussreaktor dar.

Mit dem neuen Linkersystem und verschiedenen Bausteinen wurden verschiedene Polymerträgerharze untersucht. Für die Glycosylierungen zeigte sich Polystyrol als effektivste Festphase und wurde deshalb für die Synthese der Chondroitinhexasaccharide gewählt. Zusätzlich wurden verschiedene Abgangsgruppen für die Zuckerbausteine untersucht, wobei die Phosphatgruppe im Vergleich zu Seleno- und Thioglycosiden oder Trichloracetimidatbausteinen zu höheren Kupplungsausbeuten führte.

Nach diesen vorläufigen Untersuchungen sollten die Chondroitinoligosaccharide **5** und **6** hergestellt werden (Schema 1B). Hierzu wurde die Festphase mit dem Linker funktionalisiert^[12] (Schema 1B) und mit einer Beladung^[13] von 0.47 mmol g^{-1} erhalten. Das Chondroitin-6-sulfathexasaccharid **5** wurde mit den Bausteinen **2** und **4** in 16 Stufen nach drei Tagen in einer Ausbeute von 13% (88% durchschnittliche Ausbeute pro Stufe) erhalten. Durch Verwendung der Bausteine **3** und **4** wurde Chondroitin-4-sulfathexasaccharid **6** mit einer Ausbeute von 8% (86% durchschnittliche Ausbeute pro Stufe) hergestellt. Für die Synthese der Zuckerketten von **5** und **6** wurden für jeden Zyklus Dreifachglycosylierungen mit drei Äquivalenten Baustein und einer äquimolaren Menge des Aktivators Tri-fluormethansulfonsäuretrisilylmethylester (TMSOTf) bei -15°C durchgeführt. Für die Kettenverlängerung wurde die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin entfernt und die Kupplungsausbeute der vorangegangenen Glycosylierung anhand der UV-Absorption des Piperidindibenzofulven-Addukts quantifiziert. Um ungewollte Nebenreaktionen zu vermeiden, wurde vor der Sulfatierung die terminale Fmoc-Gruppe durch ein stabiles Acetat ersetzt. Im Anschluss wurden in gepufferten Hydrazinlösungen alle Lev-Ester selektiv entfernt und die somit erhaltenen Hydroxygruppen mit Schwefeltrioxidpyridiniumkomplex in DMF und Pyridin bei 50°C sulfatiert.

Die festphasengebundenen Hexasaccharide wurden manuell aus dem Reaktionsgefäß des Synthesizers entfernt, in Dichlormethan gequollen und anschließend im Photoreaktor abgespalten. Während des Abspaltungsprozesses wurde das Lösungsmittel durch MeOH ersetzt, um die Löslichkeit der negativ geladenen Hexasaccharide zu gewährleisten. Die Rohprodukte wurden mittels Umkehrphasen-HPLC und Massenspektrometrie analysiert (RP-LCMS) und anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt (Abbildung 3A). Hierbei dienten die Carboxybenzyl(Cbz)-Schutzgruppe am Linker und die verbleibenden Benzylether als Chromophor für die UV-Detektion der Zielverbindungen während der HPLC-Reinigung. Die teilweise entschützten Chondroitinhexasaccharide **5** und **6** wurden vollständig durch NMR-Spektroskopie (Abbildung 3B) und hochauflösende Massenspektrometrie (HR-ESI-MS) charakterisiert.

Die endgültige Entfernung der Benzylether-, Trichloracetamide und Benzoyl- und Acetylester sollte durch Hydrierung und Esterverseifung realisiert werden. Diese Schritte führen zu einer einzigen Aminogruppe am Linker, die zur selektiven Kupplung der Chondroitinhexasaccharide auf Glycochips oder Nanopartikel verwendet werden kann. Durch die erschwerte Charakterisierung der hoch negativ geladenen Reaktionszwischenprodukte durch Massenspektrometrie und Dünnschichtchromatographie ist die Über-

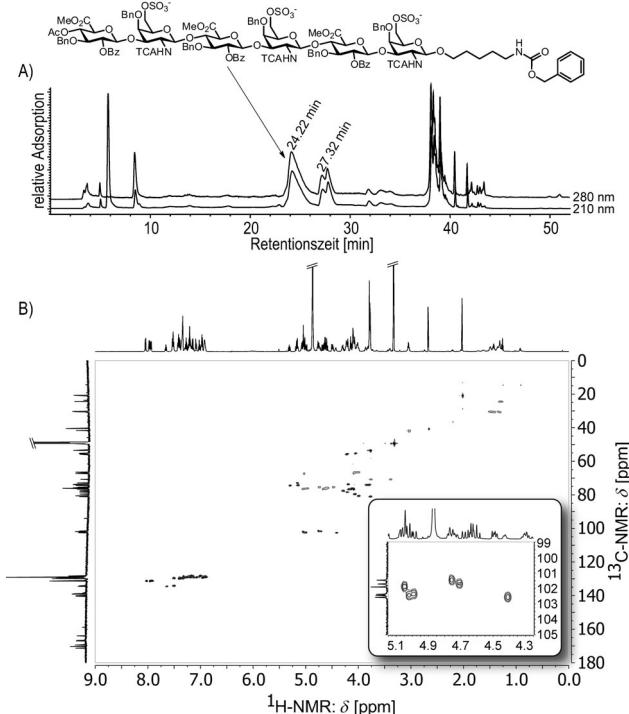


Abbildung 3. Reinigung und Charakterisierung des Chondroitinhexasaccharids 5. A) Produktreinigung durch préparative HPLC. Nach 24.22 min eluiert Produkt 5 und nach 27.32 min eine Deletionssequenz, der ein GlcA- und ein GalNAc-Rest fehlen. Die Peaks zwischen 38 und 44 min können auf Polystyrolverbindungen aus dem Merrifield-Harz zurückgeführt werden. Bedingungen: Säule: C18-Nucleodur (21×250 mm; $5 \mu\text{m}$); Flussrate: 10 mL min^{-1} ; Eluenten: $0.01 \text{ M NH}_4\text{HCO}_3$ in Wasser/MeCN; Gradient: 45% (5 min) → 55% (in 40 min) → 100% (in 5 min); Detektion: 210 und 280 nm. B) HSQC-NMR-Spektrum (600 MHz) von 5 bei 25°C in CD_3OD .

prüfung des Reaktionsfortschrittes in den Entschüttungsreaktionen eine große Herausforderung, weshalb ein effektiver Prozess für die endgültige Entschüttung noch entwickelt wird.

Die Kombination eines automatisierten Kohlenhydrat-synthesizers mit einem lichtlabilen Linker, der in einem Durchflussphotoreaktor effektiv abgespalten werden kann, ermöglichte die Synthese von zwei Chondroitinhexasacchariden, die als Beispiel für die Synthese von GAGs herangezogen werden kann. Durch die Kombination verschiedener Bausteine sollten sich GAG-Oligosaccharide wie Heparin, Heparansulfat, Keratansulfat oder Dermatansulfat mit definierten Sulfatierungsmustern in einer kurzen Zeit für biologische Versuche herstellen lassen.

Eingegangen am 19. Dezember 2012
Online veröffentlicht am 15. April 2013

Stichwörter: Automatisierte Festphasensynthese · Glycosaminoglycane · Photospaltbare Linker

- [1] *Essentials of Glycobiology* (Hrsg.: A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, J. Marth), 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **2009**.
- [2] a) L. Kjellén, U. Lindahl, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, *60*, 443–475; b) R. J. Linhardt, T. Toida, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 431–438; c) R. Klim, L. Li, P. J. Wrighton, M. S. Piekarczyk, L. L. Kiessling, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 989–994; d) C. I. Gama, L. C. Hsieh-Wilson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 609–619.
- [3] a) S. Arungundram, K. Al-Mafraji, J. Ason, F. E. Leach III, I. J. Amster, A. Venot, J. E. Turnbull, G. J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17394–17405; b) Y.-P. Hu, S.-Y. Lin, C.-Y. Huang, M. M. L. Zulueta, J.-Y. Liu, W. Chang, S.-C. Hung, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 557–563; c) C. I. Gama, S. E. Tully, N. Sotogaku, P. M. Clark, M. Rawat, N. Vaidehi, W. A. Goddard III, A. Nishi, L. C. Hsieh-Wilson, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 467–473; d) C. Noti, J. de Paz, L. Polito, P. H. Seeberger, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 8664–8686; e) T. Polat, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12795–12800; f) J.-i. Tamura, Y. Nakada, K. Taniguchi, M. Yamane, *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 39–47.
- [4] a) F. Y. Avci, P. L. DeAngelis, J. Liu, R. J. Linhardt, *Front. Mod. Carbohydr. Chem.* **2007**, *960*, 253–284; b) M. Gotoh, T. Sato, T. Akashima, H. Iwasaki, A. Kameyama, H. Mochizuki, T. Yada, N. Inaba, Y. Zhang, N. Kikuchi, Y.-D. Kwon, A. Togayachi, T. Kudo, S. Nishihara, H. Watanabe, K. Kimata, H. Narimatsu, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 38189–38196; c) Y. Xu, S. Masuko, M. Takieddin, H. Xu, R. Liu, J. Jing, S. A. Mousa, R. J. Linhardt, J. Liu, *Science* **2011**, *334*, 498–501; d) E. Bedini, C. de Castro, M. de Rosa, A. di Nola, A. Iadonisi, O. F. Restaino, C. Schiraldi, M. Parrilli, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 6284–6287; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6160–6163.
- [5] a) O. J. Plante, E. R. Palmacci, P. H. Seeberger, *Science* **2001**, *291*, 1523–1527; b) L. Kröck, D. Esposito, B. Castagner, C.-C. Wang, P. Bindschädler, P. H. Seeberger, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 1617–1622; c) D. B. Werz, B. Castagner, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2770–2771; K. Routenberg Love, P. H. Seeberger, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 612–615; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 602–605.
- [6] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091–2157.
- [7] a) K. Sugahara, T. Mikami, T. Uyama, S. Mizuguchi, K. Nomura, H. Kitagawa, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 612–620; b) W. Chai, J. G. Beeson, A. M. Lawson, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 22438–22446.
- [8] a) J. Yin, P. H. Seeberger, *Methods Enzymol.* **2010**, *478*, 197–218; b) M.-L. Hecht, P. Stallforth, D. Varón Silva, A. Adibekian, P. H. Seeberger, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 354–359.
- [9] a) K. C. Nicolaou, N. Winssinger, J. Pastor, F. DeRoose, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 449–450; b) J. K. Cho, B.-D. Park, Y.-S. Lee, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7481–7485.
- [10] F. R. Bou-Hamdan, F. Lévesque, A. G. O'Brien, P. H. Seeberger, *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 1124–1129.
- [11] a) E. E. Coyle, M. Oelgemöller, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 1313–1322; b) B. D. A. Hook, W. Dohle, P. R. Hirst, M. Pickworth, M. B. Berry, K. I. Booker-Milburn, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7558–7564.
- [12] G. F. Gisin, *Helv. Chim. Acta* **1973**, *56*, 1476–1482.
- [13] M. Gude, J. Ryf, P. D. White, *Lett. Pept. Sci.* **2002**, *9*, 203–206.