

Automatisierte Polysaccharidsynthese: Herstellung eines Mannosyl-triakontamers (30-mer)**

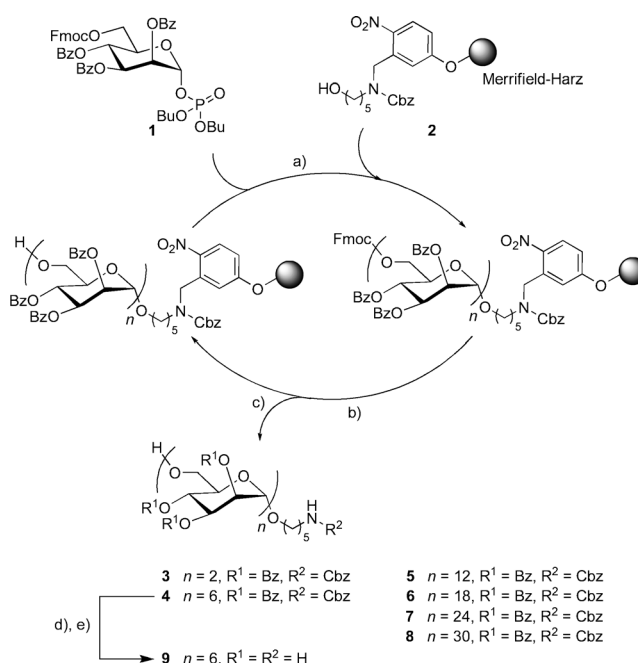
Olivia Calin, Steffen Eller und Peter H. Seeberger*

Kohlenhydrate sind strukturell hochkomplexe und diverse Biopolymere^[1] mit einer Vielzahl an biologischen Funktionen.^[2] Da die Isolation von Kohlenhydraten aus natürlichen Quellen schwer, teilweise sogar unmöglich ist, stellt die chemische Synthese eine gute Alternative für den Zugang zu reinen Oligosacchariden dar. Während Peptide^[3] und Oligonucleotide^[4] mittlerweile routinemäßig durch die automatisierte Festphasensynthese gewonnen werden können, entwickelt sich diese Methode für die Synthese von Oligosacchariden nur langsam. Dies liegt auch daran, dass die Notwendigkeit der Regio- und Stereoselektivität bei der Ausbildung einer glycosidischen Bindung eine deutlich größere präparative Herausforderung darstellt. Dennoch hat die automatisierte Oligosaccharidsynthese die Herstellung komplexer Kohlenhydrate beschleunigt.^[5] Während Polysaccharide in der Natur sehr häufig vorkommen, werden synthetische Oligosaccharide mit mehr als 20 Bausteinen kaum hergestellt. Die automatisierte Oligonucleotidsynthese, die routinemäßig ganze Gene mit bis zu 200 Bausteinen herstellen kann, dient als Inspiration für die Herstellung langkettiger Polysaccharide.^[6]

Wir beschreiben hier die Herstellung eines α -(1,6)-Oligomannosyltriakontamers (30-mer) als eine beispielhafte Machbarkeitsstudie für die Synthese langer Kohlenhydratketten durch die automatisierte Kohlenhydratsynthese. Um die Reinigung der Zielmoleküle zu ermöglichen, wurde eine Catch-Release-Strategie entwickelt, bei der das Volllängensaccharid mit einer Markierung versehen wird, mit der es an magnetische Partikel gebunden werden kann. Nach der Abtrennung von den Deletionssequenzen durch Waschen der Partikel und magnetunterstütztes Dekantieren kann das Zielmolekül wieder von diesen abgespalten werden.

Als permanente Schutzgruppen für den Phosphatbaustein **1** wurden Benzylester gewählt, da diese zum einen durch die

Nachbargruppenbeteiligung die Bildung der transglycosidischen Bindung sicherstellen und zum anderen sich einfach durch basische Bedingungen entfernen lassen. Für die Kettenverlängerung wurde die C6-Hydroxygruppe mit Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) geschützt, da sich diese Schutzgruppe selektiv und schnell mit Piperidin entfernen lässt. Dibutylphosphat als Abgangsgruppe ermöglicht eine schnelle und effektive Glycosylierungen von **1** nach Aktivierung mit Lewis-Säure.^[7] Das mit einem photolabilen *o*-Nitrobenzyl-Linker^[8] funktionalisierte Merrifield-Harz **2** diente als Festphase für die automatisierte Synthese (Schema 1).



Scheme 1. Automatisierte Synthese von α -(1,6)-Polysacchariden. Reaktionen und Bedingungen: a) Glycosylierung: **1**, TMSOTf, CH_2Cl_2 , -15°C (45 min) \rightarrow 0°C (15 min); b) Fmoc-Abspaltung: Piperidin, DMF, 25°C (5 min); c) Abspaltung von der Festphase: $h\nu$, CH_2Cl_2 ; d) NaOMe, MeOH; e) Pd/C, H_2 , H_2O . Bu = Butyl, Bz = Benzoyl, Cbz = Benzyloxycarbonyl, DMF = Dimethylformamid, Fmoc = Fluorenylmethoxycarbonyl, TMSOTf = Trifluormethansulfonsäuretrimethylsilyl-ester.

Mit dem Mannosephosphat **1** und dem funktionalisierten Merrifield-Harz **2** wurden im automatisierten Kohlenhydratsynthesizer^[5b] verschiedene α -(1,6)-Oligomannoside hergestellt (Schema 1). Für die Dreifachglycosylierungen, die mit drei Äquivalenten des Bausteins **1** bei -15°C durchgeführt wurden, diente TMSOTf als Aktivator. Die nachfolgende Entfernung der temporären Fmoc-Schutzgruppe an C6

[*] O. Calin, Dr. S. Eller, 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, dem European Research Council (ERC Advanced Grant AUTOHEPARIN für PHS) und dem Marie Curie ITN FP7 Projekt CARMUSYS (PITN-GA-2008-213592) für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201210176> zu finden.

mit Piperidin setzte das Nucleophil für den nächsten Kettenverlängerungsschritt frei. Das hierbei entstandene Piperidindibenzofulven-Addukt diente zur Quantifizierung der vorangegangenen Kupplungsausbeute durch Messung der UV-Absorption.^[9] Unter Verwendung dieser Methode konnten α -(1,6)-Oligomannoside mit Kettenlängen zwischen einem Disaccharid (**3**) bis zum 30-mer (**8**) hergestellt werden.

Disaccharid **3** und Hexasaccharid **4** konnten einfach durch Reinigung mittels Chromatographie auf Kieselgel von den Deletionssequenzen abgetrennt werden. Im folgenden Schritt wurden die Benzoate basisch und die Cbz-Schutzgruppe durch Hydrierung auf Pd/C entfernt und das vollständig entschützte Hexasaccharid **9** in 25 % Ausbeute nach 15 Stufen isoliert.

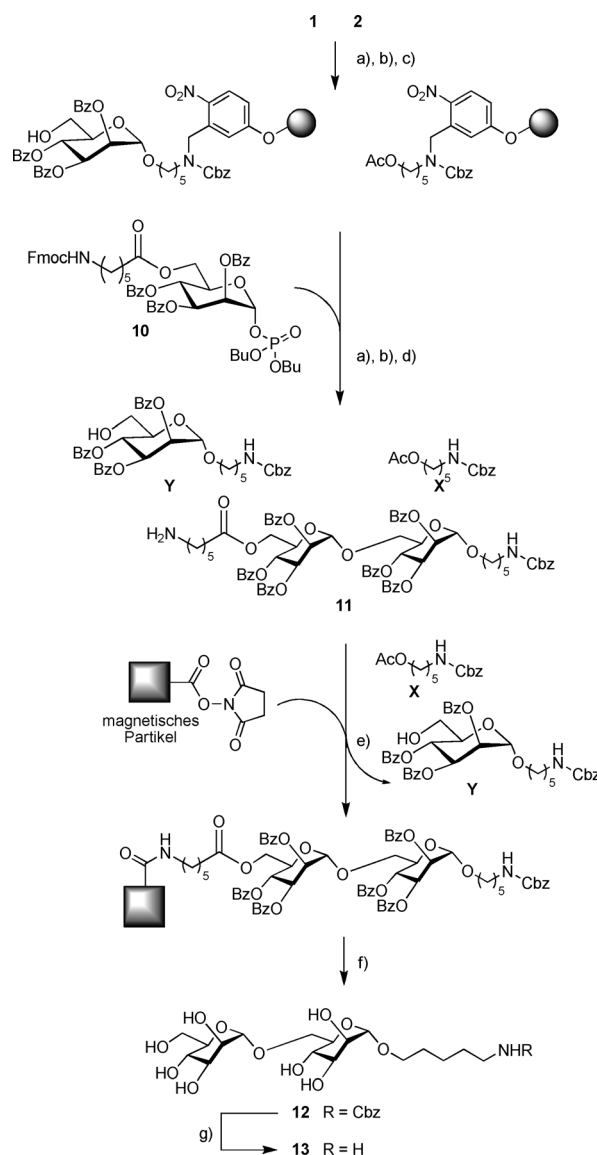
Aufgrund der veränderten Löslichkeiten gestaltete sich die Reinigung der Oligomannoside mit größeren Kettenlängen als zwölf Resten (**5**, **6**, **7** und **8**) schwierig. Die Tatsache, dass sich die Reaktionsrohprodukte nur in chlorierten Lösungsmitteln lösen, machte die Reinigung und die Abtrennung der Deletionssequenzen sowohl durch Normal- und Umkehrphasenchromatographie als auch mittels Größenausschlusschromatographie unmöglich.

Deshalb wurde eine Catch-Release-Strategie eingesetzt, um die Reinigung zu ermöglichen. Peptide, Oligonucleotide und Oligosaccharide können durch Affinitätschromatographie gereinigt werden, wenn diese mithilfe einer Markierung, wie Biotin^[10] oder Oligohistidin,^[11] an die stationäre Phase gebunden werden können. Diese Methoden setzen den Einsatz wässriger Lösungsmittelgemische voraus und können deshalb nicht für die Reinigung der geschützten Oligomannoside herangezogen werden. Überdies können Fluor-Tags die Isolation von Oligosacchariden bis zu 100-meren^[12] durch Flüssig-Flüssig- oder Festphasenextraktionen ermöglichen.^[13] Doch auch diese Methode musste für die Reinigung der längeren geschützten α -(1,6)-Oligomannoside aufgrund von Löslichkeitsproblemen ausgeschlossen werden. Deshalb wurde der Fokus auf Catch-Release-Techniken gelegt,^[14] bei denen ausschließlich das Zielmolekül kovalent an eine feste Phase gebunden wird. Deletionssequenzen und Nebenprodukte können anschließend durch einfaches Waschen abgetrennt werden. Um nur das Zielmolekül an die feste Phase zu binden, müssen die nicht umgesetzten Hydroxygruppen nach jeder Glycosylierung für die Folgekupplungsschritte blockiert werden (Capping-Schritt). So besitzt am Ende der Synthese dann ausschließlich die Volllänge-sequenz eine freie Hydroxygruppe, die selektiv mit einer Markierung versehen werden kann, um so das Zielmolekül von den Deletionssequenzen und Nebenprodukten abtrennen zu können.

Um die Catch-Release-Strategie erfolgreich für die automatisierte Synthese anwenden zu können, ist ein möglichst kurzer und effektiver Capping-Schritt nötig. Die resultierende Capping-Gruppe muss dabei während der restlichen Synthese stabil sein, und die final eingeführte Markierung muss für die Produktisolierung eine einzigartige Funktionalität aufweisen. Diese Fakten berücksichtigend wurde die Acetatgruppe für das Capping und ein 6-Aminohexansäureester als Markierung verwendet. Die einzige freie Aminogruppe an der Volllänge-sequenz sollte dann die selektive Anbindung der Zielverbindung an die magnetischen Partikel, die auf der

Oberfläche mit Carboxylsäureresten funktionalisiert waren, ermöglichen.

Die Catch-Release-Strategie wurde zunächst für die Isolierung des Dimannosids **13** evaluiert (Schema 2). Das Protokoll für die automatisierte Synthese wurde um die Capping-Schritte mit Essigsäureanhydrid in Pyridin erweitert und die Markierung wurde mittels Baustein **10**, der an C6 einen Aminohexansäureester trug, eingeführt. Das Disaccharid wurde von der Festphase durch Bestrahlung mit UV-Licht in einem Durchflussreaktor abgespalten und das Rohprodukt mit magnetischen Partikeln, deren Oberfläche mit *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert war, inkubiert.^[15]

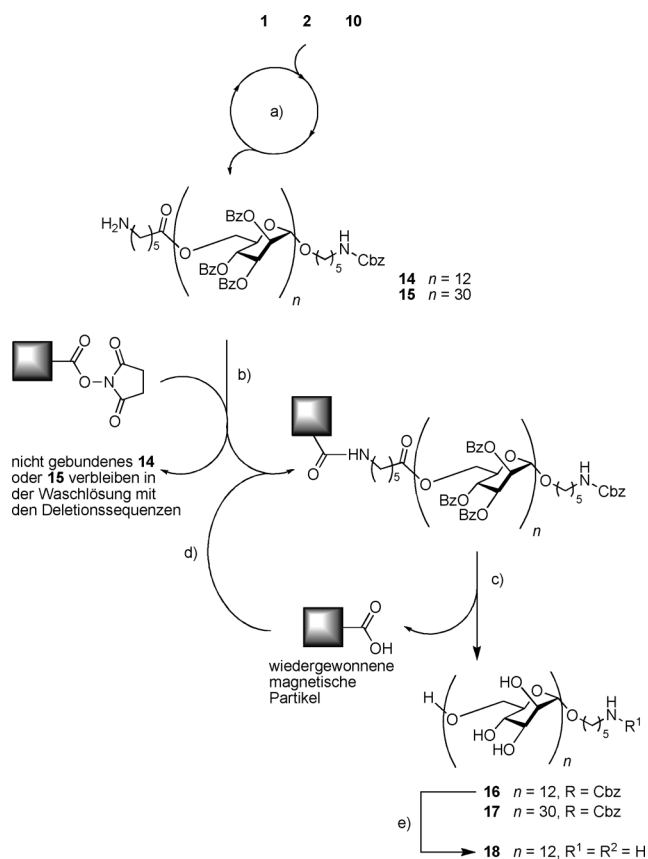


Schema 2. Anwendung der Catch-Release-Reinigung auf die automatisierte Festphasensynthese des Dimannosids **13**. Reaktionen und Bedingungen: a) Glycosylierung: **1** oder **10**, TMSOTf, CH₂Cl₂, –15 °C (45 min) → 0 °C (15 min); b) Capping: Ac₂O, Pyridin 25 °C (60 min); c) Fmoc-Abspaltung: Piperidin, DMF, 25 °C (5 min); d) Abspaltung von der Festphase: *hν*, CH₂Cl₂; e) Immobilisierung auf magnetischen Partikeln: 1. NEt₃, CH₂Cl₂, 25 °C; 2. Wegwaschen der Deletionssequenzen **X** und **Y** mit CH₂Cl₂; f) Abspaltung von den magnetischen Partikeln: NaOMe, MeOH; g) Pd/C, H₂, H₂O. Ac = Acetyl.

Mit der einzigen freien Aminogruppe des Disaccharids konnte dieses kovalent an die magnetischen Partikel gebunden werden. Anschließend wurden alle Nebenprodukte durch Waschen der magnetischen Partikel mit Dichlormethan und Methanol entfernt. Nach Behandlung der Partikel mit Natriummethanolat in Methanol wurde das abgespaltene Disaccharid **12** durch Gelfiltration gereinigt und in 22 % Ausbeute nach neun Stufen erhalten. Die Benzylcarbamatgruppe wurde durch Hydrierung entfernt und das Disaccharid **13** in 74 % Ausbeute isoliert.

Um die Kupplungsrate des Zielmoleküls an die Partikel und somit die Gesamtausbeute zu erhöhen, wurde ein zweiter Immobilisierungsschritt durchgeführt. Verbleibendes Oligosaccharid wurde so an die zurückgewonnenen Partikel des ersten Reinigungszyklus in Gegenwart von PyBOP und DIPEA gekuppelt (Schema 3).

Die automatisierte Synthese des Dodecamannosids lieferte so nach Gelfiltration das debenzoylierte 12-mer **16** in 13 % Gesamtausbeute ohne die Notwendigkeit eines weiteren HPLC-Reinigungsschrittes. Die Entfernung der Cbz-Gruppe durch Hydrierung auf Pd/C in Wasser lieferte das Dodecamannosid **18** in 62 % Ausbeute.



Schema 3. Anwendung der Catch-Release-Reinigung auf die automatisierte Festphasensynthese der Oligomannoside **16** und **17**. Reaktionen und Bedingungen: a) Automatisierte Synthese; b) Immobilisierung auf magnetischen Partikeln: 1. NEt_3 , CH_2Cl_2 , 25°C ; 2. Wegwaschen der Deletionssequenzen mit CH_2Cl_2 ; c) Abspaltung von den magnetischen Partikeln: NaOMe , MeOH , H_2O ; d) Wiederverwendung der magnetischen Partikel: **14**, **15**, PyBOP, DIPEA, CH_2Cl_2 , 25°C ; e) Pd/C, H_2 , H_2O . DIPEA = *N,N*-Diisopropylethylamin, PyBOP = Benzotriazol-1-yl-*N*-oxytris(pyrrolidino)-phosphoniumhexafluorophosphat.

Der nächste Schritt war die Synthese des Mannosyltriamers, dem bis jetzt größten Polysaccharid, das durch automatisierte oder manuelle Synthese hergestellt wurde. Das geschützte 30-mer **15** konnte in weniger als einer Woche nach der oben beschriebenen Methode erhalten werden. Die Existenz des Moleküls wurde durch Analyse des Rohprodukts nach der Abspaltung von der Festphase durch MALDI-Massenspektrometrie nachgewiesen. Das teilentschützte 30-mer **17** wurde durch die Catch-Release-Methode von Deletionssequenzen und Nebenprodukten getrennt und nach Gelfiltration in 1 % Gesamtausbeute isoliert (96 % durchschnittlich pro Stufe). Die Identität des Zielmoleküls^[16] wurde durch NMR-Spektroskopie (Abbildung 1) und MALDI-Massenspektrometrie nachgewiesen.

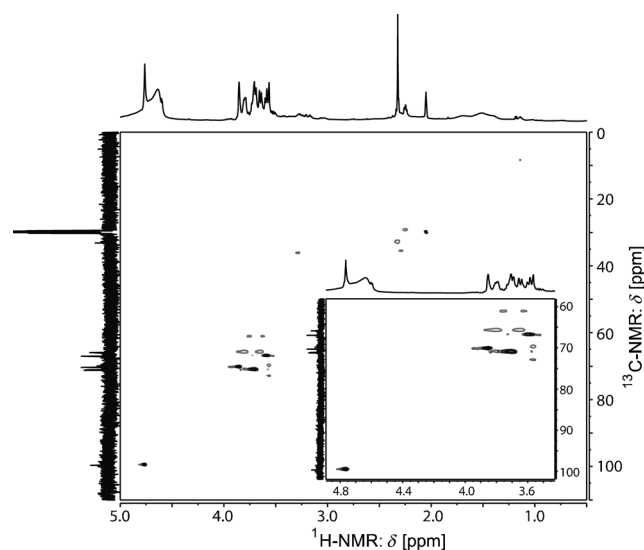


Abbildung 1. Charakterisierung des Polymannosids **17**. HSQC-NMR-Spektrum (D_2O , 600 MHz) des α -(1,6)-30-mer **17**.

Die erste automatisierte Synthese eines Polysaccharids einschließlich der Produktreinigung gelang durch die Anwendung einer Catch-Release-Technik. Diese Strategie gewährt zum ersten Mal den schnellen Zugang zu langen Polysacchariden. Biologische Anwendungen dieser Polysaccharide mit definierter Länge oder die mögliche Verwendung für die Herstellung neuer Materialien werden derzeit untersucht.

Eingegangen am 20. Dezember 2012
Online veröffentlicht am 22. April 2013

Stichwörter: Automation · Catch-Release-Technik · Festphasensynthese · Magnetische Partikel · Polysaccharide

- [1] a) T. J. Boltje, T. Buskas, G.-J. Boons, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 611–622; b) P. H. Seeberger, D. B. Werz, *Nature* **2007**, *446*, 1046–1051.
- [2] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130.
- [3] E. Atherton, R. C. Sheppard, *Solid-Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, **1989**.
- [4] M. H. Caruthers, *Science* **1985**, *230*, 281–285.

- [5] Automatisierte Festphasensynthese von Oligosacchariden: 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) M. T. C. Walvoort, H. van den Elst, O. J. Plante, L. Kröck, P. H. Seeberger, H. S. Overkleeft, G. A. van der Marrel, J. D. C. Codée, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 4469–4472; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 4393–4396; d) P. H. Seeberger, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 19–28.
- [6] R. B. Ciccarelli, P. Gunyuzlu, J. Huang, C. Scott, F. T. Oakes, *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 6007–6013.
- [7] O. J. Plante, E. R. Palmacci, R. B. Andrade, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 9545–9554.
- [8] Photolabile Linker und Abspaltung: a) C. G. Brochet, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2002**, 125–142; b) F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2091–2157; c) 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.
- [9] Quantifizierung des Piperidindibenzofulven-Addukts durch Messung der Absorption bei 301 nm in DMF/Piperidin (4:1, v/v); a) J. Niggemann, K. Michaelis, R. Frank, N. Zander, G. Höfle, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2002**, 2490–2503; b) M. Gude, J. Ryf, P. D. White, *Lett. Pept. Sci.* **2002**, 9, 203–206.
- [10] R. T. Pon, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 1715–1718.
- [11] E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Döbeli, R. Gentz, D. Stüber, *Nat. Biotechnol.* **1988**, 6, 1321–1325.
- [12] W. H. Pearson, D. A. Berry, P. Stoy, K.-Y. Jung, A. D. Sercel, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 7114–7122.
- [13] a) E. R. Palmacci, M. C. Hewitt, P. H. Seeberger, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 4565–4569; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 4433–4436; b) F. R. Carrel, P. H. Seeberger, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 2058–2065.
- [14] a) K. Egusa, S. Kusumoto, K. Fukase, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 3435–3445; b) H. Ando, S. Manabe, Y. Nakahara, Y. Ito, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 4861–4864; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 4725–4728; c) S. Hanashima, S. Manabe, Y. Ito, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 4290–4296; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 4218–4224; d) J. Wu, Z. Guo, *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 7067–7070.
- [15] Die magnetischen Partikel wurden von der PerkinElmer chemagen Technologie GmbH (Baesweiler, Deutschland) zur Verfügung gestellt.
- [16] Aufgrund der kleinen Menge an 30-mer **17** wurde die Entschützung der Cbz-Gruppe nicht durchgeführt.