

Bausteine von Oligosacchariden, XII¹⁾

Synthese der Trisaccharidkette der Determinante der Blutgruppensubstanz A, Typ 1

Hans Paulsen,* Čeněk Kolář und Wolfgang Stenzel

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Hamburg,
Martin-Luther-King-Platz 6, D-2000 Hamburg 13

Eingegangen am 6. Oktober 1977

Die Trisaccharidkette der Determinante der Blutgruppensubstanz A, Typ 1, α -D-GalNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-D-GlcNAc (**14**) wurde synthetisiert. Das selektiv blockierte Disaccharid **9** mit unsubstituierter 3'-OH-Gruppe, das über den Orthoester **11** zugänglich ist, wurde mit 6-O-Acetyl-2-azido-3,4-di-O-benzyl-2-desoxy- β -D-galactopyranosylchlorid (**12**) zum α -glycosidisch verknüpften Trisaccharid **13** gekuppelt. Die Entblockierung von **13** liefert **14**.

Building Units for Oligosaccharides, XII¹⁾

Synthesis of the Disaccharide Chain of Blood Group Substance A Type 1 Determinant

α -D-GalNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-D-GlcNAc (**14**), the trisaccharide chain of the blood group substance A type 1 determinant, was synthesised. The selectively blocked disaccharide **9** with free 3'-OH group which is available from the orthoester **11** was coupled with 6-O-acetyl-2-azido-3,4-di-O-benzyl-2-deoxy- β -D-galactopyranosyl chloride (**12**) to give the trisaccharide **13** with an α -glycosidic linkage. Deblocking of **13** gives **14**.

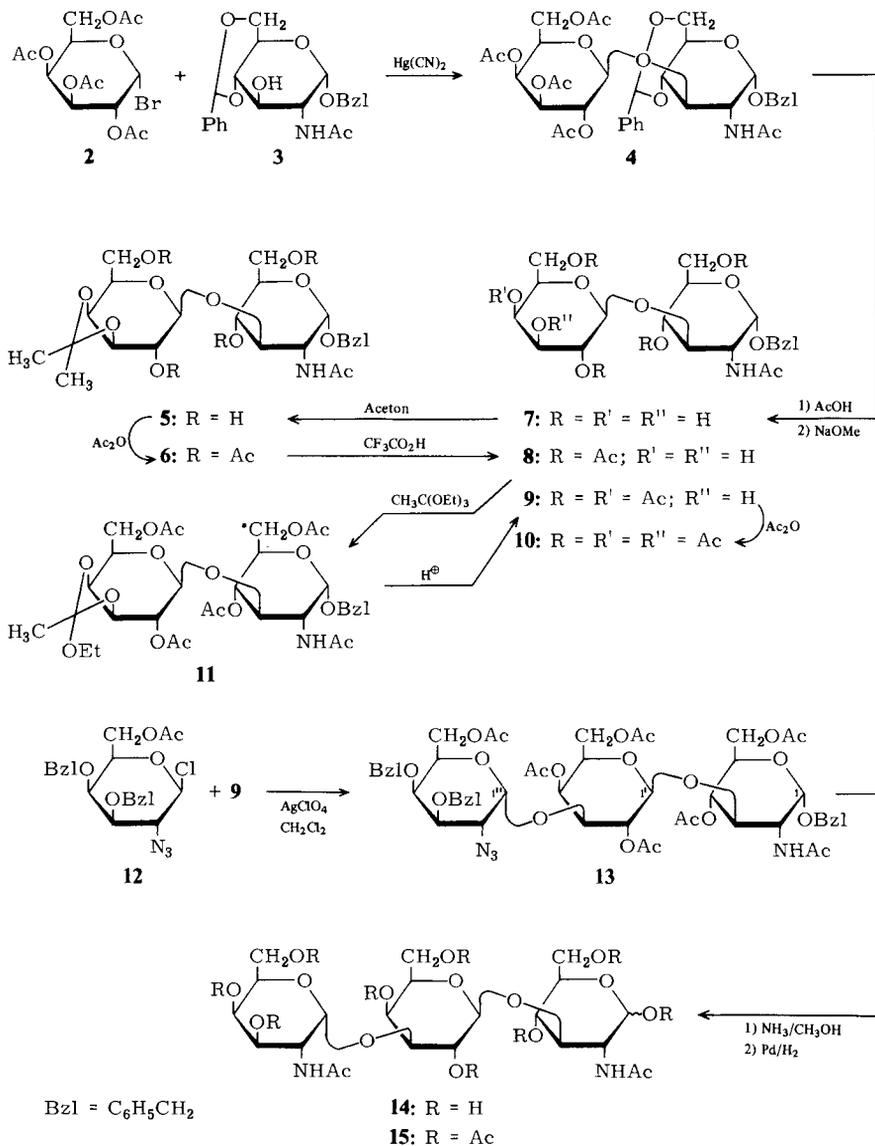
Die in den letzten Jahren erzielten bemerkenswerten Fortschritte auf dem Gebiet der Glycosid-Synthese haben die Möglichkeit der Synthese von komplexen Oligosacchariden mit verschiedenen Bausteinen und unterschiedlichen Verknüpfungsarten in greifbare Nähe gerückt. Es handelt sich um ein anspruchsvolles aktuelles Problem der Kohlenhydratchemie. Von besonderem Interesse sind komplexe Oligosaccharid-Ketten, die als Determinanten in Blutgruppensubstanzen vorkommen²⁾. Diese Oligosaccharid-Ketten, die in der Regel an einen polymeren Träger, ein Protein, gebunden sind, determinieren die spezifischen serologischen Antigeneigenschaften.

Durch die chemische Synthese von Oligosaccharid-Ketten und deren Anknüpfung an ein Protein dürfte es möglich sein, zu synthetischen Antigenen zu gelangen, deren serologische Eigenschaften mit denen der natürlichen Glycoproteine mit gleicher Oligosaccharid-Sequenz vergleichbar sind. Lemieux und Mitarbb.³⁾ haben in ihren umfangreichen, erfolgversprechenden Arbeiten hier den Weg gewiesen.

¹⁾ XI. Mittel.: H. Paulsen, Č. Kolář und W. Stenzel, Chem. Ber. 111, 2358 (1978), vorstehend.

²⁾ K. O. Lloyd, Glycoproteins with Blood Groups Activity in Int. Rev. Science, Org. Chem. Series Two, Vol. 7, Ed. G. O. Aspinnall, Butterworth, London 1976.

³⁾ R. U. Lemieux, Vortrag auf dem Symposium "Perspectives in Carbohydrate Chemistry", Kingston, Ontario 1977.



schen Mengen Silberperchlorat ergibt das Trisaccharid **13**, das nach chromatographischer Reinigung in 45proz. Ausbeute kristallin isoliert werden kann. Der Anteil an β -Glycosid bei diesem Kondensationsschritt ist so gering, daß er nicht nachgewiesen werden kann. Die α -glycosidische Verknüpfung der Azidozucker-Einheit in **13** ist aus dem 270-MHz-NMR-Spektrum zu entnehmen. Für $1''\text{-H}$ wird eine kleine Kopplung von $J_{1'',2''} = 3.2$ Hz gefunden, wie es bei einer α -glycosidischen Bindung zu erwarten ist. Für die α -Verknüpfung spricht auch der positive Wert der optischen Drehung von $[\alpha]_D^{25} = +76.8^\circ$. Das

3'-H der Galactose-Einheit liegt mit $\delta = 3.84$ bei hohem Feld und zeigt die Kopplungen $J_{2',3'} = 10.2$ und $J_{3',4'} = 3.4$ Hz. Dies lehrt, daß die neue glycosidische Bindung an der 3'-OH-Gruppe der Galactose-Einheit hergestellt wurde.

Zur Entblockierung des Trisaccharides **13** erweist es sich als vorteilhaft, zunächst die *O*-Acetyl-Gruppen mit methanolischem Ammoniak abzuspalten. Anschließend werden die Benzyl-Gruppen durch Hydrierung in Eisessig/Acetanhydrid abgespalten. Hierbei wird ebenfalls die Azido-Gruppe hydriert und die dabei gebildete Amino-Gruppe unmittelbar acetyliert. Auf diesem Wege erhält man das gewünschte freie Trisaccharid **14** als amorphe, einheitliche Substanz, deren optische Drehung von $[\alpha]_D^{20} = +135.1^\circ$ mit dem aus der Blutgruppensubstanz A, Typ 1 isolierten Produkt übereinstimmt. Gefundene Werte des Naturproduktes: $[\alpha]_D^{20} = +110^\circ$ ⁵⁾, $[\alpha]_D^{20} = +136^\circ$ ⁶⁾.

Die Acetylierung von **14** liefert das Undecaacetat **15** als Anomerengemisch, in dem das α -Anomere stark überwiegt. Dieses geht aus der kleinen Kopplung $J_{1,2} = 3.4$ Hz für 1-H ($\delta = 6.07$) des Hauptproduktes hervor.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie sind wir für die Unterstützung bei den Untersuchungen zu Dank verpflichtet.

Experimenteller Teil

Die Allgemeinen Methoden sind die gleichen wie in der vorhergehenden Mitteilung¹⁾.

Benzyl-2-acetamido-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-4,6-benzyliden-2-desoxy- α -D-glucopyranosid (4): 10.2 g (25.5 mmol) **3** werden in 1420 ml Benzol/Nitromethan (1:1; das Benzol wird über Natriumdraht, das Nitromethan durch Kochen über Phosphorpentoxid getrocknet) gelöst. Unter sorgfältigem Ausschluß von Feuchtigkeit werden 300 ml Lösungsmittel bei Raumtemp. abdestilliert. 5.64 g Quecksilber(II)-cyanid werden in die heiße Reaktionsmischung unter Rühren gegeben, und bei 60°C werden dann 10.66 g (25.93 mmol) **2**, gelöst in 100 ml Benzol, innerhalb von 8 h zugetropft. Nach Abkühlen auf Raumtemp. wird weitere 10 h gerührt. Dünnschichtchromatographisch (Ether/Aceton 6:1) zeigt sich ein Rest nicht umgesetzter Benzylidenverbindung **4**. Es werden noch 1.44 g Quecksilber(II)-cyanid und anschließend bei 60°C 2.3 g (5.59 mmol) **2** (gelöst in 25 ml Benzol) innerhalb von 4 h zugesetzt. Nach weiteren 12 h ist die Reaktion beendet. Das Reaktionsgemisch wird mit 200 ml wäßriger gesättigter NaHCO₃- und zweimal mit je 200 ml wäßriger gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wäßrigen Phasen werden noch zweimal mit je 100 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen werden i. Vak. zu einem farblosen Sirup eingedampft. Das Rohprodukt wird in wenig Aceton gelöst. Bei Zugabe von Ether/Petrol-ether fallen 18.3 g Kristalle aus. Nach Umkristallisieren aus CHCl₃/Ether/Petrol-ether Ausb. 15.2 g (81%), Schmp. 176–177°C, $[\alpha]_D^{25} = 38.4^\circ$ ($c = 1$ in CHCl₃) (Lit.⁷⁾ Ausb. 53%, Schmp. 175–177°C, $[\alpha]_D^{20} = +40^\circ$, $c = 1.43$ in CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃): 1-H $\delta = 4.97$ d, 2-H 4.29 m, 1'-H 4.67 d, 2'-H 5.17 dd, 3'-H 4.92 dd, 4'-H 5.75 d, Ph 7.28–7.50 m, NH 5.63 d, PhCH 5.56, PhCH₂ 4.43 d, 4.69 d, Acetyl 2.08 s, 1.96 s, 1.93 s, 1.92 s. $J_{1,2} = 3.8$, $J_{2,3} = 10.3$, $J_{2,NH} = 8.8$, $J_{1',2'} = 7.8$, $J_{2',3'} = 10.4$, $J_{3',4'} = 3.4$, $J_{4',5'} = 0.8$, $J_{PhCH_2} = 11.5$ Hz.

Benzyl-2-acetamido-2-desoxy-3-O-(β -D-galactopyranosyl)- α -D-glucopyranosid (7): 5.0 g (6.8 mmol) **4** werden in 50 ml 60proz. Essigsäure 1 h bis 85°C erwärmt. Anschließend wird i. Vak. eingedampft. Der Sirup wird in 70 ml CHCl₃ aufgenommen, die Lösung mit Wasser, gesättigter wäßriger NaHCO₃-Lösung und mit Wasser gewaschen. Trocknen und Eindampfen i. Vak. liefert 4.23 g Sirup, der dünn-schichtchromatographisch (1,2-Dichlorethan/Ethanol 9:1) einheitlich ist. Das Rohprodukt wird in 50 ml absol. Methanol gelöst, 2 ml 0.2 N NaOCH₃ werden zugegeben,

über Nacht wird bei Raumtemp. stehengelassen, dann mit Dowex 50 WX-8 H⁺ neutralisiert, filtriert und i. Vak. eingedampft. Die zurückbleibende kristalline Masse wird aus Methanol umkristallisiert. Ausb. 3.0 g (92%), Schmp. 243 °C, $[\alpha]_D^{23} = +93.2^\circ$ ($c = 1$ in Wasser) [Lit.⁷⁾ Schmp. 243–245 °C, $[\alpha]_D^{22} = +101^\circ$ ($c = 1.03$ in 50proz. Ethanol)].

Benzyl-2-acetamido-2-desoxy-3-O-(3,4-O-isopropyliden-β-D-galactopyranosyl)-α-D-glucopyranosid (5): 1.2 g (2.53 mmol) **7** werden mit 0.7 g wasserfreiem Kupfersulfat in 50 ml absol. Aceton (durch Kochen über Phosphorpentoxid getrocknet) suspendiert. Nach Zugabe von 0.4 ml konz. Schwefelsäure wird die Suspension unter Feuchtigkeitsausschluß 48 h gerührt. Nach Abfiltrieren wird der ungelöste Rest erneut mit 50 ml absol. Aceton, 0.7 g wasserfreiem Kupfersulfat und 0.2 ml konz. Schwefelsäure 24 h gerührt. Es wird abfiltriert und mit viel Aceton gewaschen. Alle Aceton-Filtrate werden vereinigt, mit methanolischem NaOH neutralisiert, filtriert und i. Vak. eingengt. Es werden 1.17 g amorphes Rohprodukt erhalten. Die Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie. Elutionsmittel Aceton/Ether (5:1). Ausb. 0.73 g (56%), Schmp. 178 °C, $[\alpha]_D^{20} = +107.1^\circ$ ($c = 1$ in Dioxan).

C₂₄H₃₅NO₁₁ (513.5) Ber. C 56.09 H 6.87 N 2.72 Gef. C 56.16 H 6.82 N 2.68

Benzyl-2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-(2,6-di-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-α-D-glucopyranosid (6): 0.70 g (1.36 mmol) **5** werden in 15 ml Pyridin mit 4 ml Acetanhydrid acetyliert. Nach 10 h bei Raumtemp. ist die Reaktion beendet (DC, Laufmittel CHCl₃/Methanol 1:1). Man engt i. Vak. ein und zieht zweimal mit absol. Toluol ab. Der Rückstand kristallisiert aus Essigester/Pentan. Ausb. 0.825 g (96%), Schmp. 178 °C, $[\alpha]_D^{20} = +76.8^\circ$ ($c = 1$ in CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃): 1-H δ = 4.92 d, 2-H 4.05 m, 1'-H 4.49 d, 2'-H 4.74 dd, 3'-H 4.21 dd, Ph 7.29–7.47 m, NH 5.63 d, PhCH₂ 4.47 d, 4.69 d, Acetyl 2.09 s, 2.06 s, 2.05 s, 1.97 s, Isopropyliden 1.50 s, 1.31 s. $J_{1,2} = 3.4$, $J_{2,3} = 9.8$, $J_{2,NH} = 8.8$, $J_{1',2'} = 7.2$, $J_{2',3'} = 7.2$, $J_{3',4'} = 5.4$, $J_{PhCH_2} = 11.1$ Hz.

C₃₂H₄₃NO₁₅ (681.7) Ber. C 56.38 H 6.36 N 2.05 Gef. C 56.28 H 6.44 N 1.99

Benzyl-2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-(2,6-di-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-α-D-glucopyranosid (8): 0.78 g (1.144 mmol) **6** werden in 4 ml 90proz. wäßriger Trifluoressigsäure gelöst. Nach 10 min Rühren bei Raumtemp. wird i. Vak. eingedampft und anschließend zweimal mit absol. Toluol abgezogen. Das Rohprodukt wird in Ether/Petrolether kristallisiert. Ausb. 0.68 g (93%), Schmp. 191 °C, $[\alpha]_D^{22} = +59.5^\circ$ ($c = 1$ in CHCl₃).

C₂₉H₃₉NO₁₅ (641.6) Ber. C 54.28 H 6.12 N 2.18 Gef. C 54.33 H 5.83 N 2.05

Benzyl-2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-(2,4,6-tri-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-α-D-glucopyranosid (9): 680 mg (1.06 mmol) **8** werden mit 4 ml Orthoessigsäure-triethylester in Benzol/Chloroform (1:1), das Benzol wird über Natriumdraht, das Chloroform über P₂O₅ getrocknet) gelöst. Nach Zugabe von katalytischen Mengen *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat wird bei Raumtemp. noch 2 h gerührt. Es wird mit Triethylamin neutralisiert und in Eiswasser gegossen. Aus der wäßrigen Emulsion wird das Produkt dreimal mit Ether extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. bis zur amorphen Masse (760 mg **11**) eingengt. Das Rohprodukt wird in 10 ml 80proz. Essigsäure gelöst. Nach 10 min Rühren bei Raumtemp. ist die Reaktion beendet. Nach Abdampfen der Lösungsmittel und zweimaligem Abziehen mit Toluol wird der Sirup säulenchromatographisch (CHCl₃/Aceton/Methanol 10:1:1) gereinigt. Ausb. 650 mg (89%), Schmp. 97 °C, $[\alpha]_D^{23} = +43.4^\circ$ ($c = 1$ in CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃): 1-H δ = 4.77 d, 2-H 4.27 m, 4-H 4.85 dd, 1'-H 4.40 d, 2'-H 4.69 dd, 3'-H 3.69 dd, 4'-H 5.21 d, Ph 7.22–7.39 m, NH 5.73 d, PhCH₂ 4.60 d, 4.38 d, Acetyl 2.08 s, 2.07 s, 2.04 s, 2.00 s, 1.98 s. $J_{1,2} = 3.6$, $J_{2,3} = 10.3$, $J_{2,NH} = 9.8$, $J_{3,4} = 10.0$, $J_{4,5} = 9.3$, $J_{1',2'} = 7.8$, $J_{2',3'} = 10.1$, $J_{3',4'} = 3.6$, $J_{4',5'} \approx 0.5$, $J_{PhCH_2} = 11.5$ Hz.

C₃₁H₄₁NO₁₆ (683.7) Ber. C 54.46 H 6.04 N 2.04 Gef. C 54.92 H 6.06 N 1.95

Benzyl-2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-α-D-glucopyranosid (10): Durch Acetylierung von **7** bzw. **9** mit Pyridin und Acetanhydrid wird das Heptaacetat **10** erhalten. Schmp. 175°C, $[\alpha]_D^{25} = +44.5^\circ$ ($c = 1.0$ in CHCl_3) [Lit.⁷⁾ Schmp. 173–175°C, $[\alpha]_D^{25} = +45^\circ$ ($c = 1.22$ in CHCl_3)].

¹H-NMR (270 MHz, C_6D_6): 1-H $\delta = 4.86$ d, 2-H 4.69 m, 4-H 5.18 dd, 1'-H 4.80 d, 2'-H 5.48 dd, 3'-H 5.31 dd, 4'-H 5.55 dd, Ph 7.1–7.3 m, NH 6.3 d, PhCH_2 4.54 d, 4.22 d, Ac 2.17 s, 2.00 s, 1.97 s, 1.76 s, 1.75 s, 1.74 s, 1.61 s. $J_{1,2} = 3.4$, $J_{2,3} = 9.8$, $J_{2,\text{NH}} = 9.7$, $J_{3,4} = 9.6$, $J_{4,5} = 4.6$, $J_{1',2'} = 7.8$, $J_{2',3'} = 10.3$, $J_{3',4'} = 3.2$, $J_{4',5'} = 0.5$ Hz.

Benzyl-2-acetamido-4,6-di-O-acetyl-2-desoxy-3-O-[2,4,6-tri-O-acetyl-3-O-(6-O-acetyl-2-azido-3,4-di-O-benzyl-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-β-D-galactopyranosyl]-α-D-glucopyranosid (13): 500 mg (0.731 mmol) **9**, 1.2 g Silbercarbonat und 1.5 g Drierite werden zu 12 ml CH_2Cl_2 (über P_2O_5 getrocknet) gegeben. Die Suspension wird vor Lichteinwirkung mit Alu-Folie geschützt und unter Feuchtigkeitsausschluß 1 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Zugabe von 100 mg AgClO_4 rührt man weitere 15 min. Anschließend werden 400 mg (0.89 mmol) 2-Azidogalactopyranosylchlorid **12**¹⁾, gelöst in 6 ml CH_2Cl_2 , zugegeben. Nach 1 h Rühren werden weitere 100 mg **12**, gelöst in 2 ml CH_2Cl_2 , zugesetzt, und die Suspension wird noch 1 h gerührt. Dünnschichtchromatographisch (CHCl_3 /Essigester 1:1) zeigt sich, daß **9** vollständig umgesetzt wird. Die Suspension wird mit 20 ml CH_2Cl_2 versetzt, filtriert und mit CH_2Cl_2 gewaschen, die organische Phase mit wäßriger NaHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und i. Vak. eingeengt. Der Sirup (1.13 g) wird säulenchromatographisch (CHCl_3 /Essigester 1:1) gereinigt. Ausb. 360 mg (45%), Schmp. 87°C, $[\alpha]_D^{25} = +76.8^\circ$ ($c = 1$ in CHCl_3).

¹H-NMR (C_6D_6): 1-H $\delta = 4.75$ d, 2-H 4.63 m, 4-H 5.13 dd, 1'-H 4.56 d, 2'-H 5.45 dd, 3'-H 3.84 dd, 4'-H 5.43 d, 1''-H 5.09 d, 2''-H 3.95 dd, 4''-H 3.65 d, Ph 7.06–7.35, NH 5.57 d, Acetyl 2.20 s, 1.95 s, 1.77 s–1.74 s, 1.72 s. $J_{1,2} = 3.8$, $J_{2,3} = 10.4$, $J_{2,\text{NH}} = 9.2$, $J_{3,4} \approx 10.0$, $J_{4,5} \approx 10.0$, $J_{1',2'} = 6.4$, $J_{2',3'} = 10.2$, $J_{3',4'} = 3.4$, $J_{4,5} < 0.5$, $J_{1'',2''} = 3.2$, $J_{3'',4''} = 2.6$, $J_{4'',5''} = 0.5$ Hz.

$\text{C}_{53}\text{H}_{64}\text{N}_4\text{O}_{21}$ (1092.6) Ber. C 58.22 H 5.90 N 5.12 Gef. C 58.12 H 5.80 N 4.92

2-Acetamido-3-O-[3-O-(2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-β-D-galactopyranosyl]-2-desoxy-D-glucopyranose (14): 300 mg (0.274 mmol) **13** werden mit 8 ml einer 20proz. Lösung von Ammoniak in Methanol versetzt. Nach 12 h bei Raumtemp. ist die Reaktion beendet (DC, CHCl_3 /Methanol 6:1). Zur Aufarbeitung wird mit 10 ml Toluol verdünnt und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der amorphe Rückstand wird mit wenig Ethanol/Ether gewaschen, das feste Rohprodukt (220 mg) in 5 ml Eisessig/Acetanhydrid (10:1) gelöst und 48 h bei Gegenwart von 340 mg Palladium-Kohle (10%) hydriert. Man filtriert, wäscht den Katalysator mit Eisessig und engt i. Vak. (2 Torr) ein. Der Rückstand wird mit Aktivkohle in 50proz. wäßrigem Methanol behandelt. Nach Abfiltrieren und Eindampfen i. Vak. wird das amorphe Produkt mit wenig Methanol nachgewaschen und i. Vak. getrocknet. Ausb. 114 mg amorphes Produkt (71%), $[\alpha]_D^{20} = +135.1^\circ$ ($c = 1$ in Wasser) (Drehung des isolierten Naturproduktes: $[\alpha]_D = 110^\circ$ ⁵⁾, $[\alpha]_D = +136^\circ$ ⁶⁾).

$\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_{16}$ (586.3) Ber. C 45.03 H 6.48 N 4.77 Gef. C 45.31 H 6.53 N 4.56

2-Acetamido-3-O-[3-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-2,4,6-tri-O-acetyl-β-D-galactopyranosyl]-1,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-α,β-D-glucopyranose (15): Die Acetylierung von 100 mg **14** in 8 ml Pyridin mit 2 ml Acetanhydrid liefert nach der Aufarbeitung einen farblosen Sirup. Die säulenchromatographische Reinigung (CHCl_3 /Methanol 10:1) ergibt ein amorphes Produkt als Gemisch von α- und β-Anomeren. Ausb. 136 mg (83%).

¹H-NMR (CDCl_3): 1-H $\delta = 6.07$ d, NH 5.85 d, NH'' 5.91 d. $J_{1,2} = 3.4$, $J_{2,\text{NH}} \approx J_{2'',\text{NH}''} = 10.2$ Hz.

$\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_{25}$ (964.5) Ber. C 49.77 H 5.85 N 2.90 Gef. C 49.81 H 5.87 N 2.79