

SYNTHESE VON OLIGOSACCHARID-DETERMINANTEN DES T-ANTIGENS MIT AMID-SPACER ZUR
DARSTELLUNG SYNTHETISCHER ANTIGENE¹⁾

Jean-Claude Jacquinet und Hans Paulsen*

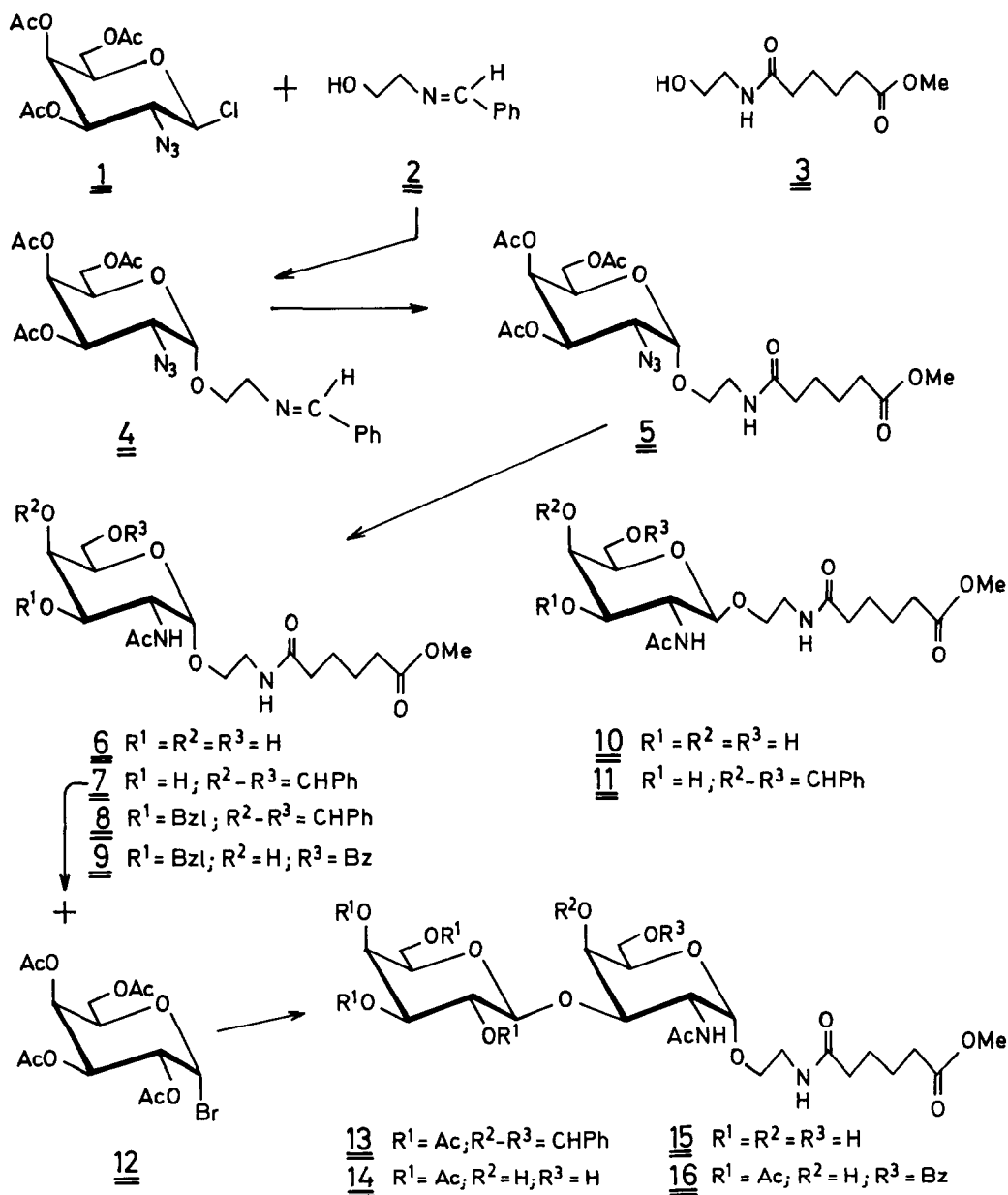
Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Hamburg
Martin-Luther-King-Platz 6, D-2000 Hamburg 13

Summary: The $\beta(1 \rightarrow 3)$ -linked disaccharide 15 was synthesized from D-galactose and a D-galactosamine unit with a watersoluble amide spacer. This represents the hapt \bar{e} n of T-antigen and, when coupled to a protein, is suitable for use as an artificial antigen. Other O - β -D-galactosylated derivatives of galactosamine were synthesized.

Das T-Antigen²⁾ ist ein Krypt-Antigen, das in normalen Individuen nicht freiliegt. Es kann aus den M- und N-Blutgruppen-aktiven Glycoproteinen der menschlichen Erythrozyten durch Neuraminidase oder saure Hydrolyse freigesetzt werden, wobei die N-Acetylneuraminsäure-Reste abgespalten werden³⁾. Die im menschlichen Serum normalerweise nachweisbaren T-Antikörper werden durch eine Stimulierung durch Bakterien der Darmflora mit T-antigenen Strukturen hervorgerufen²⁾. Das T-Antigen wird aufgrund seines Auftretens in Tumorzellen als ein Tumor-assoziiertes Antigen angesehen⁴⁾. Da vom T-Antigen die Receptorstruktur bekannt ist, ist es von erheblichem Interesse, die Determinanten im Hinblick auf die Gewinnung künstlicher Antigene zu synthetisieren.

Die T-Antigenaktivität ist an die Sequenz β -D-Gal(1 \rightarrow 3)-D-GalNAc gebunden²⁾. Das einfache Disaccharid wurde bereits von Flowers und Shapiro⁵⁾ synthetisiert. Das Disaccharid ist kovalent durch eine α -glycosidische Bindung über die Hydroxylgruppe des Serins oder Threonins an Peptidstrukturen gebunden²⁾. Die Disaccharid-Einheit kommt auch in verschiedenen anderen Glycoproteinen vor²⁾. Es wurde auch kürzlich postuliert, daß im T-Antigen teilweise noch zusätzliche Galactose-Reste in $\beta(1 \rightarrow 4)$ -glycosidischer Bindung an das N-Galactosamin geknüpft sind⁶⁾. Wir haben jetzt verschiedene, mit Galactose besetzte Derivate des N-Acetylgalactosamins synthetisiert, an die ein Spacer geknüpft ist, um hieraus durch Anknüpfung an Proteine künstliche T-Antigene zu gewinnen.

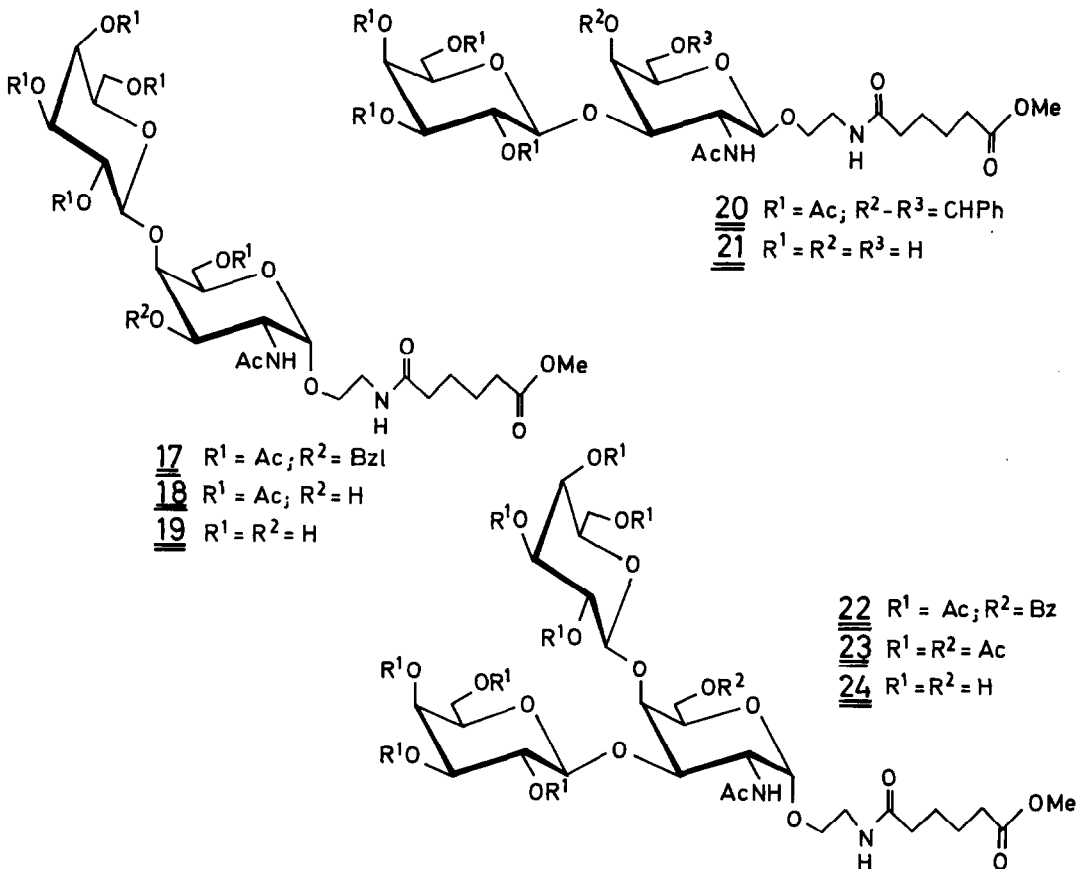
Als Spacer wählten wir den gut wasserlöslichen Peptid-ähnlichen Spacer 3, der durch Umsetzung von 2-Aminoethanol und Adipinsäuremonomethylester unter Einwirkung von DCC darstellbar ist. Außer dem Vorteil der Wasserlöslichkeit ist der 2-Aminoethanol-Teil dem Serin sehr ähnlich. Als Zuckerkomponente wurde das 3.4.6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy- β -D-galactosylchlorid (1)^{7,8)} eingesetzt, das sich für α -Glycosidsynthesen als besonders geeignet erwiesen hat⁹⁾.



Die Umsetzung von 1 mit 3 bei Gegenwart von Quecksilber-(II)-Salzen in Nitromethan verläuft jedoch recht langsam und liefert nur zu 40 % ein Glycosid. Bei Anwendung der reaktiveren Silberkatalysatoren werden erhebliche Anteile an Amidaten durch Reaktion mit der Carbonylgruppe des Amids gebildet. Hieran zeigt sich geringe Reaktionsfähigkeit der Hydroxylgruppe im 2-Aminoethanol-Teil von 3. Das Problem kann befriedigend überwunden werden, wenn zur Glycosidsynthese die leicht erhältliche Schiff'sche Base 2 für die Glyco-

sidsynthese eingesetzt wird. Mit Silbercarbonat/Silbertrifluormethansulfonat in Dichlormethan/Toluol wird das Glycosid 4 erhalten, das jedoch sofort mit Essigsäure zum Amin gespalten wird und durch Umsatz mit Adipinsäuremonomethylester in DMF bei Gegenwart von DCC in 75 % das Glycosid 5 liefert. Das α,β -Verhältnis beträgt nach den NMR-Daten etwa 5 : 1. Die 2-Azido-Gruppe wird durch Reduktion mit Zink/Essigsäure/Acetanhydrid in eine 2-Acetamido-Gruppe überführt. Nach O-Entacetylierung (MeONa) ließen sich die beiden Anomeren 6 und 10 in reiner Form nach Säulenchromatographie isolieren (6: 37 %, Smp. 206° , $[\alpha]_D^{20} + 105$ und 10: 7 % Sirup, $[\alpha]_D^{20} + 10^\circ$).

Aus 6 ließ sich mit Benzaldehyd das Derivat 7 (80 %, Smp. 221°) erhalten, das zur Disaccharidsynthese mit der Acetobromgalactose 12 umgesetzt wurde. Die besten Ergebnisse wurden in Nitromethan/Benzol mit Quecksilbercyanid/Quecksilberbromid 10 : 1 bei 60° erhalten. In 86 % ist das Disaccharid 13 (Sirup, $[\alpha]_D^{20} + 81^\circ$) zu isolieren. Die milde Hydrolyse mit 60 proz. Essigsäure ergibt das Diol 14, das nach O-Entacetylierung (MeONa) zu dem gewünschten Disaccharid-Hapten 15 (80 %, Smp. 191° , $[\alpha]_D^{20} + 76^\circ$) führt. Der Adipinsäureester von 15 kann mit Hydrazin in das Hydrazid umgewandelt werden,



wodurch über das Azid eine Kopplung an das Protein gelingt.

Da auch das β -Produkt 21 zum Vergleich von Interesse ist, wurde die Disaccharidsynthese in analoger Folge durch Umsetzung des aus 10 erhältlichen 11 mit dem Halogenzucker 12 wiederholt. In gleicher Ausbeute erhält man das Disaccharid 20, das entsprechend zum Hapten 21 entblockiert werden kann (Sirup, $[\alpha]_D^{20} + 3^\circ$).

Um eine $\beta(1\rightarrow4)$ -Verknüpfung herzustellen, wurde 7 benzyliert zu 8. Durch Hydrolyse mit 60 proz. Essigsäure war aus 8 das Diol erhältlich, das mit Benzoylcyanid in die 6-O-benzoylierte Verbindung 9 mit freier 4-OH-Gruppe überführt wurde. Die Disaccharidsynthese von 9 mit 12 lieferte unter den gleichen Bedingungen wie bei der Darstellung von 13 das $\beta(1\rightarrow4)$ -verknüpfte Produkt 17. Die Entblockierung erfolgte durch primäre Hydrogenolyse des Benzylethers zu 18 und anschließende Entacylierung. Es ergab sich das reine Disaccharid-Hapten 19 (83 %, Sirup, $[\alpha]_D^{20} + 36^\circ$).

Für eine Trisaccharidsynthese erwies es sich am günstigsten, das Disaccharid 14 zu benutzen, das mit Benzoylcyanid selektiv 6-O-benzoyliert wurde zu 16. Unter den bewährten Bedingungen ist 16 mit dem Halogenid 12 zum Trisaccharid 22 zu kuppeln (76 %, Smp. 149°C). Die Entblockierung von 22 gelingt leicht durch Entacylierung (MeONa) zum Trisaccharid-Hapten 24 (90 %, $[\alpha]_D^{20} + 60.5^\circ$). Es sei erwähnt, daß der alternative Weg zum Trisaccharid 23 durch Umsetzung des Disaccharides 18 mit 12 sehr viel schlechter verläuft und nur 40 % Produkt liefert. Die Reihenfolge der Einführung der beiden Galactose-Reste ist somit von erheblicher Bedeutung.

Die vier Haptene 15, 21, 19 und 24 werden im biologischen Test untersucht. Über die Ergebnisse wird an anderer Stelle berichtet.

J.-C.J. dankt der Alexander von Humboldt-Stiftung für die Bewilligung eines Forschungsstipendiums.

Literatur

- 1) XXVIII. *Mittel. der Reihe 'Bausteine von Oligosacchariden'*
XXVII. *Mittel.: H. Paulsen und R. Jansen, Carbohydr. Res. im Druck*
- 2) P. Vaith und G. Uhlenbruck, *Z. Immun.-Forsch.* 154, 1 (1978).
- 3) G.F. Springer, P.R. Desay, H.Y. Jang und M.S. Murthy, *Clin. Immunol. and Immunopathol.* 7, 426 (1977).
- 4) G.F. Springer, M.S. Murthy, H. Tegtmeyer und E.F. Scanlon, *Prog. Allergy* 26, 42 (1979).
- 5) H.M. Flowers und D. Shapiro, *J. Org. Chem.*, 30, 2041 (1965).
- 6) G.F. Springer, *17th J.S.H. and 15th J.S.B.T. Congress, Paris (1978)*.
- 7) H. Paulsen, A. Richter, V. Sinnwell und W. Stenzel, *Carbohydr. Res.* 64 339 (1978).
- 8) R.U. Lemieux und R.M. Ratcliffe, *Canad. J. Chem.* 57, 1244 (1979).
- 9) H. Paulsen, Č. Kolář und W. Stenzel, *Chem. Ber.* 111, 2358 (1978).

(Received in Germany 5 February 1981)