

SYNTHESEBLOCK β -D-Gal(1 \rightarrow 3)-D-GalNAc ZUR SELEKTIV-SIMULTANEN ANKNÜPFUNG
AN PEPTIDE ZU O-GLYCOPEPTIDEN¹⁾

Hans Paulsen, Michael Paal und Michael Schultz

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Hamburg
D-2000 Hamburg 13, Bundesrepublik Deutschland

The development of a block of α -D-Gal(1 \rightarrow 3)-D-GalNAc is described which allows a simultaneously selective α -glycosidic coupling of some units to the OH-groups of hydroxy amino acids containing peptides to O-glycopeptides.

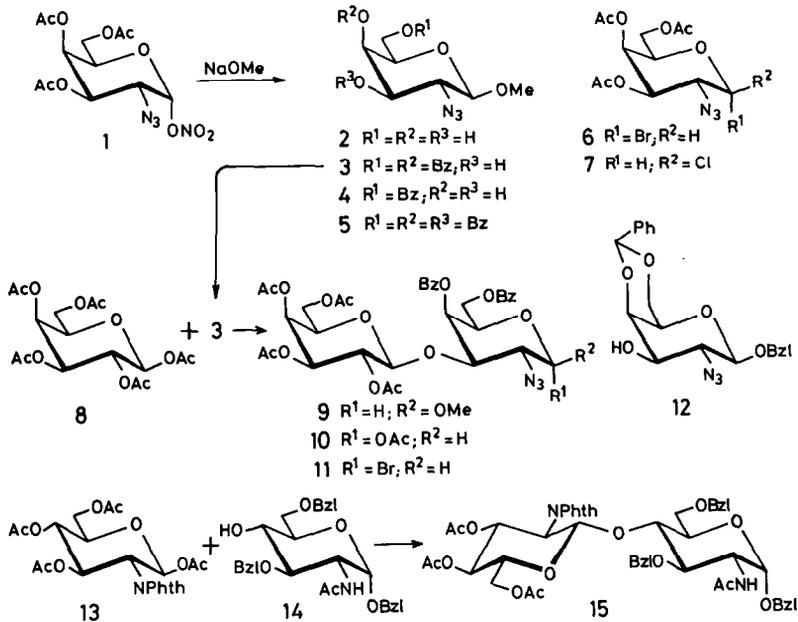
Die Einheit β -D-Gal(1 \rightarrow 3)- α -D-GalNAc(1 \rightarrow 0)-L-Ser oder -L-Thr stellt die Fundamentalstruktur der O-Glycoproteine dar²⁾. Die Saccharid-Reste sind zusätzlich mit N-Acetylneuraminsäure besetzt²⁾. Wir haben neben anderen seit längerem die Synthese dieser Einheit bearbeitet und synthetische Antigene hergestellt, die β -D-Gal(1 \rightarrow 3)- α -D-GalNAc als Determinante (T-Receptor) über verschiedene Spacer gebunden enthalten und immunologisch getestet^{3,4,5)}. Auch die beiden Grundeinheiten wurden von uns nach der step-by-step-Methode synthetisiert⁶⁾. Um die Disaccharid-Einheit vielseitiger, möglichst in einem Syntheseschritt, mehrfach synchron an Peptide anknüpfen zu können, wäre ein entsprechender Disaccharid-Syntheseblock von Interesse, mit dem die Glycosid-synthese mit hoher Stereoselektivität möglich ist. Hierfür können wir jetzt eine überzeugende Lösung vorlegen.

Das Problem der Verknüpfung des Azido-Halogenids 6 oder 7 mit dem Serin-Derivat 16 liegt darin, daß die Hydroxylgruppe des Serins äußerst reaktiv ist. Dies führt, wie wir eingehend diskutiert haben⁷⁾, dazu, daß bei einer α -Glycosidsynthese die Selektivität erheblich nachläßt. Die Umsetzung des α -Bromids 6 mit 16 nach dem in situ-Anomerisierungsverfahren⁷⁾ liefert ein Anomerengemisch. Auch die Umsetzung des β -Halogenids 7 mit 16 verläuft nicht stereoselektiv⁸⁾. Erst bei Toluol-Zusatz, der die Reanomerisierung verlangsamt, erhält man in hoher Selektivität das α -Produkt⁶⁾. Um also mit einem Disaccharid-Syntheseblock die notwendige gute Stereoselektivität zu erzielen, müßte nach unseren Regeln⁷⁾ die Reaktivität des Disaccharid-Halogenids gegenüber 6 und 7 erheblich abgesenkt werden.

Die Schwierigkeiten in der Herstellung des gewünschten Blockes liegen darin, daß im leicht zugänglichen 12 die 3-OH-Gruppe äußerst wenig reaktiv ist⁷⁾ und nicht mit befriedigender Ausbeute und Selektivität glycosidiert werden kann. In drei neuartigen Syntheseschritten haben wir das Problem mit Erfolg gelöst.

Das Nitrat 1, das bei entsprechender Lenkung der Azidonitratisierungs-

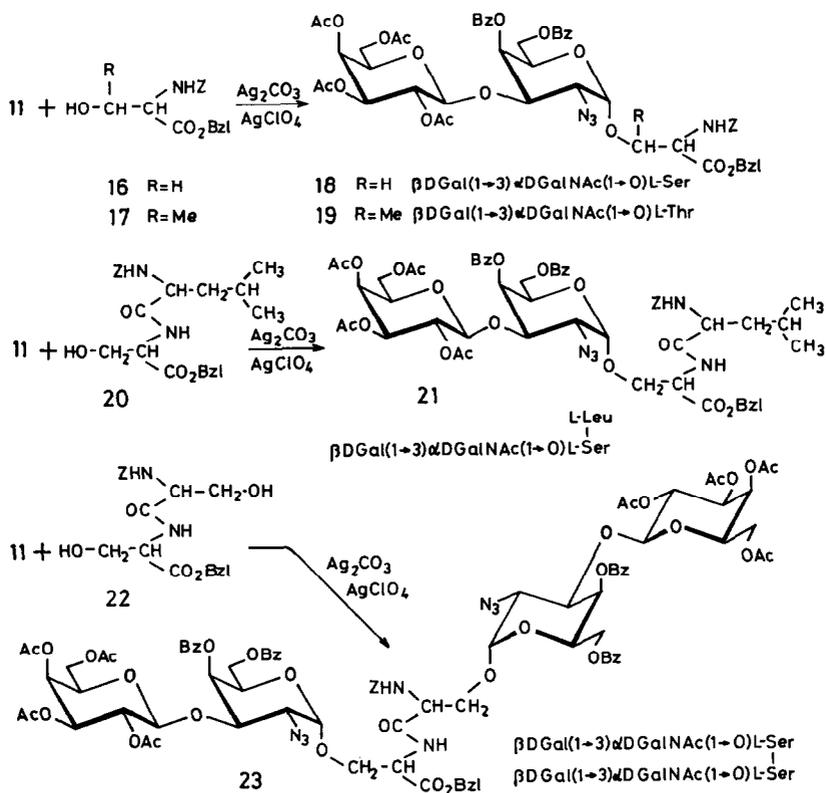
Reaktion⁹⁾ nahezu ausschließlich anfällt, läßt sich mit Natriummethylat in nahezu quantitativer Ausbeute ins β -Glycosid 2 überführen. Diese Reaktion ist auch auf weitere Alkohole, wie Allylalkohol, Benzylalkohol und andere, anwendbar. Wir benutzen sie auch mit gutem Erfolg zur Glycosidierung von Azidonitraten der 2-Azido-2-desoxy-lactose. Eine selektive Benzoylierung von 2 (Benzoylcyanid, 0° C) läßt sich so lenken, daß aus 2 in 75% Ausbeute das Dibenzoat 3 erhalten werden kann. Die Nebenprodukte 4 (10%) und 5 (5%) sind leicht chromatographisch abzutrennen.



Es wurde jetzt gefunden, daß die Trimethylsilyltriflat-Methode¹⁰⁾ zur Umsetzung mit wenig reaktiven OH-Gruppen gut geeignet ist. Voraussetzung ist allerdings ein geeignetes Substitutionsmuster in beiden Komponenten. Es sollen vorzugsweise Acyl-Substituenten vorliegen. So läßt sich 3-OH in 3 bei Gegenwart von Trimethylsilyltriflat (Dichlormethan, 4 Å) mit dem β -Acetat 8 in 85% selektiv zum β -glycosidisch verknüpften Disaccharid 9 ($[\alpha]_{\text{D}}^{26} - 52.0$ c = 0.1 CHCl_3) umsetzen. Die hohe Effektivität des Trimethylsilyltriflat-Verfahrens bei wenig reaktiven OH-Gruppen zeigt sich auch an anderen Beispielen. So ist nach diesem Verfahren durch Umsetzung von 13 mit 14 das Chitobiose-Derivat 15 ($[\alpha]_{\text{D}}^{26} + 13.8$, c = 0.25 CHCl_3) in der bisher unerreichten Ausbeute von 71% zu erhalten. Ferner sei erwähnt, daß man durch Umsetzung von 4 mit 2 Äquivalenten des β -Acetats 8 bei Gegenwart von Trimethylsilyltriflat in einem synchronen Schritt zu dem entsprechenden Trisaccharid unter Anknüpfung zweier β -glycosidisch verknüpfter Galactose-Reste an 3-OH und 4-OH zu einem Trisaccharid gelangt. Für die Darstellung einer

entsprechenden Verbindung benötigten wir früher eine step-by-step-Methode³⁾.

Das Methylglycosid 9 ist leicht mit Acetanhydrid/Schwefelsäure (100 : 1, - 20° C) zum Acetat 10 ($[\alpha]_D^{26} + 41.0$, $c = 0.1$, CHCl_3) (93%) zu acetolysieren, das mit Titanatetrbromid das gewünschte α -Bromid 11 (89%) liefert. Um die Reaktivität des Disaccharid-Halogenids 11 zu prüfen, wurde dieses zunächst mit den L-Serin- und L-Threonin-Derivaten 16 und 17 umgesetzt.



Bei der Reaktion von 11 mit 16 unter Zusatz von Silbercarbonat/Silberperchlorat (Dichlormethan/Toluol) ist in 81% das Glycosid 18 ($[\alpha]_D^{26} + 65.2$, $c = 0.5$, CHCl_3) zu erhalten. In einer entsprechenden Reaktion liefert 11 mit 17 in 85% das Glycopeptid 19 ($[\alpha]_D^{26} + 43.0$, $c = 0.5$, CHCl_3). In beiden Fällen verläuft die Reaktion vollständig stereoselektiv zum gewünschten α -Produkt. Ein Anteil an β -Produkt ist nicht nachzuweisen. Die Reaktivität in 11 ist somit gegenüber der von 6 in gewünschter Weise drastisch herabgesetzt, wodurch die bessere Selektivität bedingt ist. Dieses ist nicht nur auf die Wirkung des angeknüpften Saccharid-Restes, sondern auch auf die Anwesenheit von zwei Benzoatgruppen zurückzuführen. Die Reaktivität von 11 ist durch die Substituenten-Wahl⁷⁾ so günstig eingestellt, daß man beim Glycosidierungsschritt vom α -Bromid ausgehen kann und die in situ-Anomerisierungs-Methode

hier mit bester Ausbeute das α -Glycosid liefert. Ein Einsatz des entsprechenden β -Halogenids ist somit hier nicht notwendig. Ein weiterer Vorteil dieser Blocksynthese ist die problemlose Entblockierbarkeit (Reduktion, N-Acetylierung, Hydrierung, De-O-acylierung), die in guten Ausbeuten gelingt.

Um den neuen Syntheseblock unter schwierigsten Bedingungen zu prüfen, wurden insbesondere weitere Serin-Peptide eingesetzt. Es ist bekannt, daß die Selektivität am ehesten beim Serin Schwierigkeiten bereitet⁶⁾. Daher ist dann, wenn man eine gute Selektivität beim Serin erreicht, ganz sicher eine entsprechend selektive Reaktion beim Threonin zu erwarten. Das Dipeptid-Derivat von L-Leu-L-Ser 20 wurde analog wie 16 mit 11 zur Reaktion gebracht. Man erhielt in über 70% das Glycopeptid 21 ($[\alpha]_D^{26} + 70.3$, $c = 0.65$, CHCl_3). Wiederum verlief die Reaktion vollständig stereoselektiv. Es wurde nur das α -Produkt und kein Anteil an β -Produkt gefunden, womit die Leistungsfähigkeit des Blockes 11 bestätigt werden konnte.

Am interessantesten ist das Derivat von L-Ser-L-Ser 22. Unter analogen Bedingungen läßt sich gut in über 50% das Produkt 23 ($[\alpha]_D^{26} + 86.5$, $c = 0.58$, CHCl_3) darstellen, in dem zwei Disaccharid-Ketten an beide L-Serin-Reste synchron angeknüpft wurden. Eine sehr sorgfältige NMR-spektroskopische Untersuchung (auch 2D-Spektren) zeigt, daß auch hier die Reaktion vollständig stereoselektiv abläuft und entsprechende β -glycosidisch verknüpfte Produkte nicht nachzuweisen sind. Damit ist gezeigt, daß 11 auch für eine gleichzeitige selektive Anknüpfung mehrerer Disaccharid-Reste geeignet ist. In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung¹¹⁾ wird über einen ähnlichen Syntheseblock berichtet, der aufwendiger darzustellen ist und der mit L-Serin nicht stereoselektiv reagiert und somit für selektiv-simultane Glycopeptidsynthesen nicht geeignet ist.

Mit den hier durchgeführten Untersuchungen ist somit die Basis für die Synthese von Segmenten des Glycophorins, des Hauptglycoproteins der Erythrozyten, sowie von weiteren O-Glycoproteinen gelegt.

Literatur

1. XLVIII. Mitteil. über Bausteine von Oligosacchariden; XLVII. Mitteil.: H. Paulsen und R. Leubhn, Liebigs Ann. Chem., im Druck.
2. J. Montreuil, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 37, 157 (1980).
3. J.-C. Jacquinet und H. Paulsen, Tetrahedron Lett. 1981, 1387; H. Paulsen, J.-C. Jacquinet und W. Rust, Carbohydr. Res. 104, 195 (1982).
4. R.M. Ratcliffe, D.A. Baker und R.U. Lemieux, Carbohydr. Res. 93, 35 (1981)
5. H. Paulsen und M. Paal, Carbohydr. Res., im Druck.
6. H. Paulsen und J.-P. Hölck, Carbohydr. Res. 109, 89 (1982).
7. H. Paulsen, Angew. Chem. 94, 184 (1982); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 21, 155 (1982).
8. B. Ferrari und A.A. Pavia, Carbohydr. Res. 79, C1 (1980); R. Kaifu und T. Osawa, Carbohydr. Res. 58, 235 (1977); 69, 79 (1979).
9. R.U. Lemieux und R.M. Ratcliffe, Can. J. Chem. 57, 1244 (1979).
10. T. Ogawa, K. Beppu und S. Nakabay, Carbohydr. Res. 93, C6 (1981).
11. V.V. Bencomo, J.-C. Jacquinet und P. Sinay, Carbohydr. Res. 110, C9 (1982)

(Received in Germany 17 January 1983)