

Effekt)^[14] und fördert die Desilylierung dieser kationischen Zwischenstufe.

Mit zunehmender Zahl Si-kontrollierter Umlagerungen^[15] mehren sich die Beispiele ungewöhnlicher Reaktionen. Kürzlich wurde über 1,3-Arylverschiebungen berichtet^[16]. Unsere Befunde zeigen, wie durch den β -Si-Effekt Gerüstumlagerungen in Richtung zunehmender Ringspannung ermöglicht werden.

Eingegangen am 10. August 1989 [Z 3491]

- [1] Zusammenfassungen: G. D. Sargent in G. A. Olah, P. von R. Schleyer (Hrsg.): *Carbenium Ions, Vol. III*, Wiley, New York 1972, S. 1099; H. C. Brown: *The Nonclassical Ion Problem* (with comments by P. von R. Schleyer), Plenum, New York 1977; W. Kirmse, *Top. Curr. Chem.* 80 (1979) 125; V. A. Barkhash, *ibid.* 116 (1984) 1; P. Vogel: *Carbocation Chemistry*, Elsevier, Amsterdam 1985; D. Lenoir, Y. Apeloig, D. Arad, P. von R. Schleyer, *J. Org. Chem.* 53 (1988) 661.
- [2] Nach Kraftfeldrechnungen beträgt die Spannungsenergie von Bicyclo-[3.1.1]heptan (Norpinan, 5, $X=H$) 143.8 kJ mol⁻¹, die von Bicyclo-[2.2.1]heptan (Norbornan, 1, $X=H$) 63.2 kJ mol⁻¹: W. F. Maier, P. von R. Schleyer, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 1891.
- [3] Zusammenfassung: W. Kirmse, *Acc. Chem. Res.* 19 (1986) 36.
- [4] P. Yates, R. J. Crawford, *J. Am. Chem. Soc.* 88 (1966) 1561; R. A. Blattel, P. Yates, *Tetrahedron Lett.* 1972, 1069, 1071; C. J. Collins, I. T. Glover, M. D. Eckart, V. F. Raen, B. M. Benjamin, B. S. Bemjaminov, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 899; R. Siegfried, *Chem. Ber.* 107 (1974) 1472.
- [5] W. Kirmse, G. Arend, R. Siegfried, *Angew. Chem.* 82 (1970) 174; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 9 (1970) 165; W. Kirmse, G. Arend, *Chem. Ber.* 105 (1972) 2738, 2746; W. Kirmse, R. Siegfried, *ibid.* 105 (1972) 2754; W. Kirmse, K. Loosen, *ibid.* 114 (1981) 400; W. Kirmse, N. Knöpfel, K. Loosen, R. Siegfried, H. J. Wroblowsky, *ibid.* 114 (1981) 1187; K. Banert, W. Kirmse, H. J. Wroblowsky, *ibid.* 116 (1983) 3591.
- [6] Y. Lin, A. Nickon, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 3496.
- [7] GC-Trennung und Spektren: R. F. Cunico, *J. Org. Chem.* 36 (1971) 929.
- [8] H. G. Kuivila, C. R. Warner, *J. Org. Chem.* 29 (1964) 2845.
- [9] H. G. Kuivila, G. L. Grady, *J. Organomet. Chem.* 21 (1970) 303.
- [10] K. Grychtol, H. Musso, J. M. F. Oth, *Chem. Ber.* 105 (1972) 1789; C. Herzog, R. Lang, D. Brückner, P. Kemmer, M. Christl, *ibid.* 119 (1986) 3027.
- [11] Ähnliche Ergebnisse erhielten wir mit 6-Methyl-2-norbornyl-Kationen: W. Kirmse, M. Hartmann, R. Siegfried, H.-J. Wroblowsky, B. Zang, V. Zellmer, *Chem. Ber.* 114 (1981) 1793.
- [12] T. W. Bentley, unveröffentlicht.
- [13] W. Kirmse, F. Söllenböhmer, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1989, 774.
- [14] J. B. Lambert, G. Wang, R. B. Finzel, D. H. Teramura, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 7838, zit. Lit.
- [15] I. Fleming, S. K. Patel, C. J. Urch, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1989, 115, zit. Lit.
- [16] C. Eaborn, P. D. Lickiss, S. T. Najim, W. A. Stanczyk, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1987, 1461; C. Eaborn, K. L. Jones, P. D. Lickiss, *ibid.* 1989, 595.

Ein „Spacer“-modifiziertes Trisaccharid als photolabiler Ligand für die Affinitätsmarkierung von Antigalactan IgA X24**

Von Cornelis P. J. Glaudemans, Jochen Lehmann* und Markus Scheuring

Viele kohlenhydratbindende Proteine, z. B. Endoglycanasen, Lectine, Transportproteine für Oligosaccharide sowie Antikörper, die gegen Polysaccharide oder Glycokonjugate gerichtet sind, erkennen und binden nicht nur einzelne

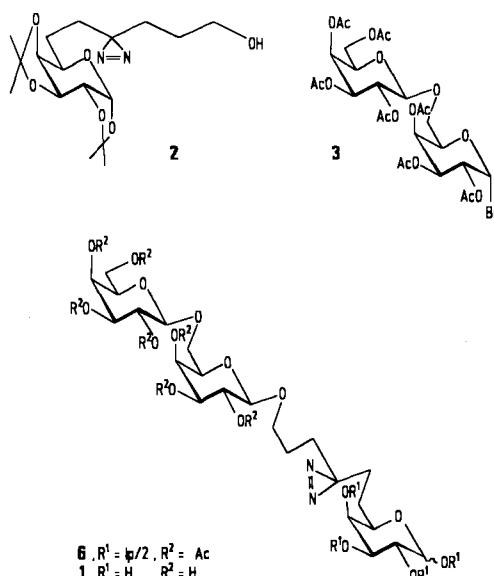
[*] Prof. Dr. J. Lehmann, Dipl.-Chem. M. Scheuring
Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität
Albertstraße 21, D-7800 Freiburg

Prof. Dr. C. P. J. Glaudemans
National Institutes of Health
Bethesda, MD 20892 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

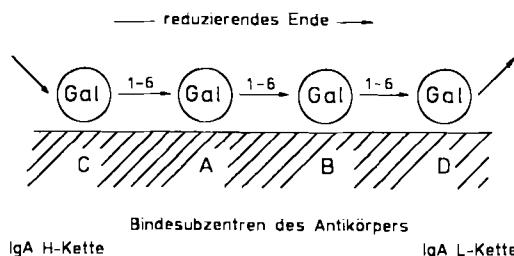
Monosaccharide sondern ganze Oligosaccharid-Sequenzen. Eingehend untersuchte Beispiele solcher kohlenhydratbindenden Proteine sind Amylasen aus verschiedensten Quellen. J. F. Robyt und D. French^[1] formulierten 1970 aufgrund kinetischer Untersuchungen ein sogenanntes „subsite“-Modell für den Bindebereich der α -Amylase aus Schweißepancreas, eines Enzyms, das Maltotriose als kleinste Struktureinheit der Stärke bindet und spezifisch an der Maltosylbindung hydrolysiert.

In Anlehnung an diese Vorstellung wurde als Maltotriose-Analogen das erste „Spacer“-modifizierte Disaccharid, zwei mit einem sechsgliedrigen acyclischen Zwischenstück verbundene α -Glucosereste, synthetisiert und festgestellt, daß die Verbindung ein kompetitiver Inhibitor des Enzyms ist^[2]. Spacer-modifizierte Oligosaccharide wurden zur Verwendung als reaktive Sonden für Rezeptorproteine konzipiert. Der Spacer ersetzt als flexible Einheit einen oder mehrere starre und raumbeanspruchende Monosaccharidreste. Er kann eine für die chemische Modifikation des Bindebereichs geeignete reaktive oder aktivierbare Gruppe tragen. Die Affinität des ganzen Moleküls sollte dadurch wenig beeinträchtigt werden. Affinitätsmarkierung ist bei Proteinen, deren Struktur wie im Falle des verwendeten Antikörpers bekannt ist, geeignet, den Bindebereich auszuloten.



Die Verwendbarkeit dieses Prinzips wird hier anhand der Bindefähigkeit des Spacer-modifizierten Trisaccharids 8-Azi-6,7,8,9,10-pentadesoxy-11- O -[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranosyl]-D-galacto-undecaose 1 an monoklonales Anti-Galactan IgA X24^[3,4] bestätigt. Das Immunoglobulin hat optimale Affinität zu einem tetrameren Segment aus (1 \rightarrow 6)- β -D-Galactopyranan (Tabelle 1), wobei die vier Bindezentrren A, B, C und D (siehe Schema 1) in dieser Reihenfolge abnehmende Affinität zu den Monosaccharidresten aufweisen^[4]. Photoaffinitätsmarkierung des IgA X24 wurde bisher mit zwei β -D-Galactosiden mäßiger Affinität durchgeführt^[5,6]. In beiden Fällen erfolgte relativ unspezifische Markierung, das heißt sowohl die L-Kette als auch die H-Kette wurden chemisch modifiziert, was entweder für die Bindung in verschiedenen Subzentren, das heißt für die Bildung verschiedener Ligand-Rezeptorkomplexe spricht oder auf zu große Beweglichkeit der aglykonisch gebundenen, reaktiven Gruppen zurückzuführen ist.

Verbindung **1** ist so konstruiert, daß von den vier Subzentren^[4, 7] drei, nämlich A, C und D, durch Galactosylreste besetzt sind und das vierte, B, durch den Spacer überbrückt



Schema 1. Darstellung des Bindungsmodus eines β -(1 \rightarrow 6)- α -Galactopyranan-Segments an die variable Region des passenden Antikörpers [4, 7].

wird. Die hohe Affinität der Verbindung **1** ($1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), die die des strukturell vergleichbaren Disaccharids Gal₂^[4] weit übertrifft (Tabelle 1), deutet auf eine optimale, stabile

Tabelle 1. Bindekstanten einiger Liganden an Antigalactan IgA X24 [4, 6].

Verbindung	$K_b [\text{M}^{-1}]$
MeGal [a]	0.50×10^3
MeGal ₂ [a]	2.10×10^4
MeGal ₃ [a]	3.20×10^5
MeGal ₄ [a]	5.70×10^5
Gal ₄ [b]	2.70×10^5
1	1.10×10^5

[a] Es handelt sich hier um das Methyl- β -D-glycopyranosid und um Methyl- β -D-(1 \rightarrow 6)-verknüpfte β -D-Galactooligosaccharide. [b] Das (1 \rightarrow 6)- β -verknüpfte, reduzierende Tetrasaccharid [16].

Besetzung des Vierzentren-Bindebereichs hin. **1** läßt sich durch modifizierte Koenigs-Knorr-Synthese^[8] aus dem als D-Galactopyranose-Analogon synthetisierten Undecaosederivat **2**^[9] mit Per-O-acetyl-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-galactopyranosylbromid **3**^[10] und anschließender Deblockierung gewinnen. **3** wurde nach einer modifizierten Vorschrift^[1, 5] mit verbesserter Ausbeute (98 % gegenüber wie beschrieben^[10] 60 %) hergestellt. Behandlung von **1** mit β -Galactosidase setzt Galactose sowie die Undecaose^[9] des reduzierenden Endes frei. Beide konnten durch dünnenschichtchromatographischen Vergleich mit authentischen Proben nachgewiesen werden.

Arbeitsvorschrift

Die Affinitätskonstante von **1** und IgA X24 wurde fluorimetrisch [5] (Tabelle 1) bestimmt.

2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-1,2:3,4-di-O-isopropyliden- α -D-galactopyranose **4**: 7 g (27 mmol) 1,2:3,4-Di-O-isopropyliden- α -D-galactopyranose [11] werden in 15 mL Chloroform gelöst. Dazu gibt man 6.88 g (29 mmol) Ag_2O , 12.5 g wasserfreies CaSO_4 und 3 g Molekularsieb 4 Å. Das Reaktionsgefäß wird dann 1 h in ein Ultraschallbad gestellt. Nach Zugabe von 1.77 g (14 mmol) Iod unter Rühren läßt man im Lauf einer weiteren Stunde 12.2 g (29 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- α -D-galactosylbromid [12] in 10 mL Chloroform zutropfen. Es wird dann weitergerührt und nach 22 h von unlöslichem abfiltriert. Das Filtrat wird mit verdünntem, wäßrigem Natrumthiosulfat, dann mit Wasser gewaschen, getrocknet (Na_2SO_4) und eingedampft. **4** entsteht als farbloses Öl (11.3 g, 71 %) und ist dünnenschichtchromatographisch einheitlich; $R_f = 0.27$, Ethylacetat/Cyclohexan, 1:1. **4** wird ohne weitere Charakterisierung weiter verarbeitet.

Per-O-acetyl-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-galactopyranosylbromid **3** [13]: 10 g (17 mmol) **4** werden in 50 mL Eisessig gelöst und bis zur Trübung mit Wasser versetzt. Fünfmal werden nach jeweils 30 min Kochen unter Rückfluß je 5 mL Wasser zugesetzt. Dann wird die Lösung auf die Hälfte im Vakuum eingedampft. Essigsäure durch wiederholte Codestillation mit Wasser, ebenfalls im Vakuum, entfernt und schließlich das ganze zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird wie üblich in 40 mL Pyridin/Acetanhydrid (2:1) acetyliert und aufgearbeitet [14]. Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Ethylacetat/Cyclohexan, 1:1; $R_f = 0.16$. Nach dem Eindampfen der entsprechenden Fraktionen bleibt **5** [13] als farbloser, fester Schaum (10.7 g, 94%); $[\alpha]_D^{20} = -5^\circ$ (Chloroform). Bromierung von **5** erfolgt in Abänderung einer bekannten Vorschrift [10] bei tiefer Temperatur (-5°C) unter Zusatz von Acetanhydrid: 0.2 g (0.294 mmol) **5** werden bei 0°C in 15 mL einer 2:1-Mischung aus Acetanhydrid und 30 % HBr in Eisessig gelöst und auf -5°C abgekühlt. Nach 48 h hat sich das Edukt vollständig umgesetzt [10]. Es wird auf die übliche Weise aufgearbeitet und das Rohprodukt **3** durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Ethylacetat/Cyclohexan, 1:1; $R_f = 0.23$) gereinigt.

6,7,8,9,10-Pentadesoxy-11-O-per-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranosyl-[1,2:3,4-di-O-isopropyliden-8-azido- β -galacto-undeca-1,5-pyranose **6** [13]: 0.3 g (0.84 mmol) **2** werden nach einer von H. Paulsen et al. [8] modifizierten Koenigs-Knorr-Synthese unter Verwendung von 7 g Silbersilikat-Aluminiumoxid-Katalysator mit 680 mg (9.2 mmol) **3** verknüpft. **6** wird als farbloser Schaum erhalten (272 mg, 34%); $R_f = 0.32$. Ethylacetat/Cyclohexan, 1:1.

1: 270 mg (0.27 mmol) **6** werden in 20 mL Chloroform und 2 mL 99 % Trifluoressigsäure gelöst und 48 h stehen gelassen. Nach Einengen im Vakuum unter wiederholter Codestillation mit Methanol wird der Rückstand in 20 mL Methanol aufgenommen und bis zur bleibenden alkalischen Reaktion mit 1 M Natriummethanolat versetzt. Nach vollständigem Umsatz ($R_f = 0.22$, Ethylacetat/MeOH/H₂O, 4:2:1) wird die methanolische Lösung eingedampft und **1** durch HPLC (reversed phase) gereinigt; Ausbeute 100 mg (60%). $[\alpha]_D^{20} = +65^\circ$ (Wasser).

Eingegangen am 7. August 1989 [Z 3484]

- [1] J. F. Robyt, D. French, *J. Biol. Chem.* **245** (1970) 3917–3927.
- [2] S. Jegge, J. Lehmann, *Carbohydr. Res.* **133** (1984) 247–254.
- [3] C. P. J. Glaudemans, M. E. Jolly, M. Potter, *Carbohydr. Res.* **30** (1973) 409–413.
- [4] C. P. J. Glaudemans, *Mol. Immunol.* **24** (1987) 371–379, zit. Lit.
- [5] G. L. Jung, K. R. Holm, C. P. J. Glaudemans, J. Lehmann, H. Lay, *Carbohydr. Res.* **174** (1988) 87–98.
- [6] C. S. Kuhn, C. P. J. Glaudemans, J. Lehmann, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 357–360.
- [7] C. P. J. Glaudemans, P. Kovac, *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* **374** (1988) 78–108.
- [8] H. Paulsen, O. Lockhoff, *Chem. Ber.* **114** (1981) 3102–3114.
- [9] J. Lehmann, M. Scheuring, *Liebigs Ann. Chem.*, im Druck.
- [10] E. M. Nashed, C. P. J. Glaudemans, *Carbohydr. Res.* **158** (1986) 125–136.
- [11] O. T. Schmidt, *Meth. Carbohydr. Chem.* **2** (1963) 324–325.
- [12] R. U. Lemieux, *Meth. Carbohydr. Chem.* **2** (1963) 221–222.
- [13] **3**: $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , 25 °C, TMS als Standard): $\delta = 6.71$ (d, $J_{1,2} = 4.05$ Hz, 1 H; H₁), 5.49 (dd, $J_{3,4} = 3.15$, $J_{4,5} = 1.5$ Hz, 1 H; H₄), 5.38 (dd, $J_{2,3} = 7.5$, $J_{3,4} = 3.15$ Hz, 1 H; H₃), 5.37 (dd, $J_{3,4} = 3.15$, $J_{4,5} = 1.2$ Hz, 1 H; H_{4'}), 5.17 (dd, $J_{1,2} = 7.8$, $J_{2,3} = 7.65$ Hz, 1 H; H_{2'}), 5.03 (dd, $J_{1,2} = 4.05$, $J_{2,3} = 7.5$ Hz, 1 H; H₂), 4.99 (dd, $J_{2,3} = 7.65$, $J_{3,4} = 3.15$ Hz, 1 H; H_{3'}), 4.52 (d, $J_{7,8} = 7.8$ Hz, 1 H; H_{6'a}), 4.46 (t, $J_{4,5} = 1.5$, $J_{5,6} = 6.0$ Hz, 1 H; H₅), 4.2 (dd, $J_{6,7,8} = 6.0$, $J_{6,7,8,9} = 11.25$ Hz, 1 H; H_{6'a}), 3.91 (dt, $J_{4,5} = 1.2$, $J_{5,6} = 6.0$ Hz, 1 H; H_{5'}), 3.83 (dd, $J_{6,7,8} = 6.0$, $J_{6,7,8,9} = 11.25$ Hz, 1 H; H_{6'b}), 3.74 (dd, $J_{6,7,8} = 6.0$, $J_{6,7,8,9} = 11.25$ Hz, 1 H; H_{6'a}), 2.20–1.97 (m, 21 H; OAc). -5° : $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 6.37$ (d, $J_{1,2} = 1.5$ Hz, 1 H; H₁), 5.68 (d, $J_{1,2} = 8.25$ Hz, 1 H; H_{1'}), 4.51 (d, $J_{1,2} = 7.65$ Hz, 1 H; H_{1'}), 4.47 (d, $J_{1,2} = 7.65$ Hz, 1 H; H_{1'}), $[\alpha]_D^{20} = -5^\circ$ (CHCl_3). -6° : $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 5.49$ (d, $J_{1,2} = 4.8$ Hz, 1 H; H₁), 5.42–5.38 (m, 2 H; H_{4',H'2'}), 5.18 (dd, $J_{2,3} = 7.5$, $J_{3,4} = 3.15$ Hz, 1 H; H_{3'}), 5.14 (dd, $J_{3,4} = 3.15$, $J_{4,5} = 1.2$ Hz, 1 H; H_{4'}), 5.02 (dd, $J_{1,2} = 7.8$, $J_{2,3} = 7.65$ Hz, 1 H; H_{2'}), 4.96 (dd, $J_{2,3} = 7.65$, $J_{3,4} = 3.15$ Hz, 1 H; H_{3'}), 4.58 (dd, $J_{2,3} = 2.7$, $J_{3,4} = 7.97$ Hz, 1 H; H₃), 4.52 (d, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, 1 H; H_{1'}), 4.41 (d, $J_{1,2} = 7.65$ Hz, 1 H; H_{1'}), 4.29 (dd, $J_{1,2} = 4.8$, $J_{2,3} = 2.7$ Hz, 1 H; H₂), 4.17 (dd, $J_{6,7,8,9} = 6.0$, $J_{6,7,8,9} = 11.25$ Hz, 1 H; H_{6'b}), 4.13 (dd, $J_{6,7,8} = 6.0$, $J_{6,7,8,9} = 11.25$ Hz, 1 H; H_{6'a}), 4.05 (dd, $J_{3,4} = 7.97$, $J_{4,5} = 1.8$ Hz, 1 H; H₄), 3.91 (t, $J_{4,5} = 1.2$, $J_{5,6} = 6.0$ Hz, 1 H; H_{5'}), 3.87 (dd, $J_{6,7,8} = 6.0$, $J_{6,7,8,9} = 11.25$ Hz, 1 H; H_{6'b}), 3.77 (dd, $J_{6,7,8} = 6.0$, $J_{6,7,8,9} = 11.25$ Hz, 1 H; H_{6'a}), 3.63–3.56 (m, 1 H; H₅), 3.5–4.91 (m, 1 H; H_{5'}), 2.2–1.96 (m, 21 H; OAc), 1.75–1.23 (m, 21 H; CH₂, CH₃); C₄₃H₆₂O₂₃N₂ (974.2): Ber.: C 53.01, H 6.34, N 2.87; Gef.: C 53.24, H 6.33, N 2.91.
- [14] M. L. Wolfson, A. Thompson, *Meth. Carbohydr. Chem.* **2** (1963) 211–215.
- [15] D. Shapiro, A. J. Acher, *Chem. Phys. Lipids* **22** (1978) 197–206.
- [16] M. E. Jolly, S. Rudikoff, M. Potter, C. P. J. Glaudemans, *Biochemistry* **12** (1973) 3039–3044.