

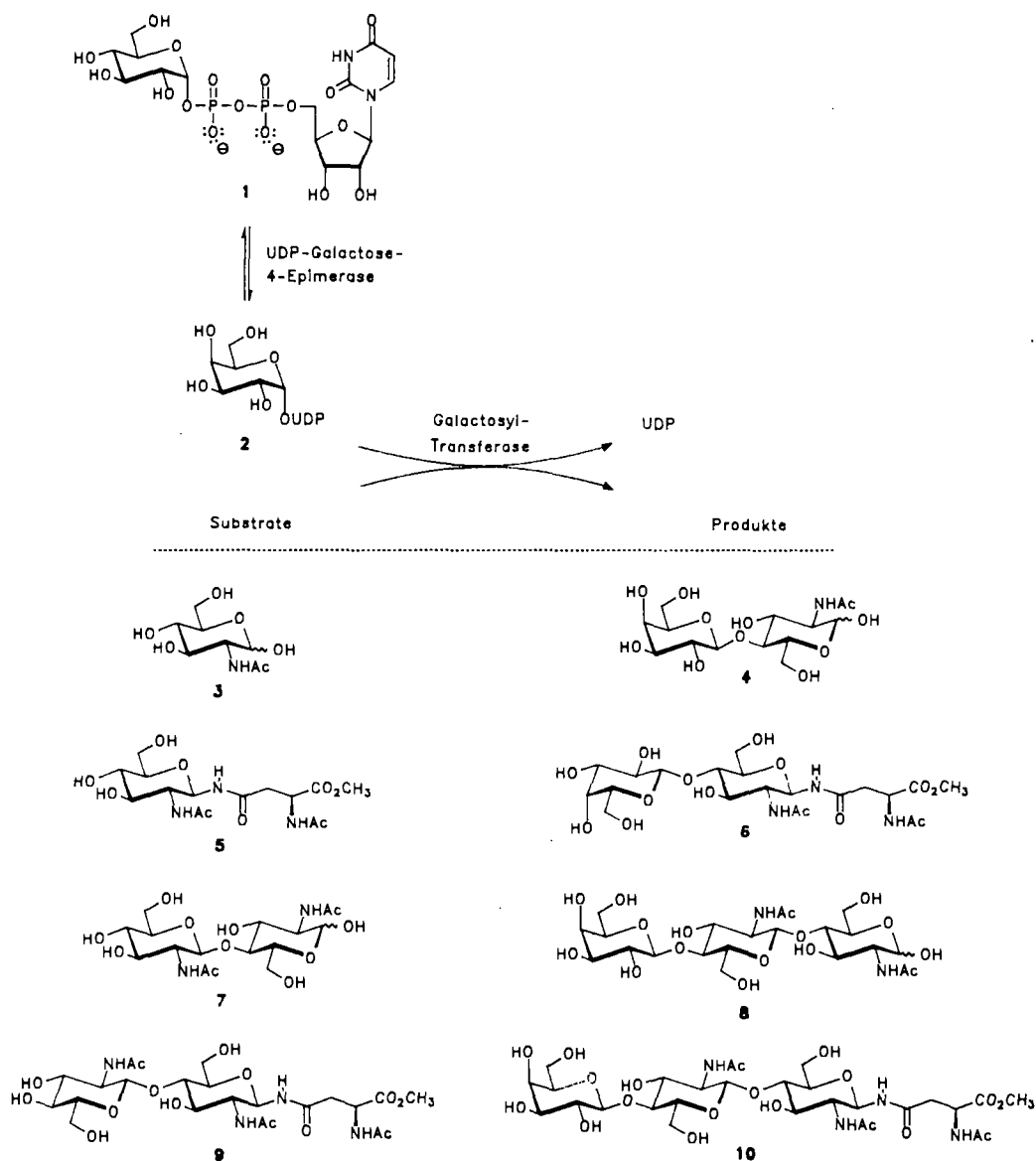
# Kombinierte chemoenzymatische Synthese von *N*-Glycoproteinbausteinen\*\*

Von Joachim Thiem\* und Torsten Wiemann

*N*-Glycoproteine spielen eine wesentliche Rolle bei biologischen Erkennungsprozessen<sup>[1a, b]</sup> wie der Tumorgenese<sup>[1c]</sup>, der bakteriellen und viralen Infektion<sup>[1d]</sup> sowie der Internalisierung verschiedener makromolekularer Stoffe. Weiterhin bilden sie die Grundlage der Blutgruppeneinteilung<sup>[1e]</sup> und sind maßgeblich für Zell-Zell-Erkennung, Zellwachstum und Zelldifferenzierung<sup>[1f]</sup>.

bedeutet aber auch, daß die chemische Synthese unblockierter Heterooligosaccharide komplex und nicht immer ergiebig ist. Als praktikable Alternative bietet sich trotz moderner und effizienter Glycosylierungsverfahren in manchen Fällen der Einsatz von Enzymen an.

Mit dem Ziel der Synthese von Partialstrukturen der *N*-Glycoproteine haben wir Galactosyl-Transferase verwendet, um die Gal-β(1 → 4)-GlcNAc-Bindung in den an Asparagin gebundenen Oligosacchariden **6** und **10** zu knüpfen (Schema 1). Die Substrate **5** bzw. **9** für diese enzymatische Reaktion wurden zuvor auf chemischem Wege synthetisiert (Sche-



Schema 1. Durch Galactosyl-Transferase katalysierte Galactosylierungen.

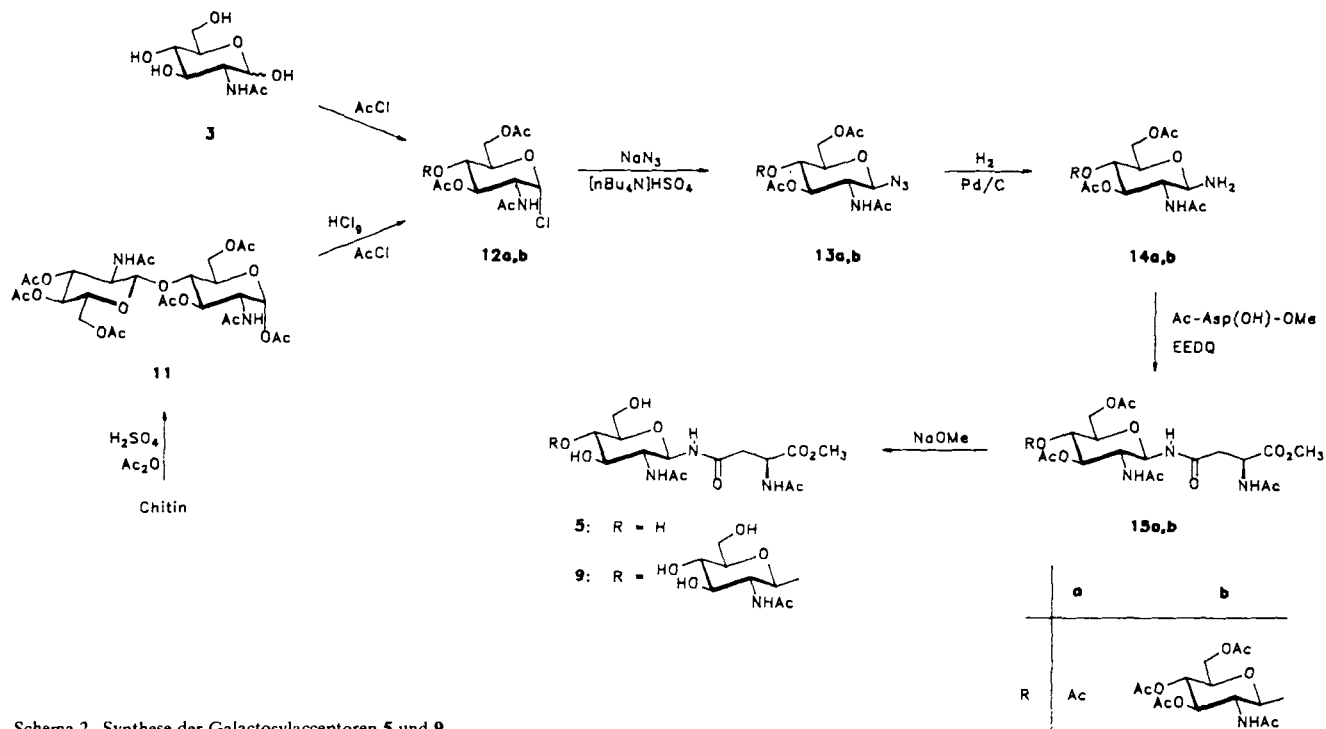
Daher findet die Bereitstellung von Vergleichssubstanzen für die Untersuchung dieser hochspezifischen Phänomene großes Interesse. Ursache der genannten Erkennungsprozesse auf molekularer Ebene ist die außerordentliche Vielfalt an Verknüpfungsmöglichkeiten von Monosacchariden; diese

ma 2). Die Aminosäure-freien Oligosaccharide **4** und **8** haben wir ebenfalls enzymatisch synthetisiert.

Die Galactosylierung erfolgt nach einer einheitlichen Vorschrift. Die für die Transferasereaktion benötigte aktivierte Form der Galactose, Uridin-5'-diphosphat-galactose (UDP-Gal) **2** ist sehr teuer und wird daher in situ aus UDP-Glucose **1** erzeugt, eine Reaktion, die von UDP-Galactose-4-Epimerase katalysiert wird. Danach findet der Galactosetransfer von UDP-Galactose auf den jeweiligen Acceptor unter Freisetzung von UDP statt.

[\*] Prof. Dr. J. Thiem, Dipl.-Chem. T. Wiemann  
Organisch-chemisches Institut der Universität  
Orléansring 23, D-4400 Münster

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



Diese zweistufige Galactosylierung ist auch, eingebunden in einen Synthesecyclus mit Cofaktorregenerierung und angewendet auf andere Substrate, mit immobilisierten Enzymen durchgeführt worden<sup>[2]</sup>. Die Kombination von Transferase und Epimerase in löslicher Form bildet aber einen guten Kompromiß zwischen Kosten einerseits sowie Vorbereitungszeit und Handhabbarkeit andererseits.

Das Glycokonjugat  $\beta$ -D-Galactopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)-2-acetamido-1-[(*N*-acetyl-1-methyl-4-L-aspartyl)amino]-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranose **6** tritt im Urin von Patienten auf, die an Aspartylglucosaminylurie leiden<sup>[6]</sup>. Der für den enzymatischen Galactosylierungsschritt benötigte Acceptor **5** wird in Anlehnung an *Hough* et al.<sup>[7]</sup> chemisch synthetisiert (Schema 2). Zunächst wird GlcNAc **3** (25 g, 113 mmol) mit Acetylchlorid zum peracetylierten  $\alpha$ -Chlorid **12a** umgesetzt. Dessen Substitution zum  $\beta$ -Azid **13a** gelingt phasentransferkatalytisch in Chloroform/Wasser. **13a** wird zum  $\beta$ -Amin **14a** reduziert, das sich mit *N*-Acetyl-L-asparaginsäure- $\alpha$ -methylester in einer Ethyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin-1-carboxylat(EEDQ)-unterstützten Reaktion kuppeln läßt. Die Des-*O*-acetylierung mit Natriummethanolat liefert das Aspartylglucosamin **5** (Ausb.: 20% über fünf Stufen bezogen auf **3**). Vor dem Galactosylierungsschritt muß **5** an Bio-Gel P2 gelchromatographisch gereinigt werden. Bei der enzymatischen Galactosylierung zu **6** wird wieder der Standardmethode gefolgt, wobei das Produkt im 0.1-mmol-Maßstab in 35% Ausbeute anfällt. Die erwartete  $\beta$ (1  $\rightarrow$  4)-Verknüpfung in **6** ist <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch belegt<sup>[3c]</sup>. Eine frühere chemische Synthese der vollständig entblockier-

### Arbeitsvorschrift

Eingegangen am 13. Juli 1989 [Z 3434]

3, 7512-17-6; 4, 32181-59-2; 5, 123883-46-5; 7, 35061-50-8; 8, 72358-28-2; 9, 123883-47-6; 10, 123883-48-7; 11, 7284-18-6; 12a, 3068-34-6; 12b, 7531-49-9; 13a, 6205-69-2; 13b, 29625-70-5; 14a, 4515-24-6; 14b, 29673-51-6; 15a, 123883-49-8; 15b, 123883-50-1; Ac-Asp-OMe, 4910-47-8; Chitin, 1398-61-4.

[1] a) H. Schachter, *Clin. Biochem.* 17 (1984) 3; b) N. Sharon, H. Lis, *Chem. Eng. News* 59 (13) (1981) 21; c) T. Feizi, *Nature (London)* 314 (1985) 53; d) J. A. Wilson, J. J. Shekel, D. C. Wiley, *ibid.* 289 (1981) 373; e) V. Gins-

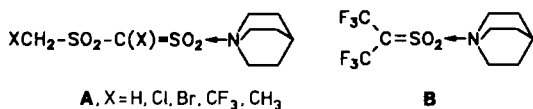
- burg, *Adv. Enzymol.* 36 (1972) 131; f) G. E. Edelman, *Spektrum Wiss.* 1984 (6) 62.
- [2] a) S. L. Haynie, C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* 47 (1982) 5416; b) C. Augé, S. David, C. Mathieu, C. Gautheron, *Tetrahedron Lett.* 25 (1984) 1467; c) J. Thiem, W. Treder, *Angew. Chem.* 98 (1986) 1100; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (1986) 1096.
- [3] Ausgewählte  $^1\text{H}$ -NMR-Daten (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ): a) **4**:  $\delta = 5.19$  (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 2.2$  Hz,  $\alpha$ -Form), 4.71 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 7.5$  Hz,  $\beta$ -Form), 4.46 (d, 1H, H-1',  $J_{1',2'} = 7.5$  Hz), 2.03 (s, 3H, NAc); b) **8**:  $\delta = 5.20$  (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 2.7$  Hz,  $\alpha$ -Form), 4.71 (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 8.1$  Hz,  $\beta$ -Form), 4.62 (d, 1H, H-1',  $J_{1',2'} = 7.9$  Hz), 4.48 (d, 1H, H-1'',  $J_{1'',2''} = 7.8$  Hz), 2.08 und 2.05 (je s, je 3H, je NAc); c) **6**:  $\delta = 5.06$  (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 9.4$  Hz), 4.49 (d, 1H, H-1',  $J_{1',2'} = 7.6$  Hz), 2.95 (dd, 1H,  $\beta$ -Asn,  $J_{\alpha,\beta} = 5.6$  Hz,  $J_{\beta,\gamma} = 17.1$  Hz), 2.82 (dd, 1H,  $\beta'$ -Asn,  $J_{\alpha,\beta'} = 7.6$  Hz); d) **10**:  $\delta = 5.09$  (d, 1H, H-1,  $J_{1,2} = 9.6$  Hz), 4.62 (d, 1H, H-1',  $J_{1',2'} = 8.1$  Hz), 4.47 (d, 1H, H-1'',  $J_{1'',2''} = 7.7$  Hz), 2.06, 2.02, 2.01 (je s, je 3H, je NAc).
- [4] H. A. Nunez, R. Barker, *Biochemistry* 21 (1982) 1421.
- [5] R. T. Lee, Y. C. Lee, *Carbohydr. Res.* 77 (1979) 270.
- [6] R. J. Pollitt, K. M. Pretty, *Biochem. J.* 141 (1974) 141.
- [7] D. E. Cowley, L. Hough, C. M. Peach, *Carbohydr. Res.* 19 (1971) 231.
- [8] M. A. E. Shaban, R. W. Jeanloz, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 54 (1981) 3570.
- [9] A. M. Leseney, R. Bourrillon, S. Kornfeld, *Arch. Biochem. Biophys.* 153 (1972) 831.
- [10] M. Spinola, R. W. Jeanloz, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 4158.
- [11] H. Kunz, H. Waldmann, *Angew. Chem.* 97 (1985) 885; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 883.

## Über die invers durch Amine stabilisierten Sulfene $\text{F}_2\text{C}=\text{SO}_2$ und $\text{FHC}=\text{SO}_2$ \*\*

Von Hans Pritzkow, Klaus Rall, Stefan Reimann-Andersen und Wolfgang Sundermeyer\*

Professor Gerhard Fritz zum 70. Geburtstag gewidmet

Trotz jahrzehntelanger Bemühungen mehrerer Arbeitsgruppen konnten bisher keine Sulfene  $\text{R}_2\text{C}=\text{SO}_2$  (Thion-S,S-dioxide) als  $\text{SO}_3$ -analoge Spezies isoliert<sup>[1]</sup>, sondern nur indirekt durch (Cyclo-)Additionen nachgewiesen werden. Doppelbindungen zwischen Kohlenstoff und Elementen der zweiten oder höherer Perioden konnten zum einen durch sterisch anspruchsvolle Substituenten, zum anderen durch Addition von Lewis-Basen an das Element mit dem größeren Atomradius stabilisiert werden. Ausgehend von einem früheren Hinweis auf die Stabilisierung von Sulfenen durch tertiäre Amine<sup>[2]</sup> gelang uns eine weitgehende Klärung der Bindungsverhältnisse in solchen Addukten am Beispiel der mit Chinuclidin als Base aminstabilisierten Sulfonylsulfene **A**<sup>[3,4]</sup>.

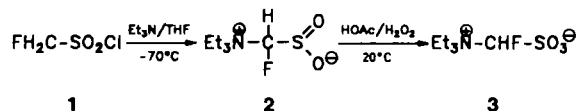


Röntgenstrukturanalysen ergaben, daß Chinuclidin unabhängig von der Art des Substituenten X am Sulfen-Kohlenstoffatom normal an das Schwefelatom mit einem Abstand, der größer als der einer S-N-Einfachbindung entsprechende ist, koordiniert und daß der C-S-Abstand mit 1.66 Å nahezu dem einer isolierten C-S-Doppelbindung gleicht. Noch deutlicher trifft dies auf das erste symmetrisch substituierte Sul-

fen **B** zu, das nicht unter den üblichen „sulfenbildenden Bedingungen“ ( $\alpha$ -H-Sulfonylhalogenid + Amin), sondern durch Aminolyse von 1,3-Diethietan-S-oxiden erhalten wurde<sup>[5]</sup>. Dies spricht dafür, daß zur Beschreibung der Elektronenverteilung in Sulfenen die mesomere Grenzstruktur  $\text{R}_2\text{C}^{\oplus}-\text{SO}_2^{\ominus}$ <sup>[6,7]</sup> mit dem Schwefelatom als elektrophile Zentrum wesentlich ist.

Nun gelang uns aber der endgültige Beweis dafür, daß Sulfene auch über das C-Atom (mesomere Grenzstruktur  $\text{R}_2\text{C}^{\oplus}-\text{SO}_2^{\ominus}$ ) stabilisiert werden können (inverse Aminstabilisierung). Einen ersten Hinweis auf einen elektrophilen Charakter des C-Atoms gab der Versuch, Dichlorsulfen zu synthetisieren, bei dem durch nucleophile Addition von Chlorid Trichlormethansulfonat entstand<sup>[8]</sup> (vgl. auch Nacharbeitungen<sup>[9,10]</sup>). Aus Fluormethansulfonylchlorid **1** hatten wir mit Trimethylamin bereits ein gemäß allen spektroskopischen

Daten invers aminstabilisiertes Sulfen  $\text{Me}_3\text{N}^{\oplus}-\text{CHF}-\text{SO}_2^{\ominus}$ <sup>[9]</sup>, jedoch keine für eine Röntgenstrukturanalyse geeigneten Kristalle erhalten. Während Chinuclidin ebenfalls invers addiert, das Produkt jedoch zersetzlich ist<sup>[3]</sup>, gelingt bei der Reaktion von **1** mit Triethylamin die Isolierung des Fluorsulfenaddukts **2** sowie dessen Kristallisation ( $\text{Fp} = 159^\circ\text{C}$  (Zers.)).



Im 84.7MHz- $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum von **2** tritt ein Dublett bei  $\delta = -164.8$  ( $^2J_{\text{HF}} = 46.6$  Hz) auf, und das 200MHz- $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum<sup>[11]</sup> zeigt die erwartete Diastereotopie der Methylenprotonen der Base als Hinweis auf die Addition an das Sulfen-C-Atom. Die Röntgenstrukturanalyse von **2**<sup>[11]</sup> belegt schließlich den Molekülbau (Abb. 1). Sowohl die C-N-Bindung mit 1.515 Å als auch die

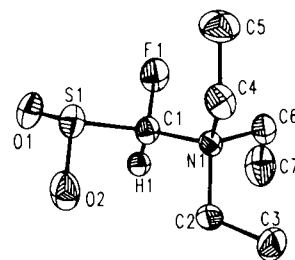


Abb. 1. Struktur von **2** im Kristall. Wichtige Abstände [Å] und Winkel [°]: S1-O 1.479(1), 1.485(1), S1-C1 1.904(1), C1-N1 1.515(2), C1-F1 1.370(2); O1-S1-O2 111.3(1), O1-S1-C1 96.7(1), O2-S1-C1 100.3(1), S1-C1-N1 117.9(1), S1-C1-F1 107.2(1), N1-C1-F1 107.1(1).

C-S-Bindung mit 1.904 Å sind länger als aus Literaturwerten für C-N- bzw. C-S-Einfachbindungen zu erwarten. Durch Oxidation mit Peressigsäure läßt sich **2** in das entsprechende Sulfonat **3** umwandeln<sup>[12]</sup>, das ebenso wie **2** durch Analyse und Massenspektrum charakterisiert wurde.

Auf einem gänzlich anderen Weg wurde das invers aminstabilisierte Difluorsulfen **5** erhalten: durch symmetrische Ringspaltung von Tetrafluor-1,3-dithietan-1,1,3,3-tetroxid **4** mit Triethylamin<sup>[13]</sup>.

Im 84.7MHz- $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum zeigt **5** ein Singulett bei  $\delta = -99.6$  ( $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ). Die Röntgenstrukturanalyse

[\*] Prof. Dr. W. Sundermeyer, Dr. H. Pritzkow, Dipl.-Chem. K. Rall, Dipl.-Chem. S. Reimann-Andersen  
Anorganisch-chemisches Institut der Universität  
Im Neuenheimer Feld 270, D-6900 Heidelberg 1

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