

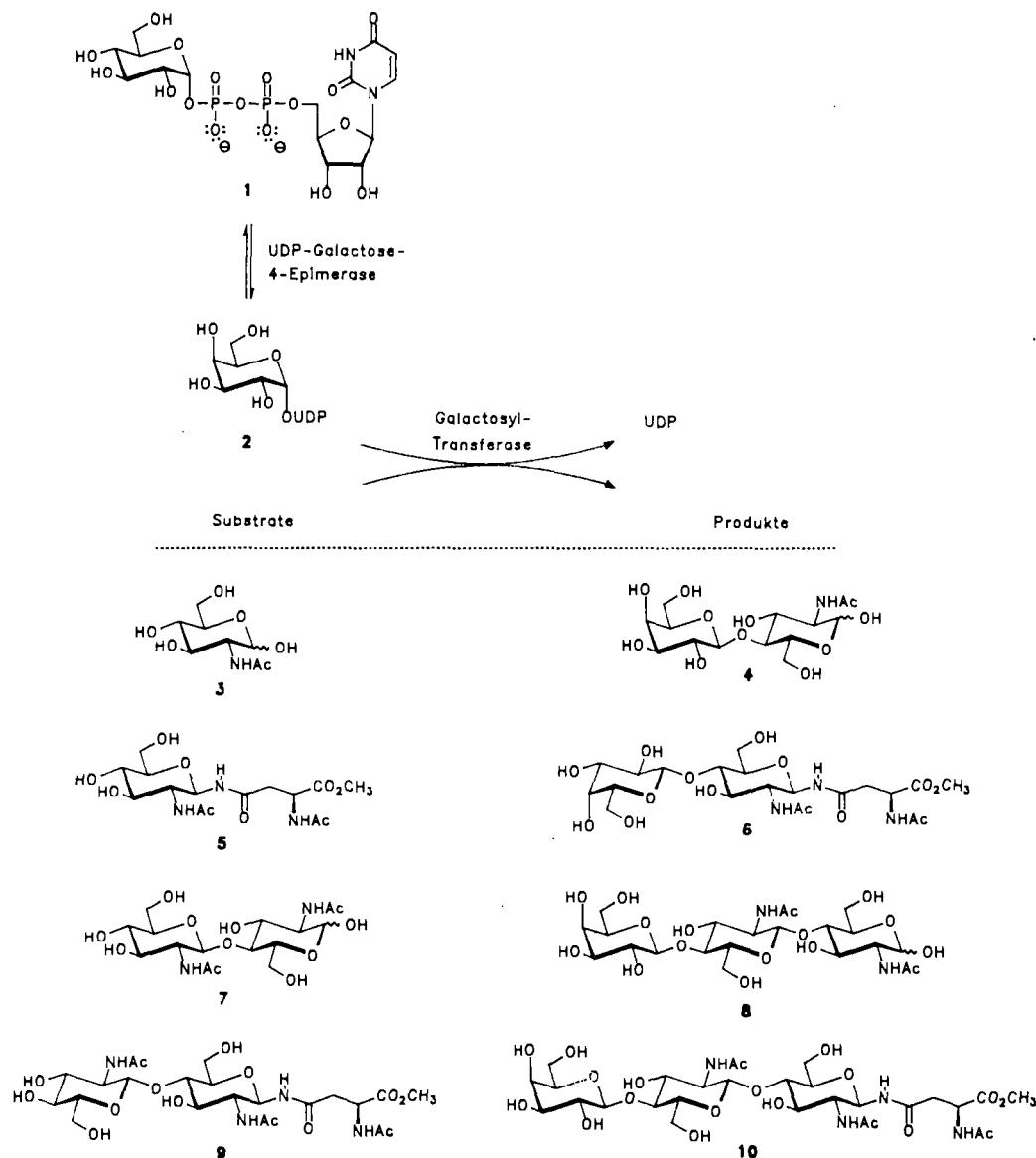
## Kombinierte chemoenzymatische Synthese von *N*-Glycoproteinbausteinen \*\*

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- $\beta$ (1  $\rightarrow$  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.

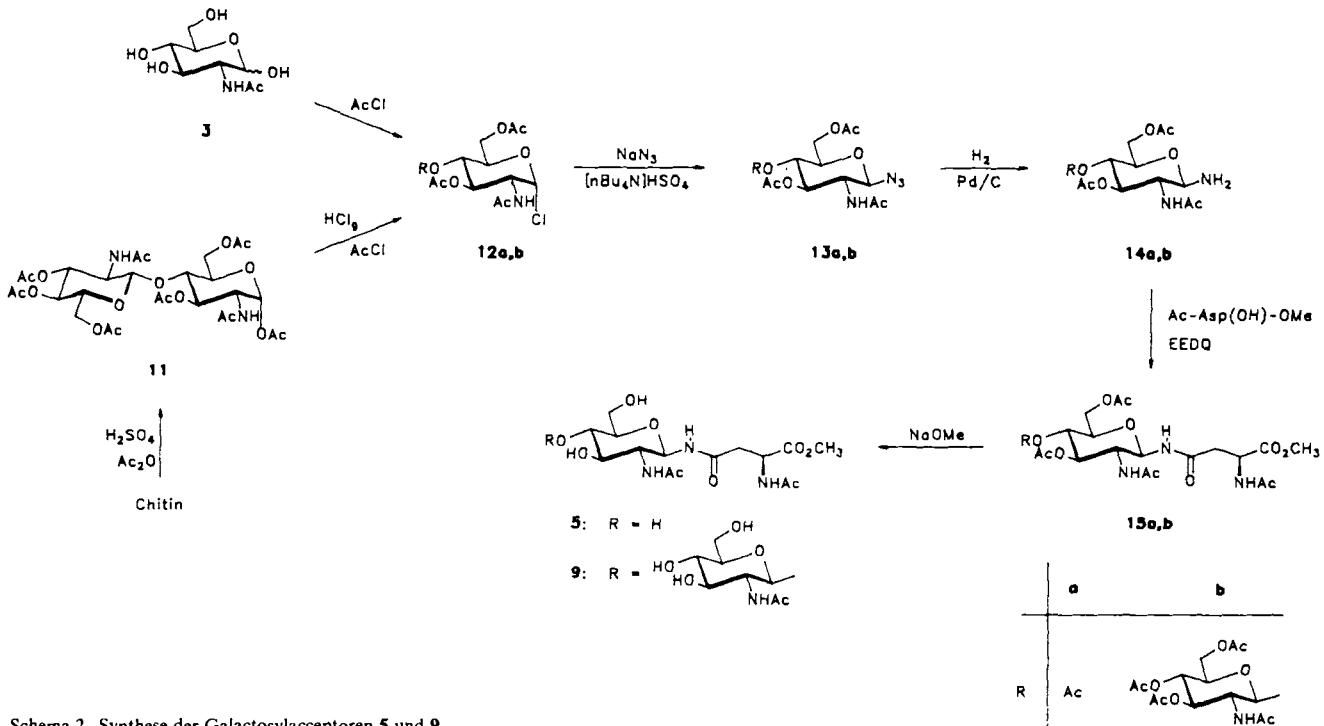
Daher findet die Bereitstellung von Vergleichssubstanzen für die Untersuchung dieser hochspezifischen Phänomene großes Interesse. Ursache der genannten Erkennungsprozesse auf molekularer Ebene ist die außerordentliche Vielfalt an Verknüpfungsmöglichkeiten von Monosacchariden; diese

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.



Schema 2. Synthese der Galactosylaceptoren 5 und 9.

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 Transf erase und Epimerase in löslicher Form bildet aber einen guten Kompromiß zwischen Kosten einerseits sowie Vorbereitungszeit und Handhabbarkeit andererseits.

Durch Galactosylierung von *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) 3 (280 mg, 0.43 mmol) bzw. *N,N'*-Diacetylchitobiose 7 (10 mg, 24 µmol) in der beschriebenen Weise erhält man *N*-Acetyllactosamin 4 (46 mg, 28%)<sup>[13a]</sup>, die zentrale Disaccharideinheit vieler Glycoproteine, bzw. das Trisaccharid 8 (8 mg, 60%)<sup>[13b]</sup>. Beide können auch ausgehend von UDP-Gal synthetisiert werden<sup>[4]</sup> sowie im Falle von *N*-Acetyl-lactosamin 4 im Synthesecyclus mit Cofaktorregenerierung<sup>[2]</sup>. Die ältere chemische Synthese von 4 halten wir dagegen wegen der höheren Stufenzahl für wesentlich aufwendiger<sup>[15]</sup>.

Das Glykonjugat β-D-Galactopyranosyl-(1 → 4)-2-acetamido-1-[(*N*-acetyl-1-methyl-4-L-aspartyl)amino]-2-desoxy-β-D-glucopyranose 6 tritt im Urin von Patienten auf, die an Aspartylglucosaminuria 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 α-Chlorid 12a umgesetzt. Dessen Substitution zum β-Azid 13a gelingt phasentransferkatalytisch in Chloroform/Wasser. 13a wird zum β-Amin 14a reduziert, das sich mit *N*-Acetyl-L-asparaginsäure-α-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 β(1 → 4)-Verknüpfung in 6 ist <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch belegt<sup>[13c]</sup>. Eine frühere chemische Synthese der vollständig entblockier-

ten Form von 6 durch Jeanloz et al. erforderte sechzehn Schritte<sup>[8]</sup>.

Das Glycopeptid 10 ist wahrscheinlich die Rezeptorstelle für Robinia-Lectin auf der Erythrocytenoberfläche<sup>[9]</sup>. Die Synthese des an Asparagin gebundenen Trisaccharids erfordert vorher wiederum die chemische Synthese des Galactosylaceptors 9, die in Anlehnung an Jeanloz et al.<sup>[10]</sup> und Kunz et al.<sup>[11]</sup> vorgenommen wird. Chitin lässt sich durch Acetylyse in ein Oligomerengemisch spalten, aus dem flash-chromatographisch α-Octaacetylchitobiose 11 (10%) isoliert werden kann. Das Octaacetat 11 (4.5 g, 6.7 mmol) wird mit trockenem Chlorwasserstoff in das α-Chlorid 12b übergeführt, das in Anlehnung an die Synthese von 5 zum β-Azid 13b umgesetzt, zu 14b reduziert und anschließend EEDQ-unterstützt mit *N*-Acetyl-L-asparaginsäure-α-methylester zu 15b gekuppelt wird. Nach Des-*O*-acetylierung wird das freie Disaccharid 9 (295 mg, 18% über fünf Stufen bezogen auf 11) an Bio-Gel P2 gereinigt und anschließend in die enzymatische Galactosylierung eingesetzt. Die Synthese des Asparagin-gebundenen Trisaccharids 10 gelingt im 50-µmol-Maßstab in 28% Ausbeute<sup>[13d]</sup>.

#### Arbeitsvorschrift

Enzymatische Galactosylierung von 3, 5, 7 und 9: Die Reaktion wird in Natriumcacodylatpuffer (25 mM, pH 7.7) in Anwesenheit von Manganchlorid (5 mM) durchgeführt. Nach Zugabe von UDP-Glucose 2 (13 mM), Acceptor (13 mM) und Rinderserumalbumin (1 mg mL<sup>-1</sup>) wird die Lösung mit Stickstoff desoxygениert. Anschließend werden Galactosyl-Transferase (EC 2.4.1.22, 1 U) und UDP-Galactose-4-Epimerase (EC 5.1.3.2, 10 U) zugefügt. Nach zwei Tagen bei 37 °C arbeitet man mit Anionenaustauscher auf und reinigt die Produkte 4, 6, 8 bzw. 10 durch Gelchromatographie an Bio-Gel P2.

Eingegangen am 13. Juli 1989 [Z 3434]

#### CAS-Registry-Nummern:

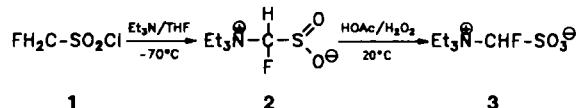
3, 7512-17-6; 4, 32181-59-2; 5, 123883-46-5; 7, 35061-50-8; 8, 72358-28-2; 9, 123883-47-6; 10, 123883-48-7; 11, 7284-18-6; 12a, 3068-34-6; 12b, 7531-49-9; 13a, 6205-69-2; 13b, 29625-70-5; 14a, 4515-24-6; 14b, 29673-51-6; 15a, 123883-49-8; 15b, 123883-50-1; Ac-Asp-OMe, 4910-47-8; Chitin, 1398-61-4.

[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. I. Shekel, D. C. Wiley, *ibid.* 289 (1981) 373; e) V. Gins-

- burg, *Adv. Enzymol.* 36 (1972) 131; f) G. E. Edelmann, *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, 1 H, H-1,  $J_{1,2} = 2.2$  Hz,  $\alpha$ -Form), 4.71 (d, 1 H, H-1,  $J_{1,2} = 7.5$  Hz,  $\beta$ -Form), 4.46 (d, 1 H, H-1',  $J_{1',2'} = 7.5$  Hz), 2.03 (s, 3 H, NAc); b) **8**:  $\delta = 5.20$  (d, 1 H, H-1,  $J_{1,2} = 2.7$  Hz,  $\alpha$ -Form), 4.71 (d, 1 H, H-1,  $J_{1,2} = 8.1$  Hz,  $\beta$ -Form), 4.62 (d, 1 H, H-1',  $J_{1',2'} = 7.9$  Hz), 4.48 (d, 1 H, H-1",  $J_{1',2'} = 7.8$  Hz), 2.08 und 2.05 (je s, je 3 H, je NAc); c) **6**:  $\delta = 5.06$  (d, 1 H, H-1,  $J_{1,2} = 9.4$  Hz), 4.49 (d, 1 H, H-1',  $J_{1',2'} = 7.6$  Hz), 2.95 (dd, 1 H,  $\beta$ -Asn,  $J_{\alpha,\beta} = 5.6$  Hz,  $J_{\beta,\beta'} = 17.1$  Hz), 2.82 (dd, 1 H,  $\beta'$ -Asn,  $J_{\alpha,\beta} = 7.6$  Hz); d) **10**:  $\delta = 5.09$  (d, 1 H, H-1,  $J_{1,2} = 9.6$  Hz), 4.62 (d, 1 H, H-1',  $J_{1',2'} = 8.1$  Hz), 4.47 (d, 1 H, H-1",  $J_{1',2'} = 7.7$  Hz), 2.06, 2.02, 2.01 (je s, je 3 H, 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.

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

Nun gelang uns aber der endgültige Beweis dafür, daß Sulfene auch über das C-Atom (mesomere Grenzstruktur  $\overset{\oplus}{\text{R}_2\text{C}}-\overset{\ominus}{\text{SO}_2}$ ) 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  $\text{Me}_3\overset{\oplus}{\text{N}}-\text{CHF}-\overset{\ominus}{\text{SO}_2}$ <sup>[9]</sup>, jedoch keine für eine Röntgenstrukturanalyse geeigneten Kristalle erhalten. Während Chinuclidin ebenfalls invers addiert, das Produkt jedoch zersetzt ist<sup>[13]</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 Diastereotropie 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

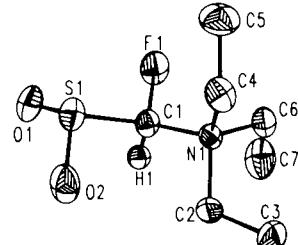


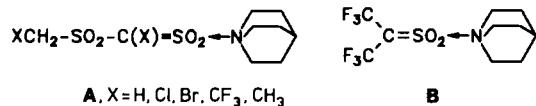
Abb. 1. Struktur von **2** im Kristall. Wichtige Abstände [Å] und Winkel [ $^\circ$ ]: S1-O 1.479(1), 1.485(1), S1-C1 1.904(1), C1-N1 1.515(2), C1-F1 1.370(2); O1-O2 111.3(1), O1-S1-C1 96.7(1), O2-S1-C1 100.3(1), S1-C1-N1 117.9(1), S1-C1-F1 107.2(1), N1-C1-F1 107.1(1).

## 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  $\text{R}_2\overset{\oplus}{\text{C}}=\overset{\ominus}{\text{SO}_2}$  (Thion-S,S-dioxide) als  $\text{SO}_3$ -analoge Spezies isoliert<sup>[11]</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-

\* 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 (Schwerpunktsprogramm) und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

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 Disfluorsulfen **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  $\delta = -99.6$  (( $\text{CD}_3$ )<sub>2</sub>SO). Die Röntgenstrukturanalyse