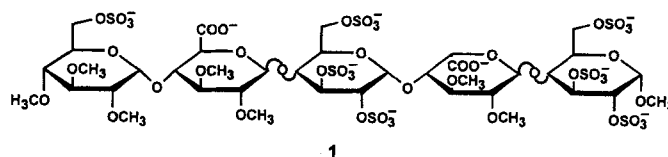


- W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 7188; j) W. J. Albery, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* **1982**, 1579; k) R. Breslow, A. Graff, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10988; l) J. Wolfe, A. Muehldorf, J. Rebek, Jr., *ibid.* **1991**, *113*, 1453; m) B. Siegel, A. Pinter, R. Breslow, *ibid.* **1977**, *99*, 2309.
- [7] J. A. Gerlt, J. W. Kozarich, G. L. Kenyon, P. G. Gassman, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9667.
- [8] a) P. Renaud, M. A. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5705; b) A. J. Kresge, *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 213; c) Y. Chiang, A. J. Kresge, *Science* **1991**, *253*, 395; d) B. Zeng, R. M. Pollack, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3838.
- [9] a) J.-M. Lehn, *Pure Appl. Chem.* **1979**, *51*, 979; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1986**, *471*, 41; *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 91; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 89; b) C. Sirlin, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **2** **1984**, 5.
- [10] B. Dietrich, M. W. Hosseini, J.-M. Lehn, R. B. Sessions, *Helv. Chim. Acta* **1983**, *66*, 1262.
- [11] a) A. Bianchi, M. Micheloni, P. Paoletti, *Coord. Chem. Rev.* **1991**, *110*, 17; b) E. Kimura, *Top. Curr. Chem.* **1985**, *128*, 113.
- [12] Übersichtsartikel: M. W. Hosseini, *Bioorg. Chem. Front.* **1993**, *3*, 67.
- [13] a) B. Dietrich, M. W. Hosseini, J.-M. Lehn, R. B. Sessions, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1282; b) M. W. Hosseini, J. M. Lehn, *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69*, 587; c) *ibid.* **1988**, *71*, 749.
- [14] R. J. Motekaitis, A. E. Martell, *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 5534.
- [15] Kristallstruktur des Hexahydrochlorids von 1: S. Boudon, A. DeCian, J. Fischer, M. W. Hosseini, J.-M. Lehn, G. Wipff, *J. Coord. Chem.* **1991**, *23*, 113.
- [16] Ionisierungskonstanten  $pK_a = 2.63$  und  $5.27$  [14].
- [17] Der Reaktionsverlauf wurde anhand der Integration des  $CH_2$ -Signals bei  $25 \pm 3^\circ C$  verfolgt. Der Austausch jedes Protons und der Isotopeneffekt des zuerst eingeführten D-Atoms auf den Austausch des zweiten Protons sind untersucht worden [19]. Da wir den Austausch beider Protonen verfolgten, sind die vorliegenden Werte eine untere Grenze für die Geschwindigkeitskonstante des H/D-Austauschs. Zwischen dem Mischen der Proben und der Aufnahme der Spektren vergingen 1 bis 5 Minuten. Die Konzentration, der pH-Wert und die Temperatur sind in den Legenden zu den Abbildungen angegeben. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von sehr kleinen Mengen an konzentrierter wäßriger Salzsäure oder Natronlauge eingestellt.
- [18] Es war nicht möglich, Messungen unter Sättigungsbedingungen durchzuführen, da die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten  $k_{obs}$  zu groß waren, um mit den verwendeten NMR-Methoden bestimmt werden zu können. Der festgestellte Faktor von ca. 100 zwischen dem Verhältnis  $k_{2M}/k_{1M}$  bei der Reaktion mit 1 und dem bei der mit 2 kann auch durch die Tatsache illustriert werden, daß  $k_{obs}$  mit 2 – bei gleicher Malonat-Konzentration (10 mM) – etwa ebenso groß ist (ca.  $260 \times 10^{-6} s^{-1}$ ) wie die mit 1 bei einer zwanzigfach kleineren Konzentration ( $10^{-4} M$  gegenüber  $10^{-3} M$  bei 2), d. h. unter Bedingungen, die für 2 viel weiter von der Sättigung entfernt sind als für 1.
- [19] E. W. Hansen, P. Ruoff, *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 2641.
- [20] Es konnte gezeigt werden, daß  $Cl^-$ -Ionen mit protonierten Polyaminen stabile Komplexe bilden (M. W. Hosseini, J. P. Kintzinger, J. M. Lehn, A. Zahidi, *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 1078) und daß  $Na^+$ -Ionen mit Protonen bei der Wechselwirkung mit dem Polyamin konkurrieren können [13c].
- [21] Dieser Makrocyclus ist im Rahmen anderer Arbeiten synthetisiert worden; A. Marquis-Rigault, J.-M. Lehn, unveröffentlichte Ergebnisse; ein anderer Zugang wurde beschrieben [22].
- [22] T. Shimada, M. Kodera, H. Okawa, S. Kida, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1992**, 1121.
- [23]  $[2] = 10^{-4} M$ ,  $[Malonat] = 2.5 \times 10^{-3} - 10^{-2} M$ . Lineweaver-Burk-Darstellung (6 Wertepaare,  $r = 0.996$ ).
- [24] N. Kyritsakas, J. Fischer, H. Fenniri, J.-M. Lehn, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [25] Geschwindigkeitserhöhung beim Protonentransfer zu einem Enolether durch einen katalytischen Antikörper: J. L. Reymond, G. K. Jahangiri, C. Stoudt, R. A. Lerner, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3909.
- [26] J. Wolf, A. Castero, J. Rebek, Jr., *Israel J. Chem.* **1992**, *32*, 97.
- [27] H. Fenniri, C. Dallaire, J.-M. Lehn, unveröffentlichte Ergebnisse.

## Synthese von maßgeschneiderten Glykokonjugaten, die AT-III-vermittelt die Blutgerinnungsfaktoren Xa und Thrombin inhibieren \*\*

Pieter Westerduin, Jan E. M. Basten, Marc A. Broekhoven, Vera de Kimpe, Will H. A. Kuijpers und Constant A. A. van Boeckel\*

Das sulfatierte Glycosaminoglycan Heparin bindet mit hoher Affinität an das Plasmaprotein Antithrombin III (AT III) und erhöht dadurch dessen Inhibitoraktivität gegenüber Faktor Xa und Thrombin, zwei an der Blutgerinnung beteiligten Serin-Proteasen<sup>[1, 2]</sup>. Die AT-III-bindende Region des Heparins besteht aus einer besonderen Pentasaccharid(PS)-Domäne<sup>[3, 4]</sup>, deren synthetisches Äquivalent zwar ebenfalls die AT-III-vermittelte Inhibition von Faktor Xa fördert, nicht jedoch die von Thrombin<sup>[5, 6]</sup>. Im Rahmen eines Programms zur Herstellung von PS-Analoga<sup>[7, 8]</sup> wurden die molekularen Grundlagen der spezifischen Bindung von PS an AT III aufgeklärt und ein räumliches Modell der Wechselwirkungen zwischen PS und AT III entworfen<sup>[9, 10]</sup>. Darüber hinaus wurden leicht zugängliche, sehr wirksame O-sulfatierte/O-methylierte PS-Analoga wie 1 identi-



fiziert<sup>[11–13]</sup>. Als nächstes war das Konzept der AT-III-vermittelten Inhibition von Faktor Xa durch PS hinsichtlich der Synthese von Derivaten mit sowohl Anti-Faktor-Xa- als auch Anti-Thrombin-Aktivität zu erweitern.

Für die AT-III-vermittelte Inhibition von Thrombin wird ein Heparinfragment mit einer Länge von mindestens 18 Saccharidresten benötigt<sup>[14]</sup>, das AT III und Thrombin an derselben Polysaccharidkette binden kann („Brücken“- oder „Templat“-Mechanismus)<sup>[15]</sup> (Abb. 1). Für die Bildung des ter-

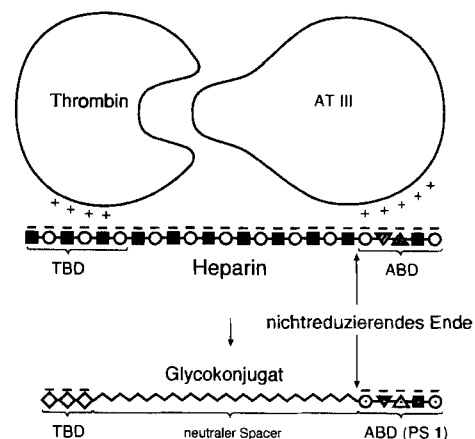


Abb. 1. Schematische Darstellung des Heparin/AT-III/Thrombin-Komplexes, die zum Konzept der synthetischen Heparin-Analoga wie der Glykokonjugate I–VI führte.

[\*] Prof. Dr. C. A. A. van Boeckel, Dr. P. Westerduin, J. E. M. Basten, M. A. Broekhoven, V. de Kimpe, Dr. Ir. W. H. A. Kuijpers  
Department of Medicinal Chemistry, N. V. Organon  
PO Box 20, NL-5340 BH Oss (Niederlande)  
Telefax: Int. + 412/662546

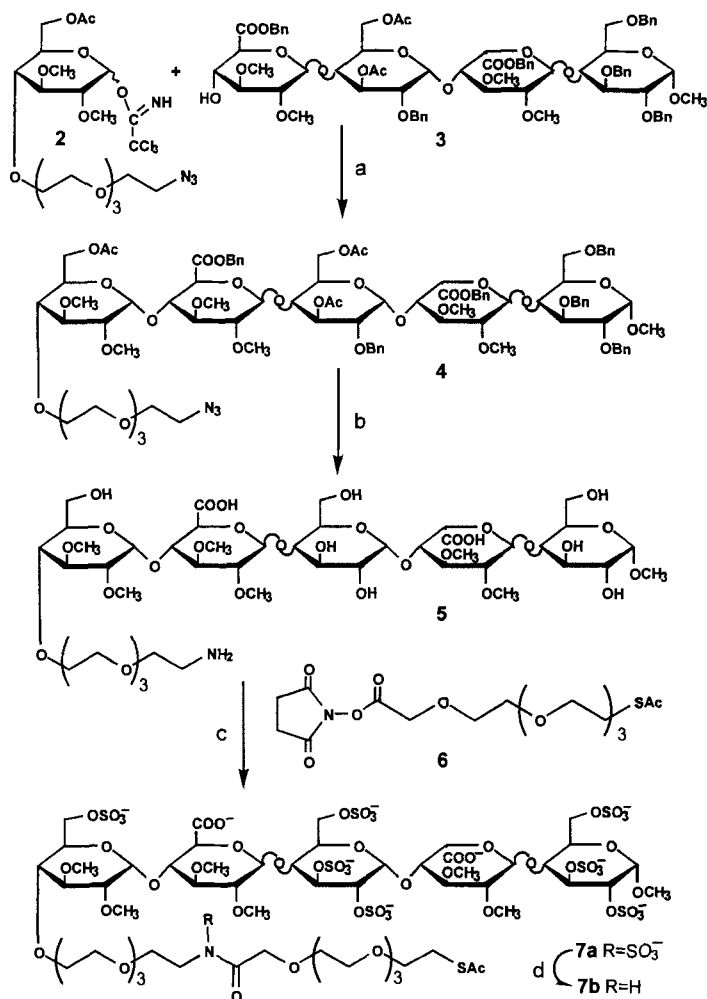
[\*\*] Diese Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Sanofi Recherche, Frankreich, durchgeführt. Wir danken Dr. M. Petitou (Sanofi Recherche) für hilfreiche Diskussionen, T. G. van Dinther und E. van As (N. V. Organon) für die Bestimmung der biologischen In-vitro-Aktivitäten sowie Dr. P. A. van Veelen (N. V. Organon) für die MALDI-MS-Messungen.

nären Heparin/AT III/Thrombin-Komplexes muß jene besondere PS-Sequenz spezifisch mit AT III sowie ein anderes beliebiges sulfatiertes Oligosaccharidfragment der Heparinkette weniger spezifisch mit Thrombin wechselwirken<sup>[15,16]</sup>. Nach unserem gegenwärtigen Modell für den ternären Komplex aus Heparin, AT III und Thrombin können Heparin-Analoga möglicherweise dadurch erhalten werden, daß ein Thrombin-bindendes Oligosaccharid über einen Spacer aus ca. 50 Atomen mit dem nichtreduzierenden Ende des AT-III-bindenden Pentasaccharids verknüpft wird (Abb. 1)<sup>[17]</sup>. Dementsprechend wurde das Glykokonjugat **1** (siehe Schema 3) synthetisiert, das aus dem AT-III-bindenden PS **1** (AT-III-bindende Domäne, ABD), einem linearen Spacer und einem persulfatierten Maltotriosid-Rest besteht (Thrombin-bindende Domäne, TBD). Um ein Pentasaccharid (ABD) mit einem funktionalisierten molekularen Spacer am nichtreduzierenden Ende zu erhalten, müssen im wesentlichen die folgenden Syntheseschritte durchgeführt werden (Schema 1): a) Glycosylierung des Tetrasaccharid-Acceptors **3** mit 6-*O*-Acetyl-4-*O*-(11-azido-3,6,9-trioxaundecan)-2,3-di-*O*-methyl-D-glucopyranosyl-trichloracetimidat **2** zum 1-Azidotetraethylenglycol-substituierten, geschützten Pentasaccharid **4**<sup>[18]</sup> und b) Verknüpfung der Aminogruppe in **5** mit dem thioacetylsubstituierten bifunktionellen Spacer **6** sowie anschließende O-Sulfatierung.

Zur Synthese des Donors **2** wurde Methyl-6-*O*-benzyl-2,3-di-*O*-methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid<sup>[19]</sup> mit Tetraethylenglycolditosylat bei 40 °C in DMF in Gegenwart von Natriumhydrid umgesetzt. Anschließend wurde Natriumazid zu der Reaktionsmischung gegeben und diese auf 70 °C erwärmt. Durch nachfolgende Acetolyse mit 1 proz. schwefeliger Säure in Essigsäureanhydrid bei -20 °C sowie Behandlung mit Piperidin und Trichloracetonitril/Caesiumcarbonat wurde der Glycosyl-Donor **2** in einer Gesamtausbeute von 30% gebildet.

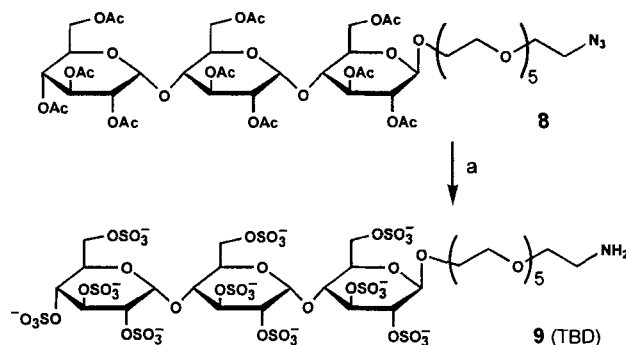
Die Kupplung von **2** an **3** mit Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf) bei -20 °C lieferte nach Reinigung das  $\alpha$ -verknüpfte Pentasaccharid **4** in 65% Ausbeute (Schema 1). Durch gleichzeitige Hydrierung der Benzylester, Benzylether und der Azidgruppe von **4** sowie anschließende Verseifung erhielt man das Pentasaccharid **5** (75% Gesamtausbeute), über dessen Aminofunktion der bifunktionelle Spacer **6** angebunden werden kann. Dieser wurde ausgehend von Tetraethylenglycol in einer siebenstufigen Synthese erhalten: 1) Monosilylierung (*tert*-Butyldimethylsilylchlorid/NaH in DMF), 2) Einführung eines Methylencarbonsäureesters (NaH/*tert*-Butylbromacetat in DMF), 3) Desilylierung (Tetrabutylammoniumfluorid), 4) Tosylierung (Tosylchlorid, Pyridin, 20 h, Raumtemperatur), 5) Substitution des Tosylats durch Thioacetat (KSAc/Aceton, 18 h, Raumtemperatur), 6) Spaltung des *tert*-Butylesters (Trifluoressigsäure in Dichlormethan) und 7) Aktivierung der Carboxygruppe (Diisopropylcarbodiimid/*N*-Hydroxysuccinimid) lieferten **6** in 20% Gesamtausbeute. Durch Kupplung von **5** an **6** wurde nach Sulfatierung mit dem Triethylamin/Schwefeltrioxid-Komplex in DMF bei 50 °C eine Mischung aus **7a** und **7b** erhalten. HPL-chromatographisch und massenspektrometrisch wurde nachgewiesen, daß die Amidgruppe im Spacer zu ca. 65% unter Bildung von **7a** sulfatiert worden war. Dieses Problem ließ sich leicht beheben: Mit 0.2 N Salzsäure wurde bei 0 °C die Amidsulfatgruppe (ohne Spaltung einer O-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Bindung) selektiv und quantitativ desulfatiert und so das Produktgemisch quantitativ zum gewünschten ABD-Rest **7b** umgesetzt.

Damit der Spacer des Glykokonjugats insgesamt aus einer Kette von ca. 50 Atomen besteht, sollte das polysulfatierte Maltotriosid-Fragment (TBD) einen Spacer aus ca. 25 Atome aufweisen. Dieser sollte eine thiophile Gruppe zur Kupplung an die Thiolfunktion in **7b** nach Entfernung der Acetylenschutzgruppe



Schema 1. a) TMSOTf, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4-Å-Molekularsieb, 1 h, -20 °C (65%); b) Pd/C, H<sub>2</sub>, DMF, H<sub>2</sub>O, HOAc, 24 h und 0.3 M NaOH, CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 1/1, 4 h (75%); c) H<sub>2</sub>O, DMF, *N*-Methylmorpholin, 15 min (80%); Et<sub>3</sub>N·SO<sub>3</sub>, DMF, 50 °C, 16 h; d) 0.2 N HCl, 24 h, 0 °C (100%).

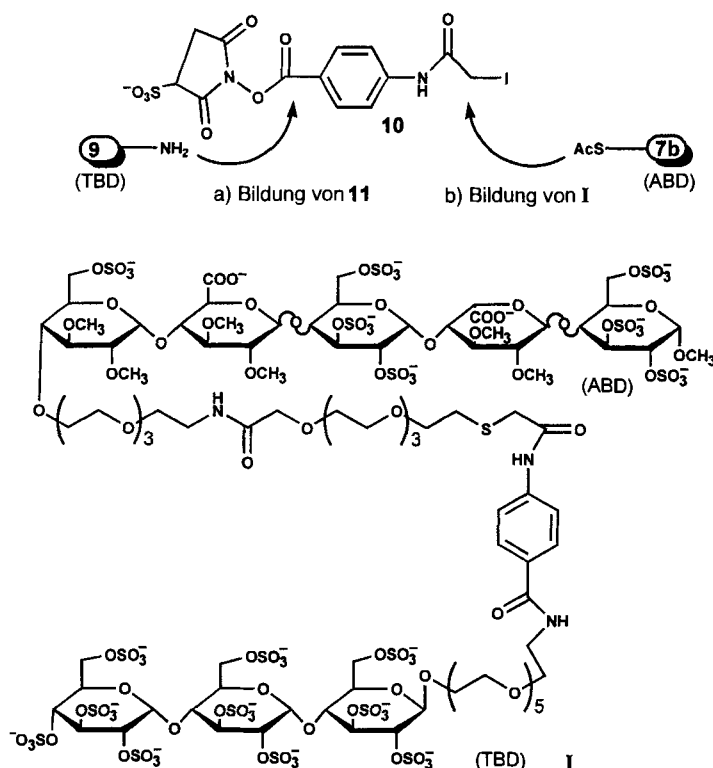
enthalten. Dementsprechend wurde peracetyliertes Maltotriose-Trichloracetimidat<sup>[20]</sup> TMSOTf-unterstützt an 1-Azido-17-hydroxy-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecan<sup>[21]</sup> unter Bildung des 1-Azidoheptaethylenglycolglycosids **8** gekuppelt. Verseifung, Sulfatierung und katalytische Hydrierung lieferten das polysulfatierte Maltotrisaccharid-1-Aminoheptaethylenglycol-derivat **9** in 55% Ausbeute (Schema 2), aus dem durch Kondensation mit



Schema 2. a) KOtBu, MeOH, 6 h; Et<sub>3</sub>N·SO<sub>3</sub>, DMF, 50 °C, 16 h; Pd/C, H<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, HOAc, 24 h (55%).

Sulfosuccinimidyl(4-iodoacetyl)benzoat **10** (sulfo-SIAB) der TBD-Rest **11** in 70% Ausbeute nach Reinigung durch G-15-Gelausschluß-Chromatographie erhalten wurde (Schema 3).

Die ABD- und TBD-Komponente wurden in einem Schritt verknüpft (Schema 3): Eine Lösung von **7b** (ABD) und **11**



Schema 3. a) sulfo-SIAB (**10**), DMF/H<sub>2</sub>O (70%); b) **7b** und **11**, 0.1 M wäßrige Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung (pH = 7.5), 0.05 M NH<sub>2</sub>OH·HCl-Lösung, 4 h (65%).

(TBD) in 0.1 M Natriumhydrogenphosphat-Puffer (pH 7.5) wurde mit 0.05 M Hydroxylamin unter Argon behandelt und nach G-50-Gelausschluß-Chromatographie das Konjugat **I** in 65% Ausbeute und in exzellenter Reinheit erhalten, wie mit <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie<sup>[22]</sup> und Umkehr-UV-Kapillar-Elektrophorese ( $[\alpha]_D^{21}(\text{I}) = 40.1$  ( $c = 1$  in Wasser)) bestätigt wurde. Zusätzlich wurde die Identität von **I** eindeutig durch matrixunterstützte Laserdesorption/ionisations(MALDI)-Massenspektrometrie belegt<sup>[23, 24]</sup>.

Die ABD- und TBD-Fragmente des Glykokonjugats **I** sind über einen 53 Atome langer Spacer verknüpft, wodurch sie im Hinblick auf die Länge einem Heparinfragment mit ca. 18 Saccharid-Einheiten ähneln. Tatsächlich weist **I** eine beträchtliche Anti-Thrombin-Aktivität auf (Tabelle 1), wodurch belegt wird, daß die Synthese von großen, komplexen Heparin-analogen Oligosacchariden durch Anwendung der hier vorgestellten Spacer-Methode elegant und effizient umgangen werden kann. Um die Voraussetzungen für die Bindung von TDB an Thrombin zu untersuchen, wurden auch ein Disaccharid und ein Pentasaccharid (Cellobioseheptasulfat und Maltopentaosehexadecasulfat) synthetisiert und wie für **I** beschrieben an ABD **7b** gebunden, wodurch die ABD-TBD-Konjugate **II** ( $[\alpha]_D^{21} = 24.8$  ( $c = 1$  in Wasser)) bzw. **III** ( $[\alpha]_D^{21} = 30.6$  ( $c = 0.4$  in Wasser)) erhalten wurden.

Als weiteres stellte sich uns die Frage, ob das AT-III-bindende Pentasaccharid auch als Thrombin-bindende Domäne fungieren kann. Für diesbezügliche Untersuchungen sollten symmetri-

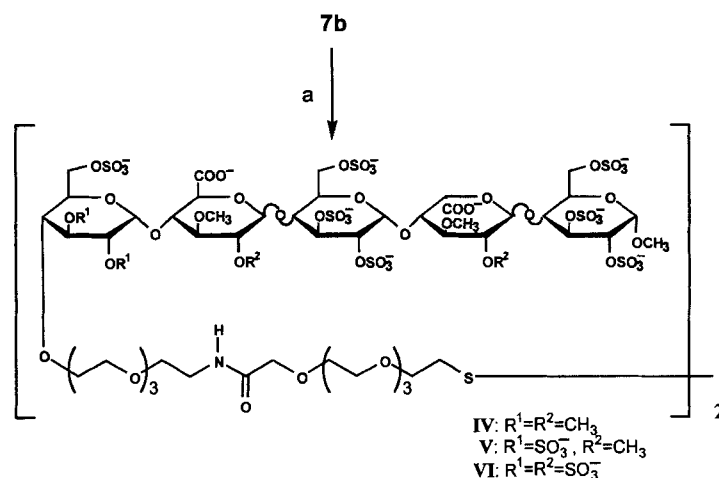
Tabelle 1. AT-III-vermittelte Anti-Xa- und Anti-Thrombin-in-vitro-Aktivitäten der Glykokonjugate **I–VI** sowie die von PS **1** und Heparin.

Verbindung	TBD-Einheit[a]	Anti-Xa-Aktivität [U mg <sup>-1</sup> ]	Anti-Thrombin-Aktivität [U mg <sup>-1</sup> ]	Anti-Xa-/Anti-Thrombin-Aktivität
<b>I</b>	Maltotriose (10)	490	64	7.6
<b>II</b>	Cellobiose (7)	740	10	74
<b>III</b>	Maltopentaose (16)	280	330	0.9
<b>IV</b>	TBD = ABD (7)	770	14	55
<b>V</b>	TBD = ABD (9)	640	36	18
<b>VI</b>	TBD = ABD (11)	280	160	1.75
PS <b>1</b>	–	1600	–	∞
Heparin	Oligosaccharid	160	160	1

[a] In Klammern ist jeweils die Zahl der Sulfatgruppen an der TBD-Einheit angegeben.

sche Pentasaccharid-Konjugate (z.B. **IV**) geeignet sein, die sich durch oxidative Kupplung eines Thiois wie **7b** nach Entfernen der Acetylenschutzgruppe herstellen lassen sollten.

Tatsächlich gelang die Dimerisierung des funktionalisierten Pentasaccharids **7b** zum symmetrischen Konjugat **IV** in einem Schritt mit Hydroxylamin in Gegenwart von Sauerstoff (Schema 4). Die Ausbeute nach G-50-Gelausschluß-Chromatogra-



Schema 4. a) 0.1 M wäßrige Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung (pH = 7.5), 0.05 M NH<sub>2</sub>OH·HCl-Lösung, O<sub>2</sub>-Strom, 16 h (90%).

phie betrug dabei 90%. Die Identität von **IV** ( $[\alpha]_D^{21} = 46.9$  ( $c = 1$  in Wasser)) konnte <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch und MALDI-massenspektrometrisch zweifelsfrei belegt werden<sup>[25]</sup>. Die Konjugate **V** ( $[\alpha]_D^{21} = 42.9$  ( $c = 1$  in Wasser)) und **VI** ( $[\alpha]_D^{21} = 31.6$  ( $c = 0.82$  in Wasser)) wurden wie für **IV** beschrieben synthetisiert.

Die Konjugate **I–VI** wurden in vitro auf AT-III-vermittelte Anti-Xa- und Anti-Thrombin-Aktivität getestet und die Ergebnisse mit denen mit Heparin und PS **1** verglichen (Tabelle 1). Die Konjugate weisen gute bis starke AT-III-vermittelte Anti-Xa- und Anti-Thrombin-Aktivitäten auf.

Es zeigt sich eindeutig, daß eine Erhöhung der Ladung im TBD-Rest zu einer höheren Anti-Thrombin-Aktivität führt. Es steht also nun eine chemische Methode zur Verfügung, um Anti-Xa- und Anti-Thrombin-Aktivität in ein synthetisches Glykokonjugat einzuführen, d. h. es sollten so maßgeschneiderte Antithrombotica hergestellt werden können.

Eingegangen am 4. September 1995 [Z8366]

**Stichworte:** Antithrombotica · Enzyminhibitoren · Heparin

- [1] B. Casu, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1985**, 43, 51.
- [2] *Heparin: Chemical and Biological Properties; Clinical Applications* (Hrsg.: D. A. Lane, U. Lindahl), Edward Arnold, London, **1989**.
- [3] J. Choay, J. C. Lormeau, M. Petitou, P. Sinaÿ, J. Fareed, *Ann. NY Acad. Sci.* **1981**, 370, 644.
- [4] L. Thunberg, G. Backstrom, U. Lindahl, *Carbohydr. Res.* **1982**, 100, 393.
- [5] J. Choay, M. Petitou, J. C. Lormeau, P. Sinaÿ, B. Casu, G. Gatti, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, 116, 492.
- [6] G. M. T. Vogel, D. G. Meuleman, F. G. M. Bourgondien, P. M. J. Hobbelen, *Thromb. Res.* **1989**, 54, 399.
- [7] M. Petitou, C. A. A. van Boeckel in *Progress in the Chemistry of Natural Products*, Vol. 60 (Hrsg.: W. Hertz, G. W. Kirby, C. Tamm), Springer, Berlin, **1992**, S. 143.
- [8] C. A. A. van Boeckel, M. Petitou, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 1741; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 1671.
- [9] P. D. J. Grootenhuys, C. A. A. van Boeckel, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 2743.
- [10] C. A. A. van Boeckel, P. D. J. Grootenhuys, A. Visser, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, 1, 423.
- [11] J. Basten, G. Jaurand, G. Olde-Hanter, P. Duchaussoy, M. Petitou, C. A. A. van Boeckel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, 2, 905.
- [12] H. Lucas, J. E. M. Basten, P. Konradsson, C. A. A. van Boeckel, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 462; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 434.
- [13] P. Westerduin, C. A. A. van Boeckel, J. E. M. Basten, M. A. Broekhoven, H. Lucas, A. Rood, H. van der Heijden, R. G. M. van Amsterdam, T. G. van Dinther, D. G. Meuleman, A. Visser, G. M. T. Vogel, J. B. L. Damm, G. T. Overklift, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, 2, 1267.
- [14] D. L. Lane, J. Denton, A. M. Flynn, L. Thunberg, U. Lindahl, *Biochem. J.* **1984**, 218, 725.
- [15] S. T. Olson, I. Björk, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 6353.
- [16] S. T. Olson, H. R. Halvarson, I. Björk, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 6342.
- [17] P. D. J. Grootenhuys, P. Westerduin, D. Meuleman, M. Petitou, C. A. A. van Boeckel, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, 2, 736.
- [18] Zur Glycosylierung mit Imidaten siehe: R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 213; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 212.
- [19] P. J. Garegg, H. Hultberg, *Carbohydr. Res.* **1981**, 93, C10.
- [20] Nach Standardvorschriften in drei Stufen aus kommerziell erhältlichlicher Maltotriose hergestellt.
- [21] Nach der für 1-Azido-11-hydroxy-3,6,9-trioxaundecan beschriebenen Methode hergestellt: C. R. Bertozzi, M. D. Bednarski, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 4326.
- [22] I: <sup>1</sup>H-NMR (Bruker-BRX-400-Spektrometer, 400 MHz, D<sub>2</sub>O, 300 K, δ(HOD) = 4.76): ABD-Einheit 1 (reduzierendes Ende): δ = 5.19 (d, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 4.0 Hz, H-1), 4.20 (m, H-2), 4.69 (m, H-3), 4.01 (m, H-4), 4.08 (m, H-5), 4.4 (m, H-6, H-6'); ABD-Einheit 2: 5.39 (br. s, 1 H, H-1), 3.56 (m, H-2), 3.85 (m, H-3), 4.19 (m, H-4), 4.87 (d, 1 H, J<sub>4,5</sub> = 3 Hz, H-5); ABD-Einheit 3: 5.44 (d, 1 H, d, J<sub>1,2</sub> = 4.0 Hz, H-1), 4.62 (t, 1 H, J<sub>2,3</sub> = 9.0 Hz, H-3), 4.06 (m, H-4), 4.21 (m, H-5); ABD-Einheit 4: 4.71 (d, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 6.0 Hz, H-1), 3.29 (dd, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 6.0 Hz, J<sub>2,3</sub> = 7.0 Hz, H-2), 3.57 (m, H-4), 3.75 (m, H-5); ABD-Einheit 5 (nichtreduzierendes Ende): 5.49 (d, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 3.0 Hz, H-1), 3.35 (dd, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 3.0 Hz, J<sub>2,3</sub> = 7.0 Hz, H-2), 3.57 (m, H-3), 3.48 (t, 1 H, J = 7 Hz, H-4), 3.89 (m, H-5); TBD-Einheit 1 (reduzierendes Ende): 4.99 (d, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 5.0 Hz, H-1), 4.54 (t, 1 H, J = 5 Hz, H-2), 4.18 (m, H-4), 4.62 (m, H-5); TBD-Einheit 2: 5.57 (d, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 4.0 Hz, H-1), 4.69 (m, H-2), 4.95 (dd, 1 H, J = 6, 7 Hz, H-3), 4.18 (m, H-4); TBD-Einheit 3: 5.67 (d, 1 H, J<sub>1,2</sub> = 4.0 Hz, H-1), 4.95 (m, H-3), 4.63 (m, H-4); Spacer: 2.63 (AB, 2 H, J = 40, 16 Hz, SCH<sub>2</sub>C(O)), 2.92 (t, 2 H, J = 6.0 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S).
- [23] Zur MALDI-massenspektrometrischen Untersuchung von Heparin-analogen Oligosacchariden siehe: P. Juhasz, K. Biemann, *Carbohydr. Res.* **1995**, 270, 131.
- [24] MALDI-Massenspektrum des gemischten Konjugats I (Vision-2000-Spektrometer, (Arg-Gly)<sub>10</sub> als basisches Peptid für die Bildung des ionischen Komplexes, 3-Hydroxypicolinsäure als Matrix): ber. für (I + 2(Arg-Gly)<sub>10</sub> + H<sup>+</sup>): 7971, gef. 7972 [(M + 2(Arg-Gly)<sub>10</sub> + H<sup>+</sup>)].
- [25] Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des symmetrischen Konjugats IV ist nahezu identisch zu dem der Vorstufe 7b (und dem des ABD-Kohlenhydrat-Teils von I[22]), mit Ausnahme des Triplets für CH<sub>2</sub>S: δ(7b) = 3.26 (t, CH<sub>2</sub>Sac); δ(IV) = 2.79 (t, CH<sub>2</sub>SSCH<sub>2</sub>) (Bruker-BRX-400-Spektrometer, 400 MHz, D<sub>2</sub>O, 300 K, δ(HOD) = 4.76); MALDI-Massenspektrum des symmetrischen Konjugats IV (Vision-2000-Spektrometer, (Arg-Gly)<sub>10</sub> als basisches Peptid für die Bildung des ionischen Komplexes, 3-Hydroxypicolinsäure als Matrix): MH<sup>+</sup> (IV + 2(Arg-Gly)<sub>10</sub> + H<sup>+</sup>): gef. 8180, ber. 8181.2.

## Stabile, hochungesättigte Glyceride – enzymatische Synthese mit einer Carotinoidsäure\*\*

Vassilia Partali, Lise Kvittingen, Hans-Richard Sliwka\* und Thorleif Anthonsen

Das große Interesse an hochungesättigten langkettigen Glyceriden in der Medizin und Nahrungsmittelindustrie führte zur Entwicklung mehrerer Anreicherungs- und Synthesemethoden<sup>[1–4]</sup>. Die Glyceridester ungesättigter Fettsäuren wie Icosapentaensäure (C20:5), Docosahexaensäure (C22:6) und der konjugierten Ajenonsäuren (C12:5, C14:5) sind allerdings mindestens ebenso instabil wie ihre Fettsäuren und können deshalb allenfalls bei tiefen Temperaturen unter Schutzgas oder mit Stabilisatoren, z.B. Carotinoiden, gehandhabt werden<sup>[4–6]</sup>.

Die Synthese stabiler, hochungesättigter Glyceride muß daher aufbauen auf stabilen, hochungesättigten Fettsäuren. Die etwa 25 in geringer Konzentration natürlich vorkommenden Carotinoidsäuren erfüllen beide Anforderungen<sup>[7]</sup>. Eine dieser Säuren, 8'-Apo-β-carotinsäure (C30:9), ist ein stabiles, Vitamin-A-aktives Carotinoid, das als Ethylester (C30-Ester) **2** (siehe Schema 1) auch kommerziell erhältlich ist<sup>[8,9]</sup>.

Glyceride mit Carotinoiden als Fettsäure sind bisher in der Natur nicht gefunden worden, obwohl man die natürlich vorkommende Säure des Esters **2** als eine dehydrogenierte Form der ebenfalls natürlich vorkommenden verzweigten Fettsäuren betrachten kann<sup>[8,10]</sup>.

Wir erwarten, daß die Carotinoidglyceride **3**, **4**, **6**, **7** die vielfältigen physiologischen Wirkungen der Fettsäuren und der Carotinoide vereinen<sup>[11–13]</sup>. Carotinoidglyceride dürften besser absorbiert werden und daher erhöhte pharmakologische Wirkungen zeigen als freie Carotinoide, die selbst mit Fettsäuren verestert nur unvollkommen von Mensch und Tier aufgenommen werden<sup>[14–16]</sup>. Die Carotinoidfette **6**, **7** sind polyfunktionelle Glyceridderivate, in denen der antioxidative Carotinoidteil als intramolekularer Stabilisator für die ungesättigten Fettsäureacylgruppen im Molekül wirken kann, während gleichzeitig die Fettsäureacylgruppen die Absorption des Carotinoids erleichtern<sup>[17]</sup>. Wir berichten hier über die Synthese der ersten stabilen hochungesättigten, konjugierten Glyceride.

Konventionelle Glyceridsynthesen (Umesterung, direkte Synthese) erschienen als Zugang zu diesen Verbindungen weniger geeignet, da der Carotinoidester **2**, wie allgemein Carotinoide, unter den Reaktionsbedingungen (hohe Temperatur oder Säuren) zerstört wird<sup>[18,19]</sup>. Die konjugierten Mono-, Di- und Triconononylglycerin-Derivate **3**, **4**, **6**, **7** wurden deshalb mit Hilfe enzymatischer Katalyse hergestellt (Schema 1), einer Methode, die bisher in der Carotinoidchemie noch wenig Anwendung gefunden hat<sup>[20–22]</sup>.

Die Verbindungen **3** und **4** wurden durch Veresterung, die Fette **6** und **7** durch Umesterung erhalten. Glycerin **1** und der C30-Ester **2** reagierten in Decalin bei 30–37 °C mit *Candida Antartica*-B(CAB)-Lipase bei reduziertem Druck in 43 % Ausbeute zu den Mono- und Diglyceriden **3** und **4** in etwa gleichen

[\*] Dr. H.-R. Sliwka  
Norges Teknisk Naturvitenskapelige Universitet  
Institutt for Organisk Kjemi-NTH  
N-7034 Trondheim (Norwegen)  
Telefax: Int. +73 59 54 73  
E-mail: hrs@nvg.unit.no

Dr. V. Partali, Dr. L. Kvittingen, Dr. T. Anthonsen  
Norges Teknisk Naturvitenskapelige Universitet  
Kjemisk Institutt-AVH

[\*\*] Wir bedanken uns für Diskussionen zur Enzymkatalyse, für NMR- und Massenspektren sowie für technische Unterstützung bei P. Halling, H. Anthonsen, B. Olsrød, A. Melbye und S. Liaaen-Jensen.