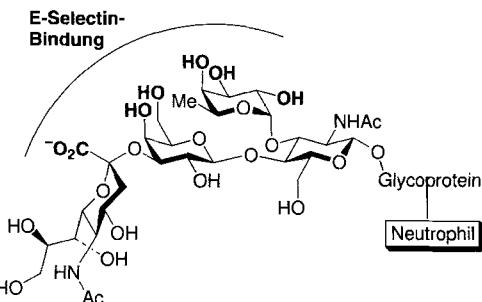


- [9] Silylsubstituierte Allenyllithiumverbindungen: E. J. Corey, C. Rücker, *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 719; R. C. Hartley, S. Lamothe, T. H. Chan, *ibid.* **1993**, 34, 1449.
- [10] Einige chelatisierte Lithiumreagentien racemisierten intramolekular [6f]: G. Fraenkel, K. V. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 10336.
- [11] Zur Stereodynamik anderer Allenyl/Propargyllithiumverbindungen siehe Lit. [1, 5]; R. W. Hoffmann, J. Lanz, R. Metternich, G. Tarara, D. Hoppe, *Angew. Chem.* **1987**, 99, 1196; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, 26, 1145; D. Hoppe, C. Gonschorrek, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 785; E. M. G. A. van Kruchten, A. Haces, W. H. Okamura, *ibid.* **1983**, 24, 3939; W. J. le Noble, D.-M. Chiou, Y. Okaya, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 7743.
- [12] Propargylliganden in Übergangsmetallkomplexen können auch π -komplexiert sein: P. W. Blosser, J. C. Galucci, A. Wojciecki, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 2994. Diese Cp₂Zr-Propargylverbindungen weisen C_c-Verschiebungen zwischen 99 und 120 ppm auf: C. P. Casey, C. S. Yi, *ibid.* **1992**, 114, 6597.
- [13] Die thermodynamischen Parameter wurden durch Zuordnen eines δ -Wertes für C_c von 165 für das Allenyl-(8-A) und von 98 für das Propargylisomer (8-P) abgeschätzt. Eine prinzipielle Unsicherheit in den thermodynamischen Parametern ergibt sich aus der Abschätzung des δ -Wertes für Allenyl-C_c, der von 191.5 für monomeres Allenyllithium [6b, 7a] bis zu 162 für 6 reicht.
- [14] Als interessantes Beispiel, bei dem verstärkte Solvatisierung eine stärker lokalisierte Lithiumkoordination ergibt, siehe I. Hoppe, M. Marsch, K. Harms, G. Boche, D. Hoppe, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 2328; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 2158.
- [15] Die 1,3-Verschiebung ist wahrscheinlich intramolekular, da nahe verwandte Verbindungen wie 6 eine C-Li-Kopplung bis zu viel höheren Temperaturen beibehalten. Die Li-C-Kopplung bei 9 war nicht gut aufgelöst.
- [16] Geschätzt nach Daten aus J. F. McGarrity, C. A. Ogle, Z. Brich, H.-R. Loosli, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 1810.
- [17] X. Creary, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 7632.

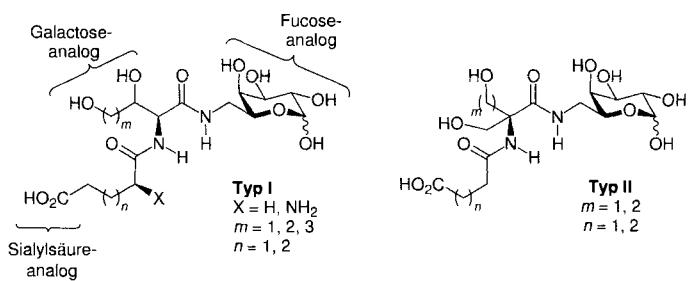
chemoenzymatischen Ansatz vereinfachten Synthese von SLe^x^[4] bleiben die Nachteile der hohen Produktionskosten und der geringen oralen Bioverfügbarkeit bestehen, weshalb weiterhin und intensiver denn je nach einfacheren und günstigeren Mimeta gesucht wird. Wegen der schwachen Rezeptor-Ligand-Bindung konnte die Struktur dieser Komplexe nicht untersucht werden; lediglich die Kristallstruktur des freien E-Selectins wurde aufgeklärt^[5]. Daher wurden die für die Bindung zwischen SLe^x und den Selectinen notwendigen funktionellen Gruppen der SLe^x-Einheit anhand vieler einfacherer Struktur-Aktivitäts-Modelle bestimmt. Die 2-, 3- und 4-Hydroxygruppen der Fucose, die 4- und 6-Hydroxygruppen der Galactose sowie die negative Ladung des Carboxylatrestes der Sialylsäure von **1** haben sich als essentiell herausgestellt (Schema 1)^[6]. Anhand der Ergebnisse von Molekülmechanik-Rechnungen und analytischer Daten wurde für SLe^x die in Schema 1 gezeigt aktive Bindungskonformation vorgeschlagen^[7], welche als Grundlage für die Synthese von SLe^x-Mimeta dient^[8], und es gibt bereits mehrere Verbindungen, deren In-vitro-Aktivität der von SLe^x gleichkommt oder diese übersteigt.



Schema 1. Sialyl-Lewis^x; für die Bindung erforderlichen funktionellen Gruppen sind hervorgehoben.

Unter Verwendung der genannten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen haben wir mehrere SLe^x-Mimeta entworfen, von denen die meisten eine L-Fucoseeinheit enthielten, die am anomeren Zentrum mit einem geeigneten Spacer verknüpft war^[8b, d]. In der hier beschriebenen Reihe ist die L-Fucose durch L-Galactose ersetzt worden, um geeignete Dihydroxy- α -aminosäuren (**3–7**) an C6 anbinden zu können. Die Dihydroxyeinheiten dienen hierbei als Ersatz der 4- und 6-Hydroxygruppen der Galactose in SLe^x. Durch Anknüpfung einer passenden Alkylseitenkette mit einem terminalen Carboxylatrest wird die negative Ladung eingeführt, und es resultieren Verbindungen vom Typ **I** oder **II** (Schema 2).

Das Galactosamin **2** dient als zentrale Glycosideinheit in allen Mimeta und konnte einfach und in hoher Ausbeute aus L-Galactose hergestellt werden (Tabelle 1)^[9]. Die Aminosäuren **3–5** wurden mit Threonin-Aldolase nach einer von uns entwickelten



Schema 2. Zwei Typen der entwickelten Glycopeptidmimeta.

Synthese neuartiger 6-Amido-6-desoxy-L-galactose-Derivate als potente Sialyl-Lewis^x-Mimeta**

Michael W. Cappi, Wilna J. Moree, Lei Qiao, Thomas G. Marron, Gabriele Weitz-Schmidt und Chi-Huey Wong*

Auf Zelloberflächen befindliche Oligosaccharide sind hinsichtlich ihrer Strukturen hoch diversifiziert und an vielen Zellfunktionen beteiligt. Das terminale Fragment einiger Glycoproteine und -lipide, Sialyl-Lewis^x (SLe^x, Schema 1), ist eines dieser Kohlenhydrate. SLe^x fungiert als Ligand für mehrere Selectine, besonders für E-, L- und P-Selectin^[1]. Diese Adhäsionsrezeptoren spielen bei der frühen Wechselwirkung zwischen Leukozyten und dem vaskulären Endothelium eine Rolle^[2]. Die Bindung zwischen dem Selectin und dem zugehörigen Kohlenhydratganden scheint eine Voraussetzung für die Extravasation von Neutrophilen zu sein und hat einen entscheidenden Einfluß sowohl auf die Rezirkulation von Lymphozyten als auch auf die Plättchenadhäsion.

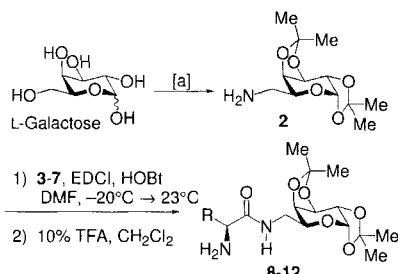
Zwar ist die Bindung zwischen SLe^x und den Selectinen unter Gleichgewichtsbedingungen sehr schwach, doch ist SLe^x in vielen Modellen für akute Krankheiten ein effektiver Entzündungshemmer und befindet sich zur Zeit in der zweiten klinischen Untersuchungsphase^[3]. Trotz der kürzlich durch einen

[*] Prof. C.-H. Wong, Dr. M. W. Cappi, Dr. W. J. Moree, Dr. L. Qiao, Dr. T. G. Marron
Chemistry Department, The Scripps Research Institute
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)
Telefax: Int. + 619/784-2409

Dr. G. Weitz-Schmidt
Präklinische Forschung, Sandoz Pharmaceuticals Ltd.
CH-4002 Basel (Schweiz)

[**] Diese Arbeit wurde von der National Science Foundation (USA), von Sandoz Pharmaceuticals Ltd. und von der NATO (Stipendium für W. J. M.) gefördert.

Tabelle 1. Kupplung der Aminosäuren 3–7 an das Galactosamin 2.



Aminosäure	Produkt	Ausb. [%]
3	8	59
4	9	75
5	10	74
6	11	57
7	12	57

[a] a) CuSO_4 , Aceton, H_2SO_4 , 88%; b) TsCl , Pyridin, 90%; c) NaN_3 , DMF, 115°C, 91%; d) H_2 (2.4 atm), Pd/C , MeOH , 100%; Boc = *tert*-Butoxycarbonyl; EDCI = *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid; HOBt = Hydroxybenzotriazol; Ts = $\text{MeC}_6\text{H}_4\text{SO}_2$.

Methode synthetisiert und als *N-tert*-Butoxycarbonyl(Boc)-Derivate eingesetzt^[10]. Die Aminosäuren 6 und 7 wurden jeweils in vier Stufen aus Serin^[11] bzw. 1-Hydroxy-4-benzoyloxy-2-butanon^[12] hergestellt.

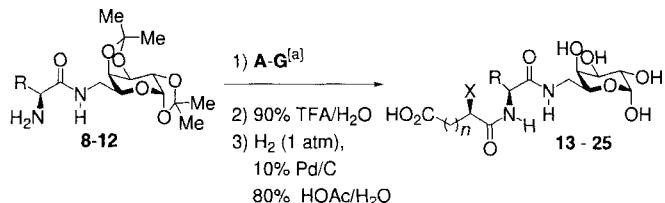
Die zentrale Amidbindung des Glycosylpeptids wurde effizient durch EDCI/HOBt-Kupplung geknüpft (Tabelle 1). Nach der Abspaltung der Boc-Gruppe konnte die Alkylseitenkette mit dem Carboxylatrest als Ersatz für die Sialylsäure eingeführt werden. Dazu wurden die Aminoglycoside 8–12 mit aktivierten Carbonsäuren zu den geschützten Mimetica in hohen Ausbeuten umgesetzt (Tabelle 2). Die saure Hydrolyse der Acetonide und die Hydrogenolyse der Benzylether lieferten die vollständig entschützten Mimetica 13–25, die chromatographisch an Biogel P2 mit Wasser als Eluens gereinigt und ¹H-NMR-spektroskopisch sowie durch hochauflösende Massenspektrometrie vollständig charakterisiert wurden (Tabelle 3).

Die Mimetica wurden in einem SLe^x-Glykokonjugat-Assay hinsichtlich ihrer Bindung an immobilisiertes, rekombinantes E-Selectin getestet^[13]. Die IC₅₀-Werte deuten darauf hin, daß die Aktivität von zwei voneinander unabhängigen Faktoren abhängt: von der als Galactosemimeticum verwendeten Aminosäure 3–7 und von der Alkylseitenkette mit dem Carboxylatrest. Die geringen Aktivitäten der Mimetica 13–15 sind ein Hinweis darauf, daß 3 ein ungeeigneter Ersatz für den Galactoserest ist. In fast allen Fällen erwies sich die Länge der Alkylseitenkette als entscheidend, wie anhand eines Vergleichs von 16, 22 und 24 mit 17, 23 bzw. 25 deutlich wird. Einige dieser Verbindungen sind mindestens ebenso aktiv wie SLe^x (19, 23–25); die Aktivität des Mimeticums 25 ist sogar doppelt so hoch wie die von SLe^x.

Eingegangen am 12. April 1996 [Z 9026]

Stichworte: Glycopeptide · Selectine · Sialyl-Lewis^x

Tabelle 2. Synthese der Glycopeptidmimetica 13–25.



Amin (P = Bn)	Kupplungs- methode [a]	R	n	X	Produkt (P = H)	Ausb. [%]	IC ₅₀ [mM]
8	A		1	H	13	52	10
8	B		2	H	14	50	10
8	C		1	NH ₂	15	65	10
9	A		1	H	16	49	inaktiv [b]
9	B		2	H	17	56	4.2 [b]
9	C		1	NH ₂	18	49	1 [b]
10	A		1	H	19	65	1 [c]
10	B		2	H	20	63	inaktiv [b]
10	C		1	NH ₂	21	50	1.5
11	D		1	H	22	68	inaktiv
11	E		2	H	23	53	0.3
12	F		1	H	24	45	0.3 [b]
12	G		2	H	25	29	0.2 [b]

[a] A) Bersteinsäureanhydrid, MeOH; B) Glutarsäureanhydrid, MeOH; C) EDCI, HOBr, DMF, N-Cbz-Benzylxyloxyasparaginsäure; D) $\text{BnO}_2\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{COCl}$, CH_2Cl_2 , Et_3N ; E) $\text{BnO}_2\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{COCl}$, CH_2Cl_2 , Et_3N ; F) EDCI, HOBr, DMF, $\text{BnO}_2\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$; G) EDCI, HOBr, DMF, $\text{BnO}_2\text{C}(\text{CH}_2)_3\text{CO}_2\text{H}$. [b] Aktivität des Aminosäure-3-Epimers. [c] Aktivität eines Epimers nach Diastereomerentrennung über Camphorsäureester und anschließender Hydrolyse. IC_{50} (SLe^x) = 0.5 mM. Cbz = Benzylxyacarbonyl.

Tabelle 3. Spektroskopische Daten von 13, 16, 19, 22 und 24.

13: ¹H-NMR (400 MHz, D_2O , 23°C, TMS, α/β = 1:1.3); δ = 5.18 (d, J = 3.4 Hz; H 1 α), 4.50 (d, J = 7.8 Hz; H 1 β), 4.38–4.35 (m; H 2' α/β), 4.05–4.02 (m; H 5 α , H 3' α), 3.96–3.93 (m; H 3' β), 3.88 (br. d, J = 3.4 Hz; H 4 α), 3.81 (d, J = 3.1 Hz; H 4 β), 3.80–3.77 (m; H 3 α), 3.75 (dd, J = 11.5, 3.6 Hz; H 2 α), 3.68–3.54 (m; H 3 β , H 5 β , C4'-H₂ α/β), 3.57–3.49 (m; H 2 β , C6-H₂ α/β), 3.40–3.30 (m; C6-H₂ α/β), 2.53 (m; C2'-H₂ α/β , C3'-H₂ α/β); HR-MS (–80 eV): m/z : gef. 397.1446 ($M + \text{H}^+$), ber. 397.1458

16: ¹H-NMR (400 MHz, D_2O , 23°C, TMS, α/β -Gemisch): δ = 5.23 (d, J = 3.5 Hz; H 1 α), 4.55 (dd, J = 7.9, 4.6 Hz; H 1 β), 4.40–4.35 (m; H 2' α/β), 4.30–4.27 (m; H 3' β), 4.11–4.05 (m; H 5 α , H 3' α), 3.92 (br. d, J = 2.8 Hz; H 4 α), 3.86 (d, J = 3.4; H 4 β), 3.83 (dd, J = 10.4, 3.2 Hz; H 3 α), 3.77 (dd, J = 10.4, 3.7 Hz; H 2 α), 3.76–3.68 (m; H 5 β , C4'-H₂ α/β), 3.62 (dd, J = 10.0, 3.4 Hz; H 3 β), 3.56–3.34 (m; H 2 β , C6-H₂ α/β), 2.61–2.40 (m; C2'-H₂ α/β , C3'-H₂ α/β) 1.82–1.69 (m; C4'-H₂ α/β); HR-MS (–80 eV): m/z : gef. 433.1447 ($M + \text{Na}^+$), ber. 433.1434

19: ¹H-NMR (400 MHz, D_2O , 23°C, TMS): δ = 5.20 (d, J = 3.6 Hz; H 1 α), 4.53–4.51 (m; H 1 β), 4.35–4.33 (m; H 2' α/β), 4.12–4.04 (m; H 5 α , H 3' α/β), 3.89 (br. s; H 4 α), 3.85–3.78 (br. s; H 3 α , H 4 β), 3.77–3.57 (m; H 2 α , H 3 β , H 5 β , C6-H₂ α/β), 3.51–3.33 (m; H 2 β , C6-H₂ α/β), 2.59–2.52 (m; C2'-H₂ α/β , C3'-H₂ α/β), 1.65–1.52 (m; C4'-H₂ α/β , C5'-H₂ α/β); HR-MS (–80 eV): m/z : gef. 447.1607 ($M + \text{Na}^+$), ber. 447.1591

22: ¹H-NMR (400 MHz, D_2O , 23°C, TMS): δ = 5.20 (d, J = 3.5 Hz; H 1 α), 4.52 (d, J = 7.8 Hz; H 1 β), 4.06–4.03 (m; H 5 α), 3.96–3.88 (m; H 4 α , 2 \times $\text{CH}_2\text{H}_\beta\text{OH}$ α/β), 3.82–3.79 (m; H 3 α , H 4 β , 2 \times $\text{CH}_2\text{H}_\beta\text{OH}$ α/β), 3.77 (dd, J = 10.2, 3.6 Hz; H 2 α), 3.66–3.63 (m; H 5 β), 3.59 (dd, J = 9.9, 3.2 Hz; H 3 β), 3.48–3.39 (m; H 2 β , C6-H₂ α/β), 3.36–3.29 (m; C6-H₂ α/β), 2.52 (br. s; C2'-H₂ α/β , C3'-H₂ α/β); MS (–80 eV): m/z : gef. 419 ($M + \text{Na}^+$), ber. 419

24: ¹H-NMR (400 MHz, D_2O , 23°C, TMS): δ = 5.20 (d, J = 3.3 Hz; H 1 α), 4.60–4.46 (m; H 1 β , C4'-H₂ α/β), 4.10–4.30 (m; H 2 α/β , H 3 α/β , H 4 α/β , H 5 β , C6-H₂ α/β , CH_3OH α/β), 2.69–2.50 (m; C2'-H₂ α/β , C3'-H₂ α/β), 2.19–1.98 (m; C3'-H₂ α/β); HR-MS (–80 eV): m/z : gef. 433.1448 ($M + \text{Na}^+$), ber. 433.1434

- [1] a) P. J. Green, T. Tamatani, T. Watanabe, M. Miyasaka, A. Hasegawa, M. Kiso, C. T. Yuen, M. S. Stoll, T. Feizi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *188*, 244; b) M. L. Phillips, E. Nudelman, F. C. A. Gaeta, M. Perez, A. K. Singhal, S. I. Hakomori, J. C. Paulson, *Science* **1990**, *250*, 1130; c) G. Walz, A. Aruffo, W. Kolanus, M. Bevilacqua, B. Seed, *ibid.* **1990**, *250*, 1132; d) J. B. Lowe, L. M. Stoolman, R. P. Nair, R. D. Larsen, T. L. Berhend, R. M. Marks, *Cell* **1990**, *63*, 475; e) C. R. Bertozzi, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 703; f) L. A. Lasky, *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 113.
- [2] E. Larsen, *Cell Adhesion*, 1. Aufl., CRC Press, Boca Raton, FL, **1995**, S. 203.
- [3] a) T. Murohara, J. Margiotta, L. M. Phillips, J. C. Paulson, S. DeFrees, S. Zalipsky, L. S. S. Guo, A. M. Lefer, *Cardiovasc. Res.* **1995**, *30*, 965; b) M. Buerke, A. S. Weyrich, Z. Zheng, F. C. A. Gaeta, M. J. Forrest, A. M. Lefer, *J. Clin. Invest.* **1994**, 1140.
- [4] Y. Ichikawa, Y.-C. Lin, D. P. Dumas, G.-J. Shen, E. Garcia-Junceda, M. A. Williams, R. Bayer, C. Ketcham, L. E. Walker, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9283.
- [5] B. J. Graves, R. L. Crowther, C. Chandran, J. M. Rumberger, S. Li, K.-S. Huang, D. H. Presky, P. C. Familietti, B. A. Wolitzky, D. K. Burns, *Nature* **1994**, *367*, 532.
- [6] a) A. Giannis, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 188; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 178; b) J. Y. Ramphal, Z.-L. Zheng, C. Perez, L. E. Walker, S. A. DeFrees, F. C. A. Gaeta, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3459; b) B. K. Brandley, M. Kiso, S. Abbas, P. Nikrad, O. Srivastava, C. Foxall, Y. Oda, A. Hasegawa, *Glycobiology* **1993**, *3*, 633; d) S. A. DeFrees, F. C. A. Gaeta, Y.-C. Lin, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *37*, 3459; e) C. T. Yuen, A. M. Lawson, W. Chai, M. Larkin, M. S. Stoll, A. C. Stuart, F. X. Sullivan, T. J. Ahern, T. Feizi, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9126.
- [7] a) K. Scheffler, B. Ernst, A. Katopodis, J. L. Magnani, W. T. Wang, R. Weismann, T. Peters, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2034; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1841; b) Y. Ichikawa, Y.-C. Lin, D. P. Dumas, G.-J. Shen, E. Garcia-Junceda, M. A. Williams, R. Bayer, C. Ketcham, L. E. Walker, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9283; c) G. E. Ball, R. A. O'Neill, J. E. Schultz, J. B. Lowe, J. B. W. Weston, J. O. Nagy, E. G. Brown, C. J. Hobbs, M. D. Bednarski, *ibid.* **1992**, *114*, 5449.
- [8] Neuere repräsentative Beispiele für SLe^x-Mimetica: a) A. A. Birkbeck, S. V. Ley, J. C. Prodrer, *Bior. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2637; b) T. Uchiyama, V. P. Vassilev, T. Kajimoto, W. Wong, H. Huang, C.-C. Lin, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5395; c) S. Hanessian, H. Prabhanjan, *Synlett* **1994**, 868; d) S.-H. Wu, M. Shimazaki, C.-C. Lin, L. Qiao, W. J. Moree, G. Weitz-Schmidt, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 106; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 88; e) T. P. Kogan, B. Dupre, K. M. Keller, I. L. Scott, H. Bui, R. V. Market, P. J. Beck, J. A. Voytus, B. M. Bevelle, D. Scott, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4976; f) T. Eisele, A. Toeper, G. Kretzschmar, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1389; g) G. Thoma, F. Schwarzenback, R. O. Duthaler, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 154; h) H. Ohmoto, K. Nakamura, T. Inoue, N. Kondo, Y. Inoue, K. Yoshimasa, H. Kondo, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasagawa, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1339; i) M. J. Bamford, M. Bird, P. M. Gore, D. S. Holmes, R. Priest, J. C. Prodrer, V. Saez, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 239; j) C. R. Bertozzi, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 703; k) U. Sprengard, M. Schudok, W. Schmidt, G. Kretzschmar, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 359; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 321.
- [9] J. A. May, A. C. Sartorelli, *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 971.
- [10] V. P. Vassilev, T. Uchiyama, T. Kajimoto, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4081.
- [11] a) T. T. Otani, M. Winitz, *Arch. Biochem. Biophys.* **1960**, *90*, 254; b) Y. Nakamura, A. Ito, C.-G. Shin, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1994**, *67*, 2151.
- [12] a) G. F. Hennion, F. P. Kupecki, *J. Org. Chem.* **1953**, *18*, 1601; b) G. Krüger in *Houben-Weyl: Methoden der Organischen Chemie*, Bd. E5 (Hrsg.: J. Falbe), Thieme, Stuttgart, **1995**, S. 504.
- [13] G. Weitz-Schmidt, D. Stokmaier, G. Scheel, N. E. Nifant'ev, A. B. Tuzikov, N. V. Bovin, *Anal. Biochem.* **1996**, *238*, 184.

Eine praktikable Synthese von N-Acetyl-D-lactosamin mit Galactose-Oxidase und β-Galactosidase**

Teiji Kimura, Shuichi Takayama, Hongmei Huang und Chi-Huey Wong*

Mit unserem wachsenden Verständnis der biologischen Rolle von Glycokonjugaten^[1] steigt auch das Bedürfnis für einen preiswerten Zugang zu synthetischen Oligosacchariden in größeren Mengen. N-Acetyl-D-lactosamin (Galβ1,4GlcNAc, LacNAc) und dessen Derivate sind besonders nützlich für das Studium von biologischen Erkennungsprozessen^[2] und waren das Ziel zahlreicher Synthese-Anstrengungen unter Einsatz von klassisch-chemischen^[3] sowie von enzymatischen Methoden^[4]. Chemische Synthesen sind zwar bekannt, doch sind sie meist mehrstufig und komplex. Eine β-1,4-Galactosyl-Transferase-katalysierte, hoch regioselektive und effiziente Reaktion mit In-situ-Regenerierung von UDP-Galactose ist für die Synthese von LacNAc in großem Maßstab entwickelt worden^[5]. Allerdings behindern die begrenzte Verfügbarkeit der Enzyme sowie deren hoher Preis und Instabilität den Einsatz dieser Methode^[6]. Die β-D-Galactosidase von *Bacillus circulans* ist ebenfalls zur Galβ1,4-Verknüpfung durch umgekehrte Hydrolyse und Transglycosylierung eingesetzt worden^[7]. Die Vorteile dieser Reaktion sind der geringe Preis des Enzyms, dessen hohe Stabilität und die einfachen Reaktionsbedingungen (Zuckernucleotide müssen nicht verwendet werden)^[8]. Die Nachteile bestehen darin, daß wegen der hydrolysierenden Wirkung des Enzyms die bisher erhaltenen Ausbeuten niedrig sind und die Zielverbindung nur schwer aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden kann, das weitere, sehr ähnliche Verbindungen enthält^[7-9]. Hier berichten wir, daß das *p*-Nitrophenylglycosid von 6-Oxo-D-galactose (in der die primäre OH-Gruppe der Galactose zur Aldehydfunktion oxidiert wurde) in der β-Galactosidase-katalysierten Reaktion als Donor verwendet werden kann und daß unter diesen Bedingungen die Transglycosylierung gegenüber der Hydrolyse kinetisch bevorzugt ist.

Schema 1 zeigt die durch β-Galactosidase katalysierte Reaktion. Bekanntermaßen^[10] werden mit Glycosyldonoren, die schlechte Abgangsgruppen aufweisen (z. B. Lactose), oft komplexe Produktgemische aus Mono-, Di- und Trisacchariden erhalten. Substrate mit guten Abgangsgruppen (z. B. *p*-Nitrophenylgalactosid) reagieren mit Glycosylacceptoren im Überschuß irreversibel, wobei die Sekundärhydrolyse und die weitere Glycosylierung des Transglycosylierungs- sowie des Hydrolyseproduktes und des Donors zurückgedrängt wird. Um herauszufinden, welcher Schritt der kinetisch kontrollierte ist, wurde der Einfluß des Acceptors auf die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion, v_0 , untersucht (Schema 2, Tabelle 1). Im Fall von *p*-Nitrophenylgalactosid, GalβOpNP 1, erhöhte sich die anhand des freigesetzten *p*-Nitrophenols gemessene Anfangsreaktionsgeschwindigkeit durch den Zusatz von Acceptor nicht (Nr. 1-3), obwohl die Transglycosylierungsausbeute von 14 auf 30 % stieg. Dies legt nahe, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes ist und daß das Verhältnis von Transglycosylierung zu Hydrolyse hauptsächlich

[*] Prof. Dr. C.-H. Wong, Dr. T. Kimura, Dipl.-Chem. S. Takayama, Dr. H. Huang
Chemistry Department, The Scripps Research Institute
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA (USA)
Telefax: Int. + 619/784-2409

[**] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health gefördert (GM44154). Wir danken Daiwa Kasei KK, Osaka (Japan), für Spenden an β-Galactosidase aus *Bacillus circulans*.