

Schema 2.

tion von Ethen-1,2-dithiolat und durch photochemische Reaktion von **1** sind mehrere Mechanismen plausibel, die derzeit untersucht werden.

### Experimentelles

Oxidation von *cis*-Dinatrium-ethen-1,2-dithiolat: Eine wäßrige Lösung (150 mL) von *cis*-Dinatrium-ethen-1,2-dithiolat [13] (2.78 g, 20.4 mmol) und Iod (5.18 g, 20.4 mmol) in 20%iger wäßriger Kaliumiodidlösung (150 mL) [14] wurden nacheinander unter intensivem Rühren innerhalb von 7 h bei  $-10^\circ\text{C}$  unter Stickstoff zu einem Gemisch aus Ether (300 mL) und Wasser (250 mL) gegeben. Nach einstündigem Rühren wurde nach Phasentrennung mit Ether extrahiert und der Extrakt mit 10%iger Natriumthiosulfatlösung und Wasser gewaschen. Nach Chromatographie an Cellulose (Chloroform) erfolgte die Trennung durch Gelpermeationschromatographie (GPC).

**1**: 254 mg (14%); Schmp.  $97.5\text{--}98.5^\circ\text{C}$  (gelbe Prismen);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6.88$  (s);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 127.6$ ; IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3010, 1515, 1170, 800, 650\text{ cm}^{-1}$ ; UV (Cyclohexan):  $\lambda = 357$  ( $\epsilon = 2.1 \times 10^3$ ),  $265$  ( $\epsilon = 2.4 \times 10^3$ ),  $235$  ( $\epsilon = 4.0 \times 10^3$ ) nm; EI-MS:  $m/z$  180 ( $M^+$ ), 147, 116, 90, 57; C,H-Analyse ber. für  $\text{C}_4\text{H}_4\text{S}_4$ : C 26.64, H 2.24; gef.: C 26.69, H 2.24.

Ein *meso*-Isomer von **2** (9.6 mg, 0.5%) konnte aus der Diastereomerenmischung durch Umkristallisation aus Chloroform isoliert werden: Schmp.  $127.5\text{--}128.5^\circ\text{C}$  (gelbe Prismen);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6.77$  (d, 2H,  $J = 9.5$  Hz),  $6.62$  (d, 2H,  $J = 9.5$  Hz),  $4.94$  (s, 2H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 126.5, 115.4, 56.1$ ; IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3030, 3020, 2905, 1540, 1125, 810\text{ cm}^{-1}$ ; UV (Cyclohexan):  $\lambda(\epsilon) = 325$  sh ( $1.4 \times 10^3$ ),  $247$  ( $6.1 \times 10^3$ ) nm; EI-MS:  $m/z$  271 ( $M^+ + 1$ ), 207, 180, 147, 135, 116, 90, 58; C,H-Analyse ber. für  $\text{C}_6\text{H}_6\text{S}_6$ : C 26.64, H 2.24; gef.: C 27.14, H 2.36.

**3**: 32 mg (2%); Schmp.  $150^\circ\text{C}$  (Zers., gelbe Prismen);  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6.48$  (s);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 131.7$ ; IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 3025, 1535, 1280, 1155, 910, 830, 730, 715\text{ cm}^{-1}$ ; UV (Cyclohexan):  $\lambda(\epsilon) = 243$  ( $2.8 \times 10^4$ ) nm; EI-MS:  $m/z$  360 ( $M^+$ ), 270, 180, 147, 116, 90, 58; C,H-Analyse ber. für  $\text{C}_8\text{H}_8\text{S}_8$ : C 26.64, H 2.24; gef.: C 26.76, H 2.29.

Eingegangen am 2. Mai 1996 [Z 9087]

**Stichworte:** Cyclisierungen · Polyene · Schwefelverbindungen · Synthesemethoden

- [1] R. Pauncz, D. Ginsburg, *Tetrahedron* **1960**, *9*, 40; N. L. Allinger, J. T. Sprague, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 5734; *Tetrahedron* **1975**, *31*, 21; O. Ermer, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 3964; D. N. J. White, M. J. Bovill, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1977**, 1610; W. R. Roth, O. Adamczak, R. Breuckmann, H.-W. Lennartz, R. Boese, *Chem. Ber.* **1991**, *124*, 2499.
- [2] C. G. Krespan, B. C. McKusick, T. L. Cairns, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 1515; C. G. Krespan, *ibid.* **1961**, *83*, 3434; T. S. Cameron, R. C. Haddon, S. M. Mattar, S. Parsons, J. Passmore, A. P. Ramirez, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1992**, 1563.
- [3] K. B. Borisenko, M. Broschag, I. Hargittai, T. M. Klapötke, D. Schröder, A. Schulz, H. Schwarz, I. C. Tornieporth-Oetting, P. S. White, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1994**, 2705.
- [4] Über die röntgenographische Charakterisierung des *meso*-Isomers von **2** wird getrennt berichtet. Das *meso*:*dl*-Isomerenverhältnis wurde  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch in  $\text{CDCl}_3$  ermittelt.
- [5] Kristallographische Daten von **1** (gelbe Prismen aus Hexan):  $\text{C}_4\text{H}_4\text{S}_4$ ,  $M_r = 180.34$ , Kristallabmessungen  $0.45 \times 0.30 \times 0.15\text{ mm}$ ,  $a = 8.092(2)$ ,  $b = 11.254(3)$ ,  $c = 7.674(2)\text{ Å}$ ,  $V = 698.9(4)\text{ Å}^3$ ,  $\rho_{\text{ber.}} = 1.71\text{ g cm}^{-3}$ ,  $\mu = 11.99\text{ cm}^{-1}$ ,  $Z = 4$ , orthorhombisch, Raumgruppe *Phen* (Nr. 60), Mac-Science-MXC18-Diffraktometer,  $\lambda = 0.71069\text{ Å}$ ,  $T = 296\text{ K}$ , 1528 gemessene Reflexe, 1262 symmetrieunabhängige,  $R = 0.042$ ,  $R_w = 0.055$ .

- [6] Kristallographische Daten von **3** (gelbe Prismen aus Chloroform):  $\text{C}_8\text{H}_8\text{S}_8$ ,  $M_r = 360.68$ , Kristallabmessungen  $0.35 \times 0.30 \times 0.20\text{ mm}$ ,  $a = 12.075(4)$ ,  $b = 11.566(8)$ ,  $c = 10.592(5)\text{ Å}$ ,  $\beta = 95.12(3)^\circ$ ,  $V = 1473(1)\text{ Å}^3$ ,  $\rho_{\text{ber.}} = 1.62\text{ g cm}^{-3}$ ,  $\mu = 11.38\text{ cm}^{-1}$ ,  $Z = 4$ , monoklin, Raumgruppe  $P2_1/c$  (Nr. 14), Mac-Science-MXC18-Diffraktometer,  $\lambda = 0.71069\text{ Å}$ ,  $T = 296\text{ K}$ , 3843 gemessene Reflexe, 3368 symmetrieunabhängige,  $R = 0.043$ ,  $R_w = 0.041$ .
- [7] Die Twist-Form von **1** wies unter den drei Konformationen (Twist, Sessel und Halbsessel) laut MP2/D95\*-Rechnungen unter Optimierung an den lokalen Minima die niedrigste Energie auf.
- [8] T. Shimizu, K. Iwata, N. Kamigata, S. Ikuta, *J. Chem. Res. (S)* **1994**, 436.
- [9] In unseren ab-initio-MO-Berechnungen (MP2/D95\*) von Dimethyldisulfid wurde für die günstigste Konformation ein Diederwinkel von  $89.1^\circ$  erhalten.
- [10] A. Veillard, J. Demuyck, *Chem. Phys. Lett.* **1970**, *4*, 476; A. Rauk, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6517; R. Block, L. Jansen, *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 3322; D. A. Dixon, D. Zeroka, J. J. Wendoloski, Z. R. Wassermann, *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 5334.
- [11] C,H-Analyse ber.: C 26.64, H 2.24; gef.: C 27.54, H 2.23.
- [12] Diastereomerenverhältnis 2:1. Das Hauptisomer konnte durch GPC aus der Diastereomerenmischung von **4** isoliert werden: blaßgelbe Flüssigkeit;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6.67$  (d, 1H,  $J = 9.8$  Hz),  $6.49$  (d, 1H,  $J = 9.8$  Hz),  $4.57$  (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz),  $3.46\text{--}3.38$  (m, 1H),  $3.21$  (d, 1H,  $J = 16.6$  Hz),  $3.02$  (d, 1H,  $J = 16.6$  Hz),  $2.63\text{--}2.48$  (m, 2H),  $1.74$  (s, 3H),  $1.73$  (s, 3H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 126.2, 125.8, 123.4, 113.9, 56.9, 43.7, 36.1, 30.9, 20.3, 19.2$ ; IR (rein):  $\tilde{\nu} = 3020, 2990, 2910, 2870, 2810, 1535, 1440, 1420, 1380, 1170, 805\text{ cm}^{-1}$ ; EI-MS:  $m/z$  262 ( $M^+$ ), 198, 127, 103, 93; C,H-Analyse ber. für  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{S}_4$ : C 45.76, H 5.38; gef.: C 46.07, H 5.31.
- [13] W. Schroth, J. Peschel, *Chimia* **1964**, *18*, 171.
- [14] H. E. Wijers, H. Boelens, A. van der Gen, L. Brandsma, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1969**, *88*, 519.

## Chemoenzymatische Synthese eines sialylierten Undecasaccharid-Asparagins\*\*

Carlo Unverzagt\*

Professor Hans Paulsen zum 75. Geburtstag gewidmet

Glycoproteine üben im Organismus viele Schlüsselfunktionen aus und beteiligen somit Kohlenhydrate direkt oder indirekt an der Durchführung und der Steuerung von essentiellen Prozessen<sup>[1]</sup>. Neben dem Einfluß auf die korrekte Faltung und die physikalischen Eigenschaften von Proteinen wirken Oligosaccharide auch als Überträger von biologischen Informationen. So treten Oligosaccharide zunehmend als Liganden in der zellulären Erkennung in Erscheinung<sup>[2]</sup>. Adhäsionsphänomene, die durch das terminale Tetrasaccharid Sialyl-Lewis X<sup>[3]</sup> vermittelt werden, haben eine besondere Aktivität auf der Suche nach Pharmaka mit Wirksamkeit bei Volkskrankheiten wie rheumatischer Arthritis oder Herzinfarkt hervorgerufen. Auf der Oberfläche von aktivierten B-Lymphozyten wurde das Kohlenhydrat-bindende Protein CD22<sup>[4]</sup> gefunden, das die Sequenz  $\alpha$ -N-Acetylneuraminsäure-(2  $\rightarrow$  6)-Galactose an den Termini von Asparagin-gebundenen Oligosacchariden (*N*-Glycanen) erkennt. Ein natürlicher Ligand für CD22 ist das Undecasaccharid-Asparagin-Konjugat **1**, dessen Kohlenhydratstruktur häufig auf Serum- und Zelloberflächenglycoproteinen auftaucht. Die folgende Arbeit stellt die erstmalige Synthese von **1** vor, einer vollständig glycosylierten Teilstruktur von Glycoproteinen. Entscheidend für das Gelingen der Synthese war eine Kombination aus chemischen und enzymatischen Methoden.

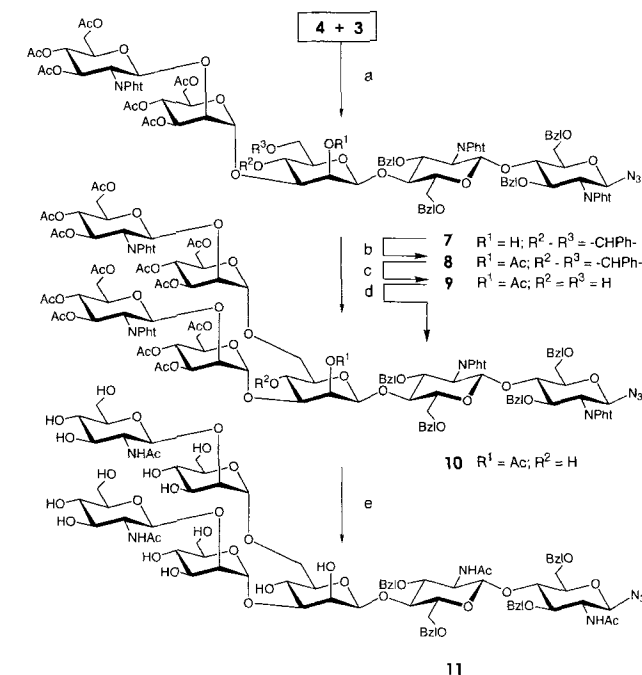
[\*] Dr. C. Unverzagt

Institut für Organische Chemie und Biochemie  
der Technischen Universität München  
Lichtenbergstraße 4, D-85748 Garching  
Telefax: Int. + 89/2891-3210

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und von der Leonhard-Lorenz-Stiftung gefördert und beim achten Europäischen Kohlenhydratsymposium 1995 in Sevilla vorgestellt. Ich danke der Hoechst AG und Boehringer Mannheim für Sachmittel und Prof. Dr. H. Kessler für seine Unterstützung.

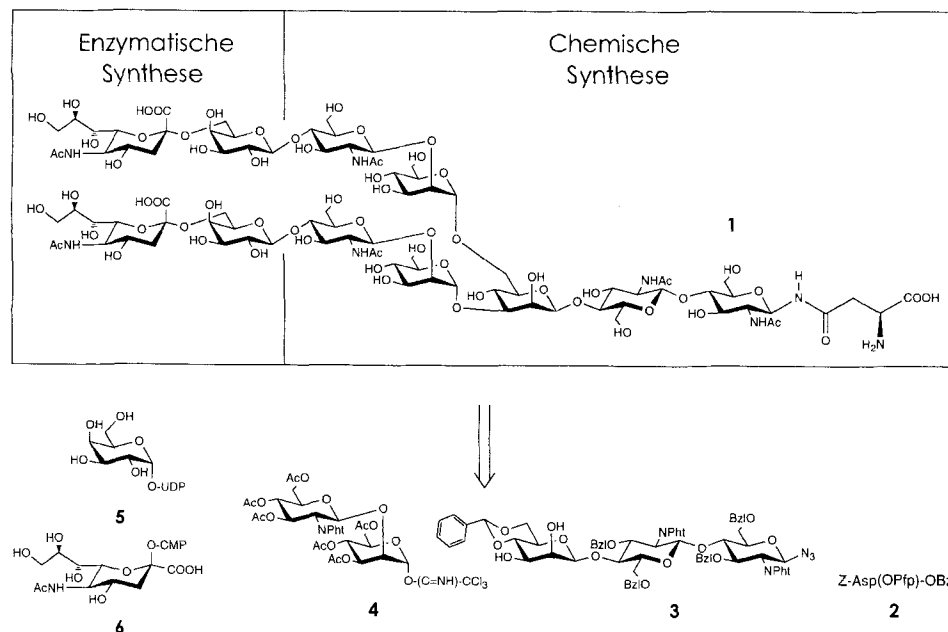
Die wesentlichen Arbeiten zur chemischen Synthese von *N*-Glycanen und ihren Teilstrukturen wurden in den Gruppen von Ogawa<sup>[5]</sup> und Paulsen<sup>[6]</sup> durchgeführt. Ein Meilenstein dabei war die Synthese des gesamten Kohlenhydratanteils von **1** auf rein chemischem Weg<sup>[5a]</sup>. Will man solche komplexen Oligosaccharide in Glycopeptide<sup>[7]</sup> einbauen, so erhöhen sich die Anforderungen an die verwendeten Schutzgruppen sowohl im Peptid- als auch im Zuckerteil, was leicht zum Scheitern der Synthese bei der Entschützung führen kann. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde ein neues Konzept zur Darstellung von *N*-Glycanen und deren Konjugaten entwickelt, das die Synthesestrategien der modernen Kohlenhydratchemie mit der Eleganz von enzymatischen Glycosylierungen<sup>[8]</sup> verbindet. Die Synthese des biantennären Undecasaccharid-Asparagins **1**, einer vollständig glycosylierten Teilstruktur des Human-Transferrins und der Ribonuclease, gelang erstmals durch die kombinierte Anwendung von chemischen und enzymatischen Methoden unter Verwendung der Bausteine **2–6** (Schema 1).

Ein effizienter Weg zur konvergenten Synthese von *N*-Glycanen durch Blockbausteine wurde bereits entwickelt<sup>[9]</sup>. Die Schlüsselsequenz dieser Synthese ist eine doppelte regioselektive Glycosylierung des benzylidengeschützten  $\beta$ -Mannosids **3** an den Positionen 3'' und 6''. Die Glycosylierung des nach der  $\beta$ -Mannosidsynthese von Kunz<sup>[10]</sup> aufgebauten Core-Trisaccharids **3** findet an der äquatorialen 3''-OH-Gruppe statt und nicht an der axialen 2''-OH-Gruppe. Die Umsetzung des Trisaccharids **3** mit dem sehr reaktiven Disaccharid-trichloracetimidat **4**<sup>[9, 11, 12]</sup> ergibt das Pentasaccharid **7** regio- und stereoselektiv mit der gewünschten  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  3)-Verknüpfung in 84% Ausbeute (Schema 2). Diese liegt um mehr als 20% höher als bei der Umsetzung des von Paulsen eingeführten<sup>[13]</sup> analogen Acetamido-substituierten Donors<sup>[9]</sup> (62%). Um spätere Nebenreaktionen an der 2''-OH-Gruppe des Pentasaccharids **7** auszuschließen, wird diese Funktion acetyliert (**8**) und anschließend das Benzylidenacetal mit wässriger Essigsäure abgespalten (**9**). Das Pentasaccharid **9** trägt zwei freie OH-Gruppen (Position 4'' und 6''), und die Umsetzung mit dem Donor **4** unter Verdünnungsbedingungen verläuft regio- und stereoselektiv zum  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  6)-verknüpften Heptasaccharid **10**. Mit einer Ausbeute von 73% gelingt diese Reaktion deutlich besser als die Glycosylierung des Acetamido-substituierten Pentasaccharids<sup>[9]</sup>. Nach diesem Verfahren wurden mehr als 5 g des Heptasaccharids **10** synthetisiert. Wahrscheinlich sind Phthalimidoreste im Vergleich zu Acetamidogruppen bei der Aktivierung von Trichloracetimidaten vorteilhaft, weil mit geringeren Mengen an Bortrifluorid-Diethyletherkomplex gearbeitet werden kann, was die Umlagerungstendenz des Imidoesters im Donor zum unreaktiven Trichloracetamid<sup>[14]</sup> verringert.



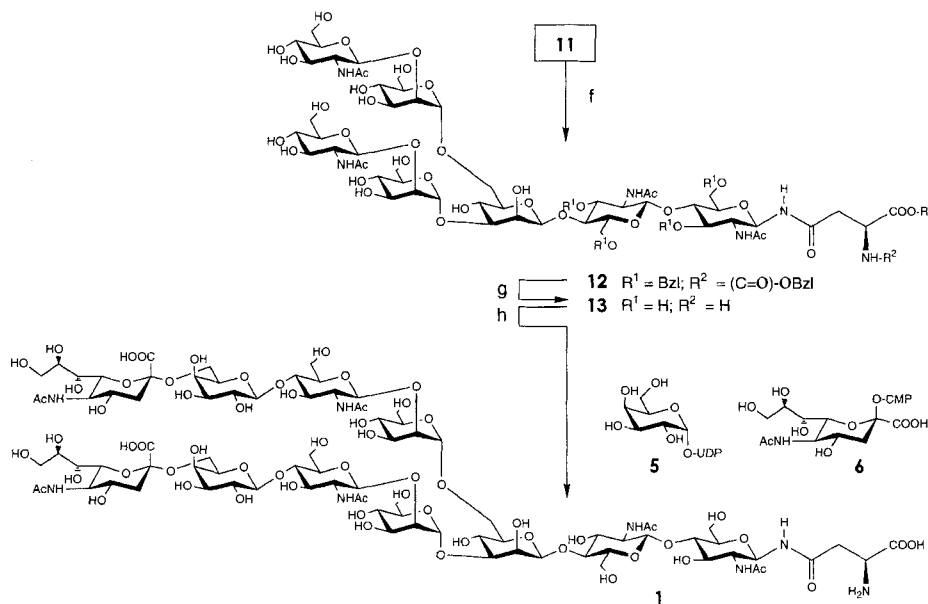
Schema 2. a)  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (84%); b)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , Pyridin (quant.); c) 80%  $\text{AcOH}$ , 80 °C (81%); d) **4**,  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (73%); e) 1. Ethylendiamin, *n*BuOH (90 °C, 16 h); 2.  $\text{Ac}_2\text{O}$ , Pyridin; 3.  $\text{MeNH}_2$  (40%) in  $\text{H}_2\text{O}$ . 1–3. (98%).

(1  $\rightarrow$  6)-verknüpften Heptasaccharid **10**. Mit einer Ausbeute von 73% gelingt diese Reaktion deutlich besser als die Glycosylierung des Acetamido-substituierten Pentasaccharids<sup>[9]</sup>. Nach diesem Verfahren wurden mehr als 5 g des Heptasaccharids **10** synthetisiert. Wahrscheinlich sind Phthalimidoreste im Vergleich zu Acetamidogruppen bei der Aktivierung von Trichloracetimidaten vorteilhaft, weil mit geringeren Mengen an Bortrifluorid-Diethyletherkomplex gearbeitet werden kann, was die Umlagerungstendenz des Imidoesters im Donor zum unreaktiven Trichloracetamid<sup>[14]</sup> verringert.



Schema 1. Das Undecasaccharid-Asparagin-Konjugat **1** ist eine Teilstruktur von *N*-Glycoproteinen und kann durch chemische und enzymatische Synthese aus den Bausteinen **2–6** dargestellt werden. Phit = Phthaloyl, Pfp = Pentafluorphenyl, CMP = Cytidin-5'-monophosphat, UDP = Uridin-5'-diphosphat.

Für die Weiterreaktion des Heptasaccharids **10** zum Asparagin-Konjugat **13** ist es notwendig, den Zeitpunkt der Verknüpfung mit der Aminosäure und die Reihenfolge der Schutzgruppenabspaltung an die empfindlichen funktionellen Gruppen anzupassen. Besonders kritisch sind hierbei die Phthalimidogruppen. Alle Versuche, diese nach der Knüpfung der *N*-glycosidischen Bindung zum Asparagin selektiv abzuspalten, gelangen nicht. Daher wurde folgende Taktik angewendet: Zunächst werden die Acetylgruppen abgespalten und die Phthalimidofunktionen in **10** durch *N*-Acetylgruppen ersetzt. Anschließend wird das Heptasaccharid **11**, dessen vier Benzyletherschutzgruppen in Gegenwart der anomeren Azidofunktion nicht reduziert werden können, selektiv ins Glycosylamin überführt und mit dem in der Seitenkette aktivierten Asparaginsäurederivat **2** acyliert. Das so erhältliche Heptasaccharid-



Schema 3. f) 1. Propandithiol,  $\text{Et}_3\text{N}$ , MeOH; 2. Z-Asp(OPfp)-OBzl, HOBT, *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) (63 %); g)  $\text{Pd}/\text{H}_2$ , MeOH, AcOH (95 %); h) 1. UDP-Gal, Galactosyltransferase, alkalische Phosphatase; 2. CMP-*N*-Acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac),  $\alpha$ -2,6-Sialyltransferase, alkalische Phosphatase (86 %).

Asparagin-Konjugat **12** trägt nur noch Benzylschutzgruppen, die sich in einem Schritt durch Hydrogenolyse entfernen lassen (Schema 3).

Die Realisierung dieser Sequenz erfordert allerdings eine Reihe von verbesserten Reaktionsbedingungen. So gelingt die Abspaltung der Phthalimidgruppen aus **10** zwar mit Hydrazinhydrat in Ethanol, es entstehen jedoch polarere Nebenprodukte, und die Ausbeute sinkt auf bis zu 50 %. Die Nebenreaktionen entstehen wahrscheinlich durch die Reduktion der anomeren Azidofunktion mit Diimin<sup>[15]</sup>, das aus Hydrazin zum Erwärmen in geringen Mengen gebildet wird. Verwendet man statt dessen *N*-Methylhydrazin, so steigen die Ausbeuten auf ca. 70 %. Ein wesentlich besseres Ergebnis konnte mit den von Hindsgaul<sup>[16]</sup> eingeführten Bedingungen zur Dephthaloylierung erreicht werden. Erwärmt man das Heptasaccharid **10** mit Ethylendiamin in *n*-Butanol, so entsteht intermediär die gewünschte Tetraaminoverbindung, die nach einer Acetylierungs-Desacetylierungs-Sequenz als wasserlösliches Heptasaccharid **11** in sehr hoher Ausbeute (98 %) isoliert werden kann. Diese Abspaltungsbedingungen sind somit sehr vorteilhaft für die Dephthaloylierung komplexer Oligosaccharide in Gegenwart von Azidogruppen. Die selektive Reduktion der Azidofunktion in **11** gelingt durch Hydrogenolyse mit Raney-Nickel oder Palladium auf Calciumcarbonat. Nach der Acylierung des Glycosylamins mit dem Pentafluorphenylester **2**<sup>[17]</sup> stellte sich jedoch heraus, daß ein Gemisch der anomeren *N*-Glycoside im Verhältnis  $\alpha:\beta = 1:1$  entstanden war. Der Anteil des nichtnatürlichen  $\alpha$ -Glycosids konnte auch durch Hydrogenolyse unter stark basischen Bedingungen nicht unter 30 % gesenkt werden. Da Glycosylamine besonders gut in Gegenwart von Säuren anomerisieren, ist anzunehmen, daß in diesem Fall der Edelmetallkatalysator die Anomerisierung zum  $\alpha$ -Amin begünstigt. Somit mußte eine edelmetallfreie Reduktion<sup>[18]</sup>, die besonders gut im basischen Milieu abläuft, gefunden werden. Die Reduktion des Heptasaccharidazids **11** mit Propandithiol im Überschuß in Methanol-Triethylamin<sup>[19]</sup> erfüllt diese Anforderungen. Die Reagentien können nach der Reduktion abdestilliert werden, und die Acylierung des intermediären Glycosylamins mit **2** ergibt nach HPLC-Reinigung 63 % des  $\beta$ -konfigurierten Hepta-

saccharid-Asparagin-Konjugats **12**. Mit der Glycosyl-Aminosäure **12** ist somit auf chemischem Weg ein Baustein zugänglich, der neben der Umsetzung zu **1**, auch für Glycopeptidsynthesen<sup>[5c]</sup> attraktiv ist.

Um die Glycosyltransferasereaktionen in der Synthese von **1** als letzte Modifikation durchführen zu können, werden zunächst die verbleibenden Schutzgruppen in **12** durch einen katalytischen Hydrierungsschritt mit Palladiumschwarz entfernt. Das geschützte Heptasaccharid-Asparagin **13** weist zwei terminale *N*-Acetylglucosaminreste auf, die ein gutes Substrat<sup>[20]</sup> für die Galactosyltransferase (EC 2.4.1.22) sind. Unter Verwendung der durch alkalische Phosphatase beschleunigten enzymatischen Glycosylierungsmethode<sup>[21]</sup> werden zwei Galactosereste in einem Schritt auf **13** übertragen. Die alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1) baut den im Verlauf der Reaktion von UDP-Galactose **5** und **13** entstehenden Inhibitor Uridin-

diphosphat ab und erhöht dadurch sowohl die Reaktionsgeschwindigkeit als auch die Ausbeute an intermediär entstandenen Nonasaccharid-Asparagin. Dieses wird doppelt sialyliert durch anschließende Inkubation der Reaktionslösung mit  $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  6)-Sialyltransferase (EC 2.4.99.1), alkalischer Phosphatase und dem Donorsubstrat CMP-*N*-Acetylneuraminsäure. Die Übertragung der insgesamt vier Saccharideinheiten wird als Eintopfreaktion durchgeführt, und man erhält so das Undecasaccharid-Asparagin **1** in 86 % isolierter Ausbeute. Dabei zeigt sich, daß – trotz der bekannten Präferenz<sup>[22]</sup> der beiden Glycosyltransferasen für den (1  $\rightarrow$  3)-Arm – unter den Reaktionsbedingungen eine nahezu vollständige enzymatische Glycosylierung stattfindet. Die Reinigung des Reaktionsgemisches durch Ausschlußchromatographie ergab **1**, dessen Struktur durch <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie (500 MHz)<sup>[23]</sup>, Vergleich mit Referenzspektren<sup>[24]</sup> und Elektrospray-MS<sup>[25]</sup> bestätigt wird. Damit ist es erstmals gelungen, das komplexe Glykokonjugat **1**, das bislang nur aus natürlichem Material isoliert werden konnte<sup>[26]</sup>, auch durch Synthese zu erhalten.

Die Synthese von *N*-Glycanen ist weiterhin eine Herausforderung, die durch kombinierten Einsatz von chemischen und enzymatischen Synthesemethoden verbessert werden kann. Gegenwärtig wird der Einbau von **1** in Glycopeptide geprüft, um die Synthese von vollständig glycosylierten Glycoproteinfragmenten zu ermöglichen.

Eingegangen am 31. Januar 1996 [Z 8772]

**Stichworte:** Chemoenzymatische Synthesen · Glycoproteine · Glycoside · Kohlenhydrate · Polysaccharide

- [1] a) A. Varki, *Glycobiology* **1993**, 3, 97–130; b) R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683–720.  
 [2] T. A. Springer, L. A. Lasky, *Nature* **1991**, 349, 196–197.  
 [3] a) M. L. Phillips, E. Nudelman, F. C. A. Gaeta, M. Perez, A. K. Singhal, S.-I. Hakomori, J. C. Paulson, *Science*, **1990**, 250, 1130–1132; b) G. Walz, A. Aruffo, W. Kolanus, M. Bevilacqua, B. Seed, *Science*, **1990**, 250, 1132–1135; c) L. A. Lasky, *Science* **1992**, 258, 964–969; d) A. Giannis, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 188–191; *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.* **1994**, 33, 178–180.  
 [4] L. D. Powell, D. Sgroi, E. R. Sjöberg, I. Stamencovic, A. Varki, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 7019–7027.

# Homogenkatalysatoren für den Claus-Prozeß – Synthese und Struktur des katalytisch aktiven Intermediats *cis*-[(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PtS<sub>3</sub>O]\*\*

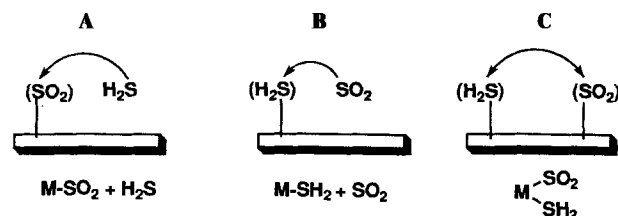
Alan Shaver\*, Mohammad El-khateeb und  
Anne-Marie Lebuvis

Die Entschwefelung von Rohöl und Erdgas ist zur Zeit der vielleicht bedeutendste industrielle Prozeß zur Vermeidung der Umweltverschmutzung. Die Hydrodesulfurierung (HDS)<sup>[1]</sup> schwefelhaltiger Verbindungen ergibt Kohlenwasserstoffe und das giftige, gasförmige H<sub>2</sub>S, das durch den Claus-Prozeß entsorgt wird<sup>[2]</sup>. Hierbei werden mit hoher Effizienz H<sub>2</sub>S und SO<sub>2</sub>, das durch partielle Oxidation von H<sub>2</sub>S gewonnen wird, an Aluminiumoxid bei 300 °C zu elementarem Schwefel und Wasser umgesetzt:

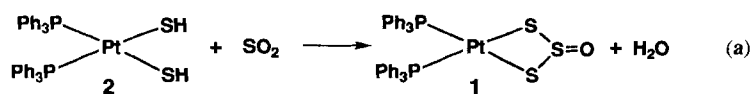


Zahlreiche Materialien katalysieren diese Reaktion, die sogar in Wasser stattfindet. Untersuchungen zur stufenweisen Adsorption und zu den Reaktionen von SO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>S an Aluminiumoxid liefern meist keine eindeutigen Ergebnisse<sup>[3]</sup>. Einzelheiten des Reaktionsmechanismus sind nur zum Teil verstanden. Klar ist, daß ein Sauerstoffatom übertragen und Schwefel-Schwefel-Bindungen geknüpft werden müssen. Die Chemie von Übergangsmetall-Schwefel-Verbindungen in homogener Phase hat für beide Reaktionstypen bislang nur wenige Beispiele hervorgebracht.

Wir interessieren uns für Reaktionen löslicher Metallkomplexe, die mit dem Claus-Prozeß verwandt sind. Dazu haben wir drei Modelle für den oberflächenkatalysierten Prozeß entwickelt und diese auf Reaktionen von Metallkomplexen in homogener Phase übertragen. In Modell A greift H<sub>2</sub>S adsorbiertes SO<sub>2</sub> an, in Modell B SO<sub>2</sub> adsorbiertes H<sub>2</sub>S, und in Modell C werden



beide Gase adsorbiert, bevor die Reaktion abläuft. Hier berichten wir über die Reaktion von *cis*-[(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Pt(SH)<sub>2</sub>] *cis*-2 mit SO<sub>2</sub>, die nach Modell B zu [(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PtS<sub>3</sub>O] **1** und Wasser führt und damit analog zu einem Schritt des Claus-Prozesses abläuft [Gl. (a)]. Beide Komplexe katalysieren im Unterschied zu *trans*-2 die Claus-Reaktion.



[\*] Prof. A. Shaver, Dr. M. El-khateeb, Dr. A.-M. Lebuvis  
Department of Chemistry  
McGill University  
801 Sherbrooke Street West  
Montreal, PQ H3A 2K6 (Kanada)  
Telefax: Int. + 514/398-3797  
E-mail: SHAVER@OMC.LAN.MCGILL.CA

[\*\*] Diese Arbeit wurde von dem National Sciences and Engineering Research Council of Canada und dem Quebec Department of Education finanziell unterstützt.

- [5] a) T. Ogawa, M. Sugimoto, T. Kitajima, K. K. Sadozai, T. Nukada, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 5739–5742; b) Y. Nakahara, S. Shibayama, Y. Nakahara, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1996**, 280, 67–84; c) I. Matsuo, Y. Nakahara, Y. Ito, T. Nukada, Y. Nakahara, T. Ogawa, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, 3, 1455–1463.
- [6] Übersicht: H. Paulsen, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 851–857; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 823–839.
- [7] H. G. Garg, K. von dem Bruch, H. Kunz *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, 50, 277–310.
- [8] Übersicht zu enzymatischen Glycosylierungen: C.-H. Wong, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa, T. Kajimoto, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 453–474, 569–593; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 412–432, 521–546.
- [9] C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 1170–1173; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1102–1104.
- [10] a) H. Kunz, W. Günther, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 1118–1191; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 1086–1087; b) W. Günther, H. Kunz, *Carbohydr. Res.* **1992**, 228, 217–241.
- [11] R. R. Schmidt, W. Kinzy in *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, Vol. 50 (Hrsg.: D. Horton), Academic Press, New York, **1994**, S. 21.
- [12] Der Donor **4** [9] wurde im 20-g-Maßstab durch folgende Reaktionssequenz erhalten: a) 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-β-D-mannopyranose und 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido-β-D-glucopyranosyl-trichloracetimidat, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Molekularsieb 4 Å, BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (59%); b) Hydrazinacetat, DMF (85%); c) CCl<sub>3</sub>CN, 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (89%).
- [13] H. Paulsen, B. Helpap, *Carbohydr. Res.* **1991**, 216, 289–313.
- [14] F. Cramer, N. Hennrich, *Chem. Ber.* **1961**, 94, 976–989.
- [15] S. Hünig, H. R. Müller, W. Thier, *Angew. Chem.* **1965**, 77, 368–377; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1965**, 4, 271–280.
- [16] O. Kanie, S. C. Crawley, M. M. Palcic, O. Hindsgaul, *Carbohydr. Res.* **1993**, 243, 139–164.
- [17] Darstellung von **2** nach: M. Green, J. Bermann, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 5851–5852.
- [18] Verfahren zum Aufbau der GlcNAc-β-Asn-Bindung ohne Einsatz von Edelmetallen: a) A. Y. Khorlin, S. E. Zurabayan, R. G. Macharadze, *Carbohydr. Res.* **1990**, 85, 201–208; b) T. Inazu, K. Kobayashi *Synlett.* **1993**, 869–870; c) S. T. Cohen-Anisfield, P. T. Lansbury Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 10531–10537.
- [19] a) A. Bayley, D. N. Standring, J. R. Knowles, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 19, 3633–3634. b) Nach diesem Verfahren wurde simultan ein Anthracensulfonamid gespalten und eine Azidofunktion reduziert: J. Y. Roberge, X. Beebe, S. J. Danishefsky, *Science* **1995**, 269, 202–204.
- [20] a) L. J. Berliner, M. E. Davis, K. E. Ebner, T. A. Beyer, J. E. Bell, *Mol. Cell Biochem.* **1984**, 62, 37–42; b) C. Augé, R. Fernandez-Fernandez, C. Gautheron, *Carbohydr. Res.* **1990**, 200, 257–268; c) J. Lehmann, *Carbohydr. Res.* **1994**, 252, 325–332.
- [21] a) C. Unverzagt, H. Kunz, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 9308–9309; b) C. Unverzagt, S. Kelm, J. C. Paulson, *Carbohydr. Res.* **1994**, 251, 285–301; c) Wir wurden darauf hingewiesen, daß der Einfluß von alkalischer Phosphatase in Galactosylierungen auch von A. Redlitz in einer Diplomarbeit (Berlin, 1988) untersucht wurde; d) Die verwendeten Glycosyltransferasen und Zuckernukleotide wurden von Sigma bezogen, die alkalische Phosphatase (calf intestine) von Boehringer Mannheim.
- [22] Übersicht: H. Schachter, *Biochem. Cell. Biol.* **1986**, 64, 163–181.
- [23] I: 5,6 mg Ausbeute (86% aus **13**); [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = –9.1° (0.5, H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 5.19 (d, J<sub>1,2</sub> < 1.0 Hz, 1H, H-1<sup>4</sup>), 5.12 (d, J<sub>1,2</sub> = 9.7 Hz, 1H, H-1<sup>1</sup>), 5.01 (d, J<sub>1,2</sub> < 1.0 Hz, 1H, H-1<sup>4</sup>), 4.83 (d, J<sub>1,2</sub> < 1.0 Hz, 1H, H-1<sup>1</sup>), 4.69–4.65 (m, 3H, H-1<sup>2</sup>, H-1<sup>5</sup>, H-1<sup>5</sup>), 4.505, 4.502 (2d, J<sub>1,2</sub> = 7.8 Hz, 2H, H-1<sup>6</sup>, H-1<sup>6</sup>), 4.31 (dd, J<sub>2,3</sub> = 1.9 Hz, H-2<sup>3</sup>), 4.25 (dd, J<sub>2,3</sub> = 1.9 Hz, H-2<sup>4</sup>), 4.17 (dd, J<sub>2,3</sub> = 1.9 Hz, H-2<sup>4</sup>), 3.00 (dd, J<sub>gem</sub> = 17.2 Hz, J<sub>vic</sub> = 4.2 Hz, 1H, β-CHa-Asn), 2.92 (dd, J<sub>vic</sub> = 7.0 Hz, 1H, β-CHb-Asn), 2.76–2.71 (m, 2H, H-3eq<sup>N</sup>, H-3eq<sup>N</sup>), 2.14, 2.13, 2.09, 2.07, 2.06 (5s, 18H, NAc), 1.78 (t, J<sub>gem</sub> = 12.1 Hz, 2H, H-3ax<sup>N</sup>, H-3ax<sup>N</sup>). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, D<sub>2</sub>O, [D<sub>6</sub>]DMSO als interner Standard; die chemischen Verschiebungen wurden aus einem HMQC-Spektrum ermittelt: δ = 104.8 C-1<sup>6</sup>, C-1<sup>6</sup>, 102.6 C-1<sup>2</sup>, 101.8 C-1<sup>3</sup>, 100.7 C-1<sup>4</sup>, 100.6 C-1<sup>5</sup>, C-1<sup>5</sup>, 98.1 C-1<sup>4</sup>, 81.9 C-4<sup>5</sup>, C-4<sup>5</sup>, 81.8 C-3<sup>3</sup>, 80.9 C-4<sup>2</sup>, 80.2 C-4<sup>1</sup>, 79.4 C-1<sup>1</sup>, 77.8 C-2<sup>4</sup>, 77.6 C-2<sup>4</sup>, 77.5 C-5<sup>1</sup>, 75.7 C-5<sup>2</sup>, C-5<sup>2</sup>, C-5<sup>3</sup>, C-5<sup>5</sup>, C-5<sup>5</sup>, 75.0 C-5<sup>6</sup>, C-5<sup>6</sup>, 74.9 C-5<sup>4</sup>, 74.1 C-5<sup>4</sup>, 74.0 C-3<sup>1</sup>, 73.8 C-3<sup>6</sup>, C-3<sup>6</sup>, C-3<sup>N</sup>, C-3<sup>N</sup>, 73.3 C-3<sup>2</sup>, C-3<sup>5</sup>, C-3<sup>5</sup>, 73.0 C-8<sup>N</sup>, C-8<sup>N</sup>, 72.0 C-2<sup>6</sup>, C-2<sup>6</sup>, 71.4 C-2<sup>3</sup>, 70.7 C-3<sup>4</sup>, C-3<sup>4</sup>, 69.7 C-7<sup>N</sup>, C-7<sup>N</sup>, 69.6 C-4<sup>6</sup>, C-4<sup>6</sup>, 69.4 C-4<sup>N</sup>, C-4<sup>N</sup>, 68.6 C-4<sup>4</sup>, C-4<sup>4</sup>, 67.1 C-6<sup>3</sup>, 67.0 C-4<sup>3</sup>, 64.6 C-6<sup>6</sup>, C-6<sup>6</sup>, 64.0 C-9<sup>N</sup>, C-9<sup>N</sup>, 62.9 C-6<sup>4</sup>, C-6<sup>4</sup>, 61.5 C-6<sup>5</sup>, C-6<sup>5</sup>, 61.2 C-6<sup>2</sup>, 61.1 C-6<sup>1</sup>, 56.2 C-2<sup>2</sup>, 55.9 C-2<sup>5</sup>, C-2<sup>5</sup>, 54.9 C-2<sup>1</sup>, 53.2 C-5<sup>N</sup>, C-5<sup>N</sup>, 52.1 αC-Asn, 39.0 C-3<sup>N</sup>, C-3<sup>N</sup>, 36.3 βC-Asn, 23.9, 23.8, 23.7 NAc.
- [24] L. Dorland, J. Haverkamp, B. L. Schut, J. F. G. Vliegthart, *FEBS Lett.* **1977**, 77, 15–20.
- [25] ESI-MS: (50proz. 0.01 M NH<sub>4</sub>OAc–50proz. Acetonitril): C<sub>88</sub>H<sub>144</sub>N<sub>8</sub>O<sub>64</sub> M<sub>r</sub> (ber.) 2336.8; M<sub>r</sub> (gef.) = 2337.8 (M + 1).
- [26] R. R. Townsend, E. Hilliker, Y.-T. Li, R. A. Laine, W. R. Bell, Y. C. Lee, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 9704–9710.