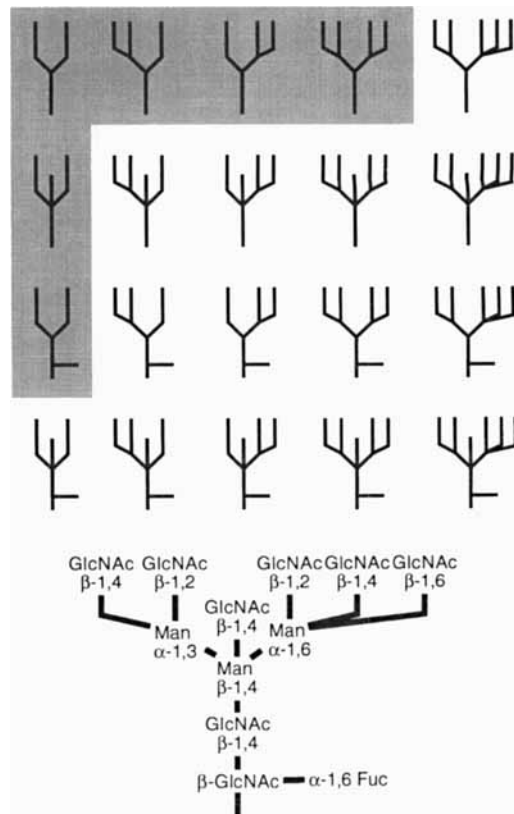


- [14] C. E. Housecroft, *Cluster Molecules of the p-Block Elements*, Oxford Univ. Press, Oxford, 1994, S. 31. Deutsch: *Clusterverbindungen von Hauptgruppenelementen*, VCH, Weinheim, 1996, S. 31.
- [15] a) J. E. Davies, J. Kopf, E. Weiss, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1982**, 38, 2251–2253; b) E. Weiss, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 1565–1587; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 1501–1523.
- [16] M. R. Mason, J. M. Smith, S. G. Bott, A. R. Barron, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4971–4984.
- [17] Unveröffentlichte Ergebnisse zit. in M. A. Paver, C. A. Russell, D. S. Wright, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 1679–1688; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1545–1554.
- [18] Kristalle von $4 \cdot 2 \text{ C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ wurden durch Umkristallisieren aus Toluol bei -17°C nach 3 Wochen erhalten. Kristallographische Daten von **4**: $(\text{C}_7\text{H}_{18}\text{N}_2\text{OSSiLi}_2)_n \cdot 2 \text{ C}_7\text{H}_8$; $M_r = 1505.84$, monoklin, Raumgruppe $P2_1/n$ (No. 14), $a = 15.560(4)$, $b = 19.728(6)$, $c = 15.629(8) \text{ \AA}$, $\beta = 104.24(3)^\circ$, $V = 4650(3) \text{ \AA}^3$, $Z = 2$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.075 \text{ g cm}^{-3}$, $\mu(\text{MoK}\alpha) = 0.268 \text{ mm}^{-1}$, $\lambda(\text{MoK}\alpha) = 0.71069 \text{ \AA}$, $T = -103(1)^\circ\text{C}$, $F(000) = 1616$. Die Daten wurden mit einem Rigaku-AFC6S-Diffraktometer an einem farblosen Prisma gesammelt ($0.50 \times 0.40 \times 0.15 \text{ mm}^3$), das direkt aus der Lösung auf einer epoxybeschichteten Glasfaser angebracht wurde. 8822 Reflexe, davon 8494 unabhängig ($R_{\text{int}} = 0.085$), 2188 beobachtete Reflexe mit $I > 3.00 \sigma(I)$ zur Verfeinerung von 283 Parametern verwendet. Die Struktur wurde mit Direkten Methoden gelöst und durch Fourier-Techniken erweitert [25]. Die S-, O-, N-, Si-/C-Positionen wurden anisotrop verfeinert, die restlichen Kohlenstoff- und Wasserstoffatome isotrop. Die Siliciumatome der Me_3Si -Gruppen und die Kohlenstoffatome der $t\text{Bu}$ -Gruppen waren über alle Lagen verteilt. Diese Positionen wurden daher als Siliciumlagen mit partiellen Besetzungsfaktoren verfeinert, die zu einer Elektronenpopulation entsprechend drei Silicium- und drei Kohlenstoffatomen auf sechs Lagen führen. Die Lagen der Silicium- und Kohlenstoffatome konnten nicht unterschieden werden, daher sind die C-C- und Si-C-Abstände ungewöhnlich. Die Lösungsmittelmoleküle waren stark fehlgeordnet, weshalb die Kohlenstoffatome mit partiellen Besetzungsfaktoren auf bestimmte Lagen einbezogen wurden. Die Wasserstoffatome wurden einbezogen, aber nicht verfeinert. Die Verfeinerung konvergierte bei $R = 0.125$ und $R_w = 0.084$.
- [19] M. B. Power, J. W. Ziller, A. R. Barron, *Organometallics* **1992**, 11, 2783–2790.
- [20] T. Greiser, E. Weiss, *Chem. Ber.* **1977**, 110, 3388–3396.
- [21] G. Kresze, A. Maschke, R. Albrecht, K. Bederke, H. P. Patzschke, H. Smalla, A. Trede, *Angew. Chem.* **1962**, 74, 135–144; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1962**, 1, 89–98.
- [22] $\lambda(\text{S-N}) = 0.1941 \text{ d(S-N)} - 20.66$ und $\lambda(\text{S-O}) = 0.2364 \text{ d(S-N)} - 25.84$, wobei $\lambda(\text{S-N})$ und $\lambda(\text{S-O})$ die Wellenlängen der Streckschwingungen in 10^{-4} cm und $d(\text{S-N})$ und $d(\text{S-O})$ die Bindungslängen in pm sind: A. J. Banister, J. A. Durrant, I. B. Gorrell, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1985**, 81, 1771–1782.
- [23] E. Parkes, J. D. Woollins, *Inorg. Synth.* **1989**, 25, 48–49.
- [24] G. M. Sheldrick, *SHELXL-92, Programm zur Kristallstrukturverfeinerung*, Universität Göttingen, 1993.
- [25] DIRDIF94: P. T. Beurskens, G. Admiraal, G. Beurskens, W. P. Bosman, R. de Gelder, R. Israel, J. M. M. Smith, *The DIRFIX-94 Program System*, Technischer Bericht des kristallographischen Labors der Universität Nijmegen, Niederlande, 1994.

bezeichnet. Glycoproteine können somit als natürliche Verbindungsbibliotheken angesehen werden, deren Elemente sehr ähnlich sind, aber in den Detailstrukturen große Diversität aufweisen. Komplexe N-Glycane werden nach der Zahl der „Antennen“ unterschieden, die zwei bis fünf betragen kann, sowie durch charakteristische Substitutionen an der Core-Struktur (Schema 1). Im Falle des pharmazeutisch wichtigen Glycopro-



Schema 1. Bei komplexen N-Glycanen führt die Kombination von fünf unterschiedlichen Verzweigungsgraden (erste Zeile) mit einer Core-Substitution durch einen „bisecting“ GlcNAc-Rest (zweite Zeile) oder mit einer Core-Fucosylierung (dritte Zeile) sowie mit beiden Modifikationen (vierte Zeile) zu zwanzig unterschiedlichen Grundgerüsten. Sieben Verbindungen dieser Stoffklasse (grau unterlegt) wurden durch ein flexibles System aus Oligosaccharidbausteinen bereits synthetisiert.

Ein modulares System zur Synthese der häufigsten N-Glycane**

Carlo Unverzagt*

In Glycoproteinen variieren die an Asparagin gebundenen Oligosaccharide (N-Glycane) im Verzweigungsgrad, in den terminalen Zuckern und in der Art der Substitution am Core-Pentasaccharid.^[1] Eine divergente Kombination der möglichen Verknüpfungen führt zu Tausenden von verwandten Oligosacchariden. Dieses Phänomen wird als Mikroheterogenität^[2]

[*] Dr. C. Unverzagt^[†]

Institut für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München
Lichtenbergstraße 4, D-85748 Garching

[†] Gegenwärtige Anschrift:

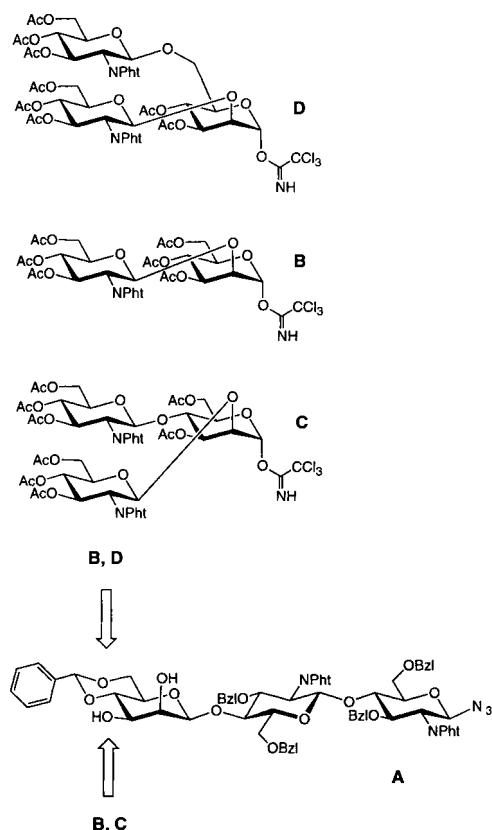
Institut für Organische Chemie der Universität
Karlsruhe 23, D-80333 München
Telefax: Int. + 89/5902-483

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und von der Leonhard-Lorenz-Stiftung gefördert. Ich danke der Hoechst AG und Boehringer Mannheim für Sachmittel und Prof. Dr. H. Kessler für seine Unterstützung.

teinhormons Erythropoietin wurde festgestellt, daß die biologische Wirksamkeit^[3] der Glycoform mit tetraantennären N-Glycanen in vivo deutlich höher ist als mit biantennären.

Die Synthese^[4] von biantennären sialylierten N-Glycanen^[5] gelang bisher nur in wenigen Fällen. Von komplexen tri- und tetraantennären N-Glycanen wurden Teilstrukturen synthetisiert.^[6] Die vollständigen, multiantennären Verbindungen sind nur durch eine aufwendige Isolierung^[7] aus natürlichem Material oder durch Semisynthese^[8] in geringen Mengen zugänglich. Die biochemische Synthese von N-Glycanen verläuft schrittweise unter Beteiligung von Glycosyl-Transferasen, allerdings sind nur wenige der für die Verzweigungen zuständigen N-Acetylglucosaminyl-Transferasen^[2c] kloniert und exprimiert worden. Mit einem modularen Synthesekonzept (Schema 2) ist es uns nun gelungen, auch tri- und tetraantennäre N-Glycane zu erhalten.

Zum chemischen Aufbau biantennärer N-Glycan-Grundkörper wurde ein neues Konzept entwickelt.^[9] Ausgehend von dem Core-Trisaccharid **A** (Schema 2) konnten die Positionen 3 und 6 des zentralen β -Mannosylrests mit dem Donor **B** regio- und

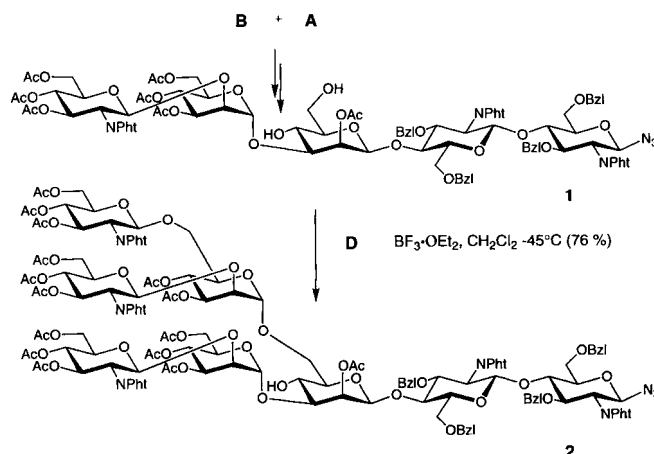


Schema 2. Die Bausteine A–D; Pht = Phthaloyl.

stereoselektiv glycosyliert werden.^[5c] Durch eine nachfolgende enzymatische Synthese wurden sialylierte biantennäre *N*-Glycane aufgebaut.^[5c] Nach diesem Konzept der doppelten regio-selektiven Glycosylierung von **A** gelang nun auch die Synthese der tri- und tetraantennären *N*-Glycane **2**, **5** und **6**, die die am häufigsten auftretenden Verzweigungsmuster komplexer *N*-Glycane aufweisen (siehe Schema 3, 4). Dazu wurden die Trisaccharidbausteine **C** und **D** synthetisiert (Schema 2), die mit **A** und **B** ein modulares System bilden. So können wertvolle Intermediate vielseitig eingesetzt werden, um zu den verschiedenen *N*-Glycan-Basisstrukturen zu gelangen. Entscheidend für den Erfolg dieses Konzepts ist das optimierte Schutzgruppenmuster der Bausteine und eine hohe Reaktivität an den Verknüpfungsstellen durch die 1,2-Diolstruktur der Acceptoren.

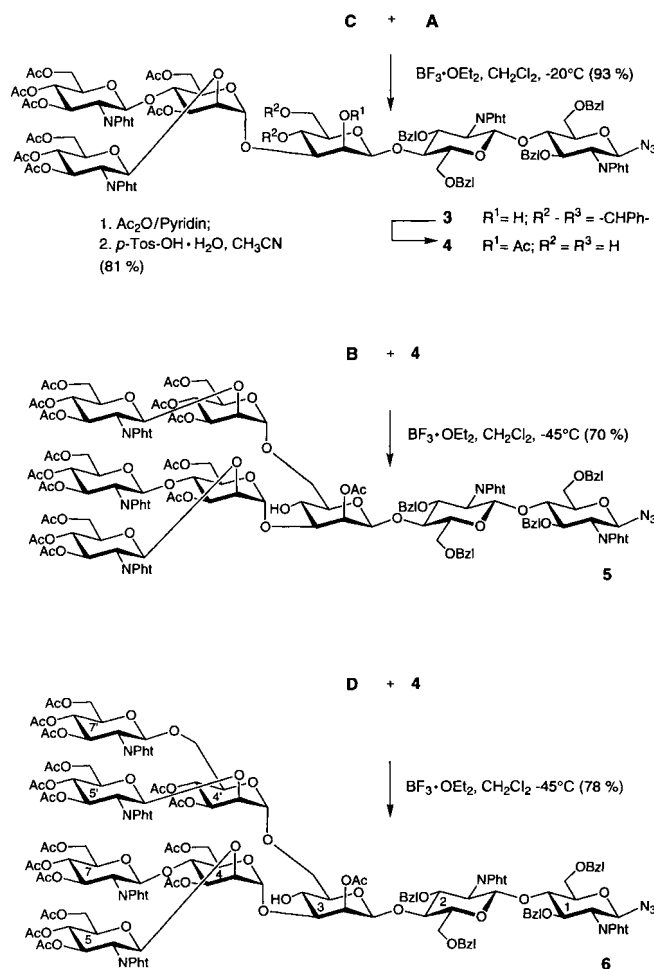
Die in der Synthese von **C**^[10] und **D**^[13] benötigten Allyl- und Benzylschutzgruppen wurden durch Acetatreste ersetzt, da Benzylgruppen im Mannosylteil des Donors zu β -konfigurierten Nebenprodukten bei der Glycosylierung führen können.^[6d] Damit haben die drei als α -Imidate^[15] vorliegenden Donoren **B–D** eine einheitliche Schutzgruppenbelegung, die eine leichte Entschützung dieser Molekülteile erwarten läßt.

Bei der Synthese von biantennären *N*-Glycanen aus dem Core-Trisaccharid **A** und dem Donor **B** wurde das Pentasaccharid **1** als Intermediat erhalten^[5c] (Schema 3). Dieses wurde mit **B** zum Heptasaccharid in 73% Ausbeute verlängert. Für diese selektive Reaktion an der primären OH-Funktion wurden Verdünnungsbedingungen verwendet, da ansonsten eine Überreaktion stattfand. Zur Überprüfung der Glycosylierungseigenschaften des verzweigten und damit sterisch anspruchsvolleren Trisaccharidimidats **D** wurde zunächst dessen Verknüpfung mit dem Pentasaccharid **1** untersucht. Unter Verdünnungsbedingungen ergab die Aktivierung des Imidats **D** mit dem Bortrifluorid-Diethylether-Komplex das triantennäre Octasaccharid **2**^[16]

Schema 3. Synthese von **1** und **2**.

in 76% Ausbeute (Tabelle 1). Dabei entstand selektiv das α -1,6-verknüpfte Produkt, was aus der charakteristischen Tieffeldverschiebung des ^{13}C -NMR-Signals von C-6³ (60.4 \rightarrow 66.3) und der für α -Mannoside typischen C-1,H-1-Kopplungskonstante^[17] von 176.2 Hz für C-1^{4'} hervorgeht.

Eine mögliche sterische Hinderung bei der regio-selektiven Glycosylierung von OH-3³ des Core-Trisaccharids **A** durch den verzweigten Donor **C** trat nicht auf. Statt dessen gelang die Verknüpfung zum Hexasaccharid **3** in einer unerwartet hohen Ausbeute von 93% (Schema 4). Die neu gebildete α -1,3-Bin-

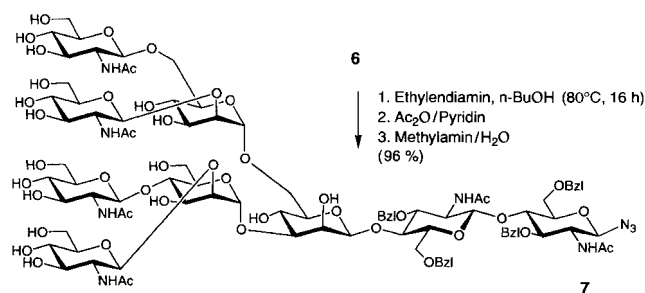
Schema 4. Synthese von **4–6**.

dung läßt sich anhand der NMR-Daten belegen: Das ^{13}C -NMR-Signal von C-3³ wird von $\delta = 69.9$ (A) auf 78.0 (3) verschoben, und für C-1⁴ beträgt $J_{\text{C-1,H-1}} = 172.7$ Hz. Nach der Acetylierung der freien Hydroxygruppe in 3 und der Debenzyldienierung mit *p*-Toluolsulfonsäurehydrat in Acetonitril wurde das Hexasaccharid 4 erhalten. Unter diese Bedingungen gelang die saure Acetalspaltung unter Erhaltung der zahlreichen Acetylgruppen. Die anschließende Verlängerung des Acceptors 4 mit dem linearen Donor B lieferte das triantennäre Octasaccharid 5 in 70 % Ausbeute (Tabelle 1). Die Gegenwart des verzweigten Mannosids im 1,3-Arm von 4 beeinträchtigte die Reaktion an der primären OH-Funktion nicht.

Auch die sterisch anspruchsvollste Glycosylierung des Hexasaccharidacceptors 4 gelang mit dem Trisaccharidbaustein D regio- und stereoselektiv (Schema 4). Man erhielt das Nonasaccharid 6, eine Teilstruktur von tetraantennären N-Glycanen, in 78 % Ausbeute (Tabelle 1). Bei ähnlichen Reaktionen mit verzweigten Donoren wurden von mehreren Autoren erhebliche Schwierigkeiten^[18] bei der Knüpfung der glycosidischen Bindung beobachtet.

Überraschenderweise zeigt ein Vergleich der Ausbeuten der Glycosylierung mit dem linearen Disacchariddonor B einerseits und den verzweigten Donoren C und D andererseits, daß die beiden Trisaccharidimide unter identischen Bedingungen sogar höhere Ausbeuten als das Disaccharid B liefern. Wahrscheinlich liegen die Reaktivitäten der Trisaccharide C und D unter der von B, so daß wegen der verlangsamt Umlagerung zum Trichloracetamid^[19] höhere Ausbeuten resultieren. Dieser Vorteil sollte sich allerdings nur dann in den Ausbeuten niederschlagen, falls keine zusätzliche sterische Hinderung bei der Glycosylierung auftritt. Rückschließend ist die Kombination der Donoren C und D mit den komplexen Acceptoren, die zwei benachbarte freie OH-Gruppen tragen, aus sterischer Sicht sehr günstig. Die geschützten Verbindungen 1–6 wurden durch Flash-Chromatographie gereinigt und NMR-spektroskopisch durch HMQC-, HMQC-COSY-, HMQC-DEPT-, HMQC-TOCSY-, TOCSY- und NOESY-Experimente^[20] charakterisiert.

Die Spaltung der Phthalimidoreste in den synthetisierten N-Glycane ist kritisch. Das Glycan 6 wurde durch eine dreistufige Eintopfreaktion zum wasserlöslichen Nonasaccharid 7 umgesetzt (Schema 5), wobei die Verwendung von Ethylendiamin in



Schema 5. Selektive Abspaltung der Schutzgruppen: Synthese von 7.

n-Butylalkohol^[21] und die folgende Acetylierungs-Desacetylierungs-Sequenz sich bereits bei der Entschützung der biantennären Stammverbindung bewährt haben.^[5c] Durch Festphasenextraktion konnte das bis auf den Chitobiosylteil vollständig deblockierte Nonasaccharid 7 in hoher Ausbeute isoliert werden (Tabelle 1). Die verbleibenden Schutzgruppen sind strategisch wertvoll und ermöglichen den Aufbau von Glykokonjugaten über einer N-glycosidische Bindung am anomeren Zentrum sowie eine Reinigung über Umkehrphasen-HPLC.^[5c]

Tabelle 1. Physikalische und spektroskopische Daten von 2, 5, 6 und 7 [16]. Für die vollständig charakterisierten Verbindungen 2 und 5 sind die NMR-Daten nur auszugsweise aufgeführt [a].

<p>2: $[\alpha]_D^{25} = -13.3^\circ$ ($c = 0.5$ in Dichlormethan); $\text{C}_{146}\text{H}_{150}\text{N}_8\text{O}_{60}$ (2976.81); FAB-MS (NBA): $M_{\text{ber.}} = 2974.9$, $M_{\text{gef.}} = 2976$ ($M + \text{H}^+$); ^{13}C-NMR (125 MHz, $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$): $\delta = 97.7$ (C-1⁴α, $J(\text{C-1,H-1}) = 176.2$ Hz im gekoppelten HMQC-Spektrum), 97.6 (C-1⁷), 96.9 (C-1³), 96.64 (C-1⁴α, $J(\text{C-1,H-1}) = 176.2$ Hz), 96.62 (C-1²), 96.0 (C-1⁵), 95.9 (C-1⁵), 84.7 (C-1¹)</p> <p>5: $[\alpha]_D^{25} = +4.0^\circ$ ($c = 0.5$ in Dichlormethan); $\text{C}_{146}\text{H}_{150}\text{N}_8\text{O}_{60}$ (2976.81); FAB-MS (NBA): $M_{\text{ber.}} = 2974.9$, $M_{\text{gef.}} = 2099.1$ ($M + \text{Na}^+$); ^{13}C-NMR (125 MHz, $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$): $\delta = 97.7$ (C-1⁴α, $J(\text{C-1,H-1}) = 177.6$ Hz), 97.1 (C-1⁴α, $J(\text{C-1,H-1}) = 177.6$ Hz), 96.8 (C-1²), 96.7 (C-1³), 96.4 (C-1⁵), 96.2 (C-1⁵), 95.3 (C-1⁷), 84.8 (C-1¹)</p> <p>6: $[\alpha]_D^{25} = -2.1^\circ$ ($c = 0.5$ in Dichlormethan); $\text{C}_{164}\text{H}_{167}\text{N}_9\text{O}_{68}$ (3352.14); FAB-MS (NBA): $M_{\text{ber.}} = 3350.0$, $M_{\text{gef.}} = 3377.5$ ($M + \text{Na}^+$); ^1H-NMR (500 MHz, $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$): $\delta = 8.04\text{--}7.60$ (m, 24H, Pht), 7.30–6.70 (m, 20H, Ar), 5.64 (m, 1H, H-3⁵), 5.62 (m, 1H, H-3⁷), 5.48–5.39 (m, 3H, H-1⁷, H-3⁵, H-3⁷), 5.31 (d, $J(1,2) = 8.5$ Hz, 1H, H-1⁵), 5.29 (d, $J(\text{OH-4,4}) = 5.2$ Hz, 1H, OH-4³), 5.25 (d, $J(1,2) = 9.5$ Hz, 1H, H-1¹), 5.18–5.12 (m, 2H, H-1², H-1⁵), 5.04–4.97 (m, 3H, H-2³, H-4², H-4³), 4.94 (d, $J(1,2) = 8.2$ Hz, 1H, H-1¹), 4.89 (dd, $J(3,4) = J(4,5) = 9.5$ Hz, 1H, H-4⁵), 4.85–4.80 (m, 3H, H-4⁷, H-3⁴, CH₂O), 4.76–4.70 (m, 3H, H-1⁴, H-3⁴, H-4⁴), 4.50–4.42 (m, 3H, H-1³, CH₂O), 4.39 (d, $J_{\text{gem}} = 12.2$ Hz, 1H, CH₂O), 4.37–3.82 (m, 25H), 3.80–3.62 (m, 6H, H-2¹, H-2⁷, H-4⁴, H-5⁴, H-5⁵, H-6b⁵), 3.59 (m, 1H, H-6a³), 3.57–3.50 (m, 2H, H-5¹, H-5²), 3.48–3.36 (m, 4H, H-6a¹, H-6b², H-6b³, H-6a⁴), 3.30–3.17 (m, 6H, H-3³, H-4³, H-5², H-5⁵, H-6b¹, H-6a³), 3.04–2.94 (m, 2H, H-6b³, H-6b⁴), 2.90 (m, 1H, H-5³), 2.02, 2.015, 2.01, 2.0, 1.98, 1.96, 1.92, 1.78, 1.77, 1.76, 1.75, 1.74, 1.73, 1.68, 1.63 (15s, 51H, OAc); ^{13}C-NMR (125 MHz, $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$): $\delta = 170.1\text{--}167.2$ (C=O), 138.3, 138.1, 138.0 (C-ipso, Ar), 135.1, 134.9, 134.6 (C-4/5, Pht), 130.9, 130.7, 130.6, 130.5 (C-1/2, Pht), 128.2–127.0 (C-Ar), 123.8, 123.7, 123.4 (C-3/6, Pht), 97.9 (C-1⁴α, $J(\text{C-1,H-1}) = 180.0$ Hz), 97.7 (C-1⁷), 96.70 (C-1², C-1³β, $J(\text{C-1,H-1}) = 162.7$ Hz), 96.65 (C-1⁴α, $J(\text{C-1,H-1}) = 172.6$ Hz), 96.2 (C-1⁵), 96.0 (C-1⁵), 95.3 (C-1⁷), 84.7 (C-1¹), 77.0 (C-4²), 76.8 (C-3¹), 76.6 (C-3³), 75.7 (C-5¹), 75.5 (C-3⁵), 75.3 (C-4¹), 74.3 (C-5³), 74.2 (C-5⁵), 73.9 (CH₂O), 73.4 (C-2³), 73.3 (C-2⁴), 73.2, 72.3 (CH₂O), 71.6 (CH₂O, C-4⁴), 71.0 (C-5⁵), 70.8 (C-5⁷), 70.7 (C-5⁵), 70.5 (C-5⁷), 70.3 (C-2³), 70.1 (C-3⁷), 69.9 (C-3⁵, C-3⁷), 69.8 (C-3⁵), 69.6 (C-3⁴), 68.8 (C-3⁴), 68.6 (C-4³), 68.5 (C-5⁴), 68.4 (C-4⁷), 68.3 (C-4⁵), 68.2 (C-4⁷), 67.9 (C-5⁴, C-6⁴), 67.4 (C-6¹, C-6²), 66.5 (C-6³), 66.2 (C-4³), 64.8 (C-4⁴), 61.9 (C-6⁴, C-6⁵), 61.5 (C-6⁷), 61.4 (C-6⁵, C-6⁷), 55.8 (C-2³), 54.6 (C-2¹), 54.5 (C-2⁷), 53.9 (C-2⁷), 53.8 (C-2⁵, C-2⁵), 20.4, 20.2, 20.1, 20.0, 19.8 (OAc)</p> <p>7: $[\alpha]_D^{25} = -27.9^\circ$ ($c = 0.5$ in Wasser); $\text{C}_{94}\text{H}_{133}\text{N}_9\text{O}_{45}$ (2109.12); ESI-MS (Wasser/Methanol, 1/1): $M_{\text{ber.}} = 2107.8$, $M_{\text{gef.}} = 1055.4$ ($M + 2\text{H}^+$); ^1H-NMR (500 MHz, D_2O, $[\text{D}_6]\text{-Aceton}$ als interner Standard): $\delta = 7.36\text{--}7.12$ (m, 20H, Ar), 4.98 (d, 1H, $J(1,2) < 1.0$ Hz, H-1⁴), 4.78 (d, $J_{\text{gem}} = 12.2$ Hz, 1H, CH₂O), 4.68 (d, $J_{\text{gem}} = 12.0$ Hz, 1H, CH₂O), 4.61 (d, 1H, $J(1,2) < 1.0$ Hz, H-1⁴), 4.53–4.50 (m, 2H), 4.47–4.31 (m, 6H, H-1³, H-1⁵, H-1⁷, H-1⁷, CH₂O), 4.25 (m, 3H, H-1², CH₂O), 4.10 (m, 2H, H-1⁵, H-2⁴), 3.97–3.92 (m, 3H, H-2³, H-3⁴, H-6a⁴), 3.22–3.18 (m, 2H, H-5², H-5³), 2.86 (m, 1H, H-5⁵), 1.91, 1.90, 1.89, 1.88, 1.66, 1.62 (6s, 18H, NAc); ^{13}C-NMR (125 MHz, D_2O, $[\text{D}_6]\text{-Aceton}$ als interner Standard): $\delta = 174.9\text{--}174.0$ (C=O), 138.6, 138.4, 137.7, 137.6 (C-ipso, Ar), 129.1–128.2 (C-Ar, C-1¹), 101.8 (C-1⁷), 100.7 (C-1²), 100.5 (C-1³), 100.2 (C-1⁵), 99.8 (C-1⁵), 99.5 (C-1⁴), 96.9 (C-1⁴), 88.8 (C-1¹), 81.0 (C-3³), 80.4 (C-3¹), 80.3 (C-3³), 78.4 (C-4⁴), 77.6 (C-4²), 76.9 (C-2⁴), 76.5 (C-2⁴), 76.3 (C-5¹), 76.24 (C-5⁷), 76.16 (C-5⁵), 76.14 (C-5⁷), 75.8 (C-5³), 75.4 (C-4¹), 74.6 (C-5³), 74.2, 74.10 (CH₂O), 74.07 (C-5², C-3⁷), 73.9, 73.6 (C-3⁵, C-3⁷), 73.3 (C-3⁵, CH₂O), 72.1 (C-5⁴), 71.8 (C-5⁴), 70.7 (C-2³), 70.3, 70.1 (C-4⁵, C-4⁷, C-4⁷, C-6⁴), 69.9 (C-3⁴, C-4⁵), 68.4 (C-3⁴), 68.3 (C-6²), 68.0 (C-6¹), 67.8 (C-4⁴), 65.8 (C-4³), 65.6 (C-6³), 61.4 (C-6⁴), 61.1, 61.0 (C-6⁵, C-6⁷), 60.5 (C-6⁵), 55.9 (C-2⁵, C-2⁷, C-2⁷), 55.7 (C-2⁵), 55.3 (C-2²), 54.0 (C-2¹), 22.8, 22.7, 22.5, 22.3 (NAc)</p>
--

[a] NBA = *m*-Nitrobenzylalkohol, Pht = Phthaloyl.

Eine zusätzliche Erweiterung des flexiblen Synthesekonzepts gelang bereits mit einem modifizierten A-Baustein, mit dem Core-fucosylierte N-Glycane zugänglich wurden,^[22] sowie durch die Glycosylierung der freien OH-4³-Funktion eines aus A und B aufgebauten Heptasaccharids^[5c] unter Bildung eines „bisected“ Octasaccharids.^[23]

Erstmals konnten mit den vielseitig einsetzbaren Bausteinen A–D nach einem einzigen Synthesepfad die häufigsten Grundkörper komplexer N-Glycane aufgebaut werden. Die modulare Struktur dieser natürlichen Oligosaccharide wurde somit in eine effiziente chemische Synthese übersetzt. Dadurch lassen sich in Zukunft diese sonst sehr schwer isolierbaren und mit vielfältigen biologischen Funktionen versehenen N-Glycane nach Bedarf

herstellen. Die durchweg in hohen Ausbeuten erhaltenen Verbindungen wurden von einem Großteil der Schutzgruppen befreit und sind somit für eine Funktionalisierung des anomeren Zentrums sowie einer enzymatischen Verlängerung des Oligosaccharidteils zugänglich.

Eingegangen am 27. Januar 1997 [Z10037]

Stichworte: Glycane • Glycoside • Glycosylierungen • Kohlenhydrate • Polysaccharide

- [1] Übersicht: E. G. Berger, E. Buddecke, J. P. Kamerling, A. Kobata, J. C. Paulson, J. F. G. Vliegthart, *Experientia* **1982**, *38*, 1129–1162.
- [2] Übersichten: a) R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683–720; b) A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130; c) H. Schachter, *Biochem. Cell. Biol.* **1984**, *64*, 163–181.
- [3] M. Takeuchi, N. Inoue, T. W. Strickland, M. Kobuta, M. Wada, R. Shimizu, S. Hoshi, H. Kozutsumi, S. Takasaki, A. Kobata, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 7819–7822.
- [4] a) Übersicht: H. Paulsen, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 851–857; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 823–839.
- [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) C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2507–2510; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2350–2353.
- [6] a) H. Paulsen, B. Helpap, *Carbohydr. Res.* **1991**, *216*, 289–313; b) J. Kerekgyarto, J. P. Kamerling, J. B. Bouwstra, J. F. G. Vliegthart, A. Liptak, *ibid.* **1989**, *186*, 51–62; c) K. K. Sadozai, Y. Ito, T. Nukada, T. Ogawa, A. Kobata, *ibid.* **1986**, *150*, 91–101; d) K. K. Sadozai, T. Nukada, Y. Ito, Y. Nakahara, T. Ogawa, A. Kobata, *ibid.* **1986**, *157*, 101–123; e) J. Arnarp, M. Haraldsson, J. Lönngren, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1982**, 1841–1844; f) *Carbohydr. Res.* **1981**, *97*, 307–313; g) J. Arnarp, J. Lönngren, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1981**, 2070–2074.
- [7] a) S. W. Homanns, R. A. Dwek, D. L. Fernandes, T. W. Rademacher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 6286–6289; b) T. Endo, *J. Chromatogr. A* **1996**, *720*, 251–261; c) K. G. Rice, M. L. Corradi Da Silva, *ibid.* **1996**, *720*, 235–249.
- [8] a) M. H. Chiu, T. Tamura, M. S. Wadhwa, K. G. Rice, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 16195–16202; b) M. H. Chiu, V. H. Thomas, H. J. Stubbs, K. G. Rice, *ibid.* **1995**, *270*, 24024–24031; c) C.-H. Lin, M. Shimazaki, C.-H. Wong, M. Koketsu, R. R. Juneja, M. Kim, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1625–1630; d) J. Helin, H. Maaheimo, A. Seppo, A. Keane, O. Renkonen, *Carbohydr. Res.* **1995**, *266*, 191–209.
- [9] C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1170–1173; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1102–1104.
- [10] Der Donor **C** wurde durch folgende Reaktionssequenz erhalten: a) Benzyl-3,6-di-O-allyl- α -D-mannopyranosid [11] und 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- α , β -D-glucopyranosylfluorid [12], CH_2Cl_2 , 4-Å-Molekularsieb, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (81%); b) 1. PdCl_2 , NaOAc , AcOH ; 2. Ac_2O /Pyridin, 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) (77%); c) 1. Pd/H_2 , MeOH ; 2. Cl_3CCN , 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU), CH_2Cl_2 (80%).
- [11] J. Arnarp, J. Lönngren, *Acta Chem. Scand. B* **1978**, *32*, 696–697.
- [12] b) C. Unverzagt, H. Kunz, *J. Prakt. Chem.* **1992**, *334*, 570–578.
- [13] Der Donor **D** wurde durch folgende Reaktionssequenz erhalten: a) Benzyl-3,4-di-O-benzyl- α -D-mannopyranosid [14] und 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-desoxy-2-phthalimido- β -D-glucopyranosyltrichloracetimidat [15], CH_2Cl_2 , 4-Å-Molekularsieb, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (53%); b) 1. Pd/H_2 , MeOH ; 2. Ac_2O /Pyridin (70%); c) 1. Hydraziniumacetat, DMF; 2. Cl_3CCN , DBU, CH_2Cl_2 (68%).
- [14] J. Arnarp, M. Haraldsson, J. Lönngren, *Carbohydr. Res.* **1981**, *97*, 307–313.
- [15] R. R. Schmidt, W. Kinzy in *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. Vol. 50* (Hrsg.: D. Horton), Academic Press, New York, **1994**, S. 21–123.
- [16] Die Numerierung der Reste entspricht der von 6.
- [17] a) K. Bock, C. Pedersen, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1974**, 293–297; b) S. Wolfe, B. M. Pinto, V. Varma, R. Y. N. Leung, *Can. J. Chem.* **1990**, *68*, 1051–1062.
- [18] a) Y.-M. Zhang, A. Brodzky, P. Sinai, G. Saint-Marcoux, B. Perly, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1195–1216; b) P. Grice, S. V. Ley, J. Pietruszka, H. W. M. Priepke, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 206–208; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 197–200.
- [19] F. Cramer, N. Henrich, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 976–989.
- [20] a) H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 507–554; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 490–536; b) H. Kessler, P. Schmieder, M. Kurz, *J. Magn. Reson.* **1989**, *65*, 400–405.
- [21] O. Kanie, S. C. Crawley, M. M. Palcio, O. Hindsgaul, *Carbohydr. Res.* **1993**, *243*, 139–164.
- [22] J. Seifert, C. Unverzagt, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6527–6530.
- [23] a) C. Unverzagt, *Abstr. Pap. 17th Int. Carbohydr. Symp.* (Ottawa, Kanada), **1994**, B1.66; b) C. Unverzagt, J. Seifert, noch unveröffentlichte Ergebnisse.

Eine effiziente Synthese von Gangliosid GM2 für die Verwendung in Tumorimpfstoffen**

Julio C. Castro-Palomino, Gerd Ritter,*
Sheila R. Fortunato, Stefan Reinhardt,
Lloyd J. Old und Richard R. Schmidt*

Menschliche Krebszellen exprimieren Kohlenhydratantigene an ihrer Zelloberfläche, die als Zielmoleküle für eine spezifische Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern oder Impfstoffen dienen können.^[1] Beispiele für diese Antigene sind die Ganglioside GM2, GD2, GD3, O-Acetyl-GD3 und Fucosyl-GM1, das neutrale Glycosphingolipid globo-H, die T-, Tn- und sTn-Epitope auf Glycoproteinen sowie das Le^y-Epitop, das in Glycolipiden und Glycoproteinen vorkommt. Von diesen ist das Gangliosid GM2 von besonderem Interesse: a) GM2 kommt auf der Zelloberfläche von zahlreichen Krebsarten beim Menschen vor, z. B. Melanom, Sarkom und Nierenkrebs.^[2] b) GM2-reaktive Antikörper (poly- und monoklonale Antikörper von Mäusen und Menschen) sind „in vitro“ cytotoxisch für humane GM2⁺-Krebszellen.^[3,4] c) GM2 ist im Menschen wegen der gelegentlich natürlich vorkommenden niedrigtitrigen IgM-Antikörper gegen GM2,^[4] wegen der beim Menschen relativ leicht isolierbaren monoklonalen Antikörpern gegen GM2^[5] und wegen der Bildung von Antikörpern gegen GM2 nach Immunisierung mit GM2 enthaltenden Impfstoffen^[3,4,6–8] immunogen. d) Das Vorkommen von GM2-Antikörpern scheint bei Melanompatienten mit höheren Überlebenschancen und längeren krankheitsfreien Intervallen in Zusammenhang zu stehen.^[4] e) Keine toxischen Nebenwirkungen werden bei einer Immunreaktion auf GM2 beobachtet.^[4]

Es wurden bisher mehrere Ansätze untersucht, eine Immunantwort gegen GM2⁺-Krebszellen in Melanompatienten hervorzurufen, beispielsweise durch Immunisierung mit GM2⁺-Tumorzellen^[7] oder mit GM2, das aus Geweben aufgereinigt und mit immunologischen Adjuvantien gemischt verabreicht wurde.^[3,4] Neuere Impfstoffe in der klinischen Prüfung bestehen aus aufgereinigtem GM2, das chemisch an ein immunogenes Trägermolekül gekoppelt ist, und einem Adjuvans.^[6] Mit Impfstoffen, bestehend aus GM2⁺-Krebszellen oder an Bacillus Calmette Guerin (BCG) adsorbiertem GM2, wurden im allgemeinen Antikörper des IgM-Isotyps mit nur relativ niedrigen Serumtitern induziert. Diese Antikörper waren meist nur kurze Zeit im Serum nachweisbar, und eine sekundäre Immunantwort konnte nicht hervorgerufen werden. Die Eigenschaften der durch GM2 hervorgerufenen Immunantwort sind typisch für eine T-Zell-unabhängige Immunantwort.^[3,4] Es wurde gezeigt, daß nach Verabreichung eines Impfstoffes, der aus chemisch an das Trägermolekül KLH (keyhole hemocyanin) gekoppeltem und mit dem zu den Saponinen gehörenden Adjuvans QS21 besteht, die IgM-Antikörperantwort verstärkt und IgG-Antikörper gebildet werden.^[6] Die IgG-Antikörper waren im ELISA (enzym-linked immuno sorbent assay) nachweisbar, in dem als Antigen aufgereinigtes GM2 verwendet wurde. Allerdings reagierten diese IgG-Antikörper nicht mit humanen Krebszellen, die GM2 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren.^[8]

*] Prof. Dr. R. R. Schmidt, J. C. Castro-Palomino, S. Reinhardt
Fakultät für Chemie der Universität
D-78457 Konstanz
Dr. G. Ritter, S. R. Fortunato, Dr. L. J. Old
Ludwig Institute for Cancer Research
New York Branch at Memorial Sloan Kettering Cancer Center
1275 York Avenue, New York, NY 10021 (USA)

**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.