

DOI: 10.1002/ange.200502615

Totalsynthese eines Tetrasaccharid-Antigens von *Bacillus anthracis* – Basis für einen Impfstoff gegen Anthrax**

Daniel B. Werz und Peter H. Seeberger*

Wenige Tage nach den Anschlägen vom 11. September 2001 wurden in den USA vier unschuldige Menschen Opfer von Briefen, die ein scheinbar harmloses weißes Pulver enthielten. Ein Großteil der amerikanischen Bevölkerung war die folgenden Wochen über in Angst und Schrecken versetzt, der Briefverkehr in den USA kam dadurch fast zum Erliegen. Das weiße Pulver bestand aus Sporen des Gram-positiven Bodenbakteriums *Bacillus anthracis*.^[1,2] Diese Sporen nehmen weder durch extreme Temperaturen noch durch radioaktive Strahlung, weder durch aggressive Chemikalien noch durch ihr Austrocknen oder mechanische Beschädigungen größeren Schaden. Diese hohe Resistenz ermöglicht es den Bakterien, über viele Jahre hinweg im Boden zu überleben.^[3]

Die Sporen von *Bacillus anthracis* sind die Erreger von Anthrax (Milzbrand), einer meist zum Tode führenden Krankheit, die besonders Rinder, Schafe, Ziegen und andere Pflanzenfresser befällt. Menschen dagegen infizieren sich nur sehr selten, es sei denn, Anthrax-Sporen werden speziell präpariert und als biologische Waffe eingesetzt: Werden die Sporen eingeatmet und gelangen so in die Lunge, stirbt die betreffende Person üblicherweise innerhalb weniger Tage. Drei Polypeptide bilden das Anthrax-Toxin, das eine Hauptrolle in allen Stadien der Infektion spielt, angefangen von der Keimung der Sporen bis zum vaskulären Kollaps, der letztlich zum Tod führt.^[4]

Wie bei den meisten Bakterien findet man auch bei *Bacillus anthracis* spezifische Oligosaccharide auf der Oberfläche der Sporen, von denen man annimmt, sie seien für die erste Interaktion mit dem Wirt von entscheidender Bedeutung. Aus solchen spezifischen Oligosacchariden können Impfstoffe entwickelt werden, die eine Immunantwort hervorrufen.^[5] Kohlenhydrate verändern sich durch Evolutions-

prozesse weitaus langsamer als Proteine und haben daher zu einer ganzen Reihe häufig eingesetzter Impfstoffe geführt.^[6] Durch Verabreichung synthetischer Oligosaccharid-Impfstoffe wurden unter anderem bei verschiedenen Tumorerkrankungen,^[7] bei dem Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum*^[8] sowie bei *Haemophilus influenzae* Typ b^[9] vielversprechende Ergebnisse erzielt.

Die Struktur des Tetrasaccharids **1**, das sich auf der Oberfläche des Sporen-Glycoproteins BC1A von *Bacillus anthracis* findet, wurde 2004 aufgeklärt (Abbildung 1).^[10] Ein

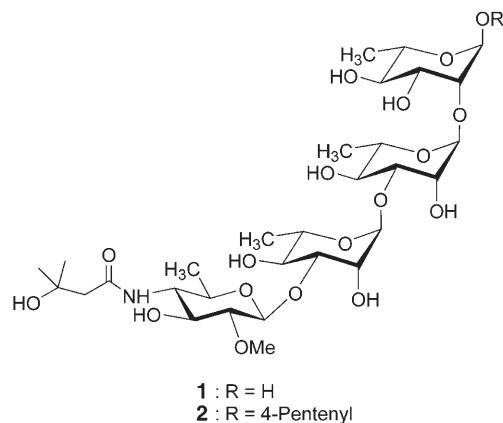


Abbildung 1. Struktur des terminalen Tetrasaccharids **1** auf dem am häufigsten vorkommenden Glycoprotein von *Bacillus anthracis* sowie seines zur Kupplung befähigten Analogons **2**.

besonderes Merkmal dieses Antigens ist der endständige nichtreduzierende Zucker, die so genannte Anthrose, die bislang selbst in nahe verwandten Arten nicht gefunden werden konnte.^[10] Aus diesem Grund ist **1** ein besonders attraktives Zielmolekül als potenzieller Anthrax-Impfstoff und sollte zu einer hochspezifischen Immunantwort gegen die Sporen des Erregers *Bacillus anthracis* führen.

Hier beschreiben wir die erste Totalsynthese des Tetrasaccharids **2**. Dazu haben wir eine konvergente [2+2]-Strategie gewählt, die zugleich einen einfachen Zugang zu Analoga und kürzeren Sequenzen ermöglicht. Die terminale Pentenyl-Einheit fungiert als Linker für die spätere Konjugation mit einem Transportprotein zur Entwicklung des Impfstoffes. Ein effizienter Zugang zum spezifischen Monosaccharid Anthrose ist ein wichtiger Teil dieser Totalsynthese.

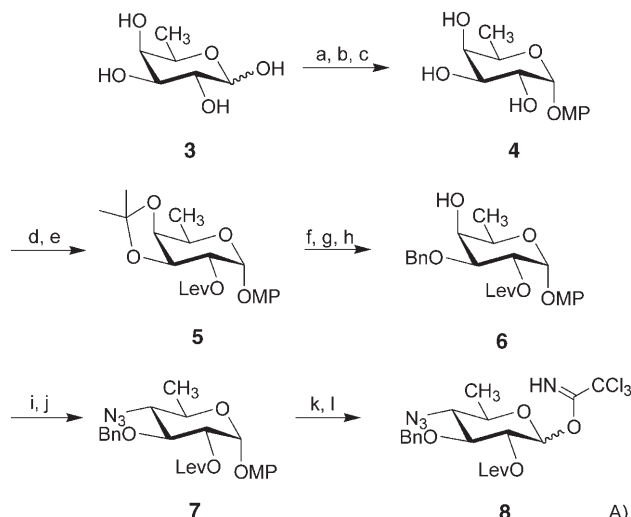
Der Aufbau des terminalen Zuckers, der Anthrose,^[10] beginnt ausgehend von käuflich erhältlicher D-Fucose (Schema 1). Acetylierung des Startmaterials **3**, Schützung des anomeren Zentrums mit 4-Methoxyphenol sowie Abspaltung der Acetat-Schutzgruppen führten zu **4**. Für die $\beta(1\rightarrow3)$ -glycosidische Bindung im Zielmolekül wird eine partizipierende Gruppe in Nachbarschaft zum anomeren Zentrum benötigt, die sich selektiv abspalten lässt, um später die Methylierung an O-2 durchzuführen. Als Schutzgruppe der Wahl erwies sich hierbei eine Lävulinoyl-Einheit. Daher wurde **4** zunächst mit 2,2-Dimethoxypropan und anschließend weiter zum C2-O-Lävulinoyl-**5** umgesetzt. Die Entfernung des Isopropylidens und eine über das Zinn-Ketal erfolgende selektive Benzylierung der Hydroxygruppe

[*] Dr. D. B. Werz, Prof. Dr. P. H. Seeberger
Laboratorium für Organische Chemie
Eidgenössisch Technische Hochschule (ETH) Zürich
ETH-Hönggerberg, HCI F 315
Wolfgang-Pauli-Strasse 10, 8093 Zürich (Schweiz)
Fax: (+41) 44-633-1235
E-mail: seeberger@org.chem.ethz.ch

[**] Diese Arbeit wurde unterstützt von der ETH Zürich, durch ein Feodor Lynen-Stipendium der Alexander von Humboldt-Stiftung (AvH) und durch ein Emmy Noether-Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft (für D.B.W.). Wir danken Prof. Dr. B. Jaun und B. Brandenburg für NMR-Messungen.

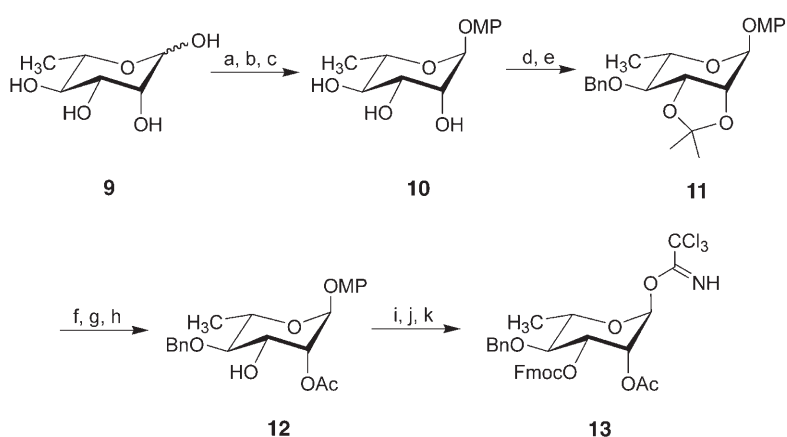
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

an C-3 ergeben **6**. Die Inversion der Konfiguration an C-4 wurde durch die Umsetzung der verbleibenden Hydroxygruppe mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid und die darauf folgende S_N2-artige Substitution des Triflats mit Natriumazid erreicht,^[11] was den Zugang zu **7** ermöglichte. Die Abspaltung der anomeren 4-Methoxyphenylgruppe mithilfe von wässriger Cerammoniumnitrat-Lösung und die nachfolgende Umsetzung des resultierenden Halbacetals mit Trichloracetonitril und katalytischen Mengen Natriumhydrid als Base ergaben das Anthrose-Trichloracetimidat **8**. Ein alternativer, deutlich längerer Syntheseweg zum Anthrose-Monosaccharid wurde kürzlich beschrieben.^[12]



Scheme 1. Synthese des Anthrose-Bausteins **8**. Reagentien und Bedingungen: a) Ac₂O, Pyridin, 12 h, quant.; b) MPOH, BF₃·OEt₂, Aceton, 0 °C → 25 °C, 12 h, 71 %; c) NaOMe, MeOH, 6 h, quant.; d) 2,2-Dimethoxypropan, BF₃·OEt₂, Aceton, 0 °C → 25 °C, 12 h, 96 %; e) LevOH, DMAP, DIPC, CH₂Cl₂, 0 °C, 3 h, 92 %; f) HCl (pH 3), MeOH, 50 °C, 18 h, 85 %; g) *n*Bu₄SnO, Toluol, Wasserabscheider, Rückfluss, 2 h; h) BnBr, TBAI, Toluol, Rückfluss, 3 h, 95 % (2 Stufen); i) Tf₂O, Pyridin, 0 °C, 90 min; j) NaN₃, DMF, 25 °C, 10 h, 80 % (2 Stufen); k) CAN, H₂O/CH₃CN, 25 °C, 1 h; l) Cl₃CCN, NaH, CH₂Cl₂, 25 °C, 45 min, 78 % (2 Stufen). MPOH = 4-Methoxyphenol, LevOH = Lävulinsäure, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, DIPC = Diisopropylcarbodiimid, Bn = Benzyl, TBAI = Tetrabutylammoniumiodid, CAN = Cerammoniumnitrat.

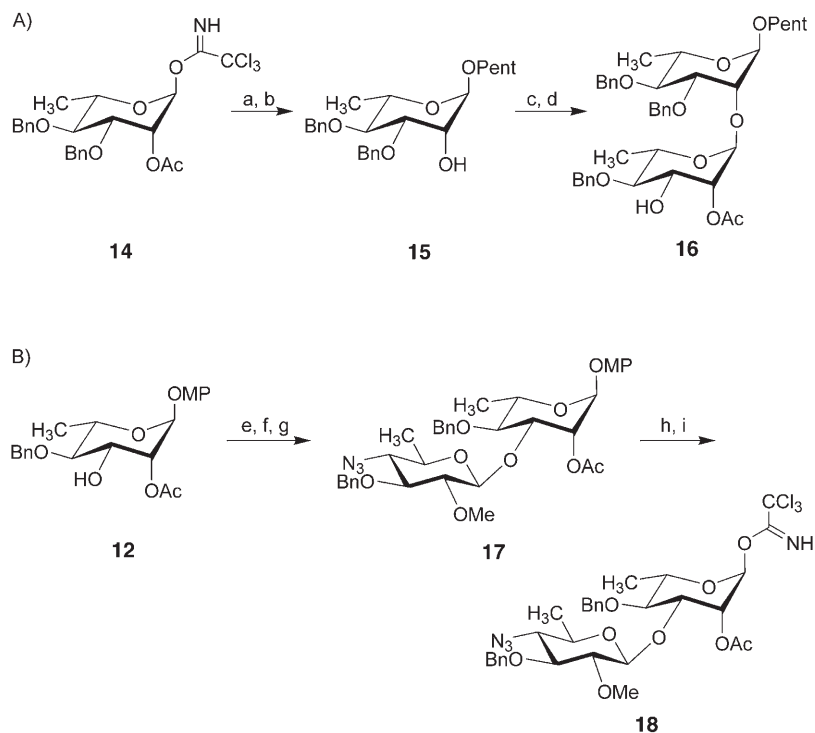
Als nächste Einheit wurde der Rhamnose-Baustein **13** synthetisiert (Schema 2). Er enthält eine partizipierende Gruppe an C-2, um α-Selektivität zu gewährleisten, und eine leicht entfernbare Schutzgruppe (Fmoc) an Position 3. Zunächst wurde das anomere Zentrum unter den schon beschriebenen Bedingungen durch 4-Methoxyphenyl geschützt.^[13] Die Bildung des *cis*-verknüpften Acetals und die anschließende Benzylierung ergaben **11**. Die Umsetzung des Acetals zum entsprechenden Orthoester und dessen Ringöffnung zum kinetisch bevorzugten axialen Acetat führten anschließend zu **12**. Die verbleibende Hydroxygruppe wurde mit Fmoc geschützt und das 4-Methoxyphenylglycosid gespalten, wonach schließlich durch die Reaktion mit Trichloracetonitril



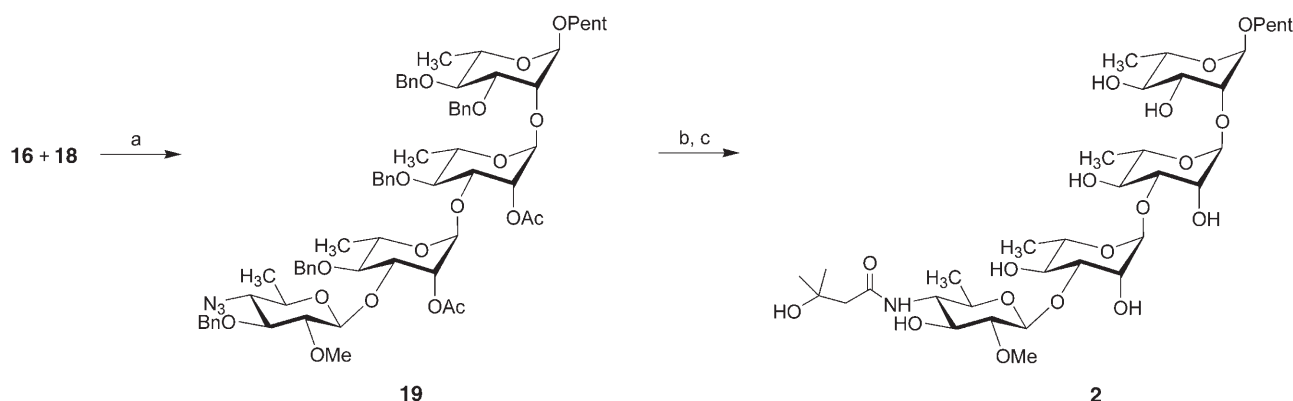
Scheme 2. Synthese des Rhamnose-Bausteins **13**. Reagentien und Bedingungen: a) Ac₂O, Pyridin, 12 h, quant.; b) MPOH, BF₃·OEt₂, Aceton, 0 °C → 25 °C, 12 h, 80 %; c) NaOMe, MeOH, 12 h, 96 %; d) 2,2-Dimethoxypropan, BF₃·OEt₂, Aceton, 0 °C → 25 °C, 12 h, 84 %; e) NaH, BnBr, DMF, 0 °C → 25 °C, 4 h, quant.; f) HCl (pH 3), MeOH, 50 °C, 89 %; g) 1,1,1-Triethoxyethan, *para*-Toluolsulfonsäure (kat.), DMF, 50 °C, 50 min; h) AcOH/H₂O (4:1, v/v), 10 °C, 10 min, 98 % (2 Stufen); i) FmocCl, Pyridin, 25 °C, 2 h, 88 %; j) CAN, H₂O/CH₃CN, 25 °C, 1 h, 76 %; k) Cl₃CCN, NaH, CH₂Cl₂, 25 °C, 1 h, 94 %. Fmoc = Fluorenylmethoxycarbonyl.

in Gegenwart katalytischer Mengen Natriumhydrid das geschützte Monosaccharid **13** erhalten wurde.

Der Aufbau des Tetrasaccharids über eine [2+2]-Strategie beginnt mit der Reaktion des literaturbekannten Rhamnose-Bausteins **14**^[14] mit 4-Penten-1-ol (Schema 3). Die Pentenyl-Einheit ermöglicht die spätere Konjugation des Tetrasaccha-



Scheme 3. Synthese der Disaccharid-Einheiten **16** (A) und **18** (B). Reagentien und Bedingungen: a) 4-Penten-1-ol, TMSOTf, CH₂Cl₂, –20 °C, 45 min, 79 %; b) NaOMe, MeOH, 4 h, 96 %; c) **13**, TMSOTf, CH₂Cl₂, 0 °C, 1 h, 91 %; d) Piperidin, DMF, 25 °C, 30 min, 89 %; e) **8**, TMSOTf, CH₂Cl₂, 0 °C, 1 h, 90 %; f) Hydrazinacetat, CH₂Cl₂, MeOH, 25 °C, 12 h, quant.; g) MeI, Ag₂O, THF, Me₂S (kat.), 25 °C, 8 h, 73 %; h) CAN, H₂O/CH₃CN, 25 °C, 1 h; i) Cl₃CCN, NaH, CH₂Cl₂, 25 °C, 1 h 95 % (2 Stufen). TMSOTf = Trimethylsilyltriflat.



Schema 4. Abschluss der Totalsynthese von **2**. Reagentien und Bedingungen: a) TMSOTf, CH₂Cl₂, 0 °C, 70 min, 73 %; b) Na/NH₃(l), THF, –78 °C, 60 %; c) 3-Hydroxy-3-methylbutansäure, HATU, DIPEA, DMF, 25 °C, 2 h, 75 %. HATU = *N*-[(Dimethylamino)-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridin-1-yl-methylen]-*N*-methylmethanaminium-hexafluorophosphat, DIPEA = Diisopropylethylamin.

rids an ein Transportprotein, das zur Entwicklung des Impfstoff-Kandidaten benötigt wird. Die Entfernung der Acetat-Funktion an C-2, eine weitere Glycosylierung mit **13** und die Abspaltung von Fmoc ergaben das Disaccharid **16**. Während der letztgenannten Reaktion wurde zu einem geringen Teil (ca. 10 %) die Wanderung der Acetat-Funktion von C-2 nach C-3 beobachtet. Das entsprechende, unerwünschte Nebenprodukt ließ sich jedoch säulenchromatographisch leicht entfernen.

Die Synthese des zweiten Disaccharids (Schema 3B) begann mit der Glycosylierung der Anthrose-Einheit **8** durch Rhamnose **12**, einer Zwischenstufe beim Aufbau des Bausteins **13**. Der Lävulinoyl-ester gewährleistete bei der Glycosylierung die β -Selektivität. Der benötigte Methoxy-substituent an C-2 war weitaus schwieriger einzuführen als ursprünglich geplant: Selbst starke Methylierungsreagentien wie Methyltriflat und Diazomethan führten zu keinem befriedigenden Ergebnis. Erst Methyljodid in Gegenwart von Silber(I)-oxid und katalytischen Mengen Dimethylsulfid führte zu der gewünschten Transformation. Die oben erwähnte Methode zur Umwandlung von Methoxyphenylglycosid in das Trichloracetimidat ergab das Disaccharid **18**.

Die beiden Disaccharid-Bausteine **16** und **18** wurden unter typischen Glycosylierungsbedingungen gekuppelt, wobei Tetrasaccharid **19** entstand (Schema 4). Die vollständige Abspaltung aller Schutzgruppen sowie die Reduktion der Azid-Einheit zum Amin gelangen mit Natrium in flüssigem Ammoniak. Die Bildung des Amids mit 3-Hydroxy-3-methylbutansäure unter Einsatz von HATU^[15] führte zum Zielmolekül **2**, dessen Struktur durch ausführliche spektroskopische Studien und unter Berücksichtigung der literaturbekannten Daten für **1** bestätigt werden konnte.

Wir haben hier einen konvergenten Syntheseweg zu einem Tetrasaccharid-Antigen des Anthrax-verursachenden Bakteriums *Bacillus anthracis* präsentiert. Zurzeit werden sowohl immunologische Studien durchgeführt als auch weitere Derivate hergestellt. Über die Ergebnisse dieser Arbeiten wird in Kürze berichtet.

Eingegangen am 26. Juli 2005

Online veröffentlicht am 19. September 2005

Stichwörter: Anthrose · Impfstoffe · Kohlenhydrate · Oligosaccharide · Totalsynthesen

- [1] M. Mock, A. Fouet, *Annu. Rev. Microbiol.* **2001**, 55, 647–671.
- [2] P. Sylvestre, E. Couture-Tosi, M. Mock, *Mol. Microbiol.* **2002**, 45, 169–178.
- [3] W. L. Nicholson, N. Munakata, G. Horneck, H. J. Melosh, P. Setlow, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, 64, 548–572.
- [4] M. Moayeri, S. H. Leppla, *Curr. Opin. Microbiol.* **2004**, 7, 19–24, zit. Lit.
- [5] B. Kuberan, R. J. Linhardt, *Curr. Org. Chem.* **2000**, 4, 653–677.
- [6] R. Roy, *Drug Discovery Today Technol.* **2004**, 1, 327–336.
- [7] S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 882–911; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 836–863.
- [8] L. Schofield, M. C. Hewitt, K. Evans, M.-A. Siomos, P. H. Seeberger, *Nature* **2002**, 418, 785–789.
- [9] V. Verez-Bencomo, V. Fernández-Santana, E. Hardy, M. E. Toledo, M. C. Rodríguez, L. Heynngnezz, A. Rodríguez, A. Baly, L. Herrera, M. Izquierdo, A. Villar, Y. Valdés, K. Cosme, M. L. Deler, M. Montane, E. Garcia, A. Ramos, A. Aguilar, E. Medina, G. Toraño, I. Sosa, I. Hernandez, R. Martínez, A. Muzachio, A. Carmentates, L. Costa, F. Cardoso, C. Campa, M. Diaz, R. Roy, *Science* **2004**, 305, 522–525.
- [10] J. M. Daubenspeck, H. Zeng, P. Chen, S. Dong, C. T. Steichen, N. R. Krishna, D. G. Pritchard, C. L. Turnbough, Jr., *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 30945–30953.
- [11] J. Golik, H. Wong, B. Krishnan, D. M. Vyas, T. W. Doyle, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 1851–1854.
- [12] R. Saksena, R. Adamo, P. Kováč, *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 1591–1600.
- [13] K. Sarkar, I. Mukherjee, N. Roy, *J. Carbohydr. Chem.* **2003**, 22, 95–107.
- [14] A. Fürstner, T. Müller, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 7814–7821.
- [15] L. A. Carpino, A. El-Faham, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 3561–3564.