

Kohlenhydrate

Synthese von pentaantennären N-Glycanen mit Bisecting-GlcNAc und Core-Fucose**

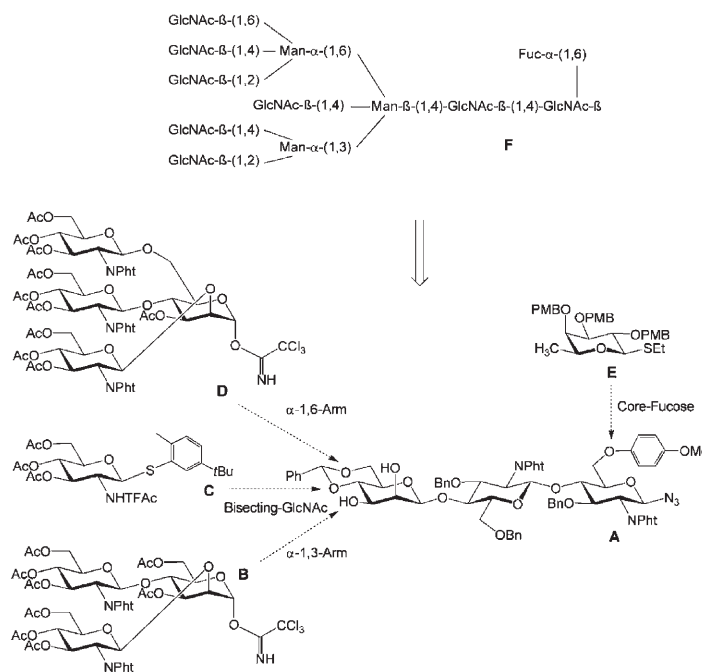
Steffen Eller, Ralf Schuberth, Gislinde Gundel, Joachim Seifert und Carlo Unverzagt*

Professor Joachim Thiem zum 65. Geburtstag gewidmet

Rekombinante therapeutische Glycoproteine tragen hauptsächlich mit Asparagin verknüpfte Oligosaccharide (N-Glycane), die oft entscheidend für die Wirksamkeit des Glycoproteins sind. Der heterogene Aufbau der Glycane aus natürlichen Glycoproteinen ist ein erhebliches Hindernis für die gesamte glycobiologische Forschung,^[1] und trotz der Verbesserungen bei der chemischen Synthese von N-Glycanen^[2–10] werden für biologische Studien nach wie vor meist N-Glycane aus natürlichen Quellen eingesetzt.^[11] Wir haben eine modulare Bausteinsynthese für die häufigsten N-Glycane des komplexen Typs entwickelt,^[12] die nach einem zufälligen Ergebnis erstmals das N-Glycan mit den meisten Verzweigungen und Core-Substitutionen (Glycan **F**; Schema 1) zugänglich macht.

Die von uns entwickelten modularen Bausteine ermöglichen die Synthese von komplexen N-Glycanen mit bis zu vier Antennen^[12] sowie einem Bisecting-GlcNAc-Rest^[4,13,14] oder einem Core-Fucose-Rest.^[15] Dabei waren „bisected“ N-Glycane mit drei oder vier Antennen besonders schwierig zu erhalten.^[4] Auf der Grundlage neuer Fortschritte^[14] in der Synthesemethodik untersuchten wir das komplexe N-Glycan **F** (Schema 1). Dort weist das Man α 1,6Man β -Element einen besonders hohen Verzweigungsgrad auf, da beide Mannoseeinheiten jeweils vier glycosidische Bindungen enthalten. Pentaantennäre N-Glycane wurden in Ovomuroid^[16] und Fisch-Hyosophorin^[17] sowie in CHO-Zellen^[18] und HepG2-Zellen.^[19]

Wegen der Komplexität von **F** wurden zunächst pentaantennäre N-Glycane ohne Core-Substitution aufgebaut. Ausgehend von Benzylmannosid (**2**) wurde über ein Stannylacetal eine 3-O-Allylierung (**3**) erreicht (Schema 2).^[20,21] Die dreifache Glycosylierung (6 Äquiv. Donor **1**) führte zum Tetrasaccharid **4** (77 %), das zu **5** desallyliert wurde. Die anschließende Acetylierung gelang erst bei Zugabe von DMAP.



Schema 1. Retrosynthese von pentaantennären N-Glycanen mit Bisecting-GlcNAc und Core-Fucose. Ac = Acetyl, Pht = Phthalimido, Bn = Benzyl, TFAc = Trifluoracetyl, PMB = *p*-Methoxybenzyl.

Nach der Debenzylierung konnte das Halbacetal zum Imidat **D** umgesetzt werden, dessen optimierte Kupplung mit dem Hexasaccharid **12** das Decasaccharid **13** in 65 % Ausbeute ergab (Schema 3).

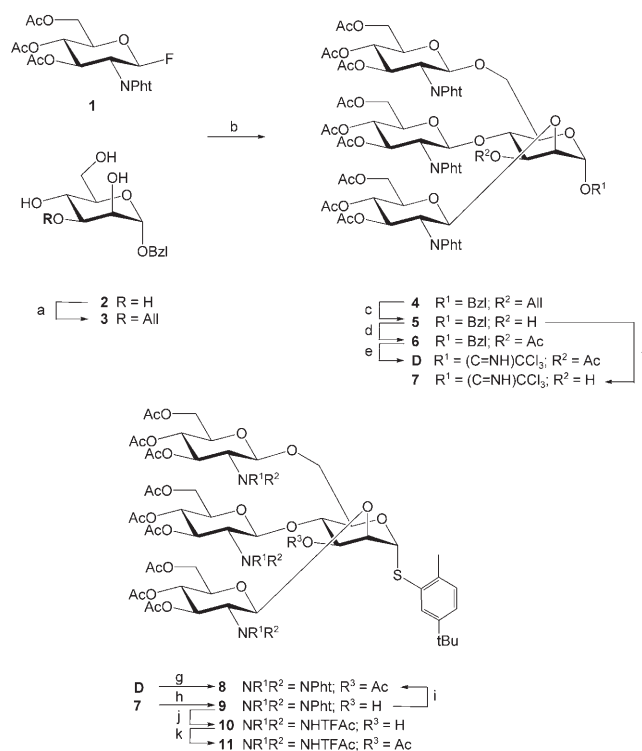
Wegen der hohen Reaktivität des Donors **D** wurde der zusätzliche Einbau eines Bisecting-GlcNAc-Rests und einer Core-Fucose versucht. Dazu wurde Donor **B**^[12] mit dem Core-Trisaccharid **A** verknüpft (Schema 4).^[15] Das entstandene Hexasaccharid (80 %) wurde acetyliert und debenzylideniert (75 % über 2 Stufen). Nach der selektiven Chloracetylierung von **14** konnte das Hexasaccharid **15** mit dem Thioglycosid **C**^[4] zum „bisected“ Heptasaccharid **16** verknüpft werden. Die Entfernung des Chloracetylrests lieferte den Akzeptor **17**, der mit dem Disaccharid **18** verknüpft wurde (77 %). Das Nonasaccharid **19** wurde entschützt und in 93 % Ausbeute zum triantennären Decasaccharid **21** fucosyliert.

Anschließend wurde die Kupplung des Heptasaccharids **17** mit Donor **D** (5 Äquiv.) versucht (Schema 5). Nach Flashchromatographie und HPLC-Trennung wurden lediglich 9 % der pentaantennären „bisected“ Verbindung **22** erhalten.

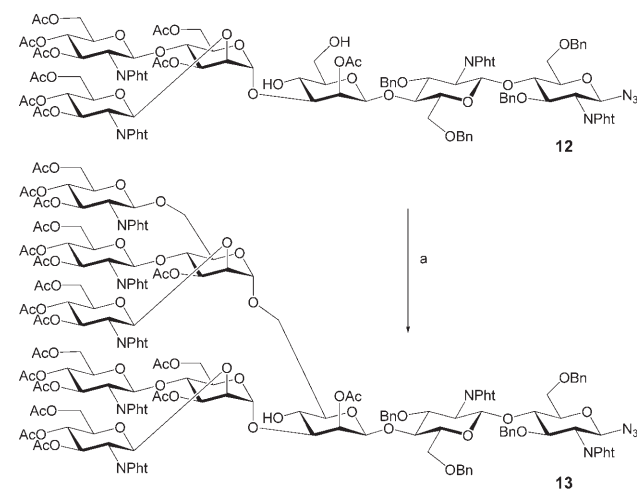
[*] S. Eller, R. Schuberth, G. Gundel, J. Seifert, Prof. C. Unverzagt
Bioorganische Chemie
Gebäude NW1, Universität Bayreuth
95440 Bayreuth (Deutschland)
Fax: (+49) 921-555-365
E-Mail: carlo.unverzagt@uni-bayreuth.de

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die Unterstützung dieser Arbeit.

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

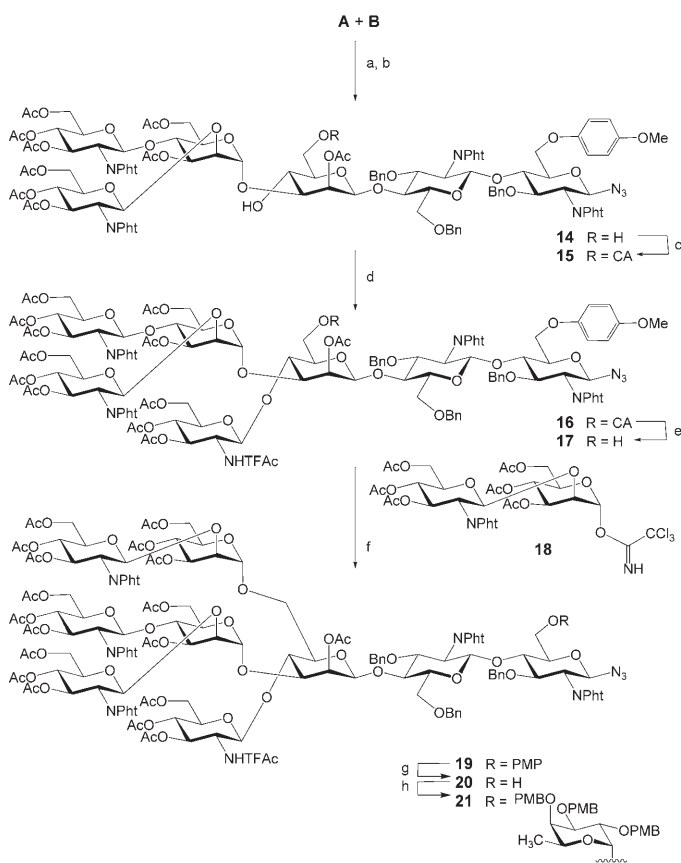


Schema 2. a) 1. Bu₄SnO, MeOH, Rückfluss; 2. AllBr, CsF, DMF, (1.–2.: 70%); b) BF₃·OEt₂, CH₂Cl₂, –10°C, MS 4 Å, 77%; c) PdCl₂, MeOH, 77%; d) Ac₂O, Pyridin, DMAP, 81%; e) 1. H₂, PdO·H₂O, AcOH, MeOH, 82%; 2. Cl₃CCN, DBU, CH₂Cl₂, 0°C, 85%; f) 1. H₂, PdO·H₂O, AcOH, MeOH, 77%; 2. Cl₃CCN, K₂CO₃, CH₂Cl₂, 82%; g) 5-*tert*-Butyl-2-methylthiophenol, BF₃·OEt₂, CH₂Cl₂, 0°C, MS 4 Å, 69%; h) 5-*tert*-Butyl-2-methylthiophenol, BF₃·OEt₂, CH₂Cl₂, –10°C, MS 4 Å, 86%; i) Ac₂O, Pyridin, DMAP, 58%; j) 1. Ethylendiamin, *n*BuOH, 80°C, 68%; 2. PfpOTFAc, NEt₃, THF; 3. Ac₂O, Pyridin, (2.–3.: 63%); k) Ac₂O, Pyridin, 84%. All = Allyl, MS = Molekularsieb, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, Pfp = Pentafluorphenyl, DBU = 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en, THF = Tetrahydrofuran.



Schema 3. a) D, BF₃·OEt₂, CH₂Cl₂, –20°C, MS 4 Å, 65%.

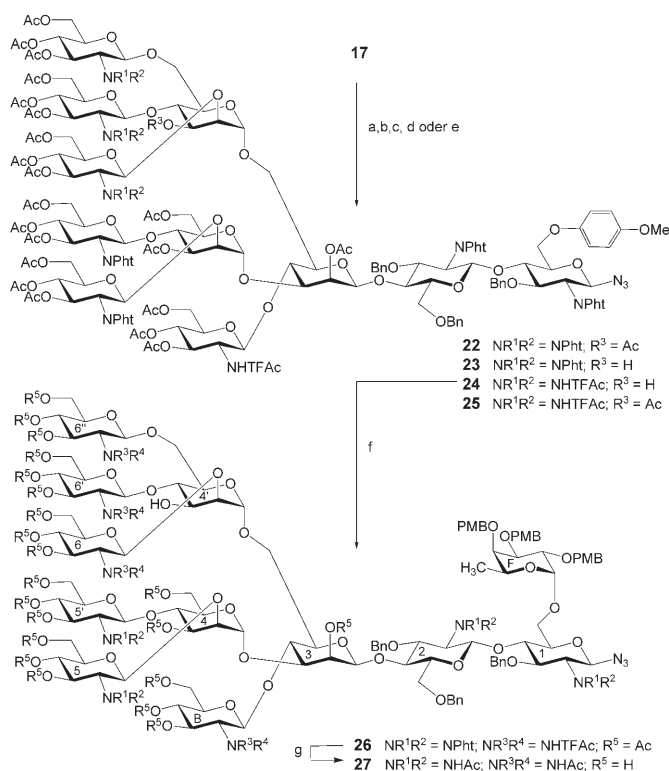
Um eine andere Aktivierung zu testen, wurde das Imidat **D** in das Thioglycosid **8** umgewandelt. Die Umsetzung des Donors **8** (3.3 Äquiv.) mit **17** ergab 16% Ausbeute nach HPLC-



Schema 4. a) A, B, BF₃·OEt₂, CH₂Cl₂, –25°C, MS 4 Å, 80%; b) 1. Ac₂O, Pyridin; 2. *p*TosOH·H₂O, CH₃CN, (1.–2.: 75%); c) Chloressigsäureanhydrid, Pyridin, CH₂Cl₂, 0°C, 77%; d) C, NIS, TFOH, CH₂Cl₂, –30°C, MS 4 Å, 61%; e) K₂CO₃, CH₂Cl₂/MeOH (10:1), –10°C, 84%; f) BF₃·OEt₂, CH₂Cl₂, –25°C, MS 4 Å, 77%; g) CAN, CH₃CN, Toluol, H₂O, 89%; h) E, CuBr₂, Bu₄NBr, CH₂Cl₂, DMF, 93%. TFOH = Trifluormethansulfonsäure, Tos = Toluol-4-sulfonyl, NIS = *N*-Iodsuccinimid, DMF = *N,N*-Dimethylformamid, CA = Chloracetyl, CAN = Cer(IV)-ammoniumnitrat, PMP = *p*-Methoxyphenyl.

Trennung, allerdings stellte sich das Produkt laut analytischer HPLC-MS als eine 1:1-Mischung aus Undecasaccharid **22** und einem weiteren Undecasaccharid heraus, dem eine Acetylgruppe fehlte. Da der Akzeptor **17** als Reinsubstanz vorlag, wurde Donor **8** durch HPLC-MS analysiert, wobei Anteile einer zweiten Verbindung mit einer fehlenden Acetylgruppe nachgewiesen wurden (10%). Diese Verbindung (**9**) war bereits in der unvollständig an O3 acetylierten Charge des Donors **D** enthalten. Aus der Glycosylierung mit dem 9:1-Gemisch der Donoren **8** und **9** wurde geschlossen, dass das Nebenprodukt **9** als sehr effizienter Donor wirkt, da daraus das Undecasaccharidprodukt **23** in 50% Anteil gebildet wurde. Überraschenderweise zeigten sich bei der HPLC-MS-Analyse des Reaktionsgemischs, das mit dem verunreinigten Imidat **D** (10% **7**) erhalten wurde, nur Spuren des Undecasaccharids **23** neben Undecasaccharid **22**.

Daher wurden die reinen Donoren **8** und **9** aus dem Zwischenprodukt **5** hergestellt. Das gewünschte Imidat **7** konnte aus **5** nur erhalten werden, wenn K₂CO₃ zugesetzt wurde, wodurch eine zusätzliche Imidatbildung an 3-OH



Schema 5. a) **D**, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, CH_2Cl_2 , -10°C , MS 4 Å (**22**: 9%); b) **8**, NIS, TfOH , CH_2Cl_2 , -30°C , MS 4 Å (**22**: 8%); c) **9**, NIS, TfOH , CH_2Cl_2 , -30°C , MS 4 Å (**23**: 31%); d) **10**, NIS, TfOH , CH_2Cl_2 , -30°C , MS 4 Å (**24**: 47%); e) **11**, NIS, TfOH , CH_2Cl_2 , -30°C , MS 4 Å (**25**: 38%); f) 1. **24**, CAN, CH_3CN , Toluol, H_2O , 82%; 2. **E**, CuBr_2 , Bu_4NBr , CH_2Cl_2 , DMF, 75%; g) 1. Ethylendiamin, $n\text{BuOH}$, 80°C ; 2. Ac_2O , Pyridin; 3. MeNH_2 (40% in H_2O) (1.–3.: 59%).

vermieden wurde.^[22,23] Aus dem Imidat **7** wurden die Thio-
glycoside **9** und **8** gewonnen.

Bei den Glycosylierungen mit den Donoren **8** und **9** zeigten sich deutliche Unterschiede. Erfreulicherweise führte der reine Donor **9** zum Undecasaccharid **23** in 31 % Ausbeute. Dagegen wurden mit reinem Donor **8** nur 8 % des Undecasaccharids **22** erhalten. Wir nahmen an, dass die niedrigen Kupplungsausbeuten mit Imidat **D** und Thioglycosid **8** vorwiegend auf einem sterischen Effekt der an O3 acetylierten Tetrasaccharide beruhten. Um den sterischen Anspruch des Donors **9** weiter zu verringern, wurden die peripheren Phthalimido-Reste gegen Trifluoracetamide ausgetauscht. Die N-trifluoracetylierten Donoren **10** und **11** wurden aus Donor **9** erhalten (Schema 2). Der an O3 acetylierte Donor **11** führte zum Undecasaccharid **25** in 38 % Ausbeute. Mit Donor **10** (3-OH) konnte die Ausbeute an Undecasaccharid **24** auf 47 % gesteigert werden. Eine Acetylgruppe an O3 kann die Reaktivität der Donoren **D**, **8** und **11** durch sterische und elektronische Effekte vermindern. Daher sollten die erhöhten Ausbeuten der „bisected“ Undecasaccharide mit den Donoren **9** und **10** auf den umgekehrten Effekten beruhen. Die peripheren Phthalimidogruppen und das Acetat an O3

des aktivierten Mannosids sind Schlüsselstellen, die simultan die Reaktivität der Donoren beeinflussen.

Die Abspaltung der PMP-Funktion aus **24** (82 %) und die anschließende Core-Fucosylierung ergaben das Dodecasaccharid **26** (75 %). Die basische Entschützung und N-Acetylierung zum Dodecasaccharid **27** wurde in drei Schritten als Eintopfreaktion durchgeführt. Verbindung **27** ist ein Derivat von **F** und trägt eine Azidogruppe zur Herstellung von Neoglycoproteinen oder Glycopeptiden.

Erstmals gelang die chemische Synthese von hoch verzweigten pentaantennären N-Glycanen und ihren Derivaten mit Bisecting- und Core-Fucosyl-Modifikation. Durch systematische Optimierung der sterisch anspruchsvollsten Glycosylierung konnten Schlüsselfunktionen ermittelt werden, die für sterische Hinderung im Innern und an der Peripherie ausschlaggebend sind. Die Verwendung der universell einsetzbaren modularen Bausteine sollte die chemische Synthese von verzweigten N-Glycanen generell erleichtern.

Eingegangen am 24. November 2006,
veränderte Fassung am 23. Januar 2007
Online veröffentlicht am 20. April 2007

Stichwörter: Glycoproteine · Glycosylierungen · Kohlenhydrate · Schutzgruppen · Sterische Hinderung

- [1] B. Lowe, A. Varki, *Essentials in Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **1999**.
- [2] A. Düffels, S. V. Ley, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1999**, 375.
- [3] D. M. Ratner, E. R. Swanson, P. H. Seeberger, *Org. Lett.* **2003**, 5, 4717.
- [4] H. Weiss, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 4389; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4261.
- [5] G. M. Watt, G. J. Boons, *Carbohydr. Res.* **2004**, 339, 181.
- [6] V. Y. Dudkin, J. S. Miller, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 736.
- [7] Y. Ito, S. Hagihara, I. Matsuo, K. Totani, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, 15, 481.
- [8] B. Li, H. Song, S. Hauser, L.-X. Wang, *Org. Lett.* **2006**, 8, 3081.
- [9] T. W. Rising, T. D. Claridge, N. Davies, D. P. Gamblin, J. W. Moir, A. J. Fairbanks, *Carbohydr. Res.* **2006**, 341, 1574.
- [10] S. Jonke, K. G. Liu, R. R. Schmidt, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 1274.
- [11] K. G. Rice, *Anal. Biochem.* **2000**, 283, 10.
- [12] C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2078; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1989.
- [13] C. Unverzagt, J. Seifert, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 4549.
- [14] R. Schuberth, C. Unverzagt, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 4201.
- [15] J. Seifert, C. Unverzagt, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6527.
- [16] K. Yamashita, J. P. Kamerling, A. Kobata, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 12809.
- [17] T. Taguchi, K. Kitajima, Y. Muto, S. Yokoyama, S. Inoue, Y. Inoue, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 228, 822.
- [18] L.-L. Y. Frado, J. E. Strickler, *Electrophoresis* **2000**, 21, 2296.
- [19] B. Campion, D. Leger, J. M. Wieruszkeski, J. Montreuil, G. Spik, *Eur. J. Biochem.* **1989**, 184, 405.
- [20] V. K. Srivastava, C. Schuerch, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 3269.
- [21] N. Nagashima, M. Ohno, *Chem. Lett.* **1987**, 141.
- [22] J. M. Lassaletta, K. Carlsson, P. J. Garegg, R. R. Schmidt, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 6873.
- [23] D. Qiu, R. R. Koganty, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 961.