



Republik
Österreich
Patentamt

(11) Nummer: **AT 396 474 B**

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 707/92

(22) Anmeldetag: 6. 4.1992

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 1.1993

(45) Ausgabetag: 27. 9.1993

(51) Int.Cl.⁵ : **C07H 5/06**
C07H 3/04, 3/06, G01N 33/53,
C12Q 1/34, 1/48

(56) Entgegenhaltungen:

C.A. 95(9), 1981, 81363G C.A. 75(9), 1971, 64158P

(73) Patentinhaber:

KOSMA PAUL DIPL.ING. DR.
A-1230 WIEN (AT).
MÄRZ LEOPOLD DIPL.ING. DR.
A-1170 WIEN (AT).

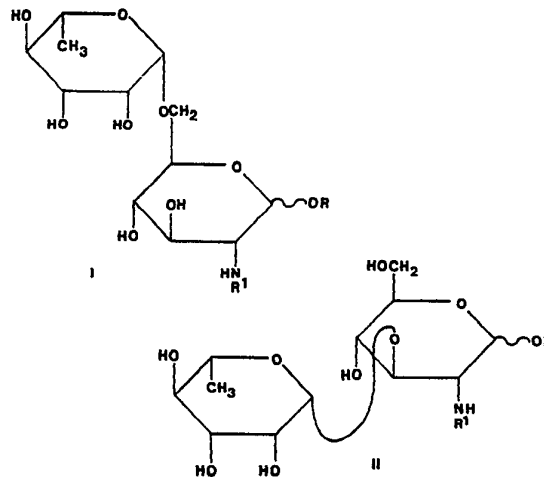
(54) NEUE D-GLUCOSAMIN-DERIVATE

(57) Herstellung und Verwendung von fucosylierten Di- und Tri-saccharid-Derivaten des D-Glucosamins
Disaccharid-Derivate der allgemeinen Formel I und II wobei R für Alkenyl, Aminoalkyl und R¹ für Acyl oder Wasserstoff steht.

Trisaccharid-Derivate der allgemeinen Formel III wobei R_a für Wasserstoff, Alkyl, Alkenyl, Aminoalkyl

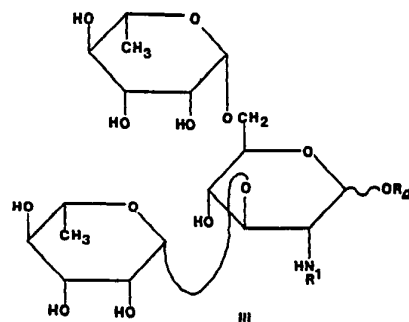
und R¹ für Wasserstoff oder Acyl steht, Methoden zur Herstellung dieser Verbindungen und Verwendung zur Herstellung von Reagenzien zur Bestimmung von Antikörpern und Enzymen.

Disaccharid-Derivate der allgemeinen Formel I und II



wobei R für Alkenyl, Aminoalkyl und R¹ für Acyl oder Wasserstoff steht.

Trisaccharid-Derivate der allgemeinen Formel III



wobei R_a für Wasserstoff, Alkyl, Alkenyl, Aminoalkyl und R¹ für Wasserstoff oder Acyl steht, Methoden zur Herstellung dieser Verbindungen und Verwendung zur Herstellung von Reagenzien zur Bestimmung von Antikörpern und Enzymen.

INV 0078018

AT 396 474 B

Beschreibung

Die Erfindung betrifft neue Di- und Trisaccharid-Derivate des D-Glucosamin, deren besondere Merkmale in der 3-Substitution, der 6-Substitution oder der 3,6-Disubstitution mit α -L-Fucosylresten besteht.

Die α -1-3- und die α -1-6-Fucosylierung von N-Acetylglucosamin sind weit verbreitete Charakteristika natürlich vorkommender Glykoproteine (E. Staudacher et al. (1991) Eur. J. Biochem. 199, 745-751). Die chemische Synthese von Teilstrukturen, die diese Merkmale enthalten, bildet ein Weg, die Beziehung zwischen Struktur und biologischem Effekt, zum Beispiel Immunogenität, zu erforschen. Aus eigenen Arbeiten geht hervor, daß Insekten-Glykoproteine beide Bindungen der Fucose an denselben N-Acetylglucosaminrest, entweder alternativ oder kumulativ, aufweisen können (E. Staudacher et al. (1992) Glycoconj. J., im Druck) und daß durch diese Substitutionsmuster immunogene Gruppierungen entstehen (Ch. Prenner et al. (1992) Biochem. J., im Druck).

Es ist daher von Interesse, D-Glucosamin-Derivate mit den genannten Strukturmerkmalen in einer reaktiven Form darzustellen, um sie mit geeigneten Makromolekülen, zum Beispiel Proteinen, zu Immunogenen und anderen anwendbaren Verbindungen konjugieren zu können. Die Errungenschaft der neuen D-Glucosamin-Derivate liegt darin, daß sie einen Zugang zur biologischen Signifikanz eines neu entdeckten natürlich vorkommenden Strukturcharakteristikums ermöglichen.

Dies ist deswegen von Bedeutung, weil Insektenzellen für die rekombinante Expression von heterologen Proteinen und Glykoproteinen verwendet werden; das Auftreten insektenspezifischer Strukturmerkmale kann bei der Administration im Wirbeltierorganismus zu Effekten führen, die einer Anwendung entgegenstehen; der Entwicklung von Nachweis- und Analysendiagnostika kommt dabei besondere Bedeutung zu.

Die besonderen Vorteile der neuen D-Glucosamin-Derivate liegen darin, daß sie

1. Teilstrukturen neu entdeckter natürlich vorkommender immunogener Kohlenhydrat-Seitenketten biologisch aktiver Glykoproteine darstellen,
2. den Zugang zur Aufklärung von Struktur-Wirkungsbeziehungen eröffnen,
3. aufgrund ihrer reaktiven Gruppe zur Herstellung von Konjugaten für die Anwendung als Immunogene, Antigene, Inhibitoren, an Chromatographie-Matrices immobilisierbare Affinitätsreaktanten und als Enzymsubstrate geeignet sind.

Beispiel 1

3,4-O-Isopropyliden-2-O-(4-methoxybenzyl)- α -L-fucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-O-allyl 2-acetamido-2-desoxy-3,4-O-(1,1,3,3,-tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)- β -D-glucopyranosid

Eine Suspension von S-Ethyl 3,4-O-isopropyliden-2-O-(4-methoxybenzyl)- β -L-fucopyranosid (350 mg), O-Allyl 2-acetamido-2-desoxy-3,4-O-(1,1,3,3,-tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)- β -D-glucopyranosid (330 mg) und Molekularsieb 4A (3 g) in 12 ml Diethylether/Dichlormethan 5:1 wurde während 6 h mit Iodonium-di-symCollidinium-perchlorat (520 mg) versetzt und 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Verdünnen mit Dichlormethan wurde über Celite abfiltriert, und das Filtrat wurde mit 5 % wäßriger Natriumthiosulfat-Lösung ausgeschüttelt. Nach Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat wurde eingeeengt und der Rückstand über Kieselgel mit Toluol/Ethylacetat 1:1 chromatographisch gereinigt. Man erhält so 160 mg Produkt als Sirup.

$[\alpha]_D^{20} -30^\circ$ (c = 1,6, CHCl_3).

$\text{C}_{40}\text{H}_{67}\text{NO}_{12}\text{Si}$:	Berechnet	C 59,3,	H 8,3,	N 1,7
	Gefunden	C 59,6,	H 8,1,	N 1,6.

Beispiel 2

3,4-O-Isopropyliden-2-O-(4-methoxybenzyl)- α -L-fucopyranosyl-(1-6)-O-allyl 2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid

Eine Lösung von 3,4-O-Isopropyliden-2-O-(4-methoxybenzyl)- α -L-fucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-O-allyl 2-acetamido-2-desoxy-3,4-O-(1,1,3,3,-tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)- β -D-glucopyranosid (87 mg) in 4 ml THF wurde mit 0,1 ml einer 1,1 molaren Lösung von Tetrabutylammoniumfluorid in THF versetzt. Nach 4 h Rühren bei Raumtemperatur wurde eingeeengt und über Kieselgel mit Ethylacetat/Methanol 5:1 chromatographisch gereinigt. Man erhält so 50 mg Produkt als Sirup.

$[\alpha]_D^{20} -100^\circ$ (c = 0,5, CHCl_3).

$\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{NO}_{11}$	Berechnet:	C 59,25,	H 7,28,	N 2,47
	Gefunden:	C 58,95,	H 7,69,	N 2,26.

Beispiel 3

2,3,4-Tri-O-acetyl- α -L-fucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-O-allyl 2-acetamido-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosid

Eine Lösung von 3,4-O-Isopropyliden-2-O-(4-methoxybenzyl)- α -L-fucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-O-allyl 2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (31 mg) in 5 ml Dichlormethan/Wasser 18:1 wurden mit 32 mg 2,3-Dicyano-5,6-dichlor-p-benzochinon versetzt und 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Eindampfen zur Trockene wurde in 5 ml trockenem Pyridin gelöst und mit 0,2 ml Acetanhydrid versetzt. Nach 5 h Rühren bei Raumtemperatur wurde unter Zusatz von Toluol eingedampft und über Kieselgel mit Ethylacetat chromatographiert. Man erhält so 21 mg Produkt als Sirup.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} -61^{\circ}$ (c = 1,0, CHCl₃).

C ₂₇ H ₃₉ NO ₁₅	Berechnet:	C 52,51,	H 6,37,	N 2,27
	Gefunden:	C 52,63,	H 6,59,	N 2,17.

Beispiel 4

α -L-Fucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-O-allyl 2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid

Eine Lösung von 16 mg 2,3,4-Tri-O-acetyl- α -L-fucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)-O-allyl 2-acetamido-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy- β -D-glucopyranosid in 5 ml absolutem Methanol wurde mit 0,5 ml einer 0,1 M methanolischen Natriummethoxid-Lösung versetzt und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zusatz von DOWEX-50 (H⁺-Form) bis zu neutralem pH wurde abfiltriert, eingedampft, in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Man erhält so 10 mg Produkt als amorphes Pulver.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} -30^{\circ}$ (c = 0,4, H₂O).

C ₁₇ H ₂₉ NO ₁₀	Berechnet:	C 50,12,	H 7,17,	N 3,44.
	Gefunden:	C 49,78,	H 7,25,	N 3,17.

¹³C-NMR: 175,5 (CO), 134,3 (-CH=), 119,0 (=CH₂), 101,2 (C-1), 100,2 (C-1'), 75,9 (C-5), 74,7 (C-3), 72,8 (C-5'), 71,5 (OCH₂), 70,7 (C-4), 70,4 (C-3'), 69,1 (C-2'), 68,1 (C-6), 67,7 (C-5'), 56,5 (C-2), 23,1 (CH₃), 16,3 (C-6').

Beispiel 5

O-Allyl 2-acetamido-2-desoxy-3,6-di-O-(3,4-O-isopropyliden-2-4-methoxybenzyl- α -L-fucopyranosyl)- β -D-glucopyranosid

50 mg 3,4-O-Isopropyliden-2-O-(4-methoxybenzyl)- α -L-fucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-O-allyl 2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid, 37 mg S-Ethyl 3,4-O-isopropyliden-2-O-(4-methoxybenzyl)- β -L-fucopyranosid werden in 9 ml Diethylether/Dichlormethan 1:1 gelöst und mit 2 g Molekularsieb 4A versetzt. Während 3 h werden 60 mg Iodonium-di-collidinium-perchlorat portionsweise zugesetzt und weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Verdünnen mit 50 ml Dichlormethan wird über Celite abfiltriert, mit 5%iger Natriumthiosulfat-Lösung ausgeschüttelt und nach Trocknen über Natriumsulfat eingedampft. Reinigung an Kieselgel mit Ethylacetat gibt 23 mg Produkt als Sirup.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} -79^{\circ}$ (c = 0,8, CHCl₃).

C ₄₅ H ₆₃ NO ₁₇	Berechnet	C 61,84,	H 7,26,	N 1,60
	Gefunden	C 61,41,	H 6,98,	N 1,47.

Beispiel 6

O-Allyl 2-acetamido-4-O-acetyl-3,6-di-O-(2,3,4-tri-O-acetyl- α -L-fucopyranosyl)-2-desoxy- β -D-glucopyranosid

17 mg O-Allyl 2-acetamido-2-desoxy-3,6-di-O-(3,4-O-isopropyliden-2-[4-methoxybenzyl]- α -L-fucopyranosyl)- β -D-glucopyranosid wurde in 4 ml Dichlormethan/Wasser 18:1 gelöst, mit 16 mg 2,3-dicyano-5,6-dichloro-benzochinon versetzt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde eingedampft, getrocknet, in 2 ml Pyridin aufgenommen und mit 0,3 ml Acetanhydrid versetzt. Nach 6 h Rühren bei Raumtemperatur wurde eingeeengt und über Kieselgel mit Hexan/Ethanol 3:1 gereinigt. Man erhält so 12 mg Produkt als farblose Kristalle.

Fp.: 172° (Ethylacetat)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} -120^\circ$ (C = 0,6, CHCl_3).

$\text{C}_{37}\text{H}_{53}\text{NO}_{21}$	Berechnet	C 52,42,	H 6,30,	N 1,65.
	Gefunden	C 52,28,	H 6,05,	N 1,44.

5

Beispiel 7

O-Allyl 2-acetamido-2-desoxy-3,6-di-O- α -L-fucopyranosyl- β -D-glucopyranosid

10 Eine Lösung von 7 mg O-Allyl 2-acetamido-4-O-acetyl-3,6-di-O-(2,3,4-tri-O-acetyl- α -L-fucopyranosyl)-2-desoxy- β -D-glucopyranosid in 1,5 ml Methanol wurde mit 0,2 ml einer 0,1 M methanolischen Natrium-methanolat Lösung versetzt und 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit DOWEX 50 (H^+ -Form) neutralisiert, abfiltriert und eingedampft. Der Rückstand wird in 2 ml Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Man erhält so 4,5 mg Produkt als amorphes Pulver.

15 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -112^\circ$ (c = 0,4, Wasser).

$\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{NO}_{14}$	Berechnet	C 49,90,	H 7,10,	N 2,53.
	Gefunden	C 50,59,	H 7,10,	N 2,23.

20

Beispiel 8

α -L-Fucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-O-3-(2-aminoethylthio)propyl 2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid

25 Eine Lösung von 5 mg α -L-Fucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-O-allyl 2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid und 6,5 mg cysteamin-Hydrochlorid in 2 ml Wasser wird in einer Quarzküvette 5 h bei 254 nm bestrahlt. Die Lösung wird über Sephadex G-25 entsalzt und gefriergetrocknet. Man erhält so 4,5 mg Produkt als amorphes Pulver.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} -28^\circ$ (c = 0,4, Wasser).

30 ^{13}C -NMR: 175,6 (CO), 102,3 (C-1), 100,3 (C-1'), 75,9 (C-5), 74,6 (C-3), 72,8 (C-5'), 70,9 (C-4), 70,5 (C-3'), 69,5 (OCH_2), 69,1 (C-2'), 68,3 (C-6), 67,7 (C-5'), 56,5 (C-2), 39,3 (NCH_2), 29,4, 29,0 (SCH_2), 28,0 (CH_2), 23,2 (CH_3), 16,3 (C-6').

Beispiel 9

35 Konjugation mit Rinder-Serumalbumin (BSA)

40 Eine Lösung von 2 mg α -L-Fucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-O-3-(2-aminoethylthio)propyl 2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid in 1 ml 0,1 M wässriger NaHCO_3 -Lösung wird zu einer Lösung von 2 μl Thiophosgen in 1 ml Chloroform zugesetzt und 4 h bei Raumtemperatur kräftig gerührt. Die organische Phase wird abpipettiert, und die wässrige Phase wird zweimal mit je 2 ml Chloroform extrahiert. Nach Durchleiten von Stickstoff wird die wässrige Phase zu einer Lösung von 4,0 mg BSA in 0,1 M NaHCO_3 /0,3 M NaCl (2 ml) zugegeben und 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird über Sephadex G-25 mit 0,01 M NaHCO_3 gereinigt. Die Ninhydrin-positiven Fraktionen werden gepoolt und gegen Wasser dialysiert. Man erhält so 3,3 mg BSA-Konjugat als weißes amorphes Pulver mit einer Ligandbelegung von 3 - 4 mol Oligosaccharid pro mol BSA.

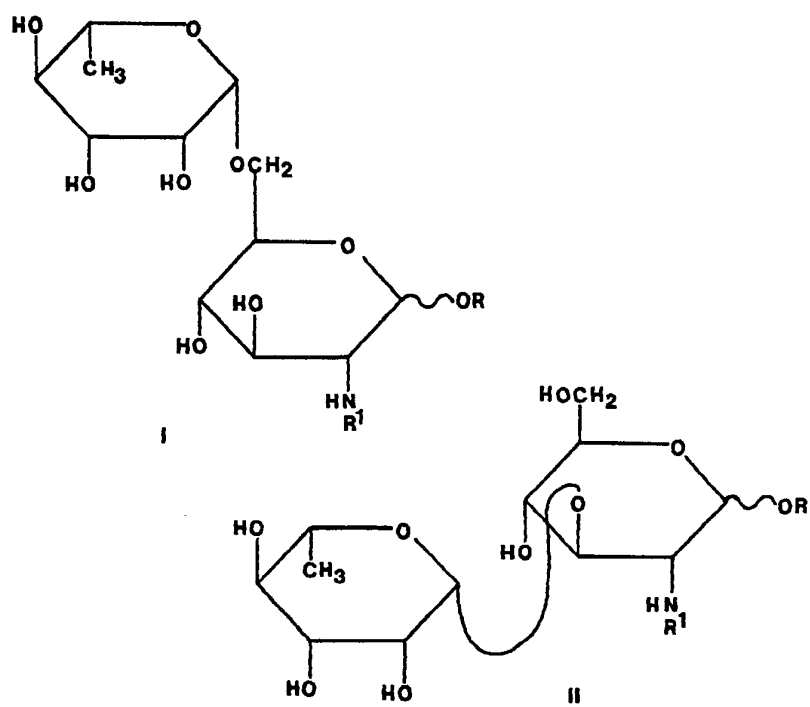
45

50

55

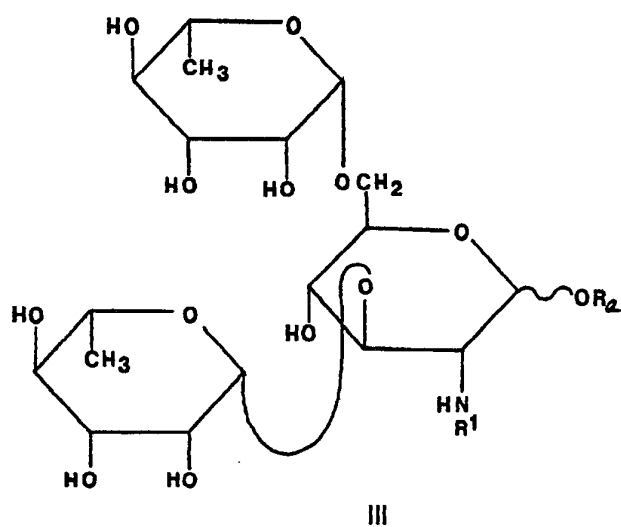
PATENTANSPRÜCHE

1. Neue D-Glucosaminderivate der allgemeinen Formel I und II



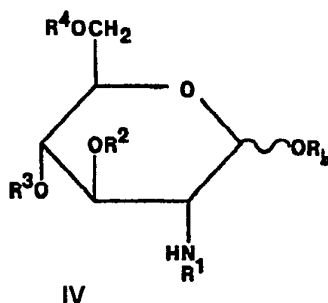
wobei R für Alkenyl, Aminoalkyl und R¹ für Wasserstoff und Acyl steht.

2. Neue D-Glucosaminderivate der Formel III

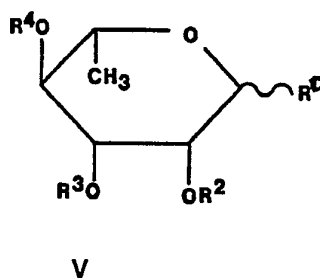


wobei R_a für Wasserstoff, Alkyl, Alkenyl, Aminoalkyl und R^1 für Wasserstoff oder Acyl steht.

3. Verfahren zur Herstellung der neuen D-Glucosaminderivate der allgemeinen Formel I und II, dadurch gekennzeichnet, daß man an sich bekannte D-Glucosaminderivate der allgemeinen Formel IV

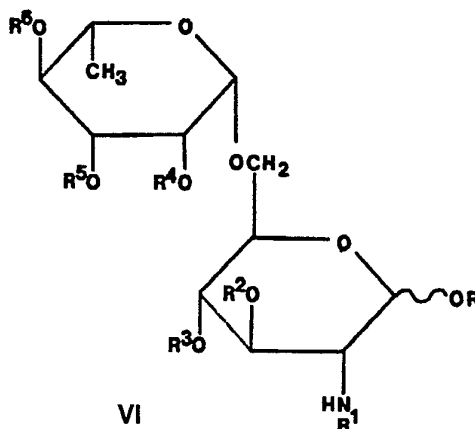


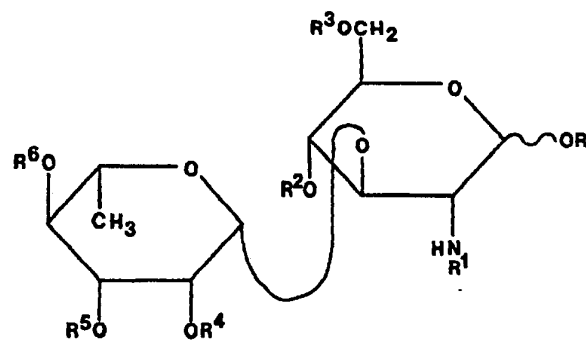
wobei R_b für Alkyl, Alkenyl, Aryl, R^1 für Acyl, R^2 und R^3 für eine bifunktionelle Schutzgruppe Alkylsilyl, Alkyliden, Aryliden und R^4 für Wasserstoff oder unabhängig davon R^3 und R^4 für eine bifunktionelle Schutzgruppe Alkylsilyl, Alkyliden, Aryliden steht, in einem inerten Lösungsmittel wie Halogenkohlenwasserstoffen, Ether, Aromatischen Kohlenwasserstoffen, N,N-Dimethylformamid unter Katalyse mit Schwermetallsalzen wie Silber-salzen, Quecksilbersalzen, Kupfersalzen oder thiophilen Reagenzien wie Iodoniumdicollidinumpchlorat, Methyltriflat, Dimethyl(methylthio)sulfoniumtriflat mit einem an sich bekannten L-Fucosederivat der allgemeinen Formel V



wobei R^c für Halogen, Thioalkyl, Trichloracetimidat, R^2 für Arylmethyl, R^3 und R^4 für Alkyl, Aryl, Acyl, Alkyliden, Aryliden steht, zur Reaktion bringt, chromatographisch reinigt, und die Schutzgruppen nach bekannten Verfahren entfernt.

4. Verfahren zur Herstellung der neuen D-Glucosaminderivate der allgemeinen Formel III, dadurch gekennzeichnet, daß man D-Glucosaminderivate der allgemeinen Formeln VI und VII





VII

wobei R für Alkyl, Alkenyl, Aryl, R¹ für Acyl, R² und R³ für Wasserstoff, R⁴ für Arylmethyl, R⁵ und R⁶ für Alkyl, Acyl, Aryl, Alkyliden steht, mit einem L-Fucosederivat der allgemeinen Formel V in einem inerten Lösungsmittel unter Katalyse mit Schwermetallsalzen oder thiophilen Reagenzien zur Reaktion bringt, chromatographisch reinigt und die Schutzgruppen nach bekannten Verfahren entfernt.

5. Verwendung der neuen D-Glucosaminderivate der Formel I, II und III als Liganden zur Herstellung von Glykokonjugaten nach bekannten Verfahren, insbesondere mit Enzymen und Antikörpern, mit Avidin und Biotin, sowie Fluorochromen.

6. Verwendung der neuen D-Glucosaminderivate der Formel I, II und III in konjugierter Form als Immunogene zur Erzeugung von Antikörpern, die gegen Kohlenhydrat-Seitenketten von Proteinen gerichtet sind.

7. Verwendung der neuen D-Glucosaminderivate der Formel I, II und III als Antigene für den Nachweis und die Bestimmung der Antikörper nach Anspruch 6.

8. Verwendung der neuen D-Glucosaminderivate der Formel I, II und III als Inhibitoren von Antigen-Antikörper-Reaktionen im Rahmen von Testsystemen für Allergien.

9. Verwendung der neuen D-Glucosaminderivate der Formel I, II und III als Ausgangsmaterial zur Herstellung von Affinitätschromatographiemedien für die Reinigung von Enzymen sowie poly- und monoklonalen Antikörpern durch Kopplung der endständigen Aminogruppe nach bekannten Verfahren an controlled-pore-glass, Silikagel, Agarose, Dextran, Polyacrylamid oder andere makromolekulare Träger.

10. Verwendung der neuen D-Glucosaminderivate der Formel I, II und III als Ausgangsmaterial für Substrate zur Bestimmung von spezifischen Enzymen, insbesondere Fucosidasen und Fucosyltransferasen.