



Glykosylierung Hot Paper

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202115433

Internationale Ausgabe: doi.org/10.1002/anie.202115433

Deutsche Ausgabe: doi.org/10.1002/ange.202115433

Zu einem Systematischen Verständnis des Einflusses der Temperatur auf Glykosylierungsreaktionen

Owen T. Tuck, Eric T. Sletten, José Danglad-Flores, und Peter H. Seeberger*

Abstract: Die Bildung von glykosidischen Bindungen ist eine ständige Herausforderung in der Praxis. Mit dem Ziel, die Reproduzierbarkeit und Effizienz der Synthese von Oligosacchariden zu verbessern, wird hier die Beziehung zwischen der Aktivierung des Glykosyl-Donors und der Reaktionstemperatur untersucht. Ein neues semi-automatisches Assay zeigt, dass die Mitglieder einer Gruppe von Thio glykoside unterschiedlich auf die Aktivierung bei verschiedenen Temperaturen reagieren. Die Muster der Schutzgruppen und des Thio-Aglykons führen zu bemerkenswerten Unterschieden in der Temperaturempfindlichkeit der Glykosyl-Donors. Wir führen das Konzept der Donor-Aktivierungstemperatur ein, um experimentelle Erkenntnisse zu erfassen, und folgern daraus, dass Glykosylierungen, die unterhalb dieser Referenztemperatur durchgeführt werden, schädlichen Nebenreaktionen entgehen. Kenntnisse über Aktivierungstemperaturen ermöglichen eine vereinfachte Temperaturbehandlung und erleichtern die Optimierung der Verwendung von Glykosyl-Donors. Bei der isothermen Glykosylierung unterhalb der Aktivierungstemperatur halbierten sich die benötigten Bausteinäquivalente im Vergleich zu dem bisher in der Lösungs- und Festphasen-Oligosaccharidsynthese verwendeten Standard-“Rampen“-Verfahren.

Einleitung

Glykane sind strukturell und funktionell vielfältige Moleküle mit Signifikanz in der Biologie und ungenutztem Potenzial für biomedizinische und materielle Anwendungen.^[1] Allerdings stellt die refraktäre Natur der Kohlenhydratsynthese ein großes Hindernis für die systematische Untersuchung und Nutzung von Glykanen dar. Die Glykosylierungsreaktion, bei der Kohlenhydrate höherer Ordnung durch die Verknüpfung eines Glykosyldonors (Glykosylierungsmittel) mit einem Glykosyl-Akzeptor (Nukleophil) entstehen, ist für ihre schlechte Reproduzierbarkeit und ihre oft unregelmäßigen Ergebnisse berüchtigt.^[2] In der Praxis werden glykosidische Bindungen hergestellt, indem sie unzählige Glykosylkupplungspaare (Glykosylierungsmittel und Nukleophil), Promotorsysteme, Lösungsmittel und Konzentrationen verwenden und sich dabei auf kaum unterschiedliche Temperaturregime verlassen.^[3] Trotz jüngster Fortschritte bei der Standardisierung der Bildung glykosidischer Bindungen sowie eines verbesserten physikalisch-organischen und mechanistischen Verständnisses der Faktoren, die die Ergebnisse bestimmen,^[4–9] behindern Unreproduzierbarkeit und schlechte Übertragbarkeit den Fortschritt. Hier wollen wir die grundlegende Rolle der Temperatur ermitteln, einem Schlüsselparameter, der die Ausbeute und Selektivität von Glykosylierungen beeinflusst. Unser Ansatz nutzt eine halbautomatische Plattform, um den Prozess zu parametrisieren, die Standardisierung zu verbessern und die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Das Endziel ist ein experimentell erprobter, “Plug-and-Play“-Temperaturansatz, der optimale Bedingungen für die gewünschte chemische Glykosylierung bietet.

Im Labor beginnen die meisten Glykosylierungen bei kryogenen Temperaturen (–78 °C) und werden über Nacht allmählich auf Umgebungstemperatur erwärmt.^[2,10] Diese unkontrollierte Art der Erwärmung ist grundsätzlich fehlerhaft und variabel, da sie in hohem Maße von der Größe der Reaktion, der spezifischen Wärmekapazität des Lösungsmittels, den Eigenschaften des Gefäßes, der Größe des Kühlbades und anderen, weitgehend unberücksichtigten thermischen Überlegungen abhängt.^[2] In den meisten Protokollen wird beispielsweise die Temperatur des Wärmebads und nicht die der Reaktionslösung angegeben.^[11] Leider sind die bisherigen Glykosylierungsbedingungen oft eine Frage des persönlichen Ermessens, was zu verwirrenden Unterschieden führt.

Angesichts der Tatsache, dass Glykosylierungsreaktionen in Sekundenschnelle erfolgen können^[8] und die Rate unerwünschter Nebenreaktionen mit steigender Reaktions-

[*] O. T. Tuck, Dr. E. T. Sletten, Dr. J. Danglad-Flores, Prof. Dr. P. H. Seeberger

Department of Biomolecular Systems
Max-Planck Institute of Colloids and Interfaces
Am Mühlenberg 1, 14476 Potsdam (Deutschland)
E-mail: peter.seeberger@mpikg.mpg.de

Prof. Dr. P. H. Seeberger
Department of Chemistry and Biochemistry
Freie Universität Berlin
Animallee 22, 14195 Berlin (Deutschland)

O. T. Tuck
Derzeitige Adresse: Department of Chemistry
University of California, Berkeley
Berkeley, CA 94720 (USA)

© 2022 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.

temperatur zunimmt, kann die derzeitige Temperaturbehandlung zur Irreproduzierbarkeit von Glykosylierungssystemen beitragen, was zu einer schlechten Umsetzung und Vorhersage der Selektivität führt.^[12] Andreana und Crich stellten kürzlich fest, dass Aktivierungsenergie, Selektivität und komplexe Geschwindigkeitsregime, die bei der Bildung glykosidischer Bindungen eine Rolle spielen, alle von der Temperatur abhängen und dass Experimente bei einer einzigen

Temperatur die Reproduzierbarkeit und Qualität von Glykosylierungen verbessern würden, indem sie eine Schlüsselvariable festlegen.^[2] Wir sind daran interessiert, diese Erkenntnisse in die Praxis umzusetzen, indem wir die Temperaturbehandlung für eine Reihe von handelsüblichen Glykosyl-Donors optimieren, die einen hohen Prozentsatz der im menschlichen Glykom vorkommenden Bindungen liefern können.^[13] Ein besseres Verständnis der Temperatur würde den Verbrauch von Glykosyl-Donors verringern und die Gesamteffizienz verbessern, was den Zugang zu interessanten und nützlichen Strukturen erweitern würde. Die Optimierung ist von besonderer Bedeutung im Zusammenhang mit der automatisierten Glykan-Assemblierung (im Folgenden AGA), bei der die Prozessautomatisierung darauf abzielt, Glykosylierungen innerhalb kürzester Zeit und idealerweise bei Temperaturen nahe der Raumtemperatur durchzuführen.

Thioglykoside dienen als Modelle zur Entschlüsselung von Störfaktoren bei der Kohlenhydratsynthese.^[14,15] Thioglykoside, die wegen ihrer synthetischen Handhabbarkeit und langen Haltbarkeit geschätzt werden, lassen sich leicht mit dem N-Iodsuccinimid (NIS) und Trifluorsäure-(TfOH) Promotorsystem aktivieren.^[16] Es wird angenommen, dass die Oxidation des anomeren Schwefelatoms durch NIS (Abbildung 1A) zur Bildung des Glykosylkations führt, das durch eine vom Lösungsmittel getrennte Wechselwirkung mit dem Triflat-Gegenion oder durch direkten Kontakt stabilisiert werden kann, wobei entweder ein Glykosyltriflat oder ein Glykosylhalogenid-Zwischenprodukt gebildet

wird.^[17] Die Stärke der Interaktion zwischen dem vorherrschenden Zwischenprodukt und dem Nukleophil sowie die elektronische oder sterische Beteiligung von Schutzgruppen und die relativen Energien der Zwischenprodukte bestimmen die Kinetik und das stereochemische Ergebnis der resultierenden glykosidischen Bindung.^[2,17,18] Da das oxidierte Addukt für die Herstellung erforderlich ist, kamen wir zu dem Schluss, dass ein Ansatz zur Temperaturoptimierung mit der Aktivierung des Glykosyl-Donors durch NIS/TfOH beginnen sollte. Der Aktivierungsschritt ist bei der Lösungs- und Festphasensynthese identisch, da er nur den gelösten Glykosyl-Donor betrifft. Im Allgemeinen führen zu niedrigen Temperaturen zu trägen Reaktionen, während unangemessen hohe Temperaturen oder schnelles Erhitzen zu Nebenreaktionen führen können, die die Effizienz verringern. Beide Extreme sind unerwünscht und erfordern einen Überschuss an Reagenzien oder mehr Zeit, um die Reaktion zum Abschluss zu bringen.^[12,19] Wir stellen hier eine semi-automatische Plattform vor, mit der wir die Beziehung zwischen Reaktionstemperatur und Aktivierung untersuchen und modulieren können (Abbildung 1B).

Ergebnisse und Diskussion

Semi-automatischer Temperatur-Assay der Glykosyl-Donor-Aktivierung

Es wurde ein semi-automatischer Quench-Assay entwickelt, um die Beziehung zwischen Glykosyl-Donor und Temperatur (Abbildung 2A) für eine Gruppe von handelsüblichen Thioglykosyl-Donors zu untersuchen. Wir konzentrierten uns auf die Beziehung zwischen Glykosyl-Donor und Aktivierungstemperatur in Abwesenheit eines Nukleophils. Hierzu wird zuerst ein Glykosyl-Donor in das Reaktionsgefäß gegeben und auf die eingestellte Temperatur abgekühlt. Sobald die gewünschte Temperatur der Reaktionslösung erreicht ist, die mit einer internen faseroptischen Sonde

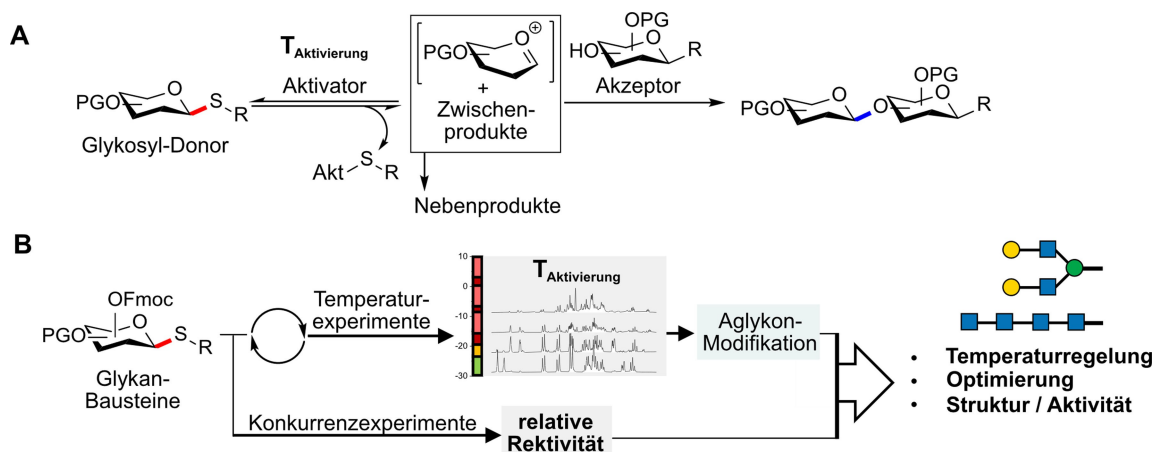


Abbildung 1. Vereinfachtes Schema der Thioglykosylierung. A) Die Temperatur hat bei jedem Schritt der Glykosylierungsreaktion Einfluss. B) In dieser Untersuchung wird ein automatisierter Aufbau verwendet, um eine Reihe von Temperaturbedingungen für eine Gruppe von Thioglykosiden zu scannen, wobei relative Reaktivitätsmessungen von einer separaten Plattform einbezogen werden. PG = Protecting Group (Schutzgruppe), $T_{\text{activation}}$ = Aktivierungstemperatur.

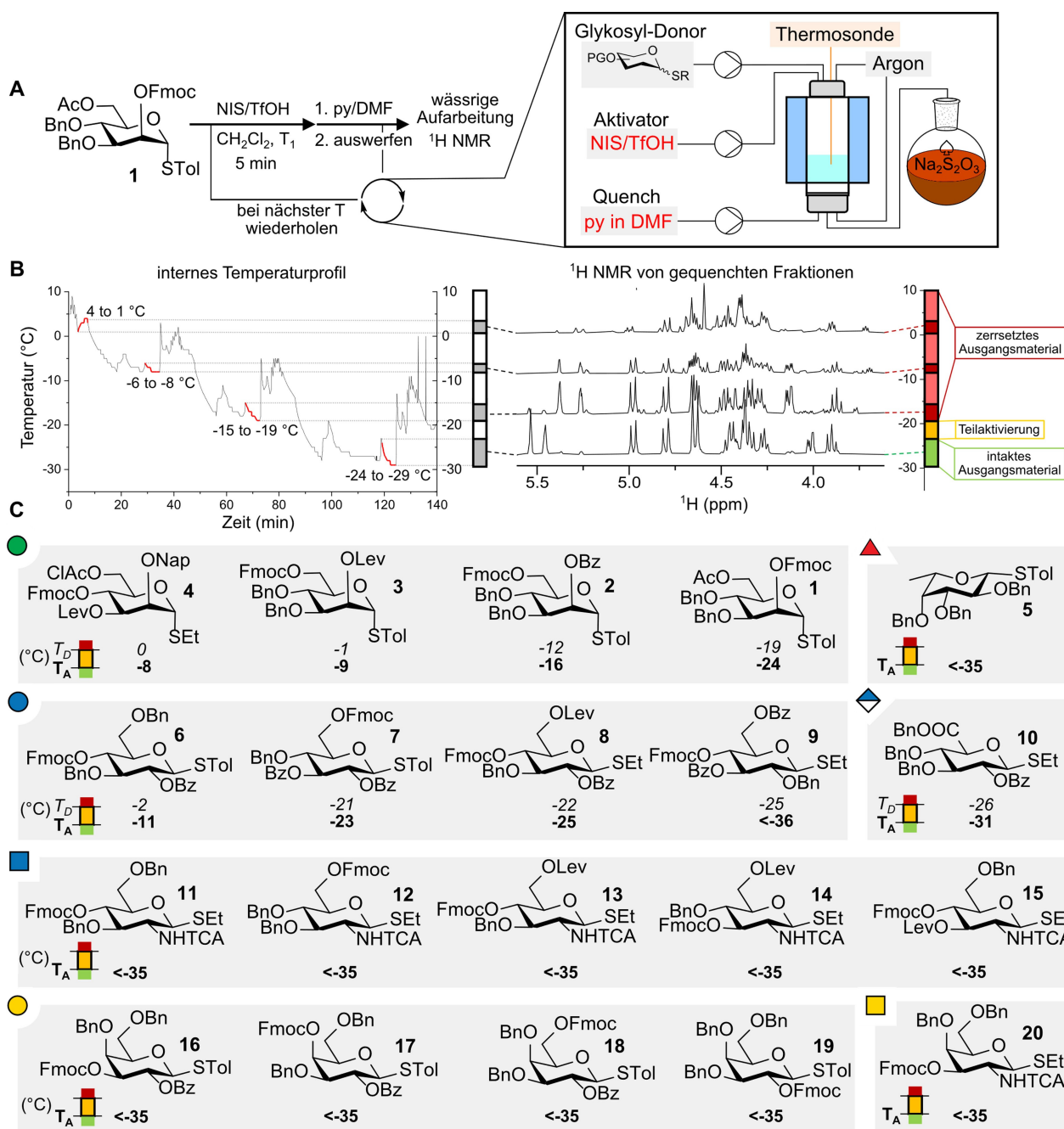


Abbildung 2. Systematische Evaluierung der Aktivierungstemperatur verschiedener Thioglykosid-Monosaccharid Glykosyl-Donors mit Hilfe eines semi-automatischen Assays. A) Allgemeines Schema des Aktivierungsassays. B) Repräsentatives Temperaturdiagramm aus einem automatisierten Quenchexperiment und ^1H NMR (400 MHz) Overlay der gequenchten Fraktionen. Die rot hervorgehobenen Bereiche zeigen den Temperaturbereich an, in dem die Donorlösung NIS/TfOH ausgesetzt ist. Nach der Aktivierung werden die gequenchten und aufgearbeiteten Fraktionen mittels ^1H NMR analysiert, um die Zersetzung in den jeweiligen Temperaturbereichen zu evaluieren. Die Spektren des 2-Fmoc-geschützten Mannosylthioglykosids **1** sind dargestellt. C) Untersuchte Aktivierungsparameter für eine Gruppe vollständig geschützter Glykosyl-Donors. Die Temperaturen markieren die oberen und unteren Grenzen der partiellen Aktivierung, wie in (B) dargestellt. Die kursiv gedruckten Temperaturen geben die obere Grenze an bzw. den Punkt, an dem in der ^1H NMR eine Zersetzung beobachtet wurde ($T_{\text{decomposition}} = T_D$), während die fett gedruckten Werte die höchste Temperatur darstellen, bei der die Reaktionsbedingungen fast ausschließlich das Ausgangsmaterial lieferten ($T_{\text{activation}} = T_A$). STol = Thiothiolo, SEt = Thioethan, OBn = Benzylether, OBz = Benzylester, OFmoc = 9-Fluorenylmethylcarbonat, NHTCA = Trichloracetamid, OLev = Lävulinester, ClAcO = Chloracylester, NapO = 2-Naphthylmethyl ether.

gemessen wird, wird die Donorlösung fünf Minuten lang unter aktiver Kühlung mit NIS/TfOH ausgesetzt, um den engstmöglichen internen Temperaturbereich aufrechtzuer-

halten (rot hervorgehobener Teil, Abbildung 2B). Nach fünf Minuten wird eine Pyridinlösung in DMF zugegeben, und die Reaktionslösung wird sofort in ein Fläschchen mit

Natriumthiosulfat überführt. Die Mischung wird dann aufgearbeitet, während das System den nächsten Zyklus bei der nächsten Temperatur einleitet. Im Allgemeinen wurden für jeden Glykosyl-Donor vier verschiedene Temperaturen untersucht. Mit Hilfe der Proton NMR wurden die Rohmischungen der bei unterschiedlichen Temperaturen behandelten Glykosyl-Donor verglichen, wobei jedes Spektrum einem anderen Temperaturbereich entsprach (Abbildung 2B, weitere Daten zu den Glykosyl-Donor Temperaturen in den Hintergrundinformationen). Um das Verhalten des Glykosyl-Donors unter diesen Bedingungen qualitativ zu evaluieren, wurde das Verschwinden der anomeren (C-1) und C2-Protonen des Ausgangsmaterials als diagnostische chemische Verschiebung verwendet (Abbildung 2B). Die höchste Temperatur, bei der das Ausgangsmaterial über fünf Minuten Reaktionszeit erhalten blieb, wird als Aktivierungstemperatur (T_A , fett gedruckt) definiert. Umgekehrt wird die niedrigste Temperatur, bei der das Ausgangsmaterial durch Nebenreaktionen oder Aktivierung vollständig verbraucht wurde, als Zersetzungstemperatur (T_D , kursiv gedruckt) bezeichnet. Der Temperaturbereich zwischen T_A und T_D ist die Zone der Teilaktivierung (Abbildung 2B).

Der halbautomatische Aktivierungstemperatur-Assay verdeutlichte die Temperaturdynamik in den Anfangsstadien der Glykosylierung. Mannosid **1** (Abbildung 2A) ist beispielsweise nach einer fünfminütigen Reaktion bei -24 bis -29°C völlig intakt, aber bei Temperaturen zwischen -19 und -15°C entsteht ein sekundäres Produkt ($\delta = 5.25$ ppm), das mit dem Verschwinden der anomeren Protonenresonanz ($\delta = 5.55$ ppm) des Ausgangsmaterials einhergeht (Abbildung 2B). Mannosid **1** wird bei einer Temperatur zwischen -19 und -24°C schnell aktiviert, vermutlich wenn genügend thermische Energie zur Verfügung steht, um die Aktivierungsbarriere oder genauer gesagt den Aktivierungsentropieterm $T\Delta S^\ddagger$ zu überwinden, der an der Umwandlung in Zwischenprodukte beteiligt ist.^[2] Wenn **1** also bei einer Glykosylierungsreaktion auf einer niedrigeren Temperatur als seiner T_A gehalten wird, könnte die Reaktion kontrolliert ablaufen. Umgekehrt könnte die Behandlung von **1** bei erhöhter Temperatur zu schädlichen Nebenreaktionen führen, da das Ausgangsmaterial nach fünf Minuten nicht mehr zu erkennen ist. Die untersuchten Thioglykoside waren sehr unterschiedlich temperaturempfindlich (Abbildung 2C). Während Mannoside im Allgemeinen bei höheren Temperaturen aktiviert werden, zersetzten sich Glukoside leichter. Glukosamin- und Galaktosid-Glykosyl-Donors zersetzten sich unter allen untersuchten Bedingungen, wobei selbst bei -35°C (der niedrigsten Temperatur, die in der Anlage erreicht werden kann) nach fünf Minuten keine Spuren des Ausgangsmaterials mehr vorhanden waren. Im Allgemeinen stimmen diese Daten mit den bisher beobachteten Trends zwischen Konfiguration und Reaktivität des Glykosyl-Donors überein;^[20] sie stellen jedoch den ersten systematischen Versuch dar, die Reaktion von Thioglykosiden auf die Temperatur zu verstehen. Darüber hinaus ist ein allgemeiner Trend in Bezug auf das Schutzgruppenmuster und die Zersetzungstemperatur erkennbar. Der Einbau von elektronenziehenden Gruppen (EWG) wie Estern erhöht die Aktivierungstemperatur, während elektronenabgebende Gruppen

(EDG) oder elektronenreiche Gruppen wie Ether und Carbonate schon bei niedrigen Temperaturen zur Zersetzung führen.^[21] Der elektronische Effekt ist am deutlichsten beim Vergleich der Glykosyl-Donors **2** und **3**. Der Lävulinoyl-Substituent (Lev) an **3** ist vermutlich elektronenziehender als der Benzylester (Bn) an **1**, d.h. **1** ist reaktiver und kann Aktivierungsbarrieren zu reaktiven Zwischenprodukten leichter überwinden. Die Reaktivität wird durch die Verwendung einer dritten Esterschutzgruppe (**4**, $T_A = 0^\circ\text{C}$) noch weiter moduliert. Auch die Position der sperrigen Fmoc-Gruppe scheint die Aktivierungstemperatur zu beeinflussen.

Aglykon-Modifikation ermöglicht Anpassung der Aktivierungstemperatur

Ein unerwartetes Ergebnis der in Abbildung 2C dargestellten Daten war die niedrige T_A der Glukosamin-Glykosyl-Donors **11–15**, die wir durch die Betrachtung der Aglykon-Abgangsgruppe rationalisierten. Die Glukosaminyl-Donors, zusätzlich zu den Glykosyl-Donors **4**, **8**, **9** und **10**, enthalten Thioethyl (SEt)-Einheiten an ihrer anomeren Position, im Gegensatz zu den Thiotoluyll (STol)-Abgangsgruppen in den übrigen Glykosyl-Donors. Oscarson^[22] and Gildersleeve^[23] zeigten, dass die Nukleophilie des Schwefelatoms durch Induktion oder durch Blockierung ankommender Elektrophile durch sterische Hinderung verringert werden kann, wodurch die Glykosyl-Donors stabilisiert und ihre Aktivierungstemperaturen erhöht werden.^[24,25] Ebenso kann STol die Reaktivität der Glykosyl-Donors im Vergleich zu SEt verringern. Um diese Hypothese zu testen, ersetzten wir das Aglykon von Glukosamin **11** und Galaktosid **16** durch zunehmend deaktivierende Thiole in zwei Schritten, die über ein Glykosylphosphat-Zwischenprodukt verlaufen (Abbildung 3A). Assays zur Aktivierungstemperatur von STol-Glukosamin **21** zeigten, dass das Ausgangsmaterial bei der niedrigsten getesteten Temperatur erhalten blieb. Eine weitere Abstimmung mit dem Di-*ortho*-methylthiophenol (**22**) verringerte die Temperaturempfindlichkeit weiter: das hochgradig sterisch gehinderte und elektronenziehende *ortho*-Trifluormethylthiophenolglykosid **23** zeigte bei Raumtemperatur Ausgangsmaterial in etwa gleichem Verhältnis wie ein gequenchtes Zwischenprodukt (siehe Hintergrundinformationen), was die kinetische Kontrolle durch den Thioersatz und seine Auswirkungen auf die Aktivierungstemperatur verdeutlicht (Abbildung 3B). Die Deaktivierung der Thiole brachte das reaktive Galaktosid **16** innerhalb der Grenzen unseres Assays (Abbildung 3C, **24,25**). Korrelationen zwischen Aglykon-Modifikationen und Temperatur sind nützliche Erkenntnisse für künftige temperaturgesteuerte sequenzielle Glykosylierungsreaktionen,^[14] und könnten dazu beitragen, Stereoselektivitätseffekte im S_N1 - S_N2 -Glykosylierungskontinuum zu rationalisieren.^[2]

Experimente zum Austausch von Aglykonen geben Aufschluss über die Struktur-Reaktivitäts-Beziehung für die ausgewählte Thioglykoside. Der Ersatz des Thioethyls am Glukosaminyl-Donor **11** durch ein Thiotoluyll-Aglykon (**21**) lädt zum direkten Vergleich mit Glukosid **6** ein, da sich die

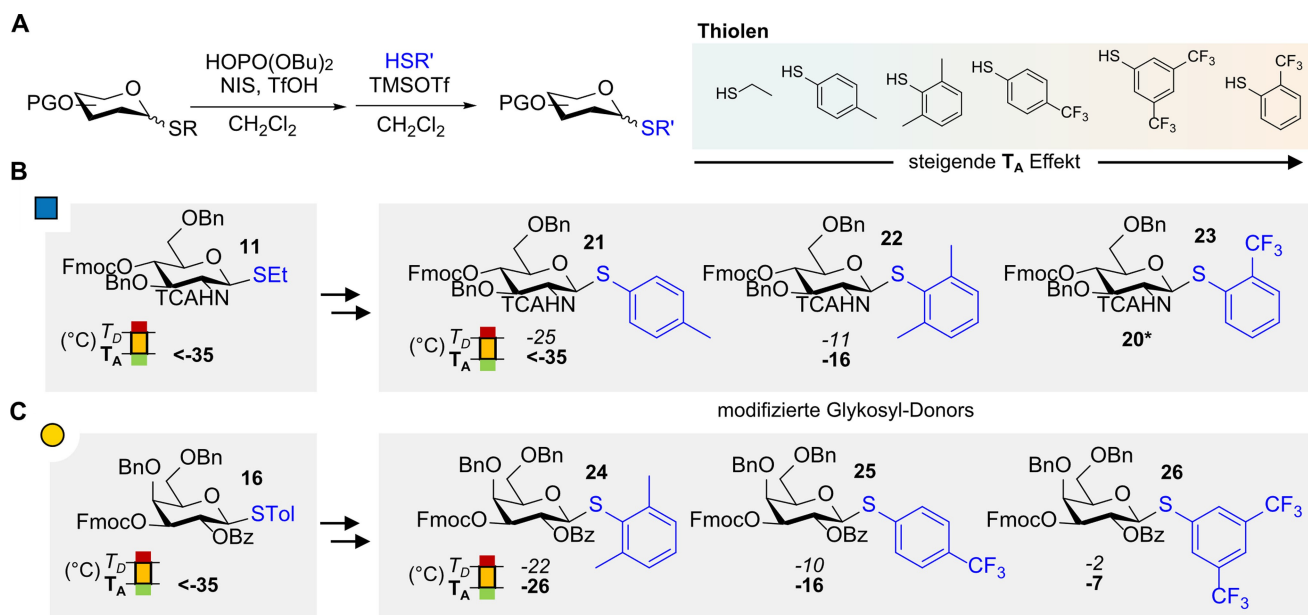


Abbildung 3. Der Ersatz des Aglykons verändert die Temperaturempfindlichkeit von Glykosyl-Donors. A) Allgemeines Schema für den Ersatz des Aglykons von Glykosyl-Donors, die unterhalb der für AGA und die Gruppe der Ersatzthiole verwendeten Mindesttemperatur aktiviert werden. B, C) Aktivierungsparameter für die Glykosyl-Donors **11** bzw. **16** und neue Parameter nach dem Aglykon-Ersatz. *) Bei Glukosamin **11** mit *ortho*-CF₃-Thiophenol an der anomeren Position waren sowohl Ausgangsmaterial als auch aktivierte Addukte bei Raumtemperatur vorhanden.

beiden nur in Bezug auf ihre C-2-Schutzgruppen unterscheiden.^[26,27] Das Trichloracetylamid (TCA) an der C-2-Position von **21** scheint das Glukosamin stärker zu aktivieren als die Benzoylgruppe von **6**. Daher kann der allgemeine Trend, dass Glukosaminyl-Donors eine niedrigere T_A aufweisen als ihre Glukosid-Gegenstücke, sowohl auf das Thioethyl-Aglykon als auch auf das Amid-Motiv zurückgeführt werden. Die zusätzlichen Thioethyl-enthaltenden Donors stehen in einem weiteren Zusammenhang mit ihrer beobachteten T_A . Glukosid **8** beispielsweise enthält einen C-6-Lävulinoyl-ester, scheint aber auf den ersten Blick aktiver zu sein als sein Analogon **6**, da es sich bei niedrigeren Temperaturen zersetzt. Das Thioethyl-Aglykon an **8** verdeutlicht jedoch diese scheinbare Ausnahme. Die Modifizierung der Glukose an der C-2-Position mit einem elektronenreichen, nicht teilnehmenden Benzylether (**9**) senkte die Aktivierungstemperatur sogar bei zwei Estern, während die Umwandlung in Glucuronsäure (**10**) eine ähnliche Temperaturstabilität aufwies wie bei Verwendung der elektronenziehenden Lev-Schutzgruppe (**8**). Außerdem luden die Unterschiede im Aglykon T_A zum Vergleich zwischen dem Diester Thiotoluy-Mannosid **3** und dem Triester Thioethyl-Mannosid **4** ein. Der Vergleich von Galaktosiden mit anderen Donors verdeutlicht eine Hierarchie der T_A zwischen den Konfigurationen: Fucose, N-Acetyl-Galaktosamin < Galaktose < Glukosamin < Glukose < Mannose.^[28] Dieser Trend ist besonders bemerkenswert, da sich Galaktose-, N-Acetylglukosamin- und Fukose-Glykosyl-Donors bei der AGA oft als schwerfällig erweisen und doppelte Kopplungszyklen oder zusätzliche Äquivalente erfordern, um akzeptable Kopplungseffizienzen zu erreichen.^[29] Der Aglykon-Ersatz zur Modulation der Reaktivität dieser problematischen Glyko-

syl-Donors und zur Herbeiführung von Aktivierungsbarrieren innerhalb der AGA-Reichweite bietet die Möglichkeit, die synthetische Effizienz zu erhöhen und den Zugang zu bisher schwierigen Verknüpfungen zu verbessern.

Relative Reaktivitätswerte (RRV) von Thioglykosiden

Um unser Verständnis von Donoreigenschaften, Temperatur und Reaktivität zu verbessern, haben wir versucht, unsere Ergebnisse mit dem Konzept der relativen Reaktivität in Beziehung zu setzen.^[20,22,30,31] Der von Wong eingeführte relative Reaktivitätswert (RRV),^[20] wird aus einer Konkurrenzreaktion zwischen äquimolaren Mengen zweier Glykosyl-Donors, D_{exp} und D_{ref} , abgeleitet (Abbildung 4A). Thiotoluy-peracetyliertes Mannosid **27** wird auf ein arbiträres $RRV=1$ gestellt. Die Aufgabe, RRVs zu ermitteln, ist jedoch nicht trivial.^[31] Die Verwendung eines inerten internen Standards, peracetylierter Mannose **28**, und der Vergleich nur von Glykosyl-Donors mit nicht mehr als zwanzigfachen Unterschieden in der experimentellen Reaktivität lieferte die am besten reproduzierbaren Ergebnisse (Abbildung 4A).^[31] Diese Daten stellen den ersten Report der RRV für Fmoc-haltige Thioglykoside dar.

Die relativen Reaktivitäten stimmen in einigen Punkten mit den Ergebnissen der Aktivierungstemperatur überein, unterscheiden sich jedoch in anderen Bereichen (Abbildung 4C). Mannoside und Glukoside wiesen im Allgemeinen die höchste T_A auf, was darauf hindeutet, dass ihre Reaktivität gering ist. RRV-Experimente unterstützten diesen Trend, aber innerhalb der Monosaccharidgruppen waren die Vergleichsergebnisse unerwartet und variabel. Je nach

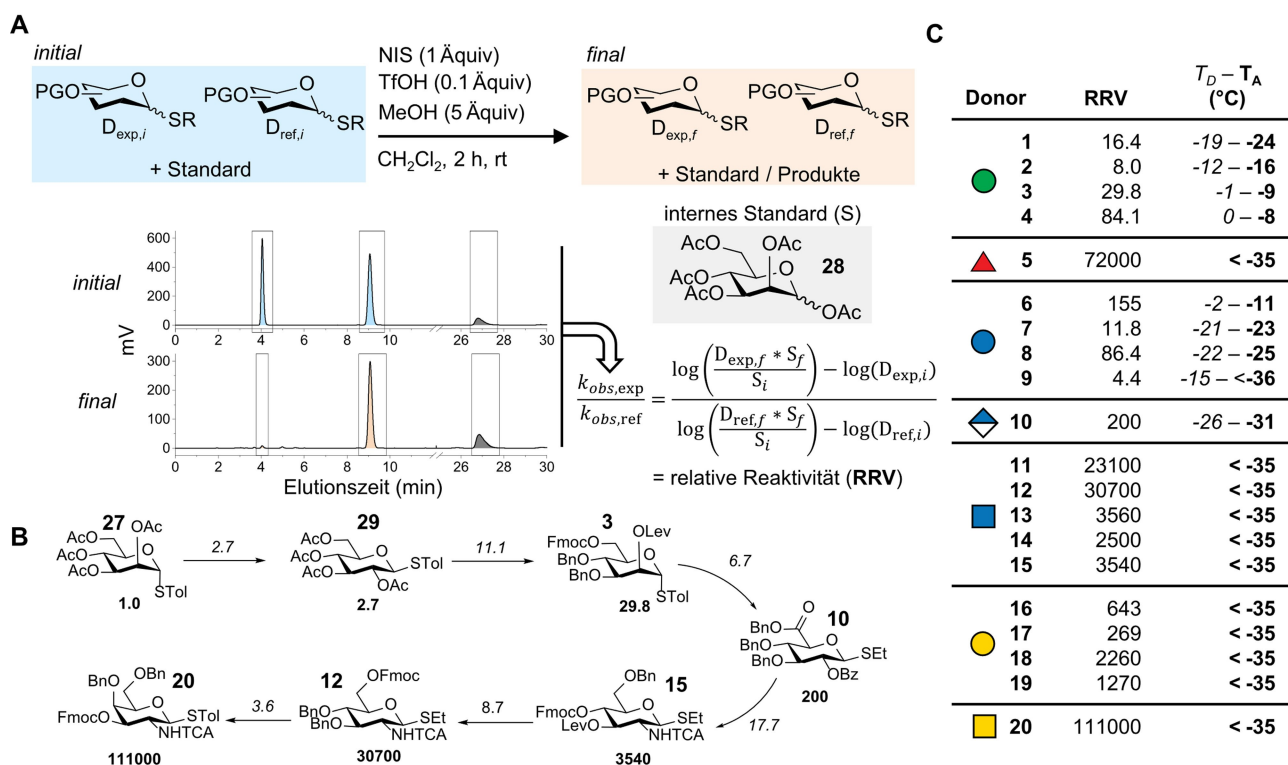


Abbildung 4. Vergleich der Aktivierungstemperaturen von Glykosyl-Donors mit der relativen Reaktivität. A) Schematische Darstellung eines kompetitiven HPLC-Experiments. Repräsentative Trace aus der Reaktion von 2-O-Lev, 6-O-Fmoc Thiotoluyloxymannosid gegen Glukosebenzyliden-Referenz. Der inerte interne Standard **28** wird zur Korrektur der volumetrischen Verluste nach der Aufarbeitung verwendet. B) Methode zur Bestimmung der absoluten Reaktivität, wobei das peracetylierte Thiotoluyloxymannosid **27** arbiträr auf 1.0 gesetzt wird. Jeder Pfeil steht für ein RRV-Experiment. C) Tabelle der experimentellen RRV-Werte für eine Gruppe von Thioglykosiden neben den Daten des Aktivierungsexperiments.

Schutzgruppenmuster könnten unterschiedliche, konkurrierende Mechanismen im Spiel sein. Nichtlineare Trends zwischen T_A und RRV könnten auf Werte hindeuten, die konkurrierende Aspekte des mechanistischen Kontinuums beschreiben (siehe Hintergrundinformationen).^[18,32,33] Interessanterweise wiesen Galaktoside, obwohl sie temperaturempfindlicher sind als N-Acetylglucosamin-Glykosyl-Donors (Abbildung 4C), niedrigere RRVs auf. Die Reaktivität der Galaktose-Glykosyl-Donors in Bezug auf die Fmoc-Position war C-6 > C-2 > C-3 > C-4. Die N-Acetylglucosamin-Glykosyl-Donors **13–15** waren die nächst reaktiveren; da sie elektronenziehende Substituenten enthalten, sind **11** und **12** folglich reaktiver, obwohl der Unterschied in der Größenordnung zwischen **11** und **13** merkwürdig ist. Die direkte Konkurrenz zwischen der perbenzylierten Fucose **5** und dem N-Acetylgalaktosamin-Thioethylglykosid **20** zeigt, dass das Galaktosamin etwa 1.5-mal reaktiver ist als die Fucose. Im Allgemeinen stellen wir fest, dass die Regression des natürlichen Logarithmus der RRVs gegen die chemischen Verschiebungen des anomeren Protons der von uns untersuchten Glykosyl-Donors keine Linearität erkennen lässt, wie dies von anderen berichtet wurde (siehe Hintergrundinformationen). RRVs gehen davon aus, dass die Glykosyl-Donors in ihren Standardzuständen (d.h. bei Raumtemperatur) reagieren, aber die meisten Glykosylierungen werden unter anderen Bedingungen durchgeführt. Außerdem ändert sich der relative Energieunterschied zwi-

schen den Donorpaaren in Abhängigkeit von der Temperatur. Künftige Experimente sollten die relativen Reaktivitäten bei niedrigeren Temperaturen, die nicht der Umgebungstemperatur entsprechen, quantifizieren. Im Allgemeinen weisen Glykosyl-Donors mit einem RRV von mehr als 250 eine T_A von weniger als -35°C auf, was bedeutet, dass eine niedrige T_A grob aus dem RRV abgeleitet werden kann. Ein interessanter Ausreißer in diesem Datensatz ist 9. Obwohl seine T_A relativ niedrig ist, war das gemessene RRV entgegen dem allgemeinen Trend ebenfalls sehr klein.

Temperaturregelung verbessert Modell-Tetramer AGA-Synthesen

AGA ermöglicht den einfachen Zugang zu komplizierten Oligosacchariden durch iterative Kopplung von Glykosyl-Donors an Nukleophile, die an einem festen Träger gebunden sind. Durch orthogonale Schutzgruppenmodifikation werden naszierende Akzeptoren freigelegt, um Chemospezifität zu gewährleisten. Der Kopplungsschritt (Glykosylierung) ist die wichtigste, aber am wenigsten verstandene Komponente der AGA. Er bestimmt sowohl die Ausbeute als auch das stereochemische Ergebnis einer bestimmten Oligosaccharidsynthese. Während der Glykosylierung sind die interagierenden Einheiten bei praktisch jeder Reaktion unterschiedlich. Struktur und Elektronik des Glykosyl-Do-

nors sorgen für eine unterschiedliche Reaktivität (Abbildung 4)^[20,21] und jedes Hydroxyl-Nukleophil (Akzeptor) im wachsenden Glykan unterscheidet sich vom vorherigen Akzeptor, je nach der gewünschten Verknüpfung.^[28]

Bislang wird ein allgemeines Kopplungsprotokoll verwendet, das für eine Reihe von Glykosyl-Donors geeignet ist und das sich während der Entwicklung von AGA etabliert wurde.^[34] In einem Standardzyklus reagieren 6.5 Äquiv. des Glykosylierungsreagenzes 5 Minuten lang bei -20°C , dann wird das Reaktionsgefäß im Laufe von fünf Minuten auf 0°C erwärmt und 15 Minuten lang bei dieser Temperatur gehalten, bevor das Reaktionsgemisch abgelassen und gewaschen wird, um nachfolgende Zyklen vorzubereiten. Schwierige Verbindungen können eine doppelte Kopplung erfordern, bei der der gesamte Prozess wiederholt wird. Mit diesem allgemeinen Verfahren wurden mit AGA Polysaccharide bis zu einer Länge von 151-mer^[35] und Glykogen-Oligosaccharide mit mehreren schwierigen cis-glykosidischen Bindungen hergestellt.^[36] Um einen übermäßigen Verbrauch wertvoller Bausteine zu vermeiden, müssen die Reaktionsbedingungen jedoch häufig an neue synthetische Herausforderungen angepasst werden. Fortschritte in der AGA-Hardware, wie z.B. die Hinzufügung einer internen Sonde zur präzisen Messung und Steuerung der Reaktionstemperatur,^[29] in Verbindung mit der Notwendigkeit, ein Modell für reproduzierbare isotherme Glykosylierungen zu entwickeln, veranlassten uns dazu, die Rolle der Temperatur in vollständigen AGA-Synthesen zu untersuchen.

Temperaturuntersuchungen deuten darauf hin, dass diese AGA-Bedingungen daher zu einer unnötigen Zersetzung

von **2** bei erhöhten Temperaturen führen könnten, bei denen die anfänglichen fünf Minuten bei -20°C für eine vollständige Kopplung ausreichen. Diese Beobachtung stimmt mit früheren AGA-Vorbereitungen eines α -(1,6)-Octamannosids überein, bei denen vergleichsweise kurze Kopplungszeiten verwendet wurden (8 Minuten bei -20°C und 5 Minuten Rampe auf 0°C).^[29] Wir stellen die Hypothese auf, dass die Aufrechterhaltung einer Temperatur unterhalb von T_A den Glykosyl-Donor schon und zu effektiveren Glykosylierungen führt. Die Aktivierungstemperatur T_A stellt daher einen Referenzparameter dar, der möglicherweise die Obergrenze oder die höchste Betriebstemperatur für eine effiziente Kopplung darstellt.

Die Anwendung der aus den T_A -Experimenten gewonnenen Erkenntnisse verbesserte die Synthese eines Modell- β -(1-4)-Glukose-Tetramers **31** (Abbildung 5A). Glukosid **6** kann kontrolliert bis zu -11°C aktiviert werden (Abbildung 2C), aber Standard-AGA-Bedingungen (-20°C , 5 min 0°C , 20 min) halten den Glykosyl-Donor während des größten Teils der Kopplungszeit über dieser Temperatur. Um die Nützlichkeit von T_A zu testen, haben wir drei AGA-Synthesen des Modell- β -(1,4)-Glukose-Tetramers **31** unter Verwendung von drei Äquivalenten des Glykosyl-Donors statt der üblichen 6.5 Äquivalente durchgeführt. Große Überschüsse helfen, die gewünschten Strukturen zu erreichen, sind aber kostspielig und führen zu einer Zersetzung des Glykosyl-Donors. Drei Äquivalente des Glukosids **6** pro Zyklus ergaben das Tetramerprodukt **31** in deutlich höherer relativer Reinheit (89.1%), wenn isotherme Bedingungen verwendet wurden (25 min bei -25°C , Abbildung 5B, C). Da die Kopplungstemperatur unter der T_A für **6** (-11°C)

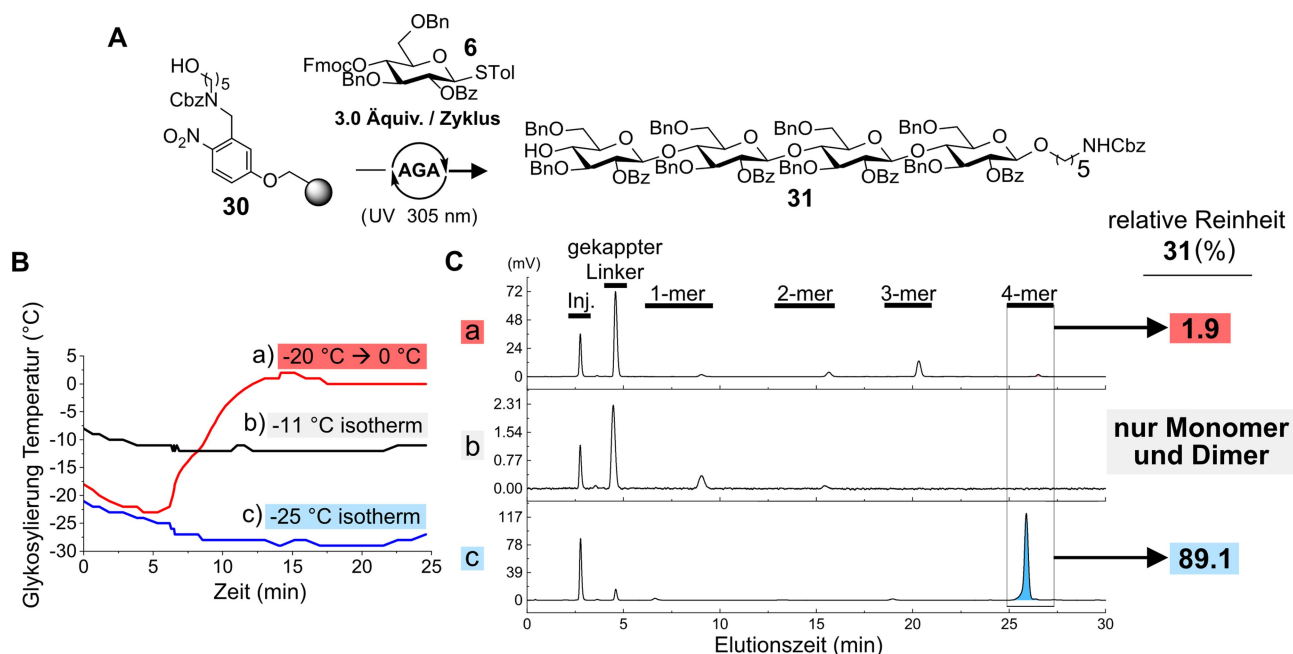


Abbildung 5. Optimierung der Cellulose-Tetramer-Synthese durch T_A . A) Schema der AGA des geschützten Cellulose-tetramers. B) Vergleich der internen Temperatur der einzelnen Glykosylierungszyklen. C) HPLC-Spuren der rohen, durch Photospaltung gewonnenen Produkte der AGA-Synthesen in (B). Die relative Reinheit ist definiert als das Verhältnis des Integrals des Produktpeaks (Elutionszeit = 26 min) zur Summe der Integrale des Produktpeaks und zusätzlicher Deletionssequenzen.

lag, wurde die Gesamtreaktionszeit auf 25 min gehalten, um eine langsamere Kinetik zu ermöglichen. Umgekehrt ergab die Kontrollsynthese unter Verwendung der Standard-AGA-Kupplungstemperaturen (-20°C , 5 min, 0°C , 20 min) nur 1.9% des gewünschten Tetramers im Vergleich zu den Deletionssequenzen (Abbildung 4B, C), was die nachteiligen Auswirkungen der Zersetzung bei erhöhten Temperaturen auf den Gesamterfolg der Synthese zeigt. Interessanterweise führte die Synthese von **31** durch isotherme Glykosylierung bei -11°C , der T_{A} von **6**, nur zu Monomer, Dimer und verkaptem Linker (**30**). Unter diesen Bedingungen befindet sich **6** bei einer Temperatur, die zu Zersetzung und schlechter Umsetzung führt. Im Vergleich dazu reichte bei der Kontrollsynthese sogar ein kurzes Intervall bei -20°C , also unterhalb der Höchsttemperatur, aus, um einige Ziel-tetramer zu erzeugen. Somit ist eine Glykosylierung unterhalb der jeweiligen Aktivierungstemperatur erforderlich, um bei der Synthese von **31** effiziente Kupplungen zu erzielen.

Eine Änderung des Standard-“Rampen“-Regimes verbesserte den Zugang zum Modell-Tetramer **31** erheblich und bestätigte die Optimierungsbemühungen. Insgesamt zeigen diese Experimente die Anwendbarkeit von T_{A} -Messungen und ihr Potenzial zur Optimierung der Kopplungsbedingungen und zur drastischen Verringerung des Verbrauchs von Bausteinen. Übliche Lösungsphasenbehandlungen – kryogene Einleitung und anschließende Erwärmung auf Raumtemperatur – können einen wichtigen Aktivierungsschwellenwert überschreiten, wodurch der Syntheserfolg eingeschränkt und die Reaktionszeiten unnötig verlängert werden. Trotz der erheblichen Effizienzgewinne, die durch die T_{A} -gesteuerte Temperaturregung erzielt werden, räumen wir ein, dass die Aktivierung allein ein unvollständiges Bild der Synthese von Oligosacchariden vermittelt. An dem Kopplungsschritt ist auch der nucleophile Glykosyl-Akzeptor beteiligt, und die Wechselwirkungen zwischen dem aktivierten Glykosyl-Donor und -Akzeptor erfordern wahrscheinlich eine bestimmte Temperatur für eine optimale Umwandlung in das Produkt.^[28] Weitere Studien werden dazu beitragen, das Gleichgewicht zwischen Nucleophilie des Akzeptors, Donor-Reaktivität und Temperatur zu klären.

Zusammenfassung

Es wurde ein semi-automatischer Assay entwickelt, um die Beziehung zwischen Glykosyl-Donor, Aktivierung und Reaktionstemperatur zu untersuchen. Für eine Reihe von Thioglykosiden wurden Aktivierungstemperaturbereiche festgelegt. Die von uns untersuchten Glykosyl-Donors variieren stark in der T_{A} und können durch die Platzierung von EDG- oder EWG-Schutzgruppen oder durch die Anpassung des Thio-Aglykons manipuliert werden. Die letztgenannte Strategie ist vorteilhaft, da sie die Einstellung hochreaktiver, zuvor schwer zu handhabender Glykosyl-Donors auf besser kontrollierbare Temperaturbedingungen ermöglicht, sowohl in der festen Phase als auch in Lösung. Dieser Ansatz brachte erhebliche synthetische Vorteile mit sich, darunter die Optimierung der Verwendung von Glykosyl-Donors und

die Vereinfachung der Temperaturbehandlung. Die Effizienz und Reinheit des automatisierten Aufbaus eines Tetraglukosids wurde erheblich verbessert, indem die Glykosyl-Donor-Äquivalente um mehr als die Hälfte ($6.5 \rightarrow 3$ Äquiv.) reduziert wurden, verglichen mit dem derzeit für die AGA verwendeten thermischen Standard-“Rampen“-Verfahren, was eine signifikante Kostensenkung bedeutet. In künftigen Studien müssen der Kopplungsschritt und Methoden zur Manipulation der Kopplungstemperatur untersucht werden, um eine optimale Umwandlung zu erreichen. So könnte beispielsweise durch eine Aglykonmodifikation die T_{A} der Glykosyl-Donors erhöht werden, was eine Kopplung bei höheren Temperaturen ermöglicht, was wiederum den Umsatz bei Verknüpfungen mit geringer Nucleophilie des Akzeptors verbessert.^[37] Generell ist anzumerken, dass die Aktivierungstemperaturen in Lösung gemessen werden und allgemein für Glykosylierung in der Lösungsphase gelten. In Kombination mit isothermen Glykosylierungen und potenziellen Anwendungen des maschinellen Lernens gehen wir davon aus, dass dieser Ansatz dazu beitragen wird, den scheinbar unfügsamen Charakter der Behandlung von Glykosyl-Donors zu zähmen, indem er experimentell ermittelte Sollwerte für Glykosylierungen liefert. Systematische Optimierungsbemühungen, insbesondere solche, die durch automatisierte Technologie unterstützt werden, sind vielversprechend für die Weiterentwicklung der Synthese von Oligosacchariden.

Danksagung

Wir bedanken uns bei der Max-Planck-Gesellschaft für die großzügige finanzielle Unterstützung. O.T.T. dankt für die finanzielle Unterstützung durch einen Fulbright Study/Research Award, der von der Fulbright-Kommission und Fulbright Deutschland vergeben wird. E.T.S. dankt für die finanzielle Unterstützung durch die Alexander von Humboldt-Stiftung. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Erklärung zur Datenverfügbarkeit

Die Daten, die die Ergebnisse dieser Studie unterstützen, sind in den Hintergrundinformationen zu diesem Artikel verfügbar.

Stichwörter: Aktivierungstemperatur · Glykane · Glykosylierung · Kohlenhydrate · Thermische Stabilität

[1] *Essentials of Glycobiology* (Hrsg.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, A. G. Darvill, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, P. H. Seeberger), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), **2015**.

[2] P. R. Andreana, D. Crich, *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7*, 1454.

[3] X. Zhu, R. R. Schmidt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1900; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1932.

- [4] H. H. Trinderup, S. M. Andersen, M. Heuckendorff, H. H. Jensen, *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, 3251.
- [5] C.-W. Chang, M.-H. Lin, C.-C. Wang, *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 2556.
- [6] C.-W. Chang, C.-H. Wu, M.-H. Lin, P.-H. Liao, C.-C. Chang, H.-H. Chuang, S.-C. Lin, S. Lam, V. P. Verma, C.-P. Hsu, C.-C. Wang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 16775; *Angew. Chem.* **2019**, *131*, 16931.
- [7] S. Moon, S. Chatterjee, P. H. Seeberger, K. Gilmore, *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 2931.
- [8] S. Chatterjee, S. Moon, F. Hentschel, K. Gilmore, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 11942.
- [9] D. Crich, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 9193.
- [10] G. Ngoje, Z. Li, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 1879.
- [11] C. O. Kappe, D. Dallinger, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 51.
- [12] C.-W. Chang, M.-H. Lin, C.-H. Wu, T.-Y. Chiang, C.-C. Wang, *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 15945.
- [13] P. H. Seeberger, *Glyco-Bioinformatics–Bits ‘n’ Bytes of Sugars*, Beilstein Institut, Potsdam, **2009**, p. 25.
- [14] J. D. C. Codée, R. E. J. N. Litjens, L. J. van den Bos, H. S. Overkleeft, G. A. van der Marel, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 769.
- [15] E. Fischer, K. Delbrück, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1909**, *42*, 1476.
- [16] G. Lian, X. Zhang, B. Yu, *Carbohydr. Res.* **2015**, *403*, 13.
- [17] P. O. Adero, H. Amarasekara, P. Wen, L. Bohé, D. Crich, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 8242.
- [18] A. Hettikankamalage, R. Lassfolk, F. Ekholm, R. Leino, D. Crich, *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 7104.
- [19] H. M. Christensen, S. Oscarson, H. H. Jensen, *Carbohydr. Res.* **2015**, *408*, 51.
- [20] Z. Zhang, I. R. Ollmann, X. S. Ye, R. Wischnat, T. Baasov, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 734.
- [21] B. Fraser-Reid, J. C. López in *Reactivity Tuning in Oligosaccharide Assembly* (Hrsg.: B. Fraser-Reid, J. Cristóbal López), Springer Berlin, Heidelberg, **2011**, S. 1.
- [22] M. Lahmann, S. Oscarson, *Can. J. Chem.* **2002**, *80*, 889.
- [23] Z. Li, J. C. Gildersleeve, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11612.
- [24] F. Yu, H. M. Nguyen, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 7330.
- [25] G.-J. Boons, R. Geurtsen, D. Holmes, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6325.
- [26] M. Heuckendorff, C. M. Pedersen, M. Bols, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5956.
- [27] L. T. Poulsen, M. Heuckendorff, H. H. Jensen, *ACS Omega* **2018**, *3*, 7117.
- [28] C. W. Chang, M. H. Lin, C. K. Chan, K. Y. Su, C. H. Wu, W. C. Lo, S. Lam, Y. T. Cheng, P. H. Liao, C. H. Wong, C. C. Wang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 12413; *Angew. Chem.* **2021**, *133*, 12521.
- [29] J. Danglad-Flores, S. Leichnitz, E. T. Sletten, A. Abragam Joseph, K. Bienert, K. Le Mai Hoang, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 8893.
- [30] N. L. Douglas, S. V. Ley, U. Lücking, S. L. Warriner, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1998**, 51.
- [31] X. Li, L. Huang, X. Hu, X. Huang, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 117.
- [32] E. Mucha, M. Marianski, F.-F. Xu, D. A. Thomas, G. Meijer, G. von Helden, P. H. Seeberger, K. Pagel, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4174.
- [33] T. Hansen, H. Elferink, J. M. A. van Hengst, K. J. Houthuijs, W. A. Remmerswaal, A. Kromm, G. Berden, S. van der Vorm, A. M. Rijs, H. S. Overkleeft, D. V. Filippov, F. P. J. T. Rutjes, G. A. van der Marel, J. Martens, J. Oomens, J. D. C. Codée, T. J. Boltje, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2664.
- [34] M. Guberman, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 5581.
- [35] A. A. Joseph, A. Pardo-Vargas, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 8561.
- [36] Y. Zhu, M. Delbianco, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 9758.
- [37] D. Crich, V. Dudkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6819.

Manuskript erhalten: 12. November 2021

Akzeptierte Fassung online: 15. Januar 2022

Endgültige Fassung online: 15. Februar 2022