



Doctoral Thesis

## **Verschiedene Aspekte der automatisierten Heparin-Synthese De Novo Synthese von Bausteinen, ein neuer Linker und Zusammenknüpfen von Heparin Oligosacchariden**

**Author(s):**

Bindschädler, Pascal Michael

**Publication Date:**

2009

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005838635> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 18274

**DIFFERENT ASPECTS OF AUTOMATED HEPARIN SYNTHESIS:  
*DE NOVO* SYNTHESIS OF BUILDING BLOCKS, A NEW LINKER,  
AND SYNTHESIS OF HEPARIN OLIGOSACCHARIDES**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

**PASCAL MICHAEL BINDSCHÄDLER**

Dipl. Nat. Sci. ETH Zürich

Date of birth

28.4.1979

citizen of

Winterthur (ZH)

accepted on the recommendation of

Professor Dr. Peter H. Seeberger

Professor Dr. Erick M. Carreira

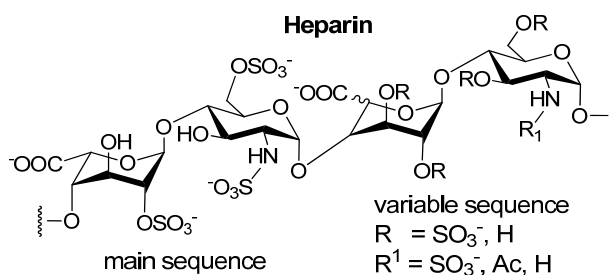
2009

## Summary

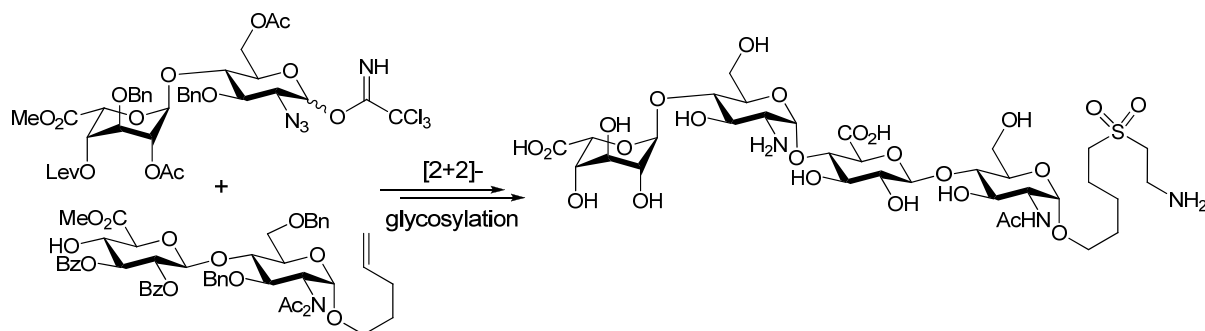
This dissertation includes two parts: the first part deals with different aspects of automated heparin synthesis. The second part is dedicated to the solution phase synthesis of biologically relevant oligosaccharides.

### Part I

Different aspects of automated heparin synthesis are investigated in **the first part of this dissertation**. Heparin and heparan sulfate are the most complex glycosaminoglycans (GAGs), a class of highly functionalized, linear, and negatively charged bioactive polysaccharides. Heparin is composed of disaccharide repeating units consisting of an uronic acid (D-glucuronic acid or L-iduronic acid) 1,4-linked to a D-glucosamine. Over the last 40 years, highly elaborate chemical methods for the assembly of heparin oligosaccharides have been developed. However, routine access to libraries of heparin oligosaccharides is still not feasible due to the enormous efforts needed for their synthesis in solution. Application of automated solid-phase synthesis to the synthesis of heparin oligosaccharides is of paramount importance as the automated assembly is expected to provide fast access to a large library of heparin oligosaccharides of defined structure and length.

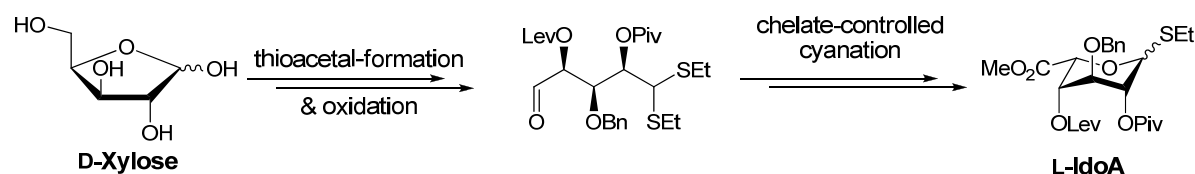


**Chapter 2** describes the first synthesis of a specific heparan sulfate carbohydrate sequence that is believed to be involved in scrapie pathogenesis. The solution phase assembly of the tetrasaccharide is accomplished relying on a [2+2]-glycosylation approach. Key to differentiate the two amine groups is the use of the *N,N*-diacyl group. The synthesis pointed out several challenges and limitations of existing synthetic methods. These issues are addressed in Chapters 3-6.

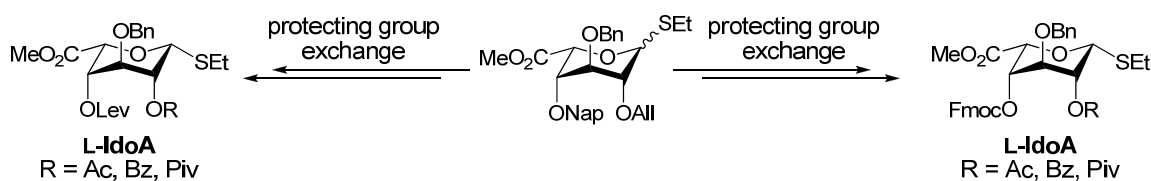


Fast synthetic access to large quantities of L-iduronic acid (L-IdoA) monosaccharide building blocks represents a major hurdle on the way to synthetic heparin oligosaccharides. **Chapter 3** is dedicated to this issue and describes the large scale *de novo* synthesis of a suitably protected L-iduronic acid from D-xylose and a second approach that further diversifies on the protecting group pattern. The key steps are a  $\text{MgBr}_2 \cdot \text{OEt}_2$ -mediated stereoselective cyanation and a subsequent *Pinner* reaction. The second approach allows to diverge the synthesis to six differentially protected L-iduronic acid monosaccharides building blocks.

*First Approach:*

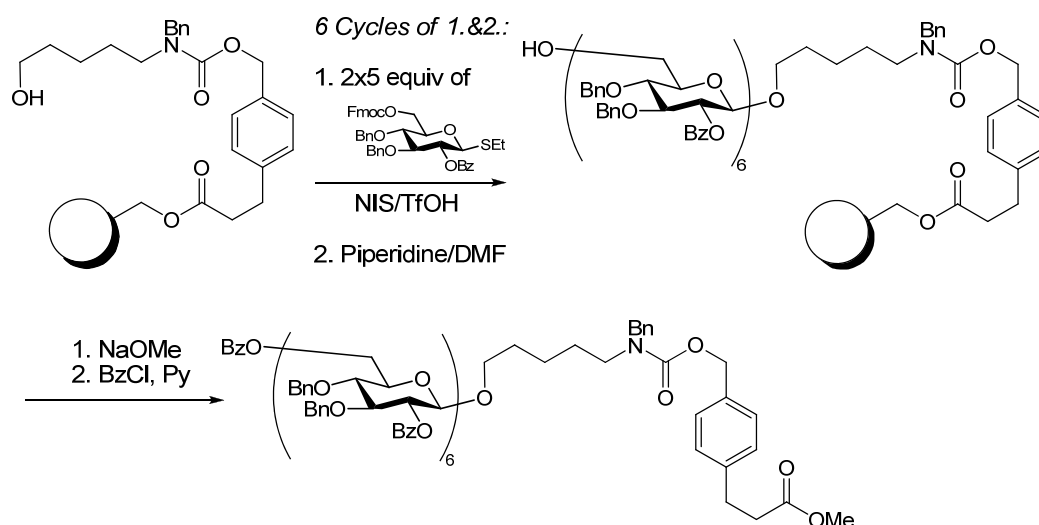


*Second Approach:*

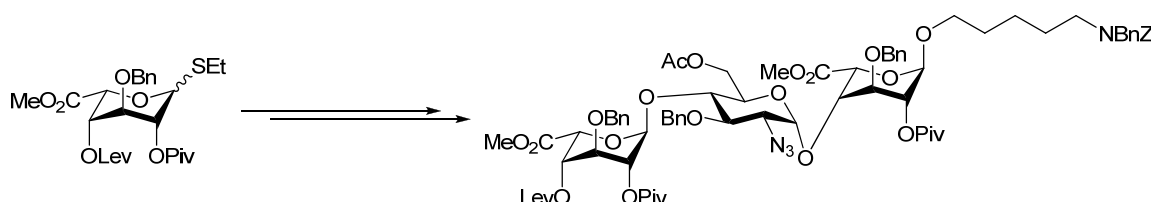


The octendiol linker, the linker of choice for the automated synthesis of oligosaccharides, obviates the use of electrophiles, needed for the activation of thioglycosides. Cleavage from the resin and post-assembly modifications of the obtained pentenyl linker are often troublesome. Addressing these issues, **Chapter 4** describes the synthesis and evaluation of a novel linker system for the synthesis of oligosaccharides. The linker is loaded onto a *Merrifield* resin, and is used for the automated assembly of a 1,6-linked glucose hexasaccharide. Detailed investigations allow for the first time the use of thioglycosides in the

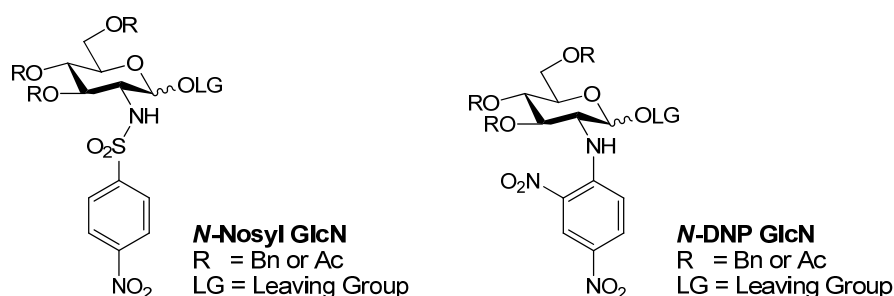
automated synthesis of oligosaccharides. Upon global deprotection the novel linker yields an amine that can be used directly for biological investigations.



The synthetic utility of the procured L-iduronic acid thioglycoside (Chapter 3) in combination with the novel linker (Chapter 4) for the construction of heparin oligosaccharides is demonstrated in **Chapter 5** by the solution phase assembly of a trisaccharide.

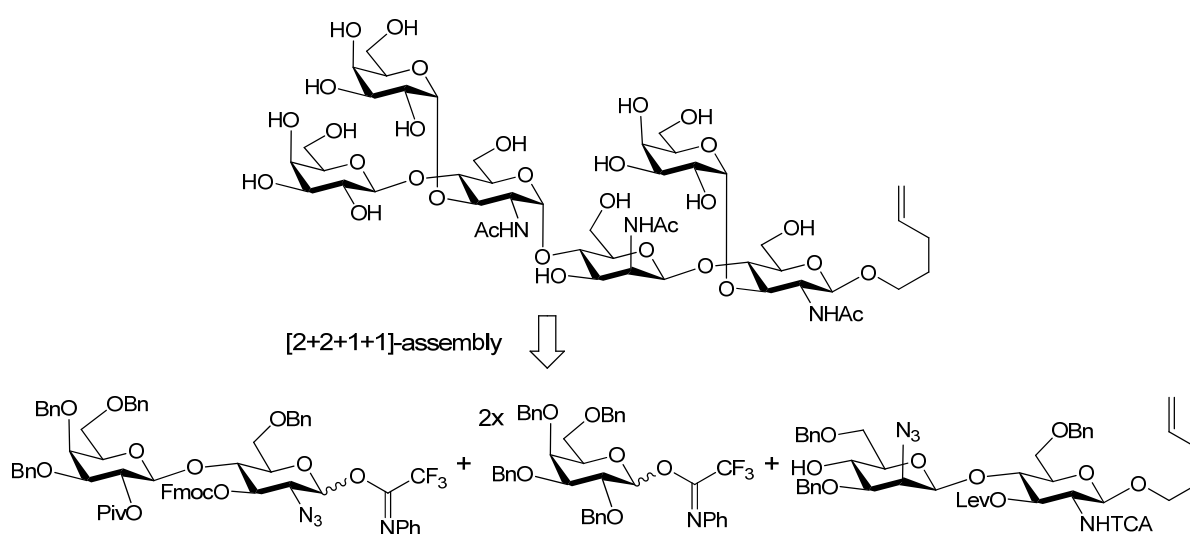


To differentiate the amino groups in an assembled heparin oligosaccharide, a second non-participating protecting group that is orthogonal to the commonly used azido group is required. Addressing this issue, **Chapter 6** describes the synthesis of *N*-4-nitrobenzenesulphonamide (nosyl) and *N*-2,4-dinitrophenyl (DNP) protected glucosamine (GlcN) building blocks and their evaluation as glycosylating agents in heparin synthesis.

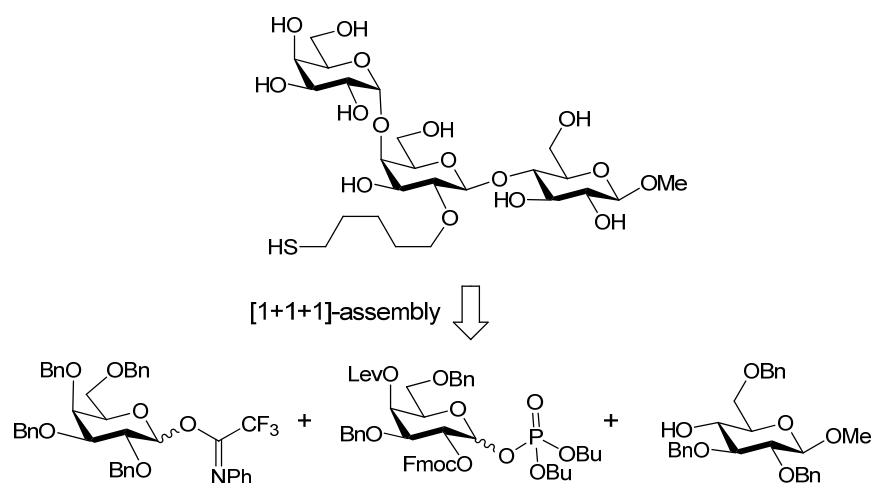


## Part II

The second part of this dissertation includes the solution phase synthesis of two biologically relevant structures. In **Chapter 7**, the first synthesis of a hexasaccharide repeating unit of a potential carbohydrate antigen, the major cell wall polysaccharide of *Bacillus anthracis*, is described. The assembly starts with a glycosylation of two elaborate disaccharide building blocks to provide selectively the  $\alpha$ -linkage to glucosamine, and is followed by the sequential selective introduction of two  $\alpha$ -galactosidic residues. All three couplings rely on glycosyl *N*-phenyltrifluoroacetimidates.



Finally, **Chapter 8** describes the solution phase synthesis of a linker-functionalized Gb-3 trisaccharide, using a monosaccharide based coupling approach. Gb-3 is a receptor for Shiga-like toxins and has recently been shown to play a role in the entry of HIV-1 into cells.

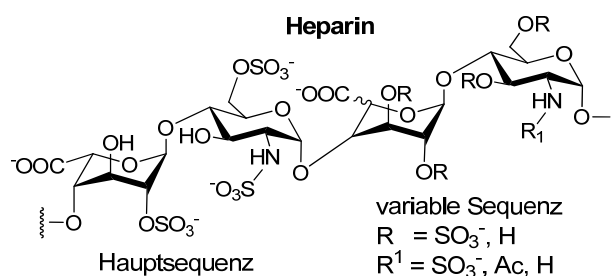


## Zusammenfassung

Die vorliegende Doktorarbeit besteht aus zwei Teilen. Der erste Teil handelt von verschiedenen Aspekten der automatisierten Heparinsynthese; der zweite Teil ist der Synthese biologisch wichtiger Oligosaccharide gewidmet.

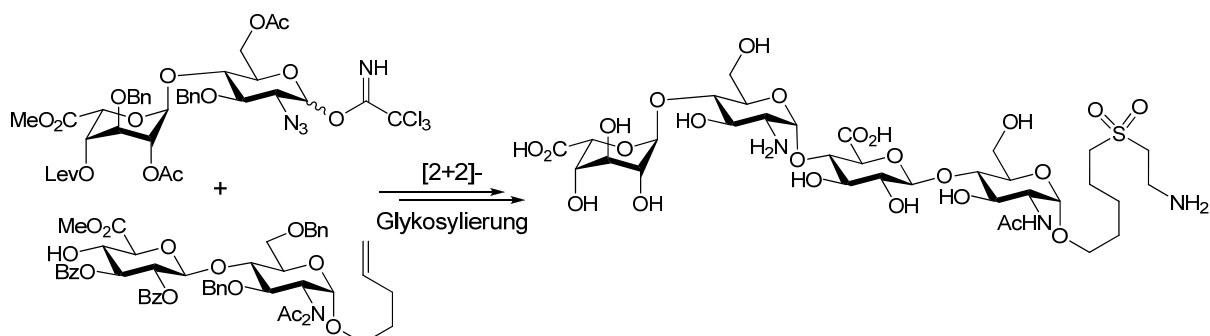
### Teil I

**Im ersten Teil dieser Doktorarbeit** werden verschiedene Aspekte der automatisierten Heparinsynthese untersucht. Heparin und Heparansulfat sind die komplexesten Glykosaminoglykane (GAG), eine Klasse hochfunktionalisierter, linearer, negativ geladener, und biologisch aktiver Polysaccharide. Heparin ist zusammengesetzt aus sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten bestehend aus Uronsäure-Bausteinen (D-Glucuronsäure oder L-Iduronsäure), die *via* 1,4-Verknüpfung mit D-Glucosamin verbunden sind. In den vergangenen 40 Jahren wurden ausgeklügelte Methoden zum Zusammenknüpfen von Heparin-Oligosacchariden entwickelt. Aufgrund des enormen Aufwandes für deren Synthese in Lösung ist routinemässiger Zugang zu Bibliotheken von Heparin-Oligosacchariden jedoch noch nicht möglich. Die Anwendung der automatisierten Festphasensynthese auf die Synthese von Heparin-Oligosacchariden ist von höchster Wichtigkeit, da das automatisierte Verknüpfen voraussichtlich schnellen Zugang zu einer grossen Bibliothek an Heparin-Oligosacchariden von wohldefinierter Struktur und Länge ermöglichen wird.



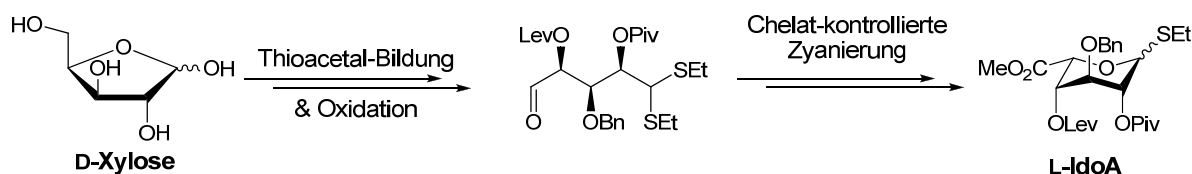
**Kapitel 2** handelt von der erstmaligen Synthese einer spezifischen Heparansulfat-Sequenz, von der man vermutet, dass sie an der Entstehung der Traberkrankheit beteiligt ist. Die Synthese wird in Lösung durchgeführt und beruht auf einem [2+2]-Verknüpfungsansatz. Der Schlüssel zur Unterscheidung zweier Amin-Gruppen ist die Verwendung der

*N,N*-Diacylgruppe. Die Synthese zeigt mehrere Herausforderungen und Grenzen bestehender synthetischer Methoden auf. Die Kapitel 3-6 befassen sich mit diesen Problemen.

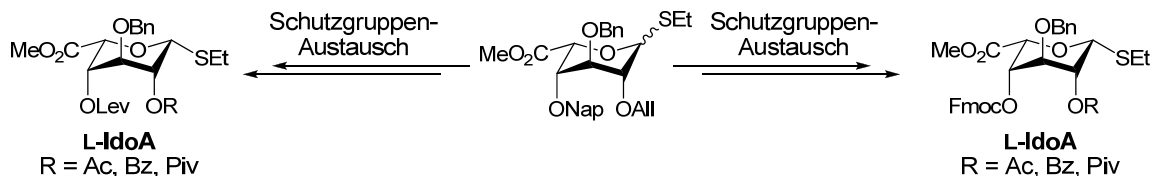


Schneller Zugang zu grossen Mengen an L-Iduronsäure (L-IdoA) Monosacchariden stellt eine hohe Hürde auf dem Weg zu synthetischen Heparin-Oligosacchariden dar. **Kapitel 3** ist diesem Problem gewidmet und beschreibt die *de novo* Synthese grosser Mengen einer passend geschützten L-Iduronsäure ausgehend von D-Xylose sowie einen zweiten Ansatz, der das Schutzgruppenmuster weiter diversifiziert. Schlüsselschritte sind eine  $MgBr_2 \cdot OEt_2$ -vermittelte stereoselektive Zyanierung und eine nachfolgende *Pinner*-Reaktion. Der zweite Ansatz erlaubt das Divergieren der Synthese zu sechs unterschiedlich geschützten L-Iduronsäuremonosaccharid-Bausteinen.

Erster Ansatz:



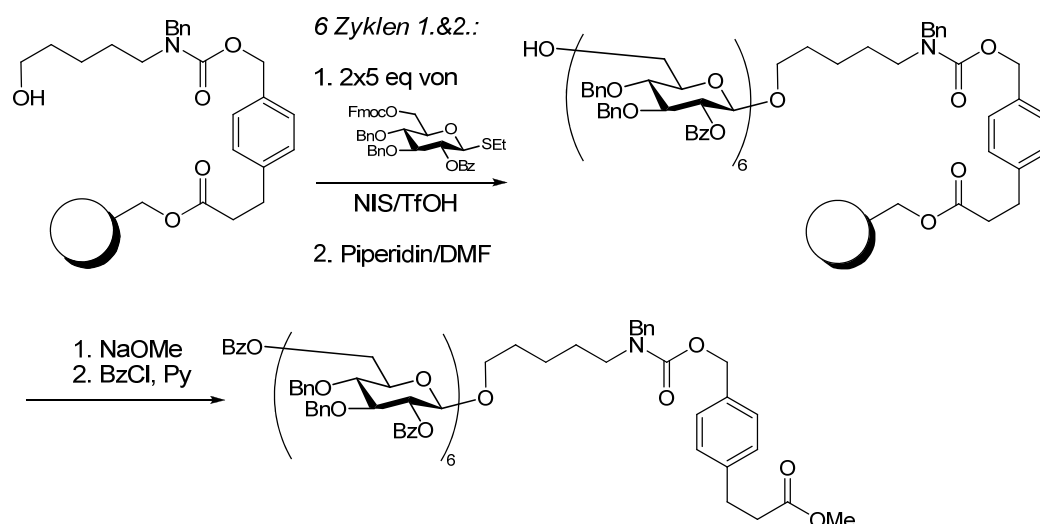
Zweiter Ansatz:



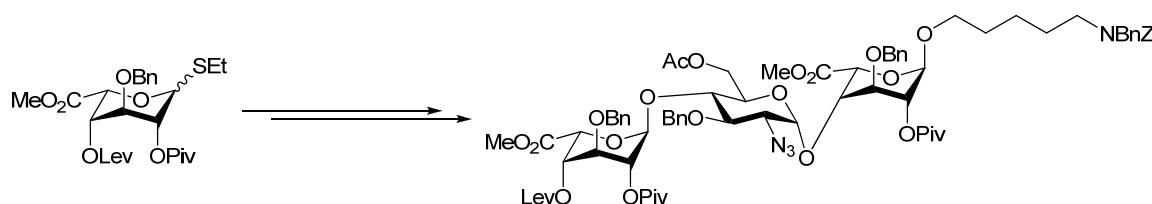
Der Oktendiol-Linker, der Linker der Wahl für die automatisierte Synthese von Oligosacchariden verunmöglicht den Gebrauch von Elektrophilen, die für die Aktivierung von Thioglykosiden benötigt werden. Abspaltung vom Harz und nachgängige Modifizierung des erhaltenen Pentenyl-Linkers sind häufig beschwerlich. **Kapitel 4** widmet sich diesen Problemen und beschreibt die Synthese und Evaluierung eines neuartigen Linker-Systems für



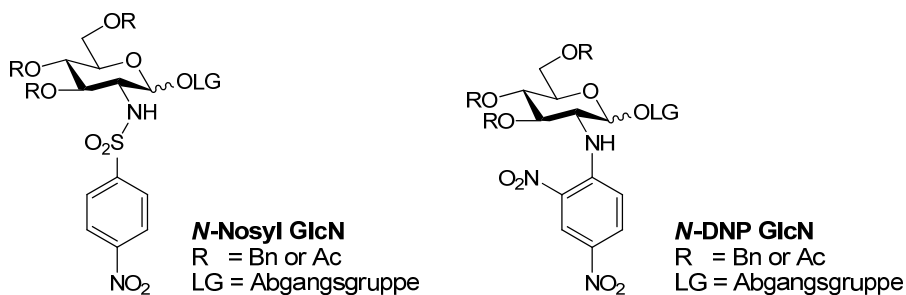
die Synthese von Oligosacchariden. Der Linker wird an ein *Merrifield*-Resin geknüpft und für die automatisierte Synthese eines 1,6-verknüpften Hexasaccharids verwendet. Ausführliche Untersuchungen ermöglichen die erstmalige Verwendung von Thioglykosiden in der automatischen Synthese von Oligosacchariden. Nach der vollständigen Entschützung zum Ende einer Synthese liefert der neuartige Linker ein Amin, das direkt für biologische Untersuchungen verwendet werden kann.



**Kapitel 5** zeigt den synthetischen Nutzen des erhaltenden L-Iduronsäure Thioglykosids (Kapitel 3) in Kombination mit dem neuartigen Linker (Kapitel 4) zum Aufbau von Heparin-Oligosacchariden anhand der Synthese in Lösung eines Trisaccharids.

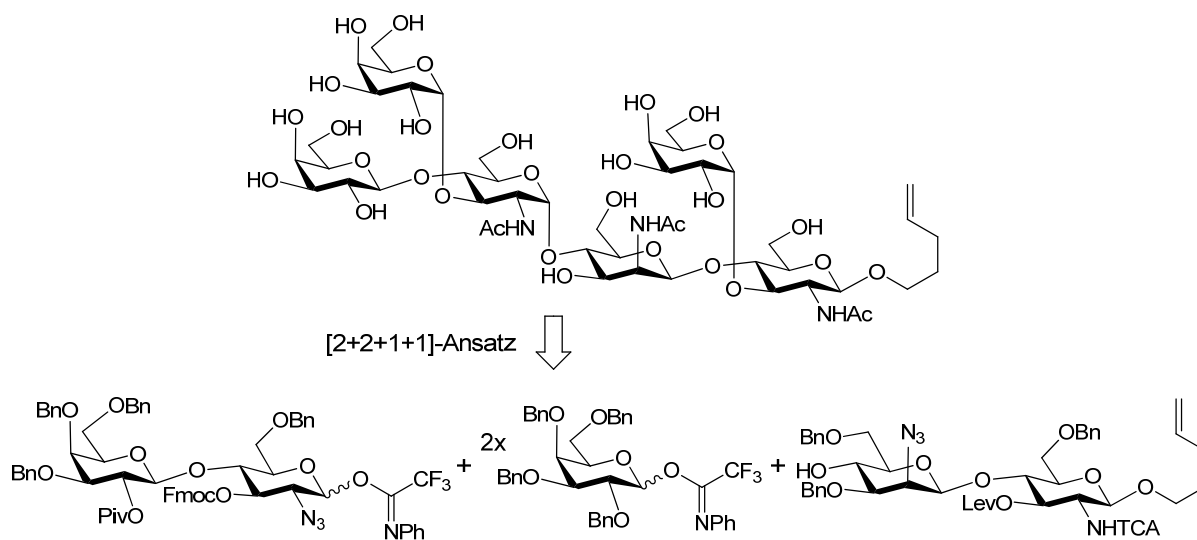


Um die Amin-Gruppen eines aufgebauten Heparin-Oligosaccharids zu unterscheiden, wird eine zweite nicht-partizipierende Schutzgruppe benötigt, die orthogonal zur standardmässig verwendeten Azid-Gruppe ist. Kapitel 6 befasst sich mit dieser Suche und beschreibt die Synthese von *N*-4-nitrobenzolsulphonamid (nosyl) und *N*-2,4-dinitrophenyl (DNP) geschützten Glucosamine-Bausteinen (GlcN) und deren Evaluierung als Glykosilierungs-Agentien in der Heparinsynthese.



## Teil II

Der zweite Teil dieser Doktorarbeit beinhaltet die Synthese zweier biologisch relevanter Strukturen in Lösung. Kapitel 7 beschreibt die erstmalige Synthese einer sich wiederholenden Hexasaccharid-Einheit eines möglichen Zucker-Antigens, des Hauptzellwand-Polysaccharids von *Bacillus anthracis*. Die Synthese beginnt mit der Verknüpfung zweier aufwendig hergestellter Disaccharid-Bausteinen, wobei selektiv eine  $\alpha$ -Verknüpfung zu Glucosamin erhalten wird. Anschliessend werden sequentiell zwei  $\alpha$ -galactosidische Bindungen eingeführt. Die drei Kupplungen beruhen auf der Verwendung von Glykosyl *N*-Phenyltrifluoroacetimidaten.



Kapitel 8 beschreibt abschliessend die auf einer Monosaccharid-Strategy basierende Synthese eines Linker-bestückten Gb-3 Trisaccharids in Lösung. Kürzlich wurde gezeigt, dass Gb-3, ein Rezeptor für Shiga-ähnliche Toxine, eine Rolle beim Eindringen von HIV-1 in Zellen spielt.

