

ANTIGENES DE GROUPE SANGUIN

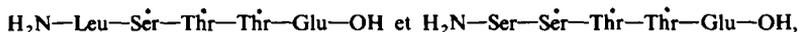
SYNTHESE DE GLYCOPEPTIDES T_N REPRESENTANT LA PARTIE N-TERMINALE DE LA GLYCOPHORINE HUMAINE A^N ET A^{Mc}

B. FERRARI et A. A. PAVIA*

Laboratoire de Chimie Bioorganique, Faculté des Sciences d'Avignon, 84000-Avignon, France

(Received in France 5 June 1984)

Résumé — Dans ce travail nous décrivons la première synthèse chimique des triglycopentapeptides



dans lesquels * représente l'unité 2-acétamido-2-désoxy- α -D-galactopyranosyle. Ces composés représentent respectivement la partie N-terminale des glycophorines A^N et A^{Mc} et sont responsables de la spécificité immunologique T_N. Ils ont été obtenus selon les techniques classiques de synthèse peptidique recourante en phase liquide en utilisant alternativement des aminoacides et des O-glycosylaminoacides protégés et activés de façon adéquate. Les unités glycosidiques ont été introduites sous la forme de dérivés 2-azido-2-désoxy-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl-L-sérine et L-thréonine, eux-mêmes obtenus à partir du monosaccharide réducteur et de L-sérine ou L-thréonine en utilisant l'anhydride trifluorométhanesulfonique comme agent de condensation. La réduction des groupements azido suivie de l'acétylation et de l'hydrogénolyse permet d'obtenir les deux triglycopentapeptides totalement déprotégés.

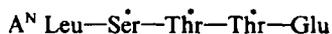
Abstract — This report describes the first synthesis of the triglycosylated pentapeptides



in which * represents the 2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl residues. These compounds constitute the antigenic aminoterminal portions of respectively human glycophorin A^N and A^{Mc}. The above compounds were obtained by a stepwise peptide coupling strategy in solution, beginning at the C terminus and proceeding toward the N-terminus, using amino acids or suitably protected and activated O-glycosyl-amino acids. Carbohydrate residues were introduced into the sequence as 2-azido-2-deoxy- α -D-galactopyranosyl-L-serine and L-threonine derivatives obtained from the reducing sugar and amino acid by the trifluoromethanesulfonic anhydride procedure. Reduction of the azido functions followed by acetylation and catalytic hydrogenolysis afforded the above antigenic T_N glycosylated pentapeptides.

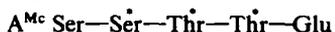
La glycophorine A, la principale glycoprotéine de la membrane des globules rouges humains, a été intensivement étudiée. Elle possède de nombreux récepteurs, dont ceux du virus de la grippe, de la malaria (*Plasmodium falciparum*) et de certaines lectines ainsi que les déterminants antigéniques du groupe sanguin MN.

Il est maintenant bien établi¹⁻³ que le déterminant antigénique MN est situé dans le triglycopentapeptide terminal de la glycophorine A, le polymorphisme de la chaîne peptidique en position 1 et 5 étant responsable de la spécificité. Les structures respectives des triglycopentapeptides M et N ont été confirmées par de nombreux auteurs aussi bien par les techniques classiques de dégradation⁴ que par des études en RMN du carbon-13⁵



*, oligosaccharide.

De nombreux variants génétiques de ces groupes sanguins ont été mis à jour, les plus étudiés étant le variant M^{c,7} hybride glycosylé des antigènes M et N et le variant M^B non glycosylé dérivant de l'antigène N par la présence d'une asparagine à la place de la thréonine en position 4.



D'après certains auteurs⁹ le précurseur biosynthétique de l'antigène MN serait l'antigène T lui-même issue de l'antigène T_N par action de la β -galactosyl transférase. D'autres auteurs⁵ réfutent de façon catégorique cette hypothèse.

Précédemment nous avons obtenu le pentapeptide N-terminal de la glycophorine A^M portant la spécificité immunologique T_N (α -GalNac),¹⁰ ce composé représentant un intérêt certain pour une étude approfondie par RMN du carbone-13 et du proton.¹¹

Nous rapportons ici la synthèse des pentapeptides triglycosylés de spécificité T_N issus de la glycophorine A^N et A^{Mc}. Les synthèses du variant M^B et d'autres analogues non glycosylés seront décrites ailleurs.¹² Le syndrome T_N est un désordre génétiquement acquis caractérisé par la présence d'antigènes T_N à la surface des érythrocytes¹³ en raison d'une déficience en galactosyl transférase (T transférase). Il est souvent associé à des désordres hématologiques graves tels que leucopénie et thrombopénie.¹⁴⁻¹⁶ D'autre part certains auteurs ont montré que l'apparition de sites antigéniques T_N est liée au développement de la leucémie^{17,18} et de tumeurs du sein et du colon.¹⁹ Enfin, il a été montré que les érythrocytes T_N contrairement à ceux portant la spécificité MN ou T, sont résistants à l'invasion par *Plasmodium falciparum* (agent de la malaria), cette observation met en valeur le rôle des unités acide sialique et galactose lors d'une telle invasion.²⁰

Ces deux glycopentapeptides T_N (N et Mc) ainsi que le dérivé M précédemment décrit¹⁰ et les pentapeptides non glycosylés¹² font l'objet d'une étude biologique approfondie. Ces composés sont testés à la fois comme antigènes artificiels, accepteurs de β -galactosyl transférase et récepteurs de différentes lectines dont celles de *Salvia sclarea* et *Agaricus bisporus*. Les résultats de ces tests seront présentés ultérieurement.²⁵

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La technique utilisée pour la synthèse de l'antigène M précédemment décrit¹⁰ a été reproduite pour l'obtention des composés 14 (N) et 18 (M°). L'unité α -GalNac est introduite sous la forme du 2-azido-2-désoxy-3,4,6-tri-*O*-benzyl- α -D-galactopyranoside correspondant.

La condensation entre le monosaccharide réducteur 2 et les esters actifs de la sérine 3 et de la thréonine 1 et 4 est réalisée en présence d'anhydride trifluorométhane sulfonique^{26,27} et permet d'obtenir les glycosides correspondants 5, 6 et 7 (Schéma 1).

Ces composés peuvent être utilisés sans contrainte particulière de la même façon qu'un aminoacide dans une synthèse de type peptidique classique. Le groupement protecteur fluorenylméthoxycarbonyl (Fmoc) a été choisi en raison de sa stabilité dans le milieu acide de la réaction de glycosylation et de son clivage aisé dans des conditions basiques douces (pipéridine).

L'ester *N*-hydroxysuccinimyl⁷ très réactif, est utilisé sous la forme de mélange anomérique, la séparation des anomères étant effectuée au niveau du glycodipeptide 8. Par contre les esters *p*-nitrophénoliques 5¹⁰ et 6, à défaut d'une grande réactivité sont très aisément purifiés par chromatographie rapide.²¹

La séquence réactionnelle suivie pour préparer les pentapeptides N et M° est représentée dans le Schéma 2. Les acylations sont effectuées soit dans le dichlorométhane soit dans un mélange de dichlorométhane et de *N,N*-diméthylformamide. Dans le cas de con-

densation avec un ester *p*-nitrophénolique, le 1-hydroxybenzotriazole est ajouté à la réaction. La réduction du groupement azido est effectuée par traitement avec le borohydrure de sodium en présence de chlorure de nickel et d'acide borique suivie de l'acétylation. Cette technique s'était révélée efficace dans la synthèse du glycopeptide issu de la glycophorine A^M.¹⁰

L'utilisation du groupement benzyloxycarbonyl (Z) comme protection de l'amine de l'acide amino N-terminal ainsi que celle de groupements benzyles comme protection des autres fonctions permet la déprotection totale de la molécule en une seule étape par hydrogénolyse en présence de Pd/C. Les spectres de RMN du carbone-13 ont permis de contrôler la structure et la pureté énantiomérique²⁴ des deux pentapeptides finaux 14 et 18. (Tableau 1).

La filtration sur gel (Sephadex LH 20) des composés protégés, associée à la chromatographie, s'est révélée une méthode de purification rapide et efficace.

PARTIE EXPERIMENTALE

Méthodes générales

Les points de fusion sont mesurés au moyen d'un appareil Büchi et ne sont pas corrigés. Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés sur un polarimètre Perkin-Elmer (modèle MC 241).

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du ¹³C ont été enregistrés sur un appareil Bruker WP 80 (25.2 MHz) excepté pour les deux triglycopentapeptides déprotégés 14 et 18 enregistrés sur un appareil Bruker WP 200 SY (50.3 MHz).

Pour les solutions dans le CDCl₃, les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne.

Avant enregistrement des spectres, les solutions aqueuses des composés 14 et 18 sont désionisées par passage sur une petite colonne de résine échangeuse d'ions Chelex 100 (H⁺). Après lyophilisation, les résidus sont repris dans D₂O. Les déplacements chimiques sont mesurés par rapport au 1,4-dioxanne, pris comme référence interne, dont le déplacement chimique est fixé à 67.86 ppm.

Le déroulement des réactions, ainsi que l'homogénéité des

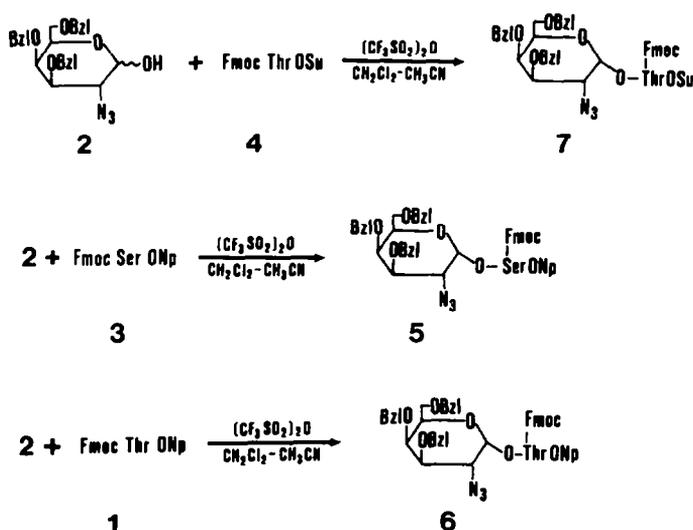


Schéma 1.

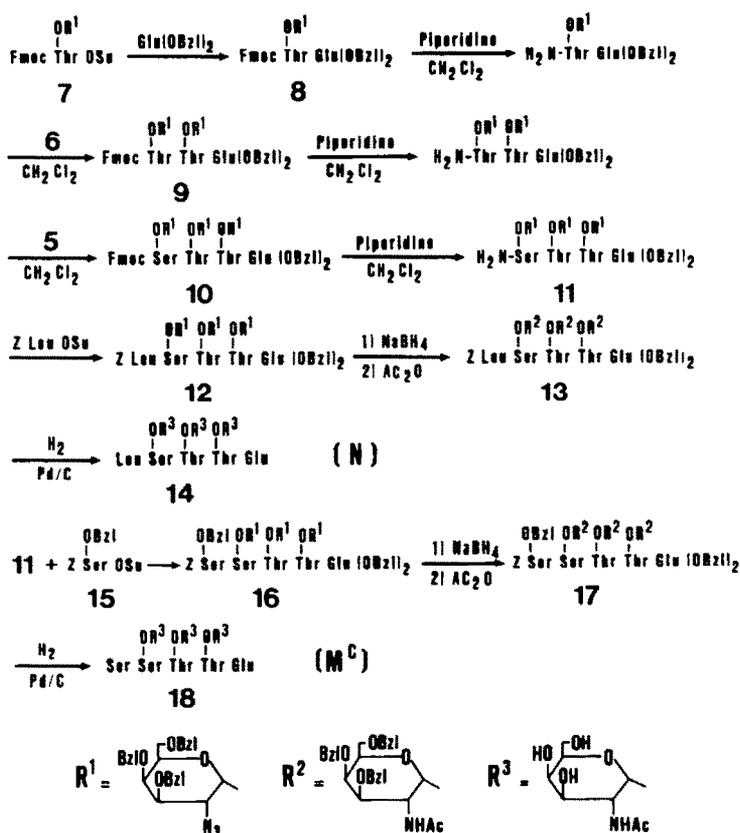


Schéma 2.

Tableau 1. RMN du carbone-13

Déplacements chimiques des glycopeptides T_N de la glycophorine A^N et A^{M^c}

	14 (N)	18 (M ^c)
Cl	99.33 (Ser 2); 100.55, 100.64 (Thr 3, Thr 4)	99.42 (Ser 2); 100.18, 100.44 (Thr 3, Thr 4)
C2	51.10	51.18 (3)
C3, C4	69.92, 69.87, 69.71 (2) 69.51, 69.32	69.96, 69.80, 69.61 69.39, 69.24
C5	72.73 (1), 72.65 (2)	72.80(2), 72.72(1)
C6	62.51 (3)	62.57 (3)
Ser C α	54.69	55.83 (Ser 1), 54.84 (Ser 2) ^a
C β	68.35	61.55 (Ser 1), 68.68 (Ser 2)
Thr C α	58.50, 58.06	58.66, 57.98
C β	78.79, 78.65	78.41, 77.94
C γ	19.79, 19.54	19.35, 19.13
Glu C α	53.11	54.99 ^a
C β	27.35	28.45
C γ	31.37	32.11
Leu C α	53.21	
C β	41.24	
C γ	25.17	
C δ	22.98, 22.63	
CH3 (NHAc)	23.70, 23.67, 23.54	23.70 (2), 23.52 (1)

^a Ces valeurs peuvent être interverties.

composés décrits ont été contrôlés par chromatographie sur couche mince (CCM) sur gel de Silice (Merck F 254). La révélation des couches minces se fait en UV ondes courtes et par vaporisation d'une solution éthanolique contenant 10% d'acide sulfurique suivie d'un chauffage à 100°. Les composés comportant une fonction amine libre sont révélés par vaporisation d'une solution de fluorescamine suivie de l'observation en UV grandes ondes. Les chromatographies sur colonne utilisent le gel de Silice Merck 60, 230-400 mesh. Les chromatographies rapides²¹ sont effectuées sur le même gel, sous pression d'azote.

Les filtrations sur gel des composés protégés sont effectuées sur Sephadex LH-20 (Pharmacia) avec un mélange CH₂Cl₂-méthanol (1:1, v/v) par une procédure identique à celle d'une chromatographie classique. Les microanalyses ont été effectuées par le service de microanalyses du Centre de Recherche Clin-Midy de Montpellier.

Ester p-nitrophénolique de la N-(fluorénylméthoxycarbonyl)-L-thréonine (1). La Fmoc-L-Thr (Bu)^t-ONP monohydrate (préparé selon la technique de Bodanszky et al., 1980²²) (5 g, 9.3 mmoles) est dissoute dans un mélange de CH₂Cl₂ (20 ml) et d'acide trifluoroacétique (20 ml). Après 1 hr à température ambiante la CCM indique une disparition complète du composé de départ. La solution est concentrée et le résidu obtenu est repris par du CH₂Cl₂ (250 ml). La phase organique est lavée avec une solution de NaHCO₃ saturée (150 ml), avec de l'eau (150 ml), séchée sur Na₂SO₄. L'évaporation de la phase organique sèche laisse un résidu qui est purifié par chromatographie rapide (hexane-EtOAc-HOAc 63:35:0.2, v/v/v) pour donner le composé 1 pur sous forme de mousse sèche (3.85 g, 89%); [α]_D²⁰ -57.1 (c 1.0, CHCl₃); ¹³C-rmn δ : 67.9 (C β), 67.4 (CH₂-Fmoc), 59.7 (C α), 47.2 (C9-Fmoc), 20.1 (C γ). (Calc pour C₂₅H₂₂O₇N₂: C, 64.9; H, 4.8; N, 6.05. Trouvé: C, 64.5; H, 5.05; N, 6.0%.)

Ester p-nitrophénolique de la N-(fluorénylméthyl-oxycarbonyl)-O-(2-azido-2-désoxy-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-L-thréonine (6). La Fmoc-L-Thr-ONp 1 (1.45 g, 3.13 mmoles) et l'anhydride trifluorométhane sulfonique (0.45 ml) sont dissous dans un mélange de CH₂Cl₂ (15 ml) et d'acétonitrile (15 ml). Le composé 2¹⁰ (0.56 g, 1.17 mmoles) en solution dans le dichlorométhane (10 ml) est ajouté par fractions à température ambiante sur une période de 20 mn. L'agitation est maintenue 5 mn après la fin de l'addition et une solution de NaHCO₃ saturée (50 ml) est ajoutée. Le mélange réactionnel est extrait par du CH₂Cl₂ (200 ml), lavé avec de l'eau (50 ml) et la phase organique est séchée sur Na₂SO₄ puis concentrée pour donner une huile qui est purifiée par chromatographie rapide. Une élution avec un mélange CH₂Cl₂-acétone-HOAc (98:2:0.2, v/v/v) permet de récupérer le composé 1 en excès (0.7 g), une autre élution avec un mélange, hexane-EtOAc-HOAc (70:30:0.3, v/v/v) permet d'obtenir 0.57 g d'anomère α pur, 0.2 g d'anomère β pur et 0.13 g d'un mélange des deux dans le rapport 1:1. Ces composés sont obtenus sous forme d'huiles, rendement global: 85%. Anomère α : [α]_D²⁰ +22.2 (C 1.0, CHCl₃); ¹³C-rmn δ : 99.7 (C1), 60.3 (C2), 59.5 (C α -Thr), 47.3 (C9-Fmoc), 18.8 (C γ -Thr). (Calc pour C₃₂H₄₉O₁₁N₄: C, 68.9; H, 5.45; N, 6.2. Trouvé: C, 68.6; H, 5.6; N, 6.0%.)

N-(Fluorénylméthoxy-carbonyl)-O-(2-azido-2-désoxy-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-L-thréonyl-L-glutamate de dibenzyle (8). A une solution du composé 7¹⁰ (1.41 g, 1.57 mmoles) sous, la forme d'un mélange anomérique (6:4, α/β) dans le dichlorométhane on ajoute une solution de paratoluène-sulfonate d'acide L-glutamique dibenzylester (Bachem; 0.79 g, 1.57 mmoles) dans le CH₂Cl₂ contenant de la N,N-diisopropyléthylamine (0.4 ml).

Après 5 hr d'agitation à température ambiante de l'acide acétique est ajouté et la solution est évaporée pour laisser une huile qui est purifié par chromatographie rapide (hexane-acétate d'éthyle, 7:3, v/v).

Le composé anomérique α 8 pur (0.95 g) est isolé ainsi que le composé anomérique β (0.6 g). Les 2 anomères sont obtenus sous forme d'huiles; rendement global: 89%. Anomère α : [α]_D²⁰ +37.9 (C 1.0, CHCl₃); ¹³C-rmn δ : 97.59 (C1), 60.95 (C2),

56.58 (C α -Thr), 51.88 (C α -Glu), 47.40 (C9-Fmoc), 30.20 (C γ -Glu), 27.6 (C β -Glu) 15-42 (C γ -Thr). (Calc pour C₆₅H₆₅O₁₂N₅: C, 70.4; H, 5.9; N, 6.3. Trouvé: C, 70.4; H, 5.9; N, 6.2%.)

Le composé 8 α est aussi obtenu à partir du composé 6 α mais avec un rendement global inférieur.

N-(Fluorénylméthoxy-carbonyl)-O-(2-azido-2-désoxy-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-L-thréonyl-O-(2-azido-2-désoxy-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-L-thréonyl-L-glutamate de dibenzyle (9). A une solution du composé 8 (0.76 g, 0.68 mmoles) dans le CH₂Cl₂ (40 ml) est ajoutée de la pipéridine (10 ml) et le mélange est agité pendant 15 mn à température ambiante. Le résidu huileux obtenu après évaporation est repris par du CH₂Cl₂ (200 ml), la solution est lavée, avec HCl 0.5 N (50 ml), avec de l'eau (2 x 50 ml), séchée sur sulfate de sodium et évaporée. L'huile obtenue est utilisée sans autre purification pour l'étape suivante. Elle est dissoute dans le CH₂Cl₂ (15 ml): cette solution est ajoutée par fractions à une solution du composé 6 (0.66 g, 0.72 mmoles) et de 1-hydroxybenzotriazole (0.195 g) dans un mélange de CH₂Cl₂ (40 ml) et de DMF (4 ml). Après 1 hr d'agitation à température ambiante de la diisopropyléthylamine (0.4 ml) est ajoutée et après 3 hr supplémentaires la CCM (fluorescamine) indique la disparition du composé de départ. De l'acide acétique (0.5 ml) est alors ajouté et la solution est concentrée jusqu'à obtention d'un produit huileux qui est purifié par filtration sur gel sur colonne de Sephadex LH 20.

Les fractions contenant le composé 9 (1.02 g) sont rassemblées et purifiées par chromatographie sur gel de silice (CH₂Cl₂-acétone, 98:2, v/v) pour donner le composé 9 pur sous la forme d'un sirop (0.85 g, 74%). [α]_D²⁰ +50.7 (C, 1.0, CHCl₃); ¹³C-rmn δ : 98.87 et 97.32 (2 Cl), 61.00 et 60.64 (2 C2), 57.26 et 54.93 (2 C α -Thr), 51.88 (C α -Glu), 47.40 (C9-Fmoc), 30.20 (C γ -Glu), 27.37 (C β -Glu), 15.69 et 14.96 (2 C γ -Thr). (Calc pour C₉₆H₉₉O₁₈N₉: C, 69.2; H, 6.0; N, 7.6. Trouvé: C, 68.8; H, 5.9; N, 7.5%.)

N-(Fluorénylméthoxy-carbonyl)-O-(2-azido-2-désoxy-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-L-séryl-O-(2-azido-2-désoxy-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-L-thréonyl-O-(2-azido-2-désoxy-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-L-thréonyl-L-glutamate de dibenzyle (10). Le clivage du groupement protecteur Fmoc est effectué selon le traitement décrit précédemment c'est à dire le composé 9 en solution dans le CH₂Cl₂ (20 ml) est traité pendant 15 mn par la pipéridine (7 ml). Après les lavages classiques, l'évaporation de la phase organique séchée fournit une huile claire. Cette dernière est immédiatement reprise par du CH₂Cl₂ (10 ml) et la solution obtenue est ajoutée par fractions à une solution du composé 5¹⁰ (0.45 g, 0.49 mmoles) et de 1-hydroxybenzotriazole (0.35 g) dans un mélange de CH₂Cl₂ (30 ml) et de DMF (2 ml).

Après 2 hr à température ambiante de la diisopropyléthylamine est ajoutée et la réaction est agitée 3 hr supplémentaires. Le traitement habituel permet d'obtenir, après filtration sur gel Sephadex LH 20 suivie d'une chromatographie sur gel de silice (hexane-EtOAc, 7:3, v/v), le composé 10 analytiquement pur sous forme d'huile (0.72 g, 78%). [α]_D²⁰ +67.8 (C 1.0, CHCl₃); ¹³C-rmn δ : 99.4, 98.8 et 97.1 (3 Cl), 56.0, 54.7 et 53.8 (2 C α -Thr et C α -Ser), 51.9 (C α -Glu), 47.3 (C9-Fmoc), 30.1 (C γ -Glu), 27.2 (C β -Glu), 15.3 et 14.8 (2 C γ -Thr). (Calc pour C₁₂₆H₁₃₁O₂₄N₁₃: C, 68.4; H, 6.0; N, 8.2. Trouvé: C, 68.1; H, 6.05; N, 8.3%.)

N-(Benzylloxycarbonyl)-L-leucyl-O-(2-azido-2-désoxy-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-L-séryl-O-(2-azido-2-désoxy-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-L-thréonyl-O-(2-azido-2-désoxy-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-L-thréonyl-L-glutamate de dibenzyle (12). Le composé 10 (0.34 g, 0.154 mmoles) est dissous dans le dichlorométhane (15 ml), la pipéridine (3 ml) est ajoutée et la réaction est agitée pendant 15 min à température ambiante puis traitée comme décrit précédemment. L'huile brute obtenue, formée par le composé 11, est reprise par du CH₂Cl₂ (10 ml) et traitée par l'ester N-

hydroxysuccinimyle de la *N*-benzyloxycarbonyl-L-leucine (Bachem, 0.09 g). La solution est agitée à température ambiante jusqu'à disparition en CCM du composé amine libre (test à la fluorescamine). Après 2 hr les solvants sont évaporés et le résidu est purifié par filtration sur gel avec Sephadex LH 20 pour donner le composé 9 pur sous forme d'huile (0.32 g, 93%). $[\alpha]_D^{20} + 52.0$ (C 1.0, CHCl_3); ^{13}C -rnm δ : 99.2, 98.8 et 97.1 (3 Cl), 56.1, 54.7 et 53.8 (2 α -Thr et α -Ser), 52.3 (α -Leu), 51.9 (α -Glu), 41.7 (C β -leu), 30.1 (C γ -Glu), 27.3 (C β -Glu), 24.7 (C γ -Leu), 22.9 et 21.8 (2C γ -Leu), 15.4 et 14.8 (2C γ -Thr). (Calc pour $\text{C}_{125}\text{H}_{138}\text{N}_{14}\text{O}_{25}$: C, 67.1; H, 6.2; N, 8.8. Trouvé: C, 67.3; H, 6.2; N, 8.6%.)

N-(Benzyloxycarbonyl)-L-leucyl-O-(2-acétamido-2-désoxy-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-L-séryl-O-(2-acétamido-2-désoxy-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-L-thréonyl-O-(2-acétamido-2-désoxy-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-L-thréonyl-L-glutamate de dibenzyle (13). Le composé 12 (0.32 g, 0.14 mmoles) est dissous dans une solution éthanolique (48 ml) de chlorure de nickel (4%) et d'acide borique (2%), NaBH_4 (0.12 g) dans l'éthanol (25 ml) est ensuite ajoutée goutte à goutte sur une période de 30 mn. Après 3 hr 30 mn à température ambiante le spectre IR de la réaction indique la disparition de la bande azide à 2120 cm^{-1} , de l'acide acétique est alors ajouté pour neutraliser la réaction. La solution est évaporée et le résidu est acétylé pendant une nuit à température ambiante par un mélange de pyridine (25 ml) et d'Ac $_2$ O (25 ml). La réaction est concentrée et le solide résiduel est repris par du CH_2Cl_2 (200 ml), cette solution est ensuite lavée avec une solution aqueuse saturée de KHSO_4 (50 ml), avec de l'eau (50 ml), avec une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 (50 ml), avec de l'eau (50 ml) et séchée sur Na_2SO_4 .

La concentration de la phase organique conduit à un solide qui est chromatographié (toluène-acétone, 625:375, v/v) pour donner le composé 13 pur sous la forme d'une poudre blanche (0.24 g, 73%). F 75-80°; C; $[\alpha]_D^{20} + 82.4$ (C 1, CH_2Cl_2). (Calc pour $\text{C}_{131}\text{H}_{150}\text{O}_{28}\text{N}_8$: C, 68.9; H, 6.6; N, 4.9. Trouvé: C, 69.0; H, 6.6; N, 4.7%). Echantillon paramagnétique.

L-Leucyl-O-(2-acétamido-2-désoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-séryl-O-(2-acétamido-2-désoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-thréonyl-O-(2-acétamido-2-désoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-thréonyl-L-acide glutamique (14). Le composé 13 (0.16 g, 0.07 mmoles) en solution dans un mélange de méthanol-eau-HOAc (8:1:5, v/v/v, 20 ml) est hydrogéné pendant une nuit en présence de Pd-C 10% (0.2 g) sous une pression d'hydrogène de 4 bars. Après essorage du catalyseur sur célite, évaporation du filtrat, désionisation par la résine Chelex 100 (H^+), le composé 14 est obtenu sous la forme d'un solide hygroscopique (0.75 g, 92%). $[\alpha]_D^{20} + 130$ (Cl, H_2O); ^{13}C -rnm: voir Tableau 1.

Ester N-hydroxysuccinimyle de la *N*-benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-sérine 15. La *N*-benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-sérine brute, préparée à partir de la *N*-benzyloxycarbonyl-L-sérine (4.8 g, 20 mmoles) selon la procédure décrite par Sugano *et al.*²³ pour le dérivé *N*-terbutyloxycarbonyl, est utilisée sans purification via le sel de cyclohexylammonium. Le sirop obtenu (3.8 g) est dissous dans un mélange de dioxane (70 ml) et d'EtOAc (15 ml) et traité à 0° successivement par la *N*-hydroxysuccinimide (1.15 g) et la DCC (2.27 g). Après 1 hr la réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 1 nuit. La dicyclohexylurée est essorée et le filtrat concentré en une huile qui est purifiée par chromatographie rapide (CH_2Cl_2 -acétone-acide acétique, 90:10:0.3, v/v/v). Le composé 15 est obtenu pur sous la forme d'un sirop qu'il n'a pas été possible de cristalliser (3.95 g, 47% rendement global sur les 2 réactions). $[\alpha]_D^{20} - 5.6$ (C 1.0, DMF); ^{13}C -rnm δ : 69.5 (C β), 53.2 (Ca), 25.6 (CH $_2$ -OSu). (Calc pour $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_7$: C, 62.0; H, 5.2; N, 6.6. Trouvé: C, 61.6; H, 5.15; N, 6.5%.)

N-Benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-séryl-O-(2-azido-2-désoxy-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-L-séryl-O-(2-azido-2-désoxy-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-L-thréonyl-O-(2-azido-2-désoxy-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-L-thréonyl-L-glutamate de dibenzyle (16). Une solution du composé 10 (0.35 g, 0.158 mmoles)

dans le CH_2Cl_2 (15 ml) est traité par la pipéridine (3 ml) pendant 15 mn. Le traitement habituel conduit à nouveau au composé 11 qui est immédiatement repris par du CH_2Cl_2 (15 ml) et traité par l'ester actif 15 (0.1 g, 0.23 mmoles) pendant 1 nuit à température ambiante. L'évaporation *in vacuo* laisse une huile qui est purifiée successivement par une filtration sur gel avec Sephadex LH 20 et par chromatographie rapide (hexane-EtOAc, 7:3, v/v) pour donner le composé 16 pur sous forme d'huile (0.31 g, 85%). $[\alpha]_D^{20} + 62.9$ (C 1.0, CHCl_3); ^{13}C -rnm δ : 99.3, 98.8 et 97.1 (3 Cl), 51.9 (C α -Glu), 30.2 (C γ -Glu), 27.3 (C β -Glu), 15.4 et 14.8 (2 C γ -Thr). (Calc pour $\text{C}_{129}\text{H}_{138}\text{O}_{26}\text{N}_{14}$: C, 67.3; H, 6.0; N, 8.5. Trouvé: C, 67.4; H, 6.25; N, 8.6%.)

N-Benzyloxycarbonyl-O-benzyl-L-séryl-O-(2-acétamido-2-désoxy-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-L-séryl-O-(2-acétamido-2-désoxy-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-L-thréonyl-O-(2-acétamido-2-désoxy-3,4,6-tri-O-benzyl- α -D-galactopyranosyl)-L-thréonyl-L-glutamate de dibenzyle (17). Le composé 16 (0.3 g, 0.13 mmoles) en solution dans l'éthanol (40 ml) avec du chlorure de nickel (8%) et de l'acide borique (4%) est traité par NaBH_4 (0.11 g) dans l'éthanol (20 ml) pendant 3 hr.

La réaction est ensuite neutralisée par l'acide acétique et concentrée pour donner un résidu qui est acétylé pendant une nuit par un mélange de pyridine (20 ml) et d'Ac $_2$ O (20 ml). Le traitement habituel conduit à un solide qui est chromatographié (toluène-acétone, 625:375, v/v) pour donner le composé 17 pur sous la forme de poudre blanche (0.195 g, 64%). F 92-96°; $[\alpha]_D^{20} + 83.9$ (C 1, CHCl_3). (Calc pour C: 69.0; H, 6.4; N, 4.8. Trouvé: C, 68.7; H, 6.4; N, 4.6%). Echantillon paramagnétique.

L-Séryl-O-(2-acétamido-2-désoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-séryl-O-(2-acétamido-2-désoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-thréonyl-O-(2-acétamido-2-désoxy- α -D-galactopyranosyl)-L-thréonyl-L-acide glutamique (18). Le composé 17 (0.13 g, 0.055 mmoles) est hydrogéné, dans les mêmes conditions que celles décrites pour le composé 14, pour donner le triglycopentapeptide déprotégé 18 sous la forme d'un solide hygroscopique. (0.058 g, 93%). $[\alpha]_D^{20} + 118.1$ (C 1, H_2O); ^{13}C -rnm voir Tableau 1.

REFERENCES

- O. O. Blumenfeld et A. A. Adamy, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **75**, 2727 (1978).
- K. Wasniowska, A. Drynick et E. Lisowska, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **75**, 385 (1977).
- H. Furthmayr, *Nature* **271**, 519 (1978).
- E. Lisowska, *Blood Transfusion and Immuno-haematology*, Tome XXIV, No. 1, 75. Librairie Arnette, Paris (1981).
- R. Prohaska, T. A. W. Koerner, Jr., I. M. Armitage et H. Furthmayr, *J. Biol. Chem.* **256**, 5781 (1981).
- H. Furthmayr, M. N. Metaxas et M. Metaxas-Bühler, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **78**, 631 (1981).
- W. Dahr, M. Kordowickz, K. Beyreuther et J. Krüger, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **362**, 363 (1981).
- W. Dahr, K. Beyreuther, E. Gallasch, J. Krüger et P. Morel, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **362**, 81 (1981).
- G. F. Springer et P. R. Desai, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **61**, 470 (1974).
- B. Ferrari et A. A. Pavia, *Int. J. Peptide Protein Res.* **22**, 549 (1983).
- A. A. Pavia et B. Ferrari, *Ibid.* **22**, 539 (1983).
- B. Ferrari et A. A. Pavia, *Ibid.* **24**, 488 (1984).
- J. P. Carton, *Blood Groups and Other Red Cell Surface Markers in Health and Disease* (Edited by C. Salmon), p. 39. Masson, New York (1982).
- G. W. G. Bird, *Clinical Laboratory Science* (Edited by T. J. Greenwalt et E. A. Steane), Vol. 1, p. 443. CRC Press, Cleveland, Ohio (1977).
- P. Sturgeon, S. J. Luner, D. T. McQuinston et C. J. Allan, *Vox Sang.* **25**, 481 (1973).
- G. W. G. Bird, N. K. Shinton et J. Wingham, *Br. J. Haematol.* **21**, 443 (1971).

- ¹⁷ M. L. Baldwin, C. Barrasso et R. L. Ridolfi, *Am. J. Clin. Pathol.* **72**, 1024 (1979).
- ¹⁸ P. M. Ness, G. Garraty, P. A. Morel et H. A. Perkins, *Blood* **54**, 30 (1979).
- ¹⁹ G. F. Springer, P. R. Desai, M. S. Murthy et E. F. Scanlon, *Glycoproteins and Glycolipids in Disease Processes*, p. 311. ACS, Symposium Serie No. 80 (1978).
- ²⁰ J. P. Cartron, O. Prou, M. Luilier et J. P. Soulier, *Br. J. Haematol.* **55**, 639 (1983).
- ²¹ W. C. Still, M. Khan et A. Mitra, *J. Org. Chem.* **43**, 2923 (1978).
- ²² A. Bodanszky, M. Bodanszky, N. Chandramouli, J. Z. Kwei, J. Martinez et J. C. Tolle, *J. Org. Chem.* **45**, 72 (1980).
- ²³ H. Sugano et M. Miyashi, *J. Org. Chem.* **41**, 2352 (1976).
- ²⁴ A. A. Pavia et J. M. Lacombe, *J. Org. Chem.* **48**, 2564 (1983).
- ²⁵ J. P. Cartron, B. Ferrari, M. Huet et A. A. Pavia, *Exp. Clin. Immunogenet.* **1**, 112 (1984).
- ²⁶ J. M. Lacombe, A. A. Pavia et J. M. Rocheville, *Can. J. Chem.* **59**, 482 (1981).
- ²⁷ A. A. Pavia et S. N. Ung-Chhun, *Can. J. Chem.* **59**, 473 (1981).