

## Preliminary communication

**Synthese von 3-Desoxy-D-manno-2-octulosonsäure (KDO)-Oligosacchariden\***

HANS PAULSEN, YUTAKA HAYAUCHI

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Hamburg, D-2000 Hamburg 13  
(Bundesrepublik Deutschland)

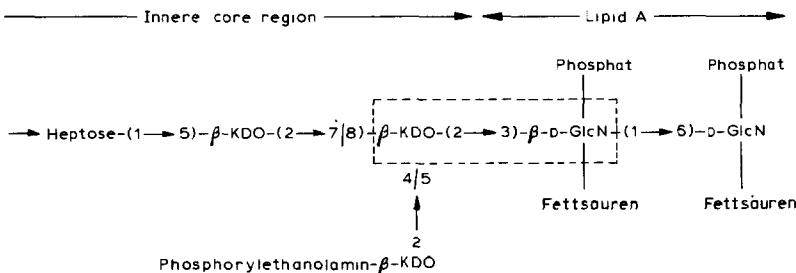
und FRANK M. UNGER

Sandoz-Forschungsinstitut, Wien, A-1235 Wien (Österreich)

(Eingegangen am 23. Juli 1982; angenommen am 5. Oktober 1982)

Ein wesentlicher Bestandteil der inneren Core-Region von Lipopolysacchariden von Gramnegativen Enterobacteriacean ist die 3-Desoxy-D-manno-2-octulosonsäure (KDO)<sup>2</sup>. Die vorgeschlagene Struktur für das KDO-haltige Segment der Lipopolysaccharide ist in 1 wiedergegeben<sup>3</sup>. Die KDO ist danach in  $\beta$ -D-(2 $\rightarrow$ 3)-glycosidischer Bindung an die nicht reduzierende 2-Amino-2-desoxy-D-glucoseeinheit des Lipid A gebunden. Die KDO-Region des inneren Cores ragt somit über die Membran hinaus. Sie besteht aus einer verzweigten Trisaccharideinheit, die drei Moleküle KDO enthält, von denen die Verknüpfungsart noch nicht vollständig geklärt ist<sup>2,4</sup>. Es dürften auch Variationen unter verschiedenen Bakterienstämmen möglich sein<sup>3</sup>. An die KDO-Region schliesst sich die Heptose-Region an, die in (1 $\rightarrow$ 5)-glycosidischer Bindung an eines der KDO-Moleküle der Verzweigung gebunden ist<sup>3</sup>. Der Heptose-Region folgt das äussere Core und die O-spezifischen Seitenketten. Synthesen von Oligosaccharideinheiten dieser Anordnung sind von erheblichem Interesse.

Es ist uns jetzt gelungen, die Disaccharideinheit aus KDO und 2-Amino-2-desoxy-D-glucose, die die Nahtstelle zwischen Lipid A und innerer Core-Region darstellt,



1

\*XLIV. Mitteilung der Serie "Bausteine von Oligosacchariden". XLIII. Mitteil., siehe Zit. 1.

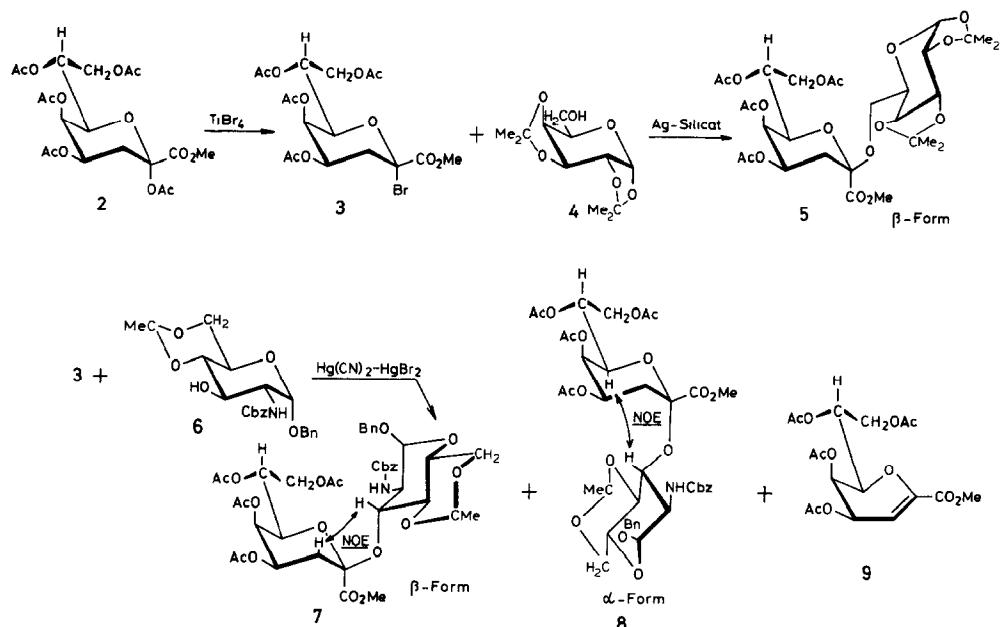
zu synthetisieren. Bei Oligosaccharidsynthesen mit Glycopyranosylhalogeniden von KDO trat bisher als Hauptreaktion stets eine unerwünschte Eliminierung zum Methyl-4,5,7,8-tetra-*O*-acetyl-2,6-anhydro-2,3-didesoxy-D-*manno*-oct-2-enosonat (**9**) ein. Dieses war eine Einschränkung der Oligosaccharidsynthese, und mit dem Pyranosylchlorid von KDO waren demgemäß keine Verknüpfungen möglich<sup>2</sup>. Als wesentlich günstiger hat sich dagegen das Pyranosylbromid **3** erwiesen, das wir jetzt aus dem Acetat **2** mit Titantribromid in Dichlormethan unter wasserfreien Bedingungen<sup>5,6</sup> in nahezu quantitativer Ausbeute gewinnen konnten.

Mit sehr reaktiven Hydroxylgruppen von einfachen Alkoholen oder OH-6-Gruppen von Sacchariden reagiert **3** bei Gegenwart des reaktiven Silbersilikat-Katalysators<sup>7</sup> in hohen Ausbeuten stereoselektiv nur zu β-Glycosiden. Unter diesen Bedingungen ergibt **3** mit Methanol 98 %, mit 2-Propanol 81 % β-Glycosid. Die Umsetzung von **3** mit dem D-Galactose-Derivat **4** führt ebenfalls in 75 % ausschliesslich zu dem β-D-glycosidisch verknüpften 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden-6-*O*-[methyl-(4,5,7,8-tetra-*O*-acetyl-3-desoxy-β-D-*manno*-2-octulopyranosyl)onat]-α-D-galactopyranose (**5**). Bei Abnahme der Reaktivität der Hydroxylgruppen nimmt die Selektivität und Ausbeute bei der Glycosidsynthese ab, und der Anteil an Eliminierungsprodukt **9** steigt stark an.

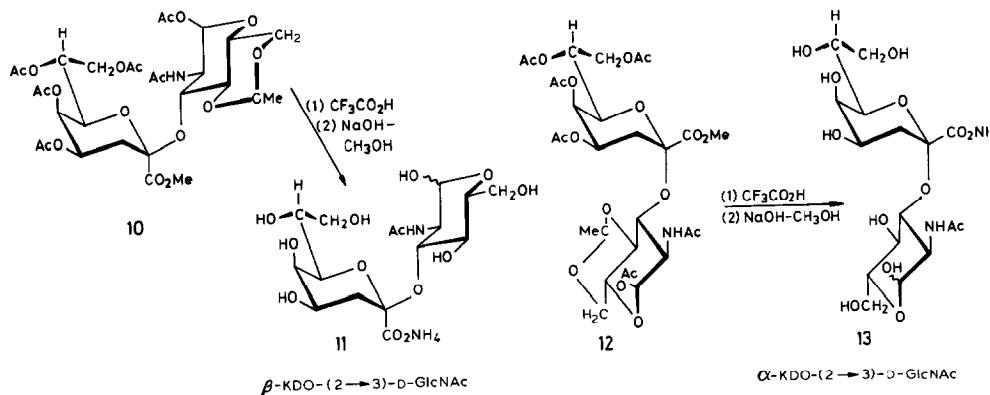
Besonders schwierig sind die Verhältnisse bei der relativ weniger reaktiven OH-3-Gruppe der 2-Amino-2-desoxy-D-glucose, die mit KDO gekuppelt werden muss, um zur gewünschten Einheit β-KDO-(2→3)-D-GlcNAc (**11**) zu gelangen. Es wurde eine Serie von 2-Amino-2-desoxy-D-glucose-Derivaten mit freier OH-3-Gruppe auf ihre Reaktivität überprüft. Hierbei erwies sich die Ethylen-Verbindung<sup>8</sup> **6** am günstigsten. Bei der Umsetzung von **3** mit **6** bei Gegenwart von Silbersilikat<sup>7</sup> waren jedoch nur 5–10 % Kondensationsprodukt zu erhalten, von dem der grösste Teil unerwünschtes α-D-glycosidisch verknüpftes Disaccharid war. Der übrige Teil der Reaktionsprodukte bestand vorwiegend aus **9**.

Es zeigte sich jedoch, dass beim Einsatz des Katalysators Quecksilbercyanid–Quecksilberbromid 3:1 in Nitromethan (20°) die unerwünschte Eliminierungsreaktion in erheblichem Masse unterdrückt werden konnte, so dass etwa 40–50 % an Disacchariden Benzyl-2-(benzyloxycarbonyl)amino-2-desoxy-4,6-*O*-ethylenidene-3-*O*-[methyl-(4,5,7,8-tetra-*O*-acetyl-3-desoxy-β-D-*manno*-2-octulopyranosyl)onat]-α-D-glucopyranosid (**7**) und Benzyl-(2-benzyloxycarbonyl)amino-2-desoxy-4,6-*O*-ethylenidene-3-*O*-[methyl-(4,5,7,8-tetra-*O*-acetyl-3-desoxy-α-D-*manno*-2-octulopyranosyl)onat]-α-D-glucopyranosid (**8**) neben **9** erhalten werden kann. Das Verhältnis von **7+8+9** beträgt etwa 1:4. Die Auf trennung des Gemisches **7+8+9** erfordert eine mehrfache Chromatographie. Nach Entacetylierung lässt sich säulenchromatographisch das Eliminierungsprodukt **9** abtrennen. Nach Re-acetylierung sind dann die Anomeren **7+8** chromatographisch zu trennen (Dichlormethan–Ether 7:1, v/v). Beim Einsatz von 100 mg **3** mit 2 molaren Mengen **6** ergaben sich 59 % **7+8**, von denen 6 % β-Produkt **7**,  $[\alpha]_D^{20} + 88^\circ$  (c 0,55, chloroform) und 40 % α-Produkt **8**,  $[\alpha]_D^{20} + 111^\circ$  (c 0,8, chloroform) isoliert wurden. Bei grösseren Ansätzen von 1 g **3** ist die Ausbeute mit 38 % **7+8** geringer; das Produktverhältnis war jedoch identisch.

Erhebliche Schwierigkeiten bereitete die Zuordnung der beiden Anomeren. Die 400 MHz-<sup>1</sup>H-N.m.r.-Spektren beider Verbindungen liessen sich voll analysieren und zuordnen. Aus den chemischen Verschiebungen war jedoch keine sichere Entscheidung



zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Form möglich. Diese gelang durch Nuclear-Overhauser-Experimente (NOE). Bei der in kleinerer Menge isolierten Verbindung wurde ein NOE zwischen den Protonen H-3a' und H-3 der 2-Amino-2-desoxy-D-glucoseeinheit gefunden. Dieses spricht für die  $\beta$ -Verbindung 7. Im anderen Produkt ergab sich ein NOE-Effekt zwischen H-6' und H-3. Das Modell zeigt, dass diese Wechselwirkung nur bei einer  $\alpha$ -Form auftreten kann. Mit der NOE-Zuordnung ist gleichzeitig eine Aussage über die bevorzugte Konformation an den beiden ketosidischen Bindungen gegeben, wie sie in Zeichnung 7 und 8 abgebildet ist.



Zur Entblockierung wird am günstigsten zunächst die Benzylether- und die Benzyloxycarbonyl-Gruppe durch Hydrierung entfernt. Nach Nachacetylierung erhält man aus 7 das Acetat 10 (90 %) und entsprechend aus 8 das Acetat 12 (85 %). Eine Abspaltung der Ethylidengruppe gelingt mit Trifluoressigsäure. Die restlichen Acetylgruppen und die Estergruppierung werden mit NaOH-Methanol entfernt. Die Endprodukte werden an Dowex 1-X-8 ( $\text{HCO}_3^-$ )-Form absorbiert, mit  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  wieder eluiert und mit Sephadex G-10 von den restlichen Salzen entfernt. Man gelangt so zur reinen 2-Acetamido-3-O-[ammonium-(3-desoxy- $\beta$ -D-manno-2-octulopyranosyl)onat]-2-desoxy-D-glucopyranose (11, 71 %),  $[\alpha]_D^{20} + 19^\circ$  (*c* 0,9, Wasser) und zur 2-Acetamido-3-O-[ammonium-(3-desoxy- $\alpha$ -D-manno-2-octulopyranosyl)onat]-2-desoxy-D-glucopyranose (13, 62 %),  $[\alpha]_D^{20} + 24^\circ$  (*c* 0,5, Wasser). Damit steht das wichtige Verbindungsglied zwischen Lipid A und der KDO-Region zur Verfügung. Alle neuen Verbindungen ergaben befriedigende Analysendaten. Ihre Struktur wurde durch  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -N.m.r.-Spektren gesichert.

## LITERATUR

- 1 H. Paulsen und H. Tietz, *Angew. Chem.*, im Druck.
- 2 F. M. Unger, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 38 (1981) 323–388.
- 3 O. Lüderitz, E. T. Rietschel und O. Westphal, *Int. Rev. Biochem.*, 14 (1977) 239–335.
- 4 P. Prehm, S. Stirm, B. Jann und K. Jann, *Eur. J. Biochem.*, 56 (1975) 41–55.
- 5 H. Paulsen und A. Bünsch, *Carbohydr. Res.*, 100 (1982) 143–167.
- 6 H. Paulsen, *Angew. Chem.*, (1982) 184–201; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, (1982) 155–173.
- 7 H. Paulsen und O. Lockhoff, *Chem. Ber.*, 114 (1981) 3102–3114.
- 8 P. C. Wyss und J. Kiss, *Helv. Clin. Acta*, 58 (1975) 1833–1847.