

Preliminary communication

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

HANS PAULSEN, YUTAKA HAYAUCHI

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

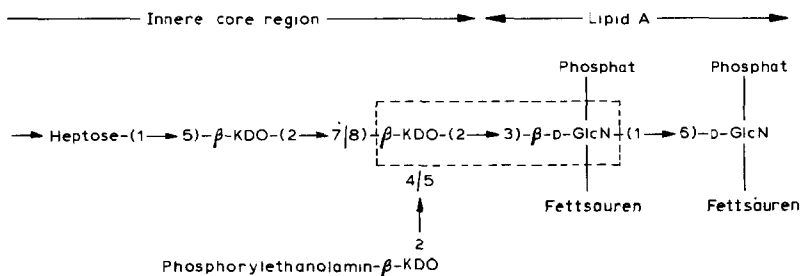
und FRANK M. UNGER

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 Enterobacteriaceen ist die 3-Desoxy-D-manno-2-octulonsäure (KDO)². Die vorgeschlagene Struktur für das KDO-haltige Segment der Lipopolysaccharide ist in 1 wiedergegeben³. Die KDO ist danach in β -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^{2,4}. Es dürften auch Variationen unter verschiedenen Bakterienstämmen möglich sein³. 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 ist³. 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,



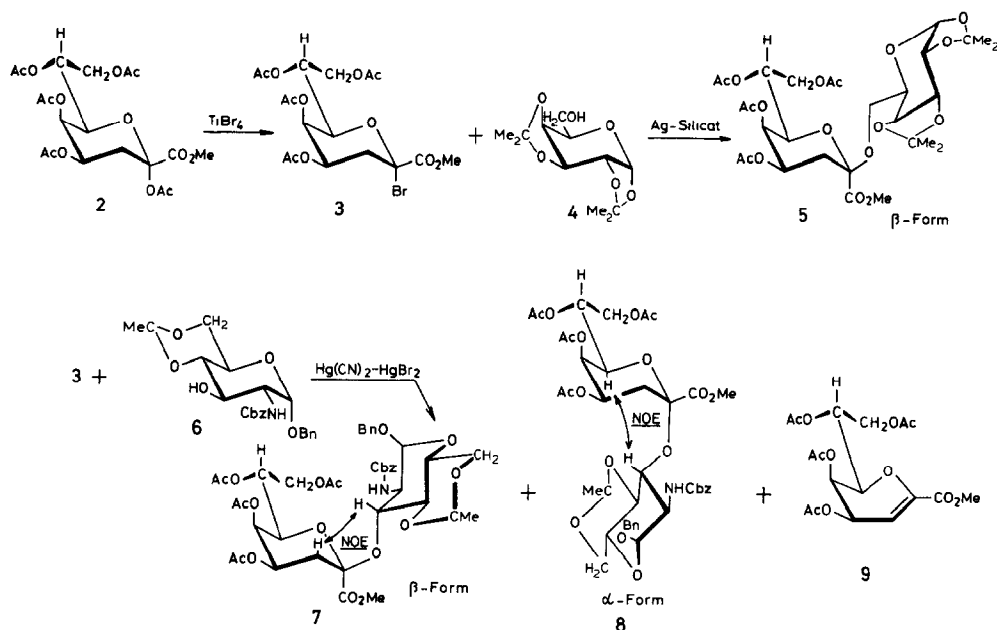
zu synthetisieren. Bei Oligosaccharidsynthesen mit Glycopyranosylhalogeniden von KDO trat bisher als Hauptreaktion stets eine unerwünschte Eliminierung zum Methyl-4,5,7,8-tetra-*O*-acetyl-2,6-anhydro-2,3-didesoxy-*D*-manno-oct-2-enosonat (9) ein. Dieses war eine Einschränkung der Oligosaccharidsynthese, und mit dem Pyranosylchlorid von KDO waren demgemäss keine Verknüpfungen möglich². Als wesentlich günstiger hat sich dagegen das Pyranosylbromid 3 erwiesen, das wir jetzt aus dem Acetat 2 mit Titanetetrabromid in Dichlormethan unter wasserfreien Bedingungen^{5,6} 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-Katalysators⁷ 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.

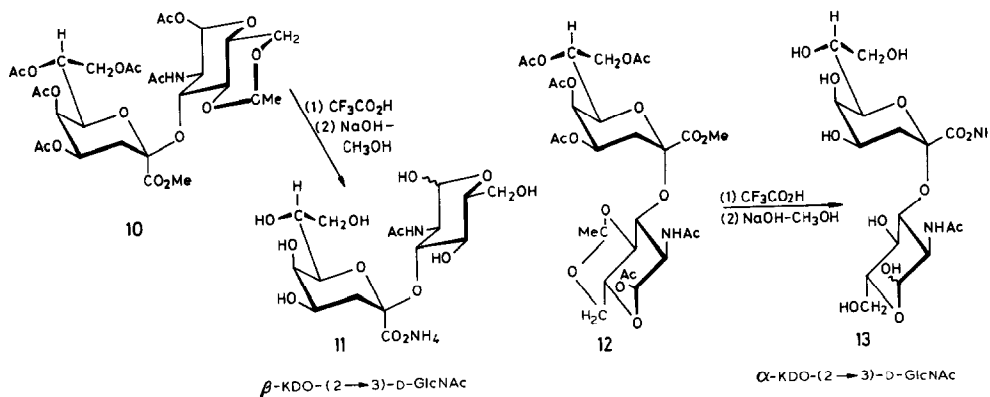
Besonders schwierig sind die Verhältnisse bei der relativ weniger reaktiven OH-3-Gruppe der 2-Amino-2-desoxy-*D*-glucose, die mit KDO gekuppelt werden muss, um zur gewünschten Einheit β -KDO-(2 \rightarrow 3)-*D*-GlcNAc (11) zu gelangen. Es wurde eine Serie von 2-Amino-2-desoxy-*D*-glucose-Derivaten mit freier OH-3-Gruppe auf ihre Reaktivität überprüft. Hierbei erwies sich die Ethylen-Verbindung⁸ 6 am günstigsten. Bei der Umsetzung von 3 mit 6 bei Gegenwart von Silbersilikat⁷ 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*-ethylen-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*-ethylen-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 beträgt etwa 1:4. Die Auftrennung des Gemisches 7+8+9 erfordert eine mehrfache Chromatographie. Nach Entacetylierung lässt sich säulenchromatographisch das Eliminierungsprodukt 9 abtrennen. Nach Reacetylierung 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-¹H-N.m.r.-Spektren beider Verbindungen liessen sich voll analysieren und zuordnen. Aus den chemischen Verschiebungen war jedoch keine sichere Entscheidung



zwischen α - und β -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 β -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 α -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 Benzoyloxycarbonyl-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 (HCO_3^-)-Form absorbiert, mit NH_4HCO_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- β -D-*manno*-2-octulopyranosyl)onat]-2-desoxy-D-glucopyranose (11, 71 %), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 19^\circ$ (c 0,9, Wasser) und zur 2-Acetamido-3-O-[ammonium-(3-desoxy- α -D-*manno*-2-octulopyranosyl)onat]-2-desoxy-D-glucopyranose (13, 62 %), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 24^\circ$ (c 0,5, Wasser). Damit steht das wichtige Verbindungsglied zwischen Lipid A und der KDO-Region zur Verfügung. Alle neue Verbindungen ergaben befriedigende Analysendaten. Ihre Struktur wurde durch ^1H - und ^{13}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. Stirn, 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.