

RICHARD KUHN und REINHARD BROSSMER

Über das durch Viren der Influenza-Gruppe spaltbare Trisaccharid der Milch

Aus dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg
(Eingegangen am 24. März 1959)

Aus Lactaminsäurelactose wurden durch Methylierung und anschließende Hydrolyse 2.3.6-Trimethyl-glucose und 2.4.6-Trimethyl-galaktose erhalten. Daraus folgt für das durch Viren der Influenza-Gruppe und durch RDE spaltbare Trisaccharid die Formel I.

Über die unmittelbaren chemischen Wirkungen von Viren auf lebende Zellen und Gewebe ist erst wenig bekannt.

Ausgangspunkt für ein chemisches Verständnis der Wechselwirkungen von Viren der Influenza-Gruppe mit der Oberfläche von roten Blutkörperchen, von Bronchial-Epithel u. a. sind Arbeiten von F. M. BURNET und seiner Schule gewesen. Darin wurde gezeigt, daß gewisse Mucoproteide verschiedener Herkunft die Fähigkeit besitzen, die durch auf 56° erhitztes Influenzavirus (sog. Indikator-Virus) bewirkte Hämagglutination zu hemmen. Diese Eigenschaft ging bei Vorbehandlung der hemmenden Mucine mit aktivem (nicht erhitztem) Virus verloren. F. M. BURNET zog die Schlußfolgerung, daß die hemmenden Mucoproteide (die löslich sind und sich isolieren lassen) identische oder mindestens nahe verwandte Strukturen besitzen wie die in der Zellwand verankerten Rezeptoren (die unlöslich sind und sich nicht isolieren lassen)¹⁾. A. GOTTSCHALK²⁾ hat im Anschluß daran die enzymatische Spaltbarkeit solcher Mucoproteide durch Influenzavirus und RDE (receptor destroying enzyme der Choleravibionen) aufgefunden. Die dabei in Freiheit gesetzte N-Acetyl-neuraminsäure (= Lactaminsäure) haben E. KLENK und H. FAILLARD³⁾ kristallisiert erhalten⁴⁾.

In Anbetracht des Umstandes, daß alle spaltbaren Verbindungen sehr hochmolekular waren, überraschte es, daß die von uns aus Kuhcolostrum isolierte O-Acetyl-lactaminsäurelactose und auch die daraus hervorgehende Lactaminsäurelactose, die nur noch die Molekulargröße eines Trisaccharids besitzt, sich in den von uns durchgeführten Versuchen in gleicher Weise wie hochmolekulare Mucine als leicht spaltbar durch RDE und durch Viren der Influenza-Gruppe (Influenza B-Lee, Infl. A-FM 1, Infl. A-PR 8, Influenza A-Singapore, Virus der klassischen Geflügelpest und Mumps-

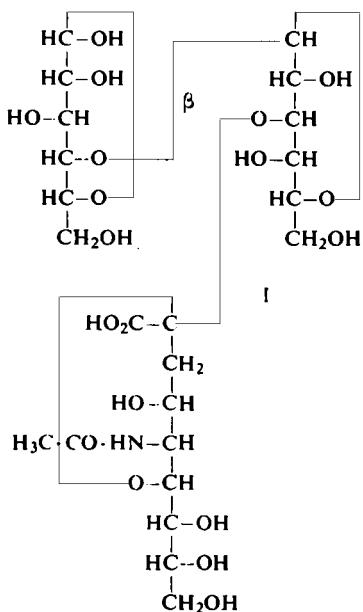
¹⁾ T. FRANCIS, JR., J. exp. Medicine 85, 1 [1947]; S. G. ANDERSON, Austral. J. exp. Biol. med. Sci. 26, 347 [1948]; F. M. BURNET, ebenda 26, 371 [1948]; S. G. ANDERSON, F. M. BURNET, F. FAZEKAS DE ST. GROTH, J. F. McCREA und J. D. STONE, ebenda 26, 403 [1948]; F. M. BURNET und M. D. MELB, Lancet 254, 7 [1948]; F. M. BURNET, Croonian Lecture, Proc. Roy. Soc. [London], Ser. B 138, 47 [1951].

²⁾ A. GOTTSCHALK und P. E. LIND, Brit. J. exp. Pathol. 30, 85 [1949]; Nature [London] 164, 232 [1949]. ³⁾ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 301, 235 [1955].

⁴⁾ In bezug auf die Entwicklung der Kenntnisse über die chemische Struktur dieser Substanz vgl. die Zusammenfassung „Nonulosaminic acids“ von F. ZILLIKEN und M. W. WHITEHOUSE in Advances Carbohydrate Chem. 13, 237 [1958].

Virus) erwiesen haben⁵⁻⁷⁾. Dadurch eröffnete sich für den Chemiker erstmals die Aussicht, die vollständige chemische Struktur eines Naturstoffes zu ermitteln, der sich wie ein Rezeptor im Sinne von P. EHRLICH verhält.

Durch die Säurehydrolyse der Lactaminsäurelactose hatten wir krist. Lactaminsäure (*N*-Acetyl-neuraminsäure) und krist. Lactose erhalten^{5,8)}. Es war noch zu ermitteln, wie diese beiden Bausteine miteinander verknüpft sind. Zu diesem Zweck haben wir



das saure N-haltige Trisaccharid mit Diazomethan behandelt, wobei zur Hauptsache der Methylester entstand, den wir zunächst in Dimethylformamid mit Silberoxyd und Methyljodid⁹⁾ und anschließend in Dimethylformamid mit Bariumoxyd und Methyljodid¹⁰⁾ methyliert haben. Die Hydrolyse des methylierten Produktes mit wäßriger Mineralsäure lieferte viel dunkle Zersetzungspprodukte. Deshalb haben wir in der bei permethylierten N-haltigen Steroidglykosiden erprobten Weise¹¹⁾ zuerst mit methanolischem HCl zu einem Gemisch von Methylglykosiden gespalten — wobei die Lösungen viel heller blieben. Nach Verseifung mit Barytwasser ließ sich nun die N-haltige methylierte Carbonsäure von den N-freien Glykosiden trennen, die aus der alkalischen Lösung mit Chloroform ausgeschüttelt werden konnten. Die N-freien Glykoside haben wir mit verd. Schwefelsäure gespalten und nach Chromatographie an Cellulose-Pul-

ver krist. 2.3.6-Trimethyl-D-glucose (44% d. Th.) und krist. 2.4.6-Trimethyl-D-galaktose (57% d. Th.) erhalten, die mit authent. Präparaten im Schmp. und Misch-Schmp., im

⁵⁾ R. KUHN und R. BROSSMER, Angew. Chem. 68, 211 [1956]; Chem. Ber. 89, 2013 [1956]; R. BROSSMER, Dissertat. Univ. Heidelberg 1957; R. KUHN, Bull. Soc. Chim. biol. 40, 297 [1958].

⁶⁾ Herr Prof. Dr. W. M. STANLEY, Berkeley/California, hat Lactaminsäurelactose, die wir ihm überließen, mit sehr hoch gereinigtem Influenzavirus inkubiert und die Spaltbarkeit bestätigt. Wir möchten ihm sowie Herrn Prof. Dr. C. A. KNIGHT auch an dieser Stelle auf richtig danken.

⁷⁾ Für die Überlassung von hochgereinigtem Hämagglobulin des Virus der klassischen Geflügelpest haben wir Herrn Prof. Dr. W. SCHÄFER, Tübingen, herzlich zu danken. Mit diesem Agglutinin-Präparat konnten wir in gleicher Weise wie mit intaktem Influenzavirus Lactaminsäurelactose enzymatisch in Lactaminsäure und Lactose spalten.

⁸⁾ In ganz geringen Mengen hatten bereits R. E. TRUCCO und R. CAPUTTO, J. biol. Chemistry 206, 901 [1954], sowie R. HEYWORTH und J. S. D. BACON, Biochem. J. 58, XXIV [1954]; 66, 41 [1957], aus lactierender Rattenmamma eine Substanz (neuramin-lactose) isoliert, die bei der Hydrolyse durch Säure Lactose und eine Sialinsäure ergab (papierchromatographisch). Über Spaltungsversuche mit Viren oder RDE wurde von diesen Autoren nichts mitgeteilt. Eine chemische Identifizierung mit Lactaminsäurelactose liegt nicht vor.

⁹⁾ R. KUHN, H. TRISCHMANN und I. LÖW, Angew. Chem. 67, 32 [1955].

¹⁰⁾ R. KUHN, H. H. BAER und A. SEELIGER, Liebigs Ann. Chem. 611, 236 [1958].

¹¹⁾ R. KUHN, I. LÖW und H. TRISCHMANN, Chem. Ber. 90, 203 [1957], und zwar S. 207.

Drehungsvermögen (Mutarotation), den IR-Spektren und Debye-Scherrer-Aufnahmen übereinstimmten.

Es ergibt sich, daß die Lactaminsäure, deren Konstitution geklärt ist¹²⁾, mit dem Hydroxyl am C-Atom 3 der Galaktose verknüpft ist¹³⁾ und somit der Lactaminsäure-lactose die Formel I zukommt.

Drehungsvermögen: In Dimethylsulfoxid zeigt Lactaminsäure Mutarotation aufwärts; die krist. Verbindung ist somit als β -Form anzusprechen. In Wasser beobachtet man keine Drehungsänderung, da diese offenbar durch die eigenen H^+ -Ionen so stark katalysiert wird, daß sie sich der Beobachtung entzieht. Lactose mutarotiert selbst bei 80° viel langsamer als Lactaminsäure bei 23° ; der Endwert für Lactose stimmt mit demjenigen in wäßriger Lösung praktisch überein:

Mutarotation von Lactaminsäure in Dimethylsulfoxid ($c = 0.23$), I-dm-Rohr		Mutarotation von Lactose · H ₂ O in Dimethylsulfoxid ($c = 0.90$), I-dm-Rohr	
Zeit	$[\alpha]_D^{23}$	Zeit	$[\alpha]_D^{180}$
7 Min.	– 115°	6 Min.	+ 85°
10 Min.	– 70°	270 Min.	+ 67°
12 Min.	– 48°	330 Min.	+ 63°
23 Min.	– 37°	420 Min.	+ 58°
∞	– 24°	∞	+ 53°

Lactaminsäure-lactose: $[\alpha]_D^{23}: + 6^\circ$ ($c = 2$, Dimethylsulfoxid)

Wenn man das Drehungsvermögen der α,β -Lactaminsäure-lactose in $CH_3 \cdot SO \cdot CH_3$ ($[\alpha]_D^{23}: + 6^\circ$) mit demjenigen der α,β -Lactose (+ 53°) und der β -Lactaminsäure (ca. – 150 bis – 200°, für $t = 0$ extrap.) in demselben Lösungsmittel vergleicht, so kommt man zu der Vermutung⁵⁾, daß die Lactaminsäure α -ketosidisch mit dem Milchzucker verknüpft ist. Bei β -ketosidischer Bindung könnte die α,β -Lactaminsäure-lactose linksdrehend sein. Im Falle der α,β -Fructose, der bestuntersuchten Ketose der D-Reihe, mit $[\alpha]_D: -92^\circ$ (Wasser), ist nämlich das β -Methyl-D-fructopyranosid ($[\alpha]_D: -172^\circ$) noch viel stärker linksdrehend als β -D-Fructose ($[\alpha]: -134^\circ$), während α -Methyl-D-fructopyranosid ($[\alpha]_D: +44^\circ$) rechtsdrehend ist. Zu berücksichtigen ist, daß Lactaminsäure nur als Pyranose vorkommen kann, nicht aber als Furanose, da das C-Atom 5 die Acetaminogruppe trägt. Derartigen optischen Vergleichen kommt indessen keine Beweiskraft zu, solange nicht Paare von epimeren α - und β -Ketosiden auch in der Reihe der 2-Keto-nononsäuren bekannt sind. Die Frage nach den sterischen Verhältnissen am C-Atom 2 der Lactaminsäure-lactose ist bis dahin offen.

Herrn Dr. W. OTTING haben wir für zahlreiche IR-Spektren, Herrn E. RÖHM für die Debye-Scherrer-Aufnahmen und Herrn W. LOCHINGER für eifreie präparative Mitarbeit zu danken.

¹²⁾ Zur Stellung der $CH_3 \cdot CO \cdot NH$ -Gruppe am C-Atom 5: D. G. COMB und S. ROSEMAN, J. Amer. chem. Soc. **80**, 497 [1958]; R. KUHN und R. BROSSMER, Liebigs Ann. Chem. **616**, 221 [1958]. — Zur Stellung der OH-Gruppe am C-Atom 4: R. KUHN und R. BROSSMER, Angew. Chem. **60**, 534 [1957]; Liebigs Ann. Chem., im Druck [1959].

¹³⁾ Kurze Mitteilung: R. KUHN und R. BROSSMER, Angew. Chem. **70**, 25 [1958].

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Methylierung der Lactaminsäurelactose

4.2 g *O-Acetyl-lactaminsäure-lactose* (Gef. COCH_3 10.2, Ber. für 1 *O*- und 1 *N*-Acetyl 12.7) wurden in 200 ccm Methanol gelöst und portionsweise mit äther. *Diazomethan-Lösung* versetzt, bis die Gelbfärbung bestehen blieb. Man ließ sodann mit einem beträchtlichen Überschuß an Diazomethan über Nacht bei 0° stehen. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels blieb eine nicht hygroskopische, weiße Substanz zurück (4.25 g), deren Lösung in Wasser neutral reagierte.

Methylierung I: Nach Trocknen i. Vak. wurde die Substanz in 80 ccm dest. trockenem Dimethylformamid bei Raumtemperatur gelöst; dazu gab man 20 ccm *Methyljodid* und innerhalb von 20 Min. 30 g *Silberoxyd* (nach HELFRICH und KLEIN)⁹⁾. Durch Kühlung mit Eiswasser ließ man die Temperatur nicht über 5° ansteigen. Anschließend haben wir in einer braunen Flasche 12 Stdn. bei $+4^\circ$, dann weitere 24 Stdn. bei Zimmertemperatur geschüttelt. Die abfiltrierten Silberverbindungen wurden sorgfältig mit 20 ccm Dimethylformamid, dann 3 mal mit je 40 ccm Chloroform gewaschen. Beim Eingießen der vereinigten Lösungen in 600–700 ccm kaltes Chloroform fiel die Hauptmenge des gebildeten Komplexsalzes $(\text{CH}_3)_4\text{N} \cdot 2 \text{AgJ}$ aus. Zur Vervollständigung der Fällung ließ man in der Kälte stehen, filtrierte ab und entfernte die letzten in Lösung gebliebenen Reste von Silbersalzen durch Schütteln mit wäßriger KCN-Lösung. Die Chloroformschicht wurde 2 mal mit Wasser gewaschen und zunächst an der Wasserstrahlpumpe, gegen Ende an der Ölpumpe abdestilliert (Bad nicht über 50°). Letzte Reste von Dimethylformamid lassen sich durch wiederholtes Abdampfen mit Toluol vertreiben. Es blieb eine gelbliche, wachsartige Substanz zurück. Zur Analyse trocknete man i. Hochvak. bei 40° bis zur Gewichtskonstanz. Gef. OCH_3 37.64 (unter den Bedingungen der Methylimidbestimmung).

Methylierung II: Man löste die partiell methylierte Substanz in 80 ccm Dimethylformamid und gab 8 g *Bariumoxyd* und 20 ccm *Methyljodid* zu¹⁰⁾. Der Ansatz wurde in einem 250-ccm-Dreihals-Schliffkolben mit KPG-Rührer und CaCl_2 -Rohr 8 Stdn. bei 0° und weitere 8 Stdn. bei 20° gerührt. Nach Waschen des abfiltrierten Niederschlaues mit Dimethylformamid haben wir 100 ccm Wasser zugegeben und mit 2 mal 100 ccm Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformschicht wurde 1 mal mit 200 ccm Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. abgedampft. Es fielen 4.15 g eines gelbbräunlichen Sirups (84 % d. Th.) an. Zur Analyse wurde i. Hochvak. bei 40° getrocknet.

$\text{C}_{36}\text{H}_{65}\text{NO}_{19}$ (815.3) Ber. für 12 OCH_3 45.65 Gef. OCH_3 43.82 (*N*-Methyl-Bedingungen)

Das IR-Spektrum ließ nur noch eine äußerst schwache OH-Bande erkennen.

Spaltung mit Säure

4.10 g Sirup wurden in 100 ccm 7-proz. *methanol. HCl* 8 Stdn. unter Rückfluß zum gelinden Sieden erhitzt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels i. Vak. erhitze man mit frischer 7-proz. methanol. Salzsäure (80 ccm) weitere 4 Stdn. unter Rückfluß zum Sieden. Man dampfte i. Vak. mehrmals mit Methanol ab. Den bräunlichen Sirup haben wir in 60 ccm Wasser gelöst und mit 20 ccm gesättigtem *Barytwasser* (3 Stdn. bei ca. 20° und weitere 4 Stdn. bei 40°) verseift. Anschließend wurde 6 mal mit je 100 ccm Chloroform ausgeschüttelt. Die wäßrige Schicht enthielt das Bariumsalz der permethylierten Lactaminsäure. Die Chloroformschicht wurde mit 200 ccm Wasser gewaschen und i. Vak. zum Sirup abgedampft. Zur Hydrolyse der Methylglykoside haben wir mit 100 ccm 0.5*n* H_2SO_4 6 Stdn. unter Rückfluß gelinde zum Sieden erhitzt. Der durch Entfernung der Schwefelsäure mit Barytwasser ent-

stehende BaSO₄-Niederschlag muß gründlich mit heißem Wasser gewaschen werden. Die vereinigten braunen Lösungen wurden auf etwa 20 ccm eingeengt, mit Aktivkohle weitgehend entfärbt und weiter abgedampft. Man erhielt 1.85 g eines von Lösungsmittel noch nicht ganz befreiten, gelben Sirups.

Auf dem Papierchromatogramm (Papier 2043 b von Schleicher & Schüll, n-Butanol mit Wasser gesätt., aufsteigend bei 37°) konnten mit Hilfe von Vergleichssubstanzen neben einer kleinen Menge 2.3.4.6-Tetramethyl-galaktose als Hauptsubstanzen 2.3.6-Trimethyl-glucose ($R_F = 0.87$; $R_{TMG} = 0.94$; TMG = 2.3.4.6-Tetramethyl-galaktose = 1) und 2.4.6-Trimethyl-galaktose ($R_F = 0.76$; $R_{TMG} = 0.82$) nachgewiesen werden.

Zur präparativen Trennung diente eine Cellulosesäule (70 × 4.8 cm), die mit n-Butanol/Benzin (110–120°)/Wasser = 38:60:20 (Vol.-Verh.) sehr gut vorgewaschen war. 1.7 g des Sirups wurden in wenig Wasser gelöst, mit gut gewaschenem Cellulosepulver angeteigt und im Exsikkator getrocknet. Die fein pulverisierte Masse brachte man auf die feuchte Säule und überdeckte mit einer 0.5-cm-Schicht von Cellulose und einem Rundfilter.

Faktion	ccm	mg	Substanzen
1–15	750	—	—
16–20	250	120	2.3.4.6-Tetramethyl-galaktose
21–24	200	35	2.3.6-Trimethyl-glucose und wenig 2.3.4.6-Tetramethyl-galaktose
25–37	650	490	2.3.6-Trimethyl-glucose
38–42	250	40	2.4.6-Trimethyl-galaktose und wenig 2.3.6-Trimethyl-glucose
43–65	1150	630	2.4.6-Trimethyl-galaktose

2.3.6-Trimethyl-D-glucose: Die vereinigten Fraktionen 25–37 (0.49 g) ergaben aus absol. Äthanol/Petroläther (30–40°) gelbstichige Prismen vom Schmp. 104–106° (0.39 g). Nach Sublimation unter 0.001 Torr (Luftbad: 105–115°) lag der Schmp. der nunmehr farblosen Prismen bei 113–115°. Mischprobe mit authent. Substanz, die bei 113–114° schmolz: 114°. $[\alpha]_D^{25}: +90^\circ$ (5 Min.) → +87° (10 Min.) → +74° (90 Min.) → +68.9° (14 Std.; Endwert; $c = 0.73$, Wasser). Lit.¹⁴⁾: $[\alpha]_D: +90.2^\circ$ → +70.5° (Wasser).



Das IR-Spektrum und die Debye-Scherrer-Aufnahme waren mit denen von 2.3.6-Trimethyl-glucose aus Octamethyl-lactose identisch.

2.4.6-Trimethyl-D-galaktose: Die vereinigten Fraktionen 43–65 (0.63 g) lieferten aus Chloroform/Petroläther (30–40°) Stäbchen vom Schmp. 95–96° (0.55 g). Durch Umkristallisieren aus Essigester/Benzin (50–70°) stieg der Schmp. auf 102–103°. Misch-Schmp. mit einem authent. Präparat (vom Schmp. 102–103°): 101–102°. $[\alpha]_D^{25}: +127^\circ$ (5½ Min.) → 111° (25 Min.) → +103° (55 Min.) → +91.6° (Endwert; $c = 1.2$, Wasser). Lit.¹⁵⁾: $[\alpha]_D: 124^\circ$ → +90.4° (Wasser); $[\alpha]_D: 124^\circ$ → +93° (Wasser).



Das IR-Spektrum und die Debye-Scherrer-Aufnahme waren identisch mit denen von 2.4.6-Trimethyl-galaktose aus Lacto-N-tetraose¹⁶⁾ und mit denen eines synthet. Vergleichspräparates¹⁷⁾.

¹⁴⁾ J. C. IRVINE und E. L. HIRST, J. chem. Soc. [London] 121, 1213 [1922].

¹⁵⁾ D. J. BELL und S. WILLIAMSON, J. chem. Soc. [London] 1938, 1196; E. G. V. PERCIVAL und J. C. SOMERVILLE, ebenda 1937, 1615.

¹⁶⁾ R. KUHN und H. H. BAER, Chem. Ber. 89, 504 [1956].

¹⁷⁾ E. L. HIRST, Edinburgh.