

RICHARD KUHN und ADELIN GAUHE

## Über drei saure Pentasaccharide aus Frauenmilch

Aus dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg

(Eingegangen am 31. Juli 1961)

Es wurden 3 Pentasaccharide (a, b, c) aus Frauenmilch isoliert, die je 1 Mol. Lactaminsäure (*N*-Acetyl-neuraminsäure), 1 Mol. Glucose, 2 Moll. Galaktose und 1 Mol. *N*-Acetyl-glucosamin enthalten. Unter Abspaltung der sauren Komponente gehen a und b in Lacto-*N*-tetraose über, während c die isomere Lacto-*N*-neotetraose liefert. — Durch zwei Stämme von Influenzavirus wurde das Pentasaccharid a viel leichter als c gespalten und b praktisch nicht angegriffen.

Aus entrahmter Frauenmilch ließen sich nach Dialyse, Adsorption an Carboraffin und am Anionenaustauscher MIH mit Hilfe von Cellulosesäulen drei Pentasaccharide gewinnen. Wir haben sie als a, b und c bezeichnet. Das Pentasaccharid c, das mengenmäßig stark überwiegt, ist Morgan-Elson-negativ, während a und b die Farbreaktion geben. Alle drei sind stark sauer, reduzierend, Anilinphthalat-, Ehrlich- und Bial-positiv. Die  $R_{Lactose}$ -Werte in Äthylacetat/Pyridin/Wasser/Eisessig (5:5:4:1) betragen:

$$a = 0.37 \quad b = 0.32 \quad c = 0.26$$

Durch  $H^+$ -Ionen (schon durch die eigene Acidität) wird sehr leicht die saure Komponente (Lactaminsäure, NANA) abgespalten. Dabei wurde aus a und b die bekannte und in ihrer Struktur geklärte Lacto-*N*-tetraose<sup>1)</sup> kristallisiert erhalten; aus c dagegen ein gleichfalls gut kristallisierendes, isomeres Tetrasaccharid, das die Farbreaktion nach Morgan-Elson nicht gibt und von dessen Konstitution die nachstehende Arbeit handelt (Lacto-*N*-neotetraose).

Da die Verknüpfungsstellen mit der Ketosäure noch unbekannt sind, kann das Pentasaccharid a als  $\alpha$ -Lactaminsäure-lacto-*N*-tetraose, b als  $\gamma$ -Lactaminsäure-lacto-*N*-tetraose und c als  $\alpha$ -Lactaminsäure-lacto-*N*-neotetraose bezeichnet werden.

Durch RDE (receptor destroying enzyme, aus Cholera vibriolen) wurden alle 3 Pentasaccharide gespalten. Die Influenzastämme B-Lee und A-PR 8 hydrolysierten a, langsamer auch c, aber b nicht merklich.

Herrn Dr. Dr. R. BROSSMER und Herrn Dr. H. EGGE danken wir für die von ihnen gereinigten Viruspräparate, Frl. D. TSCHAMPEL für eifrige präparative Hilfe.

<sup>1)</sup> R. KUHN und H. H. BAER, Chem. Ber. 89, 504 [1956].

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Gewinnung der sauren Oligosaccharide erfolgte auf ähnliche Weise wie die Isolierung der 3'-Lactaminsäure-lactose aus Kuhcolostrum<sup>2)</sup>.

*Beispiel:* 6.3 l Frauenmilch ergaben durch Zentrifugieren 5.8 l Magermilch, die in Cellophanschläuchen bei +4° gegen dest. Wasser dialysiert wurden (3×24 Stdn. gegen jeweils frisches dest. Wasser). Die Außenflüssigkeit, insgesamt 100 l, engten wir i. Vak. auf 1.3 l ein. Auf Zusatz des gleichen Volumens 96-proz. Äthanol schied sich in der Kälte Lactose (58 g) ab. Die abzentrifugierte Lösung wurde durch Abdampfen mit Wasser i. Vak. von Alkohol befreit und auf 1.7 l eingengt. Wir rührten sie dann 8 Stdn. mit 500 g Carboraffin, fügten noch 200 g Carboraffin zu und rührten weitere 6 Stunden. Die Lösung zeigte immer noch eine schwache Ehrlich-Reaktion. Das Carboraffin wurde abgesaugt und auf der Nutsche nacheinander mit warmem dest. Wasser (60–70°, 30 l), 8-proz. Äthanol (11 l), 12-proz. Äthanol (5 l), 20-proz. (10 l), warmem 50-proz. (12 l, 55–60°) und 50-proz. Äthanol, dem 2% Eisessig zugesetzt waren, (12 l) eluiert. Die einzelnen Eluate wurden eingengt und getrennt weiter behandelt.

Das Filtrat und die wäßrigen Eluate wurden teilweise entsalzt, indem wir sie kurz mit Amberlite IR-120 schüttelten, den Kationenaustauscher abfiltrierten und die nun stark saure Lösung durch Schütteln mit Amberlite-IR-45 rasch auf pH~4 brachten und filtrierten. Restliche Cl-Ionen entfernten wir durch Zutropfen von gesättigter Silberacetat-Lösung. Bei den weniger salzhaltigen alkoholischen Eluaten erübrigte sich die Vorbehandlung mit IR-120 und IR-45; sie wurden nach Vertreiben des Alkohols mit konz. Bariumacetat- und mit heiß gesättigter Silberacetat-Lösung von SO<sub>4</sub>-, PO<sub>4</sub>- und Cl-Ionen befreit. Nach Entfernung restlicher Kationen mit Hilfe von IR-120-Säulen wurden die Lösungen zur Adsorption der sauren Oligosaccharide über Säulen mit Anionenaustauscher MIH (Acetatform) filtriert (500 bzw. 750 g MIH für die mit 20- und mit 50-proz. Äthanol gewonnenen Fraktionen). Neutrale Oligosaccharide wurden durch Waschen mit dest. Wasser entfernt. Dann eluierten wir die sauren Oligosaccharide mit Natriumacetat-Lösung (zunächst 0.05 m, dann 0.1 m und 0.5 m). Die durch Filtration über IR-120-Säulen von Na-Ionen befreiten Lösungen wurden i. Vak. bei möglichst niedriger Temperatur eingengt unter mehrmaligem Zusatz von Wasser, um die Essigsäure weitgehend zu entfernen. Dann wurde über Blaugel und KOH gefriergetrocknet. Man erhielt so bei Verarbeitung von 6.3 l Frauenmilch aus den verschiedenen Carboraffin-Eluaten folgende Fraktionen (insgesamt 6.741 g):

Filtrat und wäßrige Eluate*)	0.845 g	} viel 6'-Lactaminsäure-lactose wenig 3'-Lactaminsäure-lactose
Eluate mit 8-proz.* <sup>1)</sup> und 12-proz. Äthanol	0.339 g	
Eluat mit 20-proz. Äthanol	1.885 g	3'- und 6'-Lactaminsäure-lactose, höhere Oligosaccharide
Eluat mit 50-proz. Äthanol	2.992 g	höhere Oligosaccharide, nur Spuren 3'- und 6'- Lactaminsäure-lactose
Eluat mit 50-proz. Äthanol + 2-proz. Essigsäure	0.680 g	chromatographisch nur sehr langsam wandernde höhere Oligosaccharide

\*) Vom wäßrigen Eluat wurden die letzten 10 l, von dem Eluat mit 8% Äthanol die ersten 5 l verworfen, weil sie nur sehr schwache Ehrlich-Reaktion zeigten.

<sup>2)</sup> R. KUHN und R. BROSSMER, Chem. Ber. 89, 2013 [1956].

Freie Lactaminsäure fand sich nur in sehr geringer Menge. Die von uns früher<sup>3)</sup> zur Gewinnung der neutralen Oligosaccharide aus Frauenmilch hergestellten „Kohle-Eluate“, die nach Enteiweißung mit  $\text{Ba}(\text{OH})_2/\text{ZnSO}_4$ , Entsalzung mit Amberlite IR-120 und IR-45 und Adsorption an Carboraffin durch Elution mit 20-proz. Essigsäure bzw. mit 30-proz. Alkohol gewonnen waren, enthalten auch einen großen Teil der lactaminsäurehaltigen Oligosaccharide. Diese lassen sich mit Hilfe von MIH daraus abtrennen. Man findet aber in so hergestellten Präparaten viel mehr freie Lactaminsäure als bei der oben beschriebenen schonenderen Methode.

**Chromatographie an Cellulosesäulen:** Etwa 2 g Oligosaccharidgemisch (Carboraffin-Eluat) wurden als Papieradsorbat auf die mit dem Elutionsgemisch vorgewaschene Säule ( $5 \times 50$  cm, Linterspulver Schleicher & Schüll Nr. 124) aufgebracht. Eluiert wurde mit Essigester/Pyridin/Wasser/Eisessig (5:5:3.5:1). Die ersten 1500 ccm waren meist zuckerfrei. In den folgenden 2500 ccm erschienen nacheinander Lactaminsäure, 3'- und 6'-Lactaminsäure-lactose. Nach weiteren 1000 ccm, die wieder nahezu zuckerfrei waren, trat in den folgenden 2000 ccm zunächst Pentasaccharid a im Eluat auf, später b und zuletzt c. Zur Elution der höheren Oligosaccharide steigerten wir dann den Wassergehalt im Lösungsmittel.

Außer den drei reinen Pentasacchariden a, b und c erhielten wir Zwischenfraktionen, die ein zweites Mal chromatographiert werden mußten. Die Fraktionen wurden, zuletzt unter mehrfachem Zusatz von Wasser, i. Vak. stark eingeeengt und über  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KOH}$  zum Sirup eingedunstet. Wir nahmen in Wasser auf, setzten etwas Silberacetat zu, entfärbten mit Carboraffin und filtrierten über wenig IR-120 ( $\text{H}^+$ ), um Reste von Pyridin zu entfernen. Die sauren Filtrate wurden sofort i. Vak. eingeeengt und gefriergetrocknet (Blaugel/KOH); im allgemeinen empfahl sich eine nochmalige Adsorption an MIH (Acetatform) und Elution mit Natriumacetat-Lösung; nach Entfernung von  $\text{Na}^+$  mit IR-120 wurde eingeeengt und gefriergetrocknet.

**Analysen:** Die gefriergetrockneten Präparate halten hartnäckig Essigsäure fest, die sich auch bei  $100^\circ$  i. Hochvak. nicht entfernen läßt. Zur Analyse verrieben wir etwa 100 mg Pentasaccharid mit einigen ccm absol. Methanol, filtrierten von wenig Flöckchen ab und versetzten mit dem doppelten Volumen trockenem Äther. Die Zucker fielen als amorphe weiße Niederschläge aus, die abzentrifugiert, 2mal mit trockenem Äther gewaschen und über  $\text{KOH}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$  zunächst im Exsikkator, dann 24 Stdn. bei  $10^{-3}$  Torr/ $100^\circ$  getrocknet wurden.

$\text{C}_{37}\text{H}_{62}\text{N}_2\text{O}_{29}$ (998.9)	Ber.	C 44.49	H 6.26	N 2.81	2 $\text{CH}_3\text{CO}$ 8.62
Pentasaccharid a:	Gef.	C 44.19	H 6.68	N 2.60	$\text{CH}_3\text{CO}$ 8.68
Pentasaccharid b:	Gef.	C 44.40	H 6.08	N 2.51	$\text{CH}_3\text{CO}$ 8.66
Pentasaccharid c:	Gef.	C 44.65	H 6.23	N 2.59	$\text{CH}_3\text{CO}$ 8.67

Potentiometrische Titration von c: 5.890 mg (16.370 mg) verbr. 0.555 ccm (1.415 ccm) 0.01 n NaOH. Gef. Äquiv.-Gew. 1060, 1157.

Pentasaccharid b:  $[\alpha]_D^{25} = +14.5$  bis  $15^\circ$  ( $c = 1$ , Wasser)

Pentasaccharid c:  $[\alpha]_D^{25} = +13^\circ$  ( $c = 1$ , Wasser)

Lactaminsäurebestimmung: <sup>4)</sup>

$\text{C}_{37}\text{H}_{62}\text{N}_2\text{O}_{29}$ (998.9)	Ber.	Lactaminsäure 30.96
Pentasaccharid a:	Gef.	25.33, 25.68
Pentasaccharid b:	Gef.	25.12, 25.12
Pentasaccharid c:	Gef.	27.59, 27.31

<sup>3)</sup> A. GAUHE, P. GYÖRGY, J. R. E. HOOVER, R. KUHN, C. S. ROSE, H. W. RUELIUS und F. ZILLIKEN, Arch. Biochem. Biophysics 48, 214 [1954]; R. KUHN, H. H. BAER und A. GAUHE, Chem. Ber. 89, 2514 [1956].

<sup>4)</sup> Nach L. SVENNERHOLM, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 24, 604 [1957]. Dabei erhält man Werte, die 80–85% d. Th. entsprechen.

**Abspaltung von Lactaminsäure durch  $H^{\oplus}$ -Ionen:** Je 120 mg der Pentasaccharide (a, b, c) wurden in 1.2 ccm 0.01 *n*  $H_2SO_4$  4 Tage bei 37° gehalten. Die chromatographische Prüfung ergab, daß in allen 3 Fällen praktisch alles Ausgangsmaterial verschwunden und Lactaminsäure gebildet worden war. Außerdem enthielten die Hydrolysate von a und b eine Morgan-Elson-positive Substanz von  $R_{Lactose}$  0.58\*) (Anilinphtalat-positiv, Ehrlich-negativ), das Hydrolysat von c eine Morgan-Elson-negative Substanz von  $R_{Lactose}$  0.56\*) (Anilinphtalat-positiv, Ehrlich-negativ). — In allen 3 Lösungen wurde  $SO_4^{2\ominus}$  mit verd.  $Ba(OH)_2$ -Lösung entfernt. Anschließend wurde über Amberlite IR-120 (1.3×8 cm) und zur Abtrennung saurer Substanzen über MIH (Acetatform; 1.2×12 cm) filtriert. Die Filtrate, welche die neutralen Oligosaccharide enthielten, wurden gefriergetrocknet.

**Lacto-*N*-tetraose aus dem Pentasaccharid a:** Aus dem Hydrolysat von a erhielt man so 59 mg (70% d. Th.), die in 0.33 ccm Wasser aufgenommen und in der Hitze mit 1 ccm absol. Äthanol versetzt wurden. Nach Animpfen mit Lacto-*N*-tetraose und 2tägigem Stehenlassen im Eisschrank wurden 25 mg farblose Nadeln abgesaugt. IR-Spektrum identisch mit dem von Lacto-*N*-tetraose.

**Lacto-*N*-tetraose aus dem Pentasaccharid b:** Das Hydrolysat von b lieferte 68 mg (81% d. Th.), die ebenso aus 0.8 ccm Wasser + 2 ccm absol. Äthanol umkristallisiert wurden: 36 mg farblose Nadeln, Schmp. ca. 211–214° (Zers.). IR-Spektrum identisch mit dem von Lacto-*N*-tetraose.

**Lacto-*N*-neotetraose aus dem Pentasaccharid c:** Aus dem Hydrolysat von c gewannen wir 64 mg (76% d. Th.) rohe Tetraose. 40 mg davon wurden in 0.5 ccm Wasser heiß gelöst, filtriert und in der Wärme mit 2.3 ccm absol. Äthanol bis zur beginnenden Trübung versetzt. Beim Erkalten kristallisierten Büschel farbloser Nadeln, die abgesaugt und mit 90-proz. Äthanol gewaschen wurden. 20 mg, Schmp. ca. 214–218° (Zers.). IR-Spektrum verschieden von dem der Lacto-*N*-tetraose.

**Spaltungsversuche mit RDE:** Wir verwendeten ein teilweise gereinigtes Präparat (Nr. 21 A) der BEHRING-WERKE, Marburg, das mit Glucose und Lactose stabilisiert war. Der Inhalt einer Ampulle wurde in 2.5 ccm Wasser aufgenommen.

10 mg (0.01 mMol) der 3 Pentasaccharide a, b und c wurden in 0.1 ccm 0.1 *n*  $Na_2CO_3$ -Lösungen gelöst (pH der Lösungen 6.4–6.8). Jeweils die Hälfte jeder Lösung wurde mit dem 3fachen Volumen Enzymlösung versetzt; zu der anderen Hälfte, die als Kontrolle diente, gaben wir das 3fache Volumen dest. Wasser. Enzymsätze und Kontrollen wurden bei 37° gehalten. Nach 12 und nach 24 Stdn. entnahmen wir Proben zur Chromatographie.

Die Pentasaccharide in den Kontrollen erschienen nach 12 und nach 24 Stdn. unverändert. Bei den Enzymsätzen waren nach 12 Stdn. die Pentasaccharidflecken im Chromatogramm sehr viel schwächer als bei den Kontrollen, dafür erschienen Flecken von Lactaminsäure und von Lacto-*N*-tetraose (bei a und b) bzw. von Lacto-*N*-neotetraose (bei c). Nach 24 Stdn. waren alle 3 Pentasaccharide fast ganz in Lactaminsäure und Tetraose zerlegt. Unter den gleichen Bedingungen wird 3'-Lactaminsäure-lactose schon in weniger als 12 Stdn. völlig in Lactaminsäure und Lactose gespalten.

**Spaltungsversuche mit Influenzavirus:** Es wurden 2 verschiedene Viren geprüft:

1) *B-Lee*, gereinigt durch Adsorption an und Elution von Erythrocyten und anschließendes Ultrazentrifugieren, aufgenommen in physiologischer Kochsalzlösung. Je 10 mg Pentasaccharid wurden in 0.1 ccm 0.1 *n*  $Na_2CO_3$ -Lösung gelöst und mit Wasser auf 1 ccm aufgefüllt. Die Lösungen (pH 6.4–6.8) wurden steril filtriert (Zentrifugieren über G 5-Fritte).

\*) Chromatographie mit Äthylacetat/Pyridin/Wasser/Eisessig (5:5:4:1), absteigend.

Zu je 0.2 ccm Pentasaccharidlösung fügten wir 0.04 ccm Virussuspension für die Enzymansätze bzw. 0.04 ccm 0.9-proz. Kochsalzlösung für die Kontrollen und inkubierten bei 37°. Nach 24, 48 und 80 Stdn. wurden Proben chromatographiert (Äthylacetat/Pyridin/Wasser/Eisessig (5:5:3:1); die Inkubationslösungen wurden jeweils unmittelbar chromatographiert, ohne die Viren durch Hitze zu inaktivieren). Nach 24 Stdn. war das Pentasaccharid a im Enzymansatz zum großen Teil in Lactaminsäure und Lacto-*N*-tetraose gespalten, Pentasaccharid b war fast unverändert, bei Pentasaccharid c war wenig Lactaminsäure und Lacto-*N*-neotetraose neben viel unverändertem c zu sehen. Nach 48 Stdn. war die Spaltung von a und c etwas weiter vorgeschritten, bei b sahen wir sehr schwache Flecken von Lactaminsäure und Lacto-*N*-tetraose. Nach 80 Stdn. keine weitere Veränderung. Bei den Kontrollen zeigte sich auch nach 80 Stdn. keinerlei Spaltung. 3'-Lactaminsäure-lactose war unter den gleichen Bedingungen nach 24 Stdn. völlig gespalten (vorher nicht geprüft).

2) Mit einem anderen Viruspräparat (*A-PR8*, gereinigt nach H. K. MILLER und R. W. SCHLESINGER<sup>5)</sup>, in Phosphatpuffer suspendiert) erhielten wir ganz entsprechende Ergebnisse: Pentasaccharid a nach 24 Stdn. weitgehend, nach 48 Stdn. bis auf einen geringen Rest gespalten; Pentasaccharid b auch nach 48 Stdn. höchstens spurenweise gespalten; Pentasaccharid c nach 24 Stdn. etwas, nach 48 Stdn. etwa zu einem Drittel gespalten. — Bei diesen Versuchen inaktivierten wir die Viren vor dem Chromatographieren durch 1/2 stdg. Erwärmen der Inkubationslösungen auf 60°.

---

<sup>5)</sup> J. Immunology 75, 155 [1955].