

## RICHARD KUHN und ADELIN E GAUHE

### Die Konstitution der Lacto-*N*-neotetraose

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

(Eingegangen am 31. Juli 1961)

Die durch partielle Säurehydrolyse des Pentasaccharids *c* erhaltene Lacto-*N*-neotetraose kristallisiert aus Äthanol in der  $\alpha$ -Form mit 3 Moll. Kristallwasser. Sie ist aus 1 Mol. Glucose, 2 Moll. Galaktose und 1 Mol. *N*-Acetyl-glucosamin aufgebaut. Auf Grund von Ergebnissen der Hydrierung, Perjodatspaltung, Methylierung und partieller Hydrolysen kommt der Lacto-*N*-neotetraose die Formel I zu.

Unter verhältnismäßig milden Bedingungen (0.1 *n* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 Stde., 80°) wird aus dem sauren Pentasaccharid *c* der Frauenmilch<sup>1)</sup> praktisch nur Lactaminsäure (1 Mol.) abgespalten und ein in feinen Nadeln kristallisierendes Tetrasaccharid erhalten. Dieses unterscheidet sich von der isomeren, bekannten Lacto-*N*-tetraose<sup>2)</sup> vor allem dadurch, daß es die Morgan-Elson-Reaktion nicht gibt; hinsichtlich der Bausteine (1 Mol. Glucose, 2 Moll. Galaktose, 1 Mol. *N*-Acetyl-glucosamin) stimmt es mit der Lacto-*N*-tetraose überein. Da in 4-Stellung substituierte *N*-Acyl-hexosamine die Farbreaktion mit *p*-Dimethylamino-benzaldehyd nicht geben<sup>3)</sup> und durch partielle Säurehydrolyse eines Gemisches höherer Oligosaccharide der Frauenmilch bereits ein Morgan-Elson-negatives Disaccharid, das *N*-Acetyl-lactosamin (4- $\beta$ -Galaktosido-*N*-acetyl-glucosamin), erhalten worden war<sup>4)</sup>, lag die Vermutung nahe, daß sich die Lacto-*N*-neotetraose vom *N*-Acetyl-lactosamin ableitet. Die folgenden Befunde zeigen, daß das neue Tetrasaccharid in der Tat aus 1 Mol. Lactose und 1 Mol. *N*-Acetyl-lactosamin aufgebaut ist, die entsprechend Formel I miteinander verknüpft sind. Der einzige strukturelle Unterschied zwischen Lacto-*N*-tetraose und Lacto-*N*-neotetraose besteht somit darin, daß der zweite Galaktoserest nicht mit dem 3-ständigen sondern mit dem 4-ständigen Hydroxyl des Aminozuckers verknüpft ist<sup>5)</sup>.

Wird I mit NaBH<sub>4</sub> zum Tetrarit reduziert, so findet man bei anschließender Säurehydrolyse keine Glucose mehr; diese stellt daher das reduzierende Ende dar. Läßt man NaJO<sub>4</sub> auf I einwirken, so wird der Glucoserest und einer der beiden Galaktosereste zerstört, und man findet nach Hydrolyse mit Säure Glucosamin und Galaktose im Molverhältnis 1:1, d. h. die beiden Bausteine, die gemäß Formel I keine Glykolgruppierung enthalten.

1) R. KUHN und A. GAUHE, Chem. Ber. 95, 513 [1962], voranstehend.

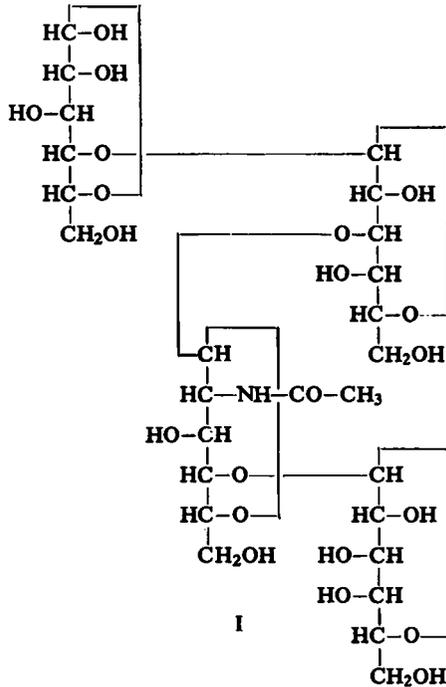
2) R. KUHN, A. GAUHE und H. H. BAER, Chem. Ber. 86, 827 [1953].

3) R. KUHN, A. GAUHE und H. H. BAER, Chem. Ber. 87, 1138 [1954]; R. KUHN und G. KRÜGER, ebenda 89, 1473 [1956].

4) R. KUHN, H. H. BAER und A. GAUHE, Chem. Ber. 87, 1553 [1954].

5) Durch einen Schreibfehler ist bei R. KUHN, Angew. Chem. 72, 805 [1960], in der Formel der Lacto-*N*-neotetraose (dort Formel V) der Aminozucker an die 4-Stellung des ersten Galaktoserestes statt an die 3-Stellung gesetzt worden.

In Übereinstimmung mit Formel I erhielten wir als Spaltstücke der permethylierten Lacto-*N*-neotetraose: 2,3,6-Trimethyl-glucose, 2,4,6-Trimethyl-galaktose, 3,6-Dimethyl-*N*-acetyl-*D*-glucosamin und 2,3,4,6-Tetramethyl-galaktose.



Bei partieller Säurehydrolyse gab (papierchromatographisch) die Lacto-*N*-neotetraose in Übereinstimmung mit Lacto-*N*-tetraose: Lactose, Lacto-*N*-biose II (3- $\beta$ -*N*-Acetyl-glucosaminido-galaktose) und Lacto-*N*-triose II (d. h. das nach Abspaltung des endständigen Galaktoserestes in beiden Fällen zu erwartende Trisaccharid). Die aus Lacto-*N*-tetraose erhaltene Morgan-Elson-positive Lacto-*N*-triose I ( $R_L = 0.52$ ) trat jedoch nicht auf; statt dessen erschien ein etwas rascher wanderndes Morgan-Elson-negatives Trisaccharid ( $R_L = 0.60$ ); die nach Abspaltung der Glucose entstehenden Trisaccharide sind danach verschieden. Das neue Morgan-Elson-negative Trisaccharid (Lacto-*N*-neotriose I) erscheint als 3- $\beta$ -[*N*-Acetyl-lactosaminido]-galaktose. Daß in ihm ein in 3-Stellung substituierter Galaktoserest das reduzierende Ende darstellt, ergibt sich auch daraus, daß nach Perjodatspaltung und Säurehydrolyse Lyxose papierchromatographisch nachweisbar war.

Nach Versuchen von Prof. W. T. J. MORGAN, London, zeigt Lacto-*N*-neotetraose serologisch eine Wirksamkeit, wie sie bei Polysacchariden von Pneumokokken Typ XIV gefunden wurde; sie war in seinen Testen wirksamer als *N*-Acetyl-lactosamin.

Herrn Prof. W. T. J. MORGAN danken wir für serologische Bestimmungen, Herrn E. RÖHM für die Ausführung von Bausteinanalysen und Herrn H. TRISCHMANN für Permethylierungsversuche.

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

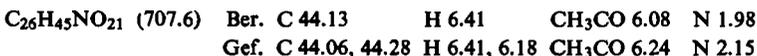
Für die Papierchromatographie verwendeten wir Schleicher & Schüll-Papier Nr. 2043 b mgI, für die Chromatographie an Cellulosesäulen Linterspulver Schleicher & Schüll Nr. 124. Die bei der Chromatographie benutzten Lösungsmittel waren:

- Lm Ia Äthylacetat/Pyridin/Eisessig/Wasser (5:5:3:1)  
 Lm Ib „ „ „ „ (5:5:3.5:1)  
 Lm Ic „ „ „ „ (5:5:4:1)  
 Lm II Petroläther (90°)/Äthylacetat/Eisessig/Wasser (13:9:2:2)  
 Lm III Äthylacetat/Eisessig/Wasser (9:2:2)  
 Lm IV Äthylacetat/Pyridin/Wasser (2:1:2), obere Schicht

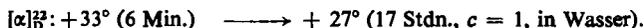
*Lacto-N-neotetraose aus dem Pentasaccharid c*: 300 mg *Pentasaccharid c*<sup>1)</sup> wurden in 60 ccm auf 80° vorgewärmte 0.1 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eingetragen und 1 Stde. bei 80° gehalten. Dann wurde abgekühlt und mit Ba(OH)<sub>2</sub>-Lösung auf pH 5–6 gebracht. Nach Entfernung des BaSO<sub>4</sub> zeigte ein Chromatogramm außer Lactaminsäure und Lacto-N-neotetraose nur Spuren von Ausgangsmaterial sowie von Glucose und Galaktose. Nach Filtrieren über Amberlite IR-120 (1.8 × 18 cm) wurden Lactaminsäure und Reste von c durch Filtration über MIH (Acetat-form; 1.8 × 20 cm) entfernt. Filtrat und Waschwasser ergaben 172 mg (81% d. Th.) Rückstand. Er wurde in 0.75 ccm Wasser gelöst. Die auf Zusatz von 1.14 ccm absol. Äthanol abgeschiedenen Flöckchen wurden heiß abfiltriert und mit 2 ccm 60-proz. Äthanol nachgewaschen. Zum Filtrat gab man in der Hitze 6 ccm absol. Äthanol. Beim Erkalten trat Kristallisation ein. Nach 2-tägigem Stehenlassen bei +4° wurde abgesaugt, mit 90-proz. und absol. Äthanol gewaschen und über H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/KOH getrocknet: 122.6 mg farblose feine Nadeln. Die exsikkatortrockene Substanz enthält 3 Moll. Wasser:



Nach 48 stdg. Trocknen bei 10<sup>-3</sup> Torr/115° war die Substanz wasserfrei:



12.299 mg (48 Stdn. bei 10<sup>-3</sup> Torr/115° getrocknet) nahmen an der Luft 99.7 mg an Gewicht zu, das entspricht einer Aufnahme von 3.2 Moll. H<sub>2</sub>O.



*Bausteinanalyse (E. Röhm)*: 10.35 mg *Lacto-N-neotetraose* wurden in einem 3-ccm-Meßkölbchen in 2 ccm 99-proz. Ameisensäure 4 Stdn. bei 100° hydrolysiert; das Hydrolysat wurde im Exsikkator zur Trockne gebracht. Dann wurde mit 0.5 ccm 0.5 n HCl 4 Stdn. bei 100° nachhydrolysiert und nach Zugabe von 0.04 ccm Pyridin mit Wasser auf 3 ccm aufgefüllt. Aliquote Teile dieser Lösung wurden chromatographiert (Lm Ia) und die Hydrolysenprodukte nach der TTC-Methode<sup>6)</sup> (unter Verwendung eines ebenso behandelten Vergleichsgemisches aus 1 Tl. Glucose, 2 Tln. Galaktose und 1 Tl. Glucosamin·HCl) bestimmt. Man fand: 1 Glucosamin (101%), 2 Galaktose (101%), 1 Glucose (95%).

*Bestimmung der reduzierenden Endgruppe*: Zu 6 mg *Lacto-N-neotetraose* in 0.1 ccm Wasser wurden 1.5 mg NaBH<sub>4</sub> zugesetzt. Nach 1½ Stdn. wurde mit Methanol verdünnt, 1 Tropfen 2 n Essigsäure zugesetzt (zur Zerstörung von unverbrauchtem NaBH<sub>4</sub>) und über IR-120 (H<sup>⊕</sup>) (0.5 × 4 cm) filtriert. Das Filtrat wurde i. Vak. eingedampft und mehrmals mit absol. Methanol abgedampft. Der Rückstand wurde mit 1 ccm 1 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> im zugeschmolzenen Röhrchen

<sup>6)</sup> F. G. FISCHER und H. DÖRFEL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 297, 164 [1954]; F. G. FISCHER und H. J. NEBEL, ebenda 302, 10 [1955].

11 Stdn. bei 104° hydrolysiert. Nach Entfernung von  $\text{SO}_4^{2\ominus}$  mit  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  wurde chromatographiert: man fand nur Galaktose und Glucosamin (sowie etwas 3-Glucosaminido-galaktose), aber keine Glucose.

*Perjodatoxydation:* Zu 23 mg Lacto-*N*-neotetraose ( $3\text{H}_2\text{O}$ ) gaben wir 1 ccm 0.25 *n*  $\text{NaJO}_4$ -Lösung, füllten mit Wasser auf 5 ccm auf und ließen im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen. Nach 5 Stdn. und nach 48 Stdn. wurde je die Hälfte der Lösung nach Zusatz einer Spur Äthylenglykol über Amberlite IR-120 ( $1.1 \times 8$  cm) und IR 45 ( $1.2 \times 6$  cm) filtriert. Die Filtrate wurden i. Vak. eingedampft und die Rückstände mit 1 ccm 1 *n*  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10 Stdn. bei 100–105° hydrolysiert. Nach Entfernung von  $\text{SO}_4^{2\ominus}$  mit  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  zeigte die (auf 0.2 ccm eingedampfte) Lösung im Chromatogramm nur Galaktose und Glucosamin (neben wenig Glucosaminido-galaktose) im Verhältnis 1:1 (TTC-Methode). Die Glucose und einer der beiden Galaktosereste sind also zerstört worden.

*Saure Partialhydrolyse:* 5 mg Lacto-*N*-neotetraose in 1 ccm 0.5 *n*  $\text{H}_2\text{SO}_4$  wurden 15 Min. im siedenden Wasserbad erwärmt. Die rasch abgekühlte Lösung wurde mit  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung von  $\text{SO}_4^{2\ominus}$  befreit. Zum papierchromatographischen Vergleich wurden 5 mg Lacto-*N*-tetraose ebenso behandelt. Im Papierchromatogramm (Lm IV, absteigend) sieht man (außer etwas Ausgangsmaterial, *N*-Acetyl-glucosamin, Glucose, Galaktose und wenig Glucosamin):

Lacto- <i>N</i> -neotetraose		Lacto- <i>N</i> -tetraose		Spaltstück
<i>R</i> <sub>Lactose</sub>	ME *)	<i>R</i> <sub>Lactose</sub>	ME *)	
—	—	1.43	+	Lacto- <i>N</i> -biose I <sup>7,8)</sup>
1.40	—	—	—	<i>N</i> -Acetyl-lactosamin <sup>8)</sup> (wenig)
1.14	+	1.14	+	Lacto- <i>N</i> -biose II <sup>1,7)</sup>
1.00	—	1.00	—	Lactose
0.72	+	0.72	+	Lacto- <i>N</i> -triose II <sup>7,9)</sup>
0.60	—	—	—	Neo-lacto- <i>N</i> -triose I
—	—	0.52	+	Lacto- <i>N</i> -triose I <sup>7,9)</sup>

\*) Morgan-Elson-Reaktion

*Methylierung:* Die auf 0° gekühlte Lösung von 200 mg Lacto-*N*-neotetraose ( $\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{NO}_{21} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) in 6 ccm Dimethylformamid wurde mit 1.8 ccm  $\text{CH}_3\text{J}$ , 1.2 g BaO und 47 mg  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  18 Stdn. unter Eiskühlung und weitere 40 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Kühlen auf 0° wurde mit  $\text{CHCl}_3$  ausgeschüttelt. Die mit Wasser, Natriumthiosulfatlösung und nochmals mit Wasser gewaschene und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknete  $\text{CHCl}_3$ -Lösung lieferte beim Eindampfen i. Vak. einen fast farblosen Rückstand, der aus Benzol/Petroläther umgefällt wurde (225 mg).



205 mg methylierte Lacto-*N*-neotetraose wurden in 20 ccm 1 *n*  $\text{H}_2\text{SO}_4$  11 Stdn. bei 102° hydrolysiert. Das mit  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung auf pH 6 gebrachte Hydrolysat wurde zur Adsorption von Aminozucker über eine Amberlite-IR-120( $\text{H}^{\oplus}$ )-Säule ( $1.8 \times 15$  cm) gegeben. Filtrat und Washwasser, die die Neutralzucker enthielten, wurden nach Filtration über eine kleine IR-45-Säule i. Vak. eingedampft: Rückstand 119 mg. Das Papierchromatogramm (Lm III, aufsteigend) zeigte: 2.3.4.6-Tetramethyl-galaktose, 2.3.6-Trimethyl-glucose, 2.4.6-Trimethyl-galaktose, sehr wenig 3.4.6-Trimethyl-galaktose und Spuren langsamerer Flecken. Mit Hilfe einer Cellulosesäule [Elutionsmittel Petroläther (90°)/Äthylacetat/Eisessig/Wasser (13:9:2:2)

<sup>7)</sup> R. KUHN, H. GAUHE und H. H. BAER, Chem. Ber. 87, 289 [1954].

<sup>8)</sup> R. KUHN, H. H. BAER und A. GAUHE, Chem. Ber. 87, 1553 [1954].

<sup>9)</sup> R. KUHN, A. GAUHE und H. H. BAER, Chem. Ber. 89, 1027 [1956].

(Lm II) ließ sich aus dem Gemisch der Neutralzucker die 2.3.4.6-Tetramethyl-galaktose (33 mg) abtrennen. Destillation bei  $10^{-3}$  Torr/100–110° ergab ein farbloses Öl, das nach  $R_F$ -Wert und IR-Spektrum mit authent. 2.3.4.6-Tetramethyl-galaktose (aus permethylierter Lactose) übereinstimmte. — Bei der Weiterelution der Linterssäule mit Äthylacetat/Eisessig/Wasser (9:2:2) (Lm III) ergab sich keine befriedigende Trennung von Trimethylglucose und Trimethylgalaktose. Durch erneute Chromatographie der vereinigten Trimethylhexosefraktionen (75 mg) an Cellulose (Lm III) erhielten wir neben Mischfraktionen 19.5 mg reine 2.3.6-Trimethyl-glucose und 20.4 mg reine 2.4.6-Trimethyl-galaktose, die spontan kristallisierten. Beide wurden bei  $10^{-3}$  Torr destilliert. Die IR-Spektren und die  $R_F$ -Werte (Lm III, aufsteigend) waren identisch mit denen von authent. 2.3.6-Trimethyl-glucose bzw. 2.4.6-Trimethyl-galaktose.

Nach dem Auswaschen der Neutralzucker aus der IR-120-Säule wurde der Aminozucker mit 200 ccm 1 *n* HCl eluiert. Der Rückstand der i. Vak. eingeengt und mehrfach mit Wasser abgedampften Lösung wurde im Exsikkator über Natronkalk getrocknet. Chromatogramm (in Lm Ia, aufsteigend): neben 3.6-Dimethyl-glucosamin ( $R_{\text{Glucosamin}}$  2.00) nur Spuren eines Aminozuckers vom  $R_F$ -Wert des 6-Methyl-glucosamins. Zur *N*-Acetylierung wurde in 1.5 ccm Wasser aufgenommen, 3 ccm absol. Methanol zugesetzt und unter Kühlung je 0.15 ccm *Acesanhydrid* und Triäthylamin zugegeben. Nach 10 Stdn. (Raumtemperatur) wurde das gleiche Vol. Wasser zugegeben und nacheinander über je eine kleine Säule mit Amberlite IR-120 bzw. IR-45 filtriert. Beim Eindampfen der neutralen Lösung i. Vak. erhielten wir 50 mg eines fast weißen kristallinen Rückstands, den wir durch Aufnehmen in absol. CH<sub>3</sub>OH und Filtrieren über Celite/Darco G 60 reinigten. Beim Umkristallisieren aus Äthanol/Äther/Petroläther erhielten wir 21 mg 3.6-Dimethyl-*N*-acetyl-*D*-glucosamin in weißen Stäbchen.

C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>6</sub> (249.3) Ber. OCH<sub>3</sub> 24.90 Gef. OCH<sub>3</sub> 24.76

$[\alpha]_D^{22}$ : + 36° (nach 5 Stdn.,  $c = 0.8$ , in Wasser) (Lit.<sup>10</sup>): + 35 ± 5°.

*R<sub>N</sub>*-Acetyl-glucosamin 1.65 (Lm Ia, aufsteigend), Morgan-Elson-positiv.

<sup>10</sup> R. W. JEANLOZ, J. org. Chemistry 26, 905 [1961].