

# Darstellung und enzymatische Spaltbarkeit von $\alpha$ -Ketosiden der N-Propionyl-, N-Butyryl- und N-Benzoyl-D-neuraminsäure

Von

P. Meindl und H. Tuppy\*

Aus dem chemischen Laboratorium der Arzneimittelforschung Ges. m. b. H. \*\*  
und dem Institut für Biochemie der Universität Wien

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 19. September 1966)

N-Propionyl-, N-Butyryl- und N-Benzoyl-D-neuraminsäure wurden nach der Methode von *Kuhn* und *Baschang*<sup>6</sup> dargestellt und in ihre Benzyl- $\alpha$ -ketoside umgewandelt. Das Benzylketosid der N-Propionyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure war, wenn auch langsamer als die entsprechenden Ketoside der N-Acetyl- und N-Glykolyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure, sowohl durch *Vibrio cholerae*-Neuraminidase als auch Influenza-A-Virus spaltbar. Die Ketoside der N-Butyryl- und Benzoyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure wurden von Neuraminidase nicht angegriffen. Für Vergleichszwecke wurden auch die anomeren Methylketoside der N-Benzoyl-D-neuraminsäure sowie deren Methylester dargestellt.

N-Propionyl, N-butyryl and N-benzoyl-D-neuraminic acid were synthesized following the method of *Kuhn* and *Baschang*<sup>6</sup> and converted into their benzyl  $\alpha$ -ketosides. The benzyl ketoside of N-propionyl- $\alpha$ -D-neuraminic acid was hydrolyzed by both *Vibrio cholerae* neuraminidase and influenza A virus, though more slowly than the corresponding ketosides of N-acetyl and N-glycolyl- $\alpha$ -D-neuraminic acid. The ketosides of N-butyryl and N-benzoyl- $\alpha$ -D-neuraminic acid were resistant to neuraminidase action. For comparative purposes, the anomeric methyl ketosides of N-benzoyl-D-neuraminic acid and their methyl esters were also prepared.

---

\* Herrn Prof. Dr. *E. Klenk* zum 70. Geburtstag gewidmet.

\*\* Arzneimittelforschung Ges. m. b. H., A-1120 Wien, Belghofergasse 8, Österreich.

Wir haben vor kurzem über die Substratspezifität der *Vibrio cholerae*-Neuraminidase und einer Influenzavirus-Neuraminidase berichtet<sup>1</sup>. Die Enzyme zeigen insofern eine ausgeprägte sterische Spezifität, als sie von Paaren  $\alpha$ ,  $\beta$ -anomerer Sialinsäure-ketoside jeweils die schwächer linksdrehenden und darum als  $\alpha$ -Ketoside bezeichneten Verbindungen spalten, während sie die stärker linksdrehenden  $\beta$ -Ketoside nicht angreifen<sup>1-3</sup>. Alle bisher synthetisierten Ketoside der N-Acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure<sup>4</sup> erwiesen sich als spaltbar; die Natur des  $\alpha$ -ketosidisch gebundenen Aglykons ist daher für die enzymatische Hydrolyse von untergeordneter Bedeutung. Synthetische Ketoside der N-Glykoly- $\alpha$ -D-neuraminsäure<sup>5</sup> wurden von den Neuraminidasen ebenfalls gespalten; allerdings war die Geschwindigkeit ihrer Hydrolyse durch das Enzym von Influenza-A-Virus (*Melbourne*) beträchtlich geringer als die der Hydrolyse der entsprechenden Ketoside der N-Acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure<sup>1</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluß, den die Natur des N-Acyl-Restes auf die Spaltbarkeit von N-Acyl-D-neuraminsäure- $\alpha$ -ketosiden ausübt, näher untersucht. Zu diesem Zwecke wurden die Benzyl- $\alpha$ -ketoside dreier in der Natur nicht vorkommender Sialinsäuren, der N-Propionyl-, der N-Butyryl- und der N-Benzoyl-D-neuraminsäure, synthetisiert und auf ihre enzymatische Spaltbarkeit geprüft. Von der N-Benzoyl-D-neuraminsäure wurden auch die beiden  $\alpha$ ,  $\beta$ -anomeren Methylketoside und deren Methylester dargestellt.

N-Propionyl-, N-Butyryl- und N-Benzoyl-D-neuraminsäure konnten nach dem Verfahren, das *Kuhn* und *Baschang*<sup>6</sup> für die Synthese der N-Acetyl-D-neuraminsäure beschrieben haben, hergestellt werden. N-Propionyl- und N-Butyryl-D-glucosamin wurden auf die von *Roseman* und *Ludowieg*<sup>7</sup> für N-Acetyl-D-glucosamin beschriebene Art, N-Benzoyl-D-glucosamin nach *Inouye*<sup>8</sup> dargestellt (**1 A bis 1 C**, Tab. 1) und nach bewährter Methode<sup>9</sup> zu den entsprechenden 4,6-O-Benzyliden-Derivaten (**2 A bis 2 C**, Tab. 2) umgesetzt. Aus diesen ließen sich durch Kondensation mit dem Kaliumsalz des Oxalessigsäure-di-*tert.*-butylesters und durch nachfolgende Hydrierung und Decarboxylierung die N-Acyl-D-neuraminsäure- $\gamma$ -lactone erhalten, bei deren alkalischer Verseifung die N-Acyl-D-neuraminsäuren (**3 A bis 3 C**, Tab. 3) entstanden.

Die optischen Drehwerte der N-Propionyl-, N-Butyryl- und N-Benzoyl-D-neuraminsäure weichen nur geringfügig von der optischen Drehung der

<sup>1</sup> P. Meindl und H. Tuppy, Mh. Chem. **97**, 990 (1966).

<sup>2</sup> P. Meindl und H. Tuppy, Mh. Chem. **96**, 816 (1965).

<sup>3</sup> R. Kuhn, P. Lutz und D. L. MacDonald, Chem. Ber. **99**, 611 (1966).

<sup>4</sup> P. Meindl und H. Tuppy, Mh. Chem. **96**, 802 (1965).

<sup>5</sup> P. Meindl und H. Tuppy, Mh. Chem. **97**, 654 (1966).

<sup>6</sup> R. Kuhn und G. Baschang, Ann. Chem. **659**, 156 (1962).

<sup>7</sup> S. Roseman und J. Ludowieg, J. Amer. Chem. Soc. **76**, 301 (1954).

<sup>8</sup> Y. Inouye, K. Onodera, S. Kitaoka und S. Hirano, J. Amer. Chem. Soc. **78**, 4722 (1956).

<sup>9</sup> W. Roth und W. Pigman, J. Amer. Chem. Soc. **82**, 4608 (1960).

Tabelle 1. 2-N-Acylamino-2-deoxy-D-glucopyranosen

| N-Acyl-Rest                 | Summenformel*                                    | Schmp., °C         | $[\alpha]_D^a$ (Wasser)/°C | Ausb. <sup>b</sup> , % |
|-----------------------------|--|--------------------|----------------------------|------------------------|
| 1A N-Propionyl <sup>c</sup> | C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> O <sub>6</sub> N  | 185—188<br>(Zers.) | +40° (c 5,0)/23            | 55                     |
| 1B N-Butyryl <sup>d</sup>   | C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub> N | 194—196<br>(Zers.) | +37° (c 5,0)/23            | 51                     |
| 1C N-Benzoyl <sup>e</sup>   | C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> O <sub>6</sub> N | 193—195<br>(Zers.) | +42° (c 2,4)/24            | 60                     |

<sup>a</sup> Die N-Acylamino-2-deoxy-D-glucopyranosen mutarotieren;  $[\alpha]_D$  ist die nach Gleichgewichtseinstellung gemessene spezif. Drehung.

<sup>b</sup> Ausb. bezogen auf Glucosaminhydrochlorid.

<sup>c</sup> vgl. R. Kuhn und F. Haber, Chem. Ber. **86**, 722 (1953).

<sup>d</sup> vgl. Lit.<sup>8</sup>

<sup>e</sup> vgl. Lit.<sup>9</sup>

\* Die C,H- und N-Analysenwerte stimmten mit den ber. Werten sehr gut überein.

Tabelle 2. 2-Acylamino-2-deoxy-4,6-O-benzyliden-D-glucopyranosen

| N-Acyl-Rest               | Summenformel*                                    | Schmp., °C                | $[\alpha]_D^a$ (Pyridin)/°C | Ausb. <sup>b</sup> , % |
|---------------------------|--|---------------------------|-----------------------------|------------------------|
| 2A N-Propionyl            | C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> O <sub>6</sub> N | 215—223<br>(langs. Zers.) | +44° (c 5,0)/22             | 82                     |
| 2B N-Butyryl              | C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> O <sub>6</sub> N | 227—236<br>(langs. Zers.) | +43° (c 4,05)/24            | 90                     |
| 2C N-Benzoyl <sup>c</sup> | C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> O <sub>6</sub> N | 211—216<br>(langs. Zers.) | +64° (c 5,0)/23             | 90                     |

<sup>a</sup> Die 2-Acylamino-2-deoxy-4,6-O-benzyliden-D-glucopyranosen mutarotieren;  $[\alpha]_D$  ist die nach Gleichgewichtseinstellung gemessene spezif. Drehung.

<sup>b</sup> Ausb. bezogen auf die als Ausgangsmaterial dienende 2-Acylamino-2-deoxy-D-glucopyranose.

<sup>c</sup> vgl. Lit.<sup>13</sup>

\* Die C,H- und N-Analysenwerte stimmten mit den ber. Werten sehr gut überein.

N-Acetyl-D-neuraminsäure ab. Das chromatographische Verhalten entspricht ebenfalls den Erwartungen; mit zunehmender Größe des N-Acylrestes ist eine Abnahme des hydrophilen Charakters der N-Acyl-D-neuraminsäuren und somit ein Anstieg der  $R_f$ -Werte verbunden (Tab. 3). Bei der Umsetzung mit Thiobarbitursäure nach Aminoff<sup>10</sup> und mit Resorcin nach Svennerholm<sup>11</sup> gaben die N-Acyl-D-neuraminsäuren die erwarteten Farbreaktionen; während jedoch die (auf gleiche molare Konzentrationen der N-Acyl-D-neuraminsäuren bezogenen) Färbungen bei der Thiobarbitursäure-Reaktion bei allen Verbindungen etwa gleich stark waren, nahm die Intensität der Farbreaktion mit

<sup>10</sup> D. Aminoff, Biochem. J. **81**, 384 (1961).

<sup>11</sup> L. Svennerholm, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] **24**, 604 (1957).

Resorcin von der N-Propionyl- über die N-Butyryl- zur N-Benzoyl-D-neuraminsäure stark ab (Tab. 10).

Bei der Synthese der N-Benzoyl-D-neuraminsäure (3 C) waren kleine Modifikationen der von *Kuhn* und *Baschang*<sup>6</sup> gegebenen Vorschrift angezeigt. So wurde auf die Abtrennung des bei der Kondensation nicht umgesetzten Oxalessigsäure-di-*tert.*-butylesters mit Äther verzichtet, da auch das N-Benzoyl-D-neuraminsäure- $\gamma$ -lacton etwas ätherlöslich ist. Das bei der Lactonspaltung entstehende, an Dowex 1-X 8 gebundene Material mußte wegen seiner geringen Wasserlöslichkeit vom Ionenaustauscher mit verd. Äthanol, das Ameisensäure in 1*n*-Konzentration enthielt, eluiert werden. Das beim Einengen des Eluates anfallende Rohkristallisat ließ sich durch fraktioniertes Umlösen aus Wasser in zwei Verbindungen auftrennen. Diese stehen zueinander — nach ihren übereinstimmenden Elementaranalysen zu schließen — im Verhältnis der Isomerie. Sie unterscheiden sich in ihren Löslichkeiten,  $R_f$ -Werten, Schmelzpunkten, spezifischen Drehungen und in ihrem reaktiven Verhalten.

Die leichter wasserlösliche und niedriger schmelzende Verbindung (Schmp. 192—194° [Zers.]), deren optische Drehung in wäßriger Lösung

Tabelle. 3. N-Acyl-D-neuraminsäuren

| N-Acyl-Rest     | Summenformel  | % C        | % H  | % N  | Schmp., °C         | $[\alpha]_D$ (Wasser)/°C | $R_{NA}$ <sup>a</sup> | Ausb. <sup>b</sup> , % |    |               |   |            |      |      |                    |       |            |      |    |            |      |      |                |  |            |      |      |                    |
|-----------------|---|------------|------|------|--------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------|----|---------------|---|------------|------|------|--------------------|-------|------------|------|----|------------|------|------|----------------|--|------------|------|------|--------------------|
| 3 A N-Propionyl | C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub> N  | Ber. 44,58 | 6,55 | 4,33 | 175—178<br>(Zers.) | — 38°                    | (c 5,0)/23            | 1,28                   | 20 |               |   |            |      |      |                    |       |            |      |    |            |      |      |                |  |            |      |      |                    |
|                 |   | Gef. 44,42 | 6,65 | 4,09 |                    |                          |                       |                        |    | 3 B N-Butyryl | C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> O <sub>9</sub> N<br>C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> O <sub>9</sub> N · ½ H <sub>2</sub> O | Ber. 46,30 | 6,87 | 4,15 | 165—168<br>(Zers.) | — 36° | (c 5,0)/23 | 1,75 | 26 | Ber. 45,09 | 6,99 | 4,04 | 3 C N-Benzoylc | C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub> N | Ber. 51,75 | 5,70 | 3,77 | 192—194<br>(Zers.) |
| 3 B N-Butyryl   | C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> O <sub>9</sub> N<br>C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> O <sub>9</sub> N · ½ H <sub>2</sub> O | Ber. 46,30 | 6,87 | 4,15 | 165—168<br>(Zers.) | — 36°                    | (c 5,0)/23            | 1,75                   | 26 |               |   |            |      |      |                    |       |            |      |    |            |      |      |                |  |            |      |      |                    |
|                 |   | Ber. 45,09 | 6,99 | 4,04 |                    |                          |                       |                        |    |               |   |            |      |      |                    |       |            |      |    |            |      |      |                |  |            |      |      |                    |
| 3 C N-Benzoylc  | C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub> N  | Ber. 51,75 | 5,70 | 3,77 | 192—194<br>(Zers.) | — 30°                    | (c 2,0)/26            | 2,08                   | 16 |               |   |            |      |      |                    |       |            |      |    |            |      |      |                |  |            |      |      |                    |
|                 |   | Gef. 51,63 | 5,72 | 3,99 |                    |                          |                       |                        |    |               |   |            |      |      |                    |       |            |      |    |            |      |      |                |  |            |      |      |                    |

<sup>a</sup> Papierchromatographie mit Essigester—Eisessig—Wasser (3 : 1 : 3).

<sup>b</sup> bezogen auf die entsprechende 2-Acylamino-2-deoxy-4,6-O-benzoyliden-D-glucopyranose.

<sup>c</sup> vgl. Lit.<sup>13</sup>

( $[\alpha]_D = -30^\circ$ ) sich nicht wesentlich von jener der N-Acetyl-, N-Propionyl- und N-Butyryl-D-neuraminsäure unterscheidet, ist die N-Benzoyl-D-neuraminsäure (3 C). Sie gibt nämlich, wie weiter unten näher erläutert werden wird, bei der säurekatalysierten Umsetzung mit Methanol ein Methyl- $\beta$ -ketosid, das mit dem aus Methoxyneuraminsäure<sup>12</sup> durch Benzoylierung erhaltenen N-Benzoyl-D-neuraminsäure- $\beta$ -methyl-ketosid in allen seinen Eigenschaften übereinstimmt. N-Benzoyl-D-neuraminsäure wurde vor kurzem auch von *Wesemann* und *Zilliken*<sup>13</sup> synthetisiert.

Das schwer wasserlösliche, höher schmelzende Isomere (Schmp. 211—216° [Zers.]), das sowohl mit Thiobarbitursäure<sup>10</sup> als auch mit Resorcin<sup>11</sup> eine kräftige Farbreaktion gab, zeigte (in Dimethylsulfoxid) eine spezifische Drehung von  $-65^\circ$  gegenüber einem  $[\alpha]_D$ -Wert von  $-26^\circ$  für die niedriger schmelzende N-Benzoyl-D-neuraminsäure; mit beiden Verbindungen konnte in Dimethylsulfoxid auch bei vier Wochen langer Beobachtung keine Mutarotation festgestellt werden. Da bei der Synthese von N-Acyl-D-neuraminsäuren nach *Kuhn* und *Baschang*<sup>6</sup> vier isomere N-Acyl-nonulosaminsäuren entstehen können, die sich hinsichtlich der Konfiguration an den Kohlenstoffatomen 4 und 5 voneinander unterscheiden, ist anzunehmen, daß für die Differenz zwischen dem isolierten höher schmelzenden Isomeren der N-Benzoyl-D-neuraminsäure und dieser selbst eine verschiedene Konfiguration am C-Atom 4 oder 5 verantwortlich ist.

Die N-Acyl-D-neuraminsäuren wurden zur Darstellung ihrer Benzyl- $\alpha$ -ketoside zunächst mittels Essigsäureanhydrid und Pyridin acetyliert, wobei die 2,4,7,8,9-Penta-O-acetyl-derivate (4 A—4 C, Tab. 4) in analysen-

Tabelle 4. 2,4,7,8,9-Penta-O-acetyl-N-acyl-D-neuraminsäuren

| N-Acyl-Rest    | Summenformel                         | % C        | % H  | % N  | $R_{NA}$ <sup>a</sup> | Ausb. <sup>b</sup> , % |
|----------------|--------------------------------------|------------|------|------|-----------------------|------------------------|
| 4A N-Propionyl | $C_{22}H_{31}O_{14}N$                | Ber. 49,53 | 5,86 | 2,63 | 2,95                  | 62                     |
|                | $C_{22}H_{31}O_{14}N \cdot 1/2 H_2O$ | Ber. 48,71 | 5,95 | 2,58 |                       |                        |
|                |                                      | Gef. 48,86 | 6,05 | 2,46 |                       |                        |
| 4B N-Butyryl   | $C_{23}H_{33}O_{14}N$                | Ber. 50,45 | 6,08 | 2,56 | 3,30                  | 55                     |
|                | $C_{23}H_{33}O_{14}N \cdot 1/2 H_2O$ | Ber. 49,64 | 6,16 | 2,52 |                       |                        |
|                |                                      | Gef. 49,66 | 6,30 | 2,54 |                       |                        |
| 4C N-Benzoyl   | $C_{26}H_{31}O_{14}N$                | Ber. 53,70 | 5,37 | 2,41 | 3,35                  | 61                     |
|                | $C_{26}H_{31}O_{14}N \cdot H_2O$     | Ber. 52,09 | 5,55 | 2,34 |                       |                        |
|                |                                      | Gef. 52,18 | 5,86 | 2,49 |                       |                        |

<sup>a</sup> Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G mit *n*-Butanol—*n*-Propanol—0,1*n*-HCl (1 : 2 : 1).

<sup>b</sup> bezogen auf N-Acyl-D-neuraminsäure.

<sup>12</sup> *E. Klenk*, Z. physiol. Chem. **268**, 50 (1941).

<sup>13</sup> *W. Wesemann* und *F. Zilliken*, Ann. Chem. **695**, 209 (1966).

reiner Form, wenn auch nicht kristallisiert, erhalten wurden. Diese konnten, in Eisessig und Essigsäureanhydrid gelöst, mit trockenem Chlorwasserstoff zu den entsprechenden Acetochlorverbindungen (5A—5C, Tab. 5) umgesetzt werden; die 2-Chlor-2-deoxy-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-

Tabelle 5. 2-Chlor-2-deoxy-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-acyl-D-neuraminsäuren

| N-Acyl-Rest    | Summenformel  | % Cl*                  | Schmp., °C         | $R_{NA}$ <sup>a</sup> | Ausb. <sup>b</sup> , % |
|----------------|---|------------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|
| 5A N-Propionyl | C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>12</sub> NCl | Ber. 6,95<br>Gef. 7,11 | —                  | 3,35                  | 77                     |
| 5B N-Butyryl   | C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>12</sub> NCl | Ber. 6,77<br>Gef. 6,06 | —                  | 3,60                  | 49                     |
| 5C N-Benzoyl   | C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>12</sub> NCl | Ber. 6,36<br>Gef. 6,17 | 132—134<br>(Zers.) | 3,80                  | 55                     |

<sup>a</sup> Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G mit *n*-Butanol—*n*-Propanol—0,1*n* HCl (1:2:1).

<sup>b</sup> bezogen auf die entsprechende 2,4,7,8,9-Penta-O-acetyl-N-acyl-D-neuraminsäure.

\* Die C,H- und N-Analysenwerte stimmten mit den ber. Werten sehr gut überein.

N-benzoyl-D-neuraminsäure (5C) kristallisierte. Die Acetochlorverbindungen der N-Propionyl-, N-Butyryl- und N-Benzoyl-D-neuraminsäure wurden sodann mit überschüssigem wasserfreiem Benzylalkohol, der zugleich als Lösungsmittel diente, in Gegenwart von Silbercarbonat zu den 4,7,8,9-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -benzylketosiden (6A—6C, Tab. 6) umgesetzt; diese gingen bei milder alkalischer Hydrolyse in die gut kristalli-

Tabelle 6. Benzyl- $\alpha$ -Ketoside der 4,7,8,9-Tetra-O-acetyl-N-acyl-D-neuraminsäuren

| N-Acyl-Rest     | Summenformel*   | Schmp., °C         | $[\alpha]_D$ (Essigsre.)/°C | $R_{NA}$ <sup>a</sup> | Ausb., %        |
|-----------------|---|--------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------|
| 6A N-Propionyl  | C <sub>27</sub> H <sub>35</sub> O <sub>13</sub> N                     | 199—201<br>(Zers.) | —17° (c 2,5)/24             | 4,40                  | 56 <sup>b</sup> |
| 6B N-Butyryl    | C <sub>28</sub> H <sub>37</sub> O <sub>13</sub> N                     | 182—183<br>(Zers.) | —15° (c 2,5)/25             | 4,61                  | 56 <sup>b</sup> |
| 6C-K1 N-Benzoyl | C <sub>31</sub> H <sub>35</sub> O <sub>13</sub> N                     | 170—171<br>(Zers.) | — 9° (c 5,0)/23             | 5,40                  | 82 <sup>c</sup> |
| 6C-K2 N-Benzoyl | C <sub>31</sub> H <sub>35</sub> O <sub>13</sub> N · 1H <sub>2</sub> O | 120—127            |                             |                       |                 |

<sup>a</sup> Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G mit *n*-Butanol—*n*-Propanol—0,1*n*HCl (1:2:1).

<sup>b</sup> bezogen auf die Acetochlorverbindung, aus der das Ketosid durch Umsetzung mit Benzylalkohol in Gegenwart von Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dargestellt worden ist.

<sup>c</sup> bezogen auf 7C, durch dessen Umsetzung mit Acetanhydrid und Pyridin 6C erhalten wurde.

\* Die C,H- und N-Analysenwerte stimmten mit den ber. Werten sehr gut überein.

sierenden Benzyl- $\alpha$ -ketoside der N-Propionyl-, N-Butyryl- und N-Benzoyl-D-neuraminsäure (7 A—7 C, Tab. 7) über. Das  $\alpha$ -Benzylketosid der 4,7,8,9-Tetra-O-acetyl-N-benzoyl-D-neuraminsäure (6 C), das bei der Reaktion von 5 C mit Benzylalkohol als Sirup angefallen war, konnte durch Acetylierung der 2-Benzyl-N-benzoyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (7 C) mit Essigsäureanhydrid in Pyridin kristallisiert erhalten werden. Je nach den Bedingungen der Kristallisation trat 6 C in verschiedener Form auf: während beim Umlösen aus heißem Aceton—Wasser die wasserfreie Verbindung isoliert wurde (6 C-K 1, Schmp. 170—171° [Zers.]), fiel beim langsamen Kristallisieren aus demselben Lösungsmittelgemisch bei Zimmertemperatur ein Monohydrat an (6 C-K 2, Schmp. 120—127°); wie zu erwarten war, stimmten die wasserfreie und die hydratwasserhaltige Form im Bezug auf ihr spezifisches Drehvermögen und ihr chromatographisches Verhalten miteinander überein.

Tabelle 7. Benzyl- $\alpha$ -Ketoside der N-Acyl-D-neuraminsäuren

| N-Acyl-Rest  | Summenformel                                     | % C Ber. (Gef.)  | % H Ber. (Gef.) | Schmp., °C                | $[\alpha]_D$ (Konz.)/°C      | $R_{NA}$ <sup>a</sup> | Ausb., %        |
|--------------|--|------------------|-----------------|---------------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------|
| 7A Propionyl | C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> O <sub>9</sub> N | 55,20<br>(55,10) | 6,58<br>(6,67)  | 162—163<br>(Zers.)        | —16° (1,25) <sup>b</sup> /23 | 3,70                  | 82 <sup>d</sup> |
| 7B Butyryl   | C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> O <sub>9</sub> N | 56,20<br>(55,90) | 6,84<br>(6,77)  | 163—164<br>(Zers.)        | —19° (1,25) <sup>b</sup> /23 | 4,06                  | 76 <sup>d</sup> |
| 7C Benzoyl   | C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> O <sub>9</sub> N | 59,86<br>(59,59) | 5,90<br>(5,92)  | 190—199<br>(langs. Zers.) | —19° (2,4) <sup>c</sup> /22  | 4,40                  | 40 <sup>e</sup> |

<sup>a</sup> Papierchromatographie mit Äthylacetat—Eisessig—Wasser (3 : 1 : 3).

<sup>b</sup> In Wasser.

<sup>c</sup> In Dimethylsulfoxid.

<sup>d</sup> bezogen auf 6A bzw. 6B, durch deren alkalische Verseifung das Ketosid erhalten worden ist.

<sup>e</sup> bezogen auf 5C, aus dem das Ketosid durch Umsetzung mit Benzylalkohol in Gegenwart von Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und anschließende Verseifung dargestellt worden ist.

Von der N-Benzoyl-D-neuraminsäure (3 C) wurden auch die  $\alpha$ ,  $\beta$ -anomeren Methylketoside sowie deren Methylester dargestellt (Tab. 8). Das Methyl- $\alpha$ -ketosid (8 C  $\alpha$ ) war nach der Methode von Koenigs und Knorr<sup>14</sup> durch Umsetzung der 2-Chlor-2-deoxy-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-benzoyl-D-neuraminsäure (5 C) mit Methanol und durch alkalische Verseifung des dabei entstandenen Peracetylderivates, das aus Aceton—Wasser bei Zimmertemperatur als Monohydrat kristallisierte, zugänglich. Aus dem Ketosid 8 C  $\alpha$  erhielt man mit Diazomethan den 2-Methyl-N-benzoyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure-methylester (8 C  $\alpha$ -Me). Der anomere 2-Methyl-N-

<sup>14</sup> W. Koenigs und E. Knorr, Ber. deutsch. Chem. Ges. **34**, 957 (1901).

Tabelle 8. Die anomeren N-Benzoyl-D-neuraminsäure-methylketoside und deren Methyltester

| Ketosid  | Summenformel  | % C   | % H  | % N  | Schmp.,<br>°C                                | $[\alpha]_D$ (Wasser)/°C | $R_{NA}^a$ | Ausb.<br>%                        |
|--|---|-------|------|------|--|--------------------------|------------|-----------------------------------|
| <b>8C<math>\alpha</math></b> Methyl- $\alpha$ -ketosid                     | Ber. $C_{17}H_{23}O_9N$                                   | 52,98 | 6,02 | 3,63 | 179—185                                      | — 3°                     | 3,21       | 58 <sup>b</sup>                   |
|  | Ber. $C_{17}H_{23}O_9N \cdot$<br>$\cdot \frac{1}{2} H_2O$ | 51,77 | 6,14 | 3,55 |  |                          |            |                                   |
|  | Gef. $C_{17}H_{23}O_9N \cdot$<br>$\cdot \frac{1}{2} H_2O$ | 52,03 | 6,51 | 3,55 |  |                          |            |                                   |
| <b>8C<math>\beta</math></b> Methyl- $\beta$ -ketosid                       | Ber. $C_{17}H_{23}O_9N$                                   | 52,98 | 6,02 | 3,63 | 145—146                                      | — 42°                    | 2,77       | 61 <sup>c</sup>                   |
|  | Ber. $C_{17}H_{23}O_9N \cdot$<br>$\cdot \frac{1}{2} H_2O$ | 51,77 | 6,14 | 3,55 |  |                          |            |                                   |
|  | Gef. $C_{17}H_{23}O_9N \cdot$<br>$\cdot \frac{1}{2} H_2O$ | 51,48 | 6,26 | 3,48 |  |                          |            |                                   |
| <b>8C<math>\alpha</math>-Me</b> Methyl- $\alpha$ -ketosid-<br>methyltester | Ber. $C_{18}H_{25}O_9N$                                   | 54,13 | 6,31 | 3,51 | 174—175                                      | — 10°                    | 4,60       | 49 <sup>d</sup>                   |
|  | Ber. $C_{18}H_{25}O_9N \cdot$<br>$\cdot H_2O$             | 51,80 | 6,52 | 3,36 |  |                          |            |                                   |
|  | Gef. $C_{18}H_{25}O_9N \cdot$<br>$\cdot H_2O$             | 51,94 | 6,59 | 3,45 |  |                          |            |                                   |
| <b>8C<math>\beta</math>-Me</b> Methyl- $\beta$ -ketosid-<br>methyltester   | Ber. $C_{18}H_{25}O_9N$                                   | 54,13 | 6,31 | 3,51 | 213—215°<br>(nach<br>Umwandlung<br>bei 125°) | — 33°                    | 4,48       | 38 <sup>e</sup> , 27 <sup>b</sup> |
|  | Ber. $C_{18}H_{25}O_9N \cdot$<br>$\cdot 1 H_2O$           | 51,80 | 6,52 | 3,36 |  |                          |            |                                   |
|  | Gef. $C_{18}H_{25}O_9N \cdot$<br>$\cdot 1 H_2O$           | 52,02 | 6,48 | 3,52 |  |                          |            |                                   |

<sup>a</sup> Papierchromatographie mit Äthylacetat—Eisessig—Wasser (3:1:3).

<sup>b</sup> bezogen auf 2-Methyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-benzoyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure, aus der 8C $\alpha$  durch alkal. Verseifung erhalten worden ist.

<sup>c</sup> bezogen auf 8C $\beta$ -Me, durch dessen Umsetzungen mit  $CH_2N_2$  erhalten worden ist.

<sup>d</sup> bezogen auf 8C $\alpha$ , durch dessen Umsetzung mit  $CH_2N_2$  der Methyltester (8C $\alpha$ -Me) dargestellt worden ist.

<sup>e</sup> bezogen auf 3C, durch dessen Umsetzung mit 1-proz. methylalkohol. HCl der Ketosid-Methyltester (8C $\beta$ -Me) dargestellt worden ist.

<sup>f</sup> bezogen auf Methoxynuraminsäure, aus der 8C $\beta$ -Me durch Veresterung mit  $CH_3N$ , und N-Benzoylierung dargestellt worden ist.



benzoyl- $\beta$ -D-neuraminsäure-methylester (**8 C  $\beta$ -Me**) bildete sich beim vielstündigen Erhitzen der N-Benzoyl-D-neuraminsäure (**3 C**) mit 1proz. methanol. HCl; er ging bei milder alkalischer Verseifung in das  $\beta$ -Methylketosid der N-Benzoyl-D-neuraminsäure (**8 C  $\beta$** ) über.

Tabelle 9. Spaltung der Benzyl- $\alpha$ -Ketoside von N-Acyl-D-neuraminsäuren durch *V. cholerae*-Neuraminidase und Influenza-A-Virus

| Substrate<br>Benzyl- $\alpha$ -Ketoside<br>von: | $\mu$ Mole N-Acyl-D-neuraminsäure,<br>freigesetzt durch |   |
|---|---|---|
|   | <i>V. cholerae</i> -<br>Neuraminidase <sup>a</sup>      | Influenza-A-Virus,<br>Stamm <i>Melbourne</i> <sup>b</sup> |
| N-Acetyl-D-neuraminsäure                        | 0,087   | 0,220   |
| N-Glycolyl-D-neuraminsäure                      | 0,057   | 0,049   |
| N-Propionyl-D-neuraminsäure                     | 0,019   | 0,023   |

<sup>a</sup> Anzahl der  $\mu$ Mole N-Acyl-D-neuraminsäure, die während 1 Stde. bei 37° und pH 6,4 aus 1 ml einer Inkubationslösung, welche 1  $\mu$ Mol Ketosid und 0,30 ml Enzym enthielt, freigesetzt worden sind.

<sup>b</sup> Anzahl der  $\mu$ Mole N-Acyl-D-neuraminsäure, die während 1 Stde. bei 37° und pH 6,5 aus 1 ml einer Inkubationslösung, welche 1  $\mu$ Mol Ketosid und 0,05 ml Virus-Suspension enthielt, freigesetzt worden sind.

Tabelle 10. Extinktionskoeffizienten der in der Resorcin- und Thiobarbitursäure-Reaktion mit den synthetischen N-Acyl-D-neuraminsäuren gebildeten Färbungen

| N-Acyl-D-neuraminsäure                | Thiobarbitursäure-Reaktion<br>$\epsilon_{\text{mol}}^a$ (546 m $\mu$ ) | Resorcin-Reaktion<br>$\epsilon_{\text{mol}}^a$ (578 m $\mu$ ) |
|---------------------------------------|--|---|
| <b>3A</b> N-Propionyl-D-neuraminsäure | 66 500   | 7 900   |
| <b>3B</b> N-Butyryl-D-neuraminsäure   | 57 900   | 5 000   |
| <b>3C</b> N-Benzoyl-D-neuraminsäure   | 61 900   | 3 340   |

<sup>a</sup> Quotient aus der Extinktion der Färbung und der Molarität der zur Reaktion gebrachten N-Acyl-D-neuraminsäure. Die Messungen erfolgten mit einem Photometer Eppendorf.

2-Methyl-N-benzoyl- $\beta$ -D-neuraminsäure (**8 C  $\beta$** ) und ihr Methylester (**8 C  $\beta$ -Me**) ließen sich auch aus Methoxyneuraminsäure darstellen. Wenn Methoxyneuraminsäure<sup>12</sup> mit Diazomethan verestert und mit Benzoesäureanhydrid N-benzoyliert wurde, entstand **8 C  $\beta$ -Me**, dessen alkalische Verseifung **8 C  $\beta$**  lieferte. Die aus Methoxyneuraminsäure erhaltenen Präparate von **8 C  $\beta$**  und **8 C  $\beta$ -Me** stimmten in jeder Hinsicht mit den entsprechenden aus N-Benzoyl-D-neuraminsäure gewonnenen Präparaten überein und gaben, miteinander gemischt, auch keine Schmelzpunktdepression. Eine „N-Benzoyl-methoxyneuraminsäure“, die von *Paerels* und *Schut*<sup>15</sup> durch direkte N-Benzoylierung der Methoxyneuraminsäure

<sup>15</sup> G. B. Paerels und J. Schut, *Biochem. J.* **96**, 787 (1965).

dargestellt worden, jedoch weder durch eine Elementaranalyse noch durch Schmelzpunkt, spezifische Drehung und chromatographische Daten charakterisiert worden ist, dürfte mit der 2-Methyl-N-benzoyl- $\beta$ -D-neuraminsäure (8 C  $\beta$ ) identisch sein.

Die  $\alpha$ ,  $\beta$ -anomeren N-Benzoyl-D-neuraminsäure-methylketoside und deren Methylester zeigen (Tab. 8) die gleichen Unterschiede der optischen Drehung, die wir bereits früher<sup>2</sup> bei den n-Amyl- und n-Hexylketosiden und Kuhn<sup>3</sup> bei den Methylketosiden der N-Acetyl-

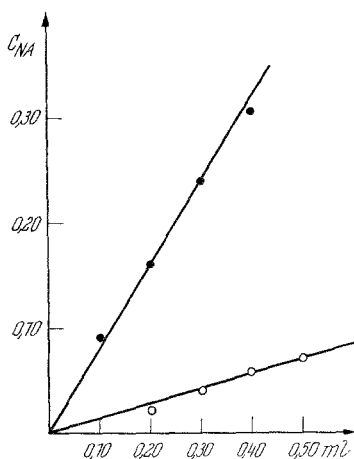


Abb. 1

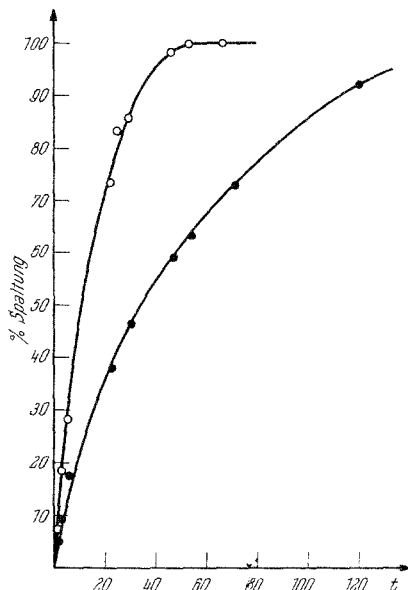


Abb. 2

Abb. 1. Spaltung des Benzyl- $\alpha$ -Ketosides der N-Propionyl-D-neuraminsäure durch *V. cholerae*-Neuraminidase (—○—○—○—○—) und durch Influenza-A-Virus, Stamm *Melbourne* (—●—●—●—●—), in Abhängigkeit von der Enzym- bzw. Virus-Menge. Jeder Ansatz enthielt in 1 ml 1  $\mu$ Mol Benzyl- $\alpha$ -Ketosid und ein variables Volumen (0,10 bis 0,50 ml) Enzymlösung bzw. Virussuspension. Es wurde 2 Stdn. bei pH 6,4 bzw. pH 6,5 und 37° inkubiert.  $c_{NA}$ :  $\mu$ Mole/ml enzymatisch freigesetzter N-Propionyl-D-neuraminsäure

Abb. 2. Spaltung des Benzyl- $\alpha$ -Ketosides der N-Propionyl-D-neuraminsäure durch *V. cholerae*-Neuraminidase (—○—○—○—○—) und durch Influenza-A-Virus, Stamm *Melbourne* (—●—●—●—●—), in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Die Ansätze enthielten in 1 ml 0,30  $\mu$ Mol Benzyl- $\alpha$ -Ketosid, 0,60 ml Enzymlösung bzw. 0,10 ml Virussuspension und wurden bei pH 6,4 bzw. pH 6,5 und 37° inkubiert.

D-neuraminsäure festgestellt haben. Nach dem Glykosidierungsverfahren von *Koenigs* und *Knorr*<sup>14</sup> werden die weniger stark linksdrehenden und darum als  $\alpha$ -Ketoside bezeichneten Verbindungen erhalten, während sich bei der säurekatalysierten Umsetzung der N-Acyl-D-neuraminsäuren mit Alkoholen die anomeren  $\beta$ -Ketoside bilden.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ketoside der N-Propionyl-, N-Butyryl- und N-Benzoyl-D-neuraminsäure haben eine gut titrierbare Carboxylgruppe. Unter den stark sauren Bedingungen des Resorcinrestes nach *Svennerholm*<sup>11</sup> reagieren sie kräftig positiv; die Färbung, die sie bei

der Reaktion mit Thiobarbitursäure nach *Aminoff*<sup>10</sup> geben, ist hingegen etwa 30mal schwächer als jene, die bei der Umsetzung äquivalenter Mengen der entsprechenden nichtglykosidierten N-Acyl-D-neuraminsäuren entsteht. In der Reihe der Benzylketoside nehmen die bei der Papier- und Dünnschichtchromatographie beobachteten  $R_f$ -Werte vom N-Propionyl- über das N-Butyryl- zum N-Benzoyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure-Derivat beträchtlich zu. Ein Vergleich der  $R_f$ -Werte der anomeren Methylketoside der N-Benzoyl-D-neuraminsäure sowie ihrer Methylester zeigt, daß die  $\alpha$ -Verbindungen stets schneller als ihre  $\beta$ -Anomeren wandern.

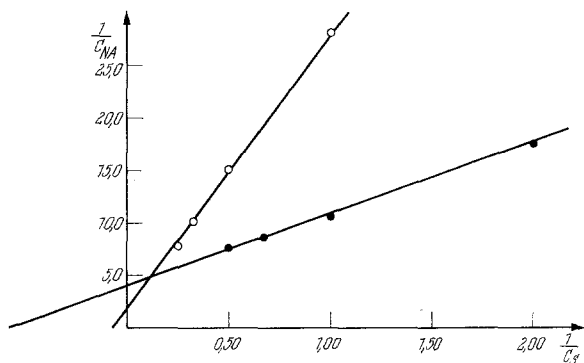


Abb. 3. Spaltung des Benzyl- $\alpha$ -ketosides der N-Propionyl-D-neuraminsäure durch *V. cholerae*, Neuraminidase (—○—○—○—) und durch Influenza-A-Virus, Stamm *Melbourne* (—●—●—●—) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration  $c_s$ . Jeder Ansatz enthielt in 1 ml 0,20 ml Enzymlösung bzw. 0,10 ml Virussuspension. Es wurde 3 Stdn. bzw. 2 Stdn. bei 37° und pH 6,4 bzw. pH 6,5 inkubiert.  $c_s$ :  $\mu$ Mole/ml Benzyl- $\alpha$ -ketosid;  $c_{NA}$ :  $\mu$ Mole/ml enzymatisch freigesetzter N-Propionyl-D-neuraminsäure

Bei der Untersuchung der Spaltbarkeit der  $\alpha$ -Ketoside der N-Propionyl-, N-Butyryl- und N-Benzoyl-D-neuraminsäure durch *V. cholerae*-Neuraminidase und Influenza-A-Virus, Stamm *Melbourne*, ergab sich, daß nur das Benzylketosid der N-Propionyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure hydrolysiert wurde, während das Benzylketosid der N-Butyryl- sowie das Methyl- und das Benzylketosid der N-Benzoyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure auch nach 20stdg. Einwirkung der Enzyme keine meßbare Spaltung zeigten. Die Geschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse des N-Propionyl- $\alpha$ -D-neuraminsäurebenzylketosides war gering. Es wurde von der bakteriellen Neuraminidase und vom Influenzavirus 5- bzw. 10mal langsamer als N-Acetyl- und 3- bzw. 2mal langsamer als N-Glykoly- $\alpha$ -D-neuraminsäurebenzylketosid gespalten (Tab. 9); diese Versuche wurden bei einer Substratkonzentration von  $10^{-3}$  m vorgenommen, bei der die Hydrolysegeschwindigkeit der Menge der eingesetzten Enzyme proportional war (Abb. 1). Bei genügend langer Einwirkung der Enzyme wurde das N-Propionyl- $\alpha$ -D-neuraminsäurebenzylketosid quantitativ in N-Propionyl-D-neuraminsäure und Benzylalkohol gespalten (Abb. 2). Die Abhängigkeit der Hydrolyse-

geschwindigkeit von der Substratkonzentration entsprach der *Michaelis—Mentenschen* Kinetik (Abb. 3); mit dem Benzylketosid der N-Propionyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure als Substrat betrug die *Michaeliskonstante* ( $K_M$ ), nach *Lineweaver* und *Burk*<sup>16</sup> graphisch ermittelt, für *V. cholerae*-Neuraminidase  $1,3 \times 10^{-2} m$  und für Influenza-A-Virus, Stamm *Melbourne*,  $1,7 \times 10^{-3} m$ ; mit dem Benzylketosid der N-Acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure als Substrat sind unter den gleichen Bedingungen niedrigere  $K_M$ -Werte,  $4 \times 10^{-3} m$  bzw.  $1 \times 10^{-3} m$  bestimmt worden<sup>1</sup>.

Aus den enzymatischen Untersuchungen geht demnach hervor, daß die Affinität der Neuraminidasen für  $\alpha$ -Ketoside der Sialinsäuren von deren N-Acylrest stark abhängig ist und von N-Acetyl über N-Glykoyl zu N-Propionyl abnimmt; die Abnahme ist bei Influenza-A-Virus, Stamm *Melbourne*, größer als bei der *V. cholerae*-Neuraminidase, deren Substratspezifität offenbar geringer ist. Von beiden Enzymen werden Sialinsäure- $\alpha$ -ketoside mit N-Butyryl- oder N-Benzoylresten, die noch sperriger als N-Glykoyl- und N-Propionylreste sind, nicht mehr gespalten.

Herrn Dr. *H. G. Pereira*, World Influenza Center, London, sind wir für die Überlassung, Herrn Dr. *G. Bodo*, Arzneimittelforschung Ges. m. b.H., Wien, für die Vermehrung und Reinigung von Influenza-A-Virus, Stamm *Melbourne*, aufrichtig verbunden. Frau *A. Edelmann* danken wir für die Ausführung der enzymatischen Versuche, Herrn *H. Mahr* für seine ausgezeichnete Mitarbeit bei der Herstellung der Substrate.

### Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Heitztischmikroskop nach *Kofler* bestimmt.

Die Elementaranalysen wurden von Herrn Dr. *J. Zak*, Univ. Wien, ausgeführt; die in dieser Arbeit angegebenen Werte sind jeweils das Mittel aus den Ergebnissen einer Doppelbestimmung.

Die optischen Drehungen wurden mit einem *Zeiss*-Kreispolariometer  $0,01^\circ$  und einem lichtelektrischen *Perkin-Elmer*-Polarimeter in 1 dm-Röhren gemessen.

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel G nach *Stahl* und als Laufmittel *n*-Butanol—*n*-Propanol—0,1 *n*-HCl (1:2:1, *v/v/v*), für die Papierchromatographie *Schleicher & Schüll*-Papier 2043 a und als Laufmittel Äthylacetat—Eisessig—Wasser (3:1:3, *v/v/v*, absteigend) verwendet. Um die Sialinsäurederivate sichtbar zu machen, wurden die Dünnschichtchromatogramme mit konz.  $H_2SO_4$ -Wasser (1:1, *v/v*) besprüht und erhitzt<sup>17</sup>, die Papierchromatogramme mit Natriummetaperjodat und Benzidin<sup>18</sup> behandelt. Als  $R_{NA}$  be-

<sup>16</sup> *H. Lineweaver* und *D. Burk*, J. Amer. Chem. Soc. **56**, 658 (1934).

<sup>17</sup> *K. Randerath*, Dünnschichtchromatographie, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 1962.

<sup>18</sup> Anfärbereagentien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie, *E. Merck A.G.*, Darmstadt, 5 (Reagens Nr. 22).

zeichnen wir die auf den  $R_f$ -Wert der N-Acetyl-D-neuraminsäure (= 1,00) bezogenen relativen  $R_f$ -Werte der Neuraminsäurederivate.

#### 2-Propionylamino-2-deoxy-D-glucopyranose (1 A)

Eine Lösung von 64,8 g (0,30 Mole) D-Glucosamin-hydrochlorid in 1500 ml Wasser und 150 ml Methanol wurde unter Rühren bei 0 bis 5° mit 1200 ml Dowex 1-X 8 (CO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Form, 0,86 Äqu.) versetzt. Nach Zugabe von 54 g (0,41 Mole) Propionsäureanhydrid wurde 90 Min. weitergerührt. Sodann wurde das Austauscherharz abgesaugt und mit Wasser gründlich ausgewaschen. Das Filtrat und das Waschwasser wurden vereinigt und durch eine mit 200 ml Amberlite IR-120-H<sup>+</sup> beschickte Chromatographiesäule filtriert.

Das Eluat wurde kurz auf 80—90° erwärmt und sodann bei 45° i. Vak. eingedampft. Der sirupöse Eindampfrückstand wurde in 200 ml 96proz. Äthanol bei 50° gelöst und diese Lösung mit Äther bis zur Trübung versetzt. Es kristallisierten 38,6 g 1 A, Schmp. 185—188° [Zers.] (vgl. Tab. 1). Aus den Mutterlaugen konnten noch zwei weitere Kristallisate, 16,3 g (Schmp. 176 bis 187° [Zers.]) und 4,85 g (Schmp. 175—186° [Zers.]) gewonnen werden.

2-Butyrylamino-2-deoxy-D-glucopyranose (1 B) wurde analog 1 A aus Glucosamin-hydrochlorid und Buttersäureanhydrid, 2-Benzoylamino-2-deoxy-D-glucopyranose (1 C) nach Inouye<sup>8</sup> hergestellt (vgl. Tab. 1).

#### 2-Propionylamino-2-deoxy-4,6-O-benzyliden-D-glucopyranose (2 A)

60,7 g (0,26 Mole) 1 A, 210 ml (2,05 Mole) Benzaldehyd und 38 g (0,28 Mole) ZnCl<sub>2</sub> wurden 14 Stdn. bei Zimmertemp. geschüttelt. Das Gemisch erwärmte sich und erstarrte allmählich zu einer festen Masse. Nach beendeter Reaktion wurde das Kristallisat 3mal mit je 250 ml Petroläther (PÄ, 40—60°) und 2mal mit je 250 ml Wasser ausgewaschen. Wir erhielten 80 g eines von Benzaldehyd und ZnCl<sub>2</sub> befreiten Rohproduktes, das in 1800 ml Äthanol und 600 ml Wasser heiß gelöst wurde. Nun wurde filtriert und das klare Filtrat mit 7,5 l heißem Wasser versetzt. 2 A kristallisierte in farblosen Nadeln, die nach dem Absaugen, Waschen und Trocknen 64,2 g wogen. Schmp. 215—223° [langsame Zers.]. Aus der Mutterlauge konnten weitere 4,0 g vom Schmp. 205—223° [Zers.] isoliert werden (vgl. Tab. 2).

Auf analoge Art wie 2 A wurden 2-Butyrylamino-2-deoxy-4,6-O-benzyliden-D-glucopyranose (2 B) und 2-Benzoylamino-2-deoxy-4,6-O-benzyliden-D-glucopyranose (2 C) dargestellt (vgl. Tab. 2).

#### N-Propionyl-D-neuraminsäure (3 A)

5,0 g 2 A und 5,0 g Kaliumsalz des Di-tert.-butyl-oxalessigesters<sup>6, 19-21</sup> wurden in 62 ml wasserfr. Dioxan und 62 ml absol. Methanol bei 20° geschüttelt. Nach 4 Tagen war alles gelöst. Man ließ noch 3 Tage bei 20° stehen und stellte dann die Lösung mit Amberlite IR-120-H<sup>+</sup> (etwa 15 ml, mit absol. Methanol gewaschen) auf pH 6. Der Austauscher wurde abgesaugt und mit Methanol gewaschen, Filtrat und Waschflüssigkeit vereinigt und i. Vak. bei 30° zu einem Sirup eingedampft. Dieser wurde in 25 ml Methanol aufgenom-

<sup>19</sup> R. H. Baker und F. G. Bordwell in: Org. Syntheses, Coll. Vol. III, 141.

<sup>20</sup> H. Staudinger, Ber. dtsh. Chem. Ges. **41**, 3558 (1908).

<sup>21</sup> H. J. Backer und J. D. H. Homan, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas **58**, 1048 (1939).

men und 2 Tage bei  $+4^\circ$  aufbewahrt. Ein Kristallinat, 0,35 g **2 A**, wurde abgetrennt und die nunmehr klare Lösung zur Entfernung der restlichen  $K^+$ -Ionen nochmals mit Amberlite IR-120- $H^+$  (45 ml) behandelt. Die Eluate, die eine positive Resorcin-Reaktion<sup>11</sup> gaben, wurden gesammelt (etwa 400 ml) und i. Vak. bei  $30^\circ$  auf 80 ml eingengt. Dann wurde (bei  $20^\circ$ ) nach Zusatz von Wasser (2,5 ml) mit Pd (aus 0,5 g Palladiumoxid) hydriert. Nach 6 Stdn. war die Wasserstoffaufnahme, 387 ml (unter Normalbedingungen), beendet. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde i. Vak. bei  $30^\circ$  eingedampft und der Rückstand in 80 ml Wasser aufgenommen. Die wäßrige Phase wurde 3mal mit Äther, die Ätherextrakte einmal mit Wasser ausgeschüttelt. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden sodann am siedenden Wasserbad erwärmt und nach beendeter Gasentwicklung (etwa 20 Min.) mit etwas Aktivkohle versetzt. Man ließ 1 Stde. bei Zimmertemp. stehen und filtrierte dann durch eine Schicht aus Hyflo-Superpel. Die rosa gefärbte Lösung wurde mit 2 *n*-NaOH auf pH 9 gestellt und im Eisschrank bei  $+4^\circ$  24 Stdn. aufbewahrt. Der Alkaliverbrauch (Verseifung der gebildeten Lactone) wurde durch regelmäßige Zugabe von 2 *n*-NaOH kompensiert. Nach beendeter Lacton-Spaltung wurde die Lösung zuerst mit 20 ml Dowex 50-X 8 ( $H^+$ -Form) behandelt und dann auf eine mit Dowex 1-X 8 (Formiat-Form; 150 ml) beschickte Säule aufgebracht. Man wusch mit 3000 ml Wasser nach und eluierte **3 A** mit 0,4 *n*-Ameisensäure. Die mit Resorcin positiv reagierenden Fraktionen (Fraktionen Nr. 25—50; 20 ml Eluat pro Fraktion) wurden vereinigt und i. Vak. bei  $30^\circ$  eingedampft. Der rot gefärbte Rückstand (1,75 g) wurde in wenig Wasser gelöst und durch eine 3,5 cm hohe Schicht aus Aktivkohle und Hyflo-Supereel (5:3, g/g) filtriert. Der nun farblose Eindampfrest (1,70 g) wurde in Wasser (2 ml) gelöst und durch Zugabe von Eisessig (35 ml) zur Kristallisation gebracht. Wir erhielten 1,00 g **3 A** (vgl. Tab. 3).

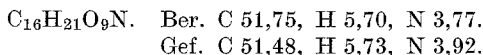
Analog **3 A** wurde aus dem K-Salz des Oxalessigsäure-di-*tert.*-butylester und **2 B** *N*-Butyryl-*D*-neuraminsäure (**3 B**) erhalten (vgl. Tab. 3).

#### *N*-Benzoyl-*D*-neuraminsäure (**3 C**)

50 g **2 C** und 40 g K-Salz des Oxalessigsäure-di-*tert.*-butylesters wurden in 480 ml wasserfr. Dioxan und 480 ml absol. Methanol 5 Tage bei  $20^\circ$  geschüttelt. Man ließ noch 2 Tage stehen und versetzte dann mit 64 ml Amberlite IR-120- $H^+$ . Der Austauscher wurde abgesaugt und die schwach sauer reagierende Lösung (pH 6) i. Vak. bei  $35^\circ$  zu einem Sirup eingedampft. Er wurde in 150 ml Methanol aufgenommen und 2 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Ein Kristallinat, 6 g **2 C**, wurde abgetrennt und das klare Filtrat zur Entfernung der restlichen  $K^+$ -Ionen nochmals mit 350 ml Amberlite IR-120- $H^+$  behandelt. Dann wurde auf 350 ml eingengt und (bei  $20^\circ$ ) mit Pd (aus 4 g Palladiumoxid) hydriert. Die Wasserstoffaufnahme war nach 8 Stdn. beendet. Nachdem der Katalysator abfiltriert war, wurde die Lösung i. Vak. bei  $30^\circ$  auf ca. 200 ml eingedampft, mit 300 ml Dioxan/Wasser (1:1, *v/v*) versetzt und am siedenden Wasserbad erwärmt. Die Gasentwicklung war nach 90 Min. beendet. Die nunmehr dunkelrot gefärbte Lösung wurde mit Aktivkohle nahezu entfärbt. Zur Spaltung der Lactone waren 130 ml 1 *n*-NaOH erforderlich (vgl. Lactonspaltung bei der Synthese von **3 A**). Die Lösung wurde sodann durch eine mit Dowex 1-X 8 (Formiat-Form; 1000 ml) beschickte Chromatographiesäule (15—20 Tropfen pro Min.) filtriert. Man wusch zuerst mit 10 l Wasser und dann mit 5 l Wasser/Äthanol (1:1, *v/v*) nach; eluiert wurde mit 1 *n*-HCOOH in Wasser/Äthanol (1:1, *v/v*). Das Eluat wurde in Fraktionen zu 20 ml aufgefangen und in regelmäßigen Zeitabständen dem Resorcin-Test nach *Svenner-*

*holm*<sup>11</sup> unterworfen. Die Fraktionen 240—390 wurden vereinigt und i. Vak. bei 40° auf etwa 600 ml eingedampft, wobei eine Fällung (7,2 g) vom Schmp. 204—208° [Zers.] anfiel. Die rötlich gefärbte Mutterlauge wurde durch Aktivkohle filtriert und das farblose Filtrat i. Vak. bei 40° bis zur beginnenden Kristallisation eingedampft. Nach mehrmaligem Einengen der Mutterlauge erhielten wir 6,78 g **3 C** vom Schmp. 192—194° [Zers.] (vgl. Tab. 3).

Die Kristalle (s. o.) vom Schmp. 204—208° [Zers.] (7,2 g) wurden in 22 ml 1*n*-NaOH und 1000 ml Wasser gelöst, die Lösung sodann mit Ameisensäure neutralisiert und zuerst durch Aktivkohle, dann zur Entfernung der Na<sup>+</sup>-Ionen durch überschüssiges Dowex 50-X 8 (H<sup>+</sup>-Form) filtriert. Das farblose Filtrat wurde i. Vak. bei 40° bis zur Ausscheidung eines Kristallisates, das abgesaugt wurde, eingeeengt. Diese Operation wurde mehrere Male wiederholt, wobei sich 5,81 g einer schwer wasserlöslichen, kristallinen Substanz mit einem Schmp. von 211—216° [Zers.] sowie 0,95 g eines gut wasserlöslichen Kristallisates (**3 C**) vom Schmp. 192—194° [Zers.] abschieden. Die Substanz mit Schmp. 211—216° [Zers.], die in einer Ausb. von 12% (bezogen auf **2 C**) erhalten wurde, besaß die gleiche Elementarzusammensetzung wie **3 C**:



$[\alpha]_D^{26} = -65^\circ$  ( $c = 5,0$ , Dimethylsulfoxid). Papierchromatographie:  
 $R_{NA} = 2,72$ .

#### 2,4,7,8,9-Penta-O-acetyl-N-propionyl-D-neuraminsäure (**4 A**)

500 mg **3 A** wurden mit 5 ml Pyridin (über KOH destill.) und 8 ml frisch destill. Ac<sub>2</sub>O unter Rühren und Eiskühlung versetzt. Nach 2 Stdn. war alles gelöst. Man ließ etwa 12 Stdn. bei + 4° stehen, goß dann die klare gelbe Lösung auf 50 g zerkleinertes Eis und rührte die Mischung 1 Stde. Das Pyridin wurde mit der entsprechenden Menge eines Kationenaustauschers (Dowex 50-X 8, H<sup>+</sup>-Form) entfernt und die nun farblose Lösung lyophilisiert. Der Rückstand (1,10 g) wurde in 10 ml Essigester und 60 ml Äther gelöst. Nach der Zugabe von 40 ml P $\dot{A}$  trat eine gelbliche amorphe Fällung (118 mg) auf, die abfiltriert und verworfen wurde. Die Mutterlauge wurde i. Vak. bei 30° eingedampft und der Eindampfrückstand, ein farbloses Harz, in 10 ml Äther aufgenommen. Aus dieser Lösung wurde nach portionenweiser Zugabe von etwa 200 ml P $\dot{A}$  eine flockige Fällung erhalten, die nach dem Trocknen über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> i. Vak. bei Zimmertemp. 510 mg wog. Die Substanz war dünnschichtchromatographisch einheitlich. In der Mutterlauge war neben **3 A** eine zweite, im Dünnschichtchromatogramm schneller wandernde Substanz ( $R_{NA} = 5,0$ ) nachweisbar (vgl. Tab. 4).

Auf analoge Art wie **4 A** wurde 2,4,7,8,9-Penta-O-acetyl-N-butryryl-D-neuraminsäure (**4 B**) aus **3 B**, Pyridin und Ac<sub>2</sub>O erhalten (vgl. Tab. 4).

#### 2,4,7,8,9-Penta-O-acetyl-N-benzoyl-D-neuraminsäure (**4 C**)

Man ließ 500 mg **3 C** in 5 ml Pyridin mit 8 ml Ac<sub>2</sub>O unter Rühren bei + 4° 16 Stdn. reagieren. Die klare gelblich gefärbte Reaktionslösung wurde in 50 ml Wasser/Äthanol (1:1, *v/v*) von 0° eingegossen, das Gemisch 1 Stde. gerührt und sodann auf eine mit 45 ml Dowex 50-X 8 (H<sup>+</sup>-Form) beschickte Chromatographiesäule aufgebracht. Die Eluate, welche die Peracetylverbindung enthielten, wurden gesammelt und lyophilisiert. Der amorphe Rückstand wurde in 10 ml Essigester und 30 ml Äther gelöst und mit etwa 30 ml P $\dot{A}$

bis zum Auftreten einer Trübung versetzt. Nach längerem Stehen flockte eine voluminöse Fällung aus, die abgetrennt und verworfen wurde. Nach Zugabe von weiteren 80 ml  $P\ddot{A}$  erhielten wir **4 C** als gut filtrierbare amorphe Substanz, welche im Dünnschichtchromatogramm einheitlich war ( $R_{NA} = 3,35$ ) und nach dem Trocknen über  $P_2O_5$  i. Vak. bei Zimmertemp. 418 mg wog. Aus der Mutterlauge konnten noch weitere 63 mg **4 C** isoliert werden (vgl. Tab. 4). In der Mutterlauge waren neben **4 C** zwei weitere Substanzen dünn-schichtchromatographisch ( $R_{NA} = 5,26$  und  $6,10$ ) nachweisbar.

*2-Chlor-2-deoxy-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-propionyl-D-neuraminsäure (5 A)*

450 mg **4 A** wurden in 21 ml Eisessig und 7 ml  $Ac_2O$  gelöst. Die auf 0 bis  $+4^\circ$  gekühlte Lösung wurde mit trockenem HCl-Gas gesättigt. Sodann wurden das Lösungsmittel und die überschüss. Salzsäure i. Vak. bei  $35^\circ$  entfernt und der Eindampfrückstand in 1 ml Essigester und 10 ml Äther gelöst. Nach Zugabe von 10 ml  $P\ddot{A}$  trat eine ölige Fällung auf, die verworfen wurde. Die nunmehr klare Lösung wurde in 100 ml  $P\ddot{A}$  eingegossen. **5 A** fiel als amorphe Fällung an, die gut filtrierbar war. Sie wurde 1 Stde. i. Vak. über  $P_2O_5$  getrocknet; Ausb. 333 mg. Die Substanz war dünn-schichtchromatographisch einheitlich (vgl. Tab. 5).

Auf gleiche Weise wie **5 A** erhielten wir aus **4 B** und HCl *2-Chlor-2-deoxy-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-butyryl-D-neuraminsäure (5 B)* (vgl. Tab. 5).

*2-Chlor-2-deoxy-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-benzoyl-D-neuraminsäure (5 C)*

300 mg **4 C** wurden in 15 ml Eisessig und 5 ml  $Ac_2O$  gelöst. In diese Lösung wurde bei  $0^\circ$  trockenes HCl-Gas bis zur Sättigung eingeleitet. Das Lösungsmittel und die überschüss. HCl wurden sodann i. Vak. bei  $40^\circ$  abgedampft. Der Eindampfrückstand, ein farbloses Öl, wurde in 5 ml Essigester und 40 ml Äther gelöst. Nach Zugabe von 75 ml  $P\ddot{A}$  erhielt man eine flockige Fällung, die verworfen wurde. Dem klaren Filtrat wurden weitere 75 ml  $P\ddot{A}$  zugesetzt. **5 C** kristallisierte in farblosen Nadeln aus und wog nach dem Isolieren und Trocknen (i. Vak. über  $P_2O_5$  bei Zimmertemp.) 170 mg. Zur Analyse wurde die Säure aus 5,5 ml Essigester, 35 ml Äther und 70 ml  $P\ddot{A}$  umkristallisiert. Ausb. 157 mg (vgl. Tab. 5).

*2-Benzyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-propionyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (6 A)*

2,58 g **5 A** ( $4,5 \cdot 10^{-3}$  Mole) und 1,8 g Silbercarbonat ( $6,5 \cdot 10^{-3}$  Mole) wurden mit 18 ml wasserfr. Benzylalkohol 14 Stdn. bei Zimmertemp. unter Lichtausschluß geschüttelt. Nach beendeter Reaktion wurde mit 50 ml Aceton versetzt und das Silbersalz über Hyflo-Supercel abfiltriert. Die nunmehr klare und schwach gelb gefärbte Lösung wurde mit 50 ml Wasser versetzt und auf eine mit Dowex 1-X8 (Formiat-Form; 300 ml) beschickte Säule aufgetragen. Nachdem die Lösung eingesickert war, wurde zuerst mit 5 l Wasser/Aceton (1:1,  $v/v$ ) nachgewaschen, dann mit 0,4*n*-HCOOH in Aceton/Wasser (1:1,  $v/v$ ) das peracetylierte Benzylketosid der N-Propionyl-D-neuraminsäure eluiert. Die im Resorcin-Test positiv reagierenden Fraktionen wurden gesammelt und i. Vak. bei  $40^\circ$  eingedampft. Der kristalline Eindampfest (2,3 g) wurde in 50 ml Aceton und 20 ml Wasser gelöst, mit etwas Tierkohle behandelt, die nahezu farblose Lösung am siedenden Wasserbad bis zur beginnenden Trübung eingeeengt und über Nacht bei  $+4^\circ$  stehengelassen. Dabei kristallisierten 1,65 g **6 A** (Schmp.  $199-201^\circ$ ), die aus 15 ml Aceton/Wasser (2:1,  $v/v$ ) nochmals umgelöst wurden. Ausb. 1,45 g (vgl. Tab. 6).



*2-Benzyl-N-propionyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (7 A)*

1,3 g **6 A** ( $2,2 \cdot 10^{-3}$  Mole) wurden mit 20 ml 1*n*-NaOH ( $20 \cdot 10^{-3}$  Mole) 15 Min. bei 40° verseift. Zur Entfernung der Na<sup>+</sup>-Ionen wurde mit überschüss. Kationenaustauscher Dowex 50-X 8 (H<sup>+</sup>-Form) versetzt, der Austauscher ausgewaschen und das Filtrat lyophilisiert. Den Rückstand (998 mg) lösten wir in 0,5 ml Wasser und 5 ml Methanol; sodann wurden 55 ml Äther zugegeben und filtriert. Nach Zugabe von insgesamt 80 ml Äther und 50 ml P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> isolierten wir 834 mg **7 A**; Schmp. 160—163°. Zur Analyse wurde nochmals aus Wasser (0,4 ml) + Methanol (3,5 ml) + Äther (90 ml) umkristallisiert; Ausb. 761 mg (vgl. Tab. 7).

Auf analoge Art wie **6 A** und **7 A** wurde aus **5 B**, Benzylalkohol und Silbercarbonat *2-Benzyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-butryryl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (6 B)* (vgl. Tab. 6) und nach deren alkalischer Verseifung *2-Benzyl-N-butryryl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (7 B)* erhalten (vgl. Tab. 7).

*2-Benzyl-N-benzoyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (7 C)*

Aus 2,6 g **5 C**, 20 ml wasserfr. Benzylalkohol und 1,5 g Silbercarbonat wurde unter den für **6 A** beschriebenen Versuchsbedingungen ein Reaktionsprodukt (2,1 g) erhalten, das nicht zur Kristallisation zu bringen war. Das Harz wurde daher zur Verseifung der O-Acetylgruppen in 60 ml Wasser aufgenommen und langsam mit 30 ml 1*n*-NaOH versetzt. Die Na<sup>+</sup>-Ionen wurden mit überschüss. Dowex 50-X 8 (H<sup>+</sup>-Form) entfernt und die Lösung bei 40° i. Vak. auf ein kleines Volumen eingengt. Es kristallisierten 1,09 g **7 C** aus. Das Kristallisat wurde in einem Gemisch aus Aceton (28 ml), Wasser (22 ml) und Methanol (40 ml) gelöst und die Lösung bei 40° i. Vak. bis zur beginnenden Kristallisation (auf etwa 20 ml) eingengt. **7 C** wog nach dem Absaugen und Trocknen (i. Vak. über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) 856 mg (vgl. Tab. 7).

*2-Benzyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-benzoyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (6 C)*

206 mg **7 C** wurden bei etwa 20° mit 1,5 ml Pyridin (über KOH destill.) und 2,5 ml frisch destill. Ac<sub>2</sub>O unter kräftigem Rühren versetzt. Nach 1 Stde. war das Reaktionsgemisch klar; man ließ nun 15 Stdn. bei + 4° stehen. Sodann wurden 10 ml Wasser/Alkohol (1:1, *v/v*) von 0° zugegeben und das Pyridin über Dowex 50-X 8 (H<sup>+</sup>-Form) entfernt, das Ketosid aus dem Austauscher mit Alkohol/Wasser (1:1, *v/v*) ausgewaschen und die im Resorcin-Test positiven Fraktionen des Eluats i. Vak. bei 40° eingedampft. Der Rückstand wurde in 5 ml Aceton gelöst und auf dem sied. Wasserbad mit Wasser bis zur beginnenden Trübung versetzt. Es kristallisierten allmählich 188 mg **6 C**. Die Substanz wurde aus heißem Aceton/Wasser umgelöst. Sie fiel in Form kubischer Kriställchen vom Schmp. 170—171° [Zers.] (**6 C-K 1**) an (129 mg). Die vereinigten Mutterlaugen hinterließen nach dem Eindampfen einen teilweise kristallinen Rückstand (144 mg), der in Aceton (15 ml) gelöst wurde. Nun wurde bei Zimmertemp. Wasser bis zur Trübung zugegeben und die Lösung in einem offenen Gefäß stehengelassen, wobei ein Teil des Lösungsmittels allmählich verdunstete. Nach 3 Tagen wurden 101 mg **6 C-K 2** isoliert. Die Substanz kristallisierte nadelförmig, zeigte ein Schmelzintervall von 120—127° und war chromatographisch einheitlich. **K 1** und **K 2** wurden für die Elementaranalyse 2 Stdn. i. Vak. bei 100° über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet (vgl. Tab. 6).

*2-Methyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-benzoyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure*

1,61 g **5 C**, 1,12 g Silbercarbonat und 50 ml wasserfr. Methanol wurden 13 Stdn. unter Lichtausschluß geschüttelt. Nach beendeter Reaktion wurde durch Hyflo-Supercel filtriert und das klare Filtrat auf eine mit Dowex 50-X 8 ( $H^+$ -Form; 10 ml) beschickte Chromatographiesäule aufgebracht. Das Austauscherharz wurde mit Methanol nachgewaschen und das Eluat i. Vak. bei 40° eingedampft. Der Rückstand (1,51 g) wurde in 10 ml Methanol und 200 ml Äther gelöst. Auf die Zugabe von 400 ml *P*Ä entstand eine Fällung, die nach einiger Zeit abfiltriert wurde. Aus dem Filtrat wurden nach portionenweiser Zugabe von insgesamt 425 ml *P*Ä 785 mg 2-Methyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-benzoyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure zur Kristallisation gebracht. Nach dem Umlösen aus Methanol (2 ml), Äther (60 ml) und *P*Ä (140 ml) betrug die Ausb. 603 mg (38%, bez. auf **5 C**). Schmp. 110°,  $[\alpha]_D^{25} = -19^\circ$   $c = 5,0$ , AcOH). Zur Analyse wurde i. Vak. über  $P_2O_5$  getrocknet.

$C_{25}H_{31}O_{13}N \cdot H_2O$ . Ber. C 52,54, H 5,82, N 2,45.

Gef. C 52,35, H 5,78, N 2,58.

*2-Methyl-N-benzoyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (8 C  $\alpha$ )*

Zu 502 mg 2-Methyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-N-benzoyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure wurden 50 ml Wasser und 10 ml 1*n* NaOH zugegeben. Man ließ 15 Min. bei 40° stehen. Nach Entfernung der  $Na^+$ -Ionen mit Dowex 50-X 8 ( $H^+$ -Form) wurde die Lösung lyophilisiert. Das Ketosid fiel als farbloses Harz (352 mg) an und wurde aus Wasser (1 ml), Methanol (18 ml), Äther (100 ml) und *P*Ä (40 ml) zur Kristallisation gebracht (304 mg); Schmp. 172—182° (Zers.; nach Umwandlung bei 145°). Zur Analyse wurde aus Wasser (1,5 ml) + Methanol (5 ml) + Äther (20 ml) umkristallisiert und 2 Stdn. i. Vak. bei 100° über  $P_2O_5$  getrocknet (vgl. Tab. 8).

*2-Methyl-N-benzoyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure-methylester (8 C  $\alpha$ -Me)*

79 mg **8 C  $\alpha$**  wurden in 5 ml wasserfr. Methanol warm gelöst und mit einer Lösung von  $CH_2N_2$  in Äther (15 ml) versetzt. Nach der Zugabe von 35 ml Äther trat eine flockige Fällung auf, die abgetrennt wurde. Dem klaren Filtrat wurden nochmals 20 ml Äther hinzugefügt, worauf die Kristallisation des Esters (**8 C  $\alpha$ -Me**) einsetzte. Er wurde aus Methanol (3 ml) und Äther (18 ml) umkristallisiert. Vor der Elementaranalyse wurde 2 Stdn. i. Vak. bei 100° über  $P_2O_5$  getrocknet (vgl. Tab. 8).

*2-Methyl-N-benzoyl- $\beta$ -D-neuraminsäure-methylester (8 C  $\beta$ -Me)*

a) *Darstellung aus 3 C*: 1,5 g **3 C** wurden in 500 ml 1proz. absol. methanol. HCl 11 Stdn. unter Rückfluß gekocht, wobei es langsam in Lösung ging. Zur Entfernung der  $Cl^-$ -Ionen ließ man die Lösung durch Dowex 1-X 8 (Formiat-Form; 80 ml) sickern und wusch sodann das Austauscherharz mit Methanol aus. Die Eluate und Waschflüssigkeiten wurden vereinigt und im Vak. bei 40° eingedampft. Der teilweise kristalline Rückstand (1,7 g) wurde mit 10 ml Methanol digeriert. Die unlöslichen Kristalle wogen nach Waschen mit Methanol und Trocknen 262 mg; Schmp. 210—217° [Zers.]. Bei diesem Kristallisat dürfte es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um den Me-Ester von **3 C** handeln.

Die Mutterlauge und die Waschflüssigkeiten (zusammen 22 ml) wurden mit 250 ml Äther und 40 ml *P*Ä versetzt. Eine schmierige Fällung wurde ab-

getrennt und zu dem nunmehr klaren Filtrat Äther (60 ml) und  $P\dot{A}$  (100 ml) zugegeben. Die Kristallisation von  $8\text{ C } \beta\text{—Me}$  setzte sofort ein. Das Kristallisat (810 mg) wurde aus Methanol (6 ml) und Äther (55 ml) umkristallisiert. Die chromatographisch einheitliche Substanz wurde für die Analyse 2 Stdn. im Vak. bei  $100^\circ$  über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet (vgl. Tab. 8).

b) *Darstellung aus Methoxyneuraminsäure*: 746 mg Methoxyneuraminsäure (Schmp. ab  $200^\circ$  [Zers.];  $[\alpha]_D^{27} = -52^\circ$ ), aus Rindersubmaxillarismucin dargestellt<sup>22</sup>, wurden bei  $50^\circ$  in 250 ml absol. Methanol gelöst und nach dem Erkalten mit überschüss. äther.  $\text{CH}_2\text{N}_2$  versetzt. Eine Trübung wurde abfiltriert und das Filtrat im Vak. bei  $30^\circ$  eingedampft. Den zurückbleibenden Methylester der Methoxyneuraminsäure, ein farbloses Öl, lösten wir in 80 ml Methanol, versetzten dann mit 1,21 g Benzoesäureanhydrid und erhitzen das Gemisch 1 Stde. am siedenden Wasserbad. Nun wurde im Vak. bei  $50^\circ$  eingedampft. Eine papierchromatographische Prüfung ergab, daß die N-Benzoylierung quantitativ verlaufen war. Das Reaktionsprodukt wurde in 100 ml Wasser aufgenommen und 4mal mit Äther ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase, welche  $8\text{ C } \beta\text{—Me}$  enthielt, wurde sodann im Vak. bei  $40^\circ$  eingedampft und hinterließ ein rotgelbes Harz (937 mg). Dieses wurde in 30 ml Methanol gelöst und mit 250 ml Äther versetzt. Eine flockige Fällung wurde abfiltriert, das klare Filtrat mit 110 ml  $P\dot{A}$  versetzt und von einem öligen Niederschlag abdekantiert. Aus der Mutterlauge kristallisierten nach portionenweiser Zugabe von insgesamt 190 ml  $P\dot{A}$  362 mg  $8\text{ C } \beta\text{—Me}$ . Beim Umlösen aus Methanol (7 ml) + Äther (70 ml) erhielten wir schließlich 284 mg, die für die Analyse 2 Stdn. im Vak. bei  $100^\circ$  über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet wurden (vgl. Tab. 8).

#### 2-Methyl-N-benzoyl- $\beta$ -D-neuraminsäure $8\text{ C } \beta$

Zu einer Lösung von 500 mg  $8\text{ C } \beta\text{—Me}$  in 14 ml Wasser wurden 2 ml 1 *n*-NaOH hinzugefügt. Man ließ 15 Min. bei  $40^\circ$  stehen und entfernte dann die  $\text{Na}^+$ -Ionen über Dowex 50-X 8 ( $\text{H}^+$ -Form). Die Lösung wurde im Vak. bei  $40^\circ$  eingedampft und hinterließ eine farblose, amorphe Substanz (558 mg). Diese wurde aus Wasser (0,5 ml), Methanol (8 ml) und Äther (200 ml) zur Kristallisation gebracht. Ausb.: 347 mg; Schmp.  $144\text{—}145^\circ$  [Zers.]. Zur Analyse wurde aus Wasser, Methanol und Äther umkristallisiert und 2 Stdn. im Vak. bei  $100^\circ$  über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet (vgl. Tab. 8).

#### Versuche mit Neuraminidase

Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* (Behringwerke A. G., Marburg/Lahn) war in einem 0,05 *m*-Acetatpuffer (pH 5,5), der 9 mg/ml NaCl und 1 mg/ml  $\text{CaCl}_2$  enthielt, gelöst und besaß laut Angabe der Erzeugerfirma eine Aktivität von 500 Einheiten/ml. 1 ml dieser Lösung wurde mit 4 ml eines 0,1 *m*-Maleinsäure—NaOH Puffers<sup>23</sup>, pH 6,4, der 0,02 *m*  $\text{CaCl}_2$  enthielt, auf 5 ml gebracht. 0,30 ml der auf diese Weise erhaltenen Enzymlösung setzten aus 1 ml  $10^{-3}$  *m* N-Acetylneuraminyllactose<sup>1, 24</sup> in 1 Stde. bei pH 6,4 und  $37^\circ$  0,152  $\mu$ Mole N-Acetyl-D-neuraminsäure in Freiheit.

Influenza-A-Virus, Stamm *Melbourne*, stammte vom World Influenza Center, London. Die in unsere Versuche eingesetzten Virus-Präparate<sup>1</sup> ent-

<sup>22</sup> F. Weygand und H. Rinno, Z. physiol. Chem. **306**, 173 (1957).

<sup>23</sup> „Methods in Enzymology“ (Hrsg.: S. P. Colowick und N. O. Kaplan), Vol. I, 142, Academic Press, New York, 1955.

<sup>24</sup> M. Schneir, R. J. Winzler, M. E. Raffelson, Biochem. Preparations **9**, 1 (1962).

hielten  $2^{15}$  hämagglutinierende Einheiten pro ml. 0,05 ml der Virussuspension setzten aus 1 ml  $10^{-3}m$  N-Acetylneuraminyllactose in 1 Stde. bei pH 6,5 und  $37^\circ$  0,285  $\mu$ Mole N-Acetyl-D-neuraminsäure in Freiheit.

Die Spaltungsversuche mit *V. cholerae*-Enzym wurden bei pH 6,4 in einem 0,1 *m*-Maleinsäure—NaOH-Puffer, der 0,02 *m*  $CaCl_2$  enthielt, mit Influenza-A-Virus, Stamm *Melbourne*, hingegen bei pH 6,5 in einem 0,067 *m*-Phosphatpuffer ausgeführt. Die Inkubationstemperatur betrug immer  $37^\circ$ . Wurde länger als 3 Stdn. inkubiert, so enthielt 1 ml der Inkubationslösung neben dem Substrat und dem Enzym bzw. Virus noch 50 Einheiten Penicillin. Jeder Versuch wurde als Doppelbestimmung ausgeführt und von einem gleich behandelten Kontrollansatz, der kein Enzym enthielt, begleitet.

Die Bestimmung der enzymatisch freigesetzten Sialinsäuren erfolgte nach einer unseren Erfordernissen angepaßten Thiobarbitursäure-Reaktion<sup>1, 10</sup>. Es wurden Eichkurven für die N-Propionyl-, N-Butyryl- und N-Benzoyl-D-neuraminsäure im Maleinsäure—NaOH-Puffer und Phosphatpuffer aufgenommen.