

SYNTHESE EINES 3-DESOXY-D-MANNO-2-OCTULOSONSÄURE (KDO)-HALTIGEN
TETRASACCHARIDES UND DESSEN STRUKTURVERGLEICH MIT EINEM ABBAU-
PRODUKT AUS BAKTERIEN-LIPOPOLYSACCHARIDEN¹⁾

Hans Paulsen^{a,*}, Michael Stiem^a und Frank M. Unger^b

Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg
Martin-Luther-King-Platz 6; D-2000 Hamburg 13 (Bundesrepublik Deutschland)^a
Sandoz Forschungsinstitut, Brunner Str. 59; A-1235 Wien (Österreich)^b

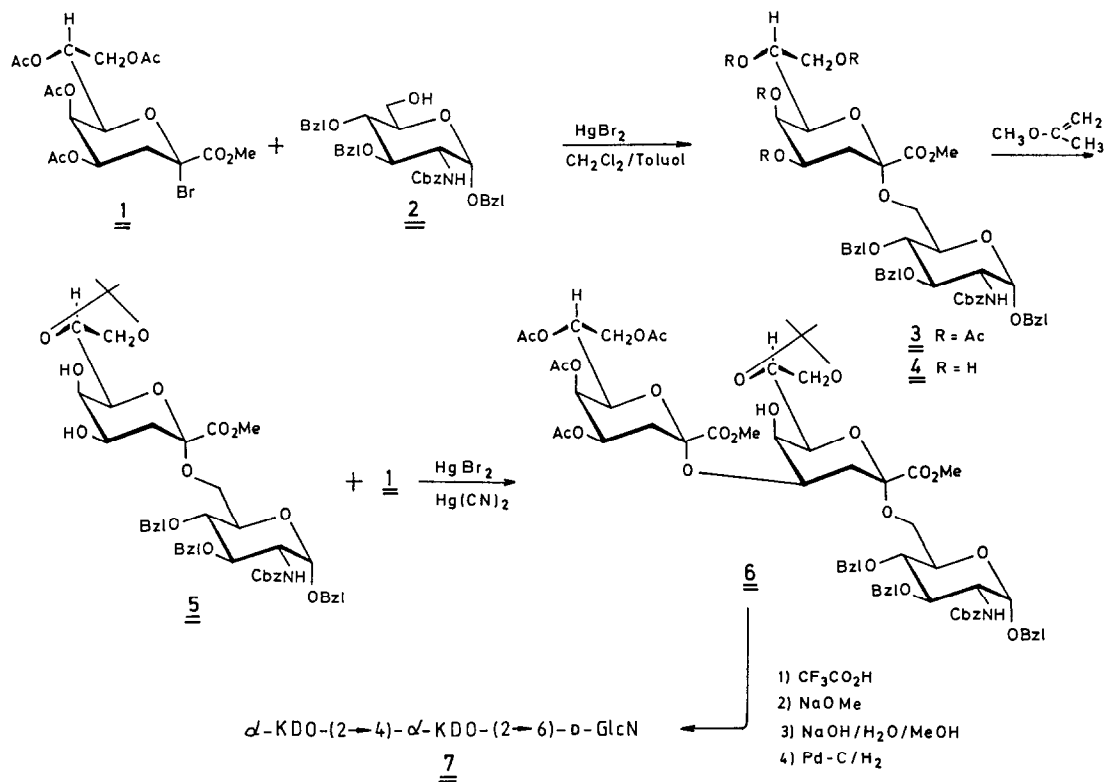
*Abstract: The tetrasaccharide α -KDO-(2-4)- α -KDO-(2-6)- β -D-GlcN(1-6)-D-GlcN 18 has been synthesized in a sequential oligosaccharide synthesis. This compound is identical with the degradation product which has been isolated from a R-mutant of *Salmonella minnesota*. Thus, the kind of linkage of KDO to each other and with the lipid A has been proved in a systematic way.*

Die Endotoxine von gramnegativen Bakterien stellen in der Regel Lipopolysaccharide dar, bei denen an das membranständige Lipoid A über eine Core-Sequenz die O-spezifischen Ketten gebunden sind. Die Verknüpfungsart von Lipoid A mit der inneren Core-Kette, die 3-Desoxy-D-manno-octulosonsäure (KDO) und L-Glycero-D-mannoheptose enthält, war längere Zeit unklar. Es konnte dann gezeigt werden²⁾, daß die KDO an 6'-OH und nicht, wie vorher angenommen, an 3'-OH des Glucosamin-Disaccharides von Lipoid A gebunden ist. Unger³⁾ untersuchte kürzlich ein Lipopolysaccharid aus einer R-Mutante von *Salmonella minnesota* Re 595, das nur eine Core-Kette aus KDO-Resten enthielt. Hieraus ließ sich ohne Spaltung der KDO-Bindung durch Hydrazinolyse ein Tetrasaccharid α -KDO-(2-4)- α -KDO-(2-6)- β -GlcN(1-6)-GlcN isolieren. Diese Struktur wurde durch Vergleich von ¹³C-NMR-Daten mit Vergleichssubstanzen erschlossen. Wir haben jetzt dieses Tetrasaccharid synthetisiert, um die Identität festzustellen.

Zur Erprobung der Synthese wurde zunächst das Trisaccharid 7 dargestellt. Als Glycosyldonor hatte sich bereits das KDO-Bromid 1 bewährt⁴⁾. Da dieses jedoch bei Glycosidierungsreaktionen leicht eliminiert, ist die Struktur des Glycosylakzeptors sorgfältig zu wählen. Am günstigsten erwies sich 2, das sich bei Gegenwart von HgBr₂ (CH₂Cl₂/Toluol) zum α -verknüpften Disaccharid 3 umsetzen läßt (53 %). Nach Umwandlung von 3 in 4 ergibt dieses mit Methoxypropen in kinetisch kontrollierter Reaktion 5 (80 %), bei dem durch Umkristallisation geringe Mengen (5 %) von mitgebildetem β -Produkt leicht abgetrennt werden konnten.

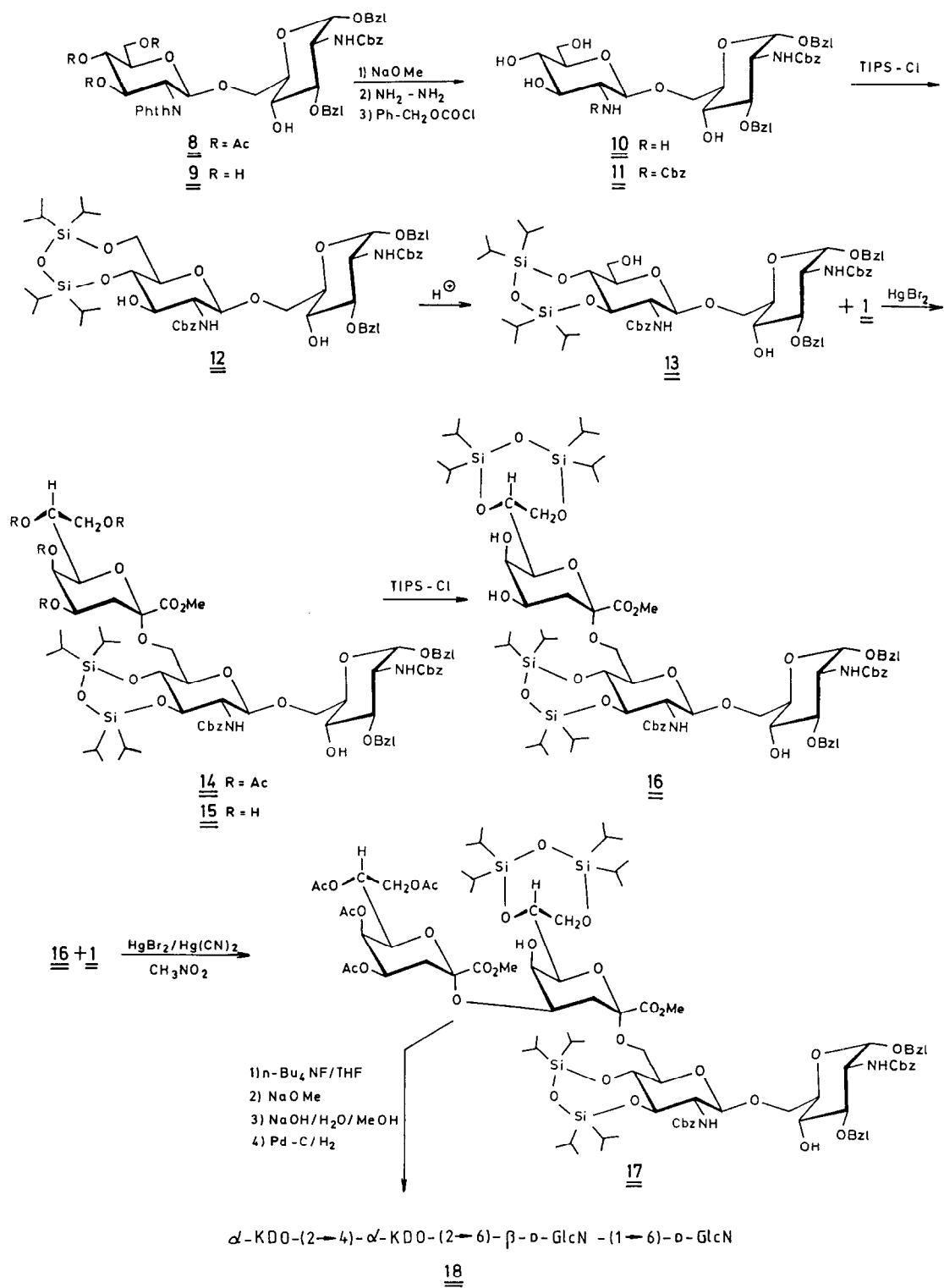
Die 4'-OH-Gruppe in 5 ist erheblich reaktiver als die 5'-OH-Gruppe, so daß 5 direkt mit 1 der nächsten Glycosidierung bei Gegenwart von HgBr₂/Hg(CN)₂ (Nitromethan) unterworfen werden kann. Man gelangt in 44 % zu 6, wobei die geringen Mengen an β -Produkt (5 %) gut abgetrennt werden können. Eine Entblockierungssequenz von 6 über eine saure Hydrolyse der Isopropyliden-Gruppe,

der alkalischen Spaltung der Acetylgruppen und Methyl ester sowie der Hydrogenolyse führt zum freien Trisaccharid 7 ($[\alpha] +82$, $c=1.3$ in H_2O). Die α -glycosidische Verknüpfung beider KDO-Reste ergibt sich aus den folgenden 1H -NMR-Werten: $\delta = 1.77$ (dd, $J_{3a'',3e''} 13.2$, $J_{3a'',4''} 12.1$ Hz, H-3a''), 1.93 (dd, $J_{3a',3e'} 12.9$, $J_{3a',4'} 12.3$ Hz, H-3a'), 2.02 (dd, $J_{3e',4'} 5.6$ Hz, H-3e'), 2.17 (dd, $J_{3e'',4''} 4.5$ Hz, H-3e''), TMS innerer Standard.



Für die Tetrasaccharid-Synthese ist das Saccharid 8⁵⁾ das günstigste Ausgangsprodukt. Zunächst wird 8 über 9 und Spaltung der Phthalimidogruppe in die Benzoyloxycarbonylverbindung 11 überführt. Aus 11 ist mit 1,3-Dichlor-1,1,3,3-Tetraisopropyl-disiloxan (TIPS-Cl)⁶⁾ 12 erhältlich. Bei Gegenwart von *p*-Toluolsulfonsäure in Dimethylformamid läßt sich 12 in die 3,4-substituierte Verbindung 13 umlagern (80 %). Diese stellt einen ausgezeichneten Glycosylakzeptor für die nächsten Glycosidierungsreaktionen dar.

Das Derivat 13 läßt sich mit 1 bei Gegenwart von HgBr₂ (CH₂Cl₂/Toluol) zum Trisaccharid 14 umsetzen (40 %). Ein kleiner Anteil von 3 % β -Produkt ist gut abtrennbar. Nach Entacetylierung zu 15 kann 15 nochmals mit TIPS-Cl umgesetzt werden, wobei selektiv 16 entsteht (61 %). Damit ist wiederum ein Glycosylakzeptor verfügbar, in dem die 4"-OH-Gruppe wesentlich reaktiver als die 5"-OH-Gruppe ist. die 4-OH-Gruppe an der reduzierenden Glucosamin-Einheit ist



ebenfalls sehr wenig reaktiv und stört bei keiner der beschriebenen Umsetzungen.

Im letzten Glycosidierungsschritt wird 1 mit 16 bei Gegenwart von $\text{HgBr}_2/\text{Hg}(\text{CN})_2$ (Nitromethan) umgesetzt, wobei ausschließlich das α -glycosidisch verknüpfte Produkt 17 entsteht (30 %). Zur Entblockierung werden zunächst mit Tetrabutylammoniumfluorid⁶⁾ die TIPS-Reste abgespalten. Hierbei wird teilweise der Methylester der terminalen KDO-Einheit hydrolysiert und bildet ein Lacton mit 5"-OH. Dieses ist jedoch unerheblich, da bei den weiteren Entblockierungsschritten, der Abspaltung der Acetylgruppen und der Methylester, das Lacton gleichfalls gespalten wird, so daß für die abschließende Hydrogenolyse ein einheitliches Produkt eingesetzt werden kann. (Ausb. über alle Deblockierungsschritte 59 %). Man gelangt so zu dem entblockierten Tetrasaccharid 18. Dieses enthält zwei freie Aminogruppen und zwei freie Carboxylgruppen, so daß die Verbindung ein zweifaches Zwitterion bildet. ($[\alpha] +61$, $c=1.5$ in H_2O). Die α -Verknüpfung der beiden KDO-Reste ergibt sich hier ebenfalls aus folgenden ^1H -NMR-Daten: $\delta = 1.75$ (dd, $J_{3a''',3e'''} 13.1$, $J_{3a''',4'''} 12.0$ Hz, H-3a'''), 1.91 (dd, $J_{3a'',3e''} 12.6$, $J_{3a'',4''} 12.0$ Hz, H-3a''), 2.03 (dd, $J_{3e'',4''} 5.0$ Hz, H-3e''), 2.14 (dd, $J_{3e''',4'''} 5.0$ Hz, H-3e'''), TMS innerer Standard.

In der folgenden Tabelle sind die ^{13}C -NMR-Werte des synthetischen Produktes denen des von Unger³⁾ isolierten Produktes gegenübergestellt. Es ist erkennbar, daß eine vollständige Identität zwischen beiden Produkten besteht. Damit ist ebenfalls auf synthetischem Wege die Verknüpfungsart der KDO-Reste untereinander und mit dem Lipoid A sichergestellt.

Subst.	C-1'''	C-2'''	C-3'''	C-4'''	C-5'''	C-6'''	C-7'''	C-8'''				
<u>18</u>	176.6	100.5	35.2	66.8	67.1	73.4	70.8	64.3				
a)	176.4	100.2	35.2	66.7	66.9	73.3	70.5	64.2				
	C-1''	C-2''	C-2''	C-4''	C-5''	C-6''	C-7''	C-8''				
<u>18</u>	175.6	100.6	34.0	69.5	65.4	73.2	70.6	64.3				
a)	175.5	100.5	34.1	69.3	65.2	73.2	70.4	62.2				
	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'	C-1 α	C-2 α	C-3 α	C-4 α	C-5 α	C-6 α
<u>18</u>	100.2	56.5	72.6	70.6	75.7	62.2	90.3	55.2	71.0	70.8	71.2	70.0
a)	100.2	56.4	72.4	70.4	75.5	62.2	90.1	55.1	70.8	70.8	71.0	69.8

a) Von Unger³⁾ aus *Salmonella minnesota* Re 595 isoliertes Tetrasaccharid. Hierbei externer Standard Dioxan 67.4 ppm. Bei 18 interner Standard Acetonitril 1.3 ppm.

Literatur

- 1) LXXII. Mitteilung der Reihe 'Bausteine von Oligosacchariden'; LXXI. Mitteil. H. Paulsen und J.P. Lorentzen, *Carbohydr. Res.* im Druck.
- 2) M. Imoto, S. Kusumoto, T. Shiba, H. Naoki, M. Iwashita, E.Th. Rietschel, H.-W. Wollenweber, G. Galanos und O. Lüderitz, *Tetrahedron Lett.* 24, 4017 (1983).
- 3) R. Christian, G. Schulz, P. Waldstätten und F.M. Unger, *Tetrahedron Lett.* 25, 3433 (1984).
- 4) H. Paulsen, Y. Hayauchi und F.M. Unger, *Carbohydr. Res.* 111, C5 (1983).
- 5) H. Paulsen, Y. Hayauchi und F.M. Unger, *Liebigs Ann. Chem.* 1984, 1288.
- 6) W.T. Markiewicz, *J. Chem. Res. (S)* 1979, 24; J.J. Oltvoort, M. Kloosterman, J.-H. van Boom, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* 120, 501 (1983).

(Received in Germany 20 December 1985)