

## SYNTHESE DER HEPTOSE- UND Kdo-HALTIGEN TRISACCHARIDKETTE DER INNEREN CORE-REGION VON LIPOPOLYSACCHARIDEN IN IMMUNOGENER FORM

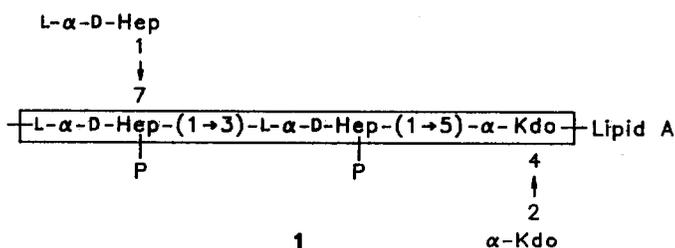
Hans Paulsen\* und Elisabeth C. Höffgen

Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg

D-2000 Hamburg 13 FRG

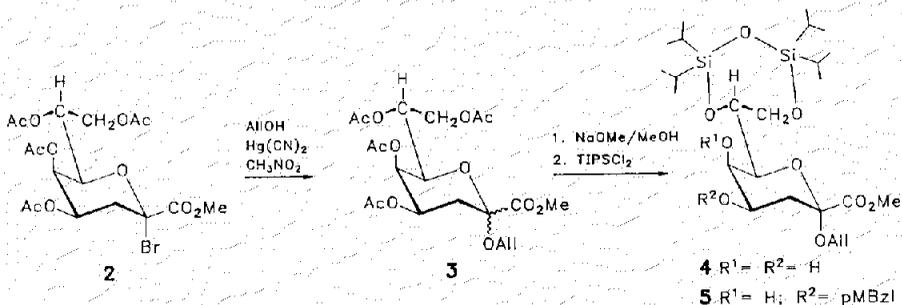
**Abstract:** An effective synthesis of the  $\alpha$ -allylglycoside 13 of the trisaccharide L- $\alpha$ -D-Hep-(1 $\rightarrow$ 3)-L- $\alpha$ -D-Hep-(1 $\rightarrow$ 5)- $\alpha$ -Kdo is developed using the trichloroacetimidate method. The trisaccharide 14 carrying a cysteamine spacer is copolymerized with acrylamide to polymer 16 containing the trisaccharide 13 in immunogenic form.

Lipopolysaccharide (LPS) sind wichtige Bestandteile der äußeren Zellmembran von gram-negativen Bakterien. Sie bestehen aus drei Teilen, dem membrangebundenen hydrophoben Lipid A, der mittleren Core-Region und den endständigen O-spezifischen Ketten. Insbesondere die zum Lipid A proximal ständige innere Core-Region ist in den LPS von verschiedensten gram-negativen Bakterien sehr ähnlich.<sup>1)</sup> Antikörper gegen die innere Core-Region sind somit von erheblichem Interesse, da sie Kreuzreaktivität gegenüber LPS verschiedener gram-negativer Bakterien zeigen sollten.<sup>2)</sup> Die innere Core-Region enthält die ungewöhnlichen Zucker L-Glycero-D-manno-heptose (Hep) und 3-Desoxy-D-manno-2-octulosonsäure (Kdo). In Formel 1 ist schematisch die Struktur der linearen Kette der inneren Core-Region von LPS wiedergegeben.



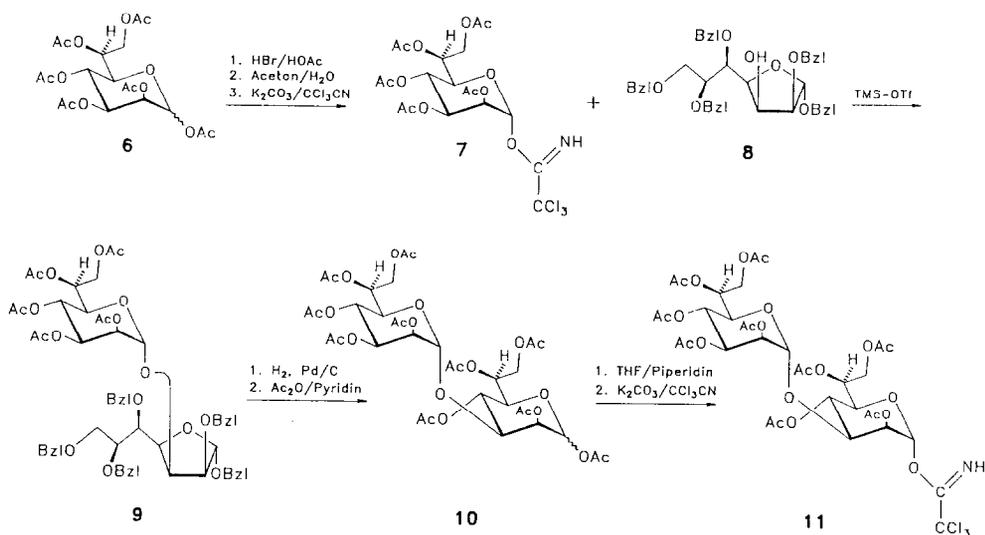
Synthetische Segmente der inneren Core-Region<sup>3-6)</sup>, die an einen polymeren Träger gebunden werden, sind zur Gewinnung monoclonaler Antikörper gegen die innere Core-Region und zum Studium der Spezifität der Antikörper von erheblicher Bedeutung. Für die Kdo-Region wurden bereits monoclonale Antikörper dargestellt und deren Spezifität bestimmt.<sup>7)</sup> Wir haben jetzt die in den meisten gram-negativen Bakterien vorkommende Hauptkette aus Kdo- und Hep-Einheiten in immunogener Form synthetisiert.

Für die Synthese des linearen Trisaccharides in 1 wird als Glycosylakzeptor das Kdo-Allylglycosid 5 benötigt, um eine spätere Copolymerisation mit Acrylamid zu ermöglichen. Als Glycosyldonor ist der Syntheseblock 11 aus zwei Heptoseeinheiten darzustellen. Die Glycosidsynthese des Kdo-Bromides 2 mit Allylalkohol liefert, wie beschrieben, stets ein Anomerengemisch 3 (76%) im Verhältnis von  $\alpha:\beta$  wie 2:1, das chromatographisch nicht zu trennen ist.<sup>8)</sup> Wir erreichten eine Trennung in einfacher Weise durch Abspaltung der Acetylgruppen in 3 und Umsetzung mit 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan (TIPS-Cl<sub>2</sub>) bei -10°C (0,25 mmol TIPS-Cl<sub>2</sub>, 1 ml DMF, 0,6 mmol Imidazol, 70%). Das gewünschte reine  $\alpha$ -Anomer 4 [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> = +34,5 = 1, CHCl<sub>3</sub>) ist dann leicht durch Mitteldruckchromatographie zu erhalten. Zur selektiven Blockierung der 4-OH-Gruppe in 4 wird 4 mit Bu<sub>2</sub>SnO umgesetzt und anschließend mit 4-Methoxybenzylchlorid zu 5 (80% [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +17,3, C = 1, CHCl<sub>3</sub>) alkyliert.

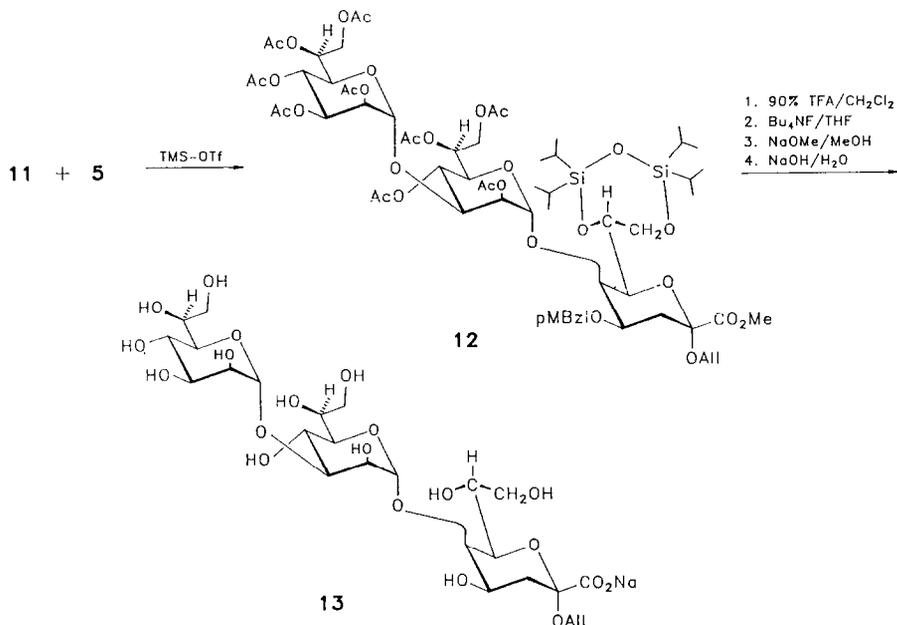


Für die Gewinnung des geeigneten Disacchariddonors hat sich nach Überprüfung der verschiedensten Glycosidierungsmethoden der folgende Weg als optimal erwiesen: Das bekannte Heptaacetat der Heptose 6<sup>3)</sup> muß zunächst mit HBr/Eisessig in das Glycosylbromid überführt werden<sup>5)</sup> (quantitativ), welches sich mit Aceton/Wasser zur am C-1 entblockierten Verbindung hydrolysieren läßt, die glatt in das entsprechende  $\alpha$ -Imidat 7<sup>9)</sup> überführt wird (75%, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +20,0, C = 1, CHCl<sub>3</sub>). Das Imidat 7 erweist sich gegenüber den Thioglycosiden und Glycosylhalogeniden als überlegenes Glycosidierungsreagenz.

Die Umsetzung von 7 mit dem bekannten Akzeptor 8 in Gegenwart von Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMS-OTf) liefert in 96% Ausbeute das Disaccharid 9 ([ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +39,0, c = 1, CHCl<sub>3</sub>). Nach hydrogenolytischer Abspaltung der Benzylether und anschließender Acetylierung ergibt sich 10 als Anomerengemisch (83%). Bei 10 gelingt die Abspaltung der 1-O-Acetylgruppe im Gegensatz zu 6 mit THF/Piperidin (15 h, rt, 87%) direkt in einheitlicher Reaktion. Hieraus kann mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und Trichloracetonitril das  $\alpha$ -Trichloracetimidat 11 erhalten werden (91%, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>21</sup> = +7,5, c = 1, CHCl<sub>3</sub>).



Die Kupplung von 11 mit 5 unter TMS-OTf-Katalyse gelingt in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> mit 72% Ausbeute ( $[\alpha]_D^{22} = +29,3$ ,  $c = 1$ , CHCl<sub>3</sub>). In einer vierstufigen Entblockierungssequenz wird, bezogen auf 12, das gewünschte  $\alpha$ -Allylglycosid 13 in 71% erhalten. 13 wird als Natriumsalz isoliert.



Die Bindung von 13 an einen polymeren Träger muß über einen Spacer erfolgen um einen, für die Antigen-Antikörper Wechselwirkung, ausreichenden Abstand des antigenen Trisaccharides vom Polymer zu gewährleisten.

