

Die Synthese von 2,6:3,4-Dianhydro-1-desoxy-D-*talo*-hept-1-enit, einem irreversiblen Inhibitor der β -Galactosidase aus *E. coli*

Jochen Lehmann* und Berit Schwesinger

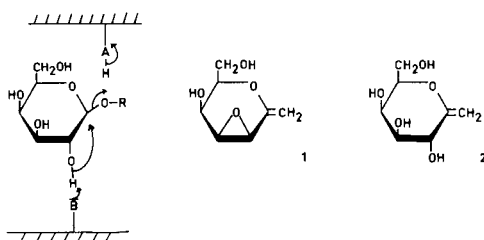
Chemisches Laboratorium der Universität Freiburg i. Br.,
Albertstr. 21, D-7800 Freiburg i. Br.

Eingegangen am 22. Juni 1978

The Synthesis of 2,6:3,4-Dianhydro-1-desoxy-D-*talo*-hept-1-enitol, an Irreversible Inhibitor of β -Galactosidase from *E. coli*

Starting from known 3,4,5,7-tetra-*O*-acetyl-2,6-anhydro-D-*glycero*-L-*manno*-heptononitril 2,6:3,4-dianhydro-1-desoxy-D-*talo*-hept-1-enitol (**1**) was prepared by a conventional multistep synthesis. The product **1** is supposed to react as an alkylating agent with a nucleophilic group at the glycon binding site of β -galactosidase from *E. coli*. In preliminary experiments **1** irreversibly inhibits the enzyme.

In einer früheren Arbeit¹⁾ wurde gezeigt, daß Monosaccharid-Derivate, die eine Vinyloxiran-gruppierung aufweisen, leicht und regioselektiv mit Nucleophilen verschiedenster Art reagieren. Der nucleophile Angriff findet dabei stets am allylischen Kohlenstoffatom des Oxiranringes statt. Verbindungen dieser Art eignen sich unter Umständen wie andere Oxirane²⁾ als irreversible Inhibitoren für Glycosidasen. Im Falle der β -Galactosidase aus *E. coli* wird ein bifunktionaler Mechanismus der Glycosidhydrolyse diskutiert³⁾.



Während die protonierende Gruppe AH mit Hilfe eines irreversiblen Inhibitors markiert werden konnte⁴⁾, sind Markierungsversuche am hypothetischen Protonenakzeptor B1 bisher nicht durchgeführt worden. Eine für diesen Zweck geeignete Verbindung ist 2,6:3,4-Dianhydro-1-desoxy-D-*talo*-hept-1-enit (**1**).

¹⁾ M. Brockhaus, W. Gorath und J. Lehmann, Liebigs Ann. Chem. **1976**, 89.

²⁾ G. Legler, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. **349**, 767 (1968); G. Legler und L. M. Omar Osama, ebenda **349**, 1488 (1968); H. Braun, G. Legler, J. Deshusses und G. Semenza, Biochem. Biophys. Acta **483**, 135 (1977); M. L. Shulman, S. D. Shiyan und A. Ya. Khorlin, ebenda **445**, 169 (1976).

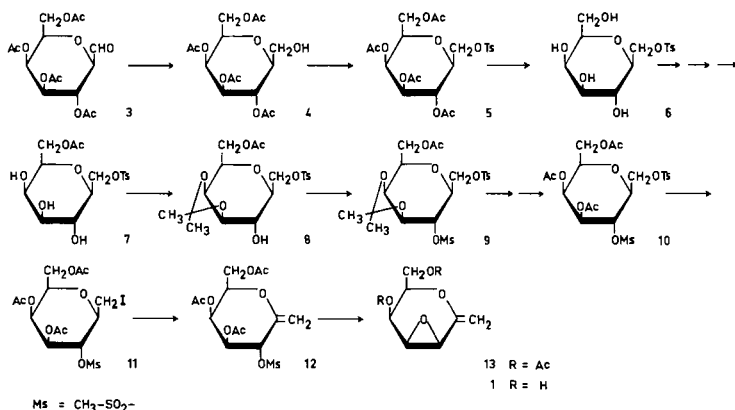
³⁾ K. Wallenfels und R. Weil in The Enzymes, Vol. 7, 617 (1972); M. Brockhaus, H.-M. Dettinger, G. Kurz, J. Lehmann und K. Wallenfels, Carbohydr. Res., im Druck.

⁴⁾ M. Brockhaus und J. Lehmann, FEBS Lett. **62**, 154 (1976).

Da der sterisch vergleichbare 2,6-Anhydro-1-desoxy-D-galacto-hept-1-enit (**2**)⁵⁾ eine deutliche Affinität für die Galactosylbindungsstelle des Enzyms hat⁵⁾, ist Ähnliches von Verbindung **1** zu erwarten.

Annäherung des elektrophilen Kohlenstoffatoms 3 in Verbindung **1** an eine nucleophile Gruppe, evtl. die Gruppe B1 der Galactosylbindungsstelle, sollte zur Reaktion und damit zur Inaktivierung des Enzyms führen.

Als Ausgangsprodukt für die Synthese des Vinyloxirans **1** diene 3,4,5,7-Tetra-O-acetyl-2,6-anhydro-D-glycero-L-manno-heptose (**3**)⁶⁾, die durch Reduktion nach einer Methode von Albrecht et al.⁷⁾ aus dem 3,4,5,7-Tetra-O-acetyl-2,6-anhydro-D-glycero-L-manno-heptonitril⁸⁾ gewonnen wurde.



Reduktion von **3** mit Platin/Wasserstoff in Eisessig, anschließende Tosylierung und Entacetylierung⁹⁾ liefert den 2,6-Anhydro-1-O-tosyl-D-glycero-L-manno-heptit (**6**)⁵⁾, der nach Fuchs et al.¹⁰⁾ selektiv zum 7-O-Acetyl-2,6-anhydro-1-O-tosyl-D-glycero-L-manno-heptit (**7**) acetyliert wird. Die anschließenden Reaktionsschritte führen über die nicht kristallisierten erhaltenen Produkte **8** – **10** zum kristallisierten 4,5,7-Tri-O-acetyl-2,6-anhydro-1-iod-3-O-mesyl-D-glycero-L-manno-heptit (**11**).

11 wird mit Silberfluorid in Pyridin dehydrohalogeniert¹¹⁾, und das ungesättigte, nicht kristallisierte erhaltene und nicht näher charakterisierte Mesylat **12** wird mit Natriummethoxid in das gewünschte kristallisierte Vinyloxiran **1** umgewandelt. Die Umsetzung von **12** zu **1** verläuft einheitlich; Nebenprodukte können nicht festgestellt werden.

Wie erwartet reagiert **1** in wäßriger Lösung quantitativ und einheitlich (DC) mit Cyanid und mit Azid¹²⁾. Auch konnte eine irreversible Hemmung der β -Galactosidase durch **1** in vorläufigen Versuchen festgestellt werden¹²⁾.

Die Konstitution **1** leitet sich aus dem Gang der Synthese und dem IR-Spektrum ab. Eine Zuordnung der Signale im ¹H-NMR-Spektrum der unsubstituierten Verbindung **1** bereite Schwierigkeiten. Die Richtigkeit der Konstitution **1** konnte jedoch über das übersichtliche ¹H-NMR-Spektrum einer acetylierten, nicht näher charakterisierten Probe von **1** (**13**) gesichert werden.

⁵⁾ M. Brockhaus und J. Lehmann, Carbohydr. Res. **53**, 21 (1977).

⁶⁾ H.-M. Dettinger, G. Kurz und J. Lehmann, Carbohydr. Res., in Vorbereitung.

⁷⁾ H. P. Albrecht, D. B. Repke und J. G. Moffatt, J. Org. Chem. **38**, 1836 (1973).

⁸⁾ B. Helferich und K. L. Bettin, Chem. Ber. **94**, 1159 (1961).

⁹⁾ P. Schlesselmann, persönliche Mitteilungen.

¹⁰⁾ E.-F. Fuchs und J. Lehmann, Chem. Ber. **107**, 721 (1974).

¹¹⁾ B. Helferich und E. Himmen, Ber. Dtsch. Chem. Ges. **61**, 1825 (1928).

¹²⁾ J. Lehmann und B. Schwesinger, unveröffentlichte Ergebnisse.

Experimenteller Teil

Dünnschichtchromatographie (DC): Fertigplatten Kieselgel F₂₅₄ (Merck). — Präp. Schichtchromatographie: Kieselgel 60 PF₂₅₄ (Merck). — Laufmittelsysteme: A: Ether/Petrolether (60–70°C) (4:1, v/v), B: Benzol/Methanol (4:1, v/v). — Entwicklung: Besprühen mit halbkonz. Schwefelsäure und Erhitzen auf 120°C. Iodwasserstoffabspaltung mit Silberfluorid der Fa. Fluka (Best. Nr. 85183). — Optische Drehung: Polarimeter 141 der Fa. Perkin-Elmer. — Schmelzpunkte: Schmelzpunktapparat nach Dr. Tottoli (unkorrigiert). — ¹H-NMR-Spektren: Spektrometer EM 390 (90 MHz), interner Standard TMS. — IR-Spektren: Perkin-Elmer-137-Spektrometer.

7-O-Acetyl-2,6-anhydro-1-O-tosyl-D-glycero-L-manno-heptit (7): 2,6-Anhydro-1-O-tosyl-D-glycero-L-manno-heptit (**6**)^{5,9} wurde nach *Fuchs et al.*¹⁰ selektiv acetyliert: Zu einer Lösung von 10 g (28.7 mmol) **6** in 165 g absol. Pyridin wurden 27.0 g Hexamethyldisilazan und 16.5 g Chlortrimethylsilan gegeben. Nach 5 h wurde i. Wasserstrahlvak. eingengt, in 250 ml CCl₄ aufgenommen, 2mal mit je 100 ml Wasser gewaschen, getrocknet (MgSO₄) und i. Vak. zum Sirup eingedampft. Den in 55 ml Pyridin und 40 ml Acetanhydrid gelösten Sirup versetzte man mit 3.2 ml Essigsäure. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (Laufmittel A) verfolgt. Sie war nach etwa 22 h beendet. Nach Eindampfen der Mischung (14.0 g, 23 mmol, Sirup) wurde in 115 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 140 ml 30proz. Essigsäure bei Raumtemp. gerührt, bis nach etwa 5 h die Entsilylierung vollständig war (DC-Kontrolle, Laufmittel B). Es wurde i. Vak. eingengt und eine kleine Probe des gelblichen Sirups für analytische Zwecke schichtchromatographisch gereinigt (Laufmittel B). Ausb. 7.7 g (68.5%); $[\alpha]_D^{27.8} = +2.5^\circ$ (*c* = 0.8 in Methanol).

IR (Film): 3350 (OH), 1700 (C=O), 1340 (CH₃), 1220 (CO), 1170 cm⁻¹ (S=O). — ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 2.03 (s, 3H, OCOCH₃), 2.4 (s, 3H, C₆H₄–CH₃), 3.2–5.0 (m, 12H), 7.3 und 7.75 (2m, jedes 2H, C₆H₄).

7-O-Acetyl-2,6-anhydro-4,5-O-isopropyliden-1-O-tosyl-D-glycero-L-manno-heptit (8): 7.5 g (19.2 mmol) rohes **7** in 100 ml absol. Aceton wurden mit 5 g wasserfreiem CuSO₄ und 100 µl konz. Schwefelsäure 24 h bei Raumtemp. gerührt (DC, Laufmittel B). Nach Neutralisation mit BaCO₃, Filtrieren durch eine D4-Fritte und Eindampfen i. Vak. erhielt man ein gelbliches Öl (7.85 g, 95%), das nicht kristallisiert werden konnte. Für analytische Zwecke wurde eine kleine Probe schichtchromatographisch an Kieselgel gereinigt. $[\alpha]_D^{27.8} = +40^\circ$ (*c* = 1.33 in Chloroform).

IR (Film): 3400 (OH), 1730 (C=O), 1340 (CH₃), 1220 (CO), 1170 cm⁻¹ (S=O). — ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1.25 (s, 3H, CH₃), 1.38 (s, 3H, CH₃), 2.04 (s, 3H, OCOCH₃), 2.4 (s, 3H, C₆H₄–CH₃), 3.03–4.44 (m, 10H), 7.2 und 7.65 (2m, jedes 2H, C₆H₄).

7-O-Acetyl-2,6-anhydro-4,5-O-isopropyliden-3-O-mesyl-1-O-tosyl-D-glycero-L-manno-heptit (9): Zu einer auf 0°C gekühlten Lösung von 7.5 g (17.4 mmol) **8** in 60 ml absol. Pyridin gab man tropfenweise unter Rühren 440 mg Methansulfonsäurechlorid (30 mmol) und ließ unter Rühren bei 4°C 18 h stehen. Man setzte dann 1 ml Wasser zu, ließ 15 min stehen und tropfte anschließend die Mischung unter Rühren in 200 ml Wasser. Extraktion der wäßrigen Phase mit Chloroform (3 × 100 ml), Waschen der organischen Phase mit Wasser, Trocknen (MgSO₄) und Eindampfen i. Vak. lieferte 8.2 g **9** (93%) als gelbliches Öl. Eine kleine Probe wurde schichtchromatographisch an Kieselgel gereinigt. $[\alpha]_D^{27.8} = +32^\circ$ (*c* = 0.84 in Chloroform).

IR (Film): 1730 (C=O), 1340 (CH₃), 1220 (CO), 1170 cm⁻¹ (S=O). — ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1.30 (s, 3H, CH₃), 1.47 (s, 3H, CH₃), 2.07 (s, 3H, OCOCH₃), 2.4 (s, 3H, C₆H₄–CH₃), 3.15 (s, 3H, OSO₂CH₃), 3.47–4.65 (m, 9H), 7.32 und 7.78 (2m, jedes 2H, C₆H₄).

4,5,7-Tri-O-acetyl-2,6-anhydro-3-O-mesyl-1-O-tosyl-D-glycero-L-manno-heptit (10): 8.0 g (15.7 mmol) **9** in 100 ml Methanol wurden mit 50 ml Wasser versetzt und mit wenigen Tropfen konz. Schwefelsäure 3–4 h bei 90°C unter Rückfluß gekocht (DC, Laufmittel B). Die Lösung wurde mit BaCO₃ neutralisiert, abfiltriert (D4-Fritte) und i. Vak. eingengt. Das mehrmals mit Toluol einge-

dampfte Filtrat acetylierte man mit 100 ml Acetanhydrid in 150 ml Pyridin. Danach wurde die Mischung in 200 ml Eiswasser eingerührt. Nach 30 min Rühren extrahierte man mit Chloroform (3×150 ml), schüttelte die organische Phase mit gesättigter wäßriger NaHCO_3 -Lösung (2×50 ml), anschließend mit Wasser und trocknete (MgSO_4). Nach Einengen der Lösung wurden 8.0 g (92%) gelbliches Öl (**10**) erhalten. $[\alpha]_{\text{D}}^{27.8} = -2^\circ$ ($c = 1.27$ in Chloroform).

IR (Film): 1740 (C=O), 1350 (CH_3), 1220 (CO), 1170 cm^{-1} (S=O). — $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 2.04$ (s, 3H, OCOCH_3), 2.07 (s, 3H, OCOCH_3), 2.17 (s, 3H, OCOCH_3), 2.47 (s, 3H, $\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3$), 3.08 (s, 3H, OSO_2CH_3), 3.6–4.5 (m, 6H, 2-H, 6-H, $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$, CH_2OTs), 4.73 (t, 1H, 3-H), 5.15 (dd, 1H, 4-H), 5.43 (d, 1H, 5-H), 7.37 und 7.83 (2 m, jedes 2H, C_6H_4).

4,5,7-Tri-*O*-acetyl-2,6-anhydro-1-iod-3-*O*-mesyl-*D*-glycero-*L*-manno-heptit (**11**): Eine Lösung von 7.8 g (14.1 mmol) **10** in 100 ml Acetanhydrid wurde mit 2.3 g NaI 15 min unter Rückfluß auf $140-150^\circ\text{C}$ (Badtemp.) erhitzt. Nach dem Abkühlen verdünnte man mit 200 ml Aceton, filtrierte, engte i. Vak. ein und nahm den Rückstand in 100 ml Chloroform auf. Es wurde mit Wasser (2×50 ml), dann mit wäßriger gesättigter NaHCO_3 -Lösung (2×50 ml) und schließlich mit Wasser (2×50 ml), dem eine Spatelspitze Natriumhydrogensulfid zugesetzt worden war, gewaschen, getrocknet (MgSO_4) und i. Vak. eingeeengt. Man erhielt einen gelblichen Sirup (5.8 g, 81.5%), der teilweise aus Ether nach vorsichtiger Zugabe von wenig Petrolether ($60-70^\circ\text{C}$) kristallisierte. Die feste Substanz wurde aus Ether umkristallisiert; Schmp. 120°C ; $[\alpha]_{\text{D}}^{27.8} = -12^\circ$ ($c = 0.97$, in Chloroform).

IR (KBr): 1740 (C=O), 1240 (CO), 1170 cm^{-1} (S=O). — $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 2.03$ (s, 3H, OCOCH_3), 2.04 (s, 3H, OCOCH_3), 2.15 (s, 3H, OCOCH_3), 3.07 (d, 3H, OSO_2CH_3), 3.28 (m, 2H, CH_2I), 3.57 (m, 1H, 2-H), 3.9–4.33 (m, 3H, 6-H, $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$), 4.68 (t, 1H, 3-H), 5.12 (m, 1H, 4-H), 5.42 (d, 1H, 5-H).

$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{IO}_{10}\text{S}$ (508.3) Ber. C 33.08 H 4.16 S 6.31 Gef. C 32.85 H 4.08 S 6.40

4,5,7-Tri-*O*-acetyl-2,6-anhydro-1-desoxy-3-*O*-mesyl-*D*-galacto-hept-1-enit (**12**): 3.0 g (5.9 mmol) **11** in 30 ml Pyridin wurden mit 1.0 g technischem Silberfluorid versetzt und 3 h bei Raumtemp. heftig geschüttelt. Man verdünnte mit 100 ml Chloroform, filtrierte (D 4-Fritte), schüttelte das Filtrat mit Thiosulfatlösung, anschließend die organische Phase mit Wasser und trocknete (MgSO_4). Die eingeeengte Lösung der Verbindung **12** wurde ohne weitere Reinigung zur Synthese von **1** verwendet.

2,6:3,4-Dianhydro-1-desoxy-*D*-talo-hept-1-enit (**1**): 1.6 g (4.2 mmol) **12** wurden in 50 ml absol. Methanol gelöst und vorsichtig tropfenweise mit $\text{N}/10$ NaOCH_3 -Lösung versetzt. (Die Lösung darf nicht alkalisch bleiben!) Die Bildung von **1** ließ sich dünnschichtchromatographisch verfolgen. **1** färbt sich beim Besprühen mit Schwefelsäure rot. Diese Eigenschaft haben auch andere Allyl-epoxide⁵¹. Nach beendeter Reaktion gab man zur Abtrennung von Salzen die Lösung auf eine Kieselgelsäule (18×1.5 cm) und eluierte mit Methanol. Das Eluat wurde mit Aktivkohle entfärbt und i. Vak. eingedampft. **1** kristallisiert auf Zugabe von wenig Aceton in feinen Nadeln aus. Ausb. 450 mg (48%, bez. auf **11**), Schmp. 119°C , $[\alpha]_{\text{D}}^{27.8} = +55.5$ ($c = 0.52$ in Aceton). — IR (KBr): 3300 (OH), 1640 cm^{-1} (C=C).

$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_4$ (158.2) Ber. C 53.16 H 6.37 Gef. C 52.72 H 6.44

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) des Diacetylderivates von **1** (5,7-Di-*O*-acetyl-2,6:3,4-dianhydro-1-desoxy-*D*-talo-hept-1-enit (**13**): $\delta = 2.01$ (s, 3H, OCOCH_3), 2.13 (s, 3H, OCOCH_3), 3.57 (m, 1H, 3-H), 3.74 (t, 1H, 4-H), 3.9–4.33 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$, 6-H), 4.7 (d, 1H, 1-H, $J_{\text{gem}} \approx 1.5$ Hz), 4.84 (d, 1H, 1-H), 5.15 (t, 1H, 5-H).