

Synthese von 2-Acetamido-1,4-imino-1,2,4-trideoxy-D-galaktitol und kompetitive Inhibition der humanen lysosomalen β -Hexosaminidase A

Bernhard Liessem^a, Athanassios Giannis^{*,a}, Konrad Sandhoff^a
und Martin Nieger^b

^a Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn, Gerhard-Domagk-Str. 1, D-53121 Bonn (Deutschland)

^b Institut für Anorganische Chemie der Universität Bonn, Gerhard-Domagk-Str. 1, D-53121 Bonn (Deutschland)

(Eingegangen am 14. März 1993; angenommen in revidierter Form am 30. September 1993)

ABSTRACT

The synthesis of 2-acetamido-1,4-imino-1,2,4-trideoxy-D-galactitol (**1**; 2-acetamido-4-amino-1,4-anhydro-2,4-dideoxy-D-galactitol) by two different routes starting from 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose is described. Compound **1** is a competitive inhibitor of human lysosomal β -hexosaminidase A with K_i values of 18 μ M (β -subunit) and 220 μ M (α -subunit). Similar properties were found for the already known 2-acetamido-2-deoxy-D-glucosyl-hydroxymethyl-1,4-lactone.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Synthese von 2-Acetamido-1,4-imino-1,2,4-trideoxy-D-galaktitol **1** auf zwei voneinander unabhängigen Wegen, ausgehend von 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose, wird beschrieben. Die Verbindung ist ein kompetitiver Inhibitor der menschlichen lysosomalen β -Hexosaminidase A mit K_i -Werten von 18 μ M (β -Untereinheit) bzw. 220 μ M (α -Untereinheit). Ähnliche Eigenschaften besitzt auch das bekannte 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucosyl-hydroxymethyl-1,4-lacton.

EINLEITUNG

Die menschlichen lysosomalen Hexosaminidasen (EC 3.2.1.52) katalysieren die Abspaltung β -glykosidisch gebundener 2-Acetamido-2-desoxy-D-galaktose- und 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucosereste von einer Reihe von Glykokonjugaten. Sie sind sowohl an dem intrazellulären Abbau von Glykolipiden wie GM2 und seinem Asialoderivat GA2, als auch am Abbau von Glykoproteinen, Glykosaminoglykanen und Oligosacchariden beteiligt¹. Gegenüber 2-Acetamido-2-desoxy- β -D-galaktosi-

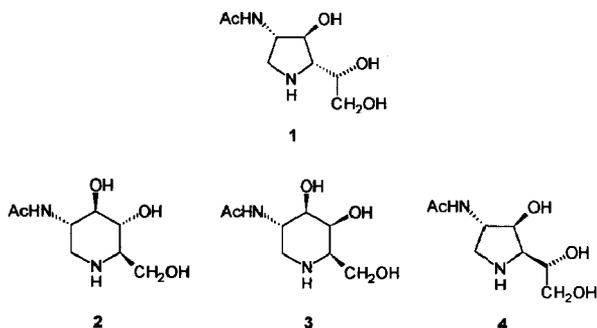
* Korrespondenzautor.

den besitzen sie eine höhere Affinität als gegenüber den entsprechenden D-Glucosaminiden².

Die beiden Hauptisoenzyme, β -Hexosaminidase A (Hex A) und β -Hexosaminidase B (Hex B), bestehen aus zwei etwa gleich großen, nicht kovalent gebundenen Untereinheiten. Während die Hex A aus zwei unterschiedlichen Ketten ($\alpha\beta$) besteht, stellt die Hex B ein Homodimeres aus zwei β -Untereinheiten³ dar ($\beta\beta$). Jede Untereinheit der Hex A besitzt ein aktives Zentrum mit unterschiedlichen Substratspezifitäten. Neutrale, wasserlösliche Substrate werden von dem aktiven Zentrum auf der β -Kette sehr viel schneller hydrolysiert, während die α -Kette für negativ geladene Oligosaccharide oder für synthetische 2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glucosid-6-sulfate spezifisch ist⁴. Der Ausfall der β -Hexosaminidasen aufgrund von erblichen Defekten führt zur Tay-Sachs-Krankheit (Defekt in der α -Untereinheit) bzw. zur Sandhoff'schen Krankheit (Defekt in der β -Untereinheit), wobei vor allem das Gangliosid GM2 massiv in den Lysosomen akkumuliert⁵.

Um Einblicke in den enzymatischen Mechanismus der Hexosaminidasen zu gewinnen, wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Verbindungen, sowohl natürlich vorkommende als auch chemisch synthetisierte, als Inhibitoren dieser Enzyme eingesetzt⁶. Darunter sind auch die Piperidin- und Pyrrolidinanaloga der 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose und 2-Acetamido-2-desoxy-D-Galaktose **2** (ref 7), **3** (ref 8), und **4** (ref 9) (Schema 1).

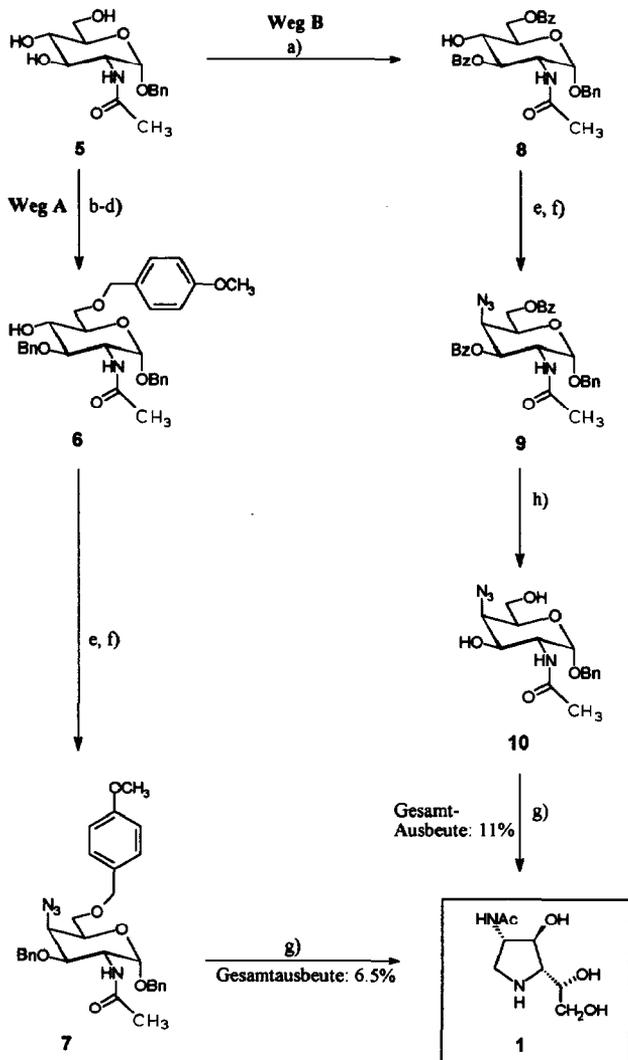
Verbindung **2** ist ein potenter β -Hexosaminidase-Inhibitor. Für die Verbindungen **3** und **4** liegen keine Daten für eine Hemmung vor. Vor dem Hintergrund, daß 2-Acetamido- β -D-Galaktoside eine höhere Affinität zu diesen Enzymen besitzen und um den Einfluß der Ringgröße auf die inhibitorischen Eigenschaften zu untersuchen, synthetisierten wir das Pyrrolidinderivat **1** als ersten Inhibitor seiner Art für lysosomale β -Hexosaminidasen. Als Ausgangsmaterial diente 2-Acetamido-D-glucose, welches unter Ausnutzung des gesamten Kohlenstoffgerüsts in die Zielverbindung **1** umgewandelt wurde.



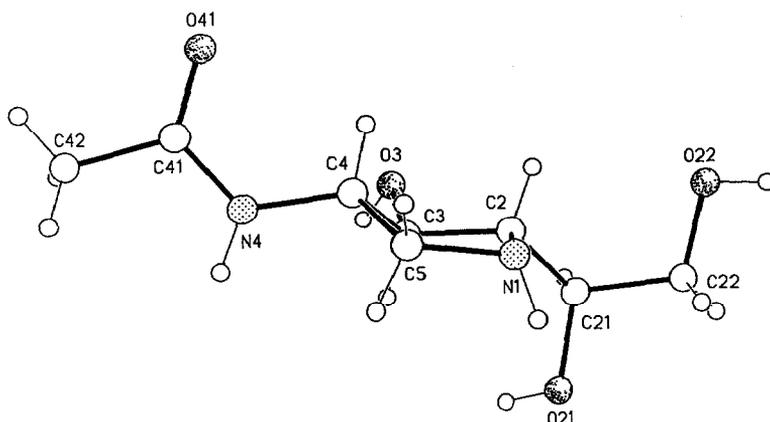
Schema 1.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Synthese von **1** wurde auf zwei voneinander unabhängigen Wegen durchgeführt. Beiden Wegen gemeinsam ist das aus 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose erhaltliche α -Benzylglykosid¹⁰ **5**. Aus **5** läßt sich in drei Stufen die Verbindung **6** herstellen¹¹, die anschließend über die Zwischenstufe des Azids **7** die Zielverbindung **1** ergibt (Schema 2, Weg A, Gesamtausbeute bezogen auf 2-



Schema 2. Synthesewege für 2-Acetamido-1,4-imino-1,2,4-trideoxy-D-galaktitol **1**. [a: BzCl-Pyridin, 2 h -45°C , 8 h RT, 50%; b: $p\text{-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4\text{CH}(\text{OMe})_2\text{-H}^+$, 70°C , 91%; c: BnBr-Ba(OH)₂, RT, 82%; d: NaCNBH₃-CF₃COOH, RT, 70%; e: (CF₃SO₂)₂O-Pyridin, -30°C ; f: NaN₃-DMF, RT, Weg A 50%, Weg B 80%; g: H₂-Pd-C, RT, Weg A 50%, Weg B 60%; h: NaOMe-MeOH, RT, 90%].



Schema 3. Stereoansicht von 2-Acetamido-1,4-imino-1,2,4-trideoxy-D-galaktitol **1**. Die Numerierung der Atome ist willkürlich und entspricht nicht den IUPAC-Regeln.

Acetamido-2-desoxy-D-glucose 6.5%). Alternativ (Schema 2, Weg B) läßt sich aus **5** nach einer selektiven Benzoylierung¹² das 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucosederivat **8** gewinnen, welches in das Azid **9** umgewandelt wird. Nach Abspaltung der *O*-Benzoyl-Schutzgruppen und anschließender Hydrierung erhält man ebenfalls Verbindung **1** (Gesamtausbeute bezogen auf 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose 11%).

Die Verbindung **8** läßt sich mit 50% zwar nur in mäßigen Ausbeuten erhalten, jedoch erfolgt die Umsetzung zum 4-Azido-Derivat **9** über einen einheitlicheren Reaktionsverlauf als bei Verbindung **7**. Durch einfache Umkristallisation aus Ethanol-Wasser läßt sich **9** in reiner Form erhalten. Zur Reinigung von **7** muß hingegen an Kieselgel chromatographiert werden. Bei der katalytischen Hydrierung der Verbindungen **7** bzw. **10** in Ethanol wurde das gewünschte Produkt **1** erhalten.

Durch zweimaliges Umkristallisieren aus Methanol lassen sich Einkristalle von Verbindung **1** in ausreichender Größe erhalten, so daß eine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt werden konnte. Eine Stereoansicht des Pyrrolidinderivates **1** zeigt das Schema 3. Im Kristall liegt die Verbindung als verdrillter Briefumschlag (envelope) vor.

Die Inhibitionswirkung von **1** auf die verschiedenen aktiven Zentren der Hex A wurde mit den synthetischen Substraten 4-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid¹³ (Muf-GlcNAc) und 4-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid-6-sulfat⁴ (Muf-GlcNAc-6-SO₄) gemessen (Abb. 1).

In Tabelle I sind die K_i -Werte für die kompetitive Inhibition der Hex A durch Verbindung **1** wiedergegeben. Erwartungsgemäß wird durch diese Verbindung die β -Untereinheit der Hex A stärker gehemmt als die α -Untereinheit.

Nachdem sich der fünfgliedrige Heterozyklus **1** als wirksamer β -Hexosaminidase-Inhibitor erwiesen hat, wollten wir entsprechend das schon bekannte 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucohydroximo-1,4-lacton **11** überprüfen¹⁴ (Schema 4).

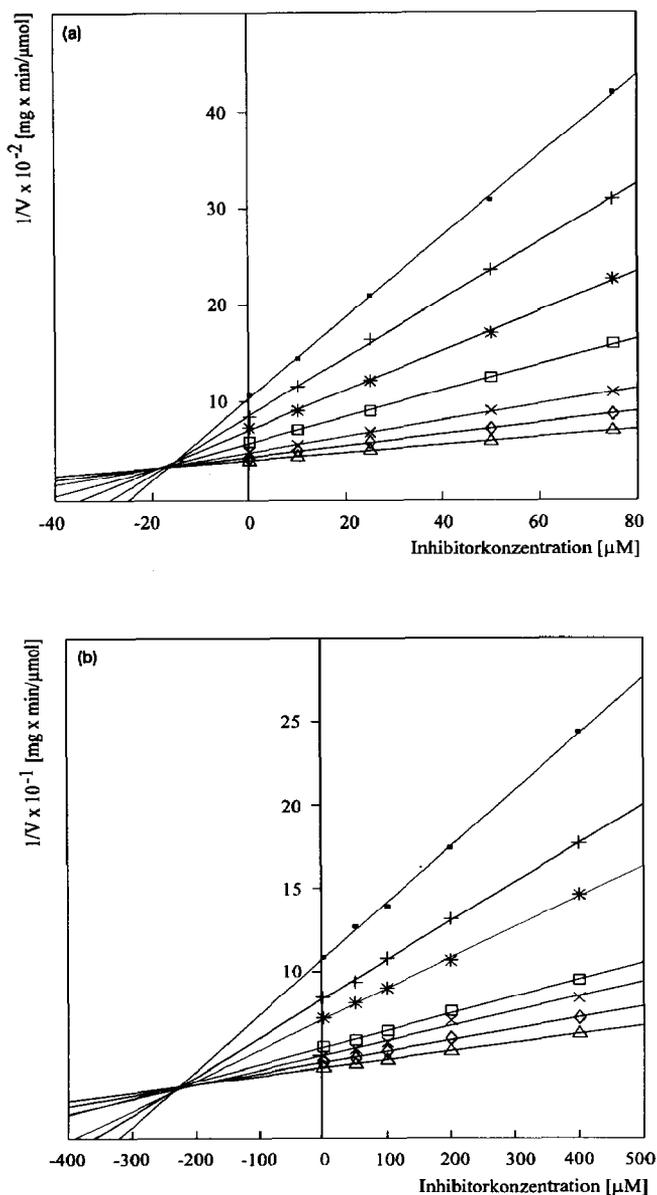


Abbildung 1. Dixon-Plot: Bestimmung der Hemmkonstanten K_i der Verbindung 1 für die lysosomale β -Hexosaminidase A in Gegenwart verschiedener Substratkonzentrationen. [a] Muf-GlcNAc: 0.25 mM (■), 0.375 mM (+), 0.5 mM (*), 0.75 mM (□), 1.25 mM (×), 1.75 mM (◇), 2.5 mM (△); b) Muf-GlcNAc-6-SO₄: 0.1 mM (■), 0.15 mM (+), 0.2 mM (*), 0.3 mM (□), 0.5 mM (×), 0.7 mM (◇), 1.0 mM (△). Zur Messung der Enzymaktivität siehe Experimenteller Teil].

Die nach Originalvorschrift synthetisierte Verbindung 11 ist ein strukturelles Analogon des 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucono-1,4-lactons 12. In der Literatur wurde die Frage nach der inhibitorischen Wirkung von Verbindung 12 kontrovers

TABELLE I

Hemmkonstanten für die kompetitive Inhibition der β -Hexosaminidase A durch Verbindung 1 bzw. 11

Inhibitor	K_i -Wert [μ M]	
	α -Untereinheit	β -Untereinheit
1	220	18
11	245	20

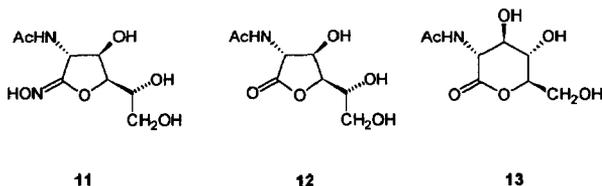
diskutiert. Es wurde einerseits behauptet, daß die Hemmung auf das darin in Spuren vorhandene 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucono-1,5-lacton **13** zurückzuführen ist¹⁵. Im Gegensatz dazu vertreten andere Autoren die Ansicht, daß auch das 1,4-Lacton **12** die β -Hexosaminidase A hemmt¹⁶. Wir konnten nun zeigen, daß die unter physiologischen Bedingungen stabile Verbindung **11** ebenfalls ein kompetitiver Inhibitor der β -Hexosaminidase A ist (Tabelle I und Abb. 2). Die K_i -Werte liegen in demselben Bereich, wie die für das Pyrrolidin-Derivat **1** ermittelten. Somit ist das Ergebnis ein Hinweis darauf, daß auch das 1,4-Lacton **12** ein Inhibitor der β -Hexosaminidase A sein kann.

Vergleicht man die Hemmwirkungen der Verbindungen **1** und **11** mit denen der Lactone **12** und **13**, so scheint die Ringgröße der Inhibitoren entgegen der in Literatur¹⁵ vertretenen Ansicht für ihre inhibitorische Eigenschaften nicht entscheidend zu sein.

Verbindung **1** kann am Stickstoffatom leicht funktionalisiert werden. Zur weiteren Verwendung für die affinitätschromatographische Reinigung¹⁷ oder für die geplante Photoaffinitätsmarkierung der β -Hexosaminidasen ist dies ein Vorteil.

EXPERIMENTELLER TEIL

Allgemeine Methoden.—Alle Reaktionen wurden dünn-schichtchromatographisch (DC) auf Glasplatten (Kieselgel 60, Merck) verfolgt. Die Detektion erfolgte durch Ansprühen mit einer Lösung aus 500:10:2, konz. Essigsäure, konz. Schwefelsäure und Anisaldehyd und anschließender Entwicklung im Heißluftstrom. Die säulenchromatographischen Trennungen erfolgten an Kieselgel (Korngröße 40–63 μ m, Merck) bei Normaldruck.



Schema 4.

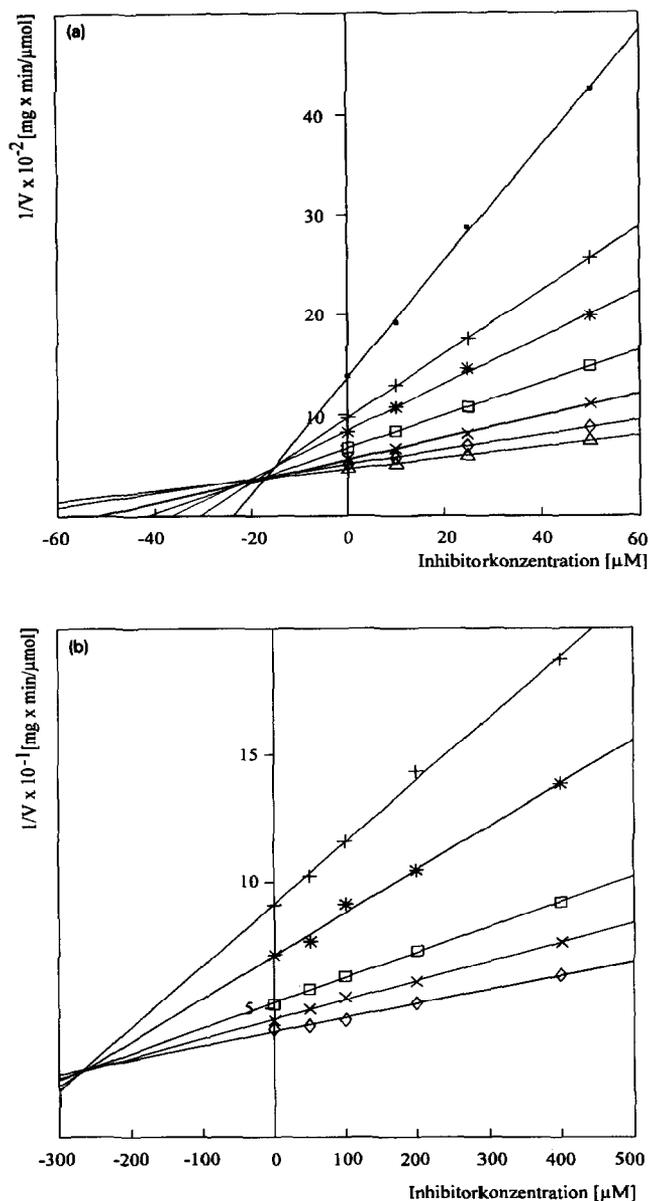


Abbildung 2. Dixon-Plot: Bestimmung der Hemmkonstanten K_i der Verbindung **11** für die lysosomale β -Hexosaminidase A in Gegenwart verschiedener Substratkonzentrationen. [a] Muf-GlcNAc: 0.25 mM (\blacksquare), 0.375 mM (+), 0.5 mM (*), 0.75 mM (\square), 1.25 mM (x), 1.75 mM (\diamond), 2.5 mM (Δ); b) Muf-GlcNAc-6-SO₃: 0.5 mM (+), 0.75 mM (*), 1.25 mM (\square), 1.75 mM (x), 2.5 mM (\diamond). Zur Messung der Enzymaktivität siehe Experimenteller Teil].

Benzyl-2-acetamido-4-azido-3-O-benzyl-2,4-didesoxy-6-O-(p-methoxybenzyl)- α -D-galaktopyranosid (7).—In einer ausgeheizten und mit Argon gespülten Apparatur wurde eine Lösung aus Benzyl-2-acetamido-3-O-benzyl-2-desoxy-6-O-(p-methoxy-

benzyl)- α -D-glucopyranosid¹¹ **6** (1.06 g, 2.04 mmol, 1.00 Äquiv.), absolutem Pyridin (0.63 mL) und CH₂Cl₂ (15 mL) auf –40°C abgekühlt. Innerhalb von 10 min wurde Trifluormethansulfonsäureanhydrid (0.52 mL, 3.06 mmol, 1.5 Äquiv.) zugetropft. Die Lösung färbte sich gelb. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei –30°C gelagert. Dünnschichtchromatographische Kontrolle (2:1 CCl₄–Aceton) zeigte vollständige Umsetzung (R_f 0.64). Nach Hydrolyse des überschüssigen Tf₂O (MeOH, 1 mL) wurde das Reaktionsgemisch mit CH₂Cl₂ (50 mL) verdünnt und so schnell wie möglich aufgearbeitet. Hierzu wurde die organische Phase 5 × mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (je 50 mL) und 2 × mit H₂O (je 50 mL) gewaschen, anschließend über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel in vacuo abdestilliert. Ohne weitere Reinigung wurde der Rückstand in trockenem DMF (25 mL) gelöst, mit Natriumazid (0.268 g, 4.08 mmol) versetzt und 8 h gerührt. Nach Verdünnung mit CH₂Cl₂ (100 mL) wurde 5 × mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (je 50 mL) extrahiert und die organische Phase über MgSO₄ getrocknet (DC: 2:1 CCl₄–Aceton, R_f 0.58). Das Lösungsmittel wurde in vacuo abdestilliert und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel mit 2:1 CCl₄–Aceton gereinigt. Ausb. 555 mg (50% über zwei Stufen), farbloser Feststoff; Schmp. 188–189°C; $[\alpha]_D^{20} + 100.4^\circ$ (c 0.25, CHCl₃); IR (KBr): ν 2110 (N₃) cm⁻¹, 1645 (C=O) cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.70 ppm (s, 3 H, CH₃), 3.45–3.65 (m, 1 H, H-2), 3.71 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ 10.5, $J_{3,4}$ 3.6 Hz, H-3), 3.80 (s, 3 H, O-CH₃), 3.95 (m, 1 H, H-5), 4.09 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ 3.6, $J_{4,5}$ 1.5 Hz, H-4), 4.40 und 4.63 (2d, 2 H, J 12 Hz, Ph-CH₂), 4.45 und 4.75 (2d, 2 H, J 12 Hz, Ph-CH₂), 4.40–4.70 (m, 4 H, H-6,6', Ph-CH₂), 4.90 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 3.6 Hz, H-1), 5.25 (d, 1 H, $J_{2,NH}$ 9 Hz, NH), 6.90–7.40 (m, 14 H, ArH); FABMS (*m*-Nitrobenzoesäure): m/z 547.2 [M + H]⁺. Anal. Ber für C₃₀H₃₄N₄O₆ (546.6): C, 65.92; H, 6.27; N 10.25. Gef.: C, 65.79; H, 6.39; N, 9.99.

Benzyl-2-acetamido-2-desoxy-3,6-di-O-benzoyl- α -D-glucopyranosid (8).—Zu einer auf –45°C gekühlten Lösung von Benzyl-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopyranosid¹⁰ **5** (6.22 g, 20 mmol, 1.0 Äquiv.) in absolutem Pyridin (75 mL) wurde innerhalb von 20 min frisch destilliertes Benzoylchlorid (5 mL, 44 mmol, 2.2 Äquiv.) zugetropft. Es wurde noch 2 h bei dieser Temperatur gerührt, anschließend das Kältebad entfernt und 8 h bei Raumtemperatur weitergerührt (DC: 40:1 CHCl₃–MeOH, R_f 0.91). Während der Reaktion fiel Pyridinhydrochlorid aus. Nach Zugabe von MeOH (0.5 mL) wurde mit CH₂Cl₂ (150 mL) verdünnt und die Lösung mit 1 N HCl (5 × 100 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch mit 40:1 CHCl₃–MeOH als Elutionsmittel gereinigt. Ausb. 5.19 g (50%), farbloser Feststoff; Schmp. 77–80°C; $[\alpha]_D^{20} + 117.7^\circ$ (c 0.485, CHCl₃); ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.60 ppm (s, 3 H, CH₃), 3.24 (d, 1 H, $J_{4,OH}$ 4.5 Hz, OH), 3.84 (ddd, 1 H, $J_{4,5} = J_{3,4} = 9$ Hz, $J_{4,OH}$ 4.5 Hz, H-4), 4.05 (m, 1 H, H-5), 4.46 und 4.78 (2dd, 2 H, $J_{6,6'}$ 12.9, $J_{5,6'}$ 2.1, $J_{5,6}$ 3.9 Hz, H-6, H-6'), 4.47 (ddd, 1 H, $J_{2,3}$ 10.5, J 9.6, $J_{1,2}$ 3.6 Hz, H-2), 4.54 und 4.77 (2d, 2 H, J 12 Hz, Ph-CH₂), 4.97 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 3.6 Hz, H-1), 5.38 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ 10.5, $J_{3,4}$ 9 Hz, H-3), 5.78 (d, 1 H, $J_{2,NH}$ 9.6 Hz, NH), 7.30–8.20 (m, 15 H, ArH); FABMS

(*m*-Nitrobenzoesäure): m/z 520.2 $[M + H]^+$. Anal. Ber. für $C_{29}H_{29}NO_8$ (519.6): C, 67.04; H, 5.63; N, 2.70. Gef.: C, 66.60; H, 5.57; N, 2.43.

Benzyl-2-acetamido-4-azido-2,4-didesoxy-3,6-O-dibenzoyl- α -D-galaktopyranosid (9).—In einer ausgeheizten und mit Argon gespülten Apparatur wurde Benzyl-2-acetamido-2-desoxy-3,6-O-dibenzoyl- α -D-glucopyranosid **8** (3.83 g, 7.4 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (40 mL) gelöst und mit absolutem Pyridin (2.6 mL) versetzt. Anschließend wurde die Lösung auf $-30^\circ C$ abgekühlt und innerhalb von 1 h Trifluormethansulfonsäureanhydrid (1.82 mL, 11.09 mmol) hinzugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei $-30^\circ C$ gelagert.

Nach Methanolyse (6 mL) wurde die Lösung mit CH_2Cl_2 (60 mL) verdünnt und anschließend $4 \times$ mit gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung (je 100 mL) und $2 \times$ mit H_2O (je 100 mL) extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase über $MgSO_4$ wurde das Lösungsmittel abgedampft. Das zurückbleibende Öl wurde nicht weiter aufgearbeitet, sondern direkt umgesetzt (DC: 2:1 Toluol–Essigsäureethylester, R_f 0.39). Das Rohprodukt wurde in absolutem DMF (100 mL) gelöst, mit Natriumazid (1.69 g, 25.9 mmol) versetzt und 8 h bei Raumtemperatur gerührt (DC: 2:1 Toluol–Essigsäureethylester, R_f 0.31). Nach Zugabe von CH_2Cl_2 (150 mL) wurde $3 \times$ mit gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung (je 100 mL) und $2 \times$ mit H_2O (je 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Der so erhaltene Feststoff wurde in heißem EtOH gelöst und gerade soviel H_2O zugegeben, bis eine leichte Trübung entstand. Zur vollständigen Kristallisation wurde über Nacht bei $4^\circ C$ stehengelassen. Ausb. 3.2 g (80%), farblose Kristalle; Schmp. 160 – $165^\circ C$; $[\alpha]_D^{20} -13.5^\circ$ (c 0.445, $CHCl_3$); IR (KBr): ν 2110 (N_3) cm^{-1} , 1720 (C=O) cm^{-1} ; 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$): δ 1.63 ppm (s, 3 H, CH_3), 4.22 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ 3.6, $J_{4,5}$ 1.5 Hz, H-4), 4.35 (m, 1 H, H-5), 4.50 (m, 2 H, H-6, H-6'), 4.50 und 4.73 (2d, 2 H, J 12 Hz, Ph- CH_2), 4.85 (m, 1 H, H-2), 4.98 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 3.6 Hz, H-1), 5.55 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ 10.5, $J_{3,4}$ 3.6 Hz, H-3), 5.65 (d, 1 H, $J_{2,NH}$ 9.6 Hz, NH), 7.25–8.15 (m, 15 H, ArH); FABMS (*m*-Nitrobenzoesäure): m/z 545.2 $[M + H]^+$. Anal. Ber. für $C_{29}H_{28}N_4O_7 \cdot H_2O$ (562.6): C, 61.91; H, 5.37; N, 9.96. Gef.: C, 62.26; H, 5.40; N, 9.35.

Benzyl-2-acetamido-4-azido-2,4-didesoxy-3,6-di-O-benzoyl- α -D-galaktopyranosid (10).—Benzyl-2-acetamido-4-azido-2,4-didesoxy-3,6-di-O-benzoyl- α -D-galaktopyranosid **9** (2.64 g, 4.85 mmol) wurde in MeOH (100 mL) suspendiert. Nach Zugabe von 0.1 N Natriummethanolat (14.8 mL, 14.8 mmol) ging das Ausgangsprodukt in Lösung. Es wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt (DC: 14:1 CH_2Cl_2 –MeOH, R_f 0.45). Die basische Lösung wurde mit Kationenaustauscher (Amberlite IR 120, H^+ -Form) versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach Neutralisation (pH-Kontrolle) wurde der Kationenaustauscher entfernt und das Lösungsmittel abgedampft. Der zurückbleibende Feststoff wurde mit Hexan gewaschen, um den bei der Reaktion entstandenen Benzoesäuremethylester abzutrennen. Ausb. 1.47 g (90%), farbloser Feststoff; Schmp. 225 – $227^\circ C$; $[\alpha]_D^{20} +122.5^\circ$ (c 0.2, MeOH); 1H NMR (400 MHz, Me_2SO-d_6): δ 1.85 ppm (s, 3 H, CH_3), 3.42–3.54 (m, 2 H, H-6, H-6'), 3.79 (t, 1 H, $J_{5,6} = J_{5,6'} = 6.5$ Hz, H-5), 4.0 (m, 3 H, H-2, H-3, H-4), 4.40 und 4.63 (2d, 2

H, J 12.3 Hz, Ph-CH₂), 4.70 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 2.4 Hz, H-1), 4.92 (t, 1 H, $J_{6,\text{OH}} = J_{6',\text{OH}} = 5.7$ Hz, OH), 5.41 (d, 1 H, $J_{3,\text{OH}}$ 4.5 Hz, OH), 7.25–7.40 (m, 5 H, ArH), 7.85 (d, 1 H $J_{2,\text{NH}}$ 7.5 Hz, NH); FABMS (*m*-Nitrobenzoesäure): m/z 337.1 [M + H]⁺. Anal. Ber. für C₁₅H₂₀N₄O₅ (336.4): C, 53.57; H, 5.99; N, 16.66; Gef.: C, 53.34; H, 6.01; N, 16.70.

2-Acetamido-1,4-imino-1,2,4-tridesoxy-D-galaktitol (1).—*Weg A:* Eine Suspension aus Benzyl-2-acetamido-4-azido-3-*O*-benzyl-2,4-didesoxy-6-*O*-(*p*-methoxybenzyl)- α -D-galaktopyranosid **6** (550 mg, 1 mmol) in EtOH (60 mL) wurde mit Palladium-Kohle-Katalysator (50 mg, 10%ig) versetzt. In einem Autoklaven wurde das Gemisch bei 2 atü und Raumtemperatur zunächst 6 h hydriert. Anschließend wurde der Katalysator erneuert und bei gleichem Druck und Temperatur eine Woche weiter hydriert. Nach Beendigung der Reaktion (DC: 2:1:0.01 CH₂Cl₂-MeOH-wässr. NH₃ 25%ig, R_f 0.24) wurde der Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit 2:1:0.01 CH₂Cl₂-MeOH-wässr. NH₃ 25%ig ergab **1**. Ausb. 200 mg (50%), farblose Kristalle.

Weg B: In EtOH (60 mL) wurde Benzyl-2-acetamido-4-azido-2,4-didesoxy- α -D-galaktopyranosid **10** (550 mg, 1.64 mmol) suspendiert, mit 80 mg Palladium-Kohle (10%ig) versetzt und im Autoklaven bei Raumtemperatur und 2 atü hydriert. Nach 4 h wurde der Katalysator erneuert und drei Tage bis zum polarsten Produkt weiterhydriert (DC-Kontrolle). Die Aufarbeitung erfolgte wie unter Weg A beschrieben. Die spektroskopischen Daten beider Produkte sind identisch. Ausb. 201 mg (60%); Schmp. 145–150°C (Zersetzung); $[\alpha]_D^{20} + 4.1^\circ$ (c 0.365, MeOH); IR (KBr): ν 3600–3200 (br, NH und OH) cm⁻¹; ¹H NMR (250 MHz, D₂O): δ 1.95 ppm (s, 3 H, CH₃), 2.73 (dd, 1 H, $J_{1,1'}$ 11.8, $J_{1,2}$ 5.7 Hz, H-1), 2.86 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ 6.8, $J_{4,5}$ 4.8 Hz, H-4), 3.15 (dd, 1 H, $J_{1,1'}$ 11.8, $J_{1,2}$ 7.3 Hz, H-1'), 3.53 (dd, 1 H, $J_{6,6'}$ 11.7, $J_{5,6'}$ 7.7 Hz, H-6'), 3.65 (dd, 1 H, $J_{6,6'}$ 11.7, $J_{5,6}$ 4 Hz, H-6), 3.77 (m, 1 H, H-5), 3.93 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ 5.8, $J_{3,4}$ 6.8 Hz, H-3), 4.05 (m, 1 H, $J_{1,2}$ 5.7, $J_{1',2}$ 7.3, $J_{2,3}$ 5.8 Hz, H-2); FABMS (*m*-Nitrobenzoesäure): m/z 204.7 [M + H]⁺. Anal. Ber. für C₈H₁₆N₂O₄ · H₂O (222.24): C, 43.24; H, 8.16; N, 12.60. Gef.: C, 43.20; H, 8.21; N, 12.56.

Röntgenstrukturanalyse von 1.—Die Intensitätsmessung erfolgte mit graphitmonochromatischer CuK _{α} -Strahlung ($\lambda = 1.5418$ Å) auf einem Enraf-Nonius-CAD4-Diffraktometer. Die Strukturlösung erfolgte mittels Direkter Methoden. Alle Nicht-Wasserstoffatome wurden anisotrop, die H-Atome isotrop mit einem Reiter-Modell verfeinert. Es wurde eine Extinktionskorrektur durchgeführt. Die absolute Konfiguration 2*S*, 3*S*, 4*S*, und 5*R* wurde bestätigt.

Summenformel: C₈H₁₆N₂O₄, Kristallgröße: 0.25 × 0.30 × 0.35 mm, Kristallsystem: monoklin, Raumgruppe: P2₁ (Nr. 4), Elementarzelle: $a = 5.597(1)$ Å, $b = 8.599(1)$ Å, $c = 10.228(1)$ Å, $\beta = 92.09(1)^\circ$, Volumen: 491.9(1) Å³, Z: 2, F(000): 220, Scan Typ: ω , Scan Bereich: $(0.70 + 0.15 \tan \theta)^\circ$, $2\theta_{\text{max}}$: 120°, $\mu(\text{CuK}\alpha)$: 0.89 mm⁻¹, Anzahl gemessener Reflexe: 1545, Anzahl unabhängiger Reflexe: 1453,

Anzahl beobachteter Reflexe mit $|F| > 4\sigma(F)$: 1424, L.S. Parameter: 151, Temperatur: 193 K, R: 0.036, R_w : 0.040, Gewichtungsschema: $w^{-1} = \sigma^2(F) + 0.0005F^2$.

Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, Gesellschaft für wissenschaftlich-technische Information mbH, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen, unter Angabe der Hinterlegungsnummer CSD-57276, der Autoren und des Zeitschriftenzitats angefordert werden.

Enzymatik.—Zur Bestimmung der β -Hexosaminidase-Aktivität wurden 20 μL einer geeignet verdünnten Enzymprobe (max. 1 mU pro Ansatz), 10 μL Rinderserumalbumin (1 mg/mL), 100 μL 2 mM Muf-GlcNAc-6-SO₄ (ref 4) bzw. Muf-GlcNAc (ref 13) (in 100 mM Citratpuffer, pH 4.4) und 70 μL H₂O zusammenpipettiert. Nach Inkubation (30 min, 37°C) wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 1 mL einer wäßrigen Lösung aus 0.2 M Na₂CO₃ und 0.2 M Glycin angehalten. Die Menge an freigesetztem 4-Methylumbelliferon wurde fluorimetrisch bestimmt. Eine Enzymeinheit (U) entspricht unter diesen Bedingungen der Hydrolyse von 1 μmol Muf-GlcNAc-6-SO₄ bzw. Muf-GlcNAc pro Minute.

Die Bestimmung der K_i -Werte erfolgte nach der Methode von Dixon¹⁸. Hierzu wurde in verschiedenen Meßreihen das entsprechende Enzym unter den oben beschriebenen Bedingungen mit verschiedenen Konzentrationen von Muf-GlcNAc-6-SO₄ bzw. Muf-GlcNAc in Abwesenheit und in Gegenwart steigender Konzentrationen des Inhibitors inkubiert.

Die lysosomale menschliche β -Hexosaminidase A wurde aus postmortaler Leber extrahiert und durch Ammoniumsulfatfällung, Chromatographie an Concanavalin A-Sepharose und Ionenaustauschchromatographie teilgereinigt¹⁹. Die spezifische Aktivität betrug 9.7 U/mg Protein.

DANK

Die Autoren bedanken sich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Gi 204/1-1) für die finanzielle Unterstützung.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 K. Sandhoff und H. Christomanou, *Human. Genet.*, 50 (1979) 107–143.
- 2 K. Sandhoff und W. Wässle, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 352 (1972) 1119–1133.
- 3 D.L. Mahuran und J.A. Lowden, *Can. J. Biochem.*, 58 (1980) 287–294.
- 4 H.-J. Kytzia und K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.*, 260 (1985) 7568–7572.
- 5 K. Sandhoff, E. Conzelmann, E.F. Neufeld, M.M. Kaback, und K. Suzuki in C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, und D. Valle (Hrsg.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, Bd. 2, McGraw Hill, New York, 1989, pp. 1807–1839.
- 6 (a) R.C. Bernotas und B. Ganem, *Carbohydr. Res.*, 167 (1987) 312–316; (b) G. Legler, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 48 (1990) 319–384; (c) D. Beer, J.-L. Maloisel, D.M. Rast, und A. Vasella, *Helv. Chim. Acta*, 73 (1990) 1918–1922; (d) M. Horsch, L. Hoesch, A. Vasella, und D.M. Rast, *Eur. J. Biochem.*, 197 (1991) 815–818; (e) P.S. Liu, M.S. Kang, und P.S. Sunkara, *Tetrahedron Lett.*, 32 (1991) 719–720; (f) D.R. Wolk, A. Vasella, F. Schweickart, und M.G. Peter, *Helv. Chim. Acta*, 75 (1992) 323–334; (g) G. Legler und R. Bollhagen, *Carbohydr. Res.*, 233 (1992) 113–123; (h)

- T. Aoyagi, H. Suda, K. Uotani, F. Kojima, T. Aoyama, K. Horiguchi, M. Hamada, and T. Takeuchi, *J. Antibiotics*, 45 (1992) 1404–1408.
- 7 (a) G.W.J. Fleet, P.W. Smith, R.J. Nash, L.E. Fellows, R.B. Parekh, and T.W. Rademacher, *Chem. Lett.*, 164 (1986) 1051–1054; (b) E. Kappes und G. Legler, *J. Carbohydr. Chem.*, 8 (1989) 371–388; (c) H. Böshagen, F.-R. Heiker, und M. Schueller, *Carbohydr. Res.*, 164 (1987) 141–148; (d) G. Legler, E. Lüllau, E. Kappes, und F. Kastenholz, *Biochim. Biophys. Acta*, 1080 (1991) 89–95.
- 8 A.M. Schueller und F.-R. Heiker, *Carbohydr. Res.*, 203 (1990) 308–313.
- 9 W. Meyer zu Reckendorf und N.W. Micheli, *Chem. Ber.*, 105 (1972) 2998–3013.
- 10 R. Kuhn, H.H. Baer, und A. Seeliger, *Liebig Ann. Chem.*, 611 (1958) 236–241.
- 11 R. Johansson und B. Samuelson, *J. Chem. Soc., Perkin. Trans. I*, (1984) 2371–2374.
- 12 R.I. Sakhary, B.A. Silwanis, M.A. Nashed, und H. Paulsen, *Carbohydr. Res.*, 203 (1990) 319–323.
- 13 S.K. Srivastava, Y.C. Awasthi, A. Yoshida, und E. Beutler, *J. Biol. Chem.*, 249 (1974) 2043–2048.
- 14 D. Beer und A. Vasella, *Helv. Chim. Acta*, 68 (1985) 2254–2274.
- 15 (a) T.E. Couling und R. Goodey, *Biochem. J.*, 119 (1970) 303–306; (b) J. Conchie, A.J. Hay, I. Strachan, und G.A. Levvy, *Biochem. J.*, 102 (1967) 929–941.
- 16 M. Pokorny, E. Zissis, und H.G. Fletcher, Jr., und N. Pravdić, *Carbohydr. Res.*, 37 (1974) 321–329.
- 17 (a) H. Hettkamp, G. Legler und E. Bause, *Eur. J. Biochem.*, 142 (1984) 85–90; (b) H. Paulsen und M. Matzke, *Liebigs Ann. Chem.*, (1988) 1121–1126; (c) J. Schweden und E. Bause, *Biochem. J.*, 264 (1989) 347–355; (d) R.C. Bernotas und B. Ganem, *Biochem. J.*, 270 (1990) 539–540; (e) G. Legler, E. Lüllau, E. Kappes, und F. Kastenholz, *Biochim. Biophys. Acta*, 1080 (1991) 89–95.
- 18 M. Dixon, *Biochem. J.*, 55 (1953) 170–171.
- 19 K. Sandhoff, E. Conzelmann, und H. Nehr Korn, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 358 (1977) 779–787.