

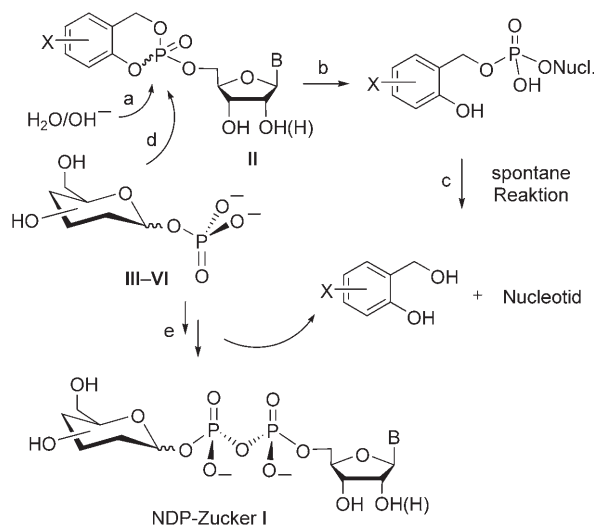
Effiziente Synthese von Nucleosiddiphosphat-Glycopyranosen**

Silke Wendicke, Svenja Warnecke und Chris Meier*

Nucleosiddiphosphat-Pyranosen **I** (NDP-Zucker; siehe Schema 1) spielen als Glycosyldonoren eine Schlüsselrolle bei der Synthese von Oligo- und Polysacchariden.^[1,2] Darüber hinaus wirken sie als Vorstufen für die Synthese von Desoxyzuckern, Aminoazuckern, kettenverzweigten Zuckern, Uronsäuren und Glycokonjugaten. Bei biosynthetischen, enzymkatalysierten Prozessen wird die energiereiche Bindung zwischen dem C1-Atom des Glycosylrests und dem β -Phosphatrest gespalten, wodurch der Glycosylrest unter Freisetzung von Nucleosiddiphosphat (NDP) auf eine Oligosaccharidkette übertragen wird. Für Biosynthesestudien von Oligosacchariden (z. B. Lipopolysacchariden)^[3] ist ein effizienter Zugang zu dieser wichtigen Substanzklasse unabdingbar. Die klassische Methode ist die Kupplung von Glycosyl-1-phosphaten mit Nucleotidmorpholidaten nach Moffat, Khorana et al.^[4,5] Dieses Verfahren liefert die Produkte allerdings nur in sehr geringen Ausbeuten (5–25 %), und dies auch nur nach langen Reaktionszeiten. Versuche, die Ausbeuten durch Zusatz von Aktivatorn wie 1*H*-Tetrazol^[6–9] zu verbessern, waren bisher selten erfolgreich und führten auch bei uns nicht zum Erfolg. Außer den Morpholidaten wurden auch Imidazolidate verwendet, allerdings auch hier ohne die gewünschte Verbesserung der chemischen Ausbeuten.^[10–12] Hindsgaul und Jakeman beschrieben eine alternative Methode, bei der Nucleosiddiphosphate mit Glycosyl-1-bromiden umgesetzt werden.^[13,14] Wie bei der Morpholidat-Methode waren auch hier die Ausbeuten insgesamt nicht befriedigend, und außerdem ließ sich die Konfiguration am anomeren Zentrum nicht kontrollieren. Thiem und Mitarbeiter berichteten über eine enzymatische Synthese ausgehend von ungeschützten Zuckern, die zunächst phosphoryliert und anschließend mit einem Nucleosidtriphosphat umgesetzt wurden.^[15,16] Diese Syntheseroute, die über drei aufeinander folgende enzymkatalysierte Schritte verläuft, hängt entscheidend von der Verfügbarkeit der nötigen Kinasen und NDP-Zucker-Pyrophosphorylasen sowie von den zum Teil teuren Nucleosidtriphosphaten ab. Zudem übertrafen die beschriebenen Ausbeuten auch bei dieser Methode selten 30 %. Wir berichten hier über eine konzeptionell neue Methode zur chemischen Synthese von NDP-Zuckern ausgehend

von *cyclo*-Saligenyl(*cyclo*Sal)-Nucleosidphosphatrestern des Typs **II** (Schema 1), die als Aktivester eingesetzt wurden.

Ursprünglich wurde das *cyclo*Sal-Konzept zur intrazellulären Freisetzung von biologisch aktiven Nucleotiden entwickelt.^[17] Die hochselektive Spaltung beruht auf einem nucleophilen Angriff auf den neutralen Phosphatrest durch Wasser oder Hydroxidionen, wodurch ein selektiver Hydrolyseweg eingeleitet wird, der zur Freisetzung des Nucleotids führt (Weg a–c; Schema 1). Dieses Verfahren wurde auf eine



Schema 1. Prinzip der Spaltung der *cyclo*Sal-Phosphatrestriester mit Wasser/Hydroxid oder Pyranose-1-phosphaten.

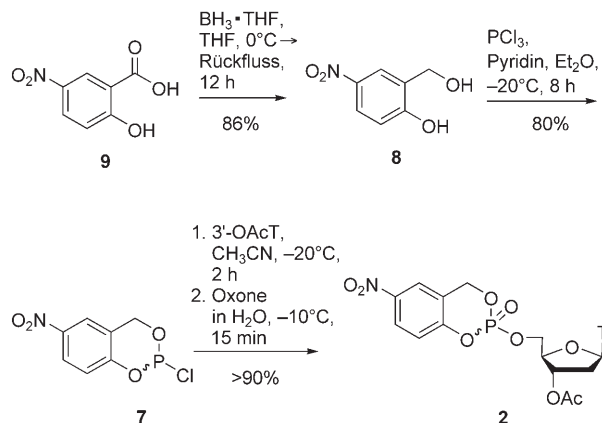
Vielzahl von Nucleosidanaloga angewendet und liefert zum Teil eine erhebliche höhere antivirale Aktivität als jene des Stammnucleosids.^[18–20] Im Prinzip sollte sich der gleiche Verbindungstyp auch als Aktivester zur Anwendung bei Synthesen eignen. Beispielhaft wurde versucht, *cyclo*Sal-Nucleotide wie **II** mit Salzen der nucleophilen Glycopyranosyl-1-phosphate **III–VI** unter Bildung der Pyrophosphatbindung in den entsprechenden NDP-Zuckern umzusetzen (Weg d,e; Schema 1).

Ausgangsmaterialien waren 5-Nitro-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetylthymidin **2** sowie die per-acetylierten Glycopyranosyl-1-phosphate **3–6** (siehe Schema 3). Zur Synthese dieser Verbindungen wurde wie folgt vorgegangen: Thymidin wurde durch Silylierung mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBDMS-Cl) an der 5'-Position geschützt. Das Produkt wurde mit Acetanhydrid zum vollgeschützten Thymidin in 92 % Ausbeute umgesetzt. Anschließend wurde die TBDMS-Gruppe selektiv mit Tetra-*n*-butylammoniumfluorid [(*n*Bu)₄NF] abgespalten und 3'-*O*-Acetylthymidin (3'-OAcT)

[*] Dr. S. Wendicke, Dipl.-Chem. S. Warnecke, Prof. Dr. C. Meier
Institut für Organische Chemie, Department Chemie der Fakultät
für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Universität
Hamburg
Martin-Luther-King-Platz 6, 20146 Hamburg (Deutschland)
Fax: (+49) 404-2838-2495
E-Mail: chris.meier@chemie.uni-hamburg.de
Homepage: <http://www.chemie.uni-hamburg.de/oc/meier/>

[**] Diese Arbeiten wurden im Rahmen des SFB 470/A8 durchgeführt.
Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung.

in 96 % Ausbeute isoliert. Diese Verbindung wurde anschließend durch Reaktion mit 5-Nitro-*cycloSal*-phosphorchloridit **7** in den Phosphatriester **2** überführt. **7** war ausgehend von 2-Hydroxymethyl-4-nitrophenol **8** hergestellt worden,^[21] das wiederum durch Reduktion aus dem Salicylsäurederivat **9** mit Boran in THF synthetisiert worden war (86 % Ausbeute). Das zunächst gebildete Phosphit-Intermediat wurde durch Oxidation mit Oxone (2 KHSO₅·KHSO₄·K₂SO₄) in den *cycloSal*-Phosphatriester **2** überführt (> 90 % Ausbeute; Schema 2). Das erhaltene



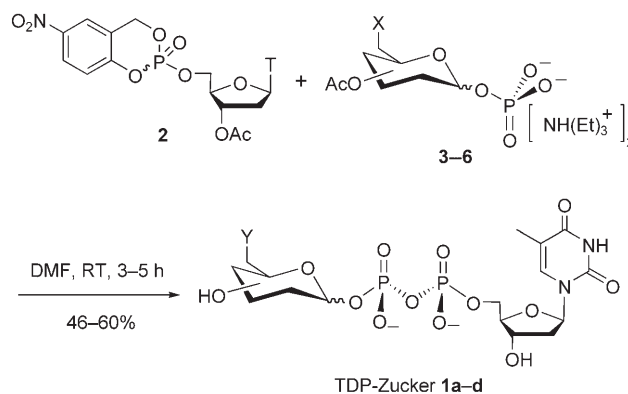
Schema 2. Synthese von 5-Nitro-*cycloSal*-(3'-OAc)-thymidinmonophosphat.

Rohprodukt war bereits ausreichend rein für die Verwendung in der Reaktion mit den Glycosyl-1-phosphaten. Wird das Oxone durch das in unseren früheren Arbeiten verwendete *tert*-Butylhydroperoxid ersetzt, sind die Ausbeuten deutlich niedriger, manchmal scheiterte die Reaktion sogar. Außer Oxone kann auch die aus der automatisierten DNA-Synthese bekannte Iod/Pyridin/THF/Wasser-Lösung verwendet werden.

D-Glucose, D-Mannose, D-Galactose und 6-Desoxy-D-glucose^[22] wurden mit Standardverfahren per-acetyliert und anschließend mithilfe zweier Methoden in die entsprechenden 1-Phosphate überführt. Im Fall der α -konfigurierten Pyranosyl-1-phosphate **3**(α)–**6**(α) wurden die Pentaacetylglucopyranosen am anomeren Zentrum durch Reaktion mit Hydraziniumacetat^[23] geschützt und anschließend mit Dibenzyl(diisopropylamino)phosphin und 1*H*-Tetrazol umgesetzt.^[24] Das dabei entstehende Phosphit wurde mit *m*-Chlorperbenzoesäure bei 0°C oxidiert, wobei die Dibenzylphosphatriester in 31–70 % Ausbeute gebildet wurden. Zur Synthese der β -konfigurierten Varianten wurden die Pentaacetylglucopyranosen in Bromide (HBr, HOAc) überführt, die anschließend mit Dibenzylphosphit in Gegenwart von Ag₂CO₃ bei 0°C umgesetzt wurden.^[25] Diese Reaktion lieferte ausschließlich β -D-Glycopyranosylphosphate in 81–98 % Ausbeute. Allerdings lieferte im Fall von D-Mannose auch die letztgenannte Reaktionsfolge ausschließlich die α -konfigurierten Phosphatriester. Die Phosphatgruppe wurde durch Hydrogenolyse mit Pd/C, H₂ und NEt₃ debenzyliert, wobei die α - bzw. β -konfigurierten D-Glucose-

3(α) und **3**(β), D-Galactose- (**4**(α) und **4**(β)), D-Mannose- (**5**(α)) und D-6-Desoxyglucosephosphate (**6**(α) und **6**(β)) als Triethylammonium-Salze in 73–95 % Ausbeute entstanden.

Bei der Reaktion des 5-Nitro-*cycloSal*-Nucleotids **2** mit den Pyranosyl-1-phosphaten **3**–**6** wurden die höchsten Ausbeuten mit DMF als Lösungsmittel erhalten. Bereits nach drei bis fünf Stunden bei Raumtemperatur waren die *cycloSal*-Phosphatriester vollständig umgesetzt, und in allen Fällen hatte sich stereospezifisch ein einziges Produkt gebildet (Schema 3). Die gleiche Reaktion in Pyridin benötigte hingegen erheblich längere Reaktionszeiten, während derer sich der *cycloSal*-Triester **2** zudem langsam zersetzte.



3–**5**: X = OAc; **6**: X = H **1a**–**c**: Y = OH; **1d**: Y = H

Schema 3. Synthese der NDP-Zucker ausgehend von *cycloSal*-Phosphatriestern.

Vor der Reinigung wurden die Acetylgruppen im Rohprodukt mit einer 1:7:3-Mischung von NEt₃/MeOH/H₂O abgespalten. Diese Schutzgruppenentfernung vor der Reinigung erleichtert die chromatographische Isolierung entscheidend. Die TDP-Zucker **1a**–**d** wurden an einer mit RP-18-Kieselgel gefüllten Glassäule gereinigt. Üblicherweise reichen zwei Passagen, um hochreine Produkte zu isolieren. Die Ausbeuten der NDP-Zucker betrugen zwischen 46 und 60 % (Tabelle 1). Wie erwartet bestätigte die spektroskopische Charakterisierung, dass die Anomerenkonfiguration homogen sowie identisch mit der Konfiguration der eingesetzten Glycopyranosyl-1-phosphate war.

Tabelle 1: Ausbeuten an dTDP-Pyranosen.

	D-Glc 1a (α)	D-Glc 1a (β)	D-Man 1b (α)	D-Man 1b (β)	D-Gal 1c (α)	D-Gal 1c (β)	6d-D-Gul 1d (α)	6d-D-Gul 1d (β)
Ausb. [%]	60	40	49	–	58	46	–	57

Anstelle der Triethylammonium-Salze der Zuckerphosphate wurden auch die entsprechenden Salze mit lipophileren Gegenionen untersucht, z. B. (nBu)₄N⁺. Zwar verbesserte sich die Löslichkeit wie erwartet, es stellte sich jedoch heraus, dass die Reinigung der NDP-Zucker viel schwieriger wurde, was letztlich zu merklich geringeren Ausbeuten führte.

Für den Vergleich unserer neuen mit der klassischen Methode wurden die Synthesen von TDP-D-Glucose **1a(α)** und **1a(β)** nach dem Morpholidat-Verfahren in Pyridin oder DMF wiederholt. Noch beim Abbruch der Reaktion nach fünf Tagen konnte das als Ausgangsmaterial verwendete Nucleotidmorpholidat im Reaktionsgemisch nachgewiesen werden. Nach Entschützung und Reinigung wurden die Zielverbindungen **1a(α,β)** in nur 10% Ausbeute isoliert. Dieser Befund zeigt, dass mit unserer neuen Methode sehr effizient und schnell anomereneine NDP-Glycopyranosen zugänglich sind.

Die neue Methode wurde anschließend zur Synthese der bislang unbekannten TDP-D-6-Desoxygulopyranose (**1d(β)**) eingesetzt, die nun für Biosynthesestudien von Lipopolysacchariden zur Verfügung steht. Darüber hinaus wurde die vorgestellte Methode bereits zur Synthese von NDP-Zuckern mit den Nucleosiden Uridin, 2'-Desoxyguanosin und Cytidin eingesetzt.^[26] Offensichtlich hat die neue Methode ein sehr breites Anwendungsspektrum.

Die *cycloSal*-Technik kann also nicht nur erfolgreich als Pronucleotid-System verwendet werden – sie wurde hier erstmals auch als neue Methode zur Synthese von Biokonjugaten eingesetzt, die durch eine Pyrophosphat-Gruppierung verknüpft sind.

Experimentelles

Der *cycloSal*-Triester **2** (100 mg, 0.2 mmol) und die entsprechenden Glycopyranosyl-1-phosphate **3-6** (1.2 Äquiv.) wurden in wasserfreiem DMF (5 mL) gelöst, und diese Lösung wurde 3–5 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Umsatz wurde durch Dünnschichtchromatographie überprüft. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter reduzierten Druck entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die wässrige Phase wurde lyophilisiert, und der Rückstand wurde anschließend mit einer Mischung aus NEt₃ (0.7 mL), MeOH (5 mL) und H₂O (2 mL) bei Raumtemperatur 12 h behandelt. Nach erneuter Lyophilisation wurde das Rohgemisch an einer mit RP-18-Kieselgel gefüllten Glassäule mit Wasser oder einem Wasser/Acetonitril-Gradienten als Eluent gereinigt. Beispielfhaft ist hier die Charakterisierung für **1c(α)** und **1c(β)** zusammengefasst. **1c(α)**: ¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 1.29 (t, 18H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, 2 × CH₃-NEt₃), 1.94 (d, 3H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, Thymin-CH₃), 2.37–2.44 (m, 2H, H-2'), 3.21 (q, 12H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, 2 × CH₂-NEt₃), 3.71–3.83 (m, 3H, H-5, H-6), 3.93 (dd, 1H, ³J_{HH} = 10.3 Hz, ³J_{HH} = 3.0 Hz, H-3), 4.04 (d, 1H, ³J_{HH} = 3.0 Hz, H-4), 4.19–4.20 (m, 4H, H-2, H-4', H-5'), 4.63 (m, 1H, H-3'), 5.65 (dd, 1H, ³J_{HP} = 7.3 Hz, ³J_{HH} = 3.8 Hz, H-1), 6.36 (dd, 1H, ³J_{HH} = 6.5 Hz, ³J_{HH} = 6.5 Hz, H-1'), 7.76 ppm (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, Thymin-CH₃); ³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ = –11.20 (d, J_{PP} = 20.9 Hz, P_β), –12.66 ppm (d, J_{PP} = 20.9 Hz, P_α); HR-MS (ESI) ber. für C₁₆H₂₅N₂O₁₆P₂ [M+H]: 563.0685, gef.: 563.0671. **1c(β)**: ¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 1.23 (t, 18H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, 2 × CH₃-NEt₃), 1.88 (s, 3H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, Thymin-CH₃), 2.27–2.39 (m, 2H, H-2'), 3.15 (q, 12H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, 2 × CH₂-NEt₃), 3.57 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, ²J_{HH} = 10.3 Hz, H-6), 3.63–3.67 (m, 1H, H-4), 3.70 (dd, 1H, ³J_{HH} = 3.0 Hz, ²J_{HH} = 10.3 Hz, H-6), 3.74–3.80 (m, 2H, H-3, H-5), 3.87

(d, 1H, ³J_{HH} = 3.3 Hz, H-2), 4.13–4.14 (m, 3H, H-4', H-5'), 4.58–4.60 (m, 1H, H-3'), 4.91 (dd, 1H, ³J_{HP} = 7.6 Hz, ³J_{HH} = 7.6 Hz, H-1), 6.31 (dd, 1H, ³J_{HH} = 6.6 Hz, ³J_{HH} = 6.6 Hz, H-1'), 7.71 ppm (d, 1H, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, Thymin-CH₃); ³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ = –11.75 (d, J_{PP} = 20.7 Hz, P_β), –13.24 ppm (d, J_{PP} = 20.7 Hz, P_α); HR-MS (ESI): ber. für C₁₆H₂₅N₂O₁₆P₂ [M+H]: 563.0685, gef.: 563.0673.

Eingegangen am 19. Juli 2007,

veränderte Fassung am 30. August 2007

Online veröffentlicht am 21. November 2007

Stichwörter: Glycokonjugate · Glycophosphotransferasen · Glycosylierungen · Kohlenhydrate · Nucleotide

- [1] E. F. Neufeld, W. Z. Hassid, *Adv. Carbohydr. Chem.* **1963**, *18*, 309.
- [2] N. K. Kochetkov, V. N. Shibaev, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1973**, *28*, 307.
- [3] M. Skurnik, L. Zhang, *APMIS* **1996**, *104*, 849.
- [4] S. Roseman, J. J. Distler, J. G. Moffatt, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 659.
- [5] J. G. Moffatt, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 3756.
- [6] E. S. Simon, S. Grabowski, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1834.
- [7] V. Wittmann, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2144.
- [8] R. E. Campbell, M. E. Tanner, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9487.
- [9] A. Schäfer, J. Thiem, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 24.
- [10] Q. Zhang, H.-W. Lui, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9065.
- [11] R. R. Schmidt, B. Wegmann, K.-H. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 121.
- [12] S. Zamyatina, C. Gronow, M. Oertelt, H. Puchberger, P. Brade, P. Kosma, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4322; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4150.
- [13] M. Arlt, O. Hindsgaul, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 14.
- [14] S. C. Timmons, D. L. Jakeman, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1227.
- [15] R. Stiller, J. Thiem, *Liebigs Ann. Chem.* **1992**, 467.
- [16] U. Gambert, J. Thiem, *Top. Curr. Chem.* **1997**, *186*, 21.
- [17] C. Meier, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1081.
- [18] C. Meier, M. Lorey, E. De Clercq, J. Balzarini, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1417.
- [19] C. Meier, T. Knispel, V. E. Marquez, M. A. Siddiqui, E. De Clercq, J. Balzarini, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1615.
- [20] C. Meier, A. Lomp, A. Meerbach, P. Wutzler, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5157.
- [21] C. Meier, E. De Clercq, J. Balzarini, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 837.
- [22] Zunächst versuchten wir, eine Synthese von 6d-D-Gulose aus der Literatur zu reproduzieren (L. M. Lerner, *Carbohydr. Res.* **1975**, *44*, 116). Da dies nicht gelang, erarbeiteten wir eine neue Syntheseroute, die wir demnächst publizieren werden.
- [23] G. Excoffier, D. Gagnaire, J.-P. Utile, *Carbohydr. Res.* **1975**, *39*, 368.
- [24] M. M. Sim, H. Kondo, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2260.
- [25] G. Baisch, R. Öhrlein, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 383.
- [26] Die Daten dazu werden wir demnächst publizieren.