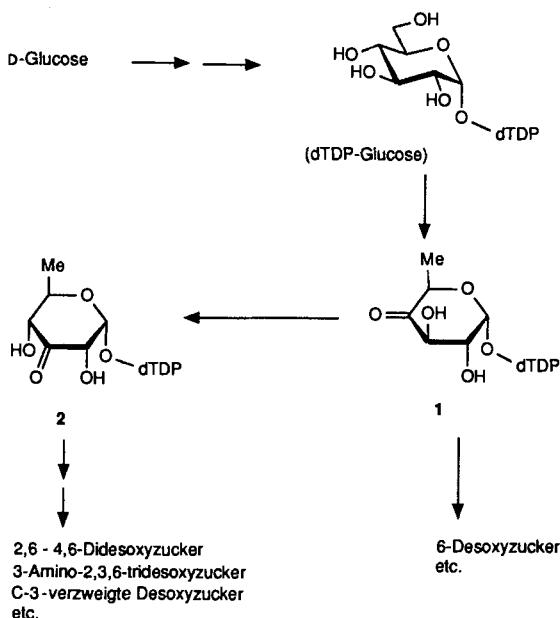


**Thymidindiphospho-6-desoxy- $\alpha$ -D-ribo-3-hexulose  
– Synthese einer zentralen Zwischenstufe der  
Biosynthese von Di- und Tridesoxyzuckern\*\***

Thomas Müller und Richard R. Schmidt\*

Zahlreiche Antibiotika enthalten Desoxy-, Aminodesoxy- und C-verzweigte Desoxyzucker als Bausteine. Nur sehr unvollständig ist ihre Biosynthese aufgeklärt<sup>[1, 2]</sup>. Eine erste wichtige Zwischenstufe auf diesem Wege ist die aus dTDP-Glucose (Schema 1) mit NAD-abhängiger dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase (z.B. von *E. coli*) erzeugte dTDP-6-Desoxy-D-xylo-4-hexulose 1, die u.a. Vorstufe für die häufig vorkommenden 6-Desoxyzucker ist<sup>[1–3]</sup>.

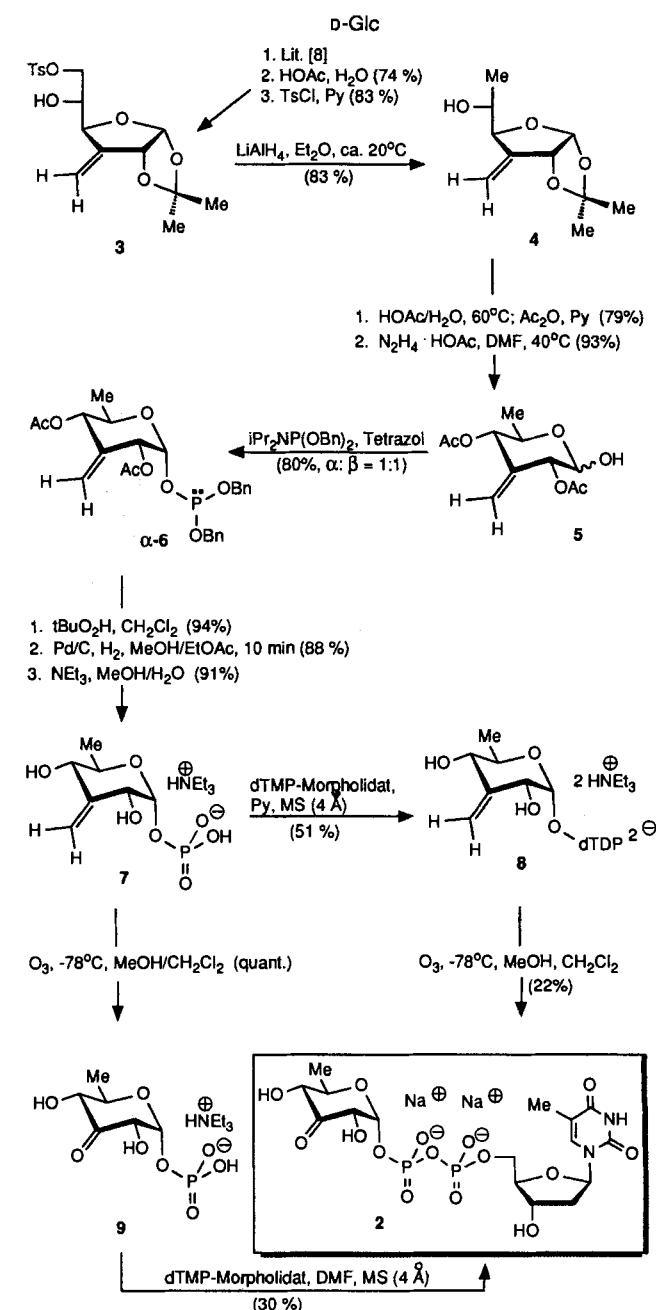


Schema 1.

Eine Isomerase überführt 1 vermutlich in die entsprechende 3-Hexulose 2, die Titelverbindung<sup>[2]</sup>, die als nächste zentrale Zwischenstufe (mit Pyridoxaminphosphat als Cofaktor) für die Bereitstellung der wichtigen Didesoxy-, Aminodesoxy- und C-verzweigten Zucker fungiert<sup>[2, 4]</sup>. Die 6-Desoxy-3-hexulose-Zwischenstufe 2 konnte bislang nicht isoliert werden<sup>[2]</sup>; deshalb ist die Synthese von 2 für die Aufklärung der Biosynthese von Di- und Tridesoxyzuckern (z.B. mit 4,6-Dehydratase- oder Isomerase-defizienten Mutanten) von großer Bedeutung<sup>[2]</sup>. Wegen der hydrolytischen Instabilität von Nucleosiddiphosphaten von Desoxyzuckern<sup>[5]</sup> und der großen Neigung zur  $\beta$ -Eliminierung des Nucleosiddiphosphatrestes bei 3-Ulosiden<sup>[6]</sup> ist die Synthese von Verbindung 2 besonders schwierig. Wir stellen hier eine erste, effiziente Synthese vor<sup>[7]</sup>, die – nach Abspaltung aller Schutzgruppen (im zweitletzten oder im letzten Reaktionsschritt) – auf einer späten Einführung der 3-Oxofunktion durch Ozonolyse der entsprechenden Methylenverbindung basiert.

Zunächst wurde D-Glucose auf bekanntem Wege in das 1,2:5,6-Di-O-isopropyliden-3-methylen-Derivat übergeführt<sup>[8]</sup>;

selektive Abspaltung der 5,6-O-Isopropylidengruppe mit 50proz. Essigsäure und anschließende regioselektive 6-O-Tosylierung ergab Verbindung 3 (Schema 2). Durch Reaktion mit LiAlH<sub>4</sub> in Ether bei Raumtemperatur wurde daraus die 6-Desoxyverbindung 4 in 83% Ausbeute hergestellt. Behandeln mit 80proz. Essigsäure bei 60 °C führte zur Abspaltung der Isopropylidengruppe; anschließende Acetylierung mit Acetanhydrid in Pyridin und selektive Abspaltung der 1-O-Acetylgruppe mit Hydrazinacetat<sup>[9]</sup> in DMF bei 40 °C lieferte das Pyranosederivat 5 in hoher Gesamtausbeute. Durch Reaktion mit dem monofunktionalen Phosphitylierungsreagens Bis(benzylxy)diisopropylaminophosphan<sup>[10]</sup> in Anwesenheit von Tetrazol wurde das Phosphit 6 als ein 1:1- $\alpha$ / $\beta$ -Gemisch erhalten<sup>[11]</sup>, das sich als hinreichend stabil für eine Trennung durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (PE/EtOAc = 10:1 + 1% NET<sub>3</sub>) erwies. Die so erhaltene Verbindung  $\alpha$ -6 (Tabelle 1) wurde durch Oxidation mit



Schema 2.

[\*] Prof. Dr. R. R. Schmidt, Dipl.-Chem. T. Müller

Fakultät Chemie der Universität

Postfach 5560 M 725, D-78434 Konstanz

Telefax: Int. +7531/883135

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

Tabelle 1. Ausgewählte physikalische Daten von **2**, **α-6**, **7**, **8** und **9**. Kopplungskonstanten in Hz.

**2:**  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 1.05$  (d,  $J_{5',6'} = 5.8$ , 3 H, 6'-H), 1.73 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 2.14–2.18 (m, 2 H, 2'-H, 2'-H), 3.93–4.07 (m, 5 H, 4'-H, 5'-H, 5'-H, 4"-H, 5"-H), 4.41–4.56 (m, 2 H, 3'-H, 2"-H), 5.67 (dd,  $J_{1',2'} = 7.1$ ,  $J_{1',2'} = 4.3$ , 1 H, 1"-H), 6.13 (dd,  $J_{1',2'} = 6.6$ ,  $J_{1',2'} = 6.9$ , 1 H, 1"-H), 7.55 (s, 1 H, 6-H);  $^{31}\text{P-NMR}$  (161.7 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = -10.64$  (d,  $J_{\text{P},\text{P}} = 22.5$ , 1 P), -6.02 (d,  $J_{\text{P},\text{P}} = 22.5$ , 1 P); Negativ-Ionen-FAB-MS (70 eV):  $m/z$  (%): 545 (27) [ $\text{M}-\text{H}^+$ ]

**α-6:**  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.16$  (d,  $J_{5',6'} = 6.2$ , 3 H, 6-H), 1.97, 2.17 (2 s, 6 H, 2  $\times$   $\text{OAc}$ ), 3.99 (d,  $J_{5',6'} = 9.8$ ,  $J_{5',6'} = 6.2$ , 1 H, 5-H), 4.86–4.94 (m, 4 H, 2  $\times$   $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.95–5.11 (m, 3 H, 4-H, Methylen-H), 5.41 (dd,  $J_{1',2'} = 3.5$ ,  $J_{2',4'} = 1.1$ , 1 H, 2-H), 5.68 (dd,  $J_{1',2'} = 8.3$ ,  $J_{1',2'} = 3.5$ , 1 H, 1"-H), 7.24–7.38 (m, 10 H, 2  $\times$  Ph);  $^{31}\text{P-NMR}$  (161.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 138.85$  (s, P)

**7:**  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 1.05$  (t,  $J = 7.3$ , 9 H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ ), 1.07 (d,  $J_{5',6'} = 5.4$ , 3 H, 6-H), 2.97 (q,  $J = 7.3$ , 6 H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ ), 3.52–3.62 (m, 2 H, 4-H, 5-H), 4.08 (m, 1 H, 2-H), 4.83–5.01 (m, 2 H, Methylen-H), 5.24 (dd,  $J_{1',2'} = 6.5$ ,  $J_{1',2'} = 3.7$ , 1 H, 1"-H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 9.16$  (s, 3 C,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ ), 18.11 (s, 1 C, 6-C), 47.61 (s, 3 C,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ ), 70.89 (d,  $J_{1',2'} = 8.9$ , 1 C, 2-C), 71.80–73.40 (2 s, 2 C, 4-C, 5-C), 95.48 (d,  $J_{1',2'} = 6.3$ , 1 C, 1-C), 105.58 (s, 1 C, 3-C), 146.30 (s, 1 C, Methylen-C);  $^{31}\text{P-NMR}$  (161.7 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 3.97$  (s, P); Negativ-Ionen-FAB-MS (70 eV):  $m/z$  (%): 239 (100) [ $\text{M}-\text{H}^+$ ]

**8:**  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 1.05$  (d,  $J_{5',6'} = 5.8$ , 3 H, 6-H), 1.07 (t,  $J = 7.3$ , 18 H, 2  $\times$   $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ ), 1.73 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 2.13–2.18 (m, 2 H, 2'-A, 2'-E), 2.97 (q,  $J = 7.3$  Hz, 12 H, 2  $\times$   $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ ), 3.61–3.63 (m, 2 H, 4"-H, 5"-H), 3.95–3.97 (m, 3 H, 4'-H, 5'-H, 5"-H), 4.08 (m, 1 H, 2"-H), 4.42 (m, 1 H, 3'-H), 4.97–5.04 (m, 2 H, Methylen-H), 5.37 (dd,  $J_{1',2'} = 7.0$ ,  $J_{1',2'} = 3.7$ , 1 H, 1"-H), 6.16 (dd,  $J_{1',2'} = 6.8$ ,  $J_{1',2'} = 7.1$ , 1 H, 1"-H), 7.52 (d,  $J = 0.9$ , 1 H, 6-H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 9.17$  (s, 6 C, 2  $\times$   $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ ), 12.59 (s, 1 C,  $\text{CH}_3$ ), 18.20 (s, 1 C, 6"-C), 39.56 (s, 1 C, 2'-C), 47.63 (s, 6 C, 2  $\times$   $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ ), 66.32 (d,  $J_{1',2'} = 5.2$ , 1 C, 5'-C), 71.07 (d,  $J_{1',2'} = 9.1$ , 1 C, 2'-C), 71.82–73.44 (m, 3 C, 3'-C, 4"-C, 5"-C), 85.92 (s, 1 C, 1'-C), 86.35 (d,  $J_{1',2'} = 9.1$ , 1 C, 4-C), 96.25 (d,  $J_{1',2'} = 6.4$ , 1 C, 6"-C), 105.62 (s, 1 C, 3"-C), 112.62 (s, 1 C, 5-C), 138.33 (s, 1 C, 6-C), 164.54 (s, 1 C, Methylen-C), 152.60 (s, 1 C, 2-C), 167.40 (s, 1 C, 4-C);  $^{31}\text{P-NMR}$  (161.7 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = -12.35$  (d,  $J_{\text{P},\text{P}} = 22.5$ , 1 P), -10.81 (d,  $J_{\text{P},\text{P}} = 22.5$ , 1 P); Negativ-Ionen-FAB-MS (70 eV):  $m/z$  (%): 543 (31) [ $\text{M}-\text{H}^+$ ]

**9:**  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 1.09$  (t,  $J = 7.3$ , 9 H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ ), 1.23 (d,  $J_{5',6'} = 5.8$ , 3 H, 6-H), 3.00 (q,  $J = 7.3$ , 6 H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ ), 3.86–3.99 (m, 2 H, 4-H, 5-H), 4.44 (m, 1 H, 2-H), 5.58 (dd,  $J_{1',2'} = 6.7$ ,  $J_{1',2'} = 4.3$ , 1 H, 1"-H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 13.82$  (s, 3 C,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ ), 23.98 (s, 1 C, 6-C), 51.16 (s, 3 C,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ ), 77.70–83.52 (2 s, 2 C, 4-C, 5-C), 81.71 (d,  $J_{1',2'} = 5.2$ , 1 C, 2-C), 103.06 (d,  $J_{1',2'} = 4.3$ , 1 C, 1-C), 199.54 (s, 1 C, 3-C);  $^{31}\text{P-NMR}$  (161.7 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = -1.44$  (s, P); Negativ-Ionen-FAB-MS (70 eV):  $m/z$  (%): 241 (100) [ $\text{M}-\text{H}^+$ ]

*tert*-Butylhydroperoxid praktisch quantitativ in das entsprechende Phosphat übergeführt, das wesentlich weniger stabil als das Phosphit **α-6** ist. Durch kurzzeitiges Hydrieren mit Palladium auf Kohle als Katalysator konnte das Phosphat chemoselektiv debenzyliert werden, ohne die Methylengruppe zu entfernen. Mit  $\text{NEt}_3$  in Methanol/Wasser wurde dann desacetyliert und so die völlig entschützte wichtige Zwischenstufe **7** als Triethylammoniumsalz in hoher Gesamtausbeute erhalten.

Zur Herstellung des Zielmoleküls **2** aus **7** wurden zwei Wege beschritten. Zunächst wurde aus **7** mit Thymidinphosphomorpholidat<sup>[12]</sup> in Pyridin und Molekularsieb (4 Å) das Thymidin-diphospho-Derivat **8** synthetisiert. **8** wurde durch präparative HPLC (5%  $\text{CH}_3\text{CN}$  in 0.5 M  $\text{HNEt}_3^+ \text{HCO}_3^-$ ) in 51% Ausbeute als Bis(triethylammonium)-Salz erhalten; es ist erwartungsgemäß bei pH = 7 stabil und als Methylen-Analogon von **2** für biologische Untersuchungen ebenfalls von Interesse. Zur Erzeugung der 3-Ulose-Struktur wurde eine Methanolösung von **8** bei -78 °C mit einer bei -78 °C gesättigten Lösung von Ozon in Dichlormethan versetzt und das Reaktionsgemisch anschließend durch Reversed-Phase-HPLC an RP-18 (3%  $\text{CH}_3\text{CN}$  in 0.5 M  $\text{HNEt}_3^+ \text{HCO}_3^-$ ) getrennt; dabei wurde neben dem Edukt das Zielmolekül **2** als Bis(triethylammonium)-Salz nach Lyophilisation in 22% Ausbeute erhalten. Wegen der geringen Hydrolysestabilität dieses Salzes (Halbwertszeit bei pH 7 ca. 1 h) wurde durch Ionenaustausch (Amberlite IR-120,  $\text{Na}^+$ -Form) das Dinatriumsalz von **2** hergestellt, das wie erwartet<sup>[13]</sup> erheblich stabiler ist. Durch Änderung der Reihenfolge der Reak-

tionsschritte bei der Synthese von **2** aus **7** konnte überraschenderweise eine höhere Gesamtausbeute erzielt werden. Durch direkte Ozonolyse von **7** bei -78 °C ließ sich das 3-Ulose-phosphat **9** in praktisch quantitativer Ausbeute erzeugen. Trotz hoher Instabilität von **9** lieferte die Morpholidatmethode<sup>[12]</sup> das Zielmolekül **2** in 30% Ausbeute, wobei zur Reinigung das oben aufgeführte Verfahren eingesetzt wurde<sup>[14]</sup>. Das Zielmolekül **2** konnte so in reiner Form isoliert (30 mg) und strukturell – ebenso wie die Zwischenverbindungen **3–9** – durch NMR- ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) und FAB-MS-Daten gesichert werden (**2**, **α-6**, **7–9** siehe Tabelle 1). Das hier vorgestellte Synthesekonzept ist offensichtlich variabel und für die Herstellung weiterer interessanter Nucleosidderrivate von Desoxyzuckern geeignet<sup>[7]</sup>; es sollte deshalb einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung ihrer Biosynthese leisten können.

Eingegangen am 2. Februar 1995 [Z 7683]

**Stichworte:** Desoxyzucker · Ketozucker · Kohlenhydrate · Nucleosiddiphosphatzucker

- [1] H. Griesbach, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1978**, *35*, 81–126; V. N. Shibaev, *ibid.* **1986**, *44*, 277–339.
- [2] J. S. Thorson, S. F. Lo, H.-W. Liu, C. R. Hutchinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6993–6994; H.-W. Liu, J. S. Thorson, *Annu. Rev. Microbiol.* **1994**, *48*, 223–256, zit. Lit.
- [3] R. Okazaki, T. Okazaki, J. L. Strominger, A. M. Michelson, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3014–3026; C. E. Snipes, G. U. Brillinger, L. Sellers, L. Mascaro, H. G. Floss, *ibid.* **1977**, *252*, 8113–8117.
- [4] C. E. Snipes, C. Chang, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 701–706; H. G. Floss in *The Antibiotics*, Vol. 4 (Hrsg.: J. W. Corcoran), Springer, Berlin, **1981**, S. 215–235; J. J. Lee, J. P. Lee, P. J. Keller, C. E. Cottrell, C.-J. Chang, *J. Antibiotics* **1986**, *39*, 1123–1134.
- [5] E. Heinz, H. Schmidt, M. Hoch, K.-H. Jung, R. R. Schmidt, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *184*, 445–453; M. Hoch, E. Heinz, R. R. Schmidt, *Carbohydr. Res.* **1989**, *193*, 33–47; R. R. Schmidt, B. Wegmann, K.-H. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, *121*–124.
- [6] T. Eisele, R. R. Schmidt, unveröffentlicht; T. Eisele, Diplomarbeit, Universität Konstanz, 1993.
- [7] T. Müller, unveröffentlicht.
- [8] O. T. Schmidt in *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. II (Hrsg.: R. L. Whistler, M. L. Wolfrom), Academic Press, New York, **1963**, S. 318–325; W. Sowa, G. M. S. Thomas, *Can. J. Chem.* **1966**, *44*, 836–838; A. Mazur, B. E. Tropp, R. Engel, *Tetrahedron* **1984**, *44*, 3949–3956.
- [9] G. Excoffier, D. Gagnaire, J.-P. Utile, *Carbohydr. Res.* **1975**, *39*, 368–373.
- [10] W. Bannwarth, A. Trzeciak, *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 175–183.
- [11] Versuche zur säurekatalysierten Anomerisierung von  $\beta$ -6 →  $\alpha$ -6 führten zur Zersetzung.
- [12] S. Roseman, J. J. Distler, J. G. Moffat, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 659–663; J. G. Moffat, *Methods Enzymol.* **1966**, *8*, 136–142.
- [13] R. R. Schmidt, K. Frische, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 1747–1750; K. Frische, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 297–303.
- [14] Reinigung mit stark basischem Anionenaustauscher (Dowex 2 X 8 [ $\text{Cl}^-$ ]) durch Elution mit wässriger  $\text{LiCl}$ -Lösung führte zur Zersetzung von Verbindung **2**.