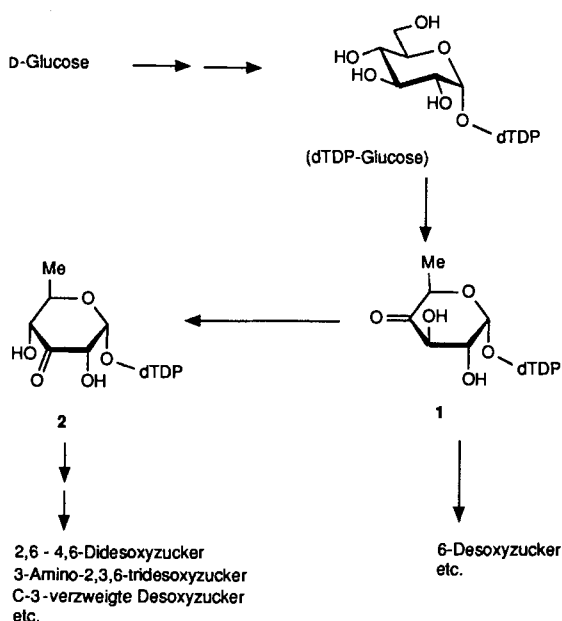


Thymidindiphospho-6-desoxy- α -D-ribo-3-hexulose – Synthese einer zentralen Zwischenstufe der Biosynthese von Di- und Tridesoxyzuckern**

Thomas Müller und Richard R. Schmidt*

Zahlreiche Antibiotica enthalten Desoxy-, Aminodesoxy- und C-verzweigte Desoxyzucker als Bausteine. Nur sehr unvollständig ist ihre Biosynthese aufgeklärt^[1, 2]. 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 dTPD-6-Desoxy-D-xylo-4-hexulose **1**, die u.a. Vorstufe für die häufig vorkommenden 6-Desoxyzucker ist^[1–3].

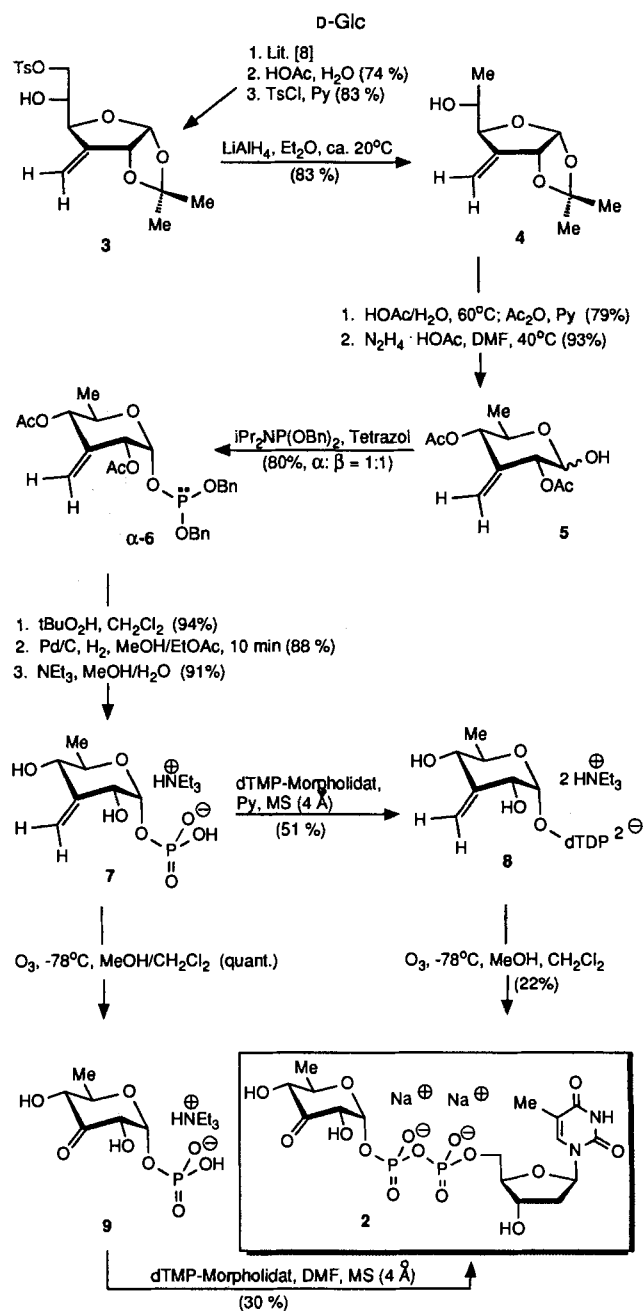


Schema 1.

Eine Isomerase überführt **1** vermutlich in die entsprechende 3-Hexulose **2**, die Titelverbindung^[2], die als nächste zentrale Zwischenstufe (mit Pyridoxaminphosphat als Cofaktor) für die Bereitstellung der wichtigen Didesoxy-, Aminodesoxy- und C-verzweigten Zucker fungiert^[2, 4]. Die 6-Desoxy-3-hexulose-Zwischenstufe **2** konnte bislang nicht isoliert werden^[2]; 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^[2]. Wegen der hydrolytischen Instabilität von Nucleosiddiphosphaten von Desoxyzuckern^[5] und der großen Neigung zur β -Eliminierung des Nucleosiddiphosphatrestes bei 3-Uliden^[6] ist die Synthese von Verbindung **2** besonders schwierig. Wir stellen hier eine erste, effiziente Synthese vor^[7], 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^[8];

selektive Abspaltung der 5,6-O-Isopropylidengruppe mit 50proz. Essigsäure und anschließende regioselective 6-O-Tosylierung ergab Verbindung **3** (Schema 2). Durch Reaktion mit LiAlH₄ 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^[9] in DMF bei 40 °C lieferte das Pyranosederivat **5** in hoher Gesamtausbeute. Durch Reaktion mit dem monofunktionalen Phosphitylierungsreagens Bis(benzyloxy)diisopropylaminophosphan^[10] in Anwesenheit von Tetrazol wurde das Phosphit **6** als ein 1:1- α/β -Gemisch erhalten^[11], das sich als hinreichend stabil für eine Trennung durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (PE/EtOAc = 10:1 + 1% NEt₃) erwies. Die so erhaltene Verbindung α -**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: ¹H-NMR (250 MHz, D₂O): δ = 1.05 (d, $J_{5',6'} = 5.8$, 3H, 6"-H), 1.73 (s, 3H, CH₃), 2.14–2.18 (m, 2H, 2'-H, 2"-H), 3.93–4.07 (m, 5H, 4'-H, 5'-H, 5"-H, 4"-H), 4.41–4.56 (m, 2H, 3'-H, 2"-H), 5.67 (dd, $J_{1',2'} = 7.1$, $J_{1',2''} = 4.3$, 1H, 1'-H), 6.13 (dd, $J_{1',2'a} = 6.6$, $J_{1',2'e} = 6.9$, 1H, 1'-H), 7.55 (s, 1H, 6-H); ³¹P-NMR (161.7 MHz, D₂O): δ = -10.64 (d, $J_{P,P'} = 22.5$, 1P), -6.02 (d, $J_{P,P'} = 22.5$, 1P); Negativ-Ionen-FAB-MS (70 eV): m/z (%): 545 (27) [$M-H^+$]⁻

α -6: ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.16 (d, $J_{5,6} = 6.2$, 3H, 6-H), 1.97, 2.17 (2 s, 6H, 2 \times OAc), 3.99 (dq, $J_{4,5} = 9.8$, $J_{5,6} = 6.2$, 1H, 5-H), 4.86–4.94 (m, 4H, 2 \times CH₂Ph), 4.95–5.11 (m, 3H, 4-H, Methylen-H), 5.41 (dd, $J_{1,2} = 3.5$, $J_{2,4} = 1.1$, 1H, 2-H), 5.68 (dd, $J_{1,2} = 8.3$, $J_{1,2} = 3.5$, 1H, 1-H), 7.24–7.38 (m, 10H, 2 \times Ph); ³¹P-NMR (161.7 MHz, CDCl₃): δ = 138.85 (s, P)

7: ¹H-NMR (250 MHz, D₂O): δ = 1.05 (t, $J = 7.3$, 9H, N(CH₂CH₃)₃), 1.07 (d, $J_{5,6} = 5.4$, 3H, 6-H), 2.97 (q, $J = 7.3$, 6H, N(CH₂CH₃)₃), 3.52–3.62 (m, 2H, 4-H, 5-H), 4.08 (m, 1H, 2-H), 4.83–5.01 (m, 2H, Methylen-H), 5.24 (dd, $J_{1,2} = 6.5$, $J_{1,2} = 3.7$, 1H, 1-H); ¹³C-NMR (62.9 MHz, D₂O): δ = 9.16 (s, 3C, N(CH₂CH₃)₃), 18.11 (s, 1C, 6-C), 47.61 (s, 3C, N(CH₂CH₃)₃), 70.89 (d, $J_{2,P} = 8.9$, 1C, 2-C), 71.80–73.40 (2 s, 2C, 4-C, 5-C), 95.48 (d, $J_{1,P} = 6.3$, 1C, 1-C), 105.58 (s, 1C, 3-C), 146.30 (s, 1C, Methylen-C); ³¹P-NMR (161.7 MHz, D₂O): δ = 3.97 (s, P); Negativ-Ionen-FAB-MS (70 eV): m/z (%): 239 (100) [$M-H^+$]⁻

8: ¹H-NMR (250 MHz, D₂O): δ = 1.05 (d, $J_{5',6'} = 5.8$, 3H, 6"-H), 1.07 (t, $J = 7.3$, 18H, 2 \times N(CH₂CH₃)₃), 1.73 (s, 3H, CH₃), 2.13–2.18 (m, 2H, 2'-a-H, 2'-e-H), 2.97 (q, $J = 7.3$ Hz, 12H, 2 \times N(CH₂CH₃)₃), 3.61–3.63 (m, 2H, 4"-H, 5"-H), 3.95–3.97 (m, 3H, 4'-H, 5'-H, 5"-H), 4.08 (m, 1H, 2"-H), 4.42 (m, 1H, 3'-H), 4.97–5.04 (m, 2H, Methylen-H), 5.37 (dd, $J_{1',2'} = 7.0$, $J_{1',2''} = 3.7$, 1H, 1'-H), 6.16 (dd, $J_{1',2'a} = 6.8$, $J_{1',2'e} = 7.1$, 1H, 1'-H), 7.52 (d, $J = 0.9$, 1H, 6-H); ¹³C-NMR (62.9 MHz, D₂O): δ = 9.17 (s, 6C, 2 \times N(CH₂CH₃)₃), 12.59 (s, 1C, CH₃), 18.20 (s, 1C, 6'-C), 39.56 (s, 1C, 2'-C), 47.63 (s, 6C, 2 \times N(CH₂CH₃)₃), 66.32 (d, $J_{5',P} = 5.2$, 1C, 5'-C), 71.07 (d, $J_{2',P} = 9.1$, 1C, 2'-C), 71.82–73.44 (m, 3C, 3'-C, 4'-C, 5'-C), 85.92 (s, 1C, 1'-C), 86.35 (d, $J_{4',P} = 9.1$, 1C, 4'-C), 96.25 (d, $J_{1',P} = 6.4$, 1C, 6'-C), 105.62 (s, 1C, 3'-C), 112.62 (s, 1C, 5-C), 138.33 (s, 1C, 6-C), 164.54 (s, 1C, Methylen-C), 152.60 (s, 1C, 2-C), 167.40 (s, 1C, 4-C); ³¹P-NMR (161.7 MHz, D₂O): δ = -12.35 (d, $J_{P,P'} = 22.5$, 1P), -10.81 (d, $J_{P,P'} = 22.5$, 1P); Negativ-Ionen-FAB-MS (70 eV): m/z (%): 543 (31) [$M-H^+$]⁻

9: ¹H-NMR (250 MHz, D₂O): δ = 1.09 (t, $J = 7.3$, 9H, N(CH₂CH₃)₃), 1.23 (d, $J_{5,6} = 5.8$, 3H, 6-H), 3.00 (q, $J = 7.3$, 6H, N(CH₂CH₃)₃), 3.86–3.99 (m, 2H, 4-H, 5-H), 4.44 (m, 1H, 2-H), 5.58 (dd, $J_{1,2} = 6.7$, $J_{1,2} = 4.3$, 1H, 1-H); ¹³C-NMR (62.9 MHz, D₂O): δ = 13.82 (s, 3C, N(CH₂CH₃)₃), 23.98 (s, 1C, 6-C), 51.16 (s, 3C, N(CH₂CH₃)₃), 77.70–83.52 (2 s, 2C, 4-C, 5-C), 81.71 (d, $J_{2,P} = 5.2$, 1C, 2-C), 103.06 (d, $J_{1,P} = 4.3$, 1C, 1-C), 199.54 (s, 1C, 3-C); ³¹P-NMR (161.7 MHz, D₂O): δ = -1.44 (s, P); Negativ-Ionen-FAB-MS (70 eV): m/z (%): 241 (100) [$M-H^+$]⁻

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 debenziliert werden, ohne die Methylengruppe zu entfernen. Mit NEt₃ 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^[12] in Pyridin und Molekularsieb (4 Å) das Thymidindiphospho-Derivat 8 synthetisiert. 8 wurde durch präparative HPLC (5% CH₃CN in 0.5 M HNEt₃⁺ HCO₃⁻) 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 Methanollösung 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% CH₃CN in 0.5 M HNEt₃⁺ HCO₃⁻) 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, Na⁺-Form) das Dinatriumsalz von 2 hergestellt, das wie erwartet^[13] 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^[12] das Zielmolekül 2 in 30% Ausbeute, wobei zur Reinigung das oben aufgeführte Verfahren eingesetzt wurde^[14]. Das Zielmolekül 2 konnte so in reiner Form isoliert (30 mg) und strukturell – ebenso wie die Zwischenverbindungen 3–9 – durch NMR- (¹H, ¹³C, ³¹P) 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 Nucleosidderivate von Desoxyzuckern geeignet^[7]; 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. Griesebach, *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. Utille, *Carbohydr. Res.* **1975**, 39, 368–373.
- [10] W. Bannwarth, A. Trzeciak, *Helv. Chim. Acta* **1987**, 70, 175–183.
- [11] Versuche zur säurekatalysierten Anomerisierung von β -6 \rightarrow α -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 [Cl⁻]) durch Elution mit wässriger LiCl-Lösung führte zur Zersetzung von Verbindung 2.