NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO (11) **312033** (13) B1

(51) Int Cl[7] C 07 H 7/04, 3/06, C 08 B 37/00

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19993892	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	1999.08.12		
(24) Løpedag	1999.08.12	(85) Videreføringsdag	
(41) Alm. tilgj.	2000.02.14	(30) Prioritet	1998.08.13, EP, 98202709
(45) Meddelt dato	2002.03.04		

(71) Patenthaver Akzo Nobel NV, Postbus 9300, NL-6800 SB Arnhem, NL
Sanofi-Synthelabo SA, 174, avenue de France, F-75013 Paris, FR

(72) Oppfinner Dirk Jan Vermaas, Oss, NL

(74) Fullmektig Bryn & Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) Benevnelse **Fremgangsmåte for selektiv oksydasjon av primære alkoholer av oligosakarider**

(56) Anførte publikasjoner Ingen

(57) Sammendrag

Det er beskrevet en fremgangsmåte for selektiv oksydasjon av primære alkoholer av oligosakarider for å danne tilsvarende karboksylsyrederivater av alkoholene ved anvendelse av katalytiske mengder av en di-tertiær-alkyl nitroksylfri rest, kjennetegnet ved at 1,3-dibrom-5,5-dimetylhydantoin eller 1,3-diklor-5,5-dimetylhydantoin blir anvendt som oksyderingsmiddel, og reaksjonen blir utført i nøytrale til basiske betingelser ved en pH < 10.

Fremgangsmåten er nyttig for fremstiling av (delvis beskyttete) oligosakarider omfattende karboksylatgrupper, både mellomprodukter og sluttprodukter.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en ny fremgangsmåte for selektiv oksydasjon av primære alkoholer av oligosakarider.

Oligo- og polysakarider inneholdende uronsyre-byggeklosser så som glycosaminoglycaner heparin, heparansulfat, kondroitinsulfat og dermatansulfat har viktige fysiologiske funksjoner, de kan blant annet ha antitrombotisk aktivitet. Slike forbindelser kan bli isolert fra biologiske kilder så som tarmslimhinne, men kan også bli fremstilt syntetisk.

Dette krever generelt en fler-trinns syntese. Et nøkkeltrinn i denne syntesen er oskydasjon av primære hydroksylgrupper av (mellom)-oligosakarider til karboksylsyrer uten å påvirke enten de ubeskyttete sekundære hydroksylgruppene eller beskyttelse av andre hydroksylgrupper som også er til stede i molekylet.

I de fleste fremgangsmåtene kjent innenfor fagområdet for oksydasjon av oligosakarider, så som krombaserte oksydasjonsreaksjoner er selektiv oksydasjon av primære hydroksylgrupper ikke mulig. Reaksjonene krever også beskyttelse av sekundære hydroksylgrupper som ellers ville være ubeskyttete. Som et resultat trenger den selektive oksydasjonen av primære hydroksylgrupper av oligosakarider ved anvendelse av disse kjente fremgangsmåtene mer enn et reaksjonstrinn (som involverer beskyttelse av sekundære hydroksylgrupper, oksydasjon av primære hydroksylgrupper og avbeskyttelse av sekundære hydroksylgrupper).

Derimot beskriver Davis, N.J. og Flitsch, S.Ll. /*Tetrahedron Letters*, Vol, 34, 1181-1184 (1993)) en ett-trinns fremgangsmåte for selektriv oksydasjon av primære hydroksylgrupper av delvis beskyttete monosakarider til deres karboksylsyrer. Reaksjonen blir utført i et to-fase oppløsningsmiddelsystem (diklormetan og vann) ved anvendelse av natriumhypokloritt som oksideringsmiddel i nærvær av katalytiske mengder av 2,2,6,6-tetrametyl-1-piperidinyloksy (TEMPO). En alvorlig ulempe ved denne fremgangsmåten er at det er blitt oppdaget at den ikke er egnet for oligosakarider omfattende mer enn en sakaridenhet. I slike tilfeller går ikke oksydasjon til dannelse av ønskete karboksylsyrer. En ulempe ved syntesen er 2-fase oppløsningsmiddelsystemet som krever en faseoverføringskatalysator.

En annen fremgangsmåte for fullstendig og selektiv oksyidasjon av primære alkoholer av oligo- og polysakarider er blitt beskrevet (WO 95/07303). Denne fremgangsmåten er derimot bare vellykket med ubeskyttete oligosakarider. I oksidasjonen blir det også anvendt et hypohalit og en katalytisk mengde av en di-tertiær-alkylnitroksyl, derimot i et vandig medium ved pH 9-13. Den sistnevnte

fremgangsmåten er ugunstig for oksydasjon av beskyttete oligosakarider på grunn av at beskyttelsen ikke forblir intakt under disse sterkt basiske betingelsene. Videre blir store mengder salter dannet i denne reaksjonen, og fjerning derav er spesielt et problem i tilfeller med mindre oligosakarider (se f.eks. De Nooy, A.E.J. et al in *Receuil des Travaux Chimiques des Pays Bas,* 113/03, mars 1994).

En ny fremgangsmåte er nå blitt oppdaget som er nyttig for selektriv oksydasjon av primære hydroksylgrupper av oligosakarider som ikke har ulempene nevnt ovenfor. Oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for selektiv oksydasjon av primære alkoholer av oligosakarider for å danne tilsvarende karboksylsyrederivater av alkoholer ved anvendelse av katalytiske mengder av en di-tertiær-alkyl nitroksylfri rest, kjennetegnet ved at 1,3-bidrom-5,5-dimetylhydrantoin eller 1,3-diklor-5,5-dimetylhydratoin blir anvendt som oksyderingsmiddel, og reaksjonen blir utført ved nøytrale til basiske betingelser ved en pH < 10. Fremgangsmåten er spesielt nyttig for selektiv oksydasjon av delvis beskyttete oligosakaradier.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen fører til produksjon av karboksylsyrer av (delvis beskyttete) oligosakarider i gode til høye utbytter.

Disse resultatene er uventete. Til tross for at 1,3-dibrom-5,5-dimetylhydrantoin (bidromantin) - og likeledes analoger derav, er kjente som et nyttig oksiyeringsmiddel, blir det anvendt for både primære og sekundære alkoholer, men mest effektivt for sekundære alkoholer. Oksydasjonen fører til dannelsen av tilsvarende aldehyder og ketoner (se f.eks. Orazi, O.O. et al., *Anales Asoc. Quim. Argentina* **42**, 139-46 (1954)
og Reed, R.A. *Chem.Proch.* **23,** 299-302 (1960)). Fullstendig og selektiv oksydasjon av primære hydroksylfunksjoner ved anvendelse av dette midlet for å danne tilsvarende karboksylsyrer er aldri blitt rapportert.

Lignende resultater, dvs. oksydasjon av primære og sekundære alkoholer til aldehyder og ketoner, ble oppnådd ved anvendelse av visse organiske N-klor-forbindelser i nærvær av et di-tertiær-alkyl nitroksyl (EP 0,775,684).

Noen organiske N-halogen-midler er videre blitt foreslått for fremstilling av polymere karboksylater (DE 4209869).

Fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse er nyttig for selektiv oksydasjon av primære alkoholfunksjoner i oligosakarider, spesielt når hydroksy-gruppene er delvis beskyttete. Fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse

etterlater beskyttelsesgruppene upåvirkete slik at disse gruppene kan bli fjernet ved et senere stadium, når ytterligere omdanning av oligosakaridet er nødvendig. Foretrukne oligosakarider omfatter 1-6, fortrinnsvis 1-2, monosakaridenheter. Videre foretrukne oligosakarider er (mellomprodukter ved syntese av) antitrombotiske glycosaminoglycaner eller glycosaminoglycan-lignende molekyler, som de som er beskrevet i EP 84,999, EP 301,618, EP 454,220, EP 529,715 og lignende. Spesielt foretrukne er fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen hvor henholdsvis metyl 6-O-acetyl-4-O-[2-O-acetyl-3-O-(fenylmetyl)-α-L-idopyranuronosyl)-2-deoksy-2-[[(fenylmetoksy)karbonyl]amino]-3-O-(fenylmetyl)-α-D-glucopyranosid, 3-O-acetyl-1,6-anhydro-2-azido-2-deoksy-4-O-[2,3-bis-O-(fenylmetyl)-β-D-glucopyranuronosyl]-β-D-glucopyranos, metyl 4-O-(2,3-bis-O-metyl-α-L-idopyranuronosyl)-2,3,6-tris-O-fenylmetyl)-β-D-glucopyranos og metyl 4-O-(2,3-bis-O-metyl-β-D-glucopyranuronosyl)-2,3,6-tris-O-(fenylmetyl-β-D-fenylmetyl)-β-D-glucopyranos blir dannet. Oksydasjon av beskyttende oligosakarider blir fortrinnsvis utført ved en pH på 7-9, og mest foretrukket ved pH 8.

Di-tertiær-alkylnitroksylfri rest kan være acyklisk, men er fortrinnsvis en cyklisk forbindelse, som beskrevet i WO 95/07303 og EP 0,775,684 (som herved er inkludert som referanse). Den mest foretrukne nitroksylforbindelsen er 2,2,6,6-tetrametylpiperidin-1-oksyl. I fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen blir en katalytisk mengde av en nitroksylforbindelse anvendt. Fagfolk innenfor dette området vet hva som menes med dette. Det er foretrukket at en katalytisk mengde av nitroksyl er 0,05 - 10 mol.%, og spesielt 0,5 - 5 mol.%, og mest foretrukket er 1 - 3 %, basert på alkoholen.

En foretrukket fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen er fremgangsmåten hvor 1,3-dibrom-5,5-dimetylhydrantoin blir anvendt som oksydant.

Oksydanten blir anvendt i minst stoikiometriske mengder basert på alkoholen. Det et foretrukket at 2- 4 mol. ekvivalenter av aktivt halogen (dvs. $(halogen)^+$) blir anvendt, som betyr når det gjelder dibromantin 1-2 mol. ekvivalenter av forbindelsen.

I en egnet fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen kan nitroksylforbindelsen bli tilsatt til en løsning av alkoholen i et hensiktsmessig oppløsningsmiddel, ved kontrollert pH, hvoretter oksydanten kan bli tilsatt. Reaksjonssekvensen er derimot ikke kritisk, og reagensene kan også bli kontaktet med hverandre i en annen sekvens.

Reaksjonen kan bli utført i en mengde forskjellige oppløsningsmidler som fortrinnsvis er blandbare med vann. Foretrukne oppløsningsmidler er tetrahydrofuran, *tert.*-butanol og acetonitril, idet *tert.*-butanol er mest foretrukket.

pH til reaksjonsblandingen blir kontrollert ved anvendelse av fremgangsmåter som er velkjente innenfor fagområdet. En meget egnet fremgnagsmåte er bufring med en natriumhydrogenkarbonat-oppløsning.

Reaksjonstemperaturen er ikke meget kritisk, men er fortrinnsvis 0°C til 30°C, og mest foretrukket er romtemperatur.

Beskyttelsesgruppe som er til stede i oligosakaridene i fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, er velkjente innenfor fagområdet. Foretrukne beskyttelsesgrupper innbefatter benzyl, benzoyl og acetyl for hydroksygrupper, og benzyl og metyl for karboksylatgrupper av uronsyrer. Andre beskyttytelsesgrupper, så som levoluyl, alkoksyfenyl, kloracetyl, trityl og lignende kan bli anvendt med lik grad av vellykkethet. Anomerisk senter kan bli beskyttet med en alkylgruppe eller ved hjelp av en 1,6-anhydro-funksjonalitet.

Benzyloksykarbonyl, benzoyl og azid er nyttige grupper for å beskytte amino-funksjonene.

Oppfinnelsen er videre illustrert i følgende eksempler.

EKSEMPLER

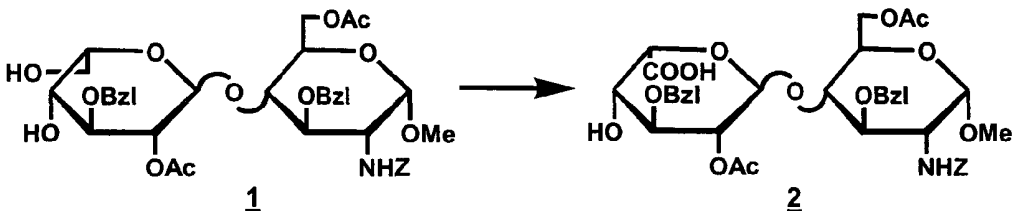
Anvendte forkortelser:

Bzl = benzyl

Z = benzyloksykarbonyl

EKSEMPEL 1

Syntese av metyl 6-O-acetyl-4-O-[2-O-acetyl-3-O-(fenylmetyl)-α-L-idopyranuronosyl)-2-deoksy-2-[[(fenylmetoksy)karbonyl]amino]-3-O-(fenylmetyl)-α-D-glucopyranosid



1 2

10 g metyl 6-O-acetyl-4-O-[2-O-acetyl-3-O-(fenylmetyl)-α-L-idopyranosyl)-2-deoksy-2-[[(fenylmetoksy)karbonyl]amino]-3-O-(fenylmetyl)-α-D-glucopyranosid (**1**) ble oppløst i 90 ml t-butanol, og oppløsningen ble avkjølt ved 10°C. Suksessivt ble følgende reagenser tilsatt: 26 ml vann, 4,65 g natriumhydrogenkarbonat, 44 mg 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloksy fri rest og 5,85 g 1,3-dibrom-5,5-dimetyl-ydantoin. Blandingen ble omrørt i 6 timer ved 20°C. Reaksjonen ble stoppet med 2,85 g natriumtiosulfat i 10 ml vann ved 10°C, og produktet ble isolert ved ekstrahering og avdampning.

Utbyttet av tittelforbindelse (**2**) var 8,4 g.

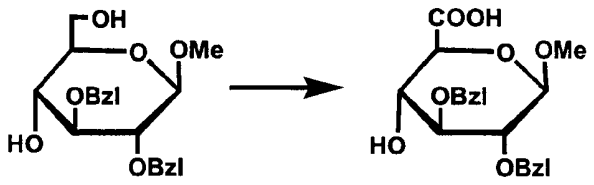
TLC: diklormetan, metanol 90/10 på silica, R_f = 0.2.

Ytterligere identifikasjon: ^{13}C-NMR av metyl 6-O-acetyl-4-O-[2-O-acetyl-6-metyl-3-O-(fenylmetyl)-α-L-idopyranuronosyl]-2-deoksy-2-[[(fenylmetoksy)karbonyl]-amino]-3-O-(fenylmetyl)-α-D-glucopyranosid (metylester ifølge **2**, fremstilt fra **2** ifølge generelt kjente fremgangsmåter. Oppløsningsmidlet var $CDCl_3$, og kjemiske skift er relative til TMS innstilt på 0 ppm):

posisjon	C1	C2	C3	C4	C5	C6
glucuronamid-enhet	98,9	54,6	79,1	75,1	69,2	62,3
iduronsyreenhet	98,1	67,1	74,4	67,7	68,4	170,7

EKSEMPEL 2

Syntese av metyl 2,3-bis-O-(fenylmetyl)-ß-D-glucopyranosiduronsyre



3 **4**

En oppløsning av 50 mg metyl-2,3-O-(fenylmetyl)-ß-D-glucopyranosid (**3**) i 0,88 ml tetrahydrofuran og 0,22 ml vann ble fremstilt. Suksessivt ble følgende reagenser tilsatt: 67,6 mg natriumhydrogenkarbonat, 0,36 mg of 2,2,6,6-tetrametyl-1-piperidinyloksy fri rest og 65,8 mg 1,3-dibrom-5,5-dimetylhydantoin. Blandingen ble omrørt og undersøkt ifølge TLC. Når fullført, ble reaksjonen stoppet med 0,89 ml

mettet natriumhydrogenkarbonat-løsning, og 0,26 ml 10 % natriumtiosulfat-løsning, og produktet ble isolert ved ekstrahering og avdampning.

Produktet ble renset ved kolonne-kromatografi.

Utbyttet av tittelforbindelse (**4**) var: 48 mg.

TLC: diklormetan, metanol 90/10 på silica, R_f = 0,2.

Ytterligere identifikasjon: ^{1}H-NMR metyl 2,3-bis-O-(fenylmetyl)-6-(fenylmetyl)-ß-D-glucopyranosiduronsyre (benzylester av **4**, fremstilt fra **4** ifølge generelt kjente fremgangsmåter. Oppløsningsmidlet var $CDCl_3$, og kjemiske skift er i forhold til TMS innstilt på 0 ppm):

posisjon	δ	multiplisitet
H1	4,37	d
H2	3,44	dd
H3	3,51	m
H4 + H5	3,84-3,92	m
OH på C4	2,74	d
CH_2 fra Bzl på C2 og C3	4,68-4,91	m
CH_2 fra Bzl på C6	5,25	s
aromatiske protoner	7,26-7,38	m

Følgende forbindelser ble alle fremstilt ifølge ovennevnte fremgangsmåte, begynnende fra tilsvarende 6-hydroksy-forbindelser.

Forbindelse	**Eluerings-middel på TLC (SiO_2)**	**R_F verdi**
3-O-acetyl-1,6-anhydro-2-azido-2-deoksy-4-O-[2,3-bis-O-(fenylmetyl)-β-D-glucopyranuronosyl]-β-D-glucopyranos	CH_2Cl_2/MeOH 9/1	0,15
metyl 4-O-(2,3-bis-O-metyl-α-L-idopyranuronosyl)-2,3,6-tris-O-fenylmetyl)-β-D-glucopyranos	CH_2Cl_2/MeOH 9/1	0,30
metyl 4-O-(2,3-bis-O-metyl-β-D-glucopyranuronosyl)-2,3,6-tris-O-(fenylmetyl)-β-D-glucopyranos	CH_2Cl_2/MeOH 9/1	0,40
metyl 4-O-(2-O-acetyl-3-O-metyl-α-L-idopyranuronosyl)-2,3,6-tris-O-(fenylmetyl)-β-D-glucopyranos	CH_2Cl_2/MeOH 9/1	0,20
metyl 4-O-(2-O-acetyl-3-O-metyl-α-L-idopyranuronosyl)-3-O-metyl-2,6-bis-O-(fenylmetyl)-β-D-glucopyranos	CH_2Cl_2/MeOH 9/1	0,10
metyl 4-O-(2,3-bis-O-metyl-α-L-idopyranuronosyl)-3,6-bis-O-metyl-2-O-(fenylmetyl)-β-D-glucopyranose	CH_2Cl_2/MeOH 9/1	0,10
metyl 4-O-(2,3-bis-O-metyl-α-L-idopyranuronosyl)-6-O-metyl-2,3-bis-O-(fenylmetyl)-β-D-glucopyranos	CH_2Cl_2/MeOH 85/15	0,60
metyl 6-O-acetyl-4-O-[2-O-acetyl-3-O-(fenylmetyl)-α-L-idopyranuronosyl]-2-O-(benzoylamino)-2-deoxy-3-O-(fenylmetyl)-β-D-glucopyranos	CH_2Cl_2/MeOH 9/1	0,35
metyl 4-O-(2,3-bis-O-metyl-β-D-glucopyranuronosyl)-6-O-metyl-2,3-bis-O-(fenylmetyl)-β-D-glucopyranos	CH_2Cl_2/MeOH 9/1	0,30
1,6-anhydro-2,3-bis-O-[2-(1,1-dimetyletoksy)-2-oksoetyl]-4-O-(2,3-bis-O-metyl-β-D-glucopyranuronosyl)-β-D-glucopyranos	CH_2Cl_2/MeOH 95/5	0,10
metyl 2-O-[2-(1,1-dimetylethoksy)-2-oksoetyl]-4-O-(2,3-bis-O-metyl-α-L-idopyranuronosyl)-6-O-metyl-3-O-(fenylmetyl)-β-D-glucopyranos	CH_2Cl_2/MeOH 9/1	0,40
metyl 4-O-(2,3-bis-O-metyl-α-L-idopyranuronosyl)-6-[[2-okso-2-(fenylmetoksy)etyl][fenylmetoksy)karbonyl]amino]-2,3-bis-O-(fenylmetyl)-β-D-glucopyranos	CH_2Cl_2/MeOH 9/1	0,40
metyl 4-O-[2-O-acetyl-3-O-(fenylmetyl)-α-L-idopyranuronosyl]-6-O-benzoyl-2-deoksy-2-[[(fenylmetoksy)karbonyl]amino]-3-O-(fenylmetyl)-α-D-glucopyranosid	toluene/ acetone 6/4	0,10
metyl 4-O-[2-O-benzoyl-3-O-(fenylmetyl)-α-L-idopyranuronosyl]-6-O-benzoyl-2-deoksy-2-[[(fenylmetoksy)karbonyl]amino]-3-O-(fenylmetyl)-α-D-glucopyranosid	CH_2Cl_2/MeOH 9/1	0,60
metyl 4-O-(2-O-acetyl-3-O-metyl-α-L-idopyranuronosyl)-3,6-bis-O-metyl-2-O-(fenylmetyl)-β-D-glucopyranose	CH_2Cl_2/MeOH 9/1	0,20
metyl [3-O-(fenylmetyl)-α-L-idopyranosyluronsyre 2,6-δ-lacton]-(1→4)-O-[6-O-acetyl-2-deoksy-3-O-(fenylmetyl)-2-[[(fenylmetoksy)karbonyl] amino]-α-D-glucopyranosid]	eter/heptan 9/1	0,40
metyl [3-O-(fenylmetyl)-α-L-idopyranosyluronsyre 2,6-δ-lacton]-(1→4)-O-[2-deoksy-3,6- bis-O-(fenylmetyl)-2-[[(fenylmetoksy)karbonyl] amino]-α-D-glucopyranosid]	eter/heptan 8/2	0,40
17-azido-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadecyl [2,6-bis-O-etyl-3,4-O-(1-metyletyliden)-β-D-galactopyranosyl]-(1→4)-O-(3-O-etyl-α-L-idopyranosyluronsyre 2,6-δ-lacton)-(1→3)-(2,6-bis-O-etyl- β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-O-(3-O-etyl-α-L-idopyranosyluronsyre 2,6-δ-lacton)	CH_2Cl_2/MeOH 9/1	0,90

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for selektiv oksydasjon av primære alkoholer av oligosakarider for å danne tilsvarende karboksylsyrederivater av alkoholene ved anvendelse av katalytiske mengder av en di-tertiær-alkyl nitroksylfri rest, karakterisert ved 1,3-dibrom-5,5-dimetylhydantoin eller 1,3-diklor-5,5-dimetylhydantoin blir anvendt som oksyderingsmiddel, og reaksjonen blir utført i nøytrale til basiske betingelser ved en pH < 10.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at oligosakaridene er delvis beskyttete.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, karakterisert ved at oligosakaridene er (mellomprodukter i syntesen av) glycosaminoglycaner eller glycosaminoglycan-lignende molekyler.

4. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 - 3, karakterisert ved at pH er 7-9.

5. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 - 4, karakterisert ved at di-tertiær-alkylnitroksylfri rest er 2,2,6,6-tetrametyl-1-piperidinyloksy.

6. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 - 5, karakterisert ved at oksyderingsmidlet er 1,3-dibrom-5,5-dimetyl-hydantion.

7. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 - 6, karakterisert ved at det molare forholdet av alkohol til oksyderingsmidlet er 1:2 til 1:4 (i forhold til aktivt halogen),

8. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 - 7, karakterisert ved at reaksjonstemperaturen er 0°C til 30°C.