

280/92

.....

Eljárás β -fukopiranozil-foszfátok sztereoszelektív előállítására, valamint az ezekből készíthető nagy tisztaságú GDP-fukóz előállítására

Merck Patent GmbH, Darmstadt, NSZK

61316

A bejelentés napja: 1992. 01. 30.

Elsőbbsége: 1991. 01. 29. (P 41 02 817.1-43) NGK

K I V O N A T

Eljárás β -fukopiranozil-foszfátok sztereoszelektív előállítására, amelyre jellemző, hogy a 2-es, 3-as és 4-es helyzetben védett L-fukózt a megfelelő O-(α -L-fukopiranozil)-triklór-acetimidáttá alakítják, ezt egy $\text{PO}(\text{OH})(\text{OR})_2$ általános képletű, teljesen savmentes szerves foszfáttal - a képletben R jelentése 1-4 szénatomos alkilcsoport, benzil- vagy fenilcsoport - reagáltatják, a foszfátcsoport R maradékát és a fukopiranozilgyűrű védőcsoportjait lehasítják és a szabad β -L-fukopiranozil-foszfátot só formájában izolálják.

A találmány tárgyához eljárás igen tiszta guanozin-difoszfát-fukóz előállítására is tartozik, mely eljárásra jellemző, hogy hogy β -L-fukopiranozil-foszfátból könnyen oldható sót készítenek, a sót aktivált guanozin-monofosfáttal (GMP) reagáltatják és a keletkezett GDP-fukózt preparatív HPLC-módszerrel, eluensként könnyen elpárologtatható puffer-rendszert alkalmazva tisztítják.

280/92 A

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

61 3 16

2000

C07H 11/04

1805 C07H 13/00

C07H 13/04

C07H 15/12

C07H 19/207

Képviselő:

Danubia Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Eljárás β -fukopirazo²il-foszfátok sztereoszelektív előállítására, valamint az ebből készíthető nagytisztaságú GDP-fukóz előállítására

MERCK Patent GmbH, Darmstadt, NSZK

Feltaláló(k): SCHMIDT Richard R. *Konstanz*,
JUNG Karl-Heinz *Konstanz*,
WEGMANN Barbara *München*,
KINZY Willy *Jülich*,
HEMBERGER Jürgen *Aachen*

NSZK

A bejelentés napja: 1992. 01. 30.

Elsőbbségei: 1991. 01. ³¹29. (P 41 02 817, 1-43)

NSZK

74020-903 To

A találmány tárgya eljárás β -fukopiranozil-foszfátok sztereoszelektív előállítására, valamint az ezekből készíthető igen tiszta guanozin-difoszfát-fukóz (GDP-fukóz) előállítására.

Ismert, hogy az L-fukóz a tej oligoszacharidjainak, valamint vércsoportanyagoknak az alkotórésze (pl.: Hakomori, Progr. Biochem. Pharmacol. 10 /1975/, 167). A dezoxihexóz továbbá baktériumok lipopoliszacharidjaiban, valamint az emlősállatok gliko-szfingolipidjeiben is jelen van (Flowers, Adv. Carbohydr. Chem. 39 /1981/, 279). A fukózilezett glikolipideknek fontos szerepe van a sejtnövekedés szabályozásában és a sejt differenciálódásában. Különös jelentősége van azonban annak a ténynek, hogy tumorsejtek felületi szerkezetében is vannak fukózilezett glikolipidek, és ezek antigén tulajdonságokkal rendelkeznek (Hakomori, Ann. Rev. Biochem. 50 /1981/, 733). Így jelentőségük lehet a tumorok diagnosztikálásában és gyógyításában. A fukóz-tartalmú oligoszacharidok és glikolipidek bioszintéziséhez egyebek között bizonyos enzimek, a fukozil-transzferázok szükségesek. Ezeknek a fukozil-transzferázoknak a szubsztrátuma a guanozin-diphoszfát-fukóz (GDP-fukóz).

Ezért a fukózilezett glikolipid bázisú, tumor-asszociált antigének megvizsgálásához és előállításához nagyobb mennyiségű, igen tiszta GDP-fukóz szükséges. Annak ellenére, hogy ez a szükséglet már hosszabb ideje fennáll, eddig a GDP-fukóz szintéziséhez csupán egy kémiai (Nunez és munkatársai, Can. J. Chem. 59 /1981/, 2086) és néhány enzimes

(pl.: Yamamoto és munkatársai, Agric. Biol. Chem. 48 /1984/, 823) módszer vált ismertté; ezek például a fukóz-1-foszfáton vagy a GDP-mannózon keresztül vezetnek a céltermékhez, hátrányuk, hogy csak kis mennyiségű GDP-fukózt szolgáltatnak.

A GDP-fukóz kémiai előállításában kétség kívül a fukóz-1-foszfát a kulcsvegyület, kielégítő mennyiségben történő szintézise a korlátozó tényező az össz-szintézisben. A fukóz-1-foszfát két különböző konfigurációban fordul elő, mégpedig α -fukopiranozil-foszfátként, amely viszonylag egyszerűen a klórfoszfoamidátos módszerrel (Westerduin és munkatársai, Tetrahedron Lett. 27 /1986/, 1211) állítható elő, és β -fukopiranozil-foszfátként. A GDP-fukóz előállításához kizárólag a β -fukopiranozil-foszfát alkalmas. A β -fukopiranozil-foszfát előállítására ismert kémiai szintézisutak (Nunez és mktsai, a fent idézett helyen, Tsai és mktsai, Carbohydr. Res. 64 /1978/, 297) hátránya, hogy alacsony a sztereoszelektivitásuk és/vagy kicsi a hozam; legalább egy részük bonyolult és hosszadalmas, így a legjobb esetben laboratóriumi méretű előállításához alkalmasak. A β -fukopiranozil-foszfát előállításában eddig felmerült nehézségei valószínűleg a vegyület nagyfokú (főleg savakkal szembeni) instabilitására vezethetők vissza.

A β -fukopiranozil-foszfátból kiinduló GDP-fukóz-előállítási módszereknek (Nunez és mktsai, lásd fent) további hátránya, hogy a végtermék tisztítását csupán ioncserélővel végzik, ezért számos biokémiai célra a termék további tisztítása, legalább azonban sótalanítása lehet szükséges.

Ez azonban továbbra csökkenti a hozamot.

A találmány feladata tehát olyan eljárás fejlesztése volt, amellyel β -fukopiranozil-foszfát, majd ebből GDP-fukóz állítható elő nagy sztereoszelektivitással, jó hozammal, nagy tisztaságban, emellett egyszerű módon.

Azt találtuk, hogy β -fukopiranozil-foszfátokat nagy hozamban állíthatunk elő úgy, hogy védett L-fukóz α -triklór-acetimidátjait nagy tisztaságú szerves foszfáttal, például dibenzil- vagy difenil-foszfáttal reagáltatjuk.

Azt találtuk továbbá, hogy a szükséges α -triklóracetimidátok szintén nagy hozammal állíthatók elő L-fukóz, illetve annak 2-es, 3-as és 4-es helyzetben védett formáinak triklór-acetonitrillel végzett sztereoszelektív reagáltatásával, aminek során előnyösen nátriumhidridet alkalmazunk bázisként.

Végül azt tapasztaltuk, hogy a találmány szerint előállított β -fukopiranozil-foszfátokat egy további találmány szerinti lépésben aktivált GMP-vel reagáltatva a GDP-fukózt különösen előnyösen nyerhetjük, ha a β -fukopiranozil-foszfátokat jól oldódó sóvá, előnyösen tri-n-oktil-ammónium-sóvá alakítjuk. A GDP-fukóz nagy tisztaságát könnyen elpárologtatható eluenssel végzett nagy nyomású folyadékkromatográfiával érhetjük el, és az eljárást még egyszerűsíthetjük.

A találmány tárgya tehát eljárás β -fukopiranozil-foszfátok szelektív előállítására. Az eljárásra jellemző, hogy a 2-es, 3-as és 4-es helyzetben védett L-fukózt a megfelelő O-(α -L-fukopiranozil)-triklór-acetimidáttá alakítjuk, ezt

egy $\text{PO}(\text{OH})(\text{OR})_2$ általános képletű, teljesen savmentes szerves foszfáttal - a képletben R jelentése 1-4 szénatomos alkilcsoport, benzil- vagy fenilcsoport - reagáltatjuk, a foszfátcsoport R maradékát és a fukopiranozilgyűrű védőcsoportjait lehasítjuk és a szabad β -L-fukopiranozil-foszfátot só formájában izoláljuk.

A találmány tárgya továbbá eljárás igen tiszta GDP-fukóz sztereoszelektív előállítására. Az eljárásra jellemző, hogy β -L-fukopiranozil-foszfátot könnyen oldódó sóvá alakítunk, a sót aktivált GMP-vel reagáltatjuk és a kapott GDP-fukózt könnyen elpárologtatható puffer-rendszerrel mint eluenssel végzett HPLC-val tisztítjuk.

Különösen előnyös, ha ebben az eljárásban a fentiek szerint előállított β -fukopiranozil-foszfátot alkalmazzuk kiindulási anyagként.

A találmány szerinti eljárás egy különösen előnyös módoszata szerint a tri-O-acetil-L-fukózt a tetraacetilezett vegyületből egylépcsős, előnyösen hidrazin-acetáttal végzett reakcióban állítjuk elő, ami az össz-szintézis egyszerűsítéséhez is hozzájárul.

A találmány tárgyához tehát olyan eljárás is tartozik, amely szerint 2,3,4-tri-O-acetil-L-fukózt egylépcsős eljárással állítunk elő a tetraacetilezett fukózból.

Amennyiben a 2,3,4-védett L-fukóz és a triklóracetónitril reagáltatásában más típusú bázist alkalmazunk, α -fukopiranozil-triklóracetimidát és β -fukopiranozil-acetimidát különböző elegyei keletkeznek, amelyeket a további

feldolgozáshoz szét kell választani. Ha bázisként nátrium-hidridet vagy analóg bázist alkalmazunk, kizárólag az α -triklóracetimidát keletkezik. Az α -imidát hozama, például tri-O-acetil-L-fukózra vonatkoztatva, átlagban 70-80 %-ot tesz ki.

A védett L-fukóz α -triklóracetimidátjainak a fukopiranozil-foszfáthoz vezető reakcióban alkalmazott $P(OH)(OR)_2$ általános képletű foszfátok tisztasága, különösen savmentesége döntően befolyásolja a sztereoselektivitást a keletkező anomerek vonatkozásában. A GDP-fukóz előállításához nem alkalmas α -fukopiranozil-foszfátok akkor keletkeznek szelektív módon, ha az alkalmazott foszfátok kisebb mennyiségű savat, például bór-trifluoridot tartalmaznak, vagy sav kerül a reakcióelegybe. Ha kizárólag a β -fukopiranozil-foszfátot akarjuk előállítani, feltétlenül savmentesen kell dolgozni. A β -anomer hozama, a megfelelő α -triklór-acetamidátra vonatkoztatva, a találmány szerinti eljárásban tisztítás után 85-95 %.

Ha a találmány szerinti eljárás szerint előállított β -fukopiranozil-foszfát - a konkrét esetben tri-O-acetil-L-fukózból kiindulva és az imidát-vegyületen keresztül jutva el a céltermékhez - hozamát összehasonlítjuk a két ismert kémiai szintézis (Nunez és mktasai, Tsai és mktsai) hozamával, a következő kép alakul ki: a találmány szerinti eljárásban a kívánt terméket (só alakjában) átlagosan 70 %-os hozammal kapjuk, míg Nunez és munkatársainak eljárása kb. 50 %-os hozamot, az L-fukoz orto-acetátjából kiinduló el-

járás (Tsai) mintegy 20 %-os hozamot biztosít. Ezen túlmenően a találmány szerinti eljárás, különösen Nunez eljárásához képest kevesebb és egyszerűbb eljárási lépésekből áll.

A találmány szerinti össz-szintézisre jellemző a nagy sztereoszelektivitás, a lépések kis száma, az egyszerűség (például nem kell az α - és a β -anomert szétválasztani) és az igen jó hozam. Az újszerű tisztítás következtében a legérzékenyebb biokémiai folyamatokban is alkalmazható, igen nagy tisztaságú GDP-fukóz nyerhető. Az eljárás igen alkalmas a nagyobb léptékben történő megvalósítására is.

Az alábbiakban az ábrákat ismertetjük.

Az 1. ábra a triszubsztituált L-fukóznak az α -triklóracetimidáton keresztül történő átalakítását mutatja, amelynek során a megfelelő védett α - és β -L-fukopiranozil-foszfát keletkezik.

1: triszubsztituált L-fukóz; 2: a védett L-fukóz β -triklóracetimidátja; 3: az L-fukóz α -triklóracetimidátja; 4: 2,3,4-védett α -L-fukopiranozil-foszfát; 5: 2,3,4-védett β -fukopiranozil-foszfát; $R' = R^1CO-$, R^1 , $R^2 = 1-4$ szénatomos alkilcsoport, benzil- vagy fenilcsoport; $R = R^1$.

A 2. ábra a GDP-fukóz szintézisét mutatja β -fukopiranozil-foszfátból kiindulva. 5: 2,3,4-védett β -fukopiranozil-foszfát; 6: a 2,3,4-védett β -fukopiranozil-foszfát sója; 7: a nem védett β -fukopiranozil-foszfát sója; 8: az (aktívált) GMP-morfolidát sója; 9: GDP-fukóz (só); $R' = R^1CO-$,

$R^1, R^2 = 1-4$ szénatomos alkilcsoport, benzil- vagy fenilcsoport; $R = R^1$, $K =$ előnyösen szerves kation.

R , illetve R^1 előnyös jelentése benzilcsoport. R' jelentése R^1CO- vagy R^1 . A β -fukopiranozil-foszfátból kiinduló GDP-fukóz-szintézis esetén R' előnyös jelentése R^1CO- , amelyben R^1 előnyösen metil- vagy benzilcsoportot jelent. R' előnyös jelentése acetil- vagy benzilcsoport, a legelőnyösebben acetilcsoport. Amennyiben R^1 jelentése fenil- vagy benzilcsoport, az aromás gyűrűk egyszeresen vagy többszörösen szubsztituáltak lehetnek. Alkalmas szubsztituensek a fluor-, klór-, brómatom, hidroxil- és metilcsoport. Előnyösen azonban az aromás gyűrűk nem hordanak szubsztituenset. K^+ szervetlen vagy szerves kationt jelent, előnyös jelentése $NH(R^3)^+$ általános képletű szerves kation, ahol R^3 jelentése egyenes vagy elágazó szénláncú, előnyösen egyenes szénláncú, 1-10 szénatomos alkilcsoport. A legelőnyösebb kationok: $NH(C_2H_5)_3^+$ és $NH(C_8H_{17})_3^+$. Egy molekulán belül egy-egy csoport jelentése azonos vagy különböző lehet, előnyös azonban az azonos jelentés.

A fukóz hidroxilcsoportjainak módosításával kapcsolatos műveletek, így pl. észterezés, éterezés, halogénezés, átészterezés, átéterezés, elszappanosítás, éterhasítás, védőcsoportok bevezetése, lehasítása, valamint a glikozilimidát előállítás a szénhidrát-kémia szabvány módszerei szerint végezhető el, ha mást nem kötünk ki. E szabvány módszerek átfogó ismertetése pl. az alábbi könyvben található: Carbohydrate Chemistry (Edt. John F. Kennedy), Ox-

ford Science Publication, Clarendon Press, 1988.

A találmány szerinti eljárást előnyösen az alábbiak szerint valósítjuk meg.

Ahhoz, hogy a glikozid-szénatomon vagy az anomer szénatomon a kívánt változtatásokat tudjuk elvégezni, védőcsoportok bevezetése szükséges. A kívánt reaktivitástól függően előnyösen észter- vagy étercsoportokat lehet használni. A találmány szerinti eljárás során védőcsoportként előnyösen acetil- vagy benzilcsoportokat használunk, de a fentiekben megadott alternatívák is sikeresen alkalmazhatók.

Triszubsztituált fukóz szintézise (1)

2,3,4-tri-O-benzil-L-fukopiranóz (1. képlet) L-fukózból például Wegmann és mksai módszerével (Carbohydr. Res. 184 /1988/, 254) vagy Dejter-Juszynski és mksai módszerével (Carbohydr. Res. 18 /1971/, 219) állítható elő. A találmány szerinti eljárásban azonban inkább triacetilezett L-fukózt állítunk elő, mert ez a vegyület a további lépésekhez alkalmasabb.

A 2,3,4-tri-O-acetil-L-fukopiranóz előállítására a találmány értelmében 1,2,3,4-tetra-O-acetil- α -L-fukopiranózt egylépcsős reakcióban előnyösen hidrazin-acetáttal reagáltatunk dimetil-formamidban. Az anomer acetilcsoport szelektív elhidrolizáltatásához hidrazin-acetát helyett benzilamint, kálium-hidroxidot, kálium-cianidot vagy bisz(tri-butyl-ón)-oxidot alkalmazhatunk.

A triacetilezett termékben az α : β anomer arány átlagosan 3:1. Ez azonban a további reagáltatás és a sztereosze-

lektivitás szempontjából lényegtelen. A termék pl. kovasavgelen végzett kromatográfiás tisztítása után a triacetilezett L-fukopiranóz anomer-elegyét 75-85 %-os hozammal kapjuk. A technika állását képező eljárás (Nunez és mktsai) szerint a terméket csak bonyolult több lépcsős reakciósorban kapják, és nem tisztítják. A kiindulási anyag, az 1,2,3,4-tetra-O-acetil- α -L-fukopiranóz vagy a kereskedelmi forgalomban kapható, vagy Nunez és mktsai, ill. Prihar és mktsai (Biochemistry 12 /1973/, 997) ismert eljárása szerint könnyen hozzáférhető.

Triszubsztituált L-fukopiranóz α - és β -triklór-acetimidátjának (2, 3) szintézise

2,3,4-tri-O-acetil- vagy -tribenzil-L-fukopiranózt (1) az ismert glikozil-imidát-módszer (pl. Schmidt és mktsai, Angew. Chem. 92 /1980/, 763) szerint triklór-aceto-nitrillel reagáltatunk. Az alkalmazott bázis fajtájával az anomer-arányt szabályozhatjuk. Ha bázisként nátrium-hidridet alkalmazunk, meglepő módon kizárólag a további szintézishez szükséges O-(2,3,4-tri-O-acetil- ill. -benzil- α -L-fukopiranozil)-triklór-acetimidát (3), azaz csak az α -anomer keletkezik. Ugyanez az eredmény, ha kéőárium-hidridet vagy nátrium-hidroxidot alkalmazunk. Ha azonban más bázist, például 1,2-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-ént (DBU) vagy kálium-karbonátot alkalmazunk, az α - és β -triklór-acetimidát elegye keletkezik, az anomer-arány kb. 7:1 és 1:1 között van. Ezért a találmány szerinti eljárásban előnyösen olyan bázist alkalmazunk, amely nátrium-hidrid módján reagál. Az α -triklór-

acetimidátot előnyösen kromatográfiásan tisztítjuk. A tisztított termék átlagos hozama 70-80 %.

Triszubsztituált L-fukopiranozil-foszfátok (4, 5) szintézise

Az L-fukóznak a fentiek szerint előállított triszubsztituált α -triklór-acetimidátját $PO(OH)(OR)_2$ általános képletű szerves foszfáttal (e képletben R jelentése R^1 és R^1 jelentése a fenti) reagáltatjuk. Jó hozammal kapjuk a megfelelő triszubsztituált L-fukopiranozil-foszfátot, előnyösen a dibenzil-(2,3,4-tri-O-acetil- ill. -tri-O-benzil- α -L-fukopiranozil-foszfátot (4) és a dibenzil-(2,3,4-tri-O-acetil- ill. -tri-O-benzil- β -fukopiranozil)-foszfátot (5). Szerves foszfátként előnyben részesítjük a dibenzil-foszfátot, egyrészt, mert könnyen hozzáférhető, másrészt mert a benzilcsoport különösen könnyen szelektíve lehasítható.

Természetesen a többi, fent említett foszfátok, pl. a difenil-foszfát is alkalmas. Az α - és a β -konfigurációjú foszfátok sztereoszelektív előállítása szempontjából azonban döntő, hogy a reakció során sav jelen van vagy sem. A tiszta α -anomer (4) keletkezik, ha katalitikus mennyiségű savat, például bór-trifluoridot adagolunk. Amennyiben az alkalmazott foszfát nem túl tiszta, a sav adagolásától el is tekinthetünk. Teljesen savmentes reakcióelegy esetén a tiszta β -anomer keletkezik. Ehhez általában az szükséges, hogy a foszfátot legalább egyszer frissen átkristályosítsuk vagy más intézkedéssel gondoskodjunk a teljes savmentességről.

Tisztítás után a hozam általában 85 % és 90 % közötti, a védett L-fukóz triklór-acetimidátjára vonatkoztatva. Különös tisztítás nélkül a hozam 90-98 %. A fukózyűrűn lévő észtercsoport (védőcsoport) milyensége nem nagyon befolyásolja a hozamot. A tisztítást például előnyösen kromatográfiásan végezzük, kovasavgélen.

β -L-Fukopiranozil-guanozin-5'-pirofoszfát (GDP-fukóz) (9) szintézise

A további szintézishez előnyösen a fukózyűrűn észtercsoportokkal védett β -fukopiranozil-foszfátokat, különösen előnyösen a megfelelő acetil- vagy benzoilszármazékot alkalmazzuk. Ezek a védőcsoportok a foszfát-védőcsoportok előnyösen hidrogenolízissel végzett eltávolítása során megmaradnak. Ennek megfelelően az előnyös kiindulási anyagok a dibenzil- vagy difenil-(2,3,4-tri-O-acetil- β -L-fukopiranozil)-foszfát (5). A benzil- illetve fenilcsoportokat például hidrogénnel palládium katalizátoron hasíthatjuk le ismert módszerrel. Más katalizátor, pl. platina vagy nikkel-katalizátor is alkalmas arra, hogy a fenil- vagy benzilcsoportokat lehasítjuk anélkül, hogy a fukóz-védőcsoportokat hidrolizálnának. A hidrolízist ammónium-formiáttal is végezhető el.

A keletkezett 2,3,4-tri-O-acetil- β -L-fukopiranozil-foszfátot (6) előnyösen sóként, előnyösen a bisz(triethylammónium)-só alakjában izoláljuk és kívánt esetben kromatográfiásan tisztítjuk. Az elkülönítéshez azonban más sót, például a bárium- vagy a bisz(tri-n-butyl-ammónium)-sót is

választhatjuk. A reakciót célszerűen vékonyréteg kromatográfiában követjük.

A következő lépésben a fukopiranozil-gyűrű védőcsoportjait (előnyösen acetilcsoportok) ismert módon eltávolítjuk, így kapjuk a szabad β -L-fukopiranozil-foszfát (7) megfelelő sóját. Ez a lépés általában kvantitatíve megy végbe. A találmány szerinti eljárás egy előnyösen kiviteli módja szerint a kapott β -fukopiranozil-foszfátból a tri(n-oktil-ammónium)-sót képezzük. Ez a só a szintézis következő és egyben utolsó lépésében különösen előnyösnek bizonyult, valószínűleg kedvező oldhatósága miatt. Az ilyen értelemben hasonló tulajdonságú, $\text{NH}(\text{R}^3)^+\text{X}^-$ általános képletű sók (különösen azok, amelyekben R^3 jelentése hosszabb alkillánc) is kiválóan alkalmazhatók. Az előnyösen alkalmazott bisz(tri-n-oktil-ammónium)-(β -L-fukopiranozil)-foszfátot guanozin-monofoszfáttal reagáltatjuk GDP-fukózzá, a végtermékké. Ehhez feltétlenül szükséges, hogy a guanozin-monofoszfátot aktivált formában vigyük reakcióba, mert csak ezuton jó hozam érhető el. Különösen előnyösnek bizonyult a GMP-5'-foszfor-morfolidát alkalmazása, de az irodalomból ismert más aktivált GMP-formák, például Nunez és mktsai által leírtak szintén alkalmazhatók. A találmány szerinti eljárás egy előnyös kiviteli módja szerint 4-morfolin-N,N'-diciklohexil-karboxamidínium-guanozin-5'-monophoszfor-morfolidátot (8) alkalmazunk. Az L-GDP-fukóz (9) bisz(tri-n-oktil-ammónium)-sója kb. 70 %-os hozammal keletkezik. A további tisztítás során a vegyületet az e célra kedvezőbb bisz(trietyl-

-ammónium)-sóvá alakítjuk, és ezt HPLC-kromatográfiás módszerrel tisztítjuk, előnyösen fordított fázisú adszorbenssel. A GDP-fukóz jó hozama, nagy tisztasága, de az eljárás egyszerűsége szempontjából is fontos, hogy eluensként könnyen elpárologtatható puffer-rendszert alkalmazzunk. Alkalmas eluens például trietil-ammónium-hidrogén-karbonát, alternatív lehetőség ammónium-hidrogén-karbonát vagy ammónium-formiát alkalmazása.

A fenti tisztítás előnye, hogy igen egyszerűen nagyon tiszta GDP-fukózhoz jutunk, és nincs szükség a közismerten hozamcsökkentő sótalánító lépésre.

Az alábbi kiviteli példákkal a találmányt konkrét formában ismertetjük.

Az alábbi kromatográfiás rendszereket alkalmaztuk:

Vékonyréteg kromatográfia: DC műanyagfóliás kovasavgéll

60 F₂₅₄ (E. Merck, Darmstadt, NSZK), detektálás UV-fényben 254 nm hullámhossznál, ill. 10 t%-os H₂SO₄ permetezésével és ezt követő melegítéssel 110 °C

Oszlopkromatográfia: kovasavgéll 60, szemcseméret 0,063-0,200 nm (E. Merck, Darmstadt, NSZK).

HPLC elemzésre: LiChrospher RP-18, 125x4 mm, 5 µm (E. Merck, Darmstadt, NSZK), puffer: 0,05 M trietil-ammónium-hidrogén-karbonát (pH 7,1) 3,5 %-os acetonitriles oldata; 0,5 ml/perc R_f = 3,24 perc (GMP), 3,85 perc (GDP-fukóz), 12,7 perc (GMP-morfolidát).

Preparatív HPLC: LiChrosorb RP-18, 250x10 mm, 7 µm (E. Merck, Darmstadt, NSZK), puffer mint fent.

A szintetizált közbelső és végtermékeket ^1H -NMR és ^{13}C -NMR módszerrel azonosítottuk, tisztaságukat meghatároztuk.

1. példa

0,50 g (0,86 mmol) 2,3,4-tri-O-benzil-L-fukopiranóz (például Wegmann és mksai szerint előállított) és 0,24 g (0,86 mmol) kereskedelmi, nem különösen tisztított dibenzil-foszfát 20 ml vízmentes diklór-metánnal készített oldatát szobahőmérsékleten, nitrogénléggör alatt mintegy 2 órán át keverjük. Amennyiben a dibenzil-foszfát nagyon tiszta, az elegyhez katalitikus mennyiségű bór-trifluoridot adunk. Az oldatot betöményítjük, majd kromatográfiásan, toluol és acetone 9:1 arányú elegyével tisztítjuk. 0,54 g (90 %) dibenzil-(2,3,4-tri-O-benzil- α -L-fukopiranozil)-foszfátot (4) kapunk stintelen olaj alakjában. A vékonytétteg kromatigráfiásan toluol és acetone 7:1 arányú elegyével mért R_f -érték 0,60. $[\alpha]_{578} = -68,2^\circ$ ($c = 1$, kloroform).

2. példa

0,50 g (0,86 mmol) 2,3,4-tri-O-benzil-L-fukopiranóz és 0,24 g (0,86 mmol) frissen átkristályosított dibenzil-foszfát 20 ml vízmentes diklór-metánnal készített oldatát szobahőmérséklet nitrogénléggör alatt mintegy 1 órán át keverjük. Az oldatot betöményítjük, majd kromatográfiásan, toluol és acetone 7:1 arányú elegyével tisztítjuk. 0,57 g (95 %) dibenzil-(2,3,4-tri-O-benzil- β -L-fukopiranozil)-foszfátot (5) kapunk stintelen olaj alakjában. A vékonytétteg kromatigráfiásan toluol és acetone 7:1 arányú elegyével mért R_f -érték

0,45. $[\alpha]_{578} = -9,7^\circ$ ($c = 1$, kloroform).

3. példa

6,00 g (18 mmol) 1,2,3,4-tetra-O-acetil- α -L-fukopiránóz (1c) (pl. Nunez és mksai szerint előállított) és 1,99 g (21,6 mmol) hidrazin-acetát 20 ml vízmentes dimetil-formamiddal készített oldatát 50 °C-on kb. 4,5 órán át keverjük. Etil-acetát adagolása után az elegyet mintegy kétszer vizes nátrium-klorid-oldattal extraháljuk, a szerves fázist betöményítjük, majd 40-60 °C forrástartományú petroléter és etil-acetát 1:1 arányú elegyével kromatografáljuk. 80 %-os hozammal kapjuk a 2,3,4-tri-O-acetil-L-fukopiránózt (1), az anomer arány $\alpha:\beta = 3:1$. DC $R_f = 0,47$ (40-60 °C forrástartományú petroléter és etil-acetát 1:1 arányú elegye).

4. példa

(a) 2,00 g (6,89 mmol) 2,3,4-tri-O-acetil-L-fukopiránóz-anomerelegy és 7,0 ml (70 mmol) triklór-acetonitril 20 ml vízmentes diklór-metánnal készített elegyéhez szobahőmérsékleten és nitrogénlégkör alatt 0,25 g (10,9 mmol) nátrium-hidridet adunk. Az elegyet kb. 12 órán át keverjük, diatómafeldön keresztül szűrjük, majd betöményítjük. Kromatográfiás tisztítás (petroléter és etil-acetát 3:1) 2,13 g (71 %) O-(2,3,4-tri-O-acetil- α -L-fukopiranozil)-triklór-acetimidátot (3) kapunk.

(b) 0,50 g (1,72 mmol) 2,3,4-tri-O-acetil-L-fukopiránóz-anomerelegy, 73 mg (1,72 mmol) litium-klorid, 0,20 ml (1,34 mmol) 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-én és 2,0 ml (20 mmol) triklór-acetonitril 20 ml vízmentes acetonitrillel ké-

szített elegyét szobahőmérsékleten és nitrogénléggör alatt mintegy 12 órán át keverjük. Petroléter és dietil-éter 2:5 arányú elegyével végzett kromatográfiás tisztítás után O-(2,3,4-tri-O-acetil- α -L-fukopiranozil)-triklór-acetimidát (3) és O-(2,3,4-tri-O-acetil- β -L-fukopiranozil)-triklór-acetimidát (2) elegyét kapjuk 92 % hozammal (α : β = 6,5:1).

(c) 0,85 g (2,93 mmol) 2,3,4-tri-O-acetil-L-fukopiranoz-anomerelegy, 3 ml (30 mmol) triklór-acetonitril és 2,73 g (19,7 mmol) kálium-karbonát 12 ml vízmentes diklór-metánnal készített elegyét szobahőmérsékleten és nitrogénléggör alatt kb. 4 órán át keverjük, utána diatómafüldün át szűrjük és az oldószert eltávolítjuk. Petroléter és dietil-éter 2:5 arányú elegyével végzett kromatográfiás tisztítás után O-(2,3,4-tri-O-acetil- α -L-fukopiranozil)-triklór-acetimidát (3) és O-(2,3,4-tri-O-acetil- β -L-fukopiranozil)-triklór-acetimidát (2) elegyét kapjuk 76 % hozammal (α : β = 1: 1,3).
 α -anomer: $[\alpha]_D = -116,0^\circ$ (c = 1, kloroform), $R_f=0,54$
(petroléter és etil-acetát 2:1), op.: 107-109 °C.
 β -anomer: $[\alpha]_D = -24,5^\circ$ (c = 1, kloroform), $R_f=0,34$
(petroléter és etil-acetát 2:1), op.: 60-63 °C.

5. példa

0,20 g (0,46 mmol) O-(2,3,4-tri-O-acetil- α -L-fukopiranozil)-triklór-acetimidát és 0,13 g (0,47mmol) kereskedelmi, külön nem tisztított dibenzil-foszfát 7 ml diklór-metánnal készített oldatát szobahőmérsékleten kb. 2,5 órán át keverjük. Ha a dibenzil-foszfát nagyon tiszta, katalitikus mennyiségű bór-trifluoridot is adagolunk. Az oldatot betö-

ményítjük, majd toluol és acetone 7:1 arányú elegyével kromatografáljuk. A terméket kloroform és dietil-éter 20:1 arányú elegyével újból kromatografáljuk. 0,23 g (91 %) dibenzil-(2,3,4-tri-O-acetil- α -L-fukopiranozil)-foszfátot (4) kapunk szintelen olaj alakjában. DC (toluol/acetone/trietil-amin 84:15:1) $R_f = 0,38$. $[\alpha]_D = -83,7^\circ$ ($c = 1$, kloroform).

6. példa

0,50 g (1,15 mmol) O-(2,3,4-tri-O-acetil- α -L-fukopiranozil)-triklór-acetimidát és 0,29 g (1,16 mmol) kereskedelmi, külön nem tisztított difenil-foszfát 25 ml diklór-metánnal készített oldatát szobahőmérsékleten kb. 6,5 órán át keverjük. Ha a difenil-foszfát nagyon tiszta, katalitikus mennyiségű bór-trifluoridot is adagolunk. Az oldatot betöményítjük, majd petroléter és dietil-éter 1:5 arányú elegyével kromatografáljuk. 0,38 g (63 %) difenil-(2,3,4-tri-O-acetil- α -L-fukopiranozil)-foszfátot (4) kapunk szintelen olaj alakjában. DC (petroléter/dietil-éter 1:5) $R_f = 0,41$.

7. példa

0,30 g (0,69 mmol) O-(2,3,4-tri-O-acetil- α -L-fukopiranozil)-triklór-acetimidát és 0,19 g (0,68 mmol) kereskedelmi, de frischen átkristályosított dibenzil-foszfát 12 ml vízmentes diklór-metánnal készített oldatát szobahőmérsékleten és nitrogénléggör alatt kb. 1 órán át keverjük, majd betöményítjük és toluol és acetone 7:1 arányú elegyével kromatografáljuk. A terméket petroléter és dietil-éter 1:5 arányú elegyével újból kromatografáljuk. 86 %-os hozammal kapjuk a dibenzil-(2,3,4-tri-O-acetil- β -L-fukopiranozil)-

foszfátot (5) szintelen olaj alakjában. DC (toluol és aceton 7:1) $R_f = 0,30$. $[\alpha]_D = +0,5^\circ$ ($c = 1$, kloroform).

8. példa

72 mg (0,13 mmol) dibenzil-(2,3,4-tri-O-acetil- β -L-fukopiranozil)-foszfát (5) és 4 mg palládium terahidrofurán és etil-acetát 1:1 arányú, vízmentes elegyének 10 ml-jével készített elegyét hidrogénlégkörben rázzuk. A reakció végét vékonyréteg-kromatográfián ($R_f = 0,19$, kloroform és metanol 60:40) határozzuk meg. Az elegyet szűrjük, a szűrletet betöményítjük és kloroform, metanol és trietil-amin 60:39:1 arányú elegyével kromatografáljuk. A terméket dioxánban liofilizáljuk. 68 mg (90 %) bisz(trietil-ammónium)-(2,3,4-tri-O-acetil- β -L-fukopiranozil)-foszfátot (6) kapunk amorf por alakjában.

9. példa

80,0 mg (0,135 mmol) bisz(trietil-ammónium)-(2,3,4-tri-O-acetil- β -L-fukopiranozil)-foszfát 3 ml vizes metanollal készített elegyéhez 0,5 ml trietil-amint adunk. 18 óra elteltével az elegyet betöményítjük és vízből liofilizáljuk. 73,8 mg (100 %) bisz(trietil-ammónium)-(β -L-fukopiranozil)-foszfátot (7) kapunk higroszkóposb fehér por alakjában. A terméket nem tisztítjuk.

10. példa

73,8 gmg (0,135 mmol) bisz(trietil-ammónium)-(β -L-fukopiranozil)-foszfát 5 ml vízmentes piridinnel készített oldatához 0,117 ml (0,135 mmol) tri-(n-oktil)-amint adunk. Az elegyet betöményítjük és a kapott tri-(n-oktil)-ammóniumsót

piridinnel 10^{-2} Hgmm nyomáson többszörösen végzett lepárlással szárítjuk. A sóhoz 109 mg (0,15 mmol) 4-morfolin-N,N'-diciklohexil-karboxamidínium-guanozin-5'-monofoszformorfolidát piridin és dimetil-formamid vízmentes, 1:1 arányú elegyével készített oldatát adjuk. A reakciót analitikus HPLC kromatográfiásan követjük. Mintegy 5 nap elteltével a reakcióelegyet szárazra pároljuk. A maradékot trietil-ammónium-hidrogén-karbonát pufferben (pH 7,4, 0,05 M) felvesszük, a tri-(n-oktil)-amint éteres extrahálással eltávolítjuk és a terméket preparatív HPLC módszerrel ($t_R = 9,4$ perc) tisztítjuk. Az eluensként szolgáló puffert elpárologtatjuk. 23,3 mg (25 %) igen tiszta bisz(trietil-ammónium)-(β -L-fukopiranozil)-guanozin-5'-pirofoszfátot (9) kapunk amorf por alakjában.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás β -fukopiranozil-foszfátok sztereoszelektív előállítására, azzal j e l l e m e z v e, hogy a 2-es, 3-as és 4-es helyzetben védett L-fukózt a megfelelő O-(α -L-fukopiranozil)-triklór-acetimidáttá alakítjuk, ezt egy $\text{PO}(\text{OH})(\text{OR})_2$ általános képletű, teljesen savmentes szerves foszfáttal - a képletben R jelentése 1-4 szénatomos alkilcsoport, benzil- vagy fenilcsoport - reagáltatjuk, a foszfátcsoport R maradékát és a fukopiranozilgyűrű védőcsoportjait lehasítjuk és a szabad β -L-fukopiranozil-foszfátot só formájában izoláljuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy védőcsoportként acetil- vagy benzilcsoportokat alkalmazunk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a védett L-fukózt nátrium-hidriddel szelektív módon a megfelelő α -triklór-acetamidáttá alakítjuk.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a 2,3,4-tri-O-acetil-L-fukózt a tetra-acetilezett formából egylépcsős reakcióban állítjuk elő.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a tetra-O-acetil-L-fukóz anomer acetilcsoportját hidrazin-acetáttal hasítjuk le.

6. Eljárás igen tiszta guanozin-difoszfát-fukóz (GDP-fukóz) sztereoszelektív előállítására, azzal jellemezve, hogy β -L-fukopiranozil-foszfátból könnyen oldható sót ké-

szítunk, a sőt aktivált guanozin-monofoszfáttal (GMP) reagáltatjuk és a keletkezett GDP-fukózt preparatív HPLC-módszerrel, eluensként könnyen elpárologtatható puffer-rendszert alkalmazva tisztítjuk.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy β -L-fukopiranozil-foszfátot tri-(n-oktil)-ammóniumsóvá alakítjuk.

8. A 6. vagy 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy aktivált GMP-ként GMP-morfolidátot alkalmazunk.

9. A 6-8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a preparatív HPLC tisztítás során eluensként trietil-ammónium-hidrogénkarbonátot alkalmazunk.

10. A 6-9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás GDP-fukóz előállítására, azzal jellemezve, hogy az alkalmazott β -L-fukopiranozil-foszfátot az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárással állítottuk elő.

A meghatalmazott:

2. oldal
[Handwritten signature]

DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
9.

[Handwritten signature]
[Handwritten signature]

61316

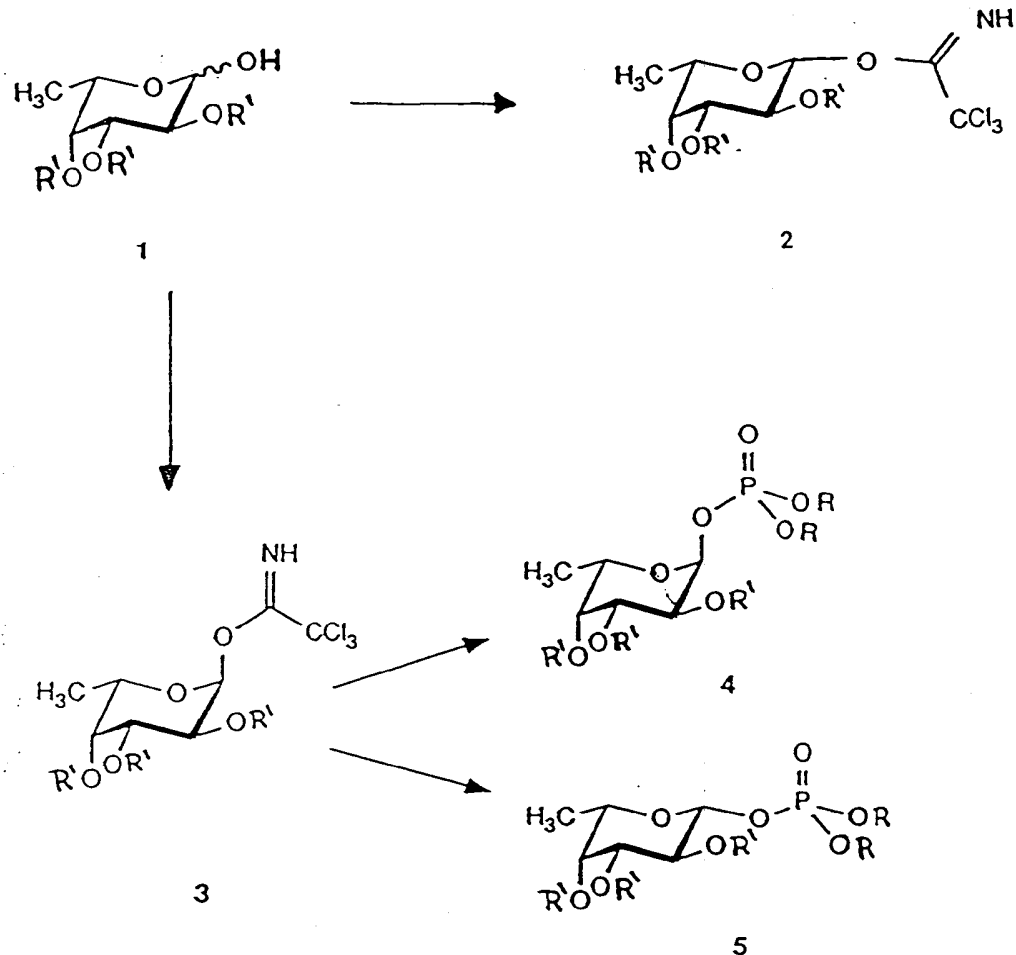


Fig. 1

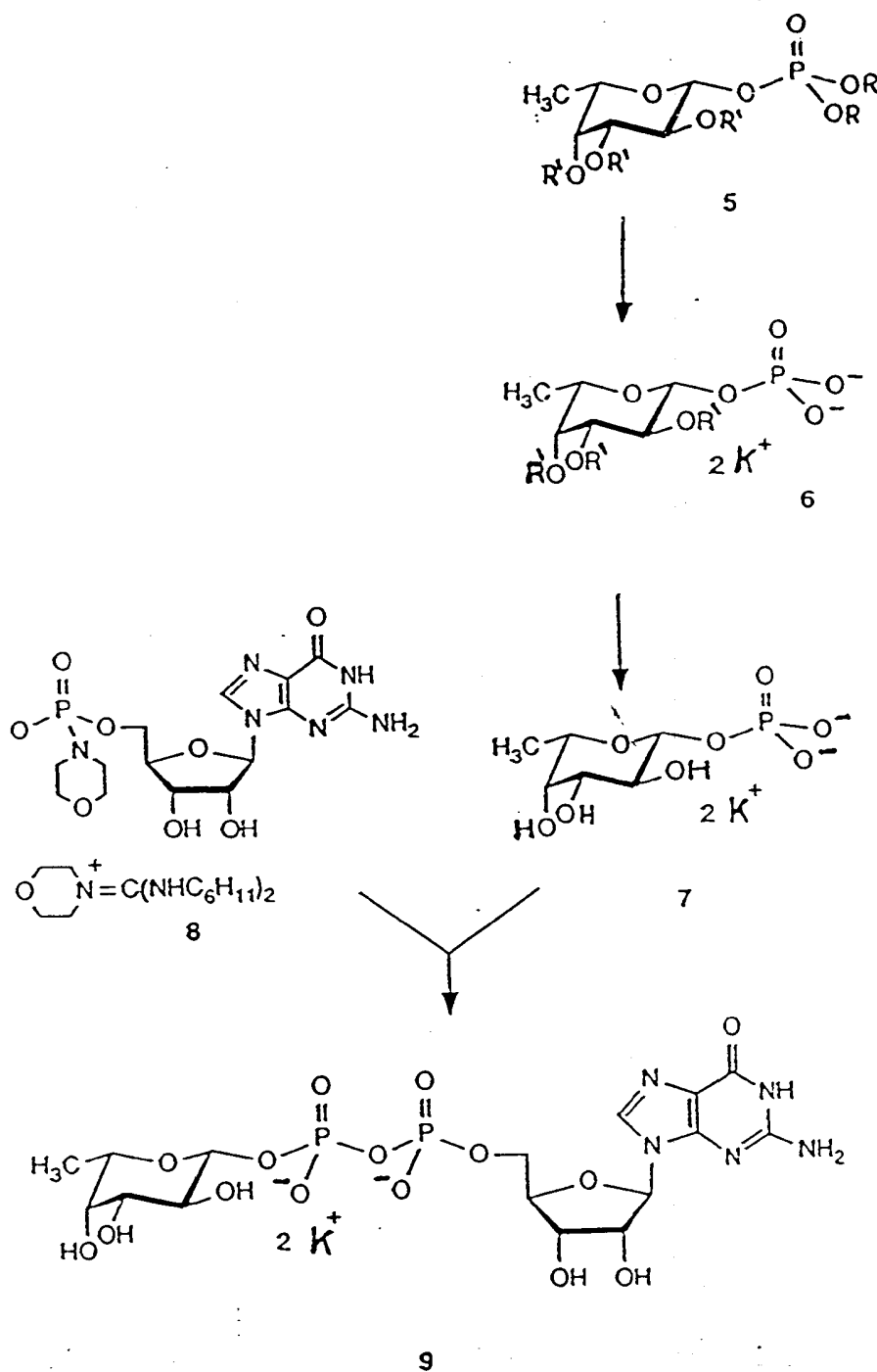


Fig. 2