

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.01227

· 论 著 ·

## N-(9-芴甲氧羰基)-O-(2,3,4,6-四苄基- $\alpha$ -D-半乳糖基)-L-丝氨酸的合成

李翔<sup>1,2</sup>, 郭俊香<sup>1</sup>, 张春梅<sup>1</sup>, 吴秋业<sup>1</sup>, 胡宏岗<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学药学院有机化学教研室, 上海 200433
2. 第二军医大学研究生管理大队, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 得到全苄基保护的糖氨基酸, 用于各种糖肽的合成。 **方法** 以半乳糖为起始化合物通过 5 步反应得到全苄基保护的半乳糖硫苷(5), 并将 5 与 Fmoc-Ser-OAllyl 进行糖基化, 再脱去烯丙基得到目标糖氨基酸(1)。 **结果** 中间体及目标化合物结构均通过 NMR、MS 等光谱确证, 得到目标糖氨基酸。 **结论** 合成方法具有操作简便、通用性好及保护基易脱除等特点, 目标糖氨基酸适用于各类糖肽的合成。

**[关键词]** 糖氨基酸; 丝氨酸; 半乳糖; 合成

**[中图分类号]** R 916.42 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)11-1227-04

### Synthesis of N-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-O-(2,3,4,6-tetra-O-benzyl- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-serine

LI Xiang<sup>1,2</sup>, GUO Jun-xiang<sup>1</sup>, ZHANG Chun-mei<sup>1</sup>, WU Qiu-ye<sup>1</sup>, HU Hong-gang<sup>1\*</sup>

1. Department of Organic Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Brigade of Postgraduate Administration, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To obtain fully protected glyco amino acid for synthesis of various glycopeptides. **Methods** With galactose as the initial compound, the full benzyl protected  $\beta$ -D-1-thio-galactopyranoside (5) was obtained after 5 steps of reactions. Then it was used as donor for glycosylation with Fmoc-Ser-OAllyl to yield fully protected glyco amino acid. Finally, the allyl group was removed to obtain the objective glyco amino acid (1). **Results** The structures of the intermediate and objective compounds were confirmed by MS, <sup>1</sup>HNMR and <sup>13</sup>CNMR, and the target glyco amino acid was obtained. **Conclusion** The present synthetic method is simple to perform and can be widely used; meanwhile, the protective base can be easily removed. The target glyco amino acid is suitable for synthesis of various glycopeptides.

**[Key words]** glyco amino acids; serine; galactose; synthesis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(11):1227-1230]

糖蛋白在细胞间的粘连、识别、组织的分化和发育、免疫调节、肿瘤的转移、炎症的发生以及病原体的感染等生理和病理过程中发挥着极为重要的作用, 糖蛋白上的糖基侧链会影响蛋白的构象及理化性质, 甚至对其生物活性产生重大影响<sup>[1-4]</sup>。但由于糖蛋白分子结构复杂, 合成难度大, 因此, 糖蛋白的特定片段即糖肽常被用作糖蛋白研究的模型工具。目前, 糖肽合成成为有机合成的研究热点。糖肽的合成需要以糖基化的氨基酸为原料。尽管天然存在的糖蛋白种类繁多, 但蛋白质与糖之间仅有氧连接和氮连接两种连接方式<sup>[5-6]</sup>。

目前, 氧连糖氨基酸的糖羟基的保护基通常为乙酰基<sup>[7]</sup>, 该保护基需在碱性条件下脱除, 而糖肽中

可能含有的酯基或酰胺基对碱性条件较为敏感。因此, 有必要在糖氨基酸中引入合适的保护基以避免其脱除过程中对糖肽的结构造成影响。本研究选择氢化条件下极易脱除的苄基作为糖保护基, 以氧连的方式合成得到苄基保护的糖氨基酸(1)。合成新路线如图 1 所示。

### 1 方法

1.1 仪器和试剂 恒温磁力搅拌器(上海志威电器有限公司); 旋转蒸发器(LOOYE ZX98-1); 水浴锅(LOOYE ZX98-1); 2ZX-4 型旋片真空泵、低温冷却循环泵(上海欲康科教仪器设备有限公司); 循环水式多用真空泵 SHB-III A(上海欲康科教仪器设备有限公司)

**[收稿日期]** 2011-04-22 **[接受日期]** 2011-07-26

**[基金项目]** 国家自然科学基金(20902109)。Supported by National Natural Science Foundation of China(20902109)。

**[作者简介]** 李翔, 第二军医大学药学专业 2008 级本科学员。E-mail: lixiangsmmu@163.com

\* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81871205, E-mail: huhonggang\_fox@msn.com

限公司);ZF7B 紫外分析仪(上海康生化仪器制造厂)。乙酸酐(国药集团化学试剂有限公司,批号:F20071205,99%)、乙酸钠(国药集团化学试剂有限公司,批号:F20090911,98%)、对甲苯硫酚(Aladdin,批号:200807121,99%)、溴苄(BnBr, Acros,批号:105871000,97%)、四丁基碘化铵(TBAI, Aladdin,批号:11401,98%)、甲醇(国药集团化学试剂有限公司,批号:T20100331,95%)、钠(国药集团化学试剂有限公司,批号:20061108,95%)、四(三苯

基磷)化钼(Aladdin,批号:29339,98%)、三氟甲磺酸(TCI,批号:T0751,97%)、碳酸铯(Aladdin,批号:13083,95%)、烯丙基溴(Acros,批号:102902500,99%)、N-甲基苯胺(TCI,批号:M0147,98%)、二氯甲烷(Acros,批号:348460010,99%)、丙酮(国药集团化学试剂有限公司,批号:T20100409,99%)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF, Acros,批号:116220010,99%)。

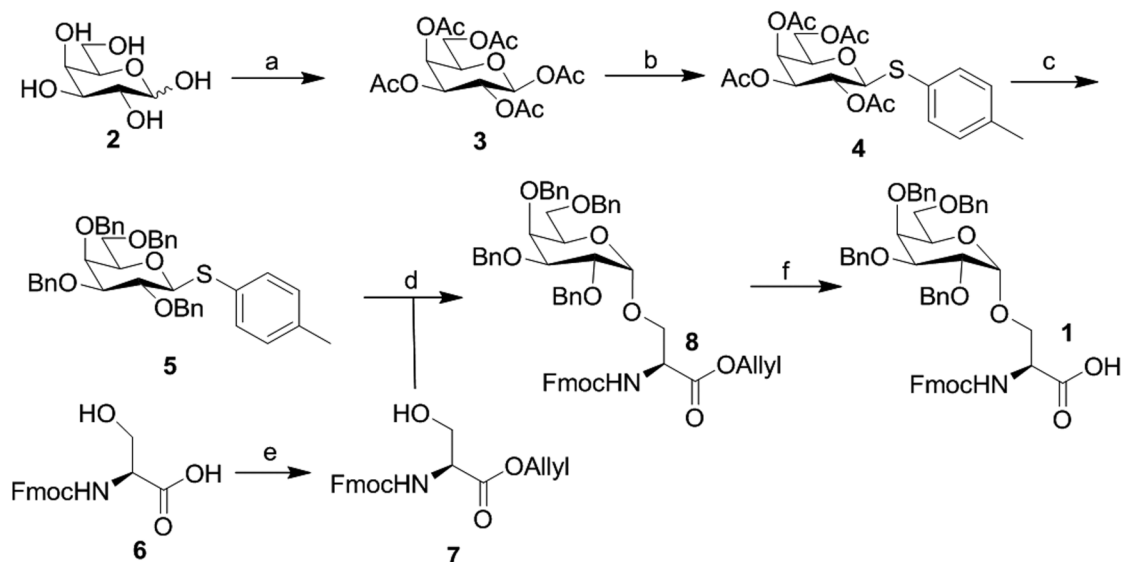


图 1 目标化合物的合成路线

图 1 Synthetic route of compound 1

Reagents and conditions: (a)  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{AcONa}$ , reflux, 8 h, in 69.8% yield; (b) *p*-thiocresol, DCM,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , 2 h, in 63.8% yield; (c)  $\text{CH}_3\text{ONa}-\text{CH}_3\text{OH}$ , then BnBr, NaH, DMF, in 57.9% yield; (d) NIS, TfOH, Molecular sieves 4A, DCM,  $-30^\circ\text{C}$ , in 49.4% yield; (e)  $\text{Ce}_2\text{CO}_3$ , Allyl bromide, DMF, r. t., 10 h, in 75.9% yield; (f)  $(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Pd}$ , NMA, THF, r. t., 5 h, in 83.8% yield

1.2 化合物 3 的合成 半乳糖 2 (20.0 g, 111.1 mmol), 醋酸钠 (23.6 g, 288.6 mmol) 溶解于 380 ml 醋酸酐中, 加热回流 8 h; 反应结束后, 混合物加入到冰水中, 搅拌 2 h, 有大量固体析出, 减压过滤, 滤饼用冰水洗涤后再用甲醇重结晶, 得白色粉末 3 (30.0 g), 产率为 69.8%。测得 m. p.  $140.6 \sim 141.5^\circ\text{C}$ , 与文献[8]一致。

1.3 化合物 4 的合成 氩气保护条件下, 将化合物 3 (10.0 g, 25.6 mmol), 对甲苯硫酚 (6.0 g, 48.8 mmol) 溶解 100 ml 无水二氯甲烷中, 冰浴条件下缓慢加入  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (8.0 ml, 62.8 mmol), 搅拌反应 2 h; 反应液依次用饱和  $\text{NaHCO}_3$  溶液、饱和  $\text{NaCl}$  水溶液洗涤, 有机层用无水硫酸钠干燥; 浓缩至干, 残留物用柱色谱纯化(石油醚: 乙酸乙酯=6:1), 得白色粉末 4 (7.4 g), 产率为 63.8%。测得 m. p.

$115.8 \sim 116.1^\circ\text{C}$ , 与文献[9]一致。

1.4 化合物 5 的合成 将化合物 4 (5.0 g, 11.0 mmol) 溶解于甲醇钠溶液 (45 ml, 0.05 mol/L), 室温下搅拌 2 h; 反应完成后, 用  $\text{H}^+$  交换树脂将反应液调至中性, 过滤后将溶剂旋干; 用 50 ml 无水 DMF 溶解, 随后加入 TBAI (343 mg, 0.87 mmol) 和 BnBr (6.5 ml, 52.23 mmol), 反应体系用冰浴降至  $0^\circ\text{C}$  之后, 加入 NaH (1.83 g, 45.75 mmol), 反应 5 h; 反应结束后, 用  $\text{NH}_4\text{Cl}$  溶液淬灭, 加入饱和  $\text{NaHCO}_3$  溶液, 然后用乙酸乙酯萃取, 有机层用饱和  $\text{NaCl}$  溶液洗涤, 再用无水硫酸钠干燥; 浓缩至干, 残留物用柱层析纯化(石油醚: 乙酸乙酯=8:1), 得化合物 5 (3 g), 产率为 57.9%。 $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz): 7.46 (d, 2H,  $J=8.1$  Hz), 7.38 (d, 3H,  $J=7.2$  Hz), 7.24~7.35 (m, 18H), 6.97~7.00

(m, 2H), 4.95 (d, 1H,  $J=11.5$  Hz), 4.80 (d, 1H,  $J=10.3$  Hz), 4.68~4.78 (m, 3H), 4.55~4.65 (m, 2H), 4.37~4.51 (m, 2H), 3.96 (d, 1H,  $J=2.5$  Hz), 3.91 (t, 1H,  $J=9.4$  Hz), 3.65 (d, 2H,  $J=6.4$  Hz), 3.54~3.61 (m, 2H), 2.27 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz): 135.06, 134.69, 134.54, 134.19, 133.34, 128.38, 126.51, 125.73, 124.59, 124.49, 124.35, 124.08, 124.02, 123.94, 123.84, 123.76, 123.60, 84.29, 80.50, 73.63, 73.53, 71.77, 70.65, 69.96, 69.77, 68.97, 65.06;  $m/z$   $\text{C}_{41}\text{H}_{42}\text{O}_5\text{S} [\text{M}+\text{Na}]^+$ : 669.90。

1.5 化合物 7 的合成 氩气保护条件下, 将化合物 6 (10.0 g, 30.5 mmol) 溶于 88 ml 无水甲醇中, 加入  $\text{Ce}_2\text{CO}_3$  (5.0 g, 15.4 mmol), 室温下搅拌 2 h, 减压浓缩; 残留物用 DMF 溶解, 加入烯丙基溴 (3.2 ml, 36.9 mmol), 室温下搅拌反应 8 h, 有白色沉淀生成; 反应完成后, 白色沉淀物用硅藻土滤除, 将滤出液溶剂旋干, 残留物用柱层析纯化(石油醚: 乙酸乙酯=2:1), 得白色粉末 7 (8.5 g), 产率为 75.9%。

$^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz): 7.74 (d, 2H,  $J=7.5$  Hz), 7.58 (s, 2H), 7.34~7.43 (m, 2H), 7.30 (t, 2H,  $J=7.4$  Hz), 5.76~5.95 (m, 2H), 5.33 (d, 1H,  $J=17.3$  Hz), 5.18~5.26 (m, 1H), 4.66 (d, 2H,  $J=3.7$  Hz), 4.32~4.54 (m, 3H), 4.21 (t, 1H,  $J=6.9$  Hz), 3.98 (s, 1H), 3.91 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz): 166.42, 152.47, 140.00, 139.88, 137.51, 137.48, 127.55, 123.90, 123.25, 121.23, 116.15, 115.07, 63.41, 62.46, 59.36, 52.35, 43.34;  $m/z$   $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}_5 [\text{M}+\text{Na}]^+$ : 390.63。

1.6 化合物 8 的合成 氩气保护条件下, 将化合物 7 (1.0 g, 2.7 mmol), 5 (2.6 g, 4.0 mmol), 4A 型分子筛 (5.0 g) 和 N-碘丁二酰亚胺 (1.4 g, 6.3 mmol) 溶解于 100 ml 二氯甲烷中, 降温至  $-30^\circ\text{C}$ , 搅拌 0.5 h; 将 TfOH (0.1 ml, 1.4 mmol) 缓慢加入到反应体系中, 搅拌 30 min; 反应完成后, 用三乙胺淬灭, 过滤除去分子筛, 滤液用  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  水溶液和饱和 NaCl 水溶液洗涤, 再用无水硫酸钠干燥; 过滤浓缩, 残留物用柱层析纯化(石油醚: 乙酸乙酯=7:1), 得化合物 8 (1.2 g), 产率为 49.4%。 $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz): 7.86 (d, 2H,  $J=7.3$  Hz), 7.70 (d, 2H,  $J=7.5$  Hz), 7.32~7.58 (m, 27H), 6.37 (d, 1H,  $J=9.0$  Hz), 5.90~6.06 (m, 1H), 5.43 (d, 1H,  $J=$

16.9 Hz), 5.31 (d, 1H,  $J=10.3$  Hz), 5.07 (d, 1H,  $J=11.3$  Hz), 4.82~5.00 (m, 4H), 4.64~4.81 (m, 5H), 4.61 (d, 1H,  $J=12.0$  Hz), 4.42~4.55 (m, 3H), 4.27~4.38 (m, 2H), 4.14~4.22 (m, 1H), 4.04~4.13 (m, 2H), 3.94~4.03 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz): 165.95, 152.29, 140.12, 140.07, 137.48, 134.91, 134.79, 134.75, 134.15, 127.84, 124.53, 124.50, 124.40, 124.37, 124.00, 123.88, 123.81, 123.78, 123.69, 123.64, 123.23, 121.35, 116.10, 114.77, 95.85 (C-1), 74.90, 72.69, 71.20, 70.94, 69.59, 69.49, 69.30, 66.58, 66.31, 65.20, 63.27, 62.28, 51.01, 43.36;  $m/z$   $\text{C}_{55}\text{H}_{55}\text{NO}_{10} [\text{M}+\text{Na}]^+$ : 913.21。

1.7 目标化合物 1 的合成 将化合物 8 (1.0 g, 1.12 mmol) 溶解于 15 ml THF 中, 加入  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (129.5 mg, 0.1 mmol), 随后加入 N-甲基苯胺 (1.2 ml, 11.2 mmol), 室温下搅拌反应 2 h; 反应结束后, 浓缩, 残留物用柱层析纯化(石油醚: 乙酸乙酯=1:1, 二氯甲烷: 甲醇=10:1), 得化合物 1 (800 mg), 产率为 83.8%。 $^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ :  $\text{CD}_3\text{OD}=4:1$ , 600 MHz): 7.74 (d, 2H,  $J=7.4$  Hz), 7.61 (d, 2H,  $J=5.9$  Hz), 4.91 (d, 1H,  $J=16.3$  Hz), 4.79 (d, 1H,  $J=11.5$  Hz), 4.70~4.75 (m, 2H), 4.68 (d, 1H,  $J=11.5$  Hz), 4.55 (d, 1H,  $J=11.3$  Hz), 4.48 (t, 2H,  $J=11.6$  Hz), 4.30~4.40 (m, 3H), 4.20 (t, 1H,  $J=7.2$  Hz), 4.06~4.13 (m, 1H), 4.00~4.06 (m, 2H), 3.80~4.00 (m, 1H), 3.50~3.60 (m, 1H), 3.42~3.50 (m, 1H);  $^{13}\text{C}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ :  $\text{CD}_3\text{OD}=4:1$ , 125 MHz): 172.01, 156.48, 143.65, 141.05, 138.36, 138.18, 137.73, 137.54, 128.78, 128.20, 128.17, 128.15, 128.03, 127.69, 127.57, 127.50, 127.46, 127.38, 127.31, 126.85, 124.95, 119.68, 98.41 (C-1), 78.42, 76.26, 74.62, 73.19, 72.85, 69.59, 68.66, 68.60, 66.83, 54.12, 46.90;  $m/z$   $\text{C}_{52}\text{H}_{51}\text{NO}_{10} [\text{M}-\text{H}]^-$ : 848.34。

## 2 结果和讨论

2.1 糖供体的选择 糖供体的 1 位活化形式主要有 3 种: 卤素糖苷、三氯亚胺酯和硫苷(图 2)。文献用全苄基保护的氟苷制备  $\alpha$  构型的糖氨基酸, 收率仅为 40%<sup>[10]</sup>。糖的全苄基保护三氯亚胺酯尽管收率很高, 但需要糖的甲苷作为原料, 而且步骤也较疏

苷长。此外卤苷和三氯亚胺酯的稳定性也比硫苷差,因此本研究选择硫苷作为糖的活化形式,在N-碘丁二酰亚胺催化的条件下进行糖基化,不仅反应收率较高,而且具有很好的立体选择性。

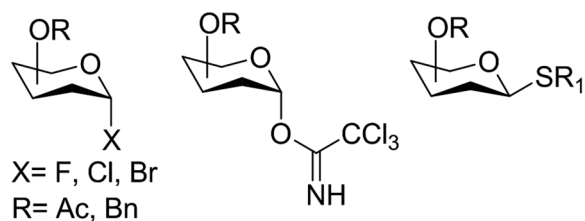


图2 常用的糖基化供体

Fig 2 Most used glycosyl donors for glycosylation

2.2 化合物5与化合物7的糖基化反应 在全苄基化的半乳糖硫苷供体5与氨基酸受体7的糖基化反应过程中,由于半乳糖2位是苄基取代,不存在邻位参与效应,得到的主要产物为 $\alpha$ 构型,化合物8的端基碳的化学位移在96.0左右,与文献<sup>[11]</sup>报道的 $\alpha$ 构型产物相一致,而同类结构的 $\beta$ 构型端基碳信号应在100.0以上。另外,如果采用乙酰基作为保护基,则得到的糖氨基酸为 $\beta$ 构型<sup>[12]</sup>,因此,采用苄基作为保护基不仅容易脱除,而且可以选择性的得到 $\alpha$ 构型的糖氨基酸,TLC检测也显示糖基化反应产物中 $\alpha$ 构型为主要产物。

目前,关于苄基保护的氧连糖氨基酸的合成鲜有报道,本研究以半乳糖为起始物,经过5步反应合成得到了目标糖氨基酸,其结构经高分辨质谱及NMR的确证。该合成方法简便易行,适用于其他类似糖氨基酸的合成。另外,目标化合物也可用于糖肽及糖蛋白的合成中,尤其适用于含有碱敏感保护基或酯基结构的糖肽和糖蛋白的合成。

#### [参考文献]

[1] Bischoff D, Pelzer S, Bister B, Nicholson G J, Stockert S, Schirle M, et al. The biosynthesis of vancomycin-type glycopeptide antibiotics[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2001, 40: 4688-4691.

- [2] Yamamoto N, Tanabe Y, Okamoto R, Dawson P E, Kajihara Y J. Glycosynthases enable a highly efficient chemoenzymatic synthesis of N-glycoproteins carrying intact natural N-glycans[J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 501-510.
- [3] Hu H, Xue J, Swarts B M, Wang Q, Wu Q, Guo Z J. Synthesis and antibacterial activities of N-glycosylated derivatives of tyrocidine A, a macrocyclic peptide antibiotic[J]. *J Med Chem*, 2009, 52: 2052-2059.
- [4] Caralioto R M, Criscuoli M, Cucchi P, Giachetti A, Giannotti D, Giuliani S, et al. MEN 11420 (Nepadutant), a novel glycosylated bicyclic peptide tachykinin NK2 receptor antagonist[J]. *Br J Pharmacol*, 1998, 123: 81-91.
- [5] Swarts B M, Chang Y, Hu H, Guo Z. Synthesis and CD structural studies of CD52 peptides and glycopeptides[J]. *Carbohydr Res*, 2008, 343: 2894-2902.
- [6] George S K, Schwientek T, Holm B, Reis C A, Clausen H, Kihlberg J. Heterobifunctional ligands: practical chemoenzymatic synthesis of a cell adhesive glycopeptide that interacts with both selectins and integrins[J]. *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 11117-11125.
- [7] Wu Z, Guo X, Guo Z. Chemoenzymatic synthesis of glycosylphosphatidylinositol-anchored glycopeptides[J]. *Chem Commun*, 2010, 46: 5773-5774.
- [8] Kumar R, Tiwari P, Maulik P R, Misra A K. Comparative structural analysis of 5,6,7,9-tetra-O-acetyl-4,8-anhydro-1,3-dideoxy-D-glycero-L-gluco-nonulose and its 1-O-acetylated analog, 1,2,3,4,6-penta-O-acetyl-beta-D-galactopyranose using X-ray crystallography[J]. *Carbohydr Res*, 2005, 340: 2335-2339.
- [9] Magnusson G. Carbohydrate thio ortho esters, synthesis and characterization[J]. *J Org Chem*, 1976, 41: 4110-4112.
- [10] Jiang Z H, Gandhi S, Koganty R R. Glycosylceramide analogues; WIPO Patent Application WO2004028475[P]. [2004-04-08].
- [11] Lacombe J M, Pavia A A. Chemical synthesis of some mono- and digalactosyl O-glycopeptides[J]. *J Org Chem*, 1983, 48: 2557-2563.
- [12] Konradsson P, Udodong U E, Fraser-Reid B. Iodonium promoted reactions of disarmed thioglycosides[J]. *Tetrahedron Lett*, 1990, 31: 4313-4316.

[本文编辑] 尹茶