

E. coli O86 O-Antigen 全保护五糖 重复单元的化学简易合成

程水红^{1,2}, 魏国华¹, 杜宇国^{1,2}

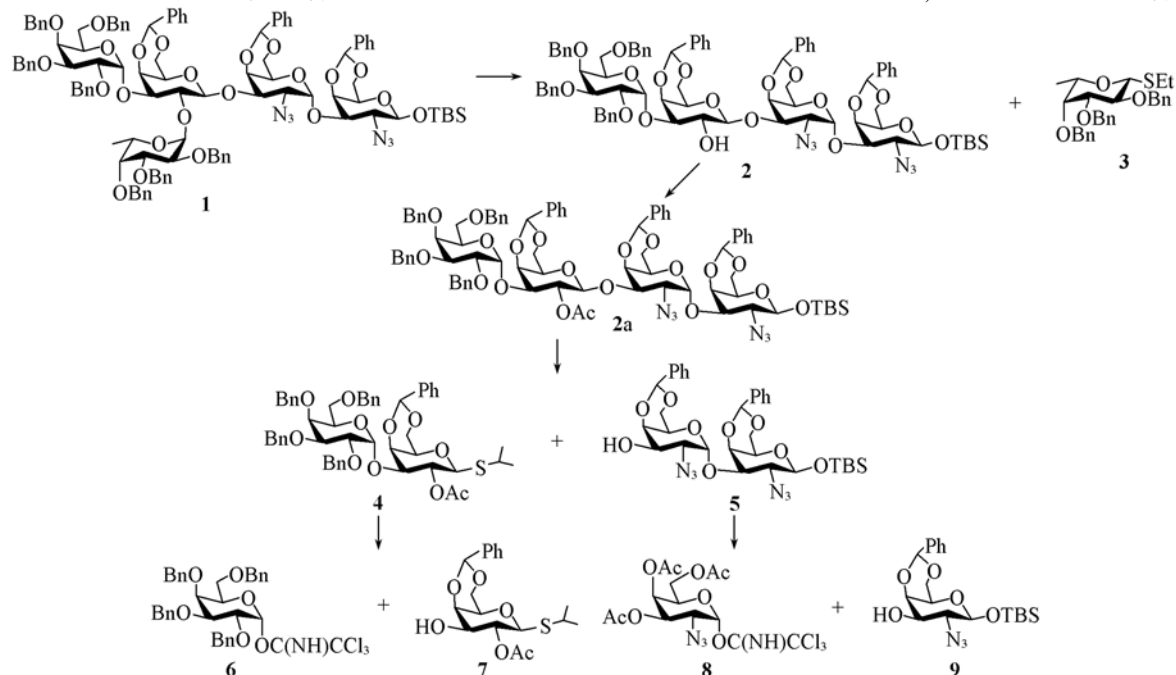
(1. 中国科学院生态环境研究中心环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京 100085;
2. 中国科学院研究生院化学与工程学院, 北京 100049)

摘要 以5个单糖组分为原料, 经过7步, 以21%的总产率得到 *E. coli* O86 抗原全保护的5糖重复单元. 在合成路线中, 充分利用糖基化反应的立体选择性原则, 结合 $\text{HClO}_4\text{-SiO}_2$ 固体催化剂和“IP”策略, 大大提高了合成的效率. 整个合成路线设计操作简单, 选择性高, 消耗低, 产率高, 可以用于快速高效地合成其它一些具有生物活性的寡糖分子.

关键词 大肠杆菌 O86 型 O-抗原; B 血型抗原; 寡糖合成

中图分类号 O629.12 文献标识码 A 文章编号 0251-0790(2009)05-0919-04

大肠杆菌 O86 型 (*Escherichia coli* O86) O-抗原为含有乙酰氨基半乳糖的多糖, 其五糖重复单元的化学结构如 Schemem 1 所示. *E. coli* O86 多糖抗原表现出很高的 B 血型活性, 能够引起 B 血型机体强烈的免疫应答, 产生大量的抗 B 血型抗原抗体^[1,2]. 为了更系统地研究和发发展 *E. coli* O86 抗原的生物活性, 合成了结构明确的 *E. coli* O86 五糖单元的簇合物. 研究表明, 寡糖簇合物能够大大地提高抗原与细胞表面的结合力, 通过制备合成寡糖簇合物实现人体自身的免疫治疗是近年来糖化学和糖生物学研究的热点之一^[3]. 本文合成了 *E. coli* O86 五糖重复单元 **1**, 为簇合物大分子的化学合成和生物研究提供原料基础. 根据多年寡糖合成的经验^[4]和糖化学的立体和区域选择性的原则, 按 Scheme 1 对化合物



Scheme 1 Retrosynthetic analysis of protected pentsaccharide 1

收稿日期: 2008-10-09.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30701043)资助.

联系人简介: 魏国华, 男, 博士, 助理研究员, 主要从事寡糖药物的设计合成研究. E-mail: wgh@rcees.ac.cn

1 进行了逆合成分析.

1 实验部分

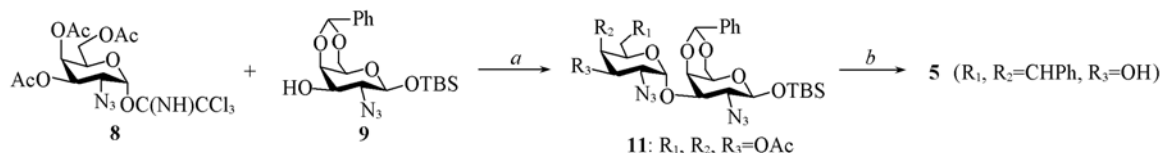
1.1 仪器与试剂

Bruker ARX-400 核磁共振仪 (以 CDCl_3 为溶剂, 以 Me_4Si 为内标); MALDITOF-MS 质谱仪 [Dihydroxybenzoic acid (DHB) as matrix]; ZF7^c 紫外分析仪 (上海康华生化仪器制备有限公司); 薄层色谱 (TLC) 在 HF_{254} 硅胶板 (烟台芝罘硅胶开发试验厂) 上用体积分数为 30% 的硫酸甲醇溶液或紫外分析仪 (UV) 检测; 柱色谱采用 100 目的硅胶 (青岛海洋化工厂), 以乙酸乙酯-石油醚 (分析纯, 北京化学试剂厂) 为淋洗液.

无水二氯甲烷 (DCM, 分析纯, 北京化学试剂厂) 经氢化钙干燥; 三甲基硅基三氟甲磺酸酯 (TM-SOTf, 纯度 >98%, Aldrich 公司); 碘代琥珀亚酰胺 (NIS, 纯度 >98%, Aldrich 公司); 三氟甲磺酸银 (AgOTf , 纯度 >98%, Aldrich 公司); 高氯酸 (HClO_4 , 分析纯, 北京化学试剂厂); 无水甲醇 (MeOH, 分析纯, 北京化学试剂厂); 苯甲醛 (PhCHO, 分析纯, 北京化学试剂厂); 原甲酸三乙酯 [$\text{HC}(\text{OEt})_3$, 分析纯, 北京化学试剂厂]; 对甲苯磺酸 (TsOH, 分析纯, 北京化学试剂厂); 乙腈 (CH_3CN , 分析纯, 北京化学试剂厂).

1.2 实验过程

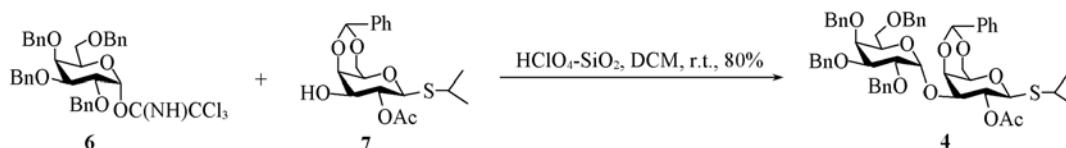
1.2.1 化合物 **5** 的合成 参考文献[4,5]的方法, 化合物 **5** 由化合物 **8**^[6] 和 **9**^[7] 得到 (见 Scheme 2), 3 步总产率为 80%. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +101.4^\circ (c 1.0, \text{CHCl}_3)$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ : 0.17 (s, 3H), 0.18 (s, 3H), 0.95 (s, 9H), 2.2 (s, 1H), 3.37 (s, 1H), 3.59 (dd, 1H, $J=3.3, 10.5$ Hz), 3.78 (dd, 1H, $J=7.6, 10.5$ Hz), 4.04 ~ 4.14 (m, 3H), 4.25 ~ 4.36 (m, 5H), 4.57 (d, 1H, $J=7.7$ Hz), 5.24 (d, 1H, $J=3.4$ Hz), 5.58 (s, 1H), 5.59 (s, 1H), 7.35 ~ 7.89 (m, 10H); 元素分析实测值 (% , $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{N}_6\text{O}_9\text{Si}$ 计算值): C 56.20 (56.29), H 6.23 (6.20); MALDITOF-MS 实测值 (计算值): 705.5 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (682 $[\text{M}]^+$).



Scheme 2 Synthetic routes of disaccharide acceptor **5**

Reagents and conditions: a. TMSOTf, DCM, -20°C ; b. (i) NaOMe, MeOH; (ii) PhCHO, $\text{HC}(\text{OEt})_3$, TsOH, CH_3CN (80% in three steps).

1.2.2 化合物 **4** 的合成 参考文献[4,5]的方法, 化合物 **4** 由化合物 **6**^[8] 和 **7**^[9] 得到 (见 Scheme 3), 产率为 80%. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +40.2^\circ (c 1.0, \text{CHCl}_3)$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ : 1.24 (d, 3H, $J=6.9$ Hz), 1.37 (d, 3H, $J=6.6$ Hz), 1.95 (s, 3H), 3.26 ~ 3.30 (m, 1H), 3.48 ~ 3.59 (m, 2H), 3.77 (dd, 1H, $J=3.3, 9.6$ Hz), 3.87 ~ 3.92 (m, 3H), 3.96 (t, 1H, $J=9.0$ Hz), 4.03 ~ 4.07 (m, 1H), 4.26 ~ 4.29 (m, 2H), 4.38 ~ 4.49 (m, 3H), 4.54 ~ 4.93 (m, 7H), 5.08 (d, 1H, $J=3.4$ Hz), 5.35 (s, 1H), 7.10 ~ 7.45 (m, 30H); 元素分析实测值 (% , $\text{C}_{51}\text{H}_{58}\text{O}_{11}\text{S}$ 计算值): C 70.12 (70.09), H 6.50 (6.56); MALDITOF-MS 实测值 (计算值): 913.4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (890 $[\text{M}]^+$).

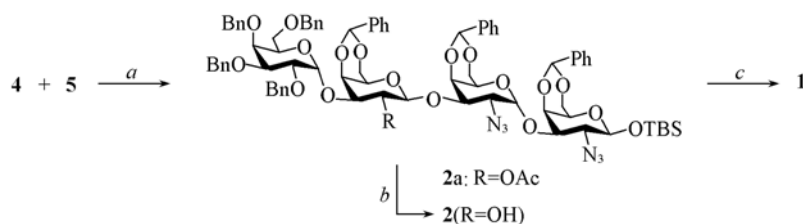


Scheme 3 Synthetic route of disaccharide donor **4**

1.2.3 化合物 **2a** 的合成 参考文献[4,5]的方法, 化合物 **2a** 由化合物 **4** 和 **5** 得到 (见 Scheme 4), 产率为 82%. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +99.8^\circ (c 1.0, \text{CHCl}_3)$; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ : 0.16 (s, 3H), 0.18 (s,

3H), 0.95(s, 9H), 1.92(s, 3H), 3.49(d, 1H, $J=6.6$ Hz), 3.64(dd, 1H, $J=3.5, 10.5$ Hz), 3.74(dd, 1H, $J=3.5, 10.1$ Hz), 3.79(dd, 1H, $J=7.6, 10.5$ Hz), 3.83~3.98(m, 5H), 4.01~4.11(m, 3H), 4.20~4.33(m, 6H), 4.38(d, 1H, $J=11.9$ Hz), 4.46(d, 1H, $J=11.8$ Hz), 4.54(d, 1H, $J=11.2$ Hz), 4.56(d, 1H, $J=7.5$ Hz), 4.63(d, 1H, $J=10.5$ Hz), 4.68(d, 1H, $J=12.0$ Hz), 4.69(d, 1H, $J=7.8$ Hz), 4.76(d, 1H, $J=11.4$ Hz), 5.06(d, 1H, $J=3.4$ Hz), 5.26(d, 1H, $J=3.5$ Hz), 5.34(s, 1H), 5.40(dd, 1H, $J=7.8, 10.0$ Hz), 5.57(s, 1H), 5.59(s, 1H), 7.14~7.15(m, 35H); 元素分析实测值(%), $C_{81}H_{92}O_{20}N_6Si$ 计算值): C 65.01(64.96), H 6.25(6.19); MALDITOF-MS 实测值(计算值): $1519.2[M+Na]^+(1496[M]^+)$.

1.2.4 目标化合物 **1** 的合成 将化合物 **2a** (800 mg, 0.53 mmol) 溶于干燥的 DCM (5 mL) 和无水 MeOH (5 mL) 中, 滴入 1 mol/L 的甲醇钠使反应体系 pH 达到 9~10, 室温搅拌 5 d. 加入酸性树脂 H^+ resin 120 中和反应, 滤去树脂, 滤液浓缩, 经硅胶色谱柱分离纯化得到白色泡沫状固体 **2** (500 mg, 65%). 将化合物 **2** (450 mg, 0.31 mmol) 溶于干燥 DCM (5 mL) 中, 在氮气保护下, 使体系降温至 $-40 \sim -30$ °C, 加入 NIS (140 mg, 0.62 mmol) 和 AgOTf (36 mg, 0.14 mmol), 搅拌 20 min, 在氮气保护下将化合物 **3**^[10] (283 mg, 0.59 mmol) 的干燥 DCM (5 mL) 溶液逐滴滴入上述体系中, 于 -30 °C 下反应 1.5 h. 滴入三乙胺中和, 反应液浓缩后经硅胶色谱柱分离得到白色泡沫状化合物 **1** (350 mg, 62%). $[\alpha]_D^{25} = +45.0^\circ (c 1.0, CHCl_3)$; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ : 0.17(s, 3H), 0.19(s, 3H), 0.95(m, 12H), 2.95(m, 2H), 3.29(d, 1H, $J=2.1$ Hz), 3.40~3.47(m, 3H), 3.65~3.79(m, 3H), 3.80~3.95(m, 7H), 4.04~4.13(m, 4H), 4.15~4.27(m, 3H), 4.29~4.48(m, 11H), 4.54~4.56(m, 3H), 4.57(d, 1H, $J=7.9$ Hz), 4.60(d, 1H, $J=12.0$ Hz), 4.63(d, 1H, $J=7.6$ Hz), 4.73(d, 1H, $J=12.0$ Hz), 4.77(d, 1H, $J=12.0$ Hz), 4.80(d, 1H, $J=2.9$ Hz), 4.83(d, 1H, $J=2.8$ Hz), 5.30(d, 1H, $J=3.5$ Hz), 5.33(s, 1H), 5.36(d, 1H, $J=3.3$ Hz), 5.56(d, 1H, $J=3.5$ Hz), 5.59(s, 1H), 5.60(s, 1H), 7.10~7.56(m, 50H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$), δ : -4.9, -4.0, 16.3, 18.0, 25.6, 29.6, 58.1, 63.9, 64.2, 66.0, 66.1, 66.3, 68.9, 69.2, 69.3, 69.6, 70.1, 70.2, 71.1, 71.2, 71.5, 72.0, 72.4, 72.8, 72.9, 73.1, 73.4, 74.4, 74.7, 75.5, 75.9, 76.0, 76.2, 76.3, 77.1, 77.2, 77.9, 78.4, 80.0, 92.4, 94.6, 96.8, 97.4, 100.7, 100.8, 100.9, 102.2, 126.0, 126.2, 127.2, 127.3, 127.4, 127.6, 127.9, 128.0, 128.1, 128.2, 128.3, 128.6, 128.9, 137.4, 137.7, 137.8, 138.3, 138.6, 138.7, 138.8, 138.9, 139.1, 139.4; 元素分析实测值(%), $C_{106}H_{118}O_{23}N_6Si$ 计算值): C 68.09(68.00), H 6.31(6.35); MALDITOF-MS 实测值(计算值): $1893.4[M+Na]^+(1870[M]^+)$.



Scheme 4 Synthetic routes of pentasaccharide **1**

Reagents and conditions: a. NIS, TMSOTf, DCM, r. t. (yield 82%); b. NaOMe, MeOH (yield 65%);

c. **3**, NIS, AgOTf, DCM, -40 °C (yield 62%).

2 结果与讨论

化合物 **1** 可以从 5 个单糖组分开始合成. 为了提高 α 构型链接, 在糖单元 **6**, **8**, **3** 的 2 位, 分别采用苄基和叠氮作为非邻基参与基团, 而为了高立体选择性地得到 β 链接的化合物 **2a**, 我们利用了 2-乙酰基的邻基参与效应.

根据文献[4]的方法, 化合物 **8** 和 **9** 偶联, 可以高选择性 ($\alpha:\beta=9:1$) 地得到 α 链接的二糖 (**11**),

产率高达 80%；脱乙酰基，苄亚甲基保护 4, 6-位羟基化合物，得到二糖受体 **5**；从 $^1\text{H NMR}$, δ : 5.24 (d, 1H, $J=3.4$ Hz, H1^{II}) 判断得到了所要合成的 α 链接产物。

单糖供体 **6** 和单糖受体 **7** 在固体酸 $\text{HClO}_4\text{-SiO}_2$ [11] 的催化下，可以高选择性 ($\alpha:\beta=8:1$) 地得到 α [$^1\text{H NMR}$, δ 5.08 (d, 1H, $J=3.4$ Hz, H1^{II})] 链接的二糖 **4**，产率为 80%，避免了用传统催化剂所引起的异头硫基的迁移。受体 **5** 和供体 **4** 在 NIS/TMSOTf 的催化下偶联，高选择性地得到唯一 β 连接的四糖 **2a**。由于化合物 **2a** 中的乙酰基是在糖的 2 位上，空间位阻效应使得在甲醇钠条件下脱除乙酰基比较困难，室温下反应 5 d，产率仅为 65%。提高反应温度和碱性强度，则分解产物增多。

四糖受体 **2** 与岩藻糖供体 **3** 的偶联反应采取“IP”反滴加的策略 [12]，用温和的 AgOTf 取代 TMSOTf 作为催化剂，在低温条件下，将化合物 **3** 慢慢滴加到化合物 **2** 和催化剂的混合反应体系中，可以避免化合物 **3** 的快速分解，从而高效率 ($\alpha:\beta=10:1$, 62%) 地得到目标化合物 **1**。从 $^1\text{H NMR}$, δ 5.36 (d, 1H, $J=3.3$ Hz, H1^{IV}) 和 $^{13}\text{C NMR}$, δ 94.6 (C1^{IV}) 判断合成了 α 链接产物。

经过 7 步，以 21% 的总产率得到了目标化合物 **1**，为后续合成簇合物大分子提供了大量的原料基础。合成本化合物的一些策略和技巧可用于快速高效地合成其它一些生物活性的寡糖分子。

参 考 文 献

- [1] Springer G. F., Horton R. E., Forbes M. J. *Exp. Med.* [J], 1959, **110**: 614—618
- [2] Springer G. F., Horton R. E. *J. Clin. Invest.* [J], 1969, **48**: 1280—1291
- [3] Kitov P. I., Sadowska J. M., Mulvey G., *et al.* *Nature* [J], 2000, **403**: 669—672
- [4] Du Y., Wei G., Linhardt R. J. *Tetrahedron Lett.* [J], 2003, **44**: 6887—6890
- [5] Wei G., Du Y., Linhardt R. J. *Tetrahedron Lett.* [J], 2004, **45**: 6895—6898
- [6] Grundler G., Schmidt R. R. *Liebigs Ann. Chem.* [J], 1984: 1826—1847
- [7] Orgueira H. A., Bartolozzi A., Schell P., *et al.* *Chem. Eur. J.* [J], 2003, **9**(1): 140—169
- [8] Alessandro D., Alberto M., Alessandro M. *J. Org. Chem.* [J], 1999, **64**: 933—944
- [9] Cheng L. J., Chen Q., Liu J., *et al.* *Carbohydr. Res.* [J], 2007, **342**: 975—981
- [10] Lonn H. *Carbohydr. Res.* [J], 1985, **139**: 105—113
- [11] Du Y., Wei G., Cheng S., *et al.* *Tetrahedron Lett.* [J], 2006, **47**: 307—310
- [12] Schmidt R. R., Toepfer A. *Tetrahedron Lett.* [J], 1991, **32**: 3353—3355

Facile Synthesis of Protected Pentasaccharide Repeat Unit of *E. coli* O86 O-Antigen

CHENG Shui-Hong^{1,2}, WEI Guo-Hua^{1*}, DU Yu-Guo^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract The protected pentasaccharide repeat unit of *E. coli* O86 O-antigen was successfully synthesized in seven steps and in 21% overall yield through a combination of $\text{HClO}_4\text{-SiO}_2$ solid acid catalytic and inverse procedure. Experimental simplicity, high stereoselectivity, low cost, satisfactory yield are major advantages of our approach. The results of the present exploration should be valuable in the preparation of other oligosaccharides.

Keywords *E. coli* O86 O-antigen; Human blood group B antigen; Oligosaccharide synthesis

(Ed.: H, J, Z)