

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

Disialosyl Galactosylgloboside 的全合成：一種與腎細胞
癌有關的醣質體抗原(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2119-M-038-001-

執行期間：91 年 12 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

執行單位：臺北醫學大學生藥技術學系

計畫主持人：蔡祐輔

計畫參與人員：許佳恆；藍文豪

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 6 月 6 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

Disialosyl Galactosylgloboside 的全合成:一種與腎細胞癌有關的醣質體抗原(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC 91－2119－M－038－001

執行期間：91 年 12 月 01 日 至 92 年 07 月 31 日

執行單位：臺北醫學大學生藥技術學系

計畫主持人：蔡祐輔

計畫參與人：藍文豪

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 5 月 29 日

緒言

表現在細胞表面的醣質體，在分子間的辨識過程中扮演者非常重要的角色。例如：細菌與病毒感染、發炎時細胞的黏附、癌細胞的轉移、免疫反應、細胞分裂與動物授精等，都與細胞表面的醣質體有關。¹

惡性腫瘤侵害人體，依據 Dukes 分類，² 可分為四個步驟。步驟一，腫瘤細胞停留在粘膜層(mucosal layer)；步驟二，腫瘤細胞開始侵害肌肉層(muscle layer)，但還沒發生轉移；步驟三，在某些區域淋巴結(lymph nodes)出現腫瘤轉移；步驟四，腫瘤細胞轉移至其他器官。而「轉移」，對癌症而言是最大的問題。若沒有轉移的困擾，則大部份癌的症皆可經由手術、放射治療法(radiation)和化學治療法(chemotherapy)治癒。

早在三十多年前，Hakomori³ 與 Mora⁴ 便分別觀察到，在癌細胞形成時，其細胞表面的醣脂質(glycosphingolipid, GSL)有異常的改變。其後，在文獻研究報告也陸續提出，⁵ 基本上在所有癌細胞的細胞表面皆會發生異常的醣化反應(glycosylation)形成醣蛋白(glycoprotein)或/及醣脂質(glycolipid)；其細胞表面的醣(carbohydrate)，無論在量、結構或種類皆與正常細胞有很明顯的差異。例如，表現在人類黑色素瘤(melanoma)及神經母細胞瘤(neuroblastoma)的 GM3、GM2、GD3、GD2 醣脂質；及表現在人類小細胞肺癌(small-cell lung carcinoma)的岩藻醣化 GM1(fucosyl GM1)醣脂質。^{6,7}

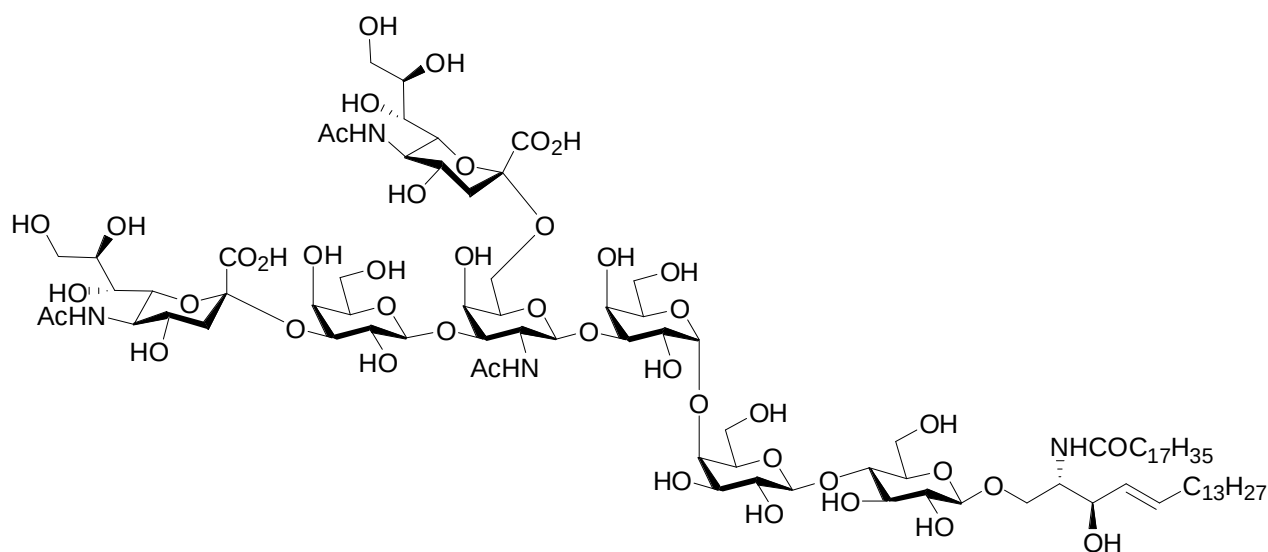
Hakomori⁸ 也指出，細胞表面的醣抗原及 GSL 分別在細胞黏附(adhesion)過程與穿透膜信號傳遞的控制，皆扮演重要的角色。在文獻上，也有一些研究報告來支持此論點。例如：第一，在個體形成(ontogenesis)及腫瘤形成(oncogenesis)過程中，在定量及定性上皆可測得 GSL 有明顯的改變。⁹ 第二，細胞－細胞的相互作用，可以被特別的 GSL、與此 GSL 相關的寡醣(oligosaccharide)或與此 GSL 相關的醣共軛體(glycoconjugate)抑制。¹⁰ 最後，與醣結合的 lectins¹¹ 或 selectins¹² 蛋白質，也會在細胞表面上表現出。在前述中，我們曾提及「轉移」對癌症而言是最大的問題。而癌細胞的轉移，便是與細胞－細胞的相互作用有關。

Hakomori 也進一步提到，¹³ 傳達細胞黏附與四個分子系統有關。第一，細

胞的接觸，即是由侷限在相鄰細胞表面上的 GSL 嵌片(patch)先相互作用，隨後再協同與 integrin 或免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)等的黏附蛋白(adhesion protein)作用。第二，細胞上其它醣質體(醣脂質或醣蛋白)再與特別的 lectins 或 selectins 作用。第三，黏附蛋白(如 fibronectin) 再與他們的 integrin 受體作用。第四，在免疫球蛋白家族裡的黏附蛋白再彼此互相作用，或與 integrin 作用。

由前幾段描述可知，醣質體在癌細胞形成及細胞－細胞相互作用的過程皆扮演非常重要的角色。因此，這些與癌細胞有關的醣質體抗原，已被視為發展成治療癌症的新策略。^{13, 14}

由 Saito 的研究報告¹⁵指出，在腎細胞癌的細胞表面上，較長鏈的醣脂質有明顯的增加，此顯著的表現與腎細胞癌的轉移有密切的關聯。而 Hakomori 的研究報告更明切指出此唯一醣脂質化合物 disialosyl galactosylgloboside(DSGG)，¹⁶其組成及結構如圖一所示。

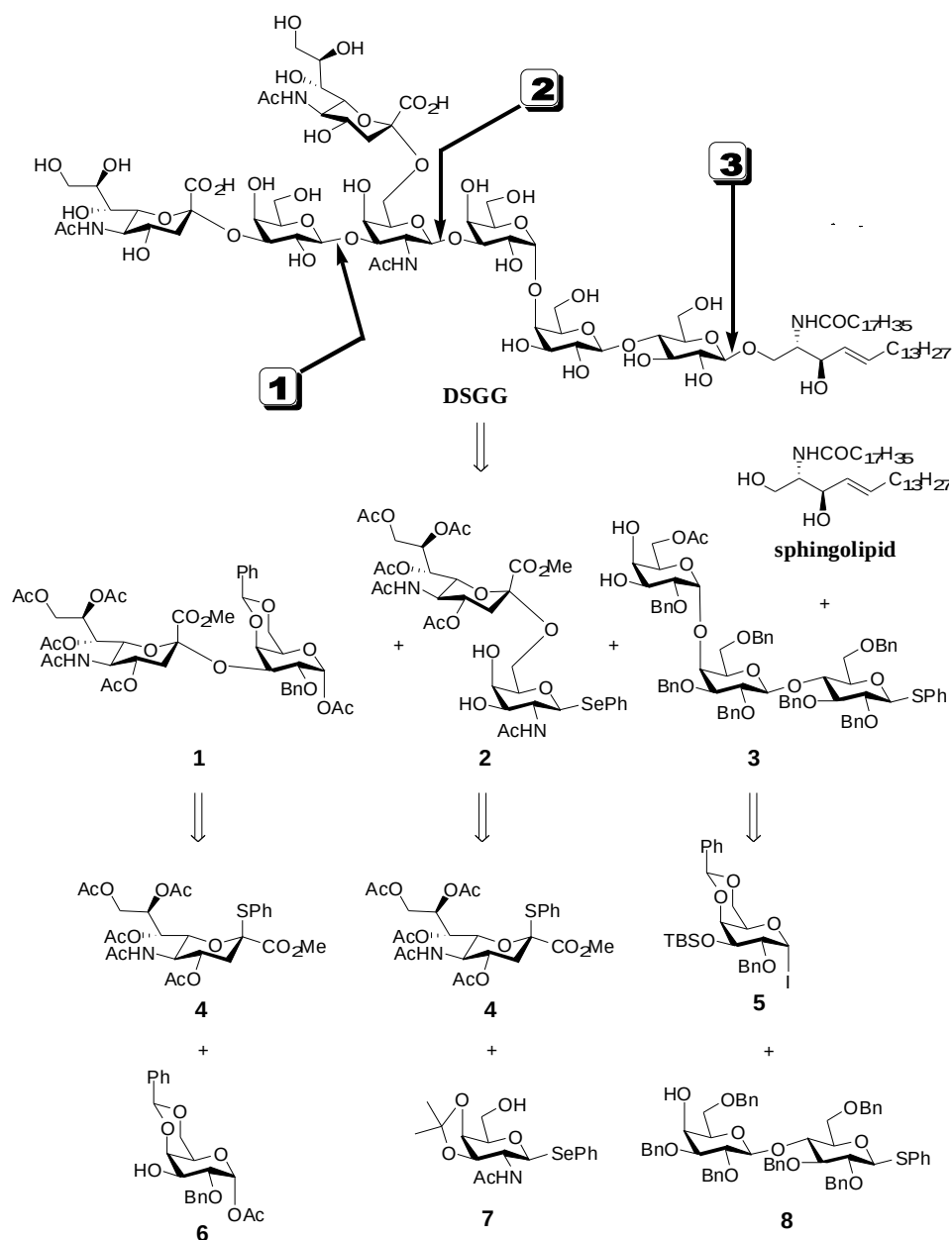


圖一：Disialosyl Galactosylgloboside (DSGG)的組成及結構

利用與癌細胞表面有關的醣質體抗原，可成為治療癌症的新策略—即免疫療法(immunotherapy)與抗黏附療法(anti-adhesion therapy)。¹⁷ 由於生物體含有醣脂質化合物 DSGG 的量非常少，無法從天然來源獲得足夠的量，進行各項生物測試實驗；再者，目前文獻尚無有關合成醣脂質化合物 DSGG 的研究報告發表，因此急需開發新合成途徑，有效製備大量的醣脂質化合物 DSGG。所以本計劃擬以化學方法來製備大量的醣脂質化合物 DSGG，進而探討免疫療法與抗黏附療法

治療腎細胞癌的功效。

化合物 **DSGG** 是由二分子唾液酸(*N*-acetylneuraminic acid)、三分子半乳醣(galactose)、一分子半乳醣乙醯胺(*N*-acetylgalactosamine)、一分子葡萄糖(glucose)及鞘脂質(sphingolipid) 組成的七醣(heptasaccharide)醣脂質(glycolipid)化合物。綜觀其整個分子結構(圖一)，本計畫將採用收斂合成(convergent synthesis)策略來給予製備。有關醣脂質化合物 **DSGG** 的逆合成(retrosynthesis)分析，如圖式一所示。



〔圖式一〕：醣脂質化合物 **DSGG** 的逆合成分析

醣脂質化合物 **DSGG** 的製備，預計由四大片斷(如圖式一中箭號 1、2、3 所指)進行醣甘化反應(glycosylation)得到。此四大片斷，分別為唾液酸與半乳醣

的二糖(disaccharide)衍生物 **1**、唾液酸與半乳糖乙醯胺的二糖衍生物 **2**、半乳糖與乳糖的三糖(trisaccharide)衍生物 **3** 及鞘脂質。衍生物 **1** 的製備，預計由醣供體(glycosyl donor)2-碘唾液酸(2-iodio-*N*-acetylneuraminic acid)衍生物 **4** 與醣受體(glycosyl acceptor)1-乙醯基(acetyl group)半乳糖甘(1-acetyl galactoside)衍生物 **6** 進行醣甘化反應製得。衍生物 **2** 的合成，擬由醣供體 2-苯硫基唾液酸衍生物 **4** 與醣受體 1-苯基半乳糖乙醯胺(1-phenylselenyl-*N*-acetylgalactosamine)衍生物 **7** 進行醣甘化反應製得。衍生物 **3** 的製備，將由醣供體 1-碘半乳糖(1-iodiogalactose)衍生物 **5** 與醣受體 1-苯硫基乳糖(1-thiophenyllactose)衍生物 **8** 進行醣甘化反應獲得。

有關醣脂質化合物 DSGG 的全合成工作，本計畫預計以二年時間完成。第一年，將著重於要用來合成醣脂質化合物 DSGG 之建構單元(building block)(單醣衍生物 **4**、**5**、**6**、**7** 及二醣衍生物 **8**)的製備。第二年，將著重於各建構單元之醣甘化反應的研究，並完成醣脂質化合物 DSGG 的全合成。

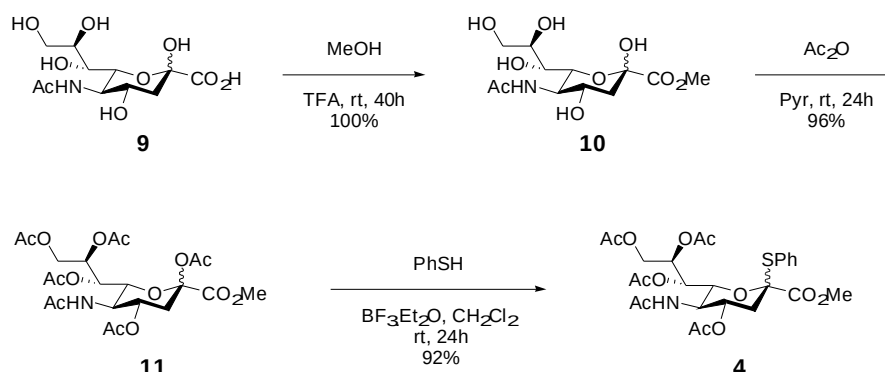
本計畫目前已完成建構單元化合物 **4** 的製備，並同時著手建構單元化合物 **5**、**6**、**7** 與 **8** 的合成。其進度與製備方法，如結果與討論所述。

結果與討論

唾液酸醣甘化供體 **4** 的合成

有關唾液酸 **9** 當做醣甘化供體(glycosyl donor)的製備方法，在文獻上已有很多相關的報告發表。本研究擬採用以苯硫基為離去基

(leaving group)的唾液酸糖苷化供體 **4**，如圖式二所示。



〔圖式二〕唾液酸糖苷化供體 **4** 的合成

以三氟醋酸(trifluoroacetic acid, TFA)為催化劑，唾液酸 **9** 與無水甲醇在室溫下進行酯化反應(esterification)。反應 40 小時後，製得產率為 100% 的甲基酯唾液酸化合物 **10**。其氫核磁共振光譜在 δ 3.77 有一隻單一態(singlet)吸收峰，此為甲基酯基團之甲基氫核的化學位移。酯化反應也曾以 AG50W-X8(H^+)、Amberlite IR120(H^+)等酸性樹脂為催化劑，製備化合物 **10**，但產率只有 61% 至 65%。

將化合物 **10** 溶於無水吡啶(pyridine)溶劑裏，與乙酸酐(acetic anhydride)在室溫下進行氧－乙醯化反應(*O*-acetylation)。反應 24 小時後，減壓濃縮除去吡啶溶劑，得到黃色固體粗產物。此粗產物以快速管柱色層(flash column chromatography)分析純化，可得到產率為 96% 無色固體的甲基酯多氧－乙醯化(per-*O*-acetylation)唾液酸化合物 **11**。其氫核磁共振光譜在 δ 1.89、2.04、2.06 與 2.15 有四隻單一態吸收峰，此為乙醯基之甲基氫核的化學位移。

在無水二氯甲烷(dichloromethane)溶劑裏，三氟化硼乙醚酯(boron trifluoride etherate, $BF_3 \cdot Et_2O$)路易士酸為催化劑，以硫酚取代化合物 **11** 之變旋異構性碳原子(anomeric carbon atom)上的乙醯氧基(acetoxy group)。此反應混合物以飽和碳酸鈉水溶液洗滌後，減壓濃縮除去二氯甲烷溶劑，得到黃色固體粗產物。此粗產物以快速管柱色層(flash column chromatography)分析純化，可得到產率為 92% 的無色固體苯硫基唾液酸變旋異構物(anomer)混合物 **4**。由兩異構物混合物氫核磁共振光譜之 H_{3e} (α 異構物 δ 2.83ppm, β 異構物 δ 2.64ppm)吸收峰的面積比，得知 α 異構物與 β 異構物的比例為 1 / 2。而其氫核磁共振光譜在 δ 7.30 ~ 7.50 為多重態吸收峰，此為苯環的化學位移。

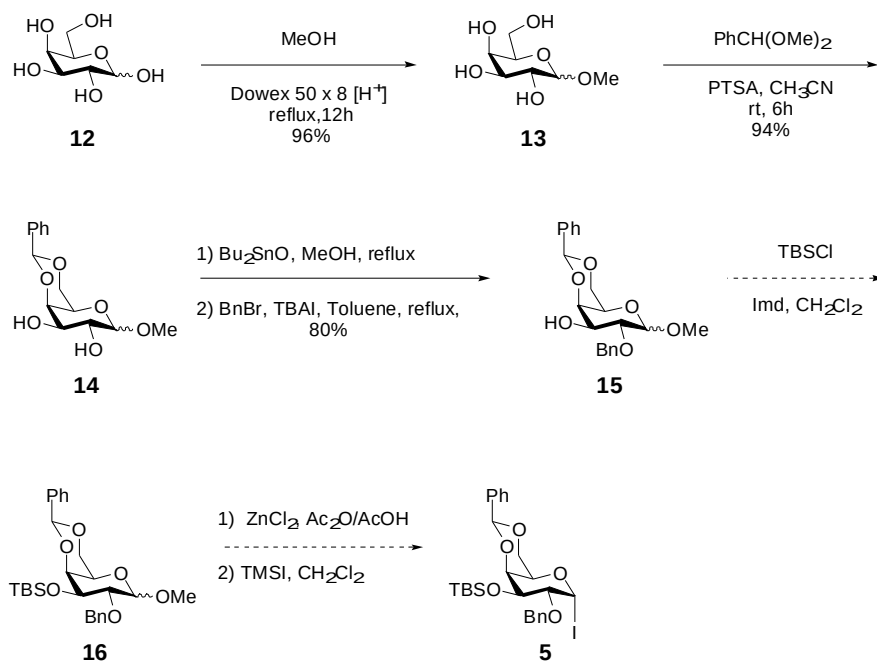
由起始物唾液酸 **9** 經三步反應，可製得總產率為 88% 的無色固體苯硫基唾液酸變旋異構物混合物 **4**。

糖供體 1－碘半乳糖衍生物 **5** 的合成

半乳糖衍生物 **5** 的製備（如圖式三），以半乳糖化合物 **12** 為起始物。將無水甲醇加到已含有半乳糖化合物 **12** 與酸型式樹脂 Dowex 50 x 8 的反應瓶內，此反應混合物在迴流狀態下反應 12 小時後，過濾移走樹脂，減壓濃縮除去甲醇，便可製得產率為 96% 的無色固體變旋異構物甲基半乳糖甘 **13**。¹⁸ 由兩異構物混合物氫核磁共振光譜之甲基氫核吸收峰(α 異構物 δ 3.39ppm, β 異構物 δ 3.30ppm)的面積比，得知 α 異構物與 β 異構物的比例為 5 / 1。

甲基半乳糖甘 **13** 不再純化，逕自進行下一步反應。在冰浴下，迅速將對一甲苯磺酸(*p*-toluenesulfonic acid, PTSA)加至含有甲基半乳糖甘 **13** 與 PhCH(OMe)₂ 的 acetonitrile 溶液裡，此反應混合物持續在室溫下反應 6 小時。反應粗產物經快速管柱層析純化，可獲得產率為 94% 白色固體混合物 **14**。¹⁹

混合物 **14** 與二丁基氧化錫(dibutyltin oxide, Bu₂SnO)甲醇溶液，在迴流狀態下先反應 2 小時，再減壓狀態下除去甲醇溶劑。所生成的產物，在依序加入無水甲苯、碘化四丁基銨(tetrabutylammonium iodide, TBAI)與溴化苄基。此反應混合物在迴流狀態下反應 12 小時後，生成的粗產物經快速管柱層析純化，可獲得產率為 80% 白色固體混合物 **15**。²⁰

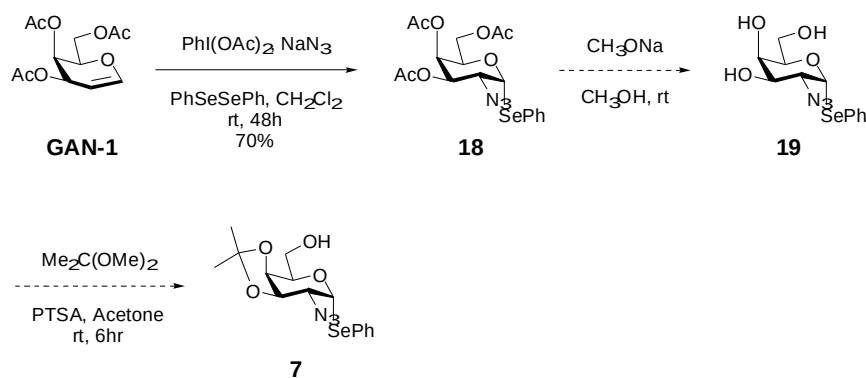


〔圖式三〕1-碘半乳糖衍生物 **5** 的合成

1-苯硒半乳糖乙醯胺衍生物 **7** 的合成

半乳糖乙醯胺衍生物 **7** 的製備（如圖式四），以 per-O-acetyl galactal(**GAN-1**) 為起始物。將買來的 per-O-acetyl galactal 化合物 **GAN-1** 先給予乾燥，再依序加入 NaN₃、PhSeSePh 與二氯甲烷(dichloro methane, CH₂Cl₂)溶劑。此二氯甲烷溶液

置於冰浴中，迅速加入 $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ ，而後將此反應混合物回溫至室溫下反應 48 小時，生成的粗產物經快速管柱層析純化，可獲得產率為 80% 白色固體混合物 **18**。²¹



〔圖式四〕 1-苯硒半乳糖乙醯胺衍生物 **7** 的合成

參考文獻

- 1). Varki, A. *Glycobiology* **1997**, 3, 97.
- 2). Muramatsu, T. *Glycobiology* **1993**, 3, 294.
- 3). Hakomori, S; Murakami, W.T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1968**, 59, 261.
- 4). Mora, P. T.; Brady, R. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1969**, 63, 1290.
- 5). (a) Hakomori, S. *Cancer Res.* **1985**, 45, 2450. (b) Lloyd, K. O. *Cancer Biol.* **1991**, 2, 421. (c) Kim, Y. J.; Varki, A. *Glycoconjugate J.* **1997**, 14, 569.

- 6). Hakomori, S. *Annu. Rev. Immunol.* **1984**, 2, 103.
- 7). Hakomori, S. *Adv. Cancer Res.* **1989**, 52, 257.
- 8). Hakomori, S. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 18713.
- 9). Fenderson, B. A.; Eddy, E. M.; Hakomori, S. *BioEssays* **1990**, 12, 173.
- 10). (a) Marchase, R. B. *J. Cell. Biol.* **1977**, 75, 237. (b) Obata, K.; Oide, M.; Handa, S. *Nature* **1977**, 266, 369. (c) Bird, J. M.; Kimber, S. J. *Dev. Biol.* **1984**, 104, 449.
- 11). (a) Cherayil, B. J.; Weiner, S. J.; Pillai, S. *J. Exp. Med.* **1989**, 170, 1959. (b) Cooper, D. N. W.; Barondes, S. H. *J. Cell Biol.* **1990**, 110, 1681.
- 12). (a) Springer, T. A. *Nature* **1990**, 346, 425. (b) Stoolman, L. M. *Cell* **1989**, 56, 907.
- 13). Hakomori, S. *Cancer Cell* **1991**, 3, 461.
- 14). Hakomori, S. *Adv. Cancer Res.* **1989**, 52, 257.
- 15). Saito, S.; Orikasa, S.; Oyama, C.; Satoh, M.; Fukushima, Y. *Int. J. Cancer* **1991**, 49, 329.
- 16). Satoh, M.; Handa, K.; Saito, S.; Tokuyama, S.; Ito, A.; Miyao, N.; Orikasa, S.; Hakomori, S. *Cancer Res.* **1996**, 56, 1932.
- 17). Danishefsky, S. T.; Allen, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 836.
- 18). Sahai, P.; Chawla, M.; Vishwakarma, R. A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 1283.
- 19). Kobayashi, Y.; Shiozaki, M. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 2570.
- 20). Itoh, T.; Shirakami, S. *Heterocycles* **2001**, 55, 37.
- 21). (a) Santoyo-Gonzalez, F.; Galvo-Flores, F. G.; Garcia-Mendoza, P.; Hernandez-Mateo, F.; Isac-Garcia, J.; Robles-Diaz, R. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 6122. (b) Czernecki, S.; Ayadi, E.; Randriamandimby, D. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 8256.

