

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

利用 D-quinic acid 來設計和合成 glycosidase 之抑制劑及  
其類似物

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2113-M-032-004-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：淡江大學化學系

計畫主持人：施增廉

計畫參與人員：郭威伸 林雅玲

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 8 月 13 日

前言:許多生化現象的發生，例如：消化 (digestion)、醣蛋白的生物合成 (biosynthesis of glycoproteins)，或是在細胞表面寡醣 (oligosaccharides)的修飾或辨認等過程，都和醣分解酵素催化反應 (glycosidase catalyzed reactions)有重要的關聯。

酵素催化反應即是由醣分解酵素 (glycosidase)利用其活性位置上擁有的各種不同官能基 (圖 1)<sup>1</sup>，在蛋白質表面進行切除 (lysis)寡醣或醣胜肽的單醣連結 (glycosidic linkage)，並產生穩定的過渡態陽離子 (intermediate oxonium ion)，因此達到催化的目的，進而引發各種不同的生化反應。

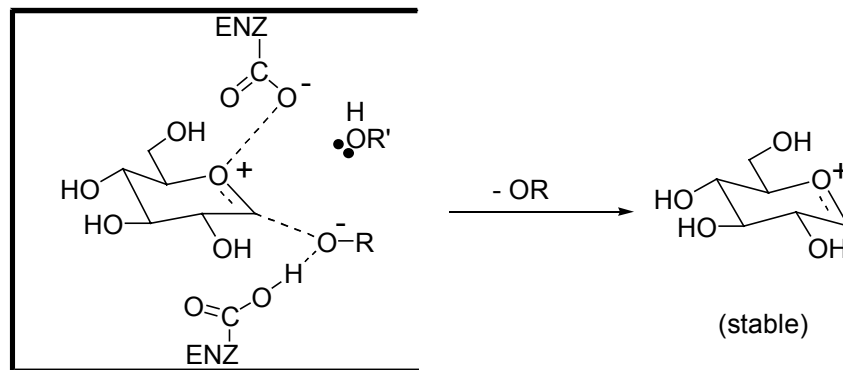


圖 1. 酵素切除配醣 (glycoside)的假想圖

所以，我們只要針對此一催化反應機制，找到一適當的分子，抑制此酵素進而阻斷反應的發生，此分子即可當作一種醣分解酵素抑制劑 (glycosidase inhibitors)，並具潛力可以適用於治療病毒感染<sup>2</sup>、癌症<sup>3</sup>、糖尿病與內分泌失調<sup>4</sup>等疾病。

### 研究動機

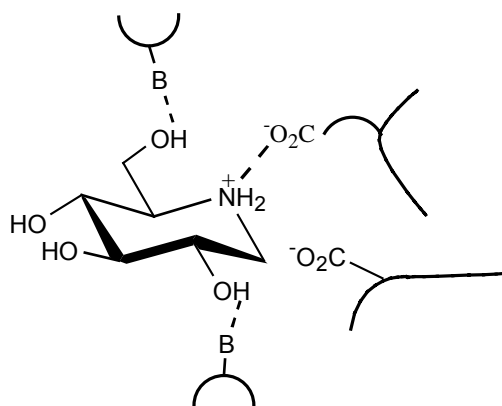
近年來，利用 polyhydroxylated piperidines 與其衍生物作為一種抑制劑，進行對特定醣分解酵素抑制效果的研究，引起了學術和工業界的興趣和重視，並有許多的論文著作和專利被發表<sup>5</sup>。其介紹與抑制原理如下：

Polyhydroxylated piperidines 的衍生物擁有與六碳醣 (hexoses)相似的結構與立體化學，一般稱為 azasugars 或 iminosugars<sup>5</sup>。不同的是，有一氮原子取代原本環上的氧原子<sup>1</sup>。例如：當 azasugars 被質子化 (protonated)時，可成功地模擬 (mimic) D-glucose 陽離子化中間物 (cationic intermediates)的分子形狀與電荷，並干擾酵素水解醣類 (enzymatic glycosidase modification)的過程 (圖 2)<sup>1</sup>。



圖 2. 一般醣類的 oxonium(左)與被質子化的 azasugar(右)之過渡態比較圖

舉例來說，當在生理 (physiological) 的酸鹼值條件下，被質子化的 azasugar 會與醣分解酵素活性位置 (active site) 上的鹼性官能基 (base residues) 作用<sup>6</sup>。其作用的方法是透過環上的氫氧團 (hydroxyl groups) 與酵素活性位置的親水基部分 (hydrophilic region) 接合 (binding)，或是其環上陽離子化的胺基 (amine) 也會與活性位置上的酸基結合 (圖 3)<sup>7</sup>。利用以上兩種機制，就可以使酵素活性位置上所能作用的官能基變少，因此降低酵素活性而達到抑制效果<sup>7</sup>。



B = base residues

圖 3. 含氮的抑制劑在醣分解酵素的活性位置上作用示意圖

理論上，最好的酵素抑制劑必須擁有與特定醣基陽離子 (glycosyl cation) 相似的結構，還需符合的空間立體 (steric) 位向與電子組態，才能夠緊緊地與酵素的活性位置接合<sup>6</sup>。所以 azasugars 上的氫氧基位置也是影響抑制效果的重要因素。例如 glucosidase 的抑制劑 deoxynojirimycin (DNJ)<sup>8</sup> 對於  $\beta$ -galactosidase 或  $\alpha$ -mannosidase 就沒有抑制效果<sup>10</sup>。而 mannosidase 的抑制劑 deoxymannojirimycin (DMJ)<sup>9</sup> 對 glucosidase 抑制效果就不好<sup>10</sup>。

另外，化合物 **1** (1,4,5-trideoxy-1,5-imino-D-lyxohexitol)<sup>11</sup>，對於  $\alpha$ -D-glucosidase、 $\beta$ -D-glucosidase 與  $\beta$ -D-galactosidase 都表現出很有潛力的抑制效果<sup>11</sup>。以上皆說明，不論是此類化合物或其他藥物，皆具其專一和特異性，所以必需開發和合成各式各樣的化合物，才能從其中找到適合的藥物分子或持續改良藥物的療效。有鑑於此，我們利用不同的起始物 D-(-)-quinic acid，經過對不同環境之氫氧基，選擇不同保護基<sup>12a,13a</sup>，並嘗試合成與化合物 **1** 為 2,3-epi 的化合物 **2** 或 2,3,5-epi 的化合物 **3**，以及 2,5-epi 的化合物 **4**。並希望他們未來在抑制方面有良好的效果 (圖 4)。

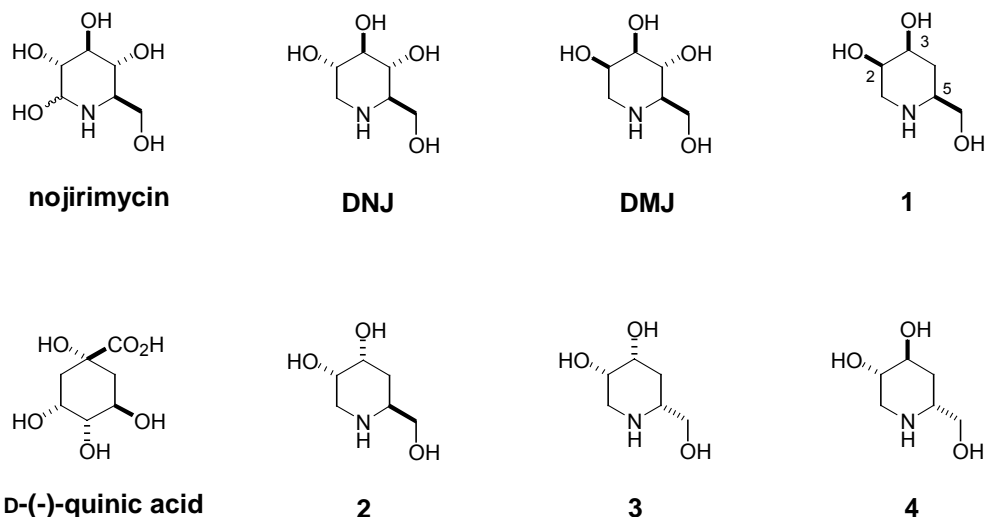


圖 4. 各種已知的 azasugars 以及利用 D-(-)-quinic acid 欲合成的標的物 2、3、4

化合物 1 最初的合成方式是利用 3-deoxy-D-hexose 作為起始物，並需要一醣異構物酶 (glucose isomerase)<sup>11</sup>。而我們的合成策略如下 (圖 5)：藉著保護 D-(-)-quinic acid 其順式 (*cis*)<sup>12a</sup> 或反式 (*trans*)<sup>13a</sup> 的相鄰 diols，經過一連串官能基轉換得到 enone<sup>12,13b</sup>。還原 enone 為 allylic alcohol 後<sup>13c,14</sup>，再引入胺基 (amine)<sup>15</sup>。當雙鍵被切斷成為雙醛基<sup>16</sup>時，預期化合物會自行環合反應<sup>17</sup>，得到一含有 immonium ion 和醛基的化合物。緊接著在 pH 值為 4 的條件下再進行還原反應<sup>1</sup>，最後將保護基移除，即可得到具有不同立體化學的標的物—trihydroxyl piperidines 2、3 與 4。

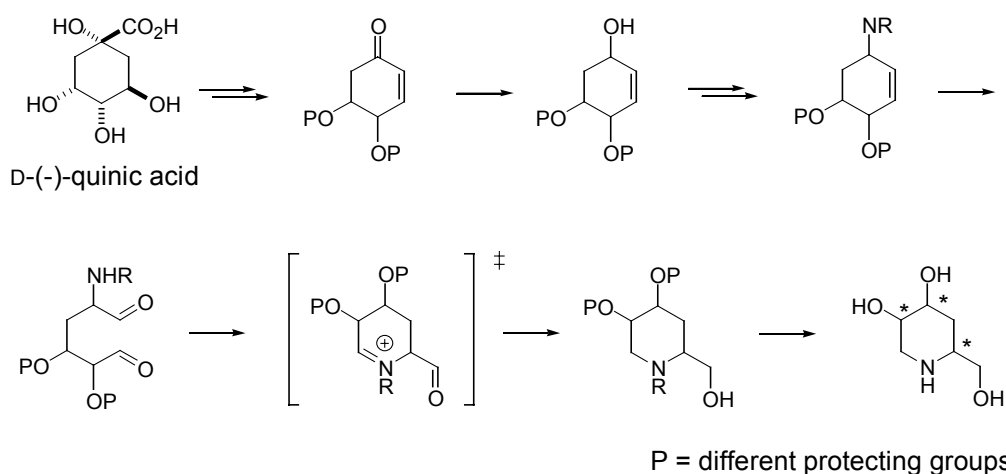


圖 5. 合成 2,4,5-trihydroxyl piperidine 的流程圖

除了 azasugar 以外，多氫氧基環己烷的相關化合物 (highly oxygenated cyclohexane derivatives)，例如 quercitols，也具有潛力可發展成為醣分解酵素抑制劑。而 quercitols 的衍生物 sylvestre，已被證實對糖尿病患者有很好的療效<sup>18</sup>。

查閱文獻發現，Balci 曾經報導可利用 1,4-cyclohexadiene 為起始物 (圖 7)，來合成(±)-*proto*-quercitol<sup>21</sup>。而 Balci 合成(±)-*proto*-quercitol 的方法如下：在 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 下，利用 TPP (tetraphenylporphyrin) 與 O<sub>2</sub> 及照光條件下，進行 photooxygenation 得到兩個 endoperoxides，而其中 *anti* 的異構物經由還原 (LAH)、acetylation (Ac<sub>2</sub>O/pyridine) 保護得到化合物 **38**，接著進行 dihydroxylation (KMnO<sub>4</sub>/MgSO<sub>4</sub>/EtOH/H<sub>2</sub>O) 與 acetylation (Ac<sub>2</sub>O/pyridine) 的反應，最後利用 NH<sub>3</sub>/MeOH 進行 deacetylation，即可得到(±)-*proto*-quercitols。同時，Balci 也利用另一 *syn* 的 endoperoxide 立體異構物，經由相同反應條件得到化合物 **42**，然後再經過幾步反應又可得到另一(±)-*gala*-quercitol<sup>21</sup>。

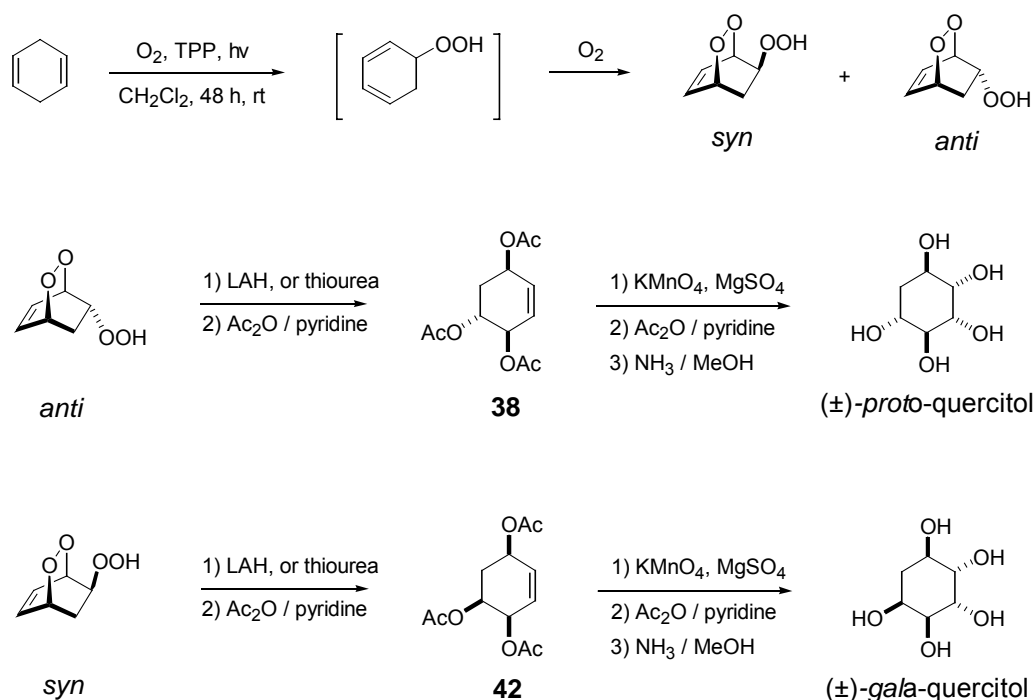


圖 7. 合成(±)-*proto*-quercitol 以及(±)-*gala*-quercitol 的流程圖

所以，我們在此提出另外一種方式合成(+)-*proto*-quercitol，可藉由化合物 **10**，即合成 trihydroxyl piperidines 過程的中間物，經由反轉 C<sub>4</sub> 之立體位向<sup>22</sup>，同樣可得到化合物 **38**。然後再經過 dihydroxylation (KMnO<sub>4</sub>/MgSO<sub>4</sub>/EtOH/H<sub>2</sub>O 或 RuCl<sub>3</sub>·xH<sub>2</sub>O/NaIO<sub>4</sub>)<sup>21,31b</sup>，即可得到(+)-*proto*-quercitol (圖 8)。

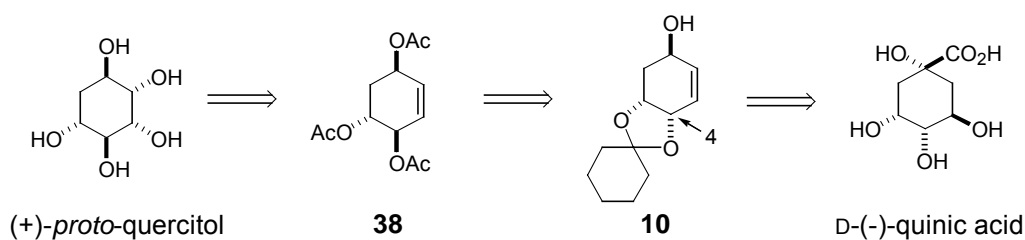


圖 8. (+)-proto-quercitols 的逆合成圖

### Trihydroxyl piperidines 的合成部分

由圖 5 之逆合成概念，我們使用市售的 D-(-)-quinic acid 為起始物，以 benzene 為溶劑，然後加入酸性催化劑 PTSA，並使用 Dean-Stark trap 裝置和迴流的條件下，利用 cyclohexanone 進行順式的保護得到化合物 5<sup>25</sup>，粗產率為 82% (文獻產率為 98%)。接著，將化合物 5 利用 LAH 進行還原，得到一 triol 的產物 6<sup>12a,26</sup>，粗產率為 93% (圖 10)。一般未反應完的 LAH，是直接以水慢慢加入將它 quench<sup>26</sup>，但我們發現此方法並不適用於量大的實驗，推測是因為其產生的混合物為粘稠狀，會包附著產物，造成後來的過濾過程中，需使用過量的溶劑多次沖洗和濃縮才能得到部分產物，且產率約有 80%。之後我們改用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·10H<sub>2</sub>O 替代水的作用<sup>27</sup>，成功地改善此情況，粗產率可達 93%。

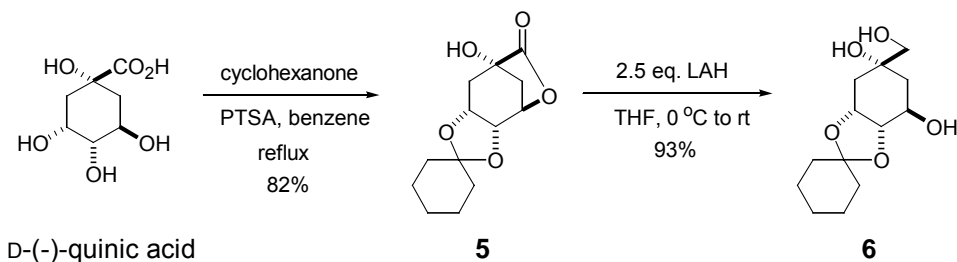


圖 9. 利用 D-(-)-quinic acid 為起始物合成化合物 6

將化合物 6 溶於 MeOH 中，並加入 NaIO<sub>4</sub>，以便將 diol 切斷，可得到一 hydroxy ketone 的白色固體 7<sup>12a</sup>，產率為 80% (圖 11)。然後將化合物 7 溶於 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>，以 triethylamine 作為鹼，並在 0 °C 下慢慢加入 MsCl 進行消除反應<sup>28</sup>，得到一紫外線吸收性質的 enone 黃色固體 8<sup>12b</sup>，產率 89%。利用此實驗條件進行消除反應所得的結果與其他文獻<sup>12b,29</sup> 比較，雖然產率有稍許下降 (文獻反應條件為 *p*-toluenesulfonyl chloride/pyridine，產率為 95%)，可是卻大幅縮短了反應所需時間 (文獻：1-5 天，本論文：5-6 小時)。

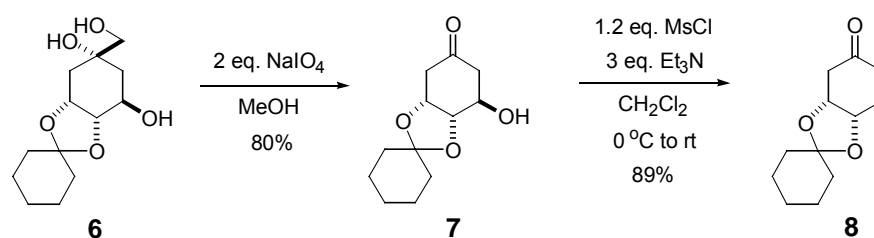


圖 10. 利用化合物 6 合成化合物 8

當我們利用 Luche's reduction ( $\text{NaBH}_4/\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ ) 的反應條件可以還原化合物 8 上的酮基<sup>13c,14</sup>。而 TLC 展開 ( $\text{EtOAc}/\text{hexane} = 1/1$ ) 並顯色後可發現， $R_f$  值約在 0.4-0.6 的位置，可看到有兩個產物， $R_f$  值約差 0.1，推測產物為  $\alpha$  和  $\beta$  之 allylic alcohols (圖 12)。

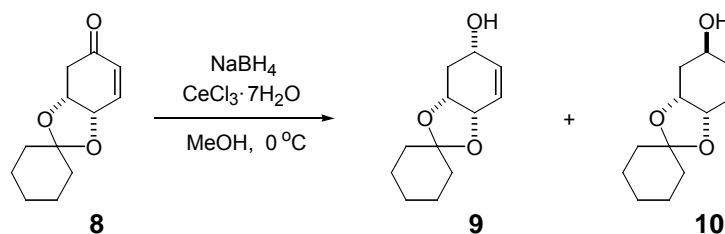


圖 11. 化合物 8 經由 Luche's reduction 還原成為兩個 allylic alcohols

至此，化合物 9 和 10 其立體化學尚未決定。二者可先經由管柱層析分離純化，緊接著我們討論如何決定這兩個 allylic alcohol 的立體結構。在查閱文獻之後，發現有一類似化合物 36 (圖 13)<sup>30a</sup>，其判別  $H_1$  立體向位的方法是計算出其偶合常數大小 ( $J_{1,6a} = J_{5,6a} = 9.0 \text{ Hz}$ ,  $J_{1,6e} = 4.5 \text{ Hz}$ ,  $J_{5,6e} = 4.5 \text{ Hz}$ )，推論得知  $H_1$  的立體化學是在 pseudoaxial 的位置<sup>30a</sup>。我們認為可以運用類似的方法，只要判讀化合物 9 或 10 的  $^1\text{H NMR}$  光譜，經由算出偶合常數大小的方式，即可判別  $H_1$  立體空間為 pseudoequatorial 或 pseudoaxial。但是，由  $^1\text{H NMR}$  光譜 (附圖 5、7) 可發現，兩個化合物上的  $H_1$ ，恰巧皆與  $H_4$  或  $H_5$  重合，無法真正判別哪一組吸收為  $H_1$ 。

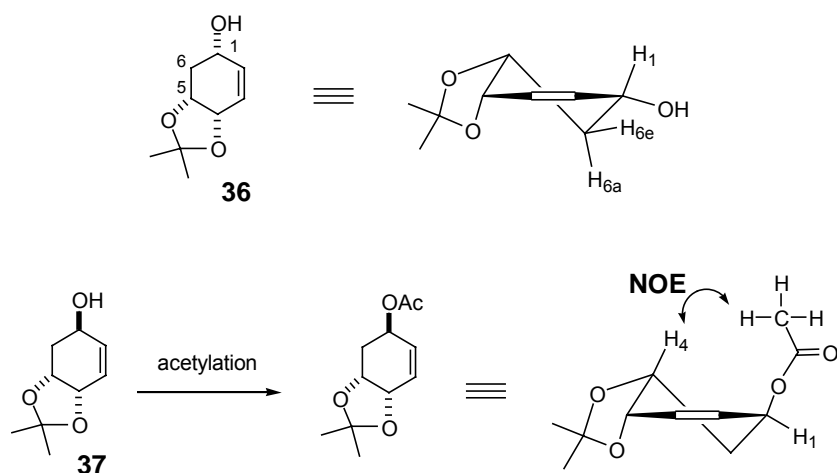


圖 12. 化合物 36 與 37 的立體化學示意圖

過去文獻中還有另一類似的化合物  $37^{30b}$ ，其判定立體結構的方法是先將化合物  $37$  進行 acetylation<sup>30b</sup>。然後可以定出  $H_4$  和  $H_5$  在  $^1H$  NMR 光譜的位置為 4.32 ppm，而當 irradiation 此位置的氫的訊號時，在 NOE difference 光譜上看到，OAc 官能基上的甲基 ( $\delta = 1.92$ ) 有增強 (enhancement) 現象發生，可清楚的知道兩者在空間位向是相近的，所以可以判定  $H_1$  的氫是在 pseudoequatorial 的位置<sup>30b</sup>。

參考上述文獻的方法，我們嘗試將化合物  $9$  進行 acetylation，得到化合物  $28$  (圖 14)。此時  $^1H$  NMR 光譜上  $H_1$ 、 $H_4$  與  $H_5$  上的氫，就沒有重合現象發生。之後，可算出  $H_1$  與  $H_6$  之間的偶合常數如下： $J_{1,6a} = 9.2$  Hz,  $J_{1,6e} = 4.8$  Hz,  $J_{5a,6e} = 4.8$  Hz。或是更進一步利用 NOESY 二維光譜 (附圖 35)，可觀察到  $H_1$ 、 $H_4$  與  $H_5$  都有偶合的訊號，皆可證明它們在立體空間上為相同的位向。所以確定極性較小的化合物  $9$  其  $H_1$  是在 pseudoaxial 位置，化合物  $10$  的  $H_1$  在 pseudoequatorial 的位置，而產率比為  $9 : 10 = 56\% : 41\%$ 。

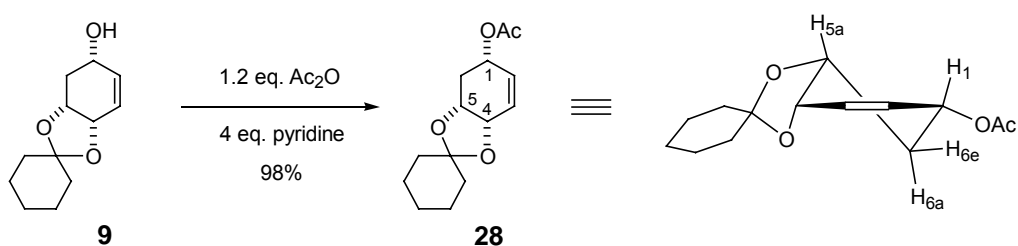


圖 13. 將化合物 9 進行 acetylation 得到化合物 28 以及其立體化學

之後我們先選用化合物  $9$ ，在 mesylation ( $MsCl/Et_3N$ ) 的反應條件下，chloride 經過  $S_N2$  反應機構取代 mesylated group 得到一 allylic chloride<sup>15a</sup> (化合物  $11$ )，產率 87% (圖 15)。而當化合物  $11$  在  $NaN_3/DMF$  並加熱至  $65^\circ C$  的條件下，azide 又經過  $S_N2$  反應取代 chloride<sup>15b</sup> 得到化合物  $12$ ，產率 85%。化合物  $12$  再經由 dihydroxylation<sup>21,31</sup> 可得到化合物  $13$ ，粗產率為 68%。以上 dihydroxylation 的立



體位向並未仔細判定，因其最後會被切除，並不影響結果，但根據本實驗室的經驗，dihydroxylation 的發生應為相對於 cyclohexyl 的 *anti* 位置<sup>36</sup>。

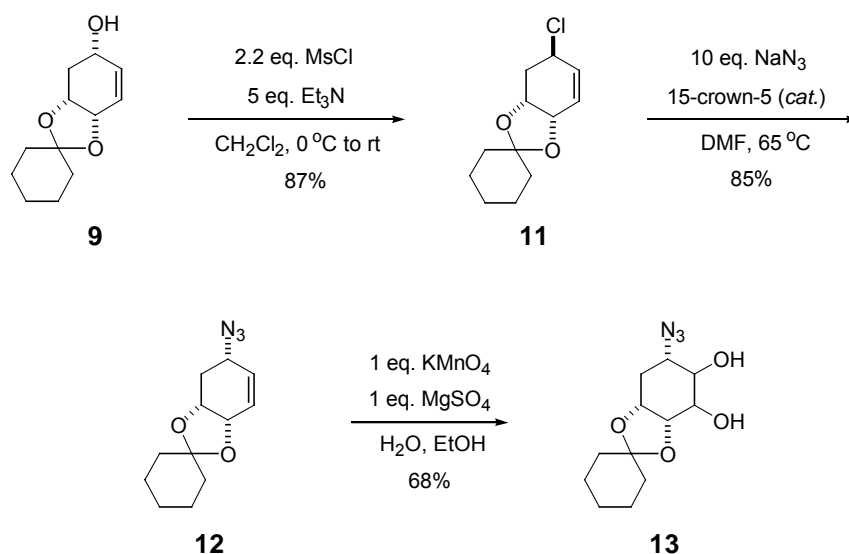
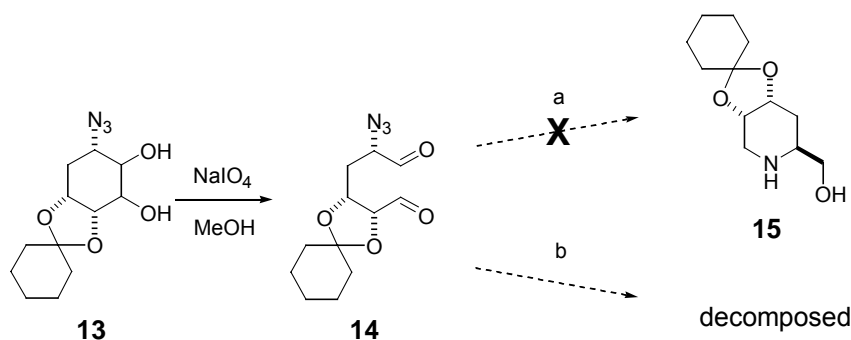


圖 14. 由化合物 9 合成化合物 13

而從上述的實驗流程中，我們發現當利用  $\text{OsO}_4/\text{NMO}/\text{tert-butanol}$  反應條件<sup>31a</sup> 進行 dihydroxylation 時，得到的產物化合物 13 在純化和往後的實驗流程中，會一直有淡黃色的顏色難以去除。因此當我們改用  $\text{KMnO}_4/\text{MgSO}_4$  實驗條件後<sup>21</sup>，此問題可得到改善，而得到產物是透明的油狀液體，且產率差異不大（皆為 65%-70%）。



Reagents and conditions: (a)  $\text{H}_2$  (1 atm), various catalysts, then  $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ ; (b)  $\text{Pd}/\text{C}$ ,  $\text{H}_2$  (3 atm), then  $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{MeOH}$ .

圖 15. 嘗試由化合物 13 進行開環、環化及氫化反應

接著，我們嘗試將化合物 13，先利用  $\text{NaIO}_4/\text{MeOH}$  開環<sup>32</sup> (圖 16)，由其 TLC 顯示，產物 14 的點在 TLC 上變為寬帶 (broad) 狀，且 crude 的  $^1\text{H}$  NMR 光譜亦可觀察到在  $\delta = 9-10$  之間有兩組吸收，可證明有 aldehyde 的存在。然後，我們嘗試利用各種不同的催化劑，對化合物 14 進行氫化反應希望可得到化合物 15。

嘗試的催化劑有：Pd (5%-10%)/C、Raney Ni、Pd(OH)<sub>2</sub>/C 與 Lindlar's catalyst 等催化劑，並使反應在約一大氣壓的氫氣下進行<sup>33a-d</sup>。但由 TLC 觀察其 R<sub>f</sub> 值並沒有明顯的變化，於是利用 NaBH<sub>3</sub>CN 進行還原，得到的產物由 crude 的 <sup>1</sup>H NMR 光譜判斷並不是我們所希望的標的物；若改以加壓條件 (約 2-3 atm) 氫化<sup>15b</sup>，則反應物會分解，因此這方法似乎不可行。

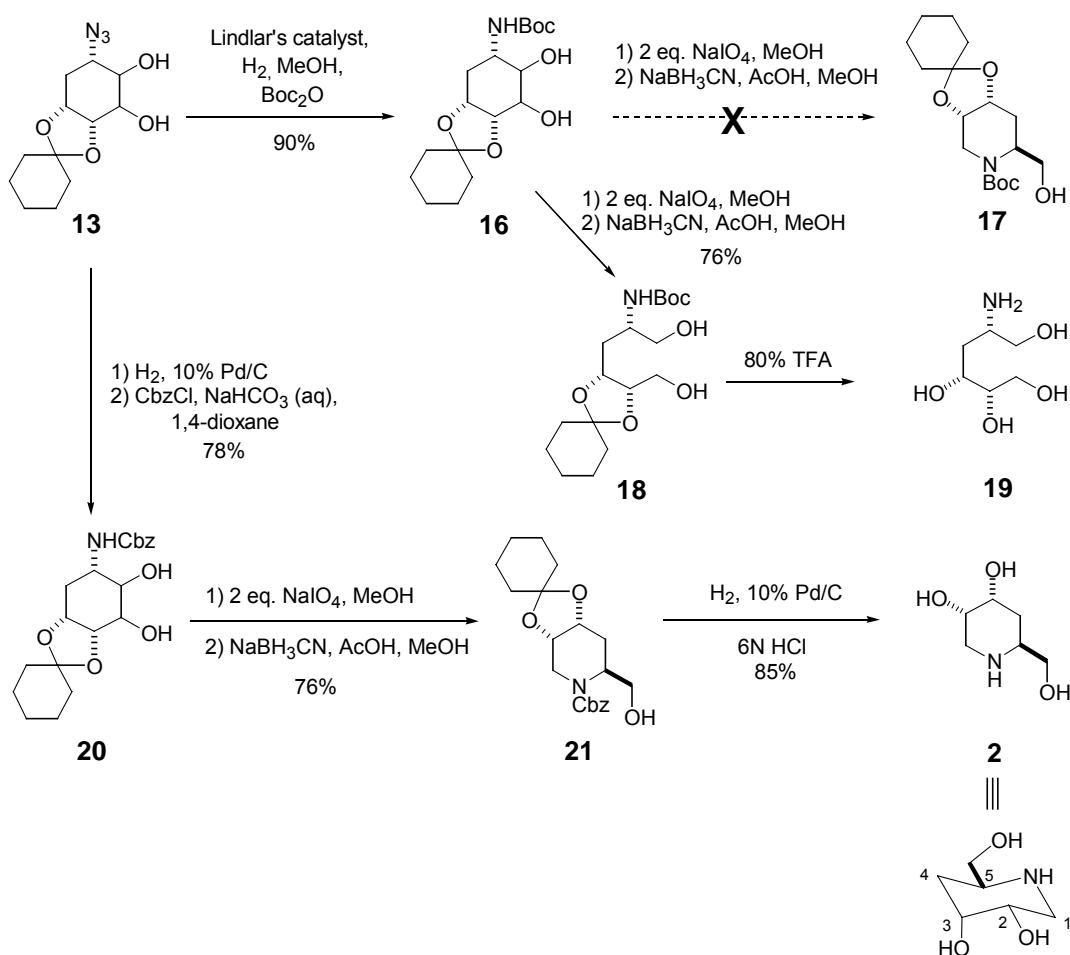


圖 16. 採用不同的胺基保護並嘗試合成化合物 2

之後，我們決定先將化合物 13 上的胺基氫化 (Lindlar's catalyst)，並同時對還原後的胺基作保護<sup>33d,33e</sup> (圖 17)。首先是採用 Boc<sub>2</sub>O 保護<sup>33d</sup> 得到化合物 16，粗產率 90%。再經過 NaIO<sub>4</sub>/MeOH 開環，以及 NaBH<sub>3</sub>CN/MeOH/pH 4 條件下還原後<sup>1</sup>，雖然利用了管柱層析分離純化，但得到的產物在 <sup>1</sup>H NMR 光譜上仍有多餘的訊號，無法輕易判定結構。所以我們決定先將此化合物進行加酸 (80% TFA) 切除保護基的反應，希望藉著其性質的重大改變 (親油性變為親水性)，在反應完後的萃取過程中，或許能夠將大部分雜質留在有機層中，使以後的純化過程較容易。反應完成後經萃取，再將水層以減壓濃縮方式去除溶劑，得到的剩餘物利用管柱層析純化 (混合溶劑 MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/10% NH<sub>4</sub>OH<sub>(aq)</sub> = 1/2/0.1-3/1/0.5 沖提)，得到的化合物其 <sup>1</sup>H NMR 光譜，在 δ 約 1.94-1.16 的位置，即是次甲基

(methylene)的兩個氫質子的吸收，發現有重合的現象。根據文獻報導過的 azasugar，若是環合的分子，則這組氫質子應為不同環境<sup>1,11</sup>。所以推測先前的實驗過程中並沒有自行環合(化合物 **18**)，而且之後得到的不是我們的標物，而是一個直鏈含氮的碳氮化合物 **19**。

最後，我們一樣先將化合物 **13** 氫化，但是改用 CbzCl 作保護<sup>1,33e</sup> 得到化合物 **20**，粗產率 78%。經過和前文一樣的反应條件，進行開環和還原步驟得到化合物 **21**，粗產率 76%，並在加酸 (6N HCl)同時氫化 (Pd/C, H<sub>2</sub>)去保護基後<sup>1</sup>，終於得到我們的標物 – 化合物 **2** (產率 85%)。化合物 **2** 的結構可由 HMQC、HMBC (附圖 18、19)二維光譜證明是正確無誤的。另外，在決定其立體化學方面，我們可先從 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 二維光譜，判定環上氫質子的相對位置。接著由與 H<sub>4</sub> 的偶合常數： $J_{4a,5} = 11.8 \text{ Hz}$ ,  $J_{4e,5} = 4.8 \text{ Hz}$ ，判定 H<sub>5</sub> 是在 axial 的位置。或是由 NOESY 圖譜 (附圖 17)上 H<sub>5</sub> 與 H<sub>2</sub>、H<sub>3</sub> 沒有偶合的訊號，可以進一步確定 H<sub>5</sub> 與 H<sub>2</sub>、H<sub>3</sub> 二個氫質子的立體化學是相反的。

由以上之結果，我們也試著再利用化合物 **10**，並仿照化合物 **2** 的製備流程，試圖合成不同立體化學的化合物 **3** (圖 18)。但是在化合物 **10** 進行 mesylation<sup>15a</sup> 時，反應性非常不好，甚至經過加熱後，也只能得到少量的化合物 **22**，並回收大部分的起始物 **10**。

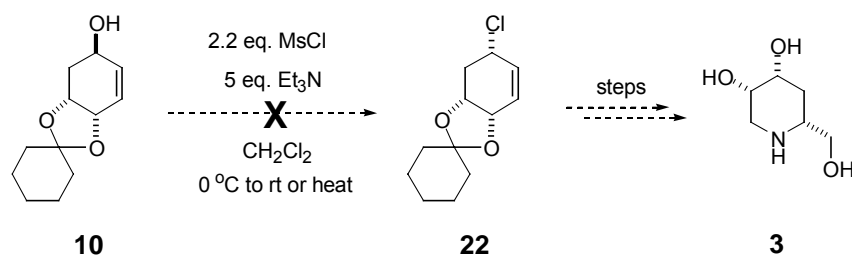


圖 18. 由化合物 **10** 嘗試合成化合物 **3**

結語：過去一年來，經過學生之努力，成果豐碩，已有論文一篇發表在 *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 5751-5754 其他結果將陸續投稿中。

