噻唑烷-4-酮连假三糖的合成及其对 T 淋巴细胞增殖活性研究

陈 华^a 高 芳^a 殷庆梅^a 李春晓^b 李 娜^b
孟 明^b 李小六^{*,a}

(^a 河北大学化学与环境科学学院 保定 071002)

(^b 河北大学医学部 河北省化学生物学重点实验室 保定 071002)

摘要 以双叠氮基糖 **1**、糖醛 **2** 和巯基乙酸为原料, 室温条件下, 利用 Staudinger/aza-Wittig/环合一锅法反应, 合成了新型噻唑烷-4-酮连假三糖衍生物 **3a** 和 **3b**, 并经脱苯甲酰基(Bz)保护基, 分别得到了相应产物 **4a** 和 **4b**. 初步生物活性测试表明, 化合物 **4a** 和 **4b** 能显著促进 T 淋巴细胞增殖, 具有较强的免疫增强活性.

关键词 噻唑烷-4-酮; 假三糖; 免疫增强剂

Synthesis and Proliferative Effects on T Lymphocytes of Novel Thiazolidin-4-one Linked Pseudotrisaccharides

Chen, Hua^a Gao, Fang^a Yin, Qingmei^a Li, Chunxiao^b Li, Na^b
Meng, Ming^b Li, Xiaoliu^{*,a}

(^a Key Laboratory of Chemical Biology of Hebei Province, College of Chemistry and Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002)

(^b Medical School, Hebei University, Baoding 071002)

Abstract Novel thiazolidin-4-one-linked pseudotrisaccharides **3a** and **3b** were synthesized by the one-pot tandem Staudinger/aza-Wittig/cyclization reaction at room temperature starting from a bis-azidosugar, a sugar aldehyde and mercaptoacetic acid. The debenzoylation of **3a** and **3b** afforded the corresponding compounds **4a** and **4b**, respectively. The preliminary biological evaluation of compounds **4a** and **4b** showed that compounds **4a** and **4b** had significant effects on T-cell proliferation, and hold potential as immunostimulating agents.

Keywords thiazolidin-4-one; pseudotrisaccharides; immunostimulating agent

免疫是机体重要的生理保护功能, 许多疾病的发生、发展与机体免疫功能的失调和缺陷密切相关, 因此, 从调节机体的免疫功能着手调整机体自身功能、防治机体疾病已经受到广泛重视^[1]. 化学合成的小分子免疫调节剂因其在治疗自身免疫疾病方面独特的优势, 如良好的化学及酶学稳定性、适应多种剂型和给药途径的需要, 且成本较低、纯度高、在提高效价的同时可降低毒副作用等, 成为新型免疫调节剂的研发热点之一^[2]. 目前, 化学合成小分子免疫调节剂主要为含氮杂环衍生物(如咪唑类、噻唑烷类和噁唑类等)^[3]、核苷

类衍生物^[4]和氮杂糖^[5-7]、糖苷(肽)类似物^[8,9]等(图 1). 然而, 免疫调节的复杂性及靶点不确定性, 致使新型小分子免疫调节剂的设计和发现及其构效关系研究面临很大困难和挑战.

噻唑烷-4-酮环是一类广谱的杂环类药效基团, 其衍生物表现出良好的抗病毒、抗肿瘤和抗菌等活性^[10], 而一些噻唑烷类衍生物, 如 Levamisole^[11], Pidotimod^[12]和 CGP52608^[13](图 1), 报道有较高的免疫增强活性. 最近, 实验室基于糖类分子在免疫识别、免疫系统激活等生理过程中的重要靶向作用^[14], 从提高与细胞的识别

* E-mail: lixl@hbu.cn; Tel.: 0312-5971116.

Received November 29, 2011; revised December 12, 2011; published online January 6, 2012.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 20972039, 21172051), the Natural Science Foundation of Hebei Province (No. B2011201169), the Natural Science Foundations of Education Department of Hebei Province (Nos. 2009309, ZH2011110, Y2011119), and the Program of Science and Technology of Hebei Province (No. 09276418D-13).

国家自然科学基金(Nos. 20972039, 21172051)、河北省自然科学基金(No. B2011201169)、河北省教育厅自然科学基金(Nos. 2009309, ZH2011110, Y2011119)、河北省科学技术研究与发展计划(No. 09276418D-13)资助项目.

图1 部分化学小分子免疫调节剂

Figure 1 Some chemical small molecule immunomodulating agents

能力及亲和性出发, 依据活性基团叠加原理, 设计合成了含噻唑烷-4-酮的类核苷和假双糖衍生物 (C-pseudonucleosides 和 pseudodisaccharides, 图1), 结果表明, 该类化合物能显著促进免疫 T 淋巴细胞的增殖^[15,16]. 因此, 本文在此基础上, 进一步以双叠氮基糖 1、糖醛 2 和巯基乙酸为原料, 利用 Staudinger^[17]/aza-Wittig^[18]/环合^[10]—锅法反应, 设计合成了噻唑烷-4-酮连假三糖衍生物 3a 和 3b, 并经脱保护得到相应产物 4a 和 4b, 如 Scheme 1 所示. 初步探讨了假三糖 4a 和 4b 对 T 淋巴细胞的增殖活性. 原料双叠氮基糖 1 和糖醛 2 的合成路线分别见 Schemes 2 和 3.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

熔点由 SGW[®] X-4 显微熔点仪(温度计未校正)测定; 旋光由 SGW[®] X-1 自动旋光仪测定; 核磁共振谱用 BRUKER AC-P600 (600 MHz)型核磁共振仪测定, TMS 为内标; 高分辨质谱(ESI)用 FTICR-MS (Ionspec 7.0T)型质谱仪测定; 细胞光密度用 BioRad 3550 型酶标仪测定; 层析用硅胶(200~300 目)为青岛海洋化工厂产品, 刀豆蛋白-A (Con A)购于 Sigma 公司. 本文所用其他试

Reagents and conditions: (a) (i) PPh₃, toluene, r.t., 0.5 h; (ii) HSCH₂COOH, r.t., 2 h; (b) CH₃ONa/CH₃OH, dioxane, 2 h

Scheme 1

Reagents and conditions: (a) Ref. [19]; (b) NaBH₄, MeOH/H₂O, 0 °C; (c) TsCl, Pyr, 0 °C; (d) BzCl, Pyr, 0 °C, 10 h; (e) NaN₃, DMF, 100 °C

Scheme 2

Reagents and conditions: (a) Ref. [20]; (d) DMSO, toluene, Pyr, TFA, DCC, r.t.

Scheme 3

剂均为分析纯, 无水试剂均按常规方法处理, 水为二次蒸馏水.

1.2 (2R,3R,4R,5R)-2,5-二叠氮甲基-3,4-二苯甲酰氧基四氢呋喃(1)的合成

1.2.1 (2R,3S,4S,5R)-2,5-二羟甲基-3,4-二羟基四氢呋喃(7)的合成

将 10.5 g (1.5 equiv.) 硼氢化钠(NaBH₄)溶于 50 mL 水中, 冰浴下滴加到化合物(2S,3S,4S,5R)-5-羟甲基-3,4-二羟基四氢呋喃-2-甲醛(6) (30 g) 的 150 mL 甲醇溶液中,

50 min 滴加完毕, 室温搅拌, 4 h 后 TLC 检测反应完全, 加饱和氯化铵溶液淬灭反应, 搅拌至反应体系无气泡生成, 抽滤浓缩. 浓缩液用硅胶柱分离[*V*(甲醇): *V*(乙酸乙酯)=5:1]得 20.2 g 淡黄色糖浆化合物 **7**, 收率 66.3%. [α]_D²⁵ +90.4 (*c* 1.0, MeOH); ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 3.64 (dd, *J*=12.0, 6.0 Hz, 2H), 3.73 (dd, *J*=12.0, 3.6 Hz, 2H), 3.83~3.86 (m, 2H), 3.97~3.98 (m, 2H); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ : 61.9 (2C), 77.4 (2C), 83.7 (2C). HRMS (ESI) calcd for C₆H₁₂O₅Na (M+Na)⁺ 187.0562, found 187.0565.

1.2.2 (2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-2,5-二(对甲苯磺酰氧基)甲基-3,4-二苯甲酰氧基四氢吡喃(**8**)的合成

将 20.2 g 化合物 **7** 用 180 mL 吡啶溶解, 在冰浴下, 分批加入对甲苯磺酰氯(TsCl) 46.9 g (2 equiv.), 0.5 h 后 TLC 检测反应完全. 冰水浴下, 向反应液中缓慢滴加 28 mL 苯甲酰氯(BzCl, 2 equiv., 按前一步完全反应计算), 滴加完毕, 撤去冰浴, 升温至室温搅拌, 1 h 后 TLC 检测反应完全, 用 2 mol/L 盐酸溶液中和至弱酸性, 用乙酸乙酯(200 mL×2)萃取, 分液, 有机相用饱和食盐水(180 mL×3)洗, 无水硫酸镁干燥. 抽滤浓缩, 浓缩液用硅胶柱分离[*V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=3.5:1]得 21 g 黄色糖浆化合物 **8**, 两步总收率 36.2%. [α]_D²⁵ +20.6 (*c* 1.0, EtOAc); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 2.38 (s, 6H), 4.29~4.31 (m, 6H), 5.48 (d, *J*=2.4 Hz, 2H), 7.66 (d, *J*=8.4 Hz, 4H), 7.47 (t, *J*=7.8 Hz, 4H), 7.61 (t, *J*=7.8 Hz, 2H), 7.77 (d, *J*=7.8 Hz, 4H), 8.01 (d, *J*=7.8 Hz, 4H); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃Cl₃) δ : 51.9 (2CH₂), 79.2 (2C), 82.7 (2C), 128.6 (2C), 129.9 (2C), 133.8 (2C), 165.7 (2C=O). HRMS (ESI) calcd for C₃₄H₃₂NO₁₁S₂Na (M+Na)⁺ 703.1263, found 703.1260.

1.2.3 (2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-2,5-二叠氮甲基-3,4-二苯甲酰氧基四氢吡喃(**1**)的合成

将 21.0 g 化合物 **8** 溶解在 50 mL 二甲基甲酰胺(DMF), 分批加入 8.0 g 叠氮化钠(NaN₃, 4 equiv.), 氮气保护下室温反应 2.5 h 后, 加热至 100 °C 至原料反应完全, 减压蒸去 DMF, 浓缩液用硅胶柱分离[*V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=6:1]得 9.1 g 淡黄色糖浆化合物 **1**, 收率 70.1%. [α]_D²⁵ +8.8 (*c* 1.0, EtOAc); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 3.67 (q, *J*=5.4 Hz, 2H), 3.72 (q, *J*=4.2 Hz, 2H), 4.49~4.50 (m, 2H), 5.65 (dd, *J*=3.6, 0.6 Hz, 2H), 7.50 (t, *J*=7.8 Hz, 4H), 7.62 (td, *J*=7.8, 0.6 Hz, 2H), 8.08 (dd, *J*=7.8, 0.6 Hz, 4H); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃Cl₃) δ : 51.9 (2C), 79.2 (2C), 82.6 (2C), 128.6 (2C), 129.8 (2C), 133.7 (2C), 165.7 (2C=O). HRMS (ESI) calcd for C₂₀H₁₈N₆O₅Na (M+Na)⁺ 445.1216, found 445.1218.

1.3 (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-6-甲氧基-3,4,5-三苯甲酰氧基四氢-2*H*-吡喃-2-甲醛(**2**)的合成

将 35.6 g (2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-2-羟甲基-6-甲氧基-3,4,5-三苯甲酰氧基四氢-2*H*-吡喃(**10**)溶解在 28 mL 二甲基亚砜(DMSO)中, 室温下, 加入 40 mL 甲苯, 5 mL 吡啶, 3 mL 三氟乙酸, 33.2 g 二环己基碳二亚胺(DCC), 反应结束后, 向溶液中加入石油醚析出固体二环己基脲(DCU), 多次抽滤, 加水稀释, 用乙酸乙酯萃取, 无水硫酸镁干燥, 抽滤, 浓缩得黄色溶液, 经硅胶柱色谱分离[*V*(石油醚): *V*(乙酸乙酯)=3:1], 得 26.8 g 白色固体化合物 **2**, 收率 76.2%. m.p. 83~84 °C; [α]_D²⁵ +75.4 (*c* 1.0, EtOAc); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 3.50 (s, 3H), 4.41 (dd, *J*=10.2, 1.8 Hz, 1H), 5.31 (dd, *J*=10.2, 4.2 Hz, 1H), 5.35 (d, *J*=4.2 Hz, 1H), 5.64 (t, *J*=9.6 Hz, 1H), 6.22 (t, *J*=9.6 Hz, 1H), 7.29 (t, *J*=7.8 Hz, 2H), 7.36~7.43 (m, 6H), 7.51 (t, *J*=7.8 Hz, 2H), 7.88 (d, *J*=7.2 Hz, 2H), 7.95 (d, *J*=7.2 Hz, 2H), 7.99 (d, *J*=7.2 Hz, 2H), 9.72 (d, *J*=1.8 Hz, 1H, CHO); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃Cl₃) δ : 56.2, 68.7, 69.7, 71.6, 72.8, 97.4, 128.3, 128.4, 128.4, 129.7, 129.9, 133.2, 133.5, 133.5, 165.4, 165.7, 195.5 (CHO). HRMS (ESI) calcd for C₂₈H₂₄O₉Na (M+Na)⁺, 527.1298, found 527.1300.

1.4 (S,S)-3,3'-{[(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-二苯甲酰氧基四氢吡喃-2,5-二基]二(亚甲基)}二{2-[(3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-6-甲氧基-3,4,5-三苯甲酰氧基四氢-2*H*-吡喃-2-基]噻唑烷-4-酮}(**3**)的合成

将 1.0 g 化合物 **1** 溶解在 15 mL 干燥的甲苯中, 搅拌下加入 1.4 g (2.2 equiv.)三苯基膦, 氮气保护, 室温搅拌 0.5 h 后, TLC 监测原料 **1** 消失, 然后加入 2.4 g (2 equiv.)化合物 **2**. 室温搅拌 0.5 h 后, 再加入巯基乙酸 0.65 mL (4 equiv.), 继续室温搅拌 2 h 后, TLC 监测反应完全. 加入适量(15 mL)乙酸乙酯, 用饱和碳酸钾溶液中和, 无水硫酸镁干燥, 抽滤浓缩. 浓缩液用硅胶柱多次分离[*V*(环己烷): *V*(乙酸乙酯)=3:1], 最终得到两种纯净异构体产物 **3a** 和 **3b**.

(*R,R,S,S*)-3,3'-{[(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-二苯甲酰氧基四氢吡喃-2,5-二基]二(亚甲基)}二{2-[(3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-6-甲氧基-3,4,5-三苯甲酰氧基四氢-2*H*-吡喃-2-基]噻唑烷-4-酮}(**3a**): 无色油状物, 收率 4.4%. [α]_D²⁵ +20.4 (*c* 1.0, EtOAc); ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 3.18 (d, *J*=15.6 Hz, 2H), 3.34 (s, 6H), 3.44 (d, *J*=15.0 Hz, 2H), 3.71 (d, *J*=15.6 Hz, 2H), 3.95 (dd, *J*=14.4, 4.2 Hz, 2H), 4.15~4.29 (m, 2H), 4.45 (dd, *J*=10.2, 2.4 Hz, 2H), 5.14 (dd, *J*=13.2, 3.6 Hz, 4H), 5.24 (brs, 2H), 5.30 (d, *J*=3.6 Hz, 2H), 5.85 (t, *J*=9.6 Hz, 2H), 6.04 (t, *J*=9.6 Hz, 2H), 7.22~

7.29 (m, 10H), 7.36~7.43 (m, 10H), 7.51~7.54 (m, 4H), 7.79 (d, $J=7.2$ Hz, 4H), 7.83 (d, $J=7.2$ Hz, 4H), 7.96 (d, $J=7.2$ Hz, 4H), 8.09 (d, $J=7.2$ Hz, 4H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3Cl_3) δ : 31.6, 45.4, 55.9, 62.1, 70.5, 71.6, 79.0, 81.8, 97.1, 128.5~133.7 (Ph-C), 165.3, 165.4, 165.7 (2C), 171.8 (2C). HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{80}\text{H}_{70}\text{N}_2\text{O}_{23}\text{S}_2\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^{+}$ 1513.3690, found 1513.3692.

(*R,S,S,S*)-3,3'-{[(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-二苯甲酰氧基四氢呋喃-2,5-二基]二(亚甲基)}二{2-[(3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-6-甲氧基-3,4,5-三苯甲酰氧基四氢-2*H*-吡喃-2-基]噻唑烷-4-酮}(3b): 无色油状物, 收率 18.3%. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 35.4$ (c 1.0, EtOAc); ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 3.18~3.26 (m, 2H), 3.32 (s, 3H), 3.50 (s, 3H), 3.38 (d, $J=4.8$ Hz, 1H), 3.40 (d, $J=4.8$ Hz, 1H), 3.70 (d, $J=4.8$ Hz, 1H), 3.72 (d, $J=4.8$ Hz, 1H), 3.79~3.82 (m, 1H), 3.97 (dd, $J=13.8$, 4.2 Hz, 2H), 4.20~4.23 (m, 1H), 4.29 (q, $J=7.2$ Hz, 1H), 3.40 (d, $J=10.2$ Hz, 1H), 4.45 (dd, $J=10.2$, 3.0 Hz, 1H), 4.66 (s, 1H), 5.06 (t, $J=3.0$ Hz, 1H), 5.14~5.15 (m, 3H), 5.19 (t, $J=2.4$ Hz, 1H), 5.22 (dd, $J=10.2$, 2.4 Hz, 1H), 5.30 (q, $J=3.0$, 3.0 Hz, 1H), 5.59 (t, $J=3.0$ Hz, 1H), 5.93 (t, $J=9.0$ Hz, 1H), 6.01~6.03 (m, 1H), 6.12 (t, $J=10.2$ Hz, 1H), 7.04~7.10 (m, 3H), 7.17~7.22 (m, 7H), 7.29~7.50 (m, 14H), 7.46~7.56 (m, 2H), 7.71~7.80 (m, 6H), 7.88~7.94 (m, 8H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3Cl_3) δ : 31.6, 42.1, 44.7, 56.0, 56.0, 61.1, 61.8, 68.0, 68.7, 68.9, 70.0, 70.4, 70.6, 71.7, 79.0, 80.3, 80.6, 81.1, 81.6, 97.1, 97.1, 128.2, 128.3, 128.4, 128.5, 128.5, 128.6, 129.6, 129.7, 129.8, 129.9, 130.0, 130.1, 133.1, 133.2, 133.3, 133.4, 133.6, 165.3, 165.4, 165.7, 165.8, 166.1, 171.9, 173.0. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{80}\text{H}_{70}\text{N}_2\text{O}_{23}\text{S}_2\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^{+}$ 1513.3690, found 1513.3686.

1.5 (*S,S*)-3,3'-{[(2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-3,4-二羟基四氢呋喃-2,5-二基]二(亚甲基)}二{2-[(3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-3,4,5-三羟基-6-甲氧基四氢-2*H*-吡喃-2-基]噻唑烷-4-酮}(4)的合成

将 40.0 mg 化合物 3a 搅拌溶解到 1 mL 无水甲醇和 3 mL 二氧六环的混合溶液中, 然后加入 14.7 mg (2 equiv.) 的甲醇钠, 室温搅拌 2 h, TLC 监测原料反应完全, 加入阳离子树脂室温搅拌 15 min, 中和至中性, 过滤浓缩, 浓缩液用硅胶柱多次分离 [V (乙酸乙酯): V (甲醇)=10:1] 得 12.0 mg 无色油状物(*R,R,S,S*)-3,3'-{[(2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-3,4-二羟基四氢呋喃-2,5-二基]二(亚甲基)}二{2-[(3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-3,4,5-三羟基-6-甲氧基四氢-2*H*-吡喃-2-基]噻唑烷-4-酮}(4a), 产率 67.8%. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 9.4$ (c 1.0, MeOH); ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 3.34 (d, $J=3.6$

Hz, 2H), 3.39 (dd, $J=9.0$, 3.6 Hz, 2H), 3.47 (s, 6H), 3.52 (t, $J=9.6$ Hz, 2H), 3.58 (t, $J=9.6$ Hz, 2H), 3.78~3.82 (m, 4H), 3.85 (dd, $J=9.6$, 1.2 Hz, 2H), 4.02 (dd, $J=14.4$, 2.4 Hz, 4H), 4.71 (d, $J=4.2$ Hz, 2H), 5.41 (brs, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 19.5, 32.3, 54.5, 60.2, 63.5, 71.1, 72.0, 72.9, 74.1, 79.8, 82.3, 100.0, 171.7, 173.8. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_{15}\text{S}_2\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^{+}$ 681.1591, found 681.1584.

同上方法制得白色固体化合物(*R,S,S,S*)-3,3'-{[(2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-3,4-二羟基四氢呋喃-2,5-二基]二(亚甲基)}二{2-[(3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-3,4,5-三羟基-6-甲氧基四氢-2*H*-吡喃-2-基]噻唑烷-4-酮}(4b), 产率 70.2%. m.p. 171.8~173.1 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 19.8$ (c 1.0, MeOH); ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 3.21 (q, $J=7.2$ Hz, 1H), 3.32 (s, 3H), 3.35 (q, $J=4.2$ Hz, 2H), 3.37 (brs, 1H), 3.41 (q, $J=4.2$ Hz, 2H), 3.45 (s, 3H), 3.47 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 3.56~3.59 (m, 2H), 3.61~3.66 (m, 2H), 3.73 (dd, $J=15.0$, 1.2 Hz, 1H), 3.80 (dd, $J=6.0$, 5.4 Hz, 1H), 3.89 (t, $J=5.4$ Hz, 1H), 3.91 (dd, $J=9.0$, 1.8 Hz, 1H), 3.94~3.99 (m, 2H), 4.04 (t, $J=3.0$ Hz, 1H), 4.06~4.07 (m, 2H), 4.68~4.81 (m, 2H), 5.24 (s, 1H), 5.33 (s, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ : 32.0, 32.2, 42.9, 46.4, 47.6, 54.5, 54.6, 62.4, 63.4, 69.7, 71.1, 71.2, 71.7, 71.9, 72.0, 73.6, 74.0, 78.7, 79.8, 80.3, 82.2, 100.0, 100.1, 173.6, 174.1. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_{15}\text{S}_2\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^{+}$ 681.1591, found 681.1590.

1.6 化合物 4 对小鼠 T 淋巴细胞增殖的影响

1.6.1 小鼠脾淋巴细胞悬液的制备

颈椎脱臼处死 BALB/C 小鼠, 用碘伏浸泡 5 min, 再用 75% 乙醇浸泡小鼠 3 min, 沿腹腔中线剪开小鼠腹腔, 取出脾脏置于培养皿中, 剪去脂肪和筋膜组织, 用 RPMI-1640 培养液漂洗^[15]. 置组织于研磨器中^[15]加入适量磷酸盐缓冲液(PBS 液)研磨, 制成脾细胞悬液, 过 200 目筛网, 将得到的细胞悬液置于离心管中 1500 r/min 离心 15 min. 弃上层清液, 加入 Tris- NH_4Cl 溶液 9 倍体积 0.83 g/100 mL 的氯化铵(NH_4Cl)溶液与 1 倍体积 2.06 g/100 mL 的 Tris-HCl 溶液(pH 7.65)混合, 用 NH_4Cl 调节 pH 值至 7.2)裂解红细胞, 室温静置 5 min, 以除去红细胞, 见离心后所得为白色沉淀上方只有一层红色膜为最佳状态, 用 RPMI-1640 培养液 1000 r/min 离心 10 min 洗涤细胞 3 次, 以除去剩余的氯化铵. 将上述收集到的脾细胞置于培养瓶中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱培养 2 h, 以除去贴壁细胞, 收集未贴壁的细胞悬液即为脾淋巴细胞. 台盼蓝染色计数, 接种培养, 活细胞数大于 95%, 备用.

1.6.2 化合物 4 对小鼠 T 淋巴细胞增殖的影响

取上述方法制备的小鼠脾淋巴细胞悬液, 调整细胞浓度为 5×10^6 个/mL, 检测化合物 4 对刀豆蛋白-A (Con A) 诱导小鼠 T 淋巴细胞的增殖作用. 化合物 4 + Con A 组: 96 孔细胞培养板中加入 90 μ L/孔脾淋巴细胞悬液, 再每孔加入含 Con A 的 RPMI-1640 培养液(Con A 质量浓度为 20 μ g/mL), 最后加化合物 4 使其最终质量浓度分别为 5, 10, 25, 50, 100 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$; 每一质量浓度 4 个复孔, 并设未加样品化合物脾细胞和只加 Con A 的脾细胞组为对照, 所有的试验均至少重复 3 次, 置于 37 $^{\circ}$ C, 含 5%的 CO₂ 条件下分别培养 72 h 后每孔加四甲基唑蓝(MTT) 10 μ L (5 g/L)继续孵育 4 h, 弃去上清, 然后每孔加入 100 μ L DMSO 溶解 MTT 甲簪沉淀, 用微型振荡器振荡混匀, 变色后用酶联免疫检测仪分别测定 570 nm 波长处的吸光度 $A_{570\text{ nm}}$. 增殖率计算(%) = $(A_{\text{给药组}} - A_{\text{对照组}}) / A_{\text{对照组}} \times 100\%$.

2 结果与讨论

2.1 原料五元双叠氮基糖 1 和六元糖醛 2 的合成

五元双叠氮基糖原料 1 的合成参照 Scheme 2 进行. 以市售 D-氨基葡萄糖盐酸盐(5)为原料, 按文献[19]方法一步制得五元糖醛 6. 由于化合物 6 在醇中溶解性较好, 因此选择硼氢化钠为还原剂, 还原醛基为羟基, 进一步对伯醇羟基对甲苯磺酰(Ts)化, 仲醇苯甲酰基(Bz)保护, 再经伯醇羟基叠氮化, 得到五元双叠氮基糖原料 1. 六元糖醛 2 的合成参照 Scheme 3 进行. 以 α -D-葡萄糖甲基糖苷(9)为原料, 按文献方法(硅烷基保护伯醇)[20]制得 Bz 保护的六元糖醇 10. 再以 DMSO 与 DCC 为氧化试剂, 利用 Pfitzner-Moffatt 氧化反应[21]将 C-6 位伯醇氧化为醛, 得到六元糖醛原料 2.

2.2 噻唑烷酮连假三糖衍生物的制备

噻唑烷-4-酮衍生物的合成通常由醛、胺和巯基乙酸制备[22,23], 而以糖醛与糖胺进行此反应时, 几乎不反应. 考虑到糖胺由叠氮基糖还原得到, 因此, 以双叠氮基糖 1、糖醛 2 和巯基乙酸为原料, 利用 Staudinger/aza-Wittig/环合一锅法反应, 可以有效合成噻唑烷-4-酮连假三糖衍生物, 其反应机理是糖基叠氮首先和三苯基膦(PPh₃)生成氮膦中间体, 继而与糖醛反应原位生成亚胺, 亚胺再和巯基乙酸成环脱水得到目标产物. 在实验室已有基础上[16], 选用甲苯为溶剂, 室温搅拌, 双叠氮基糖 1、糖醛 2 和巯基乙酸的物质的量比为 1 : 2 : 4, PPh₃ 的用量为 2.2 equiv., 合成了化合物 3 (总收率 40.0%, Scheme 1). 由于双叠氮基糖 1 具有 S₂ 交替对称轴(alternating axis of symmetry), 理论上, 该反应应产生 3 个非对映异构体(新产生的手性中心为噻唑烷酮环上的手性碳), 分别为

(S,S), (R,R)和(S,R)构型. 但是由于各异构体之间极性相差不大, 且与反应副产物三苯氧膦的极性相当, 经过多次硅胶柱层析分离, 最终得到两个纯净异构体 3a(收率 4.4%)和 3b(收率 18.3%), 以及三种异构体混合物(收率 11.7%). 化合物 3a 和 3b 不溶于甲醇, 因此以甲醇和二氧六环(V : V = 1 : 3)为混合溶剂, 在甲醇钠条件下脱除苯甲酰基保护基, 分别以 67.8%和 70.2%的收率制备了噻唑烷酮连假三糖 4a 和 4b.

2.3 噻唑烷酮连假三糖衍生物的结构分析

所有新化合物的结构通过 ¹H NMR, ¹³C NMR, ¹H-¹H COSY 和高分辨质谱(HRESIMS)确定. 由于双叠氮基糖 1 具有 S₂ 交替对称轴, 因此原料 1 及其相应的对称中间体 7 和 8, 在 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱图中均表现出对称的峰信号(即只有一半的氢和碳信号峰), 但高分辨质谱显示其完整分子量. 观察噻唑烷酮连假三糖衍生物 3a 及其脱保护产物 4a 的 NMR 谱图也具有类似的对称谱学特征, 因此, 可以确定化合物 3a 和 4a 中的两个噻唑烷酮的相对构型一致, 即同为(S,S)或(R,R)构型, 以保证分子的对称性. 而相应异构体 3b 和 4b 表现出所有的氢和碳 NMR 信号峰, 推断其绝对构型为(S,R). 进一步, 参照之前报道的方法[16], 对(S,S)和(R,R)构型的化合物的最小能量化的 Chem3D Pro 8.0 (ChemOffice[®] 2003, CambridgeSoft[®] Corporation)模拟(图 2), 结果提示(S,S)构型中, 噻唑烷酮环上的手性碳上的 2-H 和糖醛的异头碳上的 1'-H 二面角接近 180 $^{\circ}$, 而(R,R)构型中两个氢的二面角接近 60 $^{\circ}$. 依据 Karplus 方程推断, 前者两个氢将有较大的偶合常数, 后者的偶合常数较小. 化合物 4a 的 ¹H-¹H COSY 表明 2-H 为化学位移 δ 5.41 处的单峰(可认为偶合常数为 0 Hz), 因此, 结合 Chem3D 模拟结果, 初步推断化合物 3a 和 4a 的绝对构型应该为(R,R).

图 2 化合物 3 (S,S)和(R,R)构型的最小能量化计算的结构
Figure 2 The proposed structure with calculated minimum energies for (S,S) and (R,R) of 3
Fragment structure by Chem3D Pro 8.0

2.4 化合物 4 对小鼠 T 淋巴细胞增殖的影响

以未处理的脾细胞为空白对照, 以刀豆蛋白-A (Con A, 浓度为 20 μ g/mL)诱导的脾细胞为阳性对照, 测试了化合物 4 (5, 10, 25, 50, 100 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$)对小鼠 T 淋

巴细胞增殖的影响. 设 Con A 诱导的脾细胞相对增殖率为 100% (实际增值率为 42%, $p < 0.001$), 测试结果如图 3 所示. 结果表明, 在与 Con A 的共同作用下, 化合物 **4a** 和 **4b** 在所测浓度下均能有效促进 T 淋巴细胞的增殖. 其中, 化合物 **4a** 在五种浓度下, 与 ConA 处理的对照组相比, 对小鼠 T 淋巴细胞的增殖率分别为: 95%, 82%, 84%, 129%, 96%, 不呈现浓度依赖关系, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 达到增殖率最大值. 而化合物 **4b** 在五种浓度下, 对小鼠 T 淋巴细胞的增殖率分别为: 154%, 134%, 114%, 59%, 34%, 增殖率随浓度的增加而降低, 呈现明显的浓度依赖关系, $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到增殖率最大值. 此外, 在没有 Con A 诱导时, 化合物 **4a** 和 **4b** 均没有表现出对 T 淋巴细胞的增殖效应(结果未列出). 因此, 化合物 **4** 毒性小且对 Con A 诱导的 T 淋巴细胞有协同增殖作用. 以上分析结果初步表明: (1)双噻唑烷酮连假三糖 **4a** 和 **4b** 对 T 细胞有良好的增殖活性, 是一类潜在的免疫增强佐剂; (2)与噻唑烷酮连假双糖活性($20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 增殖率 70% 左右)^[16]比较, 假三糖 **4a** 和 **4b** 对 T 细胞增殖活性更为显著, 表明增加识别结合位点, 可提高此类化合物的免疫调节活性; (3)不同立体构型的化合物 **4a** 和 **4b** 对 T 细胞增殖活性影响不大, 但合适浓度的选择对进一步的免疫活性测试是必要的. 进一步的合成及活性研究正在进行.

图 3 化合物 **4a** 和 **4b** 对 Con A 诱导的小鼠 T 淋巴细胞的增殖影响

Figure 3 The effects of compounds **4a** and **4b** on Con A-induced splenocyte proliferation

Data are means $\pm$ SEM of at least three independent experiments. # $p < 0.001$ with respect to the untreated cells; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ with respect to the Con A-treated cells

References

- [1] Stockinger, B. *Nature* **2009**, 458, 44.
- [2] Werner, G. H.; Jollès, P. *Eur. J. Biochem.* **1996**, 242, 1.
- [3] Failli, A.; Caggiano, T. J. *Curr. Opin. Ther. Pat.* **1992**, 2, 882.
- [4] Lee, J.; Chuang, T. H.; Redeck, V.; She, L.; Pitha, P. M.; Carson, D. A.; Raz, E.; Cottam, H. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**,

- 100, 6646.
- [5] Vyavahare, V. P.; Chakraborty, C.; Maity, B.; Chattopadhyay, S.; Puranik, V. G.; Dhavale, D. D. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 5519.
- [6] Zhang, X. L.; Liu, M.; Xie, P.; Wan, S. H.; Ye, J. T.; Zhou, X.; Wu, J. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 3789.
- [7] Ye, X. S.; Sun, F.; Liu, M.; Li, Q.; Wang, Y. H.; Zhang, G. S.; Zhang, L. H.; Zhang, X. L. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 3688.
- [8] Costantino, V.; D'Esposito, M.; Fattorusso, E.; Mangooni, A.; Basilico, N.; Parapini, S.; Taramelli, D. *J. Med. Chem.* **2005**, 48(23), 7411.
- [9] Yang, G. L.; Schmieg, J.; Tsuji, M.; Franck, R. W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, 3818.
- [10] Verma, A.; Saraf, S. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, 43, 897.
- [11] Fabrizi, F.; Dixit, V.; Messa, P. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2010**, 32, 756.
- [12] Du, X. F.; Jiang, C. Z.; Wu, C. F.; Won, E. K.; Choung, S. Y. *Arch. Pharm. Res.* **2008**, 31, 1153.
- [13] Herrera, F.; Mayo, J. C.; Martin, V.; Sainz, R. M.; Antolin, I.; Rodriguez, G. *Cancer Lett.* **2004**, 211, 47.
- [14] Lucas, A. H.; Rittenhouse-Olson, K.; Kronenberg, M.; Apicella, M. A.; Wang, D.; Schreiber, J. R.; Taylor, C. E. *Vaccine* **2010**, 28(4), 1121.
- [15] Chen, H.; Yin, Q. M.; Li, C. X.; Wang, E. K.; Gao, F.; Zhang, X. B.; Yin, Z.; Wei, S. N.; Li, X. L.; Meng, M.; Zhang, P. Z.; Li, N.; Zhang, J. C. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, 2, 845.
- [16] Li, X. L.; Yin, Q. M.; Jiao, L. L.; Qin, Z. B.; Feng, J. N.; Chen, H.; Zhang, J. C.; Meng, M. *Carbohydr. Res.* **2011**, 346, 401.
- [17] Kürti, L.; Czako, B. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*, Science Publication, Beijing, **2007**, pp. 428~429 (in Chinese).
(Kürti, L.; Czako, B. 有机合成中命名反应的战略性应用(导读版), 导读专家: 陈耀全, 吴毓林, 科学出版社, 北京, **2007**, pp. 428~429.)
- [18] Kürti, L.; Czako, B. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*, Science Publication, Beijing, **2007**, pp. 24~25 (in Chinese).
(Kürti, L.; Czako, B. 有机合成中命名反应的战略性应用(导读版), 导读专家: 陈耀全, 吴毓林, 科学出版社, 北京, **2007**, pp. 24~25.)
- [19] Abdel-Rahman, A. A. H.; El Ashry, S. H.; Schmidt, R. R. *Carbohydr. Res.* **1999**, 315, 106.
- [20] Zhen, X.-L.; Li X.-L.; Lu, X. J. *Hebei Univ. (Nat. Sci. Ed.)* **2009**, 2, 164 (in Chinese).
(甄晓丽, 李小六, 鹿欣, 河北大学学报(自然科学版), **2009**, 2, 164.)
- [21] Kürti, L.; Czako, B. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*, Science Publication, Beijing, **2007**, pp. 346~347 (in Chinese).
(Kürti, L.; Czako, B. 有机合成中命名反应的战略性应用(导读版), 导读专家: 陈耀全, 吴毓林, 科学出版社, 北京, **2007**, pp. 346~347.)
- [22] Chen, H.; Bai, J.; Zhao, L.; Yuan, X.-G.; Li, X.-L.; Cao, K.-Q. *Chin. J. Org. Chem.* **2008**, 28(6), 1092 (in Chinese).
(陈华, 白洁, 赵莲, 苑香果, 李小六, 曹克强, 有机化学, **2008**, 28(6), 1092.)
- [23] Chen, H.; Bai, J.; Zhao, L.; Yuan, X.-G.; Li, X.-L.; Cao, K.-Q. *Chin. J. Org. Chem.* **2009**, 29(1), 94 (in Chinese).
(陈华, 白洁, 赵莲, 苑香果, 李小六, 曹克强, 有机化学, **2009**, 29(1), 94.)

(Li, L.; Fan, Y.)