



肝素三糖和四糖衍生物的高立体选择性合成

代元伟^{1,2}, 刘威³, 徐鹏^{1*}, 俞飏^{1*}

1. 中国科学院上海有机化学研究所, 生命有机化学国家重点实验室, 上海 200032

2. 重庆大学药学院, 天然产物全合成与创新药物研究重庆市重点实验室, 重庆 401331

3. 上海科技大学物质科学与技术学院, 上海 201210

*通讯作者, E-mail: peterxu@sioc.ac.cn; byu@sioc.ac.cn

收稿日期: 2022-09-02; 接受日期: 2022-10-08; 网络版发表日期: 2023-02-24

国家自然科学基金(编号: 22177125)、国家重点研发计划(编号: 2018YFA0507602)和中科院青年创新促进会(编号: 2020258)资助项目

摘要 肝素是一种高度硫酸化的天然黏多糖类物质, 可以介导各种生理和病理过程, 临床上主要用于预防和治疗静脉血栓症。本文报道了一条利用正交保护基策略, 高立体选择性合成肝素寡糖的路线, 获得7个氨基葡萄糖基6-O-硫酸化修饰程度不同的肝素三糖和四糖衍生物(28~34)。该路线采用叔丁基二苯基硅基(TBDPS)作为叠氮葡萄糖砌块伯羟基的保护基, 利用N-苄基三氟乙酰亚胺酯给体, 实现了关键的GlcN-(1→4)-GlcA糖苷键的高 α 选择性的构建; 利用[1 + 2]和[2 + 2]糖苷化策略, 合成了4个全保护的肝素三糖和四糖前体; 采用优化的保护基脱除和硫酸化操作, 高效便捷地获得目标肝素三糖和四糖。这一系列肝素寡糖衍生物在还原端带有氨基为端基的连接臂, 为制备肝素类寡糖芯片, 系统性研究肝素寡糖与蛋白, 如乙酰肝素酶的相互作用打下了基础。

关键词 肝素寡糖, 叔丁基二苯基硅基, N-苄基三氟乙酰亚胺酯给体, α 选择性糖苷化

1 引言

肝素(Heparin)和硫酸肝素(Heparan sulfate)是高度硫酸化的糖胺聚糖, 由1→4连接的糖醛酸(α -L-艾杜糖醛酸或者 β -D-葡萄糖醛酸)与己糖胺(α -D-氨基葡萄糖)交替连接而成, 分子量分布在5000~30000之间。早期, 肝素主要用于血栓性疾病的预防和治疗, 是临床常见的抗凝血药物^[1]。近期, van Haren课题组^[2]发现药物肝素能有效改善新冠患者的症状; 李丹和刘聪课题组^[3]合作发现肝素能够高效诱导 α -突触核蛋白(α -syn)形成全新构象的聚集纤维复合物(hep- α -syn), 减弱其在神经元上的病理毒性, 揭示了肝素在调控病理性淀粉样

纤维的构象和病理性毒性中的重要作用。

近20年来, 糖芯片技术(glycan microarrays)发展迅速, 已成为研究聚糖与蛋白相互作用的有效工具, 用于鉴定聚糖识别蛋白、糖蛋白结合特异性和筛选药物作用靶标等^[4]。该技术的关键是将结构多样的聚糖分子通过共价或者非共价方法固定于经化学修饰的载玻片表面^[5]。乙酰肝素酶(Heparanase, HPSE)是目前发现的哺乳动物细胞中唯一能切割细胞外基质中硫酸肝素的内源性糖苷酶, 水解位点位于葡萄糖醛酸与己糖胺之间的 β -糖苷键。因其可促进肿瘤细胞的浸润、转移和微血管形成, 被视为抗肿瘤和抗炎症的潜在靶点^[6]。2021年, Agelidis等^[7]发现, 乙酰肝素酶在机体抗病毒

引用格式: Dai Y, Liu W, Xu P, Yu B. Highly stereoselective synthesis of heparin tri- and tetra-saccharide derivatives. *Sci Sin Chim*, 2022, 53: 529–536, doi: 10.1360/SSC-2022-0177

免疫力、增殖信号和细胞死亡之间也可能扮演角色。2002年, Okada和Yamada等^[8]采用酸解长链肝素分离得到结构确定的肝素寡糖片段, 较系统地研究了人乙酰肝素酶所能识别的肝素寡糖底物。其中识别较好的底物有四糖**Tetra-1** (图1)和相关六糖, 其中的共同特点是具有-GlcN(NS,6S)-GlcUA-GlcN(NS,6S)-三糖片段。由于肝素化学结构的复杂性和不均一性, 从天然肝素降解得到结构单一的寡糖片段非常困难。我们希望通过化学合成来制备结构精确、含有不同硫酸化修饰程度的寡糖; 为借助糖芯片技术, 系统性地研究结构确定的肝素寡糖与乙酰肝素酶的相互作用, 为乙酰肝素酶抑制剂的研究和筛选提供方案。

为了更好地模拟天然肝素分子, 方便中间体和目标产物的合成, 我们将四糖**Tetra-1**片段非还原端的不饱和葡萄糖醛酸设定成葡萄糖醛酸; 并在四糖片段还原端连接二甘醇胺结构的连接臂以用于芯片制备(图1)。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

比旋光由Perkin-Elmer 241MC型自动旋光仪(美国)测定; 核磁共振由MERCURY300, Bruker AV-400或Bruker AV-500型核磁共振仪(德国)测定, 以四甲基硅烷(TMS)作为内标(0 ppm), 裂分模式标识为: 单峰(s)、两重峰(d)、三重峰(t)、四重峰(q)和宽峰(brs)。残余溶剂峰CHCl₃ (核磁共振氢谱, ¹H NMR δ = 7.26 ppm; 核磁共振碳谱, ¹³C NMR δ = 77.16 ppm);

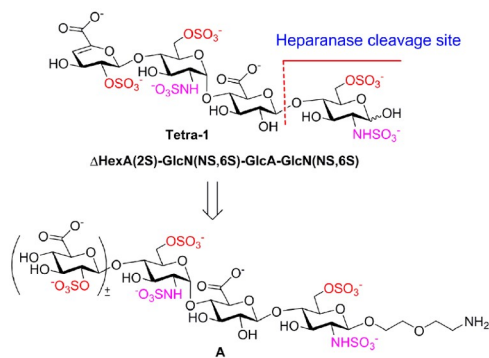


图1 乙酰肝素酶识别的底物四糖**Tetra-1**和目标寡糖衍生物**A**的化学结构(网络版彩图)

Figure 1 Structure of **Tetra-1** and the targeted oligosaccharides **A** relevant to the substrates of heparanase (color online).

CD₃OD (¹H NMR δ = 3.30 ppm; ¹³C NMR δ = 49.00 ppm); 或D₂O (¹H NMR δ = 4.67 ppm)。核磁共振信号归属和耦合常数是依据氢谱、¹H-¹H COSY和¹H-¹³C HSQC相关谱实验确定。低分辨质谱由HP-5989A型质谱仪测定; 高分辨质谱由APEXIII 7.0 TESLA FTMS (ESI)或者IonSpec 4.7 Tesla FTMS (MALDI)型仪器测定。薄层色谱(TLC)在预制的0.5 mm厚HF254硅胶板上进行。糖类化合物采用硫酸-乙醇溶液显色。制备薄层析色谱采用预制的0.5 mm HSGF硅胶板(20 × 20), 柱层析的硅胶为H型10-40 μ 。除特别说明外, 所有的反应均在氮气或者氩气保护下采用无水溶剂进行。糖苷化反应都在采用真空条件火焰灼烧活化的4或5 Å分子筛存在下进行。所有反应溶剂均采用溶剂处理装置纯化后直接用于反应。四氢呋喃、乙醚加入钠丝, 二苯甲酮回流至蓝色, 氮气保护下蒸出; 二氯甲烷、甲苯加钙氢回流, 氮气保护下蒸出; *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、吡啶、甲醇用活化的分子筛干燥后直接使用; 乙醇加镁条回流干燥处理。其他溶剂和试剂除特殊说明外按标准方法进行纯化和处理。详细纯化步骤参考文献^[9]。

2.2 实验方法

标准操作A. 6位酰基保护的*N*-苯基三氟乙酰亚胺酯给体的[2 + 2]糖苷化通用方法: 将给体(1.2 equiv.)和受体(1.0 equiv.)混合, 甲苯带水三次, 油泵抽干, 溶于干燥的甲苯(0.2 mol/L)中, 加入4 Å MS (加入质量为给体和受体质量之和), 氩气保护下室温先搅拌30 min, 冷至-30℃, 加入促进剂TMSOTf (0.1 equiv.)。TLC检测反应基本完全后, 三乙胺淬灭反应, 加硅藻土过滤, 旋干, 快速柱层析纯化。

标准操作B. 6位叔丁基二苯基硅基(TBDPS)保护的*N*-苯基三氟乙酰亚胺酯给体的[2 + 2]糖苷化通用方法: 将给体(1.2 equiv.)和受体(1.0 equiv.)混合, 甲苯带水三次, 油泵抽干, 溶于干燥的甲苯(0.1 mmol)中, 加入5 Å MS (加入质量为给体和受体质量之和), 氩气保护下室温先搅拌30 min, 冷至-30℃, 加入促进剂三氟甲磺酸叔丁基二甲基硅酯(TBSOTf, 0.2 equiv.)。TLC检测反应基本完全后, 三乙胺淬灭反应, 加硅藻土过滤, 旋干, 柱层析纯化(甲苯(Tol):乙酸乙酯(EtOAc) = 20:1)。

标准操作C. 脱除TBDPS和Lev保护基: 将肝素寡糖溶于吡啶/醋酸(3:2, 0.2 mol/L), 慢慢加入水合肼

(5 equiv. 每个Lev基团). 在室温搅拌6 h, TLC显示Lev保护基全部脱除, 加入丙酮淬灭反应, 乙酸乙酯稀释, 1 mol/L盐酸洗涤, 饱和碳酸氢钠水溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干, 快速柱层析(Tol:EtOAc = 2:1), 得到目标产物. 将肝素寡糖溶于干燥的吡啶(0.2 mol/L), 慢慢加入氟化氢·吡啶络合物(HF·Py, 20 equiv. per TBDPS), 在室温搅拌36 h, TLC显示TBDPS保护基全部脱除, 加入乙酸乙酯稀释, 1 mol/L盐酸洗涤, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干, 快速柱层析(石油醚(PE):EtOAc = 1.5:1), 得到目标产物.

标准操作D. *O*-硫酸化: 将*O*-硫酸化前体溶于DMF (0.1 mol/L)中, 加入三氧化硫·吡啶络合物(SO₃·Py, 5 equiv. 每个OH基团), 室温下反应4 h. TLC (RP-18反相板, MeOH/H₂O淋洗体系)监测反应完全后, 加入甲醇淬灭反应, 后加入Et₃N调节体系至弱碱性, 减压浓缩. 之后采用Sephadex LH-20 (二氯甲烷(DCM):甲醇(MeOH) = 1:1)提纯; 或者RP-18反相柱提纯(MeOH/H₂O淋洗体系), 梯度淋洗分离得到*O*-硫酸化产物. 最后, 通过Dewex50WX4 Na⁺柱将其交换成更加稳定的钠型.

标准操作E. 水解甲酯和苯甲酰基: 将肝素前体溶于四氢呋喃溶液(0.05 mol/L), 慢慢加入事先混合好的30%双氧水(100 equiv. 每个COOMe)和1 mol/L氢氧化锂(50 equiv. per COOMe), 室温搅拌12 h. 加入3 mol/L KOH水溶液至体系pH达到14, 室温再反应12 h. TLC监测反应完全后, 加入酸性树脂或者1 mol/L盐酸调至中性. 减压浓缩, 凝胶柱Sephadex LH-20 (DCM:MeOH = 1:1)分离得到目标产物.

标准操作F. Staudinger还原: 将*O*-硫酸化产物溶于四氢呋喃(0.02 mol/L)中, 加入0.1 mol/L氢氧化钠水溶液(5 equiv. 每个N₃), 之后滴加入1 mol/L三甲基膦四氢呋喃溶液(4 equiv. per N₃), 室温下反应4 h. TLC (RP-18反相板, MeOH/H₂O淋洗体系)监测反应完全后, 小心地滴加0.1 mol/L 盐酸溶液调pH至7~8, 减压浓缩得到粗品.

标准操作G. *N*-硫酸化: 将Staudinger还原的粗品直接溶解在甲醇(0.02 mol/L)中, 加入三乙胺($V_{\text{NEt}_3}:V_{\text{MeOH}} = 3:10$), 0.1 mol/L氢氧化钠水溶液(2 equiv. per NH₂), 充分搅拌, 0℃下将SO₃·Py (5 equiv. per NH₂)加入, 30和60 min后再加入两份硫酸化试剂SO₃·Py, 在冰水浴下继续反应. TLC (反相板, MeOH/H₂O淋洗体系)监测反

应完全后, 减压浓缩, 反相柱RP-18 (MeOH/H₂O淋洗体系)提纯, 梯度淋洗分离出*N*-硫酸化产物, 最后通过Dewex50WX4 Na⁺离子柱将其交换成钠盐.

标准操作H. 氢化脱除苄基: 将起始原料溶于甲醇和缓冲水(pH 7)的混合溶液($V_{\text{MeOH}}:V_{\text{Buffer}} = 1:1$)中, 加入20% Pd(OH)₂/C (质量与起始原料相等), 常压室温下氢化反应24 h, 使用滤纸过滤掉, 旋干得到目标分子, 使用凝胶柱G-10提纯, 最后通过Dewex50WX4 Na⁺离子柱将其交换成钠盐, 冷冻干燥得到白色粉末状固体.

3 结果与讨论

在前期关于肝素寡糖的工作中, 叠氮葡萄糖6位羟基一般采用酰基保护基(苯甲酰基(Bz)、乙酰基(Ac)、乙酰丙酰基(Lev)等), 期望在糖苷化时利用酰基的远程参与作用, 获得较高的 α 选择性^[10]. 然而, 在进行[1 + 2]和[2 + 2]糖苷化时, 得到的糖苷化产物往往是 α/β 混合物. 2005年, Wei课题组报道的肝素二糖的正交合成策略中, 将TBDPS作为叠氮葡萄糖给体6位羟基保护基, 与¹C₄构型的葡萄糖醛酸3,6内酯受体的[1 + 1]糖苷化可以以60%的收率得到单一 α 构型的二糖; 而与⁴C₁构型的葡萄糖醛酸受体的[1 + 1]糖苷化的分离收率仅有25%^[11]. 随后, 洪上程课题组^[12]将TBDPS保护基引入到肝素聚糖的合成, 通过筛选叠氮葡萄糖给体2,3位保护基, 发现3位采用对溴苄基(*p*-BrBn), 4位采用2-萘甲基(2-NAP)保护, 6位采用TBDPS保护的叠氮葡萄糖给体与葡萄糖或艾杜糖受体的[1 + 1]糖苷化中, 得到 α 的二糖产物, 进而完成了肝素二糖至八糖的高效合成. 因此, 我们拟在[2 + 2]糖苷化反应中, 考察TBDPS作为叠氮葡萄糖6位保护基, ⁴C₁构型的葡萄糖糖醛酸二糖作为受体, 对于糖苷化选择性的影响.

3.1 肝素寡糖的逆合成分析

如图2所示, 我们拟采取正交的保护基策略, 合成氨基葡萄糖6位不同硫酸化程度的肝素三糖和四糖. 将需要硫酸化的羟基用正交的TBDPS和Lev保护, 需要硫酸化的氨基采用叠氮基(N₃)取代, 裸露的羟基采用苄基(Bn)和Bz保护, 糖醛酸6位的羧基采用甲基(Me)保护; 利用汇聚式的[1 + 2]和[2 + 2]糖苷化策略制备保护的肝素三糖和四糖骨架. 其中, 我们拟采用本课题组发展的*N*-苄基三氟乙酰亚胺酯给体进行关键的 α -(1→4)

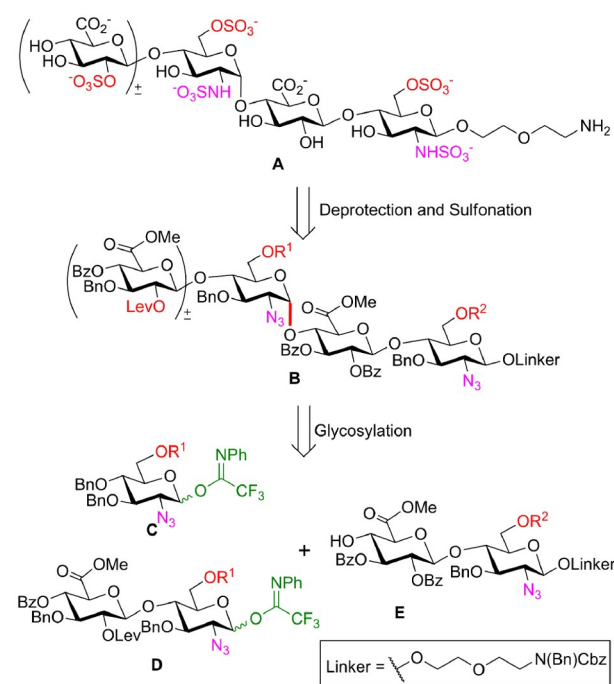


图2 肝素三糖和四糖衍生物A的逆合成分析(网络版彩图)
Figure 2 Retrosynthetic analysis of the targeted tri- and tetrasaccharides A (color online).

糖苷键的立体选择性构建; 随后, 利用优化好的保护基脱除和硫酸化操作, 合成目标肝素三糖和四糖衍生物。相较于葡萄糖受体, $^4\text{C}_1$ 构型的葡萄糖糖醛酸二糖受体的糖苷化活性较弱^[13], 如何通过给体、受体活性的调控和糖苷化条件的筛选制备得到高产率高选择的糖苷化产物是合成中的一个难点。

3.2 单糖和二糖给体的合成

从已知叠氮葡萄糖 $1^{[14]}$ 出发(图3), 采用三氟乙酸水溶液脱除苄叉保护基, 叔丁基二苯基氯硅烷(TBDPSCI)和三乙胺(Et_3N)选择性保护伯羟基, 得到6-*O*-TBDPS保护的叠氮葡萄糖 2 。裸露的4位羟基进行酰化, 分别得到4-*O*-Bz叠氮葡萄糖 3 和4-*O*-Lev叠氮葡萄糖 4 。采用四丁基氟化铵(TBAF)/醋酸(AcOH)条件, 脱除异头位的叔丁基二甲基硅基(TBS), 接着与*N*-苯基三氟乙酰亚胺氯和碳酸钾反应, 制备得到*N*-苯基三氟乙酰亚胺酯二糖给体 5 和 6 。

对于二糖给体 11 的合成(图4), 采用硫苷给体 $7^{[15]}$ 与6-*O*-Bz叠氮葡萄糖受体 8 进行[1 + 1]糖苷化, 得到二糖 9 。接着, 采用硼烷四氢呋喃($\text{BH}_3\cdot\text{THF}$)/二丁基三氟甲磺酸盐($\text{Bu}_2\text{B}\cdot\text{OTf}$)区域选择性地还原苄叉保护

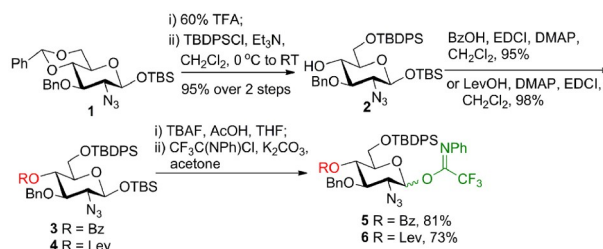


图3 单糖给体5和6的合成(网络版彩图)
Figure 3 Synthesis of monosaccharide donors 5 and 6 (color online).

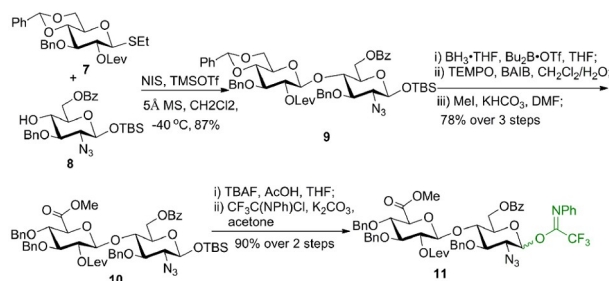


图4 二糖给体11的合成(网络版彩图)
Figure 4 Synthesis of disaccharides donor 11 (color online).

基^[16], 裸露的6位伯羟基进行2,2,6,6-四甲基哌啶-氮-氧化物(TEMPO)/醋酸碘苯(BAIB)氧化^[16], 随后甲酯化, 得到二糖 10 。之后, 采用TBAF/ HOAc 条件, 脱除异头位的TBS保护基, 紧接着与*N*-苯基三氟乙酰亚胺氯和碳酸钾反应, 制备得到*N*-苯基三氟乙酰亚胺酯二糖给体 11 。

对于二糖给体 14 的合成(图5), 采用硫苷给体 7 与6-*O*-TBDPS叠氮葡萄糖受体 2 进行[1 + 1]糖苷化, 得到二糖 12 。接着, 采用酸性条件脱除苄叉保护基, 6位伯羟基进行TEMPO/BAIB氧化^[17], 随后甲酯化, 4位仲羟基进行Bz保护, 得到二糖片段 13 。之后, 采用TBAF/ AcOH 条件, 脱除异头位的TBS保护基, 接着与*N*-苯基三氟乙酰亚胺氯和碳酸钾反应, 制备得到*N*-苯基三氟乙酰亚胺酯二糖给体 14 。

3.3 糖苷化条件的筛选

成功得到单糖和二糖给体之后, 我们具体研究了叠氮葡萄糖6位羟基保护基对于[2 + 2]糖苷化选择性的影响, 探索最佳糖苷化条件以获得较高的产率和 α 选择性。糖苷化是聚糖合成中最重要的反应之一, 自Fischer糖苷化发现以来, 糖化学家已发展出多种高效

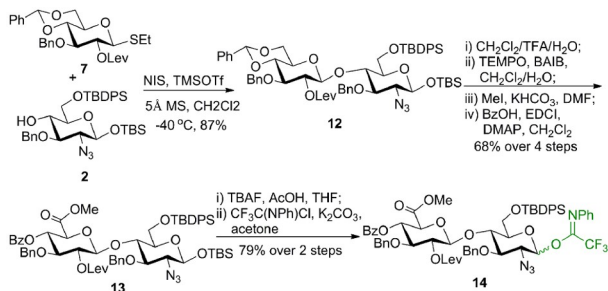


图 5 二糖给体14的合成(网络版彩图)

Figure 5 Synthesis of disaccharide donor 14 (color online).

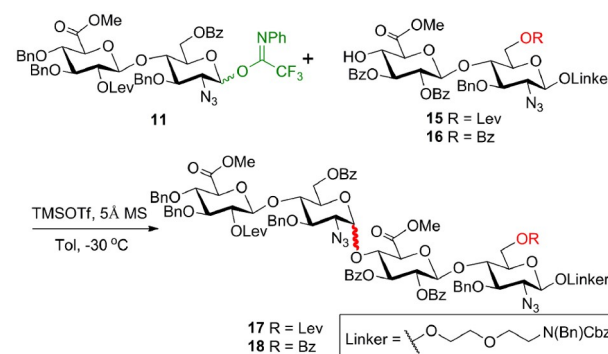
的糖苷化方法, 其中部分糖苷化方法被成功应用于肝素类寡糖的化学合成中^[10b]. 本课题组^[10a,10c,18]发展的 *N*-苯基三氟乙酰亚胺酯给体法和金催化邻炔基苯甲酸酯给体法(Yu Glycosylation)都曾成功应用于肝素寡糖的合成^[18].

本文中, 我们利用 *N*-苯基三氟乙酰亚胺酯给体法, 考察6位Bz和TBDPS基团对于糖苷化产率和选择性的影响. 首先, 将6-*O*-Bz保护的二糖给体13与6-*O*-Lev保护的二糖受体15^[18a]溶解于甲苯中, 加入分子筛(5 Å), 充分搅拌后, 冷却至-30°C, 慢慢滴加0.1 equiv.三氟甲磺酸三甲基硅酯(TMSOTf), 低温下继续反应. TLC监测反应, 给体完全消失后滴加三乙胺淬灭反应, 四糖17的分离收率为68%, α/β 选择性达到6.9:1 (表1, 实例1). 将受体换成6-*O*-Bz保护的受体16^[18a], 糖苷化反应得到四糖18, 收率下降到41%, α/β 选择性下降到1.8:1 (实例2); 尝试采用给体反加策略, 糖苷化反应收率提高到52%, α 选择性稍有提高($\alpha/\beta = 2.2:1$) (实例3).

接着, 我们尝试6-*O*-TBDPS保护的二糖给体14与二糖受体15的糖苷化反应. 利用甲苯作为溶剂, 5 Å分子筛作为干燥剂, 充分搅拌后, 冷却至-30°C, 加入0.2 equiv. TMSOTf (表2, 实例1). 令人惊喜的是, 该糖苷化以中等的收率(56%)得到 α 专一性的四糖产物17. 考虑到TBSOTf作为常见促进剂, 活性较TMSOTf稍弱, 我们继续尝试0.2 equiv. TBSOTf作为促进剂, 糖苷化收率进一步提高到72%, 选择性仍然是单一 α 构型(实例2). 尝试采用二糖的三氯乙酰亚胺酯给体的[2 + 2]糖苷化反应, 产率不如 *N*-苯基三氟乙酰亚胺酯给体高(45%). 接下来考察溶剂对于产率的影响, 将甲苯换成肝素合成中常用的二氯甲烷或乙醚, 糖苷化选择性没有变化, 但是收率有所下降(实例3和4). 利用优化的糖

表1 给体11与受体15/16的[2 + 2]糖苷化反应

Table 1 Glycosylation of disaccharides 15/16 with donor 11

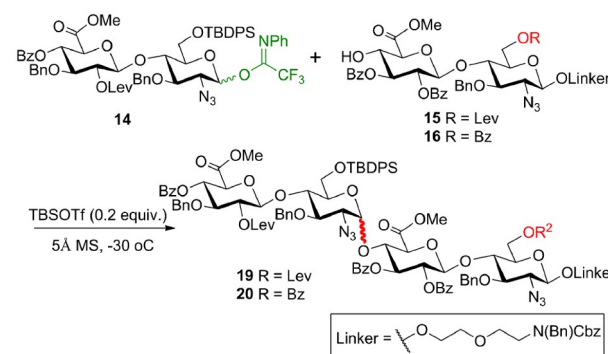


实例	二糖受体	产率(%)	比例(α/β)
1	15	68	6.9:1
2	16	41	1.8:1
3 ^{a)}	16	52	2.2:1

a) 将6-*O*-Bz保护的二糖受体16溶解于甲苯中, 加入分子筛(5 Å), 充分搅拌后, 冷却至-30°C; 随后滴加0.1 equiv.三氟甲磺酸三甲基硅酯(TMSOTf); 再慢慢滴加二糖给体的甲苯溶剂至反应瓶中, 低温下继续反应(约3 h).

表2 给体14与受体15/16的[2 + 2]糖苷化反应

Table 2 Glycosylation of disaccharides 15/16 with donor 14



实例	二糖受体	溶剂	产率(%)	比例(α/β)
1	15	Toluene	56	1:0
2	15	Toluene	72	1:0
3	15	CH ₂ Cl ₂	65	1:0
4	15	Et ₂ O	37	1:0
5	16	Toluene	69	1:0

苷化条件, 二糖给体14与6-*O*-Bz保护的受体16进行糖苷化, 以69%的收率得到 α 专一性的四糖产物20 (实例5).

在上述[2 + 2]糖苷化中, TBDPS保护基给体取得不错的糖苷化收率和选择性, 我们继续考察在[1 + 2]糖苷化反应中的效果. 如我们所愿, 6-*O*-TBDPS叠氮葡萄糖给体**5/6**与糖醛酸二糖受体**15/16**的糖苷化反应能以大于70%的收率得到单一- α 构型的三糖产物(表3).

3.4 保护基脱除和硫酸化方法的摸索

基于本课题组对于肝素类寡糖化学合成的基础, 我们开始尝试保护基脱除和硫酸化修饰合成最终的肝素寡糖. 以四糖**19**为例(图6), 首先, 我们采用HF·Py脱除四糖**19**的6-*O*-TBDPS保护基, 水合肼-醋酸条件脱除Lev保护基, 得到四糖**24**; 接着以SO₃·Py作为硫酸化试剂, DMF作为溶剂, 室温反应过夜, 以88%的收率得到*O*-硫酸化修饰的四糖**25**; 之后, 利用过氧化氢化锂水解葡萄糖醛酸的甲酯, 氢氧化钾水溶液皂化脱除Bz保护基, 得到四糖**26**; 然后, 我们采用Staudinger还原条件, 利用三甲基磷还原叠氮成氨基, 紧接着在碱性条件下, 采用SO₃·Py络合物作为硫酸化试剂, 以86%的收率得到*N*-硫酸化修饰的四糖**27**; 最后, 采用20%Pd(OH)₂/C作为催化剂, 利用缓冲溶液体系(pH 7), 常压氢化得到最终肝素类四糖**28**, 保护基脱除和硫酸化修饰七步反应总收率达到57%. 最终化合物通过氢谱、碳谱和质谱分析确定其结构.

按照上述优化的保护基脱除和硫酸化修饰的实验

表3 给体**5/6**与受体**15/16**的[1 + 2]糖苷化反应

Table 3 Glycosylation of disaccharides **15/16** with donors **5/6**

5 R¹ = Bz
6 R¹ = Lev

15 R = Lev
16 R = Bz

21 R¹ = Bz; R² = Lev
22 R¹ = Bz; R² = Bz
23 R¹ = Lev; R² = Lev

Linker =

实例	单糖给体	二糖受体	产率(%)	比例(α/β)
1	5	15	75	1:0
2	5	16	79	1:0
3	6	15	72	1:0

步骤, 我们顺利制备得到了另外6个硫酸化程度不同的肝素类四糖**29~31**和三糖**32~34**, 总收率为42%~60%(图7).

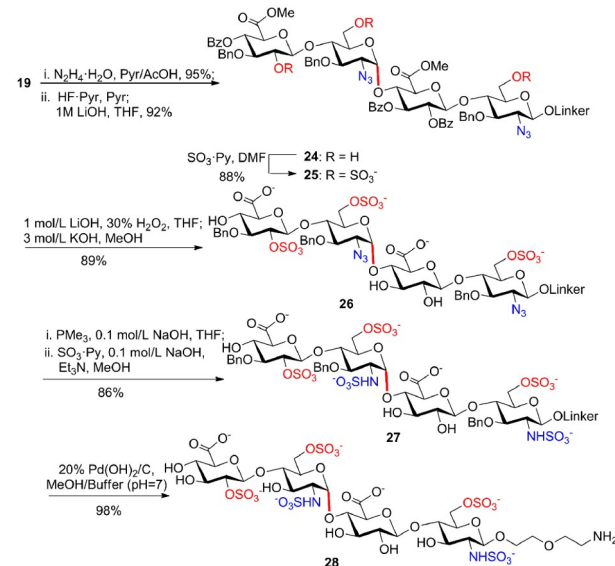


图6 肝素四糖衍生物**28**的合成(网络版彩图)

Figure 6 Synthesis of heparin tetrasaccharide derivative **28** (color online).

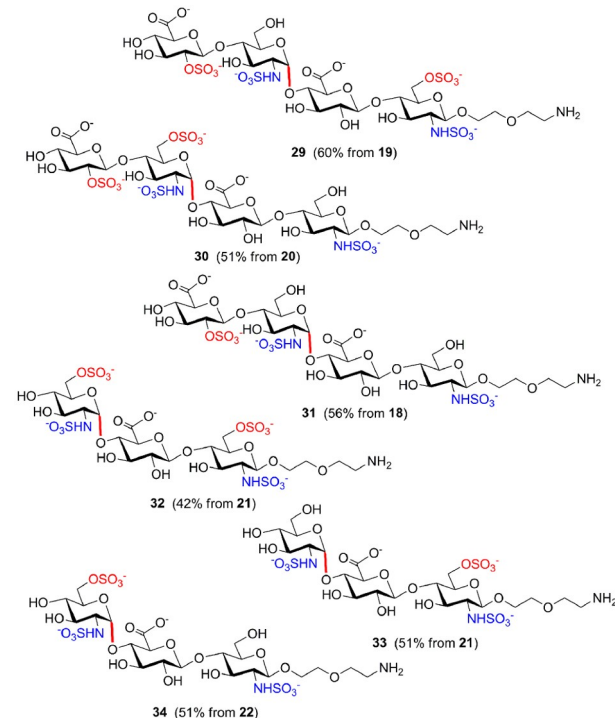


图7 肝素寡糖衍生物**29~34**的合成(网络版彩图)

Figure 7 Synthesis of heparin oligosaccharide derivatives **29~34** (color online).

4 结论

我们报道了一条利用合理的保护基方法高效合成带有氨基终端连接臂的肝素寡糖的路线. 该路线采用 TBDPS 作为叠氮葡萄糖伯羟基的保护基, 利用 *N*-苯基三氟乙酰亚胺酯给体法, 实现了关键的 GlcN-(1→4)-GlcA 糖苷键的 α 专一性构建; 采用汇聚式的 [1+2] 和 [2

+2] 糖苷化合成了 7 个正交保护的肝素三糖和四糖前体; 采用优化的保护基脱除和硫酸化操作, 高效便捷地获得 7 个 *O*-硫酸化修饰程度不同的肝素三糖和四糖衍生物 **28~34**. 这一系列带有氨基链的肝素寡糖的合成, 为我们制备肝素类寡糖芯片, 研究肝素寡糖与乙酰肝素酶的相互作用提供了材料.

补充材料

本文的补充材料见网络版 chem.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

参考文献

- (a) van Boeckel CAA, Petitou M. *Angew Chem Int Ed*, 1993, 32: 1671–1690; (b) Petitou M, van Boeckel CAA. *Angew Chem Int Ed*, 2004, 43: 3118–3133
- van Haren FMP, van Loon LM, Steins A, Smoot TL, Sas C, Staas S, Vilaseca AB, Barbera RA, Vidmar G, Beccari H, Popilevsky F, Daribayeva E, Venkatesan B, Mozes S, Postel R, Popilevski N, Webb A, Nunes Q, Laffey JG, Artigas A, Smith R, Dixon B, Richardson A, Yoon HJ, Page C. *Brit J Clin Pharma*, 2022, 88: 2802–2813
- Tao Y, Sun Y, Lv S, Xia W, Zhao K, Xu Q, Zhao Q, He L, Le W, Wang Y, Liu C, Li D. *Nat Commun*, 2022, 13: 4226
- Park S, Gildersleeve JC, Blixt O, Shin I. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 4310–4326
- Hyun JY, Pai J, Shin I. *Acc Chem Res*, 2017, 50: 1069–1078
- Jayatilake KM, Hulett MD. *J Transl Med*, 2020, 18: 453
- Agelidis A, Turturice BA, Suryawanshi RK, Yadavalli T, Jaishankar D, Ames J, Hopkins J, Koujah L, Patil CD, Hadigal SR, Kyzar EJ, Campeau A, Wozniak JM, Gonzalez DJ, Vlodavsky I, Li J, Perkins DL, Finn PW, Shukla D. *JCI Insight*, 2021, 6: e144255
- Okada Y, Yamada S, Toyoshima M, Dong J, Nakajima M, Sugahara K. *J Biol Chem*, 2002, 277: 42488–42495
- Armarego WLF, Perrin DD. *Purification of Laboratory Chemicals*. 4th Ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1996
- (a) Xu P, Xu W, Dai Y, Yang Y, Yu B. *Org Chem Front*, 2014, 1: 405–414; (b) Mende M, Bednarek C, Wawryszyn M, Sauter P, Biskup MB, Schepers U, Bräse S. *Chem Rev*, 2016, 116: 8193–8255; (c) Xu W, Liu W, Li X, Xu P, Yu B. *Acta Chim Sin*, 2020, 78: 767–777 (in Chinese) [许伟长, 刘威, 李祥, 徐鹏, 俞飏. 化学学报, 2020, 78: 767–777]
- Fan RH, Achkar J, Hernández-Torres JM, Wei A. *Org Lett*, 2005, 7: 5095–5098
- (a) Hu YP, Lin SY, Huang CY, Zulueta MML, Liu JY, Chang W, Hung SC. *Nat Chem*, 2011, 3: 557–563; (b) Zulueta MML, Lin SY, Lin YT, Huang CJ, Wang CC, Ku CC, Shi Z, Chyan CL, Irene D, Lim LH, Tsai TI, Hu YP, Arco SD, Wong CH, Hung SC. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 8988–8995; (c) Chiu LT, Sabbavarapu NM, Lin WC, Fan CY, Wu CC, Cheng TJR, Wong CH, Hung SC. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 5282–5292
- Lucas R, Hamza D, Lubineau A, Bonnaffé D. *Eur J Org Chem*, 2004, 2004: 2107–2117
- Murakata C, Ogawa T. *Carbohydr Res*, 1992, 234: 75–91
- Schimmel J, Passos Eleutério MI, Ritter G, Schmidt RR. *Eur J Org Chem*, 2006, 2006: 1701–1721
- Jiang L, Chan TH. *Tetrahedron Lett*, 1998, 39: 355–358
- Epp JB, Widlanski TS. *J Org Chem*, 1999, 64: 293–295
- (a) Li J, Dai Y, Li W, Laval S, Xu P, Yu B. *Asian J Org Chem*, 2015, 4: 756–762; (b) Liu X, Song Y, Liu A, Zhou Y, Zhu Q, Lin Y, Sun H, Zhu K, Liu W, Ding N, Xie W, Sun H, Yu B, Xu P, Li W. *Angew Chem Int Ed*, 2022, 61: e202201510

Highly stereoselective synthesis of heparin tri- and tetra-saccharide derivatives

Yuanwei Dai^{1,2}, Wei Liu³, Peng Xu^{1*}, Biao Yu^{1*}

¹ State Key Laboratory of Bioorganic and Natural Products Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry, University of Chinese Academy of Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

² Chongqing Key Laboratory of Natural Product Synthesis and Drug Research, School of Pharmaceutical Sciences, Chongqing University, Chongqing 401331, China

³ School of Physical Science and Technology, ShanghaiTech University, Shanghai 201210, China

*Corresponding authors (email: peterxu@sioc.ac.cn; byu@sioc.ac.cn)

Abstract: Heparin, a naturally highly sulfated glycosaminoglycan, mediates various physiologic and pathophysiologic processes, and is mainly used for the prevention and treatment of venous thrombosis in clinic. Here we report an efficient synthesis of heparin oligosaccharides with different degrees of 6-*O*-sulfonation modification, employing orthogonal protective group strategy. *tert*-Butyldiphenylsilyl (TBDPS) group is used as the protective group of 6-OH of the 2-azide-glucose donors, and highly α -selective construction of the key GlcN-(1 $\rightarrow$ 4)-GlcUA glycosidic bond was achieved with the corresponding *N*-phenyl trifluoroacetimidate donors. Thus, tri- and tetra-saccharides are synthesized by the convergent [1 + 2] and [2 + 2] glycosylation. The fully elaborated oligosaccharides have then been successfully transformed into the target heparin oligosaccharides **28–34** via an optimal sequence of manipulation of the protecting groups. The post-assembly manipulations include desilylation with HF·Py (for removal of TBDPS group), delevulinoylation with hydrazine hydrate (for removal of levulinoyl group), saponification under Zemplén conditions (for removal of methyl ester and benzoyl group), *O*-sulfonation with sulfur trioxide pyridine complex (for hydroxyl groups), reduction and *N*-sulfonation (for azido group), and atmospheric pressure hydrogenation (for removal of benzyl and Cbz groups). The availability of these heparin oligosaccharide derivatives which bear amino linker shall facilitate the preparation of glycan chips for studies on the interaction between heparin oligosaccharides with proteins, such as the heparanase.

Keywords: heparin oligosaccharide, TBDPS group, *N*-phenyl trifluoroacetimidates, α -selective glycosylation

doi: [10.1360/SSC-2022-0177](https://doi.org/10.1360/SSC-2022-0177)