

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 6 月 25 日 (25.06.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/125307 A1

(51) 国际专利分类号:
C07H 15/04 (2006.01) *C07K 2/00* (2006.01)
C07H 1/00 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/119584

(22) 国际申请日: 2019 年 11 月 20 日 (20.11.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201811551666.0 2018 年 12 月 18 日 (18.12.2018) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 尹健(YIN, Jian); 中国江苏省无锡市滨湖区
蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。
胡静(HU, Jing); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖
大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 刘中华

(LIU, Zhonghua); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖
大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 秦春君
(QIN, Chunjun); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖
大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代
理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL
PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省
哈尔滨市松北区科技一街 99 号 18 栋 E 区 501
张勇, Heilongjiang 150028 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) Title: METHOD FOR CHEMICAL SYNTHESIS OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA O11 SEROTYPE O ANTIGEN OLIGOSACCHARIDE

(54) 发明名称: 一种绿脓假单胞菌O11血清型O抗原寡糖的化学合成方法

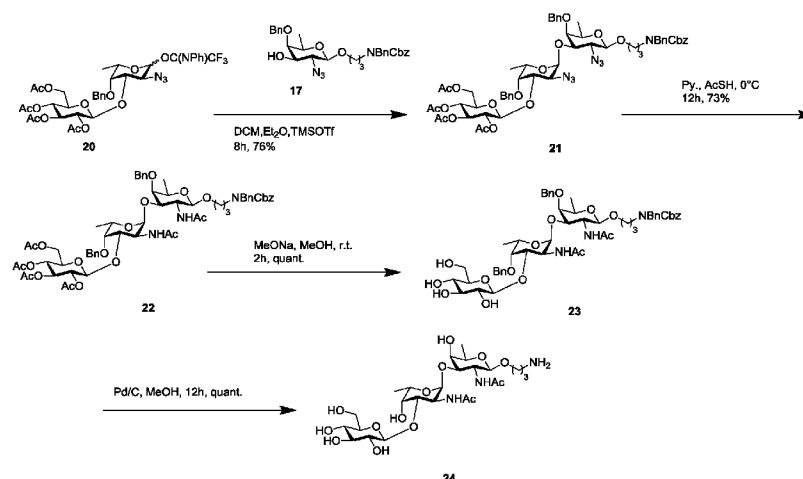


图 7

(57) Abstract: Disclosed is a method for constructing a Pseudomonas aeruginosa O11 serotype O antigen oligosaccharide using a D-glucose block, a L-fucosamine block and a D-fucosamine block, wherein the D-glucose block or the L-fucosamine block is connected to the D-fucosamine block via a 1,2- α -cis-glycosidic bond, and the D-glucose block is connected to the L-fucosamine block via a 1,2- β -trans-glycosidic bond, wherein the construction of the 1,2- α -cis-glycosidic bond is performed in a mixed solvent, the mixed solvent comprising two or more of dichloromethane, ethyl ether and thiophene.

(57) 摘要: 一种利用D-葡萄糖砌块、L-岩藻糖胺砌块、D-岩藻糖胺砌块构建绿脓假单胞菌O11血清型O抗原寡糖的方法; 其中, D-葡萄糖砌块或L-岩藻糖胺砌块与D-岩藻糖胺砌块通过1,2- α -顺式-糖苷键连接, D-葡萄糖砌块与L-岩藻糖胺砌块通过1,2- β -反式糖苷键连接, 其中, 1,2- α -顺式-糖苷键的构建是在混合溶剂中进行的; 其中, 混合溶剂包括二氯甲烷、乙醚、噻吩中的两种或两种以上。

SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

一种绿脓假单胞菌 O11 血清型 O 抗原寡糖的化学合成方法

技术领域

本发明涉及一种绿脓假单胞菌 O11 血清型 O 抗原寡糖的化学合成方法，属于化学领域。

背景技术

绿脓假单胞菌是一类需氧的、杆状的革兰氏阴性菌，一般栖息于土壤和水环境中。特别的，绿脓假单胞菌也是一类广泛存在于医院环境中的机会主义致病菌，引发菌血症，尿路感染以及肺炎等疾病。绿脓假单胞菌的易感人群包括烧伤病人、ICU 中的病人、手术后病人以及免疫系统缺陷病人例如癌症、糖尿病和先天性囊泡纤维症患者。在我国大陆地区的呼吸机相关性肺炎（VAP）和医院获得性肺炎（HAP）中绿脓假单胞菌的流行性研究发现，在 VAP 中，绿脓假单胞菌占有所有分离株的 19.4%（95% 置信区间（CI）17.6-21.2%），HAP 的比例比较相似，为 17.8%（95% CI 14.6-21.6%）。此外，该研究还发现从 VAP 中分离到的绿脓假单胞菌对庆大霉素（51.1%, 95% CI 37.7-64.4%）和阿米卡星（22.5%, 95% CI 14.3-33.6%）具有较高的耐药性，而从 HAP 中分离得到的绿脓假单胞菌对阿米卡星（22.2% (95% CI 13.8-33.6%)）和头孢哌酮（50.0% (95% CI 30.2-69.8%)）具有较高的耐药性。

在全球范围内，临床上发现绿脓假单胞菌对包括多粘菌素、氟喹诺酮类、碳青霉烯类等抗生素具有一定的耐药性。2016 年，世界卫生组织将绿脓假单胞菌列为目前最急需研究和发展新型抗生素或者疫苗的致病菌之一。截至目前，市场上还没有针对该致病菌的疫苗问世。有关绿脓假单胞菌的疫苗研究始于 1980 年代，研究领域集中于该致病菌的脂多糖、糖-蛋白缀合物、鞭毛、灭活或者减毒全菌以及该菌的 DNA 序列等方面。绿脓假单胞菌的脂多糖由一些在人体上不常见的单糖以及糖苷键连接方式构成，是一种重要的毒力因素。根据单糖种类的和糖苷键连接方式的不同，绿脓假单胞菌共有 20 种不同的血清型抗原。其中具体结构为 $[-3)-\alpha\text{-L-N-乙酰岩藻糖胺}-(1-3)-\alpha\text{-D-N-乙酰岩藻糖胺}-(1-2)-\beta\text{-D-葡萄糖}-(1-)]_n$ 的 O11 血清型抗原，这是一个由三糖重复片段收尾相接而成的一个长链抗原，具体的重复单元数 n 受该致病菌的基因所调控。

目前，针对该结构化合物都是从含有该脂多糖结构的野生治病菌或者含有编码该结构的基因工程菌中提取得，包括 LPS 高表达菌株的构建和培养，蛋白酶 k 的降解，石炭酸热萃取，Tricine-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 分析和 Western immunoblot 检测等一系列步骤。此外，使用生物提取方法得到的脂多糖还存在化学结构不均一的问题，同时还存在着安全性的问题，因为是从菌体中直接提取的脂多糖，很有可能会掺杂其他细菌毒力因子，不仅不能够对人体产生免疫保护，反而会使人体受到菌体毒力因子的直接感染而致病，这样会产生严重的副作用。为了避免这样的问题，我们决定利用化学合成的方法来直接合成该脂多糖，这样就避免了化学结构不均一以及掺杂其他未知毒力因子的问题，合成出的脂多糖具有明确的化学结构，并且可以保证仅有此种荚膜多糖参与疫苗的组成，不会掺杂其他物质。

然而，在复杂寡糖合成过程中，糖苷键的构建是寡糖合成中最基本但是也最为棘手和关键的问题，由于糖类化合物结构的多样性，立体化学的复杂性，因此与其他结构的有机化合物不同，寡糖的合成方法学依然是不成熟和不完善的，被认为是有机化学领域中唯一存在众多方法（数十种之多）但又有没有一个具有普适性的方法为大家公认的领域。因为糖模块的结构复杂、顺式糖苷键选择性低，导致难以该结构合成构建，目前还没有报道利用化学合成的方法来构建该化合物，从而制约了该结构化合物的化学合成方法的研究。

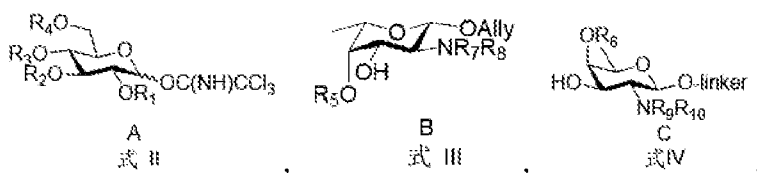
发明内容

为了解决上述问题，本发明通过三种糖砌块化学方法合成绿脓假单胞菌的 O11 血清型 O 抗原三糖片段，主要包括葡萄糖砌块、L-岩藻糖胺砌块、D-岩藻糖胺砌块以及 1,2- α -顺式-糖苷键和 1,2- β -反式糖苷键。其中 D-岩藻糖胺的合成和 1,2- α -顺式-糖苷键的构建是该目标三

糖的关键步骤。本发明开发了一条由 D-葡萄糖合成 D-岩藻糖胺的方法，并且通过溶剂效应，温度效应和添加剂效应的协同作用成功解决了构建 1,2- α -顺式-糖苷键的立体选择性问题。利用合成的三个糖基砌块合成了保护目标三糖，最后脱去保护得到的目标三糖如式 1。同时，三糖的还原端组装有带有氨基的连接臂，为下一步的缀合蛋白作准备。

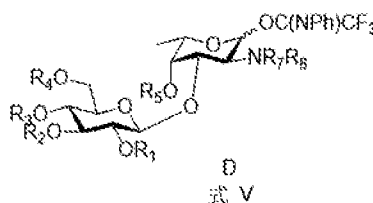
本发明的第一个目的是提供一种绿脓假单胞菌的 O11 血清型 O 抗原三糖的合成方法，所述方法包括：利用 D-葡萄糖砌块、L-岩藻糖胺砌块、D-岩藻糖胺砌块构建 O 抗原三糖；其中，D-葡萄糖砌块或 L-岩藻糖胺砌块与 D-岩藻糖胺砌块通过 1,2- α -顺式-糖苷键连接，D-葡萄糖砌块与 L-岩藻糖胺砌块通过 1,2- β -反式糖苷键连接，所述 1,2- α -顺式-糖苷键的构建是在混合溶剂中进行的；所述混合溶剂包括二氯甲烷、乙醚、噻吩中的两种或两种以上。

在本发明的一种实施方式中，所述 D-葡萄糖砌块的化学结构如式 II 所示，L-岩藻糖胺砌块的化学结构式如式 III 所示，D-岩藻糖胺砌块的化学结构式如式 IV 所示，



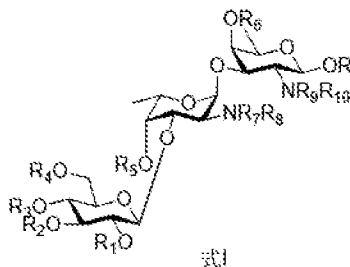
其中，linker 包括 $-(CH_2)_n-N-Y_1Y_2$ ，或者 $O-(CH_2)_n-SY_1(Y_2)$ ，或者 $O-(CH_2)_n-N_3$ ， $n=1\sim10$ ； Y_1 为氢 (H) 或者苄基 (Bn)； Y_2 为氢 (H) 或者苄甲氧羰基 (Cbz)； R_1 包括但不限于氢 (H)、酯基、乙酰基 (Ac)、苯甲酰基 (Bz)、新戊酰基 (Piv)、氯乙酰基 (ClAc)、乙酰丙酰基 (Lev)、烯丙基酰基 (Alloc)； R_2, R_3, R_4 为氢 (H) 或者酯基、醚基包括但不限于乙酰基 (Ac)、苯甲酰基 (Bz)、新戊酰基 (Piv)、氯乙酰基 (ClAc)、乙酰丙酰基 (Lev)、烯丙基酰基 (Alloc) 以及苄基 (Bn)、对甲氧基苄基 ($pMBn$)、烯丙基 (All)、三苯甲基 (Tr)、单甲氧基三苯甲基 (Mmt) 和硅醚类基团基团； R_5, R_6 包括但不限于氢 (H)、醚类基团、苄基 (Bn)、对甲氧基苄基 ($pMBn$)、烯丙基 (All)、三苯甲基 (Tr)、单甲氧基三苯甲基 (Mmt) 和硅醚类基团基团； R_7, R_8, R_9, R_{10} 包括氢 (H)、氮 (N) 或者乙酰基 (Ac)。

在本发明的一种实施方式中，所述方法包括利用 D-葡萄糖砌块和 L-岩藻糖胺砌块合成二糖片段，其化学结构如式 V 所示，

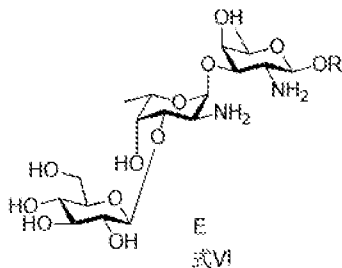


在本发明的一种实施方式中，所述 D-葡萄糖砌块与 L-岩藻糖胺砌块的 1,2- β -反式糖苷键连接是在 TMSOTf 促进作用下，以二氯甲烷作为溶剂中进行的。

在本发明的一种实施方式中，所述方法包括利用二糖片段与 D-岩藻糖胺砌块合成三糖片段，其化学结构式如式 I 所示，



在本发明的一种实施方式中，所述方法包括预先合成 O 抗原三糖前体，还原得到 O 抗原三糖，所述 O 抗原三糖前体的化学结构式包括如下通式：



在本发明的一种实施方式中，所述 D-葡萄糖砌块（式 II）的端基位是三氯乙酰亚胺酯，为离去基团，其余取代基 R_n 参见式 II。

在本发明的一种实施方式中，所述 D-葡萄糖砌块的合成方法包括：以为 1,2,3,4,6-五-O-乙酰基葡萄糖起始原料，利用干燥 N,N-二甲基甲酰胺和乙酸酐脱去 1 号位乙酰基裸露出 -OH，裸露的 -OH 与三氯乙腈 (Cl_3CN) 反应得到化合物 D-葡萄糖砌块。

在本发明的一种实施方式中，所述 L-岩藻糖砌块（式 III）端基位为烯丙基 (OAlI) 保护，其余位置取代基 R_n 参见式 III。

在本发明的一种实施方式中，所述 L-岩藻糖砌块是以烯丙基 2-脱氧-2-叠氮基-L-岩藻糖苷为起始原料，用二丁基氧化锡 (Bu_2SnO) 和 2-溴甲基萘的作用下选择性保护 4 号位的羟基得到 4-Nap 岩藻糖；然后用苄基保护剩余的 3 号位羟基，再在二氯二氰基苯醌的作用下脱去 4 号位的 Nap 基团得到最终糖砌块 B。

在本发明的一种实施方式中，所述 D-岩藻糖胺砌块的端基位为 linker，如式 IV 所示。

在本发明的一种实施方式中，所述 D-岩藻糖胺砌块的合成方法利用葡萄糖构建得到 D-岩藻糖胺，包括：以 3,4,6-O-三乙酰基甘露糖烯为原料，经过叠氮化物、硒试剂得到 1-硒苯-2-叠氮葡萄糖，脱除乙酰基，然后 6-C 进行甲基化，最终得到 D-岩藻糖胺类化合物。

在本发明的一种实施方式中，所述方法具体包括：以 3,4,6-O-三乙酰基甘露糖烯为原料，在二乙酸碘苯 ($PhI(OAc)_2$) 作用下，与叠氮基三甲基硅烷 ($TMS-N_3$) 和二苯基二硒 (Ph_2Se_2) 生成 1-硒苯-2-叠氮葡萄糖，然后碱性条件下脱除乙酰基，加入 4-甲苯磺酰氯实现 6-C 甲基化，得到 D-岩藻糖胺化合物。

在本发明的一种实施方式中，所述方法还包括将 D-岩藻糖胺化合物的 3、4-C 进行保护，然后脱去 4-C 的 Nap 基团，用乙酰基保护起来，四丁基溴化铵 (NBS) 水解 D-岩藻糖的 1 号位硒苯基，用 Cl_3CN 和 DBU 将岩藻糖做成糖基三氯乙酰亚胺酯，随后在路易斯酸的促进下组装上氨基连接臂，最后脱去 D-岩藻糖 3 号位上的乙酰基得到 D-岩藻糖胺砌块。

在本发明的一种实施方式中，所述 3-C 的保护试剂包括甲氧基苄氯 (PMBCl) 和氧化二丁基锡 (Bu_2SnO)。

在本发明的一种实施方式中，所述 4-C 的保护试剂包括苄基。

在本发明的一种实施方式中，所述 4-C 的 Nap 基团的脱除去利用 DDQ 实现的。

在本发明的一种实施方式中，所述路易斯酸包括三氟甲磺酸三甲基硅脂。

本发明的第二个目的是提供一种组装有氨基连接臂的绿脓假单胞菌的 O11 血清型 O 抗原三糖，所述抗原三糖是利用上述方法制备得到的。

本发明的第三个目的是提供一种糖-蛋白缀合物的制备方法，所述方法是利用上述的组装有氨基连接臂的绿脓假单胞菌的 O11 血清型 O 抗原三糖。

本发明的第四个目的是提供一种糖-蛋白缀合物的制备方法，所述方法是包含绿脓假单胞菌的 O11 血清型 O 抗原三糖，所述绿脓假单胞菌的 O11 血清型 O 抗原三糖的制备方法为上述方法。

本发明的第五个目的是将上述的组装有氨基连接臂的绿脓假单胞菌的 O11 血清型 O 抗原三糖应用于在开发或制备绿脓假单胞菌疫苗或者绿脓假单胞菌感染导致的疾病的药物中的应用。

本发明有益效果：

1、本发明是通过化学方法合成得到绿脓假单胞菌 O11 血清型 O-抗原三糖片段。本发明中开发了一种由 D-甘露糖转变为 D-岩藻糖的方法，方法简便高效，除了 6-C 甲基化约 50 左右，其余都可在 80% 以上；然后所得糖基砌块用于合成绿脓假单胞菌 O11 血清型 O-抗原三糖片段。

2、常用糖苷键的构建是利用糖环 C-2 位酰基辅助下的邻基参与效应，高效率的构建 1,2-反式糖苷键，2-位乙酰基作为糖化学保护策略中最易得、最有效的保护剂，如本发明中反式糖苷键的构建。然而对于 1,2-顺式反应，由于反应方法是没有普适性的，各反应条件对反应影响较大，其中有设计糖砌块的时候选择性在 C-6 用大空间位阻的保护基保护和在特别的针对半乳糖的在 C-4 位引入酰基形成类似长程邻基辅助效应的机制的报道，本发明方法采用一种适宜的混合溶剂，实现了顺式糖苷键的均一构建，立体选择性可达 100%。

3、本发明通过保护基团的选择和优化以及糖苷化反应的策略，成功完成了 O11 三糖重复单元的制备。本发明方法合成的绿脓假单胞菌 O11 血清型 O-抗原三糖片段组装有氨基连接臂，可以和抗原蛋白相连制成糖缀合物，对发展治疗和预防绿脓假单胞菌疫苗具有重要作用。

附图说明

- 图 1：单糖砌块 **3** (D-葡萄糖砌块) 的合成路线图；
- 图 2：单糖砌块 **7** (L-岩藻糖砌块) 的合成路线图；
- 图 3：单糖砌块 **17** (D-岩藻糖胺砌块) 的合成路线图；
- 图 4：单糖砌块 **17** 构建方法一的合成路线图；
- 图 5：单糖砌块 **17** 构建方法二的合成路线图；
- 图 6：二糖 **20** 的合成路线图；
- 图 7：三糖 **24** 的合成路线图。
- 图 8：三糖 **S23** 的合成路线设计图。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员会理解，下列实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或者制造商建议的条件进行，所用的试剂或者仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

本发明的产率计算方法为“产物 (mol) / 反应底物 (mol) * 100%”。本发明中化合物结构鉴定的方法为核磁共振图谱的测定 (400M)，高分辨质谱测定，旋光值测定，结果在每个化合物的具体合成中列出。

实施例 1

糖砌块 **3** (D-葡萄糖砌块) 的合成如图 1：

如图 1 所示，以全乙酰葡萄糖 **1** 作为起始原料，在干燥的 N, N-二甲基甲酰胺中利用乙酸肼 ($\text{NH}_2\text{-NH}_2\text{-AcOH}$) 选择性的水解掉 1 号位上的乙酰基。得到的 1-OH 葡萄糖 **2** 在然后无水二氯甲烷中利用三氯乙腈 (Cl_3CN) 和 1,8-二氮杂二环十一碳-7-烯 (DBU) 生成葡萄糖基三氯乙酰亚胺酯 **3**。

具体试验操作和步骤：

化合物 **2**：全乙酰葡萄糖 **1** (5.0 g, 12.8 mmol) 溶解在无水 DMF (65 ml) 中，加入醋酸肼 (1.45 g, 15.6 mmol)。反应在 40℃ 下搅拌 6 h，用 TLC 监测反应物消失。反应液冷却到室温，用饱和 NaCl 溶液洗涤，分离有机相，用无水 Na_2SO_4 干燥，浓缩后用硅胶柱纯化 (石油醚/乙酸乙酯，2:1) 得化合物 **2** (3.9 g, 11.2 mmol)。该化合物的鉴定数据已有相关文献报道。

化合物 **3**：化合物 **2** (1.1 g, 3.16 mmol) 溶解在无水 DCM (30 ml) 并且冷却到 0℃。依次往反应液里面加入 Cl_3CN (3.2 ml, 31.6 mmol) 和 DBU (0.45 ml, 0.3 mmol)，该反应在冰

浴下搅拌 4 h, 用 TLC 监测反应原料消失。反应液恢复到室温, 用饱和 NaHCO_3 萃取, 分离有机相, 用无水 Na_2SO_4 干燥, 浓缩后用硅胶柱纯化 (石油醚/乙酸乙酯, 4:1) 得化合物 **3** (1.3 g, 2.8 mmol)。该化合物的鉴定数据已有相关文献报道。

实施例 2:

糖砌块 **7** (L-岩藻糖砌块) 的合成路线为图 2。

如图 2 所示, 以烯丙基 2-脱氧-2-叠氮基-L-岩藻糖苷 **4** 为起始原料, 先在含有甲醇钠的碱性环境下脱去 3,4 号位的乙酰基, 得到的二羟基化合物在二丁基氧化锡和溴甲基萘的作用下在 4 号位选择性的用 Nap 基保护起来得到化合物 **5**, 3-Nap 化合物 **5** 的羟基用苄基保护生成化合物 **6**。最后用 DDQ 脱去 **6** 的 Nap 基得到化合物 3-OH 化合物 **7**。

具体试验操作和步骤:

化合物 **5**: 烯丙基 2-脱氧-2-叠氮基-L-岩藻糖苷 **4** (500 mg, 2.2 mmol) 溶于无水甲苯 (22 ml), 然后加入二丁基氧化锡 (814 mg, 3.3 mmol)。将反应液加热到 110 °C 搅拌 1 h。随后反应液冷却到 40 °C, 加入溴甲基萘 (814 mg, 3.3 mmol) 和四丁基溴化铵 (1.05g, 3.3mmol), 继续反应 20 h。反应完全后加入乙酸乙酯 (30 ml) 稀释, 用饱和食盐水洗涤。分离有机相, 浓缩后用硅胶柱纯化 (石油醚/乙酸乙酯, 5:1) 得化合物 **5** (527 mg, 1.7 mmol, 79%)。 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 34.0^\circ$ (c = 1.00, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 7.85 (dt, $J = 10.5, 7.7$ Hz, 4H, Ar-H), 7.59 – 7.45 (m, 3H, Ar-H), 5.94 (ddt, $J = 16.8, 10.9, 5.6$ Hz, 1H, Ally-H), 5.33 (dd, $J = 17.2, 1.7$ Hz, 1H, Ally- $\text{CH}_{2\text{a}}$), 5.21 (dd, $J = 10.5, 1.5$ Hz, 1H, Ally- $\text{CH}_{2\text{b}}$), 4.88 (s, 2H, 2Nap-H), 4.12 (dd, $J = 12.9, 6.2$ Hz, 1H, Ally-H), 4.23 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, 1-H), 4.12 (dd, $J = 12.9, 6.2$ Hz, 1H, Ally- $\text{OCH}_{2\text{b}}$), 3.74 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H, 4-H), 3.66 (dd, $J = 10.0, 8.0$ Hz, 1H, 2-H), 3.47 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H, 5-H), 3.35 (dd, $J = 10.0, 3.3$ Hz, 1H, 3-H), 2.32 (s, 1H, 4-OH), 1.34 (d, $J = 6.4$ Hz, 6- CH_3)。 ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 134.65, 133.65, 133.20, 128.55, 127.93, 127.77, 126.98, 126.33, 126.22, 125.75, 117.61, 100.75, 79.41, 77.33, 77.22, 77.01, 76.70, 72.19, 70.19, 69.97, 68.34, 62.57, 16.33. HRMS(ESI)m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+$ 391.1581, found 391.1564。

化合物 **6**: 将化合物 **5** (527 mg, 1.7 mmol) 溶于无水 DMF (17 ml) 中, 冷却至 0 °C, 冰浴 30 min。往反应瓶中加入 NaH (140mg, 3.4 mmol), 继续在 0 °C 下搅拌 30 min, 加入溴化苄 (0.5 ml, 3.4 mmol)。反应液恢复到室温, 继续搅拌 4 h, 待反应原料全部消失之后加入 DCM (20 ml) 稀释, 用冰水淬灭反应。用饱和 NaHCO_3 洗涤三次, 合并有机相, 浓缩后经硅胶柱纯化 (石油醚/乙酸乙酯, 25:1) 得到化合物 **6** (531 mg, 1.2mmol, 68%) $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 50.3^\circ$ (c = 1.00, CHCl_3)。 ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 7.90 – 7.77 (m, 4H, Ar-H), 7.57 – 7.45 (m, 3H, Ar-H), 7.38 – 7.21 (m, 6H, Ar-H), 5.94 (dddd, $J = 16.9, 10.8, 6.1, 5.0$ Hz, 1H, Ally-H), 5.32 (dt, $J = 17.2, 1.7$ Hz, 1H, Ally-H), 5.19 (dq, $J = 10.5, 1.5$ Hz, 1H, Ally-H), 4.97 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, PhCH), 4.87 (s, 2H, 2Nap-H) 4.71 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, PhCH-H), 4.39 (ddt, $J = 12.9, 5.0, 1.6$ Hz, 1H, Ally-H), 4.22 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 1-H), 4.10 (ddt, $J = 12.9, 6.1, 1.4$ Hz, 1H, Ally-H), 3.87 (dd, $J = 10.4, 8.0$ Hz, 1H, 2-H), 3.55 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, 4-H), 3.42 - 3.38 (m, 1H, 5-H), 3.36 (dd, $J = 10.4, 2.8$ Hz, 1H, 3-H), 1.20 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, 6- CH_3)。

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ 138.38, 135.34, 133.93, 133.38, 133.23, 128.55, 128.48, 128.36, 128.07, 127.89, 127.83, 126.79, 126.38, 126.21, 125.90, 117.58, 101.11, 81.07(C-1), 75.17, 74.85, 72.87, 70.74, 70.07, 63.31, 17.02。 HRMS(ESI)m/z calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+$ 482.2050, found 482.2041。

化合物 **7**: 将化合物 **6** (531 mg, 1.16 mmol) 溶于二氯甲烷 (50 ml) 和水 (5 ml) 的混合溶剂中, 反应液冷却至 0 °C, 加入 DDQ (540 mg, 2.32 mmol)。反应液在室温下搅拌 2 h, 待 TLC 监测原料全部反应完全后, 用 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 洗涤反应液, 分离有机相, 用无水硫酸钠干燥后浓缩, 经硅胶柱纯化 (石油醚/乙酸乙酯, 3:1) 得到化合物 **7** (325 mg, 0.96 mmol, 85%)。 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -3.6^\circ$ (c = 1.00, CHCl_3)。 ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 7.42 – 7.28 (m, 5H, Ar-H), 5.94 (dddd, $J = 16.7, 10.4, 6.1, 5.1$ Hz, 1H, Ally-H), 5.33 (dq, $J = 17.2, 1.6$ Hz, 1H, Ally-H),

5.21 (dq, $J = 10.5, 1.4$ Hz, 1H, Ally-H), 4.81 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H, Bn-H), 4.72 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H, Bn-H), 4.41 (ddt, $J = 12.9, 5.1, 1.6$ Hz, 1H, Ally-H), 4.26 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, 1-H), 4.11 (ddt, $J = 12.9, 6.1, 1.4$ Hz, 1H, Ally-H), 3.58 – 3.49 (m, 3H, 2-H, 4-H, 5-H), 3.45 (dd, $J = 10.4, 3.3$ Hz, 1H, 3-H), 2.14 (s, 1H, -OH), 1.31 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, 6-Me). ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform- d) δ 138.02, 133.75, 128.68, 128.30, 128.18, 117.63, 101.11, 78.60, 76.04, 73.12, 70.95, 70.17, 64.73, 17.01. HRMS(ESI) m/z calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+$ 342.1424, found 342.1430.

实施例 3:

糖砌块 **17** 的合成路线为图 3。

如图 3 所示, 以 3,4,6-*O*-三乙酰基甘露糖糖烯 **8** 为起始原料, 与二乙酸碘苯 ($\text{PhI}(\text{OAc})_2$)、叠氮基三甲基硅烷 (TMS-N_3) 和二苯基二硒 (Ph_2Se_2) 加成反应得到 1-硒苯基-2-叠氮基化合物 **9**。用甲醇和甲醇钠脱去 **9** 的三个乙酰基, 然后利用接着用 4-甲苯磺酰氯 (TsCl) 选择性保护 6 号位羟基得到化合物 **10**。接下来, 6-Ts 葡萄糖 **10** 的 Ts 基团用碘化钠碘代, 紧接着用氰基硼氢化钠 (NaCNBH_3) 把 6 号位还原成甲基, 得到 D-岩藻糖化合物 **11**。用对甲氧基苄氯 (PMBCl) 和氧化二丁基锡 (Bu_2SnO) 选择性保护 D-岩藻糖化合物的 3 号位得到化合物 **12**, 随后用苄基保护 4 号位羟基得到化合物 **13**。**13** 的 4 号位 Nap 用 DDQ 脱去, 随后用乙酰基保护起来得到化合物 **14**。用四丁基溴化铵 (NBS) 水解化合物 **14** 的 1 号位硒苯基, 紧接着用 Cl_3CN 和 DBU 将 1-OH 岩藻糖做成糖基三氯乙酰亚胺酯供体 **15**。随后在三氟甲磺酸三甲基硅脂的促进下化合物 **15** 与一个三碳连接臂反应, 得到一个组装有连接臂的岩藻糖化合物 **16**。最后在甲醇和甲醇钠的碱性环境下脱去化合物 **16** 的乙酰基得到糖砌块 **17**。

具体试验操作和步骤:

化合物 **9**: 将半乳糖烯化合物 **8** (2.0g, 7.35 mmol) 溶于无水二氯甲烷 (35 ml) 中, 然后冷却到 -30°C 。在氩气保护下加入二乙酸碘苯 (2.4g, 7.35 mmol) 和叠氮三甲基硅烷 (1.8 ml, 14.7 mmol), 继续在 -30°C 下搅拌 0.5 h, 然后缓慢恢复到室温, 继续搅拌 3 h 之后经 TLC 监测原料反应完全。反应液用饱和 NaHCO_3 洗涤 (20 ml) 3 次, 分离有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液旋干后经由硅胶柱纯化 (石油醚/乙酸乙酯, 6:1), 得到化合物 **9** (2.4 g, 5.15mmol, 70%)。 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 931.7^\circ$ ($c = 1.00, \text{CHCl}_3$)。 ^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 7.78 - 7.11 (m, 5H, Ar-H), 6.01 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, H-1), 5.47 (dd, $J = 3.4, 1.4$ Hz, 1H, 4-H), 5.12 (dd, $J = 10.9, 3.3$ Hz, 1H, 3-H), 4.67 (ddd, $J = 7.1, 5.8, 1.3$ Hz, 1H, 5-H), 4.26 (dd, $J = 10.9, 5.4$ Hz, 1H, 2-H), 4.08 (dd, $J = 11.5, 5.9$ Hz, 1H, 6a-H), 4.02 (dd, $J = 11.4, 7.1$ Hz, 1H, 6b-H), 2.15 (s, 3H, COCH_3), 2.07 (s, 3H, COCH_3), 1.98 (s, 3H, COCH_3)。 ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform- d): δ 169.93, 137.08, 135.12, 129.91, 129.19, 128.56, 128.23, 128.04, 127.97, 84.44, 77.22, 75.34, 73.68, 73.44, 70.09, 67.05, 58.99, 21.67, 20.83。 HRMS(ESI) m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{Se}[\text{M}+\text{Na}]^+$ 494.0442。

化合物 **10**: 将化合物 **9** (0.5g, 1.1 mmol) 溶解在甲醇 (2.2 ml) 里, 加入甲醇钠 (29 mg, 0.5 mmol)。反应液在室温下搅拌 2 h, TLC 检测显示原料反应完全。用氢型 Amberlite IR120 树脂中和反应液至 ~ 7 。过滤树脂, 将溶剂旋干。

将上一步的粗产物溶解在无水吡啶 (8 ml) 里, 在氩气保护下加入 TsCl (253 mg, 1.3 mmol)。反应液在室温下搅拌 12 h, TLC 检测原料反应完全。用 DCM 稀释反应液, 用 1M 盐酸洗涤, 然后用饱和碳酸氢钠萃取。合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 浓缩后用硅胶柱纯化 (二氯甲烷/甲醇, 200:1) 得到化合物 **10** (384 mg, 0.77mmol, 70%)。 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 133.6^\circ$ ($c = 1.00, \text{CHCl}_3$)。 ^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 7.72 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, Ar-H), 7.58 (dt, $J = 6.7, 1.6$ Hz, 2H, Ar-H), 7.36 - 7.23 (m, 6H, Ar-H), 5.86 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, H-1), 4.57 - 4.50 (m, 1H, 5-H), 4.29 (dd, $J = 10.6, 6.0$ Hz, 1H, 6a), 4.10 - 3.93 (m, 3H, H-2, H-4, 6b-H), 3.78 (ddd, $J = 9.8, 6.0, 3.3$ Hz, 1H, H-3), 2.68 (dd, $J = 6.5, 4.8$ Hz, 2H, 3-OH, 4-OH), 2.44 (s, 3H, PhCH_3)。 ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 145.20, 135.04, 132.36, 132.11, 132.01, 129.94, 129.24, 128.78, 128.66, 128.24, 128.00, 127.67, 84.62, 77.34, 77.22, 77.02, 76.70, 70.62, 69.97, 67.87, 67.55, 61.57, 21.68。 HRMS(ESI) m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{NaO}_5\text{SSe}[\text{M}+\text{Na}]^+$ 506.0265。

化合物 **11**: 在氩气保护下, 将化合物 **10** (380 mg, 0.76 mmol) 溶于 2-丁酮 (9.6 ml) 中, 加入碘化钠 (568 mg, 3.8 mmol)。反应液在 80℃ 下搅拌 12 h, TLC 检测原料反应完全。反应液恢复到室温, 加入乙酸乙酯 (10 ml) 稀释, 用 10% 硫代硫酸钠洗涤两次, 水洗涤两次, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥。浓缩后经硅胶柱纯化 (石油醚/乙酸乙酯, 4:1) 得到新化合物 (259 mg, 0.57 mmol, 75%)。[α]_D²⁰ = 317.6° (c = 1.00, CHCl₃)。¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 7.61 – 7.43 (m, 4H, Ar-H), 7.39 – 7.12 (m, 6H, Ar-H), 5.96 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, 1-H), 4.44 – 4.33 (m, 1H, 5-H), 4.22 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, 4-H), 4.09 (dd, *J* = 10.2, 5.3 Hz, 1H, 2-H), 3.79 (ddd, *J* = 9.9, 6.1, 3.3 Hz, 1H, 3-H), 3.17 (dd, *J* = 12.7, 8.2 Hz, 1H, 6-H_a), 3.06 (dd, *J* = 12.7, 6.0 Hz, 1H, 6-H_b), 2.75 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, 3-OH), 2.45 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, 4-OH)。¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 134.58, 132.92, 132.87, 132.81, 129.49, 129.32, 129.28, 129.18, 128.19, 127.97, 127.46, 85.04, 84.62, 77.36, 77.25, 77.04, 76.73, 72.32, 71.32, 68.93, 61.71, 26.94。HRMS(ESI)*m/z* calcd for C₁₂H₁₄N₃NaO₃Se [M+Na]⁺ 477.9143。

在氩气的保护下将新化合物溶解在 DMF (2 ml) 中, 加入氰基硼氢化钠 (48 mg, 0.75 mmol)。反应在 95℃ 下搅拌 12 h, TLC 检测原料反应完全。反应液恢复到室温, 用水和乙酸乙酯洗涤反应液, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 浓缩后用硅胶柱纯化 (石油醚/乙酸乙酯 2:1) 得到化合物 **11** (35 mg, 0.1 mmol, 70%)。[α]_D²⁰ = 259.4° (c = 1.00, CHCl₃)。¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 7.73 - 7.45 (m, 2H, Ar-H), 7.40 - 6.93 (m, 3H, Ar-H), 5.92 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, H-1), 4.39 (dt, *J* = 7.4, 6.0 Hz, 1H, 5-H), 4.05 (dd, *J* = 10.0, 5.3 Hz, 1H, 2-H), 3.91 - 3.74 (m, 2H, H-3, 4-H), 2.60 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, 3-OH), 2.26 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, 4-OH), 1.27 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, 6-CH₃)。 ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ 134.48, 129.15, 127.90, 85.00, 77.22, 71.46, 71.29, 68.69, 61.88, 15.98。HRMS(ESI)*m/z* calcd for C₁₂H₁₅N₃NaO₃Se [M+Na]⁺ 346.0230, found 346.0226。

化合物 **12**: 将化合物 **11** (3.0g, 9.1 mmol) 溶于无水甲苯 (54 ml) 中, 在氩气保护下加入 Bu₂SnO (3.5g, 13.7 mmol)。反应液加热到 118℃ 搅拌下回流 1.5 h。随后将反应液冷却至 60℃, 加入 PMBCl (1.9 ml, 13.7 mmol) 和 TBAI (5.1 g, 13.7 mmol), 继续搅拌 2 h。反应液冷却到室温, 加入乙酸乙酯 (80 ml) 稀释, 用水 (100 ml) 洗涤 2 次, 分离有机相, 用无水硫酸钠干燥, 滤液浓缩后用硅胶柱纯化 (石油醚/乙酸乙酯, 6:1) 得到化合物 **12** (2.7 g, 6 mmol, 66%)。[α]_D²⁰ = 137.9° (c = 1.00, CHCl₃)。¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 7.26 (s, 11H, Ar-H), 5.88 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, H-1), 4.70 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, Bn-H), 4.63 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, Bn-H), 4.36 - 4.24 (m, 1H, 5-H), 4.15 (dd, *J* = 10.2, 5.3 Hz, 1H, 2-H), 3.86 (dt, *J* = 3.2, 1.5 Hz, 1H, 4-H), 3.82 (s, 3H, Me-H), 3.69 (dd, *J* = 10.2, 3.2 Hz, 1H, 3-H), 2.35 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H, 4-OH), 1.26 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, 6-Me)。 ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ 159.74, 134.40, 129.75, 129.10, 129.08, 127.75, 114.14, 85.28, 78.85, 71.84, 68.61, 68.55, 60.18, 55.31, 16.05。HRMS(ESI)*m/z* calcd for C₂₀H₂₃N₃O₄SeNa [M+Na]⁺ 472.0751, found 472.0725。

化合物 **13**: 用将化合物 **12** (2.2 g, 4.9 mmol) 溶于 DMF (30 ml) 中, 0℃ 下搅拌 30 min, 在氩气保护下缓慢加入氢化那 (396 mg, 9.8 mmol)。冰浴下继续搅拌 30 min, 往反应液中逐滴加入溴化苄 (1.2 ml, 9.8 mmol)。继续搅拌反应 2 h, TLC 检测原料全部反应完全, 加入冰水淬灭反应, 用 DCM 稀释反应液, 萃取后由无水硫酸钠干燥, 浓缩液使用硅胶柱纯化 (石油醚/乙酸乙酯, 30:1) 得到化合物 **13** (1.9 g, 3.6 mmol, 74%)。[α]_D²⁰ = 71.5° (c = 1.00, CHCl₃)。 ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 7.57 - 7.55 (m, 2H, Ar-H), 7.36 - 7.25 (m, 10H, Ar-H), 6.94 - 6.91 (m, 2H, Ar-H), 5.92 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, H-1), 4.94 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H, PhCH), 4.77 - 4.66 (m, 2H, PhCH₂), 4.60 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, PhCH), 4.33 (dd, *J* = 10.2, 5.3 Hz, 1H, H-2), 4.21 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H, H-5), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.71 (dd, *J* = 10.3, 2.7 Hz, 1H, H-3), 3.68 (dd, *J* = 2.8, 1.1 Hz, 1H, H-4), 1.12 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, 6-CH₃)。 ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 159.63, 138.33, 134.48, 129.72, 129.16, 128.90, 128.44, 128.32, 127.90, 127.77, 114.14, 85.79, 80.47, 77.16, 76.01, 75.13, 72.40, 69.56, 61.03, 55.46, 16.69。HRMS(ESI)*m/z* calcd for C₂₇H₂₉N₃NaO₄Se [M+Na]⁺ 562.1221,

found 562.1209。

化合物14: 将化合物13 (900 mg, 1.67 mmol) 溶解于DCM (84 ml) 中, 在氩气保护下加入2,3-二氯-5,6-二氰基-1,4-苯醌 (564 mg, 2.5 mmol) 和水 (4.2 ml)。反应在室温下搅拌7 h, 用TLC检测反应完全。加入DCM (50 ml) 稀释, 用10%硫代硫酸钠 (100 ml) 洗涤反应液两次。分离有机相, 经由无水硫酸钠, 浓缩后用硅胶柱纯化 (石油醚/乙酸乙酯, 10:1) 得到新产物 (573 mg, 1.4 mmol, 82%)。把新产物溶解在干燥的吡啶 (3.2 ml) 中, 冷却至0℃, 30 min后缓慢加入乙酸酐 (0.5 ml, 5.12 mmol), 反应液恢复到室温继续搅拌5 h, TLC检测原料反应完全。用1M的盐酸洗涤反应液, 接着用饱和碳酸氢钠和饱和食盐水萃取。分离有机相, 浓缩后用硅胶柱纯化 (石油醚/乙酸乙酯=20:1) 得到化合物**14** (598 mg, 1.3 mmol, quant)。¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 7.68 - 7.21 (m, 9H, Ar - H), 5.91 (d, J = 5.3 Hz, 1H, H-1), 5.46 (dd, J = 3.3, 1.2 Hz, 1H, H-4), 4.75 (d, J = 10.7 Hz, 1H, PhCH₂), 4.53 (d, J = 10.7 Hz, 1H, PhCH), 4.48 - 4.37 (m, 1H, H-5), 4.12 (dd, J = 10.3, 5.4 Hz, 1H, H-2), 3.78 (dd, J = 10.4, 3.3 Hz, 1H, H-3), 2.15 (s, 3H, COCH₃), 1.12 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 6-CH₃)。 ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ 170.52, 136.90, 134.53, 129.12, 128.50, 128.34, 128.07, 127.88, 85.08, 71.68, 68.89, 67.77, 60.36, 20.76, 16.07。 HRMS(ESI)m/z calcd for C₂₁H₂₃N₃NaO₄Se [M+Na]⁺ 484.0751, found 484.0749。

化合物 15: 将化合物 14 (580 mg/1.3 mmol) 溶于四氢呋喃 (6 ml) 和水 (6 ml) 的混合溶液, 并且冷却至 0℃。加入四丁基溴化铵 (538 mmol, 3 mmol), 反应液回复到室温继续搅拌 5 h, TLC 检测显示原料反应完全。反应液用 10%硫代硫酸钠洗涤, 用 DCM 和水萃取, 分离有机相, 用无水硫酸钠干燥, 浓缩后用硅胶柱纯化 (石油醚/乙酸乙酯, 4:1) 得到新化合物 (417 mmol, 1.3 mmol, quant.) [α]_D²⁰ = 54.9° (c = 1.00, CHCl₃)。 ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 7.43 - 7.30 (m, 8H, Ar-H), 5.47 (dd, J = 3.3, 1.3 Hz, 1H, 1a-H), 5.34 (dd, J = 3.4, 1.1 Hz, 0.8H, 4b-H), 5.32 (d, J = 3.6 Hz, 1H, 4a-H), 4.77 (d, J = 10.8 Hz, 1H, PhCH), 4.75 (d, J = 11.1 Hz, 0.8H, PhCH), 4.54 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1b-H), 4.53 (d, J = 10.8 Hz, 1H, PhCH), 4.53 (d, J = 11.1 Hz, 0.8H, PhCH), 4.32 (qd, J = 6.6, 1.3 Hz, 1H, 5-H), 4.03 (dd, J = 10.5, 3.2 Hz, 1H, 2a-H), 3.74 (dd, J = 10.5, 3.5 Hz, 1H, 3a-H), 3.69 (td, J = 6.4, 1.1 Hz, 0.8H, 5b-H), 3.58 (dd, J = 10.2, 7.9 Hz, 0.8H, 2b-H), 3.45 (dd, J = 10.3, 3.4 Hz, 0.8H, 3b-H), 2.19 (s, 2.4H, COCH₃), 2.18 (s, 3H, COCH₃), 1.25 (d, J = 6.5 Hz, 2.4H, 6b-CH₃), 1.19 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 6a-CH₃)。 ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.90, 170.88, 137.15, 137.04, 128.63, 128.52, 128.40, 128.22, 128.17, 96.20, 92.46, 77.91, 77.48, 77.36, 77.16, 77.16, 76.84, 74.36, 71.91, 71.67, 69.69, 69.46, 68.39, 65.21, 64.03, 59.82, 20.95, 20.93, 16.55, 16.42。 HRMS(ESI)m/z calcd for C₁₅H₁₉N₃O₅Na[M+Na]⁺ 344.1217, found 344.1208。

将新化合物 (417 mmol, 1.3 mmol) 溶于无水二氯甲烷 (14 ml), 冷却至 0℃。依次加入三氯乙腈 (0.4 ml, 3.78 mmol) 和 DBU (23 μ L, 0.13 mmol), 反应液继续搅拌 5h, TLC 检测原料反应完全。直接将反应液在室温下浓缩, 经由硅胶柱纯化 (石油醚/乙酸乙酯, 10:1) 得到化合物 **15** (518 mg, 1.1 mmol, 88%)。

化合物 16: 糖基三氯乙酰亚胺酯 **15** (518 mg, 1.1 mmol) 和氮-苄基-氮-甲酸苄酯-丙醇 (500 mg, 1.7 mmol) 溶于无水 DCM 中, 加入 4Å 分子筛, 室温下搅拌半小时。然后将反应液冷却至 -40℃, 在氩气下加入缓缓加入 TMSOTf (0.3 ml, 1.3 mmol)。反应液在 -40℃ 下继续搅拌 4 h, 用 TLC 监测原料反应完全, 用三乙胺 (1 ml) 淬灭反应。反应液用饱和 NaHCO₃ 萃取, 分离有机相, 用无水 Na₂SO₄ 干燥后经由硅胶柱纯化得到化合物 **16** (396 mg, 0.44 mmol, 60%)。 [α]_D²⁰ = -10.8° (c = 1.00, CHCl₃)。 ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 7.45 - 7.16 (m, 15H, Ar-H), 5.23 - 5.12 (m, 2H, PhCH), 4.74 - 4.59 (m, 3H, 3-H, 2PhCH), 4.61 - 4.38 (m, 2H, 2NPhCH), 4.21 (dd, J = 33.3, 8.0 Hz, 1H, 1-H), 4.02 - 3.87 (m, 1H, linker-OCH), 3.79 (t, J = 9.5 Hz, 1H 2-H), 3.67 (d, J = 3.0 Hz, 1H, 4-H), 3.63 - 3.27 (m, 4H, 5-H linker-OCH, linker-NCH₂), 2.07 (s, 3H, COCH₃), 2.01 - 1.76 (m, 2H, linker-CH₂), 1.24 (d, J = 6.4 Hz, 3H, 6-CH₃)。 ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ

170.38, 137.95, 137.70, 128.52, 128.46, 128.40, 128.32, 127.97, 127.92, 127.87, 127.27, 101.99, 77.37, 77.25, 77.05, 76.74, 76.19, 75.59, 74.23, 70.48, 67.40, 67.19, 61.11, 50.90, 44.67, 43.62, 28.48, 28.03, 20.89, 16.57. HRMS(ESI)m/z calcd for $C_{33}H_{38}N_4O_7Na[M+Na]^+$ 625.2633, found 625.2650.

化合物 **17**: 将化合物 **16** (262 mg, 0.42 mmol) 溶于甲醇 (4 ml) 中, 加入甲醇钠 (40 mg)。反应液在室温下搅拌 2 h, 待原料全部反应完全之后, 用甲醇稀释反应液, 用氢型 Amberlite IR120 树脂中和反应液至 pH ~7。滤去树脂, 滤液浓缩后经由硅胶柱纯化 (石油醚/乙酸乙酯, 3:1) 得到化合物 **17** (244 mg, 0.42 mmol, quant.)。 $[\alpha]_D^{20} = -24.1^\circ$ (c = 1.00, $CHCl_3$)。 ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.76 – 6.87 (m, 15H, Ar-H), 5.22 (d, $J = 9.4$ Hz, 2H, PhCH), 4.83 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H, PhCH), 4.78 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H, PhCH), 4.58 (d, $J = 14.0$ Hz, 2H, PhCH), 4.25 – 4.08 (m, 1H, 1-H), 4.05 – 3.86 (m, 1H, linker-OCH), 3.62 – 3.34 (m, 7H, 2-H, 3-H, 4-H, 5-H, linker-OCH, linker-NCH₂), 2.46 (s, 1H, -OH), 2.02 – 1.80 (m, 2H, linker-CH₂), 1.31 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, 6-CH₃)。 ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 138.00, 128.58, 128.56, 128.50, 128.26, 128.08, 127.95, 127.89, 102.12 (1-C), 78.48, 77.36, 75.94, 72.96, 70.84, 67.24, 64.70, 50.94, 43.74, 28.58, 16.91。 HRMS(ESI)m/z calcd for $C_{31}H_{36}N_4NaO_6 [M+Na]^+$ 583.2527, found 583.2531.

实施例 4: D-岩藻糖砌块合成方法的考察

方法一:

根据已有文献报道的类似化合物合成方法中总结得到合成 D-岩藻糖砌块的方法 1, 如图 4 所示。以半乳糖烯糖 **S1** 作为起始原料, 在二苯基二硒醚、三甲基硅烷基叠氮和二乙酰基碘苯的共同作用下, 在其一号二号位分别引入硒苯基和叠氮基, 得到重要的中间体 **S2**, 在甲醇/甲醇钠作用下, 脱去三四六号位的乙酰基得到化合物 **S3**, 接着在四六位引入苄叉基得到化合物 **S4**, 再将三号位用乙酰基暂时保护起来得到化合物 **S5**, 然后在三甲基硅三氟甲磺酸和硼烷的共同作用下, 将苄叉基选择性打开, 将苄基引入到四号位, 得到化合物 **S6**, 然后在裸露的六号位在对甲苯磺酰氯和吡啶的作用下引入对甲苯磺酰基, 得到化合物 **S7**, 然而在将六号位的对甲苯磺酰基用碘原子取代时, 反应无法顺利进行。

发明人尝试了不同条件, 包括: 乙腈和 TBAI 在分别在 100°C, 80°C 条件下以及丁酮和碘化钠在 80°C 的条件下进行反应, 均未能在六号位引入碘, 得到相应的产物 **S8**, 进而无法继续沿路线合成目标合成 D-岩藻糖砌块。

方法二:

对方法一进行改进, 改进之后的合成路线如图 5 所示。以全乙酰葡萄糖烯糖 **S9** 为起始原料, 利用自由基加成反应, 在一号二号位分别引入硒苯基和叠氮基, 得到化合物 **S10**, 然后脱乙酰后得到化合物 **S11**, 紧接着四六位用苄叉基同时保护得到化合物 **S12**, 然后将三号位暂时用乙酰基保护后得到化合物 **S13**, 接下来在 80% 醋酸溶液中打开苄叉基得到化合物 **S14**, 在六号位在对甲苯磺酸和吡啶的条件下引入对甲苯磺酰基, 得到化合物 **S15**, 然后在 2-丁酮的回流溶液中与碘化钠反应, 六号位引入碘, 得到化合物 **S16**。用氰基硼氢化钠还原的方法还原化合物 **S16** 的六号位羟基, 使之还原成甲基, 得化合物 **S17**, 然后在四号位先引入三氟甲磺酰基, 得到化合物 **S18**, 再用亚硝酸钾还原, 得到四号位竖直羟基的化合物 **S19**, 即成功将四号位平伏的羟基转变为竖直键的羟基, 从而转变成 D-岩藻糖构型, 而后在氧化银的中性条件下, 在四号位的羟基上引入苄基, 得到化合物 **S20**。

这种方法尽管能够得到所需的化合物 **S20**, 但是实用性不高, 主要体现在路线步骤太长, 共计有 11 个反应模块, 尤其是在 4-OH 转位和最后一步利用 Ag_2O 上 OBn 基团两步反应产率都不足 50% 上, 以至于该路线总产率不足 2%。

实施例 5:

二糖 **20** 的合成路线为图 6。

如图 6 所示, 二糖 **18** 的合成依靠先前由图 1 路线合成的葡萄糖化合物 **3** 和由图 2 路线合成的 L-岩藻糖化合物 **7** 在路易斯酸 TMSOTf 的催化下完成。随后在甲醇溶液中利用氯化铯水

解掉二糖 **18** 还原端的烯丙基得到 1-OH 二糖化合物 **19**。最后用 2,2,2-三氟-N-苯基亚氨代乙酰氯将 **19** 做成含有 N-苯基-三氟乙酰亚胺酯的二糖供体 **20**。

具体试验操作和步骤:

化合物 **18**: 在氮气保护下将单糖供体 **3** (500 mg, 1.0 mmol) 和糖基受体 **7** (165 mg, 0.52 mmol) 溶于无水 DCM (10 ml), 加入 4Å 分子筛。反应液在室温下搅拌 30 min, 然后冷却至 0°C, 加入 TMSOTf (36 µL, 0.2 mmol)。反应液缓慢回复到室温并继续搅拌 5 h, TLC 检测发现原料反应完全。反应液用三乙胺淬灭, 用饱和碳酸氢钠溶液萃取, 浓缩液经硅胶柱纯化 (石油醚/乙酸乙酯, 2:1) 得到化合物 **18** (300 mg, 0.46 mmol, 88%)。[α]_D²⁰ = 2.3° (c = 1.00, CHCl₃)。¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 7.52 – 6.73 (m, 6H, Ar-H), 5.84 (ddt, J = 16.4, 10.8, 5.6 Hz, 1H, Ally-H), 5.23 (d, J = 17.3 Hz, 1H, Ally-H), 5.17 – 5.05 (m, 3H, Ally-H, 3'-H, 4'-H), 5.03 (t, J = 8.2 Hz, 1H, 2'-H), 4.80 (d, J = 11.3 Hz, 1H, Bn-H), 4.77 (d, J = 7.7 Hz, 1H, 1'-H), 4.46 (d, J = 11.4 Hz, 1H, Bn-H), 4.29 (dd, J = 13.0, 5.0 Hz, 1H, Ally-H), 4.20 (dd, J = 12.3, 4.4 Hz, 1H, 6'-Ha), 4.17 – 4.08 (m, 2H, 6'-Hb, 1-H), 4.00 (dd, J = 13.0, 6.2 Hz, 1H, Ally-H), 3.66 (qd, J = 10.3, 4.9 Hz, 3H, 5'-H, 2-H, 3-H), 3.43 (d, J = 2.5 Hz, 1H, 4-H), 3.35 (d, J = 6.4 Hz, 1H, 5-H), 1.99 (s, 3H, CH₃CO), 1.95 (s, 3H, CH₃CO), 1.92 (s, 3H, CH₃CO), 1.79 (s, 3H, CH₃CO), 1.10 (d, J = 6.3 Hz, 3H, 6-CH₃)。 ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ 170.38, 170.08, 169.04, 168.88, 137.76, 133.47, 128.04, 127.91, 127.52, 117.24, 100.54, 98.46, 79.37, 77.03, 75.44, 74.68, 72.99, 71.87, 71.34, 70.06, 69.76, 68.00, 61.87, 61.62, 20.46, 20.32, 16.50。 HRMS(ESI)m/z calcd for C₃₀H₃₉N₃NaO₁₃ [M+Na]⁺ 672.2375, found 672.2377。

化合物 **19**: 将化合物 **18** (300 mg, 0.46 mmol) 溶于无水甲醇 (23 ml), 随后将反应液加热到 40°C。加入氯化钯 (16 mg), 继续搅拌 1 h, TLC 检测原料反应完全。反应液用 DCM 稀释并用饱和碳酸氢钠萃取, 分离有机相, 浓缩后经硅胶柱 (石油醚/乙酸乙酯, 1:1) 纯化得到化合物 **19** (256 mg, 0.40 mmol, 88%)。[α]_D²⁰ = -7.1° (c = 1.00, CHCl₃)。 ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d)。 -anomer δ 7.35 – 7.22 (m, 5H, Ar-H), 5.23 (d, J = 3.5 Hz, 1H, 1-H), 5.22 – 5.00 (m, 3H, 2'-H, 3'-H, 4'-H), 4.86 – 4.72 (m, 2H, 1'-H, Bn-H), 4.43 (d, J = 11.0 Hz, 1H, Bn-H), 4.38 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 1'-H), 4.28 (dd, J = 10.6, 2.7 Hz, 1H, 3-H), 4.25 – 4.11 (m, 2H, 6'-Hab), 4.11 – 4.02 (m, 1H, 5-H), 3.75 – 3.65 (m, 2H, 2-H, 5'-H), 3.61 (d, J = 2.8 Hz, 1H, 4-H), 2.01 (s, 3H, OAc-Me), 1.97 (s, 3H, OAc-Me), 1.93 (s, 3H, OAc-Me), 1.72 (s, 3H, OAc-Me), 1.10 (d, J = 6.4 Hz, 3H, 6-Me)。 -anomer δ 7.35 – 7.22 (m, 5H, Ar-H), 5.22 – 5.00 (m, 3H, 2'-H, 3'-H, 4'-H), 4.80 (d, J = 11.5 Hz, 1H, Bn-H), 4.47 (d, J = 11.3 Hz, 1H, Bn-H), 4.38 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 1'-H), 4.22 – 4.03 (m, 4H, 6ab-H, 1'-H, 3-H), 3.74 – 3.58 (m, 3H, 2-H, 4-H, 5'-H), 3.51 – 3.41 (m, 1H, 5-H), 2.01 (s, 3H, OAc-Me), 1.97 (s, 3H, OAc-Me), 1.94 (s, 3H, OAc-Me), 1.72 (s, 3H, OAc-Me), 1.10 (d, J = 6.4 Hz, 3H, 6-Me)。 ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.79, 170.69, 170.43, 170.38, 169.33, 169.29, 169.15, 169.05, 137.87, 128.44, 128.39, 128.36, 128.32, 128.24, 128.14, 128.12, 128.00, 127.93, 102.18, 101.52, 98.74, 98.67, 98.65, 96.22, 92.72, 79.54, 79.42, 79.37, 77.37, 77.25, 77.14, 77.05, 76.87, 76.73, 76.48, 75.73, 75.52, 75.17, 75.03, 75.00, 74.96, 74.06, 73.33, 73.23, 73.20, 72.13, 72.10, 71.97, 71.82, 71.56, 70.69, 70.62, 70.40, 68.25, 68.20, 66.62, 63.71, 63.53, 62.05, 61.99, 61.78, 58.93, 43.75, 29.68, 20.71, 20.69, 20.66, 20.58, 20.56, 20.54, 16.78, 16.67, 16.61, 16.57。 HRMS(ESI)m/z calcd for C₂₇H₃₅N₃NaO₁₃ [M+Na]⁺ 632.2062, found 632.2039。

化合物 **20**: 将化合物 **19** (86 mg, 0.14 mmol) 溶于无水 DCM 中并冷却到 0°C。在氩气保护下加入 2,2,2-三氟-N-苯基亚氨代乙酰氯 (0.1 ml) 和 DBU (30 µL)。反应液恢复到室温继续搅拌 20 h。在室温下浓缩后经由硅胶柱纯化 (石油醚/乙酸乙酯, 2.5:1) 得到化合物 **20** (67 mg)。

实施例 6:

三糖 **24** 的合成路线为图 7。

如图 7 所示, 二糖供体 **20** 和单糖受体 **17** 在二氯甲烷, 乙醚和噻吩等溶剂的共同作用下由路易斯酸 TMSOTf 催化得到 1,2-cis 连接的三糖 **21**。用硫代乙酸和吡啶在零度下将 **21** 的叠氮基还原成乙酰氨基化合物 **22**。**22** 葡萄糖基上的 4 个乙酰基在碱性条件下脱除得到化合物 **23**。最后, 用钯碳和氢气脱去所有的芳香基团得到组装有氨基连接臂的绿脓假单胞菌 O11 血清型 O 抗原三糖。

具体试验操作和步骤:

化合物 **21**: 在氩气保护下将二糖供体 **20** (35 mg) 和单糖受体 **17** (45 mg) 溶于无水 DCM (0.9 ml)、乙醚 (0.9 ml) 和噻吩 (0.9 ml) 的混合溶剂中, 加入 4 Å 分子筛, 在室温下搅拌 30 min, 随后冷却至 0°C。加入 TMSOTf, 继续搅拌 8 h, TLC 检测显示糖基供体全部反应完毕。用三乙胺淬灭反应, 用饱和碳酸氢钠萃取, 有机相浓缩后经硅胶柱 (石油醚/乙酸乙酯, 3:1) 和 Sephadex LH-20 凝胶柱 (DCM/MeOH, 1:1) 纯化得到化合物 **21** (37 mg)。 $[\alpha]_D^{20} = -44.5^\circ$ (c = 1.00, CHCl₃)。¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.41 – 7.19 (m, 20H, Ar-H), 5.30 – 5.04 (m, 6H, 2PhCH, 1'-H, 2''-H, 3''-H, 4''-H), 4.83 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, PhCH), 4.77– 4.75 (m, 3H, 2PhCH, 1''-H), 4.55 – 4.50 (m, 2H, NPhCH), 4.42 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, PhCH), 4.33 – 4.21 (m, 1H, 6''-H), 4.18 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, 1-H), 4.07 (m, 2H, 3'-H, 6''-H), 4.00 – 3.88 (m, 1H, linker-OCH), 3.81 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H, 2-H), 3.79 – 3.67 (m, 2H, 5'-H, 5''-H), 3.62 (dd, *J* = 10.7, 3.7 Hz, 1H, 2'-H), 3.53 – 3.26 (m, 6H, linker-OCH, linker-NCH₂, 3-H, 4H, 4'-H), 2.04 (s, 1H, COCH₃), 2.00 (s, 1H, COCH₃), 1.96 – 1.81 (m, 2H, linker-CH₂), 1.80 (s, 1H, COCH₃), 1.30 (d, *J* = 6.7, 3H, 6-CH₃), 1.10 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, 6'-CH₃)。 ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.70, 170.41, 169.22, 168.95, 138.47, 137.94, 137.78, 128.50, 128.44, 128.38, 127.99, 127.96, 127.89, 127.86, 127.77, 127.62, 127.25, 102.44, 100.52, 99.60, 79.20, 79.11, 77.34, 77.22, 77.02, 76.70, 75.31, 75.26, 73.29, 72.29, 71.96, 70.71, 68.03, 67.50, 67.18, 63.61, 61.76, 58.26, 50.90, 49.78, 44.76, 43.68, 29.69, 28.52, 28.09, 23.42, 20.66, 20.59, 16.95, 16.54。 HRMS(ESI)m/z calcd for C₅₈H₆₉N₇NaO₁₈[M+Na]⁺ 1174.4591, found 1174.4626。

化合物 **22**: 将化合物 **21** (30 mg) 溶于干燥吡啶 (0.5 ml) 和硫代乙酸 (0.5 ml) 里。0°C 下搅拌 12 h, 用 TLC 检测原料反应完全, 用甲苯与反应液共沸三次后用硅胶柱纯化 (二氯甲烷/甲醇, 50:1) 得到化合物 **21** (30 mg)。 $[\alpha]_D^{20} = 49.5^\circ$ (c = 1.00, CHCl₃)。 ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.80 – 6.90 (m, 20H, Ar-H), 6.83 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, NHAc-H), 6.18 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, NHAc-H), 5.27 – 5.13 (m, 3H, 3''-H, 2Cbz-H), 5.10 – 4.99 (m, 2H, 1'-H, 4''-H), 4.96 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H, 2''-H), 4.88 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, Bn-H), 4.84 – 4.79 (m, 1H, Bn-H), 4.74 (d, *J* = 15.5 Hz, 2H, Bn-H), 4.63 (d, *J* = 8.0 Hz, 3H, 1''-H, 3-H, 2'-H), 4.41 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, Bn-H), 4.34 – 4.25 (m, 2H, 6''-H, 1-H), 4.25 – 4.13 (m, 1H, 2-H), 4.09 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H, 6''-H), 3.86 (dtt, *J* = 34.7, 10.8, 6.0 Hz, 3H, 5'-H, 4-H, 3'-H), 3.66 (dd, *J* = 9.7, 6.0 Hz, 1H, 5''-H), 3.60 – 3.52 (m, 1H, 3-H), 3.44 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, 5-H, 4'-H), 3.34 – 3.08 (m, 1H, linker-OCH₂-H), 2.87 (dt, *J* = 14.3, 5.0 Hz, 1H, linker-NH₂-H), 2.14 (s, 3H, OAc-Me), 2.09 (s, 3H, NHAc-Me), 2.06 (s, 3H, OAc-Me), 2.00 (s, 3H, OAc-Me), 1.89 (s, 3H, NHAc-Me), 1.80 (s, 3H, OAc-Me), 1.68 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 1.32 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, 6'-Me), 1.17 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 6-Me)。 ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 171.62, 171.05, 170.77, 170.42, 169.28, 168.83, 156.56, 138.81, 138.17, 137.98, 137.35, 136.86, 128.66, 128.55, 128.51, 128.47, 128.36, 128.17, 128.09, 127.96, 127.91, 127.80, 127.76, 127.71, 127.65, 127.50, 127.28, 127.19, 126.35, 101.24, 100.77, 99.67, 80.00, 79.66, 78.94, 77.83, 77.23, 75.05 (d, *J* = 13.2 Hz), 73.18, 72.20, 72.07, 70.73, 68.21, 67.52, 67.33, 65.76, 61.95, 52.22, 49.70, 47.60, 42.47, 31.92, 29.69, 26.87, 23.33, 20.84, 20.58, 20.56, 17.24, 16.73。 HRMS(ESI)m/z calcd for C₅₈H₆₉N₇NaO₁₈[M+Na]⁺ 1206.4998。

化合物 **23**: 将化合物 **22** (22 mg) 溶解于甲醇中 (5 ml) 并加入甲醇钠 (10 mg)。反应液在室温下搅拌 2 h, 用 TLC 检测原料反应完全, 用氢型 Amberlite IR120 树脂中和反应和至 ~7。过滤树脂, 反应液浓缩后经硅胶柱纯化 (二氯甲烷: 甲醇, 10:1) 得到化合物 **23** (18 mg)。

$[\alpha]_D^{20} = -16.3^\circ$ 。 ^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 7.60 – 7.13 (m, 20H), 7.12 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, NHAc-H), 6.69 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, NHAc-H), 5.23 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H, Cbz-H), 5.15 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H, Bn-H), 5.05 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H, Cbz-H), 4.96 – 4.83 (m, 2H, 1'-H, Bn-H), 4.79 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H, Bn-H), 4.72 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, Bn-H), 4.66 – 4.49 (m, 2H, Bn-H, 2'-H), 4.36 (s, 1H, OH-H), 4.28 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, 2A-H), 4.22 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, Bn-H), 4.03 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, 1''-H, NCH₂-H), 4.00 – 3.84 (m, 4H, 3'-H, 1-H, 6''-H, OCH₂-H), 3.72 (dd, $J = 12.5, 6.1$ Hz, 1H, 6''-H), 3.64 (q, $J = 6.7$ Hz, 1H, 5-H), 3.42 (ddd, $J = 26.0, 12.9, 5.7$ Hz, 4H, 5-H, 2''-H, 3''-H, 4''-C), 3.33 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, 3-H), 3.31 – 3.19 (m, 2H, 4'-H, 5''-C), 3.15 (td, $J = 9.7, 4.0$ Hz, 1H, OCH₂-H), 2.88 – 2.74 (m, 2H, NH₂-H), 2.09 (s, 3 H, NHAc-Me), 1.96 (s, 3H, NHAc-Me), 1.72 – 1.57 (m, 2H, linker-CH₂), 1.32 (s, $J = 6.4$, 3H, 6-Me), 1.03 (s, $J = 6.3$, 3H, 6-Me)。 ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.97, 172.65, 156.77, 138.85, 138.64, 137.11, 136.82, 128.75, 128.60, 128.38, 128.14, 128.05, 127.64, 127.50, 127.34, 127.26, 127.07, 101.41, 99.87, 82.13, 79.54, 77.36, 77.04, 76.72, 76.31, 75.31, 74.62, 74.34, 74.14, 72.82, 71.70, 70.92, 67.67, 67.56, 65.55, 62.61, 52.00, 49.50, 48.11, 42.01, 29.72, 26.65, 23.53, 17.50, 16.75。HRMS(ESI) m/z calcd for C₆₂H₇₇N₃NaO₂₀ [M+Na]⁺ 1038.4570, found 1038.4538。

化合物 **24**: 将化合物 **23** (12 mg) 溶于甲醇 (3ml)、二氯甲烷 (1 ml) 和水 (1 ml) 的混合溶剂, 并加入两滴冰乙酸, 随后加入钯碳 (10 mg)。反应在 BLT-2000 中压氢化仪中进行, 氢气压力为 0.4 MPa, 反应时间 12 h。待反应结束后反应液用硅藻土过滤, 浓缩后经 CHROMAFIX C₁₈ ec 纯的得到化合物 **24** (7 mg)。 ^1H NMR (400 MHz, Deuterium Oxide) δ 5.03 (s, 1H, 1'-H), 4.51 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, 1''-H), 4.37 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, 1-H), 4.17 (s, 1H, 2'-H), 4.07 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H, 5'-H), 4.02 (s, 1H, 3'-H), 3.99 – 3.86 (m, 4H, 2-H, 4'-H, 6''-H, OCH₂-H), 3.80 – 3.75 (m, 1H, 5-H), 3.67 (ddt, $J = 16.6, 10.9, 6.0$ Hz, 3H, 3-H, 6''-H, OCH₂-H), 3.46 (m, 2H, 3''-H, 5''-H), 3.34 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H, 4''-H), 3.26 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H, 2''-H), 3.05 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, NCH₂-H), 2.00 (s, 3H, NHAc-Me), 1.98 (s, 3H, NHAc-Me), 1.91 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH₂-H), 1.23 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, 6-Me), 1.21 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, 6'-Me)。 ^{13}C NMR (101 MHz, Deuterium Oxide) δ 174.35, 101.49, 100.22, 98.89, 76.54, 76.00, 75.46, 74.78, 72.81, 71.31, 70.63, 70.33, 69.63, 69.60, 68.39, 67.88, 66.88, 60.84, 51.31, 47.88, 37.60, 26.64, 22.20, 22.17, 15.39, 15.29。HRMS(ESI) m/z calcd for C₂₅H₄₅N₃NaO₁₄ [M+Na]⁺ 634.2794, found 634.2789。

实施例 7: 考察溶剂对三糖 **24** 中顺式糖苷键构建的影响

利用糖环 C-2 位酰基辅助下的邻基参与效应, 高效率的构建 1,2-反式糖苷键已成为糖化学中较为成熟的方法, 而 2-位乙酰基作为糖化学保护策略中最易得、最有效的保护剂, 一般被优先考虑, 例如在本专利中化合物 **18** 的合成。然而对于 1,2-顺式反应, 目前还没有成熟的方法。参照实施例 6, 其他条件不变, 改变溶剂组分, 产物构型结果见表 1。

表 1 不同溶剂构建糖苷键的结果

溶剂	无水二氯甲烷 (3.0 ml)	无水二氯甲烷/乙醚 (1.5 ml+1.5ml)	无水二氯甲烷/乙醚/噻吩 (1 ml+1 ml+ 1 ml)
产物	$\alpha/\beta=1.2: 1$	$\alpha/\beta=6: 1$	100% α 构型

由表 1 可知, 1,2-顺式糖苷键构建受溶剂影响很大, 其中以无水二氯甲烷/乙醚/噻吩混合溶剂效果最佳, 可以达到均一 α 构型产物, 反应立体选择性可达 100%。

实施例 8: 乙酰基组装时机对于糖链合成的影响

分别在单糖阶段对乙酰氨基进行组装, 得到乙酰氨基二糖供体 **S21** 和乙酰氨基受体 **S22**。以此开展糖苷化反应未能顺利完成目标三糖 **S23** 的合成, 分析原因为供体二糖还原端 2 号位乙酰氨基被活化后形成稳定的噁唑啉环中间体, 限制了糖苷化反应的进行。上述结果表明以非参与性的叠氮基作为乙酰氨基前体, 将有利于提高目标寡糖合成的反应性和立体选择性。

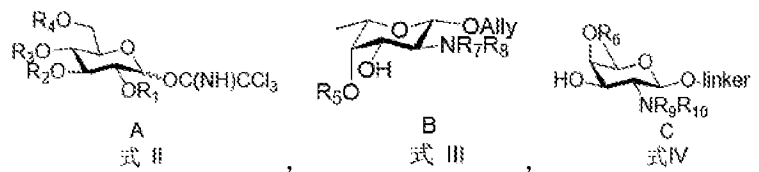
虽然本发明已以较佳实施例公开如上, 但其并非用以限定本发明, 任何熟悉此技术的人, 在不脱离本发明的精神和范围内, 都可做各种的改动与修饰, 因此本发明的保护范围应该以

权利要求书所界定的为准。

权 利 要 求 书

1、一种绿脓假单胞菌 O11 血清型 O 抗原三糖的合成方法，其特征在于，所述方法包括：利用 D-葡萄糖砌块、L-岩藻糖胺砌块、D-岩藻糖胺砌块构建 O 抗原三糖；其中，D-葡萄糖砌块或 L-岩藻糖胺砌块与 D-岩藻糖胺砌块通过 1,2- α -顺式-糖苷键连接，D-葡萄糖砌块与 L-岩藻糖胺砌块通过 1,2- β -反式糖苷键连接，所述 1,2- α -顺式-糖苷键的构建是在混合溶剂中进行的；所述混合溶剂包括二氯甲烷、乙醚、噻吩中的两种或两种以上。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述 D-葡萄糖砌块的化学结构如式 II 所示，L-岩藻糖胺砌块的化学结构式如式 III 所示，D-岩藻糖胺砌块的化学结构式如式 IV 所示，



其中，linker 包括 $-(CH_2)_n-N-Y_1Y_2$ ，或者 $O-(CH_2)_n-SY_1(Y_2)$ ，或者 $O-(CH_2)_n-N_3$ ， $n=1\sim 10$ ； Y_1 为氢 (H) 或者苄基 (Bn)； Y_2 为氢 (H) 或者苄甲氧羰基 (Cbz)；

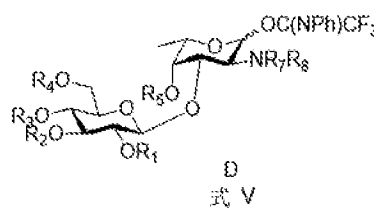
R_1 包括但不限于氢 (H)、酯基、乙酰基 (Ac)、苯甲酰基 (Bz)、新戊酰基 (Piv)、氯乙酰基 (ClAc)、乙酰丙酰基 (Lev)、烯丙羰基 (Alloc)；

R_2, R_3, R_4 为氢 (H) 或者酯基、醚基包括但不限于乙酰基 (Ac)、苯甲酰基 (Bz)、新戊酰基 (Piv)、氯乙酰基 (ClAc)、乙酰丙酰基 (Lev)、烯丙羰基 (Alloc) 以及苄基 (Bn)、对甲氧基苄基 (pMBn)、烯丙基 (All)、三苯甲基 (Tr)、单甲氧基三苯甲基 (Mmt) 和硅醚类基团基团；

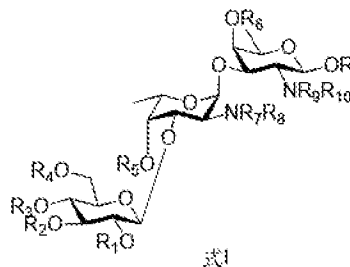
R_5, R_6 包括但不限于氢 (H)、醚类基团、苄基 (Bn)、对甲氧基苄基 (pMBn)、烯丙基 (All)、三苯甲基 (Tr)、单甲氧基三苯甲基 (Mmt) 和硅醚类基团基团；

R_7, R_8, R_9, R_{10} 包括氢 (H)、氮 (N) 或者乙酰基 (Ac)。

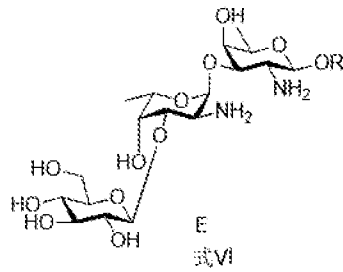
3、根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，所述方法包括利用 D-葡萄糖砌块和 L-岩藻糖胺砌块合成二糖片段，其化学结构如式 V 所示，



4、根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述方法包括利用二糖片段与 D-岩藻糖胺砌块合成三糖片段，其化学结构式如式 I 所示，



5、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述方法包括预先合成 O 抗原三糖前体，还原即得 O 抗原三糖，所述 O 抗原三糖前体的化学结构式为式 VI，



6、根据权利要求 1-5 任一所述的方法，其特征在于，所述方法是利用葡萄糖合成得到 D-岩藻糖胺，包括：以 3,4,6-O-三乙酰基甘露糖烯为原料，经过叠氮化物、硒试剂得到 1-硒苯-2 叠氮葡萄糖，脱除乙酰基，然后 6-C 进行甲基化，最终得到 D-岩藻糖胺类化合物。

7、一种组装有氨基连接臂的绿脓假单胞菌的 O11 血清型 O 抗原三糖化合物，其特征在于，所述化合物是利用权利要求 1-6 任一所述方法制备得到的。

8、一种糖-蛋白缀合物的制备方法，其特征在于，所述方法是包含绿脓假单胞菌的 O11 血清型 O 抗原三糖，所述绿脓假单胞菌的 O11 血清型 O 抗原三糖的制备方法为权利要求 1-6 任一所述的方法。

9、权利要求 1-6 所述合成方法在开发或制备绿脓假单胞菌疫苗或者绿脓假单胞菌感染导致的疾病的药物中的应用。

10、权利要求 7 所述化合物或者权利要求 8 所述的糖-蛋白缀合物的制备方法在开发或制备绿脓假单胞菌疫苗或者绿脓假单胞菌感染导致的疾病的药物中的应用。

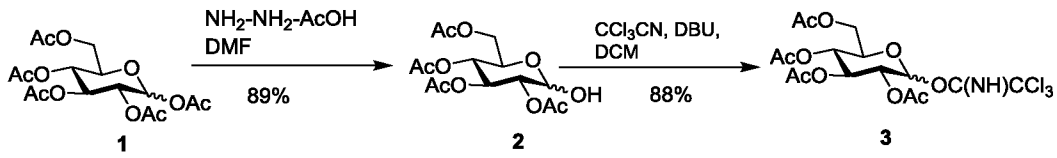


图 1

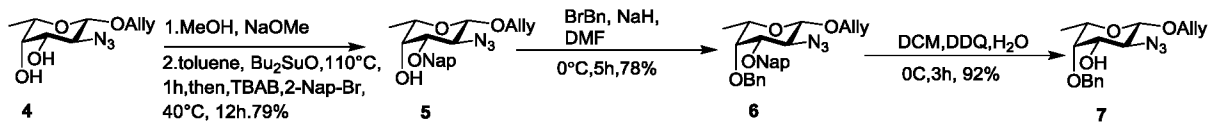


图 2

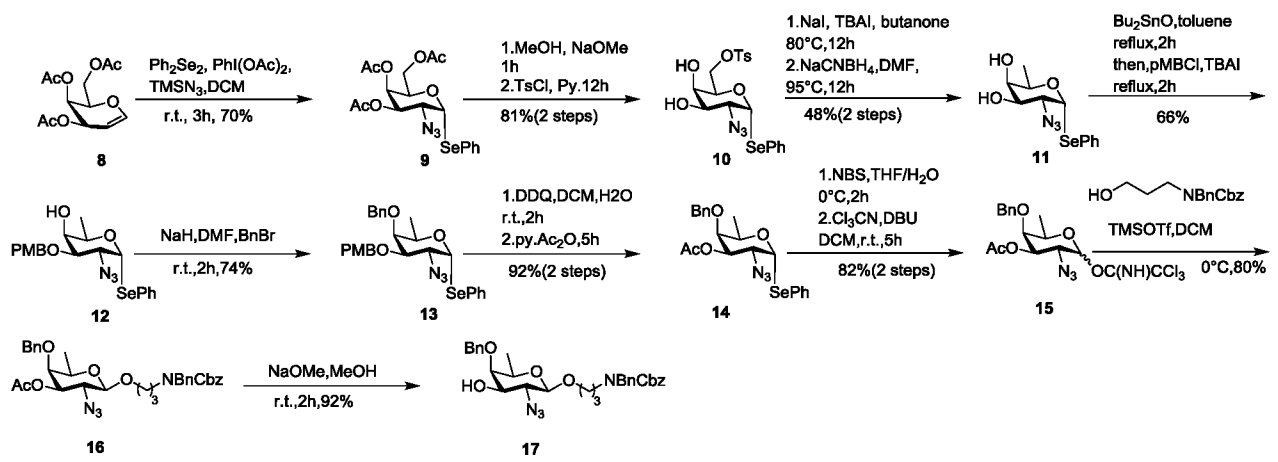


图 3

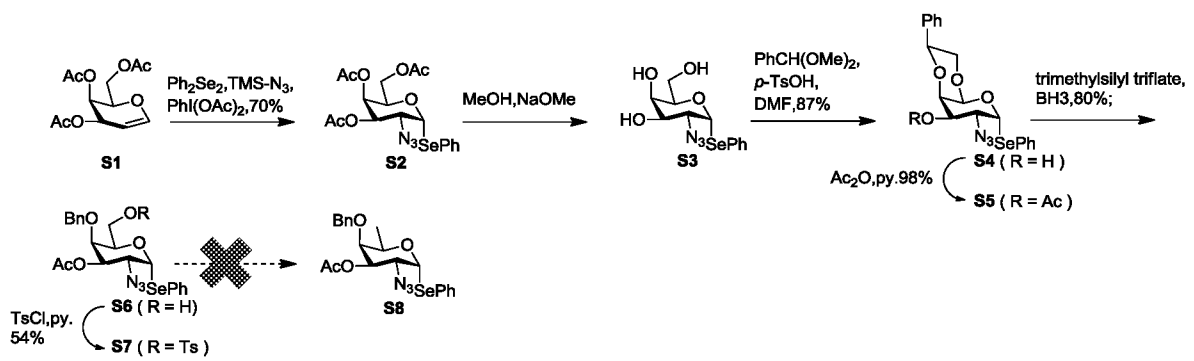


图 4

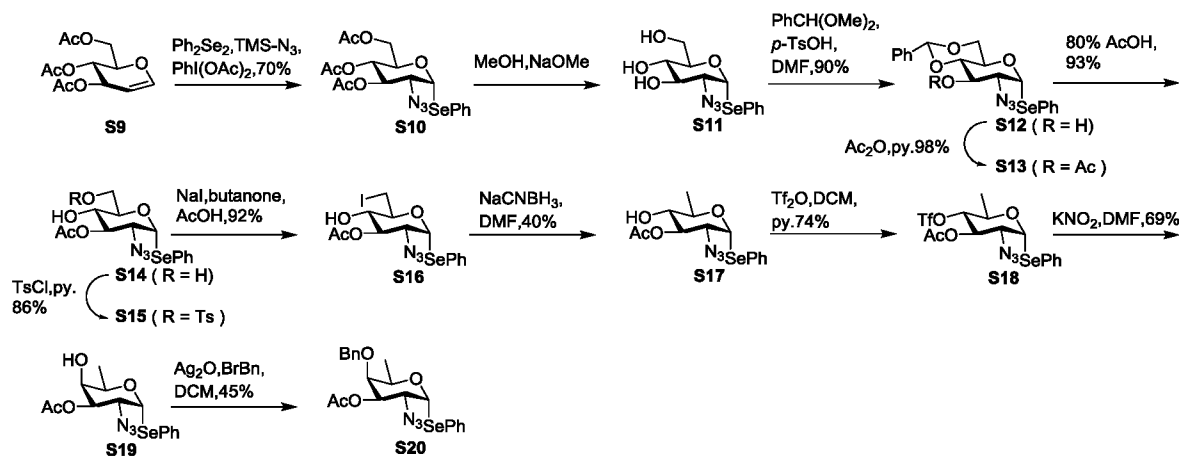


图 5

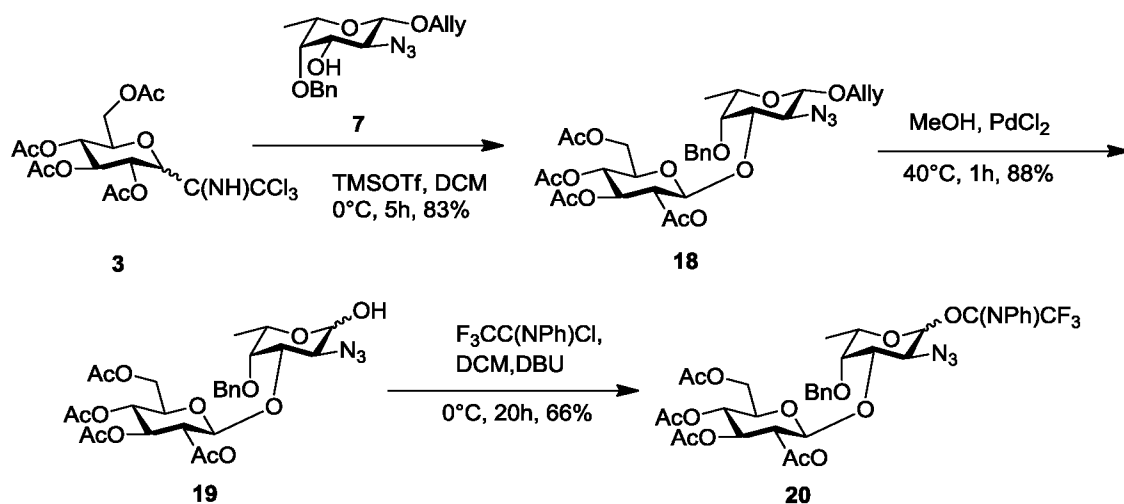
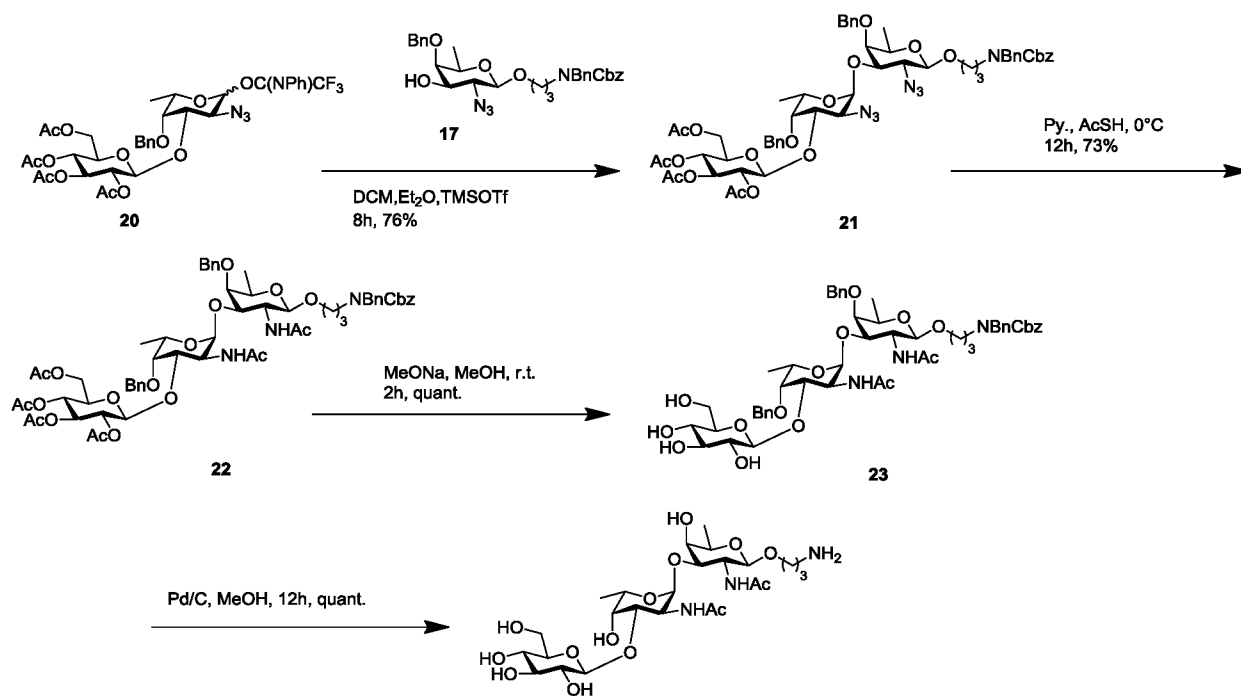


图 6



24

图 7

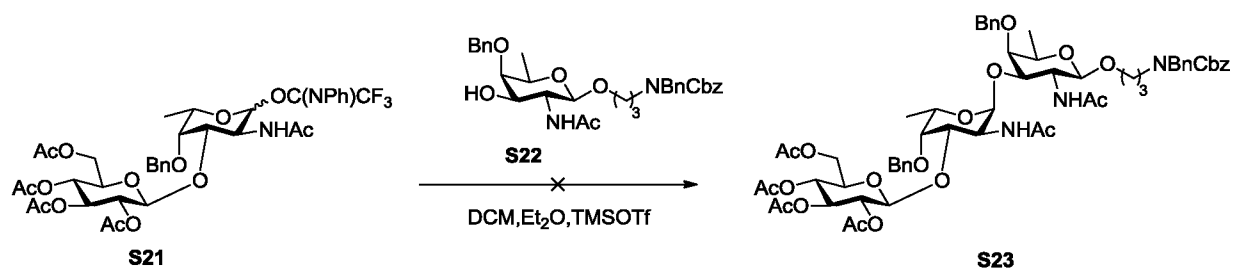


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/119584

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H 15/04(2006.01)i; C07H 1/00(2006.01)i; C07K 2/00(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H; C07K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; DWPI; SIPOABS; CJFD; CNKI; CNTXT; USTXT; WOTXT; EPTXT; STN-REGISTRY; STN-CAPLUS; PATENTICS; 超星读秀; DUXIU, ISI-Web of Science: 江南大学, 尹健, 胡静, 刘中华, 秦春君, 绿脓假单胞菌, 绿脓菌, 抗原, 三糖, 疫苗, 感染, *Pseudomonas pyocyaneum*, antigen, Ag, trisaccharide, trisaccharose, vaccine, infection**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 109627270 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 16 April 2019 (2019-04-16) claims 1-10	1-10
Y	D'AMBRA, A. J. et al. "Analysis by the Reductive-cleavage Method of a Polysaccharide Containing 2-acetamido-2, 6-dideoxy-D and -L-galactopyranosyl Residues" <i>Carbohydrate Research</i> , Vol. 251, 03 January 1994 (1994-01-03), ISSN: 0008-6215, p. 128, lines 12-16	1-10
Y	CN 108558961 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 21 September 2018 (2018-09-21) description, paragraphs [0221]-[0224], and figure 23	1-10
Y	QIN, Chunjun et al. "Total Synthesis of a Densely Functionalized Plesiomonas Shigelloides Serotype 51 Aminoglycoside Trisaccharide Antigen" <i>Journal of the American Chemical Society</i> , Vol. 140, No. 8, 29 January 2018 (2018-01-29), ISSN: 1520-5126, page 3122, Scheme 2	6-10
A	CN 107709343 A (MAX PLANCK SOCIETY FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE) 16 February 2018 (2018-02-16) entire document	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 January 2020

Date of mailing of the international search report

19 February 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/119584

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109627270	A	16 April 2019	None			
CN	108558961	A	21 September 2018	CN	108558961	B	06 August 2019
				WO	2019144508	A1	01 August 2019
				US	2019233459	A1	01 August 2019
CN	107709343	A	16 February 2018	US	2018296687	A1	18 October 2018
				WO	2016198170	A8	27 April 2017
				EP	3303357	A1	11 April 2018
				WO	2016198170	A1	15 December 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/119584

A. 主题的分类 C07H 15/04(2006.01)i; C07H 1/00(2006.01)i; C07K 2/00(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																	
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07H; C07K; A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS;DWPI;SIP0ABS;CJFD;CNKI;CNTXT;USTXT;WOTXT;EPTXT;STN-REGISTRY;STN-CAPLUS;PATENTICS;超星读秀;ISI-Web of Science;江南大学, 尹健, 胡静, 刘中华, 秦春君, 绿脓假单胞菌, 绿脓菌, 抗原, 三糖, 疫苗, 感染, <i>Pseudomonas pyocyaneum</i> , antigen, Ag, trisaccharide, trisaccharose, vaccine, infection																	
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 109627270 A (江南大学) 2019年 4月 16日 (2019 - 04 - 16) 权利要求1-10</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>D' AMBRA, Anello J. 等. "Analysis by the Reductive-cleavage Method of a Polysaccharide Containing 2-acetamido-2, 6-dideoxy-D and -L-galactopyranosyl Residues" Carbohydrate Research, 第251卷, 1994年 1月 3日 (1994 - 01 - 03), ISSN: 0008-6215, 第128页第12-16行</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 108558961 A (江南大学) 2018年 9月 21日 (2018 - 09 - 21) 说明书第[0221]-[0224]段, 说明书附图23</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>QIN, Chunjun 等. "Total Synthesis of a Densely Functionalized Plesiomonas Shigelloides Serotype 51 Aminoglycoside Trisaccharide Antigen" Journal of the American Chemical Society, 第140卷, 第8期, 2018年 1月 29日 (2018 - 01 - 29), ISSN: 1520-5126, 第3122页 Scheme 2</td> <td>6-10</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 109627270 A (江南大学) 2019年 4月 16日 (2019 - 04 - 16) 权利要求1-10	1-10	Y	D' AMBRA, Anello J. 等. "Analysis by the Reductive-cleavage Method of a Polysaccharide Containing 2-acetamido-2, 6-dideoxy-D and -L-galactopyranosyl Residues" Carbohydrate Research, 第251卷, 1994年 1月 3日 (1994 - 01 - 03), ISSN: 0008-6215, 第128页第12-16行	1-10	Y	CN 108558961 A (江南大学) 2018年 9月 21日 (2018 - 09 - 21) 说明书第[0221]-[0224]段, 说明书附图23	1-10	Y	QIN, Chunjun 等. "Total Synthesis of a Densely Functionalized Plesiomonas Shigelloides Serotype 51 Aminoglycoside Trisaccharide Antigen" Journal of the American Chemical Society, 第140卷, 第8期, 2018年 1月 29日 (2018 - 01 - 29), ISSN: 1520-5126, 第3122页 Scheme 2	6-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
PX	CN 109627270 A (江南大学) 2019年 4月 16日 (2019 - 04 - 16) 权利要求1-10	1-10															
Y	D' AMBRA, Anello J. 等. "Analysis by the Reductive-cleavage Method of a Polysaccharide Containing 2-acetamido-2, 6-dideoxy-D and -L-galactopyranosyl Residues" Carbohydrate Research, 第251卷, 1994年 1月 3日 (1994 - 01 - 03), ISSN: 0008-6215, 第128页第12-16行	1-10															
Y	CN 108558961 A (江南大学) 2018年 9月 21日 (2018 - 09 - 21) 说明书第[0221]-[0224]段, 说明书附图23	1-10															
Y	QIN, Chunjun 等. "Total Synthesis of a Densely Functionalized Plesiomonas Shigelloides Serotype 51 Aminoglycoside Trisaccharide Antigen" Journal of the American Chemical Society, 第140卷, 第8期, 2018年 1月 29日 (2018 - 01 - 29), ISSN: 1520-5126, 第3122页 Scheme 2	6-10															
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																	
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件																	
国际检索实际完成的日期 2020年 1月 7日		国际检索报告邮寄日期 2020年 2月 19日															
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 吕世华 电话号码 (86-512) 88996878															

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 107709343 A (马克斯 普朗克科学促进学会) 2018年 2月 16日 (2018 - 02 - 16) 全文	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/119584

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	109627270	A	2019年 4月 16日	无	
CN	108558961	A	2018年 9月 21日	CN	108558961 B 2019年 8月 6日
				WO	2019144508 A1 2019年 8月 1日
				US	2019233459 A1 2019年 8月 1日
CN	107709343	A	2018年 2月 16日	US	2018296687 A1 2018年 10月 18日
				WO	2016198170 A8 2017年 4月 27日
				EP	3303357 A1 2018年 4月 11日
				WO	2016198170 A1 2016年 12月 15日