

## 肿瘤相关抗原 T<sub>n</sub> 及其低聚体的合成 \*

章国林 胡永洲(杭州 310031 浙江大学药学院药物化学教研室)

**摘要** 目的:展示肿瘤相关抗原 T<sub>n</sub> 及其低聚体合成的进展。方法:查阅国内外文献,概括肿瘤相关抗原 T<sub>n</sub> 及其低聚体合成的方法。结果:肿瘤相关抗原 T<sub>n</sub> 是由糖基供体与保护丝氨酸(苏氨酸)缩合,去保护基后而得,T<sub>n</sub> 抗原低聚体通过 T<sub>n</sub> 的逐步缩合或直接缩合而得。结论:肿瘤相关抗原 T<sub>n</sub> 及其低聚体的合成是肿瘤疫苗研究中的一个热点。

**关键词** T<sub>n</sub> 抗原;合成;低聚体

### Synthesis of tumor associated antigen T<sub>n</sub> and its oligomers

Zhang Guolin( Zhang GL), Hu Yongzhou( Hu YZ) ( Dept of Medicinal Chemistry School of Pharmaceutical Science Zhejiang University, Hangzhou 310031)

**ABSTRACT OBJECTIVE:** To show the new synthetic methods of tumor associated antigen T<sub>n</sub> and its oligomers.

**METHOD:** Consulting the literatures at home and abroad, the synthetic methods of T<sub>n</sub> and its oligomers were reviewed.

**RESULTS:** Tumor associated antigen T<sub>n</sub> was synthesized by condensation of glycosyl donors with protected serine (threonine) and removal of the protecting groups from both compounds. Oligomeric T<sub>n</sub> was synthesized by direct or indirect condensation of T<sub>n</sub>. **CONCLUSION:** The synthesis of tumor associated antigen T<sub>n</sub> and its oligomers is a hot field in the research of tumor vaccines.

**KEY WORDS** T<sub>n</sub> antigen, synthesis oligomer

细胞生物和生物化学研究表明糖蛋白在细胞识别和调节细胞生长方面具有重要作用。正常细胞和不受控制的生长肿瘤细胞在细胞膜上的糖脂和糖蛋白分布不同。肿瘤细胞膜的糖蛋白被认为是肿瘤相关抗原(tumor associated antigens), Thomsen-Friedensreich 即 T 抗原(Galβ1 → 3 GalNAcα1 → O-Ser/Thr), T 抗原的前体 T<sub>n</sub> 抗原(GalNAcα1 → O-Ser/Thr), sialosyl-T<sub>n</sub> 抗原(NeuAcα2 → 6 GalNAcα1 → O-Ser/Thr)已被证实为肿瘤相关抗原。其结构见图1。其中 T<sub>n</sub> 抗原在肿瘤粘蛋白中表达,在正常细胞中,T<sub>n</sub> 抗原是隐蔽的,细胞恶变时,其糖膜可发生不完全糖基化或新糖基化,导致抗原暴露于表面。T<sub>n</sub> 抗原对肿瘤具特异性,并且在正常细胞和组织中的表达具约束性。研究<sup>[1]</sup>表明蛋白质骨架结构中的 T<sub>n</sub> 抗原具有细胞免疫性和抑制肿瘤的能力。因此,T<sub>n</sub> 抗原的化学合成对研究免疫调节作用机制和开发新型的肿瘤疫苗具有重要意义。

T<sub>n</sub> 抗原的化学合成一般分二部分,首先分别合成

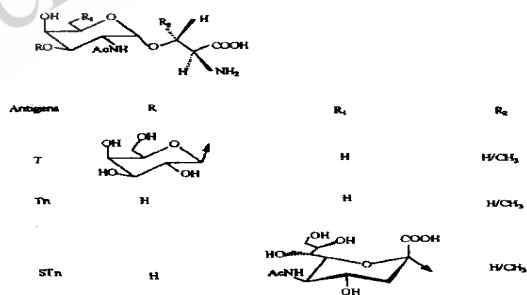


图1

糖基供体及相应的丝氨酸(苏氨酸)衍生物,进而缩合,去保护基而得。由于 T<sub>n</sub> 抗原 O-糖苷键相当于缩醛结构,具有缩醛的化学敏感性,遇到酸会被切断或端基异构化,O-糖苷键对碱也敏感,中等强度的碱可以通过糖的β-消除反应使糖肽分解。强亲核性试剂也会切断糖苷键或使其异构化。因此,进行 T<sub>n</sub> 合成时,就必须选

\* 浙江省教委资助项目

择温和的保护及去保护方法,温和的缩合方法。

## 1 糖基供体的合成

Kaifu 等首先报道了合成 Tn 抗原的脱氧半乳糖衍生物(1)。合成路线见图 2。

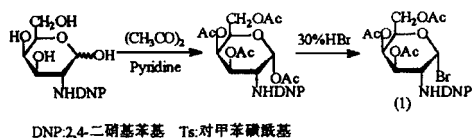


图 2

Le mieu 等用半乳糖为原料合成 2-迭氮-2-脱氧-3,4,6-三乙酰基-1-卤-半乳糖及 2-迭氮-2-脱氧-3,4,6-三乙酰基-1-羟基半乳糖。见图 3。

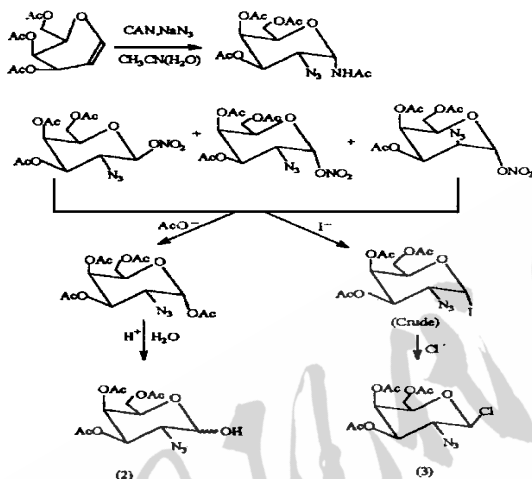


图 3

Nalcker 等对上述方法进行改进,合成了 2-迭氮-2-脱氧-3,4,6-三苄基-1-羟基半乳糖(4),合成路线见图 4。此方法通过一步简单的柱层析和重结晶加以纯化,比较简单、经济。

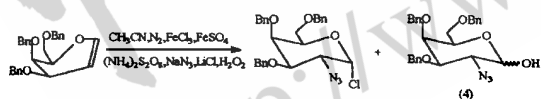


图 4

Czernecki<sup>[2]</sup>等用硒试剂合成化合物(2)和(4),产率较高,从半乳糖开始分别为 80%和 60%。

Marra 等<sup>[3]</sup>用硫代试剂合成化合物(4)。除图 2 外,上述合成方法都先在半乳糖的 2 位引入迭氮基,1 位引入羟基或卤原子。引入的迭氮基先不还原成 NH<sub>2</sub>,待糖苷键形成后再还原,这样不会影响与丝氨酸(苏氨酸)衍生物的缩合反应。

## 2 Tn 抗原的合成

GalNAc 和 Ser/Thr 侧链羟基之间的糖苷键的缩合有以下几种方法。

### 2.1 Koenigs-Knorr 及其改良法 使用的重金属催化

剂多为银或汞盐,如 Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, AgClO<sub>4</sub>(图 5)<sup>[9]</sup>, Hg(CN)<sub>2</sub>(图 6)<sup>[4]</sup>等,生成的 O-糖肽键的构型不仅受催化剂种类的影响,还受异头碳卤原子反应活性、保护剂类型及糖 2-位基团的影响。活性最强催化剂是 AgClO<sub>4</sub> 或 AgSO<sub>3</sub>CF<sub>3</sub>。图 7<sup>[6]</sup>的缩合未用重金属催化剂,但反应时间较长,长达 5 d。

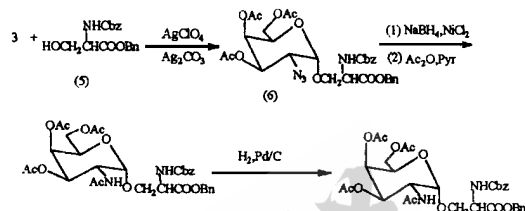


图 5

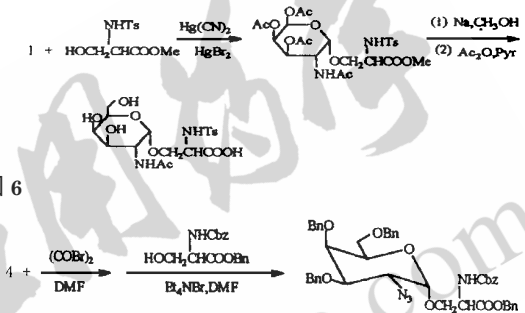


图 6

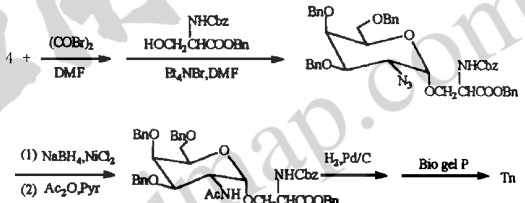


图 7

图 5 和图 7 先在 2 位引入迭氮基,迭氮基转化成 Tn 中的 -NHAc,可用以下方法<sup>[4]</sup>:用 NaBH<sub>4</sub>-NiCl<sub>2</sub>, Lindler 催化剂,硫化氢的吡啶水溶液将 -N<sub>3</sub> 选择性地还原成氨基,然后与醋酸酐反应生成 -NHAc;也可用硫代醋酸,二甲基苯基磷和醋酸将 -N<sub>3</sub> 直接变成 -NHAc。糖的保护基基用氢化催化脱去。半乳糖的乙酰基保护基用 Na 和甲醇溶液,水合肼和甲醇溶液,饱和甲醇氨溶液等<sup>[6]</sup>方法脱去。

2.2 EEDQ 法 EEDQ(2-乙氧基-1,2-二氧喹啉-1-甲酸乙酯)是一种有效和温和的缩合剂,缩合过程中生成喹啉不影响 O-糖苷键。利用此法合成了含有 Tn 抗原的低级肽<sup>[12]</sup>,见图 8。

2.3 三氟乙酰亚胺酯法 半乳糖的 1-O-三氟乙酰亚胺酯在 BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> 或 AgSO<sub>3</sub>CF<sub>3</sub> 催化下与 Ser/Thr 的侧链羟基可以形成 O-糖肽键。见图 9<sup>[7]</sup>。然后与图 5 和图 7 相同合成 Tn 抗原。

### 3 Tn 抗原低聚体的合成

文献<sup>[8]</sup>报道:与抗体结合所需要的 Tn 抗原的最小结构单位不是单体,而是低聚体。因此,Tn 抗原低聚体

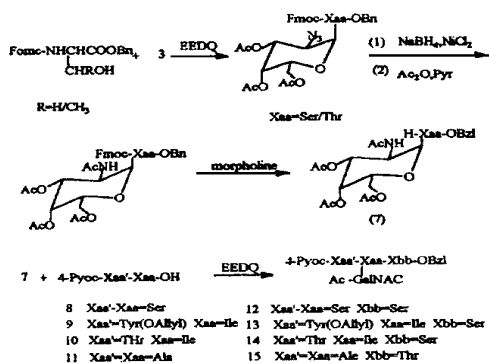


图 8

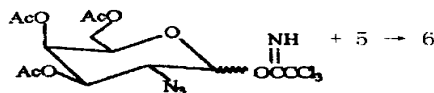


图 9

对诱导有效的免疫应答是非常重要的。Tn 抗原低聚体的合成有以下几种方法。

3.1 逐步缩合法 其合成途径是将 Tn 抗原逐个合成上去<sup>[8-10]</sup>。

从 16 开始,可以分别合成连有间隔基团的单体,二聚体,三聚体 Tn 抗原(图 10)<sup>[8]</sup>。由于 Tn 抗原的体积较大,所以必须设置间隔基团以消除 Tn 抗原之间的空间阻碍。为此,用 N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)酯法可将间隔基团 4-氨基丁酸连到被保护的 Tn 抗原上,得到的 18 经酸解,由-NHBoc 变成-NHAc, O-脱乙酰基后得单体 Tn 抗原。二聚体 Tn 抗原的合成有以下步骤:①将 18 酸解以暴露氨基;②然后与 17 缩合得二聚体前体,以后各步与合成单体 Tn 抗原相同,这样可合成二聚体 Tn 抗原。同样方法可合成三聚体 Tn 抗原。

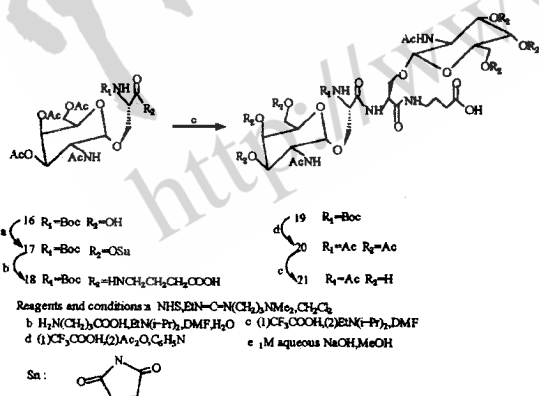


图 10

3.2 直接缩合法 直接缩合法是先合成要缩合的片断,然后将其直接缩合<sup>[7,10,11]</sup>。如先合成含有 Tn 抗原的片断,在 EEDQ 存在下与另一含有 Tn 抗原的片断缩合<sup>[6]</sup>,然后脱去保护剂。或用逐步缩合法先合成 Tn 抗

原低聚体,然后与其它化合物直接缩合。由于 Tn 抗原低聚体在赖氨酰赖氨酸架上可形成三元配合物。为此先合成 Tn 抗原低聚体,然后与赖氨酰赖氨酸中的三个氨基连接。由于赖氨酰赖氨酸的三个氨基间隔较远,所以不必象图 10 那样使用间隔基,赖氨酰赖氨酸的一个羧基可用于与载体分子结合。直接缩合法的优点是:可避免逐步缩合法中加及去保护剂时对 O-糖苷键的影响。

除了上述方法外,还有固相合成法<sup>[12]</sup>等。

#### 4 结 语

当 Tn 抗原与载体蛋白结合或加免疫佐剂后具有较强的细胞免疫性和抑制肿瘤的能力,可阻止肿瘤的生长、扩散和复发;而且细胞免疫应答比体液免疫应答对治疗肿瘤更有效。因此合成 Tn 及含 Tn 抗原的肿瘤疫苗的研究成为肿瘤疫苗研究中的一个热点<sup>[13-15]</sup>。

#### 参考文献

- 1 Singhal A, Fohn M, Hakomori S. Induction of  $\alpha$ -N-acetylgalactosamine O-serine/threonine (Tn) antigen-mediated cellular immune response for active immunotherapy in mice. *Cancer Res*, 1991, 51: 1406.
- 2 Czernecki S, Ayadi E. Preparation of diversely protected 2-azido-2-deoxyglycopyranoses from glycals. *Can J Chem*, 1995, 73: 343.
- 3 Marra A, Gauffeny F, Sinay P. A novel class of glycosyl donors: anomeric S-xanthates of 2-azido-2-deoxy-D-galactopyranosyl derivatives. *Tetrahedron*, 1991, 47 (28): 5149.
- 4 许家喜,杨俊海.糖肽的合成. *化学通报*, 1998, 3: 22.
- 5 Sjolín P, Elofsson M, Kihlberg J. Removal of protective groups from glycopeptides: base does not epimerize peptide stereocenters, and  $\beta$ -elimination is slow. *J Org Chem*, 1996, 61: 560.
- 6 Kunz H, Birnbach S, Werning P. Synthesis of glycopeptide with the Tn and T antigen structure, and their coupling to bovine serum albumin. *Carbohydr Res*, 1990, 202: 207.
- 7 Toyokuni T, Dean B, Hakomori S. Synthetic vaccines: 1. synthesis of multivalent antigen cluster-lysyllysine conjugates. *Tetrahedron Lett*, 1990, 31: 2673.
- 8 Toyokuni T, Dean B, Cai S, et al. Synthetic vaccines: synthesis of a dimeric Tn antigen-lipo-peptide conjugate that elicits immune responses against Tn-expressing glycoproteins. *J Am Chem Soc*, 1994, 116: 395.
- 9 Kim JM, Roy R. Oligomeric glycopeptidomimetics bearing the cancer related Tn antigen. *Tetrahedron Lett*, 1997, 38 (20): 3487.

- 10 Bay S, Richard C. A possible approach to a synthetic carbohydrate vaccine. *J Pept Res*, 1997, 49(6): 620.
- 11 Roy R, Kim JM. Self-assembling glycodendrimers of biological significance: a comparison study of synthesis cancer. *Polym Mater Sci Eng*, 1997, 77: 195.
- 12 Bielfeldt T, Peters S, Meldal M, *et al*. A new strategy for solid phase synthesis of O-glycopeptides. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1992, 31(7): 857.
- 13 Cao Y, Stosiel P, Springer GF, *et al*. Thomsen-Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study. *Histochem Cell Biol*, 1996, 106(2): 197.
- 14 Rodenberg SA. Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens. *Immunol Today*, 1997, 18(4): 175.
- 15 Coulie PG. Human tumor antigens recognized by T cells: new perspectives for antigen-cancer vaccines?. *Mol Med Today*, 1997, 3(6): 261.

收稿日期: 1999 - 01 - 18