行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

噻吩組成雜環化合物之合成及應用研究(2/3)
期中進度報告(精簡版)

計 畫 類 別 ：個別型
計 畫 編 號 ：NSC 95-2113-M-002-007-
執 行 期 間 ：95 年 08 月 01 日至 96 年 07 月 31 日
執 行 單 位 ：國立臺灣大學化學系暨研究所

計 畫 主 持 人 ：方俊民

報 告 附 件 ：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處 理 方 式 ：期中報告不提供公開查詢

中 華 民 國 96 年 05 月 10 日

國科會期中精簡報告
計畫編號：95-2113-M-002-007
計畫名稱：僿吩組成雜環化合物之合成及應用研究(2/3)
計畫主持人：方俊民
執行起迄：2006/08/01 ~ 2007/07/31
執行單位：台灣大學化學系

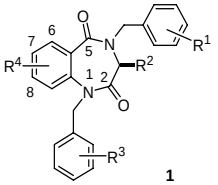
方俊民教授研究室成果暨博士班學生進度報告

一、成果報告

Period: August 1, 2006 to April 30, 2007

1-1. Practical Synthesis of Potential Endothelin Receptor Antagonists of 1,4-Benzodiazepine-2,5-dione Derivatives Bearing Substituents at the C_3-, N_1- and N_4-Positions. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 510–518.

Various 1,4-benzodiazepine-2,5-dione compounds, particularly those having substituents at the C_3-, N_1- and N_4-positions are synthesized. The prepared 1,4-benzodiazepine-2,5-dione compounds are evaluated for endothelin receptor antagonism by a functional assay that measures the inhibitory activity against the change of intramolecular calcium ion concentration induced by endothelin-1.



1

Figure 1. 1,4-Benzodiazepine-2,5-dione derivatives **1** with a nearly planar core ring structure flanked by two aryl side-arms are designed to evaluate their activities in endothelin receptor antagonism.

1-2. Stable Benzotriazole Esters as Mechanism-Based Inactivators of the Severe Acute Respiratory Syndrome 3CL Protease. *Chem. & Biol.* **2006**, *13*, 261–268.

A new class of stable benzotriazole esters is found to be mechanism-based inactivators of $3CL^{pro}$. Mechanistic investigation using kinetic and mass-spectrometry analyses indicates that the active-site Cys-145 is acylated, and no irreversible inactivation was observed with the use of C145A mutant.

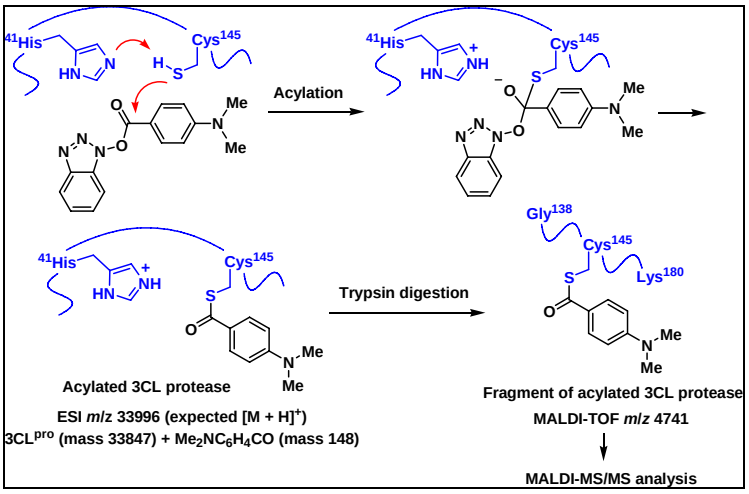


Figure 2. Benzotriazole Esters as Mechanism−Based Inactivators of SARS 3CL Protease

1-3. Fluorescent Organic Nanoparticles of Benzofuran–Naphthyridine Linked Molecules: Formation and Fluorescence Enhancement in Aqueous Media. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3713–3716.

Enthynyl–linked benzofuran–naphthyridine compounds show high-yield fluorescence with solvatochromic properties. One of compounds, ABAN, has successfully formed fluorescent organic nanoparticles (FONs).

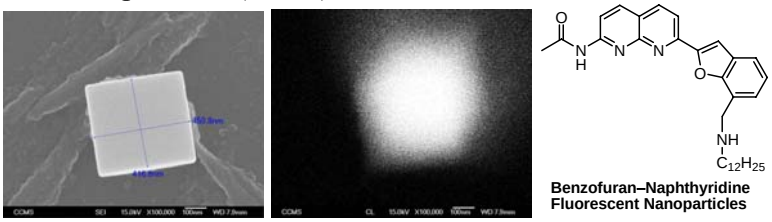


Figure 3. Benzofuran–naphthyridine fluorescent nanoparticles

1-4. Novel Linear Hexanuclear Cobalt String Complexes (Co_6^{12+}) and One-Electron Reduction Products (Co_6^{11+}) Supported by Four Bpyany^{2-} Ligands. *Dalton Trans.* **2006**, 2106–2113.

The preparation and characterization of novel hexacobalt string complexes, $[Co_6(\mu6\text{-bpyany})_4(NCS)_2](PF_6)_n$ (n = 1, 2) and $[Co_6(\mu6\text{-bpyany})_4(OTf)_2](OTf)_n$ (n = 1, 2) are presented.

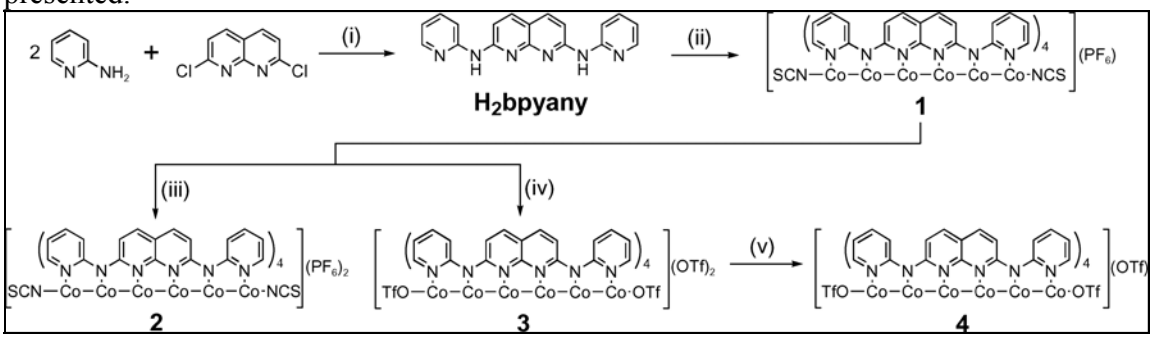


Figure 4. The synthetic routes of H2bpyany and its hexanuclear cobalt complexes.

1-5. Weak Antiferromagnetic Coupling for Novel Linear Hexanuclear Nickel(II) String Complexes (Ni_6^{12+}) and Partial Metal–Metal Bonds in Their One-Electron Reduction Products (Ni_6^{11+}). *Dalton Trans.* **2006**, 3249-3256.

The preparation, crystal structures, magnetic properties and electrochemistry of novel linear hexanuclear nickel string complexes (Ni_6^{12+}) and their corresponding 1-e$^-$ reduction products (Ni_6^{11+}) are reported.

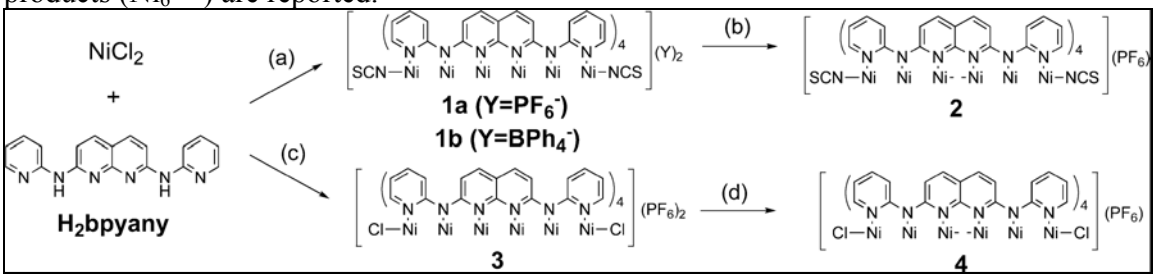


Figure 5. The synthetic routes for the preparation of linear hexanuclear nickel complexes.

1-6. Hexaamide Molecule Annexed with Pyrenes for Selective Detection of Phosphate and Pyrophosphate Ions by Ratiometric Fluorescence Changes. *J. Chin. Chem. Soc.* **2006**, *53*, 1439–1446.

N,*N*'-bis{3,5-di[(1-pyrenylmethyl)carbamoyl]benzyl} pyridine-2,6-dicarbamide provides a pseudo-tetrahedron cleft and multiple hydrogen bondings to form a 1:1 complex with phosphate (or pyrophosphate) ion in a highly selective manner, in comparison with other anions (F^-, Cl^-, Br^-, SCN^-, AcO^-, NO_3^-, and ClO_4^-).

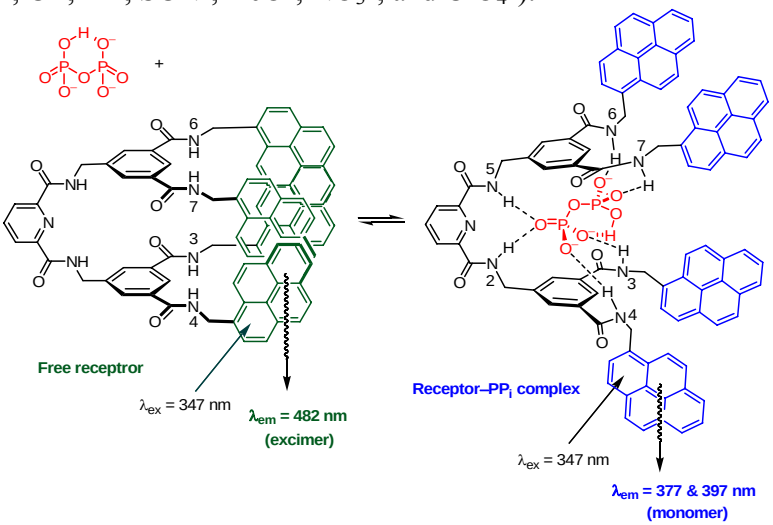


Figure 6. Selective and sensitive detection of pyrophosphate ion.

1-7. Ethynyl-Linked (Pyreno)Pyrrole–Naphthyridine and Aniline–Naphthyridine Molecules as Fluorescent Sensors of Guanine via Multiple Hydrogen Bondings. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 117–122.

New fluorescent molecular sensors for 9-alkylguanines were constructed by conjugation of 2-acetamido-1,8-naphthyridine with *N*-Boc-pyrrole, *N*-Boc-pyreno[2,1-*b*]pyrrole or acetanilide moieties via an ethynyl bridge.

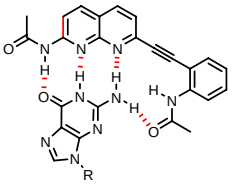


Figure 7. Receptor molecules designed for binding guanine with multiple hydrogen bondings.

1-8. Synthesis of Polycyclic and 4,5-Diacyl Thiophene-2-carboxylates via Intramolecular Friedel–Crafts Alkylations and Unusual Autooxidative Fragmentation of the Derivatives Obtained from the Samarium Diiodide Promoted Coupling Reactions of Thiophene-2-carboxylate with Carbonyl Compounds. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1421–1428.

An efficient method, comprising the SmI_2-promoted three-component coupling reaction, alcohol oxidation, dehydration and autooxidative fragmentation, was explored to prepare 4,5-diacylthiophene-2-carboxylates that were easily elaborated to heterocycle-fused thiophenes.

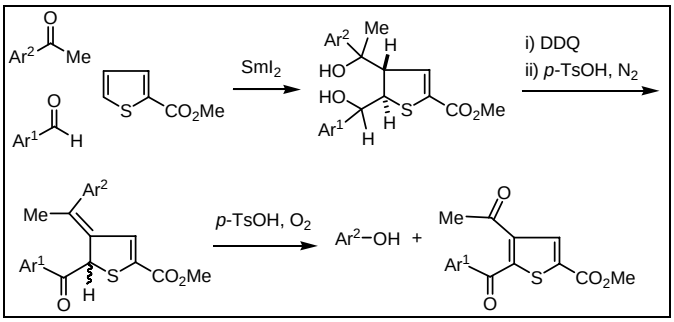


Figure 8. Formation of 4,5-diacylthiophenes via oxidative fragmentation

1-9. Microwave Assisted One-Pot Tandem Reactions for the Direct Conversion of Primary Alcohols and Aldehydes to Triazines and Tetrazoles in Aqueous Media. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3141–3144.

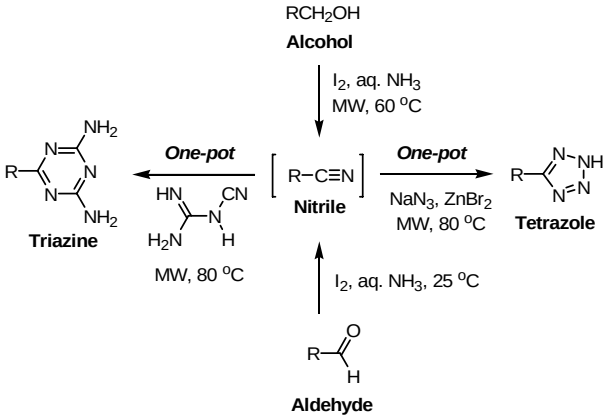


Figure 9. One-pot transformation of primary alcohols and aldehydes to trizaines and tetrazoles.

A series of primary alcohols and aldehydes were treated with iodine in ammonia water under microwave irradiation to give the intermediate nitriles, which, without isolation, underwent [2 + 3] cycloadditions with dicyandiamide and sodium azide to afford high

yields of the corresponding triazines and tetrazoles, including the α-amino- and dipeptidyl tetrazoles in high optical purity.

二、方俊民教授研究室博士班學生進度報告

Period: August 1, 2006 to April 30, 2007

周子琪（博三）磁性奈米粒子於生物辨識系統上之應用
陳冠宏（博三）感測系統用於偵測焦磷酸脂之設計與合成
劉朕與（博三）設計及合成天然物 Lipid II 與衍生物以研究其對於 Transglycosylase 在細菌合成細胞壁的影響
卓佳慶（博二）開發及應用碳水化合物在水相的新式反應
許建銘（博二）Isolation and Modification of Moenomycin A as Antibiotics
溫文賢（博二）新型流感抑制劑的設計與合成
呂紹宏（博一）感測系統用於水相偵測鳥糞嘌呤核苷單磷酸鹽及醣類分子之設計與合成
陳俊霖（博一）Synthesis of Zanamivir Derivatives as Anti-Influenza Agents
王仁聰（博一）設計合成 Lipid II 類似物作為抗生素之研究

Student: 周子琪（博三）
Research topic: 磁性奈米粒子於生物辨識系統上之應用

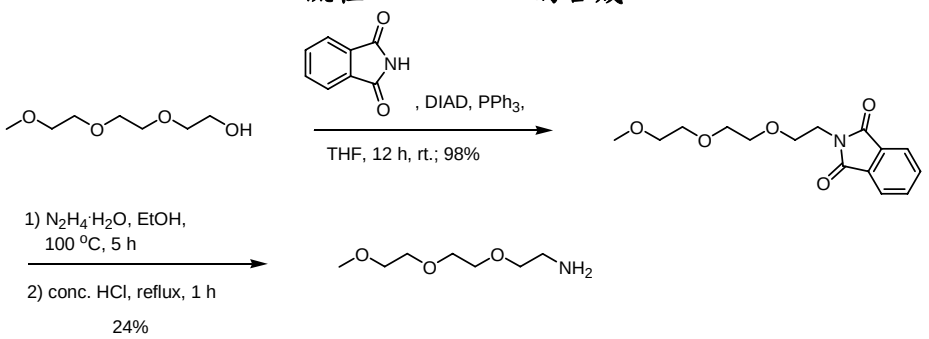
動物流行性感冒病毒依照核蛋白或間質抗原來分類的話，分成 A、B、C 三型，後兩型僅在人類身上發現過，而 A 型的話，則可以引起多種動物（人、豬、馬、禽和許多野生動物）的流行性感冒症狀，是屬於人畜共通的傳染病原，我們最近常聽到的禽流感即是在鳥禽類之間流傳的流行性感冒病毒。流感病毒具有多種亞型，分類方法是依其表面的血球凝集蛋白抗原（HA，H1-H16）與神經胺酸酵素抗原（NA，N1-N9）的不同來決定，一般人類的流行性感冒病毒為 H1-H3、N1-2 這幾類，而禽流感則從 H1-H16、N1-N9 皆有，若禽流感病毒突變到人傳人的階段，人類將會因為無抗體而受到極重大的傷害；故能夠快速檢測流感病毒，以期能達到早期發現，早期隔離、治療，減少病毒散播的機會，就成了我們的研究目標。

奈米粒子由於其顆粒小、表面積大、易於做表面修飾造成多價效應等優點，成為我們檢測禽流感病毒的平台；而其中的磁性奈米粒子由於具備磁分離的便利性，更能夠將低濃度的病毒加以濃縮來提高檢測的靈敏度；因此，本研究主要在合成具生物相容性的磁性奈米粒子，並在其表面修飾能和禽流感辨識的特定抗體，如此一來，利用磁性與抗體抗原專一結合性，就可單離出欲分離的病毒。

一、以質譜分析方法來偵測病毒

日前，本實驗室已成功的合成出包覆有生物相容性較高之矽烷的三氧化四鐵磁性奈米粒子，並利用末端為胺基的 Methoxy tri(ethylene glycol)（MEGA）當作抗非特異性結合的阻斷試劑[1]。

流程一、MEGA 的合成



我們先將 0.5 mg 的磁性奈米粒子（MNP）溶於 125 μL 的 DMSO 中，用超音波震盪三十分鐘後，加入 10 mg 的 Suberic acid bis(N- hydroxysuccinimide ester)（DSS）使 MNP 表面活化，清洗掉多餘的 DSS 後，再加入 MEGA 修飾 MNP 表面，最後再用含螢光基團的二級抗體測試是否可成功的減少非特異性結合，在測試過多種不同的 MEGA 濃度後，以 30 mM 的 MEGA 35 μL 來保護 0.5 mg 沒接上一級抗體的 MNP（Ab free-MNP）有最好的效果。

瞭解到 MEGA 的確對於 MNP 有良好的阻斷非特異性結合能力後，我們依下列步驟將αH5-1 抗體[2]及 MEGA 接裝到 MNP 上（Ab-MNP）；另外，因為 Ab free-MNP 與 Ab-MNP 本身有些微的差別，故 MEGA 的濃度與量再針對 Ab-MNP 做調整。

流程二、將抗體修飾到 MNP 上

125 μl MNP (0.5 mg in 125 μl DMSO) sonicated for 30 min

↓

Add 5 mg DSS to activate the amino groups on the MNP

↓ 1 h

Magnetic separation and washed with DMSO for three times

↓

15 μl Antibody

↓ 1 h, 4 ºC

50 mM MEGA (30 μl)

↓ 18 h, 4 ºC

Magnetic separation and washed with DMSO for three times

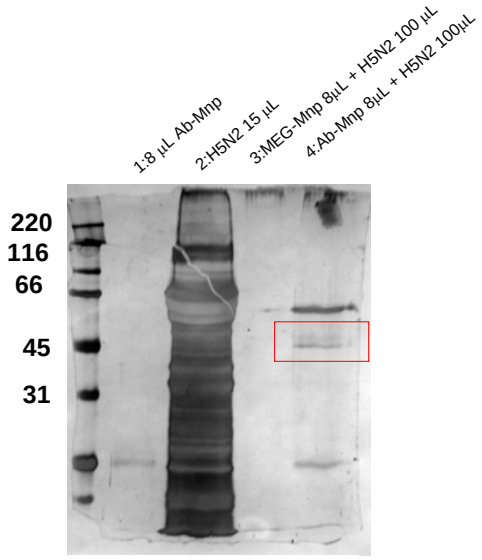
↓

H5 virus

↓

Bioassay

得到 Ab-MNP 後，先用 RIPA 清洗之，這是進一步確保 MNP 表面無以非特異性連結的其他物質存在，再將含 H5N2 病毒的尿囊液[2]與之混合，以利用 Ab-MNP 將病毒單離出，所得的結果如圖一所示：

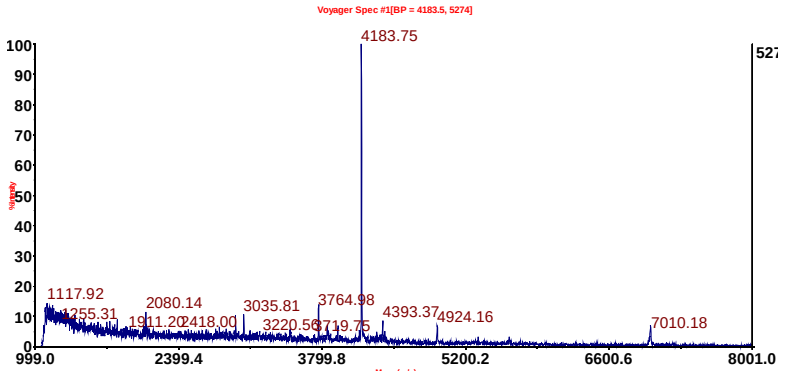


➢ Lysis buffer : 2X RIPA
➢ Wash buffer :1X RIPA

圖一、Ab free-MNP 和 Ab-MNP 與病毒反應後之 PAGE

Line 1 是 Ab-MNP 單獨跑片，只有在約 22 kD 處有一個屬於抗體的 band；Line 2 是含 H5N2 病毒的尿囊液，因含有許多其他的蛋白，故看起來十分的混亂；Line 3 是 Ab free-MNP 在與病毒混合後的結果，因為 MNP 上無抗體，故所得的結果既無看到

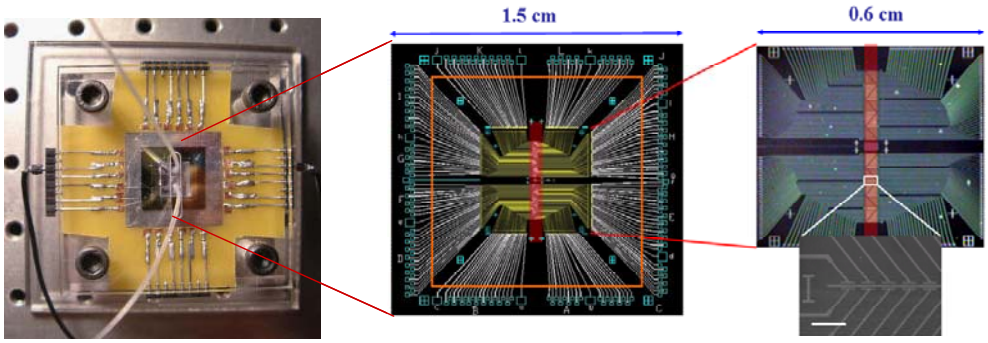
抗體也無病毒；Line 4 是 Ab-MNP 與病毒液混合後的結果，可看到我們將病毒由 Line 2 的混亂情況成功的單離出來。比對台大獸醫系陳奕成的碩士論文[3]將 Line 4 紅框處的 band 挖下分離並將上清液送測質譜，可在資料庫中搜尋到此 band 所含的蛋白質是與 A/Chicken/Pennsylvania /1370/1983 H5N2 的 HA 有相近的 strain。另外，Ab-MNP 在抓完病毒後，我們也用 trypsin 將 MNP 表面的蛋白質消化後，再將洗淨並磁分離的 MNP 直接拿去測 MALDI-TOF，可得到如圖二的結果，若是 Ab free-MNP 則不會得到一個疑似蛋白質的訊號（Data not shown）；但圖二中的訊號在蛋白質資料庫中並沒有找到相符的片段，將 H5N2 的 HA 序列與之比對亦無，推測有可能是因為抗體與病毒的作用部位因連結緊密並未被 trypsin 切斷，故得到的訊號並非單獨由病毒造成，可能也參雜了部份的抗體序列在其中，故無法順利的比對出正確的蛋白質序列，這部份將是我們未來要努力的目標。



圖二、Ab-MNP 與病毒反應完再以 trypsin 處理後所得之 MASS 圖

二、以電分析方法來偵測病毒

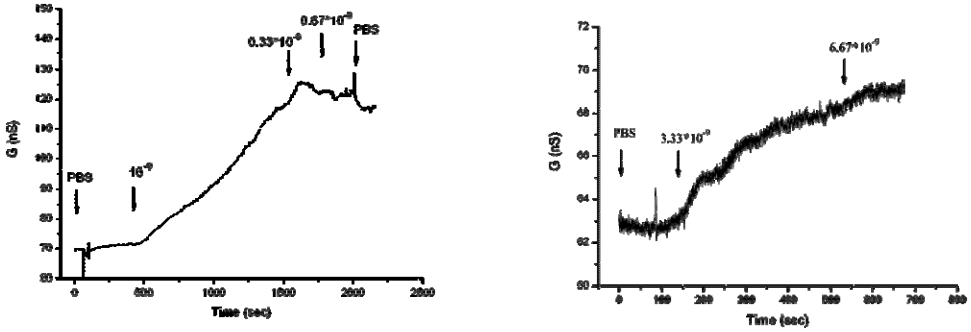
另一方面，SiNW-場效電晶體是個靈敏度極高且可即時量測目標物的新方法[4]，敝實驗室與陳逸聰老師合作，將抗體修飾到 silicon nanowires 上（SiNWs），並利用電流量的變化來偵測病毒。



圖三、SiNW-場效電晶體

首先，我們將 silane aldehyde 藉由矽氧鍵接到 SiNWs 上，接著以每小時 0.15 ml 的速率將抗體混合液（抗體母液：PBS：40 mM $Na(CN)BH_3$ ＝ 5：85：10）導入，使抗體上的胺基與 SiNWs 上的醛基反應產生 imine，再利用混合液中加入的 $Na(CN)BH_3$ 將其還原，如此便可使抗體接在 SiNWs 上，未接上抗體的醛基則通入

Tris 混合液（Tris：PBS：40 mM $Na(CN)BH_3$ ＝ 5：85：10）將其反應完，並也藉由 Tris 來抑制非特異性結合；修飾好 SiNWs 後，便將待測病毒液導入，所得的結果如圖四所示。



圖四、用 SiNWs 測量病毒所得之電流與時間的關係圖

由 Zeta potential 我們可知，在生理條件下，此病毒靜帶電是負值，而我們的 SiNWs 是 p-type 的，故得到正向訊號是符合預期的，但由於單純導入 PBS 時，未能得到一個很平穩的訊號（如圖四右），且加入稀釋了特定倍數的病毒液後，訊號大小與不同濃度的病毒並無明顯的相關，未來一方面需要有更穩定的 device，一方面也需要朝向有良好的 negative control 與 S/N ratio 更加明顯的結果邁進。

未來計畫

在第一部份中，目前已可確定我們能使用 Ab-MNP 將病毒單離出來，並藉由比對 PAGE 來確認此一結果，但由於 PAGE 或 Western blotting 太過費時，希望能用 MALDI-TOF 來增進辨識病毒的速度，雖然以 MALDI-TOF 量測已有初步的結果，但比對的資料庫尚未建立，故如何利用質譜的方法確認利用 Ab-MNP 抓到的病毒將是我們未來的目標。

第二部分中，未來將以有良好的 negative control 與明顯的 S/N ratio 為目標；negative control 測試中，除了用上述的 Tris 作為阻斷非特異性鍵結的試劑外，還會嘗試在第一部份中使用的 MEGA；而為了有明顯的 S/N ratio，首先必須建立篩選 device 的標準，並改善 device 的品質，像是 1. SiNWs 的量、2. PDMS 製作的 channel 時，PDMS 的軟硬度是否適中，是否會漏水漏電、3. 固定 device 時的鬆緊度是否會影響液體導入時的流速、4. 更換導入的液體時，該如何減少接觸到管子時，管子產生的硬力；在改善了上述的條件後，預期將會有更好的結果。

參考文獻

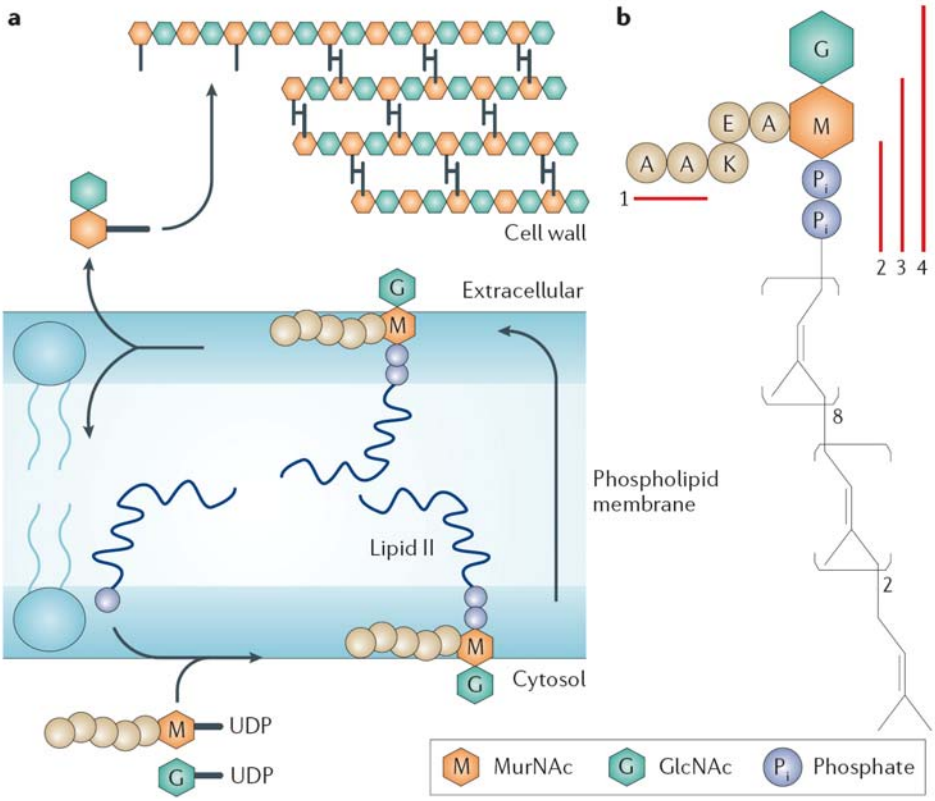
1. Chen, Yu-Ju; Lin, Chun-Cheng *Small* **2006**, *2(4)*, 485-489.
2. αH5-1 抗體及 H5N2 病毒是由台大獸醫系王金和老師實驗室所提供。
3. 陳奕成，台大獸醫系碩士論文，2006。
4. Patolsky, Fernando; Zheng, Gengfeng; Hayden, Oliver; Zhuang, Xiaowei; Lieber, Charles M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101(39)*, 14017-14022.

Student: 陳冠宏（博三）
Research topic: 感測系統用於偵測焦磷酸脂之設計與合成

(一) 前言

磷酸酯在生物體中扮演著不可或缺的角色。除了可與蛋白質分子結合形成生物膜，而提供細胞相當的防禦作用外，多種不同類型的磷酸酯也在自然界中扮演著許多重要機制。例如細胞壁的增生機制、血管壁的增生因子等，在許多的研究中皆發現與磷酸酯有關。因此，設計能對生物體中不同磷酸酯有效的偵測方法，將是一項重要課題。

菌體細胞和人體細胞間，最大的差異在於前者擁有獨特的細胞壁構造。為達到偵測目的，須先了解其增生過程。首先，二磷酸尿草—*N*—乙醯胞壁酸(UDP-MurNAc)會依序與胺基丙酸(*L*-Ala)、麩胺酸(*D*-Glu)、離胺酸(*L*-Lys)及一個雙胜肽（*D*-Ala-*D*-Ala）反應，生成二磷酸尿草—*N*—乙醯胞壁酸—五胜肽。接著，二磷酸尿草—*N*—乙醯胞壁酸—五胜肽將與焦磷酸脂結合，然後再以醣酶鍵與二磷酸尿草—*N*—乙醯葡萄醣胺(UDP-GlcNAc)反應生成「雙醣—胜肽」。之後藉由焦磷酸脂的幫助下穿過細胞膜，與正在成長的胜醣反應並釋放出焦磷酸脂，這個反應將增加胜醣鏈的長度。最後胜肽在肽基轉移酶的催化下，進行重要的交聯反應，而生成具高強度的網狀細胞壁。在細胞壁合成途徑中，焦磷酸脂循環地工作，是為細胞壁增生過程中重要而不可或缺的角色。其途徑如**圖一**。[1]

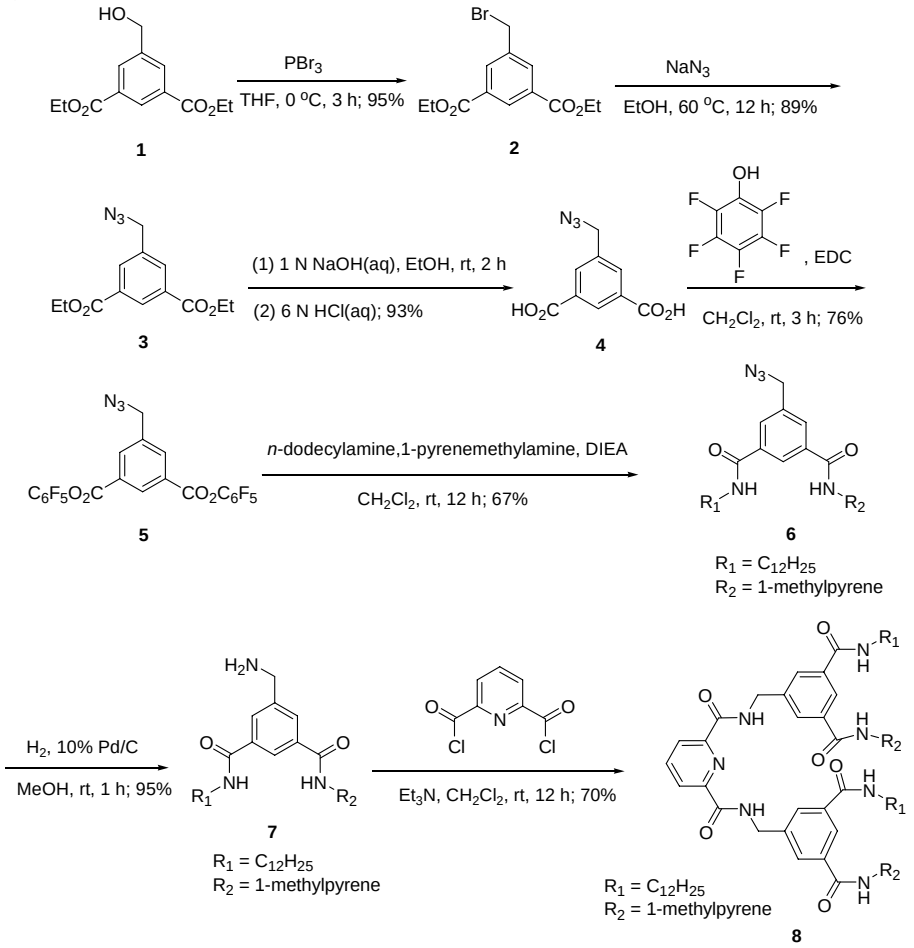


圖一 細胞壁合成途徑

此外，近年來研究發現，許多疾病皆與血管不正常增生有相當的關聯，於是血管增生及其調控的機制成為十分重要之課題。研究中發現水解磷酸酯Lysophosphotidic Acid (LPA)可刺激血管內皮細胞之複製與移行。而由於其接受器之發現，水解磷酸脂正是目前剛啟蒙且十分受到重視的控制血管生成的可能因子。此外，LAP對於生殖也有相當的重要性。子宮細胞表面的一種蛋白質，可用來呼應 LPA 的分子活動。當這個接收器接收到LPA分子，便會對身體發出強烈的生殖信號。

由上述過程可發現，在細胞壁合成或是血管增生的途徑中，磷酸脂皆扮演著重要的角色，若能對磷酸酯做辨識，未來對於這類型實驗的研究，必將提供更有效的幫助。因此，我們希望能設計針對磷酸脂具特殊專一性且相當靈敏的感測器，以達到預期的目標。

(二)實驗部份

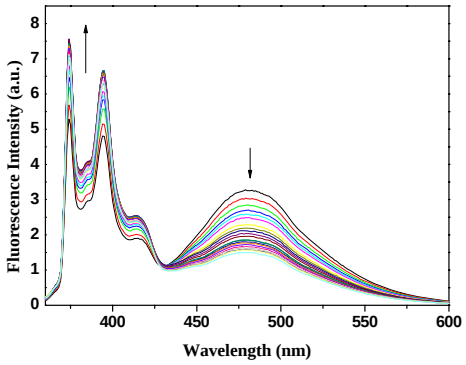


圖二、焦磷酸酯受體的合成途徑

本實驗室已成功合成針對磷酸根離子以及焦磷酸根離子有相當選擇性的多重醯胺受體分子 [2]。因此，本研究選擇含有多重醯胺鍵結的受體化合物 **8**，做為焦磷酸脂的感測器。首先，多重醯胺與焦磷酸根離子藉氫鍵作用產生良好鍵結，並在受體分子外圍引入兩條含 12 個碳的長碳鏈，以及兩個 pyrene 分子。希望藉由長碳鏈與焦磷酸酯碳鏈間的凡得瓦作用力，增強整體受體分子對焦磷酸酯的鍵結能力。設計中引入

pyrene 分子，則是希望藉由受體分子與焦磷酸酯在鍵結前後對 pyrene 分子所產生影響，達到螢光訊號改變的目標。其合成途徑如**圖二**。

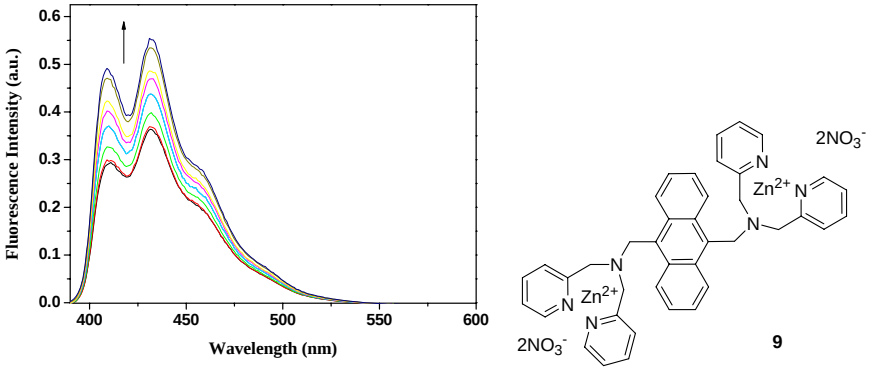
實驗中發現，未加入磷酸根離子前，受體分子中兩個 pyrene 分子藉由 π-π 作用力拉近彼此間的距離，由螢光光譜上可明顯發現激發複體的放光。當加入磷酸根離子，醯胺鍵與磷酸根離子藉氫鍵作用產生良好鍵結後，增加了 pyrene 分子間的距離，在螢光光譜上可發現激發複體的放光減弱，取而代之的是單體放光的增強。如**圖三**所示。



圖三 $(Bu_4N)_3HP_2O_7$ was titrated into a 1.0 μM solution of **8** over the concentration range 0-1000 μM. Excitation wavelength was 345 nm. All titrations were performed in DMSO.

利用此單體與激發複體放光強度間的變化實驗，可發現此受體分子對於焦磷酸根離子有最好的辨識能力，其次為磷酸根離子。而其他陰離子則幾乎不會產生任何變化。由於在受體分子上引入了兩條長碳鏈，相信在對於焦磷酸酯的偵測上應可提供更好的辨識效果，此實驗目前仍在進行中。

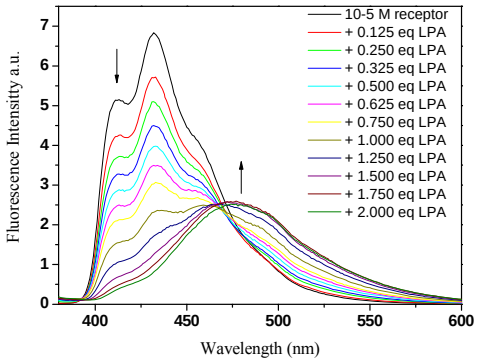
對於 LPA 的辨識，我們選擇了文獻上已報導的化合物 **9** 作為受體分子。此化合物在磷酸根離子的偵測上已有許多的應用，當其與磷酸根離子鍵結，經由光誘導電子轉移 Photoinduced Electron Transfer (PET)機制而產生螢光增強的現象[3]。如**圖四**。



圖四 Fluorescence spectra of **9** following the addition of increasing amounts of TBAP. TBAP was titrated into a 5 μM solution of Receptor over the concentration range 0-10 μM. Excitation wavelength was 380 nm. All titrations were performed in aqueous solution, pH 7.22, 10 mM HEPES.

而在實驗過程中卻發現，不同於磷酸根離子所導致 PET 螢光光譜變化，當逐漸增加含有長碳鏈的 LPA 時，螢光光譜上出現類似激發複體放光的變化。如**圖五**。由於

此類分子在緩衝溶液及室溫條件下能觀測到激發複體放光的例子相當少見。為證明此放光確為激發複體所產生，我們對此放光現象做了螢光半生期實驗，以及合成不同碳鏈長度的磷酸分子作為受質分子。實驗結果證明，當此受體分子與長於十個碳數的磷酸酯鍵結後，由於緩衝溶液中碳鏈-碳鏈間的疏水性增強，導致 Anthracene 彼此接近而產生激發複體放光。歸納以上結果，相對於磷酸根離子，我們可利用受體分子 **9** 在與 LPA 鍵結後所產生不同的光譜變化，達到不錯的辨識效果。



圖五 Fluorescence spectra of **9** following the addition of increasing amounts of LPA. LPA was titrated into a 10 μM solution of **9** over the concentration range 0-20 μM. Excitation wavelength was 380 nm. All titrations were performed in aqueous solution, pH 7.22, 10 mM HEPES.

(三)未來方向

由實驗結果顯示，目前對於焦磷酸酯以及水解磷酸酯皆能有效的辨識。在未來研究方向中，我們將在 Lipid Ⅱ與酵素同時存在的條件下，利用以上所合成的受體分子對其所釋放的焦磷酸酯做偵測。若能如預期般，對釋放出的磷酸酯有高靈敏且高選擇性的辨識，則對於未來研究細胞壁的增生機制上，將提供強而有力的幫助。

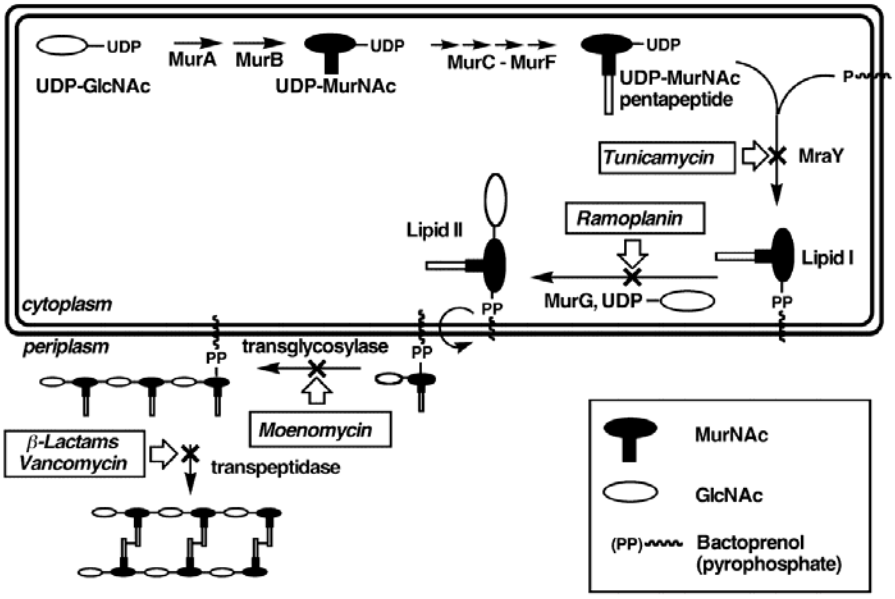
(四) 參考文獻

1 Breukink, E.; Kruijff, B.D. Nature Reviews Drug Discovery 2006, 1-12
2 台大化學系廖仁海博士論文
3 Wongkongkatep, J.; Miyahara, Y.; Ojida, A.; Hamachi, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 665 –668

Student: 劉朕與（博三）
Research topic: 設計及合成天然物 Lipid II 與 Transglycosylase 的抑制劑

一、前言

為了因應細菌不斷突變對我們的身體健康造成危害,我們必須盡快找出新一代的抗生素。在文獻的搜尋後,我們可以知道在細菌的繁殖複製中細胞壁的形成是相當重要的(圖一)，如果我們可以尋找找出新的化合物，能有效抑制促使細菌細胞壁複製的酵素，就可以達到殺菌的效用，且由於哺乳動物的細胞並不如細菌含有細胞壁,因此我們期望此抑制劑並不會對人類的細胞產生影響。



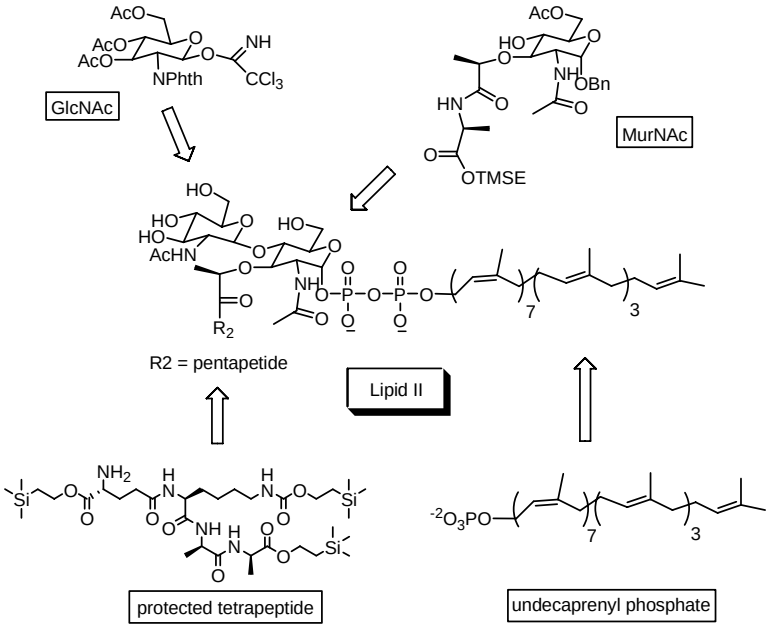
圖一、細胞壁的形成、所需酵素及抑制藥物

從圖一我們可以得知:細菌的細胞壁形成是一步步的,且我們人類已經發現了幾種天然物,如萬古黴素可以抑制其中的 transpeptidase 步驟。但是不幸的是細菌可以藉著突變而產生對萬古黴素的抗藥性.所以我們不得不從新尋找另一藥物.而另一天然物 Moenomycin 則可以抑制另一酵素 transglycosylase,使的醣類不能轉醣化而無法串連。但是雖然 Moenomycin 對於 transglycosylase 有良好的抑制效果,人體卻不能藉著消化系統而吸收 Moenomycin,因此無法直接將其製備成藥物.

因此,我們將以合成出新的化合物以抑制 transglycosylase 為目標,並期望將來可以被發展成為有效的藥物;從圖一我們可以得知 Lipid II 為 transglycosylase 的天然 substrate,我們將以 Lipid II 為模型,改變分子上的官能基或基團,研究其和 transglycosylase 的辨識能力,並以其為設計抑制劑的主要資訊。

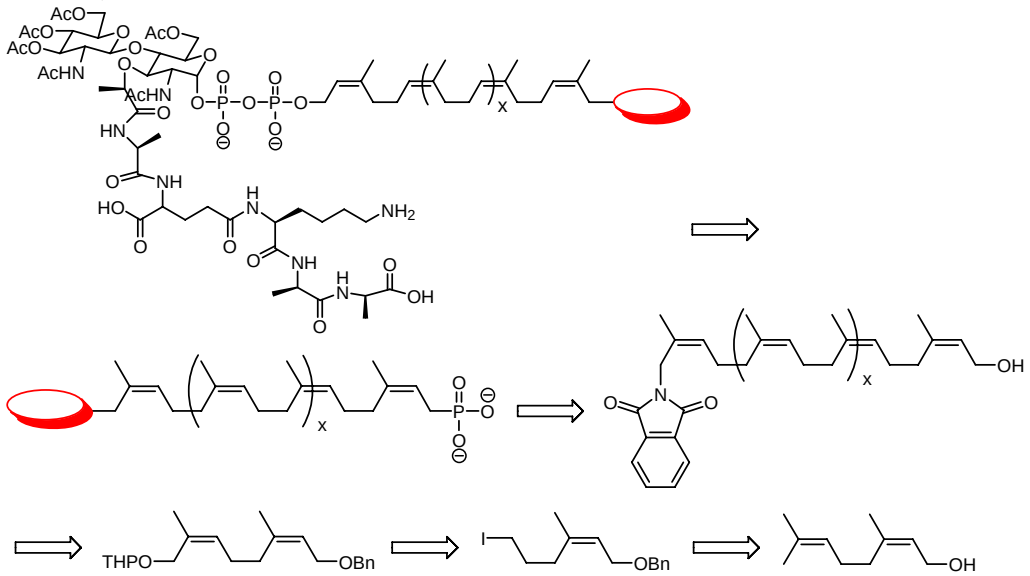
二、實驗部份

經過一些努力之後,我們以圖二所示的合成策略已經完成天然物 Lipid II 的全合成。我們將會以此天然物做為發展 assay 系統的標準品,並期望能發展出良好的 assay 系統。



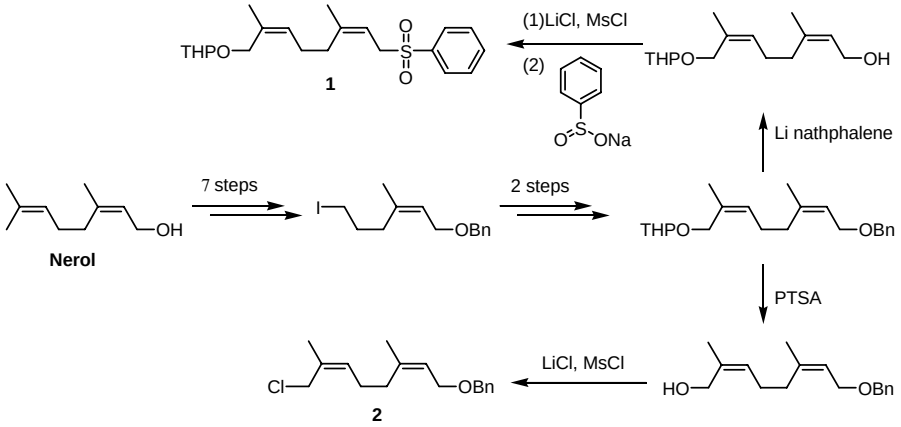
圖二、Lipid II 之合成策略

對於當前的藥物篩選中,慢速的篩選方法是不能滿足研究所需的。我們必須以發展快速的篩選方法為目標。經過文獻的搜尋之後,我們可以得知 transglycosylase 所能辨識的 substrate 並不一定需要總共五十五個碳的 Lipid chain,將其置換為較短一點的 Lipid chain 也是可被酵素所辨識而進行轉醣化。因此我們設計一些含有較短的 Lipid chain 的 substrate 並將其末端引入一螢光團,期望其被酵素所辨識而進行轉醣化的同時所釋放出 Lipid chain 同時會產生螢光的變化已做為快速篩選 inhibitor 之用。我們所設計的合成步驟如圖三所示。



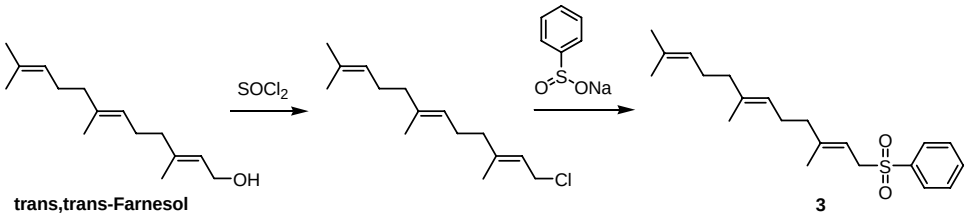
圖三、含螢光團 Lipid II 衍生化合物之設計

我們所選用的起始物為 nerol,經過一系列的步驟之後可以分別得到 building blocks **1** 和 **2**,詳細的合成步驟如圖四所示。

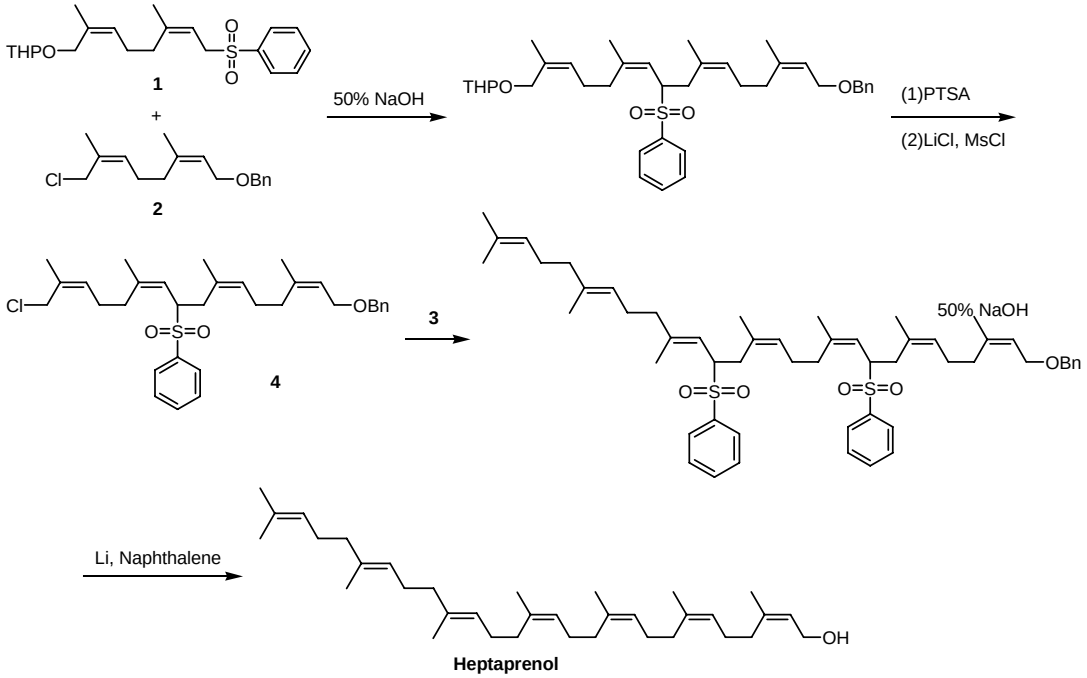


圖四、合成 building blocks **1** 和 **2**

之後,我們再使用 *trans*,*trans*-Farnesol 為起始物,經過兩步的合成步驟之後可得到另一 building block **3**,如圖五所示:



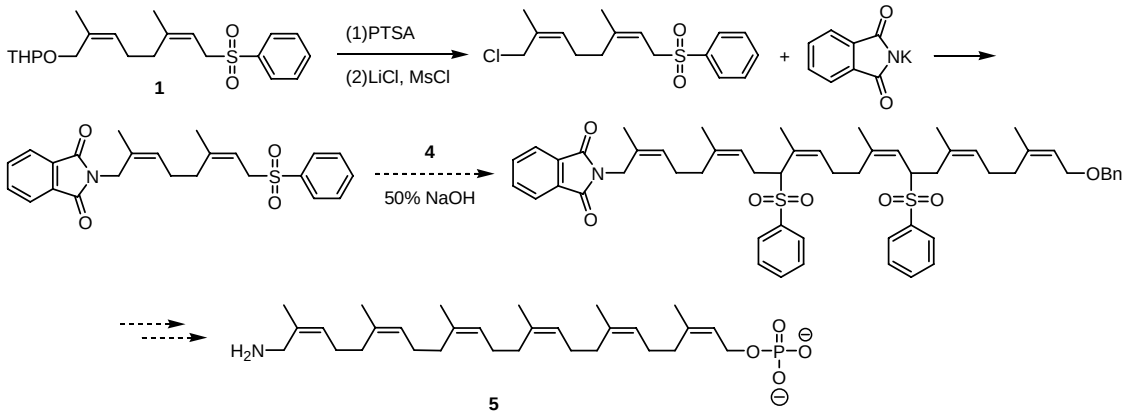
圖五、合成 building block **3**



圖六、合成 Heptaprenol

我們再把已合成出的 building blocks **1**、**2** 和 **3** 分別的聯結之後,在以還原的方法去除保護基,可得到 Heptaprenol (圖六),之後將會以與之前合成天然物 Lipid II 相同之方法,製備含有較短 35 個碳 Lipid chain 的 Lipid II 衍生物,以比較 Lipid II 與其衍生物被 transglycosylase 所辨識能力的相異之處。

我們再以 building blocks **1** 和 **4** 聯結之後再分別引入胺基跟磷酸根基團,以作為連接雙醣和螢光團之用,如圖七所示。



圖七、聯結 building blocks **1** 和 **4**，並分別引入胺基跟磷酸根基團

之後將 compound **5** 連結螢光團,再與之前已製備的雙醣連結就可得到含有螢光團的 Lipid II 衍生物,並期望能在最短的時間內與 transglycosylase 測試其所能被辨識的能力,並寄望此化合物在進行轉醣化時能藉著螢光的變化以針對此 target 發展快速篩選新藥的方法。

參考資料

(1)Liu, H.; Ritter, T. K.; Sadamoto, R.; Sears, P. S.; Wu, M.; Wong, C.-H. *ChembioChem*, **2003,** *4*, 603-609

(2)VanNieuwenhze, M. S.; Mauldin, S. C.; Zia-Ebrahimi, M.; Winger, B. E.; Hornback, W. J.; Saha, S. J.; Aikins, J. A.; Blaszczak, L. C. *J. Am. Chem. Soc*. **2002**, *124*, 3656-3660

Student: 卓佳慶（博二）
Research topic: 開發及應用碳水化合物在水相的新式反應

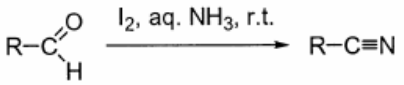
一、前言

碳水化合物包含許多重要的生物功能，與生物體的成長、免疫系統，以及癌細胞的新陳代謝都有相關的重要性。 醣蛋白則與細胞的穩定性，抗體的辨識，以及微細胞組織結合的能力有關。由於碳水化合物的多樣性，因此一直是許多化學家的研究重點。有鑒於醣化學的研究蓬勃發展，開發出新式的有機反應，以及建立起一個簡單操作、低污染性的實驗環境，對於醣類的合成，以及檢測碳水化合物這方面的研究有莫大的幫助，相對於環境的污染也可以有效的降低。

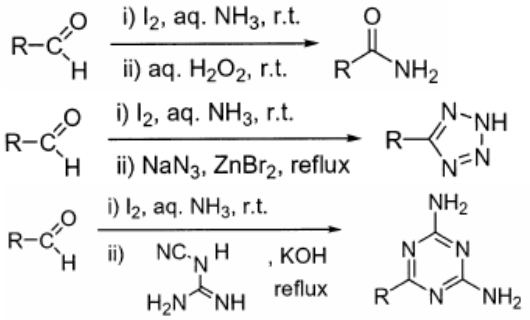
水本身無毒、沸點適中、容易取得，且在自然界與生物體中佔了相當大的比例，是個相當理想的溶劑。倘若可以開發出醣類的水相反應，不僅可以縮短反應流程，並且減少有機物的使用。另外，也符合近年來提倡經濟化學與綠色化學的概念，降低對有機物的浪費與環境的污染。

二、合成

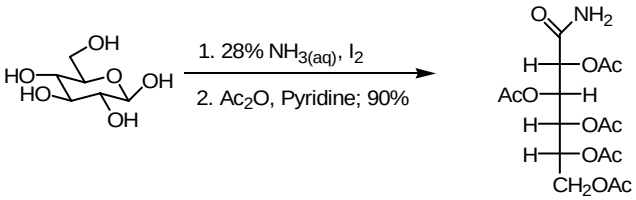
先前本實驗室開發出一系列的水相氧化反應。將醛類在氨水和碘的作用下，進行氧化反應。此一水相反應可高效率地將醛氧化成氰化合物。

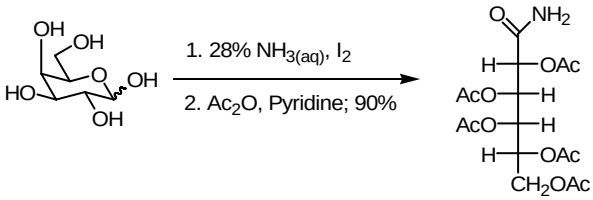


繼續添加其他試劑則可以進行一鍋化反應，而得到不同的衍生物。

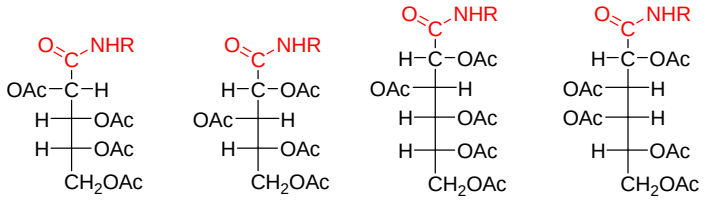


爾後本實驗室嘗試將水溶性的醣類分子，進行相同的氧化反應，則得到醛基醯胺化的結果。此類的反應可直接將一號碳上的醛基轉換成醯胺基化合物，並且大幅地縮短整個反應流程，此外也降低了反應所需的成本，提供了一個低污染且有效率的選擇性氧化反應。





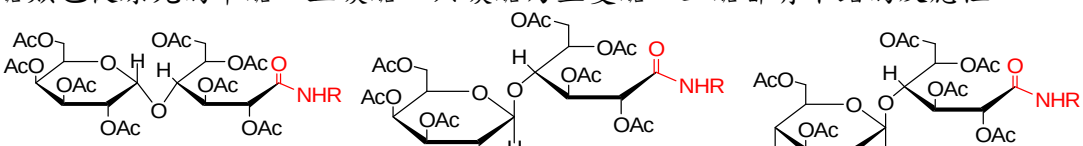
先前，本實驗室嘗試將不同的醣類與胺類分子進行偶合反應。從原先的氨水改用乙基胺取代，仍然有良好的反應性。而後衍生至正己基胺以及苯甲胺。



	from D-arabinose	from D-xylose	from D-glucose	from D-galactose
NH_3	74%	78%	87%	85%
$EtNH_2$	40%	69%	70%	30%
$n\text{-}C_6H_{13}NH_2$	72%		81%	
$PhCH_2NH_2$	74%		85%	

(i) I_2, RNH_2, H_2O (MeOH), 25 °C, 2–10 h. (ii) Ac_2O, pyridine, 25 °C, 12 h.

醣類也從原先的單醣；五碳醣、六碳醣乃至雙醣、三醣都有不錯的反應性。



50% from maltose + NH_3/I_2 in H_2O
95% from maltose + $EtNH_2/I_2$ in H_2O
30% from maltose + $HO_2CCH_2NH_2/I_2$ in $NaHCO_3/H_2O$ (pH = 9.5)

63% from lactose + NH_3/I_2 in H_2O
94% from lactose + $EtNH_2/I_2$ in H_2O

51% from cellobiose + NH_3/I_2 in H_2O
94% from cellobiose + $EtNH_2/I_2$ in H_2O

(i) I_2, 28% aqueous NH_3 or $EtNH_2$, 25 °C, ~ 8 h. (ii) Ac_2O, pyridine, 25 °C, 12 h.

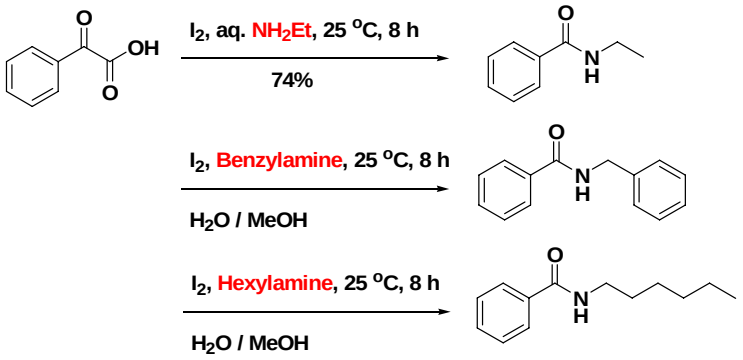
目前已經將這個反應衍生到不同取代基的胺類分子，其中包括長碳鏈、末端烯類、雙官能基 (末端醇類、末端胺類)，預期可利用這樣的特性更深入地進行碳水化合物的特性研究。

Entry	aldose	peracetylated amide product[b]	yield, % [b]
1	Arabinose	Benzylamine	74
2	Arabinose	Hexylamine	72
3	Glucose	Benzylamine	84
4	Glucose	Hexylamine	80
5	Glucose	Ethanolamine	77

6	Glucose	Ethylene diamine	75
7	Glucose	Allyamine	78
8	Glucose	1,4-diaminobutane	84

[a] aldose (1 mmol), amine (1 ml), iodine (0.52 g, 2 mmol), solvent : H_2O/MeOH, in air at room temperature for 10 hr. [b] yield of isolated compound.

此外，這類的反應對於苯甲羰基甲酸(benzoylformic acid)也可以得到醯胺化的結果。



目前尚未確定整個反應的機制，但是初步了解這樣的一個結果應該是透過脫羧基作用(decarboxylation)，進而得到醯胺類化合物。

三、未來計畫

本實驗室已經掌握此類醯胺化反應，可以順利將醛醣(Aldoses)和不同特性的胺類反應成醯胺類化合物。目前正利用疏水性的胺類分子著手準備進一步碳水化合物的性質測試，預期以微量培養皿為測試模板。另外針對唾液酸的研究亦有了初步的結果。未來，我們將利用這個方法，結合奈米材料和發光材料應用在醣蛋白分子的研究上，以期提供醣蛋白一個快速的篩選方法，以及縮短在醣蛋白上的合成步驟，也期望能將這個反應，藉此拓展對於唾液酸的研究。

Student: 許建銘（博二）
Research topic: Isolation and Modification of Moenomycin A as Antibiotics

前言：

Moenomycins 包含了 A、A_{12}、C_1、C_3 以及 C_4，屬於含磷多糖脂類，具有抗生素的效果，也是目前文獻上所認知的抗生素中，唯一可以抑制 TGase 的天然化合物。Moenomycin A 的主體為 pentasaccharide，包含了一段透過 phosphoglycerate 連接於其中一個醣的長碳鏈脂類（如圖 1）。

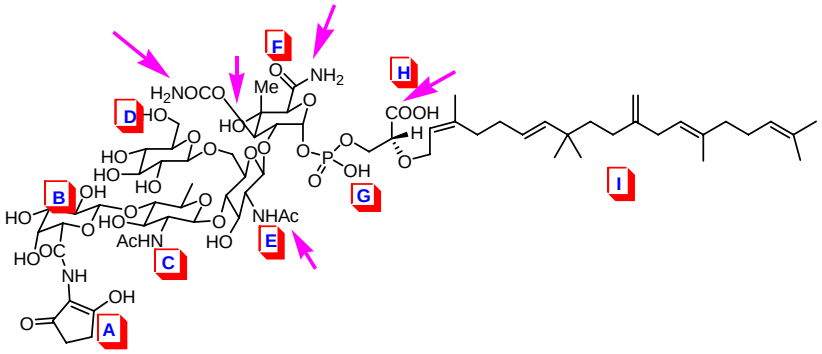


圖 1. Moenomycin A 的結構以及具有抗菌活性的基本部位 (箭頭所指處).

由於 Moenomycin A 很難被腸胃所吸收，因此目前僅使用於促進禽畜之生長，改進飼料效率用，而不用作全身感染之治療。目前 Menomycin A 的作用機制被假定為藉由 lipid part 與細胞膜固定後，再以高選擇性辨識的 oilgosaccharide 的部分做為基底與酵素結合（如圖 2）。

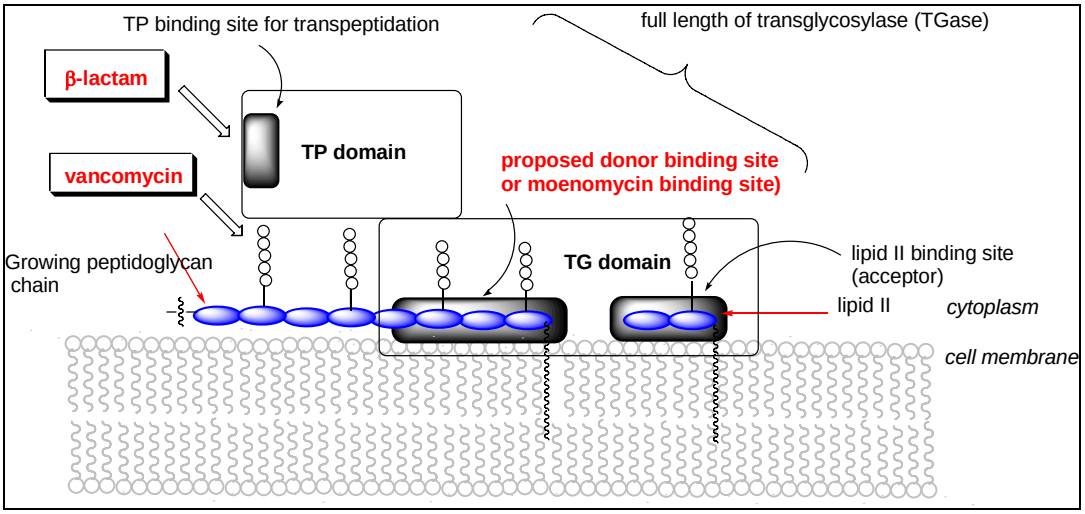


圖 2. Pictorial representation of a class A PBP and one proposed mechanism for the transglycosylation process

2007 年加拿大 British Columbia 大學的 Strynadka 教授於 Science 期刊上發表了 Menomycin A 與 glycosyltransferase(GT) 的 binding 形式[1]，證明了 Menomycin A 的 oilgosaccharide部分與glycosyltransferase(GT)的確具有良好的結合能力（如圖3）。

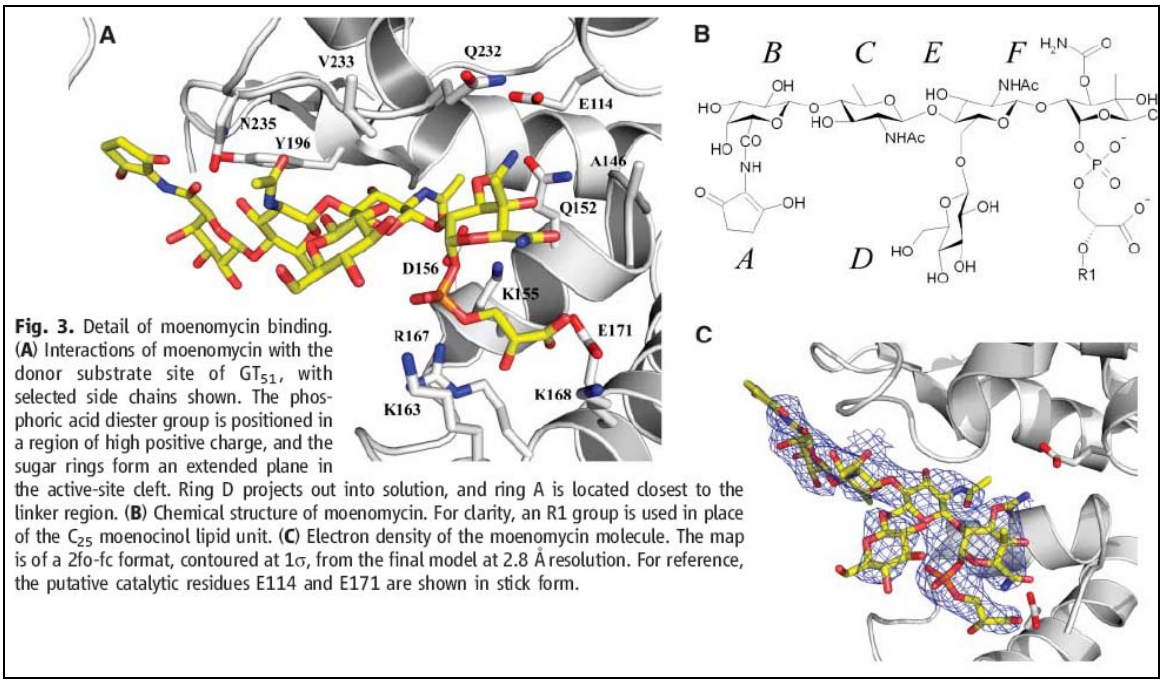


Fig. 3. Detail of moenomycin binding. (**A**) Interactions of moenomycin with the donor substrate site of GT_{51}, with selected side chains shown. The phosphoric acid diester group is positioned in a region of high positive charge, and the sugar rings form an extended plane in the active-site cleft. Ring D projects out into solution, and ring A is located closest to the linker region. (**B**) Chemical structure of moenomycin. For clarity, an R1 group is used in place of the C_{25} moenocinol lipid unit. (**C**) Electron density of the moenomycin molecule. The map is of a 2fo-fc format, contoured at 1σ, from the final model at 2.8 Å resolution. For reference, the putative catalytic residues E114 and E171 are shown in stick form.

在此，為了解決 Moenomycin A 不易被吸收以及以 Moenomycin A 為基礎發掘新的抗生素，我們將以修飾 Moenomycin A 的方法來設計可以抑制 TGase 的新型分子。

目前研究成果：

由於 MoenomycinA 並沒有被販賣，而且目前也沒有關於此類分子的全合成研究，因此，我們必須由商業上所販賣的動物成長促進劑來分離得到。其中包含了 4-8%的 Flavomycin 複合物（如圖 4）。Moenomycins 包括了 Moenomycin A、A12、C1、C3 以及 C4，而組要成分為 Moenomycin A。

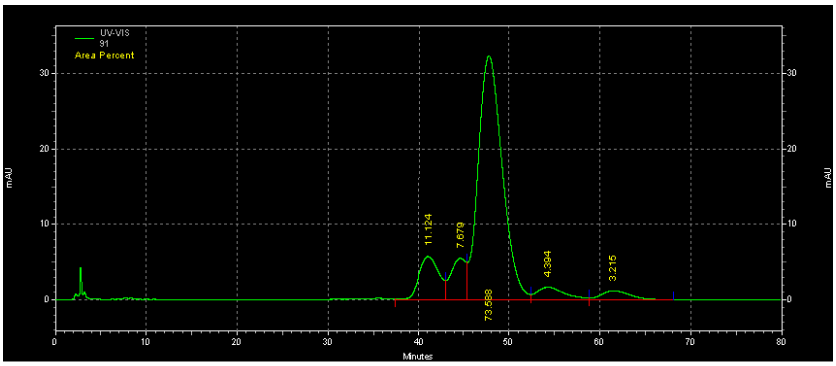


圖 4. HPLC of moenomycins

每根 peak 所對應之化合物由左至右分別為 moenomycin A_{12}、moenomycin C_1、moenomycin A、moenomycin C_3 以及 moenomycin C_4。藉由分離得到的 MoenomycinA，我們可以透過以下的化學修飾方法來得到 Moenomycin A 的類似物（如圖 5）。

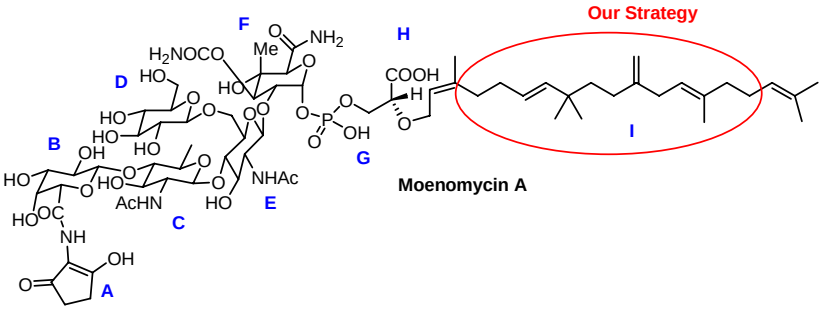


圖 5. Our strategy for modifying meonomycin A

我們的方法之一是修飾 Moenomycin A 的長碳鏈脂類，藉由組合式的處理，系統地嵌入一段新的長碳鏈脂類，以探討長碳鏈脂類部分對於 Moenomycin A 的活性會有何種影響。我們的方法是參考文獻資料，先將 Moenomycin A 保護，在利用臭氧裂解的方法，將 Moenomycin A 原有的長碳鏈脂類切除而得到醛類（如圖 6）。

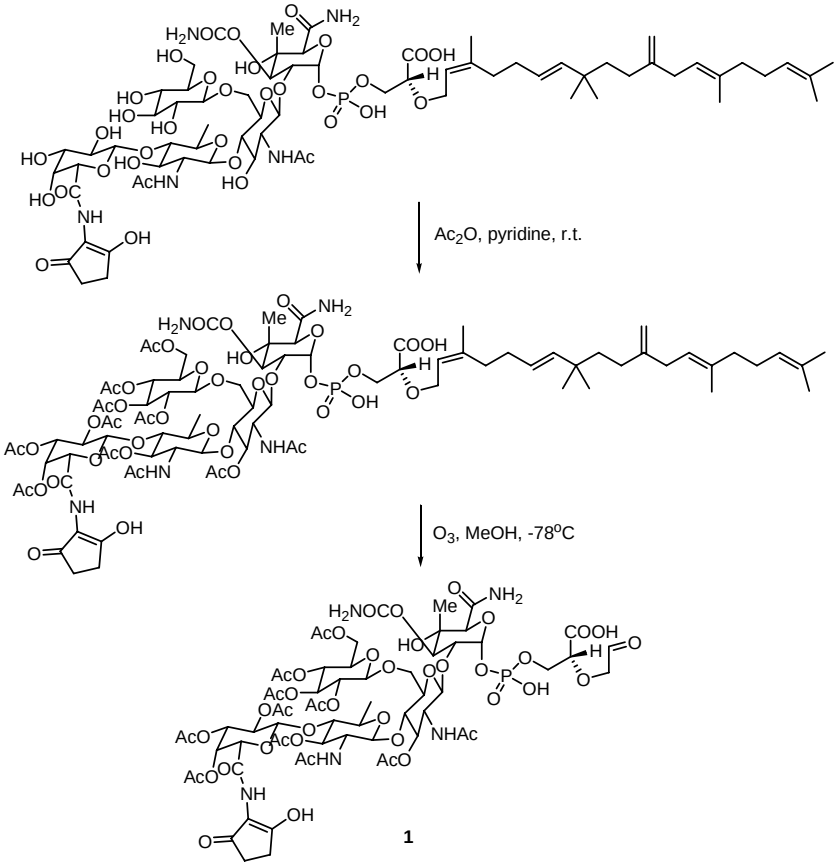


圖 6. 切除 Moenomycin A 的長碳鏈脂類

得到此具有醛基的 Moenomycin A 衍生物 **1** 後，我們可以利用 Wittig 反應，來接上一段新的長碳鏈脂類（如圖 7），如此，便可得到新的 Moenomycin A 衍生物並進行 MIC 測試，以探討長碳鏈脂類部分對 Moenomycin A 活性的影響。

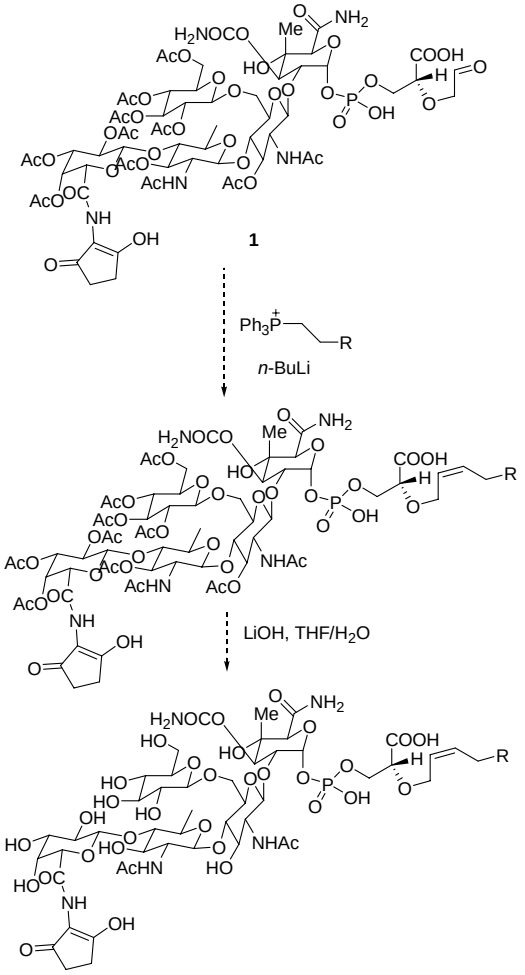


圖 7. The Wittig reaction of moenomycin A derivative **1**.

另外一個方法則是參考哈佛大學 Kahne 教授的論文[2]，將 Moenomycin A 降解成為 pentasaccharide 部分的衍生物，之後在利用化學方法重新建構成為長碳鏈脂類部分類似 Lipid II 的新型分子（如圖 8），以期待能夠具有良好的生物活性。

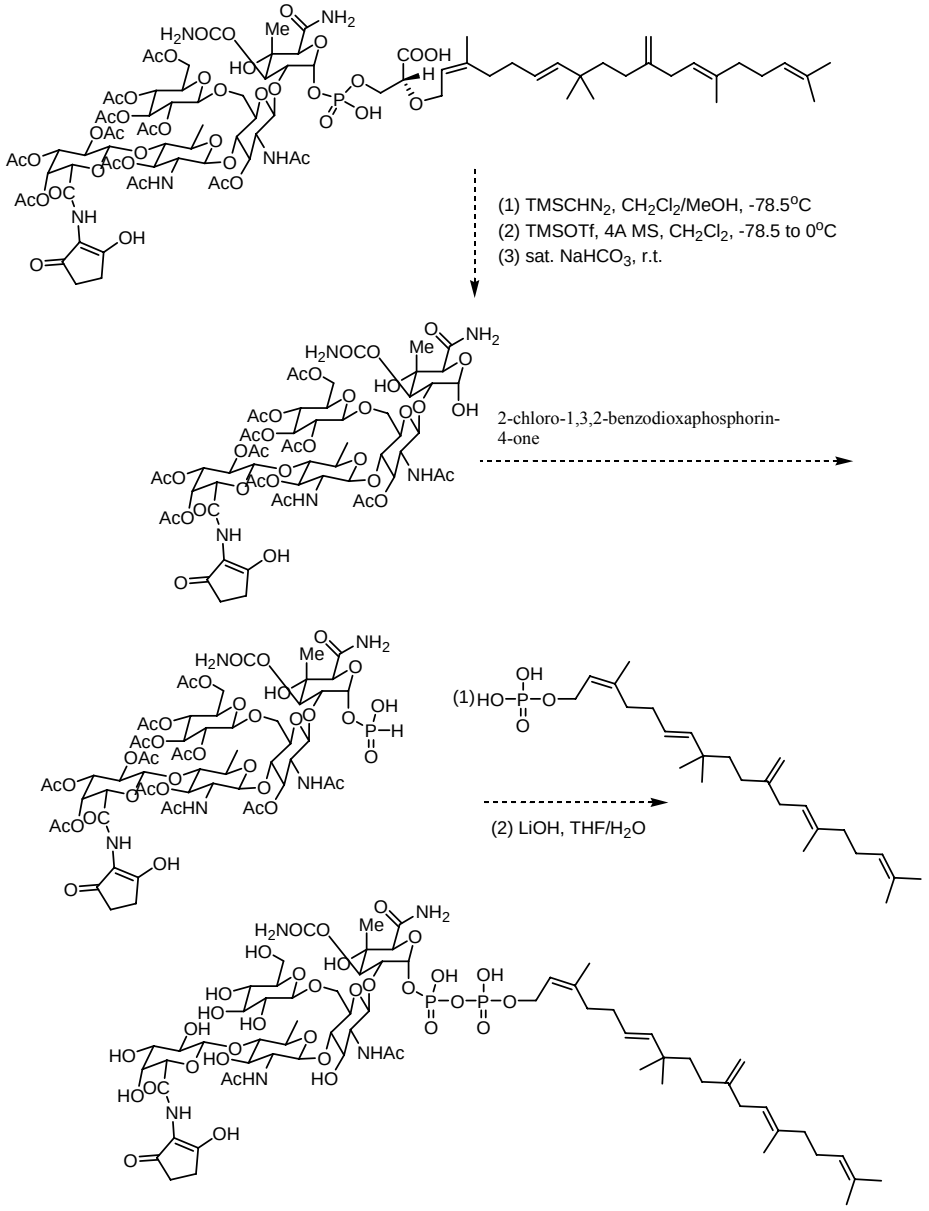


圖 8. The reconstruction of moenomycin A.

未來展望：

在文獻的實驗方法方面，還有一些較難處理的小步驟需要好好改善，而實驗內容也有某些關鍵點需要克服；再者，Moenomycin A 由於分離上的限制，也必須要花費人力方可得到足夠的原料，因此需要再花費一段時間方可得到好的結果。如果這兩種方法皆可成功建立，未來也可使用不同的長碳鏈脂類來重新建構而得到新型的分子，並且可以再將方向延伸至 Moenomycin A 的 oilgosaccharide 部分，將 pentasaccharide 部分降解成為 trisaccharide，再以此二種方法為本，進行更加深入的研究。

Student: 溫文賢（博二）
Research topic: 新型流感抑制劑的設計與合成

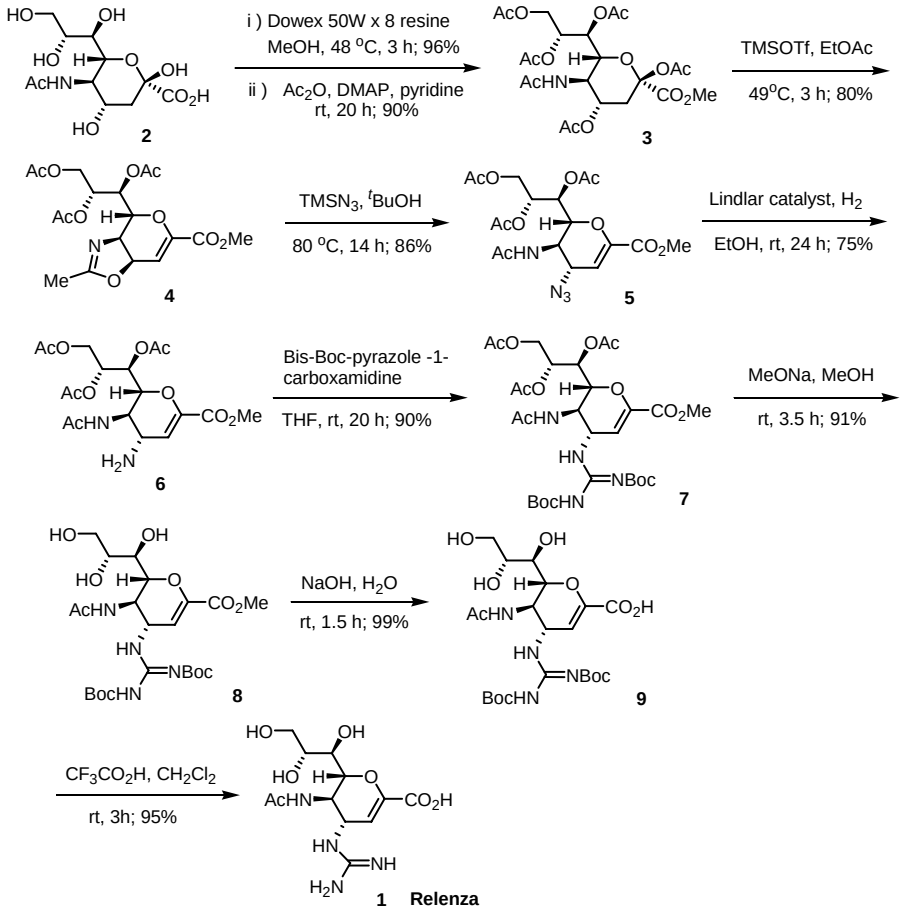
一、前言

流感(Influenza)是具有高度傳染力且會致死的傳染性疾病，從歷史上得知流感在全球各地都有爆發過，其中西元 1918 年、1957 年、1968 年更分別造成了全球 4000 多萬、100~400 多萬及 100 多萬人的喪命，而這三次流感大流行的起源是經常在野禽或家禽之間傳播的流感病毒株，演化出能感染人類的型式。這些病毒在人體內進一步適應，或與人類流感病毒株交換基因，形成了在人類之間也很容易傳染的新型病原。圖一顯示出了流感病毒株所有可能的感染源途徑，其範圍包含了某些哺乳類動物及鳥禽類，所以只要流感一旦爆發了，其勢必會對全球造成重大的影響[1]。

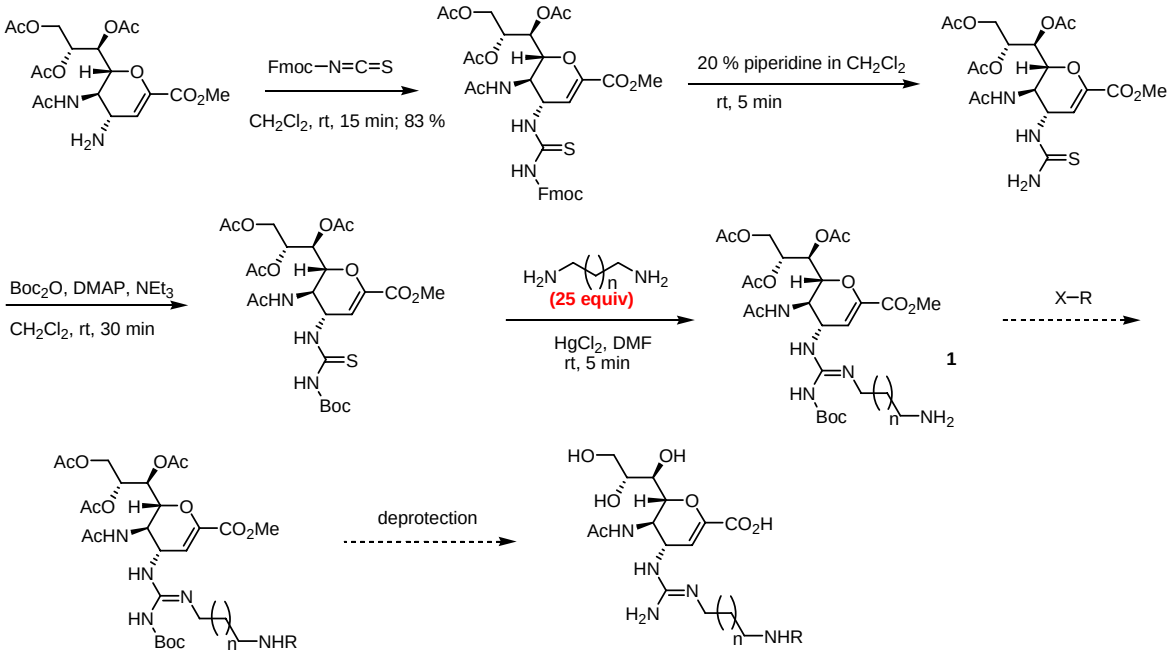
在整個病毒株的感染過程中，病毒株表面上有兩種蛋白質扮演著極為重要的角色，一是血球凝集素 (hemagglutinin, HA)，會與宿主細胞表面上的唾液酸結合，以利病毒進入細胞中，當新病毒株形成要離開細胞而去感染下一個新細胞時，另外一個蛋白質，神經胺酸酶 (neutaminidase, NA)會切斷新病毒株與宿主細胞的連結以利新病毒株去感染下一個新細胞。目前有效的抗病毒藥物瑞樂沙 (Relenza)及克流感(Tamiflu)，這兩種藥物都是針對神經胺酸酶的抑制劑，在一些研究當中發現，這兩種藥物的使用也會造成病毒的抗藥性，所以持續開發新的抗流感藥物是有其必要性及急迫性。

二、藥物設計及合成

在 2006 年的自然期刊上報導了神經胺酸酶(N1)與各種抑制劑的結晶[1]，其發現在神經胺酸酶與抑制劑作用的活性中心旁還有一個凹槽(pocket)，如果利用原先的抑制劑再衍生出一些可以跟此”凹槽”作用的官能基則可以大大的提升原來的抑制效果，本實驗室設計的想法是利用已具有很好抑制效果的神經胺酸酶抑制劑瑞樂沙作為主要架構，再利用有機合成的方法去做修飾或衍生以得到效果更好的新型抑制劑，主要衍生的位置是在 C-4 上再接一段長短適中的烷胺基分子(alkyl amine)，最後再利用胺基去接上各種小分子進而建立一小型的分子資料庫(library)，而從裡面找出最佳的抑制劑或利用神經胺酸酶與抑制劑的結構與活性關係(Structure Activity Relationship, SAR)再進一步的修飾胺基上的官能基，首先我們已在很短的時間內成功的合成出瑞樂沙以及化合物 **1**。

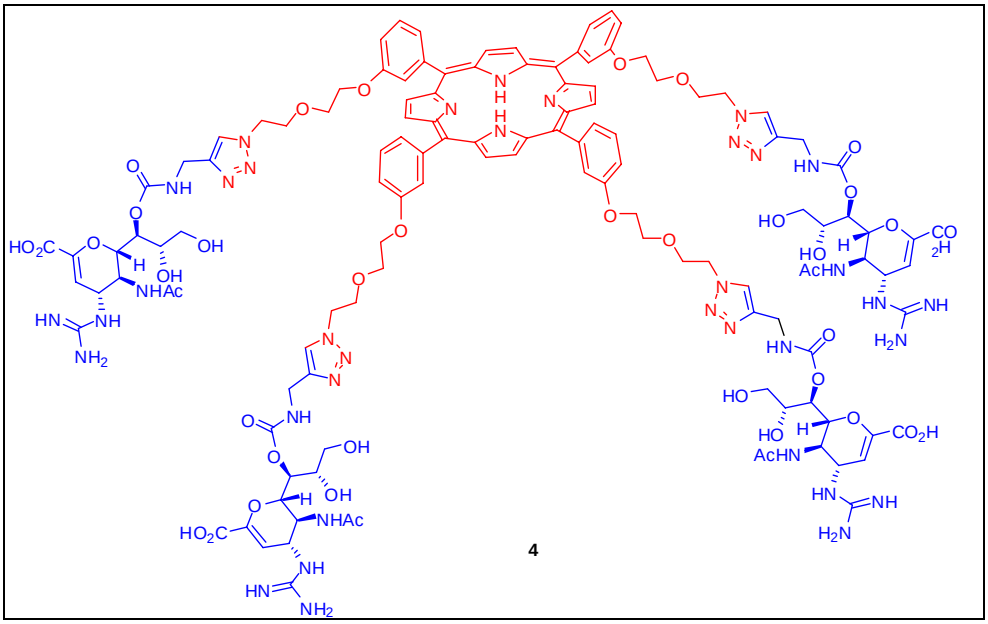


圖一、Relenza 之合成

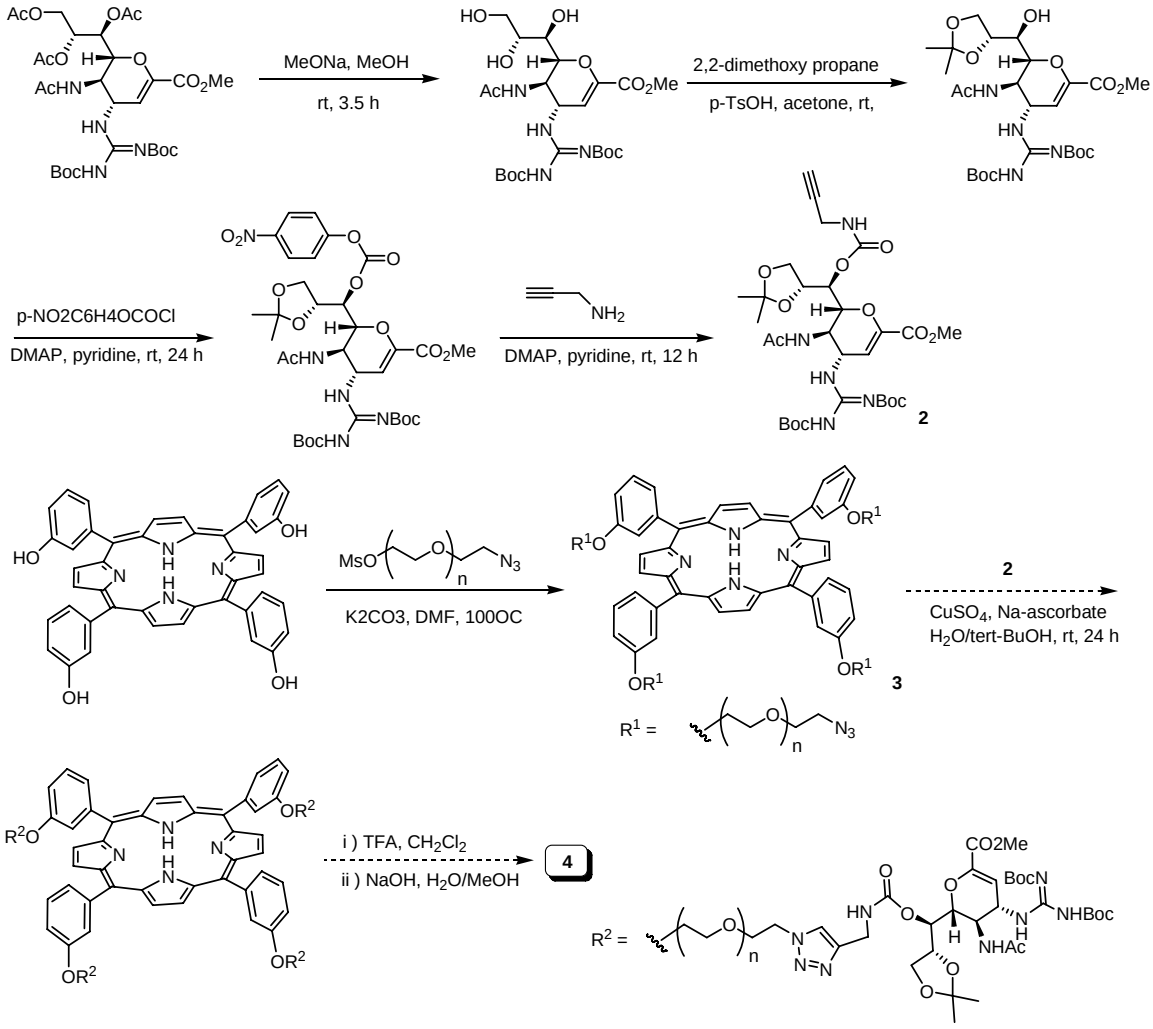


圖二、Relenza 衍生物之合成

另一方面，已知神經胺酸酶在細胞表面上以四聚體的型式存在，若利用多價效應(multivalent effect)則可增進對病毒的抑制能力，在 2005 年 GSK 藥廠合成出了瑞樂沙的二聚體，其也証實了的確利用多價效應是可以提高抑制病毒的能力，本實驗室也希望更進一步合成出帶有四個瑞樂沙分子的四聚體 **4**。



從合成的角度我們把此分子分成兩個部份，第一部分是瑞樂沙的衍生物 2，第二部份是紫質的類似物的合成，此類分子是已知對人體沒有太大毒性，而且已經有非常多的研究指出此類分子可應用在光動力療法上以殺死癌細胞或病毒，此四聚體的合成途徑如圖三。我們實驗室以經合成出了化合物 **2** 及化合物 **3**，最後利用”Click Chemistry”把兩個部分連接起來就可以得到目標分子 **4**。



圖三、Relenza 四聚體之合成

三、未來計畫

相信在極短的時間內我們實驗室應該可以用化合物 **1** 為中間體進而迅速的建立出神經胺酸酶抑制劑的小型分子庫，另一方面，我們也可以進一步改變化合物 **4** 中間部分長鏈的長度而找到一個有最好抑制效果的分子。

。

四、參考文獻

1. Russell, Rupert J.; Haire, Lesley F.; Stevens, David J.; Colins, Patrick J.; Lin, Yi Pu; Blackburn, G. Michael; Hay, Alan J.; Gamblin, Steven J.; Skehel, John J. *Nature* **2006**, *443*, 45.

Student: 呂紹宏（博一）
Research topic: 感測系統用於水相偵測鳥糞嘌呤核苷單磷酸鹽及醣類分子之設計與合成

(一) 前言

分子辨識（molecular recognition）在近年來的發展上有越來越蓬勃的趨勢。隨著人類對於生命科學更加深入的研究了解，如金屬離子、陰離子、陽離子、醣類分子乃至於核酸等受質，在生物體內都扮演著舉足輕重的角色，也因此擴大了分子辨識的範疇。由於生物體內的作用機制相當複雜，藉由分子辨識的機制來了解這些分子間的作用力，進而解開離子傳輸、生物訊息傳遞等關鍵步驟，有助於代謝的調解與疾病的治療。因此合成人工的水溶性受體直接來進行分子辨識有其絕對的重要性。

核苷酸是由一個磷酸根、一個五碳醣和一個鹼基所組成。許多核苷酸組合成一長條，就是去氧核醣核酸（DNA）分子，包含腺嘌呤（A）、鳥糞嘌呤（G）、胞嘧啶（C）及胸腺嘧啶（T）四種鹼基，而核醣核酸（RNA）的組成則是腺嘌呤、鳥糞嘌呤、胞嘧啶及尿嘧啶（U）四種鹼基。而華生–克里克的 DNA 雙股螺旋結構就是由這些含氮鹼互相堆疊及互補吸引的氫鍵建立而成。

在許多研究指出，若是核酸中這些含氮鹼基無法與另一含氮鹼基達成密合的互補雙鍵(mismatch)，或是形成突起(bulge)，則很有可能造成基因的突變，因此相當多科學家急於想設計出能夠辨識特定含氮鹼基的感測分子，以便於偵測 DNA 中可能引起突變的位置，在這些含氮鹼中，我們希望設計出感測分子來選擇性辯識鳥糞嘌呤核苷單磷酸鹽(GMP)，並增加其水溶性，以便於將來可用於體內(in vivo)測試。

在另一部份醣類分子辨識方面，醣分子不但是能量的來源，且也有實驗證實寡醣分子在生物體內細胞與細胞聯繫及訊息傳遞中扮演著重要的地位，甚至在細胞被病毒或細菌感染時也顯示與糖類分子辨識有直接關係，而好的醣類受體分子除了可以當作藥物(anti-infective drugs)使用外，也可以開發成為糖的感測器，用於需要長時間監控體內醣分子濃度的病人身上。

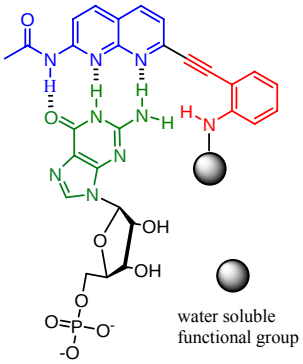
醣分子在生物體內的重要性已是眾所皆知，但由於醣分子本身具有多官能基及三度空間的立體結構特性，因此在人工合成受體的設計上比起其他受質更具有挑戰性，也正因為如此，文獻上與醣分子辨識的相關著作並不多，由於其重要性以及發展性，所以我們希望能設計出可水溶且具辨識性的醣類受體分子，使將來也有希望用於體內(in vivo)測試。

(二) 實驗部份

本實驗室已成功合成出針對鳥糞嘌呤衍生物具選擇性的口奈啶受體分子[1]，

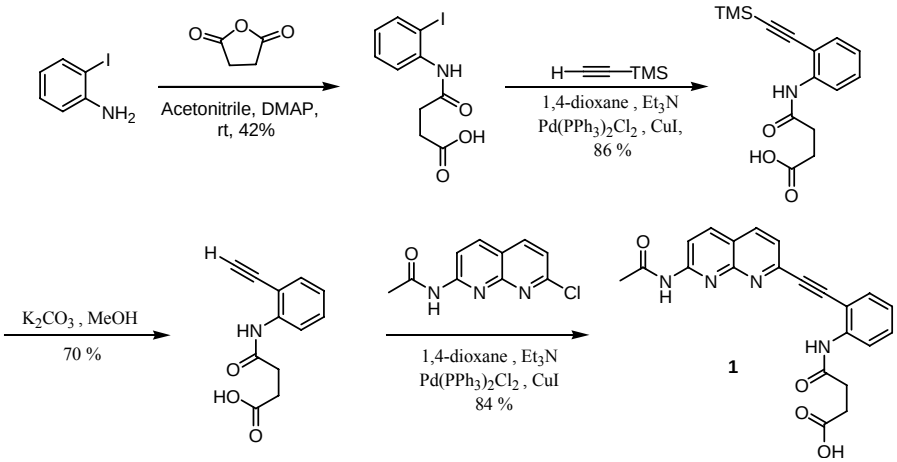
利用口奈啶受體分子已知的三重互補氫鍵，再加上三鍵延伸共軛的苯胺達到第四重氫鍵辨識，藉此增加與受體分子鳥糞嘌呤的結合常數，對於此方面的研究，我們認為還有改進的空間，我們希望能夠直接於水相辨識鳥糞嘌呤核苷單磷酸鹽，而不是僅侷限於有機相辨識鳥糞嘌呤衍生物，以便將來可用於生物體內的測試及應用。

以過往的研究為基礎，我們希望由苯胺延伸出的官能機能與核苷或單磷酸鹽產生氫鍵吸引力，更藉此官能基使受體分子達到水溶性如**圖一**，進而進行水相分子辨識。



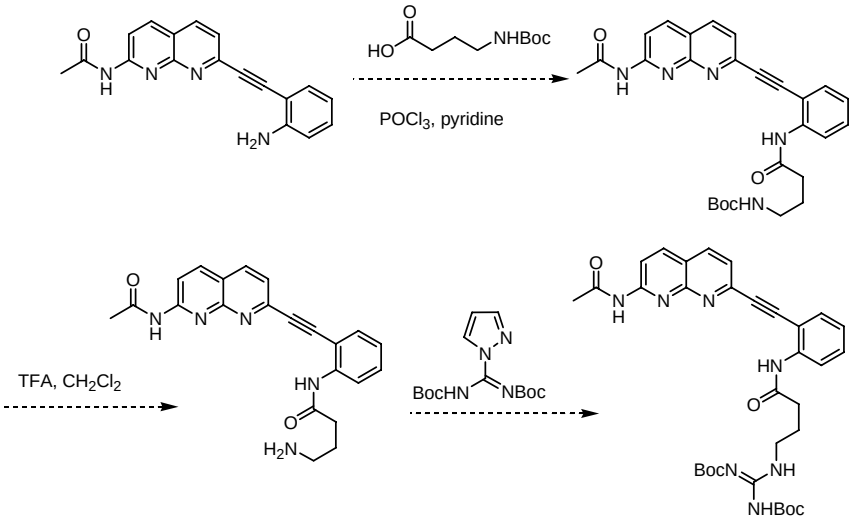
圖一 由苯胺引進水溶性基團以辨識 GMP 示意圖

在我們設計的受體分子中，首先由於酸基容易融於水中，所以我們很容易先想到引進一個酸基基團，希望藉由此酸基基團使得整個受體分子水溶性增加，而帶有酸基基團的受體分子之合成路徑如**圖二**。



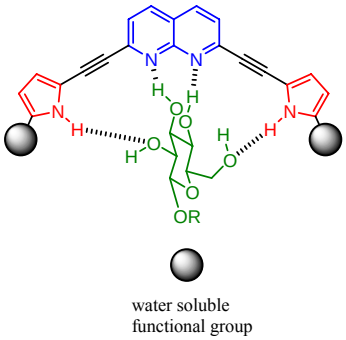
圖二 鳥糞嘌呤核苷單磷酸鹽含酸基之受體分子合成路徑

除了引進酸基基團增加水溶性外，我們希望引進的基團也能與 GMP 的醣或是磷酸根部分有所鍵結，因此我們引進了 guanidine 基團，其合成路徑如**圖三**。



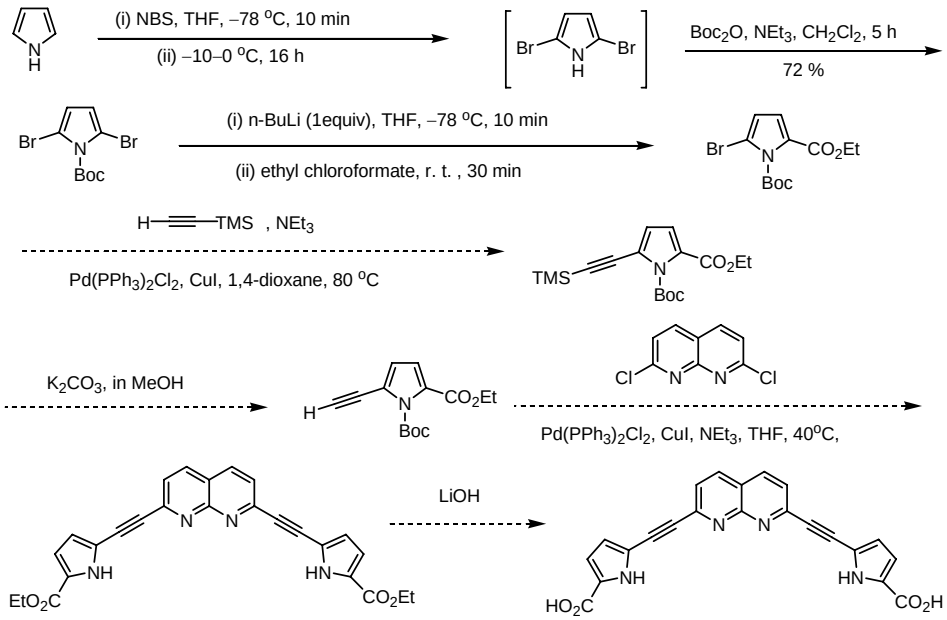
圖三 鳥糞嘌呤核苷單磷酸鹽含 guanidine 之受體分子合成路徑

在另一部份醣類分子辨識方面，本實驗室已成功合成出針對單醣衍生物具選擇性的受體分子 BPN[2]，以過為往的研究為基礎，我們亦希望由 BPN 的 pyrrole 部份衍生出具水溶性的基團如**圖四**，進而進行水相分子辨識。



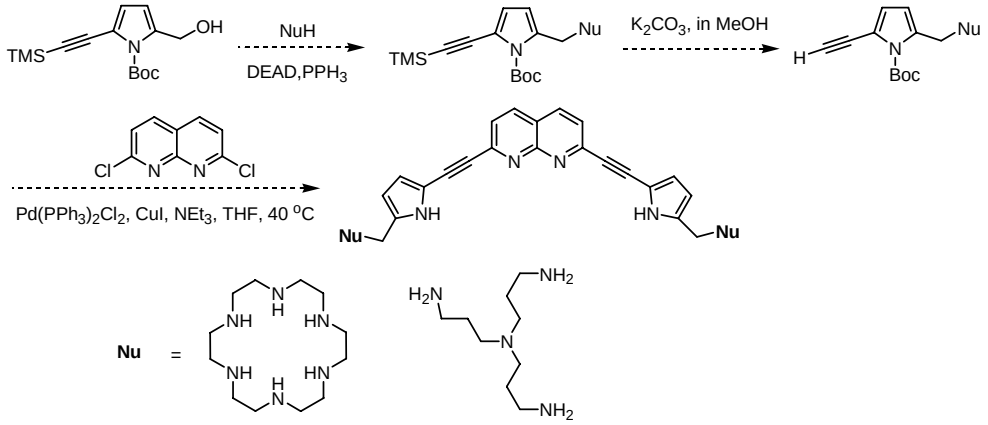
圖四 水溶性醣類受體分子示意圖

一樣的想法我們認為引進一個酸基可以增加我們受體分子的水溶性，於是我們在 pyrrole 分子上引入一個酸基，而我們的之合成路徑如**圖五**。



圖五 醣類受體分子合成路徑

另外文獻中也有相當多的基團可以增加分子的水溶性，例如使用冠狀醚或是含胺基分子，我們希望藉由引進不同水溶性基團，以建立一系列水溶性受體分子，而從中找尋到適合辨識醣類分子的受體，其合成策略如**圖六**所表示。



圖六 一系列合成水溶性醣類受體分子之合成策略

(三) 未來方向

由於我們實驗室已成功合成出鳥糞嘌呤衍生物及醣類衍生物的受體分子，我們希望保留原本受體分子與受質分子的結合孔洞以及特殊的紫外-可見光和螢光性質，並透過衍生出的水溶性基團而使受體分子能於水相達到辨識效果，進而增加多重氫鍵辨識效果而使結合常數大大增加，若能成功創造出水溶性受體分子，則相信將來在生物系統內將可有相當廣泛的應用價值。

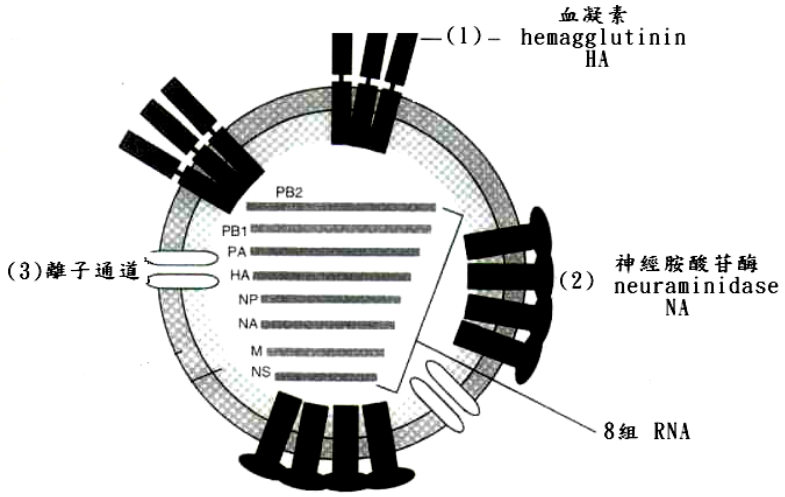
(四) 參考文獻

1. Shao-Hung Lu, Srinivasan Selvi, and Jim-Min Fang, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 117–122.
2. Jim-Min Fang, Srinivasan Selvi, Jen-Hai Liao, Zdenek Slanina, Chao-Tsen Chen, and Pi-Tai Chou, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3559–3566.

Student: 陳俊霖（博一）
Research topic: Synthesis of Zanamivir Derivatives as Anti-Influenza Agents

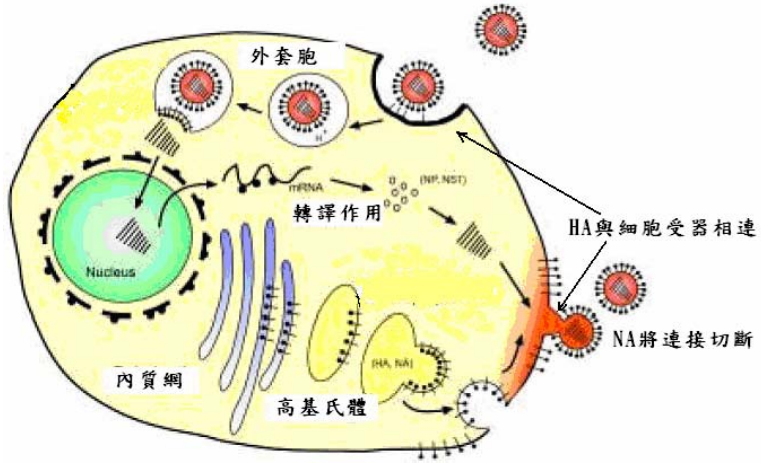
一. 前言

流行性感冒（Influenza）為一種急性呼吸道疾患，是由流行性感冒病毒所引起。病毒分 A、B、C 三型，其中 A 型病毒所引起的流行性感冒病人的症狀最為嚴重，也會造成大規模的流行。流行性感冒病毒之遺傳物質為 RNA，外殼上具有三種主要構造(圖一)：(1)血凝素[hemagglutinin, HA] (2)神經胺酸苷酶 [neuraminidase, NA]與(3)離子通道。



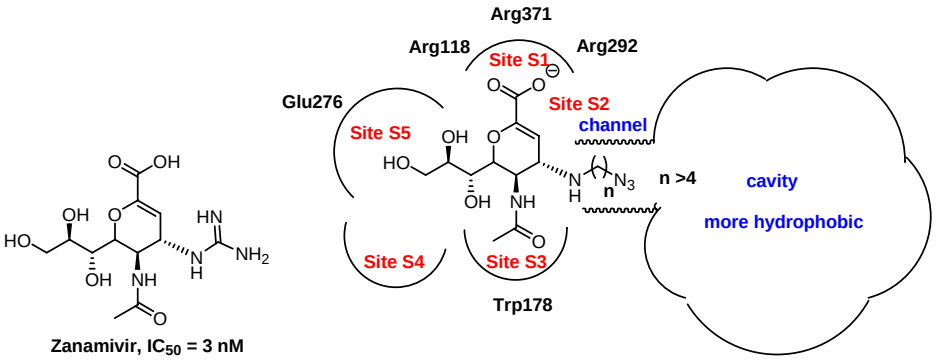
圖一. 感冒病毒構造

當感冒病毒要進入活體細胞時，病毒表面上的血凝素(HA)與活體細胞表面的受器相結合後，病毒進入細胞形成外套胞，接著將遺傳物質 RNA 注入細胞核之中，利用活體細胞的資源將病毒本身所需的蛋白質轉譯出來後，在細胞內重新組裝後，離開細胞時，血凝素(HA)和細胞表面受器在次相連，故必須以神經胺酸苷酶(NA)將之切斷後，使整個病毒可以離開宿主細胞，再感染其他正常細胞，所以本實驗室設計抑制劑的重點在於抑制神經胺酸苷酶(NA)切除血凝素(HA)與細胞表面受器相連的狀態，使病毒不能離開宿主細胞而達到抑制的效果(圖二)。



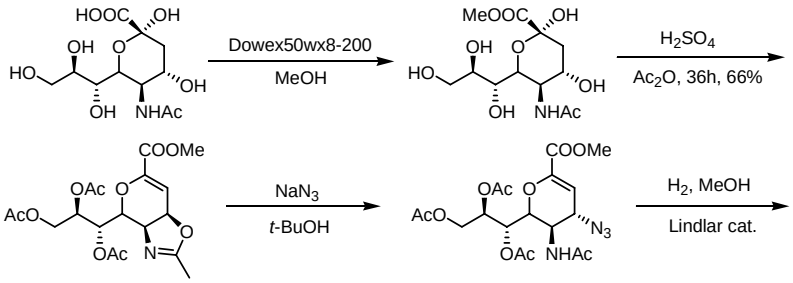
圖二. 感冒病毒感染週期

本實驗室在解讀 Relenza 與神經胺酸苷酶(NA)的作用關係時發現，在 Relenza 的 4 號碳位置有一個 tunnel 存在，而 tunnel 的後端具
有個舒水性的空穴，所以為了使 Relenza 與神經胺酸苷酶(NA)的結合更加完美達到更好的抑制效果，所以本計畫預計在 Relenza 的 4 號胺基上，延伸出取代基，並在取代基末端以 N_3 當作另一個作用端，在延伸上可以使用 click reaction 作其他取代。

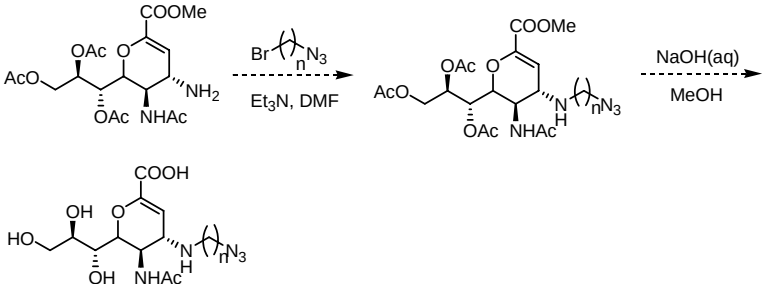


二. 本文

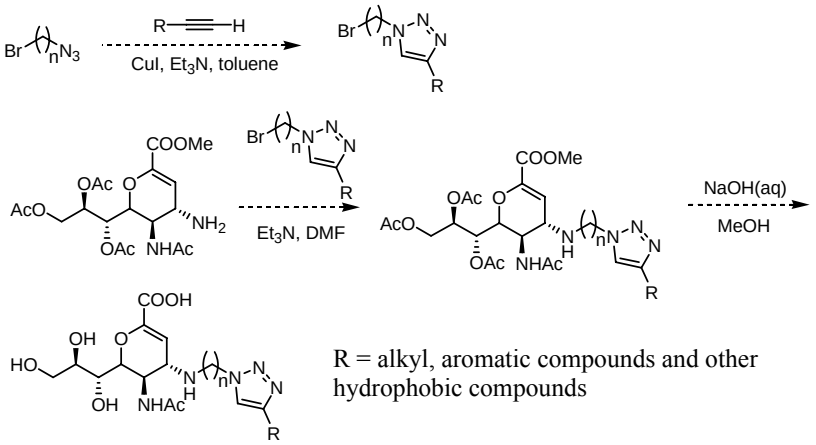
計畫由 sialic acid 為起始物，進行以下反應



(1)一般步驟：



(2)其他衍生物步驟:



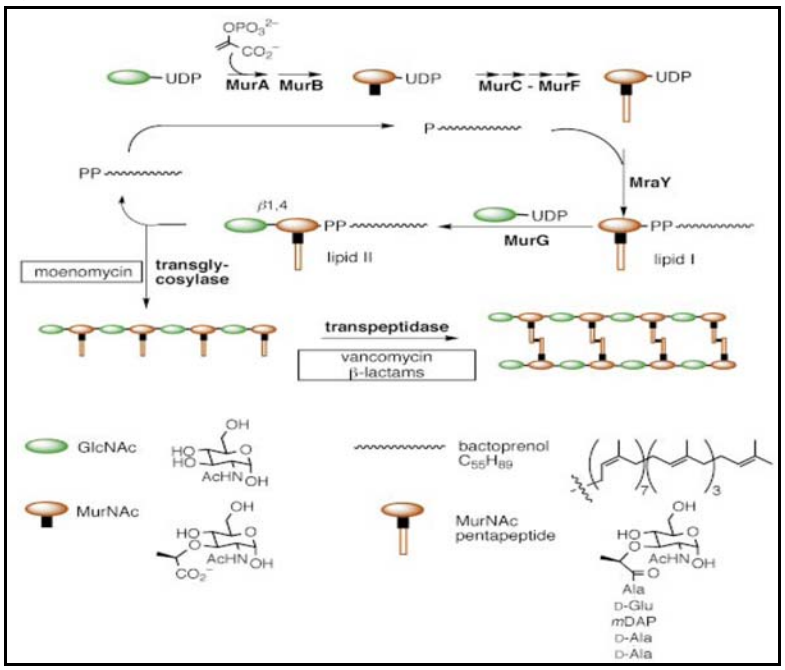
三. 未來展望：

合成 Relenza 衍生物後，將測試其生物活性，在運用其生物活性測試數據研判官能基與神經胺酸苷酶(NA)作用，以便於接下來的構造上改來，來找出最佳的抑制流感化合物。

Student: 王仁聰 (博一)
Research Topic: 設計合成 Lipid II 類似物作為抗生素之研究

一. 前言

致病型細菌一直是人們健康的威脅來源之一，雖然目前研究上有許多種類的抗生藥物於臨床上使用，但這類的細菌會因環境的變遷與生存的需求，而突變出更能適應的菌株；對於這些苟活下來的細菌，可能將它們的抗藥基因傳給子代，使得原本的藥物喪失作用或是降低效果而產生抗藥性；因此，人們對傳染性疾病的憂心又再度升高，原有的抗生素已經不再是控制病情的萬靈丹，具抗藥性細菌散播速度更是超出我們的想像；因此，如何發展更新的抗生素將是一項重要挑戰。



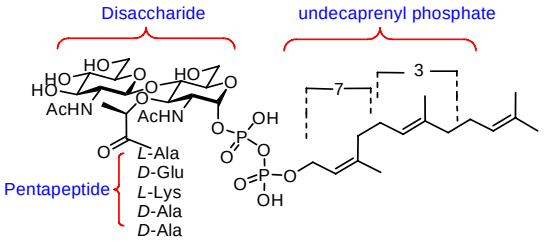
圖一、 細胞壁生合成過程(註: Moenomycin 抑制 GT 活性、Vancomycin、β-lactams 抑制 TP 活性)[1]

細胞壁的形成主要是利用膜上轉醣酶(glycosyltransferase, GT)與轉胜肽酶 transpeptidase (TP)的雙功能蛋白質(penicillin-binding proteins, PBPs)，其催化肽聚醣(peptidoglycan)單元以高度網狀聚合而成，抵抗了滲透壓與維持整個細胞的形狀(圖一)[1]。而這酵素目前被認為是極佳的藥物發展對象，因為它是建構細胞壁所必須部份，並且與哺乳類細胞是不相同的。而原先發現已的抗生素如: Vancomycin、Penicillin 等可抑制胜肽酶的活性，但是經人們大量的使用，產生抗藥性導致治療上的窘境日漸突現；而 Moenomycin 則是多醣體的抗生素，其結構和轉醣酶受質類似，模擬了轉醣酶催化時的過渡態，具有不錯的抑制效果，但是 Moenomycin 分子不易被人體給吸收，大大降低了用藥的價值。

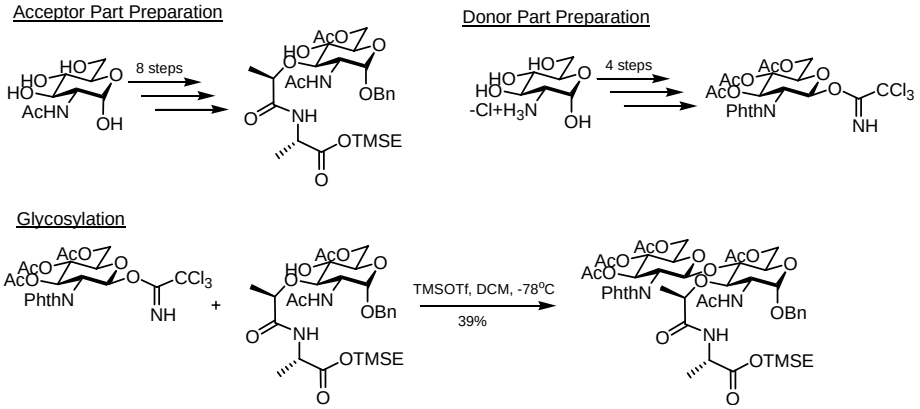
在我們的研究方向，主要是設計與合成出具有抑制細胞壁生合成的化合物，因此以天然的 lipid II 受質為主軸架構，修飾官能基來獲得各式各樣的 lipid II 的類似物，針對我們所研究的目標酵素-轉醣酶進行活性分析。

二. 實驗部份

首先，在整個研究中必須建立完整的生物分析系統，對於所純化出的蛋白質評估酵素活性特性，因此我們須先經由化學合成法來獲得足量 transglycosylase 的天然受質 lipid II (圖二)。而 lipid II 結構合成策略上，由文獻[2]與實驗室已合成出的技術，我們分為三片段進行: (1)disaccharide 先接上 L-Ala (2)tetrapeptide (3)undecaprenyl phosphate；在雙醣部份我們是以 GlcNAc 與 MurNAc(含 L-Ala)經由 glycosylation 而得(流程一)。

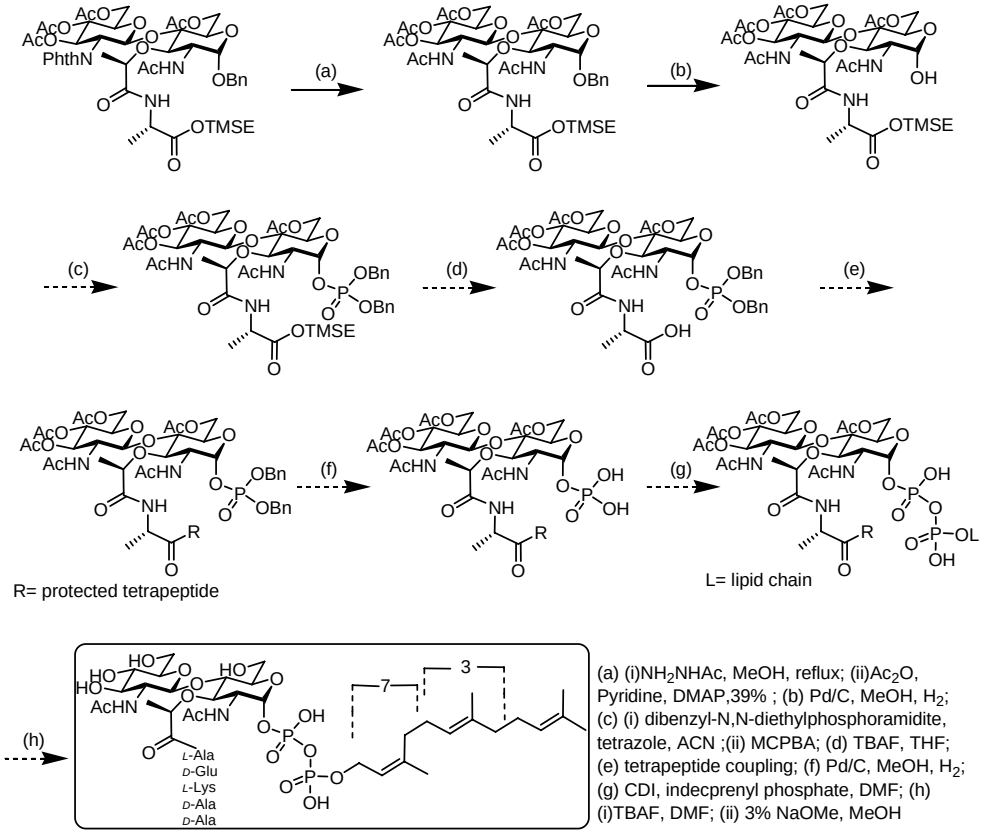


圖二、天然 Lipid II 受質結構



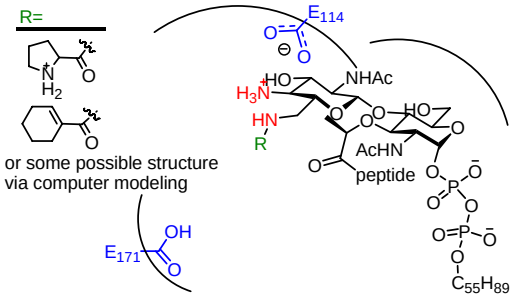
流程一、Disaccharide 合成步驟

製備雙醣部份後，經由下列(式二)的合成步驟，接上 tetrapeptide 與萃取出 undecaprenyl phosphate 部份，去掉各保護基經 HPLC 純化，可得到我們預期的 lipid II 受質產物。



流程二、Lipid II substrate 合成路徑

後續研究方面，今年 Strynadka etc.在 science 雜誌中 [3]，報導出在細胞壁合成的 transglycosylation 過程中，作者利用 moenomycoin 抑制轉醣酶活性後，首次成功地將晶體結晶出，經 X-ray 解出的晶體提供了 Moenomycoin 跟轉醣酶(GT_{51})相互作用的主要活性區，並由電子密度圖分佈來得知各區域帶電的情形；這對於我們結構設計提供許多訊息；因此我們改變原先的策略，目前打算將 lipid II 分子修飾醣區的 GlcNAc 部份，將 4′和 6′中氫氧基改變成胺基，我們預期 4′-的胺基在生理條件下會形成胺鹽而帶正電荷，與胺基酸序列中的 E_{114} 負電荷產生離子作用力；而修飾的 6′-胺基部份會先以電腦模擬計算，篩選出吻合度高的氮雜環酸類，經由醯胺鍵偶合連接，亦利用著氮雜環正電荷之特性來模仿醣偶合反應的正價過渡態(圖三)。



圖三、預期具活性的 Lipid II 受質類似物

三.未來方向

製備足量 lipid II 化合物以建立完善生物分析後，開始著手修飾物的合成，針對 GlcNAc 的 4′和 6′-氫氧基置換成胺基，增加修飾後的受質與酵素鍵結能力而達到抑制效果，這方面想法尚未有文獻報導過，因此修飾後的 lipid II 受質若達到我們預期的效果，這將提供以 lipid II 修飾抑制物為主的抗生素，經由結晶更大大的提供轉醣酶作用活性位子。

Reference:

(1) Thomas K. Ritter, Chi-Huey Wong *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3508-3533
(2) Benjamin Schwartz, Jay A. Markwalder, Yi Wang *J. Am. Chem. Soc*. **2001**, *123*, 11638-11643
(3) Andrew L. Lovering, Liza H. de Castro, Daniel Lim, Natalie C. J. Strynadka *Science* **2007**, *315*, 1402-1405

方俊民教授出席國際會議報告
計畫編號：95-2113-M-002-007
計畫名稱：僿吩組成雜環化合物之合成及應用研究(2/3)
計畫主持人：方俊民
執行起迄：2006/08/01 ~ 2007/07/31
執行單位：台灣大學化學系

On March 30, I was invited by Prof. Fred Ziegler to give a lecture in the Department of Chemistry, Yale University. My lecture title was "SARS and antiviral drug discovery". Before talking on the main subject, I first briefed our current research programs that include (i) natural product chemistry of *Dendrobium huoshanense* and *Gastrodia elata*, (ii) SmI_2/mercaptan co-catalyzed acetal-Tishchenko-lactone reactions, (iii) Carbohydrate elaboration, analysis and sensing, in particular, immobilization of oligosaccharides; (iv) Transglycosylase substrates and inhibitors in bacterial cell wall biosynthesis, (v) Phosphate ion sensors with pyrene reporting units, and (vi) Detection and inhibition of influenza virus. My lecture was greatly appreciated by audience.

This lecture is mainly on our structure-based SARS drug discovery program, which turned out to be successfully in discovery existing drugs and synthetic inhibitors against severe acute aspiratory syndrome. The main content includes (i) SARS 3CL protease preparation, (ii) High throughput fluorescence assay, (iii) Protease inhibitors discovery, (iv) Cell-based screen of anti-SARS agents, and (v) 3-D structure of protease–inhibitor complex. Due to the limitation of lecture time, I focused on the efficient synthesis of AG7088 and dipeptidomimetic α,β-unsaturated esters, as well as their properties on 3CL protease inhibition, anti-SARS activity, and cytotoxicity. I also talked about our serendipitous discovery of benzotriazole esters as mechanism−based inactivators of SARS 3CL protease.

The next day, March 31, we held a full-day symposium on synthetic organic chemistry at Yale University to mark Professor Fred Ziegler's retirement from full-time service. This symposium featured six lectures by

Patrick Harran (Univ. Texas Southwest Medical Center): Synthetic means to reach natural ends.
James Leighton (Columbia Univ.): Synthetic silicon as a Lewis acid: New strategies & opportunities for asymmetric synthesis.
Paul Wender (Stanford Univ.): Fantastic Fred: Synthesis and lessons for a lifetime.
Glenn Micalizio (Yale Univ.): Group 4 metal-mediated reactions for carbon–carbon bond formation: cross coupling via directed carbometalation.
Koichi Mikami (Tokyo Inst. Technol.): Two decades after Yale with my mentor.
Gilbert Stork (Columbia Univ.): Morphine, the ageless prima donna.

Because I have common research interests with these speakers, and close "academic relationship" with them, we have very good communication in this symposium. This vivid chat and discussion continued in the gala dinner party.