

단 신

탄소로 연결된 당단백질 합성을 위한 이민에 시안기의 효소적 도입

배철만 · 이택헌 · 안용현*

단국대학교 화학과

(2003. 12. 11 접수)

The Enzymatic Introduction of Cyanide into Imine for the Synthesis of Carbon-linked Glycopeptide

Cheolman Bae, Teckheon Lee, and Yonghyun Ahn*

Department of Chemistry, Dankook University, Seoul 140-714, Korea

(Received December 11, 2003)

주제어: 아몬드분말, 당단백질, 이민, 효소

Keywords: Almond Meal, Glycopeptide, Imine, Enzyme

당단백질은 약으로서의 잠재된 가능성 때문에 많은 관심을 갖게 되었다.¹ 탄수화물에 아미노산부분이 산소 또는 질소로 glycosidic 결합을 하고 있으며 이러한 구조는 분자간 인식을 하는데 아주 중요한 기능을 한다. 산소로 연결된 glycosidic 결합을 하는 예는 GalNAc-O-ser, Gal-O-ser, Man-O-ser, GlcNAc-O-ser등이 있다.² 산소 또는 질소로 연결된 당단백질들을 의학적 연구를 위하여 사용할때 생체내에서 화학적 또는 효소적 작용으로 당이 해리된다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 산성 또는 염기성조건하에서도 안정하며 생체내에서도 당이 해리되지 않는 산소 또는 질소가 탄소로 치환된 당단백질(C-glycopeptide)을 연구하게 되었다. 탄소로 연결된 β -galactoside serine이 처음 합성된후 다양한 합성방법이 알려졌다.³ Wittig rearrangement,⁴ C-galactosyl enamide ester의 비대칭 수소화반응⁵ 그리고 키랄 보조기를 이용한 방법⁶을 이용한 연구가 보고된 바 있다.

이민에 촉매를 이용한 광학선택적인 이민기의 도입은 질소를 포함하는 기능성화합물의 합성에 중요한 방법으로 이용되어져 왔다.⁷ 대표적인 방법이 Strecker 합성이다.⁸ 이러한 비대칭 합성방법은 광학적으로 활성을 가지는 α -amino nitrile를 얻게 되고 이를 산으로 처리

하였을 때 광학적으로 활성을 가지는 인공아미노산을 만들게 된다. 이러한 Strecker반응을 탄소-당단백질(C-glycopeptide)의 입체선택적인 반응에 이용하였고 이때 키랄보조제로서 키랄아민의 역할이 매우 중요하다. 그러나 탄소-당단백질을 합성하기 위하여 Strecker 반응을 이용한 결과 낮은 입체선택성을 나타낸다.⁹

지방을 제거한 아몬드 분말은 (R)-oxynitrilase를 포함하고 있고 이 효소는 알데히드 또는 케톤에 이민기를 입체선택적으로 도입하여 키랄 알콜을 생성한다.¹⁰ 본 연구에서는 지방을 제거한 아몬드 분말을 사용하여 이민에 이민기를 도입하여 탄소-당단백질을 입체선택적으로 합성하기 위한 연구를 시도하였다.

실 험

합성에 사용한 아민들은 Aldrich사의 제품을 사용하였고 화합물의 분리에 사용된 용매는 시약급으로 정제하지 않고 사용하였다. 합성시 사용한 CH_2Cl_2 는 CaH_2 를 사용하여 물을 제거한 후 증류하여 사용하였다. TLC 판 (60 F254)은 Merck사제품을 사용하였으며 column chromatography는 silica gel(230-400 mesh)를 사용하였다. ¹H NMR은 200 MHz(Varian Gemini 200) 또는 400 NMR

spectrometer(Bruker)를 사용하여 얻었다. 지방이 제거된 아몬드 분말은 Sigma사에서 구입하였다.

1,2;3,4-Di-O-cyclohexyliden- α -D-galactopyranose의 합성

Cyclohexanone(8 mL)이 들어있는 플라스크에 D-galactose(6.5 g, 36 mmol)을 넣고 1,4-dioxane(5 mL)을 가한 후 2분 동안 교반하였다. 주사기로 황산(2 mL)을 한 방울씩 천천히 주입하면서 상온에서 3시간 교반하였다. 반응이 완결된 후 chloroform(20 mL)을 넣고 포화된 sodium bicarbonate 용액을 가하여 중화시킨 후 유기층을 분리한다. 유기층에 무수 MgSO_4 를 가하여 물을 제거한 후 얻어진 유기용매를 감압 하에서 제거하였다. 생성물은 silica gel column chromatography로 정제하였다(Hexane: Ethyl acetate=8:2 R_f =0.19). 수득율 8.2 g (yield: 67%) $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 200 \text{ MHz})$ δ 5.56(d, 1H, J = 5 Hz), 3.64~4.72(m, 5H), 1.18~1.79(m, 20H).

1,2;3,4-Di-O-cyclohexyliden- α -D-galacto-hexo-1,5-dialdopyranose(I)의 합성

-60 °C에서 250 mL의 플라스크에 dimethyl sulfoxide (3.1 mL, 44 mmol)를 CH_2Cl_2 (20 mL) 용액에 넣고 CH_2Cl_2 (10 mL)에 녹인 oxalyl chloride(1.86 mL, 22 mmol)를 N_2 가스 하에서 가한 후 2분간 교반한다. 교반후 -10 °C로 조절하고 화합물 I(8.69 g, 20 mmol)를 녹인 CH_2Cl_2 (20 mL)용액을 10분간 가한다. 다시 -60 °C로 조절 한 뒤 CH_2Cl_2 10 mL에 녹인 triethylamine(10 mL)를 5분간 가하고 상온이 될 때까지 격렬하게 교반한다. 반응이 완결되면 분별깔대기에 옮긴 후 유기층을 포화된 brine(2회 \times 5 mL)으로 세척한다. 분리된 유기층을 무수 MgSO_4 를 이용하여 물을 제거하고 감압 하에서 용매를 제거한다. 얻어진 생성물은 silica gel column chromatography로 정제하였다(Hexane: Ethyl acetate=8:2 R_f =0.5) 수득율 6.82 g(yield: 84%) $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 200 \text{ MHz})$ δ 9.62(s, 1H), 5.63(d, 1H, J = 5 Hz), 4.15~4.72(m, 4H), 1.18~1.79(m, 20H).

N-(6-Deoxy-1,2;3,4-di-O-cyclohexyliden- α -D-galactopyranos-6-yliden)phenylethyl imine의 합성

Molecular sieve 4 Å(2 g)을 포함하는 CH_2Cl_2 20 mL가 들어 있는 플라스크에 화합물 (I) (338.4 mg, 1.00 mmol)를 넣고 (R)-(+)- α -methylbenzyl amine(145.4 mg, 1.2 mmol)을 가한 후 5시간동안 교반하면서 환류시킨다. 반응이 끝나면 molecular sieve를 여과하여 제거하고 감압 하에서 용매를 제거한다. 이렇게 얻어진 이민

은 더 이상의 정제 없이 다음 반응에 이용하였다. $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 200 \text{ MHz})$ δ 7.72(d, 1H), 7.15~7.38(m, 5H), 5.59(d, 1H, J = 5 Hz), 4.21~4.69(m, 4H), 1.18~1.79(m, 23H).

2-[1(R)-(Phenylethyl)amino]-2-[1,2;3,4-Di-O-cyclohexyliden- α -D-galactopyranosyl] acetonitrile [2a]의 합성

이소프로필알콜(25 mL)과 0.2 M 인산완충용액 (pH=7.8, 1 mL)가 들어있는 플라스크에 지방이 제거된 아몬드 가루(300 mg)를 넣고 2분 동안 교반한다. 이 혼합용액에 이소프로필알콜 1 mL에 녹인 이민(1a, 477 mg, 1.01 mmol)와 acetone cyanohydrin(0.1 mL, 1.1 mmol)을 차례대로 가한 후 상온에서 24시간동안 교반한다. 반응혼합물을 celite를 통해 여과한 후 여액을 감압 하에서 제거한다. 얻어진 생성물은 silica gel column chromatography로 정제하였다. (Hexane: Ethyl acetate=8:2, R_f =0.6) 수득율 215 mg(수득율 46%) 2a의 syn-(R,R): $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 400 \text{ MHz})$ δ 7.15~7.38(m, 5H), 5.53(d, 1H, J = 5.2 Hz), 4.08(q, 1H, J = 6.4 Hz), 3.62~4.67(m, 5H), 1.18~1.79(m, 23H), 2a의 anti-(R,S) δ 7.15~7.38(m, 5H), 5.53(d, 1H, J = 5.2 Hz), 4.0(q, 1H, J = 6.4 Hz), 3.62~4.67(m, 5H), 1.18~1.79(m, 23H).

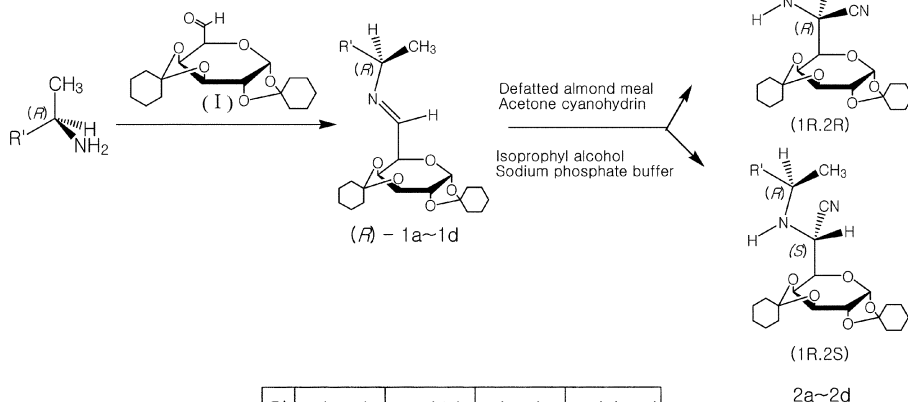
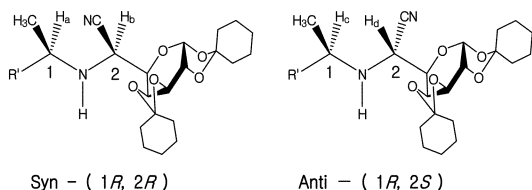
결과 및 고찰

(R)-(+)- α -Methylbenzylamine(a), (R)-(+)-1-(1-naphthyl)ethylamine(b), (R)-(-)-sec-butylamine(c), (R)-(-)-1-cyclohexylethylamine(d), (S)-(-)- α -methylbenzylamine(e), (S)-(-)-1-(1-naphthyl)ethylamine(f), (S)-(+)-sec-butylamine(g), 그리고 (S)-(+)-1-cyclohexylethylamine(h)등 광학활성을 가지는 이민들을 D-galactose의 알콜기를 cyclohexanone으로 보호한 후 산화과정을 거쳐 얻어진 알데하이드(I)와¹¹ 축합반응을 하여 1a~1h의 이민들을 얻었다.

키랄중심을 가지고 있는 이민에 지방이 제거된 아몬드 가루, acetone cyanohydrin를 인산완충용액과 이소프로필알콜의 혼합용액에서 실온에서 24시간 반응시켰다. 아몬드가루에는 (R)-oxynitrilase를 함유하고 있기 때문에 효과적으로 시안기를 이민에 도입하게 되었다. 동일한 반응조건에서 아몬드가루를 가하지 않고 반응을 하였을 경우 반응이 전혀 진행되지 않았고 이러한 결과는 아몬드가루에 포함된 (R)-oxynitrilase에 의한 것임을 알 수 있었다.¹⁰ 시안기는 입체 선택적으로 도입되며 2개의 키랄 중심을 가지는 부분입체이성질체들이 얻어

졌다. 이렇게 얻어진 생성물들은 부분입체이성질체의 혼합물 형태로 분리되어졌고 **2a**부터 **2d**까지는 (1*R*, 2*R*)와 (1*R*, 2*S*)의 혼합비를 그리고 **2e**부터 **2h**까지는 (1*S*, 2*R*)와 (1*S*, 2*S*)의 혼합비율을 ¹H-NMR spectrum를 이용하여 결정하였다. 생성물 **2a**는 (1*R*, 2*R*) 부분입체이성질체와 (1*R*, 2*S*) 부분입체이성질체가 혼합되어있고 (1*R*, 2*R*)를 syn 그리고 (1*R*, 2*S*)를 anti로 명명했을 경우 **2a**의 ¹H-NMR spectrum data를 보면, syn-(1*R*, 2*R*)의 C-1에 있는 수소(H_a)는 4.08 ppm, anti-(1*R*, 2*S*)에서 C-1에 있는 수소(H_c)는 4.00 ppm에서 나타난다. 그러한 nmr 결과는 기존의 발표된 내용과 일치함을 알 수 있었다.¹²

키랄 중심(R)을 가지는 이민에 의해 만들어진 (R)-**1a**부터 (R)-**1d**까지의 4개 이민들을 이용하여 얻어진 부분입체이성질체의 혼합 비율은 (1*R*, 2*R*): (1*R*, 2*S*)가 방향족아민인 **2a** 82:18, **2b** 90:10으로 얻어졌고 지방족아민인 **2c** 58:42, **2d** 53:47의 비율로 얻어졌다. 효소에 의하여 도입되는 시안기는 키랄 보조기로써 방향족아민의 경우에 보다 입체선택성이 높은 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 (S)-이성질체를 이용하였을 때도 비슷한 결과로 나타났다.



| R' | phenyl | naphthyl | butyl | cyclohexyl |
|-----|--------|----------|-------|------------|
| (R) | a | b | c | d |
| (S) | e | f | g | h |

Scheme 1.

(S)의 키랄중심을 가진 이민의 경우 효소에 의해 새롭게 생긴 키랄 중심의 비율이 (1*S*, 2*S*)-isomer가 주된 생성물로 나왔다. 생성된 부분입체이성질체의 혼합 비율 (1*S*, 2*R*):(1*S*, 2*S*)는 방향족아민 경우 **2e** 27:73, **2f** 28:72로 얻어졌고 지방족아민인 경우 **2g** 44:56, **2h** 48:52로 얻어졌다.

(S)형태의 키랄중심을 가진 이민을 이용하여 얻어진 경우 새롭게 만들어진 키랄중심이 (S)형태가 주생성물로 얻어졌다. 이러한 결과는 키랄보조제로 사용된 광학활성아민의 configuration이 (R) 또는 (S)에 관계없이 아몬드분말을 이용하여 얻어진 새로운 키랄중심은 (R)-configuration이 주생성물로 얻어지는 것으로 보고되었으나¹³ 본 연구에서는 새롭게 형성되는 chiral center가 이민상태에서 광학활성아민의 configuration에 의해 제어되어짐을 알 수 있었다. 이러한 결과의 부분적인 설명은 galactose의 키랄중심의 영향으로 인한 것으로 추측된다.

본 연구에서는 C-glycopeptide의 합성을 위하여 효소적 방법을 사용하여 이민에 시안화기를 도입하였고 이때 생성되는 키랄중심은 지방족 키랄 아민(butyl-, cyclohexyl-)을 사용하였을 때 새로운 키랄중심을 제어한 효과를 나타내지 않았지만 방향족 키랄아민(phenylethyl-, naphthylethyl-)에서는 생성물의 입체중심을 제어하는 효과가 보다 높게 나타남을 알 수 있었다.

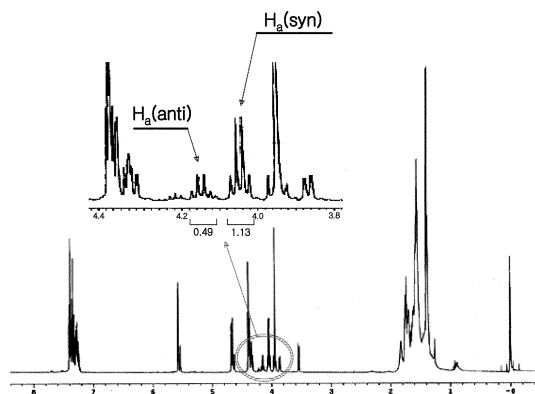
Table 1. The enzymatic introduction of cyanide into imines

| Run | R' | imine | product | yield ² (%) | Diastereomer ratio ¹ | |
|-----|-------------|-------------------------|-----------------|------------------------|---|---|
| | | | | | (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>):(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>) | (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>):(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>) |
| 1 | phenyl- | (<i>R</i>)- 1a | 2a | 46 | 82 : 18 | - |
| 2 | 1-naphthyl- | (<i>R</i>)- 1b | 2b ³ | 44 | 90 : 10 | - |
| 3 | butyl- | (<i>R</i>)- 1c | 2c | 49 | 58 : 42 | - |
| 4 | cyclohexyl- | (<i>R</i>)- 1d | 2d | 48 | 53 : 47 | - |
| 5 | phenyl- | (<i>S</i>)- 1e | 2e | 53 | - | 27 : 73 |
| 6 | 1-naphthyl- | (<i>S</i>)- 1f | 2f | 51 | - | 28 : 72 |
| 7 | butyl- | (<i>S</i>)- 1g | 2g | 58 | - | 44 : 56 |
| 8 | cyclohexyl- | (<i>S</i>)- 1h | 2h | 55 | - | 48 : 52 |

1) The diastereomer ratio was based on the ¹H-NMR spectrum except 2b.

2) The yield was based on the mixture of diastereomers.

3) The diastereomer ratio was obtained from HPLC.

Fig. 1. ¹H NMR spectrum of **2e**.

이 연구는 2003학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

인 용 문 헌

- Fisher, J. F.; Harrison, A. W.; Bundy, G. L.; Wilkinson, K. F.; Rush, B. D.; Ruwart, M. J. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 3140.
- Bertozzi, C. R.; Hoeplich, P. D.; Bednarski, M. D. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6092.
- (a) Pearce, A. J.; Ramaya, S.; Thorn, S. N. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5453. (b) Estevez, J. C.; Long, D. D.; Fleet, G. W.; Dwek, R. A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8287. (c) Gurjar, M. K.; Mainkar, A. S.; Syamala, M. *Tetrahedron Asymmetry*. **1993**, *4*, 2343. (d) Bertozzi, C. R.; Hoeplich, P. D.; Bednarski, M. D. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6092. (e) Herpin, T. F.; Motherwell, W. B.; Weibel, J. M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1997**, 923. (f) Arya, P.; Ben, R. N.; Qin, H. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6131. (g) Dondoni, A.; Marra, A.; Massi, A. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6601. (h) Dondoni, A.; Marra, A.; Massi, A. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 933.
- Lay, L.; Meldal, M.; Nicotra, F.; Panza, L.; Russo, G. *Chem. Commun.* **1997**, 1469.
- Debenham, S. D.; Debenham, J. S.; Burk, M. J.; Toone, E. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9897.
- Ben, R. N.; Orellana, A.; Arye, P. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4817.
- (a) Gotor, V. *J. of Biotech.* **2002**, *96*, 35. (b) Fache, F.; Schulz, E.; Tommasino, M. L.; Lemaire, M. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2159. (c) Kobayashi, S.; Ishitani, H. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1069.
- (a) Strecker, A. *Ann. Chem. Pharm.* **1850**, *75*, 27. (b) Duthaler, R. O. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 1539. (c) Stout, D. M.; Black, L. A.; Matier, W. L. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 5369.
- Vincent, S. P.; Schleyer, A.; Wong, C. H. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4440.
- Griengl, H.; Schwab, H.; Fechter, M. *TIBTECH.* **2000**, *18*, 252.
- Hoppe, I.; Schollkopf, U.; Tolle, R. *Synthesis*, **1983**, 789.
- Inaba, T.; Fujita, M.; Ogura, K. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1274.
- Lee, T.; Ahn, Y. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2002**, *23*, 1490.