

dc_228_11

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Biológiailag aktív oligoszacharidok és
analogonjaik szintézise**

Dr. Borbás Anikó

Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Gyógyszerészi Kémia Tanszék,
MTA-DE Szénhidrátkémiai Kutatócsoport

2012

I. Bevezetés

Az utóbbi 50 évben az elválasztástechnikai és szerkezetvizsgálati módszerek fejlődésének köszönhetően a szénhidrátok biológiai szerepének megítélése jelentősen módosult. Nyilvánvalóvá vált, hogy a sejtek felületén glikoproteinek vagy glikolipidek formájában megjelenő oligoszacharidok számos alapvető biológiai folyamatban kulcsszerepet játszanak mint biológiai információhordozók. A szénhidrátok részvételével zajló bonyolult biokémiai folyamatok felderítéséhez nélkülözhetetlenné váltak a szintetikusan előállított természetes és módosított oligoszacharidok. Ekkorra a szintetikus szénhidrátkémia eszköztára – megfelelő glikozilezési módszerek, hidroxil-védőcsoportok szelektív kialakítása és eltávolítása – alkalmassá vált bonyolultabb oligoszacharidok előállítására is. Szerencsésen találkozott tehát a glikobiológia keltette igény a szintetikus lehetőségekkel, ami az oligoszacharidok szintézisének ugrásszerű fejlődését eredményezte.

A debreceni Kossuth Lajos Tudományegyetem Biokémiai Tanszékén Lipták András vezetésével már az 1980-as évektől kezdődően intenzíven foglalkoztak szintetikus oligoszacharid-kémiával. Egyetemi hallgatóként csatlakoztam a csoporthoz, és doktori munkámat is Lipták András témavezetésével végeztem acetál védőcsoportok vizsgálata valamint bakteriális oligoszacharidok kémiai szintézise témakörben. A PhD fokozat megszerzése után is ezen a területen folytattam kutatásaimat az MTA-DE Szénhidrátkémiai Kutatócsoportnál. (A csoport a Biokémiai Tanszéken alakult 1996-ban Lipták András vezetésével, majd 2005-ben Antus Sándor irányítása alatt a Szerves Kémiai Tanszékhez csatlakozott.)

Az akadémiai doktori értekezésben a PhD fokozat megszerzése óta folytatott kutatásaim legfontosabb eredményeit foglaltam össze. Ezeket az eredményeket növényi eredetű elágazó láncú arabinogalaktánok előállítása, valamint a biológiai szabályozási folyamatokban meghatározó szerepet játszó anionos szénhidrátok szulfonsav-mimetikumainak szintézise terén értük el.

II. Vizsgálati módszerek

A szintetikus munka során a modern preparatív szerves kémia makro-, félmikro- és mikromódszereit alkalmaztuk. A reakciók követésére vékonyréteg-kromatográfiát használtunk. A nyerstermékek tisztítása kristályosítással, oszlopkromatográfiával és gélkromatográfiával történt. Az előállított vegyületek jellemzésére, azonosítására, és szerkezetének igazolására elemanalízist, olvadáspont meghatározást, fajlagos forgatóképesség meghatározást, egy- és kétdimenziós NMR spektroszkópiát, tömegspektroszkópiát, CD-vizsgálatokat és röntgendiffrakciós méréseket alkalmaztunk.

A doktori értekezés kísérleti részt nem tartalmaz, mivel a bemutatott eredmények teljes kísérleti anyaga megtalálható tudományos publikációk és PhD értekezések formájában.

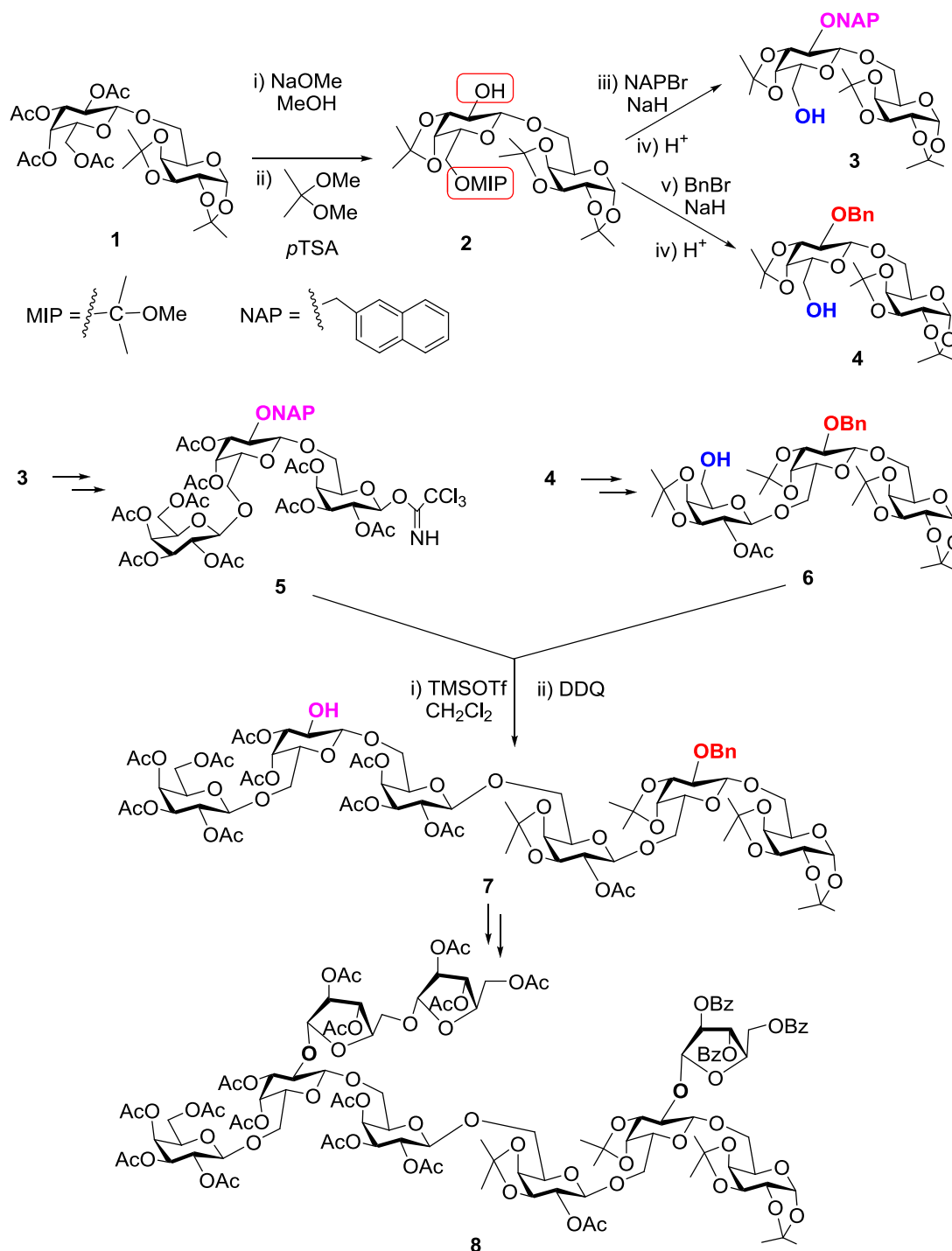
III. Új tudományos eredmények

III.1. Növényi eredetű arabinogalaktánok szintézise

A II-típusú arabinogalaktánok a legáltalánosabban előforduló, többszörösen elágazó szerkezetű növényi poliszacharidok, általában aminosavakhoz kötötten, arabinogalaktán proteinek (AGP) formájában fordulnak elő. Az arabinogalaktánok jelentős farmakológiai aktivitással rendelkeznek, számos elterjedten alkalmazott gyógynövénynél (pl. bíbor kasvirág, *Echinacea purpurea*) bizonyítottan az arabinogalaktán-protein tartalomhoz kötődik a gyógyító hatás.

III.1.1. Egyszerű és hatékony eljárást dolgoztunk ki (1-6)- β -D-galaktán alapvázú, 2-es helyzetben α -L-arabinofuranozil elágazást hordozó növényi arabinogalaktánok kémiai szintézisére. A ciklikus izopropilidén-acetál és (metoxidimetil)metil (MIP) vegyes acetál védőcsoport-kombináción alapuló eljárással di- és trigalaktán építőelemeket állítottunk elő (pl. **3-6**), majd ezek felhasználásával különböző hosszúságú galaktán alapvázak moduláris szintézisét valósítottuk meg (pl. **7**). Az ortogonális

védőcsoportokkal ellátott galaktánokból változatos szerkezetű, 3-9 monoszacharidból felépülő, mono- és diarabinozil elágazást tartalmazó arabinogalaktánokat állítottunk elő (pl. **8**, 1. ábra).¹⁻⁶



1. ábra. Egy mono- és egy diarabinozil elágazást tartalmazó hexagalaktán szintézise

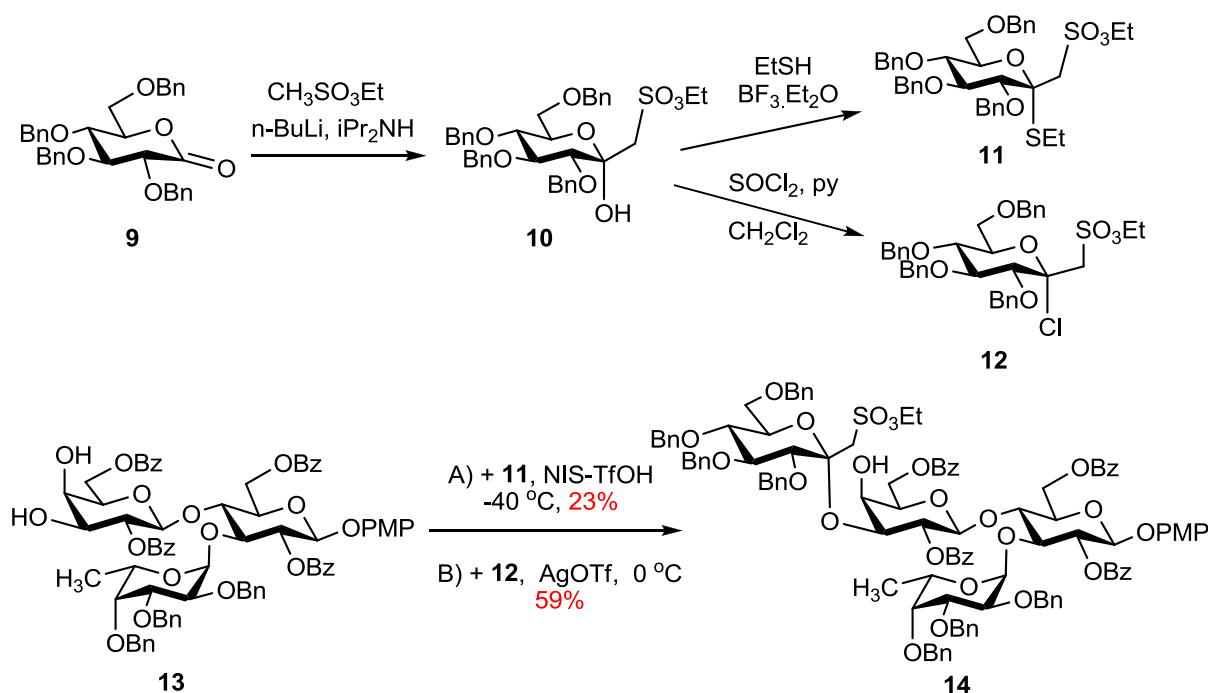
III.1.2. Az arabinogalaktán oligoszacharidok szintéziséhez kidolgozott (metoxidimetil)metil vegyes acetálos védőcsoport-stratégiát ciklodextrineken is

alkalmaztuk. A módszernek rendkívül nagy gyakorlati jelentősége lehet, mert alkalmas nagytisztaságú 3-szubsztituált és 2,6-diszubsztituált ciklodextrinek szintézisére.⁷

III. 2. Sziálsav-tartalmú lektin ligandumok szulfonsav mimetikumainak szintézise

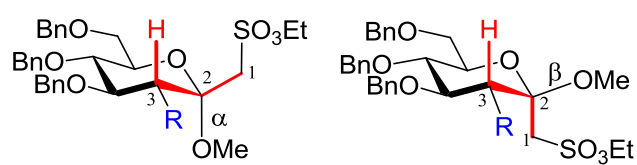
A sejtfelszíni glikokonjugátumok sziálsavtartalmú oligoszacharid egységei – mint különböző szénhidrátkötő fehérjék (szelektinek, bakteriális adhézinek, influenza hemagglutinin) ligandumai – kulcsszerepet játszanak gyulladások, bakteriális és vírus fertőzések kialakulásában. Ezen betegségek kezelésének egyik módja lehet a természetes szénhidrátligandumoknál erősebb kötődésre képes, szintetikus mimetikumokon alapuló antiadhéziós terápia.

III.2.1. Védett aldonsavlaktonokból karbanion addíciós reakcióban 1-dezoxi-1-etoxiszulfonil-hept-2-ulopiranozil származékokat állítottunk elő (pl. **10**), amelyek a biológiailag rendkívül jelentős ulóz-2-onsavak (pl. sziálsav) szulfonsav analogonjai. Az anomer szulfonsav-tartalmú származékokat glikozil donorként alkalmazva potenciálisan gyulladásgátló oligoszacharid-szulfonsavakat szintetizáltunk (pl. **14**, 2. ábra).⁸⁻¹²



2. ábra. A szialil Lewis X tetraszacharid egy szulfonsav mimetikumának szintézise

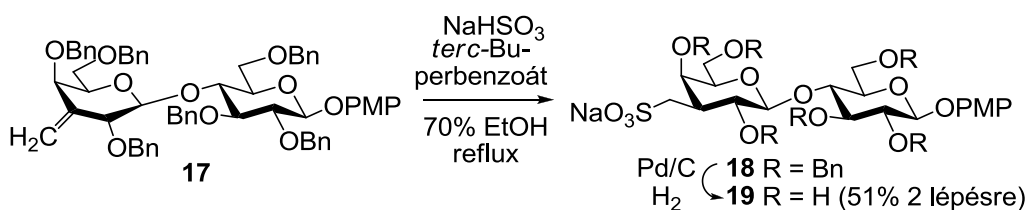
III.2.2. Ketozil-glikozid anomer párokon végzett NMR vizsgálatokkal megmutattuk, hogy a kvaterner anomer szénatomot tartalmazó glikozidok anomer-konfigurációjának meghatározására felhasznált három kötésen át ható proton-szén csatolási állandó ($^3J_{C1-H3}$) értékét *transz* térállásnál a C-3 szubsztituensek jelentősen befolyásolják. A vizsgált csatolási állandó kizárólag 3-dezoxi-glikozidoknál szerkezetbizonyító erejű, más esetekben egyéb vizsgálati módszert is alkalmazni kell az egyértelmű szerkezetmeghatározáshoz.¹³



	$^3J_{C1,H3,cisz}$ (Hz)	$^3J_{C1,H3,transz}$ (Hz)
15α,β: R=OBn	< 1	2,4
16α,β: R=H	< 1	4,8

3.ábra. A C-3 szubsztituens hatása három kötésen át ható proton-szén csatolási állandóra

III.2.3. A gyomorfekélyt okozó *Helicobacter pylori* megtelepedését gátló antiadhéziós terápia kidolgozása céljából szulfonsavmetil-tartalmú laktozidokat állítottunk elő többek között exometilén származékon végrehajtott hidrogénszulfid-addícióval (4. ábra).¹⁴⁻¹⁵



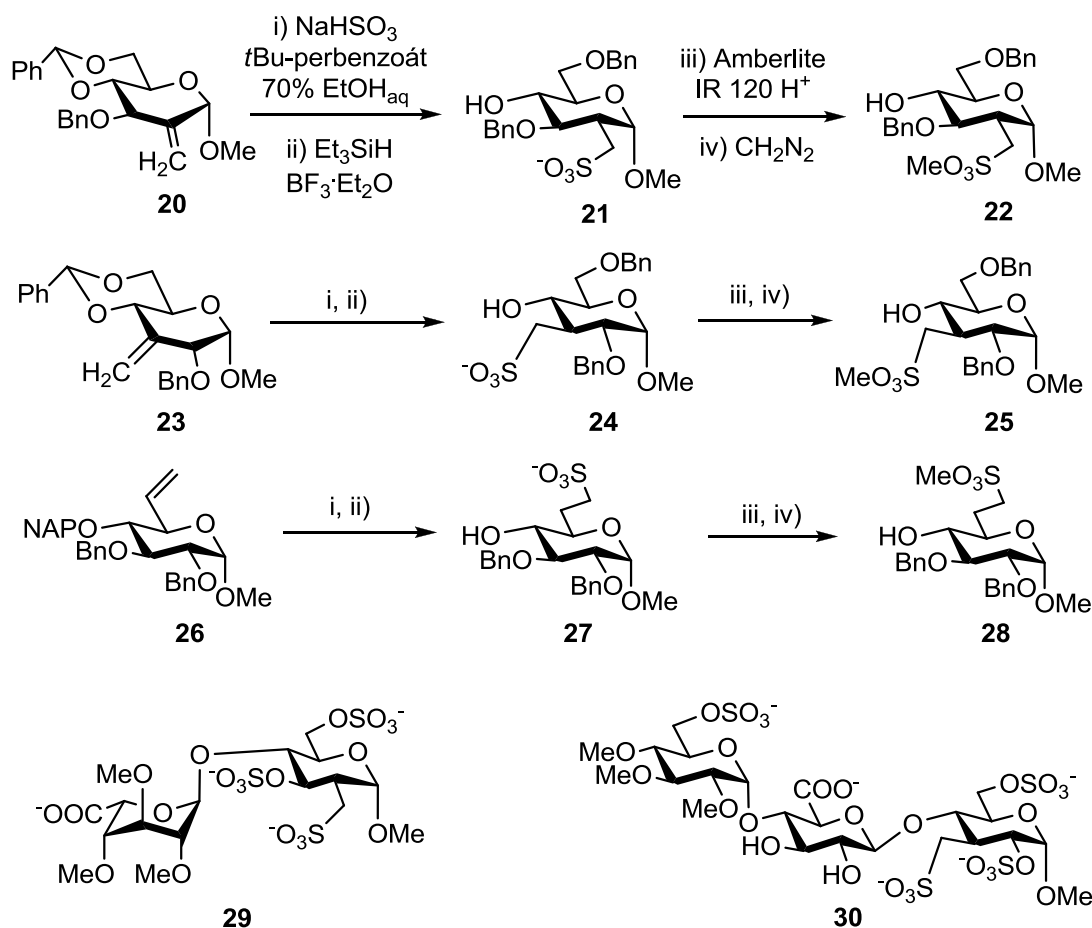
4.ábra. A *Helicobacter pylori* adhézinek egy potenciális ligandumának szintézise

III. 3. Az antitrombotikus hatású idraparinux szulfonsav mimetikumainak szinézise

A heparin poliszacharid és frakcionált származékai elterjedten használt antitrombotikumok, alkalmazásuk azonban gyakran súlyos mellékhatásokkal jár. Egy szintetikus heparin pentaszacharid gyógyszer (Arixtra®) kifejlesztésével az antitrombotikus kezelés mellékhatásainak jelentős részét kiküszöbölték, ám a vegyület

rendkívüli bonyolultsága és alkalmazásának korlátai miatt jelenleg is intenzíven folyik a szintetikus antikoagulánsok kutatása.

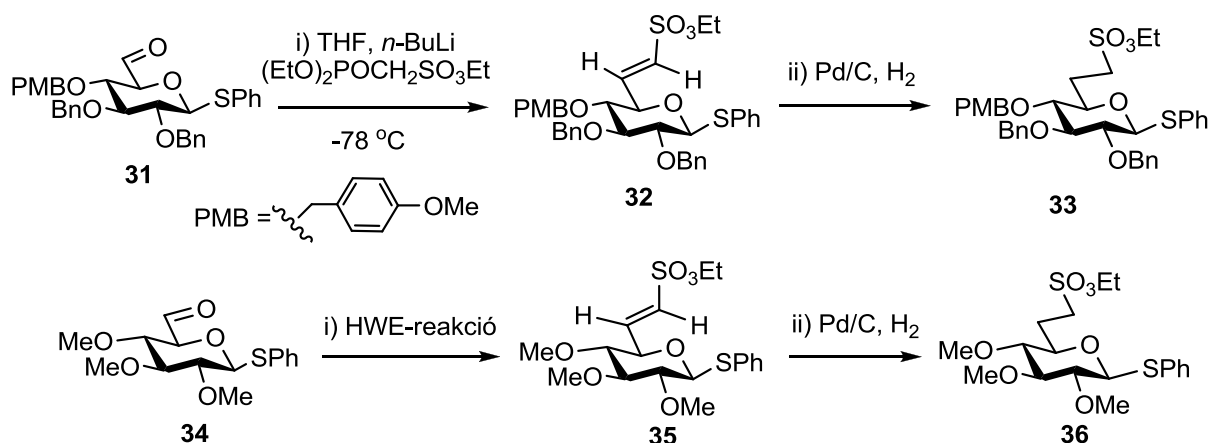
III.3.1. Egy kiemelkedő antitrombotikus hatású szintetikus heparinoid pentaszacharid, az idraparinux bioizoszter szulfonsav-mimetikumainak szintéziséhez C-2, C-3 és C-6 helyzetben szulfonsavmetil-tartalmú glikozil-akceptorokat állítottunk elő gyökös szulfit-addícióval (**22**, **25** és **28**). Az építőelemekből L-iduronsav és D-glükuronsav-tartalmú di- és triszacharidokat szintetizáltunk (pl. **29**, **30**) – ezek az első oligoszacharidok, amelyek egyszerre tartalmazznak uronsav egységet és szulfonsav-csoportot is (5. ábra).¹⁶⁻¹⁹



5.ábra. Szulfonsavmetil-tartalmú glikozil akceptorok szintézise (**22**, **25** és **28**); az idraparinux egy diszacharid és egy triszacharid mimetikumának (**29**, **30**) szerkezete

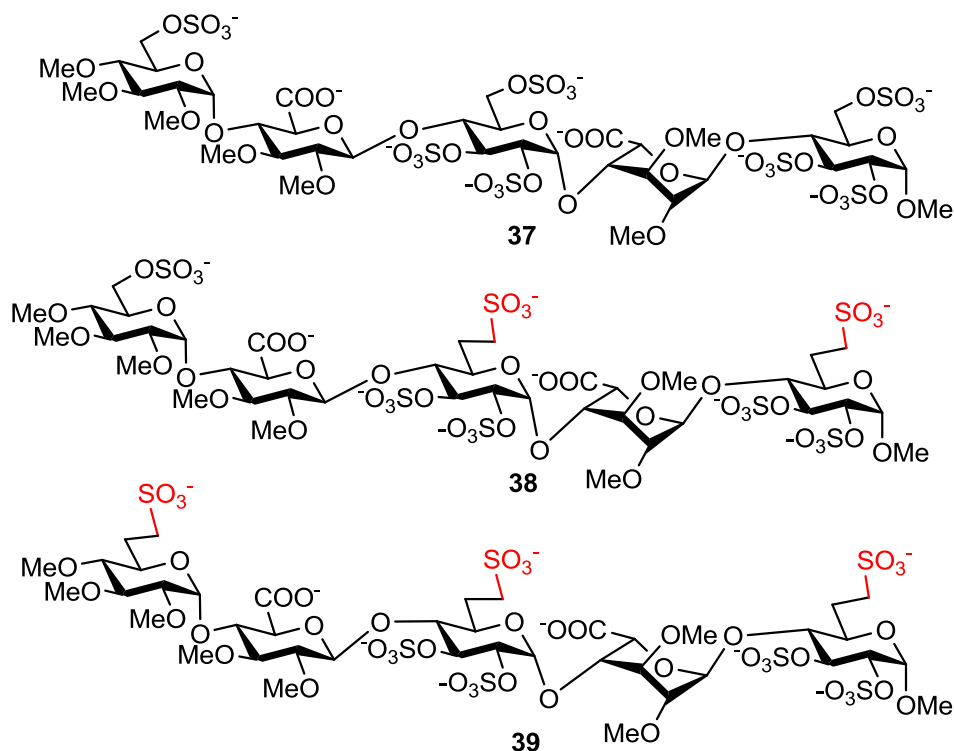
III.3.2. Glikozil donorként és akceptorként is felhasználható tioglikozid építőelemeket állítottunk elő dialdózokon végrehajtott Horner-Wadsworth-Emmons (HWE)

reakcióval, és azt követő szelektív hidrogénezéssel (6. ábra).



6.ábra. Szulfonsavmetil-csoport kialakítása tioglikozidokon

Előállítottuk az idraparinux pentaszacharid egy diszulfonsav (**38**) és egy triszulfonsav mimetikumát (**39**) C-6 helyzetben szulfonátometil-tartalmú glikozil-donor és akceptor építőelemek felhasználásával. A szulfonsav mimetikumok szintézisével párhuzamosan az idraparinuxot (**37**) is előállítottuk, hogy a vérálvadásgátlási vizsgálatokhoz referencia molekulaként alkalmazhassuk (7. ábra).²⁰



7. ábra. Az idraparinux (**37**) és az előállított bioizoszter szulfonsav-mimetikumok (**38**, **39**) szerkezete

III.3.2. Humán vérplazmán *in vitro* meghatároztuk az Arixtra és az általunk előállított pentaszacharidok anti-Xa aktivitását. A pentaszacharid diszulfonsav (**38**) nagyobb mértékben gátolta a véralvadási Xa faktort, mint az eddig ismert legjobb antikoaguláns hatású szénhidrát, az idraparinux (**37**). Ezzel bebizonyítottuk a szulfátészterek bioizoszter szulfonsavakkal történő helyettesítésének létjogosultságát. Megállapítottuk, hogy a biológiai aktivitás szempontjából alapvető fontosságú a szulfonsavcsoportok helyzete és száma. NMR vizsgálaton alapuló konformációanalízis segítségével magyarázatot találtunk a pentaszacharid triszulfonsavnál (**39**) tapasztalt jelentős aktivitáscsökkenésre.²⁰

IV. Az értekezésben összefoglalt kutatások folytatása, az eredmények hasznosítása

Az általunk előállított arabinogalaktán oligoszacharidokat immunológiai vizsgálatokban alkalmazták az *E. purpurea* préslevéből izolált arabinogalaktán-komponensek azonosítására. A további vizsgálatokhoz kutatócsoportunknál elkezdődött a 3,6-elágazású arabinogalaktánok szintézise.^{K1,K2}

A *Helicobacter pylori* potenciális ligandumainak biológiai vizsgálata alapján tervezzük szénhidrát-szulfonsavak BSA-konjugátumainak előállítását. Kezdeményeztük az eddig előállított oligoszacharid-szulfonsav származékok antimetasztatikus és antivirális vizsgálatait.

A véralvadásgátló hatású pentaszacharidoknál további hatás-szerkezet összefüggések meghatározása céljából folyamatban van újabb regioizomer szulfonsav származékok szintézise. Együtműködés keretében elkezdődött a pentaszacharid-szulfonsavak antitrombinnal való kölcsönhatásának vizsgálata NMR, STD NMR, cirkuláris dikroizmus, valamint izotermális kalorimetriás mérésekkel is.

V. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. A. Borbás, L. Jánossy, A. Lipták: Scope and limitation of the application of the (methoxydimethyl)methyl group in the synthesis of 2'-O-, and 2',6'-di-O-(α -L-arabinofuranosyl)- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-D-galactoses. *Carbohydr. Res.* **318** (1999) 98-109. IF: 1.252

2. M. Csávas, A. Borbás, L. Jánossy, G. Batta, A. Lipták: Synthesis of the α -L-Araf-(1-2)- β -D-Galp-(1-6)- β -D-Galp-(1-6)-[α -L-Araf-(1-2)]- β -D-Galp-(1-6)-D-Gal hexasaccharide as a possible repeating unit of the cell-cultured exudates of *Echinacea purpurea* arabinogalactan. *Carbohydr. Res.* **336** (2001) 107-115. IF: 1.349
3. A. Lipták, A. Borbás, L. Jánossy, L. Szilágyi: Preparation of (2-naphthyl)methylene acetals of glycosides and their hydrogenolytic transformation into 2-naphthylmethyl (NAP) ethers. *Tetrahedron Lett.* **41** (2000) 4949-4953. IF: 2.558
4. A. Borbás, Z. B. Szabó, L. Szilágyi, A. Bényei, A. Lipták: Dioxane-type (2-naphthyl)methylene acetals of glycosides and their hydrogenolytic transformation into 6-O- and 4-O-(2-naphthyl)methyl (NAP) ethers. *Tetrahedron*, **58** (2002) 5723-5732. IF: 2.420
5. M. Csávas, A. Borbás, L. Szilágyi, A. Lipták: Successful combination of (methoxydimethyl)methyl (MIP) and (2-naphthyl)methyl (NAP) ethers for the synthesis of arabinogalactan-type oligosaccharides. *Synlett*, (2002) 887-890. IF: 2.695
6. M. Csávas, A. Borbás, L. Jánossy, A. Lipták: Synthesis of an arabinogalactan-type octa- and two isomeric nonasaccharides. Suitable tuning of protecting groups. *Tetrahedron Lett.* **44** (2003) 631-635. IF: 2.326
7. A. Lipták, L. Jánossy, A. Borbás, J. Szejtli: Mixed acetals of cyclodextrins. Preparation of hexakis-, heptakis- and octakis[2,6-di-O-(methoxydimethyl)methyl]- α -, β - and γ -cyclodextrins. *Carbohydr. Res.* **337** (2002) 93-96. IF: 1.631
8. A. Borbás, G. Szabovik, Zs. Antal, P. Herczegh, A. Agócs, A. Lipták.: Sulfonmethyl analogues of aldose-2-ulonic acids. Synthesis of a new sialyl Lewis X analogue. *Tetrahedron Lett.* **40** (1999) 3639-3642. IF: 2.400
9. A. Borbás, G. Szabovik, Zs. Antal, K. Fehér, M. Csávas, L. Szilágyi, P. Herczegh, A. Lipták: Sulfonic acid analogues of the sialyl Lewis X tetrasaccharide. *Tetrahedron: Asymmetry*, **11** (2000) 549-566. IF: 2.797
10. M. Csávas, G. Májer, M. Herczeg, J. Remenyik, L. Lázár, A. Mándi, A. Borbás, S. Antus: Investigation of glycosylating properties of 1-deoxy-1-ethoxysulfonyl-hept-2-ulopyranosyl derivatives. Synthesis of a new sulfonic acid mimetic of the sialyl Lewis X tetrasaccharide. *Carbohydr. Res.* **346** (2011) 1527-1553. IF: 1.898
11. Lipták A., Borbás A.: Cukor C-szulfonsavak és –metilén-szulfonsavak szintézise. *Magy. Kém. Foly.* **109-110** (2004) 60-63.

12. Z. B. Szabó, A. Borbás, I. Bajza, A. Lipták, S. Antus: First synthesis of sulfonic acid analogues of *N*-acetylneuraminic acid. *Tetrahedron Lett.* **49** (2008) 1196-1198. IF: 2.538
13. G. Májer, A. Borbás, T. Z. Illyés, L. Szilágyi, A. Cs. Bényei, A. Lipták: Synthesis of ketopyranosyl glycosides and determination of their anomeric configuration on the basis of the three-bond carbon-proton couplings. *Carbohydr. Res.* **342** (2007) 1393-1404. IF: 1.723
14. L. Lázár, M. Csávás, A. Borbás, Gy. Gyémánt, A. Lipták: Synthesis of methyl 6-deoxy-4-*O*-(sodium sulfonato)- α -L-talopyranoside, its C-4 epimer and both isosteric [4-C-(potassium sulfonatomethyl)] derivatives. *Arkivoc* (2004, vii) 196-207. IF: 0.418
15. A. Borbás, M. Csávás, L. Szilágyi, G. Májer, A. Lipták: Replacement of carbohydrate sulfates by sugar C-sulfonic acid derivatives, *J. Carbohydr. Chem.* **23** (2004) 133-146. IF: 1.017
16. M. Herczeg, L. Lázár, A. Borbás, A. Lipták, S. Antus: Toward synthesis of the isosteric sulfonate analogues of the AT-III binding domain of heparin. *Org. Lett.* **11** (2009) 2619-2622. IF: 5.420
17. L. Lázár, M. Herczeg, A. Borbás, A. Lipták, S. Antus: Synthesis of sulfonic acid analogues of the non-reducing end trisaccharide of the antithrombin binding domain of heparin. *Tetrahedron Lett.* **51** (2010) 6711-6714. IF: 2.618
18. M. Herczeg, L. Lázár, A. Mándi, A. Borbás, I. Komáromi, A. Lipták, S. Antus: Synthesis of disaccharide fragments of the AT-III binding domain of heparin and their sulfonatomethyl analogues. *Carbohydr. Res.* **346** (2011) 1827-1836. IF: 1.898
19. L. Lázár, E. Mező, M. Herczeg, A. Lipták, S. Antus, A. Borbás: Synthesis of the non-reducing end trisaccharide of the antithrombin-binding domain of heparin and its bioisosteric sulfonic acid analogues, *Tetrahedron*, közlésre benyújtva
20. M. Herczeg, L. Lázár, Zs. Bereczky, K. E. Kövér, I. Timári, J. Kappelmayer, A. Lipták, S. Antus, A. Borbás: Synthesis and anticoagulant activity of bioisosteric sulfonic acid analogues of the antithrombin-binding pentasaccharide domain of heparin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, közlésre benyújtva

VI. Az értékezés témájához kapcsolódó közlemények

- K1. B. Classen, M. Csávás, A. Borbás, T. Dingermann, I. Zündorf: Monoclonal antibodies against an arabinogalactan-protein from pressed juice of *Echinacea purpurea*. *Planta Med.* **70** (2004) 861-865. IF: 1.879

- K2. A. Fekete, A. Borbás, S. Antus, A. Lipták: Synthesis of 3,6-branched arabinogalactan-type tetra-and hexasaccharides for characterization of monoclonal antibodies. *Carbohydr. Res.* **344** (2009) 1434-1441. IF: 2.025
- K3. K.E. Kövér, K. Fehér, L. Szilágyi, A. Borbás, P. Herczegh and A. Lipták: 2D NMR spectra of oligosaccharides enhanced by band-selective suppression of unwanted signals. *Tetrahedron Lett.* **41** (2000) 393-396. IF: 2.558
- K4. F. Sajtos, L. Lázár, A. Borbás, I. Bajza, A. Lipták: Glycosyl azides of sugar 2-sulfonic acids, *Tetrahedron Lett.* **46** (2005) 5191-5194. IF: 2.484
- K5. Zs. Jakab, A. Fekete, A. Borbás, A. Lipták, S. Antus: Synthesis of new sulfonic acid-containing oligosaccharide mimetics of sialyl Lewis A. *Tetrahedron*, **66** (2010) 2404-2414. IF: 3.219
- K6. A. Borbás, P. Herczegh: Synthesis of lipid II phosphonate analogues, *Carbohydr. Res.* **346** (2011) 1628-1632. IF: 1.898
- K7. Zs. Jakab, A. Fekete, M. Csávás, A. Borbás, A. Lipták, S. Antus: Synthesis of a sulfonic acid mimetic of the sulfated Lewis A pentasaccharide. *Carbohydr. Res.* **347** (2012), 90-93. IF: 1.898

VII. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Lipták András professzor úrnak, hogy elindított a kutatói pályán, és PhD témavezetőként majd kutatócsoportvezetőként irányította munkámat. A kutatómunka iránti lelkesedése, elhivatottsága és alázata példaértékű számomra. El nem múló hálát érzek bizalmaért és szeretetteljes támogatásáért.

Kiemelt köszönettel tartozom Antus Sándor professzor úrnak, az MTA-DE Szénhidrátkémiai Kutatócsoport vezetőjének, amiért folyamatosan figyelemmel kísérte, és hasznos tanácsaival segítette kutatómunkámat és szakmai előrehaladásomat.

Az értekezésben összefoglalt tudományos eredmények a Biokémiai Tanszéken és az MTA-DE Szénhidrátkémiai Kutatócsoportnál dolgozó munkatársaim közreműködése nélkül nem jöhettek volna létre. Köszönöm volt kollégáim, dr. Antal Zsuzsa, dr. Bajza István, dr. Farkas Erzsébet, Gálné dr. Remenyik Judit, dr. Gyémánt Gyöngyi, dr. Hajkó János, dr. Jakab Zsolt, dr. Kandra Lili, dr. Kerékgyártó János, dr. Kiss László, Madarasiné Molnár Katalin, dr. Májer Gábor, prof. Nánási Pál, Ráczné Gulyás Márta, dr. Sajtos Ferenc, dr. Szabovik Gabriella, dr. Szurmai Zoltán, Tótiné Dienes Veronika és dr. Varga Zsolt segítségét és barátságát. Különösen hálás vagyok közvetlen munkatársaimnak, dr. Csávás Magdolnának, dr. Fekete Anikónak, Jánossy Lórántnak, Kovácsné Tóth Emesének, dr. Lázár Lászlónak, dr. Herczeg Mihálynak, dr. Mándi Attilának, és Varga Mariannak kitartásukért, lelkes és odaadó munkájukért és barátságukért.

Köszönöm minden társszerzőm értékes szakmai hozzájárulását és segítségét.