

Válasz
dr. Fügedi Péter bírálói véleményére
„Biológiailag aktív oligoszacharidok és analogonjaik szintézise”
című MTA doktori értekezésemről

Megköszönöm dr Fügedi Péternek, hogy időt szánt dolgozatom elolvasására és véleményezésére. Köszönöm értékes és elgondolkodtató bírálatát, és a munkáról alkotott pozitív véleményét. Megjegyzéseire és kérdéseire az alábbiakban válaszolok.

A (2-naftil)metil-éterek mint mostohagyermek (bírálat, 4. oldal)

A (2-naftil)metilén-acetálok regioszelektív gyűrűnyitási reakcióinak tanulmányozását kedves és értékes munkáim közé sorolom, az értekezésbe pusztán szerkesztési okokból nem került be. Az értekezésben biológiai célok szerint csoportosítva mutattam be a szintetikus munkát, és mivel egyik esetben sem volt központi jelentősége a (2-naftil)metil védőcsoportok használatának, ezért egyik fejezetbe sem illett bele ennek a kutatási területnek a részletes tárgyalása.

Régi és új szintézis-stratégia oligoszacharid-szintézisekben (bírálat, 4. oldal)

A védőcsoport-stratégia az oligoszacharidok szintézisében általában eszköz, a cél a szabad oligoszacharid. Az arabinogalaktánok szintézise során nem ez volt a helyzet, nem pusztán az volt a célunk, hogy valahogyan előállítsuk az arabinogalaktánokat, hanem az is, hogy az izopropilidén-MIP védőcsoport-stratégia alkalmazásával állítsuk elő. A Lipták csoport írta le elsőként ezt a védőcsoport-kombinációt, és ennek a „saját” védőcsoportnak a hasznosságát, oligoszacharidokon való alkalmazhatóságát, teljesítőképességét is demonstrálni akartuk – ez legalább olyan fontos cél volt, mint az arabinogalaktánok előállítása.

A heparinoidok szintézisének a bírálóm által említett diszacharid-szintéziseket a kutatásaink kezdetén végeztük. Ekkor az alapkérdés az volt, hogy a szénhidrát-szulfonsavak só formában egyáltalán glikozilezhetőek-e, és ezt a legegyszerűbb donorral, az acetobrómglikózzal próbáltuk ki. Ráadásul a szulfonsav-sók glikozilezése a funkcionálatlan donorral sikeres volt, míg későbbi kísérleteink a funkcionális iduronsav-donorral eredménytelenek voltak. Nagyobb oligoszacharidoknál már más stratégiát követtünk, és kifejezetten törekedtünk arra, hogy minél kevesebb átalakítást kelljen elvégezni az „advanced stage” intermediereken, bár a heparinoidoknál az oligoszacharid-szinten történő funkcionális elkerülhetetlen.

(Megjegyzem, a „rég”i” stratégia, az oligoszacharid-szintű funkcionális elkerülés lehet előnyös is, az én első munkám egy mikobakteriális sejtfelszíni triszacharid szintézise volt, ahol a lépések számát azáltal tudtam az irodalmi eljárásokhoz képest a felére csökkenteni, hogy nem monoszacharid-, hanem triszacharid-szinten végeztem el bizonyos funkcionális elkerülést.)

Hogyan alakulhatnak sóvá a karbonsav- és szulfonsav-észterek az adott körülmények között (95. ábra)?

A 95. ábrán bemutatott átalakításoknál a szulfonsav- és karbonsav-metilészterek viselkedése különböző. A szulfonsav-észterekből a metilezési lépésben képződő NaI hatására nukleofil szubsztitúciós reakcióban szulfonsav-sók képződnek. Ez a folyamat egyirányú, aminek az az oka - ahogyan ezt Herczeg Mihály PhD védésén Kuszmann professzor úr kérdésére tisztáztuk -, hogy a szulfonát-anion jobb távozó csoport mint a jodidion. Az ellentétes irányú reakció, vagyis a szulfonsav-só átalakítása szulfonsav-észterre csak abban az esetben megy végbe, ha a szulfonsav ezüst-sóját reagáltatjuk alkil-jodiddal. Ekkor ezüst-jodid

formájában a jodid kivonódik a rendszerből, és képződik a szulfonsav alkil-észter, erre található néhány példa az irodalomban.

Meg kell jegyezni, hogy a **252→254**, **253→256** és **251→258** reakcióknál azt tapasztaltuk, hogy a szulfonsav-észterek részben már a dezacetilezési lépésben Na-sóvá alakulnak, és az alkalmazott NaOMe mennyiségétől függően szulfonsav-észter és szulfonsav-só különböző arányú keverékei képződnek. Ezért a későbbiekben a védőcsoportok eltávolításának sorrendjén változtattunk, a szulfonsavak Na-sóvá alakítását a dezacetilezési lépés előtt végeztük el, hogy egységes terméket kapjunk.

A karbonsavakra vonatkozóan viszont teljesen jogos a bírálói észrevétel, azok a metilezés után metilészter formában vannak jelen, és csak NaOH-os kezelés hatására alakulnak át Na-sóvá. Ennek a lépésnek a leírása sajnálatos módon kimaradt a közleményből és az értekezéséből is.

Bizonyított-e az *Echinacea purpurea* kivonatok *in vivo* hatása, mik a hatásért felelős vegyületek?

Az *Echinacea purpurea* alkoholos/vizes kivonata immunstimuláló és gyulladásgátló hatású, ezt *in vivo* vizsgálatokban bizonyították (1-8. irodalom). Az 1980-as, '90-es években Wagner és munkatársai *E. purpurea* sejt kultúrából izolált poliszacharidokkal végeztek *in vitro* és *in vivo* kísérleteket; az egereken végzett *in vivo* vizsgálatokban azt találták, hogy a poliszacharidok aktiválják a monocitákat és makrofágokat, ennek alapján feltételezték, hogy ezek a szénhidrátok a humán makrofágok aktiválására is képesek (3. irodalom).

A későbbi vizsgálatok megerősítették, hogy a növény *in vivo* immunmoduláló hatást fejt ki (4-8. irodalom). Több tanulmány kimeli, hogy az *Echinacea* készítmények nem egységesek, de mindegyik tartalmaz fenolokat (kávéssav származékok), poliszacharidokat, és alkilamidokat, ezért külön-külön is megvizsgálták ennek a három vegyülettípusnak az *in vivo* hatását (4. irodalom). A vizsgálatok szerint a növény alkilamid jellegű komponensei ((2E)-N-izobutylundeka-2-én-8,10-diinamid, (2E,4E,8Z,10Z)-N-izobutyl-dodeka-2,4,8,10-tetraénamid) hatékonyan stimulálják a makrofág funkciót, kötődnek a humán kannabiod receptorkhoz és gátolják a TNF- α tumor nekrosis faktort; a kávéssav- és poliszacharid-származékok viszont nem fejtenek ki *in vivo* hatást. Más vizsgálatok is megerősítették a növény alkilamid-tartalmának immunstimuláló hatását, és rámutattak, hogy az *Echinacea* készítményekben jelenlévő kávéssav-származékok (főleg cikóriasav: (2R,3R)-2,3-bis[[(E)-3-(3,4-dihydroxifenil)prop-2-enil]oxi]butándisav) *in vivo* hatása kis bioelérhetőségük miatt kizárható (5-9. irodalom).

Összefoglalva: az *Echinacea purpurea* kivonatok *in vivo* immunstimuláló hatása bizonyított. Hosszú ideig az arabinogalaktánokat tartották az aktív komponensnek, ezt azonban a 2000 utáni vizsgálatok nem erősítették meg. A legújabb eredmények szerint a növény alkilamid-komponensei eredményezik az immunstimuláló hatást.

Irodalom:

1. Bauer R., Jurcic, K., Puhlmann, J., Wagner, H. Immunologische *In-vivo* und *In-vitro*-Untersuchungen mit *Echinacea*-Extrakten. *Arzneimittelforschung* **1988**, 38, 276–281.
2. Emmendorffer, A. C.; Wagner, H.; Lohmann-Matthes, M.: Immunologically active polysaccharides from *Echinacea purpurea* plant and cell cultures in *Immunomodulatory Agents from Plants*, **1999**, 89-104, Ed. Wagner, H.
3. Roesler, J.; Emmendorffer, A.; Steinmueller, C.; Luetig, B.; Wagner, H., Lohmann-Matthes, M. L. Application of purified polysaccharides from cell cultures of the plant *Echinacea purpurea* to test subjects mediates activation of the phagocyte system, *International Journal of Immunopharmacology*, **1991**, 13, 931-941.
4. Skopinska-Rozewska, E.; Sokolnicka, I.; Siwicki, A. K.; Stankiewicz, W.; Dabrowski, M. P.; Buchwald, W.; Krajewska-Patan, A.; Mielcarek, S.; Mscisz, A.; Furmanowa, M. Dose-

- dependent *in vivo* effect of *Rhodiola* and *Echinacea* on the mitogen-induced lymphocyte proliferation in mice, *Polish Journal of Veterinary Sciences*, **2011**, 14, 265-272.
5. Raso, Giuseppina Mattace; Pacilio, Maria; Di Carlo, Giulia; Esposito, Emanuela; Pinto, Luisa; Meli, Rosaria, *In-vivo* and *in-vitro* anti-inflammatory effect of *Echinacea purpurea* and *Hypericum perforatum*, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2002**, 54, 1379-1383.
6. Bodinet, C.; Lindequist, U.; Teuscher, E.; Freudenstein, J. Effect of an orally applied herbal immunomodulator on cytokine induction and antibody response in normal and immunosuppressed mice, *Phytomedicine*, **2002**, 9, 606-613.
7. Gertsch, J., Schoop, R., Kuenzle, U., Suter, A. Echinacea alkylamides modulate TNF- α gene expression via cannabinoid receptor CB2 and multiple signal transduction pathways. *FEBS Lett.* **2004**, 577, 563–569.
8. Goel, V.; Chang, Ch.; Slama, J.V.; Barton, R.; Bauer, R.; Gahler, R.; Basu, T. K. Alkylamides of *Echinacea purpurea* stimulate alveolar macrophage function in normal rats, *International Immunopharmacology*, **2002**, 2, 381-387.
9. A. Matthias, L. Banbury, L. M. Stevenson, K. M. Bone, D. N. Leach, R. P. Lehmann, Alkylamides from *Echinacea* Modulate Induced Immune Responses in Macrophages, *Immunological Investigations*, **2007**, 36, 117–130.

Mennyire vitte előre a munka az egyes részterületeken a biológiai problémák megoldását?

A szénhidrát-alapú gyulladásgátló és antimetasztatikus terápia kidolgozása, a 90-es évek óta tartó rendkívül intenzív ipari és akadémiai kutatómunka ellenére, mindeddig nem vezetett eredményre. A szialil Lewis X tetraszacharid vezérmolekula alapján ugyan születtek jó farmakodinámiás és farmakokinetikai tulajdonsággal rendelkező szelektin-inhibitorok, de ezekből mégsem lett gyógyszer, a vegyületek kis kötődési affinitása miatt. Mivel a szelektin–ligandum kötődés döntően elektrosztatikus, ezért jó inhibitor-hatás csak olyan vegyületektől várható, amelyek erősebb ionos kötést tudnak kialakítani a fehérjével, mint a természetes ligandumok. A szulfonsavak a természetes ligandumban található *N*-acetyl-neuraminsavnál erősebb savak, ezért feltételezhető, hogy a megfelelő helyzetben szulfonsav-csoportot tartalmazó analógok erősebben képesek kötődni a szelektinekhez, mint a szialsav-tartalmú vagy egyéb karbonsav-tartalmú származékok. Sajnos biológiai háttér hiányában nem tudtuk ellenőrizni az általunk előállított szénhidrát szulfonsavak kötődési tulajdonságait, de úgy vélem, hogy a gyenge fehérje-szénhidrát kölcsönhatás problémájára ebben az esetben egy lehetséges megoldás a szulfonsav-tartalmú ligandumok szintézise.

A heparinoid antitrombotikumokra az irodalomból ismert hatás-szerkezet összefüggések a mi munkánk alapján kiegészültek azzal, hogy a szulfátészterek helyettesíthetők metánszulfoncsav-csoporttal a biológiai hatás elvesztése nélkül. Ezt jelentős új felismerésnek tartom, ami az antitrombotikumok kutatásán túl más területeken is hasznosítható. Ismeretes, hogy a heparin a véralvadást gátlóan kívül még nagyon sokféle biológiai folyamatban szerepet játszik, ezért számos területen (angiogenezis-gátlás, gyulladásgátlás, metasztázis-gátlás, etc.) gyógyszerjelöltként tartanak számon különféle heparin származékokat. Mivel a biológiai hatásban általában kulcsfontosságú a heparinoidok szulfátésztereinek részvételével kialakuló ionos kölcsönhatás, ezért véleményem szerint több terápiás területen is megfontolásra érdemes a bioizoszter szulfonsav-tartalmú heparinoidok kutatása.

Debrecen, 2013. június 6.

dr. Borbás Anikó
egyetemi docens
Debreceni Egyetem OEC
Gyógyszerészi Kémia Tanszék