



Baktériumok immundetermináns oligoszacharidjainak szintézise

doktori (PhD) értekezés tézisei

Tóth Anikó

(Témavezető: Prof. Dr. Lipták András)

Debreceni Egyetem
Természettudományi Kar
Debrecen, 2003

1. Az értekezés előzményei és célkitűzései

Az elmúlt néhány évtizedben dinamikus fejlődés figyelhető meg a szénhidrátkémia területén. A szénhidrátokat már nem csak vázanyagnak és energiaforrásnak tekintik, hanem elfogadottá vált a biológiai folyamatok szabályozásában betöltött szerepük, valamint a jelentőségük a biológiai információ tárolásában.

A szénhidrátok más molekulákhoz kapcsolódva, úgynevezett glikokonjugátumokat alkotnak (glikolipidek, glikoproteinek). Fontos szerepet játszanak a sejtnövekedés és a sejt differenciálódás szabályozásában, az immunválasz kiváltásában, a rákos sejtek áttételében, gyulladás, valamint bakteriális és vírusos fertőzések kialakulásában. A glikokonjugátumok különböző biológiai felismerési folyamatokban vesznek részt. Nagy specifitással ismernek fel baktériumokat és vírusokat, valamint kötőhelyei számos toxinnak és hormonnak.

A biokémiai és farmakológiai vizsgálatokhoz nagymennyiségű és nagy tisztaságú oligoszacharidokra van szükség. Ezen kísérletek új diagnosztikumok, vakcinák és gyógyszerek kifejlesztéséhez vezethetnek el. Ez az igény a kutatókat minél hatékonyabb, magasabb hozamú és sztereoszelektív oligoszacharid szintézisek kidolgozására ösztönzi.

A DE TTK Biokémiai Tanszék és az MTA-DE Szénhidrátkémiai Kutatócsoport munkatársai jelentős eredményeket értek el a *Mycobacterialis* eredetű sejt felszíni oligoszacharid antigének szintézise területén. 1996-ban kapcsolódtam be ebbe a szintetikus munkába Dr. Lipták András akadémikus úr irányításával, melynek során megvalósítottuk a *Mycobacterium avium* komplex 19-es szerovariáns pentaszacharid hapténjének előállítását. Az MTA-DE Szénhidrátkémiai Kutatócsoportjának másik jelentős kutatási iránya a *Shigella sonnei* O-specifikus poliszacharid oligoszacharid fragmenseinek szintézisére irányul. Ezen a két kutatási területen elért eredmények képezik az értekezés témáját.

2. Az alkalmazott vizsgálati módszerek

A szintetikus munka során a modern preparatív szerves kémia makro-, félmikro- és mikromódszereit alkalmaztuk.

A reakciók követésére, az anyagok tisztaságának ellenőrzésére, a termékarányok meghatározására vékonyréteg-, nagynyomású folyadék- és gázkromatográfiás módszereket használtunk. A nyerstelemek tisztítására, az izomerek szétválasztására kristályosítást és oszlopkromatográfiát alkalmaztunk.

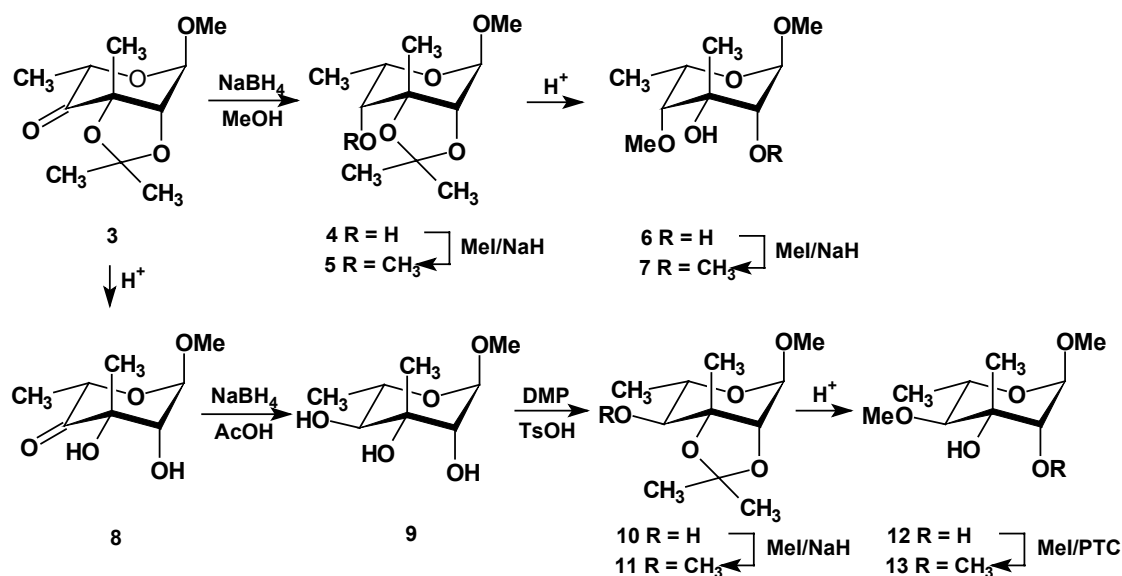
Az előállított vegyületek jellemzésére, azonosítására és szerkezetének igazolására elemanalízist, olvadáspont- és fajlagos forgatóképesség meghatározást, egy- és kétdimenziós NMR spektroszkópiát és MALDI-TOF tömegspektrometriai technikát használtunk.

3. Az értekezés új tudományos eredményei

A dolgozatban a *Mycobacterium avium* komplex 19-es szerovariáns pentaszaharid haptén, valamint a *Shigella sonnei* O-specifikus poliszacharid fragmenseinek szintézisét mutatjuk be.

3.1. A *Mycobacterium avium* komplex 19-es szerovariáns pentaszacharid hapténjének előállítása

A *Mycobacterium avium* komplex 19-es szerovariáns pentaszacharid elágazást tartalmazó monoszacharid egységének C-4 konfigurációja ismeretlen, ezért módszert dolgoztunk ki mind a *ramno*, mind a 6-dezoxi-*talo* konfigurációjú monoszacharidok előállítására. A fent említett monoszacharidok előállításának kulcs vegyülete a metil-6-dezoxi-3-*C*-metil-2,3-*O*-izopropilidén- α -L-*lyxo*-hexopirán-4-ulozid (**3**)^{*} volt, amelyet két lépésben állítottunk elő: először a metil-2,3-*O*-izopropilidén- α -L-*ramno*piranozid (**1**) 4-OH csoportját oxidáltuk PCC-vel, majd a keletkezett vegyületet *C*-metileztük a Klemer szerinti eljárással (\rightarrow **3**).

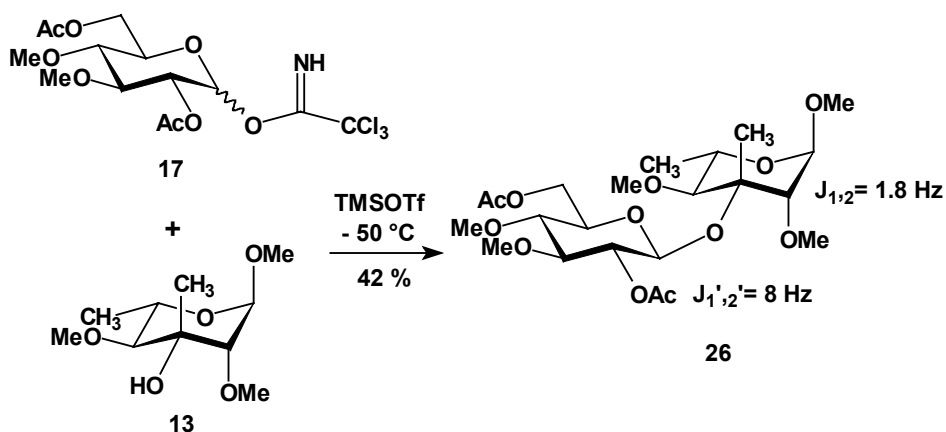


A **3** NaBH₄-del történő redukciója során szterikus okok miatt kizárólag a metil-6-dezoxi-3-*C*-metil-2,3-*O*-izopropilidén- α -L-*talo*piranozid (**4**) keletkezett.

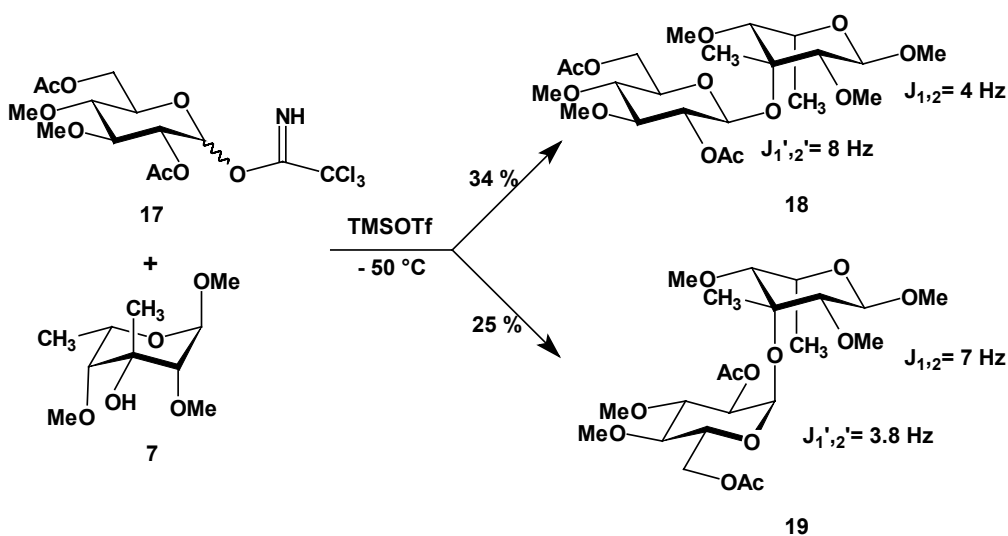
* A vegyületek számozása azonos az értekezésben alkalmazott számozással

Abban az esetben, ha a 3-ról előbb eltávolítottuk a 2,3-*O*-izopropilidén csoportot, majd ezután redukáltuk NaBH₄-del ecetsavas közegben, akkor szelektíven metil-3-*C*-metil- α -L-ramnopiranozid (9) keletkezett. Ezen vegyületek 2-OH csoportjának megfelelően végzett szelektív metilezéssel előállítottuk a kívánt monoszacharid akceptorokat, a metil-6-dezoxi-3-*C*-metil-2,4-di-*O*-metil- α -L-talopiranozidot (7) és a metil-3-*C*-metil-2,4-di-*O*-metil- α -L-ramnopiranozidot (13).

A fent említett akceptorok glikozilezésével állítottuk elő a két megfelelő C-4 epimert tartalmazó terminális diszacharidot. Mivel a szubsztituált glükuronsav származékok nem elég aktív glikozil donorok, ezért a megfelelően szubsztituált glükóz származékot (17) alkalmaztuk donorként.

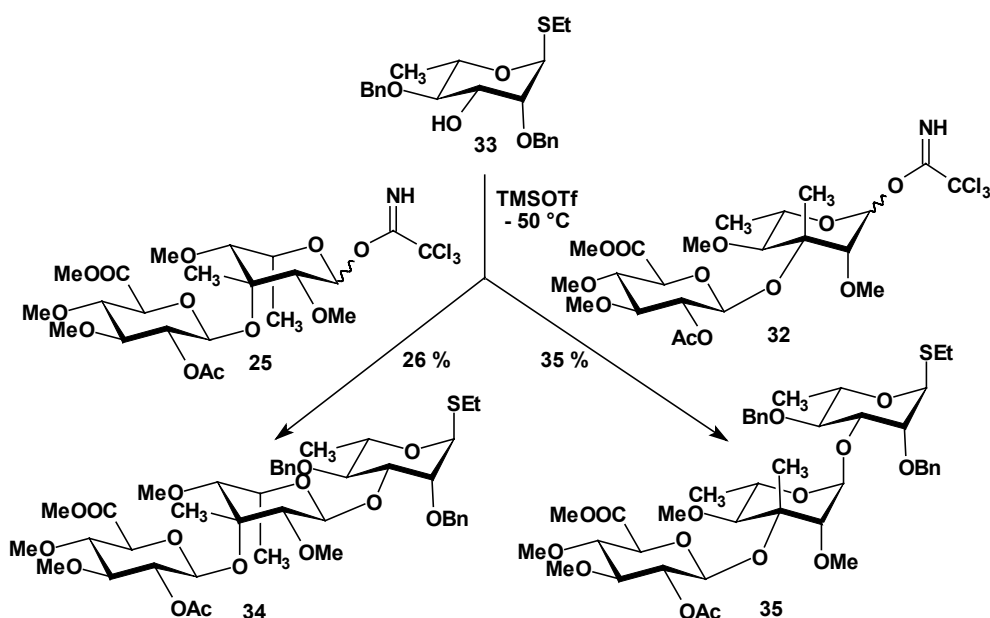


A *ramno* konfigurációjú egységet tartalmazó diszacharidot (26) 42 %-os hozammal sikerült előállítani, míg a *talo* konfigurációjú egységet tartalmazó diszacharid (18, 19) esetén α,β anomer keveréket kaptunk.

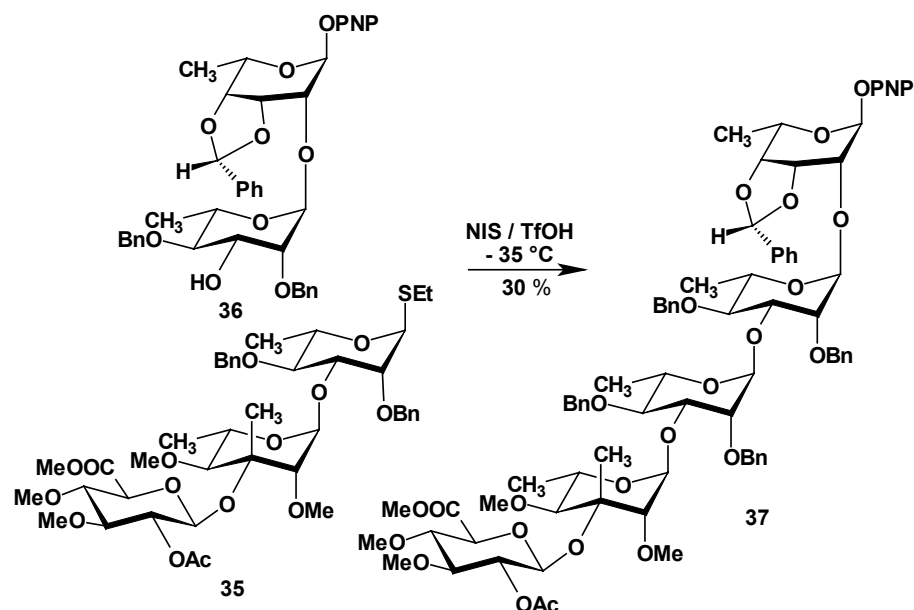


Ezenkívül azt tapasztaltuk a **18**, **19** diszacharidok NMR spektroszkópiai vizsgálata során, hogy a 6-dezoxi-*talo* konfigurációjú egység konformációs egyensúlya 4C_1 (L) konformációból eltolódott a 4C_1 (L) konformáció irányába, melynek eredményeként a $J_{1,2}$ csatolási állandó 1 Hz-ről 4.1 Hz-re változott.

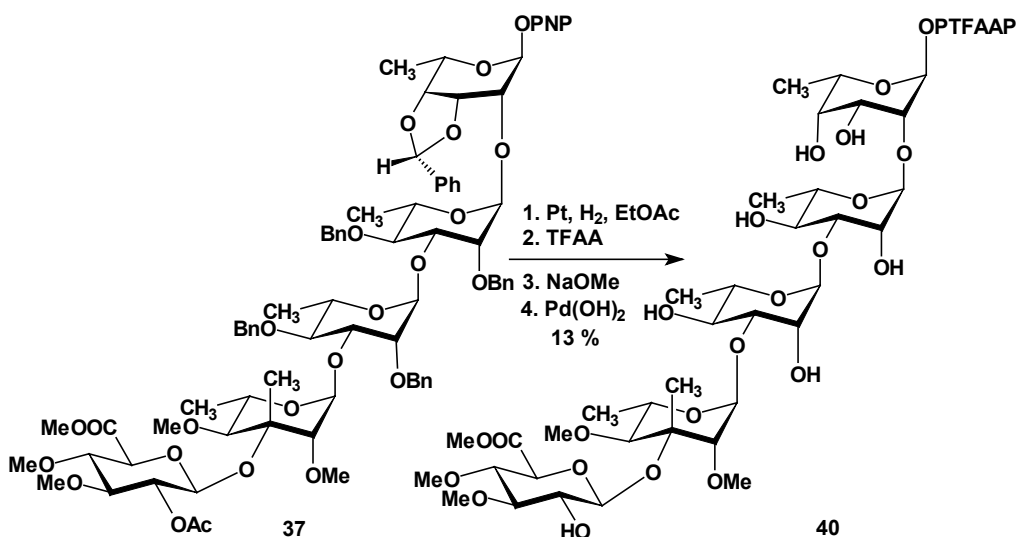
Ennek a jelenségnek a tanulmányozása érdekében előállítottunk számos teljesen, illetve részlegesen alkilezett metil-6-dezoxi-3-*C*-metil- α -L-mannopiranozid és -talopiranozid származékot. Ezen vegyületek NMR spektroszkópiai vizsgálatával igazoltuk, hogy a teljesen alkilezett metil-6-dezoxi-3-*C*-metil- α -L-talopiranozid származékok esetében a 4C_1 (L) konformáció a kedvezményezett, míg a részlegesen alkilezett metil-6-dezoxi-3-*C*-metil- α -L-talopiranozid származékok, valamint a részlegesen és teljesen alkilezett metil-6-dezoxi-3-*C*-metil- α -L-mannopiranozid származékok esetében a 4C_1 (L) konformáció dominál.



A fent említett diszacharidokat (**18** és **26**) az irodalomból ismert módszerekkel triklóracetimidát donorrá alakítottuk át (**25** és **32**) és felhasználtuk az etil-2,4-di-*O*-benzil-1-tio- α -L-ramnopiranozid (**33**) glikozilezésére és így sikeresen előállítottuk a megfelelő triszacharidokat (**34** és **35**). A **34** triszacharid 1H -NMR spektrumában is megfigyelhető, hogy a 6-dezoxi-*talo* konfigurációjú egység esetében a konformációs egyensúly jelentős arányú 4C_1 (L) konformert tartalmaz, mivel a H-1' és H-2' protonokhoz tartozó $J_{1,2'}$ csatolási állandó még mindig viszonylag nagy, 3 Hz. Ez azt jelenti, hogy a teljesen szubsztituált 6-dezoxi-L-talopiranozil egység a triszacharidon belül is dokumentálható arányban 4C_1 (L) konformációban van jelen. A *ramno* konfigurációjú egységet tartalmazó triszacharidot (**35**) 35 %-os hozammal sikerült előállítani.



Brennan és munkatársai közleményükben megadják a glikopeptid hidrolízisével és redukciójával nyert alditolnak a ^1H spektrumát. Ezt összevetve az általunk előállított di- és triszacharidok ^1H NMR spektrumával arra a következtetésre jutottunk, hogy valószínűleg a *ramno* konfigurációjú monoszacharidot tartalmazza a célvegyületünk. Ezért csak a *ramno* konfigurációjú egységet tartalmazó triszacharid donorral (**35**) végeztük el a *p*-nitro-fenil-2,4-di-*O*-benzil- α -L-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 2)-*endo*-3,4-*O*-benzilidén-6-dezoxi- α -L-talopiranozid (**36**) glikozilezését és sikeresen előállítottuk a védett pentaszacharidot (**37**).



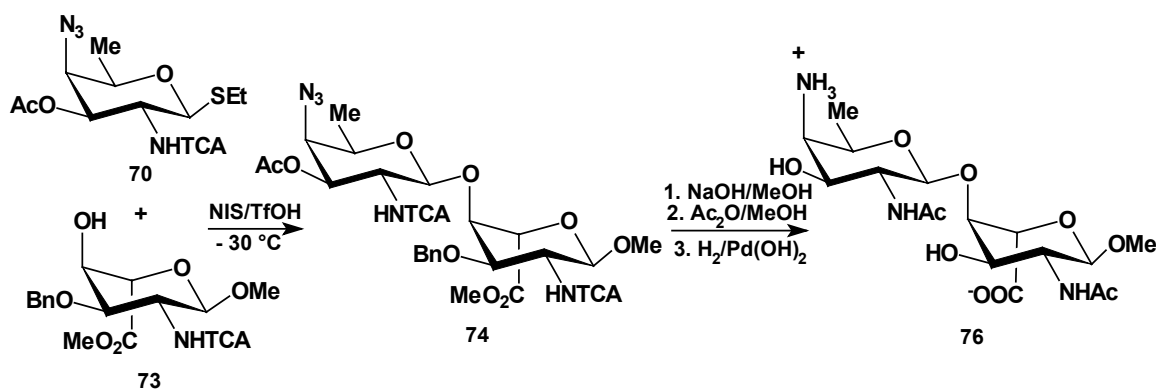
A védőcsoportok eltávolításával egy híd molekulával rendelkező szabad pentaszacharidot (**40**) nyertünk.

3.2. A *Shigella sonnei* O-specifikus poliszacharid fragmenseinek előállítása

A dolgozat második része a *Shigella sonnei* Gram-negatív baktérium O-specifikus poliszacharid fragmenseinek szintézisét tárgyalja. A *Shigella sonnei* O-specifikus poliszacharidja ismétlődő diszacharid egységekből épül fel, amely rendkívül érdekes szerkezettel rendelkezik: megtalálható benne a peptidekre jellemző ikerionos szerkezet és az oligoszacharidokra jellemző interglikozidos kötések (α -L és β -D). Ezenkívül változatos kötéstípusokkal [(1 \rightarrow 3) és (1 \rightarrow 4)] rendelkezik, valamint mindkét monoszacharid egység 2-es pozíciójában acetamido csoport van.

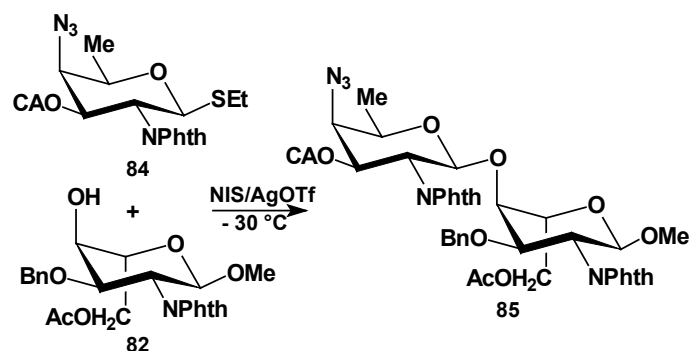
Mivel a célvegyületek 2-dezoxi-2-acetamido származékok, ezért fontos a megfelelő *N*-védőcsoportok alkalmazása és a glikozilezési reakciók során pedig a leghatékonyabb glikozil donor kiválasztása. Az 1,2-*transz* interglikozidos kötések kialakítása során *N*-védőcsoportként *N*-triklór-acetil és *N*-ftaloil csoportokat, donorként pedig tioetil-glikozidokat használtunk.

A tanszéken módszert dolgoztak ki a monomerek szintézisére. Ezen munka során előállított etil-3-*O*-acetil-4-azido-2-ftálimido-2,4,6-tridezoxi-1-tio- β -D-galaktopiranozid (**68**) ftálimido csoportját átalakítottuk triklór-acetamido csoporttá (\rightarrow **70**), valamint metil-2-azido-3-*O*-benzil-2-dezoxi- α -L-altropiranozid (**71**) azido csoportjának redukciójával, majd az ezt követő *N*-triklór-acetilezéssel kialakítottuk a **73** monomeren is a kívánt *N*-védőcsoportot.

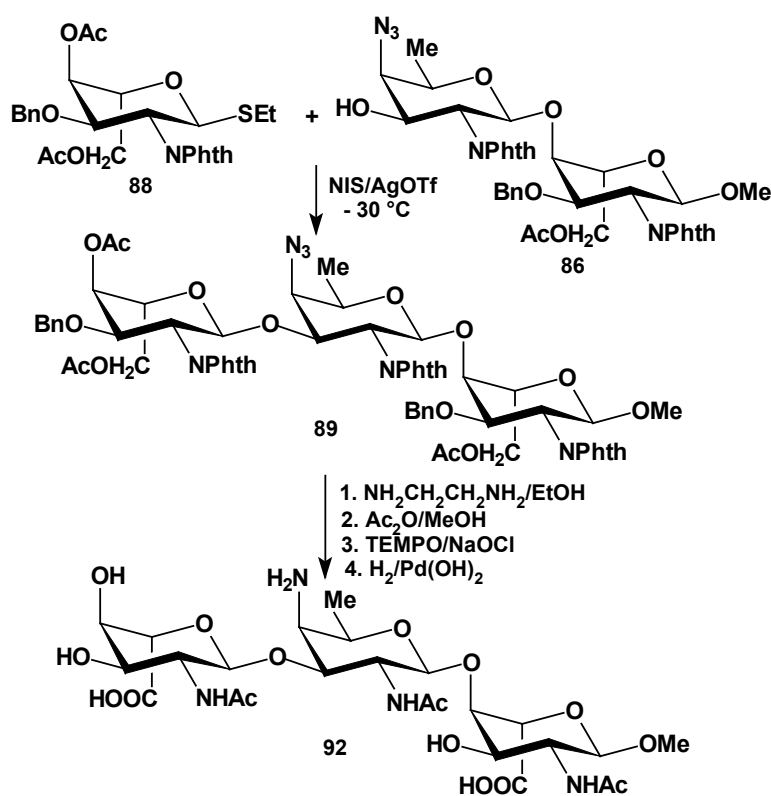


A **73** akceptor **70** tioetil donorral történő glikozilezésével előállítottuk a **74** diszacharidot, amelynek lúgos hidrolízisével, *N*-acetilezésével és katalitikus hidrogénezésével sikeresen izoláltuk az ismétlődő diszacharid egységet (**76**) szabad formában.

A nagyobb tagszámú oligoszacharidok szintézise során az *N*-triklór-acetil csoportok eltávolítása nem volt sikeres, ezért stratégiát dolgoztunk ki az *N*-ftaloil védőcsoport alkalmazhatósága érdekében.



A már előállított metil-2-azido-3-*O*-benzil-2-dezoxi- α -L-altropiranozidon kialakítottuk a ftálimido csoportot, glikozilezését elvégeztük a megfelelő trideoxi-galaktóz donorról (**84**) és így nyertük a védett diszacharidot (**85**), amelyet glikozil akceptorra alakítottuk a klór-acetil csoport eltávolításával (\rightarrow **86**).



A **81** altróz származékot tioetil-glikoziddá (\rightarrow **88**) alakítottuk irodalomból ismert módszerekkel és a **86** glikozilezésére használtuk fel, nyerve a védett triszacharidot (**89**). Ezután a ftaloil védőcsoportokat átalakítottuk acetamido csoportokká, majd a primer hidroxil csoportok oxidációja után katalitikus hidrogénezéssel nyertük a szabad, szerológiai vizsgálatra alkalmas triszacharidot (**92**). A szabad triszacharid biológiai vizsgálata folyamatban van.

4. Összefoglalás

A kísérleti munka során eljárást dolgoztunk ki mind a metil-6-dezoxi-3-C-metil-2,4-di-*O*-metil- α -L-talopiranozid, mind a metil-3-C-metil-2,4-di-*O*-metil- α -L-ramnopiranozid szintézisére.

Sikeresen előállítottuk a *Mycobacterium avium* komplex 19-es szerovariánsának híd molekulával rendelkező szabad pentaszacharidját (**40**), amely megfelelő immunogén fehérjéhez kapcsolva felhasználható *Mycobacteriális* fertőzések szerodiagnózisára.

Megvalósítottuk a *Shigella sonnei* O-specifikus poliszacharidját alkotó ismétlődő diszacharid, valamint triszacharid egység szintézisét szabad formában.

A diszacharidot alkotó szabad monoszacharidok és az ismétlődő diszacharid biológiai vizsgálatát passzív hemolízis inhibíciós teszttel végezték el. Ezen vizsgálatok szerint a természetes O-specifikus poliszacharid és az ellene termeltetett poliklonális antitest közötti kötődés jobb inhibitora volt az ismétlődő diszacharid, mint a diszacharidot alkotó monoszacharidok és a két monoszacharid közül az L-altruronsav származék bizonyult jobb inhibitornak. A triszacharid biológiai vizsgálata folyamatban van.

5. Publikációk jegyzéke

5.1 Közlemények jegyzéke

1. K. Gyergyói, **A. Tóth**, I. Bajza, A. Lipták
Unusual sugars of the GPL-type antigen of *Mycobacterium avium* serovar 19. Stereoselective synthesis of methyl 6-deoxy-3-C-methyl-2,4-di-O-methyl- α -L-mannopyranoside and its C-4 epimer
Synlett., 127-128 (1998).
2. **A. Tóth**, A. Medgyes, I. Bajza, A. Lipták, Gy Batta, T. Kontrohr, K. Péterffy, V. Pozsgay
Synthesis of the Repeating Unit of the O-specific Polysaccharide of *Shigella sonnei* and Quantitation of its Serologic Activity
Bioorg. Med. Chem. Lett., **10**, 19-21 (2000).
3. Gy. Gyémánt, **A. Tóth**, I. Bajza, L. Kandra, A. Lipták
Identification and structural analysis of synthetic oligosaccharides of *Shigella sonnei* using MALDI-TOF MS
Carbohydr. Res. **334**, 315-322 (2001)
4. **A. Tóth**, J. Remenyik, I. Bajza, A. Lipták
Synthesis of the methyl ethers of methyl 6-deoxy-3-C-methyl-2,4-di-O-methyl- α -L-talopyranoside and - α -L-mannopyranoside. Examination of the conformation and chromatographic properties of the compounds
Arkivoc **V**, 28-45 (2003)

5.2 Előadások és poszterek

1. **Tóth A.**, Bajza I., Lipták A.
A *Mycobacterium avium* komplex 19-es szerovariáns sejt felszíni antigén diszacharid egységének előállítása
XX. Kémiai Előadói Napok, Szeged, 1997. Október 13-15.
2. **A. Tóth**, K. Gyergyói, I. Bajza, A. Lipták
Synthesis of the immunodeterminant pentasaccharide fragment of the cell surface GLP of *Mycobacterium avium* serovar 19
2. German-East-European Carbohydrate Workshop, Güstrow/Rostock, March 24-28, 1999
3. **Tóth A.**, Bajza I., Pozsgay V. és Lipták A.
A *Shigella sonnei* O-specifikus poliszacharidját felépítő oligoszacharid szekvenciák szintézise
Vegyészkonferencia, Eger, 1999. Június 22-24.

4. **A. Tóth**, I. Bajza, V. Pozsgay, A. Lipták
Synthesis of di- and trisaccharide fragments of the O-specific polysaccharide of *Shigella sonnei*
10th European Carbohydrate Symposium, Galway, July 11-16, 1999
5. **A. Tóth**, I. Bajza, V. Pozsgay, A. Lipták
Synthesis of oligosaccharide fragments of the O-specific polysaccharide of *Shigella sonnei*
6th European Training Course on Carbohydrates, Debrecen, July 8-14, 2000
6. I. Bajza, **A. Tóth**, T. Kontrohr, V. Pozsgay, A. Lipták
Synthesis of higher-membered oligosaccharide fragments of the LPS of *Shigella sonnei*
20th International Carbohydrate Symposium, Hamburg, August 27-September 1, 2000
7. **Tóth A.**, Bajza I., Pozsgay V. és Lipták A.
A *Mycobacterium avium* komplex 19-es szerovariáns sejtfelszíni pentaszacharid haptén szintézise
Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, 2001. Június 22-24.
8. **A. Tóth**, I. Bajza, V. Pozsgay, A. Lipták
Synthesis of trisaccharide fragment of the O-specific polysaccharide of *Shigella sonnei*
Annual Meeting of the Committee of Carbohydrates of Chemistry of the Hungarian Academy of the Sciences, Mátrafüred, May 21-23, 2002
9. **A. Tóth**, I. Bajza, V. Pozsgay, A. Lipták
Synthesis of trisaccharide fragment of the O-specific polysaccharide of *Shigella sonnei*
Summer Course Glycosciences (7th European Training Course on Carbohydrates), Wageningen, June 23-27, 2002