

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**KÉN- ÉS SZELÉNTARTALMÚ GLIKOMIMETIKUMOK
SZINTÉZISE**

Szabó Tamás

Témavezető: Prof. Dr. Szilágyi László



DEBRECENI EGYETEM

Kémiai Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2019.

1. Az értekezés előzményei és célkitűzései

A sejtek felszínén található N- illetve O-glikozidok adják azt a páratlan glikán mintázatot, amit a sejt ujjenyomatának is szoktak nevezni. A sejt felszíni glikánokat glikozil transzferázok és glikozilázok által pontosan szabályozott reakciók sora alakítja ki. A rájuk jellemző szekvenciák és fűrtformák óriási mennyiségű információ tartalommal bírnak, amit gyakran, mint „cukor kód” említene. Az információ kiolvasásának egyik módja a megfelelő szénhidrát receptorokkal történő kölcsönhatáson alapul. Ez a fehérje-glikán felismerés az utóbbi években egyre nagyobb figyelmet kapott. Ezen felismerési folyamatban résztvevő fehérjék legismertebb képviselői a lektinek, amelyeket először növényekből izoláltak. Ilyen például a *Viscum album* agglutinin (VAA).

Az állati szervezetekben előforduló lektineknek ennél szélesebb körű funkcióit ismerjük. Részt vesznek sejten belüli válaszreakciók kiváltásában, a sejt-sejt, a sejt-sejt közti állomány kölcsönhatásaiban. Egyik legnépesebb családjuk a galektinek. Nevükkel ellentétben gyengén kötnek β -galaktózt és általában laktózra vagy N-acetilaktózaminra specifikusak. A galektinek rendellenes szabályozása, főként túlzott termelődése jelentős szerepet játszik több patológiai folyamatban, mint a rheumatoid arthritis, gyulladások, fibrózis és a rák.

A lektin-glikán kölcsönhatás megismerésében jelentős szerepet játszanak a szénhidrát mimetikumok. Ilyen például a szelektinek gátlására kifejlesztett szialil Lewis-X, amely klinikai vizsgálatokban hatásosan gátolta az iszkémiával érintett testrészek újbóli vérellátásakor fellépő allergiás reakciót, vagy a Bimosiamose, amely asztmás betegeknél hatásos a légutakban megjelenő gyulladás visszaszorítására.

Napjainkra már több galektin-3 inhibítor vegyületet előállítottak. Leghatásosabbnak a galaktóz C-3 szénen módosított és a szimmetrikus digalaktozil tio-glikozidok, illetve a laktóz C-1-en módosított multivalens származékok bizonyultak. A TD131_1 nevű származék hatékonyan csökkentette a pajzsmirigy tumorsejtek ellenállását, különösen doxorubicinnel, illetve ionizáló sugárzással kombinálva. Hasonlóan a Taxol által indukált apoptózist erősítette a laktulozil-L-leucin. A galektin-1 és galektin-3 szerepe ellentétes egymással, ezért a szelektív gátlás elősegítésére több szerkezetoptimalást is végeztek. Egy

a C-3-on szubsztituált szimmetrikus digalaktozil-szulfid származék affinitása a galektin-3-hoz 200 szorosa volt a galektin-1 lektinnel szemben mért értéknek.

Célul tűztük ki toxikus növényi agglutininek, illetve az emberi szervezetre káros lektinek gátlására alkalmas további glikomimetikumok szintézisét. Előnyös, ha ezek a szénhidrát származékok olyan glikozidos kötéseket tartalmaznak, amelyek ellenállóak glikozidáz enzimekkel szemben.

A lektin-gátlási vizsgálatok céljára olyan bivalens tio-, diszulfido-, szeleno-, és 1,2,3-triazolo-glikozidokat állítottunk elő, amelyek központi aromás magként benzol-, naftalin-, vagy 1,5-diazabiciklo[3.3.0]okta-3,6-dién-2,8-dion („bimán”) vázat tartalmaztak. A szénhidrát egységeket tekintve galaktóz, laktóz, glükóz és mannóz származékokat állítottunk elő.

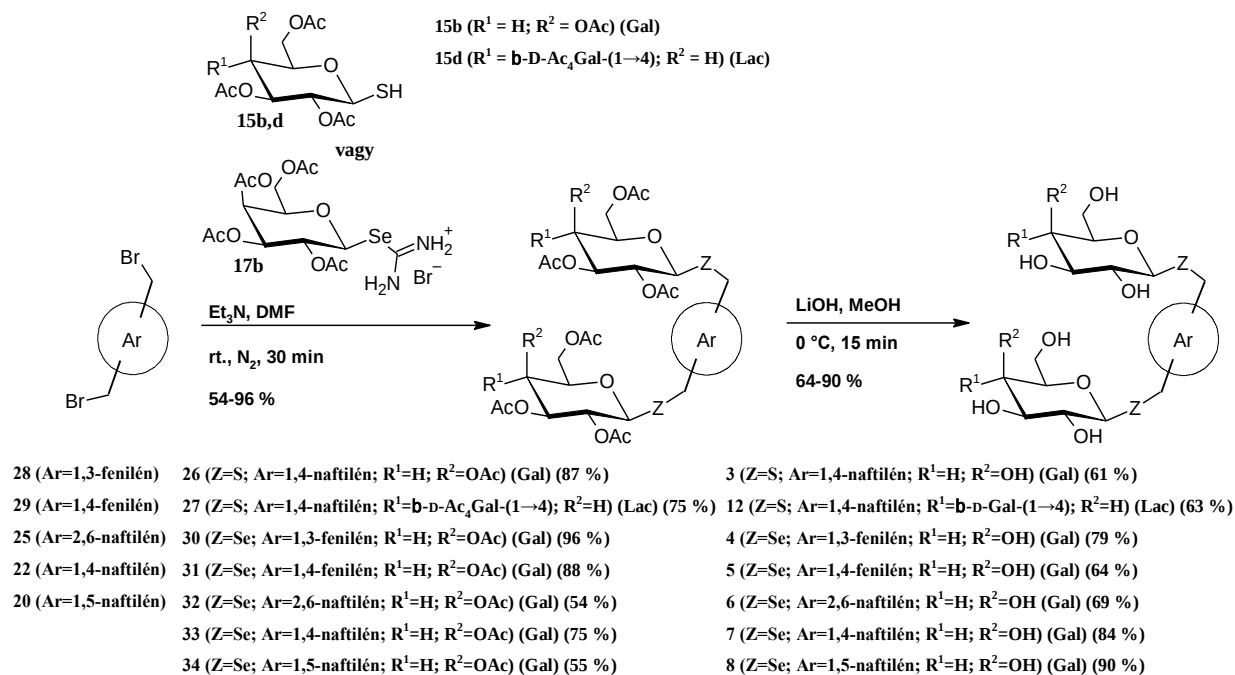
2. Az alkalmazott vizsgálati módszerek

Kísérleti munkánk során a modern szerves kémia makro-, félmikro- és mikro-módszereit alkalmaztuk. A reakciókat vékonyréteg-kromatográfiával követtük, az előállított vegyületeket oszlopkromatográfiával és/vagy kristályosítással tisztítottuk. Az új vegyületek jellemzésére, azonosítására és szerkezetük igazolására klasszikus analitikai eljárásokat egy- és kétdimenziós NMR spektroszkópiás módszereket, egykristály-röntgendiffrakciót, illetve tömegspektrometriát alkalmaztunk.

3. Eredmények

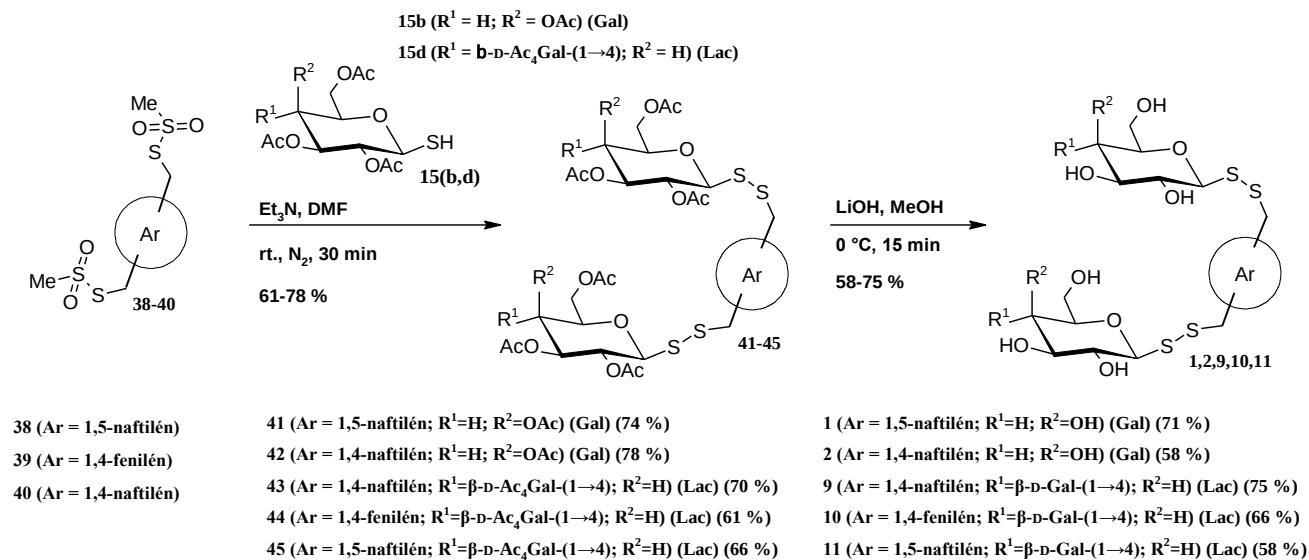
3.1. Glikozilezett benzol- és naftalin származékok szintézise

A **22** 1,4-bisz(brómmetil)naftalint **15(b,d)** per-O-acetil-D-glikopiranozil tiolokkal reagáltatva a **26**, **27** tio-glikozidokat, míg a **20**, **22**, **25**, **28**, **29** bisz(brómmetil)aréneket **17b** 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galaktopiranozil szelenourónium bromiddal reagáltatva **30-34** szeleno-glikozidokat kaptunk (1. ábra).



1. ábra

Naftalin- és benzol központi vázra kapcsolt bivalens tio- és szeleno-glikozidok előállítása



2. ábra

Naftalin- és benzol központi vázra kapcsolt bivalens ditio-glikozidok előállítása

A **41-45, 26, 27, 30-34** benzol és naftalin alapvázra kapcsolt szénhidrát egységek acetil védőcsoportjait sztöchiometrikus mennyiségű lítium-hidroxiddal eltávolítva jó hozammal kaptunk **1-12** szabad cukor származékokat.

3.2. Glikozilezett benzol- és naftalin származékok jellemzése és biológiai aktivitása

Az **1-12** vegyületek közül kiválasztott jellemző példák konformációs tulajdonságait molekuladinamikai számításokkal Dr. Fehér Krisztina (Genti Egyetem) térképezte fel. Az aromás maghoz kapcsolódó két glikozil egység orientációját az anomer (C-1) atomjainak távolságával jellemezte. A **4, 5** szelenogalaktozidok illetve **9, 11** diszulfido laktozidok esetében ezek a 4-11 Å között változó távolságok azt mutatták, hogy a glikozidos kötés menti rotációval a vegyületek majdnem az egész rendelkezésre álló konformációs teret képesek betölteni.

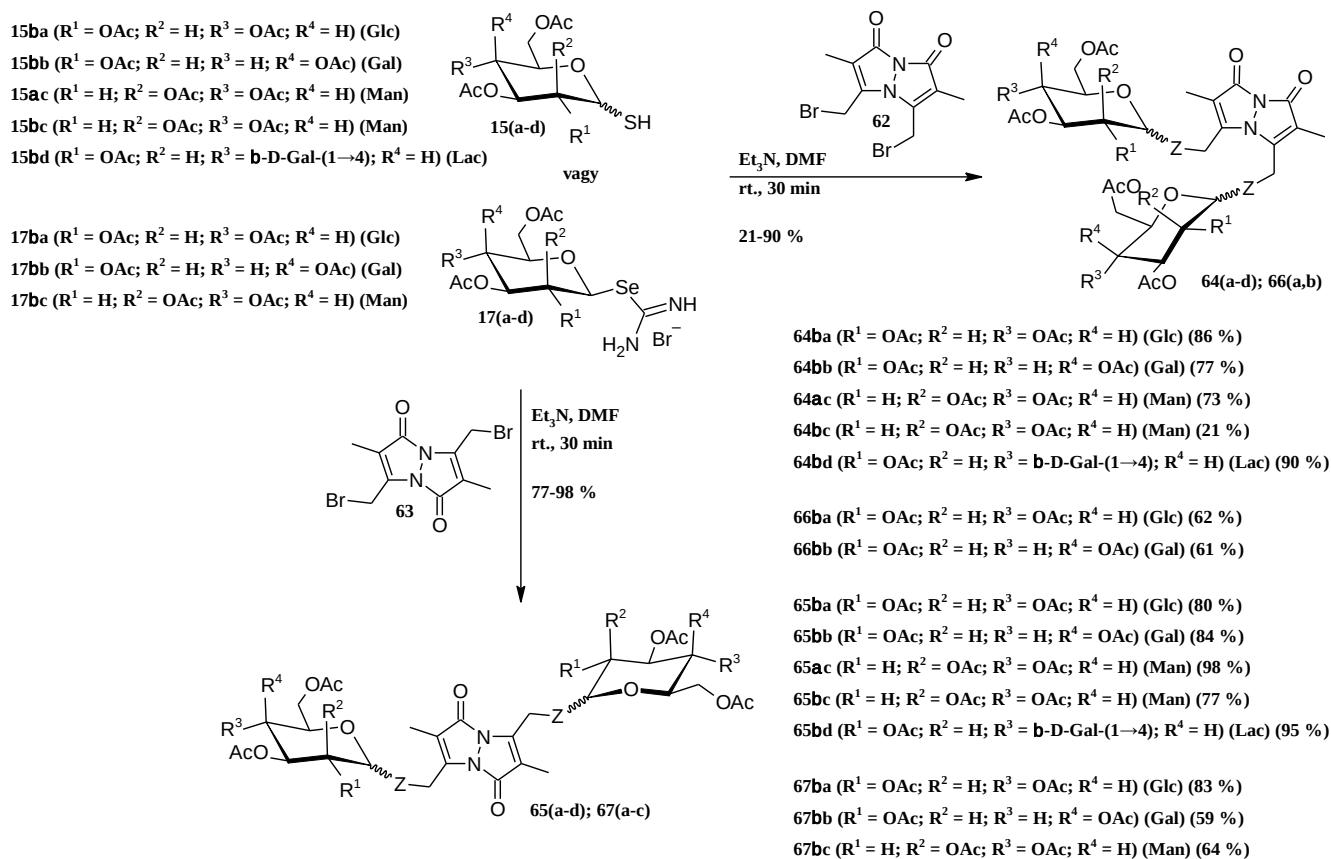
Az **1-12** vegyületek biológiai aktivitását Prof. Hans-Joachim Gabius és csoportja vizsgálta (Ludwig Maximillians Egyetem, München). A származékok lektin-glikán kölcsönhatásra gyakorolt inhibíciós aktivitásait három különböző rendszeren tesztelték. A szilárd fázisú próbák során a felülethez rögzített glikoproteinről (aszialofetuinon) a VAA lektint a **2** diszulfid és a **6** szelenoszulfid az alap szénhidrátnál tízszer hatékonyabban szorította le. Az áramlásos citofluorometriai mérésekben a humán tumor sejtvonalak sejtfelszíni glikánjain három különböző humán galektin kötődését is a **9** diszulfid gátolta a leghatékonyabban. A komplexebb rendszerek felé tett lépés során, amelyben a naftalin alapú glükokonjugátumok inhibíciós hatását hisztokémiai módszerekkel egér szövet metszeteken tesztelték, a **9** és **12** vegyületek kiemelkedő hatékonyságúnak bizonyultak a humán galektinek szöveti kötődésének gátlásában. A galektin-8 rögzített egér vékonybél szöveten való kötődését a laktózt tartalmazó **9-es** vegyület százszor jobban gátolta, mint a szabad laktóz.

3.3. Glikozilezett bimán származékok szintézise

A **62 syn-** és **63 anti-(CH₂Br;CH₃)B** származékokat a **15(a-d)** per-O-acetil-D-glikopiranozil tiolokkal reagáltatva a **64(a-d), 65(a-d)** tio-glikozidokat, míg a **17(a-c)**

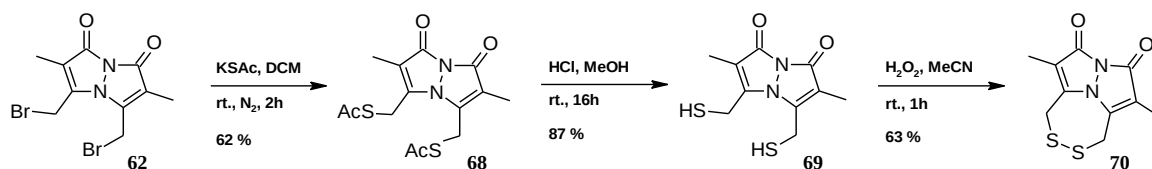
2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glikopiranozil szelenourónium bromidokkal reagáltatva **66(a,b)**, **67(a-c)** szeleno-glikozidokat kaptunk (3. ábra).

Munkánk során néhány új kéntartalmú nem glikozilezett bimán származékot is előállítottunk, mint a **68** *syn*-(CH₂SAc;CH₃)B, **69** *syn*-(CH₂SH;CH₃)B, **71** *anti*-(CH₂SAc;CH₃)B (4. ábra), illetve az intramolekuláris diszulfid hidat tartalmazó **70** *syn*-(CH₂S-;CH₃)B származék.



3. ábra

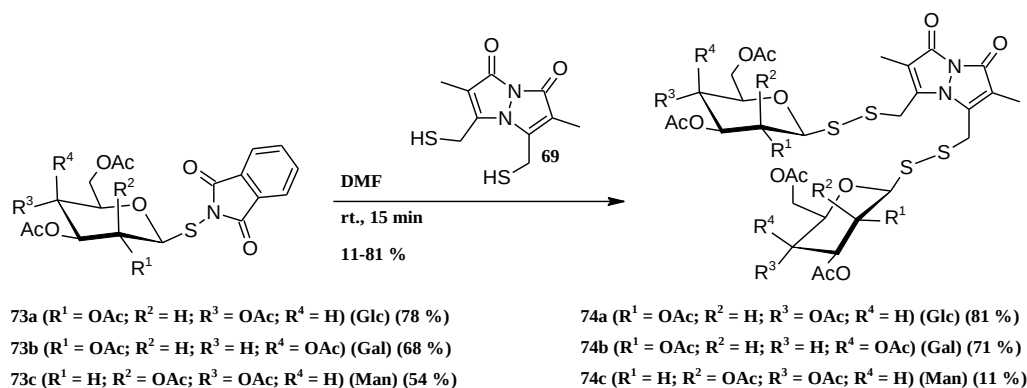
Bimán tio- és szeleno-glikozidok



4. ábra

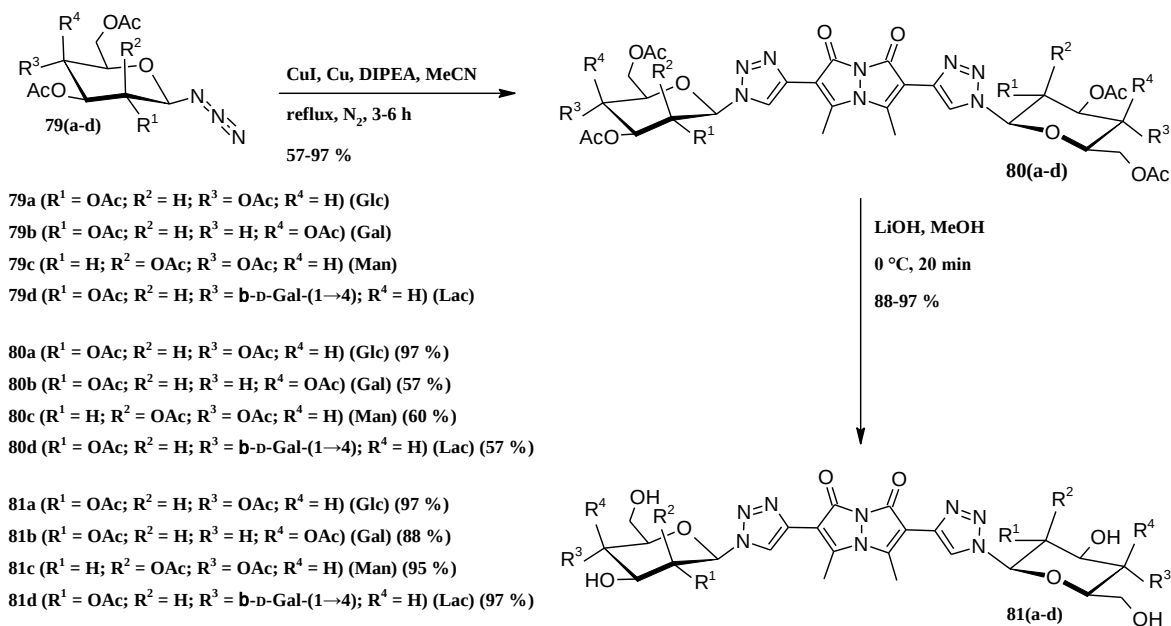
Nem glikozilezett bimán származékok előállítása

Egy további interglikozidos kötés, a diszulfid híd kialakításával jutottunk **74(a-c)** *syn*-(CH₂S₂GliAc₄;CH₃)B glikozilezett bimán származékokhoz. Bimán ditio-glikozidokat a **73(a-c)** *N*-ftaloil-S-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-glikopiranozil)szulfénamidok és **69** *syn*-(CH₂SH;CH₃)B bimán-ditiol reakciójával nyertünk. (5.ábra)



5. ábra
Bimán ditio-glikozidok előállítása

További lehetőségek keresése közben akadtunk a CuAAC („katt”) reakcióra, ami a glikozil azidok könnyű hozzáférhetőségéből adódóan egy vonzó lehetőségnek mutatkozott a szénhidrát egységek és a bimán váz kapcsolására. A **79(a-d)** per-*O*-acetil-β-D-glikopiranozil azidok és **78** reakciója jó hozamokkal szolgáltatva a **80(a-d)** 1,2,3-triazolo glikozidokat. A **78** *syn*-(CH₃;C≡CTMS)B trimetilszilil csoportjai egy tandem reakcióban az azidokkal való kapcsolás során lehasadtak. A **80(a-d)** acetil csoportjait lítium-hidroxiddal eltávolítva kaptuk a **81(a-d)** szabad cukor származékokat.



6. ábra
Bimán triazolo-glikozidok előállítása

3.4. Glikozilezett bimán származékok jellemzése és biológiai aktivitása

Vizsgáltuk az alapvázhoz csatolt glikozil egységek fluoreszcenciára gyakorolt hatását, ehhez felvettük a glikozilezett bimán származékok UV-Vis abszorpciós és fluoreszcens spektrumait. Ahogyan az várható volt, a *syn* izomerek megtartották fluoreszcens tulajdonságaikat, azonban adódott egy kivétel: a **66(a,b)** szeleno-glikozidok esetében nagy valószínűséggel a szelén és a bimán fluorofór között végbemenő fotoindukált elektron transzfernek (PET) köszönhetően a fluoreszcens tulajdonság eltűnt. A glikozil egységek konfiguráció változtatásának nem volt észlelhető hatása a fluoreszcens tulajdonságokra.

A **64** *syn*-(CH₂SGlcAc₄;CH₃)B, **65** *anti*-(CH₂SGlcAc₄;CH₃)B, **68** *syn*-(CH₂SAC;CH₃)B, **70** *syn*-(CH₂S-;CH₃)B, **80** *syn*-(CH₃;TAGlcAc₄)B bimán származékok szerkezetének jellemzésére Dr. Bényei Attila (Debreceni Egyetem Fizikai Kémiai Tanszék) végzett egykristály röntgendiffrakciós méréseket. Az általunk vizsgált esetekben, a kristályban gyakran két független molekula detektálható aszimmetrikus egységként. A bimán vázat alkotó két anellált pirazon gyűrű nincs egy síkban, az eltérés 0-50 fok között változik. A két pirazon gyűrű síktól való eltérése az aszimmetrikus egységben található két

molekulára is különböző, pl. **68** *syn*-(CH₂SAc;CH₃)B esetében 13/22 fok, a **64** *syn*-(CH₂SGlcAc₄;CH₃)B esetén 5/19 fok, míg az intramolekuláris diszulfid hidas **70** *syn*-(CH₂S-;CH₃)B vegyületben 4/19 fok. A két cukor egység anomer szénatomjai közötti távolság tág határok között változik: a **65** *anti*-(CH₂SGlcAc₄;CH₃)B esetében 5.9 Å a **80** *syn*-(CH₃;TAGlcAc₄)B származékban 14.0 Å.

4. Az eredmények hasznosítási lehetőségei

A sejtfelszíni glikánok és lektinek közötti felismerési folyamatok mélyebb megértéséhez, olyan új glikokonjugátumokat állítottunk elő, amelyekben a szénhidrát egységeket az O-glikozidos kötés oxigénje helyett S/Se és diszulfid híddal kapcsoltuk a központi aromás magként alkalmazott benzol- és naftalinvázra. Az említett kölcsönhatások felelősek több patofiziológiai folyamat kialakulásáért, olyan betegségekben, mint a gyulladás, a reumatoid arthritis, a fibrózis és a rák.

Az új bivalens benzol/naftalin magra tio-, diszulfido- és szeleno-glikozidokként kapcsolt galaktóz egységeket tartalmazó mimetikumokat, a VAA növényi toxin blokkolására, míg a laktózt tartalmazóakat a sejtek adhézíóját/növekedését szabályozó humán galektinek inhibíciójára állítottuk elő. A várt lektin inhibíciós aktivitás három biokémiai/fizikai technikával is alátámasztásra került: a szilárd fázisú próbák során a felülethez kötött glikoproteineken, humán karcinóma sejtek felületi lektin kötő képesség csökkenésének citofluorometriai vizsgálataival, és egér szövetmetszeteken hisztokémiai módszerekkel. Egyes esetekben az alap szénhidráthoz viszonyítottan százszoros inhibíciós aktivitást lehetett mérni. Az eredmények alapján a tanulmányozott szénhidrát mimetikumok lehetővé teszik fiziológiailag releváns kölcsönhatások vizsgálatát.

További munkánk során egy sor új fluoreszcens és nem fluoreszcens glikokonjugátumot állítottunk elő és jellemeztünk, amelyekben mono- és diszacharid egységekkel láttuk el az 1,5-diazabiciklo[3.3.0]okta-3,6-dién-2,8-dion (bimán) heteroaromás gyűrűrendszert. *Syn*- és *anti*-bimán központi magra mono- és diszacharid egységeket tio-, ditio- és szeleno-glikozidos kötéssel kapcsoltuk. További bivalens bimán szénhidrát származékokat nyertünk glikozil azidok és bimán dietinil származékának

CuAAC katalizálta reakciójából, ezekben a központi bimán vázra a cukor egységek 1,2,3-triazol gyűrűvel kapcsolódtak.

Néhány glikozilezett és nem glikozilezett bimán származék kristály és molekulaszervezete is meghatározásra került, az új vegyületek fluoreszcens tulajdonságaival együtt.

Ezen vegyületeket főként a fluoreszcens tulajdonságaikból adódóan különösen jól használhatóak lehetnek szénhidrát kötő fehérjék vizsgálatában.

Előzetes vizsgálatok azt mutatták, hogy az újonnan előállított **69** ($\text{CH}_2\text{SH};\text{CH}_3$)B, **70** ($\text{CH}_2\text{S-};\text{CH}_3$)B, **68** ($\text{CH}_2\text{SAc};\text{CH}_3$)B és **64βc** ($\text{CH}_2\text{S-}\beta\text{-ManAc}_4;\text{CH}_3$)B származékok közepes hatékonysággal inhibálták az afrikai álomkórt okozó *Trypanosoma brucei* parazita szaporodását.



Nyilvántartási szám: DEENK/26/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szabó Tamás
Neptun kód: Q0Q4V1
Doktori Iskola: Kémiai Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

1. **Szabó, T.**, Bényei, A., Szilágyi, L.: Bivalent glycoconjugates based on 1,5-diazabicyclo[3.3.0]octa-3,6-diene-2,8-dione ("bimane") as a central scaffold.
Carbohydr. Res. 473, 88-98, 2019. ISSN: 0008-6215.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2019.01.002>
IF: 2.074 (2017)
2. Kaltner, H., **Szabó, T.**, Fehér, K., André, S., Balla, S., Manning, J. C., Szilágyi, L., Gabius, H. J.:
Bivalent O-glycoside mimetics with S/disulfide/Se substitutions and aromatic core: Synthesis, molecular modeling and inhibitory activity on biomedically relevant lectins in assays of increasing physiological relevance.
Bioorg. Med. Chem. 25 (12), 3158-3170, 2017. ISSN: 0968-0896.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2017.04.011>
IF: 2.881





További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (1)

3. Illyés, T. Z., **Szabó, T.**, Szilágyi, L.: Glycosylation via mixed disulfide formation using glycosylthio-phtalimides and -succinimides as glycosylsulfenyl-transfer reagents.
Carbohydr. Res. 346 (12), 1622-1627, 2011. ISSN: 0008-6215.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2011.04.020>
IF: 2.332

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 7,287

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
4,955**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2019.02.13.



Egyéb közlemény

1. **Szabó Tamás**, Neu József, Garadnay Sándor, (R,S)-N,N-diizopropil-3-(2-hidroxi-5-(hidroximetil)fenil)-3-fenilpropilamin rezolválása (R)-N-acetil-fenilglicinnel, Bilingual lecturebook on spectroscopy: on the 80th birthday of professor Dr. Ferenc Billes, szerk. Ziegler Ildikó és Fejes István, Esztergom **2014.** p. 101-106. ISBN 978-963-08-9474-6

Szabadalmak

1. **Szabó Tamás**, Neu József, Garadnay Sándor; Rezolválás N-acil-fenilglicin származékokkal, Richter Gedeon Nyrt. (P1200360)
2. Neu József, **Szabó Tamás**, Garadnay Sándor; Ipari eljárás fesoterodin előállítására, Richter Gedeon Nyrt. (P1200361)
3. Garadnay Sándor, Neu József, **Szabó Tamás**; Eljárás benzazepin származékok előállítására, Richter Gedeon Nyrt. (P1400545, EP3221297)
4. **Szabó Tamás**, Neu József, Garadnay Sándor; Eljárás fíngolimod hidroklorid előállítására, Richter Gedeon Nyrt. (P1500617, HU230806)
5. Neu József, **Szabó Tamás**, Garadnay Sándor; Process for the preparation of high-purity Prasugrel, Richter Gedeon Nyrt. (P1600389, WO2017221187)
6. Neu József, Garadnay Sándor, **Szabó Tamás**; Industrial process for the preparation of cariprazine, Richter Gedeon Nyrt. (P1600420, WO2018007986)
7. **Szabó Tamás**, Neu József, Garadnay Sándor; Process for the preparation of 4-(4-aminophenyl)morpholin-3-one, Richter Gedeon Nyrt. (P1800007)

Előadások

1. **Szabó Tamás**, Szilágyi László, Glikozilezett bimán származékok szintézise Heterociklusos és Elemorganikus Kémiai Munkabizottság ülése Balatonszemes, 2014. május 21-23.
2. **Szabó Tamás**, Szilágyi László, Glikozilezett bimán származékok szintézise Szénhidrát, Nukleinsav és Antibiotikum Munkabizottság Ülése, Mátraháza 2014. május 27-29.

3. **Szabó Tamás**, Herbert Kaltner, Fehér Krisztina, Sabine André, Balla Sára, Joachim C. Manning, Szilágyi László, Hans-Joachim Gabius, Aromás magra épített bivalens S/Se-glikozid-mimetikumok: szintézis, lektin-kötődés, hisztokémia, MKE Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló 2017. június 19-21.

Poszterek

1. **Szabó Tamás**, Szilágyi László, Glikozilezett Bimán származékok szintézise, Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, 2013. június 26-28.
2. **Szabó Tamás**, Szilágyi László, Syntheses of Glycosylated Bimane Derivatives, 15th Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry, Olomouc, 2013. szeptember 1-5.
3. **Szabó Tamás**, Szilágyi László, Thio- and selenoglycosyl derivatives of bimanies as potential antitrypanosomal agents. Syntheses and fluorescent studies, XVI International Conference on Heterocycles in Bioorganic Chemistry, Metz, 2015. június 8-11.
4. **Szabó Tamás** és Szilágyi László, Bimánok tio- és szeleno-glikozid származékai mint potenciális anti-trypanosoma ágensek. Szintézisek és fluoreszcens mérések, MKE 2. Nemzeti Konferencia, Hajdúszoboszló, 2015. augusztus 31. - szeptember 2.
5. Herbert Kaltner, **Szabó Tamás**, Fehér Krisztina, Sabine André, Balla Sára, Joachim C. Manning, Szilágyi László, Hans-Joachim Gabius, Bivalent O-glycoside mimetics with S/disulfide/Se substitutions and aromatic core: synthesis, lectin binding, histochemistry, 17th Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry, Linz, 2017. augusztus 30. – szeptember 2.