



Synthesis of naturally occurring carbohydrates containing β -mannosidic linkages

doktori (PhD) értekezés tézisei

Rákó János

**Témavezetők:
Dr. Kerékgyártó János
Dr. Szurmai Zoltán**

**Debreceni Egyetem TTK
Biokémiai Tanszék
Debrecen, 2001.**

I. Az értekezés előzményei és célkitűzései

A szénhidrátok biológiai szerepéről alkotott véleményünk az elmúlt néhány évtizedben alaposan átértékelődött. Sokáig csak élőlények vázanyagaként, energiaforrásként tartottuk számon a vegyületeket. Az ötvenes években azonban antibiotikumokban, bakteriális poliszacharidokban amino-cukrokat mutattak ki. Később, a glikokonjugátumok (glikolipidek, glikoproteinek) felfedezése és biológiai szerepének tanulmányozása a szénhidrátokat, különösen az oligoszacharidokat, az érdeklődés középpontjába helyezte. A glikokonjugátumok élőlények citoplazmájában, extra-celluláris folyadékaiban és sejt-membránjában is megtalálhatók. Utóbbiak oligoszacharid komponensei alapvető szerepet játszanak a sejtek „külvilággal” történő kommunikációjában, enzimek, hormonok, baktériumok, vírusok, toxinok kötőhelyei. Az oligoszacharidok, mint sejtek felszíni antigénjei is fontos szerepet játszanak. Közismert például, hogy a vércsoport-antigének, melyek gliko-szfingolipidek, csak az oligoszacharid komponensek összetételében különböznek. A baktériumok immunológiai sajátosságai a kapszula, vagy a külső membrán lipopoliszacharidjának szénhidrát összetételétől függenek.

Az oligoszacharidok építőelemekre vonatkoztatott információtaroló képessége sokkal nagyobb, mint a nukleinsavaké, vagy a fehérjéké, hiszen a monoszacharid egységek polifunkciós vegyületek, melyek gyűrűtagszáma és anomerkonfigurációja is különbözhet. Ez okozza azonban az oligoszacharidok szintézisének legnagyobb nehézségét is.

Az oligoszacharidok biológiai jelentőségének növekedése forradalmasította a szénhidrátkémiát. A nagy mennyiségben előállítható, nagytisztaságú szintetikus anyag segítségével ugyanis olyan további biológiai vizsgálatok, konformációs analízisek végezhetők el, melyek izolált mintával nem lehetségesek.

1995-ben kapcsolódtam be a KLTE (2001-től Debreceni Egyetem) TTK Biokémiai Tanszékén folyó munkába. A szintetikus csoport egyik legfontosabb kutatási iránya a β -mannozidos kötést tartalmazó természetes oligoszacharidok szintézise. Ezek közül egy bakteriális oligoszacharid és az *N*-glikoprotein antennák core pentaszacharidjának előállítása volt feladatom. Ez utóbbi kapcsán külön hangsúlyt kapott a β -mannozidos kötés kialakításának „oxidáció-redukció” módszerében olyan reakciókörülmények kidolgozása, melyek alkalmazása lényegesen megjavítja a redukció sztereoszelektivitását. Modellvegyületek birtokában, feladatom volt még megvizsgálni izolált helyzetű észter csoportokat is tartalmazó mannozidok Zemplén dezacilezési reakcióit.

II. Az alkalmazott vizsgálati módszerek

Szintetikus munkánk során a modern preparatív szerves kémia makro-, félmikro-, és mikromódszereit egyaránt alkalmaztuk. A reakciók követésére, az anyagok tisztaságának ellenőrzésére vékonyréteg-kromatográfiát, az anyagok elválasztására kristályosítást illetve oszlopkromatográfiát használtunk. Az előállított vegyületek jellemzésére, azonosítására, szerkezetének igazolására a klasszikus eljárások (elemanalízis, olvadáspont és fajlagos forgatóképesség meghatározása) mellett modern spektroszkópai módszereket (IR, egy és két dimenziós NMR, valamint tömegspektrometriai technikák) alkalmaztunk.

III. Az értekezés új tudományos eredményei

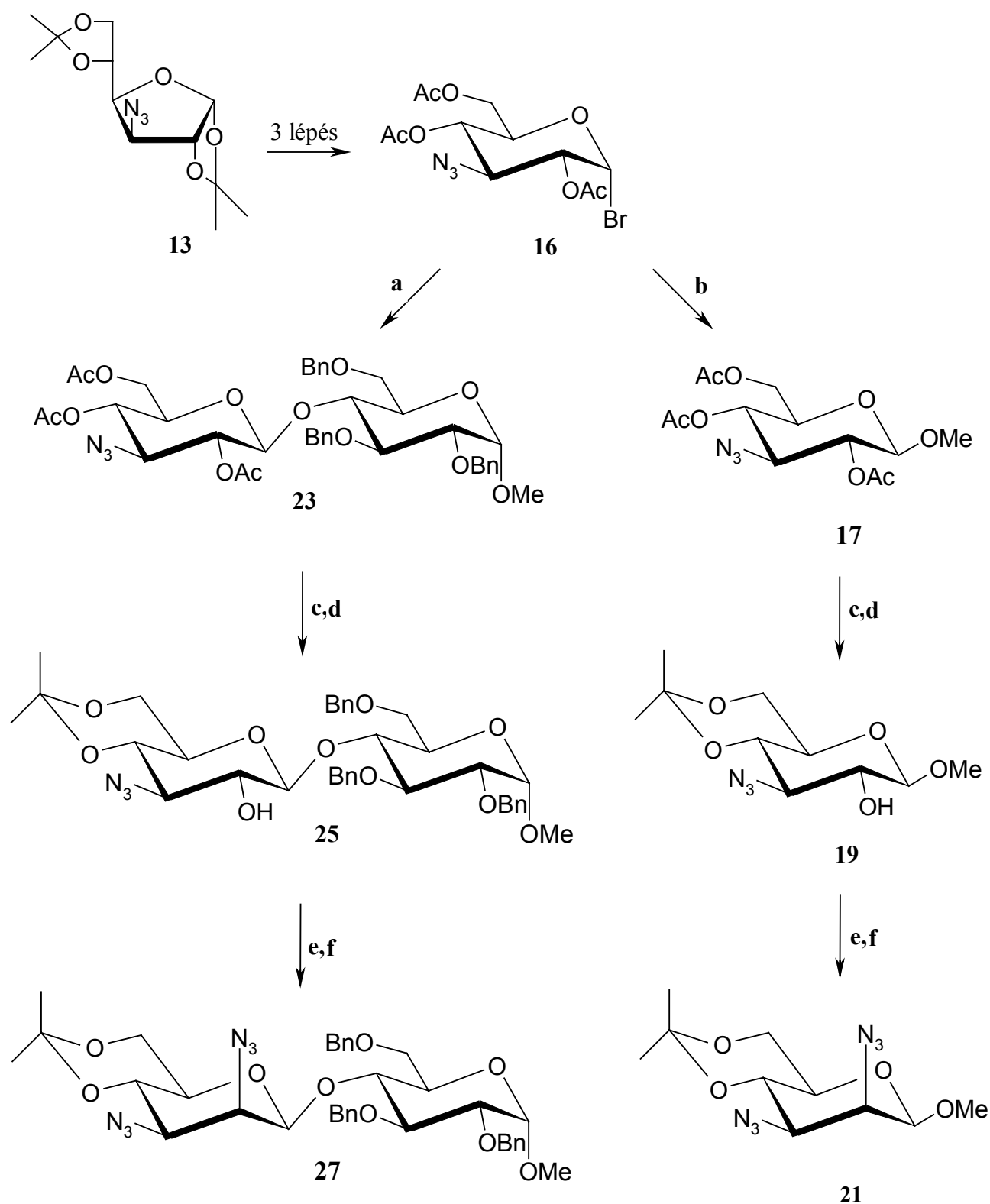
1. Egy ritka baktériumsejtfal építőelem, a 2,3-diacetamido-2,3-didezoxi-D-mannuronsav β -glikozidjainak szintézise

A bakteriális oligoszacharidok, neoglikoproteinek (mesterséges bakteriális antigének) előállítása már több évtizedes múltra tekint vissza a Tanszéken. Feladatunk volt egy ritka bakteriális építőelem, a 2,3-diacetamido-2,3-didezoxi-D-mannuronsav preparálása β -glikozid formájában. E különleges monoszacharid egység egy Gram-negatív baktérium, a *Bordetella pertussis* (a számarköhögés kórokozója) sejtfalában fordul elő. A célvegyületet 2,3-diazido-2,3-didezoxi- β -D-mannopiranozidokból állítottuk elő. A diazido származékokat kétféleképpen is sikeresen szintetizáltuk.

2,3-Diazido-2,3-didezoxi- β -D-mannopiranozidok előállítása „direkt” úton

Az **1**^{*} vegyületből 4 lépésben preparált **5** mannozil-bromidból, az azido csoport nemrésztvevő jellegét kihasználva jutottunk a **6**, **7**, **8** és **12** β -mannozidokhoz. A „direkt” β -mannozilezések előnye, hogy a donort csak egyszer kell előállítani, mellyel különböző aglikonok glikozilezhetők. Hátránya azonban, hogy a kevésbé reaktív alkoholok esetében a szelektivitás és a hozam is erősen lecsökkenhet.

* A vegyületek számozása az értekezésben használt számozást követi.

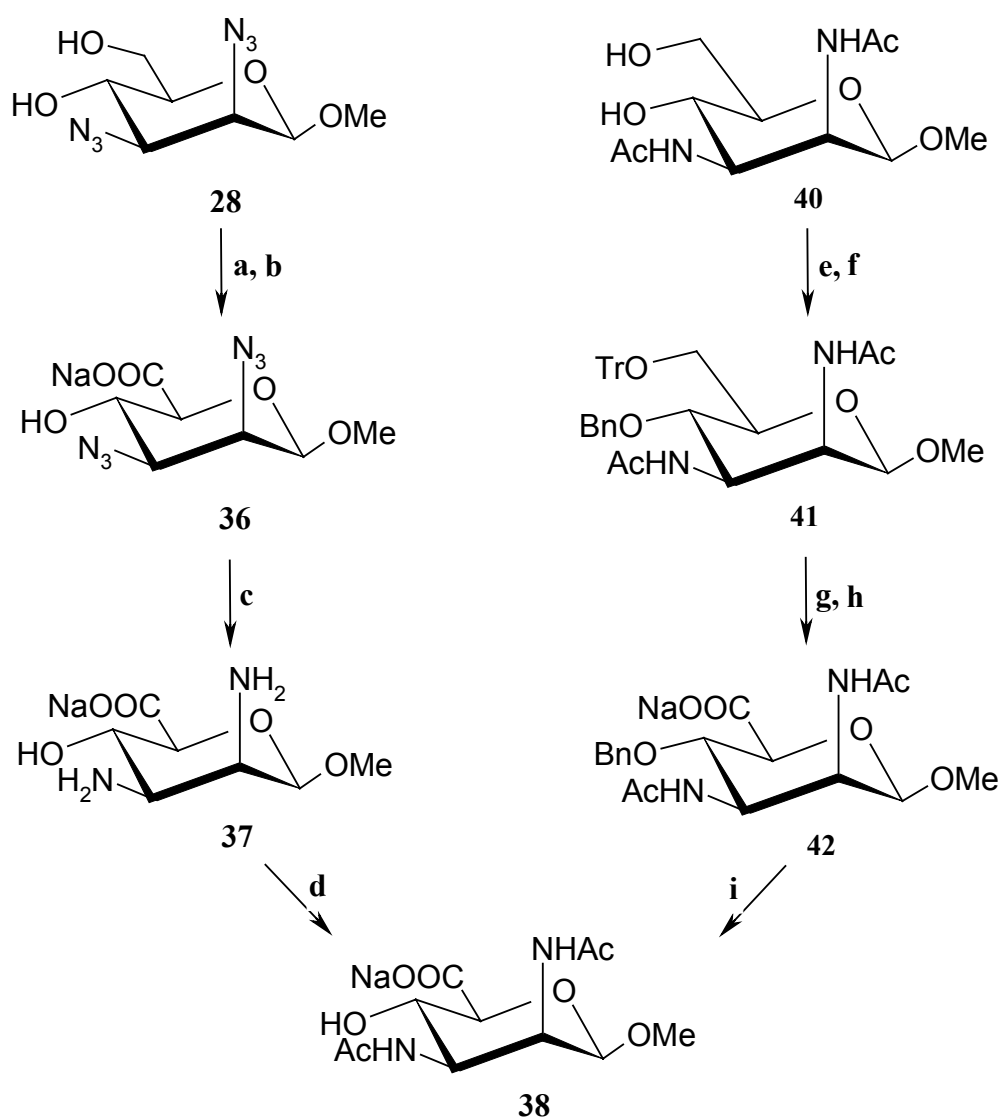


2. ábra: a) Metil-2,3,6-tri-*O*-benzil- α -D-glükopiranozid, AgOTf, 4 Å, CH₂Cl₂, Toluol;
b) HgBr₂, 4Å, MeOH; c) NaOMe, MeOH; d) *p*TSA, 2,2-Dimetoxi-propán; e) Piridin, Tf₂O;
f) DMF, NaN₃

Az „indirekt” reakcióút előnye, hogy kevésbé reaktív alkoholokat is jó hozammal, kiváló β -szelektivitással lehet glikozilezni. Hátránya, hogy minden egyes célvegyületnél külön-külön végre kell hajtani a C-2 konfigurációjának megváltoztatását.

Mannuronsav származékok előállítása

A **38** célvegyületet a **28** diazido származék TEMPO oxidációja (**36**), majd az azido csoportok kemoszelektív redukciója után (**37**) *N*-acetilezéssel, valamint a **40** diacetamido vegyület tritilezését, benzilezését (**41**), és Jones oxidációját követő (**42**) katalitikus hidrogénezéssel is előállítottuk.

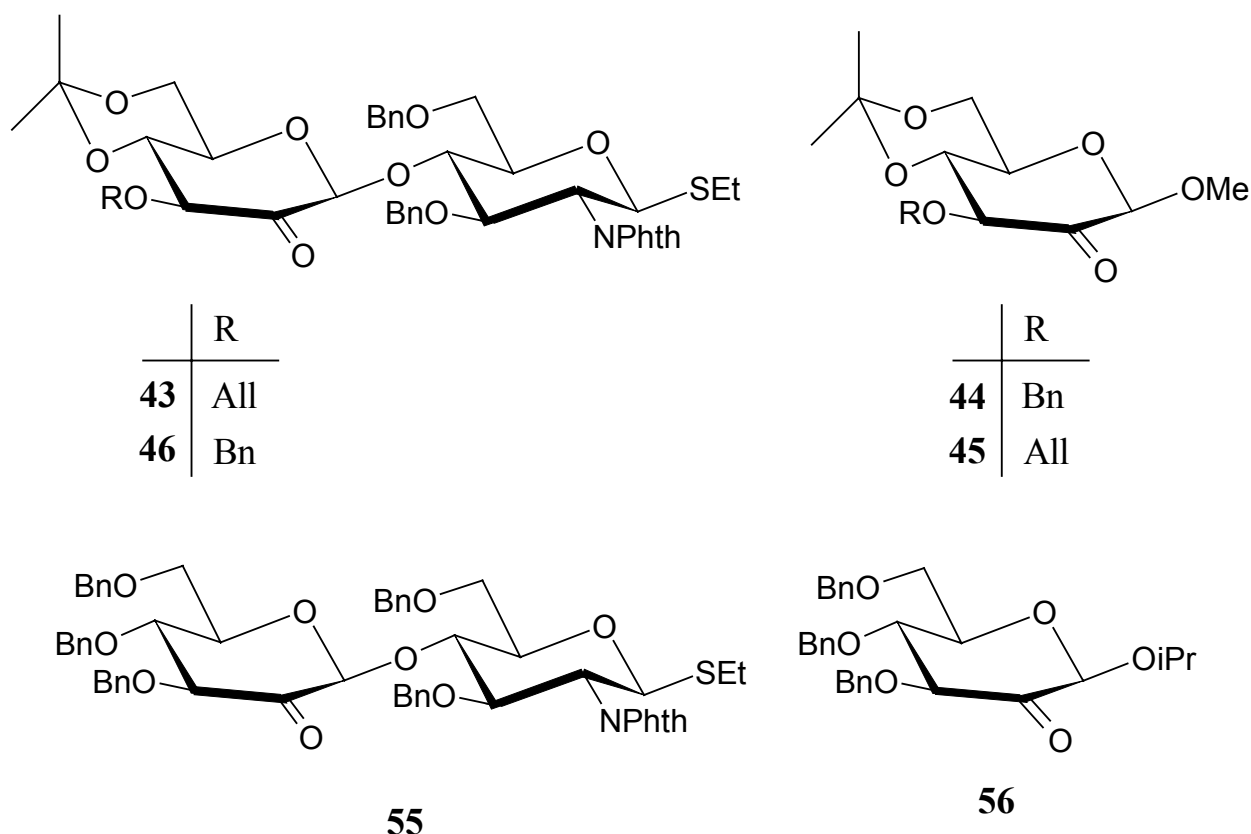


3. ábra: **a)** TEMPO, NaOCl; **b)** NaOH; **c)** Pd-hidroxid, H₂; **d)** MeOH, Ac₂O; **e)** Piridin, TrCl; **f)** BaO, Ba(OH)₂, BnBr; **g)** CrO₃, H₂SO₄, CH₂Cl₂/Aceton; **h)** NaOH; **i)** PdC, H₂

A kidolgozott reakcióutak reményét adnak arra nézve, hogy a 2,3-diacetamido-2,3-didezoxi-D-mannuronsavat oligoszacharidokba építve is elő tudjuk állítani β -glikozidok formájában.

2. β -D-Glikozid-2-ulózok borohidridekkel végzett redukciójának sztereoszelektivitását befolyásoló új tényezők, az „aktivált” DMSO különleges szerepe

A β -mannozidos kötés előfordul az összes *N*-glikoprotein core oligoszacharidjában, bizonyos baktériumok sejtfalában. Kialakítása az oligoszacharid kémia egyik legnehezebb feladata. Az egyik leggyakrabban alkalmazott eljárás az „oxidáció-redukció” módszer, amelynek kulcs intermedierjei a β -D-glikozid-2-ulózok. Feladatunk volt a β -mannozidos kötés hatékonyabb kialakítását célul tűzve ki szisztematikus vizsgálatokat végezni β -D-glikozid-2-ulózok borohidridekkel végzett redukciójának sztereoszelektivitását befolyásoló új faktorkok megismerésére.



4. ábra

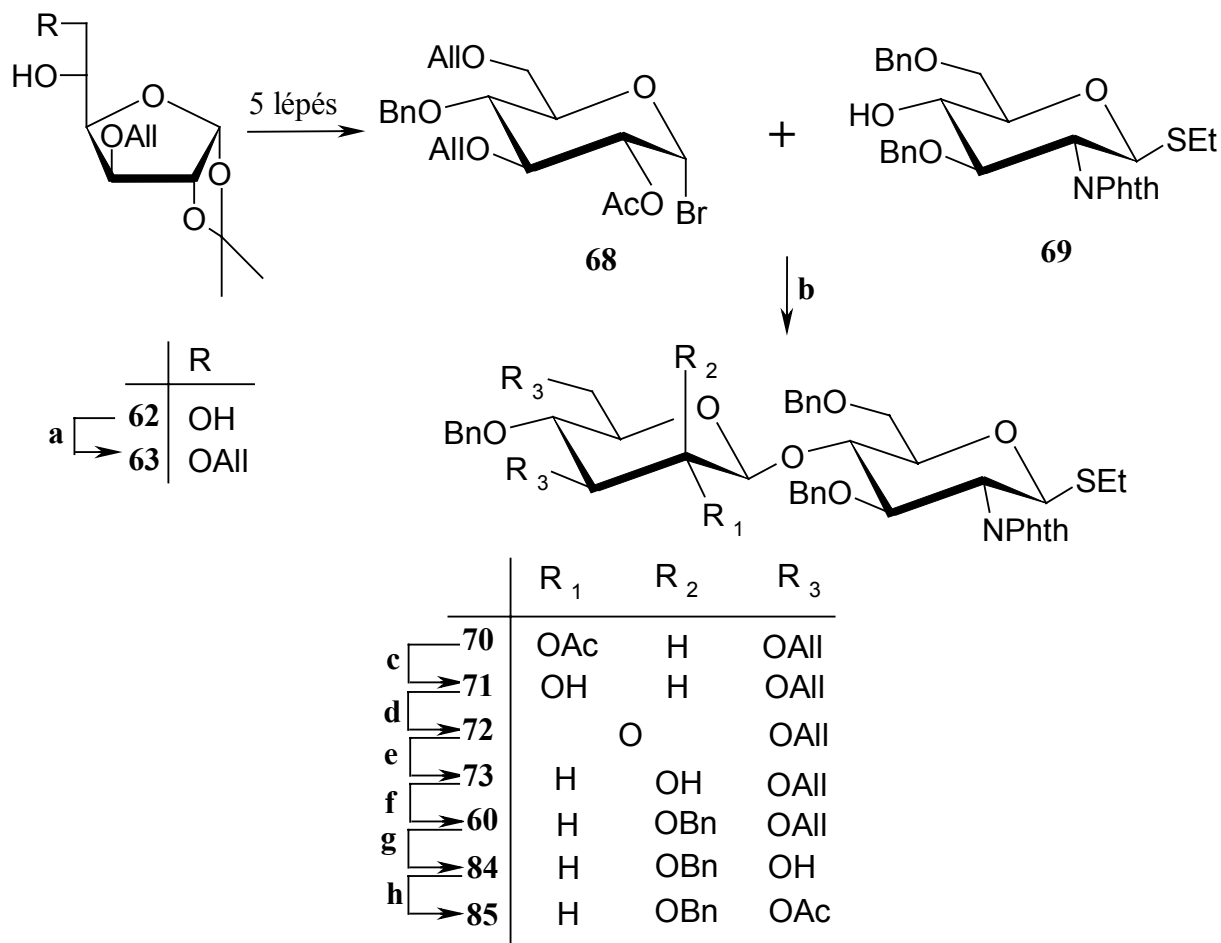
Ezen vizsgálatokhoz előállítottuk a β -D-glikozid-2-ulóz **45**-öt és **46**-ot. A **43-46**, **55**, **56** vegyületek különböző körülmények között végzett redukcióinak eredményeit a következőkben lehet összegezni: igazoltuk az eddig ismert tényezőknek (anomer konfiguráció, a keto funkció szomszédságában levő 3-*O*-szubsztituens jellege) a reakcióban betöltött szerepét, valamint megfigyeltük a redukálandó karbonil szomszédságában lévő 3-*O*-benzil és 3-*O*-allil étereknek a redukció sztereoszelektivitására gyakorolt azonos hatását. Továbbá megállapítottuk, hogy a 4,6-*O*-acetál jelenléte a monoszacharid-ulozidok esetében kismértékben, míg diszacharid-ulozidok esetében nagymértékben rontja a sztereoszelektivitást.

Megfigyeltük az acetoxi-dimetil-szulfónium acetát („aktivált” DMSO) különös hatását, jelenlétében minden esetben jelentősen javult a β -*manno*-szelektivitás (a **43**-as és **46**-os vegyületnél 7:3→91:9, a **44**-es és **45**-ös ulózok esetében >10:1→>99:1). Egy egyszerű, preparatív szempontból rendkívül vonzó, általánosan alkalmazható eljárást dolgoztunk ki, amelynek használata kiváló β -*manno*-szelektivitást, így az eddigieknél jobb hozamot tesz lehetővé 4,6-*O*-acetál védőcsoportok jelenlétében is, mono- és diszacharidok esetében egyaránt.

3. N-Glikoproteinekben előforduló core pentaszacharid teljesen és parciálisan benzilezett glikozil-azidjainak szintézise

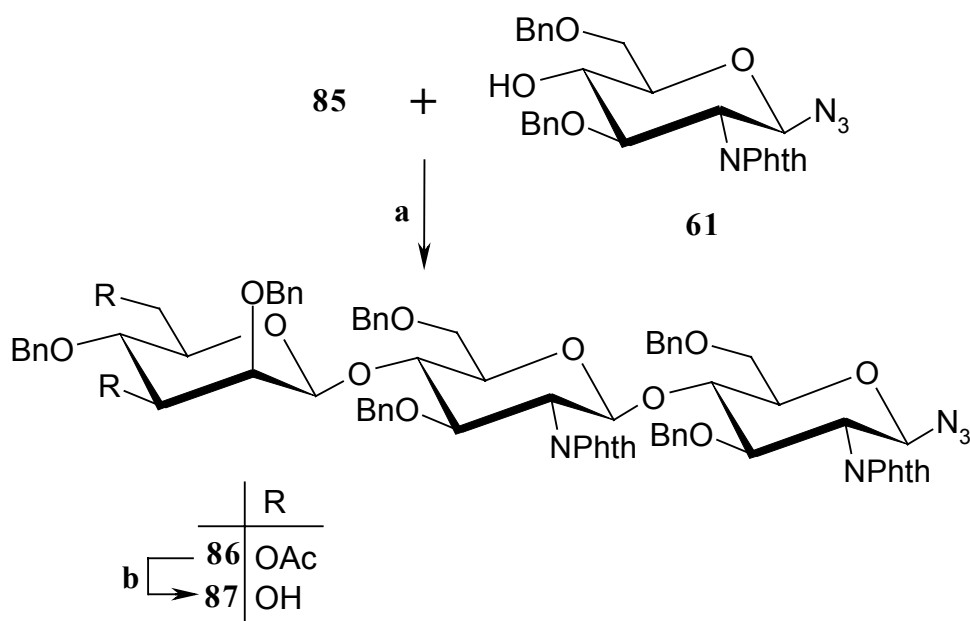
A legtöbb *N*-glikoprotein glikánban megtalálható ugyanazon core pentaszacharid. Kutatócsoportunk célul tűzte ki szelektíven védett oligopeptidek és *O*-benzilezett oligoglikozil-aminok közötti kapcsolási reakcióknak, mind a peptid, mind a szénhidrát méretének függvényében történő vizsgálatához teljesen *O*-benzilezett glikozil-azidok (amelyek a glikozil-aminok prekursorai) sorozatának előállítását. Feladatul kaptuk a core pentaszacharid teljesen és parciálisan benzilezett glikozil-azid formában történő előállítását. Célvegyületeink (**91** és **93**) szintézisének alapját a 3' és 6' helyzetben allil időleges védőcsoportot hordozó **60** diszacharid-tioglikozid preparálása képezte.

A **62**-es glükofuranóz allilezése szolgáltatta a **63**-as származékot, mely vegyületet öt lépéses szintézisben alakítottunk a **68**-as glükopiranozil-bromiddá. A **68** glikozil donor és a **69** glikozil akceptor kondenzációja, majd az acetil csoport eltávolítása után a β -mannozidos kötést az előző fejezetben ismertetett eredményekre alapozva, a **71** származék oxidációt követő redukcióval történő C-2 epimerizációjával alakítottuk ki. A **73**-as vegyület



5. ábra: **a)** Bu₂SnO, AllBr, Bu₄NBr, Toluol **b)** AgOTf, 4 Å, Toluol, CH₂Cl₂; **c)** K₂CO₃, MeOH/THF; **d)** DMSO, Ac₂O; **e)** Bu₄NBH₄, THF; **f)** BnBr, Ag₂O, KI, DMF; **g)** (PPh₃)₃RhCl, EtOH; **h)** Piridin, Ac₂O

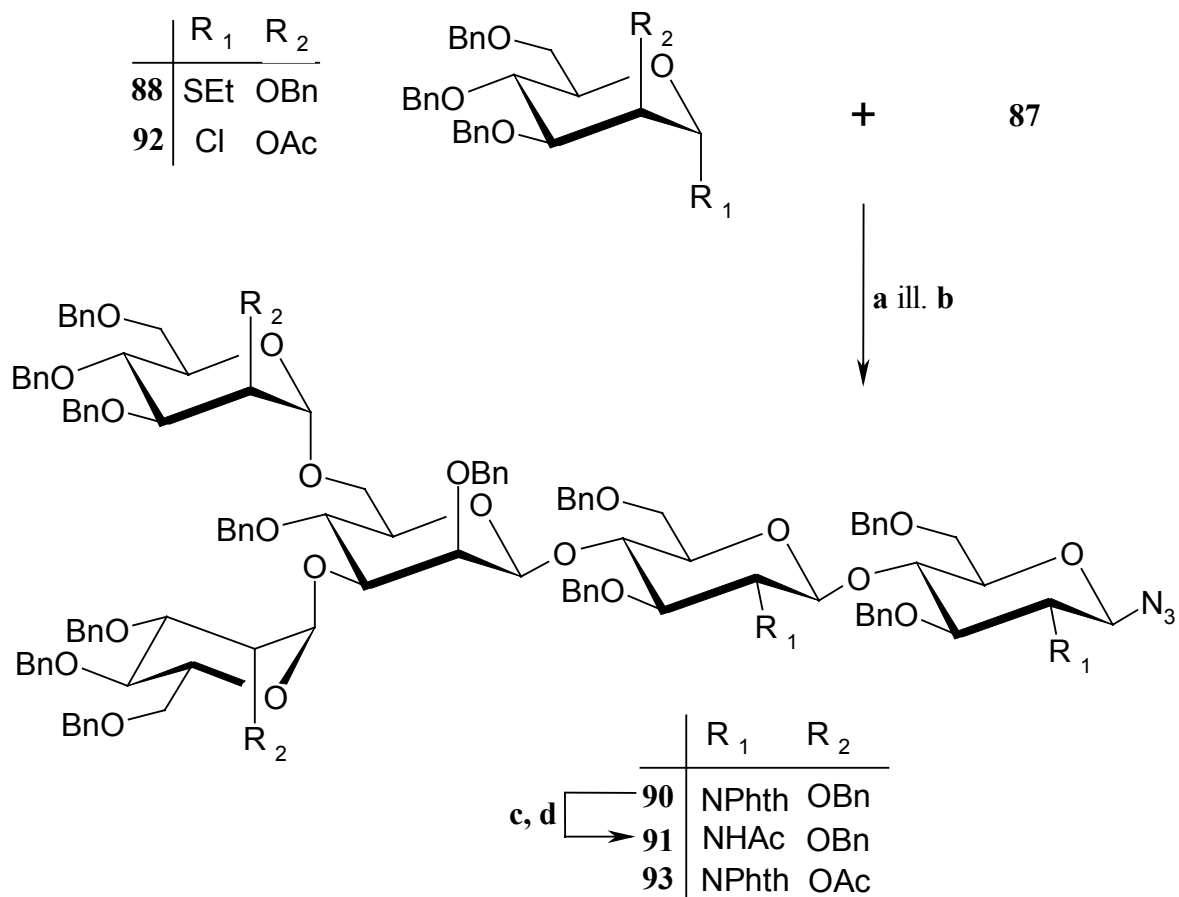
benzilezése vezetett a **60** diszacharid alkiltio-glikozidhoz, melynek allil csoportjait eltávolítottuk, a szabad OH funkciókat acetileztük (→**85**). A **61** szelektíven védett glikozil-azidot a megfelelő alkiltio-glikozid anomer centrumának aktiválásával állítottuk elő. A **85** glikozil donor és **61** akceptor kondenzációja szolgáltatta a **86** triszacharidot, majd az acetil csoportok eltávolításával jutottunk a **87** triszacharidhoz, amely a cél pentaszacharidok előállításához alkalmas glikozil akceptor.



6. ábra: a) NIS, AgOTf, 4 Å, CH₃CN, CH₂Cl₂; b) K₂CO₃, THF/MeOH

A **87**-es triszacharid akceptor és **88** donor kondenzációja vezetett a **90** pentaszacharidhoz, melynek ftálimido csoportjait eltávolítottuk, majd az amino csoportokat acetileztük ($\rightarrow$ **91**). A **91** pentaszacharid és kutatócsoportunk által már korábban előállított mono-, di-, és triszacharid azidok anomer azid funkcióinak kemoselektív redukciója (PtO₂/H₂) vezet a teljesen *O*-benzilezett glikozil-aminokhoz. Ezen glikozil-aminok és szelektíven védett oligopeptidok kapcsolási reakcióinak vizsgálatát az amino funkciók *in situ* "csapdába ejtésével" a közeljövőben tervezzük.

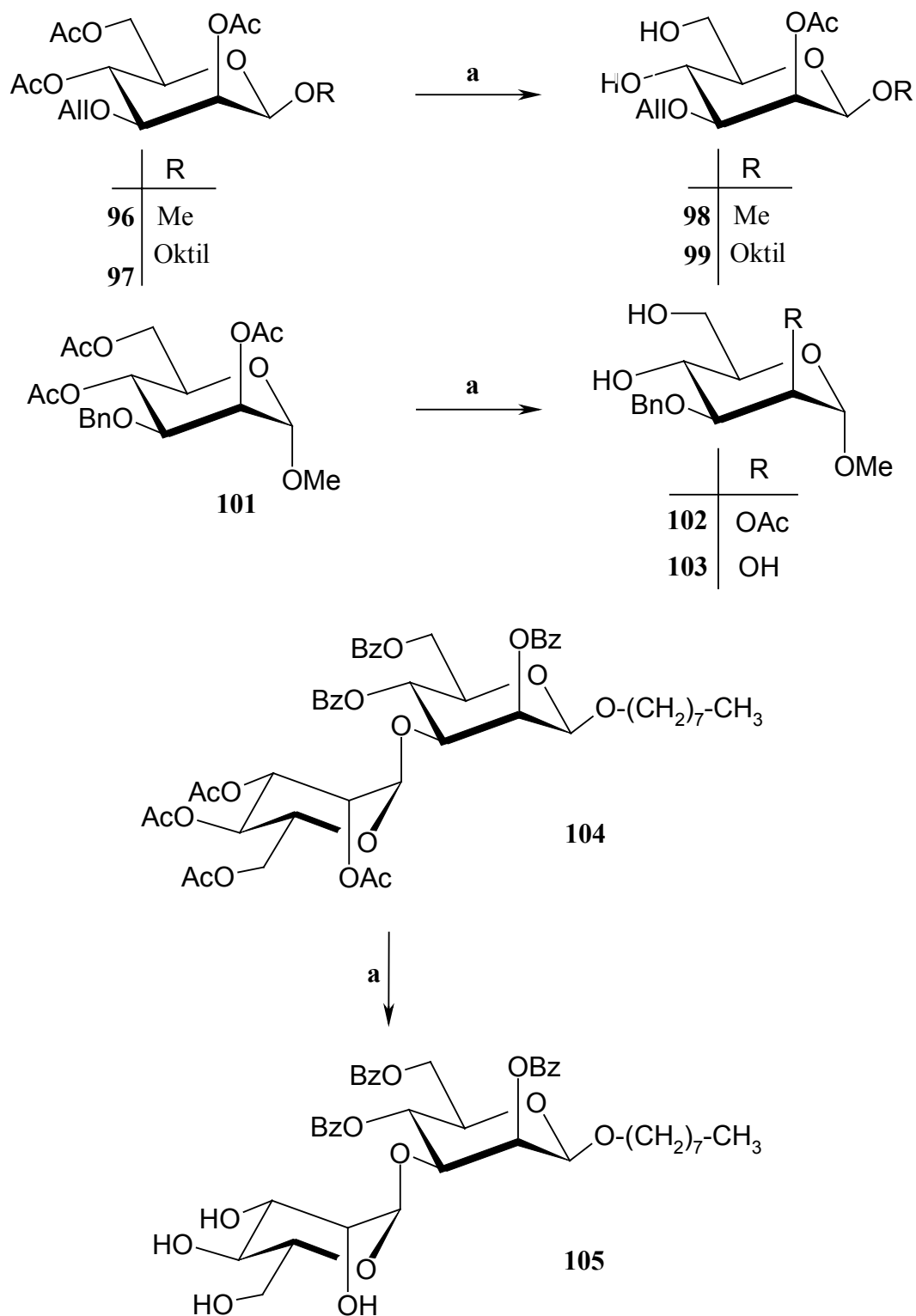
Magasabb tagszámú glikozil-azidok előállítását célul tűzve ki a **87**-es triszacharid akceptor és **92** ezüst-triflát promotor jelenlétében végzett kondenzációjával előállítottuk a **93** pentaszacharidot is, mely vegyület a 2''' és 2'''' helyzetben időleges acetil csoportokat tartalmaz, így alkalmas magasabb tagszámú glikozil-azidok előállítására.



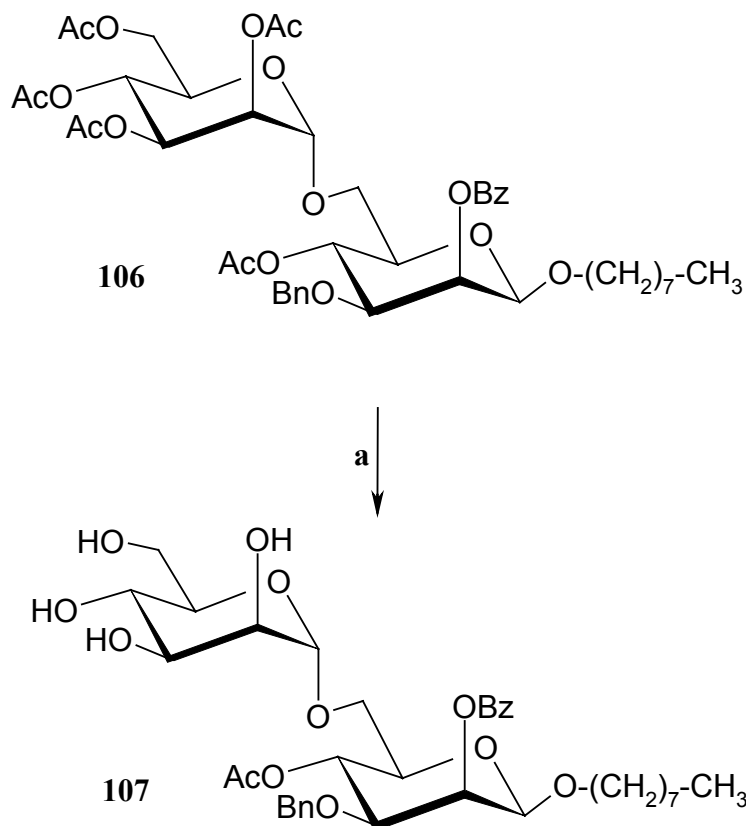
7. ábra: **a)** MeOTf, 4 Å, CH₂Cl₂; **b)** AgOTf, 4 Å, CH₂Cl₂, Toluol;
c) Etilén-diamin, *n*-BuOH; **d)** Piridin, Ac₂O

4. Zemplén dezacilezési reakciók vizsgálata mannozidok körében

A Zemplén dezacilezés a szénhidrátkémia leggyakrabban alkalmazott reakciói közé tartozik. A Tanszék munkatársai figyelték meg, hogy *glüko*- és *galakto*- vegyületek esetében az izolált helyzetű acil csoportokat nem lehet metanolban katalitikus mennyiségű nátrium-metiláttal eltávolítani. Feladatomban volt néhány α- (**101**) és β-mannozidot (**96** és **97**) előállítani, majd az izolált helyzetű észter funkciók viselkedését ezeken és két diszacharid modellvegyületen (**104** és **106**) tanulmányozni a Zemplén reakció körülményei között.



8. ábra: **a**) NaOMe, MeOH



9. ábra: a) NaOMe, MeOH

Megállapítottuk, hogy a C-2 izolált helyzetű acil csoportja β -mannozidokban sokkal stabilisabb, mint az α -anomerekben. Úgy tűnik, hogy az acil csoportok „anomális” viselkedéséhez alapvetően nem az anomercentrum szomszédsága, hanem izolált helyzete a döntő tényező. Ez a megfigyelés egyezik más kutatók tapasztalataival. Feltételezhető, hogy a nem izolált helyzetű acil csoportok esetében (például a 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -D-mannopiranozil egységen) acil vándorlás miatt nagyon gyors az átésztereződés sebessége.

IV. Közlemények

1. Zoltán Szurmai, János Rákó, Károly Ágoston, Alain Danan, and Daniel Charon
 β -Glycosides of 2,3-diazido-2,3-dideoxy-D-mannose, a synthetic precursor of a rare bacterial cell-wall building unit
Org. Lett., **2** (2000) 1839-1842.
2. János Kerékgyártó, János Rákó, Károly Ágoston, Gyöngyi Gyémánt, and Zoltán Szurmai
New factors governing stereoselectivity in borohydride reductions of β -D-glycoside-2-uloses - The peculiar effect of "activated" DMSO
Eur. J. Org. Chem., **2000**, 3931-3935.
3. Károly Ágoston, András Dobó, János Rákó, János Kerékgyártó, Zoltán Szurmai
Anomalous Zemplen deacylation reactions of α - and β -D-mannopyranoside derivatives
Carbohydr. Res., **330** (2001) 183-190.

V. Előadások és posztterek

1. János Kerékgyártó, János Rákó, Károly Ágoston, Johannis P. Kamerling, and Johannes F. G. Vliegthart
Synthesis of fully *O*-benzylated glycosyl azides as precursors for the preparation of *N*-glycopeptides
Annual Meeting of the Committee of Carbohydrate Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences. 14-15, May 1998, Mátrafüred, Hungary
2. János Rákó, Zoltán Szurmai, János Kerékgyártó
Improved stereoselectivities in Bu_4NBH_4 reduction of β -D-glycoside-2-uloses
Annual Meeting of the Committee of Carbohydrate Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences. 9-10, May 1999, Mátrafüred, Hungary
3. János Rákó, Zoltán Szurmai, and János Kerékgyártó
Improved stereoselectivities in Bu_4NBH_4 reduction of β -D-glycoside-2-uloses
10th European Carbohydrate Symposium. July 11-16, 1999. Galway, Ireland
Abstracts PA074
4. János Rákó, Károly Ágoston, Gyöngyi Gyémánt, Zoltán Szurmai, János Kerékgyártó
New factors governing stereoselectivity in borohydride reductions of β -D-glucoside-2-uloses. The peculiar effect of "activated" DMSO.
6th European Training Course on Carbohydrates. July 8-14, 2000. Debrecen, Hungary