



# ***A *Shigella sonnei* lipopoliszacharidja O-specifikus szénhidrátlánca ismétlődő egységének szintézise***

Tézisek

**Medgyes Adél**

**Témavezető: Prof. Dr. Lipták András**

Debreceni Egyetem, Természettudományi Kar

Debrecen, 2004



## 1. Az értekezés előzményei és célkitűzései

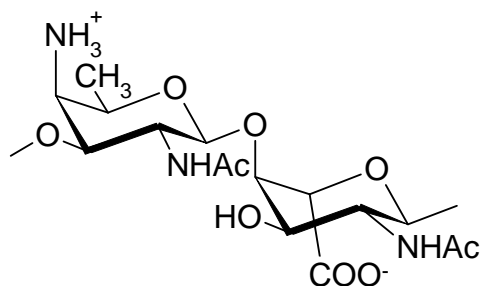
Napjainkban a szénhidrátok biológiai szerepének felismerése a szénhidrátkémia páratlan fejlődését vonta maga után. Míg korábban a szénhidrátokat kizárólag tartaléktápanyagként tartották számon újabban a modern műszeres technikák, elsősorban az NMR és tömegspektroszkópia fejlődése révén tudjuk, hogy a szénhidrátok (oligo- és polisza-  
charidok) akár szabadon, akár pedig proteinekkel és lipidekkel alkotott konjugátok formájában (glikoproteinek, proteoglikánok és glikolipidek), fontos biológiai szerepet töltenek be. Legfontosabb a biológiai felismerési folyamatokban játszott szerepük. E molekulák oligoszacharid láncai általában a sejtmembrán felületén helyezkednek el, ezáltal kitüntetett szerepük van a sejtek külvilággal történő és a sejtek közötti kommunikációban. 1993-tól kezdve vettem részt a Debreceni Egyetem Biokémiai Tanszékén Prof. Dr. Lipták András irányításával a doktori képzésben. Dolgozatom ezen idő alatt elért eredmények összefoglalása. Doktori értekezésem témája a Debreceni Egyetem Biokémiai Tanszékén végzett kutatási program része. Célunk a *Shigella sonnei* által okozott fertőzés elleni védőoltás kifejlesztésének előkészítése volt. A *Shigella sonnei* Gram-negatív baktérium. Feltételezéseink szerint hatékony oltóanyag a *Shigella sonnei* lipopoliszacharidja O-specifikus szénhidrátláncának természetes poliszacharidjánál rövidebb, 2-4 ismétlődő egységből álló, oligoszacharid előállítására és hordozó proteinhez való kovalens kapcsolása útján állítható elő. Dolgozatomban az O-specifikus oldallánc ismétlődő egységének szintézisét tűztem ki célul.

## 2. Az alkalmazott vizsgálati módszerek

Szintetikus munkám során a modern preparatív kémia makro-, félmikro- és mikromódszereit alkalmaztam. A reakció követésére, az anyagok tisztaságának ellenőrzésére, a termékarányok meghatározására vékonyréteg-, nagynyomású folyadék- és gázkromatográfiás módszereket használtam. A nyerstermékek tisztítását, a klasszikus kristályosításon kívül oszlopkromatográfia segítségével végeztem. Az előállított vegyületek jellemzésére, szerkezetének igazolására a klasszikus eljárások (elemanalízis, olvadáspont és fajlagos forgatóképesség meghatározása) mellett modern spektroszkópiai módszereket (egy- és kétdimenziós NMR, tömegspektrometriai technikák) alkalmaztam.

### 3. Az értekezés új tudományos eredményei

A *Shigella sonnei* O-specifikus oldalláncának ismétlődő egysége két ritka monoszacharidból épül fel, egy  $\alpha$ -kötéssel kapcsolódó 2-acetamido-2-dezoxi-L-altruronsavból és a  $\beta$ -kötéssel kapcsolódó 2-acetamido-4-amino-2,4,6-tridezoxi-D-galaktopiranózból (1. ábra): A diszacharid peptidekre jellemző ikerionos szerkezete, az interglükozidos kötések [ $\alpha$ -L-



1. ábra.

(1 $\rightarrow$ 3) és  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)] a mindkét monoszacharidban fellelhető 2-NHAc, szokatlan szerkezetre utalnak.

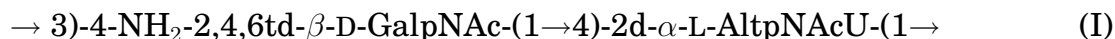
#### 3.1. A 2-acetamido-4-amino-2,4,6-tridezoxi-D-galaktóz egység előállítása

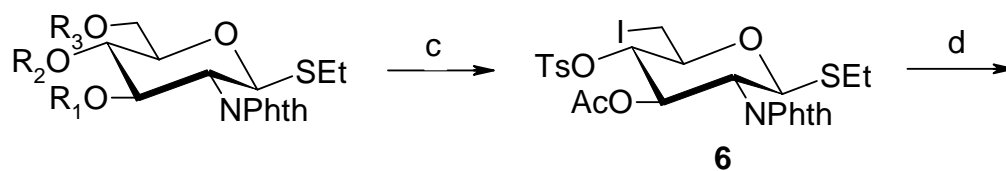
D-glükózaminból kiindulva előállítottam a 2-acetamido-4-amino-2,4,6-tridezoxi-D-galaktóz egységet, a következőképpen:

- A C-4 helyzetben konfiguráció inverziót hajtottam végre és a 7-be a 4-azido funkciót a 4-O-tozil származék nátrium-aziddal végzett nukleofil cseréjével vezettem be. Az azido funkció katalitikus redukcióját a szintézis legutolsó lépéseként, oligoszacharid szinten végeztem;
- A C-6 helyzetben a 6-dezoxi funkció kialakítása a 6 6-dezoxi-jód közti termékén keresztül katalitikus redukcióval történt (2. ábra).

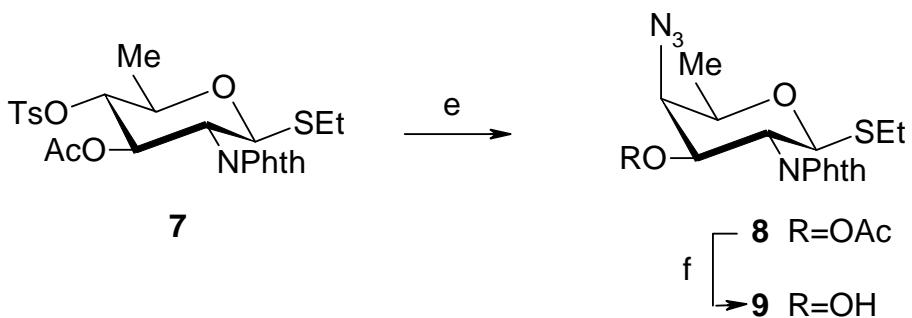
#### 3.2. A diszacharidok szintézise

A következő szerkezetek bármelyike leírhatja a *Shigella sonnei* O-specifikus poliszacharidjának ismétlődő egységét:



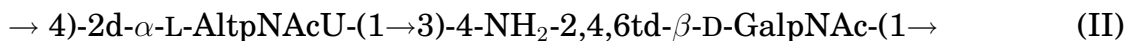


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
a → <b>3</b>	Ac	Ip	
b → <b>4</b>	Ac	H	H
b → <b>5</b>	Ac	Ts	Ts



Reagensek és reakciókörülmények: (a)  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 2 óra, 96%; (b)  $\text{TsCl}$ , piridin, 4 nap, 77%; (c)  $\text{NaI}$ ,  $\text{MeCOEt}$ , reflux, 16 óra, 69%; (d)  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd/C}$ ,  $\text{EtOH}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , 2 óra, 86%; (e)  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{DMF}$ ,  $120\text{ }^\circ\text{C}$ , 16 óra, 61%; (f)  $\text{NaOMe}$ ,  $\text{MeOH}$ , 30 perc, 88%.

2. ábra.



Előállítottam az I és II szerkezetnek megfelelő metil-(2-acetamido-4-amino-2,4,6-tridezoxi- $\beta$ -D-galaktopiranozil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2-acetamido-2-dezoxi- $\alpha$ -L-altropiranozid)uronsav (**43**) és metil-[(2-acetamido-2-dezoxi- $\alpha$ -L-altropiranozil)uronsav]-(1 $\rightarrow$ 3)-2-acetamido-4-amino-2,4,6-tridezoxi- $\beta$ -D-galaktopiranozid (**53**) diszacharidokat. A 2-amino funkció védelmére *N*-ftaloil és *N*-tetraklórftaloil csoportokat alkalmaztam. Az anomer centrumot tioglikozid, triklór-acetimidát és halogenid formában aktiváltam.

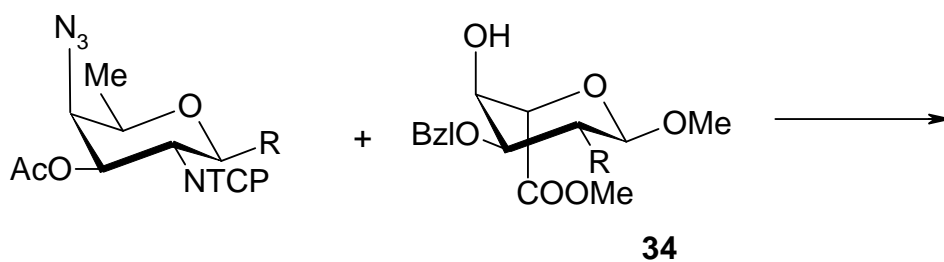
Az I szerkezetű diszacharid előállítására a 2-*N*-tetraklórftaloillal védett **28** tioetil és **38** imidát donort a **8** galaktózszármazékból állítottam elő. A glikozilezési reakciókban alkalmazott aktivátorokat valamint a reakciók hozamait a 1. táblázatban foglaltam össze. A NPhth-val és a NTCP-val védett **33** és **34** akceptorokat a **38** imidáttal glikozi-

Donor	Akceptor	Aktivátor	Diszacharid	Hozam (%)
<b>38</b>	<b>32</b>	TMSOTf	<b>39</b>	32
<b>38</b>	<b>33</b>	TMSOTf	<b>40</b>	89
<b>38</b>	<b>34</b>	TMSOTf	<b>41</b>	93
<b>28</b>	<b>34</b>	NIS/TfOH	Ø	

1. táblázat. Az I szekvencia előállítására alkalmazott glikozilezési reakciók eredményei

lezve kitűnő 89% illetve 93%-os hozammal nyertem a **40** és **41** diszacharidot (3. ábra). Oldékonysági problémák miatt a **39** diszacharid csak 32%-os hozammal keletkezett. Az *N*-ftaloil csoportot tartalmazó **40** diszacharid védőcsoportjainak eltávolítása nem járt sikerrel. Az *N*-tetraklórftaloil funkcióval védett **41** diszacharid védőcsoportjainak eltávolítása a 4. ábra szerint történt:

- első lépésként a **41** uronsav metil-észtert LiOH-al hidrolizáltam;
- második lépésként a tetraklórftaloil csoportot etilén-diaminnal metanolban reflux hőmérsékleten lehasítottam;
- majd harmadik lépésként a 2-amino csoportokat acetileztem és így 38%-os hozammal jutottam a **42** vegyülethez;
- negyedik lépésként a galaktóz azido csoportját és a benzil csoportot redukáltam, Pd(OH)<sub>2</sub>/C katalizátort alkalmazva hidrogén atmoszférában, a metil-(2-acetamido-4-amino-2,4,6-tridezoxi- $\beta$ -D-galaktopiranozil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2-acetamido-2-dezoxi- $\alpha$ -L-altropiranozid)uronát (**43**) végterméket 51%-os hozammal izoláltam.



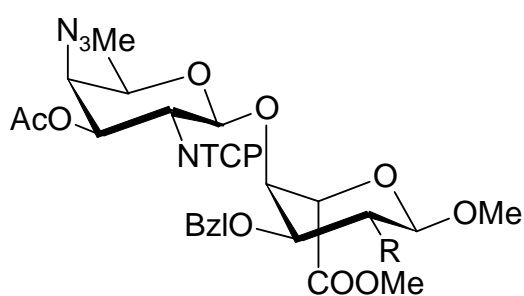
**38** R= OC(=NH)CCl<sub>3</sub> ( $\alpha/\beta$ )

**28** R= SEt

**32** R= NHAc

**33** R= NPhth

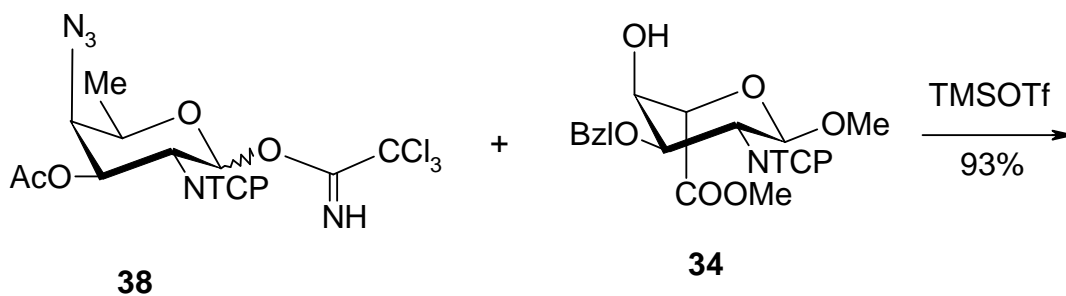
**34** R= NTCP



**38 + 32**  $\rightarrow$  **39**, R= NHAc, 32%

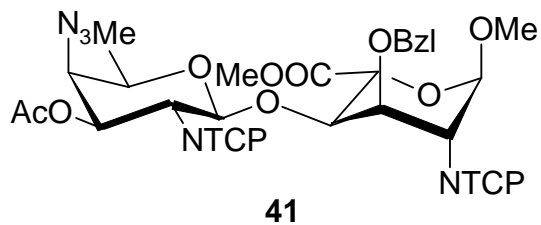
**38 + 33**  $\rightarrow$  **40**, R= NPhth, 89%

**28 + 34**  $\rightarrow$   $\emptyset$



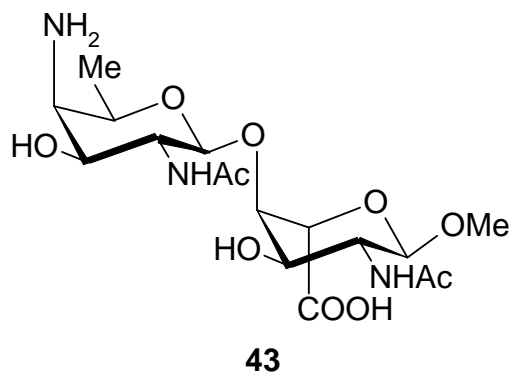
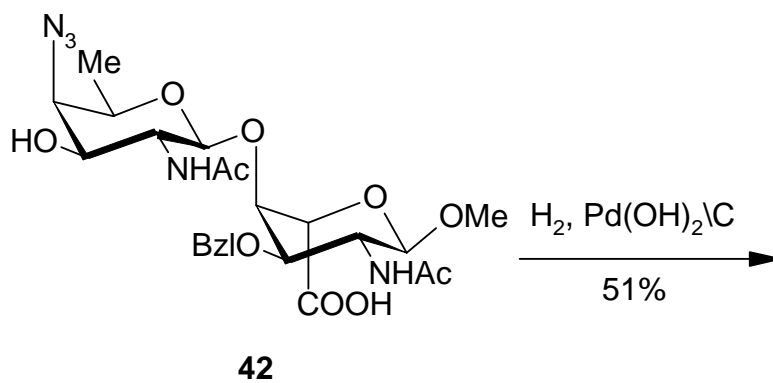
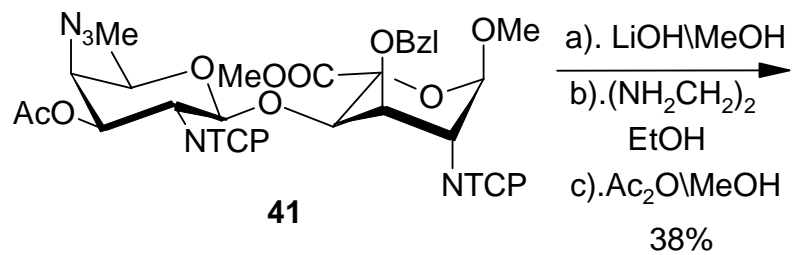
**38**

**34**



**41**

3. ábra.



4. ábra.



A II szerkezetű diszacharid szintézisének alkalmazott donorokat, akceptorokat, reakciókörülményeket, valamint a kapcsolási reakciók hozamait a 2. táblázatban foglaltam össze:

Donor	Akceptor	Aktivátor	Diszacharid	Hozam (%)
<b>35</b>	<b>14</b>	TMSOTf	∅	
<b>35</b>	<b>12</b>	TMSOTf	<b>44</b>	69
<b>35</b>	<b>31</b>	TMSOTf	<b>45</b>	44
<b>36</b>	<b>31</b>	AgOTf	<b>45</b>	35

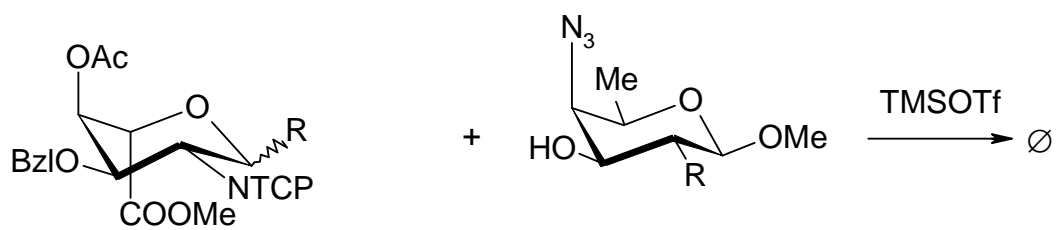
2. táblázat. A II szekvencia előállítására alkalmazott glikozilezési reakciók eredményei

A II szekvencia előállítására donorként a 2-NTCP-vel védett **35** imidátot és a **36** bromidot alkalmaztam, akceptorként a 2-NHAc(**14**), 2-NPhth(**12**) és 2-NTCP(**31**) galaktózszármazékokat használtam fel. A **35** imidát donort TMSOTf-al aktiváltam (5. ábra). A 2-N-ftaloil (**12**) akceptor glikozilezése a **35** imidáttal 69%-os hozammal eredményezte a **44** diszacharidot. Jóval alacsonyabb hozammal (44%) nyertem a **45** diszacharidot a 2-N-tetraklótftaloillal védett **31** akceptorral és az előbbi donorral (**35**) végrehajtott kapcsolási reakció során. Ugyanazt a **45** diszacharidot nyertem a **36** glikozil-bromid donor és a **31** 2-NTCP akceptor reakciója során alacsonyabb, 35%-os hozammal. Nem keletkezett a várt diszacharid a 2-NHAc(**14**) akceptor glikozilezésekor.

Az előző pontban tapasztalt nehézségek miatt a II szerkezetű diszacharid előállítására a glikozilezés után történő oxidáció stratégiáját alkalmaztam (6. ábra). A **31** 2-NTCP galaktóz akceptor 3-OH-ját a **48** altropiranóz imidáttal glikozileztem, TMSOTf katalizátor jelenlétében, így 60%-os hozammal jutottam a **49** diszacharidhoz. A **49** vegyület savas dezacetilezésével előállítottam a **50** 4,6-diolt, amelyet TEMPO-val mediált gyökös oxidációval az **51** terméké alakítottam. Ez esetben is a szokásos reakciókat alkalmaztam az **51** vegyület védőcsoportjainak eltávolítására és így állítottam elő az **53** végterméket.

### 3.3. Immunológiai vizsgálatok

A rendelkezésemre álló **15** galaktóz származékot, a **43** diszacharidot és a metil-(2-acetamido-2-dezoxi- $\alpha$ -L-altropiranozid)uronsavat (**57**) immunológiai vizsgálatoknak vettem alá. A vizsgálat a passzív hemolízis inhibíció teszt alkalmazásával történt. Ennek eredményeként mindkét monoszacharid és a **43** diszacharid kompetitív inhibitornak bizonyult, az  $IK_{50}$  inhibíciós konstans 9,8 mM a **15** galaktózszármazék 6,9 mM az



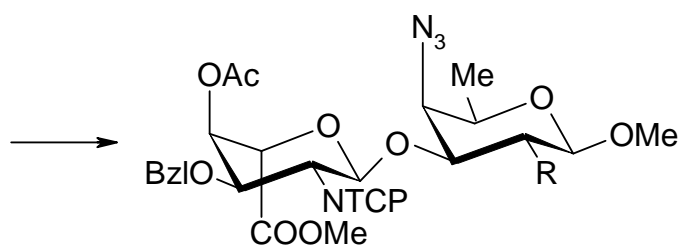
**35** R= OC(=NH)CCl<sub>3</sub>

**36** R= Br

**14** R= NHAc

**12** R= NPhth

**31** R= NTCP



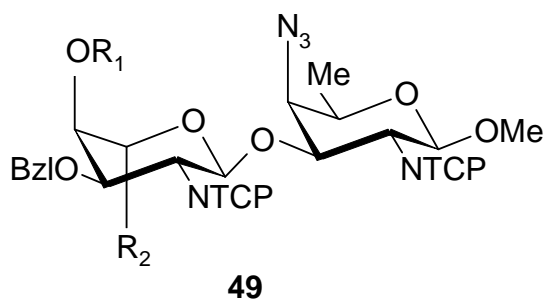
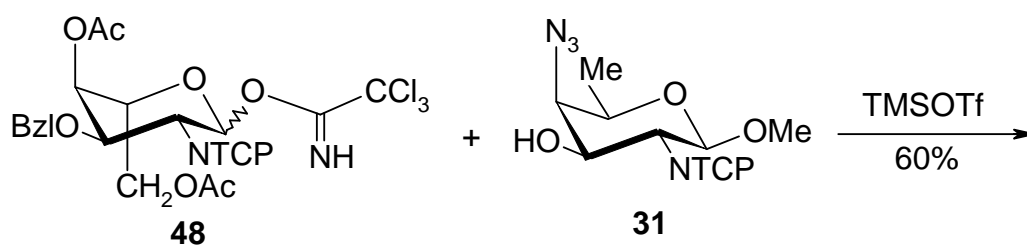
**35 + 14** → ∅

**35 + 12** → **44**, R= NPhth, 69%

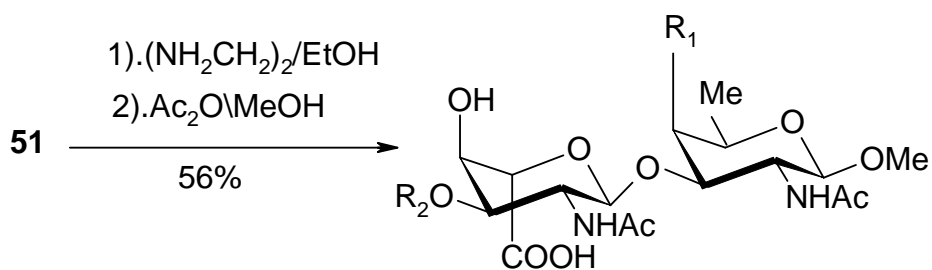
**35 + 31** → **45**, R= NTCP, 44%

**36 + 31** → **45**, R= NTCP, 35%

5. ábra.



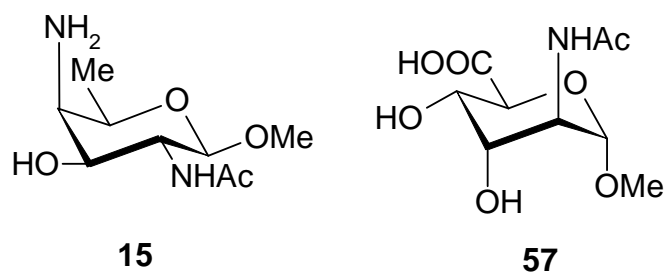
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
a → <b>49</b>	Ac	CH <sub>2</sub> OAc
b → <b>50</b>	H	CH <sub>2</sub> OH
b → <b>51</b>	H	COOH



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
c → <b>52</b>	N <sub>3</sub>	Bzl
c → <b>53</b>	NH <sub>2</sub>	H

Reagensek és reakciókörülmények: (a) HCl, MeOH, 1 nap, 98%; (b) TEMPO, NaOCl, 2 óra, 61%; (c) H<sub>2</sub>, Pd(OH)<sub>2</sub>/C, EtOH, CH<sub>3</sub>COOH, 4 nap, 51%.

6. ábra.



*7. ábra.*

**57** altruronsav és 3,9 mM a **43** diszacharid esetében. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a diszacharid antitesthez történő illeszkedése és affinitása lényegesen kedvezőbb mint a diszacharidot felépítő monoszacharidoké.

## 4. Közlemények jegyzéke

### A PhD dolgozat alapját képező közlemények

- Synthesis of the Monosaccharide Units of the O-Specific Polysaccharide of *Shigella sonnei*, A. Medgyes, E. Farkas, A. Lipták, V. Pozsgay, *Tetrahedron*, **53**, (1997), 4159.
- Synthetic Studies Towards the O-specific Polysaccharide of *Shigella sonnei*, A. Medgyes, I. Bajza, E. Farkas, V. Pozsgai, A. Lipták, *J. Carbohydr. Chem.*, **19(3)**, (2000), 285.
- Synthesis of the Repeating Unit of the O-specific Polysaccharide of *Shigella sonnei* and Quantitation of its Serologic Activity, A. Tóth, A. Medgyes, I. Bajza, A. Lipták, Gy. Batta, T. Kontrohr, K. Péterffy, V. Pozsgay, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, (2000), 19.

### Egyéb közlemények

- The Use of a New Magnesium-Derived Hydride Reagent for Carbohydrate Derivatives, G. Szabovik, A. Medgyes, Zs. Antal, Zs. Varga, W. Knott, A. Lipták, *Polish J. Chem.*, **73**, 1999, 1003.
- Synthesis of 4-substituted phenyl 2,5-anhydro-1,6-dithio- $\alpha$ -D-gluco- and  $\alpha$ -L-guloseptanosides possessing antithrombotic activity, É. Bozó, A. Medgyes, S. Boros, J. Kuzsmann, *Carbohydr. Res.*, **329**, (2000), 25.

### Előadások

- Új megközelítés az *N*-glikoproteinek törzs régiójának előállításában, A. Medgyes, A. Lipták, *Magyar Szénhidrátkémiai Munkabizottsági Ülés*, május 22-24, 1995.
- Unusual Opening of Sugar Oxiranes with a New Magnesium-Derived Hydride Reagent, A. Medgyes, Zs. Antal, G. Szabovik, A. Lipták, W. Knott, *XVIII International Carbohydrate Symposium*, July 21-26, 1996, Milano, Italy.
- Synthesis of the Monosaccharide Units of the O-Specific Polysaccharide of *Shigella sonnei*, A. Medgyes, E. Farkas, A. Lipták, and V. Pozsgay, 1. *German-East-European- Carbohydrate Workshop for Field Researchers*, March 22-24, 1997, Güstrow.

- Synthesis of the Monosaccharide Units of the O-Specific Polysaccharide of *Shigella sonnei*, A. Medgyes, E. Farkas, A. Lipták, and V. Pozsgay, *Magyar Szénhidrátkémiai Munkabizottsági Ülés*, május 24-27, 1997, Mátrafüred.

## Poszterek

- A *Shigella sonnei* O-specifikus oldallánca monoszaccharid egységeinek szintézise, E. Farkas, A. Medgyes, A. Lipták, *Vegyészkonferencia 1995*, augusztus 29-31, 1995, Debrecen.
- Synthesis of the Monosaccharide Constituents of the Mimetic Antigen of *Shigella sonnei*, A. Lipták, A. Medgyes, E. Farkas, V. Pozsgay, *XVIII International Carbohydrate Symposium*, July 21-26, 1996, Milano, Italy.
- The Use of a new Derived Magnesium-Derived Hydride Reagent for Carbohydrate Derivatives, A. Medgyes, G. Szabovik, Zs. Antal, W. Knott and A. Lipták, *XVIII International Carbohydrate Symposium*, July 21-26, 1996, Milano, Italy.