



**Anionos oligoszacharidok szintézise
1-dezoxi-1-etoxiszulfonil-hept-2-ulopiranozil építőelemek felhasználásával.
Ketopiranozil-glikozidok anomer konfigurációjának vizsgálata
doktori (PhD) értekezés tézisei**

Májér Gábor
(Témavezető: Dr. Borbás Anikó)

Debreceni Egyetem
Tudományegyetemi Karok
Debrecen, 2008

1. Az értekezés előzményei és célkitűzései

A Debreceni Egyetem Szénhidrátkémiai Kutatócsoportjának egyik kutatási területe az adhéziós proteinek ligandumaiként szolgáló, negatív töltést viselő szénhidrátok szulfonsav-analógjainak szintézise. E munka keretében korábban előállították a szialil Lewis X tetraszacharid szulfonsav tartalmú analógjait, amelyhez donorként az etil 3,4,5,7-tetra-*O*-benzil-1-dezoxi-1-etoxiszulfonil-2-tio- α -D-*glükó*-hept-2-ulopiranozidot (**37***) használták. Doktori munkám során a **37** glikozil donor további szintetikus hasznosításában vettem részt.

A gyomor- és nyombélfekély valamint a gyomorrák okozója egy Gram-negatív baktérium, a *Helicobacter pylori*, amely különböző szénhidrát egységek felismerése, és a hozzájuk történő asszociáció révén képes a gyomor nyálkahártyáján megkötődni. A *H. pylori* adhéziós fehérjéinek liganduma, többek között, a 3'-szialilezett és a 3'-szulfatált laktóz és laktózamin. Egyik célunk az volt, hogy az említett donor felhasználásával olyan laktóz alapú triszacharid-szulfonsavat állítsunk elő, amely potenciális receptora lehet a gyomorfekély bakteriális kórokozójának.

A glikozilezési reakciókban a **37** donorból eliminációs mellékreakcióban mindig keletkezett a **40** *exo*-glikál, mivel a molekula anomer centrumához kapcsolódó metilén csoport hidrogénjei a szulfonsav-csoport elektronszívó hatása miatt lazítottak, így a glikozilezési reakcióban keletkező glikozilium kation nemcsak glikoziddá, hanem a lazított proton eliminációjával *exo*-glikállá is átalakulhat. Minél kisebb volt az akceptor reaktivitása, annál nagyobb mértékben került előtérbe az eliminációs reakció, rontva a glikozilezési reakciók hozamát.

Célunk volt az 1-dezoxi-1-etoxiszulfonil- α -D-*glükó*-hept-2-ulopiranozból (**36**) különböző glikozil donorok szintézise, glikozilezési reakcióik vizsgálata, a glikozidképződés hozamának javítása, és az eliminációs reakció részesedésének csökkentése.

Másik célunk a legmegfelelőbb reakciókörülményeket alkalmazva $\alpha(2\rightarrow5)$ interglikozidos kötésű, maltóz-típusú, többszörös negatív töltést hordozó oligoszacharidok előállítása volt. A poliszulfatált maltooligomerek heparin-analóg, rák- és vírusellenes hatása régóta ismert, a biológiai hatás összefügg a polianionos jelleggel. Poliszulfonilezett maltóz típusú oligomerek esetén hasonló biológiai aktivitás feltételezhető.

*A tézisekben a vegyület számozása megegyezik a disszertációban használttal

2. Az alkalmazott vizsgálati módszerek

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

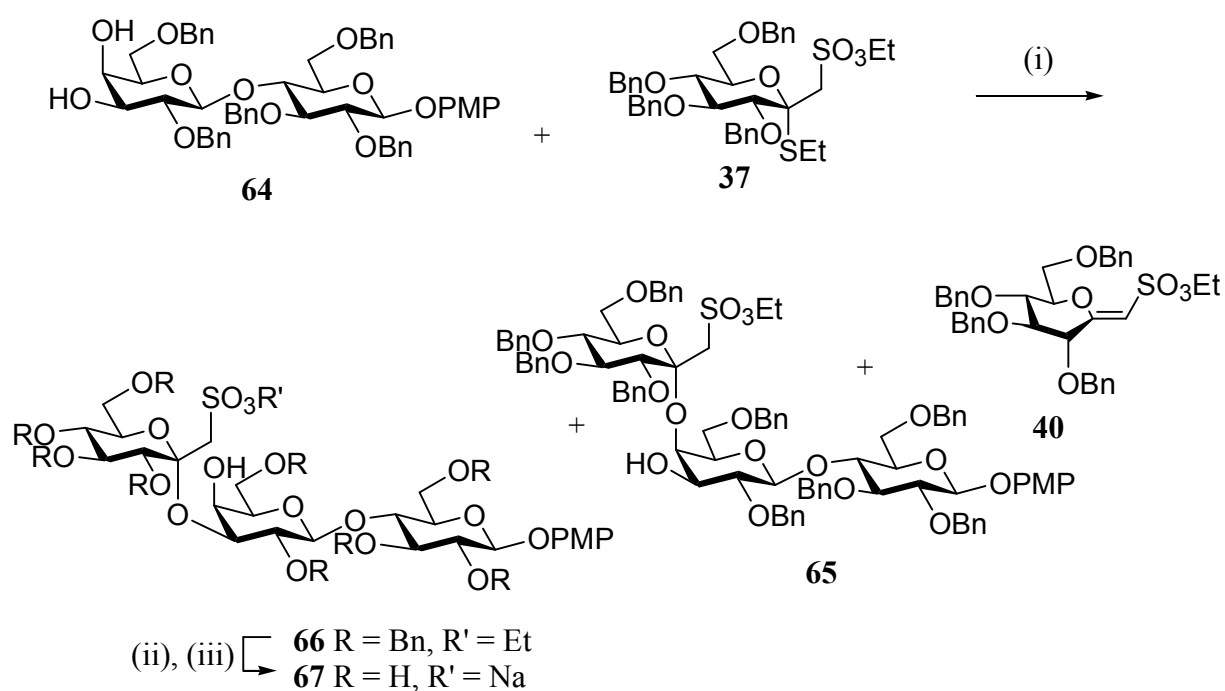
A reakciók követésére, az anyagok tisztaságának ellenőrzésére, a termékarányok meghatározására vékonyréteg-, és nagynyomású folyadékkromatográfiás módszereket használtunk. A nyerstermékek tisztítására, az izomerek elválasztására kristályosítást és oszlopkromatográfiát alkalmaztunk.

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

3. Az értekezés új tudományos eredményei

3.1. A *Helicobacter pylori* természetes ligandumainak szintetikus szulfonsav analógja

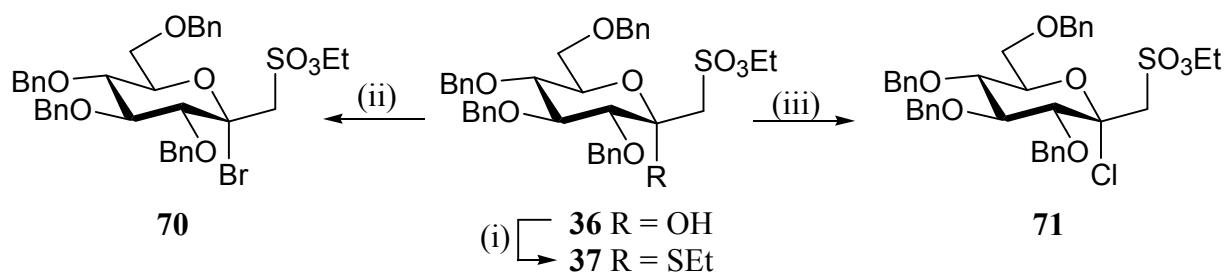
Az **37** glikozil donor és a **64** védett laktozid akceptor reakciójával regioizomer triszacharid-szulfonsavakat nyertünk (**65**, **66**), majd a **66**-os 3'-izomerből a védőcsoportok eltávolításával előállítottuk a természetes ligandumok szulfonsav analogonját (**67**), amely potenciális receptora lehet a tápcsatorna-betegségek kórokozójának, a *H. pylori* baktériumnak.



1. ábra: (i) NIS – TfOH, CH₂Cl₂, -40 °C, (ii) NaI, acetone, (iii) Pd/C, H₂, EtOH - víz

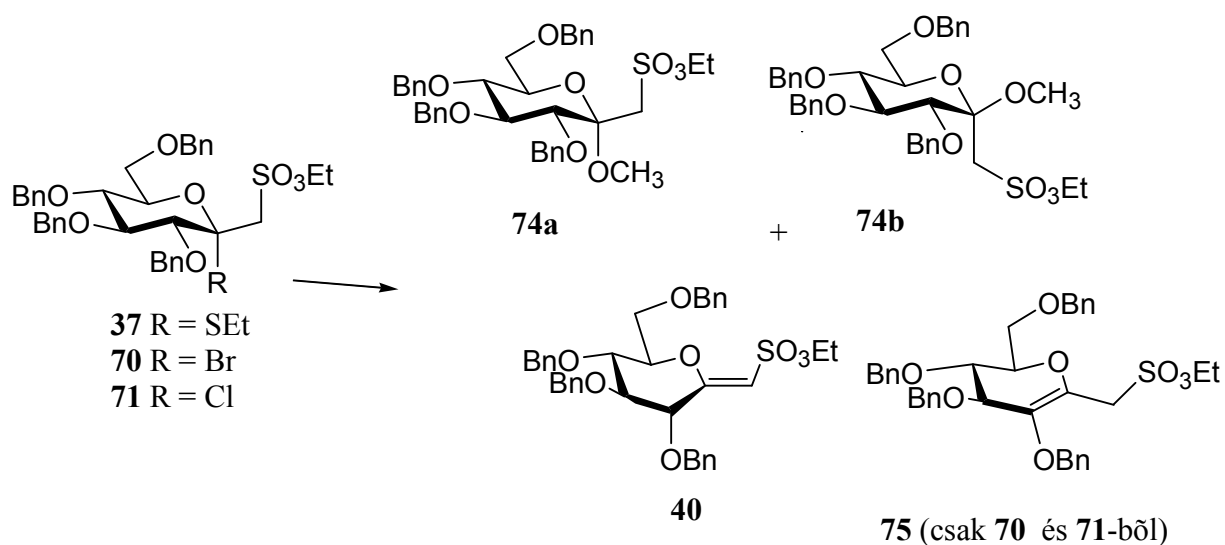
3.2. Az 1-dezoxi-1-etoxiszulfonil-hept-2-ulopiranozil donorok glikozilezési reakcióinak vizsgálata

Az etil 3,4,5,7-tetra-*O*-benzil-1-dezoxi-1-etoxiszulfonil-2-tio- α -D-*glüko*-hept-2-ulopiranozid (**37**) donorral való glikozilezések reakciókörülményeinek optimalizálása céljából előállítottuk a donor bróm- (**70**) és klórcukor származékát (**71**) is (**2. ábra**).



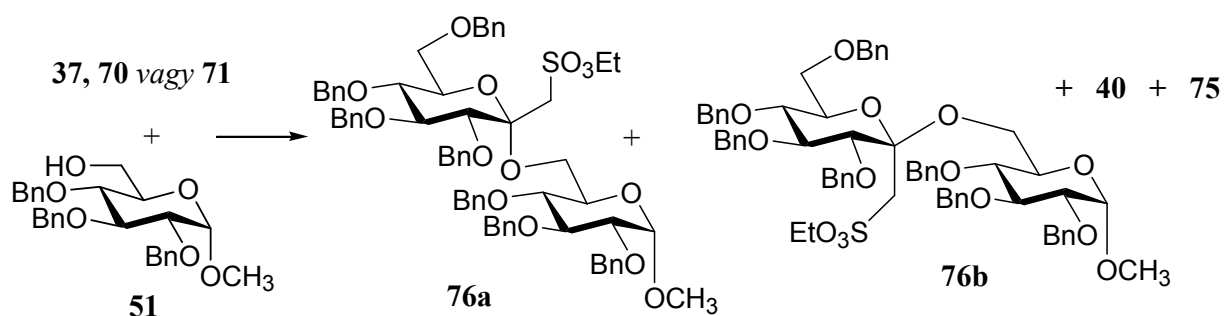
2. ábra: (i) EtSH, BF₃·Et₂O, 0 °C, (ii) **36**-ből: Br₂, 0 °C, (iii) **37**-ből: piridin, SOCl₂, RT

Ezekkel a donorokkal a reaktív metanolt (**3. ábra**), a primer szabad OH-t tartalmazó **51** (**4. ábra**), és a szekunder szabad OH-t tartalmazó **72** és **73** akceptorokat glikozileztük (**5. ábra**), hogy megvizsgáljuk az akceptorok reaktivitásának hatását a képződő glikozid és glikál termékek arányára. A tioglikozid donor NIS-TfOH-val aktivált reakcióiban változtattuk a sav mennyiségét és a hőmérsékletet, valamint használtunk DMTSB és MeOTf promotorokat is. A halogenid donorokat (**70**, **71**) nehézfém sókkal (AgOTf, Hg(CN)₂, és Hg(CN)₂ – HgBr₂) aktiváltuk, vagy tisztán metanollal reagáltattuk (metanolízis). A termékek arányát HPLC kromatográfiával vizsgáltuk.

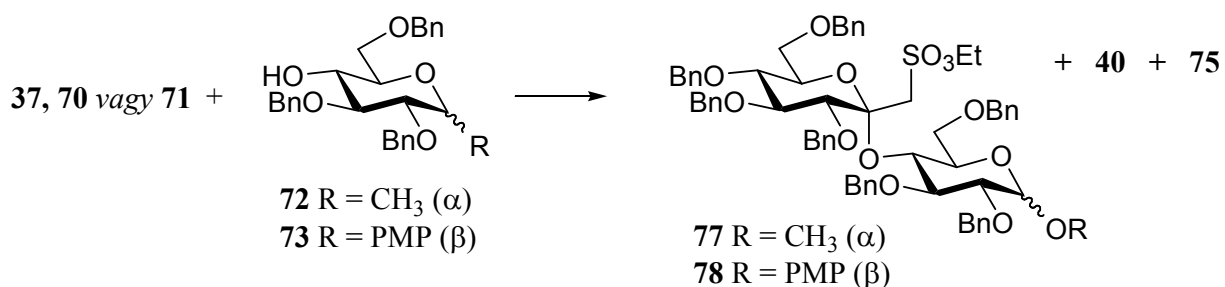


3. ábra

A reaktív akceptorok (metanol, 6-OH-glükózid (**51**)) esetében a glikozilezés nem volt sztereoselektív, anomer glikozidok keveréke (**74a**, **74b** és **76a**, **76b**) képződött. Az α -szelektivitás nőtt az akceptor reaktivitásának csökkenésével és tioglikozid donornál a hőmérséklet emelésével. (Az α : β anomerarány metilglikozidoknál 11:1 és 2:3 között változott, míg a 2 \rightarrow 6 kötésű diszacharidoknál (**76a**, **76b**) mindig α -glikozid volt a főtermék 12:1 - 3:1 arányban). A kis reaktivitású akceptorokból (**72**, **73**) sztereoselektíven csak α -glikozid képződött.



4. ábra



5. ábra

A glikozilium kation képződésének és az akceptorral való reakciójának sebessége valamint az elimináció sebessége határozta meg a glikozilezés és az elimináció arányát. Metanol glikozilezésekor a donortól és az aktiválás módjától függetlenül elimináció nem (vagy csak elhanyagolható mértékben) történt, mivel a glikozilium kation azonnal elreagált a nagyon reaktív, nagy feleslegben jelen lévő aglikonnal. A 6-OH tartalmú glükózid akceptor esetében a tioglikozid alacsony hőmérsékleten, kis savkoncentráció mellett kissé jobb donor volt, mint a halogén-cukrok. A tioglikozid gyorsan aktiválódott, az alacsony hőmérsékleten az elimináció lassan ment végbe, így a képződő glikozilium kation 60-90%-ban elreagált az elegendően reaktív akceptorral.

A halogén-cukrok aktiválása lassabban történt, így egyszerre kisebb koncentrációban volt jelen glikozilium kation, ugyanakkor magasabb hőmérsékleten előtérbe került az

elimináció. Kis reakcióképességű akceptorok esetén a halogén-cukrok bizonyultak jobb donornak, 0 °C-on történő aktiválással. Ezen a hőmérsékleten az akceptor már elég reaktív volt, így a képződő glikozilium kationból versengő reakcióban (3:7 – 1:1 arányban) képződött glikozid és glikál. A szekunder hidroxilok alacsony hőmérsékleten (-40 °C) nem voltak reakcióképesek, magasabb hőmérsékleten pedig az elimináció sebessége jelentősen meghaladta a glikozilezés sebességét, ezért a tioglikozid kis reaktivitású akceptorok glikozilezésére nem volt alkalmas.

A halogenid donorok (70, 71) reakcióelegyeiben az *exo*-glikál mellett azonosítottuk a 75 *endo*-típusú glikál terméket is, melynek képződésére három mechanizmust javasoltunk: a donor vegyületből E1 mechanizmussal, a glikozilium kationból a C-3 protonjának távozásával, vagy a képződő 40 *exo*-glikálból savkatalizált átrendeződéssel.

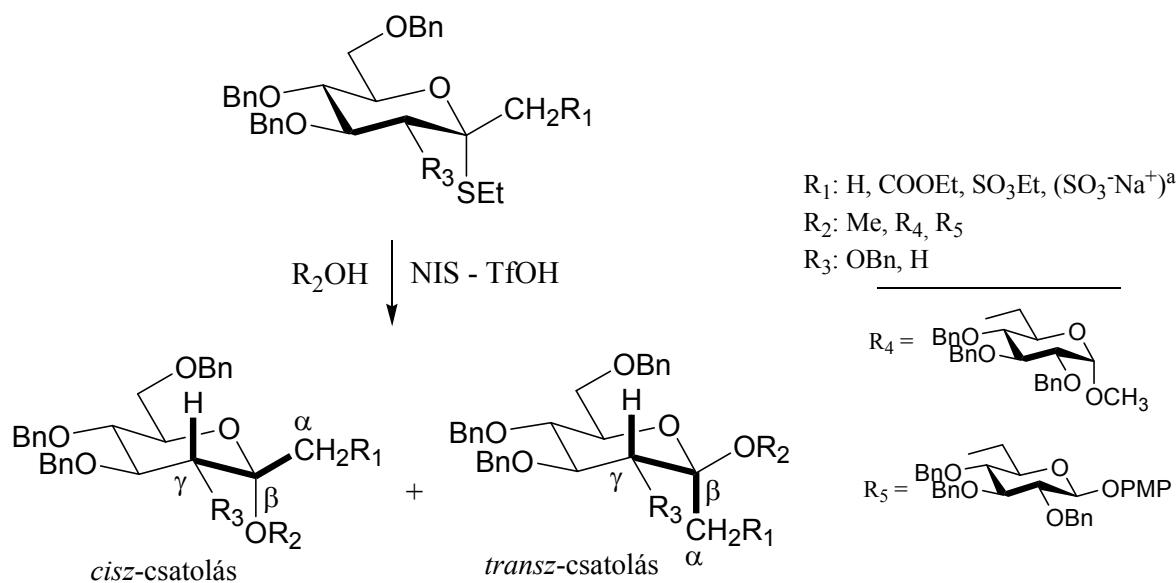
3.3. Ketopiranozil-glikozidok szintézise és anomer konfigurációjuk meghatározása három kötésen át ható proton-szén csatolási állandó alapján

Az általunk előállított ketozil-glikozidok (74a,b, 76a,b, 77 és 78) anomer centruma nem tartalmaz protont, így azok anomer konfigurációját proton-szén három kötésen át ható csatolási állandók mérésével határoztuk meg ($^3J_{C1H3}$). Irodalmi adatok szerint a csatolási állandó a Karplus szabálynak megfelelően a diéderes szög függvényében változik, ennek megfelelően α -glikozidok (74a, 76a, 77 és 78) esetében kicsi, míg a β -glikozidok esetében nagy csatolási állandó értéket vártunk. A mért értékek azonban ellentmondásosak voltak: az α -glikozidok csatolása 1 Hz - 2.7 Hz tartományban változott, a β -glikozidoké ~2.5 Hz volt. Szisztematikus vizsgálatokat végeztünk annak megállapítására, hogy a csatolási úthoz kapcsolódó szubsztituensek hogyan befolyásolják a $^3J_{C1,H3}$ értékét és mennyiben használhatók ezek az értékek az anomer konfiguráció meghatározására.

Különböző ketozil-glikozid anomer párokat állítottunk elő (metil-glikozidokat és diszacharidokat, (1. Táblázat) amelyekben a csatolási úthoz kapcsolódó szubsztituenseket (elektronegativitást, térkitöltést) változtattuk, és megmértük a háromkötéses proton-szén csatolási állandókat. Az eredmények azt mutatták, hogy a szubsztituensek elsősorban a *transz* csatolásokat befolyásolták, a szubsztituenshatás jelentősen függött a szubsztitúció helyétől. Anomer pároknál az α -glikozid csatolása (*cisz* csatolás) minden esetben kisebb volt (~1 Hz), mint a β -glikozidé (*transz* csatolás), ugyanakkor szénhidrátok anomer konfigurációjának meghatározására csak anomer párok esetében használható nagy biztonsággal. Az olyan szerkezet meghatározás, amely csak az egyik anomer csatolási állandóján alapul, vagy egy

olyan származék adatain, amely a csatolási úton eltérő szubsztituenseket, vagy azonos szubsztituenseket eltérő elrendezésben tartalmaz, megbízhatatlan, ezért ilyen esetekben ajánlott más szerkezeti bizonyítékokat keresni (pl. a NOE mérések, röntgenkristallográfiás mérések).

1. Táblázat: Ketopiranozil-glikozid anomer párok és három kötésen át ható csatolási állandójuk ($^3J_{C\alpha,H\gamma}$)



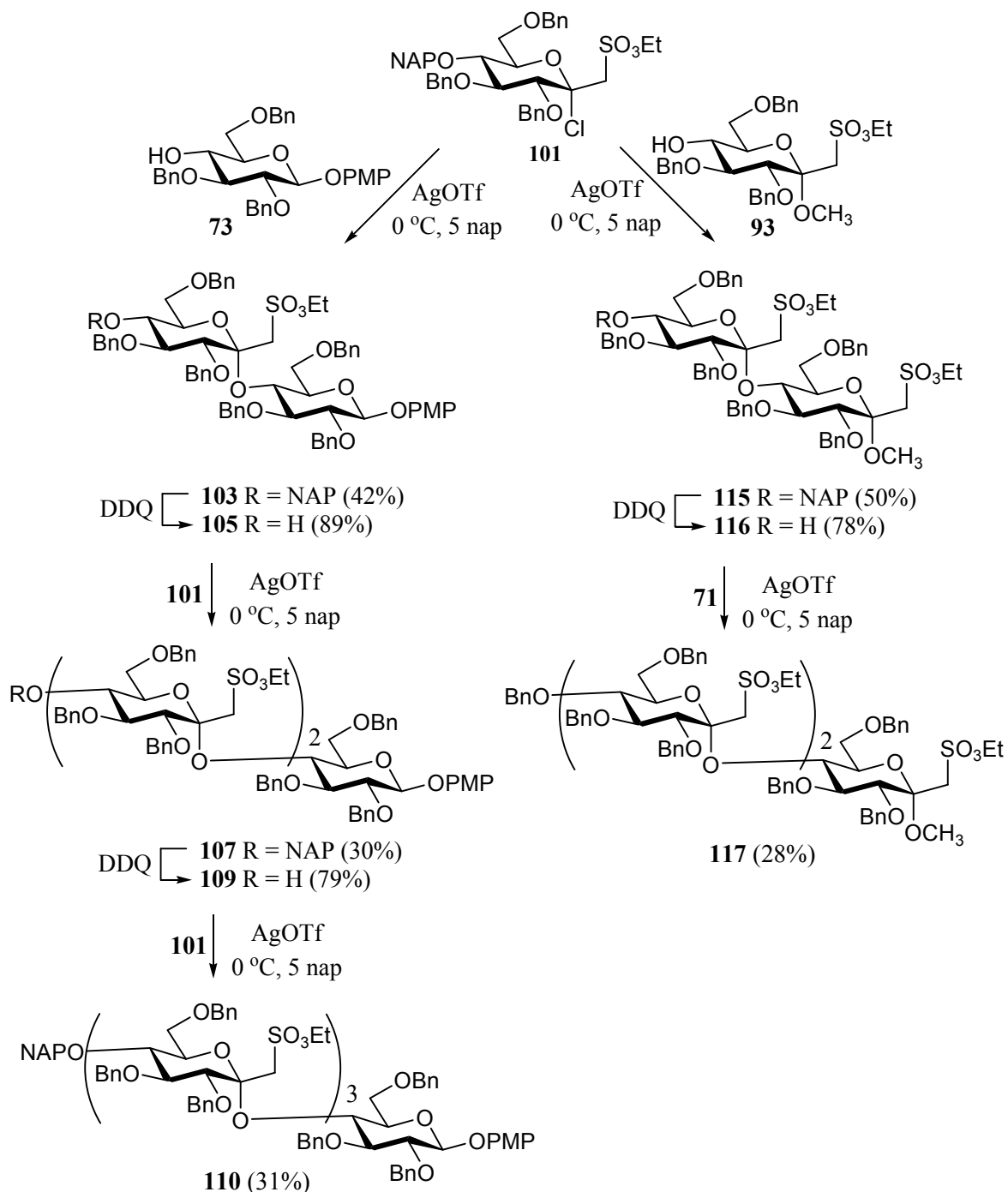
^aA **82a** és **82b** sószármazékokat a **74a** és **74b**

észter-származékokból állítottuk elő NaI-dal acetonban

Sor	R ₁	R ₂	R ₃	Vegyület	$^3J_{C\alpha,H\gamma}$	Vegyület	$^3J_{C\alpha,H\gamma}$
					(Hz) <i>cisz</i>		(Hz) <i>transz</i>
1.	SO ₃ Et	CH ₃	OBn	74a ^a	~1	74a	2.4
2.	SO ₃ Et	R ₄	OBn	76a	≤ 1	76a	2.5
3.	SO ₃ Et	Bn	OBn	79a ^a	≤ 1	79a	2.3
4.	SO ₃ Et	R ₅	OBn	81a	~ 2	81a	n.a.
5.	SO ₃ Na ^a	CH ₃	OBn	82a	≤ 1	82a	2.4
6.	SO ₃ Et	CH ₃	H	86a	≤ 1	86a	4.8
7.	COOEt	CH ₃	OBn	89a	~1	89a	2.6
8.	H	CH ₃	OBn	91a	1.8	91a	2.6

3.4. Poliszulfonált maltóz-típusú oligomerek előállítása

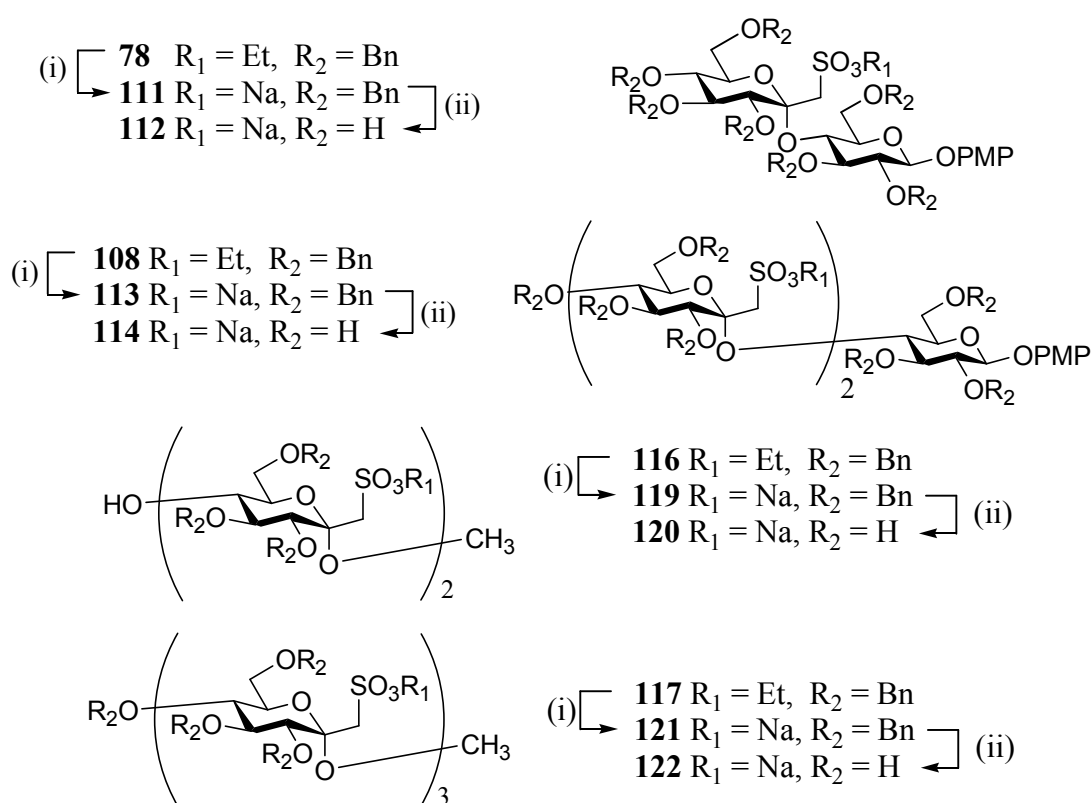
A dolgozat utolsó része poliszulfonált, maltóz-típusú oligoszacharidok szintézisét mutatja be. Ehhez olyan glikozil-klorid donort állítottunk elő a 3,4,7-tri-*O*-benzil-5-*O*-(2-naftil)metil-1-dezoxi-1-etoxiszulfonil- α -D-glüko-hept-2-ulopiranozból (**98**), amely C-5 helyzetben szelektíven eltávolítható (2-naftil)metil (NAP) védőcsoportot tartalmazott (**101**), így glikozilezést követően annak eltávolításával a képződött glikozidot mindig akceptorrá tudtuk átalakítani (**6. ábra**).



6. ábra

A **73** és a **93** akceptorok glikozilezése után a képződő diszacharidokról (**103**, **115**) eltávolítottuk a nemredukáló-végi 5'-NAP védőcsoportokat, így két diszacharid akceptort kaptunk (**105**, **116**), amelyeket ismét glikozileztünk a **101** donorral. Ilyen iteratív glikozilezési módszerrel kétféle homológ sorozatot állítottunk elő tetra- (**110**) és triszacharidig (**117**).

A védett cukorszulfonsav-etilészterekből először nátrium-szulfonát származékot képeztünk, majd katalitikus hidrogénezéssel eltávolítottuk a benzil-típusú védőcsoportokat (7. ábra).



7. ábra: (i) NaI (1.1 ekv.), aceton, 3 óra, reflux, 97% **111**, 84% **113**, 82% **119**, 72% **121**;
(ii) Pd/C (20 m/m %), H₂, AcOH, EtOH – H₂O, 62% **112**, 81% **114**, 78% **120**, 72% **122**.

4. Összefoglalás

1) Előállítottuk *Helicobacter pylori* természetes ligandumainak szabad triszacharid-sulfonsav analogonját (**67**), amely inhibitora lehet a tápcsatorna-betegségek kialakulásáért felelős baktérium adhéziós proteinjeinek.

2) Védett 1-dezoxi-1-etoxiszulfonil-hept-2-ulopiranozild donorokat állítottunk elő, és tanulmányoztuk a glikozilezési reakcióikat. Megállapítottuk, hogy kis reaktivitású akceptorok glikozilezésére a klorid-donor a legalkalmasabb, AgOTf aktivátor jelenlétében. A klorid donor felhasználható maltóz-típusú polyszulfonált oligoszacharidok szintézisére.

3) Felismertük a ketozil-glikozidok anomer konfigurációjának meghatározására alkalmazott, $^3J_{C1,H3}$ mérésen alapuló NMR módszernek a bizonytalanságát. A módszer alkalmazhatóságának vizsgálatához ketozil-glikozid anomer párokat állítottunk elő, amelyeken a csatolási úthoz kapcsolódó szubsztituensek minőségét (elektronegativitását, térkitöltését) változtattuk. Felismertük, hogy a csak egy anomer formában rendelkezésre álló ketozil-glikozidok anomer konfigurációjának meghatározására a módszer nem nyújt kellő bizonyosságot, ilyenkor célszerű egyéb modern műszeres módszereket használni a szerkezet meghatározáshoz.

4) Megfelelő védőcsoport stratégiával olyan 1-dezoxi-1-etoxiszulfonil-hept-2-ulopiranozil donort állítottunk elő, amelyet maltóz típusú oligoszacharidok előállításához építőelemként használhattunk. Ennek felhasználásával előállítottuk az építőelem ismétlődésével beépülő tetraszacharidot, amely PMP-glükózid aglikont tartalmazott, valamint előállítottunk egy triszacharid származékát, amely metil aglikont tartalmazott. A védett cukorszulfonsav-etilészterekből előállítottuk a szabad szulfonsavak Na-sóit, amelyek a poliszulfatált maltooligomerekhez hasonló szerkezetük miatt potenciális biológiai aktivitással bírnak: A poliszulfatált maltooligomerek heparin-analóg, rák- és vírusellenes hatása is régóta ismert.

5. Publikációk jegyzéke

5.1. Közlemények jegyzéke

1. A. Borbás, M. Csávás, L. Szilágyi, **G. Májer**, A. Lipták; Replacement of carbohydrate sulfates by sugar C-sulfonic acid derivatives; *J. Carbohydr. Chem.*, 23 (2004) 133-146.
2. **G. Májer**, A. Borbás, T. Z. Illyés, L. Szilágyi, A. Cs. Bényei, A. Lipták; Synthesis of ketopyranosyl glycosides and determination of their anomeric configuration on the basis of the three-bond carbon–proton couplings; *Carbohydr. Res.*, 342 (2007) 1393–1404.

5.2 Előadások (E) és poszterek (P)

1. A. Borbás, M. Csávás, **G. Májer**, A. Lipták; Synthesis of lactose sulfonic acids; *First Austrian-Hungarian Carbohydrate Conference*, Burg-Schlaining, Austria, 24-27 September 2003. (E)

2. Borbás A., **Májer G.**, Szilágyi L., Lipták A.; Ketopiranozil glikozidok szintézise és anomer konfigurációjuk meghatározása; *Szénhidrátkémiai Munkabizottsági Ülés*, Debrecen, 2004. XI. 5. (E)
3. A. Borbás, **G. Májer**, Z. B. Szabó, A Lipták; Investigation of glycosylation properties of 1-ethoxysulfonyl-hept-uloypyranosyl derivatives; *2nd Austrian-Hungarian Carbohydrate Conference*, Somogyaszaló, Hungary, 24-26 May 2005. (E)
4. Borbás A., **Májer G.**, Illyés T. Z., Szilágyi L., Lipták A.; Ketopiranozil-glikozidok szintézise és anomer konfigurációjuk meghatározása; *Vegyészkonferencia*, Hajdúszoboszló, 2005. június 28.-30. (E)
5. A. Borbás, Z. B. Szabó, **G. Májer**, A. Lipták; Synthesis of saccharide sulfonic acids; *2nd German-Hungarian Workshop*, Debrecen, Hungary, 4 April, 2006. (E)
6. **G. Májer**, A. Borbás, A. Lipták; Synthesis of maltose-type oligosaccharides containing sulfonic acid moiety at the anomeric configuration; *Szénhidrátkémiai Munkabizottsági Ülés*, Mátrafüred, 2006. május 31.-június 2. (E)
7. A. Borbás, F. Sajtos, **G. Májer**, A. Lipták; Preparation of C-sulfated sugar donors for the synthesis of C-sulfate containing Sialyl Lewis X analogues; *Third Pan-Pacific Conference on Sialoglycoscience and Other Novel Forms of Glycosylation*, Gold Coast, Australia, 14-17 July 2002. (P)
8. Borbás A., Májer G., Szeghy G., Lipták A.; Polianionos maltooligomerek építőelemeinek szintézise; *Vegyészkonferencia*, Hajdúszoboszló, 2001. június 27-29, P-96. (P)
9. Borbás A., Csávás M., **Májer G.**, Lipták A.; Szulfonilezett laktóz származékok szintézise; *Vegyészkonferencia*, Hajdúszoboszló, 2003. június 26-28, P-13. (P)
10. **G. Májer**, A. Borbás, A. Lipták; Synthesis of ketopyranosyl glycosides and determination of their anomeric configuration; *First German-Hungarian workshop*, Hannover, Germany, July 5-6, 2004, P-07. (P)
11. **G. Májer**, A. Borbás, Z. B. Szabó, A. Lipták; Investigation of glycosylation properties of 1-deoxy-1-ethoxysulfonyl-hept-uloypyranosyl derivatives; *13th European Carbohydrate Symposium*, Bratislava, Slovakia, 21-26 August, 2005, P-37. (P)
12. **G. Májer**, A. Borbás, Z. B. Szabó, A. Lipták; Investigation of glycosylation reactions using 1-deoxy-1-ethoxysulfonyl-hept-2-uloypyranosyl donors; *2nd German Hungarian Workshop*, Debrecen, Hungary, 4 April, 2006, P-2. (P)