



**A glikozidos-kötés kiterjesztése: diszulfid- és -szulfénamid típusú glikozidok
szintézise és szerkeztvizsgálata**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Illyés Tünde-Zita

Témavezető: Dr. Szilágyi László

**Extension of the glycosidic bond: syntheses and structural studies of
diglycosyl disulfides and glycosyl sulfenamides**

Ph.D. Theses

Tünde-Zita Illyés

Supervisor: Dr. László Szilágyi

Debreceni Egyetem, Természettudományi Kar

Debrecen, 2004.

1. Az értekezés előzményei és célkitűzései

A szénhidrátok az élővilágban igen nagy mennyiségben, rendkívüli változatosságban találhatók. Bár a különböző *monoszacharidok* is fontos szerepet játszanak számos biológiai folyamatban, az esetek túlnyomó többségében szénhidrát (esetenként nem szénhidrát) *alegységekből* felépített *glikozidok*, *oligo-* illetve *poliszacharidok* a biológiai funkció hordozói. Az oligoszacharidok alegységei - kevés kivételtől eltekintve - egy *oxigénen* keresztül *két*, egyszeres (szigma) *kötéssel* kapcsolódnak egymáshoz.

Ismeretesek oligoszacharidok olyan heteroanalogonjai, melyekben az interglikozidos oxigén atomot más atomok (N, S, Se, C) helyettesítik. A természetben előfordulnak olyan szénhidrátszármazékok is, amelyekben a monoszacharid komponenseket *háromkötéses* híd (C-X-Y-C) kapcsolja össze eltérően a természetes glikozidok *kétkötéses* (C - O - C) kapcsolódásától. A háromkötéses interglikozidos hídra leggyakoribb példát az 1→6 glikozidos kötés (X=O, Y=C) képviseli (pl. amilopektinben); az *esperamicin-calicheamicin* daganatellenes antibiotikumokban pedig N-O interglikozidos híd található.

Értekezésemben olyan szénhidrátszármazékok szintéziséről számolok be, amelyekben az alegységeket – tipikusan – háromkötéses híd kapcsolja össze *két*, oxigéntől különböző *heteroatom* közbeiktatásával (háromkötéses glikozidos híd).

Az -S-S- *diszulfid*-kötés (X=S, Y=S) jól ismert a peptidek és fehérjék körében, továbbá ciklopeptidekben. A diszulfid hidak biztosítják, hogy a fehérjék háromdimenziós szerkezete adott körülmények között fennmaradjon. Ez a szerkezeti elem azonban szénhidrátok alkotórészeként nem fordul elő a természetben. Az interglikozidos O atom helyettesítése diszulfid-kötéssel új típusú szénhidrátszármazékokat eredményez, amelyekben a háromkötéses interglikozidos híd tulajdonságai jelentősen módosítják ezen származékok kémiai szerkezetét és térszerkezetét, mely tulajdonságok fontos szerepet játszanak szénhidrátok biológiai kötődési folyamataiban.

Vizsgáltuk továbbá a *szulfénamid*-kötés (X=S, Y=N) glikozidos hídként történő beépítését szénhidrát származékokba. Ez a szerkezeti elem szintén alig ismert a szénhidrátkémiában.

Célul tűztük ki az előállított új származékok szerkezetének és térszerkezetének vizsgálatát oldat- és szilárd fázisban egyaránt NMR, röntgendiffrakciós és kiroptikai módszerekkel.

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 vékonyréteg-kromatográfiát használtunk. A nyerstermékek tisztítására kristályosítást és oszlopkromatográfiát alkalmaztunk.

Az előállított új vegyületek szerkezetét elsősorban NMR mérésekkel igazoltuk. Emellett alkalmaztuk a klasszikus analitikai eljárásokat (elemanalízis, olvadáspont és fajlagos forgatóképesség meghatározás), tömegspektrometriát valamint egykristály röntgenkristallográfiát.

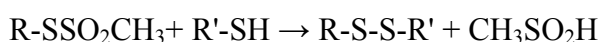
Az NMR vizsgálatok során a termékek teljes ^1H -, ^{13}C -, egyes esetekben ^{15}N -NMR hozzárendelését egy- illetve kétdimenziós technikák ^1H - ^1H COSY, TOCSY, ^{13}C - ^1H HSQC, ^{13}C - ^1H HMBC, ^{15}N - ^1H HSQC és ^{15}N - ^1H HMBC alkalmazásával végeztük el. Az -S-S- kötés kiralitását CD spektroszkópiai módszerrel tanulmányoztuk.

3. Az értekezés új tudományos eredményei

A dolgozatban nem szimmetrikus *diglikozil-diszulfidok* valamint *glükozil-szulfénamidok* szintézisét mutatjuk be, és beszámolunk az új származékok szerkezetvizsgálatának eredményeiről.

3.1. Vegyes (nem szimmetrikus) diszulfidok szintézise szénhidrátokból

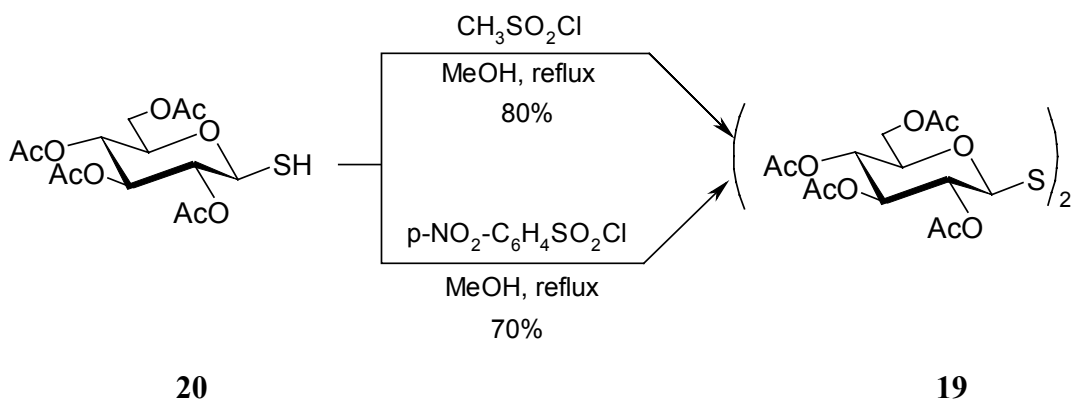
Vegyes diszulfid diszacharidok szintézisét egy, az irodalomból ismert általános módszer szerint valósítottuk meg, alkiltiolszulfonát észterek tiolokkal való reakciójában:



3.1.1. 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glükopiranozil metántiolszulfonátból (7)

7¹előállítására kísérleteket végeztünk 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-tio- β -D-glükopiranozil (20) metánszulfonsavkloriddal (A: CH₃SO₂Cl) való reakciójában. 20-at metánszulfonsav-kloriddal reagáltattuk (metanol, reflux hőmérséklet) a reakcióelegyben azonban a 19 szimmetrikus diglükozil-diszulfid volt túlsúlyban. A kívánt glükoziltiolszulfonsavészter képződésének elősegítése céljából vizsgáltuk a reakciókörülmények hatását (l. 1. táblázat). A várt reakciótermékeket egyik esetben sem sikerült izolálni.

A kísérleteket kiterjesztettük más glükozil-szulfonsavészter előállítására, p-NO₂-fenilszulfonsavklorid (B: p-NO₂-C₆H₄SO₂Cl) alkalmazásával, azonban az előbbiekhöz hasonló eredményeket kaptunk (l. 1. táblázat).



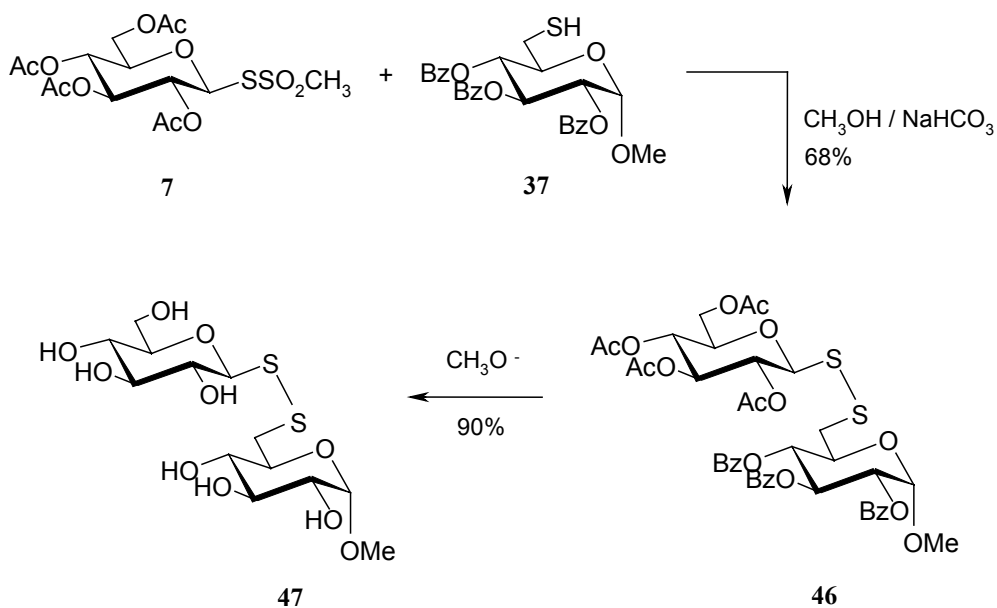
1. táblázat

Szulfonilezési reakciók

Tiol	Savklorid	Körülmények	Tiol : Savklorid	Reakcióelegy
20	A	MeOH, 4°C, Et ₃ N	1 : 1	Többkomponensű
	A	MeOH, 4°C, Et ₃ N	1 : 3	Többkomponensű
	A	MeOH, szh	1 : 1	19 (főtermék)
	A	MeOH, szh, Et ₃ N	1 : 1	19 (főtermék)
	A	MeOH, szh, Et ₃ N	1 : 5	Többkomponensű
	A	DMF, 4°C, Et ₃ N	1 : 3	19 (főtermék)
	B	MeOH, szh, Et ₃ N	1 : 1	19 (főtermék)
	B	MeOH, 4°C, Et ₃ N	1 : 3	Többkomponensű

¹A vegyületek számozása azonos az értekezésben alkalmazott számozással

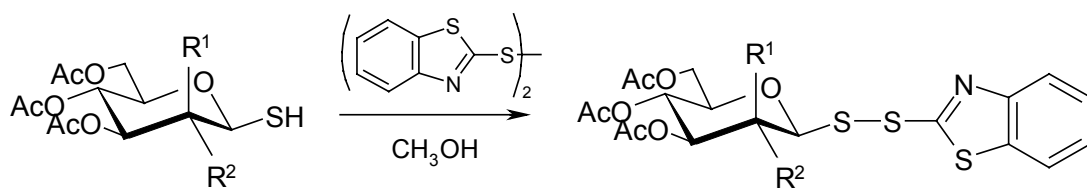
Analóg módon állítottuk elő az 1→6 diszulfidkötést tartalmazó **46** diszacharidot, melyben *négykötéses* interglikozidos diszulfid híd található.



Kísérleteket végeztünk könnyebben hozzáférhető, és/vagy a 7 metántiolszulfonát reagensnél jobb glikozil-transzfer sajátságokkal rendelkező származékok előállítására. Ezek az anomer centrumhoz kapcsolódó elektrofil jellegű kétvegyértékű S atomot tartalmazó származékok: glikozil-aryl-diszulfidok (Gly-SS-Ar), vagy S-glikozil-N-acil szulfénamidok. A kénatom elektrofil karaktere a hozzá kapcsolódó szubsztituensek elektronszívó hatásának köszönhető.

3.1.2. Aril-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glikopiranozil)-diszulfidok

A 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio-β-D-glükopiranozt (**20**) és 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio-β-D-mannopiranozt (**23**) 2,2'-ditiobisz (benzotiazol)-lal (**21**) metanolban reagáltatva, előállítottuk a **22** és **24** vegyes diszulfidot:



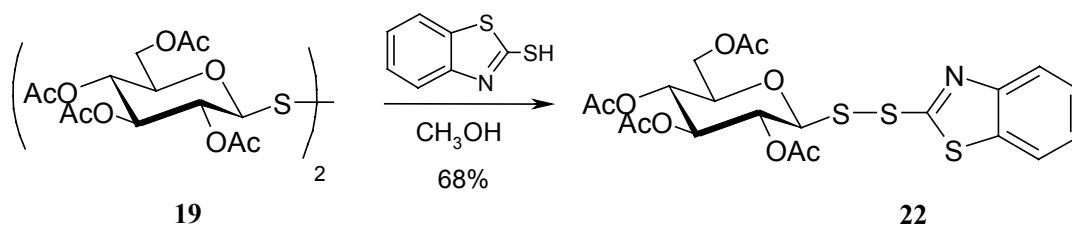
20 R¹= H, R²= OAc

23 R¹= OAc, R²= H

22 R¹= H, R²= OAc (65%)

24 R¹= OAc, R²= H (74%)

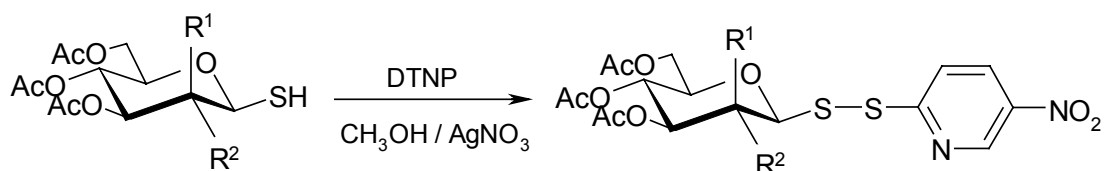
Diszulfid komponensként a bis-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glükopiranozil)-diszulfidot (**19**), tioként pedig benzotiazol-2-tiolt alkalmazva **22** hasonló körülmények között, hasonló hozammal állítható elő.



19

22

További glikozil-aril vegyes diszulfidok előállítása céljából vizsgáltuk glikozil tiolok reakcióját 2, 2'-ditiobisz (5-nitropiridin)-nel (DTNP) (l. 3. táblázat).



20 R¹= H, R²= OAc

23 R¹= OAc, R²= H

25 R¹= H, R²= OAc

26 R¹= OAc, R²= H

3. táblázat

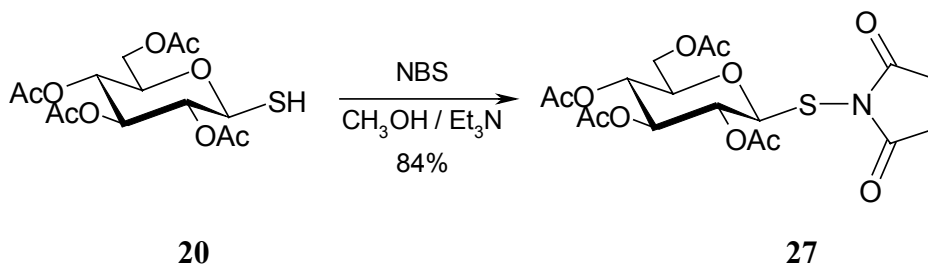
DTNP reakciói^a 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glikopiranozil tiolokkal

Tiol	Termék	Hozam (%)
20	25	58 ^b 35 ^c
23	26	53 ^b 30 ^c

^a Tiol: 2, 2'-ditiobisz-(5-nitropiridin) arány 1:1.1, ^b metanolban 1 ekv. AgNO₃ jelenlétében, ^c metanolban AgNO₃ hozzáadása nélkül

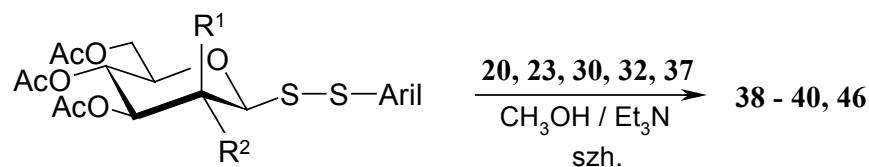
N-szukcinil-S-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glükopiranozil)sulfénamid

A **27** szulfénamid típusú glikozil-, „donor” vegyületet jó hozammal állítottuk elő 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-tio-β-D-glükopiranoziból (**20**) N-bróm-szukcinnimiddel (NBS) metanolban Et₃N jelenlétében.



3.1.3. Diszulfid-tiol cserereakciók glikozil-aril-diszulfidokkal

Vizsgáltuk az új glikozil-transzfer reagensek hatékonyságát, különös tekintettel glikozil-tiolokkal való reakcióra (l. 4. táblázat).



Aril: 2-benzotiazolil **22** R¹= H, R²= OAc

24 R¹= OAc, R²= H

Aril: 5-nitro-2-piridil **25** R¹= H, R²= OAc

26 R¹= OAc, R²= H

Megállapítottuk, hogy a glikozil-aril reagensekkel előállított β,β -(1 \rightarrow 1')-diszulfid-diszacharidok hozamai összemérhetők a **7** metántiolszulfonát alkalmazásával kapottakkal. A glikozil-aril vegyes diszulfidok azonban sokkal könnyebben előállíthatók, a szimmetrikus aril-diszulfidok (Ar-S-S-Ar) és glikozil tiolok (Gly-SH) közötti diszulfid-tiol cserereakció útján (l. fent).

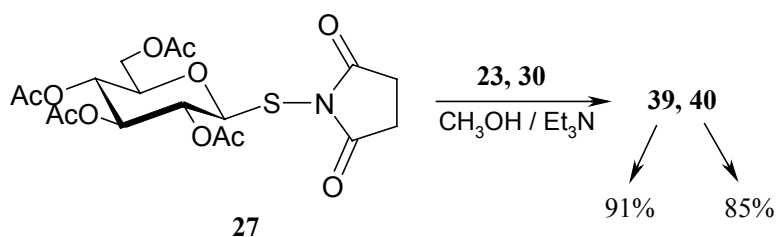
4. táblázat

Diszulfid diszacharidok előállítása aril-glikozil diszulfidokból ^{a, b}

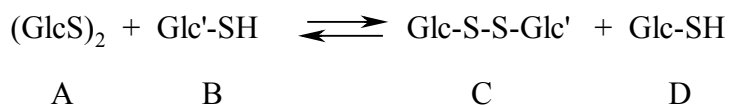
Tiol donor	Tiol	Termék	Hozam (%)
24	20	39	41
22	23	39	45
22	30	40	43
22	32	38	40
22	37	46	40
26	20	39	50
25	23	39	53
25	30	40	48
25	37	46	45

^a Tiol: diszulfid arány 1:1, ^b Reakcióidő 20 perc

A **27** új glikozil-transzfer reagens glikozil-tiolokkal való reakciója viszont sokkal jobb hozammal szolgáltatja a **39** a **40** vegyes diszulfid-diszacharidokat:



3.1.4. Diszulfid-tiol cserereakciók a **19** szimmetrikus diglükózil diszulfiddal



19 -et különböző glikozil-tiol komponensekkel (**23**: *Man*, **30**: *Gal*, **31**: *Gal(1→4)Glc*, **32**: *GlcNAc*) reagáltatva, a reakcióelegyek pH-ját megfelelő vizes puffer oldattal 8-10-es értékre állítva, az egyensúly beállta után a reakcióelegyekből a vegyes diszulfid / szimmetrikus diszulfid arányt (A/C) ¹H-NMR spektrumokból a H-1 vagy H-5 protonok rezonanciajeleinek integráljai segítségével határoztuk meg (l. 5. táblázat).

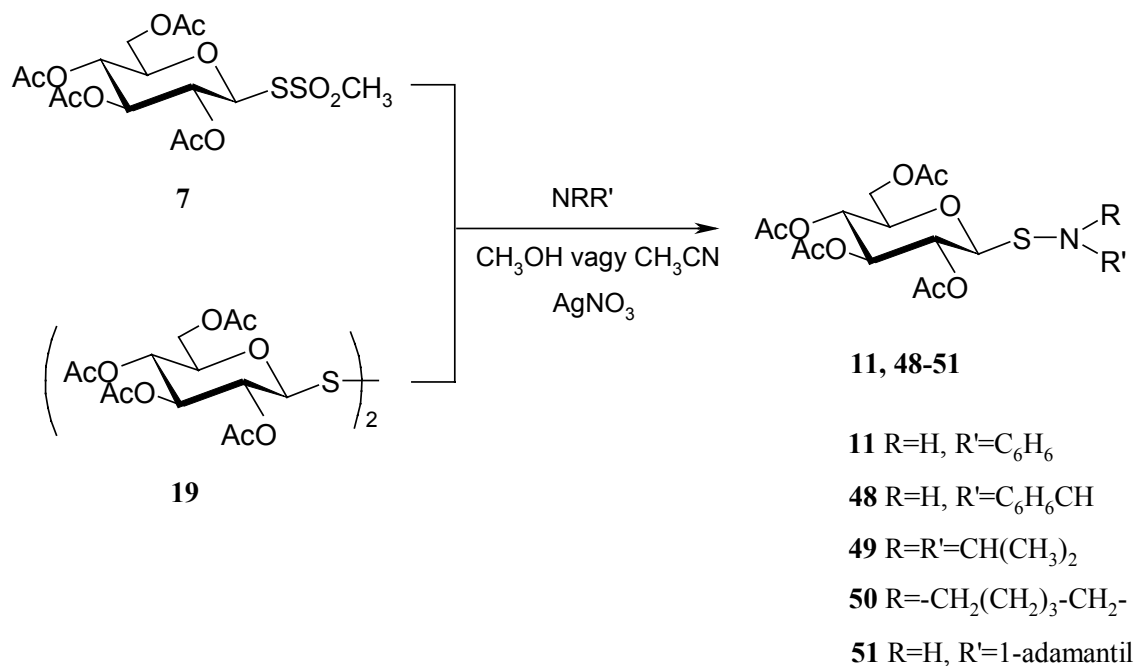
5. táblázat

Glikozil tiolok és **19** diszulfid cserereakciói

Tiol	Arány (tiol: diszulfid)	pH	A/C termékarány
30	1 : 1	8.5	45: 55
23	1 : 1	8.5	45: 55
31	1 : 1	8.5	45: 55
32	1 : 1	8.5	45: 55
30	1.5 : 1	10.0	40: 60
23	2 : 1	10.0	25: 75

3.2. Glükózil-szulfénamidok szintézise

N-szubsztituált-S-glükózil-szulfénamidokat szintetizáltunk a **7** metántiol-szulfonátból egyszerű alifás és aromás aminokkal végzett nukleofil szubsztitúciós reakciókban. Benzilamin készségesen reagált a **7**-tel enyhe körülmények között szolgáltatva a megfelelő N-benzil-S-glükózil-szulfénamidot. A reakció lassúbb volt szekunder aminokkal vagy az aromás anilinnel, míg a szterikusan gátolt 1-adamantilaminnal nem történt átalakulás (l. 6. táblázat).



6. táblázat: Glükózil szulfénamidok és reakciókörülmények

Vegy.	Szulfénamid	Reakciótűt	Reagens ^a	Oldószer	Hozam (%)
11		6	1 : 2	CH ₃ OH	32
		7	1 : 8	CH ₃ CN	51
48		6	1 : 4	CH ₃ OH	45 ^b
		6	1 : 8	CH ₃ CN	57 ^b
		7	1 : 4	CH ₃ OH	60
		7	1 : 8	CH ₃ CN	87
49		6	1 : 4	CH ₃ OH	41
		7	1 : 4	CH ₃ CN	43
50		6	1 : 4	CH ₃ OH vagy CH ₃ CN	51
		7	1 : 4	CH ₃ OH	53
51		6	1 : 4	CH ₃ OH	15

^a Tiol donor: amin; 1 ekvivalens AgNO₃

^b AgNO₃ hozzáadása nélkül hasonló hozamokat értünk el

Egy másik módszer szulfénamidok szintézisére a szimmetrikus diszulfidok S-S kötésének hasítása Ag^+ ion aktiválással (l. 6. táblázat). A szimmetrikus bisz-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glükopiranozil)-diszulfid (**19**) készségesen reagált különböző aminokkal, és a **7** glikozil-metántiolszulfonáttal szemben kis reaktivitást mutató aminok sokkal reaktívabbak voltak ilyen körülmények között. Megállapítottuk, hogy az Ag^+ ion aktiválás számottevően növeli a **7** metántiolszulfonát reaktivitását, így lehetővé téve a sztérikusan gátolt 1-adamantil-S-glikozil-szulfénamid (**51**) képződését, noha kis hozammal (l. 6. táblázat).

3.3. Az új származékok szerkezetvizsgálata

Az új vegyületek anomer konfigurációit $^3J_{\text{H1-H2}}$ csatolási állandók alapján határoztuk meg, kivéve a manno-származékok esetén, ahol $^2J_{\text{H1-C2}}$ és $^3J_{\text{H1-C3}}$ csatolások igazolták egyértelműen a konfigurációt.

Az S-glikozil-N-szubsztituált szulfénamidok primer szerkezetét ^{15}N -HMBC mérésekkel bizonyítottuk; vegyes diszulfid-diszacharidokban az interglikozidos kötésen keresztüli konnektivitás tényét NOE és röntgendiffrakciós valamint standard analitikai mérések igazolták.

A vegyületek konformációs sajátosságait NMR, röntgendiffrakciós és CD módszerekkel tanulmányoztuk. Folyadékfázisban a glikopiranóz gyűrűk térbeli közelsége a vázprotonok közötti interannuláris NOE-k nyújtanak kvalitatív információt.

Szilárd fázisban a C1-S-S-C1' torziós szög értéke a röntgendiffrakciós adatok alapján $\sim 80^\circ$ -nak adódott, a másik két interglikozidos torziós szög pedig az exo-anomer effektus érvényesülését jelezte mindkét piranoz gyűrűben.

A CD mérések alapján az S-S diszulfid-kötés kiralitása oldatban és szilárd fázisban egyaránt *M*.

4. Összefoglalás

A kísérleti munka során eljárást dolgoztunk ki nem-szimmetrikus 1 \rightarrow 1' és 1 \rightarrow 6' diszulfid-diszacharidok szintézisére a **7** metántiolszulfonát tioaldózokkal való reakciójában. Új glikozil aril diszulfidok valamint glikopiranozil-szukcinimidoil-szulfid előállítását valósítottuk meg, vizsgáltuk ezen vegyületek glikoziltio- „donorként” való alkalmazását nem-szimmetrikus diszulfid diszacharidok szintézisében. Vizsgáltuk a

diszulfid-tiol cserereakciókat a **19** szimmetrikus diglükózil diszulfiddal vegyes diglükózil diszulfidok előállítására.

Glükózil aril- és alkil- szulfénamidokat állítottunk elő **7** metántiolszulfonátból. Vizsgáltuk a **19** szimmetrikus diszulfid S-S kötésének hasítását Ag^+ ion aktiválással glükózil aril- és alkil- szulfénamidok előállítására.

Tanulmányoztuk a vegyületek konformációs sajátosságait folyadék- és szilárd fázisban NMR, röntgendiffrakciós és CD módszerekkel.

5. Publikációk

Az értékezés alapjául szolgáló közlemények

1. László Szilágyi, **Tünde-Zita Illyés**, Pál Herczegh
Elaboration of a novel type of interglycosidic linkage: syntheses of disulfide Disaccharides
Tetrahedron Lett. **2001**, *42*, 3901-3903.
2. **Tünde-Zita Illyés**, Dóra Molnár-Gábor, László Szilágyi
Novel approaches to the syntheses of *N*-substituted *S*-glycosyl-sulfenamides,
Carbohydr. Res. **2004**, közlésre elfogadva.

Egyéb közlemény

3. László Szilágyi, **Tünde-Zita Illyés**, Zoltán Györgydeák, György Szabó, András Karácsony
Syntheses of partially hydrogenated [1, 2, 4]-triazolo-[4, 5-a]-pyrimidin-4-ones through cyclization of 2-arylidenehydrazino-6-methyl-4-pyrimidones
ARKIVOC, **2004**, közlésre elfogadva.

Az értékezés témájához kapcsolódó előadások, (E) és poszterek (P)

1. László Szilágyi, Pál Herczegh, Tünde-Zita Illyés
Elaboration of a novel type of interglycosidic linkage: syntheses of disulfide oligosaccharides: 8th Belgian Organic Syntheses Symposium, Ghent, July 10-14, 2000, Belgium (P)
2. Illyés Tünde-Zita, Herczegh Pál, Bényei Attila, Szilágyi László
Diszulfid diszacharidok szintézise és szerkezetvizsgálata: MTA Kém. Tud. Oszt., Szénhidrátkémiai Munkabizottság Előadóülése, Mátrafüred, 2001. május 14-16. (E)

3. Illyés Tünde-Zita, Herczegh Pál, Bényei Attila, Szilágyi László
Diszulfid diszacharidok szintézise és szerkezetvizsgálata: Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, 2001. június 27-29.(P)
4. Tünde-Zita Illyés, László Szilágyi, Pál Herczegh
Syntheses of disulfide-linked disaccharide mimics: 11th European Carbohydrate Symposium, Lisbon, September 2-7, 2001, Portugal (P)
5. László Szilágyi, Krisztina Fehér, Attila Bényei, Tünde-Zita Illyés
Conformational preferences in diglycosyl disulfides: 11th European Carbohydrate Symposium, Lisbon, September 2-7, 2001, Portugal (P)
6. Illyés Tünde-Zita, Molnár-Gábor Dóra, Szilágyi László
A glikozid kötés kiterjesztése: glikozil-diszulfidok és-szulfénamidok: VIII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Kolozsvár, 2002. november 15-17. (E)
7. Forgó Péter, Fehér Krisztina, Illyés Tünde-Zita, Szilágyi László
Diszulfidok-diszacharidok konformációjának vizsgálata MNR módszerekkel: Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, 2003. június 26-28. (P)
8. Kurtán Tibor, Illyés Tünde-Zita, Bényei Attila, Antus Sándor, Szilágyi László
Dikalkogenid-diszacharidok térszerkezetének vizsgálata oldatban és szilárd fázisban: Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, 2003. június 26-28. (P)
9. Tünde-Zita Illyés, Dóra Molnár-Gábor, László Szilágyi
Extension of the glycosidic bond: glycosyl disulfides and sulfenamides: 13th European Symposium on Organic Chemistry, Cavtat-Dubrovnik, September 10-15, 2003, Croatia (P)

Egyéb előadások és poszterek

10. Hadady Zsuzsa, Illyés Tünde-Zita, Szilágyi László, Somsák László, Docsa Tibor, Tóth Béla, Gergely Pál
Hetreocyclic derivatives of D-glucose as potential inhibitors of glycogen phosphorylase enzymes: MTA Kém. Tud. Oszt., Szénhidrátkémiai Munkabizottság Előadói ülése, Mátrafüred, 2002. május 21-23.(E)
11. Katalin E. Kövér, Krisztina Fehér, Tünde-Zita Illyés, László Szilágyi, Gyula Batta, Stefan Berger
Accurate determination of small one-bond heteronuclear residual dipolar couplings by modified heteronuclear correlation experiments: 44th ENC Conference, Savannah, GA, USA, March 30 – April 4, 2003 (P)

