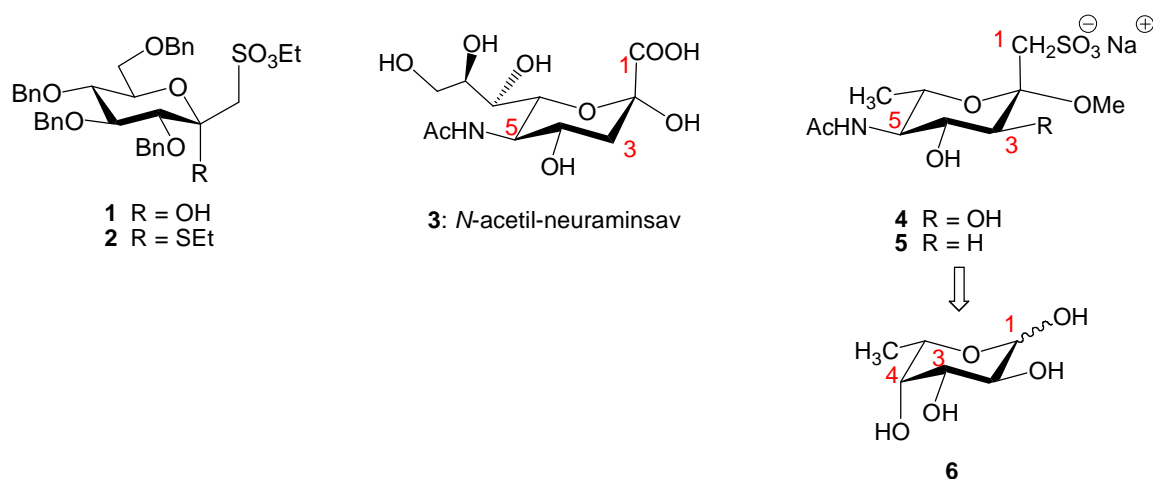


Kutatási zárójelentés a „Szénhidrát-szulfonsav típusú szíálsav-mimetikumok szintézise és neuraminidáz-gátló hatásuk vizsgálata” (K 62802) című pályázatról

1. Potenciálisan neuraminidáz-gátló vegyületek szintézise

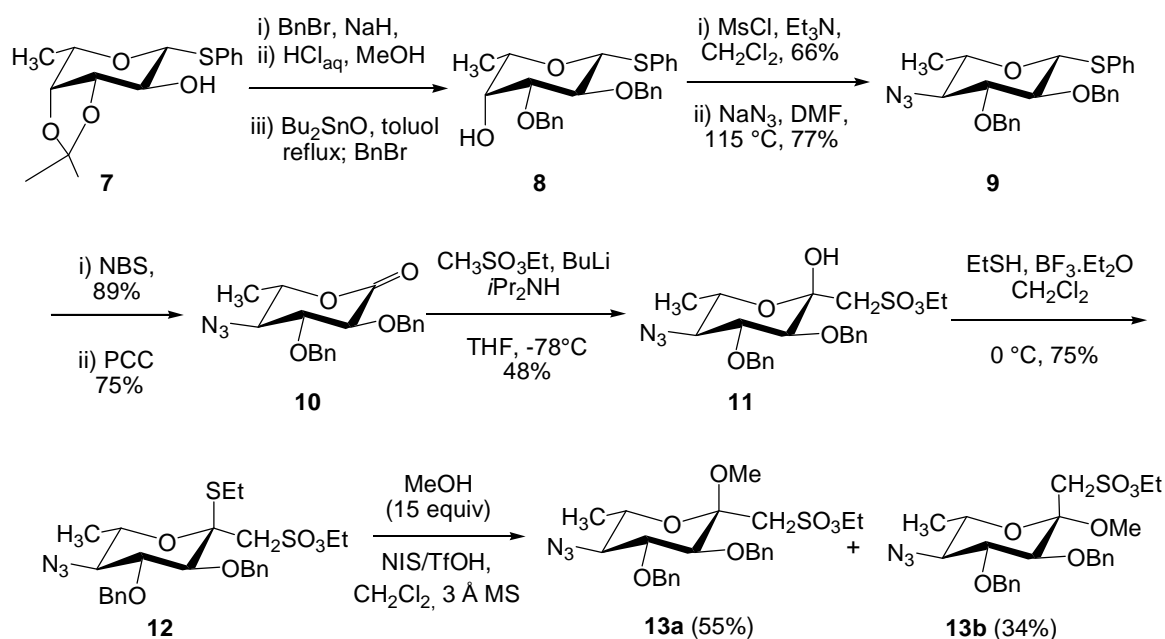
1.1. Az *N*-acetyl-neuraminsav szulfonsav mimetikumainak szintézise L-fukózból

Korábbi kutatásaink során tetra-*O*-benzil-Dglükózból kiindulva előállítottunk egy anomer helyzetű szulfonátometil-csoportot tartalmazó vegyületet (**1**), amelynek 2-etiltio származékát (**2**) felhasználtuk szulfonsav-tartalmú szelektin-antagonisták szintézisére.¹ Ezek a C-1 helyzetben szulfonsavat tartalmazó hept-2-ulózok (**1** és **2**) az *N*Ac-neuraminsav (**3**) első szulfonsav-analagonjainak tekinthetők, azonban számos szerkezeti elemet nélkülöznek (3-dezoxi-, 5-acetamido-funkció, ¹C₄ konformáció), amelyek vírusos vagy bakteriális fertőzéseknél szerepet játszhatnak a szénhidrát-fehérje kölcsönhatás kialakulásában. Ezért célul tűztük ki az *N*Ac-neuraminsav közelebbi analagonjainak szintézisét, amelyek potenciálisan neuraminidáz-gátló hatásúak lehetnek, valamint felhasználhatók a különböző felismerési folyamatokban kulcsszerepet játszó szíálsavtartalmú oligoszacharidok mimetikumainak előállítására is. Olyan származékot terveztünk, amely az anomer helyzetű szulfonsav-csoport mellett tartalmazza az 5-acetamido-csoportot és a konformációja is megfelel a szíálsav (**3**) ²C₅ konformációjának. Mivel a dezoxigenált származék (**5**) szintézise nehéz feladatnak tűnt, először, mintegy előtanulmányként, a 3-hidroxi vegyületet (**4**) is előállítottuk.² Kiindulási anyagként az L-fukózt használtuk (**6**), ami a 3-OH-t megfelelő térállásban tartalmazza, és axiális 4-OH csoportja lehetővé teszi az ekvatoriális térállású acetamid-csoport kialakítását egy inverzióval járó nukleofil szubsztitúcióval.



1. ábra. Korábbi kutatásaink során előállított szénhidrát-szulfonsavak (**1**, **2**), az *N*Ac-neuraminsav (**3**), az új szulfonsav-mimetikumok (**4**, **5**) és a kiindulási L-fukóz (**6**) szerkezete

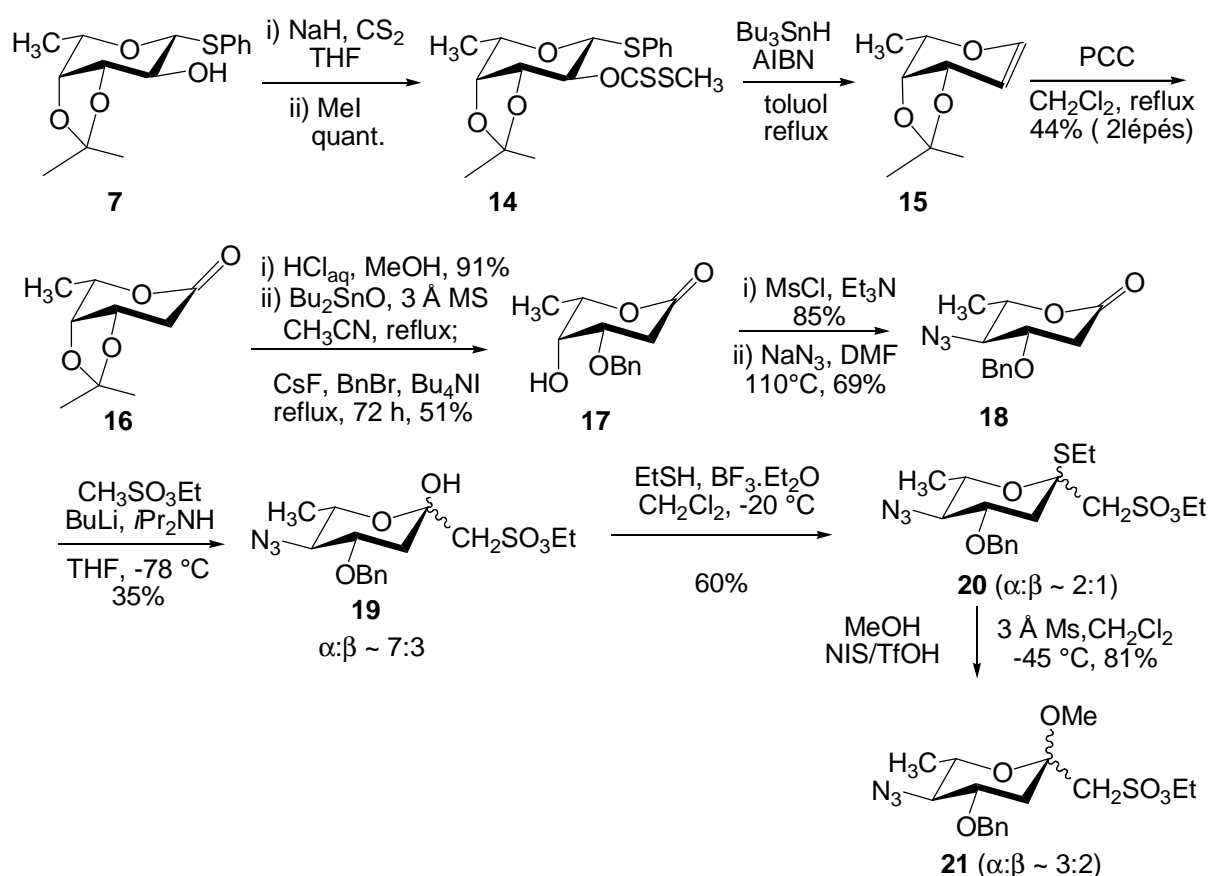
Mindkét szulfonsav-mimetikumot a fenil-3,4-*O*-izopropilidén-1-tio- α -L-fukopiranozidból (**7**) állítottuk elő. A nem-dezoxigenált származék szintézisénel metánszulfonil távozó csoportot alakítottunk ki a 4-OH származékon (**8**), majd a terméket nátrium-aziddal reagáltatva megkaptuk a 4-dezoxi-4-azid vegyületet (**9**). Ezután a feniltio-aglikont NBS-sel lehasítottuk, a keletkezett hemiacetált fukonsavlaktonná oxidáltuk (**10**), majd karbanion-addícióval kialakítottuk az anomer helyzetű etoxiszulfonilmetil-csoportot. A karbanion addíció a korábbi tapasztalatoknak megfelelően sztereoselektív módon adta az α -anomert, amiből a szokásos módon, etántiollal képeztük az α -etil-tio-származékot. Végül az anomer centrum fixálása céljából metil-glikozidot állítottunk elő; a reakcióban ~5:3 arányban képződött az α - és β -anomer (**13a** és **13b**, 2. ábra).



2. ábra A nem-dezoxigenált szulfonsav-mimetikumok szintézise L-fukózból

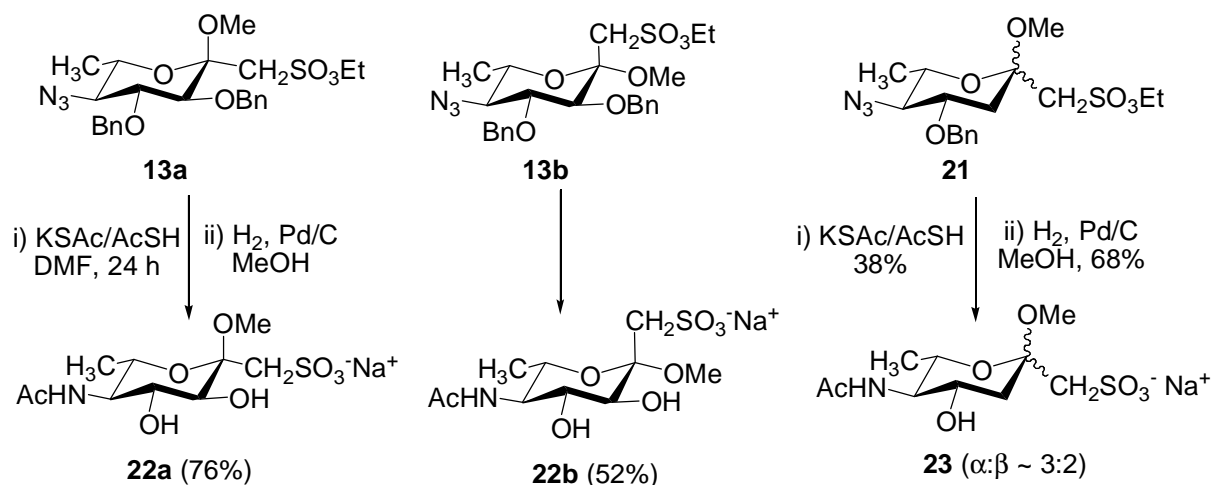
A 3-dezoxi-mimetikum szintézisénel (3. ábra) először 2-*O*-xantogenát származékot képeztünk (**14**), majd gyökös redukzív eliminációval egy lépésben elvégeztük a dezoxigenálást és az aglikon eltávolítását. Az így nyert **15** glikált piridinium-klórkromáttal 2-dezoxi-laktonná oxidáltuk (**16**), majd két lépésben előállítottuk az azid-bevitelre alkalmas 4-OH származékot (**17**). A további átalakítások során a metánszulfonsav-etilészterrel végzett reakciónál (**18**→**19**) lényeges különbséget tapasztaltunk a **11** vegyület előállításához képest: a karbanion-addíciós reakcióban anomerkeverékként képződött a **19** származék (α : β ~7:3),

amit a 2-helyzetű szubsztituens hiányával magyaráztunk. Az azonos kromatográfiás mobilitású anomereket nem sikerült szétválasztani, így keverékkel végeztük el a tioglikozidképzést. A reakció a szokásos hőmérsékleten (0 °C-szobahő) sikertelen volt, de -20 °C-on elfogadható hozammal adta a kívánt **20** terméket, $\alpha:\beta \sim 2:1$ arányban. A tioglikozidból metilglikozidokat képeztünk (**21**), $\alpha:\beta \sim 3:2$ anomer-aránnyal.



3. ábra. A 3-dezoxi-szulfonsav-mimetikumok szintézise L-fukózból

A szintézisút utolsó szakaszában az azidcsoport acetamiddá alakítását és a védőcsoportok eltávolítását végeztük el. Kálium-tioacetát és tioecetsav reagenskombinációval az azidcsoport redukciója és a képződő amin acetilezése egy reakcióelegyben végbemegy. Az irodalmi módszer a mi esetünkben is kiválóan működött, ráadásul az erősen nukleofil AcS⁻ ion egyúttal a szulfonsav-észterek etilcsoportját is lehasította. A benzilétereket katalitikus hidrogénezéssel távolítottuk el, így megkaptuk a tervezett **22** és **23** szulfonsav-mimetikumokat² (4. ábra).



4. ábra. Acetamidképzés és a védőcsoportok eltávolítása

A metil-glikozid formában előállított vegyületek neuraminidáz-gátló hatását megvizsgáltuk *Clostridium perfringens* neuraminidázon.² A 3-OH származékok (**22a,b**) inaktívnak bizonyultak, a 3-dezoxi származék (**23**) viszont mmol-os koncentrációban reprodukálható enzimgátlást mutatott (IC₅₀ = 4,6 mMol). Ennek alapján feltételezzük, hogy a **23** szerkezet megfelelően helyettesítheti oligoszacharidokban az NAc-neuraminsavat, és így megfelelő származéka felhasználható szialilezett oligoszacharidok új szulfonsav-mimetikumainak előállítására. A megvalósított szintézis bonyolultsága és csekély hozama miatt azonban hatékonyabb szintézisút kidolgozására van szükség.

Előállítottunk néhány 3-dezoxi-3-szulfonátometil-L-ramnozid-származékot is, amelyek mutattak kis mértékű neuraminidáz-gátlást, de a **23** vegyület aktivitását nem érték el.

1.2. Az N-acetil-neuraminsav szulfonsav mimetikumainak szintéziséhez kapcsolódó egyéb eredmények

Mivel az 1-dezoxi-1-szulfonil-heptulóz származékok nem tartalmazznak protont a glikozidos szénatomon, ezért anomer konfigurációjuk meghatározása a szokásos proton-proton csatolási állandó helyett a C-1 és H-3 között három kötésen át ható csatolási állandó (³J_{C1,H3}) alapján történt.¹ A proton-szén három kötésen át ható csatolási állandók a Karplus-összefüggésnek megfelelően a C₁ és H₃ torziós szögének függvényében változnak. A kis csatolási állandók (**1**: ³J_{C1,H3}=2,1Hz, **2**: ³J_{C1,H3}=2,7Hz; 1. ábra) alapján egyértelmű volt a C1 és H3 csoportok szin térállása, vagyis a vegyületek α-konfigurációja.¹ A későbbiekben néhány származéknál ellentmondásos eredményt kaptunk, ezért részletesen megvizsgáltuk,

milyen korlátokkal alkalmazhatók a $^3J_{C1,H3}$ értékek ketozil-glikozidok szerkezetének meghatározására.^{3,4} Megállapítottuk, hogy anomer párok esetében a C1 és H3 szinklinális elrendeződésénél (*cisz*-csatolás) mindig kisebb a $^3J_{C,H}$ érték, mint az antiperiplanális elrendeződésénél (*transz*-csatolás), ám általában elég kis különbség (1-2 Hz) van a két érték között. Ha csak az egyik anomer áll rendelkezésre, akkor a $^3J_{C,H}$ mérésen kívül ajánlott más módszerekkel is – pl. NOE mérésekkel, röntgendiffrakciós vizsgálatokkal – bizonyítani a szerkezetet.)

Tanulmányoztuk az anomer helyzetű szulfonátometil-csoportot tartalmazó tioglikozidok és glikozil-halogenidek glikozilezési reakcióit.^{4,5} Megállapítottuk, hogy kis reaktivitású akceptorok esetén a megfelelő glikozil-kloriddal lehet a leghatékonyabban glikozilezni (ekkor a legkisebb az eliminációs mellékreakció részaránya). Az eredményeket hasznosítva előállítottuk a szialil Lewis X egy új, szulfonsav-tartalmú tetraszacharid mimetikumát.⁵

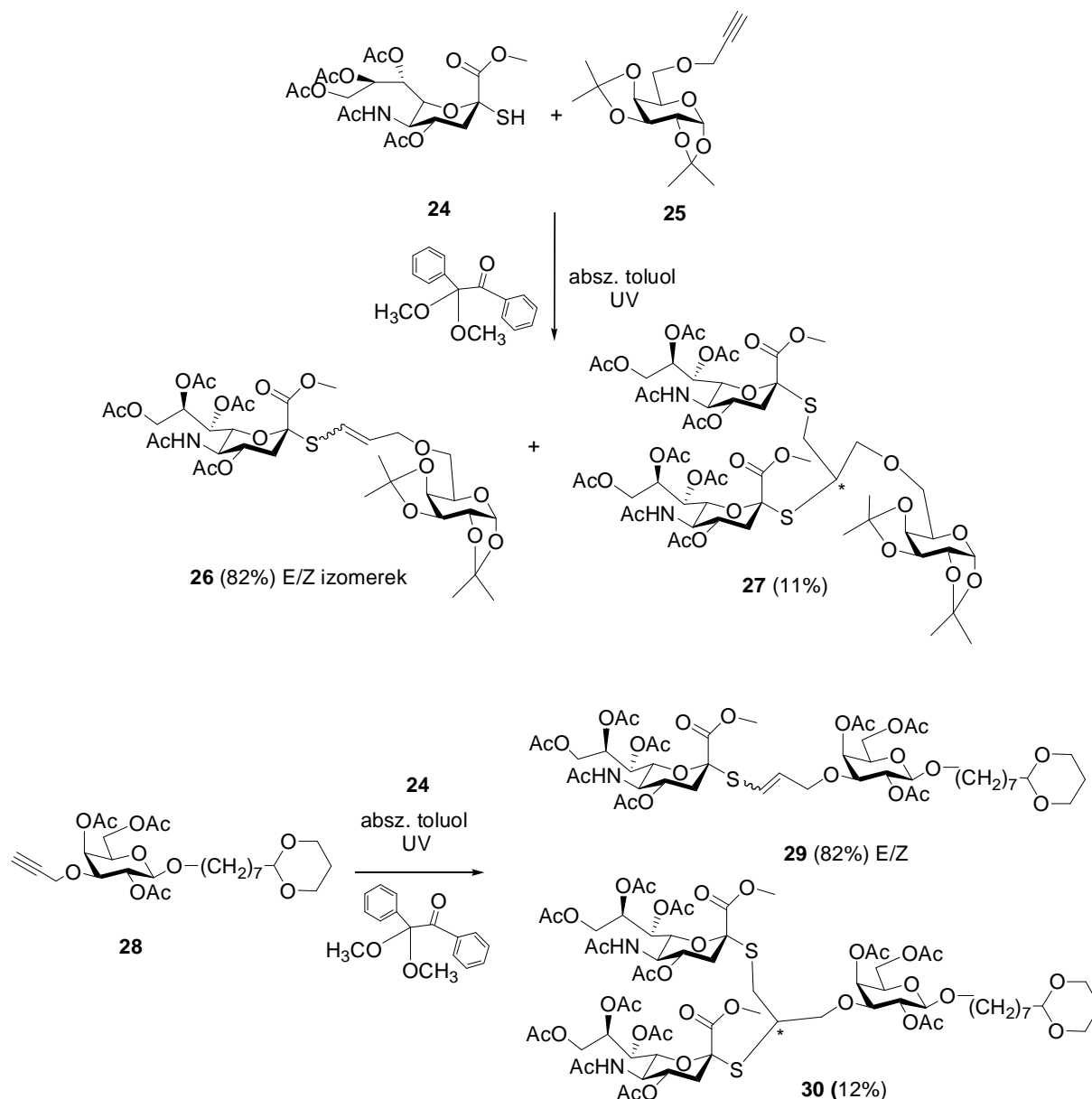
Előállítottuk a tumor-markerként ismert N-acetil-neuraminsav-tartalmú tetraszacharid, a szialil Lewis^a két szulfonsav mimetikumát. A szialil Lewis^a molekulában - a szialil Lewis^x tetraszacharidhoz hasonlóan - a galaktozil egység 3-as hidroxilját glikozilezi a szialinsav. Az előállított mimetikumokban a szialilezett galaktozil diszacharid-részletet galaktozil-3-C-szulfonsav monoszachariddal helyettesítettük, a szulfonsav-csoport megfelelő sztereokémiájú kialakítását kétszeres nukleofil szubsztitúcióval valósítottuk meg.⁶

1.3. Sziálsav-tioglikozid tartalmú oligoszacharidok előállítása tio-click reakcióval

Az előállított származékok gyenge neuraminidáz-gátló hatása miatt, a kutatási tervet módosítva, sziálsav-tioglikozid-tartalmú oligoszacharid mimetikumok szintézisét valósítottuk meg tio-click reakcióval (A. Dondoni, *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (2008) 8995-8999.) Az alkalmazott gyökös tiol-addíció annyiban hasonlít a jól ismert azid-alkin click reakcióra, hogy melléktermék nélkül, enyhe körülmények között, kvantitatív módon adja a terméket. Az általunk választott módszert (2 tiol 1,2-addíciója alkinra) szénhidrátokon még nem alkalmazták. Ez a munkánk kezdeti stádiumban van (a reakció kvantitatív megvalósítása modell-vegyülettel működött, sziálsav származékkal problematikusnak bizonyult). Eddig galaktóz 6-os és 3-as helyzetéhez csatlakoztattunk egy vagy két sziálsav-2-tio egységet (5. ábra).

A vegyületek potenciális inhibitorai lehetnek szelektineknek, valamint az influenzavírus, rotavírus és a *H. pylori* sziálsav-kötő fehérjéinek, így gyulladáscsökkentő,

antivirális és antibakteriális hatást mutathatnak. Az eredményeket még csak konferenciákon mutattuk be.⁷



5. ábra. Galaktóz 3-as és 6-os helyzetében 2-tio-sziálsavat tartalmazó pseudo di- és triszacharidok szintézise

2. A véralvadásgátló hatású idraparinux pentaszacharid szulfonsav-mimetikumainak szintézise

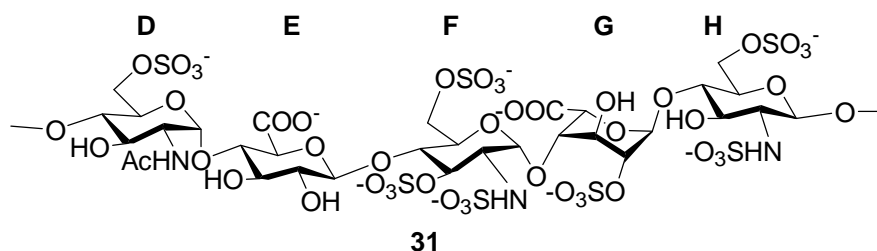
A tervezett kutatások kiterjesztéseként egy újabb biológiai célterületen is hasznosítani akartuk a szénhidrát-szulfonsavak szintézisében szerzett tapasztalatokat. Az irodalomból ismert legjobb antitrombotikus hatású szintetikus heparinoid pentaszacharidot, az idraparinuxot vezérmolekulának tekintve új típusú antitrombotikumok kifejlesztését

határoztuk el. Ezek a kutatások szintetikus és biológiai hatást tekintve is nagyon sikeresnek bizonyultak, és jelenleg is folyamatban vannak.

2.1. Irodalmi előzmények: a heparin véralvadásgátló hatása és szintetikus antitrombotikus pentaszacharidok szintézise

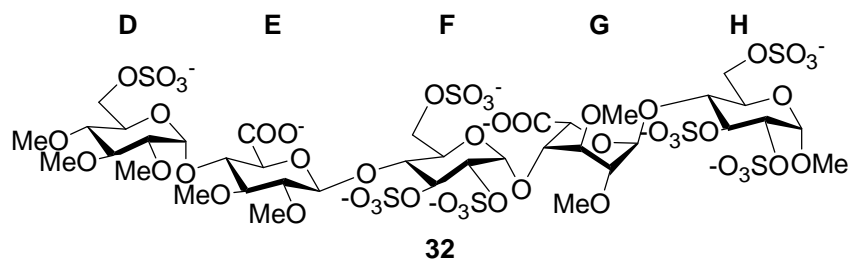
A heparin poliszacharid véralvadásgátló hatását már felfedezésekor, 1916-ban felismerték, és javasolták alkalmazását koagulációs rendellenességek kezelésére. Erre azonban csak kb. két évtizeddel később, a megfelelő tisztítási eljárás kidolgozása után került sor. A sertésbélből izolált heparin és alacsony moltömegű, frakcionált formája azóta is a legáltalánosabban használt antitrombotikum, ám az alkalmazásával kapcsolatos problémák (intravénás adagolás, súlyos mellékhatások) miatt az 1980-as években gyógyszergyárak által is támogatott intenzív kutatások kezdődtek szintetikus antitrombotikumok előállítására.

A szintetikus antitrombotikumokhoz vezető első fontos felfedezés az antitrombin III (AT-III) és a heparin közötti kölcsönhatás felismerése volt. Az AT-III a véralvadási kaszkád egyik szerin proteáz inhibitora, feladata a trombin és Xa faktor gátlása. A heparin antitrombotikus hatása abból származik, hogy aktiválni képes az AT-III fehérjét. A kutatások következő állomása a heparin antitrombin-kötő pentaszacharid egységének (31) izolálása és azonosítása volt. Kiderült, hogy ez a pentaszacharid közvetett szelektív Xa gátló, vagyis hozzákötődik az antitrombinhoz, ami ennek következtében a véralvadási faktorok közül kizárólag a Xa faktort gátolja. A Sanofi és Organon közös gyógyszerkutatási programjának keretében francia és holland kutatók 55 lépéses szintézissel előállították az antitrombin-kötő pentaszacharid módosított analógját, ami a klinikai vizsgálatokban alapján kiváló antikoaguláns szernek bizonyult: kisebb dózisban, ritkább adagolás mellett jobb antitrombotikus hatást mutatott, mint a frakcionált heparin. A vegyület Arixtra márkanéven vált gyógyszerre 2001-ben.



6. ábra. A heparin antitrombin-III kötő pentaszacharid egysége

Az Arixtra rendkívül nehéz szintézise miatt folytatódtak az egyszerűbb szerkezetű származékokra irányuló kutatások. Az eddig előállított legjobb hatású szintetikus antikoagulánsnak a „nem-glikózamino-glikán” szerkezetű idraparinux (32) bizonyult. A vegyületben a glükózamin egységeket glükózzal helyettesítették, ami nagy mértékben leegyszerűsítette a szintetikus munkát.

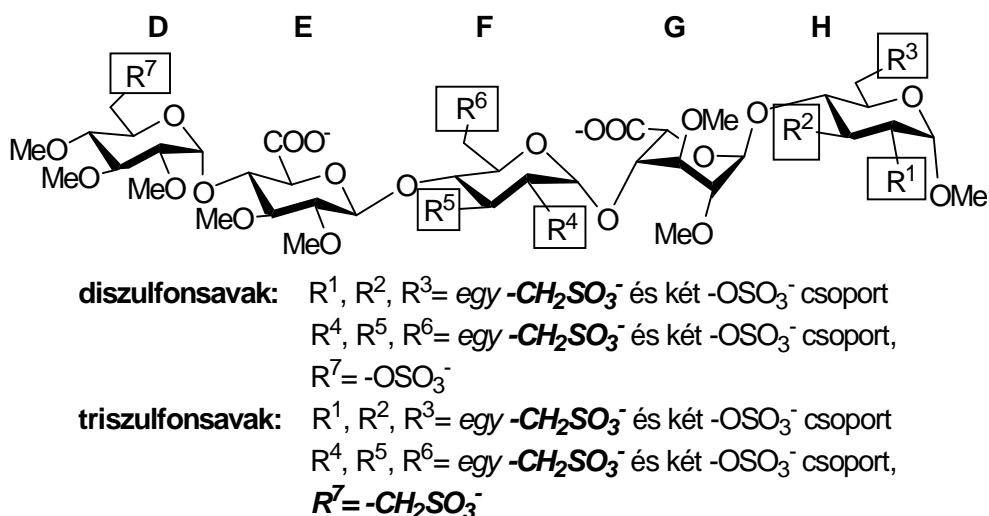


7. ábra. Az idraparinux szerkezete

2.2. Célkitűzés

Kutatásainkhoz az idraparinuxot választottuk vezérmolekulának. Célul tűztük ki, hogy a pentaszacharid-antitrombin kötődésben kulcsszerepet játszó szulfátésztereket (OSO_3^-) szisztematikusan bioizoszter szulfonátometil-csoportokkal ($CH_2SO_3^-$) helyettesítve di- és triszulfonsav-mimetikumokat állítunk elő. A heparin hatás-szerkezet összefüggéseinek vizsgálata alapján ismert, hogy a szulfátészterek nem helyettesíthetők foszfátészterekkel vagy karbonsavakkal. A szulfonsavakkal történő helyettesítést azonban nem vizsgálták. Úgy véltük, hogy a szulfátészterek bioizoszter szulfonsavakkal történő helyettesítése hatásos mimetikumokat eredményezhet. Van erre utaló irodalmi példa: mannóz-6-foszfátok bioizoszter foszfonsav és szulfonsav analogonjai hatékonyan kötődnek kation-független mannóz-6-foszfát receptorokhoz.

Az idraparinux a D egységén egy, az F és H egységén három-három szulfátésztert tartalmaz, ezek közül két vagy három csoport helyettesítését terveztük oly módon, hogy egy cukoregységen legfeljebb egy cserét hajtunk végre, a többi helyen pedig megtartjuk a szulfátészter csoportokat (8. ábra). A pentaszacharidok szintézise előtt az EF és GH diszacharid fragmentumok, valamint a DEF triszacharid fragmentum mimetikumainak előállítását terveztük, hogy megfelelő jártasságot szerezzünk a szulfonsav- és uronsav-tartalmú oligoszacharidok szintézisében.

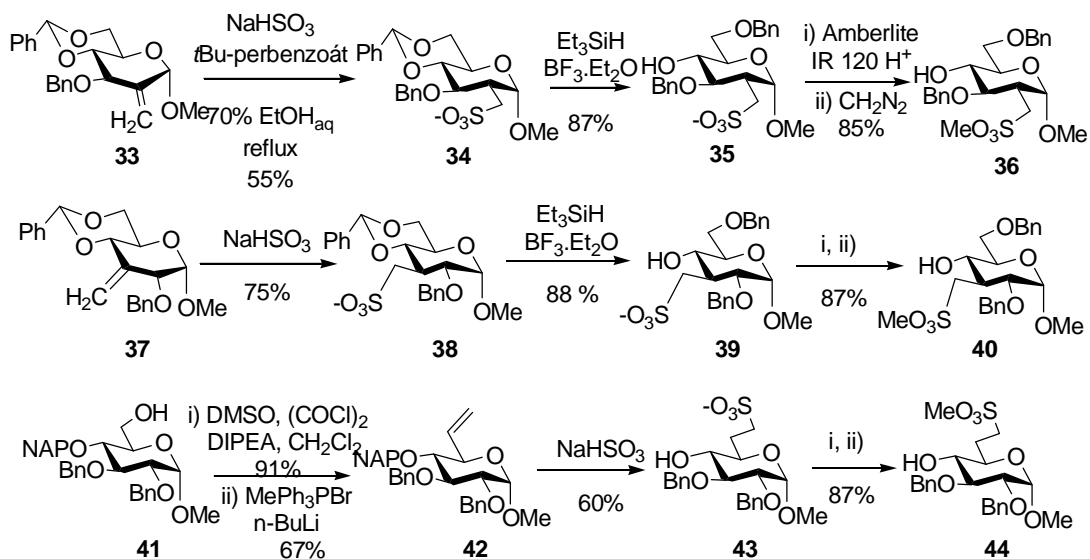


8. ábra. Az idraparinux bioizoszter szulfonsav mimitikumai, tervezett szerkezetek

2.3. Az EF és GH diszacharid-fragmensek szulfonsav mimitikumainak szintézise

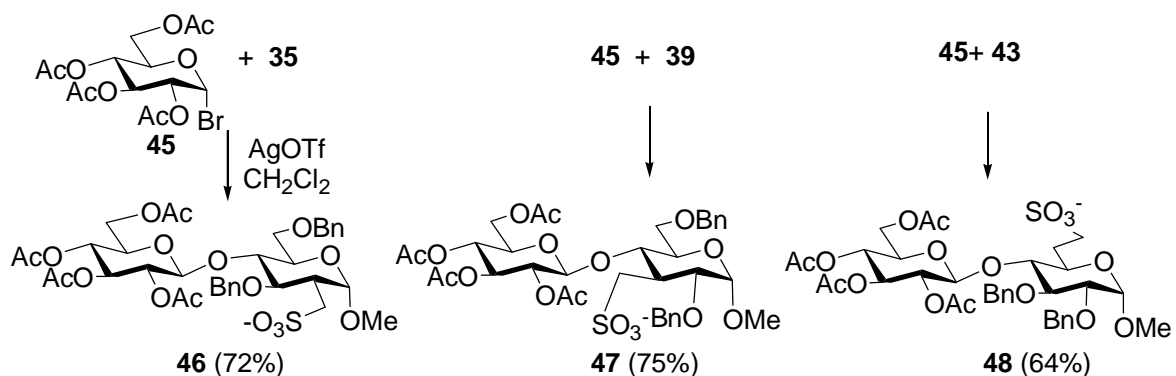
Az antitrombin-kötő pentaszacharid a glükóz-egységeken kívül egy D-glükuronasav és egy L-iduronsav építőelemet tartalmaz, ezek beépítése többféle módon történhet. Használhatunk glükuronasav vagy iduronsav donorokat, de végezhetjük a glikozilezést a megfelelő idóz vagy glükóz építőelemmel, és az uronsavvá oxidálást di-, tri vagy akár pentaszacharid-szinten is végrehajthatjuk. A leghatékonyabb módszer megtalálása céljából előállítottuk a célvegyületek di- és triszacharid fragmentumait.⁸⁻¹⁰

Elsőként a C-2, C-3 és C-6 helyzetben szulfonometilezett és megfelelően védett glükozidokat állítottuk elő akceptor formában (9. ábra). A szintézis megfelelően védett glükóz származékokból indult (**33**, **37**, **41**), kulcslépése az exometilén-csoportokon végrehajtott $NaHSO_3$ addíció volt. A reakció mechanizmusa régóta ismert, gyökös láncreakcióban szulfit-gyökanion kapcsolódik a kettős kötés láncvégi szénatomjához. A regioszelektivitás mellett a **37** és **38** származéknál kiváló sztereoselektivitást is tapasztaltunk, kizárólag ekvatoriális szulfonátometil-csoportot tartalmazó származékok képződtek. A **34** és **38** származékokból a benzilidén-gyűrű regioszelektív redukciójával jutottunk a szabad 4-OH csoportot tartalmazó akceptorokhoz, a **42** vegyületből pedig közvetlenül megkaptuk az akceptorként használható származékot (**43**). A szulfonsav-sókból (**35**, **39**, **43**) a sav felszabadítását követő diazometános metilezéssel szulfonsavésztereket állítottunk elő (**36**, **40**, **44**), és a továbbiakban mind a só-, mind az észter-formájú származékokat glikozileztük.



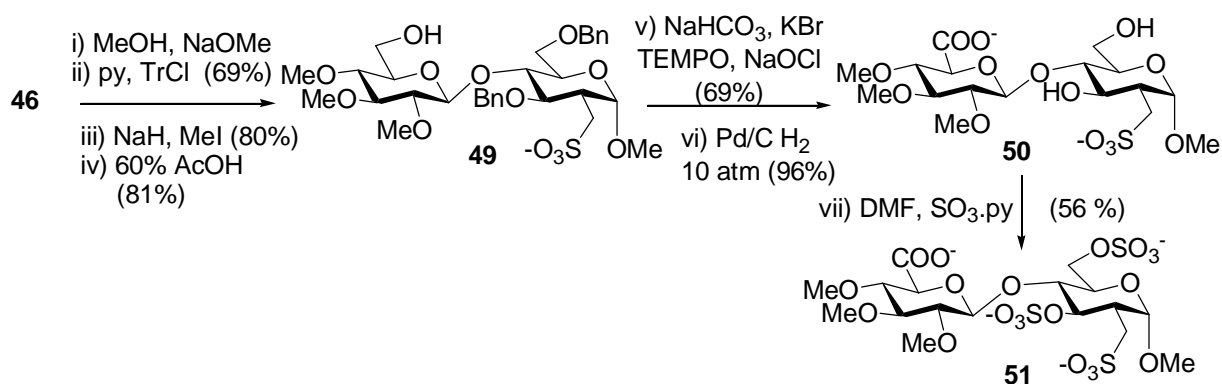
9. ábra Szulfonsav-tartalmú akceptorok szintézise

Az EF diszacharidok szintézise során a szulfonsavakat Na-só formájában használtuk akceptorként, és ezeket a származékokat acetobrom-glükózzal (**45**) jó hozammal glikozileztük (10. ábra).



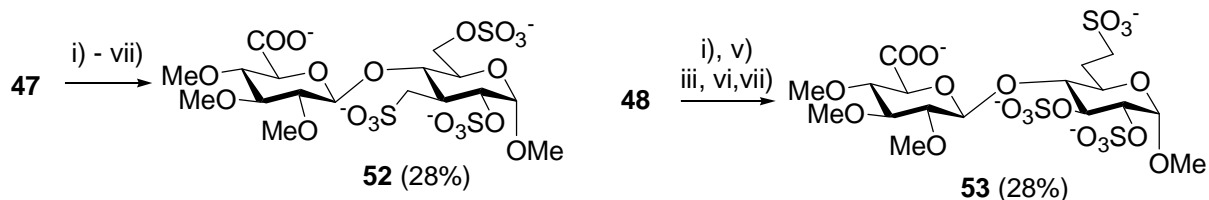
10. ábra. A szulfonsav-sók glikozilezése acetobrom-glükóz donorral

Ezt követően a 2-es helyzetű szulfonátometil-csoportot tartalmazó **46** diszacharidon dezacetilezés és tritilezés után kialakítottuk a három metiléter funkciót (**49**), majd a „D”-egységet detritileztük és glükuronsavvá oxidáltuk, ezután eltávolítottuk a benzil védőcsoportokat (**50**), végül a szabad hidroxilcsoportok szulfatálásával megkaptuk az első szulfonsavtartalmú EF diszacharid származékot (**51**, 11. ábra).



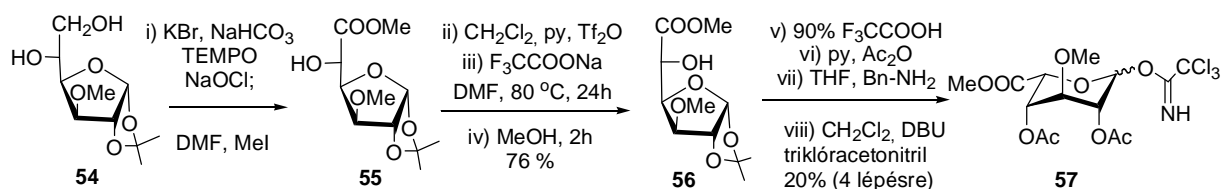
11. ábra. Oxidáció glükuronsavvá diszacharid-szinten; az első EF szulfonsav-fragmentum

Ezt a reakciút követve a **47** diszacharidból sikeresen állítottuk elő a 3-dezoxi-3-szulfonátometil származékot (**52**, 12. ábra). A 6-os helyzetű szulfonátometil-csoportot tartalmazó származék (**48**) esetében azonban dezacetilezést követően a tritilezési reakciót nem tudtuk végrehajtani, ezért a reakciólépések sorrendjét megváltoztattuk. Először szelektív oxidációval előállítottuk a glükuronsavat, majd ezután alakítottuk ki a metilétereket. Ez a reakciút rövidebb volt (elmaradt a tritilezési és detritilezési lépés), de kockázatosabb, mert az uronsavak bázikus körülmények között (pl. alkilezésnél) könnyen β -eliminációt szenvedhetnek. Szerencsére ebben az esetben nem történt elimináció a metilezési lépésben, és végül elfogadható összhozammal izoláltuk a harmadik EF származékot (**53**).^{8,9}



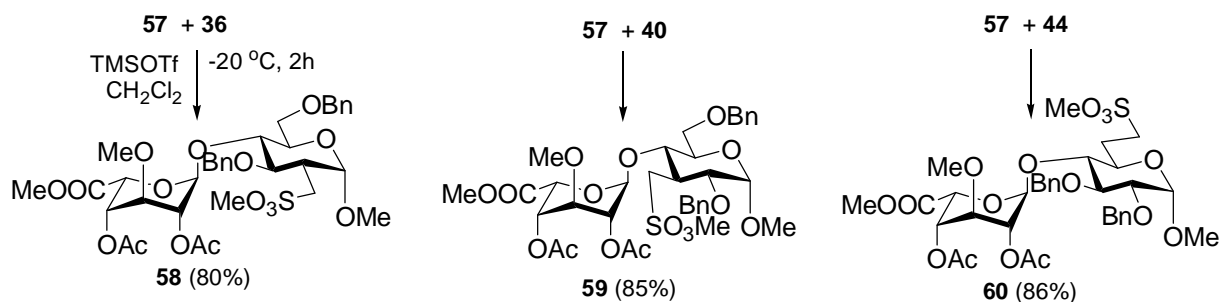
12. ábra. Oxidáció glükuronsavvá diszacharid-szinten; EF szulfonsav-fragmentumok

A tervezett GH fragmentumok szintéziséhez az **54** D-glükofuranóz-származékból irodalmi módszereket követve előállítottuk az **57** L-iduronsav donort (13. ábra).



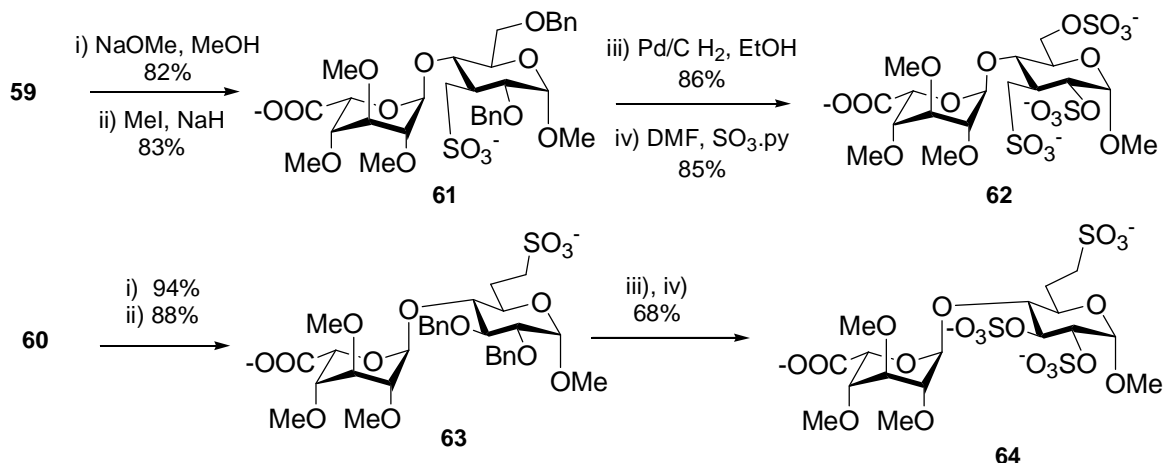
13. ábra. Az L-idopirauronsav donor szintézise

Az iduronsav-donorról a szulfonsavtartalmú akceptorok észter formáit (**36**, **40**, **44**) glikozileztük (14. ábra), mivel a só-formájú akceptorokkal végzett glikozilezések eredménytelenek voltak. A donor 2-es helyzetű résztvevő csoportja biztosította a reakciók sztereoselektivitását, így kiváló hozammal képződtek az 1,2-transz interglikozidos kötést tartalmazó diszacharidok (**58**, **59**, **60**).



14. ábra. A szulfonsavészter akceptorok glikozilezése iduronsav donorról

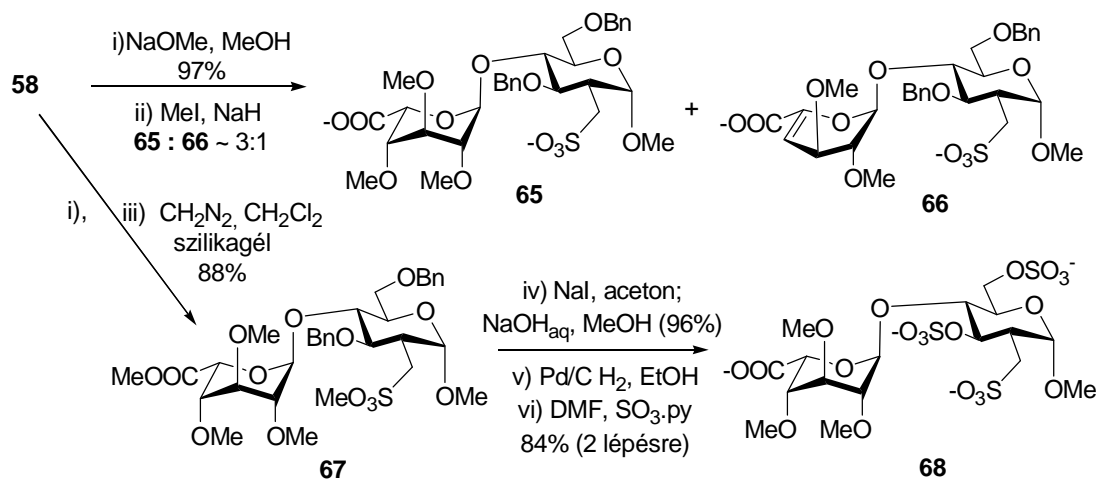
Az uronsav-tartalmú diszacharidokon már csak a metiléter- és a szulfátészter-csoportok kialakítása volt hátra. Az **59** és **60** vegyületekből dezacetilezés és metilezés után kiváló hozammal kaptuk a trimetilezett származékokat (**61**, **63**), amelyekből két lépésben eljutottunk az idraparinux GH fragmensének 3-dezoxi-3-szulfonátometil- (**62**) és a 6-dezoxi-6-szulfonátometil-analogonjához (**64**, 15. ábra).



15. ábra. Az iduronsav-tartalmú diszacharidok átalakítása

A 2-szulfonátometil-csoportot tartalmazó származék (**58**) NaH-del végrehajtott metilezése során azonban β -eliminációt tapasztaltunk, és a kb. 30%-ban képződött eliminációs terméktől (**66**) nem tudtuk megtisztítani a **65** trimetil-származékokat (16. ábra). Az elimináció elkerülése céljából a metilezést enyhén savas közegben, diazometánnal hajtottuk

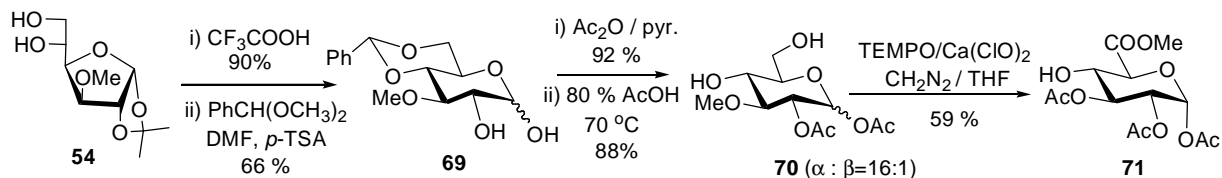
vége. A szilikagéllal aktivált reakció több napot vett igénybe, de végül jó hozammal eredményezte a kívánt **67** származékot, amelyből sóképzés, katalitikus hidrogénezés és szulfatálás után kiváló hozammal nyertük a harmadik GH diszacharid-szulfonsavat (**68**).^{8,9}



16. ábra. A 2-szulfonátometil-tartalmú GH diszacharid szintézise

2.4. A DEF triszacharid-fragmens szulfonsav mimetikumainak szintézise

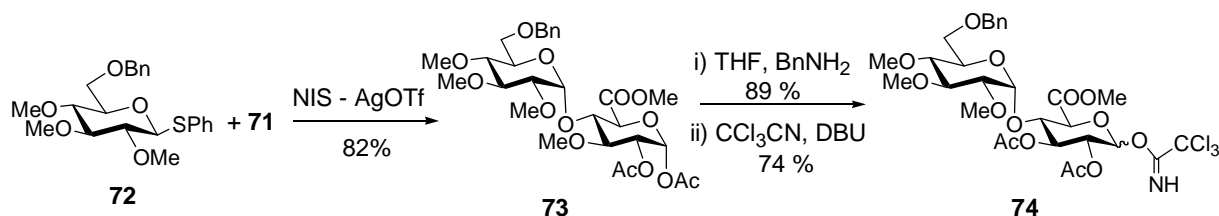
Az idraparinux pentaszacharid szintézisében az egyik nehéz feladat a D és E, valamint az F és G egységek közötti α -glükozidos kötés kialakítása. Ennek a problematikus kötéstípusnak a kialakítását először triszacharid-szinten kívántuk tanulmányozni, ezért előállítottuk a DEF triszacharid három szulfonsav analogonját. A szintézist úgy terveztük, hogy egy közös DE donorral glikozilezzük a háromféle, 2-, 3- és 6-szulfonátometil-tartalmú glikozil-akceptort. A DE donorhoz az E-egységet uronsav-akceptor formájában (**71**) állítottuk elő a már korábban is alkalmazott **54** glükofuranóz származékból (17. ábra).



17. ábra Az E glükuronsav-akceptor építőelem szintézise

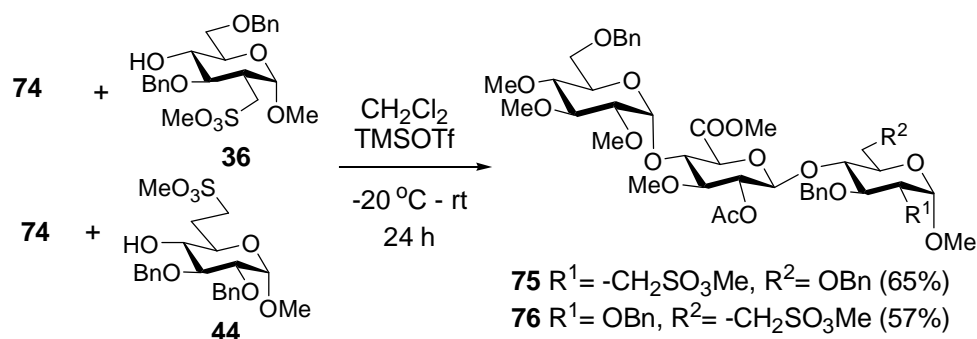
A **71** uronsavat az egyszerűen előállítható **72** feniltio-glükoziddal glikozilezve jó hozammal nyertük a kívánt **73** diszacharidot. A kiváló α -szelektivitást a donor 2-es helyzetű

nem-résztevő csoportja, és az uronsav-akceptor kis reaktivitása együttesen eredményezte. A **73** diszacharidot két lépésben a **74** triklóracetimidát-donorra alakítottuk át (63. ábra).



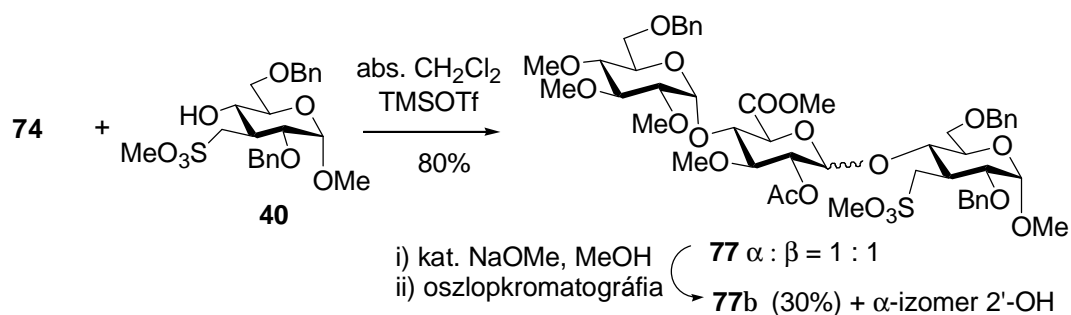
18. ábra A DE diszacharid donor szintézise

A DE donorról glikozileztük a **36** és a **44** szulfonsav-tartalmú akceptorokat, és jó hozammal nyertük a triszacharidokat, a várt β -kötéssel az E és F egységek között (**75**, **76**, 19. ábra).



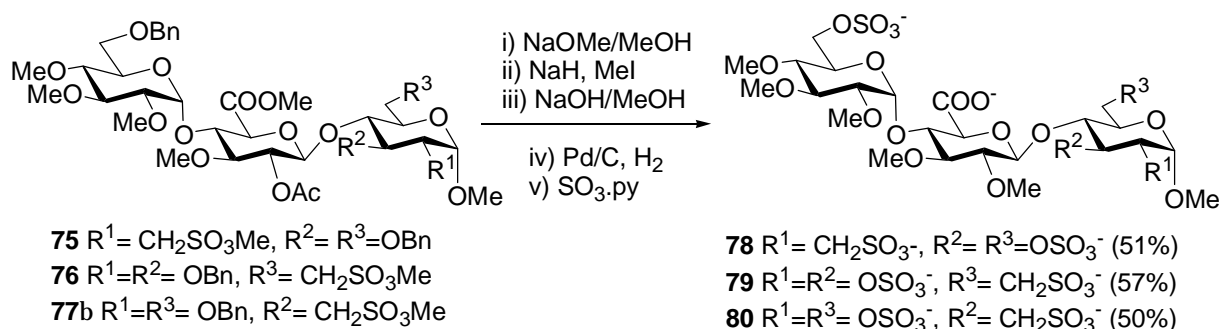
19. ábra A C-2 és C-6 szulfonátometil tartalmú akceptorok glikozilezése a DE donorról

A C-3-szulfonátometil akceptor (**40**) glikozilezése azonban meglepő eredményt hozott. A donor 2-es helyzetű résztvevő-csoportja nem biztosította a várt β -szelektivitást, a reakcióban 1:1 arányban alakult ki α -és β -interglikozidos kötés (20. ábra), ráadásul a **77** anomerkeverékét nem tudtuk kromatográfiásan szétválasztani. Szerencsére a Zempléndezacetilezésnél jelentős reaktivitásbeli különbség mutatkozott az anomerek között, és az α -anomer kemoszelektív dezacetilezése után sikerült a **77b** származékot tiszta formában izolálni.



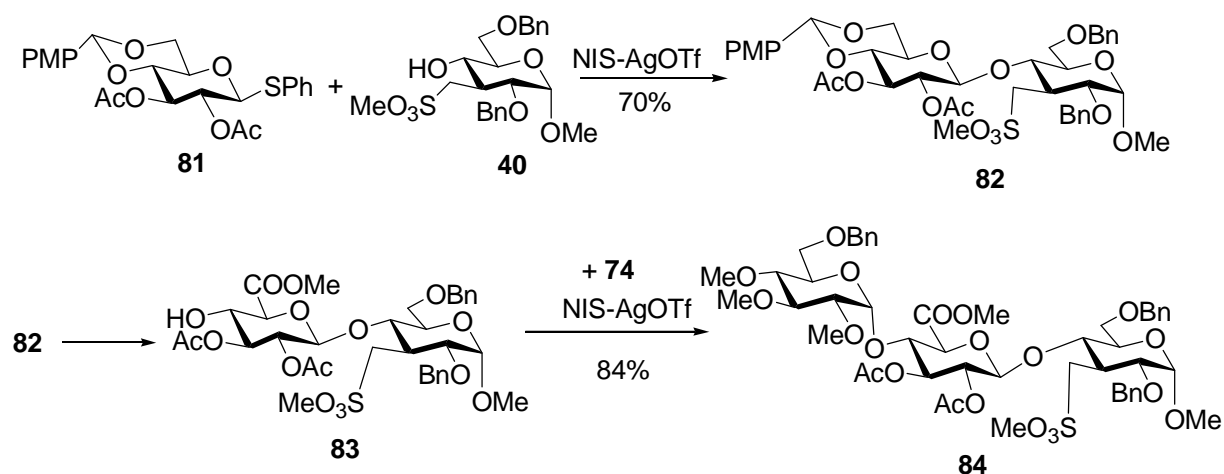
20. ábra. A C-3 szulfonátometil tartalmú akceptor glikozilezése a DE donorról

A dezacetilezés és metilezés, valamint a katalitikus hidrogénezést követő szulfatálás mindhárom triszacharidnál kiváló hozammal ment végbe, így sikeresen izoláltuk az idraparinux DEF triszacharid egységének három szulfonsav mimetikumát (**78-80**, 21. ábra).¹⁰



21. ábra. A DEF triszacharid szulfonsav-mimetikumai

Látható, hogy a triszacharidok szintézise során az 1,2-cisz kötésű DE diszacharidot kiváló hozammal tudtuk előállítani, ugyanakkor a C-3-szulfonsavat tartalmazó származék (**40**) glikozilezésénél váratlan szelektivitási problémába ütköztünk, amelyet meg kellett oldanunk, hogy esélyünk legyen a megfelelő pentaszacharid mimetikum szintézisére. Úgy véltük, hogy a **40** akceptor β -oldalon lévő C-3 helyzetű szulfonometil csoportja és a **74** uronsav-donor szintén β -oldali karboxilcsoportja közötti taszítás gátolja a β -glikozidos kötés kialakulását (20. ábra). A kedvezőtlen szterikus hatások kiküszöbölésére kidolgoztunk egy új reakcióutat, melynek során először előállítottuk a karboxil-funkciót nem tartalmazó EF-diszacharidot (**82**), és az E egység uronsavvá alakítását diszacharid-szinten végeztük el. A módosított szintézisútnak csak a glikozilezési lépéseit emeltem ki a 22. ábrán. Először egy nem-uronsav donort (**81**) alkalmazva jó sztereoselektivitással előállítottuk a **82** származékot (a reakció β -szelektivitása megerősítette a szterikus gátlásra vonatkozó feltételezéseket), majd az E egységet uronsavá oxidáltuk és felszabadítottuk a 4'-OH csoportot (**83**). Az így nyert akceptort a korábban is alkalmazott **74** donorral glikozilezve jó összhozammal izoláltuk a **84** triszacharidot.¹⁰

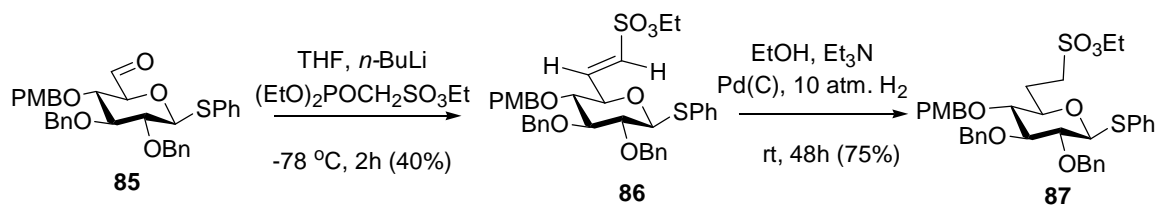


22. ábra. A C-3 szulfonátometil tartalmú DEF triszacharid új szintézise

2.5. Az idraparinux diszulfonsav és triszulfonsav mimetikumának szintézise

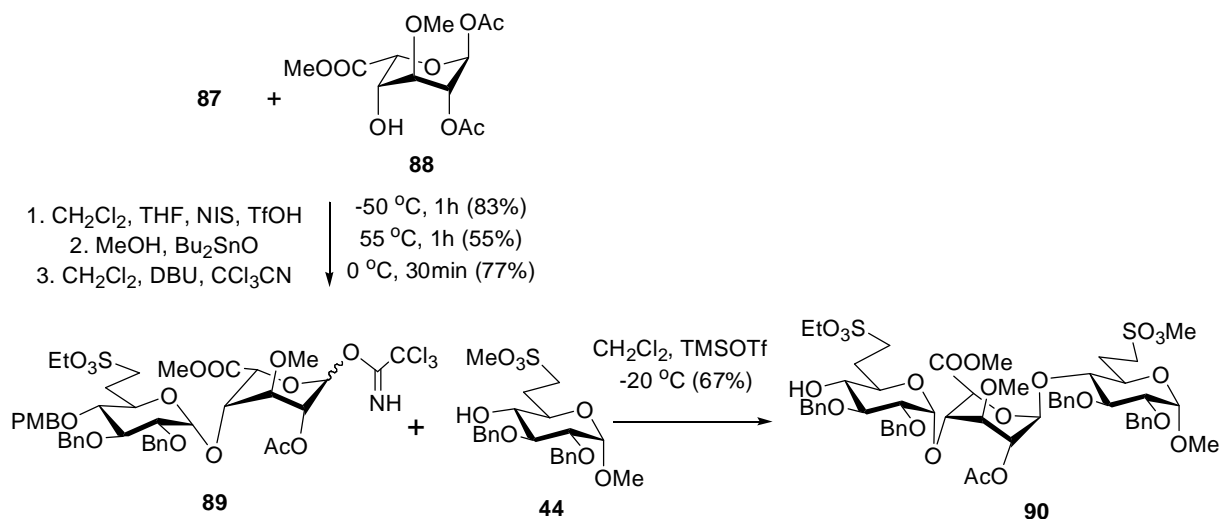
A di- és triszacharid szulfonsavak szintézise során nyert tapasztalatokat hasznosítva sikerült előállítanunk az idraparinux egy diszulfonsav és egy triszulfonsav mimetikumát, az előbbi az F- és H-egységek, az utóbbi a D-, F- és H-egységek 6-os helyzetében tartalmaz egy-egy szulfonátometil csoportot.^{11,12} (A szulfonsav mimetikumok mellett az idraparinuxot is előállítottuk két új, az irodalmitól eltérő szintézisúton, és referencia molekulaként alkalmaztuk a biológiai vizsgálatoknál.¹²)

A pentaszacharid diszulfonsav előállítás egyik kulcslépése a szulfonsavtartalmú F-építőelem szintézise volt, amelyet középső elem lévén olyan formában kellett előállítanunk, hogy donorként és akceptorként is hasznosítani tudjuk. Glikozil-donorként felhasználható tioglikozidból indult a szintézis, a szulfonsav-csoport kialakítására Wadsworth-Horner-Emmons reakciót alkalmaztunk (23. ábra). A **85** származékon végrehajtott addíciós-eliminációs reakcióban sztereoszelektív módon képződött a 6-szulfonátometilén származék (*E*)-izomerje (**86**), amiből trietilamin jelenlétében végrehajtott szelektív hidrogénezéssel nyertük a donorként használható F-egységet (**87**).



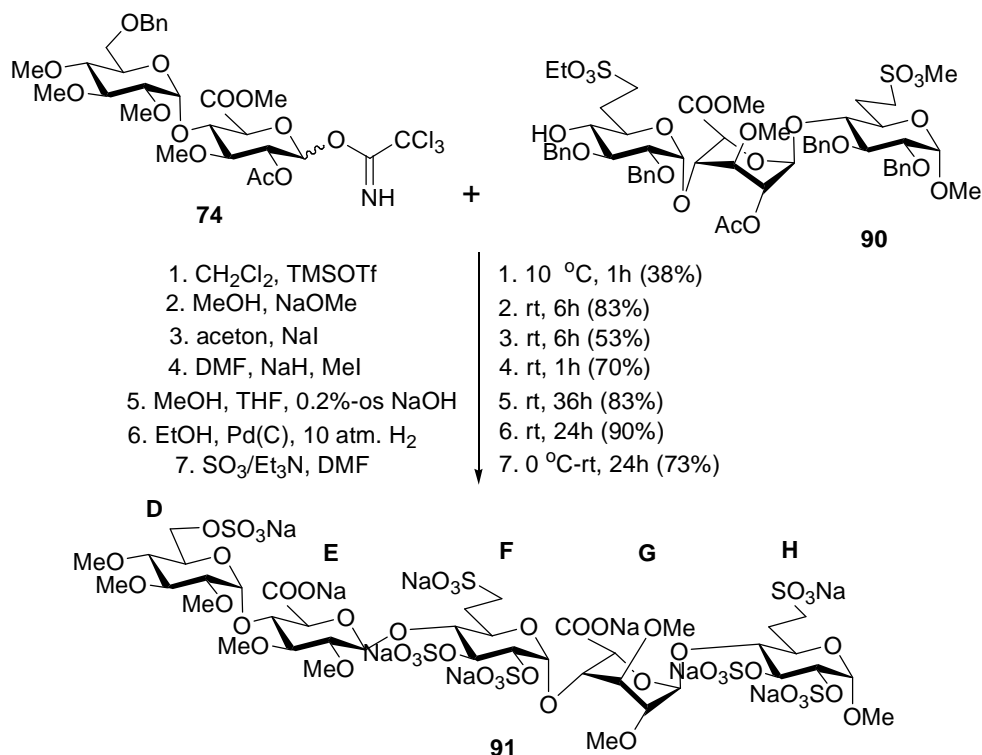
23. ábra. A 6-C-szulfonátometil tartalmú F egység mint glikozil donor szintézise

A **88** iduronsav akeceptort glikozileztük a **87** vegyülettel, majd a képződő diszacharidból szelektív anomer-dezacetilezés után előállítottuk a **89** imidátot (24. ábra). A **89** diszacharid donort hozzákapcsoltuk a di- és triszacharid fragmentumok szintézisének már alkalmazott **44** szulfonátometil-csoportot tartalmazó akceptorhoz. A glikozilezés körülményei között lehasadt a következő glikozilezendő hidroxilt védő 4-metoxibenzil-csoport (PMB), ezért a képződött triszacharidot (**90**) további átalakítás nélkül használhattuk akceptorként.



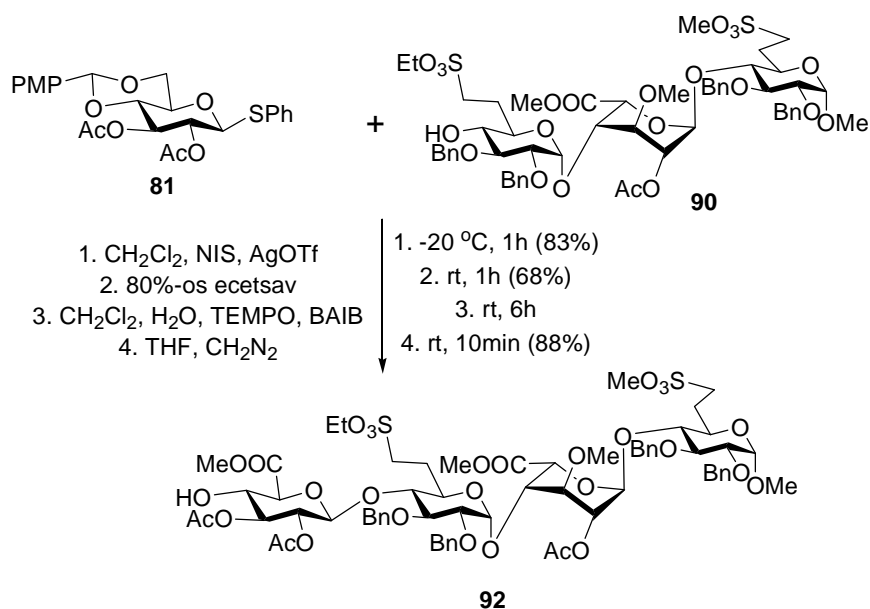
24. ábra. A két szulfonátometil-csoportot tartalmazó FGH triszacharid akceptor szintézise

Az FGH triszacharid akceptor (**90**) glikozilezésére azt a DE diszacharid donort (**74**) használtuk fel, amit korábban a triszacharid-fragmentumok szintéziséhez állítottunk elő. A glikozilezési lépésben nagy donor-felesleggel sem tudtuk elérni az akceptor teljes konverzióját a glükuronsav-tartalmú donor kis reaktivitása miatt, így a kívánt pentaszacharidot csak mérsékelt, 38%-os izolált hozammal sikerült kinyernünk a reakcióelegyből (25. ábra). A további átalakításokat már kiváló hozammal tudtuk végrehajtani, és végül sikeresen izoláltuk az idraparinux pentaszacharid első szulfonsav-mimetikumát (**91**).^{11,12}



25. ábra. Az idraparinux diszulfonsav mimetikumának szintézise

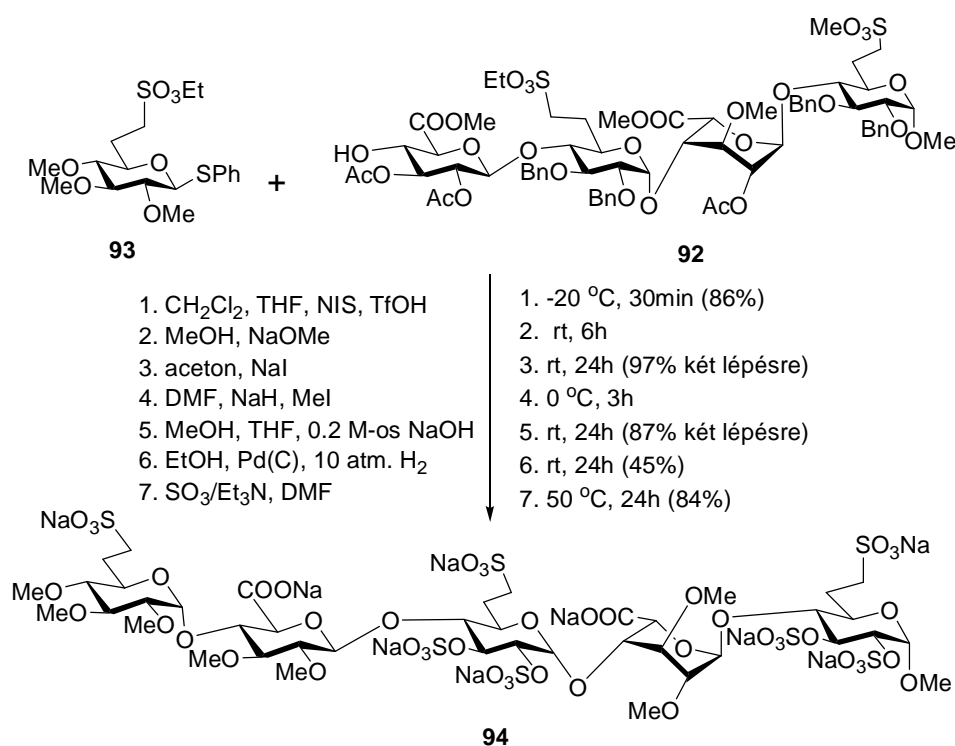
A pentaszacharid triszulfonsav szintéziséhez felhasználtuk a **90** FGH-triszacharid építőelemet. El akartuk kerülni a glükuronsav-donorral tapasztalt rossz hozamú glikozilezési lépést, ezért az E-egységet nem-uronsav formában, a triszacharid fragmentumok szintézisének már alkalmazott **81** feniltio-glükózid donor felhasználásával kapcsoljuk a triszacharidhoz (26. ábra).



26. ábra. A pentaszacharid triszulfonsav EFGH egységének szintézise

A kiváló hozammal és sztereoszelektivitással nyert tetraszacharidon a 4-metoxi-benzilidén védőcsoport eltávolítása után szelektív oxidációt hajtottunk végre, így megkaptuk a glükuronsav-tartalmú **92** származékot (26. ábra).

A szulfonsav-tartalmú **93** D-egységet az F-építőelem szintézisével analóg módon (lásd 23. ábra) Wadsworth-Horner-Emmons reakcióval állítottuk elő, majd hozzákapcsoltuk a **92** tetraszacharid akceptorhoz (27. ábra). Az N-jód-szukcinimid (NIS) és trifluormetánszulfonsav (TfOH) promotorok jelenlétében végrehajtott glikozilezési lépésben jó hozammal képződött a három szulfonátometil-csoportot tartalmazó védett pentaszacharid, amiből a szükséges átalakítások után sikeresen izoláltuk az idraparinux újabb szulfonsav mimetikumát (**94**).¹²

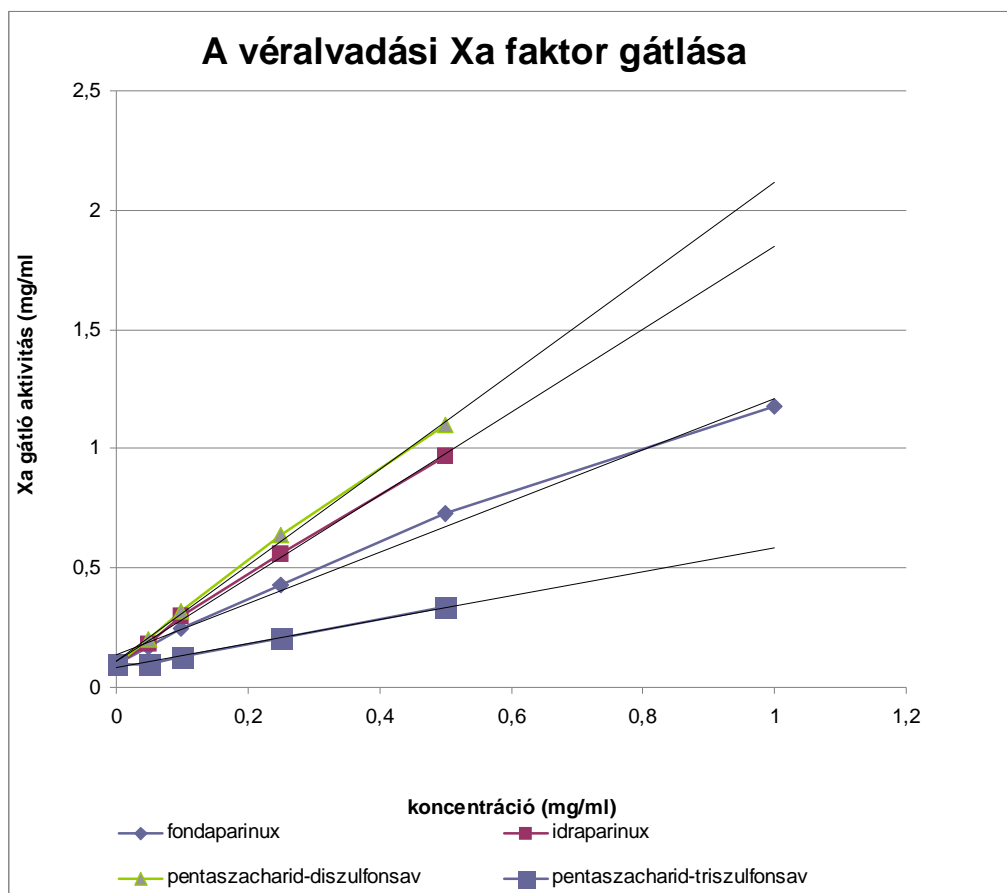


27. ábra. Az idraparinux triszulfonsav mimetikumának szintézise

2.6. Az idraparinux diszulfonsav és triszulfonsav mimetikumának véralvadásgátló hatása

A DE OEC Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézetével együttműködésben megvizsgáltuk az előállított pentaszacharidok véralvadás-gátló hatását.^{11,12} Mivel a heparinoid pentaszacharidok a Xa-faktor közvetett gátlásával fejtenek ki véralvadásgátló hatást, ezért vérplazmán *in vitro* anti-Xa aktivitási méréseket végeztünk a fondaparinux, az általunk előállított idraparinux (**32**) és a két szulfonsav-tartalmú

pentaszacharid (91, 94) felhasználásával.



A mért értékeket a koncentráció függvényében ábrázolva a mérési pontokra illesztett egyenesek meredekségéből meghatároztuk a heparinhoz viszonyított fajlagos anti-Xa aktivitásokat (1. táblázat).

	Anti-Xa aktivitás (U/mg)
fondaparinux	1031
idraparinux (32)	1733
pentaszacharid-diszulfonsav (91)	2003
pentaszacharid-triszulfonsav (94)	485

1. táblázat: A pentaszacharidok anti-Xa aktivitása

Az adatokból jól látható, hogy az **E** és **F** egység 6-os helyzetében kialakított szulfonátometil-csoportok a véralvadásgátló hatást kis mértékben javították, a **91** vegyület nagyobb aktivitást mutatott, mint a jelenleg ismert legjobb antikoaguláns hatású szintetikus

pentaszacharid, az idraparinux. Ezzel első ízben bizonyítottuk, hogy a szulfátészter-csoport a biológiai hatás elvesztése nélkül helyettesíthető bioizoszter szulfonsav-csoporttal.¹² Ugyanakkor a **D**-egységen kialakított újabb szulfonsav-csoport a gátló hatást nagymértékben lerontotta, jelezve, hogy a helyettesített csoportok száma és/vagy helyzete rendkívül fontos, és érdemes további szulfonsav-analagonokkal részletes hatás-szerkezet összefüggés vizsgálatokat végezni.

Ismert, hogy a heparinoidok antivirális és antimetasztatikus hatással is rendelkeznek. Az idraparinux mimetikumok szintézisére irányuló kutatásokban nyert pentaszacharidok, valamint di- és triszacharid szulfonsavak antimetasztatikus vizsgálata folyamatban van az Országos Onkológiai Intézet Kísérleti Farmakológiai Tanszékén, a Leuveni Egyetemen pedig a származékok antivirális hatását tesztelik. A DE OEC Orvosi Vegytani Intézetében elvégzett mérések szerint ezek a szulfonsavak a természetes heparinoidokhoz hasonló mértékben gátolják az I. típusú foszfatazt.

3. Az OTKA kutatás keretében elért egyéb eredmények

A Lipták András irányításával folyó szénhidrátkémiai kutatásoknak az 1970-es évek közepétől fontos területe volt a szénhidrát-acetálok vizsgálata. Lipták-tanítványokként ezeket a kutatásokat folytatva difenil-metilén-acetálok $\text{LiAlH}_4\text{-AlCl}_3$ reagenssel végzett regioszelektív gyűrűnyitását tanulmányoztuk kinetikai és *in silico* módszerekkel a reakció mechanizmusának felderítésére.^{13,14}

A gyűrűnyitási reakcióval hatékony szintézisutat dolgoztunk ki fukopiranozidok regioizomer (2-naftil)metil származékainak szintézisére, és az így előállított fukozid-építőelemeket felhasználtuk a *Dictyostelium discoideum* nyálkagomba glikoprotein-pentaszacharidjának szerkezetbizonyító szintézisében.¹⁵

Előállítottuk szénhidrátok dioxán- és dioxolán-típusú 9-antracénilmetilén-acetáljait, tanulmányoztuk regioszelektív gyűrűnyitási valamint katalitikus hidrogénezési reakcióikat. A 9-antracénilmetilén-acetál és a belőle redukzív gyűrűnyitással képezhető 9-antracénilmetil-éter védőcsoportként, és kromofor jelzőcsoportként is használható.¹⁶

Szénhidrát-szulfonsavak szintézisére alkalmas módszerek kutatása keretében tanulmányoztuk tioglikozidok reakcióit különböző tionukleofil reagensekkel.¹⁷

1-Tio-*N*-acetil-D-glükózamin származék anomer pozíciójába lipofil láncot tartalmazó foszfonát csoportokat építettünk be. A származékok tio-analagonjai a baktérium sejtfal-

bioszintézis kulcs-intermedierjének, a lipid II-nek, így potenciálisan antibakteriális hatásúak lehetnek.¹⁸

4. Az OTKA kutatások eredményeinek publikálása

Az OTKA kutatások eredményeiből eddig 14 referált folyóiratbeli közlemény és két PhD értekezés készült el.^{2-6, 8-18} (A közleményekből 10 megjelent, 4-et közlésre elfogadtak, az egyik PhD értekezés védeése 2009-ben zajlott,⁴ a másik doktori eljárás bírálati szakaszban van¹²). Az összefoglalóban bemutatott, de még nem közölt eredmények publikálása (pl. alkin-tiol reakció tiosziálsavval; véralvadásgátló hatású pentaszacharidok szintézise) folyamatban van.

5. Irodalomjegyzék

1. a) Borbás, A., Szabovik, G., Antal, Zs., Herczegh, P., Agócs, A., Lipták, A.: Sulfonomethyl analogues of aldose-2-ulonic acids. Synthesis of a new sialyl Lewis X analogue. *Tetrahedron Lett.* **40** (1999) 3639-3642. b) Borbás, A., Szabovik, G., Antal, Zs., Fehér, K., Csávás, M., Szilágyi, L., Herczegh, P., Lipták, A.: Sulfonic acid analogues of the sialyl Lewis X tetrasaccharide. *Tetrahedron: Asymmetry.* **11** (2000) 549-566.
2. Szabó, Z. B., Borbás, A., Bajza, I., Lipták, A., Antus, S.: First synthesis of sulfonic acid analogues of *N*-acetylneuraminic acid, *Tetrahedron Lett.* **49** (2008) 1196-1198.
3. Májer, G., Borbás, A., Illyés, T-Z., Szilágyi, L., Bényei, A., Lipták, A.: 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.
4. Májer Gábor: Anionos oligoszacharidok szintézise 1-dezoxi-1-etoxiszulfonil-hept-2-ulopiranozil építőelemek felhasználásával, PhD értekezés, Debreceni Egyetem, Kémia Doktori Iskola, 2008.
5. Csávás, M., Májer, G., Herczeg, M., Remenyik, J., Lázár, L., Mándi, A., Borbás, A., Antus, S.: Investigation of glycosylating properties of 1-deoxy-1-ethoxysulfonyl-hept-2-ulopyranosyl derivatives. Synthesis of a new sulfonic acid mimetic of the sialyl Lewis X tetrasaccharide, *Carbohydr. Res.* (2011). közlésre elfogadva
6. Jakab, Zs., Fekete, A., Borbás, A., Lipták, A., Antus, S.: Synthesis of new sulfonic acid-containing oligosaccharide mimetics of sialyl Lewis X. *Tetrahedron*, **66** (2010) 2404-2414.
7. Csávás, M., Borbás, A., Bajza, I., Lipták, A., Antus, S. A *Helicobacter pylori* fertőzésben szerepet játszó szénhidrát-ligandumok szulfonsav mimetikumainak szintézise, Vegyészkonferencia, 2010. Hajdúszoboszló, P-9, 99. oldal
8. Herczeg, M., Lázár, L., Borbás, A., Lipták, A., Antus, S.: Toward synthesis of the isosteric sulfonate analogues of the AT-III binding domain of heparin, *Org. Lett.* **11** (2009) 2619-2622.
9. Herczeg, M., Lázár, L., Mándi, A., Komáromi, I., Borbás, A., Lipták, A., Antus, S.: Synthesis of disaccharide fragments of the AT-III binding domain of heparin and their sulfonatomethyl analogues. *Carbohydr. Res.*, közlésre elfogadva

10. Lázár, L., Herczeg, M., Fekete, A.; Borbás, A., Lipták, A., Antus, S.: Synthesis of sulfonic acid analogues of the non-reducing end trisaccharide of the antithrombin-binding domain of heparin, *Tetrahedron. Lett.*, **51** (2010), 6711–6714.
11. Borbás, A., Herczeg, M., Lázár, L., Lipták, A., Antus, S.: First sulfonic acid analogue of idraparinux, the anticoagulant pentasaccharide, *Drugs of the Future*, **35** Suppl. A (2010) 186-187. Ed. Prous, J., Mealy, N. E., Thomson Reuters
12. Herczeg, M.: Az antitrombotikus hatású idraparinux pentaszacharid új szintézise és szulfonsav tartalmú analogonjainak előállítás, PhD értekezés, Debreceni Egyetem, Természettudományi Doktori Tanács, Kémiai Doktori Iskola, Debrecen, 2011. – védési folyamat elindítása jóváhagyva 2011. 03. 29-én.
13. A. Mándi, I. Komáromi, A. Borbás, D. Szikra, I. P. Nagy, A. Lipták, S. Antus: Quantum chemical studies on the partial hydrogenolysis of methyl 2,3-*O*-diphenylmethylene- α -L-rhamnopyranoside, *Tetrahedron Lett.*, **52** (2011) 1256-1259.
14. A. Mándi, I. D. Szikra, I. P. Nagy, Mihály Herczeg, Komáromi, A. Borbás, S. Antus: Kinetic studies on the partial hydrogenolysis of methyl 2,3-*O*-diphenylmethylene- α -L-rhamnopyranoside, *Carbohydr. Res.*, (2011), közlésre elfogadva
15. Szabó, Z. B., Herczeg, M., Fekete, A., Batta, Gy., Borbás, A., Lipták A., Antus, S.: Synthesis of three regioisomers of the pentasaccharide part of the Skp1 glycoprotein of *Dictyostelium discoideum*. *Tetrahedron: Asymmetry*, **20** (2009) 808-820.
16. Jakab, Zs., Mándi, A., Borbás, A., Bényei, A., Komáromi, I., Lázár, L., Antus, S., Lipták, A.: Synthesis, regioselective hydrogenolysis, partial hydrogenation and conformational study of dioxane and dioxolane type (9'-anthracenyl)methylene acetals of sugars, *Carbohydr. Res.*, **344** (2009) 2444-2453.
17. Lipták, A., Lázár, L., Borbás, A., Antus, S.: Reactions of phenyl and ethyl 2-*O*-sulfonyl-1-thio- α -D-manno- and β -D-glucopyranosides with thionucleophiles, *Carbohydr. Res.*, **344** (2009) 2461-2467.
18. Borbás, A., Herczeg, P.: Synthesis of lipid II phosphonate analogues *Carbohydr. Res.*, (2011) közlésre elfogadva