

Gyógyhatású szénhidrátok – a véralvadásgátlástól a géncsendesítésig

HERCZEG Mihály,^a CSÁVÁS Magdolna,^a BEREZKI Ilona,^a MEZŐ Erika,^{a,b} ESZENYI Dániel,^{a,b}
KICSÁK Máté,^a HADHÁZI Ádám,^a TOLLAS Szilvia,^a VARGA Eszter,^a SZILÁGYI Eszter,^a
MOLNÁR J. Dénes,^a BEGE Miklós,^a PÉNZES András,^a HERCZEGH Pál^a és BORBÁS Anikó^{a,*}

^aDebreceni Egyetem, GYTK, Gyógyszerészi Kémia Tanszék, Egyetem tér 1., 4032 Debrecen, Magyarország

^bDebreceni Egyetem, TTK, Szerves Kémia Tanszék, Egyetem tér 1., 4032 Debrecen, Magyarország

1. Bevezetés

A sejtfelszíni oligoszacharidok kulcsszerepet játszanak a biológiai jelek továbbításában, különböző normális és patológiás felismerési folyamatokban, így például a sejt-sejt kommunikációban, az immunválasz kiváltásában, bakteriális és virális fertőzésekben, kardiovaszkuláris és gyulladásos betegségekben, a rákos áttétek kialakulásában. Ezeknek a folyamatoknak a molekuláris részleteit azonban sok esetben nem ismerjük elég pontosan, a bennük résztvevő oligo- és poliszacharidok heterogenitása és lenyűgöző mértékű szerkezeti változatossága ugyanis olyan szintetikus és analitikai problémákat vet fel, amelyek megoldására még mindig nem elégségesek az eszközeink és módszereink. Míg a nukleinsavak és peptidok automatizált szekvenálása és szintézise rég megoldott, a glikokonjugátumok szénhidrát részének szekvenálása és a szilárd fázisú automatizált oligoszacharid-szintézis csak az utóbbi évtizedre vált elérhetővé, és alkalmazhatóságuk erősen korlátozott. Ez az egyik oka annak, hogy a szénhidrát-alapú gyógyszerkutatásban kevés a látványos eredmény. A megfelelő hatékonyságú és stabilitású szénhidrát gyógyszerjelöltek kifejlesztésénél további problémát jelent a glikozidos kötések savas és enzimátikus hidrolízissel szembeni érzékenysége, valamint az, hogy a szénhidrátok jellemzően csak kis energiájú kölcsönhatások kialakítására képesek. Mindezek alapján érthető, hogy az intenzív kutatómunka ellenére csak nagyon kevés szénhidrát-tartalmú hatóanyag van jelen a gyógyszerpiacon.^{1,2}

A szénhidrátokban azonban vitathatatlanul óriási diagnosztikai és terápiás lehetőségek rejlenek, és ezek mind teljesebb felderítése és kiaknázása a glikokémikusok és glikobiológusok egyik legfontosabb feladata. Elsőrendű cél a szintetikus és analitikai eszköztár további fejlesztése, pontosan ismert szerkezetű oligoszacharidok szintézise, illetve biológiai környezetben stabil szénhidrát-mimetikumok megtervezése és előállítása, majd ezek felhasználásával a szénhidrátok biológiai szerepének további vizsgálata, a hatásért felelős szerkezetek pontos azonosítása és új terápiás célpontok meghatározása.

A Debreceni Egyetemen Bognár Rezső és Lipták András munkássága nyomán nagy hagyományai vannak a szénhidrát- és oligoszacharidkémiai kutatásoknak. Ezen hagyományokból táplálkozva Tanszékünk egyik kiemelt kutatási területe a gyógyhatású szénhidrát-mimetikumok

szintézise. Célunk a természetes származékoknál stabilabb és erősebb kölcsönhatásokra képes mimetikumok előállítása. Erről a területről az antikoaguláns hatású heparinoid pentaszacharidok szintézise, multivalens szénhidrát-ligandumok előállítása és új típusú mesterséges nukleozidok kutatása terén elért legújabb eredményeinket mutatjuk be röviden.

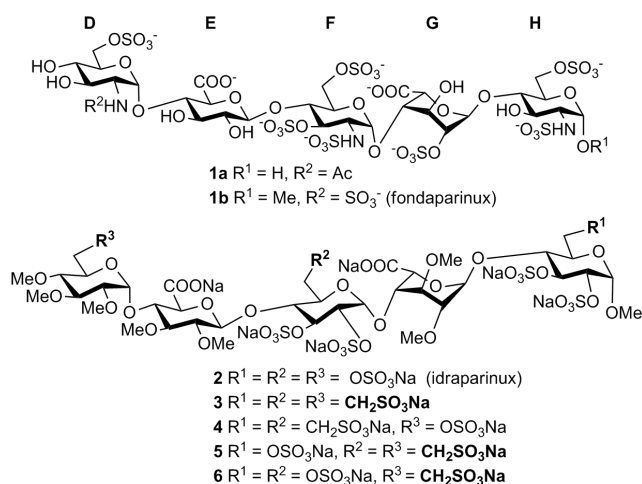
2. Véralvadásgátló hatású heparinoid pentaszacharid-szulfonsavak szintézise

A heparin lineáris láncú, glükózamin és hexuronsav (D-glükuronsav és L-iduronsav) egységekből váltakozva felépülő, nagymértékben szulfatált poliszacharid. Bár elsősorban véralvadásgátló hatásáról ismert, ezen kívül még nagyon sok biológiai folyamatot képes befolyásolni: nagy negatív töltéssűrűsége révén erős Coulomb-kölcsönhatásokat alakít ki különböző fehérjékkel, jelentősen módosítva működésüket. Több területen is (pl. atheroszklerózis, angiogenesis, Alzheimer-kór) intenzíven vizsgálják a heparin-alapú terápia lehetőségét, ám ezeket a kutatásokat nehezíti a poliszacharid heterogenitása. Mivel az egyes heparin láncokban a D-glükuronsav és L-iduronsav aránya, és a monoszacharid-egységek szulfatációs foka nagy eltéréseket mutat, sokszor már az is komoly nehézséget jelent, hogy a biológiai aktivitásért felelős oligoszacharid-szakasz pontos szerkezetét meg tudják határozni. Éppen ezért a változatos szerkezetű heparin-fragmentumok előállítása és széleskörű biológiai vizsgálata nagyon fontos és intenzíven művelt oligoszacharidkémiai kutatási terület.³

A heparint több mint 30 éven keresztül alkalmazták antitrombotikumként úgy, hogy sem a véralvadásgátló hatás mechanizmusát, sem a hatásért felelős egység szerkezetét nem ismerték. Ma már pontosan tudjuk, hogy a heparin alloszterikusán aktiválja a vérplazma egyik fehérjéjét, az antitrombint (AT), és ez az aktivált fehérje gátolja a véralvadási kaszkád két proteázát, a trombint és a Xa faktort.⁴ Az antitrombin aktiválását a poliszacharidnak egy kicsiny, öt monoszacharidból álló egysége végzi, ezt az aktív pentaszacharidot az azonosításnál alkalmazott jelölés miatt **DEFGH** egységnek nevezi a szakirodalom (**1a**, 1. Ábra). A hatásmechanizmus ismeretében nyilvánvalóvá vált, hogy a heterogén poliszacharid lánc nagy része közömbös az alvadásgátlás szempontjából,

* Tel.: +36-52-512913/22475 ; fax: +36-52-512914 ; e-mail: borbas.aniko@pharm.unideb.hu

viszont szerepet játszik a mellékhatások (vérzékenység, súlyosabb esetekben thrombocytopenia) kialakulásában. Így kiemelt gyógyszerfejlesztési cél lett az antitrombin-kötő pentaszacharid kémiai szintézise. Az első szintetikus heparin pentaszacharid gyógyszer, a fondaparinux (**1b**, Arixtra®) óriási előrelépést jelentett az antitrombotikus terápiában, mert alkalmazásával a heparinnál tapasztalt mellékhatásokat szinte teljesen ki lehetett küszöbölni.^{4,5} A vegyület bonyolult szintézise és klinikai hiányosságai (pl. rövid felezési idő, nem dóziszfüggő hatás) által indukált további kutatások elvezettek a sokkal egyszerűbb szerkezetű, glükózamin egységet nem tartalmazó szintetikus heparinoidokhoz, amelyek kiemelkedő képviselője, az idraparinux (**2**)⁶ közel kétszer nagyobb antikoaguláns aktivitással rendelkezik, mint a fondaparinux.



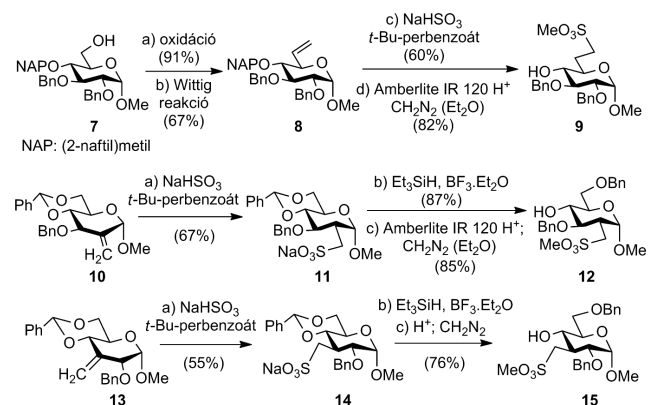
1. Ábra. A heparin antitrombin-kötő doménje (**1a**), a belőle kifejlesztett szintetikus vérvadásásgátló gyógyszer (**1b**) és a laboratóriumunkban előállított antioaguláns pentaszacharidok (**2-6**) szerkezete.

Kutatócsoportunkban új típusú antikoagulánsok kifejlesztése céljából évek óta foglalkozunk az idraparinux szulfonsav-analagonjainak szintézisével. Ennek során a pentaszacharid-antitrombin kötődésben kulcsszerepet játszó szulfát-félésztereket (-OSO₃⁻) szisztematikusan izoszter szulfonátometil-csoportokkal (-CH₂SO₃⁻) helyettesítjük, amelyek ellenállnak a szulfatázok és az észterázok hidrolitikus hatásának, így biológiai környezetben stabilabbak a szulfátésztereknél, ugyanakkor képesek az antikoaguláns aktivitáshoz szükséges erős ionos kötések kialakítására. Az elmúlt évek során a primer szulfátészterek helyettesítésével sikeresen előállítottunk egy tri- (**3**) és két diszulfonsavat (**4**, **5**), egy monoszulfonsav származékot (**6**), és a referencia molekula (**2**) szintézisére is kidolgoztunk két új szintetikus útvonalat⁷⁻¹⁴ (1. Ábra). A következőkben a szintetikus munka néhány érdekesebb részletét mutatjuk be, és ismertetjük a szerkezet és az antikoaguláns hatás közötti eddig feltárt összefüggéseket.

2.1. A szulfonsav-tartalmú építőelemek előállítása

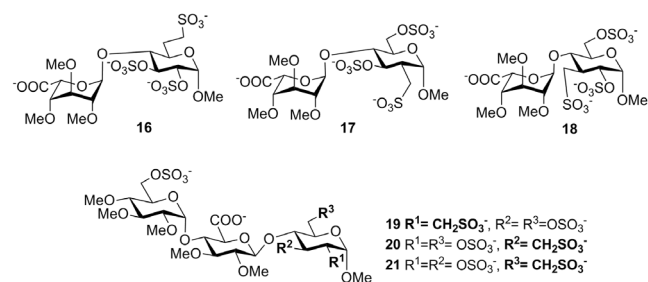
Az irodalmi előzmények hiánya miatt a szulfonátometil-csoportot tartalmazó monoszacharid-építőelemek előállítása képezte munkánk legnehezebb és legérdekesebb részét. Kezdeti célkitűzésünk az volt, hogy a glükóz egységeken mind primer, mind szekunder helyzetben végrehajtjuk a szulfátészterek cseréjét, ezért olyan módszert kerestünk,

amellyel a szulfonátometil-csoportok a cukoryűrű C-2, C-3 és C-6 helyzetében is kialakíthatók. Erre a célra elsőként a szén-szén kettős kötéssel végrehajtott gyökös NaHSO₃ addíciót alkalmaztuk (2. Ábra). Az addíciós lépés előtt a megfelelően védett glükozidokon a szabad hidroxilból oxocsoportot képeztünk, majd Wittig-reakcióval kialakítottuk az exometilén-csoportot (**8**, **10** és **13**). Ezután következett a szintézis kulcs lépésének számító gyökös addíció, amely minden esetben kiváló regio- és sztereoselektivitással adta a várt szulfonsav-sókat. Ezt követően felszabadítottuk a glikozileendő hidroxil-csoportokat, végül a szulfonsav-sókból a sav szabad tétele után diazometánnal végrehajtott metilézéssel szulfonsav-metilésztereket állítottunk elő (**9**, **12** és **15**).⁷



2. Ábra. Szulfonátometil-csoport kialakítása gyökös NaHSO₃ addícióval.

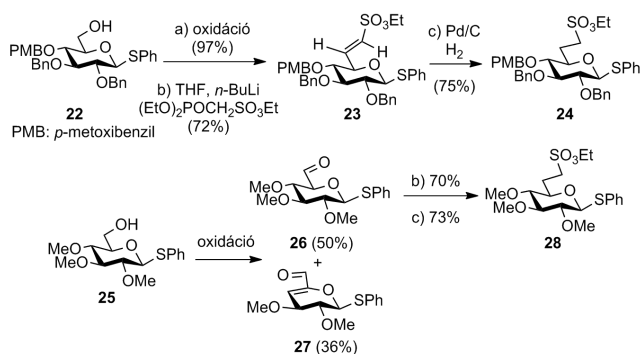
A **9**, **12** és **15** szulfonsav-észterek kiváló glikozil akceptoroknak bizonyultak, még a kis reaktivitású uronsav-donorokkal is megfelelő affinitással reagáltak. Így előállítottuk a tervezett pentaszacharidok L-iduronsav-tartalmú diszacharid- (**16-18**) és D-glükuronsav-tartalmú triszacharid-fragmentumait (**19-21**) – ezzel elsőként szintetizáltunk olyan oligoszacharidokat, amelyek egyszerre tartalmaznak uronsav egységet és szulfonsav-csoportot is (3. Ábra).⁷⁻¹⁰



3. Ábra. Uronsav-tartalmú, heparinoid oligoszacharid-szulfonsavak.

A magasabb tagszámú oligoszacharidokhoz azonban új, glikozil donorként is használható, szulfonsav-tartalmú építőelemekre volt szükségünk, a metil-glikozidokat ugyanis az anomer csoport túlzott stabilitása miatt nem vagy csak nagyon rossz hozammal lehet glikozil-donorra alakítani. (Oligoszacharidok szintézise során akceptorok nevezünk azt a reakciópartnert, amely a hidroxil-csoportjával nukleofilként vesz részt a reakcióban, és donornak nevezük azt a reaktánst, amely a glikozidos szénatomjával elektrofilként reagál.) Új építőelemként

tioglikozidokat kívántunk előállítani, mivel a tioglikozidok stabilak, ezért jó glikozil akceptorok, tiofil reagensekkel mégis könnyen távozásra bírható az anomer csoportjuk, így donorként is kiválóan hasznosíthatók. A tioglikozid-szulfonsavak képzéséhez azonban a NaHSO_3 -addíciót nem tudtuk alkalmazni, mert a reakciót katalizáló *t*-butilperbenzoát a tio-aglikont is oxidálta, nehezen izolálható glikozil-szulfonidok és -szulfonok keverékét eredményezve. Modellreakciók alapján tioglikozidokon is alkalmazható módszernek bizonyult a szulfonátometilén származékot eredményező addíciós-eliminációs mechanizmusú Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) reakció. A pentaszacharid közepére beépítendő F-egységhez először a **22** származékot oxidáltuk, majd az így nyert dialdózt dietilfoszfónátometánszulfonsav-etilészterrel¹⁵ reagáltatva (HWE-reakció) előállítottuk a **23** telítetlen szulfonsavetilészter származékot. A kizárólag (*E*)-izomer formában képződő olefinből katalitikus hidrogénezéssel jutottunk el a **24** molekulához (4. Ábra).

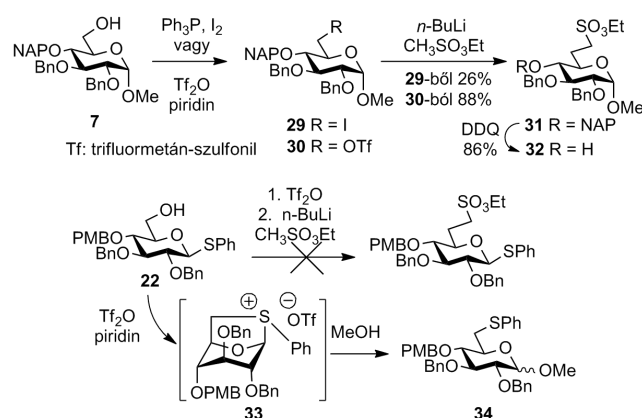


4. Ábra. Szulfonátometilézés Horner-Wadsworth-Emmons reakcióval.

Hasonló módon, de jóval szerényebb összhozammal állítottuk elő a **25** tioglikozidból a D-építőelemként szolgáló **28** glikozol-donort; a gyengébb kitermelés oka az volt, hogy az oxidációs lépésnél nem tudtuk kiküszöbölni a **27**-et eredményező eliminációs mellékreakciót. A HWE-reakcióval ugyan szekunder helyzetben is ki tudtuk alakítani a szulfonátometilén-csoportot, de a hidrogénezési lépésnél sem a konverzió, sem a sztereoselektivitás nem volt megfelelő, így a továbbiakban kizárólag a primer helyzetű szulfonsavat tartalmazó pentaszacharidok szintézisével foglalkoztunk. A rendelkezésünkre álló **9**, **24** és **28** építőelemek két pentaszacharid-szulfonsav szintéziséhez voltak elegendőek.¹¹

A munka folytatásához nagy mennyiségben volt szükségünk a szulfonsav-tartalmú monoszacharidokra, ezért az eddigieknél hatékonyabb módszert kerestünk az előállításukra. Primer helyzetű metánszulfonsav-bevitelre leggyorsabb reakciót a nukleofil-csere, amely a megfelelően védett 6-hidroxi származékból (**7**) két lépésben végrehajtható (5. Ábra). A hatékonyság szempontjából kulcsfontosságúnak bizonyult a távozó csoport: a **29** 6-jód származék csak szerény konverzióval reagált a metánszulfonsav-etilészterből generált karbanionnal, a 6-*O*-trifluorometán-szulfonát (**30**) intermediereken keresztül viszont kiváló hozammal nyertük a **31** szulfonsav-etilészter származékot, majd ebből a **32** glikozil akceptort.^{14,16} Meglepő módon a **22** tioglikozidon ez a szulfonsav-beviteli módszer nem működött. Az első lépésben képződő 6-*O*-triflát származék ugyanis a

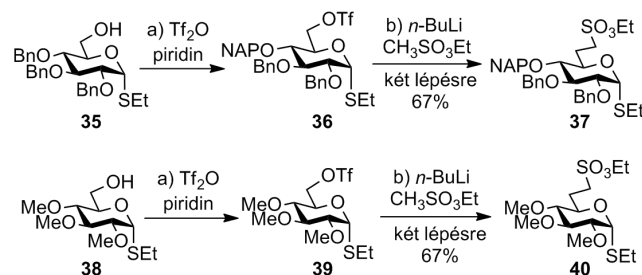
β -helyzetű feniltio-csoport nukleofil támadása révén azonnal átalakult szulfónium-ionná (**33**); ennek az intermediereknél a képződését metanol hozzáadásával igazoltuk, melynek hatására a **34** metil-glikozid képződött.¹⁶



5. Ábra. Szulfonátometil-csoport kialakítása nukleofil cserével: hatékony reakció α -glikozidon és sikertelen kísérlet β -glikozidon.

Feltételeztük, hogy az intramolekuláris nukleofil csere csak akkor megy végbe, ha az aglikon β -térhelyzetű, és α -tioglikozidból kiindulva elkerülhető az anomer csoport nem kívánt részvétele a reakcióban. A megfelelő α -tioglikozidokon (**35**, **38**) valóban a kívánt módon játszódott le a szulfonátometil-csoport bevitel (6. Ábra). A primer hidroxilokból képezett triflát-észtereket (**36**, **39**) litiált metánszulfonsav-etilészterrel reagáltatva kiváló hozammal nyertük a két szulfonsav-tartalmú glikozil donort (**37**, **40**).

Miután sikerült hatékony módszerrel nagy mennyiségben előállítani a 6-dezoxi-6-szulfonátometil tartalmú D-, F- és H-építőelemeket, hozzáálltunk a tervezett pentaszacharid szulfonsavak szintéziséhez.



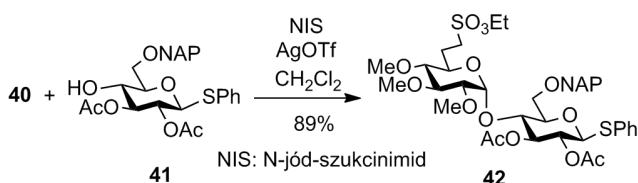
6. Ábra. Szulfonátometil-csoport kialakítása nukleofil cserével α -S-glikozidokon.

2.2. A pentaszacharidok szintézise

A pentaszacharidok szintézisére kipróbált többféle reakciót közül a leghatékonyabbnak azt találtuk, amikor az uronsavak prekursorait, a D-glükózt és L-idózt használtuk a glikozilezésekből, és a prekursorokat oligoszacharid-szinten oxidáltuk uronsavvá. A pentaszacharid vázat minden esetben [2+3] blokk-szintézissel, a megfelelően védett DE diszacharid donorok és FGH triszacharid akceptorok össze-kapcsolásával állítottuk elő. A szintézis során acetyl-csoporttal védjük azokat a hidroxilokat, amelyek a végtermékben metil-éter formában vannak, míg a szulfatálendő hidroxilokon benzil-éter védőcsoportokat

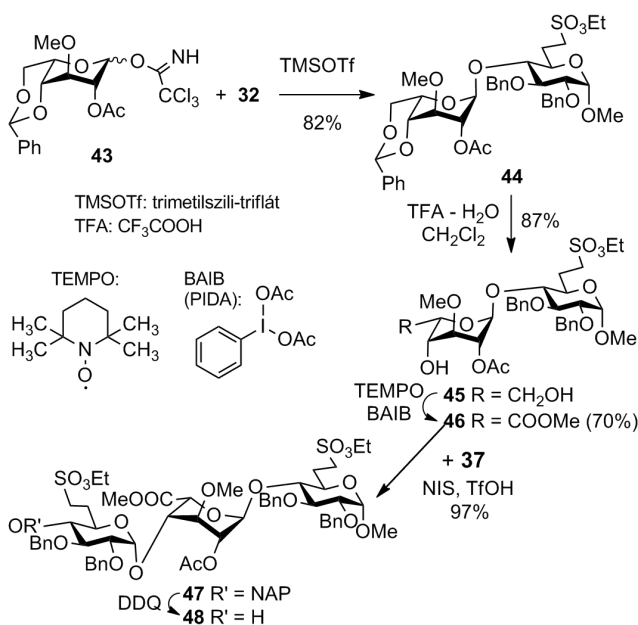
alkalmaztunk. Ezek a védőcsoportok egyúttal biztosították a glikozilezési lépések megfelelő sztereoselektivitását is: a C-2 helyzetű észterek az 1,2-transz-, az éterek pedig az 1,2-cisz-glikozidos kötések kialakulását segítették elő. Időleges hidroxil védőcsoportként 2-naftilmetil-étert alkalmaztunk, amely szelektíven eltávolítható mind az acetyl-, mind a benzil-csoportok mellől. A szintézis részleteit a pentaszacharid triszulfonsav (**3**) előállításán keresztül mutatjuk be.

A **41** tioglikozidot használtuk az **E**-uronsav egység prekursoraként, amit a **40** tioglikoziddal glikozileztünk.¹⁴ A két tioglikozid közül az éter védőcsoportokat viselő, ezért reaktívabb **40** származék kemoselektív aktiválásával képeztük a **42** diszacharidot. A **40** vegyület C-2 éter védőcsoportja nem-résztevő tulajdonságával elősegítette a kívánt 1,2-cisz (α -D konfigurációjú) interglikozidos kötés kialakulását (7. ábra).



7. Ábra. A DE diszacharid donor előállítása kemoselektív glikozilezéssel.

A szulfonsavtartalmú **32** glikozil akceptor és a **43** L-idopiranozil-imidát donor reakciójával állítottuk elő a teljesen védett **44** diszacharidot. Ebben az esetben a donor C-2 résztvevő csoportja biztosította a kívánt 1,2-transz (α -L konfigurációjú) glikozidos kötés kialakulását a **G** és **H** egység között (8. ábra). Ezután az időz részről eltávolítottuk

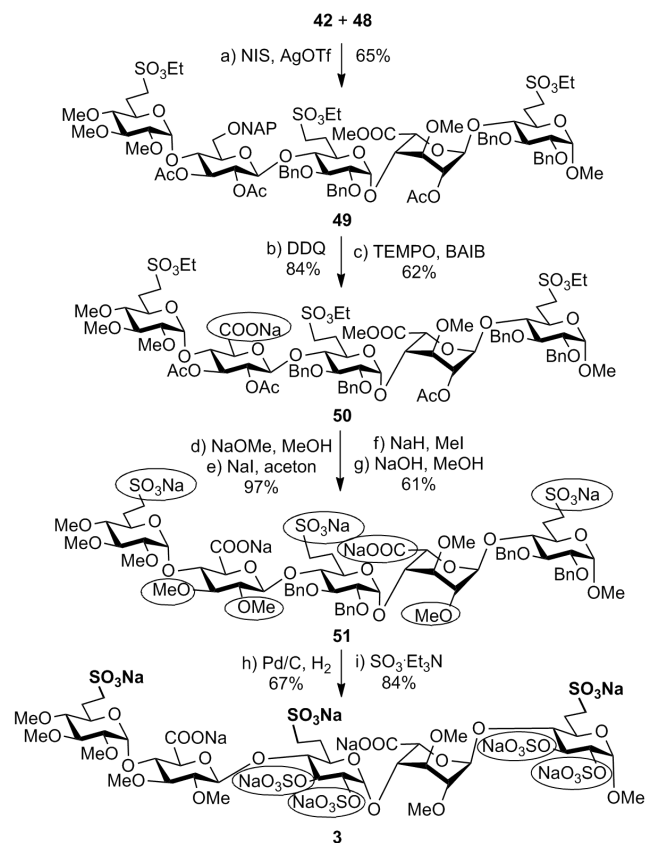


8. Ábra. Az FGH diszacharid akceptor szintézise.

a 4,6-benzilidén acetált, majd a **45** diolból TEMPO (tetrametilpiperidin-1-oxil) és BAIB (bisz-acetoxijódbenzol) reagensekkel végzett szelektív gyökös oxidációval képeztük az L-iduronsav-tartalmú **46** diszacharid

akceptort. A **46** 4'-OH származékot a **37** szulfonsav-tartamú **F** építőelemmel glikozilezve nyertük a **47** triszacharidot, amelyből a 2-naftilmetil-éter (NAP) oxidatív hasításával állítottuk elő a **48** akceptort.

A **42** diszacharid és a **48** triszacharid összekapcsolásával jó hozammal és teljes sztereoselektivitással nyertük a **49** védett pentaszacharidot (9. Ábra).



9. Ábra. A pentaszacharid triszulfonsav (**3**) szintézise. Az adott lépésben kialakított/átalakított csoportokat ellipszissel jelöltük.

A pentaszacharid vázon kialakítottuk az **E** glükuronsav egységet (**50**), a szulfonsav- és karbonsav-észtereket sóvá alakítottuk, az acetyl csoportokat metilre cseréltük (**51**), végül eltávolítottuk a benzilétereket, és a felszabaduló hidroxilok szulfatálásával megkaptuk a **3** pentaszacharid triszulfonsavat.^{11,14} Hasonló módon állítottuk elő az idraparinuxot (**2**),¹³ és a további szulfonsav származékokat (**4-6**) is, amelyek közül eddig a **2-4** vegyületekről vannak részletes biológiai és szerkezetvizsgálati eredményeink

2.3. Szerkezet és antikoaguláns aktivitás

A pentaszacharid szulfonsavak (**3**, **4**) antikoaguláns hatását humán plazmán végzett *in vitro* Xa faktor-gátlási vizsgálatokkal határoztuk meg, referenciaként az idraparinuxot (**2**) és a fondaparinux gyógyszermolekulát (**1**) használtuk (1. Táblázat). A pentaszacharid-diszulfonsav (**4**) kiváló anti-Xa aktivitást mutatott, kétszer aktívabbnak bizonyult mint a forgalomban lévő gyógyszer (**1**), a **3** triszulfonsav-származéknál viszont nagyon jelentős hatáscsökkenést tapasztaltunk.

1. Táblázat. A pentaszacharidok *in vitro* Xa-gátló hatása

Pentaszacharid	Anti-Xa aktivitás (U/mg) ^a
fondaparinux (1)	1195±189
idraparinux (2)	1911±193
3 triszulfonsav	384±139
4 diszulfonsav	2153±153

^a Egységnyi nemzetközi heparin standard aktivitására vonatkoztatott érték.

A véralvadást gátló hatásban mutatkozó óriási különbség okait keresve NMR mérésekkel és molekuladinamikai szimulációval vizsgáltuk a szabad, és az antitrombinhoz kötött 2-4 pentaszacharidok térszerkezetét. Ezek a vizsgálatok azt mutatták, hogy az antitrombinhoz kötött pentaszacharidok térszerkezete gyakorlatilag azonos, ami érthető, hiszen a kötődéshez szükséges konformáció determinált. A 2 és 4 pentaszacharidok szabad állapotban egyetlen kitüntetett konformációt vesznek fel, ami megegyezik a kötött állapotú konformációkkal, ez magyarázza kiváló aktivitásukat. A pentaszacharid triszulfonsavnak viszont szabad állapotban két stabilis konformációja van, és ezek egyike jelentősen eltér a kötött konformációtól.¹⁷ Az eltérő konformer valószínűleg nehezen tud a kötődéshez szükséges biokativ térszerkezetbe átbillenni, ez magyarázhatja a biológiai aktivitás jelentős csökkenését.

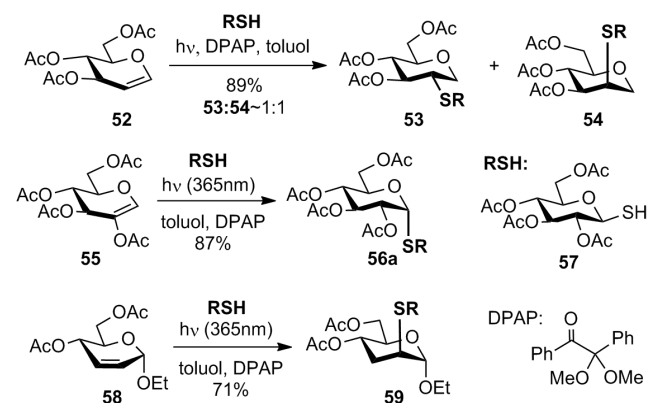
Eredményeink bizonyítják, hogy a szulfátészterek helyére beépített szulfonsav-csoportok biztosítani tudják a biológiai hatáshoz szükséges erős kötődést, ugyanakkor módosíthatják az oligoszacharid térszerkezetét, ami alapvetően befolyásolja a biológiai aktivitást. Az 5 és 6 pentaszacharid-szulfonsavak jövőbeni vizsgálatai tovább pontosíthatják ismereteinket a szerkezet és antikoaguláns hatás kapcsolatáról. A szerkezet-hatás összefüggések alaposabb megismerése más terápiás területen is segítheti a hatásos heparin származékok kifejlesztését, és felgyorsíthatja az Alzheimer-kór, a gyulladásgátlás vagy a daganatok terápiájának terén folyó heparin-alapú gyógyszerkutatótást is.

3. Önszerveződő multivalens rendszerek szintézise stabil glikomimetikumokból

3.1. Fotokatalizált tioladdíció endociklusos kettőskötést tartalmazó szénhidrát származékokon

Az oligoszacharidok *in vivo* alkalmazása során komoly problémát jelenthet az *O*-glikozidos kötések hasítása glikozidázok által. Ez a probléma kiküszöbölhető az enzimatisz hidrolízisnek ellenálló szintetikus glikomimetikumokkal – ilyenek például a tioglikozidok, amelyekben a glikozidos oxigént egy kénatom helyettesíti. A tioglikozidos kötés kialakítására az utóbbi években egyre elterjedtebben alkalmazzák a terminális alkéneken lejátszódó fotokatalizált, gyökös mechanizmusú tioladdíciót, amely enyhe körülmények között bármilyen oldószerben végrehajtható gyors, regio- és sztereoselektív és jó hozamú reakció.¹⁸ Ezekben az eljárásokban általában 1-tiocukrokat reagáltatnak alkenil-szubsztituált (többnyire allilezett) szacharidokkal, aminosavakkal vagy peptidekkel, ami alkilszulfanil híddal összekötött mimetikumokat eredményez.¹⁹

Úgy véltük, jelentősen kibővíthető a tioladdíció alkalmazási köre, ha endociklusos kettős kötésű szénhidrátokat használunk alkén partnerként, mert így a cukoregységeket közvetlenül, hídmolekula beiktatása nélkül kapcsolhatjuk egymáshoz vagy más biomolekulához. Ezért megvizsgáltuk a könnyen előállítható endoglikálok és 2,3-telítetlen glikozidok fotokatalizált reakcióját különböző tiollokkal 2,2-dimetoxi-2-fenil-acetofenon (DPAP) fotoiniciátor jelenlétében.^{20,21} Amint az 1-tioglikóz-peracetáttal (57) végzett tioladdíció példáján látható, a reakciók teljes regio- és sztereoselektivitással mentek végbe (10. Ábra). A *D*-glükárra (52) történő addíció sajnos nem mutatott sztereoselektivitást, az 53 és 54 diasztereomerek ~1:1 arányú, nehezen elválasztható elegyét adta. Az 55 2-acetoxi-*D*-glükál és az 58 2,3-telítetlen glikozid esetében viszont nagyon jó konverziót és teljes sztereoselektivitást tapasztaltunk, ezzel elsőként mutattuk be, hogy ezek a telítetlen szénhidrátok kiváló alkén partnerek lehetnek a fotoiniciált tioladdíciós reakciókban.²⁰



10. Ábra. Gyökös tioladdíció endociklusos kettős kötés tartalmazó szénhidrátokon.

Változatos szerkezetű tiollokkal reagáltatva az 55 2-acetoxi-glikált megállapítottuk, hogy a reakciónak vannak korlátai: aromás és benzil-helyzetű tiollokkal a láncközi kettős kötés nem, vagy csak kis konverzióval reagál.²¹ Ugyanakkor alkil-tiollokkal, cukor-tiollokkal, ciszteinnel, peptidekkel jó konverzióval és mindig teljes sztereoselektivitással megy végbe az addíció, 1,2-cisz (α -*D*) tioglikozidok képződését eredményezve (2. Táblázat).^{20,22} Ez a módszer gyors, egyszerű és enyhe reakcióút nyújt oligoszacharidok és glikokonjugátumok stabil tioglikozid mimetikumainak szintézisére.

A 2,3-telítetlen glikozidok tioladdíciós reakciói is mindig teljes regio- és sztereoselektivitással játszódtak le és kizárólag 3-dezoxi-2-*S*-diszacharidok képződését eredményezték.²¹ Ez a szelektivitás lehetővé teszi α -(1→2)-*S*-kötésű mannobiozid mimetikumok gyors és hatékony szintézisét, amit oligomannozidok multivalens tiomimetikumainak szintézisében hasznosítottunk.

3.2. Multivalens mannobiozid mimetikumok szintézise

A human immunodeficiency virus (HIV) számos más kórokozóhoz (pl. Ebola vírus) hasonlóan a felületén található oligomannozid struktúrák és a gazdasejt mannozoktő lektinjei közötti kölcsönhatás révén képes megfertőzni a szervezetet. A fertőzés megakadályozásának egyik módja lehet a multivalens szénhidrát ligandumokon alapuló

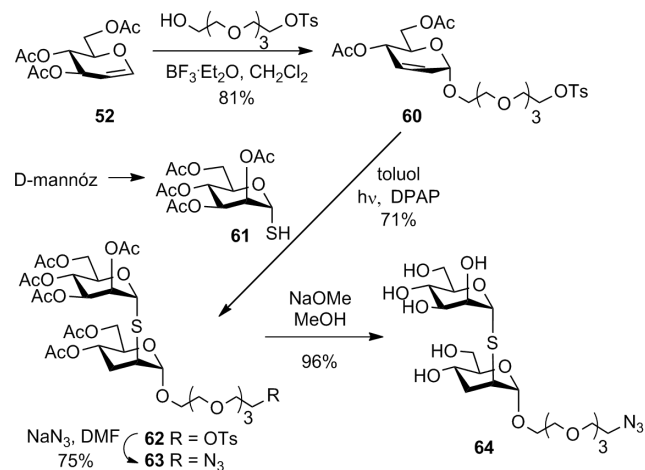
antiadhéziós terápia. Multivalens ligandumok és receptorok kölcsönhatásának átlagos szabadenergia változása gyakran nagyobb, mint a monomerek közötti kölcsönhatás mértéke. Ilyenkor szinergizmus lép fel a megsokszorozott molekulafajták között, ami ellensúlyozhatja a receptor-ligandum kölcsönhatások jellemzően kis energiáját.

2. Táblázat. Tioladdíció 2-acetoxi glükózon

RSH	Termék (hozam %)
	nincs reakció
	56b (22%)
	56c (67%)
	56d (69%)
	56e (61%)
	56f (60%)

Az utóbbi időben a multivalencia eléréséhez elsősorban nem kovalens felépítésű vázhoz kötik a monomereket, hanem önszerveződő, klaszterképző vegyületeket alkalmaznak, melyek előállítás biológiailag aktív molekulák és amfifil szerkezetek összekapcsolásával történik.²³ Mi is ezt az elvet alkalmaztuk potenciálisan HIV-ellenes multivalens szénhidrátok előállításában során, amelyek bioaktív mannbiozid részét tioladdícióval állítottuk elő²⁴ (11. Ábra) Az **52** glikálból Ferrier-reakcióval egy hídmolekulával

ellátott 2,3-telítetlen glikozidot (**60**) állítottunk elő, amiből 1-tiomannóz-peracetáttal végrehajtott addícióval nyertük a tioglikozid kötésű mannbiozid-mimetikumot (**62**). Azidképzés és Zemplén dezacetilezés után megkaptuk a lipofil hordozóhoz konjugálható hidrofíl bioaktív egységet (**64**).

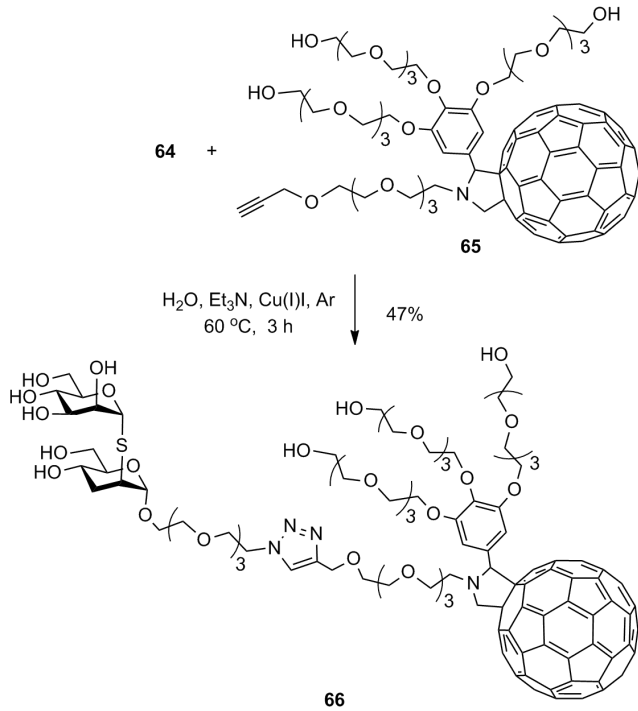


11. Ábra. Azid-alkin cikloaddícióra kész mannbiozid mimetikum szintézise tioladdícióval.

Lipofil csoportként többek között a **65**²⁵ fullerén-C₆₀ származékot választottuk, amelyet 1,3-dipoláris cikloaddícióval kapcsolunk össze a **64** mannbiozid mimetikummal (12. ábra). A fullerén tetraetilén-glikol oldalláncai biztosították a **66** végtermék megfelelő vízdékonyságát. A **64** vegyület felhasználásával több amfifil származékot is előállítottunk, amelyek a fényterápiás vizsgálatok szerint vízben 60-100 nm méretű multivalens aggregátumokká szerveződnek.²⁴ A származékok mannbiozid-lectinnekkel való kötődésének vizsgálata folyamatban van.

4. Új típusú peptid-nukleinsavak: ciszteinil-nukleozidok szintézise és oligomerizálása

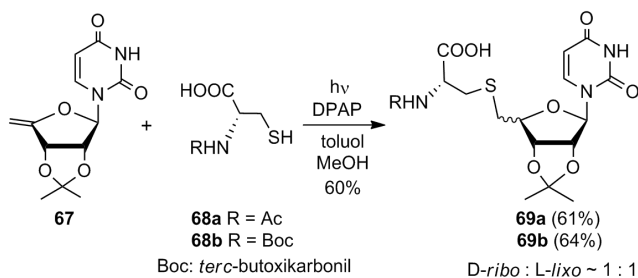
A szintetikus nukleozid származékokat széles körben használják gyógyászati célokra daganatellenes és vírusellenes szerként. A módosított nukleozidok egy intenzíven kutatott, óriási gyógyászati potenciállal bíró alkalmazási lehetősége a géncsendesítés. Géncsendesítő terápia során egy hibás vagy rosszul működő fehérje által okozott betegség gyógyítása a cél a fehérjét kódoló gén expressziójának transzkripció vagy transláció szintű, szelektív gátlásával.²⁶ Erre a célra meghatározott szekvenciájú, az adott génnel vagy az arról átíródó mRNS-sel komplementer szintetikus nukleinsav analógok használhatók. Ezekkel a mesterséges nukleinsavakkal szemben alapvető követelmény a nukleáz rezisztencia, ami biztosíthatja a hatás kifejtéséhez szükséges életidejüket. Terápiás szempontból ígéretes származékok a peptid-nukleinsavak (PNS), amelyek különleges szerkezetükből adódóan ellenállnak mind a nukleázok, mind a proteázok litikus hatásának. Az irodalomból ismert peptid-nukleinsavakban a természetes nukleinsavak enzimatikusan hasítható cukor-foszfát gerincét egy peptidváz, leggyakrabban poli-aminoetilglicin helyettesíti, és a nukleobázisok közvetlenül ehhez a peptidvázhoz kapcsolódnak²⁷ – vagyis ezek a származékok nem tartalmaznak szénhidrátot.



12. Ábra. Aggregációra képes mannobiozid-fullerén konjugátum szintézise.

A fotokatalitikus tioladdíciós reakció felhasználásával olyan peptid nukleinsavak kifejlesztését határoztuk el, amelyek a természetes nukleinsavakban megtalálható cukor komponenst is tartalmazzák, így azoknak közelebbi szerkezeti analógjai, mint a hagyományos PNS származékok. Célunk ciszteinil-nukleozid monomerek előállítását volt, amelyekből a peptid-szintézis eszközeivel oligocisztein gerincet tartalmazó ún. cisztein-nukleinsavak nyerhetők.

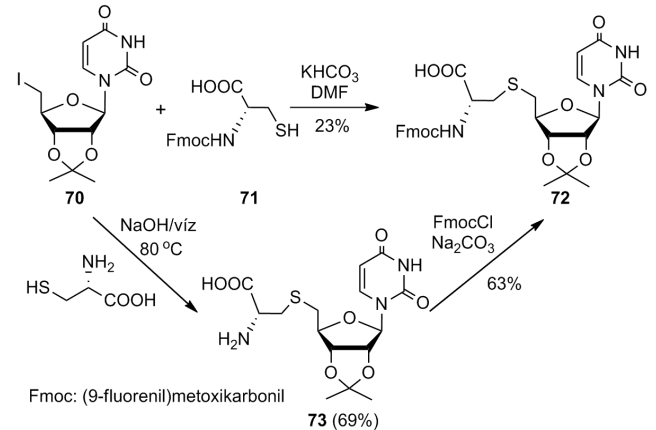
A ciszteinil-nukleozid monomerek előállításának körülményeit a legkönnyebben kezelhető nukleozidon, az uridinen dolgoztuk ki. A 4'-exometilén uridin (67) és a 68a *N*-acetilcisztein reakciója a várakozásainkkal ellentétben nem mutatott sztereoselektivitást, az addíció a *D*-ribo- és *L*-lixo-konfigurációjú diasztereomerek 1:1 arányú, szétválaszthatatlan keverékét adta, és ugyanilyen eredményt kaptunk *N*-terc-butoxikarbonil-ciszteinnel is. (13. Ábra). Megvizsgáltuk, hogy a cukor részen a ciklikus izopropilidén acetál helyett acetyl vagy szilil védőcsoportot alkalmazva javítható-e a kívánt *D*-ribo-izomer hozama, de sajnos nem jártunk sikerrel.



13. Ábra. Cisztein konjugálása uridinnel fotokatalitikus tioladdícióval.

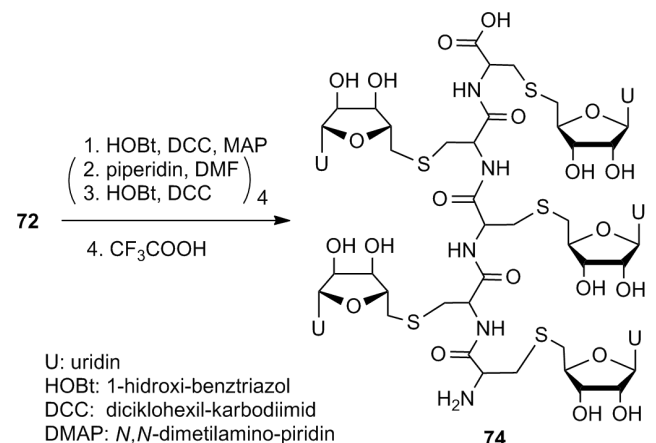
Ezt követően nukleofil szubsztitúciós reakcióval kapcsoltuk a ciszteint a ribóhoz (14. Ábra). A 70 5'-jód uridin és az

N-(fluorenil-metoxikarbonil)-cisztein reakciója kizárólag a kívánt 72 terméket adta, de rossz hatékonysággal. Alacsony hőmérsékleten kicsi volt a konverzió, magasabb hőmérséklet vagy erősebb bázis alkalmazása viszont az Fmoc csoport bomlásához vezetett. Végül a szabad ciszteinnel végrehajtott nukleofil szubsztitúció (73), és az Fmoc védőcsoport utólagos kialakítása bizonyult a leghatékonyabb reakciónak, így jó összhozzammal kaptuk a szilárdfázisú peptidszintézisre alkalmas 72 ciszteinil-uridin monomert.



14. Ábra. Peptidszintézisre alkalmas ciszteinil-nukleozid szintézise.

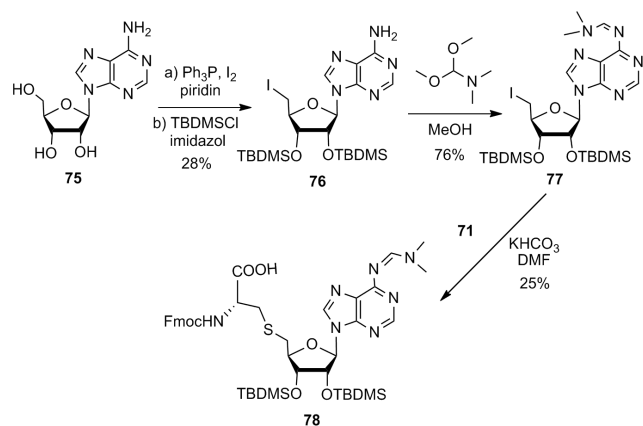
A peptidszintézist Wang gyantán hajtottuk végre. Első lépésben a szabad karboxilcsoportot tartalmazó ciszteinil-származékot észter-kötéssel a szilárd fázishoz kötöttük, majd követték a peptidszintézis protokollját (15. Ábra). Lehasítottuk a cisztein aminocsoportjáról az Fmoc védőcsoportot, ezután a 72 származék és a megfelelő reagensek hozzáadásával kialakítottuk az első peptidkötést. A rendelkezésünkre álló monomerral még három kapcsolási ciklust tudtunk végrehajtani, így egy védett pentapeptidet kaptunk, amit vizes trifluoecetsavval lehasítottunk a gyantáról. A savas kezelés egyúttal a védőcsoportokat is eltávolította, így megkaptuk az első ciszteinil-nukleozid oligomer végtermékünket (74).



15. Ábra. Pentaciszteinil-nukleinsav előállítása Wang gyantán.

A géncsendesítéshez 21-22 tagszámú, meghatározott bázisszekvenciájú nukleinsav származék szükséges. Szilárdfázisú vagy automatizált peptidszintézissel ez a lánchosszúság könnyen elérhető, de valamennyi nukleobázisból elő kell állítanunk hozzá a megfelelő ciszteinil-nukleozid monomert.

A szintézist az uridin komplementer nukleozidjával, az adenozinnal folytattuk (16. Ábra). Az uridinre kidolgozott szintézisút és védőcsoport-stratégia sajnos nem működött, az 5'-jód származékból a purinbázis részvételével intramolekuláris ciklizáció történt. Számos kísérlet után a peptidszintézisre alkalmas **78** ciszteinil-konjugátumot végül a következő módon állítottuk elő: a bázis aminocsoportját *N,N*-dimetilformamidin formában védjük, a ribóz részen szilil védőcsoportokat alkalmaztunk, és a **71** Fmoc-védett ciszteinellel hajtottuk végre a nukleofil szubsztitúciót.



16. Ábra. Ciszteinil-adenozin monomer előállítása

Folyamatban van a **78** ciszteinil-adenozinból homooligomer előállítása, amit a **74** származékkal való Watson-Crick hibridizációs vizsgálatokhoz kívánunk felhasználni. Megkezdjük a további ciszteinil-nukleozid monomerek előállítását, hogy megvalósíthassuk távlati célunkat, változatos bázisszekvenciájú, géncsendesítésre alkalmas cisztein-nukleinsavak kifejlesztését.

Köszönetnyilvánítás

Köszönjük az OTKA pénzügyi támogatását, a K 62802, K 79126 és K 109208 pályázatok nélkül a kutatások nem valósulhattak volna meg. A kutatás részben a TÁMOP 4.2.4 A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg. Köszönjük a hivatkozási listában szereplő társszerzőink értékes hozzájárulását.

Hivatkozások

1. Wong, C.-H. *Carbohydrate based Drug Discovery* 1-2, John Wiley-VCH: Weinheim, **2003**.
2. Seeberger, P. H.; Werz, D. B. *Nature*, **2007**, *446*, 1046–1051.
3. Miller, G. J.; Hansen, S. U.; Avizienyte, E.; Rushton, G.; Cole, C.; Jayson, G. C.; Gardiner, J. M. *Chem. Sci.*, **2013**, *4*, 3218–3222.
4. van Boeckel, C. A. A.; Petitou, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3118–3133.
5. Chang, C.-H.; Lico, L. S.; Huang, T.-Y.; Lin, S.-Y.; Chang, C.-L.; Arco, S. D.; Hung, S.-C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 9876–9879.
6. Westerduin, P.; van Boeckel, C. A. A.; Basten, J. E. M.; Broekhoven, M. A.; Lucas, H.; Rood, A.; van der Heiden, H.; van Amsterdam, R. G. M.; van Dinther, T. G.; Meuleman, D. G.; Visser, A.; Vogel, G. M. T.; Damm, J. B. L.; Overklist, G. T. *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, *2*, 1267–1280.
7. Herczeg, M.; Lázár, L.; Borbás, A.; Lipták, A.; Antus, S. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2619–2622.
8. Lázár, L.; Herczeg, M.; Fekete, A.; Borbás, A.; Lipták, A.; Antus, S. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 6711–6714.
9. Herczeg, M.; Lázár, L.; Mándi, A.; Borbás, A.; Komáromi, I.; Lipták, A.; Antus, S. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 1827–1836.
10. Lázár, L.; Mező, E.; Herczeg, M.; Lipták, A.; Antus, S.; Borbás, A. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7386–7399.
11. Herczeg, M.; Lázár, L.; Bereczky, Zs.; Kövér, K. E.; Timári, I.; Kappelmayer, J.; Lipták, A.; Antus, S.; Borbás, A. *Chem.–Eur. J.* **2012**, *18*, 10643–10652.
12. Herczeg, M.; Mező, E.; Lázár, L.; Fekete, A.; Kövér, K. E.; Antus, S.; Borbás, A. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 3149–3158.
13. Herczeg, M.; Mező, E.; Eszenyi, D.; Antus, S.; Borbás, A. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 2919–2927.
14. Mező, E.; Herczeg, M.; Eszenyi, D.; Borbás, A. *Carbohydr. Res.* **2014**, *388*, 19–29.
15. Carretero, J. C.; Demillequand, M.; Ghosez, L. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 5125–5134.
16. Herczeg, M.; Mező, E.; Eszenyi, D.; Lázár, L.; Csávás, M.; Bereczki, I.; Antus, S.; Borbás, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 5570–5573.
17. Kövér Katalin és Komáromi István kutatócsoportjának még nem publikált eredményei.
18. Hoyle, C. E.; Lee, T. Y.; Roper, T. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2004**, *42*, 5301–5338.
19. Dondoni, A.; Marra, A. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 573–586.
20. L. Lázár, M. Csávás M. Herczeg, P. Herczegh, A. Borbás, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 4650–4653.
21. Lázár, L.; Csávás, M.; Hadházi, Á.; Herczeg, M.; Tóth, M.; Somsák, L.; Barna, T.; Herczegh, P.; Borbás, A. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 5339–5350.
22. Dénès, F.; Pichowicz, M.; Povie, G.; Renaud, P. *Chem. Rev.*, **2014**, *114*, 2587–2693.
23. Barnard, A.; Smith, D. K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6572–6581.
24. Csávás, M.; Demeter, T.; Herczeg, M.; Timári, I.; Kövér, K. E.; Herczegh, P.; Borbás, A. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 6983–6986.
25. Tollas, S.; Bereczki, I.; Borbás, A.; Batta, G.; Vanderlinden, E.; Naesens, L.; Herczegh, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 2420–2423.
26. Dallas, A.; Vlassov, A. V. *Med Sci Monit* **2006**; *12*, RA67–74.
27. Nielsen P. E. In *Chemical Synthetic Biology* Luisi, P. L.; Chiarabelli, C. Eds.; John Wiley & Sons, **2011**, pp 107–118.

Carbohydrates as potential therapeutics - from anticoagulation to gene-silencing

Synthesis of carbohydrate mimetics for potential pharmaceutical applications is one of our main research topics in the Department of Pharmaceutical Chemistry at the University of Debrecen. As therapeutical application of glycosides is hampered by their *in vivo* instability and their low binding affinity towards proteins, we focus on the design and synthesis of unnatural derivatives with an increased stability and with better binding properties.

In this article, we summarized our recent results in the following topics: i) synthesis and biological evaluation of heparinoid pentasaccharide sulfonic acids; ii) preparation of thio-linked glycosides by photoinduced free radical hydrothiolation of endocyclic double bond of sugars and application of the thiol addition method in the synthesis of self-assembling multivalent thiomannobioside ligands of mannose-binding lectins; iii) synthesis of a cysteinyl uridine pentapeptide, the first member of a novel type of peptide nucleic acids.