

Véralvadásgátló hatású pentaszacharid-szulfonsav származék szintézise

TDK dolgozat

Készítette: **Varga Eszter**

Témavezetők:

Dr. Borbás Anikó

Tanszékvezető, egyetemi docens

Dr. Herczeg Mihály

Tudományos munkatárs

Debreceni Egyetem Gyógyszerésztudományi Kar

Gyógyszerészi Kémiai Tanszék

Debrecen

2014.

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	2
2.	Irodalmi áttekintés	3
2.1.	A vérzéscsillapodás (hemosztázis)	3
2.2.	Az antikoagulánsok csoportosítása.....	5
2.2.1.	K-vitamin antagonisták (kumarinok, orális antikoagulánsok).....	5
2.2.2.	Heparin.....	6
2.2.3.	Indirekt Xa-gátló gyógyszerek (heparinoidok)	6
2.2.4.	Direkt Xa-gátló gyógyszerek	8
2.2.5.	Direkt trombingátlók.....	8
2.3	Szintetikus pentaszacharid-származékok előállítása – Előzetes eredmények és célkitűzés	8
2.4.	Az oligoszacharidok szintézisének alapjai	10
2.4.1.	Védőcsoportok szerepe az oligoszacharidok szintézisében	11
2.4.2.	Az oligoszacharid szintézisekben alkalmazott stratégiai eljárások.....	11
2.4.3	Tioglikozidok aktiválása	12
3.	Saját vizsgálatok	13
3.1.	Célkitűzés, saját szerep a kutatásban	13
3.2.	A védett pentaszacharid előállítása.....	14
3.3.	A védett pentaszacharid átalakítása	15
3.3.1.	Dezacetilezés / sóképzés	15
3.3.2.	Metilezés	15
3.3.3.	(2-Naftil)metil (NAP) védőcsoport eltávolítása.....	16
3.3.4	Oxidáció	17
3.3.5.	Karbonsavsó képzése	17
3.3.6.	Benzil-védőcsoportok eltávolítása	18
3.3.7.	Szulfátészter-csoportok bevitele	19
4.	Összefoglalás	25
5.	Kísérleti rész	20
6.	Irodalomjegyzék	26
7.	Rövidítések jegyzéke	29
8.	Köszönetnyilvánítás.....	31

1. Bevezetés

A thromboembólia korunk veszedelmes járványának mondható, különösen az iparosodott országokban megdöbbentő a gyakorisága. A verőereket érintő problémák, mint a szélütés, szívizomelhalás és érszűkület közismertnek mondhatóak, de mellettük az érrendszer „másik”, vénás oldalának a megbetegedései sem kevésbé gyakoriak és következményeikben ugyanolyan félelmetesek. A vénás trombózis, illetve a tüdőembólia az Európai Unió évente mintegy félmillió polgárának a halálához vezet, és a megbetegedés gyakorisága egyre nő, amelynek több oka is van. Ezek közt megemlítendő a mozgáshiányos életmód, a hosszú repülőutak, az egyébként hatásos gyógyszerek trombózisra hajlamosító mellékhatása, illetve a fogamzásgátlók és egyéb hormonkészítmények fokozott elterjedése. Hasonlóan a nyugati országokhoz, hazánkban is komoly népegészségügyi terhet jelent a vénás thromboembóliás betegek egyre növekvő száma. Fontos megjegyezni, hogy a betegség nem csak az akut szakaszában potenciálisan halálos volta miatt veszélyes, kései következményei is rendkívül súlyosak, az életkörülményeket jelentősen rontják (például a vénák elzáródását követő krónikus lábszárfekély).

Látható tehát, hogy a modern szemléletű alvadásgátló megelőzés és kezelés döntő jelentőségű a mai társadalomban, és kulcsfontosságú a leghatékonyabb és elegendő ideig alkalmazott terápia megválasztása. A szoros ellenőrzést igénylő és számos mellékhatással bíró hagyományos antikoagulánsok mellett ma egyre több az új alternatíva. A téma jelentőségét jól mutatja, hogy jelenleg is számos kutatás foglalkozik az újabb, kedvezőbb tulajdonságokkal bíró véralvadásgátlók előállításával.

A mi kutatócsoportunkban évek óta folynak intenzív kutatások a heparin-analóg pentaszacharidok szintézisével kapcsolatban. Az eddigi legnagyobb hatékonysággal bíró szintetikus analógot, az idraparinuxot használtuk vezérmolekulaként. A munka során olyan pentaszacharid-származékokat állítottunk elő, amelyek a szulfátészter-csoportok helyett metánszulfonsav-csoportokat tartalmaznak, ezáltal a biológiai közegben való stabilitás és az aktivitás növekedését is vártuk. A szintézis után vizsgáltuk ezen molekulák véralvadásgátló hatását is. A kapott eredmények alapjául szolgálhatnak további farmakológiai vizsgálatoknak és új szintetikus gyógyszerkészítmények kifejlesztésének is.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A vérzéscsillapodás (hemosztázis)

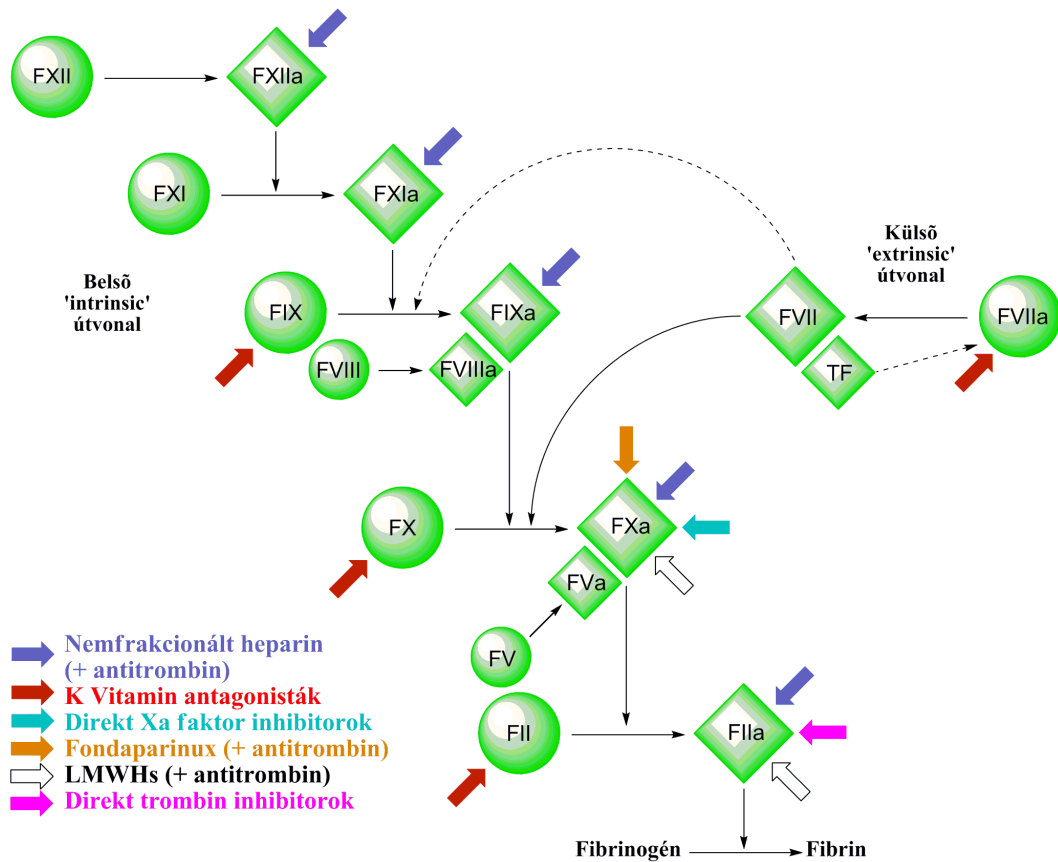
A hemosztázis fogalma alatt az érpályának azt a képességét értjük, amely lehetővé teszi, hogy a vér az érpályán belül megtartsa folyékony állapotát és abból kikerülve elveszítse azt, ún. véralvadékot képezve. A vérzéscsillapító mechanizmusok összességének pontos működése esszenciális a szervezet életben maradásához, alapvető jellemzői, hogy egészséges egyéneknél gyorsan működésbe lép, csak érsérülést követően aktiválódik, a sérülés helyére korlátozódik és a vérzéscsillapodás után inaktiválódik.¹ A hemosztázis kórosnak tekintendő, ha a vér az érpályán belül megalvad (thrombosis), vagy pedig a vér az érpályát elhagyva sem alvad meg (haemorrhagiás diathesis).

A vérzéscsillapodás három fő szakaszra bontható. A sérülést követően először helyi érszűkület (vasoconstrictio) jön létre, ez azonban csak átmeneti és csak a valóban hatásos és tartós vérzéscsillapító mechanizmusok megindulására ad időt. A második szakaszban történik a vérlemezkék (thrombocyták) kitapadása, aktiválódása és aggregálódása. Az aggregált thrombocytákból alakul ki az érsérülés helyéhez tapadó thrombocytadugó, azaz a fehér thrombus. Ezzel párhuzamosan megindul a harmadik szakasz, a véralvadás (koaguláció) folyamata, amely vérben oldhatatlan fibrinháló képződéséhez vezet, és az a vér sejtjes elemeivel együtt létrehozza a sérülést véglegesen és stabilan elzáró alvadékot (vörös thrombus).^{1,2} A továbbiakban a harmadik lépésre, a véralvadásra fókuszálok és ennek mechanizmusát mutatom be részletesebben.

A fibrinhálózat képződése egy többlépcsős reakciósorozat végeredménye. Az egymást követő lépésekben egy-egy proenzim alakul át aktív enzimmé (az enzimek egy kivétellel szerin-proteázok). Az aktivált enzim egy további proenzimben hasít peptidkötés(ek)e)t, és így módon aktivál egy újabb enzimet. Ezt az egyre gyorsuló folyamatsort nevezzük „véralváadási kaszkád”-nak.

Az alvadás folyamata két úton indulhat meg. Természetes körülmények között a véralvadás az extrinsic, azaz külső indíttatású út faktoraival indul meg, ez a korai fibrinképződéshez vezet. Az intrinsic, azaz belső indíttatású út folyamatsora később lép be, a normális véralvadáshoz ez az út is elengedhetetlen, hiszen ez a folyamat felelős a kaszkád felerősítéséért, és az alvadék stabilizálásáért. Ahogyan az **1. ábra** is mutatja, a két folyamat

csak a kezdeti lépésekben különbözik egymástól, más faktorok aktiválódnak, a későbbi lépések viszont már megegyeznek.



1. ábra: A véralvási kaszkád és a véralvadásgátlók támadáspontjai

Az extrinsic út, így a véralvadás legfőbb beindítója az aktivált VII faktor (FVIIa), de normál körülmények között a VII faktor csak rendkívül kis mértékben képződik és gyorsan inaktiválódik is. Azonban ha szöveti sérülést követően a VII faktor kapcsolatba lép a szöveti faktornak (TF) nevezett kofaktorával, akkor aktivitása jelentősen megnő, és beindul az extrinsic útvonal. A VIIa-TF komplex a X faktor aktiválásához (Xa) vezet, emellett a IX faktort is aktiválja, a IXa faktor pedig elősegíti és felgyorsítja az említett $X \rightarrow Xa$ átalakulást. Az extrinsic útvonal egyik fontos funkciója, hogy megindítja a belső, intrinsic útvonalat, amely a XI faktor aktiválásával kezdődik. A XI faktort az addig aktivált proteázok alakítják XIa-vá, ez a proteáz pedig a $IX \rightarrow IXa$ átalakulást indítja meg. A IXa faktor Ca^{2+} ionok, negatív töltésű foszfolipid-felület, és VIIIa faktor jelenlétében képes a X faktor aktiválására. A mindkét út során keletkezett Xa faktor a kaszkád kulcslépését, a protrombin (FII) $\rightarrow$ trombin (FIIa) átalakulást iniciálja. Az átalakításhoz szükséges aktivációs komplexben a Xa az aktív enzim, a protrombin a szubsztrát, az Va faktor a regulátor fehérje, a komplex Ca^{2+} -ok jelenlétében aktív lipidfelületen jön létre. A központi fontosságú trombin elengedhetetlen a

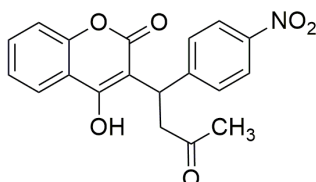
fibrinogén → fibrin átalakuláshoz, aktiválja a XI faktort, mely révén stabilizálódik a fibrinhálózatot, további közvetlen hatásként pedig aktiválja a thrombocytákat is, illetve gátolja a korai fibrinolízist. A fiziológiás alvadásszabályozás fontos eleme, hogy a trombin csak addig fejtsse ki hatását, amíg szükséges. Az inaktiválást a vérplazma egyik fehérjéje, az antitrombin (AT) végzi, mely a trombin enzimátikus hatását irreverzibilisen felfüggeszti. Az AT affinitása a trombin molekulához önmagában kicsi, ezáltal az antitrombin csak nagyon lassú folyamatban képes inaktiválni a trombint, de heparin jelenlétében az inaktivációs folyamat jelentősen felgyorsul. A véralvadásgátlók (antikoagulánsok) csoportjairól, köztük a heparinról és származékairól valamint támadáspontjaikról a következő fejezetben részletesen lesz szó.¹⁻³

2.2. Az antikoagulánsok csoportosítása

A jelenleg ismert antikoagulánsokat támadáspontjuk szerinti csoportosításban szeretném bemutatni, fokozott figyelmet fordítva a heparinokra és a heparin származék pentaszacharidokra, mivel ezek szorosan kapcsolódnak a saját kutatási témámhoz. A továbbiakban ismertetett véralvadásgátlókat és támadáspontjaikat az **1. ábrán** tüntettem fel.

2.2.1. K-vitamin antagonisták (kumarinok, orális antikoagulánsok)

A kumarinok (pl. *acenokumarol*, **2. ábra**) véralvadásgátló hatása azon alapul, hogy hatásuk következtében a K-vitamin dependens véralvadási faktorok: a protrombin (FII), a VII, a IX és a X faktor csak funkcióképtelen előanyagként szintetizálódnak a májban. Látható, hogy a véralvadást több ponton gátolják, hatásuk nem specifikus. Az orális adagolás a páciensek szempontjából előnyös, jól tolerálható, de a kumarin-származékoknak számos hátrányos tulajdonságuk is van. Hatásuk lassan alakul ki, terápiás ablakuk szűk, rendszeres kontrollt igényel használatuk, valamint interakcióba lépnek számos étellel és gyógyszerrel.¹



2. ábra: Acenokumarol

2.2.2. Heparin

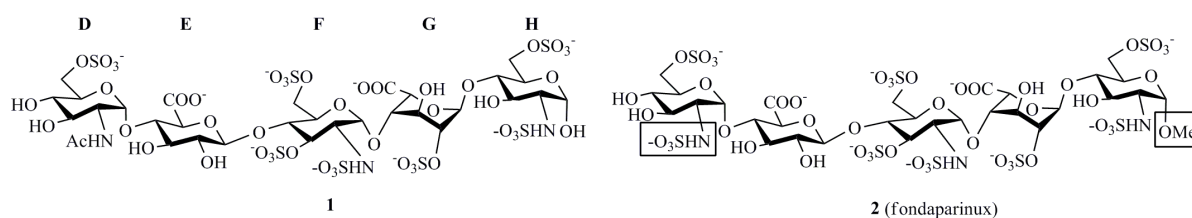
A gyógyászatban véralvadásgátlóként már az 1940-es évek óta alkalmazzák. Hatását indirekt módon, az antitrombinhoz kötődve fejti ki, ezáltal blokkolja a trombin és a Xa faktort a véralvadási kaszkádban. A heparin katalitikus szerepet játszik a trombin-antitrombin reakcióban. Az antitrombin és a trombin is nagy affinitással kötődik a heparinhoz, majd az így létrejött hármass komplexben az enzim aktív centruma és az inhibitor között kovalens kötés jön létre, és a trombin inaktiválódik. Az antitrombin heparin nélkül is képes kötődni a trombinhoz, de heparin jelenlétében sokkal nagyobb reakciósebességgel, kb. 2000-szer gyorsabban történik meg az inaktiváció. Minthogy a trombin-antitrombin komplex affinitása a heparinhoz kicsiny, a heparin szabaddá válik, és újra felhasználódhat egy következő reakcióban. Az ún. nem frakcionált heparin (UFH) a szulfatált glükózaminoglikánok csoportjába tartozó heterogén poliszacharid, különböző diszacharidegységekből épül fel, amelyeket egy aminocukor (D-glükózamin) és egy uronsav (D-glükuronsav vagy L-iduronsav) alkot. Az így felépült láncok hossza és molekulatömege változik, ráadásul a láncot alkotó egységek nagy része közömbös az alvadásgátló hatás szempontjából, viszont a mellékhatások létrehozásában szerepük lehet. Ezért az UFH-ból depolimerizálással, frakcionált, kis molekulatömegű heparinokat (LMWH) állítottak elő. (Minél kisebb a heparin molekulatömege, annál nagyobb mértékben csökken a trombinaktiváló és nő az FXa-ellenes hatása.) A heparinok csak parenterálisan adhatók, további hátrányuk, hogy vérzéses mellékhatásokat, illetve egy ritka, de nagyon súlyos mellékhatásként heparin indukálta thrombocytopeniát okozhatnak.

Belátható, hogy az első két csoport hatása nem specifikus, számos hátrányos tulajdonságuk van, ezért szükség volt új, célzottan ható antikoagulánsok kifejlesztésére.

2.2.3. Indirekt Xa-gátló gyógyszerek (heparinoidok)

Az indirekt, célzott Xa-gátlókat a heparinból fejlesztették ki, ezek is az antitrombinhoz kötődve hatnak. Az 1980-as évek elején fedezték fel, hogy az antitrombin aktiválását egy egyedi pentaszacharid okozza (1, 3. ábra). Ezután számos kutatási program indult olyan szintetikus pentaszacharid analógok szintetizálására, melyekkel a heparin mellékhatásai kiküszöbölhetőek, és hosszabb ideig tartó biológiai aktivitással rendelkeznek.⁴ Az egyik ilyen hatásosnak bizonyuló szintetikus pentaszacharid analóg az 1987-ben szintetizált *fondaparinux* (2, Arixtra[®], Sanofi-Aventis, majd GlaxoSmithKline) volt, előnye a nagyobb hatékonyság

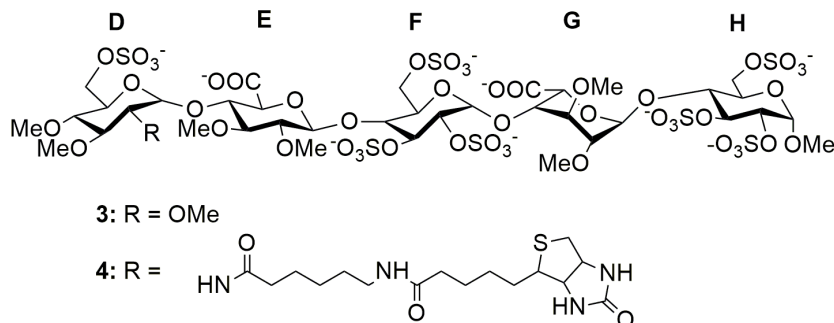
mellett a napi dózis jelentős csökkenthetősége volt.³⁻⁵ Érdeemes megemlíteni, hogy a fondaparinux máig az első és egyetlen forgalomban lévő szintetikus oligoszacharid gyógyszer.



3. ábra: A heparin aktív pentaszacharid egysége (1) és a fondaparinux (2)

Később olyan analógok kerültek előtérbe, melyek szintézise egyszerűbb, ilyen volt a teljesen *O*-szulfatált és *O*-metilezett származék, a nagy biológiai aktivitással bíró *idraparinux* (3, 4. ábra).

Előnyös tulajdonságai ellenére mégsem vált gyógyszerre, mivel a klinikai vizsgálatának harmadik fázisában kiderült, hogy a mellékhatásként fellépő vérékenység a hatóanyag nagyon hosszú felezési ideje (120 óra) miatt nehezen kezelhető, ezért a további fejlesztését leállították.⁶ Az *idrabiotaparinux*ot (4, 4. ábra) abból a célból fejlesztették ki, hogy az idraparinux okozta vérékenységi problémákat ki lehessen küszöbölni.⁷



4. ábra: Az idraparinux (3) és az idrabiotaparinux (4)

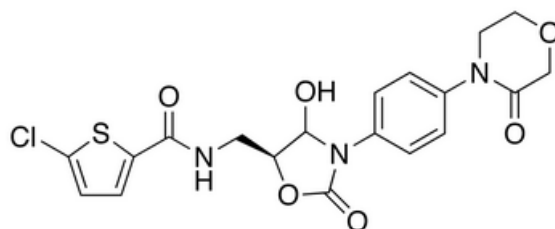
Vegyület	Név	Előállítás	Felezési idő	Dózis
	LMW heparin	Izoláció állati szervekből	1 óra	2x30 mg/nap v 40 mg/nap
2	fondaparinux (2)	55 lépéses szintézis	17 óra	2.5 mg/nap
3	idraparinux (3)	42 lépéses szintézis	120 óra	2.5 mg/hét

1. táblázat: Véralvadásgátló hatású természetes és szintetikus származékok összehasonlítása

Ez a molekula biotint tartalmaz és intravénás avidinnel inaktiválható, így vérzékenységi komplikációk fellépése esetén avidin hozzáadásával a véralvadásgátló hatás könnyen és gyorsan semlegesíthető.

2.2.4. Direkt Xa-gátló gyógyszerek

A célzott, direkt Xa-inhibitorok nem igényelnek antitrombint hatásuk kifejtéséhez, a molekula aktív centrumában hatnak. Jellemzőjük, hogy az FXa-t nemcsak a plazmában és a protrombinképző komplexben, hanem a thrombusban is gátolják, mivel kis molekulatömegük következtében oda is penetrálnak. A *rivaroxaban* (Xarelito, Bayer) az első ilyen új, orálisan alkalmazható, nagy szelektivitású FXa-inhibitor.^{1,5}



5. ábra: Rivaroxaban

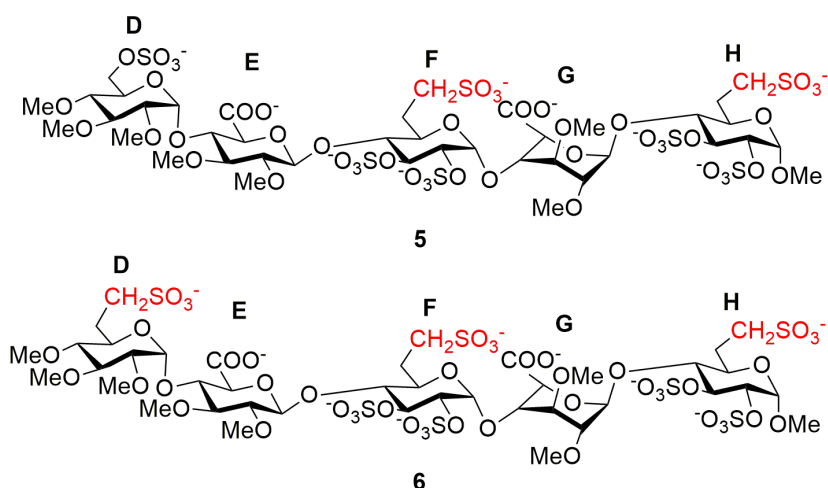
2.2.5. Direkt trombingátlók

A trombin (FIIa) gátlásának elsődleges célja a fibrinképződés megakadályozása. Az eddig ismert legerősebb, irreverzibilis trombingátló az orvosi piócából izolált *hirudin*, mely hatását a trombinhoz kötődve, azzal 1:1 arányban enzim-inhibitor komplexet képezve fejt ki. A hirudin csak parenterálisan adható, létezik azonban szintetikus, orálisan adható, hatékony, direkt trombininhibitor is, ilyen a *dabigatran-etexilát* (Pradaxa, Boehringer Ingelheim).^{2,5}

2.3 Szintetikus pentaszacharid-származékok előállítása – Előzetes eredmények és célkitűzés

A kutatócsoportunk évekkal ezelőtt céljaként tűzte ki, hogy az idraparinuxot vezérmolekulaként használva, azon különböző változtatásokat végrehajtva új típusú antikoaguláns pentaszacharid-származékokat állít elő. Az új irányvonalat az jelentette, hogy az idraparinux farmakofór szulfátészter-csoportjait ($-\text{OSO}_3^-$) bioizoszter metánszulfonsav-csoporttal ($-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$) kívántuk helyettesíteni. Feltételeztük, hogy a szulfonsav-sók is

biztosíthatják a biológiai aktivitáshoz szükséges ionos kötések kialakulását, ráadásul ellenállnak a szulfatázok és az észterázok hidrolitikus hatásának, ezért tovább képesek a szervezetben maradni. Az elmúlt évek során két ilyen, szulfonsav tartalmú származékot sikerült szintetizálni (származékonként ~50 lépést igényelt az előállítás).⁸ Az egyik származék, a pentaszacharid-diszulfonsav, az **F** és a **H** egységen tartalmaz metánszulfonsav-csoportot, míg a másik sikeresen szintetizált molekulán, a pentaszacharid-triszulfonsav származékon, a **D**, **F**, **H** egységen is megtörtént a szulfátészter csoport cseréje szulfonátometil csoportra.



6. ábra: A pentaszacharid-diszulfonsav (5) és a pentaszacharid-triszulfonsav (6)

Az előállított két származékkal elvégezték a Xa faktor-gátlás vizsgálatát, amely meglehetősen érdekes eredményeket szolgáltatott (**2. táblázat**).^{8e} A vizsgálat azt mutatta, hogy a diszulfonsav-származék kimagasló anti-Xa hatással bír, még az eddig leghatékonyabbnak bizonyuló idraparinux aktivitását is felülmúlja. Ezzel szemben a triszulfonsav-származék csekélynek mondható Xa-gátló aktivitást mutatott.

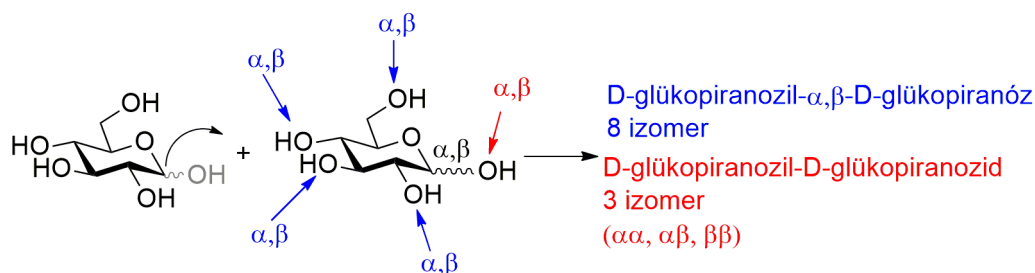
Vegyület neve	Anti-Xa aktivitás (U/mg)
fondaparinux (2, Arixtra)	1195±189
idraparinux (3)	1911±193
pentaszacharid-diszulfonsav (5)	2153±153
pentaszacharid-triszulfonsav (6)	384±139

2. táblázat: A pentaszacharidok anti-Xa aktivitása

Ezekből az eredményekből kiindulva elhatároztuk, hogy a szerkezet-hatás összefüggések minél teljesebb megismerése érdekében további szulfonsav-tartalmú származékokat szintetizálunk. A két csoport (szulfát-észter és metánszulfonsav-csoport) három lehetséges pozícióban (**D, F, H** egységeken) való kombinálásával összesen 2^3 , azaz 8 különböző vegyület állítható elő. Ebből hármat, az idraparinuxot, az említett pentaszachrid-diszulfonsav és pentaszacharid-triszulfonsav származékokat már sikeresen előállítottuk, így ezután a további öt pentaszacharid szintézise lett a kitűzött cél. Ezen öt pentaszacharid közül én, saját munkám során, olyan monoszulfonsav származék előállításán dolgoztam, mely a szulfonátometil-csoportot az **F** egységen tartalmazza. A „Saját vizsgálataim” című fejezetben ennek a vegyületnek a szintézisét mutatom be részletesen.

2.4. Az oligoszacharidok szintézisének alapjai

Az oligoszacharidok előállítása során két polifunkciós molekulát kell glikozidos kötéssel regio- és sztereoszelektíven összekapcsolni. Regioizomereket eredményez a glikozidos kötés megvalósulásának lehetséges sokfélesége, hiszen a donor molekula glikozidos szénatomja az akceptor bármelyik hidroxiljával összekapcsolódhat, továbbá a kötés a glikozidos centrumhoz α - vagy β -oldalról is csatlakozhat, így minden regioizomer kétféle (a glikozidos centrumok összekapcsolódásánál háromféle) sztereoizomer formában keletkezhet.



7. ábra: Glükopiranoz molekulák összekapcsolódása diszachariddá

Megemlítendő továbbá, hogy a glikozidos kötés konfigurációjának kialakulását két alapvető elv vezérli: az anomer effektus (az α -glikozidok kialakulásának kedvez), és a szomszédcsoporthoz való részvétel a C-2-n. A glikozil donor anomer konfigurációjával általában nem lehet kontrollálni a kialakuló glikozidos kötés térállását, mivel a glikozilezés döntően monomolekuláris (S_N1) mechanizmus szerint megy végbe. A regioszelektivitás biztosítása érdekében a glikozil akseptornak általában csak a glikozilezendő hidroxilcsoportja szabad, a többi csoportját különböző védőcsoportokkal blokkolják. A glikozil donor anomer

centrumában könnyen aktiválható, jól távozó csoport található, és ennek az egységnek a hidroxilcsoportjait is védik, nehogy glikozil akceptorként is részt vegyen a reakcióban. A sztereoszelektivitást a megfelelő reakciókörülmények (pl. hőmérséklet, oldószer) alkalmazásával, valamint a védőcsoportok helyes megválasztásával lehet elérni. Az így előállított védett oligoszacharidról a védőcsoportok eltávolítását lehetőleg olyan enyhe körülmények között kell végezni, hogy a már kialakult interglikozidos kötések ne hasadjanak és ne anomerizálódjanak. Mindezeket figyelembe véve azt mondhatjuk, hogy egy több egységből álló oligoszacharid felépítése nagy körültekintést igénylő, kihívásokkal teli folyamat. Összehasonlítva peptidek, illetve nukleinsavak szintézisével, az oligoszacharidok kémiai előállítása jóval nehezebb feladatnak bizonyul.^{9,10}

2.4.1. Védőcsoportok szerepe az oligoszacharidok szintézisében

Az oligoszacharid-kémiában a védőcsoportok helyes megválasztása nagyon fontos szempont. Figyelembe kell venni, hogy az adott csoportok hogyan befolyásolják a glikozilezési reakcióban a donor reaktivitását vagy a kialakuló glikozidos kötés térállását. A rendelkezésre álló védőcsoportok rendkívül nagy választéka lehetővé teszi minden egyes hidroxil megfelelő, egyedi védelmét, ami alapvető fontosságú a sikeres szintézishez. Leggyakrabban éter, acetál vagy észter csoportokkal védjük a hidroxilokat. A védőcsoportokat az adott szintézisben betöltött szerepük szerint állandó vagy időleges csoportokra oszthatjuk. Állandó védőcsoportokkal azokat a pozíciókat látjuk el, ahol a végtermék szabad hidroxilt tartalmaz, így azokat a szintézis utolsó lépésében távolítjuk el. Időleges védőcsoportokkal védjük azokat a hidroxilokat, amelyeket a szintézis egy adott fázisában fel kell szabadítanunk, valamilyen átalakítás, pl. lánchosszabbítás, láncelágazás vagy funkciók csoport kialakítása céljából.⁹⁻¹¹

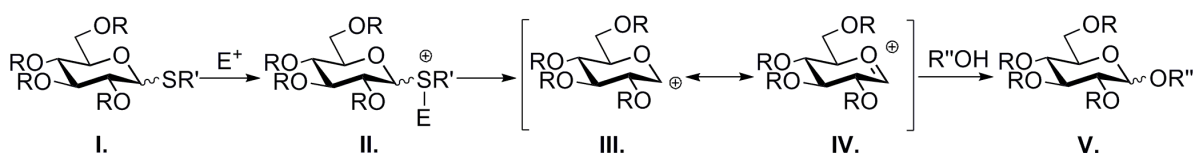
2.4.2. Az oligoszacharid szintézisekben alkalmazott stratégiai eljárások

Az oligoszacharidok előállítására többféle stratégia létezik, ezek közül kettőt mutatok be, a lépésenkénti módszert és a blokk szintézist. A lépésenkénti szintézis során mindig egy monoszacharid egységgel nő az oligoszacharid lánc. Az egymást követő glikozilezési lépések között mindig el kell távolítani a védőcsoportot az egyre nagyobb tagszámú oligoszacharid glikozilezendő hidroxilcsoportjáról. Ezzel ellentétben, a blokk szintézisek során a kívánt oligoszacharidot kisebb tagszámú oligoszacharid egységekből építik fel. Az egyik blokkot

glikozil donorra alakítják, majd elvégzik vele a másik egység szabad hidroxilcsoportjának a glikozilezését. A blokk szintézis alkalmazásának előnye, hogy csökkenti a reakciólépések számát, valamint lehetőséget ad arra, hogy a nehezebben kialakítható glikozidos kötéseket diszacharid szinten valósítsák meg.¹⁰

4.2.3 Tioglikozidok aktiválása

A tioglikozidok a stabil glikozil donorkok csoportjába tartoznak, és nagymértékű stabilitást mutatnak számos védőcsoport manipuláció során. Leggyakoribb képviselői a metiltio-,¹² etiltio-,¹² és feniltio¹³-glikozidok. Kezdetben promotorként HgSO_4 ¹³-ot, PhHgOTf ¹⁴-ot vagy NBS ¹⁵-t alkalmazták, de ekkor még csak gyenge hozamokat tudtak elérni használatukkal. Jobb hozamot kaptak, amikor a toxikus metil-triflát¹⁶ volt az aktiváló ágens. MeOTf alkalmazása során előfordulhat, hogy az aglikon részben metileződik, főleg ha alacsony reaktivitású az akceptor. Később még hatékonyabb tiofil promotorok kifejlesztésére került sor, például a dimetil(metiltio)sulfónium-trifluormetánszulfonát (DMTST),¹² a NIS/TfOH ¹⁷ és a jódonium-dikollidin-perklorát (IDCP),¹⁸ amelyek alkalmazása során anomer szulfónium ion intermediereken keresztül játszódik le a glikozilezési reakció (8. ábra). Munkám során $-\text{SPh}$ glikozidot használtam donorként NIS/AgOTf aktiválás mellett.

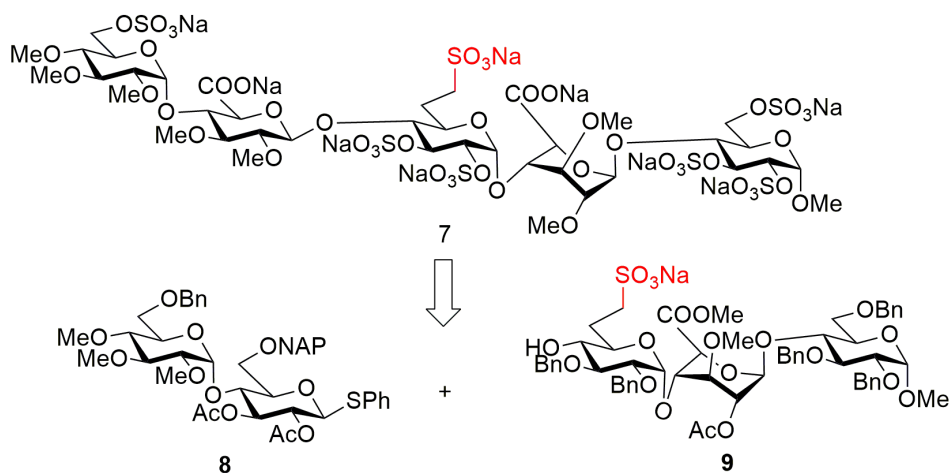


8. ábra: Tioglikozidok aktiválásának általános sémája

3. Saját vizsgálatok

3.1. Célkitűzés, saját szerep a kutatásban

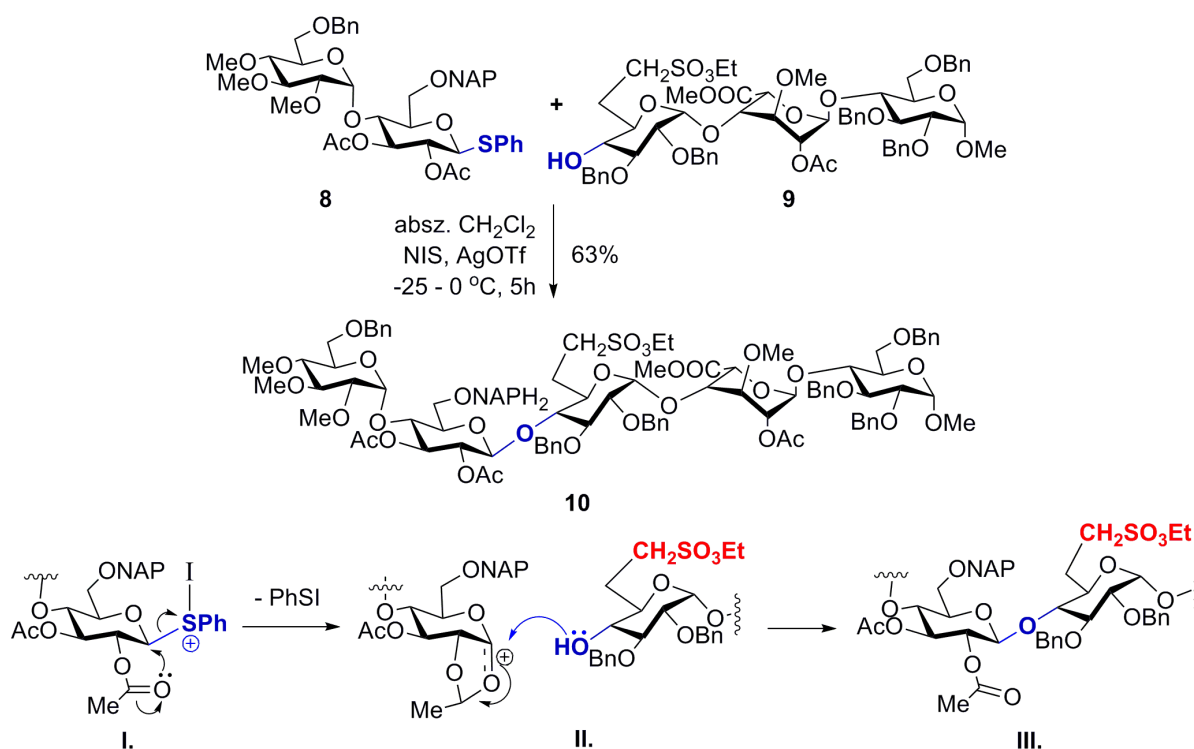
A 2.3. fejezetben részletesen bemutattam a kutatócsoportunk eddigi eredményeit, és az ezek alapján kitűzött további céljainkat. Tehát fő célként a pentaszacharid di-, és triszulfonsav-származék előállítását után, az **F** egységen szulfonsav-csoportot tartalmazó monoszulfonsav-származék (7, **9. ábra**) szintézisét tűztük ki. Személyesen a kutatás azon fázisában kapcsolódtam be a kutatócsoport munkájába, amikor a védőcsoport stratégia a korábbi tapasztalatok alapján már kirajzolódott. Továbbá a pentaszacharid építőegységei, a diszacharid donor (**8**) és a szulfonsav-tartalmú triszacharid akceptor (**9**), már rendelkezésemre álltak. A reakciók kivitelezéséhez is támaszkodhattam a már szintetizált vegyületeinknél szerzett tapasztalatokra, természetesen számos esetben módosítva azt, a saját vegyületem tulajdonságaihoz alkalmazkodva. Mindezeket figyelembe véve, a saját céljaim a triszacharid akceptor és a diszacharid donor sikeres kapcsolása, és a védett pentaszacharid céltermékké alakítása voltak. A céltermék előállítása több szempontból is fontos feladat. Egyrészt a biológiai vizsgálatok elvégzése révén kiderül, hogy milyen antikoaguláns hatással bír ez a monoszulfonsavas származék, ezáltal a szerkezet-hatás összefüggésekről teljesebb képet kaphatunk. Ezen túl az átalakítási lépések során szerzett újabb tapasztalatok nagyban segíthetik a kutatás jövőbeli további folytatását, amely reményeink szerint alapjául szolgálhat új, még hatékonyabb antikoaguláns gyógyszerek kifejlesztésének.



9. ábra: A tervezett monoszulfonsav szerkezete és retroszintetikus analízise

3.2. A védett pentaszacharid előállítása

A védett, F egységen szulfonsav-csoportot tartalmazó pentaszacharid-származékot (**7**, **9. ábra**) a korábban előállított vegyületek szintézisének tapasztalatai alapján [2+3] blokk szintézissel állítottuk elő (**DE** donor + **FGH** akceptor). Szintén a korábbi tapasztalatok alapján úgy terveztük a szintézist, hogy a blokk szintézishez olyan **DE** diszacharid építőelemet használunk, amelyekben a glükuronsav hexóz perkurzora található, és az uronsavvá oxidálást pentaszacharid-szinten hajtjuk majd végre. Így a **8** tioglikozid donort alkalmaztuk a pentaszacharid váz felépítéséhez. A donor (**8**) és a glikozil akceptor (**9**) keverékét száraz CH_2Cl_2 -ban oldottuk. A kapcsolást *N*-jód-szukcinimid (NIS) és AgOTf aktiválószerrel jelenlétében hajtottuk végre, $-25\text{ }^\circ\text{C}$ -on, a vízmentes körülmények biztosítása céljából molekulaszitát is adtunk a reakcióelegyhez. A glikozil donor C-2 helyzetében található acetil védőcsoport α -oldali résztvevő hatásának köszönhetően a reakció során sztereoszelektív módon csak a megfelelő β -glükózid (**10**) keletkezett.



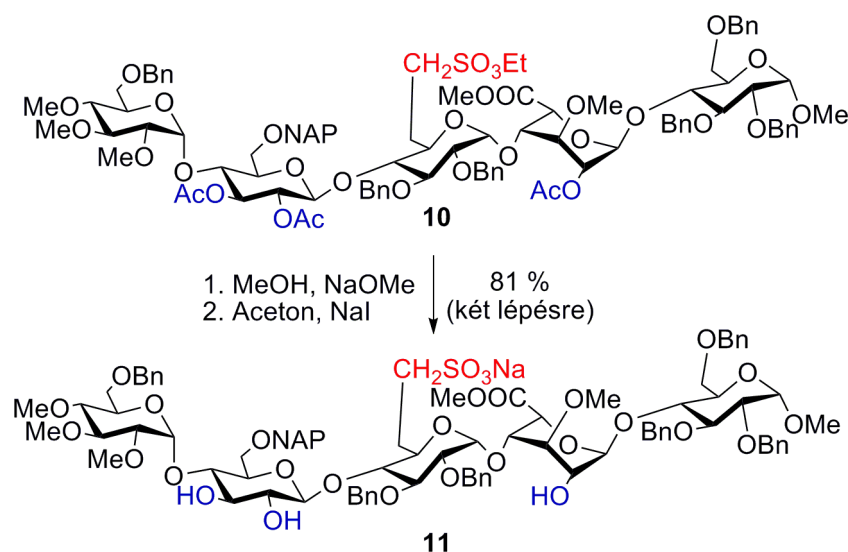
10. ábra: A védett pentaszacharid előállítása és az 1,2-*transz* glikozidos kötés kialakulásának mechanizmusa

Ezzel a pentaszacharid váz elkészült, de a célvegyületnek ez csak prekursora; számos további lépés szükséges a végtermékig: ki kell alakítani az uronsavat, eltávolítani a védőcsoportokat és kialakítani a metiléter és szulfátészter csoportokat.

3.3. Átalakítások a pentaszacharidon

3.3.1. Dezacetilezés / sóképzés

A kész pentaszacharidon végrehajtandó további átalakítások első lépéseként dezacetilezést hajtottunk végre Zemplén-féle módszerrel. A kiindulási anyagot (**10**) metanolban oldottuk fel, majd NaOMe-t hozzáadásával végeztük el az acetyl védőcsoportok eltávolítását. A szokásos feldolgozási módszert, az ioncserélő gyanta alkalmazását jelen esetben nem lehetett alkalmazni, mivel a szulfonsav-észterből felszabadulna a szulfonsav, amely gyakorlatilag megemésztene a pentaszacharidot a glikozidos kötések bontása révén. Ebből kifolyólag a reakció feldolgozását úgy végeztük, hogy 1-2 csepp ecetsav hozzáadásával semlegesítettük a bázikus katalizátort. Ezt követően, a terméket acetonban oldottuk, majd NaI-ot hozzáadva nukleofil szubsztitúciós reakcióban sót képeztünk a szulfonsav-észterből, így kaptuk meg a **11** molekulát.

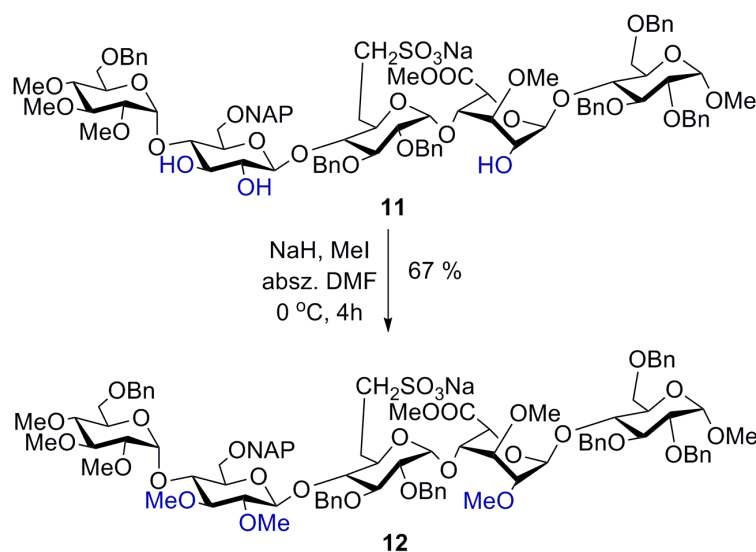


11. ábra: Az észter csoportok eltávolítása

3.3.2. Metilezés

Harmadik lépésben a szabad hidroxilcsoportok metilezését hajtottuk végre. A kiindulási anyagot (**11**) száraz DMF-ben oldottuk, majd 0 °C-ra hűtöttük. A metilezést NaH jelenlétében MeI-dal végeztük. A reakciótermékről mért MALDI spektrumból kiderült, hogy a reakció nem ment teljesen végbe, csak egy hidroxilcsoport metileződött. Ezután a reakciót azonos reakciókörülmények mellett megismételtük, az ismételt reakció termékéről mért MALDI

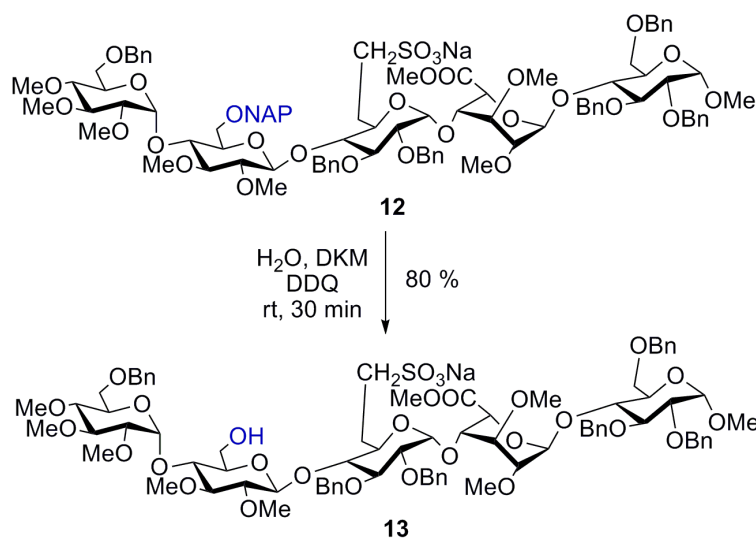
spektrum már azt mutatta, hogy sikeresen végbement a reakció, az összes hidroxilcsoportot sikerült metilezni.



12. ábra: Metilezési reakció

3.3.3. (2-Naftil)metil (NAP) védőcsoport eltávolítása

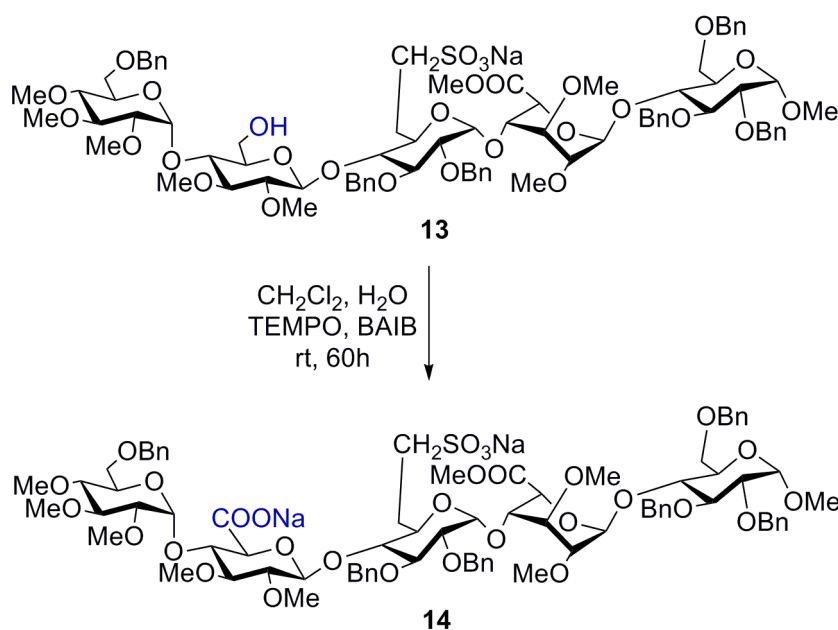
Következő lépésként szelektíven eltávolítottuk az **E** egység 6-os helyzetű (2-naftil)metil-csoportját oxidatív körülmények között, 2,3-diklór-5,6-dicián-1,4-benzokinon (DDQ) reagenssel. A kiindulási anyagot (**12**) DKM és H₂O elegyében oldottuk, ezután adtuk hozzá a DDQ-t¹⁹.



13. ábra: Szelektív NAP-éter eltávolítás

3.3.4 Oxidáció

Az előző reakció következtében felszabadult 6-os helyzetű hidroxilcsoportot oxidáltuk (biszacetoxi)jódbenzol (BAIB) és (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il)oxil (TEMPO) reagensok alkalmazásával²⁰. A reakciót vékonyréteg kromatográfiásan követve azt tapasztaltuk, hogy a reakció az adott körülmények között nem ment végbe, így a reagensok hozzáadását kétszer is megismételtük. Így már lejátszódott a reakció, de a tömegspektrometriás vizsgálat alapján arra következtethetünk, hogy a várt termékünk (**14**) mellett többszörösen oxidált származékok is keletkeztek. Sajnos így a vártól jóval több anyagvesztésünk lett. A melléktermékektől oszlopkromatográfiás módszerrel próbáltuk elválasztani a várt termékünket, de teljesen nem sikerült megtisztítani többszöri próbálkozás ellenére sem. A reakciósort így is folytatni tudtuk, azzal a reménnyel, hogy a későbbi reakciók után sikerül teljesen elválasztani a termékünket és a keletkezett melléktermékeket.

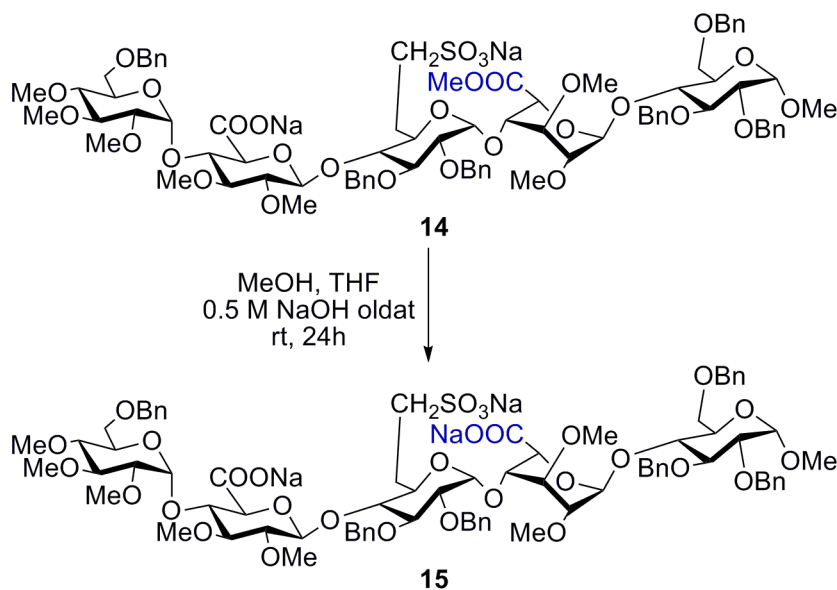


14. ábra: Oxidáció

3.3.5. Karbonsavsó képzése

Következő lépésként az L-iduronsav egység karbonsav-metilészter csoportját 0.5 M-os NaOH-oldattal MeOH és THF elegyében hidrolizálva nyertük a tri-nátriumsót (**15**). Megjegyezném, hogy az előző reakció (oxidáció) feldolgozása után a szerves fázissal végeztük tovább ezt a lépést a továbbiakkal egyetemben, mivel a MALDI eredmények alapján

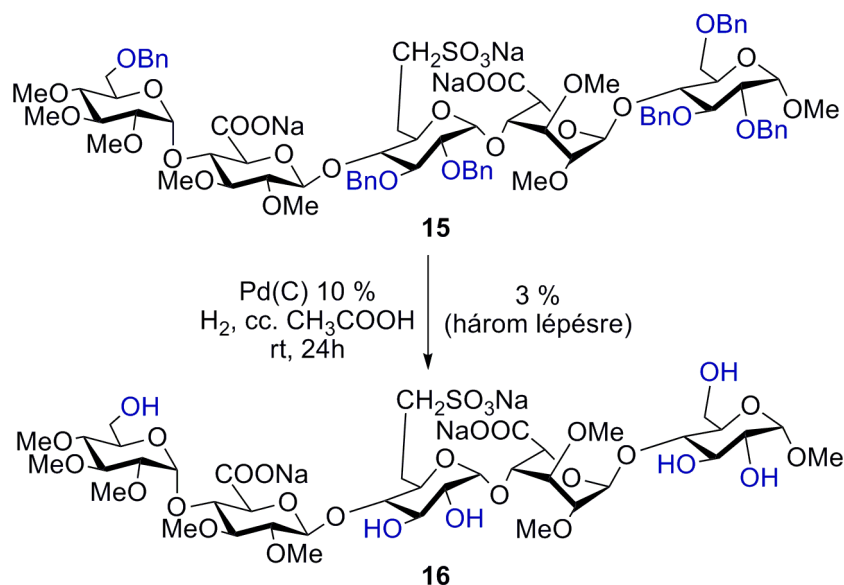
úgy találtuk, hogy csak a szerves fázisban van termékünk, a vizes fázis csak melléktermékeket tartalmaz.



15. ábra: A karbonsav-észter hidrolízis

3.3.6. Benzil-védőcsoportok eltávolítása

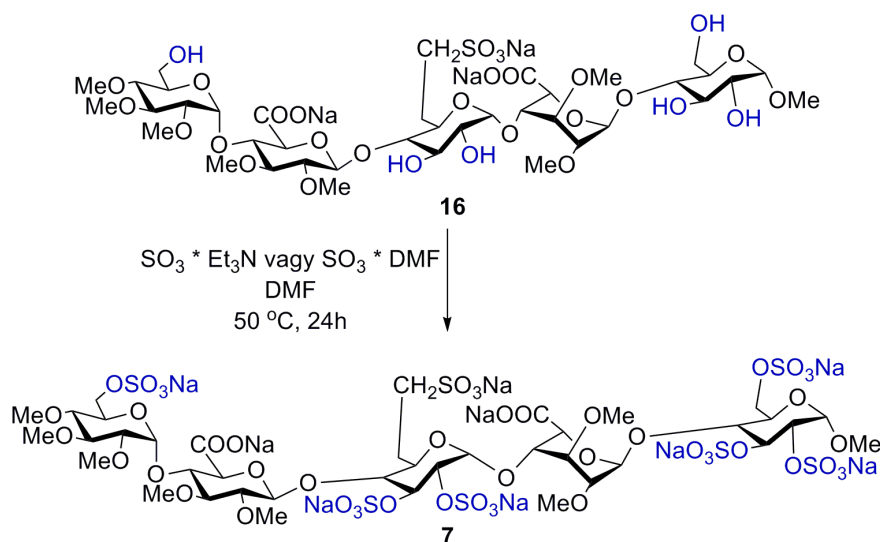
Ezután, a benzil-védőcsoportokat katalitikus hidrogénezéssel távolítottuk el, a reakciót nyomásálló bombacsőben hajtottuk végre. A **15** molekulát 96 %-os etanolban oldottuk fel, majd Pd(C) katalizátort és tömény ecetsavat adtunk hozzá, végül lezártuk a bombát és feltöltöttük H₂-gázzal. Itt megjegyezném, hogy a reakció kiindulási anyagában olyan származékok is voltak, amelyekről a benzil csoportok egy része már az oxidációs lépés során eltávozott, így ettől a reakciótól a termékünk egységesedését vártuk, és ezt is tapasztaltuk.



16. ábra: Hidrogénezés

3.3.7. Szulfátészter-csoportok bevitele

Az átalakítási reakciósor utolsó lépésében a felszabadult hidroxil-csoportokat SO₃·Et₃N-komplexszel terveztük észtereszíteni, és így előállítani a célvegyületünket (7). A reakció után tömegspektrumot készítettünk a termékünkről, melyből kiderült, hogy a szulfatálás nem ment teljesen végbe, mindössze egy szulfát-csoportot sikerült bevinnünk a molekulára. A reakciót a reagens módosításával ismételtük meg, ezúttal SO₃·DMF-komplexet használtunk. Így végül sikerült az összes szulfát-csoport bevitelével a céltermékünket, az átalakított pentaszacharidot előállítani.



17. ábra: Szulfátészter csoportok kialakítása

4. Kísérleti rész

A reakciók lefutását vékonyréteg kromatográfiásan követtük, a termékek tisztaságát is így ellenőriztük. A vizsgálatokat Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) rétegen végeztük, a használt oldószer az R_f értékek után szerepel. Az anyagok detektálására UV-lámpa fénye ($\lambda_1 = 254$ nm és $\lambda_2 = 366$ nm), illetve 5%-os etanolos kénsavoldatba történő merítés és 140 °C-ra melegítés szolgált. Oszlopkromatográfiás tisztításhoz és elválasztáshoz Szilika gél 60 (Merck 0.063-0.200 mm), Sephadex LH-20 és G-25 (Sigma-Aldrich, Bead size 25-100 μ) gélét alkalmaztunk. A szerves oldatokat MgSO₄-tal szárítottuk, majd csökkentett nyomáson, 40 °C-os vízfürdő alkalmazásával pároltuk be. A glikozidos kapcsolásnál az alacsony hőmérsékletet acetone folyékony nitrogén elegyével, Dewar-edényben biztosítottuk. Az optikai forgatóképesség mérések Perkin-Elmer 241 fényelektromos polariméteren, szobahőmérsékleten történtek. Az olvadáspontokat Kofler készülékben határoztuk meg, az értékek nem korrigáltak. Az NMR spektrumok Bruker DRX-400 (¹H 400.13 MHz, ¹³C 100.03 MHz) spektrométeren készültek CDCl₃, CD₃OD vagy D₂O oldószerben Me₄Si belső standard alkalmazásával (Me₄Si: 0.00 ppm ¹H; CDCl₃: 77.00 ppm ¹³C). A használt oldószereket az egyes vegyületek leírásánál adjuk meg. A MALDI-TOF MS mérések BIFLEX III (Bruker) tömegspektrométeren pozitív reflektrom módban történtek. A mátrix 2,4,6-trihidroxiacetofenon (THAP) telített MeCN-es oldata volt. Az ESI-TOF MS spektrumok felvétele MicrOTOF-Q (Bruker) készüléken zajlott, pozitív reflektrom módban. Az elemanalízisek Elementar Vario Micro Cube (CHNS) műszerrel lettek meghatározva. A vegyületek leírását növekvő szám szerint adtam meg.

Metil-(6-O-benzil-2,3,4-tri-O-metil- α -D-glükopiranozil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[2,3-di-O-acetil-6-O-(2-naftil)metil- β -D-glükopiranozil]-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-benzil-6-dezoxi-6-C-etoxiszulfonilmetil- α -D-glükopiranozil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[metil-(2-O-acetil-3-O-metil- α -L-idopiranozil)-uronát]-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-benzil- α -D-glükopiranozid) (10)

1.2 g (1.04 mmol) akceptort (9) és 1.23 g (1.55 mmol, 1.5 ekv.) donort (8) oldottunk 35 mL száraz DKM-ban. A vízmentes körülmények biztosítása érdekében 4 Å-s (1.0 g) molekulaszitát is adtunk az elegyhez, majd 30 percig kevertettük szobahőmérsékleten. Ezután az oldatot lehűtöttük -35 °C-ra, és további 20 percig kevertettük. Ezt követően aktiváltuk a reakcióelegyet 524 mg (2.33 mmol, 1.5 ekv. donorra nézve) NIS száraz THF-os (1.5 mL), és

96 mg (0.37 mmol, 0.24 ekv. donorra nézve) AgOTf, száraz toluolos (1.5 mL) oldatának keverékével, majd hagytuk a reakcióelegyet felmelegedni 0 °C-ig 4 órán át. A feldolgozás során hígítottuk DKM-nal a reakcióelegyet, majd szűrtük Celite®-rétegen, ezután mostuk telített Na₂S₂O₃- és NaHCO₃-oldatokkal, valamint H₂O-val semlegesre. Végül a szerves fázist szárítottuk és bepároltuk. A tisztítást oszlopkromatográfiásan végeztük (I. 6:4 Hexán-EtOAc, II. 96:4 CH₂Cl₂-EtOAc). **Hozam:** 1.217 mg (63%) szirup. [α]_D +26.3 (c 0.06, CHCl₃); R_f 0.33 (1:1 Hexán-EtOAc); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) 7.81-7.15 (m, 37H, arom.), 5.24-4.22 (m, 21H, 6 x Bn-CH₂, 5 x H-1, NAP-CH₂, SO₃Et-CH₂), 3.96-3.01 (m, 46H, 20 x váz-H, 3 x H-6a,b, 6 x OCH₃, H-7a,b), 2.33-2.20 (m, 1H, H-6a-F), 2.04, 1.99, 1.93 (m, 9H, 3 x Ac-CH₃), 1.87-1.76 (m, 1H, H-6b-F), 1.57 (t, 3H, SO₃Et-CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ (ppm) 170.3, 170.1, 169.9, 169.5 (4C, 4 x CO) 139.2, 139.1, 138.2, 138.1, 138.0, 137.9, 136.0, 133.4, 133.0 (9C, 9 x C_q arom.), 128.5-125.6 (37C, arom.), 101.1, 98.3, 98.1, 97.9, 97.6 (5C, 5 x C-1), 83.2, 82.1, 81.8, 80.2, 79.8, 79.5, 79.3, 76.1, 75.1, 74.9, 74.8, 74.6, 74.5, 74.2, 73.8, 73.4, 72.9, 71.2, 70.2, 69.1 (20C, vázszenek), 74.9, 74.6, 73.8, 73.5, 73.4 (7C, 6 x Bn-CH₂, NAP-CH₂), 68.7, 68.4, 68.3 (3C, 3 x C-6), 66.3 (1C, SO₃Et-CH₂), 60.8, 60.4, 59.4, 58.2 (4C, 4 x OCH₃), 55.3 (1C, C-1-OCH₃), 51.9 (1C, COOCH₃), 46.6 (1C, C-7-F), 25.9 (1C, C-6-F), 21.2, 21.0, 20.7 (3C, 3 x Ac-CH₃), 15.2 (1C, SO₃Et-CH₃); MALDI-TOF: mért: *m/z* 1862.74 [M+Na]⁺ (Számított: 1861.7). *Anal.*: Számított: C₉₈H₁₁₈O₃₂S (1840.03): C, 55.91; H, 6.86. Mért: C, 56.11; H, 6.99.

Metil-(6-O-benzil-2,3,4-tri-O-metil- α -D-glükopiranozil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[6-O-(2-naftil)metil- β -D-glükopiranozil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(nátrium-2,3-di-O-benzil-6-dezoxi-6-C-szulfonátometil- α -D-glükopiranozil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[metil-(3-O-metil- α -L-idopiranozil)-uronát]-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-benzil- α -D-glükopiranozid) (11)

1.217 g (0.661 mmol) **10**-et oldottunk 35 mL MeOH-ban, majd hozzáadtunk 36 mg NaOMe-t, és szobahőmérsékleten kevertettük az elegyet egy napig. A reakció lejátszódása után 1-2 csepp CH₃COOH-val semlegesítettük az oldatot, majd bepároltuk. Ezután a nyersterméket 40 mL acetonban oldottuk, majd hozzáadtunk 148.6 mg NaI-t (0.992 mmol, 1.5 ekv./észter) és szobahőmérsékleten kevertettük 24 órán át. A reakció lejátszódása után bepároltuk az elegyet, és Sephadex LH-20 oszlopon tisztítottuk metanol eluens alkalmazásával. **Hozam** (két lépésre): 919 mg (81%) szirup. [α]_D +33.7 (c 0.11, CHCl₃); R_f 0.28 (95:5 CH₂Cl₂-Aceton); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) 7.79-7.07 (m, 37H, arom.), 5.34-4.21 (m, 19H, 6 x Bn-CH₂, 5 x H-1, NAP-CH₂), 3.98-2.87 (m, 49H, 20 x váz-H, 6 x OCH₃, 3 x H-6a,b, H-7a,b, 3 x

OH), 2.43-2.38 (m, 1H, H-6a-F), 2.13-2.03 (m, 1H, H-6b-F); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 171.3 (1C, CO), 140.7, 140.1, 139.4, 139.3, 138.9, 137.4, 134.6, 134.3 (9C, 9 x C_q arom.), 129.4-126.8 (37C, arom.), 104.3, 102.2, 99.5, 98.9, 96.0 (5C, 5 x C-1), 84.6, 83.5, 81.7, 81.3, 81.2, 80.7, 80.3, 79.7, 78.0, 76.3, 75.9, 75.6, 72.6, 72.3, 71.6, 70.8, 69.2, 67.9 (20C, vázszenek), 75.7, 74.9, 74.4, 74.2, 73.9 (7C, 6 x Bn-CH_2 , NAP-CH_2), 69.8 (3C, 3 x C-6) 60.9, 60.8, 59.8, 58.5 (4C, 4 x OCH_3), 55.5 (1C, C-1- OCH_3), 52.9 (1C, COOCH_3), 48.2 (1C, C-7-F), 27.6 (1C, C-6-F); MALDI-TOF: mért: m/z 1729.72 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (Számított: 1729.64). *Anal.*: Számított: $\text{C}_{90}\text{H}_{107}\text{NaO}_{29}\text{S}$ (1707.85): C, 63.29; H, 6.31; S, 1.88. Mért: C, 63.37; H, 6.40; S, 1.97.

Metil-(6-O-benzil-2,3,4-tri-O-metil- α -D-glükopiranozil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[2,3-di-O-metil-6-O-(2-naftil)metil- β -D-glükopiranozil]-(1 $\rightarrow$ 4)-(nátrium-2,3-di-O-benzil-6-dezoxi-6-C-szulfonátometil- α -D-glükopiranozil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[metil-(2,3-di-O-metil- α -L-idopiranozil)-uronát]-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-benzil- α -D-glükopiranozid) (12)

798 mg (0,467 mmol) **11**-et oldottunk 15 mL száraz DMF-ban, majd az oldatot 0 °C-ra hűtöttük. Ezután hozzáadtunk 67.5 mg (1,68 mmol, 1.2 ekv./OH) nem tisztított (60% tisztaságú) NaH-et, és így kevertettük 30 percig szobahőmérsékleten, majd hozzáadtunk 105 μL (1.68 mmol, 1.2 ekv./OH) MeI-t és így kevertettük még 4 óráig. A reakció lejátszódása után MeOH-lal semlegesítettük a reakcióelegyet, és adtunk hozzá néhány csepp 1 M HCl-oldatot majd bepároltuk. A tisztítást Sephadex LH-20 oszlopon végeztük, MeOH eluens alkalmazásával. **Hozam:** 550 mg (67%) szirup. $[\alpha]_D^{+25}$ +49.4 (c 0.26, CHCl_3); R_f 0.38 (9:1 CH_2Cl_2 -MeOH). R_f 0.38 (9:1 CH_2Cl_2 -MeOH); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (ppm) 7.79-7.12 (m, 37H, arom.), 5.58 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 5.21 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 5.00-4.33 (m, 17H), 3.86-2.98 (m, 55H, 20 x váz-H, 9 x OCH_3 , 3 x H6a,b, H-7a,b), 2.48-2.39 (m, 1H, H-6a-F), 2.02-2.01 (m, 1H, H-6b-F); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ (ppm) 169.8 (1C, CO), 139.3, 138.9, 138.3, 138.2, 138.1, 138.0, 136.1, 133.2, 132.8 (9C, 9 x C_q arom.), 128.3-125.6 (37C, arom.), 103.0, 100.1, 99.7, 98.0, 96.0 (5C, 5 x C-1), 86.3, 84.8, 83.3, 81.6, 80.7, 80.2, 79.8, 79.6, 79.5, 79.1, 78.3, 76.4, 74.3, 74.2, 72.0, 71.5, 70.7, 70.2, 69.9, 69.6 (20C, vázszenek), 75.2, 75.1, 74.6, 73.5, 73.3, 73.2, 72.9 (7C, 6 x Bn-CH_2 , NAP-CH_2), 69.1, 68.3, 68.0 (3C, 3 x C-6), 60.6, 60.4, 60.2, 59.7, 59.6, 59.4, 59.3 (7C, 7 x OCH_3), 55.2 (1C, C-1- OCH_3), 51.7 (1C, COOCH_3), 46.8 (1C, C-7-F), 26.4 (1C, C-6-F); MALDI-TOF: mért: m/z 1771.76 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (Számított: 1771.69). *Anal.*: Számított: $\text{C}_{93}\text{H}_{113}\text{NaO}_{29}\text{S}$ (1749.93): C, 63.83; H, 6.51; S, 1.83. Mért: C, 63.92; H, 7.03; S, 2.01.

Metil-(6-O-benzil-2,3,4-tri-O-metil- α -D-glükopiranozil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-metil- β -D-glükopiranozil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(nátrium-2,3-di-O-benzil-6-dezoxi-6-C-szulfonátometil- α -D-glükopiranozil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[metil-(2,3-di-O-metil- α -L-idopiranozil)-uronát]-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-benzil- α -D-glükopiranozid) (13)

550 mg (0.314 mmol) **12**-t oldottunk 6 mL DKM és 1.2 ml H₂O elegyében, majd hozzáadtunk 107 mg (0.471 mmol, 1.5 ekv.) DDQ-t és szobahőmérsékleten kevertettük 30 percig. A reakció lejátszódását követően DKM-al hígítottuk az oldatot, majd NaHCO₃-oldattal mostuk kétszer, Na₂SO₄-on szárítottuk, szűrtük majd bepároltuk az oldatot. A tisztítást oszlopkromatográfiásan végeztük (9:1 CH₂Cl₂-MeOH). **Hozam:** 404 mg (80%) szirup. $[\alpha]_D^{+24.2}$ (c 0.06, CHCl₃); R_f 0.52 (9:1 CH₂Cl₂-MeOH); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) 7.35-7.24 (m, 30H, arom.), 5.50 (s, 1H), 5.18 (s, 2H), 4.82-4.57 (m, 15H), 3.94-3.15 (m, 55H, 20 váz-H, 9 x OCH₃, 3 x H-6,ab, H-7a,b), 2.52-2.41 (m, 1H, H-6a-F), 2.08-1.99 (m, 1H, H-6b-F); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ (ppm) 171.7 (1C, CO), 140.3-139.5 (6C, 6 x C_q arom.), 129.5-128.4 (30C, arom.), 103.5, 100.6, 99.0, 97.8, 97.0 (5C, 5 x C-1), 87.6, 86.4, 84.4, 83.0, 81.7, 81.4, 80.9, 80.6, 80.5, 80.4, 79.7, 76.8, 76.6 (20C, vázszenek), 76.6, 76.0, 74.9, 74.5, 74.1 (6C, 6 x Bn-CH₂), 70.0, 69.7, 62.8 (3C, 3 x C-6), 61.0, 60.8, 60.6, 59.9, 59.7 (7C, 7 x OCH₃), 55.6 (1C, C-1-OCH₃), 52.6 (1C, COOCH₃), 49.0 (1C, C-7-F), 27.8 (1C, C-6-F); MALDI-TOF: mért: m/z 1631.77 [M+Na]⁺ (Számított: 1631.63). *Anal.*: Számított: C₈₂H₁₀₅NaO₂₉S (1609.75): C, 61.18; H, 6.57; S, 1.99. Mért: C, 61.24; H, 6.59; S, 2.08.

Metil-(6-O-benzil-2,3,4-tri-O-metil- α -D-glükopiranozil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[nátrium-(2,3-di-O-metil- β -D-glükopiranozil)-uronát]-(1 $\rightarrow$ 4)-(nátrium-2,3-di-O-benzil-6-dezoxi-6-C-szulfonátometil- α -D-glükopiranozil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[metil-(2,3-di-O-metil- α -L-idopiranozil)-uronát]-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-benzil- α -D-glükopiranozid) (14)

395 mg (0.245 mmol) **13**-at oldottunk 8 mL DKM-ban, majd hozzáadtunk 4 mL H₂O-t. Ezután hozzáadtunk 7.6 mg (0.05 mmol, 0.2 ekv.) TEMPO-t, illetve 316 mg (0.982 mmol, 4 ekv.) BAIB-ot, és intenzíven kevertettük 60 órán keresztül. A reakciót Na₂S₂O₃-oldattal állítottuk le, a vizes fázist DKM-al háromszor mostuk, a szerves fázist pedig szárítottuk, majd bepároltuk. A tisztítást oszlopkromatográfiásan végeztük (9:1 CH₂Cl₂-MeOH). $[\alpha]_D^{+32.1}$ (c 0.09, CHCl₃); MALDI-TOF: mért: m/z 1644.71 [M+Na]⁺ (Számított: 1644.60).

Metil-(6-O-benzil-2,3,4-tri-O-metil- α -D-glükopiranozil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[nátrium-(2,3-di-O-metil- β -D-glükopiranozil)-uronát]-(1 $\rightarrow$ 4)-(nátrium-2,3-di-O-benzil-6-dezoxi-6-C-

szulfonátometil- α -D-glükopiranozil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[nátrium-(2,3-di-O-metil- α -L-idopiranozil)-uronát]-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-benzil- α -D-glükopiranozid) (15)

128.5 mg **14**-et oldottunk 1.28 mL MeOH és 1.28 ml THF elegyében. Ezután hozzáadtunk 1.28 mL 0.5 M-os NaOH-oldatot, és intenzíven kevertettük. A reakció lejátszódása után a semlegesítés HCl-oldattal történt. A terméket Dowex Na⁺ ioncserélő gyantával nátrium sóvá alakítottuk, majd bepároltuk az oldatot. MALDI-TOF: mért: m/z 1677.69 [M+Na]⁺ (Számított: 1677.55).

Metil-(2,3,4-tri-O-metil- α -D-glükopiranozil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[nátrium-(2,3-di-O-metil- β -D-glükopiranozil)-uronát]-(1 $\rightarrow$ 4)-(nátrium-6-dezoxi-6-C-szulfonátometil- α -D-glükopiranozil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[nátrium-(2,3-di-O-metil- α -L-idopiranozil)-uronát]-(1 $\rightarrow$ 4)-(α -D-glükopiranozid) (16)

96 mg **15**-t feloldottunk 6.5 mL 96%-os etanolban, majd hidrogénező bombacsőben adtunk hozzá 45 mg 10%-os Pd(C)-et és 200 μ L ecetsavat tettünk az elegyhez. A lezárt bombát hidrogénnel feltöltöttük 10 atm. nyomásra, és kevertettük 24 órán át. A reakció végbemenetele után hígítottuk az elegyet MeOH-lal, Celite[®]-rétegen kiszűrtük a katalizátort, és bepároltuk. A terméket Sephadex G-25 gélen tisztítottuk H₂O-ben. Ezután oszlopkromatográfiás tisztítást végeztünk (7:6:1 DKM-MeOH-H₂O). **Hozam** (három lépésre): 9 mg (3%). MALDI-TOF: mért: m/z 1135.49 [M+Na]⁺ (Számított: 1135.27).

Nona-nátrium-[metil-(2,3,4-tri-O-metil-6-O-szulfonáto- α -D-glükopiranozil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-metil- β -D-glükopiranozil)-uronát]-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-szulfonáto-6-dezoxi-6-C-szulfonátometil- α -D-glükopiranozil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-metil- α -L-idopiranozil)-uronát]-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-szulfonáto- α -D-glükopiranozid)] (7)

9 mg **16**-ot oldottunk 0.6 mL száraz DMF-ban, majd hozzáadtunk 43.5 mg (0.24 mmol, 5 ekv./OH) SO₃·Et₃N komplexet, és 50 °C-on kevertettük 24 órán keresztül. A reakció lejátszódását követően 20 mg szilárd NaHCO₃-ból készített vizes oldattal semlegesítettük az oldatunkat, majd bepároltuk. A terméket először Dowex Na⁺ ioncserélő gyantával, majd Sephadex G-25 gélen tisztítottuk H₂O-ben. Mivel MALDI-analízis szerint csak részleges szulfatálás ment végbe, a szulfátészter-képzést megismételtük. A megismételt reakciót azonos körülmények között végeztük el, SO₃·Et₃N helyett 36.76 mg (0.24 mmol, 5 ekv./OH) SO₃·DMF komplexet alkalmazva reagensként. A vegyület tisztítása folyamatban van.

5. Összefoglalás

A kitűzött célt, az **F** egységen szulfonátometil csoportot tartalmazó pentaszacharid-monoszulfonsav származékot sikerült szintetizálni. A vártnál jóval kisebb mennyiségben történő előállítás oka az, hogy az oxidációs lépésnél (3.3.4 fejezet) fellépő nehézségek miatt meglehetősen sok anyagot veszítettünk. Ennek következtében az utolsó lépéseket nagyon kis anyagmennyiséggel kellett elvégeznünk, ami miatt az oszlopkromatográfiás tisztítás is egyre nehezebbé vált. A közeljövőbeli céljaink közé tartozik, hogy a származékunkat biológiai vizsgálat alá vetjük, így kiderül, hogy milyen anti-Xa hatással bír ez a vegyület, illetve összehasonlíthatjuk a korábban előállított idraparinux-származékok eredményeivel. Mivel az antikoaguláns-aktivitás vizsgálat mindössze mikrogrammos anyagmennyiséget igényel, ezért gond nélkül el tudjuk végezni a rendelkezésünkre álló mennyiségű anyagból. Ezen újabb pentaszacharid sikeres szintézise és az elvégzett biológiai vizsgálatok nagy jelentőségűek lehetnek a hatás-szerkezet összefüggések vizsgálatában, ami szintén egy fontos célunk volt. A továbbiakban pedig tervezzük ennek a vegyületnek az újragyártását, hogy nagyobb mennyiségben is rendelkezésünkre álljon. Az újragyártás során a most szerzett tapasztalatainkat hasznosítani tudjuk, mivel a reakciósort végig követtük, így tudjuk, hogy melyik lépések igényelnek fokozott körültekintést, ez pedig nagy segítség lehet a reakciósor jövőbeli újakezdésénél.

A szintetikus oligoszacharid-kémiában szerzett tapasztalataimat összefoglalva elmondhatom, hogy egy pentaszacharid szintézise hosszadalmas, nagy kihívást jelentő feladat, amelynek több oka is van. Elsőként megemlíteném, hogy a pentaszacharidon a reakciók jóval lassúbbak, mint mono- vagy diszacharidokon, mert a nagyméretű molekulán sztérikusan árnyékoltak, gátoltak lehetnek a reakcióba viendő csoportok. A reakciók kivitelezése nagy körültekintést igényel, mivel vízmentes közeg biztosítása szükséges, hiszen a reakciókban általában az alkoholos hidroxilok mint nukleofilek szerepelnek, ezért a vizet, mint konkurens nukleofilt ki kell zárni. Továbbá a termékek tisztítása nehéz, gyakran többszöri oszlopkromatográfia szükséges, mivel a regio- vagy sztereoizomer melléktermékek nagyon hasonlóak a termékhez, így kromatográfiás viselkedésük is nagyon hasonló. Különösen nehéz feladatnak bizonyult a szulfonsav- és szulfátészter-sók tisztítása; ezek a vegyületek nagyon polárosak és egyéb sóktól való elválasztásuk nem egyszerű.

6. Irodalomjegyzék

- [1] Fonyó, A., Az orvosi élettan tankönyve, *Medicina Kiadó*, **2011**, 443-457.
- [2] Gyires, K.; Fürst, Zs., A farmakológia alapjai, *Medicina Kiadó*, **2011**, 564-587.
- [3] Herczeg, M., Az antitrombotikus hatású idraparinux pentaszacharid új szintézise és szulfonsav tartalmú analogonjainak előállítása, PhD dolgozat, Debreceni Egyetem, **2011**.
- [4] Petitou, M.; van Boeckel, C. A. A., A synthetic antithrombin III binding pentasaccharide is now a drug! What comes next?, *Angew. Chem.-Int. Ed.*, **2004**, 43, 3118-3133.
- [5] Losonczy, H., Az antikoaguláció új korszaka; *LAM*, **2010**, 20 (9), 569-577.
- [6] a) Gomez-Qutes, A; Lecumberri, R; Pozo, C.; Rocha, E., New anticoagulants: focus on venous thromboembolism, *Curr. Vasc. Pharmacol.*, **2009**, 7, 309-329. b) Harenberg, J., Idraparinux and idrabiotaparinux, *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*, **2010**, 3, 9-16.
- [7] Savi, P.; Herault, J. P.; Duchaussoy, P.; Millet, L.; Schaeffer, P.; Petitout, M. et al., Reversible biotinylated oligosaccharides: a new approach for a better management of anticoagulant therapy, *J. Thromb. Haemost.*, **2008**, 6, 1697-1706.
- [8] a) 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.*, **2009**, 11, 2619–2622. b) 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.*, **2010**, 51, 6711–6714. c) Herczeg, M.; Lázár, L.; Mándi, A.; Borbás, A.; Komáromi, I.; Lipták, A.; Antus, S., Synthesis of disaccharide fragments of the AT-III binding domain of heparin and their sulfonatomethyl analogues, *Carbohydr. Res.*, **2011**, 346, 1827–1836. d) Lázár, L.; Mező, E.; Herczeg, M.; Lipták, A.; Antus, S.; Borbás, A., Synthesis of the non-reducing end trisaccharide of the antithrombin-binding domain of heparin and its bioisosteric sulfonic acid analogues, *Tetrahedron*, **2012**, 68, 7386–7399. e) Herczeg, M.; Lázár, L.; Bereczky, Zs.; Kövér, K. E.; Timári, I.; Kappelmayer, J.; Lipták, A.; Antus, S.; Borbás, A., Synthesis and anticoagulant activity of bioisosteric sulfonic-Acid analogues of the antithrombin-binding pentasaccharide domain of heparin, *Chem.-Eur. J.*, **2012**, 18, 10643–10652. f) Herczeg, M.; Mező, E.; Lázár, L.; Fekete, A.; Kövér, K. E.; Antus, S.; Borbás, A., Novel syntheses of Idraparinux, the anticoagulant pentasaccharide with indirect selective factor Xa inhibitory activity, *Tetrahedron*, **2013**, 69, 3149–3158. g) Mező, E.; Herczeg, M.; Eszenyi, D. Borbás, A., Large-scale synthesis of 6-

deoxy-6-sulfonatomethyl glycosides and their application for novel synthesis of a heparinoid pentasaccharide trisulfonic acid of anticoagulant activity, *Carbohydr. Res.*, **2014**, 388, 19-29.

[9] Borbás, A., Biológiaiilag aktív oligoszacharidok és analogonjai szintézise, Akadémiai Doktori Értekezés, Debreceni Egyetem, **2012**

[10] Szabó, Z., A citoplazmában előforduló glikoprotein pentaszacharid szénhidrát részének szintézise, PhD dolgozat, Debreceni Egyetem, **2007**

[11] Meier, A., Development of a novel promoter system for thioglycoside activation, PhD dolgozat, Lund University, **2003**

[12] Fügedi, P.; Garegg P. J., A novel promoter for the efficient construction of 1,2-trans linkages in glycoside synthesis, using thioglycosides as glycosyl donors, *Carbohydr. Res.*, **1986**, 149, C9-C12.

[13] Ferrier, R. J., Hay, R. W., Vethaviasar, N., A potentially versatile synthesis of glycosides, *Carbohydr. Res.*, **1973**, 27, 55-61.

[14] Garegg, P. J., Henrichson, C., Norberg T., A reinvestigation of glycosidation reactions using 1-thioglycosides as glycosyl donors and thiophilic cations as promoters, *Carbohydr. Res.*, **1983**, 116, 162-165.

[15] Nicolaou, K. C.S., Seitz, P., Papahatjis, D. P., A mild and general method for the synthesis of O-glycosides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 2430-2434.

[16] Lönn, H., Synthesis of a tetra- and a nona-saccharide which contain α -L-fucopyranosyl groups and are part of the complex type of carbohydrate moiety of glycoproteins, *Carbohydr. Res.*, **1985**, 139, 115-121.

[17] Veeneman, G. H., van Leeuwen, S. H., van Boom, J. H., Iodonium ion promoted reactions at the anomeric centre. II An efficient thioglycoside mediated approach toward the formation of 1,2-trans linked glycosides and glycosidic esters, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 1331-1334.

[18] Veeneman, G. H., van Boom, J. H., An efficient thioglycoside-mediated formation of α -glycosidic linkages promoted by iodonium dicollidine perchlorate, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 275-278.

[19] a) Xia, J., Abbas, S. A., Locke, R. D., Piskorz, C. F., Alderfer, J. L., Matta, K. L., Use of 1,2-dichloro 4,5-dicyanoquinone (DDQ) for cleavage of the 2-naphthylmethyl (NAP) group, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 169–173. b) Wright, J. A., Yu, J., Spencer, J. B., Sequential removal of the benzyl-type protecting groups pmb and nap by oxidative cleavage using can and ddq, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 4033–4036.

[20] a) De Mico, A., Margarita, R., Parlanti, R., Vescovi, A., Piancatelli, G. J., A Versatile and Highly Selective Hypervalent Iodine (III)/2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxy-Mediated Oxidation of Alcohols to Carbonyl Compounds, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 6974–6977. b) Epp, J. B., Widlanski, T. S., Facile Preparation of Nucleoside-5'-carboxylic Acids, *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 293–295.

7. Rövidítések jegyzéke

- δ - kémiai eltolódás
- $[\alpha]_D$ - optikai forgatóképesség érték
- Ac - acetyl
- AgOTf - ezüst-triflát
- *Anal.* - elemanalízis
- AT - antitrombin
- BAIB – bisz-acetoxi-jódbenzol
- Bn – benzil
- *c* - koncentráció
- *cc* – tömény
- *d* - duplett
- DDQ - 5,6-diciano-2,3-diklór-1,4-benzokinon
- DKM - diklór-metán
- DMF - *N,N*-dimetilformamid
- ekv. - ekvivalens
- Et – etil
- Et₃N - trietilamin
- EtOH - etanol
- *J* - csatolási állandó
- LMWH - **L**ow **M**olecular **W**eight **H**eparin (kis molekulásúlyú heparin)
- MALDI-TOF MS - **M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption and **I**onization-**T**ime **O**f **F**light tömegspektrometria
- Me - metil
- MeI - metil-jodid
- MeOH - metanol
- NaOMe - nátriummetilát
- NAP - (2-naftil)metil éter
- NIS - *N*-jód-szukcinimid
- NMR - mágneses magrezonancia spektroszkópia
- *m* - multiplett

- o.p. - olvadáspont
- Ph – fenil
- PhS – feniltio
- ppm - milliommód rész (parts per million)
- R_f - retenciós faktor
- rt - room temperature (szobahőmérséklet)
- s - szinglett
- $\text{SO}_3 \cdot \text{DMF}$ - kéntrioxid- *N,N*-dimetilformamid komplex
- $\text{SO}_3 \cdot \text{Et}_3\text{N}$ - kéntrioxid-trietilamin komplex
- TEMPO - 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinil-oxil
- THF – tetrahidrofurán
- U – unit (egység)
- UFH – **U**nfractionated **H**eparin (nem frakcionált heparin)
- VRK - vékonyréteg-kromatográfia

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton mondok köszönetet témavezetőmnek, **Dr. Borbás Anikó** tanszékvezető egyetemi docensnek, TDK dolgozatom elkészítésében nyújtott hasznos tanácsaiért, önzetlen segítségéért, türelméért.

Köszönet illeti **Dr. Herczeg Mihály** tudományos munkatársat, aki a kezdetektől biztosította a helyet kísérleteim elvégzéséhez, illetve akitől sok gyakorlati dolgot megtanultam és lelkiismeretesen figyelte munkámat.

Hálával tartozom **Mező Erika** PhD hallgatónak, aki szintén figyelemmel kísérte laboratóriumi munkámat, és rengeteg segítséget nyújtott mind a dolgozatom elkészítésében, mind pedig egyéb egyetemi problémáim megoldásában, nem utolsósorban türelméért és a rám áldozott idejéért és, hogy a végsőkig tartotta bennem a lelket.

Szeretném megköszönni **Eszenyi Dániel** PhD hallgatónak, hogy hozzá is fordulhattam gyakorlati tanácsokért és tanulmányaimmal kapcsolatban egyaránt.

Köszönettel tartozom **Dr. Bakai-Bereczki Ilona** egyetemi tanársegédnek a tömegspektrometriai felvételekért.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm **Szüleimnek** a rengeteg önzetlen támogatást, illetve a **Barátaimnak** a sok biztatást, ami nélkül dolgozatom nem jöhetett volna létre.

A kutatás 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.”