

Részletes szakmai beszámoló

Korábban elért eredmények rövid ismertetése:

A természetben a szulfatált szénhidrátok egyrészt rendkívüli gyakorisággal fordulnak elő, másrészt kitüntetett biológiai, élettani feladatokat látnak el. Legjelentősebbek a glikózaminoglikánok, amelyek három karakterisztikus szerkezeti egységet tartalmaznak: uronsavakat, aminocukrokat és cukorszulfátokat. Ezek a polianion strukturák proteinekkel lépnek kölcsönhatásba és válnak szinte valamennyi állati szövetféleség alkotóelemeivé. A három alkotóelem közül a cukorszulfátokat emelnénk ki, amelyek kénsav-észterek, így bázisérzékenyek és észterázokkal is bonthatók. A cukorszulfonsavak természeti előfordulása lényegesen ritkább, mint a cukorszulfátoké, de mivel valamennyi fotoszintetizáló sejt membránjában előfordulnak, mennyiségük óriási. Ezek közül a szulfokvinovozildiilglicerol a legjelentősebb. A cukorkomponens egy 6-dezoxi-glükózszármazék. Szinte napjainkig ez volt az egyetlen ismert természetes cukorszulfonsav. Törekvésünk a cukorszulfátok (I) helyettesítése cukorszulfonsavakkal (II), ill. cukor-CH₂-szulfonsavakkal (III), amelyeknek származékai a természetben ugyancsak előfordulnak. A szerkezeti hasonlóság:

- I. Cukor-O-SO₃Na (Nátriumsó formában)
- II. Cukor-SO₃Na
- III. Cukor-CH₂SO₃Na

Az I. és III. vegyületek izoszter viszonyban állnak egymással, így a hasonló szerkezethez kapcsolódó biológiai hatás is valószínűsíthető. A II. csoporthoz tartozó vegyületek közül előállítottuk a glükóz- és galaktóz-6-szulfátot, ezek CH₂- szulfátjait, továbbá a 6-dezoxi-L-mannóz- és a 6-dezoxi-L-talóz-4-CH₂-szulfonsavait.

Vizsgálatok OTKA támogatással:

I. Szulfonsav származékok szintézise

1. Hexóz-2-SO₃Na származékok előállítása 2-tio-vándorlással: Ennek az a lényege, hogy 1,2-transz-2-O-mezil tioglikozidok alkalmasan választott nukleofilekkel 1,2-transz-2-tio-1- nukleofil (alkil, aril, azid, SR) származékokká alakíthatók, miközben mindkét centrumon (C-1, C-2) inverzió következik be: így 1-tio-β-glükozidokból 2-tio-α-mannozidok, míg 1-tio-α-mannozidokból 2-tio-β-glükozidok képződnek. (Synlett 2005, **14**, 2242-2244.). A tio-glikozidok szerencsés megválasztásával a 2-tio csoportokat (S_{Ac}, S_{Tr}, S_{NAP}, S_{PMB}, S_{All}, S_{CH₂-CH₂-SiMe₃}) szulfonsavakká tudtuk oxidálni, így akár a glüko-, akár a manno-sorban 2-szulfonsavakat preparáltunk. A cukrok C-1 (anomer) pozícióiba ugyancsak tetszőleges aktív csoportokat (pl. N₃; NH₂; SH; SCN) vihetünk be, amelyek segítségével pl. szulfonamidok, szulfopepdidek és a természetben szulfonátokat tartalmazó oligoszacharidok preparálására nyílik lehetőség. (Tetrahedron Lett., 2005, **46**, 5191-5194.)
2. Az előző fejezetben bemutatásra került, hogy az 1-tio-2-O-mezil-, vagy a 2-O-tozil-α-D-mannopiranozidok, vagy a β-D-glükopiranozidok nukleofilekkel (CH₃O-, R-COO-, N₃-) egy 1,2-átrendeződés révén pl. metil-2-tio-β-D-manno-, vagy metil-2-tio-β-D-

glüko-származékokká rendeződnek át. Ez a módszer kiváló lehetőséget nyújt arra, hogy egy szimpla oxidációval 2-C-szulfonsav-mannózokat ill. 2-C-szulfonsav-glükózokat állítsunk elő. Ezek a reakciók episzulfónium intermediereken keresztül játszódhatnak le, amelyek lehetővé teszik a kiindulási vegyületek C2-atomjának konfigurációváltását, továbbá az anomercentrumon (C-1) az aglikon α - vagy β -formában történő megjelenítését. A C2-atom konfigurációváltása rendkívül fontos folyamat, mert glüko-sorból a manno-sorba, illetve a manno-sorból a glüko-sorba lehet átmenni. Az α , β átmenetek izomerációval szabályozhatók. Felvetődött a kérdés, hogy milyen törvényszerűségek érvényesülnek abban az esetben, ha tioglikozidok 2-O-mezil-, vagy 2-O-tozil származékait tio-nukleofilekkel reagáltatjuk? Például, ha egy fenil 2-O-mezil-1-tio- β -D-glükopiranozidot nátrium-tiofenoláttal, vagy nátrium-tiometiláttal kezelünk. Ugyanez a kérdés merülhet fel, hogy milyen terméket nyerünk, ha egy fenil 2-O-mezil-1-tio- α -D-mannopiranozidot kezelünk tio-nukleofilekkel. A főtermékek analízise (MS, ¹H- és ¹³C-NMR, polarimetria, kémiai reakciók, stb.) egy új vegyületcsoport felismeréséhez vezetett. Konkrétan, ha fenil 3-O-benzil-4,6-O-benzilidén-2-O-mezil-1-tio- β -D-glükopiranozidot (**1**) NaSPh-tal kezelünk, termékként fenil 3-O-benzil-4,6-O-benzilidén-2-S-fenil-1-tio- β -D-mannopiranozidot (**2**) izoláltunk. Ha az **1**-es vegyületet NaSMe-tal reagáltattuk, úgy fenil 3-O-benzil-4,6-O-benzilidén-2-S-metil-1-tio- β -D-mannopiranozidot (**3**) nyertünk. Ezen utóbbi, **3**-as vegyületnél tisztázni kellett, hogy az anomer pozícióban valóban tiofenil csoport van-e, vagy esetleg a tiometil aglikon alakult ki. Irodalomból ismert, hogy a tioglikozidok NBS-sel szelektíven hasíthatók ciklofélcetálok keletkezése közben. A **3**-as vegyületből NBS-sel 3-O-benzil-4,6-O-benzilidén-2-S-metil- α , β -D-mannopiranozid lehetett izolálni. Ez a kísérlet egyértelműen bizonyította, hogy a β -glükozidokból ditio- β -mannozidok keletkeznek, amelyben az aglikon változatlanul marad, míg a C2-es pozícióba belépő tio-nukleofil SN-2 mechanizmus szerint konfiguráció változást eredményez 1,2-cisz-dito- β -D-mannopiranozid keletkezése közben. Megvizsgáltuk a fenil- és etil-3-O-benzil-4,6-O-benzilidén-2-O-mezil-1-tio- α -D-mannopiranozidok viselkedését különböző tio-nukleofilekkel (NaSPh v. NaSMe) szemben. Ezekből fenil- és etil-3-O-benzil-4,6-O-benzilidén 2-S-fenil (metil)-1-tio- α -D-glükopiranozidok keletkeztek. (Carbohydr. Res., **344** (2009) 2461-2467).

3. A glikoproteinek és glikolipidek terminális szénhidrátjai N-acetilneuraminsavak ill. származékaik. Biológiai jelentőségük kiemelkedő. Célunk metilénszulfonsav analogonok előállítása volt. A kiindulási molekulák L-fukóz és metánszulfonsav etilészter. Az utóbbi molekula butillítium által addicionálódik az L-fukózból levezethető aldonsav laktonra, amely 4-es pozícióban azidocsoportot tartalmaz. Az addíció lezajlása után a 3-as pozíciót dezoxi C-atomra hidrogénezük. Így a nyert hattagú szkeleton minden vonatkozásban azonos az N-acetilneuraminsav vázával. (Tetrahedron Lett., 49 (2008) 1196-1198.) A Röntgen-kristallográfiai mérések minden vonatkozásban megerősítették az NMR vizsgálatokat.
4. A cukorszulfonsavak egyik speciális formájaként előállított szulfoulózsavak szerkezeti vonásaik alapján az N-acetil-neuraminsavakhoz és a KDO származékokhoz hasonlíthatnak. Mind a három vegyület típus közös vonása, hogy az anomer centrum nem hordoz H szubsztituent, ezért az anomer konfiguráció nem határozható meg három kötéson keresztül ható proton-proton kölcsönhatás alapján. A fenti cukrok glikozidjainak anomer konfigurációját az α -C atom és a γ -C atomon lévő proton közötti proton-szén kölcsönhatás nagysága alapján határoztuk meg. (Carbohydr., Res., **342** (2007) 1393-1404). Egyébként modern szintetikus szénhidrátkémiai kutatás

elképzелhetetlen korszerű műszeres vizsgálatok nélkül. Ezen vizsgálatok teljesítőképességére jó példa a hidroxil csoportokban igen gazdag szénhidrátoknál az OH rotamerek egyensúlyi viszonyainak meghatározása, ezeket a vizsgálatokat alifás vicinális polialkoholok és rögzített konformációjú cukrok esetében végeztük el. (J. Comput. Chem., **30** (2009) 540-550.)

5. Heparin analógok a cukorszulfonsavak révén

A heparin a glükózaminoglikánok csoportjához tartozik. Poliszacharid, lineáris szerkezettel. Régen ismert, hogy a heparin a véralvadást gátolja. Az orvostudomány az 1930-as évektől kezdődően használja. Az utóbbi 30-35 évben hatalmas tudományos mozgalom létrehozta a szintetikus heparin analogonokat. A szintetikus heparin pentaszacharid monoszacharidokból 58 kémiai lépésben született meg, s nyert igen eredményes, sokoldalú felhasználást. Az öttagú oligoszacharid (D-E-F-G-H) véralvadásgátló hatását vizsgálva kiderült, hogy az oligoszacharid pentamer kötődik az antitrombinhoz, azt aktiválja, és az aktivált antitrombin inhibálja a véralvadás folyamatának több lépését.

A D-E-F-G-H monoszacharidokból felépülő, Fondaparinux elnevezésű pentamer némileg módosul a heparinhoz képest. Jellemző vonása a Fondaparinuxnak, hogy a glükózaminoglikánok aminocsoportjainak acetilezése elmarad, s az amin szulfatált formában jelenik meg.

A heparin pentaszacharidnak számos nem-glükózaminoglikán típusú analógját is előállították, néhány származék kiemelkedő antitrombotikus hatása bebizonyította, hogy a glükózamin aminocsoportjára nincs szükség, és a szabad hidroxilcsoportok metilezhetőek. A leghatékonyabb ilyen származék elnevezése Idraparinux, összetétele ugyancsak pentamer.

Felmerült a kérdés, hogy milyen aktivitással rendelkezhetnek a szulfátészterek helyett bioizoszter szulfonátometil-csoportot tartalmazó heparin-analóg oligoszacharidok. E kérdés megválaszolása céljából elhatároztuk a heparin pentaszacharid metilszulfonsav analógjainak szintézisét. A kénsavészterek módosítását metilénszulfonsavakkal kívántuk megvalósítani, úgy hogy az O-SO₃ észtercsoportokat szisztematikusan, egyesével CH₂-SO₃ csoporttal helyettesítjük. Hat diszacharid szintézisét a tavasz folyamán megvalósítottuk és publikáltuk. A visszhang igen kedvező, a szintetikus munka további fejlesztése folyamatban van. (Org. Lett., **11** (2009) 2619-2622.)

II. Természetben előforduló oligo- és poliszacharidok szintézise

A természetes eredetű oligo- és poliszacharidok negatív töltéshordozói az uronsavak, a foszforsavak és a kénsav észterek. A három területen elért eredményeinket a fenti sorrendben tárgyaljuk.

1. A *Mycobacterium avium* 19-es szerovariánsa pentaszacharid hapténjének szintézise

A mycobactériumok patogén mikroorganizmusok. Az egyes szerovariánsok eltérő sejtfelszín antigénnel rendelkeznek, melyeknek szerospecifitását a peptidoglikánok szénhidrát része határozza meg. A szénhidrát rész minden esetben különleges szerkezetű oligoszacharid. Jelentésünkben szereplő *Mycobacterium avium*

pentaszacharidja a legbonyolultabb szerkezetű az ismert mycobactériumok oligoszacharid antigénjei közül:

3,4-Di-OMe- β -D-GlcpA-(1-3)-6d-3-CMe-2,4-di-OMe- α -L-Manp-(1-3)- α -

V.

IV.

L-Rhap-(1-3)- α -L-Rhap-(1-2)-6d- α -L-Talp-(1-

III.

II.

I.

A pentaszacharid IV. és V. egységei eddig ismeretlen, szubsztituált monoszacharidok. Ezek első szintézisét megvalósítottuk. Az előbbi két egység közötti interglikozidos kötés kialakítása, egy terc. hidroxilcsoport glikozilezése, egyedülálló példa az irodalomban. Az irodalomban fellelhető bizonytalanság, nevezetesen, hogy a IV. egység esetleg nem L-Manp, hanem 6d- α -L-Talp, munkánk eredményeként cáfolatot nyert. A két teljesen azonos módon szubsztituált monoszacharid (6d-3-CMe-2,4-di-OMe- α -L-Manp ill. 6d-3-CMe-2,4-di-OMe- α -L-Talp) tercier OH csoportjának glikozilezése, sőt bármilyen szubsztitúciója esetén az utóbbinál 4C1(L) 1C4(L) konformációváltás következett be, amelynek 1H-NMR spektruma nem esett egybe a természetes pentaszacharid adott részével. Így további vizsgálat nélkül bizonyítást nyert, hogy a természetes vegyületben a szubsztituált 6d-L-Manp és nem a 6d- α -L-Talp szerepel. (Carbohydr. Res., **341** (2006) 1312-1321.)

2. A D-ribitol-1-foszfát okta- és dodekamerjeinek előállítása és ezek protein konjugátumainak szintézise

A teichoinsav főleg a Gram-pozitív baktériumok többrétegű sejt falának legkülső rétege. A teichoinsav tulajdonképpen nem is poliszacharid, mivel a cukoregységek nem glikozidos, hanem foszfodiészter kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. A ribitol molekulákat esetenként glicerín, mono-(D-galaktóz) és diszacharidok [(-6)- β -D-Galp-(1-3)- α -D-GalpNAc-(1-)] is parciálisan helyettesíthetik. Ezek a nagy móltömegű polimerek a baktérium sejt fal poliszacharidokkal és sejt fal proteinekkel kovalens kötéssel reagálhatnak, így a teichoinsav is antigénként viselkedik, ellene specifikus antitestek termelődnek.

Együttműködésben az NIH (National Institute of Child Health and Human Development) munkatársaival kidolgozásra került egy 8 és egy 12 ribitolfoszfátot tartalmazó oligomer, a terminális foszforamidátot aminoetanollal észterifikáltuk és a primer aminocsoportot 5-ketohexánsav-anhidriddel acileztük. Az így kialakított keto-funkció lehetőséget nyújtott a módosított ribitol-1,5-difoszfát oligomerek fehérjéhez kapcsolására. (Carbohydr. Res., **341** (2006) 2037-2048.)

3. Glikoproteinek szénhidrát komponensének vizsgálata

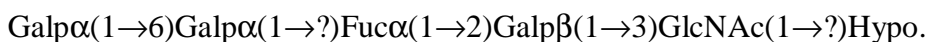
A *Dictyostelium discoideum* talajlakó amőbafajból az Angol-amerikai kutatók által izolált fehérje komplex elemzésekor egy pentaszacharid tartalomra figyeltek fel. Megállapították, hogy a pentaszacharidok igen magas galaktóztartalommal rendelkeznek, s meglepő volt az L-fukóz jelenléte is. A fehérje szekvenálás során a pentaszacharid első monoszacharid tagja N-acetil-D-glükózaminnak bizonyult. A

fehérje szekvenálás során derült ki, hogy a fehérje komplexhez a pentaszacharid kötődési helye a 143. aminosav, amely a ritkán előforduló 4-OH-prolinnak bizonyult.

A kutatók a következő szénhidrát szekvenciát javasolták:



A pentaszacharid szekvenciáját és kötéstípusát 1998-ban az alábbi módon finomították:

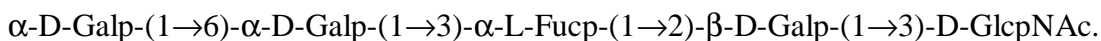


A finomítás ellenére kételyek maradtak fenn: a D és C cukoregység összekapcsolódási helyét nem tudták meghatározni, s ezért kutatócsoportunkban elhatározás született mindhárom lehetséges regioizomer pentaszacharid előállítására. A pentaszacharidokat 3+2 blokkszintézissel állítottuk elő digalaktóz donor és háromféle triszacharid akceptor felhasználásával.

A fukóz egységeken megbízható, könnyen eltávolítható védőcsoportokat alakítottunk ki és ezek reaktivitását nagy gonddal követtük. Olyan perbenzilezett metil α -L-Fucp-(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopiranozid diszacharidokat állítottunk elő, amelyek a fukopiranozil egységeken egyenként C-2', C-3' és C-4' hidroxil csoportokat hordoztak. Ezeket úgy állítottuk elő, hogy a metil 3,4,6-tri-O-benzil- β -D-galaktopiranozidot fenil 3,4-O-benzil-2-O-(2-naftil)metil-, fenil 2,4-di-O-benzil-3-O-(2-naftil)metil, vagy fenil 2,3-di-O-benzil-4-O-(2-naftil)metil-1-tio- β -L-fukopiranoziddal glikozileztük. A 2-ONAP éter nem résztvevő csoportként fejtette ki hatását. A glikozilezést NIS/TfOH-val katalizáltuk, a hozam 80 % fölöttinek bizonyult és az α -anomer aránya 8:1 és 10:1 közöttinek bizonyult. A 2-ONAP étert éterezéssel, a 3-ONAP és 4-ONAP étereket a megfelelő 2-naftilmetilén acetálok parciális hidrogenolízisével nyertük. Az ONAP étereket oxidációval DDQ-val távolítottuk el. (Tetrahedron: Asymmetry **16** (2005) 83-95.)

A pentaszacharidok előállításánál a 2+3 kondenzációt alkalmaztuk. Valamennyi köztiterméket, intermediert szintézissel állítottuk elő. Az AB diszacharidot a (2-trimethylsilyl)etil-4,6-O-benzilidén-2-dezoxi-2-ftálimido- β -D-glükopiranozid aglikon és a 2-OAc-3,4,6-tri-OBn- α -D-galaktozilbromid donor összekapcsolásával állítottuk elő. A 72 %-os hozammal izolált AB diszacharidból akceptort képeztünk és ezt háromféle C komponenssel glikozileztük. A három teljesen védett ABC triszacharidból a terminális fukóz 2-, 3-, illetve 4- helyzetű 2-naftilmetil csoportjait oxidatív úton eltávolítottuk és a kapott triszacharid akceptorokat a DE digalaktóz donorral glikozileztük.

A teljesen védett pentaszacharidok védőcsoportjait sorozat reakciókkal eltávolítva kaptuk a három szabad pentaszacharidot, amelyek az alábbi szerkezettel rendelkeznek:



A három pentaszacharid védett és védőcsoport nélküli formáit kutatócsoportunk közölte először. (Tetrahedron-Asymmetry **20** (2009) 808-820.)

4. A pályázatunk keretében „fésűfog-szerű” szerkezettel jellemezhető, elágazó láncú arabinogalaktán tetra- és hexaszacharidokat állítottunk elő immunológiai célokra. A vegyületek β -(1 \rightarrow 6) kötésű galaktopiranozil láncból épülnek fel, s a fésű fogaiként minden második galaktóz egység hordoz egy arabino-konfigurációval rendelkező furanóz egységet. Ezek az oligoszacharidok haptén tulajdonságokkal rendelkeznek, ezért olyan hídmolekula aglikonnal kellett ellátni, amely lehetővé teszi a haptének és a proteinek összezsugorítását, amely már immunogén tulajdonsággal rendelkezik. Ezek a hídmolekulák általában alifás szerves savakkal, szerves aldehidekkel, aminokkal rendelkeznek. (Carbohydr. Res., **344** (2009) 1434-1441).
5. Komplex oligoszacharidok szintézisében a védőcsoportok aromás karaktere az aglikon és acetál pozícióban több vonatkozásban befolyásolja a reakciótermékek pozitív aromás tulajdonságait. Az aromás acetálok, és a hidrogenolízissel kialakuló éterek védőcsoportként való alkalmazása lehetővé teszi az ilyen származékok röntgendiffrakciós és kiroptikai-CD vizsgálatát és a különböző mérési módszerek eredményeinek összehasonlítását. A CD mérések nem csak oldatban, hanem szilárd fázisban is elvégezhetők. (Tetrahedron **64** (2008) 1676-1688).
6. Ellervik a közelmúltban publikálta, hogy az általuk preparált (9'-antraceni)metilén acetálok hidrogenolízise $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3\text{-HCl}$ reagenssel 4-OH származékokat eredményez. Hasonló reakciót végeztünk a $\text{LiAlH}_4\text{-AlCl}_3$ reagenssel, ami ellentétes regiszlektivitású gyűrűnyitást eredményezett, és a 6-OH származékot adta. Az acetálos reakciót kiterjesztettük, és dioxolán-típusú (9'-antraceni)metilén-acetálokat is előállítottunk, majd a jól ismert 5-tagú gyűrűk hidrogenolízisét is elvégeztük. Ezeknél a reakciónál az alkalmazott reagensektől függetlenül minden esetben az acetálos szénatomon lévő nagy térkitöltésű antraceni csoport térállásától függ a gyűrűnyitás iránya. A gyűrűnyitás a teljesen egységes *exo*-izomer redukciója során az ekvatoriális éter molekulát, míg az *endo*-izomer esetén az axiális étert szolgáltatja. Megvizsgáltuk a (9'-antraceni)metilén-acetál eltávolíthatóságát katalitikus hidrogénezéssel is, a reakció sikertelenségének magyarázatára DFT (Density Functional Theory) és magas hőmérsékletű molekula dinamikai szimulációval konformációs vizsgálatok végeztünk. (Carbohydr. Res., **344** (2009) 2444-2453.)

III: Oligoszacharidok enzimológiai vizsgálata

1. A *B. licheniformis* α -amiláz hidrolízisének hőmérséklet függése

2-Cl-4-NO₂-fenil aglikonnal ellátott, α -(1 \rightarrow 4)-D-Glc oligomer sorozatot állítottunk elő dimerből-oktamerig. Az oligoszacharid sorozat felhasználásával amerikai és magyar biokémikusok a *Bacillus licheniformis* α -amilázának hőmérséklet függését térképezték fel. (Acta Biologica Hungarica **57** (2006) 367-375).

2. Diszperzin B vizsgálatában való részvétel

A diszperzin B (DSpB) baktérium által termelt glikozil hidroláz enzim, amely a feltételezések szerint képes hasítani fertőző baktériumok biofilm tulajdonságú poliszacharid burkát. Előállítottuk a humán fertőzéseket okozó *Staphylococcus aureus*

és *S. epidermidis* antigén tulajdonságú sejtfelszín poliszacharid láncának β -(1→6)-GlcNAc szerkezetű oligoszacharid fraktumait és a biokémikusok rendelkezésére bocsátottuk, hogy felhasználják a diszperzin B enzim hasítási profiljának meghatározására. (Acta Biologica Hungarica 59 (2008) 439-451.)

Tekintettel arra, hogy a jelentésben felsorolt 16 közlemény elsősorban komplex mono- és oligoszacharidok szintézisét mutatja be, továbbfejlesztettük a magunk által kialakított Oligoszacharid Adatbank adatbázisát. Az adatbank 21.000 oligoszacharid szintézist dolgozott fel, s a reakciók adatainak feldolgozása és rögzítése úgy történt, hogy egy-egy szintézis adatlapja az **aglikonok** és **glikozil donorok** mellett megadja a **védett oligoszacharidok** és a **parciálisan védett szintetikus oligoszacharidok** szerkezetét is. Ez egyben azt is jelenti, hogy egy-egy szintézis során legalább négy intermedier lehetséges fel, s a 21 ezer szintézis során minimum 94 ezer intermedier kereshető az **Oligoszacharid Adatbankban**. A keresés másodperceket vesz igénybe.

Az oligoszacharidok szintéziséhez 9 ezer eredeti cikk adatbankos feldolgozása is megtörtént. Ebben az esetben a cikkek adatbankos feldolgozása mellett a cikkek eredeti iratrendező raktárakban elhelyezésre kerültek. Az iratrendezők feldolgozása az adatbankban is bevezetésre került és rendkívül gyors keresésre adnak lehetőséget.

A kutatási időszak alatt két könyvfejezet került összeállításra:

1. .A. Lipták, A. Borbás, I. Bajza: **Protecting Group Manipulations in Carbohydrate Synthesis**, in: Comprehensive Glycoscience I-IV. Eds. H. Kamerling, G.J. Boons, Y. Lee, A. Suzuki, N. Taniguchi, A.G.J. Voragen: Elsevier, Amsterdam, 203-259, 2007.
2. Lipták András: **Szénhidrátok**, Hajós Gyöngyi: Élelmiszer-kémia, Akadémiai Kiadó, Budapest, 140-175, 2008.

Három doktori disszertáció készült a pályázat támogatásával:

1. Szerző: **Sajtos Ferenc** Témavezető: Dr. Lipták András
Az értekezés címe: **Cukor-szulfonsavak előállítása és szerkezetvizsgálata**
A védés éve: 2005
2. Szerző: **Lázár László** Témavezető: Dr. Lipták András
Az értekezés címe: **Biológiailag aktív cukor szulfátészterek analógjainak, cukor-szulfonátoknak és cukor-metilén-szulfonátoknak szintézise**
A védés éve: 2006
3. Szerző: **Szabó Zoltán** Témavezető: Dr. Lipták András
Az értekezés címe: **A citoplazmában előforduló glikoprotein pentaszacharid szénhidrát részének szintézise**
A védés éve: 2007

Scientific results on the field of sugar containing sulfonic acids

The results of the OTKA support (2005-2009)

Registration number: AT048798

The aim of the research is the synthesis and biological investigation of those oligosaccharides, which contain strong, mainly negative charge due to the presence of sugar C-sulfonic acids and sugar-methylene sulfonic acids. We hope that such types of compounds show antiviral and anti-HIV activity.

Our effort is to produce such types of ligands, which cause the clearance of the human pathogen bacterium *H. pylori* from the stomach.

During the five years time we published 16 papers in international journals. All abstracts of the 16 articles were collected, hoping that these abstracts will provide enough information for scientists who wish to collect the Summary of the scientific results we have published.

1. 1,2-trans-Glucosyl Azides of Sugar 2-Sulfonic Acids

Synlett 2005 (14) 2242-2244

Treatment of the 2-O-mesylated 1-SAc, 1-S[2-(trimethylsilyl)ethyl]- α -D-manno-, and 1-SAll- β -D-gluco-pyranosides with NaN_3 resulted exclusively in 2-SAc-, 2-S[2-(trimethylsilyl)ethyl]- β -D-gluco-, and 2-S all- α -manno-pyranosyl azides. The 2-S substituents were removed either with acetic acid (SAc), or $\text{Hg}(\text{TFA})_2$ ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{SiMe}_3$, $\text{SCH}=\text{CHCH}_3$) and the 2-SH groups were oxidized into sugar 2-sulfonic acids giving 1,2-*trans*-glycosyl azides.

2. Glycosyl Azides of Sugar 2-sulfonic Acids

Tetrahedron Lett., 2005 (46) 5191-5194

Phenyl and trityl 2-*O*-sulfonyl-1-thio- α -D-manno- and β -D-glucopyranosides were reacted with sodium azide to yield 2-*S*-phenyl or 2-*S*-trityl-D-gluco- and D-mannopyranosyl azides, respectively. Usually, both anomers were formed in approximately equal amounts and formation of glycals was also observed in some cases. The product distribution of these reactions depends on the nature of the aglycone, the applied reagent and also on the solvent. These results can be rationalised by the intermediacy of episulfonium as well as oxocarbenium ions. Oxidation of the 2-*S*-trityl- α -D-glucopyranosyl or α -D-mannopyranosyl azides by Oxone[®], gave sodium 2-sulfonato- α -D-gluco- and α -D-mannopyranosyl azides, respectively.

3. Reactions of Phenyl and Ethyl 2-*O*-Sulfonyl-1-thio- α -D-manno- and β -D-glucopyranosides with thionucleophiles

Carbohydr. Res., 2009 (344) 2461-2467.

Persubstituted derivatives of phenyl and ethyl 2-*O*-sulfonyl-1-thio- α -D-manno- and β -D-glucopyranosides were synthesized and reacted either with PhSNa or with MeSNa. The phenyl-1-thio compounds afforded the dithio-1,2-*cis*-axial/equatorial- α -D-glucopyranosides or dithio-1,2-*cis*-equatorial/axial- β -D-mannopyranosides by means of S_N2 type of reactions. Starting from the ethyl-1-thio derivatives intramolecular 1,2-thio-migration took place predominantly. In the case of mannosides both nucleophilic reagents facilitate the formation of 1-SPh- or 1-SEt glycols by elimination. The formation of unsubstituted glycol could also be observed from the ethyl-1-thio derivatives, especially by using PhSNa as a nucleophile. The 1,2-dithio-glycosides are glycosyl donors affording 1,2-*trans*-2-thio-glycosides.

4. A first synthesis of sulfonic acid analogues of *N*-acetylneuraminic acid

Tetrahedron Lett., 2008 (49) 1196-1198

Sulfonic acid analogues of *N*-acetylneuraminic are synthesized from 1-thio-*l*-fucoside derivatives with the introduction of an azido group at C-4 of the fucose moiety and carbanionic addition onto fully protected lactones. The analogues in the form of methyl glycosides are subjected to a neuraminidase inhibition assay.

5. Synthesis of ketopyranosyl glycosides and determination of their anomeric configuration on the basis of the three-bond carbon–proton couplings

Carbohydr. Res., 342 (2007) 1393-1404

Anomeric pairs of ketopyranosyl glycosides with various substituents at C _{α} , C _{β} and C _{γ} were synthesized from the corresponding thioglycosides, and the influence of the C _{α} –C _{β} –C _{γ} –H _{γ} torsion angle and substituent effects on the three-bond carbon–proton couplings was studied. The *cis* coupling constants range from 1 to 2 Hz. The *trans* couplings are generally as small as 2.3–2.6 Hz; however, for compounds bearing an unsubstituted γ -carbon, a relatively large *trans* coupling was measured (4.8 Hz). An *S*-ethyl group at the β -position increases the *cis* coupling (up to 3.2 Hz) compared to the corresponding O-glycosides.

6. Combined NRM Three-Bond Scalar Coupling Measurements and QM Calculations to Calculate OH-Rotamer Equilibrium of Polyalcohols

J. Comput. Chem., 30 (2009) 540-550

A combined but independently applied NMR and QM procedure has been used to investigate the conformational properties of the exchangeable hydroxyl protons of polyalcohols. In this study, to demonstrate the applicability of such a strategy, we investigated a simple monosaccharide, i.e. α and β anomers of a D-glucopyranoside derivative. The redundant set of experimental vicinal homonuclear and heteronuclear scalar couplings involving the OH-protons obtained for both anomers of our model compound were simultaneously analyzed to yield the preferred OH-rotamer populations and moreover to parametrize a new Karplus-type equation for ³J_{C(i-1)OH(i)} coupling. The populations of the lowest energy conformers and the conformational-averaged coupling constants were independently calculated using the QM approach in both vacuum and chloroform. The similarity of the estimated rotamer populations obtained by two very different techniques and the similarity of the experimental and calculated coupling constants suggest that these

approaches can be used in conjunction and in a fully integrated way to determine a more accurate atomic level description of molecular conformers.

7. Preparation of the pentasaccharide hapten of the GPL of *Mycobacterium avium* serovar 19 by achieving the glycosylation of a tertiary hydroxyl group

Carbohydr. Res., 341 (2006) 1312-1321

The chemical synthesis of the glycopeptidolipid-type pentasaccharide hapten of *Mycobacterium avium* serovar 19 with a trifluoroacetamido spacer at the reducing end is described. The spacer-armed pentasaccharide **31**, when conjugated to an immunogenic protein, can be applied to the serodiagnosis of mycobacterial infections. The questionable structure of the penultimate monosaccharide unit was clarified as 6-deoxy-3-*C*-methyl-2,4-di-*O*-methyl-1-mannopyranose. The occurrence of the 6-deoxy-3-*C*-methyl-2,4-di-*O*-methyl-1-talopyranose could be excluded by the presence of the large H-1'-H-2' coupling constant, which proves the 4C_1 (I) conformation as the favoured one.

8. Synthesis of octa- and dodecamers of d-ribitol-1-phosphate and their protein conjugates

Carbohydr. Res., 341 (2006) 2037-2048

The bacterial cell-wall-associated teichoic acids contain predominantly D-ribitol residues interconnected by phosphodiester linkages. Because of their location, these antigens may be vaccine candidates as part of conjugate vaccines. Here, we describe the synthesis of extended oligomers of D-ribitol-1-phosphate linked to a spacer having an amino group at its terminus. The synthesis utilized a fully protected D-ribitol-phosphoramidite that was oligomerized in a stepwise fashion followed by deprotection. The free oligomers were connected to bovine serum albumin using oxime chemistry. Thus, the ribitol phosphate oligomers were converted into keto derivatives, and the albumin counterpart was decorated with aminoxy groups. Reaction of the functionalized saccharide and protein moieties afforded conjugates having up to 20 ribitol phosphate chains.

9. Synthesis of fully protected α -L-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosides with a single free hydroxy group at position 2', 3' or 4' using *O*-(2-naphthyl)methyl (NAP) ether as a temporary protecting group

Tetrahedron: Asymmetry 16 (2005) 83-95.

Perbenzylated methyl α -L-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosides having a single free OH group at position C-2', C-3' or C-4' have been synthesized. Methyl 3,4,6-tri-*O*-benzyl- β -D-galactopyranoside was glycosylated either with phenyl 3,4-di-*O*-benzyl-2-*O*-(2-naphthyl)methyl-, phenyl 2,4-di-*O*-benzyl-3-*O*-(2-naphthyl)methyl- or phenyl 2,3-di-*O*-benzyl-4-*O*-(2-naphthyl)methyl-1-thio- β -L-fucopyranoside. The 2-ONAP ether functioned well as a non-participating group. The yields of the glycosylation reactions, promoted by NIS/TfOH, were above 80% and the stereoselectivity was 8:1 to 10:1 in favour of the α -anomers. The 2-ONAP ether was obtained by (2-naphthyl)methylation, the 3-ONAP and the 4-ONAP ethers were prepared either by hydrogenolysis of the 3,4-*O*-(2-naphthyl)methylene

acetals of β -L-fucopyranoside or by tin acetal-mediated alkylations. The latter procedure afforded higher yields. The ONAP ethers from the disaccharides were removed by oxidative cleavage with DDQ.

10. Synthesis of three regioisomers of the pentasaccharide part of the Skp1 glycoprotein of *Dictyostelium discoideum*

Tetrahedron: Asymmetry 20 (2009) 808-820.

Three regioisomers of the linear pentasaccharide part of the Skp1 glycoprotein, found in *Dictyostelium discoideum*, were prepared in the form of (2-trimethylsilyl)ethyl glycosides by means of 2+3 block syntheses using the disaccharide donor at the non-reducing end, and three different trisaccharide acceptors at the reducing end. Fucosylation of (2-trimethylsilyl)ethyl 3,4,6-tri-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-2-NPhth- β -D-glucopyranoside with different fucosyl donors carrying an *O*-(2-naphthyl)methyl ether as a temporary-protecting group at positions C2, C3 or C4 gave rise to the protected core trisaccharides. After selective removal of the (2-naphthyl)methyl group, the resulting acceptors were glycosylated with the α (1 \rightarrow 6) linked digalactosyl donor to yield the respective three regioisomeric pentasaccharides. Transformation of the phthalimido moiety into an *N*-acetyl group, followed by catalytic hydrogenation of the reducible-protecting groups furnished the free target pentasaccharides, which should be able to assist during the elucidation of the exact structure of the natural pentasaccharide.

11. Synthesis of 3,6-branched arabinogalactan-type tetra- and hexasaccharides for characterization of monoclonal antibodies

Carbohydr. Res., 344 (2009) 1434-1441.

Synthesis of tetra- and hexasaccharides built up from a β -(1 \rightarrow 6)-linked galactopyranosyl backbone with arabinofuranosyl side chains at position 3 and with a 3-aminopropyl spacer related to arabinogalactans is described. These oligosaccharides were prepared for investigation of monoclonal antibodies raised against arabinogalactan proteins (AGPs) from pressed juice of *Echinacea purpurea*.

12. Synthesis and chiroptical properties of (naphthyl)ethylidene ketals of carbohydrates in solution and solid state

Tetrahedron 64 (2008) 1676-1688.

1,3-Dioxolane- and dioxane-type (1- and 2-naphthyl)ethylidene ketals of *p*-methoxyphenyl α -L-rhamnopyranoside and β -D-glucopyranoside were prepared and their stereochemistry studied by solution and solid-state circular dichroism, X-ray diffraction, and coupled-oscillator CD calculations on the solid-state and MMFF-calculated geometries. Intermolecular exciton-coupled interactions between the nearby aromatic chromophores in the solid state and different conformers in solution and solid state could be identified as the main reason for the difference between solution and solid-state CDs.

13. Effect of temperature on subsite map of *Bacillus licheniformis* α -amylase

Acta Biologica Hungarica 57 (2006) 367-375.

To elucidate how temperature effects subsite mapping of a thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis* (BLA), a comparative study was performed by using 2-chloro-4-nitrophenyl (CNP) β -maltooligosides with degree of polymerisation (DP) 4-10 as model substrates. Action patterns, cleavage frequencies and subsite binding energies were determined at 50°C, 80°C and 100°C. Subsite map at 80°C indicates more favourable bindings compared to the hydrolysis at 50°C. Hydrolysis at 100°C resulted in a clear shift in the product pattern and suggests significant differences in the active site architecture. Two preferred cleavage modes were seen for all substrates in which subsite (+2) and (+3) were dominant, but CNP-G1 was never formed. In the preferred binding mode of shorter oligomers, CNP-G2 serves as the leaving group (79%, 50%, 59% and 62% from CNP-G4, CNP-G5, CNP-G6 and CNP-G 7, respectively), while CNP-G3 is the dominant hydrolysis product from CNP-G8, CNP-G9, and CNP-G10 (62%, 68% and 64%, respectively). The high binding energy value (-17.5 kJ/mol) found at subsite (+2) is consistent with the significant formation of CNP-G 2. Subsite mapping at 80°C and 100°C confirms that there are no further binding sites despite the presence of longer products.

14. Modeling and biochemical analysis of the activity of antibiofilm agent Dispersin B

Acta Biologica Hungarica 59 (2008) 439-451.

Bacteria in a biofilm are enmeshed in a self-synthesized extracellular polysaccharide matrix (PGA), which is a linear polymer of β (1,6)-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) residues. Dispersin B (DspB), a soluble glycoside hydrolase produced by the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* degrades PGA. The enzyme DspB is an α/β TIM-barrel protein and belongs to family 20 glycosyl hydrolases members. The enzyme activity of DspB with regard to its substrate specificity towards β (1,6)-linked GlcNAc polymers and its endo/exo character was investigated through ligand docking and the hydrolysis of synthetic oligosaccharides. Ligand docking analysis suggested that β (1,6)-linked GlcNAc oligosaccharide bound to the active site better than β (1,4)-linked GlcNAc oligosaccharide. Our combined results indicate that DspB is an exo-acting enzyme that hydrolyzes β (1,6)-linked N-acetylglucosamine oligomers.

15. Toward synthesis of the isosteric sulfonate analogues of the at-III binding domain of heparin

Organic Letters 11 (2009) 2619-2622.

D-Glucuronate and L-iduronate containing disaccharides related to the antithrombin-binding pentasaccharide of heparin, in which one of the sulfate esters is systematically replaced by a sodium sulfonatomethyl moiety, were synthesized. The sulfonic acid group was introduced by stereoselective radical addition onto the exomethylene moiety of the appropriate glycoside derivatives, and the resulting sulfonatomethyl glucosides were used as acceptors.

16. Synthesis, regioselective hydrogenolysis, partial hydrogenation, and conformational study of dioxane and dioxolane-type (9'-anthracenyl)methylene acetals of sugars

Carbohydr. Res., 344 (2009) 2444-2453.

Dioxane-type (9'-anthracenyl)methylene acetal of methyl 2,3-di-O-methyl- α -D-glucopyranoside was cleaved with LiAlH₄/AlCl₃ (3:1) or with Na(CN)BH₃-HCl regioselectively to provide the 4- or 6-O-(9'-anthracenyl)methyl ether, respectively. Hydrogenolytic reaction of the exo and endo isomers of dioxolane-type acetals proved to be directed by the configuration of the acetalic carbon as well as by the intramolecular participation of the adjacent-free hydroxyl; ring-opening reaction of the endo isomer of the methyl 2,3-O-(9'-anthracenyl)methylene- α -L-rhamnopyranoside took place with complete selectivity resulting in the axial (9'-anthracenyl)methyl ether, whereas a 1:1 mixture of the axial and equatorial ethers was formed upon the same reaction of the exo isomer. Catalytic hydrogenation of the sugar acetals resulted in (9',10'-dihydro-9'-anthracenyl)methylene derivatives without affecting the acetalic center. High-temperature molecular dynamics simulations and DFT (Density Functional Theory) geometry optimizations were carried out to study the conformation of the dioxane-type (9',10'-dihydro-9'-anthracenyl)methylene acetal.