

Glikozilált, védett aminosavak szintézise glikozilált biokonjugátumok előállítása céljából

Synthesis of Glycosilated, Protected Amino Acids for the Preparation of Glycosilated Bioconjugates

Sinteza glicozilaminoacizilor protejați în scopul obținerii bioconjugatilor glicozilați

KOVÁCS Anita Kármén PhD hallgató, Dr. HETÉNYI Anasztázia egyetemi tanársegéd,
Prof. Dr. TÓTH Gábor egyetemi tanár

Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Vegytani Intézet;
H-6720 Szeged, Dóm tér 8.; Tel.: +36-62-545-136, Fax: +36-62-545-971,
e-mail: kovacs.anita@med.u-szeged.hu, <http://www.mdche.u-szeged.hu>

ABSTRACT

Incorporation of carbohydrate moieties into biologically active molecules has widespread interest because of their decisive role in the biological recognition, transport and absorption. Despite of the importance of it, only very few building blocks are available, which can be applied for the incorporation of the carbohydrate moiety. Our aim was the preparation of appropriately protected, glycosilated amino acid derivatives which can be applied for glycopeptide synthesis or the preparation of drug conjugates.

Keywords: glycosilation, building blocks, bioconjugates, transport, absorption

ÖSSZEFOGLALÓ

Szénhidrátok beépítése biológiailag aktív molekulákba széleskörű érdeklődésre tart számot, ugyanis a glikoziláció meghatározó jelentőségű a biológiai felismerés, felszívódás és transzport szempontjából. Nyilvánvaló fontossága ellenére meglehetősen kevés olyan építőkö áll rendelkezésre, amelyekkel szénhidrátok beépítését meg tudnánk valósítani. Célunk megfelelően védett glikozilált aminosav-származékok szintézise, melyek felhasználásával glikopeptideket és gyógyszermolekula-konjugátumokat tudnánk előállítani.

Kulcsszavak: glikoziláció, építőkövek, biokonjugátumok, transzport, abszorpció

1. ELMÉLETI HÁTTÉR

Az utóbbi időkben nagyon fontos fejlesztési irányvá vált a gyógyszermolekulák transzportjának, felszívódásának a modulálása. Ennek egyik eszköze az ezen molekulák felszívódásában szerepet játszó transzporterfehérjék igénybevétele.

A bélhámsejteken keresztüli transzportot az aminosavak, peptidek, szteroidok és szénhidrátok is elő tudják segíteni, ezért az ezek konjugátumait tartalmazó készítményeknek a felszívódása jóval kedvezőbb lehet az eredeti hatóanyag-molekuláénál. Erre kiváló példa a vírusellenes Acyclovir valin-észter konjugátuma, amely Valacyclovir néven már bevezetett gyógyszer [1].

Feltételezzük, hogy más, több transzporterfehérjét is felhasználó konjugátumok még hatékonyabbak lesznek, ezért aminosavak, kis peptidek glikozilált származékait kívántuk különböző hatóanyagokhoz konjugálni, hogy így jobb felszívódású anyagokhoz juthassunk.

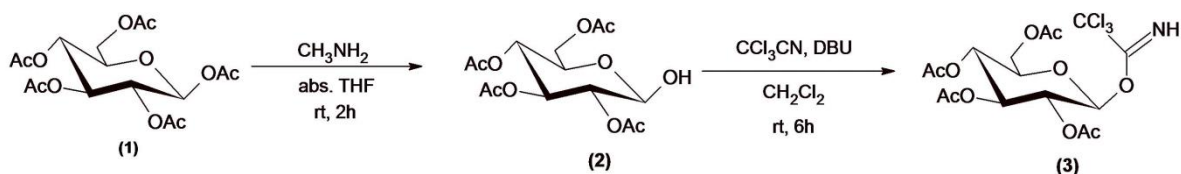
Annak ellenére, hogy az élő szervezetekben lejátszódó egyik legfontosabb reakció a glikoziláció, szintetikus kémiai kivitelezése máig problematikusnak tekinthető a szénhidrát-rész előállításai, a cukor és aminosavrész összekapcsolási, valamint a megfelelő védőcsoport-kombinációk kiválasztásának nehézségei miatt.

2. CÉLKITŰZÉS

Célul tűztük ki olyan, megfelelően védett glikozilált aminosav-származékok szintézisét, melyek felhasználásával részben glikopeptideket állíthatnánk elő; másrészt ezek felhasználásával olyan gyógyszermolekula-konjugátumokat tudnánk szintetizálni, melyek az eredetihez képest lényegesen jobb felszívódási, illetve transzport-tulajdonságokkal rendelkeznek.

3. A SZINTÉZISEK ÉS AZOK EREDMÉNYEI

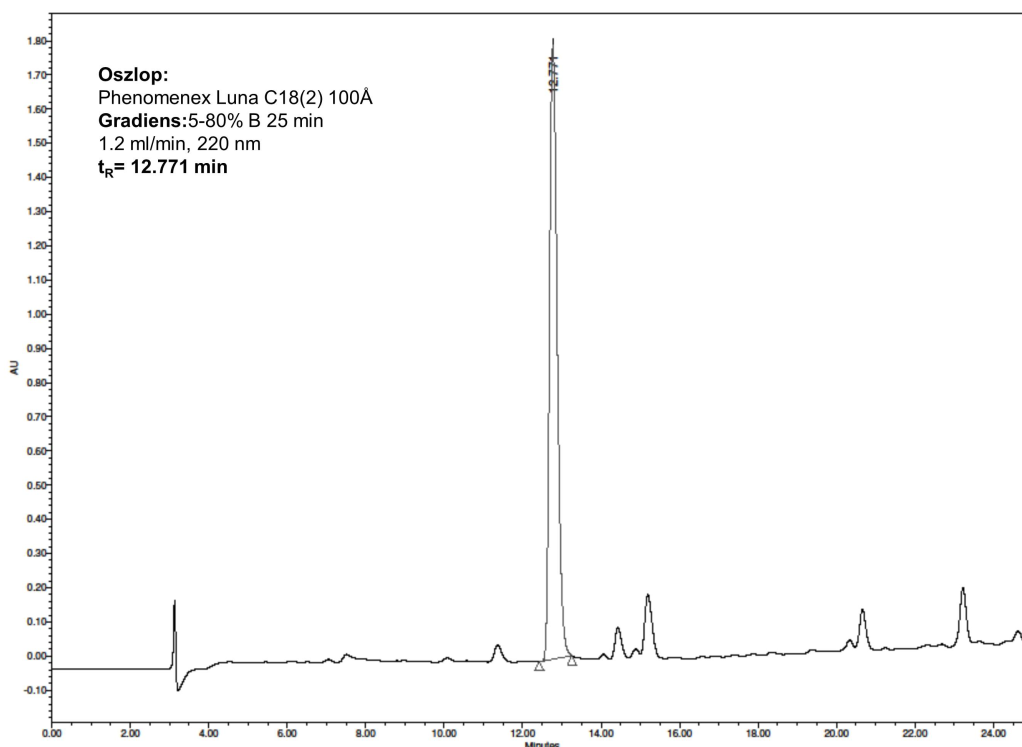
A szintézisek kulcsvegyülete olyan glükóz-származék, amely 2,3,4,6-hidroxil-csoportján védett, az 1-es hidroxil-csoportján pedig aktivált. A kulcsvegyület előállítása során a kereskedelmi forgalomban kapható 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl- β -D-glükózból (1) indultunk ki. Ennek a vegyületnek a glikozidos hidroxil-csoportján lévő acetyl-csoportot metil-aminnal távolítottuk el. A kapott termékhez, vagyis a 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glükózhoz (2) triklóracetonitrilt és 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ént (DBU) adtunk, melyek reakciójával előállítottuk a 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glükopiranozil-triklóracetimidátot (3) [2].



1. ábra

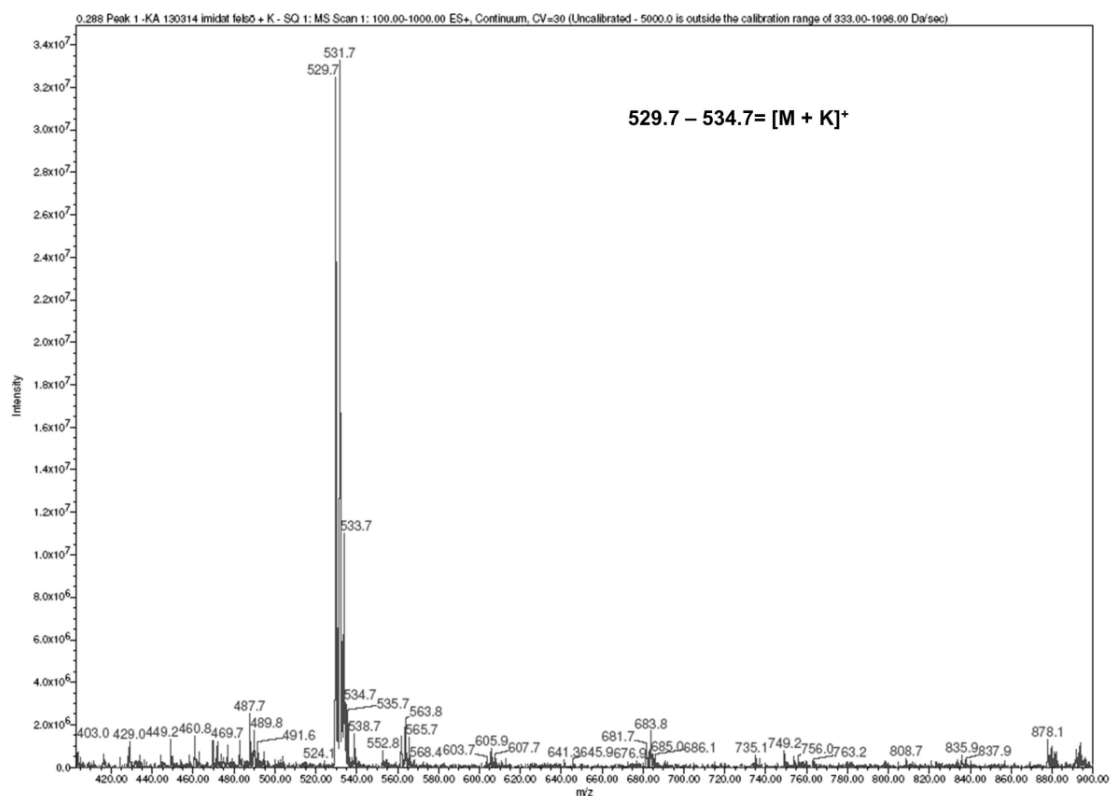
A kulcsvegyület (3) szintézise

(3) izolálására az irodalomban leírthoz képest új, hatékonyabb, gazdaságosabb módszert fejlesztettünk ki: kromatográfia helyett az etil-acetátban történő feloldás után 5%-os KHSO_4 -tal történő extrahálással szabadultunk meg a melléktermékektől.



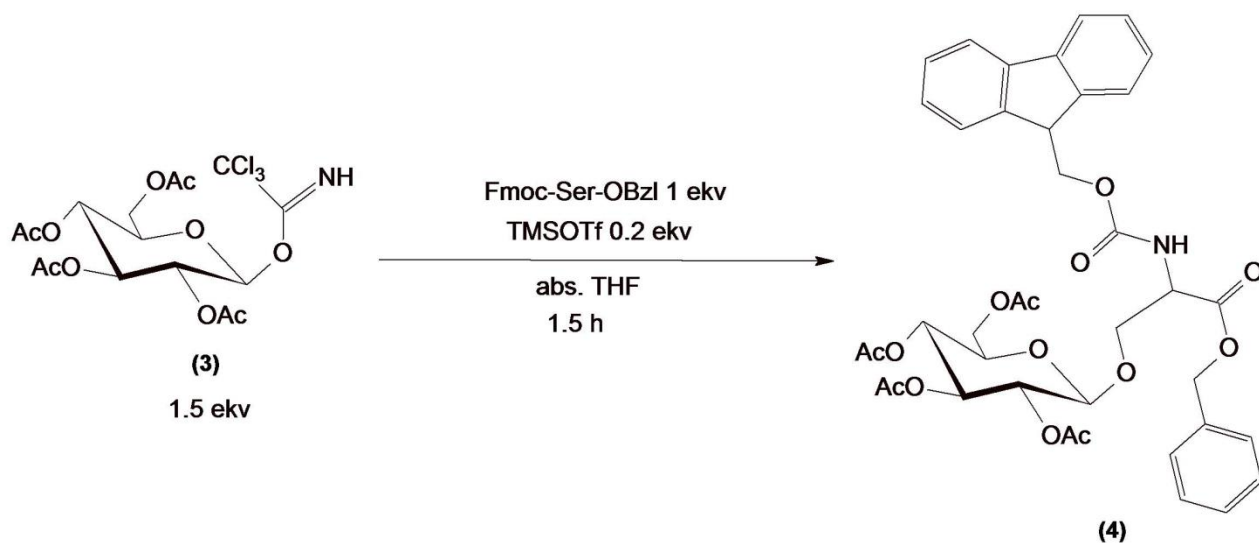
2. ábra

A tisztított (3) HPLC-profilja



3. ábra
A tisztított (3) ESI-tömegspektruma

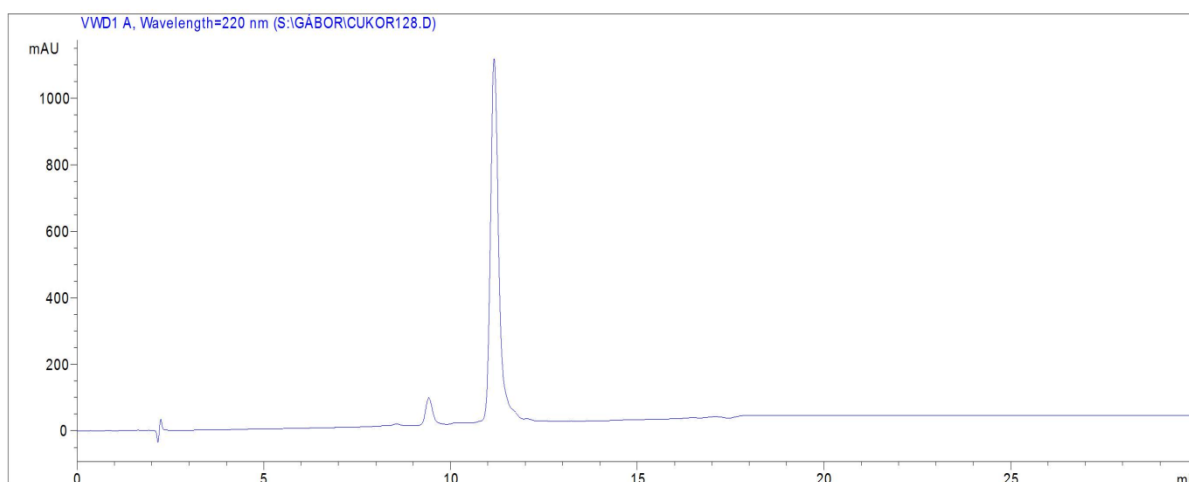
A (3)-t ezek után először Fmoc-Ser-OBzl védetlen alkoholos hidroxil-csoportjához kapcsoltuk trimetilszilil-trifluoro-metánszulfonát (TMSOTf) promóter segítségével. Ennek során megvizsgáltuk a reakció hőmérsékletfüggését: próbareakciót végeztünk $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on / $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on / $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on / szobahőmérsékleten, és azt állapítottuk meg, hogy $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on legjobb a konverzió: 21%. Ez a hozam a Fmoc-Ser-OBzl alkoholos hidroxil-csoportjának nagyfokú térgátlása miatt elmarad a glikoziláció során elvárttól ($\sim 50\text{-}70\%$), ennek ellenére sikerült előállítani a Fmoc-Ser[Glc(4Ac)]-OBzl-t (4).



4. ábra
A glikoziláció sémája

1. táblázat. Konverzió függése a hőmérséklettől

	- 45 °C	- 15 °C	0 °C	szobahőmérséklet
Konverzió (%)	11	21	15	5



5. ábra
A tisztított (4) HPLC profilja

A kívánt termék mellett azonban jelentős mértékben képződött a 2-es pozícióban dezacetilezett melléktermék, a Fmoc-Ser[Glc(3Ac)]-OBzl, melynek szerkezetét H^1 - és C^{13} -NMR spektrumának felvételével bizonyítottuk. A tapasztalt mellékreakció a szakirodalomban sem ismeretlen [3].

Az alacsony konverzió és a nagy mértékben képződött melléktermék miatt másik glikozil-akceptorhoz, a Boc-Ser-OBzl-hez fordultunk. Itt a kisebb térgátlás miatt nagyobb hozamra számítottunk.

A reakciót -15°C -on végeztük el. 25%-os konverziót értünk el, valamint dezacetilezett melléktermék nem keletkezett.

Ezek alapján elmondható, hogy a Boc-Ser-OBzl alkalmas glikozil-akceptor a glikozilezési reakcióhoz.

A továbbiakban tervezzük más hőmérsékleteken is elvégezni a Boc-Ser-OBzl glikozilációját, annak ki-derítése érdekében, hogy tudunk-e elérni jobb hozamot. Ezek után el kell távolítanunk a Bzl védőcsoportot, majd meg kell tisztítanunk a kapott Boc-Ser[Glc(4Ac)]-OH-t. Ezt követően végezhetjük el az építőkö konjugálását különböző gyógyszermolekulákhoz, valamint építhetjük be peptidekbe glikopeptidek szintézise céljából.

4. KÍSÉRLETI RÉSZ

4.1. 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glükopiranoz (2) előállítása

1,05 g (2,70 mmol) penta-O-acetil- β -D-glükóz oldása 10 ml abs. THF-ban. 680 μl (5,40 mmol) metilamin hozzáadása. Kevertetés 2 óra hosszúra szobahőmérsékleten. Bepárlás. Sárgásbarna olajos anyag.

HPLC-kromatogram: oszlop: Phenomenex Luna 10 μ C18(2) 100Å; gradiens: 5-80% B 25 min, 1,2 ml/min, 220 nm, $t_R = 15.332$ min

ESI-MS: 366,4 = $[M + NH_4]^+$

4.2. 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glükopiranozil-triklóracetimidát (3) előállítása

1,39 g (3,98 mmol) (2) oldása 22 ml abs. THF-ban. 1,28 ml (12,80 mmol) triklóracetónitril és 0,120 ml (0,80 mmol) DBU hozzáadása. Kevertetés szobahőn 6 óra hosszúra. Bepárlás. Barna olajos anyag.

HPLC-kromatogram: oszlop: Phenomenex Luna 10 μ C18(2) 100Å; gradiens: 5-80% B 25 min, 1,2 ml/min, 220 nm, $t_R = 12.452$ min

ESI-MS: 531,3 = $[M + K]^+$

4.3 A 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glükopiranozil-triklóracetimidát (3) tisztítása

8,60 g (2) oldása 50 ml etil-acetátban. Extrahálás 3 x 50 ml 5%-os KHSO₄-tal, majd 1 x 50 ml telített NaCl-oldattal. Szárítás sicc. Na₂SO₄-on. Szűrés, majd bepárlás. Tisztított (3) tömege: 4,60 g.

HPLC-kromatogram: oszlop: Phenomenex Luna 10μ C18(2) 100Å; gradiens: 5-80% B 25 min, 1,2 ml/min, 220 nm, $t_R = 12.771$ min

ESI-MS: 531,7 = [M + K]⁺

4.4. Fmoc-Ser[Glc(4Ac)]-OBzl (4) előállítása

0,084 g (0,20 mmol) Fmoc-Ser-OBzl oldása 0,5 ml abs. THF-ban. 7 μl (0,039 mmol) TMSOTf hozzáadása. -45 °C-on (aceton/szárazjég) / -15 °C-on (NaCl/jég) / 0 °C-on (jég) / szobahőmérsékleten 1 ml THF-ban oldott 0,237 g (0,30 mmol) (3) hozzáadása. Kevertetés 1,5 óra hosszáig. Bepárlás.

HPLC-kromatogram: oszlop: Phenomenex Luna 10μ C18(2) 100Å; gradiens: 70-100% B 15 min, 1,2 ml/min, 220 nm, $t_R = 11.941$ min

ESI-MS: 748,82 = [M + H]⁺

4.5. Boc-Ser[Glc(4Ac)]-OBzl (5) előállítása

0,060 g (0,20 mmol) Boc-Ser-OBzl oldása 0,5 ml abs. THF-ban. 7 μl (0,039 mmol) TMSOTf hozzáadása. -15 °C-on (NaCl/jég) 1 ml THF-ban oldott 0,237 g (0,3 mmol) (3) hozzáadása. Kevertetés 1,5 óra hosszáig. Bepárlás.

HPLC-kromatogram: oszlop: Phenomenex Luna 10μ C18(2) 100Å; gradiens: 70-100% B 15 min, 1,2 ml/min, 220 nm, $t_R = 9.486$ min

ESI-MS: 670,76 = [M + H]⁺

5. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetünket fejezzük ki a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0047 és a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0052 számú pályázatoknak a kutatáshoz nyújtott anyagi fedezetért.

6. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1] B. S. Anand, S. Katragadda, A. K. Mitra; Pharmacokinetics of Novel Dipeptide Ester Prodrugs of Acyclovir after Oral Administration: Intestinal Absorption and Liver Metabolism; The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics; The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics; 2004, vol. 311, No. 2, p. 659-667.
- [2] H. G. Sudibya, J. Ma, X. Dong, S. Ng, L. Li, X. Liu, P. Chen; Interfacing glycosilated carbon nanotube network devices with living cells to detect dynamic secretion of biomolecules; Wiley-VCH 2009; Angewandte Chemie, International Edition; 2009, Vol. 48, p. 2723-2726.
- [3] F. Kong; Recent studies on reaction pathways and applications of sugar orthoesters in synthesis of oligosaccharides; Carbohydrate Research; Elsevier; 2007, Vol. 342., p. 345-373.