

# Módosított peptidok szintézise

## DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Szolomájer-Csikós Orsolya

Témavezető:

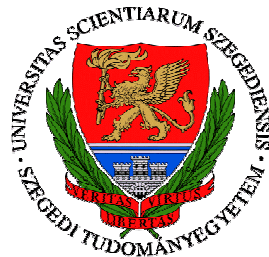
Prof. Dr. Tóth Gábor

intézetvezető egyetemi tanár

Kémia Doktori Iskola

Orvosi Vegytani Intézet

Szegedi Tudományegyetem TTIK



Szeged

2010

## Tartalomjegyzék

|   |    |
|---|----|
| Rövidítések jegyzéke  | 4  |
| 1. Bevezetés  | 6  |
| 2. Irodalmi előzmények  | 8  |
| 2.1 Fumitremorgin analógok tervezése és szintézise                      | 8  |
| 2.1.1 Az ABC transzporterek és a multidrog rezisztencia (MDR) jelensége | 8  |
| 2.1.2 Az ABC transzporterek szerkezete                                  | 9  |
| 2.2 Módosított minifehérjék szintézise                                  | 14 |
| 2.2.1 Minifehérjék  | 14 |
| 2.2.2 TC5b, a legkisebb minifehérje                                     | 15 |
| 2.3 Glikopeptidok szintézise  | 17 |
| 2.4 Radiofarmakonok készítéséhez prekurzorok előállítása                | 19 |
| 2.4.1 Az Alzheimer kór  | 20 |
| 2.4.2 Az Alzheimer kór és a Kurkumin                                    | 21 |
| 2.4.3 Képkötő eljárások és a DOTA                                       | 22 |
| 3. Célkitűzések   | 25 |
| 3.1 Fumitremorgin analógok tervezése és szintézise                      | 25 |
| 3.2 Módosított minifehérjék szintézise                                  | 25 |
| 3.3 Glikopeptidok szintézise  | 25 |
| 3.4 Radiofarmakonok készítéséhez prekurzorok előállítása                | 25 |
| 4. Kísérleti eredmények tárgyalása                                      | 26 |
| 4.1 Fumitremorgin analógok tervezése és szintézise                      | 26 |
| 4.1.1 Fumitremorgin analógok előállítása szilárd fázisú szintézissel    | 26 |
| 4.1.2 Fumitremorgin analógok előállítása oldat fázisú szintézissel      | 30 |
| 4.1.3 Ko134 fumitremorgin analóg szintézise                             | 34 |
| 4.1.4 Konformáció igazolás  | 35 |
| 4.1.5 Biológiai vizsgálati eredmények                                   | 36 |
| 4.1.5.1 Az ABC transzporterek vizsgálatára alkalmas tesztrendszerek     | 36 |
| 4.1.5.2 ABCG2 inhibitor aktivitás                                       | 38 |
| 4.1.5.3 Gátlás specificitás   | 39 |
| 4.1.5.4 Toxicitás és reverz aktivitás                                   | 40 |
| 4.2 Módosított minifehérjék szintézise                                  | 43 |
| 4.3 Glikopeptidok szintézise  | 47 |
| 4.3.1 N-glikopeptidok szintézise  | 47 |
| 4.3.2 O-glikopeptidok szintézise  | 50 |
| 4.4 Radiofarmakonok készítéséhez prekurzorok előállítása                | 52 |

|  |    |
|--|----|
| 5. Általános kísérleti rész  | 58 |
| 6. Részletes kísérleti rész  | 59 |
| 6.1 Fumitremorgin analógok tervezése és szintézise   | 59 |
| 6.1.1 A <b>III.a1</b> ( <i>1S,3S,3'S</i> ), <b>III.a1</b> ( <i>1R,3S,3'S</i> ); <b>III.a2</b> ( <i>1S,3S,3'S</i> ), <b>III.a2</b> ( <i>1R,3S,3'S</i> );<br><b>III.a3</b> ( <i>1S,3S,3'S</i> ), <b>III.a3</b> ( <i>1R,3S,3'S</i> ); <b>III.a4</b> ( <i>1S,3S,3'S</i> ), <b>III.a4</b> ( <i>1R,3S,3'S</i> )<br>fumitremorgin analógok szilárd fázisú szintézise  | 59 |
| 6.1.2 A <b>III.b1</b> ( <i>1S,3S,3'S</i> ), <b>III.b1</b> ( <i>1R,3S,3'S</i> ); <b>III.b2</b> ( <i>1S,3S,3'S</i> ), <b>III.b2</b> ( <i>1R,3S,3'S</i> );<br><b>III.b3</b> ( <i>1S,3S,3'S</i> ), <b>III.b3</b> ( <i>1R,3S,3'S</i> ); <b>III.b4</b> ( <i>1S,3S,3'S</i> ), <b>III.b4</b> ( <i>1R,3S,3'S</i> )<br>fumitremorgin analógok szilárd fázisú szintézise  | 60 |
| 6.1.3 A <b>III.c1</b> ( <i>1S,3S,3'S</i> ), <b>III.c1</b> ( <i>1R,3S,3'S</i> ); <b>III.c2</b> ( <i>1S,3S,3'S</i> ), <b>III.c2</b> ( <i>1R,3S,3'S</i> );<br><b>III.c3</b> ( <i>1S,3S,3'S</i> ), <b>III.c3</b> ( <i>1R,3S,3'S</i> ); <b>III.c4</b> ( <i>1S,3S,3'S</i> ), <b>III.c4</b> ( <i>1R,3S,3'S</i> )<br>fumitremorgin analógok szilárd fázisú szintézise  | 61 |
| 6.1.4 A <b>III.d1</b> ( <i>1S,3S,3'S</i> ), <b>III.d1</b> ( <i>1R,3S,3'S</i> ); <b>III.d2</b> ( <i>1S,3S,3'S</i> ), <b>III.d2</b> ( <i>1R,3S,3'S</i> );<br><b>III.d3</b> ( <i>1S,3S,3'S</i> ), <b>III.d3</b> ( <i>1R,3S,3'S</i> ); <b>III.d4</b> ( <i>1S,3S,3'S</i> ), <b>III.d4</b> ( <i>1R,3S,3'S</i> )<br>fumitremorgin analógok szilárd fázisú szintézise  | 62 |
| 6.1.5 Az <b>1c</b> ( <i>3S,6S,12aS</i> ), <b>1c</b> ( <i>3S,6R,12aS</i> ); <b>2c</b> ( <i>3S,6S,12aS</i> ), <b>2c</b> ( <i>3S,6R,12aS</i> );<br><b>4d</b> ( <i>3S,6S,12aS</i> ), <b>4d</b> ( <i>3S,6R,12aS</i> ); <b>3e1</b> ( <i>3S,6S,12aS</i> ), <b>3e1</b> ( <i>3S,6R,12aS</i> );<br><b>3e2</b> ( <i>3S,6S,12aS</i> ), <b>3e2</b> ( <i>3S,6R,12aS</i> ); <b>3e3</b> ( <i>3S,6S,12aS</i> ), <b>3e3</b> ( <i>3S,6R,12aS</i> );<br><b>3e4</b> ( <i>3S,6S,12aS</i> ), <b>3e4</b> ( <i>3S,6R,12aS</i> ); <b>3e5</b> ( <i>3S,6S,12aS</i> ), <b>3e5</b> ( <i>3S,6R,12aS</i> );<br><b>3e6</b> ( <i>3S,6S,12aS</i> ), <b>3e6</b> ( <i>3S,6R,12aS</i> ) fumitremorgin analógok oldat fázisú szintézise | 62 |
| 6.1.5.1 Az <b>1c</b> ( <i>3S,6S,12aS</i> ), <b>1c</b> ( <i>3S,6R,12aS</i> ) fumitremorgin analóg szintézise  | 63 |
| 6.1.5.2 A <b>2c</b> ( <i>3S,6S,12aS</i> ), <b>2c</b> ( <i>3S,6R,12aS</i> ) fumitremorgin analóg szintézise   | 64 |
| 6.1.5.3 A <b>3e1</b> ( <i>3S,6S,12aS</i> ), <b>3e1</b> ( <i>3S,6R,12aS</i> ); <b>3e2</b> ( <i>3S,6S,12aS</i> ),<br><b>3e2</b> ( <i>3S,6R,12aS</i> ); <b>3e3</b> ( <i>3S,6S,12aS</i> ), <b>3e3</b> ( <i>3S,6R,12aS</i> );<br><b>3e4</b> ( <i>3S,6S,12aS</i> ), <b>3e4</b> ( <i>3S,6R,12aS</i> ); <b>3e5</b> ( <i>3S,6S,12aS</i> ),<br><b>3e5</b> ( <i>3S,6R,12aS</i> ); <b>3e6</b> ( <i>3S,6S,12aS</i> ), <b>3e6</b> ( <i>3S,6R,12aS</i> )<br>fumitremorgin analógok szintézise   | 65 |
| 6.1.5.4 A <b>4d</b> ( <i>3S,6S,12aS</i> ), <b>4d</b> ( <i>3S,6R,12aS</i> ) fumitremorgin analóg szintézise   | 68 |
| 6.1.6 Az <b>1c'</b> ( <i>3S,6S,12aS</i> ), <b>1c'</b> ( <i>3R,6S,12aS</i> ); <b>2c'</b> ( <i>3S,6S,12aS</i> ), <b>2c'</b> ( <i>3R,6S,12aS</i> )<br>fumitremorgin analógok oldat fázisú szintézise  | 69 |
| 6.1.7 <b>Ko134</b> referens oldat fázisú szintézise  | 70 |
| 6.2 Módosított minifehérjék szintézise   | 72 |
| 6.2.1 A <b>TC5b_9D_R16hR</b> peptid szintézise   | 72 |
| 6.2.2 A <b>TC5b_R16A</b> peptid szintézise   | 73 |
| 6.2.3 A <b>TC5b_D9N_R16A</b> peptid szintézise   | 74 |
| 6.2.4 A <b>TC5b-D9AaD_R16K</b> peptid szintézise   | 74 |
| 6.2.5 A <b>TC5b_D9E</b> peptid szintézise  | 75 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>6.2.6</b> A <b>TC5b_D9N</b> peptid szintézise  | 76  |
| <b>6.2.7</b> A <b>TC5b_D9S</b> peptid szintézise  | 76  |
| <b>6.2.8</b> A <b>TC5b-D9Q</b> peptid szintézise  | 77  |
| <b>6.2.9</b> A <b>TC5b-S20E</b> peptid szintézise   | 77  |
| <b>6.2.10</b> A <b>TC5b-S20Q</b> peptid szintézise  | 78  |
| <b>6.2.11</b> A <b>TC5b-S14E</b> peptid szintézise  | 78  |
| <b>6.2.12</b> A <b>TC5b-S14Q</b> peptid szintézise  | 79  |
| <b>6.3</b> Glikopeptidek szintézise   | 80  |
| <b>6.3.1</b> A <b>Leu-Lys-[GlcNAc(β1-N)]Asn-Gly-Gly-Pro-NH<sub>2</sub></b> szilárd fázisú szintézise                            | 80  |
| <b>6.3.2</b> A <b>Leu-Lys-[GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)]Asn-Gly-Gly-Pro-NH<sub>2</sub></b><br>szilárd fázisú szintézise             | 81  |
| <b>6.3.3</b> A <b>Leu-Lys-[Man(β14)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)]Asn-Gly-Gly-Pro-NH<sub>2</sub></b><br>szilárd fázisú szintézise     | 81  |
| <b>6.3.4</b> A <b>H-Gly-Val-Glu-Asp-Ile-Ser(Xil)-Gly-Leu-Pro-Ser(Bn)-Gly-NH<sub>2</sub></b><br>peptid szilárd fázisú szintézise | 82  |
| <b>6.4</b> Radiofarmakonok készítéséhez prekurzorok előállítása   | 82  |
| <b>7.</b> Összefoglalás   | 85  |
| <b>7.1</b> Fumitremorgin analógok tervezése és szintézise   | 85  |
| <b>7.2</b> Módosított minifehérjék szintézise   | 86  |
| <b>7.3</b> Glikopeptidek szintézise   | 88  |
| <b>7.4</b> Radiofarmakonok készítéséhez prekurzorok előállítása   | 90  |
| <b>8.</b> Summary   | 91  |
| <b>8.1</b> Design and synthesis of new fumitremorgin analogues  | 91  |
| <b>8.2</b> Synthesis of modified miniproteins   | 92  |
| <b>8.3</b> Synthesis of glycopeptides   | 94  |
| <b>8.4</b> Synthesis of precursors for radiopharmakon preparation   | 95  |
| <b>9.</b> Irodalomjegyzék   | 97  |
| <b>10.</b> Köszönetnyilvánítás  | 102 |

## Rövidítések jegyzéke

Az aminosavak jelölésére az irodalomban használt 1 és 3 betűs rövidítéseket használtam.

A szövegben leggyakrabban alkalmazott rövidítések az alábbiak voltak:

|             |  |
|-------------|--|
| Fmoc        | 9-fluorenil-metil-oxi-karbonil   |
| Boc         | <i>tert</i> -butil-oxi-karbonil  |
| 2ClZ        | 2-klór-benzil-oxi-karbonil   |
| Tos         | 4-toluolszulfonil  |
| Pmc         | 2,2,5,7,8-pentametil-kromán  |
| <i>t</i> Bu | tercier-butil  |
| Trt         | tritol   |
| Bzl         | benzil   |
| Bz          | benzoil  |
| OcHex       | ciklohexil-észter  |
| ABC         | ATP-kötő domén (ATP Binding Cassette)  |
| ABCG2       | ABCG2 multidrog transzporter, az ABCG alcsalád második tagja   |
| BCRP        | emlőrák drogrezisztencia fehérje (Breast Cancer Resistance Protein)  |
| MDR1        | multidrog rezisztencia fehérje vagy P-glikoprotein (multidrog resistance protein, P glycoprotein)                                      |
| MRP1        | multidrog rezisztenciához társuló fehérje 1.(multidrog resistance-associated protein 1.)   |
| Ko134       | 3-(6-izobutil-1,4-dioxo-1,2,3,4,6,7,12,12a-octahidro-pirazino[1',2':1,6]pirido[3,4-b]indol-3-il)-propionsav- <i>tert</i> -butil-észter |
| FTC         | Fumitremorgin-C  |
| GLP-1       | glukagonszerű peptid-1   |
| P-gp        | P-glikoprotein   |
| ATP         | adenozin-trifoszfát  |
| DOTA        | 1,4,7,10-tetraazaciklododekán-1,4,7,10-tetraecetsav  |
| APP         | amiloid prekursor protein  |
| ACN         | acetonitril  |
| RP-HPLC     | Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (Fordított Fázisú Nagy Hatékonyságú Folyadékkromatográfia)                       |
| ESI-MS      | elektrospray ionizációs tömegspektrometria   |
| TFA         | trifluorecetsav  |
| DCM         | diklórmétán  |
| NMP         | <i>N</i> -metil-pirrolidon   |

|                     |   |
|---------------------|---|
| DMF                 | <i>N,N</i> -dimetilformamid   |
| MeOH                | metanol   |
| EtOAc               | etil-acetát   |
| AcOH                | ecetsav   |
| NH <sub>4</sub> OAc | ammónium-acetát   |
| TEA                 | trietyl-amin  |
| DIPEA               | <i>N,N</i> -diizopropil-etyl-amin   |
| HOAt                | 1-hidroxi-7-aza-benzotriazol  |
| HBTU                | [2(1 <i>h</i> -benzotriazol-1- <i>il</i> )-1,1,3,3-tetrametyl-uronium]-hexafluoro-foszfát |
| CIP                 | 2-kloro-1,3-dimetyl-2-imidazolinium-hexafluoro-foszfát                                    |
| TFFH                | <i>N,N,N',N'</i> ,-tetrametyl-fluoroformaminidium-hexafluoro-foszfát                      |
| TCFH                | <i>N,N,N',N'</i> ,-tetrametyl-kloroformaminidium-hexafluoro-foszfát                       |
| HATU                | [2-(7-aza-benzotriazol-1- <i>il</i> )-1,1,3,3-tetrametyl-uronium]-hexafluoro-foszfát      |
| DCC                 | <i>N,N'</i> -diciklohexil-karbodiimid   |
| DTT                 | ditiotreitól  |
| MBHA                | metyl-benzhidril-amin   |

## 1. Bevezetés

Napjainkban egyre nagyobb az érdeklődés az élő szervezeteket felépítő biomolekulák (szénhidrátok, peptidek, fehérjék, glikoproteinek, nukleinsavak) szerkezetének felderítésére, illetve a szerkezetben különböző hatásokra bekövetkező változások tanulmányozására. A szerkezet pontos megismerése segíthet a bonyolult biokémiai folyamatok megértésében, a szerkezetben bekövetkező változások időben történő felismerése pedig orvosi, diagnosztikai jelentőséggel bír.

A peptidek fehérjék poszt-transzlációs módosításai (glikoziláció, foszfatálás, fémionok, lipidek beépülése stb.) alapvető jelentőségűek a különböző biológiai felismerési folyamatokban. A fehérjék a sejten belüli szintézist követően – az oldalláncokon található változatos funkciócsoportokon keresztül – számos poszt-transzlációs módosításon mehetnek át. A leggyakoribb módosítás a foszforiláció, mely során a fehérjére specifikus kináz enzim foszfát csoportot helyez egy meghatározott (Tyr, Ser, Thr) aminosav oldalláncára. A foszforiláció során az elektrosztatikus kölcsönhatások következtében megváltozik a fehérjék konformációja, amelyből kifolyólag a funkciójuk is módosulhat. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a fehérjék aktiválódása és gátlása is bekövetkezhet ezen poszttranszlációs módosítás eredményeképpen. A fehérjék reverzibilis foszforilációja szerepet játszik a sejtek energia metabolismusában, a sejtek osztódásának, növekedésének és differenciálódásának, mozgásának, valamint anyagcsere folyamatainak szabályozásában. A glikoziláció szintén gyakori jelenség, ebben az esetben oligo/mono-szacharid láncok kapcsolódnak Asn, Ser, Thr, Hyl, Hyp aminosavak oldalláncára. A poszt-transzlációs módosítások központi szerepet játszanak a fehérjék heterogenitásának kialakításában és hozzájárulnak ahhoz, hogy ugyanazon fehérjék különböző sejtípusokban különböző feladatokat tudjanak ellátni. Napjainkban a glikoziláció iránti egyre nagyobb érdeklődés annak köszönhető, hogy az oligoszacharidok jelenlétét, illetve szerkezeti és mennyiségbeli változását megfigyelték különböző patofiziológiai állapotokban, mint pl.: tumoros megbetegedések, reumás artritisz, immunhiányos betegségek esetében.

Az elmúlt években fokozott érdeklődés mutatkozik a peptidalapú hatóanyagok iránt széles körű biológiai szerepük, kedvező biológiai és kémiai tulajdonságaik miatt. Legtöbbször a már ismert hatóanyagokat változtatjuk, hogy ezáltal javítsuk, új tulajdonságokkal ruházzuk fel, szélesebb hatásúvá vagy éppen specifikusabbá tegyük azokat. A módosított vegyület sokszor hatásosabb az eredeténél, hatékonyabb a betegséggel szemben vagy kevésbé súlyos mellékhatásokkal rendelkezik. Ha egy másik eltérő tulajdonsággal rendelkező vegyületet

kapcsolunk a molekulához (peptidhez) konjugátumokat állíthatunk elő. Ezzel a módszerrel a különböző molekulák hatását kombinálhatjuk, az eredeti hatóanyag tulajdonságait bővíthetjük. Megváltoztathatjuk a molekula fizikai-kémiai és/vagy biológiai sajátosságait. Ugyanakkor a szintézisek során mérlegelnünk kell, hogy a hatás megőrzése mellett a molekula mely részei módosíthatóak, milyen funkciós csoportokat használhatunk a konjugáláshoz és melyek jelenléte elengedhetetlen a biológiai aktivitás megőrzésére.

A detektált és biológiai hatással ellátott fehérjék működésének megértését, szervezetben betöltött funkciójuk mind teljesebb megismerését segíti a fehérjék modellezése kisebb peptidekkel. Ezen szerkezet-hatás összefüggések feldolgozásával, értékelésével megismerhetővé válnak a fehérjék aktivitásához szükséges szerkezeti elemek.

A modellpeptidek, fehérjeszakaszok, biológiailag aktív peptidek, peptidomimetikumok kémiai kutatásainak egyik legfőbb eszköze a szilárd fázisú peptidkémia. A mind összetettebb biológiailag aktív molekulák szintézise mind összetettebb védőcsoport kombinációk használatát és új szintézis stratégiák kidolgozását teszi szükségessé.

A szintetikus szilárd fázisú peptidkémia kialakulása óta jelentős fejlődésen ment keresztül, ugyanakkor még a mai napig is vannak olyan peptidek, peptidszármazékok amelyek előállítása nehézségekbe ütközik, alacsony kitermeléssel vagy elégtelen tisztasággal lehet csak megvalósítani. Az egyes módosított peptidek előállítása a mai napig is kihívást jelent, például: a különböző glikopeptidek szintézise, fémionok hozzákötése a peptidekhez stb.

Munkám során fumitremorgin analógok, módosított minifehérjék, glikopeptidek, illetve prekursorok előállításával foglalkoztam. A szintézisek során felhasználtam a modern peptidkémia nyújtotta lehetőségeket (a folyamatos fejlesztések eredményeként újabb és újabb szelektív védőcsoportok megjelenése, egyre változatosabb gyanták alkalmazása, új szelektív védőcsoport hasítási módszerek stb.) és egyes esetekben ötvöztem azokat más szintézis stratégiai módszerekkel is.



## 2. Irodalmi előzmények

### 2.1 Fumitremorgin analógok tervezése és szintézise

#### 2.1.1 Az ABC transzporterek és a multidrog rezisztencia (MDR) jelensége

A fejlettebb országokban, köztük hazánkban is, a kardiovaszkuláris megbetegedések után a rákos betegségek állnak a mortalitási statisztikák élén. Az egyre újabb kemoterápiás szerek bevezetése és a kiterjedt kutatások ellenére mind a mai napig a rákkal diagnosztizált betegek közel felénél a megbetegedés öt éven belül halálhoz vezet. Ezen előnytelen statisztikák háttérében az elégtelen prevenció és a kései diagnózis mellett a kemoterápiás szerek iránt kialakuló rezisztencia tekinthető az egyik legfontosabb tényezőnek. A rákos sejtek számos módon képesek ellenállni a kemoterapeutikumok toxikus hatásainak, melyek közül az ABC transzporter fehérjék által közvetített úgynevezett multidrog rezisztencia az egyik legintenzívebben tanulmányozott jelenség. A tumorok multidrog rezisztenciája a rák sikeres gyógyításának egyik legfőbb akadálya. A tumorsejtekben egyik vagy másik aktív transzporterként működő ABC fehérjéből nagyon sok termelődik, és a sejtből kifelé „pumpálva” megakadályozza, hogy a gyógyszermolekulák a sejten belül felhalmozódjanak.

A tumorok egy része reagál a kezelésre, a betegség gyógyítható, míg más daganatok ellenállóak. Ez utóbbi esetben hiába történik hatóanyagváltás, a daganatos sejtek ellenállnak a legeltérőbb kémiai szerkezetű gyógyszermolekuláknak is. Ezt a jelenséget hívják multidrog rezisztenciának.

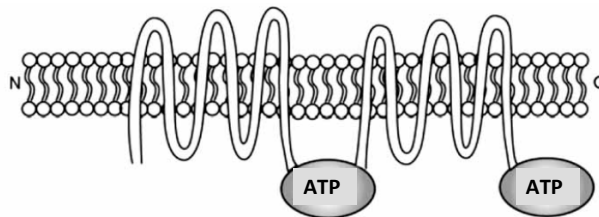
Az ABCB1 felfedezése óta nyilvánvalóvá vált, hogy egy, a membránban elhelyezkedő fehérje milyen jelentősen tudja befolyásolni az alkalmazott terápia eredményességét. Hiszen az ABCB1 expresszió szelektív előnyt jelent a tumoros sejteknek a citosztatikumkezelés során, mivel az adott szerre, illetve más molekulákra is keresztrezisztens fog túlélni és szaporodni. [1].

A multidrog rezisztencia jelenség kapcsán három ABC transzportert emelhetünk ki, ezek az ABCB1 (MDR1), az ABCC1 (MRP1) és az ABCG2 (BCRP, Breast Cancer Resistance Protein). Ezen fehérjék szubsztrátspecifitása a citosztatikumok körében meglehetősen átfedő [2].

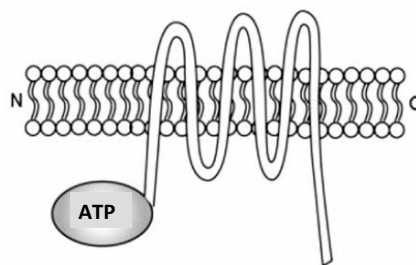
### 2.1.2 Az ABC transzporterek szerkezete

Az emberi genomban 49 ABC fehérjét azonosítottak, valamennyi eddig megismert genomban ezen kódoló gének megfelelői megtalálhatóak. Az ABC fehérjecsalád tagjai azonos építőelemekből, rendkívül konzervált ATP kötő doménekből (NBD) és a membránon átívelő, transzmembrán régiókból (TMD) épülnek fel.

Emlősökben a funkcionálisan működő ABC transzporterek legtöbbször két nukleotidkötő doménből és két transzmembrándoménből áll. Ez a négy alegység az ún. egésztranszporterek esetében egy polipeptidláncon helyezkedik el (1. ábra), de megkülönböztetünk ún. féltranszportereket is (2. ábra), amelyek egy ATP kötő doménből és egy TMD-ből épülnek fel. Ezek a féltranszporterek homo-, vagy heterodimerizáció révén válnak működőképes fehérjékké. [3] Megemlítendő, hogy egyes ABC fehérjék, mint pl. az MRP alcsalád néhány tagja egy 5 transzmembrán hélixből álló addicionális TMD-t tartalmaz. [4]



1. ábra Egész transzporter: két transzmembrán doménből (TMD) és két nukleotidkötő doménből (NBD) álló polipeptid [5]

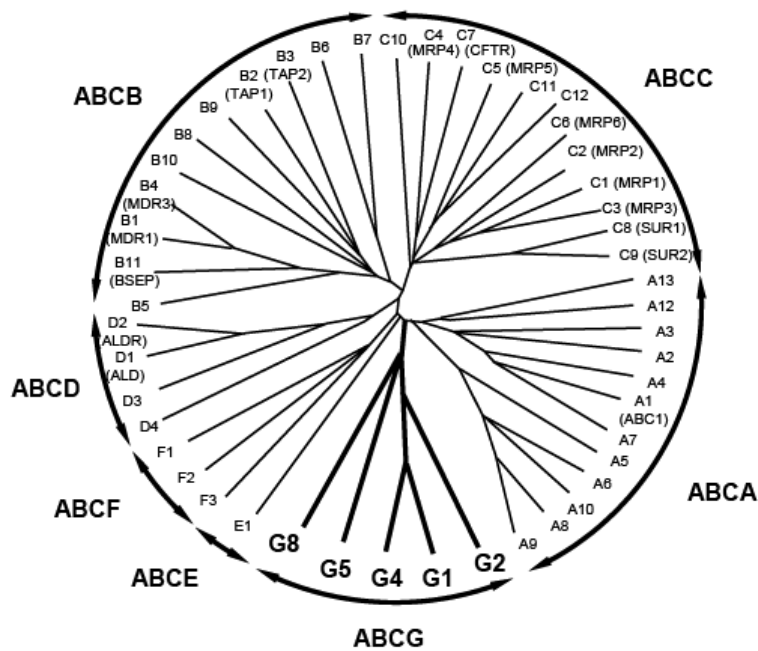


2. ábra Fél transzporter: egy transzmembrán doménből (TMD) és egy nukleotidkötő doménből (NBD) álló polipeptid [5]

A transzmembrán domének – amelyek egyenként hat  $\alpha$ -hélixből épülnek fel – alkotják az ABC transzporterek működésének alapját. Ugyanis ezek a polipeptidlánccok a membránon áthatolva, specifikusan az adott fehérjére jellemző csatornát biztosítják szubsztrátjaik számára, biztosítva az átjutást a membrán egyik oldaláról a másikra.

Az ABC proteinek, mint aktív transzporterek az ATP hidrolíziséből nyerik az energiát. Az ATP a citoplazmában elhelyezkedő nukleotidkötő doménhez kapcsolódik és a hidrolíziséből származó energia fordítódik közvetlenül az NBD-hez kapcsolódó transzmembrán domén konformációváltozására, így a szubsztrát transzportjára. [6,7,8]

Az ABC proteinek nevezéktana a szekvencia homológián alapul. A közel ötven fehérjét magába foglaló család tagjait hét alcsaládba sorolják be ABCA-tól ABCG-ig, ezen alcsaládokon belül az egyes fehérjék megjelölése egy további számmal történik (3. ábra). [6]



3. ábra A humán ABC fehérjék családfája

### *ABCA alcsalád*

Az ABCA alcsaládba, amelyet további két alcsoportra lehet osztani a kromoszómákban való elhelyezkedés alapján, 12 egész transzporter és a legnagyobb mólsúlyú ABC fehérjék többsége tartozik. Az egyik legjobban jellemzett tagja az ABCA1 protein, amelynek feladatai közé tartozik a felesleges koleszterin és foszfolipidek eltávolítása a sejtekből. [9]

### *ABCB alcsalád*

Ez a legváltozatosabb ABC alcsalád: tartalmaz mind egész- és féltranszportereket, vannak közöttük gyógyszer-, vas- és speciális fehérjetranszporterek is. Az ABCB alcsalád tagjai változatos előfordulásúak, a plazmamembránon kívül az endoplazmatikus retikulumban, lizoszómális és mitokondriális membránokon is megtalálhatóak. Ebbe a családba tartozik a legismertebb és legjobban jellemzett ABC fehérje, az ABCB1 is, amelyet elsőként hoztak kapcsolatba a multidrug rezisztenciával.

### *ABCC alcsalád*

Az alcsalád mind a 12 tagja hasonló struktúrával rendelkező egésztranszporter. Bár szerkezetileg hasonlítanak, funkcióik és molekuláris mechanizmusaik nagyon eltérőek. Vannak közöttük aktív ATP függő transzporterek, regulátor ioncsatornák és kálium-csatornák permeabilitását moduláló fehérjék is. Az MRP1 (ABCC1) volt a második ABC transzporter, amelyet kapcsolatba hoztak a tumorok multidrug rezisztencia jelenségével. [10,11,12,13] Szubsztrátjai közé tartozik pl. a daunorubicin, doxorubicin, vinkrisztin, kolhicin, de nagyon hasonló profilt mutat az ABCB1-gyel is. Az ABCC1-re és a család további négy tagjára (ABCC2, ABCC3, ABCC6 és ABCC7) jellemző, hogy a többi ABC transzportertől eltérően nem két, hanem három TMD-t tartalmaznak. Az ABCC1 különböző molekulák, drogok glutation, glukoronát és szulfát konjugátumainak, valamint organikus anionok transzportjára képes, de részt vesz egy rendkívül fontos szignalizációs molekula, a Leukotrién C4 szállításában is. [14,15,16] Számos külső és belső mérgező anyag válik semlegessé a korábban említett vegyületekkel kapcsolódva, amelyeket aztán az ABCC2 választ ki az epébe és a vizeletbe.

### *ABCD alcsalád*

Ez a család négy ABC féltranszportert foglal magába. A peroxisómális membránban helyezkednek el, így ezek génjeinek mutációja peroxisómális betegségek kialakulását eredményezi. A leggyakoribb a nemi X kromoszómához kötötten öröklődő adrenoleukodystrophia, melynek során telített zsírsavak halmozódnak fel a sejtekben. Ezt a betegséget az ALD/ABCD1 gén mutációja okozza. [17]

### *ABCE és F alcsalád*

Ezek az alcsaládok nukleotidkötő doménekkel rendelkeznek, viszont nem azonosítottak bennük transzmembrándoméneket, így jelenleg nem ismerjük transzporttal kapcsolatos funkcióikat.

### *Az ABCG alcsalád*

A humán ABCG fehérje alcsalád tagjai jellegzetes domén szerkezettel rendelkező aktív ABC fél-transzporterek, amelyek jelentősen befolyásolják a gyógyszerek farmakokinetikáját, valamint kulcsfontosságú szerepet játszanak a sejtek lipid anyagcseréjében. A transzmembrán domének (TMD) a C-terminálison, míg a nukleotidkötő domének (NBD) az N-terminálison helyezkednek el. Az ABCG2 az alcsalád legtöbbet vizsgált, legjobban jellemzett tagja, olyan fél-transzporter mely a sejtek apikális membránjában helyezkedik el.

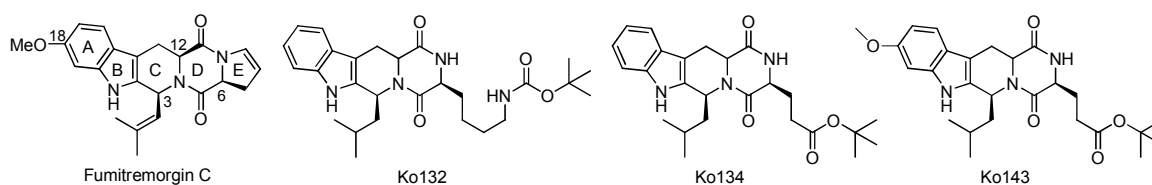
A 90-es évek végén lényegében egyidőben három különböző laboratórium is azonosította az ABCG2 molekulát: kettő drogszelektált sejtvonalból egy pedig humán cDNS könyvtárból, így a kezdetekben nem volt egységes. [18,19,20] Doyle és munkatársai rezisztens mellrák sejtvonalban azonosították, így BCRP-nek (breast cancer resistance protein) nevezték el, a verapamillal blokkolt ABCB1 funkciójú mitoxantronra rezisztens sejtvonalból származó fehérjének Allikments-ék az MXR (mitoxantrone resistance protein) nevet adták, míg Miyake és kutatócsoportja pedig ABCP-nek keresztelték el a placentában magasan expresszálódó proteint. Később azonban kiderült, hogy a cDNS könyvtárból származó fehérje a vad típusú, a másik kettő pedig hordoz egy olyan pontmutációt a 482-es pozícióban lévő aminosavnál, amely a szubsztrátspecificitást is befolyásolja. Ez a mutáció ráadásul a humán populációkban nem fordul elő, hanem a drogszelekció során keletkező szomatikus mutáció. Az ABCG2 fehérje egy féltranszporter, amely homodimerizáció révén válik funkcióképes fehérjévé. Számos szövet apikális membránjában expresszálódik, különösen az intesztinális epitel sejtekben, a placentában, a vér-agy-gátban és a májban. Jelentős szerepe van a sejtek védelmében hipoxiás körülmények között, hiszen csökkenti a hem és/vagy porfirinek intracelluláris koncentrációját. Funkciója ugyan még mind a mai napig nem teljesen tisztázott, de tény, hogy a hematopoetikus őssejtek membránjában is jelentős mennyiségben kifejeződik. [21,22,23] ABCG2 knockout egérekísérletek alapján eltérést tapasztaltak a két nem között, ugyanis a hímek májában magasabb szinten expresszálódik a

fehérje, és ez jelentős különbséget okoz az ABCG2 szubsztrát gyógyszermolekulák farmakokinetikai viselkedésében. [24] Az ABCG2-nek fontos szerepe van a különböző molekulák, toxinok, drogok anyatejbe való kiválasztásában is, erre Jonker és munkatársai világítottak rá, miután ABCG2 expressziót észleltek a tejmirigyekben. [25] Ugyancsak ők mutatták meg, hogy ABCG2<sup>-/-</sup> állatokban egyes szulfát konjugátumok vizeleten keresztüli kiválasztása lényegesen alacsonyabb, mint a vad típusú állatokban. [26]

Az ABCG2 szubsztrátjai között találunk számos gyógyszermolekulát, illetve azok metabolitját ugyanúgy, mint toxint, élelmiszerekben megtalálható molekulákat, szulfatált hormon metabolitokat, klorofill, metabolitot, fluoreszcens festéket stb.

Az ABCG2 által transzportált molekulákról általánosságban elmondható, hogy nagyméretűek, hidrofóbok, lehetnek pozitív vagy negatív töltésűek. Vannak közöttük kemoterápiás szerek, fluoreszcens festékek, antivirális szerek, antibiotikumok, egyes élelmiszerekben is megtalálható karcinogének és egyéb természetben előforduló anyagok.

Hasonlóan a multidrog rezisztenciában szerepet játszó többi ABC transzporterhez, az ABCG2 fehérjének is számos inhibitora ismert. Az inhibitorok közül először a fumitremorgin C-t (FTC) (4. ábra) azonosították (izolálása *Aspergillus fumigatus* baktérium törzsekből történt), mint ABCG2-re specifikus gátlószert, mivel azonban *in vivo* neurotoxikus [27], egy sor újabb FTC-típusú indol-diketopiperazin származékot szintetizáltak. [28] A leghatásosabbak ezen analógok közül a Ko132, Ko134 és a Ko143 vegyületek voltak (4. ábra), melyek *in vivo* egér kísérletekben [29] potenciális, nem toxikus ABCG2 inhibitoroknak bizonyultak, azonban mindhárom komponens tartalmaz egy észter kötést, mely kémiai és metabolikus szempontból instabillá teszi a vegyületeket. Hasonlóan a szubsztrátokhoz az inhibitorok esetében is sok olyan van, amelyik egyúttal a P-glikoproteint, az MRP1-et, vagy mindkettőt gátolja. Legtöbbjük éppen e tulajdonságok miatt került kipróbálásra, mint ABCG2 inhibitor. Ilyenek pl. az elakridar, a tarikvidar, vagy a ciklosporin. Az utóbbi években számos publikáció született amelyek tárgyát ABCG2 inhibitorok azonosítása képezte. [30,31]



4. ábra Néhány BCRP inhibitor

## 2.2 Módosított minifehérjék szintézise

### 2.2.1 Minifehérjék

A minifehérjék olyan makromolekulák, amelyek segítségével jobban megérthetőek a fehérje fel- és letekeredésének fontosabb lépései, valamint tanulmányozhatóak különböző szerkezetstabilizáló hatások. Ide tartoznak a hidrogén és sóhídak, a hirdofób vagy hidrofil kölcsönhatások, valamint minden olyan interakció, amely a téralkat felvételében fontos lehet. Végeredményben ezen kölcsönhatások feltérképezése segítheti elő a fehérjék racionális megtervezését. Míg a másodlagos szerkezeti elemek ( $\alpha$ -hélix) feltekeredésének primerszekvencia függése elég jól értett folyamat, addig sokkal nagyobb kihívás a harmadlagos, vagy más néven a térszerkezet felvételének megtervezése. Az említett probléma abból adódik, hogy a molekuláris téralkat kialakulása számos olyan szerkezetstabilizáló gyenge kölcsönhatás következménye, melynek jóslása nehézkes és bizonytalan kimenetelű. A jövőbeli fehérjetervezés szempontjából ezért különösen fontos, hogy megértsük ezeknek a gyenge kölcsönhatásoknak a működését.

A minifehérjéknek nincs általánosan elfogadott definíciója, ennek ellenére néhány közös jellemző mindegyikükre igaz. A legfontosabb ezek közül a harmadlagos struktúra. Ennek kialakításában a minifehérjéket alkotó összes másodlagos szerkezeti elem ( $\alpha$ -hélix,  $\beta$ -redő, és különböző kanyar régió) kooperatívan részt vesz. Felépítését tekintve az ideális minifehérjét csak  $\alpha$ ,L-aminosav építi fel, szerkezetét sem fémion, sem diszulfid-híd nem stabilizálja, nem képez dimert vagy oligomert. Ezen felül elvárás még, hogy fiziológiás körülmények között oldható legyen, vizes közegben is spontán (segédfehérjék nélkül) felvegye a natív szerkezetét és a vizsgálni kívánt koncentráció tartományban ne mutasson aggregációt.

Kis méretének köszönhetően a minifehérje egyszerűen szintetizálható hagyományos szilárd fázisú szintézissel. Ez a módszer lehetővé teszi a nem-természetes, vagy jelölt aminosavak beépítését a peptidláncba. Ezeknek a módosított aminosavaknak egyrészt a szerkezet spektroszkópai tanulmányozása során jut szerep ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  NMR, Fluoreszcens spektroszkópia), másfelől segítségükkel gyengített vagy erősített kölcsönhatások hozhatók létre, például oldalláncok csonkításával vagy hosszabbításával, ami a kölcsönhatás tanulmányozása szempontjából lehet fontos.

Az önálló felgombolyodásra képes, stabil fehérjék tervezése számos kihívással jár. Tudva azt, hogy a természetes fehérje a szekvenciájában kódol minden információt a natív

térszerkezetről, az ahhoz vezető útról (folding) és a funkciójáról [32], olyan szekvenciát kell nekünk is tervezni, ami magában hordozza ezeket a tulajdonságokat.

A természetben előforduló kisméretű önálló felgombolyodásra képes fehérjék aminosavaik jelentős hányadát használják a harmadlagos szerkezet fenntartására. Például számos toxin és proteáz inhibitor (erabutoxin vagy bovin pankreáz tripszin inhibitor) összetett diszulfid-híd rendszert képez a fehérje magjában, más fehérjék pedig fémionokat használnak stabilizáló elemként (Zn-ujj DNS kötő domén).

### 2.2.2 TC5b, a legkisebb minifehérje

A ma ismert legkisebb „*a priori*” tervezett minifehérje a TC5b, vagy más néven Trp-kalitka, 20 aminosavból áll, egy racionális fehérjetervezés eredménye, amely harmadlagos szerkezettel rendelkezik. Kiindulási vegyületként az arizonai sivatagban élő évente 4-5x táplálkozó viperagyík nyálában lévő természetes anyagot, az exendin-4-et használták. A vegyület tulajdonságai sokban megegyeznek az emberi szervezet által termelt egyik glukagonszerű peptid a GLP-1 tulajdonságaival. A fehérje így potenciális antidiabetikum jelölt molekula volt, melynek gyógyszerre történő fejlesztése során bebizonyosodott, hogy glükóz jelenlétében csökkenti a vércukorszintet. A molekula biológiai hatásai révén lassítja a gyomor kiürülését, teltségérzetet kelt és testsúlycsökkenést eredményez. Ma már a II.-es típusú diabétesznél hazánkban is hozzáférhető szer az exenatid hatóanyag névre keresztelt exendin-4 minifehérje származék.

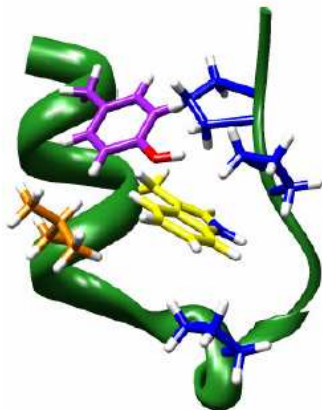
Neidigh és mts. a már említett Gila monster viperagyík nyálában megtalálható 39 aminosav hosszú helikális polipeptidből indultak ki (exendin, EX4) és számos csonkítás és mutáció után 20 aminosavra tudták csökkenteni a fehérje méretét úgy, hogy közben a szerkezetét stabilizálták, és vízdoldhatóságát növelték. [33] Az így előállított kompakt, globuláris minifehérje több mint 95%-ban van jelen feltekeredett állapotban, vízben, fiziológiás pH-n, 280 K hőmérsékleten.

Az EX4 vízben részlegesen rendezett, trifluoralkoholos közegben viszont stabil, rendezett struktúrával bír. Szerkezete egy hosszú helikális lánc és az arra visszahajló rövidebb poliprolin II hélixből áll. A szerkezet stabilitását a Trp25 köré szerveződött hidrofób mag adja, ezt a motívumot nevezték el később Trp-kalitkának (TC, Trp-cage).

A tervezés első lépéseként a hidrofób maggal semmiféle kölcsönhatást nem mutató N-terminálist csonkították le. Majd beiktattak a szerkezetbe egy stabilizáló Asp9-Arg16 sóhidat, miközben a kedvezőtlen Coulomb kölcsönhatás elkerülésére a glutaminsavat (E) glutaminra

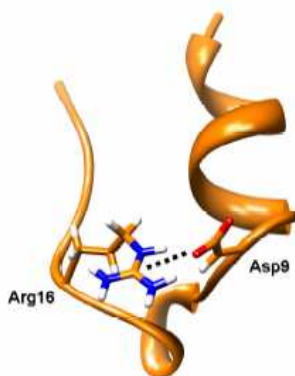


(Q) cserélték, létrehozva ezáltal a hélix-kedvelő kölcsönhatást [34]. Legvégül a hidrofób mag telítettségét tökéletesítették, fenilalanin (F) → tirozin (Y) mutációval. A végső szekvencia ennek következtében: **NLPYIQWLKDGGPSSGRPPPS**.



5. ábra A TC5b minifehérje szerkezetének szalagmodellje. A központi Trp6 (sárga) köré szerveződött hidrofób mag aminosavai vannak feltüntetve: Tyr3 (lila), Leu7 (narancssárga), Pro12, Pro18, Pro19 (kék)

A TC5b felépítésében egy  $\alpha$ -hélix, egy  $3_{10}$ -hélix és egy poliprolin II típusú hélix szerveződik a központi triptofán köré (5. ábra), vagyis a fehérje feltekeredésének hajtóereje a hidrofób kölcsönhatás. A kialakult szerkezet stabilizálásában emellett jelentős szerep jut az Asp9 és Arg16 aminosavak közt létesülő sóhidnak (6. ábra).



6. ábra A TC5b szerkezetstabilizáló Asp9-Arg16 sóhidja

A TC5b szerkezetének publikálása nagy érdeklődésnek örvend mind a kísérleti mind az elméleti kémikusok körében. Több csoport látott hozzá a további variánsok tervezéséhez, így mára már több mint 60 TC5b mutáns létezik. [35] Ezek mindegyike felvette a Trp-kalitka „foldot” (szerkezetet) kvázi fiziológiás körülmények között (pH = 6-7, 280 K). A

tanulmányokból az is kiderült, hogy mind a kémiai eltolódást, mind a távoli NOE mintázatot tekintve nagy hasonlóság volt a különböző variánsok NMR spektrumai között. A mutánsok szerkezeti elemzése során több kérdésre is választ kerestek, többek között arra, hogy mi az összefüggés a hélix önmagában meglévő stabilitása és a globális stabilitás között, hogyan befolyásolja a prolinok entrópia effektusa a folding termodinamikáját, milyen szerepe van az Asp9-Arg16 sóhídnak a szerkezet stabilitásában.

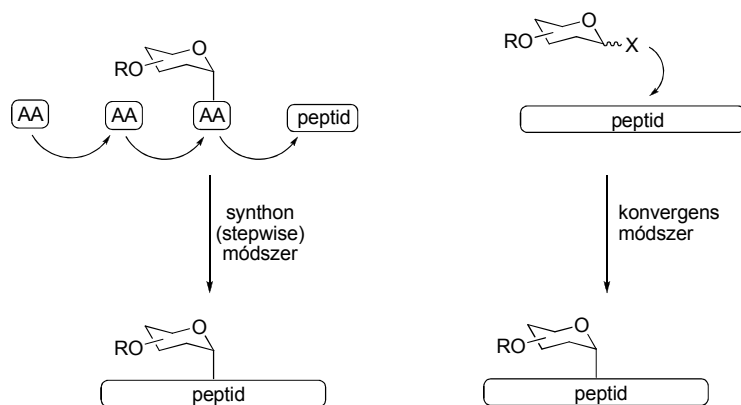
### 2.3 Glikopeptidek szintézise

Az élő szervezetben a biológiai funkciók megvalósulása a fehérjék működéséhez kötődik. A fehérjék elsődleges szerkezete, az aminosavak sorrendje egyértelműen rögzítve van a dezoxiribonukleinsav (DNS) kettős hélixében. Ennek a tervrajznak szigorú szabályok szerint kivitelezett megvalósítása a fehérjeszintézis. Azonban az így elkészült fehérjék túlnyomó többsége még nem képes biológiai szerep betöltésére. Többféle utólagos módosítás szükséges a biológiai működőképesség eléréséhez, melyek közül a foszforiláció mellett a fehérjék mintegy 90%-át érintő glikozilezés az egyik leggyakoribb poszt-transzlációs módosítás. A glikozilezés azonban nincs a DNS-ben kódolva, ezért eltérő körülmények között eltérő módon valósulhat meg, ami azonos fehérje eltérő működéséhez is vezethet. A glikozilezéssel az adott fehérjekészlet kémiai és funkcionális sokfélesége nagyságrendekkel növekszik anélkül, hogy ez újabb lényeges mennyiségű genetikai információ tárolását és felhasználását igényelné. A glikoproteinek cukorrészének funkciói igen változatosak, melyek közül csak néhányat említenék: védő funkció (a glikoproteineken lévő oligoszacharid egységek védik a polipeptidláncot a proteázokkal és antitestekkel szemben), stabilizáló funkció (a glikoproteinek oligoszacharid egységei iniciálják a polipeptidek harmadlagos szerkezetének kialakulását az endoplazmatikus retikulumban, valamint azok oldékonyságát és a natív konformáció megtartását), álcázó funkció, kapcsoló funkció, szabályozó funkció, szimbiotikus funkció stb..

A glikoproteinek tehát igen változatos biológiai szereppel rendelkeznek. Ezekben a glikokonjugátumokban a szénhidrát rész nagymértékben hozzájárul a peptid/fehérje biológiai szerepének betöltéséhez, a szükséges konformáció kialakulásához. [36-41]

A természetben előforduló glikoprotein glikánok szerkezete nagyon változatos, de a kapcsolódás a glikán és a polipeptid gerinc között jól meghatározható. [42] A két fő formája a kötésnek az *N*-kötött, ahol a glikán az aszparagin oldalláncának aminocsoportján keresztül kapcsolódik (*N*-glikán) (7. ábra) és az *O*-kötött ahol a glikán a szerin, treonin, tirozin





8. ábra A glikopeptidek előállításának két fő szintézis stratégiája

Előzetes kísérleteink során elvégeztük a mono-, di-, és triszacharid egységeket tartalmazó hexapeptid konjugátumok szintézisét, mind a konvergens mind pedig a synthon módszert alkalmazva. Annak érdekében, hogy a két kémiai módszert közvetlenül összehasonlítsuk, az eredmények közlése folyamatban vannak. [59] Kísérleteink során az is bebizonyosodott, hogy a Boc/Bzl szintézis stratégia korlátozottan alkalmazható glikopeptidek előállítására, mivel komplex *N*-glikopeptidek esetében di- és triszacharid egységeket tartalmazó modellpeptideknél az *N*-glikozidok hasadása volt megfigyelhető, *O*-glikopeptidek esetében pedig különböző TFA koncentrációkra az *O*-glikozidos kötés sérült. Az irodalomban leírtak alapján a Fmoc-védett glikozilált aszparagin és szerin származékok megfelelő építőköveknek bizonyultak a szilárdfázisú szintézis során. Egyes esetekben viszont a Boc-védőcsoporttal ellátott glikozilált aminosav építőkövek előállítása egyszerűbben megoldható, mint a Fmoc-védőcsoportokkal védetteké [60], ezért olyan szintézis stratégiák kidolgozása vált szükségessé, amelyek során a Boc-védőcsoporttal ellátott glikozilált aminosavak beépítése sikeresen megvalósítható, szilárd fázisú szintézis segítségével, a cukoregység hasadása nélkül.

## 2.4 Radiofarmakonok készítéséhez prekurzorok előállítása

A neurodegeneratív betegségek nagy része fehérje aggregátumok képződésével kezdődik. Az aggregátumok részben a sejteken kívül helyezkednek el (ilyenek pl. az Alzheimer-plakkok), részben viszont a sejten belül zárványokat alkotnak. A legismertebb neurodegeneratív betegségek: Alzheimer-kór, Parkinson-kór, Lewy-testes demencia, Huntington-kór, Prion-betegség, Amiotróf lateral sclerosis. Sokszor nem könnyű ezen betegségeket egymástól elkülöníteni, éppen a közös fehérje aggregátumok miatt. Nagyon

jellemző viszont az idegsejtek károsodásának, pusztulásának a helye, így a legtöbb neurodegeneratív betegség régió-, sőt sejtspecifikus, legalábbis a betegség korai szakaszában. A kórképek közös mechanizmusára utal az a tény, hogy a fehérjék valamennyi esetben konformációváltást szenvednek és  $\beta$ -szerkezetű polipeptid láncokat tartalmazó szálakká, fibrillumokká alakulnak át. [61] A fibrillumok, sőt a kisebb aggregátumok is enzimrezisztensek, neurotoxikus hatásúak. A szakirodalom megegyezik abban, hogy a felsorolt neurodegenerációs betegségek végső oka bizonyos fehérjék nem megfelelő feltekeredése, gombolyodása (misfolding), a hibás fehérje térszerkezetek kialakulása.

#### **2.4.1 Az Alzheimer kór**

Az Alzheimer kór az öregkor betegsége, de ritka esetben, fiatalabb korban is jelentkezhet. Évtizedes vita után el kell fogadnunk, hogy a betegséget kóros fehérje termék felszaporodása okozza, ez az indító lépés. A fiatalabb korban, a 40-65 életév között jelentkező Alzheimer kórt főleg az amiloid prekursor protein (APP) és a presenilinek mutációi idézik elő, melyek hatására az APP-ből nagy mennyiségű, igen könnyen aggregálódó neurotoxikus peptid képződik. A szinaptikus membránokban jelenlévő APP sejtadhéziós fehérje pontos biológiai szerepét nem ismerjük, viszont tudjuk, hogy különböző molekuláris formái vannak. [62] A központi idegrendszert ért traumák hatására az APP nagy mennyiségben szabadul fel. Az állandóan ismétlődő agyi traumák, illetve hipoxia hatására sok APP termelődik, ez nagyfokú  $\beta$ -amiloid képződést okoz.

A neurotoxikus  $\beta$ -amiloidok szintéziséért, illetve lebontásáért felelős proteázok egyensúlyának zavara, a szabad gyökök megkötéséért felelős enzimek alulműködése, az idegsejtekben folyó ATP-termelés csökkenése és a vér-agy gát permeabilitás megnövekedése, egyaránt hozzájárulhatnak a betegség kialakulásához.

Nagyon sokan vizsgálták az amiloid plakkok szerkezetét és összetételét. A betegség előrehaladtával a plakkok is változnak: a kezdetben diffúz plakk több lépésben szenilis plakká alakul, középen „keményítőszerűen” festődő maggal (innen jön az amiloid név). A mag kissé szivacsos állományú és főleg  $\beta$ -amiloid peptideket, tau-fehérjét és más anyagokat tartalmaz. Bizonyos festékek specifikusan kötődnek a  $\beta$ -amiloidokhoz, ennek az a magyarázata, hogy a plakkokban a polipeptidek ún.  $\beta$ -redőzött réteg vagy  $\beta$ -szalag szerkezetet vesznek fel. Az amiloid aggregátumok neurotoxikus hatásúak, a plakk közelében húzódó, a plakk magjával érintkező axonok degenerációját indítják el. Az elhalt neuronokat már nem lehet visszahozni,

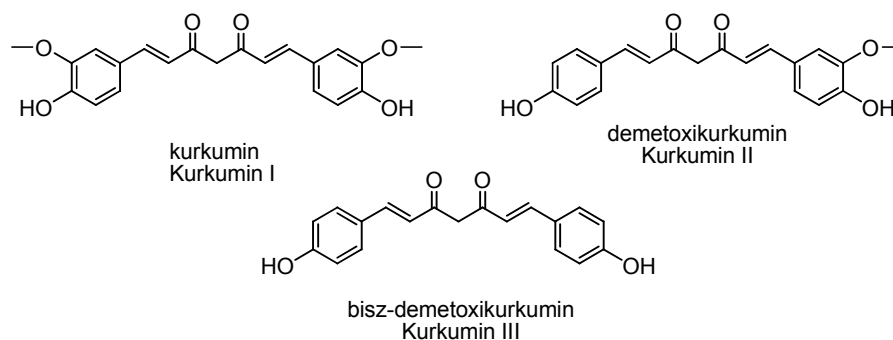
viszont a patomechanizmus ismeretében ma már nem reménytelen a betegség kezelése és a racionális gyógyszertervezés.

A  $\beta$ -amiloid polipeptid láncához különböző típusú vegyületek kapcsolódnak ionos- és másodlagos kötésekkel. Az ilyen vegyületek megakadályozzák a peptidlánc aggregációját, így alkalmasak lehetnek az Alzheimer kór kezelésére, ezeket az anyagokat összefoglaló néven  $\beta$ -szerkezetrombolóknak ( $\beta$ -sheet-breaker) nevezzük. Legismertebb ezek közül az azofesték jellegű Kongóvíz, ezen kívül megemlíthetjük a Tjernberg [63] majd később Soto [64] kutatócsoportja által felismert,  $\beta$ -amiloid 16-20, illetve 17-21 pentapeptid részleteket, melyek szintén megakadályozzák az aggregációt. Ugyanakkor Penke Botond és kutatócsoportja szintén kutatásokat végeztek, melyek során olyan peptideket kerestek, amelyek viszonylag erős kötéssel illeszkednek az amiloidhoz és megakadályozzák az aggregációt, kutatásaik eredményeként az LPYFD valamint RVVIA peptidek bizonyultak legjobbnak.

#### **2.4.2** *Az Alzheimer kór és a Kurkumin*

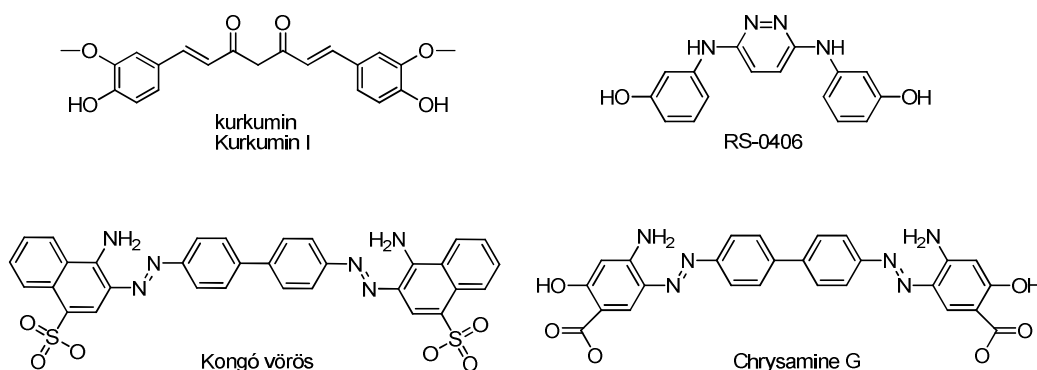
Számos közlemény született azzal kapcsolatban, hogy a kurkumin *in vivo* és *in vitro* kísérletekben közvetlenül kötődik a kisebb  $\beta$ -amiloid származékokhoz megakadályozva ezzel az aggregációt és a fibril kialakulását. A kísérleti eredmények bebizonyították, hogy a kurkumin kisebb dózisban eredményesen dezaggregálja a  $\beta$ -amiloidot, megakadályozva a fibril és az oligomer képződést, alátámasztva ezzel a kurkumin helyét az Alzheimer kórral kapcsolatos klinikai vizsgálatokban, az AD (Alzheimer-demencia) kezelésére vagy megakadályozására. A kurkuminnal kapcsolatos első közlemény az 1970-ig nyúlik vissza, amikor is indiai kutatók arról számoltak be, hogy a kurkumin patkányokban csökkentette a vér koleszterin szintjét. Az 1980-as években Aggarwal egy sor adatot publikált, miszerint a kurkumin gátolja a ráksejtek osztódását és szétvándorlását. Munkája során a kurkumint mint segédmolekulát próbálták ki korai fázisú klinikai vizsgálatokban, hasnyálmirigy- és csontvelőrák egyik fajtája, a mielóma esetében.

A kurkuma aktív összetevője a curcumin, illetve ezek származékai a kurkuminoidok, (9. ábra) számos hatását sikerült dokumentálni: ismert antioxidáns, ezen kívül gyulladásgátló, vírus, baktérium és gombaölő hatású. Különböző kutatások folynak azzal kapcsolatban is, hogy a kurkumin potenciális kemoterápiás hatóanyag. [65, 66]



9. ábra

A kurkumin hasonló kémiai szerkezettel rendelkezik, mint a Kongó vörös, [67-69] ( $\beta$ -szerkezetromboló) valamint ennek egy analógja a Chrysamine G [69, 70] (szintén kötődik a  $\beta$ -amiloid fehérjéhez), RS-0406 [71] (egy újszerű vegyület, mint potenciális inhibitora a  $\beta$ -amiloid oligomer kialakulásának) (10. ábra). A szerkezeteknek van egy közös motívuma, mindegyik vegyület esetében, a kétszeres töltésű- vagy poláris csoportokat egy hidrofób híd köti össze.



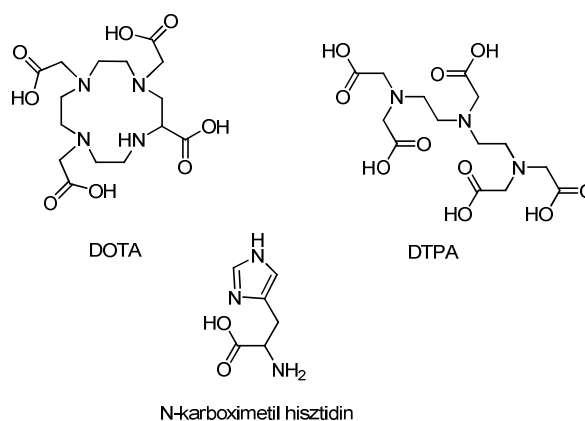
10. ábra

### 2.4.3 Képkalkotó eljárások és a DOTA

Az orvosi diagnosztikában, a kezelések során és a gyógyulás nyomon követésében fontos szerepet játszanak a különböző képkalkotó eljárások. A széles körben alkalmazott módszerek közül a CT (komputer-tomográfia) a végső kép kontrasztját, a különböző szövetek különböző elektronsűrűsége alakítja ki. A módszer lényege az, hogy az alkalmazott röntgensugarak a vizsgált beteg testének keresztmetszetén különböző irányokból haladhatnak át. Az áthaladt röntgensugár intenzitását érzékeny kristálydetektorokkal mérik, a mért jeleket számítógép segítségével feldolgozzák, és képpé alakítják. Az MRI (mágneses rezonancia képkalkotás), hasonlóan elődjéhez, a CT-hez, szintén számítógépes képfeldolgozáson alapul. Itt

azonban nem használnak ionizáló sugárzást: a  $^1\text{H}$ -atommagok NMR (mágneses magrezonancia) jelének intenzitását mérik. A képek kontrasztjának (minőségének) növelése érdekében, gyakran használnak különböző kontrasztanyagokat mindkét képalkotó módszer alkalmazásakor. A CT kontrasztanyagok általában nagy atómtömegű elemeket tartalmaznak (I, Ba, Ce, Gd, Tb, Dy, Yb, Au, Pb, Bi). Az MRI-ben paramágneses ionokat (elsősorban a  $\text{Gd}^{3+}$ -iont) használnak kontrasztnövelésre. Ezek a paramágneses ionok még alacsony koncentrációban is képesek a vízprotonok  $T1$  (és  $T2$ ) relaxációs idejét csökkenteni, így kontrasztnövekedést eredményeznek. A  $\text{Gd}^{3+}$  kilenc koordinációs helyéből általában nyolcat egy kelátképző ligandum donatoratomjai, a fennmaradó helyet pedig egy vízmolekula foglalja el. A koordinált vízmolekula protonjai a paramágneses centrum közvetlen közelében sokkal gyorsabban relaxálnak. Ez a relaxáció-gyorsító hatás a koordinált vízmolekulák gyors cseréje révén az oldószer-víz molekulában is tapasztalható.

Mind a CT, mind az MRI kontrasztanyagok szigorú követelményeknek kell megfeleljenek. Bejuttatásuk után a test megfelelő részeibe kell eljutniuk, és ott kontraszthatást kifejteniük. Ezután a kontrasztanyagoknak teljesen ki kell ürülniük a szervezetből, anélkül, hogy metabolizálódtak volna. A komplexképző ligandumok terápiás célú felhasználásának egyik jelentős területe a szervezetbe került toxikus fémek (pl.:  $\text{Pb}^{2+}$ ) vagy hosszú felezési idejű radioaktív izotópok (pl.:  $^{90}\text{Sr}$ ,  $^{144}\text{Ce}$ ) szervezetből történő kiürülésének elősegítése. A nehézfémek kedvezőtlen élettani hatásait és korlátozott kiürülésüket előnyösen változtatja meg, ha kelátkomplexeiket (DOTA, DTPA, N-karboximetil hisztidin stb.) (11. ábra) használjuk, hiszen ezeknek a komplexeknek sokkal kisebb az *in vivo* kötődésük és így a toxicitásuk is.



11. ábra



Az utóbbi években nagyon sok tudományos közlemény jelent meg különböző szintézis stratégiákról, a fémion-konjugált peptidek előállítására céljából, mint ideális diagnosztikai és terápiás biomedicinek. A szintézisek során különböző makrociklikus ligandumokat építettek be peptidekbe, mint például: DOTA, DTPA, NOTA, TETA [72-76], ezek közül is a DOTA különös figyelmet kapott mivel nagyon sokféle fémionnal képez komplexet, kivételesen nagy kötőaffinitással és kinetikai stabilitással. [77]

### 3. Célkitűzés

#### 3.1 Fumitermorgin analógok tervezése és szintézise

A Ko132, Ko134, Ko143 FTC indol-diketopiperazin család legaktívabb képviselői bizonyítottan potenciális, nem toxikus ABCG2 inhibitorok. Mindhárom analóg szerkezetében észter kötés van jelen amely kémiai és metabolikus szempontból is instabillá teszi a molekulákat. Annak érdekében, hogy növeljem az inhibitor specificitását, kémiai valamint metabolikus stabilitását, olyan új fumitermorgin analógok szintézisét terveztem, melyekben az észtert kötéssel, amid illetve alkil láncokkal helyettesítem. Továbbá céljaim között szerepelt az előállított célvegyületek HPLC, MS és NMR karakterizálása, a specificitás és szerkezet-aktivitás közötti kapcsolatok vizsgálata *in vitro* esszék segítségével valamint a Ko134 inhibitor szintézise, *in vivo* biológiai vizsgálatok elvégzése érdekében.

#### 3.2 Módosított minifehérjék szintézise

Céлом volt olyan TC5b variánsok előállítása, melyek szerkezetvizsgálata közelebb vihet a Trp-kalitka minifehérje globális stabilitásának megértéséhez, továbbá a TC5b D9 és R16 aminosavak között kialakuló sóhíd harmadlagos szerkezetre gyakorolt stabilizáló hatásának feltérképezése.

#### 3.3 Glikopeptidek szintézise

Az egyes glikopeptidek szintézise során felmerülő problémák kiküszöbölése érdekében, egy olyan kombinált Fmoc/Boc szilárd fázisú szintézis stratégia kidolgozását terveztem, melynek során Fmoc kémia alkalmazásával, Boc-védőcsoporttal ellátott aszparagin, illetve szerin származékokat építke be úgy, hogy a szintézis során a Boc védőcsoport eltávolítására egy enyhe, szelektív SnCl<sub>4</sub>-dal történő védőcsoport hasítási módszert alkalmazok.

#### 3.4 Radiofarmakonok készítéséhez prekursorok előállítása

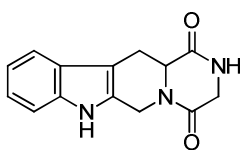
Az Alzheimer kórral kapcsolatos kutatásokat alapul véve, olyan prekursorok előállítását terveztem, amelyek a megfelelő eljárással bejuttathatóak a központi idegrendszerbe és nagy affinitással kötődve az amiloid plakkokhoz lehetővé tennék a betegség korai diagnosztizálását a megfelelő képalkotó eljárás segítségével. Céлом volt egy olyan szintézis stratégia kidolgozása melynek során, az amiloid plakkokhoz nagy affinitással kötődő H-Lys-Leu-Pro-Tyr-Phe-Asp-NH<sub>2</sub> valamint H-Leu-Pro-Tyr-Phe-Asp-NH<sub>2</sub> peptidekbe [78] olyan molekulákat építke be, mint a kurkumin (önmagában is kötődik az amiloid plakkokhoz), DOTA illetve *N*-karboximetil hisztidin (kelátképző molekulák).

## 4. Kísérleti eredmények tárgyalása

### 4.1 Fumitremorgin analógok tervezése és szintézise

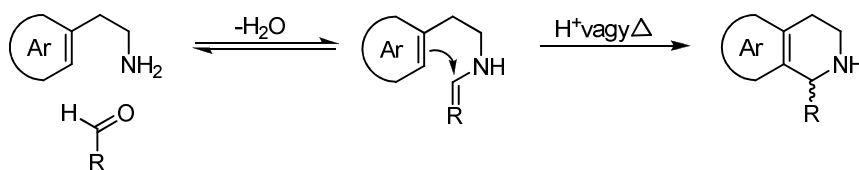
#### 4.1.1 Fumitremorgin analógok előállítása szilárd fázisú szintézissel

A fumitremorgin analógok az indol diketopiperazin alkaloidok családjába tartozó vegyületek, amelyek 1,4-dioxo-2,3,6,7,12,12a-hexahidropirazino[1'2':1,6]pirido[3,4-b]indol alapvázatot tartalmaznak (12. ábra).



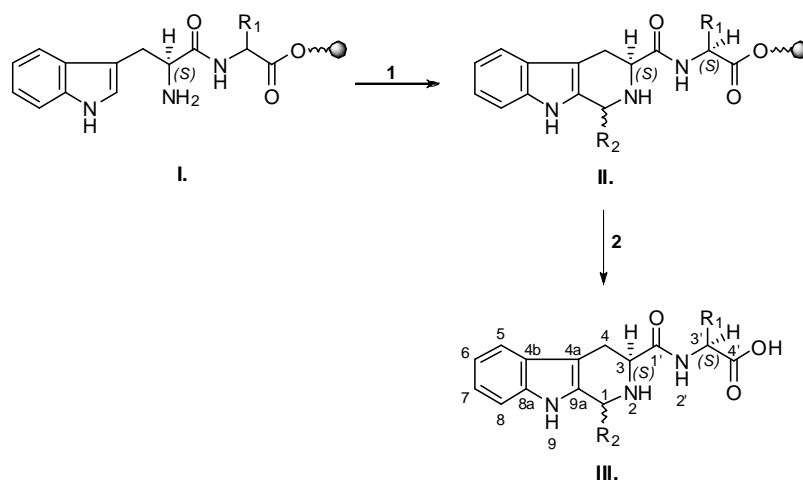
12. ábra

A fumitremorgin analógok szintézisének egyik kulcsfontosságú lépése, a Pictet-Spengler reakció (13. ábra), ahol egy aldehid és egy aromás etilamin kondenzációja során imin képződik köztermékként, melyen keresztül megtörténik az intramolekuláris gyűrűzáródás. A reakció alkalmazható fenil-etilaminok [79], pirrol-etilaminok [80], imidazol-etilaminok [81] és indol-etilaminok [82] esetében is.



13. ábra A Pictet-Spengler reakció

Munkám első részében, az új fumitremorgin analógok szintézise során, szilárd fázisú stratégiát alkalmaztam. Az alapváz fellépítését lépésenként végeztem, kiindulva a megfelelő aminosav által funkcionizált gyantából, elvégeztem a Boc-Trp-OH aminosav kapcsolását, majd a védőcsoport eltávolítása után, különböző alifás és aromás aldehideket alkalmaztam a Pictet-Spengler kondenzációhoz. Az analógok szintézise során alkalmazott reakció útát a 14. ábra szemlélteti.



14. ábra Reakció körülmények: **I.** 5 ekv. R<sub>2</sub>CHO, 5ekv. TFA, RT, 16 óra,  
**2.** HF/anizol/dimetilszulfid/*p*-krezol 89/1.8/7.4/1.8 (v/v/v/v), -5 °C, 45 perc.

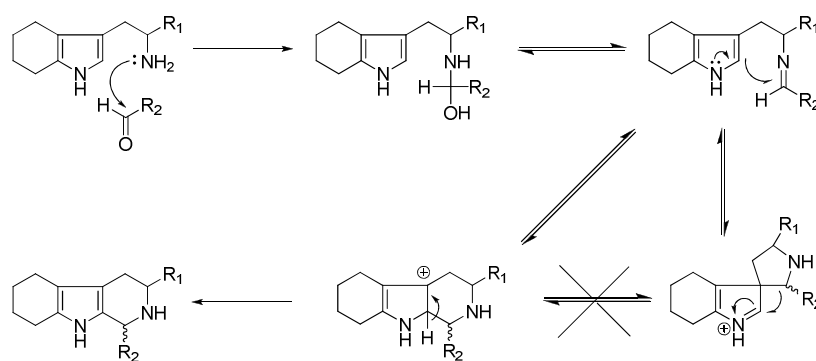
|                |  | R <sub>2</sub>   |  |   |  |
|----------------|--|--|--|---|--|
|                |  | —  |  |   |  |
| R <sub>1</sub> |  | III.a1 ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br>III.a1 ( <i>IR,3S,3'S</i> ) | III.a2 ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br>III.a2 ( <i>IR,3S,3'S</i> ) | III.a3 ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br>III.a3 ( <i>IR,3S3'S</i> ) | III.a4 ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br>III.a4 ( <i>IR,3S,3'S</i> ) |
|                |  | III.b1 ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br>III.b1 ( <i>IR,3S,3'S</i> ) | III.b2 ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br>III.b2 ( <i>IR,3S,3'S</i> ) | III.b3 ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br>III.b3 ( <i>IR,3S3'S</i> ) | III.b4 ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br>III.b4 ( <i>IR,3S,3'S</i> ) |
|                |  | III.c1 ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br>III.c1 ( <i>IR,3S,3'S</i> ) | III.c2 ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br>III.c2 ( <i>IR,3S,3'S</i> ) | III.c3 ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br>III.c3 ( <i>IR,3S3'S</i> ) | III.c4 ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br>III.c4 ( <i>IR,3S,3'S</i> ) |
|                |  | III.d1 ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br>III.d1 ( <i>IR,3S,3'S</i> ) | III.d2 ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br>III.d2 ( <i>IR,3S,3'S</i> ) | III.d3 ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br>III.d3 ( <i>IR,3S3'S</i> ) | III.d4 ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br>III.d4 ( <i>IR,3S,3'S</i> ) |

1.táblázat Háromciklusos fumitremorgin analógok

Merrifield gyantát használva szilárd hordozóként, első lépésben négy különböző Boc védőcsoporttal ellátott aminosavat kapcsoltam a klórmethyl funkcionális polisztirol hordozóra: Boc-Lys(2ClZ)-OH, Boc-Arg(Tos)-OH, Boc-Glu(OcHex)-OH, Boc-Asp(OcHex)-OH, a kapcsolási reakciót KF jelenlétében végeztem. Az így kapott gyanták borítottságát Gizin teszt segítségével ellenőriztem. [83] A továbbiakban a Boc-védőcsoport eltávolítása

TFA oldattal történt, az ezt követő semlegesítési reakciót pedig TEA oldattal végeztem. Mind a négy esetben következő aminosavként Boc-Trp-OH-t kapcsoltam DCC kapcsolószer jelenlétében, majd ezt követte egy újabb Boc-védőcsoport eltávolítás, amely az **I.** termék keletkezését eredményezte (14. ábra).

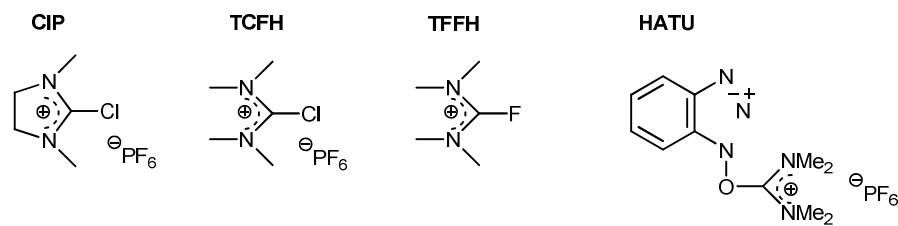
A következő lépésben négy különböző aldehidet használtam a Pictet-Spengler kondenzációhoz: acetaldehid, butiraldehid, propionaldehid, valamint benzaldehid (14. ábra, 1. táblázat). [84-87] A kondenzációs reakció a triptofán észter és az aldehidek között lejátszódhat nem savas apoláros közegben (általában melegítést igényel), valamint savas közegben poláros oldószer jelenlétében, a reakció mechanizmusát a 15. ábra szemlélteti. [88] A fomitremorgin analógok előállítása során a Pictet-Spengler kondenzációhoz TFA-t alkalmaztam katalizátorként valamint a reakciót inert körülmények között végeztem, szobahőmérsékleten, reakció idő 16 óra (14. ábra).



15. ábra

Utolsó lépésként az aminosav-oldallánc védőcsoportok eltávolítása, valamint a gyantáról történő hasítás egy lépésben történt: HF/anizol/dimetilszulfid/*p*-krezol eleggyel. Mindegyik esetben mindkét diasztereomer **III.** keletkezése megfigyelhető volt (14. ábra, 1. táblázat). A szintézisek végeztével az előállított fomitremorgin analógokról készült analitikai HPLC kromatogramok valamint az ESI-MS módszer segítségével elkészített spektrumok alátámasztották a kívánt termékek keletkezését.

A továbbiakban a peptidek tetrahidro- $\beta$ -karbolin oldalláncának meghosszabbítása Fmoc-védett aminosavval nem volt sikeres, sem a reakció körülmények változtatása, sem a különböző kapcsolószer alkalmazása, melyek a korábbi irodalmak alapján sztérikusan gátolt kapcsolások esetében eredményesnek bizonyultak: **CIP**, **TFFH**, **TCFH**, **HATU** [89-95] nem volt célravezető (16. ábra, 2. táblázat).

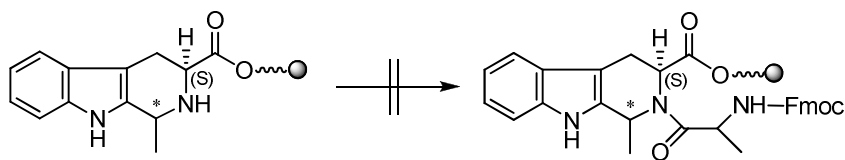


16. ábra A szilárd fázisú szintézis során használt kapcsolószer

| <i>védett aminosav</i> | <i>kapcsolószer</i>                       | <i>oldószer</i>                     | <i>reakció körülmények</i>   |
|------------------------|---|-------------------------------------|--|
| 3 ekv. Fmoc-L-Ala-OH   | 3 ekv. CIP<br>3 ekv. CIP<br>3 ekv. CIP    | NMP<br>DMF<br>DCM                   | 6 ekv. DIPEA, 2×16h, RT;<br>6 ekv. DIPEA, 2×16h, RT;<br>6 ekv. DIPEA, 2×16h, RT;   |
| 3 ekv. Fmoc-L-Ala-OH   | 3 ekv. TFFH<br>3 ekv. TCFH<br>3 ekv. HATU | DMF<br>DMF<br>DMF                   | 6 ekv. DIPEA, 2×16h, RT;<br>6 ekv. DIPEA, 2×16h, RT;<br>6 ekv. DIPEA, 2×16h, RT;   |
| 3 ekv. Fmoc-L-Ala-OH   | 3 ekv. TCFH<br>3 ekv. TCFH<br>3 ekv. TCFH | vízm. DMF<br>vízm. DCM<br>vízm. NMP | 6 ekv. DIPEA, 2×16h, RT; <b>Ar atm</b><br>6 ekv. DIPEA, 2×16h, RT; <b>Ar atm</b><br>6 ekv. DIPEA, 2×16h, RT; <b>Ar atm</b> |

2. táblázat

**TCFH** kapcsolószer jelenlétében sikerült előállítani a kívánt terméket, de a kapcsolási reakció nagyon kis mértékben játszódott le, abban az esetben is, ha változtattam a reakció körülményeket (2. táblázat). A tetrahidro- $\beta$ -karbolin szekunder amino funkciós csoportjának acilezése szilárd fázisú szintézis során nem valósult meg (17. ábra), ezért a további fumitremorgin analógok szintézise során oldat fázisú szintézis stratégiát alkalmaztam.

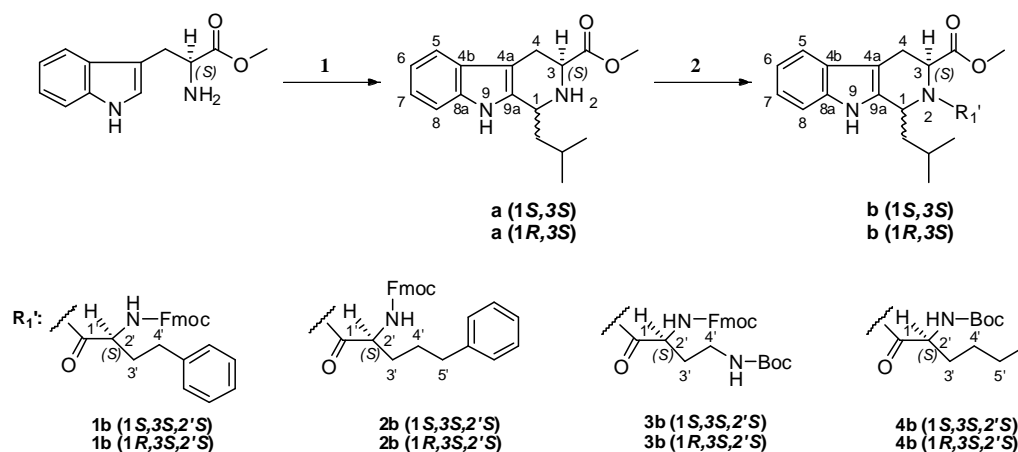


17. ábra

#### 4.1.2 Fumitremorgin analógok előállítása oldat fázisú szintézissel

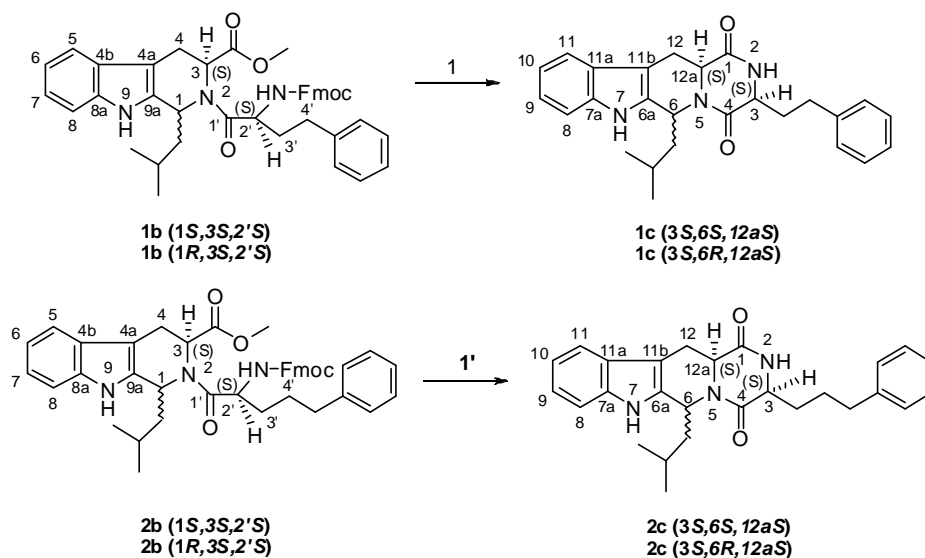
Az új fumitremorgin analógok szintézise az enantiomer tiszta L-triptofán-metil-észter (H-Trp-OMe) átalakításával indult. A **4.1** fejezetben leírtakhoz hasonlóan első lépésben elvégeztem a Pictet-Spengler kondenzációs reakciót izovaleraldehid (5 ekv.) segítségével, TFA (5 ekv.) katalizátor jelenlétében. A gyűrűzáródás következtében egy új királis centrum alakult ki, ennek megfelelően minkét diasztereomer keletkezése megfigyelhető volt **a (1S,3S)**, **a (1R,3S)** (18. ábra). Az így előállított vegyületből lehetőség nyílt újabb fumitremorgin analógok előállítására, ennek megfelelően a diketopiperazin gyűrű kialakítása érdekében a tetrahydro- $\beta$ -karbolin származékkal további reakciókat végeztem: első lépésben megtörtént a megfelelő aminosav kapcsolás, melyet egy Fmoc vagy Boc védőcsoport hasítás (a beépített aminosavtól függően) valamint egy intramolekuláris gyűrűzáródás követett. Kapcsolt aminosavként három Fmoc-védőcsoporttal valamint egy Boc-védőcsoporttal ellátott aminosavat ( $R_1'$ ) választottam: Fmoc-Homophe-OH, Fmoc-Nva-(5-phenyl)-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH valamint Boc- Nle-OH (18. ábra).

Az aminosavak kapcsolása TCFH (3 ekv.) kapcsolószer segítségével történt, DIPEA (6 ekv.) jelenlétében, inert körülmények között. Az aminosav-maradékok ( $R_1'$ ) beépítése a tetrahydro- $\beta$ -karbolin származékokba minden esetben sikeresen megtörtént (18. ábra). A reakciók lejátszódását analitikai HPLC segítségével követtem, mind a négy esetben mindkét diasztereoisomer keletkezése megfigyelhető volt.



18. ábra Reakció körülmények: **1.** 5 ekv.  $(CH_3)_2CH-CH_2-CHO$ , 5 ekv. TFA, DCM, RT, 16 óra, **2.** 3 ekv. Fmoc-aminosav, 3 ekv. TCFH, 6 ekv. DIPEA, DCM, RT, 16 óra, Ar atm..

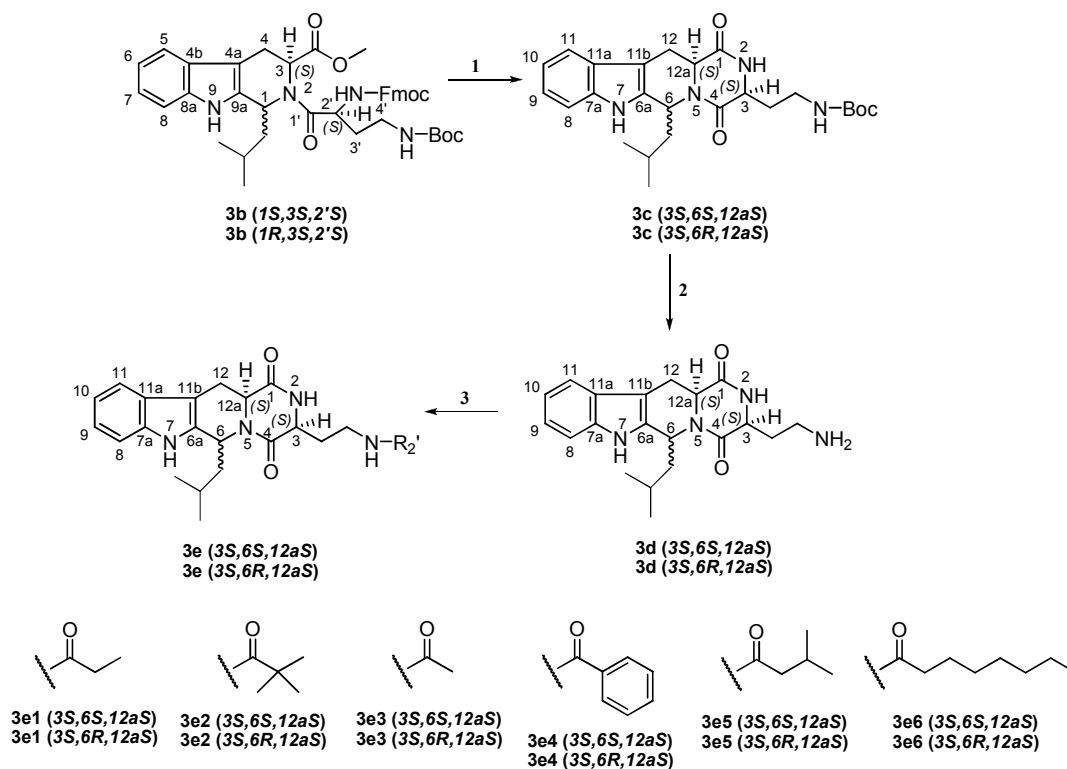
A továbbiakban a **1b** (*1S,3S,2'S*); **1b** (*1R,3S,2'S*), **2b** (*1S,3S,2'S*); **2b** (*1R,3S,2'S*) valamint a **3b** (*1S,3S,2'S*); **3b** (*1R,3S,2'S*) intermedierek esetében, a Fmoc-védőcsoport eltávolítását és az ezt követő intramolekuláris gyűrűzárást egy lépésben végeztem, piperidin oldattal (19. ábra). A reakciók lejátszódását ugyancsak analitikai HPLC segítségével követtem, 30 perc elteltével a kiindulási anyag teljes átalakulása, valamint a kívánt **1c** (*3S,6S,12S*); **1c** (*3R,6R,12S*), **2c** (*3S,6S,12S*); **2c** (*3R,6R,12S*) és **3c** (*3S,6S,12S*); **3c** (*3R,6R,12S*) termékek keletkezése volt megfigyelhető (19. ábra).



19. ábra Reakció körülmények: **I.** és **I'** 10% piperidin, DCM, RT, 30 perc.

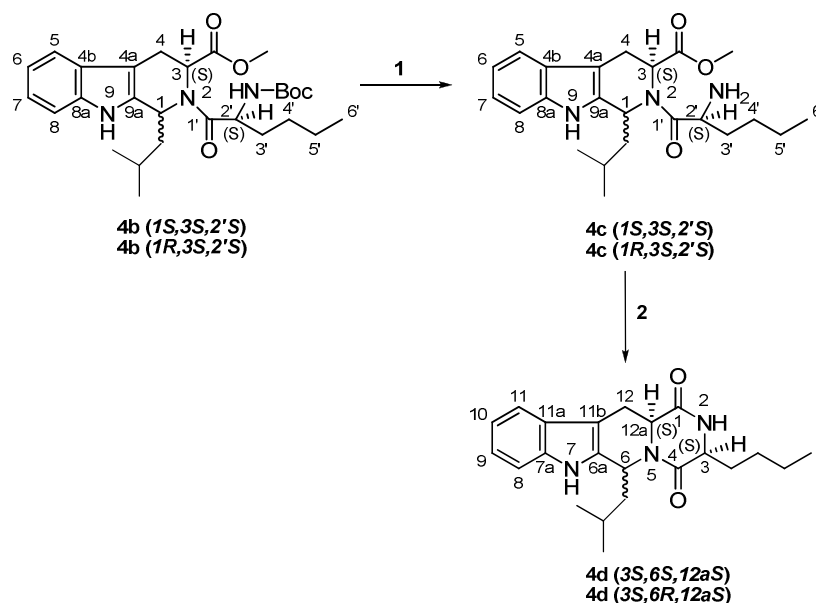
A **3c** (*3S,6S,12S*); **3c** (*3R,6R,12S*) köztitermékkel további reakciókat végeztem, mivel a beépített aminosav Boc-oldallánc védőcsoportjának eltávolítása után, lehetőség nyílt a már szabad oldalláncban lévő primer amino csoport acilezésére. A Boc-védőcsoport eltávolítását TFA oldattal végeztem, majd hat különböző acilező reagenst (2 ekv.) használtam az amidkötés kialakítására: benzoil-klorid, propionil-klorid, pivaloil-klorid, izovaleril-klorid, ecetsavanhidrid valamint kapronsav (20. ábra). A reakciókat bázis (TEA) jelenlétében végeztem, valamint a reakciók lefolyását analitikai HPLC segítségével követtem és minden egyes esetben mindkét diasztereomer keletkezése megfigyelhető volt (20. ábra).





20. *ábra* Reakció körülmények: **1.** 10% piperidin, DCM, RT, 30 perc, **2.** 50% TFA, DCM, RT, 1 óra, **3.** 2 ekv. acilezőszer, 4 ekv. TEA, DCM, RT, 1 óra.

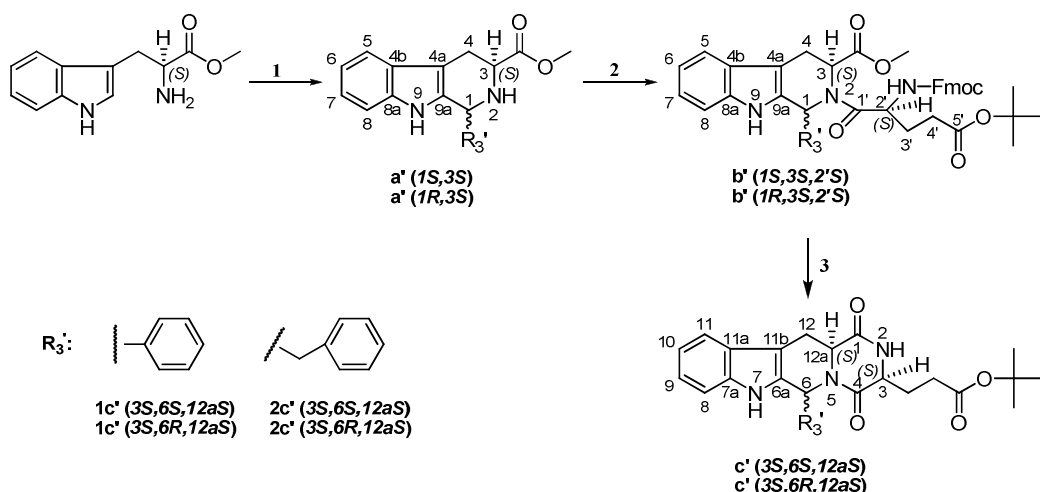
A **4b (1*S*,3*S*,2'*S*)**, **4b (1*R*,3*S*,2'*S*)** intermedier esetében a diketopiperazin gyűrű kialakítása két lépésben történt: első lépésben elvégeztem a Boc-védőcsoport eltávolítását TFA oldattal, ezt követte az intramolekuláris gyűrűzárás piperidin oldat segítségével. A reakciók végeztével ebben az esetben is mindkét diaszereomer keletkezése megfigyelhető volt **4d (3*S*,6*S*,12*aS*)**, **4d (3*S*,6*R*,12*aS*)** (21. *ábra*).



21. ábra Reakció körülmények: **1.** 50% TFA, DCM, RT, 1 óra, **2.** 10% piperidin, DMF, RT, 30 perc.

A fumitremorgin analógok oldat fázisú szintézise során, a Pictet-Spengler reakciót benzaldehid, illetve fenilacetaldehid segítségével is elvégeztem (22. ábra). Az analógok előállításánál a tetrahydro- $\beta$ -karbolin szekunder amino funkciós csoportjának acilezésére Fmoc-Glu(OtBu)-OH aminosavat használtam ugyanazt a szintézis stratégiát követve, mint az előző analógok esetében. Végtermékként pedig mindkét esetben, mindkét diasztereomert sikeresen szintetizáltam **1c'** (3*S*,6*S*,12*aS*), **1c'**(3*S*,6*R*,12*aS*), illetve **2c'** (3*S*,6*S*,12*aS*), **2c'**(3*S*,6*R*,12*aS*) (22. ábra).

Az oldat fázisú szintézis stratégia segítségével előállított fumitremorgin analógokról készült analitikai HPLC kromatogramok, valamint az ESI-MS módszer segítségével elkészített spektrumok, alátámasztották a kívánt termékek keletkezését.

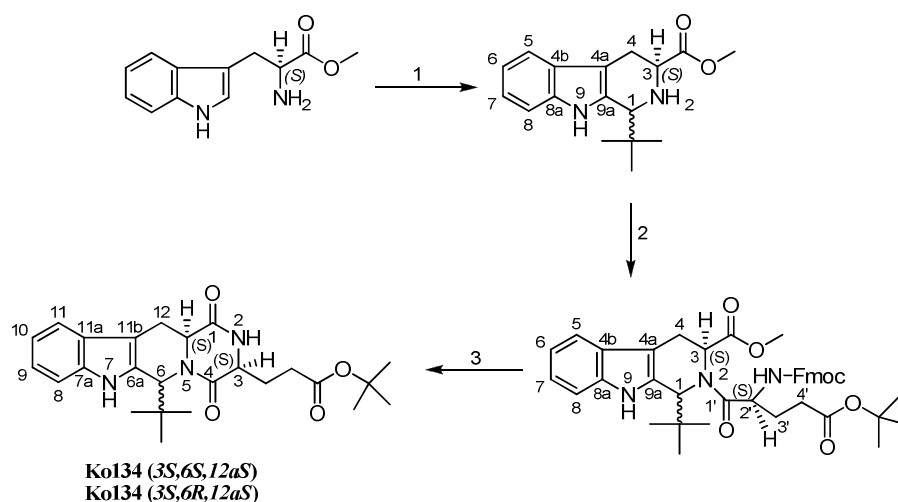


22. *ábra* Reakció körülmények: **1.** 5 ekv.  $R_3'$ CHO, 5 ekv. TFA, DCM, RT, 16 óra, **2.** 3 ekv. Fmoc-Glu(OtBu) $_x$ H $_2$ O, 3 ekv. TCFH, 6 ekv. DIPEA, DCM, RT, 16 óra, Ar atm., **3.** 10% piperidin, DMF, RT, 30 perc.

#### 4.1.3 Ko134 fumitremorgin analóg szintézise

A 4.1.2 fejezetben leírtak alapján a Ko134 referens szintézise szintén oldat fázisban történt. Kiindulási anyagként optikailag tiszta L-triptofán-metil-észtert (H-Trp-OMe) használtam. Első lépésben izovaleraldehiddel végeztem a Pictet-Spengler reakciót és a 4.1 fejezetben leírtakhoz hasonlóan szintén TFA-t használtam katalizátorként. A gyűrűzáródás következtében egy új királis centrum alakult ki, ennek megfelelően mindkét diasztereoizomer keletkezése megfigyelhető volt. A továbbiakban két lépésben kialakítottam a diketopiperazin gyűrűt: első lépésben megtörtént az aminosav kapcsolás, melyet egy intramolekuláris gyűrűzáródás követett. Kapcsolt aminosavként Fmoc-Glu(OtBu)-OH aminosavat használtam. A kapcsolási reakciót inert reakciókörülmények között végeztem, TCFH kapcsolószerrel, bázis jelenlétében (23. *ábra*). Az alkalmazott reakciókörülmények között a Fmoc-védett aminosav beépítése sikeres volt, ebben az esetben is, minkét diasztereoizomer keletkezése megfigyelhető volt. Utolsó lépésként a Fmoc-védőcsoport eltávolítását, valamint az ezt követő intramolekuláris gyűrűzáródást egy lépésben végeztem, piperidin oldattal. A reakció analitikai HPLC segítségével jól követhető volt, 30 perc elteltével megtörtént a kiindulási anyag teljes átalakulása, és a kívánt termék keletkezett (23. *ábra*).

A oldat fázisú szintézis végeztével az előállított Ko134 fumitremorgin analógról készült analitikai HPLC kromatogram, valamint az ESI-MS módszer segítségével elkészített spektrum alátámasztották a kívánt termék keletkezését.

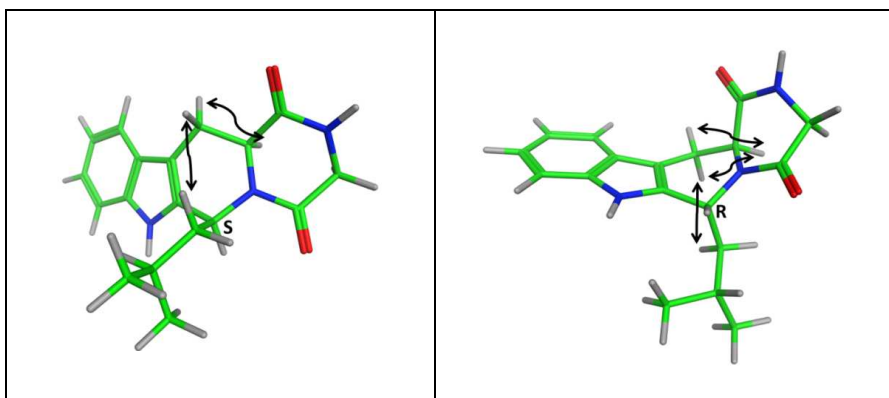


23. ábra Reakció körülmények: **1.** 5 ekv.  $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CHO}$ , 5 ekv. TFA, DCM, RT, 16 óra, **2.** 3 ekv. Fmoc-Glu(OtBu)-OH, 3 ekv. TCFH, 6 ekv. DIPEA, DCM, RT, 16 óra, Ar atm., **3.** 10% piperidin, DCM, RT, 30 perc

#### 4.1.4 Konformáció igazolása

Az előállított diasztereomerek szerkezetének azonosítása NMR spektroszkópai mérések segítségével történt. A **3e2** vegyület  $^1\text{H}$  NMR spektrumában 2.84 és 3.36 ppm értékeknél egy dupla dublett jelentkezett, a H-12-es protonnak köszönhetően, 11.8 és 15.5 Hz valamint 5.1 és 15.6 csatolási állandó értékekkel. A diasztereomerek geometriáit a H-12 dupla dublett csatolási állandók valamint a Noesy spektrumban megfigyelt H-12 és H-12a anellációs proton illetve a H-12 és  $\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$  közötti kereszt-csatolások jelenlétének segítségével határoztuk meg. A H-12a anellációs proton körüli cisz-transz elhelyezkedésnek köszönhetően a H-12 dupla dublett egy nagy és egy közepes csatolási állandóval rendelkezett.

A kialakított új kiralitás centrum sztereokémiáját 2D NMR NOESY mérések segítségével állapítottuk meg. A **3e2** vegyület NOESY mérései során a H-12 és  $\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$  csoportok jelei között keresztcsatolásokat azonosítottunk, ugyanakkor 2.84 ppm-nél a H-12 proton és a CH anellációs proton között nem volt kölcsönhatás megfigyelhető ami az S konfiguráció kialakulását igazolta.



24. ábra. A kialakult új királis centrum lehetséges kereszt-csatolásai a Noesy spektrumban

#### 4.1.5 Biológiai vizsgálati eredmények

##### 4.1.5.1 Az ABC transzporterek vizsgálatára alkalmas tesztrendszerek

Számos *in vitro*, *in vivo* és *ex vivo* rendszer áll rendelkezésünkre az ABC transzporterek és a különböző gyógyszermolekulák, toxikus komponensek közötti kölcsönhatás vizsgálatára. A korai gyógyszerfejlesztés során elsősorban az *in vitro* módszerek kerülnek előtérbe, hiszen ezek alkalmasak arra, hogy viszonylag rövid idő alatt több száz, akár több ezer molekula adott transzporterrel való kölcsönhatását prediktálják. Az adott molekula szerkezeten belüli sorsáról, ADME (abszorpció, diszorpció, metabolizmus, exkrécio) tulajdonságairól, valamint ezekben a folyamatokban az ABC transzporterek szerepéről csak a jóval korlátozottabban kivitelhető *in vivo* vizsgálatok adhatnak felvilágosítást. Az *in vivo* kísérletekhez hasonlóan az *ex vivo* modellek, úgymint az izolált perfúziós vékonybél, máj, vese vagy agy is fontos információt ad a gyógyszerek felszívódásáról, eloszlásáról, eliminációjáról és kiválasztásáról, ugyanakkor az állatkísérletekkel összehasonlítva jobban kontrollálhatóak. [96,97,98,99]

##### *In vitro* módszerek

Alapjában véve az *in vitro* rendszerek két típusát különböztetjük meg: a vizsgálatok történhetnek az adott transzportet stabilan vagy tranziensen expresszáló sejtekkel, vagy pedig a kívánt ABC fehérjét kifejező sejtekből készült membrán preparátumokon. A módszer alapulhat az ATP hirdolízisének, vagy pedig a szubsztrát transzportjának a mérésén, ez esetben vizsgálhatjuk közvetlenül az adott molekula ABC fehérje általi transzportját vagy

pedig egy jól ismert, ún. Riporter szubsztrát transzportjára való hatását. Az előbbi módszer a gyógyszerjelölt és drog transzporter közötti kölcsönhatás jellemzésére, az utóbbi pedig az inhibitor molekulák detektálására alkalmas.

3. táblázat Az *in vitro* gyógyszer-transzporter kölcsönhatások vizsgálatára alkalmazott esszék

| In vitro esszé fajták                 | Esszé típusa sejt/membrán alapú esszé   | Transzporter típusa efflux/uptake | "Riporter" szubsztrát   | Az esszéből származtatható információk, adatok   | Alkalmas teszt vegyületek (permeabilitás alapján)                                    |
|---------------------------------------|---|-----------------------------------|---|--|--|
| <b>Calcein esszé</b>                  | sejt alapú indirekt-gátlási esszé   | efflux                            | fluoreszcens festék   | IC <sub>50</sub> interakció  | magas vagy közepes   |
| <b>Hoechst esszé</b>                  | sejt alapú indirekt-gátlási esszé   | efflux                            | fluoreszcens festék   | IC <sub>50</sub> gyógyszer-gyógyszer interakció  | magas vagy közepes   |
| <b>Uptake transzport esszé</b>        | sejt alapú indirekt-gátlási esszé   | uptake                            | fluoreszcens festék, izotóppal jelölt vegyület, jelöletlen vegyület | IC <sub>50</sub> gyógyszer-gyógyszer interakció  | alacsony vagy közepes permeabilitású   |
| <b>Vezikuláris transzport esszé</b>   | membrán alapú indirekt-gátlási esszé  | efflux                            | fluoreszcens festék, izotóppal jelölt cpd, jelöletlen vegyület      | IC <sub>50</sub> gyógyszer-gyógyszer interakció  | alacsony permeabilitású: direct VT<br>magas vagy közepes permeabilitású: indirekt VT |
| <b>ATPáz esszé (aktiválás/gátlás)</b> | membrán alapú aktiválási és gátlási esszé   | efflux                            | fluoreszcens festék, izotóppal jelölt vegyület, jelöletlen vegyület | EC <sub>50</sub> , IC <sub>50</sub> megkülönböztethető hogy a tesztanyag szubsztrátja vagy inhibitora a vizsgált transzporternek | magas vagy közepes   |
| <b>Monolayer efflux esszé</b>         | immortalizált sejtvonalak, transzfektált barrier sejtek, egy vagy több transzporter fehérje kifejezésére alkalmas | efflux és uptake                  | fluoreszcens festék, izotóppal jelölt cpd, jelöletlen vegyület      | permeabilitás és a tesztvegyület nettó fluxusa   | alacsony vagy közepes  |

Az esszékből származtatható információ:

a. A *Calcein és Hoechst esszé* esetében az  $IC_{50}$ , azt a drogrezisztenciát jelenti, amely a referencia szubsztráthoz vagy gátlószerhez (Ko134) képest 50%-kal gátolja a festék (CalceinAM/Hoechst) kipumpálását a sejtéből.

b. Az *ATPáz esszé* esetében, az  $EC_{50}$  aktivitási teszt esetén, a tesztelt molekula hatására történő aktivitás növekedés 50%-ához tartozó drogkoncentrációt jelenti, valamint az  $IC_{50}$  gátlási teszt esetében, azt a drogkoncentrációt, amely 50%-kal gátolja az ismert szubsztráttal aktivált transzportert.

c. Az *Uptake és Vezikuláris transzport esszé* esetében  $IC_{50}$  azt a drogrezisztenciát jelenti, amely 50%-kal gátolja az ismert szubsztrát transzportját a sejt/vezikula belsejébe.

A festéktranszport esszék esetében, a szubsztrátok intracelluláris akkumulációját a transzporter csökkenti, az inhibitorok vagy kölcsönhatók pedig visszaállítják azonos szintre a szülői sejtvonálhoz képest az ABC fehérjét expresszáló sejtekben. Sok esetben fluoreszcens szubsztrátokat alkalmaznak. Más esetekben, mint pl. a Hoechst 33342 és a pheophorbid A az ABCG2 esetében, vagy a Calcein-AM az ABCB1 és ABCC1 esetén, egy nem fluoreszcens prekuzort adnak a sejtekhez, amely a sejten belül válik fluoreszcenssé. Annak köszönhetően, hogy csak viszonylag kevés molekula fluoreszcens, ezt a módszert is elsősorban indirekt mérésekre alkalmazzák.

#### 4.5.1.2 ABCG2 inhibitor aktivitás

Az új előállított vegyületek inhibitor aktivitás mérésére Hoechst esszét alkalmaztunk. A Hoechst 33342 membránpermeábilis lipofil molekula, amely a DNS A-T régiójához kötődve fluoreszcenssé válik. A fluoreszcens jel nagysága a DNS-hez kötődött festék mennyiségével egyenesen arányos. A Hoechst 33342 szubsztrátja az ABCG2 transzporternek, így azok a sejtek, amelyek expresszálják az ABCG2-t kipumpálják a festéket. A transzporter inhibitorai gátolják a Hoechst kipumpálását a sejtéből, a transzporter szubsztrátjai pedig kompetícióba léphetnek vele. Mindkét esetben az intracelluláris koncentráció növekszik, ami a fluoreszcens jel növekedését eredményezi. Az esszé kivitelezéséhez alkalmazható humán szelektált sejtvonál, illetve bármely sejtvonál mely magas szinten fejezi ki az ABCG2 fehérjét. MCF7MX sejtek magas szinten fejezik ki az ABCG2 fehérjét, ennek megfelelően a biológiai vizsgálatok során a fent említett MCF7MX sejtvonalat valamint kontrollként az MCF7 sejteket használtuk. Ko134-et mint pozitív kontrollt alkalmaztuk és már 1  $\mu$ M Ko134

esetén 100%-os gátlás tapasztaltunk. Az új analógok esetében a vizsgálatok során 1  $\mu\text{M}$  – 10  $\mu\text{M}$ -os koncentráció tartományt alkalmaztunk.

A vizsgálatok során a triciklusos analógok (**IIIa- IIId**) nem mutattak aktivitást. A tetraciklusos származékok **1c** (*3S,6S,12aS*), **2c** (*3S,6S,12aS*), **3e1** (*3S,6S,12aS*), **3e2** (*3S,6S,12aS*), **3e4** (*3S,6S,12aS*), **3e5** (*3S,6S,12aS*), **3e6** (*3S,6S,12aS*), **4d** (*3S,6S,12aS*), valamint a diasztereomer elegyek **1c'** (*3S,6S,12aS*), **1c'** (*3S,6R,12aS*), **2c'** (*3S,6S,12aS*), **2c'** (*3S,6R,12aS*) gátló hatása összehasonlítható volt a Ko134-el. (4. táblázat) Az összes sztereokémiaiilag tiszta vegyület *3S,6S,12aS* konfigurációval rendelkezett, a megfelelő diasztereomer párjaik pedig **3e6** (*3S,6R,12aS*) abszolút konfigurációval, melyek közül a **3e6** (*3S,6R,12aS*) kivételével egyik sem mutatott aktivitást.

A továbbiakban meghatároztuk az egyes diasztereomer elegyek  $\text{IC}_{50}$  értékeit illetve azon analógok  $\text{IC}_{50}$  értékeit melyek potenciális ABCG2 gátlást mutattak. Az **1c** (*3S,6S,12aS*), **2c** (*3S,6S,12aS*), **3e2** (*3S,6S,12aS*), **3e5** (*3S,6S,12aS*), **3e6** (*3S,6S,12aS*) és **4d** (*3S,6S,12aS*) vegyületek  $\text{IC}_{50}$  értékei nanomoláris tartományban mérhetőek voltak, valamint az **1c'** (*3S,6S,12aS*), **1c'** (*3S,6R,12aS*), **2c'** (*3S,6S,12aS*), **2c'** (*3S,6R,12aS*) diasztereomer elegyek aktivitása közel megegyezett a Ko134-el. A **3e2** (*3S,6S,12aS*), **3e5** (*3S,6S,12aS*), **3e6** (*3S,6S,12aS*) analógok közül melyek a **3e2** (*3S,6R,12aS*), **3e5** (*3S,6R,12aS*), **3e6** (*3S,6r,12aS*) vegyületek diasztereomer párjai, csak a **3e5** (*3S,6S,12aS*) eredményezett elfogadható gátlást, annak ellenére, hogy 18-szoros különbség volt a *3S,6S,12aS* [**3e5** (*3S,6S,12aS*)] illetve *3S,6S,12aS* [**3e5** (*3S,6S,12aS*)] diasztereomerek  $\text{IC}_{50}$  értékei között (0.40  $\mu\text{M}$  és 7.04  $\mu\text{M}$ ).

#### 4.5.1.3 Gátlás specificitás

Az inibitorok specificitásának meghatározása érdekében, Calcein festék esszét alkalmaztunk, melynek során teszteltük az analógok ABCB1 és ABCC1 inhibitor aktivitását. A Calcein-AM egy nem fluoreszcens prekursora a fluoreszcens Calceinnek, illetve szubsztrátja mind az ABCB1 mind az ABCC1-nek.

Vizsgáltuk az **1c** (*3S,6S,12aS*), **2c** (*3S,6S,12aS*), **3e2** (*3S,6S,12aS*), **3e4** (*3S,6S,12aS*), **3e5** (*3S,6S,12aS*), **3e6** (*3S,6S,12aS*), **4d** (*3S,6S,12aS*) analógokat, melyek nanomolár értékekkel rendelkeztek, az **1c'** (*3S,6S,12aS*), **1c'** (*3S,6R,12aS*), **2c'** (*3S,6S,12aS*), **2c'** (*3S,6R,12aS*) diasztereomer elegyeket, valamint a **3e2** (*3S,6R,12aS*), **3e5** (*3S,6R,12aS*), **3e6** (*3S,6R,12aS*) vegyületeket. A **3e4** (*3S,6S,12aS*) analóg mutatta a leghatékonyabb specificitást (19-szeres az ABCC1-re és 62-szeres ABCB1-re). Megjegyzendő, hogy minden egyes



vegyület nagyon hasonló értékeket mutatott az ABCB1 és ABCC1-re nézve. (4. táblázat, 25.ábra) Az egyetlen kivétel a **3e2 (3S,6R,12aS)** vegyület volt, amely 8-szor jobban gátolta az ABCC1-et mint az ABCB1-et (33.4 és 4.1  $\mu\text{M}$ ). (4. táblázat) Még jelentősebb, hogy az ABCG2 gátlás esetében tapasztalt sztereospecificitás (**3S,6S,12aS** a **3S,6R,12aS** szemben) teljes mértékben hiányzott az ABCB1 illetve ABCC1 gátlás esetében. Továbbá a **3S,6R,12aS** konfigurációjú vegyületek nem mutattak specifikus gátlást az ABCG-re nézve az ABCB1 és ABCC1-el szemben. A várakozásoknak megfelelően, a **2c'** (**3S,6S,12aS**), **2c'** (**3S,6R,12aS**) racemát nem mutatott specificitást az ABCG2-re az ABCB1 és ABCC1-el szemben, 3.0, 2.75, 3.35  $\mu\text{M}$   $\text{IC}_{50}$  értékekkel. (25.ábra)

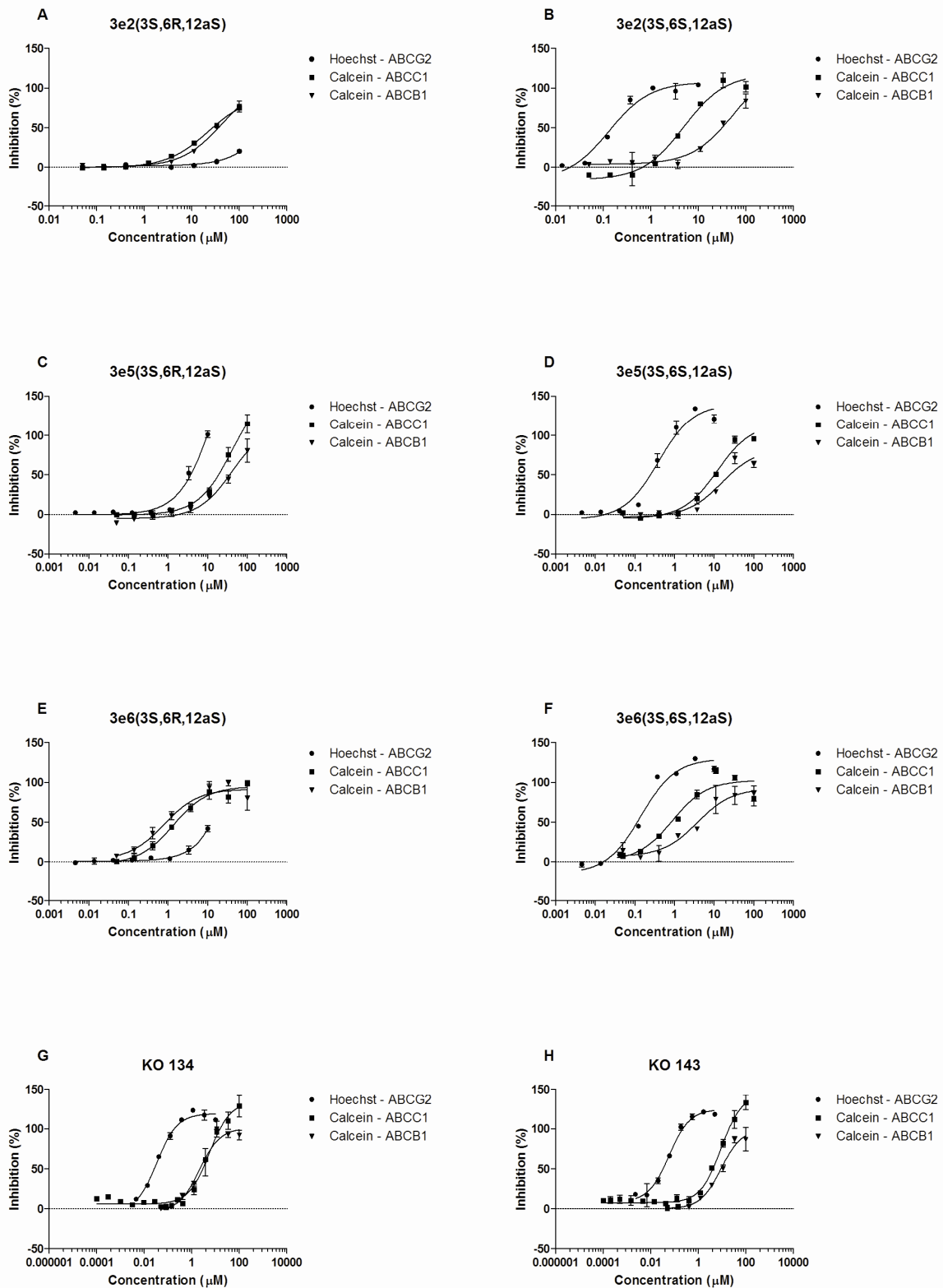
A Ko134-el kapcsolatos *in vivo* biológiai vizsgálatok folyamatban vannak.

#### 4.5.1.4 Toxicitás és reverz aktivitás

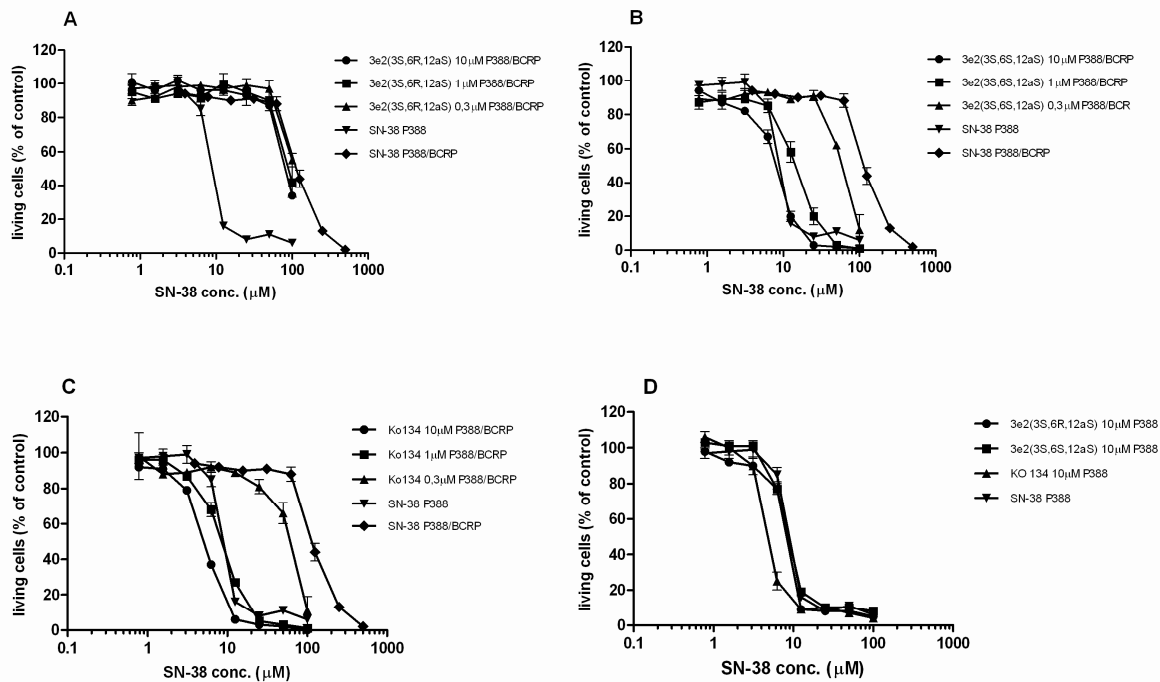
A **3e2 (3S,6S,12aS)** analóg jelentős specificitást mutatott az ABCB1 és ABCC1 szemben. Az ABCB1-el szemben legkisebb potenciált tanúsító ( $\text{IC}_{50}$  33.4  $\mu\text{M}$ ) vegyületek, amelyek az ABCG2-t szubmikromolekuláris  $\text{IC}_{50}$  értékek mellett gátolták további vizsgálatoknak vetettük alá. Az SN-38-al (P388BCRP sejtekben az „irinotecan” aktívmetabolítja) szembeni reverz ABCG2 közvetített gátlás vizsgálata során a **3e2 (3S,6S,12aS)** analóg a **Ko134**-el megegyező hatást fejtet ki, 1  $\mu\text{M}$ -os koncentrációnál mindkét vegyület teljesen megfordította az irinotekánnal szembeni gátlást (26.ábra B,C) anélkül, hogy bármilyen hatást gyakorolt volna a P388 sejtekre (26.ábra D). Ugyanakkor a **3e2 (3S,6S,12aS)** analóg kevésbé toxikusnak bizonyult a Ko134-el szemben, MRC-5 sejtekben 2-szer magasabb  $\text{EC}_{50}$  értéket mutatva a Ko134-el szemben (96.55  $\mu\text{M}$  és 44.11  $\mu\text{M}$ ). (27.ábra)

| Molekula szám                  | ABCG2 gátlás | ABCG2 gátlás          | ABCB1 gátlás          | ABCC1 gátlás          |
|--------------------------------|--------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Vegyület                       | 10 uM (%)    | IC <sub>50</sub> (uM) | IC <sub>50</sub> (uM) | IC <sub>50</sub> (uM) |
| 1c(3S,6S,12aS)                 | 118          | 0,05                  | 0,75                  | 0,82                  |
| 2c(3S,6S,12aS)                 | 113          | 0,06                  | 0,84                  | 0,92                  |
| 3e1(3S,6R,12aS)                | 0            | >100                  | >100                  | 86                    |
| 3e1(3S,6S,12aS)                | 113          | 1,8                   | -                     | 83,48                 |
| <b>3e2(3S,6R,12aS)</b>         | 7            | -                     | 40,3                  | 37,6                  |
| <b>3e2(3S,6S,12aS)</b>         | 131          | 0,41                  | 33,4                  | 4,1                   |
| 3e3(3S,6R,12aS)                | 1            | -                     | -                     | -                     |
| 3e3(3S,6S,12aS)                | 59           | 24,7                  | >100                  | 52,3                  |
| <b>3e4(3S,6R,12aS)</b>         | 4            | 150                   | 28,85                 | 33,63                 |
| <b>3e4(3S,6S,12aS)</b>         | 110          | 0,14                  | 8,74                  | 2,66                  |
| <b>3e5(3S,6R,12aS)</b>         | 101          | 7,4                   | 28,6                  | 42,87                 |
| <b>3e5(3S,6S,12aS)</b>         | 121          | 0,4                   | 13,1                  | 12,1                  |
| <b>3e6(3S,6R,12aS)</b>         | 42           | 16,07                 | 0,99                  | 1,34                  |
| <b>3e6(3S,6S,12aS)</b>         | 117          | 0,14                  | 2,58                  | 0,88                  |
| 4d(3S,6S,12aS)                 | 110          | 0,32                  | 8,38                  | 6,21                  |
| 1c'(3S,6R,12aS;<br>3S,6S,12aS) | 88           | 5,50                  | 1,79                  | 2,9                   |
| 2c'(3S,6R,12aS;<br>3S,6S,12aS) | 96           | 3,00                  | 2,75                  | 3,53                  |
| Ko134                          | 111          | 0,06                  | 2,04                  | 5,51                  |
| Ko143                          | 118          | 0,06                  | 8,74                  | 9,13                  |

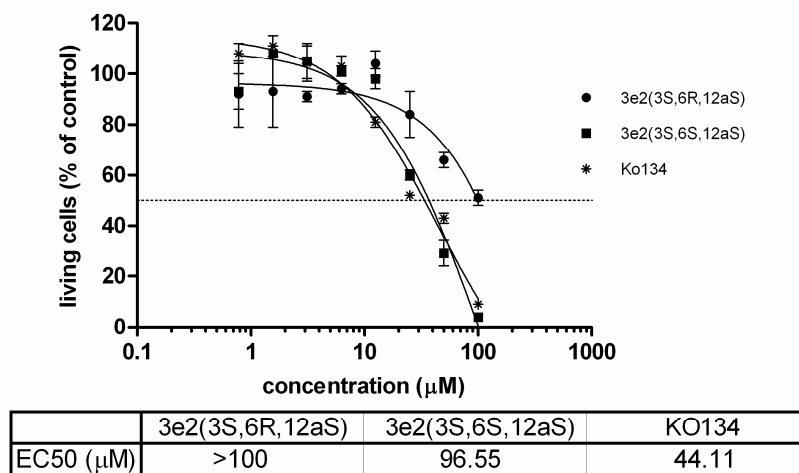
4. táblázat



25.ábra



26.ábra



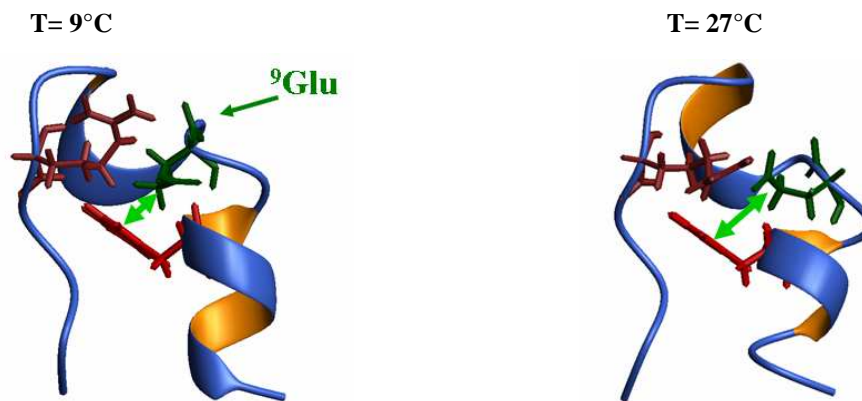
27.ábra

#### 4.2 Módosított minifehérjék szintézise

Munkám első részében olyan TC5b analógokat állítottam elő melyek alkalmasak lehetnek annak vizsgálatára, hogy a TC5b minifehérjében jelenlévő Asp9-Arg16 sóhíd milyen mértékben járul hozzá a minifehérje szerkezetének globális stabilitásához, illetve a fehérje feltekeredéséhez.

Korábbi Hudáky és mts. által végzett kísérletek során bebizonyosodott, hogy az eredeti TC5b fehérjének a 9. pozícióban metilén hosszabbított változata (Asp9→Glu9)

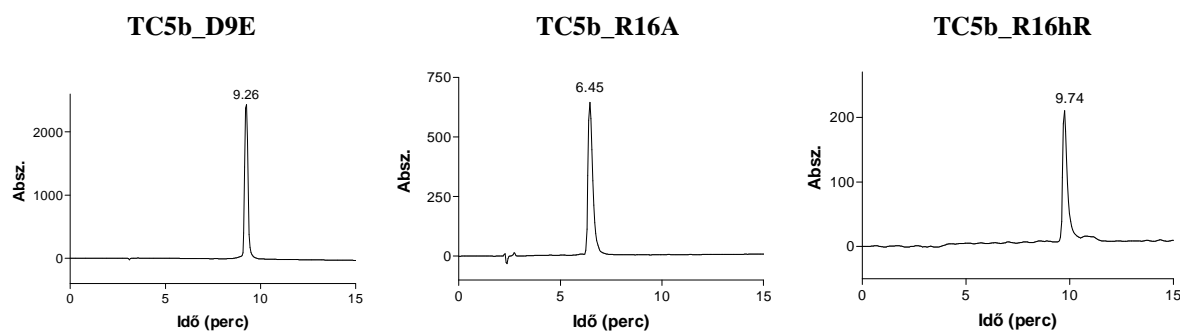
térszerkezetiileg stabilabb. [100] A  $\text{CH}_2\text{-COO}^- \rightarrow (\text{CH}_2)_2\text{-COO}^-$  mutánsban a sóhíd optimálisabb, térszerkezete akár  $\sim 30^\circ\text{C}$ -on is jól jellemezhető csupán egyetlen téralkattal (hőstabilabb minifehérje, 28. ábra). A TC5b\_D9E mutánsban a sóhíd egyik karja egy metilénsoporttal meg lett hosszabbítva, minek következtében kedvezőbb hidrofób kölcsönhatás alakult ki a glutaminsav oldallánca és a hidrofób mag között.



28. ábra A TC5b\_D9E (TC6b) térszerkezetének stabilitása

A sóhíd-optimált TC5b\_D9E (NLYIQWLKEGGPSSGRPPPS) mutánst alapul véve előállítottam ennek a fehérjének néhány variánsát: TC5b\_D9N (NLYIQWLKNGGPSSGRPPPS), TC5b\_R16A (NLYIQWLKDGGPSSGAPPS), TC5b\_D9N\_R16A (NLYIQWLKNGGPSSGAPPS), TC5b\_D9S (NLYIQWLKSGGPSSGRPPPS), TC5b\_R16hR (NLYIQWLKDGGPSSGhRPPPS) (hR, homo-arginin, az arginin metilén-hosszabbított változata), TC5b\_D9AaD\_R16K (NLYIQWLKAaDGGPSSGKPPPS) (AaD, adipinsav, a glutaminsav metilén-hosszabbított változata).

A minifehérjék szintézisét manuálisan, szilárd fázisú szintézis stratégiával végeztem, Fmoc-kémia alkalmazásával. Az elkészült peptidek gyantáról történő hasítása TFA oldattal történt. A szintézisek végeztével az előállított minifehérjékről készült analitikai HPLC kromatogramok, valamint az ESI-MS módszer segítségével elkészített spektrumok igazolták a kívánt termékek keletkezését (29. ábra).



29. ábra Néhány tisztított TC5b variáns analitikai HPLC kromatogramja. HPLC körülmények: oldószerek (A) 0,05 M NH<sub>4</sub>OAc, valamint (B) 60% ACN/0,05 M NH<sub>4</sub>OAc, 8-23% 15 min (B) lineáris gradiens, áramlási sebesség 1 ml/min, Phenomenex Luna 5 µm C18 300A

Arra kerestük a választ, hogy milyen mértékben lehet egy metilén-csoport „mozgatásával” finoman hangolni egy meglévő kölcsönhatást. A sóhíd szerepére abból is lehet következtetni, hogy ha az nincs jelen a szerkezetben, ez kétféleképpen érhető el a sóhíd mutációjával (TC5b\_D9S, TC5b\_D9N), valamint savas körülmények közötti vizsgálatokkal.

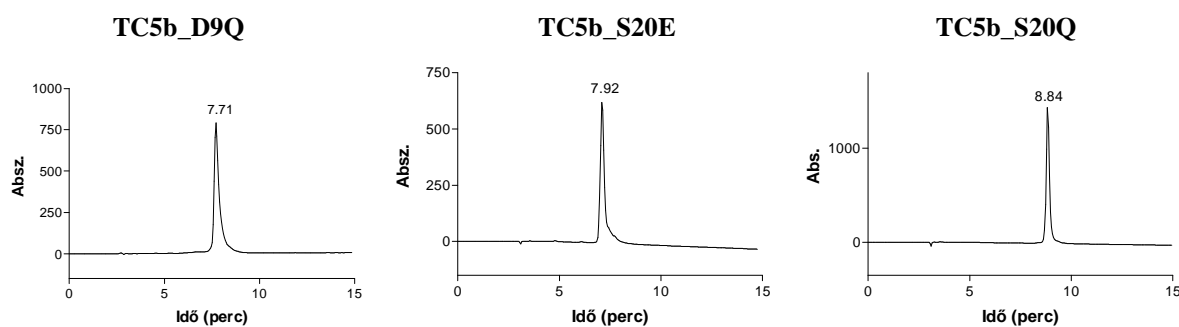
Az elvégzett vizsgálatok alapján a Trp-kalitka sóhídja nem egy izolált stabilizáló szerkezeti elem, de egy eléggé fontos integrált része a rendezett struktúrának. A megvizsgált mutánsok esetében a stabilizáló tendenciák három specifikus, ugyanakkor egymáshoz kapcsolódó kölcsönhatások segítségével jellemezhetők: elektrosztatikus, hélix-stabilizáló (QxxxY) és hidrofób (az Arg16 aminosav  $-(CH_2)_3-$  oldallánca valamint Trp9 aminosav indol gyűrűje között). A vizsgált mutációk alapján az Arg16 aminosav  $-(CH_2)_3-$  oldallánc maradék hálózati kölcsönhatása sokkal fontosabb, mint egy negatív töltésű Asp9/Glu9 és egy pozitív töltésű guanidin csoport közötti. A sóhíd mutációja (TC5b\_D9S, TC5b\_D9N) kevésbé drasztikus mint az Arg16 aminosav hidrofób oldalláncának megszüntetése (TC5b\_R16A).

Az előállított TC5b variánsokról savas ( $2,8 \leq \text{pH} \leq 3,2$ ) és semleges körülmények között készült  $H^1-H^1$  NMR mérésekből ( $T = 280 \text{ K}$ ), valamint a közeli és távoli ECD (elektronikus cirkuláris dikroizmus) spektroszkópia segítségével meghatározott másodlagos szerkezetbeli változások adataiból kiderült, hogy ezen minifehérjék gombolyodása (unfolding) nem egy kétállapotú folyamat, (mint azt Neidigh [101] és mts., illetve Streicher [102] és mts. állították) hanem annál sokkal bonyolultabb (mint azt Mok és mts., [103] illetve Ahmed és mts. [104] feltételezték).

A széles hőmérsékleti tartományban ( $5 \leq T \leq 85 \text{ }^\circ\text{C}$ ) végzett ECD olvadási görbék, savas NMR vizsgálatok és a CCA+ eredmények („Convex Constraint Algorithm” a cirkuláris dikroizmus spektrumok elemzésére szolgáló program) [105-107] alapján kijelenthetjük, hogy

a tipikus Trp-kalitka olvadása egy bonyolult folyamat, amely minimum egy intermedieren keresztül játszódik le és vezet a stabil szerkezet eléréséhez.

Korábbi kutatások szerint sok globuláris fehérjének van egy második térszerkezete, amely fonál alakú aggregátum, vagy „amiloid” szerű. (mint az Alzheimer-kór esetében). Ilyen aggregációt figyeltek meg a TC5b\_D9N és további foszfatált mutánsok esetében (megváltozott a térszerkezet→ $\beta$ -redővé), tehát aggregációs tulajdonságai alapján a Tc5b kiváló modellje lehet az *Alzheimer* kórismérvért felelős aggregátumoknak. Munkám második részében olyan TC5b mutánsokat állítottam elő, amelyek alkalmasak lehetnek, mint referensek a már foszfatált analógokkal kapcsolatos vizsgálatok során: TC5b\_D9Q (NLYIQWLKQGGPSSGRPPPS), TC5b\_S14E (NLYIQWLKDGGPSE GRPPPS), TC5b\_S14Q (NLYIQWLKNGGPSQGRPPPS), TC5b\_S20E(NLYIQWLKNGGPSSGRPPP E), TC5b\_S20Q (NLYIQWLKNGGPSSGRPPPQ). A minifehérjék szintézise, tisztítása az előbbieken leírt módon történt.



30. ábra Néhány tisztított TC5b variáns analitikai HPLC kromatogramja. HPLC adatok: oldószerek (A) 0,05 M NH<sub>4</sub>OAc, valamint (B) 60% ACN/0,05 M NH<sub>4</sub>OAc, 8-23% 15 min (B) lineáris gradiens, áramlási sebesség 1 ml/min, Phenomenex Luna 5  $\mu$ m C18 300A

A szintézisek végeztével az előállított minifehérjékről készült analitikai HPLC kromatogramok valamint az ESI-MS módszer segítségével elkészített spektrumok igazolták a kívánt termékek keletkezését (30. ábra). A szintetizált TC5b minifehérjékkel kapcsolatos vizsgálatok folyamatban vannak.

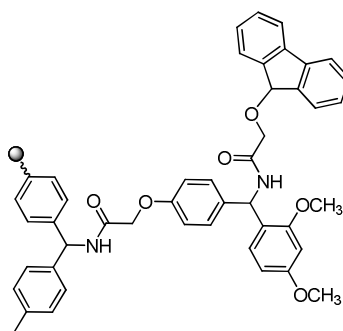
## 4.3 Glikopeptidek szintézise

### 4.3.1 *N*-glikopeptidek szintézise

Munkám során egy új szintézis stratégiát dolgoztam ki, melynek során a glikopeptidek szintézise egy kombinált Fmoc/Boc szintézis stratégia révén valósult meg úgy, hogy az aminosavak beépítése Fmoc szintézis stratégia alkalmazásával történt, viszont a cukorrész beépítésére Boc-védetett glikozilált aminosav származékokat alkalmaztam. A szintézis során a Boc-védőcsoport eltávolítása egy új szelektív védőcsoport hasítási módszerrel történt,  $\text{SnCl}_4$  segítségével. [108]

Az aszparaginon glikozilált peptidek szintézisére modellnek kiválasztott hexapeptid a TC5b minifehérje 7-12 fragmense  $\text{NLYIQWLKD}^*\text{GGPRPPPS}$ , ahol „\*” a glikoziláció helyét jelöli [109] (korábban már szintetizáltuk a teljes minifehérjét és módosított származékait **4.2**, glikozilált TC5b mutánst is előállítottunk, galaktozil aszparaginnal, a célból, hogy a glikoziláció térszerkezeti hatásait vizsgáljuk).

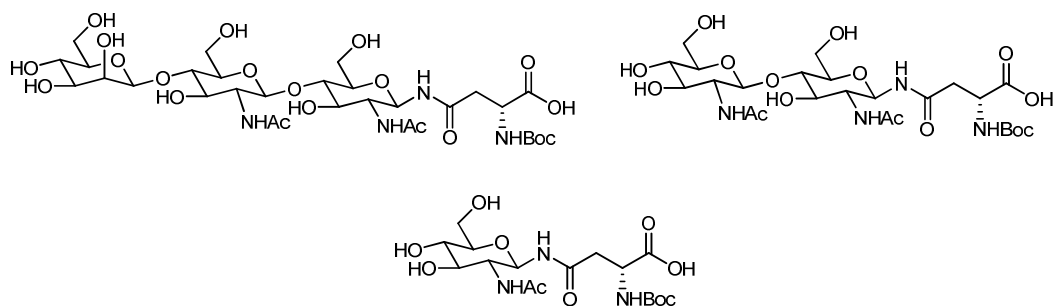
Az *N*-glikopeptidek szintézise Fmoc kémia alkalmazásával, Rink amid MBHA gyantán történt. Előzetes kísérleteim során más Fmoc kémiában általában alkalmazott: Wang, 2-klórtritol klorid valamint Rink amid gyanták nem bizonyultak megfelelőnek, mivel az  $\text{SnCl}_4$ -dal történő védőcsoport hasítás következtében a peptid-gyanta közötti kötés hasadása volt megfigyelhető, kivéve a Rink amid MBHA (31. ábra) gyanta esetében.



31. ábra Rink amid MBHA gyanta

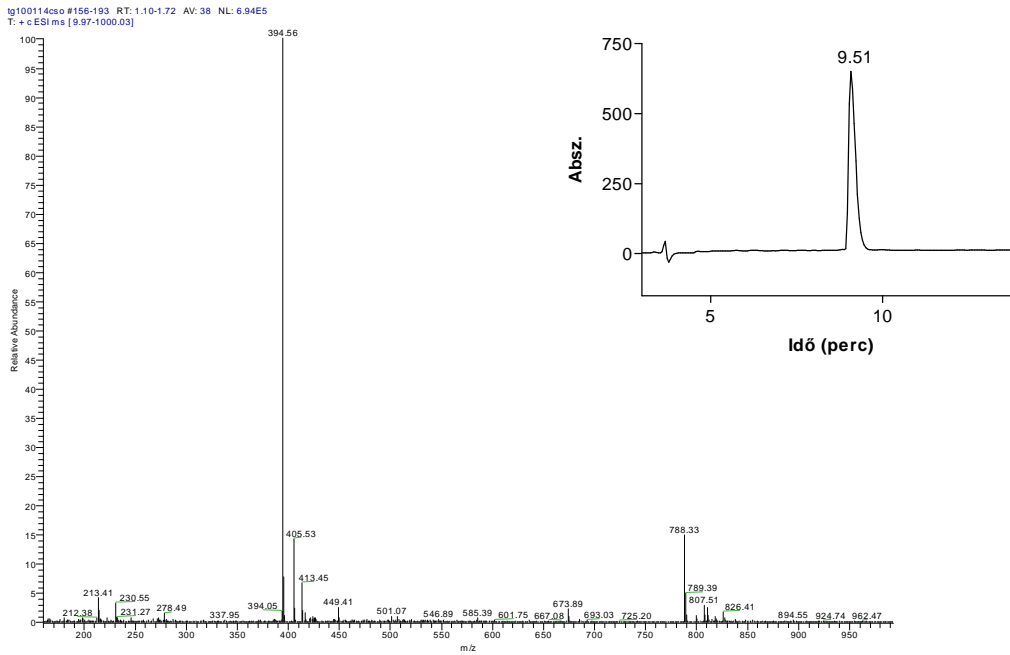
Az *N*-glikopeptidek szintézise során Boc-védett glikozilált mono- di- illetve triszacharid egységeket tartalmazó aszparagin származékokat építettem be (32. ábra).



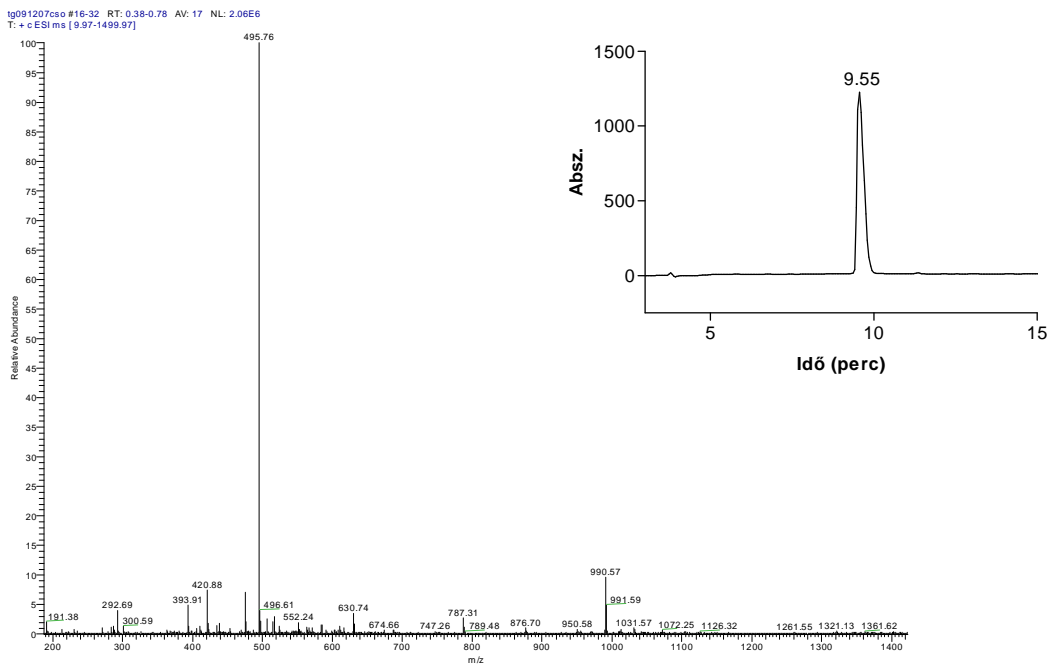


32. ábra A szintézis során beépített GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn, GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn, [Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn származékok

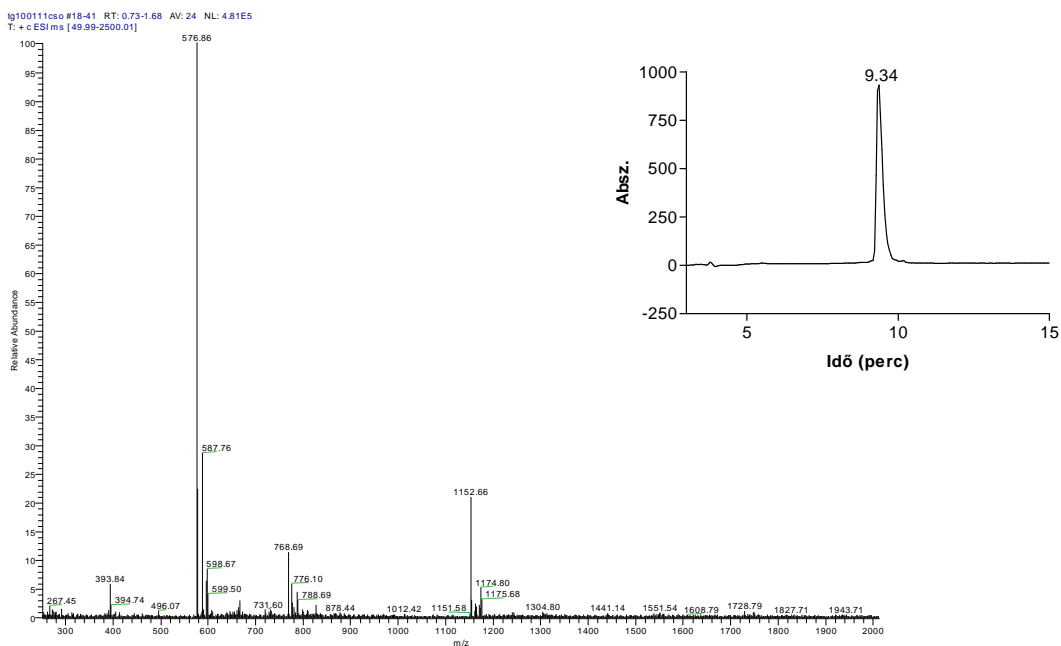
A szintézisek során a peptidek első három aminosavát Fmoc-kémia alkalmazásával Rink amid MBHA gyantára kötöttem, majd megtörtént a Boc-védett glikozilált aszparagin származékok beépítése, ezt követte a Boc-védőcsoport eltávolítása 0,2M SnCl<sub>4</sub>/DCM oldattal, végül az utolsó két aminosav kapcsolása szintén Fmoc-kémia alkalmazásával történt. A peptidek gyantáról történő hasítása TFA oldattal történt. A kombinált szintézis stratégia alkalmazásával sikeresen előállítottam a kívánt Leu-Lys-[GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn-Gly-Gly-Pro-NH<sub>2</sub>, Leu-Lys-[GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn-Gly-Gly-Pro-NH<sub>2</sub>, Leu-Lys-[Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn-Gly-Gly-Pro-NH<sub>2</sub> glikopeptideket, kiküszöbölve a di- illetve triszacharid egységeket tartalmazó glikopeptidek esetében a cukorrész hasadásából származó melléktermékek keletkezését. A szintézisek végeztével az előállított vegyületekről készült analitikai HPLC kromatogramok, valamint az ESI-MS tömegspektrometriás módszer segítségével elkészített spektrumok is igazolták a kívánt termékek keletkezését (33., 34., 35. ábra). A nyers peptidek tisztítását Phenomenex Jupiter 10u C18 300A (250x15.00 mm) preparatív oszlopon végeztem, (A) 0,1% TFA valamint (B) 80% ACN/ 0,1 TFA eluenseket használva, 40-60% (B) lineáris gradienssel, 4 ml/min áramlási sebességgel, 220 nm-en.



33. ábra Az analitikai HPLC kromatogramja, valamint ESI-MS spektruma a tisztított Leu-Lys-[GlcNAc(β1-N)]Asn-Gly-Gly-Pro-NH<sub>2</sub> peptidnek. HPLC körülmények: oldószerek (A) 0,1% TFA; (B) 80% ACN/0,1% TFA; 8-23% 15 min (B) lineáris gradiens, áramlási sebesség 1 ml/min, Phenomenex Luna 5 μm C18 300A



34. ábra Az analitikai HPLC kromatogramja, valamint ESI-MS spektruma a tisztított Leu-Lys-[GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)]Asn-Gly-Gly-Pro-NH<sub>2</sub> peptidnek. HPLC körülmények: oldószerek (A) 0,1% TFA; (B) 80% ACN/0,1% TFA; 5-20% 15 min (B) lineáris gradiens, áramlási sebesség 1 ml/min, Phenomenex Luna 5 μm C18 300A



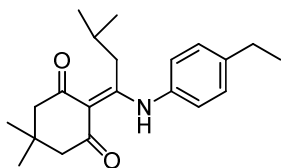
35. ábra Az analitikai HPLC kromatogramja, valamint ESI-MS spektruma a tisztított Leu-Lys-[Man( $\beta$ 14)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn-Gly-Gly-Pro-NH<sub>2</sub> peptidnek. HPLC körülmények: oldószerek (A) 0,1% TFA; (B) 80% ACN/0,1% TFA; 5-20% 15 min (B) lineáris gradiens, áramlási sebesség 1 ml/min, Phenomenex Luna 5  $\mu$ m C18 300A

#### 4.3.2 O-glikopeptidek szintézise

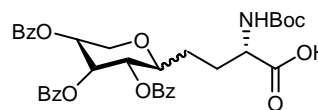
Az SnCl<sub>4</sub>-al történő szelektív Boc védőcsoport hasítási módszert O-glikopeptidek esetében is szerettem volna alkalmazni, ennek megfelelően modellként kiválasztottam az aggrecan fehérje egy fragmensét GVEDIS\*GLPSG amely a fehérje legerősebben glikozilezett régiójából származó repetitív szekvencia („\*” a glikoziláció helyét jelöli). [110] Az aggrecan a porc-állomány egyik fő makromolekuláris komponense, amely a reumatoid arthritis egyik lehetséges autoantigénje. A H-Gly-Val-Glu-Asp-Ile-[Xil( $\beta$ 1-O)]Ser-Gly-Leu-Pro-Ser(Bzl)-Gly-NH<sub>2</sub> peptid esetében ugyanazt a szintézis stratégiát alkalmaztam, mint az N-glikopeptidek esetében azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben védenem kellett a glikozilált szerin származék hidroxil csoportjait, valamint a peptidben található trifunkciós aminosavak oldalláncait.

A korábbi O-glikopeptidek előállításával kapcsolatos kísérleteink során Fmoc szintézis stratégia alkalmazásával a *Ser-Bzl*, *Ser(Xil)-Bz*, *Glu-*, *Asp-ODmab* (36. ábra) védőcsoport kombináció bizonyult a legoptimálisabbnak, ennek megfelelően az O-glikopeptid

előállításánál ugyanezt a védőcsoport kombinációt alkalmaztam. A szintézise során Boc védőcsoporttal ellátott glikozilált szerin származékot (37. ábra) építettem be.

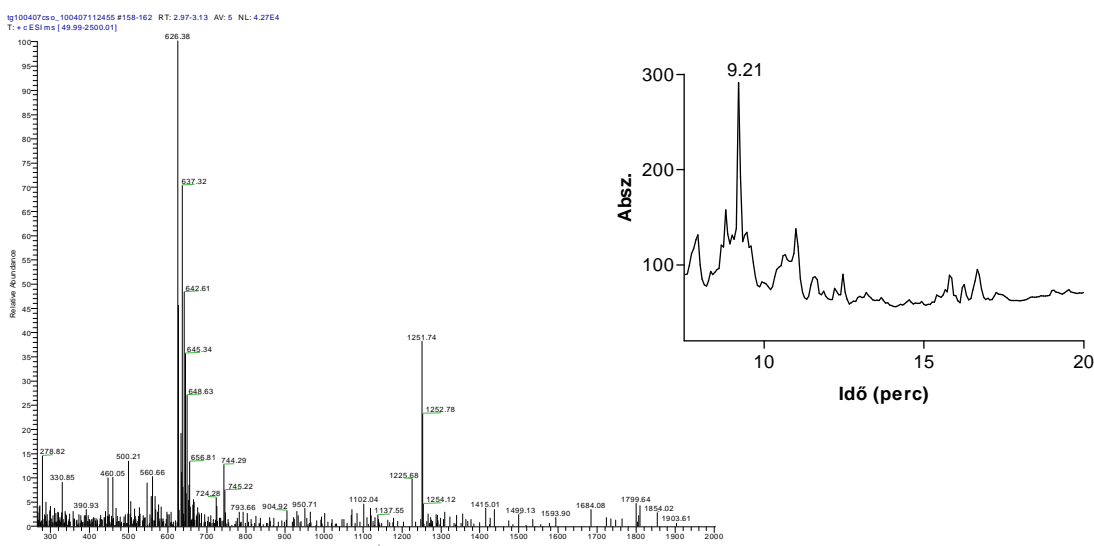


36. ábra Dmab védőcsoport



37. ábra Boc-Ser[Xil(OBz)<sub>3</sub>]-OH

A peptid első öt aminosavát a Fmoc kémia alkalmazásával Rink amid MBHA polimerre kötöttem, ezt követte a Boc védőcsoporttal ellátott glikozil szerin származék beépítése, majd a Boc védőcsoport eltávolítása 0,2M SnCl<sub>4</sub>/DCM oldattal, végül az utolsó négy aminosav kapcsolása szintén Fmoc kémia alkalmazásával történt. A szintézis végeztével eltávolítottam az ODmab védőcsoportot 2% hidrazin-hidrát/DMF eleggyel, majd lehasítottam a peptidet a gyantáról 5% H<sub>2</sub>O/TFA oldattal, legvégül pedig megtörtént a Bz védőcsoport eltávolítása 20% hidrazin-hidrát/MeOH oldattal. A szintézis végeztével a glikopeptidről készült analitikai HPLC kromatogram, valamint az ESI-MS tömegspektrometriás módszer segítségével elkészített spektrum alátámasztották a kívánt termék keletkezését (38. ábra). A nyers peptid tisztítását Phenomenex Jupiter 10u C18 300A (250x15.00 mm) preparatív oszlopon végeztem, (A) 0,1% TFA valamint (B) 80% ACN/ 0,1 TFA eluenseket használva, 40-60% (B) lineáris gradienssel, 4 ml/min áramlási sebességgel, 220 nm-en.

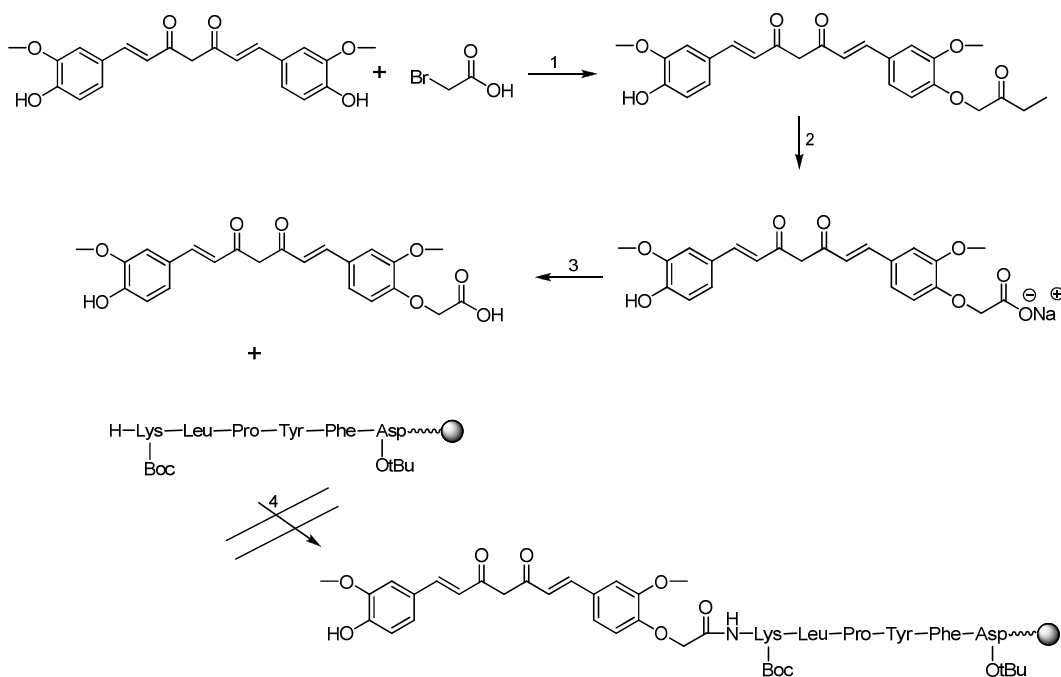


38. ábra Az analitikai RP-HPLC kromatogramja valamint ESI-MS spektruma a nyers H-Gly-Val-Glu-Asp-Ile-Ser(Xil)-Gly-Leu-Pro-Ser(Bzl)-Gly-NH<sub>2</sub> peptidnek. HPLC körülmények: oldószerek (A) 0,1% TFA; (B) 80% ACN/ 0,1% TFA; 20-100% 20 min (B) lineáris gradiens, áramlási sebesség 1 ml/min, Phenomenex Luna 5 μm C18 300A

#### 4.4 Radiofarmakonok készítéséhez prekursorok előállítása

A prekursorok előállításának első lépéseként szintetizáltam az amiloid plakkokhoz korábbi vizsgálatok szerint nagy affinitással kötődő **H-Leu-Pro-Tyr-Phe-Asp-NH<sub>2</sub>**, valamint a **H-Lys-Leu-Pro-Tyr-Phe-Asp-NH<sub>2</sub>** peptideket, Fmoc szilárd fázisú szintézist alkalmazva. Munkám során egy olyan stratégiát dolgoztam ki, mely lehetővé teszi ezen peptidekhez a kurkumin (önmagában is kötődik az amiloid plakkokhoz), DOTA és *N*-karboximetil hisztidin (nagyon jó kelátképző) molekulák beépítését. Előzetes kísérleteket végeztem, melynek első lépéseként a kurkumin fenolrészének hidroxilcsoportját alkileztem kálium-karbonát jelenlétében, brómecetsav-etil-észtert használva alkilezőszerként (39. ábra). A reakció során mind a mono-, mind pedig a bisz-alkilezett termék keletkezése megfigyelhető volt, abban az esetben is, ha fél ekvivalens alkilezőszert használtam a reakció során. Mivel a monoalkilezett származékkal szerettem volna további reakciókat végezni, ezért megpróbálkoztam a termékek magas nyomású oszlopkromatográfiás elválasztásával. Az elválasztást hexán:i-propanol eleggyel végeztem, 5 atm. nyomáson. A mono- illetve bisz-alkilezett termékek elválasztása sikeren megvalósult. A következő lépésben elvégeztem az észter lúgos hidrolízisét, két lépésben, elsőként NaOH segítségével, majd kisavanyítottam az oldatot TFA-val (39. ábra).

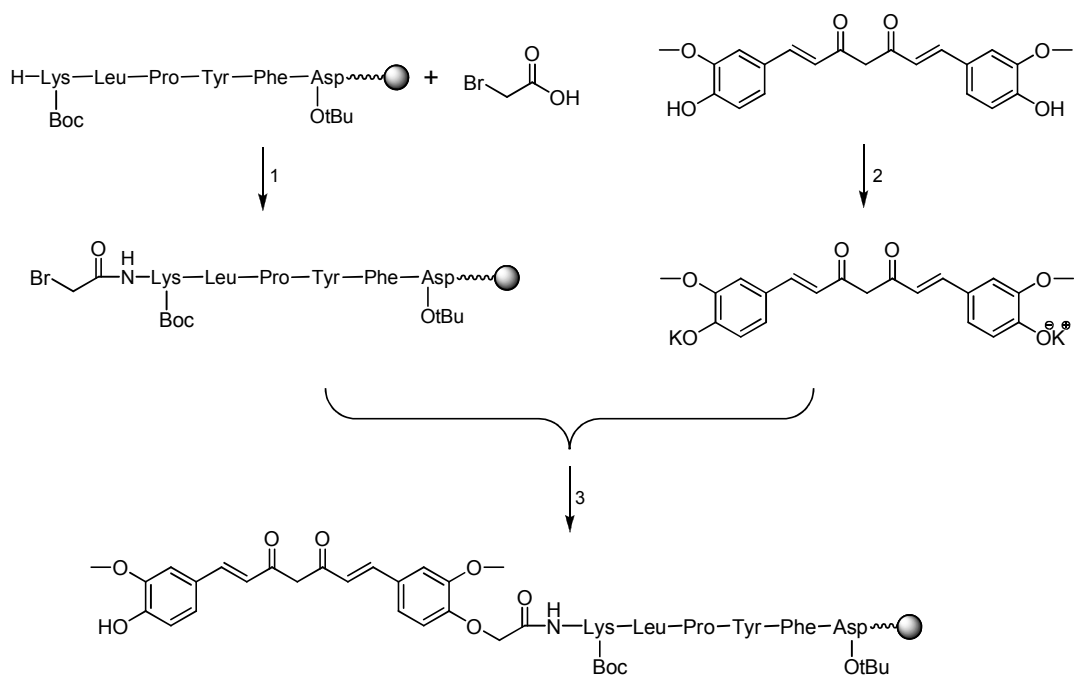
A következő lépésben a már szabad hidroxilcsoportot tartalmazó kurkumin származékot szerettem volna hozzákapcsolni a már Fmoc stratégia segítségével elkészített, gyantán lévő peptidhez. Az előállított intermedier szilárd fázishoz való kapcsolása viszont nem valósult meg, ezért egy új módszert dolgoztam ki (39. ábra).



39. ábra Reakció körülmények: **1.** 0,5 ekv.  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF, 2 óra, 50 °C, **2.** NaOH,  $\text{H}_2\text{O}$ , RT, 20 perc, **3.** TFA, pH = 2, RT, **4.** 3 ekv. DCC, DCM, RT, 2 óra.

További kísérleteim során, első lépésként Fmoc stratégia segítségével elkészített Wang gyantán lévő peptidhez, bróm-ecetsavat kapcsoltam, ezzel párhuzamosan a kurkumint kálium-karbonáttal reagáltattam, elkészítve ezáltal a kurkumin K-sóját, majd az elkészült K-sót hozzáadtam a gyantához (40. ábra). A következő lépésben lehasítottam a terméket a gyantáról TFA oldat segítségével. A szintézis végeztével a prekuzorrol készült analitikai HPLC kromatogram, valamint ESI-MS tömegspektrometriás módszer segítségével elkészített spektrum alapján, megállapítottam a kívánt termék keletkezését.

Munkám második részében beépítettem a kurkumint már tartalmazó peptidbe a DOTA molekulát (41. ábra). A lizin oldalláncának aminocsoportjához hozzákapcsoltam a terc-butil védőcsoportokkal védett DOTA-t, HOAt, valamint HBTU kapcsolószerek jelenlétében. A reakciót oldatban végeztem és lejátszódása analitikai HPLC segítségével jól követhető volt. Utolsó lépésként eltávolítottam a DOTA hidroxilcsoportjain levő terc-butil védőcsoportokat TFA oldat segítségével, a reakció lefolyását szintén oldat fázisban végeztem és analitikai HPLC segítségével követtem.

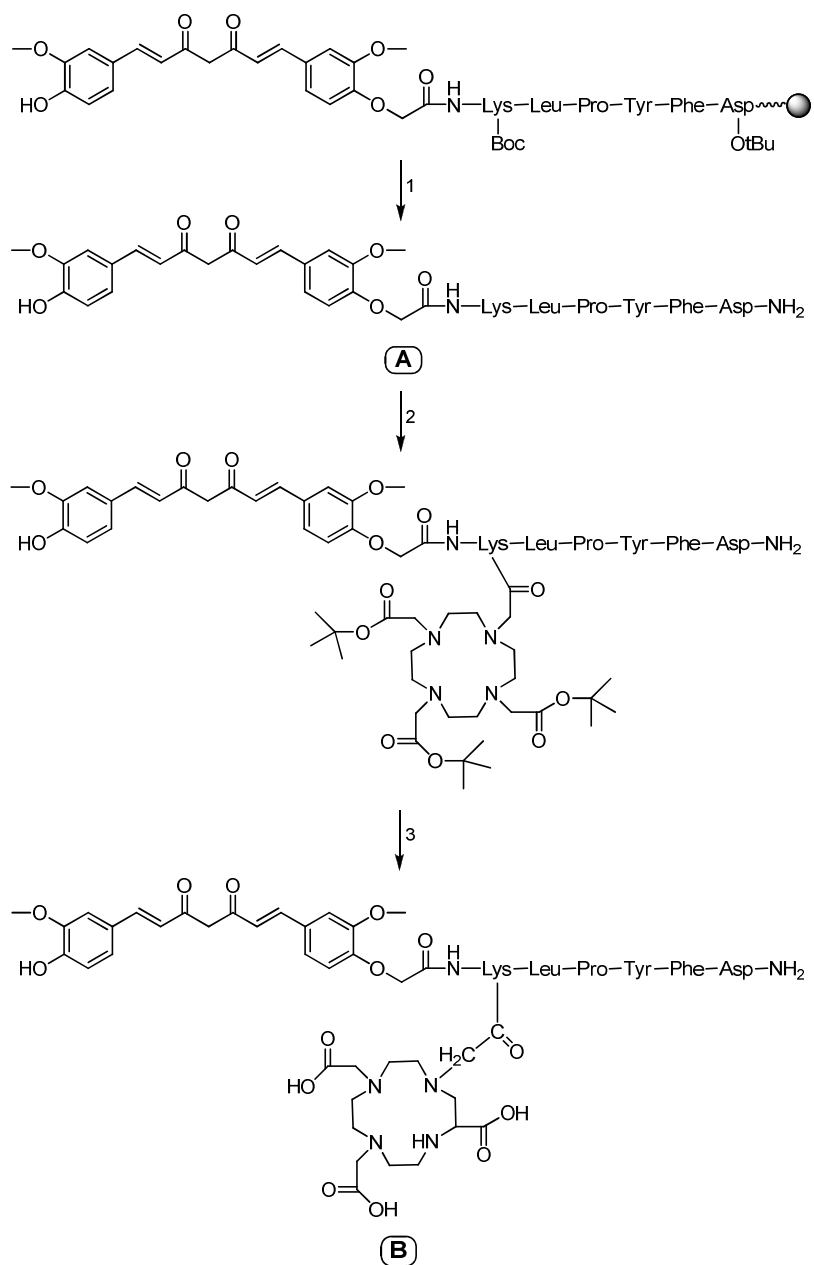


40. ábra Reakció körülmények: 1. 5 ekv. DCC, DMF, RT, 3 óra, 2.  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF, 50 °C, 3 óra, 3. DMF, RT, 16 óra.

A továbbiakban a fenti sikeres módszert alkalmazva szintén Fmoc startégia segítségével előállítottam a megfelelő gyantán lévő peptidet, majd hozzákapcsoltam a brómecetsavat, továbbá az *N*-karboximetil hisztidint DCC kapcsolószer jelenlétében (42. ábra), sikeresen előállítva ezáltal egy újabb prekuzort.

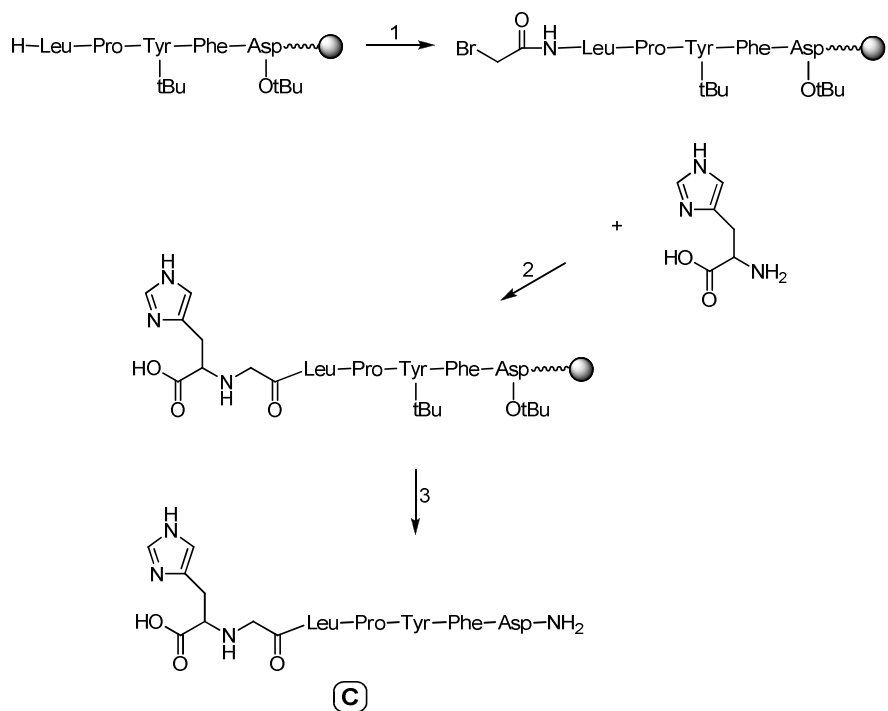
A szintézisek végeztével az előállított prekuzorokról készült analitikai HPLC kromatogramok, valamint az ESI-MS tömegspektrometriás módszer segítségével elkészített spektrumok alátámasztották a kívánt termékek keletkezését (43., 44., 45. ábra).

A prekuzorok előállítására megfelelő szintézist sikerült kidolgoznom, melynek során sikeresen beépítettem a KLPYFD, illetve LPYFD peptidekbe a kurkumin, DOTA, *N*-karboximetil hisztidin molekulákat, az anyagok biológiai vizsgálata folyamatban van.

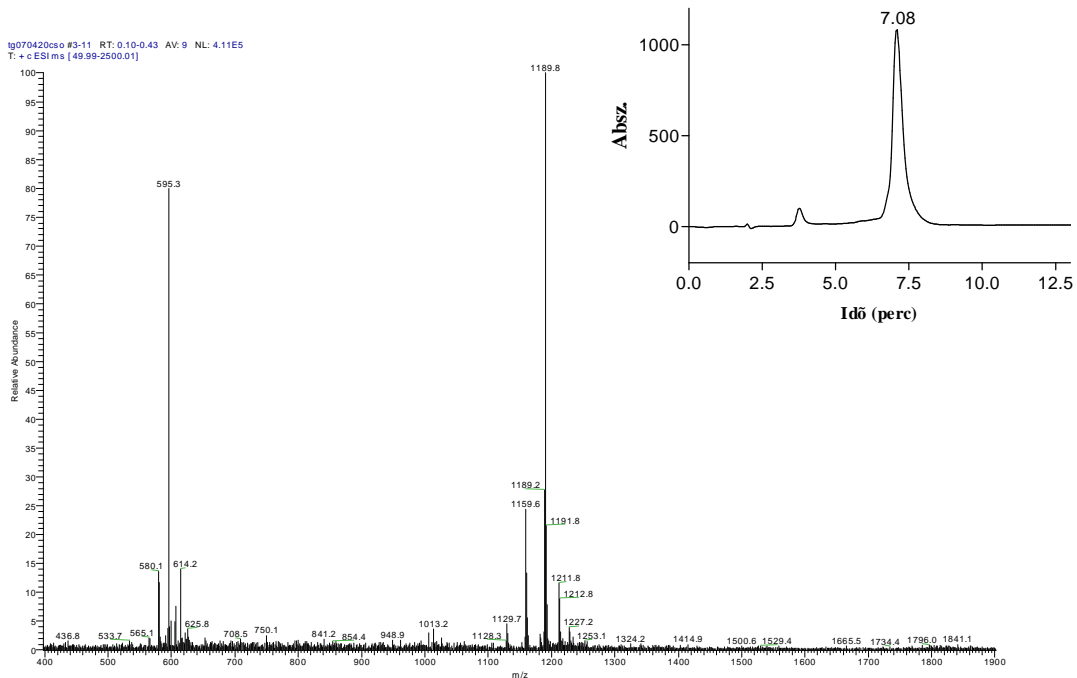


41. ábra Reakció körülmények: **1.** 5:95 (v/v %) H<sub>2</sub>O/TFA, RT, 2 óra, **2.** 1 ekv. DOTA, 1 ekv. HOAt, 1 ekv. HBTU, vízm. DMF, RT, 6 óra, **3.** 60:40:10 (v/v/v %) TFA/DCM/H<sub>2</sub>O, RT, 10 óra.

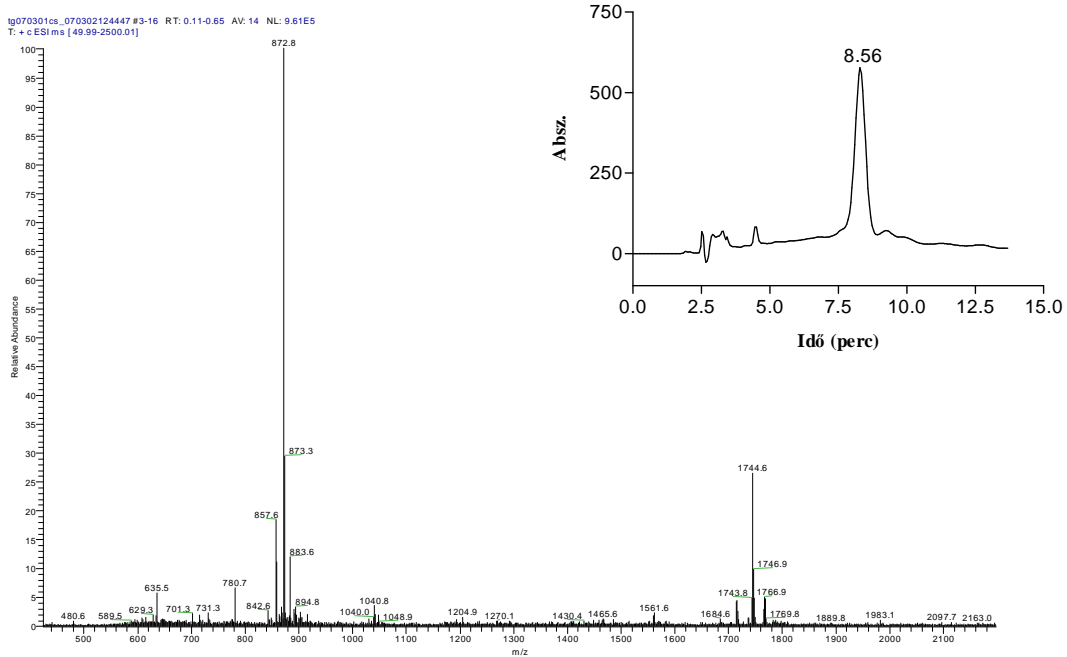




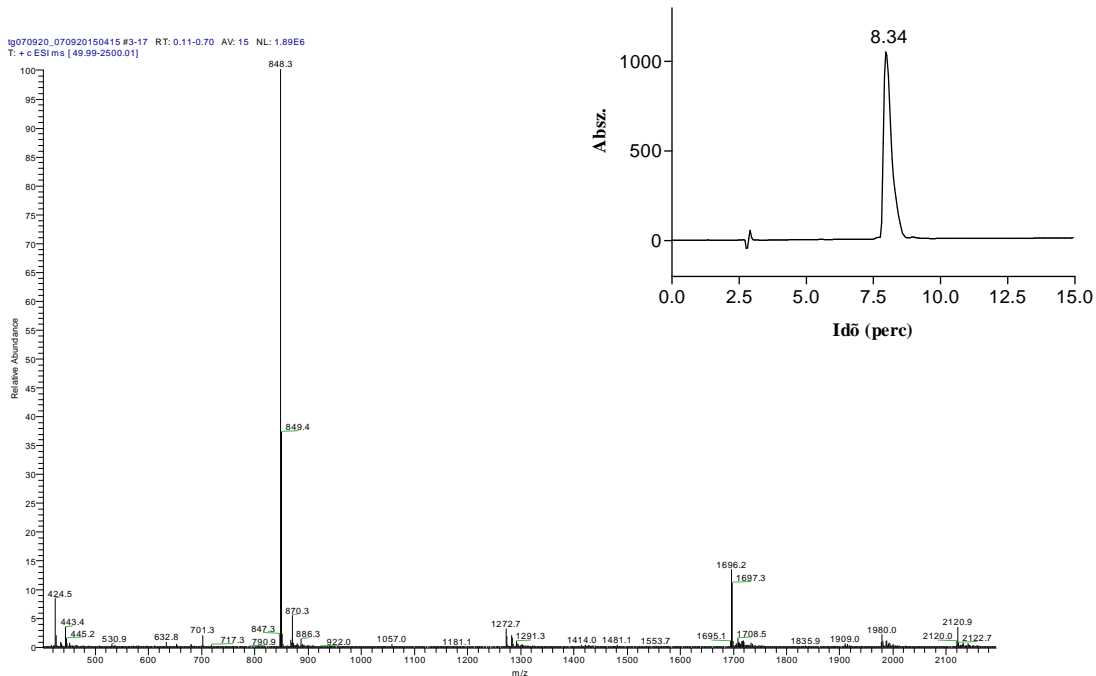
42. ábra Reakció körülmények: 1. DMF, RT, 3 óra, 2. 3 ekv. DCC, DCM, RT, 72 óra, 3. 02:08:90 (v/v/v %) anizol/DMS/HF, -5 °C, 10 óra.



43. ábra Az analitikai RP-HPLC kromatogramja és ESI-MS spektruma a tisztított kurkumint tartalmazó A prekuzornak. HPLC adatok: oldószerek (A) 0,1% TFA; (B) 80% ACN/ 0,1% TFA; 60-75% 15 min (B) lineáris gradiens, áramlási sebesség 1 ml/min, Phenomenex Jupiter 10 µm C18 300A



44. ábra Az analitikai RP-HPLC kromatogramja, valamint ESI-MS spektruma a tisztított kurkumint, valamint DOTA-t tartalmazó **B** prekuzornak. HPLC adatok: oldószerek (A) 0,1% TFA; (B) 80% ACN/ 0,1% TFA; 40-55% 15 min (B) lineáris gradiens, áramlási sebesség 1 ml/min, Phenomenex Jupiter 10  $\mu$ m C18 300A



45. ábra Az analitikai RP-HPLC kromatogramja, valamint ESI-MS spektruma a tisztított N-karboximetil hisztidint tartalmazó **C** prekuzornak. HPLC adatok: oldószerek (A) 0,1% TFA; (B) 80% ACN/ 0,1% TFA; 60-75% 15 min (B) lineáris gradiens, áramlási sebesség 1 ml/min, Phenomenex Jupiter 10  $\mu$ m C18 300A

## 5. Általános kísérleti rész

A kísérletekben felhasznált vegyszereket a következő cégektől szereztük be:

- a) kapcsolószerek: BACHEM, Iris Biotech GmbH;
- b) aldehidek, sav-kloridok, savanhidridek, bázisok, TFA: Fluka, Sigma Aldrich;
- c) aminosavak: Reanal, ChemImpex, Orpegen;
- d) L-triptofán-metilészter\*HCl: ChemImpex;
- e) oldószerek: Sigma Aldrich, Promochem, Alfa Aesar, Merck;
- f) gyanták: Senn Chemicals, Varian, BioMatrix Inc.;

A tisztított anyagok analitikai RP-HPLC ellenőrzését valamint a reakciók követését Agilent 1100, Agilent 1200 készülékek segítségével végeztem.

RP-HPLC kromatográfiás tisztításokat Knauer (Knauer pumpa 64, UV-VIS detektor 64). Shimadzu (LC-10AD Shimadzu pumpa, SPD-20A Shimadzu UV-VIS detektor), Shimadzu (LC-20AD Shimadzu pumpa, SPD-20A Shimadzu UV-VIS detektor) készülékeken végeztem.

A tömegspektrumok Finningan TSQ 7000 készülékkel készültek ESI ionizációs technikával.

A fumitremorgin analógok szintézise során, egyes esetekben, a reakciók lefutását vékonyréteg kromatográfiával is követtem, Kieselgel 60 (Merck) 0,2 mm vastagságú lapokat használva. A fumitremorgin analógokban lévő aromás részeknek köszönhetően az anyagok detektálására 200-400 nm-ig terjedő UV-lámpát alkalmaztam és határoztam meg az  $R_f$  értékeket. Az  $R_f$ -értékeket a következő oldószerekben határoztam meg: (A) EtOAc:hexán (10:90 v/v%), (B) EtOAc:DCM (20:80 v/v%). A folyadékkromatográfiás elválasztásokat BÜCHI (BÜCHI C-615 pumpa, BÜCHI C-601 vezérlő) készülék segítségével végeztem, boroszilikát 3.3 típusú oszlopok segítségével, 0,015-0,040 mm szemcseméretű szilikagélt (Merck) használva.

Az NMR spektrumok felvétele BrukerAvance III 600 készülékkel történt 298 °K-en ( $^1\text{H}$ : 600,2 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 150,05 MHz). A mérésekhez használt deuterált oldószer dimetilszulfoxid (DMSO- $d_6$ ) volt. A spektrumok leírásánál felhasznált rövidítések: d: dublett; s: szingulett; dd: dupla dublett; t: triplett; és m: multipllett. A kémiai eltolódások ppm értékben vannak megadva, viszonyítva egy belső standardhoz, tetrametilszilánhoz (TMS), valamint a csatolási értékek (J) Hz-ben.

## 6. Részletes kísérleti rész

### 6.1 Fumitremorgin analógok tervezése és szintézise

A nyers fumitremorgin analógok tisztítását Phenomenex Jupiter 10  $\mu$  C18 300A (250x15 mm) preparatív oszlopon végeztem, (A) 0.1% TFA valamint (B) 80% ACN/ 0.1 TFA eluenseket használva, 4 ml/min áramlási sebességgel, 278 nm-en.

A reakciók lejátszódásának követése Phenomenex Luna 5  $\mu$  C18 300A oszlopon történt, (A) 0.1% TFA; (B) 80% ACN/ 0.1% TFA eluenseket használva, 1 ml/min áramlási sebességgel, 278 nm-en.

**6.1.1 A III.a1 (*1S,3S,3'S*), III.a1 (*1R,3S,3'S*); III.a2 (*1S,3S,3'S*), III.a2 (*1R,3S,3'S*); III.a3 (*1S,3S,3'S*), III.a3 (*1R,3S,3'S*); III.a4 (*1S,3S,3'S*), III.a4 (*1R,3S,3'S*) fumitremorgin analógok szilárd fázisú szintézise**

Boc-Arg(Tos)-Merrifield (2,00 mmol, 4,00 g, borítottság: 0,50 mmol/g) gyantát használtam kiindulási anyagként. Első lépésben a Boc-védőcsoport eltávolítása érdekében, hozzáadtam a gyantához TFA/DCM oldatot (2x10 ml, 50 v/v%) oldatot és 5 illetve 25 percen át kevertettem. Ezután kimostam a gyantát: DCM (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DCM (3x10 ml) oldószerrel, semlegesítettem TEA/DCM (2x10 ml, 10 v/v%) oldattal, majd újból kimostam a gyantát a fent említett módon. A következő aminosav kapcsolás érdekében feloldottam Boc-L-Trp-OH (6,00 mmol, 1,82 g) aminosavat és DCC (6,00 mmol, 1,23 g) kapcsolószert DCM-ban (10 ml), hozzáöntöttem a gyantához és 3 órán át kevertettem. A kapcsolási reakció után kimostam a gyantát: DCM (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DCM (3x10 ml) oldószerrel, majd mintát vettem és ninhidrin-teszttel ellenőriztem a kapcsolási reakciót. Negatív teszteredmény után, a Boc-védőcsoport hasítása érdekében hozzáadtam a gyantához kétszer TFA/DCM (2x10 ml, 50 v/v%) oldatot és 5 perc, illetve 25 percen át kevertettem, ezt követően kimostam a gyantát: DCM (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DCM (3x10 ml) oldószerrel. A következő lépésben négyfelé osztottam a gyantát és mind a négy esetben különböző aldehideket használtam a Pictet-Spengler kondenzációhoz. Hozzáadtam külön-külön mind a négy gyantához TFA/DCM (10 ml, 10 v/v%) oldatot, majd pedig az első rész gyantához hozzáadtam acetaldehidet (5,00 mmol, 0,28 ml, 10 ekv.), a második rész gyantához propionaldehidet (5,00 mmol, 0,36 ml, 10 ekv.), a harmadik rész gyantához butiraldehidet (0,45 ml, 5 mmol, 10 ekv.) és végül a negyedik rész gyantához benzaldehidet (0,52 ml, 5,00

mmol, 10 ekv.). 16 óra elteltével a gyantákat kimostam DCM (4x10 ml), MeOH (4x10 ml), DCM (4x10 ml) oldószerekkel.

Az analógok gyantáról való lehasítása HF-al történt, gyökfogók jelenlétében. Minden egyes esetben hozzáadtam a gyantához (1,00 g) HF-ot (20 ml) valamint anizolt (0,40 ml), dimetil-szulfidot (1,60 ml), p-krezolt (0,40 ml), majd 60 percen át, -5°C-on kevertetem. 45 perc eltelte után a gyantáról lepároltam a HF-ot, majd dietil-éterrel (3x30 ml) mostam. Az analógok leoldása a gyantáról ACN-el (10 ml) és H<sub>2</sub>O-el (50 ml) történt. Ezt követte az oldat liofilizálása. Az előállított fumitremorgin analógok analitikai paramétereit az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat Az előállított fumitremorgin analógok analitikai paramétereit

| Vegyület kód   | [M+H] <sup>+</sup><br>MS (ESI <sup>+</sup> )<br><i>m/z</i> mért | Analitikai<br>HPLC<br>gradiens | t <sub>R</sub> (perc)<br>(a tisztított analóg analitikai<br>HPLC retenciósi ideje)                      | m <sub>nyers</sub><br>(g) | m <sub>tiszta</sub><br>(g) |
|--|---|--------------------------------|---|---------------------------|----------------------------|
| <b>III.a1</b> ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br><b>III.a1</b> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) | 387   | 25-45 % (B)<br>20 perc         | t <sub>R III.a1</sub> ( <i>IS,3S,3'S</i> ) = 8,78<br>t <sub>R III.a1</sub> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) = 9,11  | 0,19                      | 0,032                      |
| <b>III.a2</b> ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br><b>III.a2</b> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) | 401   | 15-30 % (B)<br>15 perc         | t <sub>R III.a2</sub> ( <i>IS,3S,3'S</i> ) = 9,31<br>t <sub>R III.a2</sub> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) = 10,16 | 0,12                      | 0,025                      |
| <b>III.a3</b> ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br><b>III.a3</b> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) | 415   | 20-30 % (B)<br>10 perc         | t <sub>R III.a3</sub> ( <i>IS,3S,3'S</i> ) = 6,13<br>t <sub>R III.a3</sub> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) = 6,46  | 0,22                      | 0,040                      |
| <b>III.a4</b> ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br><b>III.a4</b> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) | 449   | 35-45 % (B)<br>15 perc         | t <sub>R III.a4</sub> ( <i>IS,3S,3'S</i> ) = 8,11<br>t <sub>R III.a4</sub> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) = 8,48  | 0,18                      | 0,027                      |

**6.1.2 A III.b1 (*IS,3S,3'S*), III.b1 (*IR,3S,3'S*); III.b2 (*IS,3S,3'S*), III.b2 (*IR,3S,3'S*); III.b3 (*IS,3S,3'S*), III.b3 (*IR,3S,3'S*); III.b4 (*IS,3S,3'S*), III.b4 (*IR,3S,3'S*) fumitremorgin analógok szilárd fázisú szintézise**

Boc-Glu(OcHex)-Merrifield (2,22 g, 2,00 mmol, borítottság: 0,9 mmol/g) gyantát használtam kiindulási anyagként. Az analógok szintézisét a 6.1.1 fejezetben leírtak alapján végeztem el. Az előállított fumitremorgin analógok analitikai paramétereit a 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat Az előállított fumitremorgin analógok analitikai paraméterei

| Vegyület   | [M+H] <sup>+</sup><br>MS (ESI <sup>+</sup> )<br><i>m/z</i> mért | Analitikai<br>HPLC<br>gradiens | <i>t<sub>R</sub></i> (perc)<br>(a tisztított analóg RP-<br>HPLC retenció ideje)  | <i>m</i> <sub>nyers</sub><br>(g) | <i>m</i> <sub>tiszta</sub><br>(g) |
|--|---|--------------------------------|--|----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>III.b1</b> ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br><b>III.b1</b> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) | 360   | 25-40 % (B)<br>15 perc         | <i>t<sub>R</sub></i> <b>III.b1</b> ( <i>IS,3S,3'S</i> ) = 8,74<br><i>t<sub>R</sub></i> <b>III.b1</b> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) = 9,29 | 0,18                             | 0,033                             |
| <b>III.b2</b> ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br><b>III.b2</b> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) | 374   | 15-30 % (B)<br>15 perc         | <i>t<sub>R</sub></i> <b>III.b2</b> ( <i>IS,3S,3'S</i> ) = 5,66<br><i>t<sub>R</sub></i> <b>III.b2</b> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) = 6,04 | 0,19                             | 0,028                             |
| <b>III.b3</b> ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br><b>III.b3</b> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) | 388   | 25-40 % (B)<br>15 perc         | <i>t<sub>R</sub></i> <b>III.b3</b> ( <i>IS,3S,3'S</i> ) = 8,02<br><i>t<sub>R</sub></i> <b>III.b3</b> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) = 8,66 | 0,23                             | 0,048                             |
| <b>III.b4</b> ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br><b>III.b4</b> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) | 422   | 35-45 % (B)<br>15 perc         | <i>t<sub>R</sub></i> <b>III.b4</b> ( <i>IS,3S,3'S</i> ) = 8,51<br><i>t<sub>R</sub></i> <b>III.b4</b> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) = 8,67 | 0,19                             | 0,027                             |

**6.1.3 A III.c1 (*IS,3S,3'S*), III.c1 (*IR,3S,3'S*); III.c2 (*IS,3S,3'S*), III.c2 (*IR,3S,3'S*); III.c3 (*IS,3S,3'S*), III.c3 (*IR,3S,3'S*); III.c4 (*IS,3S,3'S*), III.c4 (*IR,3S,3'S*) fumitremorgin analógok szilárd fázisú szintézise**

Boc-Asp(OcHex)-Merrifield (3,00 g, 2.00 mmol, borítottság: 0,66 mmol/g) gyantát használtam kiindulási anyagként. Az analógok szintézisét a **6.1.1** fejezetben leírtak alapján végeztem el. Az előállított fumitremorgin analógok analitikai paramétereit a **7. táblázat** tartalmazza.

7. táblázat Az előállított fumitremorgin analógok analitikai paraméterei

| Vegyület kód   | [M+H] <sup>+</sup><br>MS (ESI <sup>+</sup> )<br><i>m/z</i> mért | Analitikai<br>HPLC<br>gradiens | <i>t<sub>R</sub></i> (perc)<br>(a tisztított analóg RP-<br>HPLC retenció ideje)  | <i>m</i> <sub>nyers</sub><br>(g) | <i>m</i> <sub>tiszta</sub><br>(g) |
|--|---|--------------------------------|--|----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>III.c1</b> ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br><b>III.c1</b> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) | 346   | 17-32 % (B)<br>15 perc         | <i>t<sub>R</sub></i> <b>III.c1</b> ( <i>IS,3S,3'S</i> ) = 9,10<br><i>t<sub>R</sub></i> <b>III.c1</b> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) = 9,76 | 0,19                             | 0,035                             |
| <b>III.c2</b> ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br><b>III.c2</b> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) | 360   | 15-30 % (B)<br>15 perc         | <i>t<sub>R</sub></i> <b>III.c2</b> ( <i>IS,3S,3'S</i> ) = 7,03<br><i>t<sub>R</sub></i> <b>III.c2</b> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) = 7,44 | 0,17                             | 0,022                             |
| <b>III.c3</b> ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br><b>III.c3</b> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) | 374   | 28-38 % (B)<br>10 perc         | <i>t<sub>R</sub></i> <b>III.c3</b> ( <i>IS,3S,3'S</i> ) = 6,18<br><i>t<sub>R</sub></i> <b>III.c3</b> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) = 6,40 | 0,29                             | 0,052                             |
| <b>III.c4</b> ( <i>IS,3S,3'S</i> )<br><b>III.c4</b> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) | 408   | 35-45 % (B)<br>15 perc         | <i>t<sub>R</sub></i> <b>III.c4</b> ( <i>IS,3S,3'S</i> ) = 8,09<br><i>t<sub>R</sub></i> <b>III.c4</b> ( <i>IR,3S,3'S</i> ) = 8,11 | 0,15                             | 0,021                             |

**6.1.4 A III.d1 (1*S*,3*S*,3'*S*), III.d1 (1*R*,3*S*,3'*S*); III.d2 (1*S*,3*S*,3'*S*), III.d2 (1*R*,3*S*,3'*S*); III.d3 (1*S*,3*S*,3'*S*), III.d3 (1*R*,3*S*,3'*S*); III.d4 (1*S*,3*S*,3'*S*), III.d4 (1*R*,3*S*,3'*S*)** fumitremorgin analógok szilárd fázisú szintézise

Boc-Lys(2ClZ)-Merrifield (3,23 g, 2,00 mmol, borítottság: 0,61 mmol/g) gyantát használtam kiindulási anyagként. Az analógok szintézisét a **6.1.1** fejezetben leírtak alapján végeztem el. Az előállított analógok analitikai paramétereit a **8. táblázat** tartalmazza.

8. táblázat Az előállított fumitremorgin analógok analitikai paramétereit

| Vegyület   | [M+H] <sup>+</sup><br>MS (ESI <sup>+</sup> )<br><i>m/z</i> mért | Analitikai<br>HPLC<br>gradiens | <i>t<sub>R</sub></i> (perc)<br>(a tisztított analóg RP-<br>HPLC retenció ideje)  | <i>m<sub>nyers</sub></i><br>(g) | <i>m<sub>t</sub></i><br>(g) |
|--|---|--------------------------------|--|---------------------------------|-----------------------------|
| <b>III.d1 (1<i>S</i>,3<i>S</i>,3'<i>S</i>)<br/>III.d1 (1<i>R</i>,3<i>S</i>,3'<i>S</i>)</b> | 359   | 17-32 % (B)<br>15 perc         | <i>t<sub>R</sub></i> III.d1 (1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> , 3' <i>S</i> ) = 8,28<br><i>t<sub>R</sub></i> III.d1 (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> , 3' <i>S</i> ) = 8,72 | 0,27                            | 0,045                       |
| <b>III.d2 (1<i>S</i>,3<i>S</i>,3'<i>S</i>)<br/>III.d2 (1<i>R</i>,3<i>S</i>,3'<i>S</i>)</b> | 373   | 15-30 % (B)<br>15 perc         | <i>t<sub>R</sub></i> III.d2 (1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> , 3' <i>S</i> ) = 8,49<br><i>t<sub>R</sub></i> III.d2 (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> , 3' <i>S</i> ) = 8,99 | 0,29                            | 0,038                       |
| <b>III.d3 (1<i>S</i>,3<i>S</i>,3'<i>S</i>)<br/>III.d3 (1<i>R</i>,3<i>S</i>,3'<i>S</i>)</b> | 387   | 24-34 % (B)<br>10 perc         | <i>t<sub>R</sub></i> III.d3 (1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> , 3' <i>S</i> ) = 5,33<br><i>t<sub>R</sub></i> III.d3 (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> , 3' <i>S</i> ) = 5,67 | 0,22                            | 0,041                       |
| <b>III.d4 (1<i>S</i>,3<i>S</i>,3'<i>S</i>)<br/>III.d4 (1<i>R</i>,3<i>S</i>,3'<i>S</i>)</b> | 421   | 35-45 % (B)<br>15 perc         | <i>t<sub>R</sub></i> III.d4 (1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> , 3' <i>S</i> ) = 8,22<br><i>t<sub>R</sub></i> III.d4 (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> , 3' <i>S</i> ) = 8,70 | 0,26                            | 0,050                       |

**6.1.5 Az 1c (3*S*,6*S*,12*aS*), 1c (3*S*,6*R*,12*aS*); 2c (3*S*,6*S*,12*aS*), 2c (3*S*,6*R*,12*aS*); 4d (3*S*,6*S*,12*aS*), 4d (3*S*,6*R*,12*aS*); 3e1 (3*S*,6*S*,12*aS*), 3e1 (3*S*,6*R*,12*aS*); 3e2 (3*S*,6*S*,12*aS*), 3e2 (3*S*,6*R*,12*aS*); 3e3 (3*S*,6*S*,12*aS*), 3e3 (3*S*,6*R*,12*aS*); 3e4 (3*S*,6*S*,12*aS*), 3e4 (3*S*,6*R*,12*aS*); 3e5 (3*S*,6*S*,12*aS*), 3e5 (3*S*,6*R*,12*aS*); 3e6 (3*S*,6*S*,12*aS*), 3e6 (3*S*,6*R*,12*aS*)** fumitremorgin analógok oldat fázisú szintézise

L-triptofán-metilészterxHCl-ot (15 mmol, 3,83 g) DCM-ban (150 ml) szuszpendáltam, majd nátrium-hidrogénkarbonát oldattal (3x150 ml, 10 m/v%) és telített sóoldattal extraháltam (2x150 ml). Az így kapott szerves fázist szárítottam (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), szűrtem, majd acetonitrillel szárazra pároltam. A kapott L-triptofán-metilésztert (11 mmol, 2,54 g) feloldottam DCM-ban (200 ml), majd hozzáadtam izovaleraldehidet (55 mmol, 5,92 ml, 5

ekv.) valamint trifluoecetsavat (4,23 ml, 55 mmol, 5 ekv.). A reakcióelegyet szobahőmérsékleten, 16 órán át kevertettem. A reakcióidő lejárta után az elegyet szárazra pároltam, EtOAc-ban (500 ml) oldottam, majd az így kapott elegyet extraháltam nátrium-hidrogénszulfáttal (3x100 ml, 10 m/v%), nátrium-hidrogénkarbonáttal (3x100 ml, 10 m/v%) és végül telített sóoldattal (2x100 ml). Az így kapott szerves fázist szárítottam (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), szűrtem, majd vákuumbepárló segítségével szárazra pároltam. Vékonyréteg kromatográfiai módszer segítségével megállapítható volt, hogy a kiindulóanyag jelentős része elreagált a kívánt termék keletkezése közben, a használt eluens hexán:EtOAc (10 v/v%). A reakció analitikai HPLC segítségével is jól követhető volt. A keletkezett köztitermék **a (IS,3S)**, **a (IR,3S)** tömege: 2,12 g, retenciós ideje  $t_{R\ a\ (IS,3S)} = 10,28$ ;  $t_{R\ a\ (IR,3S)} = 10,74$ , 20-100%-ig (B) 20 perces lineáris gradienssel, MS (ESI<sup>+</sup>): m/z mért 287 ([M + H]).

A következő lépésben négyfelé osztottam az **a (IS,3S)**, **a (IR,3S)** terméket és négy különböző védett aminosavval reagáltattam.

#### 6.1.5.1 Az **1c (3S,6S,12aS)**, **1c (3S,6R,12aS)** fumitremorgin analóg szintézise

Egy lombikba kimértem **a (IS,3S)**, **a (IR,3S)** nyersteget (0,53 g, 1,85 mmol), feloldottam frissen desztillált DCM-ban (50 ml), hozzáadtam DIPEA-t (11,10 mmol, 1,90 ml, 6 ekv.), majd az elegyet 30 percen keresztül inert körülmények között kevertettem, Ar atmoszféra alatt. Ezzel párhuzamosan kimértem Fmoc-L-Homophe-OH aminosavat (5,55 mmol, 2,22 g, 3 ekv.), valamint TCFH kapcsolószert (5,55 mmol, 1,55 g), ezen anyagokat szintén feloldottam frissen desztillált DCM-ban (50 ml), majd a 30 perc előaktiválás elteltével hozzáadtam a lombikban lévő elegyhez. A reakciót 10 órán át kevertettem szobahőmérsékleten, Ar atmoszféra alatt. A reakciót analitikai RP-HPLC-n követtem, a reakcióidő előrehaladtával jól követhető volt a kiindulási anyag elreagálása és ezzel egyidőben a kívánt termék keletkezése. A reakció lejárta után az elegyet DCM-nal hígítottam (100 ml), majd kálium-hidrogénszulfát oldattal (3x150 ml, 10 m/v%), nátrium-hidrogénkarbonát oldattal (3x150 ml), majd telített sóoldattal extraháltam (2x150 ml). A kapott szerves fázist szárítottam (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), szűrtem, majd vákuumbepárló segítségével szárazra pároltam. A keletkezett nyers köztitermék **1b (IS,3S,2'S)**, **1b (IR,3S,2'S)** tömege: 0,62 g. A következő lépésben megtisztítottam az **1b (IS,3S,2'S)**, **1b (IR,3S,2'S)** nyers köztitermeget (2x0,12 g) és a tisztított diasztereomer keveréket használtam fel a további reakcióhoz. A tisztítást 40-100%-ig (B) 60 perces lineáris gradienssel végeztem. A tisztított intermedier **1b (IS,3S,2'S)**, **1b (IR,3S,2'S)** tömege: 0,068 g, retenciós ideje  $t_{R\ 1b\ (IS,3S,2'S)} =$



24,91;  $t_{R\ 1b(1R,3S,2'S)} = 25,21$ , 20-100%-ig (B) 20 perces lineáris gradienssel, MS (ESI<sup>+</sup>): m/z mért 669 ([M + H]).

A következő lépésben a Fmoc-védőcsoport eltávolítását valamint az intramolekuláris gyűrűzáródást egy lépésben végeztem, piperidin/DCM oldattal (10 v/v%). A reakciót szintén analitikai RP-HPLC-n követtem és a kiindulási anyag eltűnése után (30 perc) a reakció elegyet ecetsavval kisavanyítottam (pH = 4), majd bepároltam és feloldottam ACN/H<sub>2</sub>O elegyben (5 ml, 20 v/v%), ezt követően újabb tisztítást végeztem, 30-90%-ig (B) 60 perces lineáris gradienssel. A tisztítás során az **1c (3S,6S,12aS)** valamint az **1c (3S,6R,12aS)** diasztereoisomer fomitremorgin analógokat sikeresen elválasztottam. A tisztított analógok tömege: 0,052 g **1c (3S,6S,12aS)**, 0,030 g **1c (3S,6R,12aS)**, retenciós ideje  $t_{R\ 1c(3S,6S,12aS)} = 7,28$ ;  $t_{R\ 1c(3S,6S,12aS)} = 7,86$ , 70-85%-ig (B) 15 perces lineáris gradienssel, MS (ESI<sup>+</sup>): m/z mért 415 ([M + H]).

#### 6.1.5.2 A **2c (3S,6S,12aS)**, **2c (3S,6R,12aS)** fomitremorgin analóg szintézise

Egy lombikba kimértem **a (1S,3S)**, **a (1R,3S)** nyersterméket (1,85 mmol, 0,53 g), majd a kapcsolási reakciót, valamint a reakció feldolgozását a **6.1.5.1** fejezetben leírtak alapján végeztem, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben kapcsolt aminosavként Fmoc-L-Nva-(5-phenyl)-OH-t használtam (5,55 mmol, 2,30 g, 3 ekv.).

A **2b (1S,3S,2'S)**, **2b (1R,3S,2'S)** nyers köztitermék tömege: 0,460 g, retenciós ideje  $t_{R\ 2b(1S,3S,2'S)} = 22,75$ ;  $t_{R\ 2b(1R,3S,2'S)} = 22,98$ , 20-100%-ig (B) 20 perces lineáris gradienssel, MS (ESI<sup>+</sup>): m/z mért 683 ([M + H]). A következő lépésben a **2b (1S,3S,2'S)**, **2b (1R,3S,2'S)** nyers köztiterméket megtisztítottam (2x0,12 g) és a tisztított diasztereomer keveréket használtam fel a további reakcióhoz.

A tisztítás 40-100%-ig (B) 60 perces lineáris gradienssel történt. A tisztított diasztereomer keverék **2b (1S,3S,2'S)**, **2b (1R,3S,2'S)** tömege: 0,052 g.

A következő lépésben a Fmoc-védőcsoport eltávolítását, valamint az intramolekuláris gyűrűzárást szintén a **6.1.5.1** fejezetben leírtak alapján végeztem, majd a feldolgozást követően újabb tisztítást végeztem, 30-60%-ig (B) 60 perces lineáris gradienssel. A tisztítás során a **2c (3S,6S,12aS)**, valamint a **2c (3S,6R,12aS)** diasztereomer fomitremorgin analógokat sikeresen elválasztottam. A tisztított analógok tömege: 0,045 g **2c (3S,6S,12aS)**, 0,037 g **2c (3S,6R,12aS)**, retenciós ideje  $t_{R2c(3S,6S,12aS)} = 7,85$ ;  $t_{R2c(3S,6R,12aS)} = 7,97$ , 70-85%-ig (B), 15 perces lineáris gradienssel, MS (ESI<sup>+</sup>): m/z mért 429 ([M + H]).

**6.1.5.3** Az **3e1** (*3S,6S,12aS*), **3e1**(*3S,6R,12aS*); **3e2** (*3S,6S,12aS*), **3e2** (*3S,6R,12aS*); **3e3** (*3S,6S,12aS*), **3e3** (*3S,6R,12aS*); **3e4** (*3S,6S,12aS*), **3e4** (*3S,6R,12aS*); **3e5** (*3S,6S,12aS*), **3e5** (*3S,6R,12aS*); **3e6** (*3S,6S,12aS*), **3e6** (*3S,6R,12aS*) fumitremorgin analóg szintézise

Egy lombikba szintén kimértem **a** (*1S,3S*), **a** (*1R,3S*) nyersterméket (1,85 mmol, 0,53 g), majd a kapcsolási reakciót, valamint a reakció feldolgozását a **6.1.5.1** fejezetben leírtak alapján végeztem, ebben az esetben kapcsolt aminosavként Fmoc-L-Dab(Boc)-OH-t használtam (5,55 mmol, 2,44 g, 3 ekv.).

A **3b** (*1S,3S,2'S*), **3b** (*1R,3S,2'S*) nyers köztitermék tömege: 0,64 g, retenciós ideje  $t_{R\ 3b\ (1S,3S,2'S)} = 23.45$ ;  $t_{R\ 3b\ (1R,3S,2'S)} = 24.18$ , 20-100%-ig (B) 20 perces lineáris gradienssel, MS (ESI<sup>+</sup>): m/z mért 708 ([M + H]). A **3b** (*1S,3S,2'S*), **3b** (*1R,3S,2'S*) nyers köztiterméket megtisztítottam és a tisztított diasztereomer keveréket használtam fel a további reakcióhoz. A tisztítás 40-100%-ig (B) 60 perces lineáris gradienssel történt. A tisztított diasztereomer keverék **3b** (*1S,3S,2'S*), **3b** (*1R,3S,2'S*) tömege: 0,330 g.

A következő lépésben a Fmoc-védőcsoport eltávolítását, valamint az intramolekuláris gyűrűzáródást szintén a **6.1.5.1** fejezetben leírtak alapján végeztem. A keletkezett **3c** (*3S,6S,12aS*), **3c** (*3R,6S,12aS*) köztitermék (diasztereomer keverék) tömege: 0,28 g, retenciós ideje  $t_{R\ 3c\ (3S,6S,12aS)} = 15,47$ ;  $t_{R\ 3c\ (3R,6S,12aS)} = 16,08$  , 20-100%-ig (B) 20 perces lineáris gradienssel, MS (ESI<sup>+</sup>): m/z mért 454 ([M + H]).

A továbbiakban az oldalláncban lévő Boc-védőcsoport eltávolítás érdekében hozzáadtam a bepárolt anyaghoz TFA/DCM oldatot (5 ml, 50 v/v%), reakció idő 1 óra. A reakció lejátszódását szintén analitikai HPLC-n követtem. A **3d** (*1S,3S,2'S*), **3d** (*1R,3S,2'S*) köztitermék (diasztereomer keverék) tömege: 0,20 g, retenciós ideje  $t_{R\ 3d\ (1S,3S,2'S)} = 9,40$ ;  $t_{R\ 3d\ (1R,3S,2'S)} = 10,13$ , 20-100%-ig (B) 20 perces lineáris gradienssel, MS (ESI<sup>+</sup>): m/z mért 354 ([M + H]).

A **3d** (*1S,3S,2'S*), **3d** (*1R,3S,2'S*) nyers köztiterméket bepároltam, feloldottam ACN/H<sub>2</sub>O elegyben (50 ml, 20v/v%), majd egy újabb tisztítás következett. A tisztítás 40-80%-ig (B) 60 perces lineáris gradienssel történt. A tisztított intermedier **3d** (*1S,3S,2'S*), **3d** (*1R,3S,2'S*) tömege: 0,09 g. Az utolsó lépésben **3d** (*1S,3S,2'S*), **3d** (*1R,3S,2'S*) intermediert hatfelé osztottam és hat különböző acilezőszerrel reagáltattam. Mindegyik esetben azonos reakciókörülmények között végeztem az acilezési reakciót, a tisztított **3d** (*1S,3S,2'S*), **3d** (*1R,3S,2'S*) köztiterméket (0,042 mmol, 0,014 g), feloldottam DCM-ban (5 ml), hozzáadtam

TEA-t (0,168 mmol, 23,28  $\mu$ l, 4 ekv.), majd 30 perc után hozzáadtam az elegyekhez az acilezőszert:

- a. propionsav-kloridot (0,084 mmol, 7,33  $\mu$ l, 2 ekv.)
- b. pivalinsav-kloridot (0,084 mmol, 10,44  $\mu$ l, 2 ekv.)
- c. ecetsavanhidridet (0,084 mmol, 8,40  $\mu$ l, 2 ekv.)
- d. benzoil-kloridot (0,084 mmol, 8,43  $\mu$ l, 2 ekv.)
- e. izovaleril-kloridot (0,084 mmol, 10,33  $\mu$ l, 2 ekv.)
- f. kaprilsavat (0,084 mmol, 13,31  $\mu$ l, 2 ekv.)

A reakciókat analitikai RP-HPLC-n követtem, 1 óra elteltével a reakciókat kisavanyítottam (pH = 5), bepároltam és feloldottam ACN/H<sub>2</sub>O elegyben (5 ml, 10 v/v%), majd liofilizáltam. A keletkezett diasztereomer keverékeket megtisztítottam. A tisztítás preparatív HPLC-n történt, 40-80%-ig (B) 80 perces lineáris gradienssel. Az előállított fumitremorgin **3e1** (3*S*,6*S*,12*aS*), **3e1**(3*S*,6*R*,12*aS*); **3e2** (3*S*,6*S*,12*aS*), **3e2** (3*S*,6*R*,12*aS*); **3e3** (3*S*,6*S*,12*aS*), **3e3** (3*S*,6*R*,12*aS*); **3e4** (3*S*,6*S*,12*aS*), **3e4** (3*S*,6*R*,12*aS*); **3e5** (3*S*,6*S*,12*aS*), **3e5** (3*S*,6*R*,12*aS*); **3e6** (3*S*,6*S*,12*aS*), **3e6** (3*S*,6*R*,12*aS*) analógok analitikai paramétereit az 9. táblázat tartalmazza.

**3e2** (3*S*,6*S*,12*aS*) <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  0.76 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, ib), 0.94 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, ib), 1.08 (s, 9H, tb), 1.50-1.42 (m, 1H, ib), 1.54 (ddd, *J* = 13.1, 8.6, 4.6 Hz, 1H,ib), 1.61 (ddd, *J* = 13.1, 8.7, 4.5 Hz, 1H, ib), 1.82 (dt, *J* = 13.5, 6.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 2.07 (dt, *J* = 13.2, 7.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 2.84 (dd, *J* = 15.5, 11.8 Hz, 1H, H-12), 3.17 (dt, *J* = 13.1, 5.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 3.30 (dt, *J* = 13.2, 7.1 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 3.36 (dd, *J* = 15.6, 5.1 Hz, 1H, H-12), 4.00 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, H-3), 4.15 (dd, *J* = 11.7, 4.9 Hz, 1H, H-12a), 5.36 (dd, *J* = 8.5, 4.5 Hz, 1H, H-6), 7.01 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-10), 7.09-7.06 (m, 1H, H-9), 7.36 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-8), 7.53 (dd, *J* = 9.8, 6.7 Hz, 2H, H-11, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 8.32 (s, 1H, H-2), 11.10 (s, 1H, H-7); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  C:21.8, 22.6, 24.2, 24.6, 27.9, 30.3, 36.0, 46.1, 50.6, 52.2, 55.7, 105.8, 111.8, 118.2, 119.2, 121.3, 126.3, 135.5, 136.2, 169.8, 170.2

**3e3** (3*S*,6*S*,12*aS*) <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  0.76 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, ib), 0.93 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, ib), 1.50-1.42 (m, 1H, ib), 1.54 (ddd, *J* = 13.1, 8.6, 4.6 Hz, 1H, ib), 1.60 (ddd, *J* = 13.1, 8.6, 4.5 Hz, 1H, ib), 1.84-1.75 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH, Me), 2.05 (td, *J* = 13.7, 6.9 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 2.84 (dd, *J* = 15.5, 11.8 Hz, 1H, H-12), 3.17-3.11 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 3.29 (td, *J* = 13.4, 6.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 3.36 (dd, *J* = 15.6, 5.1 Hz, 1H, H-12), 4.01 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, H-3), 4.14 (dd, *J* = 11.7, 4.9 Hz, 1H, H-12a), 5.36 (dd, *J* = 8.5, 4.5 Hz, 1H, H-6), 7.01 (dd, *J* = 10.9, 3.9 Hz, 1H, H-10), 7.09-7.05 (m, 1H, H-9), 7.36 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-8), 7.54 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-11), 7.86 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 8.37 (s, 1H, H-2),

11.09 (s, 1H, H-7); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 21.3, 22.1, 22.6, 23.7, 24.1, 29.7, 35.2, 45.7, 50.0, 51.5, 55.2, 105.3, 111.4, 117.7, 118.7, 120.8, 125.8, 135.0, 135.7, 169.1, 169.1, 169.7

**3e3 (3*S*,6*R*,12*aS*)** <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.92 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, ib), 1.06 (d, *J* = 5.8 Hz, 3H, ib), 1.66-1.58 (m, 2H, ib, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 1.74-1.67 (m, 1H, ib), 1.77 (s, 3H, Me), 1.90-1.82 (m, 2H, ib), 2.76 (dd, *J* = 14.8, 12.2 Hz, 1H, H-12), 3.12-3.05 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 3.25-3.18 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH, H-12), 4.00-3.95 (m, 1H, H-3), 4.32 (dd, *J* = 11.9, 4.3 Hz, 1H, H-12a), 5.75 (dd, *J* = 11.6, 2.8 Hz, 1H, H-6), 6.98 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-10), 7.07 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-9), 7.32 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-8), 7.42 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-11), 7.86 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 8.42 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H-2), 11.02 (s, 1H, H-7); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 22.4, 23.0, 23.9, 25.1, 27.9, 35.3, 36.3, 39.6, 39.7, 39.9, 40.0, 40.1, 40.3, 40.4, 42.7, 47.7, 52.3, 52.9, 105.2, 111.6, 118.3, 119.2, 121.6, 126.5, 134.8, 136.4, 165.8, 167.0, 170.1

**3e4 (3*S*,6*S*,12*aS*)** <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.75 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, ib), 0.94 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, ib), 1.51-1.41 (m, 1H, ib), 1.58-1.51 (m, 1H, ib), 1.64-1.58 (m, 1H, ib), 2.01-1.93 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 2.25-2.18 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 2.86 (dd, *J* = 15.3, 11.9 Hz, 1H, H-12), 3.37 (dd, *J* = 15.6, 4.9 Hz, 1H, H-12), 3.44 (td, *J* = 12.8, 6.3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 3.54 (td, *J* = 13.0, 6.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 4.11 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, H-3), 4.18 (dd, *J* = 11.6, 4.8 Hz, 1H, H-12a), 5.38 (dd, *J* = 8.3, 4.3 Hz, 1H, H-6), 7.01 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-10), 7.07 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-9), 7.36 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-8), 7.45 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar), 7.51 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, Ar), 7.54 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-11), 7.86 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar), 8.42 (s, 1H, H-2), 8.51 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 11.10 (s, 1H, H-7); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 21.8, 22.5, 24.2, 24.6, 30.1, 36.5, 39.6, 39.7, 39.9, 40.0, 40.1, 40.3, 46.2, 50.6, 52.1, 55.7, 105.8, 111.9, 118.3, 119.2, 121.3, 126.3, 127.7, 128.7, 131.5, 135.0, 135.5, 136.2, 166.7, 169.8, 170.3.

**3e4 (3*S*,6*R*,12*aS*)** <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.92 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, ib), 1.06 (d, *J* = 5.8 Hz, 3H, ib), 1.67-1.59 (m, 2H, ib, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 1.90-1.83 (m, 2H, ib), 2.05-1.97 (m, 1H, ib), 2.82 (dd, *J* = 14.8, 12.3 Hz, 1H, H-12), 3.23 (dd, *J* = 15.2, 4.2 Hz, 1H, H-12), 3.46-3.33 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 4.06-4.03 (m, 1H, H-3), 4.35 (dd, *J* = 11.9, 4.3 Hz, 1H, H-12a), 5.76 (dd, *J* = 11.3, 2.8 Hz, 1H, H-6), 6.98 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-10), 7.07 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-9), 7.32 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-8), 7.45-7.39 (m, 3H, Ph), 7.49 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-11), 7.78 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, Ph), 8.46 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 8.51 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H-2), 11.01 (s, 1H, H-7); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13C: 22.0, 23.4, 24.6, 27.4, 35.7, 39.1, 39.2, 39.4, 39.5, 39.7, 39.8, 39.9, 42.3, 47.2, 51.9, 52.6, 104.7, 111.1, 117.8, 118.7, 121.1, 126.1, 127.1, 128.2, 131.1, 134.2, 134.3, 135.9, 165.4, 166.5, 166.6.

9. táblázat Az előállított fumitremorgin analógok analitikai paramétereit

| Vegyület kód                                       | [M+H] <sup>+</sup><br>MS (ESI <sup>+</sup> )<br>m/z mért | Analitikai<br>HPLC<br>gradiens | t <sub>R</sub> (perc)<br>(a tisztított analóg RP-<br>HPLC retenciósi ideje)      | m <sub>nyers</sub><br>(g) | m <sub>t</sub><br>(g)  |
|--|--|--------------------------------|--|---------------------------|--|
| <b>3e1 (3S,6S,12aS)</b><br><b>3e1 (3S,6R,12aS)</b> | 356  | 60-70% (B)<br>10 perc          | t <sub>R 3e1 (3S,6S,12aS)</sub> = 4,21<br>t <sub>R 3e1 (3S,6R,12aS)</sub> = 4,61 | 0,025                     | m <sub>t 3e1 (3S,6S,12aS)</sub> = 0,0035<br>m <sub>t 3e1 (3S,6R,12aS)</sub> = 0,0026 |
| <b>3e2 (3S,6S,12aS)</b><br><b>3e2 (3S,6R,12aS)</b> | 373  | 66-76% (B)<br>10 perc          | t <sub>R 3e2 (3S,6S,12aS)</sub> = 5,21<br>t <sub>R 3e2 (3S,6R,12aS)</sub> = 5,36 | 0,032                     | m <sub>t 3e2 (3S,6S,12aS)</sub> = 0,0014<br>m <sub>t 3e2 (3S,6R,12aS)</sub> = 0,0041 |
| <b>3e3 (3S,6S,12aS)</b><br><b>3e3 (3S,6R,12aS)</b> | 387  | 55-65% (B)<br>10 perc          | t <sub>R 3e3 (3S,6S,12aS)</sub> = 4,14<br>t <sub>R 3e3 (3S,6R,12aS)</sub> = 4,25 | 0,036                     | m <sub>t 3e3 (3S,6S,12aS)</sub> = 0,0025<br>m <sub>t 3e3 (3S,6R,12aS)</sub> = 0,0036 |
| <b>3e4 (3S,6S,12aS)</b><br><b>3e4 (3S,6R,12aS)</b> | 421  | 65-75% (B)<br>10 perc          | t <sub>R 3e4 (3S,6S,12aS)</sub> = 5,51<br>t <sub>R 3e4 (3S,6R,12aS)</sub> = 5,71 | 0,042                     | m <sub>t 3e4 (3S,6S,12aS)</sub> = 0,0045<br>m <sub>t 3e4 (3S,6R,12aS)</sub> = 0,0042 |
| <b>3e5 (3S,6S,12aS)</b><br><b>3e5 (3S,6R,12aS)</b> | 359  | 53-68% (B)<br>10 perc          | t <sub>R 3e5 (3S,6S,12aS)</sub> = 8,35<br>t <sub>R 3e5 (3S,6R,12aS)</sub> = 8,56 | 0,038                     | m <sub>t 3e5 (3S,6S,12aS)</sub> = 0,0029<br>m <sub>t 3e5 (3S,6R,12aS)</sub> = 0,0057 |
| <b>3e6 (3S,6S,12aS)</b><br><b>3e6 (3S,6R,12aS)</b> | 373  | 70-80% (B)<br>10 perc          | t <sub>R 3e6 (3S,6S,12aS)</sub> = 5,51<br>t <sub>R 3e6 (3S,6R,12aS)</sub> = 5,86 | 0,054                     | m <sub>t 3e6 (3S,6S,12aS)</sub> = 0,0034<br>m <sub>t 3e6 (3S,6R,12aS)</sub> = 0,0036 |

#### 6.1.5.4 A **4d (3S,6S,12aS)**, **4d (3S,6R,12aS)** fumitremorgin analóg szintézise

Egy lombikba kimértem **a (1S,3S)**, **a (1R,3S)** nyersterméket (1,85 mmol, 0,53 g.), majd a kapcsolási reakciót, valamint a reakció feldolgozását szintén a **6.1.5.1** fejezetben leírtak alapján végeztem, aminosavként Boc-L-Nle-OH-t használtam (5,55 mmol, 1,28 g, 3 ekv.).

A **4b (1S,3S,2'S)**, **4b (1R,3S,2'S)** nyers köztitermék (diasztereomer keverék) tömege: 0,25 g, retenciósi ideje t<sub>R 4b (1S,3S,2'S)</sub> = 21,13; t<sub>R 4b (1R,3S,2'S)</sub> = 21,41, 20-100%-ig (B) 20 perces lineáris gradienssel, MS (ESI<sup>+</sup>): m/z mért 500 ([M + H]).

A következő lépésben az oldalláncban lévő Boc-védőcsoport eltávolítás érdekében hozzáadtam **4b (1S,3S,2'S)**, **4b (1R,3S,2'S)** nyers köztitermékhez TFA/DCM oldatot (5 ml, 50 v/v%), reakció ideje 1 óra. A reakció lejátszódását szintén analitikai HPLC-n követtem és a reakció előrehaladtával jól megfigyelhető volt a kívánt termék keletkezése.

A kapott **4c (1S,3S,2'S)**, **4c (1R,3S,2'S)** termék tömege: 0,14 g, retenciósi ideje t<sub>R 4c (1S,3S,2'S)</sub> = 15,03; t<sub>R 4c (1R,3S,2'S)</sub> = 15,23, 20-100%-ig (B) 20 perces lineáris gradienssel, MS (ESI<sup>+</sup>): m/z mért 708 ([M + H]).

A következő lépésben szintén a nyerstermékkel indultam tovább, elvégeztem az intramolekuláris gyűrűzárást piperidin/DCM oldattal (5 ml, 10 v/v%). A reakciót szintén analitikai HPLC-n követtem és a kiindulási anyag elreagálása után (30 perc), a reakcióelegyet ecetsavval kisavanyítottam (pH = 4), majd bepároltam és feloldottam ACN/H<sub>2</sub>O elegyben (5 ml, 20 v/v%), ezt követően újabb tisztítást végeztem 30-90%-ig (B) 60 perces lineáris gradienssel. A tisztítás során a **4d** (*3S,6S,12aS*), valamint a **4d** (*3R,6S,12aS*) diasztereomer fumitremorgin analógokat sikeresen elválasztottam egymástól. A tisztított analógok **4d** (*3S,6S,12aS*), **4d**(*3R,6S,12aS*) tömege: 0,0056 g **4d** (*3S,6S,12aS*), 0,0047 g **4d**(*3R,6S,12aS*), retenciósideje  $t_{R \text{ 4d } (3S,6S,12aS)} = 6,82$ ;  $t_{R \text{ 4d } (3R,6S,12aS)} = 7,13$ , 70-80%-ig (B) 10 perces lineáris gradienssel, MS (ESI<sup>+</sup>): m/z mért 500 ([M + H]).

**6.1.6** Az **1c'**(*3S,6S,12aS*), **1c'**(*3R,6S,12aS*); **2c'**(*3S,6S,12aS*), **2c'**(*3R,6S,12aS*) fumitremorgin analógok oldat fázisú szintézise

Kiindulási anyagként szintén L-triptofán-metilészter\*HCl-ot használtam (15 mmol, 3,83 g) és a **6.1.5** fejezetben leírtakhoz hasonlóan felszabadítottam sójából. Az így kapott L-triptofán-metilésztert (10 mmol, 2,20 g) kettéosztottam, és mindkét esetben feloldottam DCM-ban (100 ml). A továbbiakban a Pictet-Spengler reakcióhoz két különböző aldehidet alkalmaztam benzaldehidet (2,96 ml, 25 mmol), valamint fenilacetaldehidet (2,80 ml, 25 mmol). A reakciót valamint a reakció feldolgozását a **6.1.5** fejezetben leírtak alapján végeztem, és mindkét esetben mindkét diasztereomer keletkezése megfigyelhető volt. A keletkezett **1a'**(*IS,3S*), **1a'**(*IR,3S*) (diasztereomer keverék) köztitermék tömege: 0,80 g, retenciósideje  $t_{R \text{ 1a' } (IS,3S)} = 10,016$ ;  $t_{R \text{ 1a' } (IR,3S)} = 10,587$ , 20-100%-ig (B) 20 perces lineáris gradienssel, MS (ESI<sup>+</sup>): m/z mért 307 ([M + H]), valamint a **2a'**(*IS,3S*), **2a'**(*IR,3S*) köztitermék (diasztereomer keverék) tömege: 0,92 g, retenciósideje  $t_{R \text{ 2a' } (IS,3S)} = 10,10$ ;  $t_{R \text{ 2a' } (IR,3S)} = 10,55$ , 20-100%-ig (B) 20 perces lineáris gradienssel, MS (ESI<sup>+</sup>): m/z mért 321 ([M + H]).

A következő lépésben a **1a'**(*IS,3S*), **1a'**(*IR,3S*) (1,12 mmol, 0,80 g) valamint a **2a'**(*IS,3S*), **2a'**(*IR,3S*) (1,26 mmol, 0,92 g) nyers köztitermékekhez Fmoc-L-Glu(OtBu)-OHxH<sub>2</sub>O aminosavat kapsoltam (3,36 mmol, 1,48 g, 3 ekv. illetve 3,78 mmol, 1,67 g, 3 ekv.). A kapcsolási reakció, a Fmoc védőcsoport hasítás valamint az intramolekuláris gyűrűzáródás **6.1.5.1** fejezetben leírtak alapján.

A kapcsolási reakció utáni nyers termékek tömege: 0,65 g **1b'**(*IS,3S,2'S*), **1b'**(*IR,3S,2'S*), 0,72 g **2b'**(*IS,3S,2'S*), **2b'**(*IR,3S,2'S*), retenciósideje  $t_{R \text{ 1b' } (IS,3S,2'S)} = 23,28$ ;

$t_{R1b'(IR,3S,2'S)} = 23,77$  valamint  $t_{R2b'(IS,3S,2'S)} = 24,09$ ;  $t_{R2b'(IR,3S,2'S)} = 24,42$ , 20-tól 100%-ig (B) 20 perces lineáris gradienssel, **1b'(IS,3S,2'S)**, **1b'(IR,3S,2'S)** MS (ESI<sup>+</sup>): m/z mért 714 ([M + H]), **2b'(IS,3S,2'S)**, **2b'(IR,3S,2'S)** MS (ESI<sup>+</sup>): m/z mért 728 ([M + H]).

Az intramolekuláris gyűrűzáródást követő nyers termékek retenciósideje: az **1c'(3S,6S,12aS)**, **1c'(3R,6S,12aS)** analógok esetében  $t_{R1c'(3S,6S,12aS)} = 15,14$ ;  $t_{R1c'(3R,6S,12aS)} = 15,67$ , valamint a **2c'(3S,6S,12aS)**, **2c'(3R,6S,12aS)** analógok esetében  $t_{R2c'(3S,6S,12aS)} = 16,14$ ;  $t_{R2c'(3R,6S,12aS)} = 16,80$ , 20-100%-ig (B) 20 perces lineáris gradienssel. A nyers termékeket 40-80%-ig 80 perces lineáris gradienssel tisztítottam meg.

Az előállított fumitremorgin **1c'(3S,6S,12aS)**, **1c'(3R,6S,12aS)**; **2c'(3S,6S,12aS)**, **2c'(3R,6S,12aS)** analógok analitikai paramétereit az 10. táblázat tartalmazza.

10. táblázat Az előállított fumitremorgin analógok analitikai paramétereit

| Vegyület kód                                     | [M+H] <sup>+</sup><br>MS (ESI <sup>+</sup> )<br>m/z mért | Analitikai<br>HPLC<br>gradiens | t <sub>R</sub> (perc)<br>(a tisztított analóg RP-<br>HPLC retenciósideje)    | m <sub>nyers</sub><br>(g) | m <sub>t</sub><br>(g)  |
|--|--|--------------------------------|--|---------------------------|--|
| <b>1c'(3S,6S,12aS)</b><br><b>1c'(3R,6S,12aS)</b> | 460  | 85-100% (B)<br>15 perc         | t <sub>R1c'(3S,6S,12aS)</sub> = 5,49<br>t <sub>R1c'(3R,6S,12aS)</sub> = 5,67 | 0,25                      | m <sub>t1c'(3S,6S,12aS)</sub> = 0,015<br>m <sub>t1c'(3R,6S,12aS)</sub> = 0,023 |
| <b>2c'(3S,6S,12aS)</b><br><b>2c'(3R,6S,12aS)</b> | 474  | 65-80 % (B)<br>15 perc         | t <sub>R2c'(3S,6S,12aS)</sub> = 6,88<br>t <sub>R2c'(3R,6S,12aS)</sub> = 7,79 | 0,32                      | m <sub>t2c'(3S,6S,12aS)</sub> = 0,018<br>m <sub>t2c'(3R,6S,12aS)</sub> = 0,032 |

### 6.1.7 Ko134 referens oldat fázisú szintézise

L-triptofán-metilészter\*HCl-ot (15 mmol, 3,83 g) DCM-ban (150 ml) szuszpendáltam, majd nátrium-hidrogénkarbonát oldattal (3x150 ml) és telített sóoldattal (2x150 ml) extraháltam. Az így kapott szerves fázist szárítottam (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), szűrtem, majd acetonitriles bepárlással szárítottam. Az előző lépésből kapott L-triptofán-metilésztert (11 mmol, 2,54 g) feloldottam DCM-ban (200 ml), majd hozzáadtam izovaleraldehidet (55 mmol, 5,92 ml, 5 ekv.), valamint TFA-t (55 mmol, 4,237 ml, 5 ekv.). A reakcióelegyet szobahőmérsékleten 16 órán át kevertetem. A reakcióidő lejártá után az elegyet szárazra pároltam, EtOAc-ba oldottam (500 ml), majd az elegyet rendre nátrium-hidrogénszulfáttal (3x100 ml, 10 m/v%), nátrium-hidrogénkarbonáttal (3x100 ml, 10 m/v%) és végül telített sóoldattal (2x100 ml) extraháltam. Az így kapott szerves fázist szárítottam (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), szűrtem, majd vákuumbepárló

segítségével szárazra pároltam. Vékonyréteg-kromatográfiás módszer segítségével megállapítható volt, hogy a kiindulóanyag túlnyomó része elreagált a kívánt diasztereomer keverék keletkezése közben, a használt eluens hexán:EtOAc (10:90 v/v%). A reakció analitikai HPLC segítségével is jól követhető volt. A keletkezett köztitermék tömege: 2,12 g, retenciós ideje  $t_{R(1.izomer)} = 10,28$ ;  $t_{R(2.izomer)} = 10,74$ , 20-100%-ig (B) 20 perces lineáris gradienssel, MS (ESI<sup>+</sup>): m/z mért 287 ([M + H]).

A következő lépésben (7,40 mmol, 2,12 g) nyerstermékkel indultam tovább, feloldottam frissen desztillált DCM-ban (250 ml), majd hozzáadtam DIPEA-t (44,4 mmol, 7,55 ml, 6 ekv.). Az elegyet 30 percen keresztül kevertettem, inert körülmények között (Ar atmoszféra alatt). Ezzel párhuzamosan kimértem a termékhez képest Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH aminosavat (22,2 mmol, 9,84 g, 3 ekv.), valamint TCFH kapcsolószert (22,2 mmol, 6,22 g, 3 ekv.), ezen anyagokat szintén feloldottam frissen desztillált DCM-ban (250 ml), majd a 30 perc előaktiválás elteltével hozzáadtam a lombikban lévő elegyhez. A reakciót 10 órán át Ar atmoszféra alatt kevertettem, szobahőmérsékleten. A reakciót analitikai RP-HPLC-n követtem, a reakció idő előrehaladtával jól követhető volt a kiindulási jelentős részének elreagálása és ezzel egyidőben a kívánt termék keletkezése. A nyerstermék (diasztereomer keverék) retenciós ideje  $t_{R(1.izomer)} = 23,64$ ;  $t_{R(2.izomer)} = 24,53$ , 20-100%-ig (B) 20 perces lineáris gradienssel, MS (ESI<sup>+</sup>): m/z mért 694 ([M + H]). A reakció lejárta után az elegyet hígítottam DCM-nal (100 ml), majd kálium-hidrogénszulfát oldattal (3x250 ml, 10 m/v%), ezt követően nátrium-hidrogénkarbonát oldattal (3x250 ml, 10 m/v%), majd telített sóoldattal (2x250 ml) extraháltam. A kapott szerves fázist szárítottam (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), szűrtem, majd vákuumbepárló segítségével szárazra pároltam. A keletkezett nyers köztitermék tömege: 8,95 g. A következő lépésben a nyers intermediert megtisztítottam és a tisztított diasztereoizomer keveréket használtam fel a további reakcióhoz. A fumitremorgin analógok HPLC körülmények közötti rossz oldhatósága miatt valamint a tisztítandó termék megnövelt mennyisége miatt a tisztítást (ACN/H<sub>2</sub>O elegyében kisebb mennyiségeknél megoldható volt a preparatív HPLC-vel történő tisztítás) hexán:EtOAc oldószerekkel, magasnyomású oszlopkromatográfia segítségével végeztem (BÜCHI készülék, 5 bar nyomáson). A kapott 4,23 g köztitermék tisztaságát analitikai HPLC segítségével is ellenőriztem. Az oszlopkromatográfia során sikeresen elválasztottam az izomereket egymástól és csak az (S,S,S) izomert használtam a továbbiakban. A következő lépésben a Fmoc-védőcsoport eltávolítását, valamint az intramolekuláris gyűrűzáródást egy lépésben végeztem, piperidin/DCM oldattal (10:90 v/v%). A reakciót szintén analitikai HPLC-n követtem és a kiindulási anyag teljes elreagálása után (30 perc), a reakcióelegyet ecetsavval kisavanyítottam



pH = 4, majd bepároltam. Ezt követte egy újabb oszlopkromatográfiás tisztítás az előbbieken leírt módon, DCM:EtOAc oldószerekkel. A kapott 0,82 g **Ko134** (*S,S,S*) analóg tisztaságát mind vékonyrétegekromatográfiás módszerrel mind pedig analitikai HPLC segítségével is ellenőriztem, retenciós idő  $t_{R(1.izomer)} = 10,34$ ;  $t_{R(2.izomer)} = 10,62$ , 20-100%-ig (B) 20 perces lineáris gradienssel. A **Ko134** fumitremorgin analógról készült ESI-MS spektrum is igazolta a kívánt termék keletkezését, MS (ESI<sup>+</sup>): m/z mért 440 ([M + H]).

## 6.2 Módosított minifehérjék szintézise

A munkám során előállított **TC5b** minifehérje analógok szintézisét manuális szilárdfázisú szintézissel végeztem, Fmoc-kémia alkalmazásával. A szilárd hordozóként Fmoc-Ser(tBu)-Wang gyantát (0,25 mmol, 0,59 g, borítottság: 0,42 mmol/g), Fmoc-Glu(OtBu)-Wang gyantát (0,25 mmol, 0,75 g, borítottság: 0,33 mmol/g), valamint Fmoc-Gln(Trt)-Wang gyantát (0,25 mmol, 0,70 g, borítottság: 0,35 mmol/g) használtam. Az előállított TC5b analógok szekvenciáját, valamint analitikai paramétereit a *11. táblázat* tartalmazza.

A nyers peptidek tisztítását Phenomenex Jupiter 10  $\mu$  C18 300A (250x15.00 mm) preparatív oszlopon végeztem. A peptidek tisztítása kihívást jelentett ezért az általában alkalmazott (A) 0,1% TFA, valamint (B) 80% ACN/ 0,1 TFA eluensek helyett, (A) 0,05 M NH<sub>4</sub>OAc, valamint (B) 60% ACN/0,05 M NH<sub>4</sub>OAc eluenseket használtam (2 ml/min áramlási sebességgel, 220 nm-en, 20-50% (B), 60 perces lineáris gradienssel).

### 6.2.1 A **TC5b\_9D\_R16hR** peptid szintézise

**TC5b\_9D\_R16hR** (NLYIQWLKDGGPSSG-**Har**-PPPS-OH) peptid szintézise során Fmoc-Ser(tBu)-Wang gyantát (0,25 mmol, 0,59 g, borítottság: 0,42 mmol/g) használtam, amit előzetesen DMF-ben (20 ml) duzzasztottam, majd DMF-fel mostam (10 ml). Első lépésben a Fmoc-védőcsoport eltávolítása érdekében, hozzáadtam a gyantához TEA/DCM oldatot (2x10 ml, 10:90 v/v%) és 5, illetve 15 percen át kevertettem. Ezután kimostam a gyantát: DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml) és DMF (3x10 ml) oldószerekkel. A következő aminosav kapcsolása érdekében feloldottam Fmoc-Pro-OHxH<sub>2</sub>O (0,75 mmol, 0,266 g, 3 ekv.) aminosavat, valamint DCC kapcsolószert (0,75 mmol, 0,154 g, ekv.) DMF-ben (10 ml), hozzáöntöttem a gyantához és 3 órán át kevertettem. A kapcsolási reakció után kimostam a gyantát a fent említett módon, majd mintát vettem és ninhidrin-teszttel ellenőriztem a

kapcsolási reakciót. Negatív teszteredmény után, újabb Fmoc-védőcsoport hasítást végeztem a már említett módon. A peptidlánc építéséhez felhasznált további aminosavak:

- Fmoc-Pro-OH (0,75 mmol, 0,28 g, 3 ekv.);
- Fmoc-Har(Pmc)-OH (0,75 mmol, 0,50 g, 3 ekv.);
- Fmoc-Gly-OH (0,75 mmol, 0,22 g, 3 ekv.);
- Fmoc-Ser(tBu)-OH (0,75 mmol, 0,28 g, 3 ekv.);
- Fmoc-Asp(OtBu)-OH (0,75 mmol, 0,30 g, 3 ekv.);
- Fmoc-Lys(Boc)-OH (0,75 mmol, 0,35 g, 3 ekv.);
- Fmoc-Leu-OH (0,75 mmol, 0,26 g, 3 ekv.);
- Fmoc-Trp-OH (0,75 mmol, 0,31 g, 3 ekv.);
- Fmoc-Gln(Trt)-OH (0,75 mmol, 0,45 g, 3 ekv.);
- Fmoc-Ile-OH (0,75 mmol, 0,26 g, 3 ekv.);
- Fmoc-Tyr-OH (0,75 mmol, 0,34 g, 3 ekv.);
- Fmoc-Asn-OH (0,75 mmol, 0,44 g, 3 ekv.);

Az aminosavakat az előbbieken leírt módon kapcsoltam, szintén 3 órás kapcsolási időt alkalmazva. A szintézis végeztével kimostam a gyantát DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml) oldószerekkel, majd végül egy újabb Fmoc-védőcsoport hasítást végeztem a fentiekben leírt módon. A Fmoc-hasítás után a gyantát újra kimostam DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml) oldószerekkel majd szárítottam.

A peptid gyantáról való lehasítása érdekében 1,00 g gyantához hozzáadtam H<sub>2</sub>O:TFA (5 ml 5:95 v/v%) oldatot, amely tartalmazott DTT-t (3%, 0,30 g). 3 óra eltelte után lepároltam az oldószert a gyantáról vákuumbepárló segítségével, majd a keletkezett peptidet éterrel kicsaptam, leszűrtem, végül dietil-éterrel (3x30 ml) mostam. A peptid leoldása a gyantáról ACN (3 ml) és vízzel (30 ml) történt. Ezt követte az oldat liofilizálása.

## 6.2.2 A TC5b\_R16A peptid szintézise

A **TC5b\_R16A** (NLYIQWLKDGGPSSGAPPPS-OH) peptid szintézise a **6.2.1** fejezetben leírtak alapján történt azzal a különbséggel, hogy a **TC5b** minifehérje R16 aminosavát alaninra (A) cseréltem, ennek megfelelően a szintézis során (0,75 mmol, 0,23 g, 3 ekv.) Fmoc-Ala-OH aminosavat építettem be a peptidlánc 16-os pozíciójába. Az aminosavak kapcsolását a **6.2.1** fejezetben leírtak alapján végeztem, szintén 3 órás kapcsolási időt alkalmazva. A szintézis végeztével kimostam a gyantát DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml), oldószerekkel, majd végül egy újabb Fmoc-védőcsoport hasítást végeztem.

A Fmoc-hasítás után a gyantát újra kimostam DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml) oldószerekkel, majd szárítottam.

A peptid gyantáról való lehasítása érdekében 1,00 g gyantához hozzáadtam H<sub>2</sub>O:TFA (5 ml 5:95 v/v%) oldatot, amely tartalmazott DTT-t (3%, 0,30 g). 3 óra eltelte után lepároltam az oldószert a gyantáról vákuumbepárló segítségével, majd a keletkezett peptidet éterrel kicsaptam, leszűrtem, végül dietil-éterrel (3x30 ml) mostam. A peptid leoldása a gyantáról ACN (3 ml) és vízzel (30 ml) történt. Ezt követte az oldat liofilizálása. A kapott nyers peptid tömege: 0,45 g.

### 6.2.3 A TC5b\_D9N\_R16A peptid szintézise

A **TC5b-R16A** (NLYIQWLKNGGPSSGAPPPS-OH) peptid szintézise a **6.2.1** fejezetben leírtak alapján történt azzal a különbséggel, hogy a **TC5b** minifehérje D9 aminosavát aszparaginra (N) valamint R16 aminosavát alaninra (A) cseréltem, ennek megfelelően Fmoc-Asn-OH (0,75 mmol, 0,44 g, 3 ekv.) és Fmoc-Ala-OH (0,75 mmol, 0,23 g, 3 ekv.) aminosavakat építettem be a 9-es és 16-os pozícióba. Az aminosavak kapcsolását a **6.2.1** fejezetben leírtak alapján végeztem, szintén 3 órás kapcsolási időt alkalmazva. A szintézis végeztével kimostam a gyantát DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml), oldószerekkel, majd végül egy újabb Fmoc-védőcsoport hasítást végeztem. A Fmoc-hasítás után a gyantát újra kimostam DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml) oldószerekkel, majd szárítottam.

A peptid gyantáról való lehasítása érdekében 1,00 g gyantához hozzáadtam H<sub>2</sub>O:TFA (5 ml 5:95 v/v%) oldatot, amely tartalmazott DTT-t (3%, 0,30 g). 3 óra eltelte után lepároltam az oldószert a gyantáról vákuumbepárló segítségével, majd a keletkezett peptidet éterrel kicsaptam, leszűrtem, végül dietil-éterrel (3x30 ml) mostam. A peptid leoldása a gyantáról ACN (3 ml) és vízzel (30 ml) történt. Ezt követte az oldat liofilizálása. A kapott nyers peptid tömege: 0,37 g.

### 6.2.4 A TC5b-D9AaD\_R16K peptid szintézise

A **TC5b-D9AaD\_R16K** (NLYIQWLKAaDGGPSSGKPPPS-OH) peptid szintézise a **6.2.1** fejezetben leírtak alapján történt azzal a különbséggel, hogy a **TC5b** minifehérje D9 aminosavát adipinsavra (AaD) valamint R16 aminosavát lizinre (K) cseréltem. A szintézis során Fmoc-Aad(OtBu)-OH (0,75 mmol, 0,32 g, 3 ekv.) és Fmoc-Lys(Boc)-OH (0,75 mmol,

0,35 g, 3 ekv.) aminosavakat építettem be a 9-es és 16-os pozícióba. Az aminosavak kapcsolását a **6.2.1** fejezetben leírtak alapján végeztem, szintén 3 órás kapcsolási időt alkalmazva. A szintézis végeztével kimostam a gyantát DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml) oldószerekkel, majd végül egy újabb Fmoc-védőcsoport hasítást végeztem. A Fmoc-hasítás után a gyantát újra kimostam DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml) oldószerekkel, majd szárítottam.

A peptid gyantáról való lehasítása érdekében 1,00 g gyantához hozzáadtam H<sub>2</sub>O:TFA (5 ml 5:95 v/v%) oldatot, amely tartalmazott DTT-t (3%, 0,30 g). 3 óra eltelte után lepároltam az oldószert a gyantáról vákuumbepárló segítségével, majd a keletkezett peptidet éterrel kicsaptam, leszűrtem, végül dietil-éterrel (3x30 ml) mostam. A peptid leoldása a gyantáról ACN (3 ml) és vízzel (30 ml) történt. Ezt követte az oldat liofilizálása. A kapott nyers peptid tömege: 0,42 g.

#### **6.2.5 A TC5b\_D9E peptid szintézise**

A **TC5b\_D9E** (NLYIQWLKEGGPSSGRPPPS-OH) peptid szintézise a **6.2.1** fejezetben leírtak alapján történt azzal a különbséggel, hogy a **TC5b** minifehérje D9 aminosavát glutaminsavra (E) cseréltem, ennek megfelelően Fmoc-Glu(OtBu)-OH (0,75 mmol, 0,33 g, 3 ekv.) aminosavat építettem be a kilences pozícióba. Az aminosavak kapcsolását a **6.2.1** fejezetben leírtak alapján végeztem, szintén 3 órás kapcsolási időt alkalmazva. A szintézis végeztével kimostam a gyantát DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml) oldószerekkel, majd végül egy újabb Fmoc-védőcsoport hasítást végeztem. A Fmoc-hasítás után a gyantát újra kimostam DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml) oldószerekkel, majd szárítottam.

A peptid gyantáról való lehasítása érdekében 1,00 g gyantához hozzáadtam H<sub>2</sub>O:TFA (5 ml 5:95 v/v%) oldatot, amely tartalmazott DTT-t (3%, 0,30 g). 3 óra eltelte után lepároltam az oldószert a gyantáról vákuumbepárló segítségével, majd a keletkezett peptidet éterrel kicsaptam, leszűrtem, végül dietil-éterrel (3x30 ml) mostam. A peptid leoldása a gyantáról ACN (3 ml) és vízzel (30 ml) történt. Ezt követte az oldat liofilizálása. A kapott nyers peptid tömege: 0,29 g.

## 6.2.6 A TC5b\_D9N peptid szintézise

A **TC5b\_D9N** (NLYIQWLKNGGPSSGRPPPS-OH) peptid szintézise a **6.2.1** fejezetben leírtak alapján történt azzal a különbséggel, hogy a **TC5b** minifehérje D9 aminosavát aszparaginra (N) cseréltem, ennek megfelelően Fmoc-Asn-OH (0,75 mmol, 0,44 g, 3 ekv.) aminosavat építettem be a 9-es pozícióba. Az aminosavak kapcsolását a **6.2.1** fejezetben leírtak alapján végeztem, szintén 3 órás kapcsolási időt alkalmazva. A szintézis végeztével kimostam a gyantát DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml) oldószerekkel, majd végül egy újabb Fmoc-védőcsoport hasítást végeztem. A Fmoc-hasítás után a gyantát újra kimostam DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml) oldószerekkel, majd szárítottam.

A peptid gyantáról való lehasítása érdekében 1,00 g gyantához hozzáadtam H<sub>2</sub>O:TFA (5 ml 5:95 v/v%) oldatot, amely tartalmazott DTT-t (3%, 0,30 g). 3 óra eltelté után lepároltam az oldószert a gyantáról vákuumbepárló segítségével, majd a keletkezett peptidet éterrel kicsaptam, leszűrtem, végül dietil-éterrel (3x30 ml) mostam. A peptid leoldása a gyantáról ACN (3 ml) és vízzel (30 ml) történt. Ezt követte az oldat liofilizálása. A kapott nyers peptid tömege: 0,31 g.

## 6.2.7 A TC5b\_D9S peptid szintézise

A **TC5b\_D9S** (NLYIQWLKSGGPSSGRPPPS-OH) peptid szintézise a **6.2.1** fejezetben leírtak alapján történt azzal a különbséggel, hogy a **TC5b** minifehérje D9 aminosavát szerinre (S) cseréltem, ennek megfelelően Fmoc-Ser(tBu)-OH (0,75 mmol, 0,28 g, 3 ekv.) aminosavat építettem be a 9-es pozícióba. Az aminosavak kapcsolását a **6.2.1** fejezetben leírtak alapján végeztem, szintén 3 órás kapcsolási időt alkalmazva. A szintézis végeztével kimostam a gyantát DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml) oldószerekkel, majd végül egy újabb Fmoc-védőcsoport hasítást végeztem. A Fmoc-hasítás után a gyantát újra kimostam DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml) oldószerekkel, majd szárítottam.

A peptid gyantáról való lehasítása érdekében 1,00 g gyantához hozzáadtam H<sub>2</sub>O:TFA (5 ml 5:95 v/v%) oldatot, amely tartalmazott DTT-t (3%, 0,30 g). 3 óra eltelté után lepároltam az oldószert a gyantáról vákuumbepárló segítségével, majd a keletkezett peptidet éterrel kicsaptam, leszűrtem, végül dietil-éterrel (3x30 ml) mostam. A peptid leoldása a

gyantáról ACN (3 ml) és vízzel (30 ml) történt. Ezt követte az oldat liofilizálása. A kapott nyers peptid tömege: 0,35 g.

#### 6.2.8 A TC5b-D9Q peptid szintézise

A **TC5b-D9Q** (NLYIQWLKQGGPSSGRPPPS-OH) peptid szintézise szintén **6.2.1** fejezetben leírtak alapján történt ebben az esetben a **TC5b** minifehérje D9 aminosavát glutaminra (Q) cseréltem, ennek megfelelően a szintézis során Fmoc-Gln(Trt)-OH (0,75 mmol, 0,33 g, 3 ekv.) aminosavat építettem be a 9-es pozícióba. Az aminosavak kapcsolását a **6.2.1** fejezetben leírtak alapján végeztem, szintén 3 órás kapcsolási időt alkalmazva. A szintézis végeztével kimostam a gyantát DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml) oldószerekkel, majd végül egy újabb Fmoc-védőcsoport hasítást végeztem. A Fmoc-hasítás után a gyantát újra kimostam DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml) oldószerekkel, majd szárítottam.

A peptid gyantáról való lehasítása érdekében 1,00 g gyantához hozzáadtam H<sub>2</sub>O:TFA (5 ml 5:95 v/v%) oldatot, amely tartalmazott DTT-t (3%, 0,30 g). 3 óra eltelte után lepároltam az oldószert a gyantáról vákuumbepárló segítségével, majd a keletkezett peptidet éterrel kicsaptam, leszűrtem, végül dietil-éterrel (3x30 ml) mostam. A peptid leoldása a gyantáról ACN (3 ml) és vízzel (30 ml) történt. Ezt követte az oldat liofilizálása. A kapott nyers peptid tömege: 0,36 g.

#### 6.2.9 A TC5b-S20E peptid szintézise

A **TC5b-S20E** (NLYIQWLKDGGPSSGAPPPE-OH) peptid szintézise a **6.2.1** fejezetben leírtak alapján történt, ebben az esetben viszont (0,25 mmol) Fmoc-Glu(OtBu)-Wang gyantát (0,25 mmol, 0,75 g, borítottság: 0,330 mmol/g) használtam. A **TC5b** minifehérje S20 aminosavát glutaminsavra (E) cseréltem, ennek megfelelően a szintézis során Fmoc-Glu(OtBu)-OH (0,75 mmol, 0,33 g, 3 ekv.) aminosavat építettem be a 20-as pozícióba. Az aminosavak kapcsolását a **6.2.1** fejezetben leírtak alapján végeztem, szintén 3 órás kapcsolási időt alkalmazva. A szintézis végeztével kimostam a gyantát DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml) oldószerekkel, majd végül egy újabb Fmoc-védőcsoport hasítást végeztem. A Fmoc-hasítás után a gyantát újra kimostam DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml) oldószerekkel, majd szárítottam.

A peptid gyantáról való lehasítása érdekében 1,00 g gyantához hozzáadtam H<sub>2</sub>O:TFA (5 ml 5:95 v/v%) oldatot, amely tartalmazott DTT-t (3%, 0,30 g). 3 óra eltelté után lepároltam az oldószert a gyantáról vákuumbepárló segítségével, majd a keletkezett peptidet éterrel kicsaptam, leszűrtem, végül dietil-éterrel (3x30 ml) mostam. A peptid leoldása a gyantáról ACN (3 ml) és vízzel (30 ml) történt. Ezt követte az oldat liofilizálása. A kapott nyers peptid tömege: 0,27 g.

#### 6.2.10 A TC5b-S20Q peptid szintézise

A **TC5b-S20Q** (NLYIQWLKDGGPSSGAPPPQ-OH) peptid szintézise a **6.2.1** fejezetben leírtak alapján történt ebben az esetben viszont Fmoc-Gln(Trt)-Wang gyantát (0,25 mmol, 0,70 g, borítottság: 0,357 mmol/g) használtam. A **TC5b** minifehérje S20 aminosavát glutaminra (**Q**) cseréltem, ennek megfelelően a szintézis során Fmoc-Gln(Trt)-OH (0,75 mmol, 0,33 g, 3 ekv.) aminosavat építettem be a huszas pozícióba. Az aminosavak kapcsolását a **6.2.1** fejezetben leírtak alapján végeztem, szintén 3 órás kapcsolási időt alkalmazva. A szintézis végeztével kimostam a gyantát DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml) oldószerekkel, majd végül egy újabb Fmoc-védőcsoport hasítást végeztem. A Fmoc-hasítás után a gyantát újra kimostam DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml) oldószerekkel, majd szárítottam.

A peptid gyantáról való lehasítása érdekében 1,00 g gyantához hozzáadtam H<sub>2</sub>O:TFA (5 ml 5:95 v/v%) oldatot, amely tartalmazott DTT-t (3%, 0,30 g). 3 óra eltelté után lepároltam az oldószert a gyantáról vákuumbepárló segítségével, majd a keletkezett peptidet éterrel kicsaptam, leszűrtem, végül dietil-éterrel (3x30 ml) mostam. A peptid leoldása a gyantáról ACN (3 ml) és vízzel (30 ml) történt. Ezt követte az oldat liofilizálása. A kapott nyers peptid tömege: 0,34 g.

#### 6.2.11 A TC5b-S14E peptid szintézise

A **TC5b-S14E** (NLYIQWLKDGGPSEGAPPPS-OH) peptid szintézise a **6.2.1** fejezetben leírtak alapján történt ebben az esetben a **TC5b** minifehérje S14 aminosavát glutaminsavra (**E**) cseréltem, ennek megfelelően a szintézis során Fmoc-Glu(OtBu)-OH (0,75 mmol, 0,33 g, 3 ekv.) aminosavat építettem be a 14-es pozícióba. Az aminosavak kapcsolását a **6.2.1** fejezetben leírtak alapján végeztem, szintén 3 órás kapcsolási időt alkalmazva. A szintézis végeztével kimostam a gyantát DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml)

oldószerrel, majd végül egy újabb Fmoc-védőcsoport hasítást végeztem. A Fmoc-hasítás után a gyantát újra kimostam DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml) oldószerrel, majd szárítottam.

A peptid gyantáról való lehasítása érdekében 1,00 g gyantához hozzáadtam H<sub>2</sub>O:TFA (5 ml 5:95 v/v%) oldatot, amely tartalmazott DTT-t (3%, 0,30 g). 3 óra eltelté után lepároltam az oldószer a gyantáról vákuumbepárló segítségével, majd a keletkezett peptidet éterrel kicsaptam, leszűrtem, végül dietil-éterrel (3x30 ml) mostam. A peptid leoldása a gyantáról ACN (3 ml) és vízzel (30 ml) történt. Ezt követte az oldat liofilizálása. A kapott nyers peptid tömege: 0,36 g.

#### 6.2.12 A TC5b-S14Q peptid szintézise

A **TC5b-S14E** (NLYIQWLKDGGPSQGAPPPS-OH) peptid szintézise a **6.2.1** fejezetben leírtak alapján történt ebben az esetben a **TC5b** minifehérje S14 aminosavát glutaminra (**Q**) cseréltem, ennek megfelelően a szintézis során Fmoc-L-Gln(Trt)-OH (0,75 mmol, 0,33 g, 3 ekv.) aminosavat építettem be a 14-es pozícióba. Az aminosavak kapcsolását a **6.2.1** fejezetben leírtak alapján végeztem, szintén 3 órás kapcsolási időt alkalmazva. A szintézis végeztével kimostam a gyantát DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml) oldószerrel, majd végül egy újabb Fmoc-védőcsoport hasítást végeztem. A Fmoc-hasítás után a gyantát újra kimostam DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml) oldószerrel, majd szárítottam.

A peptid gyantáról való lehasítása érdekében 1,00 g gyantához hozzáadtam H<sub>2</sub>O:TFA (5 ml 5:95 v/v%) oldatot, amely tartalmazott DTT-t (3%, 0,30 g). 3 óra eltelté után lepároltam az oldószer a gyantáról vákuumbepárló segítségével, majd a keletkezett peptidet éterrel kicsaptam, leszűrtem, végül dietil-éterrel (3x30 ml) mostam. A peptid leoldása a gyantáról ACN (3 ml) és vízzel (30 ml) történt. Ezt követte az oldat liofilizálása. A kapott nyers peptid tömege: 0,29 g.



11. táblázat Az előállított módosított TC5b analógok szekvenciája és analitikai paraméterei

| Név             | Szekvencia                  | [M+H] <sup>+</sup><br>MS (ESI <sup>+</sup> )<br><i>m/z</i> mért | t <sub>R</sub> (min)<br>(a tisztított anyagok RP-<br>HPLC retenciós ideje) |
|-----------------|-----------------------------|---|--|
| TC5b-9D_R15hR   | NLYIQWLKDGGPSSG-Har-PPPS-OH | 2185  | 6,14   |
| TC5b-R16A       | NLYIQWLKDGGPSSGAPPPS-OH     | 2086  | 6,45   |
| TC5b_D9N_R16A   | NLYIQWLKNGGPSSGAPPPS-OH     | 2084  | 7,07   |
| TC5b-D9AaD_R16K | NLYIQWLKAaDGGPSSGKPPPS-OH   | 2170  | 7,61   |
| TC5b-D9E        | NLYIQWLKEGGPSSGRPPPS-OH     | 2184  | 9,26   |
| TC5b_D9N        | NLYIQWLKNGGPSSGRPPPS-OH     | 2169  | 7,17   |
| TC5b_D9S        | NLYIQWLKSGGPSSGRPPPS-OH     | 2142  | 8,54   |
| TC5b-D9Q        | NLYIQWLKQGGPSSGRPPPS-OH     | 2184  | 7,71   |
| TC5b-S14E       | NLYIQWLKDGGPSEGRPPPS-OH     | 2213  | 7,07   |
| TC5b-S14Q       | NLYIQWLKDGGPSQGRPPPS-OH     | 2212  | 8,74   |
| TC5b-S20E       | NLYIQWLKDGGPSSGRPPPE-OH     | 2113  | 7,10   |
| TC5b-S20Q       | NLYIQWLKDGGPSSGRPPPQ-OH     | 2212  | 8,84   |

### 6.3 Glikopeptidek szintézise

#### 6.3.1 A Leu-Lys-[GlcNAc(β1-N)]Asn-Gly-Gly-Pro-NH<sub>2</sub> szilárd fázisú szintézise

Rink amid-MBHA gyantát (0,24 mmol, 0,30 g, borítottság: 0,42 mmol/g) 20 ml DMF-ben (20 ml) duzzasztottam majd szintén DMF-el mostam (3x10 ml). Első lépésben a Fmoc-védőcsoport eltávolítása érdekében, hozzáadtam a gyantához TEA/DCM (2x10 ml, 10:90 v/v%) oldatot és 5, illetve 15 percen át kevertetem. Ezután kimostam a gyantát: DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml) oldószerekkel. A első aminosav kapcsolás érdekében feloldottam N-α-Fmoc-Pro-OH·H<sub>2</sub>O (0,72 mmol, 0,25 g, 3 ekv.) aminosavat, valamint DCC (0,72 mmol, 0,14 g, 3 ekv.) kapcsolószert DFM-ben (10 ml), majd hozzáöntöttem a gyantához és 3 órán át kevertetem. A kapcsolási reakció után kimostam a gyantát a fent említett módon, majd mintát vettem és ninhidrin-tesztel ellenőriztem a kapcsolási reakciót. Negatív teszteredmény után, újabb Fmoc-védőcsoport hasítást végeztem a már említett módon. A peptidlánc építéséhez a következő lépésben Fmoc-Gly-OH (0,72 mmol, 0,21 g, 3 ekv.) aminosavat kapcsoltam, szintén DCC (0,72 mmol, 0,14 g, 3 ekv.) kapcsolószert jelenlétében.

A Boc-védett [GlcNAc(β1-N)]Asn aminosav kapcsolás előtt a gyantát kimostam MeOH (3x10 ml) és DCM (3x10 ml) oldószerekkel. A kapcsolás során Boc-védett glikozilált aminosav származékot (0,48 mmol, 0,30 g, 2 ekv.), DCC (0,48 mmol, 0,09 g, 2 ekv.), valamint HOBt (0,48 mmol, 0,06 g, 2 ekv.) kapcsolószereket feloldottam DCM/DMF (10 ml

50:50 v/v%) elegyben, kapcsolási reakció ideje 16 óra. A reakció lejárta után a gyantát kimostam DMF (3x10 ml), MeOH (3x10 ml), DMF (3x10 ml) oldószerekkel, ezt követte a Boc védőcsoport hasítás, melyhez elkészítettem egy SnCl<sub>4</sub> oldatot (SnCl<sub>4</sub>/DCM, 20 ml 2:88 v/v%), majd hozzáöntöttem a gyantához, reakcióidő 20 perc. A reakció lejátszódását a gyanta piros színeződése jelezte. A reakció lejárta után a gyantát kimostam DMF (4x10 ml), MeOH (4x10 ml), DCM (4x10 ml), DMF (4x10 ml) oldószerekkel, ezt egy semlegesítés követett TEA/DCM oldattal (2x10 ml 10:90 v/v%) reakció idő 5 perc illetve 15 perc, majd újból kimostam a gyantát DMF (4x10 ml), MeOH (4x10 ml), DMF (4x10 ml) oldószerekkel.

Az utolsó két aminosav kapcsolása szintén Fmoc kémia alkalmazásával történt, a fent említett módon. A peptidlánc építéséhez felhasznált további két aminosav: N- $\alpha$ -Fmoc-N- $\epsilon$ -Boc-Lys (0,72 mmol, 0,33 g, 3 ekv.), N- $\alpha$ -Fmoc-Leu-H<sub>2</sub>O (0,72 mmol, 0,17 g, 3 ekv.).

Az aminosavakat az előbbieken leírt módon kapcsoltam, szintén 3 órás kapcsolási időt alkalmazva. A szintézis végeztével kimostam a gyantát DMF (4x10 ml), MeOH (4x10 ml), DMF (4x10 ml) oldószerekkel, majd végül egy újabb Fmoc-védőcsoport hasítást végeztem.

A peptid gyantáról való lehasítása érdekében a gyantához hozzáadtam H<sub>2</sub>O:TFA (5 ml 5:95 v/v%) oldatot, 3 óra eltelte után lepároltam az oldószert a gyantáról vákuumbepárló segítségével, majd a keletkezett peptidet éterrel kicsaptam, leszűrtem, végül dietil-éterrel mostam (3x30 ml). A peptid leoldása a gyantáról ACN-el (3 ml ) és H<sub>2</sub>O-el (30 ml ) történt. Ezt követte az oldat liofilizálása, a nyers peptid tömege: 0,35 g.

### **6.3.2 A Leu-Lys-[GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn-Gly-Gly-Pro-NH<sub>2</sub> szilárd fázisú szintézise**

Az Leu-Lys-[GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn-Gly-Gly-Pro-NH<sub>2</sub> glikopeptid szintézise a **6.3.1** fejeztben leírtak alapján történt azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben Boc-védett glikozilált [GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn aminosav származékot (0,48 mmol, 0,30 g, 2 ekv.) építettem be, a nyers peptid tömege: 0,38 g.

### **6.3.3 A Leu-Lys-[Man( $\beta$ 14)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn-Gly-Gly-Pro-NH<sub>2</sub> szilárd fázisú szintézise**

Az Leu-Lys-[Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn-Gly-Gly-Pro-NH<sub>2</sub> glikopeptid szintézise szintén a **6.3.1** fejezetben leírtak alapján történt, viszont ebben az esetben sor

került a Boc-védett glikozilált [Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn aminosav származék (0,48 mmol, 0,38 g, 2 ekv.) beépítésére, a nyers peptid tömege: 0,29 g.

#### 6.3.4 A H-Gly-Val-Glu-Asp-Ile-Ser(Xil)-Gly-Leu-Pro-Ser(Bzl)-Gly-NH<sub>2</sub> peptid szilárd fázisú szintézise

Az *O*-glikopeptid szintézise szintén a 6.3.1 fejezetben leírtak alapján történt. A szintézis során a következő aminosavakat, valamint Boc-védett glikozilált szerin származékot építettem be:

- Fmoc-Gly-OH (0,72 mmol, 0,21 g 3 ekv.)
- Fmoc-Ser(Bzl)-OH (0,72 mmol, 0,30 g, 3 ekv.)
- Fmoc-Pro-OH (0,72 mmol, 0,25 g, 3 ekv.)
- Fmoc-Leu-OH (0,72 mmol, 0,25 g, 3 ekv.)
- Boc-Ser[Xil(Bz)3]-OH (0,72 mmol, 0,46 g, 3 ekv.)
- Fmoc-Ile-OH (0,72 mmol, 0,25 g, 3 ekv.)
- Fmoc-Asp(ODmab)-OH (0,72 mmol, 0,48 g, 3 ekv.)
- Fmoc-Glu(ODmab)-OH (0,72 mmol, 0,49 g, 3 ekv.)
- Fmoc-Val-OH (0,72 mmol, 0,24 g, 3 ekv.)

A szintézis végeztével a Fmoc-hasítást követően, megtörtént az ODmab-védőcsoport hasítás hidrazin-hidrát/DMF (2x10 ml 5:95 v/v%) oldattal, reakcióidő 2x10 perc, ezután kimostam a gyantát DMF (4x10 ml), MeOH (4x10 ml), DCM (4x10 ml), DMF (4x10 ml) oldószerekkel, majd megtörtént a glikopeptid gyantáról való lehasítása, valamint a reakció elegy feldolgozása szintén a 6.3.1 fejezetben leírt módon. Utolsó lépésként elvégeztem a Bz védőcsoport eltávolítását: a már liofilizált nyers peptidhez hozzáadtam hidrazin hidrát/MeOH (10 ml 20:80 v/v%) oldatot, reakciót analitikai RP-HPLC-n követtem, reakcióidő 1 óra. A reakció elegyet bepároltam vákuumbepárló segítségével, majd feloldottam H<sub>2</sub>O/ ACN (30 ml 10:90 v/v%) elegyével és liofilizáltam, a nyers peptid tömege: 0,31 g.

#### 6.4 Radiofarmakonok készítéséhez prekurzorok előállítása

Tenta gél gyantát (0,60 mmol, 3,15 g, borítottság: 0,18 mmol/g) DMF-ben duzzasztottam (20 ml), majd kimostam DMF-el (3x10 ml). A első aminosav kapcsolása érdekében, feloldottam Fmoc-Asp(OtBu)-OH aminosavat (1,80 mmol, 0,73 g, 3 ekv.), valamint DCC (1,80 mmol, 0,36 g, 3 ekv.) kapcsolószert DMF-ben (10 ml), hozzáöntöttem a

gyantához és 3 órán át kevertettem. A kapcsolási reakció után kimostam a gyantát 3x10 ml DMF (4x10 ml), MeOH (4x10 ml), DMF (4x10 ml) oldószerekkel, majd mintát vettem és ninhidrin-teszttel ellenőriztem a kapcsolási reakciót. Negatív teszteredmény után, újabb Fmoc-védőcsoport hasítást végeztem a már említett módon. A peptidlánc építéséhez felhasznált további aminosavak:

- Fmoc-Phe-OH (1,80 mmol, 0,69 g, 3 ekv.)
- Fmoc-Tyr-OH (1,80 mmol, 0,82 g, 3 ekv.)
- Fmoc-Pro-OH (1,80 mmol, 0,63 g, 3 ekv.)
- Fmoc-Leu-OH (1,80 mmol, 0,63 g, 3 ekv.)
- Fmoc-Lys(Boc)-OH (1,80 mmol, 0,84 g, 3 ekv.)

Az aminosavakat az előbbieken leírt módon kapcsoltam, szintén 3 órás kapcsolási időt alkalmazva, majd kimostam a gyantát DMF (4x10 ml), MeOH (4x10 ml), DMF (4x10 ml) oldószerekkel, majd végül egy újabb Fmoc-védőcsoport hasítást végeztem. Ezután következett a bróm-ecetsav kapcsolása (1,80 mmol, 0,25 g, 3 ekv.), melyet szintén a fenti kapcsolási eljárás alapján végeztem DCC kapcsolószer jelenlétében. A kapcsolat lejárta után kimostam a gyantát DMF (4x10 ml), MeOH (4x10 ml), DCM (4x10 ml), DMF (4x10 ml) oldószerekkel. A következő lépésben hozzákapcsoltam a gyantán lévő peptidhez a kurkumin K-sóját, amit előzőleg elkészítettem: kurkuminhoz (1,8 mmol, 0,66 g, 3 ekv.) hozzáadtam abszolútizált DMF-t (10 ml), majd hozzáadtam kálium-karbonátot (1,8 mmol, 0,24 g, 3 ekv.), majd 2 órán át kevertettem 50 °C-on, ezután pedig hozzáöntöttem a gyantához. 16 óra kevertetés után kimostam a gyantát ACN (2x10 ml), MeOH (2x10 ml), DMF (2x10 ml), DCM (2x10 ml) oldószerekkel. A peptidszármazék gyantáról történő hasítása H<sub>2</sub>O/TFA (20 ml 10:90 v/v%) oldattal történt, hasítási idő 3 óra. A hasítás után a reakció elegyet bepároltam vákuumbepárló segítségével, majd éterrel kicsaptam, leoldottam AcOH/H<sub>2</sub>O (10 ml 20:80 v/v%) eleggyel, majd liofilizáltam. A kapott nyersterméket (0,52 g) megtisztítottam 45-70%-ig 50 perc alatt történő lineáris gradienssel, melynek eredményeképpen 0,12 g tiszta **A** prekuzort kaptam, MS (ESI<sup>+</sup>): m/z mért 1189 ([M + H]).

A következő lépésben a DOTA molekula beépítésének céljából a kurkumint már tartalmazó tiszta peptidszármazékkal (0,05 mmol, 0,059 g) indultam tovább, melyet feloldottam DMF-ben (4 ml), majd hozzáadtam DOTA-t (0,05 mmol, 0,028 g, 1 ekv.), HOAt (0,05 mmol, 0,0068 g, 1 ekv.), valamint HBTU (0,05 mmol, 0,019 g) kapcsolószereket. A reakciót analitikai HPLC segítségével követtem, a kiindulási anyag elreagálása után (3 óra elteltével) a reakció elegyet bepároltam és éterrel kicsaptam, AcOH/H<sub>2</sub>O (30 ml 20:80 v/v%) eleggyel oldottam le, ezt követte az oldat liofilizálása. A kapott nyers intermedier tömege:

0,060 g. Utolsó lépésben lehasítottam a DOTA-ról a terc-butil védőcsoportokat, H<sub>2</sub>O/TFA (10:90 v/v%) oldattal, reakciót szintén analitikai HPLC segítségével követtem, 5 óra elteltével a reakciót leállítottam és a fentiekben leírt feldolgozási eljárást újra megismételtem. A nyersterméket megtisztítottam 40-100%-ig 60 perc alatt történő lineáris gradienssel, melynek eredményeképpen 0,013 g tiszta **B** prekuzort kaptam, MS (ESI<sup>+</sup>): m/z mért 1744 ([M + H]).

Az előbbiekben leírt szintézis stratégiát követve előállítottam az LPYFD-gyantán lévő peptidet, majd szintén hozzákapcsoltam a bróm-ecetsavat. A következő lépésben pedig a kurkumin molekulához hasonlóan beépítettem *N*-karboximetil hisztidint (0,6 mmol, 0,27 g, 1 ekv.). A peptid gyantáról történő hasítása, valamint a peptid származék feldolgozása szintén az előbbiekben leírt módon történt. A nyerstermék tömege: 0,32 g. A nyersterméket megtisztítottam 40-70%-ig 60 perc alatt történő lineáris gradienssel, melynek eredményeképpen 0,074 g tiszta **C** prekuzort kaptam, MS (ESI<sup>+</sup>): m/z mért 848 ([M + H]).

## 7. Összefoglalás

### 7.1 Fumitremorgin analógok tervezése és szintézise

Az ABC transzporterek ABCG alcsaládjába tartozó ABCG2 fehérje a rákos sejtek multidrog rezisztenciájában szerepet játszó fél-transzporter, mely csupán egyetlen transzmembránból és egy nukleotidkötő doménből áll. Az ABCG2 az ATP hidrolízise során felszabaduló energiát használja szubsztrátja koncentráció-gradienssel szembeni transzportjához. Az egyik legjelentősebb transzporter – az MDR1 és az MRP1 mellett – a tumorterápia során fellépő rezisztenciában, amely felelős a mitoxantron rezisztencia kialakulásáért a tumorsejtekben.

Az ABCG2 (BCRP) fehérjének számos inhibitora ismert, ezek közül elsőként az FTC-t (fumitremorgin C) azonosították (izolálása *Aspergillus fumigatus* baktérium törzsekből történt), amely az indol alkaloidok családjának egyik képviselője, mivel azonban *in vivo* neurotoxikus, egy sor újabb FTC-típusú indol-diketopiperazin származékot szintetizáltak. A leghatásosabbak ezen analógok közül a Ko132, Ko134 és a Ko143 vegyületek voltak (4. ábra), melyek *in vivo* egér kísérletekben potenciális, nem toxikus ABCG2 inhibitoroknak bizonyultak, azonban mindhárom komponens tartalmaz egy észter kötést, mely kémiai és metabolikus szempontból instabillá teszi a vegyületeket.

Annak érdekében, hogy növeljem az inhibitor stabilitását, specificitását és szelektivitását, új fumitremorgin analógokat terveztem és szintetizáltam.

Munkám első részében a szilárd fázisú szintézisek során a peptidok tetrahydro- $\beta$ -karbolin oldalláncának meghosszabbítása Fmoc-védett aminosavval nem volt sikeres, sem a reakció körülmények változtatása, sem a különböző kapcsolószerek alkalmazása: CIP, TFFH, TCFH, HATU nem volt célravezető. A tetrahydro- $\beta$ -karbolin szekunder aminjének acilezése szilárd fázisú szintézis során nem valósult meg, ezért úgy döntöttem, hogy megpróbálkozom a fumitremorgin analógok oldatban történő előállításával. Az oldat fázisú szintézisek során a Fmoc- illetve Boc-védőcsoporttal ellátott aminosavak beépítése sikeresen megtörtént (TCFH kapcsolószer segítségével, bázis jelenlétében és inert körülmények között).

Szilárd és többlépéses oldat fázisú szintézis stratégiák segítségével új fumitremorgin analógokat állítottam elő, illetve egy hatékony, egyszerűen kivitelezhető oldat fázisú szintézis stratégiát dolgoztam ki az irodalomból már ismert Ko134 inhibitor előállítására. A Ko134 szintézise során sikeresen ötvöztem a HPLC kromatográfiás módszert a normál fázisúval folyadék kromatográfiával. A HPLC kromatográfiás módszert segítségével, a szintézisek

során keletkező diasztereomerek elválasztását sikeresen megvalósítottam, előállítva ezáltal diasztereomer tiszta fumitremorgin analógokat.

Az FTC-Ko család képviselői megfelelő kiindulási pontnak bizonyultak, mivel jelentős specificitást tanúsítottak a biológiai vizsgálatok során. (25. ábra) Vizsgálataink során bebizonyosodott, hogy az FTC típusú diketopiperazin gyűrűs váz szerkezete nélkülözhetetlen az aktivitás szempontjából, mivel a IIIa-IIIc triciklusos molekulák vizsgálataink során nem tanúsítottak aktivitást (Hoechst esszé). Másrészt azon vegyületek amelyek tartalmazták a diketopiperazin gyűrűs szerkezetet aktívnak bizonyultak, abban az esetben ha 3*S*, 6*S*, 12*aS* konfigurációval rendelkeztek. (25. ábra) Előzetes vizsgálatokat alapul véve a 3*S*, 6*R*, 12*aS* konfigurációjú vegyületek inaktívnak bizonyultak a várakozásoknak megfelelően, kivéve a 3e5 (3*S*, 6*R*, 12*aS*) molekulát amely részleges aktivitást tanúsított. Viszont a 3e5 (3*S*, 6*S*, 12*aS*) disztereomer pár 110-szer hatékonyabb IC<sub>50</sub> értékeket tanúsított (16,7 μM és 0,14 μM).

Megjegyzendő, hogy az ABCG2 gátlás esetében tapasztalt szelektív sztereospecificitás teljesen hiányzott az ABCB1 és ABCC1 gátlás esetén. (25. ábra) Az a tény, hogy a 6-os helyzetben lévő konfiguráció önmagában specificitást adott az ABCG2-nek az ABCB1 illetve ABCC1-el szemben, még nem lett közölve.

A Ko134-el kapcsolatos in vivo biológiai vizsgálatok folyamatban vannak.

## 7.2 Módosított minifehérjék szintézise

A minifehérjék olyan makromolekulák, amelyek segítségével jobban megérthetőek a fehérje fel- és letekeredésének fontosabb lépései, valamint tanulmányozhatóak különböző szerkezetstabilizáló hatások. Ide tartoznak a hidrogén és sóhídak, a hidrofób vagy hidrofíli kölcsönhatások, valamint minden olyan interakció, amely a téralkat felvételében fontos lehet. Végeredményben ezen kölcsönhatások feltérképezése segítheti elő a fehérjék racionális megtervezését.

Munkám első részében olyan TC5b analógokat állítottam elő melyek alkalmasak lehetnek annak vizsgálatára, hogy a TC5b minifehérjében jelenlévő Asp9-Arg16 sóhíd milyen mértékben járul hozzá a minifehérje szerkezetének globális stabilitásához, illetve a fehérje feltekeredéséhez. Korábbi Hudáky és mts. által végzett kísérletek során bebizonyosodott, hogy az eredeti TC5b fehérjének a 9. pozícióban metilén hosszabbított változata (Asp9→Glu9) térszerkezetileg stabilabb.

A sóhíd-optimált TC5b\_D9E (NLYIQWLKEGGPSSGRPPPS) mutánst alapul véve előállítottam ennek a minifehérjének néhány variánsát: TC5b\_D9N

(NLYIQWLKNGGPSSGRPPPS), TC5b\_R16A (NLYIQWLKDGGPSSGAPPPS), TC5b\_D9N\_R16A (NLYIQWLKNGGPSSGAPPPS), TC5b\_D9S (NLYIQWLKSGGPSSGRPPPS), TC5b\_R16hR (NLYIQWLKDGGPSSGhRPPPS) (hR, homo-arginin, az arginin metilén-hosszabbított változata), TC5b\_D9AaD\_R16K (NLYIQWLKAaDGGPSSGKPPPS) (AaD, adipinsav, a glutaminsav metilén-hosszabbított változata). A minifehérjék szintézisét manuálisan, szilárd fázisú szintézis stratégiával végeztem, Fmoc-kémia alkalmazásával. Az elkészült peptidek gyantáról történő hasítása TFA oldattal történt.

Arra kerestük a választ, hogy milyen mértékben lehet egy metilén-csoport „mozgatásával” finoman hangolni egy meglévő kölcsönhatást. A sóhíd szerepére abból is lehet következtetni, hogy ha az nincs jelen a szerkezetben, ez elérhető a sóhíd mutációjával (TC5b\_D9S, TC5b\_D9N) valamint savas körülmények közötti vizsgálatokkal.

Az elvégzett vizsgálatok alapján a Trp-kalitka sóhídja nem egy izolált stabilizáló szerkezeti elem, de egy eléggé fontos integrált része a rendezett struktúrának. A megvizsgált mutánsok esetében a stabilizáló tendenciák három specifikus ugyanakkor egymáshoz kapcsolódó kölcsönhatások segítségével jellemezhetők: elektrosztatikus, hélix-stabilizáló (QxxxY) és hidrofób (az Arg16 aminosav  $-(CH_2)_3-$  oldallánca valamint Trp6 aminosav indol gyűrűje között). A vizsgált mutációk alapján az Arg16 aminosav  $-(CH_2)_3-$  oldallánc maradék hálózati kölcsönhatása sokkal fontosabb, mint egy negatív töltésű Asp9/Glu9 és egy pozitív töltésű guanidin csoport közötti. A sóhíd mutációja (TC5b\_D9S, TC5b\_D9N) kevésbé drasztikus, mint az Arg16 aminosav hidrofób oldalláncának megszüntetése (TC5b\_R16A).

Az előállított TC5b variánsokról savas ( $2,8 \leq \text{pH} \leq 3,2$ ) és semleges ( $6,5 \leq \text{pH} \leq 7,1$ ) körülmények között készült  $H^1$ - $H^1$  NMR mérésekből ( $T = 280 \text{ K}$ ) valamint a közeli- és távoli ECD (elektronikus cirkuláris dikroizmus) spektroszkópia segítségével meghatározott másodlagos szerkezetbeli változások adataiból kiderült, hogy ezen minifehérjék gombolyodása (unfolding) nem egy kétállapotú folyamat, hanem annál sokkal bonyolultabb.

A széles hőmérsékleti tartományban ( $5 \leq T \leq 85 \text{ }^\circ\text{C}$ ) végzett ECD olvadási görbék, savas NMR vizsgálatok és a CCA+ eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a tipikus Trp-kalitka olvadása egy bonyolult folyamat, amely minimum egy intermedieren keresztül játszódik le és vezet a stabil szerkezet eléréséhez.

Korábbi kutatások szerint sok globuláris fehérjének van egy második térszerkezete, amely fonál alakú aggregátum, vagy „amiloid” szerű. (mint az Alzheimer-kór esetében). Ilyen aggregációt figyeltek meg a TC5b\_D9N és további elkészített foszfátalt mutánsok esetében (megváltozott a térszerkezet  $\rightarrow \beta$ -redővé). Aggregációs tulajdonságai alapján a TC5b kiváló modellje lehet az *Alzheimer* kórismérvért felelős aggregátumoknak. Munkám második



részében olyan TC5b mutánsokat állítottam elő, amelyek alkalmasak lehetnek, mint referensek a már foszfátolt analógokkal kapcsolatos vizsgálatok során: TC5b\_D9Q (NLYIQWLKQGGPSSGRPPPS), TC5b\_S14E (NLYIQWLKDGGPSE GRPPPS), TC5b\_S14Q (NLYIQWLKNGGPSQGRPPPS), TC5b\_S20E(NLYIQWLKNG GPSSGRPPPE), TC5b\_S20Q (NLYIQWLKNGGPSSGRPPPQ). A szintetizált TC5b minifehérjékkel kapcsolatos vizsgálatok folyamatban vannak.

### 7.3 Glikopeptidek szintézise

Napjainkban a glikozilált peptidek előállítása az egyik legnagyobb kihívás a peptidkémiaiában, különösen azon glikopeptidek esetében, amelyek oligoszacharid egységet tartalmaznak. Ezt részben a szénhidrát-rész előállítási problémái, másrészt az összekapcsolás nehézségei, illetve a glikopeptidek érzékenysége okozza.

Előzetes kísérleteink során bebizonyosodott, hogy a Boc/Bzl szintézis stratégia korlátozottan alkalmazható glikopeptidek előállítására, mivel komplex *N*-glikopeptidek esetében di- és triszacharid egységeket tartalmazó modellpeptideknél az *O*-glikozidok hasadása volt megfigyelhető, *O*-glikopeptidek esetében pedig különböző TFA koncentrációkra az *O*-glikozidos kötés sérült. Az irodalomban leírtak alapján a Fmoc-védett glikozilált aszparagin és szerin származékok megfelelő építőköveknek bizonyultak a szilárdfázisú szintézis során. Egyes esetekben viszont a Boc-védőcsoporttal ellátott glikozilált aminosav építőkövek előállítása egyszerűbben megoldható, mint a Fmoc-védőcsoportokkal védetteké.

Munkám során egy új szintézis stratégiát dolgoztam ki melynek során a glikopeptidek szintézise egy kombinált Fmoc/Boc szintézis stratégia révén valósult meg úgy, hogy az aminosavak beépítése Fmoc szintézis stratégia alkalmazásával történt, viszont a cukorrész beépítésére Boc-védett glikozilált aminosav származékokat alkalmaztam. A szintézis során a Boc-védőcsoport eltávolítása egy új szelektív védőcsoport hasítási módszerrel történt, SnCl<sub>4</sub> segítségével.

Az aszparaginon glikozilált peptidek szintézisére modellnek kiválasztott hexapeptid a Tc5b minifehérje 7-12 fragmense NLYIQWLKD\*GGPRPPPS, ahol „\*” a glikoziláció helyét jelöli. Az *N*-glikopeptidek szintézise Fmoc kémia alkalmazásával, Rink amid MBHA gyantán történt. Előzetes kísérleteim során más Fmoc kémiaiában általában alkalmazott: Wang, 2-klórtritol klorid valamint Rink amid gyanták nem bizonyultak megfelelőnek, mivel az SnCl<sub>4</sub>-

dal történő védőcsoport hasítás következtében a peptid-gyanta közötti kötés hasadása volt megfigyelhető, kivéve a Rink amid MBHA gyanta esetében.

Az N-glikopeptidek szintézise során Boc-védett glikozilált mono-, di-, illetve triszacharid egységeket tartalmazó aszparagin származékokat építettem be: **GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn, GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn, [Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn.**

A szintézisek során a peptidek első három aminosavát Fmoc-kémia alkalmazásával Rink amid MBHA gyantára kötöttem, majd megtörtént a Boc-védett glikozilált aszparagin származékok beépítése, ezt követte a Boc-védőcsoport eltávolítása 0,2M SnCl<sub>4</sub>/DCM oldattal, végül az utolsó két aminosav kapcsolása szintén Fmoc-kémia alkalmazásával történt. A peptidek gyantáról történő hasítása TFA oldattal történt.

A kombinált szintézis stratégia alkalmazásával sikeresen előállítottam a kívánt Leu-Lys-[GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn-Gly-Gly-Pro-NH<sub>2</sub>, Leu-Lys-[GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn-Gly-Gly-Pro-NH<sub>2</sub>, Leu-Lys-[Man( $\beta$ 14)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn-Gly-Gly-Pro-NH<sub>2</sub> glikopeptideket, kiküszöbölve a di-, illetve triszacharid egységeket tartalmazó glikopeptidek esetében a cukorrész hasadásából származó melléktermékek keletkezését.

Az SnCl<sub>4</sub>-dal történő szelektív Boc védőcsoport hasítási módszert *O*-glikopeptidek esetében is szerettem volna alkalmazni, ennek megfelelően modellként kiválasztottam az aggreccan fehérje egy fragmensét **GVEDIS\*GLPSG** amely a fehérje legerősebben glikozilezett régiójából származó repetitív szekvencia („\*” a glikoziláció helyét jelöli). A H-Gly-Val-Glu-Asp-Ile-[Xil( $\beta$ 1-O)]Ser-Gly-Leu-Pro-Ser(Bzl)-Gly-NH<sub>2</sub> peptid esetében ugyanazt a szintézis stratégiát alkalmaztam mint az N-glikopeptidek esetében azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben védenem kellett a glikozilált szerin származék hidroxilcsoportjait valamint a peptidben található trifunkciós aminosavak oldalláncait.

A korábbi *O*-glikopeptidek előállításával kapcsolatos kísérleteink során Fmoc szintézis stratégia alkalmazásával a **Ser-Bzl, Ser(Xil)-Bz, Glu-, Asp-ODmab** védőcsoport kombináció bizonyult a leghatékosabbnak, ennek megfelelően az *O*-glikopeptid előállításánál ugyanezt a védőcsoport kombinációt alkalmaztam. A szintézise során Boc védőcsoporttal ellátott glikozilált szerin származékot **Boc-Ser[Xil(OBz)<sub>3</sub>]-OH** építettem be. A szintézis során ugyanazt a stratégiát követtem, mint az *N*-glikopeptidek esetében azzal a különbséggel, hogy a szintézis végeztével eltávolítottam az ODmab védőcsoportot hidrazin-hidrát eleggyel, majd lehasítottam a peptidet a gyantáról TFA oldattal, legvégül pedig megtörtént a Bz védőcsoport eltávolítása hidrazin-hidrát oldattal.

A fentiekben leírt *N*- illetve *O*- glikopeptidek esetében sikeresen kidolgoztam egy új kombinált szintézis stratégiát, mely lehetővé teszi Boc-védett glikozilált aminosav származékok beépítését Fmoc stratégiát alkalmazva.

#### 7.4 Radiofarmakonok készítéséhez prekursorok előállítása

Az Alzheimer kórra jellemző, hogy az agyban az idegsejteket elpusztító kóros fehérje-lerakódások, úgynevezett amiloid plakkok keletkeznek, amelyek az Amiloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) 1-42 peptid kóros felhalmozódásai. Az Alzheimer-kórt főleg az amiloid prekursor protein (APP) és a presenilinek mutációi idézik elő, melyek hatására az APP-ből nagy mennyiségű, igen könnyen aggregálódó neurotoxikus peptid képződik. Az  $\beta$ -amiloid polipeptid láncához különböző típusú vegyületek kapcsolódnak ionos- vagy másodlagos kötésekkel. Az ilyen vegyületek megakadályozzák a peptidlánc aggregációját, így alkalmasak lehetnek az Alzheimer-kór kezelésére. Ezeket az anyagokat összefoglaló néven  $\beta$ -szerkezetrombolóknak nevezzük pl.: a kongó vörös és néhány  $\beta$ -amiloid fragmens: LPFFD, LPYFD, RVVIA, stb. Számos közlemény született azzal kapcsolatban, hogy a kurkumin *in vivo* és *in vitro* kísérletekben közvetlenül kötődik a kisebb  $\beta$ -amiloid származékokhoz, megakadályozva ezzel az aggregációt és a fibril kialakulását.

Munkám során egy kombinált szilárd illetve oldat fázisú szintézis stratégia segítségével, korábbi vizsgálatok szerint az amiloid plakkokhoz nagy affinitással kötődő H-Lys-Leu-Pro-Tyr-Phe-Asp-NH<sub>2</sub> valamint H-Leu-Pro-Tyr-Phe-Asp-NH<sub>2</sub> peptidekbe sikeresen beépítettem a kurkumin (önmagában is kötődik az amiloid plakkokhoz), DOTA, illetve *N*-karboximetil hisztidin molekulákat (kelátképző molekulák).

Vizsgáltam a fent említett prekursorok előállítását, oldat illetve szilárd fázisú szintézis stratégiát alkalmazva. Munkám során a kurkumin fenolrészének hidroxilcsoportját brómecetsav etil-észterrel alkileztem. Az előállított intermedier beépítése során probléma merült fel, ezért egy új szintézis stratégiát dolgoztam ki. Első lépésként szilárd fázisú szintézis stratégia segítségével – Fmoc kémiát alkalmazva – szintetizáltam az LPYFD illetve KLPYFD peptideket, majd szilárd fázison hozzákapcsoltam mindkét peptidhez a brómecetsavat. Az elkészített bróm-acetil peptidhez hozzákapcsoltam a kurkumint, majd a kapott származékot oldat fázisban DOTA-val acileztem. Ugyanezt a szintézis stratégiát sikeresen alkalmaztam az *N*-karboximetil hisztidin beépítésére is, melynek során szintén az elkészült bróm-acetil peptidhez kapcsoltam az *N*-karboximetil hisztidint.

Többlépéses szilárd és oldat fázisú szintézissel sikeresen előállítottam a kívánt prekursorokat, ezen anyagok biológiai vizsgálata folyamatban van. Ugyanakkor új prekursorok tervezése, valamint új előállítási stratégiák kidolgozása van folyamatban.

## 8. Summary

### 8.1 Design and synthesis of new fumitremorgin analogues

The human ABCG2 protein belongs to the ABCG subfamily of ABC transporters. The members of this subfamily are ABC half-transporters, they contain only one ABC and one transmembrane domain.

ABCG2 protein (placenta-specific ABC transporter/mitoxantrone resistance-associated protein/breast cancer resistance protein) has been identified recently as a candidate protein responsible for cancer multidrug resistance. The over expression of ABCG2 was found in several drug-selected cell lines and in tumorous tissues of patients. The activity of the human ABCG2 was suggested to be the major cellular defense mechanism against the cytotoxic drug, mitoxantrone, also several other drugs have been indicated as potential substrates of this drug pump.

The first ABCG2 specific reversal agent was the mycotoxin fumitremorgin C (FTC) isolated from *Aspergillus fumigates*. As this compound a member of a group of indole alkaloids, is a specific, selective inhibitor of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). As this compound is neurotoxic *in vivo*, a focused library of FTC-type indolyl-diketopiperazines was synthesised. The most potent members of the library Ko132, Ko134, and the analog Ko143 that was added later proved to be potent and non-toxic ABCG2 inhibitors *in vivo* in mice. However, all three compounds harbor an ester linkage and, therefore, are chemically and metabolically unstable.

To improve the specificity and selectivity of inhibitor while eliminating the potential for toxicity, we have designed and synthesized a new class of FTC analogues using solid and solution phase synthesis strategy. To prepare larger quantities of Ko134 (published in literature) for *in vivo* studies, we have developed a straightforward and efficient solution phase synthesis strategy for the preparation of Ko134 inhibitor, using both RP-HPLC and column chromatography.

First we applied the solid phase synthesis strategy for the preparation of new fumitremorgin analogues. In solid phase, the elongation of the peptide chain with a Fmoc-

protected amino acid to the tetrahydro- $\beta$ -carboline's secondary nitrogen wasn't successful under various reaction conditions, even with the most potent coupling reagents: TCFH, TFFH, CIP, HATU. Therefore we decided to synthesize fumitremorgin analogues in solution phase. In solution phase incorporation of the Fmoc- and Boc-protected amino acids was successful using TCFH coupling reagent.

The FTC-Ko family proved to be a good starting point since these compounds displayed significant specificity that was confirmed in this study (Fig 25.).

Our data show that the FTC type diketo-piperazine ring structure is essential for activity as tricyclic analogues IIIa-IIIId showed no activity in the Hoechst assay. On the other hand, compounds that preserved the diketo-piperazine ring structure were all active provided they had a *3S, 6S, 12aS* configuration (Fig 25.). Based on previous data, the compounds with *3S, 6R, 12aS* configuration were inactive as expected except perhaps the partially active 3e5 (*3S,6R,12aS*). But even in that case 3e5 (*3S,6S,12aS*) the diastereoisomeric pair was more than 110-fold more potent with IC<sub>50</sub> values of 16.7  $\mu$ M and 0.14  $\mu$ M respectively. Remarkably, stereospecificity (*3S, 6S, 12aS* vs *3S, 6R, 12aS*) observed in ABCG2 inhibition was completely absent in inhibition of ABCB1 and ABCC1 (Fig 25.). Moreover, the compounds with *3S, 6R, 12aS* configuration did not exhibit ABCG2 specificity over ABCB1 and ABCC1. The fact that configuration at position 6 alone confers specificity for ABCG2 over ABCB1 and ABCC1 has not been described before. This specificity confined to a single chiral center is quite unexpected considering the previously described broad substrate specificity of these ABC transporters. The **Ko134** *in vivo* biological analysis are in progress.

## 8.2 Synthesis of modified miniproteins

Understanding the mechanism behind protein folding, which is one of the most fundamental biochemical process, is proved to be a challenging task. Miniproteins represent simple and useful model systems in order to study the structural determinants of protein folding and stability. Miniproteins are adequate models to investigate various protein-structure modifying effects such as temperature, pH, point mutation(s), H-bonds, salt bridges, molecular packing, etc.. TC5b, a 20-residue Trp-cage protein is one of the smallest of such models with a stable 3D fold, understanding the stability and folding of globular proteins.

Hudaky et al. designed a new variant of TC6b, differs only by a methylene group from TC5b. Tc6b exhibits enhanced heat stability and adopts a stable fold at physiological temperature.

Based on this salt bridge optimized model system TC5b\_D9E (NLYIQWLKEGGPSSGRPPPS) new miniprotein analogues were synthesized: TC5b\_D9N (NLYIQWLKNGGPSSGRPPPS), TC5b\_R16A (NLYIQWLKDGGPSSGAPPPS), TC5b\_D9N\_R16A (NLYIQWLKNGGPSSGAPPPS), TC5b\_D9S (NLYIQWLKSGGPSSGRPPPS), TC5b\_R16hR (NLYIQWLKDGGPSSGhRPPPS), TC5b\_D9AaD\_R16K (NLYIQWLKAaDGGPSSGKPPPS). The peptides were synthesized by solid-phase technique utilizing Fmoc-chemistry.

In order to monitor the structure stabilizing factor of the salt bridge Asp9-Arg16, the new TC5b mutants were studied at two different pHs ( $\sim 3,0$  and  $\sim 7,0$ ), over a wide range of temperature relevant for proteins ( $55 \leq T \leq 85^\circ\text{C}$ ). Secondary structural changes recorded by ECD data were jointly analyzed and quantified by the deconvolution program CCA+. In order to locate structural differences at an atomic level in the fully folded states, high resolution  $\text{H}^1$ - $\text{H}^1$  NMR studies were completed ( $T = 280 \text{ K}$ ) both at neutral ( $6,5 \leq \text{pH} \leq 3,2$ ) and acidic ( $2,8 \leq \text{pH} \leq 3,2$ ) pH conditions. With the above model miniproteins and tools in hand, our aim was to evaluate the role of salt bridge on protein fold stability.

During the structural analysis, we found that the salt bridge of the Trp-cage scaffold is not an isolated structure stabilizing element but rather an integrated part of the foldamer. In case of the examined mutants the observed stability tendencies can be understood by considering three specific, but coupled interactions: electrostatic, helix-stabilizing (QxxxY) and hydrophobic [of the  $-(\text{CH}_2)_3-$  arm of Arg16 with the indole ring of Trp6]. Based on the herein reported mutation studies it seems that the interaction network of the  $-(\text{CH}_2)_3-$  arm of Arg16 residue is of higher importance, than the one operative between the negatively charged Asp9/Glu9 and the positively charged guanidine group. The elimination of one of the salt bridge forming partner (TC5b\_D9S, TC5b\_D9N) is less drastic than the elimination of the hydrophobic arm of Arg16 (TC5b\_R16A).

The deconvolution of ECD spectra and the analysis of the acidic NMR spectra revealed that the melting scenario of the Trp-cage is not a simple two-state mechanism but rather a more complex process with at least one intermediate state.

Protein aggregation and misfolding of proteins can be linked to the origin of many conformational diseases which can be either genetic or spontaneous. The proteins involved can either have an unstructured or lineal unfolded form such as in Alzheimer's and Parkinson's disease or Type II Diabetes, or can be globular, showing a folded 3D-structure. Protein aggregation is a major importance in biomedicine, yet it is not well understood. In the framework of our research project on the structural analysis of TC5b analogues we observed

aggregation in case of TC5b\_D9N and other TC5b phosphorylated mutants. Consequently, TC5b structure can serve as a good model for Alzheimer's aggregates. Based on our previous studies new TC5b analogues were synthesized for further structural investigations: TC5b\_D9Q (NLYIQWLK**Q**GGPSSGRPPPS), TC5b\_S14E (NLYIQWLK**D**GGPSEGRPPPS), TC5b\_S14Q (NLYIQWLK**NG**GPS**Q**GRPPPS), TC5b\_S20E(NLYIQWLK**NG**GPSSGR**P**PE), TC5b\_S20Q (NLYIQWLK**NG**GPSSGR**PP**Q).

### 8.3 Synthesis of glycopeptides

The rational preparation of the glycosylated peptides is still one of the most challenging tasks of peptide chemistry especially of those having oligosaccharide moieties.

For the preparation of glycopeptides a mixed Fmoc/Boc solid-phase synthesis strategy was applied by using a new, mild and selective Boc deprotecting agent.

According to literature the Fmoc-protected glycosylated asparagine and serine derivatives proved to be suitable building blocks for the solid-phase peptide synthesis. In some cases the preparation of Boc-protected glycosylated amino acid building blocks are more convenient than the Fmoc protected ones.

For the incorporation of the Boc-protected glycosylated amino acid derivatives in the model peptides selective Boc deprotecting agent tin(IV) chloride was used. The glycopeptides were synthesized using Fmoc chemistry on a TFA cleavable Rink-amide MBHA resin. According to our investigations other resins commonly used in Fmoc chemistry (Rink amide, 2-chlorotrityl resin, Wang resin) showed leakage of the peptide from the resin during cleavage with tin(IV) chloride, except the Rink-amide MBHA.

As model peptides we used a shorter fragment of the Trp-cage miniprotein (Leu-Lys-Asn\*-Gly-Gly-Pro) and an aggrecan fragment, from the most glycosylated region of the protein (Gly-Val-Glu-Asp-Ile-Ser\*-Gly-Leu-Pro-Ser-Gly). (Where \* is site of glycosylation).

For the synthesis of Leu-Lys-[GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn-Gly-Gly-Pro-NH<sub>2</sub>, Leu-Lys-[GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc ( $\beta$ 1-N)]Asn-Gly-Gly-Pro-NH<sub>2</sub>, Leu-Lys-[Man( $\beta$ 14)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn-Gly-Gly-Pro-NH<sub>2</sub> Rink amide-MBHA resin was applied. As building blocks N, $\alpha$ -Boc-protected glycosylated asparagine derivatives were used: **GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn**, **GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn**, **[Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N)]Asn**.

The first 3 amino acids were incorporated using Fmoc strategy. After coupling of Boc-protected glycosylated aspartic acid derivatives, the resin was treated twice with 0.2 M SnCl<sub>4</sub>,

giving the resin a red colour due to complex formation with SnCl<sub>4</sub>. Coupling of the last two amino acid was performed using Fmoc chemistry.

The synthesis strategy of H-Gly-Val-Glu-Asp-Ile-[Xil( $\beta$ 1-O)]Ser-Gly-Leu-Pro-Ser(Bzl)-Gly-NH<sub>2</sub> was the same as in case of *N*-glycopeptides in exception that in this case the peptide contains a glycosylated serin derivative with three unprotected hydroxyl functional groups and several trifunctional amino acids, which side chains must be protected during the synthesis. Based on our earlier research the Ser-Bzl, Ser(Xil)-Bz, Glu-, Asp-ODmab protecting group combination was suitable for the preparation of this glycopeptide. As building block *N*, $\alpha$ -Boc-protected serin derivative **Boc-Ser[Xil(OBz)<sub>3</sub>]-OH** was used. Dmab-deprotection was made with a solution of hydrazine-hydrate, on resin. Bz-deprotection was made in solution-phase with hydrazine-hydrate.

In summary we found a convenient solid-phase synthesis strategy for the preparation of the above glycosylated-hexapeptide conjugates. I have developed a strategy that combines the Fmoc and Boc SPPS approaches for the preparation of *N*- and *O*-glycopeptides in high purity and reasonable yield, using SnCl<sub>4</sub> for Boc deprotection, which leaves the acid sensitive glycosidic bonds intact.

#### 8.4 Synthesis of precursors for radiopharmakon preparation

Alzheimer's disease is characterized by the presence of  $\beta$ -amyloid fibril formation. The inhibition of this peptide accumulation may be a prevention method for Alzheimer's disease. Beta-sheet breakers constitute a new class of drugs that are designed to specifically bind amyloid-beta peptide and block and/or reverse this abnormal conformational change. Several classes of molecules have been reported to inhibit  $\beta$ -amyloid fibril formation for example: Congo Red, some short fragments of the A $\beta$  (RVVIA, LPFFD, LPYFD), curcumin (the phenolic yellow curry pigment curcumin directly binds small  $\beta$ -amyloid species to block aggregation and fibril formation *in vitro* and *in vivo*).

For the preparation of the precursors, amyloid peptide mimics LPYFD, KLPYFD, curcumin, DOTA and *N*-carboxymethyl-histidin were chosen. In the framework of our project on the synthesis of precursors in solution phase, phenolic hidroxyl group of the curcumin was alkylated with ethyl-bromoacetat. The resulting curcumin derivative was then used to create a curcumin-peptide, but incorporation wasn't successful.

Therefore we decided to modify the strategy for the incorporation of curcumin in the model peptide by using a new mixed solution and solid phase synthesis strategy. First the



short fragments of the  $\beta$ -amyloid peptide LPYFD and KLPYFD were synthesized manually using Fmoc peptide synthesis protocols. Henceforth, bromo-acetyl KLPYFD-peptide was used for coupling with curcumin (in solid phase) then curcumin-peptide was acylated with DOTA in solution phase. For the incorporation of *N*-carboxymethyl histidin the same synthesis strategy was used, as well the synthesized bromo-acetyl LPYFD-peptide was used for coupling with *N*-carboxymethyl histidin.

In summary, we found a convenient strategy for the preparation of the above precursors, using a combined solid and solution phase synthesis. With this combined technique incorporation of the curcumin, DOTA and *N*-carboxymethyl-histidin was successful. Analysis concerning the new biological activity are in progress.

## 9. Irodalomjegyzék

1. Sarkadi B, Homolya L, Szakács G, Váradi A, *Physiol Rev*, **2006**, *86*, 1179-236
2. Sarkadi B, Szakács G, Váradi A. Multidrug resistance in Cancer- Role of ABC Transporter Protein. [www. sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)
3. Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF, *Nature*, **1990**, *346*, 362-5.
4. Deeley RG, Cole SP, *Semin Cancer Biol.*, **1997**, *8*,193-204.
5. Tefkova J., Poledne R., Hubacek A. J., *Physiol. Res.*, **2004**, *53*, 235
6. Dean M, Hamon Y, Chimini G, *J Lipid Res*, **2001**, *42*, 1007-17.
7. Glavinas H, Krajcsi P, Cserepes J, Sarkadi B, *Curr Drug Deliv*, **2004**, *1*, 27-42.
8. Karpowich N, Martsinkevich O, Millen L, Yuan YR, Dai PL, MacVey K, Thomas PJ, *Structure*, *9*, 571-86.
9. Young SG, Fielding CJ, *Nat Genet*, **1999**, *22*, 316-8.
10. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG, *Science*,**1992**, *258*, 1650-4.
11. Cole SP, Sparks KE, Fraser K, Loe DW, Grant CE, Wilson GM, Deeley RG, *Cancer Res*, **1994**, *54*, 5902-10.
12. Grant CE, Valdimarsson G, Hipfner DR, Almquist KC, Cole SP, Deeley RG, *Cancer Res.*, **1994**, 357-61.
13. Deeley RG, Cole SP, *Semin Cancer Biol*, **1997**, *8*, 193-204.
14. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J, *J Natl Cancer Inst*, **2000**, *92*, 1295-302.
15. Robbiani DF, Finch RA, Jäger D, Muller WA, Sartorelli AC, Randolph GJ, *Cell.*, **2000**, *103*, 757-68.
16. Schultz MJ, Wijnholds J, Peppelenbosch MP, Vervoordeldonk MJ, Speelman P, van Deventer SJ, Borst P, van der Poll T, *J Immunol*, **2001**, *166*, 4059-64.
17. Glavinas H, Krajcsi P, Cserepes J, Sarkadi B, *Curr Drug Deliv*, **2004**, *1*, 27-42.
18. Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V and Dean M, *Cancer Res*, **1998**, *58*, 5337-5339.
19. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK and Ross DD, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1998**, *95*, 15665-15670.
20. Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, Bates SE, *Cancer Res*, **1999**, *59*, 8-13.

21. Kim M, Turnquist H, Jackson J, Sgagias M, Yan Y, Gong M, Dean M, Sharp JG and Cowan K, *Clin Cancer Res*, **2002**, *8*, 22-28.
22. Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B, *Blood*, **2002**, *99*, 507-12.
23. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP, *Nat Med*, **2001**, *7*, 1028-34.
24. Merino G, van Herwaarden AE, Wagenaar E, Jonker JW, Schinkel AH, *Mol Pharmacol*, **2005**, *67*, 1765-71.
25. Jonker JW, Merino G, Musters S, van Herwaarden AE, Bolscher E, Wagenaar E, Mesman E, Dale TC and Schinkel AH, *Nat Med*, **2005**, *11*, 127-129.
26. Mizuno N, Suzuki M, Kusuhara H, Suzuki H, Takeuchi K, Niwa T, Jonker JW, Sugiyama Y, *Drug Metab Dispos*, **2004**, *32*, 898-901.
27. Plate R, H. H. Hermkens P, Behm H, C. J. Ottenheijm H. *J. Org. Chem.*, **1987**, *52*, 560-564.
28. van Loevezijn A, Allen JD, Schinkel AH, Koomen GJ. *Bioorg Med Chem Lett.*, **2001**, *11*, 29-32.
29. Allen JD, van Loevezijn A, Lakhai JM, van der Valk M, van Tellingen O, Reid G, Schellens JH, Koomen GJ, Schinkel AH. *Mol Cancer Ther.*, **2002**, *1*, 417-25.
30. Matsson P, Englund G, Ahlin G, Bergström CA, Norinder U, Artursson P. *J Pharmacol Exp Ther.*, **2007**, *323*, 19-30.
31. Matsson P, Pedersen JM, Norinder U, Bergström CA, Artursson P. *Pharm Res.*, **2009**, *26*, 1816-31.
32. Anfinsen C. B., *Science*, **1973**, *181*, 223.
33. Neidigh J. W., Fesinmeyer R. M., Andersen N. H., *Nat. Struct. Biol.*, **2002**, *9*, 425.
34. Huyghues-Despointes B. M., Klinger T. M., Baldwin R. L., *Biochemistry*, **1995**, *34*, 13267.
35. Barua B., Lin J. C., Williams V. D., Kummeler P., Neidigh J. W., Andersen N. H., *Protein Eng. Des. Sel.*, **2008**, *21(3)*, 171.
36. Varki L. A., *Glycobiology*, **1993**, *3*, 97.
37. Dwek R. *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 683.
38. Helenius A., Aebi M., *Science*, **2001**, *291*, 23.
39. Imperiali B.; O'Connor S. E., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1999**, *3*, 643.
40. Knight P., *Nature Biotechnology*, **1989**, *7*, 35.
41. Mandal M.; Dudkin V. Y.; Geng X.; Danishefsky S. J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 2557.

42. Treumann A., Lively M. R., Schneider P., Ferguson M. A. J., *Biol. Chem.*, **1995**, 270, 6088.
43. Lemuieux, R. U., Hendriks, K. B., Stick, R. V., James, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 155, C6-C10.
44. Seitz O., *Chembiochem.*, **2000**, 1, 214.
45. Paulsen H., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1990**, 29, 823.
46. Montreuil J., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1980**, 37, 157.
47. Tanner. W., *Biochim. Biophys. Acta*, **1987**, 906, 81.
48. Wieland F., *Biochemie*, **1988**, 70, 1493.
49. Lis H., Sharon N., *Eur. J. Biochem.*, **1993**, 218, 1.
50. Schwartz R. T., Datema R., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **1982**, 40, 287.
51. Meldal M., Lee. Y. C., Lee. R. T., *Academic Press: San Diego*, **1994**, 145.
52. Gamblin D. P., Scanlan E. M., Davis B. G., **2007**, 1, 605.
53. Gamblin D. P., Scanlan E. M., Davis B. G., *Chem Rev*, **2009**, 109(1), 131.
54. Mizuno M., Muramoto I., Kobayashi K., Yaginuma H., Inazu T., *Synthesis*, **1999**, 1, 162.
55. Kajihara Y., Suzuki Y., Yamamoto N., Sasaki, K., Sakakibara T., Juneja L. R., *Chem. Eur. J.*, **2004**, 10, 971.
56. Meinjohanns E., Meldal M., Paulsen H., Dwek R. A., Bock K., *J. Chem Soc. Perkin Trans.*, **1998**, 1, 549.
57. Michael K., *ACS Symposium Series*, **2007**, 960, 328.
58. Cohen-Anisfeld S. T., Lansbury P. T., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 105.
59. Kerékgyártó J., Kalmár L., Szurmai Z., Hegyi O., Tóth G. K., közlés folyamatban **2010**.
60. Atherton E., Bury C., Sheppard R.C., Williams B.J., *Tetrahedron Letters*, **1979**, 32, 3041.
61. Mager P. P., Penke B., Walter R., Harkany T., Härtig, W., *Current Medicinal Chemistry*, **2002**, 9, 1763.
62. Tanzi R. E., McClatchey A. I., Lamperti E. D., Villa-Komaroff L., Gusella J. F., Neve R. L., *Nature.*, **1988**, 331, 528.
63. Tjenberg L. O., J., Lindquist F., Johansson. J., Karlstrom A. L., Thyberg J., Terenius L., Nordstedt C., *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 8545.
64. Soto C., Kindy M. S., Baumann M., Frangione B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **1996**, 226, 672.

65. Shahamas C., Faisal T., Sehamuddin G., *Current Trends of Biotechnology and Pharmacy*, **2008**, 2(2), 226.
66. Chih L. L., Jen K. L., *J. of Can. Mol.*, **2008**, 4(1), 11.
67. Puchtler H., Sweat F., Levine M., *J. Histochem. Cytochem.*, **1962**, 10, 355.
68. Podlisny M. B., Walsh D. M., Amarante P., Ostaszewski B. L., Stimson E. R., Maggio J. E., Teplow D. B., Selkoe D. J., *Biochem.*, **1998**, 37, 3602.
69. Klunk W. E., Debnath M. L., Pettergrew J. W., *Neurobiol. Aging.*, **1994**, 15, 691.
70. Klunk W.E., Jacob R. F., Mason R. P., *Anal. Biochem.*, **1999**, 266, 66.
71. Nakagami Y., Nishimura S., Murasugi T., Kaneko I., Megura M., Marumoto S. K. H., Koyama K., Oda T., *Br. J. Pharmacol.*, **2002**, 137, 676.
72. León-Rodríguez L. M., Ortiz A., Weiner A., Zhang S., Kovacs Z., Kodadek T., Sherry A. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 3514.
73. Edreira M., Melendez-Alafort L., Mather S. J., *Nucl. Med. Commun.*, **2002**, 23, 493.
74. Gali H., Sieckmann G. L., Hoffman T. J., Owen N. K., Mazuru D. G., Forte L. R., Volkert W. A., *Bioconjugate Chem.*, **2002**, 13, 224.
75. León-Rodríguez L. M., Kovacs Z., *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19(2), 391.
76. Fichna J., Janecka A., *Bioconjugate Chem.*, **2003**, 14, 1.
77. Liu S., Edwards D. S., *Bioconjugate Chem.*, **2001**, 12, 7.
78. Szegedi V., Fülöp L., Farkas T., Rózsa E., Robotka H., Kis Z., Penke Z., Horváth S., Molnár Z., Datki Z., Soós K., Toldi J., Budai D., Zarándi M., Penke B., *Neurobiol. Dis.*, **2005**, 18, 499.
79. Pictet A., Spengler T., *Ber.*, **1911**, 44, 2030.
80. Rosseau J. F., Dodd R. H., *J. Org., Chem.*, **1998**, 63, 2731.
81. Sánchez-Sánchez M. M., Tel-Alberdi L. M., Rioseras M. J., Rico-Ferreira M. R., Bermejo-González F., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1993**, 66, 191.
82. Tatsui G. J., *Pharm. Soc. Jpn.*, **1928**, 48, 92.
83. Gisin B.J., Merrifield R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, 94, 3102.
84. Kaljuste K.; Undén A., *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 9211.
85. Mohan R., Chou, Y-L., Morrissey M. M., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 3963.
86. Yang L., Guo L., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 5041.
87. Mayer J. P., Bankaitis-Davis D., Zhang J., Beaton G., Bjergarde K., Andersen C. M., Goodman B. A., Herrera C. J., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 5633.
88. Kowalski P., Bojarski A. J., Mokrosz J. L., *Tetrahedron*, **1995**, 51, 2737.

89. Carpino L. A., El-Fahman A., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5401.
90. Akaji K., Kuriyama N., Kimura T., Fujiwara Y., Kiso Y., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 3177.
91. Akaji K., Kuriyama N., Kiso Y., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 3315.
92. Akaji K., Kuriyama N., Kiso Y., *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 3350.
93. Akaji K., Tamai Y., Kiso Y., *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 9341.
94. Akaji K., Tamai Y., Kiso Y., *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 3350.
95. Carpino L. A., El-Fahman A., Minor C. A., Albericio F. J., *Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, *65*, 201.
96. Lin JH, Yamazaki M, *Clin Pharmacokinet*, **2003**, *42*, 59-98.
97. Zhang Y, Bachmeier C, Miller DW, *Adv Drug Deliv Rev*, **2003**, *55*, 31-51.
98. Xia CQ, Milton MN, Gan LS, *Curr Drug Metab*, **2007**, *8*, 341-63.
99. Glavinás H, Krajcsi P, Cserepes J, Sarkadi B, *Curr Drug Deliv*, **2004**, *1*, 27-42.
100. Hudák P., Stráner P., Farkas V., Váradi Gy., Tóth G., Perczel A., *Biochemistry*, **2008**, *47*, 1007.
101. Neidigh J. W., Fesinmeyer R. M., Andersen N. H., *Nat. Struct. Biol.*, **2002**, *9*, 425.  
Streicher W. W., Makhatadze G. I., *Biochemistry*, 2007, *46*, 2876.
102. Mok K. H., Kuhn L. T., Goetz M., Day I. J., Lin J. C., Andersen N. H., Hore P. J., *Nature*, **2007**, *447*, 106.
103. Ahmed Z., Beta I. A., Mikhonin A. V., Asher S. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 10943.
104. Perczel A., Hollósi M., Tusnády G., Fasman G. D., *Protein Eng.*, **1991**, *4*, 669.
105. Perczel A., Park K., Fasman G. D., *Anal. Biochem.*, **1992**, *203*, 83.
106. Jákli I., Perczel A., *Pept. Sci.*, **2009**, *15*, 738.
107. Freeman NS., Gilon C., *Synlett*, **2009**, *13*, 2097.
108. Neidigh J.W., Fesinmeyer R. M., Andersen N. H., *Nature Struct. Biol.*, **2002**, *9*, 425.
109. Doege K. J., Sasaki M., Kimura T., Yamada Y., *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*(2), 894.

## **Köszönetnyilvánítás**

Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Tóth Gábor tanszékvezető egyetemi tanárnak, témavezetőmnek a szakmai irányításért. Köszönöm, hogy beavatott a peptidkémiai és laboratóriumi munkával kapcsolatos fontos tudnivalókba, és önállóságot biztosított a munkám során.

Külön köszönettel tartozom Dósai Molnár Évának, aki nélkülözhetetlen tanácsaival, önzetlen támogatásával, alapvetően hozzájárult szakmai fejlődésemhez és sikeres munkámhoz. Köszönöm munkatársaimnak Nagy Katalinnak, Váradi Györgyinek, Hegyi Orsolyának, Rákosi Kingának a szakmai segítséget.

Hálával tartozom az Orvosi Vegytani Intézet munkatársainak, akikhez bármikor fordulhattam a kísérleteim közben felvetődő gondjaimmal.

Köszönöm Pádár Petrának a disszertációm alapos áttanulmányozását és hasznos észrevételeit.

A tömegspektrometriai méréseket Dr. Kele Zoltánnak köszönöm.

A szerkezetvizsgálatokat Prof. Dr. Perczel András és munkatársainak köszönöm.

A biológiai vizsgálatokat Dr. Krajcsi Péter és munkatársainak, valamint Prof. Dr. Zupkó István és munkatársainak köszönöm.

Köszönöm Dr. Kerékgyártó Jánosnak és munkatársainak a szintetizált glikozilált aminosav származékokat.

Köszönöm drága Szüleimnek az áldozatvállalást és azt a sok szeretetet, megértést és támogatást, melyet tanulmányaim során nyújtottak és nyújtanak mind a mai napig.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm férjemnek a támogatását, megértését és türelmét.