

Aminosav-származékok és peptidek tervezése és szintézise
a XIII-as véralvadási faktor gátlására.

Egyetemi doktori értekezés

Nagy Attila

Gyógyszerkutató Intézet, 1989

B 5153



E 3.431

TARTALOMJEGYZÉK

oldal

I.	Bevezetés.....	1
I.1.	A véralvadásról általában.....	1
I.2.	Irodalmi áttekintés; az FSF gátlására irányuló törekvések.....	4
I.3.	Célkitűzések.....	12
II.	Szintézisek, módszerek.....	13
III.	Eredmények, hatás-szerkezet összefüggések vizsgálata.....	24
IV.	Összefoglalás.....	41
V.	Kísérleti rész.....	42
VI.	Irodalomjegyzék.....	71

A dolgozatban használt fontosabb rövidítések jegyzéke

FSF	fibrin stabilizáló faktor, XIII-as véralvadási faktor (a proenzimet és az aktivált enzimet is így jelöltem)
TG-áz	szöveti (pl. máj) transzglutamináz
γ -GTP	γ -glutamil-transzpeptidáz

Szubsztituensek, reagensek, oldószerek

Z	benzil-oxikarbonil, v. karbobenzoxi
Boc	terc.-butil-oxikarbonil
Trt	tritol
Me	metil
Ac	acetyl
Bzl	benzil
Ph	fenil
Tcp	2,4,5-triklórfenil
Pfp	pentafluorfenil
Suc	szukcinil
Bu ^t	tercier-butyl
TEA	trietyl-amin
DCC	diciklohexil-karbodiimid
DCU	diciklohexil-karbamid
DPKA	3,5-dimetil-pirazol-1-karboxamidin
JBT	jodozobenzol-bisztrifluoracetát
NBP	4-(4-nitrobenzil)-piridin
TMDDM	N,N,N',N'-tetrametil-diamino-difenil-metán
CHIBE	klórhangyasav-izobutyl-észter
TosOH	toluolszulfonsav
TFA	trifluorecetsav
AcOH	ecetsav
EtOAc	etyl-acetát
Pip	piperidin
Pir	piridin
THF	tetrahidrofuran
DMF	dimetyl-formamid

Ritkábban előforduló és új aminosavak

Ag1	anthglutin, Glu(NHNH-Ph[2-COOH])
Aly	2-amino-4-(2-aziridil)-vajsav
Ase	azaszerin, Ser(COCHN ₂)
Dap	2,3-diamino-propionsav
Glc	2-amino-4-ciano-vajsav
Don	5-oxo-6-diazo-norleucin
Pal(3)	3-(3-piridil)-alanin

I. Bevezetés

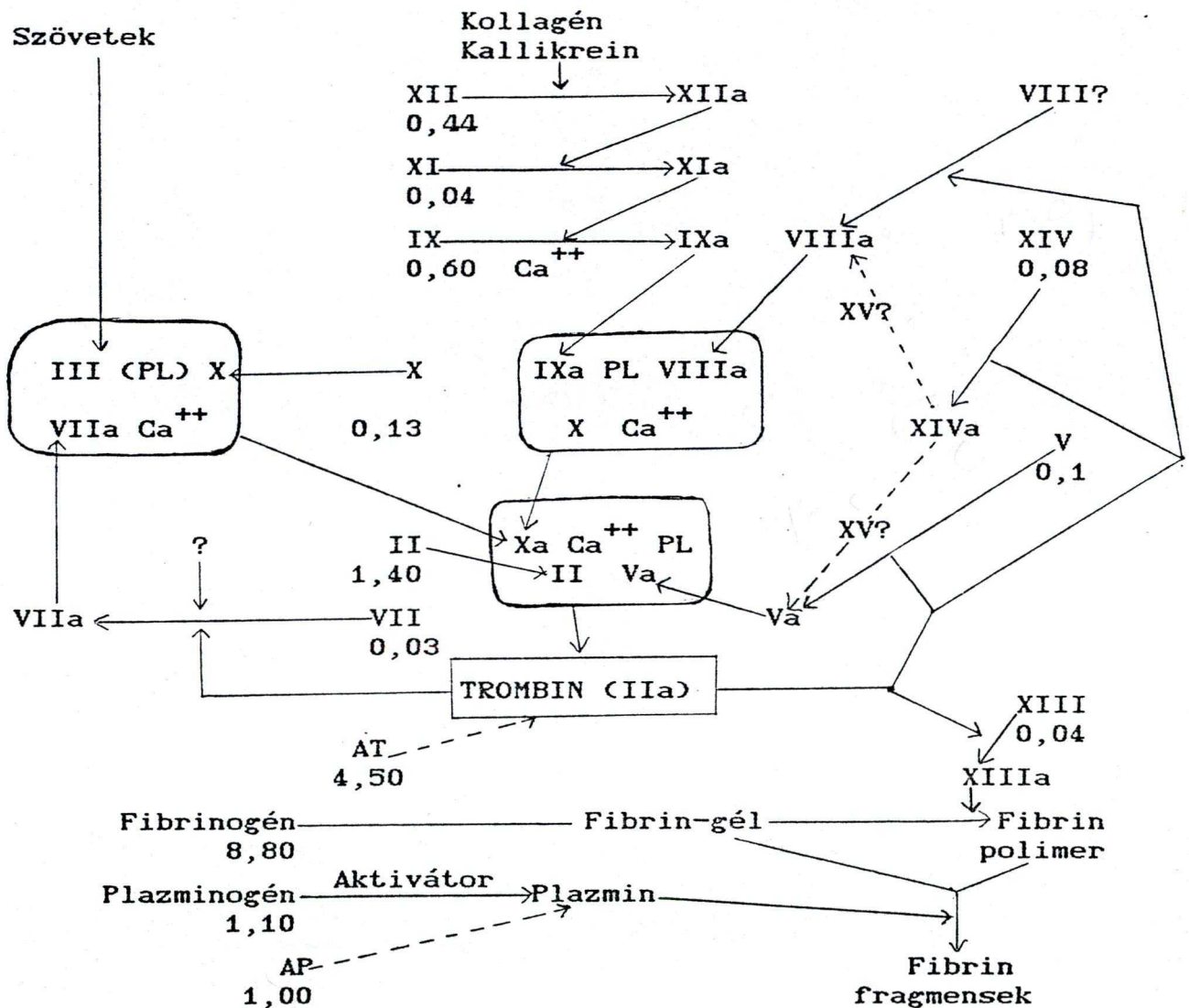
I.1. A véralvadásról általában

A hemosztázis az élő szervezet egyik fontos védekező rendszere. A magasabb rendű szervezetek eme igen bonyolult, árnyalt szabályozási rendszer segítségével akadályozzák meg az elvérzést az érfalak sérülése esetén, valamint a spontán belső vérzéseket.

A szabályozási folyamatban részt vesznek az érfalak, a vérlemezkék, valamint a plazmában oldott fehérjék, az alvadási és fibrinolitikus rendszer faktorai. E tényezők összehangolt kölcsönhatása a hemosztázis. Az érfalak sérülése működésbe hozza a vérlemezkéket és az alvadási rendszert, mely utóbbi még külön is kölcsönhatásban van az előbbivel. Az alvadék proteolitikus lebontását a fibrinolitikus rendszer végzi.

A hemosztázis folyamatai közül emberben a véralvadás a meghatározó. A plazmában végbemenő alvadási kaszkád-folyamatról alkotott mai elképzelést az 1. ábrán láthatjuk. A római számok azokat az ún. koagulációs faktorokat jelölik, melyek a plazmában találhatók inaktív állapotban. Többségük igen specifikus tripszinszerű enzimek zimogénje: így a XII, XI, IX, X, VII és II. Ez utóbbi protrombin néven ismert. Az V-ös és a VIII-as zimogének aktiválás után akcelerátorként működnek. A XIII-as faktor a transzglutamináz előenzimje, és a PL a folyamatban résztvevő foszfolipideket jelöli. Az a

indexszel az enzimek aktív formáit jelöltük.



1. ábra. A véralvadási kaszkád és a fibrinolízis főbb mozzanatai, valamint a résztvevő plazmafehérjék koncentrációja μM -ban. (Az inhibitorok elsődleges támadáspontját szaggatott-vonal jelzi.)

Az alvadás folyamata két fő fázisra bontható. Az elsőben egymást követő zimogén-enzim átalakulásokat találunk, melyek végül trombin képződéséhez vezetnek. A második fázisban a trombin a fibrinogént hasítva hidrofób és ionos kötésekkel stabilizált fibringélt alakít ki, melyet az ugyancsak a trombin által aktivált XIII-as faktor "oldhatatlan", térhálós fibrin-polimerré alakít [1].

A trombin specifikus gátlására irányuló törekvéseket a trombinnak a véralvadásban játszott középponti szerepe indokolja. Intézetünkben Bajusz Dr. és kollektívája jelentős sikereket könyvelhet el e téren. Az általuk szintetizált GYKI 14166 (D-Phe-Pro-Arg-H), ill. a később kifejlesztett N-monometil-származék, a GYKI 14766 jelű D-MePhe-Pro-Arg-H 10^{-8} M koncentráció tartományban specifikusan képesek gátolni a trombint.

Az intézeti hagyományok és az elért sikerek kapcsán a 70-es évek végén próbálkozások történtek a kaszkád egy másik fontos enzimjének, a XIII-as, vagy fibrin-stabilizáló faktornak (FSF) a gátlására. Az így szerzett tapasztalatokra támaszkodva kezdtük el újra 1984-ben az FSF gátlására irányuló kísérleteinket.

I.2. Irodalmi áttekintés; az FSF gátlására irányuló törekvések

A véralvadási kaszkád utolsó szakasza, a stabilizált, "oldhatatlan" fibrin kialakulása önmagában is összetett folyamat. Legalábbis gerincesekben az. Megismerése több évtized tudományos munkáját foglalja magában.

A fibrinogén izolálására és fibrinné való átalakulására vonatkozó első vizsgálódások egy évszázadra nyúlnak vissza. A századforduló óta hatalmas információmennyiség gyűlt össze e fehérje fizikai, molekuláris sajátságairól [2,3], míg a 70-es évek végére felderítették kémiai szerkezetét, az $[(A)\alpha, (B)\beta, \gamma]_2$ jelöléssel ellátott dimerstruktúrát. Ebben az α -, β -, és γ -fehérjeláncokat cisztinhidak kötik össze, A és B az $(A)\alpha$ - és $(B)\beta$ -lánc N-terminális, ún. fibrinopeptid része. Mindkettőt a trombin hasítja le a fibrinogén-fibrin transzformációban [4].

Az a feltételezés, hogy a fibrin-szálak keresztkötései transzamidálás útján jöhetnek létre, már az ötvenes évek végén felmerült Laki Kálmán és Lóránd László elképzelésében, melyet a hatvanas évek elején publikáltak [5].

A fehérjeláncok glutamin-részeinek γ -savamid és lizin-részeinek ε -amino-csoportjai között izopeptid-kötés létrehozásáért felelős enzim izolálása és jellemzése a hatvanas évek végétől mondhatni egészen napjainkig elhúzódott, mikor is 1986-ban sikerült meghatározni az enzim primer

struktúráját [6]. Az enzim a véralvadási kaszkádban a XIII-as faktor elnevezést kapta, de ismeretes úgy is mint Laki-Lóránd faktor, fibrinoligáz, transzglutamináz, fibrin-stabilizáló faktor (FSF). (A következőkben ez utóbbi jelölést használjuk.) Az enzimnomenklatura szerint: EC 2.3.2.13 (protein-glutamin: amin γ -glutamil-transzferáz). FSF-aktivitást hordozó enzim egyaránt található a plazmában, a lemezkékben és a placentában. A kb. 340000 D relatív molekulatömegű plazma FSF katalitikus "a" ($M_r \approx 80000$ D) és nemkatalitikus "b" ($M_r \approx 85.000$ D) láncokból álló a_2b_2 dimer. A lemezke- és placenta-eredetű FSF a "b" alegység nélküli dimer formában létezik, csak a katalitikus "a"-láncot tartalmazza (a_2). A katalitikus "a" alegység egy 730 aminosavból álló, nem glikozilált polipeptid lánc. Aktiválása a következő lépésekben foglalható össze [6] :

- 1.) a trombin hasítja a proenzimet az Arg³⁷-résznél,
- 2.) Ca²⁺-kötés Gln⁴⁶⁸ és Asp⁴⁷⁹ térségében, melynek következtében
- 3.) Cys³¹⁴ SH-csoportja aktiválódik és a γ -CONH₂ kötést ammónia felszabadulása mellett tio-észterré alakítja.

A trombin a katalitikus "a"-láncot is hasítja a Lys⁵¹³-rész mentén, ami az enzimaktivitás elvesztéséhez vezet. Az a tény, hogy a trombin az FSF aktiválásában és inaktiválásában egyaránt részt vesz, újabb példát szolgáltat a

trombinnak a véralvadásban betöltött fontos szabályozó szerepére.

FSF-hez hasonló transzglutamináz (TG-áz) enzimet izoláltak több szövetből, pl. patkány májból is. Ezeknek az ún. szöveti TG-ázoknak a szerkezete még nem ismert, többet tudunk működésük mechanizmusáról. A tengerimalac májából izolált TG-áz katalitikus működésének mechanizmusát vizsgálva már a 60-as évek közepén megállapították (Folk), hogy az enzim aktív centrumában lévő Gly-Gln-Cys-Trp ciszteinjének SH-csoportja megfelelő akceptorral (peptid-Gln) ammónia kilépése közepette tetraéderes acil-enzim komplexet képez, mely amin-donor jelenlétében a komplex aminolízise révén γ -amiddá és szabad enzimmé alakul [10]. Az is régóta ismeretes, hogy a TG-ázok aktív centrumában talált fenti tetrapeptid-szekvencia az FSF-re is jellemző [7]. Jelentős különbség mutatkozik ugyanakkor a kétféle enzim akceptor-szubsztrát specificitásában. A máj TG-áznak például jó szubsztrátjai a fibrinogén és a fibrin is, melyekkel 21 helyen képes izopeptid-kötéseket létrehozni. Az FSF a fibrint csupán 6 intermolekuláris izopeptidkötéssel képes polimerizálni, s bár a fibrinogénhez való affinitása közel azonos a fibrinhez való affinitásával [39], a molekulánkénti keresztkötések száma pontosan nem ismert. Általában úgy tűnik, hogy az FSF nagyobb szelektivitást mutat az akceptor Gln környezetét illetően, mint a TG-ázok, bár az FSF-nek sem csak

a fibrin a természetes szubsztrátja, hanem számos fehérje is, pl. az V-ös véralvadási faktor, α_2 -makroglobulin, lemezke-miozin, aktin, fibronectin [6].

Az FSF és a TG-ázok akceptor-szubsztrát-specifitását vizsgálva Gorman és Folk olyan dekapeptidet szintetizált [9a], mely határozottan jobb szubsztrátja az FSF-nek, mint a tengerimalac májból izolált TG-áznak. E szubsztrát kikísérletezésében jelentős szerepet játszott a hasonló specifitású FSF szubsztrát, a β -kazein, melynek vizsgálatai során a Gln¹⁶⁷ bizonyult az "aktív" akceptornak. A Leu-(Gly)₃-Gln-Gly-Lys-Val-Leu-Gly-NH₂ peptidet a Leu³ változatával együtt az FSF aktivitásának klinikai meghatározására ajánlják az eddig használt β -kazein helyett [9]. A Gly részeket Ser-nel felcserélve a specifitás jelentősen nő az FSF irányába, míg a láncvégi Val-Leu egyszerű felcserélése teljesen lerontja a peptid FSF-szubsztrát jellegét, noha továbbra is jó TG-áz-szubsztrát marad. Ha azonban a Val, ill. Leu akármelyikét Ala-ra cserélték, a peptid szubsztrát-jellege mindkét enzimre nézve elveszett [9a]. (Kiváló példája ez annak, hogy a TG-áz szubsztrátok esetében is lényeges az akceptor-Gln környezete, ha nem is olyan mértékben, mint az FSF-nél.)

Jó TG-áz szubsztrátnak bizonyult a Z-Gln-Gly-OH (Folk) dipeptid, melyből az enzim hidroxilamin jelenlétében hidroxamátot képez. Az enzim a dipeptid γ -p-nitrofenil-

-észterét elhidrolizálja. Más aktív észterek hidrolízisére is képes a TG-áz. A trimetil-ecetsav p-nitrofenil-észterével való reakcióban a képződő trimetil-acetil-enzim komplex stabilitása olyan mértékű (a metilcsoportok elektronküldő effektusának és térkitöltésének következtében), hogy lehetővé tette jelzett acil-enzim-komplex izolálását [10]. Ezzel szemben a Z-Gln-Gly-OH azon analógjai, melyek a β -, vagy γ -szénatomon CH_3 -szubsztituált glutamint tartalmaznak, hidroxilamin jelenlétében nem képeznek γ -hidroxamátot a TG-áz hatására. Valószínű tehát, hogy nem képződik acil-enzim komplex. A dipeptid esetében eszerint fontos a Gln egyenes oldallánca, szemben a trimetil-ecetsav-észternél tapasztaltakkal. (Ennek az lehet a magyarázata, hogy a Z-Gln-Gly-OH kötődésében a Gln-oldallánc mellett a $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CO}-$ peptid-váz is részt vesz, míg a trimetil-ecetsav-észter esetében ilyen molekularész nincs.)

Az említett aktív észterek jó kompetitív gátlóknak bizonyultak, s ennek alapján állítottak elő különböző észtereket az FSF gátlására. Így pl. Lóránd [17], majd azt követően Ch. Ljunggren [18] olyan tio-észtereket szintetizáltak (a tio-kolin és annak különféle N-alkil származékainak észtereit), melyek még a danzil-kadaverinnél (lásd alább) is valamivel jobb FSF-gátlóknak bizonyultak.

A metil-izocianát az enzim aktív centrumában lévő Cys SH-jával tiokarbamoil-észtert képez, ami stabil vegyület; pl.

a jelzett metil-tiokarbamoil-TG-áz izolálható volt. Folk [19] ennek alapján különböző alkil-izocianátokkal gátolni tudta a TG-ázt. A gátlást Z-Gln-Gly-OH-val ki lehetett küszöbölni. N-metil-karbamiddal az enzim nem reagált, mint ahogy a glutamin karbamid-analógjából képzett Z-Alb-Gly-OH-val sem.

A fent említett TG-áz szubsztrát, a Z-Gln-Gly-OH közepesen gátolja az FSF-et a keresztkötések kiépítésében. Ugyanakkor az FSF e dipeptidet nem konvertálja a megfelelő γ -acil-származékká pl. hidroxilamin, danzil-kadaverin vagy glicin-metilészter jelenlétében. Ennek alapján a Z-Gln-Gly-OH nem tekinthető az enzim szubsztrátjának. Jelzett Z-Gln-Gly-OH fibrinbe történő inkorporálását azonban nem vizsgálták. Csak azt állíthatjuk biztonsággal, hogy a dipeptid az FSF akceptor-kötőhelyén kötődik, s ily módon képes gátolni az enzimet. (Elképzelhető, hogy nem képződik acil-enzim, de az sem zárható ki, hogy egy kevésbé aktív komplex alakul ki.) A Z-Gln-Gly-OH jól példázza a két enzim akceptor-szubsztrát specificitásának különbözőségét.

Donor-szubsztrát tekintetében azonban mindkét enzim jóval kevésbé specifikus. Számos kismolekulájú amint képesek például fehérjékbe beépíteni. Napjainkban derült fény diaminok (kadaverin, putreszcin), sőt hisztamin glutamil-oldalláncokba történő beépítésére, mely utóbbi immunstimulusokkal való összefüggéseit vizsgálták [8].

A különféle kismolekulájú aminosavak fehérjékbe történő

készséges inkorporálódása állította a kutatók figyelmének középpontjába az aminosavakat mint potenciális enzimgátlókat. Az akceptor-enzim komplex aminolízise révén pl. glicin-metil- és etil-észterek γ -glutamil-glicin-észtereket eredményeznek fibrin keresztkötések kiépülése helyett. A gátló hatás gyenge ugyan, de karakterisztikus [11].

Lóránd [12] fejlesztette ki a máig egyik legjobb FSF gátlót, a danzil-kadaverint [N-(5-aminopentil)-5-dimetil-amino-1-naftalinszulfonamid]. A számos szintetikus amin-inhibitor közül, melyek $X-(CH_2)_n-NH_2$ alakkal jellemezhetők, az $n=5$ "amin-oldallánc"-hosszúság mutatkozott igen lényegesnek. A danzil-kadaverin analógok közül egyedül a "Lys"-oldallánc középső részén kénatommal helyettesített 3-tia változat mutatott fokozottabb FSF-gátló hatást [13].

A legújabb (1988) potens TG-áz gátlók közé tartoznak a 3-halo-4,5-dihidro-izoxazol-származékok (Castelhano). Ezen vegyületek egyike tulajdonképpen egy a γ -glutamil-transzpeptidáz (γ -GTP) irreverzibilis inhibitoraként ismert antibiotikum, az $(\alpha$ -S,5-S)- α -amino-3-klór-4,5-dihidro-5-izoxazolecetsav dekarboxilezett, Z-Tyr-nel acilezett származéka [31]. Míg az antibiotikum akceptor-analóg inhibitor, addig a fenti dekarboxilezett származékról már nem állíthatjuk biztosan, hogy az akceptor-kötőhelyen kötődő inhibitorról van szó. A karbobenzoxi-tirozil rész kötőhelye könnyen lehet azonos a donor-inhibitor danzil-kadaverin

naftalin-részének kötőhelyével.

Meg kell még említenünk, hogy a TG-ázt irreverzibilisen gátolják SH-reagensek, pl. jódacetamid, α -bróm-4-hidroxi-3-nitroacetofenon, N-(2-hidroxi-5-nitrofenil-acetil)-L-2-amino-4-oxo-5-klórvaleriánsav-metil-észter. A jódacetamidok gátlás Z-Gln-Gly-OH-val a metil-izocianáthoz hasonlóan kivédhető volt.

I.3.Célkitűzések

Az irodalmi áttekintésben ismertetett szubsztrátok és gátlók igen fontos szerepet játszottak az enzimkinetikai vizsgálatokban, sőt klinikai enzimaktivitás mérések tekintetében is. Terápiás jelentőségű FSF-gátlót azonban nem sikerült még előállítani. Laboratóriumunkban ezért olyan peptidszármazékok tervezésével és szintézisével próbálkoztunk, melyek rendelkeznek az ehhez szükséges hatásossággal.

Célunk volt továbbá az aktív centrumra irányított gátlók segítségével az aktív centrum környezetére vonatkozó információk szerzése. Így például esetleges ionos kötődési helyek feltérképezése, mely igen fontos adat lehet specifikus inhibitorok tervezéséhez.

A továbbiakban az általam szintetizált vegyületeket és azok in vitro hatásának vizsgálata során szerzett tapasztalatokat, eredményeket ismertetem.

II. Szintézisek, módszerek

Ebben a fejezetben ismertetem az FSF-gátlás céljából tervezett vegyületek szintézisét, különös tekintettel a felmerült kémiai problémák megoldására.

A Z-Met-Gly-OH (I) szintézise klasszikus peptidkémiai módszerekkel történt. Érdemes megjegyezni, hogy a vegyület peroxiddal szennyezett éterből is jó termeléssel, tisztán kristályosítható. A kevés szulfoxid-származék szennyezés oldatban maradt.

A $\text{Z-Met(Me)}^+\text{-Gly-OH.TosO}^-$ -t (II) először az I metil-észteréből próbáltuk előállítani a $\text{Z-Met(Me)}^+\text{-ONP}$ szintézisének alapján [14]. Ez utóbbi a Met-származékból toluolszulfonsav-metil-észterrel készült vízm. EtOAc-ban. Az I metil-észterének metilezése azonban nem sikerült ilyen módon. Az S-metil-metionin szintézisének irodalmából kiderül, hogy a közeg polaritásának fokozása az ionos termék képződését nagy mértékben elősegíti [15]. Ennek figyelembevételével I-et és metil-jodidot aceton-vízben oldva melegítettünk 45°C -on zárt térben. A II-nek megfelelő jodid néhány óra alatt kialakult, a reakcióelegy - az aceton ledesztillálása és etil-acetátos extrakció után - tisztán tartalmazta a terméket. Az oxidációra érzékeny jodid ellenionok tozilát-ciklusú AG-1X2 anioncserélő gyantán készségesen lecserélődnek. A tozilát stabil liofilizátumot ad. Rosszul oldódó metionin-tartalmú peptidek

oldékonysága a metilezés révén javul pl. DMF-ben [14]. A fenti módszerrel esetleg nagyobb metioninos peptidek is metilezhetők (vizes acetón, vizes alkohol vagy vizes acetonitril elegyekben), pl. ha fragmenskondenzációhoz oldékonyabbá kívánjuk tenni azokat.

Alkilező reagensként metil-jodid helyett benzil-bromidot, ill. 2-naftil-metil-bromidot használva a fentiekkel egyező reakcióúton a megfelelő benzil-, ill. 2-naftil-metil-szulfónium származékokhoz jutottunk, valamivel rosszabb hozammal (III, IV). A bromidsók liofilizátumai néhány hetes állás után bomlanak.

A Z-Met-Gln-His-OH tripeptidet klasszikus peptidkémiai módszerekkel szintetizáltuk, s a fentiekkel azonos módon készítettük el a metil-, benzil-, ill. 2-naftil-metil-szulfónium-származékokat (V, VI, VII).

A $(Z\text{-Hcy-Gly-OH})_2$ -t (VIII) a $(Z\text{-Hcy-OH})_2$ és Gly-OBu^t vegyes anhidrides kapcsolását követő TFA-s kezeléssel nyertük. A kiindulási homocisztint metioninból állítottuk elő [26].

A fentivel teljesen analóg módon nyertük a $(Z\text{-Cys-Gly-OH})_2$ -t (IX).

A Z-Met(O)-Gly-OH-t, az I szulfoxid-származékát (X) 99,5%-os ecetsavas oldatban 0,5N H_2O_2 -dal készítettük I -ből.

A Z-His-Gly-OH-t (XI) Z-His(Z)-OTcp és Gly-OBu^t kapcsolásával állítottuk elő. TEA/MeOH-lal eltávolítottuk a Z-védőcsoportot az imidazolról, majd TFA-s kezeléssel

eltávolítottuk a tercier-butil-észtert. Vizes metanolos átkristályosítás után sómentes végtermékhez jutottunk.

A Z-His-Gln-His-OH (XII) előállításánál a tripeptid-metil-észter NaOH-os hidrolízisét követő sótelenítés okozott problémát. Végül ekvivalens sósav hozzáadása után víz/acetone elegyből sómentesen nyertük ki a tripeptidet. Azt találtuk ugyanis, hogy 3mmol NaCl 20mL vízben oldva még 100mL acetone hozzáadására sem válik ki. Ez a módszer alkalmas lehet egyéb, a karboxi-terminuson szabad hisztidint tartalmazó peptidek sómentesítésére, illetve belső-só formában történő izolálására.

Z-Dap-Gly-OBu^t-ből kiindulva szintetizáltuk az α -karbobenzoxi- β -karboxamidil-L-diaminopropionil-glicin TFA-sóját (XIII). A Z-Asn-OH JBT-s (Hoffmann-reagens) lebontásának analógiájára [27] a Z-Asn-Gly-OBu^t-t a megfelelő Dap-származékká alakítottuk. A savanyú oxalát jó hozammal, kromatográfiásan csaknem egységes termékként kristályosítható. A 3,5-dimetil-pirazol-1-karboxamidin (DPKA) acetátja sem oldódik kellőképpen vízmentes DMF-ben, s így a guanilezés meglehetősen gyengén ment. Egy csepp víz hozzáadása azonban a reakciót gyorsan teljessé tette. (Bázisként TEA-t használtunk.)

A Z-Asp-Gly-OH DCHA-sóját (XIV) sikerült stabil, egységes vegyületként előállítani. Ehhez Z-Ser-Gly-OBu^t-ből indultunk ki, melyet Boc-Gly-OPfp-vel acileztük jó hozammal. (A

klórszénsav-izobutil-észterrel, ill. klórszénsav-etil-észterrel képzett vegyes anhidridekkel nem sikerült acilezni a szerin-OH-t. Triklórfenil-észterrel pedig csak rossz hozammal.) (Az azaszerin szintézisének az irodalomban [20,21] az N-védett glicin pivaloil-kloriddal képzett vegyes anhidridjével, klóracetil-, ill. brómacetil-kloridon keresztül, valamint N-karboxi-glicin-anhidriddel képzik az O-glicil-szerint.) A Boc-csoport eltávolítását követően a trifluoracetát sót pH=4-en szobahőn diazotáltuk NaNO_2 -tel. A termékünket EtOAc-cal extraháltuk. A Na_2SO_4 -on szárított, híg EtOAc-os oldatból is kvantitatíve kikristályosodott a dipeptid DCHA-sója.

A Z-Don-OH piperidínium-sóját (XVI) sikerült izolálni. Z-Glu-OPh, ill. Z-Glu-OBzl oldalláncán CHIBE-vel képzett vegyes anhidrid diazometános reakcióját követően az α -észtert vizes metanolos piperidinnel hidrolizáltuk. (Az irodalomban [23] részletesen ismertetett problémákkal mi is találkoztunk, az α,γ -diészter mellett karbobenzoxi-piroglutaminsav-észter a mi termékeinket is szennyezte.) A hidrolízist követően a jelentős Z-Glu-OH-szennyezéstől úgy szabadultunk meg, hogy termékünk piperidínium-sóját butanol/EtOAc 2:1 arányú elegyével extraháltuk, ugyanis a dikarbonsav piperidínium-sója a vízben marad.

(A Tfa-Glu-OEt-ből, a karbobenzoxi-származékkal szemben, problémamentes a γ -diazometil-keton szintézise [32]. Újabban

azonban az (S)-3-karbobenzoxi-5-oxo-4-oxazolidinpropionsavból savkloridon keresztül, diazometánnal szintetizáltak α -karbobenzoxi- γ -diazometil-ke-ton-származékot a mellékreakciók kiküszöbölésével [34].)

A Boc-Glu(CH₃)-OH (XVII) szintéziséhez Boc-Glu-OBzl-ből indultunk ki. A γ -diazometil-ke-ton struktúrá-t XVI-hoz hasonlóan vegyes anhidrid/diazometán reakcióval építettük ki. Itt azonban a Boc-csoport jelentős térgátlása következtében a vegyes anhidrid nem képez piroglutamin-származékot, s így a diazometil-ke-ton is jobb hozammal képződik. Metanolban, piridin-klórhidrát és 1N vizes sósav hatására (pH $\approx$ 4-5) a diazometil-ke-ton klórmetil-ke-tonná alakítható, melyet Pd/C mellett 80%-os ecetsavban hidráltunk. A Cl készségesen lehidrálódott. A képződött HCl azonban jelentős mértékben hasította a Boc-csoportot. Ennek kiküszöbölésére ekvivalens NaOAc-ot adtunk az ecetsavas oldathoz.

A Z-MeGlu(CH₃)-OH (XVIII) szintézisé-nél Z-MeGlu(OBu^t)-OH-ból indultunk ki [28]. Előbb fenol/DCC segítségével fenil-észterré alakítottuk, majd TFA-val eltávolítottuk a γ -OBu^t-csoportot, és végül a fentiekhez hasonlóan kialakítottuk a diazometil-ke-ton-t. A fenil-észter piperidines hidrolízisét követően sósavas EtOAc-cal klórmetil-ke-ton-t képeztünk, melyet Zn/AcOH-ban 1 órán át refluxoltunk. A végtermékként kapott metil-ke-ton-származékot oszlop-kromatográfiával tisztítottuk.

A metil-ke-ton struktúra kialakításának egy másik módszerével is próbálkoztunk a Z-Glu(CH₃)-OH.DCHA (XIX), ill. a Z-Glu(CH₃)-Gly-OH (XX) előállításánál. A Z-Glu(NCH₃OCH₃)-OH-t vízmentes THF-ben MeMgCl segítségével konvertáltuk metil-ke-tonná, közepes hozammal. A XX szintézisé-nél hasonlóképpen jártunk el, csak a megfelelő dipeptid N,O-dimetil-hidro-xamát-jából indultunk ki. (Megjegyzendő, hogy a reakció többszöri próbálkozás után sem ment végbe metil-magnézium-jodiddal. Tény, hogy a reagens éteres oldatának hatására az első lépésben képződő Mg-só kivált, de a reakció elmaradása ezzel sem magyarázható, mert THF-es hígítás után, homogén oldatban sem képződött metil-ke-ton.)

A Z-Glc-OH DCHA-sóját (XXI) az irodalomban leírt módon szintetizáltuk [24], csak a DCHA-só izolálásával kristályos termékhez jutottunk.

A Z-Glc-OTcp kristályos vegyület, melyet Gly-OBu^t-vel kapcsoltunk. TFA-s kezelés után a megfelelő dipeptidhez (XXII) jutottunk.

Itt érde-mes megjegyezni, hogy a Z-Gln-OH → Z-Glc-OH reakció analógiájára próbálkoztunk a Z-Gln-Gly-OH → Z-Glc-Gly-OH reakcióúton XXII direkt szintézisével. Vízmentes piridinben DCC-vel szobahő-n nem történt változás, míg 80°C-on többkomponensű termékhez jutottunk. Ressler [24] megemlíti, hogy a szabad α-karboxi-csoportnak fontos szerepe van mind a Gln, mind az Asn nitril-származékának ilyen módon történő

képződésében. Úgy tűnik, hogy a dipeptid szabad α -karboxi-terminusa már nem képes katalizálni a γ -amidból történő vízelvonást. Így a nitril-származék csak erélyes körülmények között, melléktermékként képződik.

XXIII és XXIV szintézise klasszikus módszerekkel történt.

A Z-Agl-Gly-OH-t (XXV) Z-Glu(OTcp)-Gly-OBu^t és o-hidrazinobenzoésav-klórhidrát kondenzációjával kaptuk. (Vízmentes DMF-ben 2 ekv. TEA mellett.) (Az o-hidrazinobenzoésav belső-sója TEA jelenlétében sem oldódik vízmentes DMF-ben, míg a klórhidrát TEA hatására előbb oldatba megy, majd leválik a TEA.HCl.) Az o-hidrazinobenzoésav-klórhidrátot antranilsav diazotálását követő SO₂-os redukcióval állítottuk elő. Az Sn²⁺/Sn⁴⁺ redox rendszerrel történő redukció a képződő ón-komplex stabilitása miatt nem bizonyult jó megoldásnak.

A Z-Glu(Gly-OH)-Gly-OH (XXVI) előállítását a XXV-höz hasonlóan Z-Glu(OTcp)-Gly-OBu^t és Gly-OBu^t reakcióját követő TFA-s kezeléssel oldottuk meg.

A Z-Pal(3)-Gly-OH (XXVII) szintézisének a rendelkezésre álló Boc-Pal(3)-OH-ból indultunk ki. Előbb a Boc-Pal(3)-Gly-OMe-t állítottuk elő, majd a Boc-csoport eltávolítása után Z-OSu-val acileztünk, s végül szappanosítottunk. A metil-észter lúgos hidrolízisét követően, kihasználva a vegyület poláros és egyszersmind apoláros karakterét, vizes és szerves extrakciókkal tisztítottuk a kromatográfián

többfoltos nyers terméket.

A Z-Aly-Gly-OLi (XXVIII) dipeptidben az Aly új aminosav, melyet δ -hidroxi-L-lizinből kiindulva szintetizáltunk. (Az L-hidroxi-lizin-klórhidrát a Degussa cég ajándéka volt.) Először a δ -hidroxi-L-lizin (Hyl) ϵ -Boc-származékát [H-Hyl(Boc)-OH. $1/2\text{Cu}^{2+}$] készítettük el, a lizinnél jól bevált módszer szerint [40]. A Z-Hyl(Boc)-OH-t a réz-komplex EDTA melletti karbobenzoxilezésével szintetizáltuk. Ezt benzol/etanol elegyben refluxolva, a turner elegyet észterező feltétellel elválasztva alakítottuk laktonná. Kromatográfiásan két foltot kaptunk. Az egyik a lakton a másik pedig etil-észter volt. Az előbbi éterből tisztán kristályosodott. Az étert bepárolva olajos termékhez jutottunk, mely fő tömegében az etil-észtert tartalmazta (kb. 5-10% lakton szennyezéssel). Jelentős eltérést mutatott a két termék forgatása is. Külön kezelve a két frakciót, mindkettőt néhány órán át refluxoltuk vízmentes etanolban, kálium-glicinát feleslege mellett [29]. Ennek eredményeként mindkét frakció kromatográfiásan azonos viselkedésű Z-Hyl(Boc)-Gly-OH-vá alakult, melyek DCHA-sóját jó termeléssel izoláltuk etilacetátból. A Z-Hyl(Boc)-OH DCHA-sója, mely kb. 15-20% szennyezésként volt jelen, kb. 15% dipeptiddel együtt az anyalúgban maradt. Ebből következtetve, az acilezés (kálium-glicinát 5-szörös feleslege mellett) kb. 75-80%-os volt mindkét frakciónál. (Ez pedig még akkor is

figyelemreméltó, ha tekintetbe vesszük a kálium-glicinát amino-funkciójának jelentős nukleofilitását.)

(A továbbiakban a laktonból származó vegyületeket a az etil-észterből származókat pedig b izomernek nevezzük)

A Z-Hyl(Boc)-Gly-OH.DCHA a és b frakcióinak forgatása eltért ugyan, de nem szignifikánsan. A felszabadított DCHA-sókból a Z-Hyl(Boc)-Gly-OMe-származékokat diazometánnal készítettük, majd az ϵ -Boc-védőcsoport eltávolítását követően a Z-Hyl-Gly-OMe.TFA-származékokat izoláltuk. A forgatásértékek itt is csak kis mértékben tértek el. A fenti vegyületek ϵ -amino-csoportjának tritilezését vízmentes piridinben tritil-kloriddal végeztük. A Z-Hyl(Trt)-Gly-OMe-származékok forgatásai azonban már jelentős különbséget mutattak. Lehetséges tehát, hogy az EDTA-réz-komplex jelenlétében végzett karbобензоxilézés lúgos miliójében a δ -C optikai centrum racemizálódott, s a labilisabb laktont képző diasztereomer etilészterré alakult a laktonizálás körülményei között. (Reflux etanol/benzol elegyben.)

A Z-Hyl(Trt)-Gly-OMe-származékok O-mezilezését vízmentes piridinben, mezil-kloriddal végeztük. A Z-Hyl(δ -Mes, ϵ -Trt)-Gly-OMe-származékokat TEA mellett, CHCl_3 /MeOH elegyben refluxolva alakítottuk ki az aziridin-gyűrűt [30]. A Z-Aly(Trt)-Gly-OMe-származékok forgatásértékei szintén jelentős eltérést mutattak.

Érdemes itt megemlíteni, hogy amennyiben a vízmentes

piridinben végzett mezilezést követően a reakcióelegyet több napig -18°C -on állni hagytuk, az aziridin-gyűrű nem képződött meg, szemben az azilin szintézisének korábban tapasztaltakkal [30]. A mezil-származék piridines oldatát vízre öntöttük, a csapadékot kloroformban feloldottuk, vízzel, KHSO_4 -tal, vízzel mostuk, majd bepároltuk. Az így kapott olaj azonban néhány óra állás után jórészt egy kromatográfiásan mobilisabb folttá alakult. Egyértelműen az aziridin-képződés irányába ment azonban a reakció, ha közvetlenül a feldolgozás után kloroformban oldottuk, és TEA felesleg jelenlétében néhány órát refluxoltuk anyagunkat.

Ezen tapasztalatok magyarázatára feltételezzük, hogy a kromatográfiásan mozgékonyabb, nagy R_f -értékű termék úgy keletkezik, hogy a lizin oldallánc 5-ös szénatomja és az α -2-NH-csoport nitrogénje 6-tagú gyűrűt zár. Külső bázis hiányában a kilépő metánszulfonsav a jelentősen bázikus Trt-amino-csoporton kötődik meg, és egyúttal blokkolja azt. Ilyen módon az egyébként is stabil 6-tagú gyűrű kialakulása kedvezményezett. Külső bázis, pl. TEA jelenlétében azonban a 3-tagú gyűrű képződését a gyűrű viszonylagos stabilitása mellett a nukleofil Trt-NH-csoport és a parciálisan pozitív 5-ös C-atom térbeli közelsége, a távozó-csoport kilépését követő gyors rekombinálódás lehetősége biztosítja.

A Trt-védőcsoportnak az aziridin-nitrogénről történő eltávolításakor azt tapasztaltuk, hogy mind a hangyasavas,

mind a trifluorecetsavas módszerek a savérzékeny gyűrű részleges felnyílásához vezettek; 30%-os kloroformos TFA-ban azonban egy óra alatt, szobahőn, a gyűrű sérülése nélkül el lehetett távolítani a Trt-védőcsoportot. A Z-Aly-Gly-OMe-származékok érdekes módon kloroformos oldatban napokig eltarthatók voltak, míg bepárolva, olajként még -18°C -on is kromatográfiásan többfoltos terméké bomlottak.

Az ekvivalensnél kevesebb 0,1N LiOH-oldat hozzáadásával az a izomerből 2-3 foltos termék lett. A b izomer azonos körülmények között kromatográfiásan csaknem egységes terméké (XXVIII) alakult, s liofilizátuma eltartható volt.

Elkészítettünk még néhány nagyobb peptidet is (IV-es táblázat), melyek klasszikus peptidkémiai módszerekkel történt előállítását itt nem részletezzük.

III. Eredmények, hatás-szerkezet összefüggések vizsgálata

A XIII-as véralvadási faktort gátló vegyületek tervezésénél figyelembe vettük az irodalmi áttekintésben már említett ismereteket, és az intézetünkben korábban végzett ezirányú vizsgálódások tapasztalatait.

Vegyületeink tervezésénél nagy segítséget jelentett még az, hogy szinte azonnal visszajelzést kaptunk azok hatásosságáról. Bár a kísérleti részben részletesen ismertetem vizsgálati módszerünket, néhány ezzel kapcsolatos gondolatot érdemes előre megemlíteni.

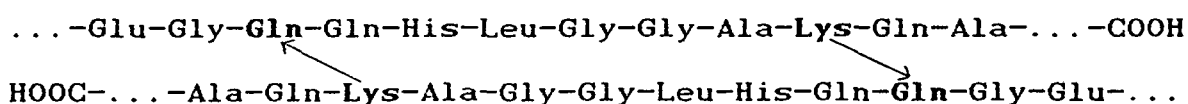
Minden egyes kereszt-kötés-gátlásra irányuló mérésünket ugyanazon az ismert fibrinogén-tartalmú, plazma-fehérjéktől teljesen meg nem tisztított nyers preparátumon végeztük, melynek viszonylag magas volt az FSF-aktivitása. Ez egyben azt is jelenti, hogy a méréseinket az egyik természetes szubsztrátjával mintegy preinkubált enzimen végeztük. A fibrinogén-fibrin átalakulást és a fibrin-FSF reakciót Ca^{2+} és trombin hozzáadásával indítottuk el az inhibitor távollétében (kontroll), ill. jelenlétében (teszt).

Minthogy in vivo az FSF és a fibrinogén nem komplex formájában van jelen a véráramban [38], eredményeinkből nem mindig következtethetünk vegyületeink fiziológiás viselkedésére. Különösen érvényes ez nagyobb kötőterséget igénylő nagyobb, kompetitív gátló peptidek esetében, hiszen

mint ismeretes, az FSF természetes szubsztrátjának, a fibrinnek (ill. a fibrinogénnek is) akceptor- és donor-környezetben egyaránt van specifikus kötőhelye az FSF aktív formáján. Így tehát nem teljesen azonosak a szubsztrát és bizonyos gátlók kompetíciójának feltételei.

Mindezen megfontolások ellenére mérési módszerünk igen alkalmas relatív keresztkötés-gátlások jól reprodukálható, gyors meghatározására. Kontroll vegyületként a már korábban említett danzil-kadaverint, és a Z-Gln-Gly-OH-t használtuk, melyek rendszerünkben 10^{-4} M-ban kb. 50%-ban gátolják az FSF-et.

Mivel elsődlegesen peptid-származékok tervezését és szintézisét tűztük ki célul, a Z-Gln-Gly-OH és a Z-Gln-Gln-His-OH tripeptid alapján kezdtük munkánkat. A Gln-Gln-His szekvencia ugyanis a fibrin γ -láncának az a részlete, melyről bebizonyosodott, hogy ennek Gln¹ részével alakul ki a fibrin γ - γ -dimer (2.ábra) a polimerizáció első lépésében. A Z-Gln-Gln-His-OH szintén gátolja az FSF-et, bár a fentieknél valamivel kevésbé (10^{-4} M-ban $\approx$ 40%-os gátlást mutat).



2. ábra. Humán fibrinogén γ - γ -dimer keresztkötésének vázlata.

A $\text{Z-Met}(\text{CH}_3)^+-\text{Gly-OH}$ (II) és hasonlóképpen a III-VII vegyületek metionin oldallánca pozitív töltésű kénatomot tartalmaz a δ -helyzetben. Miután a glutamin oldallánc parciálisan pozitív karbonil szénatomja (mellyel a TG-áz SH-csoportja acil-enzim komplexet képez) is δ -helyzetű, feltételeztük, hogy a metil-metionin-oldallánc kölcsönhatásba lép az enzim aktív centrumával, só-kötést létesít az aktív SH-csoporttal, és azt metilezi Z-Met-Gly-OH felszabadulása mellett. Ezt a várakozást alátámasztotta az a tény is, hogy a metil-metionint tartalmazó peptidek merkapto-etanollal könnyen deblokkolhatók. (Bodánszky szulfoxidálódással szembeni védőcsoportként javasolja a metil-szulfónium funkciót [14].)

Amint az I-es táblázatból is látható, II 10^{-4}M -ban 50%-ban gátolta az FSF-et, azaz sikerült a referencia-vegyületek hatását egy egészen más struktúrával reprodukálni.

A metil-metionin-oldalláncban a metil-csoportot benzil-, ill. 2-naftil-metil-csoportokra cserélve apoláros, gyűrűs kötőhelyek után kutattunk erősebb kötődést remélve. A III-VII vegyületeknél mért gyengébb aktivitások azonban nem támasztották alá ilyen kötőhelyek létezését. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy vizsgálódásaink elején a TG-áz gátlását is mértük fibrinogénen, és azt találtuk, hogy a $\text{Z-Met}(\text{Bzl})^+-\text{Gly-OH}$ (III) és a $\text{Z-Met}(\text{2-naftil-metil})^+-\text{Gly-OH}$ (IV) 10^{-4}M -ban 50, ill. 60%-ban gátolta az enzimet, míg az

FSF-et nem, ill. csak 23%-ban.

A $(Z\text{-Hcy-Gly-OH})_2$ (VIII), ill. $(Z\text{-Cys-Gly-OH})_2$ (IX) 50, ill. 58%-os gátlást mutattak FSF-en. Eredetileg feltételeztük, hogy az enzim aktív SH-csoportja diszulfid-hidat létesít a peptidek δ -helyzetű S-atomjával [Hcy esetén: $\text{CH}(\alpha)\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}(\delta)\text{-S-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, Cys esetén: $\text{CH}(\alpha)\text{-CH}_2\text{-S-S}(\delta)\text{-CH}_2\text{-CH}$] Z-Hcy-Gly-OH, ill. Z-Cys-Gly-OH felszabadulása mellett. Az észlelt mérsékelt gátló hatás arra utalhat, hogy a várt Z-Cys(enzim)-Gly-OH és Z-Hcy(enzim)-Gly-OH ugyan kialakul, de könnyen el is bomlik, belőlük az enzim könnyen regenerálódik - talán éppen az esetleg még a helyszínen tartózkodó Hcy, ill. Cys peptidek mint SH-vegyületek hatására.

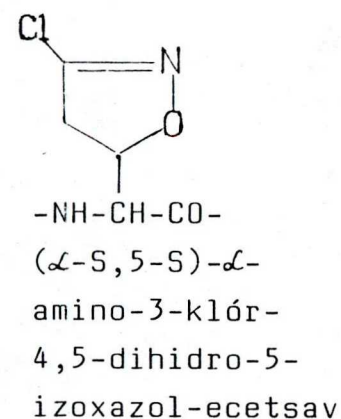
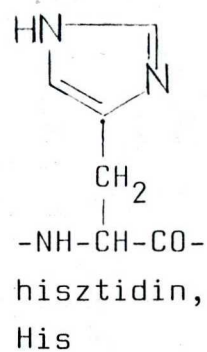
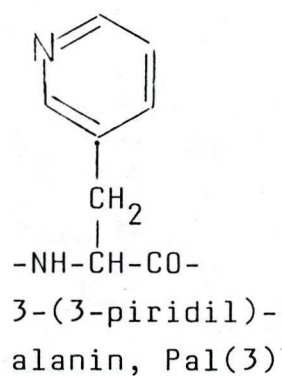
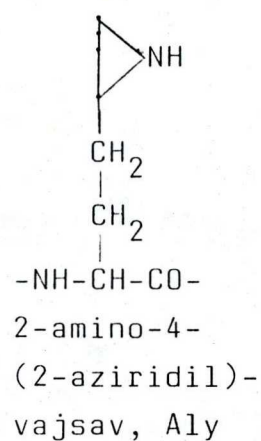
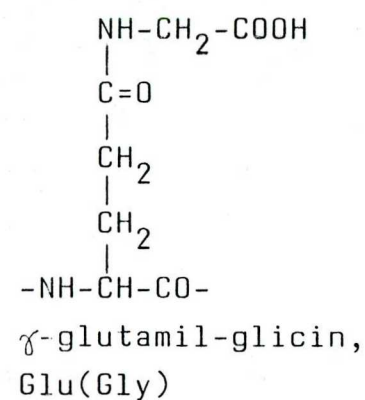
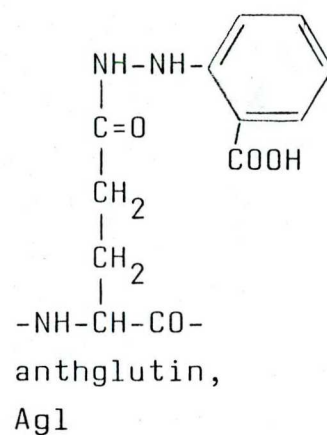
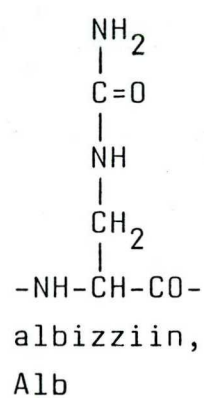
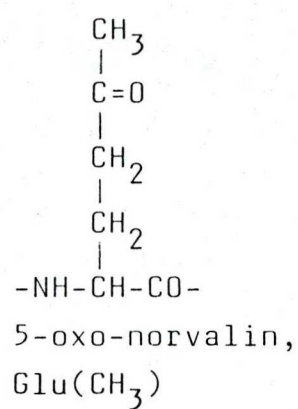
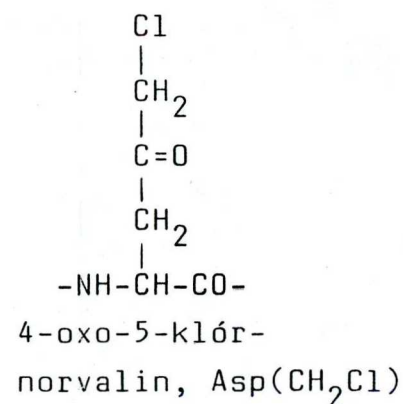
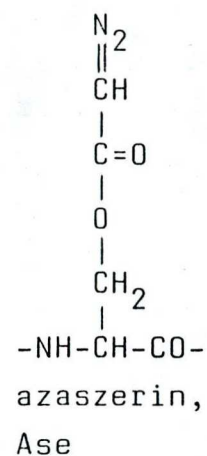
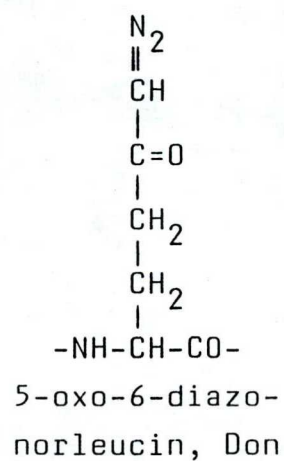
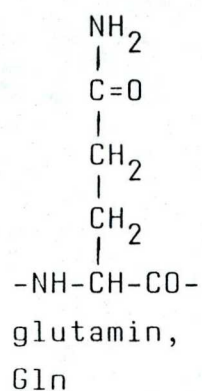
A Z-Met-Gly-OH (I) egyáltalán nem mutatott gátló hatást, míg a szulfoxidja (X) $[-\text{CH}_2(\gamma)\text{-}\overset{\text{O}}{\underset{\uparrow}{\text{S}}}\text{-CH}_3]$, mely formailag hasonlatos a Gln $[-\text{CH}_2(\gamma)\text{-}\overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}\text{-NH}_2]$ savamid funkciójához, 30%-ban gátolta az FSF-et 10^{-4}M koncentrációban. A TG-ázt azonban 63%-ban gátolta 10^{-4}M -ban, ami újabb igazolása a két enzim aktív-centrum-környezete eltérő voltának. (A szulfoxid-származék gátló hatását egyébként is csak valamilyen aktív centrum árnyékolásként értelmezhetjük.)

A már említett VIII és IX vegyület is jelentős TG-áz gátlást mutatott: 67%, ill. 52% .

J.M. Buchanan amido-transzferázokról írott részletes tanulmányában [35] tárgyalja, hogy ezen enzimcsalád a glutamin

savamid-nitrogénjét építi be nukleotidokba (purin, pirimidin), antranilátba, nikotinamidba, hisztidinbe és még egy sor fontos bioorganikus vegyületbe. Ezen enzimek aktív centrumában ugyancsak egy cisztein SH-csoport van, mely a glutamin δ -helyzetű karbonil szénével aktív tioésztert képez. Az enzim aktív centrumának és működése mechanizmusának megismerésében fontos szerepet kapott néhány vegyület, melyek az aktív centrummal stabil adduktot képeznek. Az antibiotikum azaszerin és az 5-oxo-6-diazo-norleucin képesek alkilezni az enzim SH-csoportját, míg pl. az albizziin tiokarbamoil-vegyületet képezve gátolja az enzimet. A 4-oxo-5-klórnorvalin szintén alkilezés révén gátol. Ez utóbbi két vegyület esetében az enzim az oldallánc δ -helyzetű szénatomjával lép reakcióba, míg az előbbieknél az oldallánc ε -helyzetű "alkilező" szénatomjával (3.ábra).

A glutamin-szubsztrát illeszkedésénél ugyan fontos szerepet játszik az α -amino- és karboxi-funkció, valamint az oldallánc δ -helyzetű karbonilja, erős alkilezőszerek esetén azonban az oldalláncon lévő funkciós-csoportok α -széntől való távolsága nem annyira meghatározó. (A norvalin-származék karbonil szene pl. γ -helyzetű, mint az aszparagin-oldalláncban.) Tény azonban, hogy a Z-homoglutaminil-glicin is szubsztrátja a TG-áznak [22].



3. ábra. A glutamin-transzportban résztvevő SH-enzimeket gátló fontosabb aminosavak szerkezete.

Egy másik SH-enzim, a γ -glutamil transzpeptidáz (γ -GTP) γ -peptidkötésben lévő glutaminok (pl. glutation) hasítását végzi, szintén acil-enzim-komplex kialakulásán keresztül. Az enzim természetes, irreverzibilis gátlói a már említett azaszerin és az 5-oxo-6-diazo-norleucin, valamint az (α -S,5-S)- α -amino-3-klór-4,5-dihidro-5-izoxazolecetsav és reverzibilis gátlója az antibiotikum anthglutin, mely a glutaminsav γ -orto-benzo-esav-hidrazidja.

További vegyületeinket a fenti ismeretek felhasználásával terveztük. A Z-Alb-Gly-OH-t már korábban vizsgálták intézetünkben, s nem bizonyult hatásosnak. Az albizziin-karbamid guanidin-analógjától (XIII) az aktív centrum közelében lévő esetleges pozitív-töltés-kötőhely révén vártunk árnyékoló hatást. A vegyület azonban hatástalan volt.

A fent említett gyűrűs izoxazolidin jó gátló sajátsága arra engedett következtetni, hogy egy 5-tagú-gyűrűs oldalláncot az enzim képes felismerni. A hisztidin dipeptidbe építésével szintén jól kötődő, árnyékoló hatású gátlót szándékoztunk előállítani. A Z-His-Gly-OH (XI) 10^{-4} M koncentrációban 88%-ban és 10^{-5} M-ban 32%-ban gátolta az FSF-et fibrin keresztkötések kiépítésében.

Azt a feltételezést, hogy a XI hatását az aktív centrum közelében fejti ki, igazolni látszik a tény hogy, a Gln-Gln-His természetes szubsztrátrészlet első, "akceptor" glutaminját hisztidinre cserélve, a kapott Z-His-Gln-His-OH

(XII) 75 és 23%-os gátlást mutatott 10^{-4} , ill. 10^{-5} M koncentrációban.

Mint láthattuk, az enzim aktív S^- -csoportja egyaránt felismeri a metil-metionin pozitív töltésű kénatomját és a hisztidin enyhén bázisos imidazol-NH-ját. Az imidazolnál erősebb bázicitású gyűrűs oldalláncból jobb gátló sajátságokat remélve megvizsgáltuk a Z-Pal(3)-Gly-OH-t (XXVII), mely 3-piridil-oldalláncot tartalmaz. A vegyület hatása pontosan egyezik a Z-His-Gly-OH-nál mért értékekkel. A Z-Phe-Gly-OH (XXIX) hatásának vizsgálatával eldönthető, hogy a XXVII-nél mért gátlásért a piridin-nitrogén nukleofil funkciója a felelős vagy sem. Minthogy a XXIX 10^{-4} M-ban mindössze 19%-ban gátolta az FSF-et, az adott nukleofil funkció fontossága nem vitatható.

Az oldalláncon megfelelő távolságban lévő, az enzim-SH-hoz kötődő nukleofil alkilező funkciótól jó gátló sajátságokat reméltünk a fentiek alapján. A lizin-oldallánc végén elhelyezkedő aziridin-funkció megfelel ezen követelményeknek. A Z-Aly-Gly-OLi (XXVIII) hatása azonban elmaradt a várakozástól: 10^{-4} M-ban 58%-os, 10^{-5} M-ban pedig 20%-os gátlást mutatott.

Az I-es táblázatban felsoroltam az eddig említett fontosabb vegyületeket és azok gátló hatását.

I. Táblázat. Z-Xxx-Gly-OH dipeptidek FSF és TG-áz gátló hatása

Vegyület		Gátló hatás(%)			100-10-1 μ M-ban	
		FSF/fibrin			TG-áz/fibrinogén	
Szám	Xxx	100	10	1	100	10
	Gln (kontroll)	45	12	-	34	-
II	Met(CH ₃) ⁺	65	-	-	52	-
X	Met(O)	32	-	-	63	-
I	Met	0	-	-	0	-
XI	His	<u>88</u>	<u>32</u>	-	-	-
XIII	Dap(CI(NH)NH ₂)	15	0	-	-	-
XXVII	Pal(3)	<u>74</u>	<u>32</u>	-	-	-
XXIX	Phe	19	0	-	-	-
Danzil-kadaverin (kontroll)		62	-	-	55	-

A Z-Ase-Gly-OH-nál (XIV) mért gátló hatások szórtak (10^{-4} M-ban gyenge, ill. jó közepes hatást kaptunk). A fentihez hasonló jelenséget tapasztaltunk a Z-Glu(CHN₂)-OH-nál (XVI), a Z-Glu(CH₃)-OH-nál (XIX), valamint a Z-Glu(CH₃)-Gly-OH (XX) dipeptidnél.

Feltételezésünk szerint a fenti vegyületeknél a keton-funkció és az α -Z-NH-csoport viszonylag nukleofil nitrogénje között egyensúlyi reakcióban 5-ös gyűrű alakul ki. Az egyensúly a körülményektől függően változik. (Pl. a

vizsgálandó anyagok oldásakor némely esetben kevés 0,5N NaOH-ot használtunk a puffer hozzáadása előtt. A pH jelentéktelen változása pedig jelentősen befolyásolja az aktív keton- és a feltehetően inaktív 5-hidroxipirrolidin-származék egyensúlyi koncentrációját). Ennek kiküszöbölésére szintetizáltuk a Z-MeGlu(CH₃)-OH-t (XVIII), melyben a nitrogénen nincs proton, s így a fenti gyűrűs addukt nem alakulhat ki. A XVIII ennek megfelelően a leghatásosabb vegyületünk volt, mely 10⁻⁴M-ban 100%-os, 10⁻⁵M-ban 63%-os és 10⁻⁶M-ban 15%-os gátló hatást fejtett ki.

A Boc-Glu(CH₃)-OH (XVII) 10⁻⁴M-ban 100, 10⁻⁵M-ban 52 és 10⁻⁶M-ban 8%-os gátlást mutatott anélkül, hogy szórtak volna az eredmények. Ez pedig összhangban van azzal, hogy a Boc-NH-csoportban a nitrogén reakciókészsége a terc.-butil-csoport térgátló hatása miatt gyengébb, mint a Z-NH-csoportban, s így gyűrűzárási készsége sem oly karakterisztikus. A Boc-származék gyengébb hatása pedig alátámasztja azt a korábbi megfigyelést, hogy a Z-csoport jobban kötődik az enzimhez.

A metil-keton-funkció jó SH-enzim-gátló sajátosságai már régóta ismeretesek az irodalomból. Fittkau [41] megfigyelései szerint pl. a metil-ketonok gyakorta jobb cisztein-proteáz-gátlók (az enzimmel stabil tiohemiketált képeznek), mint a megfelelő aldehidek, melyek a szerin-proteázok közismerten jó reverzibilis inhibitorai (az enzimmel stabil

félacetált adnak).

A diazometil-kezonok ugyancsak specifikus tiol-proteáz-gátlók. A szerin-proteázokat kevésbé gátolják, mint a klórmethyl-kezonok, melyek egyaránt jó inhibitorai mindkét enzim-családnak [23,36]. [Bár a szerin-proteázok esetében nem a szerin-OH alkilezésén keresztül fejtik ki gátló hatásukat, hanem a kezon funkció félacetált képez az aktív OH-val, és a methyl-halogenid rész egy a katalitikus proton-transzfer-folyamatban résztvevő közeli ($\approx 3\text{\AA}$ távolságra lévő) hisztidin imidazolját alkilezi.]

A fentiek alapján vizsgáltunk elsősorban methyl-kezon és diazometil-kezon struktúrákat.

Vizsgáltuk továbbá a Z-MeAse-Gly-OH-t (XXX) is. (Nehezen kezelhető termék, csupán kromatográfiásan tudtuk azonosítani.) A vegyület 10^{-4}M -ban 95%-os, 10^{-5}M -ban pedig 32%-os karakterisztikus gátlást mutatott. A mérési eredmények nem szórtak, szemben a XIV-nél tapasztaltakkal, ahol az α -Z-NH-csoport nitrogénje nem volt metilezve.

A Z-Glu(H)-Gly-OH aldehyd-származékot intézetünkben már korábban vizsgálták. A fentiek alapján már nem meglepő, hogy nem mutatott karakterisztikus gátló sajátosságokat.

Minthogy néhány szerin-proteáz-gátló aldehyd megfelelő nitril-származéka is viszonylag jó inhibitornak bizonyult, mi is megvizsgáltuk a Z-Gln nitril-analógját (XXI), ill. ennek glicinnel képzett dipeptid-származékát (XXII). Az előbbi,

melyet Z-Glc-OH-nak jelöltünk, 10^{-4} M-ban 82, és 10^{-5} M-ban 32%-ban gátolta az FSF-et. A Z-Glc-Gly-OH azonban 10^{-4} M-ban csupán 27%-os gátlást mutatott. Ebből arra következtethetünk, hogy a kötődéshez nem feltétlenül szükséges a glicin az α -lánc végén. A bevezetésben már ismertetett, 1988-ban közzétett szintetikus transzglutamináz-gátló, a Z-Tyr-nel acilezett α -amino-3-klór-4,5-dihidro-5-izoxazolecetsav dekarboxilezett származéka. Ez esetben tehát nemcsak a glicin marad el, hanem az egész karboxi-terminus. (Természetesen az is elképzelhető, hogy - mint azt már a bevezetőben is említettük - a fenti vegyület nem az akceptor-, hanem a donor-kötőhelyen kötődik.)

A II. táblázatban felsoroltam a fenti meggondolások alapján szintetizált vegyületeinket és azok gátló hatását.

II. Táblázat. X-Glu(Y) és X-MeGlu(Y) szerkezetű ketonok, valamint Ser(Ac) analógjaik FSF gátló hatása

Szám	Vegyület	Gátló hatás (%) 100-10-1 μ M-ban		
		100	10	1
XVI	Z-Glu(CHN ₂) [*]	75-18	32-0	-
XIX	Z-Glu(CH ₃) [*]	30-17	7-0	-
XX	Z-Glu(CH ₃)-Gly [*]	44	17	-
XVIII	Z-MeGlu(CH ₃)	<u>100</u>	<u>63</u>	<u>15</u>
XVII	Boc-Glu(CH ₃)	<u>100</u>	<u>52</u>	<u>8</u>
XIV	Z-Ser(COCHN ₂)-Gly ^{***}	47	11	-
XXX	Z-MeSer(COCHN ₂)-Gly	<u>95</u>	<u>32</u>	-
XV	Z-Ser(COCH ₃) ^{****}	0	-	-

* A meghatározás bizonytalan, a vegyület 5-hidroxipirrolidin tautomer formája feltehetően inaktív.

*** A XVI 4-oxa-analógja Gly dipeptid formában.

**** A XIX 4-oxa-analógja Gly-dipeptid formában.

A Z-Agl-Gly-OH (XXV) 10^{-4} M-ban 95%-os, 10^{-5} M-ban 40%-os gátlást mutatott. Maga az anthglutin és karbobenzoxi-származéka pedig 30%-ban gátolta az FSF-et 10^{-5} M-ban. (Ennél a vegyületnél tehát a glicin karboxi-terminus kis mértékben ugyan, de jobb kötődést eredményez, szemben a XXII-nél tapasztaltakkal.) A megfelelő fenil-hidrazid-származék (XXIV) FSF gátló hatása 10^{-4} M-ban 33%-ra csökken, bár TG-áz gátló hatása még mindig 62%-os. A fenil-csoportot is elhagyva, a

hidrazid-származék (XXIII) már csak 17%-os gátlást mutat 10^{-4} M-ban.

Ezen adatokból jól látható az o-hidrazinobenzoésav rész 2-karboxi-funkciójának fontos szerepe. Megvizsgáltuk ezért a Z-Glu(Gly-OH)-Gly-OH-t (XXVI), mely tartalmazza az oldalláncon a szükséges karboxi-csoportot. Ez a vegyület pontosan ugyanazt a hatást mutatta, mint a XXV, igazolva az adott karboxi-funkció kiemelt fontosságát a kötődésben.

Az oldalláncon glicin helyett β -alanint tartalmazó származék (XXXI) - melynek karboxi-csoportja egy CH_2 -csoporttal távolabb helyezkedik el - 10^{-4} M-ban nem mutat gátló hatást, míg a megfelelő prolin-származék (XXXII) esetén 10^{-4} M-ban 29%-os, gyenge gátló hatás észlelhető.

A III. táblázatban felsoroltam a fenti vegyületeket gátló hatásukkal együtt.

III. Táblázat. Az anthglutin Z-Glu(X)-Gly szerkezetű dipeptid analógjainak FSF és TG-áz gátló hatása

Szám	Z-Glu(X)-Gly X	Gátló hatás (%) 100 és 10 μ M-ban			
		FSF/fibrin		TG-áz/fibrinogén	
		100	10	100	10
XXV	NHNH-Ph[2-COOH]	<u>95</u>	<u>39</u>	<u>100</u>	<u>40</u>
XXIV	NHNH-Ph	33	-	62	-
XXIII	NHNH ₂	8	-	12	-
XXVI	Gly-OH	<u>97</u>	<u>39</u>	-	-
XXXI	β -Ala-OH	0	-	-	-
XXXII	Pro-OH	29	-	-	-
	Anthglutin* (kontroll)	<u>95</u>	<u>30</u>	-	-

* H-Glu(NHNH-Ph[2-COOH])

Mivel eddigi vizsgálatainkban a Gln-t His-re, Glu(Gly-OH)-ra, ill. Anthglu-ra cserélve jó gátló sajátságokat mutató dipeptidekhez jutottunk, próbálkoztunk néhány nagyobb, specifikusan FSF-szubsztrátban az akceptor Gln cseréjével.

Ismeretes, hogy a fibrin-polimer természetes degradációját a plazmin végzi. Ennek a szerin-proteáznak specifikus, természetes gátlója az α_2 -plazmin-inhibitor (PI), melyet az aktivált FSF köt a véralvadási folyamat közben a fibrinhez, gátolva ezzel a képződő fibrin-polimer biodegradációját. A PI aminoterminusának első négy aminosavja az Asn-Gln-Glu-Gln szekvencia, melyből Gln² az akceptor [37].

A Z-Asn-Gln-Glu-Gln-NH₂ 10⁻⁴M-ban 50%-os, 10⁻⁵M-ban pedig 22%-os gátlást mutatott. A Glu(Gly-OH)² származék ugyanilyen gátló hatást fejtett ki, míg a His² változat csak 28, ill. 10%-ban gátolta az FSF-et 10⁻⁴-M koncentrációban.

A bevezetésben már említett Gorman [9a] által szintetizált FSF-szubsztrát dekapeptid alapján készített oligopeptideket a IV. táblázatban ismertetem, gátló hatásukkal együtt.

IV. Táblázat. A-B-Gly-C-Val-Leu-Gly-NH₂ oligopeptidek FSF gátló hatása

Oligopeptid			Gátló hatás (%)	
A	B	C	100 μM	10 μM
Z-Leu-Gly ₃ (kontroll*)	Gln	Lys	0	-
Z-Leu-Gly ₃	His	Lys	64	10
H-Leu-Gly ₃	His	Lys	28	-
Z	Gln	Lys	0	-
Z	Glu(Gly-OH)	Lys	55	8
Z	Glu(Gly-OH)	Ala	<u>54</u>	<u>27</u>
Z	Glu(NHNH-Ph[2-COOH])	Ala	<u>68</u>	<u>33</u>

* Ismert FSF szubsztrát [9a] Z-védett származéka

Általánosságban megállapíthatjuk, hogy nagyobb peptidjeink hatásukban elmaradnak kisebb megfelelőikénél. A fejezet elején említett gondolatmenet alapján azonban

elképzélhető, hogy tiszta enzimet előzetesen inkubálva a fenti szubsztrát-analógokkal, . . . jelentősebb . . . hatás-különbségek mutatkoznának.

IV. Összefoglalás

Jelen dolgozatban bemutattam a XIII-as véralvadási faktor gátlására irányuló törekvéseinket. Munkánk során sikerült előállítani olyan aminosav-származékokat, kisebb peptideket, melyek egy nagyságrenddel hatásosabbnak bizonyultak a fibrin-kereszt-kötések kiépülésének gátlásában, mint a referencia-vegyületként használt danzil-kadaverin.

Leghatásosabb vegyületeink, a $Z\text{-MeGlu}(\text{CH}_3)\text{-OH}$ és a $\text{Boc-Glu}(\text{CH}_3)\text{-OH}$ újabb példával támasztják alá azt a megfigyelést, hogy a metil-ke-tonok jó SH-enzim-gátlók.

Az antibiotikum anthglutin szerkezet-hatás összefüggéseit tanulmányozva feltártuk az aminosav oldalláncán található o-hidrazinobenzoesav rész karboxi-funkciójának fontos szerepét. Ennek felhasználásával sikerült egy vele azonos gátló hatású, egyszerű, természetes aminosavakból felépülő vegyületet szintetizálni: a $Z\text{-Glu}(\text{Gly-OH})\text{-Gly-OH-t}$.

Említésre érdemes még az a megfigyelés, hogy a hisztidin peptidjeinkben glutamin-antagonistaként viselkedett.

Viszonylag hatásos kisebb aminosav-, ill. peptid-származékainkat azonban nem sikerült olyan peptid-környezetbe ágyazni, mely erős, specifikus kötődést biztosítva igazán hatásos enzim-gátlót adott volna.

V. Kísérleti rész

Az olvadáspontokat mikro-Boetius készüléken mértük. Az adatok nincsenek korrigálva. A vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatokat Merck DC-Alufolien-Kieselgel 60, Art.No:5553 előregyártott lapokon végeztük. Előhívószerként a peptidkémiaiában szokásos reagenzeket alkalmaztuk. Szabad amino-funkciók kimutatására ninhidrin acetonos oldatát, egyéb NH-csoportokhoz N,N,N',N'-tetrametil-diamino-difenil-metán (TMDDM), KI és ninhidrin vizes ecetsavas elegyét használtuk. A metil-ke-ton-funkciókat 2,4-dinitrofenil-hidrazin foszforsavas oldatával, az alkilező-reagenzeket 4-(4-nitrobenzil)-piridinnel, a szerves vegyületeket pedig kénsavas KMnO_4 oldattal hívtuk elő. A használt futtatószeretek a következők voltak:

1. CHCl_3 :MeOH (95:5)
2. CHCl_3 :aceton (95:5)
3. EtOAc:Pir:AcOH:H₂O (480:20:6:11)
4. EtOAc:Pir:AcOH:H₂O (240:20:6:11)
5. EtOAc:Pir:AcOH:H₂O (120:20:6:11)
6. EtOAc:Pir:AcOH:H₂O (60:20:6:11)
7. EtOAc:Pir:AcOH:H₂O (30:20:6:11)
8. EtOAc:Pir:AcOH:H₂O (15:20:6:11)
9. EtOAc:Pir:HCOOH:H₂O (60:20:6:5,5)
10. CHCl_3 :MeOH (9:1)

11. $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (97:3)
12. $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (85:15)
13. $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (11:9:5)

Vegyületeink C, H, N, és esetenként S, F, Cl, Br, I elemi analízise kielégítő egyezést mutatott a számított értékekkel. Némely vegyület azonosítását IR- és NMR-spektrumok segítségével végeztük. Az infravörös spektrumokat Perkin-Elmer Model 557 spektrométeren vettük fel, az ^1H -NMR- és ^{13}C -NMR-spektrumok Varian Model EM 390, ill. Bruker AC 250 műszerrel készültek.

I. Z-Met-Gly-OH [42] $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: 340,403

4,62g (10mmol) Z-Met-OTcp-t feloldottunk 10mL vízm. DMF-ben, hozzáadtunk 1,25g (10mmol) Gly-OMe.HCl-ot és 1,4mL (10mmol) TEA-t, majd éjszakán át mágneses keverővel kevertük. A reakcióelegyet EtOAc-cal meghígítottuk, mostuk vízzel, NaHCO_3 -tal, vízzel, KHSO_4 -tal és ismét vízzel. A szerves fázist Na_2SO_4 -on szárítottuk, majd bepároltuk. A Z-Met-Gly-OMe-t éterből kristályosítottuk.

Op: 91,5–92,5°C R_f : 0,7(1) termelés: 87%

1,06g (3mmol) Z-Met-Gly-OMe-t 5mL metanolban feloldottunk és 3,3mL 1N NaOH-ot adtunk hozzá. Egy óra múltán 1N KHSO_4 -tal kisavanyítottuk, a metanolt bepároltuk, EtOAc-ban feloldottuk, vízzel mostuk. Az etil-acetátot Na_2SO_4 -on szárítottuk, majd

bepároltuk. Az így kapott olajat éterből kristályosítottuk.

Op: 131–132°C R_f : 0,6(6) termelés: 70%

Számított: (%) C: 52,92 H: 5,90 N: 8,23 S: 9,40

Talált: (%) C: 52,99 H: 5,90 N: 8,42 S: 9,57
53,10 5,85 8,57 9,70

II. Z-Met(Me)⁺-Gly-OH.TosO⁻ C₂₃H₃₀N₂O₈S₂: 526,635

1,7g (5mmol) I-et feloldottunk 10mL víz/aceton 1:1 arányú elegyében és 0,95mL (15mmol) metil-jodidot adtunk hozzá. Éjszakán át szobahőn állt, majd az acetont bepároltuk, EtOAc-cal kiráztuk és a vizes fázist liofilizáltuk.

R_f : 0,3(7) (R_f : 0,7-nél a I⁻ erős TMDDM pozitív foltot ad.)

Termelés: 97%

A jodid ellenionokat tozilát ciklusú AG 1-X2 anion-cserélő gyantán, vizes atmoszással toluolszulfonát anionokra cseréltük. A vizes oldatot liofilizáltuk.

Számított: (%) C: 52,50 H: 5,70 N: 5,30 S: 12,10

Talált: (%) C: 50,39 H: 5,54 N: 5,41 S: 12,10
50,65 5,65 5,11 11,63

III. Z-Met(Bzl)⁺-Gly-OH.Br⁻ C₂₂H₂₇N₂O₅SBr: 511,476

1,7g (5mmol) I-et feloldottunk 10mL aceton/víz 1:1-ben és hozzáadtunk 0,65mL (5,5mmol) Bzl-Br-ot. Három óra múltán az acetont bepároltuk, a vizes fázist EtOAc-cal extraháltuk, majd liofilizáltuk.

R_f : 0,6(7) Termelés: 98%

Számított:(%) C: 51,70 H: 5,30 N: 5,50 S: 6,30 Br: 15,60

Talált:(%) C: 51,47 H: 5,46 N: 5,14 S: 5,98 Br: 14,70
51,22 5,39 5,08 6,03 -

IV. Z-Met(2-naftil-metil)⁺-Gly-OH.Br⁻ C₂₆H₂₉N₂O₅SBr: 561,503

A vegyületet a III-nál ismertetett módon állítottuk elő,
csak benzil-bromid helyett 2-naftil-metil-bromidot
használtunk.

R_f: 0,7(7) Termelés: 91%

V. Z-Met(Me)⁺-Gln-His-OH.I⁻ C₂₅H₃₅N₆O₇SI: 689,819

2,34g (5,5mmol) Boc-Gln-OTcp-t feloldottunk 5mL vízmentes
DMF-ben, és hozzáadtunk 1,3g (5mmol) His-OMe.2HCl-et, valamint
1,4mL (10mmol) TEA-t. Egy napon át mágneses keverővel
kevertük, majd a TEA.HCl-et szűrtük és a DMF-et bepároltuk. Az
így nyert olajat EtOAc-ban oldottuk és vízzel extraháltuk. A
Boc-Gln-His-OMe-t a vizes fázisból pH = 8,5-en kristályo-
sítottuk. R_f: 0,3(6) Termelés: 65%

2g (5mmol) Boc-Gln-His-OMe-t 3mL TFA-ban feloldottunk.
Egy óra állás után éterrel eldörzsöltük. Termelés: 90%
R_f: 0,4(7)

1,6g (3mmol) H-Gln-His-OMe.2TFA-t feloldottunk 5mL
vízmentes DMF-ben, majd hozzáadtunk 1,5g (3,2mmol)
Z-Met-OTcp-t és 0,84mL (6mmol) TEA-t. A begélesedett
reakcióelegyet egy nap után EtOAc-cal eldörzsöltük, szűrtük, a
szűrőn vízzel alaposan mostuk. Termékünket exsikkátorban P₂O₅

mellett szárítottuk. Termelés:73% R_f :0,5(6)

0,56g (1mmol) Z-Met-Gln-His-OMe-t 5mL MeOH-ban felszuszpendáltunk és hozzáadtunk 1,1mL 1N NaOH-ot. Két óra múltán a reakcióelegy oldat lett. Ekkor 1,1mL 1N HCl-at adtunk hozzá és a MeOH-t bepároltuk. A kapott szappanszerű gél 10mL 10%-os AcOH-ban feloldottuk, majd AG 50W-X2 kationcserélő gyantára vittük, melyen az anyag és a Na^+ -ionok kikötődtek. Vizes mosással eltávolítottuk a sósavat, majd 0,5N NH_4OH -dal eluáltuk a tripeptidet. A bepárlás után nyert géles anyaghoz 5mL vizet adtunk és pH=7-et állítottunk be 10%-os AcOH-val. Ezután 10mL BuOH-val extraháltuk a tripeptidet és a BuOH-t bepároltuk, hexánnal eldörzsöltük. Termelés:60% R_f :0,3(7)

0,275g (0,5mmol) Z-Met-Gln-His-OH-t 5mL aceton/víz 1:1 arányú elegyében felszuszpendáltunk és hozzáadtunk 0,12mL (2mmol) metil-jodidot. Egy órán át 45°C -on, zárt térben melegítettük és a reakcióelegy oldat lett. Az acetont bepároltuk, a vizes fázist EtOAc-cal kiráztuk, majd liofilizáltuk. R_f :0,1(7) és 0,5(8) Termelés:82%

Számított:(%) C:43,53 H:5,11 N:12,18 S:4,65 I:18,39

Talált:(%) C:40,68 H:5,95 N:10,69 S:4,30 I:20,60
40,40 5,71 10,67 4,23 -

VI. Z-Met(Bzl) $^+$ -Gln-His-OH.Br $^-$ $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{N}_6\text{O}_7\text{SBr}$:719,665

1,1g (2mmol) Z-Met-Gln-His-OH-t felszuszpendáltunk 5mL aceton/víz 1:1 arányú elegyében, majd hozzáadtunk 0,26mL (2,2mmol) benzil-bromidot és 45°C -on, zárt térben

reagáltattuk. Három óra elteltével oldatot kaptunk. Az acetont bepároltuk, majd a vizes fázist EtOAc-cal kiráztuk és liofilizáltuk.

R_f : 0,4(7) Termelés: 50%

Számított: (%) C: 51,70 H: 5,46 N: 11,67 S: 4,45 Br: 11,10

Talált: (%) C: 48,16 H: 5,48 N: 10,62 S: 3,80 Br: 13,80
48,19 5,63 10,63 3,82 13,80

VII. Z-Met(2-naftil-metil)⁺-Gln-His-OH.Br⁻

$C_{35}H_{41}N_6O_7SBr$: 769,725

A VI-tal teljesen azonos módon, Bzl-Br helyett 2-naftil-metil-Br-ot használva készítettük.

R_f : 0,5(7) Termelés: 70%

Számított: (%) C: 54,61 H: 5,37 N: 10,92 S: 4,17 Br: 10,38

Talált: (%) C: 51,25 H: 5,52 N: 9,70 S: 3,52 Br: 13,40
51,08 5,40 9,74 3,72 -

VIII. (Z-Hcy-Gly-OH)₂ $C_{28}H_{32}O_4S_2$: 650,734

1,35g (5mmol) Hcy-t [26] feloldottunk 10mL 1N NaOH-ban, és 0°C-on 1 óra alatt 1,6mL (11mmol) Z-Cl-ot és 11mL 1N NaOH-ot csepegtettünk hozzá [43]. További 1 órán át keveredett szobahőn, majd éterrel kiráztuk. A vizes fázist ezután 1N KHSO₄-tal megsavanyítottuk és EtOAc-cal extraháltuk. A szerves fázist Na₂SO₄-on szárítottuk, bepároltuk, majd éterrel kristályosítottuk a (Z-Hcy-OH)₂-t. Termelés: 76% R_f : 0,3(5)

1,6g (3mmol) (Z-Hcy-OH)₂-t feloldottunk 5mL vízmentes DMF-ben, majd hozzáadtunk 0,67mL (6mmol) NMM-et és -20°C-ra

hűtöttük a reakcióelegyet. Ezután hozzácsepegtettünk 0,8mL (6mmol) CHIBE-t úgy, hogy a hőmérséklet -15 és -10°C között volt, majd -10 és -5°C között tartva a hőmérsékletet további 15 percig kevertük. Ezalatt 1g (6mmol) Gly-OBu^t.HCl-ot feloldottunk 3mL vízm. DMF-ben és hozzáadtunk 0,88mL (6mmol) TEA-t. Az így kapott oldatot -10°C -ra hűtöttük és hozzáadtuk a fenti reakcióelegyhez. Egy órán át reagáltattuk -10 és -5°C között, majd szűrtük, bepároltuk. A bepárlási maradékot 50mL EtOAc-ban oldottuk, mostuk 5%-os NaHCO_3 -tal, vízzel, 1N KHSO_4 -tal és ismét vízzel. Szárítás és bepárlás után a kapott olajat 3mL TFA-ban oldottuk és 3 órán át állni hagytuk. Toluolt adtunk ezután a reakcióelegyhez és bepároltuk, majd éterrel eldörzsöltük.

R_f : 0,7(6) Termelés: 65%

Számított: (%) C: 51,68 H: 5,27 N: 8,51 S: 9,85

Talált: (%) C: 50,56 H: 6,31 N: 8,73 S: 9,30
50,38 6,23 8,49 9,40

IX. (Z-Cys-Gly-OH)₂ $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}_2$: 622,680

A VIII-nál ismertetett módon szintetizáltuk.

Termelés: 60% R_f : 0,3(6)

Számított: (%) C: 50,15 H: 4,53 N: 8,99 S: 10,30

Talált: (%) C: 50,58 H: 5,17 N: 8,52 S: 11,86
50,39 5,03 8,53 11,81

X. Z-Met(O)-Gly-OH $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$: 356,402

1g (3mmol) I-et feloldottunk 10mL 99,5%-os ecetsavban,

majd 1 óra alatt szobahőmérsékleten hozzácsepegtettünk 7,2mL 0,5N H_2O_2 -ot. A reakcióelegyet bepároltuk, majd EtOAc-ból kristályosítottuk a terméket.

R_f :0,1(5), míg a kiindulási Z-Met-Gly-OH-é R_f :0,6(5)

R_f :0,3(6)

Termelés:78%

Számított:(%) C:50,55 H:5,66 N:7,86 S:8,99

Talált:(%) C:50,91 H:5,34 N:8,05 S:9,44
50,74 5,39 8,01 9,50

XI. Z-His-Gly-OH

$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5$:346,345

0,84g (5mmol) Gly-OBu^t.HCl-ot feloldottunk 5mL vízm. DMF-ben, majd hozzáadtunk 0,7mL (5mmol) TEA-t és 3g (5mmol) Z-His(Z)-OTcp-t. Éjszakán át mágneses keverővel kevertük a reakcióelegyet, majd EtOAc-cal kihigítottuk és vízzel mostuk. Az EtOAc-os fázist Na_2SO_4 -on szárítottuk, majd bepároltuk. Az így nyert olajat 5mL TFA-ban feloldottuk és 1 óra állás után toluol segítségével TFA-mentesre pároltuk. Olajat kaptunk, melyet 10mL MeOH-ban oldottunk és 0,5mL TEA-t adtunk hozzá. Egy óra állás után a reakcióelegyet vízmentesre pároltuk, majd EtOAc-cal eldörzsöltük és a végterméket metanol/vízből átkristályosítottuk.

R_f :0,4(5) és 0,5(7) Termelés:52% (a kiindulási anyagra nézve)

Számított:(%) C:55,48 H:5,23 N:16,17

Talált:(%) C:55,24 H:5,50 N:16,17
55,30 5,31 16,46

XII. Z-His-Gln-His-OH $C_{25}H_{30}N_8O_7$: 554,567

1,35g (2,57mmol) (V szintéziséknél ismertetett módon készített) H-Gln-His-OMe.2TFA-t 5mL vízm. DMF-ben oldottunk, 0,72mL (5,2mmol) TEA-t, majd 1,55g (2,6mmol) Z-His(Z)-OTcp-t adtunk hozzá. Éjszakán át kevertük szobahőmérsékleten, majd diizopropil-éterrel kicsaptuk a reakcióelegyet. Éterrel többször mostuk az így kapott szilárd terméket, majd metanolban oldottuk és vízzel ismét kicsaptuk. Ezt azután 3mL 1N NaOH-ban feloldottuk és két órán át kevertük, majd 3mL 1N HCl-at adtunk hozzá. A metanolt bepároltuk és kb. 30mL vízben oldottuk az anyagot, majd 100mL acetonnal leválasztottuk a kívánt belső-sót.

 R_f : 0,4(8)

Termelés: 41% (a két lépésre)

Számított: (%) C: 54,20 H: 5,40 N: 20,20

Talált: (%) C: 50,87 H: 5,63 N: 19,27
50,70 5,88 18,97**XIII. Z-Dap(C[NH] NH_2)-Gly-OH.TFA** $C_{16}H_{20}N_5O_7F_3$: 451,361

6,68g (15mmol) Z-Asn-OTcp-t feloldottunk 15mL vízmentes DMF-ben és hozzáadtunk 2,52g (15mmol) Gly-OBu^t.HCl-et, valamint 2.1mL (15mmol) TEA-t. Éjszakán át kevertük a reakcióelegyet, majd bepároltuk. Ezt követően $CHCl_3$ -ban feloldottuk, 5%-os $NaHCO_3$ -tal, vízzel, 1N $KHSO_4$ -tal, vízzel mostuk. A $CaCl_2$ -on szárított kloroformos oldatot bepároltuk, éterrel eldörzsöltük. Az így kapott géles anyagot EtOAc-ból átkristályosítottuk, szűrés után hexánnal mostuk.

R_f : 0,7(3) Op : 136–138°C $[\alpha]_D^{20} = -12,3^\circ (c=1, MeOH)$ Termelés: 67%

9,85g (22,5mmol) JBT-t (Hoffmann-reagens) feloldottunk 120mL DMF/víz 1:1 arányú elegyében. Ezután feloldottunk 20mL DMF-ben 5,7g (15mmol) Z-Asn-Gly-OBu^t-t és hozzáadtuk a fenti reakcióelegyhez [27]. Tíz perc múlva adtunk még hozzá 1mL piridint. Három óra elteltével a reakció teljes. (A képződő CO₂ eltávozását vákuum-elszívással segítettük.) A vizet vákuum-desztillációval bepároltuk (a jódbenzol vízgőz-desztillációval eltávozik, a szedőből tisztán visszanyerhető). A DMF bepárlása után a kapott olajat 10%-os K₂CO₃ és CHCl₃ között szétráztuk, majd a szerves fázist izzított K₂CO₃-on szárítottuk. Bepárlás után 20mL éterben feloldottuk az anyagot és 1,5g (16,7mmol) vízmentes oxálsav 10mL-es éteres oldatával leválasztottuk a savanyú oxalátot.

R_f : 0,2(4) és 0,6(6) Termelés: 57%

0,44g (1mmol) Z-Dap-Gly-OBu^t.C₂H₂O₄-ot 3mL DMF-ben felszuszpendáltunk és hozzáadtunk 0,32mL (3mmol) TEA-t, valamint 0,2g (1mmol) DPKA.AcOH-t. Egy csepp víz hatására a reakcióelegy oldat lett. További 0,2g (1mmol) DPKA.AcOH és 0,14mL (1mmol) TEA hozzáadásával a reakciót teljessé tettük. A DMF-et bepároltuk, EtOAc/BuOH 1:1 arányú elegye és víz között szétráztuk. A szerves fázist bepároltuk, a bepárlási maradékot aceton/éterrel megszilárdítottuk. Az így nyert terméket 2mL TFA-ban oldottuk, majd 3 óra állás után toluolt adtunk hozzá és bepároltuk. Éterrel eldörzsölve kristályosítottuk.

R_f : 0,5(7) Op: 153–157°C Termelés: 50% (a két lépésre)

Számított: (%) C: 42,58 H: 4,47 N: 15,52

Talált: (%) C: 42,41 H: 4,44 N: 15,72
 42,48 4,49 15,58

XIV. Z-Ase-Gly-OH.DCHA

$C_{27}H_{39}N_5O_7$: 545,641

2,5g (7mmol) Z-Ser-Gly-OBu^t-t feloldottunk 10mL vízm. DMF-ben és hozzáadtunk 2,4g (7mmol) Boc-Gly-OPfp-t és 0,98mL (7mmol) TEA-t. Éjszakán át keveredett, majd a DMF-et bepároltuk, a kapott olajat EtOAc-ban feloldottuk, vízzel, 5%-os NaHCO₃-tal és ismét vízzel mostuk, Na₂SO₄-on szárítottuk, majd bepároltuk. A Z-Ser(Boc-Gly)-Gly-OBu^t-t 70%-os termeléssel állítottuk elő R_f : 0,4(1).

A fenti olajat 5mL TFA-ban oldottuk és 3 órán át állni hagytuk. Ezután toluoltadtunk hozzá és bepároltuk. Termelés: 90% R_f : 0,4(7)

0,59g (1,2mmol) Z-Ser(Gly)-Gly-OH.TFA-t 20mL vízben oldottunk (pH=2,5), majd hozzáadtunk 0,2g (3,6mmol) NaNO₂-et 2mL vízben oldva. Tíz perc múltán a vizes reakcióelegyet 20mL EtOAc-cal extraháltuk (a pH 5,5 lett). Ecetsavval 3,5–4-es pH-t állítottunk be [21] és újabb 0,1g (1,8mmol) NaNO₂-et adtunk a vizes fázishoz. Tíz perc elteltével ismét extraháltuk a reakcióelegyet 10mL EtOAc-cal, a szerves fázisokat összeöntöttük, vízzel alaposan mostuk, Na₂SO₄-on szárítottuk. A híg EtOAc-os fázishoz annyi DCHA-t adtunk, hogy a pH kb. 7 legyen. Az azonnal leváló kristályokat szűrtük, kevés jeges

vízzel eldörzsöltük (a DCHA.AcOH vízben jól oldódik).

Op: 172-175°C $[\alpha]_D^{20} = +5^{\circ}$ (c=1, MeOH) $R_f: 0,5(5)$ Termelés: 46%

Számított: (%) C: 59,43 H: 7,20 N: 12,83

Talált: (%) C: 59,41 H: 7,41 N: 12,82
59,20 7,28 12,82

XV. Z-Ser(Ac)-Gly-OH

$C_{15}H_{18}N_2O_5: 338,328$

1,96g (5,56mmol) Z-Ser-Gly-OBu^t-t 6mL vízm. piridinben feloldottunk, majd 0°C-on 1,2mL (10mmol) ecetsavanhidridet adtunk hozzá. Egy óra múltán jégre öntöttük a reakcióelegyet és éterrel extraháltuk, 1N KHSO₄-tal, vízzel mostuk, Na₂SO₄-on szárítottuk, majd bepároltuk. Termelés: 85% $R_f: 0,5(1)$

Az így kapott olajat 3mL TFA-ban feloldottuk és 3 órán át állni hagytuk. Ezután toluolt adtunk hozzá és bepároltuk. EtOAc/hexánból kristályosítottuk.

$R_f: 0,4(5)$ és $0,6(6)$ (Egy $R_f: 0,4(6)$ -nál lévő szennyezéstől DCHA-són keresztül tisztítottuk meg anyagunkat.) Az össztermelés így 50%-os lett.

Számított: (%) C: 53,25 H: 5,36 N: 8,28

Talált: (%) C: 52,88 H: 5,26 N: 8,12
52,87 5,20 8,19

XVI. Z-Glu(CHN₂)-OH.Pip

$C_{19}H_{26}N_4O_5: 390,443$

4,1g (11,47mmol) Z-Glu-OPh-t feloldottunk 10mL vízm. DMF-ben, majd 1,2mL (11,47mmol) NMM-et adtunk hozzá. Ezután -20°C-ra hűtöttük és ezen a hőmérsékleten hozzáadtunk még 1,5mL (11,47mmol) CHIBE-t. Tíz percig keveredett -10 és -5°C

között, majd -20°C -on 80mL (3mmol/mL töménységű) éteres diazometánt adtunk hozzá. Ezután fél órát keveredett a reakcióelegy -10 és -5°C , majd további fél órát -5 és 0°C között. Ezt követően szobahőmérsékleten 100mL éterrel meghigítottuk, vízzel, 5%-os NaHCO_3 -tal és ismét vízzel mostuk, Na_2SO_4 -on szárítottuk, majd bepároltuk. Az így kapott olaj kromatográfiásan többfoltos termék volt. (A Z-Glu(CHN_2)-OPh $R_f:0,6(1)$ -nél jellegzetes sárga színű foltot ad ninhidrinnel, melegítés után.)

A fenti olajat 10mL MeOH-ban oldottuk és 1,5mL (15mmol) piperidint, valamint 2mL vizet adtunk hozzá. Egy óra elteltével a MeOH-t bepároltuk, 5mL vizet adtunk hozzá és 50mL BuOH/EtOAc 1:1 arányú elegyével extraháltuk a vizes fázist. (A jelentős mennyiségű Z-Glu-OH-szennyezés így a vizes fázisban maradt.) A szerves fázist bepároltuk, majd éterrel eldörzsöltük.

$R_f:0,55(5)$ Össztermelés:50%

Számított:(%) C:58,5 H:6,70 N:14,40

Talált:(%) C:58,35 H:6,90 N:11,40
 58,24 6,62 11,27

A szerkezetet IR- és NMR-spektrum alapján is azonosítottuk.

XVII. Boc-Glu(CH_3)-OH $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_5:245,279$

3,37g (10mmol) Boc-Glu-OBzl-ből a XVI-nál ismertetett módon Boc-Glu(CHN_2)-OBzl-t szintetizáltunk.

AZ így nyert olajat 10mL MeOH-ban oldottuk, majd hozzáadtunk 5g (43mmol) Pir.HCl-ot és 10mL 1N vizes sósavat. Három órán át szobahőn keveredett a reakcióelegy, majd 100mL éterrel meghígítottuk és vízzel alaposan mostuk. Az éteres fázist Na_2SO_4 -on szárítottuk és bepároltuk. Az így kapott olajat 50mL 80%-os AcOH-ban oldottuk és hozzáadtunk 1g (12mmol) NaOAc-ot (a felszabaduló HCl megkötésére), majd Pd/C katalizátoron 2 órán át hidráltuk. Szűrés és bepárlás után kromatográfiásan kétfoltos termékhez jutottunk. $R_f: 0,6(3)$ és $R_f: 0,7(3)$ (Nitrofenil-hidrazinnal mindkét termék a ketonokra jellemző sárga színreakciót mutatta.) Merck szilikagél 60-on végzett oszlop-kromatográfiás elválasztás után az NMR-spektrumok alapján az első, kisebb R_f -értékű vegyület bizonyult a kívánt terméknek. A többlépéses reakció összhozama 20%-os volt.

XVIII. Z-MeGlu(CH_3)-OH

$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_5: 265,268$

3,51g (10mmol) Z-MeGlu(OBU^t)-OH-t [28] feloldottunk 10mL vízben. THF-ben majd hozzáadtunk 1g (11mmol) fenolt és 0°C -on 2,17g (10,5mmol) DCC-t. Éjszakán át keveredett, majd szűrtük a DCU-t és a THF-et bepároltuk. A bepárlási maradékot EtOAc-ban oldottuk, 5%-os NaHCO_3 -tal, vízzel, 1N KHSO_4 -tal és ismét vízzel mostuk, Na_2SO_4 -on szárítottuk, majd bepároltuk.

Az így kapott olajat 5mL TFA-ban oldottuk, három órán át állni hagytuk, majd toluolt adtunk hozzá és bepároltuk.

1,85g (5mmol) Z-MeGlu-OPh-t a XVI-nál ismertetett módon Z-MeGlu(CHN₂)-OH-vá alakítottunk, majd a kapott olajat 10mL vízmentes EtOAc-ban feloldottuk és 0°C-on 1mL (4mmol/mL töménységű) sósavas etil-acetátot adtunk hozzá. Ezután 1g NaOAc 10mL vizes oldatával és kétszer 10mL vízzel mostuk, Na₂SO₄-on szárítottuk, majd bepároltuk.

Az így nyert klórmetil-ketont 10mL 99,5%-os AcOH-ban oldottuk, majd 0,5g Zn-forgácsot adtunk hozzá és egy órán át forraltuk [41]. Ezután az AcOH-t bepároltuk, 1N KHSO₄-tal megsavanyítottuk, és EtOAc-cal extraháltuk, vízzel alaposan mostuk, szárítottuk, majd bepároltuk. Az így kapott olajat oszlop-kromatográfiával tisztítottuk.

R_f: 0,5(3) Össztermelés: 20%

A szerkezet azonosítása IR- és NMR-spektrumok alapján történt.

XIX. Z-Glu(CH₃)-OH.DCHA

C₂₆H₄₀N₂O₅: 460,619

3,7g (10mmol) Z-Glu-OBzl-ből vegyes anhidriden keresztül képeztük a γ-N,0-dimetil-hidroxiámatot, majd a benzilésztert a XVI-nál ismertetett módon elhidrolizáltuk.

2,5g (5mmol) Z-Glu(NCH₃-OCH₃)-OH.DCHA-t 10mL 1N KHSO₄-tal felszabadítottuk, és 20mL EtOAc-cal extraháltuk. Az EtOAc-os fázist benzol/etanol eleggyel víztelenítettük. Az így nyert olajat 5mL CaH₂-en szárított THF-ben feloldottuk és 0°C-on 5mL (1mmol/mL töménységű) THF-es MeMgCl-ot adtunk hozzá. Éjszakán át szobahőmérsékleten keveredett, majd 0°C-on

újabb 5mL MeMgCl-oldatot adtunk hozzá. (Két óra múltán a konverzió teljes volt.) Ezután 0°C-on 25ml. 1N KHSO₄-oldatot adtunk a reakcióelegyhez, majd 50mL EtOAc-cal meghígítottuk, 3-szor 50mL vízzel mostuk, Na₂SO₄-on szárítottuk és bepároltuk. Az így kapott olajat szilikagélen oszlop-kromatográfiával tisztítottuk [R_f:0,6(5)]. A piridínium-sót ezután 1N KHSO₄-tal felszabadítottuk, éterrel extraháltuk, majd szárítás után éter/diizopropil-éterből leválasztottuk a DCHA-sót. Termelés:41%.

A szerkezetet IR- és NMR-spektrumokkal azonosítottuk.

XX. Z-Glu(CH₃)-Gly-OH

C₁₆H₂₀N₂O₆:336,346

XIX alapján szintetizáltuk és éter/diizopropiléter-rel kristályosítottuk.

R_f:0,6(6)

Termelés:40%

Számított:(%) C:57,14 H:5,99 N:8,33

Talált:(%) C:57,45 H:5,78 N:8,13
57,22 5,63 8,08

XXI. Z-Glc-OH.DCHA

C₂₅H₃₇N₃O₄:443,596

1,4g (5mmol) Z-Gln-OH-t feloldottunk 5mL vízm. piridinben és hozzáadtunk 1,1g (5,3mmol) DCC-t [24]. Éjszakán át keveredett, majd szűrtük a DCU-t. A piridint bepároltuk, 5mL 1N KHSO₄-tal felszabadítottuk a piridínium-sót és 50mL EtOAc-cal extraháltuk a Z-Glc-OH-t. Az EtOAc-ot szárítottuk, bepároltuk, majd hozzáadtunk 1mL (5mmol) DCHA-t és 20mL

éterrel leválasztottuk a DCHA-sót.

R_f : 0,5(2) Termelés: 70%

Számított: (%) C: 67,69 H: 8,41 N: 9,47

Talált: (%) C: 67,97 H: 8,51 N: 9,47
68,04 8,52 9,56

XXII. Z-Glc-Gly-OH

$C_{15}H_{17}N_3O_5$: 319,321

0,8g (3mmol) Z-Glc-OH-t feloldottunk 5mL vízm. THF-ben, majd hozzáadtunk 0,65g (3,3mmol) HOTcp-t és 0°C-on 0,65g (3,15mmol) DCC-t. Éjszakán át keveredett, majd a kivált DCU-t szűrtük és a THF-et bepároltuk. A triklórfenil-észtert forró EtOH-ból átkristályosítottuk. Op: 159-160°C

R_f : 0,8(2) Termelés: 73%

Számított: (%) C: 51,66 H: 3,42 N: 6,34 Cl: 24,08

Talált: (%) C: 51,47 H: 4,10 N: 6,04 Cl: 24,22
51,26 4,04 6,18 24,28

0,44g (1mmol) Z-Glc-OTcp-t feloldottunk 2mL vízm. DMF-ben és hozzáadtunk 0,17g (1mmol) Gly-OBu^t.HCl-et, valamint 0,11mL (1mmol) NMM-et. Éjszakán át keveredett, majd a reakcióelegyet éterrel meghígítottuk, vízzel mostuk, Na₂SO₄-on szárítottuk és bepároltuk. A bepárlási maradékot hexánnal eldörzsöltük és a hexánt leöntöttük. Ezt a műveletet 3-szor ismételve triklórfenoltól mentes olajat kaptunk. Ezt 30%-os toluolos TFA-ban oldottuk és 3 órán át állni hagytuk. Ezután bepároltuk, toluolt adtunk hozzá és ismét bepároltuk. A maradékot EtOAc-ban feloldottuk, vízzel mostuk, majd Na₂SO₄-on

szárítottuk és bepároltuk. Az így nyert olajat éterrel eldörzsöltük.

R_f : 0,7(6) Termelés: 70%

XXIII. Z-Glu(NHNH₂)-Gly-OH.TFA $C_{17}H_{20}N_4O_8F_3$: 465,365

2g (5mmol) Z-Glu(OMe)-Gly-OBu^t-t feloldottunk 5mL MeOH-ban és hozzáadtunk 0,73mL (15mmol) hidrazin-hidrátot. Éjszakán át keveredett, majd bepároltuk és éterrel eldörzsöltük.

R_f : 0,7(4) Termelés: 92%

0,84g (2mmol) Z-Glu(NHNH₂)-Gly-OBu^t-t feloldottunk 2mL TFA-ban, majd 3 óra állás után toluolt adtunk hozzá és bepároltuk. Éterrel eldörzsölve kristályos termékhez jutottunk.

R_f : 0,5(7) Termelés: 70% Op: 67-70°C

Számított: (%) C: 43,88 H: 4,33 N: 12,04

Talált: (%) C: 46,55 H: 4,67 N: 14,11
46,28 4,52 14,28

XXIV. Z-Glu(NHNH-Ph)-Gly-OH $C_{21}H_{24}N_4O_6$: 428,448

2g (5mmol) Z-Glu(OMe)-Gly-OBu^t-t 5mL MeOH-ban oldottunk és hozzáadtunk 1,6mL (15mM) fenilhidrazint. Két napon át kevertük, majd bepároltuk. Ezután 5mL TFA-ban feloldottuk és három órán át állt, majd toluolt adtunk a reakcióelegyhez és bepároltuk. A bepárlási maradékot 20mL 1N NaOH-ban feloldottuk és EtOAc-cal extraháltuk. Ezután AcOH-val pH=4-et állítottunk

be és a terméket EtOAc-ba átráztuk. Az EtOAc-os fázist vízzel mostuk, Na_2SO_4 -on szárítottuk, majd bepároltuk és éterrel eldörzsöltük.

R_f : 0,4(5) Op: 107–110°C Termelés: 50% (a két lépésre)

XXV. Z-Agl-Gly-OH

$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_8$: 472,457

1,9g (3,1mmol) Z-Glu(OTcp)-Gly-OBu^t-t 5mL vízm. DMF-ben oldottunk, majd hozzáadtunk 0,57g (3mmol) o-hidrazino-benzoészav-klórhidrátot és 0,88mL (6mmol) TEA-t. Éjszakán át kevertük, majd a reakcióelegyet EtOAc-cal meghígítottuk, a kivált kristályokat szűrtük, 1N KHSO_4 -tal, majd vízzel alaposan mostuk és exsikkátorban P_2O_5 mellett szárítottuk.

R_f : 0,7(3) Termelés: 60%

Az így kapott kristályos terméket TFA-ban oldottuk, három órán át állni hagytuk, majd toluolt adtunk hozzá és bepároltuk. A bepárlási maradékot EtOAc-cal eldörzsöltük és szűrtük.

R_f : 0,5(6) Op: 231–235°C Termelés: 80%

Számított:(%) C: 55,90 H: 5,10 N: 11,90

Talált:(%) C: 55,65 H: 4,91 N: 11,89
 55,79 5,05 11,92

XXVI. Z-Glu(Gly-OH)-Gly-OH

$\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_8$: 395,375

0,86g (1,5mmol) Z-Glu(OTcp)-Gly-OBu^t-t feloldottunk 2mL vízmentes THF-ben, majd hozzáadtunk 0,25g (1,5mmol) Gly-OBu^t.HCl-et és 0,21mL (1,5mmol) TEA-t. Éjszakán át

kevertük, majd EtOAc-cal meghígítottuk, vízzel, 1N KHSO_4 -tal és ismét vízzel mostuk, Na_2SO_4 -on szárítottuk. Bepárlás után a maradékot éterben feloldottuk, majd hexánnal kicsaptuk és a felülúszót leöntöttük. Ezt a műveletet 3-szor megismételve triklórffénoltól mentes olajat kaptunk. Ezt 2mL TFA-ban feloldottuk, majd 3 óra állás után toluolt adtunk hozzá és bepároltuk. A maradékot 10mL BuOH/EtOAc 1:1 arányú elegyében feloldottuk és vízzel mostuk. A szerves fázist bepároltuk és éterrel eldörzsöltük.

R_f : 0,5(7) Op: 160-162°C Termelés: 80%

Számított: (%) C: 51,64 H: 5,35 N: 10,63

Talált: (%) C: 51,30 H: 5,46 N: 10,97
 51,30 5,20 11,09

XXVII. Z-Pal(3)-Gly-OH

$\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5$: 357,369

0,266g (1mmol) Boc-Pal(3)-OH-t feloldottunk 2mL vízm. DMF-ben és hozzáadtunk 0,125g (1mmol) Gly-OMe.HCl-et, 0,14mL (1mmol) TEA-t, majd 0°C-on 0,22g (1,05mmol) DCC-t. Éjszakán át kevertük szobahőmérsékleten, majd a kivált DCU-t szűrtük és a DMF-et bepároltuk. A bepárlási maradékot feloldottuk 5mL EtOAc-ban és 2mL 1N KHSO_4 -tal extraháltuk a terméket. Ezután 5%-os NaHCO_3 -tal pH=7-et állítottunk be és a vizes fázist EtOAc-cal ismét extraháltuk. Az EtOAc-os fázist vízzel mostuk, Na_2SO_4 -on szárítottuk, majd bepároltuk.

R_f : 0,6(3) Termelés: 80%

A fenti olajat feloldottuk 3mL 30%-os toluolos TFA-ban és egy órán át állni hagytuk. Ezután bepároltuk, toluolt adtunk hozzá és ismét bepároltuk. $R_f: 0,5(9)$

0,32g (0,7mmol) Pal(3)-Gly-OMe.2TFA-t feloldottunk 2mL DMF-ben és hozzáadtunk 0,21mL (1,5mmol) TEA-t és 0,2g (0,8mmol) Z-OSu-t. Éjszakán át kevertük, majd a DMF-et bepároltuk. A bepárlási maradékot feloldottuk 5mL EtOAc-ban, majd 1mL 1N KHSO_4 -tal extraháltuk a terméket. Ezután 5%-os NaHCO_3 -tal pH=7-et állítottunk be és a vizes fázist 5mL EtOAc-cal ismét extraháltuk. Az EtOAc-ot ezután vízzel mostuk, Na_2SO_4 -on szárítottuk, majd bepároltuk.

$R_f: 0,6(3)$ Termelés: 80%

0,18g (0,5mmol) Z-Pal(3)-Gly-OMe-t feloldottunk 3mL MeOH-ban és hozzáadtunk 1,2mL 0,5N NaOH-ot. Két órán át kevertük, majd 1,2mL 0,5N HCl-at adtunk hozzá és bepároltuk. Ezután feloldottuk 5mL vízben és kétszer extraháltuk 5mL EtOAc/éter 1:1 arányú elegyével (a szerves fázis több apoláros szennyezést elvitt). A vizes fázist ezután BuOH/EtOAc 1:1 arányú elegyével háromszor extraháltuk (a poláros szennyezések a vízben maradtak). A szerves fázist bepároltuk, majd éterrel eldörzsöltük.

$R_f: 0,4(6)$ Op: 207-210°C Termelés: 70%

Számított: (%) C: 60,50 H: 5,36 N: 11,76

Talált: (%) C: 59,72 H: 5,35 N: 11,39

XXVIII. Z-Ala-Gly-OLi

 $C_{16}H_{20}N_3O_5Li$: 341,294

6,59g (28,15mmol) δ -hidroxi-L-lizin.2HCl-ot feloldottunk 42,2mL 2N NaOH-ban, majd 10mL vízben feloldottunk 3,5g (14,07mmol) $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ -t és hozzáadtuk a fenti oldathoz. Ezután 10mL tercier-butanolban oldott 6,6mL (33mmol) $(Boc)_2O$ -t adtunk az elegyhez. Éjszakán át erőteljesen kevertük. (A felszabaduló CO_2 eltávozását vákuum-elszívással segítettük.) A reakcióelegyet bepároltuk, 20mL jeges vízzel eldörzsöltük, szűrtük, majd mostuk újabb 20mL jeges vízzel, kétszer 50mL acetonnal és éterrel. R_f : 0,5(7) Termelés: 93%

7,65g (26mmol) H-Hyl(Boc)-OH.1/2 Cu^{2+} -t felfuszpendáltunk 20mL vízben és hozzáadtunk 20mL vízben oldott 12g (27,6mmol) EDTA-tetranátrium-sót. Ezután 0°C-on 20mL dioxánban oldott 5mL (35mmol) Z-Cl-ot és 17,5mL 2N NaOH-ot adagoltunk a reakcióelegyhez 5 részletben 1 óra alatt. További két órán át szobahőn kevertük, majd vízzel 500mL-re hígítottuk és kétszer 50mL éterrel extraháltuk. Ezután a vizes fázist 1N $KHSO_4$ -tal pH=3-ra savanyítottuk és kétszer 50mL EtOAc-cal extraháltuk. Az EtOAc-ot háromszor 30mL vízzel mostuk, Na_2SO_4 -on szárítottuk és bepároltuk. R_f : 0,5(4)

Az így kapott olajat feloldottuk 100mL benzolban és 50mL EtOH-t adtunk hozzá, majd 8 órán át refluxoltuk. (A terner elegyet észterező-feltéttel elválasztottuk.) A reakcióelegyet ezután bepároltuk, a kapott olajat éterben feloldottuk. Hűtőben állni hagytuk 1 órán át és ezalatt kikristályosodott

4g (41%) anyag [R_f :0,6(10)]. Ezután bepároltuk az anyalúgot. A kapott 7g bepárlási maradék fő komponense a vékonyréteg-kromatográfiásan R_f :0,7(10)-nél megjelenő folt, melyet kb. 5-10% R_f :0,6(10)-nél látható folt kísért.

Az NMR-spektrumok alapján a kisebb R_f -értékű folt a megfelelő lakton-származéknak, míg a nagyobb R_f -értékű folt a Z-Hyl(Boc)-OEt-nek felelt meg. (A két frakciót a továbbiakban külön kezeltük. A laktonból származó vegyületeket a izomernek, az etil-észterből származókat b izomernek neveztük el. Az egyes származékok forgatásértékei ugyanis a hidroxilizin-oldallánc δ -helyzetű királis centrumának racemizálódását igazolták.)

a : Op:113-115°C $[\alpha]_D^{20} = -44,29^\circ$ (c=1, metanol)

b : - $[\alpha]_D^{20} = -13,93^\circ$ (c=1, metanol)

(A továbbiakban a két izomerrel teljesen azonos reakciósoron keresztül jutottunk el a végtermékhez. Ezért az egyes szintézis-lépéseket csak az a izomer esetében ismertetem.)

3,74g (50mmol) glicint és 2,8g (49,9mmol) granulált KOH-ot feloldottunk 300mL forró, vízmentes EtOH-ban, majd hozzáadtunk 3,78g (10mmol) laktont (a). A reakcióelegyet nyolc órán át refluxoltuk, majd az EtOH-t bepároltuk. A bepárlási maradékot 1N KHSO_4 -tal megsavanyítottuk és EtOAc-cal extraháltuk. Az EtOAc-os fázist vízzel mostuk, Na_2SO_4 -on szárítottuk, majd 2mL (10mmol) DCHA-t adtunk hozzá. Fél óra alatt szobahőn kikristályosodott a Z-Hyl(Boc)-Gly-OH.DCHA

R_f : 0,2(4) és 0,4(5) Termelés: 66%

Számított:(%) C: 62,43 H: 8,57 N: 8,82

Talált:(%) C: 61,89 H: 8,85 N: 8,58
61,62 8,73 8,51

a izomer: Op: 170–172°C $[\alpha]_D^{20} = -5^\circ$ (c=1, MeOH)

b izomer: Op: 169–171°C $[\alpha]_D^{20} = -3,98^\circ$ (c=1, MeOH)

4,38g (6,9mmol) Z-Hyl(Boc)-Gly-OH.DCHA-sót felszabadítottunk. Az így kapott olajat 10mL éterben feloldottuk, majd 0°C-on hozzáadtunk 25mL (0,3M-os) éteres diazometánt, és engedték felmelegedni szobahőre. Ezután az étert bepároltuk. Kromatográfiásan egységes olajhoz jutottunk [R_f : 0,3(10)].

2,8g (6mmol) Z-Hyl(Boc)-Gly-OMe-t feloldottunk 5mL TFA-ban és egy órán át állni hagytuk. Ezután toluoltadtunk hozzá és bepároltuk. A bepárlási maradékot 5mL vízm. CHCl_3 -ban feloldottuk, majd 5mL vízm. THF-etadtunk hozzá és a keletkező kristályokat szűrtük.

R_f : 0,5(6) Termelés: 60% [A Z-Hyl(Boc)-Gly-OH.DCHA-ra nézve]

Számított:(%) C: 47,40 H: 5,44 N: 8,73

Talált:(%) C: 47,66 H: 5,36 N: 8,50
47,78 5,41 8,76

a izomer: Op: 150–151°C $[\alpha]_D^{20} = -15,7^\circ$ (c=1, MeOH)

b izomer: Op: 147–149°C $[\alpha]_D^{20} = -14,08^\circ$ (c=1, MeOH)

(A b izomer kristályosodási készsége eltért az a izomerétől, mert csak több órás állás után kristályosodott hidegen, erőteljes dörzsölés hatására.)

1,58g (3,28mmol) Z-Hyl-Gly-OMe.TFA-t felszuszpendáltunk 20mL vízm. CHCl_3 -ban és hozzáadtunk 0,95mL (6,8mmol) TEA-t, majd 0°C -on 0,92g (3,3mmol) Trt-Cl-ot. Éjszakán át hűtőben állt, majd a kloroformot mostuk vízzel, 1N KHSO_4 -tal, vízzel, 5%-os NaHCO_3 -tal és ismét vízzel. Ezután a kloroformos fázishoz toluolt adtunk és bepároltuk. A bepárlási maradékot éterben oldottuk és hexánnal eldörzsöltük.

R_f : 0,2-0,3(11) (elnyúlt TMDDM-pozitív folt) Termelés: 65%

Számított:(%) C: 70,92 H: 6,45 N: 6,89

Talált:(%) C: 70,53 H: 6,72 N: 6,32
70,68 6,73 6,31

a izomer: Op: 43-48 $^\circ\text{C}$ (amorf) $[\alpha]_D^{20} = -15,02^\circ$ (c=1, MeOH)

b izomer: Op: 114-115 $^\circ\text{C}$ $[\alpha]_D^{20} = -11,2^\circ$ (c=1, MeOH)

(Gyakorlatilag ettől a ponttól tekintettük bizonyítottnak az a és a b származékok izomer jellegét.)

1,17g (1,92mmol) Z-Hyl(Trt)-Gly-OMe-t feloldottunk 3mL vízm. piridinben és hozzáadtunk 0,54mL (3,85mmol) TEA-t és -10°C -on 0,18mL (2,3mmol) mezil-kloridot. Éjszakán át 0°C -on állt, majd a piridines reakcióelegyet jégre öntöttük, vízzel kétszer eldörzsöltük. Az így kapott olajat CHCl_3 -ban feloldottuk, mostuk vízzel, 1N KHSO_4 -tal, vízzel, 5%-os NaHCO_3 -tal és ismét vízzel. A kloroformos fázishoz ezután toluolt adtunk és bepároltuk. Az így kapott Z-Hyl(δ -Mes, ε -Trt)-Gly-OMe kromatográfiásan egységes, R_f : 0,4-0,5(11)-nél elnyúlt TMDDM- és NBP-pozitív foltot adott.

A fenti Z-Hyl(δ -Mes, ε -Trt)-Gly-OMe kloroformos oldatához kb. 10% metanolt és 0,5mL TEA-t adtunk. Három órás reflux után a reakcióelegyet bepároltuk, 10mL CHCl_3 -ban feloldottuk, majd mostuk vízzel, 5%-os NaHCO_3 -tal és ismét vízzel. Ezután toluolt adtunk a kloroformos fázishoz és bepároltuk. A bepárlási maradékot éter/hexán eleggyel eldörzsöltük.

R_f : 0,5-0,6(11) (TMDDM- és NBP-pozitív) Termelés: 66% (2 lépés)

Számított: (%) C: 73,07 H: 6,30 N: 7,10

Talált: (%) C: 73,08 H: 6,66 N: 6,78
73,06 6,69 6,79

a izomer: Op: 49-53°C (amorf) $[\alpha]_D^{20} = +22,8^\circ$ (c=1, MeOH)

b izomer: Op: 89-91°C $[\alpha]_D^{20} = +28^\circ$ (c=1, MeOH)

A szerkezeteket NMR-spektrum alapján is azonosítottuk.

330mg (0,56mmol) Z-Aly(Trt)-Gly-OMe-t feloldottunk 2mL vízm. CHCl_3 -ban és hozzáadtunk 1mL TFA-t. Egy órán át állt szobahőn, majd 5mL CHCl_3 -mal és 5mL vízzel meghigítottuk. A két fázist ezután elválasztótölcsérben összeráztuk, elválasztottuk és a vizes fázist szilárd NaHCO_3 -tal semlegesítettük. Ezután 10%-os Na_2CO_3 -oldattal pH=8,5-et állítottunk be és CHCl_3 -mal extraháltuk. A kloroformos fázist vízzel mostuk, izzított K_2CO_3 -on szárítottuk, majd bepároltuk.

R_f : 0,5(12) (TMDDM- és NBP-pozitív) Termelés: 67% (olaj)

(Az anyag kloroformos oldata napokig eltartható bomlás nélkül, míg bepárolva még -20°C-on is több kisebb R_f -ű foltra bomlik néhány óra állás után, noha közvetlenül a bepárlás után

még kromatográfiásan egységes.)

130mg (0,37mmol) Z-Ala-Gly-OMe-t feloldottunk 3mL MeOH-ban és hozzáadtunk 2,75mL 0,1N LiOH-ot. Egy óra keverés után CHCl_3 -mal és vízzel meghígítottuk, majd a két fázist elválasztottuk, a vizes fázist liofilizáltuk.

a izomer: a hidrolízis folyamán többfoltos termék keletkezett, mely kb. 50-60%-ban tartalmazta az $R_f:0,3(13)$ -nál látható TMDDM-és NBP-pozitív foltot.

b izomer: kromatográfiásan csaknem egységes [$R_f:0,3(13)$], liofilizátuma stabilan eltartható. PMR- és ^{13}CMR -spektrumok alapján XXVIII jelenléte a liofilizátumban igazolható volt, bár a szén-spektrum alapján az anyag nem tekinthető egységesnek.

Az FSF-fel indukált fibrin-polimerizáció és a TG-ázzal indukált fibrinogén-polimerizáció gátlásának vizsgálata in vitro

A vizsgálatokhoz használt reagensek:

1. 0,15M-os TRIS.HCl puffer (pH=7,4)
2. FSF-et tartalmazó fibrinogén (FBG/FSF) (KABI Diagnostica, Sweden), 2mg/mL töménységű oldat TRIS.HCl pufferben,
3. 10 NIH U/mL töménységű trombin-oldat,
4. 0,1M-os vizes CaCl_2 -oldat,
5. A vizsgálandó anyag TRIS.HCl pufferben,
6. 2%-os monoklórecetsav (MCA) vizes oldata,
7. TG-áz (tengerimalac májból Folk eljárásával [10] nyert készítmény) 0,9%-os NaCl-ban oldva.

FSF-gátlás (fibrin-polimerizáció)

200 μL FBG/FSF-oldathoz adunk 100 μL puffert (K1) vagy 100 μL MCA-t (K2) vagy 100 μL pufferben oldva a vizsgálandó anyagot (i), majd 50 μL CaCl_2 -oldat és 100 μL trombin-oldat hozzáadásával elindítjuk az alvadékképződést. A K1 és i esetben azonnal képződik fibrin-alvadék, a K2 esetben az alvadékképződés elmarad. A reakcióelegyet 2 óra után 3,5mL MCA-oldattal hígítjuk és 18 órán át állni hagyjuk, majd spektrofotométerben 280nm-en leolvassuk az extinkciós értéket. A K1 és K2 esetben észlelt kontroll értékek (E_{K1} és E_{K2}) a 0%-os, ill. a 100%-os gátlásnak felelnek meg. Ezeknek és az

i esetben mért extinkciós értéknek (E_i) a segítségével határozzuk meg a vizsgált anyag gátlási %-át az alábbi képlet szerint:

$$100 - \frac{E_{K1} - E_i}{E_{K2} - E_{K1}} \times 100 = \% \text{-os gátlás}$$

TG-áz gátlás (fibrinogén polimerizáció)

A TG-áz gátlás meghatározása a fent leírtaktól annyiban tért el , hogy a trombin helyett 200 μ L pufferben oldott TG-áz preparátumot adtunk a rendszerhez.

VI. Irodalomjegyzék

1. S.Bajusz; D.Bagdy; É.Barabás and E.Széll
Peptides Acting upon Haemostasis
In: Biomedical Significance of Peptide Research (Editors:
F.A.László and F.Antoni)
2. H.A.Scheraga and M.Laskowski, Jr.
The Fibrinogén-Fibrin Conversion
In: Advances in Protein Chemistry (Ed.: C.B.Anfinsen, Jr.)
12, 1-131 (1957) Academic Press. N.Y.
3. K.Laki (Ed.)
Fibrinogen
Academic Press. N.Y. (1968)
4. R.F.Doolittle; K.W.K.Watt; B.A.Cottrell; D.D.Strong
and M.Riley
The Amino Acid Sequence of the α -Chain of Human Fibrinogen
Nature, 280, 464-468 (1979)
5. L.Lóránd; K.Konishi and A.Jacobsen
Transpeptidation Mechanism in Blood Clotting
Nature, 194, 1148 (1962)
6. N.Takahasi; Y.Takahasi and F.W.Putnam
Primari Structure of Blood Coagulation Factor XIII.a
(Fibrinoligase, Transglutaminase) from Human Placenta
Proc. Natl. Acad. Sci., 83, 8019-8023 (1986)
7. J.E.Folk and P.W.Cole
J. Biol. Chem., 241, 3238 (1966)

8. L.Fésűs; É.F.Szűcs; K.E.Barrett; D.D.Metcalf and J.E.Folk
Activation of Transglutaminase and Production of
Protein-bound γ -Glutamyl-histamin in Stimulated Mouse Mast
Cells
J. Biol. Chem., 260(25), 13771-13778 (1985)
9. L.Fésűs and J.E.Folk
Synthetic Glutamic Peptides of Blood Coagulation Factor
XIII.
Clin. Chem., 31, 2044-2045 (1985)
- 9a. J.J.Gorman and J.E.Folk
Structural Features of Glutamine Substrates for
Transglutaminases
J. Biol. Chem., 259, 9007-9010 (1984)
10. J.E.Folk
Structure and Catalytic Properties of Hepatic
Transglutaminase
Annals N.Y. Acad. Sci., 202, 59-76 (1972)
11. L.Lóránd; R.F.Doolittle; K.Konishi and S.K.Riggs
A New Class of Blood Coagulation Inhibitors
Archives of Biochem. and Bioph., 102, 171-179 (1963)
12. L.Lóránd; N.G.Rule; H.H.Ong; R.Furlanetto; A.Jacobsen;
J.Downey; N.Öner and J.Bruner-Lóránd
Amine Specificity in Transpeptidation. Inhibition of
Fibrin Crosslinking
Biochemistry, 7, 1214-1223 (1968)

13. Ch.Ljunggren; K-J.Hoffmann; P.Stenberg; U.Svensson;
J.L.G.Nilsson; A.H.Koorn; R.Lundén
Fibrin-Stabilizing Factor Inhibitors 11. Monodansylated
Weak Aliphatic Diamines
J. Med. Chem., 17, 649 (1974)
14. M.Bodánszky
In: Principles of Peptide Synthesis
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo
p.148 (1984)
15. R.O.Atkinson and F.Poppelsdorf
Sulphonium Derivatives of D,L-Methionine and 5-(2-methyl-
thioethyl)-thioantoin
J. Chem. Soc., 1378 (1951)
16. P.Hamilton and R.Anderson
 δ -Hydroxy-L-Lysine (α,ϵ -Diamino- δ -hydroxy- α -hexanoic
Acid)
In: Biochemical Preparations, Vol:8, 55-69 (1961)
17. L.Lóránd; C.H.Chou and I.Simpson
Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 2645 (1972)
18. Ch.Ljunggren; K-J.Hoffmann; P.Stenberg and J.L.G.Nilsson
Fibrin Stabilizing Factor Inhibitors 10. Thiol Esters as
Potent Enzyme Inhibitors
J. Med. Chem., 16, 1186 (1973)
19. M.Gross; K.Norma and J.E.Folk
Isocyanates as Active-Site-Directed Inactivators of

- Guinea Pig Liver Transglutaminase
J. Biol. Chem., 7693-7699 (1975)
20. J. A. Moore; R. Dice; E. D. Nicolaides; R. D. Westland and
E. L. Wittle
Azaserine, Synthetic Studies I. and II.
J. Chem. Soc., 76, 2884-2892 (1954)
21. Th. J. Curphey and D. S. Daniel
New Synthesis of Azaserine
J. Org. Chem., 43, 4666-4668 (1978)
22. S. I. Chung; R. I. Shrager and J. E. Folk
Mechanism of Action of Guinea Pig Liver Transglutaminase
VII. Chemical and Stereochemical Aspects of Substrate
Binding and Catalysis
J. Biol. Chem., 245(23), 6421-6435 (1970)
23. E. Shaw; C. Kettner and G. D. J. Green
Peptidyl Chloromethyl Ketones and Diazomethyl Ketones as
Protease Affinity Labels
In: Peptides Synthesis-Structure-Function
Proceedings of The Seventh American Peptide Symposium
pp. 401-409
24. Ch. Ressler and H. Ratzkin
Synthesis of β -Ciano-L-alanine and γ -Ciano-L-Aminobutiric-
Acid. Dehydration Products of L-Asparagine and
L-Glutamine; a New Synthesis of Amino Acid Nitriles
J. Org. Chem., 26, 3356-3360 (1961)

25. S.Nahm and S.M.Weinreb
N-Methoxy-N-Methylamides as Effective Acylating Agents
Tetrahedron Letters, 22, 3815-3818 (1981)
26. D.B.Hope and J.F.Humphries
A Convenient Preparation of L-Homocystine from
L-Methionine
J. Chem. Soc. 869 (1964)
27. M.Waki; Y.Kitajima and N.Izumija
A Facile Synthesis of N²-protected-L-2,3-Diamino-
propanoic Acid
Synthesis, 266 (1981)
28. J.R.McDermott and N.L.Benoiton
N-Methylamino Acids in Peptide Synthesis II.
A New Synthesis of N-Benzyloxycarbonyl, N-Methylamino
Acids
Can. J. Chem., 51, 1915 (1973)
29. A. Turán and S.Bajusz
 γ - and δ -Hydroxy Amino Acids in Peptide Synthesis
In: Peptides 1978, Wroclaw University Press;
pp.553-555 (1979)
30. K.Nakajima; F.Takai; T.Tanaka and K.Okawa
Studies on Azyridine-2-Carboxylic Acid I. Synthesis of
the Optically Active L-Azyridine-2-Carboxylic Acid and Its
Derivatives
Bull. Chem. Soc. Jap., 51(5), 1577-1578 (1978)

31. A.L.Castelhano; R.Billedeau; D.H.Pliura; B.J.Bonaventura
and A.Krantz
Synthesis, Chemistry and Absolute Configuration of Novel
Transglutaminase Inhibitors
Bioorg. Chem., 16(3), 335-340 (1988)
32. F.Weygand; H.J.Bestmann und E.Klieger
N-Tryfluoracetyl-aminosäuren, XI. Synthese des 6-Diazo-
5-oxo-L-norleucins und der 7-Diazo-6-oxo-2-L-amino-
-önantsäure.
Chem. Ber., 1037 (1958)
33. Ch.T.Clarke And J.H.Jones
The Reaction of Benzyloxycarbonylglutamic Anhydride with
Diazomethane
Tetrahedron Letters, No:27, 2367-2368 (1977)
34. J.M.Scholtz and P.A.Bartlett
Convenient Differential Protection Strategy for
Functional Group Manipulation of Aspartic and Glutamic
Acids
Synthesis, 543 (1989)
35. J.M.Buchanan
The Amidotransferases
In: Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 39, 91, (1973)
36. R.Leary; D.larsen; H.Watanabe and E.Shaw
Diazomethyl Ketone Substrate Derivatives as Activ-Site-
Directed Inhibitors of Thiol Proteases. Papain

- Biochemistry, 16(26), 5857-5861 (1977)
37. T.Tomaki and N.Aoki
 Cross-Linking of α_2 -Plasmin Inhibitor to Fibrin Catalized
 by Activated Fibrin Stabilizing Factor
 J. Biol. Chem., 257, 14767-14772 (1982)
38. A.G.Loewy
 Some Thoughts on the State in Nature, Biosynthetic Origin
 and Function of Factor XIII.
 Ann. N.Y. Acad. Sci., 202, 41 (1972)
39. H.Kanaide and J.R.Shainoff
 Cross-Linking of Fibrinogen and Fibrin by FSF (Factor
 XIII.a)
 The Journal of Lab. and Clin. Med., 85, 574-597 (1975)
40. R.Schwyzer and W.Rittel
 Helv. Chim. Acta, 44, 161 (1961)
41. D.Brömme; B.Bartels; K.Peters; H.Kirschke and S.Fittkau
 The Use of Peptide Methyl Ketones as Inhibitors of
 Proteinases
 In: Peptides - Chemistry; Biology
 Interactions with Proteins
 Proc. of the 50th. Ann. Symp. of the Nobel-Prize of
 Albert Szent-Györgyi
 Szeged, Hungary, August 31-Sept. 4, 1987
 Walter de Gruyter Berlin, New York 1988 p.:53
42. K.Hofmann; A.Jöhl; A.E.Furlenmeyer and H.Kappler

J. Am. Chem. Soc., 79, 1636 (1957)

43. M. Bergmann und L. Zervas

Über ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese

Chem. Ber., 65, 1192 (1932)

Köszönetnyilvánítás

Ezúton köszönöm meg az Intézet vezetőségének, hogy lehetővé tette számomra a dolgozat elkészítéséhez szükséges munkák elvégzését.

Munkámban, a dolgozat megírásában nagy segítséget jelentett Dr. Bajusz Sándor tudományos osztályvezető irányítása, tanácsai, bírálatai, melyekért ezúton mondok köszönetet.

Köszönettel tartozom Dr. Barabás Évának a biológiai vizsgálatok pontos és napra kész elvégzéséért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom Dr. Lávich Jánosné technikusnak a számos vegyület elkészítésében végzett pontos és önálló munkájáért, valamint Taschler Istvánné technikusnak és a szintetikus V osztály valamennyi dolgozójának segítőkészségéért.

