

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**N-PEPTID-6-AMINO-D-LUCIFERIN KONJUGÁTUMOK
OPTIMALIZÁLT SZINTÉZISMÓDSZEREI ÉS BIOLÓGIAI
FELHASZNÁLÁSUK**

KOVÁCS ANITA KÁRMEN

TÉMAVEZETŐK:

Prof. Dr. Tóth Gábor

Dr. Puskás László

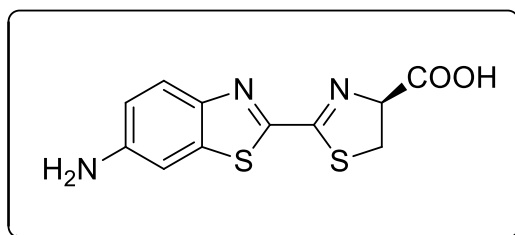


Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Vegytani Intézet
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Szeged
2019

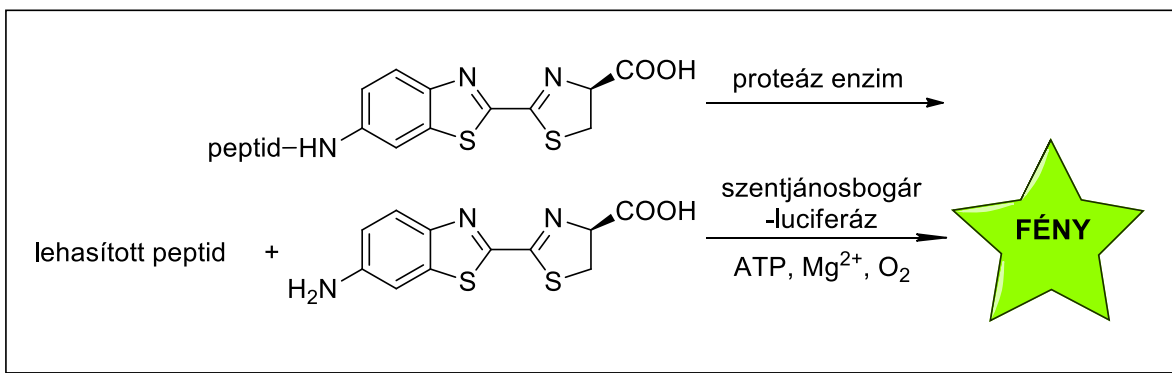
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A korábbi években a különböző biológiai minták elemzésére számos fluoreszcencián és biolumineszcencián alapuló *in vitro* és *in vivo* analitikai módszert dolgoztak ki. Ezek közül néhány fontosabb technika a különböző immunpróbák, a génaktivitást és transzkripció szabályozást mérő eljárások, biológiai képkalkító eljárások, a gyógyszerhatást és mellékhatást kimutató különböző sejtes és állatmodellek. Mikrotitráló lemezekon alapuló, nagy áteresztőképességű sejt-életképességet analizáló esszék fejlesztése - melyek különböző proteázok aktivitását detektálják - intenzív kutatás tárgyát képezi. A biolumineszcenciás rendszereknek nagy előnye a fluoreszcencián alapulókkal szemben, hogy sokkal érzékenyebbek és könnyebben automatizálhatók. A különböző sejtes és állatmodellekben alkalmazott biolumineszcenciás módszerek során számos eltérő luciferáz enzimet és ezek szubsztrátjait, luciferineket használnak. A biológiai képkalkító eljárások leggyakoribb enzim-szubsztrát rendszere a szentjánosbogár (*Photinus pyralis*) luciferáz-luciferin rendszer. A natív luciferin 6-os pozíciójában lévő hidroxil-csoport aminosocsoporttal történő helyettesítése a 6-amino-D-luciferint (továbbiakban: aLuc, 1. ábra) eredményezi, amely képes amidkötést létesíteni egy peptiddel, miközben az eredeti szubsztrát transzport és biolumineszcens tulajdonságait megőrzi.



1. ábra 6-amino-D-luciferin

Emiatt az *N*-peptid-aLuc konjugátumok különböző proteázoknak szubsztrátjai, ezáltal alkalmas enzimaktivitás meghatározására: a mérendő proteáz enzim felismeri a megfelelő szekvenciával kapcsolt konjugátum peptid részét, majd elhasítja az amidkötést a peptid és az aLuc között, ami – luciferáz enzim jelenléte esetén – fénykibocsátást eredményez (2. ábra).



2. ábra A biolumineszcens rendszer működése

Sajnos ezen szubsztrátok publikált szintézismódszerei bonyolultak, és a kereskedelmi forgalomban kapható konjugátumok drágák. Jelen disszertáció célja új, gazdaságos utak kidolgozása volt *N*-peptid-aLuc konjugátumok szintézisére.

A preparatív munka során egy prekuzort (6-amino-2-ciano-benzotiazol, **3**), két konjugátumot (*N*-Z-Asp-Glu-Val-Asp-aLuc, **6**, *N*-Fmoc-Gly-Pro-aLuc, **8**) és egy építőkövet (*N*-Boc-aLuc, **10**) állítottunk elő.

2. VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

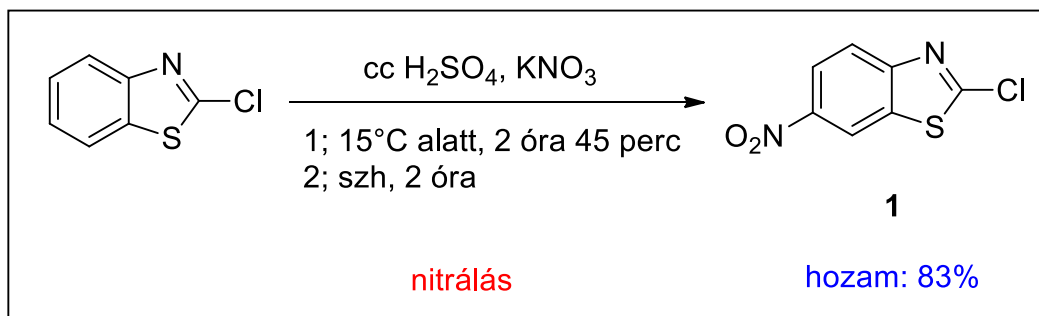
A szintetikus munka során a reakciók nagy részét millimólos mennyiségben hajtottuk végre. A reakciókat vékonyréteg-kromatográfiával, illetve RP-HPLC-vel követtük. Az előállított vegyületeket RP-HPLC-vel vagy egyszerű szűréssel és átkristályosítással tisztítottuk. A termékek szerkezetét egydimenziós NMR spektroszkópiával, valamint tömegspektrometria felhasználásával határoztuk meg. Az *N*-Z-Asp-Glu-Val-Asp-aLuc (**6**) és *N*-Fmoc-Gly-Pro-aLuc (**8**) szubsztrátok alkalmazhatóságát biokémiai rendszerekben vizsgáltuk kaszpáz-3, POP/PREP, FAP és Pro-C endopeptidáz jelenlétében. Az *in vivo* tesztek A549 kissejtes tüdőcarcinóma sejtekkel és SCID egerekbe oltott U87-Luc sejtekkel végeztük.

3. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

3.1 A prekursor szintézise

3.1.1 2-klór-6-nitro-benzotiazol (1) szintézise

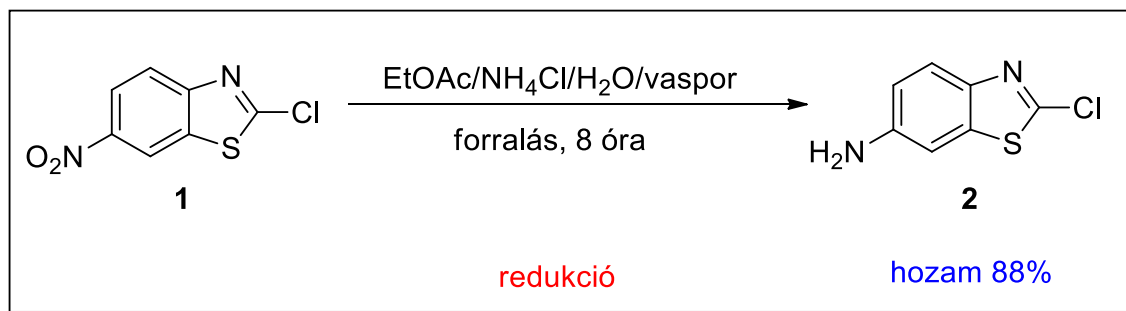
Kiindulási anyagként olcsó, kereskedelmi forgalomban kapható 2-klór-benzotiazolt használtunk, amelyet KNO_3 és cc H_2SO_4 elegyével nitráltunk, miközben a hőmérsékletet először 15°C alatt, majd szobahőmérsékleten tartottuk (3. ábra).



3. ábra 2-klór-6-nitro-benzotiazol (1) szintézise

3.1.2 6-amino-2-klór-benzotiazol (2) szintézise

A 2-klór-6-nitro-benzotiazol (1) nitro csoportját $\text{EtOAc}/\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{Cl}$ /vaspor rendszerrel redukáltuk, jó hozamot érve el (88%) (4. ábra).

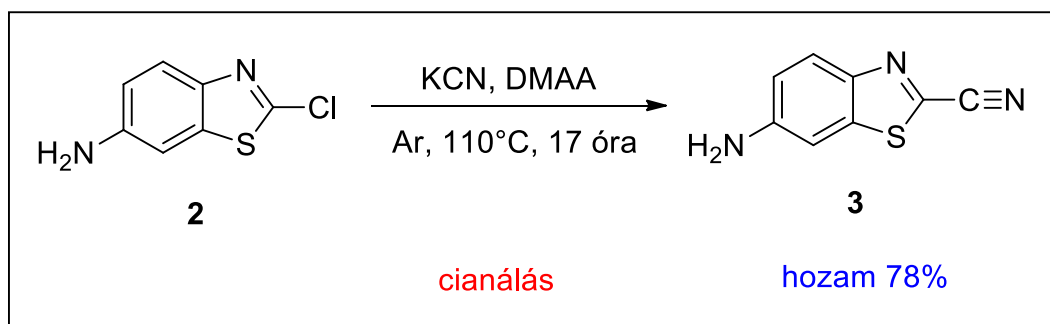


4. ábra 6-amino-2-klór-benzotiazol szintézise (2)

A Soxhlet extraktor használata oldószertakarékos és környezetbarát megoldásnak bizonyult, illetve a feldolgozás folyamatát is leegyszerűsítette: az oldatot elegendő volt dekantálni, hogy megszabaduljunk a vasportól, majd extrahálni.

3.1.3 6-amino-2-ciano-benzotiazol (3) szintézise

A kívánt prekursor előállításának kulcslépése a 6-amino-2-klór-benzotiazol (2) klóratomjának nitrilsoportra történő szubsztitúciója. A KCN megfelelő oldódásához poláros aprotikus, vízmentes oldószerre (DMAA), magas hőmérsékletre (110 °C) és hosszú reakcióidőre (17 óra) van szükség (5. ábra).



5. ábra 6-amino-2-ciano-benzotiazol szintézise (3)

3.2 N-peptid-aLuc konjugátum szintézis

Az aLuc aminocsoportjának alacsony nukleofilicitása miatt annak védőcsoporttal történő védeése problémás lett volna, ezért megbízhatóbb módszerre volt szükségünk.

Vegyes folyadék/szilárd fázisú szintézismódszer

3.2.1 N-peptid-aLuc konjugátum szintézis vegyes folyadék/szilárd fázisú Fmoc startégiával

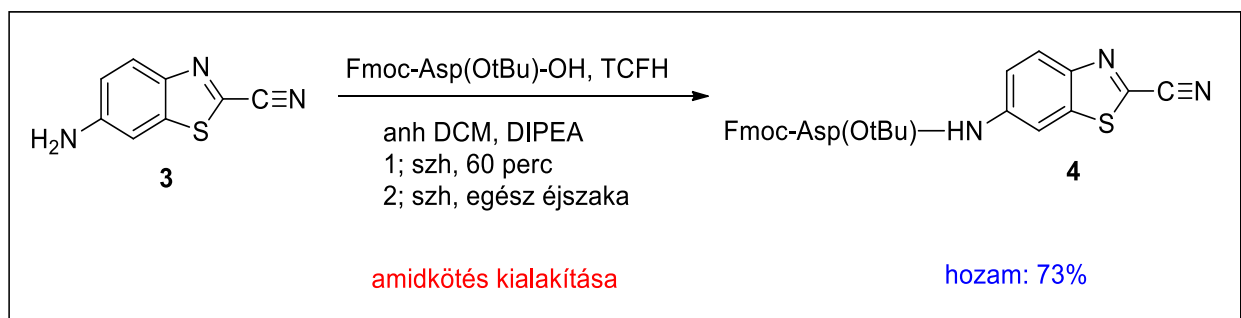
A kívánt aLuc konjugátumot (N-Z-Asp-Glu-Val-Asp-aLuc, 6) egy ötlépéses szintézisúton értük el:

- a) a célszekvencia C-terminális aminosavának kapcsolása a 6-amino-2-ciano-benzotiazolhoz
- b) ciszteinaddíció → c) gyantára kapcsolás → d) szilárd fázisú peptidszintézis
- e) hasítás a gyantáról

3.2.1.1 N-Fmoc-Asp(OtBu)-6-amino-2-ciano-benzotiazol (4) szintézise

Amidkötést alakítottunk ki Fmoc-védett aminosav (Fmoc-Asp(OtBu)-OH) és 6-amino-2-ciano-benzotiazol (3) között. A heterociklusos vegyület aminocsoportjának nagyfokú dezaktiváltsága miatt az amidkötést nem lehetett kialakítani a szokásosan használt kapcsolószerekkel, mint

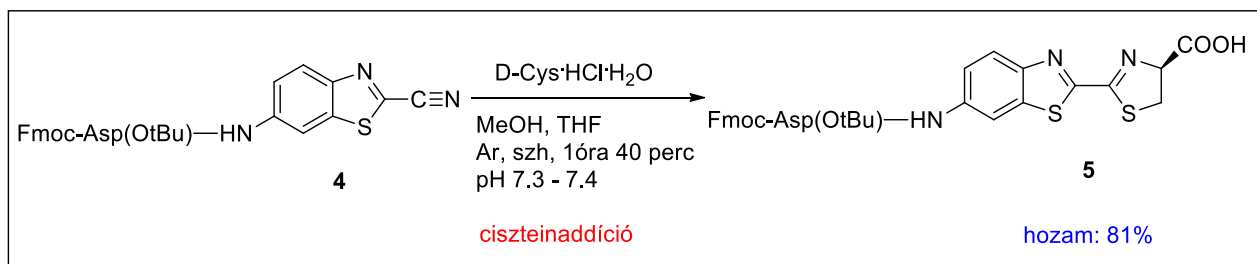
például a DCC, így egy sokkal erélyesebb kapcsolószerre volt szükségünk. TCFH-t másfélszeres feleslegben alkalmazva jó hozamot (73%) értünk el (6. ábra).



6. ábra *N*-Fmoc-Asp(OtBu)-6-amino-2-ciano-benzotiazol szintézise (4)

3.2.1.2 *N*-Fmoc-Asp(OtBu)-aLuc szintézise (5)

A D-cisztein addíciója során az aminosav-heterociklus konjugátumot feloldottuk THF és MeOH elegyében, majd ehhez az oldathoz D-cisztein-hidroklorid-monohidrát sót adtunk. A cisztein felszabadulását sójából elősegítendő, valamint a racemizációt megelőzendő, az oldat pH-ját 7.3-7.4 között tartottuk NaHCO₃-oldat segítségével (7. ábra).



7. ábra *N*-Fmoc-Asp(OtBu)-aLuc (5) szintézise

3.2.1.3 *N*-Fmoc-Asp(OtBu)-aLuc (5) gyantára kapcsolása

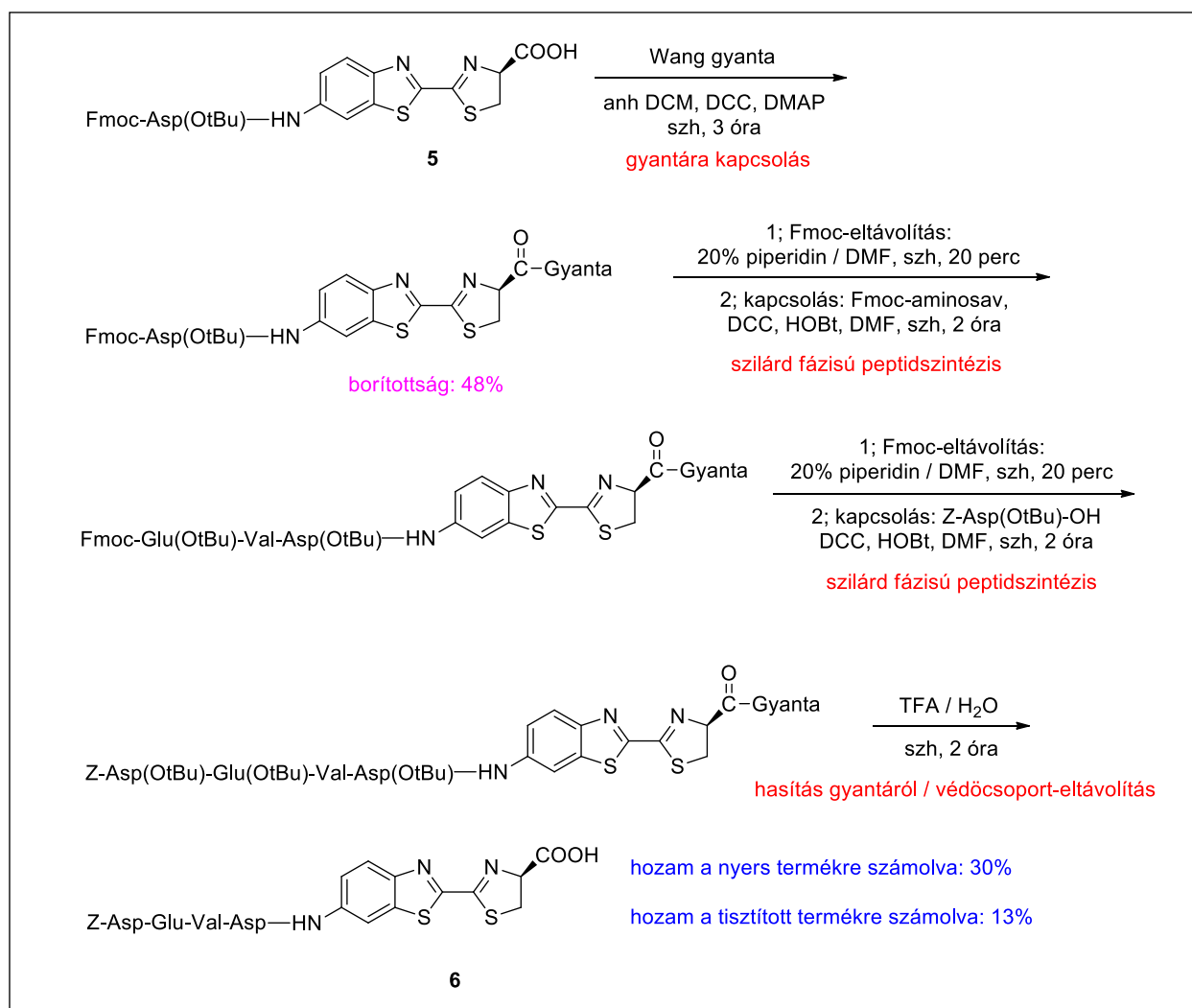
Borítottságvizsgálati tesztek alapján a két lehetséges jelölt, a Wang-gyanta és a 2-klór-tritil-klorid gyanta közül az előbbit választottuk, mivel ezen a gyantán magasabb borítottságot értünk el.

3.2.1.4 A peptidlánc kiépítése

A peptidláncot szilárd fázisú, Fmoc stratégiájú szintézissel állítottuk elő, melynek során az *N*-terminális aminosav végig *Z*-védett volt, mivel az *N*-terminális védőcsoport jelenléte a szekvencián nagyobb biológiai stabilitást eredményez (8. ábra).

3.2.1.5 A peptid-aLuc konjugátum hasítása a gyantáról

A fenti módszerrel előállított *N*-peptid-aLuc konjugátumot TFA és víz elegyével (95:5 v/v) hasítottuk le a gyantáról (8. ábra).



8. ábra *N*-Z-Asp-Glu-Val-Asp-aLuc (6) szilárd fázisú szintézise

3.2.1.6 A vegyes folyadék/szilárd fázisú szintézismódszer korlátai

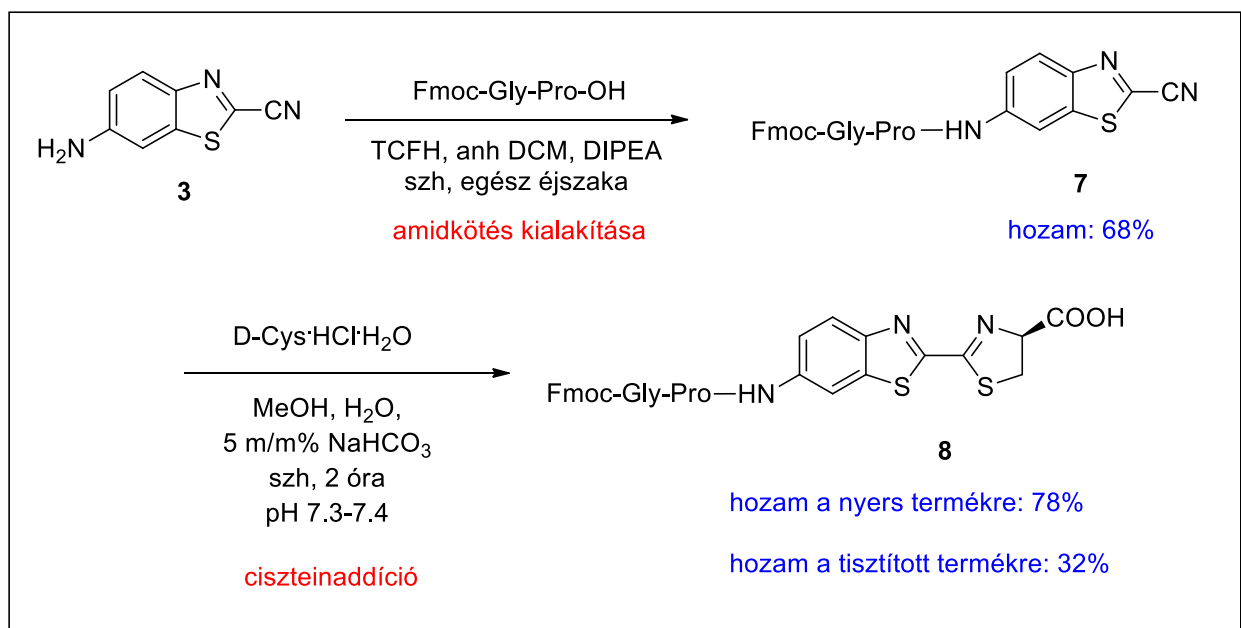
Az általunk kidolgozott módszerrel jobb hozamok érhetőek el, mint a már eddig publikált módszerekkel. A módszerünk hátránya viszont, hogy nagy esély van a termék dehidrogéneződésére a Δ^2 -tiazolin-gyűrűn belül.

Fragmenskondenzációs módszer

3.2.2 *N*-peptid-*aLuc* konjugátum szintézise fragmenskondenzációs módszerrel

A standard fragmenskondenzációs módszereken módosításokat hajtottunk végre, ezáltal sokkal magasabb hozamokat értünk el az *N*-Fmoc-Gly-Pro-*aLuc* (**8**) szintézise során. A módszer 2 lépésből áll:

- a célszekvencia (itt: *N*-Fmoc-Gly-Pro-OH) kapcsolása 6-amino-2-ciano-benzotiazollal (**3**)
- ciszteinaddíció az *N*-Fmoc-Gly-Pro-6-amino-2-ciano-benzotiazolra (**7**) (9. ábra)



9. ábra Synthesis of *N*-Fmoc-Gly-Pro-*aLuc* (**8**)

3.2.2.1 *N*-Fmoc-Gly-Pro-6-amino-2-ciano-benzotiazol (**7**) szintézise

Megfelelően védett, kereskedelmi forgalomban kapható peptidet, *N*-Fmoc-Gly-Pro-OH-t kapcsolunk a kulcsvegyülettel, a 6-amino-2-ciano-benzotiazollal (**3**), amelynek dezaktivált aminocsoportja miatt az amidkötést itt sem lehetett a szokványosan használt kapcsolószerekkel,

mint például a DCC-vel kialakítani, hanem itt is egy sokkal erélyesebb kapcsolószerre volt szükségünk. A megoldás itt is az 1.5 ekvivalensnyi mennyiségben alkalmazott TCFH volt, amelynek segítségével kiváló konverziót (97%) értünk el. Ezzel az eljárással elkerülhető volt a standard módszereknél alkalmazott extrém hosszú kapcsolási idő, valamint kielégítő hozamot (68%) értünk el.

3.2.2.2 N-Fmoc-Gly-Pro-aLuc (8) szintézise

A fentebbi, vegyes folyadék/szilárd fázisú szintézismódszernél alkalmazott lépéshez hasonlóan, a D-cisztein addíciója során az aminosav-heterociklus konjugátumot feloldottuk metanolban, majd D-cisztein-hidroklorid-monohidrátot adtunk hozzá. A cisztein felszabadulását sójából elősegítendő, valamint a racemizációt megelőzendő, az oldat pH-ját 7.3-7.4 között tartottuk NaHCO₃ -oldat segítségével (9. ábra). Az *N*-terminális aminosav Fmoc védőcsoportját nem távolítottuk el, mivel ennek jelenléte a szekvencián nagyobb biológiai stabilitást eredményez.

3.2.2.3 A fragmenskondenzációs módszer korlátai

Habár a kulcsvegyület (3) optimalizált szintézismódja, valamint az amidkötés kialakításánál és a D-cisztein addíciójánál végrehajtott módosítások jelentős fejlesztést jelentenek a standard fragmenskondenzációs módszerhez képest, még mindig vannak korlátai az általunk kifejlesztett eljárásnak: a) hosszabb (10 aminosavnál többől álló) peptidek esetén oldékonysági problémák léphetnek fel, amelyek megnehezítik az amidkötés kialakítását b) ha a *C*-terminális aminosav nem glicin vagy prolin, az amidkötés kialakítása során a *C*-terminális aminosav racemizációja léphet fel.

Építőkö előállítás a Boc-stratégiájú, szilárd fázisú szintézismódszerhez

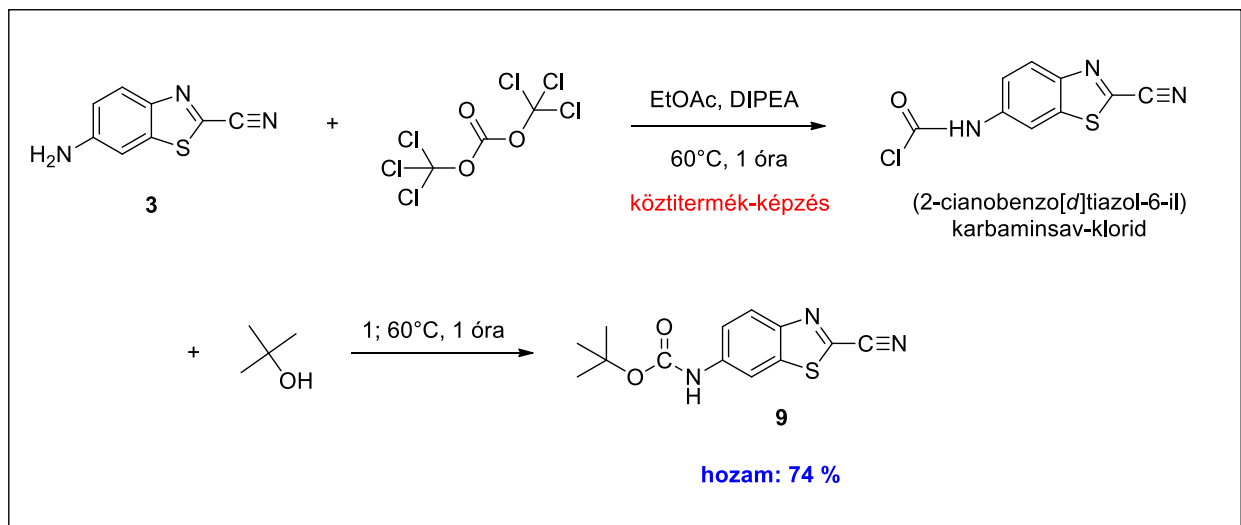
3.2.3 Építőkö előállítás az *N*-peptid-aLuc konjugátumok Boc-stratégiájú, szilárd fázisú szintéziséhez

Az *N*-peptid-aLuc konjugátumok Boc-stratégiájú, szilárd fázisú szintézisének sarokköve a nagy mennyiségben rendelkezésre álló Boc-védett aLuc. Célunk az volt, hogy előállítsunk egy olyan univerzális építőkövet, amelyhez bármely peptidszekvencia kapcsolható. A kívánt terméket egy 2 lépéses úton értük el:

a) Boc-védett 6-amino-2-ciano-benzotiazol előállítása → b) ciszteínaddíció

3.2.3.1 *N*-Boc-6-amino-2-ciano-benzotiazol (**9**) szintézise

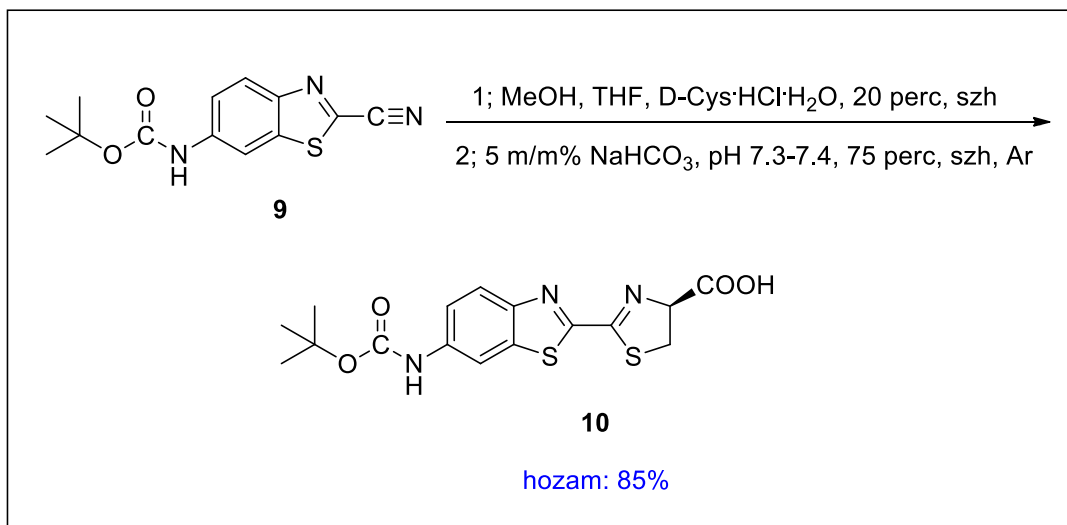
6-amino-2-ciano-benzotiazolt (**3**) feloldottunk EtOAc-ban, majd DIPEA-t és trifoszgent adtunk hozzá, köztitermék-ként 2-cianobenzo[*d*]tiazol-6-il)karbaminsav-kloridot létrehozva (10. ábra). A tBuOH beadagolása után a savas oldatot 28%-os NaOH-oldattal semlegesítettük.



10. ábra *N*-Boc-6-amino-2-ciano-benzotiazol (**9**) szintézise

3.2.3.2 *N*-Boc-*a*Luc (**10**) szintézise

N-Boc-6-amino-2-ciano-benzotiazolt (**9**) feloldottunk MeOH és THF elegyében, majd hozzáadtuk D-ciszteín-hidroklorid-monohidrát vizes oldatát. A ciszteín felszabadulását sójából elősegítendő, valamint a racemizációt megelőzendő, a pH-t 7.3-7.4 között tartottuk NaHCO₃ vizes oldata segítségével (11. ábra).



11. ábra *N*-Boc-*a*Luc (**10**) szintézise

3.2.4 Biológiai vizsgálatok

3.2.4.1 *N*-Z-Asp-Glu-Val-Asp-*a*Luc (**6**) biokémiai és sejtes tesztjei

Az *N*-Z-Asp-Glu-Val-Asp-*a*Luc (**6**) szubsztrát biológiai hatását biokémiai reakciókban igazoltuk rekombináns kaspáz-3 különböző mennyiségével. Az *N*-Z-Asp-Glu-Val-Asp-*a*Luc (**6**) szubsztrát használhatóságát is bizonyítottuk A549 kissejtes tüdő tumor sejtvonalon, amelyet egy apoptózist indukáló ágenssel, egy kurkumin analóggal (C-150) kezeltünk.

3.2.4.2 *N*-Z-Asp-Glu-Val-Asp-*a*Luc (**6**) állatkísérleti tesztje

Élő állatba (SCID egér) injektálva az *N*-Z-Asp-Glu-Val-Asp-*a*Luc (**6**) szubsztrátot, melyben egy luciferáz enzimet kifejező tumor (U87-Luc) nőtt, és melyet egy apoptózist indukáló gyógyszerjelölttel (Ac-915) kezeltünk, sikerült erős biolumineszcens jelet detektálnunk. Szignifikánsan kevesebb biolumineszcens jelet kaptunk a gyógyszerjelölttel nem kezelt, kontroll egerekben, ahol csak a háttér, alapszintű apoptózis történik.

3.2.4.3 *N*-Fmoc-Gly-Pro-*a*Luc (**8**) biokémiai tesztje

Az *N*-Fmoc-Gly-Pro-*a*Luc (**8**) szubsztrát specificitását két, tumoral összefüggésbe hozható, emberi proteázzal (POP/PREP és FAP), és egy bakteriális nem-specifikus endoproteinázzal (Pro-C) teszteltünk. Mindhárom enzim elfogadta a szubsztrátot, és felszabadította a 6-amino-D-luciferint, mely luciferáz jelenlétében erős biolumineszcens jelet hozott létre. A szubsztrát

enzimatis bomlását proteázgátlóval igazoltuk, mely teljes mértékben meggátolta a biolumineszcens jel képződését.

3.3. Összegzés

Munkánk során hatékony módszereket dolgoztunk ki *N*-peptid-aLuc konjugátumok gazdaságos szintézisére. Két módszer korábbi, már publikált szintézisutak optimalizált változata, harmadik eredményünk pedig, egy univerzális építőkő előállítása, lehetővé teszi elméletileg bármilyen *N*-peptid-aLuc konjugátum szintézisét. Az elkészült anyagok alkalmazhatóságát biológiai vizsgálatokkal is bizonyítottuk.

4. KÖZLEMÉNYEK

4.1 A doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények

[1] **Anita K. Kovács**, Péter Hegyes, Gábor J. Szebeni, Lajos I. Nagy, László G. Puskás, Gábor K. Tóth:

Synthesis of *N*-peptide-6-amino-D-luciferin conjugates

Front. Chem. **2018**, 6 (120), 1-11., doi: 10.3389/fchem.2018.00120

IF: 4.155

[2] **Anita K. Kovács**, Péter Hegyes, Gábor J. Szebeni, Krisztián Bogár, László G. Puskás, Gábor K. Tóth:

Synthesis of *N*-peptide-6-amino-D-luciferin conjugates with optimized fragment condensation strategy

Int J Pept Res Ther **2018**, (ahead of print), doi: 10.1007/s10989-018-9768-8

IF: 1.132

4.2 A doktori értekezés alapjául szolgáló előadások és poszterek

Anita K. Kovács, Péter Hegyes, Gábor J. Szebeni, László G. Puskás, Gábor K. Tóth

Synthesis of peptide-6-amino-D-luciferin conjugates

18th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence

Uppsala, Sweden, June 23-28, 2014, oral presentation

Anita K. Kovács, Péter Hegyes, Gábor J. Szebeni, László G. Puskás, Gábor K. Tóth

Boc strategy for the synthesis of peptide-6-amino-D-luciferin conjugates

19th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence

Tsukuba, Japan, 29 May – 02 June, 2016, oral presentation

Anita K. Kovács, Péter Hegyes, Gábor J. Szebeni, László G. Puskás, Gábor K. Tóth

Synthesis methods of peptide-6-amino-D-luciferin conjugates for protease activity detection

8th Conference Chemistry towards Biology

Brno, Czech Republic, August 28 – September 01, 2016, oral presentation

Anita K. Kovács, Péter Hegyes, Gábor J. Szebeni, László G. Puskás, Gábor K. Tóth

Comparison of Fmoc-, Boc- and fragment condensation strategies in the synthesis of peptide-6-amino-D-luciferin conjugates

34th European Peptide Symposium

Leipzig, Germany, September 04-09, 2016, poster presentation

Anita K. Kovács, Péter Hegyes, Gábor J. Szebeni, László G. Puskás, Gábor K. Tóth

Comparison of Fmoc-, Boc- and fragment condensation strategies in the synthesis of peptide-6-amino-D-luciferin conjugates

12th Australian Peptide Conference

Noosa Heads, Victoria, Australia, October 15-20, 2016, poster presentation

4.3 A doktori értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

[3] Anikó Angyal, András Demjén, Edit Wéber, **Anita K. Kovács**, János Wölfling, László G. Puskás, Iván Kanizsai

Lewis acid-catalyzed diastereoselective synthesis of multisubstituted *N*-acylaziridine-2-carboxamides from 2H-azirines via Joullié-Ugi three-component reaction

J. Org. Chem. **2018**, 83 (7), 3570–3581., doi: 10.1021/acs.joc.7b03189

IF: 4.805

[4] Gyula Telegdy, **Anita K. Kovács**, Kinga Rákosi, Márta Zarándi, Gábor K. Tóth

Antiamnesic properties of analogs and mimetics of the tripeptide human urocortin 3

Amino Acids **2016**, 48 (9), 2261-2266., doi: 10.1007/s00726-016-2268-2

IF: 3.173