

Zárójelentés

Az aszparagionon glikozilált peptidok szintézisének modellezésére szintetizáltuk a védett Fmoc-Leu-Lys(Fmoc)-Asp-Gly-Gly-Pro-NH₂ peptidamidot Boc stratégia felhasználásával. Az aszparaginsav béta karboxilja aktiválása után megkíséreltük a kapcsolást a peptid és az aminocukor között. A szintézis során jelentős mértékben nem kívánatos mellékreakció játszódott le az oldalláncban (aminoszukcinimid keletkezett), ennek kiküszöbölésére egy új szelektíven védett gyantához kötött modellpeptidet állítottunk elő gyantán történő glikozilációhoz: Boc-Leu-Lys(Boc)-Asp(All)-Gly(Hmb)-Gly-Pro-2-klórtritol gyanta. Ezzel párhuzamosan szintetizáltunk ekvivalensként előállítottuk a teljesen O-benzilezett glikozil azidokat: GlcNAc(β1-N3), GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N3), Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N3). A peptidok szintézise során a következő glikopeptideket állítottuk elő: H-Leu-Lys-GlcNAc(β1-N)Asn-Gly-Gly-Pro-OH, H-Leu-Lys-GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn-Gly-Gly-Pro-OH, H-Leu-Lys-Man(β1-4)GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn-Gly-Gly-Pro-OH. A GlcNAc(β1-N)Asn tartalmú glikopeptid szintézisének jó termeléssel kaptuk a kívánt terméket, amely a korrekt tömegspektrummal rendelkezett. A GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn tartalmú glikopeptid védőcsoporteltávolítása során a kívánt diszacharid-hexapeptid származék mellett egy monoszacharid egység lehasadása is megfigyelhető volt. Az O-glikozidkötés hasadásával keletkező melléktermék mennyisége összemérhető volt a kívánt termékével. A H-Leu-Lys-Man(β1-4) GlcNAc(β1-4)GlcNAc(β1-N)Asn-Gly-Gly-Pro-OH glikopeptid esetében, gyantáról való hasítás után, a kívánt triszacharid-hexapeptid származék mellett szintén megfigyelhető volt a mono- illetve a diszacharid-hexapeptid származékok keletkezése. A probléma áthidalására új stratégiákat próbáltunk ki. Elsődlegesen egy fluorén származékot állítottunk elő: N-[(9-hidroxi-metil)-2-fluorenil] borostyánkősavat, amelyet aztán szekunder amin érzékeny linkerként használtunk fel. Megpróbáltunk új lehetőséggel a glikozil-aminosav beépítésére. A peptid első három aminosavát Fmoc kémia felhasználásával Rink amid polimerre kötöttük, majd a szereplő védett glikozil aszparagin származékok katalitikus hidrogénezése után kapott Boc védett származékokat kapcsoltuk. A Boc védőcsoportot egy új módszerrel, SnCl₄-gyel távolítottunk el, amely a linker-prolin kötést érintetlenül hagyta. A Fmoc kémiában szokásos alkoxibenzil alkohol polimerek hasadnak SnCl₄-gyel. Ezután

Fmoc kémiával befejeztük a peptidet. Összeségében több sikeres stratégiát valósítottunk meg a fenti glikopeptiszármazékok előállítására. Ezek publikálása megtörtént.

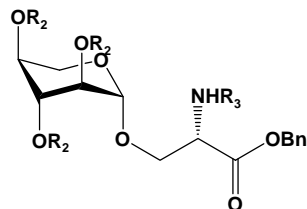
Ay előzőekben vázolt N-glikopeptid szintézisek után O-glikopeptidek szintézisével kezdtünk foglalkozni. Modellként az aggrecan fehérje két fragmensét választottuk. Az aggrecan a porc-alapállomány egyik fő makromolekuláris komponense, mely a rheumatoid arthritis egyik lehetséges autoantigénje. A kiválasztott szekvenciák (Gly-Val-Glu-Asp-Ile-Ser*-Gly-Leu-Pro-Ser-Gly és Glu-Val-Leu-Glu-Thr*-Ala-Ala-Pro-Gly-Val-Glu-Asp ahol Ser* és Thr* a glikoziláció helye) a molekula legerősebben glikozilezett régiójából származó, repetitív szekvencia. A glikozilált peptidek előállítására 2,3,4-triacetil-xilopiranozil-(β 1-O3)-N- α -Fmoc-szerint, 2,3,4-tribenzoil-xilopiranozil-(β 1-O3)-N- α -Fmoc-szerint, 2,3,4-tribenzoil-xilopiranozil-(β 1-O3)-N- α -Fmoc-threonint valamint (β 1-4)-2,3,4-triacetil-xilopiranozil-(β 1-O3)-N- α -Fmoc-szerint (2,3,4,6-tetrabenzoil-galaktopiranozil- használtunk. Az O-glikopeptid építőelemek szintéziséhez megvizsgáltuk a megfelelően védett szerin és treonin származékok xilozilezési reakcióit az anomer centrumban különböző távozó csoportot (OAc, Br, SEt, OCNHCCl₃) tartalmazó xilozil donorokkal. A legjobb hozamokat a megfelelő triklóracetimidáttal és tioglikoziddal történő glikozilezés szolgáltatta. Miután ezen reakciókban 10% körüli mennyiségben a nem kívánt alfa-anomer is képződött, a sztereoselektivitás javításának érdekében, az O-acetil résztvevő csoport helyett O-benzoilt alkalmazva is megismételtük a kapcsolási reakciókat. Az alkalmazott körülmények között mind a triklóracetimidáttal, mind a tioglikoziddal történő glikozilezés teljes sztereoselektivitással és kiváló hozammal eredményezte a kívánt xilozilezett aminosav származékokat, melyeket katalitikus hidrogénezést követően sikeresen alkalmaztunk Fmoc védőcsoport bevitele után peptidszintézisre. A különböző glikozilálási reakciók eredményének összefoglalása az alábbi ábrán illetve az alábbi táblázatban látható:



R	R ₁	R ₂	R ₃	kapcsolási körülmények	α : β	hozam
OAc	H	Ac	Boc	BF ₃ OEt ₂ , CH ₂ Cl ₂ , 0°C		0%
H	Br	Ac	Boc	AgOTf, CH ₂ Cl ₂ , -40°C	0 : 100*	35%
OAc	H	Ac	Bn	BF ₃ OEt ₂ , CH ₂ Cl ₂ , 0°C	0 : 100	56%
H	OCNHCCl ₃	Ac	Bn	Me ₃ SiOTf, CH ₂ Cl ₂ , -40°C	1 : 9*	62%
H	OCNHCCl ₃	Bz	Bn	Me ₃ SiOTf, CH ₂ Cl ₂ , -40°C	0 : 100*	78%
SEt	H	Ac	Bn	NIS, AgOTf, CH ₂ Cl ₂ , -40°C	15 : 85*	67%
SEt	H	Bz	Bn	NIS, AgOTf, CH ₂ Cl ₂ , -40°C	0 : 100*	73%

Az anomerkonfigurációt NMR felvételekkel igazoltuk.

A csillaggal jelölt vegyületek esetén a csatolási állandók az axiális OR₂ csoportokat igazolták. Pontosabban az ¹C₄(D) és a ⁴C₁(D) konformerek között dinamikus egyensúly van és ezen vegyületeknél az ¹C₄(D) konformer irányában van eltolódva. A két konformer populációja számítható a mért kapcsolási állandók és az ¹C₄(D) és a ⁴C₁(D) konformerekre jellemző $J_{1eq,2eq}$ 1.0 +/- 0.5 Hz illetve $J_{1ax,2ax}$ 8.1 +/- 0.1 Hz értékekből.



Elő kívántuk állítani a Gal(β1-4)-Xil(β1-O)-szerin és treonin származékokat is, mely munka során meg kellett valósítanunk a xilóz 4-es helyzetben történő időleges védelmét. Ennek során azonban nem várt problémák merültek fel a klóracetil védőcsoportok eltávolításánál. Ezért ez a munka még folyamatban van.

A szintetizált peptidek több olyan aminosavat tartalmaztak, ahol az oldalfunkció védele elengedhetetlen (Ser, Asp, Glu). Ezek a szokványos védőcsoportokkal nem megoldhatók. Az aminodikarbonsavak ω-karboxiljának védelésére allil-, illetve 4-(N-(1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociklohexilidén)-3-metilbutil)amino)benzil észtert (ODmab) használtunk. A szilárd fázisú szintézis után a peptidet kíméletes, enyhe savas kezeléssel távolítottuk el a 2-klórritil hordozóról, majd megvizsgáltuk a védőcsoportok eltávolíthatóságának optimumát. Azt találtuk, hogy:

1.; ODmab: legcélszerűbben szilárd fázison 2% hidrazin-hidrát/DMF eleggyel 15 perc alatt eltávolítható. Ilyen körülmények között a Bz stabil, az Ac részlegesen hasad.

2.; Az Ac-védőcsoportok teljes eltávolítására 1,5 órás 5% hidrazin-hidrát/MeOH-os kezelés volt szükséges.

3.; A szerin hidroxiljának szabadon hagyása nem vezetett megfelelő termékhez.

4.; A szerin hidroxilját legcélszerűbben Bn-éterrel tudtuk védeni. Ennek eltávolítása azonban nem bizonyult problémamentesnek, H-Cube készülékkel Pd black katalizátor használatával azonban reprodukálhatóan sikeres volt.

5.; Az allil-észter hasítása tetrakisz-(trifenilfoszfin)-palládium(0) katalizátorral diklórometánban Fmoc-Asp(OAll) és Fmoc-Glu(OAll) aminosavakon sikeres volt, de a peptidek oldására használt poláros oldószerben nem. A fent említett aminosavakon [CpRu(π -C₃H₅)(2-kinolinkarboxilát)]PF₆ katalizátorral sikeres próba reakciót végeztünk metanolban. Az ezzel a komplex-szel peptiden végrehajtott reakció azonban csak részlegesen volt sikeres, mindössze 15%-os konverziót sikerült elérnünk. Ezért újabb módszereket próbáltunk ki.

Megállapítottuk, hogy az allil védőcsoportot jó eredménnyel eltávolíthatjuk katalitikus hidrogénezéssel, H-Cube készülékkel Pd black katalizátor használatával.

Ez új módszer az irodalomban.

6.; A Bz- védőcsoport eltávolítása redukcióval nem volt sikeres, a KCN a glikozidot is hasította, 20% hidrazin-hidrátos kezelés viszont sikeres volt.

Összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy a fenti glikozilált aggregan fragmensek előállítására a következő védőcsoport-kombináció tűnik optimálisnak: Ser-Bn; Xil-Bz; Glu, Asp-ODmab.

Sikerült továbbá a konvergens módszer hatékonyságát jelentősen befolyásoló, a szelektíven védett oligopeptid és glikozil-aminok közötti kapcsolási reakció körülményeit optimalizálni. Az alkalmazott reakció körülmények között a nem kívánt mellékreakciókat erőteljesen visszaszorítottuk.

2010-ben folytattuk az aggregan fragmensek szintézisének használt védőcsoportok szelektivitásának ill. eltávolíthatóságának vizsgálatát, megkíséreltük a lágyabb enzimatis hasítást különböző lipáz enzimek felhasználásával, de az erre vonatkozó kísérleteink lényegében sikertelenek voltak. A glikozilálni nem kívánt hidroxiaminosavak oldalfunkcióinak védelmére egyébként jól használható volt a TBDMS csoport is. Az Ac védőcsoportok Bu₂SnO-val is jól eltávolíthatók voltak. A fenti munkánkból hét konferenciaelőadás és eddig két közlemény született.

Mivel a választott aggregan fragmensek számos gyakori trifunkciós aminosavat nem tartalmaztak, ezért egy új modellvegyületet kerestünk. Ez az Sp1 transzkripció faktor két fragmense (Lys-Arg-Phe-Met-Arg-Ser(Glc-NAc)-Asp-His-Leu-Ser(Glc-NAc)-Lys-His-Ile-Lys-Thr-His-Gln-Asn és Gly-Lys-Val-Tyr-Gly-Lys-Thr(Glc-NAc)-Ser(Glc-NAc)-His-Leu-Arg-Ala-His-Leu-Arg-Trp-His-Thr-Gly) volt. A fenti fragmensek esetében a His, a Lys és az Arg oldalfunkcióinak szelektív védelmét kellett megoldanunk. Azt találtuk, hogy a Lys Dde védelme (eltávolítás hidrazinolízissel) jól használható volt, hasonlóképpen jól tudtuk használni a His védésére a Bn csoportokat. Ezzel szemben az Arg védésére semmilyen kereskedelmi forgalomban kapható védőcsoport sem volt használható. Az elterjedten használt Pbf és Pmc a glikozid savérzékenysége miatt nem volt alkalmas, az elméletileg szóbjöhethető Z₂ pedig önmagában sem bizonyult felhasználhatónak. Ezért egy teljesen új, dimetilindol alapú védőcsoport elkészítése és felhasználása mellett döntöttünk. Előkísérleteket végeztünk a védett N-acetilglükózamin-szerin ill. treonin konjugátumok Königs-Knorr reakcióval történő előállítására. A korábban szintetizált aggregan fragmensekkel NMR vizsgálatokat végeztünk és az O-glikopeptidekkel kapcsolatos kezdeti munkákból három konferenciaelőadás született, egy új közleményünk publikálása folyamatban van.

A foszfopeptidekkel kapcsolatos munkánk során szintetizáltuk az alábbi Gab1 fehérje fragmenseket részben foszforilált, részben (kontrollként) nem foszforilált formában. A peptideket részben fluoreszcens festékekkel is megjelöltük. A szintetizált szekvenciák és rövidített kódjuk az alábbiak:

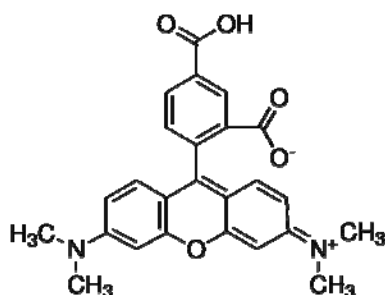
GDKQVE_{pY}LDLDDL (GDL)_D

DERVD_{pY}VVVDQK (DEQ)_K

QVE_{pY}LDLDDLDSGKSTPPRKQKSSGSGSSVADERVD_{pY}VVVDQK (QVQ)_K

{pY} = foszfortirozin, GDKQVE{pY}LDLDDL, TAMRA jelölt

TAMRA:



A foszfopeptidekkel végzendő biológiai vizsgálatok az ELTE Immunológiai tanszékén történnek és ezek jelenleg is folyamatban vannak. Ezekből közlemény még nem jelent meg.

Új, azacikloaminosav foldamert állítottunk elő és építettünk be aliciklusos béta aminosav oligomerekbe. A módosítással jó hidrofilitás szabályozási lehetőséghez jutottunk, valamint vizes rendszerekben konformációstabilizálást értünk el. Egy közleményünk és két előadásunk készült belőle.

Számos sejtpenetráló peptidet és származékot állítottunk elő

(CGGRQIKIWFQNRRMKWKK, R₈, CGGRRRRRRRR, CGGYGRKKRRQRRR és ezek Alexa Fluor® 555 jelölt származékai, RQIKIWFQNRRMKWKK,

RQIKIFFQNRRMKWKK, SRYDDSVPRYHAVRIRKEEREIKDEK,

LEAEKERRKSGGLSS, ASMWERVKSIKSSLAASNI,

IGVAASGISGLSALFEGFGF), ezek kooperációban végzett vizsgálatából két közleményünk jelent meg. Módszert dolgoztunk ki a mezo diamino pimelinsav gazdaságos előállítására, ez a peptidoglikánok egyik fontos alkotórésze. Az eredményt egy közleményben publikáltuk.