

ZÁRÓJELENTÉS

Béta-aminosavaktól a biomimetikus foldamerekig és bioaktív építőelemekig

(OTKA NF69316)

Dr. Martinek Tamás

A projektet megelőző eredményeinkkel rámutattunk, hogy a β -peptid foldamerek körében a szerkezet sztereokémiai eszközökkel rendkívül hatékonyan szabályozható. Ebből kiindulva a peptidszekvencián belül specifikus mintázat tervezésével kívántuk befolyásolni a konformációt. Ennek az elvnek a megalapozására *ab initio* kvantumkémiai modellezéssel alternáló kiralitású β -peptid oligomereket terveztünk, majd a prediktált szerkezeteket kísérletesen ellenőriztük. NMR spektroszkópiás és egyéb kiegészítő módszereket (IR, CD, VCD) alkalmazva megállapítottuk, hogy az alternáló *cisz*-2-aminociklopentánkarbonsav szekvenciák (H-[(1*S*,2*R*)-ACPC-(1*R*,2*S*)-ACPC]_n-NH₂) igen stabilis H10/12 típusú alternáló hélixet alakítanak ki. Ez a szerkezet a hasonló irodalmi modellektől eltérően részben vízben is megtartotta szerkezetét, feltehetően a ciklusos oldalláncok miatt.

Az alternáló módon kapcsolt *transz*-2-aminoaminociklopentánkarbonsav oligomerek (H-[(1*S*,2*S*)-ACPC-(1*R*,2*R*)-ACPC]_m-NH₂) azonban stabilis poláris szál konformációt vesznek fel, ami a másodlagos szerkezetből következően nanostrukturált (amiloid típusú) fibrillumokat képez. Ezekkel az eredményekkel alátámasztottuk, hogy azonos konstitúció mellett csupán sztereokémiai kontrollal a β -peptid foldamerek valamennyi főbb másodlagos szerkezete kialakítható. Ezeket az eredményeket a *Journal of American Chemical Society* folyóiratban közzé tettük.

Természetes polipeptidek (gramicidin β -helix, anti-szál) és a foldamerek körében található (alternáló H10/12 hélix, poláris-szál) példákon látható, hogy a homokirális szekvenciák mellett az alternáló heterokirális láncok is képesek másodlagos szerkezetek létrehozására. Így homokiralitás kikötése túl erős megszorítás, és megvizsgáltuk, milyen feltételeknek kell általánosan megfelelnie a sztereokémiai mintázatnak, hogy az önrendeződés még létrejöhessen. Az alábbi szabályszerűségeket ismertük fel:

1. Foldamer és természetes polipeptid hélixek esetében, a peptidkötések két oldalán csak azonos előjelű ψ és ϕ torziók fordulhatnak elő (+)[+ vagy -](-), míg a szál-típusú szerkezeteknél az eltérő előjelű szögek figyelhetők meg (+)[- vagy -](+).

2. Polipeptid hélixekben az előjelek (ld. 1. pont) meghatározzák az amid csoport orientációját a helicitás irányítottságától függően.

3. Mivel a peptidláncok önrendeződésének feltétele az amid csoportok közötti (intra)molekuláris felismerés, a kölcsönhatásban lévő szakaszoknál a peptidkötések orientációjának illeszkedőnek kell lennie. Ez megköveteli a gerinc torziók megfelelő mintázatát, amit viszont csak megfelelő sztereokémiai mintázat hozhat létre.

Mivel a gericalkotó atomok sztereokémiájának befolyása a gerinc torziókra már ismert, a fenti szabályokat alkalmazva új hélixeket terveztünk α és β -aminosavak felhasználásával. A szerkezeteket megszintetizáltuk, majd NMR, ECD spektroszkópiai módszerek és elméleti számítások segítségével jellemeztük. Eredményül az irodalomban eddig nem ismert H9-12 és H14-16 hélixeket hoztunk létre. Mindezt összevetve kimondtuk, hogy a hélixek és redőzött rétegek kialakulásához valóban nem szükséges a homokiralitás. A szükséges feltétel az ismétlődő sztereokémiai mintázat jelenléte, ami egy új tervezési alapelvet adott a kezünkbe. Eredményeinket az *Angewandte Chemie International Edition* folyóiratban közzeltük, és a rangos *Chirality 2008* (Genf) nemzetközi konferencián szóbeli előadásban is bemutattuk.

A potenciálisan bioaktív foldamerek körében nagy jelentősége van a vízdékonyságnak és a másodlagos szerkezet vizes oldószerben való szerkezeti stabilitásának. Ez utóbbira a szakirodalom három lehetséges megoldást adott: (i) oldaláncok közötti sóhidak képzése, (ii) oldalláncok közötti diszulfid kötések kialakítása és (iii) a hélix makrodipól valamint a láncvégi töltések közötti elektrosztatikus stabilizáció. Olyan módszert kerestünk, mely az oldalláncok kémiájának feláldozása nélkül képes a foldamer hélixeket vízben stabilizálni. Irodalmi adatokból ismeretes volt, hogy az aza-peptid csoport igen erős bifurkációs hidrogénkötéseket tud létesíteni, de a homo-aza-peptidek nem képesek helikális szerkezeteket létrehozni. Számításaink szerint aza-peptidek esetében a nem bifurkált hidrogénkötések is erősebbek az amid-csoport által létesítetteknél. Alternáló aza-peptid – β -peptid szekvenciákat hoztunk létre, melyben az aza-peptid – aza-peptid bifurkáció valószínűsége kisebb. A szerkezetek sztereokémiai mintázatát úgy terveztük meg, hogy a korábbi eredményeink alapján homokirális uniform amid orientáltságú és az alternáló heterokirális szerkezetek is létrejöhessenek. A szerkezeteket NMR spektroszkópia, ECD, VCD és molekulamodellzés számítások segítségével jellemeztük. Eredményeink azt mutatták, hogy az aza-peptid építőelemek alkalmazkodnak a β -aminosavak sztereokémiai mintázata által indukált másodlagos szerkezeteknek. Így létrehoztunk stabil H12 és H10/12 hélixeket is. A vizes közegben történő szerkezetvizsgálatok kimutatták, hogy a hélixek a peptidomimetikus foldamer hélixek körében egyedülállóan stabilak. Ezeket az eredményeket a *Chemistry A European Journal* folyóiratban közzeltük.

Fontos célkitűzésünk a projektben a természetes forrásból könnyen hozzáférhető kiindulási anyagokból szintetizált monoterpén származék β -aminosavak foldamerkémiail alkalmazása. Ebben a szakaszban megvizsgáltuk, hogy a nagy térkitöltésű apopinán-vázás β -aminosavak homokirális oligomerjei milyen másodlagos szerkezethez vezetnek. elméleti számításokkal igazoltuk, hogy a szekvenciában 1-3 pozícióban lévő oldalláncok között jelentős taszító erő lép fel H14 hélix esetén, míg H12 hélixnél ez az kölcsönhatás nem lép fel. A tetramer, pentamer és hexamer peptideket megszintetizáltuk és az anyagokat NMR és ECD spektroszkópiai módszerekkel valamint elméleti számításokkal jellemeztük.

Azt kaptuk, hogy a leírt sztérikus oldallánc-oldallánc kölcsönhatás miatt hexamer lánchossztól a domináns szerkezet H12 hélix, amely igen stabil. Továbbá a hélixek hidrofób kölcsönhatás által hajtott önasszociációját is megfigyeltük. Ezzel egy új módszert vezettünk be a H12 hélix kialakítására. Ennek jelentőse, hogy a H12 hélix hasonlít legjobban az α -hélixhez, és eddig az irodalom csak egyetlen módszert ismert a létrehozására. Ezek az eredmények a *Chemical Communications*-ban jelentek meg. Továbbá a fenti eredményeinket a *FOLDAMERS: from design to protein recognition* című nemzetközi konferencián meghívott plenáris előadásban mutattuk be.

Kísérletet tettünk *diexo*-(2*R*,3*S*)-3-aminobicyclo[2.2.1]hept-5-én-2-karbonsav és *diexo*-(2*S*,3*R*)-3-aminobicyclo[2.2.1]hept-5-én-2-karbonsav monomerekkel az alternáló H10/12 hélix létrehozására. Meglepetésünkre azonban az NMR és ECD mérések valamint az *ab initio* és molekuláris mechanikai számítások igazolták, hogy az áthidalt, nagyterkitöltésű és rigid ciklusos oldalláncok a molekula makrociklusos konformációba történő önrendeződését segítik elő. Ezzel egy új másodlagos szerkezeti típust találtunk a β -peptidek körében. Továbbá azt tapasztaltuk, hogy ez a struktúra önasszociációval vezikulumokat hoz létre. Annak eldöntésére, hogy a másodlagos szerkezet hidrofób felszínének nagysága milyen befolyással van az önasszociációs sajátságokra, további alternáló hélixeket hoztunk létre ciklohexán (ACHC) és ciklohexén (oldalláncú) β -aminosavak segítségével. Eredményeink azt mutatják, hogy az oldallánc topológiában egy kis eltérés is jelentős hidrofób felszín változást okoz, ami az önasszociációs sajátságokban jelentkezik. ACHC esetében vezikulumok képződését láttuk, míg az ACHEC nem vezetett önasszociációra. Az eredményeket tartalmazó kézirat beküldés előtt áll.

Egy természetes monoterpén-származékból, a (-)- α -pinénből kiindulva 9 királis aminodiolt állítottunk elő grammos mennyiségben. Vizsgáltuk az így létrehozott vegyületcsalád, mint lehetséges királis katalizátorok, felhasználhatóságát enantioszelektív átalakításokban. Dietil-cink benzaldehydre történő addíciója során gyengétől jó katalitikus

hatást tapasztaltunk. Összefüggéseket találtunk az enantioszelektivitás és az aminodiolok nitrogénjének szubsztituáltsága között. A legjobb enantioszelektivitást (ee: 84%) a terciér aminocsoportot tartalmazó aminodioloknál, így az *N*-metil-*N*-benzil- és az *N,N*-dibenzil-aminodioloknál találtuk. Kísérleti eredményeinket elméleti számításokkal is alátámasztottuk. Az aminodiolok előállítását és alkalmazását tárgyaló kézirat a *Tetrahedron* folyóiratban közlésre került.

Kereskedelmi forgalomban kapható (+)-izopinokamfeolból irodalmi úton, 2 lépésben kaptuk meg (+)- α -pinén és a (+)- δ -pinén 1:1 arányú keverékét. Korábbi tapasztalatainkat, és a két alkén klór-szulfonil-izocianáttal (CSI) szemben mutatott eltérő reaktivitását felhasználva régió- és sztereoselektív cikloaddícióval jutottunk egy új, δ -pinánnal kondenzált királis β -laktámhoz. A reakció régió- és sztereoselektivitását B3LYP/6-31+g(d,p) szintű DFT számításokkal értelmeztük. A laktám savas szolvólízisével jó termeléssel kaptuk a megfelelő *cis* β -aminosavat és aminosav észtert. Utóbbi részleges izomerizációja, a kromatográfiás elválasztást követően a *transz* észtert eredményezte. Két úton is elkészítettük a peptidszintézisek kiindulási anyagául felhasználható, megfelelő Boc védett aminosavat. Eredményeinket a *Tetrahedron: Asymmetry* folyóiratban közöltük.

Vizsgáltuk a korábbi jelentésben bemutatott monoterpénvázis aminodiolok felhasználhatóságát enantioszelektív átalakításokban. Összefüggéseket találtunk az enantioszelektivitás és az aminodiolok nitrogénjének szubsztituáltsága között. Az első évi részjelentésben közölt szintézismódszert továbbfejlesztve, új módszert fejlesztettünk ki a primer és szekunder királis aminodiolok léptéknövelt (5-10 g) előállítására.

A primer és szekunder aminodiolokat alkil- és aril-izotiocianátokkal illetve reagáltatva tiokarbamid adduktokhoz jutottunk. Az így előállított tiokarbamid származékok gyűrűzárásával királis 2-imino-1,3-oxazolidineket kaptunk. Megállapítottuk, hogy az aminodiolokból kizárólag spiro-oxazolidin szerkezetű öttagú heterociklusok keletkeznek, vagyis a reakció teljes mértékben régiószelktív. Monoterpénvázissal kondenzált hattagú heterociklusos gyűrű, így 1,3-oxazinok keletkezése még nyomokban sem volt kimutatható.

Az aminodiolok előállítását és alkalmazását tárgyaló kéziratok a *Tetrahedron* és *Arkivoc* folyóiratokban közlésre kerültek.

Kereskedelmi forgalomban kapható (+)- α -pinénből és (-)-mirtenalból kiindulva, irodalmi módszerek továbbfejlesztésével és optimalizálásával jó enantiomertisztaságú monoterpén-vázis (+)- és (-)-apopinén enantiomereket állítottunk elő. A királis monoterpénekből kiindulva, régió- és sztereospecifikus cikloaddícióval β -laktám

enantiomerekhez jutottunk. A β -laktámok savas hidrolízisével *cisz* β -aminosav és aminosav észterek hidroklorid sóit illetve ezek bázisait készítettük el. A megfelelő *transz* epimereket a *cisz* vegyületek lúgos közegű izomerizációjával állítottuk elő. Mind a *cisz*, mind a *transz* aminosavaknak *N*-Boc és *N*-Fmoc védett analógjait, valamint ezek savamidjait és fenil-alanin metilészterrel képzett dipeptid származékait is szintetizáltuk. A védett aminosavak peptidkémiai felhasználásához a fenti reakciók méretnövelését is elvégeztük. Az aminosav észterek redukciójával változatosan szubsztituált 1,3-aminoalkoholokhoz jutottunk. Az aminosav észtereket izocianátokkal reagáltatva karbamid, míg izotiocianátokkal reagáltatva tiokarbamid típusú vegyületeket kaptunk. Az találtuk, hogy az utóbbi vegyületek között számos nem toxikus, de biológiailag hatékony származék található, amelyek már igen csekély koncentráció-tartományban képesek leküzdeni a kóros tumorsejtek kemoterápiás gyógyszerekkel szembeni rezisztenciáját és erősen gátolni a kóros MDR-tumorsejtek pumpa-aktivitását. Fenti eredményekből tudományos közlemény (*Tetrahedron: Asymmetry*) és szabadalmi bejelentés született.

Farmakológiai szempontból jelentős monoterpénvázis, királis 1,3-heterociklusok előállítására. Az első és második év eredményeiként előállított apopinán-vázis béta-aminosav-származékokból primer és szekunder 1,3-aminoalkohol könyvtárakat készítettünk el. A fenti vegyületekből kiindulva 2-3 lépésben jó termeléssel jutottunk monoterpénekkal kondenzált 1,3-heterociklusos vegyületekhez: 4-pirimidinonokhoz, 2,4-pirimidindionokhoz és 2-tioxo-4-pirimidinonokhoz, valamint 2-alkil-, illetve 2-aril-imino-1,3-oxazinokhoz. Utóbbi vegyületek figyelemre méltó *in vitro* tumorelles aktivitást mutattak három humán tumor-sejtvonalon (A431, HeLa, MCF7) is. Az eredményekből szabadalmi bejelentés készült. A szabadalmi oltalom hatályba lépése után az eredményeket tudományos szaklapban is publikáljuk a közeljövőben.

Királis béta-aminosavak alkalmazása multikomponensű reakciókban. A rendelkezésre álló apopinán-vázis béta-aminosavakból kiindulva UGI négy centrumú, három komponensű (UGI-4C-3C) reakcióban *N*-szubsztituált triciklusos béta-laktám vegyülettárat állítottunk elő. A reakciók során négy aldehid, illetve két izonitril alkalmazásával tanulmányoztuk a szubsztituensek és az oldószer hatását a reakció hozamára és diasztereoselektivitására. Minden esetben nagyfokú sztereoselektivitást tapasztaltunk. Megállapítottuk, hogy az alkalmazott szerves oldószer mellett – bizonyos megkötésekkel – a reakciók környezetbarát vizes közegben, vagy akár oldószermentes körülmények között is végrehathatóak. Eredményeinket a *Molecular Diversity* folyóiratban publikáltuk.

Királis, monoterpénvázas nukleozidanalógok előállítására. Az első és második év során előállított királis primer aminodioloiból, illetve ezek közvetlen előanyagaiból, királis epoxialkoholokból kiindulva monoterpénvázas nukleozidanalógokat állítottunk elő. Az aminodioloiból kiindulva 1-5 lépésben jutottunk a megfelelő pirimidin, illetve purin bázist tartalmazó célvegyületekhez, míg az epoxialkohol és a megfelelő bázisok reakciója egy lépésben szolgáltatja a kívánt vegyületeket. A két reakcióút összehasonlítása során megállapítottuk, hogy míg az első módszer hátránya a relatíve alacsony össztermelés, a második eljárás nem alkalmazható 2-amino illetve 5-elektronszívó csoporttal szubsztituált bázisok esetében. Eredményeinkből kézirat elkészítése folyamatban van.

Tudományos közlemények:

1. Tamás A. Martinek, István M. Mándity, Livia Fülöp, Gábor K. Tóth, Elemér Vass, Miklós Hollósi, Enikő Forró, Ferenc Fülöp
Effects of the Alternating Backbone Configuration on the Secondary Structure and Self-Assembly of β -Peptides
J. Am. Chem. Soc. **128**, 13539-13544 (2006) I.f.: 7,696
2. Tamás A. Martinek, István M. Mándity, Anasztázia Hetényi, Livia Fülöp, Gábor K. Tóth, Ferenc Fülöp, The beta-peptide domain: From controlled secondary structures to nanostructured assemblies.
J. Pept. Sci. **12**, 93-93 (2006) I.f.: 1,803
3. István M. Mándity, Edit Wéber, Tamás A. Martinek,* Gábor Olajos, Gábor K. Tóth, Elemér Vass, Ferenc Fülöp*
Design of peptidic foldamer helices: a stereochemical patterning approach
Angew. Chem. Int. Ed. **48**, 2171-2175 (2009) IF: 10.031
4. Anasztázia Hetényi, Gábor K. Tóth, Csaba Somlai, Elemér Vass, Tamás A. Martinek*; Ferenc Fülöp
Stabilisation of Peptide Foldamers in an Aqueous Medium by Incorporation of Azapeptide Building Blocks
Chem. Eur. J. **15**, 10736 – 10741 (2009) IF: 5.454
5. Anasztázia Hetényi, Zsolt Szakonyi, István M. Mándity, Éva Szolnoki, Gábor K. Tóth, Tamás A. Martinek,* Ferenc Fülöp*
Sculpting the β -peptide foldamer H12 helix via a designed side-chain shape
Chemical Communications, 177-179 (2009), I.f.: 5,141
6. Zsolt Szakonyi, Anasztázia Hetényi, Ferenc Fülöp*
Synthesis and application of monoterpene-based chiral aminodiols
Tetrahedron **64**, 1034-1039 (2008), I.f.: 2,869
7. Zsolt Szakonyi, Tamás A. Martinek, Reijo Sillanpää, Ferenc Fülöp
Regio- and stereoselective synthesis of the enantiomers of monoterpene-based β -amino acid derivatives
Tetrahedron: Asymmetry, **18**, 2442–2447 (2007) I.f.: 2,468
8. Zsolt Szakonyi, Anasztázia Hetényi, Ferenc Fülöp*
Synthesis of enantiomeric spirooxazolines and spirooxazolidines by the regioselective ring closure of monoterpene-based aminodiols
ARKIVOC part (iii), 33-42 (2008), I.f.: 1,253
9. Zsolt Szakonyi, Tamás A. Martinek, Reijo Sillanpää, Ferenc Fülöp*
Regio- and stereoselective synthesis of constrained enantiomeric β -amino acid derivatives
Tetrahedron: Asymmetry, **19**, 2296–2303 (2008), I.f.: 2,634
10. Zsolt Szakonyi, Reijo Sillanpää, Ferenc Fülöp*
Synthesis of conformationally constrained tricyclic β -lactam enantiomers through Ugi four-centre three-component reactions of a monoterpene-based β -amino acid
Mol. Div. közlésre elfogadva: DOI: 10.1007/s11030-009-9143-y I.f.: 2,859.

Szabadalmak:

1. F. Fülöp, Z. Szakonyi: Chiral cyclic β -amino acids and their derivatives, pharmaceutical compositions containing them and the use of such compounds (Bioblocks Magyarország Gyógyszerkémiai és Fejlesztő Kft., Hungary) PCT Int. Appl., WO 2008/059299 A1, 36 pp.
2. Fülöp F., Szakonyi Z., Pallai P.: Monoterpén-vázzal kondenzált 1,3-heterociklusok, alkalmazásuk és ilyen vegyületeket tartalmazó gyógyászati készítmények (Bioblocks Magyarország Gyógyszerkémiai és Fejlesztő Kft., Hungary) magyar szabadalmi bejelentés száma: P0800768 (2008.12.18.), PCT bejelentés száma: PCT/HU2009/00102 (2009.12.10.).

Tudományos előadások:

1. Tamás A. Martinek, István M. Mándity, Anasztázia Hetényi, Edit Wéber, Ferenc Fülöp:
Sculpting beta-peptide foldamers via stereochemical patterning
20th International Symposium on Chirality
Geneva, Switzerland, July, 6-9, 2008. Abstr.: O11-2, p. 92
2. István Mándity, Edit Wéber, Tamás A. Martinek, Gábor K. Tóth, Elemér Vass, Ferenc Fülöp:
Building β -peptide foldamers via stereochemical LEGO approach
30th European Peptide Symposium
Helsinki, Finnország, 2008. augusztus 31-szeptember 5. Abstr.: P20121-021, p. 86
3. Martinek Tamás, Fülöp Ferenc:
Peptid-foldamerek "gépi kódja": *de novo* hélixtervezés sztereokémiai mintázatokkal
MTA Magyar Tudomány Ünnepe: Molekulák térben és időben
Budapest, 2008. november 11.
4. Zsolt Szakonyi, Tamás A. Martinek, Ferenc Fülöp:
Regio- and stereoselective synthesis of the enantiomers of apopinane-based β -amino acids; Geneva, Switzerland, July, 6-9, 2008, P-157
5. Szakonyi Zsolt:
Monoterpén-vázás *béta*-aminosavszármazékok előállításai, átalakításai és alkalmazásai; MTA Szerves és Biomolekuláris Kémiai Bizottság „Bruckner termi” előadás sorozat, Budapest, Pázmány p. sétány 1/a, 2008. 03. 28.
6. Szakonyi Zsolt, Martinek A. Tamás, Fülöp Ferenc:
Monoterpén-vázás eredetű *béta*-aminosav származékok előállításai és átalakításai; *Vegyészkonferencia*, Hajdúszoboszló, 2008. június 19-21. O-3.
7. Szakonyi Zsolt, Martinek A. Tamás, Fülöp Ferenc:
Természetes eredetű β -aminosav származékok előállításai és alkalmazásai; Gyógyszerkémiai és Gyógyszertechnológiai Szimpózium'2008, Zalakaros, 2008. szeptember 29 – 30
8. É. Szolnoki, Z. Hegedűs, T. A. Martinek, Z. Szakonyi, F. Fülöp: The effect of bicyclic residue on β -peptide helical secondary structures, COST Action CM0803,

Foldamers: building blocks, structure and function, Szeged, Hungary, October, 24-26, 2009, PO2

9. Z. Szakonyi, R. Sillanpää, F. Fülöp: Stereoselective synthesis and transformations of the enantiomers of apopinene-based β -amino acids. COST European Cooperation in Science and Technology, Szeged, Hungary, October, 24-26, 2009, P10
10. Z. Szakonyi, R. Sillanpää, F. Fülöp: Conformationally constrained tricyclic β -lactam enantiomers through Ugi-4C-3C reactions of a monoterpene-based β -amino acid. 3rd BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences, Antalya, Turkey, October 26-28, 2009, P100
11. Szolnoki É., Hegedűs Z., Martinek T., Szakonyi Z., Fülöp F.: Biciklusos oldalláncok hatása β -peptidek helikális másodlagos szerkezeteire; Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIV., Budapest, 2009. november 13-15., P-10
12. Szakonyi Z., Martinek T., Fülöp F.: Királis β -aminosav-származékok előállítása természetes forrásból; Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIV., Budapest, 2009. november 13-15., E-38
13. T. Martinek, FOLDAMERS: from design to protein recognition, Bordeaux, France, 2010. január 25-28, meghívott plenáris előadás