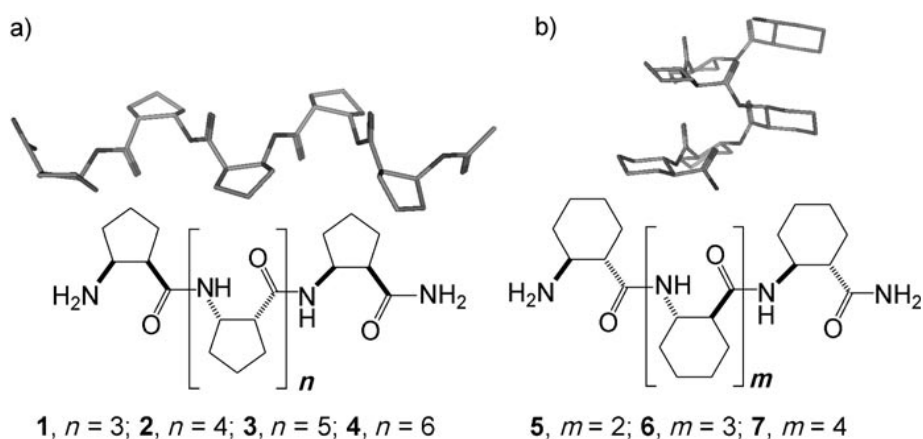
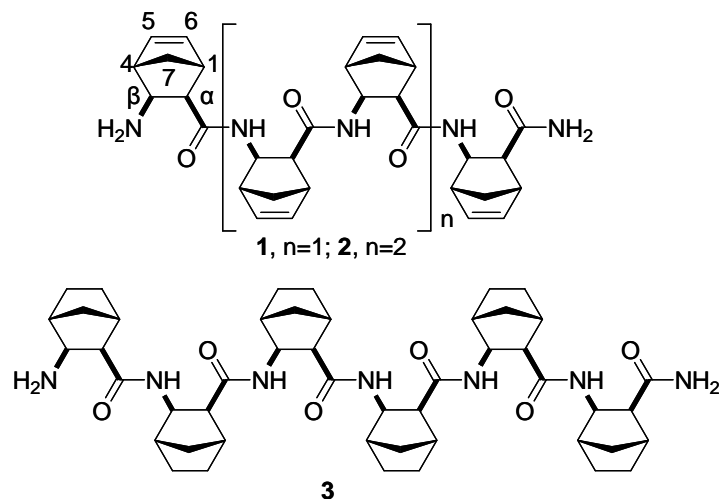


## Zárójelentés a T-48884 sz OTKA szerződésről

1, *cisz*-(1R,2S) és *transz*-(1S,2S)-ACHC (2-amino ciklohexán karbonsav) homooligomereket szintetizáltunk (6 aminosavrész hosszú) és vizsgálatokat kezdtünk kedvezményezett térszerkezetükkel kapcsolatban. Az első eredmények az 1., 12. valamint a 19. közleményekben valamint a 3., 9., 21., és 18. előadásokban találhatók.

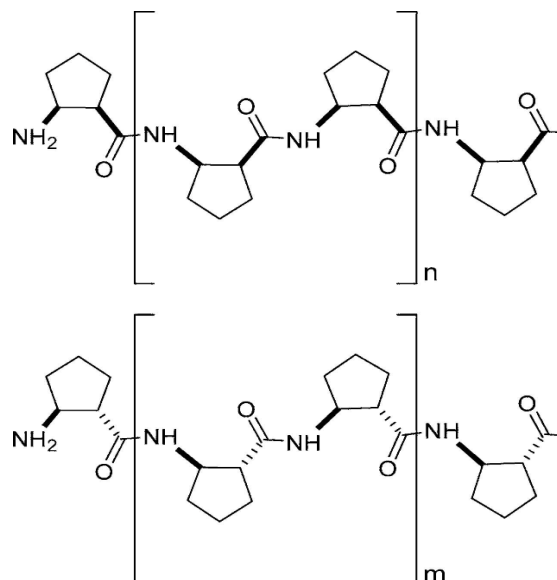


Heterokirális homooligomereket szintetizáltunk 2R,3S valamint 2S,3R amino norbornén és norbornán karbonsav felhasználásával.



A térszerkezetmeghatározás megtörtént, az eredmények publikálása folyamatban van (28. sz. előadás).

Heterokirális homooligomereket szintetizáltunk alternáló gerinckonformációjú *cisz* és *transz* ACPC (2-amino ciklopentán karbonsav) felhasználásával.



Megállapítottuk, hogy a kiralitással egyértelműen szabályozható a kapott oligomerek másodlagos szekezete (20. sz. és 32. sz. közlemények).

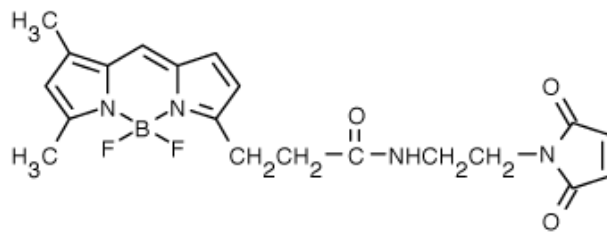
2, Számos transzporterpeptidet illetve ezek fluoreszcensen jelzett származékait állítottuk elő és vizsgáltunk meg abból a célból, hogy melyik az optimális lipofosfopeptidok sejtbejuttatására. Az általunk használt kísérleti körülmények között az oktanoil-oktaarginil-ciszteinamid bizonyult optimálisnak. A szintetizált szerkezeteket az alábbi táblázat tartalmazza.

Rövidítés	Sejt-permeábilis peptid szekvencia
R8	RRRRRRRR-C(BODIPY) (-NH <sub>2</sub> )
P-R8	Palmitoil -RRRRRRRR-C (-NH <sub>2</sub> )
O-R8	Oktanoil -RRRRRRRR-C(BODIPY) (-NH <sub>2</sub> )
MPG	C(BODIPY)-GALFLAFLAAALSLMGLWSQPKKRKY (-NH <sub>2</sub> )
MPGox	C(BODIPY)-GALFLAFLAAALSLM(O)GLWSQPKKRKY (-NH <sub>2</sub> )
Transportan	C(BODIPY)-GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (-NH <sub>2</sub> )
TP10	C(BODIPY)-AGYLLKINLKALAALAKKIL (-NH <sub>2</sub> )
O-R8-GDLD	Oktanoil-RRRRRRRR-C(BODIPY) - GDKQVEY( <i>P</i> )LDLDDL (-NH <sub>2</sub> )
O-R8-RKHP	Oktanoil-RRRRRRRR-C- RKKRISALPGPANPTNPDEADKVG-AENTITY( <i>P</i> )SLLMHP (-NH <sub>2</sub> )

Ahol (*P*) a tirozin foszforilációját,

(-NH<sub>2</sub>) a C-terminális amidvéget

(BODIPY) pedig az alábbi fluoreszcens festéket jelenti



Ezek után elkészítettük az első fluoreszcensen jelzett lipo-foszfopeptideket is, valamint számos új transzporterpeptidet illetve ezek foszfopeptid származékait állítottuk elő és vizsgáltunk meg. Ezek további biológiai vizsgálata még most is folyamatban van. A első eredményekről a 16., 17. és 26. közleményekben számoltunk be, valamint a 5, 6, 8, 11, 12, 15, 23, és 24. sz. előadások is erről szólnak.

A korábbi vizsgálatok szerint funkcionálisan aktívnak bizonyult Gab1 foszfopeptid fragmens aktív centrumának meghatározása céljából számos új, rövidebb foszfopeptidet szintetizáltunk és vizsgáltunk meg. Ezek az alábbiak:

DKQVEY(P)LDLD

QVEY(P)LDL

DKQVEY(P)L,

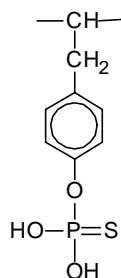
EY(P)LDLDL

biotinil-QVEY(P)LDLD

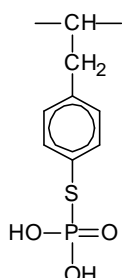
biotinil-VEY(P)LDLDL

biotinil-VEY(P)LDLD

Enzimrezisztens peptidtiofoszfát analógokat állítottunk elő. Ennek során az amidites reakcióban kapott foszfitészterek szokásos módon végzett oxidációja helyett dibenzoil tetraszulfiddal végeztük a reakciót, amely az alábbi származékot eredményezte:



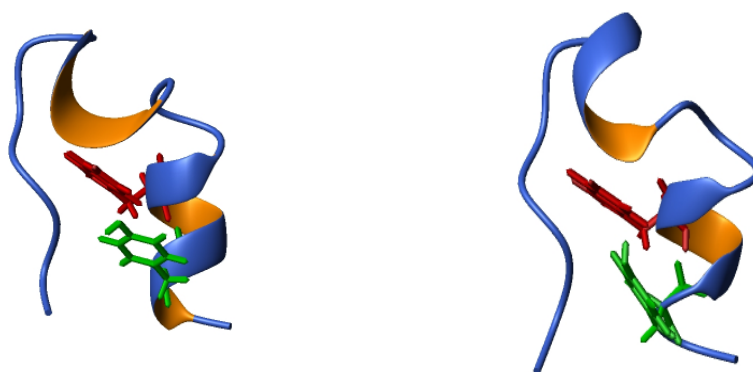
A kapott Gab1 tiofoszfoanalóg megőrizte kötődési képességét az SHP-2 fehérjéhez, viszont az eredeti foszfopeptidekhez képest elveszítette foszfatáz aktiváló hatását. Ezért célul tűztük ki egy olyan peptidtiofoszfát szintézisének kidolgozását, ahol a kénatom a foszforatom és az aromás gyűrű között van. Ez az alábbi származék lenne:



Ennek során először előállítottuk a p-merkaptó fenilalanint, majd ennek poszforamidittal történő reakciójával a megfelelő tiofoszfitésztert, amely oxidációjával a fenti ábrán lévő származékot eredményezte. Hasonló tiofoszfát származékot állítottunk elő cisztein peptidek felhasználásával is. (26., 27. és 29. sz. előadás, 30. sz. közlemény).

3, Szintetizáltunk egy minifehérjét (Tc5b) és néhány származékát. Megvizsgáltuk a módosítások konformációs hatásait (2. előadás).

Az alábbi ábrán a Tc5b (NLYIQWLKDGGPSSGRPPPS) és egy módosított stabilabb analógjának (Tc6b, NLYIQWLKEGGPSSGRPPPS) térszerkezete látható:



Ennek a stabilabb analógnak elkészítettük az alábbi, meghosszabbított származékait: A megnövekedett térszerkezeti stabilitás egyébként egy, a glutaminsav és az arginin részek közötti kedvezőbb sóhídnak köszönhető.

RLYIQWLKEGGPSSGRPPPS  
VRLYIQWLKEGGPSSGRPPPS  
AVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPS  
EAVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPS  
EEAVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPS  
EEEAVRLYIQWLKEGGPSSGRPPPS

Ezek térszerkezetvizsgálata folyamatban van.

Korábbi munkánk folytatásaként szintetizáltunk egy újabb minifehérje modellt (hairpin modell) és ennek néhány származékát. Megvizsgáltuk a módosítások konformációs hatásait (22. előadás). A szintetizált szerkezetek az alábbiak:

SESYINPDGTWTVTE  
SES(P)YINPDGTWTKTE  
SESYINPDGTWTKTE  
SEYINPDGTWTKTE

Ezeken kívül elkészítettünk egy béta szerkezet modellt is (betanova, RGWSVQNGKYTNNGKTTEGR).

A Tc5b minifehérjének több új gliko és foszfoanalógiát állítottuk elő. A CD és NMR vizsgálatok megtörténtek, az eredmények közzlése folyamatban van (25. sz. előadás).

Asn-Leu-Tyr-Ile-Gln-Trp-Leu-Lys-Asp-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Har-Pro-Pro-Pro-Ser

NLYIQWLKN(*Gal*)GGPSSGRPPPS  
NLYIQWLKNGGPSSGRPPPS  
NLYIQWLKDGGPS(*P*)SGRPPPS  
NLYIQWLKSGGPSSGRPPPS  
NLYIQWLKS(*P*)GGPSSGRPPPS

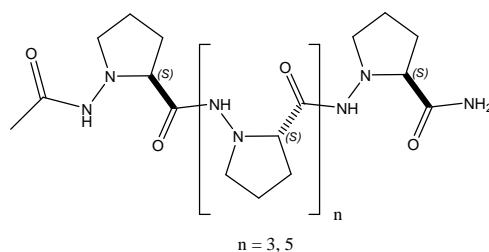
Az előző jelentésben említett hairpin modell több új analógiát készítettük el, ezek vizsgálata folyamatban van.

4, Vizsgáltuk módosított dipeptidek komplexképző sajátságait is (7. és 10. előadás)

5, Hidrazinoprolin (2-aza ACPC) felhasználásával homo és heterooligomereket készítettünk és térszerkezetvizsgálatokat végeztünk.

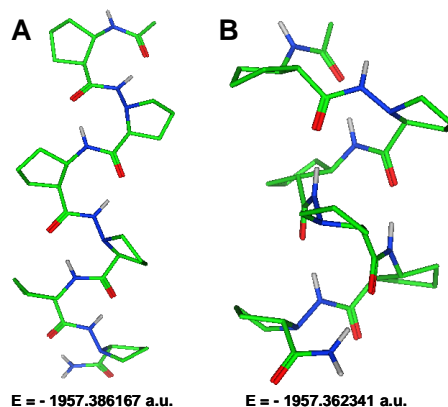
a, Homokirális hidrazino peptidek szerkezetvizsgálata

Korábbi eredményeinkből ismert, hogy a *cisz*-2-aminociklopentánkarbonsavból (*cisz*-ACPC) felépített homooligomerek oldatfázisban igen stabilis 6-szálat alkotnak. Jelen kutatásunk során célul tűztük ki a gyűrűben lévő C<sup>β</sup> atom nitrogénnel való helyettesítésének szerkezetre gyakorolt hatásának tanulmányozását. Munkánk során vizsgáltuk, a homokirális 1*S*-amino-pirrolidin karbonsav monomerekből felépülő mesterséges polimerek (aza-ACPC) térszerkezetét, és ezek stabilitását.



Vizsgált aza-ACPC homooligomerek.

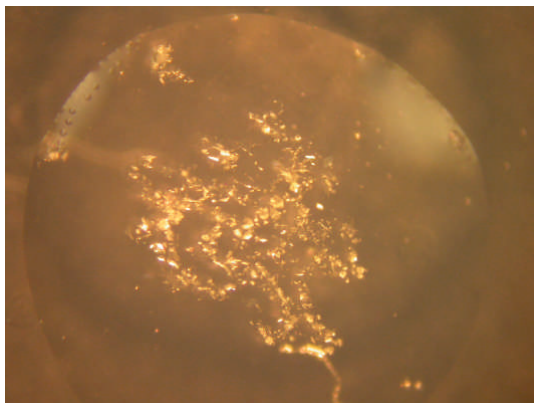
Molekulamodellezés segítségével megállapítottuk, hogy a lehetséges másodlagos szerkezetek közül (8-hélix és 12-hélix) az *ab initio* B3LYP/6-311G\*\* szinten való optimalálás után a 8-hélix a stabilabb szerkezet.



*ab initio* B3LYP/6-311G\*\* szinten optimalált 8- és 12-hélixek.

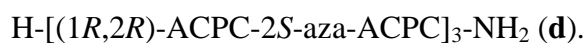
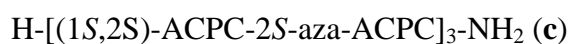
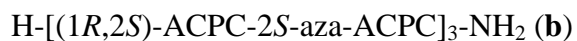
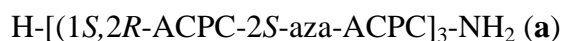
Az NMR mérések során azt tapasztaltuk, hogy a jelek túlságosan degeneráltak a szerkezet meghatározásához, így a prediktált szerkezet jellegét CD, és VCD spektroszkópia segítségével támasztottuk alá. VCD spektroszkópia eredményeinkből egy poliprolin-II hélix jelenlétére következtethetünk. A VCD számítások Gaussiannal való visszaszámítása sajnos annyira időigényes hogy belátható időn belül nem tudjuk

lefuttatni. Többszöri két-három hónapos futtatás után sem lehetett optimálni, így a szerkezet bizonyításhoz kristályosításra tértünk át. A kooperációban megvalósuló kutatás előkísérletei megtörténtek, és az ígéretesnek mutatkozó körülmények között a kristálynövesztés folyamatban van. A röntgen ismeretében az eredményeket egy rangos nemzetközi folyóiratban fogjuk összefoglalni.

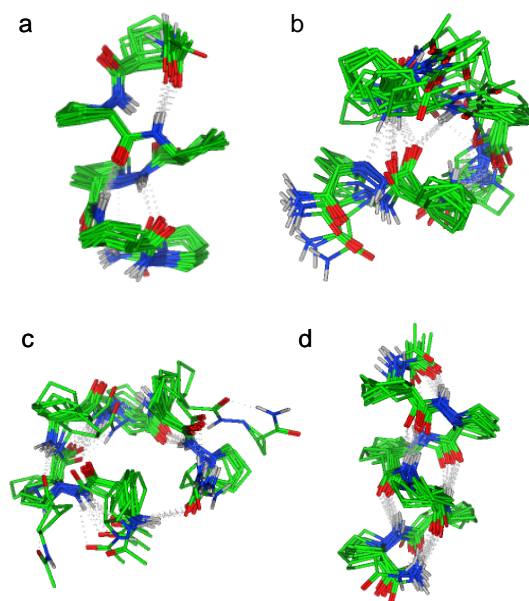


Kép a kristályokról

b, Hidrazinoprolin és cisz valamint transz ACPC felhasználásával elkészítettük a lehetséges alternáló heterooligomereket.

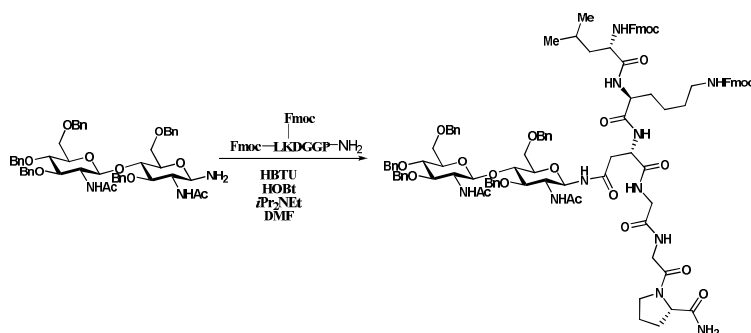


NMR és VCD vizsgálatok valamint molekuladinamikai számítások szerint az alábbi térszerkezetek alakultak ki



## 6, N-glikopeptidek szintézise

Az aszparagion glikozilált peptidek szintézisére modellnek kiválasztott hexapeptid (LKDGGP) a Tc5b minifehérje 7-12 fragmense. Korábban már szintetizáltuk a teljes minifehérjét és módosított származékait galaktozil aszparaginnal, a célból, hogy a glikoziláció térszerkezeti hatásait vizsgáljuk. Ebben az esetben a 9. pozícióba galaktozil aszparagint építettünk be a peptidláncba Fmoc stratégia felhasználásával. Az ezt követő próbálkozásunk során MBHA-gyantán szintetizáltuk a védett Fmoc-Leu-Lys(Fmoc)-Asp-Gly-Gly-Pro-NH<sub>2</sub> peptidamidot Boc stratégia felhasználásával. Az aszparaginsav béta karboxilja aktiválása után megkíséreltük az alábbi ábrán látható kapcsolást a peptid és az aminocukor között.

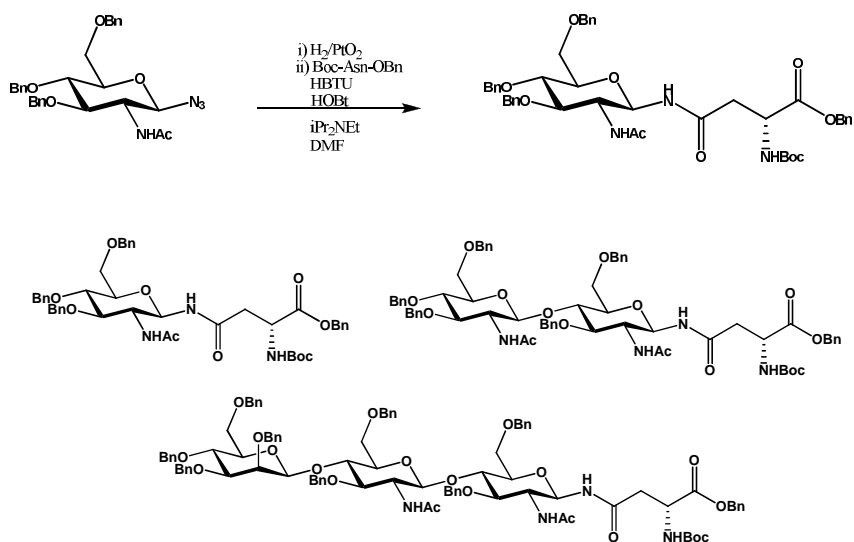


A szintézis során jelentős mértékben nem kívánatos mellékreakció játszódott le az oldalláncban (aminoszukcinimid keletkezett), ennek kiküszöbölésére egy új szelektíven védett gyantához kötött modellpeptidet állítottunk elő gyantán történő glikozilációhoz: Boc-Leu-Lys(Boc)-Asp(All)-Gly(Hmb)-Gly-Pro-2-klórtritol gyanta.



Az aszparaginsav allil észter védőcsoportjának eltávolítása után megnyílik a lehetőség a gyantán történő glikozilációhoz, a glicin gerincnitrogén atomjának védele hydroxi-metil-benzil (Hmb) védőcsoporttal történt ami megakadályozza az aminoszukcinimid gyűrű képződését. A kész védett, glikozilált peptid a 2-klórtritol gyantáról a Boc védőcsoportokkal együtt viszonylag könnyen eltávolítható. Az eredmények kiértékelése folyamatban van. Ezzel párhuzamosan synthonként előállítottuk a teljesen *O*-benzilezett glikozil azidokat: GlcNAc( $\beta$ 1-N<sub>3</sub>), GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N<sub>3</sub>), Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N<sub>3</sub>).

Az *in situ* kapcsolási reakció a glikozil aminok valamint a szelektíven védett, aktivált aszparaginsav és a védett Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro hexapeptid amid között, a szénhidrát-aszparaginsav valamint az alábbi szénhidrát-hexapeptid származékokat eredményezte:



A peptidek szintézisénel először Boc/Bzl szintézis stratégiát alkalmaztunk, a peptideket manuálisan szintetizáltuk Boc-Pro-Merrifield gyantán. A glikopeptidek gyantáról való hasítása 10% HBr/ecetsav, 90% TFA, 2% 1,4-ditio-*DL*-treitol oldattal történt, hasítási idő 2h. A glikozilált hexapeptid származékok izolálása HPLC-vel történt.

A peptidek szintézisek során a következő glikopeptideket állítottuk elő: H-Leu-Lys-GlcNAc( $\beta$ 1-N)Asn-Gly-Gly-Pro-OH, H-Leu-Lys-GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N)Asn-Gly-Gly-Pro-OH, H-Leu-Lys-Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-N)Asn-Gly-Gly-Pro-OH.

A GlcNAc( $\beta$ 1-N)Asn tartalmú glikopeptid szintézisénel jó termeléssel kaptuk a kívánt terméket, amely a korrekt tömegspektrummal rendelkezett. A GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-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. Sem a reakcióidő, sem a hasítási reakcióelegy változtatása nem okozott érdemi javulást.

A H-Leu-Lys-Man( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-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. Ezért megpróbálkoztunk egy 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, SnCl<sub>4</sub>-gyel távolítottunk el, amely a linker-prolin kötést érintetlenül hagyta. A Fmoc kémiában szokásos alkoxybenzil alkohol polimerek hasadnak SnCl<sub>4</sub>-gyel. Ezután Fmoc kémiával befejeztük a peptidet.

Összeségében több sikeres stratégiát valósítottunk meg a fenti glikopeptiszármazékok előállítására. Ezek publikálása megkezdődött.