

**2007. zárójelentés az OTKA-042884 sz. OTKA keretében végzett kutatásokról****A 42882 sz. OTKA címe: Bioaktív okta- és hexadecamerek szintézise és vizsgálata.**

A munka kezdete és befejezése: 2003-2006 december 31.

**A kutatás célja:** kémiai szintézissel biológiailag aktív és egzakt kémiai szerkezettel, homogén molekulatömeggel jellemezhető oligomer molekulák előállítása, melyek többszörös aminosav- vagy karboxil-csoportjaik révén alkalmasak arra, hogy hozzájuk ismert biológiailag hatékony anyagokat vagy származékaikat (max. 16 monomer egységet) kapcsoljunk. Kutatásaink és találmányaink konkrét tárgyát olyan új aminosav- és peptidszármazékok, peptidmimetikumok képezik, melyek a bennük levő egy vagy több protonakceptor sajátosságú terciér nitrogénatom miatt poláros közegben, különösen gyengén savas közegben jól oldódnak.

Az egyik konkrét cél az új kémiai szintézisek kivitelezhetőségének vizsgálata és kidolgozása, a másik az új vegyületek *in vitro* és *in vivo* vizsgálata volt.

A pályázat keretében di-, tri-, tetra- és oktamer hordozómolekulák, valamint bioaktív anyagok konjugátumainak előállítását, *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok elvégzését vállaltuk. Konkrét elképzelésünk az volt, hogy a legegyszerűbb di- és trifunkciós alapanyagokból olyan új, komplex oligofunkciós vegyületek előállítását kíséreljük meg, melyek gazdaságosan, tisztán, jól kezelhetően előállíthatók. Az oligofunkciós csoportokat tartalmazó vegyületek tervezésének fő szempontjai: a viszonylag jó oldhatóság biztosítása, a köztes termékek detektálhatósága, tisztíthatósága, analizálhatósága (HPLC, MS) valamint annak a lehetőségnek megteremtése, hogy lehetőleg egy-két kémiai lépéssel több bioaktív és/vagy a biológiai hatást elősegítő „spacer” molekulát (bifunkciós kispeptidet) lehessen hozzákötni.

A kutatás alapvető célkitűzésének (vagyis a határozott szerkezettel jellemezhető oligomer vegyületek előállítása) megvalósítása érdekében több funkciós csoportot tartalmazó karbonsavak, aminok és aminosavak szelektíven védett származékainak előállítási lehetőségeit vizsgáltuk. Előállítottunk olyan oligofunkciós csoportokkal rendelkező anyagokat, melyek alkalmasak arra, hogy belőlük építsük fel a kutatási tervben vázolt oligomer cél- illetve hordozómolekulákat.

**Rövidítések:** TT232= a szomatosztatin szelektíven tumorgátló heptapeptid analógja; TK= tirozinkináz; TKI= tirozin kináz inhibitorok; GnRH-III= lamprey Gonadotropin Releasing Hormon; MDR= Multi Drug Resistance; MDRI= MDR inhibitorok; GnRHI= GnRH analógok tumorgátló inhibitorai; DETA= dietiléntriámin; TAEA= tris-aminoetilamin; EDTADA= etiléndiamin tetraecetsavdianhidrid; DETAPADA= dietilén-triámin-pentaecetsav; BOC=terc.-butiloxi-karbonil; Z=benziloxi-karbonil; PTK=protein tirozin kináz; GH= growth hormon; Cpa= 4-klórifenilalanin; Dit=3,5-dijódtirozin; DNp=dinitrofenil; 5-AF=5-aminofluorescein; LH=luteinizáló hormon; FSH=follikulusz stimuláló hormon; OOI= Országos Onkológiai Intézet;

A kutatócsoportunk által a korábbi években leginkább kutatott antiantitumor hatású anyagok (GnRHI, TKI, és MDRI) analógjait és fragmenseit és oligomer konjugátumait állítottuk elő. Racionálisan megtervezett oligokarbonsavak és aminosavak egyszerű karboxamid származékait terveztük meg szintetizáltuk, valamint mértük ezek biológiai hatékonyságát, MDRI, TKI sejtprolifерációt gátló (MTT teszt) képességét, valamint RP-HPLC és micellár kromatográfiás sajátosságát vizsgáltuk.

## **A kutatás előzmények rövid ismertetése**

**Korábbi** vizsgálataink azt mutatták, hogy a vízóldékony (15-20 kDa molekulású poli-[N-vinilpirrolidon-ko-maleinsav anhidrid]) polimerhez kapcsolt (és szabadalmaztatott) antitumor hatású GnRH analógok oldékonysága, hatásspektruma és hatásmechanizmusa kedvezően megváltozott. Pl. a GnRH hormon analógjainak konjugátumait részletesen tanulmányoztuk in vitro. Megállapítottuk, hogy a konjugátumok hatásspektrum változást, oldékonyságnövekedést, és kedvezőbb farmakodinamikai (enzimatis rezisztencia, felszívódás, kiürülés, long acting hatás) tulajdonságokat eredményeztek. Feltételezéseink szerint az egymáshoz kötött biológiailag aktív monomeregységek módosíthatják egymás hatását, receptor-kötődését, internalizációját.

**Korábban** a multidrog rezisztencia (MDR) néven ismert jelenség gátlására új, a multidrog rezisztenciát gátló és citosztatikumok daganatellenes hatását fokozó peptidszármazékokat készítettünk és szabadalmaztattunk. A leghatékonyabb anyagaink az Asp, Glu, Lys aminosavak benzilcsoportokat tartalmazó származékait tartalmazták. A legjobban a -Lys(Z)- és -Glu(OBzl) szerkezeti részt tartalmazó peptidszerű molekulák váltak be. A legaktívabb peptidszármazék a Reversin 205 tulajdonképpen a lizin egy dimer származéka: BOC-Glu(OBzl)-Lys(BOC-Glu(OBzl))-OMe.

**Korábban** kimutattuk, hogy a TK gátlószerek az MDR fehérjének is szubsztrátjai. Aktuálissá vált a peptid és nempeptid molekula-kombinációk szintézise és vizsgálata.

**Korábban** a TK túlműködés elleni racionálisan fejlesztett kombinatorikus vegyületkönyvtárat, inhibitorokat fejlesztettünk ki, melyeknek a következő hatásait vizsgáltuk: az EGF-PDGF gátlás, apoptózis stimulálás, angiogenezis gátlás, proliferációs szignál gátlása, sejtosztódás gátlása. Kis molekulákból álló molekulakönyvtárakat, 2-3 gyűrűs kondenzált heterociklusos (kinazolin, kinoxalin, kinolin, kumarin, benzoimidazol, benzotiazol stb) vegyületeket és peptidszármazékokat állítottunk elő és in vitro enzim tesztekkel, humán sejt kultúrákon vizsgáltuk.

TT232 jelű tumorgátló kinázgátló peptidfragmenseit az angiogenezisre és neurogén gyulladásra és széleskörű gyógyszerrezisztenciára ható peptidek, peptidomimetikumok- karbonsav csoportot tartalmazó változatait terveztünk és szintetizáltunk annak érdekében, hogy oligomerhordozóhoz kapcsoljuk őket.

## **Az OTKA szerződés időtartalma folyamán elért eredmények:**

1. Számítógépes adatbázist készítettünk az ismert MDR1, GnRHI és TKI molekulák szerkezeti és fizikokémiai, biokémiai adataiból (molekulaszerkezetek, hatástani adatok, irodalmi referenciák, szabadalmak, molekulakönyvtárak).

Saját fejlesztésű számítógépes keresőprogramot készítettünk a vegyszerforgalmazó cégek katalógusaiban és vegyület-könyvtáraiban ismertetett alapanyagok között való racionális keresésre.

Az elektronikusan tárolt és sok szempont alapján rendszerezett adatokból a kémiai szerkezet és a várható fizikokémiai paraméterek, valamint a biológiai hatás összefüggéseit számoltuk. A kvantitatív szerkezet-hatás összefüggések vizsgálatához szükséges fizikokémiai paraméterek (pKa, logP, NMR, 3D) meghatározását követően az NMR adatok felhasználásával az adatbázis formában való feldolgozása után a vegyületek konformációját modelleztük és ebből új, várhatóan bioaktív vegyületek szerkezetét alkottuk meg.

A közismerten hatékony és az előállítani kívánt vegyületek fizikai-kémiai (NMR) és biológiai paraméterek (pKa, pKi) meghatározását követően egy SYBYL nevű programcsomaggal és egy sajátfejlesztésű szabadalmaztatott neurális hálózat-alapú szoftverrel a hatás-szerkezet

összefüggésekkel korreláló kvantitatív antiMDR és antiTK 3D molekulaszervezet-farmakofor hatástani modellt készítettünk és ennek segítségével virtuálisan és ténylegesen előállított vegyületek gyógyszerként való felhasználhatóságát próbáltuk megjósolni.

2. Tanulmányoztuk a kén atomot tartalmazó molekulákból felépíthető oligomer vegyületek kialakításának lehetőségeit. A kéntartalmú vegyületek kémiai ligációja elvileg lehetőséget nyújt több szabadfunkcós csoportot tartalmazó vegyület közti specifikus kémiai kötés kialakítására. Így például a védőcsoportokat nem tartalmazó peptid-tioészterek, tioéterek szelektíve összekapcsolhatók egymással. Így tehát lehetőség van arra, hogy bioaktív oligomer vegyületeket állítsunk elő. Vizsgáltuk a peptidek C-terminusán tioészter csoportot illetve az N-terminuson szabad SH és NH<sub>2</sub> csoportot tartalmazó peptid-származékoknak kémiai ligációval való szintézisének lehetőségeit szilárd fázison [1]. Vizsgálataink eredményei végülis azt mutatták, hogy ezen az úton nem eredményes a kismolekulasúlyú aminosavak és peptid-oligomerek előállítása.
  3. A klinika II. fázisban lévő TT232 in vivo vizsgálatát folytattuk különböző tumor modellen [6]. A TT232 molekula olyan új C-terminális és N-terminális védett di- és tri-peptidjeinek származékait állítottunk elő [8,9], amelyekben három, a biológiai hatás szempontjából fontos aminosav (Lys, Phe, D-Trp) összekapcsolódását egy TAEA molekularészlet biztosítja. Előállítottunk egy random peptid-könyvtárat, amelyben a triszamino-etilamin molekula három, szerkezetileg és kémiailag azonos NH<sub>2</sub>-csoportjain a Boc-Lys(2ClZ), Boc-Tyr(Bzl), és Boc-D-Trp aminosavak különböző variációkban kapcsolódhatnak a központi maghoz. Előállítottuk a szabad terminális NH<sub>2</sub>-csoportokat tartalmazó könyvtárat - a Boc-védőcsoportok eltávolításával -, valamint előállítottuk ezeknek a „könyvtártagoknak” egyes komponenseit is, ezek a [Boc-Lys(Z)]<sub>3</sub>-TAEA, [Boc-Tyr(Bzl)]<sub>3</sub>-TAEA, [Boc-DTrp]<sub>3</sub>-TAEA peptidomimetikumok. [BOC-Glu(OBzl)]<sub>3</sub>-TAEA, [Z-Glu(OtBu)]<sub>3</sub>-TAEA, [Z-Glu(OH)]<sub>3</sub>-TAEA, [Z-Lys(Z)]<sub>3</sub>-TAEA.
- Elvégeztük az új analógok proliferáció gátlásra (MTT teszt) és neurogén gyulladásra kifejtett hatásának in vitro elővizsgálatát. Sejtproliferációra kifejtett hatásukat A431 melanoma, SW480 colon és Kaposi Sarcoma (KS) human endothel sejtvonalakon néztük. Az SW480 sejteken a TEAE származék-random könyvtára 45 μM míg az egyik tagja, [BOC-Lys]<sub>3</sub>-TAEA [Lys(Z)]<sub>3</sub>-TAEA 1 μM IC<sub>50</sub> értéket mutatott. A KS sejtvonalon a legérdekesebb vegyületnek a védett N-terminális TT232 fragmens, a Boc-D-Phe-Cys(Acm)-Tyr-OMe bizonyult, mely az endothel sejtek növekedését idézte elő. Ezt a vegyületípust és angiogenezist indukáló tulajdonságát publikáltuk [7-11].
- Az újonnan előállított TT232 fragmensei: BOC-Cys(Acm)-Tyr-OMe; H-Cys(Acm)-Tyr-OMe; BOC-DPhe-Cys(Acm)-Tyr-OMe; H-DPhe-Cys(Acm)-Tyr-OMe; BOC-DPhe-Cys(Acm)-Tyr-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>; BOC-Cys(Acm)-Thr-NH<sub>2</sub>; H-Cys(Acm)-Thr-NH<sub>2</sub>;
4. Szisztematikusan változtatott homológ molekulaszorozatok („molekulakönyvtár”) szintetizáltunk a TT232 molekula szerkezet-biológiai hatása közti összefüggések vizsgálatára. X-Lys(Z)-Y [ahol Y tirozin analóg (Cpa, Dit) vagy aromás aminosavszármazék pl. His(DNp)] általános képletű analógok sorozatát készítettük el, továbbá az X-Lys(Z)-Tyr-OMe (ahol X= aromás aminosav) általános képletű vegyületek szintézisét kezdtük el.
  5. Fluoreszcens festék aminosav származékait állítottunk elő és mértük ezek MDR1 szubsztrát jellegét rezisztens szolid tumorokon. Előállítottuk az 5-aminofluorescein BOC-Lys(Z)-csoporttal acilezett és szukcinilezett származékát. A festékmolekulák diagnosztikumként való felhasználását gátolja az a tény, hogy a sejtekben felhalmozódó festékmolekulák

viszonylag nagy mennyiségben „kifolynak” a sejtekből, s ezért a sejten belüli floreszcencia-mérést gátolják.

6. A jeltovábbítási kaszkádot gátló, célzott molekulakönyvtárak előállítása keretében előállítottunk 28 db **fenilamino-oxálecetsav** típusú, két szubsztituált fenilgyűrű között biciklusos vázat tartalmazó, kismolekulájú nempeptid TT232 követő vegyületet. A vegyületek szerkezetét NMR és HPLC-MS spektroszkópiával igazoltuk. Az eddig elvégzett in vitro vizsgálatok alapján a vegyületek között több, nanomoláris koncentrációban is jelentős P anyag felszabadulást gátló vegyület van, emellett a vegyületek ADME paraméterei is javultak, oldékonyságuk pl.egy nagyságrenddel nagyobb a két szubsztituált fenilgyűrű között oxalil-félanilid-félhidrazid részt tartalmazó kiindulási származékoknál. Az eredményeket publikáltuk [2], és a vegyületeket szabadalmaztattuk [3, 4]. Ezen vegyületek között olyan karbonsav és aminocsoportot tartalmazó intermedier származékok vannak, melyek alkalmassá teszik a molekulát arra, hogy az oligomer hordozóhoz kapcsoljuk.
7. Előállítottunk 10 új **GnRH-III** analógot, és tucatnyi GnRH fragmenst részben oldatfázisú, részben szilárdfázisú szintetikus módszerekkel. A 6-os helyzetben  $\beta$ -aszparaginsavat tartalmazó GnRH anyagot azidos kapcsolással 4 szabad aminocsoportot tartalmazó DETA vázat tartalmazó oktamer hordozóhoz kapcsoltuk. A terméket mólsúlyszűréssel tisztítottuk. Vizsgáltuk (OOI) az in vitro endokrin (LH és FSH releasing), valamint két rákos sejtvonalon a daganatgátló hatásukat. Megállapítottuk, hogy a hormonanalógok aminosav-szekvenciájában történt egy vagy több aminosav cseréje általában nem változtatta meg lényegesen a rákellenes hatást, a kisebb fragmensek pedig nem voltak karcinogének, de nem is fejtettek ki mérhető endokrin-tumorgátló hatást. Az eredményeket publikáltuk [5]. Az oligomer GnRH anyagok megtartották ugyan biológiai hatékonyságukat, de nem bizonyultak jobbnak, mint a monomer anyagok önmagukban.

Az előállított GnRH analógok: Ac-DPhe1,DPhe2,DCpa3Dlys6,desGly10-GnRH EA; Arg8-GnRH-III; DPhe2, DTrp3, DLys6-GnRH; DPhe2, DTrp3, DLys(Succ)6-GnRH; L- $\beta$ Asp(OtBu)6, EA10-GnRH; L- $\beta$ Asp(OMe)6, desGly10-GnRH-EA; L- $\beta$ Asp6N2H4, EA10-GnRH. Ez utóbbi vegyület oligomer (tetramer) származékát is előállítottuk

Az előállított GnRH és GnRH-III fragmensei: BOC-Lys(Z)-Pro-OMe; BOC-Lys(Z)-Pro-EA; BOC-Asp(OBzl)-Pro-OMe; Z-Asp(OMe)-Pro-EA; BOC-Asp(OBzl)-Pro-Gly-NH2; Fmoc-Lys(BOC)-Pro-OMe; H-Lys(Z)-Pro-EA; Z-Leu-Arg(NO2)-Pro-OMe; BOC-Sar-Leu-Arg(NO2)-Pro-OMe; H-Ser-Lys(Z)OMe; Glp-His-Trp-OMe; Glp-His-Trp-N2H3; Glp-His(DNp)-Trp-OMe; Glp-His(DNp)-Trp-N2H3; Glp-His-Trp-Ser-Tyr-OMe; Glp-His-Trp-Ser-Tyr-N2H3; Glp-His-Trp-Lys(Z)-Tyr-N2H3;

A közreműködő szervezet (OOI: Országos Onkológiai Intézet, Dr.Vincze Borbála, dr.Gaál Dezső) vizsgálatainak eredményei:

Az antiproliferációs hatás, valamint a fluoreszcens és radioaktívan jelzett molekulák endocitózisának vizsgálták humán daganat sejtenyészeteken in vitro. Radioreceptor vizsgálatok során a peptid származékok gátolták a tríciummal jelzett GnRH-III specifikus kötődését rosszindulatú HT-29 humán, C-26 egér vastagbél- és MCF-7 humán emlő-daganatsejtek membránfrakciójában. A GnRH receptor fehérje expressziójának vizsgálatát PAGE- immunoblot technikával nyúl poliklonális IgG antitest (FL-328) alkalmazásával végezték. Az MCF-7 sejtvonal citoszol- és membrán- , valamint a C26 xenograft citoszol- és mag-frakciójában kifejezett GnRH receptor fehérje pozitívítást tapasztaltak. A GnRH receptor vizsgálatokkal összhangban a peptid származékok idő és dózis függő módon gátolták az MCF-7 és a HT-29 sejtek proliferációját. A negatív kontrollként alkalmazott

HL-26 sejttenyészetben GnRH fehérje jelenléte a fenti technikákkal nem volt kimutatható, ennek megfelelően a GnRH származékok proliferáció-gátló hatást sem fejtettek ki. MCF-7 humán emlő- és HT-29 vastagbél-daganat sejt kultúrákon tanulmányozták az új GnRH analóg készítmények (JS-1004, JS-1892 és TH-916) szelektív anti-proliferációs hatását in vitro. A sejt kultúrákat 10%-os borjú savó tartalmú RPMI tápfolyadékban tartották fenn, majd a kezelést követően a negyedik napon határozták meg a sejtszámot. MCF-7 sejtek vizsgálata során csak a JS-1004 származék esetében tapasztaltak gátló hatást (15-20 %). A várakozással ellentétben az új GnRH analóg származékok erőteljesebben gátolták a HT-29 vastagbél-daganat sejtek proliferációját (JS-1892 25-30 %-kal, a JS-1004 15-20 %-kal, TH-916 15%-kal). A sejt homogenizátumok membrán-frakciójában radioreceptor technikával mérték a tríciummal jelzett orsóhal GnRH-III származék specifikus kötődését. Megkezdték a GnRH receptor expresszió vizsgálatát Immuno-blot technika alkalmazásával. Humán xenograftos egereken a tumor akkumulációját és retencióját mérték. Elkezdték a konjugátumok akut toxikológiai vizsgálatát. A terc.butil-, és benzil-csoportokat tartalmazó lipofil oligomer peptid származékok a legnagyobb oldhatósági koncentrációban sem toxikusak in vivo. Vizsgálták a radiojelzett hidrofób peptid in vitro sejt felületi kötődését, internalizációját intakt daganatsejteken, in vivo felszívódását, szöveti megoszlását CBA/CA normál egereken.

8. Az új vegyületek **neurogén gyulladásra** kifejtett hatását in vivo (patkány tracheán), a substance P felszabadulás gátlásával mérték. A védett N-terminális TT232 fragmens, a Boc-D-Phe-Cys(Acm)-Tyr-OMe 29.4 %-ban, a Boc-védőcsoport eltávolítása után, a TEAE származék-random könyvtára hasonló mértékben (29,6 %) míg a [Boc-Lys(Z)]<sub>3</sub>-TAEA származék igen magas, 53.9 %-ban gátolta a P anyag felszabadulását. Szabadalmi bejelentést tettünk.[11].

9. Új MDR hatású, a korábban szabadalommal védett Reversin-205 és Reversin-121 jelű vegyületek analógjait és követő molekuláit állítottuk elő, melyek központi „mag”-ként TAEA, EDTADA, DETAPADA, DETA molekuláris részeket és benzilészter benziloxikarbonil csoportokat tartalmaznak. Ezek közös sajátossága, hogy bázikus karakterű terciér amin csoport(ka)t tartalmaznak, melyek elősegítik a poláros oldószerekben való oldhatóságot. Vegyületeink biológiai hatékonyságát MDR1-ATP-áz hatásának mérésével, fluoreszcens vizsgálati eljárással sejttenyészeteken történt mérésekkel vizsgáltuk. Olyan oligomer vegyületeket sikerült előállítani, melynek oldékonysága jobb a korábbi MDR gátló anyagokhoz képest.

A kísérleti eredmények szerint az MDR1 egyes peptidszerű szubsztrátjai jelentős tirozin kináz gátló hatással is rendelkeznek, és azt is kimutattuk, hogy a sejten belül ható tirozin kináz gátló és más hidrofób gyógyszerjelölt molekulák egy része aktiválja az MDR1 ATP-áz működését is.

Az MDR1 transzporter működésének stimulálására illetve gátlására korábban kifejlesztett hatékony peptid származékaik in vitro vizsgálatai alapján sikerült meghatároznunk néhány olyan kulcsfontosságú molekuláris részt, melyek igen alacsony koncentrációban stimulálják az MDR1-ATPáz rendszert és az elérhető legmagasabb oldhatósági koncentrációban sem toxikusak.

10. Új szintetikus eljárást fedeztünk fel, melynek lényege, hogy az BOC-Lys(Z) aminosav pentafluorfenil-észterével jó termeléssel szelektíven acilezhető a dietiléntriámin primer aminocsoportjai, miközben a szekunder amino csoport érintetlenül, szabadon marad. Ezt a szekunder amin egy következő lépésben szukcinilezni lehet, aktívészterré lehet alakítani, majd az így kapott védett aminokarbonsav pentafluorfenilészterével egy új DETA molekulát lehet szubsztituálni. E módszerrel tehát olyan vegyületeket lehet egybeépíteni, melyek segítségével pl. 2 db BOC és 2 db Z, vagy 4 db Z csoportot tartalmazó vegyületek

állíthatók elő, melyeket borostyánkősavanhidriddel jól lehet acilezni, majd ezekből aktív észter készíthető. E szintetikus lépések megismétlésével 2x4 aminocsoportot tartalmazó „oktamer” vegyületet állítottunk elő, mely 2 tercier nitrogénatomot is tartalmaz.

11. Oligomer anyagaink egy részét az angiogenezis-vasculogenezis stimulálására és gátlására teszteltük. A sikeres in vitro vizsgálatokat követően az in vivo vizsgálatok meglepő eredményt hoztak: az egyik TT232 fragmens-származék erőteljesen stimulálta az angiogenezist in vitro. E vegyületre és származékaira alálmányi bejelentést tettünk[11].

Jelenleg is folyik a fenti vegyületek nagyléptékű szintézisének kidolgozása, a szabadalmakhoz tartozó analóg molekulák előállítás, valamint biológiai vizsgálata. Az új vegyületekről cikkek van készülöben. [12-17].

### Elért eredmények

- előállítottuk az iminodiacetsav (IDA) származékait: BOC-IDA; IDA-bisOMe; BOC-Trp-IDA-bis(OMe); H-Trp-DETA-bis(Pht); BOC-IDA-bis(Trp-OMe); BOC-IDA-bis(Glu-bis(OBzl)); BOC-IDA-bis(IDA-bis(OMe)); H-IDA-bis(IDA-bis(OMe)); BOC-Asp-bis(IDA-bis(OMe)) ; BOC-Glu-bis[(Glu(OMe)2]; BOC-Dglu(Glu(OMe)2)OBzl;
  - előállítottuk a DETA NN-bis(ftalil) vegyületeit és származékait,: DETA-bis(Pht); BOC-Asp(OBzl)-DETA-bis(Pht); BOC-Glu(OBzl)-DETA-bis(Pht); Z-Glu(OtBu)-DETA-bis(Pht); BOC-DTrp-DETA-bis(Pht); H-Trp-DETA-bis(Pht); A ftalil csoportokat hidrazinnal hasítottuk.
  - előállítottuk a DETA NNN-tris(BOC-Asp(OBzl))- származékot, mely bizonyos mértékben a Reversin 121 jelű anyaghoz hasonló szerkezetében
  - előállítottuk az 5-aminofluorescein (=5AF) acilezett származékait, de nagyon alacsony termeléssel: DETAPADA-5AF; DETAPADA-5AF(Ac2); DETAPADA-5AF-bis[Asp(OBzl)2]; DETAPADA-5AF(Ac2) bisAsp(OBzl)2; BOC-Lys(Z)-5AF; a dietiléntriámin-pentaecetsav dianhidridet 5-aminofluoresceinhez kapcsoltuk, majd e vegyület diacetyl származékát készítettük el, de az LCMS nem igazolta a termék szerkezetét
  - előállítottuk az EDTADA vegyületből triptaminnal az-etiléndiamin-tetraecetsav-bis-triptamid vegyületet, mely kromatográfiásan jól kimutatható (Erlich reakció) volt. Ez a disav a melléktermékek képződése miatt nem bizonyult alkalmasnak a dimer származék előállítására
  - előállítottuk a DETA szelektíven bisz-acilezett származékait: [BOC-Lys(Z)]2-DETA; [Z-Lys(Z)]2-DETA; [BOC-Lys(BOC)]2-DETA; [Z-Glu(OtBu)]2-DETA; [BOC-Trp]2-DETA; EDTADA-bis[DETA-bis[(Lys(Z))-bis-dimetilaminopropilamid]
  - előállítottuk a DETA szelektíven bisz-acilezett és SUCC származékait: [Z-Glu(OtBu)]2-DETA-Succ-OH; [BOC-Lys(Z)]2-DETA-Succ-OH; [Z-Lys(Z)]2-DETA-Succ-OH;
  - előállítottunk tercier nitrogént tartalmazó (TAEA) anyagokat: [BOC-Lys(Z)]3-TAEA; [Z-Glu(OtBu)]3-TAEA; [Z-Glu(OH)]3-TAEA; [Z-Lys(Z)]3 TAEA; [BOC-Glu(OBzl)]3-TAEA;
- A tapasztalatszerzés érdekében próbakísérleteket folytattunk a dietiléntriámin-pentaecetsav-dianhidriddel, és az 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane tetramin reakciókészségével kapcsolatban.
- előállítottunk BOC-Lys(Z)- 2-amino-6-metilszulfonil-benziazol; Ez az analóg nagyon kis koncentrációban gátolja az angiogenezist.

A szintézisek során felmerült problémák a következők voltak:

1. Az oligokarbonsavak (iminodiacetsav származékok BOC-Trp-IDA, BOC-IDA bis(Trp-OH)) sem szintetikus, sem analitikai szempontokból nem bizonyultak alkalmasnak arra, hogy

- velük rutinszerűen határozott szerkezetű oligomereket állítsunk elő (oldékonysági problémák, a konverzió nem ellenőrizhető, mellékreakciók a DCC-s aktiválások során), a termékeket nem sikerült tisztán, szilárd állapotban vagy kristályosan izolálni
2. A ftalil csoport lehasításánál a fölös hidrazintól megszabadulni nehéz, ezért a DETA aktív észteres szelektív acilezését előnyösebbnek tartjuk.
  3. A DETAPADA alacsony oldékonysága miatt nem alkalmas acilezésre
  4. Az 5-AF acilezése általában igen alacsony termeléssel jár

Új oligo-funkciós vegyületszarmazékokat állítottunk elő és bizonyítottuk (MS) a szerkezetüket. Ezekből az anyagokból, mint elemi építőkövekből építettük fel a kutatási tervben vázolt több amino- illetve karbonsav csoporttal rendelkező oligomer vegyületeket.

### **Összefoglalás (A kutatás várható hasznosítása)**

Jelentős kutatómunkát fordítottunk arra, hogy korábban kifejlesztett gyógyszerjelölt molekuláink (REVERSIN 121 és 205, TT232, GnRH-III) olyan származékait állítsuk elő, melyek alkalmasak arra, hogy egy funkciós csoportukon keresztül hordozóhoz köthetővé váljanak. Mivel az MDR1 néven ismert ATPáz membránfehérje, és a fehérje tirozin kináz (PTK) nevű membránfehérjék által mediált betegségeket általában csak rosszul oldható és ezért a gyakorlatban kevésbé hatékony hidrofób vegyületekkel lehet szelektíven gátolni, ezért a peptidszerű (= -CONH- karboxamid kötések és az oldékonyságot elősegítő tercier nitrogén atomot tartalmazó) anyagok, anti-MDR és -TKI hatású vegyületek szintézisét és vizsgálatát végeztük el.

A fent leírt új anyagoknak a közismerten kedvező biológiai aktív (főleg antitumor hatású) „monomer” molekulákhoz képest előnyösebb lehet a biológiai felszívódása (orális készítménnyé való fejlesztése), a biológiai hatásspektruma (hosszantartó hatás), az enzimekkel szembeni viselkedése (rezisztencia) stb. Az önmagukban is hatékony anyagok (pl. GnRHI, MDRI és TKI) számos, itt nem részletezett előnytelen tulajdonságával szemben az előállítandó új kémiai szerkezetű oligomer vegyületek más fizikokémiai tulajdonságaik révén klinikai szempontból kedvezőbbek lehetnek egy-egy új gyógyszer kifejlesztése esetén, továbbá hasznos információkat adhatnak a polimerhez kötött bioaktív konjugátumok hatásmechanizmusának felderítéséhez. Az oligomer hordozóra kapcsolt biológiai aktív peptidszarmazékok új típusú rákellenes depó készítmények kifejlesztésének és szabadalmaztatásának alapjait teremthetik meg.

**Különösen jelentős eredmények tartjuk, hogy új vegyületeinkkel jelentősen lehet stimulálni, illetve gátolni az angiogenezist.** Az új vegyületeink szabadalmaztatását azért indítottuk el, mert a további gyógyszerfejlesztés elősegítése érdekében iparjogvédelmet szeretnénk biztosítani azon originális szerkezetű anyagok számára, melyek remélhetőleg in vivo is hatékonyaknak bizonyulnak.

Mivel az ATP foszfát csoportjával kapcsolatos molekuláris folyamatok jelentős szerepet játszanak a sejtosztódási és tumornövekedési folyamatokban, ezért a szelektív antiMDR, antiPTK, antiGnRH hatású peptidszerű anyagok a rákos megbetegedések jövőbeni gyógyszereinek tekinthetők. A kutatási program keretében szintetizált és vizsgált vegyületeinket hatásmechanizmusának molekuláris paramétereit nemzetközi szakfolyóiratokban illetve konferenciákon publikáljuk.

A kidolgozott szintézisekkel elő lehet állítani olyan aminosavak és peptidek karbonsav származékait, melyek 2-8 aminosav-tagszámú biológiai aktív vegyületeket eredményeznek.

1. *Anikó Horváth, Colleen Olive, Michael F. Good, István Tóth, A synthetic group A streptococcal vaccine of high purity and broad protective range*, 3rd International and 28th European Peptide Symposium Prague, Sept 5-10, 2004 Konferenciakiadvány p. 1119-1120, (proceeding)
  2. *Kéri Gy, Órfi L, Erős D, Hegymegi-Barakonyi B, Szántai-Kis Cs, Horváth Z, Wácsek F, Marosfalvy J, Szabadkai I, Pató J, Greff Z, Hafenbradl D, Daub H, Müller G, Klebl B, Ullrich A. Signal Transduction Therapy with Rationally Designed Kinase Inhibitors. Current Signal Transduction Therapy 1 : 67-95, 2006 I.F.:0* (OTKA szám nincs feltüntetve)
  3. *Keri Gyorgy Dr (Hu); Szolcsanyi Janos Dr (Hu); Pinter Erika Dr (Hu); Helyes Zsuzsanna Dr (Hu); Erchegeyi Judit Dr (Hu); Horvath Aniko Dr (Hu) Use Of Phenylhydrazone Derivatives As Antiinflammatory Or Analgetic Agents ES2251803T 2006 (szabadalom)*
  4. *Klebl Bert (De); Baumann Matthias (De); Hoppe Edmund (De); Brehmer Dirk (De); Daub Henrik (De); Kéri György (Hu); Varga Zoltán (Hu); Marosfalvi Jenő (Hu); Órfi László (Hu) Pyrimidine Derivatives WO2006021458, 2006 (szabadalom)*
  5. *Magdolna Kovács, Borbála Vincze, Judit E. Horváth, János Seprődi. Structure-activity study on the LH- and FSH-releasing and anticancer effects of gonadotropin-releasing hormone-III analogs. Peptides (accepted for publication) 2006 (Az OTKA szám feltüntetésével).*
  6. *Tejeda M, Gaál D, Hullán L, Hegymegi-Barakonyi B and Kéri Gy. Evaluation of the Antitumor Efficacy of the Somatostatin Structural Derivative TT-232 on Different Tumor Models. Anticancer Research 26 : 3477-3484 2006. I. F. : 1.395* (OTKA szám nincs feltüntetve)
  7. *Horváth Anikó, Vántus Tibor, Seprődi János, Idei Miklós, Tanai Henrietta, Bökönyi Györgyi, Tóvári József, Kéri György: Angiogenesisre ható peptidok és peptidomimetikumok tervezése és szintézise. MTA Peptidbiokémiai Munkabizottság (Balatonszemes, 2006. (előadás)*
  8. *Anikó Horváth, János Seprődi, Tibor Vántus, József Tóvári, István Kenessey, Henrietta Tanai, Gyöngyi Bökönyi, György Kéri. Development of Bioactive Substances for Angiogenesis. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kobe Gakuin University, Kobe, (Japan) 2006. (előadás).*
  9. *Anikó Horváth, János Seprődi, Tibor Vántus, Miklós Idei, Gyöngyi Bökönyi, József Tóvári, György Kéri. Effect of new synthetic peptides and peptidomimetics on angiogenesis. International Conference of the 43rd Japanese Peptide Symposium and 4th Peptide Engineering Meeting. 43JPS/PEM4, Yokohama, November 5-8, 2006. P124 . (abstract)*
  10. *Anikó Horváth, János Seprődi, Tibor Vántus, Miklós Idei, Gyöngyi Bökönyi, József Tóvári, István Kenessey, György Kéri. Effect of new synthetic peptides and peptidomimetics on angiogenesis. Peptide Science 2006. Eds. Hitoshi Isida and Hisakazu Mihara, Japanese Peptide Society. 249-250, 2006. (közlemény)*
  11. *Anikó Horváth, György Kéri, József Tóvári, János Seprődi, Tibor Vántus, István Kenessey, Miklós Idei, Tanai Henrietta. Peptides for activation of angiogenesis, pharmaceutical compounds containing same and use of these compounds. Magyar szabadalmi bejelentés, 2006.10. 27. (aktaszám:102369-9535 PT/TM)*
- Seprődi János, Horváth Anikó, Transzporterek kinázok és gátlás, stimulálás, gyógyszerrezisztencia diagnosztizálás, Új aminosav és peptidszármazékok tervezése és szintézise, KKK Dobogókő, (2003)*
- Seprődi János, Vincze Borbála<sup>1</sup>, Hallgas Balázs, Idei Miklós, Kovács Magda<sup>2</sup>, Tóth Géza<sup>3</sup>, Kéri György, GnRH analógok és MDR ellenes peptidok szintézise és vizsgálata. A Peptidkémiai Munkabizottság és az Nukleotidkémiai Munkabizottság együttes tudományos ülése, 2003. május 26-28, Balatonszemes*



**Készülőfélben lévő publikációk**

12. A.Horváth J.Sepródi,T.Vántus, M.Idei, G. Bökönyi, J. Tóvári, I.Kenessey, G.Kéri, Stimulation and inhibition of angiogenesis and vasculogenesis. Cikk kézirat készül **az OTKA szám feltüntetésével**
13. Idei Miklós, Kéri György et.al. Investigation of peptide and peptidomimetics HPLC, kézirat **elfogadásra benyújtva az OTKA szám feltüntetésével**
14. Kéri György, Örfi László, Bánhegyi Péter és mts, Új kinázgátló molekulák szintézise és vizsgálata. (Cikk **kéziratban az OTKA szám feltüntetésével**)
15. Vántus Tibor, Kéri György, Seprődi János és mts. Cikk készülőben az OTKA szám feltüntetésével
16. Sarkadi Balázs, Seprődi János, Glavnas Hristos, Hegedűs Tamás etc, Effects of oligomeric peptidomimetics on MDR. Cikk előkészületben 2007 .
17. A.Horváth J.Seprődi,T.Vántus, M.Idei, J. Tóvári, I.Kenessey, G.Kéri, **Use Of amino acid derivatives As Antiinflammatory Or Analgetic Agents**, Cikk készülőben **az OTKA szám feltüntetésével**
18. A.Horváth J.Sepródi,T.Vántus, M.Idei, G. Bökönyi,, J. Tóvári, I.Kenessey, G.Kéri, **Neurogén** gyulladásgátló molekulák előállítása és alkalmazása, **Szabadalmi bejelentés** Benyújtásra előkészítve.

