

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Új típusú peptid nukleinsavak és furanózgyűrűn
módosított nukleozidok szintézise**

Bege Miklós

Témavezető: Prof. Dr. Borbás Anikó



Debreceni Egyetem

Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2022

Új típusú peptid nukleinsavak és furanózcycűrűn módosított nukleozidok szintézise

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti kémia tudományágban

Írta: Bege Miklós okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
(Farmakológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Borbás Anikó, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Kurtán Tibor, az MTA doktora
Prof. Dr. Perjési Pál, PhD

A doktori szigorlat időpontja: online (Cisco Webex)
2022.05.11. 13:00

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Szakonyi Zsolt, az MTA doktora
Dr. Juhász László, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Szakonyi Zsolt, az MTA doktora
Dr. Juhász László, PhD
Prof. Dr. Kurtán Tibor, az MTA doktora
Prof. Dr. Perjési Pál, PhD

Az értekezés védésének időpontja: online (Cisco Webex)
2022.04.11. 14:00

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni, úgy jelezze a miksaprof@gmail.com e-mail címre küldött üzenetben a vitát megelőző munkanap (2022.05.10.) 16 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	5
2. Irodalmi előzmények.....	5
2.1. Természetes nukleozidok és nukleozidszármazékok	5
2.2. Természetes nukleinsavak	5
2.4. Peptid-nukleinsavak.....	6
2.5. Nukleozidanalóg gyógyszerek.....	6
2.6. Tioladdíció.....	6
3. Célkitűzés	8
4. Módszerek	8
5. Az értekezés új tudományos eredményei	8
5.1. Nukleozidok tioladdíciói	8
5.1.1. Uridin és ribotimidinszármazékok tioladdíciós reakciói	9
5.1.2. Adenozinszármazékok tioladdíciói	11
5.2. Ciszteinil nukleinsavak szintézise	11
5.2.1. Ciszteinil-uridin monomerek előállítása tioladdícióval	11
5.2.2. Ciszteinil-adenozin monomerek előállítása tioladdícióval	12
5.2.3. Ciszteinil-adenozin és -uridin monomerek előállítása nukleofil szubsztitúcióval..	12
5.2.4. Homonukleozid monomerek előállítása uridinből, adenozinból ill. citidinből.....	12
5.2.5. Dimerizálás és oligomerizálás	12
6. Összefoglalás.....	13
8. Tudományos közlemények.....	15

Rövidítések jegyzéke

ATP: adenzin-trifoszfát

cAMP= ciklikus adenzin-monofoszfát

cGMP= ciklikus guanozin-monofoszfát

DCC= diciklohexil-karbodiimid

DNS= dezoxiribonukleinsav

DPAP= 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenon

Ekv.= ekvivalens

Fmoc= 9-fluorenil-metoxikarbonil

hA: homoadenzin

hU: homouridin

LNS: lakatolt-nukleinsav

NAD= nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADP= nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

PNS= peptid-nukleinsav

PRNS: peptid-ribonukleinsav

RNS= ribonukleinsav

TBDMS= terc-butil-dimetilszilil

1. Bevezetés

A nukleozid- és nukleinsavanalógok jelentős terápiás potenciállal rendelkeznek. Munkánk során cisztein nukleozidokhoz kapcsolásával olyan vegyületeket állítottunk elő, amelyek nemcsak monomer formában rendelkezhetnek érdekes biológiai tulajdonságokkal, hanem oligomerizálva őket új típusú nukleinsavanalógokat nyerhetünk. Különböző stratégiákat dolgoztunk ki a peptidszintézis alapanyagául szolgáló monomerek előállítására, és ezeket végigvittük 2 komplementer nukleozidon: adenzinon és uridinon, valamint oligopeptideket is előállítottunk.

A fotokatalitikus tioladdíció egy előnyös tulajdonságokkal rendelkező reakció, amit széles körben használnak a „klikk” kémiában, a kémiai biológiában és a szénhidrátkémiában, viszont mindeddig nem kísérleteztek vele a nukleozidkémiaiában. Számtalan reakciókörülményt vizsgálva különböző telítetlen nukleozidszármazékokon nagyon érdekes felfedezéseket tettünk a reakció hozamának és szelektivitásának befolyásolására, valamint nagyszámú új, figyelemreméltó biológiai aktivitással rendelkező vegyületet állítottunk elő.

2. Irodalmi előzmények

2.1. Természetes nukleozidok és nukleozidszármazékok

A nukleozidok és származékaik változatos biológiai feladatokat látnak el: részt vesznek a jelátviteli folyamatokban (cAMP, cGMP), a sejtek energiaháztartásában (ATP, NADH) vagy növények esetében a fotoszintézisben (NADP).

2.2. Természetes nukleinsavak

A természetes nukleinsavakban egy cukor-foszfát lánchoz kapcsolódnak a nukleobázisok. A nukleinsav két legfontosabb tulajdonsága a gerinc milyensége, ami természetes nukleinsavak esetén egy sokszorosán negatív töltésű, polianionos váz, valamint a bázisok sorrendje. A megfelelő bázissorrendű nukleinsavak, amelyekben egymással szemben olyan bázisok találhatóak, amelyek donor és akceptor csoportjai megfelelő pozícióban vannak hidrogénkötések kialakításához, rendkívül erősen képesek egymáshoz kötődni, kétszálú struktúrákat képezve. A bázisok sorrendje tehát meghatározza, hogy egy adott nukleinsav milyen szekvenciájú másik nukleinsavhoz tud hibridizálni. A nukleinsavakat szerkezetük és funkcióik alapján két fő csoportra oszthatjuk. A DNS felel a genetikai információ hosszú távú tárolásáért a sejtmagban, míg az RNS sokkal szélesebb körű funkciókkal rendelkezik.

2.3. Szintetikus nukleinsavanalógok

A természetes nukleinsavak a nukleázokkal szembeni érzékenysükből következő alacsony féléletidejük miatt kevésbé alkalmasak biológiai felhasználásra, pl. géncsendesítésre. Ezért a gyakorlatban (mind kísérleti, mind terápiás céllal) olyan szintetikus nukleinsavanalógokat használnak, amik a természetes nukleinsavakhoz képest valamilyen módosítást tartalmaznak. A változtatás érintheti a bázist, a cukor-komponenst vagy az internukleotid kötést. A módosítás fő célja a stabilitás növelése, de fontos szempont a kötődés megfelelő erőssége, a vegyület sejtbe való bejutási képességének

növelése, valamint hogy a származék alkalmas legyen tripla hélix képzésre, ill. képes legyen aktiválni az RNáz-okat. Természetesen ugyanazon a molekulán belül többféle módosítás is előfordulhat. A legfontosabb ilyen származékok a foszforotioát típusú nukleinsavak, az LNS-ek, a 2'-O-alkilcsoportot tartalmazó származékok, valamint a peptid-nukleinsavak.

2.4. Peptid-nukleinsavak

A peptid-nukleinsavakat (PNS) 1991-ben fejlesztették ki Nielsen és mtsai. Az eredeti PNS-ekben a nukleinsavak polianionos cukor-foszfát gerincét semleges oligo *N*-(2-aminoetil)-glicin vázra (AegPNS) cserélték, amelyben az aminoetil rész aminocsoportja és a következő monomer karboxilja között alakítanak ki amidkötést, míg a glicin nitrogénjéhez egy metilénkarbonil hídon keresztül kapcsolódnak a nukleobázisok. Azóta az alap AegPNS-en kívül kifejlesztettek számtalan variáns, többek között olyanokat is, melyek tartalmazzák az egész nukleozidot (PRNS), nem csak a bázist. A PNS alapváz tehát akirális, aciklikus, elektromosan semleges, és nem tartalmaz szénhidrát komponenset. Ezek a változtatások kézzelfogható előnyökkel járnak. A semleges oligo-aminoetilglicin szál és a komplementer nukleinsav váza között nincs a kötődést csökkentő elektromos taszítás, mint a sokszorosan negatív töltésű foszfátészter gerincek között. Ennek megfelelően a peptid-nukleinsavak DNS-ekhez is kiválóan, RNS-ekhez pedig még jobban kötődnek, rendkívül stabil duplexeket képezve; ugyanakkor a szelektivitás is magasabb fokú. Minthogy nem foszfátészterkötések kapcsolják össze a monomereket, a PNS-ek rezisztensek a nukleázokkal szemben, ráadásul a bennük lévő amidkötés nem a szervezetben leginkább előforduló α -peptidkötés, ezért a peptidázoknak is nagymértékben ellenállnak. Savakra és gyenge bázisokra sem érzékenyek, ami különösen előnyös a szintézis során.

2.5. Nukleozidanalóg gyógyszerek

A nukleozidok fentebb tárgyalt, sokrétű biológiai szerepei lehetővé teszik, hogy származékaikat a gyógyászat különböző területein használjuk. Ennek alapja elsősorban az, hogy olyan vegyületeket állítanak elő, melyek a természetes nukleozidokkal való szerkezeti rokonság miatt képesek kölcsönhatásba lépni a számos nukleozid-felismerő enzim valamelyikével, és annak működését befolyásolni, vagy beépülni a szintetizálódó természetes nukleinsavakba. Kísérleti céllal számos különböző nukleozidalapú vegyületet állítottak már elő változatos biológiai hatásokkal, a klinikumban azonban a tumor- (trifluridin, citarabin, 5-fluoruracil stb.) és vírusellenes kemoterápiában van nagy jelentősége az ilyen származékoknak. Utóbbiak közé tartoznak többek között herpesz- (aciklovir, ganciklovir), HIV (zidovudin, didanozin) ill. koronavírusellenes (favipiravir, remdezivir) anyagok.

2.6. Tioladdíció

Mivel a PhD munkám során az egyik legfontosabb szintetikus módszer volt, áttekintem a tioladdíció, más nével tiol-én kapcsolás (TEC) vagy tio-klikk reakció tulajdonságait.

Általában a tioladdíciót az ún. „klick” reakciók közé sorolják. Ezek a reakciók viszonylag egyszerűen és gyorsan, jó hozammal, atomhasznosulással és szelektivitással végrehajthatóak, és

kompatibilisek reaktánsok és oldószerek széles körével. A TEC reakciókat 2 csoportra oszthatjuk: tiolok Michael addíciója elektronhiányos C-C kettős kötésre katalizátor jelenlétében tioláton keresztül, valamint gyökös mechanizmusú addíció, mely esetben „anti-Markovnyikov” termékek keletkeznek. Mivel a dolgozat alapjául végzett munka keretei között az utóbbival foglalkoztam, az alábbiakban csak azt tárgyalom.

A gyökös mechanizmusú reakció során általában egy iniciátormolekula hatására gyök képződik a tiolból. Az elektrofil tiil gyök addíciónál a kettős kötésre, így egy széngyököt eredményez, ami egy újabb tiolmolekulából hidrogént elvonva ismét egy kéngyököt képez, és a folyamat kezdődik előlről. A legjellemzőbb láncletörő lépés a diszulfidképzés 2 tiilgyök rekombinálódásával. A tiilgyök reakciója az alkénnel gyors és reverzibilis lépés, hogy melyik irányba tolik el, az a kettőskötés elektronsűrűségétől, a kéngyök és a keletkező széngyök stabilitásától, valamint a körülményektől függ. A reakció előrehaladása szempontjából kulcsfontosságú, hogy a széngyök hidrogénabsztrakciója gyorsabb legyen, mint a bomlása. Napjainkban rendkívül elterjedtek a fotoaktivált tioladdíciók, ami esetében különböző hullámhosszúságú elektromágneses sugárzás okozza az iniciátor bomlását. A 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenon (DPAP) UV fény hatására hoz létre gyököket. A fotoiniciált gyökös reakciókon kívül a fotoredox aktiválás módszerek is rendkívül elterjedtek. Ezekben iniciátor helyett valamilyen katalizátort használnak, ami fény hatására gerjesztett állapotba kerül, és ez az aktivált katalizátor oxidálja a tiolt gyökkationná, amiből deprotonálódással keletkezik a kívánt tiilgyök, ami aztán a fentebb ismertetett útvonalon keresztül reagál az alkénnel, a katalizátor pedig különböző módokon (pl. oxigénnel való reakció által) visszaalakul a kiindulási állapotába. Fémkatalizátorokat (pl. trisz-(bipiridin)-ruténium-(II)-kloridot) vagy titándioxidot is használnak, de egyre elterjedtebbek az organokatalizátorok is, mint pl. a 9-mezitil-10-metilakridínium sók, eoinsárga, vagy bengálrózsa.

A felhasználható tiol és alkén partnerek széles köre, az enyhe körülmények és a szabadon megválasztható oldószer miatt a tioladdíció rendkívül széles körben elterjedt módszer a szintetikus kémiában. Használják többek között dendrimerek előállítására a polimerkémiában és a szénhidrátkémiában. A szénhidrátkémián belül használható glikokonjugátumok előállítására, és intramolekuláris reakcióval való tiocukorszintézisre is. Végeztek tioladdíciót szénhidrátok exo- és endociklikus kettős kötésére különböző tiolokkal, beleértve alifás és aromás tiolokat, tiocukrokat, merkaptóalkoholokat. Endoglikálok esetében a hozam és a sztereoszelektivitás mértéke függ az alkén szerkezetétől, 2-szubsztituált glikálokból általában kiváló szelektivitással 1,2-cisz- α -tioglikozidok keletkeznek. Mind a tiilgyök addíciója, mind a hidrogénabsztrakció axiális irányból kedvezményezett (tehát transz-diaxiális addíció történik). Hogy melyik axiális irány kedvezményezett, az a konformációtól is függ, a konformációt pedig a körülmények pl. a hőmérséklet, vagy az oldószer is befolyásolhatja, ezért a szelektivitás is befolyásolható ezek változtatásával.

3. Célkitűzés

PhD munkám célja volt olyan új, módosított nukleozidszármazékok előállítása tioladdícióval, melyek egyrészt különböző biológiai vizsgálatoknak (pl. sejttéteképességi vagy antivirális vizsgálat) vethetőek alá, valamint amelyek összekapcsolhatóak újfajta peptid-nukleinsavakká.

4. Módszerek

A reakciókat vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel követtük. A termékek tisztítását flash oszlopkromatográfiával hajtottuk végre. A vegyületek szerkezetét egy- és kétdimenziós ^1H , ^{13}C , COSY és HSQC NMR mérésekkel, illetve MALDI-ToF és ESI MS mérésekkel igazoltuk. Az optikai forgatóképességeket szobahőmérsékleten mértük automatikus polariméterrel.

A fotoiniciált tiol-én addíciós reakciókat bórszilikát edényben hajtottuk végre, a besugárzást 75 W teljesítményű higanylámpával végeztük, a maximális emissziós hullámhossz 365 nm volt. A higanylámpát kívülről vízhűtéses immerziós köpennyel védtük. A mintákat 10-50 mL űrtartalmú bórszilikát lombikokba tettük, és a lámpától legfeljebb 2 cm-re helyeztük el. A mintákat nem kevertettük a besugárzások alatt. Az alacsony hőmérsékleten végrehajtott reakciók esetében a lombikot hűtőfürdőbe helyeztük.

5. Az értekezés új tudományos eredményei

5.1. Nukleozidok tioladdíciói

Ahogy azt fentebb említettem, a szénhidrátkémiában nagy hagyománya van a tioladdíció sokrétű felhasználásának. Habár furanózgyűrűs exometilén származékokon hajtottak végre tioladdíciókat, korábban még senki nem próbálta ki, hogyan viselkednek különböző, a cukorgyűrűn telítetlen kötést hordozó nukleozidok a tioladdíció körülményei között. A korábbi eredmények alapján szénhidrátszármazékokon a fotoiniciált tioladdíció általánosan alkalmazott körülményei között, nem túl nagy tiolfelesleggel, szobahőmérsékleten jó hozamot és kiváló sztereoselektivitást lehetett elérni. Ennélfogva ez a reakció kiváló módszernek tűnt arra, hogy különböző merkaptánokat különböző nukleozidszármazékokkal összekapcsolva számos új vegyületet állítsunk elő, ami – ismerve a módosított nukleozidok széleskörű felhasználhatóságát – nagy mennyiségű potenciálisan biológiailag aktív, új vegyület szintézisét is jelentené. Munkám során teszteltem a nukleozidok tiol-én kapcsolásaiban rejlő lehetőségeket és korlátokat, optimalizáltam a körülményeket az egyes tiolokra és alkénekre, és létrehoztam egy vegyületkönyvtárat az új, szénhidrátrészen módosított nukleozid-analógokból. A Gyógyszerészi Kémiai Tanszék kooperációs kapcsolatainak köszönhetően az előállított származékok egy része különböző biológiai kísérletekbe (sejtviabilitási, vírusellenes, antibakteriális, maláriaellenes) lett bevonva.

5.1.1. Uridin és ribotimidinszármazékok tioladdíciós reakciói

Megfelelően védett uridinből és a ribotimidinből exometilén csoportot tartalmazó származékokat állítottam elő, majd tanulmányoztam ezek tioladdíciós reakcióit.

5.1.1.1. 4'-Exometilén uridin és ribotimidin származékok tioladdíciós reakciói

Az uridinből előállított 4'-exometilénen először egy egyszerű tiollal: *n*-propilmerkaptánnal teszteltük a tioladdíciót. Szénhidratos irodalmi analógia alapján jó hozamra és teljes *D-ribo* szelektivitásra számítottunk. Azonban 3 ekv. tiol alkalmazása mellett is csak 60%-os hozamot sikerült elérni, ráadásul 2:1 arányban képződött a *D-ribo* és az *L-lixo* izomer. Megvizsgáltunk más iniciálási módszereket is a konverzió javítása érdekében, azonban a hozamok mindegyik esetben, elmaradtak a fotoiniciált módszer kitermelésétől. Többek között AIBN-iniciálta reakciót is végeztünk. Az AIBN magas hőmérsékleten hasad gyökökre, ezért a reakciót 120 °C-on hajtottuk végre. Ebben az esetben 1,5:1 volt a *D-ribo*:*L-lixo* arány, ami arra utalt, hogy a magasabb hőmérséklet ront a sztereoszelektivitáson. A tanszéken párhuzamosan folytak kísérletek pirazonil endoglikálokon, és azok azt mutatták, hogy a hűtés jelentősen javítja a konverziót, ezért kipróbáltuk, hogy mi történik, ha lehűtjük a reakcióelegyet. -30 °C-on tolulban, mindössze 2 ekv. tiol használata mellett fotoiniciált körülmények között 88%-os sikerült elérni, és a főtermék *ribo* vegyület aránya megduplázódott a szobahőmérsékletű reakcióéhoz képest. -80 °C-on, egyébként az előzővel azonos körülményeket alkalmazva már 5:1 diaszteromer arányt sikerült elérni, míg a hozam érdemben nem változott.

Miután optimalizáltam a körülményeket, és sikerült mind a hozamon, mind a szelektivitáson sokat javítani, a továbbiakban csak a legjobbnak bizonyult fotoiniciációs módszert alkalmaztam a nukleozidok tioladdíciós reakcióiban. Elsőként uridin-4'-exometiléneket reagáltattam -80 °C-on különböző tiollokkal, beleértve alkiltiolokat, aminosavszármazékokat és tiocukrokat. Primer tiolok esetében általában jó, vagy kiváló hozamot és sztereoszelektivitást lehetett elérni és mindig a *ribo* izomer volt a főtermék. *t*-Butilmerkaptán esetében viszont hűtés hatására a *lixo* izomer arány növekedett meg, ami a szelektivitás csökkenését eredményezte (3:1 *ribo*:*lixo* arányról 2:1-re). 1-Tiocukrok reakciója során pedig érdekes módon a tiol partner konfigurációja is befolyásolta a reakció sztereokémiai kimenetelét, 1-tiomannózzal *D-ribo*, míg *glüko*- és *galakto*-konfigurációjú tiollokkal *L-lixo* szelektivitással mentek végbe a reakciók. A ribotimidin 4'-exometilén esetében nem volt jelentős eltérés az uridinszármazékok reakcióihoz képest.

5.1.1.2. 3'-Exometilén uridin és ribotimidin származékok tioladdíciós reakciói

A 2',5-helyzetben sziliéterrel védett uridin és ribotimidin 3'-pozíciójában exometilén csoportot alakítottam ki, majd ezeken a származékokon folytattam a tioladdíciós reakció tanulmányozását. A 4'-exometilének esetében tapasztaltak miatt először -80 °C-on hajtottam végre tioladdíciókat. Egyszerű alkiltiolokat reakcióiban azt tapasztaltam, hogy az alkillánc növekedésével (feltehetően a hosszabb alkillánc a nagyobb elektronküldő képessége miatt stabilizálja az elektrofil tiil gyököt) csökken a

reaktivitás. Így a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on túl alacsony, vagy zéró konverzió miatt magasabb hőmérsékleten végeztem a reakciókat. Azonban a *n*-butilmerkaptán reakciói azt mutatták, hogy a túl magas hőmérséklet jelentősen rontotta a szteroselektivitást. Az említett reakciók esetében $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on nem volt érdemi konverzió, $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 62%-os hozammal és 20:1 *D-xilo*:*D-ribo* izomerarányal képződtek a termékek, míg $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on a hozam már nem nőtt jelentősen, a szteroselektivitás viszont a felére csökkent. A legnagyobb szénláncú oktil- és dodecil-merkaptánok esetében $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on is rendkívül alacsony hozamot sikerült elérni. A tioecetsav meglepően kis reaktivitást mutatott az addíciós reakcióban ($0\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on is csak 26%-os kitermelés), ennek köze lehet a tiol savasságához, ami miatt gyökképződés helyett hajlamosabb lehet a deprotonálódásra. A MesNa (merkaptó-etánszulfonsav-nátriumsó) az alkiltiolokhoz hasonlóan viselkedett.

A 3'-helyzetű kettőskötésen végzett addícióknál szobahőmérsékleten és hidegen is magasabb fokú szelektivitást tapasztaltunk, mint a 4'-származékok esetében. Meglepő módon mindig a *D-xilo* izomer volt a főtermék, vagyis a tioladdíció konfigurációs inverziót eredményezett a kiindulási nukleozid C3'-helyzetében. Ez két szempontból is meglepő. Egyrészt az irodalomban van példa glükofuranóz 3-exometilén tioladdíciójára, ami teljes *D-glüko* szelektivitással ment végbe, és ennek alapján azt vártuk, hogy a *D-ribo* konfiguráció lesz a kedvezményezett. Másrészt, míg a 4'-exometilénen az 1-tiocukrok addíciói ellentétes szteroselektivitással mentek végbe, mint a nyílt láncú tiolokkal végzett addíciók, a 3'-exometilén addícióinál sehol sem figyeltünk meg ellentétes szelektivitást. Habár a sztereoselektivitás mértéke tiolanként és hőmérsékletenként eltért, mindig a *D-xilo* izomer képződött nagyobb mennyiségben. Mindezekből látható, hogy ez a módszer alkalmas változatos *D-xilo* konfigurációjú nukleozidszármazékok előállítására, többnyire jó hozammal és kiváló szelektivitással.

A 3'-módosított *D-xilofuranozil* nukleozidszármazékok egy részén a Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszéken sejteletképeségi vizsgálatokat végeztek HaCaT egészséges és SCC-VII tumoros sejtvonalakon. Az alkiláncot hordozó vegyületek, a dodecilláncot tartalmazó vegyület kivételével, citosztatikus hatást mutattak $10\text{--}30\text{ }\mu\text{M}$ -os koncentrációban, a tumoros sejtekre nézve enyhe szelektivitással.

Széles spektrumú antivirális vizsgálatok történtek a belgiumi Rega Intézetben. Néhány vegyület kiváló antivirális hatást mutatott vakciniavírus, sárgalázvírus és humán koronavírus (229E törzs) ellen. Utóbbiak közül különösen a β -glükóz-peracetátot és α -mannóz-peracetátot hordozó vegyületek érdekesek, ugyanis azok gyakorlatilag nem mutattak citotoxicitást. Humán CoV 229E koronavírus ellen a glükóztartalmú származék $\text{EC}_{50} = 8\text{ }\mu\text{M}$ értékkel rendelkezett, míg a mannóztartalmú analógja ez ellen a vírus ellen nem mutatott aktivitást. Eszerint a nukleozidhoz kapcsolódó szénhidrát konfigurációja meghatározó az antivirális hatás szempontjából.

5.1.1.3. 2'-Exometilén uridin és ribotimidin származékok addíciós reakciói

Kétféle védőcsoportot hordozó 2'-exometilént állítottam elő uridinből és ribotimidinből: 3',5'-helyzetben TBDMS-csoportot tartalmazó, valamint 3',5'-szililénacetállal védett származékokat. Az előbbi esetben egyszerű alkiltiolok (PrSH, BuSH) és tiocukrok reakciói során is jelentős *arabino* szelektivitást tapasztaltunk mind szobahőn, mind -80 °C-on. Alkiltiolok esetében a szililénacetállal védett vegyületek addíciói hasonló eredményt hoztak, míg a tiocukrok esetében jelentősen romlott a szelektivitás, ami arra utal, hogy a védőcsoportok is képesek befolyásolni a sztereoszelektivitást.

5.1.2. Adenozinszármazékok tioladdíciói

Az uridin és ribotimidin addíciói után a purinvázis adenozin tioladdíciós reakcióit tanulmányoztam. A 2',3'-izopropilidencsoporttal védett adenozin 4'-exometilénnel csak néhány tioladdíciót hajtottam végre, ezek közül ebben a részben az 1-tioglikóz-peracetát tioladdícióját ismertettem. Fotoiniciált körülmények között, -80 °C-on 1:3 arányban képződött a *D-ribo* és az *L-lixo* termék, ami megfelel az analóg uridin-exometilén esetében tapasztalt aránynak. Az így kapott adenozinszármazék kiváló hatást mutatott plazmodium ellen (66,15 nM IC₅₀ érték Pf3D7 ellen)..

5.2. Ciszteinil nukleinsavak szintézise

A PhD munkám egyik célkitűzése volt olyan nukleozidszármazékok szintézise, amelyek alkalmasak lehetnek új típusú peptid-nukleinsavak előállítására. Ehhez tervbe vettük aminosav-nukleozid konjugátumok előállítását, melyek peptidkémia módszerekkel összekapcsolhatóak egymással, és így olyan peptidgerincű nukleinsavanalógokat kapunk, melyek a „klasszikus” peptid-nukleinsavakkal ellentétben nemcsak a nukleobázist, hanem a nukleozid furanózgyűrűjét is tartalmazzák. A monomer egységek szintéziséhez mind a nukleozid-, mind az aminosav részen megfelelő védőcsoportokat tartalmazó ciszteinil-nukleozidokat kell előállítani, amire – a cisztein tiolcsoportja miatt - egy alkalmas módszer lehet a tioladdíció. A másik lehetséges módszer a megfelelő pozícióban jó távozócsoportot tartalmazó nukleozidon végrehajtott nukleofil szubsztitúció. Mindkét reakcióutat kipróbáltam, hogy összehasonlíthassuk a teljesítőképességüket, előnyeiket, hátrányaikat.

5.2.1. Ciszteinil-uridin monomerek előállítása tioladdícióval

Két ciszteinszármazékot, az *N*-acetilciszteint és az Fmoc-ciszteint vontuk be a kísérletekbe. Az Fmoc védőcsoport használata általánosan elterjedt a peptidkémiaiban elsősorban azért, mert a hasítása enyhe körülményeket igényel. A nukleozidszármazékok tioladdíciós reakcióival kapcsolatban felgyűlt tapasztalatok alapján -80 °C-on végeztük a fotoiniciált tioladdíciókat, és mindkét esetben kiváló hozammal és sztereoszelektivitással képződött a kívánt termék. Az így kapott, Fmoc védett vegyület alkalmas lenne szilárd fázisú peptidszintézissel megvalósított oligomerszintézisre is, ám az egyébként figyelemreméltó, 91%-os izomertisztaság erre a célra nem volt elegendő.

5.2.2. Ciszteinil-adenozin monomerek előállítása tioladdícióval

A ciszteinil-adenozint az izopropilidénezett 4'-exometilénből terveztem előállítani az uridinszármazék reakcióival analóg módon. Mivel az 1-tioglükóz addíciója hasonló sztereoszelektivitással ment végbe telítetlen uridinen és adenzinon, azt vártuk, hogy ebben az esetben is az uridinanalóghoz hasonló hozamot és izomertisztaságot sikerül elérni. Azonban ugyanolyan körülmények között 2:1 arányban képződött a *D-ribo* és az *L-lixo* termék, ami azt bizonyítja, hogy a nukleobázis milyensége nagymértékben képes befolyásolni a szelektivitást. Mivel a kívánt ciszteinil-adenozinszármazék előállítására a tioladdíció nem volt alkalmas, más módszert kellett találnunk.

5.2.3. Ciszteinil-adenozin és -uridin monomerek előállítása nukleofil szubsztitúcióval

A másik módszer, ami alkalmas lehet a ciszteinil-nukleozidok előállítására: a tiolokkal végzett nukleofil szubsztitúció, ehhez megfelelően védett, 5'-helyzetben távozócsoportot tartalmazó nukleozidokat kellett előállítani.

2',3'-Helyzetben TBDMS ill. izopropilidén csoportokkal ellátott 5'-jódszármazékokat szintetizáltam uridinből, melyekre különböző, védett ciszteinszármazékokat kapcsoltam, majd az így nyert C-, és N-terminális monomereket dipeptidekké kapcsoltam össze. Előállítottuk a 2',3'-O-izopropilidénezett, a ciszteinen N-Fmoc csoportot tartalmazó konjugátumot is, melyet aztán szilárd fázisú peptidszintézisre használtunk.

Az adenzinből is előállítottam az 5'-helyzetben jódot tartalmazó származékot. Sajnos azonban ezen a származékon enyhe körülmények között (Cs_2CO_3 , 0 °C) nem játszódtott le a nukleofil csere, míg erősebb körülmények (NaOH, 80 °C) között a kiindulási anyagok bomlását figyeltük meg. A peptidkapcsolásra alkalmas adenzil-cisztein monomert tehát ezen az útvonalon sem sikerült előállítani.

5.2.4. Homonukleozid monomerek előállítása uridinből, adenzinből ill. citidinből

Mivel a nukleofil szubsztitúció túl erősebb körülményeket igényelt, a tioladdíció pedig az adenzin esetében nem bizonyult elég sztereoszelektívnek, egy új módszert dolgoztunk ki a ciszteinil-nukleozid monomerek szintézisére. A megfelelően védett uridin, adenzin és citidinszármazékokat 5'-helyzetben aldehiddé oxidálva, majd Wittig reakciót végrehajtva 5'-6' telítetlen, lánchosszabbított alkéneket állítottam elő. Ezeken a származékon végrehajtható az enyhe körülményeket igénylő tioladdíció, és mivel a reakció során nem képződik új kiralitáscentrum, nem merülnek fel sztereoszelektivitási problémák. Sajnálatos módon ezekben az esetekben a hozam jelentősen alacsonyabb volt, mint a 4'-exometilének esetében, és a reakciókörülmények változtatásával is csak mérsékelt növekedést sikerült elérni.

5.2.5. Dimerizálás és oligomerizálás

A megfelelően védett C-, és N-terminálisként funkcionáló monomerekből oldatfázisú peptidszintézissel dimereket állítottam elő. Uridinből egy, a hidroxilcsoportjain TBDMS csoportokkal

védett homodimert állítottam elő. A lánchosszabított monomerekből pedig hUhU, hAhA és hAhU dimereket szintetizáltunk.

Egy hosszabb oligomert is előállítottunk szilárd fázisú peptidszintézissel. Mivel a hatékony kapcsolási ciklusokhoz nagy feleslegben kell alkalmazni a monomert, ezért a rendelkezésre álló izopropilidén, ill. Fmoc védőcsoportokat tartalmazó uridin-monomer egy pentamer hosszúságú vegyületre volt elegendő. A szilárd hordozó szerepét Wang gyanta töltötte míg kapcsolóágensként DCC-t és HOBt-t használtam. A kész peptidet lehasítottam a gyantáról, majd flash kromatográfiával és géliszűrőssel előtisztítottam. A végső tisztítás és karakterizálás HPLC-vel történt.

6. Összefoglalás

PhD munkám célja új, potenciálisan biológiailag aktív nukleozid- és nukleinsavszármazékok szintézise volt. Ehhez szintetikus módszernek a tiol-én kapcsolást választottuk. Nukleozidok cukorgyűrűjén a világon elsőként hajtottunk végre gyökös tioladdíciót. Vizsgáltam a hozam és a sztereoszelektivitás összefüggéseit a reakciókörülményekkel: a hőmérséklettel, oldószerrel, iniciálási módszerrel. Továbbá tanulmányoztam a tiol és az alkén szerkezetének hatását, beleértve a kettőskötés helyzetét, az alkalmazott védőcsoportokat és a nukleobázis hatását. Négy nukleozidot (uridin, ribotimidin, adenzin, citidin) vontunk be a kísérletekbe, és több tucat új 2'-, 3'- és 5'-módosított származékot állítottunk elő. A reakciókörülmények optimalizálása után az esetek többségében jó vagy kiváló hozamot és sztereoszelektivitást lehetett elérni. A hűtésnek általában meghatározó szerepe van mindkettő növelésében. Uridin és ribotimidin esetében ezzel a módszerrel hatékonyan lehet nem-természetes konfigurációjú *D-arabino* és *D-xilo* konfigurációjú nukleozidokat előállítani, melyeket kooperációs partnereink segítségével különböző biológiai vizsgálatoknak vetettünk alá. A 3'-módosított, *D-xilo* konfigurációjú származékok közül az alkil-csoportot hordozó vegyületek figyelemre méltó citosztatikus hatást, míg a szénhidrát-csoportot hordozók vírusellenes hatást mutattak, az adenozinszármazékok pedig maláriaellenes hatásúnak bizonyultak.

A cisztein-nukleinsavak mint teljesen új szerkezetű peptid-nukleinsavak szintézise során komoly problémát jelentett, hogy a tioladdícióval előállított monomerek mindig tartalmaznak valamennyi diasztereoizomert szennyezőként, míg az érélyesebb körülményeket igénylő nukleofil csere nem alkalmazható minden nukleozidon. Végül egy alternatív úton, telítetlen homonukleozidok tioladdícióival sikerült oligomerizációra alkalmas ciszteinil-nukleozid monomert előállítani minden vizsgált nukleozidból. Ebben az esetben az alacsony hozam jelentett kihívást, de a körülmények változtatásával sikerült némi növekedést elérni a hozamban. Ez a módszer minden vizsgált nukleobázis esetén működőképesnek bizonyult, és több, peptidkapcsolásra alkalmas monomert is sikerült előállítani a segítségével, továbbá ezekből néhány dipeptidet szintetizálni. Végül pedig szilárd fázisú szintézis segítségével, hagyományos peptidkémiai módszerekkel előállítottam egy ciszteinil-uridin pentamert.

7. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek Prof. Dr. Borbás Anikónak, aki lehetővé tette doktori munkám végzését a tanszéken és folyamatosan koordinálta a munkámat az elméleti és a gyakorlati síkon egyaránt.

Külön köszönetem Kicsák Máténak, Szűcs Zsoltnak és Varga Mariannak a rendszeres gyakorlati segítségükért és jótanácsaikért.

Köszönöm Bakai-Bereczki Ilonának és Csávás Magdolnának a vegyületek MS spektrumainak felvételét.

Köszönet illeti Kicsák Mátét, Eszenyi Dánielt és Mező Erikát, az NMR spektrumok felvételéért, amíg én meg nem szereztem az NMR operátori képesítést.

Köszönöm a Klinikai Kutatóközpontból Dr. Pénzes-Daku Krisztinának a segítséget a szilárd fázisú peptidszintézis kivitelezésében. Köszönet Ferenc Györgyinek a Szegedi Biológiai Kutatóközpontból a pentamer HPLC tisztításáért.

Köszönet az antivirális vizsgálatok elvégzéséért Lieve Neasensnek, a maláriaellenes vizsgálatokért Brijesh Rathinak, a sejtleletképeségi vizsgálatok elvégzéséért pedig Kiss Alexandrának.

Köszönetet mondok Varga Mariannak és Fekete Dórának a vegyületek optikai forgatóképességeinek megméréséért.

Köszönet illeti Róth Józsefnét és Prof. Dr. Herczegh Pált és a tanszék további munkatársait.

Köszönettel tartozom Molnár-Koszorus Zsuzsa ügyintézőnek, hogy munkám és PhD tanulmányaim adminisztratív oldalát figyelő szemmel követte.

Végül, de nem utolsósorban köszönet illeti a családomat: szüleimet, nagyszüleimet, testvéreimet a támogatásukért.

A kutatást a GINOP-2.3.4-15-2020-00008, GINOP-2.3.2-15-2016-00008 és GINOP-2.3.3-15-2016-00021 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg. Az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-18-3 és ÚNKP-19-3 Kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának Támogatásával Készült.



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/394/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bege Miklós
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10053376

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bege, M.**, Kiss, A., Kicsák, M., Bereczki, I., Baksa, V., Király, G., Szemán-Nagy, G., Máthéné Szigeti, Z., Herczegh, P., Borbás, A.: Synthesis and Cytostatic Effect of 3'-deoxy-3'-C-Sulfanylmethyl Nucleoside Derivatives with d-xylo Configuration.
Molecules. 24 (11), 1-23, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24112173>
IF: 3.267
2. **Bege, M.**, Bereczki, I., Herczeg, M., Kicsák, M., Eszenyi, D., Herczegh, P., Borbás, A.: A low-temperature, photoinduced thiol-ene click reaction: a mild and efficient method for the synthesis of sugar-modified nucleosides.
Org. Biomol. Chem. 15 (43), 9226-9233, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C7OB02184D>
IF: 3.423

További közlemények

3. Kiss, A., Baksa, V., Tálas, L., **Bege, M.**, Borbás, A., Bereczki, I., Bánfalvi, G., Szemán-Nagy, G.: MTT Test and Time-lapse Microscopy to Evaluate the Antitumor Potential of Nucleoside Analogues.
Anticancer Res. 41 (1), 137-149, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.21873/anticancer.14759>
IF: 2.48 (2020)
4. **Bege, M.**, Bereczki, I., Molnár, D., Kicsák, M., Péntes-Daku, K., Bereczky, Z., Ferenc, G., Kovács, L., Herczegh, P., Borbás, A.: Synthesis and oligomerization of cysteinyl nucleosides.
Org. Biomol. Chem. 18, 8161-8178, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/D0OB01890B>
IF: 3.876





5. Kelemen, V., **Bege, M.**, Eszenyi, D., Debreczeni, N., Bényei, A., Stürzer, T., Herczegh, P., Borbás, A.: Stereoselective Thioconjugation by Photoinduced Thiol-ene Coupling Reactions of Hexo- and Pentopyranosyl D- and L-Glycols at Low-Temperature: Reactivity and Stereoselectivity Study.
Chem.-Eur. J. 25 (64), 14555-14571, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201903095>
IF: 4.857
6. Eszenyi, D., Kelemen, V., Balogh, F., **Bege, M.**, Csávás, M., Herczegh, P., Borbás, A.: Promotion of a Reaction by Cooling: stereoselective 1,2-cis- α -Thioglycoconjugation by Thiol-Ene Coupling at -80C.
Chem.-Eur. J. 24 (18), 4532-4536, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201800668>
IF: 5.16
7. Kicsák, M., **Bege, M.**, Bereczki, I., Csávás, M., Herczeg, M., Kupihar, Z., Kovács, L., Borbás, A., Herczegh, P.: A three-component reagent system for rapid and mild removal of O-, N- and S-trityl protecting groups.
Org. Biomol. Chem. 14 (12), 3190-3192, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C6OB00067C>
IF: 3.564
8. Herczeg, M., Csávás, M., Bereczki, I., Mező, E., Eszenyi, D., Kicsák, M., Hadházi, Á., Tollas, S., Varga, E., Szilágyi, E., Molnár, J. D., **Bege, M.**, Péntes, A., Herczegh, P., Borbás, A.: Gyógyhatású szénhidrátok - a véralvadástól a géncsendesítésig.
Magy. Kém. F. 121 (1), 13-21, 2015.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 26,627

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,69

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.07.29.

