

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Glikopeptid antibiotikumok szintetikus módosításai

Szűcs Zsolt

Témavezető: Prof. Dr. Borbás Anikó



DEBRECENI EGYETEM

Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2020

Glikopeptid antibiotikumok szintetikus módosításai

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

Írta: Szűcs Zsolt 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. Tósaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Kurtán Tibor, az MTA doktora
Prof. Dr. Szakonyi Zsolt, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem GYTK, Gyógyszerhatástani Tanszék
könyvtára (Elméleti Tömb 5. emelet)
2020. július 22. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Majoros László, PhD
Dr. Mező Gábor, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Majoros László, PhD
Dr. Mező Gábor, az MTA doktora
Prof. Dr. Kurtán Tibor, az MTA doktora
Prof. Dr. Szakonyi Zsolt, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület
tanterme
2020. július 22. 13 óra

Tartalom

Rövidítések jegyzéke	3
1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései	4
1.1. Irodalmi előzmények	4
1.2. Célkitűzés	5
2. Alkalmazott módszerek.....	7
3. Az értekezés új tudományos eredményei	8
3.1. Új módszer a teikoplanin A ₃ -2 (TC) előállítására	8
3.2. A TC további N-terminális 1,2,3-triazol származékainak előállítása	8
3.3. A teikoplanin A ₃ -2 (TC) influenzavírus ellenes származékainak szintézise	8
3.3.1. N-terminális 1,2,3-triazol származékok	8
3.3.2. N-terminális szulfonamid származékok.....	9
3.4. 4-(α -Naftiloximetil)-1,2,3-triazol gyűrűt tartalmazó teikoplanin származékok szintézise	9
3.5. A teikoplanin A ₃ -2 (TC) és a teikoplanin N-terminális guanidin származékainak előállítása ..	10
3.6. A vankomicin aglikon hexapeptid influenzavírus ellenes származékainak előállítása	11
3.7. A vankomicin aglikon aminoetilezett, amfifil származékának szintézise	11
3.8. Teikoplanin és teikoplanin pseudoaglikon (TB) kovalens dimerek szintézise	12
4. Összefoglalás	14
5. Az értekezés témájához kapcsolódó tudományos munkásság.....	15
6. Egyéb tudományos munkásság.....	16

Rövidítések jegyzéke

Boc: *tert*-butoxi-karbonil

CuAAC: copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, réz(I)-katalizált azid-alkin cikloaddíció

COSY: correlation spectroscopy, proton-proton korrelációs spektroszkópia

DMAP: 4-dimetilamino-piridin

EC₅₀: effective concentration, hatásos koncentráció

EDCI: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid

ESI: electrospray ionization, elektroporlasztásos ionizáció

HIV: humán immundeficiencia vírus, humán immunelégteség vírus

HPLC: high performance liquid chromatography, nagy teljesítményű folyadékkromatográfia

HMBC: heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy, heteronukleáris többkötéses korrelációs spektroszkópia

HSQC: heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy, heteronukleáris egyszeres-kvantum korrelációs spektroszkópia

MALDI: matrix-assisted laser desorption ionization, mátrix segített lézer deszorpciós ionizáció

MDCK: Madin-Darby Canine Kidney cells, Madin-Darby kutyavese sejtek

MIC: minimum inhibitory concentration, minimális gátló koncentráció

MS: mass spectrometry/mass spectrum, tömegspektrometria/tömegspektrum

NHS: *N*-hidroxiszukcinimid

NMR: nuclear magnetic resonance, mágneses magrezonancia

NOESY: nuclear Overhauser effect spectroscopy, mag Overhauser spektroszkópia

PyBOP: benzotriazol-1-il-oxi-*trisz*-pirrolidino-foszfónium hexafluorofoszfát

RP: reversed-phase, fordított fázisú

TEG: tetraetilénlikol

TFA: trifluoroacetic acid, trifluorecetsav

TOCSY: total correlation spectroscopy, teljes korrelációs spektroszkópia

TOF: time of flight, repülési idő

VAHP: vankomicin aglikon hexapeptid

VRE: vankomicin rezisztens *Enterococcus*

1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

1.1. Irodalmi előzmények

Az antibakteriális terápiában alkalmazott glikopeptid antibiotikumok jellegzetes szerkezetű, viszonylag nagy molekulatömegű, erősen poláros vegyületek, ezért adagolásuk elsősorban intravénásan történik. Gyakori indikációik pl. a súlyos bőr- és lágyrészfertőzések, sebfertőzés profilaxis, endocarditis, *Clostridium difficile* fertőzés (*per os*). A forgalomban lévő glikopeptidek kizárólag Gram-pozitív baktériumok ellen hatásosak.

Az 1980-as évek második felétől kezdve Európában és az USA-ban is egyre gyakrabban izoláltak glikopeptid (vankomicin) rezisztens patogén baktériumtörzseket, elsősorban *Enterococcus* fajokat. Ennek eredményeként kezdődtek el a vankomicin szintetikus kémiai átalakításai, melynek célja e rezisztens kórokozók elleni hatékony származékok előállítása volt. Ez a vankomicin típusú glikopeptidek (pl. maga a vankomicin, klóreremomicin) esetében jellemzően valamilyen lipofil szerkezeti egység hozzákapcsolását jelentette az eredeti vegyülethez (pl. *N*-alkilezés, *N*-acilezés). A lipofil szerkezeti motívumot eleve tartalmazó vegyületek (teikoplanin, A-40926) esetében nagy áttörést hozott a C-terminális módosítása, elsősorban a bázikus csoportok bevitele amidkötésen keresztül. A klinikai alkalmazásba került, második generációs lipoglikopeptidek (telavancin, dalbavancin, oritavancin) is ezeknek a hagyományos szintetikus átalakításoknak köszönhetőek. A hatásmechanizmus jobb megértése érdekében sok egyéb szerkezetmódosítást is elvégeztek az alapvegyületeken, pl. a szénhidrátok eltávolítása, a fenolos hidroxilcsoportok alkilezése, deaminálás, a C-terminális észterekké vagy hidrazidokká alakítása, stb.

Az 1990-es évek második felétől az anyavegyületek további szintetikus módosításai, mint pl. az aminosavak cseréje vagy kovalens dimerek szintézise mellett hangsúlyt kapott a glikopeptideknek más antibiotikumokkal (pl. béta-laktámok) vagy egyéb molekulákkal (pl. transzglikoziláz inhibitorok) történő összekapcsolása. Ez utóbbi célja még több támadásponton ható, összetett hatásmechanizmusú vegyületek előállítása volt.

A glikopeptid antibiotikumok V. szerkezeti csoportja (kisztamicinek) kiváló HIV-, illetve influenzavírus ellenes hatással bírnak. Ennek ismeretében elsősorban orosz kutatók állítottak elő olyan félszintetikus, más szerkezeti csoportokba tartozó glikopeptideket (pl. vankomicin, eremomicin, teikoplanin származékok), melyek hatékonynak bizonyultak HIV, hepatitis C és egyéb vírusok ellen.

A Gyógyszerészi Kémia Tanszék kutatói régóta foglalkoznak félszintetikus glikopeptid antibiotikumok szintézisével az alapvegyületekre rezisztens baktériumtörzsek ellen aktív származékok felfedezése céljából. A teikoplanin A₃-2 pszeudoaglikonjának (TC) lipofil, *n*-decil

vagy bifenil szubsztituenst tartalmazó *N*-terminális triazol származékai kiemelkedő hatással rendelkeztek glikopeptid rezisztens baktériumtörzsek ellen.

Az antivirális hatású glikopeptidek előállítása szintén szerves részét képezi a tanszéki kutatásoknak. A risztocetin aglikonból készült egyik négyszögsav-amid származék igen jó influenzavírus ellenes aktivitással bírt kedvező szelektivitási index mellett. Később a TC pszeudoaglikonból is sikerült hasonlóan jó influenzavírus ellenes hatású, bár a risztocetin származéknál toxikusabb vegyületet előállítani.

1.2 Célkitűzés

Doktori munkám célja egyrészt a teikoplanin kémiai módosítása volt új, az eddig ismert származékoknál jobb antibakteriális aktivitású vegyületek nyerése érdekében. A vegyületek szintézisének tervezésekor különös hangsúlyt fektettem a glikopeptid rezisztens Gram-pozitív kórokozók (VRE) elleni hatás elérésére. Ehhez elsősorban az aglikon rész funkciós csoportjait, így az *N*-terminális aminocsoportot vagy a *C*-terminális karboxilcsoportot szerettem volna átalakítani. A feladat elvégzéséhez a szakirodalomban megtalálható módosítások mellett a teikoplaninon eddig még meg nem valósított kémiai reakciókat kívántam alkalmazni.

Ehhez kapcsolódóan célom volt egy új, egyszerű, költséghatékony és jó hozamú eljárás kidolgozása a TC (teikoplanin A₃-2) pszeudoaglikon előállítására, mely tanszékünkön a glikopeptid származékok szintézisében a leggyakrabban használt alapvegyület.

Egy korábbi tanszéki kutatást folytatva *N*-terminális TC triazolszármazékok további analógjait kívántam előállítani, majd – amennyiben lehetséges – a kapott származékok *C*-terminálisának átalakításával szerettem volna a vegyületek antibakteriális hatékonyságát tovább növelni.

A glikopeptid antibiotikumok bázikus, pozitív töltésű *N*-terminálisának fontos szerepet tulajdonítanak a ligandumkötés szempontjából. Ennek alapján olyan teikoplanin származékokat kívántunk előállítani, melyeknél az *N*-terminális bázikusságát az aminocsoport helyett guanidino csoport biztosítja.

Irodalmi előzmények alapján célul tűzttem ki olyan, a polimixinek szerkezetét idéző, aminoetilezett glikopeptid származék előállítását, mely Gram-negatív baktériumok ellen lehet hatásos. Az átalakítást a vankomicin aglikon hexapeptidből (VAHP) kiindulva szerettem volna megvalósítani.

Az irodalomban nagy számban fellelhető kovalens vankomicin dimerekhez hasonló kovalens teikoplanin dimerek szintézisét és antibakteriális vizsgálatát is célul tűztük ki.

Az antibakteriális használatra szánt teikoplanin származékok tervezésekor fontosnak

tartottam, hogy a végtermékek (vagy legalább néhányuk) kulcsfontosságú fiziko-kémiai paraméterei hasonlóak legyenek az irodalomból ismert, bizonyítottan jó *in vivo* hatékonyságú származékok (pl. Mideplanin) megfelelő jellemzőihez. Ehhez a ChemAxon MarvinSketch[®] szoftvere nyújtott segítséget, melynek pluginjei kitűnően alkalmasak peptidek logD értékeinek és pH-függő nettó töltésének, így izoelektromos pontjának (pI) összehasonlítására és jóslására.

A TC N-terminális aminos csoportjának szisztematikus átalakításait elvégezve célom volt influenzavírusok ellen hatásos glikopeptid származékok előállítása, illetve szerkezet-hatás összefüggések felderítése. Ehhez kapcsolódóan szerettem volna baktériumok ellen lehetőleg hatástalan, szelektív vírusellenes származékokat is előállítani, melyhez kiindulási vegyületként a VAHP-et kívántam felhasználni.

2. Alkalmazott módszerek

A reakciókat vékonyréteg-kromatográfiával követtem. A vegyületeket normál és fordított fázisú oszlopkromatográfiával, preparatív vékonyrétegen vagy gélkromatográfiával tisztítottam. A vegyületek szerkezetének azonosítását 1D (^1H , ^{13}C) és 2D NMR (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H NOESY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^{13}C HSQC-TOCSY és ^1H - ^{13}C HMBC) kísérletek, illetve MALDI-TOF és ESI-TOF tömegspektrometria segítségével végeztük. A többkomponensű termékek összetételének megállapításához tömegspektrométerrel kapcsolt analitikai, fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát (RP-HPLC) használtunk. A kromatogramokat és tömegspektrumokat a DataAnalysis 3.4 és flexAnalysis (Bruker), az NMR spektrumokat a MestReNova vagy TopSpin szoftverekkel értékeltem ki.

3. Az értekezés új tudományos eredményei

3.1. Új módszer a teikoplanin A₃-2 (TC) előállítására

A teikoplanin A₃-2 pszeudoaglikon (TC) alapvegyület jó hozammal való előállítása kritikus a tanszékünk munkája szempontjából. A korábbi módszer során alkalmazott hidrogén-fluorid körülményes beszerezhetősége miatt másik módszert kellett találni az *N*-acetyl-glükózamint tartalmazó pszeudoaglikon előállítására. Számos próbálkozás után a szobahőmérsékleten végzett, tömény sósavas kezelés hozott sikert. Egyszerű feldolgozást és oszlopkromatográfiát követően a HF-os módszerrel megegyező tisztaságú terméket kaptam hasonlóan jó hozammal (kb. 75%). Az új módszer ráadásul jóval költséghatékonyabb és könnyebben kivitelezhető.

3.2. A TC további *N*-terminális 1,2,3-triazol származékainak előállítása

A tanszéken korábban készült *n*-decil és bifenil funkciót tartalmazó teikoplanin A₃-2 (TC) triazolszármazékainak bár kiváló *in vitro* aktivitása volt, szeretnénk volna megvizsgálni, hogy van-e lehetőség a hatás további növelésére a lipofil rész hosszának, szerkezetének változtatásával. A teikoplanin A₃-2-ből diazotranszferrel előállítottam az azido teikoplanin pszeudoaglikont, majd az eredeti *n*-decil származék analógjaiként Cu(I)-katalizált azid-alkin cikloaddícióval (CuAAC) nyertem a *n*-hexadecil, *n*-dodecil és *n*-oktil variánst. A bifenil-csoportot tartalmazó eredeti vegyület változataként a fenil- és az α -naftil-származékot állítottam elő. Két lipohidofil szubsztituens tartalmazó vegyület szintéziséhez egy védett galaktóz- illetve laktóz származékot használtam alkin reaktánsként.

Az alifás analógok közül a leghatásosabb az *n*-oktil-származék volt, felülmúlva az eredeti *n*-decil-származék hatását a teikoplanin rezisztens VanA *E. faecalis* esetében is. A fenil és α -naftil származékok hatása különösen biztatónak adódott. A galaktóz származékot tartalmazó vegyület staphylococcusok ellen mutatott kiváló hatást, míg a nagyobb térkitöltésű szubsztituenseket viselő analógok inaktívak voltak, valószínűleg a kötőzseb eltakarása miatt.

3.3. A teikoplanin A₃-2 (TC) influenzavírus ellenes származékainak szintézise

3.3.1. *N*-terminális 1,2,3-triazol származékok

Az előző pontban ismertetett triazol származékok influenzavírusok elleni aktivitását és citotoxicitását vizsgálva nyilvánvalóvá vált, hogy a szubsztituensek hidrofil/lipofil karaktere azokat erősen befolyásolja. A hosszabb szénláncú alifás analógok némelyike bár jó aktivitást mutatott, mindegyikük igen toxikus volt MDCK sejtekre. Az aromás csoportokat tartalmazó analógok közepes aktivitást és toxicitást mutattak függetlenül a szubsztituensek térkitöltésétől, míg a szénhidrát egységekkel funkcionizált vegyületek alig/egyáltalán nem voltak toxikusak változó

hatékonyság mellett. Megállapítottuk, hogy a citotoxikus hatás a lipofil oldalláncok hosszával arányosan nő, ami a citoplazma membrán egyre kifejezettebb károsításának eredménye lehet.

Korábban, diplomamunkám során az antivirálisan inaktív és toxikus *n*-decil TC triazolszármazéknak egy olyan módosulatát is előállítottam, melyben a lipofil rész és az aglikon között egy tetraetilénglikol linker található. Ez a vegyület rendkívül jó aktivitást mutatott influenzavírusok ellen, ráadásul sokkal kevésbé volt toxikus az MDCK sejtekre, mint a linkert nem tartalmazó analóg. Ezen eredmény alapján a toxicitás további csökkentése érdekében a TEG-linkert tartalmazó *n*-oktil-, *n*-hexil-, és *n*-butil származékok szintézisét valósítottam meg. A rövidebb oldalláncokat tartalmazó antibiotikumok toxicitása valóban csökkent, azonban sajnos egyidejűleg az influenzavírus ellenes aktivitásuk is megszűnt.

3.3.2. *N*-terminális szulfonamid származékok

Korábban még nem tanulmányozott, könnyen megvalósítható módosításnak bizonyult a TC (teikoplanin A₃-2) *N*-terminálisának szulfonamid csoporttá alakítása különböző szulfonil-kloridokkal piridin jelenlétében. A termékeket közepes (aromás), illetve kielégítő (alifás) hozamokkal lehetett izolálni.

Több szulfonamid származéknak is kifejezetten jó influenzavírus ellenes hatása volt, habár némelyikük meglehetősen citotoxikusnak bizonyult. Megfigyeltük ismét az alkánszulfonil oldalláncok hosszának növekedésével párhuzamosan egyre erősödő aktivitást, melyet egyre kifejezettebb citotoxicitás kísért. A legígéretesebb vegyületnek a *n*-hexánszulfonil származék tűnt, mivel a mérsékelt citotoxicitás mellett viszonylag alacsony koncentrációban gátolta a vírusfertőzést.

A lipofil szulfonamid származékok *in vitro* antibakteriális hatása a legtöbb esetben felülmúlta a teikoplaninét vagy a TC (A₃-2) pszeudoaglikonét, azonban egyik sem bizonyult annyira hatásosnak, mint az α -naftil csoportot tartalmazó triazol származék (3.2. fejezet). Bár a *Staphylococcus* törzsek ellen hasonlóan aktívak voltak (MIC = 0,5-2,0 μ g/ml), az *E. faecalis* törzsekre a nyolcból csak öt származék volt többé-kevésbé hatékony.

3.4. 4-(α -Naftiloximetil)-1,2,3-triazol gyűrűt tartalmazó teikoplanin származékok szintézise

A tanszék glikopeptid származékainak 44 db glikopeptid rezisztens *Enterococcus* törzs elleni *in vitro* vizsgálata során a leghatásosabb vegyületnek az α -naftil csoporttal szubsztituált teikoplanin A₃-2 (TC) triazol származék bizonyult. Mivel a *vanA* gént hordozó törzsek kb. 2/3-ada teljesen rezisztensnek mutatkozott még erre a vegyületre is, ezért szerkezetét további

optimalizálásnak vettem alá. Irodalmi előzményeket figyelembe véve előállítottam az eredeti vegyület teikoplanin, 1. típusú pszeudoaglikon (teikoplanin A₃-1, TB) és aglikon analógját, valamint a négy variáns *N,N*-dimetil-1,3-propándiaminnal és *N,N*-dietil-1,3-propándiaminnal képzett C-terminális amid származékait. A teikoplaninból kiindulva különböző savas kezelésekkel, diazotranszferrel és CuAAC reakcióval jutottam a triazol analógokhoz. Ezeket a megfelelő aminok felhasználásával, PyBOP segítette amidkapcsolással alakítottam a kívánt amid származékokká.

A vegyületek *in vitro* antibakteriális hatásának elővizsgálata során a TC (teikoplanin A₃-2) pszeudoaglikon amid származékai sokkal hatékonyabbnak bizonyultak az eredeti vegyületnél, valamint az aglikon és a TB (teikoplanin A₃-1) analógoknál is. A legmérsékeltebb hatásúnak a teikoplanin keverékből készült két származék bizonyult. Az új analógok aktivitását egy 20 törzsből álló nozokomiális *Enterococcus* kollekción vizsgáltattuk teikoplanin, vankomicin és oritavancin standardok mellett. A legjobb, gyakorlatilag az oritavancinnal megegyező *in vitro* aktivitással ismét az eredeti vegyület dietilaminopropil-amidja rendelkezett. A standard panelen (előzetes vizsgálat 8 baktériumtörzsen) kapott eredményekhez képest meglepő módon a VRE törzsek ellen a teikoplanin analóg amidja egészen jó aktivitásúnak adódott.

3.5. A teikoplanin A₃-2 (TC) és a teikoplanin N-terminális guanidin származékainak előállítása

Az *N*-terminális aminocsoport bázikus karakterének megőrzése céljából azt lipofil elemekkel szubsztituált guanidino-csoporttá alakítottam. A vegyületek szintéziséhez különböző alifás aminokat reagáltattam fenil-izotiocianáttal, majd a kapott tiokarbamidokat metánszulfosav-kloriddal trietil-amin és DMAP jelenlétében a megfelelő karbodiimidekké alakítottam. Ezeket felhasználva előállítottam négy olyan TC guanidin származékot, melyekben a C-terminálist előzetesen dietilaminopropil amiddá alakítottam. További három dimetilaminopropil amid analógot nyertem a teikoplanin keverékből, melyek esetén a guanidino-csoport az állandó fenilcsoport mellett *n*-oktil-, 4-fenilbenzil- vagy *N*-benzil-piperidil-csoporttal volt szubsztituálva.

A kutatócsoportunkban előállított szabad C-terminálisú TC analógokhoz képest az általam nyert TC amidok hatása jóval gyengébbnek adódott az *Enterococcus* törzsek ellen. A többkomponensű teikoplaninból készült amidok közül az *n*-oktil származék valamennyi baktérium szaporodását hatékonyan gátolta, míg az igen hasonló lipofilitású 4-fenilbenzil analóg, illetve az *N*-benzil-piperidil oldalláncot viselő származék csak a staphylococcusok ellen bizonyult hatékonynak.

3.6. A vankomicin aglikon hexapeptid influenzavírus ellenes származékainak előállítása

Szelektív vírusellenes vegyületek szintézise céljából a teikoplanin A₃₋₂ három leghatásosabb és egyben legkevésbé toxikus származékain található oldalláncok vankomicin aglikon hexapeptidhez (VAHP) való hozzákapcsolásával hat új végterméket állítottam elő. Ezek közül három az *N*-terminálison, három pedig a *C*-terminálison módosított. A *C*-terminális analógok szintézisének célja az volt, hogy megállapítsuk, van-e jelentősége a lipofil oldalláncok aglikonon való elhelyezkedésének a hatás szempontjából.

A két *N*-terminális triazolszármazék szintéziséhez vankomicinból Edman-degradációval és deglikozilezéssel nyertem a VAHP-et, melyet diazotranszferrel azido származékká alakítottam. Két kívánt oldalláncot CuAAC reakcióval kapcsoltam az azido aglikonhoz, így nyerve két *N*-terminálison módosított triazolt. A *n*-hexánszulfonamid származékot a VAHP és *n*-hexánszulfonil-klorid egyszerű reakciójával állítottam elő. A két *C*-terminális triazol analóg szintéziséhez az oldalláncok alkin formáját 2-azidoetilaminnal kapcsoltam össze click reakció segítségével, a szulfonamid analóg előállításához pedig etiléndiamin és hexánszulfonil-klorid reakciójával kaptam az amidkapcsolásra alkalmas oldalláncot. Ezt, illetve a triazolcsoportot tartalmazó oldalláncokat végül a PyBOP reagenst alkalmazva a VAHP karboxilcsoportjához kötöttem.

A várakozásnak megfelelően valamennyi vegyület antibakteriális hatása elhanyagolható szintre csökkent, minden bizonnyal a D-Ala kötőseb roncsolódása miatt. Számottevő influenza ellenes hatással csak a két *N*-terminális triazolszármazék bírt, igen jó, 2 µM körüli EC₅₀ értékekkel, míg az MDCK sejtekre való citotoxikus koncentráció értékük 20 µM körülinek adódott (szelektivitási indexük kb. 10). Az *N*-terminális *n*-hexánszulfonil származék és a *C*-terminálison módosított analógok inaktívak, illetve csak mérsékelt aktivitásúak voltak. Az eredmények bizonyították, hogy az influenzavírus ellenes hatás szempontjából fontos szerepe van a lipofil szubsztituens aglikonhoz való kapcsolódási helyének.

3.7. A vankomicin aglikon aminoetilezett, amfifil származékának szintézise

A Gram-negatív baktériumok intrinszc glikopeptid rezisztenciájának megtörése céljából egy olyan – polimixinek szerkezetét idéző – bázikus vankomicin aglikon származék szintézisét valósítottam meg, mely egy *n*-dekanoil oldalláncot és öt aminoetil-csoportot tartalmaz.

A *n*-dekánsavból tionil-kloriddal savkloridot képezve, majd azzal a D-leucint acilezve előállítottam a *n*-dekanoil-D-leucint. Ebből EDCI·HCl segítette aktiválással, *N*-hidroxiszukcinimid (NHS) felhasználásával nyertem az NHS aktív észtert, mellyel a vankomicin aglikon hexapeptid

N-acilezését végeztem el, előállítva az *N*-dekanoil-norvankomicin aglikont. Ennek *C*-terminálisához mono-*N*-Boc-etiléndiamint kapcsolva egy amid köztiterméket kaptam, melynek fenolos OH-csoportjait *N*-Boc-brómetilaminnal alkileztem. Az így nyert tetra-*O*-alkil származékról a Boc-védőcsoportokat TFA-val eltávolítva jutottam az amfifil célvegyülethez.

Az antibakteriális vizsgálatok alapján a végtermék sajnos továbbra sem bírt Gram-negatív ellenes hatással, sőt az eredetileg érzékeny ($MIC \leq 0,5-2 \mu g/ml$) baktériumtörzsek ellen csökkent aktivitást mutatott. Érdekes azonban, hogy a vegyület a vankomicinre kevésbé érzékeny törzsek (VanA, VanB *E. faecalis*) ellen hatásosabbnak bizonyult a vankomicinnél. Mindez arra utalhat, hogy bár a D-Ala-D-Ala terminálisokhoz kisebb affinitással kötődik, valamely más mechanizmus révén képes hatni a teikoplanin és vankomicin rezisztens törzsekre.

3.8. Teikoplanin és teikoplanin pszeudoaglikon (TB) kovalens dimerek szintézise

A teikoplanin keverékből és a TB (teikoplanin A₃-1) pszeudoaglikonból kiindulva összesen 10 kovalens dimert állítottam elő kétféle bisz-izotiocianát linker segítségével. Az első linker szintézise az 1-aminodekán 2-[2-(2-klóretoxi)etoxi]etanollal való di-*N*-alkilezésével kezdődött, majd a kapott aminoalkohol két láncvégi OH-csoportját három lépésben átalakítottuk aminocsoporttá (*O*-tozilezés, nukleofil szubsztitúció NaN₃-dal, Staudinger-redukció). Az így előállított triaminból végül szén-diszulfid és di-*terc*-butil-dikarbonát felhasználásával nyertük jó hozammal a horgonyzó egységet tartalmazó, amfifil bisz-izotiocianát linkert. A másik linkert az első változattal analóg módon nyertük a hexaetilénglikol OH-csoportjainak, majd a belőle nyert köztitermék aminocsoportjainak átalakításával.

Összesen hat N-N orientációjú dimert állítottunk elő a TB-ből és a teikoplaninból, illetve dietilaminopropil amidjukból. A monomereket nagy felesleg linkerrel reagáltattuk, majd a feldolgozás után kapott nyerstermékhez a megfelelő monomert kapcsoltuk. Hasonló stratégiával két-két N-C orientációjú TB és teikoplanin dimert is előállítottunk, melyhez az *N*-terminális védésére (*N*-Boc ill. *N*-tritol védőcsoportok) és a *C*-terminális átalakítására is szükség volt. A többkomponensű teikoplanin dimerek összetételét HPLC-ESI-MS-sel határoztuk meg. A négy szimmetrikus (N-N) dimer esetében a fő komponensek hasonló arányban voltak jelen valamennyi keverékben. A két N-C dimer esetében a komponensek száma jóval több volt az aszimmetria miatt, a detektált molekulatömeg alapján azonban a felépítő két monomer típusa jól meghatározható volt.

Az *in vitro* vizsgálatok során a dimerek antibakteriális hatékonysága azonosnak vagy gyengébbnek bizonyult, mint a megfelelő monomereké. Egyedül a VanA *E. faecalis* törzs esetében volt észlelhető, hogy az eredeti teikoplaninnál annak dimer változata jobb hatást mutatott. Általánosságban elmondható, hogy az N-C dimereknél az N-N dimerek hatásosabbak voltak,

illetve, hogy a C-terminálisuk dietilaminopropil amiddá alakítása kedvezően befolyásolta aktivitásukat. A terciér amin funkciót és *n*-decil oldalláncot tartalmazó linker jobb hatást biztosított, mint a horgonyzó egység nélküli összekötő elem. A két legaktívabb dimer a TB-amid és teikoplanin amid N-N dimere, melyek 4-8 µg/ml koncentrációban gátolták a standard panelen vizsgált baktériumtörzsek szaporodását.

4. Összefoglalás

Doktori munkám során két glikopeptid antibiotikum, a teikoplanin és a vankomicin félszintetikus módosításait végeztem el.

A teikoplanin A₃-2 pszeudoaglikon (TC) előállítására egy egyszerű, költséghatékony eljárást dolgoztam ki. Egy korábbi tanszéki kutatás folytatásaként CuAAC reakcióval a TC N-terminális 1,2,3-triazolszármazékait állítottam elő. Ezek közül a legjobb hatásúnak a α -naftiloximetil származék bizonyult. A *n*-decil triazol származék oldalláncába tetraetilénglikol linkert építve a kapott vegyület jó aktivitást mutatott influenzavírusok ellen, emellett citotoxicitása is csökkent. Az alkilcsoport lerövidítésével a citotoxicitást sikerült tovább csökkenteni, azonban ezzel az antivirális hatás is megszűnt. A TC N-terminális szulfonamid származékait is előállítottam, melyek ugyan az anyavegyületeknél jelentősen hatékonyabbak voltak rezisztens baktériumtörzsek ellen, a triazolok aktivitását nem múlták felül. A szulfonamidok szintén jó influenzavírus ellenes hatással rendelkeztek. Az α -naftiloximetil TC triazolszármazék C-terminálisát bázikus aminos csoportot tartalmazó amidcsoporttá alakítva az antibakteriális hatást sikerült tovább növelnem. A α -naftiloximetil triazolszármazék olyan analógjait is előállítottam, melyek nem csak a C-terminális szerkezetében, hanem a peptidvázon jelenlévő szénhidrát egységek számában is különböznek. A két vagy három szénhidrát egységet is tartalmazó TB (teikoplanin A₃-1) és teikoplanin változatok hatása körülbelül az eredeti triazolszármazékéval azonosnak adódott, azonban az irodalom alapján kedvezőbb farmakokinetika várható tőlük.

A teikoplanin és a TC bázikus amidszármazékainak N-terminálisát N,N'-diszubsztituált karbodiimideket alkalmazva lipofil szerkezeti elemekkel funkcionalizált guanidino-csoporttá alakítottam. Az így nyert vegyületek közül a teikoplanin *n*-oktil származéka kiváló hatású volt glikopeptid rezisztens *Staphylococcus* és *Enterococcus* törzsek ellen is.

Szelektív antivirális vegyületek előállítása céljából a leghatékonyabb és legkevésbé toxikus teikoplanin származékok oldalláncait a vankomicin aglikon hexapeptid (VAHP) N-, illetve C-terminálisához kapcsoltam CuAAC reakcióval, szulfonamidképzéssel vagy amidkapcsolással. Az N-terminális triazolszármazékok megőrizték antivirális hatásukat és elfogadható szelektivitási indexüket, míg antibakteriális hatásuk elhanyagolhatóvá vált.

Gram-negatív baktériumok elleni hatás elérése céljából a VAHP újraacilezésével, majd aminoetilezésével egy bázikus, amfifil vegyületet nyertem. A termék ugyan vankomicin rezisztens *Enterococcus faecalis* ellen hatékonyabb volt a vankomicinnél, Gram-negatív baktériumokra továbbra sem hatott.

A teikoplaninból és a teikoplanin A₃-1 (TB) pszeudoaglikonból kovalens dimereket állítottam elő kétféle bisz-izotiocianát linker segítségével, kétféle orientációban. A dimerek antibakteriális hatása nem múlta felül az anyavegyületekét.

5. Az értekezés témájához kapcsolódó tudományos munkásság



**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/332/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szűcs Zsolt
Neptun kód: ESJ7YN
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szűcs, Z.**, Ostorházi, E., Kicsák, M., Nagy, L., Borbás, A., Herczegh, P.: New semisynthetic teicoplanin derivatives have comparable in vitro activity to that of oritavancin against clinical isolates of VRE.
J. Antibiot. 72 (7), 524-534, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41429-019-0164-1>
IF: 2.446 (2018)
2. **Szűcs, Z.**, Kelemen, V., Le Thai, S., Csávás, M., Róth, E., Batta, G., Stevaert, A., Vanderlinden, E., Naesens, L., Herczegh, P., Borbás, A.: Structure-activity relationship studies of lipophilic teicoplanin pseudoaglycon derivatives as new anti-influenza virus agents.
Eur. J. Med. Chem. 157, 1017-1030, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.058>
IF: 4.833
3. **Szűcs, Z.**, Bereczki, I., Csávás, M., Róth, E., Borbás, A., Batta, G., Ostorházi, E., Szatmári, R., Herczegh, P.: Lipophilic teicoplanin pseudoaglycon derivatives are active against vancomycin- and teicoplanin-resistant enterococci.
J. Antibiot. 70 (5), 664-670, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2017.2>
IF: 2.033
4. **Szűcs, Z.**, Csávás, M., Róth, E., Borbás, A., Batta, G., Perret, F., Ostorházi, E., Szatmári, R., Vanderlinden, E., Naesens, L., Herczegh, P.: Synthesis and biological evaluation of lipophilic teicoplanin pseudoaglycon derivatives containing a substituted triazole function.
J. Antibiot. 70 (2), 152-157, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2016.80>
IF: 2.033



6. Egyéb tudományos munkásság



**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

További közlemények

5. Tevyashova, A. N., Bychkova, E. N., Korolev, A. M., Isakova, E. B., Mirchink, E. P., Osterman, I. A., Erdei, R., **Szűcs, Z.**, Batta, G.: Synthesis and evaluation of biological activity for dual-acting antibiotics on the basis of azithromycin and glycopeptides.
Bioorg. Med. Chem. Lett. 29 (2), 276-280, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.11.038>
IF: 2.448 (2018)
6. Vimberg, V., Gazak, R., **Szűcs, Z.**, Borbás, A., Herczegh, P., Cavanagh, J. P., Zieglerova, L., Závora, J., Adámková, V., Balikova Novotna, G.: Fluorescence assay to predict activity of the glycopeptide antibiotics.
J. Antibiot. 72 (2), 114-117, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41429-018-0120-5>
IF: 2.446
7. Csávás, M., Miskovics, A., **Szűcs, Z.**, Röth, E., Nagy, Z. L., Bereczki, I., Herczeg, M., Batta, G., Nemes-Nikodém, É., Ostorházi, E., Rozgonyi, F., Borbás, A., Herczegh, P.: Synthesis and antibacterial evaluation of some teicoplanin pseudoaglycon derivatives containing alkyl- and arylthiosubstituted maleimides.
J. Antibiot. 68 (9), 579-585, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2015.33>
IF: 2.173

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,412

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
11,345**

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

Debrecen, 2019.10.01.

