



ÚJ RISZTOCETIN- ÉS TEIKOPLANIN-SZÁRMAZÉKOK SZINTÉZISE

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Pintér Gábor

témavezető: Dr. Herczegh Pál

DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi Doktori Tanács
Kémiai Tudományok Doktori Iskola
Debrecen, 2010.

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Kémiai Tudományok Doktori Iskola K/5 programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2010.

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Pintér Gábor doktorjelölt 2003-2006 között a fent megnevezett Doktori Iskola K/5 programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2010.

a témavezető aláírása

Új risztocetin- és teikoplanin-származékok szintézise

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a kémia tudományágban

Írta: Pintér Gábor okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem TTK Kémiai Tudományok Doktori Iskolája
(Szénhidrátok kémiája és kémiai biológiája, K/5 programja) keretében.

Témavezető: Dr. Herczegh Pál

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.

A doktori szigorlat időpontja: 2009.

Az értekezés bírálói:

Dr.
Dr.
Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.
Dr.
Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 2010.

Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Herczegh Pálnak, a Debreceni Egyetem OEC Gyógyszerészi Kémiai Tanszék tanszékvezető egyetemi tanárának, aki mindvégig figyelemmel kísérte munkámat, hasznos tanácsaival segített, és mindig szívesen fogadta ötleteimet, elképzeléseimet. Köszönetet mondok a Gyógyszerészi Kémiai Tanszéken dolgozó és dolgozott egykori munkatársaknak.

Köszönöm Dr. Batta Gyulának az NMR-mérések terén végzett nélkülözhetetlen munkáját, Dr. Kéki Sándornak és Dr. Nagy Lajosnak a tömegspektrometriás és fényszórás-fotometriás mérésekben nyújtott segítséget.

Köszönet illeti Dr. Rozgonyi Ferencet és Dr. Ostorházi Esztert az antibakteriális, Dr. Lieve Naesens-t az antivirális vizsgálatokért, Takácsné Dr. Novák Krisztinát a logP számításokért.

Köszönet Dr. Hollósi Miklósnak, aki a hidrogén-fluoridos deglikozilezésben volt segítségünkre, és Dr. Hermecz Istvánnak, aki a kísérletek alapját jelentő teikoplaninnal segítette munkámat.

Köszönetet mondok Dr. Boda Zoltánnak és Szarvas Mariannak az elvégzett trombocita-aggregációs mérésekért, Dr. Komáromi Istvánnak és Mándi Attilának a molekula dinamikai számításokért.

Köszönöm feleségemnek a türelmet, szüleimnek a támogatást, rokonaimnak, barátaimnak a biztatást.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	1
Bevezetés, célkitűzés.....	4
1. Irodalmi áttekintés.....	5
1.1. A glikopeptid antibiotikumok szerkezete.....	5
1.2. Néhány fontosabb glikopeptid antibiotikum.....	11
1.2.1. A vankomicin.....	11
1.2.2. A teikoplanin.....	13
1.2.3. A risztocetin.....	15
1.3. A bakteriális sejtfalszintézis.....	17
1.3.1. Citoplazmatikus fázis.....	18
1.3.2. Membránhoz kötött folyamatok.....	22
1.3.3. Extracelluláris folyamatok.....	22
1.4. A glikopeptid típusú antibiotikumok hatásmechanizmusa.....	27
1.5. A glikopeptid antibiotikumokkal szembeni rezisztencia.....	30
1.6. Glikopeptid antibiotikumok félszintetikus módosítása.....	34
1.6.1. Az 1. típusú átalakítások.....	34
1.6.1.1. A szénhidrát-rész módosítása.....	34
1.6.1.2. Az N-terminális módosítása.....	43
1.6.1.3. A karboxilcsoport módosítása.....	46
1.6.1.4. A hidroxilcsoportok módosítása.....	53
1.6.2. A kötőzseb módosítása.....	54
1.6.2.1. A klóratomok szerepe.....	54
1.6.2.2. A heptapeptid gerinc szelektív hidrolízise.....	55
1.6.2.2.1. Edman-lebontás.....	55
1.6.2.2.2. A 6 és 7-es aminosavak közötti kötés hidrolízise.....	55
1.6.2.2.3. A 2 és 3-as aminosavak közötti kötés redukzív hidrolízise.....	57
1.6.2.2.4. Az 1, 2 és 3, 4-es aminosavak közötti kötés hidrolízise.....	58
1.6.2.2.5. A 3-as aminosav epimerizációja.....	61
1.6.2.2.6. Az 1, 2, 3 aminosavak által alkotott gyűrű bővítése.....	61
1.7. Dimér és multimér glikopeptid antibiotikumok.....	63
1.8. A réz(I) katalizálta azid-alkin 1,3-dipoláris cikloaddíció.....	75
1.8.1. A Cu(I) katalizálta azid-alkin cikloaddíció (CuAAC).....	75
1.8.2. A CuAAC felhasználási területei.....	79
2. Saját eredmények.....	89
2.1. A risztocetin és a teikoplanin deglikozilezése.....	89
2.2. A risztocetin új szénhidrát-származékainak szintézise.....	92
2.2.1. Glikozil-tioureido-származékok.....	92
2.2.2. Click-reakcióval előállított szénhidrát-származékok.....	95
2.3. Lipofil teikoplanin- és risztocetin-aglikon származékok.....	102
Összefoglalás.....	117
Summary.....	119
Kísérletek leírása.....	125
Irodalomjegyzék.....	136
Függelék.....	147

Rövidítések jegyzéke

D-Ala-D-Ala: D-alanil-D-alanin

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: adenosine triphosphate, adenozin-trifoszfát

Boc: terebutoxycarbonyl

Cbz: benzyloxycarbonyl

CC₅₀: 50 % Cytotoxic Concentration, 50 %-os citotoxikus koncentráció

COSY: Correlation Spectroscopy

CPE: Cytopathogen Effect, citopatogén hatás

CTP: Cytidine triphosphate, citidin-trifoszfát

CuAAC: Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, Cu-katalizálta azid-alkin cikloaddíció

DAB: diaminobutane, diaminobután (diaminobután magvú dendrimer)

DAP: diamino-pimelinsav

DIPEA: diizopropil-etilamin

DMAP: 4-dimethylaminopyridine, 4-dimetilamino-piridin

DMF: dimetil-formamid

DMSO: dimetil-szulfoxid

DOSY: Diffusin-Ordered Spectroscopy, diffúzió kontrollálta spektroszkópia

DSS: 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonic acid, 2,2-dimetil-2-szilapentán-5-szulfonsav

EC₅₀: 50 % Effective Concentration, 50 %-os effektív koncentráció

EDCI: (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide), (1-etil-3-dimetilaminopropil)-karbodiimid

FDA: Food and Drug Administration

FT-IR: Fourier Transformed Infrared Spectroscopy, Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia

GTP: Guanosine triphosphate, guanozin-trifoszfát

HBTU: 2-(1-hidroxibenzotriazol-1-il)-1,1,3,3,-tetrametilurónium-hexafluoro-foszfát

HIV: Human Immunodeficiency Virus, humán immundeficiencia vírus

HPLC: High Performance/Pressure Liquid Chromatography, nagy hatékonyságú/nyomású folyadék-kromatográfia

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence

D-Lac: D-lactate, D-tejsav

MALDI-TOF MS: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, mátrix segítette lézer deszorpciós ionizáció repülési idő tömegspektrometria

MAO-A: monoamine oxidase A, monoamin-oxidáz-A

MBC: Minimum Bactericidal Concentration, minimális baktericid koncentráció

MIC: Minimum Inhibitory Concentration, minimális gátló koncentráció

MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*

MRSE: Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*, meticillin-rezisztens *Staphylococcus epidermidis*

MSSA: Methicillin-sensitive *Staphylococcus epidermidis*, meticillin-szenzitív *Staphylococcus epidermidis*

MTS: methyltetrazolim salt, metiltetrazólium só

MurNAc: N-acetil-muraminsav

NADP: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NMR: Nuclear Magnetic Resonance, mag mágneses rezonancia

NOE: Nuclear Overhauser Effect, magi Overhauser-effektus

NOESY: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy, magi Overhauser-effektus spektroszkópia

PAMAM: Poly(amido amine), poli-amido-amin

PBP: penicillin binding protein, penicillin-kötő fehérje

PEG: polietilén-glikol

PEP: phosphoenolpyruvate, foszfo-enol-piruvát

PG: peptidoglikán

ROMP: Ring Opening Metathesis Polymerization, gyűrűfelnnyílásos metatézis polimerizáció

SPR: Surface Plasmon Resonance, felszíni plazmon rezonancia

STD: Saturation Transfer Difference, szaturáció transzfer differencia

Teico: S/R: Teicoplanin- sensitive/-resistant, teikoplanin-szenzitív/rezisztens

TFA: trifluoroacetic acid, trifluor-ecetsav

THF: tetrahidro-furán

TMS: tetramethylsilane, tetrametil-szilán

TMS-N₃: trimethylsilyl azide, trimetilszilil-azid

TOCSY: Total Correlation Spectroscopy

TGáz: transzglikoziláz

TPáz: transzpeptidáz

UDP: uridine diphosphate, uridin-difoszfát

UMP: uridine monophosphate, uridin-monofoszfát

UV: Ultraviolet, ultraibolya

vanA+: vanA gén pozitív

vanB+: vanB gén pozitív

Vanco: S/R: Vancomycin-sensitive/-resistant, vankomicin-szenzitív/rezisztens

VRE: vankomicin-rezisztens enterococcus

Bevezetés, célkitűzés

Negyedéves gyógyszerész hallgatóként (2002-ben) volt szerencsém bekapcsolódni a Debreceni Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Tanszékén folyó kutatásokba. Annak ellenére, hogy a tanszék csak 1996-ban alakult, oktatói révén már akkor komoly múlttal rendelkezett, hiszen a Magyar Tudományos Akadémia Antibiotikum-Kémiai Kutatócsoportjából nőtt ki, amely, 2006-os megszűnéséig, több évtizeden át az antibiotikum-kutatás egyik legjelentősebb bázisa volt Magyarországon.

Doktori munkám során a glikopeptid típusú antibiotikumokhoz tartozó risztocetin és teikoplanin módosításával foglalkoztam. A csoport első képviselőjét, a vankomicint 1956-ban fedezték fel az Eli Lilly cég kutatói. A vegyületcsalád több mint fél évszázados története során több száz újabb természetes vegyülettel és több ezer félszintetikus származékkal gazdagodott. Az, hogy a téma napjainkban sem veszítette el aktualitását, az egyre nagyobb méreteket öltő glikopeptidantibiotikum-rezisztenciának is köszönhető. Az Egyesült Államokban mára már a 30 %-ot is meghaladta a vankomicinnek vagy vankomicinnek és teikoplaninnak egyaránt ellenálló baktériumok által okozott nozokomiális fertőzések száma, ami továbbra is új, hatásos vegyületek kifejlesztésére ösztönzi a kutatókat. A risztocetin, a vankomicin mellett, az egyik legrégebben felfedezett glikopeptid típusú antibiotikum. Annak ellenére, hogy igen jó *in vitro* aktivitással rendelkezik, nem használható az antibakteriális terápiában, mert a vérlemezkéket összecsapja.

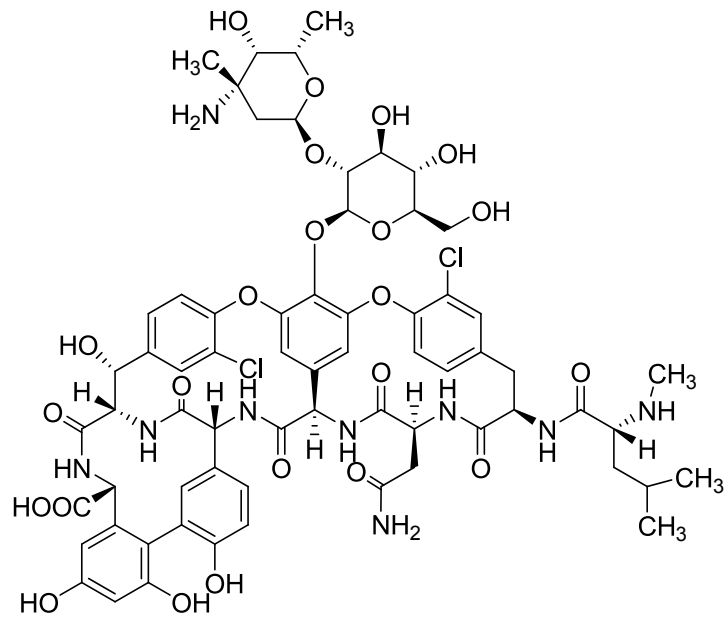
Célul tűztük ki új risztocetin-származékok szintézisét, oly módon, hogy a szénhidrát-rész teljes eltávolításával kapott aglikon N-terminálisához különböző cukor-molekulákat kapcsolunk. Ezen vegyületektől azt vártuk, hogy a trombocita-aggregáló hatás megszűnése mellett az antibakteriális aktivitás is javul az anyavegyülethez képest.

Terveink közt szerepelt, hogy teikoplanin- és risztocetin-aglikonból kiindulva, olyan lipofil származékokat állítsunk elő, amelyek a glikopeptid-rezisztens törzsekkel szemben is hatásosak. Az ötletet a nemrégiben már klinikai hármasként lépett úgynevezett lipoglikopeptidek (oritavancin, dalbavancin, telavancin) adták, amely vegyületek *staphylococcusokkal* és *enterococcusokkal* szemben mutatott aktivitása rendkívül biztató. Habár ezen származékok esetében a szénhidrát-részt megtartották, mi feltételeztük, hogy a deglikozilezéssel kapott aglikont módosítva, legalább olyan hatásos antibiotikum-származékokhoz jutunk.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. A glikopeptid antibiotikumok szerkezete

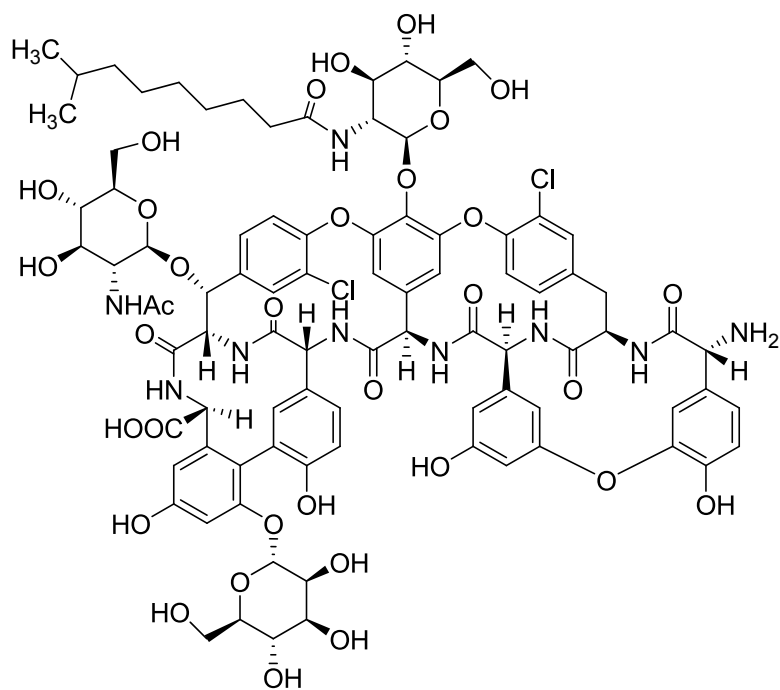
1984 előtt a vankomicin (1), teikoplanin (2), risztocetin (3) és avoparcinon (4) túl nem sok képviselőjét ismerték a glikopeptid antibiotikum-családnak. Az elsőként (1956-ban) felfedezett reprezentáns vankomicin tanulmányozásával nyert információk később nagyban segítettek a család többi tagjának karakterizálásában, ám a szerkezet meghatározására tett korai kísérleteket nehezítette a vegyület bonyolultsága, a szennyezők megléte és az a tény, hogy nem tudták kristályos formában kinyerni.



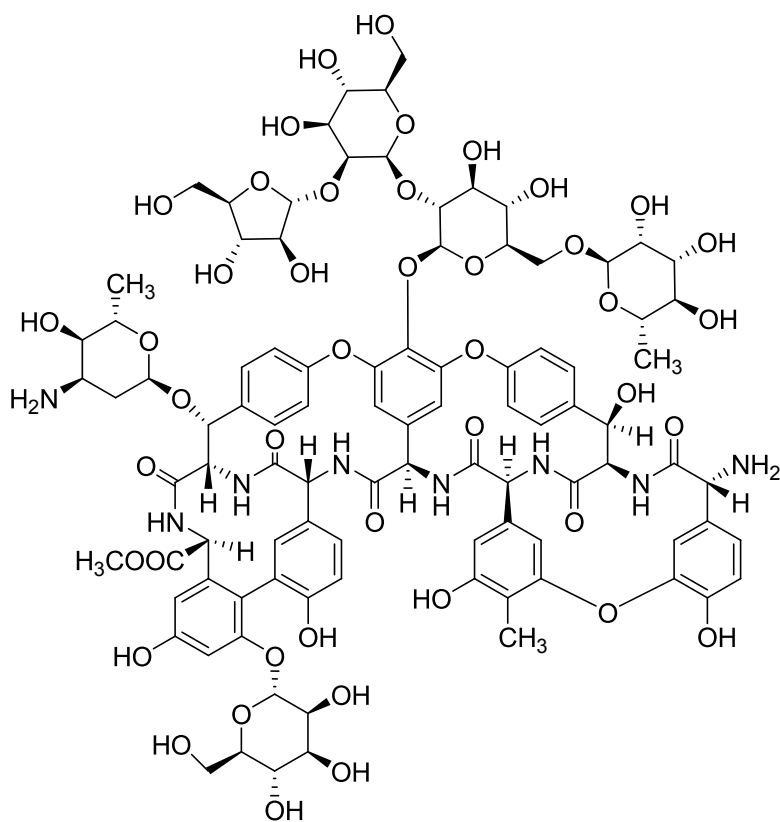
1

1. ábra A vankomicin

A tisztítási módszerek fejlődésével valamint az újabb spektroszkópai technikák megjelenésével lehetőség nyílt a vankomicin szerkezetének felderítésére. Az első ilyen kísérlet Marshall¹ nevéhez fűződik (1965), aki a vankomicin lebontásával nyert intermedierek vizsgálatával próbált meg közelebb kerülni az antibiotikum molekula szerkezetéhez, míg Williams és Kalman² 1977-ben közzétették NMR-spektroszkópiás tanulmányaikat, majd a következő évben Sheldrick³ egy bomlástermék (CDP-I) röntgenkristallográfiás analízisének eredményét. Ilyen előzmények után 1982-ben Harris és Harris⁴ meghatározta a vankomicin komplett szerkezetét, amit hamarosan a risztocetin⁵ és a teikoplanin karakterizálása követett.



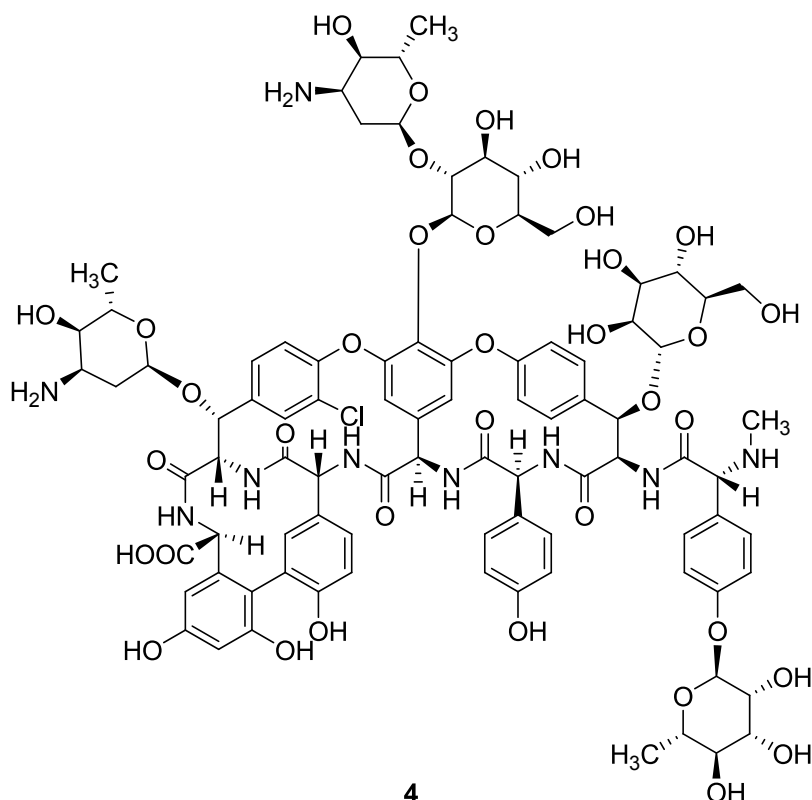
2



3

2. ábra A teikoplanin (2) és a risztocetin (3)

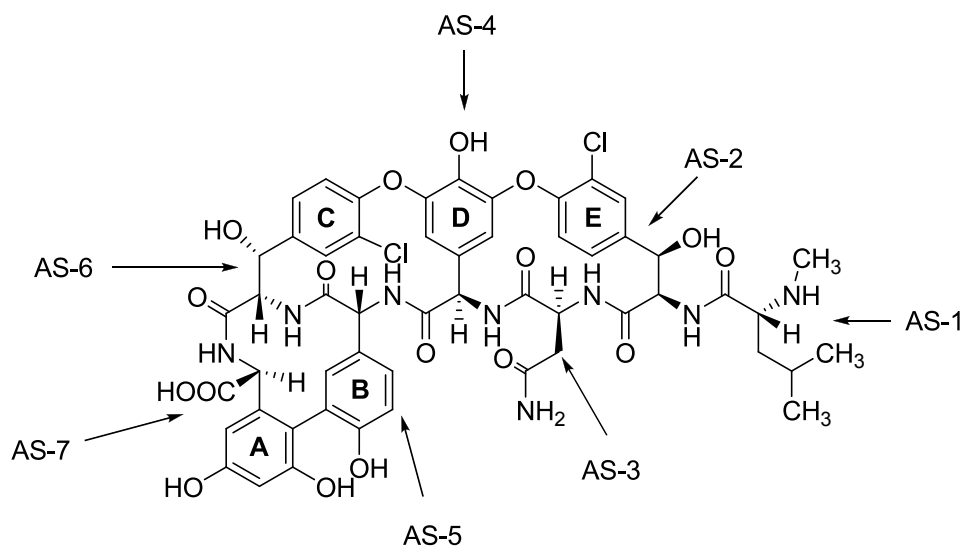
1995-ben elkészült az első, intakt glikopeptid antibiotikumon (balhimicin) elvégzett röntgenkristallográfiás analízis.⁶ A vankomicin *N*-acetil-D-alaninnal képzett komplexének röntgenkristallográfiás tanulmányozása⁷ nagymértékben elősegítette az antibakteriális hatás mechanizmusának megértését. A D-alanil-D-alanin terminálissal rendelkező peptidekhez való specifikus kötődés felismerésével rendkívüli mértékben felgyorsult az újabb és újabb származékok felfedezése: ezt a tulajdonságot kihasználták glikopeptid antibiotikumot termelő törzsek keresésénél; affinitáskromatográfiával több mint 80 %-ban lehetett kinyerni ezen antibiotikumokat a fermentfolyadékból.



4

3. ábra Az avoparcin

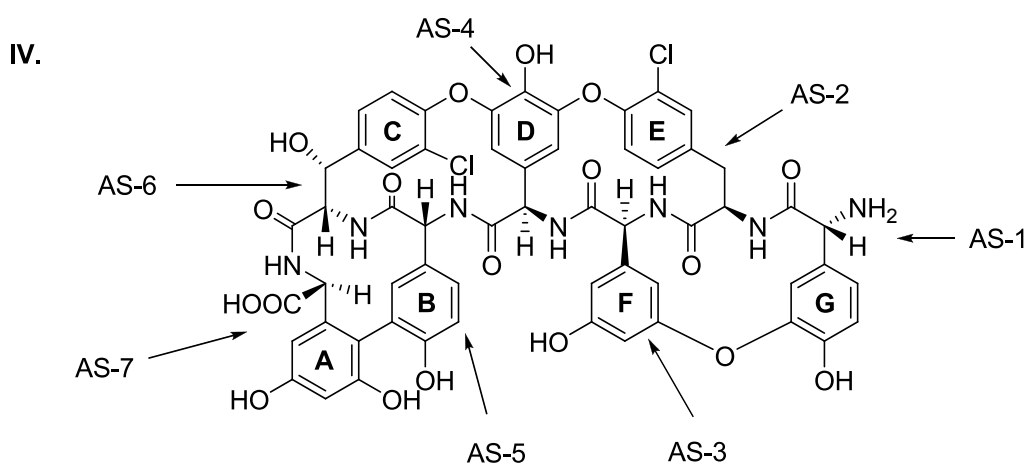
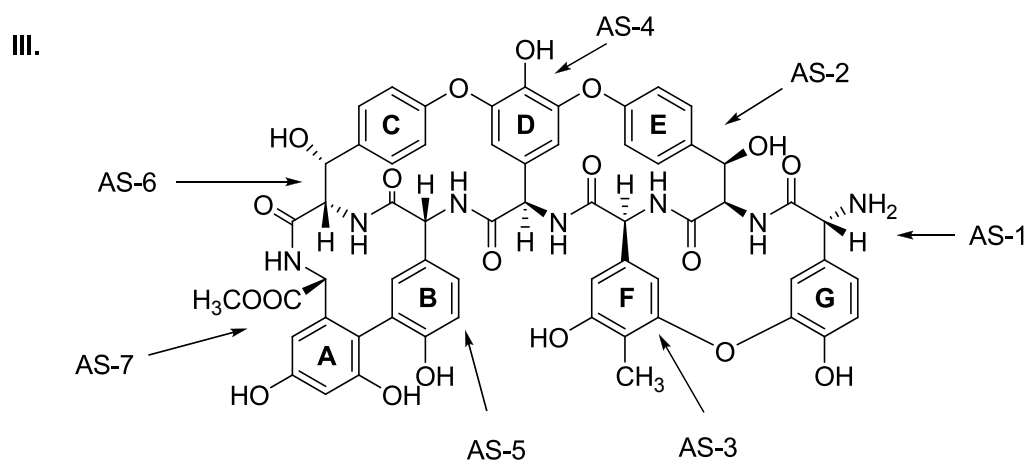
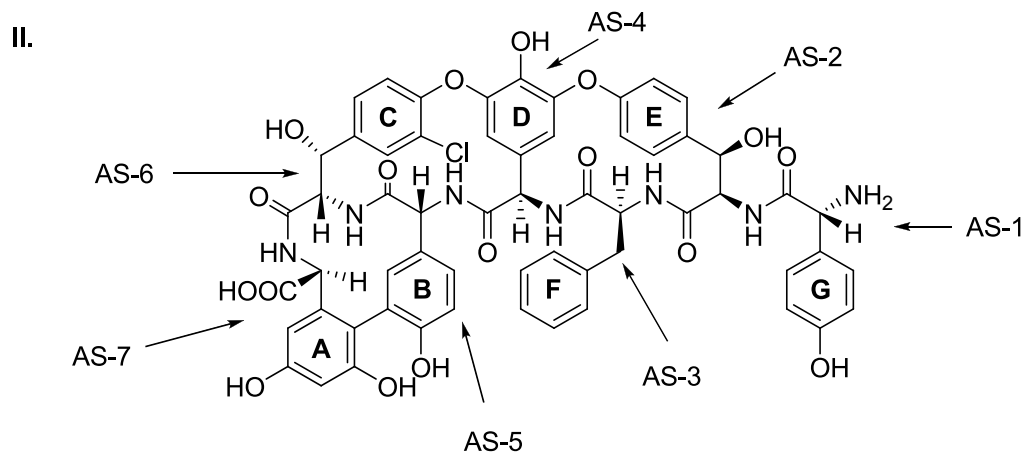
A glikopeptid antibiotikumok szerkezete, mint ahogy arra nevük is utal, egy gyűrűs heptapeptidből valamint a hozzá kapcsolódó szénhidrát-részből áll. Az aglikon felépítése alapján a több száz természetes és félszintetikus származék öt csoportba osztható. A hét aminosavat rendre AS-1 – AS-7-tel, az aromás gyűrűket pedig az ábécé nagybetűivel A – G jelölik az irodalomban.



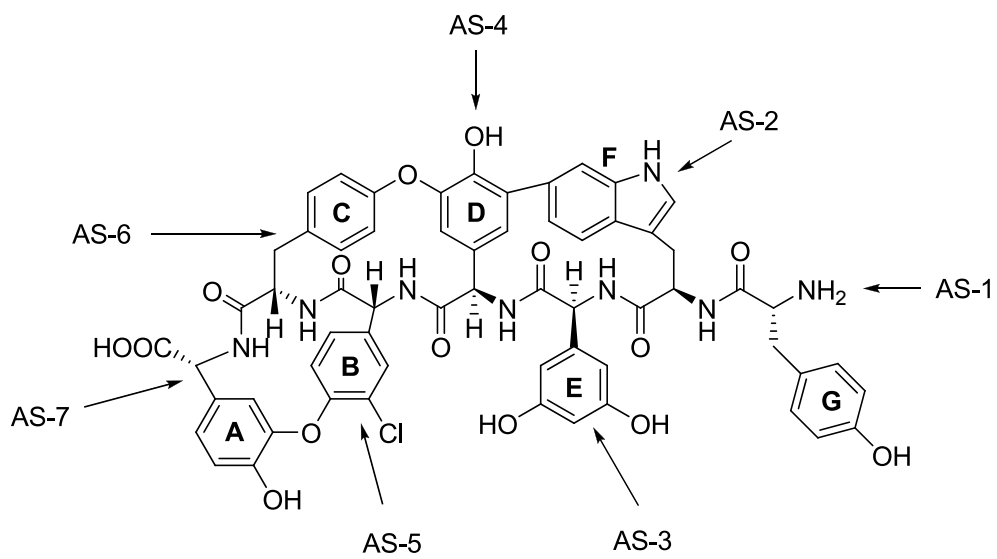
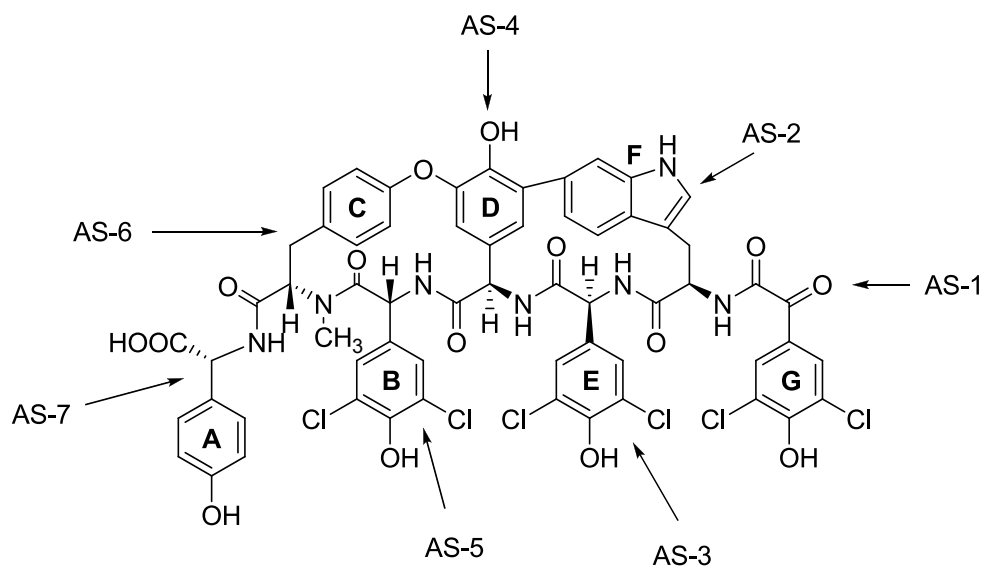
4. ábra Az I. típusú aglikon szerkezete

Az I. típusba tartozó vegyületek 1. és 3. aminosava (AS-1 és AS-3) alifás, a többi öt aminosav aromás oldalláncot tartalmaz, a II., III., IV. csoport esetében mind a hét aminosav aromás. Mind a négy csoportnál a ciklikus aglikon szerkezet kialakításában a hat peptidkötés mellett egy trifenil-éter struktúra is szerepet játszik (a C, D, E aromás gyűrűk oxigénen keresztül kapcsolódnak egymáshoz), valamint jellegzetes a bifenil szerkezet (A-B).

A III. és IV. típusba tartozó vegyületek F és G aromás gyűrűje éterkötéssel kapcsolódik össze. A IV. csoport jellegzetessége a molekula cukor részéhez kapcsolódó hosszú zsírsavlánc, aminek köszönhetően ezt az alcsoportot lipoglikopeptid néven is emlegetik. Az V. csoport némileg kakukktójásnak számít, habár ezek a vegyületek is gyűrűs heptapeptidok, de eltérnek az előző négy csoporttól abban, hogy az F aromás gyűrűjük egy indol (tehát az AS-2 triptofán). Megkérdőjelezhető a glikopeptid családba való besorolásuk, mivel ezen antibiotikum molekulák szénhidrát-részt nem tartalmaznak.



5. ábra A II., III. és IV. típusba tartozó vegyületek peptid részének felépítése



6. ábra Az V. típusba tartozó vegyületek szerkezete (komplextatin-felül és kisztamicin-alul)

1.2. Néhány fontosabb glikopeptid antibiotikum

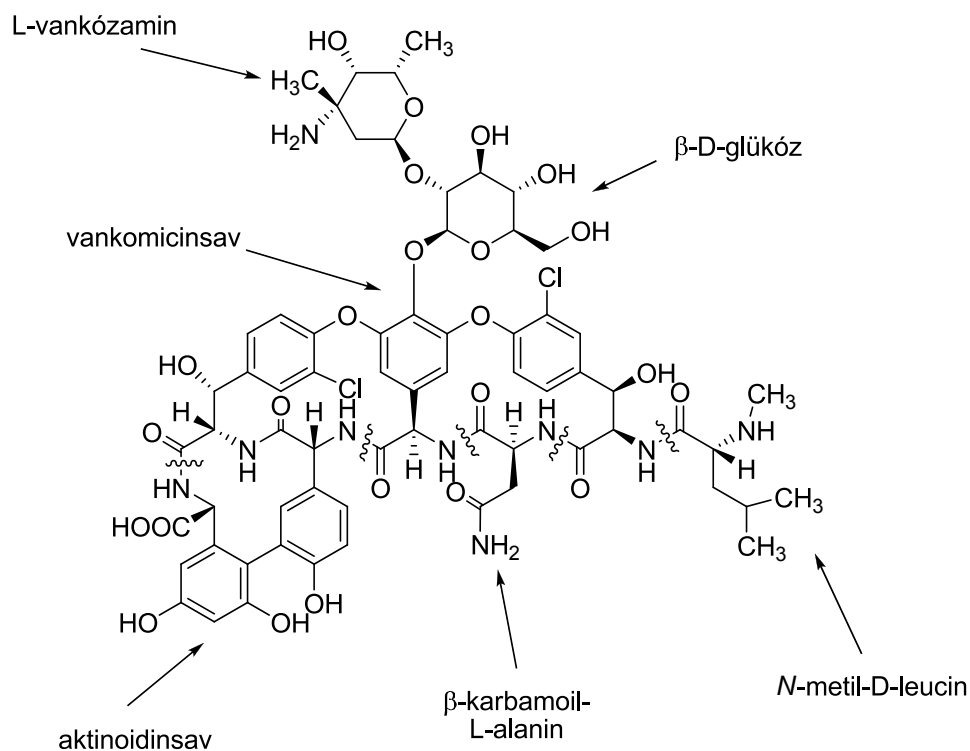
1.2.1. A vankomicin⁸

A glikopeptid antibiotikumok első reprezentánsát az amerikai Ely Lilly cég kutatói izolálták 1956-ban egy a borneói dzsungelből származó talajmintában talált mikroorganizmus, *Streptomyces orientalis* (későbbi nevén *Amycolatopsis orientalis*) fermentfolyadékából. (Később ezt a sugárgombát a Mississippi iszapjában is felfedezték és a klinikai vizsgálatokhoz szükséges antibiotikumot már ezzel termeltették). A kezdetben csak O5865 kódszám alatt futó vegyületnek a vankomicin nevet adták, ami az angol “vanquish” (győzedelmeskedik) igéből származik, utalva a legtöbb Gram-pozitív baktériummal szemben mutatott kitűnő aktivitására. A penicillin-rezisztens *staphylococcusok* gyors terjedésének köszönhetően az FDA engedélyével meglehetősen hamar, 1958-ban forgalomba került Vancocin[®] néven. A kezdeti sikerek nem voltak hosszú életűek, a jóval szélesebb spektrummal és lényegesen kisebb mellékhatás-profillal rendelkező meticillin, cefalosporinok és linkomicinek felfedezésével a “győztes” hamarosan teljesen feledésbe merült. Csillaga az 1980-as évek elején ragyogott fel újra, amikor is a meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) törzsek megjelenésével az egyedüli bevethető fegyver volt, és köszönhetően annak, hogy ekkorra Williams és mtsai felderítették a szerkezetét, lehetővé vált a vegyület lényegesen tisztább formában való előállítás (így a korábban tapasztalt mellékhatások – véna irritáció, allergiás reakciók, bőrkiütések, nefro- és ototoxicitás – nagyrészt megszűntek).

A vankomicin a glikopeptid antibiotikumok I. típusába tartozik (7. ábra). A gyűrűs heptapeptid-rész felbontható egy *N*-metil-D-leucinra (AS-1), egy β -karbamoil-alaninra (AS-3), egy többszörös fenil-éter szerkezettel rendelkező vankomicinsavra (AS-2,4,6) valamint egy bifenil struktúrájú aktinoidinsavra (AS-5,7). Az aglikont egy diszacharid glikozilezi a 4-es aminosav fenolos hidroxilcsoportján keresztül, ami β -D-glükózból és α -L-vankózaminból (3-amino-2,3,6-tridezoxi-3-C-metil-L-lixohexopiranóz) áll.

A vankomicint felhasználják *staphylococcus* okozta akut ileocolitis valamint *Clostridium difficile* által létrejött pszeudomembránózus enterocolitis kezelésére.

Mivel ez az antibiotikum a gyomor-bél traktusból nem szívódik fel, ezekben az esetekben orálisan adagolható. MRSA, valamint penicillin-rezisztens *Streptococcus pneumoniae* fertőzések esetén is kiváló szer. A vankomicin megnövekedett felhasználása az 1980-as évek második felére magával hozta a rezisztens törzsek megjelenését (1986-Európa, 1987-USA). Az egyre nagyobb számban felbukkanó vankomicin-rezisztens *staphylococcus* és *enterococcus* törzsek egy részénél még hatásos lehet a testvér-vegyület teikoplanin.



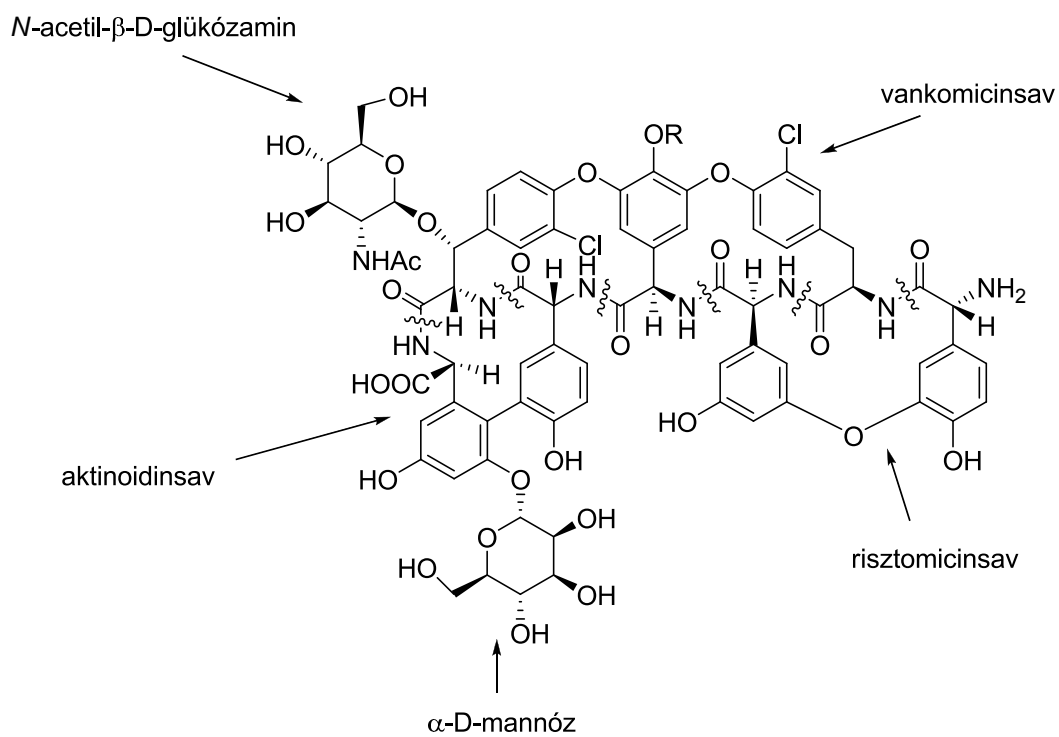
7. ábra A vankomicin szerkezete

1.2.2. A teikoplanin

A teikoplanint az olasz Lepetit cég kutatói fedezték fel 1978-ban.⁹ A több vegyületből álló keveréket az *Actinoplanes teichomyceticus* fermentlevéből izolálták és akkor még teichomycinnek nevezték. Mintegy tíz évvel később határozták meg az egymáshoz rendkívül hasonló komponensek szerkezetét és kimutatták, hogy azok aktivitása külön-külön épp olyan jó, mint a keveréké.¹⁰

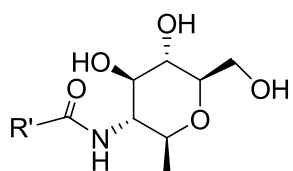
A teikoplanin a glikopeptid antibiotikum család IV. típusába tartozik, úgynevezett lipoglikopeptid (8. ábra). Az aglikon felépítésében, a vankomicinnél már megismert, vankomicin- és aktinoidinsavon túl egy bifenil-éter struktúrával rendelkező risztomicinsav (AS-1,3) vesz részt. A 7-es aminosav fenolos hidroxilcsoportjához egy α -D-mannóz, a 6-os alifás hidroxilcsoportjához egy *N*-acetyl- β -D-glükózamin kapcsolódik. A 4-es aminosav fenolos hidroxilcsoportját egy speciális cukor, egy *N*-acetyl- β -D-glükózamin (az acilcsoport egyenes vagy elágazó, 9-10 szénatomos lánc) glikozilezi. Ez utóbbi szerkezeti egységre utal a lipoglikopeptid elnevezés, és az egyes komponensek az acilező zsírsavak szerkezetében térnek el egymástól. Ez a molekularészlet (ti. az acil oldallánc) fontos szerepet játszik az antibakteriális hatásban és általa ez az antibiotikum meglehetősen hosszú (40-70 óra) keringési féléletidővel rendelkezik.

A teikoplanin 1988-ban Targocid[®] néven került be a klinikai gyakorlatba Európában, majd később Kanadában és az Egyesült Államokban is. Antibakteriális spektruma nagyjából megegyezik a vankomicinével, de *enterococcusok* ellen aktívabb és egyes vankomicin-rezisztens törzsekkel szemben is hatásos. A teikoplanint súlyos, penicillinekre, cefalosporinokra, egyéb antibiotikumokra nem reagáló bőr és lágyrész infekciók, húgyúti, alsó légúti, csont és ízületi fertőzések, septicémia, endocarditis, továbbá peritoneális dialízis okozta peritonitis kezelésére használják, illetve profilaktikusan ortopédiai műtéteknél a Gram-pozitív fertőzések megelőzésére.¹¹



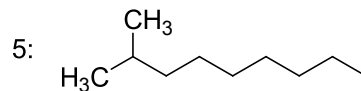
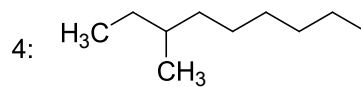
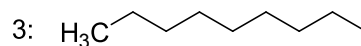
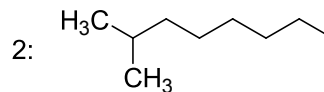
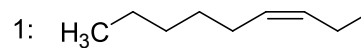
A₃-1 : R = H

A₂-(1-5) : R =



N-acil- β -D-glükózamin

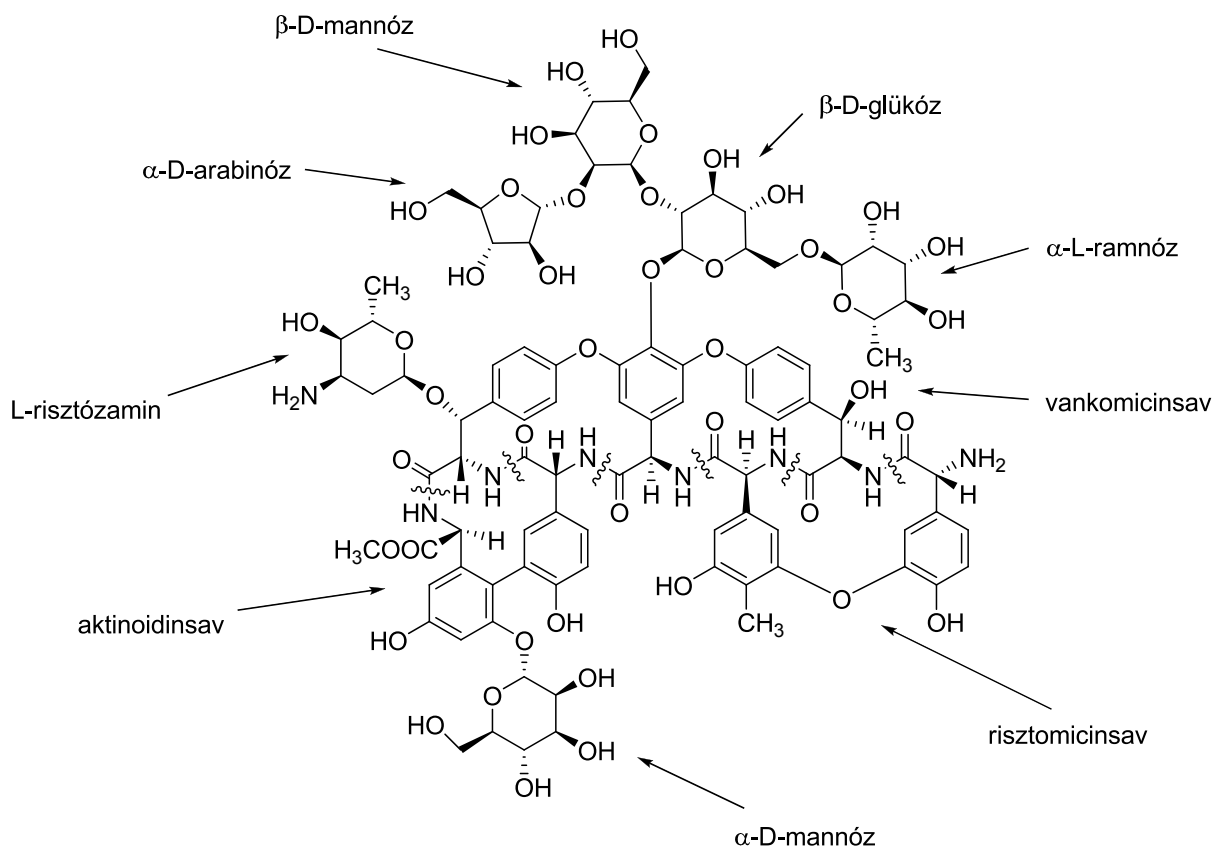
R' =



8. ábra A teikoplanin szerkezete

1.2.3. A risztocetin

A risztocetint az amerikai Abbott cég kutatói az *Amycolatopsis orientalis subsp. lurida* (későbbi nevén *Nocardia lurida*), míg a szovjetek a risztomicint a *Proactinomyces fructiferi* mélykultúrás tenyészetéből izolálták. A két felfedezés egymástól függetlenül, az '50-es évek derekán történt. A két antibiotikum szerkezeti felépítését és azonosságát több mint húsz évvel később Sztaricskai⁵ és mtsai igazolták. Antibakteriális spektruma gyakorlatilag megegyezik a vankomicinével, így hamarosan (1956-57) bekerült a klinikai gyakorlatba. 1960-ban Gangarosa¹² kutatócsoportja nyulakon végzett kísérletekkel kimutatta, hogy az antibiotikum a terápiáshoz közel eső koncentrációban trombocitopéniát és hipofibrinogémiát okoz. *In vitro* vizsgálataik során kiderült, hogy a risztocetin a vérlemezkéket koagulálja, makroszkópikus kicsapódásokat hoz létre. 1960-ban így kikerült a terápiából. Howard és Firkin¹³ fedezte fel, hogy a risztocetin nem okoz aggregációt a vérzékenység egy speciális formájánál. Megfigyelték, hogy a von Willebrand-kórban szenvedő betegek esetében nem működik a risztocetin-indukálta trombocita-aggregáció. A risztocetint még ma is használják ezen betegség gyors kimutatására, ami különösen műtéti beavatkozások előtt rendkívül fontos.



9. ábra A risztocetin szerkezete

A risztocetin a glikopeptid antibiotikumok III. típusába sorolható (9. ábra). Az aglikon egy risztomicinsavból, egy vankomicinsavból és egy aktinoidinsavból épül fel. Ez utóbbi fenolos hidroxilcsoportjához egy α -D-mannóz, a 6-os aminosav alifás OH-csoportjához α -L-ristózamin (3-amino-2,3,6-tridezoxi- α -L-ribohexopiranóz) kapcsolódik. A 4-es aminosavat egy tetraszacharid glikozilezi, ami α -D-arabinózból, α -D-mannózból, β -D-glükózból és α -L-ramnózból áll. A szerkezet-hatás összefüggések tanulmányozása során a kutatók azt feltételezték, hogy a C-terminális metoxi-karbonil-csoportja és a fenolos hidroxilcsoportok¹⁴ mellett a hetero-tetraszacharid oldallánc L-ramnóza hozható összefüggésbe az antibiotikum trombocita-aggregációs tulajdonságával. Ez utóbbit Williams¹⁵ és Mtsai egyértelműen bizonyították, amikor is naringenáz enzimmel szelektíve lehasították a ramnózt. A kapott származék nem aggregálta a vérlemezkéket.

1.3. A bakteriális sejtfalszintézis¹⁶

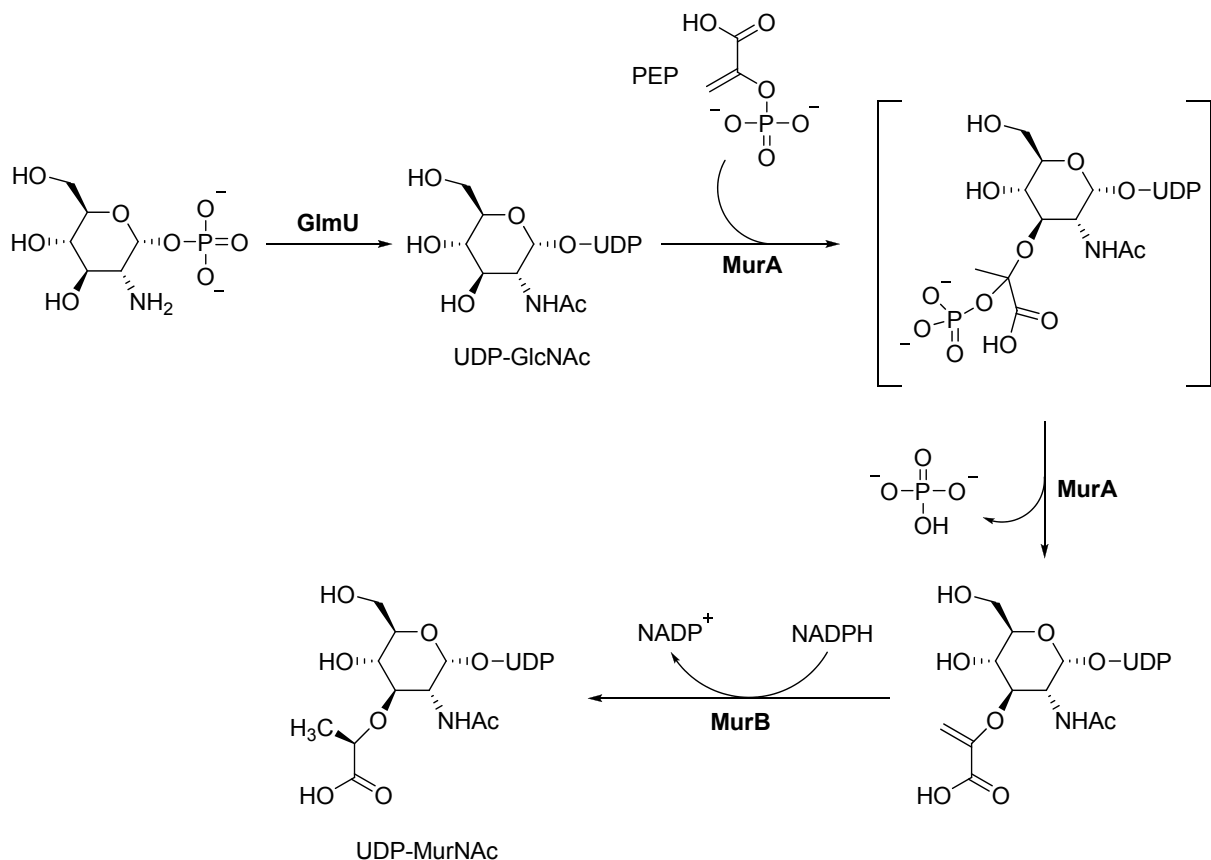
Az antibakteriális vegyületeket négy csoportba sorolhatjuk aszerint, hogy hogyan fejtik ki hatásukat. Így megkülönböztetünk sejtfalszintézist gátló, a bakteriális fehérjeszintézist blokkoló, a DNS-replikációt gátló, valamint egyéb mechanizmus szerint ható antibiotikumokat. A glikopeptidek az első csoportba tartoznak. Ahhoz, hogy hatásmechanizmusukat és a velük szemben kialakuló rezisztenciát megértsük, elengedhetetlen a bakteriális sejtfalszintézis ismerete.

A baktériumokat szerkezetük alapján két nagy csoportra oszthatjuk: Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokra. Az elkülönítésre szolgáló eljárás az ún. Gram-szerinti festés, ami során az előbbieket kristályibolya/jód-oldat kezelés hatására lila színűre festődnek, míg az utóbbiakból ez a festék alkohollal kimosható és a második, fukszinnal való festés után piros színnel látszódnak a mikroszkóp alatt. Az eltérő festődés hátterében a baktériumsejtet a külvilágtól elhatároló membrán és a peptidoglikán (PG) szerkezetbeli különbsége áll. A Gram-negatív baktériumok egy belső membránnal, egy relatíve vékony PG réteggel és egy külső membránnal rendelkeznek, míg a Gram-pozitívoknál ez utóbbi hiányzik, viszont a peptidoglikán sejtfal több rétegű és jóval vastagabb.

A peptidoglikán fal poliszacharid láncokból áll, amely váltakozva *N*-acetyl-D-glükózaminból és *N*-acetyl-muraminsavból (olyan *N*-acetyl-glükózamin, amelyhez 3-as helyzetben egy tejsav kapcsolódik éterkötéssel) épül fel. Az utóbbi komponens egy pentapeptid oldalláncot tartalmaz, amelyek között keresztkötések jönnek létre, kialakítva a PG stabil szerkezetét. A bakteriális sejtfal létfontosságú a mikroorganizmus számára, ugyanis hiánya vagy tökéletlen szerkezete esetében nem képes ellenállni az ozmotikus nyomásnak (ami akár 25 atmoszféra is lehet) és a baktériumsejt lízise következik be. A peptidoglikán sejtfal bioszintézise három fázisra osztható aszerint, hogy hol mennek végbe az enzimikus átalakítások. Így megkülönböztetünk citoplazmatikus, membránhoz kötött és extracitoplazmatikus folyamatokat. Ezek alaposabb megismerése márcsak azért is lényeges, hiszen számos antibiotikum – köztük a glikopeptidek is – valamely lépés blokkolásával fejt ki antibakteriális hatását.

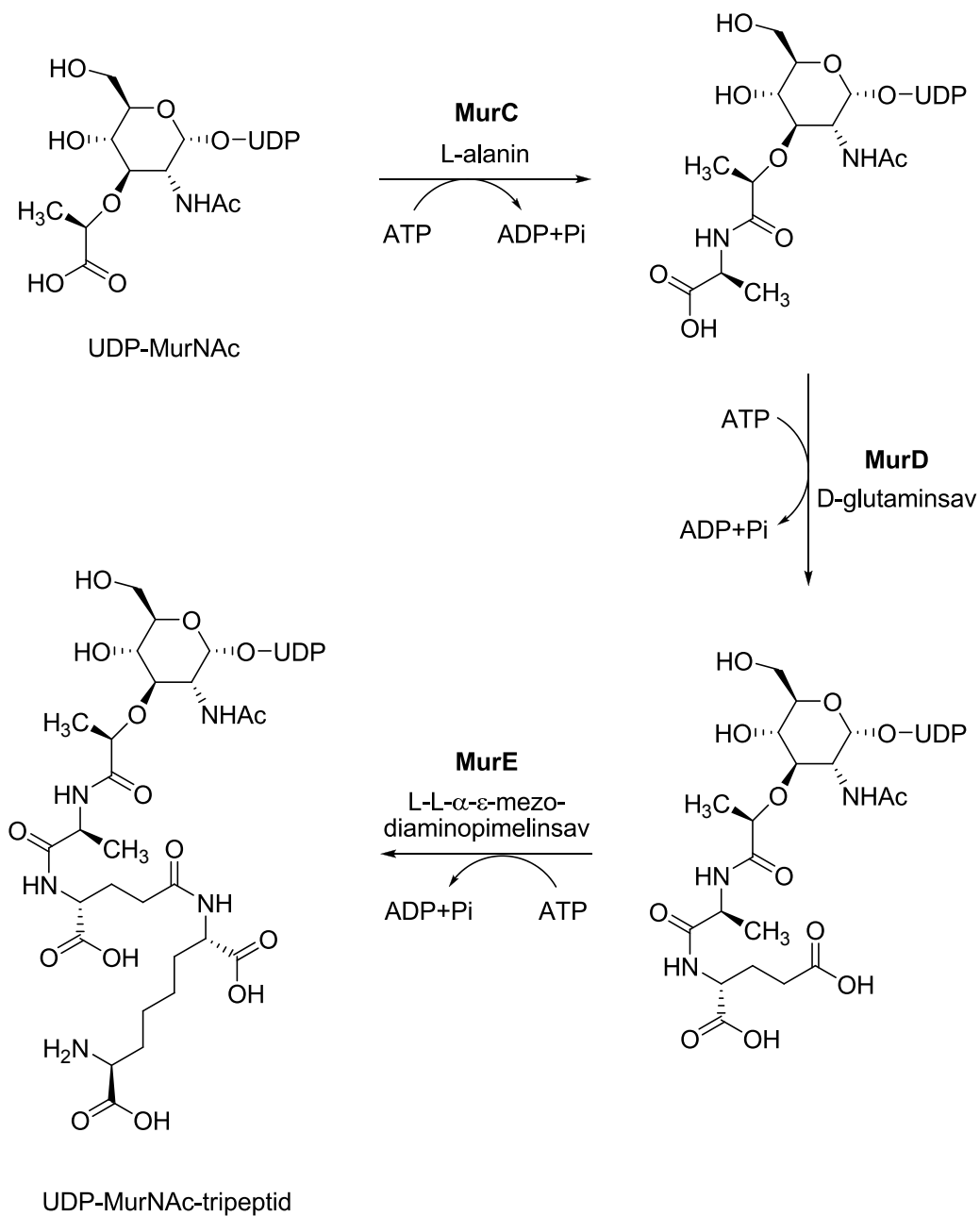
1.3.1. Citoplazmatikus fázis

Ebben a fázisban megy végbe a PG építőkövének, a diszacharil-pentapeptidnek a bioszintézise. A PG réteg murein néven is ismert (ez a görög eredetű szó falat jelent), innen származik a folyamatban részt vevő enzimek és az őket kódoló gének elnevezése MurA-G illetve murA-G. A bioszintézis glükózamin-1-foszfátból indul, amelynek *N*-acetilezését, majd uridinnel való kapcsolását egy bifunkciós enzim, a GlmU végzi. Az *N*-acetyl-muraminsavvá történő transzformációért a MurA és MurB enzimek a felelősek. MurA foszfoenol-piruvátot (PEP) használva kosubsztrátként egy 3'-O-enolpiruvil-éter kötést alakít ki egy szokatlan addíciós/eliminációs folyamatban. Az UDP-*N*-acetyl glükózamin (UDP-GlcNAc) 3'-helyzetű OH-csoportja a PEP kettőskötésére addicionál regio- és sztereospecifikusan a C₂-re, majd az enzimkatalízis második lépéseként egy HPO₄²⁻ eliminációjával létrejön egy enoléter-származék, amelynek kettőskötését MurB redukálja NADPH felhasználásával, kialakítva egy tejsav-éter típusú intermediert az UDP-*N*-acetyl-muraminsavat (UDP-MurNAc).



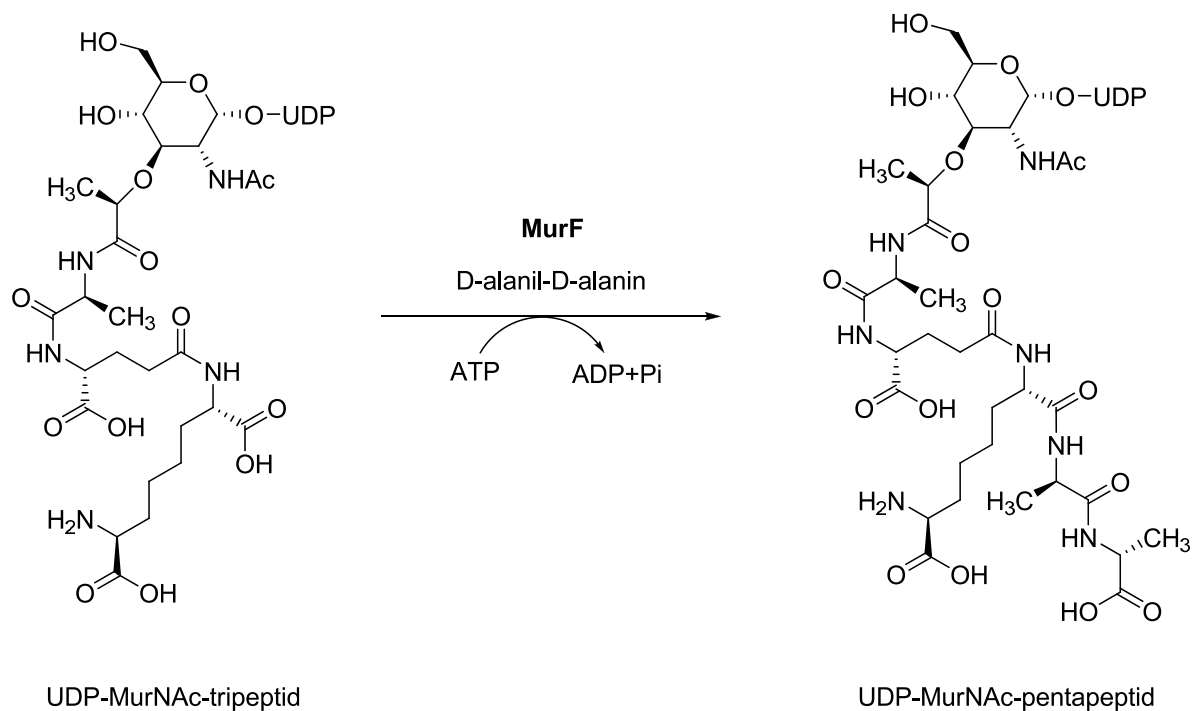
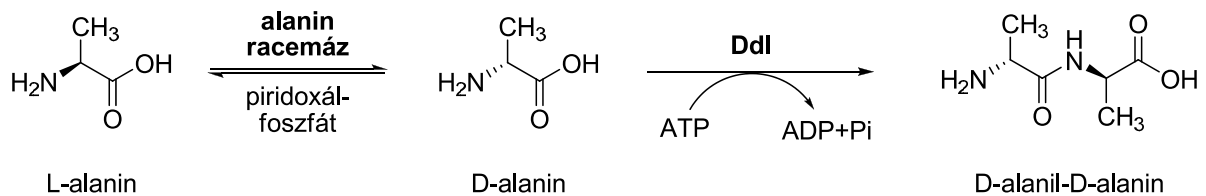
10. ábra Az UDP-*N*-acetyl-muraminsav bioszintézise

MurC, D és E enzimek rendre az L-alanin, D-glutaminsav és (L-L- α - ϵ)-mezo-diaminopimelinsav (vagy L-lizin) beépüléséért felelősek, létrehozva az UDP-N-acetil-muraminsav-tripeptid szerkezetet. Az enzimek az amidkötés kialakításához egy ATP molekulát használnak fel, létrehozva egy acil-foszfát típusú vegyes anhidridet, amely a soron következő aminosav aminocsoportját acilezi meg. MurE egy izopeptidkötést alakít ki, mivel a D-glutaminsavnak nem az α -, hanem a γ -helyzetű karboxilcsoportja acilezi a mezo-diaminopimelinsav egyik aminocsoportját.

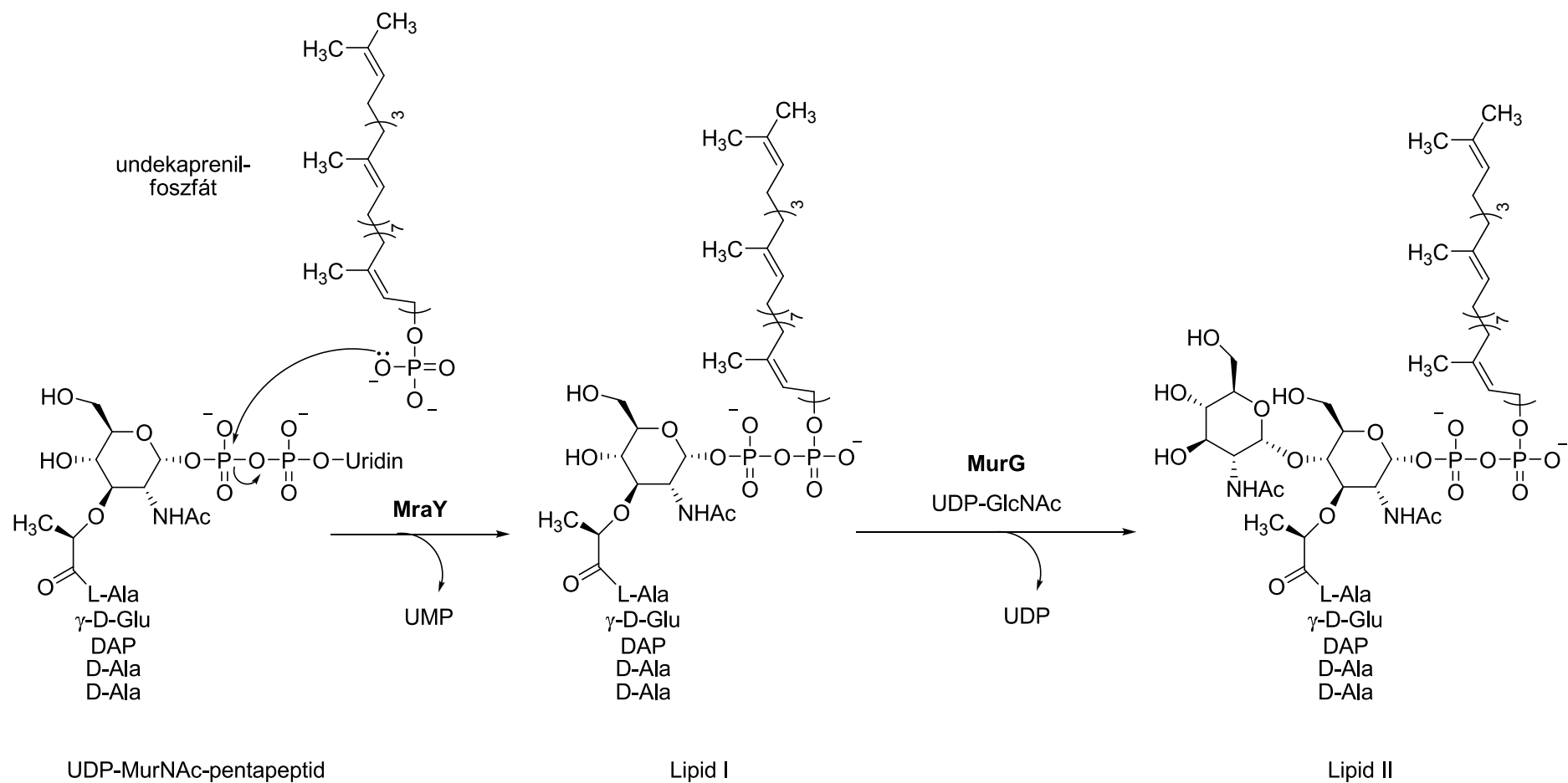


11. ábra Az UDP-N-acetil-muraminsav-tripeptid bioszintézise

A citoplazmatikus fázis befejezéseként MurF egy D-Ala-D-Ala dipeptidet kapcsol, az előzőekhez hasonlóan egy ATP-t fogyasztva, s így létrejön az UDP-*N*-acetyl-muramyl-pentapeptid. A dipeptid szintézisét egy piridoxál-foszfát dependens racemáz végzi, amely L-alaninból D konfigurációjú készíti, míg a két D-alanin összekapcsolását egy ATP függő enzim, a D-alanyl-D-alanin ligáz (Ddl) hajtja végre.



12. ábra Az UDP-*N*-acetyl-muramyl-pentapeptid bioszintézise

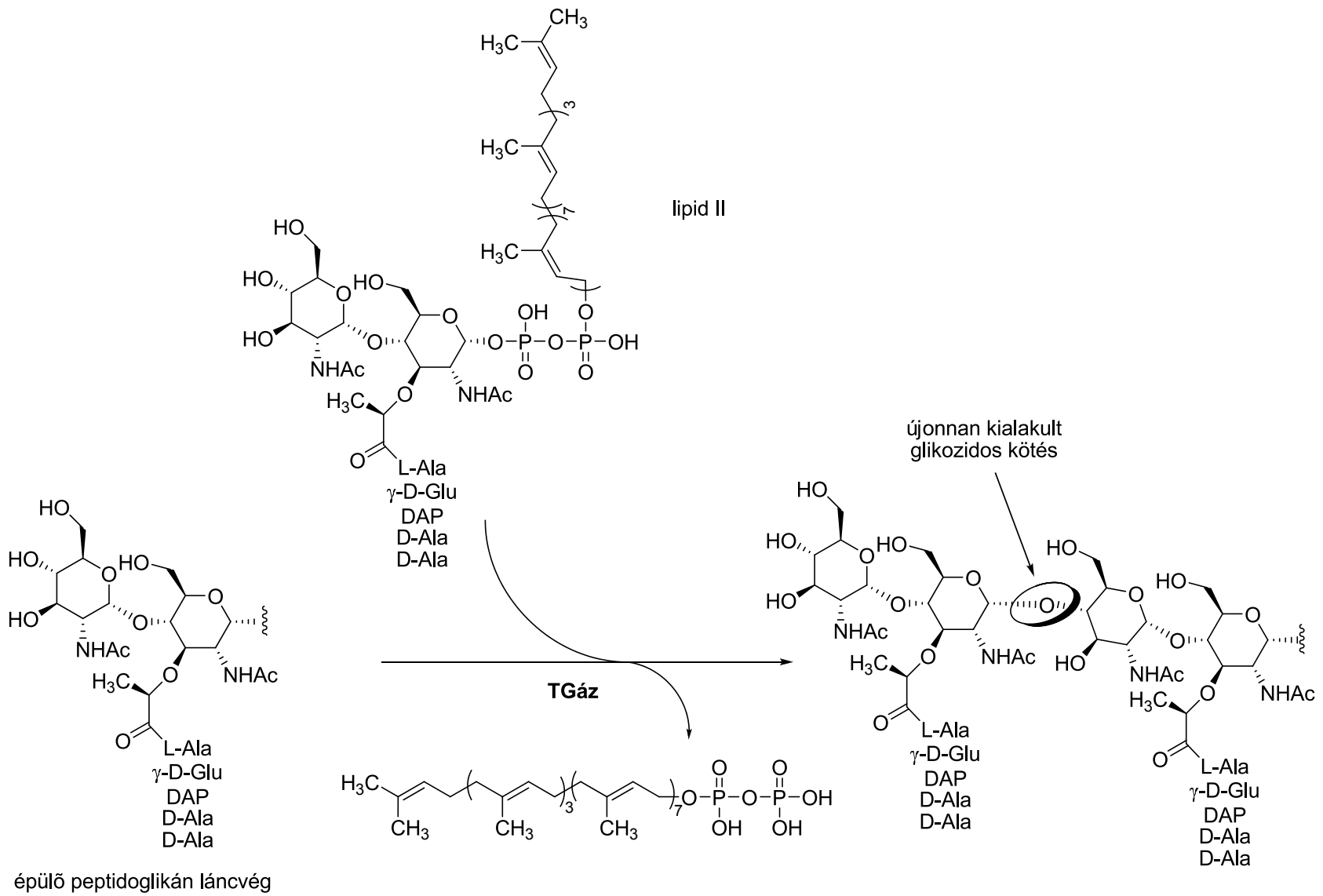


1.3.2. Membránhoz kötött folyamatok

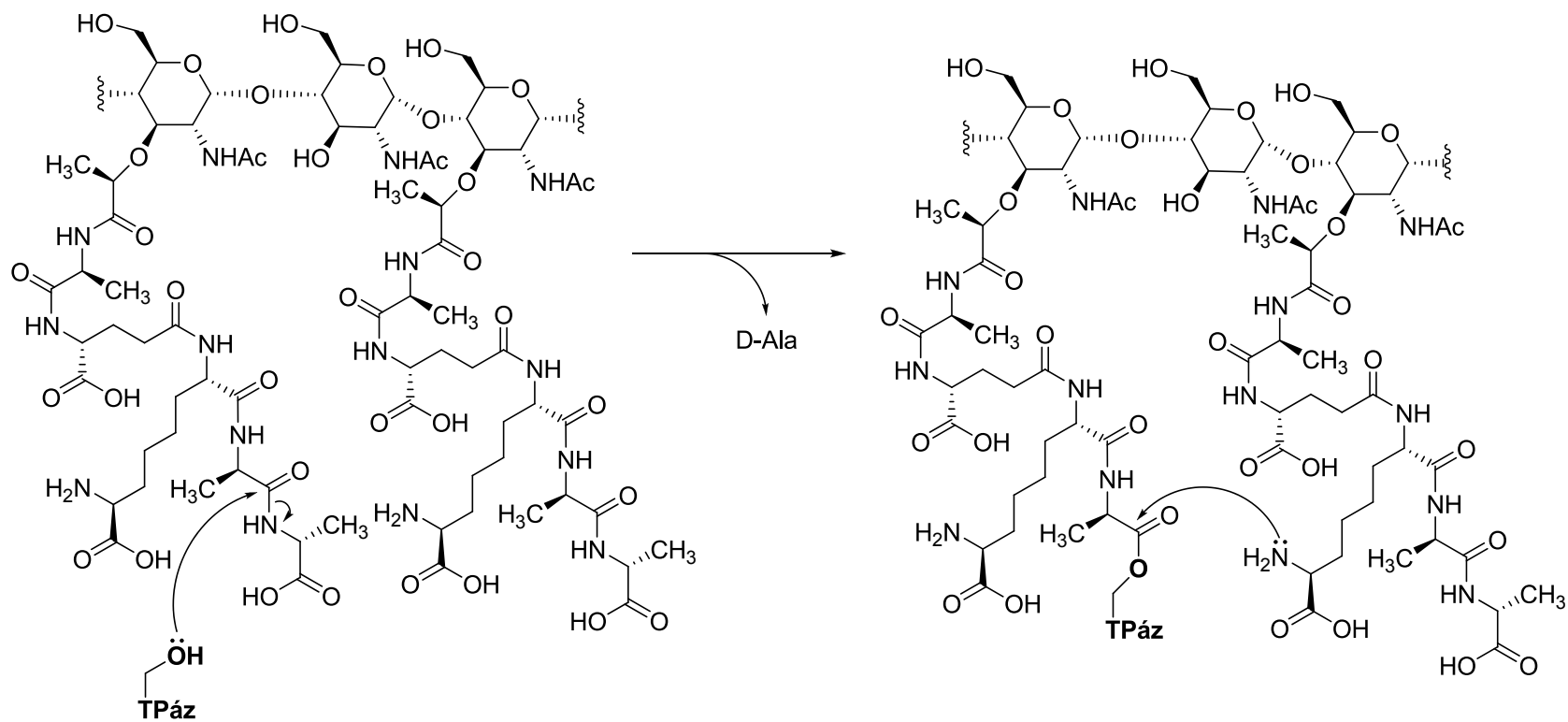
Egy transzlokáz enzim, a *MraY* hatására az *N*-acetyl-muramyl-pentapeptid egység a vízoldékony UDP hordozóról átkerül egy szokatlan membránalkotóra, az 55 szénatomos undekaprenil-foszfátra. Egy UMP molekula kihaladásával egy pirofoszfát híd jön létre a muramyl-pentapeptid és a membránba ágyazott C₅₅ lipid között. Az így képződött intermedier lipid I néven ismert. Ezt követően a membrán belső felszínéhez kötött transzglykoziláz enzim (*MurG*) α -1,4-glikozidos kötést alakít ki a lipid I muraminsav 4-es helyzetű OH-ját *N*-acetyl-D-glükózammal glikozilezve (a glikozildonor az UDP-*N*-acetyl-glükózamin). Az így létrejött lipid-diszacharil-pentapeptid neve lipid II. Ez, a baktérium sejtfalának építőköve, transzlokációval átkerül a citoplazma membrán belső felszínéről a periplazmatikus / külső felületére, ahol a transzglykozilációs és transzpeptidációs folyamatokba bekapcsolódva részt vesz a stabil peptidoglikán réteg kialakításában.

1.3.3. Extracelluláris folyamatok

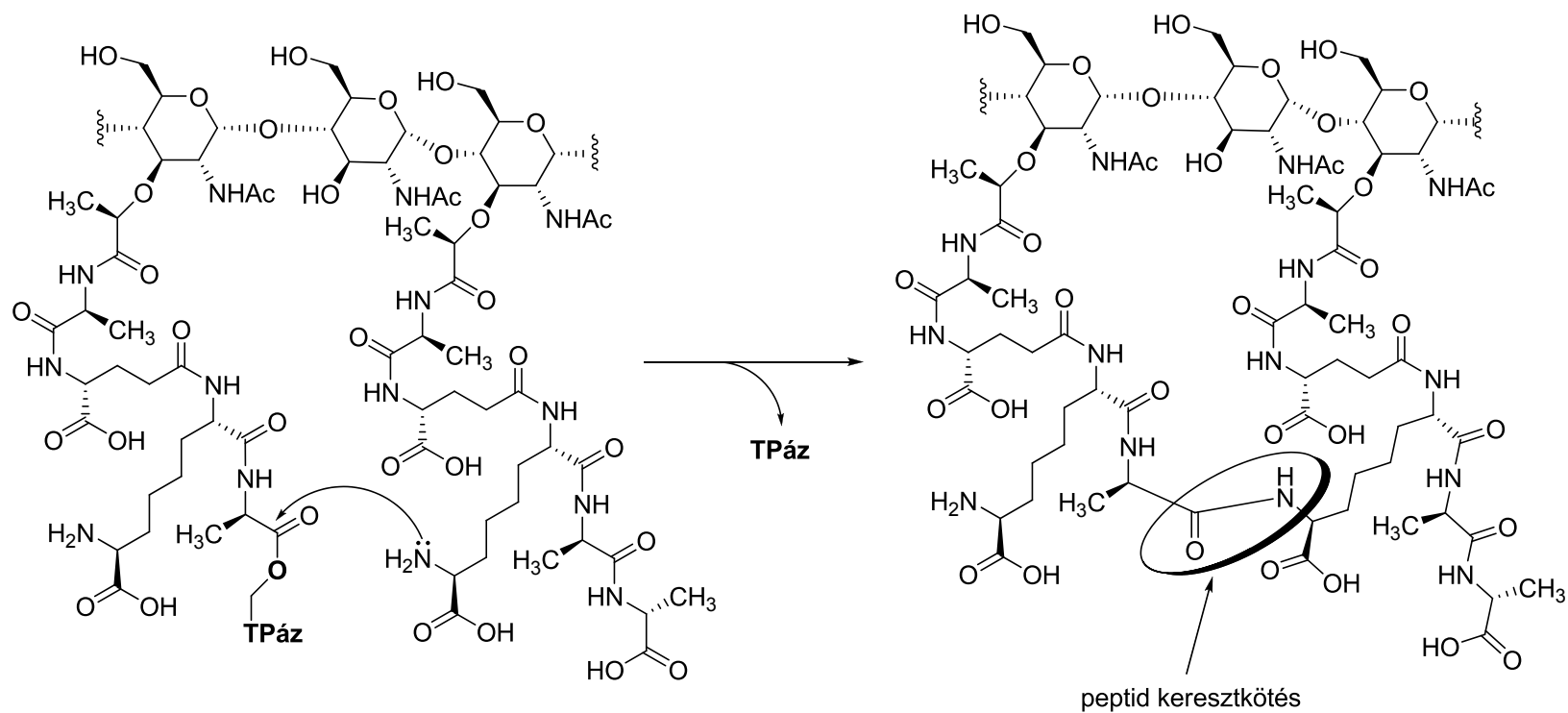
Az 55 szénatomos lipid fark révén a diszacharil-pentapeptid egység membránba kihorgonyozott állapotban van és így könnyen hozzáférhető a membránhoz kötött transzglykoziláz és transzpeptidáz enzimek számára. (Vannak bifunkciós enzimek is, amelyek diszkrét transzglykoziláz és transzpeptidáz doménnel rendelkeznek.) A transzglykoziláz (TGáz) enzim hasítja a lipid II muramyl egységének C₁-O-PO₃ kötését és egyúttal újabb diszacharil-pentapeptid egységgel glikozilezi a növekvő glikán-lánc terminális *N*-acetyl-glükózaminjának 4-helyzetű OH-csoportját. A szabaddá váló C₅₅ lipid-pirofoszfát megfelelő transzportfolyamattal visszakerül a membrán belső felszínére. A membránhoz kötött foszfátáz hidrolizálja a pirofoszfát-részt és a C₅₅ lipid-foszfát újra alkalmas lesz a lipid I kialakítására, amely lipid II-vé alakulva és transzlokálódva a membrán külső felszínére egy újabb diszacharil-pentapeptid molekulát szolgáltat az épülő peptidoglikán-lánchoz.



14. ábra A transzglykozilációs lépés



15. ábra A peptid oldalláncok közötti keresztkötés kialakításának első lépése – a terminális alanin aktiválása



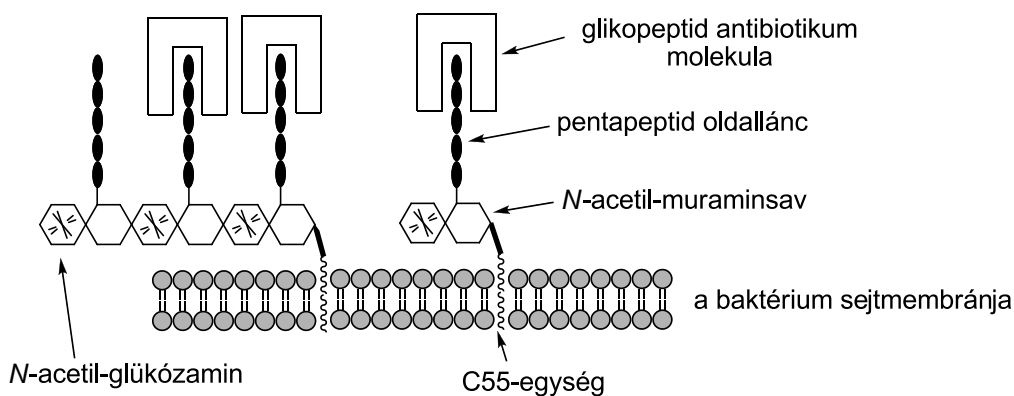
16. ábra A transzpeptidáció második lépése – a peptid-keresztkötés kialakulása

Az így létrejött glikán-láncok közötti keresztkötéseket a transzpeptidáz (TPáz) enzimek (vagy a bifunkciós enzimek transzpeptidáz doménjei) hozzák létre; ezeket másnéven PBP-nek (penicillin binding protein) is nevezik utalva arra, hogy igen erősen képesek kötni a penicillint vagy kefalosporint, amelyek ezáltal inaktíválják az enzimet. A peptid-keresztkötések kialakításának első lépéseként az enzim először hasítja a 4 és 5 D-alanin közötti peptidkötést, aminek során egy D-alanin szabaddá válik és létrejön egy *O*-acil-transzpeptidáz, amely az acilcsoportot aktív formában tartalmazza az enzim szerin oldalláncának OH-csoportjához kapcsolódva.

Az egyszerű peptidázoknál (amelyek a fehérjék hidrolízisét végzik) egy vízmolekula regenerálja az enzimet, a transzpeptidáz esetén azonban nukleofilként a szomszédos pentapeptid oldallánc mezo-diamino-pimelinsav vagy lizin α -helyzetű aminocsoportja szolgál és az enzim úgy regenerálódik, hogy közben egy peptid-keresztkötés jön létre. Meg kell jegyezni, hogy egyes Gram-pozitív baktériumok transzpeptidázai nem közvetlenül kapcsolják össze az egyik peptid oldallánc 4-helyzetű alaninját és egy másik mezo-DAP vagy lizin részét, hanem egy pentaglicin egységen keresztül. A biotranszformáció azonban mindkét esetben ugyanazt a célt szolgálja: keresztkötésekkel erősíti meg a baktérium peptidoglikán sejtfalát, ami ebben a formában már képes lesz ellenállni az ozmotikus nyomásnak és megvédeni a baktériumot a lízistől.

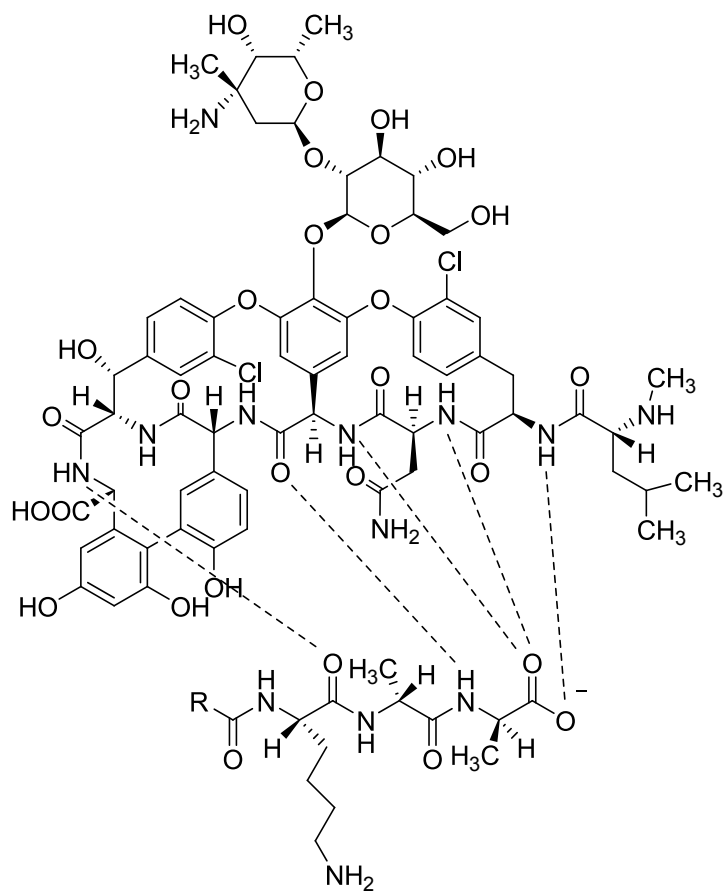
1.4. A glikopeptid típusú antibiotikumok hatásmechanizmusa¹⁷

1961-ben Reynolds¹⁸ és Jordan¹⁹ voltak az elsők, akik beszámoltak a vankomicin Gram-pozitív baktériumokra kifejtett szaporodást gátló hatásáról. Két évvel később Wallace és Strominger²⁰ risztocetinnel végzett kísérletei hasonló eredményt hoztak és megállapították, hogy ezen antibiotikum család elsődleges támadáspontja a baktériumok sejtfal-bioszintézise. A további kutatások révén fény derült a hatás molekuláris alapjaira: Nieto és Perkins^{21,22} a vankomicin antibakteriális hatását azzal magyarázták, hogy az képes specifikusan kötődni a bakteriális sejtfalprekurzor UDP-*N*-acetyl-muramyl-pentapeptide-hez. Ezt később a Williams^{23,24} és munkacsoportja által végzett mágneses magrezonancia-spektroszkópia vizsgálatok is alátámasztották, amikor is az antibiotikum és különböző acyl-D-alanyl-D-alanine terminálissal rendelkező peptidanalógok között kialakult erős, nem kovalens kölcsönhatásról számoltak be. A glikopeptid típusú antibiotikumok nincsenek hatással a Gram-negatív baktériumokra, mivel nem képesek áthatolni azok külső membránján és így eljutni a PG-szintézis helyszínére a periplazmatikus térbe. Kiváló aktivitásúak azonban számos Gram-pozitív törzssel szemben, mint a *staphylococcusok*, *streptococcusok* és *enterococcusok*. Hatásukat nem a sejtfalépítésben részt vevő transzglykoziláz vagy transzpeptidáz közvetlen gátlásán keresztül fejtik ki, hanem úgy, hogy ezen enzimek szubsztrátjául szolgáló diszacharil-pentapeptide terminális D-alanyl-D-alanine-jával kölcsönhatásba lépve azt mintegy keheleszerűen körülölelik és így az enzim nem képes hozzáférni. Az antibiotikum molekula kapcsolódhat a kereszt-kötéseket még nem tartalmazó peptidoglikán-lánc peptid oldalláncához vagy a lipid II azonos végéhez. Ez utóbbi az ún. lipoglikopeptidekre jellemző, amelyek lipofil oldalláncuk révén képesek kihorgonyozódni a membrán felszínén és a kialakított H-hidas komplex révén nemcsak a transzpeptidáz, de a transzglykoziláz enzim működését is gátolni – ez különösen a bifunkciós nagy molekulatömegű PBP-k esetén valósul meg.



17. ábra A glikopeptid típusú antibiotikumok hatásmechanizmusának sematikus ábrázolás

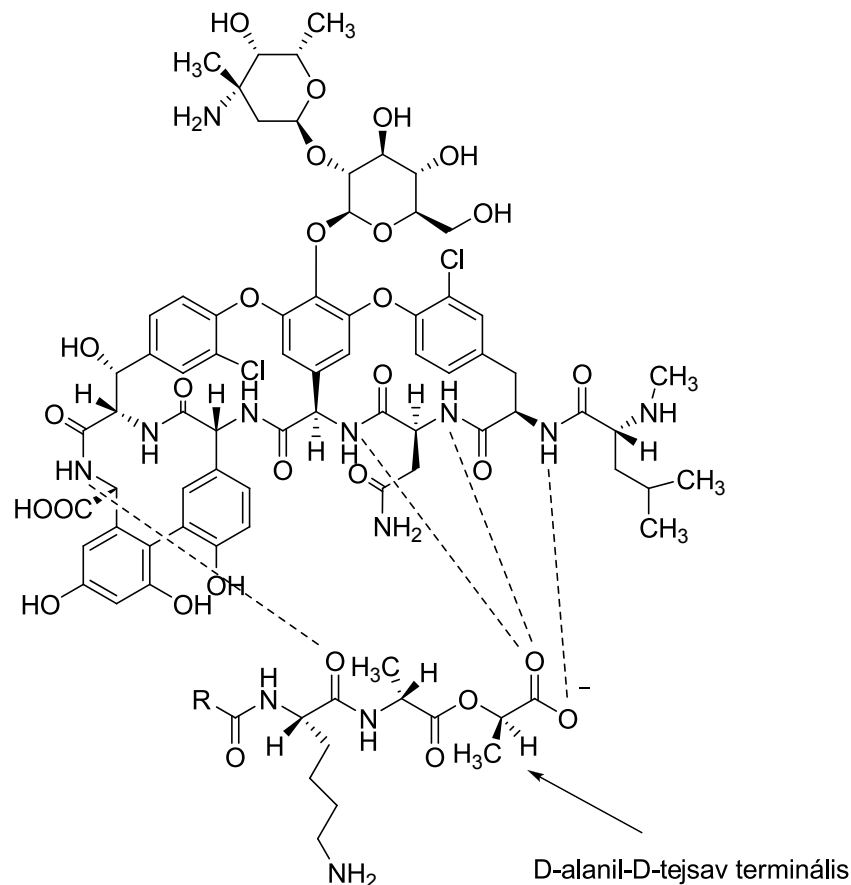
A kapcsolat öt hidrogén-híd segítségével valósul meg a sejtfallprekursor terminális két alaninja és az antibiotikum molekula között (18. ábra). A másodlagos kötés kialakításában a glikopeptid 2, 3, 4 és 7 aminosav amidkötésben lévő NH-csoportja, valamint a 4-es karbonilja vesz részt, de a molekula többi részének is nagy szerepe van a kötődés létrejöttében és így az antibakteriális hatásban. A sejtfallprekursor és az antibiotikum kölcsönhatásának erősségét, vagyis a komplex disszociációs állandóját nagyban befolyásolja a glikopeptid molekula dimerizációs képessége. Williams és mtsai kimutatták, hogy az antibiotikum másodlagos kötőerőkkel létrehozott dimerjei sokkal erősebben kötődnek a peptid-rész terminálisához, mint a monomerek, ezért minél inkább hajlamos egy glikopeptid-származék a dimerizációra, annál erősebb kapcsolatot tud kialakítani a sejtfallprekuzorral, s így annál jobb antibakteriális aktivitást mutat. Ezt a tényt kihasználva számos kovalens vankomicin-dimert állítottak elő és tanulmányozták hatását vankomicin-rezisztens törzsek esetén. (Részletesebben lásd a „Glikopeptid antibiotikumok félszintetikus módosítása” című fejezetet!).



18. ábra A sejtfalprekursor és az antibiotikum között kialakuló kölcsönhatás

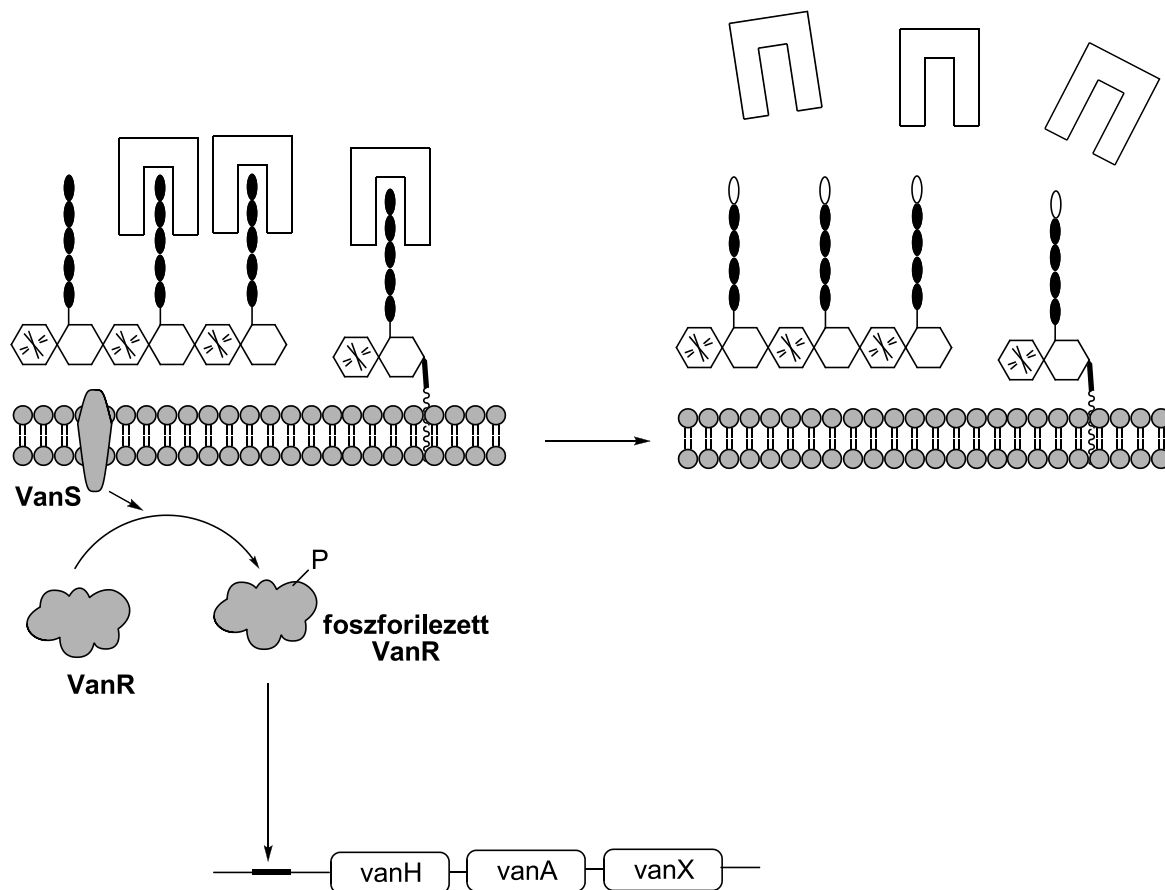
1.5. A glikopeptid antibiotikumokkal szembeni rezisztencia²⁵

A glikopeptid antibiotikumok gyógyászati alkalmazása mintegy ötven évre tekint vissza. A vankomicint és a risztocetint az ötvenes évek végén kezdték el használni, ám az utóbbit néhány év múlva visszavonták súlyos mellékhatása miatt (a vérlemezkék aggregációját okozza). A vankomicin jelentősége 1980 után nőtt meg, amikor is egyre nagyobb számban jelentek meg meticillin- illetve meticillin-oxacillin-rezisztens *staphylococcus* törzsek és ezekkel szemben egyedüli fegyver a vankomicin volt az orvosok kezében. 1988-ban Európában bekerült a klinikai gyakorlatba a teikoplanin. A megnövekedett vankomicin-felhasználás, valamint a szintén glikopeptid típusú avoparcin mezőgazdasági alkalmazásának hatására 1989-ben megjelentek az első vankomicin-rezisztens *enterococcusok*, később pedig már vankomicinre és teikoplaninra egyaránt rezisztens törzseket is izoláltak az Egyesült Államokban nozokomiális fertőzések kapcsán.



19. ábra Az antibiotikum és a megváltozott szerkezetű sejtfallprekurzor közötti kölcsönhatás

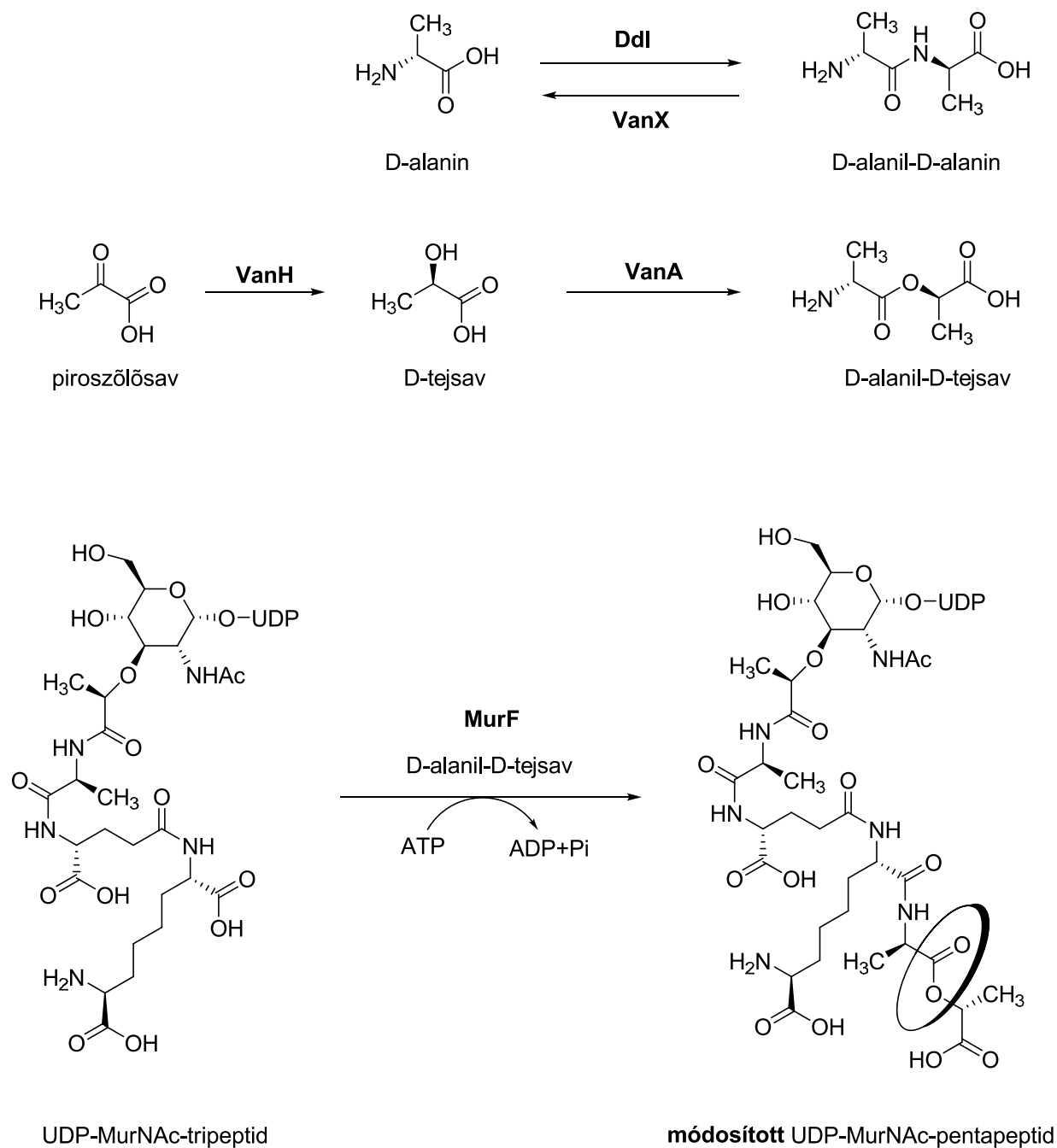
Az *enterococcusok* kevésbé veszélyes patogének, mint a *staphylococcusok*, de tekintettel arra, hogy ezek a rezisztencia-gének plazmid eredetűek, ezért azokat könnyen átadhatják más baktériumoknak. Ők maguk is veszélyesek lehetnek immunszuppresszált állapotban, gyakran okozhatnak endokarditist, húgyúti fertőzést katéter használatakor, szisztémás fertőzést dialízis esetén vagy kemoterápia okozta fehérvérsejtszám-csökkenéskor. A rezisztens *enterococcusok* között háromféle fenotípust különböztethetünk meg: VanA, VanB és VanC. A rezisztencia mechanizmusát tekintve mindháromban közös az, hogy a szokásos sejtfalprekurzor szerkezete megváltozik, ezáltal az antibiotikum kötődésének erőssége lecsökken, s így nem lesz képes gátolni a transzpeptidáz és transzglykoziláz enzimek működését. A VanA és VanB fenotípus esetén a változás abban áll, hogy míg normál esetben a diszacharil-pentapeptid terminálisa D-alanil-D-alanin, addig a vankomicin-rezisztens törzseknél ez D-alanil-D-tejsavra változik, aminek következtében az antibiotikum-sejtfalprekurzor komplexet stabilizáló H-hidak száma eggyel csökken, ami a kötődés 1000-szeres meggyengülését okozza. VanC fenotípus esetén D-alanil-D-serin lesz a terminális. Ekkor megmarad ugyan az öt H-híd, viszont a szerin hidroximetil-csoportja nem enged olyan szoros illeszkedést a vankomicinnel, mint az eredeti alanin megfelelő metilje. A kötőerősség ennél a rezisztenciatípusnál csupán csak a tizedére csökken. A VanA és VanB típusú rezisztencia plazmidhoz kötött, indukálható és átadható, míg a VanC fenotípus, ami sokkal ritkább (*E. gallinarum* törzseknél találtak ilyet), csak néhány esetben indukálható és nincs lehetőség transzfelelésre. A VanA és VanB között az a különbség, hogy az utóbbi csak vankomicinnel, míg az első teikoplaninnal szembeni ellenálló képességet is okoz. A rezisztenciáért 5 gén illetve annak terméke, 5 fehérje felelős: VanS, VanR, VanH, VanA / VanB és VanX. VanS egy transzmembrán fehérje és a glikopeptid periplazmatikus térben való megjelenését érzékeli. A sejtmembrán belső felszínén található a hisztidin-kináz doménje, ami VanR-t annak N-terminálisán foszforilezve olyan változást idéz elő a fehérje szerkezetében, hogy annak C-terminális DNS-kötő doménje képes lesz a DNS megfelelő szakaszához kötődve a vanH, vanA / vanB és vanX gének transzkripcióját indukálni.



20. ábra A rezisztenciáért felelős gének indukálódása és hatásuk

A VanH egy piruvát-dehidrogenáz, amely D-tejsavat szintetizál. A VanA ezt használja fel a D-alanil-D-tejsav előállításához. A MurF ugyanúgy képes ezt az UDP-muramil-tripeptidhez kapcsolni, mint a D-alanil-D-alanint. Azt, hogy főleg a D-alanil-D-tejsav terminálissal rendelkező diszacharil-pentapeptid keletkezzen, a VanX működése segíti. Ez az enzim egy D-alanil-D-alanin dipeptidáz, amely a D-Ala-D-Ala ligázzal konkurálva hasítja a dipeptidet és ez azt eredményezi, hogy a MurF szubsztrátjaként gyakorlatilag csak D-alanil-D-laktát lesz jelen, D-alanil-D-alanin pedig egyáltalán nem. A PG sejtfa keretkötéseinek kialakítását végző transzpeptidáznak a módosított terminálissal rendelkező prekursor is tökéletes szubsztrátja, és mivel a pentapeptid 5. aminosava úgyszólván lehasad a keretkötés kialakítása során (függetlenül attól, hogy az D-alanin vagy D-tejsav), így teljesen azonos PG réteg keletkezik.

Érdekes megemlíteni, hogy a glikopeptid antibiotikumokat termelő törzseknél ugyanez a mechanizmus látja el az önvédelmi funkciót, megakadályozván, hogy az adott törzs saját „fegyvere” áldozatául essen.



21. ábra A rezisztenciáért felelős enzimek működése – a módosított UDP-MurNAc-pentapeptid bioszintézise

1.6. Glikopeptid antibiotikumok félszintetikus módosítása

A *staphylococcus* és *enterococcus* törzsek körében az 1980-as évek végétől kezdve egyre gyakrabban bukkant fel a vankomicinnel szembeni rezisztencia, ami a kutatókat arra ösztönözte, hogy különböző kémiai és / vagy enzimatis átalakításokkal olyan félszintetikus glikopeptideket állítsanak elő, amelyek hatásosak ezen ellenálló Gram-pozitív baktériumokkal szemben. Ezek a szintetikus módosítások három csoportra oszthatók:

1. Az anyavegyület integritását megtartva, hozzá különböző molekulákat kapcsolnak.
2. A gyűrűs peptidváz szerkezetét megbontva, majd újraépítve, új aminosav(ak)at építenek be.
3. Bi- és multivalens vegyületeket hoznak létre.

1.6.1. Az 1. típusú átalakítások

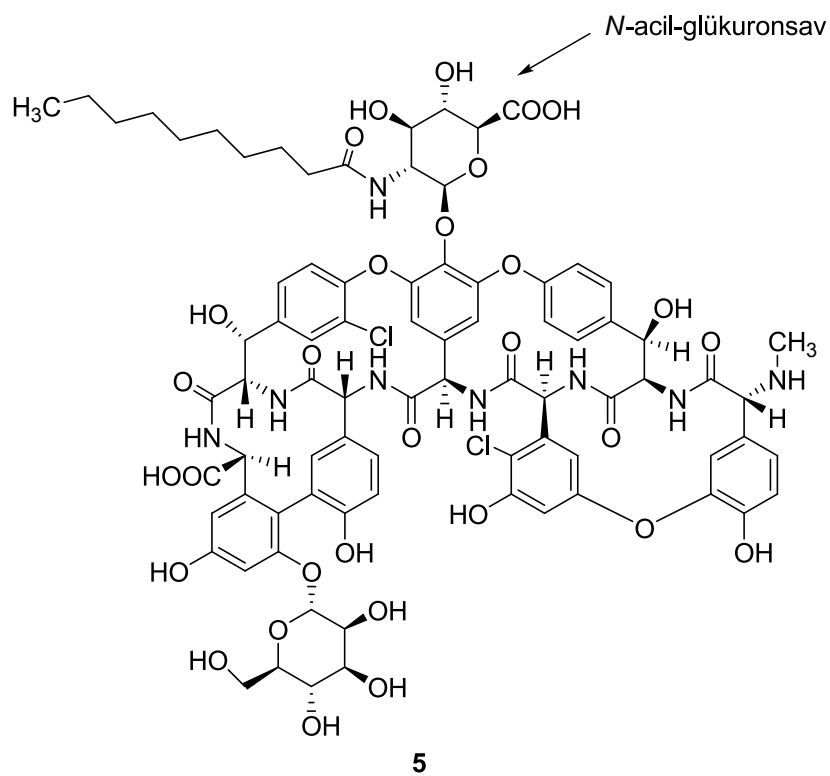
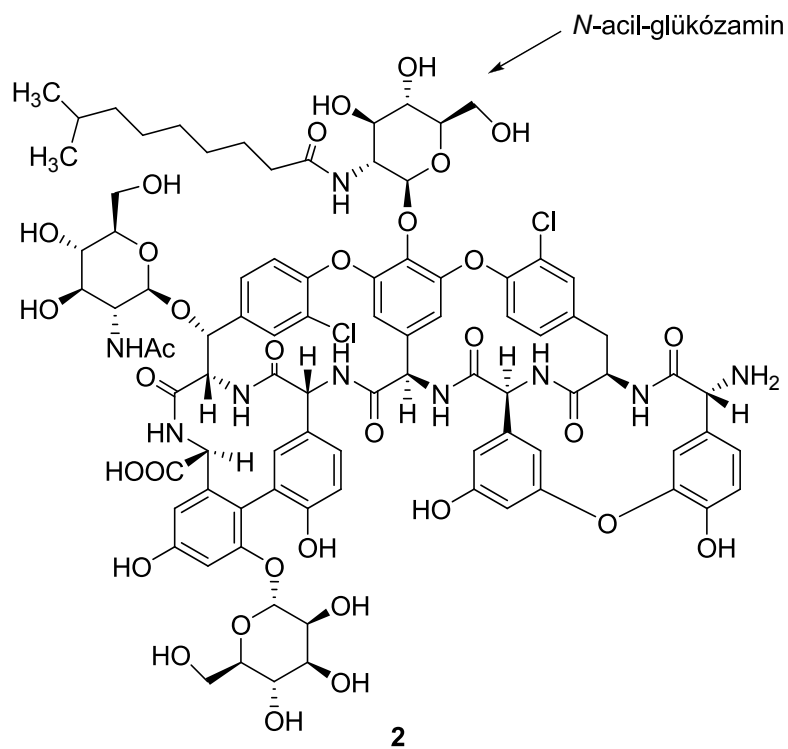
Az 1. típusba tartozó módosítások olyan változtatásokat jelentenek, amelyek a kötőzsebet (ti. a D-Ala-D-Ala terminális és az antibiotikum közötti H-hidak kialakításában szerepet játszó molekularész) nem érintik, de indirekt módon mégis befolyásolják az aktivitást. Ilyen a szénhidrát-rész átalakítása, eltávolítása, az N- illetve C-terminális módosítása, valamint a hidroxilcsoportok derivatizálása.

1.6.1.1. A szénhidrát-rész módosítása

Habár a hatás kialakulásában, a bakteriális sejtfallal prekursor D-Ala-D-Ala terminálisához való kötődésben a glikopeptid antibiotikumok szénhidrát-részei közvetlenül nem vesznek részt, mégis befolyásolják az antibakteriális spektrumot, a fizikokémiai tulajdonságokat. Hogy ez a hatás nem is olyan kis mértékű, az rögtön kitűnik, ha összehasonlítunk három, gyakorlatilag azonos peptid alapvázal rendelkező származékot a risztocetint, teikoplanint és a parvodocint (A 40,926). A risztocetin (2. ábra) a tetraszacharidja révén igen jó vízdékonysággal és hidrofilitással rendelkezik, ugyanakkor antibakteriális aktivitása egy nagyságrenddel elmarad a másik két származéké mellett.²⁶

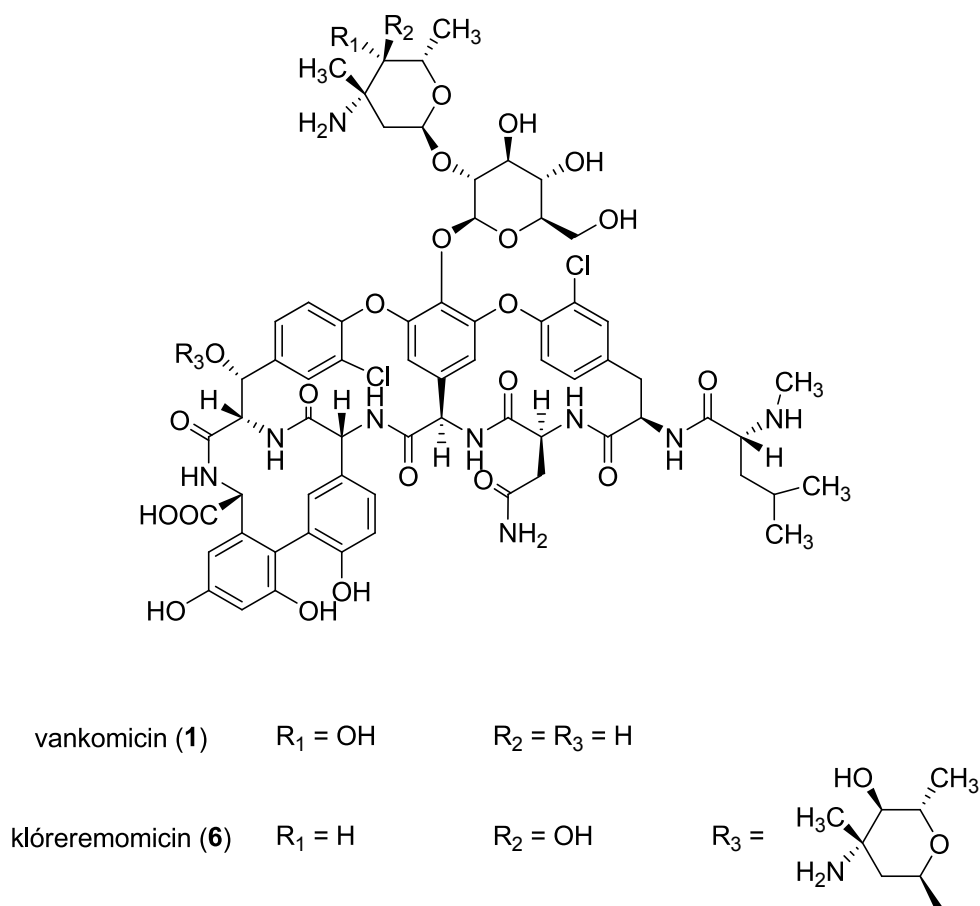
A teikoplanin (2) és a parvodicin (5) az ún. lipoglikopeptidek közé tartozik, ami azt jelenti, hogy a 4. aminosavat egy olyan aminocukor glikozilezi, amelynek aminocsoportját egy zsírsav (10 szénatomos) acilezi. A két antibiotikum *staphylococcus* és *enterococcus* ellenes aktivitása közel azonos, ám a parvodicin több mint 30-szor aktívabb *Neisseria gonorrhoea*-val szemben, ami valószínűleg annak köszönhető, hogy az acilamido-cukor itt egy *N*-acilamino-glükuronsav, míg a teikoplaninnál *N*-acil-glükózamin (22. ábra).

A szénhidrát-rész antibakteriális aktivitásra kifejtett hatását mutatja a vankomicin és a klóreremomicin (A82846B) példája is. A két vegyület peptid része teljesen azonos, az utóbbi azonban a diszacharid mellett plusz egy aminocukrot (4-epivankózamin) tartalmaz, ami a 6-os aminosav β -hidroxilcsoportját glikozilezi (23. ábra). A klóreremomicin lényegesen jobb antibakteriális aktivitása azzal magyarázható, hogy a 6. aminosavhoz kapcsolódó 4-epivankózamin segíti az antibiotikum dimerré szerveződését, ami ismert, hogy erősebb kötődést tesz lehetővé a glikopeptid és a bakteriális sejtfaiprekurzor között.²⁷ Érdekes, hogyha a vankomicinről szelektíve lehasítjuk a vankózamint (- 15 °C-on TFA-val²⁸), akkor az antibakteriális aktivitás ötödére csökken, míg a teljes diszacharid eltávolításával kapott aglikon hatása összemérhető az anyavegyületével.



22. ábra A teikoplanin (2) és a parvodicin (5) összehasonlítása

Malabarba és mtsai szisztematikusan tanulmányozták a szénhidrát-rész antibakteriális aktivitásra kifejtett hatását teikoplanin esetében. Megállapították, hogy az *N*-acil-glükózamin eltávolítása csökkenti az aktivitást, különösen *streptococcus* és *enterococcus* törzsek esetében. *In vitro* vizsgálatokban az aglikon hasonlóan jónak bizonyult, mint az anyavegyület, ám az *N*-acil-glükózamin kedvező farmakokinetikai hatását (hosszú féléletidő) mutatja, hogy *in vivo* tesztekben a teikoplanin már sokkal hatásosabb volt.

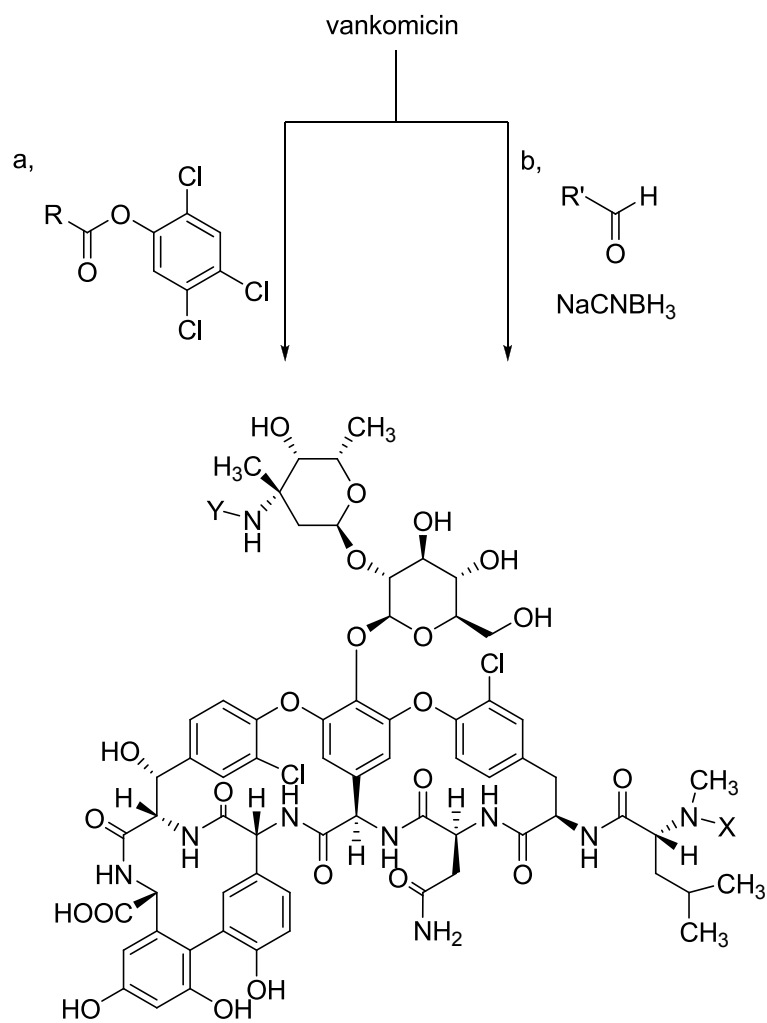


23. ábra A vankomicin és a klóreremomicin összehasonlítása

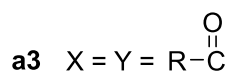
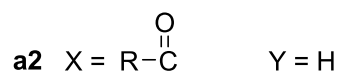
A kötőzseb közelében elhelyezkedő mannóz elősegíti a D-Ala-D-Ala terminálshoz való kötődést, ugyanakkor érdekes, hogy eltávolításával növekedett a teikoplanin koaguláz-negatív *staphylococcusokkal* szembeni aktivitása.²⁹ Míg az *N*-acil-glükózamin és a mannóz hatása a teikoplanin fizikokémiai és biológiai tulajdonságaira elég jól ismert, addig az *N*-acetyl-glükózamin szerepe nem teljesen tisztázott. Reduktív körülmények közötti eltávolításával megváltozik az 5, 6, 7 aminosavak által kialakított gyűrű konformációja. A teikoplanin különböző amidjait vizsgálva az az eredmény született, hogy az *N*-acetyl-glükózamin eltávolításával a *staphylococcus* és *E. faecalis* törzsekkel szemben mutatott aktivitás csökken,

de a vanA-pozitív törzsek esetén javul. A legjobb hatású a poliaminnal képzett amid-származék, amelynek *S. epidermidis* és *S. pyogenes* törzsekkel szembeni aktivitása két nagyságrenddel megnőtt, ha az *N*-acetyl-glükózamint eltávolították a molekuláról. Felmerül a kérdés, hogy a glikopeptid-rezisztens (vanA-pozitív) baktériumok esetén mutatott javulás az acetyl-glükózamin-vesztésnek vagy a benzil helyzetű hidroxilcsoport hiányának köszönhető.³⁰ A parvodicin *N*-acetyl-glükuronsav részének karboxilcsoportját redukálva és különböző aminokkal a C-terminálison a megfelelő amidokat kialakítva olyan *N*-acetyl-glükózamin mentes teikoplanin karboxamid-származékokhoz jutunk, amelyek a 6. aminosavon β -helyzetben OH-csoportot tartalmaznak. Ezek antibakteriális aktivitása legalább olyan jó, mint azoké, amelyekről hiányzik ez a benzil helyzetű hidroxilcsoport³¹ (leszámítva azok kiugróan magas *S. epidermidis* és *S. pyogenes* aktivitását), ami azt erősíti meg, hogy nem a benzil helyzetű OH-csoport a meghatározó, hanem az *N*-acetyl-glükózamin hiánya fokozza a rezisztens *E. faecalis* szembeni aktivitást. Legalábbis ami az *N*-acetyl-glükózamint tartalmazó karboxamidokat illeti (a saját származékaink más eredményt mutattak).

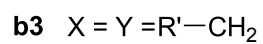
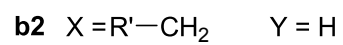
Az aminocukor módosításának hatását tanulmányozandó Nagarajan³² és mtsai sokféle származékot állítottak elő vankomicinből és klóreremomicinből kiindulva. Az ötletet a teikoplanin adta, amelynek *N*-acetyl-glükózamin része ismertén igen kedvezően befolyásolja az antibakteriális aktivitást. Alifás és aromás karbonsavak 2,4,5-triklór-fenollal készített aktív észterét használva a vankomicinből háromféle terméket kapunk: a vankózamin monoacilezésével (a1), a leucin aminocsoportjának acilezésével (a2) és a diacilezéssel (a3) keletkezett származékokhoz jutunk (24. ábra). A különböző termékek antibakteriális tesztjei alapján megállapítható volt, hogy a leghatásosabb a vankózaminon monoacilezett (a1) származék volt, a diacil (a3) mutatta a legkisebb aktivitást, az acilező ágens szempontjából pedig az aromások bizonyultak jobbnak az alifásokkal szemben, ám egyik módosítás sem növelte számottevően a vankomicin hatását.³³ A kapott eredményeket felhasználva elkészítették a vankomicin alkilezett származékait különféle aromás aldehidek (4-klór-benzaldehyd, 4-fenil-benzaldehyd, 4-p-klórfenil-benzaldehyd) és NaCNBH₃ felhasználásával.³⁴ A redukzív alkilezés (24. ábra) szintén három fajta terméket (b1, 2, 3) eredményezett, és az acilezettekhez hasonlóan itt is a vankózaminon alkilezett volt a leghatásosabb, de ez már 50-szer felülmúlta a vankomicint rezisztens *enterococcusokkal* szemben.³²



acilezett származékok (a útvonal):

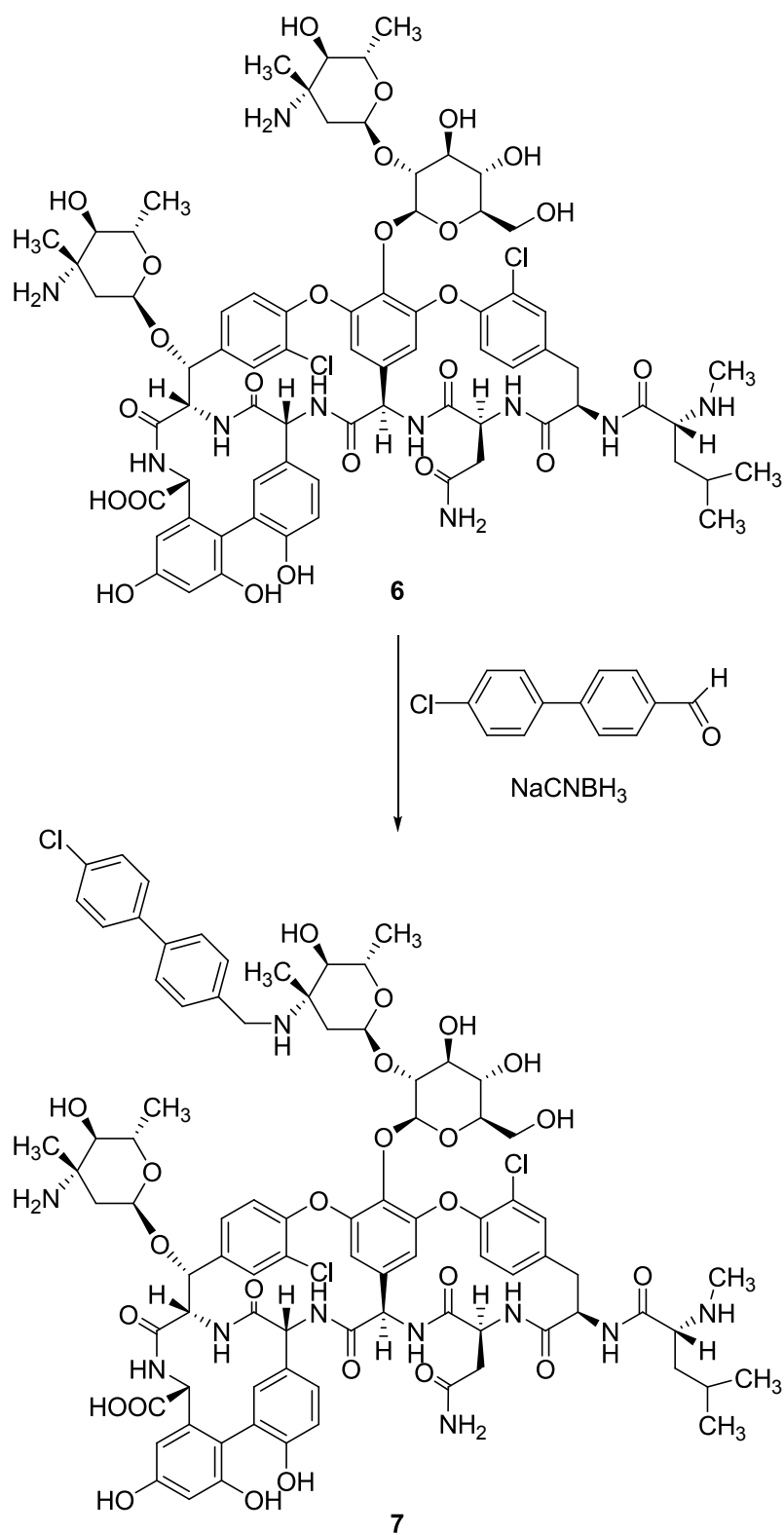


alkilezett származékok (b útvonal):



24. ábra A vankomicin acilezése (a) és alkilezése (b)

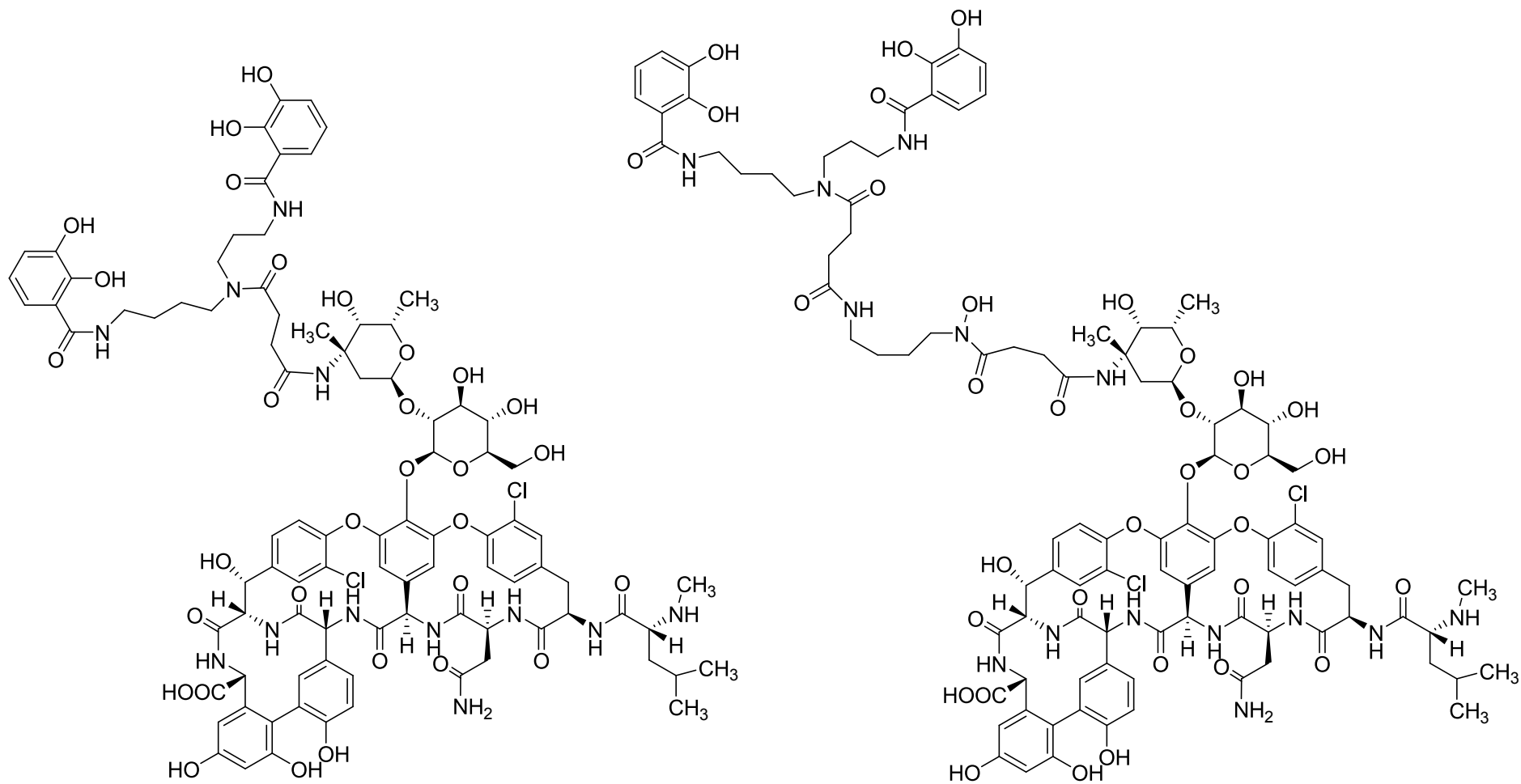
A kiváló aktivitásadatokon felbuzdulva a kutatók klóreremomicinen (6) is elvégezték a fenti módosításokat (25. ábra).



25. ábra Az oritavancin (7) szintézise

A redukív alkilálást bonyolította a molekulán lévő plusz egy aminocukor (a 6. aminosavhoz egy 4-epivankózamin kapcsolódik) és ennek megfelelően hétféle termék keletkezhet.³⁴ A diszacharid aminocsoportjának 4-p-klór-fenil-benzilezett származéka 100-szor hatásosabbnak bizonyult vankomicin- és teikoplanin-rezisztens *enterococcusokkal* szemben, mint maga a klóreremomicin, és ugyanakkor megőrizte kitűnő *staphylococcus* ellenes aktivitását. A kezdetben csak LY333328 kódszám alatt futó vegyület később felvette az oritavancin (7) nevet és az FDA engedélyével 2008-ban bekerült a klinikai gyakorlatba az Egyesült Államokban.

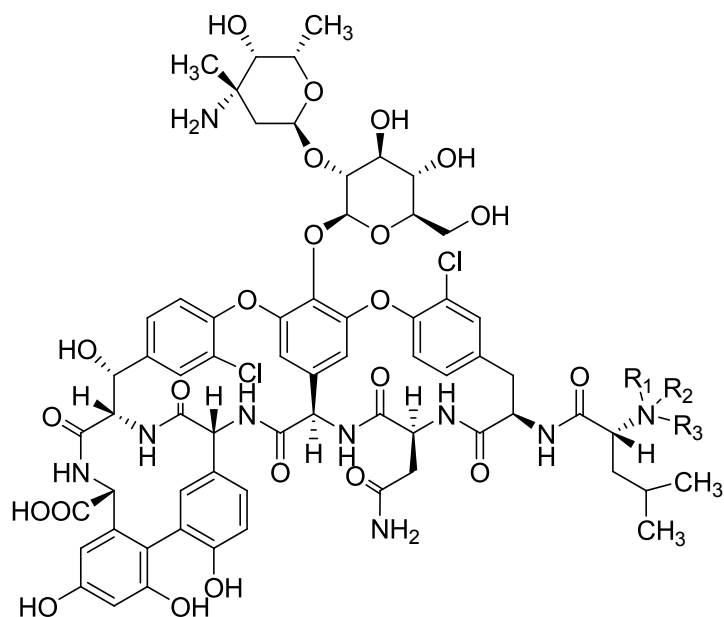
Szintén az aminocukor módosításával próbálta meg Ghosh és Miller³⁵ kiterjeszteni a glikopeptidok szűk Gram-pozitív spektrumát a Gram-negatív törzsekre ún. sziderofór-vankomicin konjugátumok létrehozásával (26. ábra). Spermidin alapú katechol és hidroxámsav származékokkal acilezték a vankózamin aminocsoportját, és az így kialakított oldalláncról azt várták, hogy a baktériumok által termelt természetes vas-kötő vegyületeket utánozva, képesek lesznek átjuttatni az antibiotikum molekulát a Gram-negatív baktériumok külső membránján (ami a glikopeptidok számára közismerten átjárhatatlan) specifikus sziderofór-receptorokon vagy -csatornákon keresztül. Az antibakteriális tesztek azt mutatták, hogy az új sziderofór-vankomicin konjugátumok Gram-pozitívokkal szembeni aktivitása egy nagyságrenddel lecsökkent, és ha a környezet elegendő vasat tartalmazott, akkor a Gram-negatívokra egyáltalán nem hatottak. Vasszegény közegben azonban egy hiperszenzitív *P. aeruginosa* törzs ellen közepes aktivitás volt tapasztalható.



26. ábra A sziderofór vankomicin konjugátumok szerkezete

1.6.1.2. Az N-terminális módosítása

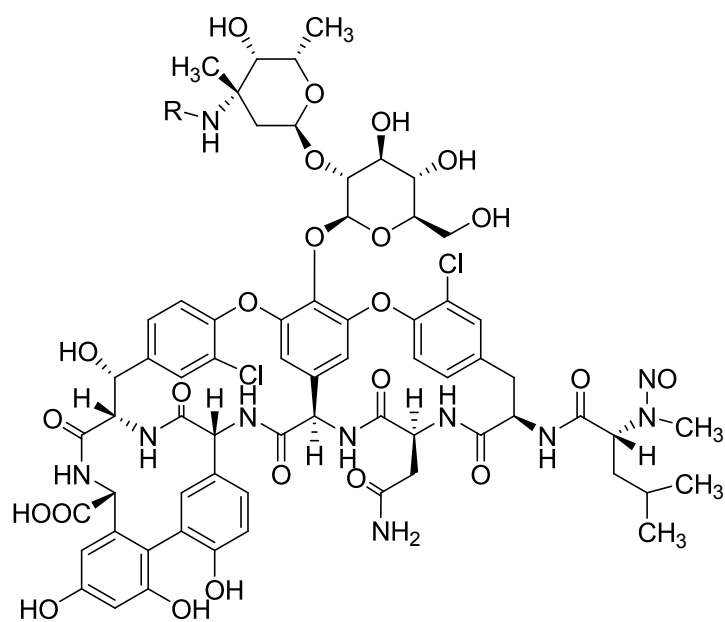
Vankomicin esetében az N-terminális (D-leucin NH₂-csoport) metilezettsége (27. ábra) csak kis mértékben befolyásolja az antibakteriális aktivitást. Az N-demetil-vankomicin (**8**) valamint a terciér (**9**) és kvaterner (**10**) nitrogént tartalmazó származékok hatása gyakorlatilag nem változott a vankomicinhez (**1**) képest.³²




- 8** R₁ = R₂ = R₃ = H
1 R₁ = CH₃, R₂ = R₃ = H
9 R₁ = R₂ = CH₃, R₃ = H
10 R₁ = R₂ = R₃ = CH₃

27. ábra Az N-terminálisán különböző mértékben metilezett vankomicin-származékok

A vankomicin N-terminálisa, a molekulán meglévő számos reaktív csoport (aminocukor, fenolos hidroxil, aszparagin amid) ellenére igen nagyfokú szelektivitással nitrozálható *in situ* generált salétromossav vagy izoamilnitrit alkalmazásával. Ezt követően a vankózamin aminocsoportja benzilezhető (reduktív alkilezéssel, lásd „A szénhidrát-rész módosítása” című fejezetet). Sajnos ez a transzformáció nem vezet igazán jó eredményre, mert mind az N-nitroso (**11**), mind pedig a benzilezett nitroso-származék (**12**) antibakteriális aktivitása 4-8-szor gyengébbnek bizonyult, mint a megfelelő anyavegyületé.³⁶



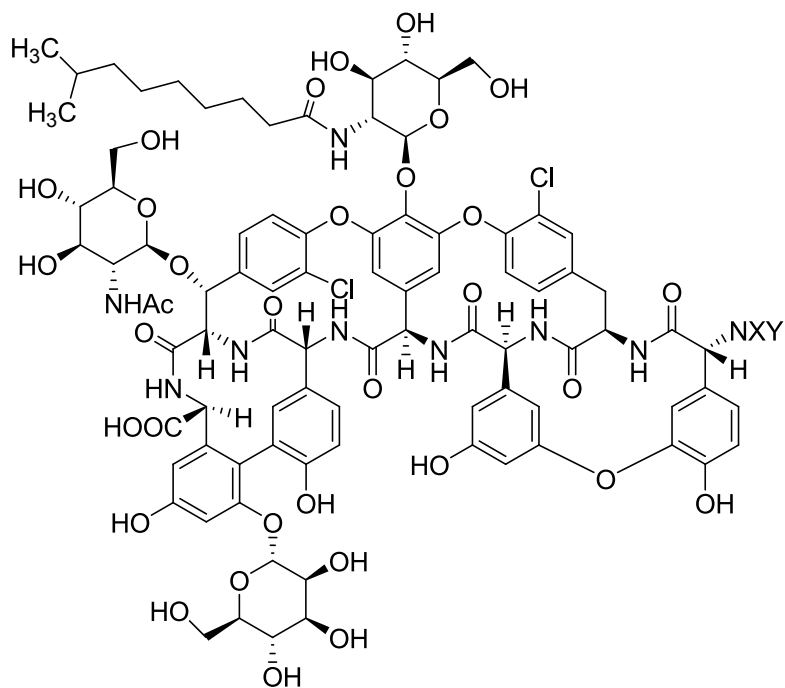
11 R = H

12 R = H₂C-

28. ábra *N*-nitrozo vankomicin-származékok

Azért, hogy megvizsgálják, hogy az N-terminális bázicitása milyen szerepet játszik a teikoplanin típusú antibiotikumok hatásmechanizmusában, Malabarba és mtsai különböző acilezett és alkilezett származékokat állítottak elő teikoplaninból és annak különböző mértékben deglikozilezett származékaiból. Ahogy az várható volt az *N*-acilezett származékok D-Ala-D-Ala kötődése tizedrészére csökkent és ennek megfelelően romlott az antibakteriális aktivitás is, bár meglepő, hogy a *staphylococcus* és *S. pyogenes* elleni hatás nem változott. Az *N*-karbamátok (Boc, Cbz) hasonlóan viselkedtek.³⁷ Különböző aminosavakkal (glicin, D- és L-lizin, L-glutamin) acilezve az N-terminálist, az szintén lerontja a sejtfalprekursorhoz való kötődési képességet és ennek megfelelően az antibakteriális aktivitást. Az acilező aminosav konfigurációjának nincs jelentős hatása.³⁸ Az előállított néhány tiokarbamid és izotioronium só esetében az előzőek vesztettek aktivitásukból, míg az utóbbiak megőrizték azt, feltehetően a továbbra is meglévő pozitív töltésnek köszönhetően.³⁹ A mono- vagy dialkilezés nem befolyásolja számottevően az N-terminális bázikus karakterét és ennek megfelelően megmarad az antibakteriális aktivitás mind *in vitro*, mind *in vivo*.⁴⁰ Ki kell emelni azonban az erősen lipofil alkiláncok (oktil, lauril) jelentőségét, ezek hatására ugyanis egy nagyságrenddel nőtt az aktivitás az anyavegyület teikoplaninhoz képest. (A teikoplanin N-

terminálisának különböző módosításait a 29. ábra mutatja.) Az általunk előállított teikoplanin-pseudoaglikon-származékok esetében a lipofil oldallánc egy triazol gyűrűn keresztül kapcsolódik az antibiotikum N-terminálisához, ami, az acil-származékokhoz hasonlóan, szintén a bázicitás elvesztésével jár, ennek ellenére mégis rendkívül hatásosak ezek a vegyületek (2.3. fejezet).



Acilezett származékok $X = H$ $Y = \overset{O}{\parallel}C-R$

N-karbamátok $X = H$ $Y = COOR'$: Boc ($R' = t$ -butil), Cbz ($R' =$ benziloxi-karbonil)

Oktapeptidek $X = H$ $Y =$ glicil, lizil, glutaminil

Tiokarbamidok $X = H$ $Y = \overset{S}{\parallel}C-NH-R$

Izotieurónium sók $X = H$ $Y = \overset{S-R}{\parallel}C=N-R'$

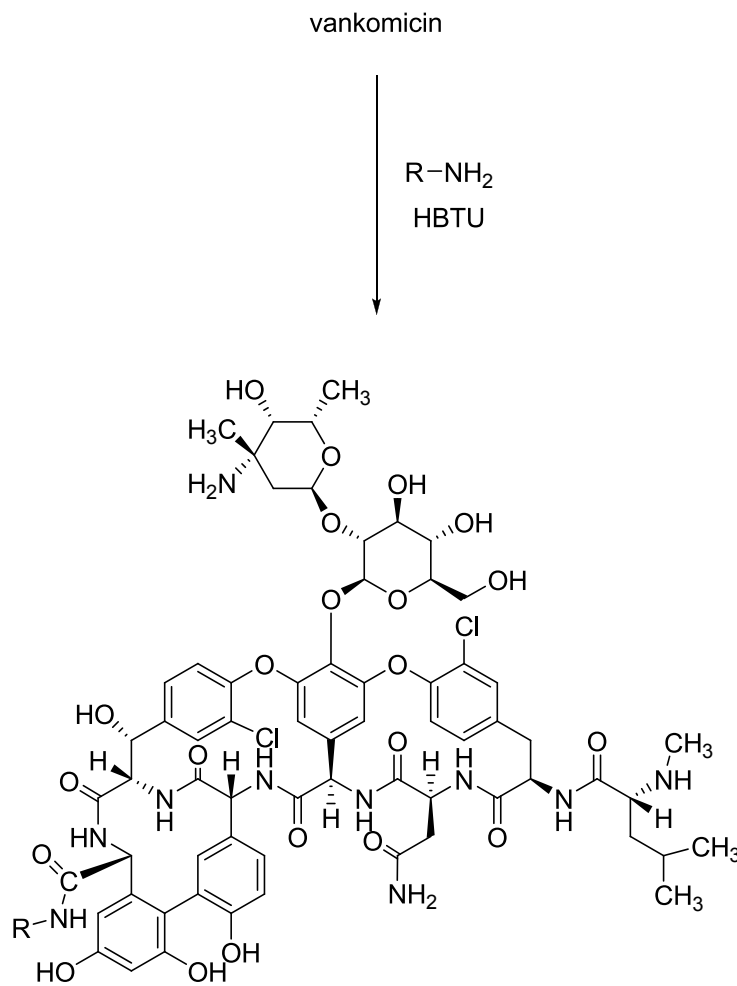
N-alkil származékok $X = H$ $Y = R$

N,N-dialkil $X = R$ $Y = R'$

29. ábra A teikoplanin N-terminálisának módosítása

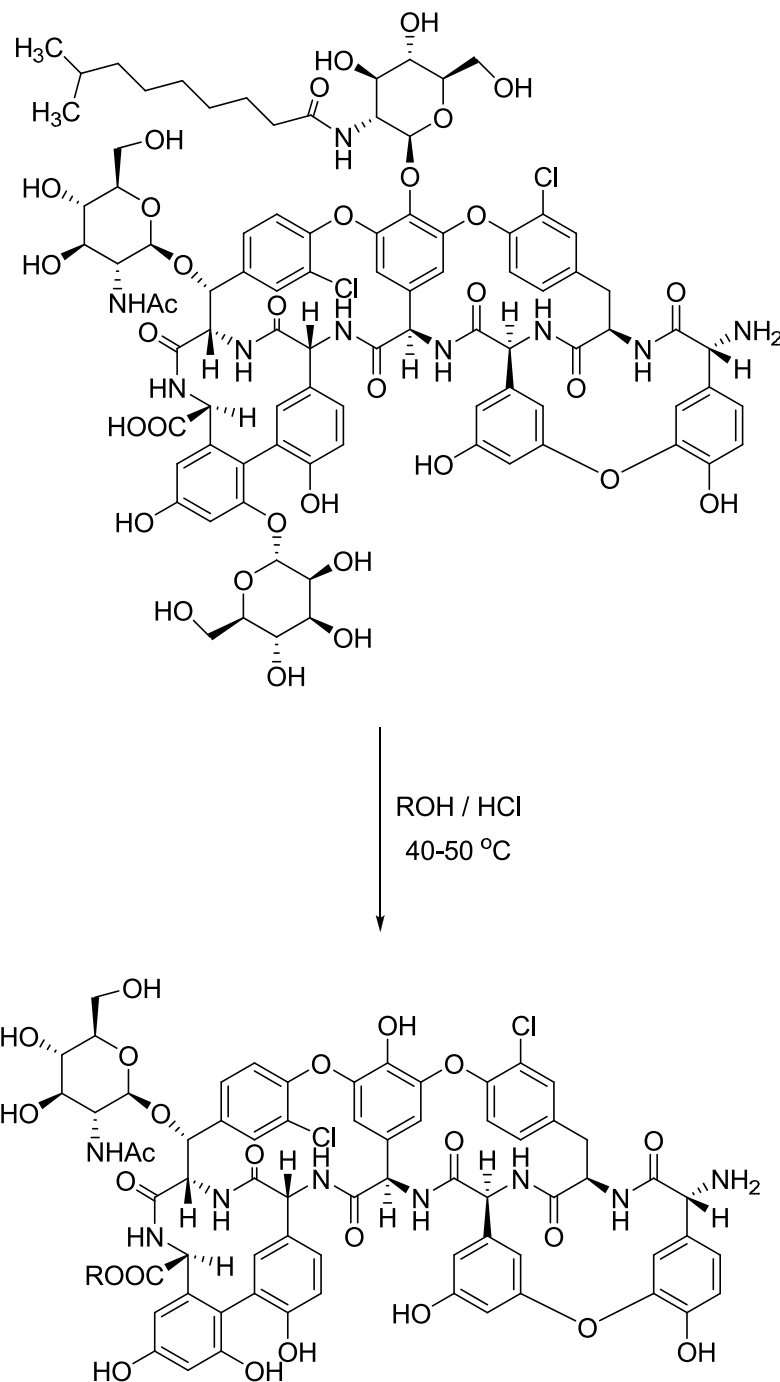
1.6.1.3. A karboxilcsoport módosítása

Különböző primer aminokat 2-(1-hidroxibenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium-hexafluoro-foszfát (HBTU) jelenlétében vankomicinnel reagáltatva a megfelelő amid-származékokhoz jutunk 50-80 %-os hozammal. Az oldatban jól működő acilezést szilárd fázisú technikára átvive lehetőség nyílt kombinatorikus módszer alkalmazására és így igen nagy számú félszintetikus vankomicin amid-származék előállítására.⁴¹



A C-terminális módosítását legszélesebb körben a teikoplaninon tanulmányozták. A glikopeptidok farmakodinámiai és farmakokinetikai sajátága és antibakteriális aktivitása szempontjából a lipofilitás és az izoelektromos pont meghatározó. A pozitív töltésű vankomicin határozottan aktívabb koaguláz-negatív *staphylococcusokkal* szemben, mint a

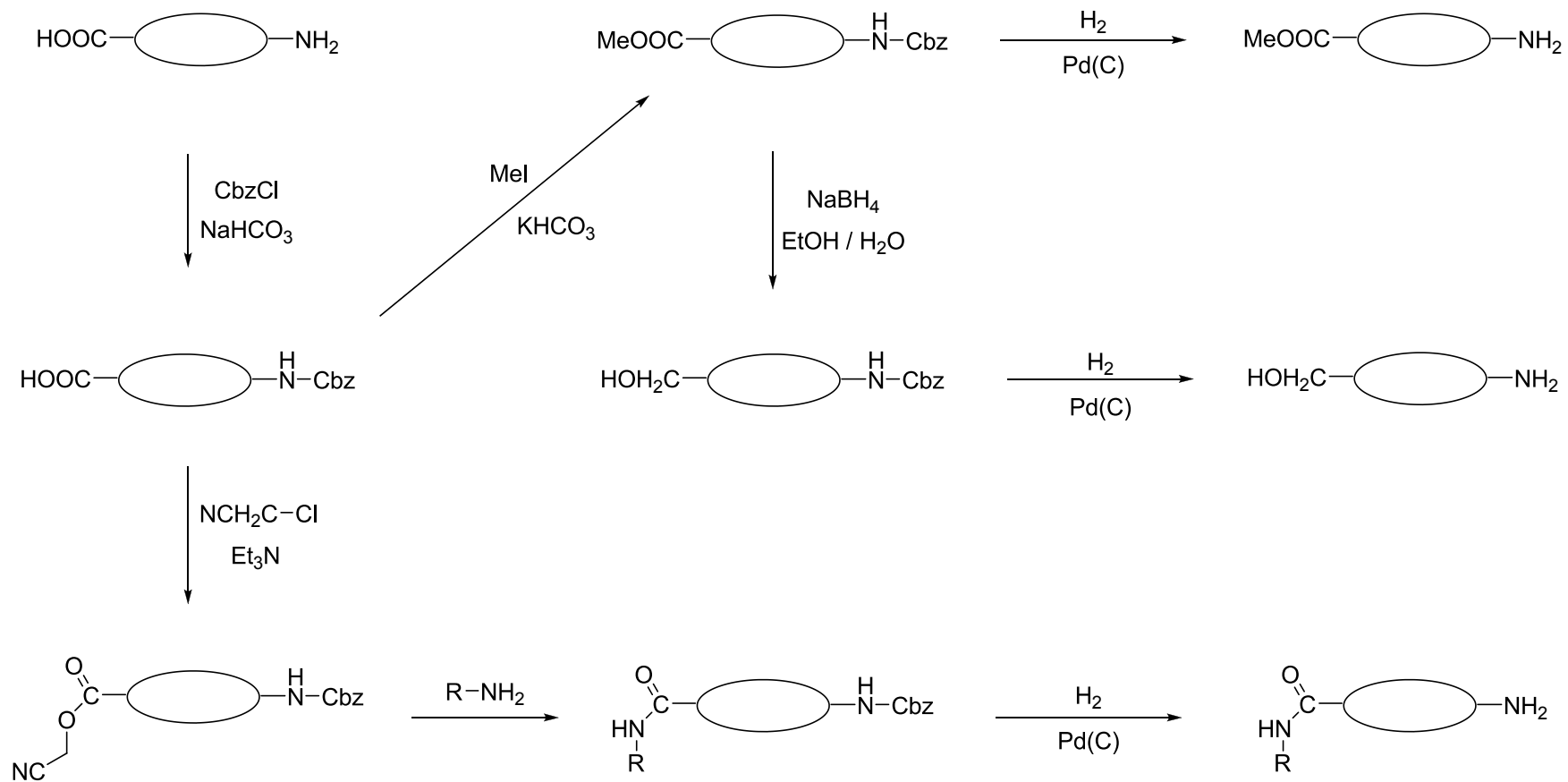
negatívan töltött, relatíve lipofílebb teikoplanin, ugyanakkor az utóbbi előnye, hogy lényegesen hosszabb keringési féléletidővel rendelkezik.



31. ábra A teikoplanin észteressítése sósavas alkohollal

Tekintettel arra, hogy a teikoplanin C-terminálisának módosítása nincs hatással a kötőzseb szerkezetére (nem befolyásolja tehát a D-Ala-D-Ala terminálisához való kötődést, így nem rontja az antibakteriális aktivitást), lehetőség nyílik olyan átalakításokra, amelyek révén a molekula nettó pozitív töltéssel rendelkezik, s ez nemcsak a koaguláz-negatív *staphylococcus*

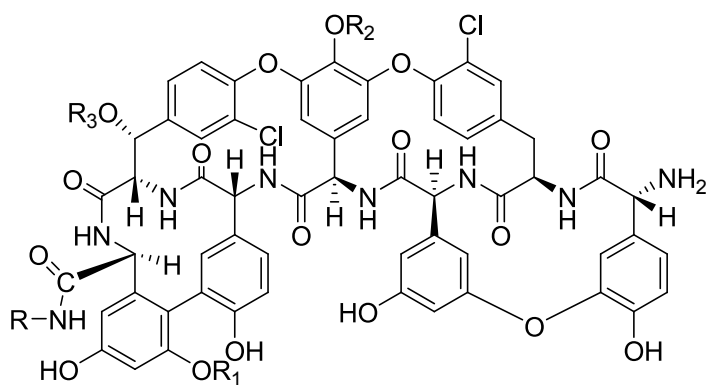
ellenes aktivitást növelheti, hanem kiterjesztheti a spektrumot a Gram-negatív baktériumokra is. Teikoplanint sósavas alkoholban 40-50 °C-on reagáltatva a megfelelő észter keletkezik, ám ilyen körülmények között az *N*-acil-glükózamin és a mannóz is elhidrolizál és egy pszeudoglikon észterhez jutunk (31. ábra).⁴² Ha az *N*-terminálisán karbamát formában (Cbz) védett vegyületet metil-jodiddal észteresítjük, akkor elkerülhető a szénhidrátok hidrolízise és a kiindulási vegyülettől függően (teikoplanin, részlegesen vagy teljesen deglikozilezett forma) a megfelelő metil-észtert állíthatjuk elő (32. ábra). Az antibakteriális teszt során a teikoplanin-aglikon benzil-észter mérsékelt aktivitást mutatott különböző Gram-negatív törzsek ellen. A karboxilcsoport redukciója (vizes etanol / NaBH₄) javította a *staphylococcusokkal* szembeni aktivitást, de az *in vivo* eredmények itt is, akárcsak az észterek esetében, rosszabbak voltak, mint az anyavegyületé.⁴³ Teikoplaninból, teikoplanin-aglikonból vagy a részlegesen deglikozilezett származékokból különböző amidokat állíthatunk elő, ha az *N*-terminális védeése után (Cbz) a karboxilcsoportot cianometil-észter formában aktiváljuk és a megfelelő aminnal reagáltatjuk, majd katalitikus hidrogénezéssel a védőcsoportot eltávolítjuk (32. ábra). A teikoplaninból képzett metil- (**13**) illetve hidroximetil-amidok (**14**) nem voltak szignifikánsan jobbak, mint a metil- vagy hidroximetil-észterek, de egérben vizsgálva *S. pyogenes* okozta szeptikémia esetén legalább olyan jók voltak, mint maga a teikoplanin.⁴⁴ Ezek az eredmények és az a tény, hogy az amidok lényegesen stabilisabbak, mint az észterek, arra ösztönözték a kutatókat, hogy számos amid-származékot állítsanak elő teikoplaninból és teikoplanin-aglikonból kiindulva (33. ábra). A teikoplanin-amidok közül a dimetilaminopropilaminnal képzett származék, a Mideplanin (**15**) bizonyult a leghatékonyabbnak a legtöbb Gram-pozitív baktériummal szemben nemcsak *in vitro*, de *in vivo* is.^{45,46} A teikoplanin-aglikon amid-származékai közül pedig két bázikus amid, egy lineáris (**16**) és egy elágazó (**17**) poliaminnal képzett termék *in vitro* Gram-pozitívokkal szembeni aktivitása összevethető volt a Mideplaninéval; kiemelkedő azonban az aglikon-származékok egészen jó Gram-negatív aktivitása (MIC: 0,25-8 µg / ml) – a Mideplanin csak Gram-pozitívok ellen volt hatásos.



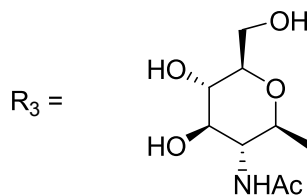
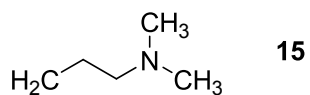
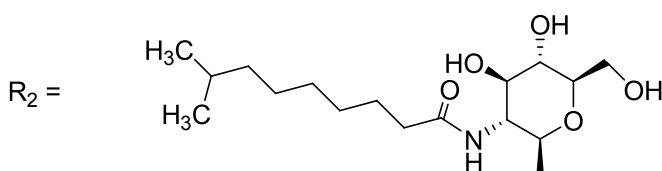
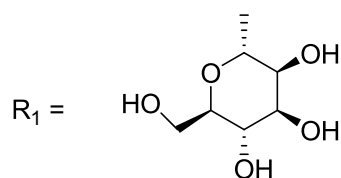
32. ábra A teikoplanin C-terminálisának módosítása (a könnyebb áttekinthetőség kedvéért az antibiotikumot egy ellipszis szimbolizálja)

Ez a két aglikon-származék ugyanolyan mechanizmus szerint hat, mint a többi glikopeptid antibiotikum, csak ezek – méretüknél és pozitív töltésükénél fogva – képesek áthatolni a Gram-negatív baktériumok külső membránján és bejutni a periplazmatikus térbe.⁴⁷ A teikoplanin amid-származékainak *in vitro* Gram-negatív ellenes aktivitását a szénhidrátartalom negatívan befolyásolja, csak a teljes mértékben deglikozilezett amidok aktívak, ugyanakkor a szénhidrátok jótékony hatást gyakorolnak az *in vivo* aktivitásra azáltal, hogy javítják a vízdékonyságot (pl. mannóz) vagy lipofil oldallánc hatására megnövelik a keringési féléletidőt (pl. *N*-acil-glükózamin).⁴⁸

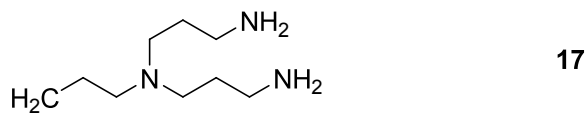
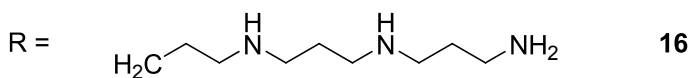
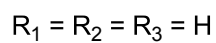
Ahogy az N-terminális esetében, úgy a C-terminális módosítása során is előállítottak oktapeptideket úgy, hogy a teikoplanin vagy aglikonjának karboxilcsoportjával acilezték különböző aminosavak α -aminocsoportját. Az *in vitro* és *in vivo* aktivitások akkor javultak jelentősen, ha a keletkezett karboxipeptid (oktapeptid) izoelektromos pontja 8,2 és 9,0 közé esett. Meglepő volt az a tény, hogy glutaminsavval (**18**) és *N*- ω -nitro-argininnel (**19**) képzett származékok esetén a sejtfallprekursor analóg di-acetil-L-lizil-D-alanil-D-alaninhoz való kötődés 2-3-szorosára nőtt, de ez nem mutatkozott az *in vitro* aktivitásokban, ugyanakkor a lizin-származéknál (**20**) 2-3-szor gyengébb kötődést tapasztaltak, viszont számottevően javult az antibakteriális hatás.⁴⁹ Ezek az ellentmondásos eredmények elgondolkodtatóak a prekursorhoz való kötődés és az antibakteriális hatás közötti összefüggést illetően, és akár újabb támadáspont / hatásmechanizmus lehetőségét is felvetik.



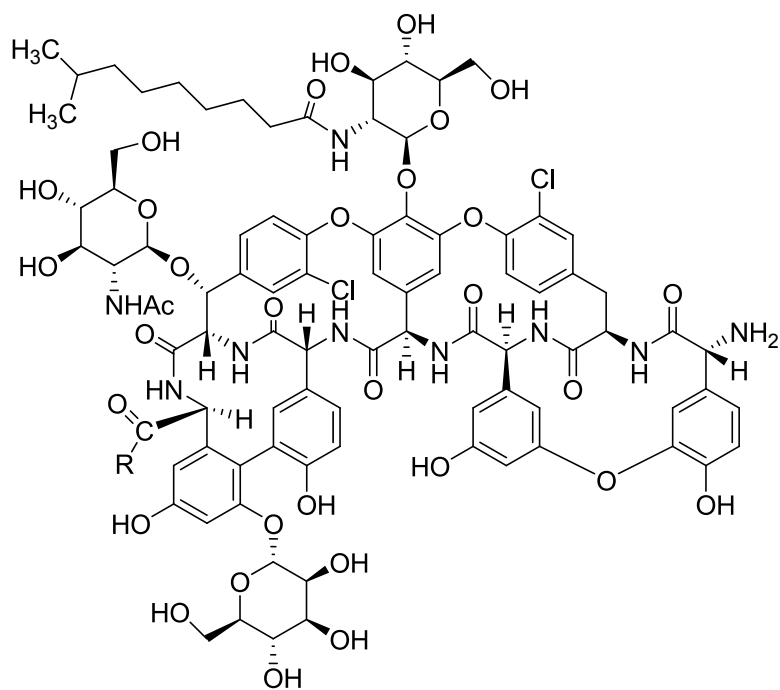
Teikoplanin amid-származékok:



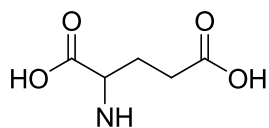
Teikoplanin-aglikon amid-származékok:



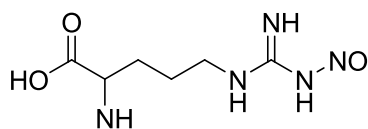
33. ábra A teikoplanin és a teikoplanin-aglikon amid-származékai



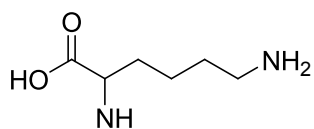
R =



18



19

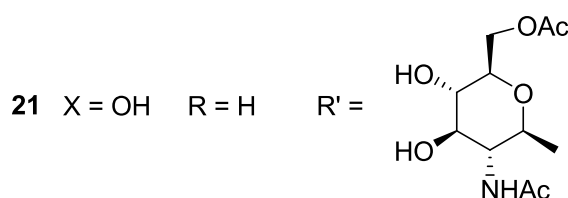
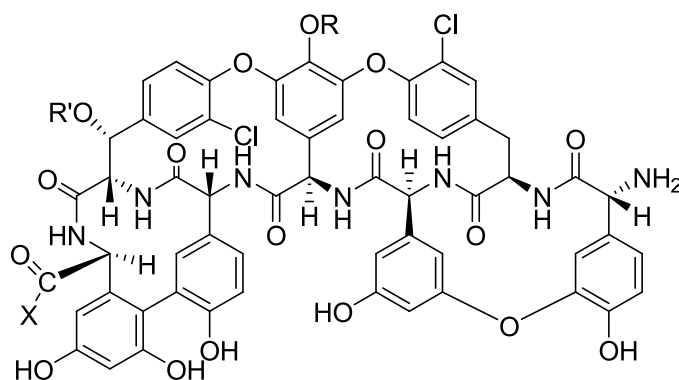


20

34. ábra A teikoplanin C-terminálisának módosításával előállított oktapeptidek

1.6.1.4. A hidroxilcsoportok módosítása

A teikoplanin-pszseudoaglikon *N*-acetil-glükózaminjának 6'-helyzetű hidroxilcsoportja szelektíve acetilezhető jégecettel tömény sósav jelenlétében. Az így kapott származék (21) *in vitro* és *in vivo* aktivitása összevethető a kiindulási teikoplanin-pszseudoaglikonéval. A szerkezet-hatás összefüggések tanulmányozására teikoplanin-aglikon amidjainak (23) és észtereinek (24) olyan származékait állították elő, amelyek 4-es aminosavának fenolos hidroxilja alkil-éter formában volt jelen. Az eredmények azt mutatták, hogy az éterképzés nem okoz jelentős javulást sem a sejtfalprekursorhoz való kötődésben sem pedig az antibakteriális hatásban, viszont a nagy térkitöltésű alkilcsoport csökkentette az *in vitro* aktivitást és csupán a bázikus alkiláncok okoztak némi javulást.⁵⁰



35. ábra A hidroxilcsoport módosítása teikoplanin-pszseudoaglikon és teikoplanin-aglikon esetében

Eremomicinen végzett NMR-kísérletek azt mutatták, hogy a klóratom a glikopeptid dimerben a két egymáshoz kapcsolódó felszín között helyezkedik el.²⁷ Eltávolítása destabilizálja a komplexet, ami megmagyarázhatja az aktivitás csökkenését azon analógok esetében, amelyekből hiányzik a halogén.⁵¹

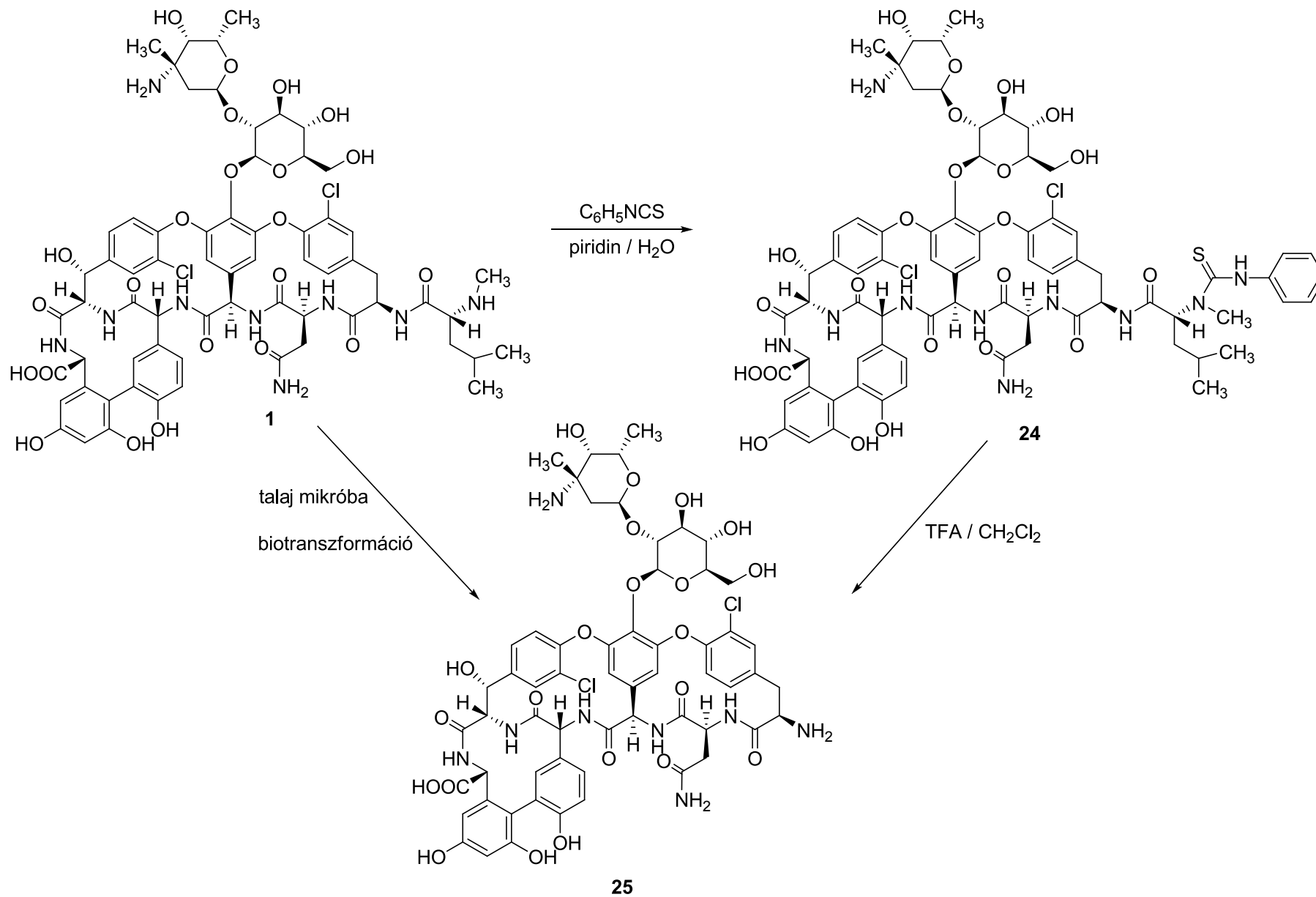
1.6.2.2. A heptapeptid gerinc szelektív hidrolízise

1.6.2.2.1. Edman-lebontás

Vankomicin esetében az 1-es aminosav szelektíve hasítható két lépésben (37. ábra). Fenilizotiocianáttal reagáltatva tiokarbamid-származék (**24**) keletkezik úgy, hogy az N-terminális metilamino-csoport addíciónál az izotiocianátra, majd TFA-val kezelve a vankomicin hexapeptid-származékához (**25**) jutunk.²⁸ Biotranszformációs úton is előállítható ez a termék egy talajban élő mikroba segítségével.⁵² A módosítás inaktiválja a vankomicint, ám a hexapeptid N-terminális aminocsoportjának reacilezésével hatásos analógokat kaptak.³² Hasonló módszerrel a III és IV glikopeptid típusba tartozó vegyületek esetében (pl. risztocetin illetve teikoplanin) az 1-es aminosav nem távolítható el, mivel egy difenil-éter hídon keresztül kapcsolódik a 3-as aminosavhoz. Ezen származékok esetében az 1-es aminosav cseréje úgy oldható meg, ha előtte a 2 és 3-as közötti amidkötést elhidrolizáljuk (lásd később).

1.6.2.2.2. A 6 és 7-es aminosavak közötti kötés hidrolízise⁵³

Ha teikoplanint, teikoplanin-aglikont vagy részlegesen deglikozilezett származékot izopropanol – cc. HCl 8:2 arányú elegyével 80 °C-on reagáltatunk, akkor két hidrolízis-terméket kapunk (38. ábra). A teljes deglikozileződés mellett a 6,7-peptidkötés hasadásával diasztereomerpárhoz jutunk, ami azzal magyarázható, hogy a 7-es aminosav D és L konfigurációjú is lehet a hidrolízis után. Annak ellenére, hogy ez a hasítás nem befolyásolja a kötőhely szerkezetét (1, 2, 3, 4 aminosavak által meghatározott), a sejtfalprekursor analóg dipeptidhez való kötődés és az antibakteriális aktivitás is tizedére csökken a teikoplanin-aglikonéhoz viszonyítva (azért ez a kontroll, mert így a szénhidrátok szerepe kizárható). Ez talán azzal magyarázható, hogy a 6 és 7-es aminosavak közötti kötés NH-ja az L-lizil-D-alanil-D-alanin terminális lizin karboxiljával alakít ki egy hidrogén-kötést, aminek a lehetősége a hidrolízis-termékek esetében nincs meg, így jelentősen csökken a kölcsönhatás erőssége az antibiotikum és a sejtfalprekursor között.

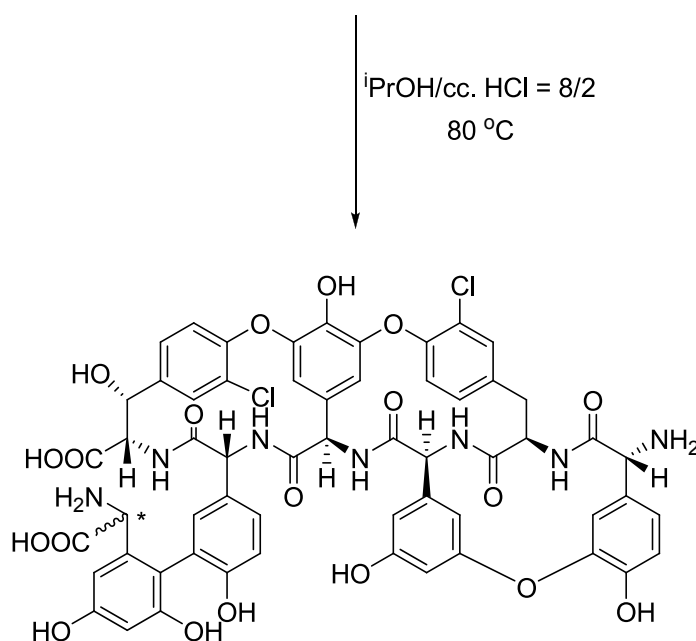


37. ábra Az Edman-lebontás (vankomicinen)

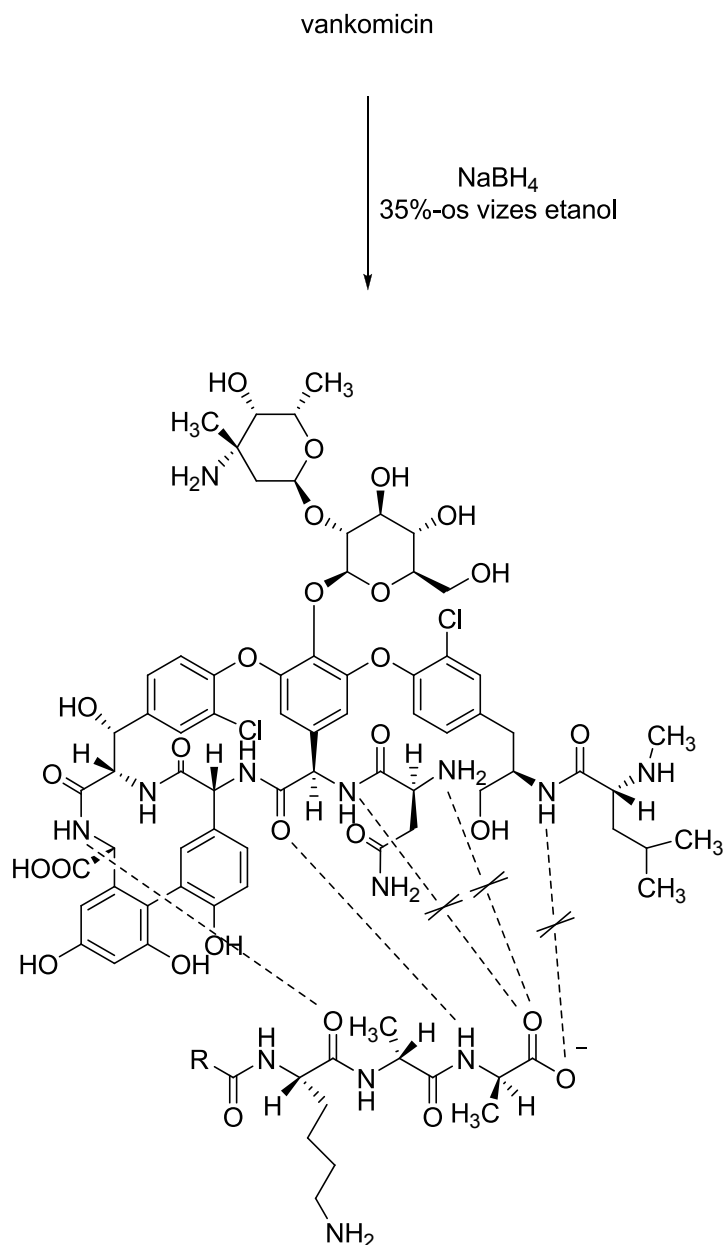
1.6.2.2.3. A 2 és 3-as aminosavak közötti kötés redukzív hidrolízise⁵⁴

Teikoplanint, vankomicint, risztocetint 35 %-os vizes etanolban NaBH₄-del reagáltatva a 2 és 3-as aminosavak közötti kötés hasítható (39. ábra). A hidrolízis során a 2-es aminosav karboxilcsoportja primer alkohollá redukálódik. Ez a módosítás drámai változást okoz az antibiotikum kötőhelyében. Ennek megfelelő az a tény is, hogy a 2D-s NMR spektroszkópiás mérések nem mutattak ki kölcsönhatást a modell peptid karboxilát-anionja és a 2 és 4-es aminosavak amid NH-ja, valamint a 3-as aminosav szabad NH₂-csoportja között sem. Az észlelt gyenge interakció, a 7-es aminosav amid NH-ja és a tripeptid lizil karbonilcsoportja között jön létre, ami némileg megmagyarázza, hogy a kötőseb drasztikus roncsolása ellenére még mindig tapasztalható némi antibakteriális aktivitás.

teikoplanin / teikoplanin-aglikon / teikoplanin-pszedeoaglikon



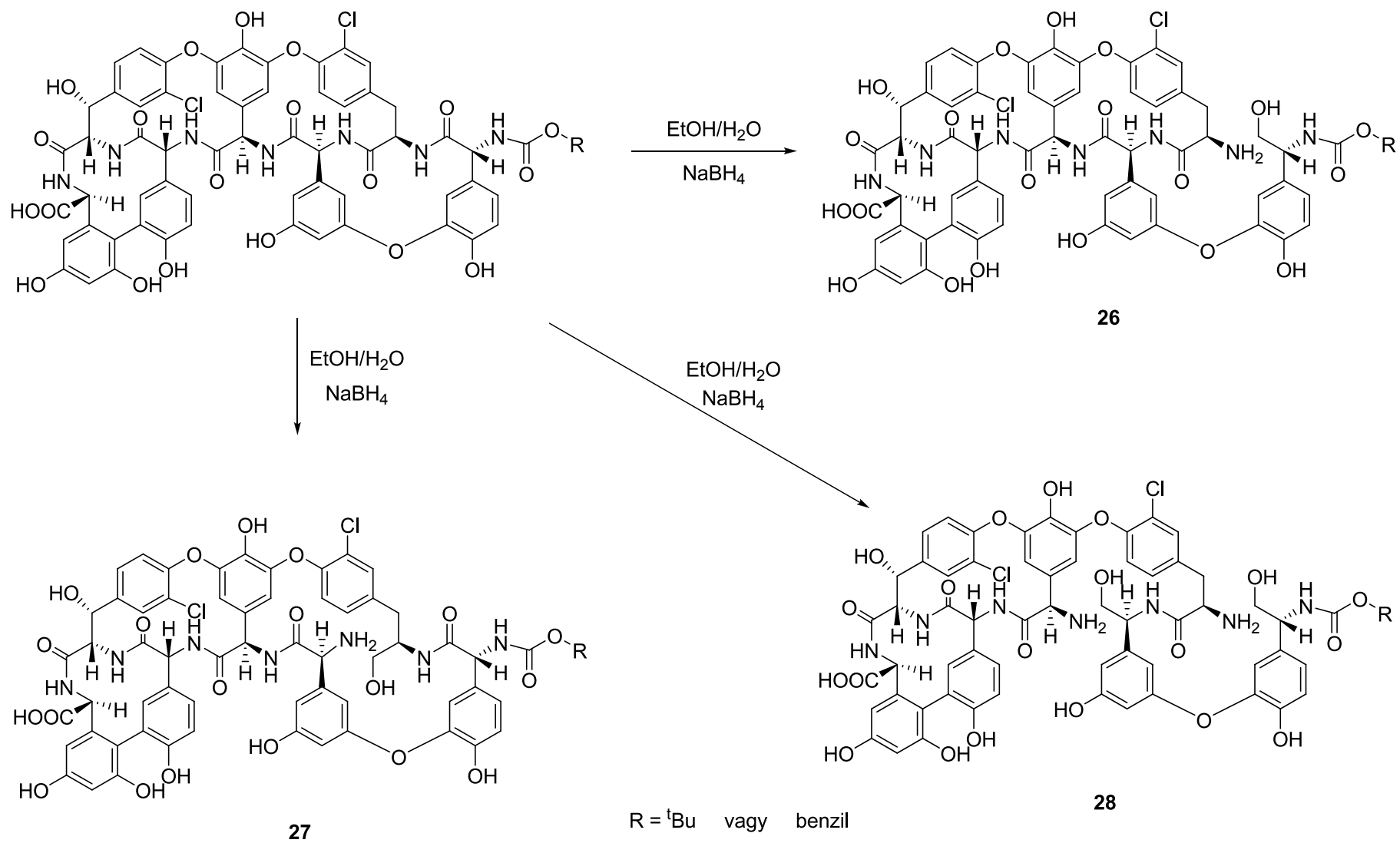
38. ábra A 6 és 7-es aminosavak közötti kötés hidrolízise (teikoplanin-származékokon)



39. ábra A 2 és 3-as aminosavak közötti kötés redukzív hidrolízise (vankomicinen)

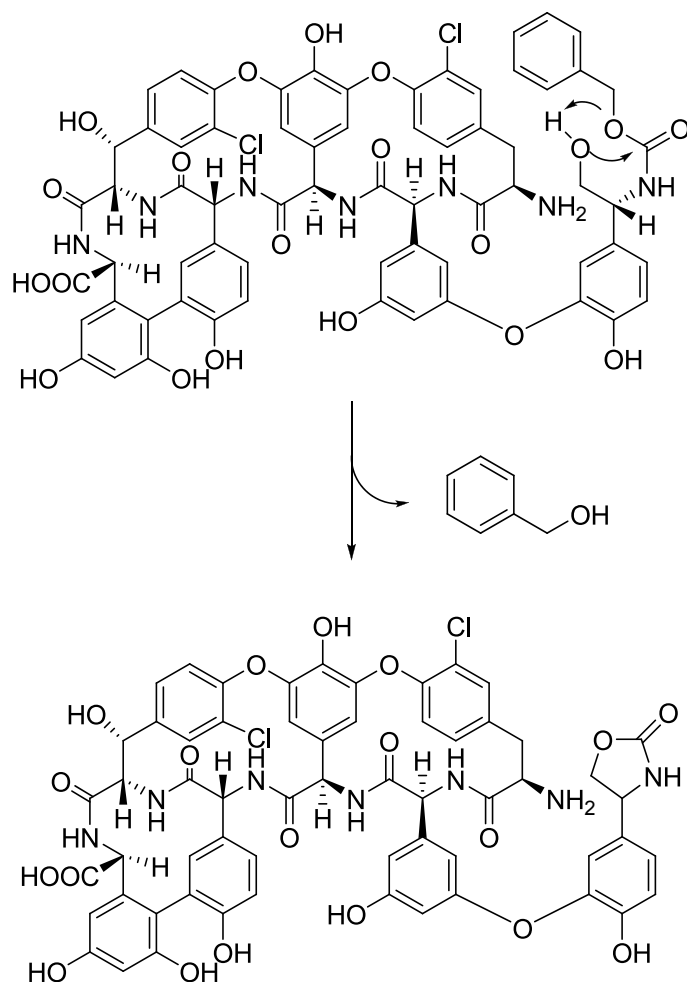
1.6.2.2.4. Az 1, 2 és 3, 4-es aminosavak közötti kötés hidrolízise⁵³

Az N-terminálisán karbamát formájában (Boc vagy Cbz) védett teikoplanin- és vankomicin-aglikonon végrehajtva az előbbieken bemutatott redukzív hidrolízist, az eredmények meglehetősen eltérőek (40. ábra). Teikoplanin-aglikon esetében az 1 és 2-es aminosavak közötti kötés-hasítás szelektivitása nagy mértékben romlik, ha az oldószerkeletben emeljük a víz arányát, és a várt teikoplanin-aglikon hexapeptid alkohol (**26**) származék helyett a 2, 3 amidkötés hasadásával keletkező pentapeptid alkohol (**27**) mennyisége nő.



40. ábra Az 1, 2 és 3, 4-es aminosavak közötti kötés hidrolízise (teikoplanin-aglikonon)

Az etanol – víz aránytól függetlenül mindig megjelenik egy melléktermék, az 1, 2 és 3, 4 kötések hasadásával keletkező tetrapeptid (28). A vankomicin-aglikon esetében az 1, 2 hidrolízis szelektivitása független az alkohol – víz aránytól. Teikoplanin-aglikonnál a keletkező termék függ az alkalmazott karbamát védőcsoporttól. A Boc meglehetősen stabilis, Cbz alkalmazásakor azonban a redukzív hidrolízissel keletkező hidroxilcsoport egy lassú intramolekuláris nukleofil reakcióban egy oxazolidinon-származékot eredményez (41. ábra). A kapott teikoplanin-aglikon hexapeptid alkohol antibakteriális aktivitása kisebb, mint magának az aglikonnak, de számottevően jobb, mint a 2 és 3-as aminosavak közötti kötés redukzív hidrolízisével kapott pentapeptid származéké, és ez különösen figyelemre méltó, ha azt vesszük, hogy az Edman-lebontással kapott megfelelő vankomicin-aglikon hexapeptid teljesen elveszítette antibakteriális hatását.



41. ábra Oxazolidinon-származék keletkezése a Cbz védett teikoplanin-aglikonon elvégzett redukzív hidrolízis során

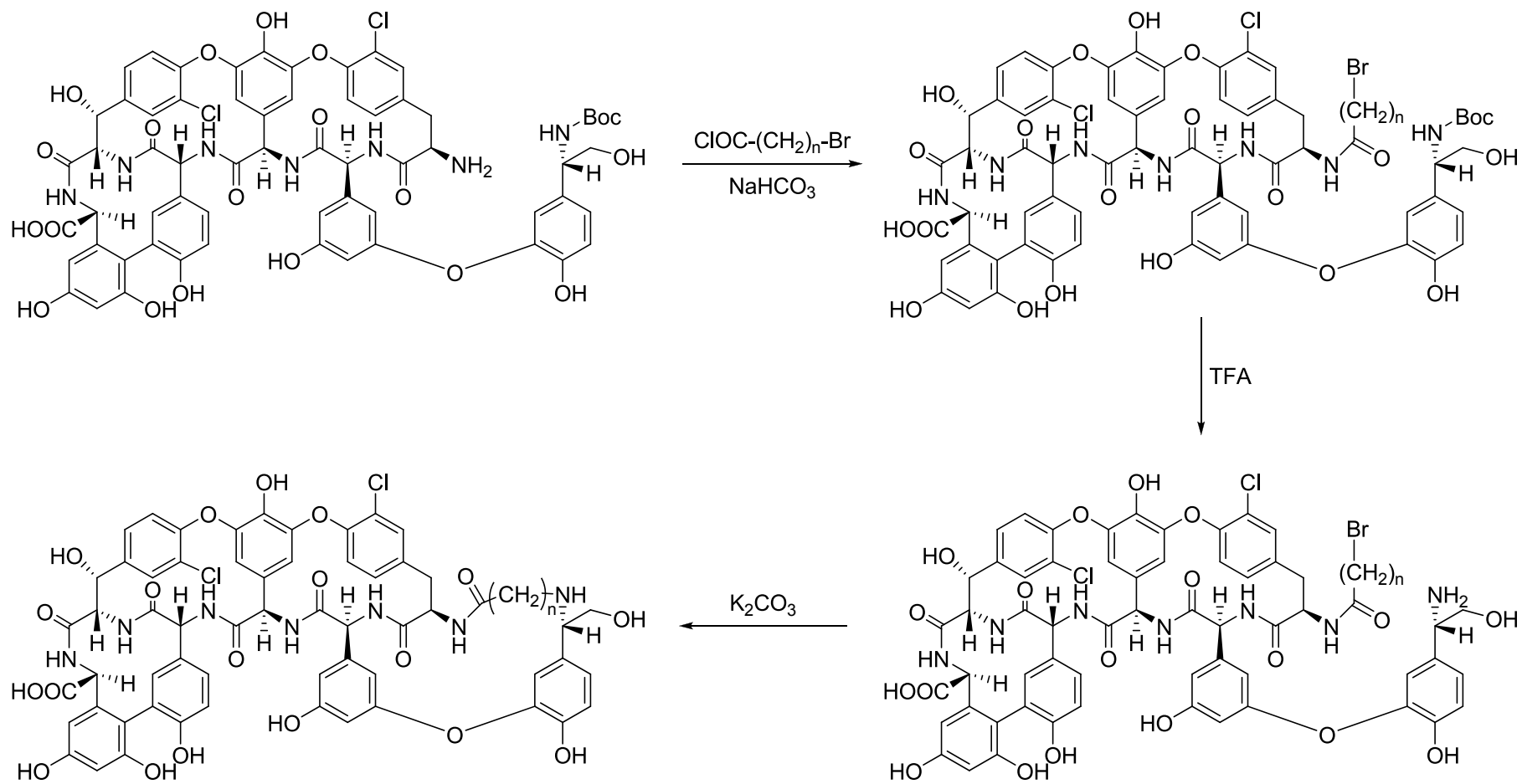
Az 1 és 2-es aminosavak közötti kötés redukzív hidrolízisével – annak ellenére, hogy teljesen hatástalan vagy jelentősen rosszabb hatású származékot szolgáltat, mint a kiindulási aglikon – fontos intermedierekhez juthatunk, amelyek N-terminálisát különféle aminosavakkal reacilezve újabb, jó aktivitású vegyületeket kaphatunk, a teikoplanin-aglikon esetében pedig, mivel az 1 és 3-as aminosavak közötti éterkötés megmarad, lehetőség nyílik az 1, 2, 3 aminosavak által kialakított gyűrű bővítésére (lásd később).

1.6.2.2.5. A 3-as aminosav epimerizációja⁵⁵

A kötőseb kialakításában lényeges szerepet játszó 3-as aminosav természetes S konfigurációját R-re változtatva (vizes vagy alkoholos oldatban erős bázist (pl. KOH) alkalmazva szobahőmérsékleten az epimerizáció 1-2 óra alatt gyakorlatilag teljesen végbemegy) a 2, 3 amidkötés 180°-kal elfordul, ami a kötőhely szerkezetét tönkreteszi, következésképpen a molekula elveszti a sejtfalprekursorhoz való kötődés képességét és ennek megfelelően antibakteriális aktivitását. A 3-as aminosav konfigurációjának változásával magyarázható a 2, 3 aminosavak közötti kötés redukzív hidrolízissel való hasításával nyert teikoplanin-származékok nagy mértékű aktivitás-csökkenése is.

1.6.2.2.6. Az 1, 2, 3 aminosavak által alkotott gyűrű bővítése⁵⁴

Ahogy már arról az 1.6.2.2.4. alfejezetben is szó volt, az N-terminálisán karbamát formában (Boc) védett teikoplanin-aglikon redukzív hidrolízisével nyert termék további átalakításával olyan származékhoz juthatunk, amelynél az 1, 2, 3 aminosavak alkotta gyűrűrendszer bővül. A redukzív hidrolízissel kapott intermedier szabad NH₂-csoportját (2-es aminosav aminocsoportja) brómcetsav-kloriddal (n=1) vagy brómpropionsav-kloriddal (n=2) Schotten-Baumann szerint acilezve, majd a védőcsoportot (Boc) TFA-val eltávolítva, a kapott köztitermékek K₂CO₃ hatására DMF-ban egy intramolekuláris nukleofil szubsztitúciós reakcióban ciklizálnak (42. ábra). A kapott termékek aktivitása nagyságrendekkel kisebb, mint a teikoplanin-aglikoné, ami azt mutatja, hogy a gyűrűbővítés negatívan befolyásolja az antibakteriális hatást.



$n = 1$ vagy 2

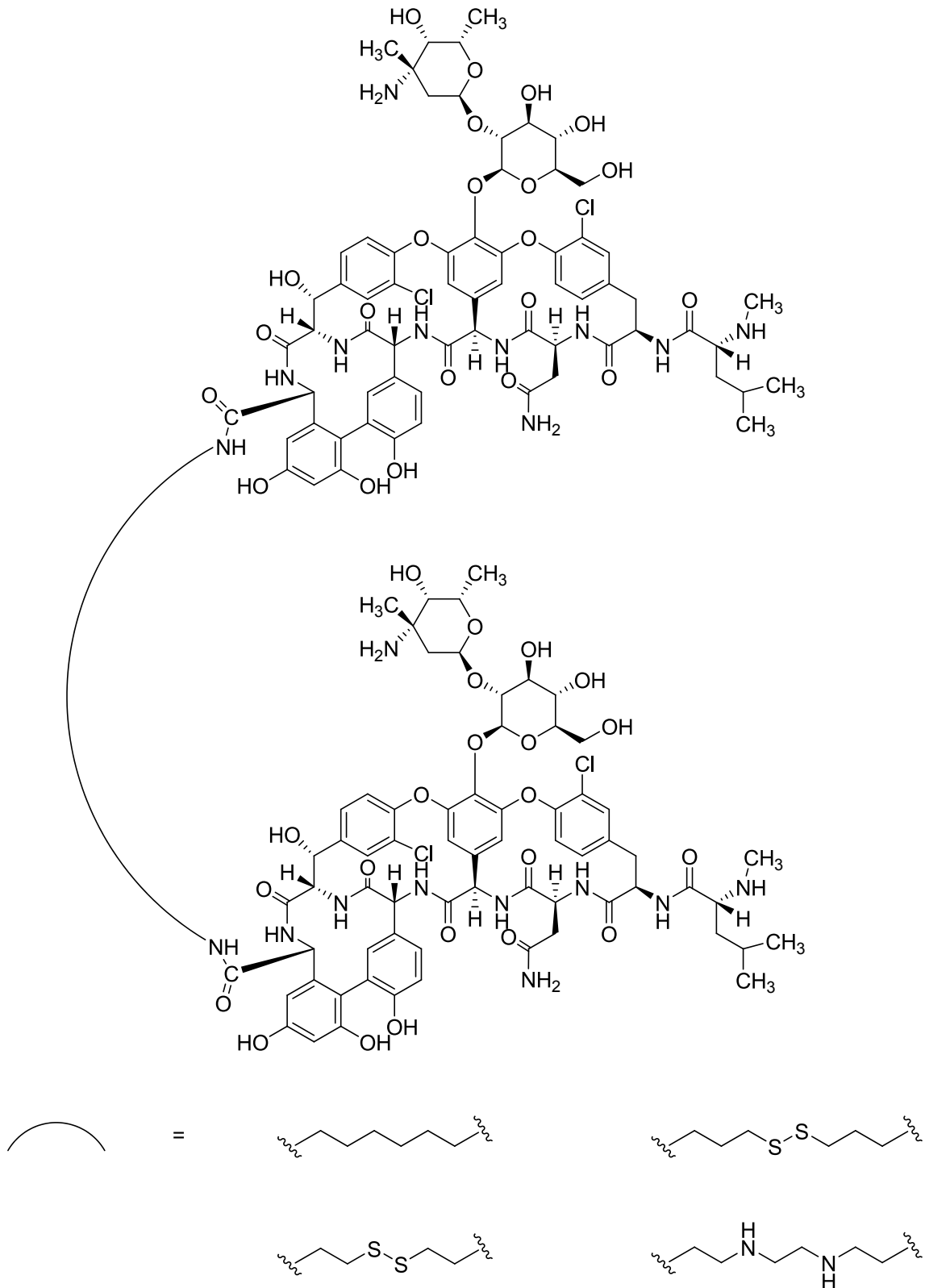
42. ábra Az 1, 2, 3 aminosavak által alkotott gyűrű bővítése

1.7. Dimér és multimér glikopeptid antibiotikumok

Williams⁵⁶ és mtsai a glikopeptideken végzett szisztematikus vizsgálataik során megállapították, hogy vizes közegben a vankomicin alacsony dimerizációs állandója több nagyságrenddel megnövekszik, ha a mintához D-alanil-D-alanin terminálist tartalmazó peptidet adnak. Ugyanakkor felismerték azt a tényt, hogy a másodlagos kötőerőkkel létrejött vankomicin-dimerek sokkal nagyobb affinitást mutatnak ligandumukkal szemben, mint a monomer antibiotikum. A legújabb eredmények alapján a ligandum nemcsak hogy dimerek kialakulását segíti, hanem ezek a dimerek képesek szupramolekuláris formává szerveződni, amelynek létezését Axelsen⁵⁷ és mtsai gélpermeációs kromatográfia, dinamikus fényszórás-fotometria és röntgenkrisztallográfiás vizsgálatokkal is igazolták. Ez a mechanizmus még számottevőbb a dimerizációra erősen hajlamos eremomicinnél és klóreremomicinnél⁵⁸, ugyanakkor a teikoplanin esetében nem tudtak dimerizációs konstans meghatározni, itt feltételezhető, hogy a kiváló antibakteriális hatás a lipofil oldalláncnak köszönhető, amely révén az antibiotikum mintegy kihorgonyozódik a baktérium sejtmembránjához.⁵⁶ Risztocetinnél bonyolultabb a helyzet, mivel a kialakuló aszimmetrikus dimernél⁵⁹ a ligand kötődése összességében csökkenti a disszociációs állandót. Az irodalomban számos példát találunk arra, hogy bivalens vagy multivalens ligandokat alkalmazva, azok receptorukhoz való kötődési erőssége nem egyszerűen kétszerese vagy többszöröse lett, hanem nagyságrendekkel nőtt meg. A vankomicin-csoportba tartozó glikopeptid antibiotikumok D-Ala-D-Ala jelenlétében mutatott viselkedése alapján a kutatók méltán feltételezték azt, hogy ha egy egyensúlyi állapotban lévő monomer-dimer keverék helyett – ahol a dimereket másodlagos kötőerők stabilizálják, és ezt a disszociációs állandó határozza meg – kovalens kötéssel kapcsolnak össze két glikopeptid molekulát, akkor méginkább megnövekszik a sejtfalprekursorhoz való kötődés, és tekintettel arra, hogy ezen kölcsönhatás erőssége jó összefüggést mutat az antibakteriális aktivitással, jobb hatású származékokhoz juthatnak, amelyek akár a rezisztens törzsek ellen is bevethetőek.

Az összefüggések mélyebb megismerése céljából Sundram⁶⁰ és mtsai vankomicin kovalens dimerjeit állították elő, s azok antibakteriális tulajdonságait vizsgálták. Bisz-(vankomicin)-karboxamidokat szintetizáltak HBTU [2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-urónium-hexafluoro-foszfát] segítségével; a kapcsolást 1,6-diamino-hexán, ciszteamin, homociszteamin és trietilén-tetramin felhasználásával végezték (43. ábra), és kontrollként – az aktivitás méréséhez – monomer adduktumokat képeztek vankomicinből ciszteaminnal és trietilén-tetraminnal. Az így létrejött vegyületek *Staphylococcus aureus*-szal valamint

vankomicin-érzékeny és –rezisztens *enterococcus*okkal szemben mutatott hatását vizsgálták. *S. aureus* esetén a dimer MIC értéke emelkedett a monomer vankomicinéhoz képest, jelentős aktivitásnövekedést figyeltek meg azonban az *enterococcus* törzseknél (különösen rezisztensek esetében).



43. ábra A bis-(vankomicin)-karboxamidok szerkezete

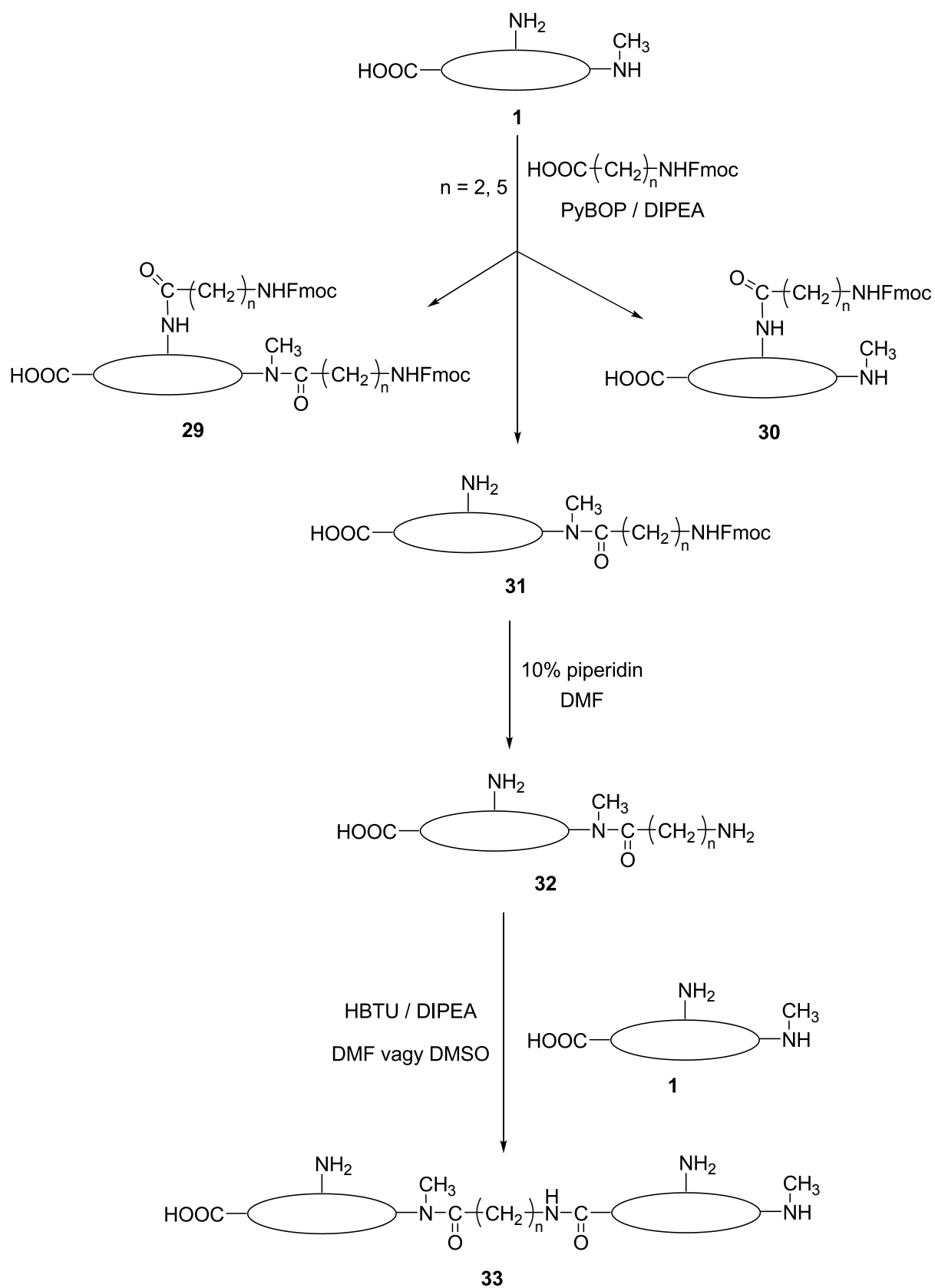
Továbbá szintetikus előállított peptidoglikán prekursorok felhasználásával fluoreszcenciás titrálással megállapították a monomer és a dimer szerkezetek disszociációs konstansát, amely értékek megerősítették a mikroorganizmusokon végzett vizsgálatok eredményeit.

A fent bemutatott karboxamidok ún. fej-fej (ff-dimer) illeszkedéssel jöttek létre, azaz az egyik vankomicin C-terminálisa a másik C-terminálisához kapcsolódott.

Staroske és Williams⁶¹ nem két C-terminális, hanem a C-terminális N-terminális kapcsolásával, ún. fej-láb (fl-dimer) csatolással állított elő vankomicin-dimereket (44. ábra). A szintézist úgy oldották meg, hogy első lépésben aminocsoportjában védett β -alaninnal illetve 6-amino-hexánsavval acilezték a vankomicint (**1**), így három származékot kaptak: a vankózamin-részen (**30**), az N-terminálison acilezett (**31**) és a diacilezett (**29**) vegyületeket, amiket fordított fázisú HPLC-vel választottak el egymástól. Az N-terminális részen acilezett származékról (**31**) a következő lépésben 10% piperidint tartalmazó DMF-fel eltávolították a védőcsoportot (**32**), majd HBTU jelenlétében végbement a dimerizáció (**33**). Staroske és Williams szerint a fl-kapcsolás azért előnyösebb, mint a ff-forma, mert így a két dimer egy tetramer formává alakulhat, ha a négy vankomicin hidrogén-kötésen keresztül stabilizálja a szerkezetet, míg a fej-fej elrendezésben csak két antibiotikum molekula kapcsolódhat hidrogén-híddal, ami nem elég erős a komplex fenntartásához.

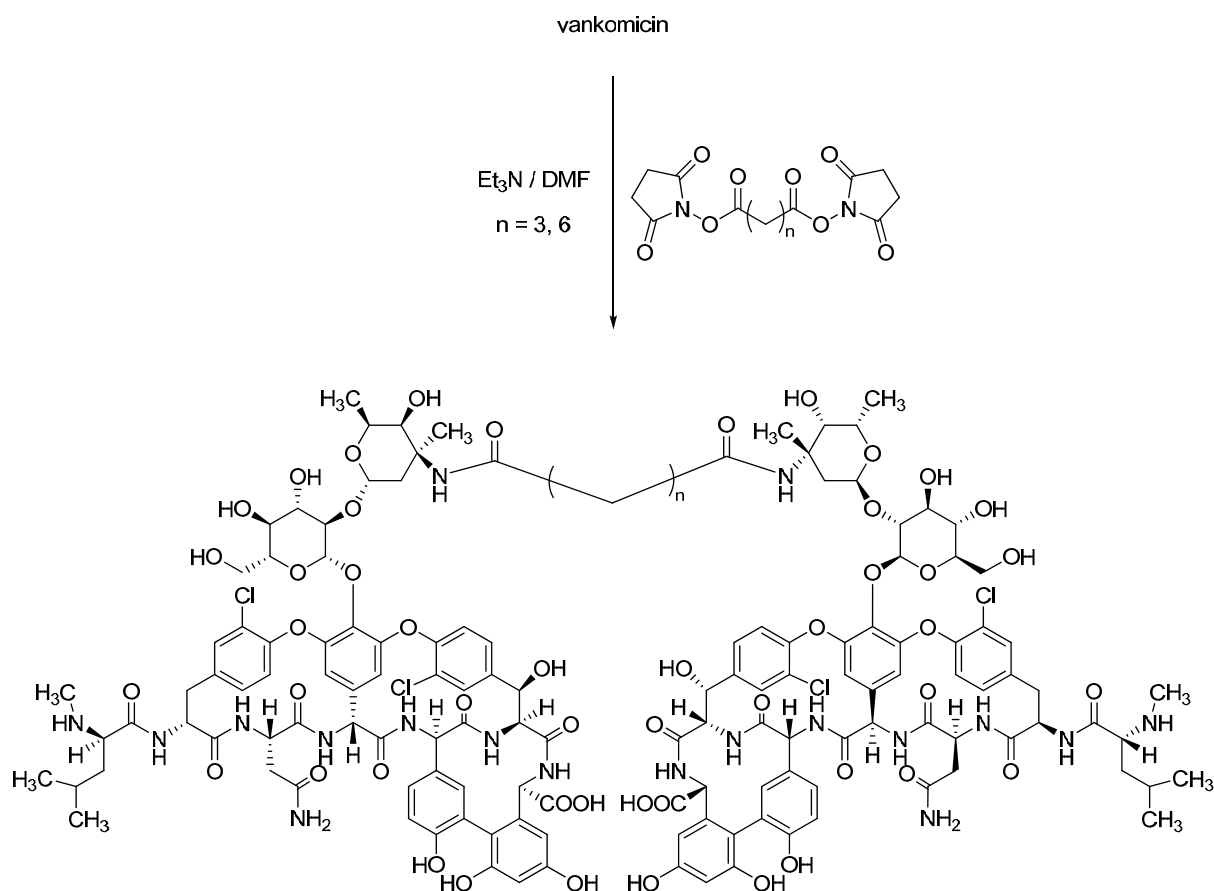
A ff- és a fl-dimerek mellett Adamczyk⁶² és mtsai olyan eljárást dolgoztak ki, amellyel a vankózamin részen keresztül kapcsoltak össze két vankomicinmolekulát (vv-dimer). A gyakorlatilag egy lépéses reakciót DMF-ben végezték trietil-amin jelenlétében és az összekapcsoláshoz glutársav (n=3) illetve parafasav (oktán-disav, n=6) bisz-N-hidroxi-szukcinimidil észterét használták. A kísérlet célja az volt, hogy a már megismert dimer-dimer komplex szerkezeten mintegy túllépve olyan vankomicin-dimert szintetizáljanak, amely képes polimer forma kialakítására. Az előállított dimerek D-Ala-D-Ala peptidhez való kötődését, s így az antimikrobiális aktivitást SPR (Surface Plasmon Resonance) technikával mérték. Az eredmény nem a várokozásnak és a feltételezéseknek megfelelően alakult: a vv-dimerek aktivitása gyakorlatilag megegyezett az alap vankomicinével.

Nicolaou⁶³ munkatársaival egy target jelenlétében végbemenő kombinatorikus szintézist dolgozott ki különböző vankomicin-dimerek kialakítására. A módszer megtervezéséhez felhasználták egyrészt a már korábban említett dimerizációs eljárásokat, másrészt a peptidkémiai kifejlesztett kombinatorikus szintézis elvét. Ugyanakkor figyelembe vették azt a tényt, miszerint egy önálló vankomicin molekula dimerizációs konstansa 700 M^{-1} , de 10^4 M^{-1} -re nő ez az érték, ha az antibiotikum a D-Ala-D-Ala vagy a D-Ala-D-Lac egységhez kötődve létrehoz egy komplexet.

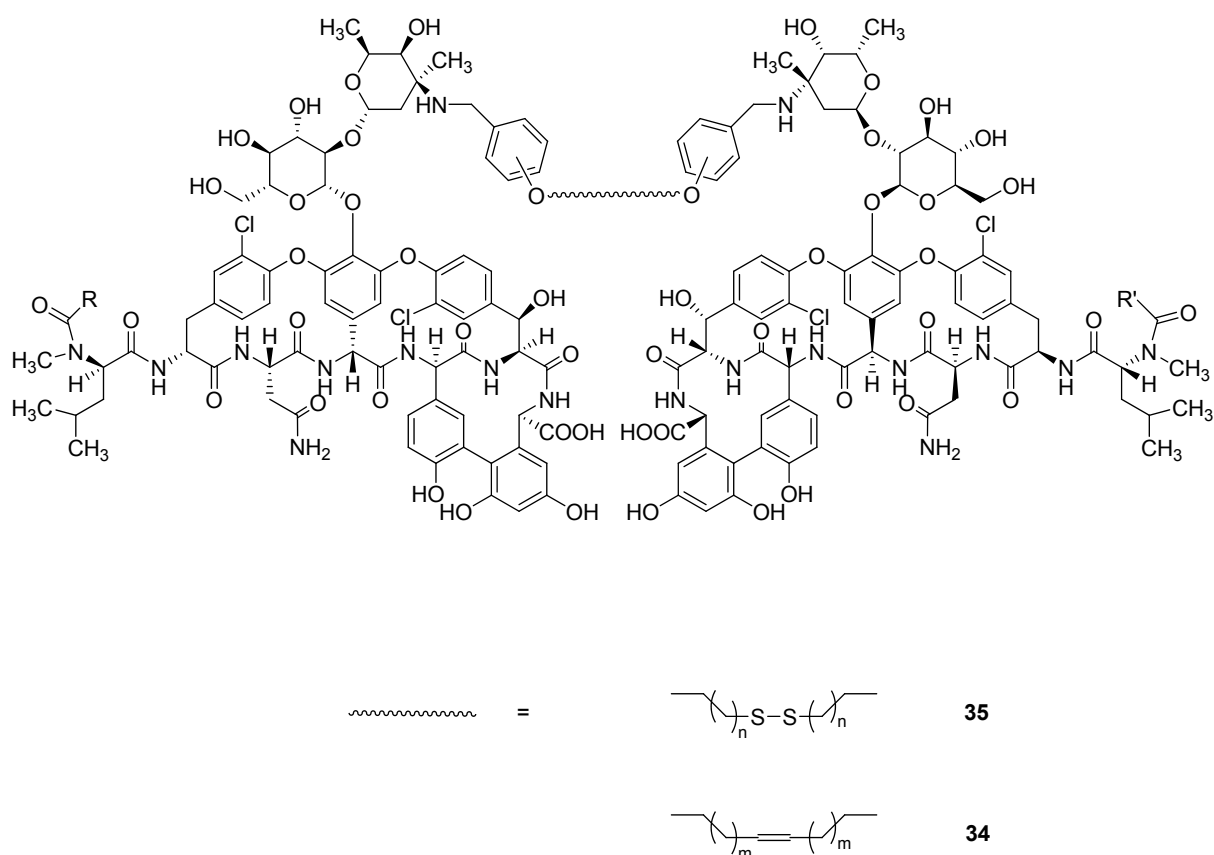


44. ábra Vankomicin fej-láb dimerjeinek szintézise (az áttekinthetőség kedvéért a vankomicin molekulát ellipszis szimbolizálja)

A szintézis lényege az volt, hogy különféle vankomicin-származékokat alakítottak ki úgy, hogy megváltoztatták a molekula N-terminális aminosav-részét. A két vankomicin összekapcsolásához egy kettős kötést tartalmazó olefin (**34**), illetve diszulfid-híddal bíró (**35**) láncmolekulát használtak (46. ábra). Először kísérletekkel meghatározták ezen összekötőmolekula optimális hosszát. Ezek után a különféle vankomicin-származékokból a megfelelő kémiai reakcióval dimereket állítottak elő úgy, hogy a reakcióelegyben jelen voltak a D-Ala-D-Ala, illetve a D-Ala-D-Lac ligandok is. A dimerizáció úgy ment végbe, hogy először egy-egy antibiotikum kötődött a targethez, és így oly mértékben megnőtt dimerizációs állandójuk, hogy képesek voltak egymással hidrogén-hidakon keresztül összekapcsolódni, majd ezt a másodlagos kötőerőt a kémiai reakcióval kialakult láncmolekula kovalens kötéssel stabilizálta. A szintézisben az egyes kombinációk (a különböző vankomicin-származékok homo- és heterodimerjei) nem azonos mennyiségben keletkeztek. Reálisnak tűnik az a megfontolás, miszerint a legnagyobb arányban létrejött dimer a legaktívabb mikroorganizmusokkal szemben.



45. ábra A vankomicin vv-dimerjeinek előállítás

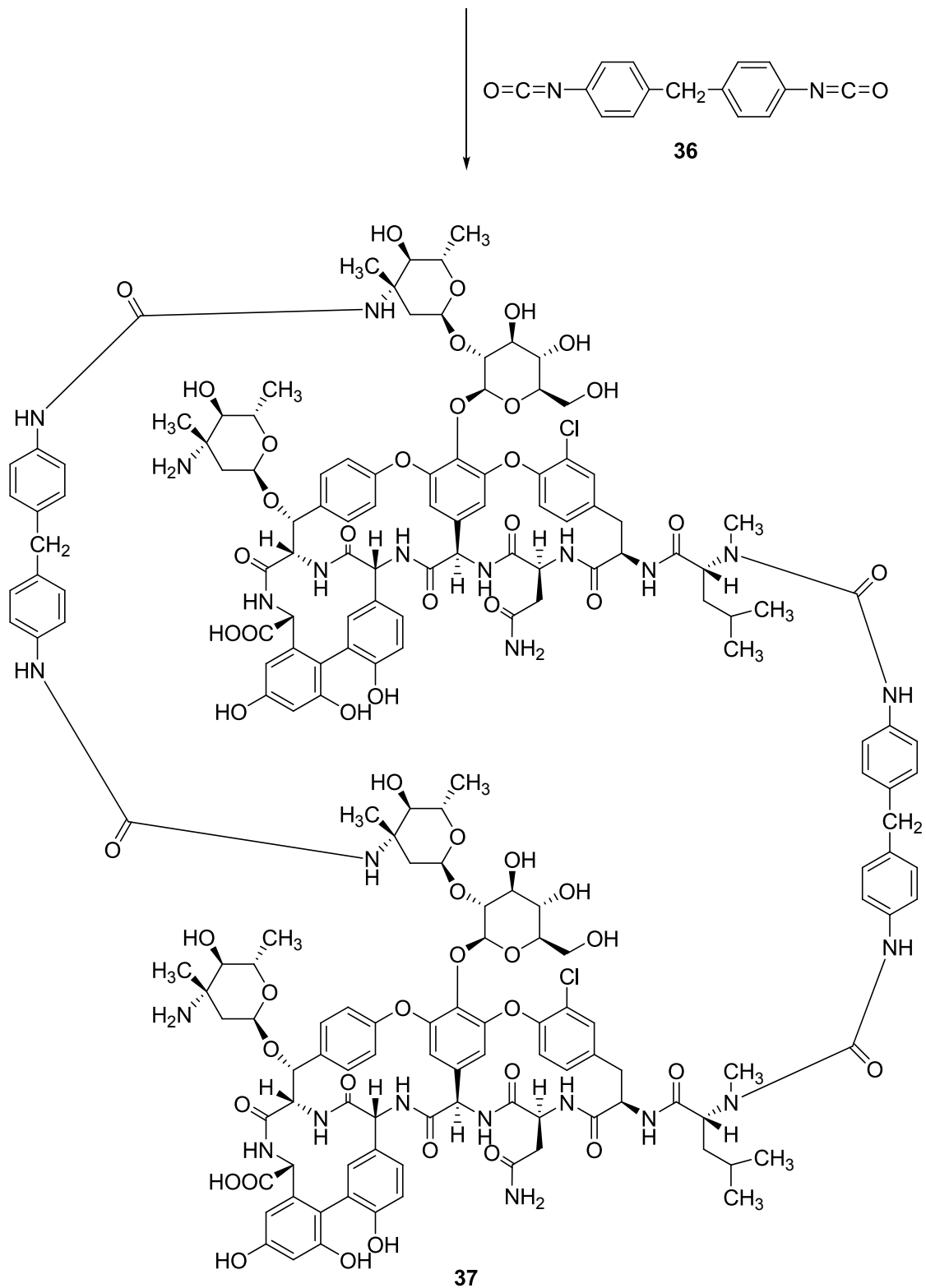


46. ábra A kombinatorikus szintézissel előállított különféle vankomicin-dimerek szerkezete

Sztaricskai⁶⁴ és mtsai eremomicinből, egy bisz-izocianát származékot (**36**) használva, egy speciális gyűrűs dimert (**37**) állítottak elő (47. ábra). A két antibiotikum molekula N-terminálisain és a 4-epivankózamin aminocsoportjain keresztül is össze volt kapcsolva. Az antibakteriális teszt azt mutatta, hogy ez a fajta dimer lényegesen gyengébb hatású, mint a monomer eremomicin, ami talán a túlságosan merev szerkezettel magyarázható, ami kedvezőtlenül befolyásolja a peptidoglikán D-Ala-D-Ala egységéhez való kötődést.

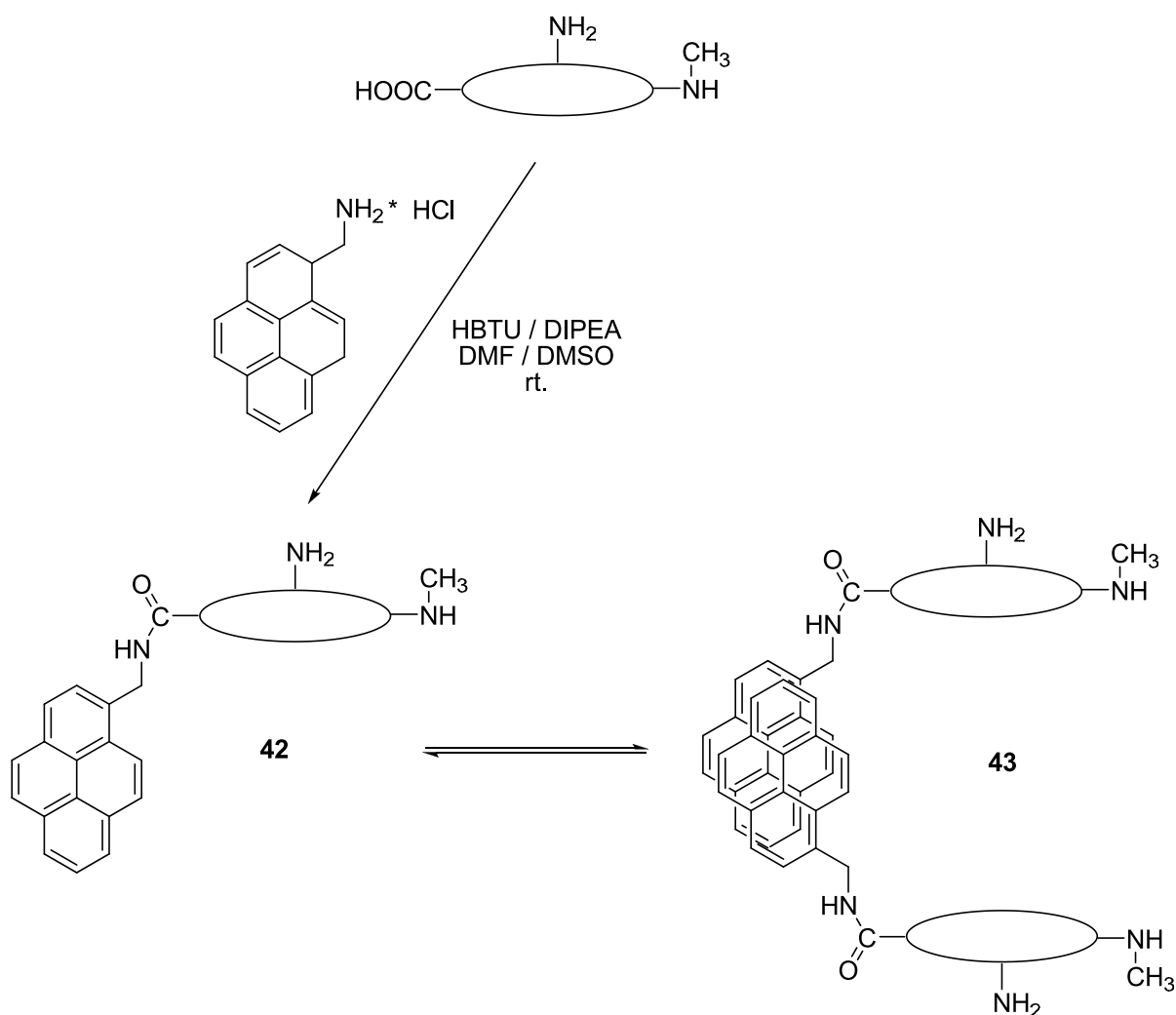
Arimoto⁶⁵ és mtsai, a dimerek mutatta biztató eredményekre alapozva, vankomicin-polimert szintetizáltak (50. ábra). A polimerizációt úgy oldották meg, hogy az antibiotikum vankózamin részéhez redukzív alkilezéssel kapcsoltak egy norbornén-származékot (**39**), majd ezt (**40**) gyűrűfelnnyílasos metatézis polimerizáció (ROMP) segítségével polimerizálták. Az elvégzett mikrobiológiai vizsgálatok azt mutatták, hogy a vankomicin-polimer (**41**) 60-szor hatékonyabb VRE-vel szemben, mint maga a vankomicin, de a megnövekedett aktivitás pontos mechanizmusát nem tudták megmagyarázni.

eremomicin



47. ábra Gyűrűs dimer kialakítása eremomicinből

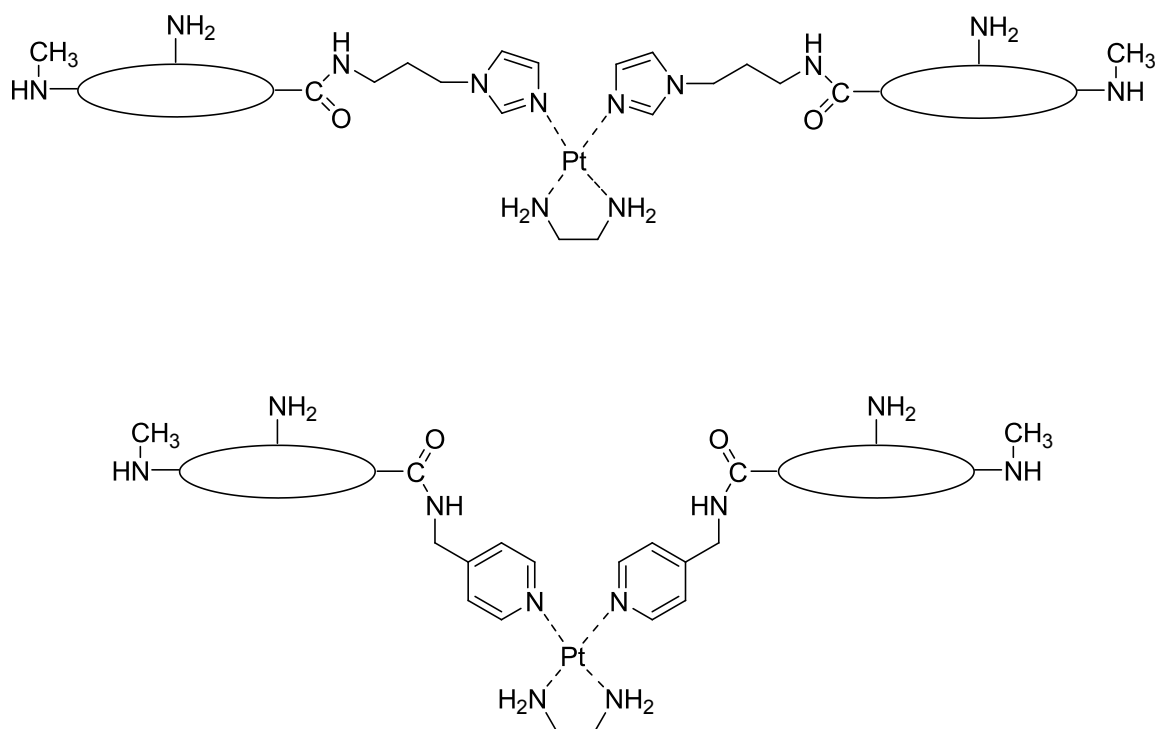
Egy kínai kutatócsoport⁶⁶ pirén-származékot (**42**) állított elő a vankomicin C-terminálisának módosításával. Az új vegyület képes volt *in situ* a baktériumsejt felszínén multivalens vankomicinné (**43**) szerveződni a pirén molekularészek között létrejött erős π - π kölcsönhatások stabilizáló ereje által. Ez az önszerveződésre hajlamos vegyület kitűnő aktivitást mutatott vanA-pozitív törzsek esetében is (MIC = 2,8 $\mu\text{g} / \text{ml}$).



48. ábra A vankomicin önszerveződő pirén-származékának szintézise (az áttekinthetőség kedvéért a vankomicin molekulát ellipszis szimbolizálja)

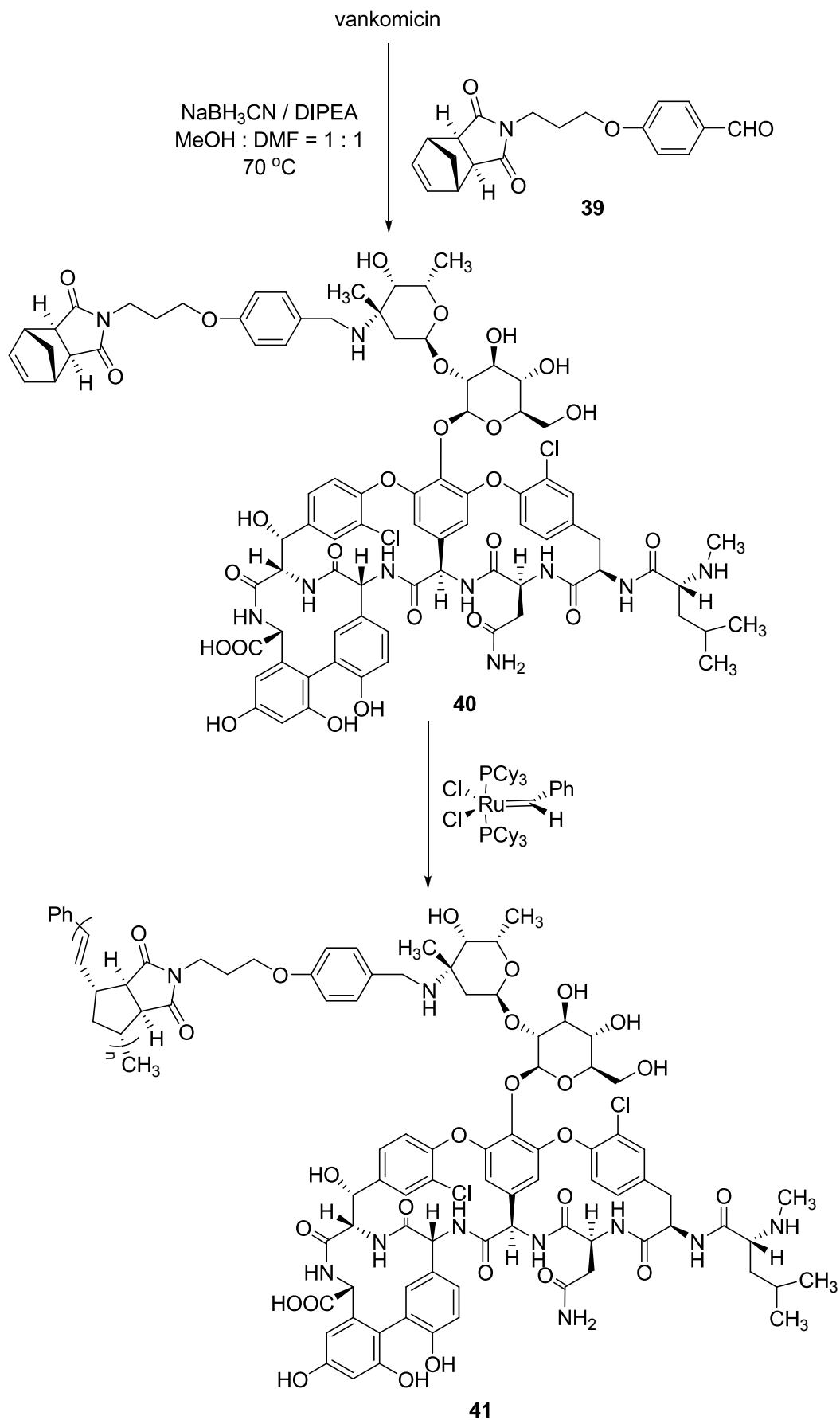
Ugyanez a csoport⁶⁷ fémkomplex kialakításával hozott létre vankomicin-dimereket. Az antibiotikum C-terminálisához piridin- illetve imidazol-származékokat kapcsoltak, majd olyan négy ligandumos platina-komplexezt állítottak elő, amelynek két liganduma egy etiléndiamin két aminocsoportja volt, míg a másik két ligandumként egy-egy vankomicinhez kapcsolt piridin (vagy imidazol) nitrogénje szolgált (49. ábra). Ezek közül több Pt-komplex is

kitűnő antibakteriális aktivitást mutatott még a vankomicinre és teikoplaninra egyaránt rezisztens *E. faecalis* esetén is.

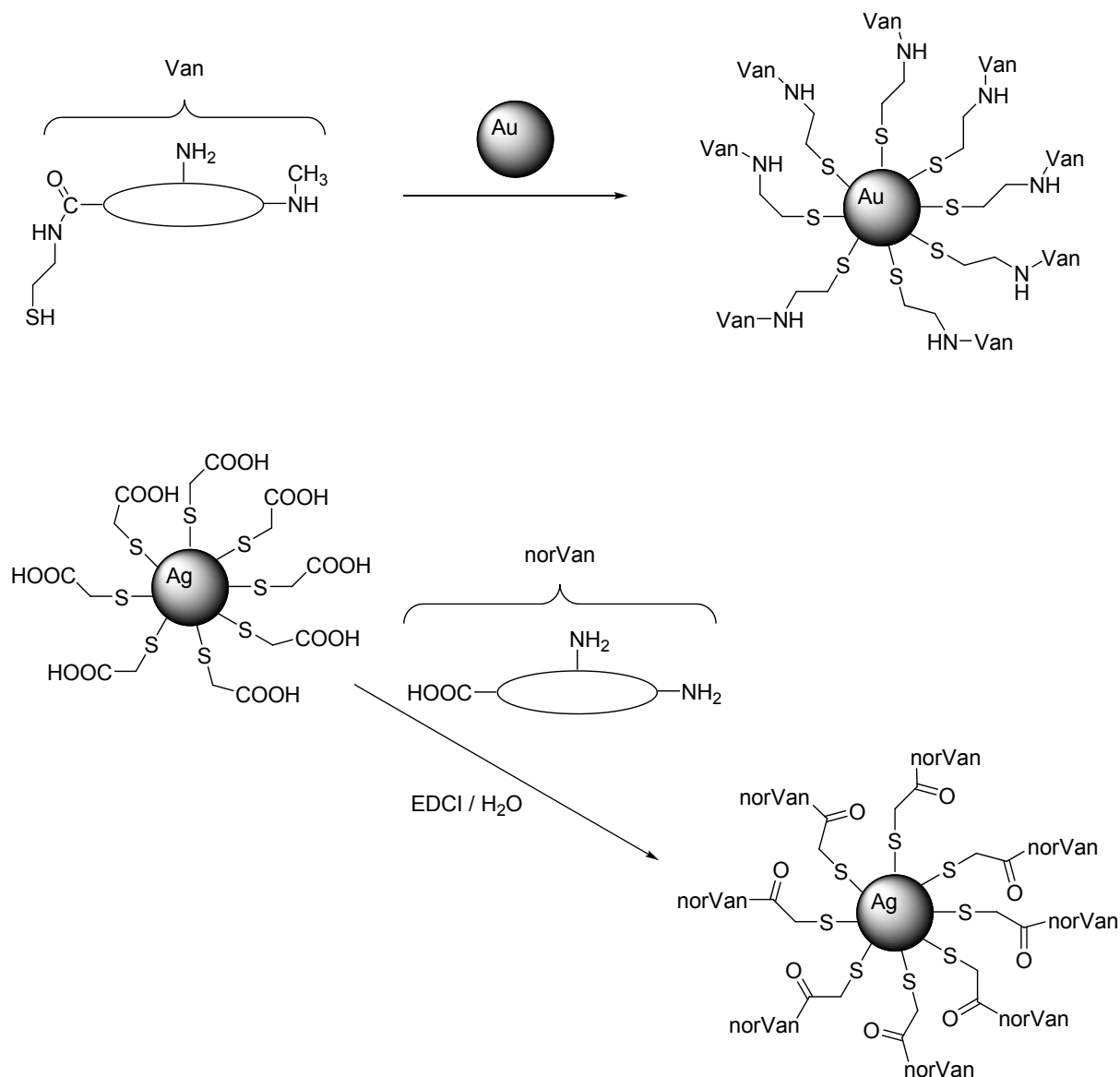


49. ábra Platina-komplex képződésével létrejött vankomicin-dimerek (az áttekinthetőség kedvéért a vankomicin molekulát ellipszis szimbolizálja)

A kovalens dimerek és polimerek mellett a multivalens vankomicin-származékok speciális formáját jelentik a nanorészecskéhez kötött antibiotikumok (51. ábra). Vankomicinből ciszteaminnal karboxamidot képezve, az képes arany nanorészecskékhez kapcsolódni.⁶⁸ A vankomicinnel bevont nanopartikulum igen hatásos volt különböző genotípusú (vanA/B/C-pozitív) rezisztens *enterococcus* törzsek ellen, és figyelemre méltó *E. colival* szemben mutatott aktivitása (MIC = 8 µg / ml). Tioglikolsavval bevont ezüst nanorészecske felszínéhez nor-vankomicin köthető EDCI segítségével.⁶⁹ Az így kialakított nanopartikulum erős bakteriosztatikus hatást mutat *E. colival* szemben. A transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek alapján a hatást azzal magyarázták a kutatók, hogy a nanorészecske tönkreteszi a külső membrán (Gram-negatív baktériumról lévén szó) integritását és így az képes bejutni a peptidoglikán szintézis helyszínére, ahol a felszínéhez kötött multivalens nor-vankomicin kifejti erőteljes gátló hatását.

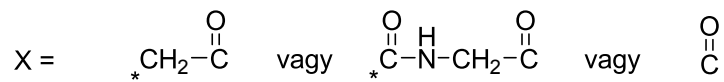
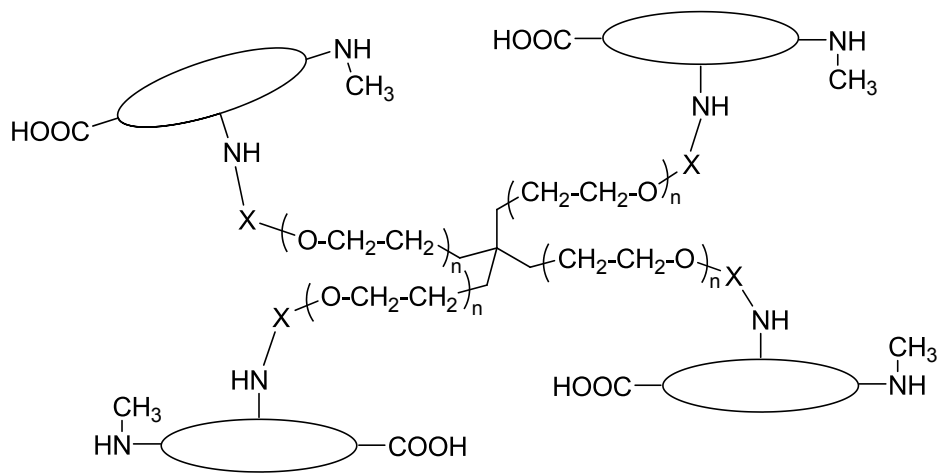


50. ábra Vankomicin-polimer szintézise



51. ábra Arany nanorészecskéhez kötött vankomicin (felül) és ezüst nanorészecskéhez kötött norvankomicin (alul)

Nem tartozik már szorosan a multivalens glikopeptid antibiotikumok közé az a vankomicin-tetramer, amelyet Greenwald⁷⁰ és mtsai állítottak elő. Négy polietilén-glikol karral rendelkező pentaeritrit alapú hordozóhoz kovalensen kötöttek négy vankomicin molekulát. Az így kialakított vankomicin-PEG komplex prodrugként funkcionál, *in vivo* ugyanis a polimer és az antibiotikum közötti kötés elhidrolizál, így nem is várható igazán aktivitás fokozódás vagy szélesebb antibakteriális spektrum. Ami viszont figyelemre méltó, az az antibiotikum farmakokinetikájában bekövetkező változás. A vankomicin polimerhez való kötésével ugyanis a keringési féléletidő 30-80-szorosára emelkedett.



$$n \sim 225$$

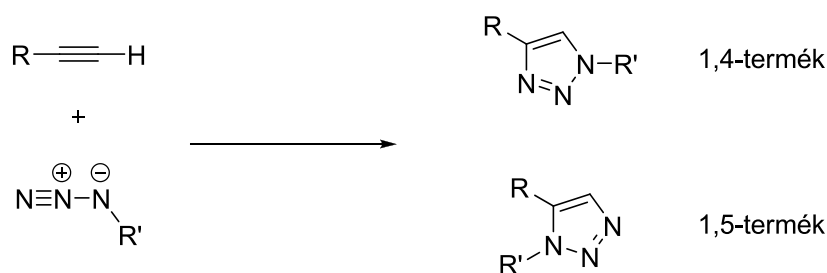
52. ábra Elágazó polietilénlikollal kialakított vankomicin-tetramer

A több mint húsz éve folyó intenzív kutatás számos bi- és multivalens glikopeptid antibiotikum származékot eredményezett, amelyekből azonban, annak ellenére, hogy sok igen kiváló antibakteriális aktivitással rendelkeznek, mind a mai napig nem született gyógyszer. Ez talán az állatkísérletekben mutatott toxicitásukkal magyarázható, ami a májban és vesében való felhalmozódásukkal függhet össze.⁷¹

1.8. A réz(I) katalizálta azid-alkin 1,3-dipoláris cikloaddíció

1.8.1. A Cu(I) katalizálta azid-alkin cikloaddíció (CuAAC)

Egy organikus azid és alkin termikus cikloaddíciós reakciójáról először Michael számolt be 1893-ban, majd mintegy 70 évvel később Huisgen behatóan tanulmányozta, és az ő neve alatt került be a kémiai szakirodalomba, mint Huisgen-féle 1,3-dipoláris cikloaddíciós reakció (53. ábra). Az amerikai Sharpless⁷² és a dán Meldal⁷³ egymástól függetlenül dolgozta ki a reakció Cu(I) katalizálta változatát, ami forradalmasította Huisgen cikloaddícióját, és az rövid idő alatt igen nagy népszerűsége tett szert. A katalizátor hatására a reaktivitás 7 nagyságrenddel megnő, aminek köszönhetően a reakció egészen enyhe körülmények között kivitelezhető, és relatíve gyorsan végbemegy, ezért gyakran click-reakciónak is nevezik.

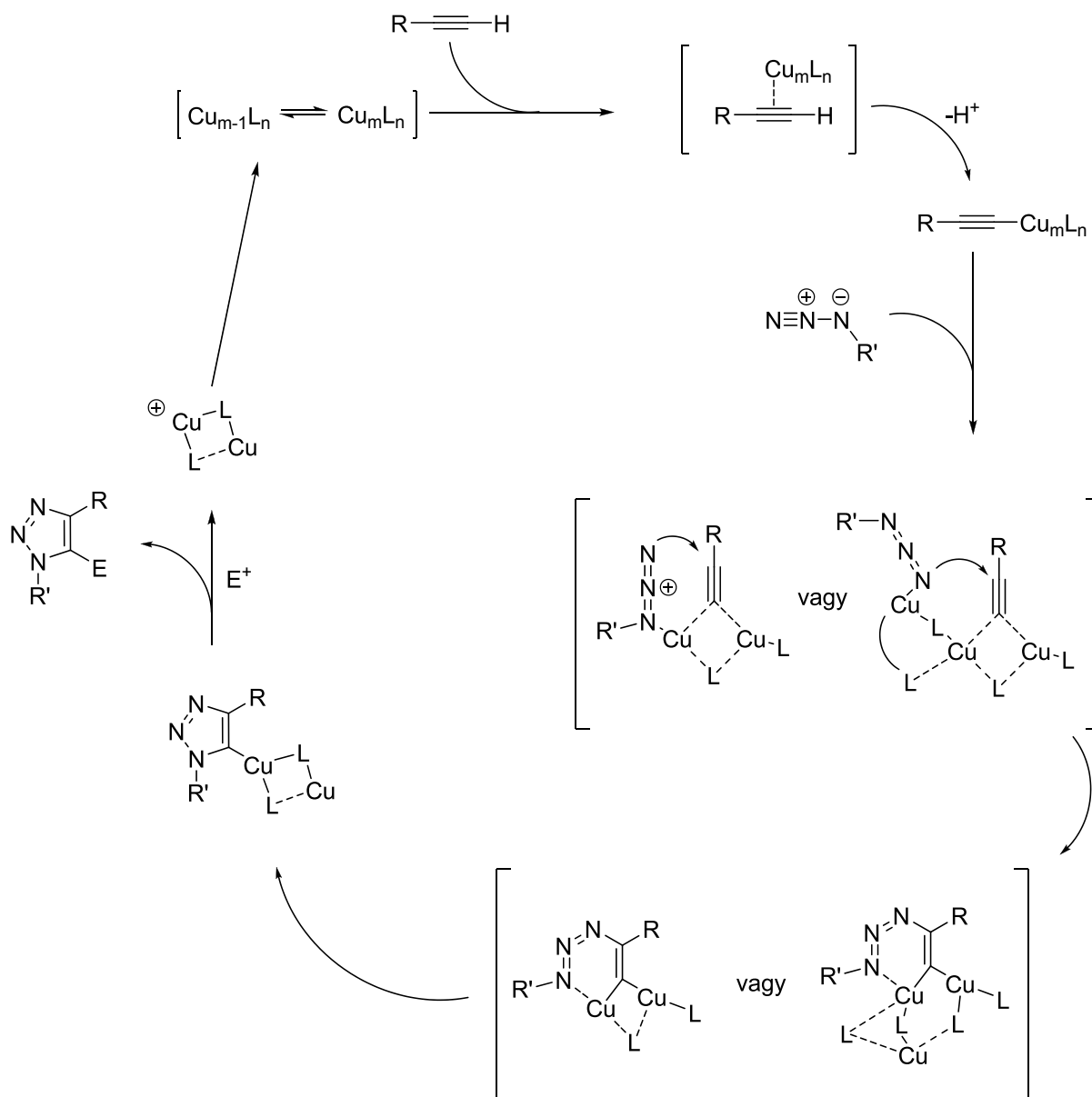


53. ábra A Huisgen-féle 1,3-dipoláris cikloaddíció (réz katalízis nélkül 1,4- és 1,5-diszubsztituált termék egyaránt keletkezhet)

A kinetikai vizsgálatok azt mutatták, hogy míg az azid-alkin cikloaddíció termikus formája koncertikus, addig a réz-katalizálta változat többlépéses reakció. Első lépésben egy réz-acetilid keletkezik, illetve újabb Cu(I) kapcsolódásával egy olyan intermedier jön létre, amihez az azid 1. vagy 3. (terminális) nitrogénjén keresztül koordinálódni képes. Ezt követően kialakul egy rezet is tartalmazó 6-tagú gyűrűs köztitermék. Átrendeződéssel egy 1,4-diszubsztituált 1,2,3-triazollá szűkül a gyűrű, amely ötös helyzetben metallált. A végtermék felszabadulása, illetve a katalizátor regenerálódása egy elektorfil (ami általában egy proton) támadását követően valósul meg.⁷⁴ (54. ábra)

A réz katalizálta azid-alkin cikloaddíciós reakció népszerűségét annak köszönheti, hogy meglehetősen gyors, enyhe körülmények között végbemegy, gyakorlatilag kvantitatív, a termikus formával ellentétben igen nagy regioszelektivitást mutat (kizárólag csak 1,4-diszubsztituált triazol keletkezik, nincs 1,5-termék), számos oldószerben végrehajtható, nagyon sok funkciós csoportot tolerál (a reakciót azok a mulekularészletek zavarhatják,

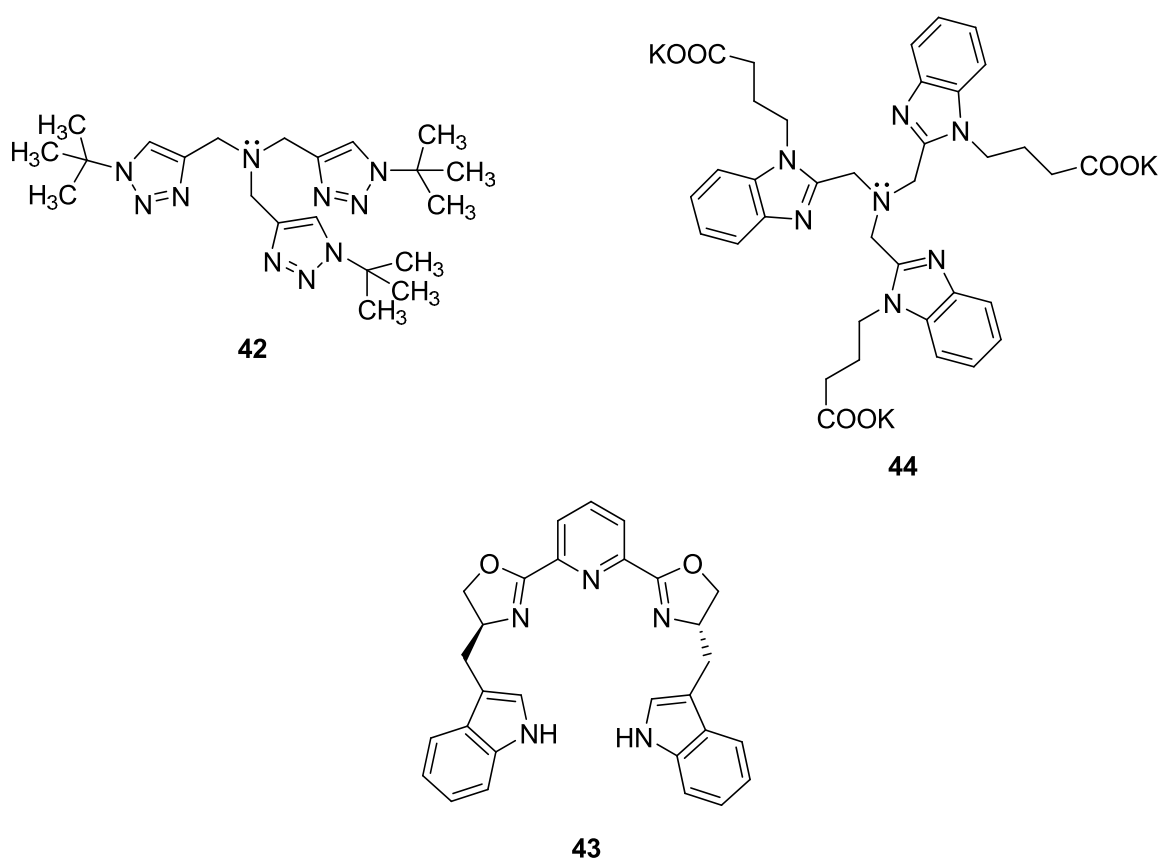
amelyek a rézzel erős komplexet képeznek; melléreakciót adhatnak a tiolok, ciklikus alkének, elektronszívó csoporttal rendelkező nitrilek). Ezen kedvező tulajdonságok miatt a click-reakciót igen széles körben használják a szerves kémia, biokémia, polimerkémia területén.⁷⁵



54. ábra A réz(I) katalizálta azid-alkin cikloaddíciós reakció mechanizmusa

Lényeges, hogy a reakciót csak az I-es oxidációs állapotú réz katalizálja. Ennek megfelelően használhatunk Cu(I)-et, ami lehet réz-halogenid önmagában, esetleg trifenil-foszfinnal kombinálva vagy réz-triflát. Ebben az esetben azonban ügyelni kell arra, hogy inert atmoszférát biztosítsunk, hogy megakadályozzuk a Cu(I) oxidációját. A Cu(I)-et *in situ* is előállíthatjuk redukcióval, erre a leggyakoribb példa a $CuSO_4 / Na$ -aszorbát rendszer. Ennek

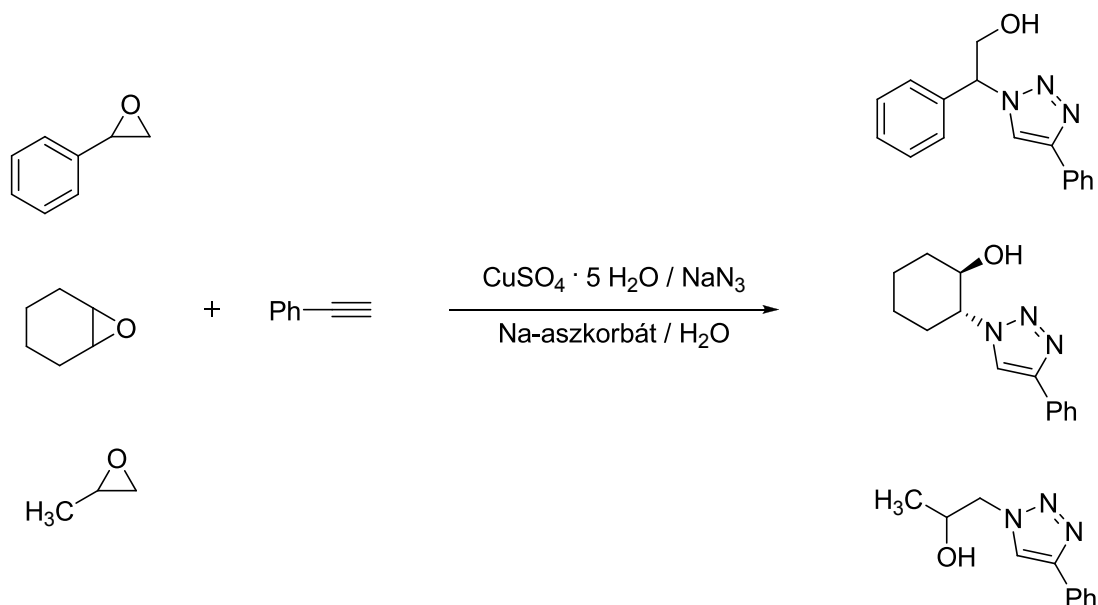
előnye, hogyha a redukálószerből nagy felesleget használunk, akkor a levegő illetve az oldószer oxigéntartalma nem zavar annyira, mint az előző esetben. Oxidációval is generálhatunk Cu(I)-et fém rézből réz(II)-szulfáttal vagy nano rézből réz(I)-oxiddal esetleg aminok sósavas sójával. Megemlíthető még a Lipshutz⁷⁶ által kidolgozott Cu(NO₃)₂-tal impregnált aktív szén, mint heterogén fázisú katalizátor. Habár a ligandum közvetlenül nem vesz részt a katalitikus folyamatban, mégis meghatározó lehet, különösen Cu(I) katalizátor esetén: fokozza az átalakulást és védi a katalizátort az oxidatív hatástól. Az egyszerű Et₃N, DIPEA, 2,6-lutidin mellett bonyolultabb szerkezetű triazol-(**42**), indol-(**43**) vagy benzimidazol-(**44**) származékokat is használnak ligandumként.



55. ábra Néhány click-reakcióhoz használatos ligandum

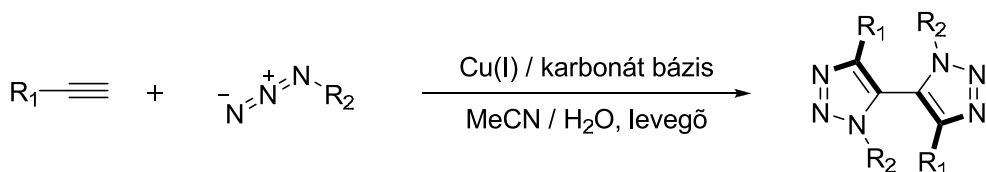
A click-reakció kivitelezéséhez az oldószerek széles skálája áll rendelkezésre. Használhatunk halogénezett (diklór-metán, kloroform), éterikus (THF, Et₂O) oldószereket, DMF-ot, DMSO-ot, hexánt, toluolt vagy akár kétfázisú toluol / víz rendszert vagy alkohol-víz elegyet. Ha az azid illetve alkin funkcióscsoportok úgy helyezkednek el a molekulán, hogy nem gátolt a rézhez való koordinációjuk, akkor általában a szubsztituenseknek nincs befolyásuk a triazol-képződésre. Meg kell említeni azonban, hogy az α -karbonil-alkinek jóval reaktívabbak mint

az alkil-alkinek. A primer és a szekunder azidok reaktivitása közel azonos, a tercier származékok azonban kevésbé reaktívak. Kihasználva továbbá azt, hogy a szerves azid-származékok sokkal reaktívabbak, mint az azid-anion, lehetőség nyílik például β -hidroxitriazolok egylombikos szintézisére, ahol is első lépésben NaN_3 -ot reagáltatnak különböző epoxidokkal, majd ezt követően hajtják végre tisztítás nélkül a click-reakciót⁷⁷ (56. ábra).



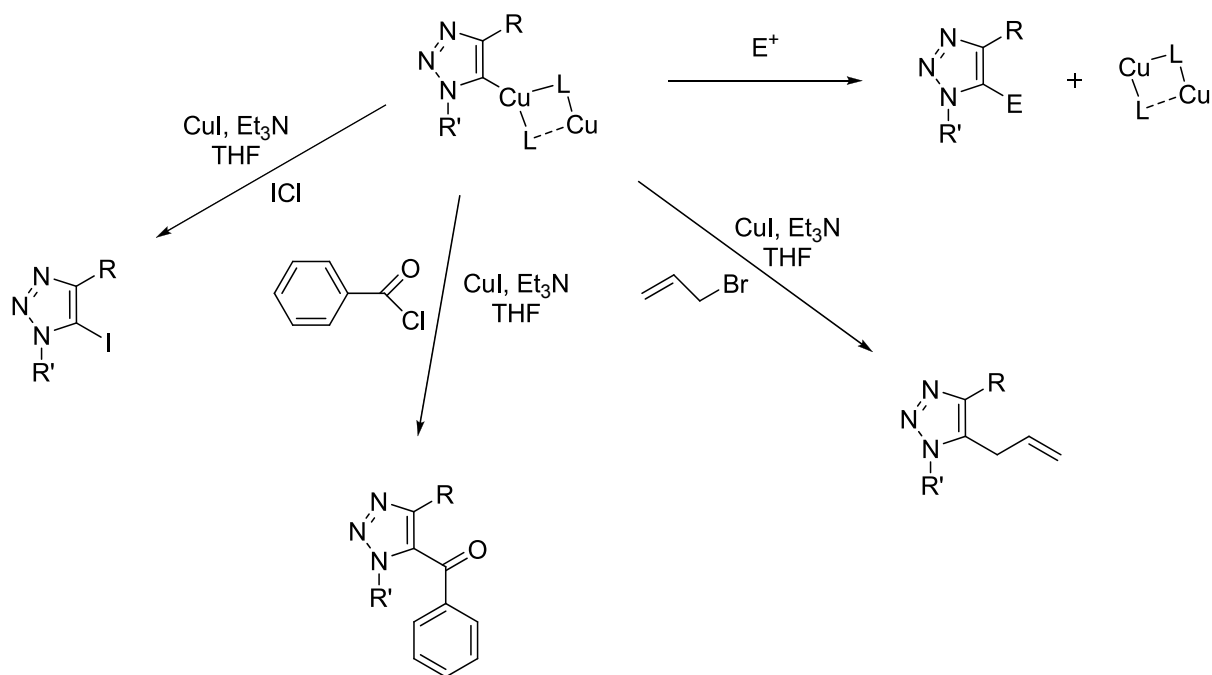
56. ábra A β -hidroxitriazolok egylombikos szintézise click-reakcióval

A CuAAC reakciók általában igen jó hozammal mennek végbe (gyakran 90-100 %), ám a körülményektől függően itt is lehetnek mellékreakciók. Kis mennyiségben keletkezhet bisztriazol oxidatív kapcsolással, amit már Rostovtsev⁷⁸ is megfigyelt mtsaival a $\text{CuSO}_4 / \text{Na-aszorbátos}$ rendszer kidolgozásakor. Angell és Burgess⁷⁹ kihasználva ezt a jelenséget bisztriazol-származékokat állított elő (57. ábra) kitűnő hozammal úgy, hogy kálium-karbonátot használva olyan mértékben lecsökkentette a proton-koncentrációt, hogy a katalizátor triazolról való lehasadása során szinte kizárólag csak az oxidatív kapcsolási reakció játszódott le.



57. ábra Bisztriazol-származékok előállítása click-reakcióval

A click-reakció ezen utolsó lépésében meghatározóak a rendszerben lévő elektrofilek, ugyanis ezek a protonnal konkurálhatnak, így például CuI katalizátort használva 5-jód-triazolt kaphatunk melléktermékként, de ezt kiaknázva 5-alkil- vagy 5-acil-triazolokat szintetizálhatunk a megfelelő alkil- vagy acil-halogenidek alkalmazásával⁸⁰ (58. ábra).

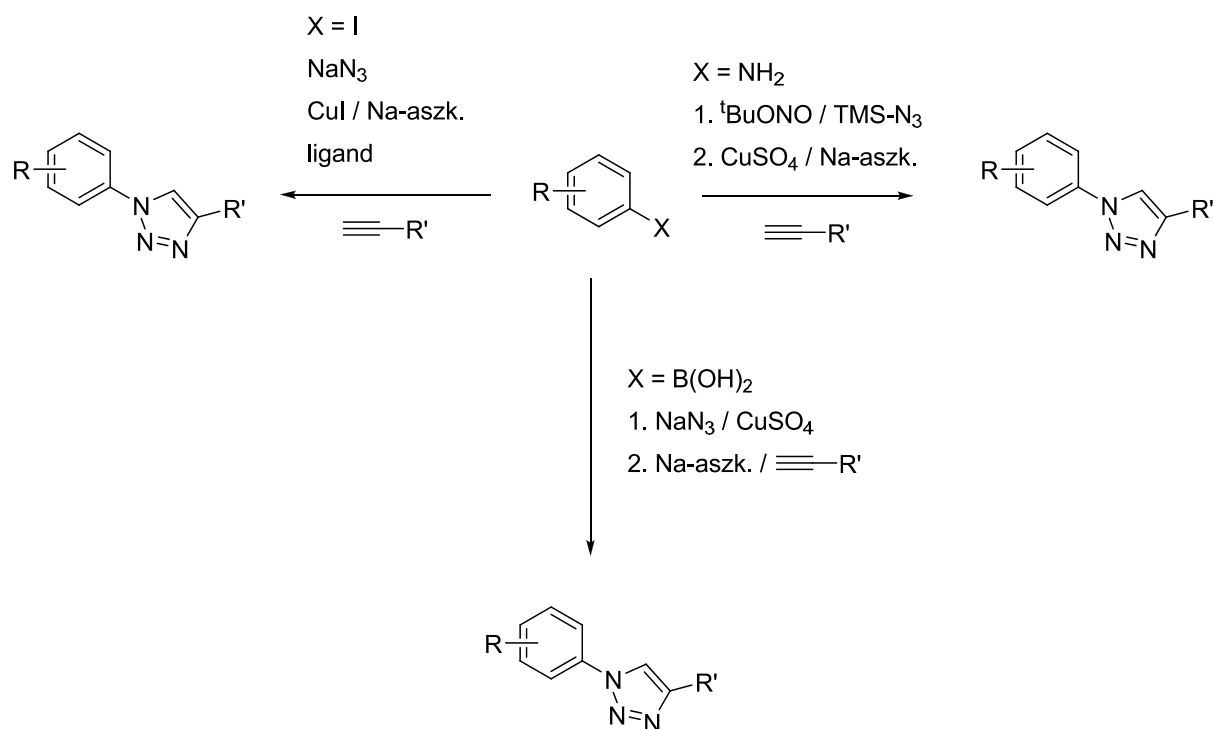


58. ábra Az 5-jód-, az 5-alkil- és az 5-acil-triazolok szintézise

1.8.2. A CuAAC felhasználási területei

Az évente megjelenő többszáz közlemény a szerves kémia, biokémia, polimerkémia, stb. területén is azt jelzi, hogy a click-reakció igen népszerű, és sikere töretlenül ível felfelé. Nem áll szándékomban ezen eredmények mélyreható, részletes ismertetése, csupán a módszer sokszínűségének érzékeltetésére néhány példát szeretnék bemutatni.

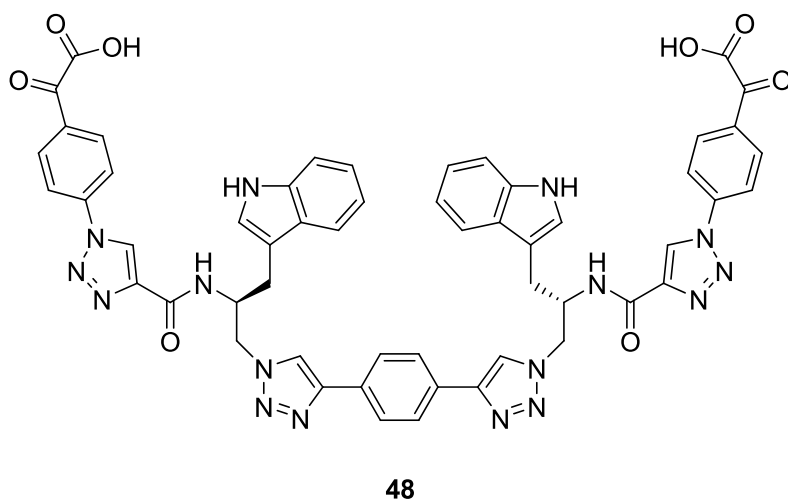
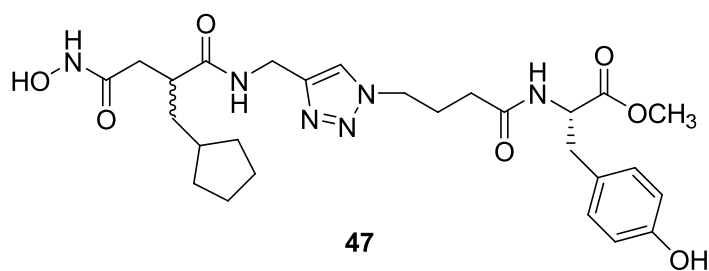
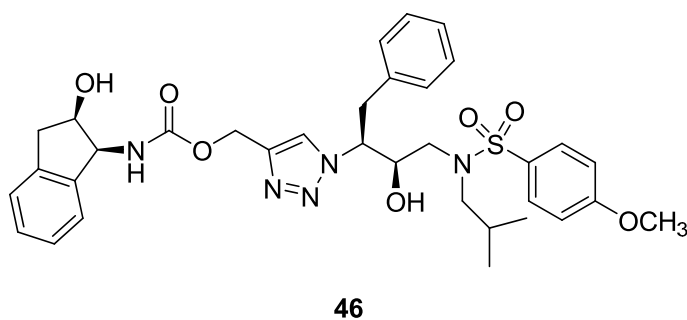
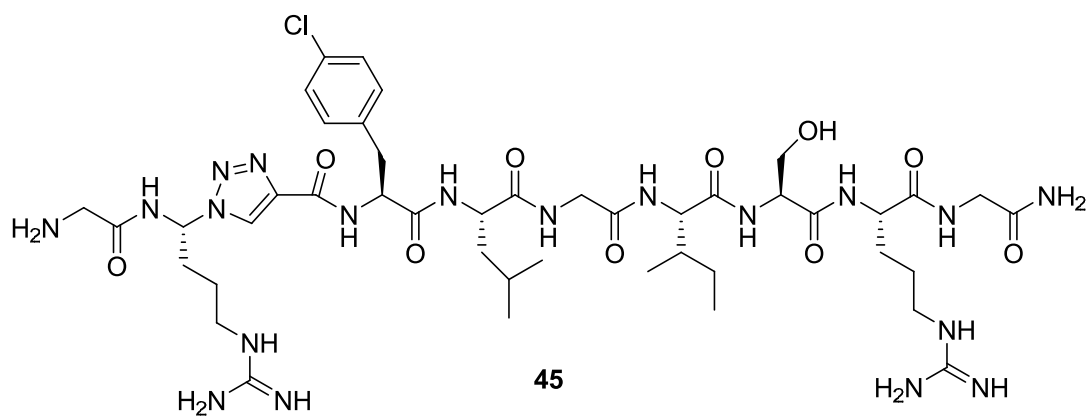
A CuAAC kiválóan alkalmazható a szerves kémiai szintézisekben 1,4-szubsztituált 1,2,3-triazolok előállítására. Kihhasználva azt, hogy a click-reakcióban egy szerves azid-származék sokkal reaktívabb, mint az azid-anion, így az azid *in situ* is előállítható aromás halogenidekből⁸¹, aromás boronsavakból⁸² (ennél a két módszernél a réz az azid kialakulását is katalizálja) vagy aromás aminokból⁸³ diazotálással trimetilszilil-azid jelenlétében (59. ábra). Megfelelő elektrofil reagensek alkalmazásával a triazol ötös helyzetébe jód-, alkil-, vagy acil-szubsztituens is bevihető (lásd korábban).



59. ábra 1,4-Szubsztituált 1,2,3-triazolok előállítása *in situ* generált aromás azidok felhasználásával

Szilárd fázisú szintézisekre is jól használható a click-reakció. Az első CuAAC-t Meldal⁸⁴ és mtsai például épp peptidotriazolok és triazzal kapcsolatos neoglikopeptidek szilárd fázisú szintézisében mutatták be. A szilárd fázisú triazol-képzést felhasználják a kromatográfiai állófázis módosítására is.

Mivel a triazol-gyűrű igen jól utánozza a peptidkötést, viszont nem érzékeny a proteolitikus folyamatokra, ezért a CuAAC reakciót felhasználták különböző proteáz inhibitorok előállítására (60. ábra). Ilyen a Tornøe⁸⁵ és mtsai által szilárd fázisú kombinatorikus szintézissel előállított triazol-könyvtár, amelynek screeningjéből egy *Leishmania mexicana* cisztein proteáz inhibitor (45) került ki. Brik⁸⁶ és mtsai egy új HIV-1-proteáz inhibitor (46), míg Wang⁸⁷ és kutatócsoportja egy hidroxámsav-részt tartalmazó triazol-származékot (47) szintetizált, amely mint metalloproteáz inhibitor igen ígéretes. Megemlíthető még Srinivasan⁸⁸ és mtsainak diabétesz kezelésére alkalmas bivalens foszfát inhibitor (48), aminek szerkezetét két egymást követő cikloaddíciós reakcióval alakították ki.

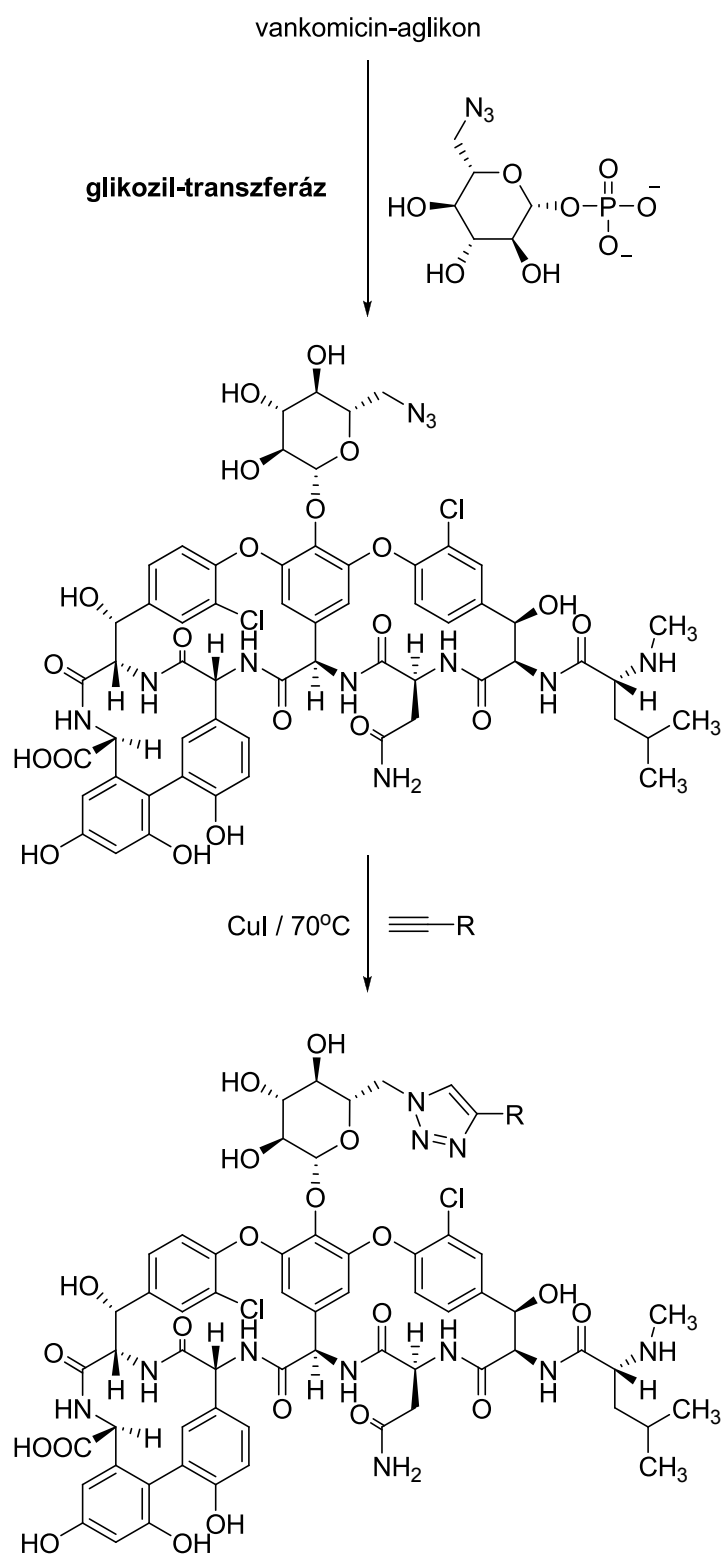


60. ábra Azid-alkin 1,3-dipoláris cikloaddícióval előállított foszfataz és proteáz inhibitorok szerkezete

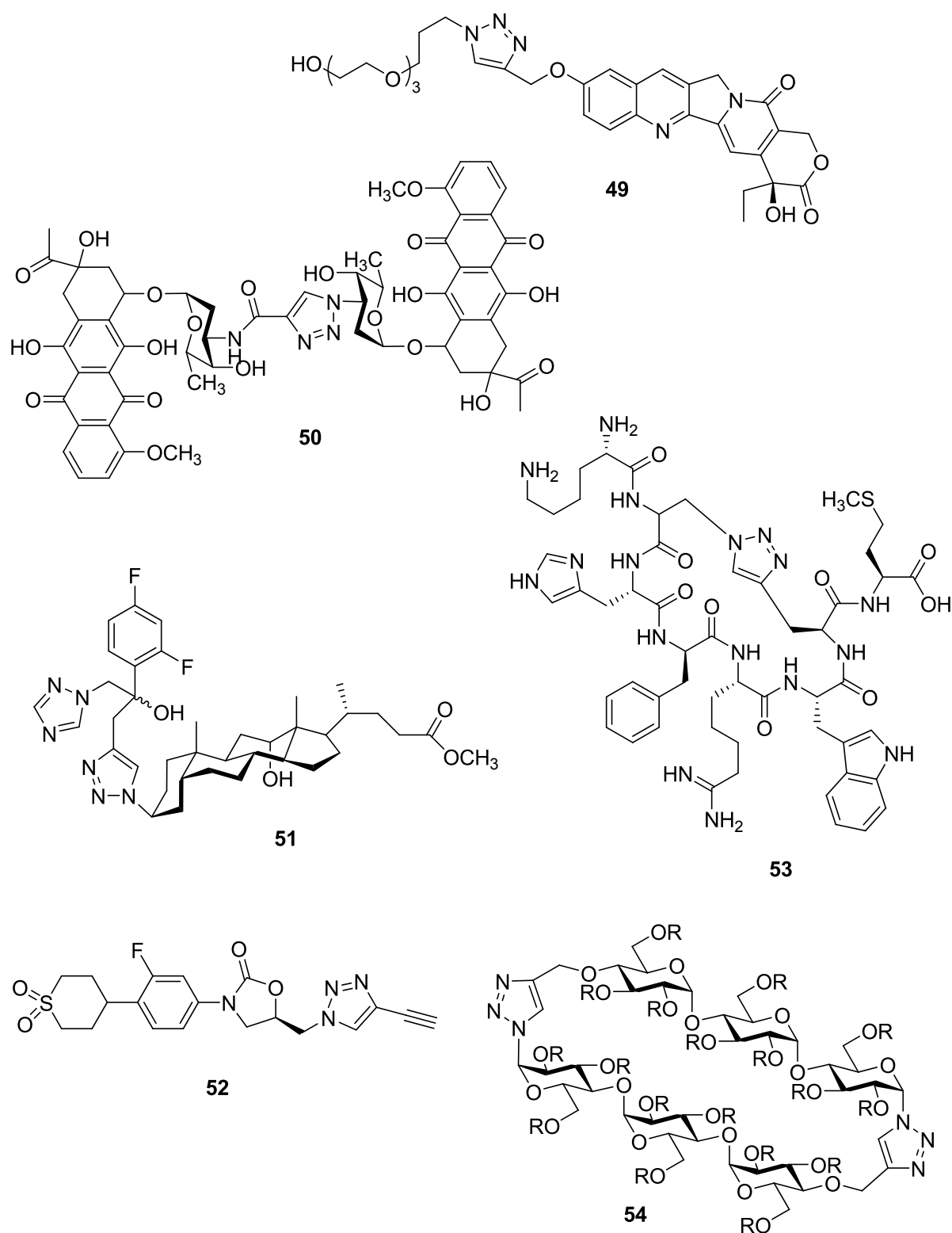
A réz-katalizálta azid-alkin cikloaddíciót számos esetben felhasználták különböző természetes vagy szintetikus, biológiailag aktív molekula módosítására (62. ábra). Xu⁸⁹ és mtsai a daganatellenes alkaloid camptothecin (**49**) vízdékonyságát növelték meg tetraetilén-glikolt kapcsolva hozzá. Egy másik kínai kutatócsoport⁹⁰ daunorubicin-dimert (**50**) állított elő click-reakcióval; az egyik antibiotikum molekula daunozaminjának aminocsoportját propinoilezték, míg a másik molekulán a cukor aminocsoportját azidra cserélték, kialakítva a kapcsoláshoz szükséges azid és alkin funkciót.

Mikrohullám segítette click-reakcióban kapcsoltak epesavat az antifungális hatású flukonazolhoz.⁹¹ A konjugátum (**51**) gombaellenes aktivitása 3-10-szerese volt az anyavegyületének. Az oxazolidinon típusú Gram-pozitív ellenes linezolid MAO-A gátló mellékhatásáért a molekula acetamidometil szubsztituense a felelős. Gravestock⁹² és mtsai ezt a molekularészt etinil-triazolra cserélték, egy azidometil-analógot buta-1,3-diinil-trimetil-szilánnal reagáltatva. A szubsztitúció hatására megszűnt az oxazolidinon-származék (**52**) enzimgátló hatása, ugyanakkor megőrizte antibakteriális aktivitását. A triazolképzést felhasználják makrociklusok kialakítására is. A peptidek körében az első ilyen próbálkozás egy melanokortin 4 receptor agonista⁹⁴ hexapeptid (**53**) kialakítása volt. A szénhidrátok területéről pedig Bodine⁹⁵ és mtsainak munkáját említhetjük, mint úttörő kísérletet a dimer makrociklizációra. Kísérletükben két maltotriózt kapcsoltak össze. A létrejött gyűrűs szacharid-származék (**54**) hasonló ligandum-kötő tulajdonságokat mutatott, mint a β -ciklodextrin. Thorson⁹³ és kutatócsoportja különböző alifás, aromás, heteroaromás molekulákat, sőt β -laktám-származékokat kapcsolt vankomicin-aglikonhoz egy enzimatis reakció és a CuAAC kombinálásával. Az azido funkciót úgy alakították ki az aglikonon, hogy 6-azido-glükóz-1-foszfáttal glikozilezték a 4-es aminosav fenolos hidroxilcsoportját glikozil-transzferáz segítségével, majd különböző alkin-származékokkal reagáltatták 70 °C-on réz(I)-jodid katalizátort használva (61. ábra). A kapott vegyületek nem mutattak számottevő eltérést a vankomicinhez illetve az aglikonhoz képest. A módszer jelentősége azonban az, hogy az egyszerűen előállítható alkin-származékok variálásával rendkívül sokféle vankomicin-aglikon-származék kialakítható és lehetőség nyílik glikopeptid – β -laktám kimérák szintézisére is.

A click-reakció alkalmas módosított DNS és oligonukleotidok előállítására is. Az egyik legfontosabb felhasználás a DNS megjelölése valamilyen fluorofór molekulával (63. ábra), ami lehetővé teszi, hogy a megoszlását, intracelluláris kötődését és a DNS-DNS kölcsönhatásokat követhessék, és így lehetővé válik a DNS-hez kapcsolódó celluláris folyamatok pontosabb felderítése.



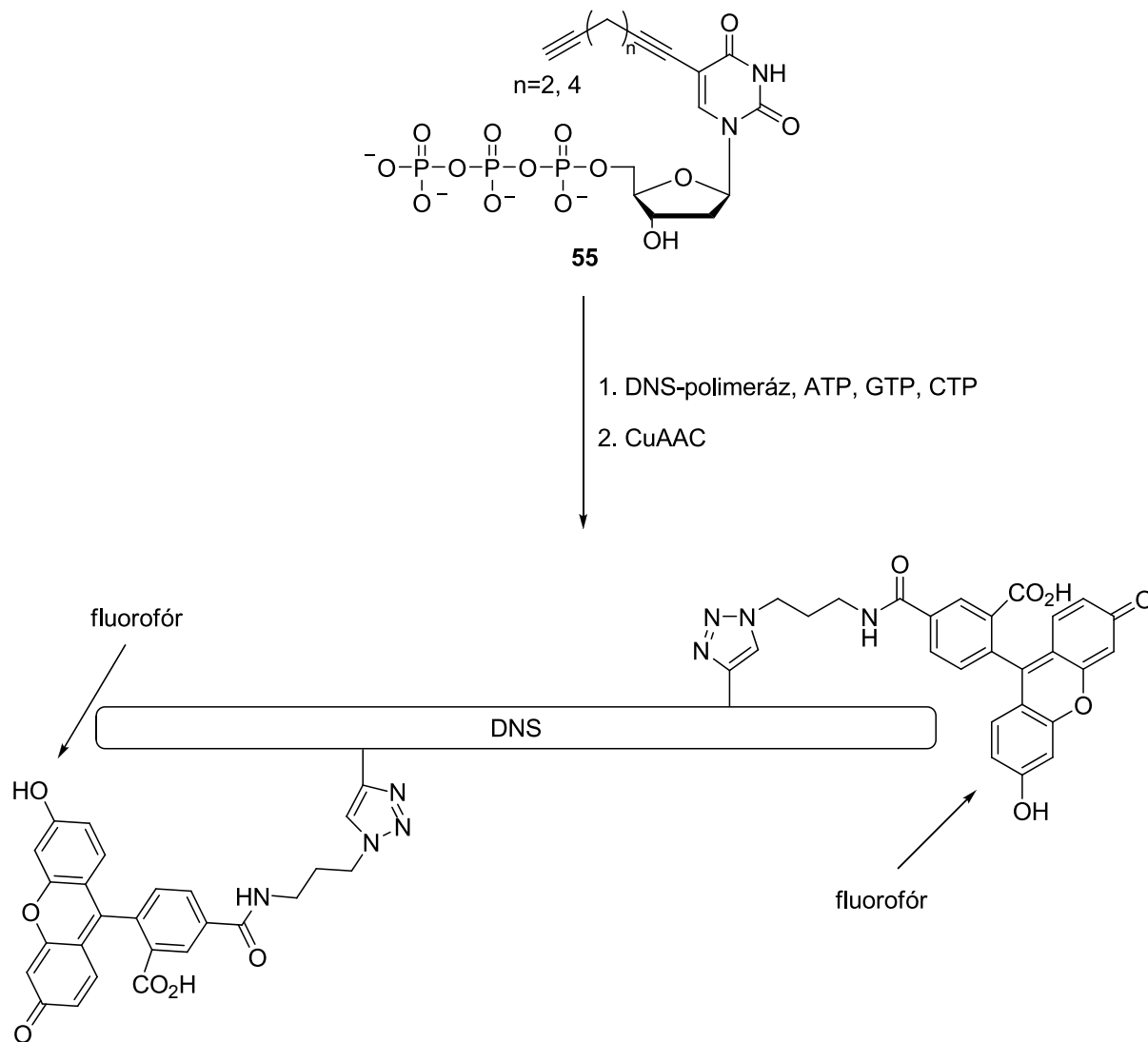
61. ábra A vankomicin-aglikon módosítása enzim katalizálta reakció és CuAAC kombinálásával



62. ábra Réz katalizálta azid-alkin cikloaddícióval módosított biológiailag aktív molekulák

Carell^{96,97} és mtsai például timidin-trifoszfát nukleobázis részén alakítottak ki terminális alkin funkciót jódnukleozidból kiindulva Sonogashira-kapcsolást felhasználva. DNS-polimeráz

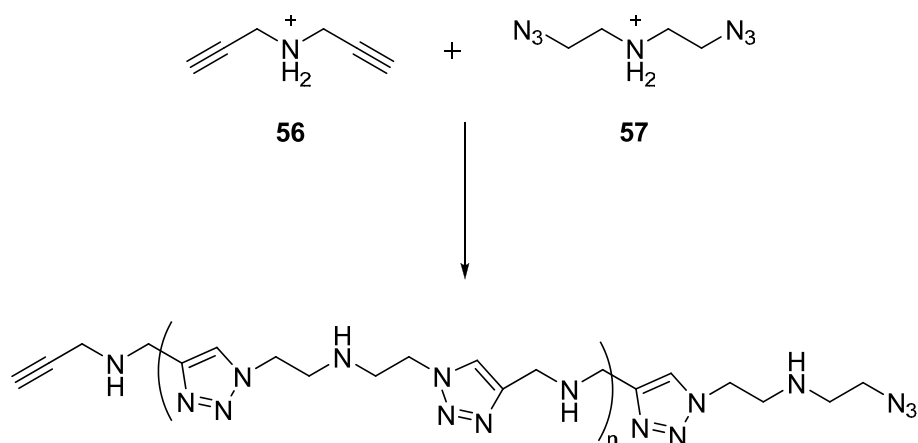
hatására ez a nukleotid (**55**) is képes volt ATP, GTP és CTP mellett beépülni a DNS-láncba, majd ezt követően azid funkciót tartalmazó fluorofórral tudták jelölni a DNS-t CuAAC reakcióval.



63. ábra A DNS fluorofórral való jelölése click-reakció felhasználásával

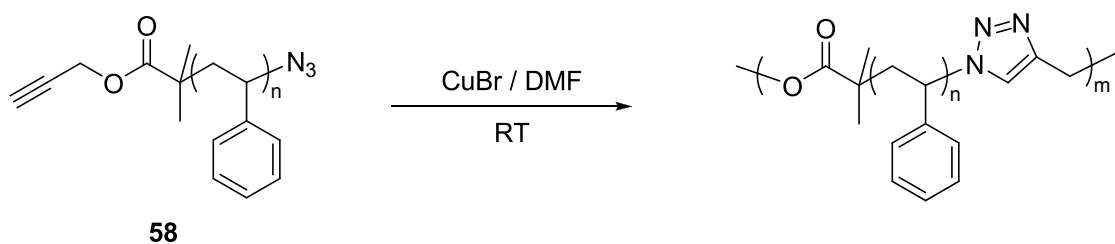
A réz-katalizálta Huisgen-féle azid-alkin cikloaddíció előnyös tulajdonságai, úgymint a közel kvantitatív hozam, a számos funkcióscsoporttal szemben mutatott tolerancia és a nagy sztérikus gátlás mellett is meglévő kiváló konverzió, igen közkedvelté tették ezt a reakciót a polimerkémia és az anyagtudományok területén is.

Steinke⁹⁸ és mtsai voltak az elsők, akik egy bisz-acetilén (**56**) és egy bisz-azid (**57**) származék polikondenzációs reakciójáról beszámoltak (64. ábra).



64. ábra Polimer előállítása bisz-acetilén és bisz-azid click-reakciójával

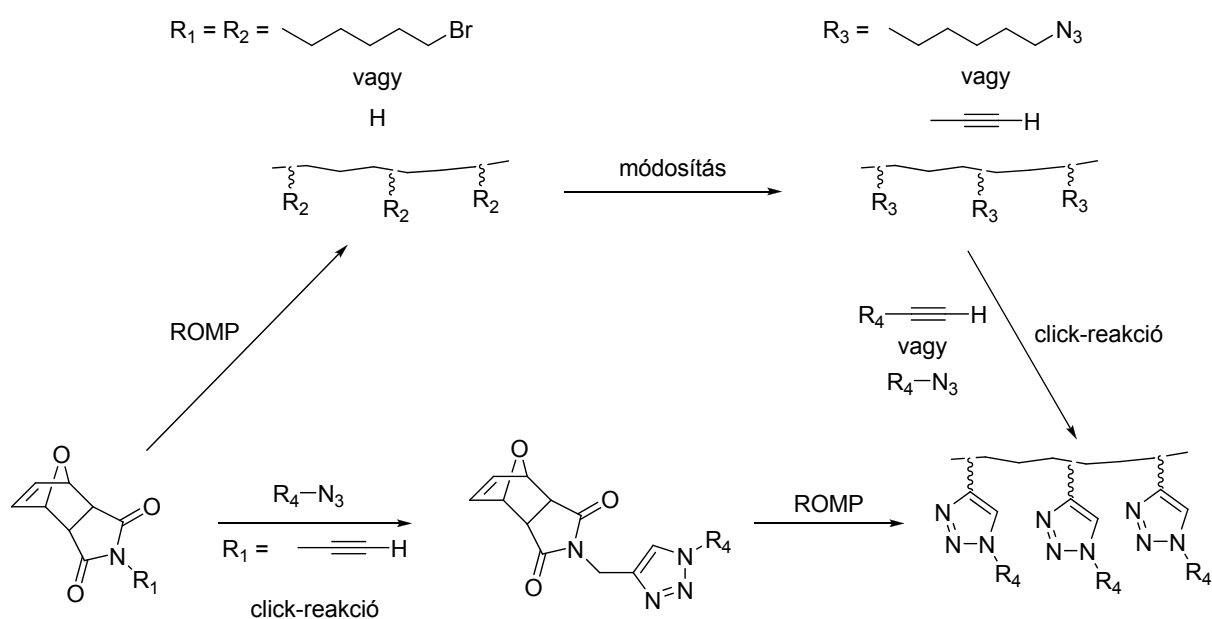
Matyjaszenski⁹⁹ és csoportja pedig egy olyan 2500 átlagos molekulatömegű polisztirolt használt fel makromonmerként (**58**), amelynek egyik végén azido, a másik végén pedig alkin funkciót alakítottak ki. Click-reakció segítségével tíz ilyen polisztirol egységet tudtak összekapcsolni (65. ábra). Ha a két bivalens monomer mellett trivalenset is tartalmaz a reakcióelegy, akkor lehetőség nyílik térhálós szerkezet kialakítására.^{100,101}



65. ábra Hetero-bifunkciós polisztirol click-reakciója

Az azid-alkin cikloaddíciót más polimerizációs technikákkal kombinálva különböző szerkezetű és tulajdonságú blokk-kopolimerek szintetizálhatók. Binder¹⁰² a gyűrű felnyílásos metatézis polimerizációt (ROMP) kombinálta a click-reakcióval ojtásos polimerek előállításához (66. ábra).

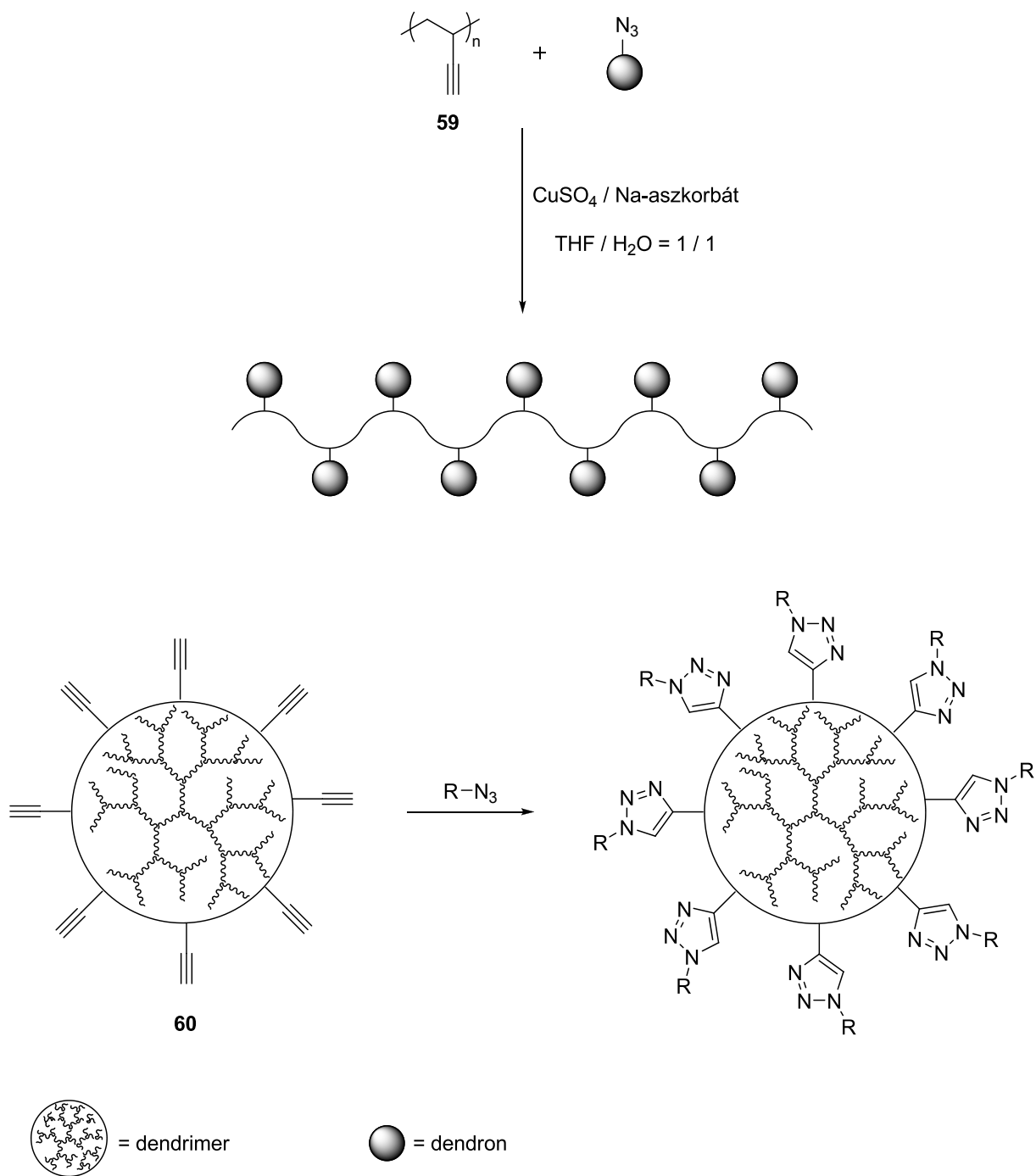
A polimerek egy speciális területét jelentik a dendrimerek, amelyek körében szintén számos példát találunk a CuAAC alkalmazására. Frechet¹⁰³ és mtsai egy poli-vinilacetilén gerinchez (**59**) kötöttek dendronokat. Hogy a sztérikus gátlás ellenére a click-reakció kiváló hozammal megy végbe, azt jól mutatják tapasztalataik: az első és második generációs dendronok esetében kvantitatív, de még a harmadik generációsnál is több mint 98%-os hozammal ment végbe a kapcsolás.



66. ábra Ojtásos polimerek előállítása a click-reakció és a gyűrű felnyílásos metatézis polimerizáció kombinálásával

Különböző szerkezetű tri-, tetra- és hexavalens acetilének és azidok alkalmas magként szolgálhatnak számos dendrimer click-reakcióval való kialakításához, de a réz-katalizálta cikloaddíció segítségével egy kész dendrimer (**60**: PAMAM, DAB, stb.) felszínéhez is nagy hatékonysággal kapcsolhatunk különböző molekulákat.

A szintetikus szerves kémia egy speciális területét jelentik az *in vivo* módosítások. A bonyolult, nagyméretű, számos funkcióscsoporttal rendelkező molekulák biokompatibilis körülmények között történő szelektív átalakítása nagy kihívást jelent a kutatók számára. Bár még csak gyerekcipőben jár, de úgy tűnik, hogy a korábbi ilyen próbálkozásokat (diszulfid-csere, Staudinger-reakció) messze felülmúlva a click-reakció nagy jelentőségre tehet szert a biomolekulák kapcsolásának és az *in vivo* molekula-jelölések terén. Az egyik kiváló példa Finn¹⁰⁴ és csoportjának munkája, akik dohánymozaikvírus 60 aktív pontjához kapcsoltak rodamin-B festéket. A click-reakciót felhasználva a vírus alkalmas lehet szupramolekuláris rendszerek kialakítására.



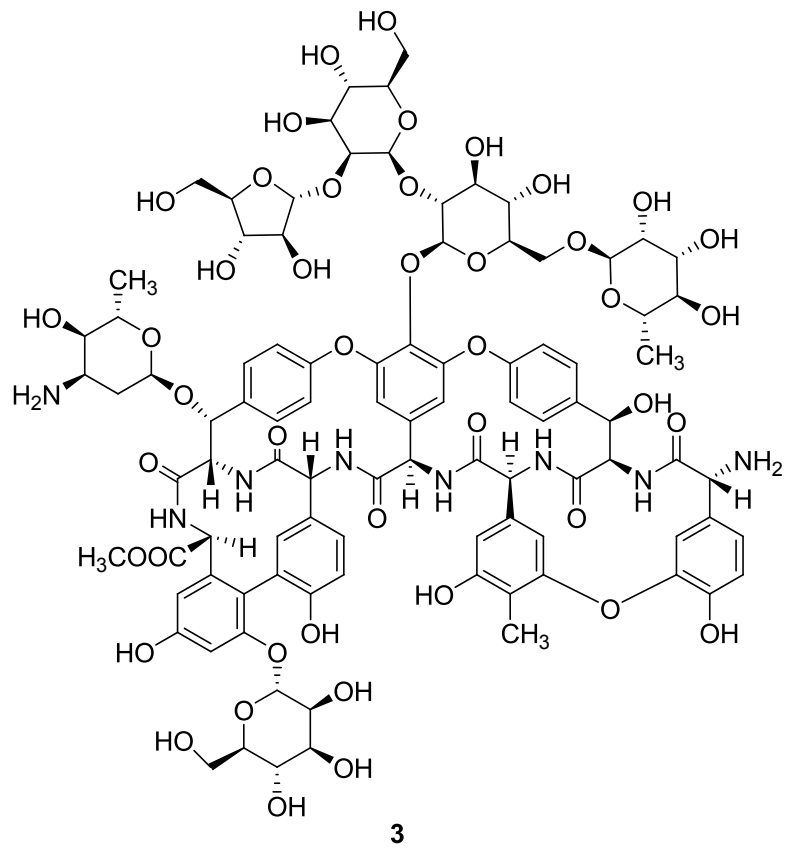
67. ábra A réz katalizálta azid-alkin cikloaddíció alkalmazása a dendrimer-kémiában

2. Saját eredmények

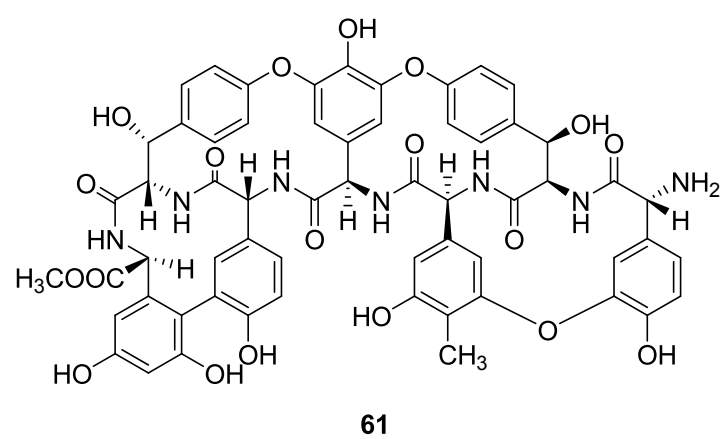
Szintetikus munkánk célja az volt, hogy risztocetinből és teikoplaninból kiindulva olyan származékokat állítsunk elő, amelyek antibakteriális aktivitása felülmúlja az anyavegyületekét és hatásosak a rezisztens baktériumtörzsek esetében is. A hatásmechanizmust ismerve valamint a saját korábbi megfigyeléseinket és az irodalomban meglévő számos pozitív eredményt figyelembe véve, joggal feltételeztük, hogy a szénhidrát-rész eltávolításával nem vész el az antibakteriális aktivitás, sőt a risztocetin esetében ez a módosítás kifejezetten előnyös lehet, hiszen így egyúttal megszabadulhatunk a súlyos mellékhatást jelentő trombocita-aggregáló tulajdonságtól. A deglikozilezést követően kétféle úton vezettük a szintéziseket. Az egyik a risztocetin új szénhidrát-származékainak előállítását volt, míg a másik irányvonalat a teikoplanin és risztocetin új lipofil származékai jelentették.

2.1. A risztocetin és a teikoplanin deglikozilezése

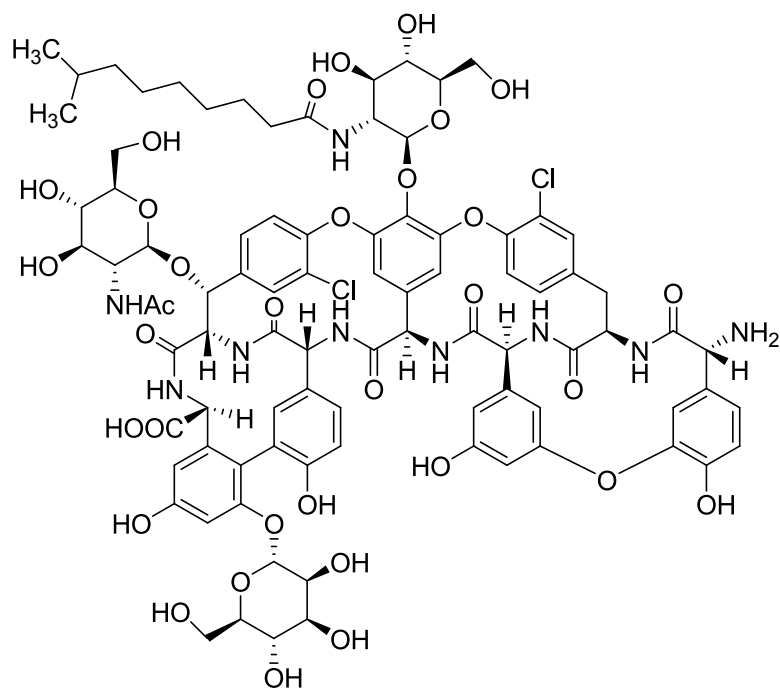
Az antibiotikum molekulák szénhidrát-részének eltávolítására a Boger¹⁰⁵ és mtsai által leírt vízmentes HF-dal történő hasítást alkalmaztuk. Ez, a peptidkémiaiában a védőcsoportok eltávolítására széles körben használt eljárás, jól működött risztocetin (**3**) esetében (68. ábra) és kielégítő hozammal jutottunk a risztocetin-aglikonhoz (**61**). Hasonló eredményt vártunk teikoplaninra (**2**) is, habár a fent említett munkacsoport csak vankomicinen, ramoplaninon és risztocetinen vizsgálta ezt a módszert. Igen jó hozammal izoláltunk egy terméket, ami meglepetésünkre nem a várt teikoplanin-aglikon volt (69. ábra). Az analitikai vizsgálatok során kiderült, hogy a molekula továbbra is tartalmazza az *N*-acetil-glükózamin részletet, tehát egy ún. pszeudoaglikonhoz (**62**) jutottunk. Megvizsgáltuk, hogy a reakciókörülmények milyen hatással vannak a termék keletkezésére. Azt tapasztaltuk, hogy sem a hőmérséklet emelése (-18 °C-ról szobahőmérsékletre), sem pedig a hosszabb reakcióidő nem okozott számottevő változást – ugyanúgy a teikoplanin-pszeudoaglikont kaptuk. A továbbiakban nem is próbálkoztunk a teikoplanin-aglikon ilyen formában való előállításával, hanem ezen a részlegesen deglikozilezett származékon hajtottuk végre a tervezett átalakításokat. A későbbi antibakteriális vizsgálatok során bebizonyosodott, milyen jó döntés volt ezen szerencsés véletlen kiaknázása.



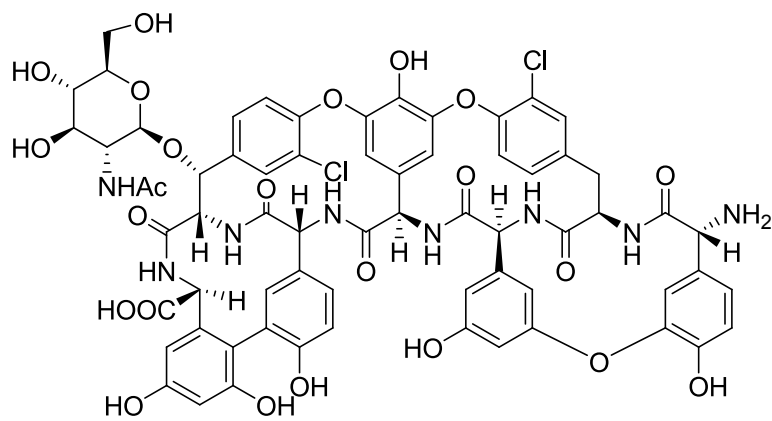
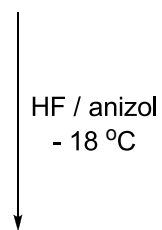
HF / anizol
- 18 °C



68. ábra A risztoctin deglikozilezése



2



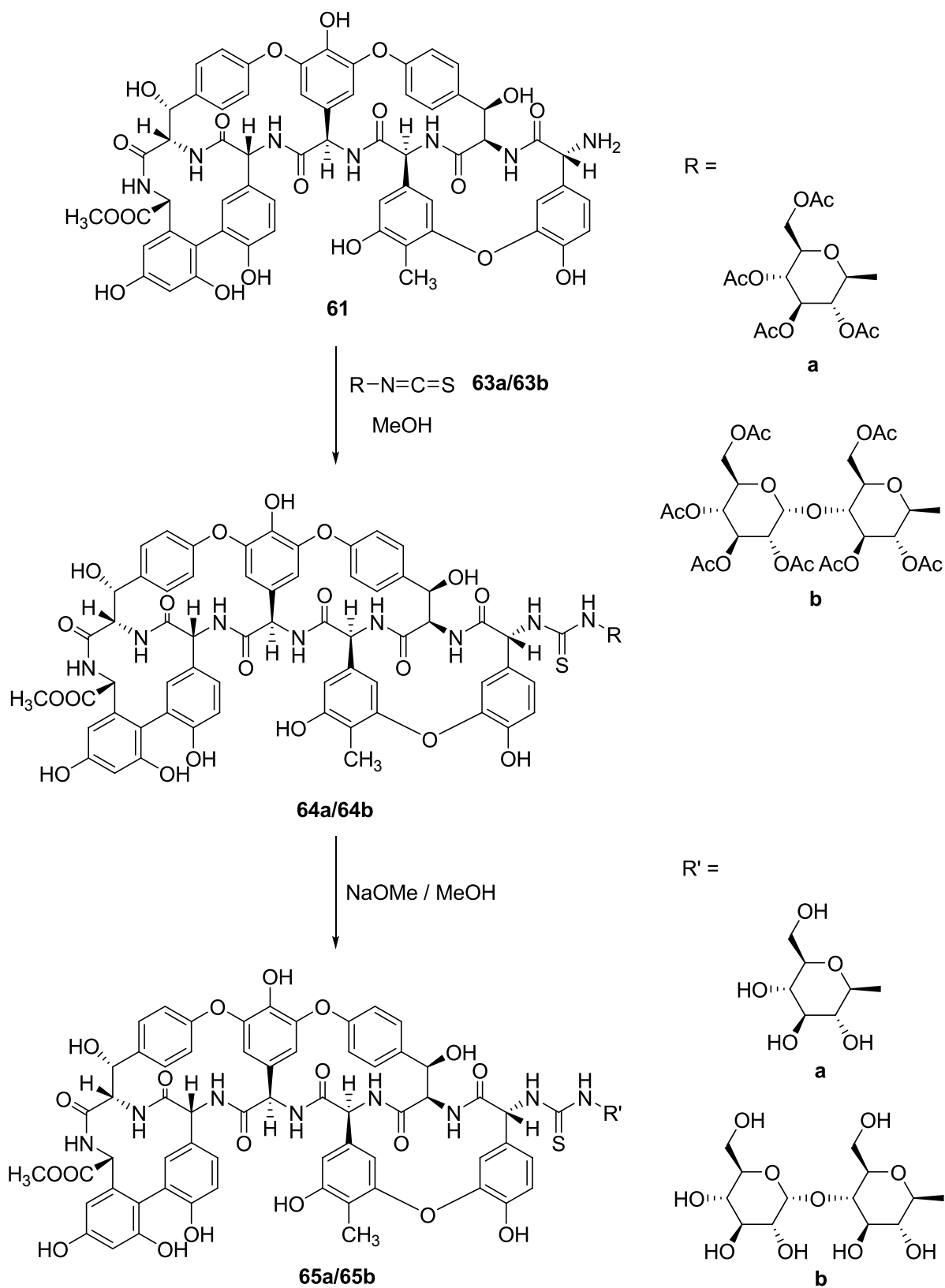
62

69. ábra A teikoplanin deglikozilezése vízmentes HF-dal

2.2. A risztocetin új szénhidrát-származékainak szintézise

2.2.1. Glikozil-tioureido-származékok

Az *in vitro* antibakteriális tesztek során kiderült, hogy a risztocetin A deglikozilezésével nyert risztocetin-aglikon (**61**) megőrzi antibakteriális aktivitását, s ez összevethető a klinikai gyakorlatban használt vankomicin, teikoplanin és linezolid hatásával. Az aglikon rendkívül rossz vízdékonysága azonban nem tette lehetővé, hogy trombocita-aggregációs tulajdonságát megvizsgáljuk. Hogy megnöveljük a vízdékonyságát, glükózt és maltózt kapcsolunk a risztocetin-aglikonhoz (**61**) az *N*-terminálisán keresztül, *N*-glikozil-tiokarbamid származékokat képezve (70. ábra). Ehhez 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-glükopiranozil-izotiocianáttal¹⁰⁶ (**63a**) reagáltattuk az aglikont. Az addíciós reakcióval kapott terméket (**64a**) oszlopkromatográfiás tisztítás után Zemplén-szerint¹⁰⁷ dezacetilezve jutottunk a kívánt vegyülethez, az *N*-β-D-glükopiranozil-tioureido risztocetin-aglikonhoz (**65a**). Az előzővel teljesen analóg módon, 2,3,6,2',3',4',6'-hepta-*O*-acetyl-D-maltozil-izotiocianáttal¹⁰⁶ (**63b**) használva reakciópartnerként, az *N*-β-D-maltozil-tioureido risztocetin-aglikont (**65b**) állítottuk elő. A két új szénhidrát-származék a vizsgált *staphylococcus* és *enterococcus* törzsekkel szemben egészen jó aktivitást mutatott (1. Táblázat), ugyanakkor a jelentős vízdékonyság-fokozódás lehetővé tette a hematológiai hatás vizsgálatát. A teszt során egyik vegyület sem csapta össze a vérlemezkéket, sőt a glükozil-származék (**65a**) még gátolta is a risztocetin által kiváltott trombocita-aggregációt.



70. ábra Glikozil-tioureido-számazékok előállítása risztocetin-aglikonból

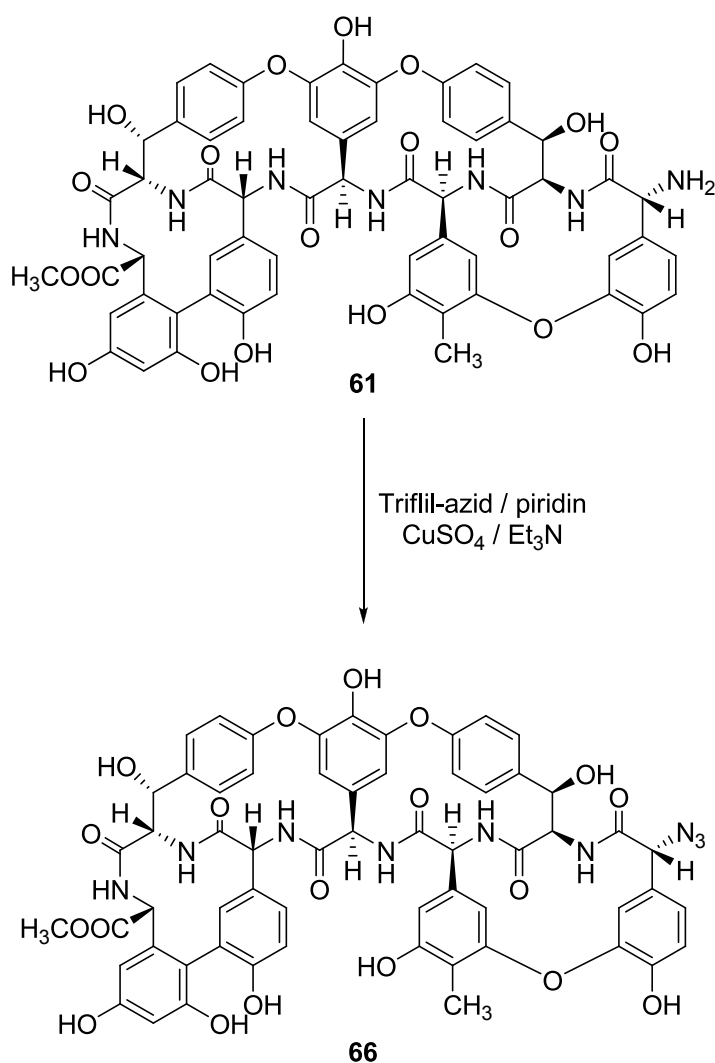
1. Táblázat A risztocetin-aglikon glikozil-tioureido-származékainak antibakteriális aktivitása

Teszt mikroorganizmus	MIC (µg / ml)						
	Risztocetin	Risztocetin-aglikon	65a	65b	Vankomicin	Teikoplanin	Linezolid
ATCC 6633 <i>B. subtilis</i>	0,5	2	8	4	2	0,5	1
ATCC 33591 MSSA	1	2	8	2	0,5	0,5	2
ATCC 29213 MRSA	4	2	8	4	1	0,5	1,5
<i>S. epidermidis</i> (MRSE)	2	2	8	4	4	4	1
ATCC 29212 <i>E. faecalis</i> Vanco: S Teico: S	2	4	16	8	0,5	0,5	4
ATCC 51299 <i>E. faecalis</i> Vanco: R Teico: S vanB +	16	4	16	8	32	1	3

2.2.2. Click-reakcióval előállított szénhidrát-származékok

A glikozil-tioureido-származékok mutatta jó antibakteriális hatás és a trombocita-aggregációs vizsgálatok eredményei sarkalltak bennünket arra, hogy előállítsuk a risztocetin-aglikon további, új szénhidrát-származékait. A cukor és az aglikon közötti kötés kialakítására egy másik módszert, a réz(I) katalizálta azid-alkin 1,3-dipoláris cikloaddíciós (click) reakciót használtuk (ld. részletesen az irodalmi részben: 1.8. fejezet) és további három molekulával bővítettük a kapcsolni kívánt szénhidrátok körét.

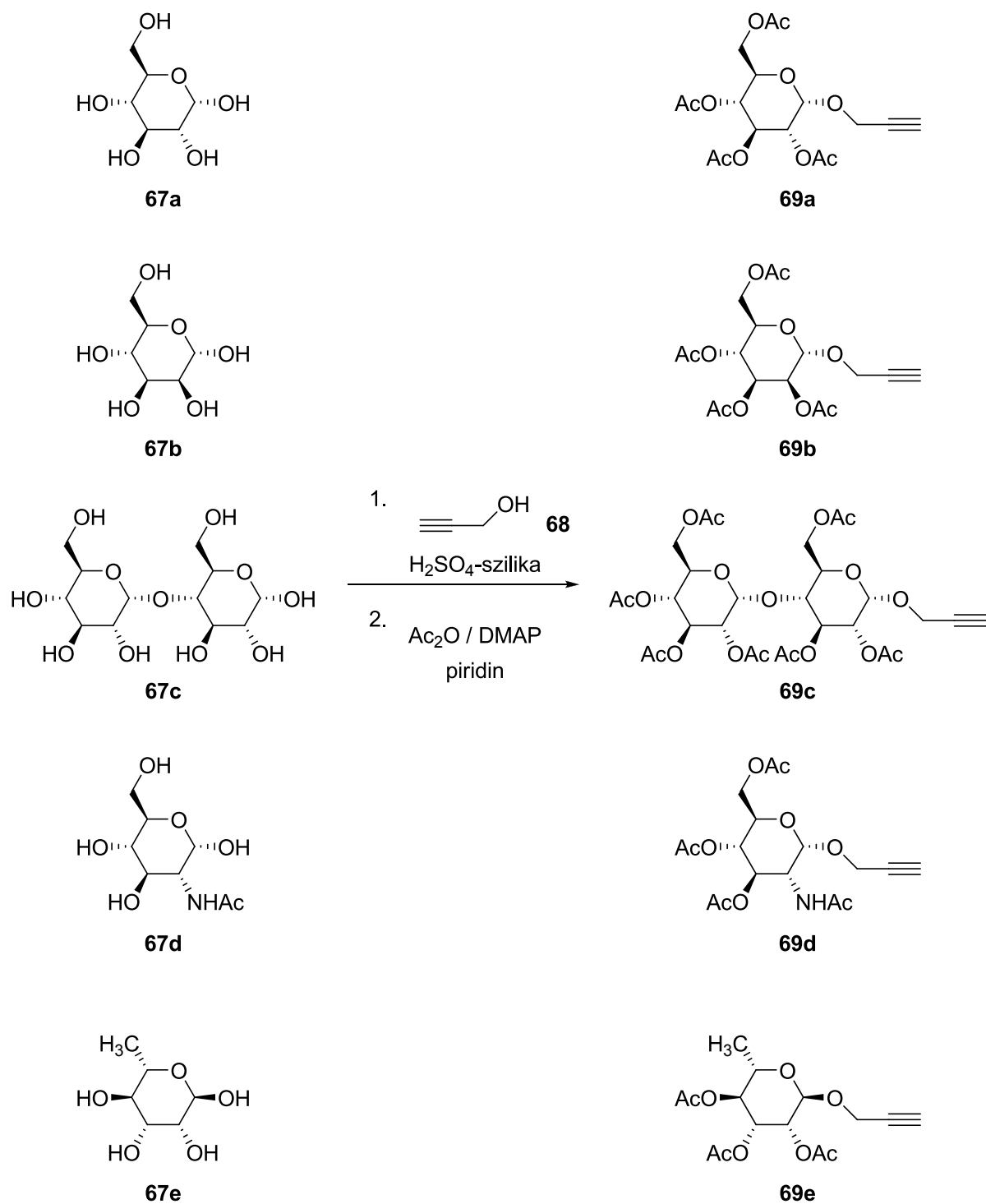
Az azidocsoportot a risztocetin-aglikon primer aminocsoportjából képeztük diazotranszfer reakció¹⁰⁸ segítségével. Az aglikont frissen készített trifluormetán-szulfonsav-aziddal reagáltatva (71. ábra) az 1. aminosav konfigurációjának megtartásával, kielégítő hozammal kaptuk az azido-risztocetin-aglikont (**66**).



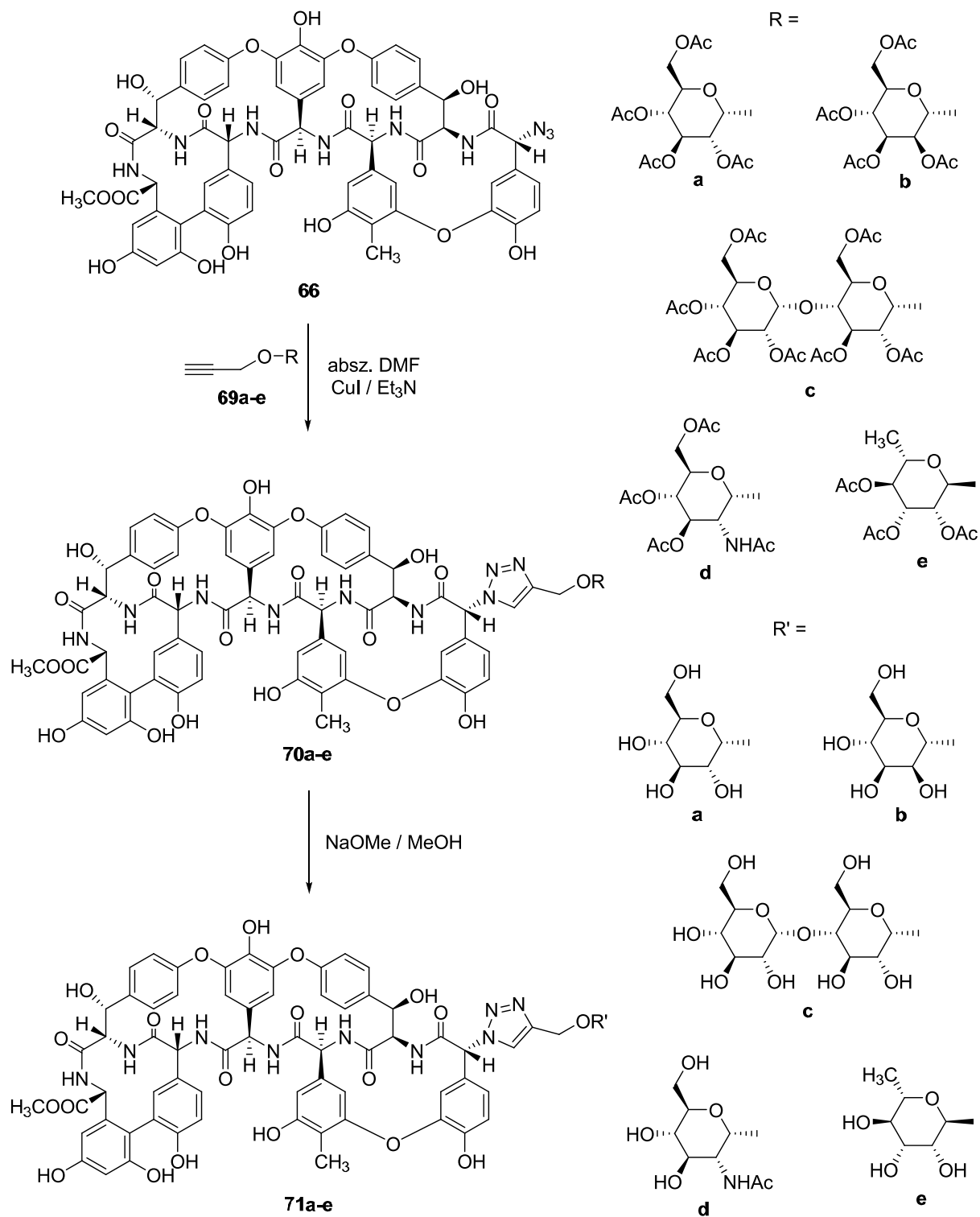
71. ábra Az azido-risztocetin-aglikon szintézise

A click-reakcióhoz szükséges terminális alkin funkciót öt különböző szénhidrátan (D-glükóz (**67a**), D-mannóz (**67b**), D-maltóz (**67c**), *N*-acetil-D-glükózamin (**67d**), L-ramnóz (**67e**)) alakítottuk ki Fischer-féle, sav katalizálta glikozilezéssel propargil-alkoholt (**68**) használva glikozil-akceptorként.¹⁰⁹ A kapott propargil-glikozidokat piridinben ecetsav-anhidriddel acetileztük és rendre a 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-propargil-glükozid (**69a**), 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-propargil-mannozid (**69b**), 2,3,6,2',3'4',6'-hepta-*O*-acetil- α -D-propargil-maltozid (**69c**), *N*-acetil-3,4,6-tri-*O*-acetil- α -D-propargil-glükózaminid (**69d**) és 2,3,4-tri-*O*-acetil- α -L-propargil-ramnozid (**69e**) termékekhez jutottunk.

A réz katalizálta Huisgen-reakciót DMF-ban hajtottuk végre Cu(I)-jodidot használva katalizátorként. A click-reakcióval nyert glikozil-oximetil-triazolil-származékok (**70a-e**) szénhidrát-részéről Zemplén¹⁰⁷ szerint eltávolítva az acetilsoportokat, a risztocetin-aglikon α -D-glükopiranozil (**71a**), α -D-mannopiranozil (**71b**), α -D-maltopiranozil (**71c**), *N*-acetil- α -D-glükózaminil (**71d**) és α -L-ramnopiranozil (**71e**) származékait kaptuk (73. ábra).



72. ábra A per-*O*-acetyl-propargil-glikozidok szintézise



73. ábra A rishocetin-aglikon click-reakcióval előállított, per-acetilezett és szabad szénhidrátokat tartalmazó származékainak szintézise

Megvizsgáltuk mind az acetilezett, mind pedig a dezacetilezett származékok aktivitását néhány jelentős Gram-pozitív törzs esetében (2. Táblázat). Azt tapasztaltuk, hogy az N-terminálison kialakított cukor-rész igen kedvezően befolyásolta a risztocetin-aglikon antibakteriális hatását. Az eredmények azt mutatták, hogy míg a D-konfigurációjú cukor-származékok (**70a-d** ill. **71a-d**) aktivitása között nem volt számottevő különbség, addig az L-ramnózzal képzett vegyületek (**70e**, **71e**) esetében jóval nagyobb MIC értékeket kaptunk. Ez az eredmény – habár csak kevés származékról van szó – arra enged következtetni, hogy a sztereokémiának nagy jelentősége van az antibakteriális aktivitásban. Az acetilezett és a szabad cukrot hordozó risztocetin-aglikon származékok hatásában csak csekély különbség volt megfigyelhető, ami talán a táptalajban jelen lévő aspecifikus észterázok működésével magyarázható.

A Gyógyszerészi Kémiai Tanszéken a risztocetin-aglikonnal korábban végzett kutatások során lipofil származékok egész sora került előállításra az N-terminálishoz négyszögsav-amidon keresztül kapcsolva különböző alifás és aromás molekulákat.¹¹⁰ Ezek közül több vegyület is kitűnő aktivitást mutatott különböző influenza vírus típusokkal szemben. Ilyen előzmények után az antibakteriális mellett antivirális vizsgálatokat is végeztünk az új szénhidrát-származékainkkal. Az acetilezett maltozil- (**70c**) és a két ramnozil-származék (**70e**, **71e**) kivételével valamennyi vegyület igen jó aktivitást mutatott az influenza A vírus H1N1 altípusával szemben, mindamellett, hogy citotoxicitásuk is biztatóan csekélynek bizonyult (3. Táblázat).

Megvizsgáltuk a dezacetilezett szénhidrát-származékok (**71a-e**) trombocita-aggregáló tulajdonságát. Habár ezek oldékonysága elmaradt a glikozil-tiokarbamid-származékokéitól, de még így is sokkal jobban oldódtak vízben (illetve a vizsgálathoz használt Tris-pufferben, pH ~ 7,4), mint a risztocetin-aglikon. Az egyes vegyületekből az elkészíthető legtöményebb (0,5 – 2,5 mg/ml) oldatokat alkalmazva azt tapasztaltuk, hogy egyik származék sem csapta össze a vérlemezkéket. A risztocetin indukálta trombocita-aggregációt a glükozil- (**71a**) és maltozil- (**71c**) gátolta, a ramnozil- (**71e**) kis mértékben fokozta, míg a mannozil- (**71b**) és *N*-acetil-glükózaminil-származék (**71d**) nem befolyásolta (4. Táblázat).

2. Táblázat A riztocetin-aglikon szénhidrát-származékainak antibakteriális aktivitása

Teszt mikroorganizmus	MIC / MBC (µg/mL)											
	Riszto-cetin	66	70a	71a	70b	71b	70c	71c	70d	71d	70e	71e
ATCC 6633 <i>B. subtilis</i>	2 / 4	4 / 1	8 / 16	2 / 8	4 / 8	4 / 4	8 / 8	4 / 4	2 / 8	4 / 8	32 / 32	16 / 16
ATCC 33591 MSSA	16 / 64	2 / 1	4 / 8	2 / 128	2 / 4	4 / 16	1 / 4	2 / 256	1 / 64	4 / 4	16 / 32	8 / 16
ATCC 29213 MRSA	16 / 64	2 / 2	4 / 8	2 / 256	2 / 4	2 / 216	1 / 4	4 / 256	0,5 / 256	2 / 2	16 / 32	8 / 8
ATCC 35984 <i>S. epidermidis</i> Biofilm képző	32 / 64	16 / 8	2 / 4	4 / 4	4 / 8	4 / 8	4 / 8	8 / 8	2 / 2	4 / 4	16 / 16	16 / 16
<i>S. epidermidis</i> NucA -	4 / 8	16 / 16	2 / 4	4 / 16	4 / 4	4 / 8	4 / 4	4 / 8	1 / 2	2 / 4	16 / 32	16 / 16
ATCC 29212 <i>E. faecalis</i> Vanco: S Teico: S	4 / 256	16 / 8	8 / 256	4 / 256	4 / 128	8 / 256	4 / 256	4 / 256	4 / 256	8 / 256	32 / 256	32 / 256
ATCC 51299 <i>E. faecalis</i> Vanco: R Teico: S vanB +	128 / 256	128 / 64	16 / 256	8 / 256	8 / 256	16 / 256	8 / 256	32 / 256	4 / 256	16 / 256	128 / 256	64 / 128
15376* <i>E. faecalis</i> Vanco: R Teico: R vanA +	128 / 256	> 256	8 / 256	4 / 256	2 / 128	16 / 64	2 / 256	8 / 256	2 / 256	8 / 256	16 / 256	16 / 256

*Ld. a 111. irodalmi hivatkozást.

3. Táblázat A risztocetin-aglikon szénhidrát-származékainak antivirális aktivitása

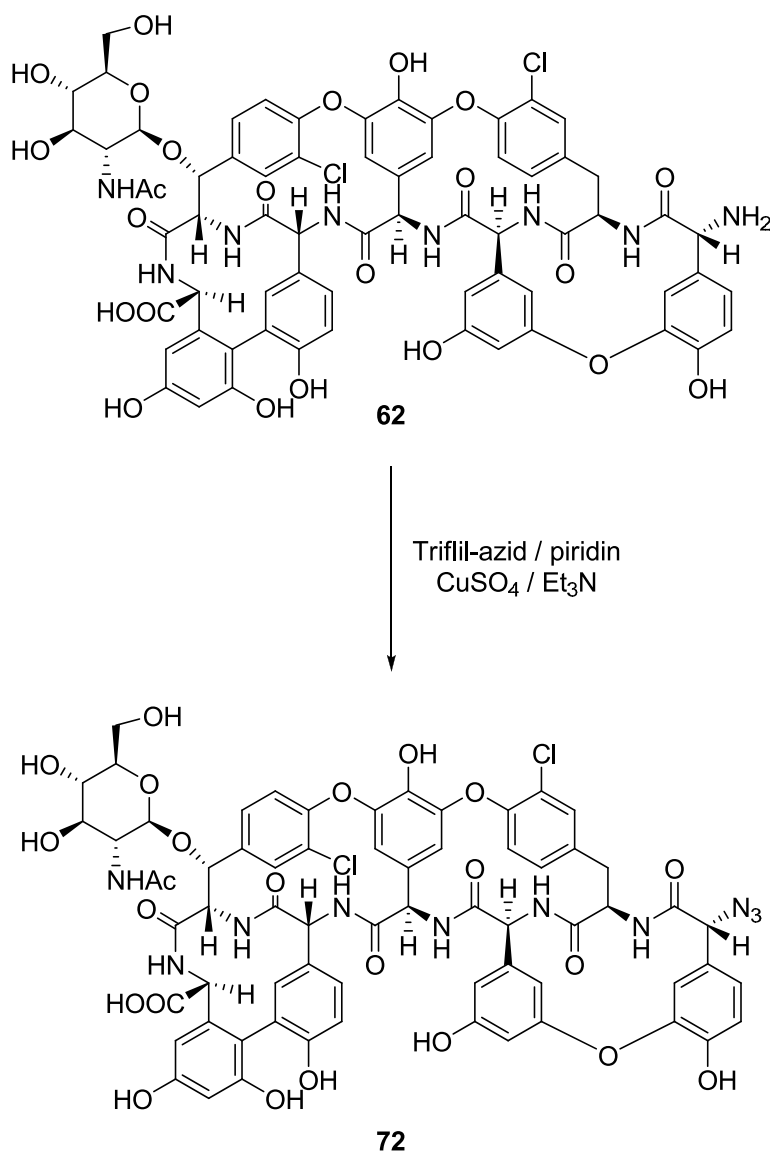
Vegyület	Citotoxicitás (μM)		Antivirális EC_{50} (μM)					
	CC_{50}	Minimum citotoxikus koncentráció	Influenza A/H1N1		Influenza A/H3N2		Influenza B	
			CPE	MTS	CPE	MTS	CPE	MTS
3	≥ 53	100	9,5	8,8	≥ 20	≥ 9	>100	>100
70a	≥ 87	≥ 100	9,5	8,2	>100	>100	>100	>100
71a	>100	≥ 100	14	16	≥ 45	≥ 30	32	33
70b	>100	20	4,0	5,0	>100	>100	>100	>100
71b	>100	≥ 100	10	22	≥ 45	≥ 46	≥ 45	≥ 50
70c	60	20	>100	>100	>100	>100	>100	>100
71c	>100	≥ 100	16	20	>100	>100	52	61
70d	≥ 70	100	8,0	5,8	>100	>100	>100	>100
71d	>100	≥ 100	9,0	8,7	≥ 45	≥ 72	32	40
70e	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
71e	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Oszeltamivir-karboxilát	>100	>100	12	11	32	38	23	27
Ribavirin	>100	>100	9,0	11	9,0	8,7	4,0	4,7
Amantadin	>500	>500	20	19	7,0	9,2	>500	>500
Rimantadin	>500	>500	224	283	4,0	5,6	>500	>500

4. Táblázat A risztocetin-aglikon dezacetilezett szénhidrát-származékainak trombocita-aggregációs vizsgálata

Vegyület	Legtöményebb oldat koncentrációja (mg/ml)	Trombocita-aggregáló tulajdonság	Risztocetin indukálta aggregációra gyakorolt hatás
71a	1,0	nem aggregál	gátol
71b	0,8	nem aggregál	közömbös
71c	0,6	nem aggregál	gátol
71d	0,9	nem aggregál	közömbös
71e	2,3	nem aggregál	kis mértékben fokozza

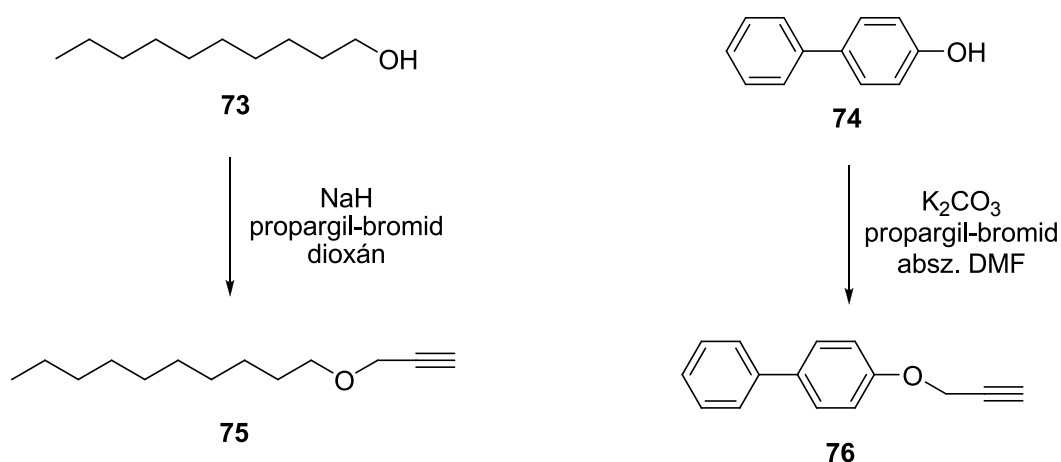
2.3. Lipofil teikoplanin- és risztocetin-aglikon származékok

A Cu(I) katalizálta Huisgen-féle 1,3-dipoláris cikloaddíciós reakciót használtuk fel a risztocetin-aglikon (**61**) és a teikoplanin-pszeudoaglikon (**62**) lipofil származékainak előállítására. A 2.2.2. fejezetben bemutatott diazotranszfer segítségével a risztocetin-aglikon mellett a teikoplanin-pszeudoaglikon primer aminocsoportját is azidra cseréltük (74. ábra).



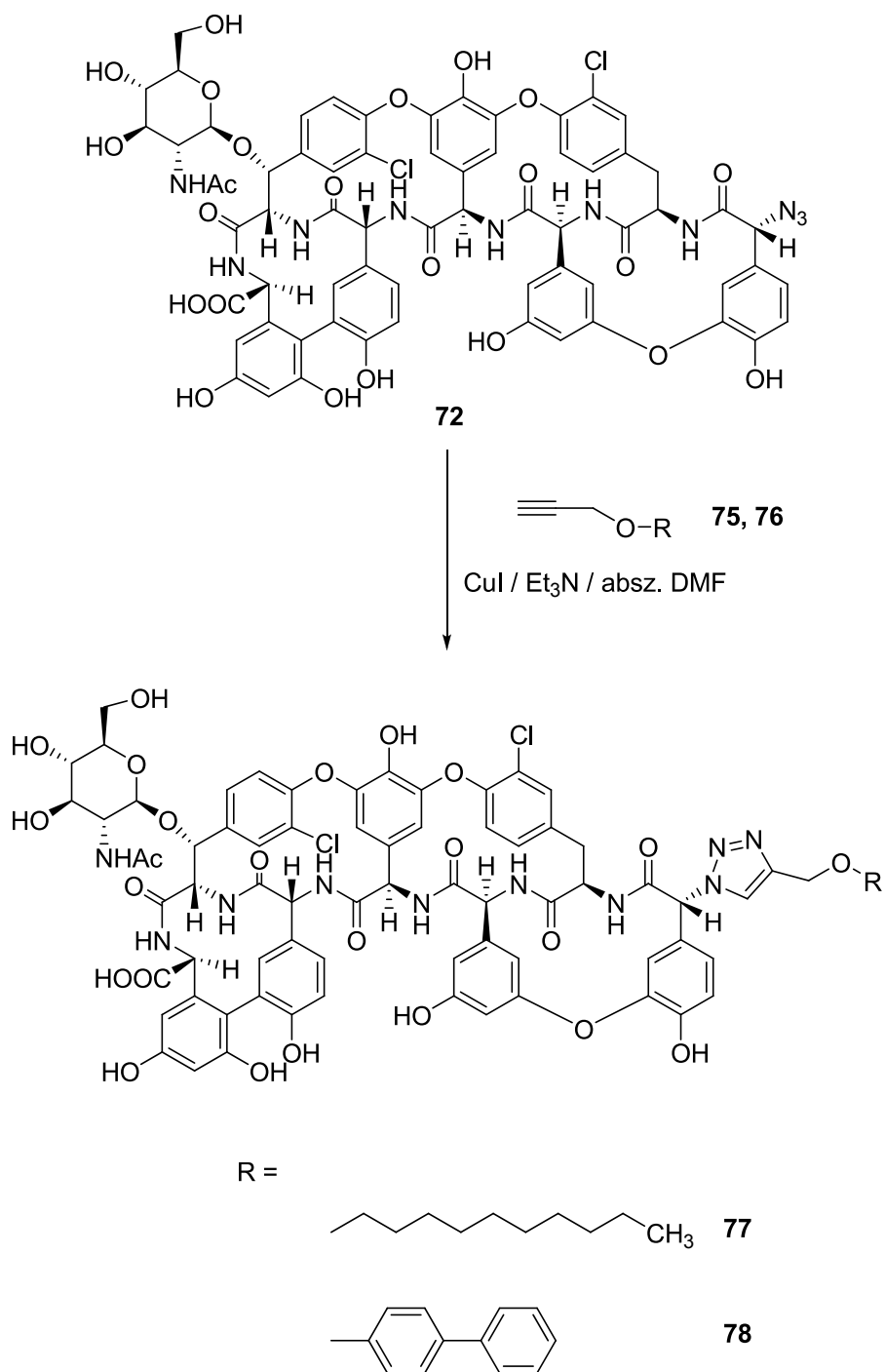
74. ábra Az azido-teikoplanin-pszeudoaglikon előállítása

A lipofil csoport kapcsolásához n-decil-propargil-étert (**75**) és 4-propargiloxi-bifenilt (**76**) képeztünk n-dekanol (**73**) és 4-fenil-fenol (**74**) propargilezésével.

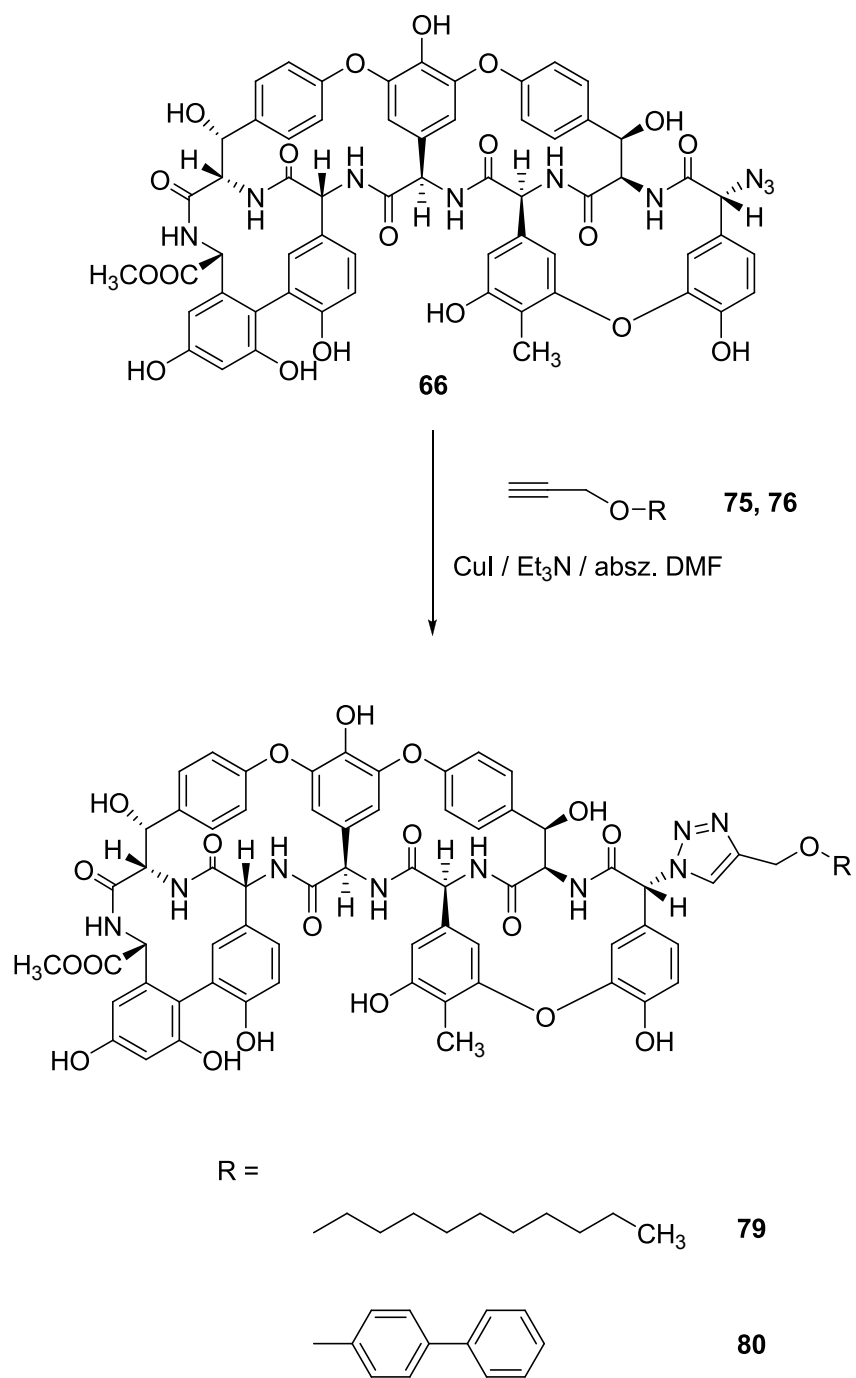


75. ábra A click-reakcióra alkalmas lipofil reagensek szintézise

A két propargil-származékot (**75**, **76**) katalitikus mennyiségű réz(I)-jodid jelenlétében reagáltatva az azidokkal (**66**, **72**), a megfelelő 1,2,3-triazolokat kaptuk (76. ábra és 77. ábra). Megvizsgáltuk mind az azidok (**66**, **72**), mind pedig a két-két lipofil származék (**77-78**, **79-80**) hatását néhány jelentős Gram-pozitív baktérium esetében. A két azido-származék (**66**, **72**) közepes aktivitást mutatott a glikopeptid-szenzitív *Enterococcus faecalis* és a *Staphylococcus aureus* valamint *epidermidis* törzsekkel szemben. Meglepő volt az a drámai különbség, amit a riztocetin-aglikon és a teikoplanin-pszepseudoaglikon származékai között tapasztaltunk. Míg az első két vegyület (**79**, **80**) teljesen hatástalan volt, addig az utóbbi kettő (**77**, **78**) kitűnő bakteriosztatikus és baktericid aktivitást mutatott még a vankomicinre és teikoplaninra egyaránt rezisztens (vanA-pozitív) *Enterococcus faecalis*-szal szemben is. A minimális baktericid koncentrációjuk közel vagy teljesen azonos volt a MIC értékükkel valamennyi vizsgált baktériumnál, ami a nagyon erős baktericid tulajdonságukat mutatja. Ez a két származék hatásosabbnak bizonyult, mint az oritavancin¹¹², annak ugyanis a baktericid koncentrációja lényegesen nagyobb, mint a bakteriosztatikus. (vanA-pozitív *E. faecium* esetében MIC = 1-2 µg/ml, MBC = 8-32 µg/ml).



76. ábra A teikoplanin-pseudoaglikon lipofil származékainak előállítása click-reakcióval



77. ábra A risztocetin-aglikon lipofil származékainak előállítása click-reakcióval

5. Táblázat A riztacetin és a teikoplanin új lipofil származékainak antibakteriális aktivitása

Teszt mikroorganizmus	MIC / MBC (µg/mL)											
	Vanko- micin	Teiko- planin	66	79	80	72	77	78	81	82	84	85
ATCC 6633 <i>B. subtilis</i>	1 / 4	0,5 / 8	1 / 4	> 256	> 256	32 / 64	0,25 / 2	0,25 / 0,5	8 / 8	2 / 4	2 / 4	0,5 / 0,5
ATCC 33591 MSSA	1 / 4	1 / 4	1 / 2	> 256	> 256	2 / 4	0,25 / 0,5	0,25 / 0,5	4 / 8	0,5 / 0,5	64 / 256	64 / 256
ATCC 29213 MRSA	2 / 4	8 / 32	2 / 2	> 256	> 256	8 / 8	0,25 / 0,5	0,25 / 0,5	4 / 8	1 / 1	64 / 256	128 / 256
ATCC 35984 <i>S. epidermidis</i> Biofilm-pozitív	2 / 4	1 / 4	8 / 16	> 256	> 256	16 / 16	0,25 / 0,5	0,5	8 / 8	1 / 1	64 / 256	256 / 256
<i>S. epidermidis</i>	2 / 4	32 / 32	16 / 16	> 256	> 256	4 / 4	0,5 / 0,5	0,5	4 / 4	1 / 1	64 / 256	16 / 64
ATCC 29212 <i>E. faecalis</i> Vanco: S Teico: S	4 / 16	4 / 16	8 / 16	> 256	> 256	32 / 32	0,25 / 0,5	0,25 / 0,5	16 / 256	2 / 256	128 / 256	32 / 128
ATCC 51299 <i>E. faecalis</i> Vanco: R Teico: S VanB +	16 / 16	16 / 64	64 / 128	> 256	> 256	32 / 64	0,25 / 0,5	0,25 / 0,5	16 / 256	2 / 128	128 / 256	64 / 256
15376* <i>E. faecalis</i> Vanco: R Teico: R VanA +	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256	0,25 / 0,5	0,25 / 0,5	16 / 256	2 / 256	128 / 256	128 / 256

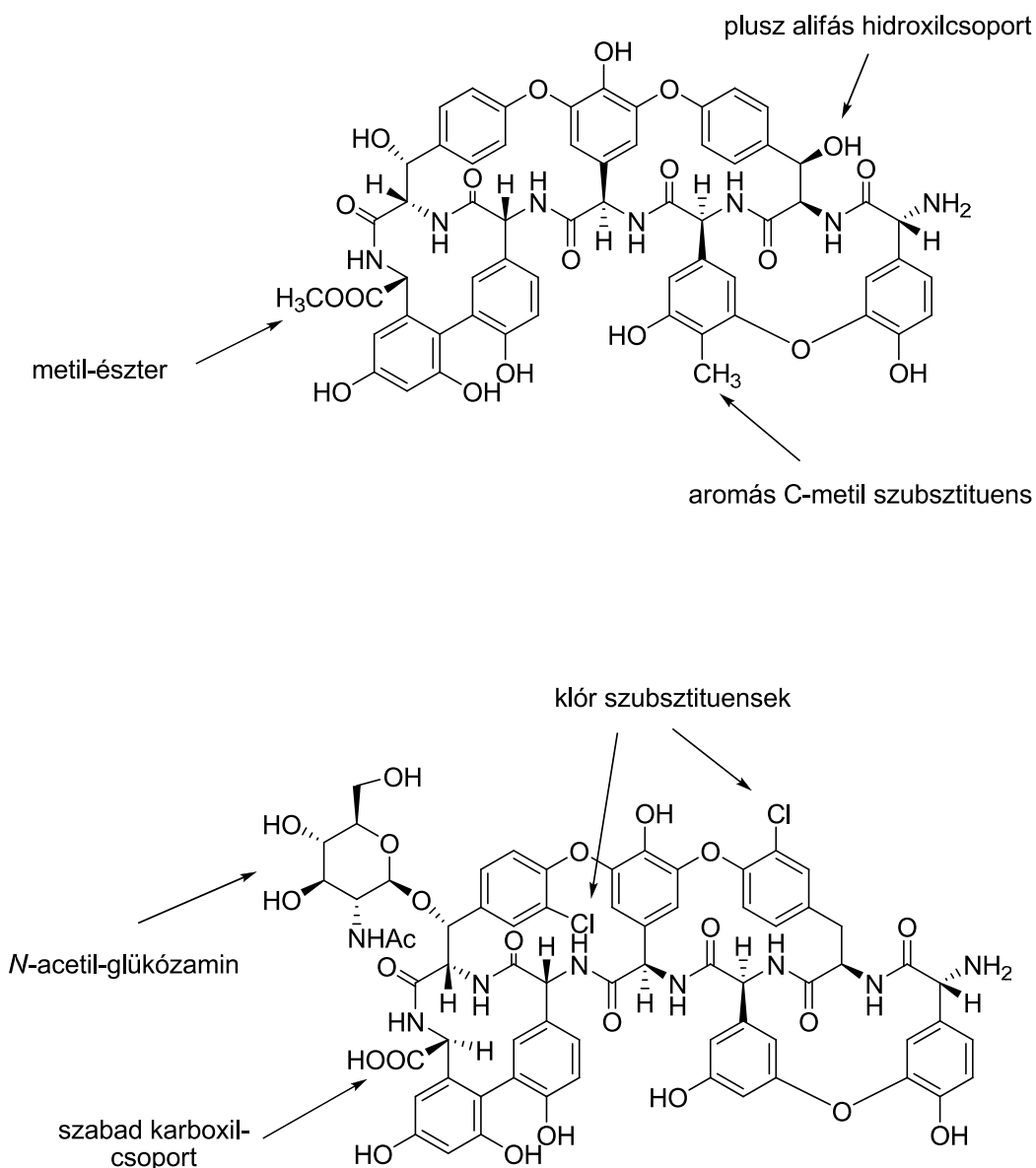
*Ld. a 111. irodalmi hivatkozást.

Az antibakteriális eredmények ellentétjét mutatták az antivirális tesztek (6. Táblázat). Az azido-teikoplanin-pszepseudoaglikon (72) és a belőle készült két lipofil származék (77, 78) teljesen inaktív volt. Az azido-risztocetin-aglikon (66) közepes aktivitást mutatott az influenza A H1N1 és H3N2 törzsekkel szemben, hatástalan volt viszont a B típus esetében. A n-decil-származék (79) jobb hatásúnak bizonyult mindhárom vizsgált altípussal szemben, mint a terápiás gyakorlatban használatos oszeltamivir-karboxilát, azonban meg kell említeni, hogy ugyanakkor citotoxicitása sem elhanyagolható. Érdekes, hogy a bifenil szubsztituenst hordozó származék (80) épp oly hatástalan volt, mint a teikoplanin-pszepseudoaglikonból képzett vegyületek.

6. Táblázat A risztocetin és a teikoplanin új lipofil származékainak antivirális aktivitása

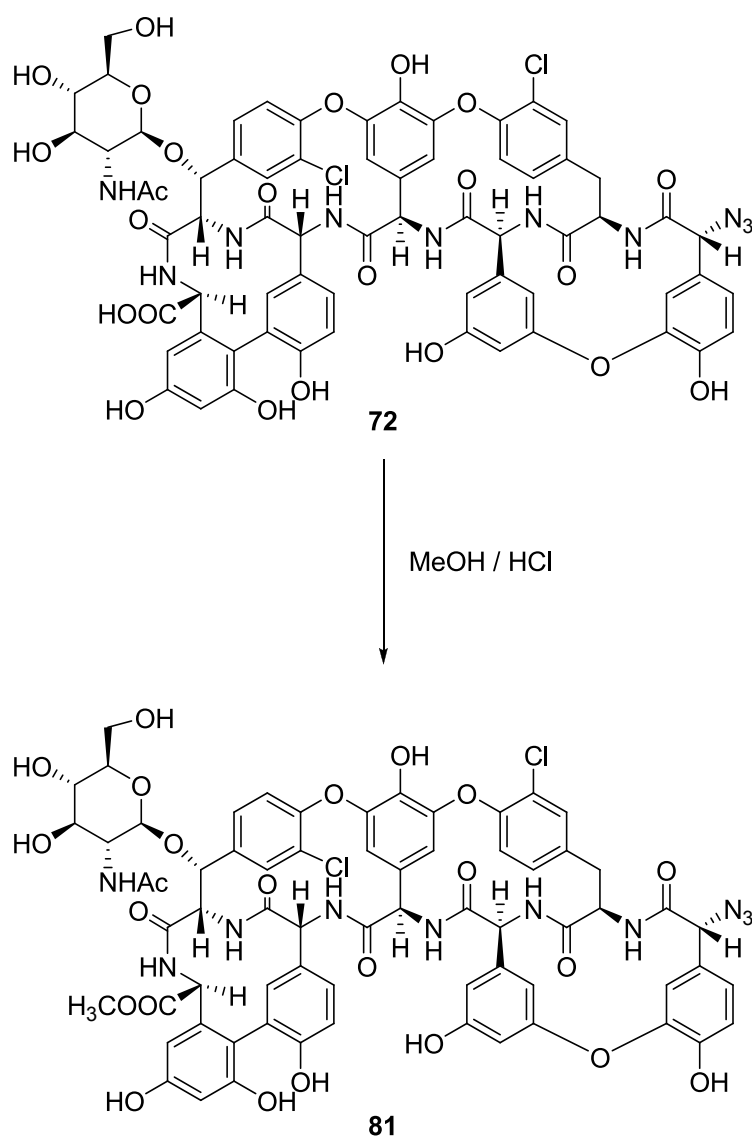
Vegyület	Citotoxicitás (μM)		Antivirális EC_{50} (μM)					
	CC_{50}	Minimum citotoxikus koncentráció	Influenza A/H1N1		Influenza A/H3N2		Influenza B	
			CPE	MTS	CPE	MTS	CPE	MTS
66	>100	100	10	8,9	20	9,2	N.A.	N.A.
	53,2	100	9	8,8	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
79	11,4	20	0,8	0,7	2	2,8	0,5	0,5
	8,5	4	0,1	0,1	0,2	0,5	0,2	0,2
80	17,4	≥ 4	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
72	59,7	20	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
77	3,7	4	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
78	2,6	4	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
81	48,7	20	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
82	0,8	0,8	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
84	0,1	0,2	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
85	4,6	$\geq 0,8$	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Oszeltamivir-karboxilát	>100	>100	2,0	8,6	0,8	1,1	12	6,4
Ribavirin	>100	>100	9,0	9,7	9	6,0	9	3,6
Amantadin	>500	>500	45	35	0,8	0,4	N.A.	N.A.
Rimantadin	241	500	10	13	0,1	0,2	N.A.	N.A.

A risztocetin-aglikon és a teikoplanin-pseudoaglikon szerkezete meglehetősen nagy hasonlóságot mutat, de ha alaposabban szemügyre vesszük a két molekulát, akkor több különbséget is megfigyelhetünk. A risztocetin-származék egy plusz alifás hidroxilcsoportot tartalmaz valamint egy aromás C-metil szubsztituenset, és hiányoznak, a teikoplaninnál meglévő, klór szubsztituensek. A C-terminális nem szabad karboxilcsoport, hanem metil-észter formában van jelen, és tekintettel arra, hogy teikoplanin-pseudoaglikont használtunk, így egy markáns különbség a meglévő *N*-acetil-glükózamin rész ez utóbbi esetében.

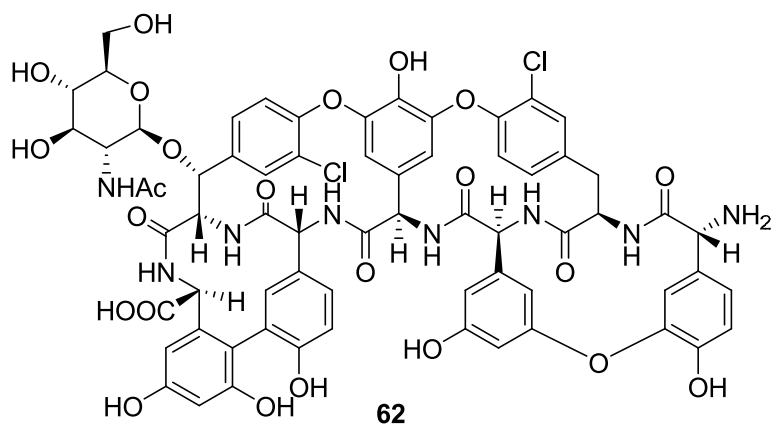


78. ábra A risztocetin-aglikon (felül) és a teikoplanin-pseudoaglikon (alul) szerkezetének összehasonlítása

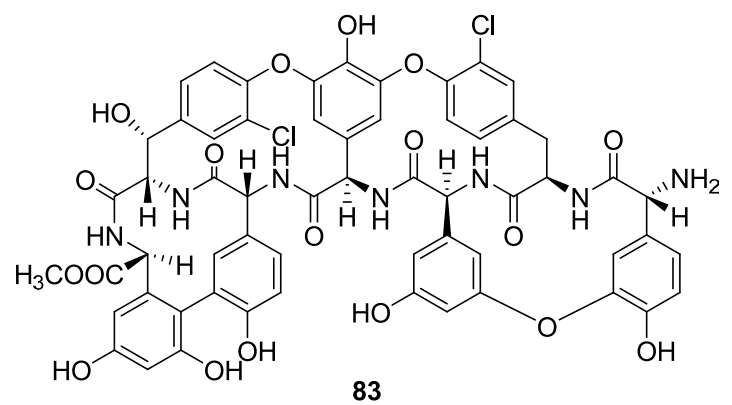
Elméletileg ezen eltérések bármelyike befolyásolhatja a biológiai aktivitást. Feltételeztük, hogy az antibakteriális hatásban a legnagyobb változást a karboxilcsoport észteresítése – ezáltal a molekula negatív töltésének megszüntetése – valamint az erősen hidrofil molekularészt jelentő aminocukor eltávolítása okozhatja, így munkánk során ezeket vizsgáltuk. Mivel mind a n-decil, mind pedig a bifenil teikoplanin-pszepseudoaglikon-származék egyformán hatásos volt, így elegendőnek láttuk csupán az egyikkel elvégezni a megfelelő transzformációkat. Az azido-teikoplanin-pszepseudoaglikon (**72**) észteresítését (79. ábra) követően, **81**-t n-decil-propargil-éterrel (**75**) reagáltatva, a click-reakció **82**-t eredményezte (81. ábra). Teikoplanin-pszepseudoaglikonból kiindulva (**62**) előállítottuk a teikoplanin-aglikon metil-észterét (**83**), amiből diazotranszferrel azidot (**84**) képeztünk (80. ábra). **84**-t n-decil-propargil-éterrel kapcsolva kaptuk **85**-t (81. ábra).



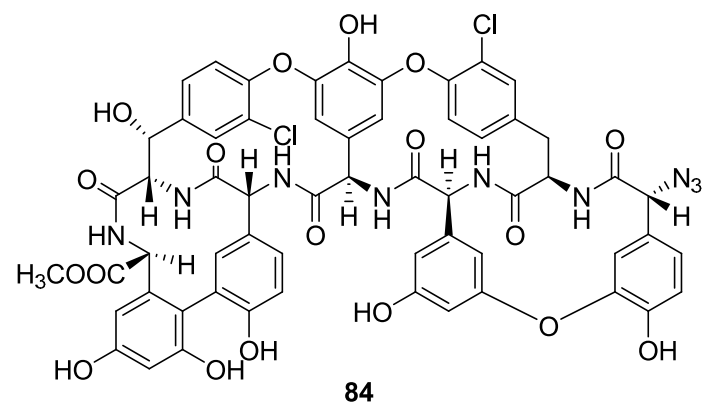
79. ábra Az azido-teikoplanin-pszepseudoaglikon észteresítése



1. 90 %-os TFA
2. MeOH / HCl

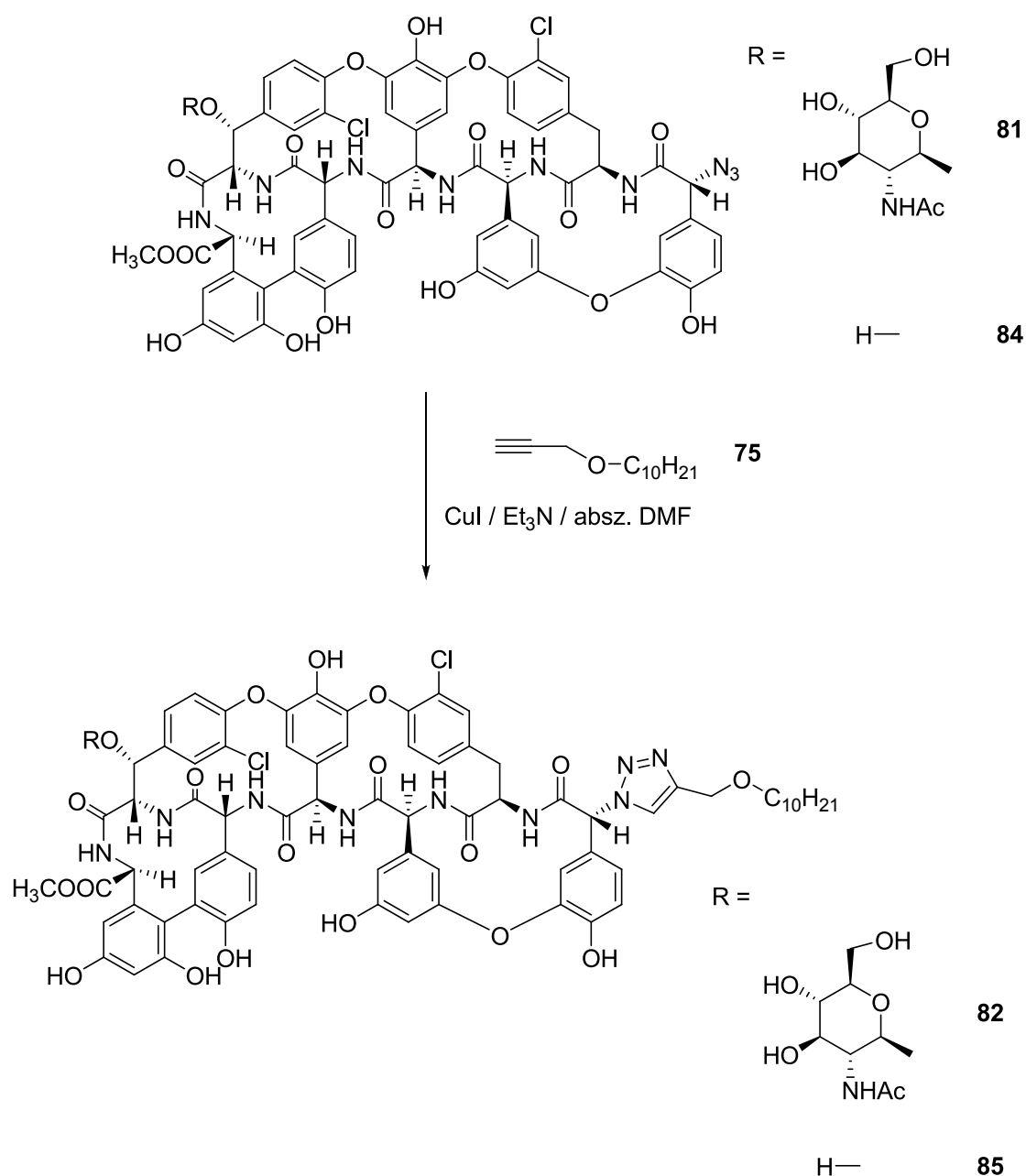


Triflil-azid / piridin
CuSO₄ / Et₃N



80. ábra Az azido-teikoplanin-aglikon metil-észterének szintézise

A teikoplanin-pszeudoaglikon decil származékának karboxilcsoportját metil-észterre (**82**) alakítva nem csökkent a kiváló bakteriosztatikus aktivitás, megszűnt azonban a cid hatás az *enterococcusok* esetében. Amennyiben az észterképzés mellett az aminocukrot is eltávolítottuk, tehát a n-decil-teikoplanin-aglikon metil-észterét (**85**) állítottuk elő, akkor inaktív származékhoz jutottunk, ami az *N*-acetil-glükózamin antibakteriális aktivitásban betöltött jelentős szerepét mutatja. A vírusellenes hatást nem befolyásolták ezek az átalakítások, valamennyi teikoplanin-származék inaktívnak bizonyult.



81. ábra A teikoplanin-aglikon-metil-észter (**85**) és a teikoplanin-pszeudoaglikon-metil-észter decil származékának (**82**) szintézise

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk, van-e összefüggés az általunk előállított vegyületek lipofilitása és antibakteriális hatása között, egy kísérletes és számítógépes technikát ötvöző módszer¹¹³ (experimental value-adjusted logP calculation) segítségével meghatároztuk valamennyi származék logP értékét (7. Táblázat). A kapott eredményeket összevetve az antibakteriális aktivitás adatokkal megállapítható, hogy a leghatásosabb származékok közepes lipofilitással rendelkeznek (logP = 0,3 – 1,3), a túlságosan lipofil vagy hidrofil vegyületek pedig csak csekély aktivitást mutatnak vagy inaktívak.

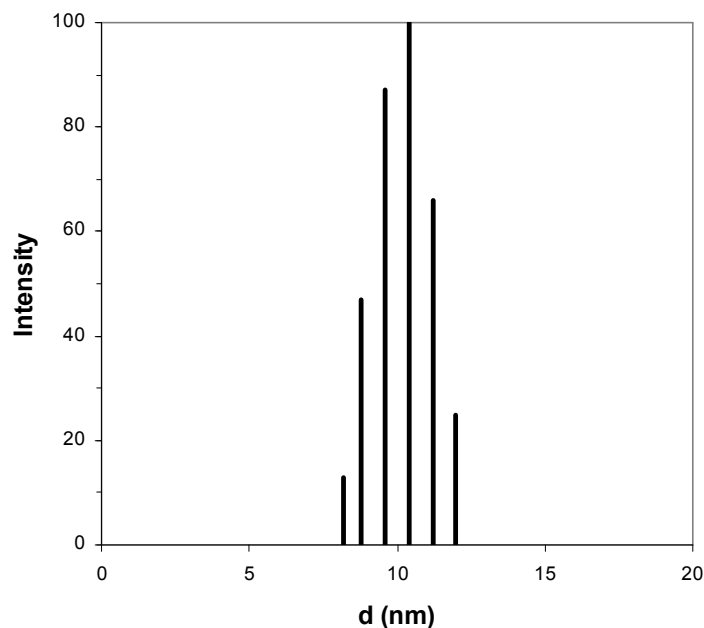
7. Táblázat A riztocetin- és teikoplanin-származékok logP értékei

Vegyület	61	66	79	80	62	72	77	78	81	82	84	85
logP (számított)	-0,91	0,29*	3,36	2,71	-2,48	-1,83	1,24	0,59	-1,96	1,11	1,57	4,64

*Rázótölcséres módszerrel kísérletesen meghatározott érték.

Az elméleti részben már részletesen ismertettem a glikopeptid antibiotikumok hatásmechanizmusának és a velük szemben kialakuló rezisztenciának a molekuláris alapjait. Az egyre nagyobb számban megjelenő ellenálló baktériumokkal szembeni küzdelem legújabb eredményét jelentik (a lipopeptidek mellett) a lipofil glikopeptid antibiotikum-származékok. A jelenleg klinikai hármás fázisban lévő oritavancin, telavancin és dalbavancin vanA-pozitív törzsekkel szemben mutatott aktivitását annak tulajdonítják, hogy lipofil szubsztituensük révén képesek a baktérium membránjához kihorgonyozódni, ott koncentrálni, továbbá fokozott dimerizációs hajlammal rendelkeznek.¹¹⁴ Ez utóbbiról pedig már a korábbi, a kovalens dimerek, trimerek és polimerek terén végzett kutatások is igazolták, hogy kedvezően befolyásolja az antibakteriális hatást rezisztens törzsek esetén.

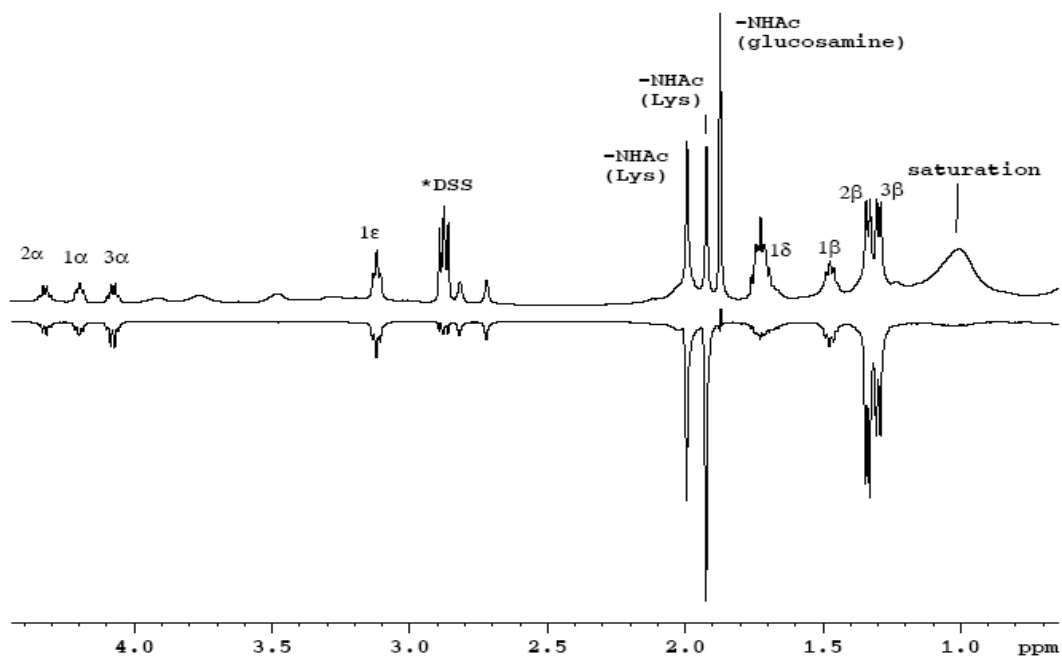
Az általunk előállított kitűnő bakteriosztatikus és baktericid hatást mutató két lipofil teikoplanin-származékot megvizsgálva, szembetűnő a molekulák amfifil jellege, köszönhetően a C-terminálison meglévő negatív töltésnek valamint az aminocukornak (hidrofil vég) és az N-terminálison – annak pozitív töltését megszüntetve – kialakított lipofil résznek (hidrofób vég). Ezzel az amfipatikus jelleggel hoztuk összefüggésbe ezen két lipofil teikoplanin-származék kiváló hatását. Feltételeztük ugyanis, hogy önszerveződéssel képesek lehetnek multivalens aggregátumok kialakítására. Nátrium-sót képezve a n-decil-származékból vizsgáltuk a vizes közegben mutatott viselkedését. A dinamikus fényszórás-fotometriás mérések monomodális eloszlású 10 nm átmérőjű aggregátumok jelenlétét mutatták (82. ábra).



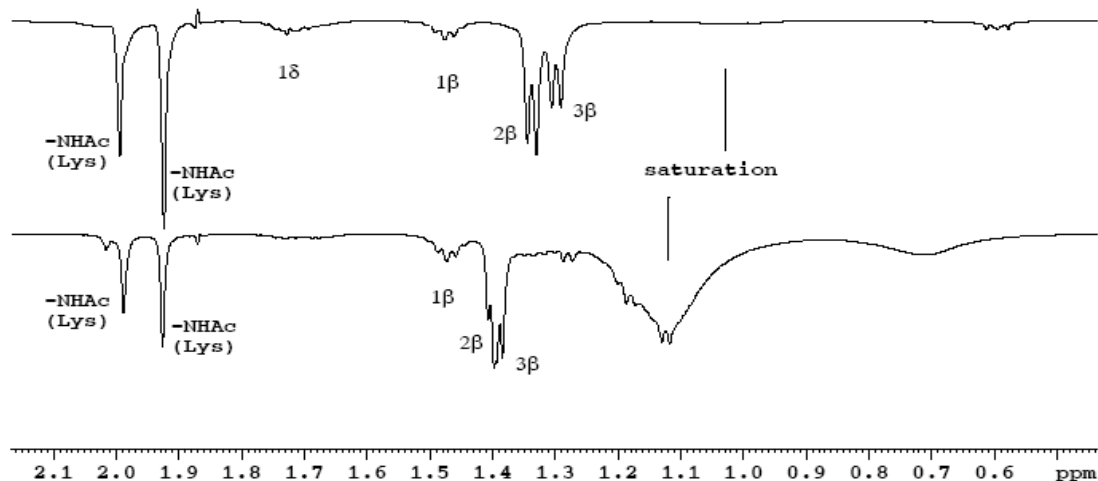
82. ábra A teikoplanin-pszepdoaglikon decil-származékából kialakult aggregátumok dinamikus fényszórás-fotometriás mérésekkel meghatározott méret eloszlása

A vizes oldatot DSS, mint belső standard, jelenlétében diffúzió kontrollált NMR spektroszkópiával (DOSY) vizsgálva, 350 ± 60 kDa molekulatömegű aggregátumok voltak megfigyelhetők. Ahhoz, hogy a kapott két, különböző dimenziójú eredmény összevethető legyen, molekula dinamikai számítások segítségével (Gaussian 03, MOPAC 2007) meghatároztuk az aggregátumok optimalizált legalacsonyabb energiájú állapothoz tartozó geometriáját.^{115,116,117} A becsült moláris térfogat ezek alapján $1,0 \text{ dm}^3/\text{mol}$ -nak adódott. Felhasználva ezt a térfogat értéket, valamint a fényszórás-fotometriás méréssel meghatározott 10 nm-es átlagos átmérőt, kiszámítható, hogy egy aggregátum kb. 240 amfifil molekulából épül fel, és ennek megfelelően a móltömege kb. 390 kDa. Ez pedig jól egyezik a DOSY NMR vizsgálat eredményével.

Ahhoz, hogy pontosabb képet kapjunk a VRE törzsekkel szemben is rendkívül hatásos lipofil vegyületeink hatásmechanizmusáról, megvizsgáltuk a n-decil-származék kölcsönhatását mind a vankomicin-szenzitív törzsekre jellemző $N\alpha, N\epsilon$ -diacetyl-L-lizil-D-alanil-D-alanin (A-ligandum), mind pedig a rezisztens baktériumok sejtfal prekursorát szimuláló $N\alpha, N\epsilon$ -diacetyl-L-lizil-D-alanil-D-tejsav (B-ligandum) modell peptid-származékokkal. Ehhez, a ligandum-receptor kölcsönhatás tanulmányozására széles körűen alkalmazott, úgynevezett szaturáció transzfer differencia (saturation transfer difference, STD) NMR spektroszkópiai módszert^{118,119,120,121,122} használtuk fel (83. ábra és 84. ábra).

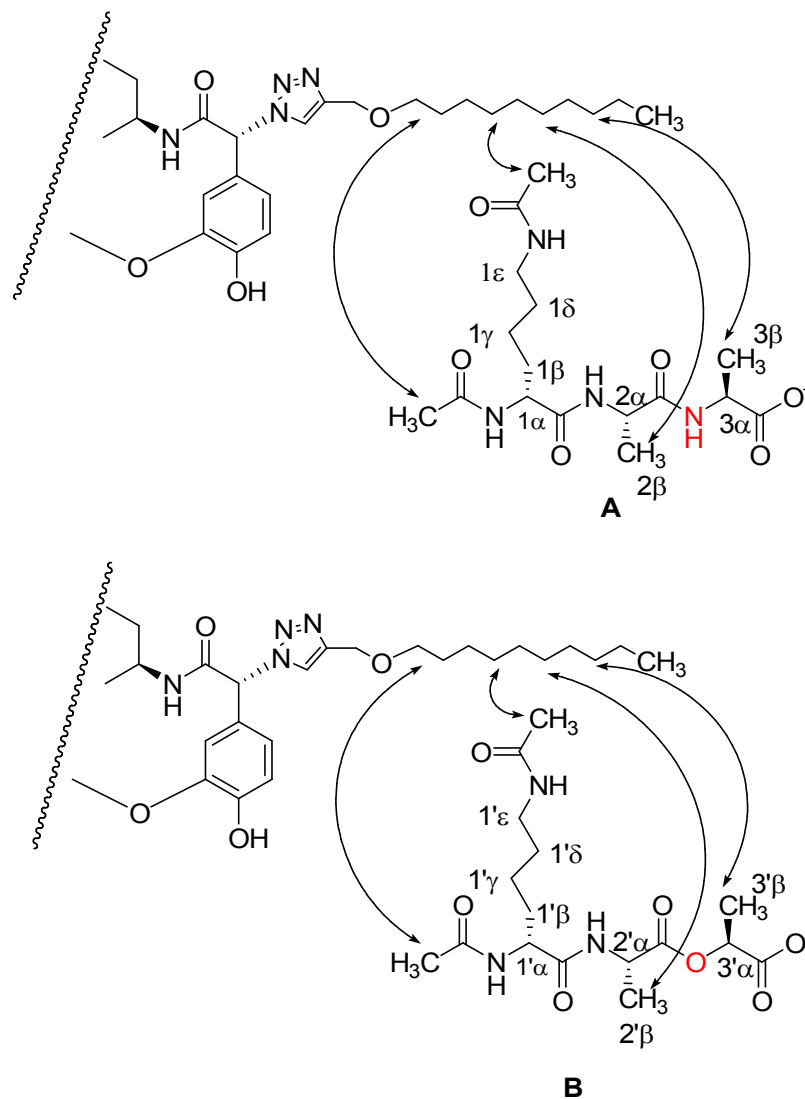


83. ábra A teikoplanin-pseudoaglikon decil származékának az A-ligandummal adott STD-spektruma



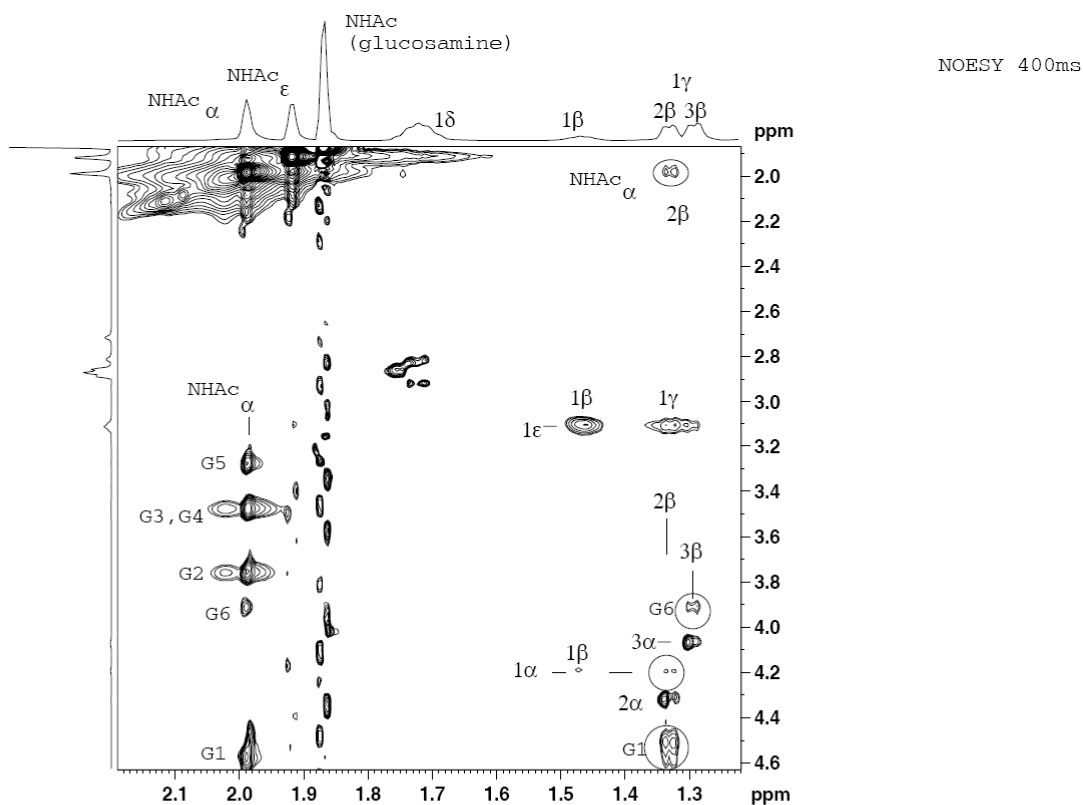
84. ábra A decil-származék A-ligandummal (felül) és B-ligandummal (alul) készült STD-spektruma

Azt tapasztaltuk, hogy mindkét sejtfal-prekurzor analóg esetében az antibiotikum lipofil decil oldallánca erős apoláris kölcsönhatásba lép a tripeptid *N*-acetyl szubsztituensek metilcsoportjaival éppúgy, mint a két alanin (A) vagy az alanin és a tejsav (B) metiljeivel (85. ábra).



85. ábra A teikoplanin-pszeudoaglikon decil származékának kölcsönhatása A- és B-ligandummal (az STD-mérések eredményeire alapozva)

Az STD vizsgálatok mellett standard NOESY kísérleteket is végeztünk, amelyek további intermolekuláris kölcsönhatások jelenlétét mutatták ki. A-ligandumot használva, egyértelműen negatív NOE-kat detektáltunk az α -NHAc metilcsoportja és a teikoplanin-pszeudoaglikon-származék *N*-acetyl-glükózaminjának csaknem valamennyi protonja között, továbbá kölcsönhatást tapasztaltunk a cukor-rész anomer protonja és a prekurzor analóg 2 β metilcsoportja között (86. ábra).



86. ábra A teikoplanin-pseudoaglikon-decil-származék és az A-ligandum komplexének NOESY-spektruma

Az elvégzett vizsgálatok segítségével közelebb kerültünk az általunk előállított lipofil teikoplanin-pseudoaglikon származékok hatásmechanizmusának megértéséhez. A molekulán kialakított apoláris oldallánc nagy valószínűséggel segíti annak kihorgonyozódását a baktérium membránjában, aminek révén az antibiotikum a hatás helyén koncentrálni tud. A (vankomicinnel és teikoplaninnal szemben is) rezisztens törzsek esetében mutatott kitűnő bakteriosztatikus és cid hatás hátterében azonban ettől sokkal összetettebb jelenség áll. Az amfifil tulajdonságból adódó aggregációs hajlam, valamint az *N*-acetyl-glükózamin és a *n*-decil oldallánc révén megvalósuló kölcsönhatások, úgy tűnik, képesek kompenzálni azt, hogy egy hidrogén-híd hiánya miatt ezredrészére gyengül a kötődés a baktérium sejtfal prekuzora és az antibiotikum molekula heptapeptid része között.

Összefoglalás

Doktori munkám során a glikopeptid típusú antibiotikumokhoz tartozó risztocetin és teikoplanin módosításával foglalkoztam. A szintetikus átalakítások egyik irányvonalát a risztocetin-aglikonból kiinduló új szénhidrát-származékok előállításai jelentették, amelyeknél a cukrokat az N-terminálison keresztül kapcsoltuk az aglikonhoz. Glikozil-izotiocianátok addíciós reakciójával glükozil- és maltozil-tioureido-származékot állítottunk elő, amelyek egészen jó antibakteriális aktivitást mutattak és nem volt trombocita-aggregáló hatásuk.

Réz(I)-katalizálta azid-alkin 1,3-dipoláris cikloaddíciós reakció felhasználásával további új cukor-származékokat szintetizáltunk. Per-*O*-acetilezett propargil-glikozidokat azido-risztocetin-aglikonnal reagáltatva az α -D-glükozil-, α -D-mannozil-, α -D-maltozil-, *N*-acetil- α -D-glükózaminil- és α -L-ramnozil-oximetil-triazolil-származékokhoz jutottunk. Zemplén szerint dezacetilezve pedig a megfelelő szabad cukrot tartalmazó vegyületeket kaptunk. A Gram-pozitív törzseken elvégzett vizsgálatok azt mutatták, hogy az N-terminálison kialakított cukor-rész igen kedvezően befolyásolta a risztocetin-aglikon antibakteriális hatását. A sztereo-kémia jelentőségét mutatja, hogy míg a D-konfigurációjú származékok aktivitása között nem volt számottevő különbség, addig az L-ramnózzal képzett vegyületek esetében jóval nagyobb MIC értékeket kaptunk. Az antibakteriális eredmények mellett figyelemre méltóak az antivirális tesztek során nyert tapasztalatok. Az acetilezett maltozil- és a két ramnozil-származék kivételével valamennyi vegyület igen jó aktivitást mutatott az influenza A vírus H1N1 altípusával szemben mindamelllett, hogy citotoxicitásuk is biztatóan csekélynek bizonyult.

Szintetikus munkám során lipofil származékokat állítottunk elő a fent említett click-reakcióval teikoplanin-pszepseudoaglikonból és risztocetin-aglikonból. A teikoplanin-pszepseudoaglikonból készült decil- és bifenil-származékok kitűnő bakteriosztatikus és baktericid hatást mutattak még a legellenállóbb *enterococcus* törzssel szemben is, ugyanakkor a risztocetin-aglikonból képzett megfelelő vegyületek teljesen inaktívak voltak. Az antivirális tesztek során ellenkező eredményt kaptunk, ott a risztocetin-aglikon decil származéka jobbnak bizonyult a vizsgált három influenza vírus esetében, mint a forgalomban lévő oszeltamivir-karboxilát, meg kell azonban jegyezni, hogy erőteljes citotoxicitást is mutatott. A hatás-szerkezet összefüggések megfejtéséhez további származékokat állítottunk elő a teikoplanin-pszepseudoaglikon decil-származékának észteresítésével illetve az *N*-acetil-glükózamin eltávolításával. Megállapítottuk, hogy metil-észter képzéssel nem változik jelentősen a

bakteriosztatikus aktivitás (*enterococcusok* esetében ugyan elvész a cid hatás), az aminocukor eltávolítása azonban gyakorlatilag teljesen inaktíválja a molekulát. Meghatároztuk az új lipofil származékok oktanol-víz megoszlási hányadosát, és ezeket az adatokat összevetettük a MIC-értékekkel, amelyek alapján megfogalmaztuk, hogy a közepesen lipofil vegyületeink a legkiválóbb antibakteriális hatásúak. A teikoplanin-*pszeudoaglikon* decil származékának dinamikus fényszórás fotometriával és DOSY NMR technikával való vizsgálata, valamint molekula dinamikai számítások segítségével bizonyítottuk, hogy ez az amfifil molekula erőteljes aggregációs hajlamot mutat vizes közegben, ami összefüggésbe hozható kiváló antibakteriális aktivitásával. Kísérletet tettünk a hatásmechanizmus molekuláris szintű pontosabb megismerésére. Az STD és a NOESY NMR vizsgálatok azt mutatták, hogy az új származék lipofil oldallánca, valamint *N*-acetyl-glükózamin része egyaránt kölcsönhatásba lép a sejtfalprekursor analóg molekulával. Feltételezéseink szerint ez talán képes kompenzálni az antibiotikum és a sejtfalprekursor közötti kölcsönhatás meggyengülését, amit a rezisztens baktériumok esetén a terminális alanin tejsavra való cseréje okoz.

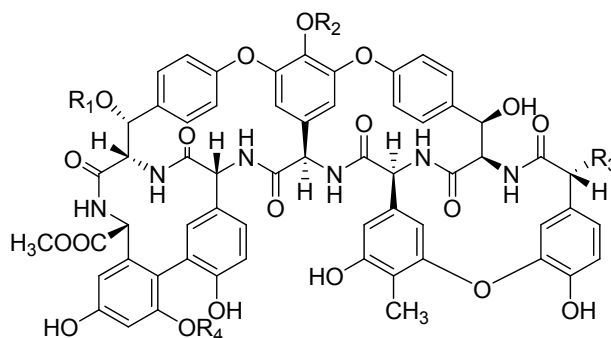
Summary

During my PhD work I dealt with the synthesis of new derivatives of ristocetin and teicoplanin. Starting from ristocetin aglycon new carbohydrate derivatives were prepared and their antibacterial and antiviral activity, as well as their platelet-aggregation property were investigated. The synthesis of new lipophilic derivatives of ristocetin aglycon and teicoplanin pseudoaglycon were carried out. Their antibacterial and antiviral effect were examined and the structure-activity relationships were studied.

Ristocetin A (**3**) was deglycosylated by anhydrous HF using the Boger's method. The resulted aglycon (**61**) was reacted with 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-glucopyranosyl isothiocyanate and 2,3,6,2',3',4',6'-hepta-*O*-acetyl-D-maltosyl isothiocyanate. After purification of the addition products (**64a, b**) by column chromatography, the Zemplén deacetylation afforded *N*-β-D-glucopyranosylthioureido and *N*-β-D-maltosylthioureido ristocetin aglycon (**65a, b**). Both new carbohydrate derivatives exhibited quite a good activity against several *staphylococci* and *enterococci* strains. Examining the haematological effect of the compounds, neither of them caused platelet-aggregation, moreover the glucosyl derivative (**65a**) inhibited the ristocetin induced thrombocyte-aggregation.

Stimulated by these promising results additional carbohydrate derivatives of ristocetin aglycon were synthesized using the copper-catalyzed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition (click) reaction discovered by Sharpless and Meldal. The azido group required to the binding was formed from the primary amino group of ristocetin aglycon (**61**) by diazotransfer reaction. Treating of the aglycon with freshly prepared trifluoromethanesulfonyl azide resulted in the azido ristocetin aglycon (**66**) in a moderate yield, retaining the configuration of the N-terminal phenylglycin.

The terminal alkyne function was formed on five different carbohydrate molecules (D-glucose, D-mannose, D-maltose, *N*-acetyl-D-glucosamine and L-rhamnose) by Fischer's acid-catalyzed (sulfuric acid on silica) glycosylation using propargyl alcohol as glycosyl acceptor. The propargyl glycosides were acetylated by acetic anhydride in pyridine. The reaction of the per-*O*-acetylated propargyl glycosides with the azido ristocetin aglycon in the presence of cuprous iodide resulted in the corresponding glycosyl-oxymethyl-triazolyl derivatives (**70a-e**). Removing the acetyl groups from the carbohydrate part of the molecules by Zemplén led to the α-D-glucopyranosyl (**71a**), α-D-mannopyranosyl (**71b**), α-D-maltopyranosyl (**71c**), α-D-*N*-acetylglucosaminyl (**71d**) and α-L-rhamnopyranosyl (**71e**) derivatives of ristocetin aglycon.

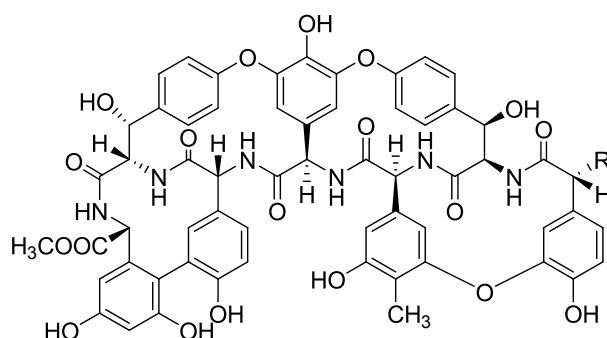


Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
3			NH ₂	
61	H	H	NH ₂	H
64a	H	H		H
64b	H	H		H
65a	H	H		H
65b	H	H		H

Table 1. The structure of ristocetin A (**3**), ristocetin aglycon (**61**) and the glycosylthioureido derivatives of the aglycon

The antibacterial activity of the acetylated and deacetylated derivatives was investigated in case of some important Gram-positive strains. We found that introduction of the sugar moieties at the N-terminus into the ristocetin aglycon molecule had a beneficial effect on the antibacterial activity. The results showed that the D-sugar containing derivatives (**70a-d** and

71a-d) do not have considerable difference in the activity, however the L-rhamnose containing compounds (**70e**, **71e**) had much higher MIC (Minimum Inhibitory Concentration) values. It may be concluded that the stereochemistry of the saccharide sidechain has a great influence on the antibacterial activity.



Compound	R	Compound	R
66	N ₃		
70a		71a	
70b		71b	
70c		71c	
70d		71d	
70e		71e	
79		80	

Table 2. The structure of azido ristocetin-aglycon (**66**) and the carbohydrate (**70a-e**, **71a-e**) and lipophilic (**79**, **80**) derivatives synthesized by click reaction

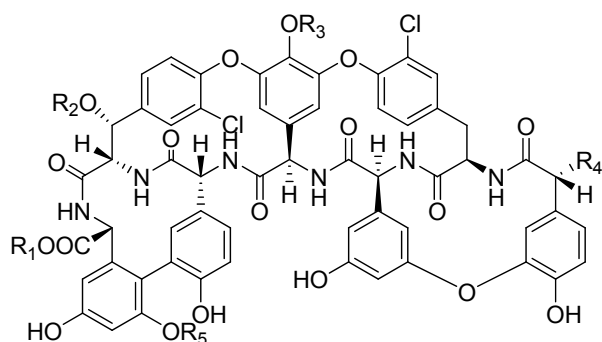
There was only a slight difference between the antibacterial effects of compounds having acetylated or free sugars, which can be explained by a possible deacetylation in the culture media by aspecific esterases.

In addition to the antibacterial assay the antiviral activity of our new carbohydrate derivatives was tested. All of the compounds except the acetylated maltosyl (**70c**) and the two rhamnosyl derivatives (**70e**, **71e**) exhibited a very good activity against the H1N1 subtype of influenza A virus, nevertheless, their cytotoxicity was sufficiently low.

The platelet aggregation property of the deacetylated carbohydrate derivatives (**71a-e**) was studied. Although their solubility was lower than that of the glycosylthioureido derivatives, but they dissolved much better in water than the ristocetin aglycon. Examining the most concentrated solution of the derivatives (0.5 – 2.5 mg/mL) none of them caused thrombocyte aggregation. The D-glucose and D-maltose analogues (**71a** and **71c**) inhibited the ristocetin induced platelet aggregation. The D-mannose and D-glucosamine derivatives (**71b** and **71d**) had no influence, but the L-rhamnose derivative (**71e**) increased the intensity of aggregation.

In the second part of my doctoral work the synthesis of lipophilic derivatives of teicoplanin pseudoaglycon and ristocetin aglycon was studied. Teicoplanin was deacetylated by the Boger's method, too. In contrast to ristocetin we obtained a partially deglycosylated product, (containing *N*-acetyl-glucosamine), the teicoplanin pseudoaglycon (**72**). The synthesis of the lipophilic derivatives was carried out by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, to which the primary amino group of the ristocetin aglycon and teicoplanin pseudoaglycon was exchanged for an azido function. The terminal alkyne moiety was formed on the lipophilic molecules: *n*-decyl-propargyl ether and 4-propargyloxybiphenyl were prepared by propargylation of *n*-decanol and 4-phenyl-phenol. The latter compounds were allowed to react with the azides (**66**, **72**) in the presence of a catalytic amount of cuprous iodide, resulting in the 1,2,3-triazoles (**77-78**, **79-80**).

The antibacterial activity of the azides (**66**, **72**) and the lipophilic derivatives (**77-78**, **79-80**) was tested in case of several Gram-positive bacteria. The azido derivatives (**66**, **72**) showed intermediate activity. The compounds prepared from ristocetin aglycon proved to be completely inactive. However, the lipophilic derivatives of the teicoplanin pseudoaglycon exhibited excellent bacteriostatic and bactericidal property against the most resistant strains, too.



Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
2	H			NH ₂	
62	H		H	NH ₂	H
83	CH ₃	H	H	NH ₂	H
72	H		H	N ₃	H
77	H		H		H
78	H		H		H
81	CH ₃		H	N ₃	H
82	CH ₃		H		H
84	CH ₃	H	H	N ₃	H
85	CH ₃	H	H		H

Table 3. The structure of teicoplanin (**2**) and its derivatives

In the antiviral tests only the decyl derivative of the ristocetin aglycon (**79**) was active against the examined two influenza A and one influenza B viruses. Its activity was superior to that of the therapeutically used oseltamivir carboxylate.

We established that converting the carboxyl group of the decyl derivative of the teicoplanin pseudoaglycon (**77**) to methyl ester (**82**) the excellent bacteriostatic activity does not decrease, but the cid effect against *enterococci* ceases. When the amino sugar was removed in addition to the ester formation (**85**), an inactive derivative was obtained. These results show an important role of the *N*-acetyl-D-glucosamine in the antibacterial activity. The above changes do not influence the antiviral activity.

Forming sodium salt from the n-decyl derivative of the teicoplanin pseudoaglycon (**77**) its behavior in aqueous media was investigated. The strong aggregation property of this molecule was proved by combination of dynamic light scattering and diffusion ordered NMR spectroscopic measurements and molecular dynamics calculations. We demonstrated that about 240 molecules can form one aggregate with 390 kDa mass which – in our opinion – can have an important role in the antibacterial activity.

To study the action mechanism on molecular level saturation transfer difference NMR spectroscopic measurements were performed. It was demonstrated that the decyl sidechain of the lipophilic teicoplanin pseudoaglycon derivative (**77**) shows a strong apolar interaction with the methyl groups of *N*-acetyl substituents of the cell wall precursor analogue peptide $N\alpha,N\epsilon$ -diacetyl-L-lisyl-D-alanyl-D-alanine (ligand A) typical of vancomycin-sensitive strains and $N\alpha,N\epsilon$ -diacetyl-L-lisyl-D-alanyl-D-lactate (ligand B) typical of resistant bacteria, as well as with the two alanine methyl groups (ligand A) or the alanine and lactate methyls (ligand B).

With the help of NOESY experiments the presence of additional intermolecular interactions was established between the bacterial cell wall precursor model tripeptide and the *N*-acetyl-glucosamine part of the teicoplanin pseudoaglycon.

Kísérletek leírása

Anyagok és módszerek

A felhasznált alapanyagokat és oldószereket a Sigma-Aldrich Kft-től valamint a Spektrum-3D Kft-től (VWR International) szereztük be. A kromatográfias elválasztáshoz (oszlop-kromatográfia és VRK) használt technikai minőségű oldószereket előzetesen desztillálással tisztítottuk. A risztocetin A (risztomicin A) a Moszkvai Állami Egyetem Gauze Intézetének ajándéka, a teikoplanin a Sanofi-Aventis Chinois Zrt. hozzájárulása – az utóbbihoz később kereskedelmi úton jutottunk hozzá (Hallechem Pharma). A ^1H - és ^{13}C -NMR spektrumokat 360 (90) és 500 (125) MHz-es készülékekkel vettük fel, Bruker DRX-360 ill. DRX-500 típusú spektrométereket alkalmazva. Oldószerként CDCl_3 -ot, d_4 -MeOH-t, d_6 -DMSO-t vagy D_2O -t használtunk, belső standardként pedig TMS-t (tetrametil-szilán) vagy DSS-t (2,2-dimetil-2-szilapentán-5-szulfonsav). A jelek asszignálása 2D HSQC, COSY és TOCSY technikák segítségével történt. A ^1H -NMR jeleinek multiplicitását a következő rövidítésekkel jelöltük: d, dublett; t, triplett; m, multipllett. Az infravörös spektrumok Perkin-Elmer 16 PC FTIR spektrométerrel készültek. A tömegspektrumokat Bruker Biflex-III MALDI TOF tömegspektrométerrel vettük fel. A dinamikus fényszórás-fotometriás méréseket BI-9000 digitális korrelátorral ellátott Brookhaven típusú készülékkel végeztük. Valamennyi előállított vegyület tisztítása flash kromatográfias technikával történt, amihez 0,040-0,063 mm (70-230 mesh) szemcseméretű Kieselgel 60 típusú szilikát használtunk (Merck Kft.). A vékonyréteg-kromatográfias futtatásokat Kieselgel 60 F_{254} lemezekon hajtottuk végre (Merck Kft.), a foltokat UV-lámpa alatt detektáltuk, vagy ammónium-molibdenát / kénsav illetve Pauly-reagens segítségével hívtuk elő.

Az antibakteriális vizsgálatokat Dr. Rozgonyi Ferenc és Dr. Ostorházi Eszter (SOTE, Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika), az antivirális teszteket Dr. Lieve Naesens (Katolikus Egyetem, Rega Intézet, Leuven, Belgium) készítette. A logP számítások Takácsné Dr. Novák Krisztina (SOTE, Gyógyszerészi Kémiai Intézet) munkáját dicsérik. A trombocita-aggregációs méréseket Dr. Boda Zoltán és Szarvas Mariann (DE OEC, II. Belgyógyászati Klinika) végezte.

Risztocetin-aglikon (61)

5,0 g (2,31 mmol) risztocetin A-t (**3**) oldottam 6,0 ml anizolban egy teflon reakcióedényben. -70 – -80 °C-on 50 ml vízmentes cseppfolyós HF-ot vezettem bele, majd hagytam felmelegedni és a reakcióelegyet -18 °C-on kevertetem 2 órán keresztül. A HF-ot és az anizolt lepároltam. A maradékra vízmentes étert öntöttem és a kiváló csapadékot kiszűrtem és mostam száraz éterrel. A nyersterméket oszlopkromatográfiásan tisztítottam (CH₂Cl₂ : MeOH = 8 : 2 → 6 : 4). 1,7 g (61 %) halvány barna port (**61**) kaptam.

MALDI-TOF MS: [M+Na]⁺ = 1196,4 m/z. Számított (C₆₀H₅₁N₇O₁₉Na) 1196,3; ¹H NMR, ¹³C NMR: Lásd 123. irodalmi hivatkozást.

2,3,4,6-tetra-O-acetil-N-β-D-glükopiranoziltioureido-risztocetin-aglikon (64a)

235 mg (0,2 mmol) risztocetin-aglikon (**61**) 3,0 ml metanollal készült oldatához 86 mg (0,22 mmol) 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glükopiranozil-izotiocianátot (**63a**) adtam. A reakcióelegyet 20 órán át hagytam állni szobahőmérsékleten, majd csökkentett nyomáson betöményítettem. A maradékot oszlopkromatográfiásan tisztítottam (toluol : metanol = 7 : 3) és 181 mg (58 %) piszkosfehér szilárd anyagot (**64a**) kaptam. [α]_D²⁰ = -58.36 (c 0.2, MeOH). UV: λ_{max} 279 nm (MeOH). MALDI-TOF MS: [M+Na]⁺ = 1585,78 m/z. Számított (C₇₅H₇₀O₂₈N₈SNa) 1586,3.

N-β-D-glükopiranoziltioureido-risztocetin-aglikon (65a)

Az acetilezett származék (**64a**) 158 mg-ját (0,1 mmol) feloldottam 3,5 ml vízmentes metanolban. A pH-t ~8-ra állítottam be 1 M metanos natrium-metilát oldattal és 12 órán át kevertetem szobahőmérsékleten. A reakcióelegyet betöményítettem, a kiváló csapadékot kiszűrtem és szárítottam. 88 mg (63 %) halványbarna szilárd anyagot (**65a**) kaptam.

[α]_D²⁰ = -79.35 (c 0.25, MeOH). UV: λ_{max} 279 nm (MeOH). MALDI-TOF MS: [M+Na]⁺ = 1417,8 m/z. Számított (C₆₇H₆₂O₂₄N₈SNa) 1418,2.

¹H NMR (szénhidrát rész, MeOD) δ ppm: 3,27; 3,40; 3,25; 3,26; 3,33; 3,59 (H₆).

¹³C NMR (szénhidrát rész, MeOD) δ ppm: 77,7; 77,4; 72,7; 70,1; 77,9; 61,3 (C₆).

2,3,6,2',3',4',6'-hepta-O-acetil-N-β-D-maltoziltioureido-risztocetin-aglikon (64b)

70 mg (0,06 mmol) aglikonból (**61**) és 45 mg (0,066 mmol) 2,3,6,2',3',4',6'-hepta-O-acetil-D-maltozil-izotiocianátból (**63b**) kiindulva az előzőeknek megfelelően állítottam elő az acetilezett maltozil-származékot (**64b**) 75 %-os hozammal. $[\alpha]_D = -57.25$ (c 0.11, MeOH). UV: λ_{\max} 280 nm (MeOH). MALDI-TOF MS: $[M+Na]^+ = 1873,8$ m/z. Számított ($C_{87}H_{86}O_{36}N_8SNa$) 1874,6.

N-β-D-maltoziltioureido-risztocetin-aglikon (65b)

Zemplén szerint dezacetilezve, 45 %-os hozammal izoláltam a maltozil-származékot (**65b**). $[\alpha]_D = -55.0$ (c 0.1, MeOH). UV: λ_{\max} 280 nm (MeOH). MALDI-TOF MS: $[M+Na]^+ = 1580,1$ m/z. Számított ($C_{73}H_{72}O_{29}N_8SNa$) 1580,3.

1H NMR (szénhidrát rész, MeOD) δ ppm: 3,85 (H_4, H_5); 3,88 (H_3); 3,99 (H_2); 4,02 (H_4', H_5'); 4,12 (H_2'); 4,23 (H_3'); 4,17; 4,27 (H_6, H_6'); 5,76 (H_1, H_1').

^{13}C NMR (szénhidrát rész, MeOD) δ ppm: 61,6 (C_6, C_6'); 70,5 (C_4, C_5); 72,9 (C_2); 73,0 (C_3); 73,8 (C_2'); 77,0 (C_5'); 77,8 (C_3'); 78,1 (C_4'); 84,5 (C_1'); 100,8 (C_1).

Általános módszer az azido-származékok előállítására (66, 72, 84)

A megfelelő amino-származékot (**61, 62, 83**) piridinben oldottam és 2 ekvivalens Et_3N -t valamint 0,1 ekvivalens vizes réz(II)-szulfát oldatot (c = 10 mg/ml) adtam hozzá és a reakcióelegyet 0 °C-ra hűtöttem. 2,5 ekvivalens frissen készített trifluormetán-szulfonil-azid vízmentes piridines oldatát hozzáadva egy éjszakán át kevertetem szobahőmérsékleten. Meghígítottam vízmentes toluollal és az oldószereket csökkentett nyomáson elpárologtattam és kétszer száraz toluolt desztilláltam le a maradékról. A flash kromatográfiás tisztítást követően a megfelelő azido-származékhoz jutottam.

Azido-risztocetin-aglikon (66)

Tisztítás: toluol : metanol = 7 : 3

Hozam: 245 mg (58 %) halványbarna szilárd anyag.

MALDI-TOF MS: $[M+Na]^+ = 1222,6$ m/z. Számított ($C_{60}H_{49}N_9O_{19}Na$) 1222,3;

IR: 2115 cm^{-1} ; 1H NMR, ^{13}C NMR: Lásd 123. irodalmi hivatkozást.

Általános módszer a per-*O*-acetilezett propargil-glikozidok előállítására (69a-e)

A megfelelő cukrot (**67a-e**) szuszpendáltam 5 (monoszacharidok) illetve 10 (maltóz) mólekvalens propargil-alkoholban (**68**) és hozzáadtam a H₂SO₄ – szilikagél katalizátort (5 mg / 1 mmol cukor). A reakcióelegyet egy éjszakán át kevertetem 65 °C-on. A propargil-alkohol rotációs vákuumbepárlóval való eltávolítása után (a maltozid kivételével, ahol a nyersterméket acetileztem) oszlopkromatográfiásan elválasztottam a propargil-glikozidot a maradék kiindulási cukortól. A propargil-glikozidok acetilezését vízmentes piridinben végeztem 2 ekvivalens ecetsav-anhidridet és katalitikus mennyiségű DMAP-t alkalmazva. Oszlopkromatográfiás tisztítást követően a termékeket MALDI-TOF tömegspektrometriás módszerrel és ¹H-NMR segítségével karakterizáltam. Az eredményeket összevetve az irodalomban közölt adatokkal, azok jó egyezést mutattak.

Általános módszer a risztocetin-aglikon per-*O*-acetilezett szénhidrát-származékainak előállítására (70a-e)

Az azido-risztocetin-aglikon (**66**) és a 2 ekvivalens per-*O*-acetilezett propargil-glikozid (**69a-e**) DMF-dal készült oldatán argon gázt buborékolttam át 10 percen keresztül, hogy az oldatot oxigénmentesítsem. Ekvivalens mennyiségű Et₃N-t és 10 mólszázalék CuI-ot hozzáadva egy éjszakán át kevertetem szobahőmérsékleten. A rezet réz-szulfid formájában lecsaptam kevés kénhidrogént vezetve a reakcióelegybe. Az oldószer csökkentett nyomáson való eltávolítása után a maradékot oszlopkromatográfiásan tisztítottam.

Per-*O*-acetilezett α-D-glükózil származék (70a)

Tisztítás: CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1.

Hozam: 30 mg (45 %) barnássárga szilárd anyag.

MALDI-TOF MS: [M+Na]⁺ = 1608,6 m/z. Számított (C₇₇H₇₁N₉O₂₉Na) 1608,3. ¹H-NMR (d₄-MeOH, 500 MHz) δ: 7 (5b); 7,12 (x1); 4,74 (u1); 5,106 (H₁); 2,04; 2,01; 1,98; 1,96 (OAc). ¹³C-NMR (d₄-MeOH, 500 MHz) δ: 136,43 (5b); 65,2 (x1); 60,85 (u1); 95,45 (C₁); 19,6; 19,5; 19,4 (OAc).

Per-O-acetilezett α -D-mannozil származék (70b)

Tisztítás: toluol : MeOH = 7 : 3.

Hozam: 46 mg (39 %) barnássárga szilárd anyag.

MALDI-TOF MS: $[M+Na]^+ = 1608,6$ m/z. Számított ($C_{77}H_{71}N_9O_{29}Na$) 1608,3.

1H -NMR (d_4 -MeOH, 500 MHz) δ : 7,04 (5b); 7,196 (x1); 4,75 (u1); 4,942 (H₁); 2,123; 2,046; 2,033; 1,946 (OAc). ^{13}C -NMR (d_4 -MeOH, 500 MHz) δ : 136,1 (5b); 64,5 (x1); 60,36 (u1); 97 (C₁); 19,2; 19,4; 19,44; 19,33 (OAc).

Per-O-acetilezett α -D-maltozil származék (70c)

Tisztítás: CH₂Cl₂ : MeOH = 85 : 15.

Hozam: 30 mg (38 %) sárga szilárd anyag.

MALDI-TOF MS: $[M+Na]^+ = 1896,9$ m/z. Számított ($C_{89}H_{87}N_9O_{37}Na$) 1896,4. 1H -NMR (d_4 -MeOH, 500 MHz) δ : 7 (5b); 7,13 (x1); 4,76 (u1); 5,02 (H₁); 5,37 (H₁'); 2,11; 2,05; 2,04; 2 (OAc). ^{13}C -NMR (d_4 -MeOH, 500 MHz) δ : 136,4 (5b); 65,1 (x1); 60,71 (u1); 95,2 (C₁); 96 (C₁'); 19,8; 19,6; 19,5 (OAc).

Per-O-acetilezett *N*-acetyl- α -D-glükózaminil származék (70d)

Tisztítás: CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1 \rightarrow 8 : 2.

Hozam: 35 mg (53 %) halványsárga szilárd anyag.

MALDI-TOF MS: $[M+Na]^+ = 1607,4$ m/z. Számított ($C_{77}H_{72}N_{10}O_{28}Na$) 1607,4.

1H -NMR (d_4 -MeOH, 500 MHz) δ : 7,012 (5b); 7,2 (x1); 4,844 (H₁); 4,754 (u1); 2,043; 2,001; 1,95 (OAc); 1,834 (NHAc). ^{13}C -NMR (d_4 -MeOH, 500 MHz) δ : 135,94 (5b); 64,74 (x1); 96,56 (C₁); 60,28 (u1); 19,18; 19,14 (OAc); 20,97 (NHAc).

Per-O-acetilezett α -L-ramnozil származék (70e)

Tisztítás: toluol : MeOH = 7 : 3.

Hozam: 55 mg (43 %) sárga szilárd anyag.

MALDI-TOF MS: $[M+Na]^+ = 1550,5$ m/z. Számított ($C_{75}H_{69}N_9O_{27}Na$) 1550,3.

1H -NMR (d_4 -MeOH, 500 MHz) δ : 6,99 (5b); 7,11 (x1); 4,68 (u1); 4,75 (H₁); 3,75 (H₂); 3,67 (H₃); 3,58 (H₄); 3,5 (H₅); 1,17 (H₆). ^{13}C -NMR (d_4 -MeOH, 500 MHz) δ : 136,43 (5b); 65,11 (x1); 60 (u1); 100,21 (C₁); 70,97 (C₂); 70,08 (C₃); 71,14 (C₄); 68,89 (C₅); 16,72 (C₆).

Általános módszer a Zemplén-féle dezacetilezésre (71a-e)

A risztocetin-aglikon per-O-acetilezett cukor-származékát (**70a-e**) vízmentes metanolban oldottam, majd a pH-t ~ 8-ra állítottam be 1 M metanos natrium-metilát oldattal. A reakcióelegyet egy éjszakán át kevertetem szobahőmérsékleten. A pH-t 6-7-re állítottam be kationcserélő gyantával (Serdolit Red[®]). A gyantát kiszűrtem és metanollal mostam. Az oldószer csökkentett nyomáson való bepárlásával a risztocetin-aglikon dezacetilezett szénhidrát-származékát (**71a-e**) kaptam.

α-D-glükozil-származék (71a)

Hozam: 19 mg (96 %) barnás anyag.

MALDI-TOF MS: $[M+Na]^+ = 1440,4$ m/z. Számított ($C_{69}H_{63}N_9O_{25}Na$) 1440,3.

α-D-mannozil-származék (71b)

Hozam: 29 mg (95 %) barnás anyag.

MALDI-TOF MS: $[M+Na]^+ = 1440,5$ m/z. Számított ($C_{69}H_{63}N_9O_{25}Na$) 1440,3.

α-D-maltozil-származék (71c)

Hozam: 24 mg (95 %) barnás anyag.

MALDI-TOF MS: $[M+Na]^+ = 1601,9$ m/z. Számított ($C_{75}H_{73}N_9O_{30}Na$) 1602,4.

N-acetil-α-D-glükózaminil-származék (71d)

Hozam: 20 mg (87 %) sárgásbarna anyag.

MALDI-TOF MS: $[M+Na]^+ = 1481,5$ m/z. Számított ($C_{71}H_{66}N_{10}O_{25}Na$) 1481,3.

α-L-ramnozil-származék (71e)

Hozam: 36 mg (91 %) barnás színű anyag.

MALDI-TOF MS: $[M+Na]^+ = 1424,5$ m/z. Számított ($C_{69}H_{63}N_9O_{24}Na$) 1424,3.

Azido-teikoplanin-pszseudoaglikon (72)

A szintézist ld. korábban az „Általános módszer az azido-származékok előállítására” résznel.

Tisztítás: $CH_2Cl_2 : MeOH = 1 : 1$.

Hozam: 830 mg (77 %) halvány barna anyag.

MALDI-TOF MS: $[M+Na]^+ = 1449,5$ m/z; $[M-H+2Na]^+ = 1471,5$ m/z. Számított ($C_{66}H_{56}Cl_2N_{10}O_{23}Na$) 1449,3, ($C_{66}H_{56}Cl_2N_{10}O_{23}Na_2$) 1471,3. IR: 2113 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 500 MHz) δ : 1,85 (NHAc metilje); 2,91 / 3,33 (z2); 4,38 (G1); 5,07 (4f); 5,16 (x1); 5,4 (z6); 5,52 (4b). $^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -DMSO, 500 MHz) δ : 23,8 (NHAc metilje) 36,9 (z2); 63,7 (x1); 76,3 (z6); 99,5 (G1); 105,3 (4f); 108,7 (4b).

Azido-teikoplanin-pszepudoaglikon-metil-észter (81)

70 mg (0,01mmol) azido-teikoplanin-pszepudo-aglikont (72) oldottam 1,8 ml metanolban, majd 0,2 ml 0,5 M sósavas metanolt adtam hozzá és 2 órán át refluxoltattam. A reakcióelegyet betöményítettem és a maradékot oszlop-kromatográfiásan tisztítottam (toluol : metanol = 6 : 4). 30 mg (41 %) anyagot (81) kaptam.

MALDI-TOF MS: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 1463,4$ m/z. Számított ($\text{C}_{67}\text{H}_{58}\text{Cl}_2\text{N}_{10}\text{O}_{23}\text{Na}$) 1463,3.

IR: 2110 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (d_4 -MeOH, 500 MHz) δ : 1,89 (NHAc); 2,97 / 3,38 (z2); 3,84 (COOCH_3); 4,49 (G1); 5,19 (x1); 5,2 (4f); 5,39 (z6); 5,69 (4b). $^{13}\text{C-NMR}$ (d_4 -MeOH, 500 MHz) δ : 22,1 (NHAc); 37,1 (z2); 52 (COOCH_3); 64,6 (x1); 78,7 (z6); 101,2 (G1); 104,6 (4f); 108 (4b).

Teikoplanin-aglikon-metil-észter (83)

250 mg (0,18 mmol) teikoplanin-pszepudoaglikont (62) feloldottam 5,0 ml 90 %-os TFA-ban és $80\text{ }^\circ\text{C}$ -on kevertetem 5 órán keresztül. A reakcióelegyet hideg vízmentes éterre öntöttem és a kivált csapadékot kiszűrtem. A nyersterméket – tisztítás nélkül – 18 ml metanolban oldottam, majd 2,0 ml 0,5 M sósavas metanolt hozzáadva 4 órán át refluxoltattam. Az oldószer bepárlása után a maradékot oszlop-kromatográfiásan tisztítottam (CH_2Cl_2 : MeOH = 8 : 2) és 98 mg (45 %) halványsárga szilárd anyagot (83) kaptam.

MALDI-TOF MS: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 1234,4$ m/z. Számított ($\text{C}_{59}\text{H}_{47}\text{Cl}_2\text{N}_7\text{O}_{18}\text{Na}$) 1234,2. $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$: Lásd 123. irodalmi hivatkozást.

Azido-teikoplanin-aglikon-metil-észter (84)

Teikoplanin-aglikon-metil-észterből (83) kiindulva a szintézist ld. korábban az „Általános módszer az azido-származékok előállítására” résznél.

Tisztítás: CH_2Cl_2 : MeOH = 8 : 2.

Hozam: 72 mg (78 %) sárgás színű szilárd anyag.

MALDI-TOF MS: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 1260,5$ m/z. Számított ($\text{C}_{66}\text{H}_{56}\text{Cl}_2\text{N}_{10}\text{O}_{23}\text{Na}$) 1260,2. IR: 2116 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$: Lásd 123. irodalmi hivatkozást.

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 500 MHz) δ : 3,83 (COOCH_3).

Általános módszer a triazol-származékok előállítására

A megfelelő azid és 1,2 ekvivalens propargil-éter vízmentes DMF-dal készült oldatán argon gázt buborékolttam át 10 percig, majd 1 ekvivalens Et₃N-t és 0,1 ekvivalens CuI-ot adtam hozzá. A reakcióelegyet egy éjszakán át kevertettem szobahőmérsékleten. A rezet réz-szulfid formájában lecsaptam úgy, hogy kevés kénhidrogén gázt vezettem a reakcióelegybe. Az oldószer csökkentett nyomáson való eltávolítása után a maradékot oszlopkromatográfiásan tisztítottam.

79

Tisztítás: CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1.

Hozam: 67 mg (64 %).

MALDI-TOF MS: [M+Na]⁺ = 1418,9 m/z. Számított (C₇₃H₇₃N₉O₂₀Na) 1418,5. ¹H-NMR (d₆-DMSO, 500 MHz) δ: 0,85 (D10); 1,2 (Me3); 3,69 (COOCH₃); 4,13 (x6); 4,2 (u1); 5,12 (z2); 5,14 (z6); 5,28 (4f); 5,62 (4b); 7,1 (5b); 7,35 (x1); 8,1 (u3); 8,29 (2b). ¹³C-NMR (d₆-DMSO, 500 MHz) δ: 9,13 (Me3); 14,6 (D10); 52,6 (COOCH₃); 62,8 (x6); 65,1 (u1); 65,3 (x1); 71,8 (z6); 72,6 (z2); 106,3 (4f); 107,9 (4b); 129,5 (2b, u3); 136,4 (5b).

80

Tisztítás: CH₂Cl₂ : MeOH = 10 : 1.

Hozam: 113 mg (54 %).

MALDI-TOF MS: [M+Na]⁺ = 1430,9 m/z. Számított (C₇₅H₆₁N₉O₂₀Na) 1430,4. ¹H-NMR (d₆-DMSO, 500 MHz) δ: 1,18 (Me3); 3,7 (COOCH₃); 4,13 (x6); 5,12 (z2); 5,15 (z6); 5,29 (4f); 5,61 (4b); 7,1 (bifenil); 7,11 (5b); 7,29 (x1); 7,42 (bifenil); 7,57 (bifenil); 7,6 (bifenil); 7,95 (u3); 8,13 (2b). ¹³C-NMR (d₆-DMSO, 500 MHz) δ: 9,41 (Me3); 52,7 (COOCH₃); 62,7 (x6); 64,8 (x1); 71,8 (z6); 72,6 (z2); 106,3 (4f); 107,9 (4b); 115,7 (bifenil); 125,5 (u3); 126,8 (bifenil); 128,4 (bifenil); 129,6 (2b, bifenil); 136,5 (5b).

77

Tisztítás: toluol : MeOH = 1 : 1.

Hozam: 115 mg (71 %).

MALDI-TOF MS: [M+Na]⁺ = 1645,4 m/z, [M-H+2Na]⁺ = 1667,5 m/z. Számított (C₇₉H₈₀Cl₂N₁₀O₂₄Na) 1645,5; (C₇₉H₈₀Cl₂N₁₀O₂₄Na₂) 1667,5. ¹H-NMR (d₆-DMSO, 500 MHz) δ: 0,85 (D10); 1,22 (D3-D8); 1,24 (D9); 1,44 (D2); 1,86 (NHAc); 2,84 / 3,25 (z2); 3,09 (G5); 3,24 (G4); 3,36 (D1); 3,39 (G3); 3,55 (G2); 3,63 (G6); 4,12 (x6); 4,3 (x7); 4,37 (x5); 4,38

(G1); 4,4 (u1); 4,98 (x2); 5,11 (4f); 5,37 (x3); 5,4 (z6); 5,56 (4b); 5,61 (x4); 6,29 (7d); 6,32 (3b); 6,33 (3d); 6,49 (7f); 6,59 (3f); 6,63 (5e); 6,65 (5f); 6,72 (1f); 6,89 (1e); 6,95 (1b); 7,03 (2e); 7,06 (x1); 7,09 (5b); 7,16 (2b); 7,25 (6f; 6e); 7,67 (u3); 7,7 (2f); 7,83 (6b).

^{13}C -NMR (d_6 -DMSO; 500 MHz) δ : 14,8 (D10); 22,93 (D9); 23,92 (NHAc); 26,47 (D3); 29,51 (D7); 29,64 (D6); 29,79 (D5); 29,81 (D4); 29,89 (D2); 32,12 (D8); 37,73 (z2); 54,38 (x5); 55,41 (x4); 56,12 (x2); 56,55 (G2); 59,56 (x3); 60,3 (x7); 60,55 (G6); 61,71 (x6); 64 (u1); 65,27 (x1); 70,4 (G4); 70,41 (D1); 74,11 (G3); 76,95 (z6); 77,7 (G5); 100,16 (G1); 102,5 (7d); 104,56 (3f); 105,23 (3d); 105,36 (4f); 108,76 (7f); 108,76 (4b); 110,61 (3b); 117,3 (5e); 118,69 (7b); 119,68 (1e); 120,78 (1b); 123,05 (5c); 124,07 (6e); 124,85 (u3); 125,37 (2e); 126,18 (5a); 126,18 (5f); 126,28 (2c); 126,4 (1f); 127,52 (6c); 127,64 (4a); 129,07 (6f); 129,3 (1a); 129,76 (6b); 131,38 (2b); 132,09 (2f); 135,18 (4d); 136,09 (7a); 136,09 (2a); 137,07 (5b); 139,26 (3a); 140,36 (1c); 142,62 (6a); 144,72 (1d); 144,72 (u2); 148,29 (4e); 148,84 (4c); 150,26 (6d); 151,89 (2d); 156,48 (5d); 156,7 (7c); 157,72 (3e); 159,05 (7e); 159,22 (3c); 166,93 (y6); 167,98 (y3); 169,42 (y5); 170,02 (y2); 170,41 (y4); 170,51 (y7); 175,04 (y1).

78

Tisztítás: toluol : MeOH = 6 : 4.

Hozam: 40 mg (49 %).

MALDI-TOF MS: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 1657,6$ m/z, $[\text{M}-\text{H}+2\text{Na}]^+ = 1679,6$ m/z. Számított ($\text{C}_{81}\text{H}_{68}\text{Cl}_2\text{N}_{10}\text{O}_{24}\text{Na}$) 1657,4; ($\text{C}_{81}\text{H}_{68}\text{Cl}_2\text{N}_{10}\text{O}_{24}\text{Na}_2$) 1679,4. ^1H -NMR (d_6 -DMSO, 500 MHz) δ : 2,85 / 3,26 (z2); 4,39 (G1); 5,1 (4f); 5,42 (z6); 5,55 (4b); 7,1 (x1, bifenil); 7,42; 7,58; 7,6 (bifenil). ^{13}C -NMR (d_6 -DMSO, 500 MHz) δ : 37,6 (z2); 65,3 (x1); 76,6 (z6); 100 (G1); 105,1 (4f); 108,6 (4b); 115,8; 126,9; 128,4; 129,6 (bifenil).

82

Tisztítás: toluol : MeOH = 7 : 3.

Hozam: 44 mg (45 %).

MALDI-TOF MS: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 1659,8$ m/z. Számított ($\text{C}_{80}\text{H}_{82}\text{Cl}_2\text{N}_{10}\text{O}_{24}\text{Na}$) 1659,5. ^1H -NMR (d_4 -MeOH, 500 MHz) δ : 0,9 (D10); 1,97 (NHAc); 3,04 / 3,41 (z2); 3,84 (COOCH_3); 4,51 (G1); 5,24 (4f); 5,4 (z6); 5,79 (4b); 6,94 (x1); 7,68 (u3). ^{13}C -NMR (d_4 -MeOH, 500 MHz) δ : 13 (D10); 21,7 (NHAc); 35,9 (z2); 51,5 (COOCH_3); 65,03 (x1); 77,9 (z6); 100,3 (G1); 104,4 (4f); 108,1 (4b); 123,7 (u3).

85

Tisztítás: CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1.

Hozam: 25 mg (44 %).

MALDI-TOF MS: [M+Na]⁺ = 1456,5 m/z. Számított (C₈₀H₈₂Cl₂N₁₀O₂₄Na) 1456,4. ¹H-NMR (d₄-MeOH, 500 MHz) δ: 0,9 (D10); 3,07 / 3,46 (z2); 3,82 (COOCH₃); 5,28 (4f); 5,3 (z6); 5,77 (4b); 6,92 (x1); 7,67 (u3). ¹³C-NMR (d₄-MeOH, 500 MHz) δ: 13 (D10); 35,7 (z2); 51,4 (COOCH₃); 64,8 (x1); 71,5 (z6); 104,5 (4f); 108,1 (4b); 123,5 (u3).

1-(Prop-2-iniloxi)dekán (75)

1,2 g (30 mmol) nátrium-hidrid (60 %-os olajos diszperzió) 30 ml dioxánnal készült szuszpenziójához kis részletekben hozzáadtam 3,16 g (20 mmol) 1-dekanol (73) dioxános oldatát (10 ml). 3,3 ml (22 mmol, 80 m/v %-os) toluolos propargil-bromid-oldatot hozzáadva, a reakcióelegyet egy éjszakán át kevertetem szobahőmérsékleten. 20 ml vizet hozzáadva 10 percig intenzíven kevertetem, majd az oldószereket vákuumban elpárologtattam. A maradékot 150 ml diklór-metánban oldottam és 2 x 50 ml vízzel extraháltam. A szerves fázist vízmentes Na₂SO₄-on szárítottam, szűrtem és bepároltam. A maradék olajszerű anyagot oszlopkromatográfiásan tisztítva (hexán : éter = 95 : 5) 1,3 g (33 %) sárga olajat (75) kaptam. ¹H-NMR (CDCl₃, 360 MHz) δ: 0,88 (t, 3 H); 1,26 (m, 14 H); 1,59 (m, 2 H); 2,41 (t, 1 H); 3,51 (t, 2 H); 4,13 (d, 2 H). ¹³C-NMR (CDCl₃, 90 MHz) δ: 14,1; 22,6; 26,1; 29,2; 29,4; 29,5; 31,8; 57,9; 70,2; 73,9; 74,0.

4-(Prop-2-iniloxi)bifenil (76)

3,4 g (20 mmol) 4-fenil-fenol (74) 40 ml vízmentes DMF-dal készült oldatához 5,5 g (40 mmol) finomra porított kálium-karbonátot és 4,5 ml (30 mmol, 80 m/v %-os) toluolos propargil-bromid-oldatot adtam. A reakcióelegyet 3 órán át kevertetem 60 °C-on, majd bepároltam. A maradékot meghígítottam 25 ml vízzel és 3 x 50 ml diklór-metánnal extraháltam. A szerves fázist vízmentes Na₂SO₄-on szárítottam, szűrtem és bepároltam. Oszlopkromatográfiás tisztítás (hexán : etil-acetát = 95 : 5) után 3,07 g (74 %) fehér kristályos anyagot (76) kaptam.

Olvadáspont: 81-83 °C. ¹H NMR (CDCl₃, 360 MHz) δ: 2,49 (t, 1 H); 4,67 (d, 2 H); 7,00-7,53 (m, 9 H). ¹³C NMR (CDCl₃, 90 MHz) δ: 55,6; 55,7; 55,8; 75,5; 75,6; 78,5; 115,1; 126,6; 126,7; 128,0; 128,7; 134,5; 140,5; 156,9.

Irodalomjegyzék

1. Marshall, F. J.; Structure Studies on Vancomycin. *J. Med. Chem.*, **1965**, 8, 18-22.
2. Williams, D. H.; Kalman, J. R.; Structural and Mode of Action Studies on the Antibiotic Vancomycin. Evidence from 270-MHz Proton Magnetic Resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 2768-2774.
3. Sheldrick, G. M.; Jones, P. G.; Kennard, O.; Williams, D. H.; Smith, G. A. Structure of Vancomycin and its Complex with Acetyl-D-alanyl-D-alanine. *Nature*. **1978**, 271, 223-225.
4. Harris, C. M.; Harris, T. M. Structure of the Glycopeptide Antibiotic Vancomycin. Evidence for an Asparagine Residue in the Peptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 4293-4295.
5. Sztaricskai, F.; Neszmélyi, A.; Bognár, R. Structural Investigation of the Antibiotic Ristomycin A: The ¹³C-NMR Evidence on the Carbohydrate Moieties and their Linkages to the Aglycone. *Tetrahedron Lett.* **1980**, 21, 2983-2986.
6. Scheldrick, G. M.; Paulus, E.; Vértesy, L.; Hahn, F. Structure of Ureido-Balhimycin. *Acta Crystallogr. Sect. B.* **1995**, 51, 89-98.
7. Loll, P. J.; Miller, R.; Weeks, C. M.; Axelsen, P. H. A Ligand-Mediated Dimerization Mode for Vancomycin. *Chem Biol.* **1998**, 5, 293-298.
8. Levine, D. P. Vancomycin: A History. *Clin. Infect. Dis.* **2006**;42, S5-S12.
9. Parenti, F.; Beretta, G.; Berti, M.; Arioli, V. Teichomycins, new Antibiotics from *Actinoplanes Teichomyceticus* Nov. Sp. I. Description of the Producer Strain, Fermentation Studies and Biological Properties. *J. Antibiot.* **1978**, 31, 276-283.
10. Cometti, A.; Gallo, G. G.; Kettenring, J.; Panzone, G. B.; Tuan, G.; Zerilli, L. F. Isolation and Structure Determination of the Main Related Substances of Teicoplanin, a Glycopeptide Antibiotic. *Farmaco Sci.* **1988**, 43, 1005-1018.
11. Targocid[®] 400 mg injekció alkalmazási előírata. www.pharmindex.hu
12. Gangarosa, E. J.; Johnson, T. R.; Ramos, H. S. Ristocetin-Induced Thrombocytopenia: Site and Mechanism of Action. *Arch. Intern. Med.* **1960**, 105, 83-89.
13. Howard, M. A.; Firkin, B. G. Ristocetin a new Tool in the Investigation of Platelet Aggregation. *Thromb. Diathesis Haemorrh.* **1971**, 26, 362-369.
14. Boda, Z.; Solum N. O.; Sztaricskai, F.; Rák, K. Study of Platelet Agglutination Induced by the Antibiotics of the Vancomycin Group: Ristocetin (Ristomycin), Actinoidin and Vancomycin. *Thrombos. Haemostas.* **1980**, 42, 1164-1179.

15. Bardsley, B.; Williams, D. H.; Baglin, T. P. Cleavage of Rhamnose from Ristocetin A Removes its Ability to Induce Platelet Aggregation. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 1998, 9, 241-244.
16. Walsh, C. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. ASM Press, **2003**, 23-40.
17. Walsh, C. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. ASM Press, **2003**, 45-48.
18. Reynolds, P. E. Studies on the Mode of Action of Vancomycin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1961**, 52, 403-405.
19. Jordan, D. C. Effect of Vancomycin on the Synthesis of the Cell Wall and Cytoplasmic Membrane of *Staphylococcus aureus*. *Can. J. Microbiol.* **1961**, 11, 390-393.
20. Wallace, C.; Strominger, J. L. Ristocetin, Inhibitors of Cell Wall Synthesis in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **1963**, 233, 2264-2266.
21. Perkins, H. R. Specificity of Combination Between Mucopeptide Precursors and Vancomycin and Ristocetin. *Biochem. J.* **1969**, 111, 195-205.
22. Nieto, M.; Perkins, H. R. Physicochemical Properties of Vancomycin and Iodovancomycin and their Complexes with Diacetyl-L-lysyl-D-alanyl-D-alanine. *Biochem. J.* **1971**, 123, 773-787.
23. Kalman, J. R.; Williams, D. H. An NMR Study of the Structure of the Antibiotic Ristocetin A. The Negative Nuclear Overhauser Effect in Structure Elucidation. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 897-905.
24. Williams, D. H.; Butcher, D. W. Binding Site of the Antibiotic Vancomycin for a Cell-Wall Peptide Analogue. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 5700-5704.
25. Walsh, C. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. ASM Press, **2003**, 148-155.
26. Selva, E.; Ciabatti, R.; Denaro, M. Int. Patent *WO 88 / 02755*, **1988**.
27. Gerhard, U.; Mackay, J. P.; Maplestone, R. A.; Williams, D. H. The Role of the Sugar and Chlorine Substituents in the Dimerization of Vancomycin Antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 232-237.
28. Nagarajan, R.; Schabel, A. A.; Selective Cleavage of Vancosamine, Glucose, and *N*-methyl Leucine from Vancomycin and Related Antibiotics. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 1306-1307.
29. Malabarba, A.; Parenti, F. Semi-Synthetic Teicoplanin Antibiotics. *Current Antimicrob. Patents.* **1990**, 2, 263-287.

30. Malabarba, A.; Ciabatti, R.; Kettenring, J.; Ferrari, P.; Scotti, R.; Goldstein, B. P.; Denaro, M. Amides of De-Acetylglucosaminyl-Deoxy Teicoplanin Active Against Highly Glycopeptide-Resistant Enterococci. Synthesis and Antibacterial Activity. *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 1493-1506.
31. Malabarba, A.; Ciabatti, R.; Scotti, R.; Goldstein, B. P.; Ferrari, P.; Kurz, M.; Andreini, B. P.; Denaro, M. New Semisynthetic Glycopeptides MDL 63, 246 and MDL 63, 042, and Other Amide Derivatives of Antibiotic A-40, 926 Active against Highly Glycopeptide-resistant VanA Enterococci. *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 869-883,
32. Nagarajan, R.; Structure-Activity Relationships of Vancomycin-type Glycopeptide Antibiotics. *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1181-1195.
33. Nagarajan, R.; Schabel, A. A.; Oocolowitz, J. L.; Counter, F. T.; Ott, J. L. Synthesis and Antibacterial Activity of *N*-Acyl Vancomycins. *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 1430-1438.
34. Cooper, R. D. G.; Snyder, N. J.; Zweifel, M. J.; Staszak, M. A.; Wilkie, S. C.; Nicas, T. I.; Mullen, D. L.; Butler, T. F.; Rodriguez, M. J.; Huff, B. E.; Thompson, R. C. *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 575-581.
35. Ghosh, M.; Miller, M. J. Synthesis and in vitro Antibacterial Activity of Spermidine-Based Mixed Catechol- and Hydroxamate-Containing Siderophor-Vancomycin Conjugates. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 43-48.
36. Pavlov, A. Y.; Berdnikova, T. F.; Olsufyeva, E. N.; Lazhko, E. I.; Malkova, I. V.; Preobrazhenskaya, M. N.; Testa, R. T.; Petersen, P. J. Synthesis and Biological Activity of Derivatives of Glycopeptide Antibiotics Eremomycin and Vancomycin Nitrosated, Acylated or Carbamoylated at the N-Terminal. *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1731-1739.
37. Malabarba, A.; Ciabatti, R.; Scotti, R.; Goldstein, B. P. Octapeptide Derivatives of Teicoplanin Antibiotics. *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 661-667.
38. Barna, C. J. C.; Williams, D. H.; Williamson, M. P. Structural Features that Affect the Binding of Teicoplanin, Ristocetin A, and their Derivatives to the Bacterial Cell-Wall Model *N*-acetyl-d-alanyl-d-alanine. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1989**, 254-256.
39. Trani, A.; Ferrari, P.; Pallanza, R.; Ciabatti, R. Thioureas and Isothiouronium Salts of the Aglycone of Teicoplanin, I. Synthesis and Biological Activity. *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1268-1275.
40. Malabarba, A.; Trani, A.; Kettenring, J.; Gerli, E.; Pallanza, R.; Berti, M.; Cavalleri, B. N^{15} -Alkyl and N^{15} , N^{15} -Dialkyl Derivatives of Teicoplanin Antibiotics. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1107-1121.

41. Sundram, U. N.; Griffin, J. H. General and Efficient Method for the Solution- and Solid-Phase Synthesis of Vancomycin Carboxamide Derivatives. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1102–1103.
42. Malabarba, A.; Trani, A.; Ferrari, P.; Pallanza, R.; Cavalleri, B. Synthesis and Biological Activity of Some Esters of the N-Acetylglucosaminyl Aglycone and of the Aglycone of Teicoplanin. *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 1572-1587.
43. Malabara, A., Ciabatti, R. Int. Patent WO 9210517, **1992**.
44. Malabarba, A.; Ciabatti, R.; Kettenring, J.; Scotti, R.; Candiani, G.; Pallanza, R.; Berti, M.; Goldstein, B. P. Synthesis and Antibacterial Activity of a Series of basic Amides of Teicoplanin and Deglucoteicoplanin with Polyamines. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4054-4060.
45. Biavasco, F.; Lupidi, R.; Varaldo, P. E. In vitro Activities of three Semisynthetic Amide Derivatives of Teicoplanin, MDL 62208, MDL 62211, and MDL 62873. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 331-338.
46. Berti, M.; Candiani, G.; Borgonovi, M.; Landini, P.; Ripamonti, F.; Scotti, R.; Cavenaghi, L.; Denaro, M.; Goldstein, B. P. Antimicrobial Activity of MDL 62,873, a Semisynthetic Derivative of Teicoplanin, in vitro and in experimental Infections. *Antimicrob Agents Chemother.* **1992**, *36*, 446-452.
47. Hancock, R. E.; Farmer, S. W. Mechanism of Uptake of Deglucoteicoplanin Amide Derivatives Across outer Membranes of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother.* **1993**, *37*, 453-456.
48. Pitkin, D. H.; Mico, B. A.; Sitrin, R. D.; Nisbet, L. J. Charge and Lipophilicity Govern the Pharmacokinetics of Glycopeptide Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* **1986**, *29*, 440-444.
49. Malabarba, A.; Ferrari, P.; Cietto, G.; Pallanza R.; Berti, M. Synthesis and Biological Activity of N⁶³-Carboxypeptides of Teicoplanin and Teicoplanin Aglycone. *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1800-1816.
50. Seneci, P.; Trani, A.; Ferrari, P.; Scotti, R.; Ciabatti, R. Synthesis and Biological Activity of O56-Substituted Carboxyesters and Carboxamides of Teicoplanin Aglycone. *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 1633-1644.
51. Mackay, J. P.; Gerhard, U.; Beauregard, D. A.; Maplestone, R. A.; Williams, D. H. Dissection of the Contributions toward Dimerization of Glycopeptide Antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4573-4580.

52. Zmijewski, M. J.; Logan, R. M.; Marconi, G.; Debono, M.; Molloy, R. M.; Chadwell, F.; Briggs, B. Biotransformation of Vancomycin B to Vancomycin Hexapeptide by a Soil Microorganism. *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 203-206.
53. Cavalleri, B.; Ferrari, P.; Malabarba, A.; Magni, A.; Pallanza, R.; Gallo, G. G. Teicoplanin, Antibiotics from Actinoplanes Teichomyceticus Nov. Sp. VIII. Opening of the Polypeptide Chain of Teicoplanin Aglycone under Hydrolytic Conditions. *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 49-59.
54. Malabarba, A.; Ciabatti, R.; Kettenring, J.; Ferrari, P.; Vékey, K.; Bellasio, E.; Denaro, M. Structural Modifications of the Active Site in Teicoplanin and Related Glycopeptides. 1. Reductive Hydrolysis of the 1,2- and 2,3-Peptide Bonds. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2137-2150.
55. Barna, J. C. J.; Williams, D. H.; Strazzolini, P.; Malabarba, A.; Leung, T.-W. C. Structure and Conformation of Epimers Derived from the Antibiotic Teicoplanin. *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 1204-1208.
56. Beauregard, D. A.; Williams, D. H.; Gwynn, M. N.; Knowles, D. J. C.; Dimerization and Membrane Anchors in Extracellular Targeting of Vancomycin Group of Antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 781-785.
57. Loll, P. J.; Derhovanessian, A.; Shapovalov, M. V.; Kaplan, J.; Yang, L.; Axelsen, P. H.; Vancomycin Forms Ligand-Mediated Supramolecular Complexes. *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 200-211.
58. Linsdell, H.; Toiron, C.; Bruix, M.; Rivas, G.; Menéndez, M. Dimerization of A82846B, Vancomycin and Ristocetin: Influence on Antibiotic Complexation with Cell Wall Model Peptides. *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 181-193.
59. Cho, Y. R.; Maguire, A. J.; Try, A. C.; Westwell, M. S.; Groves, P.; Williams, D. H.; Cooperativity and anti-Cooperativity between Ligand binding and the Dimerization of Ristocetin A: Asymmetry of a Homodimer Complex and Implications for Signal transduction. *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 207-215.
60. Uma N. Sundram and John H. Griffin, Thalia I. Nicas, Novel Vancomycin Dimers with Activity against Vancomycin-Resistant Enterococci, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13107-13108.
61. Staroske, T.; Williams, D. H. Synthesis of Covalent Head-to-Tail Dimers of Vancomycin. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4917-4920.

62. Adamczyk, M.; Moore, J. A.; Rege, S. D.; Yu, Z. Investigations into Self-Association of Vancomycin Covalent Dimers Using Surface Plasmon Resonance Technology. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2437-2440.
63. Nicolaou, K. C.; Hughes, R.; Cho, S. Y.; Winssinger, N.; Labischinski, H.; Endermann, R. Synthesis and Biological Evaluation of Vancomycin Dimers with Potent Activity against Vancomycin-Resistant Bacteria: Target-Accelerated Combinatorial Synthesis. *Chem. Eur J.* **2001**, *7*, 3824-3843.
64. Sztaricskai, F.; Batta, Gy.; Dinya, Z. Chemical Modification of the Eremomycin Antibiotic. Formation of a Cyclic Covalent Dimer. *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 314-319.
65. a, Arimoto, H.; Nishimura, K.; Kinumi, T.; Hayakawa, I.; Uemura, D. Multi-Valent Polymer of Vancomycin: Enhanced Antibacterial Activity against VRE. *Chem. Commun.* **1999**, 1361-1362.
- b, Arimoto, H.; Oishi, T.; Nishijima, M.; Kinumi, T. Affinity of a Vancomycin Polymer with Bacterial Surface Models. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3347-3350.
66. Xing, B.; Ho, P. L.; Yu, C. W.; Chow, K. H.; Gu, H.; Xu, B. Self-Assembled Multivalent Vancomycin on cell Surfaces against Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE). *Chem. Commun.* **2003**, 2224-2225.
67. Xing, B.; Yu, C. W.; Ho, P. L.; Chow, K. H.; Cheung, T.; Gu, H.; Cai, Z.; Xu, B. Multivalent Antibiotics via Metal Complexes: Potent Divalent Vancomycins against Vancomycin-Resistant Enterococci. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4904-4909.
68. Gu, H.; Ho, P. L.; Tong, E.; Wang, L.; Xu, B. Presenting Vancomycin on Nanoparticles to Enhance Antimicrobial Activities. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1261-1263.
69. QingShan, W.; Jian, J.; JinHong, F.; JiaCong, S. Norvancomycin-Capped Silver Nanoparticles: Synthesis and Antibacterial Activities against E. coli. *Sci. China Ser. B-Chem.* **2007**, *50*, 418-424.
70. Greenwald, R. B.; Zhao, H.; Peng, P.; Longley, C. B.; Dai, Q. H.; Xia, J.; Martinez, A. An Unexpected Amide Bond Cleavage: Poly(ethylene glycol) Transport Forms of Vancomycin. 2. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 798-804.
71. Pace, J. L.; Yang, G. Glycopeptides: Update on an Old Successful Antibiotic Class. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 968-980.
72. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a few Good Reactions. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.

73. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *3*, 3057-3064.
74. Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. CuI-Catalyzed Alkyne-Azide „Click” Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 51-68.
75. Binder, W. H.; Kluger, C.; Azide/Alkyne-„Click” Reactions: Applications in Material Science and Organic Synthesis. *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 1791-1815.
76. Lipshutz, B. H.; Taft, B. R. Heterogeneous Copper-in Charcoal-Catalyzed Click Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 8235-8238.
77. Yadav, J. S.; Subba Reddy, B. V.; Madhusudhan Reddy, G.; Chary, N. Three Component, Regioselective, One-Pot Synthesis of β -Hydroxytriazoles from Epoxides via 'Click Reactions'. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 9773-9776.
78. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
79. Angell, Y.; Burgess, K. Base Dependence in Copper-Catalyzed Huisgen Reactions: Efficient Formation of Bistriazoles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3649-3651.
80. Wu, Y.-M.; Deng, J.; Li, Y. L.; Chen, Q.-Y. Regiospecific Synthesis of 1,4,5-Trisubstituted-1,2,3-triazole via One-Pot Reaction Promoted by Copper(I) Salt. *Synthesis*, **2005**, 1314-1318.
81. Chen, W.-I.; Su, C.-I.; Huang, X. An Efficient Access to 4-alkylidene-5,6-dihydro-4H-pyrrolo[1,2-c][1,2,3]triazoles. *Synlett* **2006**, *9*, 1446-1448.
82. Tao, C.-Z.; Cui, X.; Li, J.; Liu, A.-X.; Liu, L.; Guo, Q.-X. Copper-Catalyzed Synthesis of Aryl Azides and 1-Aryl-1,2,3-Triazoles from Boronic Acids. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3525-3529.
83. Barral, K.; Moorhouse, A. D.; Moses, J. E. Efficient Conversion of Aromatic Amines into Azides: a One-Pot Synthesis of Triazole Linkages. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1809-1811.
84. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.

85. Tornøe, C. W.; Sanderson, S. J.; Mottram, J. C.; Coombs, G. H.; Meldal, M.; Combinatorial Library of Peptidotriazoles: Identification of [1,2,3]-triazole Inhibitors against a Recombinant *Leishmania mexicana* Cysteine Protease. *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 312–324.
86. Brik, A.; Muldoon, J.; Lin, Y.-C.; Elder, J. H.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Wong, C.-H. Rapid Diversity-Oriented Synthesis in Microtiter Plates for in situ Screening of HIV Protease Inhibitors. *Chem. BioChem.* **2003**, *4*, 1246-1248.
87. Wang, J.; Uttamchandani, M.; Li, J.; Hu, M.; Yao, S. Q. Rapid Assembly of Matrix Metalloprotease Inhibitors Using Click Chemistry. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3821-3824.
88. Srinivasan, R.; Uttamchandani, M.; Yao, S. Q. Rapid Assembly and in situ Screening of Bidentate Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatases. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 713-716.
89. Xu, C. Y.; Huang, M. Z. An Approach to New Water-Soluble Oligo(ethylene glycol) Camptothecin Analogues by 1,3-Dipolar Cycloaddition. *Chin. Chem. Lett.* **2006**, *17*, 883-886.
90. Zhang, G.; Fang, L.; Zhu, L.; Sun, D.; Wang Peng, G. Syntheses and Biological Activity of Bisdaunorubicins. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 426-34.
91. Pore, V. S.; Aher, N. G.; Kumar, M.; Shukla, P. K. Design and Synthesis of Fluconazole/Bile Acid Conjugate Using Click Reaction. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11178-11186.
92. Reck, F.; Zhou, F.; Girardot, M.; Kern, G.; Eyermann, C. J.; Hales, N. J.; Rona, R. Identification of 4-Substituted 1,2,3-Triazoles as Novel Oxazolidinone Antibacterial Agents with Reduced Activity against Monoamine Oxidase A. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 499–506.
93. Fu, X.; Albermann, C.; Zhang, C.; Thorson, J. S. Diversifying Vancomycin via Chemoenzymatic Strategies. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1513-1515.
94. Roice, M.; Johannsen, I.; Meldal, M. High Capacity Poly(ethylene glycol) Based Amino Polymers for Peptide and Organic Synthesis. *QSAR Comb. Sci.* **2004**, *23*, 662-676.
95. Bodine, K. D.; Gin, D. Y.; Gin, M. S. Synthesis of Readily Modifiable Cyclodextrin Analogues via Cyclodimerization of an Alkynyl-Azido Trisaccharide. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1638-1639.
96. Burley, G. A.; Gierlich, J.; Mofid, M. R.; Nir, H.; Tal, S.; Eichen, Y.; Carell, T. Directed DNA Metallization. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1398-1399.

97. Gierlich, J.; Burley, G. A.; Gramlich, P. M. E.; Hammond, D. M.; Carell, T. Click Chemistry as a Reliable Method for the High-Density Postsynthetic Functionalization of Alkyne-Modified DNA. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639-3642.
98. Krasia, T. C.; Steinke, J. H. G.; Formation of Oligotriazoles Catalyzed by Cucurbituril, *Chem. Commun.* **2002**, 22-23.
99. a) Tsarevsky, N. V.; Sumerlin, B. S.; Matyjaszewski, K. Step-Growth "Click" Coupling of Telechelic Polymers Prepared by Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* **2005**, *38*, 3558-3561.
b) Sumerlin, B. S.; Tsarevsky, N. V.; Louche, G.; Lee, R. Y.; Matyjaszewski, K. Highly Efficient "Click" Functionalization of Poly(3-azidopropyl methacrylate) Prepared by ATRP. *Macromolecules* **2005**, *38*, 7540-7545.
100. Altintas, O.; Hizal, G.; Tunca, U. ABC-Type Hetero-Arm Star Terpolymers through "Click" Chemistry. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2006**, *44*, 5699-5707.
101. Gao, H.; Min, K.; Matyjaszewski, K. Synthesis of 3-Arm Star Block Copolymers by Combination of "Core-first" and "Coupling-onto" Methods Using ATRP and Click Reactions. *Macromol. Chem. Phys.* **2007**, *208*, 1370-1378.
102. Binder, W. H.; Kluger, C. Combining Ring-Opening Metathesis Polymerization (ROMP) with Sharpless-Type "Click" Reactions: An Easy Method for the Preparation of Side Chain Functionalized Poly(oxynorbornenes). *Macromolecules* **2004**, *37*, 9321-9330.
103. Helms, B.; Mynar, J. L.; Hawker, C. J.; Frechet, J. M. J. Dendronized Linear Polymers via "Click Chemistry". *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15020-15021.
104. Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G., Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192-3193.
105. Wanner, J.; Tang, D.; McComas, C. C.; Crowley, B. M.; Jiang, W.; Moss, J.; Boger, D. L. A New and Improved Method for Deglycosidation of Glycopeptide Antibiotics Exemplified with Vancomycin, Ristocetin, and Ramoplanin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1169-1173.
106. a) Hunsen, M.; Long, D. A.; D'Ardenne, C. R.; Smith, A. L. Mild One-pot Preparation of Glycosyl Bromides. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 2670-2674.
b) Kühne, M.; Györgydeák, Z.; Lindhorst, T. K. A Simple Method for the Preparation of Glycosyl Isothiocyanates. *Synthesis* **2006**, *6*, 949-951.

107. Zemplén, G.; Gerecs, Á.; Hadácsi, I. Saponification of Acetylated Carbohydrates. *Chem. Ber.* **1936**, *69*, 1827-1830.
108. Yan, R.-B.; Yang, F.; Wu, Y.; Zhang, L.-H.; Ye, X.-S. An Efficient and Improved Procedure for Preparation of Triflyl Azide and Application in Catalytic Diazotransfer Reaction. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8993-8995.
109. Roy, B.; Mukhopadhyay, B. Sulfuric Acid Immobilized on Silica: an Excellent Catalyst for Fischer Type Glycosylation. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3783-3787.
110. Naesens, L.; Vanderlinden, E.; Róth, E.; Jekő, J.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Panneconque, C.; Illyés, E.; Batta, G.; Herczegh, P.; Sztaricskai, F. Anti-influenza Virus Activity and Structure-Activity Relationship of Aglycoristocetin Derivatives with Cyclobutene-dione Carrying Hydrophobic Chains. *Antiviral Res.* **2009**, *82*, 89-94.
111. Ghidán, Á.; Jeney, Cs.; Maródi, L. Cs.; Csiszár, K.; Rozgonyi, F. PCR Detection of the vanA Gene in a Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* Clinical Isolate from Hungary. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, *46*, 325-326.
112. Allen, N. E.; Nicas, T. I. Mechanism of Action of Oritavancin and Related Glycopeptide Antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, *26*, 511-532.
113. KOWWINv.1.67 logP prediction program. Syracuse Research Corporation, Syracuse, NY, USA
114. Kahne, D.; Leimkuhler, C.; Lu, W.; Walsh, C. Glycopeptide and Lipoglycopeptide Antibiotics. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 425-448.
115. a) Prowse, W. G., Kline, A. D., Skelton, M. A., Loncharich, R. J. Conformation of A82846B, a Glycopeptide Antibiotic, Complexed with its Cell Wall Fragment: an Asymmetric Homodimer Determined Using NMR Spectroscopy. *Biochemistry* **1995**, *34*, 9632-9644. (RCSB PDB ID #:1gac).
- b) Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and Testing of a General Amber Force Field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157-1174.
- c) Case, D. A.; Cheatham, T.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M. Jr., Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. The Amber Biomolecular Simulation Programs. *J. Computat. Chem.* **2005**, *26*, 1668-1688.
116. Gaussian 03, Revision C.02, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A. Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao,

- O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.
117. MOPAC 2007, Stewart Computational Chemistry (SCC), Paddington Circle Colorado Springs, CO 80921, USA.
118. Mayer, M.; Meyer, B. Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784-1788.
119. Mayer, M.; Meyer, B. Group Epitope Mapping (GEM) to Identify Segments of a Ligand in Direct Contact with a Protein: STD NMR as a Tool to Characterize Binding to Ricinus communis Agglutinin. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6108-6117.
120. Meyer, B., Peters, T. NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 864-890.
121. Peng, J. W.; Moore, J.; Abdul-Manan, N. NMR Experiments for Lead Generation in Drug Discovery. *Prog. NMR Spectrosc.* **2004**, *44*, 225-256.
122. Kövér, K.E.; Groves, P.; Jiménez-Barbero, J.; Batta, G. Molecular Recognition and Screening Using a ¹⁵N Group Selective STD NMR Method. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11579-11582.
123. Sztaricskai, F.; Batta, Gy.; Herczegh, P.; Balázs, A.; Jekő, J.; Róth, E.; Szabó, P. T.; Kardos, Sz.; Rozgonyi, F.; Boda, Z. A New Series of Glycopeptide Antibiotics Incorporating a Squaric Acid Moiety. *J. Antibiot.* **2006**, *59*, 564-582.

Függelék

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények / Publications related to the dissertation

1. Ferenc Sztaricskai, **Gábor Pintér**, Erzsébet Róth, Pál Herczegh, Szilvia Kardos, Ferenc Rozgonyi, Zoltán Boda. N-Glycosylthioureido Aglyco-ristocetins Without Platelet Aggregation Activity. *Journal of Antibiotics*, **2007**, 60, 529-533. (IF: 1,27)
2. **Gábor Pintér**, Gyula Batta, Sándor Kéki, Attila Mándi, István Komáromi, Krisztina Takács-Novák, Ferenc Sztaricskai, Erzsébet Róth, Eszter Ostorházi, Ferenc Rozgonyi, Lieve Naesens, Pál Herczegh. A Diazo Transfer – Click Reaction Route to New, Lipophilic Teicoplanin and Ristocetin Aglycon Derivatives with High Antibacterial and Anti-influenza Virus Activity. An Aggregation and Receptor Binding Study. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2009**, 62, 6053-6061. (IF: 4,89)
3. **Gábor Pintér**, Ilona Bereczki, Gyula Batta, Réka Ötvös, Ferenc Sztaricskai, Erzsébet Róth, Eszter Ostorházi, Ferenc Rozgonyi, Lieve Naesens, Zoltán Boda, Pál Herczegh. Click Reaction Synthesis of Carbohydrate Derivatives from Ristocetin Aglycon with Antibacterial and Antiviral Activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2010**. közlésre elfogadva/accepted for publishing. (IF: 2,53)

Az értekezés témájában elhangzott előadások és kiállított poszterek / Presentations and posters related to the dissertation

1. **Pintér Gábor**, Herczegh Pál, Glikopeptid antibiotikumok módosítása 1,3-dipoláris cikloaddíciós reakcióval, Gyógyszerkémiai és Gyógyszertechnológiai Szimpózium, Zalakaros, szeptember 29-30, **2008**. (E)
2. **Pintér Gábor**, Ötvös Réka, Glikopeptid típusú antibiotikumok módosítása 1,3-dipoláris cikloaddíciós reakcióval, IX. Clauder Ottó Emlékverseny, Budapest, április 23-24, **2009**. (E)
3. **Gábor Pintér**, Réka Ötvös, Gyula Batta, Ilona Bakai-Bereczki, Ferenc Sztaricskai, Erzsébet Róth, Ferenc Rozgonyi, Eszter Ostorházi, Lieve Naesens, Pál Herczegh, Synthetic study on the role of the carbohydrates on the antimicrobial activity of several glycopeptide antibiotics, Annual Meeting of the Group for Carbohydrate Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences, Mátrafüred, május 28-29, **2009**. (E)

4. Pál Herczegh, **Gábor Pintér**, Gyula Batta, Sándor Kéki, Attila Mándi, István Komáromi, Krisztina Takács-Novák, Ferenc Sztaricskai, Erzsébet Róth, Eszter Ostorházi, Ferenc Rozgonyi, Lieve Naesens, A Diazo Transfer – Click Reaction Route to New, Lipophilic Teicoplanin and Ristocetin Aglycon Derivatives with High Antibacterial and Anti-influenza Virus Activity, 11th International Conference on the Chemistry of Antibiotics and Other Bioactive Compounds (ICCA-11), San Sebastian, Baszkföld, Spanyolország, szeptember 29 – október 2, **2009**. (E)
5. Bakai-Bereczki Ilona, **Pintér Gábor**, Ötvös Réka, Batta Gyula, Sztaricskai Ferenc, Róth Erzsébet, Ostorházi Eszter, Rozgonyi Ferenc, Lieve Naesens, Szarvas Mariann, Boda Zoltán, Herczegh Pál. A risztocetin aglikon új típusú szénhidrát származékainak szintézise és biológiai hatása, Antibiotikum és Nukleotidkémiai Munkabizottsági Ülés, Debrecen, november 19-20, **2009**. (E)
6. **Pintér Gábor**, Batta Gyula, Kéki Sándor, Mándi Attila, Komáromi István, Takácsné Novák Krisztina, Sztaricskai Ferenc, Róth Józsefné, Ostorházi Eszter, Rozgonyi Ferenc, Lieve Naesens, Herczegh Pál, Új, lipofil teikoplanin- és risztocetin-aglikon származékok szintézise és antimikrobiális vizsgálata, Antibiotikum és Nukleotidkémiai Munkabizottsági Ülés, Debrecen, november 19-20, **2009**. (E)

Egyéb közlemények / Other publications

1. **Gábor Pintér**, Gyula Batta, Pál Horváth, István Löki, Tibor Kurtán, Sándor Antus, Sándor Kéki, Miklós Zsuga, Gábor Nagy, János Aradi, Tamás Gunda and Pál Herczegh. Supramolecular Polymers Based on Quadruplex Formation of Ditopic Guanosine Macromonomers in Nonaqueous Media. *Langmuir*, **2007**, *23*, 5283 -5285. (IF: 4,09)
2. Sándor Kéki, Lajos Nagy, Ákos Kuki, **Gábor Pintér**, Pál Herczegh, Miklós Zsuga. Tandem mass spectrometric study of ciprofloxacin–poly(ethylene glycol) conjugate in the presence of alkali metal ions. *International Journal of Mass Spectrometry*, **2008**, *275*, 104-109. (IF: 2,44)
3. **Gábor Pintér**, Pál Horváth, Sándor Bujdosó, Ferenc Sztaricskai, Sándor Kéki, Miklós Zsuga, Szilvia Kardos, Ferenc Rozgonyi, Pál Herczegh. Synthesis and Antimicrobial Activity of Ciprofloxacin and Norfloxacin Permanently Bonded to Polyethylene Glycol by a Thiourea Linker. *Journal of Antibiotics*, **2009**, *62*, 113-116. (IF: 1,27)

Egyéb előadások, poszterek / Other presentations and posters

1. **Gábor Pintér**, Ákos Szilágyi, Gyula Batta, Pál Horváth, István Löki, Tibor Kurtán, Sándor Antus, Sándor Kéki, Miklós Zsuga, Gábor Nagy, János Aradi, Tamás Gunda and Pál Herczegh, Synthesis of New Polyethylene Glycol Derivatives: Aggregates, Antibiotics, Second German-Hungarian Workshop, Somogyaszaló, Magyarország, április 4-8, **2006**. (E)
2. Pál Herczegh, Ákos Szilágyi, István Pelyvás, Gyula Batta, **Gábor Pintér**, Pál Horváth, Sándor Antus, Tibor Kurtán, Sándor Kéki, Miklós Zsuga, Nucleosides in antibiotic analogs and in new nano-aggregates, VIII. Jornades de carbohidrats (RSEQ), Alcalá de Henares (Madrid), Spanyolország, szeptember 13-15, **2006**. (E)
3. **Pintér Gábor**, Batta Gyula, Horváth Pál, Löki István, Kurtán Tibor, Antus Sándor, Kéki Sándor, Zsuga Miklós, Nagy Gábor, Aradi János, Gunda Tamás and Herczegh Pál, Guanozin tartalmú polimerek asszociációja, MTA Műanyag és Természetes Polimerek Munkabizottsági ülés, Budapest, április 12, **2007**. (E)
4. **Gábor Pintér**, Gyula Batta, Pál Horváth, István Löki, Tibor Kurtán, Sándor Antus, Sándor Kéki, Miklós Zsuga, Gábor Nagy, János Aradi, Tamás Gunda and Pál Herczegh, Supramolecular Polymers Based on Quadruplex Formation of Ditopic Guanosine Macromonomers in Nonaqueous Media, The 2nd BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, Tallinn-Tartu, Észtország, szeptember 13-15, **2007**. (P)
5. **Pintér Gábor**, Kovalens polietilén-glikol-származékok potenciális terápiás felhasználása, Immunfarmakonok és Biológiai hatóanyagok Gyógyszertana, Debrecen, december 10, **2007**. (E)
6. Herczegh Pál, **Pintér Gábor**, Szilágyi Ákos, Synthesis of Antibiotic analogs, 1st Hungarian-Singaporean Workshop on Drug Discovery and Biomaterials, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, március 10-11, **2008**. (E)
7. **Pintér Gábor**, Oludotun Adebayo Phillips, Herczegh Pál, Biológiailag Aktív Molekulák Kovalens Kapcsolása 1,3-Dipoláris Cikloaddícióval, Vegyészkonferencia, Hajdúszoboszló, június 19-21, **2008**. (P)
8. **Gábor Pintér**, Gyula Batta, Pál Horváth, István Löki, Tibor Kurtán, Sándor Antus, Sándor Kéki, Miklós Zsuga, Gábor Nagy, János Aradi, Tamás Gunda and Pál Herczegh, Supramolecular Polymers Based on Guanosine Macromonomers, PORANAL 2008 Symposium, Debrecen augusztus 27-29, **2008**. (P)