

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum

Gyógyszerésztudományi Kar

Gyógyszerészi Kémia Tanszék

Teikoplanin pseudo-aglikon izoindol származékainak szintézise

Tudományos Diákköri Pályamunka

Készítette:

Török Zsolt

Gyógyszerésztudományi Kar IV. évfolyam

Témavezetők:

Dr. Herczegh Pál

tanszékvezető egyetemi tanár

Dr. Sipos Attila

egyetemi tanársegéd

A pályamunka elkészítését a **TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024** számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.



2012

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések.....	3
2. Bevezetés.....	5
2.1 Az antibiotikum és az antibakteriális szerek	5
2.2 A glikopeptid antibiotikumok.....	6
2.2.1 A glikopeptid antibiotikumok szerkezete	8
2.2.2. A glikopeptid antibiotikumok hatásmechanizmusa	8
2.2.3. A glikopeptid antibiotikumokkal szemben kialakuló rezisztencia	10
2.2.4. A glikopeptid antibiotikumok indikációja	10
2.3. A teikoplanin	12
2.4 Az izoindol-képzés és a fluoreszcencia felhasználása.....	13
3. Célkitűzés	15
4. Saját vizsgálatok.....	16
4.1 Előzetes gondolatok.....	16
4.2 A teikoplanin deglikozilezése.....	16
4.3 A teikoplanin pseudo-aglikon izoindol- és benzoizoindol-származékainak előállítása	18
4.4 Az előállított vegyületek fizikai-kémiai paraméterei	22
4.5 Az előállított vegyületek antibakteriális jellemzői	23
5. Kísérleti rész	26
5.1 Anyagok és módszerek	26
4.5.2 Általános kísérleti leírás.....	27
6. Összefoglalás.....	29
7. Köszönetnyilvánítás	30
8. Irodalomjegyzék.....	31

1.Rövidítések

D-Ala	D-Alanin
D-Glu	D-Glutaminsav
D-Lak	D-Laktát
D-Ser	D-Szerin
DMF	N,N-dimetilformamid
DKM	Diklórmétán
GISA	Glikopeptidekre közepesen érzékeny (Intermediate sensitive) Staphylococcus Aureus
Glü	Glükóz
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography - Magas nyomású folyadékkromatográfia
L-Ala	L-Alanin
MALDI-ToF	Mátrix Asszociált Lézer Deszorpciós Ionizáció - Time of Flight (Repülési idő) detektorral kombinálva tömegspektrometriás mérésekhez
Man	Mannóz
MBC	Minimális Baktericid Koncentráció
MCC	Minimális Citotoxikus Koncentráció
MDR TBC	MultiDrug Resistant tuberculosis - számos első vonalbeli tbc ellenes szerre rezisztens tuberculosis
MeOH	Metanol
MIC	Minimális Inhibitorikus Koncentráció
MRSA	Meticillin (multi) Rezisztens Staphylococcus Aureus
NAD	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NMR- spektroszkópia	Mágneses Mag Rezonancia Spektroszkópia
UDP	Uridil-difoszfát
VISA	Vankomicinre közepesen érzékeny (Intermediate Sensitive) Staphylococcus Aureus

VRE	Vankomicin Rezisztens Enterococcus
VRK	Vékonyréteg Kromatográfia
VRSA	Vankomicin Rezisztens Staphylococcus Aureus
XDR TBC	eXtensively Drug Resistant tuberculosis -számos első és néhány másodvonalbeli szerre rezisztens tuberculosis
XXDR TBC	eXtremely Drug Resistant tuberculosis - csak néhány másodvonalbeli szer hatékony a baktérium ellen

2. Bevezetés

2.1 Az antibiotikum és az antibakteriális szerek

Az antibiotikum kifejezés mindazon anyagokat magába foglalja, melyek gátolják a mikroorganizmusok növekedését, esetleg el is pusztítják azokat. Ezen hatalmas család magába foglalja az antibakteriális, antivirális, antimikotikus és még sok egyéb mikroorganizmus ellenes szereket. Ennek alapján az antibakteriális szerek mindazon természetes, tehát más mikroorganizmus által termelt, fél szintetikus és szintetikus szerek, melyek a baktériumok növekedését gátolják (baktériostatikus) vagy elpusztítják azokat (baktericid).

Az antibiotikumokat már az ókori egyiptomiak illetve görögök is alkalmazták, pusztán úgy, hogy penészes növényi részeket helyeztek a sebekre. A valódi antibiotikum kutatás a 19. században indult el, majd 1942-ben Selman Waksman [1] nevezte el e szereket antibiotikumnak. A valódi áttörés 1928-ban volt, amikor is Sir Alexander Fleming [2] megfigyelte azt, hogy a *Penicillium* családba tartozó gombák egy olyan anyagot termelnek, amely a *Staphylococcus* tenyészet növekedését meggátolja. Ezt az anyagot később penicillinnek nevezte el. Ez a felfedezés indította el azt a folyamatot mely során közel 14 új antibiotikum család került felfedezésre mindösszesen 35 év alatt. Ám az 1970-es évektől ez a nagy erejű kutatás megtorpant, ugyanis a gyógyszergyárak nem látták a profitot az antibiotikum-kutatásban, mivel egy új szer kifejlesztése nagyjából 10 évet vesz igénybe és ezután csak az emberek egy szűkebb rétege használja, így a profittermelés csak hosszú távon következhet be.

A széles választékú antibiotikumok megjelenése a piacon, illetve a kutatás-fejlesztés lecsökkenése azt eredményezte, hogy manapság már megjelentek olyan kórokozók, melyek az összes β -laktám típusú antibakteriális szerre rezisztensek (pl.: az MRSA). Mindez azért következhetett be, mert az antibakteriális szereket „csodaszer”-nek gondolták, és a legtöbb esetben széles spektrumú antibakteriális szert írtak fel. És mindezt tovább súlyosbította az a helyzet, hogy az állattenyésztésben is elkezdtek alkalmazni ezen anyagokat. Mindezt tették azzal a céllal, hogy meggyógyítsák az állatokat, illetve kis mennyiségben alkalmazva antibiotikumot elősegítsék az állatok növekedését. Így a baktériumok már az állati szervezetben mutációkon mentek keresztül, majd bekerülve az emberi szervezetbe ott

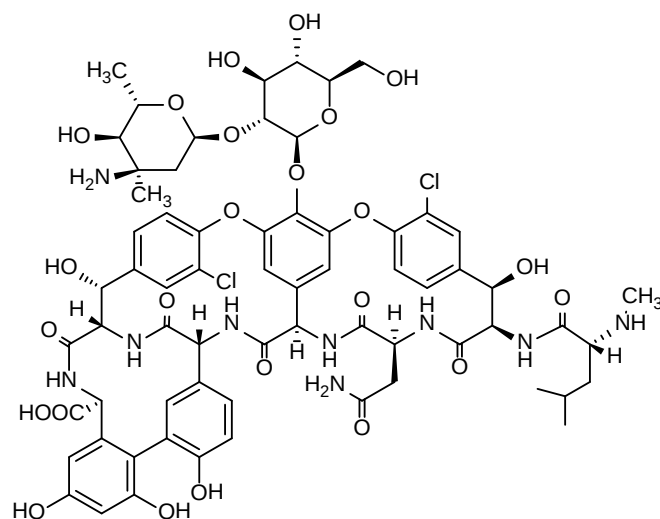
fertőzést okoztak, viszont már rezisztensek voltak az antibiotikumra. Éppen ezért 2006-ban az Európai Unió betiltotta az antibiotikumok ilyen irányú felhasználását az EU országában.[3]

Az antibiotikumok efféle alkalmazása odáig vezetett, hogy manapság megjelentek a multi- illetve polirezisztens baktérium törzsek, melyek halálos kimenetelű fertőzéseket okoznak, viszont a piacon lévő antibiotikumok nagy részére rezisztensek, így ellenük nincs védelem. Napjainkra megjelentek az MDR, XDR illetve XXDR *Mycobacterium tuberculosis*, az MRSA, illetve kiterjedt rezisztenciával rendelkező *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* és *Klebsiella* fajok. Az MRSA, illetve más penicillinrezisztens törzsek kezelésében az elsőként választandó szer a vankomicin, viszont ezen antibakteriális szer ellen is megjelent a rezisztencia (VISA, VRSA, VRE), így egyre súlyosabb problémához vezetnek az e baktériumok által okozott nozokomiális fertőzések.

E miatt a súlyos problémák miatt lenne nagy jelentősége, hogy a gyógyszergyárak ismét intenzíven foglalkozzanak az antibiotikumokkal, illetve hogy az egyes országok egészségügyi intézményeiben kialakuljon a megfelelő antibiotikum-politika. Mindemellett fontos szerep jut az egyes egyetemi tanszékek kutatómunkájának is, amellyel megkönnyíthető a gyárak kutató munkája illetve a küzdelem a kórokozók ellen.[4-6]

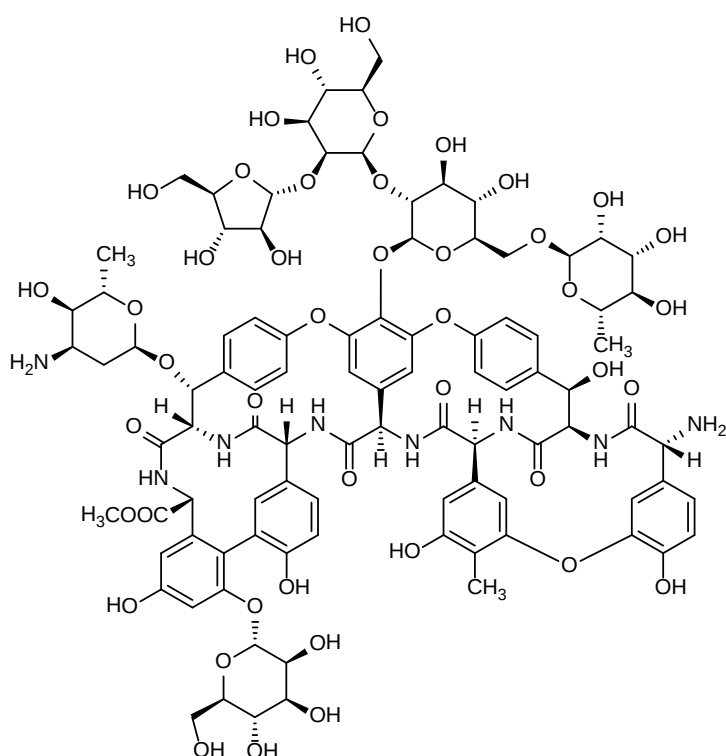
2.2 A glikopeptid antibiotikumok

A glikopeptid antibiotikumoknak a klinikumban is használt két jelentős képviselője van: a vankomicin és teikoplanin. E két antibiotikum az elsőként választandó szer, ha MRSA vagy penicillinrezisztens *Enterococcus* által okozott fertőzéstől szenved a beteg. Ebbe a családba tartozik még a risztocetin, melyet trombocita-aggregáló sajátságai miatt terápiás céllal egyelőre még nem használnak, valamint az újonnan szintetizált lipoglikopeptid-származékok: a vankomicinből előállított oritavancin és telavancin, valamint a teikoplaninból szintetizált dalbavancin.[7]



1.ábra A vankomicin szerkezeti képlete

A glikopeptid antibiotikumok első jelentős tagját, a vankomicint Edmund Kornfeld és mtsai (az Ely Lilly cég kutatói) izolálták 1956-ban egy, a borneói dzsungelből származó talajmintákban található mikroorganizmus, a *Streptomyces orientalis* (későbbi nevén *Amycolatopsis orientalis*) fermentfolyadékából.[8]



2.ábra A rizotcetin szerkezeti képlete

A risztocetint az amerikai Abbott cég kutatói az *Amycolatopsis orientalis* (későbbi nevén *Nocardia lurida*), míg a szovjetek a *Proactinomyces fructiferi* mélykultúrák tenyészetéből izolálták. A két felfedezés egymástól függetlenül, az 1950-es évek derekán történt. A két antibiotikum szerkezeti felépítését és azonosságát több mint húsz évvel később Sztaricskai és munkatársai igazolták [9].

2.2.1 A glikopeptid antibiotikumok szerkezete

A glikopeptid antibiotikumok szerkezetileg gyűrűs heptapeptidek, melyek alapvázához különböző szénhidrátok alkoholos és/vagy fenolos hidroxil-csoporton keresztül kapcsolódnak. Nicolaou és társai [10] az ebbe a családba tartozó származékokat szerkezeti felépítésük alapján 5 különböző csoportba (I-V.) sorolták. Az aminosavak számozását a peptid alaplánc N-terminális végéről indítva, a következőket tapasztalták:

- Az I. típusba sorolható heptapeptidek 1. és 3. aminosava alifás, a többi 5 aromás oldalláncot tartalmaz (pl. vankomicin).
- A II. típusú antibiotikumok az I. típusúakhoz hasonlóak, kivéve, hogy 1. és 3. aminosavuk aromás (pl. A-aktinoidin).
- A III., ill. IV. típusba sorolható származékok 1. és 3. aminosavához tartozó aromás gyűrűk éterkötéssel kapcsolódnak egymáshoz (pl. risztocetin).
- A IV. típusú oligopeptidek jellegzetessége, hogy a molekula szénhidrát részéhez kapcsolódik egy hosszabb zsírsavlánc (pl. teikoplanin, illetve lipoglikopeptidek).
- Az I.-IV. csoport vegyületeinél a ciklikus aglikon szerkezet kialakításához a peptidkötések mellett a 2., 4. és 6. aminosav aromás oldalláncai közötti éterkötések is szükségesek.
- Az V. típus heptapeptidjeinek a glikopeptid antibiotikumok családjába történő besorolása megkérdőjelezhető. Amellett, hogy 2. aminosavuk oldalláncában indol-gyűrű található, ezen molekulák szénhidrát oldalláncot sem tartalmaznak (pl. komplextatin, kisztamicin).

2.2.2. A glikopeptid antibiotikumok hatásmechanizmusa

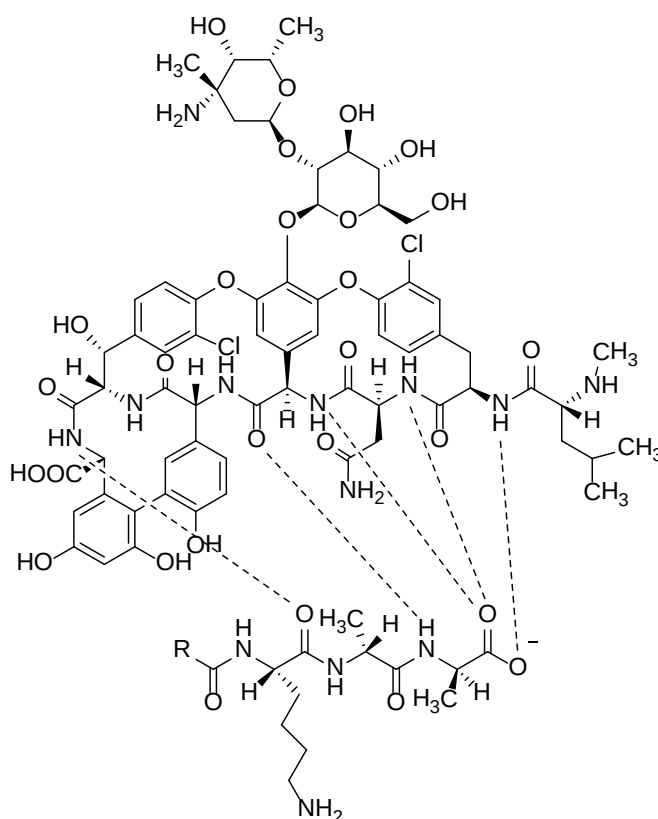
A baktériumok életciklusához nélkülözhetetlen a bakteriális sejtfal, melynek szintézisét gátolják a glikopeptid típusú antibiotikumok. A szintézis során a baktérium egy olyan peptidoglikán réteget hoz létre, mely *N*-acetyl-D-glükózaminból és *N*-acetyl-D-muraminsavból épül fel. Az utóbbi komponens egy pentapeptid (L-Ala-D-Glu-L-Ala-D-Ala-D-Ala) oldalláncot

tartalmaz, amelyek között keresztkötések jönnek létre, kialakítva ezáltal a peptidoglikán stabil szerkezetét.

Nieto és Perkins [11-12] voltak az elsők, akik feltételezték, hogy a vankomicin antibakteriális hatását azáltal fejt ki, hogy képes kapcsolódni a sejtfalszintézis egyik intermediér termékéhez, az UDP-*N*-acetyl-muramyl-pentapeptidhez. Williams és mtsai [13-14] pedig mágneses magrezonancia-spektroszkópia vizsgálatok segítségével támasztották alá a feltételezést, mégpedig úgy, hogy erős, nem kovalens kölcsönhatást mutattak ki a glikopeptid antibiotikum és különböző D-Ala-D-Ala terminálissal rendelkező peptidanalógok között.

A glikopeptid antibiotikumok tehát azáltal, hogy komplexet képeznek a pentapeptid intermediérral, meggátolják az ép sejtfa kialakulását, mely nélkül a mikroorganizmus képtelen ellenállni az ozmotikus nyomásnak, így annak lízise fog bekövetkezni.

Emellett lipoglikopeptid antibiotikumok vizsgálatai képezik az alapját azon feltételezésnek, miszerint azok megnövekedett antibakteriális hatásáért nemcsak a pentapeptid intermediérral képzett komplex, hanem a lipid-oldallánc membránhoz való asszociációja (és ezáltal membránpórusképzés) is felelős.[15]



3.ábra A glikopeptid antibiotikumok hatásmechanizmusa

2.2.3. A glikopeptid antibiotikumokkal szemben kialakuló rezisztencia

A glikopeptidekkel szemben kialakuló, leggyakrabban megfigyelt rezisztencia-mechanizmus azok biológiai célpontjának módosításán alapszik. A rezisztencia mechanizmusa a következő: a transzpeptidációban részt vevő pentapeptid utolsó aminosava a glikopeptideket kötő D-Ala helyett D-lak vagy D-Ser lesz. Az eltérő aminosav beépülése három enzimhez kapcsolható: D-Ala-D-Ala peptidáz, a D-2-ketosav-reduktáz és a D-Ala-D-laktát-ligáz. Ezen három enzim plazmidon vagy transzpozonon kódolt és indukálhatóak. A rezisztens fenotípus kialakításához mindhárom enzim működése szükséges. Több, egymástól független típusa is ismert, melyek különböznek a kialakuló rezisztencia mértékében, a felelős gének lokalizációjában és indukálhatóságában, valamint az érintett gyógyszerekben is. A két legfontosabb típus: vanA és vanB. A vanA és vanB között az a különbség, hogy az utóbbi csak vankomicinnel, míg az első teikoplaninnal szembeni ellenálló képességet is okoz.

Egy másik típusú rezisztencia is megjelent a baktériumok között, melynek alapja az, hogy a sejtfal szintézise felgyorsul, ezáltal megvastagodik a sejtfal. Ez azt eredményezi, hogy megnő a glikopeptid kötőhelyek száma, így jóval nagyobb glikopeptid koncentráció szükséges az összes pentapeptid blokkolásához. Ez a mechanizmus alacsony szintű rezisztenciát biztosít minden glikopeptid antibiotikummal szemben, de csak GISA (Glycopeptid Intermediate sensitive *Staphylococcus aureus*) törzsek esetén figyelték meg.[4,16]

2.2.4. A glikopeptid antibiotikumok indikációja

A glikopeptid antibiotikumok hatásspektruma szűk, csakis Gram-pozitív baktériumok ellen hatnak. A Gram-negatív és az obligát intracelluláris baktériumok generikus rezisztenciával rendelkeznek velük szemben. Ennek oka a Gram-negatív baktérium sejtfalának a felépítésében, illetve ezen antibiotikumok hatásmechanizmusában keresendő. A Gram-pozitív baktériumok sejtfala a következőképpen épül fel: a citoplazmát egy membrán határolja, melyet egy periplazmatikus tér választ el a külső, 30-40 rétegből álló peptidoglikán rétegtől. Ezzel szemben a Gram-negatív baktériumok sejtfal szerkezete merőben eltérő, ugyanis két, kettős rétegű membránból áll, melyek közül az egyik a külső membrán, a másik pedig a belső, citoplazma membrán. Ezen két membránréteg között helyezkedik el a periplazmatikus tér, melyben található az 1-2 rétegből álló peptidoglikán rész, mely az ún. Braun-féle lipoproteinnel van a külső membránhoz rögzítve. Az antibiotikum viszonylag nagy mérete és gyenge lipidoldékonysága miatt nem képes eljutni a peptidoglikán részhez, ezáltal hatástalan

marad ezen baktériumokkal szemben. Ennek ellenére mutattak ki vankomicinre érzékeny *Neisseria gonorrhoeae* törzseket. Az obligát intracelluláris baktériumok pedig a gazdasejten belül helyezkednek el, így maga a gazdasejt képezi a gátat az antibiotikum célba jutásához.

A Gram-pozitív baktériumokra alapvetően baktericid hatásúak, kivételt képezve ez alól az *Enterococcusok*, ugyanis itt a hatás csak bakteriosztatikus. Viszont a Gram-pozitív baktériumok között is előfordul néhány törzs, melyek generikus rezisztenciával rendelkeznek (pl. *Erysipelothrix*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Nocardia*). Esetükben a transzpeptidációban részt vevő pentapeptid D-Ala–D-Ala helyett D-Ala–D-Lak-ot tartalmaz, mely csak igen kis affinitással köti a glikopeptideket, így elmarad a kívánt hatás.

A klinikumban is használt két legfontosabb származék, a vankomicin és a teikoplanin azért nagy jelentőségű, mert bár ritkán van szükség az alkalmazásukra, de ezen esetekben gyakorlatilag nem helyettesíthetőek.

Legfőbb indikációs területük:

- valószínű vagy bizonyított meticillinrezisztens *Staphylococcus aureus*, ill. *Staphylococcus epidermidis* (MRSA, ill. MRSE) okozta súlyos fertőzések
- *Streptococcus pneumoniae* okozta meningitis
- ampicillinrezisztens *Enterococcus*-infekciók
- *Clostridium difficile* által létrejött pseudo-membránózus enterocolitis.

A teikoplanin alkalmazása vankomicinnel szemben előnyösebb bizonyos esetekben, mégpedig ha hosszabb hatást akarunk elérni (a teikoplanin felezési ideje 40-70 óra, amit az N-acil-β-D-glükózamin résznek tulajdonítanak), illetve ha a nephro - vagy ototoxicitás kockázata magasabb az átlagnál.[4,7,8]

A risztocetint a felfedezése után már az 50-es években alkalmazták a vankomicinhez hasonló terápiás indikációval, ám kiderült hogy thrombocytopeniát okoz. További kutatások bebizonyították, hogy azon személyek vérében, akik von Willebrand betegségben szenvednek, nem okoz thrombocytopeniát. Ennek hatására ma egy biokémiai gyorseszten, az Aggristinben, alkalmazzák, mint alapreagens. Az Aggristin segítségével a von Willebrand-kór azonnal szűrhető, mely legnagyobb jelentőségét a sürgős műtéti beavatkozások előtti vizsgálatoknál nyeri.[17]

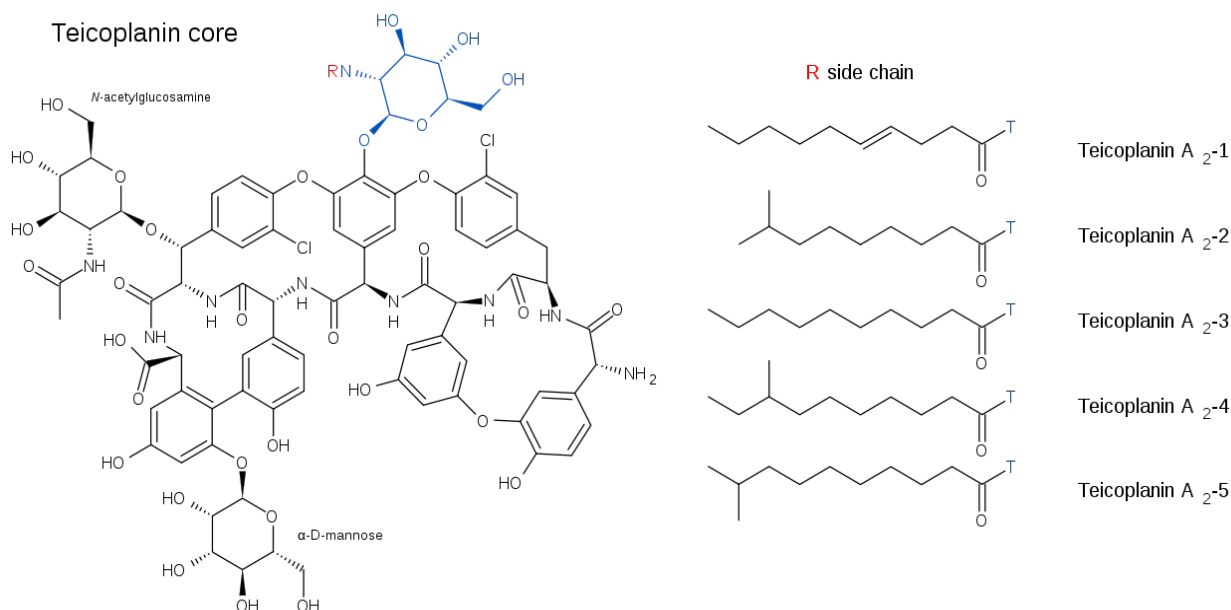
2.3. A teikoplanin

A teikoplanint az olasz Lepetit cég kutatói fedezték fel 1978-ban.[18] A több vegyületből álló keveréket az *Actinoplanes teichomyceticus* fermentlevéből izolálták és teichomycinnek nevezték el. 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.

A teikoplanin 1988-ban Targocid[®] néven került be a klinikai gyakorlatba Európában, majd később az Egyesült Államokban és Kanadában is.

Hatás spektruma szűk, csak Gram-pozitív baktériumokra hat, mely hatásmechanizmusából ered. Elsősorban meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* és *Enterococcus faecalis* által okozott fertőzésekben alkalmazzák, mint profilaktus szert, illetve mint terápiás gyógyszert. Ezen kívül bebizonyították, hogy alkalmas a pseudomembranosus colitis, valamint a *Clostridium difficile* által okozott diarrhoea kezelésére is.[4]

A glikopeptid antibiotikum család IV. típusába tartozik, úgynevezett lipoglikopeptid. A heptapeptid alapvázhoz kapcsolódik a vankomicin- és aktinoidinsavon, valamint egy bifenil-éter struktúrával rendelkező risztomicinsav. Ebből épül fel az aglikon szerkezete (A₃-1). A 6-os aminosav alifás hidroxilcsoportjához egy N-acetil-β-D-glükózamin, a 7-es aminosav fenolos hidroxilcsoportjához pedig egy α-D-Man kapcsolódik. A 4-es aminosav fenolos hidroxilcsoportjához egy speciális cukor, egy N-acil-β-D-glükózamin (A₂ (1-5)) kötődik. Ez utóbbi szerkezeti egységre utal a lipoglikopeptid elnevezés, ugyanis az egyes komponensek az acilező zsírsavak szerkezetében térnek el egymástól. Ez a molekularészlet szerepet játszik az antibakteriális hatásban és általa az antibiotikum felezési ideje meglehetősen hosszú (40-70 óra).



4.ábra A teikoplanin szerkezeti felépítése[19]

A Lepetit cég kutató központjában vizsgálták a teikoplanin metabolizmusát, biológiailag aktív metabolitok felfedezése végett. A kísérletben radioaktívan jelölt teikoplanint adtak i.v a betegeknek, majd 16 napon keresztül gyűjtötték a vizeletet. A mintát HPLC-s, szcintillációs spektrometriás, valamint ^1H -NMR módszerekkel vizsgálták. A kutatás 2 metabolit jelenlétét igazolta, melyek az A₂-3 molekula hidroxilált származékai. Viszont ezen metabolitok mennyisége csak kis igen része (<3%) a beadott teikoplanin mennyiségének. Ezenkívül megvizsgálták a hatásukat *Staphylococcus*, *Streptococcus*, valamint *Enterococcus* törzsek ellen, de hatásuk lényegesen gyengébb, mint az eredeti antibiotikumnak. A konklúziója a kísérletnek az, hogy a teikoplanin csak kis mennyisége alakul át a májban és nagy része a hatásosabb szerkezeti formában marad meg.[20]

2.4 Az izoindol-képzés és a fluoreszcencia felhasználása

Az 1980-as években alkalmazták először az izoindol-képzést, illetve az izoindol váz által létrejövő fluoreszcens aktivitást, annak érdekében, hogy aminosavakat, primer amino csoportot tartalmazó molekulákat kimutatásra alkalmassá tegyenek. [21] Ehhez elengedhetetlen vegyület az orto-ftálaldehid (illetve a később alkalmazott naftalin-2,3-dialdehid), ezenkívül szükséges egy tiol funkciós csoportot tartalmazó vegyület, illetve egy primer aminocsoport, mely lehet aminosav része, enzim része, de alkalmas az ammónia is.

Ezen reakció egyik érdekes felhasználási módja az ammónia kimutatása. Ehhez az ortoftálaldehid mellett N-acetilciszteint vagy tioglikolátot alkalmaznak, és ha a rendszerben ammónia is jelen van, akkor 415 nm-en gerjesztési csúcsot lehet detektálni. Abban az esetben hogyha tiol reagensként 2-merkapto etanolt alkalmazunk, akkor a reakció alkalmassá válik etiléndiamin kimutatására is.

Az ortoftálaldehidből és a primer aminocsoportot tartalmazó, taurinból képződő reagens alkalmas különböző kéntartalmú vegyületek azonosítására. Ekkor viszont fontos a megfelelő pH beállítása, ugyanis pl. különböző diszulfid csoportot tartalmazó vegyületek (cisztein, oxidált glutation) esetén a pH=6-7 -nek kell lennie, míg szulfid-ion kimutatáshoz pH=8 szükséges.

Egy igazán különleges ion mind kvalitatív, mind kvantitatív detektálására is alkalmas az izoindol képződésen alapuló reakció. Ez az ion pedig a cianid-ion. Azért érdekes ez a reakció, mert ebben az esetben nincs jelen tiol csoportot tartalmazó molekula, hanem a cianid-ion fog az izoindol vázhoz kapcsolódni. Ortoftálaldehidet és taurint alkalmazva, pH=9, kvalitatív kimutatás végezhető. Abban az esetben viszont ha taurin helyett glicint alkalmaznak (a megfelelő reakciókörülmények betartásával), akkor akár 10^{-8} M-os kimutatási határt is elérhetnek, ezzel akár kvantitatív mérés is végezhető.

Az analitikai alkalmazás mellett biokémiai vizsgálatokhoz is felhasználják a reakciót. A vizsgálatok során kihasználják azt, hogy különböző enzimek katalitikus helyein -SH és -NH₂ csoportok találhatók, melyek dialdehid származékkal fluoreszcens terméket eredményeznek. Ilyen enzimek pl.: glutamát dehidrogenáz, élesztő hexokináz, erithrocita transzglutamáz, xilóz reduktáz, stb. Viszont nemcsak enzimek hanem receptorok jelenlétének bizonyítására is alkalmas ezen reakció. A glükokortikoid illetve opioid receptorok esetén azon szerencsés helyzet alakul ki, hogy -NH₂ illetve -SH csoportot tartalmazó aminosav is jelen van, mégpedig olyan térállásban, ami lehetővé teszi az izoindolképzést, ezáltal pedig a receptorok jelölését.[22]

Egy 1990-es tanulmány arról számol be, hogy spectrin kötődését vizsgálták lipid kettősréteghez. Ennek során a spectrinhez izoindol vázat kapcsoltak, majd folyamatos fluoreszcens monitorozás mellett vizsgálták, hogy hogyan változik a fehérje konformációja. Emellett akrilamid-indukálta fluoescencia detektálással próbálták fényt deríteni arra, hogy

hogyan változik a spectrin konformációja melegítés hatására, mind membránhoz kötött, mind membránhoz nem kötött állapotában [23].

Ezen pár kutatási eredmény említésével a cél nem az volt, hogy a teljes irodalmi hátterét bemutassam az izoindol szerkezetnek, pusztán azt szerettem volna bemutatni, hogy már több mint 30 éve alkalmazzák e reakciót különböző kimutatási technikáknál. Viszont a pályamunka szempontjából tekintetbe véve a reakciót kiderül majd, hogy az izoindol-képzés nemcsak jelölési technikaként alkalmazható, hanem olyan módon képes változtatni a molekulák szerkezetén, mely antibakteriális hatásbeli változást fog eredményezni.

3. Célkitűzés

A TDK munkám céljával azt tűztük ki, hogy olyan teikoplanin származékokat állítsunk elő, melyek jelentősebb antibakteriális (esetleg antivirális) aktivitással rendelkezzenek, mint a piacon jelenlévő glikopeptid antibiotikumok.

A tanszéken korábban a risztocetinnel és teikoplaninnal végzett kutatások során fény derült arra, hogy a teikoplanint érdemes deglikozilezni, majd ezután módosítani az N-terminális részt. Éppen ezért az első feladatunk a teikoplanin aglikon előállítása volt.

Az általunk kitűzött következő cél az, hogy az aglikon NH_2 -csoportjához olyan molekulákat kapcsoljunk, melyek megnövelhetik az antibakteriális aktivitást. Ezen oldalláncokkal szembeni elvárásként megfogalmazható, hogy nem lehet túl nagy a hidrofilitása, ugyanis korábbi kísérleti tapasztalatok bebizonyították, hogy a lipofilebb glikopeptidek hatásosabbak a hidrofilebbekhez képest.

Ezenkívül előnyös lehet olyan származékok szintézise, melyek lehetőséget teremtenek arra, hogy ezen antibiotikumok hatásmechanizmusát vizsgálni lehessen, kihasználva az izoindol váz fluoreszcenciáját (pl. konfokális fluoreszcens mikroszkópia).

Végül megpróbáltunk egy olyan általános reakciósémát kialakítani, mellyel további hasonló származékokat lehet előállítani (például a β -laktám vázas antibiotikumok köréből), kiterjesztve ezt a gyors lefutású reakciót további kutatások folytatásához.

4. Saját vizsgálatok

4.1 Előzetes gondolatok

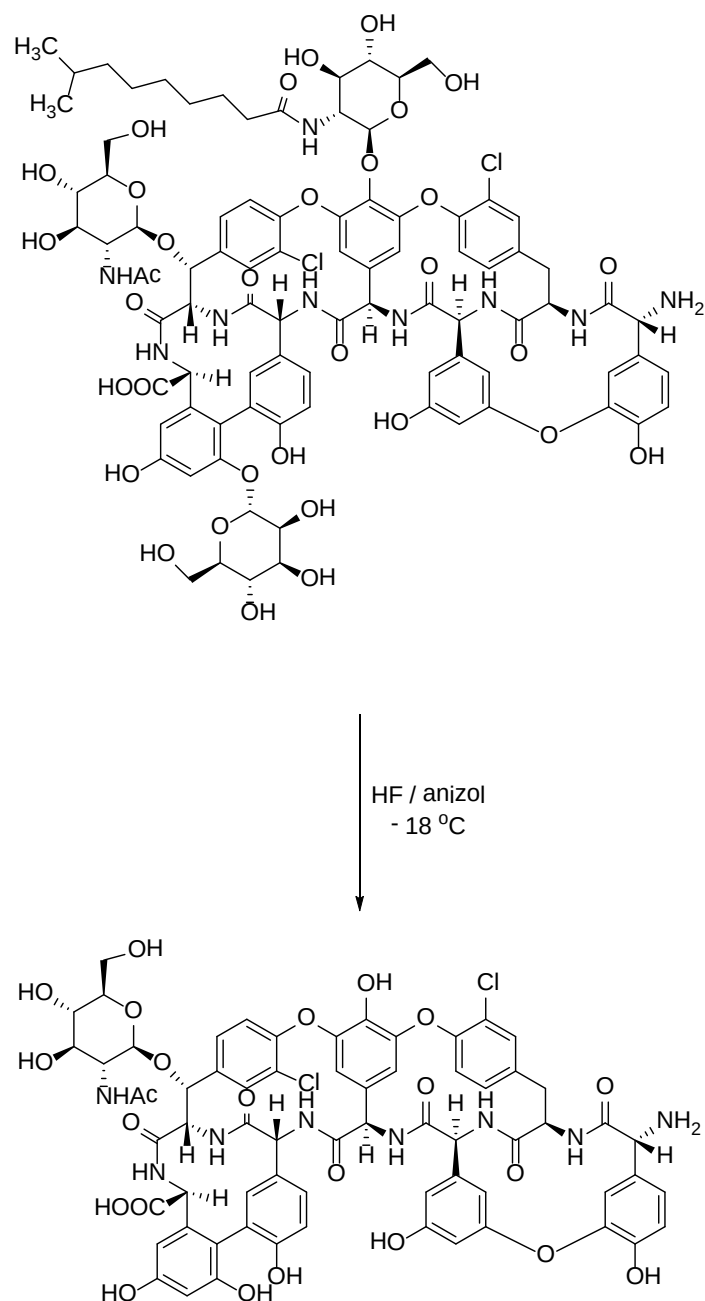
Mint ahogy már korábban említettem az első feladatunk a teikoplanin-aglikon előállítása volt. Erre a Boger és társai által kidolgozott módszer módosított formáját alkalmaztuk mely meglepő eredményre vezetett [24].

A nagyméretű heptapetid alapvázon ugyanis pusztán egyetlen glükózamin rész maradt a teljes deglikozileződés helyett. Mivel a molekulában csak az N-terminális aminocsoport található meg primer formában, így melléktermék képződésével nem kellett számolnunk, ami megkönnyítette a tisztítást és a termékek azonosítását az izoindol-képzési reakcióban.

A módosításhoz olyan reakciót kellett választanunk, amelynek eredményeképp speciális technikával nyomjelezhető funkciós csoport alakul ki, valamint olyan származékok keletkezzenek melyek lipofilitása nagyobb, mint a kiindulási vegyületé. Ezeknek a kritériumoknak az izoindol-, illetve benzoizoindol-képzési reakció megfelelt. Ezen reakciónak két előnyös tulajdonsága is van: egyrészt a gyors reakcióról van szó illetve a megfelelő körülmények betartásával könnyen alkalmazható számos vegyület kialakítására. Másodsorban a folyamat során olyan vegyületeket alkalmazhattunk melyek apoláris jellegükből adódóan megnövelték a lipofilitást.

4.2 A teikoplanin deglikozilezése

A megfelelő származékok előállításának első lépés a teikoplanin deglikozilezése. A szénhidrát oldallánc eltávolítására a már említett irodalmi példa [24] nyomán kidolgozott eljárást alkalmaztunk. Ennek során cseppfolyós, vízmentes hidrogén-fluoridot alkalmaztak anizol jelenlétében, mely az antibiotikumból egy lépésben aglikon keletkezését eredményezte.



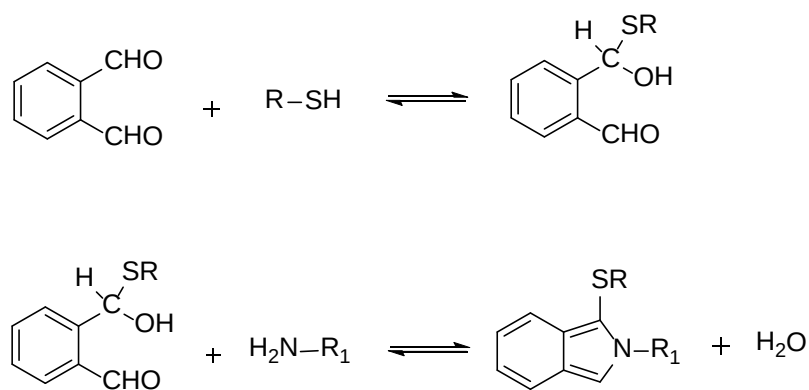
5.ábra A teikoplanin pszeudo-aglikon előállítása

Ezt a folyamatot elsősorban vankomicin, risztocetin illetve ramoplanin esetében alkalmazták, mint deglikozilációs folyamat. A hozam ezen esetekben megfelelő volt, így egy módosított protokollal teikoplaninból is elvégeztük a reakciót. Az alapos szerkezetvizsgálat fényt derített rá [25], hogy az N-acetil-glükózamin csoport továbbra is a heptapeptid alapvázhoz kapcsolódott és a reakciókörülmények megváltoztatása is ugyanazt a terméket eredményezte. Így ezt a terméket teikoplanin pszeudo-aglikonként publikálták [25]. Tanszékünk munkatársai együttműködő partnereivel. Az N-acetil-glükózamin részt csak jóval erélyesebb körülmények

között lehetett eltávolítani, ám ekkor már az alapváz is bomlást szenvedett, így a kísérleteinket ezzel a pszeudo-aglikonnal végeztük el, mely több ízben is kitűnő kiindulási váznak bizonyult antibakteriális és antivirális vegyületek előállítására. [26]

4.3 A teikoplanin pszeudo-aglikon izoindol- és benzoizoindol-származékainak előállítása

Az 1970-es évek óta ismert a reakció, mely lehetővé teszi primer aminokból izoindol-vázú molekula előállítását. Roth ismerte fel, hogy ha 2-merkaptotanol és ortoftálaldehid elegyéhez különböző aminosavakat adagolva, az oldatban intenzív fluoreszcenciás aktivitás jelentkezik [27]. A reakciót napjainkban is gyakran alkalmazzák aminosavak fluoreszcens jelzésére és kvantitatív mérésére, illetve alkalmazzák még ammónia illetve CN^- mennyiségének meghatározására.[21-23]



6. ábra Az izoindol képződés mechanizmusa

A reakció mechanizmusára számos elmélet született, pl.: Simmons és Johnson, vagy Wong, Sternson, és Schowen, amelyekben a különbségek pusztán az intermediér vegyületek elméleti kialakulásában van. De egyben mindegyik elmélet megegyezik, ez pedig a reagensek megfelelő sorrendben történő adagolása. Ennek értelmében először az ortoftálaldehidet és a tiol származékot kell feloldani, az általunk végzett kísérletben DMF és metanol elegyét használtuk, ugyanis ezen két reaktánsból egy olyan intermediér képződik, melyhez hozzáadva az előzőleg metanolban feloldott primer aminocsoportot tartalmazó vegyületet, alakul ki egy kondenzációs folyamat során az izoindol származék [22,28] (6. ábra).

A reakció lefolyása gyors, mivel az intermedierek nem stabilisak és a primer amin hozzáadva a rendszerhez, gyakorlatilag percek alatt lejátsszódik a reakció. Az intermedierek illetve az izoindol származékok instabilitása miatt a reakciót sötét lombikban kell végezni, inert gázt,

argont, átbuborékolatva a rendszeren. Így megakadályozható az oxigén illetve a fény által okozott oxidációs folyamatok károsító hatása. Mindezen körülmények betartása fontos a tárolás során is.

Ezen régóta alkalmazott reakció lehetőséget ad arra, hogy az így kialakított izoindol- és benzoizoindol-vázhoz egy tioéter-kötésen keresztül, különböző oldalláncokat kapcsoljunk. Mivel a teikoplanin-származékok heptapeptid alapvázához köthető biológiai hatásokat jelentősen befolyásolja a hozzájuk kapcsolódó funkciós csoportok által kialakított kémiai környezet, ezért az antibakteriális, ill. a fluoreszcens sajátságok vizsgálatához egy vegyületsorozatot állítottunk elő.

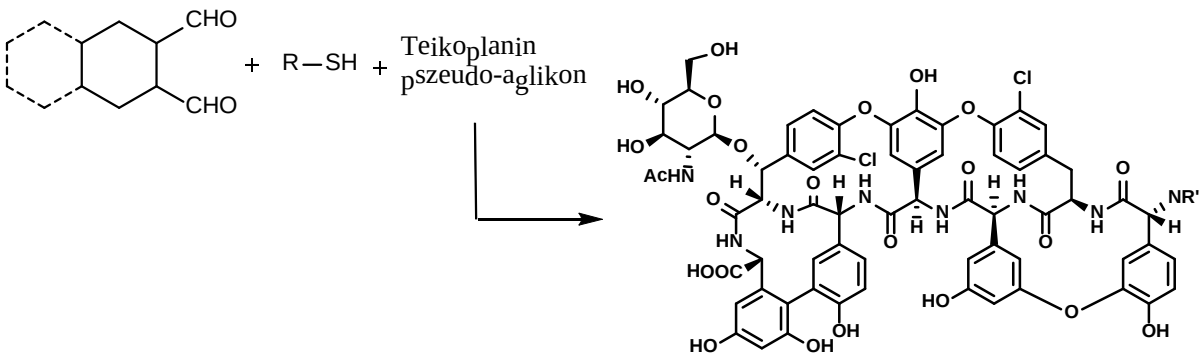
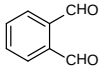
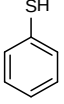
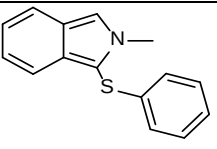
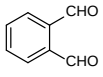
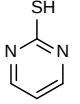
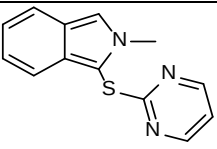
Mivel a dialdehyd származékok (ortoftálaldehid, naftalin-2,3-dialdehyd) kereskedelmi forgalomban elérhetőek, illetve a primer amint tartalmazó vegyület (teikoplanin pszeudo-aglikon) előállítását ismerttettem, így a tiol-származékok változtatásával lehet befolyásolni a keletkező vegyületek tulajdonságait.

A glikopeptid család korábbi vizsgálatait figyelembe véve megállapítható, hogy a lipofilebb tagok erősebb antibakteriális hatással rendelkezhetnek a hidrofileknél, így választottuk aromás illetve heteroaromás vegyületeket, amelyek oldalláncként beépülve a molekulába, annak apolaritását a kondenzált heteroaromás rendszerrel együtt tovább növelik. Ezek a vegyületek a következők: tiofenol, 2-merkaptó-pirimidin, ill. 2-merkaptó-benzotiazol. E tiol-reagenseket felhasználva izoindol, valamint benzoizoindol-származékokat is szintetizáltunk, azzal a céllal hogy a lipofilitást még inkább megnöveljük, illetve hogy összehasonlíthassuk a két különböző dialdehyd származék hatását az antibakteriális aktivitásra. Mindemellett a benzoizoindol-származékokról könnyebb gerjeszthetőséget feltételeztünk, mely a gerjesztési és az emissziós hullámhosszak maximumának differenciáját növelve alkalmasabbak lehetnek a fluoreszcens vizsgálatokhoz.

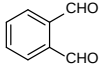
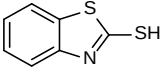
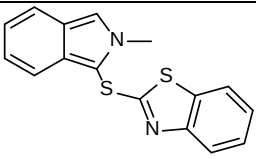
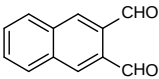
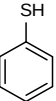
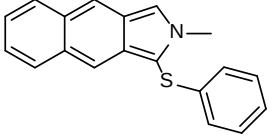
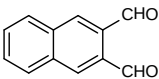
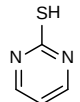
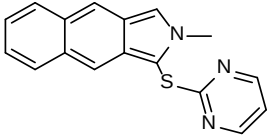
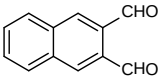
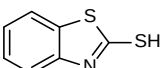
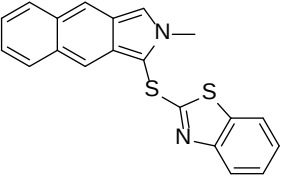
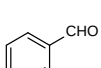
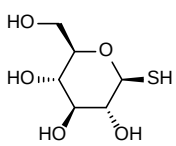
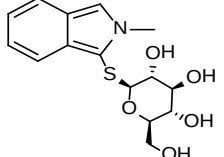
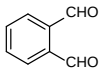
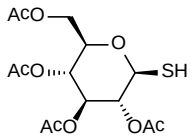
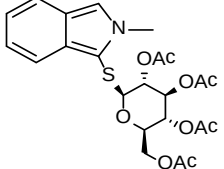
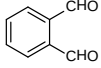
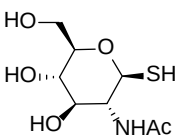
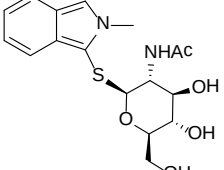
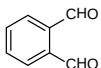
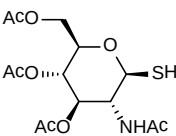
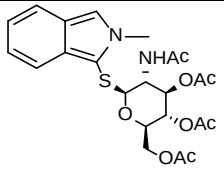
Másrészről olyan reagenseket is alkalmaztunk, melyek S-glikozidos kötással cukor oldalláncot tartalmaznak. Amennyiben védőcsoportoktól mentes szénhidrát-részeket építünk be, a hidrofilitás megnő, de az eredeti glikopeptid antibiotikum kémiai jellegéhez közelebb álló származékokat nyertünk. Védőcsoporttal ellátott per-acetil szénhidrátok alkalmazása esetén a tiol-rész lipofilitásra gyakorolt hatása kevésbé szignifikáns (1. táblázat, logP adatok). Azért alkalmaztuk ezeket a tiol-reagenseket, mert egy korábban a tanszéken végzett kutatás során kiderült, hogy ezen vegyületekkel képzett risztocetin-aglikon származékoknak is

meglepően jó az antibakteriális aktivitása [26]. Választásunk a következő glükóz-származékokra esett: 1-tio- β -D-glükózt, 1-tio-2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glükózt, 1-tio-2-acetamido-2-dezoxi-2,4,6-tri-O-acetil- β -D-glükózt illetve 1-tio-2-acetamido-2-dezoxi- β -D-glükóz.

1. táblázat Az előállított teikoplanin pszeudo-aglikon származékok szerkezete

					
Termék	Kiindulási dialdehyd származék	Tiol reagens (R-SH)	A teikoplanin pszeudo-aglikonhoz kapcsolt új rész (R'-)	Hozam (%)	logP*
1				76	7.21
2				65	5.24

1. Táblázat folytatása

3				49	7.95
4				31	8.44
5				62	6.47
6				58	9.18
7				51	2.20
8				72	6.25
9				49	3.53
10				52	5.03

* A logP értékeket a ChemSketch logP add-onnal számoltuk

A kapott termékek szerkezetének és tisztaságának ellenőrzésére több különböző módszert alkalmaztunk. A reakcióelegyből mintát vettünk és vékonyréteg-kromatográfiás technikával, megfelelő oldószerrendszert alkalmazva, ellenőriztük a reakció előrehaladását illetve a

termékképződést. Oszlopkromatográfiát alkalmazva megtisztítottuk a terméket a szennyezőktől, majd a kinyert anyagból mintát véve MALDI-ToF tömegspektrometriával ellenőriztük a vegyületek molekulatömegét. A kapott eredményeket összehasonlítva a reakció egyenlet által számolt molekulatömeggel megállapítható, hogy a megfelelő termék képződött-e. A termékek ^1H - és ^{13}C -NMR spektrumainak felvétel folyamatban van, így HPLC-s elemzéssel bizonyosodtunk meg a megfelelő tisztasági fokról. A kialakított (benzo)izoindol egységek jelenlétét emellett az UV fényben látható fluoreszcencia is igazolja, habár fluoreszcens és UV-spektrumok felvétele még nem történt meg, ami még egy hiteles bizonyíték lenne a termékek jelenlétére.

4.4 Az előállított vegyületek fizikai-kémiai paraméterei

Az előállított származékok szerkezetének ellenőrzésére elvégzett tömegspektrometriás adatokat, valamint a megfelelő tisztaság ellenőrzését biztosító HPLC-s eredményeket a 2. táblázat tartalmazza. A termékek polaritásának tanulmányozására számolt logP értékeket az 1. táblázat tartalmazza.

2.táblázat A származékok néhány fontosabb fizikai-kémiai paraméterei

Termék	Tömegspektrum (MALDI-ToF)				HPLC retenciósidő (min)**
	Összegképlet	Összegképletből számolt molekulatömeg, M (g/mol)	Észlelt molekulaionból számított molekulatömeg (g/mol)	Molekulaion és tömege (Da)*	
1	$\text{C}_{80}\text{H}_{66}\text{Cl}_2\text{N}_8\text{O}_{23}\text{S}$	1608.3	1631.3 ($\text{M}+\text{Na}^+$)	1631.6 ($\text{M}+\text{Na}^+$)	6.92
2	$\text{C}_{78}\text{H}_{64}\text{Cl}_2\text{N}_{10}\text{O}_{23}\text{S}$	1610.3	1633.3 ($\text{M}+\text{Na}^+$)	1633.7 ($\text{M}+\text{Na}^+$)	4.73
3	$\text{C}_{81}\text{H}_{65}\text{Cl}_2\text{N}_9\text{O}_{23}\text{S}_2$	1665.3	1539.4 ($\text{M}-\text{SR}+\text{K}^+$)	1539.6 ($\text{M}-\text{SR}+\text{K}^+$)	4.72
4	$\text{C}_{84}\text{H}_{68}\text{Cl}_2\text{N}_8\text{O}_{23}\text{S}$	1658.4	1697.5 ($\text{M}+\text{K}^+$)	1697.3 ($\text{M}+\text{K}^+$)	6.26
5	$\text{C}_{82}\text{H}_{66}\text{Cl}_2\text{N}_{10}\text{O}_{23}\text{S}$	1660.3	1699.4 ($\text{M}+\text{K}^+$)	1699.5 ($\text{M}+\text{K}^+$)	5.51

6	$C_{85}H_{67}Cl_2N_9O_{23}S_2$	1715.3	1589.5 (M-SR+K ⁺)	1589.5 (M-SR+K ⁺)	5.50
7	$C_{80}H_{72}Cl_2N_8O_{28}S$	1694.4	1717.5 (M+K ⁺)	1717.5 (M+Na ⁺)	4.31
8	$C_{88}H_{80}Cl_2N_8O_{32}S$	1862.4	1885.4 (M+Na ⁺)	1886.0 (M+Na ⁺)	6.40
9	$C_{82}H_{75}Cl_2N_9O_{28}S$	1735.4	1555.3 (M-R+Na ⁺)	1555.3 (M-R+Na ⁺)	4.30
10	$C_{88}H_{81}Cl_2N_9O_{31}S$	1861.4	1884.4 (M+Na ⁺)	1884.9 (M+Na ⁺)	5.41

Az egyes esetekben a következő fragmentációs mintázatot észleltük a MALDI-TOF spektrumokban: $[M]^{+} \rightarrow [M-R]^{*+} \rightarrow [M-SR]^{*+}$, habár néhány esetben a molekulaiont nem lehetett detektálni. ** A termékek tisztasága >95%.

4.5 Az előállított vegyületek antibakteriális jellemzői

Az új teikoplanin pseudo-aglikon származékok szintézise során fontos célunk volt, hogy olyan vegyületeket állítsunk elő melyek antibakteriális hatása megközelíti vagy felülmúlja a gyógyszerpiacon jelenleg is forgalomban lévő vankomicin és teikoplanin antibakteriális hatáserősségét.

A vizsgálatokat számos olyan Gram-pozitív baktériummal szemben végezték el, amelyekre a terápiában jelenleg is alkalmazott glikopeptid antibiotikumok spektruma kiterjed, illetve amelyek a nosokomiális infekciók szempontjából kiemelt jelentőségű glikopeptid-rezisztenciával rendelkeznek. A teszt során leveshígítási módszert, kettes léptékű hígítási sort alkalmaztak a következő baktériumokat felhasználva: *Bacillus subtilis*, meticillin-szenzitív és meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*, biofilmet képző, ill. mecA rezisztens *Staphylococcus epidermidis*, valamint glikopeptid-szenzitív, vanA és vanB rezisztens *Enterococcus faecalis* törzsek. A vizsgálat során mind a MIC, mind az MBC értékek meghatározása sikerült, így nem csak a bakteriosztatikus, de a baktericid hatásról is információhoz jutottunk.

Vizsgált baktériumtörzs	MIC/MBC (µg/mL)											
	Teicoplanin	Vankomicin	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
B.subtilis ATCC 6633	0,5-1/16	1/4	1/1	0,0625/0,5	1/2	2/4	0,0313/2	0,0313/4	0,125/1	0,25/64	0,125/1	0,25/1
S. aureus MSSA ATCC 29213	0,5/2	1/4	0,125/128	0,0313/0,5-2	0,0075/0,5	0,0313/1	0,015/0,5	0,015/0,5	0,0313/1	0,0625/16-32	0,5/1	0,125/1
S. aureus MRSA ATCC 33591	0,5/2-4	0,5/4	0,0625/2	0,0313/8	0,0075/0,5	0,25-0,5/0,5	0,015/0,5	0,015/4	0,0075/1	0,0313-1/128	1/1-2	0,0625/2
S. epidermidis biofilm ATCC 35984	2/16-32	2/4	0,0165/0,5	0,0165/1	0,0075/0,5	0,0313/0,5	0,015/0,5	0,015/0,5	0,0075/0,5	2/8	0,0313/0,5	0,0075/2-4
E. faecalis ATCC 29212	2/64	4/16	0,0075/256	0,0313/256	2-4/256	1/256	0,015/256	0,0313/256	2/256	1/256	1/256	2-4/256
S. epidermidis mecA	8-16/32	2/4	2/32	4/64-128	4/256	0,0313/256	0,015/256	0,0313/256	0,015/32	2-4/256	0,0075-1/64	2/32
E. faecalis 15376 vanA	256/256	256/256	2/32-64	0,0625/256	0,0313/256	0,125/32	0,5/256	0,0313/32	0,0625/256	4/256	1/256	0,0625/256
E. faecalis ATCC 51299 vanB	4/256	16/16	2/256	1/256	0,0625/256	2/256	1/256	1/256	1/256	4/256	4/256	2/256
3.táblázat Az új teikoplanin pszeudo-aglikon és a referenciaként használt antibiotikumok antibakteriális aktivitása												

MIC: Minimális gátló koncentráció, ATCC: American Typed Culture Collection, MSSA: Methicillin Érzékeny *Staphylococcus aureus*, MRSA: Methicillin Rezisztens *Staphylococcus aureus*, vanA: vanA gén pozitív, vanB: vanB gén pozitív.

Az antibakteriális eredmények tükrében megállapítható az, hogy az új származékok hatásere ssége lényegesen jobb, mint a teikoplaniné vagy vankomiciné. A MIC értékek csak néhány esetben nagyobbak, mint a referencia vegyületeké. Az MBC értékek viszont bizonyos esetekben meglepően elmaradnak a piaci glikopeptidkétől.

A meticillin-szenzitív és meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*, illetve a *Staphylococcus epidermidis* biofilmképző baktériumok esetén a származékok MIC értékei minden esetben alacsonyabbak a piaci vegyületekhez képest. Az MBC értékek, két-három molekulát kivéve, jelentősen jobbak. Igazán érdekes megfigyelést lehet tenni a biofilm képző *S. epidermidis* esetén, ugyanis három termék is képes 7,5 ng/ml koncentrációban gátolni a baktériumok növekedését, holott ezen baktérium esetén a vegyületnek még egy összetett makromolekula rendszeren is át kell jutnia, hogy eljusson a sejtfalig ahol hatását kifejti.

A *mecA* gént hordozó *Staphylococcus epidermidis*, illetve az *Enterococcus faecalis* baktériumok esetén jó néhány vegyületnél megfigyelhető, hogy lényegesen alacsonyabb koncentrációban képesek gátolni a baktériumok növekedését, mint az anyavegyület. Viszont az MBC értékek minden egyes vegyületnél lényegesen elmaradnak, így megállapítható, hogy a szintetizált származékok csak bakteriosztatikus hatást képesek kifejteni ezen baktériumokra.

A teikoplaninra és vankomicinre is rezisztens *Enterococcus faecalis* esetén azt tapasztaltuk, hogy a származékok az **1,8,9**-es vegyületek kivételével ng/ml-es koncentrációban képesek gátolni a baktériumok növekedését. A rezisztencia mechanizmust figyelembe véve arra a következtetésre jutottunk, hogy ezek a származékok nagy valószínűséggel nem a glikopeptidek hatáspontján hatnak, tehát nem a pentapeptid D-Ala részéhez kapcsolódnak, hanem a lipoglikopeptidek hatásmechanizmusánál tanulmányozott sejtmembránon történő pórusképzés segítségével akadályozzák a baktériumok életfolyamatait. Előző glikopeptid-izoidol származékaink adatai alapján joggal feltételezhetjük, hogy ezen új vegyületek is önszerveződő rendszereket képeznek vizes oldatokban és így a multivalencia jelenségén keresztül érnek el hatásfokozódást.

A *vanB* rezisztencia gént hordozó *Enterococcus faecalis* esetén a várt megnövekedett antibakteriális hatás elmaradt, pusztán egyetlen vegyületnél figyelhető meg nagyságrendekkel nagyobb hatásfokozódás. Ennek egyik lehetséges oka az lehet, hogy a *vanB* rezisztencia génnek ezen vegyületek is ugyanolyan jó induktori, mint a teikoplanin és vankomicin. Míg a

vanA génnek valószínűleg rossz induktora, így képesek az antibiotikum származékok kifejteni hatásukat ilyen alacsony koncentrációban is.

A legjobb eredményekkel rendelkező vegyületek a **2,3,5,6,7** és **10**-es vegyületek. Ez alapján megállapítható, hogy a 2-merkaptó-pirimidinnek, illetve 2-merkaptó-benzotiazolnak mind az izoindol, mind a benzoizoindol származéka kiváló antibakteriális hatású. A **7**, **10**-es vegyületek szénhidrát oldallánccal rendelkező izoindol származékok, ám így is igen kiváló hatásokkal rendelkeznek, mint ahogy azt korábbi tanulmányok is bizonyítják.

Összegezve a baktériumellenes aktivitásokat megállapítható az, hogy több nagyság rendbeli hatásnövekedést értünk el az új teikoplanin pszeudo-aglikon származékokkal, és ezen új származékok közül elsősorban a heteroaromás oldalláncot tartalmazó vegyületek tűnnek hatásosabbnak.[29]

5. Kísérleti rész

5.1 Anyagok és módszerek

A kísérlethez felhasznált teikoplanin, orto-ftálaldehid, naftalin-2,3-dialdehid, illetve a tiolszármazékok nagy része a kereskedelmi forgalomban megtalálhatóak. Az 1-tio-2-acetamido-2-dezoxi-2,4,6-tri-O-acetil- β -D-glükózt irodalmi adatok alapján állították elő a Tanszéken [30]. A dezacetilezési folyamatot a Zemlén-féle módszerrel végeztük el [31].

A reakciók végbemenetelét vékonyréteg kromatográfiás módszerrel ellenőriztük, melyhez Kieselgel 60 F₂₅₄ típusú lemezt használtunk, a foltok detektálására pedig UV-lámpát, Pauly-reagenst, ill. ammónium-molibdenát/kénsav előhívószert. Az oszlopkromatográfiás tisztítás flash kromatográfiás technikával történt, amihez 0,040-0,063 mm szemcseméretű Kieselgel 60 típusú szilikát használtunk. A tömegspektrumok felvétele Bruker Biflex III típusú tömegspektrométerrel történt. A logP értékek kiszámításához a „ChemSketch logP add-on” programot használtuk. A HPLC-s vizsgálathoz használt oldószerrendszer: A: HPLC minőségű víz pH=2,6 (TFA-val beállítva), B: acetonitril. A mérés során gradiens elúciós technikát alkalmaztak, melyet a következő táblázatban foglaltam össze:

IDŐ (perc)	A (%)	B (%)
0	90	10
0,2	80	20
10	10	90
10,4	90	10
4.táblázat A HPLC-s vizsgálat esetén alkalmazott gradiens elúciós módszer adatai		

Az áramlási sebesség: 600 $\mu\text{L}/\text{perc}$, miközben a kolonna hőmérséklete 40 °C. A méréshez Hypersil Gold 50x2.1 mmID, 1.9 μm típusú kolonnát használtak, melyre 5 μL mintát injektáltak be, és végül diódasoros detektorral szobahőmérsékleten detektálták a jeleket.

4.5.2 Általános kísérleti leírás

0,10 mmol ortoftalaldehidet (naftalin-2,3-dialdehidet) és 0,10 mmol tiol funkciós csoportot tartalmazó reagenst oldunk 5,0 mL metanolban fénytől védett vagy barna lombikban. A lombikot lezárjuk, majd 10 percig argon gázt átvezetve a rendszeren a levegőt kiszorítjuk. Az elegyet 30 percig kevertetjük, majd az elegyből vett mintát Kieselgel 60 F₂₅₄ típusú lemeze cseppentve a tiol-reagens, illetve az alkalmazott dialdehyd sajátosságainak megfelelő oldószerrendszerben futtatjuk meg a lemezt. A megjelenő intermediert UV-lámpa és ammónium-molibdenát/kénsav előhívószert alkalmazásával mutatható ki. Az ellenőrzés elvégzése után a 2,0 mL DMF + 3,0 mL MeOH elegyében előzetesen feloldott 105 mg teikoplanin pszeudo-aglikont (0,075 mmol) az elegyhez adagoljuk, majd a lombik gázterének újbóli argongázzal történő átmosása után 1 órán keresztül kevertetjük a reakcióelegyet. A reakció végbemenetelét vékonyréteg-kromatográfia segítségével ellenőrizzük, természetesen a megfelelő oldószerrendszert alkalmazva, majd a terméket jelenlétét UV-lámpa, illetve Pauly-reagenssel történő előhívással detektáljuk. A reakcióelegyet Kieselgel 60 típusú szilikára pároljuk, majd oszlopkromatográfián tisztítjuk a terméket az esetleges szennyeződésektől a korábban meghatározott eluens rendszert alkalmazva. A tisztítás során a termék fénybomlásának megakadályozására az oszlopot befedjük. A kinyert termék bepárlása után szilárd, kristályos anyag marad vissza.

A teikoplanin pszeudo-aglikont a Boger és mtsai [24] által kidolgozott módszer módosított formáját alkalmazva állították elő. A módszer leírása:

Teikoplanint (3.5 g, 1.87 mmol) oldanak anizol (3.0 mL) és folyékony HF (5.0 mL) elegyében -70 - 80°C-on, Sakakibara készüléket alkalmazva. A reakcióelegyet kevertetik -18°C-on 2 órán keresztül. A 2 óra elteltével az anizolt és a HF-ot elpárologtatják és a maradékot elegyítik hideg etil-acetát: metanol = 4:1 elegyével (100 mL). A keletkező csapadékot kiszűrik, majd hideg etil-acetáttal és éterrel mossák, így nyerve a teikoplanin pszeudo-aglikont (2.1 g, 80%).

6. Összefoglalás

A kutatómunkám során sikerült tíz új teikoplanin pszeudo-aglikon származékot előállítanom. A kísérletek során a teikoplanin pszeudo-aglikon primer aminocsoportját felhasználva izoindol, valamint benzoizoindol vázat képeztünk, melyen keresztül több, különböző fiziko-kémiai tulajdonsággal rendelkező, oldalláncot kapcsoltunk az anyavegyülethez. A reakciók tervezése során két szempontot kellett figyelembe venni: az egyik az volt, hogy az új vegyületek antibakteriális hatása emelkedettebb legyen, mint a forgalomban lévő hatóanyagoké. A másik szempont az volt, hogy a molekulák olyan fluoreszcens aktivitással rendelkezzenek, mely által alkalmassá válnak arra, hogy mikroszkópos vizsgálatokat végezve megállapíthatóak legyenek az esetleges antibakteriális hatásmechanizmusok.

A vegyületsorozat tagjait ennek megfelelően bakteriológiai módszerekkel. A minimális bakteriosztatikus és baktericid értékeket megvizsgálva megállapítható az, hogy minden egyes származék esetén igen jelentős növekedés figyelhető meg a baktérium növekedését gátló hatásban. Mindösszesen csak egyetlen baktérium esetén, a vanB rezisztencia gént hordozó *Enterococcus faecalis* esetén nem volt jelentős hatáserősödés, az összes többi vizsgált baktériumnál jelentős volt a MIC, esetleg az MBC értékek csökkenése. A hatásnövekedés az esetek jelentős részében oly annyira kifejezetté vált, hogy nemcsak $\mu\text{g/mL}$ -es, hanem már ng/mL -es koncentráció tartományban is hatásossá váltak az egyes származékok. Emellett a szintetizált molekulák a mérések során fluoreszcensnek is bizonyultak, viszont a mikroszkópos technika alkalmazásának eredményei még nem érhetőek el.

A jövőbeni céljaink közé tartozik, hogy további izoindol, illetve benzoizoindol származékokat állíthassunk elő a teikoplanin pszeudo-aglikon felhasználásával, az antibakteriális hatásnövekedés végett. Tervezzük még az izoindol reakció olyan irányú felhasználását, ahol ugyanezen tiol csoportokat használnánk, de teikoplanin helyett egy β -laktám antibiotikumot, a cefalexint használnánk. A cefalexin is tartalmaz egy primer aminocsoport, így alkalmas az izoindol képzésre, és az esetleges termékek antibakteriális hatását megmérve, szerkezet-hatás összefüggéseket lehetne levonni.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Prof. Dr. Herczegh Pál tanszékvezető egyetemi tanárnak és Dr. Sipos Attila egyetemi tanársegédnek, szakmai iránymutatásukért és a munkámhoz elengedhetetlen elméleti és gyakorlati tanácsaikért.

Köszönetet mondok Róth Józsefnének, aki mindig segítette munkámat a kísérletek gyakorlati megvalósítása során.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Hollósi Miklós egyetemi tanárnak és Dr. Illyés Eszternek az ELTE Szerves Kémiai Tanszékéről a teikoplanin deglikozilezési reakciójának végrehajtásáért.

Köszönetet szeretnék mondani továbbá az előállított vegyületek jellemzőinek megismeréséhez nélkülözhetetlen vizsgálatok elvégzéséért:

- Prof. Dr. Rozgonyi Ferencnek és Dr. Ostorházi Eszternek a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikáról a bakteriológiai tesztek elvégzéséért.
- Dr. Kiss-Sziksai Attilának a Debreceni Egyetem Szerves Analitikai Laboratóriumában elvégzett a HPLC-s vizsgálatokért.
- Dr. Bakai-Bereczki Ilonának tanszékünkéről a vegyületek MALDI-ToF tömegspektrumának felvételéért.

Végül szeretném megköszönni a DE OEC GYTK Gyógyszerészi Kémiai Tanszék minden egyes munkatársának segítségüket, értékes tanácsaikat, amellyel munkámat segítették.

8. Irodalomjegyzék

- [1] http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1952/waksman-bio.html
- [2] http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming.html
- [3] Castanon J. I. (2007). "History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds". *Poult. Sci.* 86 (11): 2466–2471.
- [4] Szarka K., Kardos G., Gyógyszerészeti mikrobiológia I., DEOEC Orvosi Mikrobiológiai intézet, 2008.
- [5] Theuretzbacher, U. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 2009, 34, 15-20.
- [6] Jovetic S., Zhu Y., Marcone G.L., Marinelli F., Tramper J., β -Lactam and glycopeptide antibiotics: first and last line of defense? *Trends Biotechnol.* 2010 Dec.; 28 (12):596-604. Epub 2010 Oct. 21. Review.
- [7]] Fürst Zs.; Gyires K. (szerk). *Farmakológia*, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2007, 799-856.
- [8] Levine D. P., *Clin. Infect. Dis.* 2006, 42, S5–S12.
- [9] Sztaricskai F., Harris C.M., Neszmélyi A., Harris T.M., Structural studies of ristocetin A (ristomycin A). Carbohydrate—aglycone linkages. *J. Am. Chem. Soc.* 102: 7093–7099 (1980)
- [10] Nicolaou K. C.; Synder S. A.(2003). *Classics in total synthesis II: More targets, strategies, methods.* Wiley-VCH.
- [11] Nieto M.; Perkins H. R., *Biochem. J.* 1971, 123, 773-787.
- [12] Perkins H. R., *Biochem. J.* 1969, 111, 195-205.
- [13] Williams D. H. ; Butcher D. W., *J. Am. Chem. Soc.* 1981, 103, 5700-5704.
- [14] Kalman J. R. ; Williams D. J., *Am. Chem. Soc.* 1980, 102, 897-905.
- [15] Allen N. E. ; Nicas T. I., *FEMS Microbiol. Rev.* 2003, 26, 511-532.
- [16] Walsh C., *Antibiotics: actions, origins, resistance.* ASM Press, 2003, 148-155.

- [17] Boda Z., Sztaricskai F., Bognár R., Rák K., Zajka G., Daróczy I., Method for preparation of ristomycin (ristocetin) A in high quality and its reagent to the study of platelet agglutination experiments. (in Hungarian) 3020/82 Hungarian Patent (June 28, 1984)
- [18] 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.
- [19]http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c9/Teicoplanin_core_and_major_components.svg, letöltve: 2012.04.21
- [20] A. Bernareggi, A. Borghi, M. Borgonovi, L. Cavenaghi, P. Ferrari, K. Vékey, M. Zanol, and L. F. Zerilli, Teicoplanin metabolism in humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992 August; *36* (8): 1744–1749.
- [21] Palczewski K., Hargrave P.A., Kochman M., o-Phthalaldehyde, a fluorescence probe of aldolase active site., *Eur. J. Biochem.* 1983 Dec. 15; *137* (3):429-35.
- [22] Zuman P., *Chem. Rev.* 2004, *104*, 3217-3238.
- [23] Michalak K., Bobrowska M., Sikorski A.F., Investigation of spectrin binding to phospholipid vesicles using isoindole fluorescent probe. Thermal properties of the bound and unbound protein. *Gen Physiol Biophys.*, 1990 Dec; *9* (6):615-24.
- [24] Wanner J. ; Tang D.; McComas C. C., Crowley, B. M.; Jiang, W.; Moss, J.; Boger, D. L. *Bioorg.. Med. Chem. Lett.* 2003, *13*, 1169-1173.
- [25] 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*, *62*, 6053-6061, 2009.

- [26] 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*. – 20 : 9 (2010), p. 2713-2717.
- [27] Marc R., Fluorescence reaction for amino acids, *Anal. Chem.*, 1971, 43 (7), pp 880–882
- [28] S. Stoney Simons Jr., David F. Johnson, Reaction of o-phthalaldehyde and thiols with primary amines: formation of 1-alkyl(and aryl)thio-2-alkylisoindoles, *J. Org. Chem.*, 1978, 43 (14), pp 2886–2891
- [29] Attila Sipos, Zsolt Török, Erzsébet Róth, Attila Kiss-Szikszai, Gyula Batta, Ilona Bereczki, Zsolt Fejes, Eszter Ostorházi, Ferenc Rozgonyi, Lieve Naesens, Pál Herczegh: Isoindole derivatives of teicoplanin pseudoaglycon with highly potent antibacterial activity *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, közlésre benyújtva
- [30] Wolfgang Meyer zu Reckendorf, William A. Bonner, Sulfur substitution compounds of amino sugars. 1-Thio-D-glucosamine, *J. Org. Chem*, 1961, 26 (11), pp 4596–4599
- [31] Zemplén G, Gerecs Á, Hadácsi I. Saponification of acetylated carbohydrates (in German). *Chem Ber* 69: 1827–1830 (1936)