



**KOVALENS INHIBITOR FEJLESZTÉSE H3 RECEPTORRA FRAGMENSALAPÚ
MEGKÖZELÍTÉSSEL**

OTDK DOLGOZAT

Garami Kristóf Noel

MSc Gyógyszervegyészmérnök hallgató

Témavezető:

Dr. Ábrányi-Balogh Péter

tudományos főmunkatárs

c. egyetemi docens

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyészmérnöki és Biomérnöki kar

2023

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Dr. Ábrányi-Balogh Péternek**, hogy dolgozatom elkészítése során mindig támogatott. Az elmúlt években végzett közös munkának köszönhetően számos értékes tanácsot kaptam tőle, melyek nagyban elősegítették szakmai fejlődésemet és ezen dolgozat elkészülését.

Szeretném kifejezni köszönetemet **Prof. Keserű György Miklósnak**, hogy a TTK Gyógyszerkémiai Kutatócsoportban végezhettem a kutatást, melyből ez a dolgozat született.

Szeretném megköszönni **Vincenzo di Lorenzonak** a dolgozatom témájával kapcsolatban végzett molekulamodellezést.

Köszönettel tartozom továbbá **Németh Csongor Gergelynek** a jó laborhangulathoz való hozzájárulásáért és a **TTK Gyógyszerkémiai Kutatócsoport** minden tagjának kutatásomban való segítségéért és támogatásáért.

Szeretnék köszönetet mondani **Szabó Pálnak** a HRMS mérések elvégzéséért, illetve **Szepesi Kovács Dénesnek** és **Varró Nikolettnek**, akiket bármikor bizalommal kereshettem liofilizálással kapcsolatban.

Tartalom

1. Bevezetés.....	3
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1. Fragmentsalapú gyógyszerkutatás	5
2.2. Kovalens fehérjejelölés.....	8
2.3. Heterociklusos vegyületek a gyógyszerkutatásban	10
2.4. A hisztamin és a H ₃ receptor.....	11
3. Célkitűzés	14
4. Saját munka	15
4.1. Szintézisterv.....	19
4.2. Szintézisek megvalósítása	20
4.3. Biológiai mérések eredményei	28
5. A kísérleti tapasztalatok értelmezése molekulamodellezés segítségével	30
6. Kísérleti rész.....	32
6.1. A kutatás során használt analitikai módszerek	32
6.2. Elvégzett preparatív munka ismertetése	33
7. Összefoglalás.....	43
8. Irodalomjegyzék.....	44

1. Bevezetés

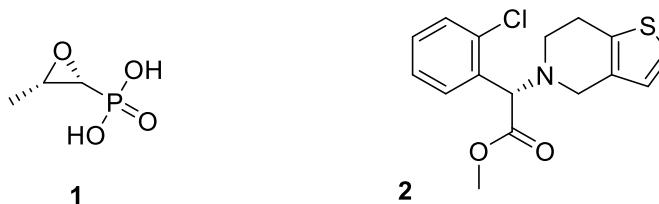
Az új gyógyszerek fejlesztése során a modern gyógyszerkutatás többféle megközelítést is alkalmaz kiindulópontok azonosítására. A hagyományos HTS-szűrési módszerek mellett, az elmúlt évtizedekben a fragmensalapú gyógyszerkutatás kiemelkedő jelentőségűvé vált, mint releváns kémiai kiindulópont keresésére alkalmas módszer.¹ Az eljárás során a konvencionális nagyméretű gyógyszereszerű molekulák szűrése helyett kisebb, úgynevezett fragmensek kémiai terét térképezzük fel annak érdekében, hogy releváns kiindulópontot találjunk a gyógyszerfejlesztéshez. A két megközelítés rövid összehasonlítása az 1. táblázatban látható.

1. táblázat A HTS és a fragmens vegyülettár rövid összehasonlítása

	HTS vegyülettár	Fragmens vegyülettár
Molekulaméret	MW>300	MW<300
Könyvtárméret	10 ⁶	10 ³
Találatok száma	kevés	sok

A gyógyszermolekulák szervezetünkben bizonyos fehérjék üregeibe vagy felszínére kötődnek, a hagyományos megközelítés alapján a molekula és a fehérje között másodrendű kölcsönhatások alakulnak ki, mely valamilyen módon megváltoztatja az adott fehérje működését. Az elmúlt időszakban azonban egyre gyakoribb az olyan gyógyszerek sikeres fejlesztése, melyek a fehérjével nem csak másodlagos kötőerőket, hanem kovalens kötést is képesek kialakítani egy kötőelem (warhead) segítségével.

Míg a kovalens fehérjemódosítás számos hátlutóval rendelkezhet (pl.: immunogenitási problémák), addig több rendkívül előnyös tulajdonsága is van (pl.: nagy hatékonyság), így a megfelelő elővigyázatossággal értékes hatóanyagok fejleszthetők ki, mint például az antibiotikum hatású foszfomicin vagy a szívelégtelenségek kezelésére és stroke megelőzésére alkalmas clopidogrel (1. ábra).²



1. ábra A foszfomicin és a clopidogrel szerkezete

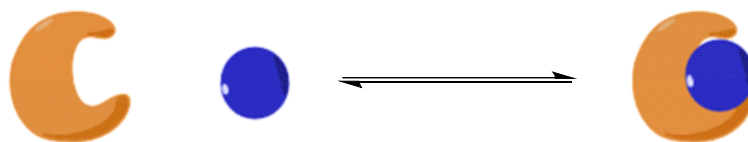
Kutatócsoportunk egyik érdeklődési területe a kovalens fragmensek szűrése, és azokból inhibitorok fejlesztése. A közelmúltban több publikáció is készült kutatócsoportunkban a témával kapcsolatban, melyekben nagyszámú, diverz szerkezetű heterociklusos elektrofil kovalens fragmens vegyülettárak tagjainak szintetizálását, illetve szűrését végezték el különböző fehérjecélpontokon nemzetközi együttműködő partnerek segítségével.³

Kutatómunkám során csatlakoztam ezekhez a kutatásokhoz, és OTDK dolgozatomban egy kovalens fragmenskönyvtár szűrését, illetve a fragmens találat fejlesztését mutatom be.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Fragmensalapú gyógyszerkutatás

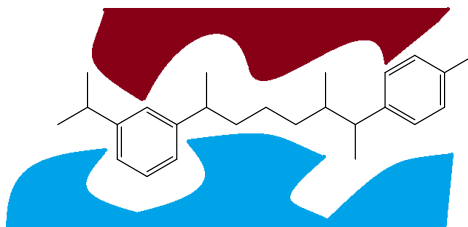
A gyógyszerek hatásukat a szervezetünkben található fehérjékkel létrejött kölcsönhatásokkal fejtik ki, a fehérjék úgynevezett kötőzsebeiben kötődnek (2. ábra), ami a gyógyszerkutatás egyik alapja, melyet még Emil Fischer és Paul Ehrlich fogalmazott meg.⁴



2. ábra Fehérje-ligandum egyensúly

Komoly kihívást jelent egy kötőzsebbe pontosan illeszkedő gyógyszer szerű molekulát találni, jelentős erőforrásokat fordítanak az alap kutatás során a kötőzsebek és az oda illeszkedő molekulák azonosítására. A megfelelő kötőzsebbe illeszkedő molekula megtalálását bonyolítja, hogy a gyógyszer szerű molekulák kémiai tere hatalmas (kb. 10^{60}), melynek túlnyomó része felderítetlen. Eleinte már létező, azonban más célra használt molekulák tesztelésével próbáltak gyógyszereket fejleszteni, azonban egy idő után ez a módszer nem bizonyult túl hatékonnak. A 20. század végére jelentősen lecsökkent a piacra kerülő gyógyszerek száma, új megközelítésekre volt szükség a gyógyszer kutatásban.

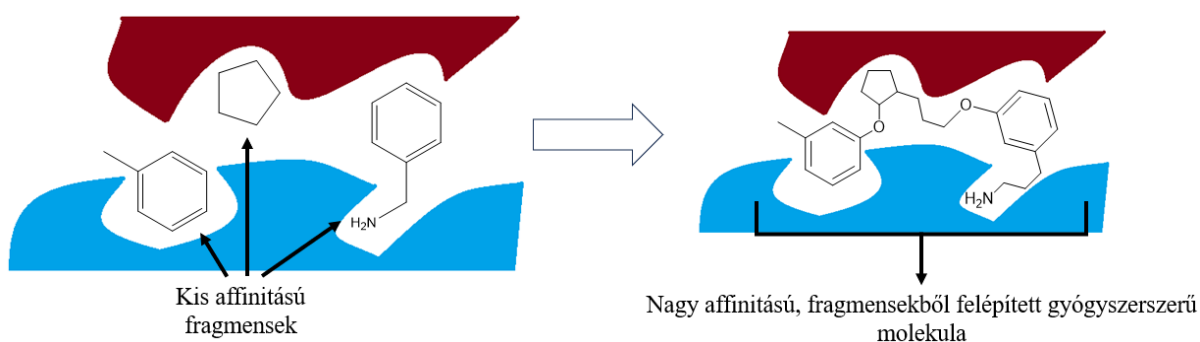
A molekuláris biológia fejlődése (DNS klónozás, fehérje expresszió) lehetővé tette az *in vitro* HTS (nagy áteresztőképességű szűrés) módszerek kifejlesztését, így elérhetővé vált egy olyan módszer, mellyel lehetséges volt sok molekula gyors biológiai szűrése. Az eljárás lényege, hogy egy robusztus biológiai teszt segítségével sok, viszonylag nagyméretű (>300 Da) molekulát vizsgálunk meg rövid idő alatt, majd az eredmények alapján azonosítjuk a releváns kémiai kiindulópontként szolgáló molekulákat (3. ábra).



3. ábra Sematikus példa HTS-szűrés eredményeképpen kapott gyógyszer szerű molekulára

A kémiai tér e módon való megismerésének egyik legnagyobb akadály, hogy a gyógyszeryszerű vegyületek száma rendkívül nagy, így nehéz a megfelelő célpont megtalálása. A HTS-szűrések során kapott találatok tesztelése esetén sok esetben a gyógyszeryszerű molekula nem tökéletesen illeszkedik be szervezetünkben található fehérje kötőzsebébe, így, ha ki is tudja fejteni hatását, sok esetben nem tökéletes. Egy ilyen, már megtalált 'nem tökéletes' molekula módosítása a pontosabb kötőzsebbe való illeszkedés érdekében, még ha lehetséges is, rendkívül körülményes munkát igényel. Egy, az elmúlt évtizedekben elterjedt újfajta megközelítés, a fragmensalapú gyógyszerfejlesztés ezt a problémát oly módon küszöböli ki, hogy kisméretű, alacsony affinitással rendelkező részecskékből építjük fel a tényleges gyógyszeryszerű molekulát, így az kevésbé tartalmaz olyan részeket, melyekre nincs szükség, és a kötőzsebbe való illeszkedés könnyebben finomhangolható.⁵

A fragmensalapú gyógyszerkutatás során tehát nem kész gyógyszermolekulákat keresünk és tesztelünk, hanem úgynevezett fragmenseket, melyek kiindulópontként szolgálhatnak a gyógyszerfejlesztésben (4. ábra).



4. ábra A fragmensalapú megközelítés során kapott találatok, és a belőlük növesztett gyógyszeryszerű molekula

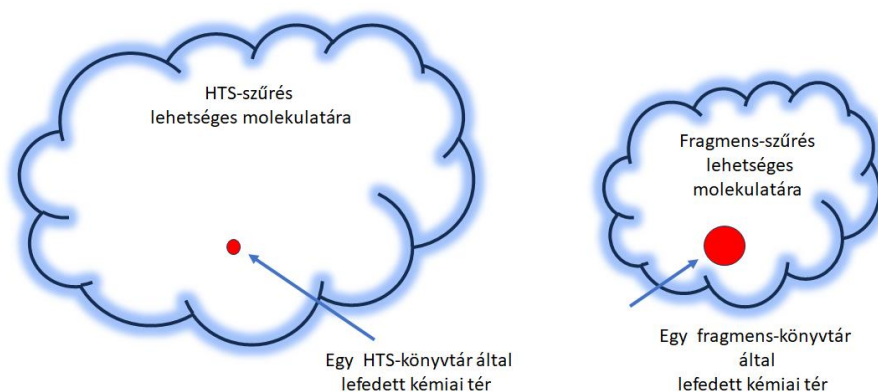
A fragmensek kis molekulatömegű anyagok, kis méretüknek köszönhetően számos kedvező tulajdonsággal rendelkeznek a nagyobb molekulákhoz képest.^{6,7} A fragmensekre általánosan érvényesül a 3-as szabály, mely azt jelenti, hogy olyan kismolekulák (< 300 Da), melyek az alábbi paraméterekkel rendelkeznek:

- 1) $\log P < 3$ (poláros molekulák)
- 2) forgatható kötések száma ≤ 3
- 3) H-kötés donor és akceptorok száma ≤ 3 .

A felsoroltak alapján tehát a fragmensek kis molekulatömegű és csekély komplexitással rendelkező vegyületek.⁸ A fragmensekre vonatkozó feltételek mellett egy fragmens vegyülettár készítése során gondos figyelmet kell fordítani arra, hogy a vegyülettár tagjai nagymértékű diverzitást mutassanak mind méret, alak, flexibilitás és komplexitás terén.⁹

A fragmensek a fehérjékhez gyengén kötődnek, affinitásuk önmagukban jóval kisebb, mint a HTS szűrések során kapott gyógyszereszerű molekuláké, azonban a fragmensek megtalálását követően azokat tovább növeszthetjük, és így a kapott molekula egy HTS-szűréshez képest nagyságrendekkel jobb affinitású is lehet. A fragmensek megfelelő biológiai környezetben történő tesztelése gyenge affinitásuk révén problémába ütközik, a HTS-szűréseknél általánosan használt biokémiai assaynél érzékenyebb módszerek alkalmazására van szükség. Az irodalomban többféle biofizikai módszer is ismert a fragmensek szűrésére, ilyenek például az NMR-n, a röntgenkristallográfián vagy az SPR-spektroszkópián alapuló módszerek.¹⁰ Az NMR-spektroszkópián alapuló módszerek alkalmazása során a fragmens kötődését vagy kémiai eltolódások változásának felismerésével, vagy pedig izotóp-jelölt fehérjék vizsgálatával határozzák meg.

A HTS-szűréshez képest a fragmensalapú megközelítés sok területen előnyösebbnek bizonyul, melyek közül kiemelendő, hogy a fragmensek „univerzuma” sok nagyságrenddel kevesebb számú tagból áll, mint a gyógyszereszerű molekuláké, így a kémiai teret jobban be lehet járni, a fragmensek esetén jobb mintavételezést tudunk elérni (5. ábra).

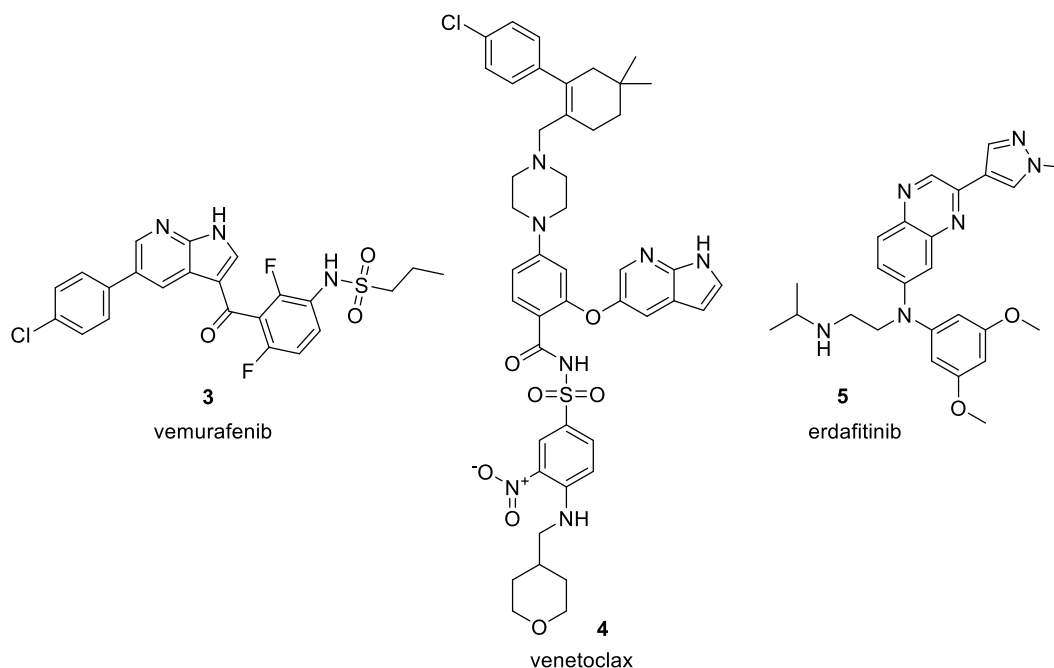


5. ábra A gyógyszereszerű-, illetve a fragmens méretű molekulák kémiai tere közti különbség szemléltetése

A fragmensek további előnye azok kedvező fizikai-kémiai paraméterei (méret, lipofilitás, oldhatóság), illetve, hogy a fragmensek a fehérjék úgynevezett „hot-spot” régióiba kötődnek. A

hot-spotok a fehérjék olyan területei, amelyeken a legfontosabb fehérje-ligandum kölcsönhatások alakulnak ki, és nagyobb méretű molekulák szűrése esetén nem mindegyik található meg.^{10,11}

A fragmensalapú gyógyszerkutatás sikerei közé tartozik a Vemurafenib (3), a Venetoclax (4) és az Erdafitinib (5) gyógyszerek fejlesztése (6. ábra), melyek sikere egyre több kutatót bátorít a fragmensalapú megközelítés alkalmazására.¹²



6. ábra A fragmensalapú gyógyszerkutatás sikerei

2.2. Kovalens fehérjejelölés

A gyógyszerkutatás kezdeti szakaszaiban kifejezetten kerülendő volt az olyan vegyületek fejlesztése, melyek a szervezetünkben található fehérjékkel kovalens kötést alakítanak ki, hiszen a nagy reaktivitású, kovalens fehérjejelölésre hajlamos molekulák számos kedvezőtlen, veszélyes tulajdonsággal rendelkezhetnek az emberi szervezetre nézve.^{13,14,15} Az elmúlt időszakban azonban a technológiai fejlődés lehetővé tette a kovalens gátlók szereke előnyeinek hatékonyabb kihasználását, így kedvező tulajdonságaik miatt egyre növekvő számban találhatóak meg a kovalens fehérjemódosításra képes hatóanyagok.^{16,17,18} A kovalens jelölésre alkalmas hatóanyagok is másodlagos kötőerőkkel ismerik fel a kötőhelyeket, azonban miután a hatóanyag a kötőhelyre került, a hozzá közel levő nukleofil aminosav-oldalláncokkal kovalens kötést képes létrehozni a molekulában található elektrofil reaktív rész, a kötőelem

(warhead).¹⁹ Tehát a hagyományos, reverzibilis inhibitorokhoz képest a kovalens inhibitorok irreverzibilis kötést hoznak létre szelektíven egy aminosavval, ami egy biológiai választ vált ki a fehérjéből. Így a fehérje-ligandum egyensúlyi folyamat eltolódik a komplex képződésének irányába (7. ábra), és egy nem-egyensúlyi kötődés jön létre.²⁰ Ez például az onkológiai terápiában vagy orvosi diagnosztikában lényeges előny a nem kovalens reverzibilis hatóanyagokkal szemben.



7. ábra Kovalens kötődés létrejöttének menete a fehérje és liganduma között

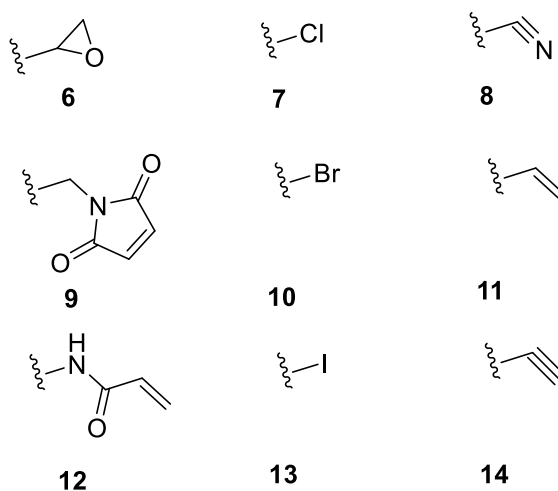
A kovalens kötődés kialakulása a fehérje és a ligandum között a ligandum affinitásának növekedését, szelektivitását, illetve legfőképp a ligandum tartózkodási idejének meghosszabbodását eredményezheti, mely előnyös tulajdonságoknak köszönhetően a kovalens inhibitorok egyre népszerűbbek.²¹ Megemlítendő azonban, hogy a megnövelt reaktivitás következtében a veszély fennáll, hogy a molekula nem a kívánt helyre kötődik. Az elmúlt időszakban több publikáció is megmutatta, hogy a megfelelő kötőelem megválasztása minimalizálhatja a nem kívánatos mellékreakciókat, és a szelektivitást alapvetően a nagy affinitású nem kovalens szerkezeti váz határozza meg. Több tanulmány is alátámasztotta már, hogy nincsen általánosan jó warhead, hanem azt mindig az adott célpontra specifikusan érdemes kiválasztani.^{22 23}

A kovalens inhibitorok felfedezése és fejlesztése több módszerrel is megvalósítható. A leggyakoribb megközelítés szerint egy nem-kovalens bioaktív anyag alapvázából (scaffold) indul ki, és azt elektrofil szerkezeti egységekkel (warhead, kötőelem, pl.: epoxidok, akrilamidok) látja el, méghozzá olyan pozícióban, hogy az a lehető legközelebb legyen majd a támadni kívánt fehérje nukleofil szerkezeti egységéhez, hogy a kívánt kovalens kötődés ki tudjon alakulni. A kémiai kiindulópont keresése a hagyományos, már röviden bemutatott HTS-szűrések alkalmazásával gyakran sikertelenül zárul. Jobb sikerráta érhető el a fragmensalapú megközelítéssel.²⁴ A kovalens fragmensek esetén a fragmensek alacsony affinitásából fakadó nehézségeket ellensúlyozza, hogy a kovalens jellegnek köszönhetően a fragmensek affinitása megnövekszik.

2.3. Heterociklusos vegyületek a gyógyszerkutatásban

A heteroatomok gyakran előfordulnak bioaktív anyagokban és heterociklusos gyűrűkben.²⁵ A gyógyszerfejlesztés során a heterociklusok mint farmakofórok alkalmazása sok esetben előnyös, ugyanis lehetőséget ad több tulajdonság optimalizálására is, mint például a hatóanyag oldhatósága, lipofilitása, polaritása, vagy H-kötés kialakításra való hajlama. Ezenfelül a szintetikus hozzáférhetőség fejlődésének köszönhetően a heterociklusos gyűrűk és gyűrűrendszerek ma már kulcsfontosságú építőelemei a gyógyszereszerű molekuláknak. A gyógyszerkutatásban található heterociklusos alapvázak túlnyomó többsége másodlagos kölcsönhatások kialakítására képes a célfehérjékkel.

Az elmúlt években egyre jelentősebb a törekvés olyan kovalens inhibitorok fejlesztésére, melyek valamilyen heterociklusos alapvázat tartalmaznak. A heterociklusokban található heteroatomok elektronszívó tulajdonságának köszönhetően olyan elektrofil kötőelemek is alkalmasak lehetnek kovalens kötés kialakítására fehérjével, melyek, ha egy nem heteroaromás gyűrűn lennének, nem mutatnának kellő reaktivitást. Ennek köszönhetően a heterociklusok esetén az általánosan használt, több atomból álló kötőelemek helyett (pl. epoxid (**6**), maleimid (**9**); akrilamid (**12**)), megfelelő kötőelem lehet például egy halogénatom is, melynek reaktivitását aromás nukleofil szubsztitúcióra a heterociklusok aktiválják. A kisebb méretű, akár egy atomos kötőelemek (Cl (**7**), Br (**10**), I (**13**)) előnye abban rejlik, hogy ha azt egy már nem-kovalens bioaktív alapvázra építjük rá, akkor feltehetően a bioaktív anyag szerkezete kisebb mértékben változik meg, és így nem veszít (annyit) bioaktivitásából a vegyület. Az említett egyatomos elektrofil kötőelemek aromás nukleofil szubsztitúciós reakcióban képesek a ciszteinhez kötődni. A halogén kötőelemeken kívül a klasszikus kisméretű warhead-ek közül alkalmas lehet még nitril (**8**), vinil (**11**) vagy acetilén (**14**) csoport is a kovalens kötődés kialakítására, ezek a funkciós csoportok nukleofil addíciós reakcióban képesek a ciszteinhez kötődni.²⁶ Érdemes megemlíteni, hogy az elmúlt években a ciszteinen kívül több más aminosavegység is gyakori célpont lett kovalens fehérjejelölések során.³² Néhány elterjedten alkalmazott elektrofil kötőelem a 8. ábrán látható.

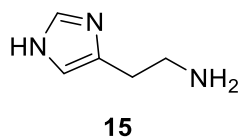


8. ábra Néhány elektrofil warhead szerkezete

Kutatócsoportunk korábban 5- és 6-tagú nitrogéntartalmú heterociklusokból álló elektrofil fragmens vegyülettárat készített és vizsgált különböző fehérjecélpontokon (MurA, trombin, HDAC8, immunoproteaszóma, Sars-Cov2 MPro). A vegyülettár számos értékes fragmenst tartalmaz a biológiai vizsgálatok alapján, jó néhány fragmens megfelelő stabilitást és reaktivitást mutatott a célfehérjékkel szemben a szűrések során, és többek között új alacsony mikromólos MurA inhibitorokat vagy a célfehérjéken új kötőhelyeket sikerült találni, melyek értékes kiindulópontok és célterületek lehetnek a gyógyszerfejlesztés további szakaszaiban. A későbbiekben kutatócsoportunk az említett vegyülettár tagjait metil csoporttal látta el a nitrogén atom(ok)on, és az újonnan kapott kvaterner nitrogént tartalmazó metilezett fragmens vegyülettár vizsgálatát is több fehérjecélponton elvégezte.^{26,27} Az elvégzett biológiai vizsgálatok azt mutatták, hogy a kvaternerezés általánosságban megnöveli az egyes fragmensek reaktivitását és a biológiai aktivitását is. Ennek oka az lehet, hogy a heterociklusok nitrogén atomjainak elektronszívó képessége megnő, mivel az *N*-kvaternerezés miatt pozitív töltés jelenik meg a heterociklusos gyűrűn, ami még inkább aktiválja az elektrofil kötőelemet.³

2.4. A hisztamin és a H₃ receptor

A hisztamin (9. ábra) egy, a szervezetünkben található fontos neurotranszmitter (ingerületátvivő anyag), számos immunválasz kialakításában részt vesz.



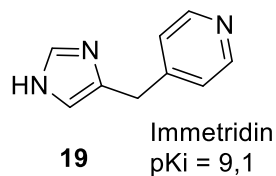
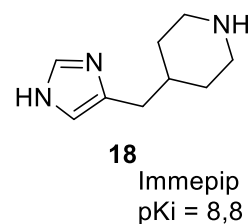
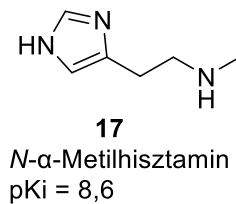
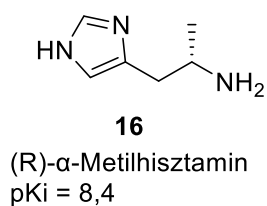
9. ábra A hisztamin szerkezete

Hírvivőként fontos szerepet tölt be többek között az allergiás reakciók kialakulásában, illetve az immunrendszer szabályozásában. A hisztamin (**15**) feladata receptorainak aktiválása, amelyekből 4 altípus ismert. Kutatómunkám során a H₃-receptor, került fókuszba, ezért ezt fogom bővebben ismertetni.

A H₃-receptort először 1983-ban azonosították Arrang és munkatársai.²⁸ A receptor a G-proteinhez kapcsolt fehérjék családjába tartozik, szerepe a hisztamin kibocsátás szabályozása a központi idegrendszerben. Ezen kívül a H₃ receptorok megtalálhatóak a szív idegvégződéseinél, illetve az agyban is, ahol különböző neurotranszmitter rendszereket szabályoznak.²⁹

Mióta 1999-ben Lovenberg és munkatársai sikeresen klónozták a hisztamin H₃ receptort, a gyógyszervállalatok nagy érdeklődéssel fordultak felé, mint potenciális gyógyszercélpont különböző rendellenességek kezelésére, mint például az elhízás, skizofrénia vagy migrén.³⁰

A hisztamin nagy affinitással kötődik a H₃ receptorhoz (pK_i = 7,8), és jelentős mennyiségben van jelen a szervezetben, így kompetitív a fejlesztett vegyületekkel szemben. A receptor szerkezete miatt gyógyszerfejlesztés során a szerkezeti diverzitás nagymértékben korlátozott, a jelenleg elérhető H₃ receptor agonisták szerkezete legtöbb esetben közel azonos a hisztaminéval, csak kisebb-nagyobb módosításokat tartalmaznak, melyeknek következtében a molekula bioaktivitása és szelektivitása kedvezőbbnek bizonyul, mint a hisztaminé. A 10. ábrán néhány H₃ receptor agonista látható.

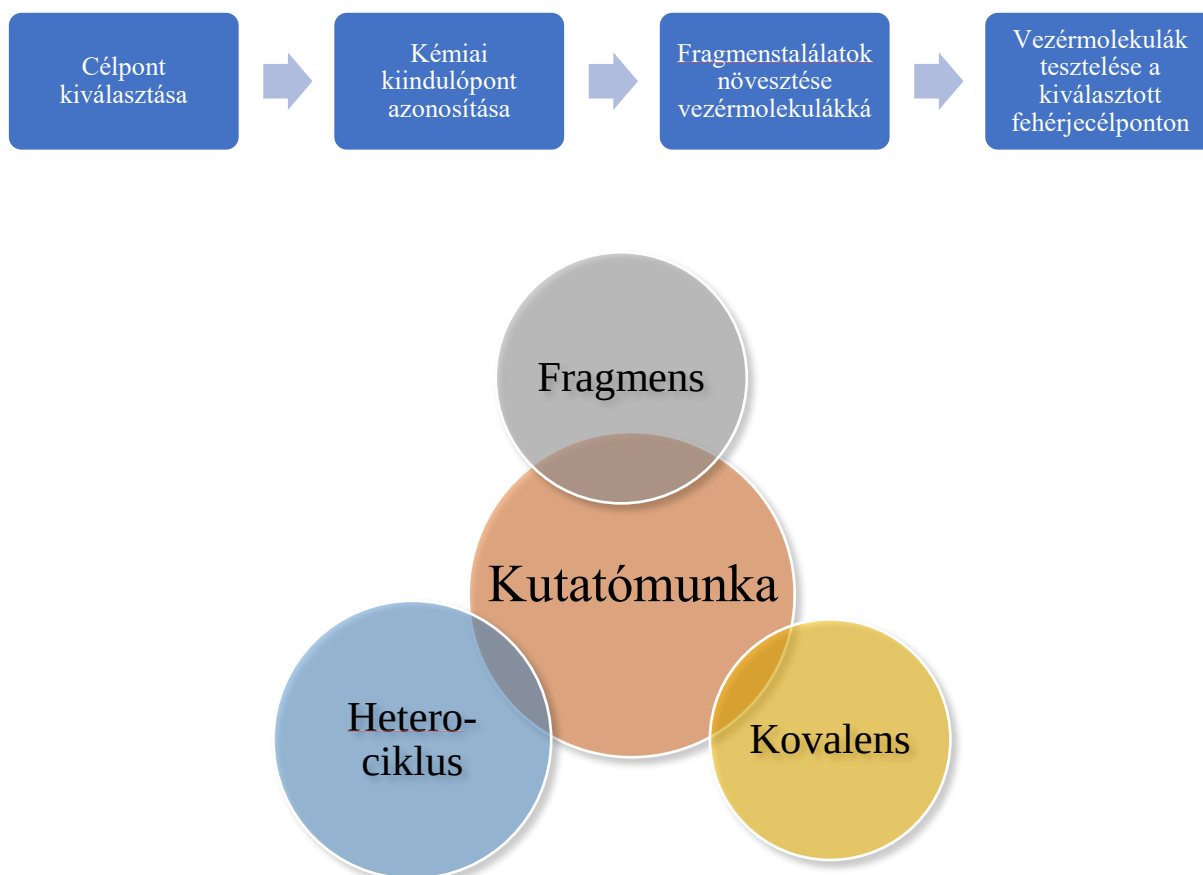


10. ábra Ismert H_3 receptor agonisták szerkezete

A rendelkezésre álló H_3 receptorokra ható bioaktív anyagok többségével fennáll a probléma, hogy csekély szelektivitást mutatnak a többi hisztamin receptorral, például a H_4 receptorral szemben, így a mai napig kihívás olyan nagy affinitással rendelkező bioaktív anyagok fejlesztése, melyek a hisztamin valamely receptorához szelektíven kötődnek.³¹ Emellett említést érdemel, hogy jelen ismereteink szerint kovalens H_3 modulátor nem ismert az irodalomban annak ellenére, hogy a H_3 kristályszerkezet alapján az aktív centrumban található egy cisztein aminosav, mint a kovalens módosítók leggyakoribb célpontja

3. Célkitűzés

Dolgozatom témája a kutatócsoport számára elérhető heterociklusos kovalens fragmens vegyülettárak szűrése a hisztamin H₃ és H₄ receptorain nemzetközi partnereink segítségével, majd a szűrés során kapott fragmens találatok irodalmi megfontolások alapján történő növesztése, a racionálisan tervezett kovalens vezérmolekulák előállítása, majd nemzetközi partnereinkkel együttműködve az új vegyületek tesztelése a hisztamin H₃ és H₄ receptorain (11. ábra).



11. ábra A kutatás munkafolyamatát leíró folyamatábra

4. Saját munka

Az elmúlt években kutatócsoportunkban figyelmet fordítottak a H_3 és H_4 receptorok működésének módosítására, és többek között a kovalens inhibíció lehetőségét vizsgálták. A hisztamin ezen receptorai fontos szerepet töltenek be az immunrendszer és az idegrendszer szabályozásában, a kovalens inhibíció pedig lehetővé tenné a precízebb, és tartósabb szabályozást. Mivel a receptorok kötőzsebében található egy cisztein aminosav, így úgy gondoltuk érdemes lehet elektrofil fragmens vegyülettár tesztelése az említett két hisztaminreceptoron. Továbbá említést érdemes, hogy a heterociklusos fragmens vegyülettár igen sok, a hisztaminban is megtalálható imidazol-, vagy ahhoz hasonló szerkezeti egységeket tartalmaz.

Munkám során a kutatócsoport számára rendelkezésre álló heterociklusos kovalens fragmens vegyülettárakat terveztük nemzetközi együttműködő partnereink segítségével a H_3R és H_4R receptorokon tesztelni. Ezután a biológiai eredmények függvényében fragmensekből növesztett új gyógyszyszerű anyagok szintézisét, és ezek tesztelését terveztük végrehajtani.

A fragmens vegyülettár, és az abból származtatott metilezett fragmens vegyülettár szűrését a H_3 és H_4 receptorokon amszterdami együttműködő partnereink végezték el. A biológiai előszűrés során a fragmens $10\ \mu\text{M}$ koncentrációban volt jelen a fehérje mellett. A fragmens vegyülettár tagjai, és a velük végzett biológiai kísérletek eredményei az alábbi ábrákon láthatóak (12-15. ábra). A fragmensek a kékkel jelölt pozíciókban elektrofil kötőelemeket (Cl, Br, I, CN, vinil, acetilén) tartalmaznak.

		A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	
													
A fragmens jelenlétében a fehérje megmaradt aktivitása %-ban kifejezve													
1	Cl	>75%	>75%	>75%	>75%	>75%	>75%	>75%	>75%	-	>75%	-	>75%
2	Br	>75%	>75%	>75%	>75%	-	>75%	>75%	>75%	-	>75%	>75%	>75%
3	I	>75%	>75%	>75%	>75%	-	>75%	>75%	>75%	-	>75%	>75%	>75%
4	CN	>75%	>75%	>75%	>75%	>75%	>75%	>75%	>75%	-	>75%	-	>75%
5	Vinil	>75%	>75%	>75%	>75%	-	>75%	>75%	-	>75%	-	>75%	>75%
6	Etinil	>75%	>75%	>75%	>75%	-	>75%	>75%	>75%	>75%	-	>75%	>75%

12. ábra H_3 receptoron vizsgált fragmensek. A „-„ jelölt vegyületek nem voltak elérhetők a vegyülettár összeállításakor.

		M	N	O	P	Q	R	S	T	U
										
A fragmens jelenlétében a fehérje megmaradt aktivitása %-ban kifejezve										
1	Cl	-	-	-	>75%	-	-	>75%	>75%	-
2	Br	-	-	-	>75%	>75%	>75%	>75%	-	>75%
3	I	-	>75%	-	>75%	-	>75%	-	-	-
4	CN	-	>75%	>75%	>75%	>75%	>75%	-	-	-
5	Vinil	>75%	-	-	>75%	>75%	>75%	-	-	>75%
6	Etil	>75%	-	-	>75%	>75%	>75%	-	-	-

13. ábra H_3 receptoron vizsgált fragmensek. A „-„ jelölt vegyületek nem voltak elérhetők a vegyülettár összeállításakor.

		A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	
													
A fragmens jelenlétében a fehérje megmaradt aktivitása %-ban kifejezve													
1	Cl	>75%	>75%	>75%	>75%	>75%	>75%	>75%	>75%	-	>75%	-	>75%
2	Br	>75%	>75%	>75%	>75%	-	>75%	>75%	>75%	-	>75%	>75%	>75%
3	I	>75%	>75%	>75%	>75%	-	>75%	>75%	>75%	-	>75%	>75%	>75%
4	CN	>75%	>75%	>75%	>75%	>75%	>75%	>75%	>75%	-	>75%	-	>75%
5	Vinil	>75%	>75%	>75%	>75%	-	>75%	>75%	-	>75%	-	>75%	>75%
6	Etil	>75%	>75%	>75%	>75%	-	>75%	>75%	>75%	>75%	-	>75%	>75%

14. ábra H_4 receptoron vizsgált fragmensek. A „-„ jelölt vegyületek nem voltak elérhetők a vegyülettár összeállításakor.

		M	N	O	P	Q	R	S	T	U
										
A fragmens jelenlétében a fehérje megmaradt aktivitása %-ban kifejezve										
1	Cl	-	-	-	>75%	-	-	>75%	>75%	-
2	Br	-	-	-	>75%	>75%	>75%	>75%	-	40%
3	I	-	>75%	-	>75%	-	>75%	-	-	-
4	CN	-	>75%	>75%	>75%	>75%	>75%	-	-	-
5	Vinil	>75%	-	-	>75%	>75%	>75%	-	-	>75%
6	Etil	>75%	-	-	>75%	>75%	>75%	-	-	-

15. ábra H_4 receptoron vizsgált fragmensek. A „-„ jelölt vegyületek nem voltak elérhetők a vegyülettár összeállításakor.

A fragmensszűrés során azt tapasztaltuk, hogy a heterociklusos fragmens vegyülettár tagjai sem a H_3R , egy vegyület kivételével pedig a H_4R receptoron sem mutattak megfelelő aktivitást. Mivel így elegendő találatot nem sikerült azonosítani, a fragmensszűrést a vegyülettár második generációjával is elvégeztük, amely vegyülettár a kereskedelmi forgalomban is elérhető heterociklusok nitrogénatomon kvaternerezett származékait tartalmazta. Az *N*-metilezés annak érdekében történt, hogy a fragmensek reaktivitását növeljük. A metilezett vegyületek és biológiai eredményeik a 16. és 17 ábrán láthatóak.

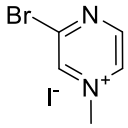
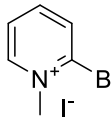
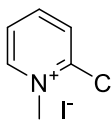
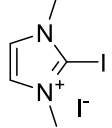
		A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	N	P	Q	R
A fragmens jelenlétében a fehérje megmaradt aktivitása %-ban kifejezve																
1+	Cl	<25%	>95%	>95%	>95%	>95%	>95%	<30%	<15%	>95%	-	>95%	-	-	-	-
2+	Br	<25%	>95%	>95%	>95%	-	>90%	<15%	<15%	>95%	>70%	>60%	-	-	>60%	<40%
3+	I	<25%	>95%	<50%	>95%	-	>60%	<15%	<20%	>70%	>95%	>95%	>95%	>95%	-	-
4+	CN	>75%	>95%	>95%	-	>95%	>95%	>95%	>95%	>70%	-	>95%	-	-	-	>90%
5+	Vinil	>75%	>95%	<25%	-	-	>70%	>75%	-	-	>95%	-	-	-	-	-
6+	Etilil	<25%	>95%	<50%	>60%	-	>95%	>50%	-	-	>95%	>95%	-	-	-	-

16. ábra H_3 receptoron vizsgált második generációs fragmensek. A „-”, jelölt vegyületek nem voltak elérhetők a vegyülettár összeállításakor.

		A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	N	P	Q	R
A fragmens jelenlétében a fehérje megmaradt aktivitása %-ban kifejezve																
1+	Cl	<50%	>75%	>95%	>75%	>95%	>85%	<40%	>60%	>90%	-	>95%	-	-	-	-
2+	Br	<50%	>95%	>95%	>85%	-	>95%	<40%	>55%	>95%	>85%	>75%	-	-	>75%	>70%
3+	I	<40%	>95%	>75%	>95%	-	>95%	<40%	>95%	>85%	>85%	>85%	>85%	>95%	-	-
4+	CN	>90%	>95%	>75%	-	>95%	>75%	>80%	>90%	>90%	-	>95%	-	-	-	>75%
5+	Vinil	>90%	>95%	<50%	-	-	>60%	>95%	-	-	>95%	-	-	-	-	-
6+	Etilil	>60%	>95%	>50%	>60%	-	>75%	>75%	-	-	>95%	>95%	-	-	-	-

17. ábra H_4 receptoron vizsgált második generációs fragmensek. A „-”, jelölt vegyületek nem voltak elérhetők a vegyülettár összeállításakor.

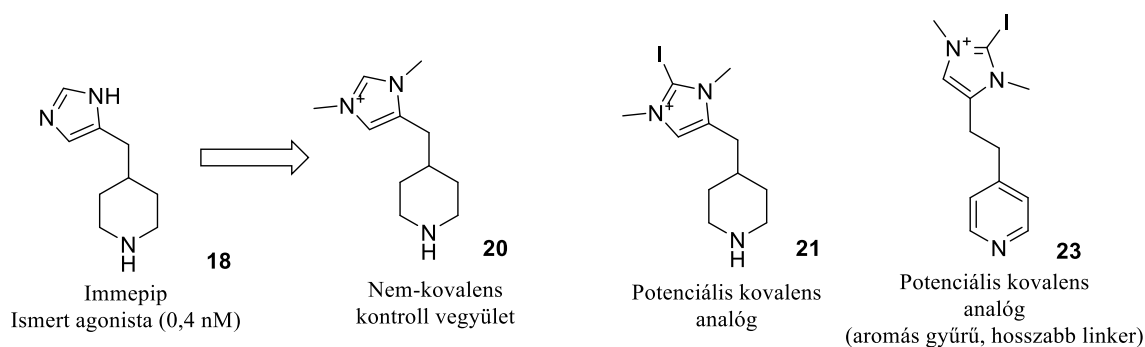
A metilezett fragmens vegyülettár esetén 61 fragmensből a H_3R receptoron 14, a H_4R receptoron pedig 7 fragmens mutatott legalább 50%-os jelcsökkenést. A metilezés, mint már kutatócsoportunk korábbi eredményeiből is kiderült, a fragmensek reaktivitását megnöveli, ez a hisztamin receptorain végzett szűrések során is látható. Érdeemes megemlíteni, hogy a H_4 receptoron aktivitást mutató fragmensek közül mindegyik aktivitást mutatott a H_3 receptoron is. Kutatásunk szempontjából nem csak a receptorokon való affinitás lényeges, hanem a szelektivitás is, így a tovább vizsgálni érdemes vegyületek számát négyre szűkítettük, amelyek a legnagyobb H_3/H_4 szelektivitást mutatták (18. ábra).

				
	G2+	A2+	A1+	H3+
pKi (H ₃ R)	6,44 +/- 0,21	6,34 +/- 0,37	6,22 +/- 0,08	6,03 +/- 0,09
H ₃ R jelcsökkenés	89%	84%	82%	83%
pKi (H ₄ R)	4,88 +/- 0,15	5,38 +/- 0,31	5,29 +/- 0,29	<4,5
H ₄ R jelcsökkenés	60%	57%	59%	0%
d(pKi)	1,55	0,96	0,92	1,81

18. ábra A fragmensszűrések során kapott találatok szűkített köre a további megfontolások alapján

A fragmensszűrés során az 2-jód-1,3-dimetilimidazólium jodid fragmens (**H3+**) míg a H₃R receptor aktivitását 83 %-kal lecsökkentette, addig a H₄R receptor aktivitásán nem változtatott, így ezt választottuk optimális találatnak szelektivitás szempontjából. A szelektivitás a gyógyszerfejlesztés során igen jelentős szempont, ugyanis egyrészt lehetővé teszi a mellékhatások minimalizálását, így biztonságosabbak lehetnek.

A találatok azonosítását követően a fragmensek méretének növelése a cél, mely alapvetően 3 megközelítés alapján történhet: egy fragmens növesztése (growing), több fragmens összeolvasztása (merging) vagy pedig több fragmens összekapcsolása (linking). Az irodalomban ismert immepip (**18**) egy 0,4 nM-os affinitással rendelkező H₃ agonista, mely tartalmazza az imidazol szerkezeti egységet, így célul tűztük ki az immepip (**18**) kovalens inhibitorra történő átalakítását. Ebből a célból a 19. ábrán látható molekulák szintézisét terveztük meg irodalmi megfontolások alapján.³⁴ Kézenfekvő választásnak tűnt az immepip (**18**) imidazol gyűrűjét metilezni és jódozni, hogy a kovalens analóghoz (**21**) jussunk. Annak érdekében, hogy a kovalens kölcsönhatás szerepét igazoljuk, a jód nélküli nem kovalens, de metilezett származékot (**20**) is terveztük előállítani. Ezen felül kíváncsiak voltunk arra, hogy ha meghosszabbítjuk a két gyűrű közötti láncot, és az alifás, háromdimenziós térkitöltésű gyűrűt egy sík aromás gyűrűre (**23**) cseréljük, milyen változást érünk el.

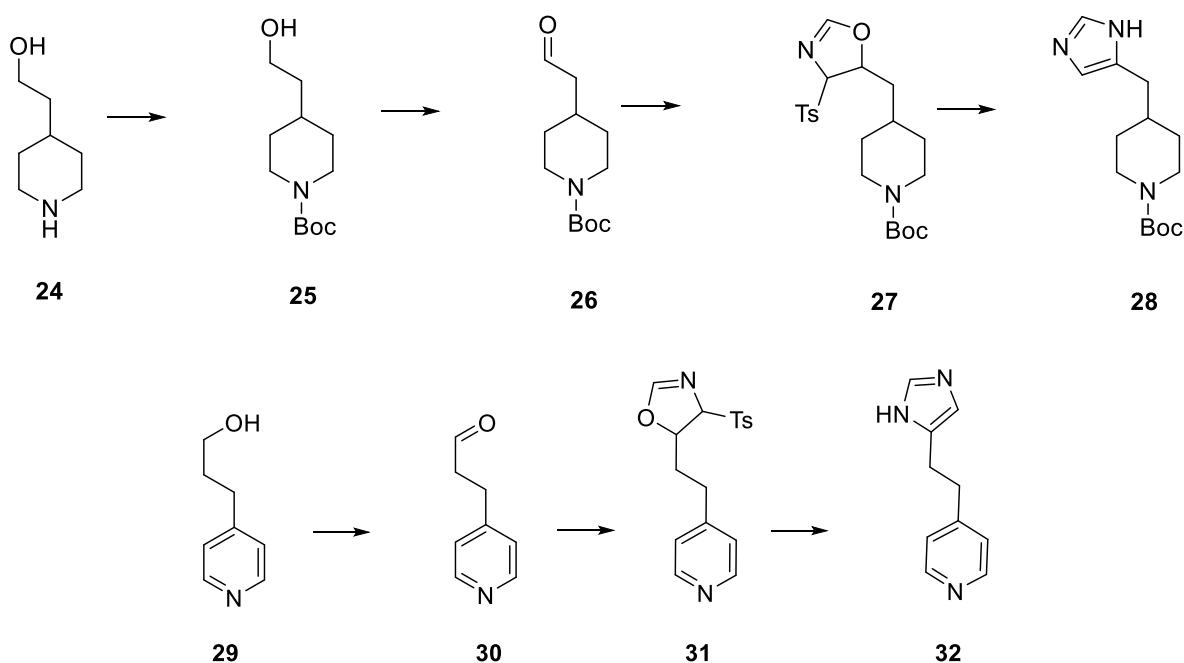


19. ábra Az irodalomban ismert immevip agonista, és a fragmensszűrés eredményeiből tervezett vegyületek

4.1. Szintézisterv

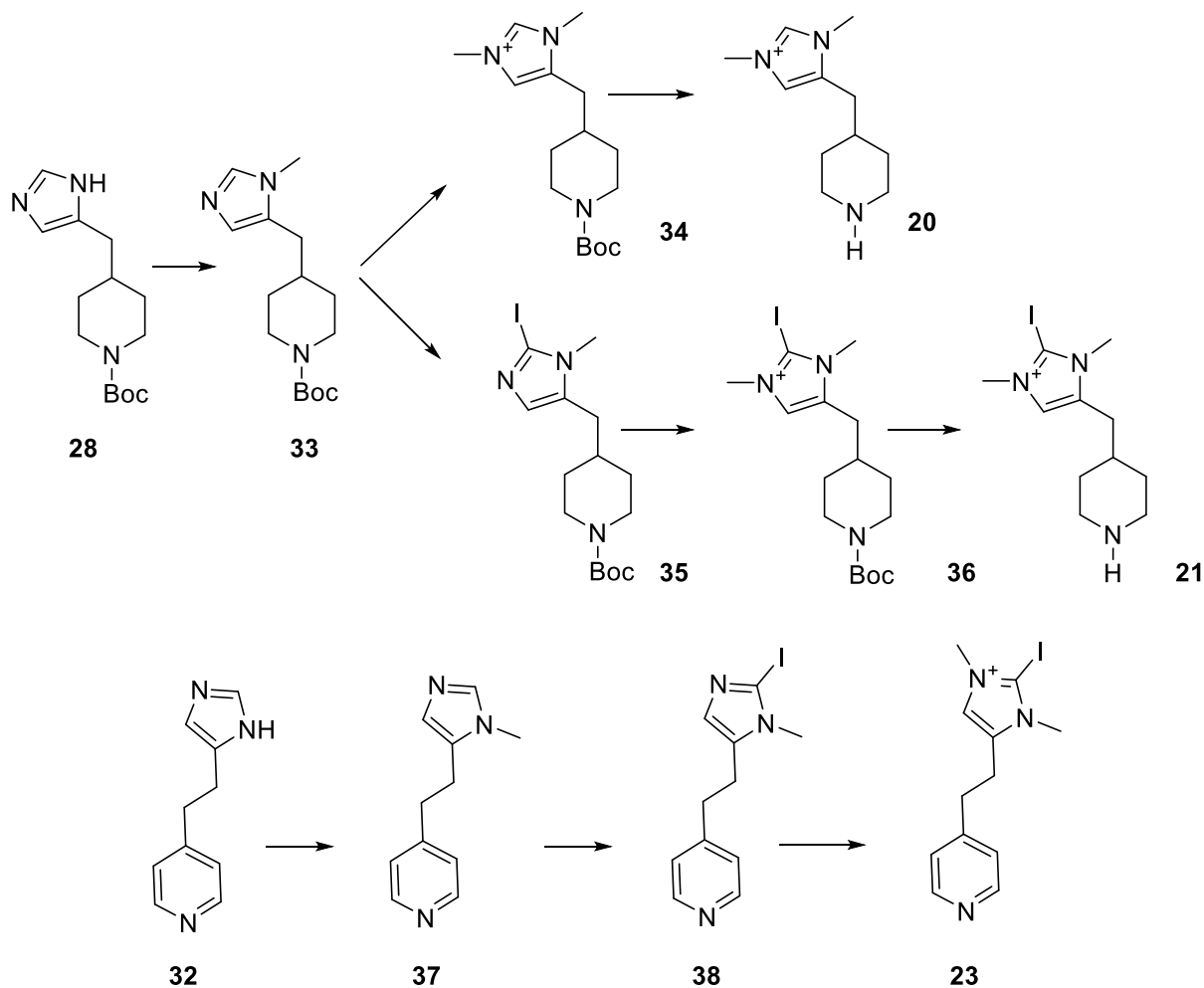
Ebben a fejezetben a tervezett potenciális kovalens inhibitorokhoz vezető szintézisutak kidolgozását, majd végrehajtását mutatom be részletesen.

A szintézisterv kidolgozása során felhasználtuk az irodalomban ismert immeviphez vezető szintézisek bizonyos lépéseit, melyek a 20. ábrán láthatóak.³⁴ A megfelelő alkoholból (**24**, **29**) kiindulva egy védőcsoport beépítést követően egy oxidációs reakció során jutunk el az aldehid intermedierhez (**26**, **30**), melyet egy gyűrűzárási reakcióba viszünk, és kapott intermediert imidazolszármazékká alakítjuk (**28**, **32**).



20. ábra Az irodalomban ismert molekulák szintézise

Az imidazolszármazék-intermedierekből a 21. ábra szerint terveztünk tovább haladni. Az irodalomban ismert intermediert a szabad nitrogén atomon metilcsoporttal szereljük fel, majd ezt követően a két nitrogénatom között jódoszuk az imidazol gyűrűt. A második metilcsoport bevitelét és az imidazol kvaternerezését ezt követően valósítjuk meg, és a piperidinszármazék esetén a Boc-védőcsoportot az utolsó lépésben távolítjuk el.

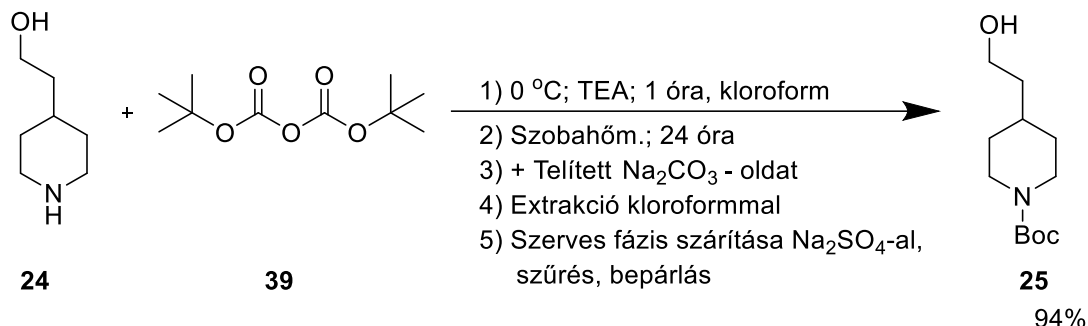


21. ábra A célmolekulákhoz vezető szintézistervek

4.2. Szintézisek megvalósítása

Az imnepipszármazék szintézisének első lépéseként 4-piperidin etanolból (24) kiindulva először di-*tert*-butil dikarbonát (39) alkalmazásával egy *N*-acilezési reakcióban Boc védőcsoportot építettem be a piperidin heterociklus *N*-atomjának megvédésére, hogy a későbbi reakciólépésekben ne okozzon mellékreakciókat. A reakció egy óra alatt lezajszódott, majd

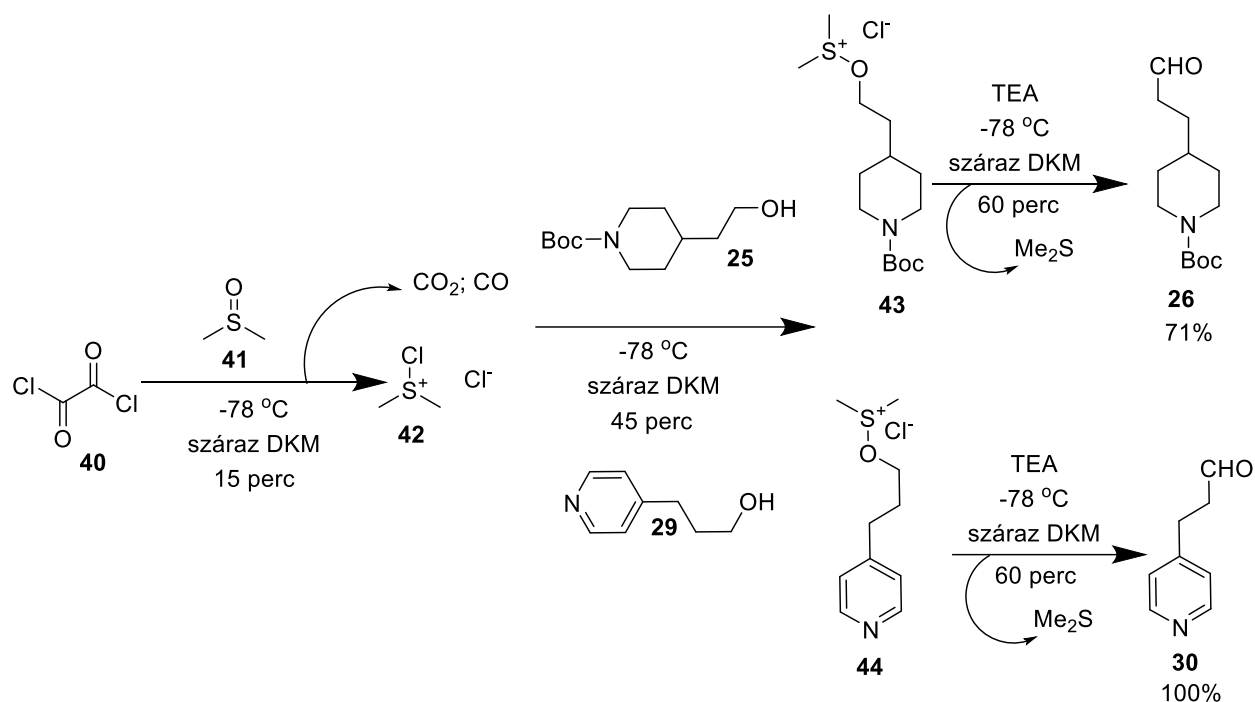
feldolgozás után (22. ábra) 94 %-os hozammal izoláltam az alkoholt, ami az irodalmi termeléshez (98 %) közeli eredmény.



22. ábra Boc-védőcsoport beépítése a piperidinszármazékba

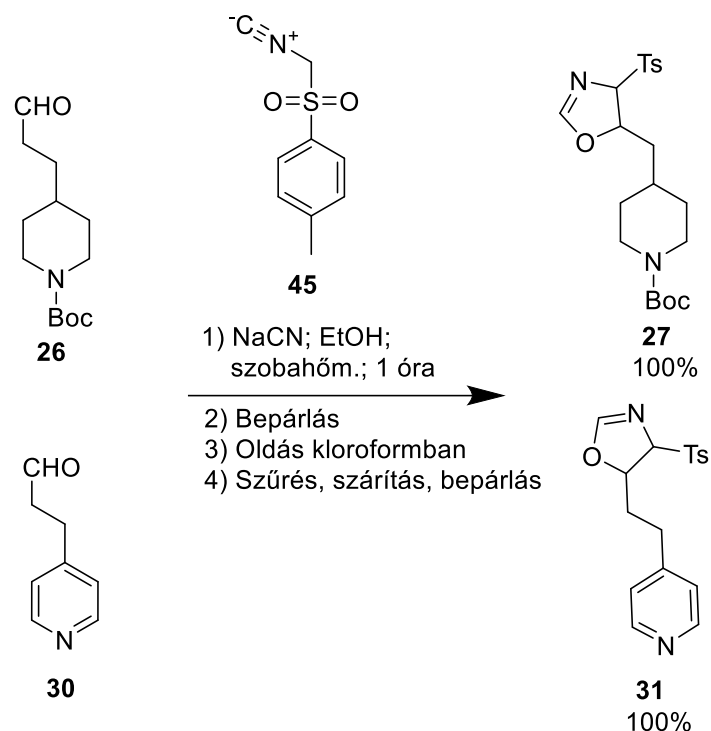
A 3-(piridin-4-il)propán-1-ol (**29**) esetén védőcsoport beépítésére nem volt szükség, hiszen az aromás nitrogén nem reaktív a következő reakciólépések során.

A terminális hidroxicsoprotot Swern-oxidációval aldehid funkciós csoporttá alakítottam. Az oxidációt oxalil-klorid és dimetil-szulfoxid jelenlétében hajtottam végre száraz diklórmetánban, majd a reakciót trietil-amin hozzáadásával kvencseltem (23. ábra). A reakcióelegyek extrakcióját követően a szerves fázist szilikagélre pároltam, majd normál fázisú flash-kromatográfiával tisztítottam a nyerstermékeket, így a két aldehidet (**26** és **30**) 71%-os, és 100%-os hozammal izoláltam. A piperidinszármazéknak nem volt UV elnyelése sem 254 nm sem 366 nm-en, így a VRK-lapokat jóddal hívtuk elő. A piridingyűrűt tartalmazó molekulával való munka során az aromás gyűrűnek köszönhetően a reakció kiindulási anyaga és terméke is UV-aktív volt.



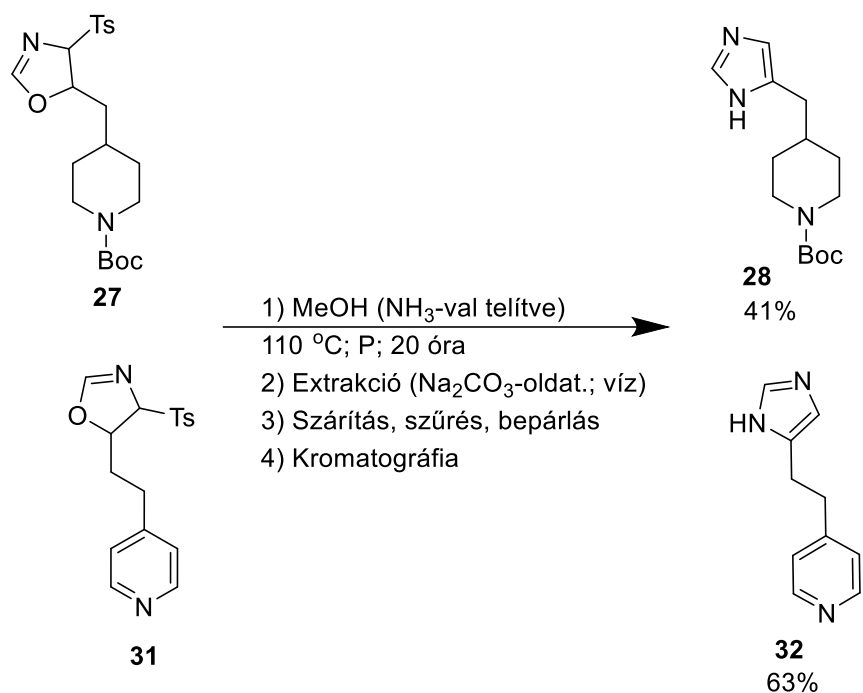
23. ábra Swern-oxidáció kivitelezése a két intermedierral

Az izolált aldehideket ezt követően katalitikus mennyiségű nátrium-cianid jelenlétében Van Leusen-reakcióban alakítottam tovább. Ez a reakció ketonok nitrillé való átalakítására alkalmas TosMIC (45; (*p*-toluolszulfonil)metil izocianid) reagens jelenlétében, de amennyiben ketonok helyett aldehideket alkalmazunk, a reakció oxazolin-származékokat eredményez. A reakció egyszerű feldolgozásával (melléktermékek kiszűrése az oldódó termék mellől) sikeresen izoláltam kvantitatív termeléssel az oxazolin-származékokat (24. ábra), majd azokat további tisztítás nélkül használtam fel a szintézissor következő lépésében.



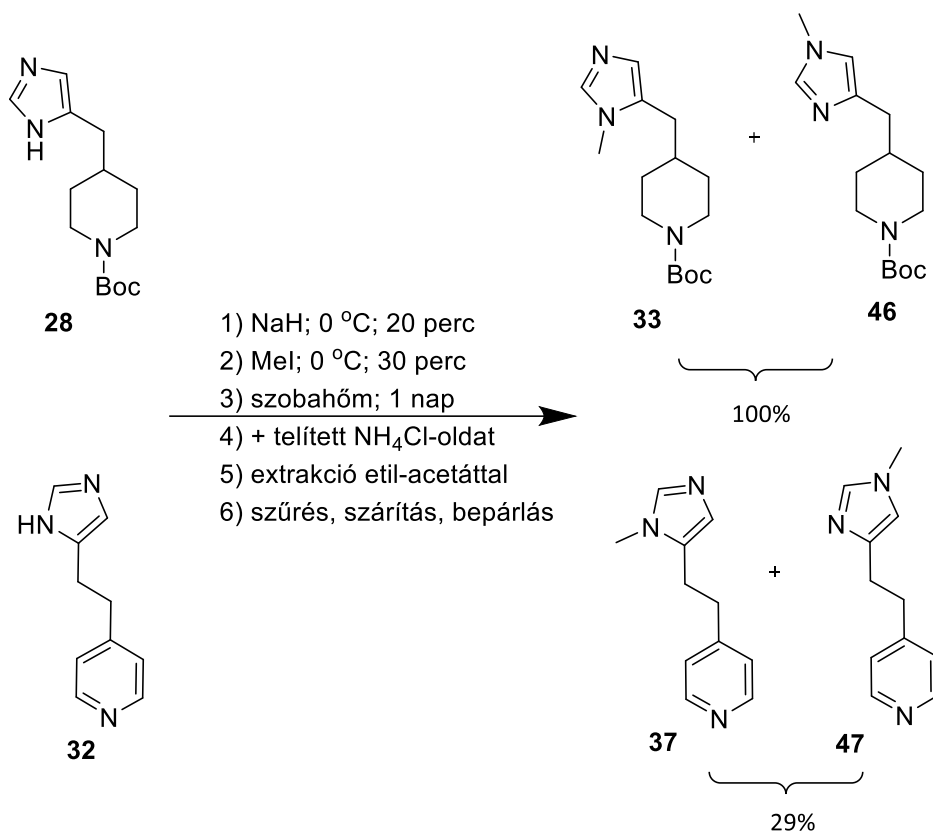
24. ábra Van Leusen reakciók egyenlete

Az oxazolin-származékok imidazol-forrásként szolgálhatnak egy oxigén-nitrogén cserén keresztül lejátszódó reakcióban.³⁵ Ezt kihasználva az oxazolin-származékok kinyerését követően tehát egy bombacsőben vagy autoklávban ammóniával telített metanolban oldottam az oxazolinokat (**27** és **31**), majd 110 °C-on kevertettem, és a reakcióelegyek feldolgozását követően a nyersterméket normál fázisú flash kromatográfiával tisztítottam. Így jutottam rendre 41%-os és 63%-os hozammal az alifás és aromás **28** és **32** imidazol-származékokhoz (25. ábra). A feldolgozás során végzett extrakciónál a fázisok rosszul váltak el egymástól, így kihívást jelentett azok elválasztása. Mivel a reakcióelegy a feldolgozás kezdetkor már kiindulási anyagot nem tartalmazott, és jelentős melléktermék képződését sem tapasztaltuk HPLC-MS alapján. A közepes termelés egyrészt az extrakciónak tudható be, ugyanis az imidazol rész amfoter jellegének köszönhetően kis mennyiségben a termékek a vizes fázisban maradtak. Ezen kívül a nyerstermék kromatográfiás tisztítása is további anyagvesztéssel járhatott.



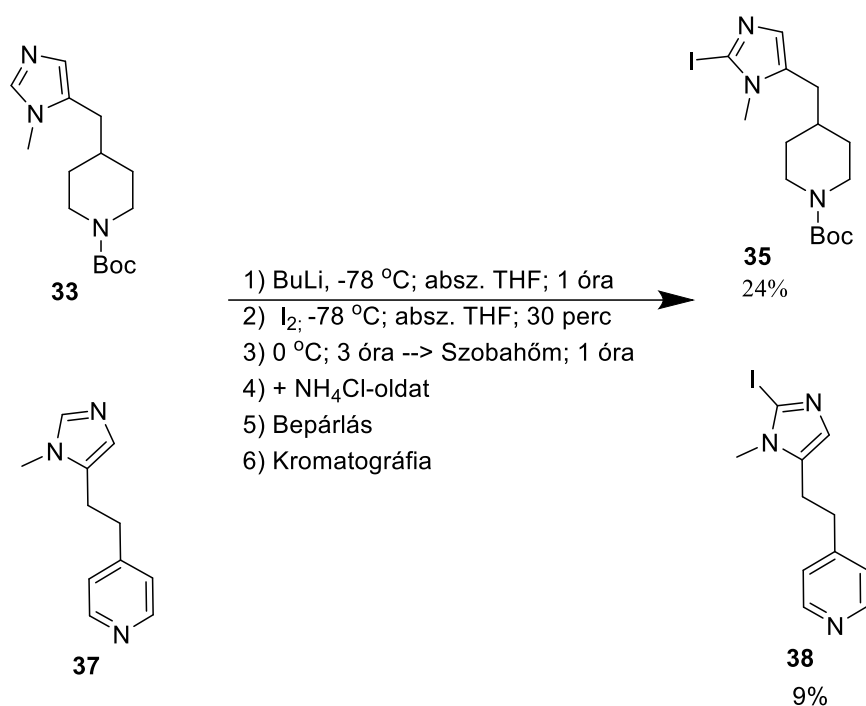
25. ábra Imidazolgyűrű kialakítása

Ezt követően az imidazol-származékok *N*-metilezését nátrium-hidrid és metil-jodid alkalmazásával hajtottam végre. A piperidinszármazékkal végzett reakció során az imidazol gyűrű mindkét egyszeresen metilezett izomerjét azonosítottam, dimetilezett származék képződését nem tapasztaltam. A reakcióelegy feldolgozását követően a **33** és **46** intermediereket 100%-os egyesített hozammal kaptam meg. A piridin-származékkal végzett metilezés során hasonlóan a **28**-al végzett reakcióhoz, mindkét *N*-metilimidazolt azonosítottam, azonban egy dimetileződött melléktermék is megjelent a reakcióelegyben, amit el kellett távolítani a **37** és **47** intermedierektől. Az alacsonyabb termelés (29%) az említett melléktermék képződésének, illetve a kromatográfias tisztítás során fellépő anyagvesztésnek tudható be. A piridin-, illetve a piperidingyűrűn való metileződés ebben a reakciólépésben a szintézissor későbbi lépései alapján kizárható volt. A reakciók során ügyelni kellett a metil-jodid alacsony hőmérsékleten történő lassú adagolására, hogy elkerülhető legyen a nem kívánt tovább metileződés. A reakciók egyenletei a 26. ábrán láthatóak.



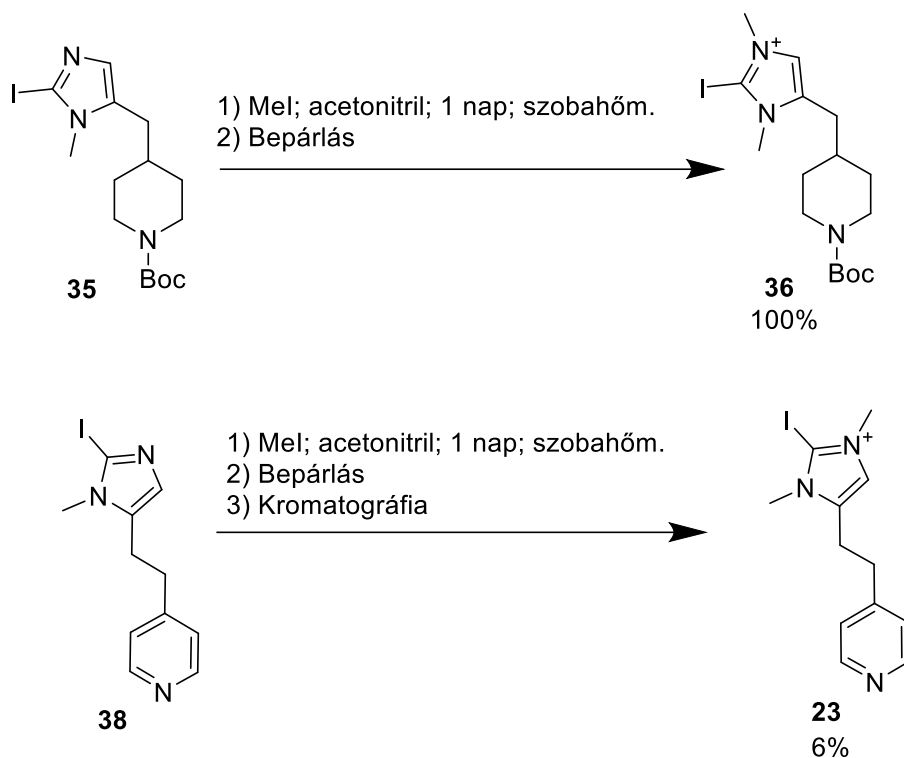
26. ábra Imidazolszármazékok N-metilezési reakciói

A metilezést követően az intermedierek jódozását hajtottam végre. A jód beépítése azért szükséges, hogy a H₃ receptor ciszteinjével aromás nukleofil szubsztitúcióba lépjen, és kovalens kötőelemként szolgáljon. A jódozási reakciókat inert körülmények között, alacsony hőmérsékleten végeztem. Először lítiáltam az imidazolszármazékokat n-butil lítium segítségével ügyelve az alacsony hőmérséklet fenntartására. Ezután elemi jód adagolásával a fémorganikus vegyületen egy lítium-jód cserét kívántam végrehajtani. A lítiálás után a jódozás követése kivitelezhető volt, de azt tapasztaltuk, hogy a jódozás terméke mellett pedig nagy mennyiségű kiindulási anyag volt még jelen, a reakció nem haladt előre a reakcióidő további növelésével, tehát a lítiálás nem volt teljes. A reakcióelegyek kvencselését követően azokat normál fázisú flash kromatográfiával tisztítottam. A reakciók alacsony termelése egyrészt a nem teljes konverzióknak, másrészt pedig a kromatográfiával járó anyagveszteségeknek tudható be.



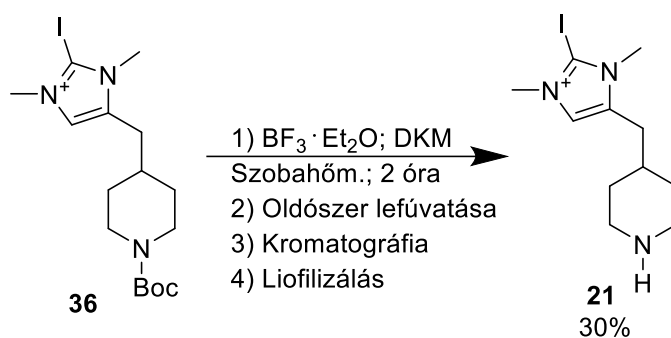
27. ábra Jódozási reakciók

Az izolált jódvegyületeket (**35** és **38**) további *N*-metilezési reakcióba vittem, hogy kvaternerezett heterociklusokhoz jussak. A reakciókat acetonitrilben végeztem, metilezőszerként metil-jodidot alkalmaztam, de ebben az esetben, mivel nem volt szükség deprotonálásra, nátrium-hidridet nem használtam (28. ábra). A kvaternerezés teljes konverzióval lejártsódott, de a piperidin-származék preparatív HPLC-n való tisztítása során az anyag bomlást szenvedett, így azt további tisztítások nélkül vittük tovább a szintézissor utolsó lépésére. A piridinszármazékot 6% termeléssel izoláltam, mely ugyancsak a kromatográfia során szenvedett anyagvesztésnek tudható be.



28. ábra N-kvaternizációs reakciók

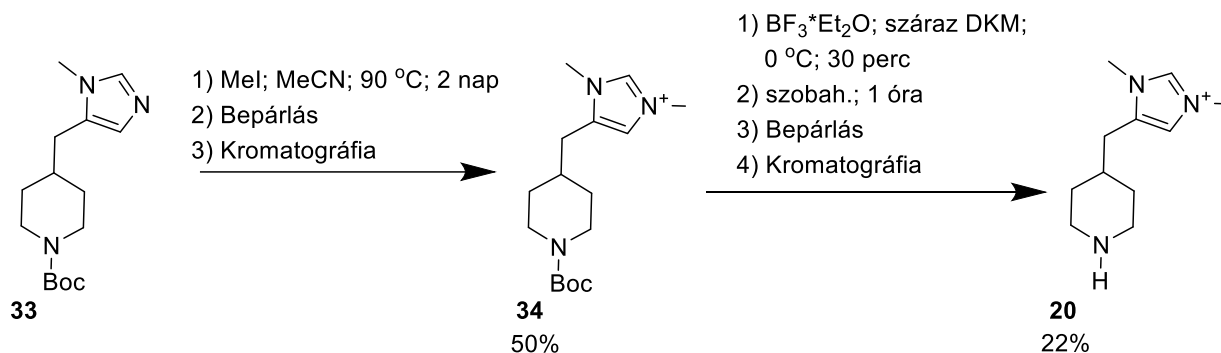
A piperidinszármazék szintézissorozatának utolsó lépése a Boc-védőcsoport eltávolítása volt, melyet $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -val valósítottam meg, száraz diklórmetánban (29. ábra). A reakció alacsony termelését a nyers termék preparatív HPLC-n történő tisztítása okozhatta. A reakció feldolgozása során bepárlás helyett az oldószer eltávolítását Ar-gázzal való lefúvatással végeztem el, ugyanis azt tapasztaltuk, hogy az anyag melegítés hatására bomlást szenved.



29. ábra A piperidin-származék Boc-védőcsoportjának eltávolítása

Annak érdekében, hogy igazoljuk, hogy a jódimidazólium és a jód kovalens kötőelem szerepet játszik a H_3 receptor működésének befolyásolásában, előállítottunk egy jódot nem tartalmazó imidazólium-származékot is, amely várhatóan gyengébben, és reverzibilisen kötődik a receptorhoz. A nem kovalens kontrollvegyület előállítását a **33** monometilzett

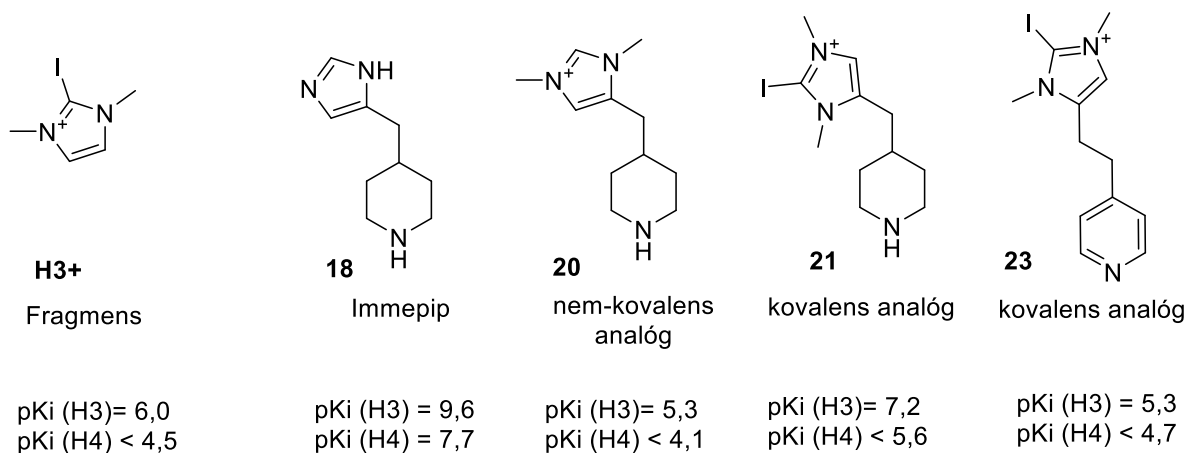
intermedier kvaternerezésével valósítottam meg. Az *N*-metilezési reakció során metil-jodidot alkalmaztam acetonitril oldószerben 90 °C-on, majd a reakció bepárlását követően a nyersterméket preparatív HPLC segítségével tisztítva jutottam **34** védett intermedierhez. Ezt követően a védőcsoport eltávolításával eljutottam a nem kovalens inhibitor végtermékig (**20**), amit ismételten preparatív HPLC segítségével tisztítottam, majd a frakciókat liofilizáltam (30. ábra). A közepes és alacsony termelés nagyrészt a preparatív HPLC során elszenvedett anyagvesztésnek tudható be.



30. ábra A nem kovalens származék szintézise

4.3. Biológiai mérések eredményei

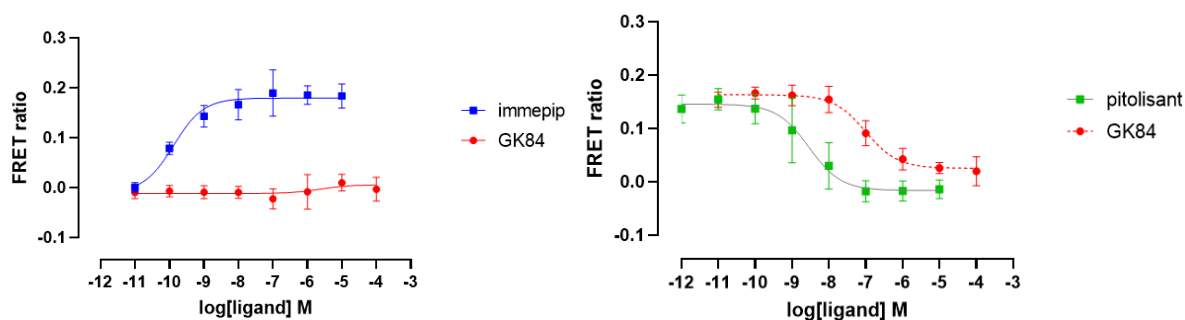
A három molekulát, melyek közül a két jódimidazólium származék kovalens inhibitorként működhet, a harmadik pedig egy nem-kovalens analóg, biológiai vizsgálatnak vetettük alá amszterdami együttműködő partnereink segítségével. Partnereink radioligand-alapú kötődési teszteket végeztek a H₃R és H₄R receptorokon, és meghatározták az általunk előállított vegyületek kötődési állandóit. A vizsgált vegyületek és a kapcsolódó biológiai eredmények összefoglalva a 31. ábrán láthatóak.



31. ábra A biológiai vizsgálatok eredményei

Az eredmények bár elmaradnak az irodalomban ismert immepiphez tartozó kötődési állandóktól, azonban a piperidines kovalens analóg kötődési állandója a H₃R receptoron sokkal jobbnak bizonyult, mint a fragmens találaté, ami alátámasztja, hogy jó irányba indultunk a szerkezet módosításával. Továbbá érdemes kiemelni, hogy a H₄ receptorhoz sokkal kevésbé kötődik a fragmens, mint az immepip, ami a szelektivitáshoz hozzájárulhat. Ugyanakkor az is látszik, hogy további optimalizálás szükséges, amely kutatómunka jelenleg is zajlik. Fontos kiemelni, hogy a nem kovalens kontroll vegyület, amely csak a jó kötőelemben és így feltételezhetően a kötődési mechanizmusban tér el a **21** kovalens immepip analógtól, még az eredeti fragmensnél is rosszabb eredményt adott. Ebből arra következtetünk, hogy a H₃ receptor kovalens jelölése is működésének irreverzibilis módosítása jó kutatási irány.

A legjobbnak bizonyult **21** funkcionális aktivitását is vizsgáltuk abból a célból, hogy meghatározzuk, agonista vagy antagonistán viselkedik (32. ábra). Ez a vizsgálat egy fluoreszcencia alapú FRET-assay alkalmazásával történt. Az ábrákon az x tengelyen a ligandum koncentrációja, az y tengelyen pedig a FRET jel aránya látható.

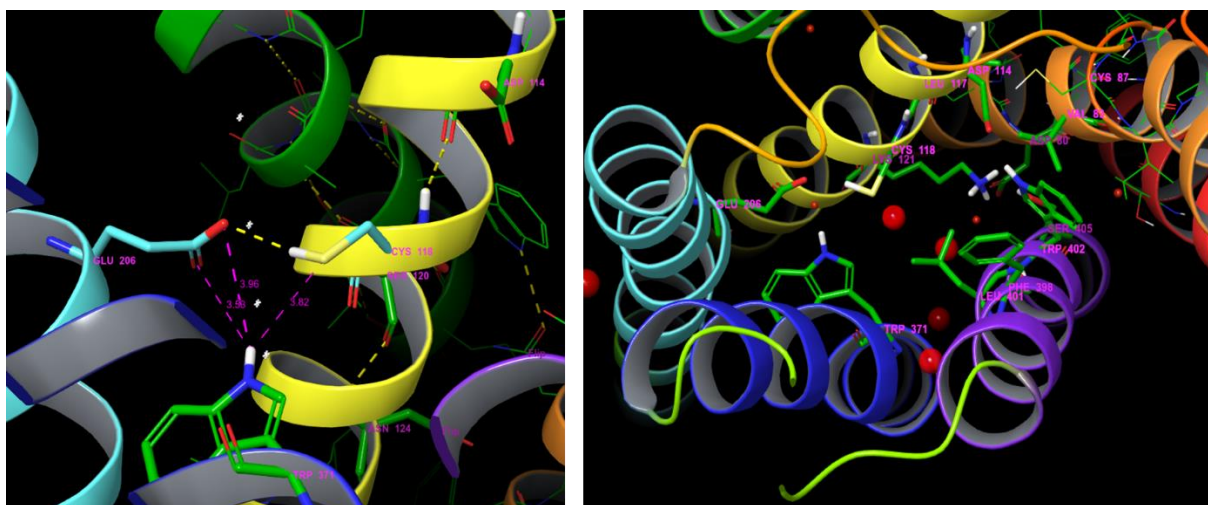


32. ábra A legjobb biológiai eredményeket mutató anyag agonista (bal ábra), illetve antagonistán (jobb ábra) létének vizsgálata

A biológiai eredmények alapján **21** esetén az agonistákra jellemző görbét nem sikerült reprodukálni, azonban az antagonistákra hasonló görbe a vizsgálatok során kirajzolódott, így a **21** feltehetően antagonistán tulajdonsággal bír a H₃ receptoron. Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy az immepip metilezése és jódozása megváltoztatja a funkcionális aktivitást serkentőről gátlószerré. Ennek a jelenségnek a részletes vizsgálata és további alkalmazási lehetőségei a kutatócsoport jövőbeli tervei között szerepelnek.

5. A kísérleti tapasztalatok értelmezése molekulamodellézés segítségével

A biológiai mérések eredményeit követően kutatócsoportunk PhD-hallgatója, *Vincenzo di Lorenzo* molekulamodellézési számításokat végzett, amelyek során az általam szintetizált molekulák és a H₃ receptor kölcsönhatásait vizsgálta. A modellezések során az előállított vegyületek kötődési helyét és a kötődések módját tervezte feltérképezni, majd ezekből az információkból a kovalens vegyületek további fejlesztésére tett javaslatot. A H₃ receptor kristályszerkezetének (PDB:7F61) releváns része, az aktív centrumban látható ciszteinnel a 33. ábrán látható.

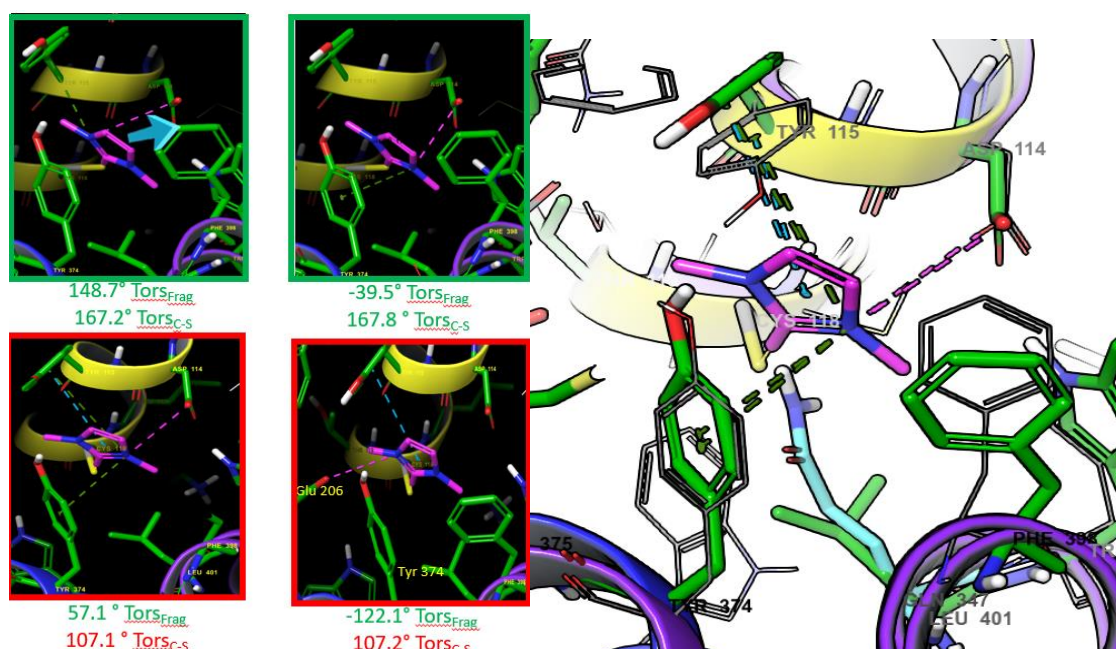


33. ábra A H₃ receptor szerkezete a célzott cisztein aminosav környezetében

A H₃R receptor szerkezetében két kötőzseb található meg, melyek közül az egyik az aszpartát, a másik pedig a glutamát kötőzseb. Ezek a zsebek a H₁ és H₂ receptorokban is megtalálhatóak. A H₃ receptor esetén a 114-es aszpartát aminosav közelében található aktív részt nevezik aszpartát zsebnek, míg szerkezeti okok következtében a glutamát zseb nehezen hozzáférhető. Emiatt a H₃ receptoron biológiai aktivitással rendelkező anyagok nagyrészt az aszpartát zseb körül fejtik ki hatásukat. Az elvégzett számítások alapján valószínűsítjük, hogy az általunk szintetizált anyagok is ehhez a zsebhez férnek hozzá. Ennek igazolására röntgendiffrakciós és MS spektrometriai mérések végrehajtására van szükség, amelyek membránreceptorok esetén nem kézenfekvőek, ezért további nemzetközi együttműködésekben tervezzük megoldani.

Feltérképeztük a kismolekulák által a receptoron kifejtett hatás lehetséges mechanizmusát, és arra jutottunk, hogy a jódimidazólium a jelen lévő nukleofil, a receptor

szerkezetében található 118-as számú ciszteinhez kötődik, és a nem kovalens kölcsönhatások mellett ez is a kismolekula aszpartát zsebbe való bekerülését segíti. Az aktív centrumba bekerülő kismolekula a 401-es számú leucin aminosav oldallánc rotációját indítja el, amelynek köszönhetően mozgásra készíti a 371-es számú triptofánt is. Ez a sor elmozdulás azt eredményezi, hogy a 6-os transzmembrán hélix közelebb kerül a többi transzmembrán hélixhez. Feltételezésünk szerint ez a konformációs változás magyarázhatja a funkcionális aktivitást. A fragmens két lehetséges kötődése az aszpartát aktív centrumban a H₃ receptoron, illetve a fragmens kötődése a H₄ receptorhoz a 34. ábrán látható. A bal oldali négy kisebb ábra a lehetséges kötőmódokat mutatja attól függően, hogy a cisztein milyen torziós szöget vesz fel a szerkezetben. A felső két ábra a kedvező, az alsó kettő a kedvezőtlen pozíciókat mutatja.



34. ábra Fragmens lehetséges kötődései a H₃ receptorhoz (bal oldal, kristályszerkezetbe dokkolás alapján), illetve a H₄ receptorhoz (AlphaFold modell alapján)

Az általunk szintetizált molekulák szelektivitása a H₃ receptoron a H₄ receptorral szemben a modellezések alapján arra vezethető vissza, hogy a H₄ receptor szerkezetében van egy glutamin szerkezeti egység (34. ábra, cián színű oldallánc), ami a kismolekula kötőzsebbe való bekerülését akadályozza. A H₃-ban ez a glutamin szerkezeti rész nem található meg, helyette egy leucin aminosavegység van, és szterikusan messzebb is helyezkedik el, aminek következtében a kismolekulák könnyebben hozzáférnek az aktív centrumhoz, mint a H₄ receptor esetében.

A modellezések azt is megmutatták, hogy a fragmenshez kapcsolódó piperidin-, illetve piridingyűrűnek jelentős szerepe van a biológiai aktivitás változásában. A flexibilisebb háromdimenziós térkitöltésű piperidingyűrűnek köszönhetően a molekula egy kissé meghajlott szerkezetet is képes felvenni, ami kedvező a kötőseb geometriájából adódóan, ugyanis ebben a „meghajlott” térállásban a modellezések alapján a fiziológiás körülmények között protonált formában jelenlevő piperidingyűrű nitrogénatomja is egy ionos jellegű kölcsönhatásba képes lépni a 114-es aszpartát aminosavval. A rigidebb, sík térkitöltésű aromás piridingyűrű és a jelenlevő aromás imidazolgyűrű miatt a piridinszármazék szerkezete sokkal merevebb, ugyanis a 2 aromás szerkezeti rész között levő metilénsoportok mindkét aromásgyűrű síkjában benne szeretne lenni, a kialakuló térállás nem kedvező további kölcsönhatások kialakulásához.

6. Kísérleti rész

6.1. A kutatás során használt analitikai módszerek

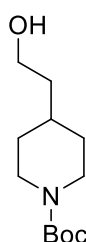
A Sigma-Aldrich Corporation vegyszereit használtam kutatásom során. A szintetikus munka során használt vékonyréteg kromatográfiás vizsgálatok során a Merck Kieselgel 60 F254 típusú szilika lapokat használtam, a lapok kiértékelését az UV-aktív anyagok esetén egy 254 nm hullámhosszúságú UV-lámpa segítségével, a nem UV-aktív anyagok esetén a lapka jódba mártásával végeztem el. A normálfázisú kromatográfiás tisztításokat a Teledyne ISCO CombiFlash Rf200 UV/VIS készülék segítségével végeztem el, a kromatográfiás eljárások során a 25-40 µm szemcseméretű flash szilikagél állófázishoz hexán-etil-acetát, illetve diklórmetán-metanol eluenskeverékeket használtam. Az ^1H és ^{13}C NMR spektrumok Varian Unity Inova 300 MHz és 500 MHz NMR berendezéssel készültek. A csatolási állandókat (J) Hz-ben, az eltolódásokat (δ) ppm-ben tüntettem fel. A folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás készülékkel (HPLC-MS) végzett méréseket a Shimadzu LCMS-2020 készülékkel készítettem 50–1000 m/z tartományban, melyben Reprospher 100 C18 (5 µm; 100×3 mm) oszlop, pozitív és negatív kettős ionforrás (DUIS $\pm$) és kvadrupól MS analizátor van. és a gradiens elúció során 0,01% hangyasavas HPLC vizet és HPLC acetonitrilt alkalmaztam mozgófázisként. Ismert molekulákról ^1H NMR, új vegyületekről pedig ^1H és ^{13}C NMR, olvadáspont (melyek a Jasco SRS OptiMelt készülékkel lettek megmérve), illetve nagyfelbontású tömegspektrummal mért tömegjeleket tüntetek fel.

Az új anyagokhoz már meglévő nagyfelbontású tömegspektrometriás méréseket a TTK Szerkezetkutató Központ MS Metabolomika Kutatólaboratóriumában végezte el Szabó Pál egy Sciex TripleTOF 600+ típusú DuoSpray ionforrással ellátott nagyfelbontású tömegspektrométer (AB Sciex, CA, USA) segítségével.

A nem feltüntetett ^1H és ^{13}C NMR, HRMS és olvadáspont adatok mérése még folyamatban van.

6.2. Elvégzett preparatív munka ismertetése

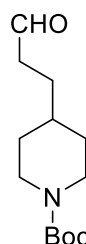
Terc-butil 4-(2-hidroxietyl)piperidin-1-karboxilát (**25**)



Egy egynyakú gömblombikban 4-piperidin etanolt (**24**; 1,64 g; 12,7 mmol) oldottam 35 ml kloroformban, majd az oldatot 0 °C-ra hűtöttem. Ezt követően 35 ml kloroformban oldottam di-*terc*-butil dikarbonátot (**39**; 3,05 g; 14,0 mmol) és trietil-amint (3,86 g; 38,2 mmol; 5,32 ml), majd az oldatot a reakcióelegyhez csepegtettem 0 °C-on. A reakcióelegyet 1 órán keresztül 0 °C-on kevertettem, majd felengedtem szobahőmérsékletre. 1 nap elteltével a reakcióelegyhez 35 ml telített Na_2CO_3 -oldatot adtam, majd elválasztottam a vizes és a szerves fázist. A vizes fázist ezt követően 3 x 60 ml kloroformmal mostam. Az egyesített szerves fázisokat nátrium-szulfáttal szárítottam, majd szűrtem, és bepároltam, így jutottam 2,75 g sárga olajhoz.

Termelés: 2,75 g (94%); sárga olaj. ^1H NMR (300 MHz, Kloroform-*d*) δ 4,18 – 3,90 (m, 2H), 3,84 – 3,40 (m, 2H), 2,89 – 2,40 (m, 2H), 1,85 – 1,61 (m, 2H), 1,56 – 1,47 (m, 4H), 1,44 (s, 9H), 1,17 – 0,98 (m, 2H).

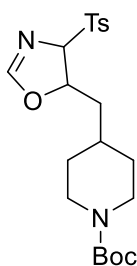
Terc-butil 4-(3-oxopropil)piperidin-1-karboxilát (**26**)



Egy háromnyakú gömblombikban oxalil-kloridot (**40**; 1,32 g; 10,4 mmol; 0,89 ml) oldottam 15 ml száraz diklórmetánban, majd az oldatot -60 °C-ra hűtöttem. Ezt követően az oldathoz DMSO-t (**41**; 1,70 g; 21,8 mmol; 1,55 ml) tartalmazó 15 ml száraz diklórmetánt csepegtettem, majd a reakcióelegyet 15 percig kevertettem és további 15 ml száraz diklórmetánban becsepegtettem az alkoholt (**25**; 2,62 g; 11,4 mmol). A reakcióelegyet ezt követően 45 percig kevertettem -60 °C-on. Az idő elteltével a reakcióelegyhez trietil-amint (4,52 g; 44,6 mmol; 6,22 ml) csepegtettem, majd 1 óra elteltével a reakcióelegyet felengedtem szobahőmérsékletre, és további 1 órát kevertettem, majd a reakcióelegyet 3 x 50 ml vízzel mostam, majd a szerves fázist Na₂SO₄-al szárítottam, bepároltam. Így jutottam 2,34 g nyerste termékhez, melyet normál fázisú flash kromatográfiával tisztítottam (hexán:etil-acetát eluenskeverék), így jutottam 1,66 g termékhez.

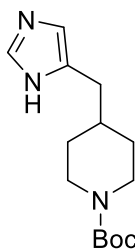
Termelés: 1,66 g (71%); színtelen olaj. ¹H NMR (300 MHz, Kloroform-*d*) δ 9,76 (s, 1H), 4,04 (d, 2H), 3,09 – 2,60 (m, 2H), 2,35 (d, *J* = 1,8 Hz, 2H), 2,12 – 1,86 (m, 1H), 1,75 – 1,60 (m, 2H), 1,43 (s, 9H), 1,26 – 0,91 (m, 2H).

Terc-butil 4-((4-tozil-4,5-dihidroxazol-5-il)metil)piperidin-1-karboxilát (**27**)



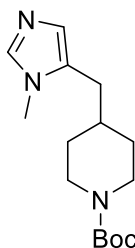
Egy egynyakú gömblombikban az aldehidet (**26**; 1,63 g; 7,20 mmol) és a tozilmetil-izocianidot (**45**; 1,61 g; 8,30 mmol) 40 ml etanolban oldottam, majd a lombik tartalmához finomra porított nátrium-cianidot (35,2 mg; 0,72 mmol) adtam és a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem 1 óráig. Ezt követően a reakcióelegyet bepároltam, és a lombik tartalmához 30 ml kloroformot adtam, majd üvegszűrő segítségével leszűrtem a kapott elegyet, és az anyalé bepárlásával jutottam 3,10 g termékhez, melyet további tisztítások nélkül használtam fel a reakciósor következő lépéséhez.

Termelés: 3,10 g (100%); világosbarna olaj. ¹H NMR (300 MHz, Kloroform-*d*) δ 7,81 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,37 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 6,97 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H), 5,20 – 5,00 (m, 1H), 4,74 (dd, *J* = 6,0, 1,7 Hz, 1H), 4,09 (m, 2H), 2,71 (t, *J* = 13,1 Hz, 2H), 2,45 (s, 3H), 1,88 – 1,62 (m, 4H), 1,62 – 1,49 (m, 1H), 1,45 (s, 9H), 1,30 – 0,91 (m, 2H).

Terc-butil 4-((1*H*-imidazol-5-il)metil)piperidin-1-karboxilát (**28**)

Az oxazolin-származékot (**27**; 3,00 g; 7,10 mmol) egy bombacsőben 20 ml ammóniával telített metanolban oldottam, majd a reakcióelegyet 100 °C-on kevertetem éjszaka. 20 óra elteltével reakcióelegyet bepároltam egy lombikban, majd a lombik tartalmát 40 ml diklórmetánban oldottam. Az oldatot 40 ml 10%-os Na₂CO₃-oldattal, majd 2 x 40 ml vízzel mostam, melyet követően a szerves fázist nátrium-szulfáttal szárítottam, szűrtem, majd bepároltam, így jutottam 1,80 g nyers termékhez, melyet normál fázisú flash kromatográfiával (diklórmetán:metanol eluenskeverék) tisztítottam, így jutottam 0,77 g termékhez.

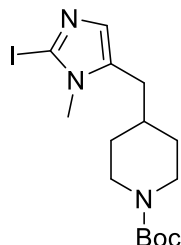
Termelés: 0,77 g (41%); sárga olaj. ¹H NMR (300 MHz, Kloroform-*d*) δ 7,59 (s, 1H), 6,77 (s, 1H), 6,68 (s, 1H), 4,06 (d, *J* = 13,1 Hz, 2H), 2,66 (t, *J* = 12,7 Hz, 2H), 2,54 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H), 1,85 – 1,70 (m, 1H), 1,65 (d, *J* = 13,5 Hz, 2H), 1,44 (s, 9H), 1,21 – 0,99 (m, 2H).

Terc-butil 4-((1-metil-1*H*-imidazol-5-il)metil)piperidin-1-karboxilát(**33**)

Egy egynyakú gömblombikban 20 ml dimetil-formamidban szuszpendáltam a nátrium-hidridet (0,10 g; 4,40 mmol) 0 °C-on argon alatt, majd 20 ml dimetil-formamidban becsepegtettem az imidazolszármazékot (**28**; 0,77 g; 2,90 mmol; 0,174 ml), és a reakcióelegyet 20 percig kevertetem 0 °C-on. Ezt követően a reakcióelegyhez további 10 ml dimetil-formamidban metil-jodidot (0,62 g; 4,35 mmol; 0,27 ml) csepegtettem, és a reakcióelegyet 30 percig 0 °C-on, majd 1 napig szobahőmérsékleten kevertetem. Ezután a reakcióelegyhez 15 ml telített NH₄Cl-oldatot adtam, majd a reakcióelegyet 3x 30 ml etil-acetáttal extraháltam. Az extrakciót követően a szerves fázist nátrium-szulfáttal szárítottam, majd szűrtem és bepároltam, így jutottam 0,80 g termékhez.

Termelés: 0,80 g (100%); világosbarna olaj. HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[M+H]^+$ Mérve $C_{15}H_{26}N_3O_2$ 280.2025; számítva 280.2033.

Terc-butil 4-((2-jód-1-metil-1*H*-imidazol-5-il)metil)piperidin-1-karboxilát (**35**)

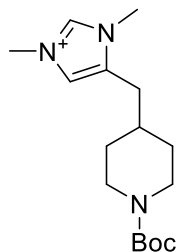


tert-butyl 4-((2-iodo-1-methyl-1*H*-imidazol-5-yl)methyl)piperidine-1-carboxylate

Egy kétnyakú gömblombikban argon atmoszféra alatt 25 ml abszolút tetrahidrofuranban oldottam az imidazolszármazékot (**33**; 0,60 g; 2,16 mmol), majd az oldatot -78 °C -ra hűtöttem. Ezt követően lassan butil-lítiumot (0,21 g; 3,24 mmol; 1,30 ml) csepegtettem a reakcióelegyhez -78 °C-on, majd a reakcióelegyet további 1 óráig kevertettem -78 °C-on. Ezután a reakcióelegyhez jódot (1,10 g; 4,33 mmol) csepegtettem 25 ml abszolút tetrahidrofuranban oldva, és a reakcióelegyet további 30 percig -78 °C-on kevertettem. Az idő elteltével a reakcióelegyet 0 °C-on kevertettem 1 óráig, majd szobahőmérsékleten éjszaka. Másnap a reakcióelegyhez 2 ml telített NH_4Cl oldatot adtam, majd a reakcióelegyet szilikára pároltam, és a nyersterméket normál fázisú flash kromatográfiával (diklórometán:metanol eluenskeverék) tisztítottam, így jutottam 0,21 g termékhez, és 270 mg kiindulási anyaghoz.

Termelés: 0,21 g (24%), sötétbarna szilárd anyag. Olvadáspont: 70 °C. HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[M+H]^+$ Mérve $C_{15}H_{25}N_3O_2I$ 406.0991; számítva 406.1000.

5-((1-*Terc*-butoxikarbonil)piperidin-4-il)metil)-1,3-dimetil-1*H*-imidazol-3-ium jodid (**34**)

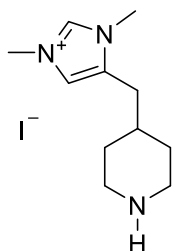


Egy kis 3 mL térfogatú üvegcsében 2 ml acetonitrilben oldottam az imidazolszármazékot (**33**; 0,20 g; 0,68 mmol), majd a reakcióelegyhez metil-jodid-ot adtam (0,46 g; 3,21 mmol; 200 μ l), és a reakcióelegyet 1 napig 90 °C-on kevertettem. Az idő elteltével a reakcióelegyhez további metil-jodidot (0,46 g; 3,21 mmol; 200 μ l) adagoltam, és a

reakcióelegyet további 1 napig kevertettem 90 °C-on, 1 nap elteltével a reakcióelegyet bepároltam és a nyersterméket (0,18 g) preparatív HPLC segítségével tisztítottam.

Termelés: 0,10 g (50%); színtelen olaj. ^1H NMR (300 MHz, Kloroform-*d*) δ 9,63 (s, 1H), 7,04 (s, 1H), 4,09 (d, $J = 13,2$ Hz, 2H), 3,93 (s, 3H), 3,85 (s, 3H), 2,90 – 2,32 (m, 4H), 1,67 (dt, $J = 14,0, 2,7$ Hz, 3H), 1,42 (s, 9H), 1,26 – 1,04 (m, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, Kloroform-*d*) δ 154,65, 138,00, 133,62, 120,30, 79,67, 36,38, 34,97, 33,84, 31,73, 30,15, 28,39. HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ Mérvé $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_2$ 294.2181; számítva 294,2192.

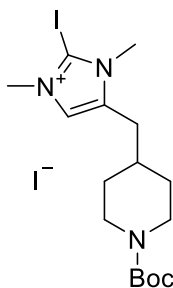
1,3-Dimetil-5-(piperidin-4-ilmetil)-1*H*-imidazol-3-ium jodid (**20**)



Egy kis 3 mL térfogatú üvegcsében az imidazolszármazékot (**34**; 0,09 g; 0,46 mmol) 2 ml száraz diklórmetánban oldottam, majd a reakcióelegyet 0 °C-ra hűtöttem. Ezt követően a reakcióelegyhez bór-trifluorid dietil-éterátot (0,18 g; 1,27 mmol; 155 μl) adtam, és a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem 3 óráig. Ezt követően a reakcióelegyet bepároltam, és a nyersterméket preparatív HPLC segítségével tisztítva jutottam a termékhez.

Termelés: 0,02 g (22%), fehér kristályos anyag. Olvadáspont: 37-40 °C. ^1H NMR (300 MHz, Acetonitrile-*d*₃) δ 8.34 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.52 – 3.34 (m, 2H), 2.96 (dtd, $J = 13.1, 10.6, 2.8$ Hz, 2H), 2.65 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.90 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 1.64 – 1.39 (m, 2H), 1.38 – 1.01 (m, 1H). (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ Mérvé $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_3$ 194.1657; számítva 194.1664.

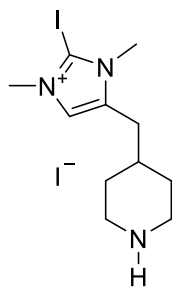
5-((1-(*Terc*-butoxikarbonil)piperidin-4-il)metil)-2-jód-1,3-dimetil-1*H*-imidazol-3-ium jodid (**36**)



Egy kis 3 mL térfogatú üvegcsében 2 ml acetonitrilben oldottam az imidazolszármazékot (**35**; 0,17 g; 0,43 mmol), majd a reakcióelegyhez metil-jodidot adtam (0,19 g; 1,29 mmol; 85 µl) és a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. Az elegyet bepároltam és így jutottam 0,18 g termékhez, melyet további tisztítás nélkül vittem tovább a következő reakcióba.

Termelés: 0,18 g (100%) barna, szilárd por. Olvadáspont: 100 °C. ¹H NMR (300 MHz, Kloroform-*d*) δ 7.31 (s, 1H), 4.24 – 3.98 (m, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 2.85 – 2.51 (m, 4H), 1.76 (d, *J* = 12.8 Hz, 3H), 1.42 (s, 9H), 1.30 – 1.05 (m, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, Kloroform-*d*) δ 154.71 , 135.20 , 122.57 , 112.62 , 79.49 , 40.26 , 37.58 , 34.70 , 31.94 , 31.92 , 31.70 , 28.45 . HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*: [M+H]⁺ MérvéC₁₆H₂₇N₃O₂I 420.1148; számítva 420.1158.

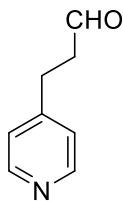
2-Jód-1,3-dimetil-5-(piperidin-4-ilmetil)-1*H*-imidazol-3-ium jodid (**21**)



A kis üvegcsében az imidazolszármazékot (**36**; 0,09 g; 0,21 mmol) ml száraz diklórmetánban oldottam, majd a reakcióelegyet 0 °C-ra hűtöttem. Ezt követően a reakcióelegyhez bór-trifluorid dietil-éterátot (0,08 g; 0,58 mmol; 71 µl) adtam, és a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem 3 óráig. Ezt követően a reakcióelegyről az oldószert lefűvattam, és a nyersterméket preparatív HPLC segítségével tisztítottam, majd a terméket tartalmazó frakciókat liofilizálással oldószermentesítettem, így jutottam 0,02 g termékhez.

Termelés: 0,02 g (30 %), színtelen olaj. ¹H NMR (300 MHz, Acetonitril-*d*₃) δ 7,45 (s, 1H), 3,79 (s, 3H), 3,72 (s, 3H), 3,40 (s, 2H), 2,92 (s, 2H), 2,73 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H), 2,28 (s, 1H), 1,89 (s, 2H), 1,42 (s, 2H), 1,41 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 135.42 , 124.24 , 102.86 , 46.31 , 43.52 , 40.94 , 36.90 , 31.85 , 30.05 , 28.29 , 9.10 . HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*: [M+H]⁺ Mérvé C₁₁H₁₉N₃I 320.0623; számítva 320.06.

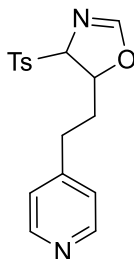
3-(Piridin-4-il)propanal (**30**)



Egy háromnyakú gömblombikban oxalil-kloridot (**40**; 8,66 g; 68,3 mmol; 5,86 ml) oldottam 100 ml száraz diklórmétánban, majd az oldatot -60 °C-ra hűtöttem. Ezt követően az oldathoz DMSO-t (**41**; 8,61 g; 110 mmol; 7,83 ml) tartalmazó 100 ml száraz diklórmétánt csepegtettem, majd a reakcióelegyet 15 percig kevertettem, majd további 100 ml száraz diklórmétánban becsepegtettem az alkoholt (**29**; 7,20 g; 52,5 mmol), és a reakcióelegyet 45 percig kevertettem -60 °C-on. Az idő elteltével a reakcióelegyhez trietil-amint (22,8 g; 210 mmol; 31,5 ml) csepegtettem, majd 1 óra elteltével a reakcióelegyet felengedtem szobahőmérsékletre, és további 1 órát kevertettem, majd a reakcióelegyet 3 x 200 ml vízzel mostam, majd a szerves fázist Na₂SO₄-al szárítottam, bepároltam. Így jutottam 7 g nyerstermékhez, melyet normál fázisú flash kromatográfiával tisztítottam (diklórmétán:metanol eluenskeverék), így jutottam 3,75 g termékhez.

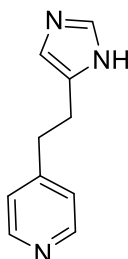
Termelés: 3,75 g (100%), narancssárga olaj. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.70 (s, 1H), 8.43 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 7.23 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.83 (s, 4H).

5-(2-(Piridin-4-il)etil)-4-tozil-4,5-dihidrooxazol (**31**)



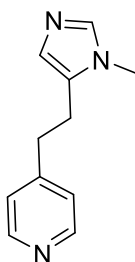
Egy egynyakú gömblombikban az aldehidet (**30**; 0,54 g; 4,0 mmol) és a tozilmetil-izocianidot (0,90 g; 4,6 mmol) 30 ml etanolban oldottam, majd a lombik tartalmához finomra porított nátrium-cianidot (19,6 mg; 0,4 mmol) adtam és a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem 1 óráig. Ezt követően a reakcióelegyet bepároltam, és a lombik tartalmához 30 ml kloroformot adtam, majd üvegszűrő segítségével leszűrtem a kapott elegyet, és az anyalé bepárlásával jutottam termékhez, melyet további tisztítás nélkül használtam fel a reakciósor következő lépéséhez.

Termelés: 1,32 g (100%), sötétbarna olaj.

4-(2-(1*H*-Imidazol-5-il)etil)piridin (**32**)

Az oxazolin-származékot (**31**; 3,00 g; 7,10 mmol) egy bombacsőben 20 ml ammóniával telített metanolban oldottam, majd a reakcióelegyet 100 °C-on kevertettem éjszaka. 20 óra elteltével reakcióelegyet bepároltam egy lombikban, majd a lombik tartalmát 40 ml diklórmetánban oldottam. Az oldatot 40 ml 10%-os Na₂CO₃-oldattal, majd 2 x 40 ml vízzel mostam, melyet követően a szerves fázist nátrium-szulfáttal szárítottam, szűrtem, majd bepároltam, így jutottam 1,8 g nyerste termékhez, melyet normálfázisú flash kromatográfiával (diklórmetán:metanol eluenskeverék) tisztítottam, így jutottam 0,77 g termékhez.

Termelés: 0,77 g (63%); barna kristályos anyag. Olvadáspont: 150 °C. ¹H NMR (300 MHz, Kloroform-*d*) δ 8.45 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 7.57 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 6.71 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 4.12 – 2.36 (m, 4H). ¹³C NMR (75 MHz, Kloroform-*d*) δ 150.86 , 149.39 , 137.24 , 134.69 , 124.00 , 115.60 , 35.00 , 27.95 . HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*: [M+H]⁺ mérve C₁₀H₁₂N₃ 174.1031; számítva 174.1038.

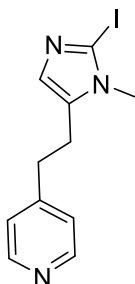
4-(2-(1-Metil-1*H*-imidazol-5-il)etil)piridin (**37**)

Egy egynyakú gömblombikban 20 ml dimetil-formamidban szuszpendáltam a nátrium-hidridet (0,27 g; 11,3 mmol; 0,45 ml) 0 °C-on, majd 30 ml dimetil-formamidban becsepegtettem az imidazolszármazékot (**32**; 1,30 g; 7,50 mmol), és a reakcióelegyet 20 percig kevertettem 0 °C-on. Ezt követően a reakcióelegyhez metil-jodidot (1,60 g; 11,3 mmol; 0,70 ml) csepegtettem, és a reakcióelegyet 30 percig 0 °C-on, majd 2 napig szobahőmérsékleten kevertettem. Ezután a reakcióelegyhez 50 ml telített NH₄Cl-oldatot adtam, majd a reakcióelegyet 3 x 70 ml etil-acetáttal, és 2 x 50 ml DKM:MeOH 10%-os eleggyel extraháltam.

Az extrakciót követően a szerves fázisokat nátrium-szulfáttal szárítottam, majd szűrtem, és bepároltam. ^1H NMR alapján a termék 2:1 arányban izomerkeverék.

Termelés: 0,45 g (29%), sötétbarna olaj. HRMS (ESI/Q-TOF) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ Mérvé $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_3$ 188.1187; számítva 188.1187.

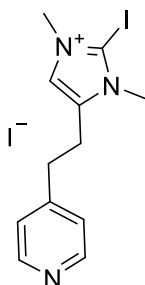
4-(2-(2-Jód-1-metil-1*H*-imidazol-5-il)etil)piridin (**38**)



Egy kétnyakú gömblombikban argon atmoszféra alatt 80 ml abszolút tetrahydrofuranban oldottam az imidazolszármazékot (**37**, 0,84 g; 4,50 mmol), majd az oldatot $-78\text{ }^\circ\text{C}$ -ra hűtöttem. Ezt követően lassan butil-lítiumot (0,29 g; 4,5 mmol; 1,80 ml) csepegtettem a reakcióelegyhez $-78\text{ }^\circ\text{C}$ -on, majd a reakcióelegyet további 1 óráig kevertettem $-78\text{ }^\circ\text{C}$ -on. Ezután a reakcióelegyhez jódot (1,2 g; 4,73 mmol) csepegtettem 10 ml abszolút tetrahydrofuranban oldva, és a reakcióelegyet további 30 percig $-78\text{ }^\circ\text{C}$ -on kevertettem. Az idő elteltével a reakcióelegyet $0\text{ }^\circ\text{C}$ -on kevertettem 3 óráig, majd a reakcióelegyhez 1 ml telített NH_4Cl -oldatot adtam, és a reakcióelegyet szilikára pároltam. A nyersterméket normál fázisú flash kromatográfia segítségével tisztítottam (diklórmétán:metanol eluenskeverék), így jutottam 0,12 g termékhez, melyet további tisztítások nélkül vittem a következő reakcióba.

Termelés: 0,12 g (9%); barna olaj.

2-Jód-1,3-dimetil-t-(2-piridin-4-il)etil)-1*H*-imidazol-3-ium jodid (**23**)



Egy kis üvegcsében 10 ml acetonitrilben oldottam az imidazolszármazékot (**38**; 0,12 g; 0,38 mmol), majd a reakcióelegyhez metil-jodidot adtam (0,22 g; 1,52 mmol; 0,10 ml) és a

reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem, 16 óra elteltével a reakcióelegyet bepároltam, majd a nyersterméket preparatív HPLC segítségével tisztítottam., így jutottam 8 mg termékhez.
Termelés: 8 mg (6%), barna olaj.

7. Összefoglalás

Az elektrofil fragmenseken alapú kovalens inhibitorok fejlesztése számottevően hozzájárulhat a személyre szabott terápiák fejlesztésében, illetve az adott célfehérjék szervezetben betöltött pontos szerepének megértésében. Az elmúlt évtizedek eredményei azt támasztják alá, hogy ez a kutatási irány ígéretes lehetőségeket kínál új gyógyszerek fejlesztésére.

Kutatómunkám során nagyszámú fragmens vizsgálata után kiválasztottam egy olyan heterociklusos elektrofil fragmenst, amely kellőképp kötődik a H₃ receptorhoz és megfelelő szelektivitást mutat a H₄ receptorral szemben. Az immepip nem kovalens H₃ agonista szerkezetét alapul véve megterveztünk egy kovalens immepip analógot, amely a kiválasztott fragmens szerkezetét tartalmazza. A tervezést követően sikeresen előállítottam több reakciólépésből álló szintetikus utakon keresztül potenciális kovalens-, és nem-kovalens H₃ receptorra nézve bioaktív vegyületeket. Ezek biológiai vizsgálata azt mutatta, hogy az immepipből kialakított vegyület az eredeti fragmensnél nagyobb aktivitást mutat, és a kovalens kötőelem meghatározó összevetve a nem kovalens kontrollvegyülettel. Ugyanakkor az immepip aktivitását nem sikerült elérni vagy javítani, így további fejlesztés alapjául szolgál. A vizsgált jódimidazólium származék antagonistát tulajdonságokat mutatott a hisztamin H₃ receptorán, amiből az következik, hogy a módosítás megfordította a funkcionális aktivitást, ami további értelmezést és vizsgálatokat igényel. A számítógépes modellezések eredményei alapján magyarázatot kaphattunk az egyes vegyületek szerkezete és aktivitása közötti összefüggésekre, és jövőbeni terveink között áll a molekulák fejlesztési lehetőségeinek szintetikus feltérképezése.

8. Irodalomjegyzék

- (1) Osborne, J.; Panova, S.; Rapti, M.; Urushima, T.; Jhoti, H. Fragments: Where Are We Now? *Biochem Soc Trans* **2020**, *48* (1), 271–280.
<https://doi.org/10.1042/BST20190694>.
- (2) Boike, L.; Henning, N. J.; Nomura, D. K. Advances in Covalent Drug Discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2022**, *21* (12), 881–898. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00542-z>.
- (3) Ábrányi-Balogh, P.; Keeley, A.; Ferenczy, G. G.; Petri, L.; Imre, T.; Grabrijan, K.; Hrast, M.; Knez, D.; Ilaš, J.; Gobec, S.; Keserű, G. M. Next-Generation Heterocyclic Electrophiles as Small-Molecule Covalent MurA Inhibitors. *Pharmaceuticals* **2022**, *15* (12).
<https://doi.org/10.3390/ph15121484>.
- (4) Klebe, G. The Foundations of Protein–Ligand Interaction. In *From Molecules to Medicines*; Sussman, J. L., Spadon, P., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2009; pp 79–101.
- (5) Murray, C. W.; Rees, D. C. The Rise of Fragment-Based Drug Discovery. *Nat Chem* **2009**, *1* (3), 187–192. <https://doi.org/10.1038/nchem.217>.
- (6) Hajduk, P. J. Puzzling through Fragment-Based Drug Design. *Nat Chem Biol* **2006**, *2* (12), 658–659. <https://doi.org/10.1038/nchembio1206-658>.
- (7) Kirsch, P.; Hartman, A. M.; Hirsch, A. K. H.; Empting, M. Concepts and Core Principles of Fragment-Based Drug Design. *Molecules* **2019**, *24* (23), 4309.
<https://doi.org/10.3390/molecules24234309>.
- (8) Vass, M.; Keserű, G. M. Fragments to Link. A Multiple Docking Strategy for Second Site Binders. *Med. Chem. Commun.* **2013**, *4* (3), 510–514.
<https://doi.org/10.1039/C2MD20267K>.
- (9) Bajusz, D.; Wade, W. S.; Satała, G.; Bojarski, A. J.; Ilaš, J.; Ebner, J.; Grebien, F.; Papp, H.; Jakab, F.; Douangamath, A.; Fearon, D.; von Delft, F.; Schuller, M.; Ahel, I.; Wakefield, A.; Vajda, S.; Gerencsér, J.; Pallai, P.; Keserű, G. M. Exploring Protein Hotspots by Optimized Fragment Pharmacophores. *Nat Commun* **2021**, *12* (1), 3201.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-23443-y>.
- (10) Amoretti, M.; Amsler, C.; Bonomi, G.; Bouchta, A.; Bowe, P.; Carraro, C.; Cesar, C. L.; Charlton, M.; Collier, M. J. T.; Doser, M.; Filippini, V.; Fine, K. S.; Fontana, A.; Fujiwara, M. C.; Funakoshi, R.; Genova, P.; Hangst, J. S.; Hayano, R. S.; Holzscheiter, M. H.; Jørgensen, L. V.; Lagomarsino, V.; Landua, R.; Lindelöf, D.; Rizzini, E. L.; Macrì, M.; Madsen, N.; Manuzio, G.; Marchesotti, M.; Montagna, P.; Pruys, H.; Regenfus, C.; Riedler, P.; Rochet, J.; Rotondi, A.; Rouleau, G.; Testera, G.; Variola, A.; Watson, T. L.; van der Werf, D. P. Production and Detection of Cold Antihydrogen Atoms. *Nature* **2002**, *419* (6906), 456–459. <https://doi.org/10.1038/nature01096>.
- (11) Bon, M.; Bilsland, A.; Bower, J.; McAulay, K. Fragment-based Drug Discovery—the Importance of High-quality Molecule Libraries. *Mol Oncol* **2022**, *16* (21), 3761–3777.
<https://doi.org/10.1002/1878-0261.13277>.

- (12) Li, Q. Application of Fragment-Based Drug Discovery to Versatile Targets. *Front Mol Biosci* **2020**, *7*, 180. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00180>.
- (13) De Cesco, S.; Kurian, J.; Dufresne, C.; Mittermaier, A. K.; Moitessier, N. Covalent Inhibitors Design and Discovery. *Eur J Med Chem* **2017**, *138*, 96–114. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.019>.
- (14) Ghosh, A. K.; Samanta, I.; Mondal, A.; Liu, W. R. Covalent Inhibition in Drug Discovery. *ChemMedChem* **2019**, *14* (9), 889–906. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cmdc.201900107>.
- (15) Park, B. K.; Boobis, A.; Clarke, S.; Goldring, C. E. P.; Jones, D.; Kenna, J. G.; Lambert, C.; Lavery, H. G.; Naisbitt, D. J.; Nelson, S.; Nicoll-Griffith, D. A.; Obach, R. S.; Routledge, P.; Smith, D. A.; Tweedie, D. J.; Vermeulen, N.; Williams, D. P.; Wilson, I. D.; Baillie, T. A. Managing the Challenge of Chemically Reactive Metabolites in Drug Development. *Nat Rev Drug Discov* **2011**, *10* (4), 292–306. <https://doi.org/10.1038/nrd3408>.
- (16) Singh, J.; Petter, R. C.; Baillie, T. A.; Whitty, A. The Resurgence of Covalent Drugs. *Nat Rev Drug Discov* **2011**, *10* (4), 307–317. <https://doi.org/10.1038/nrd3410>.
- (17) Bauer, R. A. Covalent Inhibitors in Drug Discovery: From Accidental Discoveries to Avoided Liabilities and Designed Therapies. *Drug Discov Today* **2015**, *20* (9), 1061–1073. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.05.005>.
- (18) Lagoutte, R.; Patouret, R.; Winssinger, N. Covalent Inhibitors: An Opportunity for Rational Target Selectivity. *Curr Opin Chem Biol* **2017**, *39*, 54–63. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.05.008>.
- (19) Tuley, A.; Fast, W. The Taxonomy of Covalent Inhibitors. *Biochemistry* **2018**, *57* (24), 3326–3337. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00315>.
- (20) Smith, A. J. T.; Zhang, X.; Leach, A. G.; Houk, K. N. Beyond Picomolar Affinities: Quantitative Aspects of Noncovalent and Covalent Binding of Drugs to Proteins. *J Med Chem* **2009**, *52* (2), 225–233. <https://doi.org/10.1021/jm800498e>.
- (21) Bauer, R. A. Covalent Inhibitors in Drug Discovery: From Accidental Discoveries to Avoided Liabilities and Designed Therapies. *Drug Discov Today* **2015**, *20* (9), 1061–1073. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.05.005>.
- (22) Gehring, M.; Laufer, S. A. Emerging and Re-Emerging Warheads for Targeted Covalent Inhibitors: Applications in Medicinal Chemistry and Chemical Biology. *J Med Chem* **2019**, *62* (12), 5673–5724. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01153>.
- (23) Péczka, N.; Orgován, Z.; Ábrányi-Balogh, P.; Keserű, G. M. Electrophilic Warheads in Covalent Drug Discovery: An Overview. *Expert Opin Drug Discov* **2022**, *17* (4), 413–422. <https://doi.org/10.1080/17460441.2022.2034783>.
- (24) McAulay, K.; Bilsland, A.; Bon, M. Reactivity of Covalent Fragments and Their Role in Fragment Based Drug Discovery. *Pharmaceuticals*. MDPI November 1, 2022. <https://doi.org/10.3390/ph15111366>.
- (25) Taylor, R. D.; MacCoss, M.; Lawson, A. D. G. Rings in Drugs. *J Med Chem* **2014**, *57* (14), 5845–5859. <https://doi.org/10.1021/jm4017625>.

- (26) Keeley, A.; Ábrányi-Balogh, P.; Keseru, G. M. Design and Characterization of a Heterocyclic Electrophilic Fragment Library for the Discovery of Cysteine-Targeted Covalent Inhibitors. *Medchemcomm* **2019**, *10* (2), 263–267. <https://doi.org/10.1039/c8md00327k>.
- (27) Keeley, A.; Ábrányi-Balogh, P.; Hrast, M.; Imre, T.; Ilaš, J.; Gobec, S.; Keserű, G. M. Heterocyclic Electrophiles as New MurA Inhibitors. *Arch Pharm (Weinheim)* **2018**, *351* (12). <https://doi.org/10.1002/ardp.201800184>.
- (28) Arrang, J. M.; Garbarg, M.; Schwartz, J. C. Auto-Inhibition of Brain Histamine Release Mediated by a Novel Class (H3) of Histamine Receptor. *Nature* **1983**, *302* (5911), 832–837. <https://doi.org/10.1038/302832a0>.
- (29) Wágner, G.; Mocking, T. A. M.; Arimont, M.; Provensi, G.; Rani, B.; Silva-Marques, B.; Latacz, G.; Da Costa Pereira, D.; Karatzidou, C.; Vischer, H. F.; Wijtmans, M.; Kieć-Kononowicz, K.; De Esch, I. J. P.; Leurs, R. 4-(3-Aminoazetidin-1-yl)Pyrimidin-2-Amines as High-Affinity Non-Imidazole Histamine H3 Receptor Agonists with in Vivo Central Nervous System Activity. *J Med Chem* **2019**, *62* (23), 10848–10866. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01462>.
- (30) Lovenberg, T. W.; Roland, B. L.; Wilson, S. J.; Jiang, X.; Pyati, J.; Huvar, A.; Jackson, M. R.; Erlander, M. G. Cloning and Functional Expression of the Human Histamine H3 Receptor. *Mol Pharmacol* **1999**, *55* (6), 1101–1107.
- (31) Berlin, M.; Boyce, C. W.; De Lera Ruiz, M. Histamine H3 Receptor as a Drug Discovery Target. *Journal of Medicinal Chemistry*. January 13, 2011, pp 26–53. <https://doi.org/10.1021/jm100064d>.
- (32) Csorba, N.; Ábrányi-Balogh, P.; Keserű, G. M. Covalent Fragment Approaches Targeting Non-Cysteine Residues. *Trends Pharmacol Sci* **2023**. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2023.08.014>.
- (33) Tiligada, E.; Zampeli, E.; Sander, K.; Stark, H. Histamine H3 and H4 Receptors as Novel Drug Targets. *Expert Opin Investig Drugs* **2009**, *18* (10), 1519–1531. <https://doi.org/10.1517/14728220903188438>.
- (34) Kitbunnadaj, R.; Hashimoto, T.; Poli, E.; Zuiderveld, O. P.; Menozzi, A.; Hidaka, R.; De Esch, I. J. P.; Bakker, R. A.; Menge, W. M. P. B.; Yamatodani, A.; Coruzzi, G.; Timmerman, H.; Leurs, R. N-Substituted Piperidinyl Alkyl Imidazoles: Discovery of Methimepip as a Potent and Selective Histamine H3 Receptor Agonist. *J Med Chem* **2005**, *48* (6), 2100–2107. <https://doi.org/10.1021/jm049475h>.
- (35) Grimmett, M. R. 4.08 - Imidazoles and Their Benzo Derivatives: (Iii) Synthesis and Applications. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*; Katritzky, A. R., Rees, C. W., Eds.; Pergamon: Oxford, 1984; pp 457–498. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-008096519-2.00076-X>.