

Fotoaktiválható idegnövekedési faktor mimetikumok szintézise és fotokémiai vizsgálata

Szabó Bence

BSc. IV. évfolyamos hallgató

Külső konzulens:

Dr. Cseri Levente

kutató vegyész

Belső konzulens:

Dr. Kupai József

habilitált egyetemi docens

BrainVisionCenter Kutatóintézet és Kompetenciaközpont, Kémia Osztály

Budapest Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Szerves Kémia és Technológia Tanszék

2024



Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék óriási köszönetet mondani témavezetőmnek, **dr. Cseri Leventének**, akinek iránymutatása, értékes tanácsai és konstruktív kritikái nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre. Hálás vagyok azért a számtalan dologért, amit munkám során tőle tanulhattam, melyek mind a szakmai, mind az emberi fejlődésemhez hozzájárultak. Köszönöm, hogy kutatásom során végig támogatott és a tudományos igényességre ösztönzött.

Köszönettel tartozom belső konzulensemnek, **dr. Kupai Józsefnek**, akihez bármikor bizalommal fordulhattam. Köszönöm a kapott lehetőségeket és a rengeteg tőle kapott segítséget.

Köszönöm **dr. Mucsi Zoltánnak**, a BrainVisionCenter Kémia osztályának vezetőjének, hogy munkámat az általa vezetett laboratóriumban végezhettem. Köszönettel tartozom a kutatócsoport minden tagjának, köztük **dr. Kovács Ervinnek**, **Domahidy Farkasnak** és **Kontra Bencének** szakmai tanácsaikért, segítségükért, a baráti légkör megteremtéséért. Külön köszönet illeti **Csomos Attilát**, **Horváth Zsófiát** és **Petrilla Brigittát**, akik társaságában mindig jó hangulatban telt a munka.

Köszönettel tartozom továbbá **dr. Kalydi Eszternek** és **dr. Turczel Gábornak** az NMR spektrumok felvételéért, valamint azok kiértékelésében nyújtott segítségükért.

Tartalomjegyzék

1. Irodalmi áttekintés	9
1.1. Fotoreszponzív anyagok	9
1.1.1. A fény szerepe a tudományban.....	9
1.1.2. Fényérzékenyítő anyagok.....	10
1.1.3. Fotokapcsoló molekulák.....	10
1.1.4. Fotolabilis védőcsoportok.....	12
1.1.5. Orto-nitrobenzil vázas photocagek.....	15
1.1.6. Kumarin vázas photocagek.....	18
1.1.7. Fotoreszponzív proteinek	20
1.2. Az idegnövekedési faktor és mimetikumai	23
1.2.1. Az idegrendszer felépítése, betegségei	23
1.2.2. Az idegnövekedési faktor fehérje	24
1.2.3. B-355252.....	26
1.2.4. LM11A-31.....	27
1.3. Kétfoton mikroszkópia	29
1.4. Fotolízis vizsgálatok	32
2. Célkitűzések	35
3. Kísérleti eredmények	37
3.1. Célmolekulák szintézise	37
3.1.1. NGF mimetikumok szintézise	37
3.1.2. Fotolabilis védőcsoportok szintézise	45
3.1.3. NGF mimetikumok és fotolabilis védőcsoportok kapcsolása.....	47
3.2. Spektroszkópiai és fotokémiai vizsgálatok.....	49
3.2.1. A fotolízis kvantumhatékonyságának meghatározási módszere.....	49
3.2.2. A referencia 4,4'-dimetilazobenzol vizsgálata	52
3.2.3. Az új vegyületek spektroszkópiai vizsgálata	58
3.2.4. Fotolízis kísérletek, az új vegyületek kvantumhatékonysága	63
4. Jövőbeli tervek.....	70
5. Kísérleti munka	72
5.1. A szintézisek során használt vegyszerek, eszközök és műszerek	72
5.2. Az elvégzett reakciók részletes leírása	73
5.2.1. 4,5-Diklór- <i>N</i> -(naftalin-1-ilmetil)tiofén-2-szulfonamid (1)	73
5.2.2. 4,5-Diklór- <i>N</i> -(4-metoxibenzil)- <i>N</i> -(naftalin-1-ilmetil)tiofén-2-szulfonamid (2)	74
5.2.3. <i>Terc</i> -butil-4-(3-hidroxifenil)piperazin-1-karboxilát (3).....	75
5.2.4. 4-(3-(3-Klór-5-(<i>N</i> -(4-metoxibenzil)- <i>N</i> -(naftalin-1-ilmetil)sulfamoil)tiofén-2-iloxi)fenil)piperazin-1-karboxilát (4).....	76
5.2.5. 4-(3-(3-Klór-5-(<i>N</i> -(4-metoxibenzil)- <i>N</i> -(naftalin-1-ilmetil)sulfamoil)tiofén-2-iloxi)fenil)piperazin-1-karboxilát (6).....	77
5.2.6. (9 <i>H</i> -Fluoren-9-il)metil-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-metil-1-((2-morfolinoetil)amino)-1-oxopentán-1-il)karbamát (9)	78
5.2.7. <i>Terc</i> -butil-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-metil-1-((2-morfolinoetil)amino)-1-oxopentán-1-il)karbamát (11)	79
5.2.8. (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-2-Amino-3-metil- <i>N</i> -(2-morfolinoetil)pentánamid (7).....	80
5.2.9. 1-(4,5-Dimetoxi-2-nitrofenil)etan-1-on (13)	81
5.2.10. 1-(4,5-Dimetoxi-2-nitrofenil)etan-1-ol (14)	82
5.2.11. 1-(4,5-Dimetoxi-2-nitrofenil)etil-(4-nitrofenil)-karbonát (15)	82
5.2.12. 4-(Brómmetil)-7-(dietilamino)-2 <i>H</i> -kromén-2-on (16).....	83
5.2.13. 4-(Dibrómmetil)-7-(dietilamino)-2 <i>H</i> -kromén-2-on (17)	84
5.2.14. 7-(Dietilamino)-4-(hidroximetil)-2 <i>H</i> -kromén-2-on (18)	85
5.2.15. (7-(Dietilamino)-2-oxo-2 <i>H</i> -kromén-4-il)metil-(4-nitrofenil)-karbonát (19)	85

5.2.16.	1-(4,5-Dimetoxi-2-nitrofenil)etil-4-(3-((3-klór-5-(<i>N</i> -(naftalin-1-ilmetil)sulfamoi)tiofén-2-il)oxi)fenil)piperazin-1-karboxilát (20)	86
5.2.17.	(7-(Dietilamino)-2-oxo-2 <i>H</i> -kromén-4-il)metil-4-(3-((3-klór-5-(<i>N</i> -(naftalin-1-ilmetil)sulfamoi)tiofén-2-il)oxi)fenil)piperazin-1-karboxilát (21).....	87
5.2.18.	4-Klór-5-(3-(4-((7-(dietilamino)-2-oxo-2 <i>H</i> -kromén-4-il)metil)piperazin-1-il)fenoxi)- <i>N</i> -(naftalin-1-ilmetil)tiofén-2-szulfonamid (22)	88
5.2.19.	4-Klór- <i>N</i> -((7-(dietilamino)-2-oxo-2 <i>H</i> -kromén-4-il)metil)-5-(3-(4-((7-(dietilamino)-2-oxo-2 <i>H</i> -kromén-4-il)metil)piperazin-1-il)fenoxi)- <i>N</i> -(naftalin-1-ilmetil)tiofén-2-szulfonamid (23).....	89
5.2.20.	(7-(Dietilamino)-2-oxo-2 <i>H</i> -kromén-4-il)metil-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-metil-1-((2-morfolinoetil)amino)-1-oxopentán-1-il)karbamát (24)	90
5.2.21.	(<i>R,S</i>)-1-(4,5-Dimetoxi-2-nitrofenil)etil-((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-metil-1-((2-morfolinoetil)amino)-1-oxopentán-1-il)karbamát (25)	91
5.3.	Spektroszkópiai és fotokémiai vizsgálatok leírása	91
5.3.1.	A vizsgálatok során használt eszközök, berendezések	91
5.3.2.	4,4'-Dimetilazobenzol vizsgálata	92
5.3.3.	A célmolekulák vizsgálata	93
6.	Összefoglalás	94
7.	Irodalomjegyzék	95

Jelölések és rövidítések jegyzéke

2P/TP:	kétfoton (two photon)
ATP:	adenozin-trifoszfát
BiPOLES:	Bidirectional Pair of Opsins for Light-induced Excitation and Silencing
BMACM:	7-[bisz(karboximetil)amino]kumarin-4-ilmetil
Boc:	<i>terc</i> -butiloxikarbonil
BTEACl:	benziltriethylammónium-klorid
CaMPARI:	Calcium Modulated Photoactivatable Ratiometric Integrator
CM:	kumarin-4-ilmetil
COMU:	(1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidénaminooxi)dimetilamino-morfolino-karbénium hexafluorofoszfát
cAMP:	ciklikus adenzin-monofoszfát
DBcAMP:	bukladezin (dibutiril-adenozin-ciklofoszfát)
DEACM:	7-dietilaminokumarin-4-ilmetil
DEACMOC:	7-dietilaminokumarin-4-ilmetiloxikarbonil
DIPEA:	<i>N,N</i> -diizopropil-etilamin
DKM:	diklórmétán
DMAB:	4,4'-dimetilazobenzol
DMACM:	7-dimetilaminokumarin-4-ilmetil
DMAP:	4-dimetilaminopiridin
DMCM:	6,7-dimetoxikumarin-4-ilmetil
DMF:	dimetilformamid
DMSO:	dimetilszulfid
EDC:	<i>N</i> -(3-dimetil-aminopropil)- <i>N'</i> -etil-karbodiimid
EGF:	epidermális növekedési faktor
ESI:	elektrospray ionizáció
EtOAc:	etil-acetát
Fmoc:	fluorenilmetoxikarbonil
GABA:	γ -aminovajsav
HATU:	hexafluorofoszfát-azabenzotriazol-tetrametilurónium
HOAt:	1-hidrox-7-azabenzotriazol
HPLC:	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
IUPAC:	International Union of Pure and Applied Chemistry

LG:	távozó csoport (leaving group)
LiHMDS:	lítium-bisz(trimetil-szilil)amid
MCM:	7-metoxikumarin-4-ilmetil
MeCN:	acetonitril
MeNV:	α -metil-6-nitroveratril
MeNVOC:	α -metil-6-nitroveratriloxykarbonil
miniSOG:	mini Singlet Oxygen Generator
MS:	tömegspektrometria (mass spectrometry)
MW:	mikrohullám (szintéziseknél) vagy molekulatömeg (anyagi jellemzőknél)
NBS:	<i>N</i> -brómszukcinimid
NGF:	idegnövekedési faktor
NIST:	National Institute of Standards and Technology
NMR:	mágneses magrezonancia spektroszkópia (nuclear magnetic resonance spectroscopy)
NNM:	(3-nitronaftalin-2-il)metilén
NPOM:	6-nitropiperoniloximetil
NV:	6-nitroveratril
NVOC:	6-nitroveratriloxykarbonil
<i>o</i> -NB:	<i>orto</i> -nitrobenzil
PhoCl:	PhotoCleavable protein
PMB:	<i>para</i> -metoxibenzil
PPG:	fotolabilis védőcsoport (photolabile/photoremovable protecting group)
PTB:	Physikalisch-Technische Bundesanstalt
PTC:	fázistranszfer katalizátor
r.t.:	szobahőmérséklet (room temperature)
ROS:	reaktív oxigén molekulák (reactive oxygen species)
TBAOH:	tetrabutylammónium-hidroxid
TEA:	triethylamin
TFA:	trifluorecetsav
THF:	tetrahidrofurán
TOACl:	tetraoktilammónium-klorid
UV:	ultraibolya
VRK:	vékonyréteg kromatográfia
α -CNB:	α -karboxinitrobenzil

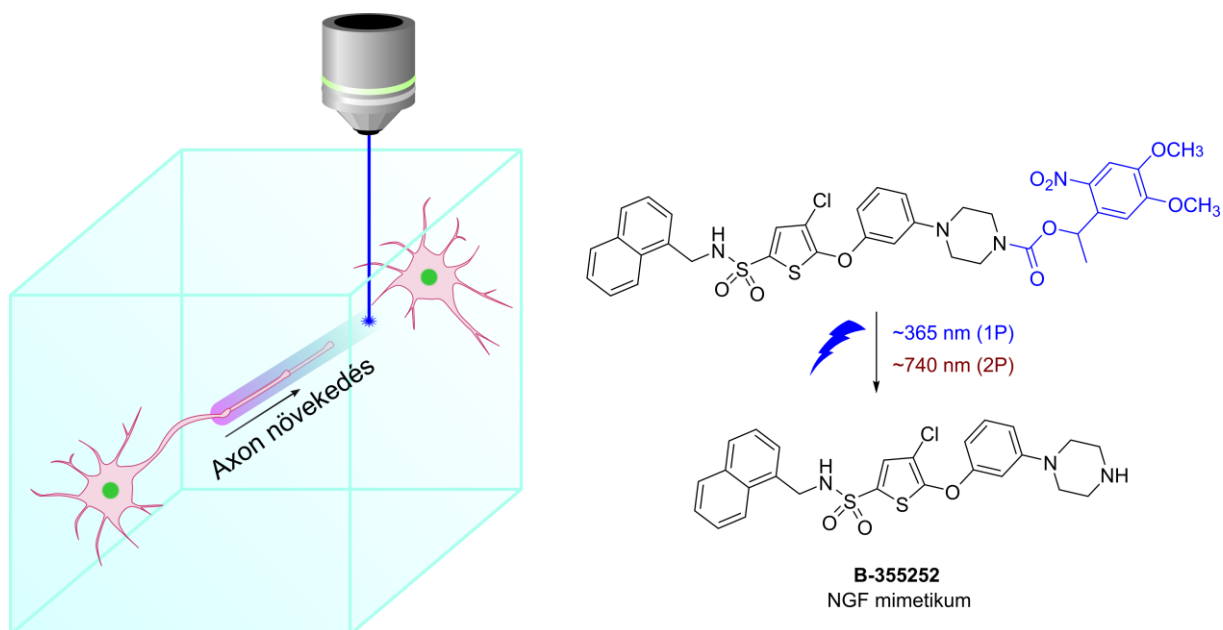
Bevezetés

Annak ellenére, hogy az emberi szervezet működését, a testünkben lejátszódó folyamatokat már az ókorban is próbálták feltérképezni, a mai napig számos megválaszolatlan kérdéssel találjuk magunkat szemben. Bár a biológia fejlődésével egyre jobb képet kapunk ennek a rendkívül komplex rendszernek a működéséről, továbbra is rengeteg olyan betegséggel találkozunk melynek nem tudjuk pontos okát, nem rendelkezünk hatékony módszerrel annak kezelésére. Szervezetünk egyik, ha nem a legfontosabb eleme az idegrendszer, melynek megfelelő működése kulcsfontosságú az általános életminőség és a mindennapi működésünk szempontjából. Sajnálatos módon azonban a World Health Organization becslései szerint világszerte több tízmillió ember szenved különböző neurodegeneratív betegségekben, melyek az idegsejtek elhalásával járnak. Ezeknek rendszerint csak tünetei kezelhetőek, jelenleg nem létezik rájuk hatékony gyógymód. Ezen betegségeken kívül is többféle trauma (például fizikai sérülés) érheti az idegrendszert, melyek során megszakad egyes idegsejtek közötti kapcsolat. Sok esetben testünk nem képes a sérült neuronok regenerálására, így az idegi sérülés permanenssé válik. Az említett egészségügyi állapotok kezeléséhez elengedhetetlen az idegsejtek működésének, fejlődésének alaposabb megértése. Mind a sérülések kezeléséhez, mind a betegségek vizsgálatára alkalmas sejtálózatok kialakításához fontos megismerni az idegsejtek nyúlványainak növekedési mechanizmusát, az erre hatással lévő faktorokat.

Az utóbbi évtizedekben több vegyületről is megmutatták, hogy képesek befolyásolni a neuritok növekedését, vagy elősegíteni sérült idegsejtek regenerálódását. Fontos azonban, hogy ezen hatóanyagok leadását térben és időben is kontrollálnunk kell a megfelelő hatás elérése érdekében. A fényt számos pozitív tulajdonsága miatt egyre gyakrabban alkalmazzák orvosi, gyógyászati célokra. A fotofarmakológia tudománya egyesíti a fotokémiát és a farmakológiát, a terület célja különböző hatóanyagok aktivitásának fénnel történő szabályozásának megvalósítása. Gyakori eszközei az úgynevezett fotolabilis védőcsoportok, melyek segítségével egy-egy hatóanyagot fény hatására fel lehet szabadítani a megfelelő helyen és időben annak „cagelt” formájából. Ahhoz azonban, hogy ez élő szervezetekben is kivitelezhető legyen, speciális technikákra van szükség, ugyanis a fény nehezen jut be az élő szövetekbe. Erre nyújt megoldást a kétfoton mikroszkópia, mely technológia fejlesztésében és alkalmazásában kutatóintézetünk anyavállalata, a Femtonics Kft. világszinten is élen jár.

A dolgozatomban bemutatott projekt célja, hogy az idegrendszer szempontjából fontos biológiai aktivitással rendelkező vegyületeket állítsak elő, majd ezeket fotolabilis

védőcsoportokkal lássam el. Az így kapott fotoaktiválható molekulák segítségével rövid távon lehetőség nyílt az axonok növekedési mechanizmusának jobb megértésére, valamint *in vitro* neuronhálózatok kialakítására a nyúlványok irányított növekedése révén. A projekt hosszú távú célja a központi idegrendszert érintő sérülések élő szervezetekben történő hatékonyabb kezelése.



1. ábra: Az axonok 3 dimenzióban kontrollált, irányított növekedése fény által felszabadított idegnövekedési faktor mimetikumok segítségével; Forrás: Dr. Cseri Levente, nem publikált munka, a szerző engedélyével.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. Fotoreszponzív anyagok

1.1.1. A fény szerepe a tudományban

A fény jelensége évezredek óta foglalkoztatja az emberiséget, így a történelem során óriási szerepe volt a tudomány fejlődésében. Kezdetben az emberi szemmel látható fényt vizsgálták, mely során idővel felismerték, hogy az az elektromágneses sugárzás egyik formája. Felfedezték azt is, hogy az elektromágneses spektrumnak a látható fényen kívül eső tartományai is léteznek. Mára a fény fogalma tudományos értelemben nem kizárólag a látható fényre, hanem az elektromágneses spektrum egyéb részeire is utal. A fény természetének és élettani hatásainak egyre jobb megértésével párhuzamosan újabb és újabb találmányok használták ki a benne rejlő lehetőségeket. Napjainkra a fény nem csupán a fizika tudományának vizsgálati alanya, de számos más területen is széles körben alkalmazott, hatékony eszköz, rengeteg technológia alapja. Így többek között elengedhetetlen a mikroszkópiás képalkotáshoz, a kémiai analízis különböző spektroszkópiás módszereihez, fotokémiai reakciók kivitelezéséhez, valamint a gyógyászatban is több modern kezelés használja.

A fény felhasználása az orvostudományban és a biológiában több szempontból előnyös. Széles hullámhossztartományon belül – nagyjából 300 és 1400 nanométer között – nem invazív, nem okozza a minta elszennyeződését, térben és időben jól kontrollálható, intenzitása és hullámhossza jól szabályozható.¹ Az említett szempontoknak megfelelően lehetőség adódik különböző biológiai folyamatok fény által történő vizsgálatára, illetve azok befolyásolására is, ha fénnel gerjeszthető molekulákat juttatunk az adott biológiai rendszerbe. A sejtek nagy része - néhány speciális sejtet leszámítva, például a szem fotoreceptorai, vagy egyes növényi sejtek - nem reagálnak a látható fényre.² Fontos azonban, hogy az ezen a tartományon kívül eső, elsősorban a 300 nm alatti nagy energiájú ultraibolya sugarak destruktívak lehetnek az élő sejtek számára, így ezek használata kerülendő. Azokat a molekulákat, melyek fény hatására reverzibilis vagy irreverzibilis változáson mennek keresztül, fotoreszponzív anyagoknak nevezzük. A nem makromolekulákra épülő, fényalapú kémiai stratégiák során alkalmazott vegyületeket három fő csoportba sorolhatjuk.³

1.1.2. Fényérzékenyítő anyagok

Az első típusba a fényérzékenyítő (angolul photosensitizer) molekulák tartoznak, melyek az alapállapotból (S_0) a besugárzott fény elnyelésével először szingulett gerjesztett állapotba (S_1) kerülnek, majd innen intersystem crossing (magyarul spinváltó átmenet) révén triplett (T_1) állapotba jutnak. Ez a molekula az alapállapotában triplett O_2 -ből (3O_2) energiatranszfer révén szingulett oxigént (1O_2) képezhet, vagy elektrontranszferrel olyan reaktív oxigén molekulákat (ROS, angolul reactive oxygen species) eredményezhet, mint a szuperoxidgyök ($O_2^{\bullet-}$), hidrogén-peroxid (H_2O_2) vagy a hidroxilgyök ($OH^{\bullet}$). Mivel mind a szingulett oxigén, mind az ROS-ek jelentős oxidatív stresszt okoznak, segítségükkel el lehet pusztítani beteg sejteket, patogén mikroorganizmusokat. Ilyen természetes „photosensitizer” molekula például a kurkumin, mely a kurkuma fűszernövény sárga színét adja.⁴ Ezen molekulákat elsősorban úgynevezett fotodinámiás kezelésekben, például rákos sejtek elpusztítására,⁵ szemölcsök eltávolítására alkalmazzák, valamint ivóvíztisztításra is használják őket.⁶

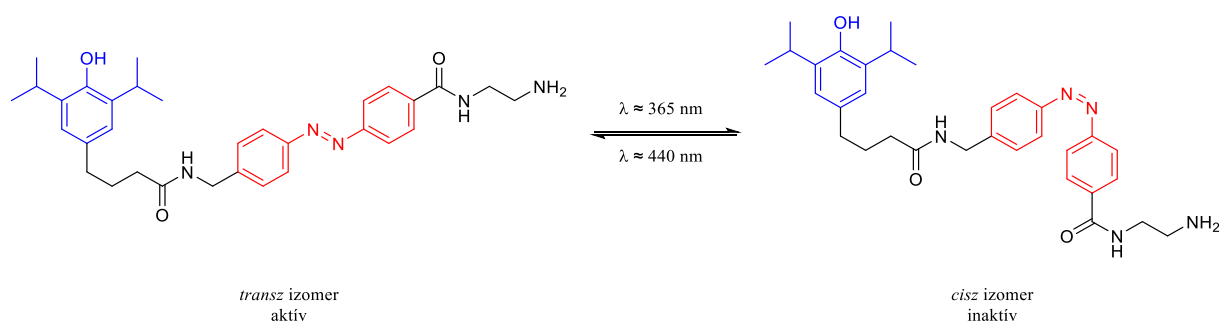
1.1.3. Fotokapcsoló molekulák

A második csoportot az úgynevezett fotokapcsoló (angolul photoswitch) molekulák alkotják. Ezeknek a vegyületnek a jellegzetessége, hogy két olyan szerkezetileg különböző állapottal rendelkeznek, melyek reverzibilisen egymásba alakíthatóak, valamint legalább az egyik irányba történő átalakítás fény segítségével valósítható meg.⁷ A másik irányba történő izomerizáció a legtöbb esetben szintén megoldható fény segítségével, másik hullámhosszon történő besugárzással, azonban történhet termikusan is.⁸ Az energetikailag stabilabb forma és a metastabil forma közötti alapállapotbeli energiagát határozza meg a spontán visszaalakulás valószínűségét. Minél nagyobb ez az energiagát, annál kevésbé valószínű, hogy a metastabil forma termikusan visszaalakul, így fény nélkül nem történik izomerizáció. Az ilyen rendszereket bistabilnak nevezzük, az átalakulás mindkét irányban fény hatására megy végbe.⁹ Ezen vegyületek jellemzésére általában a két izomer abszorpciós maximumát, valamint az adott hullámhosszon történő besugárzás során kialakult izomerek közötti egyensúlyként definiált fotostacionárius állapotot használják.¹

A fotokapcsoló molekulák biológiai célokra történő felhasználhatósága abban rejlik, hogy egy ilyen molekularészlettel helyettesítve egy biológiailag aktív vegyület megfelelő szerkezeti egységét – vagy ritkábban egyszerűen hozzákapcsolva a bioaktív komponenshez – a keletkező vegyület két formában létezhet. Feltéve, hogy a két szerkezetileg különböző forma lényegesen

eltérő affinitással kötődik egy adott biológiai célpontához (például valamilyen receptorhoz), fény segítségével „be- és kikapcsolhatjuk” a vegyület aktivitását.⁷ Ahhoz, hogy egy fotokapcsoló molekulát élő környezetben alkalmazhassunk, számos feltételnek kell megfelelnie. Először is, az izomerek közötti energiagátnak elég nagynek kell lennie ahhoz, hogy spontán ne tudjon a két forma egymásba alakulni, valamint a fény által kiváltott szerkezeti változásnak gyorsnak kell lennie és nagy kvantumhatékonysággal kell végbemennie, olyan hullámhosszon, amely nem destruktív a sejtek számára. Ezen kívül fontos, hogy a vegyület sok izomerizációs ciklust követően is hatékonyan működjön.¹

A „photoswitch” molekulák közül a legtöbb a szerkezetében lévő kettő kötés miatti cisz-transz izoméria révén működik. A legszélesebb körben alkalmazott vegyületek ezek közül az azobenzol származékok. Megfelelő hullámhosszon történő besugárzás hatására a termikusan stabil transz-azobenzol származék a metastabil cisz-azobenzol származékká alakul át, amely fény hatására vagy termikusan is visszaalakulhat,¹⁰ utóbbi azonban jellemzően nagyon lassú folyamat. Az azobenzol származékokat ezen tulajdonságuk miatt több területen alkalmazzák, így a 4,4’-dimetilazobenzolt kémiai aktinométerként használják fotonfluxus meghatározására fotokémiai kísérletek során,¹¹ de biológiai alkalmazásuk is számottevő, egy 2012-es cikkben például L. Yue és munkatársai egy azobenzol részletet tartalmazó propofol (2,6-diizopropilfenol) származék segítségével megvalósították a γ -aminovajsav poszt-szinaptikus receptoraként működő GABA-A receptor szabályozását.¹² Míg a szintetizált vegyület transz formája az általános anesztetikum propofolhoz hasonlóan aktiválta a receptort, az ebből UV fény segítségével képzett cisz forma nem váltott ki hasonló hatást.



2. ábra: Példa fotokapcsoló vegyület alkalmazására: Az azobenzol szerkezeti résszel rendelkező propofol származék fény hatására történő izomerizációs folyamatai, kékkel a propofol vázát, pirossal az azobenzol részletet jelölve.¹²

Az ilyen fotokapcsoló vegyületek alkalmazása több előnnyel jár, hiszen használatuk során nem keletkezik melléktermék, valamint egy-egy folyamatot teljesen kontrollálni tudunk a be- és kikapcsolásuk révén. Használatuk azonban sok akadályba ütközhet, a fent említett kritériumoknak való megfelelés miatt nagyon nehéz az ilyen molekulák tervezése, a fotorezponzív csoport beépítése a biológiai aktivitás megtartása mellett. Sok vegyület esetén legalább az egyik irányba történő izomerizáció a 300 nm-nél alacsonyabb hullámhossztartományba eső ultraibolya fény hatására megy végbe, amely káros az élő sejtek számára.¹³ Emellett, ha nem elég nagy az energiagát a két forma között, a spontán átalakulás miatt nem lehet precízen kontrollálni egy-egy biológiai folyamat ki- és bekapcsolását.

1.1.4. Fotolabilis védőcsoportok

A fotorezponzív anyagok harmadik csoportjába a fotolabilis védőcsoportok (angolul photolabile protecting groups (PPGs), photoremovable protecting groups, „photocages” vagy „phototriggers”) tartoznak. Ezek a védőcsoportok egy másik molekula valamely funkciós csoportjához kovalens kötéssel kapcsolhatóak, így elfedve annak kémiai vagy biológiai aktivitását. Az így kapott molekulát nevezzük „cagelt” vegyületnek. Ezt követően, megfelelő hullámhosszúságú fény hatására kötésfelhasadás történik, a védőcsoport távozása mellett újra felszabadul az aktív vegyület. Ezt a folyamatot nevezzük „uncaging”-nek. Mivel a folyamat irreverzibilis, a fotolabilis védőcsoportokra épülő stratégiák esetén a fotolízis során mindig keletkezik a védőcsoporttal sztöchiometrikus mennyiségű melléktermék. Ez több szempontból is fontos lehet, ugyanis a melléktermék keletkezésének monitorálása lehetőséget nyújt a reakciók követésére, azonban rosszul megválasztott védőcsoportok esetén ezek toxikusak lehetnek, további mellékreakciókban vehetnek részt, befolyásolhatják a biológiai folyamatot.

A „photocage” molekulákat eredetileg szerves kémiai szintézisekben felhasználható védőcsoportoknak fejlesztették, azonban hamar rájöttek azok alternatív alkalmazási lehetőségeire.³ H. Kaplan és munkatársai 1978-ban publikált cikkében sikeresen kötöttek fotolabilis védőcsoportot ATP-hez és megfigyelték, hogy a „cagelt” vegyület elvesztette biológiai hatását.¹⁴ Ez volt az első kutatás, mely megmutatta, hogy ezen védőcsoportok segítségével inaktiválni lehet egy biológiai aktivitással rendelkező vegyületet. Később számos biomolekulára alkalmazták ezt a stratégiát, így például neurotranszmitterek, nukleotidok, peptidok, enzimek fotolabilis védőcsoportokkal való védését is megvalósították.¹⁵ A technika alapja, hogy a különböző biomolekulák receptorokhoz kötődve fejtik ki hatásukat a sejtekben. A receptorkötődésnek egyrészt formai, méretbeli kritériumai vannak, hiszen a molekulának

illeszkednie kell az adott receptor kötőzsebébe, másrészt a vegyületnek rendelkeznie kell a nagy affinitású kötődéshez szükséges egy vagy több funkciós csoporttal. Ha ezeket a funkciós csoportokat „maszkírozzuk” vagy egy másikhoz úgy kötünk védőcsoportot, hogy az jelentősen megváltoztatja a molekula szerkezetét vagy méretét, akkor a vegyület nem tud a receptorához kapcsolódni, a biológiai hatás elmarad. Fény hatására azonban a védőcsoport lehasad, a biológiailag aktív anyag koncentrációja ugrásszerűen megnő, így kifejtheti biológiai hatását. A stratégia nagy előnye, hogy mivel a besugárzott fény időben és térben jól szabályozható, így megvalósítható különböző anyagok lokális felszabadítása, valamint a besugárzási idő segítségével a felszabaduló mennyiség is kontrollálható.³

Az említett tulajdonságaik miatt a fotofarmakológia fontos eszközévé váltak a PPG-k, számos kísérletben valósítják meg velük a célzott hatóanyagleadást. A közelmúltban például ezzel a technikával kezelték emberi sejteken a húgyhólyagrákot *in vitro* kísérletben,¹⁶ de egerek agyában *in vivo* is sikerült opioidokat felszabadítani azok „cagelt” formában történő bejuttatását követően.¹⁷ Az *in vivo* kísérletek megvalósítása a fény szövetekbe mélyebben történő bejuttatását követeli meg, mely sok esetben nehezen kivitelezhető. Ezen problémára az egyik megoldást az optikai szálak implantátumok jelentik, melyek megfelelő helyre történő beültetése révén lehetőség adódik ezen stratégiák élő szervezetekben történő megvalósítására.^{17,18} A másik gyakran alkalmazott módszer a kétfoton mikroszkópia (1.3. fejezet), mellyel a legtöbb esetben nagyobb precizitás érhető el, valamint a mérések során változtatható a fókuszpont.

Ahhoz, hogy a fotolabilis védőcsoportokat tartalmazó vegyületeket biológiai célokra használhassuk, sok feltételnek kell megfelelniük. Bár a konkrét kritériumok mindig az adott felhasználástól függenek, egy jó védőcsoportnak meg kell felelnie néhány általános szabálynak.^{3,15,19,20,21}

- A „cagelt” vegyületnek biológiailag teljesen inertnek, emellett tisztának, valamint termikusan és kémiaiilag (például ne történjen spontán hidrolízis) is stabilnak kell lennie a vizsgált környezetben a fotolízis előtt és közben is.
- A PPG-nek 300 nm-nél nagyobb hullámhosszon kell nagy abszorbanciával rendelkeznie, amely a sejtek számára már nem kevésbé káros, így azok a fotolízis során nem sérülnek. A fotoreakciónak továbbá minél nagyobb kvantumhatásfokkal és tisztasággal kell végbemennie.
- Sem a „cagelt” vegyület, sem a fotolízis során a PPG-ből keletkező melléktermék nem lehet toxikus, reaktív.

- A fotolízis során képződött termékek lehetőleg kis abszorbanciával rendelkezzenek a gerjesztés hullámhosszán, a kompetitív abszorpció elkerülése érdekében.
- Mind a fotolabilis védőcsoporttal rendelkező prekursor, mind az „uncaging” folyamat termékei megfelelő oldhatósággal kell, hogy rendelkezzenek a vizsgált közegben.
- A bioaktív anyag felszabadulásának gyorsabbnak kell lennie, mint az általa kiváltott biológiai reakciónak, annak érdekében, hogy az utóbbit megfelelően lehessen tanulmányozni.
- A „cagelt” vegyületeknek sötétben - vagy pontosabban a fotolízishez szükséges hullámhosszúságú fény hiányában - stabilnak kell lenniük.

A fotolabilis védőcsoportok megválasztásánál tehát számos szempontot kell figyelembe vennünk, melyek közül több is a „cagelt” vegyületek fotolízisére vonatkozik. A PPG-k megválasztásánál nagyon fontosak azok fotokémiai sajátosságai, melyek jellemzésére leggyakrabban az alábbi három tulajdonságot használják:^{21,22}

- $\lambda_{\max}$: A fotolízishez felhasznált, a legkisebb energiával gerjeszthető átmenethez tartozó azon hullámhossz, amelyen a molekula a legnagyobb abszorbanciával rendelkezik, így az „uncaging” folyamat is itt a leghatékonyabb, mértékegysége nm.
- ε_{λ_i} : Moláris abszorpciós koefficiens, melynek értéke hullámhosszfüggő, az „uncaging” folyamatnál $\lambda_{\max}$ hullámhosszon a legnagyobb az értéke. Meghatározása a Lambert–Beer-törvény alapján történik ismert koncentrációjú oldat (c , [mol dm⁻³]) abszorbanciájának mérésével (A , [-]) ismert optikai úthossz mellett (l , [cm])

$$A = \varepsilon_{\lambda_i} \cdot c \cdot l \quad (1)$$

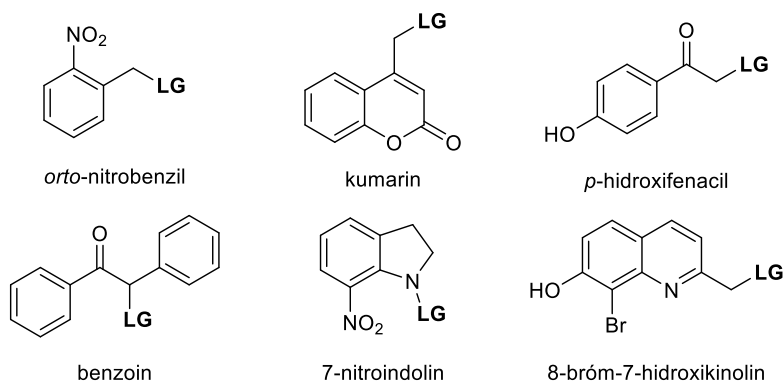
Mértékegysége az egyenletnek megfelelően M⁻¹cm⁻¹.

- Φ_u : A fotolízis kvantumhatékonysága, mely egy 0 és 1 közötti szám, megadja, hogy az elnyelt fotonok hányad része eredményez „uncaging”-et. Mértékegység nélküli mennyiség.

Az 1960-as évektől kezdődően számos olyan alapvázatot azonosítottak, melyek alkalmasak fotolabilis védőcsoportok kialakítására. A különböző alapvázatok módosításával később képesek voltak egyre jobb tulajdonságokkal rendelkező „photocage” vegyületek előállítására, mely a vegyületcsalád széles körű használatához vezetett. Napjainkra rengeteg különböző tulajdonsággal rendelkező fotolabilis védőcsoport kapható a kereskedelemben, vagy könnyen

szintetizálható az ott beszerezhető anyagokból. Ez lehetővé teszi ezen vegyületek, valamint ezek révén az „uncaging” stratégia alkalmazását számos területen.

A „photocage” molekulák leggyakoribb alapvázai közül néhányat a **3. ábra** mutat. Az ábrán LG (az angol leaving group kifejezésből) a távozócsoportot, vagyis a fotolízis során felszabaduló, biológiai aktivitással rendelkező vegyületet jelöli. Egyes esetekben ez a csoport egy karbonát vagy karbamát csoporton keresztül kapcsolódik a PPG-hez.³



3. ábra: A fotolabilis védőcsoportok gyakran alkalmazott alapvázai; LG a védett vegyületet jelöli, mely a fotolízis során felszabadul.

Mivel a dolgozatomban bemutatott új vegyületekben a fenti alapvázak közül kétfélét alkalmaztam, ezeket az alábbiakban részletesebben is bemutatom.

1.1.5. Orto-nitrobenzil vázas photocagek

Az *ortho*-nitrobenzil vázzal rendelkező fotolabilis védőcsoportok voltak az elsőként felfedezett photocagek. Eleinte szintézisek során használták őket védőcsoportként, a legkorábbi említés a használatukra Barltrop és munkatársai 1966-os cikke, melyben karbonsavak karboxilcsoportjának védelmére alkalmazták őket.²³ Bő egy évtizeddel később, 1978-ban a korábban már említett, Kaplan és munkatársai által publikált cikkben *ortho*-nitrobenzil (*o*-NB) védőcsoportot kötöttek ATP-hez, mely az első biológiai jelentőséggel bíró felhasználása volt ezen vegyületeknek.¹⁴ Az *ortho*-nitrobenzil származékok mára a leggyakrabban használt és legtöbbet vizsgált fotolabilis védőcsoportokká váltak. Segítségükkel karbonsavak, tiolok, alkoholok, aminok, és foszfátok védelmét és szabályozott felszabadítását is megvalósították, valamint leírták ezen fotolízis folyamatok mechanizmusát is.

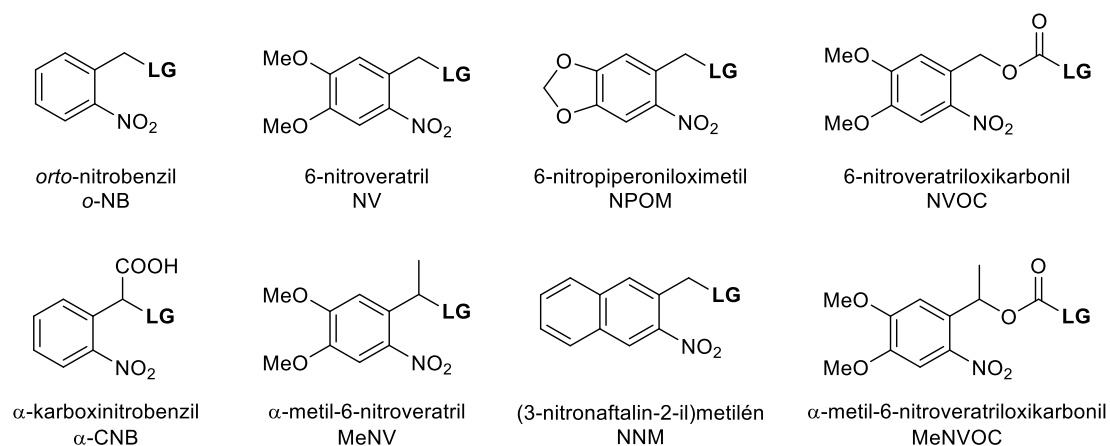
Az eredetileg használt *o*-nitrobenzil védőcsoport több kedvezőtlen tulajdonsággal rendelkezik: elnyelési maximuma 300 nm alatt van, mely káros a sejtek számára; a fotolízise

lassú, kis kvantumhatékonysággal megy végbe. Ezen tulajdonságok javítása érdekében számos szerkezeti változtatást hajtották végre ezeken a vegyületeken, így napjainkra több tucat o-nitrobenzil származékot ismerünk. Míg az aromás gyűrűn történő változtatások elsősorban a molekula abszorpciós tulajdonságait befolyásolják, a benzil helyzetű szénatomon végzett módosítások a fotolízis kvantumhatékonyságára vannak hatással.²⁰

Annak érdekében, hogy növeljék a vegyületek magasabb hullámhosszakon való elnyelését, először az aromás gyűrűt a nitro csoporthoz képest meta és para helyzetben, a benzolgyűrű 3,4 pozícióiban metoxi csoportokkal szubsztituálták, így létrehozták a 6-nitroveratril (NV) védőcsoportokat, melyek $\lambda_{\max}$ értéke már 350 nm körül van. Később, a két metoxicsoporthoz alkalmazása helyett előállítottak merevebb szerkezettel rendelkező metiléndioxi-nitrobenzil (NPOM) származékokat is,²⁴ valamint Singh és Khade az aromás gyűrűt kiterjesztve naftalinszármazékokat (NNM) is leírt.²⁵ A benzil helyzetben is több módosítást végeztek, például egy hidrogént karboxilcsoportra cserélve jobb vízzoldhatósággal rendelkező α -karboxinitrobenzil (α -CNB) csoportokat is létrehoztak.²⁶ A molekulák benzil helyzetben történő módosítása – például egy metilcsoport bevitele – stabilizálhatja a fotolízis során a köztermékeket, valamint megakadályozhatja a folyamat során képződő gyűrűs benzizoxazol származékból vízkilépéssel keletkező melléktermékek képződését, így elősegítve az „uncaging” folyamat lejátszódását.

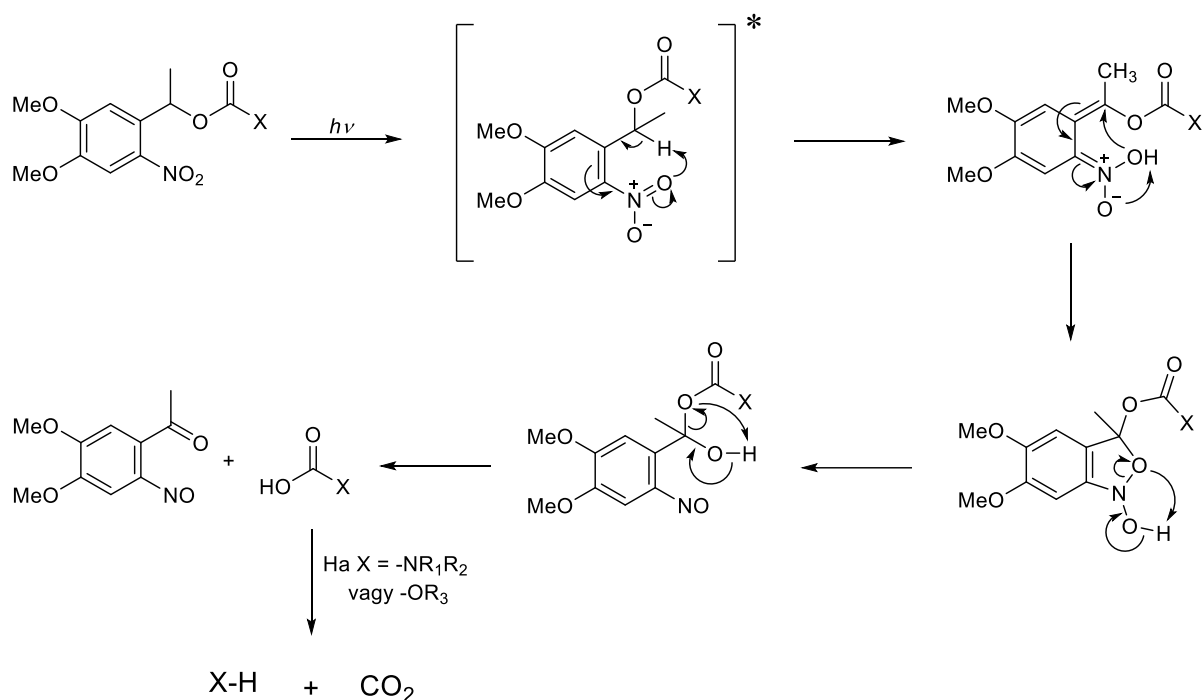
A „cagelni” kívánt vegyületek megfelelő funkciós csoportját közvetlenül kapcsolhatjuk a védőcsoport benzil helyzetű szénatomjához. Míg karbonsavak, tiolok és foszfátok esetén ez a tipikus eljárás, addig alkoholok és aminok esetében – bár szintén lehetséges lenne – nem ez az elterjedt. Ezeket a vegyületeket jellemzően karbamidsav- vagy szénsavszármazékokként kapcsolják, melyek így jobb távozócsoportok lesznek a fotolízis során, valamint sok esetben a szintézis is könnyebben megvalósítható.²⁰

A leggyakrabban alkalmazott o-nitrobenzil származékokat a **4. ábra** mutatja. Ezek közül is kiemelkedő gyakorisággal alkalmazzák a 6-nitroveratril (NV) és 6-nitroveratriloxikarbonilt (NVOC), valamint ezek származékait.



4. ábra: Gyakran alkalmazott *o*-nitrobenzil vázas fotolabilis védőcsoportok,^{20,25} LG a védett vegyület jelöli, mely a fotolízis során felszabadul.

Ezen védőcsoportok fotolízisének mechanizmusát részletesen vizsgálták, az alábbiakban az *o*-nitrobenzil észterek „uncaging” folyamatának lépéseit az NVOC védőcsoporton mutatom be (5. ábra). Ha az alapállapotú vegyület megfelelő hullámhosszúságú fényt nyel el, a fotolabilis védőcsoport gerjesztett állapotba kerül. Ezután, a nitrocsoport egyik oxigénatomja elvon egy protont a benzil helyzetű metilén vagy metin csoporttól, mely aci-nitro tautomerek keletkezésével jár. Ezt egy ciklizáció követi, mely során egy benzizoxazol származék keletkezik. A gyűrű felnyílásával a karbamát, karbonát vagy észter egy acetál származékká alakul, melyből egy *o*-nitrozobenzaldehid származék kilépése mellett a védett csoporttól függően szénsavszármazék vagy karbonsav keletkezik. A keletkező szénsavszármazék instabil, így ezek esetében spontán dekarboxiláció történik, így kapjuk meg a szabad alkoholt vagy ament, valamint melléktermékként szén-dioxid képződik.^{27,28}



5. ábra: Az MeNVOC védőcsoport fotolízisének mechanizmusa.

1.1.6. Kumarin vázas photocagek

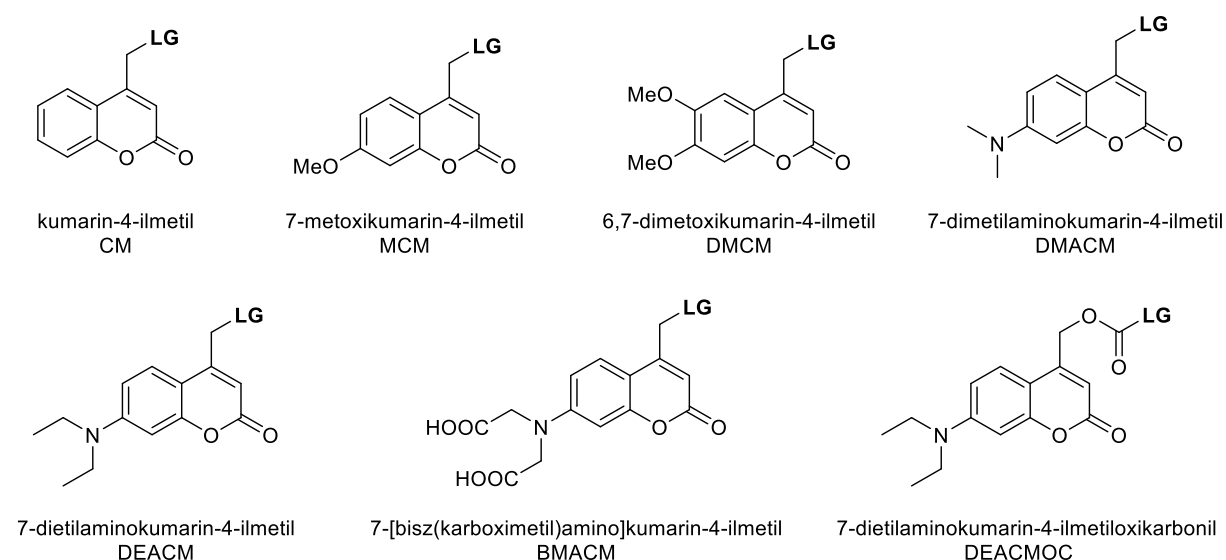
A kumarin, IUPAC nevén 2H-kromén-2-on egy természetes, különböző növények metabolizmusa során keletkező anyag, melyet először tonkababból izoláltak 1820-ban.²⁹ A kumarinok fotoaktivitását 1984-ben Givens és munkatársai figyelték meg elsőként, ekkor sikeresen alkalmazták a 7-metoxikumarin-4-ilmetil (MCM) csoportot foszfátok védésére és az ezt követő felszabadítására.³⁰ A felfedezés megnyitotta az utat a fotolabilis védőcsoportok egy új osztályának fejlesztésére, melyek kedvező tulajdonságaiknak köszönhetően hamar nagy figyelem tárgyává váltak.

A kumarinszármazékok esetében is sokféle változtatást hajtottak végre az alapvázon annak érdekében, hogy javítsák annak tulajdonságait. Elsősorban itt is a λ_{max} értékek növelésére törekedtek, ugyanis az alapcsoport, a kumarin-4-ilmetil (CM) viszonylag alacsony, 310 nm-es maximális elnyelési hullámhosszal rendelkezik, mely még káros lehet a sejtek számára. A váz 6-os és 7-es pozíciójában történt szubsztitúciók erre pozitív hatással voltak, a 7-metoxikumarin-4-ilmetil (MCM) csoportnak 320 nm-nél, míg a 6,7-dimetoxi- (DMCM) származéknak 350 nm-nél volt legnagyobb az elnyelése.³³¹ A 7-es pozícióban dialkilamino- szubsztituenseket alkalmazva jelentős javulást értek el a fotolízis kvantumhatékonyságának szempontjából, valamint ezen csoportok λ_{max} értékei még nagyobb hullámhosszakon, 350-400 nm között találhatók. Ilyen csoportok a 7-dimetilaminokumarin-4-ilmetil (DMACM), a poláris csoportjai

révén jó vízdoldhatósággal rendelkező 7-[bisz(karboximetil)amino]kumarin-4-ilmetil (BMACM),³² illetve a 7-dietilaminokumarin-4-ilmetil (DEACM) is.³

A kumarin vázas photocageket számos különböző funkciós csoport védésére lehet használni, így például foszfátok, szulfonátok, karbonsavak védésére hatékonyan alkalmazzák őket. A rosszabb távozócsoportok, így az alkoholok, tiolok, fenolok, aminok védeése esetében a cagelt vegyületek ellenállóbbak a heterolízissel szemben. Az ilyen csoportokat – hasonlóan az *o*-nitrobenzil származékokhoz – jellemzően karbonát vagy karbamát kötésen keresztül kapcsolják a kumarinszármazékokhoz. Ilyenkor a felszabaduló karbonát vagy karbamát dekarboxileződését követően kapjuk meg a szabad alkoholt, tiolt vagy ament.²⁰ Ilyen védőcsoport a 7-dietilaminokumarin-4-ilmetiloxikarbonil (DEACMOC).

Az évek során rengeteg különböző szubsztituenssel rendelkező, eltérő tulajdonságokkal bíró - például a látható fény hullámhossztartományába eső abszorpciós maximumú - kumarinszármazékot leírtak már,³³ az ebbe a csoportba tartozó leggyakrabban alkalmazott fotolabilis védőcsoportok szerkezetét a **6. ábra** szemlélteti. Ezek közül is a legnagyobb jelentőséggel a DEACM csoport rendelkezik.

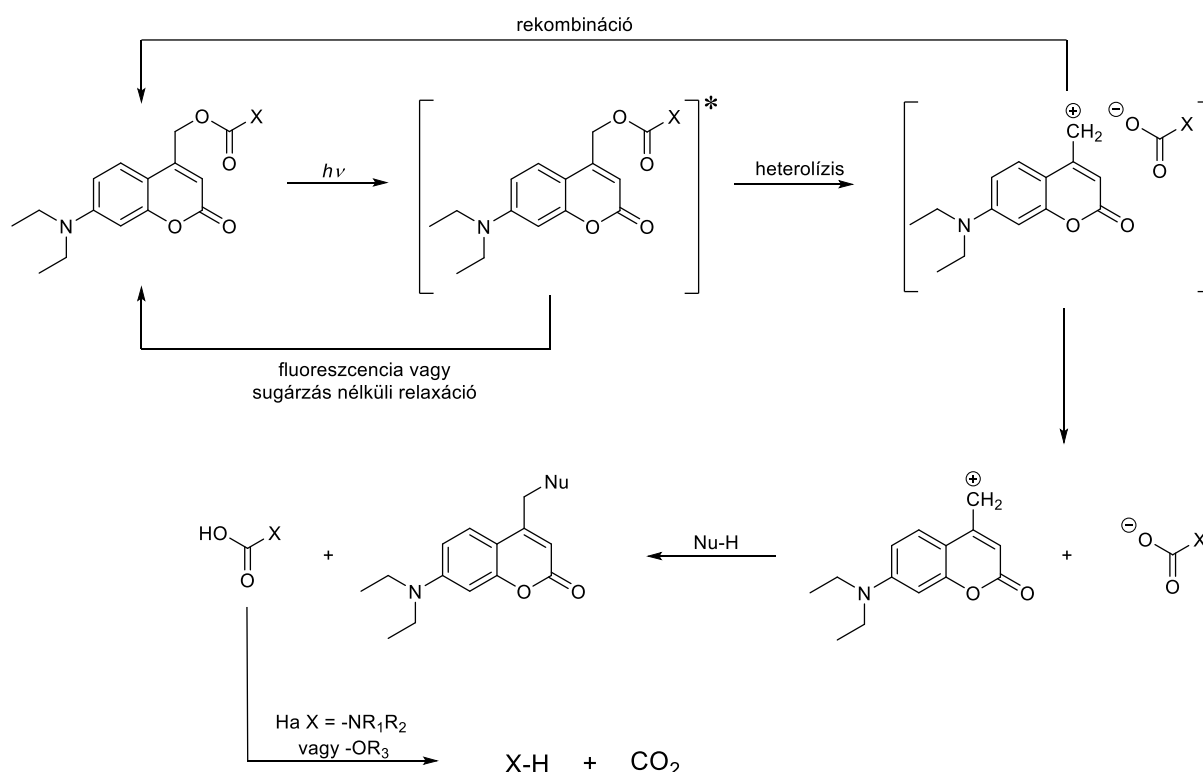


6. ábra: Gyakran alkalmazott kumarin alapváz fotolabilis védőcsoportok,^{3,32} LG a védett vegyület jelöli, mely a fotolízis során felszabadul.

Az ezekre a csoportokra jellemző biológiai szempontból ártalmatlan, magas hullámhosszúságú elnyelési maximumok, a gyorsabb „uncaging” folyamat, a nagyfokú

stabilitás miatt ezek a photocagek a hagyományos *o*-nitrobenzilek jó alternatívájává váltak,²⁰ mára egyértelműen az egyik legfontosabb védőcsoport családnak számítanak.

Ezen védőcsoportok esetén is részletesen vizsgálták az uncaging folyamat mechanizmusát, melyet a DEACMOC csoporton mutatok be (7. ábra). Az alapállapotú molekula az elnyelt fény hatására szingulett gerjesztett állapotba kerül. Innen az alapállapotba történő relaxáció végbemehet sugárzás nélküli folyamatok és fluoreszcencia vagy heterolitikus kötéshasadás révén. Utóbbi esetben a kialakuló kumarinilmetil kation és a távozó csoport anionja szoros ionpárt képez, mely a fotolízis folyamatának kulcs intermediere. Ezt követően a kumarinilmetil kation vagy magával az oldószerrel vagy az oldószer kalitkából kiszabadulva a jelenlévő nukleofilokkal reagálva egy új, stabil vegyületet alkot. Vizes közegben ez kumarin-4-ilmetil alkohol képződését eredményezi, míg az anion protont vesz fel. Ez DEACMOC csoporttal védett alkoholok vagy aminok esetén egy instabil karbonát vagy karbamát képződését jelenti, mely ezt követően spontán dekarboxileződik, így felszabadul az aktív vegyület.^{20,34,35}



7. ábra: A DEACMOC védőcsoport fotolízisének mechanizmusa.

1.1.7. Fotoreszponzív proteinek

Az eddig leírt fényalapú stratégiák azonban nem kizárólag kismolekulás vegyületekkel valósíthatók meg. Bár a természetes fehérjék közül csak néhány speciális protein, például az

állatok látásához szükséges opszinok,³⁶ vagy a növényekben megtalálható fitokrómok³⁷ reagálnak fényre, ezek mintájára mára számos mesterséges fotorezponzív proteint fejlesztettek. Ezen molekulák biológiai célokra történő felhasználása rendkívül sokszínű, melyek közül néhányat mutatok be az alábbiakban.

A lúdfű egyik fényreceptorából kifejlesztett miniSOG (mini Singlet Oxygen Generator) névre hallgató protein például a fényérzékenyítő anyagok csoportjába sorolható. A vegyület fénnel történő gerjesztése szingulett oxigén ($^1\text{O}_2$) és ROS vegyületek keletkezéséhez vezet az 1.1.2. fejezetben bemutatott módon.³⁸ A vegyület segítségével *in vitro* kísérletben sikeresen pusztítottak el tumorsejteket, így az alkalmas lehet a fotodinámiás rákkezelésben történő felhasználásra.³⁹

Azon fehérjéket, melyek képesek adott hullámhosszúságú fényt elnyelését követően fotonokat emittálni, fluoreszcens proteineknek nevezzük. Az ilyen molekulákat széles körben alkalmazzák élő szervezetekben történő mikroszkópiás képalkotáshoz. A fotokapcsoló fluoreszcens proteinek közé tartoznak például a korallokból kinyert Dronpa-ból fejlesztett molekulák. Ezen vegyületek esetén is egy fény hatására végbemenő reverzibilis *cis-transz* izomerizáció jelenti a szerkezeti változást. Míg az egyik forma fluoreszcens egy adott hullámhosszon, a másik nem az. Több, különböző hullámhosszúságú fényt elnyelő és emittáló ilyen vegyület (például bsDronpa és Padron) párhuzamos használata lehetővé teszi több folyamat egyszerre történő vizsgálatát.⁴⁰ A fluoreszcens fehérjék másik csoportjába, a fény hatására irreverzibilis változást szenvedő fotokonverziós (fotoconversion) proteinek közé tartozik a CaMPARI. A vegyület fluoreszcenciája 405 nm-es fény és magas kalciumion koncentráció együttes jelenlétében megváltozik, az eredetileg emittált zöld helyett vörös fényt bocsát ki. Ezt a tulajdonságát kihasználva a vegyületet sikeresen alkalmazták aktív neuronok jelölésére élő szervezetekben.⁴¹

A fényre érzékeny fehérjéket azonban nem csak a sejtek megfigyelésére, de egyes biológiai folyamatok kiváltására is alkalmazhatjuk. Ezt a technikát optogenetikának nevezzük, melyet elsősorban az idegrendszeri kutatásokban alkalmaznak. Az ilyen kutatások kapcsán megemlítendő vegyület a BiPOLES, melynek segítségével megvalósították a neuronaktivitás kétirányú kontrollját. A vegyületet két, különböző ioncsatornák szabályozására képes fényérzékeny anyag összekapcsolásával hozták létre. Ennek következményeként az egyik részlet gerjesztéséhez szükséges hullámhosszúságú fény hatására aktiválódnak az idegsejtek, míg a másikat gerjesztve csillapítható azok aktivitása.⁴² Szintén fontos a PhoCl névre hallgató

protein és ennek származékai, melyek megfelelő hullámhosszúságú fény hatására két fragmensre bomlanak a fő láncon történő kötés hasadás révén. Ezen tulajdonságuk miatt ezek a molekulák a kismolekulás fotolabilis védőcsoportokhoz hasonlóan használhatóak más fehérjék védelmére, majd azok megfelelő helyen történő felszabadítására.⁴³

Bár ezek a fehérjealapú technikák napjainkban egyre nagyobb figyelmet kapnak, használatuk során több nehézség is adódik. Ilyen például, hogy az exogén proteinek kifejeztetése megzavarhatja a sejtek normál működését, így nem tudjuk azok natív viselkedését vizsgálni. További probléma, hogy kismolekulás anyagok „uncaging”-hez hasonló felszabadítása genetikai eszközökkel ma még nem megvalósított, valamint, hogy a géntechnológián alapuló terápiás eljárások engedélyeztetése általában jóval bonyolultabb, mint a kismolekulás gyógyszereké. Ezen szempontok miatt – bár a fehérjékre épülő technikák ígéretesek – a kismolekulákra épülő, korábban már bemutatott stratégiák egyelőre nem veszítettek relevanciájukból.

1.2. Az idegnövekedési faktor és mimetikumai

1.2.1. Az idegrendszer felépítése, betegségei

Az idegrendszer működésének megismerésével a neurobiológia tudományága foglalkozik. Ez a specializálódott sejtekből álló hálózat szabályozza testünk különböző külső és belső ingerekre adott válaszát, teszi lehetővé az agy, a gerincvelő és az egyes szervek közötti kommunikációt, segítségével valósul meg a mozgás, az érzékelés, a gondolkodás, illetve a reflexek is. Két részre lehet osztani, a központi és perifériás idegrendszerre. A központi idegrendszer az agyat és a gerincvelőt foglalja magába, míg a perifériás az ezen két szerven kívüli minden más idegszövetet jelenti.

Az idegrendszer szerkezeti és funkcionális egységei a neuronok (idegsejtek). Ezek olyan speciális sejtek, melyek képesek impulzusokat továbbítani az idegrendszer különböző régiói, valamint az idegrendszer és a test más részei között. Bár méretük és alakjuk a szervezet különböző részein változó, minden neuron rendelkezik egy szómával (sejttest), axonnal, valamint dendritekkel.⁴⁴ Az axonokat és dendriteket egybefoglaló gyűjtőnév a neurit, ezen képződmények az idegsejtek nyúlványai. Míg a dendritek a kapott impulzust a szóma felé továbbítják,⁴⁴ az axonok elvezetik azokat onnan a következő, szomszédos idegsejt felé.

Az idegrendszer működéséhez, a jelek továbbviteléhez elengedhetetlen a neuronok kapcsolódása egymáshoz. Ez a kapcsolat az úgynevezett szinapszisok révén valósul meg, melyek olyan speciális régiók, ahol egy neuron axonja a vele szomszédos sejt egyik dendritjével kerül funkcionális kapcsolatba. A két struktúra között neurotranszmitterek (ingerületátvivő anyagok) segítségével történik meg az impulzus átvitele.⁴⁵ Amennyiben a test bármely részén ezen szinapszisok nem alakulnak ki vagy a már meglévők sérülnek, megszűnnek, az különböző funkciók elvesztésével, az idegrendszer nem megfelelő működésével jár. Ez egyrészt történhet fizikai sérülés útján, de emellett számos, a központi idegrendszert érintő betegség köthető össze a neuritok hibás növekedésével, a neuronok túlzott mértékű elhalálózásával. Ilyen betegségek például a Parkinson-kór,⁴⁶ a Huntington- és Alzheimer-kór, de a skizofrénia is.⁴⁷

Ahhoz, hogy az emberi agy működését, valamint a központi idegrendszert érintő betegségeket, az azokat kiváltó okokat jobban megismerjük és hatékony kezeléseket dolgozhassunk ki rájuk a jövőben, sejtszintű vizsgálatokra van szükség. Az agy esetében azonban ez *in vivo* legtöbbször nehezen kivitelezhető, annak sűrű szerkezete és a rendelkezésre

álló eszközök korlátozott felbontása miatt. Ennek megkerülésére egy ígéretes alternatíva a neuronok egyszerűbb *in vitro* hálózatainak létrehozása, amelyek segíthetnek az összetettebb rendszerek megértésében.⁴⁸ Mind az ilyen hálózatok létrehozásában, mind a sérült idegsejtek helyreállításában elengedhetetlen a neuritok irányított növekedésének megvalósítása.

Ennek megfelelően az elmúlt néhány évtizedben rengeteg kutatás irányult az idegsejtek fejlődésének, a nyúlványok növekedési mechanizmusának, valamint az azt befolyásoló tényezőknek a megismerésére annak reményében, hogy ezek ismeretében lehetőség nyílik a fent említett sérülések, betegségek kezelésére, gyógyítására.

1.2.2. Az idegnövekedési faktor fehérje

Az idegrendszer kifejlődése során fontos lépés az axon specifikáció. Ekkor a kezdetben gömb alakú idegsejteken megjelenő néhány nyúlvány közül kiválasztódik egy, mely a sejt axonja lesz, a többi pedig dendritté alakul.⁴⁹ Az axon ezután intenzív növekedésbe kezd, melyet a nyúlvány végén található növekedési kúp vezérel. Ahhoz, hogy az axon a megfelelő irányban fejlődjön, a növekedési kúp a környezetében lévő bizonyos molekulákat érzékeli, az azokkal való kölcsönhatás határozza meg a növekedés irányát.⁵⁰ Mára számos olyan vegyületcsaládot azonosítottak, melyek szerepet játszanak az úgynevezett kemotaxisban, így taszító vagy vonzó hatásuk révén befolyásolják az axon növekedését az idegrendszer fejlődése során.⁵¹ Ezek a molekulák elsősorban fehérjék, ilyen vegyületek például a szemaforinok, neurotrofinok, netrinek, efrinek.⁵²

A neurotrofinok családjába tartozó fehérjék elsősorban a neuronok fejlődéséhez, túléléséhez szükséges folyamatokban vesznek részt. A növekedési faktorok közé soroljuk őket, mivel képesek egyes sejtek növekedését, differenciálódását befolyásolni. Legismertebb képviselőjük az NGF (nerve growth factor, magyarul idegnövekedési faktor), melyet először Rita Montalcini és Stanley Cohen fedezett fel és izolált 1954-ben.⁵³ A két tudós később, 1986-ban megosztva megkapta a fiziológiai és orvostudományi Nobel-díjat a növekedési faktorok felfedezéséért (az NGF-et követően az EGF-et, vagyis az epidermális növekedési faktort is közösen fedezték fel). Ezzel Montalcini vált a történelem negyedik Nobel-díjas nőjévé.

Az idegnövekedési faktor egy nagyon sokat vizsgált, az idegrendszer szempontjából rendkívül fontos anyag. Biológiai funkciója nagyon sokrétű, neuroprotektív hatású,⁵⁴ de részt vesz a programozott sejthalálban, az idegsejtek differenciálódásában, érésében is.⁵⁵ Ezen kívül egyes krónikus légúti betegségek esetén a gyulladás kémiai mediátora,⁵⁶ valamint patkányoknál

megfigyelték, hogy stressz esetén is megemelkedik a szintje a szervezetben.⁵⁷ Nagy szerepet játszik az axonok növekedésében, jelenléte alapvetően serkenti a megnyúlás mértékét, de emellett annak irányát is jól tudja szabályozni. Már a '70-es évek végén is megfigyelték *in vitro* kísérletek segítségével, hogy az axonok az NGF koncentrációgradiensének megfelelő irányba fordulva növekednek.^{58,59}

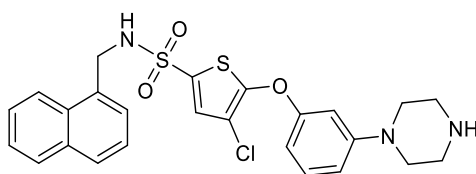
Hasonló eredményeket értek el más, az idegrendszer fejlődése szempontjából fontos fehérjéket tanulmányozva is. Így például a netrin-1 fehérjéről is megmutatták, hogy koncentrációgradiense képes befolyásolni az axonok növekedésének irányát.⁶⁰ Kézenfekvő lenne tehát, hogy ezen fehérjéket felhasználva oldjuk meg az axonok irányított növekedését, mely a már korábban említett sérülések kezelését tenné lehetővé az újonnan kialakított vagy helyreállított szinapszisok révén.

Ezen fehérjék közvetlen használata azonban sok szempontból korlátozott. Először is, izolálásuk, szintézisük költséges, valamint idő- és energiaigényes. Emellett, nehéz kontrollálni térbeli és időbeli eloszlásukat, illetve a kívánt biológiai folyamat mellett másokat is elindíthatnak.⁶¹ A neurotrofinokat neuroprotektív hatásuk miatt többször próbálták az idegrendszert érintő betegségek kezelésében felhasználni. Mivel ezek makromolekulák, így nem tudnak átmenni a vér-agy gáton. Ennek megkerülésére lehetséges az izolált, tiszta fehérjék bejuttatása közvetlenül az agyba, azonban ennek a módszernek a vizsgálata során számos súlyos mellékhatást figyeltek meg. Az NGF esetén ilyen tünetek például a neuropátiás fájdalom, a hipofágia (étvágytalanság), az agyi erek túlzott beidegződése.⁶²

Az említett szempontok miatt szükségessé vált olyan kismolekulás anyagok fejlesztése, melyek a megfelelő fehérje receptoraihoz kötődve hasonló biológiai hatást tudnak kifejteni.⁶² Ezen molekulák lehetőséget nyújthatnak a neuronok *in vitro* hálózatainak létrehozására az axonok irányítása révén, valamint potenciálisan felhasználhatóak idegrendszeri betegségek terápiás kezelésében is a fehérjék helyett. Az elmúlt évtizedekben az idegnövekedési faktor több kismolekulás mimetikumát azonosították, melyek között szerepelnek peptidek és nempeptidek is.^{63,64} Az előbbieknél hátránya, hogy a nagyobb fehérjékhez hasonlóan a vér-agy gáton nem, vagy csak kis mértékben jutnak át. Az utóbbi, nempeptid, NGF-hez hasonló biológiai hatással rendelkező vegyületek közül kettő, ezen dolgozat szempontjából fontos molekulát mutatok be részletesebben az alábbiakban.

1.2.3. B-355252

Az első molekula az irodalomban B-355252 vagy BRITE-355252 néven említett, a IUPAC szabályok szerinti nevén 4-klór-*N*-(naftalin-1-ilmetil)-5-(3-(piperazin-1-yl)fenoxi)tiofén-2-szulfonamid, melynek szerkezetét a **8. ábra** mutatja. A molekula szintézisét először A. Williams és munkatársai írták le 2010-ben,⁶⁵ a fantázianévben szereplő „B” betű vagy „BRITE” mozaikszó az Észak-Karolinai Központi Egyetemen található kutatóintézetre utal (Biomufacturing Research Institute and Technology Enterprise).



8. ábra: Az NGF mimetikum B-355252 szerkezete.

A vegyület előállításához használt szintézissor kémiai szempontból is nagy jelentőséggel bír, elsősorban a molekula heteroaril-éter váza miatt. Számos biológiai aktivitással rendelkező vegyület, gyógyszerhatóanyag rendelkezik ezen strukturális elemmel, szintézise mégis nehézségekbe ütközik.⁶⁶ Az említett cikkben ezen molekularészt mikrohullámú reaktorban, gyorsan és kiváló termeléssel sikerült előállítani S_NAr reakcióban,⁶⁵ mely megmutatta ezen módszer hatékonyságát.

A vegyület biológiai aktivitását több kísérlet is bizonyította az elmúlt 15 évben. Egér hippocampális primer idegsejteken (HT22 sejtvonala) megmutatták, hogy a glutamát magas koncentrációja által kiváltott excitotoxicitással szemben hatékonyan megvédi a neuronokat, valamint önmagában növeli azok életképességét is.⁶⁷

Később egy neurotoxin, a 6-hidroxidopamin segítségével, ugyanezen sejtvonala felhasználásával *in vitro* modellezték a Parkinson-kórt és megvizsgálták a B-355252 hatását ebben az esetben is. A korábbi kutatással összhangban itt is azt tapasztalták, hogy a vegyület jelenlétében a neuronok elhalálózása jelentős mértékben csökkent.⁶⁸ Hasonló kísérletben, kobalt(II)-klorid segítségével agyi hipoxiát modellezve is megfigyelték, hogy a vegyület jól védte az idegsejteket sérülés ellen.⁶⁹ Továbbá, sztrókot modellezve *in vivo* is vizsgálták a molekulát patkányokon. A B-355252-vel kezelt patkányokra kisebb hatással volt a sztrók, társaikhoz képest jobbak voltak motoros és érzékelő funkcióik.⁷⁰ A fenti vizsgálatok közül több is azt mutatta, hogy a vegyület neuroprotektív hatásának egyik fő oka, hogy csökkenti a

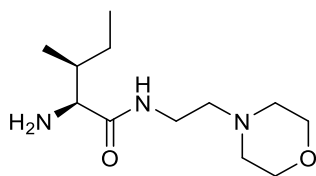
különböző betegségek során keletkező reaktív oxigén ágensek (ROS) mennyiségét. Megfigyelték továbbá azt is, hogy a kiváltott hatás nagyban függ a vegyület koncentrációjától, leginkább 10 μ M alatt érdemes azt alkalmazni, e fölött káros lehet a sejtekre.

Már 2010-ben, a molekulát elsőként szintetizáló kutatócsoport is végzett biológiai vizsgálatokat. Ezek során megállapították, hogy a B-355252 képes az NGF által kiváltott neurit növekedést serkenteni. Bár ezen jelenség hatásmechanizmusát nem vizsgálták, a B-355252 a fiziológiás NGF koncentrációnál kisebb mennyiség jelenlétében is képes volt a neuritok megnyúlásának mértékét megnövelni, önmagában azonban nem mutatott ilyen hatást.⁶⁵ Ahhoz tehát, hogy a vegyület kifejtse az idegsejt nyúlványok növekedésére gyakorolt hatását, szükség van minimális mennyiségű NGF jelenlétére. Ez *in vivo* vizsgálatok esetén adott, valamint mivel az idegrendszer számos sejtje képes NGF termelésre,⁷¹ megfelelő *in vitro* rendszerekben is elegendő annak koncentrációja ahhoz, hogy a molekula effektív legyen.

A fentiek alapján a vegyület térbeli és időbeli koncentrációjának megfelelő kontrollálásával vélhetően lehetőség adódik az axonok növekedésének mértékét és irányát befolyásolni. Ennek, és bizonyított neuroprotektív hatásának köszönhetően rendkívüli jelentőséggel bírhat az idegrendszeri sérülések, betegségek kezelésében. Továbbá, segítségével vélhetően megvalósítható az idegsejtek *in vitro* hálózatainak kialakítása.

1.2.4. LM11A-31

A második molekula melyet szeretnék bemutatni, az irodalomban LM11A-31 néven említett (2S,3S)-2-Amino-3-metil-N-[2-(4-morfolinil)etil]pentánamid, melynek szerkezetét a **9. ábra** szemlélteti. Ezt a vegyületet először S. Massa és munkatársai említik egy 2006-os cikkben, melyben számításhoz alapuló virtuális szűrés segítségével próbáltak olyan molekulákat találni, melyek a neurotrofinokhoz hasonló biológiai aktivitással rendelkezhetnek.⁷² Végül négy ilyen molekulát sikerült azonosítaniuk, melyek közül kettő felelt meg a gyógyszerhatóanyagokra vonatkozó Lipinski-szabálynak.⁷³ Ezen két vegyület közül a vér-agy gáton nagyobb mértékben átjutni képes izoleucin származékot, az LM11A-31-et vizsgálták részletesen. Megmutatták, hogy a molekula szelektíven kötődik az NGF egyik receptorához, a p75 neurotrofin receptorhoz, valamint, hogy a sejtek túlélését elősegítő folyamatokat aktiválja, továbbá neuroprotektív hatású az éretlen neurotrofinok által kiváltott apoptózissal szemben.⁷²



9. ábra: Az NGF mimetikum LM11A-31 szerkezete.

Ezt követően számos másik tanulmány igazolta a vegyület biológiai aktivitását. Egereken végzett kísérletekben megmutatták, hogy gátolja az Alzheimer-kórral járó neurodegeneratív mechanizmusokat,⁷⁴ valamint az azzal járó neuroinflammációt is.⁷⁵ A molekula emellett nem okozott mellékhatásokat sem a szervezetbe juttatva. Az említett tulajdonságai miatt az amerikai Pharmatrophix nevű vállalat egy orálisan bevehető készítményt szeretne gyártani ezen hatóanyaggal az Alzheimer-kór kezelésére. Ez a projekt jelenleg a klinikai vizsgálatok második fázisában jár.

Több más esetben is megmutatták a vegyület jótékony hatását, így például egerek agyában lassította az öregedéssel együtt járó neurodegenerációt,⁷⁶ valamint diabétesz esetén meggátolta a vér-retina gát lebomlását, mely a cukorbetegségben szenvedők esetén gyakran vaksághoz vezet.⁷⁷ Továbbá megfigyelték, hogy gerincvelői sérülést követően LM11A-31-et juttatva az egerek szervezetébe orálisan, a molekula elősegítette a neuronok gyógyulását, a kezelt alanyok mozgási és koordinációs készségei jelentősen javultak.⁷⁸ Ezen kívül megmutatták, hogy képes stimulálni a hippokampuszban a neuroenezist, valamint segíti a térbeli memória helyreállítását traumás agysérülést követően.⁷⁹ Szintén egereken végzett kísérletben bizonyították, hogy a pénisz barlangos testjének idegi sérülését követően a vegyület elősegíti az erektilis funkció helyreállítását. Az LM11A-31-gyel kezelt egyedek esetén jelentősen több neuritot, valamint jobban megnyúlt idegsejt nyúlványokat figyeltek meg a kontroll csoporthoz képest.⁸⁰

A fent említett tanulmányok alapján, a számos betegség, sérülés esetén megfigyelt regenerációs és a perifériás idegrendszerben tapasztalt neurit növekedést serkentő hatása miatt a vegyület a jövőben fontos eszköze lehet számos terápiás kezelésnek, valamint - bár célzottan erre vonatkozóan még nem végeztek kutatásokat - elképzelhető, hogy a molekula segítségével szintén megvalósítható az axonok irányított növekedése.

1.3. Kétfoton mikroszkópia

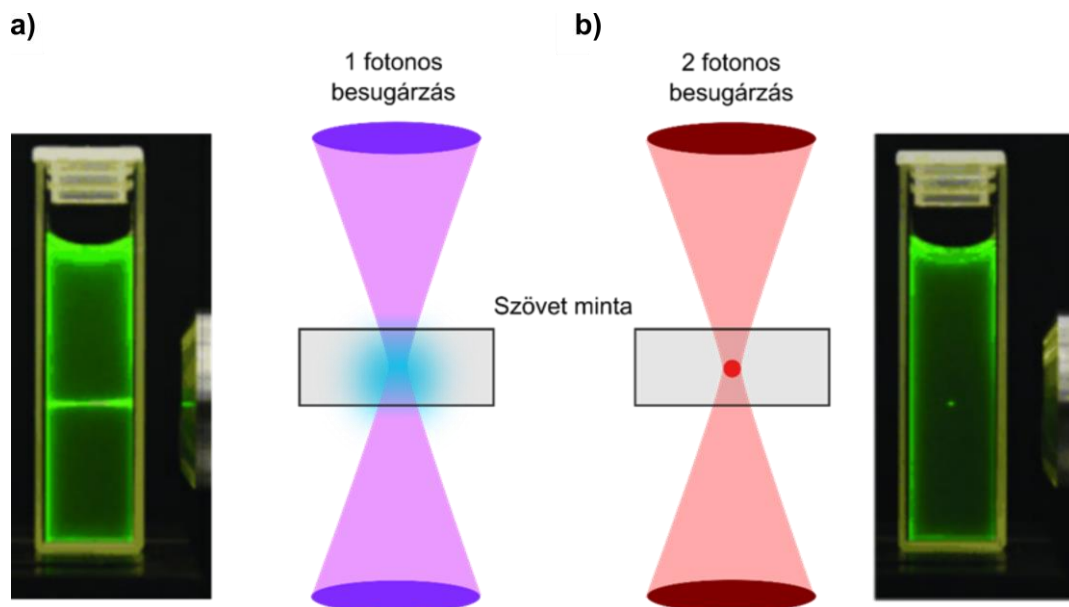
Az első mikroszkópok feltalálása óta ezek a berendezések váltak a biológiai kutatások legfontosabb eszközévé. Bár ezek segítségével óriási felfedezéseket sikerült elérni, a hagyományos optikai mikroszkópok leginkább *in vitro* rendszerekben alkalmazhatóak megfelelően.⁸¹ Az élő szervezetek közvetlen vizsgálata egészen a huszadik század végéig egy nagyon nehezen kivitelezhető, egyes esetekben lehetetlen feladat volt.

A legelterjedtebben alkalmazott fluoreszcenciás lézermikroszkópok az anyagok egyfoton abszorpcióját, egy lineáris folyamatot használnak a szöveteken belüli kontrasztok megjelenítésére.⁸² A folyamat linearitása itt azt jelenti, hogy az abszorbeált fény mennyisége egyenesen arányos a lézerfény intenzitásával.⁸³ Ezek a technikák azonban nagyon erősen limitáltak, csak a szövetek felszínétől számított kevesebb, mint száz mikrométeres távolságig használhatóak nagyfelbontású képalkotásra. Ennek oka, hogy az alkalmazott hullámhosszokon a fény a biológiai minta rengeteg összetevőjével kerülhet interakcióba, így minél mélyebben jelöljük ki a fókuszpontot, annál nagyobb mértékben szóródik vagy nyelődik el mind a besugárzás, mind a detektálás során. Ezáltal nem csak a fókuszpontban történik gerjesztés, az onnan érkező emittált fény halványodik, a kapott kép elmosódik. A konfokális mikroszkópok esetén a felbontás javítása érdekében a szövetek által emittált fény a detektor előtt egy túlyukon halad át, ezzel kiszűrve azon fénysugarakat, amelyek nem a fókusból származnak.⁸²

A fent említett problémák, nehézségek kiküszöbölésére alkalmas technika a kétfoton (2P vagy TP) gerjesztés, melyet először Denk és munkatársai alkalmaztak fluoreszcens pásztázó mikroszkóp létrehozásához 1990-ben.⁸⁴ A jelenség alapja, hogy egy molekula az egy darab megfelelő energiájú foton elnyelése helyett kettő, nagyjából feleakkora energiájú foton közel egyszerre történő (0,5 fs-on belüli) elnyelésével is gerjesztődhet. Mivel az elnyelt fotonok kisebb energiájúak, ilyenkor az elnyelt fény nagyobb hullámhosszúságú. A folyamat nemlineáris, a két foton egyidejű abszorpciójának valószínűsége a lézer intenzitásának négyzetével arányos.^{81,83}

Mivel a széles körben használt fluoreszcens festékek esetében egy darab nagy hullámhosszúságú foton energiája nem elegendő azok gerjesztéséhez, így az abszorpció és az ezt követő emisszió egy nagyon kis térfogatelemre korlátozódik a fókuszpont körül, ugyanis csak itt elegendően nagy a fotonfluxus ahhoz, hogy a kis valószínűségű kétfoton abszorpció megtörténjen. Ennek nyomán, mivel a fókuszponton kívül nincs fluoreszcencia, az összes

emittált fény kizárólag a fókuszból érkezhets, elegendő az összes emittált fény intenzitását mérni, nincs szükség annak szűrésére.⁸³



10. ábra: Az egy- és kétfotonos gerjesztés közötti különbség. Egy fluoreszcens anyag gerjesztése a) egyfoton b) kétfoton lézerrel. Forrás: Pantl Orsolya MSc Diplomamunka 2022, felhasználva a szerző engedélyével; a fényképek újrahasználva a Wiley engedélyével.⁸⁵

Annak, hogy a kétfoton abszorpció jelenségét kihasználó technikák során nagyobb hullámhosszágú fénnel dolgozhatunk, számos előnye van. Először, az ilyenkor alkalmazott, jellemzően vörös vagy közeli infravörös fény az élő sejtek számára kevésbé káros, mint az egy foton elnyeléséhez szükséges UV tartományba eső fotonok.²⁰ Továbbá, mivel a Rayleigh-szórás értelmében a szórt fény intenzitása a fény hullámhosszának negyedik hatványával fordítottan arányos,⁸⁶ az itt alkalmazott lézerek esetén kisebb mértékű szóródásra számíthatunk. Fontos szempont még, hogy az ultraibolya és látható tartományban az élő szövetekben található több anyag is hatékonyan elnyeli a fényt. A gerincesek esetében az oxihemoglobin a 650 nm-nél kisebb hullámhosszágú fény nagy részét kiszűri, míg a jelenlévő víz 1400 nm felett rendelkezik nagy abszorbanciával.⁸⁷ Ez a két tényező jelöli ki az úgynevezett „fototerápiás ablakot”, melyen belül a szövetek relatíve kis elnyeléssel rendelkeznek.²⁰ Az alkalmazott fény kisebb szóródása, valamint a szövetek kisebb abszorbanciája miatt a kétfoton mikroszkópok segítségével lényegesen jobb szöveti penetrációt lehet elérni, akár két milliméteres mélységben is vizsgálhatóak élő szervezetek.

A kétfoton technikák nemcsak a fluoreszcens mikroszkópok szempontjából nagyon jelentősek, de segítségükkel lehetőség nyílik célzott hatóanyagleadásra is. Ennek fontos eszköze az 1.1. fejezetben bemutatott fotolabilis védőcsoportok használata.

Mivel a legtöbb védőcsoport jellemzően az ultraibolya tartományban rendelkezik nagy abszorbanciával, a korábban már említett szempontok miatt orvosi biológiai alkalmazásuk akadályokba ütközik. Léteznek olyan kromofórok is, melyek a „fototerápiás ablakban” tudnak egy fotont elnyelve gerjesztődni. Ezek alkalmazása azonban szintén nem nyújt megoldást, hiszen a gerjesztéshez szükséges alacsony energia következtében ezen vegyületek érzékenyek a látható fényre is, nagyon nehéz kezelni őket. Ezen problémákra nyújt megoldást a kétfoton technológia használata, melynek segítségével az alapvetően UV vagy látható fénnel gerjeszthető molekulákat is felhasználhatjuk élő szervezetekben. Óriási előnye továbbá, hogy a nagyon precízen kontrollálható, pontszerű gerjesztésnek köszönhetően a fókuszpont megfelelő mozgatásával kétfoton lézerekkel lehetőség adódik a hatóanyag felszabadulásának három dimenzióban történő pontos szabályozására.²⁰ Így tehát az uncaging folyamatok nagymértékű tér- és időbeli kontrollja valósítható meg a kétfoton gerjesztés révén a szöveteken belül.

A kétfoton technikák megjelenését követően több hagyományos fotolabilis védőcsoport segítségével is megvalósították különböző vegyületek felszabadítását infravörös fény alkalmazásával *in vitro* rendszerekben. Bár ezen vizsgálatok során az egy fotonnal történő gerjesztéshez képest lényegesen kisebb mértékű fotolízist figyeltek meg, többek között *o*-nitrobenzil, kumarin, valamint nitroindolin vázas védőcsoportokat is sikeresen alkalmaztak.⁸⁸ A photocage vegyületek 2P technikával történő *in vivo* alkalmazására egyik első példa egy 2011-es kutatás, mely során egerek agyában sikerült a 4-metoxi-7-nitroindolinil-glutamátból nagyfokú térbeli kontrollal felszabadítani az aktív neurotranszmittert, így stimulálva egy-egy dendrittüskét.⁸⁹ Bár élő szervezetekben az uncaging technika alkalmazása még egy viszonylag új stratégia, a terület az utóbbi években egyre nagyobb figyelmet kap, a benne rejlő potenciált, lehetőségeket az említett cikk is mutatja.

1.4. Fotolízis vizsgálatok

Ahogy azt az 1.1. fejezetben már bemutattam, a „cagelt” vegyületek jellemzésére több tulajdonságukat használhatjuk. Míg a legfontosabb sajátosságok közül a maximális elnyelési hullámhossz, valamint a különböző hullámhosszakhoz tartozó moláris abszorpciós koefficiensek egy spektrofotométer segítségével egyszerűen és gyorsan meghatározhatók, az uncaging folyamatot jellemző kvantumhatékonyság mérése nem ennyire könnyű feladat.

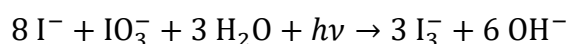
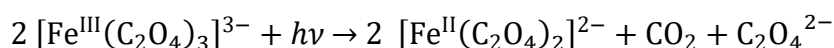
A fotolízis kvantumhatékonysága (Φ_u) egy mértékegység nélküli mennyiség, azt adja meg, hogy egy „cagelt” vegyület által elnyelt foton az esetek hányad részében vezet a molekula bomlásához. Ebből következően ez egy nulla és egy közötti érték. Egy új vegyület esetében annak Φ_u értékét alapvetően kétféleképpen határozhatjuk meg: megmérhetjük azt közvetlenül aktinometriás eljárásokkal, vagy megkaphatjuk egy már ismert kvantumhatékonyságú vegyülettel való összehasonlítás alapján.⁹⁰

A direkt meghatározás során a megfelelő hullámhosszúságú fény hatására fotolízist szenvedett molekulák számát közvetlenül hasonlítjuk össze az elnyelt fotonok számával. Ilyenkor tehát egyrészt mérni kell a minta átalakulásának mértékét, mely történhet például nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (HPLC) vagy mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia segítségével. Másrészt szükség van a minta által elnyelt fotonok számának meghatározására. Ehhez a minta abszorbanciáját, valamint a kísérlet során alkalmazott fotonfluxust kell ismernünk. Előbbit egyszerűen meghatározhatjuk a Lambert–Beer-törvény alapján a minta koncentrációja és moláris abszorpciós koefficiense alapján, utóbbi azonban a használt berendezéstől, fényforrástól függ.

Aktinométernek nevezünk minden olyan fizikai vagy kémiai rendszert, melyek felhasználásával egy adott kísérleti elrendezésben fotonfluxust tudunk mérni. Ezen belül is a kémiai aktinométerek olyan fotokémiai rendszerek, melyek tartalmaznak egy kromofórt, amely fény hatására végbemenő reakciójának pontosan ismert a kvantumhatásfoka.⁹¹ Egy adott mérési elrendezésben vizsgálva az aktinométer fotokémiai átalakulását, képesek vagyunk számszerűsíteni a mintába érkező fotonok számát, így a berendezésre, fényforrásra jellemző fotonfluxus ismertté válik. Ennek ismeretében az új vegyület fotokémiai átalakulását követve már meghatározható annak kvantumhatékonysága.

Amennyiben egy aktinométer fotokémiai tulajdonságai pontosan ismertek, és így megbízhatóan alkalmazható, azt a fentiek értelmében felhasználhatjuk más rendszerek

kvantumhatékonyságának megismerésére, így új aktinométereket létrehozva. Ennek nyomán létrehoztak két standard aktinométert, melyeket referenciaként lehet használni más rendszerek mérésére.⁹¹ Goldstein és Rabani a berlini PTB (Physikalisch-Technische Bundesanstalt) intézményében xenon lámpát használva fényforrásként, valamint szilícium fotodiódákat a mintát ért fotonok számának mérésére, meghatározták a ferrioxalát, valamint a jodid-jodát aktinométerek kvantumhatásfokát.⁹² Később, Bolton és munkatársai a gaithersburgi NIST (National Institute for Standards and Technology) intézményében az ottani állítható lézer segítségével vizsgálták ugyanezen aktinométereket.⁹³ Mivel a két csoport által meghatározott értékek jól egyeztek, így ezek a rendszerek váltak a széles körben elfogadott standard aktinométerekké. A két esetben felhasznált fotokémiai reakció:^{91,94}



A standard aktinométerek használata rendkívül bonyolult, nagyon pontos odafigyelést igényel, a mintakezelés során könnyű hibázni, valamint speciális körülmények - a ferrioxalát aktinométer alkalmazása esetén például végig sötétben kell dolgoznunk – szükségesek,⁹⁵ így ezek mindennapi használata nem célravezető. Segítségükkel azonban sok más, a mérések szempontjából kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkező aktinométert hoztak létre, melyek alkalmazása egyszerűbb.

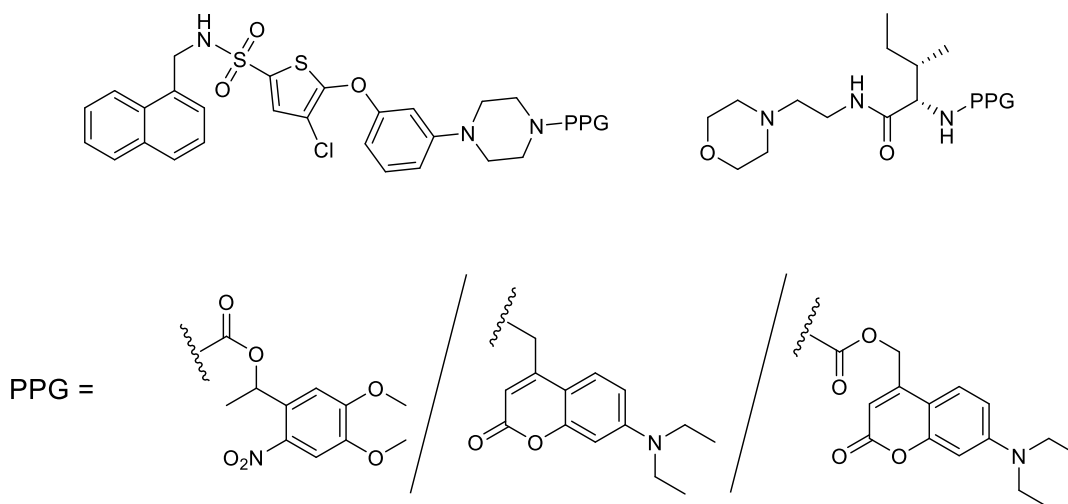
Elterjedten alkalmazzák például az *1.1. fejezetben* már említett, könnyen előállítható vagy beszerezhető, a „photoswitch” vegyületek családjába tartozó azobenzolt és különböző származékait. Ilyenkor a felhasznált fotokémiai reakció az aktinométer különböző hullámhosszúságú fény hatására végbemenő cisz-transz izomerizációja.⁹⁶ Egy 2022-ben publikált cikk alapján például a 4,4'-dimetilazobenzol (IUPAC szerinti nevén 1,2-di-*p*-tolildiazén) jól használható az UV és látható tartományban fotonfluxus meghatározására, köszönhetően a tiszta és hatékony cisz-transz izomerizációs folyamatának, a hozzá kapcsolódó egyszerű kísérleti eljárásnak, valamint annak, hogy fotokémiai vagy termikus úton visszaalakítható, így lehetőség van annak többszöri használatára.¹¹

A kvantumhatékonyság megállapítására alkalmazható második módszer egy ismert Φ -val rendelkező rendszerrel történő közvetlen összehasonlításon alapul. Ilyenkor nem számszerűsítjük a kísérlet során tapasztalható fotonfluxust, hanem azonos körülmények között mérjük az ismert kvantumhatékonyságú referenciát, valamint a jellemezni kívánt anyagot.

Ebben az esetben, mivel a két minta ugyanannyi fotonnal találkozik, ismerve a két minta kezdeti abszorbanáciáját, valamint követve a fotokémiai reakciók lejátszódását, azok időbeli lefutásából következtetni tudunk az ismeretlen kvantumhatékonyságra. Míg a referencia lehet más típusú vegyület, esetünkben a jellemezni kívánt folyamat egy „cagelt” vegyület fotolízise. Emiatt fontos, hogy a vizsgálatot csak bizonyos fokú átalakulásig végezzük, ugyanis a fotolízis során képződő molekulák szintén képesek lehetnek a beérkező fény egy részét elnyelni, így befolyásolva a minta abszorbanáciáját. Továbbá, az átalakulás a referencia és a vizsgált minta esetében nem azonos sebességű, így a két minta koncentrációja, ezáltal az abszorbanációja alapvetően sem egyenlő mértékben változik. Amennyiben a kezdeti abszorbanációkat ugyanakkorának választjuk, a referencia és a mért minta kezdeti átalakulási sebességének aránya megadja a két folyamat kvantumhatékonyságának hányadosát, melyből egyszerűen megkapjuk az általunk keresett értéket.⁹⁷

2. Célkitűzések

A kutatóintézetünk tevékenységének fókuszában az aggyal kapcsolatos kutatások, a látáshelyreállítás kutatása, valamint speciális fénystimuláció segítségével kifejlesztett neuron regenerációra alkalmas terápiás eljárások kidolgozása áll. Az utóbb említett projekt célja, hogy az idegi sérülések részletes vizsgálata, az idegsejtek nyúlványainak növekedését befolyásoló tényezők és mechanizmusok elemzése valósuljon meg, valamint, hogy a központi idegrendszert érintő károsodások gyógyítására alkalmas módszerek kerüljenek kidolgozásra. Ezen a témán belül az én munkám célja olyan vegyületek előállítása és fotokémiai tulajdonságainak meghatározása volt, amelyek alkalmasak lehetnek az említett biológiai kutatásokban való felhasználásra. Ennek megfelelően szerettem volna az *1.2. fejezetben* bemutatott, az irodalomban már ismert, de még viszonylag keveset vizsgált két idegnövekedési faktor mimetikumot szintetizálni, melyek segítségével irányított axon növekedést, valamint sérült idegszövet regenerációját szeretnénk megvalósítani. Ezen kívül célom volt az *1.1. fejezetben* ismertetett, leggyakrabban alkalmazott védőcsoportok közül kettő, egy *o*-nitrobenzil és egy kumarin alapvázsal rendelkező védőcsoport szintézise. Az így szintetizált NGF mimetikumokat és fotolabilis védőcsoportokat szerettem volna vagy közvetlenül, vagy karbamát kötésen keresztül összekapcsolni, így létrehozva több, az irodalomban még ismeretlen, új „cagelt” vegyületet (**11. ábra**).



11. ábra: A célmolekulák szerkezete, PPG a fotolabilis védőcsoportot jelöli.

Annak érdekében, hogy a későbbi kísérletek során megfelelően tudjuk alkalmazni az előállított vegyületeket, fontos ismerni azok fotokémiai tulajdonságait. Célom volt tehát az elkészített molekulák spektroszkópai jellemzése, továbbá azok fotolízis

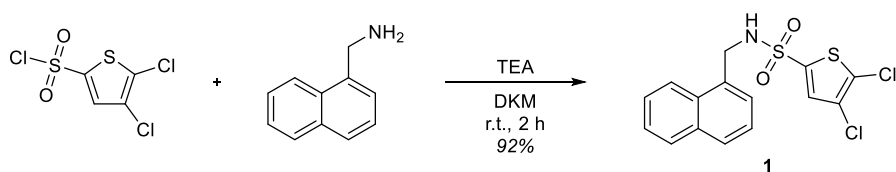
kvantumhatékonyságának meghatározása. Utóbbihoz szükséges volt egy közvetlen összehasonlításon alapuló módszer házon belüli kidolgozása az említett mérésre megfelelő referenciavegyület segítségével.

3. Kísérleti eredmények

3.1. Célmolekulák szintézise

3.1.1. NGF mimetikumok szintézise

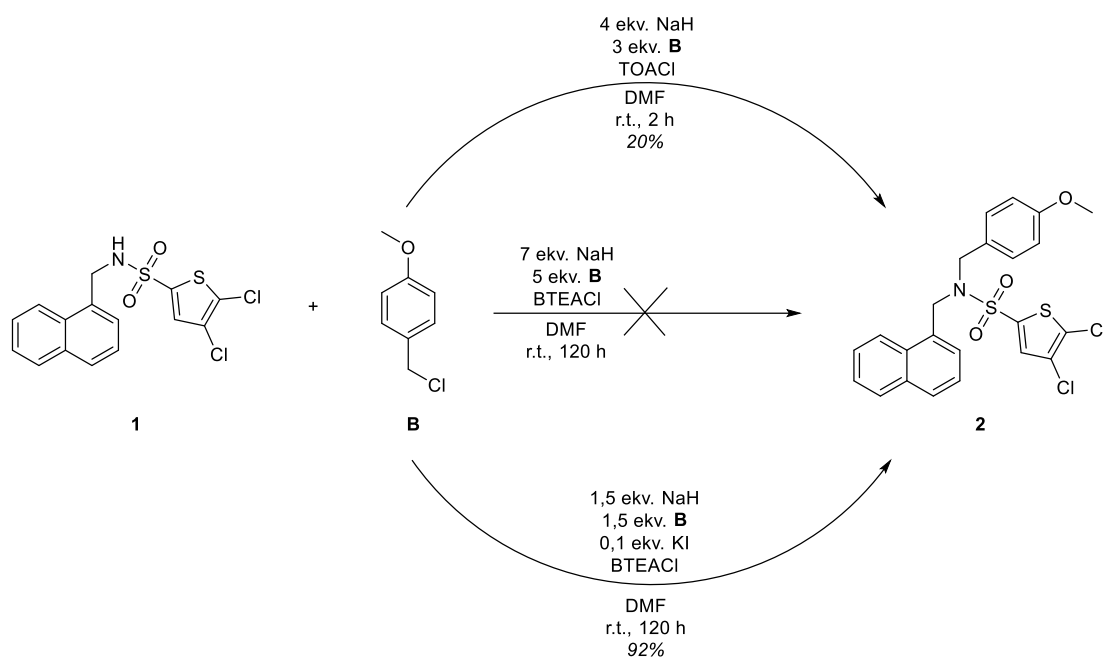
Kutatómunkám első lépéseként az 1.2. fejezetben említett két idegnövekedési faktor mimetikum szintézisét valósítottam meg. Ehhez a B-355252 néven említett fenoxi-tiofén-szulfonamid vázas vegyület esetén egy irodalmi eljárást vettem alapul.⁶⁵ A szintézissor első lépéseként a kereskedelemben kapható 4,5-diklórtiofén-2-szulfonil-klorid és 1-naftil-metil-amin reakciójában egy kén-nitrogén kötés kialakítását végeztem el gyenge bázis (TEA) jelenlétében DKM oldószerben (12. ábra). A keletkező szulfonamidot vizes extrakciót követően flash kromatográfiával tisztítottam.



12. ábra: A B-355252 szintézisének első lépése, a szulfonamid csoport kialakítása.

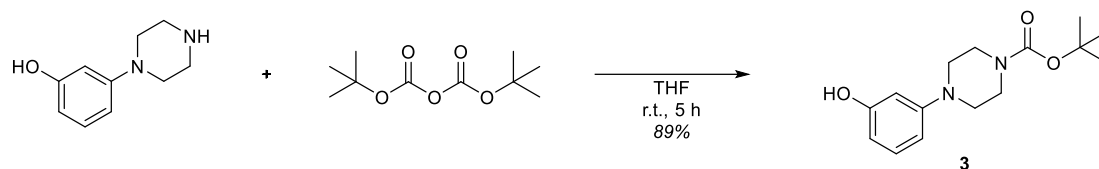
A következő reakcióban a szulfonamid csoport nitrogénjének védelme történik *para*-metoxibenzil (PMB) csoporttal. Az *N*-alkilezési reakciót DMF oldószerben, erős bázis (nátrium-hidrid) jelenlétében, fázistranszfer katalizátor segítségével végzik. Az irodalmi eljárás során reaktánsként *p*-metoxibenzil-bromidot, fázistranszfer katalizátorként pedig tetra-*n*-butilammónium-jodidot alkalmaznak, azonban ezek hiányában először *p*-metoxibenzil-klorid és tetra-*n*-oktilammónium-klorid felhasználásával próbáltam elvégezni a reakciót. Mivel a reakció több óra kevertetést követően sem játszódtott le a HPLC-MS mérés alapján, az eredetileg 1-1 ekvivalensnyi mennyiségben alkalmazott nátrium-hidridből további három, a *p*-metoxibenzil-kloridból további két ekvivalenst adagoltam az oldathoz. Ez azonban nem járt jelentős pozitív hatással, az irodalmitól lényegesen elmaradó termelés következtében csak kevés termék keletkezett. A reakciót később még több NaH és *p*-metoxibenzil-klorid jelenlétében, a PTC katalizátort benziltriethylammónium-kloridra cserélve újra próbáltam. Ez szintén nem járt sikerrel, a reakcióelegy vizsgálata alapján nem keletkezett termék, így azt nem dolgoztam fel. Az említett kísérletek sikertelensége alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a probléma vélhetően a reaktánsok különbségében keresendő. Az irodalmi eljárásban alkalmazott jodid ugyanis jobb távozócsoport, mint az általam használt klorid. A reakciót így

végül harmadik próbálkozásra sikerült jó termeléssel megvalósítani, amikor az elegyhez kis mennyiségben (0,1 ekv.) nukleofil katalizátort, mégpedig kálium-jodidot is adtam. Ennek hatására valószínűleg egyensúlyi reakcióban halogéncsere történik a *p*-metoxibenzil-kloriddal, a keletkező *p*-metoxibenzil-jodid pedig könnyebben reakcióba lép a szulfonamiddal, a jodid távozását követően pedig egy újabb klorid-jodid csere valósulhat meg, így az eredeti reaktáns teljes mennyisége lassan elreagál (**13. ábra**). A reakcióelegyhez - hasonlóan az első lépéshez – vizet adtam, majd etil-acetáttal extraháltam, végül flash kromatográfiával tisztítottam.



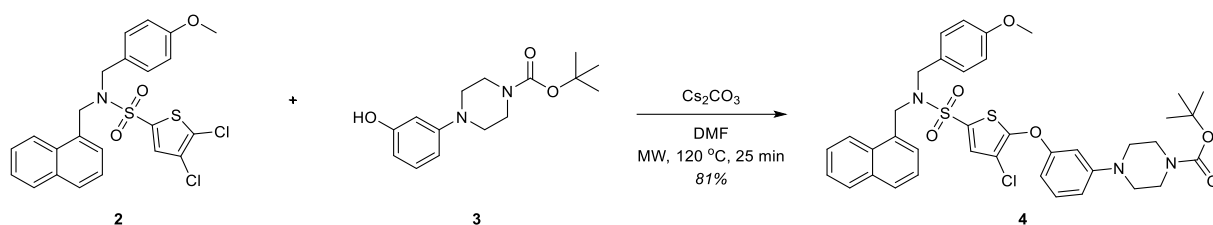
13. ábra: A szulfonamid nitrogénjének védelésére tett alkilezési kísérletek.

A szintézissor harmadik lépésében történik a NGF mimetikum vegyület heteroaril-éter vázának kialakítása. Az ehhez a reakcióhoz szükséges reaktánst (**3**) is én állítottam elő, a 3-(piperazin-1-il)fenol szekunder aminocsoportjának nitrogénjét *tert*-butoxi-karbonil (Boc) csoporttal védve (14. ábra). A védőcsoport kialakításához di-*tert*-butil-dikarbonátot használtam, THF-ben végezve a reakciót. A kapott **3**-as vegyület esetén annak tisztítására nem volt szükség, az oldószer lepárlását követően tisztán megkaptam azt.



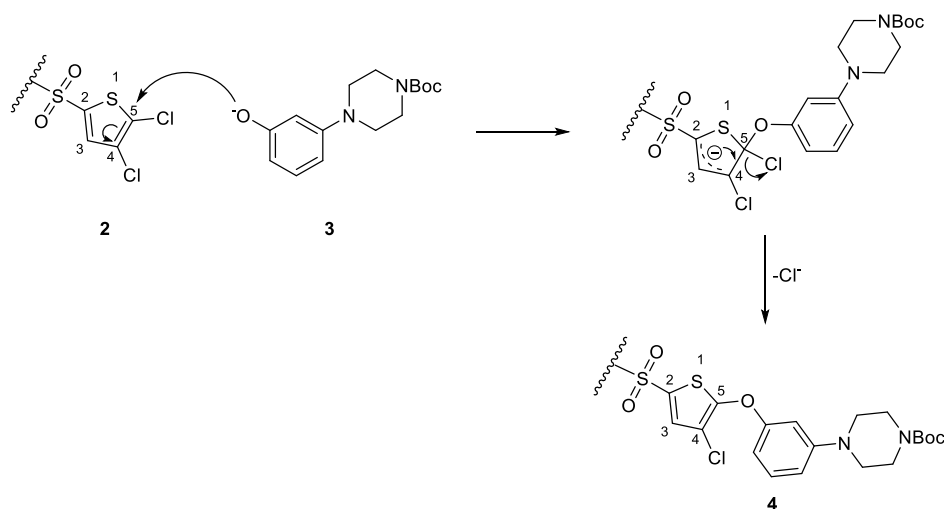
14. ábra: A Boc-csoporttal védett 3-(piperazin-1-il)fenol szintézise.⁹⁸

A heteroaril-éter váz kialakítása során **2** és **3** összekapcsolása történik egy S_NAr reakcióban (15. ábra). A reakciót számos körülmény, reagens alkalmazása esetén vizsgálták az irodalomban, ezen kombinációk közül az egyik legoptimálisabbat alkalmaztam munkám során. Ennek megfelelően a reakciót mikrohullámú reaktorban végeztem, DMF-et használva oldószerként és cézium-karbonátot bázisként.



15. ábra: A B-355252 heteroaril-éter vázának kialakítása S_NAr reakcióban.

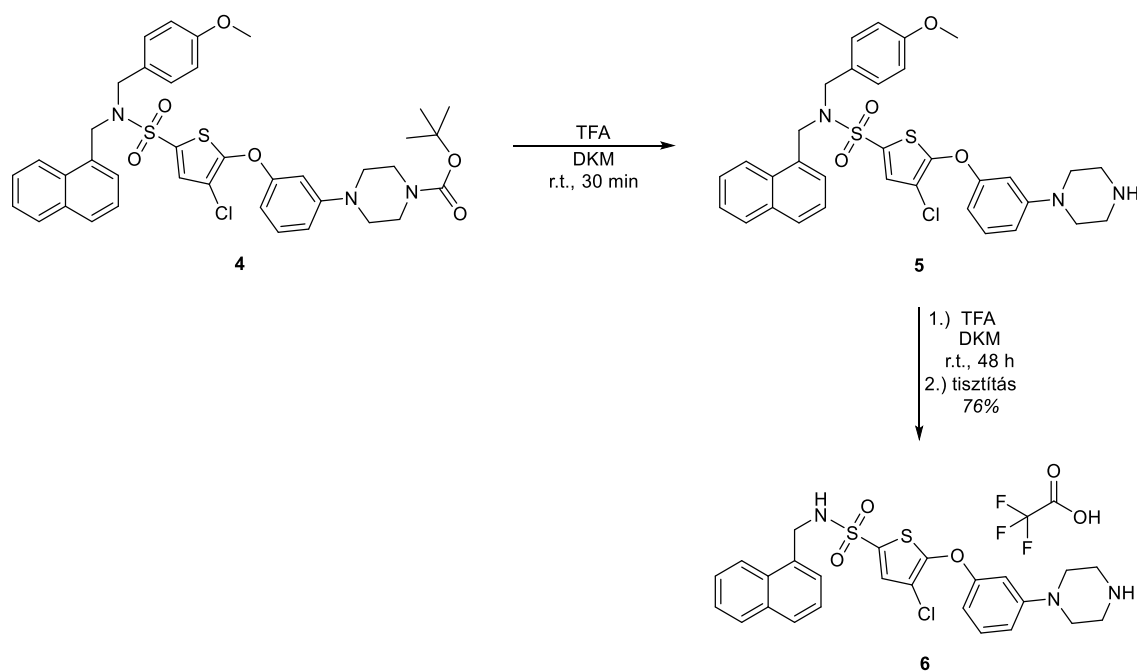
A reakcióhoz szükséges nukleofil ágens a **3**-as vegyület deprotonálásával keletkezik. Mivel ez a molekula fenolos hidroxil csoportot tartalmaz, elég egy gyenge bázis - ebben az esetben a cézium-karbonát – annak aktiválásához. Az így kialakuló fenolát támad tiofén 5-ös helyzetben lévő szénatomjára. Ezt követően a negatív töltéssel rendelkező Meisenheimer komplex köztiterméből kloridion lép ki, így lejátsszódik a szubsztitúció (16. ábra).



16. ábra: A lejátszódó S_NAr reakció mechanizmusa.

A mikrohullámú reaktorban történő reakciót követően az oldószert lepároltam, melyhez toluolt is adtam az elegyhez, ami az oldószerral minimális forráspontú biner azeotrópot képez. A terméket ezt követően flash kromatográfiával tisztítottam.

A reakciósor utolsó lépéseként a két védőcsoportot is tartalmazó **4**-ről már csak el kell távolítani a PMB és Boc csoportokat. Mivel mindkét csoport könnyen eltávolítható trifluorecetsav (TFA) segítségével, így ezt egyszerre el tudtam végezni. **4**-et DKM-ben oldottam, majd az oldathoz TFA-t adtam és szobahőmérsékleten kevertettem. HPLC-MS mérések alapján a Boc csoport eltávolítása rendkívül hamar megtörtént, azonban a PMB még jóval tovább a molekulához kapcsolódva maradt. Fél óra kevertetést követően minimális termék mellett gyakorlatilag csak a PMB csoporttal védett, Boc-ot már nem tartalmazó vegyület volt az oldatban. További két nap kevertetést követően végül sikeresen lejárásódott a reakció (**17. ábra**). A keletkező terméket az oldószer lepárlása után preparatív HPLC segítségével tisztítottam, mely során acetonitrilt és 0,2% TFA-t tartalmazó vizet használtam eluensként, aminek következtében a B-355252 trifluorecetsavas sóját kaptam meg az eljárás végén.



17. ábra: A B-355252 szintézisének utolsó lépése, a védőcsoportok eltávolítása.

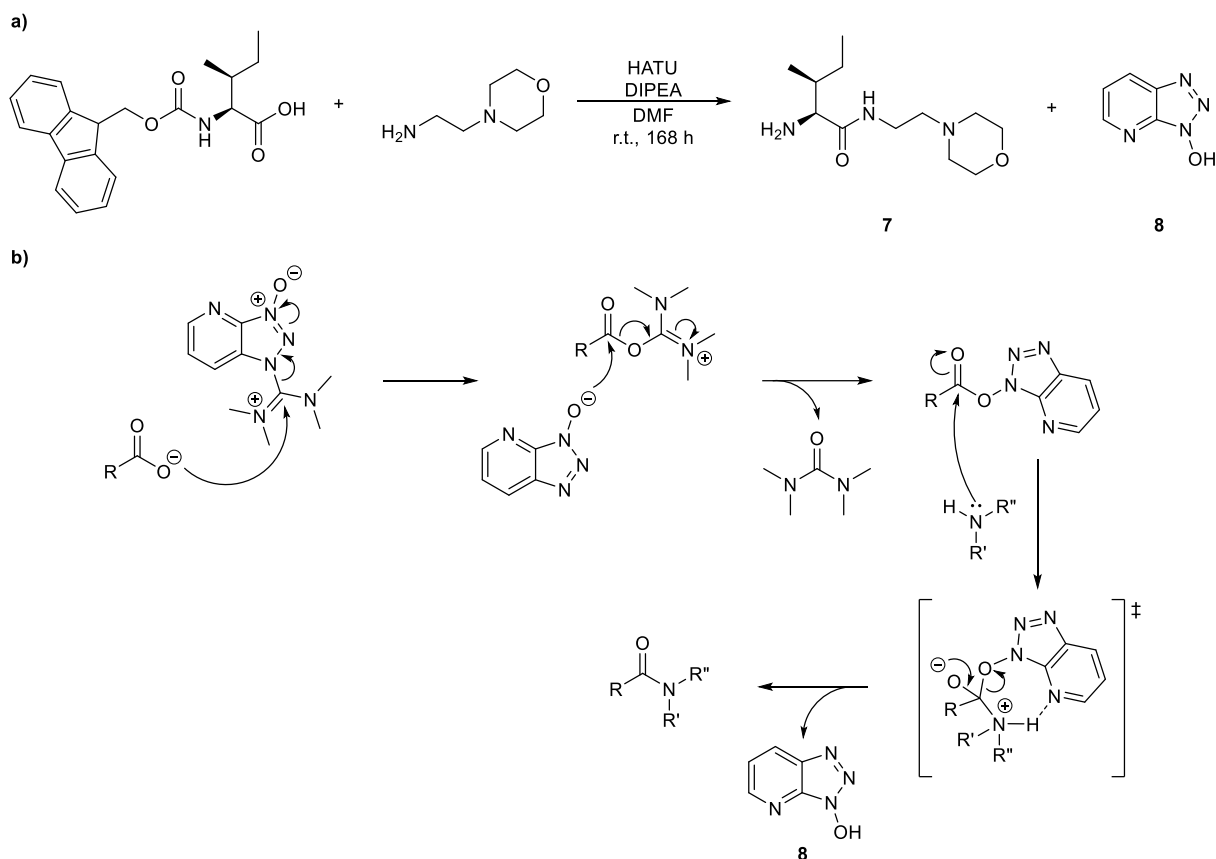
A szintézissort kétszer végeztem el, míg először kevés kiindulási anyagból néhány milligramm terméket állítottam elő az egyes reakciók tesztelése mellett, a második alkalommal a reakciók méretnövelését valósítottam meg, mely során több, mint egy gramm terméket sikerült készítenem. A méretnövelés során a szintézis harmadik lépésében a mikrohullámú

reaktorba helyezhető reakcióedények méretéből adódó limitációk miatt a reakciót több részletben végeztem el, 2 teljes anyagmennyiségét csak három részre bontva tudtam átalakítani.

A második NGF mimetikum, az LM11A-31 esetében a B-355252-vel ellentétben nem áll rendelkezésre az irodalomban részletes szintetikus eljárás. Mivel ez a vegyület az izoleucin váza és a benne lévő amidkötés révén szerkezetileg hasonlít egy dipeptidre, így az előállítását a kereskedelembe kapható 4-(2-aminoetil)morfolinból és az aminocsoportján védett L-izoleucin származékából szerettem volna megvalósítani a hagyományosan peptidek előállítására használt kapcsolószerek segítségével.

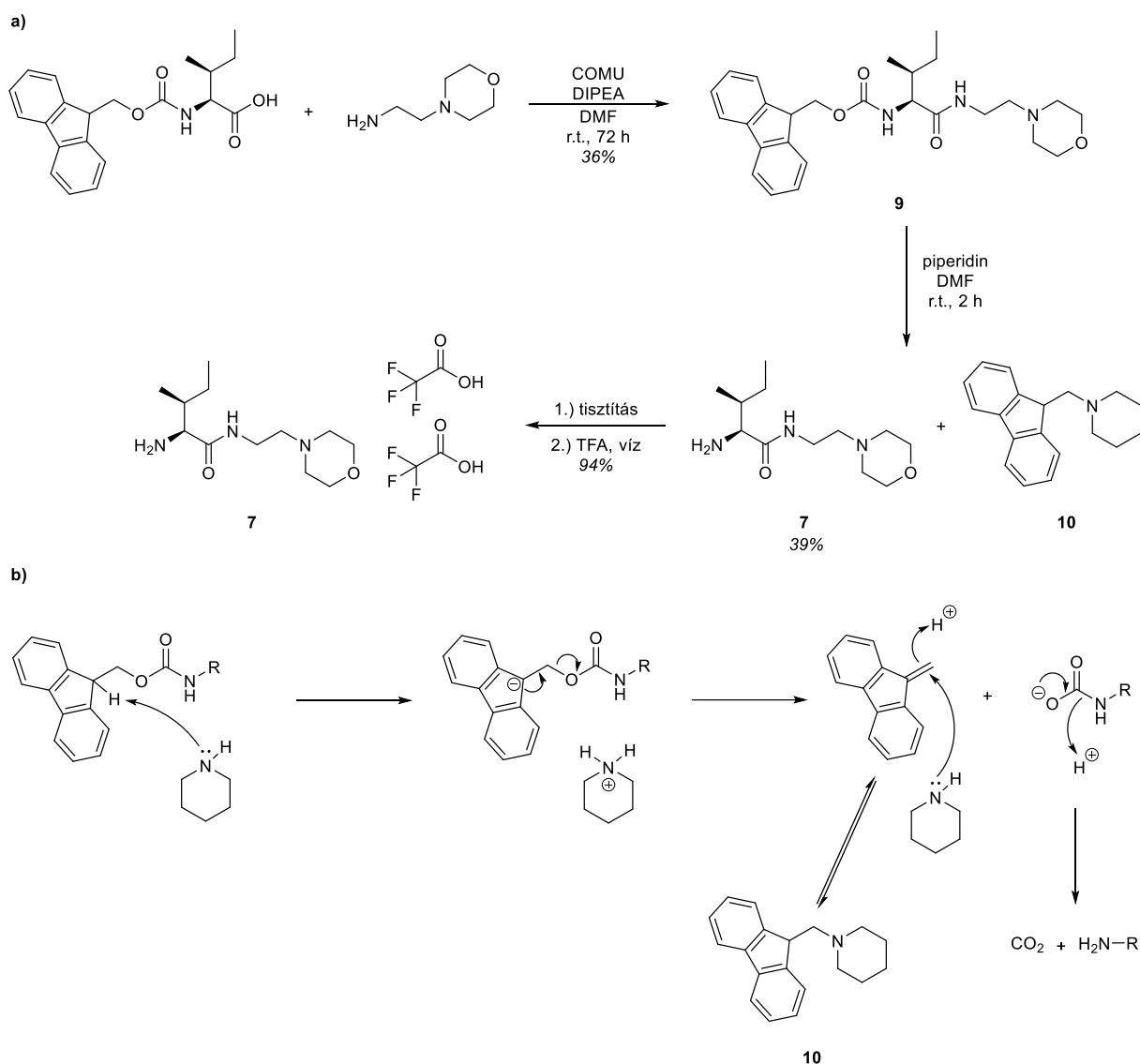
Kiindulási anyagként először az aminocsoportján fluorenil-metoxi-karbonil (Fmoc) csoporttal védett L-izoleucint választottam annak érdekében, hogy a reakciók HPLC segítségével jól követhetőek legyenek, köszönhetően a védőcsoport UV tartományban megfigyelhető abszorbanciájának ($\lambda_{\max} \approx 264$ nm).⁹⁹ A célvegyület előállítását két lépésben terveztem elvégezni, először a kiindulási vegyületek kapcsolását, majd ezt követően a védőcsoport eltávolítását szerettem volna megvalósítani az erre gyakran használt piperidin DMF-es oldatának segítségével.

A vegyület szintézisére tett első kísérletem alkalmával HATU-t használtam kapcsolószerként. Mechanizmus szempontjából, a HATU a kapcsolás során először a jelenlévő bázis (például DIPEA) által deprotonált karbonsavval lép reakcióba. Ezt követően az 1,1,3,3-tetrametil-karbamid kilépése következik, majd az így keletkező köztitermék karbonil szénatomjára végez nukleofil támadást a kapcsolni kívánt aminoszén. A héttagú gyűrűvel rendelkező átmeneti állapotból az 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (**8**) kilépése mellett keletkezik a kívánt savamid. A szintézis során a reaktánsokat DMF-ben oldva, az oldathoz HATU-t és Hünig bázist (DIPEA) adtam, majd ezt kevertettem szobahőmérsékleten. Egy hétnyi kevertetést követően azonban a HPLC-MS mérések alapján az Fmoc csoport már teljesen levált a molekuláról, így annak piperidinnel történő eltávolítására nem volt szükség (**18. ábra**). A nyers termék flash kromatográfiával történő tisztítását követően azonban az látszólag, hogy a terméket nem sikerült elválasztani a HATU-ból a kapcsolás során keletkező 1-hidroxi-7-azabenzotriazoltól (**8**), NMR alapján csak nagyjából 40%-os tisztaságot sikerült elérni. A két vegyületet újabb oszlopkromatográfia segítségével még egyszer megpróbáltam elválasztani, azonban ez sem javított a tisztaságon, így ez a szintézis sikertelennek bizonyult.



18. ábra: a) Az elvégzett reakció; b) a HATU működési mechanizmusa, a melléktermékek keletkezése.

Az első próbálkozás után egy másik kapcsolószerrel, COMU-val is elvégeztem a reakciót, a többi körülmény megváltoztatása nélkül. Ebben az esetben három nap kevertetést követően az Fmoc csoport még nem távozott, így sikerült izolálni az aminocsoportján védett LM11A-31-et. Ennek flash kromatográfiával történő tisztítását követően a védőcsoportot piperidin 30%-os DMF-es oldatával távolítottam el. A reakcióelegy feldolgozása során először savas vizes extrakciót végeztem, hogy a szabad amin só formájában átkerüljön a vizes fázisba. Ezt követően a vizes fázishoz nátrium-hidroxidot adagolva annak pH-ját lúgosra állítottam be, majd DKM-es extrakcióval átvittem a terméket a szerves fázisba. Az oldószer lepárlása után kapott nyertermék HPLC-MS vizsgálata során az látszódott, hogy az Fmoc-csoport eltávolítása során keletkező dibenzofulvén-piperidin addukt (**9**) is jelen van a termék mellett, így végül itt is flash kromatográfiával sikerült izolálni az LM11A-31-et (**19. ábra**). A kapott anyag azonban nem volt kristályos, így vizes TFA segítségével megpróbáltam sót képeztem belőle. Az eljárás végén azonban továbbra is egy olajszerű, nem kristályos anyaghoz jutottam.

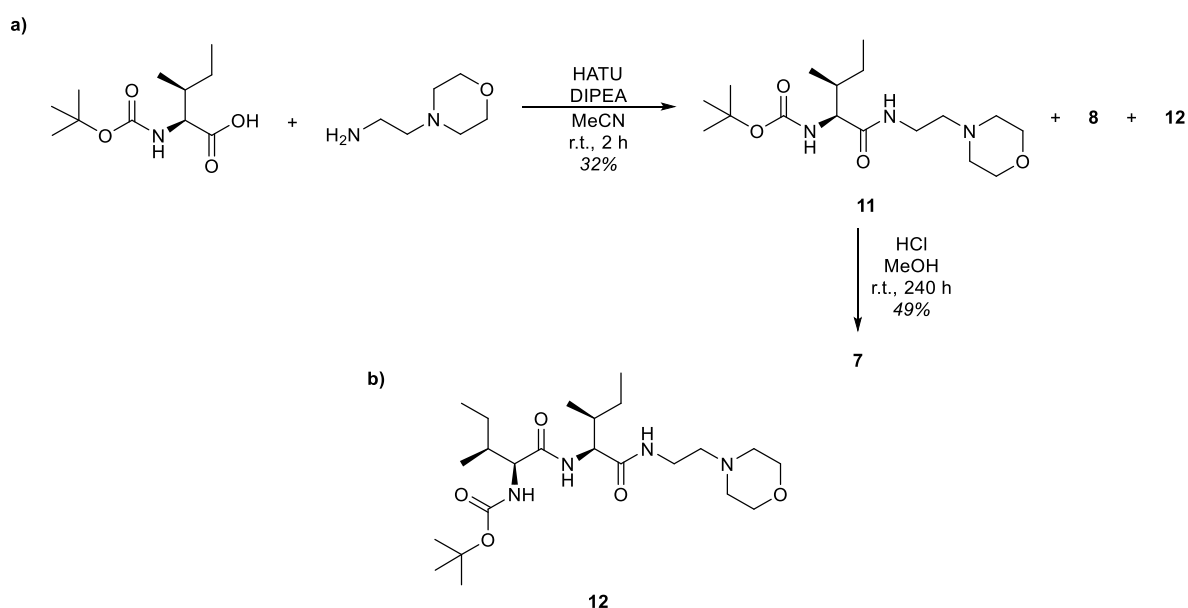


19. ábra: a) LM11A-31 szintézise COMU-val; b) Fmoc eltávolítás mechanizmusa, a 10-es melléktermék keletkezése.

A szintézis méretnöveléséhez a HATU-nál és COMU-nál olcsóbb kapcsoló ágenssel, az EDC-vel is megpróbáltam elvégezni a termék előállítását. A reakcióban az EDC mellett DMAP-t is használtam. Bázisként szintén DIPEA-val dolgoztam, oldószerként azonban DKM-t alkalmaztam DMF helyett. HPLC alapján a reakcióelegyben először az aminosav és EDC adduktja volt jelen, azonban érdekes módon a másik kiindulási anyag, a 4-(2-aminoetil)morfolin hasonló adduktja is látható volt, valamint több napi kevertetést követően számos melléktermék jelent meg az oldatban, nagyon kevés **9** képződése mellett. Az oldószer lepárlása után az elegy további feldolgozása, tisztítása nélkül a védőcsoport eltávolítása érdekében piperidines DMF-et adtam az elegyhez. Egy órányi kevertetést követően azonban az oldat kásássá vált, majd többszöri, különböző pH-n végzett extrakciós kísérletek ellenére sem

sikerült a kis mennyiségű **7**-et elválasztani a sok mellékterméktől, így végül megváltam a reakcióelegytől.

Az Fmoc csoporttal végzett reakciók során tapasztalt nehézségek miatt az aminocsoportján más védőcsoporttal rendelkező L-izoleucinnal is el szerettem volna végezni a reakciókat. Ehhez a Boc-csoporttal védett aminosavból indultam ki. Az EDC-vel végzett sikertelen próbálkozás miatt visszatértem az eredetileg használt HATU-hoz, annak reményében, hogy az Fmoc- nál a Boc csoport stabilabb lesz, egyáltalán nem fog kilépni idő előtt, így a még védőcsoporttal rendelkező terméket el tudom választani a keletkező **8**-tól. A reakcióelegy HPLC-MS-el történő vizsgálata alapján 1 óra kevertetést követően kevés kiindulási anyag mellett főleg **11** volt az oldatban, azonban 2 órát követően egy új melléktermék (**12**) is elkezdett egyre nagyobb mennyiségben megjelenni. A **20. ábra b)** része ezen melléktermék MS mérések alapján feltételezett szerkezetét mutatja.



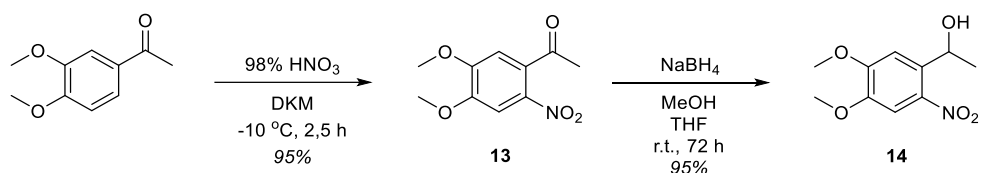
20. ábra: a) LM11A-31 szintézise Boc-csoporttal védett L-izoleucinból; b) a kapcsolás során keletkezett **12**-es melléktermék feltételezett szerkezete.

11-t flash kromatográfia segítségével sikerült elválasztani **8**-tól és **12**-től, majd a védőcsoport eltávolítását követően ezen a szintézisúton is sikerült megkapni **7**-et. Annak érdekében, hogy **7**-et egy kristályos vegyületté alakítsam, megpróbáltam annak mezilát sóját képezni. **7**-et kevés etanolban oldottam, majd ehhez THF-et adtam, az így kapott oldathoz több, mint 2 ekvivalens metánszulfonsav dietil-éteres oldatát adagoltam, azonban így sem kristályosodott ki anyag. A jövőben újabb kísérleteket tervezek tenni könnyebben kezelhető szilárd kristályos sók

előállítására a 7-es anyagokból. Az itt leírt további reakciókban azonban az olajszerű termék is megfelelően használhatónak bizonyult.

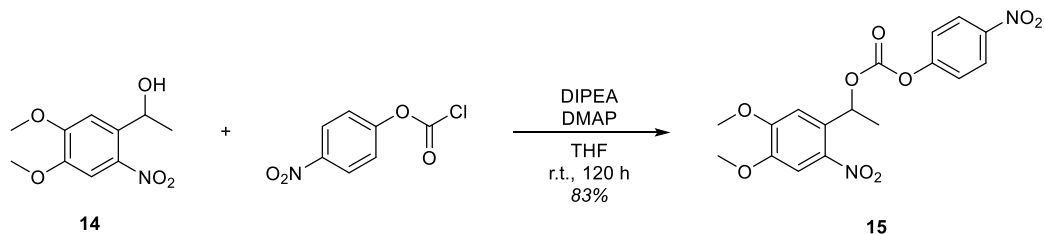
3.1.2. Fotolabilis védőcsoportok szintézise

Munkám során az irodalomban ismert, egy *o*-nitrobenzil és egy kumarin alapvázzal rendelkező fotolabilis védőcsoportot állítottam elő. Az első vegyületet a kereskedelembe kapható 3',4'-dimetoxiacetofenonból kiindulva szintetizáltam (**21. ábra**).



21. ábra: Az *o*-nitrobenzil vázas védőcsoport szintézisének első lépései.¹⁰⁰

Az első lépésben a kiindulási vegyületet nitrálása történt. Mivel a molekula több aktiváló, elektronküldő csoportot is tartalmaz az aromás gyűrűhöz kapcsolódva, így a füstölő salétromsav önmagában, tömény kénsav katalizátor nélkül is elegendő ahhoz, hogy lejártszódjon a reakció. A következő reakcióban **13**-at nátrium-borohidrid segítségével alkohollá redukáltam metanolos tetrahidrofuránban. HPLC alapján a redukció szelektív volt, a nitrocsoport egyáltalán nem redukálódott. Sem **13**, sem **14** esetén nem volt szükség kromatográfiás tisztításra, az anyagokat extrakció után tisztán megkaptam. Mivel az általam „cagelni” kívánt NGF mimetikumok aminok, melyek rossz távozócsoportok, célszerű azokat nem közvetlenül, hanem egy karbamát kötésen keresztül védeni. Az MeNVOC (α -metil-6-nitroveratriloxxikarbonil) védőcsoport prekursorának szintéziséhez **14**-et 4-nitrofenil-kloroformáttal reagáltattam Hünig bázis és katalitikus mennyiségű DMAP jelenlétében (**22. ábra**). A keletkező karbonát (**15**) rendkívül aktív, könnyen lép reakcióba más vegyületekkel.

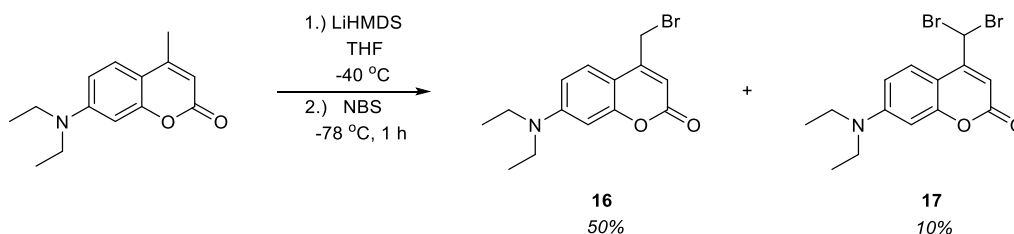


22. ábra: Az MeNVOC védőcsoport prekursorának szintézise.¹⁰¹

A reakciót sötétben végeztem, annak lejátszódását követően a reakcióelegyet 0 °C-os enyhén lúgos foszfát pufferoldatra öntöttem, melyből fehér anyag vált ki. A kivált anyag HPLC-MS

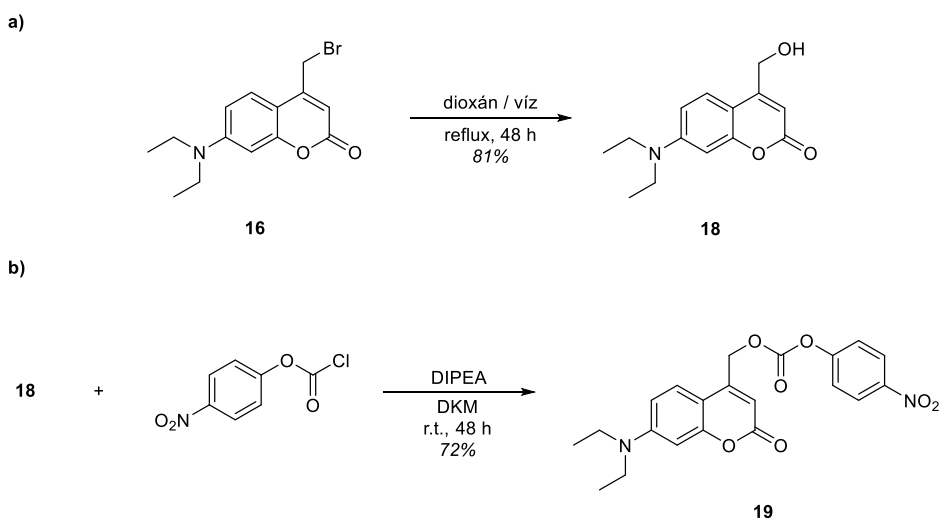
alapján nagyrészt a várt termék (15) volt, kis mennyiségű szennyezővel. A szilárd anyagot nem tisztítottam tovább, szárítás után használtam későbbi reakciókban.

A kumarin alapvázsal rendelkező fotolabilis védőcsoport szintézisét a kereskedelemben kapható 7-dietilamino-4-metilkumarinból kiindulva végeztem **(23. ábra)**.¹⁰²



23. ábra: A DEACM védőcsoport prekursorának szintézise.

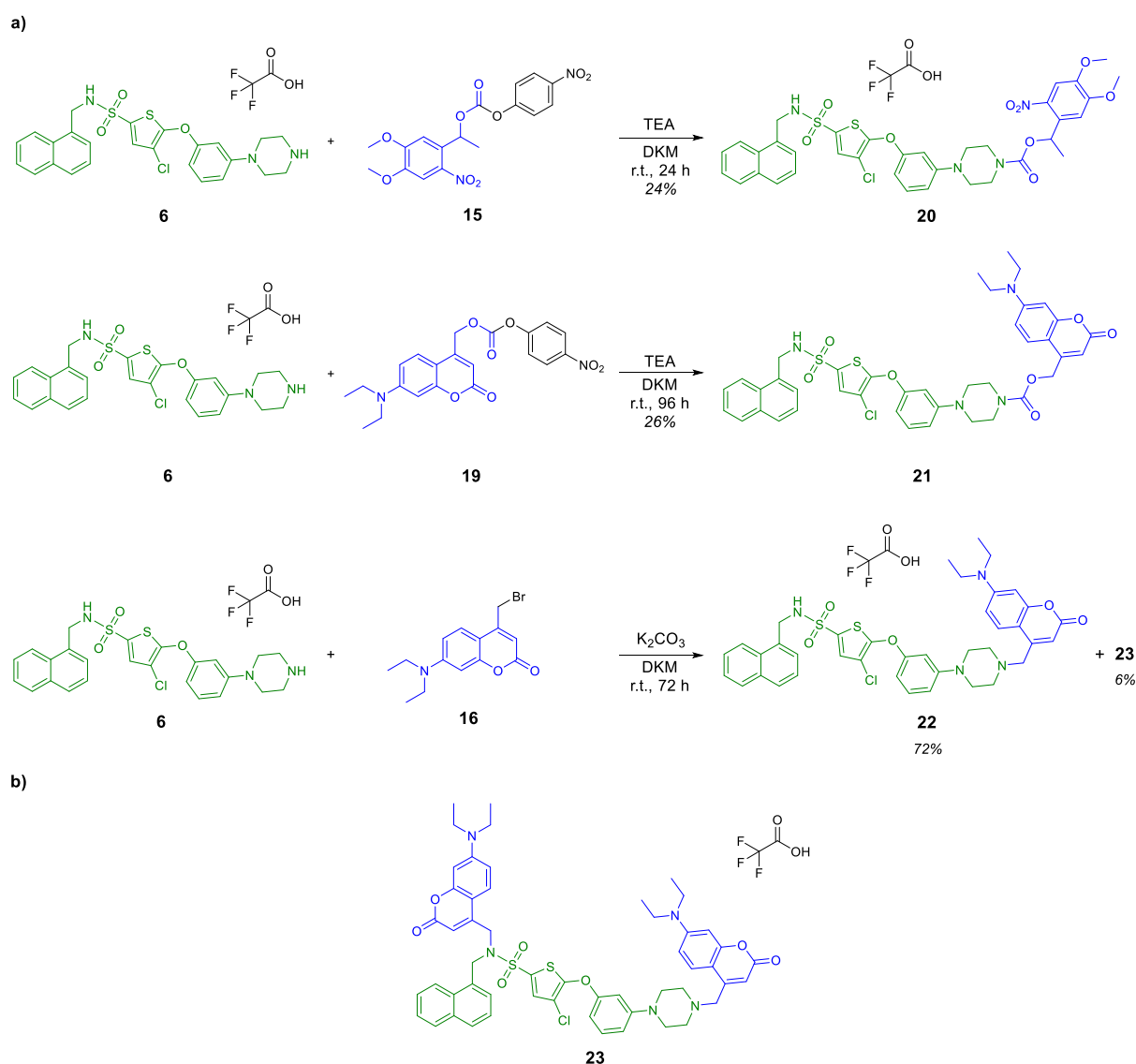
A reakció során a sztérikusan gátolt erős bázist, a lítium-bisz(trimetil)szililamidot (LiHMDS) alkalmaztam, majd elektrofil brómozó ágensként *N*-brómszukcinimid THF-es oldatát adtam az elegyhez. A reakciót egy óra elteltével 1 M-os sósav segítségével kvencseltem. HPLC alapján kis mértékben a monobrómozott **16** mellett a dibrómozott **17** is keletkezett, melyeket flash kromatográfia segítségével hatékonyan el tudtam választani egymástól. A **16**-os vegyület felhasználható a DEACM fotolabilis védőcsoport kiépítésére különböző funkciós csoportokon. A közvetlen kapcsolás mellett azonban az *o*-nitrobenzil vázas védőcsoportéhoz hasonlóan ezen photocage esetében is szerettem volna karbamát kötésen keresztül is megvalósítani a biológiai aktivitással rendelkező molekulák védelmét. Ehhez **16**-ot először 1,4-dioxán és víz elegyében refluxáltattam, majd a nukleofil szubsztitúciós reakcióban kapott alkoholt (**18**) tisztítás után szintén 4-nitrofenil-kloroformáttal reagáltattam DIPEA jelenlétében (**24. ábra**).



24. ábra: a) **16** nukleofil szubsztitúciója; b) a DEACMOC védőcsoport prekursorának előállítása.¹⁰³

3.1.3. NGF mimetikumok és fotolabilis védőcsoportok kapcsolása

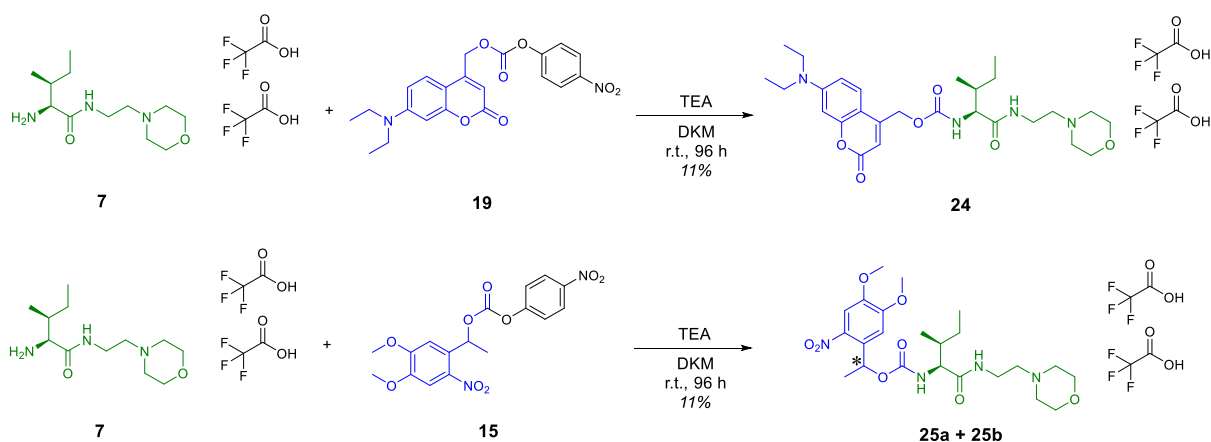
Az előző fejezetekben leírtak alapján előállított idegnövekedési faktor mimetikumok fotolabilis csoportokkal történő védését többféleképpen is elvégeztem. Az ebben a fejezetben említett összes reakciót sötétben végeztem, valamennyi termék tisztítását preparatív HPLC segítségével valósítottam meg. A B-355252 esetében megvalósítottam az MeNVOC és DEACMOC védőcsoportokkal a vegyület karbamát csoporton keresztüli kapcsolását, valamint a DEACM csoporttal való közvetlen védést is (25. ábra).



25. ábra: a) B-355252 kapcsolása fotolabilis védőcsoportokkal; b) a DEACM csoporttal történő védés során keletkező melléktermék feltételezett szerkezete; zöld színnel a biológiailag aktív részt, kékkel a fotolabilis védőcsoportot jelölve.

A **25. ábra** által bemutatott első két reakcióban a **6**-ot és a megfelelő karbonátot reagáltattam trietilamin jelenlétében. A reakciók során melléktermékként *para*-nitrofenol keletkezett, melytől a tisztítás során könnyen el tudtam választani a terméket. **20** esetén a preparatív HPLC használatakor acetonitrilt és 0,2% TFA-t tartalmazó vizet használtam eluensként, így a termék trifluorecetsavas sója keletkezett. **21** esetén azonban az acetonitril mellett 0,4 g dm⁻³-es ammónium-bikarbonát puffert használtam az eljárás során, így ebben az esetben nem só formájában kaptam meg a terméket. A reakció termelése ebben az esetben nem irányadó, ugyanis a tisztítás során a **21**-et tartalmazó oldat egy része kiömlött. A DEACM csoporttal történő közvetlen védezés során a reakcióelegyben egy melléktermék is megjelent (**25. ábra**), melynek tömegspektrometriás jele alapján az ábrán látható szerkezetre következtettem. A feltételezett szerkezetnek később az NMR vizsgálat sem mondott ellent. **22**-t és **23**-at preparatív HPLC segítségével el tudtam választani, a már említett eluens miatt itt is sóként kaptam meg őket.

Az idegnövekedési faktor receptor agonista LM11A-31 védeését csak karbamát kötésen keresztül, az MeNVOC és DEACMOC csoportokkal végeztem el (**26. ábra**).



26. ábra: LM11A-31 kapcsolása fotolabilis védőcsoportokkal.

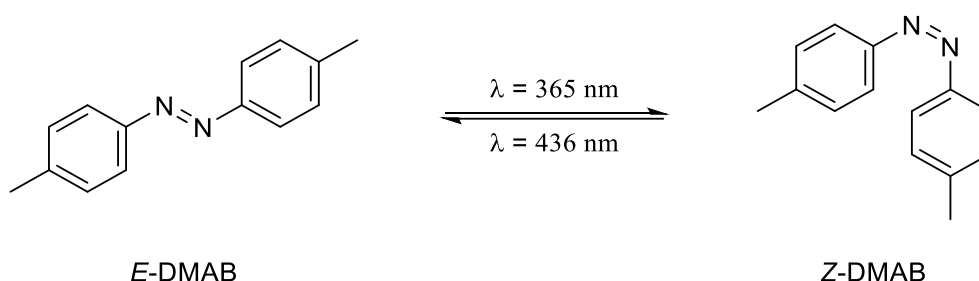
Az MeNVOC csoporttal védett **25** esetén a reakcióelegy vizsgálatakor a HPLC mérések során két, egymáshoz nagyon közeli csúcsot láttam. Ennek oka, hogy a vegyület három sztereogén centrummal is rendelkezik. Míg az L-izoleucinban lévő két királis szénatom konfigurációja *S*, mely a reakciók során nem változik, addig a védőcsoport benzil helyzetű szénatomja (a **26. ábra** esetén csillaggal jelölve) *S*- és *R*-konfigurációjú is lehet, így a reakcióban két diasztereomer képződik. A két izomert preparatív HPLC-vel nem sikerült elválasztani egymástól, valamint a kis mennyiségű anyag kevés szennyezőt is tartalmazott, így

végül ezen vegyülepár spektroszkópiái és fotokémiai karakterizációja nem készült el. **20** esetében a molekula csak egy kiralitáscentrumot tartalmaz, így a fenti reakcióban egy enantiomerpár keletkezik. **24**-et preparatív HPLC-t követően jó tisztasággal sikerült megkapni, azonban **7**-hez hasonlóan ez is egy nehezen kezelhető, olajszerű anyag volt. A szintetizált új vegyületek sötétben való stabilitását HPLC-vel ellenőriztem. A szintéziseket követően közvetlenül, valamint azt követően több héttel mintát véve a sötétben tartott anyagokból, azok tisztasága a HPLC-s mérések alapján változatlan volt.

3.2. Spektroszkópiai és fotokémiai vizsgálatok

3.2.1. A fotolízis kvantumhatékonyságának meghatározási módszere

Mint azt a *1.1. fejezetben* írtam, a maximális elnyelési hullámhossz ($\lambda_{\max}$ [nm]), a különböző hullámhosszakon vett moláris abszorpciós koeficiensek (ϵ_{λ_i} [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]) mellett a fotolabilis védőcsoportokkal ellátott vegyületek fontos tulajdonsága a fotolízisükre vonatkozó kvantumhatékonyság (Φ_u , [-]). Ennek meghatározására alapvetően két megközelítés létezik. Mindkét esetben szükségünk van a fény hatására végbemenő reakció időbeli vizsgálatára, mely során meghatározzuk a fotolízis mértékének függését a besugárzási időtől. Ennek ismeretében vagy a kísérlet során tapasztalható fotonfluxust felhasználva számolható a kvantumhatékonyság, vagy egy már jól ismert Φ -vel rendelkező rendszerrel való összehasonlítás alapján. A kísérlet során megfigyelhető fotonfluxus meghatározására aktinométereket használunk, melyek ismert kvantumhatékonyságú rendszerek. Casimiro és munkatársai egy 2022-ben publikált cikkben¹¹ kidolgoztak egy eljárást a fotonfluxus 4,4'-dimetilazobenzol (DMAB) fény hatására végbemenő reverzibilis izomerizációjának (**27. ábra**) segítségével történő meghatározására.



27. ábra: A DMAB cisz-transz izomerizációja fény hatására.

Mivel ez a fotokapcsoló vegyület a kereskedelemben kapható, valamint a használatára kidolgozott eljárás viszonylag egyszerű, én is ezt szerettem volna alkalmazni méréseim során. A fotokémiai reakció, mivel mindkét forma fotoaktív, az alábbi kinetikai egyenlettel írható le:¹¹

$$\begin{aligned} \frac{d[E]}{dt} = -\frac{d[Z]}{dt} = & -\frac{\Phi_{EZ} \cdot q}{V} \cdot \frac{\varepsilon_{E,\lambda_i} \cdot [E] \cdot f}{(\varepsilon_{E,\lambda_i} \cdot [E] + \varepsilon_{Z,\lambda_i} \cdot [Z])} + \\ & + \frac{\Phi_{ZE} \cdot q}{V} \cdot \frac{\varepsilon_{Z,\lambda_i} \cdot [Z] \cdot f}{(\varepsilon_{E,\lambda_i} \cdot [E] + \varepsilon_{Z,\lambda_i} \cdot [Z])} + k_{\Delta} \cdot [Z] \end{aligned} \quad (2)$$

Az egyenletben $[E]$ és $[Z]$ a transz és cisz formák koncentrációját $[\text{mol dm}^{-3}]$, Φ_{EZ} és Φ_{ZE} a transz-cisz és cisz-transz átalakulások kvantumhatékonyságát $[-]$, t az időt $[\text{s}]$, V az oldat térfogatát $[\text{dm}^3]$, q a beeső fotonfluxust $[\text{mol s}^{-1}]$, $\varepsilon_{E,\lambda_i}$ és $\varepsilon_{Z,\lambda_i}$ az E és Z izomerek adott hullámhosszon $[\text{nm}]$ vett moláris abszorpciós koefficienseit $[\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}]$, f a minta által elnyelt fotonok hányadát $[-]$ jelöli. Mivel ezen vegyület esetén a cisz forma termodinamikailag kevésbé stabil, így termikus úton is visszaalakulhat, az egyenletben szereplő k_{Δ} ezen folyamat reakciósebességi állandója $[\text{s}^{-1}]$. Az említett cikkben vizsgálták ezt a visszaalakulást, a korábban besugárzott mintákat sötétben állni hagyva több napot követően kapták vissza az eredeti oldatra jellemző abszorpciós spektrumot, k_{Δ} értékét $1,6 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ -nek határozták meg, így ennek a folyamatnak a hatása a kísérletek ideje alatt elhanyagolható. f értéke az oldat abszorbanciájától függ, a Lambert–Beer-törvényt felhasználva az alábbi egyenlet írható fel:

$$f = 1 - 10^{-A_{\lambda_i}} = 1 - 10^{-(\varepsilon_{E,\lambda_i} \cdot [E] + \varepsilon_{Z,\lambda_i} \cdot [Z]) \cdot l} \quad (3)$$

Az egyenletben A_{λ_i} az oldat abszorbanciáját $[-]$, l az optikai úthosszat $[\text{cm}]$ jelöli. Mivel a folyamat során mind az oldat abszorbanciája, mind az egyes formák koncentrációja az időtől függ, így a fenti differenciálegyenlet nem oldható meg analitikusan. Ennek megkerülésére az irodalomban olyan nagy koncentrációjú oldatot alkalmaznak a kísérletekhez, melynek abszorbanciája a mérés során végig 3 felett van. Ekkor f értéke 0,999, vagyis az oldat a beérkező fény legalább 99,9%-át elnyeli minden időpillanatban, így az egyenletben ennek a tagnak az elhagyása ($f \approx 1$) nem okoz érdemi hibát. Ekkor az (2)-es differenciálegyenlet megoldható, csak a koncentrációk függenek az időtől. Ennek a módszernek az alkalmazása azonban számomra nem volt lehetséges. Ennek oka, hogy az általam a vizsgálatokhoz használt fotokémiai reaktorban, a ThalesNano PhotoCube készülékében nem ismert az oldaton áthaladó fény optikai úthossza. A reaktorban ugyanis egy spektrofotométerrel ellentétben nem egy irányból érkező,

párhuzamos fénysugarak találkoznak a mintával, hanem ezek a reaktoron belül bármilyen irányból érkehetnek. Mivel ennek nyomán nem ismerjük az egyenletben szereplő I értékét, az oldat abszorbanciáját sem tudjuk pontosan megmondani. Ahhoz tehát, hogy a fotonfluxust ilyen módon meg tudjuk határozni, még töményebb oldatokkal kellene dolgozni, annak biztosítása érdekében, hogy az oldat abszorbanciája feltehetően a megfelelő tartományba essen a mérés során. Ez a megoldás azonban több szempontból sem ideális. Az általam előállított vegyületek mérése során is szükséges ismerni azok oldatainak abszorbanciáját az elnyelt fény hányadának meghatározásához. Az ezekből a vegyületekből rendelkezésre álló kis mennyiségek, valamint az oldhatósági limitációk miatt ezek esetében nem valósítható meg a hasonlóan tömény oldatokkal (ahol $f \approx 1$) való mérés, továbbá lehetséges, hogy ilyen nagy koncentrációk esetén már a Lambert–Beer-törvény sem érvényes. Ezen megfontolások alapján elvetettem a fotonfluxus számszerűsítésén alapuló kvantumhatékonyság mérést, helyette a DMAB és a fotolabilis védőcsoportokkal ellátott vegyületek azonos körülmények között történő vizsgálata alapján szerettem volna azt megállapítani.

Ha a DMAB olyan oldatából indulunk ki, mely kezdetben csak a *transz* izomert tartalmazza, és az átalakítást csak addig végezzük, amíg a *cisz* izomer mennyisége még kellően kicsi, így hozzájárulása az oldat abszorbanciájához még elhanyagolható, valamint a visszaalakulástól is eltekintünk, akkor az (2)-es egyenlet az alábbi formára egyszerűsödik:

$$\frac{d[E]}{dt} = -\frac{\Phi_{EZ} \cdot q \cdot f}{V} = -\frac{\Phi_{EZ} \cdot q \cdot (1 - 10^{-A_{E,\lambda_i}})}{V} = -\frac{\Phi_{EZ} \cdot q \cdot (1 - 10^{\varepsilon_{E,\lambda_i} \cdot l \cdot [E]})}{V} \quad (4)$$

Az általam előállított „cagelt” vegyületek esetén a reakció egyirányú, az uncaging folyamat során keletkező termékek nem tudnak visszaalakulni. A fotolízisre tehát hasonló kinetikai egyenlet írható fel:

$$\begin{aligned} \frac{d[SZB]}{dt} &= -\frac{\Phi_u \cdot q^* \cdot f^*}{V^*} = -\frac{\Phi_u \cdot q^* \cdot (1 - 10^{-A_{SZB,\lambda_i}})}{V^*} = \\ &= -\frac{\Phi_u \cdot q^* \cdot (1 - 10^{\varepsilon_{SZB,\lambda_i} \cdot l^* \cdot [SZB]})}{V^*} \end{aligned} \quad (5)$$

Az egyenletben szereplő $[SZB]$ az általam előállított valamely „cagelt” vegyület koncentrációját $[\text{mol dm}^{-3}]$ jelöli, mely függ az időtől. Amennyiben a referencia DMAB-t és a vizsgálni kívánt anyagot azonos körülmények között visszük fotokémiai reakcióba, akkor – feltételezve, hogy a reaktor fényforrásának intenzitása állandó – a mintákat érő fotonfluxus

($q = q^*$), valamint az áthaladó fénysugarak optikai úthosszai is megegyeznek ($l = l^*$). Továbbá, azonos térfogatú oldatok vizsgálata esetén ($V = V^*$), ha a kezdeti koncentrációkat úgy választjuk meg, hogy $\varepsilon_{E,\lambda_i} \cdot [E] = \varepsilon_{SZB,\lambda_i} \cdot [SZB]$ és így a kiindulási anyagok által kezdetben elnyelt fény hányada megegyezik ($f_0 = f_0^*$), akkor a két reakció kezdeti reakciósebességének hányadosa a kvantumhatékonyságok hányadosával egyezik meg:

$$\frac{\left(\frac{d[SZB]}{dt}\right)_{t=0}}{\left(\frac{d[E]}{dt}\right)_{t=0}} = \frac{-\frac{\Phi_u \cdot q^* \cdot f_0^*}{V^*}}{-\frac{\Phi_{EZ} \cdot q \cdot f_0}{V}} = \frac{\Phi_u}{\Phi_{EZ}} \quad (6)$$

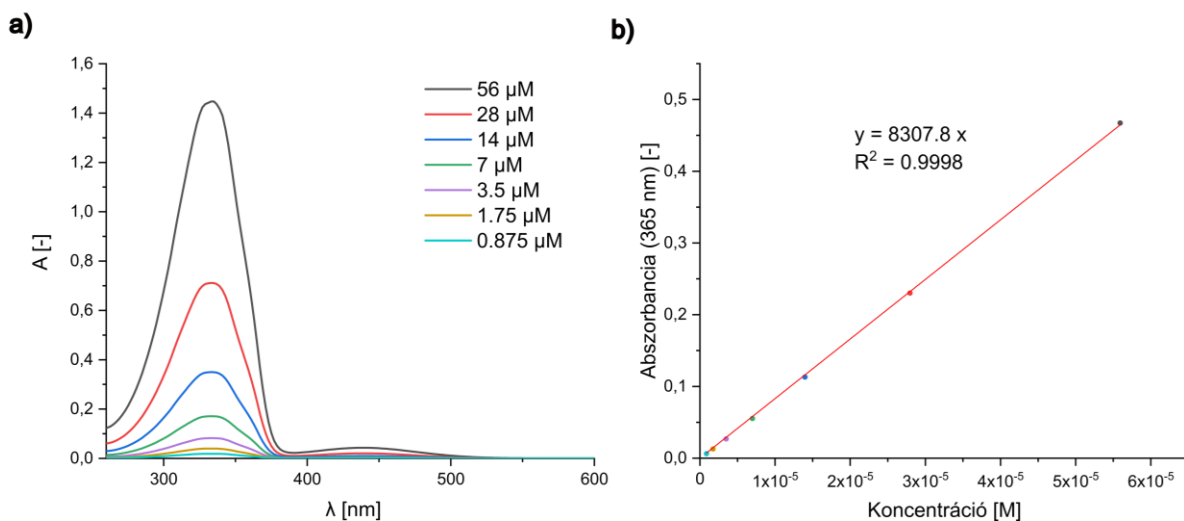
Mivel a DMAB izomerizációjának kvantumhatékonysága az irodalomban ismert, így azonos térfogatú, azonos kezdeti abszorbanciával rendelkező oldatok vizsgálata esetén könnyen kiszámolhatjuk a fotolízis kvantumhatékonyságát a kezdeti reakciósebességek alapján. Ennek meghatározására két lehetőségünk van. Az első megoldás, hogy a koncentráció időbeli változását szemléltető mérési pontokat ábrázoljuk, majd az első néhány pontra - ahol az átalakulás kvázilineáris - egyenest illesztünk, melynek meredeksége a keresett érték. Ez az eljárás azonban nem teljesen pontos, hiszen sem a referencia anyag, sem a „cagelt” vegyületek fotokémiai átalakulása valójában nem írható le egy lineáris függvénnyel (lásd 3.2.2. és 3.2.4. fejezetek). Emiatt amennyiben lehetséges, a második módszert érdemes alkalmazni, amelyben a reakciókat leíró kinetikai egyenletek segítségével nemlineáris függvényt illesztünk a mérési pontokra, majd a függvény 0 időpontbeli deriváltját vesszük, mely megegyezik a kezdeti reakciósebességgel.

3.2.2. A referencia 4,4'-dimetilazobenzol vizsgálata

A referencia anyag, a kereskedelmi forgalomban kapható DMAB szilárd kristályai kizárólag a *transz* izomert tartalmazzák. Ahhoz, hogy a vegyület *transz-cisz* izomerizációjának kezdeti sebességét meghatározzam, először ki kellett választanom, hogy a vizsgálatokat milyen hullámhosszon végezzem el. Ennek megválasztásánál több szempontot figyelembe véve, végül a 365 nm mellett döntöttem. Ennek oka, hogy ezen a hullámhosszon ismert a *transz* izomer átalakulásának kvantumhatékonysága, valamint az irodalmi adatok alapján az *E* forma moláris abszorpciós koefficiense sokszorosa a *Z* formáénak, ezen λ esetén a legnagyobb a két forma ε értékeinek hányadosa. Ez azt jelenti, hogy 365 nm-en érvényes a legtovább a (4) egyenlet felírásánál felhasznált közelítés, miszerint az izomerizáció során kezdetben elhanyagolható a *Z* forma abszorbanciája, valamint visszaalakulása. Ezen kívül fontos szempont volt, hogy a

használt fotokémiai reaktor képes ilyen hullámhosszúságú fény besugárzására, valamint, hogy itt jól vizsgálhatóak a szintetizált új vegyületek is.

Casimiro és munkatársai¹¹ cikkében a két forma 365 nm-en tapasztalható moláris abszorpciósoefficiensei acetonitril oldószerben a következők: $\varepsilon_{E,365} = 8311 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\varepsilon_{Z,365} = 101 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A *transz* DMAB oldatából kiindulva ezen a hullámhosszon kellő ideig besugározva az oldatot a *cis:transz* izomer arány 97:3-nál ér el egy fotostacionárius állapotot. Annak érdekében, hogy az *E* izomerre vonatkozó fenti adatot hitelesítsem, elvégeztem a vegyület spektroszkópai vizsgálatát. Ehhez először ismert tömegű DMAB-t oldottam acetonitrilben, majd a kapott kiindulási oldatból mintát vettem és HPLC-vel vizsgáltam azt. A frissen készült, fénytől védett oldat ez alapján kezdetben csak *transz* izomert tartalmazott. Ezt követően az oldatból hígítási sort készítettem, melyben minden oldat az előzőhöz képest feleakkora koncentrációjú volt, majd spektrofotométer segítségével felvettem az egyes oldatok spektrumát. Ezután a 365 nm-en tapasztalt abszorbancia értékeket ábrázoltam, majd azokra az origó átmenő egyenest illesztettem (**28. ábra**). A spektrumok felvételét követően a vizsgált oldatból újra mintát vettem és HPLC-vel vizsgáltam azt, mely szerint a spektroszkópai vizsgálat közben nem történt átalakulás, az oldat továbbra is csak az *E* izomert tartalmazta.

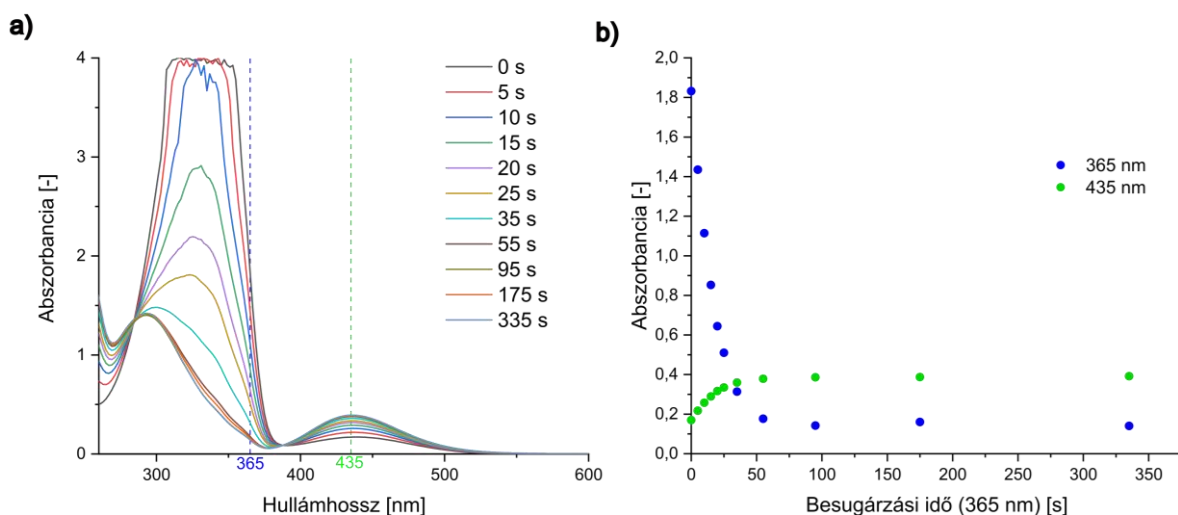


28. ábra: a) DMAB abszorpciós spektruma az UV-VIS tartományban; b) a 365 nm-en tapasztalt abszorbanciák.

Mivel a spektrofotométerben az optikai úthossz 1 cm, az illesztett egyenes meredeksége megadja az anyag moláris abszorpciósoefficiensét. Ez ebben az esetben $8308 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ -nek adódott, mely jó összhangban van az irodalmi adattal. A későbbi számolások során ezt az

általam mért adatot használtam. Az említett cikkben a fotostacionárius állapotok alapján számításos módszerekkel kapták meg a *Z* izomerre jellemző adatokat,¹¹ a továbbiakban én is az ott leírt értékeket használtam erre az izomerre.

A DMAB izomerizációjának méréséhez egy új oldatot készítettem, melynek felvettem a kezdeti spektrumát. Ezután, ismert időre a fotoreaktorba helyeztem az oldatot, ahol folyamatos kevertetés közben 365 nm-es fénnel sugároztam be azt. Adott idejű besugárzást követően újra felvettem a vegyület spektrumát, majd ezt a folyamatot ismételttem. A vegyület *E-Z* átalakulását a 365 nm-en tapasztalt egyre csökkenő, valamint a 435 nm-en – ahol a *cisz* forma rendelkezik nagyobb elnyeléssel – egyre növekvő abszorbancia jelzi (29. ábra). Látható az is, hogy a fotostacionárius állapot elég hamar, kevesebb mint két perc elteltével beáll. A használt spektrofotométerrel mérhető maximális abszorbancia 4, az a) ábrán látható spektrumok esetén ezért ez a maximum a mérés kezdeti szakaszán. A kitüntetett hullámhosszokon ez azonban nem okoz problémát, ezeken már kezdetben is a detektálási limit alatt van az abszorbancia.



29. ábra: a) Az abszorpciós spektrum változása UV fénnel történő besugárzás hatására; b) az abszorbancia változása két kitüntetett hullámhosszon.

Feltéve, hogy a reakció kezdeti szakaszán csak a *transz* forma nyel el fényt a besugárzás 365 nm-es hullámhosszán, az alábbi egyenlet írható fel:

$$\frac{d[E]}{dt} = -\frac{\Phi_{EZ} \cdot q \cdot f}{V} = -\frac{\Phi_{EZ} \cdot q \cdot (1 - 10^{-A_{E,365}})}{V} \quad (7)$$

Mivel a mérés során az abszorbanca változását vizsgáljuk, így arra kell felírnunk egy differenciálegyenletet. A Lambert–Beer-törvény felhasználásával a következő egyenlethez jutunk, melyben az abszorbanca csak az E izomer elnyelését jelenti:

$$\frac{dA_{365}}{dt} = \varepsilon_{E,365} \cdot l \cdot \frac{d[E]}{dt} = \varepsilon_{E,365} \cdot l \cdot \left(-\frac{\Phi_{EZ} \cdot q \cdot (1 - 10^{-A_{365}})}{V} \right) \quad (8)$$

Mivel az egyenletben szereplő moláris abszorpciós koefficiens, az optikai úthossz, a kvantumhatékonyság, a beeső fotonfluxus, valamint az oldat térfogata is független az időtől, ezek egy konstansba összevonhatóak:

$$C = \frac{\varepsilon_{E,365} \cdot l \cdot \Phi_{EZ} \cdot q}{V} \quad (9)$$

A (8)-as egyenlet tehát az alábbi formában írható:

$$\frac{dA_{365}}{dt} = -C \cdot (1 - 10^{-A_{365}}) = C \cdot (10^{-A_{365}} - 1) \quad (10)$$

Az egyszerűség kedvéért vezessük be az $A_{365} = x$ jelölést! Ekkor:

$$\frac{dx}{C \cdot (10^{-x} - 1)} = dt \quad (11)$$

A megfelelő határok között integrálva:

$$\frac{1}{C} \cdot \int_{x_0}^x \frac{1}{10^{-x} - 1} dx = \int_0^t dt \quad (12)$$

C -vel beszorozva, valamint a logaritmusokra vonatkozó azonosságokat felhasználva:

$$\log_{10} \left(\frac{1 - 10^{x_0}}{1 - 10^x} \right) = C \cdot t \quad (13)$$

Az egyenletet átrendezve kifejezhetjük x -et:

$$x = \log_{10} \left(1 - \frac{1 - 10^{x_0}}{10^{C \cdot t}} \right) \quad (14)$$

Mivel x_0 , vagyis a kezdeti abszorbanca szintén nem függ az időtől, bevezethetjük az alábbi paramétert:

$$B = 1 - 10^{x_0} \quad (15)$$

Ezt behelyettesítve (14)-be, megkapjuk a 365 nm-en történő abszorbanciaváltozást leíró egyenletet:

$$x = \log_{10}(1 - B \cdot 10^{-C \cdot t}) \quad (16)$$

Mivel az egyenlet csak addig érvényes ameddig a gyakorlatilag csak a *transz* izomer van az oldatban, fontos egy olyan feltétel felállítása, amely definiálja, hogy a *cisz* forma jelenlétét meddig tekintjük elhanyagolhatónak. Casimiro és munkatársai cikkéhez képest – ahol csak 20-szoros különbséget szabtak meg – én egy szigorúbb feltételt alkalmaztam, melyet az alábbi egyenlet ír le:

$$\varepsilon_{E,365} \cdot [E] > 100 \cdot \varepsilon_{Z,365} \cdot [Z] \quad (17)$$

Tehát a (16)-os egyenletet addig vettem érvényesnek amíg a *Z* izomer hozzájárulása az oldat abszorbanciájához kevesebb, mint század része az *E* formáénak. Mivel a kísérletekhez használt oldat kezdeti abszorbanciája ismert és itt csak a *transz* DMAB van jelen, így minden mérési pontban kifejezhető az egyes formák koncentrációja a 365 nm-en mért elnyelés alapján az alábbiak szerint:

$$A_{365} = \varepsilon_{E,365} \cdot [E] + \varepsilon_{Z,365} \cdot [Z] = \varepsilon_{E,365} \cdot [E] + \varepsilon_{Z,365} \cdot ([E]_0 - [E]) \quad (18)$$

Ebből kifejezve:

$$[E] = \frac{A_{365} - \varepsilon_{Z,365} \cdot [E]_0}{\varepsilon_{E,365} - \varepsilon_{Z,365}} \quad (19)$$

A számításokhoz $\varepsilon_{E,365nm}$ értékére az általam mért $8308 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ -at, míg $\varepsilon_{Z,365}$ esetén a hivatkozott cikkben számított $101 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ -t alkalmaztam. Ezek alapján az egyes mérési pontokban az oldatok koncentrációja:

1. táblázat: A DMAB izomerizációja során mért abszorbanciák és az abból számolt koncentrációk

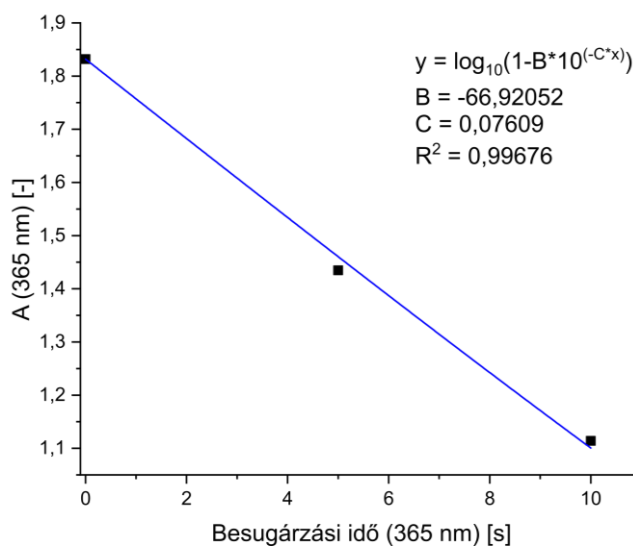
Besugárzás ideje (365 nm) [s]	Mért abszorbania (365 nm) [-]	Számolt [E] [M]	Számolt [Z] [M]	$\frac{\varepsilon_{E,365} \cdot [E]}{\varepsilon_{Z,365} \cdot [Z]}$
0	1,832	2,21E-04	0	∞
5	1,435	1,72E-04	4,84E-05	292,5
10	1,114	1,33E-04	8,75E-05	125,1
15	0,852	1,01E-04	1,19E-04	69,7

20	0,644	7,58E-05	1,45E-04	43,1
25	0,510	5,95E-05	1,61E-04	30,4
35	0,314	3,55E-05	1,85E-04	15,8
55	0,176	1,88E-05	2,02E-04	7,7
95	0,142	1,46E-05	2,06E-04	5,8
175	0,160	1,68E-05	2,04E-04	6,8
335	0,141	1,44E-05	2,06E-04	5,8

Mint az az **1. táblázat** utolsó oszlopából látszik, a (17)-es egyenletben definiált feltételnek az első három mérési pont felel meg. Ezeket a pontokat ábrázolva, majd a (16)-os egyenletnek megfelelő függvényt illesztve ezekre, megkapjuk az abszorbanca változását leíró függvényt. Míg a (16)-ban szereplő B paraméter értékét ismerjük a kezdeti abszorbanca alapján, addig C paraméter értékét nem tudjuk.

$$B = 1 - 10^{x_0} = -66,92 \quad (20)$$

Annak érdekében, hogy C paraméter értékét is megkapjam, az OriginPro 2018 szoftver segítségével történő függvényillesztést alkalmaztam, mely során B rögzített értéke mellett iterálást végeztem. A **30. ábra** mutatja az így illesztett függvényt és annak paramétereit.



30. ábra: A DMAB izomerizációjának kezdeti szakaszára illesztett függvény.

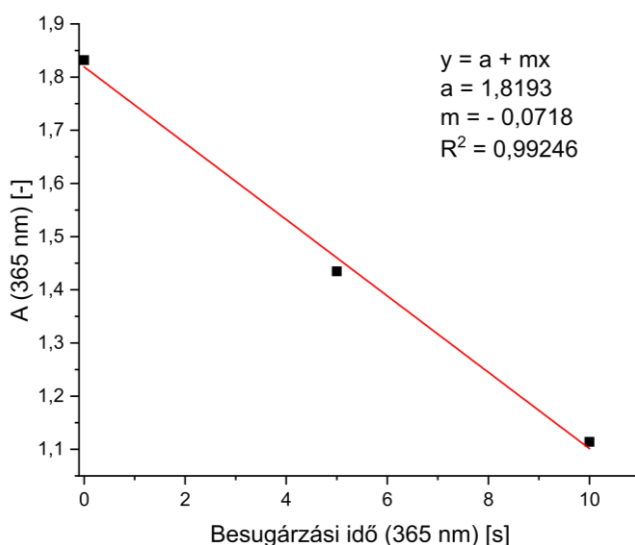
A függvény alapján számítható az abszorbanca kezdeti változása, ugyanis a (10)-es egyenlet értelmében:

$$\left(\frac{dA_{365}}{dt} \right)_{t=0} = C \cdot (10^{-x_0} - 1) = -0,0750 \text{ s}^{-1} \quad (21)$$

Ebből pedig számolható a koncentrációváltozás:

$$\left(\frac{d[E]}{dt}\right)_{t=0} = \frac{\left(\frac{dA_{365}}{dt}\right)_{t=0}}{\varepsilon_{E,365} \cdot l} = -9,024 \cdot 10^{-6} \text{ M s}^{-1} \quad (22)$$

Annak szemléltetése érdekében, hogy a kezdeti meredekség meghatározására vonatkozó két módszer között mekkora a különbség, ugyanezen pontokra egyenest is illesztettem (**31. ábra**).



31. ábra: A DMAB izomerizációjának kezdeti szakaszára illesztett egyenes.

Az egyenes meredeksége ekkor megegyezik az abszorbancia kezdeti változásával, így ebből a (22)-es egyenlethez hasonlóan számolva:

$$\left(\frac{d[E]}{dt}\right)_{t=0} = -8,642 \cdot 10^{-6} \text{ M s}^{-1} \quad (23)$$

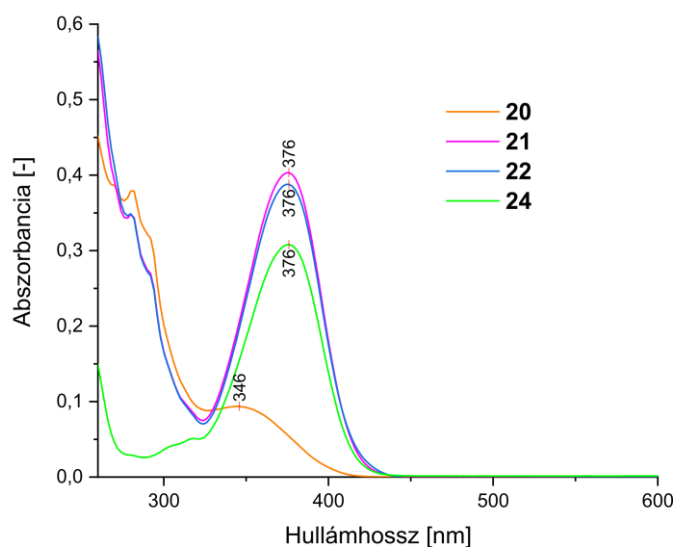
A két meghatározási módszerből kapott különböző eredmények alapján az látható, hogy az egyenes illesztése nagyjából 4%-os eltérést okoz a nemlineáris függvény illesztéshez képest. Mivel a korábban bemutatott módszer a pontosabb, így a későbbi számítások során a (22)-es egyenletben kapott értéket használtam.

3.2.3. Az új vegyületek spektroszkópiai vizsgálata

Az általam szintetizált új, fotolabilis védőcsoporttal ellátott molekulák spektroszkópiai tulajdonságainak meghatározásához spektrofotométert és spektrofluorimétert alkalmaztam.

Ezen mérések alkalmával megállapítottam az egyes molekulák maximális elnyelési hullámhosszát, az ehhez tartozó moláris abszorpciós koefficienseket, valamint vizsgáltam a 365 nm-en mutatott tulajdonságaikat. A korábban már említett megfontolásból ugyanis később ezen a hullámhosszon szerettem volna a vegyületek fotolízisére vonatkozó kísérleteket elvégezni, így szükségem volt az itt tapasztalható ϵ értékek ismeretére. Továbbá ellenőriznem kellett, hogy 365 nm-en ugyanazon átmenet gerjesztődik-e az egyes molekulákban, mint azok maximális elnyelési hullámhosszán. Amennyiben ez teljesül, a fotolízis kvantumhatékonyságát mérhetjük ezen a hullámhosszon, hiszen egyazon átmenethez ugyanaz a Φ_u érték tartozik függetlenül a gerjesztéshez használt λ -tól. Ezeken kívül mértem a vegyületek fluoreszcenciáját is, a jellemzőik még szélesebb körű feltérképezése érdekében.

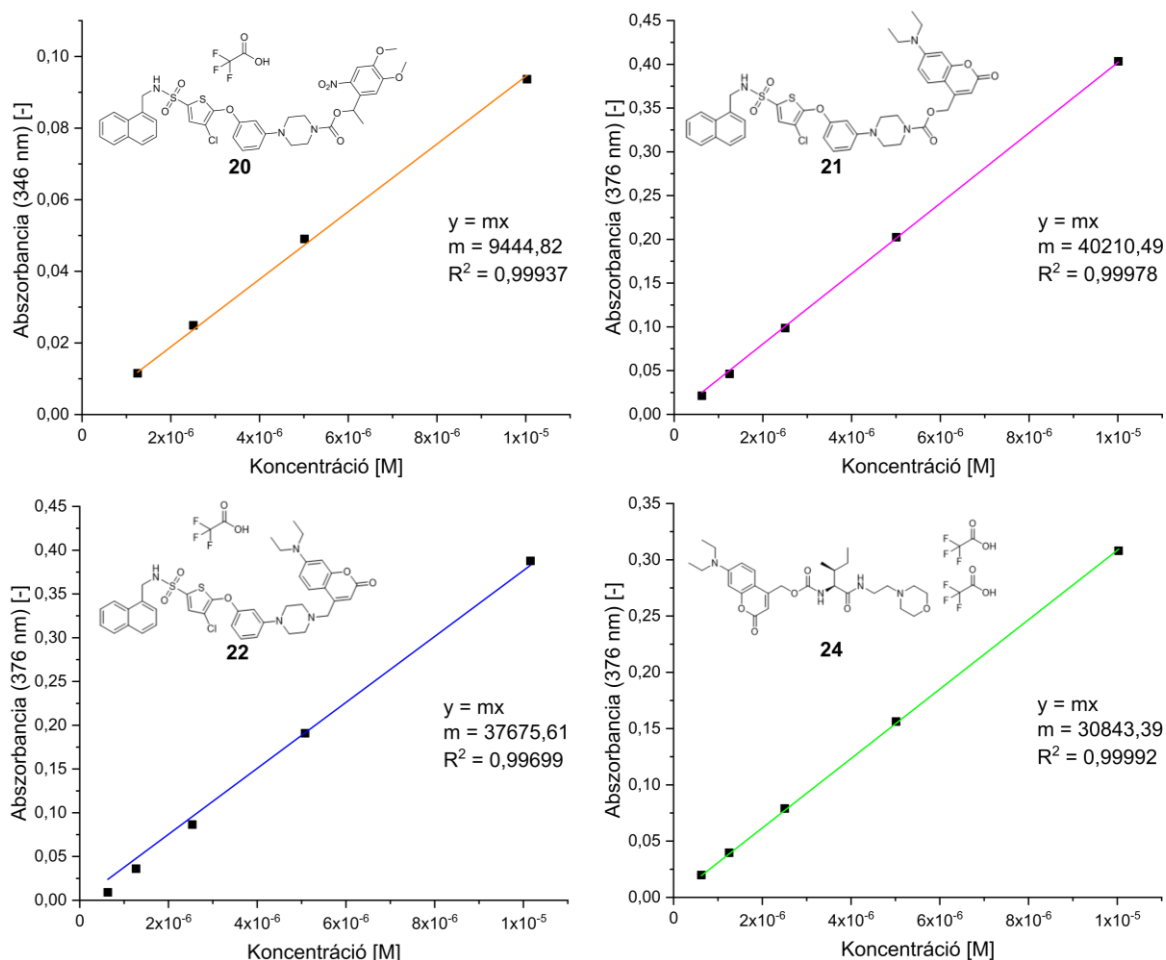
A spektrofotométerrel történő méréseket a referencia anyagnál leírtakhoz hasonlóan végeztem el. A vegyületek ismert mennyiségét annyi DMSO oldószerben oldottam, hogy 1 mM dm^{-3} -es törzsoldatokat kapjak. Ezeket acetonitrillel történő százszoros hígításban alkalmaztam a vizsgálatokhoz. Először felvettem az oldatok spektrumát, majd minden vegyület esetén hígítási sort készítettem, melyben az egyes minták az előzőhöz képest feleakkora koncentrációjúak voltak. A kiindulási oldatok ($c = 10^{-5} \text{ M}$) abszorpciós spektrumát mutatja az **32. ábra**, melyen az egyes molekulákra jellemző, a fotolízishez felhasznált átmenetekhez tartozó λ_{max} értékei is jelölve vannak.



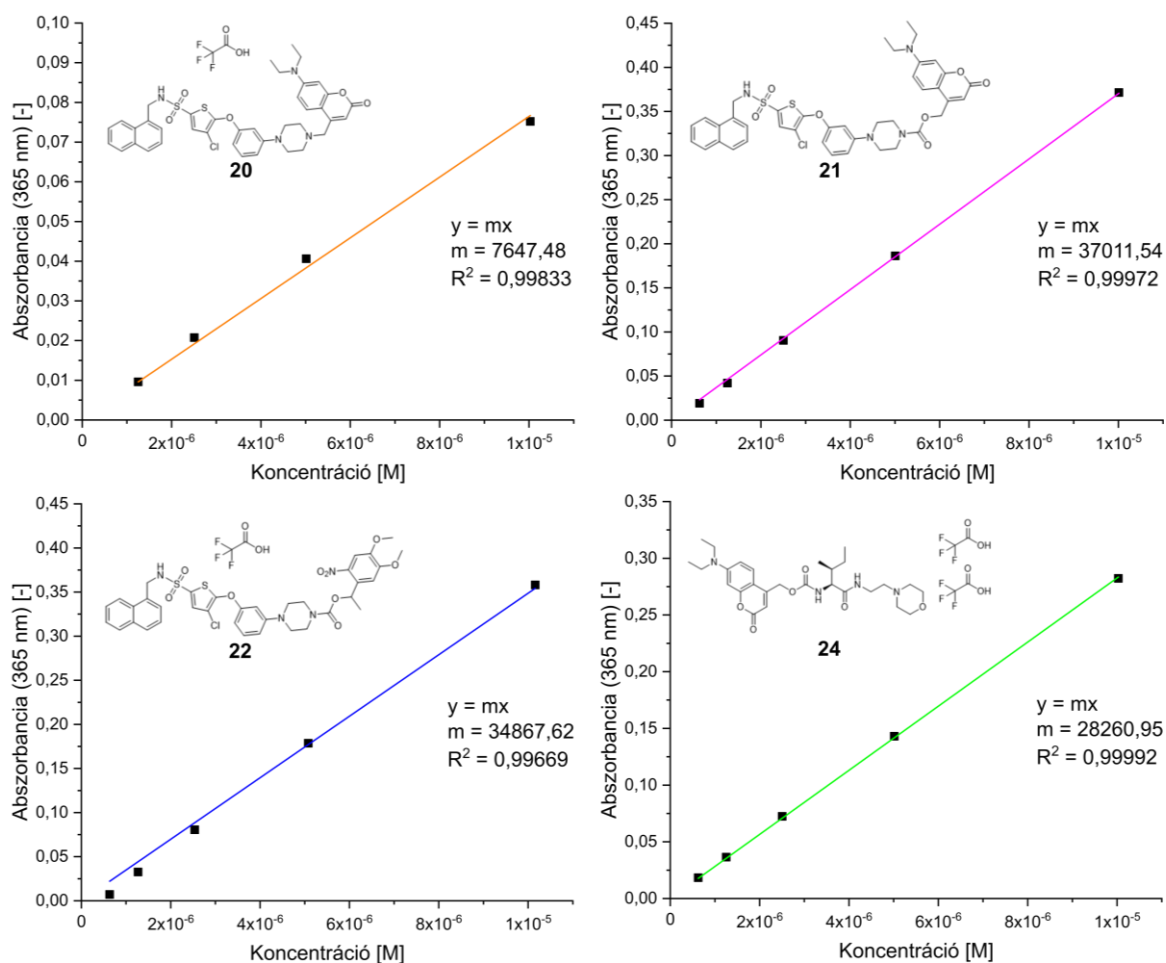
32. ábra: Az új molekulák abszorpciós spektruma 10 μM -os koncentráció esetén, DMSO:acetonitril 1:99 oldószerkeverékben, az elnyelési maximumok jelölésével.

Mint az látható, a kumarin alapváz as védőcsoportokkal kapcsolt vegyületek (21,22,24) elnyelési spektruma nagyon hasonló, $\lambda_{\max}$ értékük megegyezik, ezektől azonban jelentősen eltér az *o*-nitrobenzil (20) vázas PPG-vel kapcsolt molekula spektruma. 21, 22 és 24 is jól összehasonlíthatóak. Míg 21 és 22 esetén a védett biológiai aktivitással rendelkező vegyület a B-355252, mely maga is rendelkezik elnyeléssel az UV-VIS tartományban, addig a 24 az LM11A-31 védett származéka, melynek önmagában nincs abszorbanciája. 21 és 22 a védőcsoport kapcsolási módjában különbözik, míg utóbbi esetén közvetlenül, addig előbbinél a PPG egy karbamát kötésen keresztül kapcsolódik a B-355252-höz.

Az egyes anyagok hígítási sorának minden oldatát lemérve, az adott anyaghoz tartozó $\lambda_{\max}$ hullámhosszon és 365 nm-en ábrázoltam azok abszorbanciáját, majd a pontokra egy origón átmenő egyenest illesztve annak meredekségéből megkaptam a moláris abszorpciós koefficienseket (33. ábra és 34. ábra).



33. ábra: Az új vegyületek hígítási sorának abszorbanciája az adott vegyülethez tartozó $\lambda_{\max}$ -on, az ezekre illesztett egyenessel.



34. ábra: Az új vegyületek hígítási sorának abszorbanciája 365 nm-en, az ezekre illesztett egyenessel.

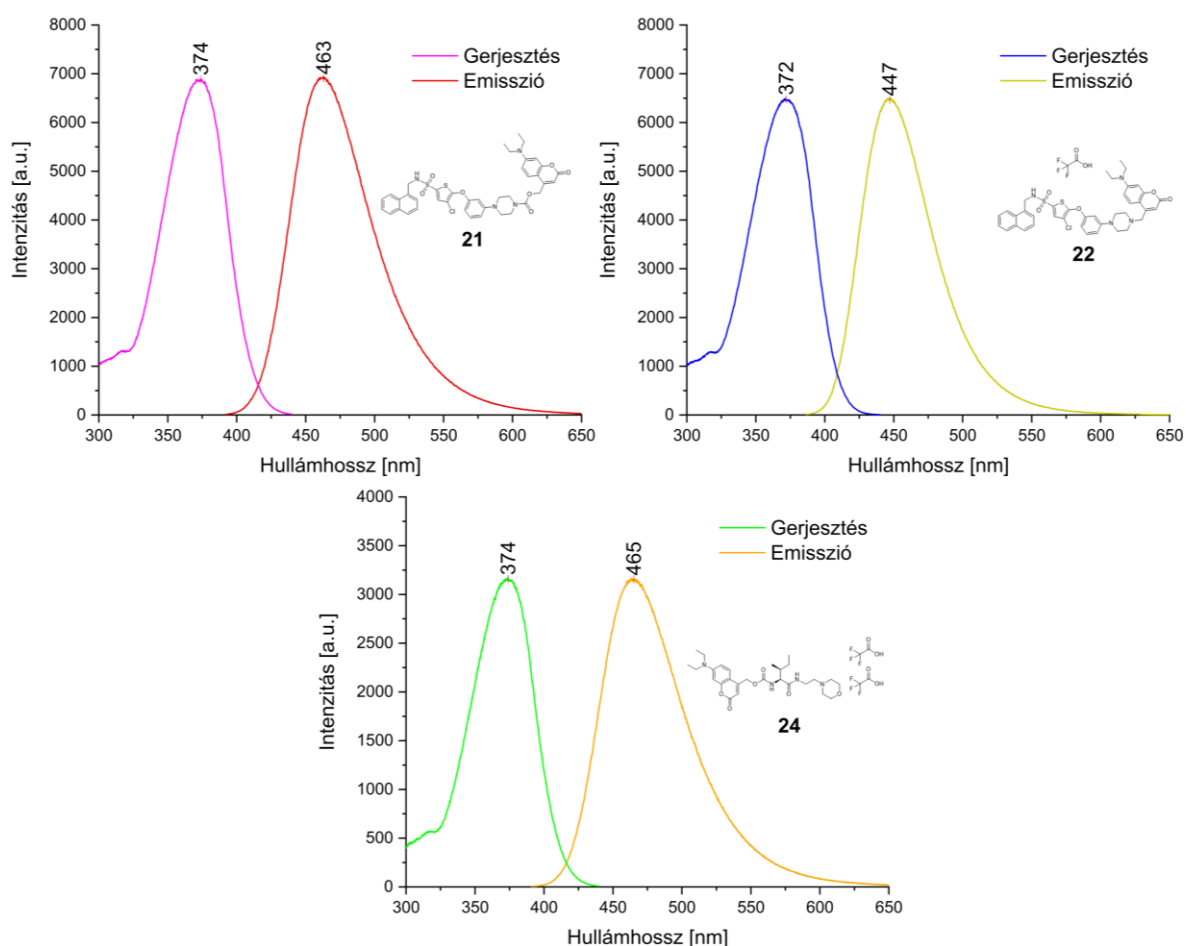
Az ezen mérések során kapott eredményeket a **2. táblázat** foglalja össze.

2. táblázat: A spektrofotometriás mérések eredményei, a moláris abszorpciós koefficienseket egésze kerekítve.

Molekula	$\lambda_{\max}$ [nm]	$\epsilon_{\lambda_{\max}}$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	ϵ_{365} [M ⁻¹ cm ⁻¹]
20	346	9445	7647
21	376	40210	37012
22	376	37676	34868
24	376	30843	28261

A photocage vegyületek esetében az az előnyös, ha fluoreszcenciájuk minél kisebb, hiszen a gerjesztett állapotból fotonok emittálásával történő relaxáció nem vezet „uncaging” folyamathoz. A molekulák fluoreszcenciájának méréséhez minden vegyület esetében a készített hígítási sor első olyan oldatát használtam, melynek $\lambda_{\max}$ -on mért abszorbanciája 0,1 alatt volt.

Míg **20** esetében ez az első, 10 μM -os oldat volt, addig **21**, **22** és **24** mérésénél rendre a 2,5 μM -os oldatokkal dolgoztam. **20** esetén nem volt megfigyelhető fluoreszcencia, a gerjesztett vegyület a relaxáció során nem emittált. A többi vegyületről felvett gerjesztési és emissziós spektrumokat a **35. ábra** mutatja, a kapott eredményeket a **3. táblázat** foglalja össze. Az ábrán látható, hogy míg **21** és **22** hasonló intenzitást mutat, **24** csak nagyjából feleakkorát.



35. ábra: Az új vegyületekről felvett gerjesztési és emissziós spektrumok.

3. táblázat: A spektrofлуорimetriás mérések eredményei.

Molekula	$\lambda_{\text{gerjesztési}}$ [nm]	$\lambda_{\text{emissziós}}$ [nm]	Stokes-eltolódás [nm]
21	374	463	89
22	372	447	75
24	374	465	91

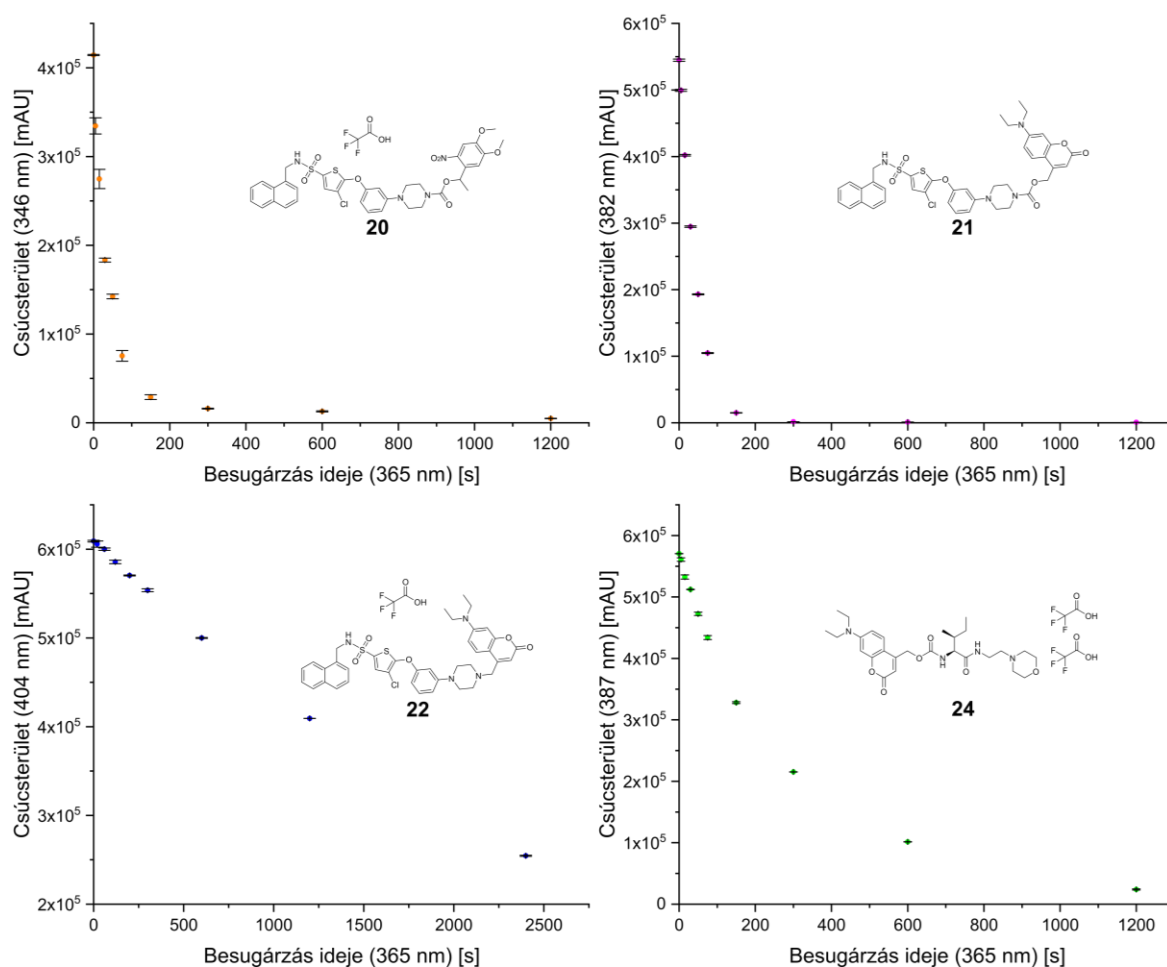
3.2.4. Fotolízis kísérletek, az új vegyületek kvantumhatékonysága

A 3.2.1. fejezetben leírtak alapján a fotolabilis védőcsoportokkal ellátott vegyületek fotolízisének vizsgálatához több tényezőt kellett biztosítanom. Ennek megfelelően a fotokémiai reaktorban ugyanazokat a beállításokat alkalmaztam, mint a referencia anyaggal végzett mérések során. Ezen kívül ugyanakkora térfogatú oldatokkal dolgoztam, mint a DMAB esetében, valamint minden kísérlet előtt spektrofotométer segítségével meggyőződtem róla, hogy kezdetben teljesül az alábbi összefüggés:

$$\varepsilon_{SZB,365} \cdot [SZB] = \varepsilon_{E,365} \cdot [E] \quad (24)$$

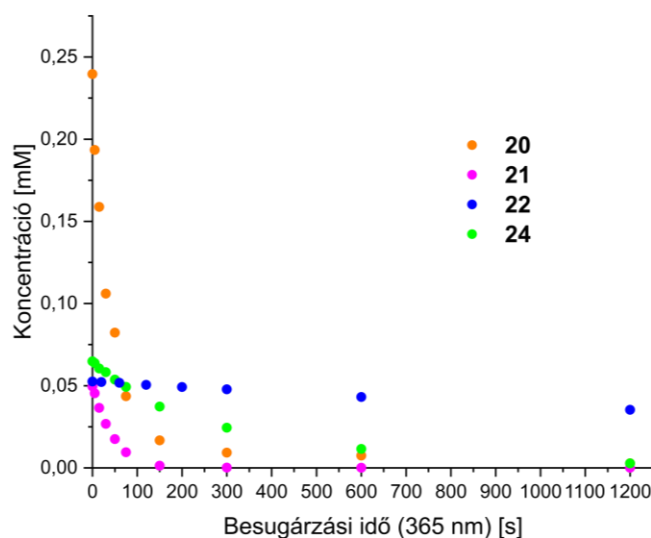
A (24)-es egyenletben szereplő ε -ok és koncentrációk az általam előállított új vegyületek és a *transz*-DMAB 365 nm-en mért moláris abszorpciós koefficiensei, valamint koncentrációi. Amennyiben ez az egyenlet érvényes, úgy annak ellenére, hogy a fotokémiai reaktoron belüli optikai úthossz nem ismert, a két oldat kezdeti abszorbanciája meg fog egyezni.

Az egyes vegyületekből DMSO oldószerben törzsoldatokat készítettem, majd a spektroszkópiai mérésekhez hasonlóan ezekből acetonitrillel történő nagyjából százszoros hígítással kaptam meg a vizsgálatokhoz használt oldatokat. Ezeket a fotokémiai reaktorba helyezve, állandó kevertetés mellett 365 nm-es fénnel sugároztam be, bizonyos időközönként mintát véve az oldatból. A minták HPLC-s vizsgálata segítségével, egy adott hullámhosszon detektált csúcsterület alapján követtem a kiindulási anyag koncentrációjának változását. A csúcsterületek változását mutatja a **36. ábra**. Minden minta két alkalommal került injektálásra HPLC-ben, az ábrázolt pontok ezek átlagát, míg a hibasávok a mérések szórását jelölik. Mivel a fotolízis során keletkező anyagok is adnak jelet HPLC-ben, így a detektáláshoz olyan hullámhosszokat választottam, amelyen a kiindulási anyag csúcsa jól elválik a többitől, így könnyen integrálható. A **20**-as vegyület esetén nem sikerült ilyet találni, a PPG-vel ellátott vegyület csúcsa átlapolt egy, tőle kicsivel nagyobb retenciós idővel rendelkező csúccsal. Emiatt feltételezve, hogy a csúcs szimmetrikus, annak csak az első felét integráltam, az ábrázoláshoz használt értékek ennek a kétszeresei.



36. ábra: A cagelt vegyületek fotolízis kísérletek során mért HPLC csúcsterületei, a hibasávokkal az egyes mintákhoz tartozó mérések szórását jelölve.

Tekintettel a híg mintákra, a HPLC diódasoros detektora által mért abszorbanciák esetén feltételezhető, hogy a csúc alatti terület és a koncentráció egyenesen arányos. Ezért, minden anyag esetén a kiindulási koncentrációk ismeretében az első (0 időpontbeli) mintához tartozó csúcsterület alapján határoztam meg a két mennyiség közötti arányt. Így az összes mérési pontban kapott csúcsterületet át tudtam váltani koncentrációra. Az így számolt koncentrációk időbeli változását a **37. ábra** szemlélteti. A kiindulási koncentrációk különbségének oka a (24)-es egyenlettel leírt feltétel, hiszen a különböző vegyületek eltérő moláris abszorpciós koefficiensekkel rendelkeznek.



37. ábra: Az egyes molekulák koncentrációjának változása UV fény hatására.

A kezdeti reakciósebesség meghatározását a referencia anyaghoz hasonlóan végeztem, a fotolízis kinetikáját leíró (5)-ös egyenletből kiindulva:

$$\frac{d[SZB]}{dt} = - \frac{\Phi_u \cdot q^* \cdot (1 - 10^{\varepsilon_{SZB, \lambda_i} \cdot l^* \cdot [SZB]})}{V^*} \quad (5)$$

Mivel az egyenletben szereplő kvantumhatékonyság, beeső fotonfluxus, valamint az oldat térfogata nem változnak a mérés során, így azok összevonhatóak egy konstansba. Hasonlóan az anyagok moláris abszorpciós koefficiensei, valamint az optikai úthossz is állandóak, így ezek is egy tagba összevonhatóak:

$$a = \frac{\Phi_u \cdot q^*}{V^*} \quad (25)$$

$$b = \varepsilon_{SZB, \lambda_i} \cdot l^* \quad (26)$$

Így a (5)-ös egyenletet az alábbi formában írhatjuk, a vizsgált anyag koncentrációját egyszerűen c -vel jelölve:

$$\frac{d[SZB]}{dt} = \frac{dc}{dt} = -a \cdot (1 - 10^{-b \cdot c}) \quad (27)$$

Ezt az egyenletet a megfelelő határok között integrálva, majd átrendezve:

$$\int_{c_0}^c \frac{1}{1 - 10^{-b \cdot c}} dc = \int_0^t -a dt = -a \cdot t \quad (28)$$

$$\frac{|10^{b \cdot c} - 1|}{|10^{b \cdot c_0} - 1|} = 10^{-a \cdot b \cdot t} \quad (29)$$

Mivel az egyenletben szereplő b paraméter és c értéke is biztosan pozitív – hiszen a moláris abszorpciós koefficiens, az optikai úthossz és a koncentráció is pozitív érték – így a bal oldalon elhagyható az abszolút érték, ugyanis mind a számláló, mind a nevező biztosan pozitív szám lesz:

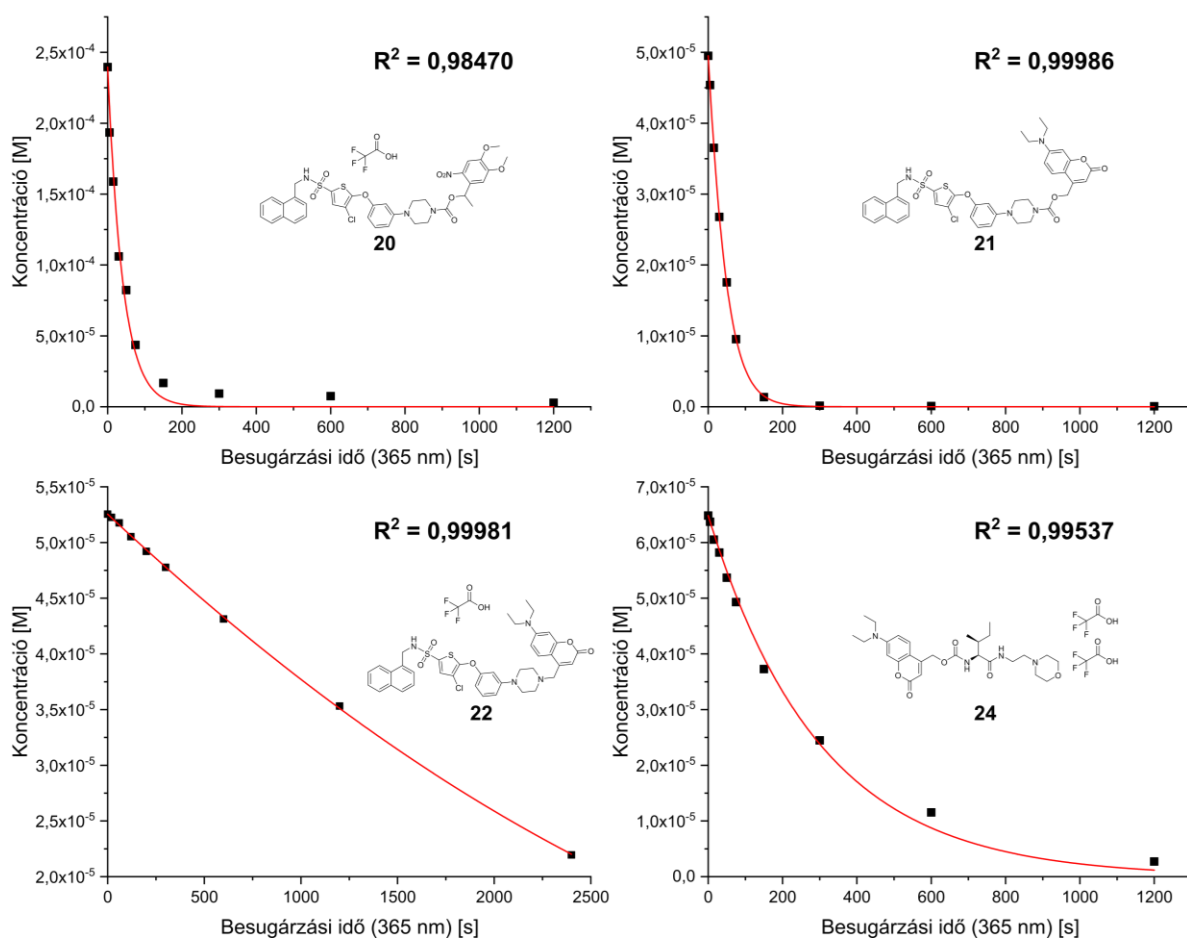
$$\frac{10^{b \cdot c} - 1}{10^{b \cdot c_0} - 1} = 10^{-a \cdot b \cdot t} \quad (30)$$

Ezt az egyenletet átrendezve ki tudjuk fejezni az adott időpontbeli koncentrációt:

$$10^{b \cdot c} = 10^{b \cdot (c_0 - at)} - 10^{-a \cdot b \cdot t} + 1 \quad (31)$$

$$c = \frac{\log_{10}(10^{b \cdot c_0} + 10^{a \cdot b \cdot t} - 1)}{b} - a \cdot t \quad (32)$$

Hasonlóan a referencia anyagnál leírtakhoz, az így kapott függvényt az OriginPro 2018 szoftver segítségével iterálást végezve a mérési pontokra illesztettem (**38. ábra**).



38. ábra: A mérési pontokra illesztett görbék a (32)-es egyenlet alapján.

A **20**-as vegyület esetében a némileg rosszabb illeszkedést vélhetően a HPLC-s mérések alapján kapott csúcsterületek pontatlansága okozza, a korábban leírt integrálási nehézségek következtében. Az illesztések alapján kapott paraméterek segítségével kiszámolható a görbék meredeksége a 0 időpontban, amely megadja a kezdeti reakciósebességet. Ennek ismeretében meg tudjuk határozni az egyes vegyületek fotolízisére jellemző kvantumhatékonyságot a referenciával való összehasonlítás alapján. A számítást a **22**-es vegyület példáján mutatom be, mely esetén az illesztett görbe paraméterei $a = 2,369 \cdot 10^{-8} \text{ M s}^{-1}$ és $b = 9560 \text{ M}^{-1}$. A (27)-es egyenlet alapján:

$$\left(\frac{dc}{dt}\right)_{t=0} = -a \cdot (1 - 10^{-b \cdot c_0}) \quad (33)$$

A **22**-es vegyület esetén behelyettesítve:

$$\left(\frac{d[22]}{dt}\right)_{t=0} = -a \cdot (1 - 10^{-b \cdot [22]_0}) = -1,624 \cdot 10^{-8} M s^{-1} \quad (34)$$

Így az (6)-os egyenletnek megfelelően:

$$\Phi_u = \Phi_{EZ} \cdot \frac{\left(\frac{d[22]}{dt}\right)_{t=0}}{\left(\frac{d[E]}{dt}\right)_{t=0}} = 0,18 \cdot \frac{-1,624 \cdot 10^{-8} M s^{-1}}{-9,024 \cdot 10^{-6} M s^{-1}} = 3,24 \cdot 10^{-4} \quad (35)$$

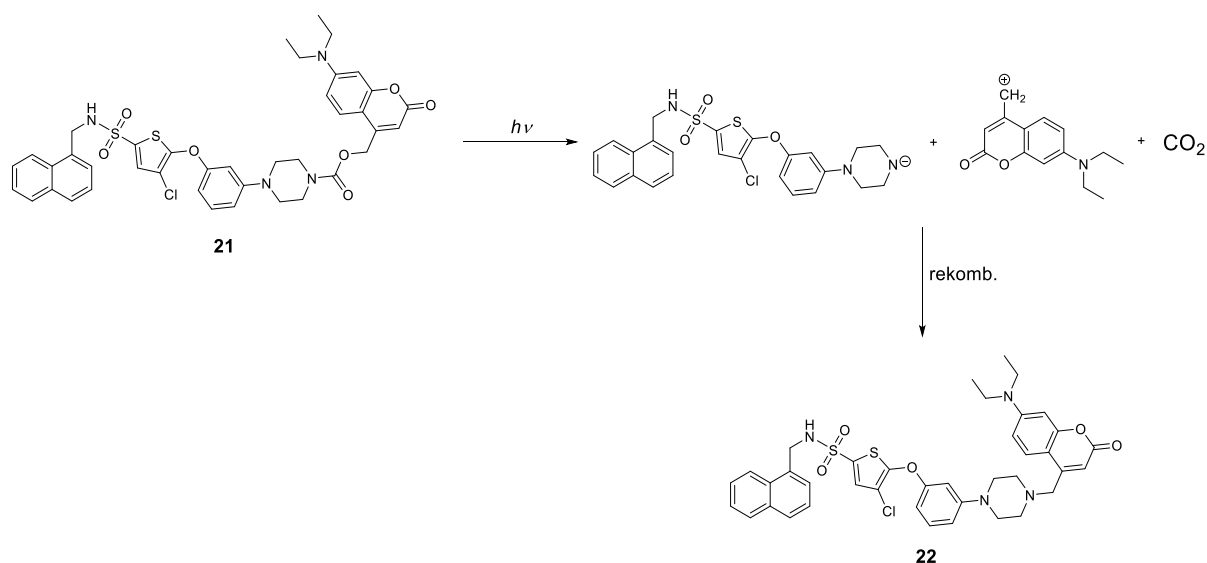
A számításokat minden vegyület esetében hasonlóan végezve, a kapott eredményeket a táblázat foglalja össze:

4. táblázat: Az új molekulák fotolízisére jellemző számított adatok.

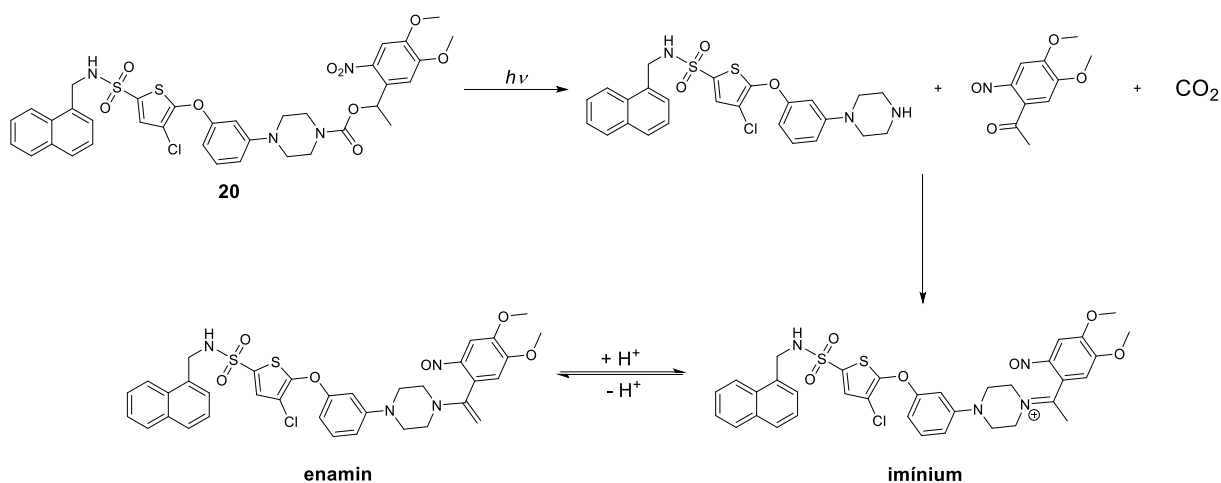
Molekula	$\left(\frac{dc}{dt}\right)_{t=0} [M s^{-1}]$	$\Phi_u [-]$
20	$-5,872 \cdot 10^{-6}$	0,117
21	$-9,402 \cdot 10^{-7}$	0,0188
22	$-1,624 \cdot 10^{-8}$	$3,24 \cdot 10^{-4}$
24	$-2,165 \cdot 10^{-7}$	$4,32 \cdot 10^{-3}$

Fontos megjegyezni, hogy a kapott kvantumhatékonyságok a kísérletekben használt közegben érvényesek és az egyes vegyületek fotolízisére vonatkoznak, nem jellemzik közvetlenül a biológiailag aktív molekulák felszabadulását. A leírt vizsgálatok során alkalmazott közeg (főleg acetonitril) ugyanis eltér a biológiai felhasználás során jelenlévő vizes közegtől. Ez elsősorban a kumarin alapvázsal rendelkező fotolabilis védőcsoportok esetén okoz különbségeket, hiszen ezek fotolízise során a heterolitikus kötéshasadást követően egy szoros ionpár alakul ki (lásd 1.1.6. fejezet). Míg vizes közegben a kialakuló kation az oldószerrel reagálva alkohollá alakul, addig az általam használt közeg csak nyomokban tartalmaz vizet, valamint más reagálni képes nukleofil jellegű ágensek sincsenek jelen. Ennek következtében az általam használt kísérleti körülmények között a kialakuló ionok rekombinációja nagyobb mértékben megy végbe, mint az biológiai környezetben történne. Ez több következménnyel is jár. Egyrészt, a kiindulási anyag koncentrációjának változását követve a vizes közeghez képest némileg kisebb kvantumhatékonyságot fogunk mérni a heterolízist követő visszaalakulás miatt. Ez a hatás főleg a **22-es** vegyület esetén jelentős, ahol a védőcsoport közvetlenül van kapcsolva. **21** és **24** esetében a kötéshasadást követően valószínűleg kisebb a visszaalakulás mértéke a kialakuló karbamát alacsony nukleofilitása miatt. Másrészt, a dekarboxileződést követően is

végbemeget rekombináció, mely a kiindulási anyag koncentrációját ugyan nem befolyásolja, az aktív vegyület felszabadulását igen. **21** fotolízisének HPLC-vel történő vizsgálatakor például a szabad B-355252 mellett **22** is jelen volt a mintákban (**39. ábra**). A kísérletek során nemcsak a kumarin vázas, de az *o*-nitrobenzil vázas védőcsoportot tartalmazó **20** esetén is lejátszódtak mellékreakciók. Így például a HPLC-MS jelek alapján vélhetően az uncaging folyamat során keletkező nitrozobenzaldehid reagált a felszabaduló szabad amin egy részével, azzal imíniumot képezve, mely enaminná alakulhat (**40. ábra**).



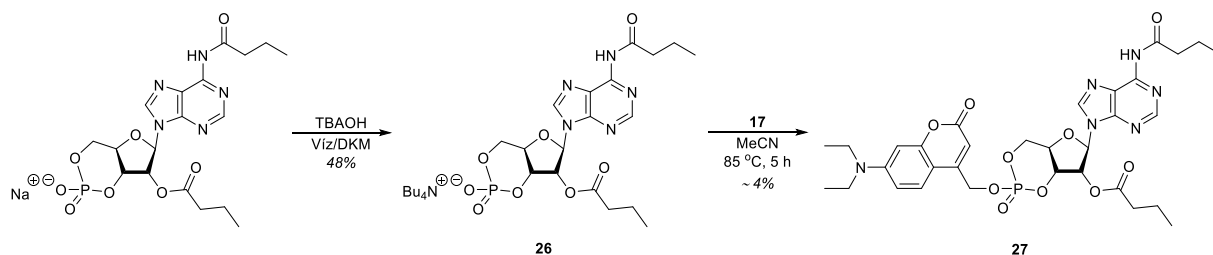
39. ábra: A **21**-es vegyület fotolízise során keletkező ionok rekombinációja **22**-vé.



40. ábra: A **20**-as vegyület fotolízise során keletkező feltételezett melléktermék.

4. Jövőbeli tervek

A dolgozatomban bemutatott kutatómunkám következő lépéseként a vizsgált **20**, **21**, **22** és **24** molekulákat szeretném nagyobb mennyiségben előállítani. **25** esetében a nagyobb mennyiségű termék szintézise mellett szeretném megvalósítani a **25a** és **25b** diasztereomerek elválasztását, valamint ezek spektroszkópai és fotokémiai karakterizálását. A nagyobb mennyiségek előállítása érdekében természetesen vizsgálni szeretném a már elvégzett reakciók alacsony termelésének okát, a melléktermékek visszaszorításának lehetséges módjait. Ezen kívül szeretném a B-355252 és LM11A-31 mellett egy harmadik vegyület, a bukladezin (dibutiril-adenozin-ciklofoszfát, DBcAMP) fotolabilis védőcsoportokkal történő kapcsolását is megvalósítani. Ez a vegyület ugyanazon jelátviteli útvonal egy későbbi pontját befolyásolja, mint az NGF és LM11A-31, a molekula neuritok növekedésére gyakorolt serkentő hatását már több kutatásban is megmutatták.^{104,105} A cagelt vegyület előállítására már történt próbareakció, melyet az irodalomban a cAMP védésére leírt módszerrel analóg módon végeztem, a bukladezin nátrium sójából kiindulva (**41. ábra**). Bár a reakcióelegy HPLC-MS vizsgálata alapján keletkezett a kívánt termék, ennek mennyisége olyan kicsi volt, hogy preparatív HPLC-vel történő tisztítást követően nem sikerült izolálni további analitikai vizsgálatokra elegendő szilárd anyagot. Céлом, hogy a jövőben ezt a vegyületet is nagyobb mennyiségben sikeresen szintetizáljam és vizsgáljam annak tulajdonságait.



41. ábra: A bukladezin védésére végzett próbareakció.

Ezekén kívül a jövőben szeretném a fotolabilis védőcsoporttal ellátott molekulák vízdíszhatóságát vizsgálni, majd azok spektroszkópai és fotokémiai karakterizálását vizes közegben is elvégezni a 3.2.4. fejezetben említett okokból. Ezt követően a kutatóintézetünk biológiai osztályával együttműködve célunk a vegyületek *in vitro* biológiai tesztelésére alkalmas mérési elrendezést kidolgozni. Ezen kísérletek során a vegyületek lézermikroszkópok segítségével kiváltott térben és időben kontrollált fotolízisét követően szeretnénk vizsgálni azok sérült neuronokra gyakorolt hatását, valamint az irányított axon növekedés

megvalósíthatóságát. Amennyiben ezen kísérletek sikerrel járnak, később *in vivo* vizsgálatokat is szándékunkban áll végezni idegszöveteken. Az 1.3. fejezet alapján ezeket a kísérleteket elsősorban kétfoton lézerek használatával szeretnénk végezni, így a molekulák kétfoton abszorpcióját is kívánom vizsgálni a jövőben.

Amennyiben szükséges, szeretném a biológiailag aktív vegyületek speciális (például a vízdoldhatóságot növelő) csoportokat tartalmazó PPG-k felhasználásával is megvalósítani. Ezeken kívül célom a jövőben olyan származékok előállítása, melyek az uncaging folyamat követését lehetővé tevő fluorogén jelzőmolekulával vannak ellátva.^{106,107}

5. Kísérleti munka

5.1. A szintézisek során használt vegyszerek, eszközök és műszerek

A különböző vegyületek előállításához a kereskedelmi forgalomban kapható vegyszereket és oldószereket használtam, melyeket a következő cégektől szereztünk be: Sigma-Aldrich (Merck), Fluorochem (Doug Discovery), Molar Chemicals, VWR. A vásárolt anyagok mindegyike megfelelő tisztaságú volt a felhasználáshoz, előzetes tisztítást nem végeztem egy esetben sem.

A mikrohullámú reaktorban végzett reakciókhoz az Anton Paar Monowave 450 típusú készüléket használtam. A reakciók követésére vékonyréteg kromatográfiát (VRK) és nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát (HPLC) alkalmaztam. A VRK vizsgálatokhoz Merck Kieselgel 60 F254-es szilikalapot alkalmaztam alumínium hordozón, az eredmények detektálásához UV lámpát, előhívószerként jódgőzt (jódkádban), valamint Pancaldi oldatot (foszfor-molibdénsav és cérium(IV)-szulfát oldata 4%-os kénsavban) használtam. A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát egy RP-HPLC-UV/VIS-MS rendszerrel, a Shimadzu Nexera LC-40-LCMS-2020 típusú készülékkel végeztem, elektropray ionizációval (ESI). Az alkalmazott oszlop típusa Ascentis Express 90 Å C18, 50 mm × 2,1 mm, 2 µm, a mérések elvégzéséhez háromfajta módszert használtam, melyek az eluensekben és a mérések hosszában különböztek:

1. módszer: Az eluens áramlási sebessége 0,8 ml min⁻¹. Az A eluens 0,1 %-os vizes TFA oldat, B eluens acetonitril. A módszer teljes időtartama 8 perc, a gradiens elúció során a B eluens aránya 5 %-ról 100 %-ra nőtt lineárisan 3,8 perc alatt.

2. módszer: Az eluens áramlási sebessége 0,8 ml min⁻¹. Az A eluens 0,4 g/l NH₄HCO₃ vizes oldata, B eluens acetonitril. A módszer teljes időtartama 8 perc, a gradiens elúció során a B eluens aránya 5 %-ról 100 %-ra nőtt lineárisan 3,8 perc alatt.

3. módszer: Az eluens áramlási sebessége 0,6 ml min⁻¹. Az A eluens 0,1 %-os vizes TFA oldat, B eluens acetonitril. A módszer teljes időtartama 11 perc, a gradiens elúció során a B eluens aránya 5 %-ról 100 %-ra nőtt lineárisan 5,7 perc alatt.

A reakciókban keletkezett termékek tisztítását flash kromatográfiával vagy preparatív HPLC-vel valósítottam meg. Az ezek során alkalmazott oldószerek az egyes recepteknél

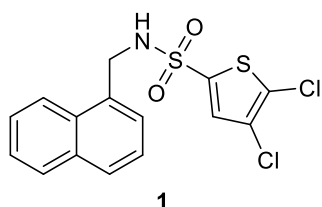
vannak feltüntetve. A flash kromatográfiás elválasztást egy Interchim Puriflash XS 520 Plus berendezéssel végeztem, különböző méretű Puriflash Interchim és RediSep Bronze oszlopokon. A preparatív HPLC-s tisztításokhoz a Teledyne ACCQ Prep HP150 készüléket alkalmaztam, Gemini 250 x 50,00 mm; 10 μ m, C18 töltött oszloppal.

A termékek szerkezetének validálásához és azok tisztaságának elemzéséhez azok NMR spektrumai is fel lettek véve. A spektrumok 400 MHz-nek megfelelő térerősségű Varian Mercury Plus (Agilent Technologies), valamint 300/400/500/600 MHz-nek megfelelő térerősségű Varian Unity INOVA berendezésekkel készültek. A kémiai eltolódás (δ) értékeket ppm-ben, a csatolási állandókat (J) Hz mértékegységben tüntettem fel az egyes anyagoknál. A jelek multiplicitásának jelölésére az alábbi rövidítéseket alkalmaztam; s: szingulett, d: dublett, t: triplett, q: kvartett, br: kiszélesedett jelek, m: multiplett.

Az egyes vegyületeknél feltüntetett $\lambda_{\max}$ értékek a legkisebb energiájú gerjesztéshez tartozó elnyelési maximum hullámhosszát jelölik. Az anyagok HR-MS-sel történő vizsgálatára a dolgozat beadását követően kerül sor.

5.2. Az elvégzett reakciók részletes leírása

5.2.1. 4,5-Diklór-N-(naftalin-1-ilmetil)tiofén-2-szulfonamid (1)



Egy gömblombikot vákuum és N_2 segítségével inertizáltam, majd bemértem a 2,3-diklórtiofén-5-szulfonil-kloridot (800 mg; 3,18 mmol) és vízmentes DKM-ben oldottam (20 ml). Ezt követően az 1-naftilmetilamint is hozzáadtam az oldathoz (500 mg; 3,18 mmol), melynek hatására az zavarossá vált. Ezután TEA-t adtam az elegyhez (0,672 ml; 4,82 mmol), amely újra kitisztult, majd szobahőmérsékleten egy héten keresztül kevertettem. Ezt követően 20 ml desztillált vizet adtam az elegyhez, majd 2×50 ml DKM-el extraháltam azt. Az egyesített szerves fázisokat 50 ml telített vizes NaCl-oldattal mostam, majd $MgSO_4$ -on szárítottam. Az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével távolítottam el, a kapott nyersteget flash kromatográfiával tisztítottam (0–30% EtOAc hexánban, lineáris gradiens). Termelés: 92% (1090 mg), fehér kristályos anyag.

HPLC:

Retenciós idő: 4,69 perc (1. módszer)

$\lambda_{\max}$: 272 nm

MS(ESI+): $MW(M+H)^+ =$ nem ionizálódik

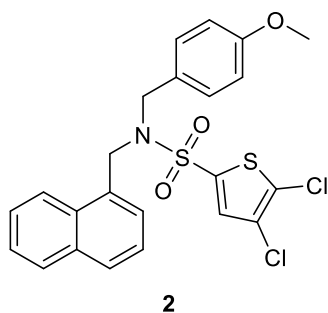
Elméleti molekulatömeg a $C_{15}H_{12}Cl_2NO_2S_2^+$ $[MW(M+H)^+]$ összegképletre számolva: 371,9681 Da

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7,94 – 7,90 (m, 1H); 7,89 – 7,85 (m, 1H); 7,85 – 7,81 (m, 1H); 7,58 – 7,49 (m, 2H); 7,42 – 7,36 (m, 2H); 7,24 (s, 1H); 4,93 (t, $J=5,7$ Hz, 1H); 4,69 (d, $J=5,7$ Hz, 2H)

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 137,19; 133,82; 131,40; 131,11; 131,01; 130,45; 129,55; 128,93; 127,41; 126,96; 126,24; 125,18; 124,67; 122,89; 45,83

Irodalom: 65

5.2.2. 4,5-Diklór-*N*-(4-metoxibenzil)-*N*-(naftalin-1-ilmetil)tiofén-2-szulfonamid (2)



Egy gömblombikba bemértem a benziltriethylammónium-kloridot (55,1 mg; 0,242 mmol) és kálium-jodidot (80,3 mg; 0,483 mmol), majd N_2 segítségével inertizáltam a lombikot. Ezután a nátrium-hidridet (290 mg; 7,25 mmol) is bemértem folyamatos gyenge nitrogénáram mellett. A lombikot jeges vízzel 0 °C-ra hűtöttem, majd folyamatos hűtés közben fecskendő és tű segítségével

szeptumon keresztül lassan beadagoltam az 1-es anyag (1800 mg; 4,83 mmol) DMF-ben (15 ml) készült oldatát. 15 perc kevertetést követően szintén a szeptumon keresztül az elegyhez adtam a 4-metoxibenzil-kloridot (0,983 ml; 7,25 mmol), majd a lombik tartalmát öt napig szobahőmérsékleten kevertettem. Ezt követően 7,5 ml desztillált vizet adtam a reakcióelegyhez, majd azt 2×100 ml EtOAc-vel extraháltam, az egyesített szerves fázisokat 100 ml vízzel, majd 100 ml telített sóoldattal mostam. Az oldatot $MgSO_4$ -on szárítottam, majd az oldószert vákuumban eltávolítottam. A terméket flash kromatográfiával tisztítottam (0–20% EtOAc hexánban, lineáris gradiens). Termelés: 92% (2190 mg), fehér kristályos anyag.

HPLC:

Retenciós idő: 5,27 perc (1. módszer)

λ_{max} : 281 nm

MS(ESI+): $MW(M+H)^+ = 492/494$ Da

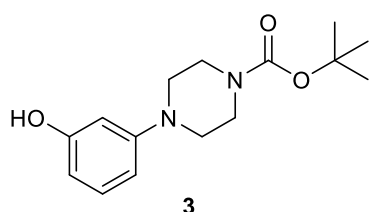
Elméleti molekulatömeg a $C_{23}H_{20}Cl_2NO_3S_2^+$ $[MW(M+H)^+]$ összegképletre számolva: 492,0256 Da

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8,08 – 8,01 (m, 1H); 7,84 – 7,74 (m, 2H); 7,52–7,45 (m, 2H); 7,40 – 7,31 (m, 2H); 7,11 (s, 1H); 6,95 – 6,86 (m, 2H); 6,65 – 6,58 (m, 2H); 4,84 (s, 2H); 4,29 (s, 2H); 3,72 (s, 3H)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 159,10; 136,86; 133,70; 131,63; 130,96; 130,77; 129,96; 129,78; 129,24; 128,61; 127,72; 126,97; 126,55; 125,99; 124,96; 124,72; 123,43; 113,59; 55,25; 51,06; 50,24

Irodalom: 65

5.2.3. *Terc*-butil-4-(3-hidroxifenil)piperazin-1-karboxilát (3)



Egy gömblombikba bemértem az 1-(3-hidroxifenil)-piperazint (500 mg; 2,81 mmol) és a di-*terc*-butil-dikarbonátot (673 mg; 3,09 mmol), majd ezeket száraz THF-ben (15 ml) oldottam. Az elegyet szobahőmérsékleten kevertettem 5 órán keresztül, ezt követően az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével

eltávolítottam. A termék további tisztítására a HPLC-s mérések alapján nem volt szükség. Termelés: 89% (697 mg), bézs színű szilárd anyag.

HPLC:

Retenciós idő: 3,51 perc (1. módszer)

λ_{max} : 273 nm

MS(ESI+): MW(M+H)⁺ = 279 Da

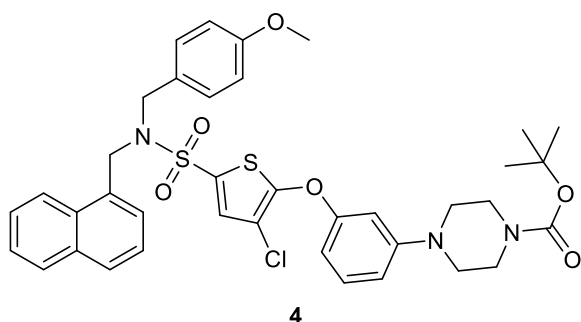
Elméleti molekulatömeg a C₁₅H₂₃N₂O₃⁺ [MW(M+H)⁺] összegképletre számolva: 279,1703 Da

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7,11 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H); 6,48 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H); 6,42 – 6,35 (m, 2H); 6,30 (s, 1H); 3,56 (t, *J* = 5,0 Hz, 4H); 3,09 (t, *J* = 5,1 Hz, 4H); 1,49 (s, 9H)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 157,03; 154,91; 152,58; 130,09; 108,82; 107,36; 103,64; 80,31; 49,19; 43,44; 28,44

Irodalom: 98

5.2.4. 4-(3-(3-Klór-5-(*N*-(4-metoxibenzil)-*N*-(naftalin-1-ilmetil)sulfamoil)tiofén-2-iloxi)fenil)piperazin-1-karboxilát (4)



Egy, a mikrohullámú reaktorba helyezhető 30 ml-es reakcióedénybe bemértem **2**-t (1000 mg; 2,03 mmol), valamint **3**-at (684 mg; 2,46 mmol) és cézium karbonátot (992 mg; 3,05 mmol). A keveréket 20 ml DMF oldószerben oldottam, majd 25 percig folyamatos kevertetés mellett mikrohullámú sugárzásnak tettem ki az

oldatot 120 °C-on, melynek végére az sötét lila színű volt. Az elegy hűtését követően az oldószer nagy részét vákuumban eltávolítottam. A kevés maradék DMF-et tartalmazó elegyhez nagyjából 10 ml toluolt adtam, majd azt újra bepároltam vákuumban, így a DMF maradványok biner azeotrópként távoztak. A nyersterméket flash kromatográfiával tisztítottam (0–50% EtOAc hexánban, lineáris gradiens). Termelés: 81% (1212 mg), fehér kristályos anyag.

HPLC:

Retenció idő: 5,63 perc (1. módszer)

$\lambda_{\max}$: 282 nm

MS(ESI+): MW(M+H)⁺ = 734/736 Da

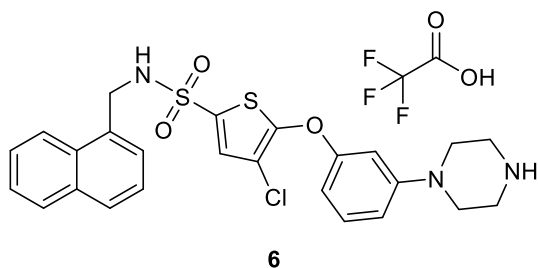
Elméleti molekulatömeg a C₃₈H₄₁ClN₃O₆S₂⁺ [MW(M+H)⁺] összegképletre számolva: 734,2120 Da

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8,09 – 8,01 (m, 1H); 7,85 – 7,76 (m, 1H); 7,78 – 7,74 (m, 1H); 7,53 – 7,42 (m, 2H); 7,40 – 7,33 (m, 1H); 7,32 (dd, *J* = 7,1; 1,7 Hz, 1H); 7,26 (t, *J* = 8,2 Hz, 1H); 7,20 (s, 1H); 6,93 – 6,84 (m, 2H); 6,76 (ddd, *J* = 8,4; 2,4; 0,8 Hz, 1H); 6,66 (t, *J* = 2,3 Hz, 1H); 6,64 – 6,56 (m, 2H); 6,53 (ddd, *J* = 8,1; 2,4; 0,7 Hz, 1H); 4,82 (s, 2H); 4,27 (s, 2H); 3,71 (s, 3H); 3,62 – 3,54 (m, 4H); 3,16 (t, *J* = 5,3 Hz, 4H); 1,49 (s, 9H)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 159,13; 158,41; 158,39; 154,80; 153,01; 133,85; 131,82; 130,67; 130,63; 130,37; 129,87; 129,21; 128,72; 128,03; 127,69; 127,37; 126,62; 126,08; 125,11; 123,66; 113,68; 113,07; 111,91; 108,38; 105,76; 80,22; 55,37; 51,01; 50,09; 48,88; 43,45; 28,57

Irodalom: 65

5.2.5. 4-(3-(3-Klór-5-(*N*-(4-metoxibenzil)-*N*-(naftalin-1-ilmetil)sulfamoil)tiofén-2-iloxi)fenil)piperazin-1-karboxilát (6)



Egy gömblombikba bemértem **4**-et (1500 mg; 2,04 mmol), majd N₂ segítségével inertizáltam azt. Szeptumon keresztül, fecskendő és tű segítségével DKM oldószert (10 ml) adtam hozzá. Az oldathoz trifluorecetsavat (2 ml) adtam, majd szobahőmérsékleten hat napig kevertettem. Mivel

HPLC alapján ezt követően sem volt teljes az átalakulás, további TFA-t (1 ml) adtam az oldathoz és még két órán keresztül kevertettem. Ezután az oldószert vákuumban eltávolítottam. A terméket preparatív HPLC segítségével tisztítottam (35–65% acetonitril 0,2%-os vizes TFA oldatban, lineáris gradiens). A terméket így TFA sóként izoláltam. Termelés: 76% (980 mg), fehér kristályos anyag.

HPLC:

Retenciósi idő: 3,99 perc (1. módszer)

λ_{max} : 281 nm

MS(ESI⁺): MW(M+H)⁺ = 514/516 Da

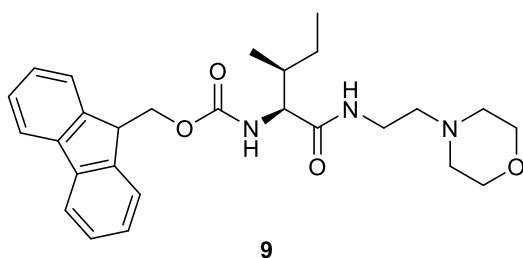
Elméleti molekulatömeg a C₂₅H₂₅ClN₃O₃S₂⁺ [MW(M+H)⁺] összegképletre számolva: 514,1020 Da

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 8,87 (s, 1H); 8,56 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H); 8,14 – 8,04 (m, 1H); 8,00 – 7,93 (m, 1H); 7,88 (dd, *J* = 7,4; 2,2 Hz, 1H); 7,61 – 7,51 (m, 2H); 7,52 – 7,41 (m, 3H); 7,33 (t, *J* = 8,1 Hz, 1H); 6,95 – 6,84 (m, 2H); 6,57 – 6,48 (m, 1H); 4,57 (d, *J* = 5,9 Hz, 2H); 3,41 (t, *J* = 5,1 Hz, 4H); 3,23 (s, 4H)

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 158,29; 157,55; 152,15; 133,70; 132,73; 131,31; 131,26; 130,08; 129,78; 128,96; 128,79; 127,30; 126,72; 126,33; 125,66; 123,97; 113,14; 110,44; 108,43; 105,81; 45,43; 44,97; 43,00

Irodalom: 65

5.2.6. (9H-Fluoren-9-yl)metil-((2S,3S)-3-metil-1-((2-morfolinoetil)amino)-1-oxopentán-1-il)karbamát (9)



Egy N₂-vel inertizált gömblombikba bemértem az *N*-(9-fluorenilmetoxikarbonil)-*L*-izoleucint (1000 mg; 2,83 mmol). Ezt vízmentes DMF-ben oldottam (40 ml), majd az oldathoz 4-(2-aminoetil)morfolint (0,371 ml; 2,83 mmol) adagoltam. Ezt követően COMU-t (1339 mg; 3,11 mmol), majd DIPEA-t (1,48 ml; 8,49 mmol) adtam az elegyhez, mely ezek hatására sötét sárga színű lett és szobahőmérsékleten 3 napig kevertettem azt. Ezután az oldószer nagy részét eltávolítottam, majd a maradékhoz EtOAc-t (100 ml) adtam. Ezt először 100 ml desztillált vízzel extraháltam, majd 100 ml telített vizes NaHCO₃-oldattal, végül 100 ml telített vizes NaCl-oldattal mostam és MgSO₄-en szárítottam. A terméket flash kromatográfia segítségével tisztítottam (0–5% metanol DKM-ben, lineáris gradiens). Termelés: 36% (475 mg), sárgás szilárd anyag.

HPLC:

Retenció idő: 4,37 perc (2. módszer)

$\lambda_{\max}$: 265 nm

MS(ESI+): MW(M+H)⁺ = 466 Da

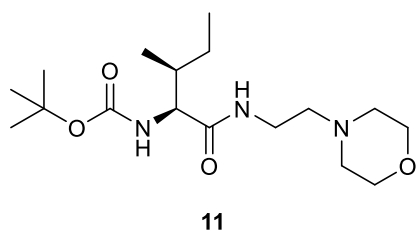
Elméleti molekulatömeg a C₂₇H₃₆N₃O₄⁺ [MW(M+H)⁺] összegképletre számolva: 466,2700 Da

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7,92 – 7,86 (m, 3H); 7,78 – 7,71 (m, 2H); 7,46 – 7,37 (m, 3H); 7,36 – 7,27 (m, 2H); 4,28 – 4,19 (m, 3H); 3,81 (t, *J* = 8,5 Hz, 1H); 3,54 (t, *J* = 4,6 Hz, 4H); 3,31 – 3,20 (m, 1H); 3,20 – 3,06 (m, 1H); 2,48 – 2,16 (br, 6H); 1,77 – 1,66 (m, 1H); 1,50 – 1,38 (m, 1H); 1,19 – 1,05 (m, 1H); 0,89 – 0,78 (m, 6H)

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 171,61; 156,44; 144,23; 141,14; 128,09; 127,48; 125,82; 120,55; 66,46; 66,07; 59,64; 57,62; 53,55; 47,12; 36,65; 36,52; 24,91; 15,80; 11,35

Irodalom: Irodalomban nem ismert

5.2.7. *Terc*-butil-((2*S*,3*S*)-3-metil-1-((2-morfolinoetil)amino)-1-oxopentán-1-il)karbamát (11)



Egy inertizált gömblombikba bemértem az *N*-(*terc*-butoxikarbonil)-*L*-izoleucint (2000 mg; 8,47 mmol) és HATU-t (3222 mg; 8,47 mmol). A keverékhez szeptumon keresztül tű segítségével acetonitril oldószert (40 ml) adtam, majd a DIPEA-t is beadagoltam (2,21 ml; 12,7 mmol) és a sárga színű elegyet szobahőmérsékleten 35 percig kevertettem. Ezt követően hozzáadtam a 4-(2-aminoetil)morfolint (1103 mg; 8,47 mmol) is, majd további 2 óráig kevertettem azt. Ezután a reakcióelegyet HPLC-vel vizsgáltam és mivel alacsony konverziót tapasztaltam, további 1 ekvivalens 4-(2-aminoetil)morfolint (1103 mg; 8,47 mmol) adtam hozzá. Az elegyet még 3 órán keresztül kevertettem, majd az oldószert vákuumban eltávolítottam. A termék tisztítása érdekében flash kromatográfiát alkalmaztam (0–20% TEA 1%-os metanolos oldata DKM-ben, lineáris gradiens). Mivel a nyert frakciók még mindig tartalmaztak szennyezőket, a terméket újabb flash kromatográfiás tisztításnak vettem alá, mely során kisebb gradienst alkalmaztam az egyes anyagok jobb elválása érdekében (0–7,5% TEA 1%-os metanolos oldata DKM-ben, lineáris gradiens). A kisebb gradiens használata ellenére a **12**-es melléktermék nem vált el megfelelően a terméktől, számos frakcióban megtalálható volt. A feltüntetett termelés csak a tiszta **11**-et tartalmazó frakciók egyesítésével kapott anyagot jelöli, emellett a kevés szennyezővel rendelkező frakciók egyesítése révén további kb. 1800 mg-ot kaptam. Termelés: 32% (939 mg), halványbarna kristályos anyag.

HPLC:

Retenciós idő: 3,25 perc (1. módszer)

λ_{max} : nincs elnyelése a 220–800 nm tartományban

MS(ESI⁺): MW(M+H)⁺ = 344 Da

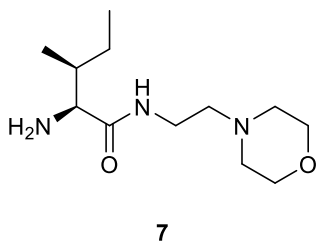
Elméleti molekulatömeg a C₁₇H₃₄N₃O₄⁺ [MW(M+H)⁺] összegképletre számolva: 344,2544 Da

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7,72 (s, 1H); 6,59 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H); 3,76 (t, *J* = 8,2 Hz, 1H); 3,55 (t, *J* = 4,6 Hz, 4H); 3,27 – 3,19 (m, 1H); 3,18 – 3,06 (m, 1H); 2,41 – 2,27 (m, 6H); 1,72 – 1,58 (m, 1H); 1,44 – 1,40 (m, 1H); 1,37 (s, 9H); 1,13 – 1,01 (m, 1H); 0,83 – 0,79 (m, 6H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 171,18; 155,25; 77,88; 66,07; 58,74; 57,09; 53,11; 36,46; 35,62; 28,13; 24,37; 15,32; 11,00

Irodalom: Ismert vegyület, szintézise nincs leírva

5.2.8. (2S,3S)-2-Amino-3-metil-N-(2-morfolinoetil)pentánamid (7)

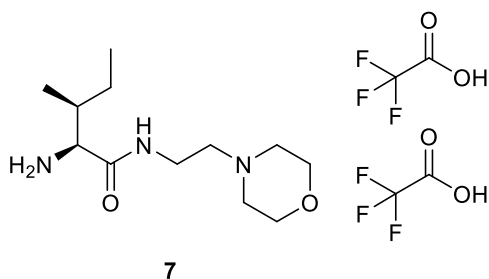


A vegyület szintézisét kétféleképpen is megvalósítottam:

1.) Egy inertizált gömblombikba bemértem **9**-et (465 mg; 1,00 mmol), majd feloldottam DMF-ben (7 ml). Az oldathoz piperidint adtam (3 ml) majd szobahőmérsékleten kevertettem az elegyet két órán keresztül. Ezt követően az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével eltávolítottam, majd a maradékot visszaoldottam 0,1 M vizes sósav oldatban (50 ml). Ezt 2 × 50 ml DKM-el extraháltam, majd a vizes fázis pH-ját 20%-os NaOH-oldat cseppenkénti adagolásával 12-re állítottam be. Az így kapott vizes oldatot 3 × 50 ml DKM-el extraháltam, majd az egyesített szerves fázisokat vákuumban bepároltam. A maradék HPLC-vel történő vizsgálata alapján az kevés piperidint is tartalmazott, ennek eltávolítására az anyagot nagyvákuumban szárítottam egy éjszakán keresztül. A terméket flash kromatográfia segítségével választottam el a **10**-es mellékterméktől (0–20% TEA 1%-os metanolos oldata DKM-ben, lineáris gradiens). Termelés: 39% (95,4 mg), halványsárga, sűrű, olajszerű anyag.

2.) Egy inertizált gömblombikban **11**-et (2000 mg; 5,82 mmol) metanolban (30 ml) oldottam, majd ehhez az oldathoz 1,25 M-os etanolos sósav-oldatot (18,6 ml) adtam és az elegyet tíz napig szobahőmérsékleten kevertettem. Ezt követően vákuumban eltávolítottam az oldószert, a terméket flash kromatográfiával tisztítottam (10–40% TEA 1%-os metanolos oldata DKM-ben, lineáris gradiens). Termelés: 49% (893 mg), színtelen, sűrű, olajszerű anyag.

A molekula trifluorecetsavas sóját is képeztem, a sóképzés eljárását is itt ismertetem.



Egy inertizált gömblombikban feloldottam **7**-et (95,4 mg; 0,39 mmol) desztillált vízben (10 ml) és TFA-t (0,1 ml; 1,31 mmol) adtam hozzá. Az elegyet ezután acetonos szárazjeges fürdőben megfagyasztottam, majd liofilizáltam. Termelés: 94% (173 mg), halványsárga, sűrű, olajszerű anyag.

HPLC:

Retenciósi idő: 2,97 perc (2. módszer)

λ_{max} : nincs elnyelése a 220–800 nm tartományban

MS(ESI+): MW(M+H)⁺ = 244 Da

Elméleti molekulatömeg a $C_{12}H_{26}Cl_2N_3O_2^+$ $[MW(M+H)^+]$ összegképletre számolva:

244,2020 Da

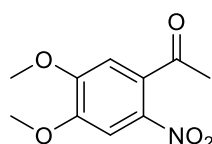
Az NMR spektrumok a 7-es vegyület trifluorecetsavas sójára lettek felvéve.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 8,75 (t, $J = 6,2$ Hz, 1H); 8,19 – 8,14 (m, 2H); 3,98 – 3,93 (br, 4H); 3,59 – 3,55 (m, 1H); 3,52 – 3,33 (br, 4H); 3,18 – 3,13 (br, 4H); 1,85 – 1,69 (m, 1H); 1,50 – 1,39 (m, 1H); 1,16 – 1,04 (m, 1H); 0,91 – 0,82 (m, 6H)

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 168,87; 63,85; 57,11; 54,91; 51,79; 36,30; 33,86; 24,53; 14,98; 11,51

Irodalom: Ismert vegyület, szintézise nincs leírva

5.2.9. 1-(4,5-Dimetoxi-2-nitrofenil)etan-1-on (13)



13

Egy gömblombikba bemértem 3',4'-dimetoxiacetofenont (20 g; 111 mmol), majd feloldottam azt vízmentes DKM-ben (100 ml). Ezután az elegyet -10 °C-ra hűtöttem és ezen hőmérséklet tartása mellett, folyamatos kevertetés közben 98%-os, füstölő salétromsavat (14 ml) csepegtettem hozzá lassan.

Az elegyet ezt követően -10 °C-on kevertettem két és fél órán keresztül. Ezt követően a lombik tartalmát erőteljes kevertetés közben nagyjából 500 ml jeges vízre öntöttem, majd ezt a vizes oldatot 3×150 ml DKM-el extraháltam. Az egyesített szerves fázisokat 2×100 ml desztillált vízzel mostam, majd $MgSO_4$ -en szárítottam. Az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével eltávolítottam, a kapott szilárd anyagot vákuumban szárítottam. A termék további tisztítására nem volt szükség HPLC alapján. Termelés: 95% (23,8 g), citromsárga szilárd anyag.

HPLC:

Retenciós idő: 3,28 perc (1. módszer)

λ_{max} : 346 nm

MS(ESI+): $MW(M+H)^+ = 226$ Da

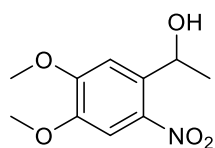
Elméleti molekulatömeg a $C_{10}H_{12}NO_5^+$ $[MW(M+H)^+]$ összegképletre számolva: 226,0710 Da

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 7,63 (s, 1H); 7,22 (s, 1H); 3,93 (s, 3H); 3,90 (s, 3H); 2,52 (s, 3H)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 199,19; 153,12; 149,36; 138,37; 131,09; 109,67; 107,13; 56,58; 56,30; 29,93

Irodalom: 100

5.2.10. 1-(4,5-Dimetoxi-2-nitrofenil)etan-1-ol (14)



14

Egy inertizált gömblombikba bemértem **13**-at (907 mg; 4,03 mmol), majd szeptumon keresztül tű segítségével metanolt (6 ml) és száraz THF-et (24 ml) adtam hozzá. A lombikot jeges vízzel 0 °C-ra hűtöttem, majd ezen a hőmérsékleten nátrium-borohidridet (609 mg; 16,1 mmol) adtam az oldathoz, melyet ezt követően szobahőmérsékleten kevertettem három napig. Ezután az oldószert vákuumban eltávolítottam, a kapott anyagot DKM (100 ml) és víz (100 ml) keverékében újra feloldottam. A fázisok elválasztása után a szerves fázist 2 × 100 ml vízzel, majd 100 ml telített sóoldattal mostam, ezt követően MgSO₄-en szárítottam. A szárítószer kiszűrése után az oldószert vákuumban eltávolítottam, a kapott termék további tisztítására nem volt szükség. Termelés: 95% (867 mg), sárgás szilárd anyag.

HPLC:

Retenciós idő: 3,27 perc (1. módszer)

λ_{max} : 350 nm

MS(ESI+): MW(M+H)⁺ = 210 Da (a molekula vízvesztéssel ionizálódik)

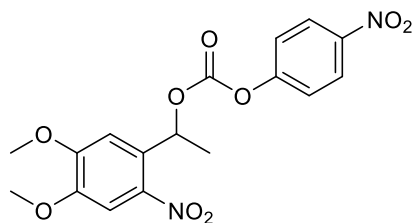
Elméleti molekulatömeg a C₁₀H₁₄NO₅⁺ [MW(M+H)⁺] összegképletre számolva: 228,0866 Da

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7,51 (s, 1H); 7,33 (s, 1H); 5,47 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H); 5,33 – 5,21 (m, 1H); 3,88 (s, 3H); 3,82 (s, 3H); 1,35 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H)

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 153,65; 147,52; 139,35; 138,41; 109,35; 107,72; 64,35; 56,46; 56,44; 25,61

Irodalom: 100

5.2.11. 1-(4,5-Dimetoxi-2-nitrofenil)etil-(4-nitrofenil)-karbonát (15)



15

Egy gömblombikot N₂ segítségével inertizáltam, majd bemértem **14**-et (300 mg; 1,32 mmol). Ezt száraz THF-ben (15 ml) oldottam, melyet szeptumon keresztül adagoltam be. Miután az anyag feloldódott, 4-nitrofenil-kloroformátot (346 mg; 1,72 mmol) adtam az oldathoz, majd közvetlenül ezután a DIPEA-t (0,345 ml; 1,98 mmol) és DMAP-t (16,1 mg; 0,132 mmol) is hozzáadtam az elegyhez. A reakcióelegyet 5 napig sötétben, szobahőmérsékleten kevertettem. Ezalatt valószínűleg a THF gőzei miatt a szeptum károsodott, kis darabjai az oldatba estek. Emiatt az esetlegesen kivált termék visszaoldására további THF-

et (25 ml) adtam az elegyhez, majd üvegszűrőn szűrtem az a szervesetlen anyagok elválasztása érdekében. A szűrletet 100 ml jéghideg 0,05 M-os vizes Na₂HPO₄-oldatra öntöttem, melynek hatására szilárd anyag vált ki. Az elegyet üvegszűrőn szűrtem, a kivált terméket szárítószekrényben szárítottam. A szűrletet állni hagyva abban további kristálykiválást figyeltem meg, így azt újra leszűrtem, a kapott terméket hasonlóan szárítottam. A termék további tisztítás nélkül lett felhasználva a további lépésekben. Termelés: 83% (429 mg), szürke kristályos anyag.

HPLC:

Retenciós idő: 4,31 perc (1. módszer)

λ_{max} : 273 nm

MS(ESI+): MW(M+H)⁺ = 393 Da

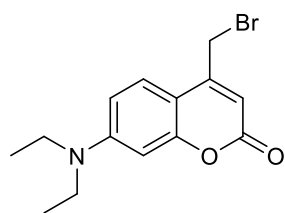
Elméleti molekulatömeg a C₁₇H₁₇N₂O₉⁺ [MW(M+H)⁺] összegképletre számolva: 393,0929 Da

¹H NMR (500 MHz, oldószer): δ (ppm) 8,30 – 8,28 (m, 2H); 7,60 (s, 1H); 7,54 – 7,51 (m, 2H); 7,19 (s, 1H); 6,29 (q, J = 6,4 Hz, 1H); 3,95 (s, 3H); 3,87 (s, 3H); 1,73 (d, J = 6,5 Hz, 3H)

¹³C NMR (126 MHz, oldószer): δ (ppm) 155,05; 153,45; 151,14; 148,14; 145,20; 139,84; 130,12; 125,34; 122,54; 108,57; 107,58; 73,01; 56,34; 56,13; 21,15

Irodalom: 101

5.2.12. 4-(Brómmetil)-7-(dietilamino)-2H-kromén-2-on (16)



16

Egy N₂-vel inertizált gömblombikba bemértem a 7-dietilamino-4-metilkumarint (1000 mg; 4,32 mmol), majd szeptumon keresztül száraz THF oldószert (40 ml) adtam hozzá. Az oldatot aceton és szárazjég segítségével nagyjából -40 °C-ra hűtöttem, majd lítium-bisz(trimetil-szilil)amid 1 M-os THF-es oldatát (9,6 ml; 9,6 mmol) adtam hozzá ezen a hőmérsékleten. Rövid kevertetést követően az elegyet -78 °C-ra hűtöttem aceton és szárazjég keverékével, majd hozzáadtam az *N*-brómszukcinimidet (925 mg; 5,2 mmol). A reakcióelegyet -78 °C-on kevertettem egy órán keresztül, majd 1 M-os vizes sósavoldattal (50 ml) kvencseltem azt. Az oldatot ezt követően 3 × 50 ml DKM-el extraháltam, majd az egyesített szerves fázisokat MgSO₄-en szárítottam, az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével eltávolítottam. A nyersterméket flash kromatográfiával tisztítottam (0–20% EtOAc hexánban, lineáris gradiens). A termék mellett a **17**-es mellékterméket is izoláltam. Termelés: 50% (676 mg), narancssárga kristályos anyag.

HPLC:

Retenciós idő: 5,24 perc (3. módszer)

λ_{max} : 399 nm

MS(ESI+): $\text{MW}(\text{M}+\text{H})^+ = 310/312 \text{ Da}$

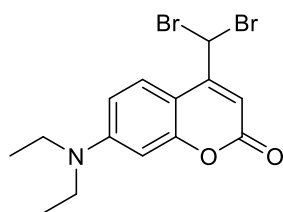
Elméleti molekulatömeg a $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{BrNO}_2^+$ [$\text{MW}(\text{M}+\text{H})^+$] összegképletre számolva:

310,0437 Da

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,48 (d, $J = 9,0 \text{ Hz}$, 1H); 6,62 (dd, $J = 9,0$; 2,6 Hz, 1H); 6,50 (d, $J = 2,6 \text{ Hz}$, 1H); 6,13 (s, 1H); 4,39 (s, 2H); 3,41 (q, $J = 7,1 \text{ Hz}$, 4H); 1,21 (t, $J = 7,1 \text{ Hz}$, 6H)

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 161,87; 156,79; 150,97; 150,44; 125,48; 109,34; 108,76; 106,25; 97,95; 44,91; 27,25; 12,56

Irodalom: 102

5.2.13. 4-(Dibrómmetil)-7-(dietilamino)-2H-kromén-2-on (17)

17

A molekulát a **16**-os vegyület szintézisének leírt eljárás végén izoláltam annak flash kromatográfiával történő tisztítása során. Termelés: 10% (162 mg), narancssárga kristályos anyag.

HPLC:

Retenciós idő: 4,32 perc (1. módszer)

λ_{max} : 414 nm

MS(ESI+): $\text{MW}(\text{M}+\text{H})^+ = 388/390/392 \text{ Da}$

Elméleti molekulatömeg a $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{Br}_2\text{NO}_2^+$ [$\text{MW}(\text{M}+\text{H})^+$] összegképletre számolva:

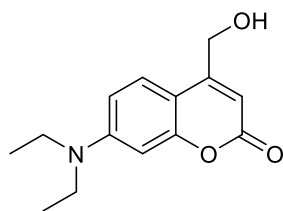
387,9542 Da

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,78 – 7,72 (m, 1H); 6,69 – 6,62 (m, 2H); 6,52 (s, 1H); 6,38 (s, 1H); 3,43 (q, $J = 7,1 \text{ Hz}$, 4H); 1,22 (t, $J = 7,1 \text{ Hz}$, 6H)

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 161,45; 156,80; 151,36; 150,86; 125,47; 108,50; 107,37; 103,73; 98,00; 44,81; 34,78; 12,43

Irodalom: Irodalomban nem ismert

5.2.14. 7-(Dietilamino)-4-(hidroximetil)-2H-kromén-2-on (18)



18

Egy inertizált gömblobbikba bemértem **16**-ot (240 mg; 0,774 mmol), majd 1,4-dioxánt (30 ml) és desztillált vizet (30 ml) adtam hozzá. Az elegyet kevertetés közben két napig refluxáltattam. Ezután lehűtöttem az oldatot, majd 3 × 75 ml EtOAc-vel extraháltam azt. Az egyesített szerves fázisokat MgSO₄-en szárítottam, majd az oldószert vákuumban eltávolítottam. A terméket flash kromatográfiával tisztítottam (10–72,5% EtOAc hexánban, lineáris gradiens). Termelés: 81% (154 mg), narancssárga kristályos anyag.

HPLC:

Retenciósidő: 3,33 perc (1. módszer)

λ_{max} : 383 nm

MS(ESI⁺): MW(M+H)⁺ = 248 Da

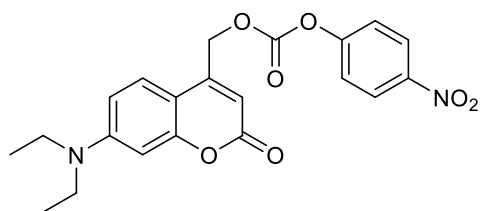
Elméleti molekulatömeg a C₁₄H₁₈NO₃⁺ [MW(M+H)⁺] összegképletre számolva: 248,1281 Da

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7,32 (d, J = 8,9 Hz, 1H); 6,57 (dd, J = 9,0; 2,6 Hz, 1H); 6,50 (d, J = 2,6 Hz, 1H); 6,26 (t, J = 1,4 Hz, 1H); 4,83 (d, J = 1,5 Hz, 2H); 3,40 (q, J = 7,1 Hz, 4H); 1,20 (t, J = 7,1 Hz, 6H)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 162,68; 156,32; 154,73; 150,58; 124,54; 108,80; 106,56; 105,73; 98,04; 61,16; 44,94; 12,56

Irodalom: 102

5.2.15. (7-(Dietilamino)-2-oxo-2H-kromén-4-il)metil-(4-nitrofenil)-karbonát (19)



19

Egy N₂-vel inertizált gömblobbikba bemértem **18**-at (100 mg; 0,404 mmol). Ezt vízmentes DKM-ben (5 ml) oldottam, majd DIPEA-t (0,352 ml; 2,02 mmol) és 4-nitrofenil-kloroformátot (408 mg; 2,02 mmol) adtam az oldathoz. Az elegyet ezt követően 5 napig sötétben, szobahőmérsékleten kevertettem. Az elegyet 20 ml DKM-mel hígítottam, majd 3 × 20 ml 0,01 M-os vizes sósavoldattal mostam azt. A szerves fázist ezután 2 × 20 ml telített vizes NaHCO₃-oldattal mostam, majd magnézium-szulfáton szárítottam. Az oldószert vákuumban eltávolítottam, majd a terméket flash kromatográfia segítségével tisztítottam (100% DKM, izokratikus elúció). Termelés: 72% (121 mg), narancssárga szilárd anyag.

HPLC:

Retenciós idő: 4,41 perc (1. módszer)

$\lambda_{\max}$: 387 nm

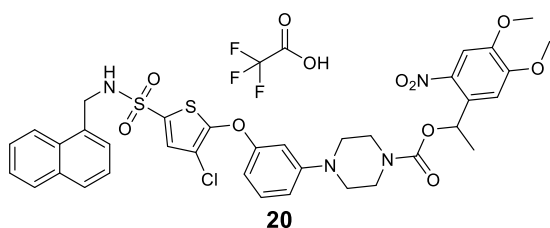
MS(ESI+): $MW(M+H)^+ = 413$ Da

Elméleti molekulatömeg a $C_{21}H_{21}N_2O_7^+$ [$MW(M+H)^+$] összegképletre számolva: 413,1343 Da

Az anyag NMR spektruma nem lett felvéve.

Irodalom: 103

5.2.16. 1-(4,5-Dimetoxi-2-nitrofenil)etil-4-(3-((3-klór-5-(*N*-(naftalin-1-ilmetil)sulfamoil)tiofén-2-il)oxi)fenil)piperazin-1-karboxilát (20)



Egy inertizált gömblombikba bemértem **6**-ot (50 mg; 0,0796 mmol) és **15**-öt (39 mg; 0,10 mmol). Szeptumon keresztül DKM oldószert (5 ml) mértem, majd trietilamint (0,028 ml; 0,199 mmol) adtam az oldathoz. Az elegyet

szobahőmérsékleten, sötétben egy napig kevertettem. A reakcióelegy HPLC-s vizsgálata alapján ekkor még volt kiindulási **6** az oldatban, így ahhoz további **15**-öt (19,6 mg; 0,05 mmol) adtam, majd az elegyet még egy hétig kevertettem. Ezután az oldószert vákuumban eltávolítottam, a terméket preparatív HPLC segítségével tisztítottam (45–75% acetonitril 0,2%-os vizes TFA oldatban, lineáris gradiens). A terméket így TFA sóként izoláltam. Termelés: 24% (16,7 mg), szürke szilárd anyag.

HPLC:

Retenciós idő: 4,99 (1. módszer)

$\lambda_{\max}$: 346 nm

MS(ESI+): $MW(M+H)^+ = 767/769$ Da

Elméleti molekulatömeg a $C_{36}H_{36}ClN_4O_7S_2^+$ [$MW(M+H)^+$] összegképletre számolva: 767,1607 Da

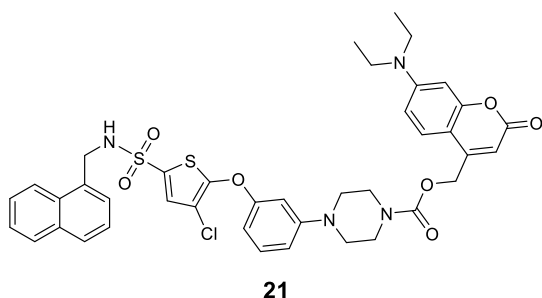
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7,93 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H); 7,87 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H); 7,83 (d, $J = 6,9$ Hz, 1H); 7,58 – 7,49 (m, 3H); 7,43 – 7,36 (m, 2H); 7,32 (s, 1H); 7,25 (t, $J = 8,4$ Hz, 1H); 6,95 (s, 1H); 6,75 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H); 6,65 (s, 1H); 6,55 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); 6,40 (q, $J = 6,5$ Hz, 1H); 4,83 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H); 4,67 (d, $J = 5,7$ Hz, 2H); 3,95 (s, 3H); 3,92 (s, 3H); 3,80 – 3,50 (br, 4H); 3,24 – 3,10 (m, 4H); 1,66 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H)

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 158,70; 158,33; 154,20; 153,56; 152,72; 148,02; 140,13; 133,91; 133,60; 131,16; 131,08; 130,78; 130,68; 129,53; 129,00; 128,00; 127,32;

126,97; 126,27; 125,27; 123,05; 113,63; 111,66; 108,77; 107,78; 105,84; 69,73; 56,84; 56,21; 48,71; 45,65; 43,33; 21,95

Irodalom: irodalomban nem ismert

5.2.17. (7-(Dietilamino)-2-oxo-2H-kromén-4-il)metil-4-(3-((3-klór-5-(N-(naftalin-1-ilmetil)sulfamoi)tiofén-2-il)oxi)fenil)piperazin-1-karboxilát (21)



Egy inertizált gömblombikba bemértem **6**-ot (50 mg; 0,0796 mmol) és **19**-et (32,8 mg; 0,0796 mmol). Ezeket DKM-ben (5 ml) oldottam, majd trietilamint (0,028 ml; 0,199 mmol) adtam az oldathoz. Az elegyet szobahőmérsékleten, sötétben négy napig kevertettem. Az oldószert

vákuumban bepároltam, majd a terméket a tisztításhoz acetonitrilben feloldottam. Mielőtt azonban az oszlopra való injektálás megtörtént volna, nagyjából az oldat fele kiömlött, ezzel jelentősen csökkentve a termelést. A terméket preparatív HPLC segítségével tisztítottam (45–85% acetonitril 0,4 g l⁻¹ -es vizes NH₄HCO₃-oldatban, lineáris gradiens). Termelés: 26% (16 mg), sárga szilárd anyag.

HPLC:

Retenciós idő: 5,02 perc (1. módszer)

$\lambda_{\max}$: 376 nm

MS(ESI⁺): MW(M+H)⁺ = 787/789 Da

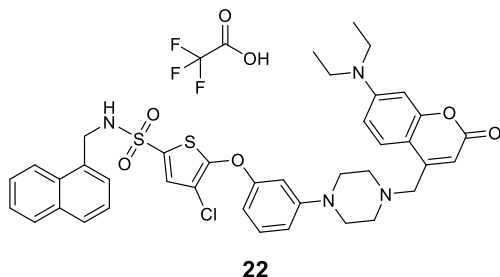
Elméleti molekulatömeg a C₄₀H₄₀ClN₄O₇S₂⁺ [MW(M+H)⁺] összegképletre számolva: 787,2021 Da

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7,92 (d, J = 7,6 Hz, 1H); 7,84 (dd, J = 6,8; 2,3 Hz, 1H); 7,80 (t, J = 6,8 Hz, 1H); 7,56 – 7,45 (m, 2H); 7,37 (d, J = 4,1 Hz, 2H); 7,31 (s, 1H); 7,28 (d, J = 8,7 Hz, 1H); 7,25 – 7,21 (m, 1H); 6,74 (dd, J = 8,3; 2,3 Hz, 1H); 6,64 (dd, J = 2,4; 2,4 Hz, 1H); 6,58 – 6,54 (m, 1H); 6,54 – 6,50 (m, 1H); 6,48 (d, J = 2,6 Hz, 1H); 6,06 (s, 1H); 5,25 (s, 2H); 4,93 (t, J = 5,8 Hz, 1H); 4,65 (d, J = 5,6 Hz, 2H); 3,72 – 3,59 (m, 4H); 3,39 (q, J = 7,1 Hz, 4H); 3,21 – 3,14 (m, 4H); 1,18 (t, J = 7,1 Hz, 6H)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 162,04; 158,63; 158,21; 156,21; 154,22; 152,65; 150,68; 150,22; 133,82; 131,11; 131,01; 130,78; 130,59; 129,41; 128,91; 127,94; 127,26; 126,88; 126,18; 125,22; 124,32; 123,04; 113,21; 111,56; 108,67; 105,89; 105,84; 97,80; 62,50; 48,71; 45,75; 44,74; 43,64; 12,43

Irodalom: irodalomban nem ismert

5.2.18. 4-Klór-5-(3-(4-((7-(diethylamino)-2-oxo-2H-kromén-4-il)metil)piperazin-1-il)fenoxi)-N-(naftalin-1-ilmetil)tiofén-2-szulfonamid (22)



Egy inertizált gömblombikba bemértem **6**-ot (202 mg; 0,322 mmol), **16**-ot (100 mg; 0,322 mmol) és K₂CO₃-at (267 mg; 1,93 mmol). Ezeket vízmentes DKM-ben (10 ml) oldottam, majd az elegyet sötétben, szobahőmérsékleten három napig kevertettem. Ezt követően az oldathoz desztillált vizet (40 ml) és

DKM-et (40 ml) adtam, majd elválasztottam a fázisokat. A vizes fázist még 2 × 40 ml DKM-el extraháltam, majd mindhárom szerves fázist egyesítettem. Ezeket 40 ml telített NaCl-oldattal mostam, majd az oldószert vákuumban eltávolítottam. A termék tisztítására preparatív HPLC-t használtam (45–75% acetonitril 0,2%-os vizes TFA oldatban, lineáris gradiens). Mivel az anyag és a **23**-as melléktermék csúcsai kissé átfedtek, így a kapott termék kevés szennyezőt tartalmazott. Ezt újból preparatív HPLC-vel tisztítottam ugyanazon módszerrel és gradienssel mint az első esetben. A terméket így TFA sóként izoláltam. A termék mellett a **23**-as mellékterméket is izoláltam. Termelés: 72% (199 mg), zöldessárga szilárd anyag.

HPLC:

Retenciós idő: 4,50 perc (1. módszer)

λ_{max} : 376 nm

MS(ESI⁺): MW(M+H)⁺ = 743/745 Da

Elméleti molekulatömeg a C₃₉H₄₀ClN₄O₅S₂⁺ [MW(M+H)⁺] összegképletre számolva: 743,2123 Da

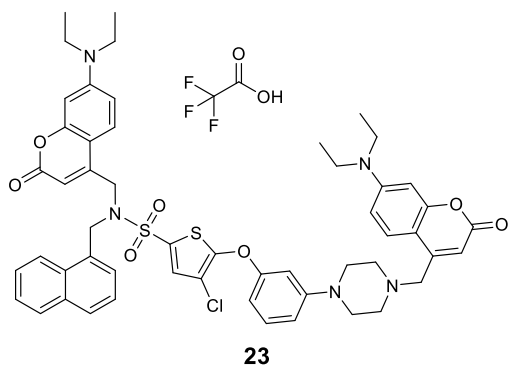
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8,02 – 7,91 (m, 1H); 7,90 – 7,85 (m, 1H); 7,82 (dd, J = 6,5; 3,0 Hz, 1H); 7,58 (d, J = 9,1 Hz, 1H); 7,55 – 7,54 (m, 1H); 7,52 – 7,51 (m, 1H); 7,44 – 7,36 (m, 2H); 7,33 (s, 1H); 7,27 – 7,26 (m, 1H); 6,70 (dd, J = 8,5; 1,5 Hz, 1H); 6,63 (dd, J = 2,6; 1,8 Hz, 1H); 6,61 – 6,59 (m, 1H); 6,58 (dd, J = 2,3; 0,7 Hz, 1H); 6,51 (d, J = 2,5 Hz, 1H); 6,11 (s, 1H); 5,32 (t, J = 5,9 Hz, 1H); 4,68 (d, J = 5,8 Hz, 2H); 4,07 (s, 2H); 3,43 (q, J = 7,1 Hz, 4H); 3,40 – 3,37 (m, 4H); 3,19 – 3,15 (m, 4H); 1,22 (t, J = 7,1 Hz, 6H)

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 161,10; 158,23; 158,11; 156,66; 151,31; 151,28; 144,64; 133,83; 131,16; 130,93; 130,90; 130,83; 129,39; 128,92; 128,37; 127,37; 126,87;

126,19; 125,28; 123,11; 113,16; 111,98; 111,70; 109,54; 109,08; 107,04; 106,14; 97,85; 55,88; 52,00; 46,99; 45,75; 44,89; 12,39

Irodalom: irodalomban nem ismert

5.2.19. 4-Klór-N-((7-(diethylamino)-2-oxo-2H-kromén-4-il)metil)-5-(3-(4-((7-(diethylamino)-2-oxo-2H-kromén-4-il)metil)piperazin-1-il)fenoxi)-N-(naftalin-1-ilmetil)tiofén-2-szulfonamid (23)



A molekulát a **22**-es vegyület szintézisének leírt eljárás végén TFA-sóként izoláltam a preparatív HPLC-vel történő tisztítás során. Termelés: 6% (22,6 mg), sárga szilárd anyag.

HPLC:

Retenciós idő: 4,96 perc (1. módszer)

$\lambda_{\max}$: 392 nm

MS(ESI⁺): MW(M+H)⁺ = 972/974 Da

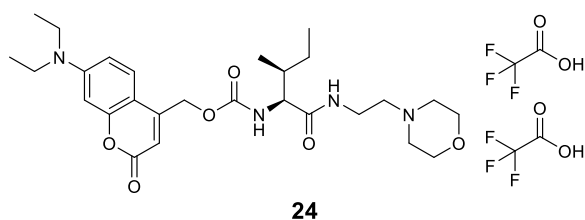
Elméleti molekulatömeg a C₅₃H₅₅ClN₅O₇S₂⁺ [MW(M+H)⁺] összegképletre számolva: 972,3226 Da

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8,13 – 8,07 (m, 1H); 7,77 (dd, J = 7,6; 1,8 Hz, 1H); 7,71 (d, J = 8,1 Hz, 1H); 7,62 (d, J = 9,1 Hz, 1H); 7,50 – 7,41 (m, 2H); 7,39 (s, 1H); 7,33 – 7,22 (m, 3H); 7,15 (d, J = 8,9 Hz, 1H); 6,76 (dd, J = 8,3; 2,0 Hz, 1H); 6,72 (dd, J = 2,3 Hz, 1H); 6,67 (dd, J = 8,1; 2,3 Hz, 1H); 6,60 (dd, J = 9,1; 2,6 Hz, 1H); 6,51 (d, J = 2,5 Hz, 1H); 6,36 – 6,29 (m, 2H); 6,17 (s, 1H); 5,65 (s, 1H); 4,92 (s, 2H); 4,38 (s, 2H); 4,06 (s, 2H); 3,45 (t, J = 5,0 Hz, 4H); 3,40 (t, J = 7,1 Hz, 4H); 3,35 (q, J = 7,1 Hz, 4H); 3,18 – 3,15 (m, 4H); 1,21 (t, J = 7,1 Hz, 6H); 1,16 (t, J = 7,0 Hz, 6H)

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ (ppm) δ 161,20; 161,12; 159,12; 158,02; 156,54; 155,75; 151,50; 151,09; 150,27; 148,99; 145,60; 133,48; 131,53; 131,36; 130,81; 129,54; 129,18; 128,58; 128,00; 126,70; 126,00; 125,88; 125,61; 124,71; 124,64; 123,25; 113,17; 111,85; 111,24; 109,54; 108,83; 108,32; 107,79; 107,02; 106,23; 106,18; 97,71; 97,43; 56,30; 52,14; 51,33; 48,30; 47,09; 44,75; 44,62; 12,31; 12,28

Irodalom: Irodalomban nem ismert

5.2.20. (7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-kromén-4-il)metil-((2S,3S)-3-metil-1-((2-morfolinoetil)amino)-1-oxopentán-1-il)karbamát (24)



Egy inertizált gömblombikba bemértem **19**-et (74,4 mg; 0,18 mmol). Ehhez a **7**-es anyag trifluorecetsavas sójának (85 mg; 0,18 mmol) DKM-ben (6 ml) készült oldatát adagoltam.

Kevertetés közben trietilamint (0,063 ml; 0,451 mmol) adtam az oldathoz, majd azt szobahőmérsékleten, sötétben négy napig kevertettem. Mivel a kevertetés közben az oldószer párolgott, azt egyszer pótoltam, ekkor 12 ml DKM-et adtam az elegyhez. A kevertetést követően az oldószert vákuumban eltávolítottam, a terméket preparatív HPLC segítségével tisztítottam (25–55% acetonitril 0,2%-os vizes TFA oldatban, lineáris gradiens). A terméket így kétszeres TFA sóként izoláltam. Termelés: 11% (14,9 mg), zöld színű, olajszerű anyag.

HPLC:

Retenciósi idő: 3,66 perc (1. módszer)

$\lambda_{\max}$: 376 nm

MS(ESI+): $MW(M+H)^+ = 517$ Da

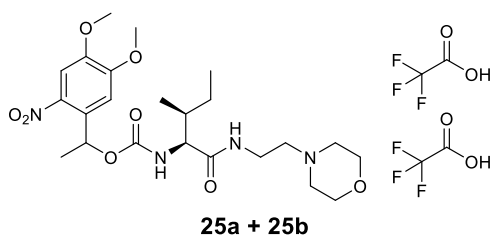
Elméleti molekulatömeg a $C_{27}H_{41}N_4O_6^+$ [$MW(M+H)^+$] összegképletre számolva: 517,3021 Da

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 8,34 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H); 7,74 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H); 7,44 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H); 6,69 (dd, $J = 9,1$; 2,5 Hz, 1H); 6,54 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H); 6,05 (s, 1H); 5,23 (s, 2H); 3,84 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H); 3,49 – 3,38 (m, 12H); 3,16 (m, 4H); 1,83 – 1,70 (m, 1H); 1,50 – 1,37 (m, 1H); 1,25 – 1,16 (m, 1H); 1,12 (t, $J = 7,0$ Hz, 6H); 0,90 – 0,80 (m, 6H)

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 171,80; 160,78; 155,68; 155,52; 151,81; 150,42; 125,22; 108,70; 105,11; 104,18; 96,83; 63,41; 61,06; 59,35; 54,70; 51,39; 43,99; 35,99; 33,44; 24,39; 15,43; 12,30; 10,86

Irodalom: irodalomban nem ismert

5.2.21. (R,S)-1-(4,5-Dimetoxi-2-nitrofenil)etil-((2S,3S)-3-metil-1-((2-morfolinoetil)amino)-1-oxopentán-1-il)karbamát (25)



Egy N₂-vel inertizált gömblombikba bemértem 7 trifluorecetsavas sóját (85 mg; 0,18 mmol), és **15**-öt (70,7 mg; 0,18 mmol). A keveréket DKM-ben (15 ml) oldottam, majd az oldathoz trietilamint (0,063 ml; 0,451 mmol) adtam. Az elegyet sötétben,

szobahőmérsékleten négy napig kevertettem. Mivel ekkor HPLC alapján még mindkét kiindulási anyagból volt az elegyben, további TEA-t (0,050 ml; 0,360 mmol) adtam az oldathoz, valamint az elpárolgott oldószert is pótoltam. Az elegyet még két napig kevertettem, majd az oldószert vákuumban eltávolítottam. A maradékot preparatív HPLC segítségével tisztítottam (25–55% acetonitril 0,2%-os vizes TFA oldatban, lineáris gradiens), azonban a két diasztereomert nem sikerült egymástól elválasztani, valamint kevés szennyezőt is tartalmazott a termékelegy. Termelés: 11% (14,2 mg), sárgászöld, olajszerű anyag.

HPLC:

Retenciósi idő (két diasztereomer): 3,49 és 3,54 perc (1. módszer)

λ_{max} : 345 nm

MS(ESI⁺): MW(M+H)⁺ = 497 Da

Elméleti molekulatömeg a C₂₃H₃₇N₄O₈⁺ [MW(M+H)⁺] összegképletre számolva: 497,2606 Da
A többszortevőjű termékelegyből készült nagyon híg minta NMR spektroszkópiai vizsgálata nem eredményezett jól kiértékelhető spektrumokat, a jövőben tervezem megismételni a mérést.
Irodalom: irodalomban nem ismert

5.3. Spektroszkópiai és fotokémiai vizsgálatok leírása

5.3.1. A vizsgálatok során használt eszközök, berendezések

A spektroszkópiai mérésekhez Shimadzu UV-1900i UV-VIS Spectrophotometer és Shimadzu RF-6000 SpectroFluorimeter berendezést használtam. Küvettaként a Hellma Analytics nagy pontosságú celláját (10x10 mm) alkalmaztam. A spektrofotométer szkennelési sebessége 648 nm min⁻¹ volt, a mért értékeket 2 nm-enként rögzítettem. A fluoriméter alacsony érzékenységi beállítással, 3 nm-es spektrális szélességgel, 600 nm min⁻¹ beállítással működött, 0,2 nm-enként rögzített adatokat.

A referencia anyag izomerizációjának, valamint az új vegyületek fotolízisének vizsgálatához a ThalesNano PhotoCube fotoreaktort alkalmaztam. A kísérletek során a fotoreaktor beállításai minden esetben az alábbiak voltak:

- „low”, 10%-os intenzitású, 365 nm-es (UV) fény
- kevertetés sebessége: 300 rpm
- 1 panellel történő megvilágítás

A kísérletek során a reaktor hőmérséklete jellemzően 30-31 °C volt, **21** fotolízise esetén 27 °C. A különböző mintákat mindig a reaktor mintatartójának azonos pozíciójába helyeztem be. A fotokémiai reakciók követésére spektrofotométert, illetve a szintéziseknél már említett SPD-M40 Photodiode detektorral felszerelt HPLC-MS készüléket használtam. A különböző oldatok megfelelő térfogatának kiméréséhez automata pipettát alkalmaztam.

5.3.2. 4,4'-Dimetilazobenzol vizsgálata

A referencia anyagként használt DMAB *E*-izomerének moláris abszorpciós koefficiensének méréséhez ismert mennyiségű szilárd anyag bemérésével $2,8 \cdot 10^{-4}$ M-os acetonitriles törzsoldatot készítettem. A törzsoldatból 0,50 ml-t pipettáztam egy 1 cm belső szélességű kvarc küvettába, majd ehhez 2,00 ml acetonitrilt pipettáztam, az oldatot Pasteur pipettával homogenizáltam, az így kapott $5,6 \cdot 10^{-5}$ M-os oldatnak felvettem az UV-VIS spektrumát. Ezt követően a mintából 1,25 ml-t pipettával eltávolítottam és azt 1,25 ml acetonitrillel pótoltam, az oldatot homogenizáltam és újra felvettem az immár feleakkora koncentrációjú minta spektrumát. Ezt további 5 alkalommal megismételtem, majd a hígítási sor egyes mintáinak 365 nm-en mért elnyeléséből a Lambert–Beer-törvény alapján meghatároztam az *E*-izomer moláris abszorpciós koefficiensét ezen a hullámhosszon. A kiindulási és a hígítási sor utolsó mintáját is vizsgáltam HPLC-vel, mely alapján látható volt, hogy kezdetben csak a *transz* forma volt az oldatban és a vizsgálatok során sem történt izomerizáció.

Az anyag fény hatására végbemenő izomerizációjának méréséhez acetonitrilben $2,2 \cdot 10^{-4}$ M-os oldatot készítettem a szilárd *E*-izomerből. Az oldatból 3,00 ml-t egy kvarc küvettába pipettáztam, majd felvettem annak spektrumát. Ezután az oldat 3,00 ml-ét egy kis keverőmaggal ellátott üvegcsébe mértem, majd azt lezártam és a fotokémiai reaktorba helyeztem. Az 5.3.1. fejezetben bemutatott beállítások mellett megvilágítottam az oldatot, majd 5, 10, 15, 20, 25, 35, 55, 95, 175, 335 másodperc besugárzást követően a teljes oldatot felhasználva spektrofotométer segítségével felvettem annak spektrumát.

5.3.3. A célmolekulák vizsgálata

A **20**, **21**, **22** és **24** vegyületek spektroszkópiai vizsgálatához először ismert mennyiségű anyag oldásával 10^{-3} M-os DMSO-ban törzsoldatokat készítettem. Minden anyag esetén egy kvarc küvettába 25 μ l ilyen törzsoldatot, valamint 2,47 ml acetonitrilt mértem be, majd homogenizálást követően felvettem a minta spektrumát. Ezt követően 1,25 ml oldatot pipettával eltávolítottam, ezt acetonitrillel helyettesítettem, az oldatot homogenizáltam és újra felvettem annak spektrumát. Ezt **20** esetében még kétszer, a többi vegyület esetén még háromszor ismételttem. A kapott eredmények alapján meghatároztam a molekulák moláris abszorpciós koeficienseit. Mindegyik anyag mérése során a hígítási sor első olyan oldatának, amelynek maximális abszorbanciája 0,1 alatti érték volt, fluoriméter segítségével felvettem a gerjesztési és emissziós spektrumát is. Az ezen mérések során választott hullámhosszak az adott anyag abszorpciós spektrumától függtek.

A molekulák fotolízisének vizsgálatához olyan oldatokra volt szükségem, melyek kezdeti abszorbanciája megegyezik a referencia anyag izomerizációjának méréséhez készített kiindulási oldat abszorbanciájával. Ehhez a vegyületek 365 nm-en meghatározott moláris abszorpciós koeficiensei alapján az adott anyag esetén szükséges koncentrációhoz képest nagyjából 100-szoros töménységű törzsoldatokat készítettem DMSO-ban. Ezekből 25 μ l-t mértem ki egy kvarc küvettába, majd 2,47 ml acetonitrilt adtam hozzá és felvettem az oldatok abszorbanciáját, hogy ellenőrizsem a 365 nm-en mérhető elnyelés megfelelőségét. Mivel egyes anyagok esetén kis eltérések voltak tapasztalhatóak, az oldatok pontos koncentrációját nem a bemérés, hanem a mért abszorbancia alapján határoztam meg. A törzsoldatok acetonitrillel történő nagyjából százszoros hígításával elkészítettem a mérésekhez alkalmazható mintákat. A **22**-es vegyület ezen oldatából több 30 μ l-es részletet vizsgáltam HPLC-vel. Ezek eredménye alapján ez a mennyiség elegendő ahhoz, hogy az automata injektor megbízhatóan tudjon 5 μ l-t juttatni az oszlopra. Az egyes anyagok oldataiból 30 μ l-t HPLC-vel vizsgáltam, majd 3,00 ml-t egy kis keverőmaggal ellátott üvegcsébe mértem, amit a fotokémiai reaktorba helyeztem. A reaktort a 5.3.1. *fejezetben* bemutatott beállításokkal használtam, **20**, **21** és **24** esetén 5, 15, 30, 50, 75, 150, 300, 600, 1200 másodperc, míg **22** esetén 20, 60, 120, 200, 300, 600, 1200, 2400 másodperc megvilágítást követően 30 μ l-es mintákat vettem az oldatokból, melyet HPLC-vel (1. módszer) vizsgáltam. Minden mintát kétszer mértem le HPLC-vel, a kiértékelést az egyes vegyületekhez tartozó csúcsok területe alapján végeztem el.

6. Összefoglalás

Az utóbbi évtizedekben több olyan kismolekulás vegyületet is azonosítottak, melyek a központi idegrendszer működése szempontjából fontos fehérjékhez hasonló biológiai hatást képesek kifejteni. Ezek a molekulák lehetőséget nyújthatnak neurodegeneratív betegségek kezelésére, valamint sérült neuronok regenerálására, amennyiben szabályozni tudjuk azok felszabadulását a sérülés környezetében. Kutatómunkám során ezért olyan vegyületek szintézisét és vizsgálatát tűztem ki célul, melyekből biológiai környezetben a sejtek károsítása nélkül nagyfokú tér- és időbeli precizitással felszabadíthatóak az idegnövekedési fehérje (NGF) kismolekulás mimetikumai.

Szintetikus munkám során sikeresen előállítottam két, az irodalomban ismert biológiai aktivitással rendelkező vegyületet, a fenoxi-tiofén-szulfonamid vázzal rendelkező B-355252-t, valamint az izoleucin származék LM11A-31-et. A vegyületek átmeneti inaktiválására és a későbbi, jól szabályozható felszabadítására elterjedten alkalmaznak fotoreszponzív vegyületeket, a fény számos előnyös tulajdonsága miatt. Ennek megfelelően két különböző alapvázzal rendelkező, összesen háromféle fotolabilis védőcsoport prekursorának szintézisét is megvalósítottam, majd ezeket az idegnövekedési faktor mimetikumokhoz kapcsoltam. A B-355252 védését MeNVOC, DEACM és DEACMOC csoportokkal is elvégeztem, míg az LM11A-31 esetén az MeNVOC és DEACM csoportokat alkalmaztam. A szintetikus munkám során számos különböző típusú reakciót, így többek között nitrálást, redukciót, N-alkilezést, O-alkilezést, S_NAr reakciót, brómozást is végeztem, valamint a peptidszintézisek során gyakran használt kapcsolóágenseket, védőcsoportokat is alkalmaztam a molekulák előállítására. Összességében 5 új fotolabilis védőcsoporttal ellátott NGF-mimetikum vegyületet állítottam elő, melyeket a jövőben biológiai mérések során fogunk alkalmazni.

Négy vegyület esetén a molekulák spektroszkópiai karakterizálását is elvégeztem, valamint vizsgáltam azok fotokémiai tulajdonságait is. Ehhez egy másik fotoreszponzív anyag, a 4,4'-dimetilazobenzol izomerizációs reakcióját használtam referenciaként, az új vegyületek fotolízisére jellemző kvantumhatékonyságot az ezzel történő összehasonlítás alapján határoztam meg. Ez az eljárás, mely jól alkalmazható olyan rendszerekben is, ahol a fény úthossza nem ismert, egy gyors és könnyen kivitelezhető alternatívaként szolgálhat különböző vegyületek fotolízisének vizsgálatára a jövőben.

7. Irodalomjegyzék

1. Szymański, W., Beierle, J. M., Kistemaker, H. A. V., Velema, W. A. & Feringa, B. L. Reversible photocontrol of biological systems by the incorporation of molecular photoswitches. *Chem. Rev.* **113**, 6114–6178 (2013).
2. Mayer, G. & Hechel, A. Biologically active molecules with a ‘light switch’. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 4900–4921 (2006).
3. Bao, C., Zhu, L., Lin, Q. & Tian, H. Building biomedical materials using photochemical bond cleavage. *Adv. Mater.* **27**, 1647–1662 (2015).
4. Dias, L. D., Blanco, K. C., Mfouo-Tynga, I. S., Inada, N. M. & Bagnato, V. S. Curcumin as a photosensitizer: From molecular structure to recent advances in antimicrobial photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol., C* **45**, 100384 (2020).
5. DeRosa, M. C. & Crutchley, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem. Rev.* **233–234**, 351–371 (2002).
6. Thandu, M., Comuzzi, C. & Goi, D. Phototreatment of water by organic photosensitizers and comparison with inorganic semiconductors. *Int. J. Photoenergy* **2015**, 521367 (2015).
7. Fuchter, M. J. On the Promise of Photopharmacology Using Photoswitches: A Medicinal Chemist’s Perspective. *J. Med. Chem.* **63**, 11436–11447 (2020).
8. Feringa, B. L. *Molecular Switches*. (Wiley-VCH, 2001).
9. Tian, H. & Zhang, J. *Photochromic Materials: Preparation, Properties and Applications* (Wiley-VCH, 2016).
10. Kobauri, P., Dekker, F. J., Szymanski, W. & Feringa, B. L. Rational Design in Photopharmacology with Molecular Photoswitches. *Angew. Chem. Int. Ed.* **62**, e202300681 (2023).
11. Casimiro, L. *et al.* 4,4'-Dimethylazobenzene as a chemical actinometer. *Photochem. Photobiol. Sci.* **21**, 825–833 (2022).
12. Yue, L. *et al.* Robust photoregulation of GABA_A receptors by allosteric modulation with a propofol analogue. *Nat. Commun.* **3**, 1095 (2012).
13. Kuntze, K. *et al.* Detour to success: photoswitching via indirect excitation. *Chem. Sci.* **15**, 11684–11698 (2024).
14. Kaplan, J. H., Forbush, B. III & Hoffman, J. F. Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analog: utilization by the sodium:potassium pump of human red blood cell ghosts. *Biochemistry* **17**, 1929–1935 (1978).

15. Ellis-Davies, G. C. R. Caged compounds: Photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nat. Methods* **4**, 619–628 (2007).
16. Breton-Patient, C. *et al.* Light-Activatable Photocaged UNC2025 for Triggering TAM Kinase Inhibition in Bladder Cancer. *ChemBioChem* **25**, e202300855 (2024).
17. McClain, S. P. *et al.* In vivo photopharmacology with light-activated opioid drugs. *Neuron* **111**, 3926–3940.e10 (2023).
18. Frank, J. A. *et al.* In Vivo Photopharmacology Enabled by Multifunctional Fibers. *ACS Chem. Neurosci.* **11**, 3802–3813 (2020).
19. Pelliccioli, A. P. & Wirz, J. Photoremovable protecting groups: Reaction mechanisms and applications. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**, 441–458 (2002).
20. Klán, P. *et al.* Photoremovable protecting groups in chemistry and biology: Reaction mechanisms and efficacy. *Chem. Rev.* **113**, 119–191 (2013).
21. Dunkel P. Photoremovable protecting groups. *Encyclopedia* **2**, 1225–1236 (2022).
22. Hansen, M. J., Velema, W. A., Lerch, M. M., Szymanski, W. & Feringa, B. L. Wavelength-selective cleavage of photoprotecting groups: Strategies and applications in dynamic systems. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 3358–3377 (2015).
23. Barltrop, J. A., Plant, P. J. & Schofield, P. Photosensitive protective groups. *Chem. Commun.* **1966**, 822–823 (1966)
24. Pease, A. C. *et al.* Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 5022–5026 (1994).
25. Singh, A. K. & Khade, P. K. 3-Nitro-2-naphthalenemethanol: A photocleavable protecting group for carboxylic acids. *Tetrahedron* **61**, 10007–10012 (2005).
26. Breiting, H. G. A., Wieboldt, R., Ramesh, D., Carpenter, B. K. & Hess, G. P. Synthesis and characterization of photolabile derivatives of serotonin for chemical kinetic investigations of the serotonin 5-HT₃ receptor. *Biochemistry* **39**, 5500–5508 (2000).
27. Romano, A. *et al.* Stimuli-responsive thiol-epoxy networks with photo-switchable bulk and surface properties. *RSC Adv.* **8**, 41904–41914 (2018).
28. Weinstain, R., Slanina, T., Kand, D. & Klán, P. Visible-to-NIR-Light Activated Release: From Small Molecules to Nanomaterials. *Chem. Rev.* **120**, 13135–13272 (2020).
29. Guibourt, N.-J.-B.-G. *Histoire Abrégée Des Drogues Simples* (1820).
30. Givens, R. S. & Matuszewski, B. Photochemistry of Phosphate Esters: An Efficient Method for the Generation of Electrophiles. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 6860–6861 (1984).

31. Geißler, D. *et al.* (Coumarin-4-yl)methyl esters as highly efficient, ultrafast phototriggers for protons and their application to acidifying membrane surfaces. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 1195–1198 (2005).
32. Briand, B., Kotzur, N., Hagen, V. & Beyermann, M. A new photolabile carboxyl protecting group for native chemical ligation. *Tetrahedron Lett.* **49**, 85–87 (2008).
33. Bojtár, M., Kormos, A., Kis-Petik, K., Kellermayer, M. & Kele, P. Green-Light Activatable, Water-Soluble Red-Shifted Coumarin Photocages. *Org. Lett.* **21**, 9410–9414 (2019).
34. Schmidt, R., Geissler, D., Hagen, V. & Bendig, J. Mechanism of photocleavage of (coumarin-4-yl)methyl esters. *J. Phys. Chem. A* **111**, 5768–5774 (2007).
35. Pincock, J. A. Photochemistry of Arylmethyl Esters in Nucleophilic Solvents: Radical Pair and Ion Pair Intermediates. *Acc. Chem. Res.* **30**, 43–49 (1997).
36. Terakita, A. The opsins. *Genome Biol.* **6**, 213 (2005).
37. Kaeser, G. *et al.* Phytochrome-Interacting Proteins. *Biomolecules* **14**, 9 (2023).
38. Torra, J. *et al.* Tailing miniSOG: structural bases of the complex photophysics of a flavin-binding singlet oxygen photosensitizing protein. *Sci. Rep.* **9**, 2428 (2019).
39. Mironova, K. E. *et al.* Genetically encoded immunophotosensitizer 4D5scFv-miniSOG is a highly selective agent for targeted photokilling of tumor cells in vitro. *Theranostics* **3**, 831–840 (2013).
40. Andresen, M. *et al.* Photoswitchable fluorescent proteins enable monochromatic multilabel imaging and dual color fluorescence nanoscopy. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1035–1040 (2008).
41. Edwards, K. A., Hoppa, M. B. & Bosco, G. The Photoconvertible Fluorescent Probe, CaMPARI, Labels Active Neurons in Freely-Moving Intact Adult Fruit Flies. *Front. Neural Circuits* **14**, (2020).
42. Vierock, J. *et al.* BiPOLES is an optogenetic tool developed for bidirectional dual-color control of neurons. *Nat. Commun.* **12**, 4527 (2021).
43. Lu, X. *et al.* Photocleavable proteins that undergo fast and efficient dissociation. *Chem. Sci.* **12**, 9658–9672 (2021).
44. Bazira, P. J. An overview of the nervous system. *Surgery* **39**, 451–462 (2021).
45. Whittaker, V. P. & Gray, E. G. The synapse: Biology and morphology. *Br. Med. Bull.* **18**, 223–228 (1962).

46. Yuan, J. *et al.* Boosting neurite outgrowth and anti-oxidative stress for treatment of Parkinson's disease by biomimetic ultrasmall nanoparticles. *Sustainable Mater. Technol.* **39**, e00807 (2024).
47. Subramanian, J. & Tremblay, M.-È. Editorial: Synaptic Loss and Neurodegeneration. *Front. Cell. Neurosci.* **15**, (2021).
48. Girardin, S. *et al.* Topologically controlled circuits of human iPSC-derived neurons for electrophysiology recordings. *Lab Chip* **22**, 1386–1403 (2022).
49. Dupraz, S. *et al.* RhoA Controls Axon Extension Independent of Specification in the Developing Brain. *Curr. Biol.* **29**, 3874-3886.e9 (2019).
50. Tessier-Lavigne, M. & Goodman, C. S. The Molecular Biology of Axon Guidance. *Science* **274**, 1123–1133 (1996).
51. Sánchez-Huertas, C. & Herrera, E. With the Permission of Microtubules: An Updated Overview on Microtubule Function During Axon Pathfinding. *Front. Mol. Neurosci.* **14**, 759404 (2021).
52. Mortimer, D., Fothergill, T., Pujic, Z., Richards, L. J. & Goodhill, G. J. Growth cone chemotaxis. *Trends Neurosci.* **31**, 90–98 (2008).
53. Cohen, S., Levi-Montalcini, R. & Hamburger, V. A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcomas 37 and 180. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **40**, 1014–1018 (1954).
54. Kume, T. *et al.* p75-mediated neuroprotection by NGF against glutamate cytotoxicity in cortical cultures. *Brain Res.* **852**, 279–289 (2000).
55. De Boer, A., Van Buel, E. M. & Ter Horst, G. J. Love is more than just a kiss: A neurobiological perspective on love and affection. *Neuroscience* **201**, 114–124 (2012).
56. Allen, S. J. & Dawbarn, D. Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clin. Sci.* **110**, 175–191 (2006).
57. Tagliatela, G., Angelucci, L., Scaccianoce, S., Foreman, P. J. & Perez-Polo, J. R. Nerve Growth Factor Modulates the Activation of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis during the Stress Response. *Endocrinology* **129**, 2212-2218 (1991).
58. Gundersen, R. W. & Barrett, J. N. Neuronal Chemotaxis: Chick Dorsal-Root Axons Turn Toward High Concentrations of Nerve Growth Factor. *Science* **206**, 1079–1080 (1979).
59. Levi-Montalcini, R. The Nerve Growth Factor 35 Years Later. *Science* **237**, 1154–1162 (1987).
60. Anggraini, D. *et al.* Guided axon outgrowth of neurons by molecular gradients generated from femtosecond laser-fabricated micro-holes. *Talanta* **267**, 125200 (2024).

61. Maliartchouk, S. *et al.* A designed peptidomimetic agonistic ligand of TrkA nerve growth factor receptors. *Mol. Pharmacol.* **57**, 385–391 (2000).
62. Weissmiller, A. M. & Wu, C. Current advances in using neurotrophic factors to treat neurodegenerative disorders. *Transl. Neurodegener.* **1**, 14 (2012).
63. Gudasheva, T. A., Povarnina, P. Y., Tarasiuk, A. V. & Seredenin, S. B. Low-molecular mimetics of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor: Design and pharmacological properties. *Med. Res. Rev.* **41**, 2746–2774 (2021).
64. Dagø, L. *et al.* NS 1231, a Novel Compound with Neurotrophic-like Effects in Vitro and in Vivo. *J. Neurochem.* **81**, 17–24 (2002).
65. Williams, A. L., Dandepally, S. R., Gilyazova, N., Witherspoon, S. M. & Ibeanu, G. Microwave-assisted synthesis of 4-chloro-N-(naphthalen-1-ylmethyl)-5-(3-(piperazin-1-yl)phenoxy)thiophene-2-sulfonamide (B-355252): A new potentiator of nerve growth factor (NGF)-induced neurite outgrowth. *Tetrahedron* **66**, 9577–9581 (2010).
66. Lian, Y., Coffey, S. B., Li, Q. & Londregan, A. T. Preparation of Heteroaryl Ethers from Azine N-Oxides and Alcohols. *Org. Lett.* **18**, 1362–1365 (2016).
67. Gliyazova, N. S., Huh, E. Y. & Ibeanu, G. C. A novel phenoxy thiophene sulphonamide molecule protects against glutamate evoked oxidative injury in a neuronal cell model. *BMC Neurosci.* **14**, 93 (2013).
68. Gliyazova, N. S. & Ibeanu, G. C. The Chemical Molecule B355252 is Neuroprotective in an In Vitro Model of Parkinson's Disease. *Cell. Mol. Neurobiol.* **36**, 1109–1122 (2016).
69. Chimeh, U., Zimmerman, M. A., Gilyazova, N. & Li, P. A. B355252, a novel small molecule, confers neuroprotection against cobalt chloride toxicity in mouse hippocampal cells through altering mitochondrial dynamics and limiting autophagy induction. *Int. J. Med. Sci.* **15**, 1384–1396 (2018).
70. Wang, H. K. *et al.* A novel NGF receptor agonist B355252 ameliorates neuronal loss and inflammatory responses in a rat model of cerebral ischemia. *J. Inflamm. Res.* **14**, 2363–2376 (2021).
71. Sofroniew, M. V, Howe, C. L. & Mobley, W. C. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 1217–1281 (2001).
72. Massa, S. M. *et al.* Small, nonpeptide p75NTR ligands induce survival signaling and inhibit proNGF-induced death. *J. Neurosci.* **26**, 5288–5300 (2006).

73. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* **46**, 3-26 (2001).
74. Nguyen, T. V. V. *et al.* Small molecule p75NTR ligands reduce pathological phosphorylation and misfolding of tau, inflammatory changes, cholinergic degeneration, and cognitive deficits in A β PPL/S transgenic mice. *J. Alzheimer's Dis.* **42**, 459–483 (2014).
75. James, M. L. *et al.* [18F]GE-180 PET detects reduced microglia activation after LM11A-31 therapy in a mouse model of Alzheimer's disease. *Theranostics* **7**, 1422–1436 (2017).
76. Xie, Y., Meeker, R. B., Massa, S. M. & Longo, F. M. Modulation of the p75 neurotrophin receptor suppresses age-related basal forebrain cholinergic neuron degeneration. *Sci. Rep.* **9**, 5273 (2019).
77. Elshaer, S. L. *et al.* Modulation of the p75 neurotrophin receptor using LM11A-31 prevents diabetes-induced retinal vascular permeability in mice via inhibition of inflammation and the RhoA kinase pathway. *Diabetologia* **62**, 1488–1500 (2019).
78. Tep, C. *et al.* Oral administration of a small molecule targeted to block proNGF binding to p75 promotes myelin sparing and functional recovery after spinal cord injury. *J. Neurosci.* **33**, 397–410 (2013).
79. Shi, J., Longo, F. M. & Massa, S. M. A small molecule p75NTR ligand protects neurogenesis after traumatic brain injury. *Stem Cells* **31**, 2561–2574 (2013).
80. Yin, G. N. *et al.* Oral Administration of the p75 Neurotrophin Receptor Modulator, LM11A-31, Improves Erectile Function in a Mouse Model of Cavernous Nerve Injury. *J. Sex. Med.* **18**, 17–28 (2021).
81. Luu, P., Fraser, S. E. & Schneider, F. More than double the fun with two-photon excitation microscopy. *Commun. Biol.* **7**, 364 (2024).
82. Helmchen, F. & Denk, W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat. Methods* **2**, 932–940 (2005).
83. Rubart, M. Two-photon microscopy of cells and tissue. *Circ. Res.* **95**, 1154–1166 (2004).
84. Denk, W., Strickler, J. H. & Webb, W. W. Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *Science* **248**, 73–76 (1990).
85. Brieke, C., Rohrbach, F., Gottschalk, A., Mayer, G. & Heckel, A. Light-Controlled Tools. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 8446–8476 (2012).

86. Young, A. T. Rayleigh scattering. *Appl. Opt.* **20**, 533–535 (1981).
87. Feng, Z. *et al.* Perfecting and extending the near-infrared imaging window. *Light Sci. Appl.* **10**, 197 (2021).
88. Klausen, M. & Blanchard-Desce, M. Two-photon uncaging of bioactive compounds: Starter guide to an efficient IR light switch. *J. Photochem. Photobiol., C* **48**, 100423 (2021).
89. Noguchi, J. *et al.* In vivo two-photon uncaging of glutamate revealing the structure-function relationships of dendritic spines in the neocortex of adult mice. *J. Physiol.* **589**, 2447–2457 (2011).
90. Specht, A., Bolze, F., Nicoud, J. F. & Goeldner, M. Characterization of one-and two-photon photochemical uncaging efficiency. *Methods Mol. Biol.* **995**, 79–87 (2013).
91. Rabani, J., Mamane, H., Pousty, D. & Bolton, J. R. Practical Chemical Actinometry—A Review. *Photochem. Photobiol.* **97**, 873–902 (2021).
92. Goldstein, S. & Rabani, J. The ferrioxalate and iodide-iodate actinometers in the UV region. *J. Photochem. Photobiol., A* **193**, 50–55 (2008).
93. Bolton, J. R., Stefan, M. I., Shaw, P. S. & Lykke, K. R. Determination of the quantum yields of the potassium ferrioxalate and potassium iodide-iodate actinometers and a method for the calibration of radiometer detectors. *J. Photochem. Photobiol., A* **222**, 166–169 (2011).
94. Straub, S., Brünker, P., Lindner, J. & Vöhringer, P. The femtochemistry of the ferrioxalate actinometer. *EPJ Web Conf.* **205**, 05016 (2019).
95. Ji, Y., DiRocco, D. A., Hong, C. M., Wismer, M. K. & Reibarkh, M. Facile Quantum Yield Determination via NMR Actinometry. *Org. Lett.* **20**, 2156–2159 (2018).
96. Roseau, M. *et al.* Azobenzene: a Visible-Light Chemical Actinometer for the Characterization of Fluidic Photosystems. *Helv. Chim. Acta* **104**, e2100071 (2021).
97. Corrie, J. E. T., Kaplan, J. H., Forbush, B., Ogden, D. C. & Trentham, D. R. Photolysis quantum yield measurements in the near-UV; A critical analysis of 1-(2-nitrophenyl)ethyl photochemistry. *Photochem. Photobiol. Sci.* **15**, 604–608 (2016).
98. Lee-Dutra, A. *et al.* Identification of 2-arylbenzimidazoles as potent human histamine H4 receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 6043–6048 (2006).
99. Tao, K., Yoskovitz, E., Adler-Abramovich, L. & Gazit, E. Optical property modulation of Fmoc group by pH-dependent self-assembly. *RSC Adv.* **5**, 73914–73918 (2015).
100. Gao, C. *et al.* Triggering a [2]Rotaxane Molecular Shuttle by a Photochemical Bond-Cleavage Strategy. *Org. Lett.* **19**, 1618–1621 (2017).

101. Koch, T. H., Barthel, B. L., Yin, H. H., Tamura, R. & Balabanova, A. Anthracycline prodrugs and methods of making and using the same. WO2016176332 (2016).
102. Bassolino, G. *et al.* Photolabile coumarins with improved efficiency through azetidinyI substitution. *Chem. Sci.* **9**, 387–391 (2018).
103. Gao, Z. *et al.* Photo-controlled release of fipronil from a coumarin triggered precursor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27**, 2528–2535 (2017).
104. Tojima, T. & Ito, E. Signal transduction cascades underlying de novo protein synthesis required for neuronal morphogenesis in differentiating neurons. *Prog. Neurobiol.* **72**, 183–193 (2004).
105. Jeon, C. Y. *et al.* Control of neurite outgrowth by RhoA inactivation. *J. Neurochem.* **120**, 684–698 (2012).
106. Labruère, R. *et al.* ‘Self-immolative’ spacer for uncaging with fluorescence reporting. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 9344–9347 (2012).
107. Pantl, O. *et al.* Seeing and Cleaving: Turn-Off Fluorophore Uncaging and Its Application in Hydrogel Photopatterning and Traceable Neurotransmitter Photocages. *ACS Appl. Mater. Interfaces* (2024).