

——— Tudományos Diákköri Dolgozat ———

Eördög Ádám

NIR tartományban emittáló fluoreszcens jelzővegyületek szintézise és vizsgálata

Dr. Kele Péter

Dr. Herner András

tudományos főmunkatárs

tudományos munkatárs

Magyar Tudományos Akadémia, Természettudományi Kutatóközpont,
Szerves Kémiai Intézet, Kémiai Biológia Kutatócsoport

Belső konzulens: Dr. Novák Zoltán egyetemi adjunktus



——— Eötvös Loránd Tudományegyetem ———

——— Természettudományi Kar ——

— Budapest, 2014 —

Tartalomjegyzék

1. Rövidítésjegyzék	3
2. Bevezetés.....	4
2.1. A fluoreszcens jelölés típusai	4
2.2. Bioortogonális kapcsolás	5
2.3. Fluoreszcens jelzővegyületek tervezése	8
3. Saját munka	12
3.1 Célkitűzések.....	12
3.2. Szintézis.....	13
3.3. Spektroszkópia.....	17
4. Összefoglalás,.....	20
5. Kísérleti rész.....	21
5.1. Általános	21
5.2. Szintézisek	22
6. Köszönetnyilvánítás	31
7. Függelék	32
8. Hivatkozások	34

1. Rövidítésjegyzék

CuAAC.....	réz(I) katalizált azid-alkin cikloaddíció (Cu(I) catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition)
Δ	forralás, forráshőmérséklet
DCM.....	diklór-metán
DFT	sűrűségfunkcionál elmélet (Density Functional Theory)
DMSO	dimetil-szulfoxid
EtOAc.....	etil-acetát
ϕ_F	fluoreszcenciás kvantumhasznosítási tényező
hex	hexán izomerelegy
HRMS.....	nagyfelbontású tömegspektrometria (High Resolution Mass Spectrometry)
HPLC.....	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (High-Performance Liquid Chromatography)
HMPA	hexametil-foszforsavtriamid
MeCN	acetonitril
NIR	közeli infravörös (Near Infra Red)
PBS.....	foszfátpufferrel pufferelt izotóniás sóoldat (Phosphate Buffered Saline)
r.t.	szobahőmérséklet (room temperature)
SPAAC.....	gyűrűfeszültség által hajtott azid-alkin cikloaddíció (Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition)
TEA	N,N,N-trietil-amin
VRK	vékonyréteg-kromatográfia

2. Bevezetés

A képalkotási technikák kiemelkedő jelentőséggel bírnak az élő rendszerek vizsgálatában. Jól mutatja ezt, hogy több, mérföldkőnek számító biológiai felismerés is a képalkotó rendszerek fejlődéséhez köthető.^{1a,b} Olyan módszerek kifejlesztése a cél, melyekben a megfigyelt élő rendszerek minimális perturbációja mellett követhetjük azok életfolyamatait, a lehető legjobb idő- és térbeli felbontás mellett. Mivel a biológiai folyamatok összehangolt molekuláris folyamatok eredményei, megfigyelésükhöz nanométer nagyságrendű felbontás szükséges. E cél eléréséhez az egyik legtöbbet kutatott területek a különböző fluoreszcens mikroszkópiás technikák, melyek jelentőségét jól mutatja, hogy 2008-ban a zöld fluoreszcens fehérjével kapcsolatos², míg 2014-ben a szuperfelbontású fluoreszcens mikroszkópia fejlesztéséért tett erőfeszítésekért osztották ki a kémiai Nobel díjat.³ A fluoreszcens mikroszkópiában a jelet az ún. fluorofór biztosítja, mely emissziójának detektálásával történhet a jelölt képletek lokalizálása, illetve a képalkotás. A fluoreszcencián alapuló képalkotási technikák előnye, hogy ezek az eljárások nem invazivak a leképezendő biológiai rendszerre nézve, a detektálás pedig relatíve egyszerűen, olcsón, nagy érzékenységgel valósítható meg. A szuperfelbontású technológiák akár egy molekula kimutatását is lehetővé teszik.⁴ A fluoreszcencia e sajátos jellemzőit kihasználva és az elmúlt évtizedekben lehetővé vált nagymértékű felbontóképesség növelés lehetővé tette a fluoreszcencián alapuló képalkotó eljárások előtérbe kerülését más technikákkal (pl. microMRI, microPET) szemben.⁵ (összehasonlítást ld. az i. függelékben) Mindezen előnyök mellett kedvező lenne a kontraszt és a behatolási mélység további növelése, melyet a jelölők megfelelő tervezésével érhetünk el.

A fluoreszcens képalkotási technikákban a kapott információ a jelölés számos paraméterétől függ. A kémiai biológiai kutatások egyik fő területe, hogy lehetővé tegyék a biomolekulák (hely)specifikus fluoreszcens jelölését.

2.1. A fluoreszcens jelölés típusai

A fluorofórokat három fő csoportra oszthatjuk. Első típusuk a genetikailag kódolt jelölők, a fluoreszcens fehérjék. Használatuk során kedvező, hogy biztosított a célfehérjéhez való kötődés, és bevitelük során nem történik kémiai beavatkozás, ugyanis a vizsgált rendszerben a fluorofórt a sejt saját bioszintézisével hozza létre, ezért nevezzük endogén jelölésnek is. A

genetikai kódolásából származó hátrány, hogy elsősorban fehérjék jelölésére alkalmas, más, genomban közvetlenül nem kódolt, vagy poszt-transzlációs módosításon áteső biomolekulák esetén nem használható. Továbbá a fluoreszcens fehérjék makromolekuláris méretükből adódóan perturbálhatják a vizsgált fehérjét, ami szintén gátolhatja alkalmazásukat. Erre példa lehet, mikor a fluorofór miatt nem hozzáférhetők a fehérje egyes funkcionális elemei, így természetes mozgásukban (pl. membránnal kölcsönhatás), működésükben zavar keletkezhet.⁶ A méretük egyben korlátozza a felbontás mértékét, hiszen a fehérje méreténél kisebb mérettartomány nem érhető el.

További lehetőség szervetlen, félvezető nanokristályok, ún. „kvantumpöttyök” (*quantum dots*, QD) fluoreszcens jelölőként való felhasználása. Ezek, bár nagy fényességgel és jó stabilitási jellemzőkkel bírnak, nem biokompatibilisek, funkcionálizálásuk és a célmolekulához kapcsolásuk pedig kihívást jelent.⁷

Alternatívát és megoldást jelentenek a fenti problémákra a fluorofórok harmadik fő típusa, a szintetikus, szerves jelzővegyületek alkalmazása. Spektrális, stabilitási és reaktivitási tulajdonságaik széles skálán változtathatóak, ezekből következően széleskörűen alkalmazhatók. Akár adott problémára tervezhetőek a kívánt tulajdonsággal bíró festékek. A kismolekulás jelölés vitathatatlan előnyei közé tartozik, hogy kis méretük a rendszer minimális perturbációját okozza, illetve a felbontás további növekedését teszi lehetővé, ami különösen kedvező a szuper-felbontású mikroszkópiához. Munkám során ezzel a csoporttal foglalkoztam, így a továbbiakban ezeket tárgyalom.

2.2. Bioortogonális kapcsolat

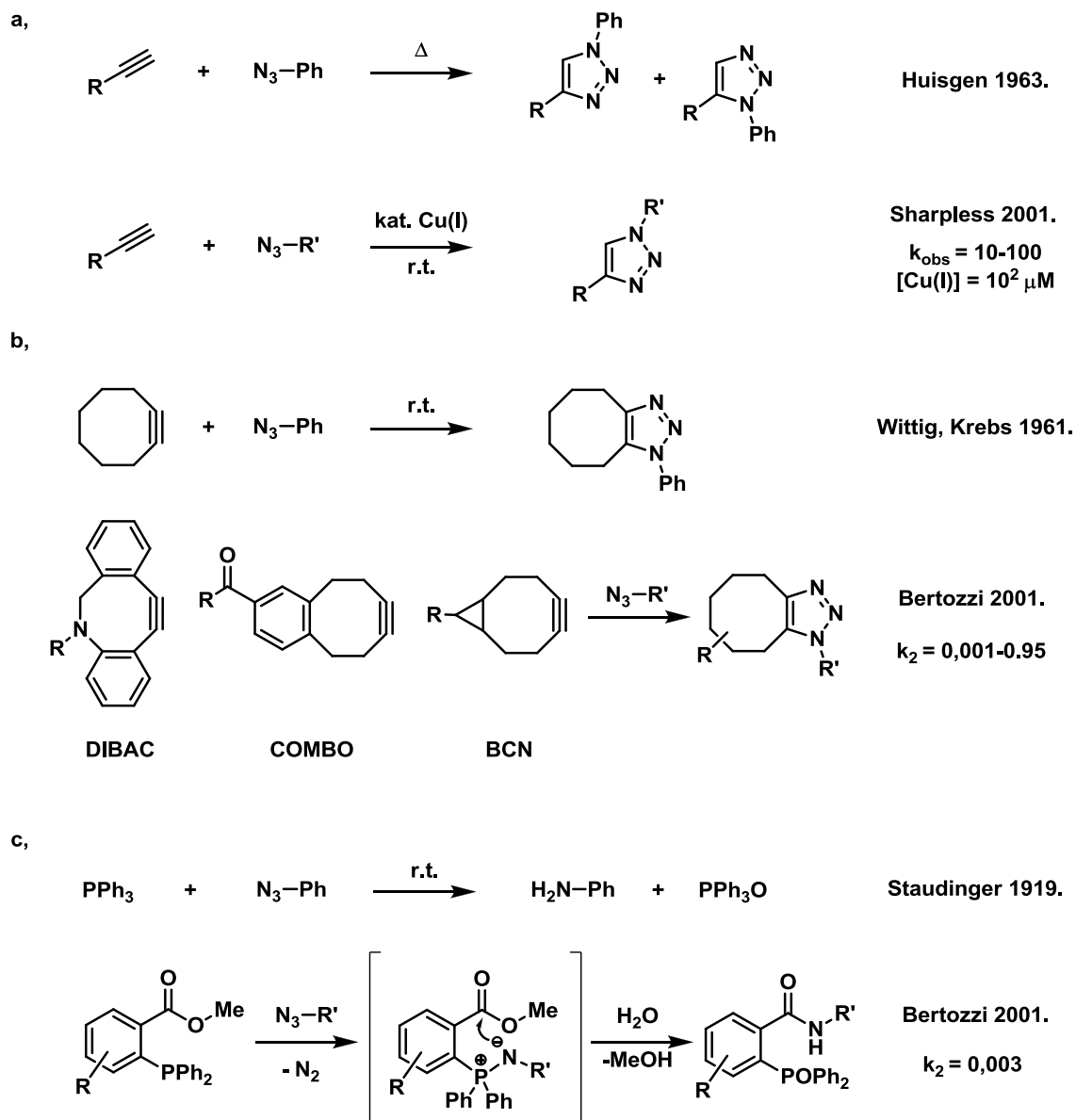
A szintetikus jelölők esetében hangsúlyt kell fektetni a bevitel módjára, melyre két eltérő módszert használnak. Az első lehetőség, hogy a jelölőt a célmolekulához közvetlenül (és sokszor *in vivo*) kapcsoljuk. Ehhez olyan specifikus reakciót kell találnunk, ami egy, a természetben is jelenlevő csoporthoz szelektíven kapcsolódik. Bár találhatunk erre is példát az irodalomban⁸, e specifikus reakciók száma csekélynek mondható, sokszor szelektivitásuk és stabilitásuk sem kielégítő (pl. tiol-maleimid kapcsolás)⁹. Második lehetőség, hogy a jelölendő makromolekulába a jelölést megelőzően egy szelektív reakciót lehetővé tevő funkciós csoporttal módosított monomert építetünk be (kémiai hírvivő, *chemical reporter*). Ez történhet pl. a sejt metabolikus apparátusát felhasználva. Az így módosított makromolekulát a

következő lépésben módosítjuk fluoreszcens jelzővegyülettel.¹⁰ Az ilyen esetekben elengedhetetlen feltétel, hogy a jelölés során alkalmazott reakcióban részt vevő funkcióscsoport párok megfeleljenek a bioortogonalitás feltételeinek.¹¹ Ezek alapján szükséges, hogy a szelektív reakció biológiailag inert funkcióscsoportok között játszódjon le, a kialakult kovalens kötés pedig kellő stabilitással bírjon a sejtes közegben. Továbbá, a reakció a biokémiai folyamatokkal összemérhető sebességgel játszódjon le a két partner között, kis koncentrációk esetén is. A kapcsolásnak fiziológiás körülmények közt kell létrejönnie anélkül, hogy bármely reagens toxikus lenne az élőlényre nézve. E kritériumok nagyban leszűkítik a kémiai eszköztárat, de mára így is több mint húsz különböző bioortogonális reakció található az irodalomban^{12,13} (ld. ii, függelék).

Ezek közül a következők alkalmazása terjedt el leginkább:

1. rézkatalizált azid-alkin cikloaddíció (CuAAC)
2. gyűrűfeszültség által kiváltott azid-alkin cikloaddíció (SPAAC)
3. tetrazinok inverz elektronigényű Diels-Alder cikloaddíciója
4. Staudinger-ligáció
5. vinil-szulfonok és tiolok reakciója
6. tetrazolok fotodisszociációjából *in situ* képződött nitril-iminek és alkének reakciója.

Általánosan igaz e reakciókra, hogy a természetben elő nem forduló funkcióscsoportok vesznek részt bennük. A funkcióscsoportok közül kiemelkedik az azid csoport jelentősége, mely elsősorban kis méretének, biomolekulák iránt mutatott inertségének, szűk reakciókeresztmetszetének és metabolikus stabilitásának köszönhető.¹⁴ A továbbiakban néhány példán ismertetem az azid csoportot is tartalmazó bioortogonális reakciókat. (1.ábra)



1. ábra Az azid csoport bioortogonális kapcsolási reakciói, és azok előzményei. a, rézkatalizált azid-alkin cikloaddíció (CuAAC); b, gyűrűfeszültég hajtotta azid-cikloalkin cikloaddíció (SPAAC); c, Staudinger-Bertozzi

Az azid csoport a szintetikus szerves kémiai átalakításoknak is fontos eszköze, a 20. században számos kutatás tárgya volt. Bioortogonális kémiai alkalmazása szempontjából több fontos reakcióját közölték. Ilyenek például a Huisgen féle 1,3-dipoláris cikloaddíció¹⁵, illetve ennek réz katalizált formája, valamint a Wittig és Krebs által leírt, gyűrűfeszültség által segített 1,3-dipoláris cikloaddíció.¹⁶ 2001-ben Sharpless és munkatársai publikálták, hogy a Huisgen féle cikloaddíció Cu(I) katalízissel szobahőmérsékleten, nagy sebességgel, kiváló regioszelektivitással és konverzióval játszódik le. (A Cu(I) katalízis specifikus az 1,4-regioizomerre, e regioszelektivitásnak a fluoreszcens jelölés szempontjából azonban általában nincs jelentősége). Ebből a reakcióból kiindulva vezették le Sharpless és mtsai a klikk reakció

és a klikk kémia fogalmát.¹⁷ Meg kell említeni, hogy a klikk reakció elnevezés több kémiai átalakítást foglal magába, leggyakrabban mégis az azid-alkin cikloaddícióra értik. Később Bertozzi és munkatársai Wittig és Krebs korai munkái alapján fejlesztették ki a réz-katalizátort nem igénylő, gyűrűfeszültség által katalizált azid-alkin cikloaddíciót.¹⁸ Mára számos, heteroatomokat, kondenzált aromás gyűrű(ke)t is tartalmazó ciklooktin származékot állítottak elő¹⁹, melyekkel egyre kedvezőbb kinetikai jellemzőket értek el, minek következtében az így kivitelezett kapcsolás sebessége megközelíti a Cu(I) katalizált reakcióét. A feszültgyűrűs ciklooktinokkal végrehajtott kapcsolások rézmentes klikk reakciókként váltak ismertté, és mára az egyik leggyakrabban alkalmazott bioortogonális eljárásként ismertek. Az azid reakcióira további példa az ún. Staudinger-redukción alapuló kapcsolás,²⁰ ami ugyancsak Bertozzi nevéhez fűződik, és Staudinger-ligációs eljárásként vagy Staudinger-Bertozzi kapcsolásként ismert. Ebben a reakcióban a foszfán reaktáns egyik aromás gyűrűjét orto-helyzetben elektrofil csapdaként funkcionáló karboxiláttal módosították. A Staudinger redukcióban köztiterméként képződő, nukleofil-jellegű ilid-nitrogén e karboxilát csoporttal intramolekuláris reakcióban reagál, vízkilépést követően pedig amid típusú végterméket kapunk.

Az említett három módszer közül a rézkatalizált klikk reakció a leggyorsabb, azonban végrehajtásához, ha kis koncentrációban is, de Cu(I) katalizátor szükséges, melynek használata kerülendő citosztatikus/citotoxikus volta miatt. Megemlítendő, hogy erőfeszítéseket tettek a réz toxikusságának csökkentésére is, különböző ligandumok kifejlesztésével.²¹ Reakciósebességi sorrendben az említett példák közül a rézmentes klikk reakciók a következnek, ezek közül azonban több mellékreakciókat is adhat, főleg tiol-nukleofilokkal,²² valamint dimerizálódhatnak, trimerizálódhatnak. A Staudinger-ligáció szelektivitásában kiváló, és nem is szükséges hozzá toxikus anyag sejtbe juttatása, viszont 4-5 nagyságrenddel kisebb másodrendű sebességi állandóval jellemezhető, mint a CuAAC. Hátrányt okozhat továbbá a foszfán spontán oxidációja, ami inaktívvá teszi a reagenst.

2.3. Fluoreszcens jelzővegyületek tervezése

A fluoreszcens jelölőmolekulák alkalmazhatóságát – a kapcsolás típusán túl – számos dolog befolyásolja. Megfelelő membránpermeabilitással, vízdoldhatósággal, és stabilitási jellemzőkkel kell rendelkezniük. A spektrális tulajdonságok pedig alapvetően meghatározzák

a jelölési lehetőségeket, hatással vannak a képalkotás kontrasztjára és az elérhető behatolási mélységre is. UV tartományban gerjeszthető molekulák minden további nélkül alkalmazhatók *in vitro* kísérletekben, míg *in vivo* körülmények között kerülendők. A fluoreszcens jelölés során a detektálás érzékenységét csökkenti az elreagálatlan reagensek emissziójából származó háttérfluoreszcencia és a szervezetekben fluoreszcens tulajdonságokkal bíró (pl. aromás oldalláncú aminosavak, szerves bázisok) természetes vegyületek saját fluoreszcenciája, az úgynevezett autofluoreszcencia.

Az autofluoreszcencia mértéke csökkenthető például, ha az abszorpciós és emissziós hullámhossz közt nagy eltérés, ún. nagy Stokes-eltolódás van. Ez ugyanis a biomolekulák közt ritkán fordul elő, így a gerjesztett fluoreszcens biomolekulák emissziója rövidebb hullámhosszokon történik, mint a detektálás, a nem kívánt tartományt szűrők alkalmazásával kiiktathatjuk.²³ Az autofluoreszcencia mértékének csökkentésére, valamint a behatolási mélység javíthatóságára ugyancsak alkalmasak azok a fluorofórok, melyeknek gerjesztési és emissziós maximumai a távoli vörös illetve a közeli infravörös tartományba esnek. Az autofluoreszcencia csökkenése ebben az esetben annak köszönhető, hogy a fluoreszcens biomolekulák ebben a hullámhossz-tartományban már sokkal kisebb számban gerjeszthetők. A behatolási mélység növekedése pedig abból adódik, hogy az élő szövetek transzmittanciája a távoli vörös – közeli infravörös tartományban a legnagyobb. Rövidebb hullámhosszknál ugyanis főleg a porfirin vázas biomolekulák, nagyobb hullámhosszknál pedig a víz elnyelése okoz nagy abszorbcanciát. Innen származik a NIR-ablak elnevezés, melyet a 650-900 nm közti régióra értünk.²⁴

Mikroszkópos alkalmazások során a fluorofórok hasznos jellemzője az ún. fényesség (B), mely a moláris abszorpciós koefficiens és a kvantumhasznosítási tényező szorzatával egyenlő.²⁵ A kvantumhasznosítási tényező Φ_F megadja, hogy milyen valószínűséggel szűnik meg a gerjesztett állapot fluoreszcens emisszióval. Megadható a fluoreszcensen emittált fotonok és az elnyelt fotonok számának arányával.

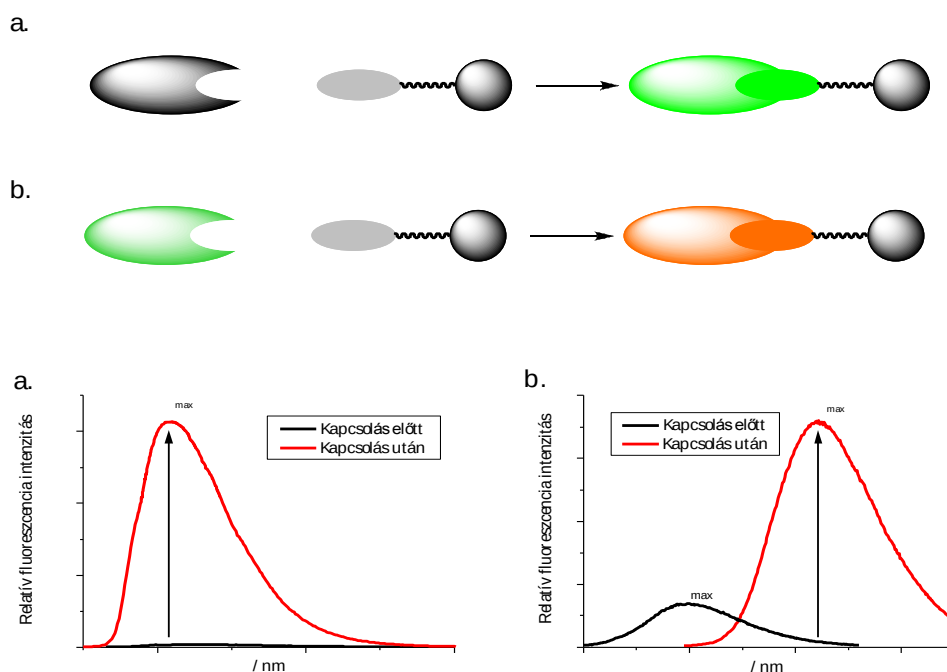
$$B = \varepsilon \cdot \Phi_F \qquad \Phi_F = \frac{\Sigma \text{fluoreszcensen emittált fotonok}}{\Sigma \text{abszorbált fotonok}}$$

Kisebb fényesség mellett is problémamentes lehet a képalkotás, de a nagyobb fényesség javítja a jel/zaj arányt, kedvezően hat az érzékenységre.

A fluorofórok különleges csoportját alkotják az ún. fluorogén jelzővegyületek. Fluorogén tulajdonság alatt azt értjük, ha az adott kémiai reakció végbemenetele során – ami legtöbbször praktikusán a kapcsolást / ligációt jelenti – a fluoreszcencia intenzitása jelentősen megnő.

Fluorogének segítségével növelhető az érzékenység és a kontraszt, ekkor ugyanis a nem specifikusan kötődő jelölők nem okoznak háttérfluoreszcenciát. Használatuk további előnye, hogy nem igénylik a minta mosását a feleslegben hozzáadott jelölők eltávolítása céljából.²⁶ Fluorogén tulajdonság származhat akár a kapcsolás során bekövetkező fluoreszcencia intenzitás növekedésétől, akár az emissziós hullámhossz eltolódásától (kapcsolás előtt más hullámhosszon emittál), vagy az említett két jelenség egyidejű megjelenésétől is (2. ábra).²⁷ A fluoreszcencia erősítést (azaz „fluorogenitást”) kifejezhetjük a kapcsolás előtt és után, a termék emissziós maximumán mért intenzitás, illetve kvantumhasznosítási tényező arányokkal. A fluorogén jelzővegyületek esetén tehát kulcskérdés, hogy mekkora a szabad és a kapcsolás utáni jelölő abszorpciós és emissziós maximumának hullámhossza, valamint mekkora a fluoreszcencia intenzitása.

Kézenfekvő lenne e jellemzőket elméleti úton, számítógépes modellezés segítségével kiszámolni, és a kapott adatok ismeretében előre megtervezni vagy akár kiszűrni a kedvező spektrális tulajdonsággal rendelkező jelzővegyületeket. Napjaink elméleti kémiai módszereivel az abszorpciós és emissziós hullámhosszak megfelelő pontossággal becsülhetők. Az átmenetek valószínűsége – azaz az oszcillátorerősség – azonban nehezebben prediktálható. Az elméleti modellek pontosításához elengedhetetlen a megfelelő számú kísérleti eredmény. Fontos megemlíteni, hogy több külső hatás is befolyással bír az



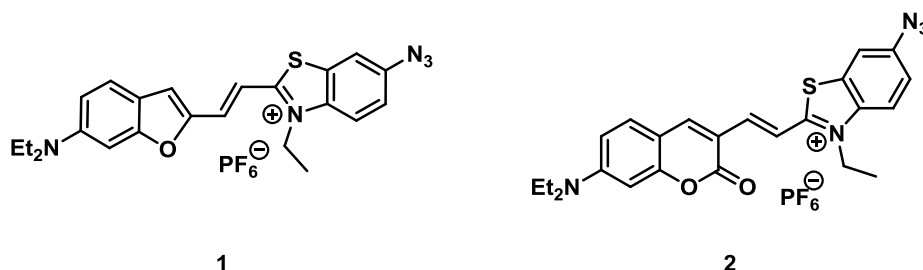
2. ábra Fluorogének típusai. a) intenzitásnövekedés a meghatározó; b) emissziós hullámhossz eltolódása a meghatározó

emisszióra: a szolvatokromizmus jelentős hullámhossz-eltolódást okozhat, illetve figyelembe kell venni, hogy bizonyos oldószerek (pl. a víz) fluoreszcencia kioltó (ún. kvencselő) tulajdonsággal rendelkeznek. Ezek miatt különösen nehéz a fluorogén tulajdonság jóslása, mértékének becslése. Kutatócsoportunkban, a kísérleti eredmények és elméleti számítások egybevetésével, olyan módszert dolgoztunk ki, melynek segítségével több esetben jó hatásfokkal tudjuk egy vegyület fluorogénitását becsülni.²⁸

3.1 Célkitűzések

- i) fluorogén tulajdonság
- ii) legalább látható tartományban levő gerjesztés és távoli vörös, közeli IR tartományba eső emissziós maximum
- iii) nagy Stokes-eltolódás
- iv) bioortogonális alkalmazáshoz szükséges funkciós csoport
- v) megfelelő vízzoldékonyság.

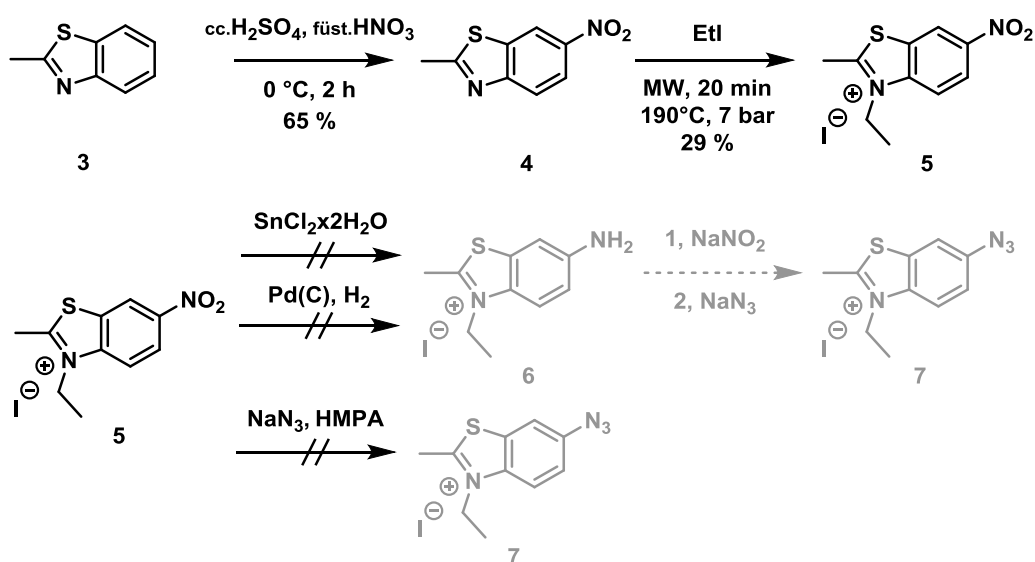
Ezek alapján a tervezett két molekula szerkezete a következő volt:



3. ábra Célvegyületek

3.2. Szintézisek

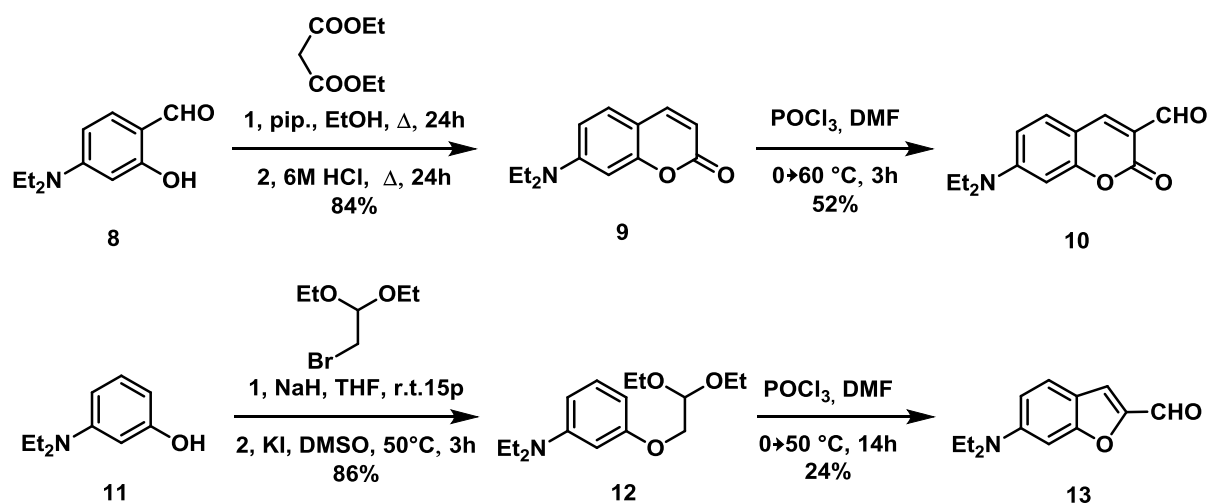
Az **1**, **2** célvegyületek szintézisét két analóg reakcióúton valósítottam meg. Elsőként a mindkettő vegyületben szereplő benzotiazólium származék kialakítását hajtottam végre. 2-metil-1,3-benzotiazolból (**3**) nitrálóelegy hozzáadásával (cc. H_2SO_4 : füst. HNO_3 2 : 3), 2-metil-6-nitro-1,3-benzotiazolt állítottam elő. Ezt követően magas hőmérsékleten mikrohullámú reaktorban etil-jodiddal történő alkilezést hajtottam végre, mely az *N*-etil-2-metil-6-nitro-1,3-benzotiazólium jodid sóát (**5**) eredményezte. Az alkilezési reakció eredményeként a 2-metil csoport képes CH-savként viselkedni, így bázissal történő deprotonálása során keletkező karbanion jó nukleofil, ami karbonilvegyületekkel kondenzációs reakcióba vihető. Kényelmes megoldásnak tűnt a nitro-csoport azid-csoportra történő cseréje, mivel így az előállított azidok alkalmas aldehidekkel egy lépésben a célvegyületekké alakíthatók. Ez az út azonban nem volt járható, ugyanis az azid csoport beépítéséhez szükséges $-\text{NH}_2$ kialakításakor az Sn(II)-vel történő redukciós lépésnél komplex reakcióelegyet kaptam. Ugyanennek a redukciós lépésnek katalitikus hidrogénezéssel történő kivitelezésekor pedig a benzotiazol nitrogén melletti kettőskötése is telítődött. Kísérletet tettem az azid csoport közvetlen, HMPA oldószerben történő beépítésére is,³⁰ de ez sem volt eredményes. Így a szintézist egy kevésbé előnyös úton kellett folytatnom (4. ábra).



4. ábra Benzotiazólium részlet kialakítása, funkcionálizálása

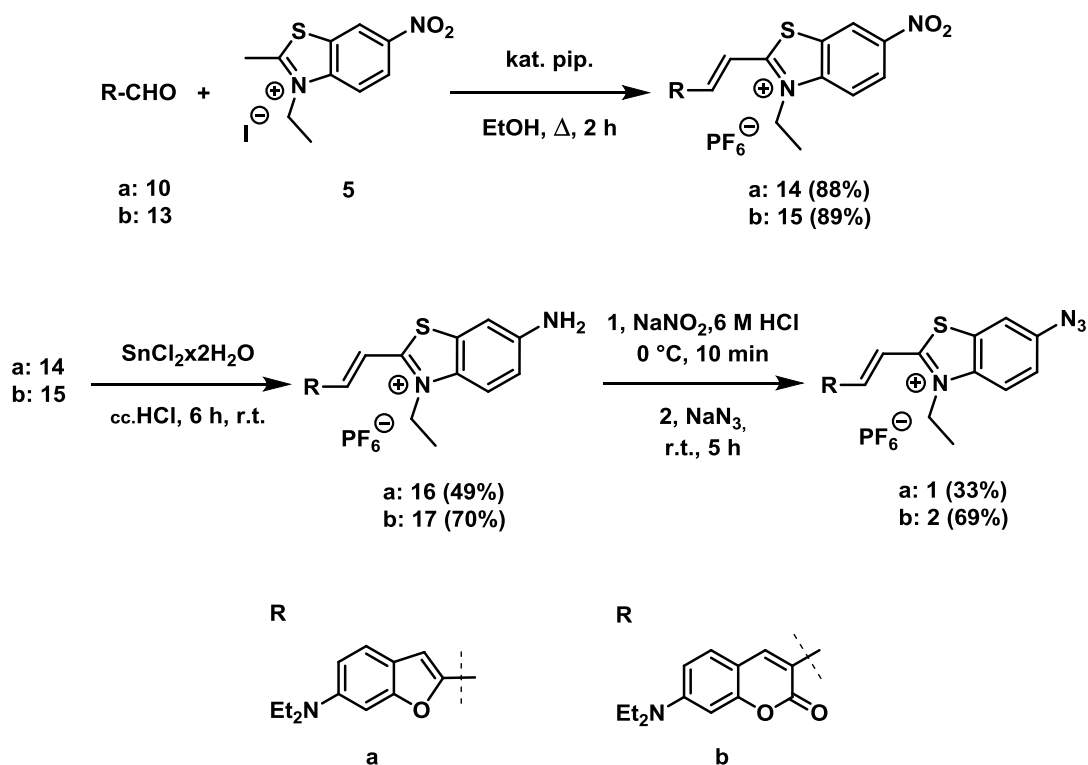
A kondenzációhoz használt aldehidek szintézisét irodalomban közölt módszer alapján valósítottam meg. A 7-dietilamino-3-formil-kumarin (**10**) előállítását 4-dietilamino-2-hidroxi-benzaldehyd (**8**) és dietil-malonát Knoevenagel-kondenzációjával kezdtem. Ennek során először a 3-as helyzetben –COOEt csoportot tartalmazó kumarinvázat alakítottam ki. Ezt követően 6 M sósavban való forralás során 7-dietilamino-kumarinhoz (**9**) jutottam, melyet Vilsmeier-Haack formilezési reakcióban alakítottam át a **10**-es aldehiddé.³¹

A 6-dietilamino-2-formil-benzofurán (**13**) szintéziséhez első lépésben 3-dietilaminofenol (**11**) és 1-bróm-2,2-dietoxi-etán közt végrehajtott Williamson-éterszintézist hajtottam végre. A **12** acetál a Vilsmeier-Haack formilezés körülményei között gyűrűt zárt, majd formileződött. Így jutottam el **13** formil-benzofurán³² származékhoz. (5. ábra)



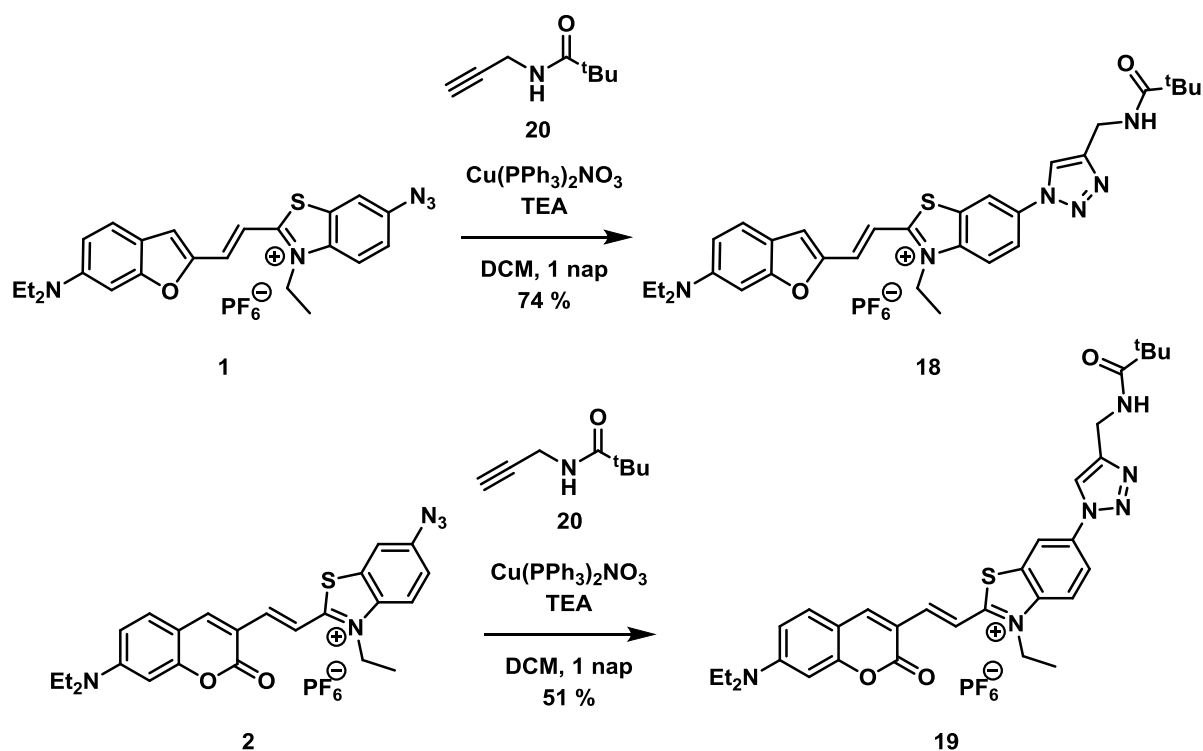
5. ábra Kapcsolható aldehidek szintézise

Az N-etil-2-metil-6-nitrobenzotiazol (**5**), valamint az előállított **10** és **13** formilvegyület kapcsolását piperidin bázis jelenlétében végeztem el etanolban. A C-C-kötés kialakulása után spontán vízkilépés történt, melynek hajtóereje feltételezhetően a konjugált szerkezet kialakulása. Kiváló kitermeléssel és sztereoselektivitással tudtam izolálni a **14** és **15** *E*-izomereket, melyeket ón(II)-kloridos redukciónak vettem alá (5. ábra). Teljes konverzióval volt lehetséges a nitro csoport szelektív redukciója, a kitermelések azonban változóak voltak, amit a termék szilárd ón(II,IV)-klorid mellékterméken történő adszorpciójának tulajdonítok. A kapott **16** és **17** amin-származékokat sósavas közegben NaNO₂ hozzáadásával diazónium sóvá alakítottam, majd a második lépésben hozzáadott NaN₃ só segítségével azid csoportot vittem be a molekulába, így jutottam el az **1** és **2** célvegyületekig (6. ábra).



6. ábra A célvegyületek kialakítása

A spektroszkópai vizsgálatokhoz a két azidvegyületet (1, 2) propargil-pivalamiddal (20) kapcsoltam CuAAC reakcióban DCM-os közegben, Cu(I) katalizátor³³ jelenlétében (7. ábra). A reakció VRK-val történő követésekor problémát jelentett, hogy nem volt észrevehető retenciós különbség a kiindulási azid és a képződő triazol vegyületek közt. Tömegspektrometriás mérések azonban kimutatták, hogy a reakció lejátszódik, teljes konverzió érhető el. A feldolgozás után a reakcióból közepes és jó kitermeléssel tudtam kinyerni a kívánt céltermékeket, melyeket spektroszkópai és analitikai vizsgálatoknak vetettem alá.

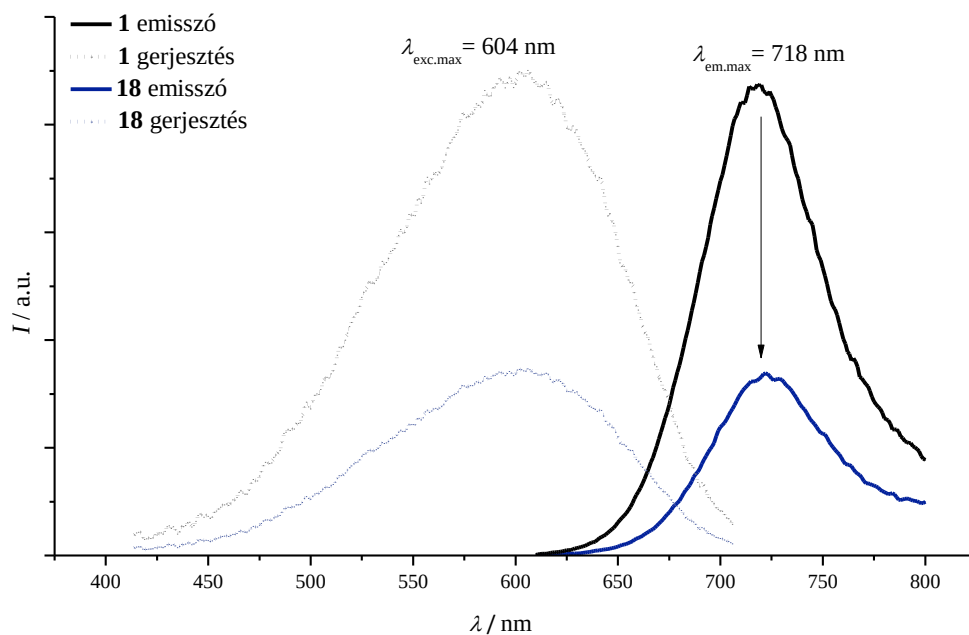


7. ábra Modellreakciók

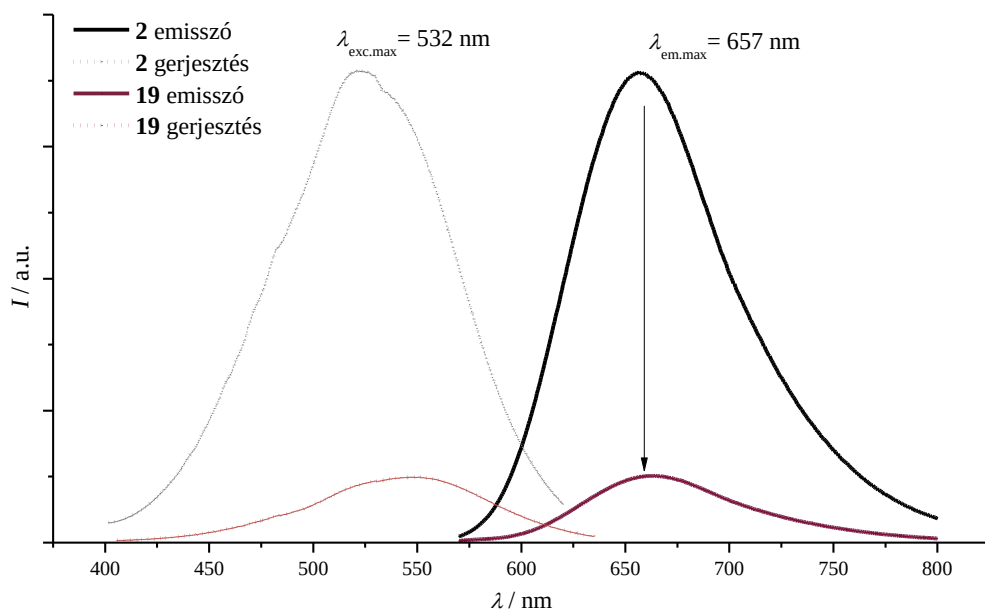
A szintézis során problémát jelentett, hogy az anyag viszonylag jól oldódott a vizes fázisban, ami megnehezítette a reakcióelegyek feldolgozását. Ezért a szintézis minden lépése után, a DCM-os extrakció előtt, a vizes fázisban NH_4PF_6 felesleget oldottam a vegyület oldhatóságát csökkentendő. Ugyanakkor a vegyületcsalád ionos szerkezete miatt szerves oldószerekben is korlátozott oldhatósággal rendelkezik, ami az NMR minták készítésekor mutatkozott meg. A konjugált származékokból 6 mg-os mennyiségnél több nem volt feloldható 600 μl oldószerben, bármilyen oldószerrel próbálkoztuk.

3.3. Spektroszkópia

A jelölővegyületeknek és izolált modellvegyületeik gerjesztési és emissziós maximumát azonos koncentrációban, DMSO oldószerben és egy biológiai mintát modellező pH 7,2-es foszfátpuffer közegben vizsgáltam.



8. ábra A benzotriazol származék azid-triazol párjának gerjesztési és emissziós görbéi



9. ábra A kumarin származék azid-triazol párjának gerjesztési és emissziós görbéi

Az azonos koncentrációban felvett gerjesztési és emissziós spektrumokat a 8. és 9. ábra foglalja össze. A foszfát pufferes közegben mért abszorpciós- és emissziós maximumokhoz tartozó hullámhosszakat az 1. táblázatban foglaltam össze.

Meghatároztam ezen vegyületek moláris abszorpciós koefficiensét ε vízben és DMSO-ban, ehhez ismert koncentrációjú oldatsorozat abszorbanciáját mértem, az eredményt az illesztett egyenes meredeksége adta. Az abszorpciós és gerjesztési maximumok jó egyezése az anyag tisztaságára, és egy – vagy több hasonló energiájú – radiatív gerjesztett állapotra enged következtetni.

Meghatároztam továbbá a két jelzővegyületnek és kapcsolt származékaiknak kvantumhasznosítási tényezőjét (Φ_F) is, melyet ismert Φ_F -el rendelkező fluoreszcens standard segítségével végeztem. A benzotiazol származékok esetén – az elnyelési hullámhosszak alapján – krezil ibolyát, a kumarin származékoknál rodamin 101-et választottam standardként.³⁴ A gerjesztési hullámhosszon, azonos abszorbanciával rendelkező oldatokat készítettem, majd korrigált emissziós spektrumokat vettem fel, melyek integráljainak arányai megadják a relatív fluoreszcens intenzitást, így kiszámítható Φ_F .

Az említett **1**, **2** azidok és **18**, **19** triazolok fotofizikai jellemzőit az 1. táblázat foglalja össze.

Ph7,2 PBS	$\lambda_{\max \text{ exc}}$ /nm	$\lambda_{\max \text{ em}}$ /nm	Ph7,2 PBS	ε / $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	Φ_F	B_{rel}	DMSO	ε / $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	Φ_F	B_{rel}
1	604	718	1 @604nm	89200	0,017	0,24	1 @604nm	129000	0,083	2,00
2	532	657	2 @532nm	73000	0,064	0,73	2 @563nm	92400	0,27	4,70
18	604	723	18 @604nm	73800	0,014	0,16	18 @612nm	86900	0,082	1,30
19	559	663	19 @559nm	33100	0,051	0,27	19 @570nm	31200	0,30	1,80

1. táblázat Azid-jelölők és triazol- modellvegyületek fotofizikai jellemzői
 B_{rel} értékeket azonos emissziós tartománnyal rendelkező fluoreszcens pepid (IFP1.4) vizes közegben
mért fényességéhez viszonyítottam. $B_{\text{IFP1.4}} = 6300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Az azonos koncentrációk mellett felvett fluoreszcencia spektrumokból kiolvasható, hogy kapcsolás után az emisszió intenzitása csökkent. A részletesebb karakterizálás után megfigyelhetjük, hogy bár a kvantumhasznosítási tényező jelentős mértékben nem változott, az abszorpciós koefficiens csökkenése tehető felelőssé az emisszió intenzitásának csökkenéséért. Ez természetesen a fényesség csökkenését is magával vonja. Kisebb ε -érték származhatna az anyag szennyezettségétől ezt azonban kizártam, ugyanis a reakció

fluorimetriás követése során is az intenzitás csökkenését tapasztaltam. ε csökkenésére még nem találtam megfelelő magyarázatot, ez későbbi számítások tárgyát képezheti.

Az előállított fluoreszcens jelzővegyületek, tehát vörös tartományban levő gerjesztéssel és NIR tartományba eső emisszióval rendelkeznek. Fényességükben valamelyest elmaradnak a hasonló emissziós tartományban alkalmazott fluoreszcens markerektől (pl. fluoreszcens fehérjéktől).³⁵ Kedvező viszont, hogy mindkét esetben nagy – 100 nm feletti – Stokes-eltolódást mutatnak. Olyan jelzővegyületekre melyek NIR tartományban emittálnak és nagy Stokes-eltolódással rendelkeznek, az irodalomban csak kevés példa van.^{36,37} Megjegyzendő, hogy vizes közegben (a fotometria mérések során) 10^{-4} M koncentrációnál még nem tapasztaltam aggregációt, ami más festékek esetén gyakori probléma. A spektroszkópiai eredmények alapján a szintetizált jelölők alkalmasak lehetnek fluoreszcens jelölésre.

4. Összefoglalás

A kutatómunka során sikeresen előállítottam a két célvegyületet. Megmutattam, hogy bioortogonális modellkísérletben kapcsolásra alkalmasak, melyek teljes konverzióval játszódtak le. A sikeres szintéziseket követően spektroszkópiailag karakterizáltam a kapcsolat előtti és utáni formákat. Habár a várt fluorogén tulajdonságot nem mutatta egyik jelzővegyület sem, emissziójuk a NIR tartományba tolódott, ami bioortogonális jelölésekhez kiválóan alkalmas. Másik célomat, a vízdékonyság növelését is sikerült elérni, amit a szintézisek és a karakterizáció során tapasztaltak támasztanak alá. Jelenleg, együttműködő partnereinknél (Karlsruhe Institute of Technology intézményében) van a két azid vegyület, ahol DNS-jelölési kísérletekben tesztelik őket.

5. Kísérleti rész

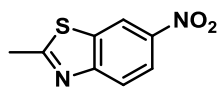
5.1. Általános

A szintézishez használt oldószerek és vegyszerek a *Sigma-Aldrich*, *Alfa Aesar*, *Fluka*, *Merck* és *Molar Chemicals* cégek termékei, azokat további tisztítás nélkül alkalmaztam. Az anyagok oszlopkromatográfiás tisztításához a *Molar Chemicals Silica gel 60* állófázist használtam, a VRK vizsgálatokat *Merck Kieselgel 60 F₂₅₄* segítségével végeztem. Analitikai HPLC vizsgálatokat HP 1100 Series műszeren, Phenomenex C(18) 5µm állófázis segítségével történt. A fluorimetriás vizsgálatokat *Jasco FP-8300* fluoriméteren, az abszorbancia méréseket *Unicam UV500* spektrofotométeren végeztem. Az IR spektrumokat *Bruker Alpha-P* spektrométeren készítettem, az NMR spektrumokat *Bruker Avance 250 MHz* és *Varian Inova 600MHz* spektrométeren vettem fel. A tömegspektrumok *Bruker Esquire 3000 Plus*-al készültek, a HRMS spektrumok *Waters Q-TOF Premier* tömegspektrométeren ESI porlasztással pozitív módban készültek. A mikrohullámú reakcióhoz *AntonPaar Monowave 400* mikrohullámú reaktort használtam.

Általános reakcióelegy feldolgozási eljárás:

Szilikagél állófázisú oszlopkromatográfiásan DCM-MeOH gradiens (40:1 -> 9:1) eluenset használva tisztítottam. A szilikagélen adszorbeálódott termékeket MeCN-ben oldott NH₄PF₆ segítségével eluáltam. A tiszta frakciók egybeöntése után feleslegben NH₄PF₆-ot adtam az oldathoz, majd bepároltam. A felesleg NH₄PF₆ eltávolítását víz-DCM rendszerben történő extrakcióval végeztem. Az alsó szerves fázist szárítószeren szárítva, majd vákuum alatt bepárolva nyertem a tiszta szilárd terméket.

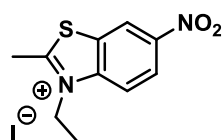
5.2. Szintézisek



2-metil-6-nitrobenzo[d]tiazol (4)

1,2 ml (9,41 mmol) 2-metil-1,3-benzotiazol és 6 ml tömény sósav elegyét 0 °C-ra hűtöttem, majd csepegtetve hozzáadtam 2 ml 95% HNO₃ és 1,5 ml cc H₂SO₄ keverékét. 20 óra eltelte után – mialatt hagytam szobahőmérsékletre felmelegedni a reakcióelegyet – darált jégre öntöttem. A szerves csapadékot kiszűrtem, majd bő vízzel mostam. A kiszárított anyag 250 ml EtOH-ban történő átkristályosítása után 1,19 g (65%) fehér szilárd anyaghoz jutottam.

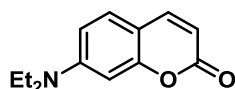
$R_f = 0,27$ (hex, EtOAc 3:1); OP 170-172°C; IR: $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1505 és 1331 (NO₂); ¹HNMR (250 MHz, CDCl₃): δ 8,78 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 8,30 (dd, $J_1 = 8,9$ Hz, $J_2 = 2,3$ Hz, 1H), 8,00 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 2,90 (s, 3H); ¹³C-NMR (62,5 MHz, CDCl₃): δ 173,2, 157,1, 144,7, 136,0, 122,6, 121,5, 117,9, 20,6; HRMS (ESI) $[M+H]^+$: [C₈H₆N₂O₂S+H]⁺-ra számolt: 195,0223, mért: 195,0231.



N-etil-2-metil-6-nitro-1,3-benzotiazolium-jodid (5)

1200 mg (6,18 mmol) 2-metil-6-nitrobenzotiazolhoz (4) 2,50 ml (31,2 mmol) etil-jodidot adtam, egy 10 ml-es mikrohullámú reaktor edényébe. A szuszpenzió homogenizálása után a reakcióelegyet 190 °C-ra fűtöttem 20 perces időtartamra, intenzív keverés mellett. A képződő barna keveréket vákuumszűrőn mostam 4x10 cm³ EtOAc és 3x5 cm³ hexán oldószerekkel. A visszamaradó zöld port tovább szárítottam vákuum alatt. Így 630 mg (29%) tiszta termékhez jutottam.

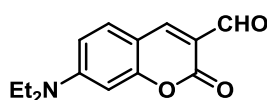
OP: 245-247 °C (bomlik); ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 9,45 (s, 1H), 8,66 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 8,57 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 4,82 (q, $J = 6,9$ Hz, 2H), 3,29 (s, 3H), 1,47 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 182,72, 146,12, 143,98, 130,21, 124,28, 121,34, 117,87, 45,43, 17,44, 13,09; HRMS (ESI) $[M]^+$: [C₁₀H₁₁N₂O₂S]⁺-ra számolt: 223,0536, mért: 223,0549.



7-(diethylamino)-2H-kromén-2-on (9)

3,87 g (20,0 mmol) 4-(diethylamino)-2-hidroxibenzaldehyd (8) és 3,30 g dietil-malonát (25,0 mmol) 50 ml EtOH-lal készült oldatát katalitikus piperidin jelenlétében forraltam 21 órán keresztül. A reakcióelegyet bepárlással koncentráltam, majd 14 ml 6 M HCl oldatban szuszpendáltattam. 20 óra forralás után a lehűlt reakcióelegyet lassan 100 ml jég-víz keverékre öntöttem keverés közben. Tömény NaOH oldat hozzáadásával az oldat kémhatását semleges tartományig növelem, a kiváló csapadékot vákuum szűrőn szűrtem, vízzel mostam, majd vákuum alatt szárítottam. Szilika oszlopon gradiens elúció mellett (hex, EtOAc 3:2→1:1) tisztítottam. A termék 3650 mg (84%) sötét sárga szilárd anyag, melyet további tisztítás nélkül használtam fel a következő reakcióban.

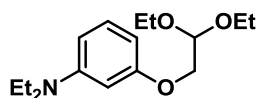
$R_f = 0,80$ (hex, EtOAc 1:1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ 7,53 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H), 7,24 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 6,56 (dd, $J_1 = 8,7$ Hz, $J_2 = 2,5$ Hz, 1H), 6,48 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), 6,33 (d, $J = 9,3$ Hz, 1H), 3,41 (q, $J = 7,1$ Hz, 4H), 1,20 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H).



7-(diethylamino)-2H-kromén-2-on-3-karbaldehyd (10)

5 ml (53,6 mmol) POCl_3 reagenst 5 ml 0 °C-os DMF oldószerhez adtam hozzá cseppenként Ar atmoszféra alatt, 10 perc kevertetés után 3,78 g (17,4 mmol) 9 kumarin származék 20 ml DMF-el készült oldatát csepegettem hozzá, majd 60 °C hőmérsékleten kevertettem 3 órán át. A reakcióidő letelte után hagytam lehűlni, majd lassú ütemben, kevertetés mellett 175 ml jég-víz keverékre öntöttem. Tömény NaOH-dal a kémhatást semleges körültre állítottam. A kivált narancssárga csapadékot szűrtem, vízzel mostam, exsikkátorban szárítottam. A kapott nyersteget EtOH-ban átkristályosítottam, a narancs-arany színű tűszerű kristályos termék tömege 2,22 g (52 %) volt.

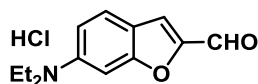
$R_f = 0,41$ (hex, EtOAc 1:1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ 10,06 (s, 1H), 8,18 (s, 1H), 7,36 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 6,60 (dd, $J_1 = 9,0$ Hz, $J_2 = 2,4$ Hz, 1H), 6,42 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H), 3,44 (q, $J = 7,1$ Hz, 4H), 1,22 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (62,5 MHz, CDCl_3): δ 187,7, 161,7, 158,8, 153,4, 145,3, 132,4, 114,0, 110,1, 108,0, 96,9, 45,2, 12,3; m/z (%) (EI, 70 eV): 245 (52, $[\text{M}^+]$), 230 (100), 202 (71).



3-(2,2-dietoxietoxi)-N,N-dietilanilin (12)

3-(dietilamino)fenol (**11**) 12,62 g-ját (76,0 mmol) feloldottam vízmentes THF-ben, majd a reakcióedényt átöblítettem argonnal, és lassan 4,00 g (91,0 mmol) NaH-t adagoltam hozzá. A reakciót a gázfejlődés megszűntéig kevertettem, majd bepároltam. A visszamaradó anyagot feloldottam 50 ml vízmentes DMSO-ban, és 14,00 g (91,0 mmol) 2-bróm-1,1-dietoxietánt és 12,85 g KI-ot (76,0 mmol) adtam hozzá. A reakcióelegyet 50 °C-on kevertettem 3 órán át, majd 50 ml vizet adtam hozzá, és 3×30 ml toluollal extraháltam, végül szerves fázist bepároltam. Ezután oszlopkromatográfiásan tisztítottam, (hex, EtOAc 5:1 → 3:1) 18,45 g (86%) halványsárga szilárd anyagot sikerült izolálni. Ezt további tisztítás nélkül használtam fel a következő reakcióban.

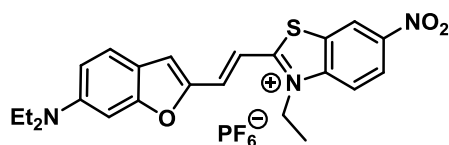
$R_f = 0,41$ (hex EtOAc 1:1).



6-(dietilamino)benzofurán-2-karbaldehid hidrogénklorid (13)

4,13 g (26,9 mmol) POCl₃-ot csepegtettem jeges hűtés közben 0,66 ml (9,0 mmol) DMF-hez Ar atmoszféra alatt. 10 perc kevertetés után 2,00 g (7,10 mmol) 3-(2,2-dietoxietoxi)-N,N-dietilanilin (**12**) oldatát adtam hozzá az elegyhez lassú ütemben, majd 50 °C hőmérsékleten kevertettem 14 órán át. Ezt követően lassan, kevertetés mellett 50 ml jég-víz keverékre juttattam ragacsos reakcióterméket. A vizes keveréket NaOH segítségével semlegesítettem, majd 3×50 ml EtOAc oldószerrel extraháltam, a szerves fázist 1×50 ml vízzel, és 1×50 ml telített NaCl oldattal mostam. Majd MgSO₄ felett szárítottam, szűrtem és bepároltam. A nyersterméket oszlopkromatográfiásan tisztítottam (hex, EtOAc 5:1), ami mélynarancs színű sűrű, olajos folyadékot eredményezett, Et₂O-ben oldottam fel majd HCl gáz segítségével világosbarna sóvá alakítottam, melyet kiszűrtem, majd kiszárítottam. A kapott tömeg 0,406 g (22 %).

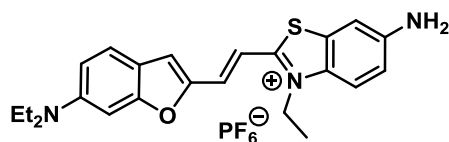
$R_f = 0,43$ (hex, EtOAc = 3:1); ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ 9,61 (s, 1H), 7,49 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 7,40 (d, $J = 0,6$ Hz, 1H), 6,76 (dd, $J_1 = 8,9$ Hz, $J_2 = 2,2$ Hz, 1H), 6,69 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 3,43 (q, $J = 7,1$ Hz, 4H), 1,21 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H), (alkil-ammónium H jele nem látható), ¹³C-NMR (62,5 MHz, CDCl₃): δ 177,6, 159,7, 151,1, 123,9, 116,0, 115,8, 111,3, 92,5, 45,0, 14,9, 12,4; m/z (%) (EI, 70 eV): 217 (41, [M⁺]), 202 (100), 174 (25).



(E)-2-(2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)vinil)-3-etil-6-nitrobenzo[d]tiazól-3-ium-hexafluorofoszfát (14)

300 mg (0,857 mmol) N-etil-2-metil-6-nitro-1,3-benzotiazólium-jodidot, 230 mg (0,906 mmol) formilbenzofurán származék HCl sóját (**13**) és 93 µl (0,942 mmol) piperidint feloldottam 20 ml EtOH-ban, majd 5 órán keresztül forrásponton kevertetem. A mély kék reakcióelegyet vákuumbepárlással töményítettem, majd az általános eljárás szerint dolgoztam fel. Végül 430 mg (88%) zöld kristályos anyagot kaptam.

OP 223-225 °C (bomlik); ^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 9,31 (s, 1H), 8,55 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 8,32 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 8,23 (d, $J = 14,6$ Hz, 1H), 7,77 (s, 1H), 7,63 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,34 (d, $J = 14,5$ Hz, 1H), 6,91 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 6,78 (s, 1H), 4,83 (q, $J = 5,9$ Hz, 2H), 3,52 (q, $J = 5,7$ Hz, 4H), 1,45 (t, $J = 6,0$, 3H), 1,18 (t, $J = 5,6$, 6H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 172,48, 160,78, 150,72, 150,03, 145,41, 144,98, 135,23, 128,44, 124,80, 124,30, 123,25, 120,52, 118,38, 116,24, 112,29, 105,61, 91,29, 44,72, 44,04, 13,55, 12,45, HRMS (ESI) $[M]^+$: $[\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}]^+$ -ra számolt: 422,1533, mért: 422,1547.

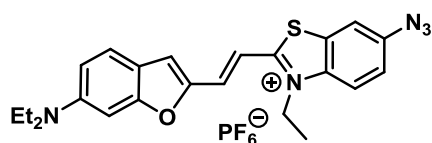


(E)-6-amino-2-(2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)vinil)-3-etilbenzo[d]tiazól-3-ium-hexafluorofoszfát (16)

440 mg (1,95 mmol) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sót feloldottam 14 ml cc, HCl-ben, majd 180 mg (0,317 mmol) **14** számú nitroszármazékot adtam hozzá. A reakciót 5 órán át kevertetem szobahőmérsékleten, majd jégre öntöttem. NaOH-ot adagoltam hozzá a semleges pH eléréséig. Ezek után a reakcióelegyet 3×75 ml DCM segítségével extraháltam. A szerves fázist 2×20 ml vízzel, majd 10 ml telített NaCl oldattal mostam, végül MgSO_4 felett szárítottam. A reakciót vákuum alatt bepároltam, majd az általános feldolgozási eljárást követve 120 mg (70%) zöld kristályos anyaghoz jutottam.

OP 217-220 °C (bomlik); ^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 7,87 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H), 7,82 (d, $J = 15,1$ Hz, 1H), 7,54 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,47 (s, 1H), 7,33 (d, $J = 15,1$ Hz, 1H), 7,25 (d, $J = 1,3$ Hz, 1H), 7,01 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 6,82 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 6,78 (s, 1H), 6,15 (széles, 2H),

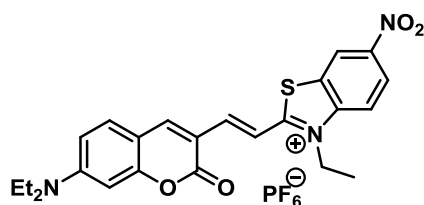
4,72 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H), 3,47 (q, $J = 7,0$ Hz, 4H), 1,43 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H), 1,15 (t, $J = 7,0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 162,43, 159,21, 149,84, 149,72, 131,53, 130,90, 130,15, 123,55, 117,62, 117,45, 116,98, 116,87, 114,38, 111,00, 107,70, 104,61, 91,80, 44,51, 43,68, 14,12, 12,40; HRMS (ESI) $[M]^+$: $[\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{OS}]^+$ -ra számolt: 392,1791, mért: 392,1801.



(E)-2-(2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-yl)vinil)-3-etil-6-azidobenzo[d]tiazól-3-ium-hexafluorofoszfát (1)

110 mg (0,204 mmol) **14** aminszármazékot oldottam fel 15 ml 6 M HCl-ban, majd 0 °C-ra hűtöttem. Ezután 17 mg (0,245 mmol) NaNO_2 1 ml H_2O -val készült oldatát adtam hozzá cseppenként. 5 perc múlva 43 mg (0,661 mmol) NaN_3 sót adtam a reakcióelegyhez, és 4,5 órán keresztül kevertettem, miközben hagytam szobahőmérsékletre melegedni. A reakcióelegy NaOH-dal való közömbösítése után 3×25 ml DCM-nal extraháltam, ezután a szerves fázist 2×25 ml vízzel mostam, majd 25 ml telített NaCl oldattal, végül MgSO_4 felett szárítottam. Bepárlás után az általános feldolgozási eljárást követtem. A teljes eljárást közvetlen fénytől elzárva végeztem. A kapott zöld kristály tömege 79 mg (68%).

OP 233-235 °C (bomlik); ^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8,19 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H), 8,18 (s, 1H), 8,09 (d, $J = 14,9$ Hz, 1H), 7,62 (s, 1H), 7,59 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 7,52 (dd, $J_1 = 9,0$, $J_2 = 2,2$ Hz, 1H), 7,35 (d, $J = 15,0$ Hz, 1H), 6,86 (dd, $J_1 = 9,0$, $J_2 = 2,0$ Hz, 1H), 6,78 (s, 1H), 4,80 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H), 3,49 (q, $J = 7,0$ Hz, 4H), 1,44 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H), 1,17 (t, $J = 7,2$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 168,74, 159,99, 149,86, 149,72, 139,76, 138,28, 133,70, 129,44, 124,18, 121,16, 120,50, 117,81, 117,26, 114,05, 111,57, 106,61, 91,51, 44,58, 43,98, 13,86, 12,46; HRMS (ESI) $[M]^+$: $[\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{OS}]^+$ -ra számolt: 418,1696, mért: 418,1707.

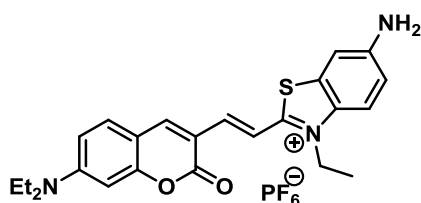


(E)-2-(2-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-kromén-3-yl)vinil)-3-etil-6-nitrobenzo[d]tiazól-3-ium-hexafluorofoszfát (15)

159 mg (0,450 mmol) **5** számú benzotiazólium származékot, és 123 mg (0,500 mmol) **10** kumarin származékot és 93 μl (0,942 mmol) piperidint feloldottam 20 ml EtOH-ban, majd

5 órán keresztül forrásponton kevertetem. A mély lila színű reakcióelegyet vákuumbepárlással betöményítettem, majd az általános feldolgozási eljárás szerint eljárva zöld kristályos anyagot nyertem. Ennek tömege 240 mg (89%).

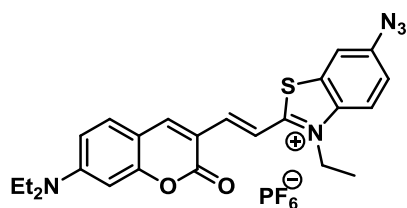
OP 218-220 °C (bomlik); ^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 9,30 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H), 8,64 (s, 1H), 8,53 (dd, $J_1 = 9,2$, $J_2 = 1,9$ Hz, 1H), 8,38 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 8,13 (d, $J = 15,1$ Hz, 1H), 7,97 (d, $J = 15,2$ Hz, 1H), 7,55 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H), 6,86 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 6,63 (s, 1H), 4,76 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H), 3,52 (q, $J = 6,9$ Hz, 4H), 1,46 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H), 1,14 (t, $J = 7,0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 175,11, 159,49, 157,57, 153,95, 149,32, 147,52, 145,72, 144,86, 132,37, 128,79, 124,41, 120,73, 116,89, 111,82, 111,36, 110,00, 109,38, 96,61, 44,91, 44,75, 13,56, 12,51, HRMS (ESI) $[M]^+$: $[\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}]^+$ -ra számolt: 450,1482, mért: 450,1460.



(E)-6-azido-2-(2-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-kromén-3-il)vinil)-3-etilbenzo[d]tiazól-3-ium-hexafluorofoszfát (17)

500 mg (1,95 mmol) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sót feloldottam 12 ml cc, HCl-ban, majd 330 mg (0,555 mmol) **15** nitroszármazékot adtam hozzá. A reakciót 5 órán át kevertetem szobahőmérsékleten, majd jégre öntöttem. Szilárd NaOH-ot adagoltam hozzá a semleges pH eléréséig, majd a reakcióelegyet 3×100 ml DCM segítségével extraháltam. A szerves fázist 2×40 ml vízzel, majd 10 ml telített NaCl oldattal mostam, végül MgSO_4 felett szárítottam. A reakciót vákuum alatt bepároltam, és az általános feldolgozási eljárás lépései után, 160 mg (49%) zöld kristályos anyagot izoláltam.

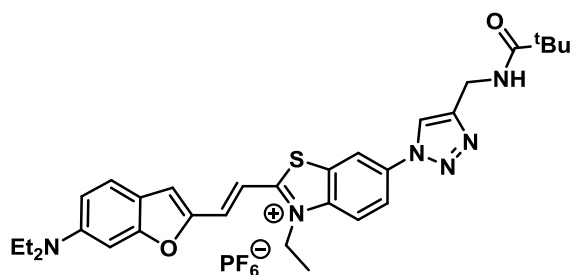
OP 203-205 °C (bomlik); ^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8,57 (s, 1H), 7,95 (d, $J = 15,5$ Hz, 1H), 7,89 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H), 7,74 (d, $J = 15,4$ Hz, 1H), 7,54 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,27 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H), 7,03 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 6,84 (dd, $J_1 = 9,0$, $J_2 = 1,4$ Hz, 1H), 6,63 (s, 1H), 4,67 (q, 2H), 3,51 (q, $J = 6,8$ Hz, 4H), 1,44 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H), 1,16 (t, $J = 7,0$ Hz, 6H) (amin H jele nem látható); ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 163,58, 159,74, 156,82, 152,75, 149,98, 146,62, 140,79, 131,49, 131,35, 130,32, 117,11, 117,02, 112,42, 111,41, 110,60, 108,70, 104,55, 96,41, 44,56, 44,01, 14,03, 12,43; HRMS (ESI) $[M]^+$: $[\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}]^+$ -ra számolt: 420,1740, mért: 420,7151.



(E)-6-azido-2-(2-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-kromén-3-il)vinil)-3-ethylbenzo[d]thiazol-3-ium-hexafluorofoszfát (2)

104 mg (0,184 mmol) **17** aminszármazékot oldottam fel 15 ml 6 M HCl-ban, majd 0 °C-ra hűtöttem. Ezután 17 mg (0,245 mmol) NaNO₂ 1 ml vízben készült oldatát adtam hozzá cseppenként. 5 perc elteltével 38 mg (0,552 mmol) NaN₃ sót adtam a reakcióelegyhez, és 1,5 órán keresztül kevertettem, miközben hagytam szobahőmérsékletre melegedni. A reakcióelegy szilárd NaOH-dal való közömbösítése után 3×25 ml DCM-nal extraháltam, ezután a szerves fázist 2×25 ml vízzel, majd 25 ml telített NaCl oldattal mostam, végül MgSO₄ felett szárítottam. Bepárlás után az általános feldolgozási eljárást követtem. A teljes eljárást közvetlen fénytől elzárva végeztem. A kapott zöld kristály tömege 36mg (33%).

OP 192-195 °C (bomlik); ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8,59 (s, 1H), 8,25 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 8,21 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 8,01 (s, 2H), 7,58 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 7,54 (dd, *J*₁ = 9,0 Hz, *J*₂ = 2,1 Hz, 1H), 6,88 (dd, *J*₁ = 9,1 Hz, *J*₂ = 2,1 Hz, 1H), 6,68 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 4,76 (q, *J* = 7,3 Hz, 2H), 3,54 (q, *J* = 7,0 Hz, 4H), 1,47 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H), 1,17 (t, *J* = 7,3 Hz, 6H); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 170,40, 159,53, 157,19, 153,37, 148,31, 144,71, 140,00, 138,19, 131,84, 129,60, 121,27, 117,51, 114,03, 111,94, 110,94, 110,51, 108,94, 96,46, 44,70, 44,41, 13,73, 12,43; HRMS (ESI) [*M*]⁺: [C₂₄H₂₄N₅O₂S]⁺-ra számolt: 446,1645, mért: 446,1658.

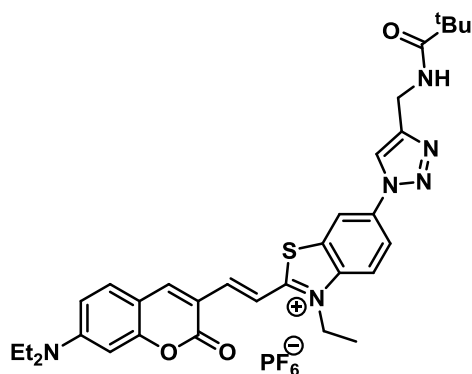


(E)-2-(2-(6-(diethylamino)benzofuran-2-il)vinil)-3-etil-6-(4-(pivalamidometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzo[d]thiazol-3-ium-hexafluorofoszfát (18)

25 mg (0,0443 mmol) **1-es** azid vegyületet, 25 mg (0,179mmol) propargil-pivalamidot (**20**) oldtam fel 8 ml DCM-ban. Hozzáadtam 3 µl TEA-t és katalitikus mennyiségű Cu(PPh₃)₂NO₃

sót, és több mint egy napig kevertettem a reakcióelegyet. Bepárlással töményítettem, majd az általános feldolgozás szerint kezeltem, így 23 mg (74%) sötétzöld szilárd termékhez jutottam.

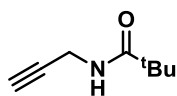
OP 208-210 °C (bomlik); ^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.96 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.37 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 8.33 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.15 (d, J = 15, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.61(m, 2H), 7.37 (d, J = 14.9 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 4.86 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 4.41 (d, J = 5.4 Hz, 2H), 3.49 (d, J = 7.4 Hz, 4H), 1.48 (t, J = 7.0 Hz, 3H), 1.23 (s, 6H), 1.14 (s, 9H); HRMS (ESI) $[M+H]^+$: $[\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}]^+$ -ra számolt: 557,2693, mért: 557,2693.



(E)-2-(2-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-kromén-3-il)vinil)-3-etil-6-(4-(pivalamidometil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzo[d]tiazól-3-ium-hexafluorofoszfát (19)

8 mg (0,0135 mmol) **2** azid származékot és 5 mg (0,0575 mmol) propargil-pivalamidot (**20**) oldottam fel 8 ml DCM-ban. Hozzáadtam 3 μl TEA-t és katalitikus mennyiségű $\text{Cu}(\text{PPh}_3)_2\text{NO}_3$ sót, és több mint egy napig kevertettem a reakcióelegyet. Bepárlás után az általános feldolgozás szerint dolgoztam fel, melynek eredményeként 5 mg (50%) sötétzöld szilárd termékhez jutottam.

OP 206-209 °C (bomlik); ^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 9.01 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.46 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 8.37 (dd, J = 9.1, 2.2 Hz, 1H), 8.14 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 8.11 (d, J = 15.2 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 15.3 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 6.90 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 4.82 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 4.42 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 3.56 (q, J = 6.9 Hz, 4H), 1.51 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 1.35 (s, 6H), 1.14 (s, 9H); HRMS (ESI) $[M+H]^+$: $[\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{N}_6\text{O}_3\text{S}]^+$ -ra számolt: 585,2642, mért: 585,2654.



N-(prop-2-inil)pivalamid (20)

700 mg propargilamint, (12,71 mmol) és 2,30 ml (16,55 mmol) trietilamint 20 ml DCM-ban, feloldottam, majd 0 °C-ra hűtést követően 1,88 ml (15,26 mmol) pivaloil-klorid 5 ml DCM-al készült oldatát adtam hozzá cseppenként. A reakcióelegyet 45 percet kevertettem, közben hagytam szobahőmérsékletre melegedni. A reakcióelegyhez 20 ml DCM-t adtam, 2×20 ml 2 M HCl oldattal, 20 ml 5 m/m% NaHCO₃ oldattal, végül 20 ml vízzel és 20 ml telített NaCl oldattal mostam, majd MgSO₄ felett szárítottam. Szűrés és bepárlás után 1,556 g (88%) piszkos fehér szilárd anyag maradt vissza.

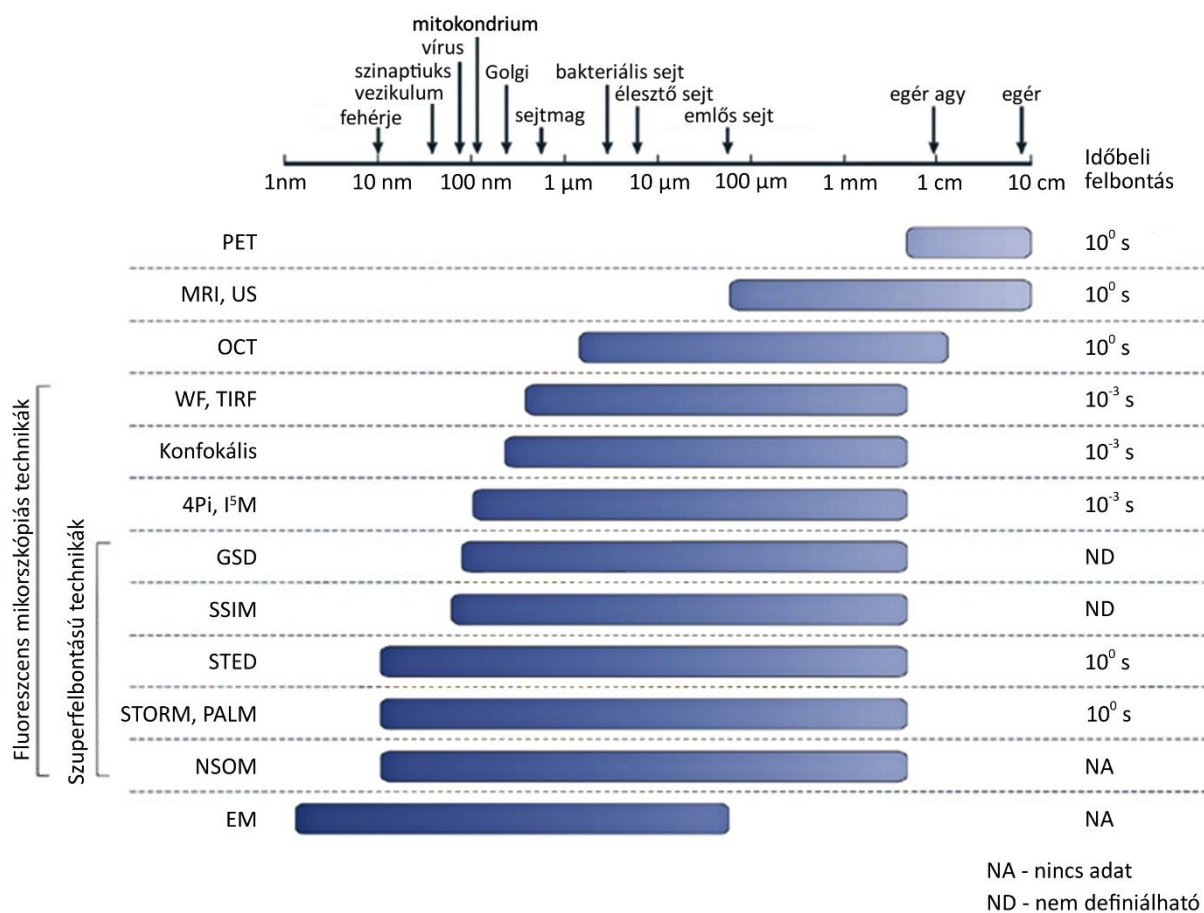
R_f = 0,60 (hex, EtOAc 1:1); OP 65-67°C; IR $\nu_{\max/\text{cm}^{-1}}$ 3316 és 653 (C≡CH), 1638 és 1525 (CONHR), 1208, ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ =5,98 (széles, 1H), 3,97 (m, 2H), 2,18 (s, 1H), 1,16 (s, 9H); ¹³C-NMR (62,5 MHz, CDCl₃): δ = 178,0, 79,8, 71,3, 38,5, 29,3, 27,3; HRMS (ESI) $[M+H]^+$: [C₈H₁₃NO+H]⁺-ra számolt: 140,1070, mért: 140,1075.

6, Köszönetnyilvánítás

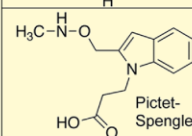
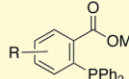
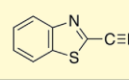
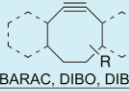
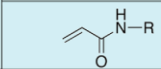
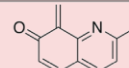
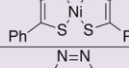
Ez úton szeretném megköszönni segítségüket és türelmüket témavezetőimnek Dr, Herner Andrásnak és Dr, Kele Péternek. Köszönöm Dr, Demeter Attilának a spektrofotometriás mérések során, Dr, Béni Szabolcsnak és Darcsi Andrásnak pedig az NMR mérések kapcsán nyújtott segítséget. Továbbá köszönettel tartozom Cserép Gergelynek, Varga Balázsnak, Dr, Kozma Eszternek, Knorr Gergelynek, Takács Leventének, Demeter Orsolyának a Kele és a Novák csoport minden tagjának a labormunka során nyújtott támogatásért.

7, Függelék

- i. Biológiai minták esetén alkalmazott (felületvizsgálati módszerek nélküli) képalkotási módszerek idő és térbeli felbontásának összehasonlítása.⁴



ii. Bioortogonális reakciók összefoglalása.¹¹

Reakció	Reaktánsok		Másodrendű reakció-sebességi állandó	Megjegyzések	Hivatkozások
Aldehid/keton kondenzáció			0.001 (H ₂ O)	kapcsolt termék hidrolizálhat, kat. anilin használható	Jencks 1959
					
			0.26 (100 mM sodium phosphate)	stabil C-C kötés alakul ki kapcsolás során	Agarwal 2013
Staudinger-ligáció	R-N ₃		0.003 (PBS)	foszfin oxidációja lehetséges problémaforrás	Saxon 2000
Cianobenzotiazol kondenzáció			9.19 (PBS)	mellékreakciók szabad tiolokkal	Rao 2009
Rézkatalizált azid-alkin cikloadíció	R-N ₃		k _{obs} 10-100 (10-100 μM Cu)	Cu(I) katalizátor szükséges	Tornoe 2002
Gyűrűfeszültség segített azid-alkin cikloadíció			0.0012-0.14 (ACN)	Cu(I) katalizátor nem szükséges, egyes ciklooktínok mellékreakcióba léphetnek szabad tiolokkal	Agard 2004
			0.17-0.96 (ACN)		Jewett 2010
További 1,3-diopláris cikloadíciók			0.013-3.9 (ACN/H ₂ O)	nitronok hidrolizálhatnak	McKay 2010
			30 (H ₂ O)	nitril-oxid fotolézis során <i>in situ</i> képződik	Gutsmiedl 2009
			0.15-58 (1:1 ACN:PBS)	nitril-imin fotolézis során <i>in situ</i> képződik	Yu 2012
			13.5 (ACN/H ₂ O)	diazó-vegyület azid-származékból képződik	McGrath 2012
			70,000-106,000 (H ₂ O)	oxanorboradién elreagálhat bázikus aminosavakkal	van Berkel 2007
	Inverz elektronigényű Diels-Alder reakciók			210-2,800,000 (PBS, 37°C)	transzciklooctén idővel átizomerizálódhat
		0.12-9.46 (95:5 H ₂ O:MeOH)		norborén és funkcionáliszt ciklopropének relative jól eltarthatók	Devaraj 2008
		0.03-13 (12-15% DMSO in PBS)			Yang 2012 Patterson 2012
Hetero-Diels-Alder reakciók					0.0015 (5:1 H ₂ O:MeOH)
További változtatás mechanizmusú reakciók			0.03-0.3 (PBS/tBuOH)	Ru katalizátor szükséges	Lin 2013
			0.25 (PBS/EtOH)	szükséges a Pi elektronok Ni segítségével történő stabilizációja	Sletten 2011
			0.12-0.57 (THF/H ₂ O)	termék hidrolizálhat vizes közegben	Stockmann 2011
	Ar-X	R-B(OH) ₂ , [Pd]	N/A	kat. Pd szükséges, bórsavak enyhén citotoxikusak	Chalker 2009
	Ar-X			kat. Pd szükséges	Kodama 2007

8, Hivatkozások

-
- ^{1a} R. Hooke. "Micrographia, or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses". London: Jo. Martyn and Ja. Allestry, **1665**.
- ^{1b} H. Gest, *Notes Rec. R. Soc. Lond.*, **2004**, 58, 187.
- ² "The Nobel Prize in Chemistry 2008", *Nobel Media AB*
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/
megtekintés dátuma: 2014.10.24.
- ³ "The Nobel Prize in Chemistry 2014", *Nobel Media AB*
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/
megtekintés dátuma: 2014.10.24.
- ⁴ E. Betzig, R. J. Chichester, *Science*, **1993**, 262, 1422.
- ⁵ M. Fernández-suárez, A. Y. Ting, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2008**, 9, 929.
- ⁶ W. Margolin, *J. Bacteriol.*, **2012**, 194, 6369.
- ⁷ U. Resch-genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-jaricot et al., *Nat. Methods.*, **2008**, 5, 763.
- ⁸ S. D. Tilley, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 1080.
- ⁹ B. Q. Shen, K. Xu, L. Liu et al., *Nat. Biotechnol.*, **2012**, 30, 184.
- ¹⁰ S. J. Luchansky, C. R. Bertozzi, *ChemBioChem*, **2004**, 5, 1706.
- ¹¹ J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.*, **2005**, 1, 13.
- ¹² G. B. Cserép, Zs. Baranyai, D. Komáromy, K. Horváti, Sz. Bösze, P. Kele, *Tetrahedron*, **2014**, 70, 5961.
- ¹³ D. M. Patterson, L. A. Nazarova, J. A. Prescher, *ACS Chem. Biol.*, **2014**, 9, 592.
- ¹⁴ M. F. Debets, C. W. van Doelen, F. P. Rutjes, F. L. van Delft, *ChemBioChem*, **2010**, 11, 1168.
- ¹⁵ R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **1963**, 2, 565.
- ¹⁶ G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.*, **1961**, 94, 3260.
- ¹⁷ H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2001**, 40, 2004.
- ¹⁸ E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, 44, 666.
- ¹⁹ B. R. Varga, M. Kállay, K. Hegyi, Sz. Béni, P. Kele, *Chem. Eur. J.*, **2012**, 18, 822.
- ²⁰ H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta*, **1919**, 2, 635.
- ²¹ D. Soriano del Amo, W. Wang, H. Jiang et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 16893.
- ²² R. van Geel, G. J. Pruijn, F. L. van Delft, W. C. Boelens, *Bioconjugate Chem.*, **2012**, 23, 392.

-
- ²³ M. D. Moriarty, A. Martin, K. Adamson et al., *J. Microsc.*, **2014**, 253. 204.
- ²⁴ R. Weissleder, *Nat. Biotechnol.*, **2001**, 19, 316.
- ²⁵ „Brightness of Fluorophores”, Jared Snider, *Thermo Fisher Sci Inc.*
<http://www.piercenet.com/method/fluorescent-probes>
utolsó megtekintés: 2014.10.24.
- ²⁶ A. Nadler, C. Schultz, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2013**, 52, 2408.
- ²⁷ A. Herner - Bioortogonális jelzésre alkalmas azid tartalmú fluorogén jelzővegyületek tervezése, előállítása és tesztelése (doktori értekezés) **2013**.
- ²⁸ A. Herner, I. Nikić, M. Kállay, E. A. Lemke, P. Kele, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, 11, 3297.
- ²⁹ A. Herner, G. E. Girona, I. Nikić, M. Kállay, E. A. Lemke, P. Kele, *Bioconjugate Chem.*, **2014**, 25, 1370.
- ³⁰ R. Duval, S. Kolb, E. Braud, D. Genest, C. Garbay, *J. Comb. Chem.*, **2009**, 11, 947.
- ³¹ J. S. Wu, W. M. Liu, X. Q. Zhuang et al., *Org. Lett.*, **2007**, 9, 33.
- ³² A. S. Klymchenko, V. G. Pivovarenki, T. Ozturk, A. P. Demchenko, *New J. Chem.*, **2003**, 27, 1336.
- ³³ Zs. Gonda, Z. Novák, *Dalton Trans.*, **2010**, 39, 726.
- ³⁴ K. Rurack, M. Spieles, *Anal. Chem.*, **2011**, 83, 1232.
- ³⁵ X. Shu, A. Royant, M. Z. Lin et al., *Science*, **2009**, 324, 804.
- ³⁶ A. Martin, C. Long, R. J. Forster, T.E. Keyes, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 5617.
- ³⁷ K. Nagy, E. Orbán, Sz. Bősze, P. Kele, *Chem. Asian J.*, **2010**, 5, 773.