

Fotoaktiválható idegnövekedési faktor mimetikumok szintézise és fotokémiai vizsgálata

SZABÓ Bence,^{a,b,*} KUPAI József^a és CSERI Levente^{b,**}

^aBudapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Műegyetem rkp. 3., 1111 Budapest, Magyarország

^bBrainVisionCenter Nonprofit Kft., Liliom u. 43–45., 1094 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A neurodegeneratív betegségek, valamint az idegrendszer érintő sérülések több tízmillió ember életét befolyásolják világszerte. Sajnálatos módon ezen kondíciók esetén legtöbbször csak a tünetek kezelése lehetséges, nem létezik rájuk hatékony gyógymód. Az ezen állapotokkal járó jelenségek, mint az idegsejtek túlzott elhalálása vagy a sejtek közötti kapcsolatok megszakadása egyes testi funkciók elvesztéséhez, az általános életminőség romlásához vezethetnek. Ahhoz, hogy az ilyen egészségügyi állapotok kezelése megvalósítható legyen, elengedhetetlen az idegsejtek működésének, fejlődésének alaposabb megértése. Az elmúlt évtizedekben több olyan fehérjét is azonosítottak szervezetünkben, melyeknek nagy szerepük van az idegrendszeri folyamatok szabályozásában. Ezek közül az egyik legfontosabb az idegnövekedési faktor (NGF) fehérje, mely rendkívül sok feladatot lát el: részt vesz az idegsejtek differenciálódásában, érésében,¹ neuroprotektív hatású,² valamint befolyásolja a fejlődő idegsejtek nyúlványainak növekedését. Utóbbi tulajdonságát már a vegyületet felfedező kutatók is megfigyelték.³ Későbbi kísérletekben megmutatták, hogy a neuronok axonjai nem csak intenzívebben nőnek NGF jelenlétében, hanem annak koncentrációgradiensének megfelelő irányba is fordulnak.⁴ Ezen tulajdonságainak megfelelően több kísérletben is próbálták a vegyületet terápiás célra alkalmazni, azonban a fehérje használata több szempontból korlátozottnak bizonyult, súlyos mellékhatásokhoz vezetett.⁵ Ennek nyomán mára több kismolekulás vegyületről is sikerült megmutatni, hogy az NGF egyes receptoraihoz kötődve hasonló hatást képesek kifejteni, így alternatívát nyújthatnak a fehérje helyett különböző kezelésekben.

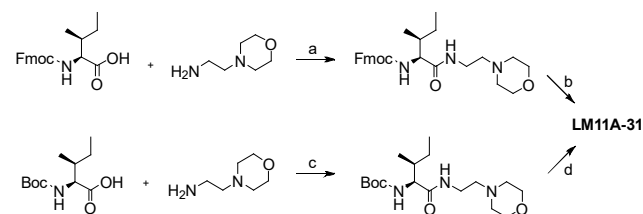
A megfelelő hatás elérése érdekében nagyon fontos ezen hatóanyagok felszabadulásának tér- és időbeli kontrollálása. Erre adnak lehetőséget az úgynevezett fotolabilis védőcsoportok, melyek segítségével átmenetileg inaktíválni lehet egy bioaktív anyagot, majd megfelelő hullámhosszúságú fény segítségével annak aktív formája újra felszabadítható. Az ilyen vegyületek tehát jól alkalmazhatók különböző lézermikroszkópiás eljárásokban, ahol a hatóanyag védőcsoporttal inaktívált formáját juttatják be a rendszerbe, majd fókuszált lézer segítségével azt nagy helybeli és időbeli precizitással szabadítják fel.

2. Eredmények

Az alább bemutatott projekt célja olyan fotolabilis védőcsoporttal ellátott kismolekulás vegyületek előállításának és karakterizálásának volt, melyek az NGF-hez hasonló bioaktivitással rendelkeznek, így potenciálisan terápiás célra használhatók. Ehhez először két, az irodalomban B-35252 és LM11A-31 néven ismert vegyületet szintetizáltunk, melyekről korábban már bizonyították, hogy az idegnövekedési faktor fehérje receptoraihoz kötődve neuroprotektív hatással rendelkeznek, serkentik a neuritok növekedését és akár sérült neuronok regenerálására is képesek.^{6–7,8,9} Ezekhez fotolabilis védőcsoportokat kapcsolva összesen öt új molekulát állítottunk elő. Szintézisüket követően a vegyületek spektroszkópiai tulajdonságainak vizsgálata, valamint a fotolízisük kvantumhatékonyságának meghatározása is megtörtént. Utóbbihoz egy új módszert dolgoztunk ki a 4,4'-dimetilazobenzol fény hatására lejátszódó izomerizációs folyamatát kihasználva.

2.1. Fotoaktiválható anyagok szintézise

Az α -metil-6-nitroveratrilojikarbonil (MeNVOC),^{10,11} a [7-(diethylamino)kumarin-4-il]metil (DEACM),¹² a [7-(diethylamino)kumarin-4-il]metiloxikarbonil (DEACMOC)¹³ fotolabilis védőcsoportok prekurzorait, valamint az NGF mimetikum B-35252-t⁷ irodalmi eljárások alapján szintetizáltuk. Az LM11A-31 esetén nem állt rendelkezésre irodalmi eljárás, ezt két módon is előállítottuk (**1. Ábra**).



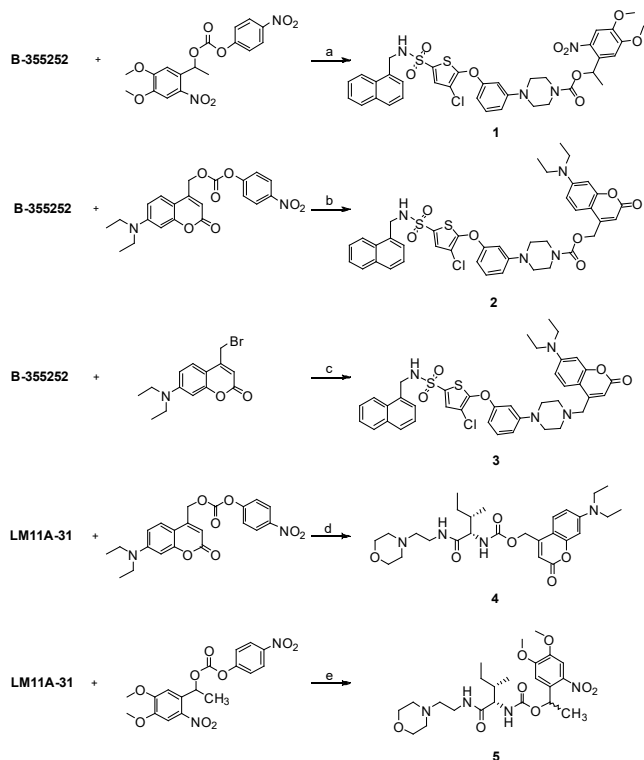
1. Ábra. Az LM11A-31 szintézise. Reakciókörülmények: (a) COMU, DIPEA, DMF, sz.h., 3 nap, 36%; (b) piperidin, DMF, sz.h., 2 óra, 39%; (c) HATU, DIPEA, MeCN, sz.h., 2 óra, 32%; (d) HCl, MeOH, sz.h., 1 nap, 49%.

A B-35252 védését mindhárom fotolabilis védőcsoporttal megvalósítottuk, az LM11A-31 esetében a DEACMOC és

* Tel.: +36 70 559 8370, e-mail: bence.szabo@brainvisioncenter.com

** E-mail: levente.cseri@brainvisioncenter.com

MeNVOC csoportokat kapcsoltuk a molekulához (2. Ábra). Utóbbi vegyületből csak nagyon kis mennyiséget sikerült előállítani, a kapott diasztereomer-elegy szétválasztása nem történt meg, így a későbbiekben ezt nem vizsgáltuk részletesebben.



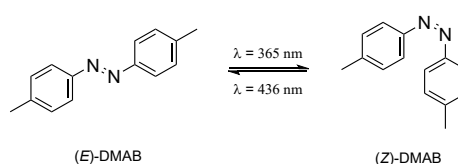
2. Ábra. Fotoaktiválható vegyületek szintézise. Reakciókörülmények: (a) TEA, DKM, sz.h., 24 óra, 24%; (b) TEA, DKM, sz.h., 4 nap, 26%; (c) K_2CO_3 , DKM, sz.h., 3 nap, 72%; (d és e) TEA, DKM, sz.h., 4 nap, 11%.

2.2. Új anyagok spektroszkópiai vizsgálata

Az újonnan szintetizált vegyületek spektroszkópiai jellemzéséhez 10^{-5} M koncentrációjú oldatokat készítettünk DMSO:acetonitril 1:99 oldószerelegyenben. Spektrofotométer segítségével felvettük ezek és az ezekből készült hígítási sorok elnyelési spektrumait. Ezek alapján meghatároztuk a molekulák fotolíziséhez használt, legkisebb energiával gerjeszhető átmenethez tartozó maximális elnyelési hullámhosszakat, a vegyületek moláris abszorpciós koefficienseit különböző hullámhosszakon. A hígítási sor egy-egy oldatán a vegyületek fluoreszcens tulajdonságait is vizsgáltuk. Utóbbi azért releváns, mert a gerjesztett állapotból fotonok emittálásával történő relaxáció nem jár bomlással, vagyis a fotolízis kvantumhatékonysága szempontjából ez egy kedvezőtlen folyamat. A molekulák spektroszkópiai tulajdonságait az 1. Táblázat foglalja össze. Látható, hogy az MeNVOC csoporttal ellátott vegyület jellemzői lényegesen eltérnek a kumarinalapú védőcsoportot tartalmazóktól: kisebb hullámhosszakon nyel el, kisebb abszorbiációval rendelkezik, valamint nem mutat fluoreszcens tulajdonságokat sem.

2.3. Fotolízis-kvantumhatékonyságok meghatározása

A fotolízis kvantumhatékonysága (Φ_f) azt fejezi ki, hogy egy foton elnyelése az esetek hányad részében vezet bomlási folyamathoz. Ebből következik, hogy meghatározásához ismernünk kell, hogy mennyi foton éri a mintát a kísérleteink során. Mivel ennek számszerűsítése sokszor nehéz, alternatív megoldásként egy ismert kvantumhatékonyságú fotokémiai reakciót is használhatunk referenciaként. Ilyenkor a két folyamatot azonos körülmények között vizsgálva következtetni tudunk az általunk keresett értékre. Esetünkben, a referenciának választott reakció a 4,4'-dimetilazobenzol (DMAB) fény hatására lejátszódó *transz*–*cisz* fotoizomerizációja volt (3. Ábra), melynek tulajdonságai az irodalomban ismertek.¹⁴



3. Ábra. A 4,4'-dimetilazobenzol fény hatására lejátszódó izomerizációja.

Mivel a vegyület termikus átalakulása nagyon lassú, ezért abban az esetben, ha a tiszta (*E*)-izomerből készült minta besugárzását csak addig vizsgáljuk, amíg a visszaalakulás elhanyagolható, akkor egyirányú folyamatként tekinthetünk a reakcióra. Munkánk során ezt addig vettük érvényesnek, amíg a keletkezett (*Z*) izomer hozzájárulása a minta abszorbiációjához kevesebb, mint századrésze a kiindulási (*E*) formáénak. Ekkor mind a referencia reakció, mind a fotoaktiválható vegyületek bomlása az alábbi kinetikai egyenlettel írható le:

$$dC/dt = -(\Phi q f)/V \quad (1)$$

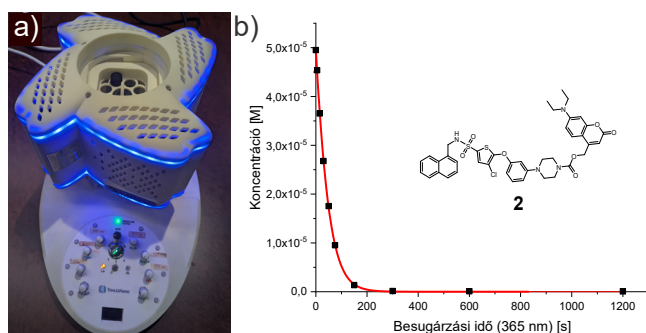
ahol c az adott kiindulási vegyület koncentrációja [M], Φ az adott folyamat kvantumhatékonysága [-], q a beeső fotonfluxus [mol s^{-1}], f a minta által elnyelt fotonok hányada [-], mely a minta abszorbiációjától függ, V pedig a minta térfogata [dm^3]. Amennyiben a referencia és az új anyagok azonos térfogatú mintáit azonos körülmények között vizsgáljuk (ahol ugyanakkora fotonfluxus éri őket), valamint a koncentrációkat úgy választjuk meg, hogy a minták abszorbiációja a 0 időpontban megegyezzen (ekkor az elnyelt fény hányada is azonos), akkor belátható, hogy a kezdeti reakciósebességek hányadosa az izomerizációs és a bomlási folyamatok kvantumhatékonyságainak hányadosával fog megegyezni. Ennek megfelelően ez egyes folyamatok kezdeti sebességének meghatározására van szükség. Ehhez a referencia anyag esetében a Lambert–Beer-törvény felhasználásával az (1)-es egyenletet átalakítva, a minta abszorbiációjának változását vizsgáltuk adott idejű 365 nm-es fényvel történő besugárzást követően.

1. Táblázat. A fotoaktiválható vegyületek spektroszkópiai tulajdonságai

Molekula	λ_{\max} [nm]	ϵ_{\max} [M ⁻¹ cm ⁻¹]	ϵ_{365} [M ⁻¹ cm ⁻¹]	Fluoreszcens intenzitás ^a [a.u.]	Stokes-eltolódás [nm]
1	346	9445	7647	n.d. ^b	n.d. ^b
2	376	40210	37012	2753	89
3	376	37676	34868	2596	75
4	376	30843	28261	1262	91

^a 1 μ M-ra normált értékek; ^b nem detektálható.

Az abszorbanciaváltozást leíró differenciálegyenlet integrálásával egy paraméteres függvényhez juthatunk. A függvényt ezután illesztettük a referenciaminta 365 nm-es elnyelését a besugárzási idő függvényében mért adatpontjaira. Az illesztési paraméterek alapján meghatározható a kezdeti reakciósebesség. A fotoaktiválható vegyületek esetében is hasonlóan jártunk el: a mintákat PhotoCube fotoreaktorban (**4. Ábra**) különböző ideig 365 nm-es fényel sugároztuk be, és a konverziót HPLC-vel követtük. A koncentrációadatokra itt is az (1)-es egyenlet integrálásával kapható paraméteres függvényt illesztettük, így kezdeti reakciósebességeket tudunk meghatározni.



4. Ábra. a) A fotolízis vizsgálatokhoz használt fotoreaktor. b) A **2**-es molekula vizsgálata során kapott adatok és az illesztett függvény.

A kezdeti reakciósebességekből - mivel a referencia esetén ismert a reakció kvantumhatékonysága - egyszerű arányossággal megkaptuk az új fotoaktiválható vegyületek fotolízis kvantumhatékonyságát, melyeket a **2. Táblázat** tartalmaz.

2. Táblázat. A illesztett függvényekre és a fotokémiai reakciókra jellemző értékek.

	R ² [-]	(dc/dt) _{t=0} [M s ⁻¹]	Φ [-]
DMAB ^a	0,9968	-9,02410 ⁻⁶	0,18
1	0,9847	-5,87210 ⁻⁶	0,117
2	0,9999	-9,40210 ⁻⁷	0,0188
3	0,9998	-1,62410 ⁻⁸	3,2410 ⁻⁴
4	0,9954	-2,16510 ⁻⁷	4,3210 ⁻³

^a Referencia reakció: 4,4'-dimetilazobenzol fotoizomerizáció.

A kapott adatok alapján a MeNVOC védőcsoport esetén lényegesen nagyobb a fotolízis kvantumhatékonysága, mint

a kumarin alapvázis védőcsoportok esetén. Fontos azonban megjegyezni, hogy az itt meghatározott értékek csak az itt alkalmazott oldószerben, azaz DMSO:acetonitril 1:99 elegyben érvényesek.

3. Összefoglalás

A munkánk során öt új fotoaktiválható idegnövekedési faktor mimetikumot állítottunk elő, melyek közül négyet részletesen is vizsgáltunk. Ezen vegyületek fotolízisének kvantumhatékonyságának meghatározására egy új módszert dolgoztunk ki, mely olyan esetekben is alkalmazható, amikor a fotonfluxus az adott kísérleti elrendezésben nem számszerűsíthető. A jövőben több hasonló további vegyület szintézisét tervezzük, valamint az itt felsorolt vizsgálatokat más - elsősorban vizes - közegben is szeretnénk elvégezni, hogy azt követően biológiai kísérletekben alkalmazzuk őket. Ezek során szeretnénk megvalósítani az axonok három dimenzióban irányított növesztését, mely lehetőséget nyújthat megfelelő topológiájú neuronhálózatok létrehozására *in vitro*, valamint hosszú távon akár *in vivo* lézertérápiás eljárásokban idegi sérülések kezelésére is.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozunk Dr. Mucsi Zoltánnak és Dr. Kovács Ervinnek szakmai tanácsaikért, valamint Dr. Kalydi Eszternek és Dr. Turczel Gábornak az NMR mérések elvégzéséért. A Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (BO/365/23/7) támogatásával készült.

Hivatkozások

- De Boer, A.; Van Buel, E. M.; Ter Horst, G. J. *Neuroscience* **2012**, *201*, 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.11.017>
- Kume, T.; Nishikawa, H.; Tomioka, H.; Katsuki, H.; Akaike, A.; Kaneko, S.; Maeda, T.; Kihara, T.; Shimohama, S. *Brain Res.* **2000**, *852*, 279–289. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02226-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02226-X)
- Cohen, S.; Levi-Montalcini, R.; Hamburger, V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1954**, *40*, 1014–1018. <https://doi.org/10.1073/pnas.40.10.1014>
- Gundersen, R. W.; Barrett, J. N. *Science* **1979**, *206*, 1079–1080. <https://doi.org/10.1126/science.493992>
- Weissmiller, A. M.; Wu, C. *Transl. Neurodegener.* **2012**, *1*, 14. <https://doi.org/10.1186/2047-9158-1-14>

6. Gliyazova, N. S.; Ibeanu, G. C. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2016**, *36*, 1109–1122.
<https://doi.org/10.1007/s10571-015-0304-5>
7. Williams, A. L.; Dandepally, S. R.; Gilyazova, N.; Witherspoon, S. M.; Ibeanu, G. C. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 9577–9581.
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2010.09.028>
8. Nguyen, T. V.; Shen, L.; Griend, L. V.; Quach, L.N.; Belichenko, N. P.; Saw, N.; Yang, T.; Shamloo, M.; Wyss-Coray, T.; Massa, S. M.; Longo, F. M. *J. Alzheimer's Dis.* **2014**, *42*, 459–483.
<https://doi.org/10.3233/JAD-140036>
9. Yin, G. N.; Ock, J.; Limanjaya, A.; Minh, N. N.; Hong, S.; Yang, T.; Longo, F. M.; Ryu, J.; Suh, J. *J. Sex. Med.* **2021**, *18*, 17–18.
<https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2020.10.015>
10. Gao, C.; Luan, Z.; Zhang, Q.; Yang, S.; Rao, S.; Qu, D.; Tian, H. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 1618–1621.
<https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b00393>
11. Koch, T. H.; Barthel, B. L.; Yin, H. H.; Tamura, R.; Balabanova, A. WO Patent 2016176332, 2016.
12. Bassolino, G.; Nancoz, C.; Thiel, Z.; Bois, E.; Vauthey, E.; Rivera-Fuentes, P. *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 387–391.
<https://doi.org/10.1039/C7SC03627B>
13. Gao, Z.; Yuan, P.; Wang, D.; Xu, Z.; Li, Z.; Shao, X. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 2528–2535.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.03.091>
14. Casimiro, L.; Andreoni, L.; Groppi, J.; Credi, A.; Métivier, R.; Silvi, S. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2022**, *21*, 825–833.
<https://doi.org/10.1007/s43630-021-00162-3>

Synthesis and photochemical characterization of photoactivatable nerve growth factor mimetic compounds

Neurodegenerative diseases and injuries of the nervous system affect tens of millions of people worldwide. In our body, a number of different compounds play a crucial role in the development and survival of neurons, one of the most important being the nerve growth factor (NGF) protein. While this protein possesses neuroprotective properties and is able to direct the growth of axons, its use for therapeutic purposes faces several problems. To overcome this, a number of small molecule compounds—able to bind to the same receptors as NGF—have been identified in the last few decades. In this work, we synthesised two of the compounds that have previously been shown to have biological effects similar to those of NGF. Following their successful syntheses, we were able to create five novel caged compounds through the covalent attachment of commonly used photolabile protecting groups (**Fig. 2**).

Four of the five novel compounds were then studied in detailed spectrophotometric and photolytic studies. First, we examined

their spectroscopic properties, such as absorption maxima, fluorescence and molar absorption coefficients (**Table 1**). Next, to determine the quantum yield of their photolysis, a new methodology was adapted using the light-controlled *cis-trans* isomerisation process of 4,4'-dimethylazobenzene as a reference. This method can be used in systems in which the photon flux can not be directly quantified.

Using the novel compounds, we plan to carry out several biological experiments in the future, in which the spatial and temporal release of the bioactive compounds will be achieved using focused light. This strategy offers the possibility of guided axon growth in three dimensions, and with that, the chance to create *in vitro* neural networks with custom topologies and, long term, to repair nerve injuries *in vivo*.