

# **Bioortogonális jelzésre alkalmas kémiai hírvivők és fluoreszcens jelzővegyületek szintézise és alkalmazása**

doktori értekezés tézisei

**Cserép Balázs Gergely**

okleveles vegyész

**Témavezető: Dr. Kele Péter**

tudományos főmunkatárs

**Kémia Doktori Iskola**

iskolavezető: Dr. Inzelt György

egyetemi tanár

**Szintetikus kémia, anyagtudomány,**

**biomolekuláris kémia program**

programvezető: Dr. Perczel András

egyetemi tanár



Eötvös Loránd Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Budapest, 2015.

## 1. Bevezetés

A fehérjék, oligonukleotidok és más biopolimerek fluoreszcens módosítására alkalmas módszerek kulcsfontosságúak a modern biotechnológiai, gyógyszerkémiai és molekuláris biológiai kutatásokban.<sup>1,2</sup> A különböző molekulák, vagy akár egész sejtek *in vitro* vagy *in vivo*, fluoreszcens jelölésének legfontosabb előnyei a sejten belüli pozícionálást lehetővé tevő jó tér- és időbeli felbontóképesség, valamint az igen érzékeny, akár egyetlen molekula kimutatására is alkalmas, relatíve olcsó detektálhatóság.<sup>3,4</sup> Több fluorofór együttes, energia-transzfer rendszerekben történő felhasználásával kölcsönhatások, ezáltal dinamikusan változó folyamatok vizsgálata is lehetséges. A legsokoldalúbb felhasználhatósági lehetőséggel a kis, szintetikus jelzővegyületek rendelkeznek, ugyanis reaktivitásuk, fotofizikai és oldhatósági paramétereik szintetikusan hangolhatóak és a genomban nem direkt módon kódolt molekulák tanulmányozására is alkalmazhatóak. Jelentőségüket jól mutatja, hogy 2014-ben, részben ilyen mesterséges jelzővegyületeknek köszönhetően, a szuperfelbontású mikroszkópia terén elért fejlesztésekért ítelték oda a kémiai Nobel-díjat.<sup>5</sup>

A biomolekulák natív környezetben történő, kis, szintetikus vegyületekkel való fluoreszcens módosításának leghatékonyabb módszerei az ún. *bioortogonális ligációkon* alapuló eljárások,<sup>6</sup> melyek során két biokompatibilis, nem-természetes funkciós csoport fiziológias körülmények között lejátszódó nagy hatékonyságú, gyors és egymásra nézve szelektív (*ortogonális*) reakciója révén stabil kovalens kötés jön létre biokompatibilis termékeket eredményezve.<sup>7</sup> A jelenleg ismert bioortogonális átalakítások közül a legelterjedtebbek és reakciósebességüket figyelembe véve leggyorsabbnak tekinthetők az azidok és alkinok közti 1,3-dipoláris cikloaddíciós, valamint a tetrazinok feszült gyűrűs alkinokkal / alkénnel való Diels-Alder reakciói.<sup>6,8</sup> Az ilyen jelölési technikák kétlépéses, szekvenciális eljárást követnek, melynek során a célvegyületet először egy bioortogonális funkciós csoporttal ellátott hírvivő molekulával (*chemical reporter*) módosítjuk, majd az így kapott, mesterségesen funkcionalizált specieszeket egy második lépésben reagáltatjuk a komplementer bioortogonális csoporttal ellátott jelzővegyülettel.<sup>9</sup> A kémiai hírvivő beépítésére több módszer is kínálkozik; fehérjék esetében lehetőség van *in vitro* C- vagy N-terminálison való előzetes módosításra, ritka aminosavakon (Cys, Tyr) történő bevitelre, vagy mesterséges aminosavak genetikai kódolására.<sup>10</sup> A cisztein, mint az egyik legritkább aminosav kiváló lehetőséget nyújt a szabad tiol csoportot elérhető helyen tartalmazó fehérjék szelektív megjelölésére, melyhez ígéretes megoldásnak tűnik a vinil-szulfonokkal történő Michael-addíció.<sup>11</sup>

## 2. Célkitűzések

A doktori kutatásaim során a fluoreszcens jelzés bevitelére alkalmas bioortogonális ligációs eljárások mindkét oldalának fejlesztésével foglalkoztam, új kémiai hírvivőket és fluoreszcens jelzővegyületeket állítottam elő, valamint vizsgáltam tulajdonságaikat és felhasználhatóságukat. Munkám ezzel összhangban három fő részre tagolódik:

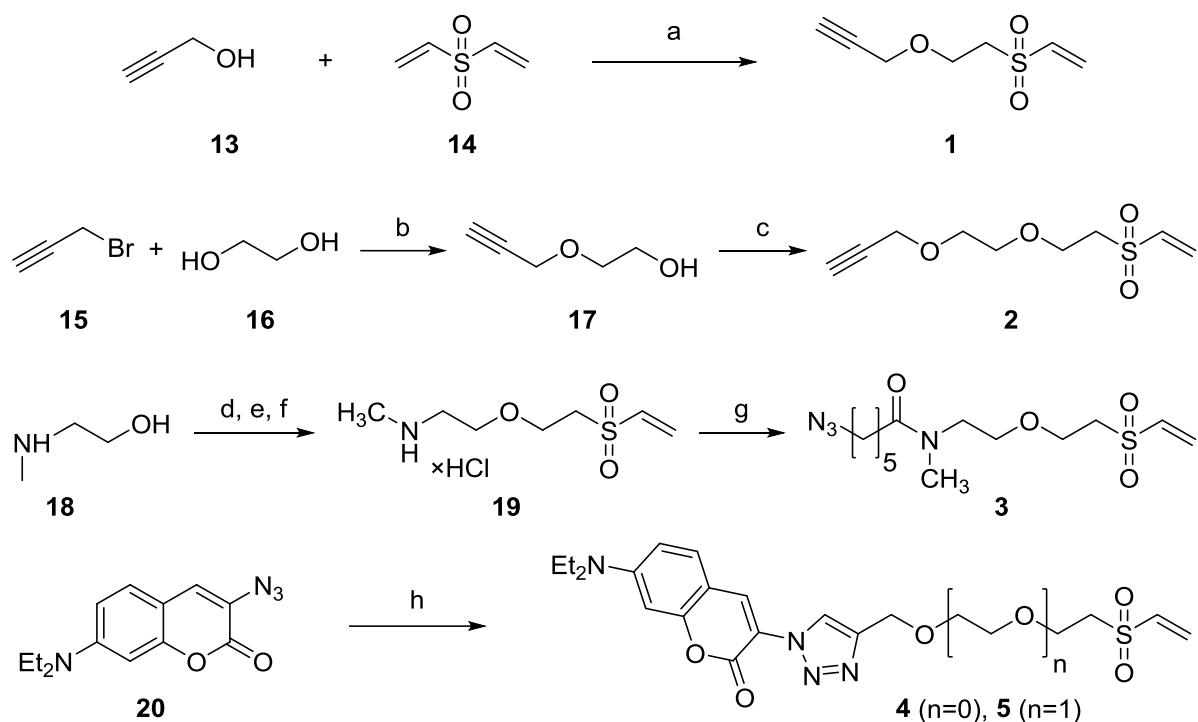
- Vinil-szulfon motívumra épülő cisztein-specifikus kémiai hírvivők és fluoreszcens jelzővegyületek (**1-5**) előállítása és a jelölési reakció szelektivitás- és sebesség vizsgálata.
- Reaktív, de kellően stabil tetrazinok (**6-9**) szintézise és szubsztituensek hatásának vizsgálata a reaktivitásra az elektronikus effektus és szterikus gátlás alapján.
- A távoli vörös – közeli IR tartományban emittáló, ún. mega-Stokes tulajdonsággal rendelkező bioortogonális fluorofórok (**10-12**) tervezése és energia-transzfer rendszerben, illetve oligonukleotidok jelölésében való felhasználásuk.

## 3. Saját eredmények

A kutatásaim során elért eredményeket a következő pontokban foglalhatjuk össze.

### 3.1. Cisztein-specifikus jelzővegyületek

Elsőként divinil-szulfonból (**14**) kiindulva optimalizált reakciókörülmények mellett vinil-szulfon és alkin funkciós csoportokkal rendelkező bifunkciós kémiai hírvivőt állítottam elő (**1**), majd a vízdékonyság növelése érdekében egy etoxi csoporttal hosszabbított változatot (**2**) terveztem. Az azid csoport beviteléhez elsőként egy amin funkciós csoportot tartalmazó köztterméket állítottam elő (**19**), melyhez 6-azido-hexánsavat kapcsolva nyertem a **3** célterméket. A cisztein-specifikus fluoreszcens jelzővegyületeket az alkin funkcióval rendelkező hírvivőkből (**1**, **2**) és 3-azido-7-dietilaminokumarinból (**20**) állítottam elő rézkatalizált azid-alkin cikloaddíciós reakcióban (1. ábra)

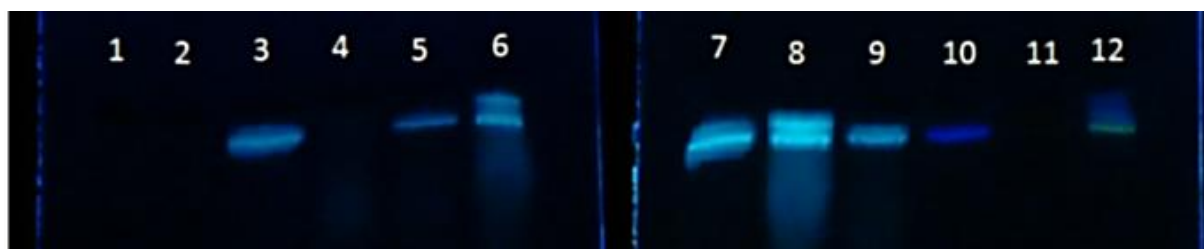


a) kat. <sup>t</sup>BuOK, abs. THF, N<sub>2</sub>, 25 °C, 45 min, 68% b) NaOH, 0 °C → 45 °C, 3 h, N<sub>2</sub>, 80% c) **14**, kat. <sup>t</sup>BuOK, abs. THF, N<sub>2</sub>, 25 °C, 45 min, 58% d) Boc<sub>2</sub>O, DCM, 25 °C, 14 h, 67% e) **14**, kat. <sup>t</sup>BuOK, abs. THF, N<sub>2</sub>, 25 °C, 45 min, 52% f) CH<sub>3</sub>COCl, abs. MeOH, 0 °C → 25 °C, 4 h, 98% g) 6-azidohexánsav, EDAC×HCl, TEA, DCM, 25 °C, 1,5 h, 35% h) **1** vagy **2**, kat. CuI, TEA MeCN, 25 °C, 3 h, 37-64%

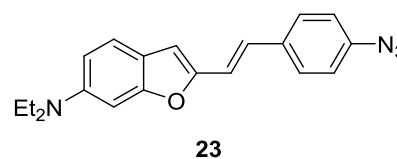
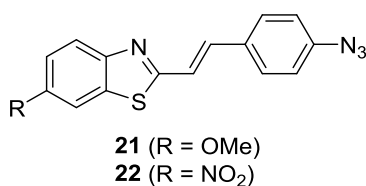
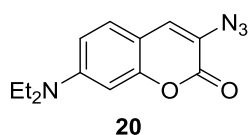
*1. ábra. Vinil-szulfon motívumot tartalmazó jelzővegyületek előállítása.*

Az előállított vegyületek szelektivitás- és pH-függő reaktivitás vizsgálatát DTHFPIC és KGDTHFPIC szekvenciájú modellpeptideken végeztük. A jó vízoldhatósággal rendelkező vinil-szulfon reagensek fiziológiás körülmények között specifikus affinitást mutattak a tiolcsoporttal szemben, ezzel a modellpeptidek gyors, szelektív és hatékony jelölését téve lehetővé a cisztein oldalláncán keresztül.

A **2** bifunkciós kémiai hírvivővel és azid funkciós csoporttal rendelkező fluorogén jelzővegyületekkel (**20-23**) szekvenciális fluorogén jelölést valósítottuk meg (KGDTHFPIC + **2**, majd második lépésben + **20-23**). Az ilyen, kiindulási állapotban nem, de a kapcsolási reakció során fluoreszcensé váló jelzővegyületekkel rámutattunk a kétlépéses eljárás előnyére a közvetlen, egy lépéses fluoreszcens jelöléssel (KGDTHFPIC + **5**) szemben, miszerint nagymértékben csökkenthető az elreagálatlan jelzővegyület okozta háttérfluoreszcencia (2. ábra, 6 és 8 sáv vs. 5 és 9-12 sáv).



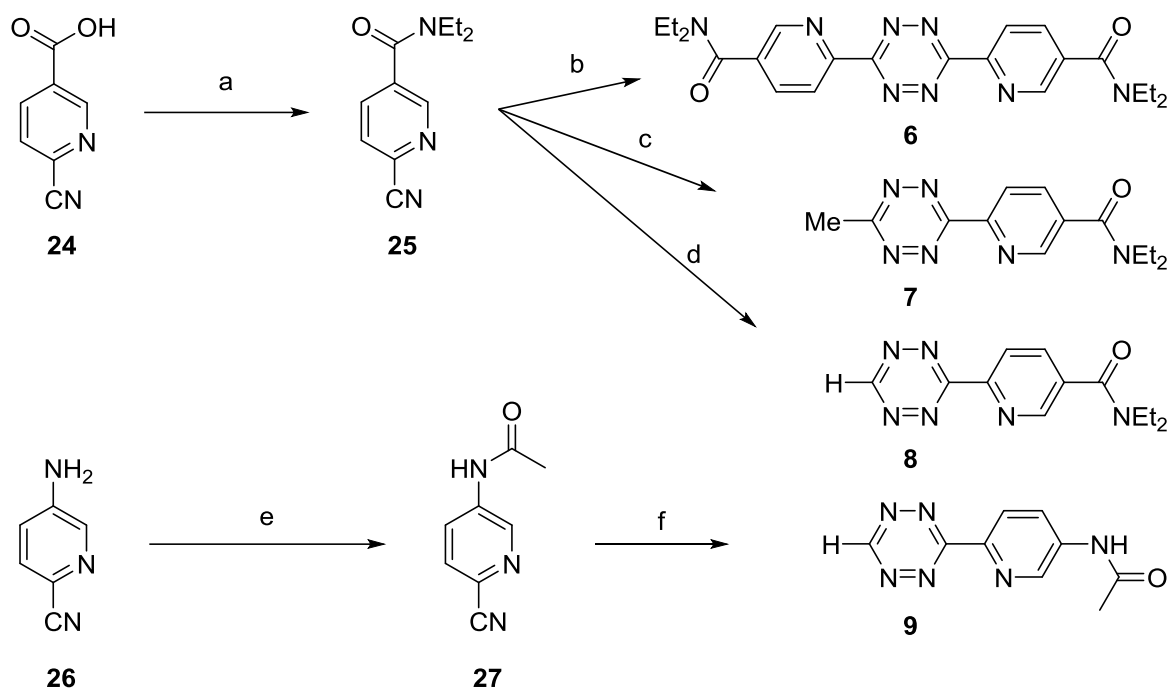
1	KGDTHFPIC	7	KGDTHFPIC-5
2	KGDTHFPIC-2	8	KGDTHFPIC + 5
3	KGDTHFPIC-5	9	KGDTHFPIC-2 + 20 + Cu(I)
4	KGDTHFPIC-2 + 20	10	KGDTHFPIC-2 + 21 + Cu(I)
5	KGDTHFPIC-2 + 20 + Cu(I)	11	KGDTHFPIC-2 + 22 + Cu(I)
6	KGDTHFPIC + 5	12	KGDTHFPIC-2 + 23 + Cu(I)



2. ábra. A gélek UV fényvel való besugárzása során kapott képek.

### 3.2. Reaktív tetrazinszármazékok

A tetrazinok fordított elektronigényű Diels-Alder reakcióban való reaktivitása viszonylag jó valószínűséggel becsülhető a diének LUMO energiaszintjei alapján. Leegyszerűsítve elmondható, hogy a tetrazinok elektronhiányossága arányos azok reakciókészségével. Ezt és a további funkcionalizálhatóságot szem előtt tartva a reaktív tetrazinszármazékok előállításához a jó elektronszívó tulajdonsággal rendelkező 6-cianonikotinsavat (**24**) választottam. A sztérikus hatások vizsgálata céljából három különböző, nikotinsavamidra (**25**) épülő tetrazint állítottam elő: egy szimmetrikusan szubsztituált származékot (**6**), egy nem-szimmetrikus, egyik oldalt metilcsoportot tartalmazó változatot (**7**) és egy monoszubsztituált tetrazint (**8**). A reaktivitás/stabilitás arány befolyásolására az amid csoport kapcsolódási sorrendjének megváltoztatásával tettem kísérletet egy amidopiridinre (**27**) épülő tetrazin szintézisével (3. ábra).



a)  $\text{HNEt}_2$ , HOBt, HBTU, EDIPA, THF, 25 °C, 16 h, 87% b) 1)  $\text{N}_2\text{H}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , THF,  $\Delta$ , 16 h; 2)  $[\text{NO}_x]$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 25 °C, 15 min, 30% c) 1)  $\text{N}_2\text{H}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , MeCN,  $\Delta$ , 16 h; 2)  $[\text{NO}_x]$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 25 °C, 15 min, 10% d) 1) formamidin-acetát,  $\text{N}_2\text{H}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , EtOH,  $\Delta$ , 16 h; 2) izopentil-nitrit,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 25 °C, 3 h, 42% e)  $\text{CH}_3\text{COCl}$ , TEA, abs. DCM, 0 °C  $\rightarrow$  25 °C, 18 h, 66% f) 1) formamidin-acetát,  $\text{N}_2\text{H}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , S, 60 °C, 16 h; 2) izopentil-nitrit,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 25 °C, 3 h, 13%

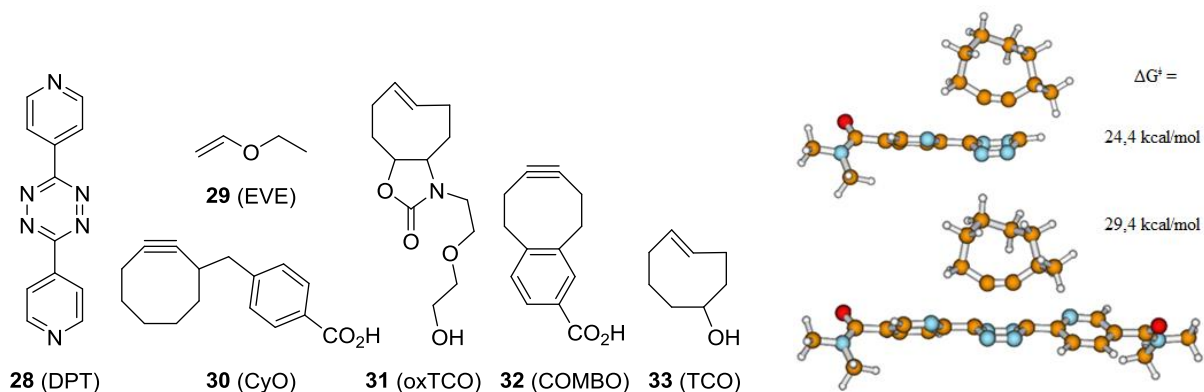
3. ábra. A **6**, **7**, **8** és **9** modell tetrazinok előállítása.

A tetrazinok vizsgálatához összehasonlítási alapként az irodalomban legtöbbször alkalmazott dipiridil-tetrazint (DPT, **28**) választottam. A tetrazinok várható reaktivitásának becslésére azok LUMO energiái alapján tettünk kísérletet<sup>12</sup>, majd meghatároztuk a jellemző sebességi állandókat etil-vinil-éterrel (EVE, **29**), cikloooktinnal (CyO, **30**) és az oxTCO (**31**) *transz*-ciklooktén származékkal. Végül a gyakorlati felhasználhatóság mérlegeléséhez az egyes tetrazinszármazékok fiziológiához hasonló körülmények közötti stabilitását is vizsgáltam (4. ábra).

Tetrazin	$t_{1/2}$ (h)	LUMO (eV)	$k_2 / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$				
			EVE <sup>a</sup>	CyO <sup>a</sup>	oxTCO <sup>b</sup>	COMBO <sup>b</sup>	TCO <sup>b</sup>
<b>DPT</b>	3	0,28	0,0012	---	2100	---	---
<b>6</b>	4	0,46	0,008	0,23	7900	---	---
<b>7</b>	88	0,83	0,00145	---	1000	210	4000
<b>8</b>	4	0,71	0,024	6,25	17000	---	---
<b>9</b>	6	0,69	0,010	2,89	---	---	---

<sup>a</sup> DMSO/víz = 9/1 v/v), 25 °C; <sup>b</sup> 1% DMSO pH = 7,2 PBS pufferben, 36 °C.

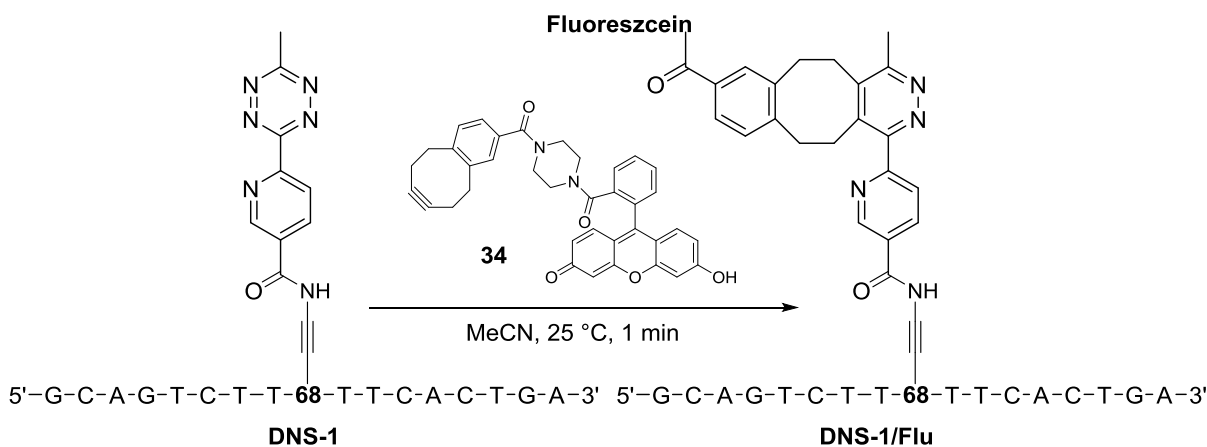
1. táblázat. A tetrazinok LUMO energiái, stabilitása és dienofilekkel szembeni reaktivitása.



4. ábra. A dienofilek (bal) és a szerkezetek átmeneti állapotokban (8+CyO, 6+CyO, jobb).

A monoszubsztituált **8** tetrazin az elektronszívó csoportok és LUMO energia alapján reaktívabbnak várt **6**-hoz képest aktívabbnak mutatkozott (1. táblázat), ezzel rámutatva a szterikus hatások fontos szerepére. A tapasztalati eredményeket olyan kvantumkémiai számításokkal is alátámasztottuk, melyben a dienofil partnert is figyelembe vevő átmeneti állapotok alapján számított aktiválási gátakból következtettünk a reakciósebességek viszonyára. Ezzel a reaktivásra olyan új, az átmeneti állapotot és így a reakciópartnert is figyelembe vevő predikciós modell állítható fel, mely a korábban alkalmazott, csupán a LUMO energiákat figyelembe vevő módszernél pontosabban jósolja meg tetrazinok reaktivitását.

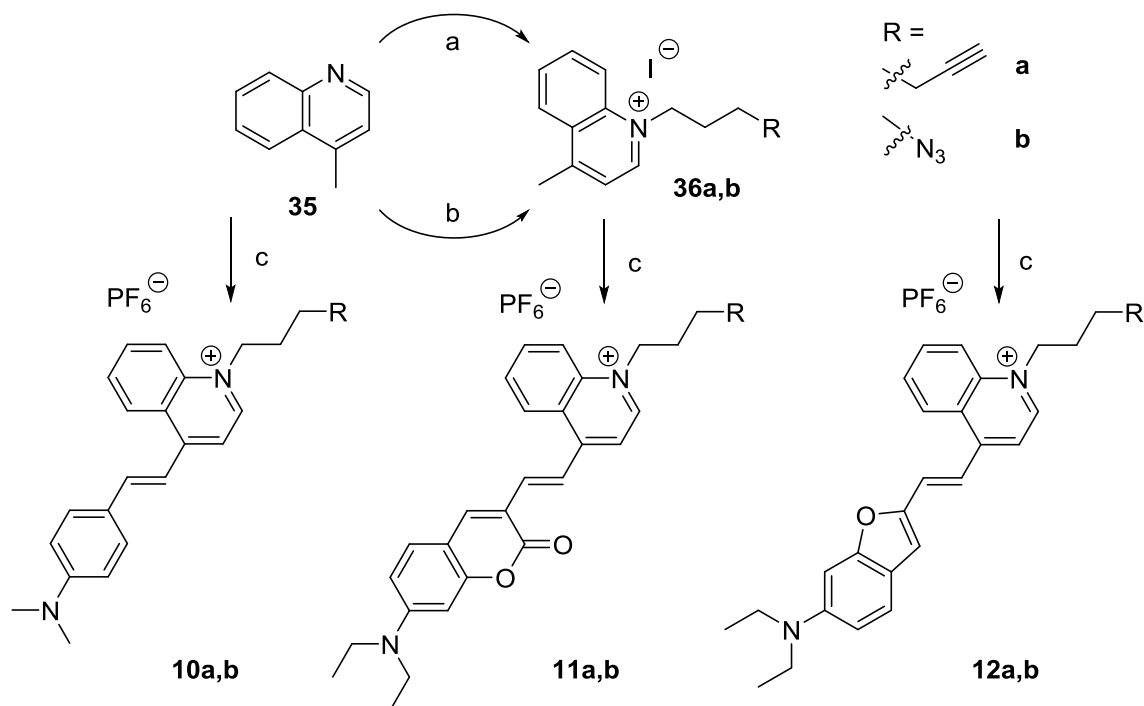
A kedvező reaktivitás/stabilitás viszonytal rendelkező **7** származék gyakorlati felhasználhatóságának vizsgálatokor meghatároztam reaktivitását a COMBO (**42**) ciklooktinnal és az általánosan használt TCO (**43**) *transz*-ciklookténnel szemben is. A kedvező eredmények után a szabad karboxilcsoporttal rendelkező származékból bioortogonalizált nukleotid építőelemet előállítottam elő, melyet szilárd fázisú technológiával oligonukleotid láncba építettünk be (**DNS-1**) és sikerrel jelöltünk meg fluoreszcens jelzővegyület (**34**) alkalmazásával (5. ábra).



5. ábra. A tetrazint tartalmazó **DNS-1** lánc jelölése COMBO-fluoreszceinnel (**51**).

### 3.3. Lepidínium-alapú fluoreszcens jelzővegyületek

A lepidínium vázelem felhasználásával azid és alkin funkciós csoportokkal ellátott, mega-Stokes tulajdonságot mutató és a távoli vörös – közeli IR tartományban emittáló fluoreszcens jelzővegyületeket állítottam elő (**10**, **11**, **12**) (6. ábra).

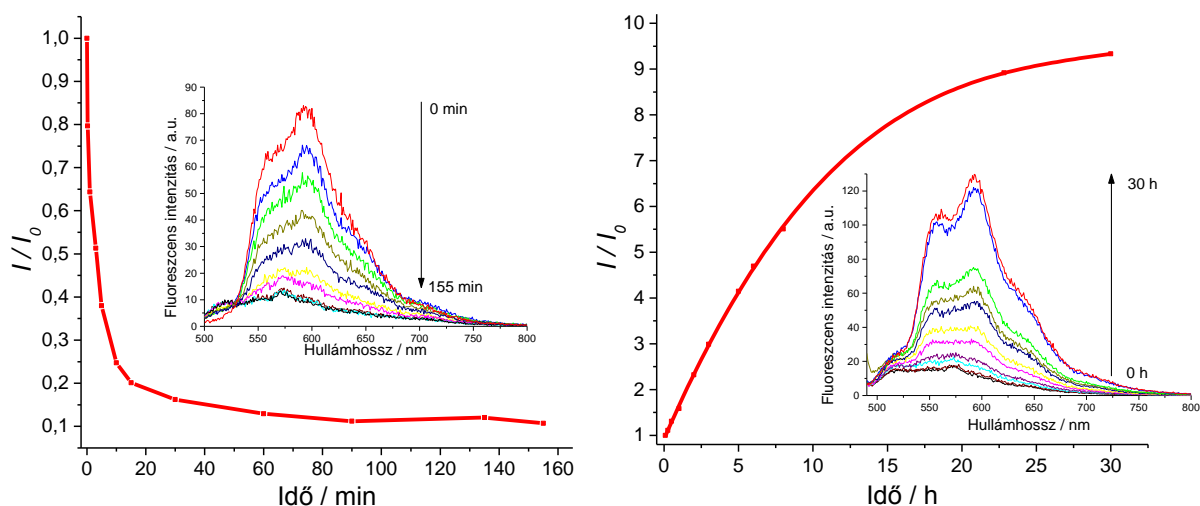


a) 6-jódhexin, MeCN,  $\Delta$ , 21 h, 86% b) 1) 1,3-dijódpropán, MeCN,  $\Delta$ , 20 h, 90%; 2)  $\text{NaN}_3$ , MeCN,  $\Delta$ , 18 h, 84%  
c) 1) 4-dimetilaminobenzaldehyd vagy 7-(dietilamino)-3-formilkumarin vagy a 6-(dietilamino)-benzofurán-2-karbaldehyd, piperidin, EtOH,  $\Delta$ , 3 h; 2)  $\text{NH}_4\text{PF}_6$ , EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$ , 95% (**10a**), 85% (**10b**), 90% (**11a**), 73% (**11b**), 93% (**12a**), 87% (**12b**)

6. ábra. A **10**, **11** és **12** lepidínium-vázás fluorofórok előállítása.

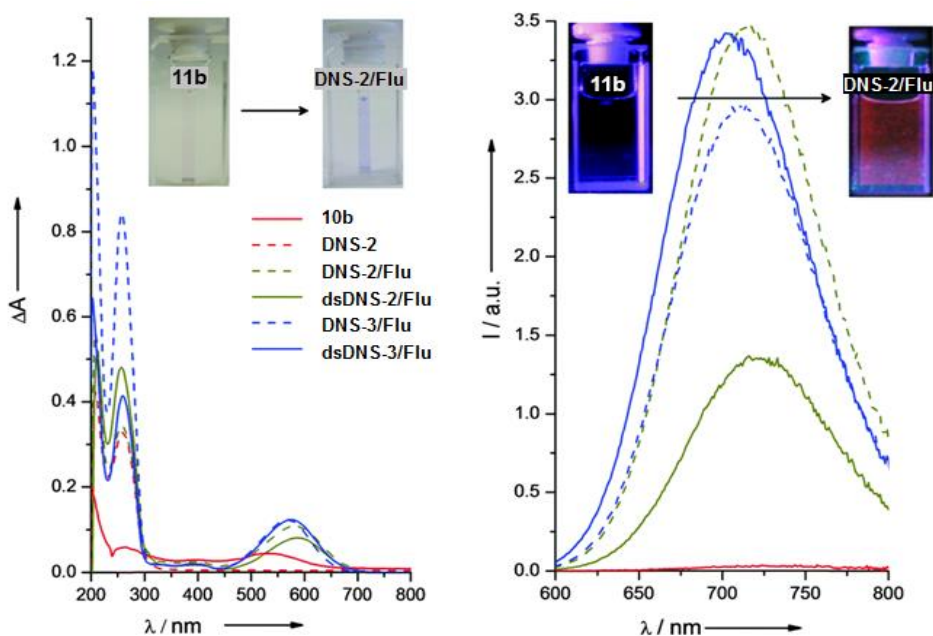
A kereskedelmi forgalmazás során felmerülő igények kielégítéshez a reakciókörülmények optimalizálásával gyors, jó termelést és tisztaságot biztosító szintetikus eljárást dolgoztam ki. A fotofizikai adataik alapján a fluorofórok optimálisak olcsó, kereskedelmi forgalomban elérhető lézerrel való gerjesztésre, és nagy (~150 nm) Stokes-eltolódásuknak köszönhetően a gerjesztési és emissziós spektrumok szétválásával ideálisan használhatóak fel energiatranszfer rendszerekben. Ezt kihasználva, a **10** jelzővegyületet és daunomicint (Dau), egy fluoreszcens rákellenes vegyületet tartalmazó modellrendszert terveztünk, melyben a két fluorofór energiatranszfer (FRET) kapcsolatban áll egymással. A választott lepidínium fluorofór nagy hatékonysággal törte le a daunomicin fluoreszcenciáját, ezzel 90%-kal csökkentve annak emisszióját. Az összekötő egység hidrolízisével és így a két vegyület szétválasztásával a daunomicin fluoreszcenciája teljes mértékben visszaállíthatónak bizonyult (7. ábra).





7. ábra. A fluoreszcens intenzitás változása 592 nm-en a daunomicin és **10** között a FRET-rendszer kialakulásakor (bal) és az összekötő egység hidrolízisekor (jobb).

Az előállított jelzővegyületek egy másik tagjával (**11**) alkin funkciós csoporttal különbözően szubsztituált oligonukleotidok (**DNS-2,3**) fluoreszcens jelölését valósítottuk meg. A jelölés hatására mindkét esetben a fluoreszcencia intenzitás nagymértékű növekedését értük el, azonban a komplementer szállal való anelláció hatására jelentős különbség mutatkozott (8. ábra). A jelenséget a fotofizikai kísérletek alapján a lokális polaritás megváltozásával magyarázhattuk, mely egyben rámutatott a fluoreszcens jelzés (5-uracil vs. 2'-ribóz) kapcsolódási pontjának fontosságára és a hibridizáció után kialakuló kettős szálaban elhelyezkedő különböző pozíciójára.



8. ábra. A jelzővegyület és az oligonukleotidok abszorpciós és fluoreszcens spektrumai.

## A doktori értekezés alapjául szolgáló publikációk:

1. G. B. Cserép, Zs. Baranyai, D. Komáromy, K. Horváti, Sz. Bősze, P. Kele, „Fluorogenic tagging of peptides via Cys residues using thiol-specific vinyl sulfone affinity tags” *Tetrahedron* **2014**, *70*, 5961.
2. G. B. Cserép, O. Demeter, E. Bätzner, M. Kállay, H-A. Wagenknecht, P. Kele, „Synthesis and Evaluation of Nicotinic Acid Derived Tetrazines for Bioorthogonal Labeling” *Synthesis* **2015**, *közlésre elfogadva*.
3. G. B. Cserép, K. N. Enyedi, A. Demeter, G. Mező, P. Kele: „NIR Mega-Stokes Fluorophores for Bioorthogonal Labeling and Energy Transfer Systems – An Efficient Quencher for Daunomycin” *Chem. Asian J.* **2013**, *8*, 494.
4. C. Stubinitzky, G. B. Cserép, E. Bätzner, P. Kele, P. H-A. Wagenknecht, „2'-Deoxyuridine Conjugated with a Reactive Monobenzocyclooctyne as a DNA Building Block for Copper-Free Click-type Postsynthetic Modification of DNA” *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 11218.

---

<sup>1</sup> B. Valeur *Molecular Fluorescence Principles and Applications*; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, **2002**.

<sup>2</sup> J. R. Lakowicz *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3<sup>rd</sup> ed.; Springer Publishing, **2006**.

<sup>3</sup> P. M. Goodwin, W. P. Ambrose, R. A. Keller *Accounts of Chemical Research* **1996**, *29*, 607.

<sup>4</sup> B. Huang, M. Bates, X. Zhuang *Annu Rev Biochem* **2009**, *78*, 993.

<sup>5</sup> [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2014/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/).

<sup>6</sup> C. P. Ramil, Q. Lin *Chem Commun (Camb)* **2013**, *49*, 11007.

<sup>7</sup> E. Saxon, C. R. Bertozzi *Science* **2000**, *287*, 2007.

<sup>8</sup> D. M. Patterson, L. A. Nazarova, J. A. Prescher *ACS Chem Biol* **2014**, *9*, 592.

<sup>9</sup> K. E. Beatty *Mol Biosyst* **2011**, *7*, 2360.

<sup>10</sup> M. Grammel, H. C. Hang *Nat Chem Biol* **2013**, *9*, 475.

<sup>11</sup> J. Morales-Sanfrutos, F. J. Lopez-Jaramillo, F. Hernandez-Mateo, F. Santoyo-Gonzalez *J Org Chem* **2010**, *75*, 4039.

<sup>12</sup> Gaussian 09 csomaggal, Hartree–Fock közelítés, 6-311++G\*\* bázison és B3LYP funkcionállal optimalizált geometriákon.