



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyésmérnöki és Biomérnöki Kar

OTDK DOLGOZAT

Aktiválható, makrociklusos tetrazinok szintézise

Unyi Zsombor

II. évf., Gyógyszervegyész-mérnöki MSc

Témavezető:

Cserép Balázs Gergely

tudományos munkatárs

Konzulens:

Kele Péter

tudományos főmunkatárs

Természettudományi Kutatóközpont

Szerves Kémia Intézet, Kémiai Biológia Kutatócsoport

Lezárva:

Budapest, 2025.01.06.

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	1
1. Bevezetés.....	3
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1. Bioortogonális reakció.....	4
2.2. Tetrazinok.....	6
2.3. <i>transz</i> -Ciklooktének	7
2.4. Bioortogonális kötés hasítás pirazin eliminációval	8
2.5. Célzott hatóanyag felszabadítás rTCO alkalmazásával.....	10
2.6. IEDDA kontrollálása makrociklikus tetrazinnal	13
2.7. Fotolabilis vegyületek	15
2.8. Nitroreduktáz enzim	17
3. Célkitűzés	19
4. Saját munka	20
4.1. Nitroreduktáz enzim által aktivált makrociklusos tetrazin szintézise	20
4.2. rTCO-rodol szintézise	24
4.3. Fénnyel aktiválható makrociklusos tetrazin szintézise.....	29
4.4. NTR enzim által aktivált makrociklusos tetrazin szintézise II	31
4.5. α -alkoxi karbamát kötést tartalmazó makrociklusos tetrazinok szintézise	33
5. Kísérleti rész.....	36
5.1. Általános kísérleti adatok	36
5.2. Szintézisek.....	37
6. Összefoglalás.....	62
Köszönetnyilvánítás	63
Irodalomjegyzék.....	64

Rövidítésjegyzék

Δ	reflux hőmérséklet
absz	abszolútizált (vízmentesített) oldószer
AIBN	azo-bisz-izobutironitril
Boc ₂ O	di- <i>tert</i> -butil-dikarbonát
BPTz	bisz-(2-piridil)-1,2,4,5-tetrazin
cc	tömény
CCO	<i>cisz</i> -ciklooktén
CDI	1,1'-karbonil-diimidazol
cTCO	metil (<i>E</i>)-6-hidroxi-1-metil-4-ciklooktén-1-karboxilát
CuAAC	réz(I)-katalizált azid-alkin 1,3-dipoláris cikloaddíció (<i>copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar azide-alkyne cycloaddition</i>)
DIBALH	diizobutil-alumínium-hidrid
DMAP	4-dimetilamino-piridin
DMF	dimetilformamid
DMF-DMA	<i>N,N</i> -dimetilformamid dimetil-acetál
D-PBS	Dulbecco foszfát pufferelt, fiziológia nátrium-klorid oldat (Dulbecco's phosphate-buffered saline)
DPPA	difenil-foszforil-azid
DSC	<i>N,N'</i> -diszukcinimidil-karbonát
EDIPA	<i>N</i> -etildiizopropilamin
GC-MS	tömegspektrometriás detektorral kapcsolt gázkromatográfia
HOMO	legmagasabb energiájú betöltött molekulapálya (<i>highest occupied molecular orbital</i>)
(HP)LC-MS	tömegspektrometriás detektorral kapcsolt (nagyhatékonyságú) folyadékkromatográfia

IEDDA	fordított elektronigényű Diels–Alder reakció (<i>inverse electron demand Diels–Alder reaction</i>)
kumarin	2 <i>H</i> -kromén-2-on
LUMO	legalacsonyabb energiájú üres molekulapálya (<i>highest occupied molecular orbital</i>)
MsCl	metánszulfonil-klorid
NBS	<i>N</i> -brómszukcinimid
NIR	közeli infravörös (fény) (near-infrared)
NTR enzim	nitroreduktáz enzim
rTCO	(<i>E</i>)-ciklooct-2-én-1-ol
PBS	foszfát pufferelt, fiziológia nátrium-klorid oldat (phosphate-buffered saline)
SPAAC	gyűrűfeszültség által kiváltott azid-alkin 1,3-dipoláris cikloaddíció (<i>strain-promoted 1,3-dipolar azide-alkyne cycloaddition</i>)
TBDMS	<i>tert</i> -butiltrimetilszilán
TBDMSCl	<i>tert</i> -butilklórdimetilszilán
TCO	<i>transz</i> -ciklooktén
TCO-OH	(<i>E</i>)-ciklooct-4-én-1-ol
TFA	trifluorecetsav
THF	tetrahidrofurán
TsCl	<i>p</i> -toluolszulfonil-klorid
Tz	2,2'-(1,2,4,5-tetrazin-3,6-diil)-difenol
UV	ultraibolya (fény) (ultraviolet)

A rákos megbetegedések kezelésének területe intenzív kutatások tárgyát képezi, és folyamatosan jelennek meg új módszerek az irodalomban^[1]. Az élő szervezetben alkalmazott gyógyszerek gyakori hátránya, hogy nem mindig a kívánt helyen fejtik ki hatásukat. Ez különösen igaz a kemoterápiás szerekre, amelyek gyakran súlyos mellékhatásokat okoznak. Ennek következtében a célzott hatóanyagleadó rendszerek kulcsszerepet kaptak a modern gyógyszerkutatásban^[2]. Ezek a rendszerek lehetővé teszik, hogy a gyógyszermolekulák térben és időben szabályozottan szabaduljanak fel, így növelve a hatékonyságot és csökkentve a mellékhatásokat. A bioortogonális kémiából ismert, tetrazinok és *transz*-ciklooktének közötti inverz elektronigényű Diels–Alder reakció egyik változatát már alkalmazzák inaktivált hatóanyagok felszabadítására^[3]. Ennek térben és időben való kontrollálására nyújtana lehetőséget aktiválható tetrazin származékok használata^[4,5]. E cél megvalósításához különösen alkalmasak a fénnel aktiválható, illetve a tumorsejtek és azok közvetlen környezetének eltérő tulajdonságait kihasználó molekulák^[6,7].

A hipotézis szerint a két módszer kombinálásával kapott inaktivált tetrazin molekula nem képes reakcióba lépni a *transz*-ciklookténen keresztül inaktivált gyógyszerhatóanyaggal (TCO-hatóanyag) mindaddig, amíg a molekulát nem éri a megfelelő külső (például fény) vagy belső (például enzim) inger. Annak hatására viszont az aktivált tetrazin a konjugátum *transz*-ciklooktén részével reagálva felszabadítja a biológiailag aktív hatóanyagot, így a gyógyszer felszabadulása szabályozható térben és időben (**1. ábra**).

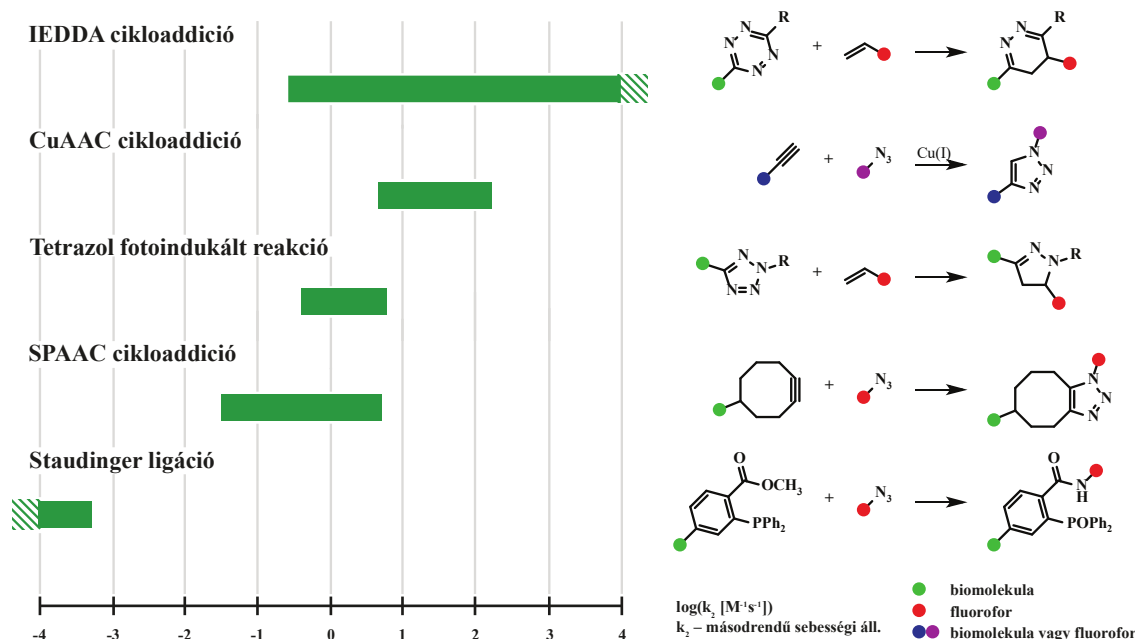


1. ábra: A célzott hatóanyagleadó rendszer működése.

A fénnel történő aktiválás kiváló módja a fotolabilis vegyületek alkalmazása^[8]. Egy másik lehetőség az, ha a molekula belső hatásokra aktiválódik, például hipoxiás környezetben^[9]. Ilyen körülmények között a nitroreduktáz enzimek túltermelődnek, amit kihasználva célzottan lehet aktiválni a molekulákat.

2.1. Bioortogonális reakciók

A biomolekulák kétlépéses, szelektív *in vivo* módosítására hatékony megoldást kínál a bioortogonális kémia^[10]. A bioortogonális reakciók magukba foglalnak minden olyan reakciót, amik egymással szelektíven reagáló, szervezetidegen, de bio kompatibilis funkciók csoportok között mennek végbe nagy hatékonysággal, fiziológiai körülmények között (2. ábra)^[11].



2. ábra: A legelterjedtebb bioortogonális reakciók összehasonlítása sebességi állandóik alapján^[12].

2.1.1. Bioortogonális reakciók fő típusai

A bioortogonális kémia jelentőségét alátámasztja, hogy 2022-ben Carolyn R. Bertozzi mellett Morten P. Meldal-nak és K. Barry Sharpless-nek ítelték oda a kémiai Nobel-díjat a klick kémia biokompatibilis kidolgozásáért^[13]. A bioortogonális kémiát Saxon és Bertozzi alapozta meg a Staudinger ligációs eljárással, amelynek hátránya az alacsony reakciósebessége^[14].

Meldal és Sharpless ennek kiküszöbölésére felfedezte a CuAAC (réz(I)-katalizált azid-alkin 1,3-dipoláris cikloaddíció) reakciót, ami a Staudinger ligációhoz hasonlóan egy terminális azid funkciós csoportot visz reakcióba^[15,16].

A CuAAC elődjének számító Huisgen 1,3-dipoláris cikloaddíció csak magas hőmérsékleten játszódik le, illetve 1,4 és 1,5-regioizomer keveréket eredményez^[17]. Ennek kiküszöbölésére, Meldal és Sharpless rájöttek, hogy Cu(I) alkalmazásával a reakció szobahőmérsékleten, közepesen nagy reakciósebességi állandóval szelektíven végbemegy, csak az 1,4-izomer keletkezik^[18]. Viszont a bakteriális és állati sejteknek a réz toxikus, így ez a reakció használhatóságát limitálja^[19].

Bertozzi és mtsai egy alternatív katalizátormentes megoldást fedeztek fel. Az alkint ciklooktinra cserélték ki, ekkor a feszült gyűrű többletenergiája miatt a reakció katalizátor mentes körülmények között lejátszódott szobahőmérsékleten^[20].

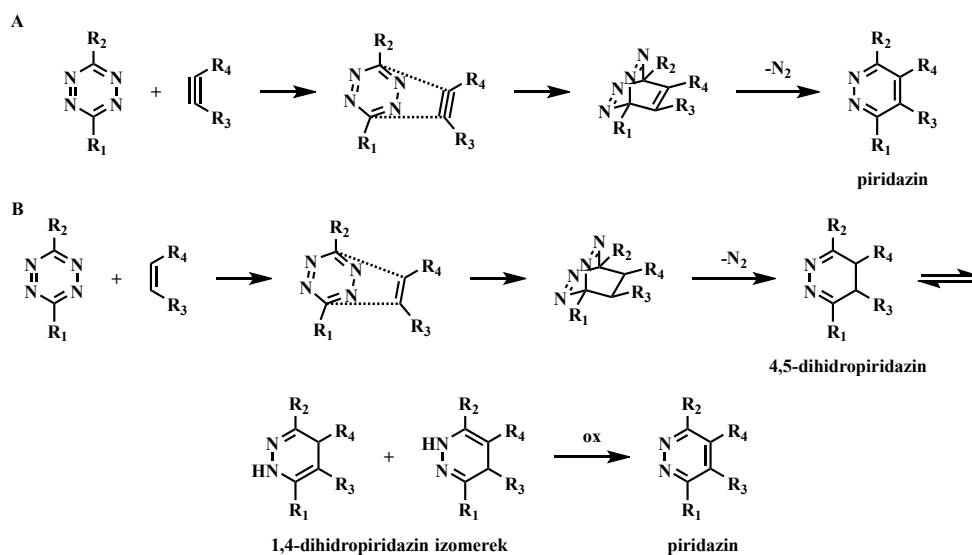
Későbbiekben Bertozzi és mtsai azt is megállapították, hogy a reakció fiziológias körülmények között is végbemegy^[21]. További fontos bioortogonális reakció az alkének és tetrazolok közötti fotoindukált cikloaddíció, ahol a reakcióban kialakuló pirazolin származék a kiindulási anyagokkal ellentétben fluoreszcens tulajdonságokkal rendelkezik, ezáltal a reakció fluorogén^[22]. Napjainkban fiziológias körülmények között a legelterjedtebb reakció a tetrazin és a feszült gyűrűs alkénok/alkinek közti IEDDA (inverz elektronigényű Diels–Alder reakció)^[23]. IEDDA cikloaddíció a dolgozatom szempontjából a legfontosabb, ezért részletesebb tárgyalom.

2.1.2. IEDDA cikloaddíció

A Diels–Alder reakciót Otto Diels és Kurt-Alder fedezte fel 1928-ban, a munkájukért 1950-ben kémiai Nobel-díjat kaptak^[24]. Diels–Alder reakció népszerűsége az egyszerűségéből és gyorsaságából adódik. A reakciósebességét elektronszívó csoporttal lehet növelni a dienofilen, vagy elektronküldő csoporttal a diénen^[25]. Ilyen csoportokkal a reakció reaktivitása megnő, mivel a HOMO és LUMO pályák között kisebb lesz az energiakülönbség^[26]. Ezzel szemben az IEDDA reakció során az elektronhiányos dién alacsony energiájú LUMO pályája lép reakcióba az elektronban gazdag dienofil magas energiájú HOMO pályájával, így a szubsztituensek hatása fordított^[27]. Egy ilyen reakció a TCO (*transz*-ciklooktén) és Tz (tetrazin) között lejátszódó

cikloaddíció. A reakció általában nagyon gyors, másodrendű reakciósebességi állandója akár a $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ értéket is elérheti^[28]. Kis számítással belátható, hogy $k_2 = 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ esetén $5 \text{ }\mu\text{M}$ dienofil és $10 \text{ }\mu\text{M}$ dién koncentráció mellett 1 másodperc alatt 95% termék keletkezik.

A tetrazinok és alkének közötti reakció legelső lépése az IEDDA [4+2] cikloaddíció, ami egy erősen feszült, áthidalt dinitrogén adduktot eredményez (**3/B. ábra**). Ez a fő sebesség meghatározó lépés. Az addukt ezután egy *retro*-Diels–Alder reakcióban N_2 kilépése mellett átalakul a megfelelő 4,5-dihidropiridazin származékká. Ezt egy tautomerizációs (1,3-prototróp átrendeződés) folyamat követi, ami 1,4-dihidropiridazin izomer keveréket hoz létre. Ezt követően az oxidációs lépés csak akkor megy végbe spontán, ha a dihidropiridazin instabil. Ha stabil, akkor oxidálószer szükséges, például nitrózus gázok, H_2O_2 vagy DDQ^[29]. A reakció orientációja és a dihidropiridazin származék konfiguráció nem játszik fontos szerepet a tetrazin ligáció legtöbb alkalmazása során, de néhány esetben esszenciális, mint például bioortogonális kötés hasítás piridazin eliminációval (*click-to-release*), amit a későbbiekben tárgyalni fogok^[30]. Ha alkint használunk dienofilként, akkor közvetlenül a végső piridazin származék keletkezik oxidáció nélkül (**3/A. ábra**)^[29].

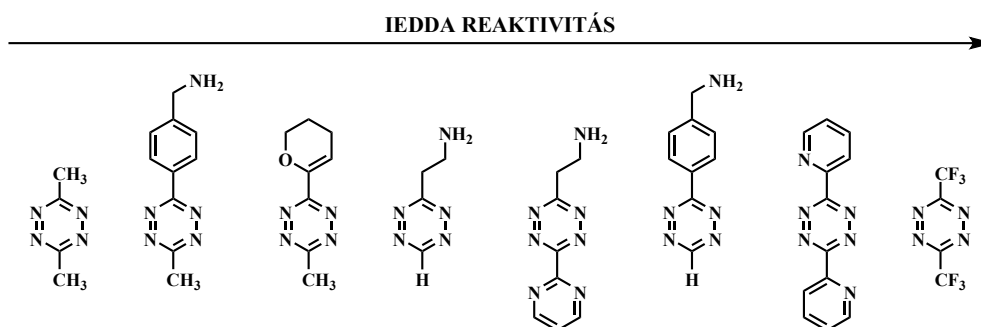


3. ábra: IEDDA cikloaddíció mechanizmusa **A)** alkin és tetrazin **B)** alkén és tetrazin esetében^[31].

2.2. Tetrazinok

Tetrazin reaktivitás az IEDDA reakcióban növekszik, ha a 3-mas és/vagy 6-os pozícióba elektronszívó csoportokat építünk be, mivel a LUMO energiája csökken (**4. ábra**)^[32].

Elektronszívó csoportok hatására, mint például karbonsav észter, trifluorometil, heteroarils csoportok, viszont nagyobb valószínűséggel fognak reagálni nukleofilekkel, például tiolokkal vagy hidrolízist követően elbomlanak. Azaz a stabilitásuk kisebb lesz fiziológiás körülmények között^[33]. A nem elektronszívó csoportokat, például alkilcsoportot tartalmazóknak a stabilitásuk nagyobb, de a reaktivitásuk kisebb^[34]. Ezek alapján belátható, hogy meg kell találni a megfelelő egyensúlyt a reaktivitás és stabilitás között.



4. ábra: Tetrazinok IEDDA reaktivitása^[35].

1,2,4,5-tetrazinok előállítására használt leggyakoribb módszer egy kétlépéses megközelítés, ami nitrileket és hidrazint (vízmentes vagy monohidrát) használ, reagensként^[36]. Általában feleslegben használják a hidrazint és gyakran használnak mellette segéd oldószert is, például etanolt vagy 1,4-dioxánt^[37]. A reakcióban keletkező dihidrotetrazint ezt követően oxidálják, hogy megkapják az aromás tetrazin gyűrűt. Az oxidációhoz leggyakrabban nitrózus gázokat használnak (nátrium-nitrit és hidrogén-klorid vagy ecetsav reakciójával állítják elő), de akár oxigén atmoszférában is lehetséges az oxidáció^[38,39].

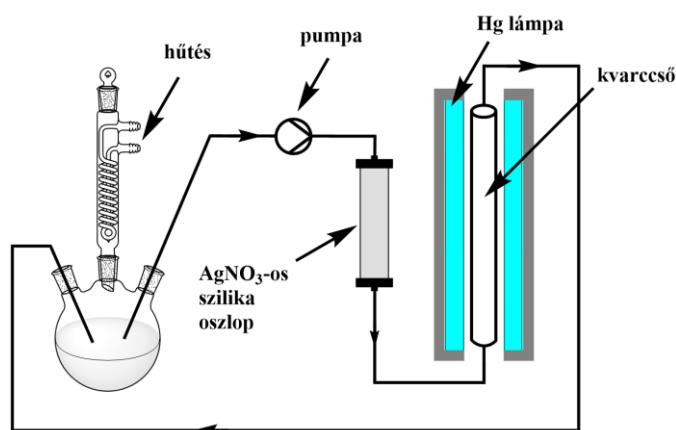
Nem-szimmetrikus tetrazinok hatékony szintézise sokkal nehezebb, az egyik nitrilt (általában a kevésbé reaktív) nagyobb feleslegben kell alkalmazni, de még így is csak alacsonyabb termelés érhető el, ezáltal a szintézis nem annyira gazdaságos^[40]. A reakció termelését katalitikus mennyiségű nikkel(II)-vagy cink(II)-trifláttal lehet megnövelni, de még így is gyakori az 50% alatti hozam^[38].

2.3. *transz*-Ciklooktének

Az IEDDA reaktivitását nemcsak a tetrazin szubsztituáltságával lehet befolyásolni. A dienofílen elektronküldő csoportok gyorsítják a cikloaddíciós lépést. A legnagyobb reaktivitás növekedést

viszont nem a szubsztituáltsággal, hanem feszült gyűrűvel lehet elérni^[41]. Sauer az 1990-es években kiterjedt kinetikai vizsgálatok alapján arra a következtetésre jutott, hogy a legnagyobb sebességi állandót feszült nyolctagú gyűrűs molekulával lehet elérni^[42]. Az elmúlt évtizedekben számos TCO származékot írtak le az irodalomban, de számos egyéb gyors dienofilt is, például norbornének, ciklopropének, ciklooktinek, de egyiknek se éri el a másodrendű sebességi állandója a legtöbb TCO másodrendű sebességi állandóját^[43].

A TCO szintéziséhez először a megfelelő CCO-t (*cisz*-ciklooktént) állítják elő, majd feloldják szerves oldószerben (Et_2O , hexán, *i*PrOH). Besugárzás alatt a reakcióelegyet folyamatosan átpumpálják egy ezüst(I)-nitráttal impregált szilikagélen. Az UV fény (254 nm) hatására a CCO egy része izomerizálódik a megfelelő TCO-é, ami megkötődik az ezüst(I)-el töltött oszlopon (komplexet képez az ezüst(I) ionnal), míg a *cisz* izomer leoldódik az oszlopról (**5. ábra**)^[44]. A fotoizomerizáció befejeztével (általában egy éjszakát vesz igénybe), az ezüst(I)-el töltött oszlopot eltávolítják, majd ammóniás metanol oldattal kioldják a szilikagélre felkötődött *transz* izomert.

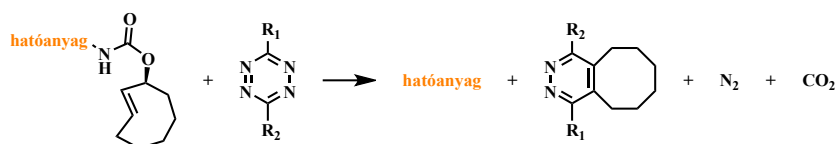


5. ábra: A folyamatos áramlású fotokémiai készülék sematikus ábrája^[44].

2.4. Bioortogonális kötés hasítás pirazin eliminációval

Az utóbbi években a bioortogonális kémia területén rengeteg kutatás folyik, elsősorban a tetrazin és TCO cikloaddíció kihasználására^[45]. A legnagyobb hangsúlyt a cikloaddíciót követő bioortogonális kötésbontás kapja. A bioortogonális kötésbontás számos alkalmazási lehetőséget rejt magában, különösen a célzott gyógyszerhatóanyag leadás vagy prodrug aktiválás területén^[46]. A cikloaddíciót követő kötésbontást Robillard és mtsai fedezték fel

először 2013-ban (**6. ábra**)^[39]. A kötéshasítással járó reakcióhoz a TCO-n allil helyzetben kell lennie egy hidroxilcsoportnak (rTCO), amihez karbamát kötésen keresztül kapcsolódik a hasítandó molekula^[39]. Későbbiekben Robillard és mtsai arra is rájöttek, hogy a kötéshasítás nem korlátozódik a karbamát kötésre, lehetséges észter, éter vagy karbonát kötés hasítása is^[47].

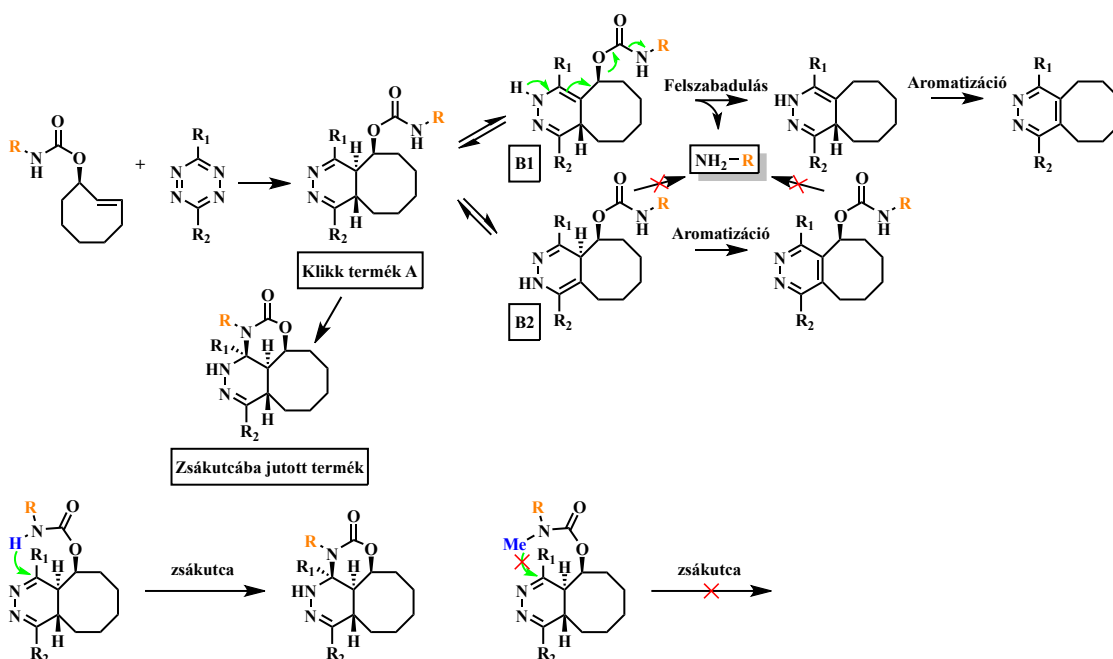


6. ábra: Hatóanyag felszabadítás sematikus ábrája^[39].

A cikloaddíciót követően eliminációval fog megtörténni a kötés hasítása. Ez egy többlépcsős folyamat, ezért mindegyik lépésnek a sebességét figyelembe kell venni a tervezéskor. Az első lépés, a klikk reakció közel kvantitatív konverzióval jár, azonban az azt követő kötéshasítás konverziója korlátozott. Mikla és mtsai ennek okát és hatékonyságának növelését fedezte fel 2018-ban^[30].

A folyamat 3 lépésre bontható (1) IEDDA cikloaddíció, (2) keletkező 4,5-dihidropirazin tautomerizációja, (3) felszabaduló 4,5-dihidropiridazin tautomer utólagos eliminációja (**7. ábra**)^[30]. 2018-ban Mikula és mtsai a reakció (2)-es és (3)-as pont mechanizmusát térképezte fel. IEDDA reakciót követően, a klikk termék (**A**), 1,4-izomerré (**B1**) vagy 2,5-izomerré (**B2**) tautomerizálódhat. A gyors kötéshasítás csak **B1** izomer keletkezése esetén tud megtörténni. Ha a **B2** izomer keletkezik, akkor az vagy tautomerizálódik **B1** izomerré és megtörténik a kötéshasítás 1,4-eliminációval vagy irreverzibilisen **B2** tovább oxidálódik.

Az oxidáció mellett egy másik út is lehetséges, amit triciklikus zsákutcának neveztek el, és ami egy intramolekuláris karbamát nitrogén támadás hatására következik be.



7. ábra: A karbamát funkcionizált rTCO és az 1,2,4,5-tetrazin közötti reakció mechanizmusa^[30].

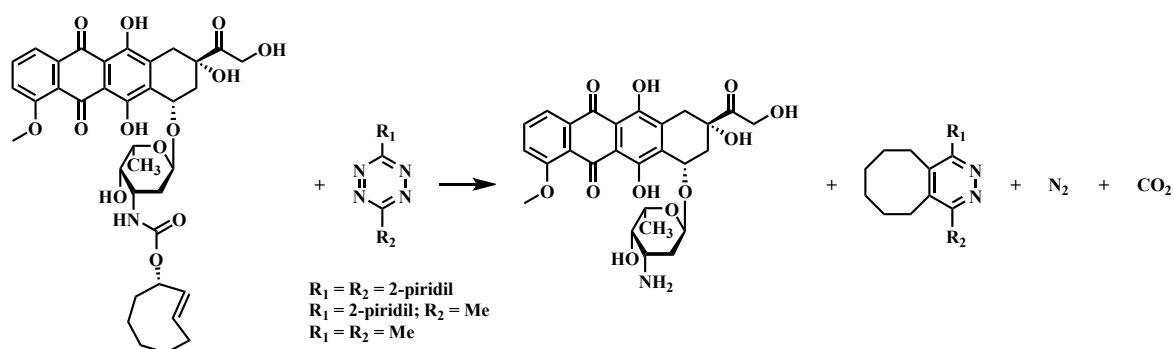
Mikula és mtsai arra a következtetésre jutottak, hogy több nemkívánatos útvonal is versenyzik a tényleges felszabadulással^[30]. A vizsgálataik azt mutatták, hogy a triciklikus zsákutca egyszerűen megszüntethető *N*-metil szubsztituált karbamát észter alkalmazásával. A környezeti paraméter vizsgálatok során pedig arra jutottak, hogy a pH-nak van a legnagyobb befolyásoló szerepe. Savas közegben a klikk reakciót követő tautomer átalakulások nagyon gyorsak. A **B2** izomer tautomerizációja némileg kedvezőbb, mint az oxidációja, így a folyamat a felszabadulás irányába eltolható. A tautomerizáció eltolásához nem kell erősen savas pH, elég, ha a tetrazin gyűrűn található R_1 és/vagy R_2 csoportok savas funkciós csoportot tartalmaznak, például karboxilcsoport.

2.5. Célzott hatóanyag felszabadítás rTCO alkalmazásával

Rákos megbetegedések gyógyítására a célzott hatóanyagleadási rendszerek egy aktívan kutatott terület^[48]. Célzott hatóanyagleadás során a hatóanyag a kívánt helyre eljutva fejt ki aktívan a hatását^[49]. A technika célja, hogy a gyógyszerek hatékonyságát növeljük az esetleges mellékhatásokat csökkentése mellett. Ehhez az adott gyógyszert valamilyen konjugátumként vagy hordozóra kötve jut be a szervezetbe, majd eljut a test egy specifikusan célzott területére.

Ezen a területen valamilyen külső behatás (pl.: fény) vagy rákos sejt specifikus enzim segítségével a hatóanyag felszabadul és hasznosul a kívánt területen^[50,51].

Célzott hatóanyagfelszabadítás megvalósítható tetrazinok és speciális, úgynevezett *click-to-release transz*-ciklooktének (rTCO) segítségével is. A cikloaddíciót követő kötésbontást először Robillard és mtsai írták le 2013-ban^[39]. Azt figyelték meg, hogy amikor rTCO-hoz karbamát kötésen keresztül valamilyen konjugátumot kapcsolnak, akkor a cikloaddíciót követően a szabad konjugátumot visszakapják. rTCO-hoz karbamát kötésen keresztül doxorubicin antibiotikumot kapcsolnak, és különböző reaktivitású tetrazinokkal vizsgálták a másodrendű sebességi állandó értékét és a doxorubicin felszabadulásának mértékét (**8. ábra**). Vizsgálták 3,6-dipiridil szubsztituált tetrazinnal, ekkor $k_2 = 57,7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ sebességi állandót mértek, de csak 7%-os felszabadulást (**1. táblázat**). Egy kevésbé reaktív 3-piridil-6-metil szubsztituált tetrazinnal tized akkora másodrendű sebességi állandót, de 55%-os doxorubicin felszabadulást. 3,6-dimetil szubsztituált tetrazin esetén $k_2 = 0,54 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, de közel 80%-os hatóanyag felszabadulást mértek. Robillard és mtsai, általánosságban megállapították, hogy a Tz reaktivitása és kötésbontás hatékonysága fordítottan arányos.



8. ábra: Doxorubicin-rTCO konjugátum reakciója különböző tetrazinokkal^[39].

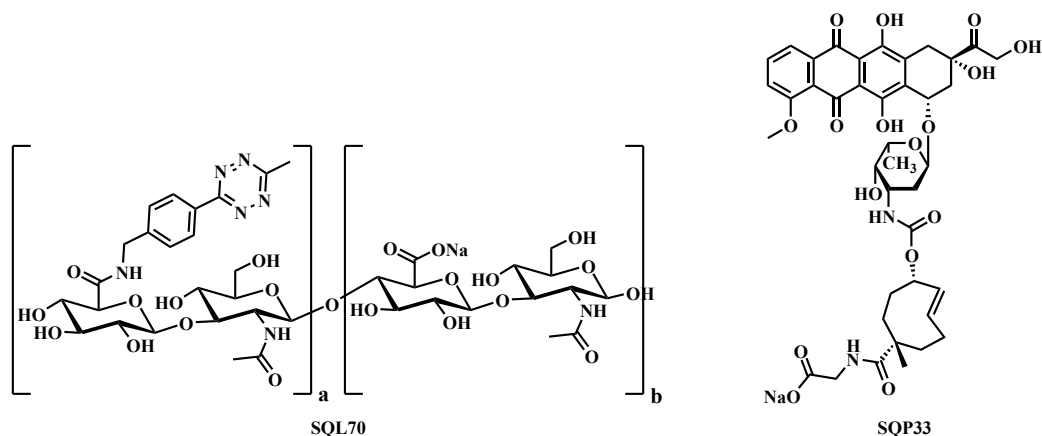
tetrazin	másodrendű sebességi állandó (axiális izomer, MeCN-ben 20 °C-on)	doxorubicin felszabadulás mértéke (axiális izomer, PBS/MeCN (3:1) 37 °C-on, 4 óra)
$R_1 = R_2 = 2$ - piridil	57,7 M ⁻¹ s ⁻¹	7%
$R_1 = 2$ -piridil $R_2 = \text{Me}$	5,94 M ⁻¹ s ⁻¹	55%
$R_1 = R_2 = \text{Me}$	0,54 M ⁻¹ s ⁻¹	79%

1. táblázat: Doxorubicin-rTCO konjugátum – tetrazin sebességi állandó és felszabadulás mértéke^[39].

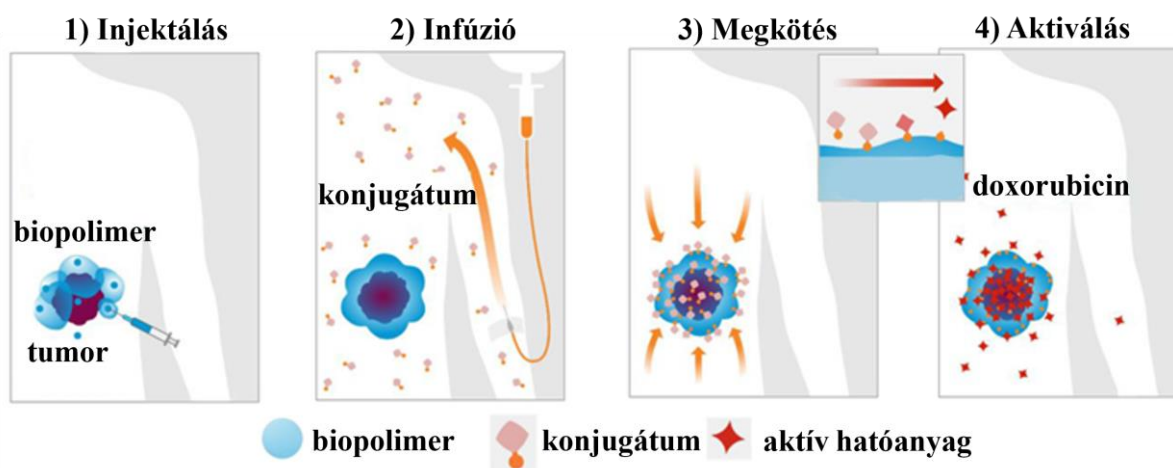
2013 óta a kémia ezen területe aktívan kutatott terület, melynek egyik legnagyobb előrelépést a Shasqi cég által fejlesztett SQ3370 gyógyszer fázis 2-be való jutása volt^[3,46,52]. A gyógyszer két teljesen különböző részből áll, a tetrazinnal módosított biopolimerből (SQL70) és a TCO-nel módosított doxorubicinből (SQP33) (**9. ábra**). Először a módosított biopolimert injektálják a tumor helyére, amit a módosított doxorubicin beadagolása követ (**10. ábra**). Ehhez egy módosított bifunkcionális TCO-t (cTCO) használnak, aminek az egyik végén a citotoxikus doxorubicin van. A molekula másik végén egy hidrofíli csoporttal van módosítva, ami a prodrug farmakokémiai tulajdonságát javítja, és ami a molekula citotoxicitásának további nagymértékű csökkenését eredményezi. Egerek esetén a hagyományos doxorubicin maximális dóziséénál 5,9-szer nagyobb SQP33 dózis esetén sem volt jelentős megfigyelhető mellékhatás, beleértve a testtömeg csökkenést is. Ez a megközelítés azért ígéretes, mivel lehetővé teszi citotoxikus gyógyszerek magas koncentrációját és helyi aktiválást a tumor helyén, ami nagyobb terápiás dózist alkalmazhatóságát jelenti jobb biztonsági profil mellett. Meg kell azonban jegyezni, hogy az injektálható hidrogél alapú aktiválás elsősorban jól lokalizálható, helyi injekcióval elérhető, de a daganat mérete vagy elhelyezkedése miatt nem operálható, például feji és nyaki rákos megbetegedések esetén alkalmazandó.

A Shasqi vállalat további ígéretes molekulák fejlesztésén is dolgozik^[2]. Az SQP22 az SQP33-hoz hasonló, de egy fontos különbséggel: ebben a vegyületben a doxorubicin helyett MMAE-t (monometil-aurisztatin E) alkalmaznak citotoxinként. MMAE egy körülbelül 700 Da tömegű peptid. Körülbelül 1000-szer mérgezőbb, mint a doxorubicin, így önmagában nem is alkalmazzák, de TCO-nel történő módosítás hatására a citotoxicitása lecsökken. Egy másik ígéretes molekula az SQT01, amely az SQL70 funkcióját látja el. Az SQT01 egy tetrazinnal

módosított antigénkötő fragmentum. Ennek az eljárásnak az az előnye, hogy infúzióval egyszerűen adagolható, és nem szükséges, hogy a daganat jól lokalizálható legyen.



9. ábra: SQ3370 molekula szerkezete^[3].



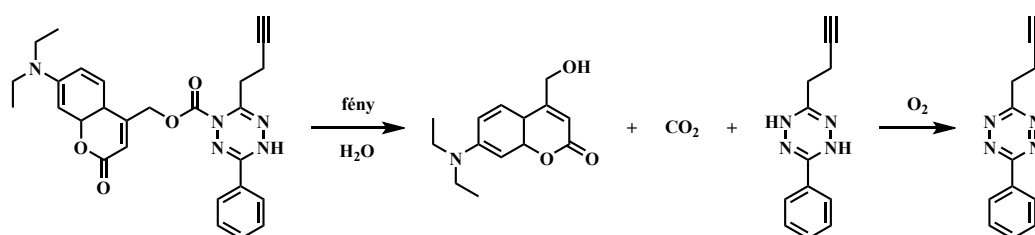
10. ábra: Shasqi vállalat által használt hatóanyag felszabadítás módszere^[3].

2.6. IEDDA kontrollálása aktiválható tetrazinokkal

A bioortogonális reakciók térben és időben történő szabályozott aktiválásának lehetősége már régóta kutatások tárgyát képezi, de különösen a közelmúltban fordult erre nagyobb figyelem^[53]. Az IEDDA reakció esetében az egyik lehetőséget a dienofilek gátlása nyújtja. Ilyenek például a Laughlin és mtsai által kifejlesztett sztérikusán gátolt ciklopropének^[54,55]. Ezekről UV fénnel való besugárzás vagy enzimatis hatásra lehasad a gátlásért felelős csoport, amely újra lehetővé teszi számukra a tetrazinnal való reakciót. Azonban UV besugárzással járó dienofil aktiválás sajnos sejtkárosodással jár, ráadásul az eddig ismert aktiválható dienofilek vagy

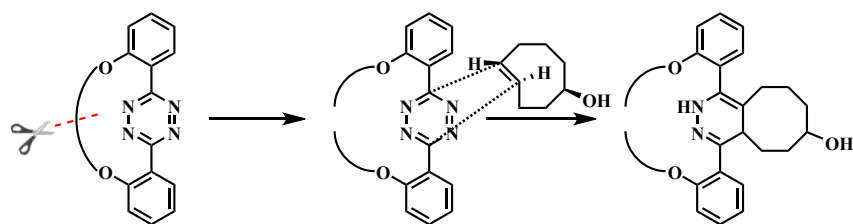
instabilak, vagy nagyon alacsony másodrendű sebességi állandóval rendelkeznek a TCO-hez képest^[54,55]. A dién oldaláról nézve, 2022-ig az egyetlen ismert megoldás fiziológias körülmények között stabil, nem reaktív dihidrotetrazinok tetrazinná történő oxidálása volt, amelyet elektródák segítségével, torma peroxidáz enzimmal vagy fotoérzékenytő (pl.: metilénkék festék) jelenléte melletti besugárzással végeztek^[53,56]. 2022-ben azonban két ennél kecssegtetőbb dién aktiválási módszert publikáltak^[4,5].

Az egyik módszer Devaraj és mtsai fejlesztették ki egy spontán oxidáló tetrazin származék felhasználásával, melyet fotolabilis védőcsoporttal láttak el^[5]. Ha a molekulát bevilágították (405 nm) vizes oldatban, akkor lehasadt a kumarin és CO₂ távozás után dihidrotetrazin keletkezett (**11. ábra**). A reakció során felszabaduló dihidrotetrazin normál légkörön is képes gyorsan és spontán oxidálódni tetrazinná, ami ezek után képes reagálni dienofilekkel. (Az irodalomból már régről ismert, hogy egyes 3-alkil-6-fenil-dihidrotetrazinok spontán oxidálódnak a levegő oxigénjének hatására^[39].)



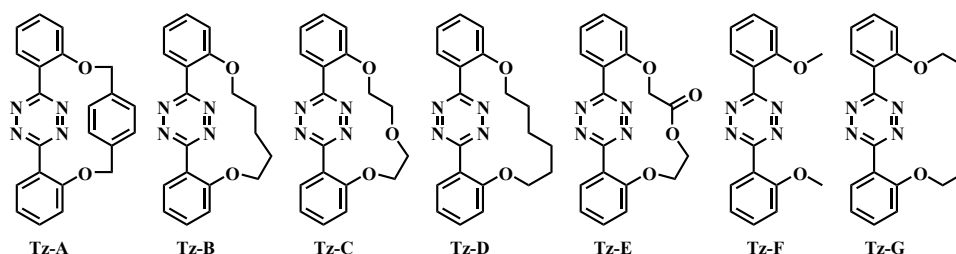
11. ábra: Devaraj és mtsai által kifejlesztett tetrazin aktiválási módszer^[5].

A másik módszert Shien és mtsai fejlesztették ki^[4]. Olyan makrociklusos tetrazinokat szintetizáltak, amelyeknek nagyon kicsi a reaktivitása az egyik legreaktívabb dienofillel, a TCO-nel szemben is (**12. ábra**). A makrociklus felnyílása esetén, a tetrazin reaktivitása visszaáll.



12. ábra: Shien és munkatársai által készített tetrazin és TCO-OH általános reakciósémája^[4].

Arra a következtetésre jutottak, hogy az **Tz-A-E** vegyületek (**12. ábra**) (50 μM) nem reagálnak a TCO-nel (100 μM) 50%-os MeCN/D-PBS (pH = 7,4) oldatban 25 °C-on, még 30 perc alatt sem. Ezzel szemben az **Tz-F-G** vegyületek 2 percen belül teljesen elreagáltak, mivel az átmeneti állapot kialakulását szterikus akadályok nem gátolják. 37 °C-on hosszan tartó HPLC-s vizsgálatokat is végeztek. Ezek a vizsgálatok azt mutatták, hogy az **Tz-A** vegyület 48 óra alatt sem lép reakcióba a dienofillel, míg az **Tz-B-E** vegyületek több mint 10%-a hasonló idő alatt elreagál. Mivel az **Tz-A-D** vegyületek esetén a makrociklus kémiai úton nem sikerült megbontani, ezért előállították az **Tz-E** molekulát, amely egy észterkötést tartalmaz. A **Tz-E** molekula szintén nem reagált TCO-nel, ha viszont az oldat NaOH-ot tartalmazott (2 mM), akkor viszont igen, mert a lúgos közegben az észterkötés elhidrolizált és a makrociklus felnyílt.

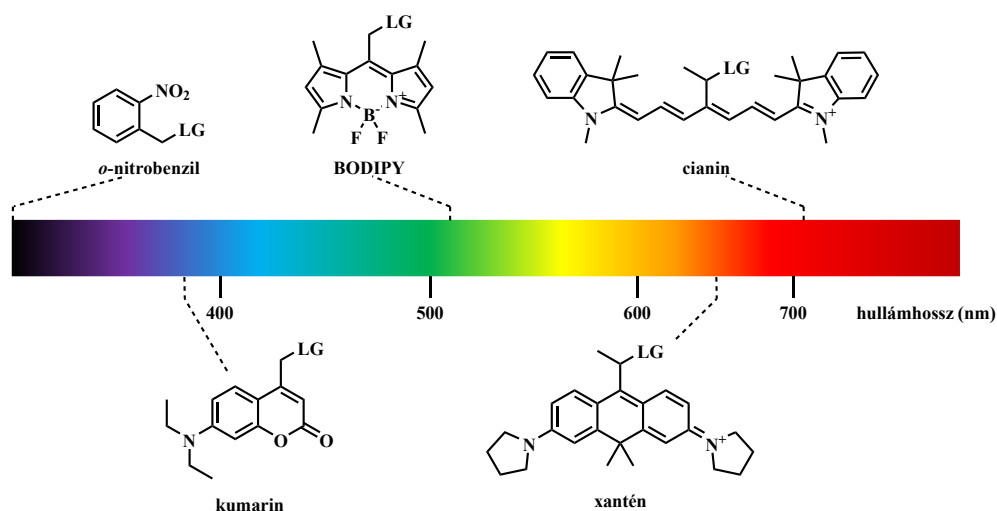


13. ábra: Shien és munkatársai által szintetizált tetrazinok^[4].

2.7. Fotolabilis vegyületek

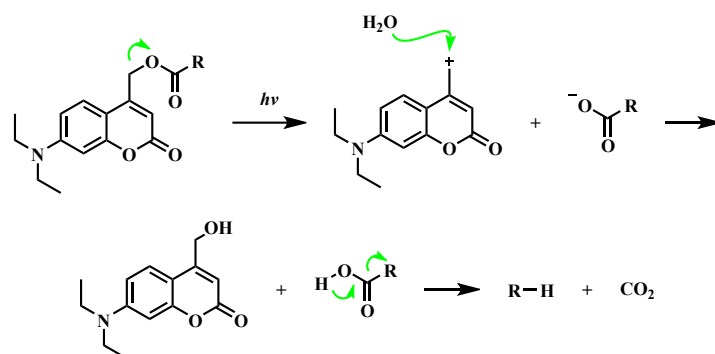
A fotolabilis vegyületek (*photocage*-ek) lehetővé teszik egy adott molekula vagy funkció csoport nem-invazív felszabadítását fény segítségével^[57]. Ilyen molekula lehet egy szintetikus prekursor vagy akár egy biológiailag aktív anyag is^[8,58–62]. Az első fotolabilis vegyületeket az 1960-as évekbe írták le, azóta számtalan biológiai célokra is használható fotolabilis vegyületet írtak le az irodalomban^[57,63–67]. Ezek a molekulák kovalens kötéssel kapcsolódnak, amelyek elhasításához nagy energia szükséges. Kezdetben ezt az energiát UV fény biztosította, ami viszont sejtkárosító hatással bír^[63,68]. Ezért számos kutatás irányult arra, hogy kisebb energiájú, látható/NIR tartományba eső fényt hasznosító fotolabilis védőcsoportokat fejlesszenek ki^[57,66,67]. A **14. ábra** tartalmazza a leggyakrabban használt fotolabilis vegyületcsaládok egy-egy képviselőjét^[6]. Az ábrán bemutatott fotolabilis vegyületek közül az *orto*-nitrobenzil származékok csak UV fénnel aktiválhatóak, aminek sejtkárosító hatása van^[63,68]. A BODIPY-k zöld fénnel (490 – 540 nm), amiknek viszont a vízben való oldhatósága nagyon rossz, így biológiai használhatóságukat limitálja^[67]. A kumarinok aktiválhatósága, a gyűrű

szubsztituenseitől függően, széles tartományba esik. Az alapváz gerjeszthetősége az UV tartományba esik, egyszerű funkcionálizálással, 7-es pozícióba elektronküldő csoporttal (pl.: dietilamino) vagy a 3-mas pozícióban az alapváz π -elektronrendszerét kiterjesztve ez akár 500 nm fölé is tolható^[6]. Az eddig felfedezett fotolabilis vegyületekcsaládok között a legnagyobb hullámhosszú fényel hasíthatónak a xanténium és a cianin típusú vegyületek bizonyultak, melyek a narancssárga – vörös tartományban is gerjeszthetőek^[57,66]. A dolgozatomból a kumarin alapú fotolabilis vegyületek a legfontosabban, ezért ezt részletesebben tárgyalom.



14. ábra: Fontosabb fotolabilis vegyületek^[6].

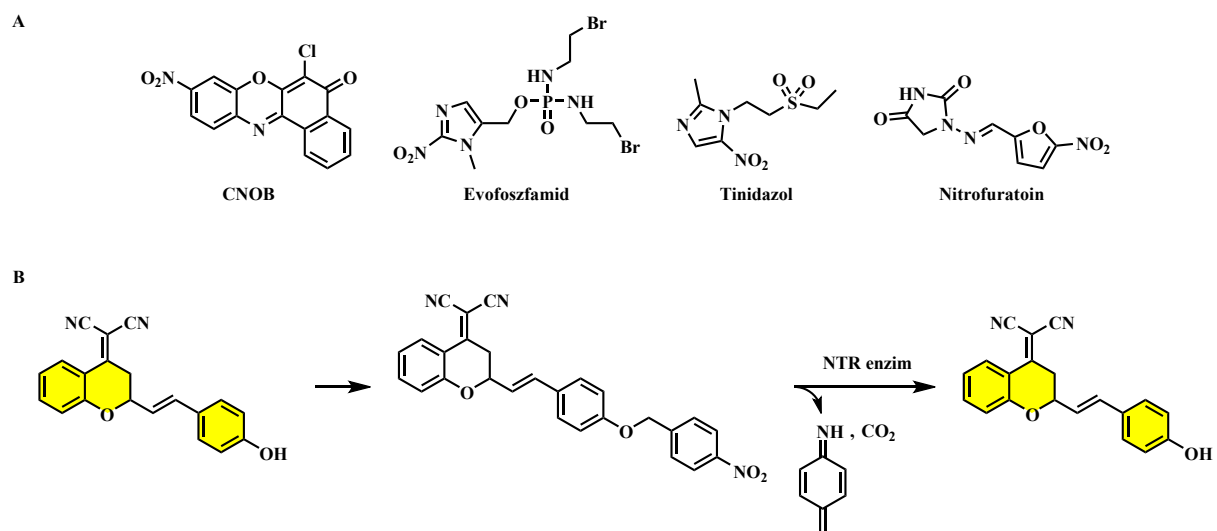
4-hidroximetil-kumarin alapú fotolabilis védőcsoportok esetén a fénybesugárzás hatására a molekula heterolitikus hasadást szenved a C-O kötés mentén, ami kontakt ionpárt eredményez (**15. ábra**)^[6]. A keletkező metilkumarin kation közvetlenül reagál az oldószerrel, például vízzel, ami a megfelelő hidroximetil-kumarin származékot eredményezi. Ha a molekula karbonát- vagy karbamátkötéssel kapcsolódik a fotolabilis vegyülethez, dekarboxileződés történik, amely egy szintetikus prekursor vagy biológiai anyag felszabadulását eredményezi. A különféle kumarin származékok közül biológiai felhasználását tekintve a 7-dietilamino-4-hidroximetilkumarin a legnépszerűbb. Az elmúlt két évtizedben számos biológiailag releváns anyagot kapcsoltak ehhez a kumarin származékhoz, beleértve a lipideket, kismolekulás enzim-inhibitorokat, peptideket, receptor antagonistákat és nukleotidokat is^[58–62]. Népszerűségét annak köszönheti, hogy szintekusan egyszerűen hozzáférhető, és a kötés kék fényel való besugárzás hatására gyorsan elhasad^[6,69]. Ezek az előnyök viszont ellensúlyozzák kicsit rossz vízoldhatóságát és a szükséges, viszonylag alacsony hullámhosszt^[6].



15. ábra: Funkcionalizált 7-dietilamino-4-hidroximetilkumarin fotokémiai hasítása^[6].

2.8. Nitroreduktáz enzim

Fotolabilis vegyületek mellett a molekula felszabadításának másik lehetősége, ha enzimeket használunk. Egy ilyen enzim a NTR (nitroreduktáz) enzim, mely csak bizonyos sejtekben, bizonyos körülmények között dúsul fel a sejtekben, így lehetővé teszi a molekulák célzott aktiválását^[7]. A célzott aktiválás azért lehetséges, mert hipoxiás állapotban az oxigénellátás- és fogyasztás közti egyensúly felborul, ennek hatására megemelkedik a redukáló enzimek szintje, beleértve a nitroreduktáz enzim szintjét is^[70]. Hipoxiás sejtekben (főleg szolid tumorok belsejében) az enzim hatására az aromás nitro csoport először nitroso csoporttá redukálódik, majd hidroxilaminná, és végül aminná. Néhány gyógyszer ezt használja ki, a kezdetben inaktív prodrug aromás nitro csoportot tartalmaz, amiből így potenciális genotoxikus anyag képződik. Az irodalomból számos hipoxia aktivált prodrug ismert **(16/A. ábra)**^[7]. Ezen felül az ilyen típusú redukciót, fluorogén bioszenzorként is lehet használni. Jun Feng Zhang és mtsai egy ismert fluorofor hidroxilcsoportjához az NTR enzim egyik szubsztrátját, *para*-nitrobenzil csoportot kapcsoltak **(16/B. ábra)**^[71]. A fluorofor csak szabad hidroxilcsoport esetén fluoreszcens, így sikeresen minimalizálták az emisszióját. Hipoxiás körülmények között az NTR enzim felismeri, és redukálja az nitro csoportot aminná. A keletkező amin nem stabil, és spontán aza-*para*-kinonmetid formájában lehasad, és a szabad hidroxilcsoport miatt a molekula fluoreszcens tulajdonsága újra megjelenik.



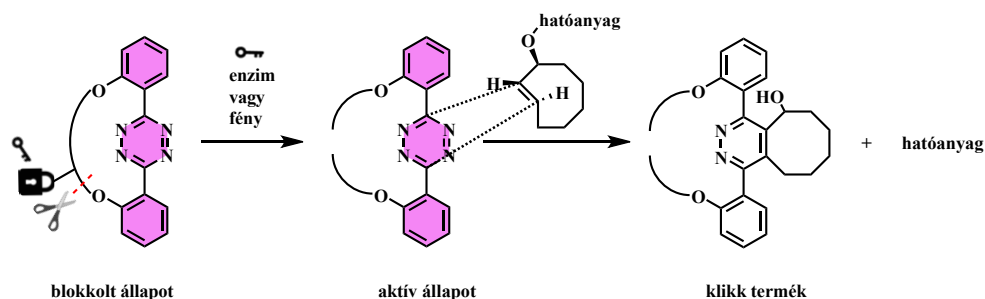
16. ábra: A) Hipoxia aktivált prodrugok^[7], **B)** NTR enzim aktiválta fluorogén jelzővegyület előállítása és működése^[71].

FEJEZET III

Célkitűzés

Kutatásom során célom az volt, hogy olyan tetrazin alapú makrociklusokat állítsak elő, melyek eredetileg nem lépnek reakcióba *transz*-ciklookténnel azonban belső (nitroreduktáz enzim jelenléte) vagy külső (fénnel való besugárzás) hatásra a makrociklus felnyílik, a tetrazin reaktívvá válik és ezt követően már képes reakcióba lépni a TCO-nel (**17. ábra**). Ehhez a rákos sejtek által hipoxiás körülmények között termelt nitroreduktáz (NTR) enzimet terveztem felhasználni, amely képes az aromás nitrovegyületeket redukálni. Így a makrociklust megfelelően funkcionalizálva az aromás nitrocsoport redukciója után elektronvándorlás következik be, ami a makrociklus felnyílását eredményezné. Hasonlóképpen, ha a makrociklust fotolabilis védőcsoporttal látjuk el, külső fényhatásra a fotolabilis molekula levál, és az elektronvándorlás révén a makrociklus felnyílik, majd reakcióba lép a TCO-nel.

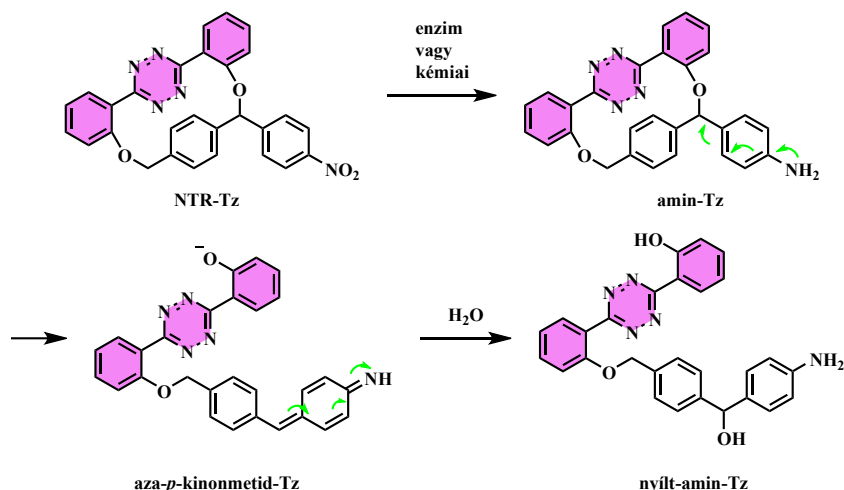
Ezen kívül IEDDA reakció vizsgálatához egy allil pozícióban módosított úgynevezett *click-to-release* TCO (rTCO) modellvegyület szintézise is a céljaim között szerepelt, amelyhez karbamát kötésen keresztül egy fluoreszcensen kioltott festékmolekulát tartalmaz. Amíg a makrociklus zárt állapotban van, az rTCO-festék intakt marad, de amikor a makrociklus felnyílik, és a klikk reakció során termék keletkezik, a festék felszabadul és fluoreszcenssé válik. A fluorogén jelzővegyületet a későbbiekben biológiailag aktív molekulára cserélve ez a módszer gyógyszerhatóanyagok felszabadítására is alkalmazható.



17. ábra: A feltételesen aktiválható tetrazin alapú makrociklus rendszer működése.

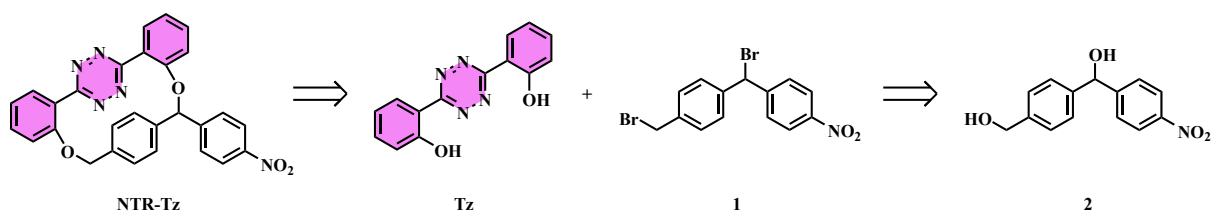
4.1. Nitroreduktáz enzim által aktivált makrociklusos tetrazin szintézise

Kutatómunkám során elsőként az **18. ábrán** látható **NTR-Tz** molekulát terveztem előállítani, amely egy nitrobenzil egységet, az egyik legegyszerűbb, nitroreduktáz (NTR) enzim által felismert funkciós csoportot tartalmaz. A feltételezett aktiválás során a makrocikluson található nitro csoport aminná redukálódik, enzimatikusan vagy kémiai úton (például katalitikus hidrogénezéssel), a makrociklus felnyílik, és egy úgynevezett aza-*para*-kinonmetid struktúra jön létre^[72]. Ez a kinonmetid nagyon reaktív nukleofilekkel, például vízzel szemben. A vízzel történő reakció hatására egy stabil, *para*-aminobenzil-alkohol tartalmú tetrazin származék keletkezik, ami reagálni tud TCO-nel.



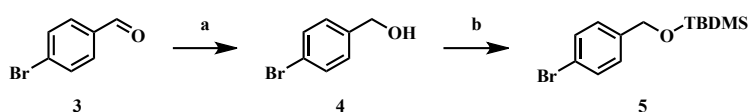
18. ábra: Nitroreduktáz enzim redukcióján alapú makrociklus felnyílása.

A szintézist az **19. ábra** alapján terveztem. Először a linkert (**2**) szintetizálom, majd a hidroxilcsoportokat brómra (**1**) cserélem szubsztitúciós reakcióval. Ezt követően a kapott vegyületet tetrazinnal (Tz) reagáltatom, így kialakítva a makrociklust (**NTR-Tz**).



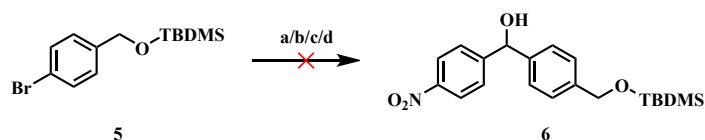
19. ábra: Az NTR-Tz makrociklus tetrazin szintézis terve.

A linker **(2)** szintéziséhez először a TBDMS védett 4-brómbenzil-alkoholt **(5)** állítottam elő jó hatékonysággal **(20. ábra)**. Ehhez az első lépés egy aldehid redukció **(3)** volt NaBH₄-el, majd a kialakított hidroxilcsoportot **(4)** TBDMSCl-dal védtem.



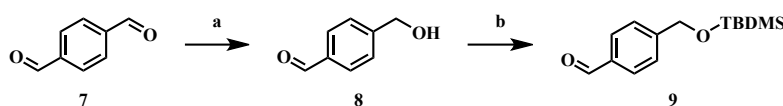
20. ábra: TBDMS védett 4-brómbenzil-alkohol szintézise **(5)**; Reagensek és körülmények: **a)** NaBH₄, THF, H₂O, 0,5 h, 24 °C, 97%; **b)** TBDMSCl, ImH, absz DMF, 3 h, 24 °C, Ar, 93%.

A következő lépés a TBDMS védett linker **(6)** szintézise volt, amelyhez lítiálást vagy Grignard reakciót alkalmaztam **(21. ábra)**. Többféle kipróbált körülmény ellenére egyik sem hozott sikert. Kezdetben a TBDMS-védett 4-brómbenzil-alkoholt **(5)** n-BuLi-mal reagáltattam, ahol GC-MS vizsgálat alapján a halogén-lítium csere megtörtént. A keletkezett lítiumorganikus vegyület viszont nem lépett reakcióba az aldehiddel, még 70 °C-on sem. Ezután Grignard-reakcióval próbálkoztam, de Et₂O-ben enyhe melegítéssel nem keletkezett a megfelelő Grignard-reagens GC-MS alapján. Grignard-reagens azonban THF-ban intenzív melegítés hatására viszont igen, amit GC-MS-el bizonyítottam. Az így keletkezett reagens azonban reflux hőmérsékleten sem reagált a 4-nitrobenzalhiddel. A védett 4-brómbenzil-alkoholból **(5)** cinkorganikus vegyületet is szintetizáltam, de ez sem lépett reakcióba az aldehiddel, intenzív melegítés hatására sem.



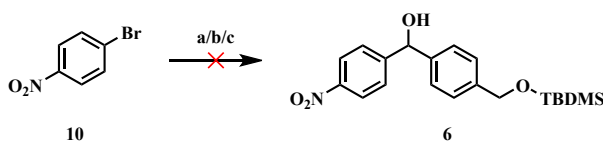
21. ábra Próbálkozások a linker szintézisére I; Reagensek és körülmények: **a)** 1) n-BuLi, absz THF, -78 °C, 0,25 h, Ar, 2) 4-nitrobenzaldehyd, absz THF, -78 °C → 70 °C, 1-1 h, Ar; **b)** Mg, I₂, absz Et₂O, 24 °C, 0,5 h, Ar, 2) 4-nitrobenzaldehyd, absz Et₂O, 24 °C, 1 h, Ar; **c)** Mg, I₂, absz THF, 70 °C, 0,5 h, Ar, 2) 4-nitrobenzaldehyd, absz THF, -78 °C → 70 °C, 1-1 h, Ar; **d)** Zn, I₂, absz DMF, 100 °C, 16 h, Ar, 2) 4-nitrobenzaldehyd, absz DMF, -24 °C → 100 °C, 4 h, Ar.

A sikertelen kísérletek után új megközelítést választottam a védett linker **(6)** előállításához, melyben nukleofilként a nitrovegyületet **(10)** terveztem alkalmazni. A reakcióhoz először az elektrofil aldehidet **(9)** kellett szintetizálnom (**22. ábra**). Az első lépés a tereftalaldehid **(7)** mono-redukciója volt NaBH_4 -el $0\text{ }^\circ\text{C}$ -on, majd a keletkező alkoholt **(8)** ez esetben is TBDMSCl-dal **(10)** védtem^[73].



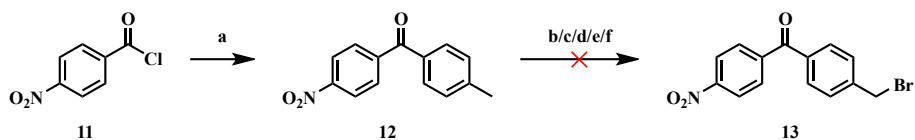
22. ábra: Az aldehid **(9)** köztitermék előállítása; Reagensek és körülmények: **a)** NaBH_4 , THF, EtOH, 3 h, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 69%; **b)** TBDMSCl, imidizol, absz DMF, 3 h, $24\text{ }^\circ\text{C}$, Ar, 95%.

Bár többféle módszerrel is próbálkoztam, a kívánt linkert **(6)** ezen az úton sem sikerült szintetizálnom (**23. ábra**). A 4-bróm-nitrobenzol **(10)** $-78\text{ }^\circ\text{C}$ -on $n\text{-BuLi}$ hatására elbomlott, még akkor is, ha csak 0,7 ekvivalens $n\text{-BuLi}$ -ot használtam. A Grignard reakcióval sem tudtam előállítani a kívánt molekulát **(6)**, mivel a Grignard reagens reflux hőmérsékletű THF-ban sem keletkezett.



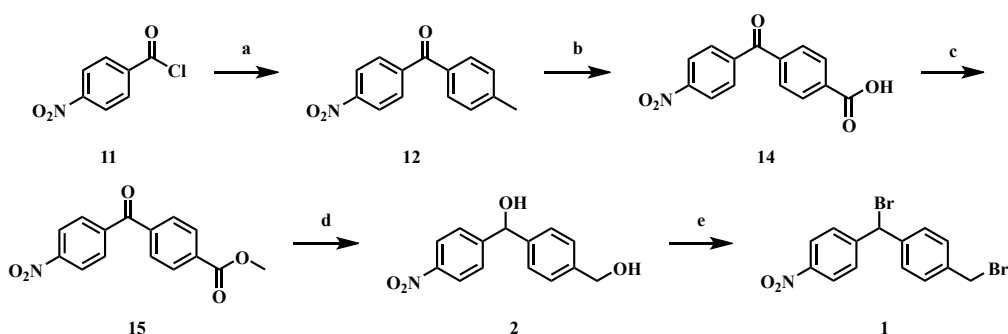
23. ábra: Próbálkozások a linker szintézisére II; Reagensek és körülmények: **a)** 1) $n\text{-BuLi}$, absz THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 0,25 h, Ar, 2) TBDMS védett 4-(hidroximetil)-benzaldehyd **(9)**, absz THF, $-78\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 70\text{ }^\circ\text{C}$, 1-1 h, Ar; **b)** 1) $n\text{-BuLi}$, absz THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 0,25 h, Ar, 2) TBDMS védett 4-(hidroximetil)-benzaldehyd **(9)**, absz THF, $-78\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 70\text{ }^\circ\text{C}$, 1-1 h, Ar; **c)** Mg, I_2 , absz THF, $70\text{ }^\circ\text{C}$, 0,5 h, Ar, 2) TBDMS védett 4-(hidroximetil)-benzaldehyd **(9)**, absz THF, $-78\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 70\text{ }^\circ\text{C}$, 1-1 h, Ar.

Ezután egy újabb megközelítést választottam a kívánt linker **(2)** szintéziséhez. Friedel-Crafts reakcióval terveztem előállítani a **13**-mas benzofenon származékot (**24. ábra**). A reakció első lépése egy Friedel-Crafts acilezés volt toluolban, mely egyben reaktáns és oldószer is volt. A reakció során főleg a para izomer **(12)** keletkezett, ami a célmolekulám szempontjából előnyös volt. Ezt követően a keletkező benzofenon **(12)** származékot benzil pozícióban gyökösen akartam bromozni **(13)**, de többszöri kísérlet ellenére sem sikerült. Próbálkoztam NBS-del és Br_2 -mal mint bróforrás, valamint többféle gyök iniciátorral (AIBN, $(\text{BzO})_2$, illetve UV-C sugárzás), továbbá kétféle oldószerrel (PhCl és CCl_4) is.



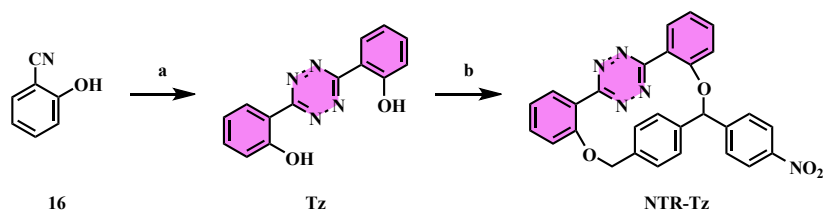
24. ábra: Próbálkozások a linker szintézisére II; Reagensek és körülmények: **a)** PhMe, AlCl₃, 24 °C, 2 h, 76%; **b)** NBS, (BzO)₂, CCl₄, 60 °C, 6 h; **c)** NBS, AIBN, CCl₄, 60 °C, 6 h; **d)** NBS, UV-C, CCl₄, 24 °C, 1 h; **e)** NBS, AIBN, PhCl, 60 °C, 6 h; **f)** Br₂, AIBN, PhCl, 60 °C, 6 h.

Végül a linker (**2**) sikeres szintéziséhez vezető út első lépése megegyezett az előző szintézissor első lépésével, de itt a Friedel-Crafts reakciót (**12**) egy Jones-oxidáció követte, majd a keletkező karbonsavból (**14**) metil-észtert (**15**) állítottam elő (**25. ábra**). Az így nyert benzofenont (**16**) DIBALH-del redukáltam (**2**), majd a hidroxilcsoportokat brómra (**1**) cseréltem cc HBr és cc H₂SO₄ jelenlétében. Többféle enyhébb reakciókörülményt is kipróbáltam (Appel-reakció, PBr₃, AcBr, MsCl, TsCl). A kipróbált reakciók közül csak a primer hidroxilcsoporton történt szubsztitúció vezetett sikerre. (A szekunder hidroxilcsoport sztérikus okok miatt nem volt elég reaktív.)



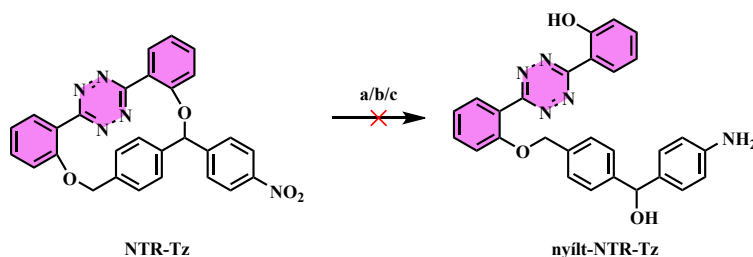
25. ábra: A linker (**1**) sikeres szintézise; Reagensek és körülmények: **a)** PhMe, AlCl₃, 24 °C, 2 h, 76%; **b)** Jones reagens, AcOH, Δ, 16 h, 85%; **c)** MeOH, cc H₂SO₄, Δ, 16 h, 98%; **d)** DIBALH, absz THF, -78 °C → 24 °C, 16 h, Ar, 88%; **e)** cc HBr, cc H₂SO₄, 24 °C, 16 h, 79%.

A makrociklus szintéziséhez szükséges tetrazint (**Tz**) először az irodalomban leírt módszerrel próbáltam előállítani, de nem jártam sikerrel (**26. ábra**)^[74]. Többszöri próbálkozás után, optimált reakciókörülmények mellett és más oxidációs módszerrel végül sikerült megfelelő termeléssel megkapnom a kívánt tetrazint (**Tz**), amit K₂CO₃ bázis és KI só jelenlétében kapcsoltam a brómozott linkerrel (**1**). A makrociklus szintézise során azonban alacsony hozamot értem el, számos melléktermék keletkezett, amelyek elválasztása sok nehézségeket okozott.



26. ábra: Nitroreduktáz alapú makrociklus szintézise; Reagensek és körülmények: **a)** 1) $\text{N}_2\text{H}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, EtOH, 80 °C, 6 h, 2) O_2 , 24 °C, 2 h, 43%; **b)** **1**, K_2CO_3 , KI, absz DMF, 50 °C, 2 h, Ar, 6%.

A kezdeti hipotézis teszteléséhez TCO-t adtam a makrociklushoz kétszeres feleslegben, és LC-MS vizsgálattal megállapítottam, hogy a makrociklus nem reagál a *transz*-ciklookténnel. A hipotézis további vizsgálatához (a makrociklus felnyitásához és a tetrazin reaktivitásának visszaállításához) szelektíven megpróbáltam redukálni a nitrocsoportot (**27. ábra**). Először katalitikus hidrogénezéssel redukáltam a nitrocsoportot, Et_3N -nal mérgezett Pd/C katalizátor jelenlétében. LC-MS alapján a nitrocsoport redukálódott és a makrociklus felnyílt, de a tetrazin gyűrű is redukálódott, ami nem reagál TCO-nel. Próbáltam SnCl_2 -dal és ZnCl_2 -dal is redukálni, de mindkét esetben hasonló eredményt kaptam, a tetrazin gyűrű is redukálódott. 2024. október 5-én az irodalomban megjelent egy ígéretes, fiziológiai körülmények között működő, aromás nitrocsoport redukcióján alapuló aktiválási módszer ^[75]. Ling és mtsai élő szervezetben tudtak aktiválni különböző prodrugokat, $\text{B}_2(\text{OH})_4$ és 4,4'-bipiridin segítségével, PBS/DMSO híg elegyében. Az ilyen típusú **NTR-Tz** aktiválás kipróbálása még folyamatban van.

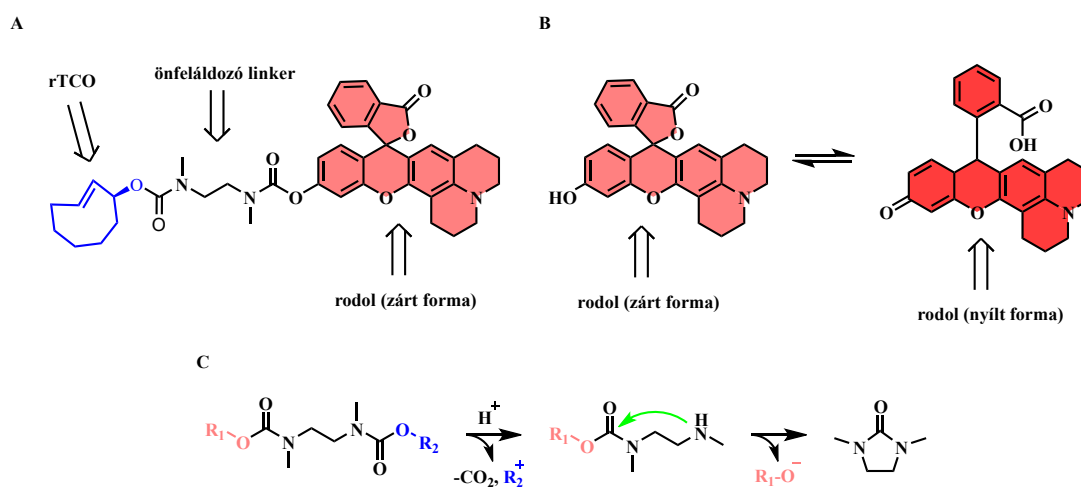


27. ábra: Nitroreduktáz alapú makrociklus redukciója; Reagensek és körülmények: **a)** 1) H_2 , Et_3N , Pd/C, EtOH, 24 °C, 5 perc; **b)** SnCl_2 , EtOH, 24 °C, 5 perc; **c)** ZnCl_2 , AcOH, 24 °C, 5 perc.

4.2. rTCO-rodol szintézise

Bár kémiai úton nem sikerült elérni a nitrocsoport szelektív redukcióját, hogy a makrociklus felnyíljon anélkül, hogy a tetrazin gyűrű is redukálódna, a kísérleteket folytattuk az enzimatis körülmények vizsgálatával. Ehhez egy új *transz*-ciklooktén reakciópartner tervezésére és szintézisére volt szükség. Az új molekula három fő részből áll: rTCO, a rodol festék zárt formája

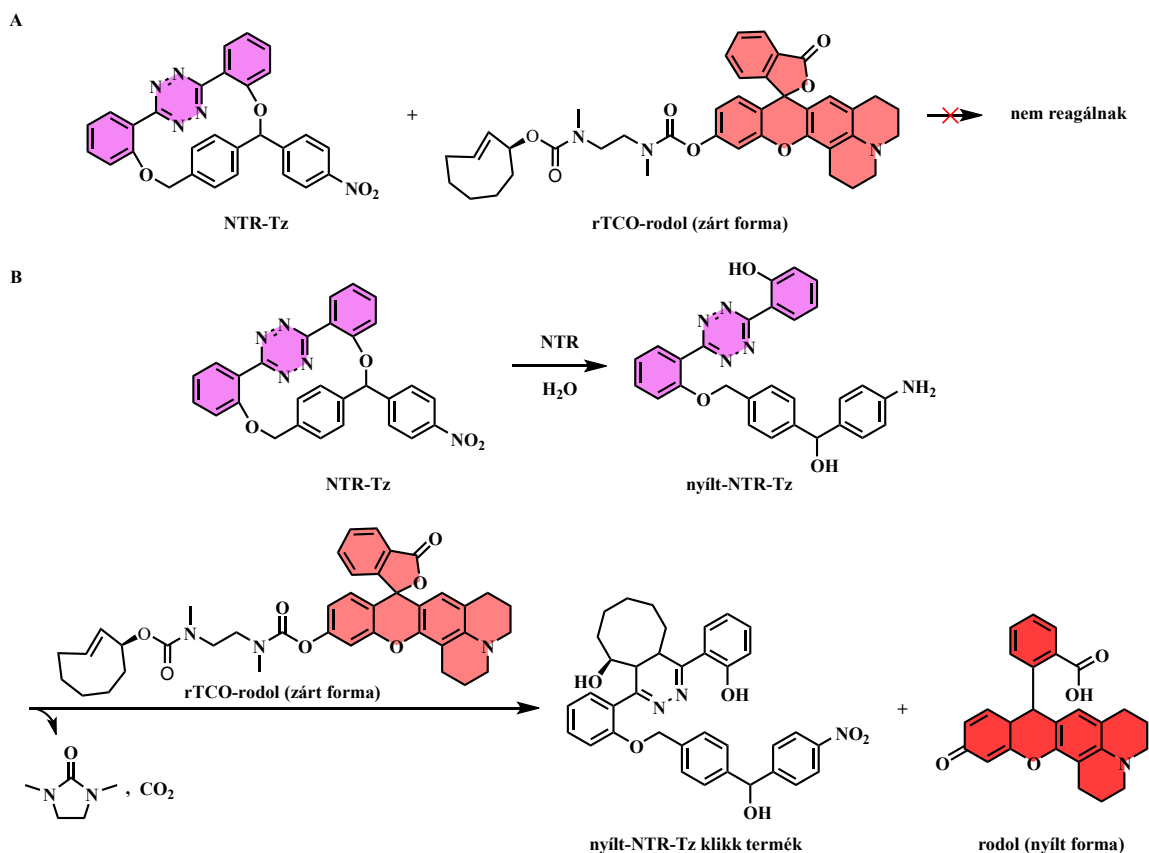
és a kettőt összekötő önfeláldozó linker (**28. ábra**). Amikor a tervezett **rTCO-rodol** molekula tetrazinnal reagál, az rTCO molekularész leválik, majd beindul az önfeláldozás folyamata (**25/C. ábra**), és felszabadul a rodol molekula nyílt, fluoreszcens formája^[8,30,76]. A rodol attól függően, hogy milyen közegben van, vagy zárt spirolakton (nem fluoreszcens), vagy nyílt festék formában jelenik meg^[76]. A rodol festékeknél nagy előny, hogy képesek vagyunk modulálni a nyílt és zárt formák közötti egyensúlyt. Apoláris közegben, például 1,4-dioxánban a zárt spirolakton forma dominál, míg poláris vizes közegben a nyílt festék forma^[76]. Mivel az **rTCO-rodol**-t biológiai rendszerekben szeretném használni, a nyílt festék forma lesz domináns. Ha a **rodol** váz szabad hidroxilcsoportját keresztül funkcionalizáljuk akkor a molekula zárt formába lesz jelen^[8]. Az önfeláldozó linker beépítése azért volt szükséges, mert a **rodol** funkcionálálása a hidroxilcsoporton keresztül erőteljes körülményeket igényel, amelyek során az **rTCO** elbomlana. Fluorogén tulajdonságán túl azért ezt a **rodol** származékot választottam, mert kutatócsoportunkban bevált, és egyszerű, magas hozamú szintézissel előállítható^[8]. Továbbá azért ezt az önfeláldozó linkert, mert ez az egyik legegyszerűbb az irodalomban fellelhetőek közül, illetve az önfeláldozása gyors^[77].



28. ábra: A) A tervezett rTCO-rodol, B) a rodol spirolakton és festék formája közötti egyensúly és C) az önfeláldozó linker bomlása.

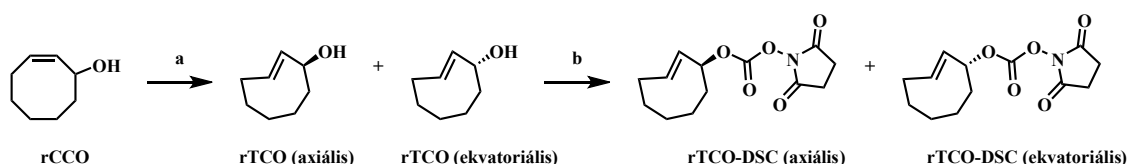
Az **rTCO-rodol** molekula azért is alkalmas a makrociklus felnyílásának bizonyítására, mert amíg a makrociklus nem nyílik fel, addig az **rTCO-rodol** intakt marad, hiszen az **rTCO** molekularészlet nem tud reagálni a tetrazinnal (**29/A. ábra**). A nitrocsoport redukcióját követően a makrociklus felnyílik, így reagálni tud az **rTCO-rodol** molekulával, és önfeláldozó linkerrel együtt leválik a rodol molekula (**29/B. ábra**). Ezt követően az önfeláldozási folyamat elindul, egy intramolekuláris NH támadás hatására egy gyűrűs karbamid és **rodol** váz

keletkezik. A biológiai közegnek köszönhetően, a rodol nyílt formában lesz jelen, ami fluoreszcencia intenzitásának növekedését eredményezt (körülbelül 1000-szerest)^[8].



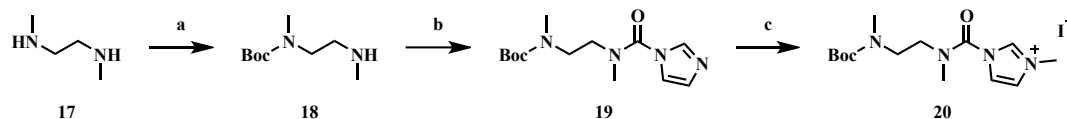
29. ábra: A makrociklus és az rTCO-rodol reakciója.

A kutatócsoportban rendelkezésre álló **rCCO**-ból a szükséges **rTCO**-t fotoizomerizációval állítottam elő az irodalom alapján (**30. ábra**)^[39]. A keletkező két izomer, axiális és ekvatoriális izomert oszlopkromatográfiával elválasztottam, majd DSC-tal külön-külön aktiváltam a két **rTCO** izomert, így kialakítva az **rTCO-DSC** származékokat^[78].



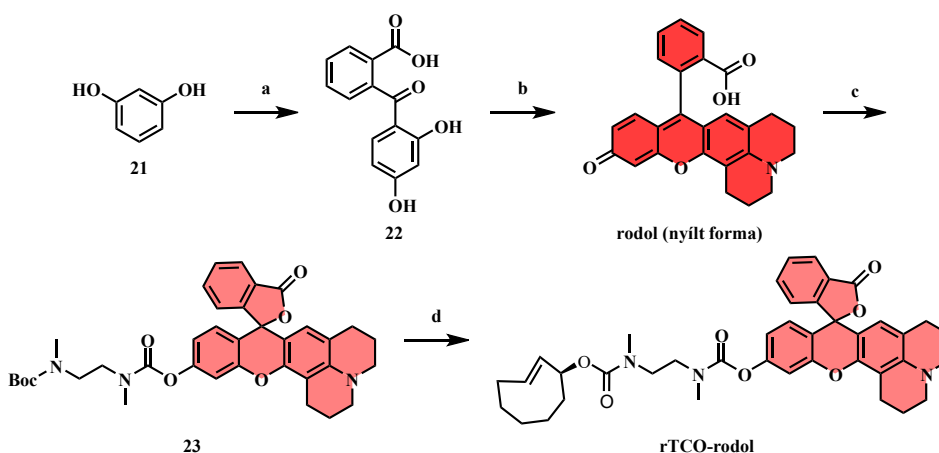
30. ábra: DSC-aktivált rTCO szintézise; Reagensek és körülmények: **a)** PhCOOMe, UV-C, hexán, Et₂O, 16 h, 23% (axiális), 28% (ekvatoriális); **b)** DSC, CH₂Cl₂, 16 h, 24 °C, 64% (axiális), 68% (ekvatoriális).

Az aktivált önfeláldozó linkert (**20**) az irodalom alapján szintetizáltam (**31. ábra**)^[8]. A diamin származékot (**17**) Boc₂O-tal védtem (**18**). A keletkező mono védett származékot CDI-lal (**19**) aktiváltam, majd a karbamidból (**19**) MeI-dal imidazólium sót (**20**) alakítottam ki.



31. ábra: Az aktivált önfeláldozó linker (**20**) szintézise; Reagensek és körülmények: **a)** Boc₂O, CH₂Cl₂, 24 °C, 16 h, 58%; **b)** CDI, THF, Δ, 16 h, 94%; **c)** MeI, MeCN, 24 °C, 16 h, 82%.

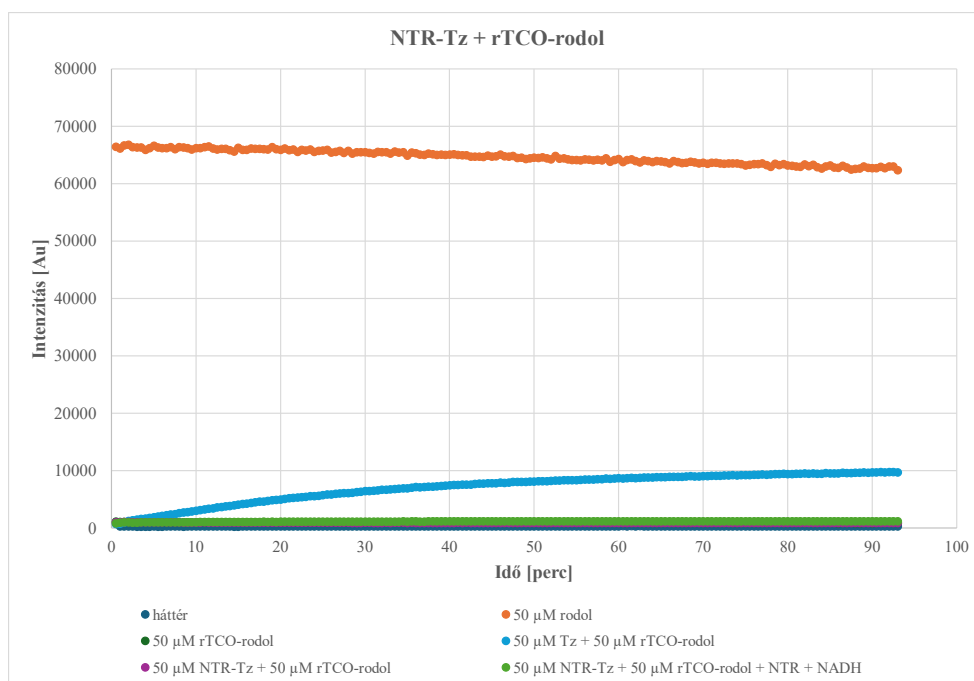
A Boc védett rodol származék (**23**) szintézisét is az irodalom alapján végeztem (**32. ábra**)^[8]. A rodol váz kialakításához rezorcin (**21**) volt a kiindulási anyag, amelyet ftálsav-anhidrid és AlCl₃ jelenlétében alakítottam benzofenon származékká (**22**). Ezt TFA oldószerben 8-hidroxi-julolidinnel reagáltatva alakítottam ki a **rodol** vázat. Ezt ezután a korábban szintetizált imidazólium sóval (**20**) reagáltattam, kialakítva a Boc védett rodol-linkor származékot (**23**). A Boc védőcsoportot TFA/CH₂Cl₂ oldószerkeverékben távolítottam el, majd a képződő TFA-sót az axiális **rTCO-DSC**-tal reagáltattam EDIPA bázis jelenlétében.



32. ábra: rTCO-rodol szintézise; Reagensek és körülmények: **a)** ftálsav-anhidrid, AlCl₃, PhNO₂, 24 °C, 16 h, 80%; **b)** 8-hidroxi-julolidin, TFA, 95 °C, 16 h, 90%; **c)** aktivált önfeláldozó linker (**21**), EDIPA, DMAP, Δ, 0,25 h, 81%; **d)** 1) TFA, CH₂Cl₂, 24 °C, 1 h, 2) rTCO-DSC (axiális), EDIPA, absz MeCN, 24 °C, 0,25 h, 72% (2 lépésre).

Az előállított **NTR-Tz** makrociklusos tetrazin és **rTCO-rodol** konjugátum nitroreduktáz enzim jelenlétében való reakcióját a kutatócsoport egyik biológus tagja, Dr. Németh Krisztina vizsgálta. Ennek során a rodol felszabadulásának követéséhez a fluoreszcencia intenzitásának változását plate readerrel követtük nyomon 545 nm-es gerjesztő fényvel vizsgálva az emissziót 575 nm-en, minden esetben 50 μM-os koncentrációjú mintákat vizsgálva 5% DMSO-t

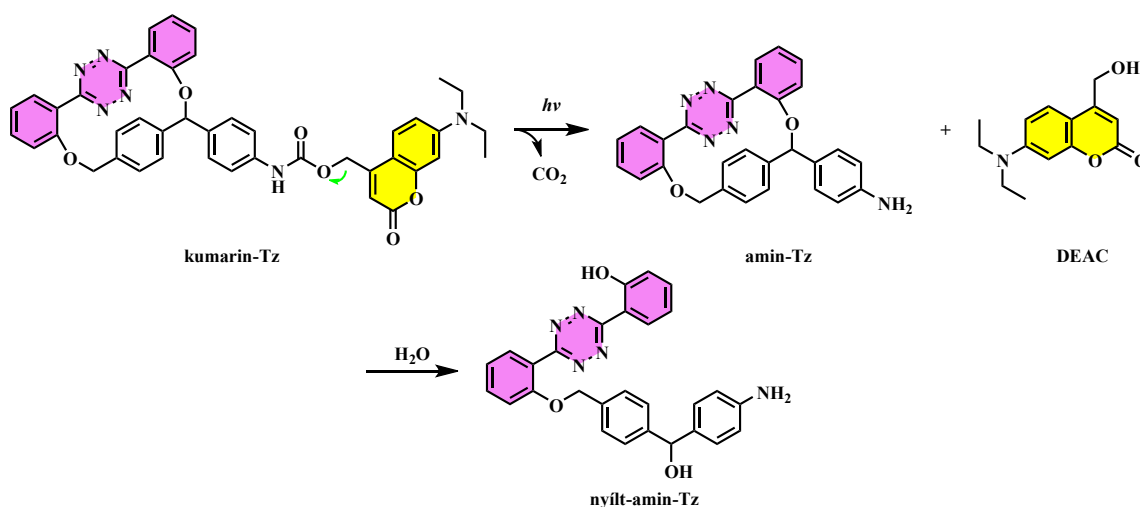
tartalmazó PBS (pH = 7,4) oldatban (**33. ábra**). Referenciaként a háttér, a szabad **rodol** és az **rTCO-rodol** konjugátum fluoreszcenciáját használtuk. Háttér és **rTCO-rodol** esetén nem tapasztaltuk a kezdeti (nagyon alacsony) intenzitás változását, **rodol** esetén pedig a korábbi tapasztalatoknak megfelelő lassú csökkenést figyeltük meg^[8]. A szabad tetrazin (**Tz**) és **rTCO-rodol** közti reakció esetében a **Tz** rossz oldhatósága miatt (kolloid szerű reakcióelegyet kaptunk) a reakció csak részben tudott lejátszódni és a fluoreszcencia intenzitásának növekedése elmaradt a várttól. Az **NTR-Tz** jobb oldhatósággal rendelkezett és a várakozásoknak megfelelően a molekula nem reagált **rTCO-rodol**-al (nem szabadult fel rodol). Azonban nem tapasztaltunk intenzitás növekedést akkor sem, amikor a reakcióelegy NTR enzimet (50 µg/ml) és kofaktorként 5 mM NADH-t tartalmazott, feltehetően a molekula *para*-nitrobenzol része nem fér be az enzim kötőzsebébe és ezért nem tudott már a redukciós lépés sem lejátszódni. Az LC-MS vizsgálatok is ezt erősítették meg, ugyanis nem tudtunk kimutatni semmilyen reakcióterméket.



33. ábra: NTR-Tz biológiai vizsgálatok.

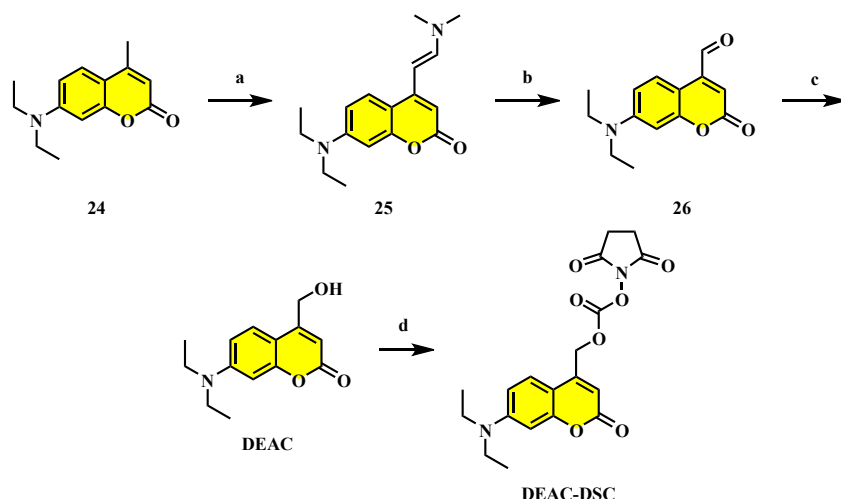
4.3. Fénnyel aktiválható makrociklusos tetrazin szintézise

Kutatómunkám során másik célom egy látható fénnyel aktiválható tetrazin származék kifejlesztése volt. Ehhez az irodalomból jól ismert és széles körben alkalmazott fotolabilis vegyületet, a 7-(dietilamino)-4-(hidroximetil)-kumarint (**DEAC**) választottam^[6]. Kék fénnyel való besugárzás hatására a kumarin heterolitikusan lehasad, ami egy prekursor felszabadulását eredményezi – esetemben egy spontán felnyíló makrociklusét (**34. ábra**). A keletkező makrociklus szerkezete megegyezik a korábban tárgyalt nitroreduktáz alapú makrociklus szerkezetével.



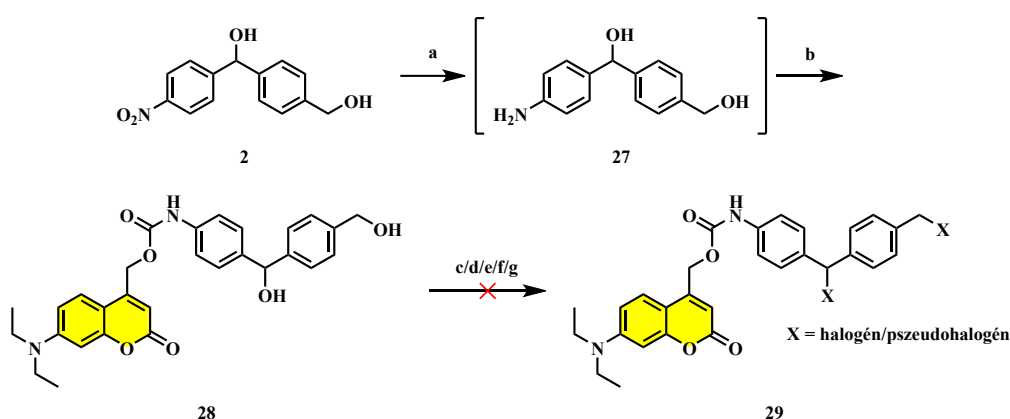
34. ábra: Kumarin fotolabilis védőcsoporttal rendelkező makrociklus bomlása fény hatására.

Első lépésként a kiválasztott modell fotolabilis vegyületet szintetizáltam, majd DSC segítségével aktiváltam az irodalomban leírtak alapján (**35. ábra**)^[69]. Ehhez először a kereskedelmi forgalomban kapható 7-dietilamino-4-metilkumarint (**24**) DMF-DMA-lal reagáltattam, így kialakítva az énamin származékot (**25**). Ezt NaIO_4 -t alkalmazásával oxidáltam aldehiddé (**26**), majd NaBH_4 -del redukáltam alkohollá (**DEAC**). Ezt követően a kumarin származék hidroxilcsoportját DSC segítségével aktiváltam (**DEAC-DSC**), sötétben dolgozva, hogy a fényérzékeny vegyület ne bomoljon el.



35. ábra: DSC aktivált kumarin szintézise; Reagensok és körülmények: **a)** DMF-DMA, DMF, Δ , 16 h, 96%; **b)** NaIO₄, THF, H₂O, 24 °C, 1,5 h, 48%; **c)** NaBH₄, THF, 24 °C, 2 h, 97%; **d)** DSC, Py, CH₂Cl₂, 24 °C, 2 h, sötét, kvant.

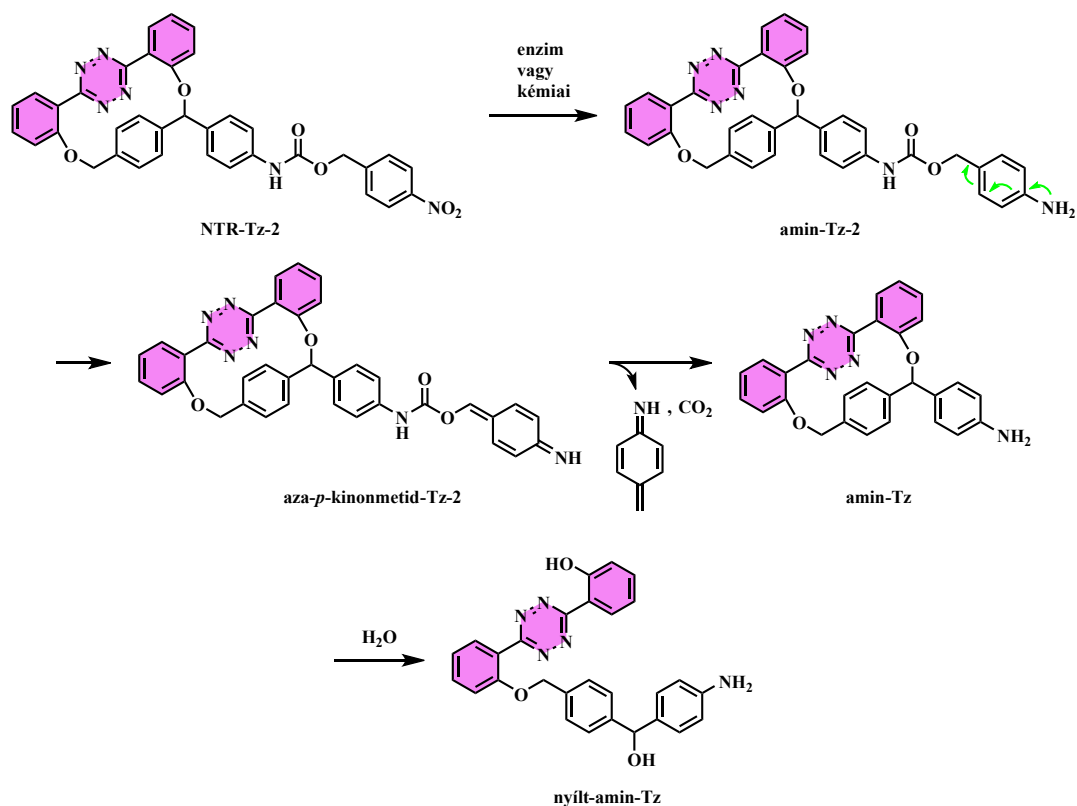
A korábban szintetizált **2** molekula nitrocsoportját katalitikusan hidrogéneztem (**27**) Et₃N-nal mérgezett Pd/C katalizátor jelenlétében, közel kvantitatív hozammal (**36. ábra**). Ezt követően a terméket azonnal felhasználtam és a korábban szintetizált **DEAC-DSC**-vel kapcsoltam össze. A kapott vegyület (**28**) hidroxilcsoportjain ezután szubsztitúciós reakciót terveztem végrehajtani. Azonban enyhe körülmények között, halogénezőszer / pszeudohalogénezőszer jelenlétében (Appel-reakció, PBr₃, AcBr, MsCl, TsCl), szobahőmérsékleten a szubsztitúció csak az egyik hidroxilcsoporton ment végbe. Magasabb hőmérsékleten viszont a molekula elbomlott, valószínűleg a karbamát kötés nem bírta az erősebb körülményeket.



36. ábra: Kumarin linker szintézise; Reagensok és körülmények: **a)** H₂, Et₃N, Pd/C, EtOH, 24 °C, 1 h, kvant; **b)** DEAC-DSC, EDIPA, 24 °C, 2 h, sötét, 38%; **c)** CBr₄, PPh₃, absz MeCN, 50 °C, 16 h, sötét, Ar; **d)** AcBr, absz MeCN, 50 °C, 16 h, sötét, Ar; **e)** PBr₃, absz MeCN, 50 °C, 16 h, sötét, Ar; **f)** MsCl, EDIPA, absz MeCN, 50 °C, 16 h, sötét, Ar; **g)** TsCl, EDIPA, absz MeCN, 50 °C, 16 h, sötét, Ar.

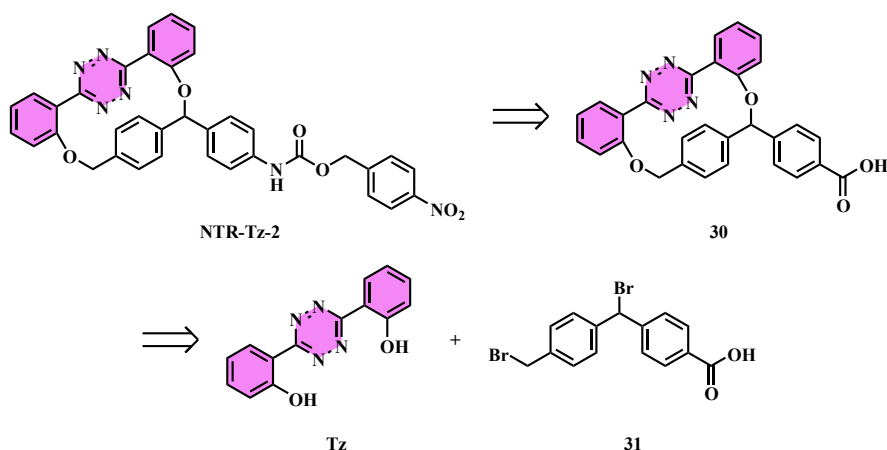
4.4. NTR enzim által aktivált makrociklusos tetrazin szintézise II

A biológiai vizsgálatok eredményei alapján egy új, enzim által aktiválható makrociklust, **NTR-Tz-2** terveztem (37. ábra). Ez a nitrobenzil egység és a makrociklus közötti nagyobb távolságnak köszönhetően várhatóan be fog férni az enzim kötőzsebébe, mivel sztérikusan nem annyira gátolt. Hasonlóan a korábban tárgyalt mechanizmushoz, a nitrocsoport redukcióját követően egy aza-*para*-kinonmetid struktúra alakul ki, ami spontán lehasad^[72]. A felbomlás után ugyanaz a makrociklus (**amin-Tz**) jön létre, mint amit korábban már tárgyaltam.



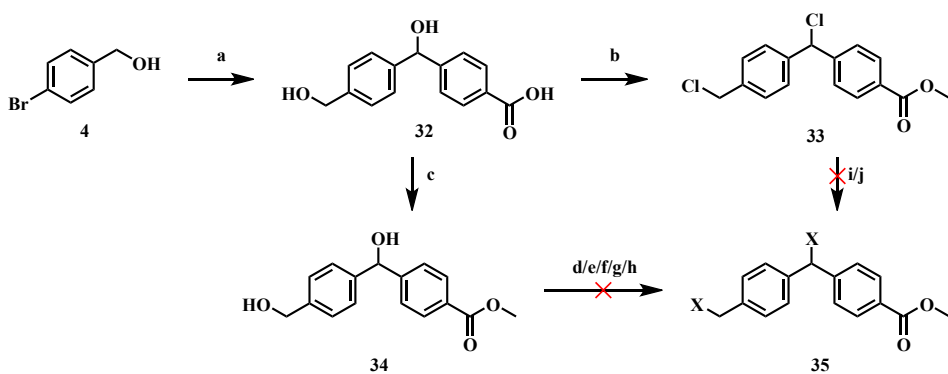
37. ábra: A 2. generációs NTR-aktivált makrociklusos tetrazin (**NTR-Tz-2**) felnyílása.

A célmolekula szintézisét először hasonló reakcióúton terveztem az előző fejezetben tárgyalt módszerhez, azonban a karbamátkötés kialakítása után a szubsztitúciós reakciót a korábbiak alapján nem tudtam megvalósítani. Így új szintézistervet dolgoztam ki, amelyben először egy makrociklus karbonsavat (**30**) állítok elő, majd Curtius lebontáson keresztül alakítom ki a karbamátkötést (38. ábra). Így elkerülöm a karbamátkötés kialakítása utáni szubsztitúciós reakció nehézségeit.



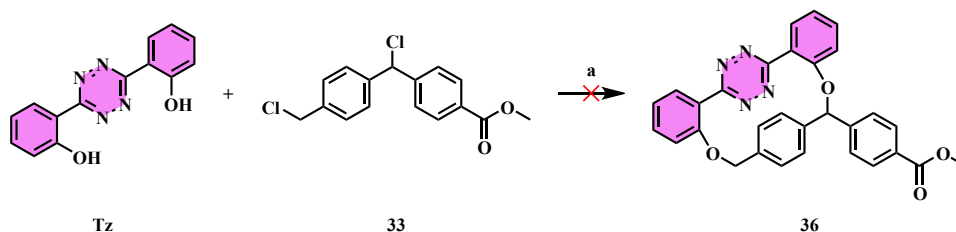
38. ábra: A NTR-Tz-2 makrociklusos tetrazin szintézisterve.

A szintézis első lépése egy n-BuLi-mal végzett litiálási reakció volt (**39. ábra**). A korábban szintetizált 4-brómbenzil-alkoholt (**4**) n-BuLi-mal reagáltattam, majd 4-formilbenzoesavat adtam hozzá. A keletkező **32** molekulát SOCl_2 -dal klóroztam, majd metanol hozzáadásával egyből metil-észterré (**33**) alakítottam. A metil észteren (**33**) kipróbáltam a klór-bróm cserét is (**35**), de ez nem vezetett sikerre, csak egyszeresen történt meg a szubsztitúció. Finkelstein reakcióval is próbálkoztam, de ebben az esetben is csak egyszeres szubsztitúciót sikerült elérni. A **32** molekulából leszármaztatható metilészteren (**34**) is próbáltam szubsztituálni (**35**) halogénezőszer / pszeudohalogénezőszer jelenlétében, de egyik módszer sem volt sikeres. Próbálkoztam Appel-reakcióval, PBr_3 -mal, AcBr -dal, MsCl -dal, és TsCl -dal, de a szubsztitúció mindegyik esetben csak a primer hidroxilcsoporton ment végbe.



39. ábra: Karbonsavat tartalmazó linker szintézise; Reagensok és körülmények: **a)** n-BuLi, absz THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 0,5 h, Ar, 2) 4-formilbenzoesav, absz THF, $-78\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 0\text{ }^\circ\text{C}$, 3,5 h, Ar 56%; **b)** 1) SOCl_2 , absz MeCN, $24\text{ }^\circ\text{C}$, 16 h, Ar, 2) MeOH, $24\text{ }^\circ\text{C}$, 0,5 h, 79% (2 lépésre); **c)** SOCl_2 , MeOH, $24\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h; **d)** CBr_4 , PPh_3 , absz MeCN, $50\text{ }^\circ\text{C}$, 16 h, Ar; **e)** AcBr , absz MeCN, $50\text{ }^\circ\text{C}$, 16 h, sötét, Ar; **f)** PBr_3 , absz MeCN, $50\text{ }^\circ\text{C}$, 16 h, sötét, Ar; **g)** MsCl , EDIPA, absz MeCN, $50\text{ }^\circ\text{C}$, 16 h, Ar; **h)** TsCl , EDIPA, absz MeCN, $50\text{ }^\circ\text{C}$, 16 h, Ar; **i)** KBr , absz MeCN, $50\text{ }^\circ\text{C}$, 16 h, Ar; **j)** NaI , acetone, $50\text{ }^\circ\text{C}$, 16 h, Ar.

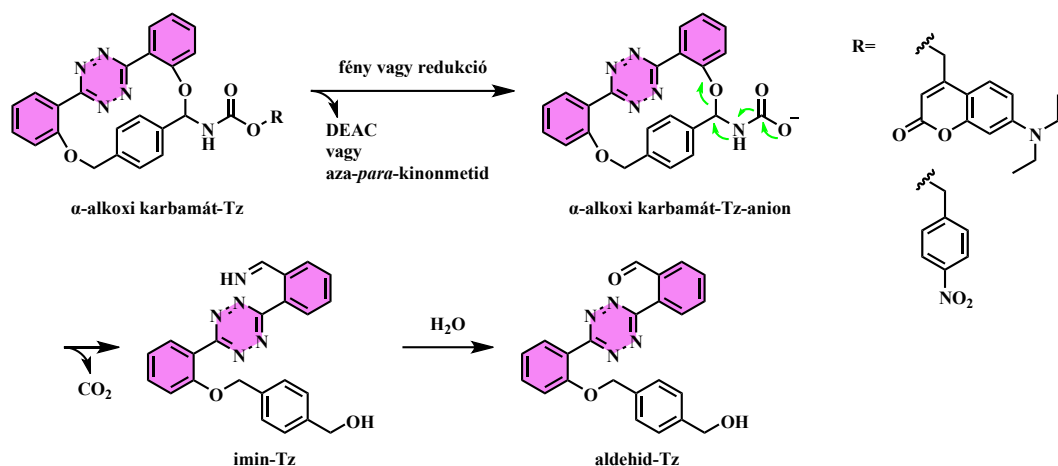
A nitroreduktáz makrociklus mintájára próbáltam meg szintetizálni a makrociklus metil-észtert **(36)** (**40. ábra**). Azonban a tömény reakcióelegyben a makrociklizálás nem ment végbe, és LC-MS alapján több mint 15 mellékterméket azonosítottam számottevő mennyiségben. Hígabb reakcióelegy alkalmazása esetén sem járt sikerrel a makrociklizálás, ismét számos melléktermék keletkezett.



40. ábra: Próba az **NTR-Tz-2** makrociklus kialakítására; Reagensek és körülmények: **a)** K_2CO_3 , KI, absz DMF, 50 °C, 2 h, Ar.

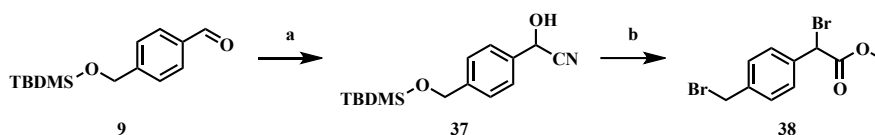
4.5. α -alkoxi karbamát kötést tartalmazó makrociklusos tetrazinok szintézise

Mivel a difenilmetanol alapú makrociklusok vagy nem rendelkeztek a kívánt tulajdonságokkal vagy előállítani sem sikerült őket, ezért más hasítható kötést tartalmazó típusú makrociklusokat terveztem (**41. ábra**). A célom egy olyan makrociklus kialakítása volt, amelynek része egy hemiaminál egység hidroxilcsoportja, míg az amincsoporthoz karbamátkötésen keresztül a **DEAC** fotolabilis védőcsoportot vagy az 4-nitrobenzil-alkoholt (mint az NTR enzim szubsztrátját) kapcsolok. Ekkor előbbi esetben kék fény hatására a kumarin vagy utóbbi esetben az enzimredukciót követően a kinonmetid leválik, és egy alkoxi-karbamát anion keletkezik^[79]. Ez az anion nem stabil, és CO_2 kilépése révén a makrociklus felnyílik, így lehetővé téve a TCO-nel való reakciót.



41. ábra: α -alkoxi karbamát egységet tartalmazó makrociklus felnyílása.

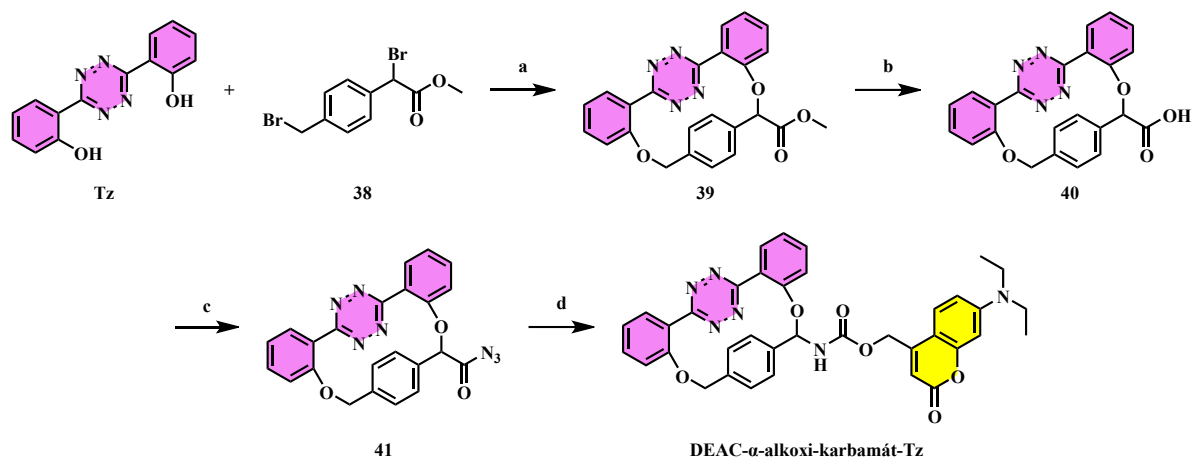
A védett hemiaminál részlet szintézisét Curtius lebontással terveztem megvalósítani, melyhez először a megfelelő linkert kellett előállítanom (**42. ábra**). Ehhez elsőként a korábban szintetizált TBDMS-el védett 4-(hidroximetil)-benzaldehyden (**9**) végeztem cianocsoport addíciót (**37**) TMS-CN és katalitikus mennyiségű Lewis bázis jelenlétében. A reakció során keletkező ciánhidrint (**37**) cc HBr és cc H₂SO₄ 2,5:1 arányú elegyében elfőztem. Az így nyert mandulasav származékot extrahálással tisztítottam, majd metanolos oldatába SOCl₂ csepegtettem, így metil észterré (**38**) alakítottam.



42. ábra: α -alkoxi karbamát linker szintézise; Reagensok és körülmények: **a**) TMS-CN, MgBr₂·Et₂O, CHCl₃, 24 °C, 1 h, 52%; **b**) 1) cc HBr, cc H₂SO₄, 100 °C, 1 h, 2) SOCl₂, MeOH, 24 °C, 1 h, 54% (2 lépés).

A szintetizált metil-észterrel (**38**) és a Tz tetrazinnal sikeresen elvégeztem a gyűrűzárási reakciót (**39**) a korábban alkalmazott körülmények között, majd a metilészter lúgos hidrolízisével a kívánt karbonsav funkcióval rendelkező makrociklusos tetrazin származékhoz jutottam (**40**) (**43. ábra**). A kapott savból DPPA segítségével sav-azidot (**41**) képeztem EDIPA bázis jelenlétében. Ezt először irodalmi példa alapján tisztítás nélkül próbáltam meg elfőzéssel izocianáttá alakítani, ám ekkor a tetrazin, valószínűleg az EDIPA bázis jelenléte miatt elbomlott^[80]. Ezért a sav-azidot oszlopkromatográfiával tisztítottam, majd ezután főztem el. Lehűtés után a keletkező izocianátot azonnal a hidroximetil-kumarin származékkal (DEAC) reagáltattam dibutil-ón-dilaurát katalizátor jelenlétében. A karbamátkötés kialakításához

elengedhetetlennek bizonyult az ön katalizátor alkalmazása, mivel nélkül nem keletkezett a kívánt termék. (Az ön katalizátort széles körben használják poliuretánok szintéziséhez is^[81].) A nyerterméket preparatív HPLC-vel tisztítottam, azonban a kívánt terméktől (**DEAC- α -alkoxi-karbamát-Tz**) a reakció során melléktermékként keletkező **aldehid-Tz** nem sikerült elválasztanom, egyszerre eluálódnak az oszlopról.



43. ábra: DEAC- α -alkoxi-karbamát-Tz szintézise; Reagensok és körülmények: **a)** K_2CO_3 , KI, absz DMF, 40 °C, 1 h, Ar, 18%; **b)** LiOH, 1,4-dioxán, H_2O , 24 °C, 2 h, 82%; **c)** DPPA, EDIPA, absz PhMe, 24 °C, 16 h, 69%; **d)** 1) absz PhMe, 80 °C, 0,25 h, 2) DEAC, dibutil-ón-dilaurát, 24 °C, 2 h.

A kicsit koszos **DEAC- α -alkoxi-karbamát-Tz**-on előzetes LC-MS méréseket végeztem. Amikor TCO-t adta hozzá, 16 óra elteltével sem csökkent a termék mennyisége és nem tapasztaltam új anyag megjelenését. Egy másik mintát pedig 1 percig 400 nm hullámhosszú fénnel besugároztam, és az LC-MS vizsgálatok alapján a makrociklus felnyílt, és TCO hozzáadás után megjelent a klikk reakcióban keletkező várt termék.

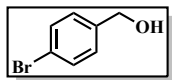
A vegyület reprodukciós előállítás jelenleg folyamatban van és megfelelő új tisztítása lépés után a fiziológiás körülmények közötti stabilitási, illetve a fluorogén **rTCO-rodol**-al végzett *in vitro* és sejtes kísérletek következnek.

5.1. Általános kísérleti adatok

A munkám során a *Sigma-Aldrich*, *Merck*, *Alfa Aesar*, *Fluka*, *Reanal*, *Romil*, *Molar Chemicals* illetve a *Fluorochem* által kereskedelmi forgalomba hozott vegyszereket használtam fel, minden esetben tisztítás nélkül. A vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatokhoz *Merck* Silica gel 60 F₂₅₄ lapokat használtam, detektáláshoz 254 és 365 nm-en működő UV lámpát használtam fel, előhíváshoz néhány esetben káliumpermanganátot használtam fel. Az flash oszlopkromatográfiás tisztításokhoz Zeochem márkájú 25-40 µm szemcseméretű szilika állófázist és *Teledyne ISCO COMBI Flash Nextgen 300+* készüléket használtam. Manuális oszlopkromatográfia során Zeochem márkájú 60-200 µm szemcseméretű szilikát használtam. A fordított fázisú szemipreparatív HPLC tisztítást *Wufeng Chrom LC100 HPLC* készülékkel végeztem, Phenomenex Jupiter C18 (250 × 21 mm I.D.) oszlopot használva, ami 110 Å pórusméretű 5 µm szemcseméretű szilika töltettel rendelkezik. Gradiens elúció: 0 perc 5% B; 5 perc 5% B; 15 perc 50% B; 25 perc 100% B; 35 perc 100% B; A eluens: 0,1% HCOOH, 99,9% MeCN; B eluens: 0,1% HCOOH, 99,9% víz; áramlási sebesség: 20 ml/perc. A termelés meghatározása előtt a megtisztított anyagokat tömegállandóságig vákuumon szárítottam. RP-HPLC-UV/Vis-MS méréseket *SHIMADZU LCMS-2020* system (LC-MS) készülékkel végeztem, Gemini C18 oszlopon (100 × 2,00 mm I.D.), mely 110 Å pórusméretű 5 µm szilika töltettel rendelkezik. A detektálást UV/Vis (220-800 nm) fotódioda-sorozat és ESI-MS detektor végezte. Lineáris gradiens elúció: 0 perc 0% B; 2,5 perc 100 % B; 3,2 perc 100 % B; 3,8 perc 0 % B; 5,0 perc 0 % B); A eluens: 0,1% HCOOH, 5 % MeCN és 94,9 % víz; B eluens: 0,1 % HCOOH, 94,9 % MeCN és 5 % víz; áramlási sebesség: 0,8 ml/perc. A minták HPLC minőségű víz (99,9% víz 0,01% HCOOH) és MeCN (99,9%, 0,01% HCOOH) elegyében készültek (1:1 V/V), a készült oldatok töménysége ~0,5 mg/ml. Az NMR mérések *Varian Inova 300 MHz* és *Varian Inova 500 MHz* spektrométerrel készültek. A minták deutero kloroformban, deutero metanolban és deutero dimetil-szulfoxidban készültek, a kémiai eltolódásokat (δ) ppm-ben adtam meg, minden esetben az adott oldószer jelét referenciaként véve.

5.2. Szintézisek

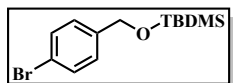
4-brómbenzil-alkohol (4)



4-brómbenzaldehydet (**3**) (5,00 g, 27,02 mmol, 1 ekv) feloldottam THF-H₂O elegyében (90 ml THF, 10 ml H₂O), majd a reakcióelegyhez lassan hozzáadagoltam NaBH₄-et (1,23 g, 32,43 mmol, 1,2 ekv). Az elegyet 30 percen keresztül szobahőmérsékleten kevertettem. 30 perc leteltével a reakcióelegyet CH₂Cl₂-nal (200 ml) hígítottam, majd lassan hozzácepegettem sósav oldatot (2 M-os, 100 ml) intenzív keverés közben. A fázisokat extrakcióval szétválasztottam, majd a vizes fázist CH₂Cl₂-nal (2×100 ml) extraháltam. Az egyesített szerves fázist telített sóoldattal (100 ml) mostam, MgSO₄-on szárítottam, szűrtem, majd vákuum alatt bepároltam. A kapott termék 4,91 g (97%) fehér szilárd anyag.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,47 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,22 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 4,62 (s, 2H), 1,92 (s, 1H). **¹³C-NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 139,7, 131,5, 128,5, 121,3, 64,4. **LC-MS (ESI)**: nem ionizál.

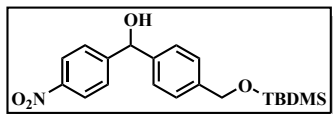
((4-brómbenzil)-oxi)(*tert*-butil)-dimetilszilán (5)



Összemértem 4-brómbenzil-alkoholt (**4**) (1,00 g, 5,35 mmol, 1 ekv), ImH-t (546 mg, 8,02 mmol, 1,5 ekv) és TBDMSCl-ot (967 mg, 6,42 mmol, 1,2 ekv), majd Ar atmoszféra alatt feloldottam absz DMF-ban (2 ml). Az oldatot 3 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, majd EtOAc-tal (20 ml) hígítottam és telített NaHCO₃ oldattal (20 ml) mostam. A fázisok szétválasztását követően a vizes fázist EtOAc-tal (4×20 ml) extraháltam. Az egyesítette szerves fázist telített sóoldattal (50 ml) mostam, MgSO₄-on szárítottam, szűrtem, majd vákuum alatt bepároltam. A nyersterméket flash oszlopkromatográfiával tisztítottam (izokratikus, hexán – EtOAc : 95 – 5). A kapott termék 1,49 g (93%) színtelen viszkózus folyadék.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,46 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,21 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 4,69 (s, 2H), 0,95 (s, 9H), 0,11 (s, 6H). **¹³C-NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 140,3, 130,1, 127,5, 120,4, 64,2, 25,8, 18,2, 5,4. **LC-MS (ESI)**: nem ionizál.

(4-(((*tert*-butil-dimetilszilil)-oxi)-metil)-fenil)(4-nitrofenil)metanol (6)



Próba A

Kihevített lombikba bemértem a TBDMS védett 4-brómbenzil alkoholt (**5**) (100 mg, 332 μ mol, 1 ekv), majd Ar atmoszféra alatt feloldottam absz THF-ban (3 ml). Az oldathoz $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on lassan hozzácepegtettem n-BuLi-ot (2,5 M hexános oldat, 130 μ l, 332 μ mol, 1 ekv). 15 perc leteltével az oldathoz hozzácepegtettem 4-nitrobenzaldehyd oldatot (100 mg, 664 μ mol, 2 ekv, 2 ml absz THF, Ar atmoszféra). Az elegyet 5 különböző hőmérsékleten ($-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, $24\text{ }^{\circ}\text{C}$, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$) kevertettem 1-1 órát. LC-MS és GC-MS vizsgálat alapján egyik hőmérsékleten se keletkezett termék.

Próba B

Kihevített kétnyakú lombikba összemértem Mg-ot (16,0 mg, 664 μ mol, 2 ekv) és katalitikus mennyiségű I_2 -ot. A lombikot Ar atmoszféra alatt addig hevítettem ameddig nem tapasztaltam lila gőzök keletkezését. A lombikba belecsepegtettem TBDMS védett 4-bromobenzil alkohol oldatot (**5**) (100 mg, 0,332 mmol, 1 ekv, 3 ml absz Et_2O , Ar atmoszféra). GC-MS vizsgálat alapján 30 perc alatt nem keletkezett Grignard reagens, de azért egy másik kihevített lombikba bemértem 4-nitrobenzaldehydet (100 mg, 664 μ mol, 2 ekv), majd Ar atmoszféra alatt feloldottam absz Et_2O -ben (2 ml). Az így kapott oldathoz hozzácepegtettem a feltételezetten nem keletkezett Grignard reagenst. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem 1 órát, LC-MS és GC-MS vizsgálat alapján nem keletkezett termék.

Próba C

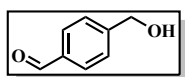
Kihevített kétnyakú lombikba összemértem Mg-ot (16,0 mg, 664 μ mol, 2 ekv) és katalitikus mennyiségű I_2 -ot. A lombikot Ar atmoszféra alatt addig hevítettem ameddig nem tapasztaltam lila gőzök keletkezését. A lombikba belecsepegtettem TBDMS védett 4-bromobenzil alkohol oldatot (**5**) (100 mg, 332 μ mol, 1 ekv, 3 ml absz THF, Ar atmoszféra). Az elegyet $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on kevertettem 30 percen keresztül. Egy másik kihevített lombikba belemértem 4-nitrobenzaldehydet (100 mg, 664 μ mol, 2 ekv), majd Ar atmoszféra alatt feloldottam absz THF-ban (2 ml). Az oldatot $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra hűtöttem, majd a Grignard reagenst lassan hozzácepegtettem. Az elegyet 5 különböző hőmérsékleten ($-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, $24\text{ }^{\circ}\text{C}$, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$) kevertettem 1-1 órát. LC-MS és GC-MS vizsgálat alapján egyik hőmérsékleten se keletkezett termék.

A reakciót megismételtem ugyanilyen körülmények között annyi különbséggel, hogy az aldehid oldatot csepegtettem a Grignard reagenshez, de itt így se keletkezett a várt termék.

Próba D

Kihevített kétnyakú lombikba összemértem Zn-et (43,0 mg, 664 μ mol, 2 ekv) és katalitikus mennyiségű I_2 -ot. A lombikot Ar atmoszféra alatt addig hevítettem ameddig nem tapasztaltam lila gőzök keletkezését. A lombikba belecsepegtettem TBDMS védett 4-bromobenzil alkohol oldatot (**5**) (100 mg, 332 μ mol, 1 ekv, 1 ml absz DMF, Ar atmoszféra). Az elegyet 100 °C-on kevertettem egy éjszakán keresztül. Egy másik kihevített lombikba belemértem 4-nitrobenzaldehydet (100 mg, 664 μ mol, 2 ekv), majd Ar atmoszféra alatt feloldottam absz DMF-ban (0,5 ml). Az elegyhez szobahőmérsékleten hozzácsepegtettem a cinkorganikus reagenst. Az oldatot 4 órán keresztül kevertettem 100 °C-on. LC-MS és GC-MS vizsgálat alapján nem keletkezett termék.

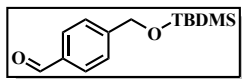
4-(hidroximetil)-benzaldehyd (**8**)^[73]



Tereftálaldehidet (**7**) (5,00 g, 37,28 mmol, 1 ekv) feloldottam THF-EtOH elegyében (30 ml THF, 20 ml EtOH), majd a reakcióelegyhez lassan hozzáadagoltam $NaBH_4$ -et (353 mg, 9,32 mmol, 0,25 ekv) 0 °C-on. A reakcióelegyet 3 órán keresztül kevertettem 0 °C-on. 3 óra leteltével a reakcióelegyet CH_2Cl_2 -nal (200 ml) hígítottam, majd lassan hozzácsepegtettem kevés sósav oldatot (2 M-os) intenzív keverés közben, a $NaBH_4$ megsemmisítése miatt. Az elegyet vízzel (100 ml) hígítottam és a fázisokat extrakcióval szétválasztottam. A vizes fázist CH_2Cl_2 -nal (2×100 ml) extraháltam, majd az egyesítette szerves fázist telített sóoldattal (100 ml) mostam, $MgSO_4$ -on szárítottam, szűrtem, majd vákuum alatt bepároltam. A nyersterméket flash oszlopkromatográfiával tisztítottam (hexán – EtOAc : 0 → 30%). A kapott termék 3,49 g (69%) fehér szilárd anyag.

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 10,01 (s, 1H), 7,90 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,54 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 4,81 (s, 2H), 1,90 (s, 1H). **^{13}C -NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 192,3, 148,03, 135,3, 129,9, 126,8, 64,1. **LC-MS (ESI)**: nem ionizál.

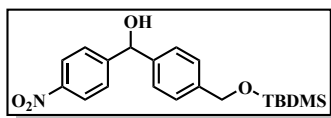
4-(((*tert*-butil-dimetilszilil)-oxi)-metil)-benzaldehyd (9)



Összemértem 4-(hidroximetil)-benzaldehydet (**8**) (1,00 g, 7,34 mmol, 1 ekv), ImH-t (750 mg, 11,02 mmol, 1,5 ekv) és TBDMSCl-ot (1,33 g, 8,81 mmol, 1,2 ekv), majd Ar atmoszféra alatt feloldottam absz DMF-ban (2 ml). Az oldatot 3 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, majd EtOAc-tal (20 ml) hígítottam és telített NaHCO₃ oldattal (20 ml) mostam. A fázisok szétválasztását követően a vizes fázist EtOAc-tal (4×20 ml) extraháltam. Az egyesítette szerves fázist telített sóoldattal (50 ml) mostam, MgSO₄-on szárítottam, szűrtem, majd vákuum alatt bepároltam. A nyersterméket flash oszlopkromatográfiával tisztítottam (izokratikus, hexán – EtOAc : 95 – 5). A kapott termék 1,76 g (95%) színtelen viszkózus folyadék.

¹H- NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9,99 (s, 1H), 7,85 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,48 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 4,82 (s, 2H), 0,96 (s, 9H), 0,12 (s, 6H). ¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) 192,2, 148,8, 135,5, 130,0, 126,2, 64,6, 26,0, 18,5. LC-MS (ESI): nem ionizál.

(4-(((*tert*-butil-dimetilszilil)-oxi)-metil)-fenil)(4-nitrofenil)metanol (6)



Próba A

Kihevített lombikba bemértem a TBDMS védett 4-bróm-nitrobenzolt (**10**) (100 mg, 495 μmol, 1 ekv), majd Ar atmoszféra alatt feloldottam absz THF-ban (3 ml). Az oldathoz -78 °C-on lassan hozzácepegtettem n-BuLi-ot (2,5 M hexános oldat, 220 μl, 545 μmol, 1,1 ekv). LC-MS vizsgálat alapján a kiindulási anyag elbomlott.

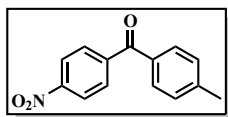
Próba B

Kihevített lombikba bemértem a TBDMS védett 4-bróm-nitrobenzolt (**10**) (100 mg, 495 μmol, 1 ekv), majd Ar atmoszféra alatt feloldottam absz THF-ban (3 ml). Az oldathoz -78 °C-on lassan hozzácepegtettem n-BuLi-ot (2,5 M hexános oldat, 140 μl, 347 μmol, 0,7 ekv). LC-MS vizsgálat alapján kiindulási anyag elbomlott, de azért 15 perc leteltével -78 °C-on hozzácepegtettem TBDMS védett 4-(hidroximetil)-benzaldehyd oldatot (**9**) (248 mg, 990 μmol, 2 ekv, 2 mL absz THF, Ar atmoszféra). Az elegyet 3 különböző hőmérsékleten (-78 °C, 24 °C, 70 °C) kevertettem 1-1 órát. LC-MS vizsgálat alapján egyik hőmérsékleten se keletkezett termék.

Próba C

Kihevített kétnyakú lombikba összemértem Mg-ot (24,0 mg, 990 μ mol, 2 ekv) és katalitikus mennyiségű I₂-ot. A lombikot Ar atmoszféra alatt addig hevítettem ameddig nem tapasztaltam lila gőzök keletkezését. A lombikba belecsepegtettem 4-bróm-nitrobenzol oldatot (**10**) (100 mg, 495 μ mol, 1 ekv, 3 ml absz THF, Ar atmoszféra. GC-MS és LC-MS vizsgálat alapján 30 perc alatt nem keletkezett Grignard reagens, de azért egy másik kihevített lombikba bemértem TBDMS védett 4-(hidroximetil)-benzaldehydet (**9**) (248 mg, 990 μ mol, 2 ekv), majd Ar atmoszféra alatt feloldottam absz THF-ban (2 ml). Az így kapott oldathoz hozzácsepegtettem a feltételezetten nem keletkezett Grignard reagenst. Az elegyet 3 különböző hőmérsékleten (-78 °C, 24 °C, 70 °C) kevertettem 1-1 órát. LC-MS vizsgálat alapján egyik hőmérsékleten se keletkezett termék.

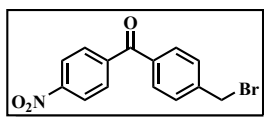
(4-nitrofenil)(*p*-tolil)-metanon (**12**)



4-nitrobenzoil-kloridot (**11**) (5,00 g, 26,95 mmol, 1 ekv) feloldottam PhMe-ban (200 ml), majd a reakcióelegyhez lassan hozzáadagoltam AlCl₃-ot (5,03 g, 37,7 mmol, 1,4 ekv). Az elegyet 2 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem. 2 óra leteltével az elegyhez vizet (10 ml) csepegtettem, majd vákuum alatt bepároltam a reakcióelegyet. A nyersterméket CH₂Cl₂-nal (100 ml) szuszpendáltam, vízzel (100 ml) hígítottam és a fázisokat extrakcióval szétválasztottam. A vizes fázist CH₂Cl₂-nal (2×100 ml) extraháltam, majd az egyesítette szerves fázist telített sóoldattal (100 ml) mostam, MgSO₄-on szárítottam, szűrtem, majd vákuum alatt bepároltam. A nyersterméket többszöri átkristályosítással (CH₂Cl₂-hexán) tisztítottam. A kapott termék 4,93 g (76%) sárga szilárd anyag. NMR alapján a termék egy izomert tartalmaz.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8,34 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,92 (d, J = 9,0 Hz, 2H), 7,72 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,32 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 2,47 (s, 3H). **¹³C-NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 194,7, 149,9, 144,7, 143,5, 133,8, 130,7, 130,5, 129,5, 123,7, 21,9. **LC-MS (ESI)**: nem ionizál.

(4-(brómmetil)-fenil)(4-nitrofenil)-metanon (**13**)



Próba A

Összemértem a Friedel-Crafts terméket (**12**) (200 mg, 829 μ mol, 1 ekv) és NBS-et (162 mg, 991 μ mol, 1,1 ekv), majd feloldottam CCl₄-ban (5 ml). Az oldathoz ezután (BzO)₂-ot (20,0 mg, 82,9 μ mol, 0,1 ekv) adtam és 6 órán keresztül 60 °C-on kevertettem (3 óra

után további 0,1 ekv (BzO)₂-ot adtam a reakcióelegyhez szobahőmérsékleten). LC-MS és GC-MS vizsgálat alapján nem keletkezett termék.

Próba B

Összemértem a Friedel-Crafts terméket (**12**) (200 mg, 829 μ mol, 1 ekv) és NBS-et (162 mg, 991 μ mol, 1,1 ekv), majd feloldottam CCl₄-ban (5 ml). Az oldathoz ezután AIBN-t adtam (13,5 mg, 82,9 μ mol, 0,1 ekv) adtam és 6 órán keresztül 60 °C-on kevertettem (3 óra után további 0,1 ekv AIBN-t adtam a reakcióelegyhez szobahőmérsékleten). LC-MS és GC-MS vizsgálat alapján nem keletkezett termék.

Próba C

Kvarclombikba összemértem a Friedel-Crafts terméket (**12**) (200 mg, 829 μ mol, 1 ekv) és NBS-et (162 mg, 991 μ mol, 1,1 ekv), majd feloldottam CCl₄-ban (5 ml). Az oldathoz ezután AIBN-t (13,5 mg, 82,9 μ mol, 0,1 ekv) adtam és UV-C lámpával bevilágítva kevertettem 24 °C-on. LC-MS és GC-MS vizsgált alapján nem keletkezett termék.

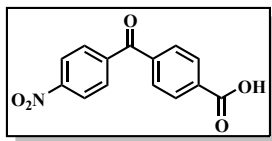
Próba D

Összemértem a Friedel-Crafts terméket (**12**) (200 mg, 829 μ mol, 1 ekv) és NBS-et (162 mg, 991 μ mol, 1,1 ekv), majd feloldottam PhCl-ban (5 ml). Az oldathoz ezután AIBN-t adtam (13,5 mg, 82,9 μ mol, 0,1 ekv) adtam és 6 órán keresztül 60 °C-on kevertettem (3 óra után további 0,1 ekv AIBN-t adtam a reakcióelegyhez szobahőmérsékleten). LC-MS és GC-MS vizsgálat alapján nem keletkezett termék.

Próba E

Összemértem a Friedel-Crafts terméket (**12**) (200 mg, 829 μ mol, 1 ekv) majd feloldottam PhCl-ban (5 ml). Az oldathoz Br₂-ot (43 μ L, 829 μ mol, 1 ekv) csepegtettem, majd AIBN-t (13,5 mg, 0,083 mmol, 0,1 ekv) adtam az oldathoz és 6 órán keresztül 60 °C-on kevertettem (3 óra után további 0,1 ekv AIBN-t adtam a reakcióelegyhez szobahőmérsékleten). GC-MS és LC-MS vizsgálat alapján nem keletkezett termék.

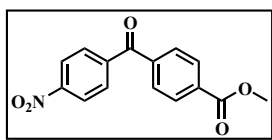
4-(4-nitrobenzoi)-benzoesav (14)



A Friedel-Crafts terméket (**12**) (5,03 g, 20,83 mmol, 1 ekv) feloldottam AcOH-ban (100 ml), majd Jones-reagenst (2,5 M-os H₂SO₄ oldat, 25,0 ml, 62,49 mmol, 3 ekv) csepegtettem az oldathoz, majd reflux hőmérsékleten kevertettem a reakcióelegyet egy éjszakán keresztül. Másnap miután szobahőmérsékletűre hűlt a reakcióelegy, jeges vízre (150 ml) öntöttem és EtOAc-tal (3×100 ml) extraháltam. Az egyesített szerves fázist NaOH oldattal (2,5 M-os) lúgosítottam (pH = 12), majd NaOH oldattal (1,0 M-os, 3×150 ml) extraháltam. Az egyesített vizes fázist cc sósav oldattal savanyítottam (pH = 2), majd a keletkező fehér terméket szűrtem és vízzel (200 ml) mostam. A terméket vákuum exsikkátorban (CaCl₂-on) szárítottam 2 napon keresztül. A kapott termék 4,78 g (85%) fehér szilárd anyag.

¹H-NMR (500 MHz, (CD₃)₂SO) δ 13,36 (s, 1H), 8,38 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 8,11 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,98 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,87 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H). **¹³C-NMR** (126 MHz, (CD₃)₂SO) δ 194,1, 166,5, 149,6, 141,9, 139,3, 134,6, 130,8, 129,9, 129,5, 123,7. **LC-MS (ESI):** *m/z* [M-H⁺]⁻-ra számolt C₁₄H₈NO₅ 270, mért 270.

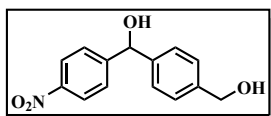
metil 4-(4-nitrobenzoi)-benzoát (15)



A benzoésav származékot (**14**) (4,78 g, 17,62 mmol, 1 ekv) MeOH-ban (50 ml) szuszpendáltam, majd cc H₂SO₄-at (10 csepp) csepegtettem a szuszpenzióhoz. A szuszpenziót egy éjszakán keresztül reflux hőmérsékleten kevertettem. Másnap a reakcióelegyet vákuum alatt bepároltam, majd CH₂Cl₂-nal (100 ml) hígítottam és vízzel (5×50 ml) mostam. A szerves fázist telített sóoldattal (50 ml) mostam, MgSO₄-on szárítottam, szűrtem és vákuum alatt bepároltam. A kapott termék 4,96 g (98%) fehér szilárd anyag, ami további tisztítást nem igényelt.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8,34 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 8,17 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,94 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,84 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 3,97 (s, 3H). **¹³C-NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 194,2, 166,1, 150,3, 142,2, 139,9, 134,3, 130,9, 129,96, 129,95, 123,8, 52,7. **LC-MS (ESI):** nem ionizál.

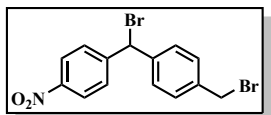
(4-(hidroximetil)-fenyl)(4-nitrofenil)-metanol (2)



A metil észtert **(15)** (1,00 g, 3,51 mmol, 1 ekv) Ar atmoszféra alatt feloldottam absz THF-ban (100 ml). Az oldathoz $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on hozzácsepegtettem DIBALH-et (1,0 M-os PhMe-os oldat, 14,0 ml, 14,02 mmol, 4 ekv). A reakcióelegyet 30 percig kevertetem $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, majd szobahőmérsékleten kevertetem egy éjszakán keresztül. Másnap az oldathoz telített NH_4Cl oldatot (10 ml) csepegtettem és vákuum alatt bepároltam. A nyersterméket flash oszlopkromatográfiával tisztítottam ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{MeOH} : 0 \rightarrow 10\%$). A kapott termék 803 mg (88%) fehér szilárd anyag.

^1H -NMR (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8,17 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 7,65 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 7,34 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,26 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 6,17 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H), 5,84 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H), 5,09 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H), 4,45 (d, $J = 5,7$ Hz, 2H). **^{13}C -NMR** (126 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 153,4, 146,3, 142,8, 141,5, 127,1, 126,4, 126,1, 123,3, 73,3, 62,6. **LC-MS (ESI):** m/z $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ -ra számolt $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{NO}_6$ 304, mért 304.

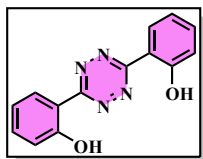
1-(bróm-(4-(brómmetil)-fenil)-metil)-4-nitrobenzol (1)



A redukció termékéhez **(2)** (50,0 mg, 193 μmol , 1 ekv) $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on cc HBr-ot (867 μl , 7,71 mmol, 40 ekv), majd cc H_2SO_4 -at (314 μl , 5,79 mmol, 30 ekv) csepegtettem. A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten kevertetem. Másnap reakcióelegyet jeges vízre (50 ml) öntöttem, majd CH_2Cl_2 -nal (3×50 ml) extraháltam. Az egyesített szerves fázist telített sóoldattal (50 ml) mostam, MgSO_4 -on szárítottam és szűrtem. A nyersterméket flash oszlopkromatográfiával tisztítottam (hexán – $\text{EtOAc} : 0 \rightarrow 50\%$). A kapott termék 58,1 mg (78%) barnás nyúlós szilárd anyag.

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8,19 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 7,62 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 7,40 (s, 4H), 6,27 (s, 1H), 4,47 (s, 2H). **^{13}C -NMR** (126 MHz, CDCl_3) δ 147,7, 139,9, 138,5, 129,7, 129,5, 128,9, 123,9, 52,5, 32,5. **LC-MS (ESI):** nem ionizál.

2,2'-(1,2,4,5-tetrazin-3,6-diil)-difenol (Tz)

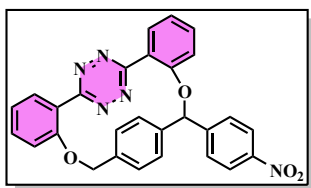


Összemértem 2-hidroxibenzonitrilt (**16**) (2,00 g, 16,79 mmol, 1 ekv) és $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ -ot (305 mg, 839 μmol , 0,05 ekv), majd EtOH-ban (30 ml) szuszpendáltam a reakcióelegyet. A reakcióelegyhez $\text{N}_2\text{H}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ -ot (4,90 ml, 100,7 mmol, 6 ekv) adagoltam és 6 órán keresztül 80 °C-on kevertettem.

Miután lehűlt szobahőmérsékletűre a reakcióelegy, oxigént buborékolttam át rajta és O_2 atmoszférán (1 atm) kevertettem 2 órán keresztül szobahőmérsékleten. A keletkező szuszpenziót szűrtem, etanollal (50 ml) mostam és vákuum alatt szárítottam. A kapott termék 952 mg (48%) vörös szilárd anyag.

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 10,88 (d, $J = 0,4$ Hz, 2H), 8,66 (dd, $J = 8,1, 1,7$ Hz, 2H), 7,56 (ddd, $J = 8,6, 7,1, 1,7$ Hz, 2H), 7,18-7,11 (m, 4H). **^{13}C -NMR** (126 MHz, CDCl_3) δ 164,1, 160,1, 135,6, 128,7, 120,7, 119,1, 114,2. **LC-MS (ESI):** $[\text{M}+\text{H}]^+$ -ra számolt $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_6\text{O}_2$ 269, mért 269.

5-(4-nitrofenil)-4,8-dioxa-2(3,6)-tetrazina-1,3(1,2),6(1,4)-tribenzolciklooktafán (NTR-Tz)

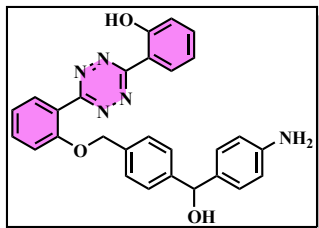


Összemértem a tetrazint (**Tz**) (33,5 mg, 126 μmol , 1 ekv), a brómozott linkert (**1**) (58,1 mg, 151 μmol , 1,2 ekv), K_2CO_3 -ot (52,2 mg, 377 μmol , 3 ekv) és KI-ot (62,6 mg, 377 μmol , 3 ekv), majd Ar atmoszféra alatt feloldottam absz DMF-ban (5 ml). A reakcióelegyet

2 órán keresztül kevertettem 50 °C-on, majd miután lehűlt szobahőmérsékletűre az oldat, vízzel (50 ml) hígítottam és CH_2Cl_2 -nal (3×50 ml) extraháltam. Az egyesített szerves fázist telített sóoldattal (50 ml) mostam, MgSO_4 -on szárítottam, szűrtem és vákuum alatt bepároltam. A nyers termék első tisztítását flash oszlopkromatográfiával végeztem (hexán – EtOAc : 0 $\rightarrow$ 30%). A nyers termék második tisztítását fordított fázisú flash oszlopkromatográfiával ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 95:5 + 0,1% HCOOH – MeCN + 0,1% HCOOH : 0 $\rightarrow$ 100%). A termék végső tisztítását újra normál fázison (hexán – acetone : 0 $\rightarrow$ 50%). A kapott termék 4,1 mg (6%) rózsaszín szilárd anyag.

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8,25 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 8,18 (td, $J = 7,6, 1,7$ Hz, 2H), 7,73 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 7,72-7,67 (m, 2H), 7,46 (td, $J = 7,6, 1,2$ Hz, 1H), 7,40 (td, $J = 8,5, 1,7$ Hz, 2H), 7,36 (dd, $J = 8,2, 1,3$ Hz, 1H), 7,14 (dd, $J = 7,6, 2,0$ Hz, 1H), 6,74 (dd, $J = 7,6, 2,0$ Hz, 1H), 6,54 (dd, $J = 7,8, 2,1$ Hz, 1H), 6,40 (dd, $J = 7,9, 2,0$ Hz, 1H), 5,79 (s, 1H), 5,24 (d, $J = 11,8$ Hz, 1H), 4,58 (d, $J = 11,7$ Hz, 1H). **LC-MS (ESI):** m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ -ra számolt $\text{C}_{28}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_4$ 490, mért

490.2-(6-(2-(((4-aminofenil)(hidroxi)-metil)-benzil)-oxi)-fenil)-1,2,4,5-tetrazin-3-il)-fenol (nyílt-NTR-Tz)



Próba A

NTR-Tz (0,50 mg, 1,02 μ mol, 1 ekv) feloldottam EtOH-ban (100 μ l), majd EDIPA (0,55 μ l, 4,09 μ mol, 4 ekv) csepegtettem az oldathoz, majd Pd/C (10 m/m%-os, 54 μ g, 51 nmol, 0,05 ekv)

mértem az oldatban. A szuszpenziót 5 percig H₂ atmoszféra (1 atm) alatt kevertettem. LC-MS alapján a nitro csoport redukálódott, a makrociklus felnyílt, de a tetrazin gyűrű is redukálódott.

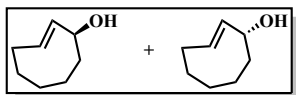
Próba B

NTR-Tz (0,50 mg, 1,02 μ mol, 1 ekv) feloldottam EtOH-ban (100 μ l), majd SnCl₂-ot (48 μ g, 255 nmol, 0,25 ekv) mértem a reakcióelegybe. A reakcióelegyet 5 percet kevertettem szobahőmérsékleten. LC-MS alapján a nitro csoport redukálódott, a makrociklus felnyílt, de a tetrazin gyűrű is redukálódott. (Számos egyéb bomlástermék is megjelent.)

Próba C

NTR-Tz (0,50 mg, 1,02 μ mol, 1 ekv) feloldottam AcOH-ban (100 μ l), majd ZnCl₂-ot (35 μ g, 255 nmol, 0,25 ekv) mértem a reakcióelegybe. A reakcióelegyet 5 percet kevertettem szobahőmérsékleten. LC-MS alapján a nitro csoport redukálódott, a makrociklus felnyílt, de a tetrazin gyűrű is redukálódott. (Számos egyéb bomlástermék is megjelent.)

(S,E)-ciclooct-2-én-1-ol (bal) és (R,E)-ciclooct-2-én-1-ol (jobb) (rTCO axiális és rTCO ekvatoriális)^[39]



rCCO-t (2,00 g, 15,85 mmol, 1 ekv) feloldottam Et₂O-hexán elegyében (150 ml Et₂O, 350 ml hexán), majd PhCOOMe-ot

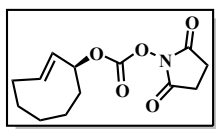
(4,00 ml, 31,70 mmol, 2 ekv) mértem az oldatba. A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül UV-fénnyel (254 nm) világítottam be, miközben AgNO₃-tal impregnált szilika oszlopon áramoltattam keresztül. Másnap az UV lámpák kikapcsolása után, a töltött oszlopot Et₂O-hexán (150 ml Et₂O, 350 ml hexán) oldatával mostam. Az oszlopból a töltetet eltávolítottam, majd a szilikát szűrőn keresztül NH₃ oldattal (25%-os vizes oldat, 300 ml), majd CH₂Cl₂-nal (300 ml) mostam. A fázisokat extrakcióval elválasztottam, a szerves fázist MgSO₄-on szárítottam, szűrtem és vákuum alatt bepároltam. A nyersteget flash oszlopkromatográfiával tisztítottam

(hexán – EtOAc : 0 → 50%). Így 451 mg (23%) axiális terméket és 553 mg (28%) ekvatoriális terméket kaptam. Mindkét termék szintelen viszkózus folyadék.

ekvatoriális: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 5,65-5,45 (m, 2H), 4,18 (m, 1H), 2,78 (s, 1H), 2,37 (m, 1H), 2,10 (m, 1H), 1,95-1,66 (m, 4H), 1,51-1,31 (m, 2H), 0,90-0,64 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 136,0, 131,9, 44,5, 36,1, 35,6, 30,5, 29,3, 27,8. LC-MS (ESI): nem ionizál.

axiális: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 5,97 (ddd, $J=16,5, 9,0, 4,5$ Hz, 1H), 5,59 (dd, $J=16,5, 3,0$ Hz, 1H), 4,61 (s, 1H), 2,52 (m, 1H), 2,09-1,80 (m, 4H), 1,72-1,43 (m, 4H), 1,17-1,05 (m, 1H), 0,82-0,71 (m, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 135,4, 130,8, 71,4, 43,4, 36,3, 36,1, 29,4, 23,4. LC-MS (ESI): nem ionizál.

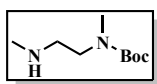
(S,E)-cyclooct-2-én-1-il-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)-karbonát (rTCO-DSC axiális)^[78]



Összemértem **axiális rTCO**-t (451 mg, 3,57 mmol) és DSC-ot (3,66 g, 14,29 mmol, 4 ekv), feloldottam CH_2Cl_2 -ban (50 ml), majd EDIPA (3,31 ml, 17,81 mmol, 5 ekv) bázist mértem a reakcióelegybe. Másnap a reakcióelegyet CH_2Cl_2 -nal (50 ml) hígítottam, majd vízzel (100 ml) mostam, majd a vizes fázist CH_2Cl_2 -nal (2×50 ml) extraháltam. Az egyesített szerves fázist telített sóoldattal (50 ml) mostam, MgSO_4 -on szárítottam, szűrtem és vákuum alatt bepároltam. A nyerste-terméket flash oszlopkromatográfiával tisztítottam (hexán – EtOAc : 0 → 50%). A kapott termék 646 mg (67%) szintelen viszkózus folyadék.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 5,97 (ddd, $J=16,5, 9,0, 4,5$ Hz, 1H), 5,59 (dd, $J=16,5, 3,0$ Hz, 1H), 4,61 (s, 1H), 2,52 (m, 1H), 2,09-1,80 (m, 4H), 1,72-1,43 (m, 4H), 1,17-1,05 (m, 1H), 0,82-0,71 (m, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 135,4, 130,8, 71,4, 43,4, 36,3, 36,1, 29,4, 23,4. **LC-MS (ESI):** nem ionizál.

tect-butyl metil-(2-(metilamino)-etil)-karbamát (18)^[8]

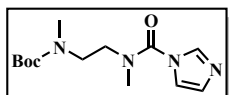


N,N'-dimetiletiléndiamint (**17**) (1,00 g, 11,34 mmol, 5 ekv) feloldottam CH_2Cl_2 -ban (10 ml), majd Boc_2O oldatot (495 mg, 2,27 mmol, 1 ekv, 20 ml CH_2Cl_2) csepegtettem a reakcióelegybe intenzív keverés közben, és egy éjszakát kevertettem szobahőmérsékleten. Másnap EtOAc-tal (100 ml) hígítottam a reakcióelegyet, majd telített Na_2CO_3 oldattal (100 ml) mostam. A vizes fázist EtOAc-tal (2×50 ml) extraháltam, majd az egyesített szerves fázist telített sóoldattal (50 ml) mostam. A nyerste-terméket flash

oszlopkromatográfiával tisztítottam (CH₂Cl₂ – MeOH : 0 → 10%). A kapott termék 1,23 g (58%) színtelen viszkózus folyadék.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 3,37-3,33 (m, 2H), 2,88 (s, 3H), 2,74-2,73 (m, 2H), 2,46 (s, 3H), 1,63 (s, 1H), 1,46 (s, 9H). **¹³C-NMR** (CDCl₃, 126 MHz) δ 156,0, 79,5, 49,7, 48,4, 36,3, 34,6, 28,4. **LC-MS (ESI):** m/z [M+H]⁺-ra számolt C₉H₂₁N₂O₂ 189, mért 189.

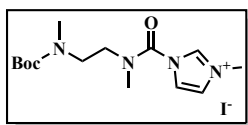
***tert*-butyl metil-(2-(*N*-metil-1*H*-imidazol-1-karboxamid)-etil)-karbamát (19)^[8]**



A mono Boc védett diamint (**18**) (1,23 g, 6,53 mmol, 1 ekv) feloldottam THF-ban (100 ml), majd CDI-t (1,27 g, 7,84 mmol, 1,2 ekv) adtam a reakcióelegyhez. A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül reflux hőmérsékleten kevertettem. Másnap miután lehűlt szobahőmérsékletűre, a reakcióelegyet vákuum alatt bepároltam. A nyersterméket feloldottam CH₂Cl₂-ban (100 ml), majd vízzel (2×100) mostam. A szerves fázist telített sóoldattal (50 ml) mostam, majd MgSO₄-on szárítottam, szűrtem és vákuum alatt bepároltam. A nyersterméket flash oszlopkromatográfiával tisztítottam (CH₂Cl₂ – MeOH : 0 → 5%). A kapott termék 1,72 g (94%) színtelen viszkózus folyadék.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7,90 (s, 1H), 7,25 (s, 1H), 7,07 (s, 1H), 3,69-3,65 (m, 2H), 3,54-3,51 (m, 2H), 3,17 (s, 3H), 2,85 (s, 3H), 1,43 (s, 9H). **¹³C-NMR** (CDCl₃, 126 MHz) δ 151,8, 137,0, 129,4, 118,0, 79,9, 47,7, 45,4, 37,4, 34,5, 28,4. **LC-MS (ESI):** m/z [M+H]⁺-ra számolt C₁₃H₂₃N₄O₃ 283, mért 283.

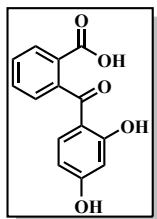
1-((2-((*tert*-butoxikarbonil)(metil)-amino)-etil)(metil)-karbamoil)-3-metil-1*H*-imidazol-3-ium jodid (20)^[8]



CDI aktivált önfeláldozó linkert (**19**) (200 mg, 708 μmol, 1 ekv) feloldottam MeCN-ben (10 ml), majd MeI-ot (441 μl, 7,08 mmol, 10 ekv) csepegtettem a reakcióelegyhez. A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem. Másnap az reakcióelegyet vákuum alatt bepároltam. A kapott termék 247 mg (82%) viszkózus színtelen folyadék.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 9,90 (s, 1H), 7,79 (s, 2H), 4,26 (s, 3H), 3,72-3,69 (m, 2H), 3,55-3,52 (m, 2H), 3,31 (s, 3H), 2,90 (s, 3H), 1,43 (s, 9H). **¹³C-NMR** (CDCl₃, 126 MHz) δ 156,2, 146,9, 136,6, 123,9, 121,0, 79,8, 491,1, 45,5, 37,9, 34,8, 28,2. **LC-MS (ESI):** m/z [M]⁺-ra számolt C₁₄H₂₅N₄O₃ 297, mért 297.

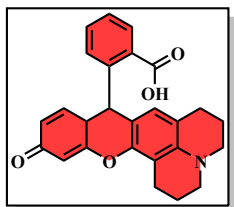
2-(2,4-dihidroxibenzoil)-benzoesav (**22**)^[8]



Összemértem rezorcint (**21**) (360 mg, 3,27 mmol, 1 ekv) és ftálsav-anhidrint (484 mg, 3,27 mmol, 1 ekv), majd feloldottam PhNO₂-ban (5 ml). Intenzív keverés közben lassan hozzáadagoltam AlCl₃-ot (1,00 g, 7,52 mmol, 2,3 ekv) és egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem. Másnap hexán-sósav (20 ml hexán, 25 ml 0,5 M sósav) elegyére öntöttem és 2 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem. A kivált szilárd csapadékot szűrtem és flash oszlopkromatográfiával tisztítottam (CH₂Cl₂ – MeOH : 0 → 10%). A kapott termék 679 mg (80%) sárga szilárd anyag.

¹H-NMR (500 MHz, (CD₃)₂SO) δ 13,14 (s, 1H), 12,20 (s, 1H), 10,69 (s, 1H), 7,96 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,64 (t, *J* = 30,3, 7,2 Hz, 2H), 7,39 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H), 6,88 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 6,36-6,16 (m, 2H). **¹³C-NMR** (126 MHz, (CD₃)₂SO) δ 200.9, 167.1, 165.4, 164.8, 140.4, 135.1, 132.7, 130.4, 130.1, 129.8, 127.8, 113.7, 108.7, 102.9. **LC-MS (ESI)**: *m/z* [M-H⁺]⁻-ra számolt C₁₄H₉O₅ 257, mért 257.

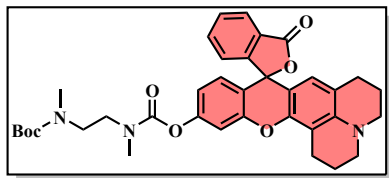
2-(12-oxo-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*,12*H*-kromen[2,3-*f*]pyrido[3,2,1-*ij*]kinolin-9-il)-benzoesav (rodol festék)^[8]



Bombacsőbe összemértem a benzofenon származékot (**22**) (260 mg, 1,00 mmol, 1 ekv) és 8-hidroxi-julolidint (190 mg, 1,00 mmol, 1 ekv), majd TFA (1,2 ml) oldószerben 95 °C-on forraltam egy éjszakán keresztül a reakcióelegyet. Másnap miután a reakcióelegy lehűlt szobahőmérsékletűre, az reakcióelegyet vákuum alatt bepároltam (CH₂Cl₂ használtam, mint segédoldószer). A terméket Et₂O (10 ml) segítségével kicsaptam, szűrtem és vákuum alatt szárítottam. A kapott termék 393 mg (90%) vörös szilárd anyag.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 8,37 (dd, *J* = 7,6, 1,5 Hz, 1H), 7,87 (td, *J* = 7,5, 1,6 Hz, 1H), 7,82 (td, *J* = 7,6, 1,5 Hz, 1H), 7,41 (dd, *J* = 7,4, 1,5 Hz, 1H), 7,16 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H), 7,14 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 6,94 (dd, *J* = 9,0, 2,3 Hz, 1H), 6,85 (s, 1H), 3,71-3,64 (m, 4H), 3,13 (t, *J* = 7,2, 5,6 Hz, 2H), 2,82-2,74 (m, 2H), 2,21-2,09 (m, 2H), 1,93-1,07 (m, 2H). **¹³C-NMR** (126 MHz, CD₃OD) δ 166,6, 166,0, 158,7, 156,1, 154,2, 153,4, 134,0, 132,5, 131,2, 130,8, 130,4, 130,2, 130,0, 127,3, 126,7, 116,2, 115,8, 114,9, 105,4, 101,8, 51,3, 50,8, 27,0, 20,0, 19,2, 19,1. **LC-MS (ESI)**: *m/z* [M+H⁺]⁺-ra számolt C₂₆H₂₂NO 412, mért 412.

***tert*-butil metil-(2-((((3'-oxo-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,3'*H*,5*H*-spiro[kromén[2,3-*f*]pirido[3,2,1-*ij*]kinolin-9,1'-izobenzofurán]-12-il)-oxi)-karbonil)-amino)-etil)-karbámat (23)^[8]**

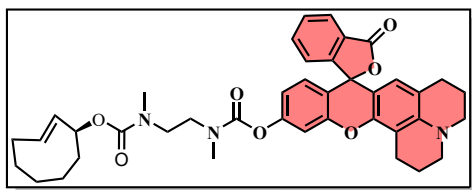


Összemértem az aktivált önfeláldozó linkert (**20**) (212 mg, 500 μ mol, 1 ekv), **rodol** festéket (206 mg, 500 μ mol, 1 ekv), DMAP-t (3,0 mg, 25,0 μ mol, 0,05 ekv) katalizátort, majd feloldottam MeCN-ben (20 ml). A reakcióelegyhez ezután

EDIPA (261 μ l, 1,5 mmol, 3 ekv) bázist csepegtettem. A reakcióelegyet 15 percig reflux hőmérsékleten kevertettem. Miután lehűl szobahőmérsékletűre, a reakcióelegyet vákuum alatt bepároltam. A nyersterméket flash oszlopkromatográfiával tisztítottam (CH_2Cl_2 – MeOH : 0 $\rightarrow$ 10%). A kapott termék 247 mg (80%) vörös szilárd anyag.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7,98 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,63 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 7,58 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 7,19-7,16 (m, 1H), 7,09 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 6,75-6,72 (m, 1H), 6,70 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 6,13 (s, 1H), 3,56-3,42 (m, 4H), 3,16 (t, J = 5,6 Hz, 2H), 3,12 (d, J = 5,8 Hz, 2H), 3,03 (s, 3H), 2,92-2,89 (m, 5H), 2,60-2,44 (m, 2H), 2,03-1,97 (m, 2H), 1,89-1,83 (m, 2H), 1,45 (s, 9H). **LC-MS (ESI):** m/z $[\text{M}+\text{H}^+]^+$ -ra számolt $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_7$ 626, mért 626.

***(S,E)*-ciclooct-2-én-1-il-(3'-oxo-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,3'*H*,5*H*-spiro[kromén[2,3-*f*]pirido[3,2,1-*ij*]kinolin-9,1'-izobenzofurán]-12-il)-etán-1,2-diilbis-(metilkarbamát) (rTCO-rodol)**

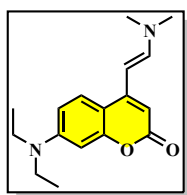


A Boc védett anyagot (**23**) (17,0 mg, 27,2 μ mol, 1 ekv) feloldottam CH_2Cl_2 -ban (1 ml), majd TFA-at (0,5 ml) csepegtettem az oldathoz. A reakcióelegyet 30 percen keresztül kevertettem szobahőmérsékleten. 30 perc

leteltével a reakcióelegyet vákuum alatt bepároltam (CH_2Cl_2 használtam, mint segédoldószer). A nyersterméket feloldottam MeCN (0,5 ml), majd belemértem **axiális rTCO-DSC**-ot (5,0 mg, 18,7 μ mol, 0,67 ekv). A reakcióelegyhez ezután EDIPA oldatot (25 μ l, 140 μ mol, 5 ekv, 0,5 ml MeCN) csepegtettem, intenzív keverés mellett. A reakcióelegyet 15 percig kevertettem szobahőmérsékleten, 15 perc leteltével a reakcióelegyet vákuum alatt bepároltam. A nyersterméket preparatív HPLC-vel tisztítottam ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 95:5 + 0,1% HCOOH – MeCN + 0,1% HCOOH : 0 $\rightarrow$ 100%). A kapott termék 9,1 mg (72%) vörös szilárd anyag.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8,00 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,67-7,62 (m, 1H), 7,59 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,12-7,07 (m, 1H), 6,72 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 6,14 (s, 1H), 5,77 (s, 1H), 5,53 (d, *J* = 16,3 Hz, 1H), 5,38 (d, *J* = 16,4 Hz, 1H), 5,30 (s, 1H), 3,66-3,46 (m, 4H), 3,18 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H), 3,16-3,09 (m, 4H), 3,07-2,97 (m, 5H), 2,94-2,88 (m, 2H), 2,61-2,46 (m, 2H), 2,02 (dt, *J* = 11,8, 5,8 Hz, 5H), 1,88 (qd, *J* = 6,7, 4,4 Hz, 3H), 1,73-1,60 (m, 2H), 1,30 (d, *J* = 13,9 Hz, 1H), 1,06 (s, 1H), 0,92-0,73 (m, 2H). **LC-MS (ESI):** *m/z* [M+H]⁺-ra számolt C₄₀H₄₄N₃O₇ 678, mért 678.

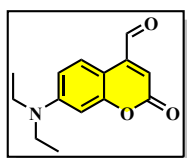
(*E*)-7-(dietilamino)-4-(2-(dimetilamino)-vinil)-2*H*-kromén-2-on (25)^[69]



A 4-metilkumarin származékot (**24**) (10,0 g, 43,23 mmol, 1 ekv) feloldottam DMF-ban (100 ml), majd DMF-DMA-ot (11,49 ml, 86,47 mmol, 2 ekv) mértem az oldathoz. A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül reflux hőmérsékleten kevertettem. Másnap miután a reakcióelegy lehűlt szobahőmérsékletűre, a reakcióelegyet CH₂Cl₂-nal (200 ml) hígítottam, majd telített NaHCO₃ oldattal (200 ml) mostam. A vizes fázist CH₂Cl₂-nal (2×100 ml) extraháltam, majd az egyesített szerves fázist telített sóoldattal (100 ml) mostam, MgSO₄-on szárítottam, szűrtem és vákuum alatt bepároltam. A terméket átkristályosítással tisztítottam EtOAc-hexán (40 ml EtOAc, 110 ml hexán). A kapott termék 12,13 g (98%) barna szilárd anyag.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,53 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 7,23 (d, *J* = 13,0 Hz, 1H), 6,55 (dd, *J* = 9,0, 2,7 Hz, 1H), 6,50 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H), 5,86 (s, 1H), 5,23 (d, *J* = 13,0 Hz, 1H), 3,41 (q, *J* = 7,1 Hz, 4H), 3,00 (s, 6H), 1,20 (t, *J* = 7,0 Hz, 6H). **¹³C-NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 163,4, 156,3, 152,3, 150,1, 146,5, 124,8, 108,1, 107,8, 98,1, 93,4, 87,4, 44,6, 12,5. **LC-MS (ESI):** *m/z* [M+H]⁺-ra számolt C₁₇H₂₃N₂O₂ 287, mért 287.

7-(diethylamino)-2-oxo-2*H*-kromén-4-karbaldehid (26)^[69]

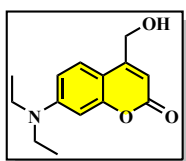


Az énamint (**25**) (12,14 g, 42,39 mmol, 1 ekv) feloldottam THF-H₂O elegyében (50 ml THF, 50 ml H₂O), majd a reakcióelegybe NaIO₄-ot (27,20 g, 127,18 mmol, 3 ekv) adtam, intenzív keverés közben. A reakcióelegyet 1,5 órán keresztül kevertettem szobahőmérsékleten. A kivált szerves fázist szűrtem, EtOAc-tal (50 ml) mostam. A reakcióelegyet vákuum alatt bepároltam (vizet nem pároltam le). A szuszpenziót telített NaHCO₃ oldattal (200 ml) hígítottam, majd CH₂Cl₂-nal (3×100 ml) extraháltam. Az egyesített szerves fázist telített sóoldattal (100 ml) mostam, MgSO₄-on szárítottam, szűrtem és vákuum alatt bepároltam. A nyersterméket flash

oszlopkromatográfiával tisztítottam (hexán – EtOAc : 0 → 50%). A kapott termék 5,03 g (48%) vörösbarna szilárd anyag.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 10,04 (s, 1H), 8,33 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 6,66 (dd, *J* = 9,2, 2,6 Hz, 1H), 6,56 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H), 6,47 (s, 1H), 3,44 (q, *J* = 7,1 Hz, 4H), 1,23 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H). **¹³C-NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 192,4, 161,7, 157,3, 150,7, 143,9, 127,1, 117,7, 109,9, 104,2, 98,2, 45,1, 12,4. **LC-MS (ESI):** *m/z* [M+H]⁺-ra számolt C₁₄H₁₆NO₃ 246, mért 246.

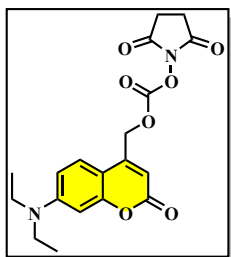
7-(dietilamino)-4-(hidroximetil)-2*H*-kromén-2-on (DEAC)^[69]



Kumarin aldehidet (**26**) (5,03 g, 20,51 mmol, 1 ekv) feloldottam THF-ban (50 ml), majd NaBH₄-et (1,55 g, 41,01 mmol, 2 ekv) adagoltam a reakcióelegyhez. A reakcióelegyet 2 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, majd telített NaHCO₃ oldattal (100 ml) hígítottam a reakcióelegyet. Az elegyet CH₂Cl₂-nal (3×150 ml) extraháltam, az egyesített szerves fázist telített sóoldattal (100 ml) mostam, MgSO₄-on szárított, szűrtem és vákuum alatt bepárooltam. A nyersteget flash oszlopkromatográfiával tisztítottam (hexán – EtOAc : 0 → 50%). A kapott termék 4,94 g (97%) sárga szilárd anyag.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,29 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 6,53 (dd, *J* = 9,0, 2,6 Hz, 1H), 6,43 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H), 6,26 (t, *J* = 1,4 Hz, 1H), 4,80 (s, 2H), 3,37 (q, *J* = 7,1 Hz, 4H), 1,97 (t, *J* = 6,2 Hz, 1H), 1,17 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H). **¹³C-NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 163,2, 156,1, 155,6, 150,6, 124,5, 108,8, 106,4, 105,1, 97,7, 60,8, 44,8, 12,5. **LC-MS (ESI):** *m/z* [M+H]⁺-ra számolt C₁₄H₁₈NO₃ 248, mért 248.

(7-(dietilamino)-2-oxo-2*H*-kromén-4-il)-metil-(2,5-dioxociclopentil)-karbonát (DEAC-DSC)^[69]

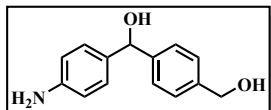


Végig sötétbe dolgozva összemértem DEAC-t (100 mg, 404 μmol, 1 ekv) és DSC-ot (310 mg, 1,21 mmol, 3 ekv), majd feloldottam CH₂Cl₂-nal (10 ml, amilénnel stabilizált). A reakcióelegyhez hozzácepegtettem piridint (163 μl, 2,02 mmol, 5 ekv) és a reakcióelegyet 2 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem. A reakcióelegyet CH₂Cl₂-nal (40 ml, amilénnel stabilizált) hígítottam, majd telített NaHCO₃ oldattal (3×50 ml) mostam, ezután telített sóoldattal (50 ml) is mostam, a szerves fázist MgSO₄-on szárítottam, szűrtem és vákuum

alatt bepároltam. Kvantitatív termeléssel a kívánt terméket kaptam, amit további tisztítás nélkül használtam fel.

LC-MS (ESI): m/z $[M+H]^+$ -ra számolt $C_{20}H_{22}NO_7$ 388, mért 388.

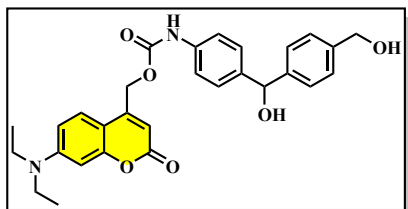
(4-aminofenil)(4-(hidroximetil)-fenil)-metanol (27)



A 2-es (105 mg, 405 μ mol, 1 ekv) molekulát feloldottam EtOH-ban (5 ml), majd Pd/C (10%-os, 21,5 mg, 20,25 μ mol, 0,05 ekv) adtam az oldathoz és Et_3N (169 μ l, 1,21 mmol, 3 ekv) bázissal mérgeztem a katalizátor. A reakcióelegyet 2 órán keresztül H_2 atmoszféra (1 atm) alatt kevertettem szobahőmérsékleten. 2 óra leteltével a reakcióelegyet fecskendőszűrővel szűrtem, vákuum alatt bepároltam a reakcióelegyet. A termék oszlopkromatográfiás tisztítás során elbomlik, így további tisztítás nélkül használtam fel.

LC-MS (ESI): m/z $[M+H]^+$ -ra számolt $C_{14}H_{16}NO_2$ 230, mért 230.

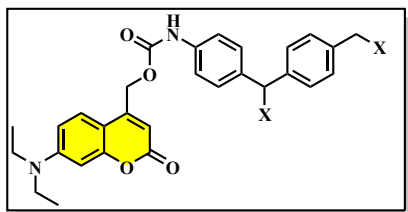
(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-kromén-4-il)-metil-(4-(hidroxi-(4-(hidroximetil)-fenil)-metil)-fenil)-karbámat (28)



Végig sötétbe dolgozva összemértem **DEAC-DSC** (156 mg, 403 μ mol, 1 ekv) és a **27-es** (92 mg, 403 μ mol, 1 ekv) molekulát, majd feloldottam absz MeCN-ban (3 ml), majd EDIPA (210 μ l, 1,21 mmol, 3 ekv) bázist csepegtettem a reakcióelegyhez. A reakcióelegyet 2 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertetem, majd vákuum alatt bepároltam. A nyersterméket flash oszlopkromatográfiával tisztítottam (CH_2Cl_2 – MeOH : 0 $\rightarrow$ 10%). A kapott termék 78 mg (38%) sárga szilárd anyag.

1H -NMR (500 MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 9,87 (s, 1H), 7,48 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 7,40 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 7,31-7,26 (m, 4H), 7,23 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 6,71 (dd, J = 9,0, 2,7 Hz, 1H), 6,55 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 6,08 (s, 1H), 5,74 (d, J = 3,7 Hz, 1H), 5,63 (s, 1H), 5,33 (s, 2H), 5,06 (s, 1H), 4,45 (s, 2H), 3,43 (q, J = 7,0 Hz, 4H), 1,12 (t, J = 7,0 Hz, 6H). **^{13}C -NMR** (126 MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 162,3, 160,7, 155,8, 152,7, 151,3, 150,5, 144,2, 140,8, 137,3, 126.,7, 126,2, 125,9, 125,4, 118,1, 108,8, 105,3, 104,9, 96,9, 73,7, 62,7, 61,3, 44,0, 12,3. **LC-MS (ESI):** m/z $[M-H]^+$ -ra számolt $C_{29}H_{31}N_2O_6$ 503, mért 503.

(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-kromén-4-il)-metil-(4-(hidroxi-(4-(hidroximetil)-fenil)-metil)-fenil)-karbámat szubsztitúciók (29)



Próba A (X = Br)

Végig sötétbe dolgozva a kumarin linkert (**28**) (25 mg, 49,7 μmol , 1 ekv) feloldottam absz MeCN-ben (2 ml), majd a reakcióelegybe bemértem PPh_3 -t (39 mg, 149 μmol , 3 ekv) és CBr_4 -ot (49,5 mg, 149 μmol , 3 ekv). A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, Ar atmoszféra alatt. LC-MS vizsgálat alapján az egyik hidroxilcsoporton megtörtént a szubsztitúció, a másik hidroxilcsoporton nem. A reakcióelegyet ezután egy éjszakán keresztül 50 °C-on kevertettem. LC-MS vizsgálat alapján a kiindulási anyag elbomlott (2 és 4 órás LC-MS vizsgálat alapján a reakcióelegy nem tartalmazott terméket).

Próba B (X = Br)

Végig sötétbe dolgozva a kumarin linkert (**28**) (25 mg, 49,7 μmol , 1 ekv) feloldottam absz MeCN-ben (2 ml), majd a reakcióelegybe bemértem AcBr-ot (11 μl , 149 μmol , 3 ekv). A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, Ar atmoszféra alatt. LC-MS vizsgálat alapján az egyik hidroxilcsoporton megtörtént a szubsztitúció, a másik hidroxilcsoporton nem. A reakcióelegyet ezután egy éjszakán keresztül 50 °C-on kevertettem. LC-MS vizsgálat alapján a kiindulási anyag elbomlott (3 órás LC-MS vizsgálat alapján a reakcióelegy nem tartalmazott terméket).

Próba C (X = Br)

Végig sötétbe dolgozva a kumarin linkert (**28**) (25 mg, 49,7 μmol , 1 ekv) feloldottam absz MeCN (2 ml)-ben, majd a reakcióelegybe bemértem PBr_3 -ot (14 μl , 149 μmol , 3 ekv). A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, Ar atmoszféra alatt. LC-MS vizsgálat alapján az egyik hidroxilcsoporton megtörtént a szubsztitúció, a másik hidroxilcsoporton nem. A reakcióelegyet ezután egy éjszakán keresztül 50 °C-on kevertettem, Ar atmoszféra alatt. LC-MS vizsgálat alapján a kiindulási anyag elbomlott (3 órás LC-MS vizsgálat alapján a reakcióelegy nem tartalmazott terméket).

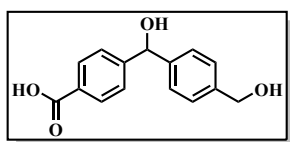
Próba D (X = OMs)

Végig sötétbe dolgozva a kumarin linkert (**28**) (25 mg, 49,7 μmol , 1 ekv) feloldottam absz MeCN-ben (2 ml), majd a reakcióelegybe bemértem EDIPA (43 μl , 249 μmol , 5 ekv) bázist, majd MsCl-ot (11,5 μl , 149 μmol , 3 ekv). A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, Ar atmoszféra alatt. LC-MS vizsgálat alapján az egyik hidroxilcsoporton megtörtént a szubsztitúció, a másik hidroxilcsoporton nem. A reakcióelegyet ezután egy éjszakán keresztül 50 °C-on kevertettem. LC-MS vizsgálat alapján a kiindulási anyag elbomlott (3 órás LC-MS vizsgálat alapján a reakcióelegy nem tartalmazott terméket).

Próba D (X = OTs)

Végig sötétbe dolgozva a kumarin linkert (**28**) (25 mg, 49,7 μmol , 1 ekv) feloldottam absz MeCN-ben (2 ml), majd a reakcióelegybe bemértem EDIPA (43 μl , 249 μmol , 5 ekv) bázist, majd TsCl-ot (28,5 mg, 149 μmol , 3 ekv). A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, Ar atmoszféra alatt. LC-MS vizsgálat alapján az egyik hidroxilcsoporton megtörtént a szubsztitúció, a másik hidroxilcsoporton nem. A reakcióelegyet ezután egy éjszakán keresztül 50 °C-on kevertettem. LC-MS vizsgálat alapján a kiindulási anyag elbomlott (3 órás LC-MS vizsgálat alapján a reakcióelegy nem tartalmazott terméket).

4-(hidroxi-(4-(hidroximetil)-fenil)-metil)-benzoesav (**32**)

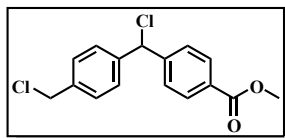


Kihevített lombikba bemértem 4-brómbenzil alkoholt (**4**) (934 mg, 5,00 mmol, 1,5 ekv), majd Ar atmoszféra alatt feloldottam absz THF-ban (20 ml). Az oldathoz -78 °C-on lassan hozzácsepegtettem n-BuLi-ot (2,5 M hexános oldat, 5,33 ml, 13,32 mmol, 4 ekv). 30 perc leteltével az oldathoz -78 °C-on hozzácsepegtettem 4-formilbenzoesav oldatot (500 mg, 3,33 mmol, 1 ekv, 20 ml absz THF, Ar atmoszféra). Az elegyet további 30 percet kevertettem -78 °C-on, majd 3 órán keresztül 0 °C-on. 3 óra leteltével az oldathoz vizet (2 ml) csepegtettem, majd vákuum alatt bepároltam. A nyerstermék tisztítását fordított fázisú flash oszlopkromatográfiával ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 95:5 + 0,1% HCOOH – MeCN + 0,1% HCOOH : 0 $\rightarrow$ 100%). Liofilizáció után a kapott termék 478 mg (56%) fehér szilárd anyag.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 7,83 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,28 (dd, J = 11,6, 7,9 Hz, 4H), 7,22 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 5,68 (s, 1H), 4,43 (s, 2H). **$^{13}\text{C-NMR}$** (126 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 183,2,

174,0, 171,4, 168,2, 165,1, 156,2, 153,4, 153,2, 152,3, 101,3, 89,9. **LC-MS (ESI):** $[M+H]^+$ -ra számolt $C_{15}H_{13}O_4$ 257, mért 257.

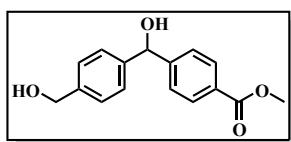
metil 4-(klór-(4-(klórmetil)-fenil)-metil)-benzoát (33)



32-es (200 mg, 774 μ mol, 1 ekv) molekulát absz MeCN-ben (500 μ l) szuszpendáltam, majd $SOCl_2$ -ot (560 μ l, 7,74 mmol, 10 ekv) adtam a szuszpenzióhoz. A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem Ar atmoszféra alatt. Másnap a reakcióelegybe MeOH-t (2 ml) csepegtettem, és 30 percen keresztül szobahőmérsékleten kevertettem a reakcióelegyet. A reakcióelegyet jeges vízre (30 ml) öntöttem, majd CH_2Cl_2 -nal (3 $\times$ 30 ml) extraháltam. Az egyesített szerves fázist telített sóoldattal (30 ml) mostam, $MgSO_4$ -on szárítottam, szűrtem és vákuum alatt bepárooltam. A nyersterméket flash oszlopkromatográfiával tisztítottam (hexán – EtOAc : 0 $\rightarrow$ 50%). A kapott termék 191 mg (79%) fehér szilárd anyag.

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8,02 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 7,48 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,38 (s, 4H), 6,13 (s, 1H), 4,57 (s, 2H), 3,91 (s, 3H), 1,58 (s, 1H). **^{13}C -NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 166,7, 145,6, 140,8, 137,8, 130,1, 129,1, 129,0, 128,3, 127,9, 63,2, 52,3, 45,7. **LC-MS (ESI):** nem ionizál.

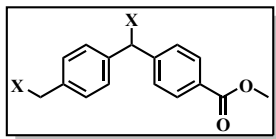
metil 4-(hidroxi-(4-(hidroximetil)-fenil)-metil)-benzoát (34)



32-es (150 mg, 580 μ mol, 1 ekv) molekulát MeOH-ban (5 ml) szuszpendáltam, majd $SOCl_2$ -ot (84 μ l, 1,16 mmol, 2 ekv) csepegtettem a reakcióelegyhez. A reakcióelegyet 2 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, majd jeges vízre (30 ml) öntöttem és CH_2Cl_2 -nal (3 $\times$ 30 ml) extraháltam. Az egyesített szerves fázist telített sóoldattal (30 ml) mostam, $MgSO_4$ -on szárítottam, szűrtem és vákuum alatt bepárooltam. A nyersterméket flash oszlopkromatográfiával tisztítottam (CH_2Cl_2 – MeOH : 0 $\rightarrow$ 10%). A kapott termék 148 mg (94%) fehér szilárd anyag.

LC-MS (ESI): nem ionizál.

metil 4-(hidroxi-(4-(hidroximetil)-fenil)-metil)-benzoát szubsztitúciók (35)



Próba A (X = Br)

Metil észtert (**34**) (25 mg, 92 μmol , 1 ekv) feloldottam absz MeCN-ben (2 ml), majd a reakcióelegybe bemértem PPh_3 -t (72 mg, 275 μmol , 3 ekv) és CBr_4 -ot (91 mg, 275 μmol , 3 ekv). A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, Ar atmoszféra alatt. LC-MS vizsgálat alapján az egyik hidroxilcsoporton megtörtént a szubsztitúció, a másik hidroxilcsoporton nem. A reakcióelegyet ezután egy éjszakán keresztül 50 °C-on kevertettem, de nem történt változás a reakcióelegyben.

Próba B (X = Br)

Metil észtert (**34**) (25 mg, 92 μmol , 1 ekv) feloldottam absz MeCN-ben (2 ml), majd a reakcióelegybe bemértem AcBr-ot (20,5 μl , 275 μmol , 3 ekv). A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, Ar atmoszféra alatt. A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, Ar atmoszféra alatt. LC-MS vizsgálat alapján az egyik hidroxilcsoporton megtörtént a szubsztitúció, a másik hidroxilcsoporton nem. A reakcióelegyet ezután egy éjszakán keresztül 50 °C-on kevertettem, de nem történt változás a reakcióelegyben.

Próba C (X = Br)

Metil észtert (**34**) (25 mg, 92 μmol , 1 ekv) feloldottam absz MeCN-ben (2 ml), majd a reakcióelegybe bemértem PBr_3 -ot (26 μl , 275 μmol , 3 ekv). A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, Ar atmoszféra alatt. A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, Ar atmoszféra alatt. LC-MS vizsgálat alapján az egyik hidroxilcsoporton megtörtént a szubsztitúció, a másik hidroxilcsoporton nem. A reakcióelegyet ezután egy éjszakán keresztül 50 °C-on kevertettem, de nem történt változás a reakcióelegyben.

Próba D (X = OMs)

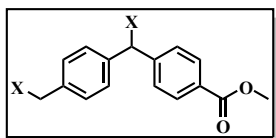
Metil észtert (**34**) (25 mg, 92 μmol , 1 ekv) feloldottam absz MeCN-ben (2 ml), majd a reakcióelegybe bemértem EDIPA (80 μl , 459 μmol , 5 ekv) bázist, majd MsCl -ot (21 μl , 275 μmol , 3 ekv). A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, Ar atmoszféra alatt. LC-MS vizsgálat alapján az egyik hidroxilcsoporton megtörtént a

szubsztitúció, a másik hidroxilcsoporton nem. A reakcióelegyet ezután egy éjszakán keresztül 50 °C-on kevertetem, de nem történt változás a reakcióelegyen.

Próba D (X = OTs)

Metil észtert (**34**) (25 mg, 92 μ mol, 1 ekv) feloldottam absz MeCN (2 ml), majd a reakcióelegybe bemértem EDIPA (80 μ l, 459 μ mol, 5 ekv) bázist, majd TsCl-ot (52,5 mg, 275 μ mol, 3 ekv). A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten kevertetem, Ar atmoszféra alatt. LC-MS vizsgálat alapján az egyik hidroxilcsoporton megtörtént a szubsztitúció, a másik hidroxilcsoporton nem. A reakcióelegyet ezután egy éjszakán keresztül 50 °C-on kevertetem, de nem történt változás a reakcióelegyen.

metil 4-(klór-(4-(klórmetil)-fenil)-metil)-benzoát szubsztitúciók (**35**)



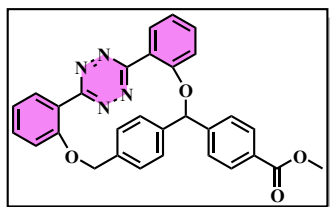
Próba A (X = Br)

Metil észtert (**33**) (50 mg, 162 μ mol, 1 ekv) feloldottam absz MeCN (5 ml), majd a reakcióelegybe bemértem KBr-ot (58 mg, 485 μ mol, 3 ekv). A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül 50 °C-on kevertetem, Ar atmoszféra alatt. LC-MS vizsgálat egyszeres szubsztitúció történt csak meg.

Próba A (X = I)

Metil észtert (**33**) (50 mg, 162 μ mol, 1 ekv) feloldottam acetonban (5 ml), majd a reakcióelegybe bemértem NaI-ot (73 mg, 485 μ mol, 3 ekv). A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül 50 °C-on kevertetem, Ar atmoszféra alatt. LC-MS vizsgálat alapján egyszeres szubsztitúció történt csak meg.

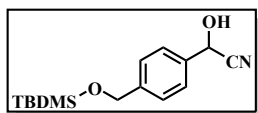
metil 4-(4,8-dioxa-2(3,6)-tetrazin-1,3(1,2),6(1,4)-tribenzolciklooktafán-5-il)-benzoát (**36**)



Összemértem tetrazin (**Tz**) (25 mg, 94 μ mol, 1 ekv), halogénezett linkert (**3**) (34,5 mg, 113 μ mol, 1,2 ekv), K₂CO₃-ot (39 mg, 282 μ mol, 3 ekv) és KI-ot (46,5 mg, 282 μ mol, 3 ekv), majd Ar atmoszféra alatt feloldottam absz DMF-ban (5 ml). A reakcióelegyet 2 órán keresztül kevertetem 50 °C-on. LC-MS alapján több mint 15 melléktermék keletkezett.

A reakciót megismételtem ugyanilyen körülmények között annyi különbséggel, hogy sokkal higabb reakcióelegyet használtam (20 ml absz DMF). LC-MS alapján így is számtalan melléktermék keletkezett.

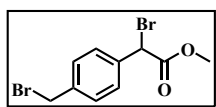
2-(4-(((*tert*-butildimetilszilil)-oxi)-metil)-fenil)-2-hidroxiacetonitril (37)



Kétnyakú lombikban TBDMS védett 4-(hidroximetil)-benzaldehydet (**9**) (2,50 g, 10 mmol, 1 ekv) feloldottam CHCl₃-ban (10 ml), majd MgBr₂·Et₂O (129 mg, 500 μmol, 0,05 ekv) Lewis-bázis adtam a reakcióelegyhez. A reakcióelegyhez lassan hozzátsepegtettem TMS-CN-ot (1,50 ml, 12 mmol, 1,2 ekv) (**HCN gáz fejlődik!**). A reakcióelegyet egy órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, majd telített Na₂S₂O₃ oldattal (10 ml) csepegtettem a reakcióelegyhez. A reakcióelegyet telített Na₂S₂O₃ oldattal (40 ml) hígítottam, majd CH₂Cl₂-nal (3×50 ml) extraháltam. Az egyesített szerves fázist telített sóoldattal (50 ml) mostam, MgSO₄-on szárítottam, szűrtem, majd vákuum alatt bepároltam. A nyersterméket flash oszlopkromatográfiával tisztítottam (izokratikus, CH₂Cl₂). A kapott termék 1,43 g (52%) szintelen viszkózus folyadék.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,46 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,38 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 5,45 (s, 1H), 4,76 (s, 2H), 3,68 (s, 1H), 0,96 (s, 9H), 0,12 (s, 6H). **¹³C-NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 143,3, 134,1, 126,8, 126,8, 119,1, 64,6, 63,4, 26,1, 18,5, -5,2. **LC-MS (ESI)**: nem ionizál.

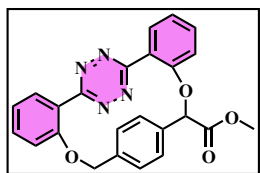
metil 2-bróm-2-(4-(brómmetil)-fenil)-acetát (38)



A nitrilt (**37**) (200 mg, 721 μmol, 1 ekv) feloldottam cc HBr (2,5 ml) és cc H₂SO₄ (1,0 ml) elegyében, majd egy órán keresztül 100 °C-on forraltam. Miután a reakcióelegy lehűlt szobahőmérsékletűre, a reakcióelegyet hideg telített sóoldatra (50 ml) öntöttem, majd EtOAc-tal (5×50 ml) extraháltam. Az egyesített szerves fázist telített sóoldattal (50 ml) mostam, MgSO₄-on szárítottam szűrtem és vákuum alatt bepároltam. A kapott barnás szilárd anyagot MeOH-ban (5 ml) szuszpendáltam, majd SOCl₂-ot (262 μl, 3,60 mmol, 5 ekv) csepegtettem a reakcióelegyhez. A reakcióelegyet egy órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, majd jeges vízre (50 ml) öntöttem. A vizes fázist CH₂Cl₂-nal (3×50 ml) extraháltam, az egyesített szerves fázist telített sóoldattal (50 ml) mostam, MgSO₄-on szárítottam szűrtem és vákuum alatt bepároltam. A nyersterméket flash oszlopkromatográfiával tisztítottam (hexán – EtOAc : 0 → 25%). A kapott termék 119 mg (54%) szintelen viszkózus folyadék.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,52 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 7,39 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 5,34 (s, 1H), 4,47 (s, 2H), 3,79 (s, 3H). **¹³C-NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 168,7, 139,1, 136,0, 129,6, 129,3, 53,6, 46,0, 32,6. **LC-MS (ESI)**: nem ionizál.

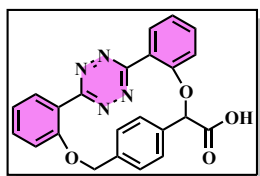
metil 4-(4,8-dioxa-2(3,6)-tetrazin-1,3(1,2),6(1,4)-tribenzolciklooktafán-5-il)-benzoát (39)



Összemértem tetrazin (**Tz**) (48 mg, 180 μmol, 1 ekv), halogénezett linkert (**38**) (58 mg, 180 μmol, 1 ekv), K₂CO₃-ot (74,5 mg, 541 μmol, 3 ekv) és KI-ot (90 mg, 541 μmol, 3 ekv), majd Ar atmoszféra alatt feloldottam absz DMF-ban (12 ml). A reakcióelegyet egy órán keresztül kevertettem 40 °C-on. Miután a reakcióelegy lehűlt szobahőmérsékletűre a reakcióelegyet vízre (30 ml) öntöttem, majd CH₂Cl₂-nal (3×30 ml) extraháltam. Az egyesített szerves fázist telített sóoldattal (30 ml) mostam, MgSO₄-on szárítottam, szűrtem, majd vákuum alatt bepároltam. A nyersterméket flash oszlopkromatográfiával tisztítottam (hexán – EtOAc : 0 → 75%). A kapott termék 17 mg (18%) rózsaszín szilárd anyag.

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN) δ 8,12 (dd, *J* = 7,8, 1,7 Hz, 1H), 8,03 (dd, *J* = 7,8, 1,7 Hz, 1H), 7,77 (tt, *J* = 7,9, 2,2 Hz, 2H), 7,51-7,43 (m, 5H), 7,07 (dd, *J* = 7,6, 1,8 Hz, 1H), 6,87 (dd, *J* = 7,9, 1,9 Hz, 1H), 6,62 (dd, *J* = 7,7, 1,9 Hz, 1H), 6,49 (dd, *J* = 7,9, 1,8 Hz, 1H), 5,19 (d, *J* = 11,4 Hz, 2H), 4,64 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H), 3,76 (s, 3H). **¹³C NMR** (126 MHz, CD₃CN) δ 170,4, 164,2, 163,9, 159,2, 157,7, 137,7, 136,0, 135,4, 135,2, 132,0, 131,7, 131,2, 130,3, 130,3, 129,4, 129,4, 128,1, 126,4, 125,7, 125,4, 125,1, 87,4, 80,1, 53,2. **LC-MS (ESI)**: *m/z* [M+H]⁺-ra számolt C₃₀H₂₃N₄O₄ 503, mért 503.

4-(4,8-dioxa-2(3,6)-tetrazin-1,3(1,2),6(1,4)-tribenzolciklooktafán-5-il)-bezoesav (40)

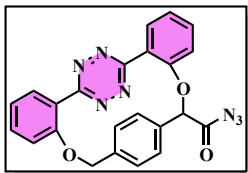


A metil észtert (**39**) (17 mg, 34 μmol, 1 ekv) feloldottam 1,4-dioxánban (3 ml). Intenzív keverés mellett a reakcióelegyhez LiOH oldatot (2,4 mg, 101 μmol, 3 ekv, 1 ml H₂O) csepegtettem. (A reakció legelején 1,5 ekv LiOH-ot, majd 1 óra leteltével további 1,5 ekv LiOH-ot.) A reakcióelegyet 2 órán keresztül kevertettem szobahőmérsékleten. 2 óra leteltével a reakcióelegyet CH₂Cl₂-H₂O (25 ml CH₂Cl₂, 25 ml H₂O) elegyére öntöttem. Intenzív keverés mellett a kétfázisú elegyhez pár csepp sósav oldatot (2 M) csepegtettem. A fázisokat extrakcióval elválasztottam, majd a vizes fázist CH₂Cl₂-nal (2×25 ml) extraháltam. Az egyesített szerves fázist vákuum alatt bepároltam. A nyerstermék fordított fázisú flash

oszlopkromatográfiával tisztítottam (H₂O/MeCN 95:5 + 0,1% HCOOH – MeCN + 0,1% HCOOH : 0 → 100%). A kapott termék 13,5 mg (82%) rózsaszín szilárd anyag.

LC-MS (ESI): m/z [M+H]⁺-ra számolt C₂₉H₂₁N₄O₄ 489, mért 489.

4-(4,8-dioxa-2(3,6)-tetrazin-1,3(1,2),6(1,4)-tribenzolciklooktafán-5-il)-benzoil azid (41)

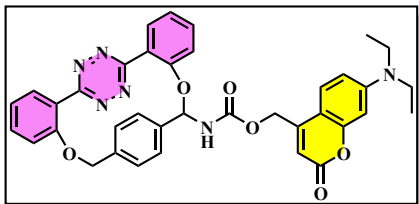


A savat (**40**) (13,5 mg, 27,6 μmol, 1 ekv) Ar atmoszféra alatt feloldottam absz PhMe-ban (2 ml). A reakcióelegyhez DPPA-ot (8,9 μl, 41,5 μmol, 1,5 ekv) és EDIPA (9,6 μl, 55,3 μmol, 2 ekv) bázist csepegtettem. A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem.

Másnap a reakcióelegyet vákuum alatt bepároltam (30 °C-on). A nyersterméket flash oszlopkromatográfiával tisztítottam (hexán – EtOAc : 0 → 25%). A kapott termék 9,8 mg (69%) rózsaszín szilárd anyag.

LC-MS (ESI): m/z [M+H]⁺-ra számolt C₂₉H₂₀N₇O₃ 514, mért 514.

(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-kromén-4-il)metil-4,8-dioxa-2(3,6)-tetrazin-1,3(1,2),6(1,4)-tribenzolciklooktafán -5-il-karbamát (DEAC-α-alkoxi-karbamát-Tz)



A savazidot (**41**) (9,8 mg, 20,2 μmol, 1 ekv) Ar atmoszféra alatt feloldottam absz PhMe-ban (3 ml), majd a reakcióelegyet 80 °C-on kevertettem 15 percet. A reakcióelegy miután lehűlt szobahőmérsékletűre reakcióelegyhez hozzáadtam **DEAC**-t (5,0 mg, 20,2 μmol, 1 ekv) és dibutil-ón-dilaurátot (6 μl, 10,1 μmol, 0,5 ekv). (Ezután végig sötétbe dolgoztam.) A reakcióelegyet 2 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, majd vákuum alatt bepároltam a reakcióelegyet. A nyersterméket preparatív HPLC-vel tisztítottam (H₂O/MeCN 95:5 + 0,1% HCOOH – MeCN + 0,1% HCOOH : 0 → 100%). LC-MS alapján a terméket nem sikerült elválasztanom az **aldehid-Tz** mellékterméktől. (Normál fázisú flash oszlopkromatográfia során (hexán – EtOAc : 0 → 100%), a termék lebomlik.) A kapott koszos termék 2,8 mg rózsaszín szilárd anyag.

LC-MS (ESI): m/z [M+H]⁺-ra számolt C₃₇H₃₃N₆O₆ 657, mért 657.

FEJEZET VI

Összefoglalás

Kutatómunkám során olyan inaktivált tetrazinok előállítása volt a célom, amelyek csak hipoxiás körülmények között, vagy fénybesugárzás hatására alakulnak reaktívvá *transz*-ciklookténekkel szemben. Ehhez először egy nitroreduktáz enzim által felismert funkciós csoportot építettem be a makrociklusba (**NTR-Tz**). A szintetizált tetrazin a várakozásnak megfelelően nem reagált TCO-nel. *In vitro* körülmények között kémiai úton redukálva a nitrocsoporthat sikerült felnyitni a makrociklust, azonban ez minden esetben a tetrazin gyűrű redukálódásával járt együtt. Ahhoz, hogy biológiai körülmények között, enzimkatalizált reakcióban is vizsgálni tudjuk, előállítottam az **rTCO-rodol** fluorogén jelzővegyületet. Ezek során azt tapasztaltuk, hogy enzim hiányában nem reagálnak egymással, mivel nem történt fluoreszcencia intenzitás növekedés, és LC-MS-sel is csak a kiindulási anyagokat tudtuk kimutatni. Sajnos azonban NTR enzim jelenlétében sem történt fluoreszcencia intenzitás növekedés, és LC-MS vizsgálat alapján megállapítottam, hogy a makrociklus nem nyílt fel. Ennek valószínűsíthető oka, hogy az **NTR-Tz** nitroaril régiója nem fér be az enzim kötőzsebébe, az nem tudta elvégezni a redukciós lépést, így új makrociklusokat terveztem szintetizálni. Ezekben a nitrofenil egység (**NTR-Tz-2**) vagy a kumarin fotolabilis védőcsoport (**kumarin-Tz**) egy *p*-amino-benzilalkohol önfeláldozó linkerrel keresztül kapcsolódik a makrociklushoz. Azonban a linkerrel a karbamát kötés kialakítása után nem sikerült a hidroxilcsoportokat a makrociklizációs lépéshez szükséges brómra cserélnem, így új szintézisutat dolgoztam ki. Ebben Curtius lebontással a legvégén alakítom ki a karbamát kötet a makrocikluson. Az új linkerrel (**35**) sikerült a szubsztitúciót végrehajtanom, de a makrociklizálást nem, így ennek megvalósítása még folyamatban van. Egy új makrociklust is terveztem, melyben a fénnel aktiválható felnyílásért egy védett hemiaminál részlet felel (**DEAC- α -alkoxi-karbamát-Tz**). Ezt a karbonsav-funkcionalizált makrociklusból Curtius lebontással állítottam elő. A melléktermékként **aldehid-Tz** szennyezőt tartalmazó termékkel ígéretes előzetes LC-MS vizsgálatokat végeztem TCO-nel, melyek során bevilágítás nélkül nem történt reakció, bevilágítás hatására viszont a makrociklus felnyílt és keletkezett a várt klikk termék.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Cserép Balázs Gergelynek, aki a szintetikus munkában segített, akármilyen probléma is merült fel.

Továbbá köszönettel tartozom a Kémiai Biológia Kutatócsoport vezetőjének, Dr. Kele Péternek a lehetőségért, hogy a Kémiai Biológia Kutatócsoportban dolgozhattam.

Köszönettel tartozom a Kémiai Biológia Kutatócsoport minden egyes tagjának – különösen Dr. Koromos Attilának az rCCO szintézisét és Dr. Németh Krisztinának az NTR enzimes biológiai vizsgálatokért.

Illetve szeretném megköszönni szüleimnek és barátaimnak a végtelen támogatásukat.

- [1] U. Anand, A. Dey, A. K. S. Chandel, R. Sanyal, A. Mishra, D. K. Pandey, V. De Falco, A. Upadhyay, R. Kandimalla, A. Chaudhary, J. K. Dhanjal, S. Dewanjee, J. Vallamkondu, J. M. Pérez de la Lastra, *Genes Dis.* **2023**, *10*, 1367–1401.
- [2] J. M. McFarland, M. Alečković, G. Coricor, S. Srinivasan, M. Tso, J. Lee, T.-H. Nguyen, J. M. Mejía Oneto, *ACS Cent. Sci.* **2023**, *9*, 1400–1408.
- [3] S. Srinivasan, N. A. Yee, K. Wu, M. Zakharian, A. Mahmoodi, M. Royzen, J. M. Mejía Oneto, *Adv. Ther.* **2021**, *4*.
- [4] I. Novianti, T. Kowada, S. Mizukami, *Org. Lett.* **2022**, *24*, 3223–3226.
- [5] L. Liu, D. Zhang, M. Johnson, N. K. Devaraj, *Nat. Chem.* **2022**, *14*, 1078–1085.
- [6] M. R. Clotworthy, J. J. M. Dawson, M. D. Johnstone, C. L. Fleming, *Chempluschem* **2024**.
- [7] E. M. Williams, R. F. Little, A. M. Mowday, M. H. Rich, J. V. E. Chan-Hyams, J. N. Copp, J. B. Smaill, A. V. Patterson, D. F. Ackerley, *Biochem. J.* **2015**, *471*, 131–153.
- [8] M. Bojtár, K. Németh, F. Domahidy, G. Knorr, A. Verkman, M. Kállay, P. Kele, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 15164–15171.
- [9] Szeip Judit, BSc Szakdolgozat, *BME*, **2023**.
- [10] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.
- [11] S. L. Scinto, D. A. Bilodeau, R. Hincapie, W. Lee, S. S. Nguyen, M. Xu, C. W. am Ende, M. G. Finn, K. Lang, Q. Lin, J. P. Pezacki, J. A. Prescher, M. S. Robillard, J. M. Fox, *Nat. Rev. Methods Primers* **2021**, *1*, 30.
- [12] G. B. Cserép, A. Herner, P. Kele, *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, 042001.
- [13] B. M. Zeglis, J. S. Lewis, *N. Engl. J. Med.* **2022**, *387*, 2291–2293.
- [14] S. S. van Berkel, M. B. van Eldijk, J. C. M. van Hest, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 8806–8827.
- [15] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [16] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [17] R. Huisgen, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565–598.
- [18] F. Amblard, J. H. Cho, R. F. Schinazi, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4207–4220.
- [19] A. J. Link, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11164–11165.
- [20] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.

- [21] N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644–648.
- [22] P. An, Z. Yu, Q. Lin, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5496–5499.
- [23] M. M. A. Mitry, F. Greco, H. M. I. Osborn, *Chem. - Eur. J.* **2023**, *29*.
- [24] J. G. Martin, R. K. Hill, *Chem. Rev.* **1961**, *61*, 537–562.
- [25] R. Sustmann, W. Sicking, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12562–12571.
- [26] K. N. Houk, *Acc. Chem. Res.* **1975**, *8*, 361–369.
- [27] W. E. Bachmann, N. C. Deno, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 3062–3072.
- [28] A. Darko, S. Wallace, O. Dmitrenko, M. M. Machovina, R. A. Mehl, J. W. Chin, J. M. Fox, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3770–3776.
- [29] A.-C. Knall, C. Slugovc, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5131.
- [30] J. C. T. Carlson, H. Mikula, R. Weissleder, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 3603–3612.
- [31] R. A. A. Foster, M. C. Willis, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 63–76.
- [32] H. Wu, N. K. Devaraj, *Top. Curr. Chem.* **2016**, *374*, 3.
- [33] D. M. Patterson, L. A. Nazarova, J. A. Prescher, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 592–605.
- [34] J. A. Wagner, D. Mercadante, I. Nikić, E. A. Lemke, F. Gräter, *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21*, 12431–12435.
- [35] A.-C. Knall, C. Slugovc, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5131.
- [36] L. M. Bickel, K. Gavriel, K. Neumann, *Eur. J. Org. Chem.* **2024**, *27*.
- [37] A. J. C. Sarris, T. Hansen, M. A. R. de Geus, E. Maurits, W. Doelman, H. S. Overkleeft, J. D. C. Codée, D. V. Filippov, S. I. van Kasteren, *Chem. - Eur. J.* **2018**, *24*, 18075–18081.
- [38] J. Yang, M. R. Karver, W. Li, S. Sahu, N. K. Devaraj, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5222–5225.
- [39] R. M. Versteegen, R. Rossin, W. ten Hoeve, H. M. Janssen, M. S. Robillard, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 14112–14116.
- [40] D. Wang, W. Chen, Y. Zheng, C. Dai, L. Wang, B. Wang, *Heterocycl. Commun.* **2013**, *19*, 171–177.
- [41] J. Sauer, D. K. Heldmann, J. Hetzenegger, J. Krauthan, H. Sichert, J. Schuster, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, *1998*, 2885–2896.
- [42] J. Sauer, R. Sustmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1980**, *19*, 779–807.
- [43] W. Kuba, M. Wilkovitsch, J. C. T. Carlson, H. Mikula, in *Click Chemistry*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, **2022**.
- [44] A. Darko, S. Boyd, J. Fox, *Synthesis (Stuttg)* **2018**, *50*, 4875–4882.
- [45] J. Li, P. R. Chen, *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 129–137.

- [46] X. Ji, Z. Pan, B. Yu, L. K. De La Cruz, Y. Zheng, B. Ke, B. Wang, *Chem. Soc. Rev.* **2019**, 48, 1077–1094.
- [47] R. M. Versteegen, W. ten Hoeve, R. Rossin, M. A. R. de Geus, H. M. Janssen, M. S. Robillard, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, 57, 10494–10499.
- [48] S. Senapati, A. K. Mahanta, S. Kumar, P. Maiti, *Signal Transduction Targeted Ther.* **2018**, 3, 7.
- [49] Y. H. Bae, K. Park, *J. Controlled Release* **2011**, 153, 198–205.
- [50] T. L. Rapp, C. A. DeForest, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2021**, 171, 94–107.
- [51] V. Maximov, V. Reukov, A. A. Vertegel, *J. Drug Delivery Sci. Technol.* **2009**, 19, 311–320.
- [52] S. and Y. N. A. and Z. M. and A. M. and M. A. and N. T.-H. and M. O. J. M. Srinivasan, *BioRxiv* **2023**, 2023--03.
- [53] G. S. Kumar, Q. Lin, *Chem. Rev.* **2021**, 121, 6991–7031.
- [54] P. Kumar, T. Jiang, S. Li, O. Zainul, S. T. Laughlin, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, 16, 4081–4085.
- [55] P. Kumar, O. Zainul, F. M. Camarda, T. Jiang, J. A. Mannone, W. Huang, S. T. Laughlin, *Org. Lett.* **2019**, 21, 3721–3725.
- [56] H. Zhang, W. S. Trout, S. Liu, G. A. Andrade, D. A. Hudson, S. L. Scinto, K. T. Dicker, Y. Li, N. Lazouski, J. Rosenthal, C. Thorpe, X. Jia, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 5978–5983.
- [57] A. Egyed, K. Németh, T. Á. Molnár, M. Kállay, P. Kele, M. Bojtár, *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, 145, 4026–4034.
- [58] C. L. Fleming, C. Benitez-Martin, E. Bernson, Y. Xu, L. Kristenson, T. Inghardt, T. Lundbäck, F. B. Thorén, M. Grøtli, J. Andréasson, *Chem. Sci.* **2024**, 15, 6897–6905.
- [59] R. Müller, A. Kojic, M. Citir, C. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, 60, 19759–19765.
- [60] F. C. Santos, A. M. S. Soares, M. S. T. Gonçalves, S. P. G. Costa, *Amino Acids* **2017**, 49, 1077–1088.
- [61] Z. Li, S. Ma, X. Yang, L. Zhang, D. Liang, G. Dong, L. Du, Z. Lv, M. Li, *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, 222, 113608.
- [62] A. Duran-Corbera, J. Font, M. Faria, E. Prats, M. Consegal, J. Catena, L. Muñoz, D. Raldua, A. Rodriguez-Sinovas, A. Llebaria, X. Rovira, *iScience* **2022**, 25, 105128.
- [63] J. A. Barltrop, P. J. Plant, P. Schofield, *Chem. Commun.* **1966**, 822.
- [64] Y. Fu, N. A. Simeth, W. Szymanski, B. L. Feringa, *Nat. Rev. Chem.* **2024**, 8, 665–685.
- [65] Y. Li, M. Wang, F. Wang, S. Lu, X. Chen, *Smart Molecules* **2023**, 1.
- [66] M. Russo, H. Janeková, D. Meier, M. Generali, P. Štacko, *J. Am. Chem. Soc.* **2024**, 146, 8417–8424.
- [67] A. Poryvai, M. Galkin, V. Shvadchak, T. Slanina, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2022**, 61.

- [68] E. Uhl, F. Wolff, S. Mangal, H. Dube, E. Zanin, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2021**, *60*, 1187–1196.
- [69] T. Weinrich, M. Gränz, C. Grünewald, T. F. Prisner, M. W. Göbel, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 491–496.
- [70] S. Nisar, B. Sui, *Sens. Diagn.* **2024**, *3*, 1505–1512.
- [71] D. Yang, H. Y. Tian, T. N. Zang, M. Li, Y. Zhou, J. F. Zhang, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9174.
- [72] A. Abe, M. Kamiya, *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, *44*, 116281.
- [73] S. J. Park, S. K. Yeon, Y. Kim, H. J. Kim, S. Kim, J. Kim, J. W. Choi, B. Kim, E. H. Lee, R. Kim, S. H. Seo, J. Lee, J. W. Kim, H.-Y. Lee, H. Hwang, Y.-S. Bahn, E. Cheong, J.-H. Park, K. D. Park, *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 3539–3562.
- [74] S. Patra, B. Sarkar, S. Maji, J. Fiedler, F. A. Urbanos, R. Jimenez-Aparicio, W. Kaim, G. K. Lahiri, *Chem. - Eur. J.* **2006**, *12*, 489–498.
- [75] Q. Wang, Y. Song, S. Yuan, Y. Zhu, W. Wang, L. Chu, *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 8643.
- [76] Y. M. Poronik, K. V. Vygranenko, D. Gryko, D. T. Gryko, *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 5242–5265.
- [77] A. Dal Corso, V. Borlandelli, C. Corno, P. Perego, L. Belvisi, L. Pignataro, C. Gennari, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59*, 4176–4181.
- [78] M. S. Robillard, H. M. Janssen, W. Ten Hoeve, M. Versteegen Ronny, *US9421274B2*, **2016**.
- [79] R. A. Mosey, P. E. Floreancig, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 7980.
- [80] A. Saady, G. K. Malcolm, M. P. Fitzpatrick, N. Pairault, G. J. Tizzard, S. Mohammed, A. Tavassoli, S. M. Goldup, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2024**, *63*.
- [81] R. P. Houghton, A. W. Mulvaney, *J. Organomet. Chem.* **1996**, *518*, 21–27.