

TDK DOLGOZAT

Fotoaktiválható kemoterápia látható fénnel

Készítette:

Molnár Tibor Ákos

MSc. I. évfolyamos hallgató

Külső témavezető:

Dr. Kele Péter

tudományos főmunkatárs

Konzulens:

Dr. Bojtár Márton

tudományos munkatárs

Természettudományi Kutatóközpont, Szerves Kémiai Intézet

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Szerves Kémia és Technológia Tanszék

2021



Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Bojtár Mártonnak a szintetikus munkában és a mérések kivitelezésében nyújtott segítségét és a szakmai iránymutatást, illetve Dr. Kele Péternek, hogy a Kémiai Biológia Kutatócsoportban dolgozhattam a Természettudományi Kutatóközpontban.

Köszönettel tartozom még a Kémiai Biológia Kutatócsoport minden egyes tagjának, akikhez bármikor fordulhattam a munkám során felmerülő kérdéseimmel tanácsért.

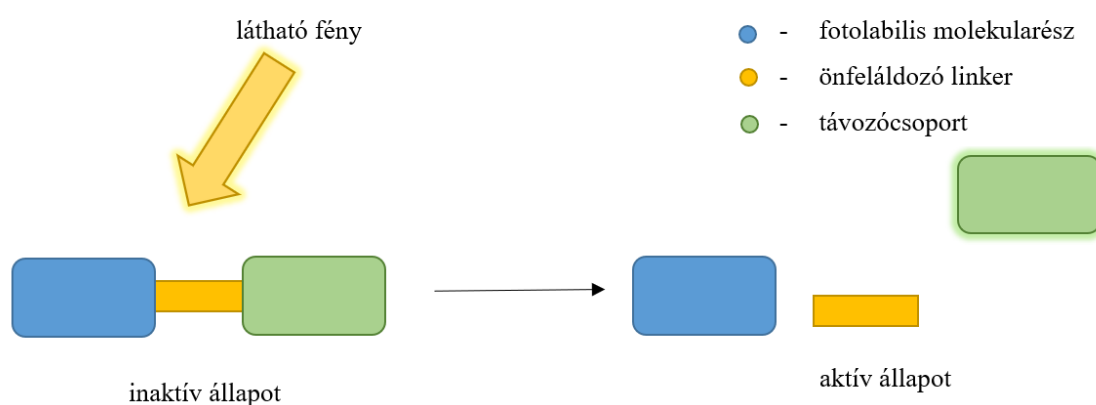
1. Rövidítésjegyzék.....	4
2. Bevezetés és célkitűzések	5
3. Irodalmi áttekintés	8
3.1. Fotolabilis vegyületek	8
3.1.1. Fontosabb fotolabilis vegyületek a kémiai biológiában	10
3.2. Önfeláldozó linkerek	12
3.3. Kemoterápia, célzott hatóanyagleadás	14
4. Célkitűzések	16
5. Saját eredmények	18
5.1. A célvegyületek szintézise	18
5.2. Fotokémiai vizsgálatok	24
6. Általános kísérleti adatok.....	32
7. A szintézisek részletes leírása	33
8. Összefoglalás	43
9. Irodalomjegyzék	44

1. Rövidítésjegyzék

dcHMeN:	<i>N,N</i> -diciklohexilmetilamin
DKM:	diklórmétán
DIPEA:	<i>N,N</i> -diizopropil-etil-amin
DMAP:	4-dimetilaminopiridin
DMF:	dimetilformamid
DSC:	<i>N,N'</i> -diszukcinimid-karbonát
EtOH:	etanol
KOtBu:	kálium- <i>terc</i> -butoxid
M:	mol/dm ³
MeCN:	acetonitril
MeOH:	metanol
NBS:	<i>N</i> -brómszukcinimid
Pd ₂ dba ₃ :	trisz(dibenzilidén-aceton)-dipalládium
Ph ₃ PMeBr:	metil-trifenilfoszfónium bromid
Q-Phos:	1,2,3,4,5-pentafenil-1'-(<i>di-terc</i> -butilfoszfino)ferrocén
TBDMSCl:	<i>terc</i> -butildimetil-szilil klorid
TEA:	trietyl-amin
TFA:	trifluorecetsav
THF:	tetrahidrofurán

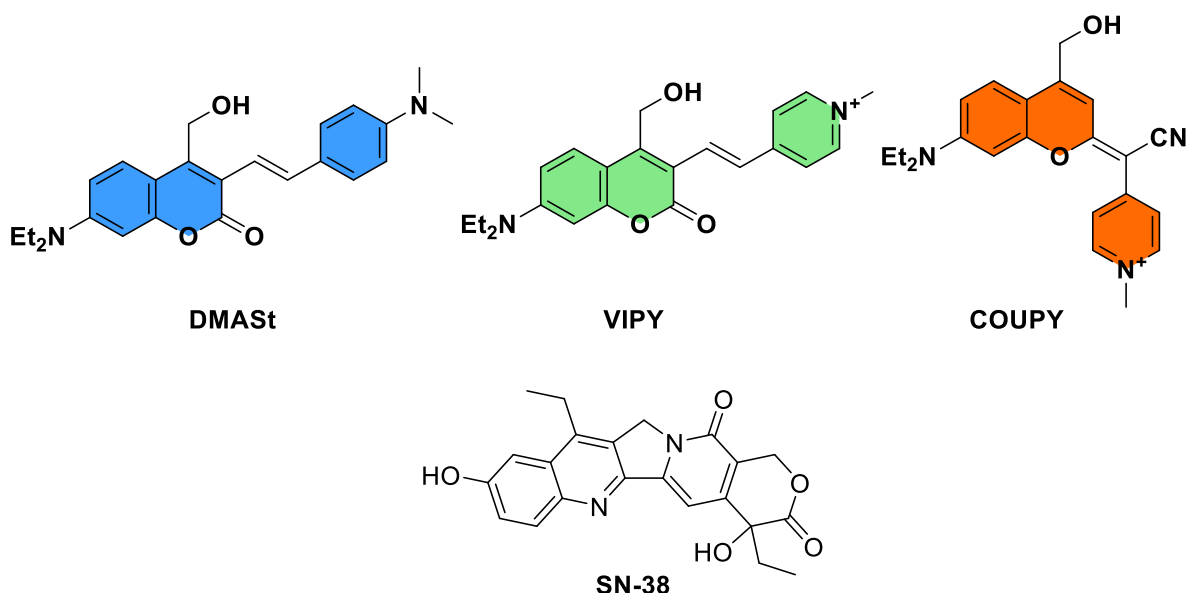
2. Bevezetés

Az élő szervezetekben alkalmazott gyógyszerhatóanyagok gyakori hátránya, hogy csak egy kis részük képes ténylegesen kifejteni a hatását, ráadásul azt sem feltétlenül ott, ahol szükség lenne rá. Ez hatványozottan igaz a kemoterápiás szerekre, amelyek gyakran súlyos mellékhatásokat okoznak, emiatt a célzott hatóanyagleadás a modern gyógyszerkutatás egyik legintenzívebben kutatott területe. A célzott hatóanyagleadó rendszerek képesek térben és időben szabályozott módon felszabadítani a kívánt biológiailag aktív molekulát, növelve a kemoterápia hatékonyságát miközben csökkenthetők a mellékhatások.¹ Ennek a megvalósítási módszerei közül kiemelkedő jelentőséggel bírnak a fénnel aktiválható hatóanyagleadó rendszerek, amelyek fotolabilis védőcsoportokat (photocage-eket) alkalmaznak. A fotolabilis védőcsoportok a megfelelő funkciós csoporton keresztül kapcsolódva képesek csökkenteni a hatóanyag (pl: kemoterápiás szer) biológiai aktivitását. A konjugátumot a megfelelő hullámhosszú fénnel megvilágítva a fotolabilis rész lehasad, így a hatóanyag visszanyeri biológiai aktivitását (1. ábra).² A legtöbb jelenleg használt vegyület UV-fénnel aktiválható, ami nagy hátrányt jelent a biológiai alkalmazhatóság terén, mivel az UV-fénynek rossz a szöveti áthatoló képessége, továbbá sejtkárosító hatása is van. Az *in vivo* felhasználáshoz elengedhetetlen, hogy olyan fotolabilis védőcsoportok álljanak a rendelkezésünkre, melyek a látható fény vörös- vagy a közeli infravörös (NIR) tartományban aktiválhatók. A fotolabilis védőcsoportokkal szemben további fontos szempontok, hogy legyenek vízoldhatóak, sötétben stabilak, illetve a besugárzás hatására ne szabaduljon fel belőlük citotoxikus melléktermék.³



1. ábra: Fotolabilis vegyülethez kötött hatóanyag felszabadítása fénnel

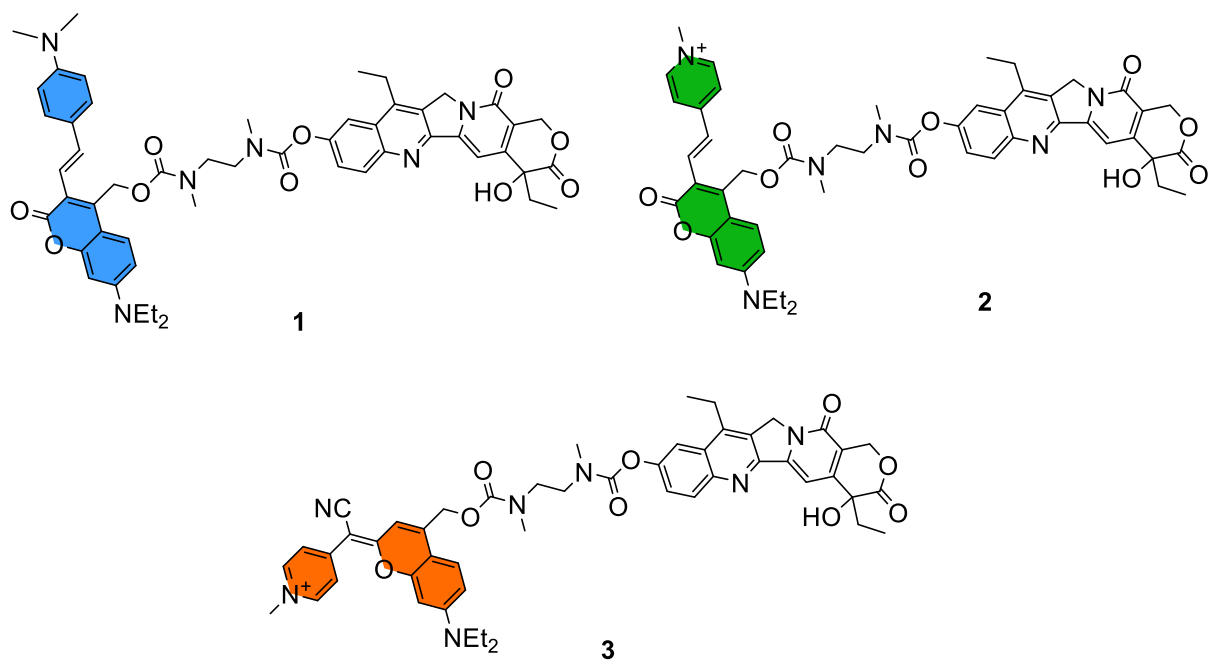
Kutatómunkám során látható (kék/zöld/narancs) fénnel aktiválható módosított kumarinvázas fotolabilis vegyületek szintézisével foglalkoztam, melyeket egy kamptotecin kemoterápiás szerhez (SN-38) kapcsoltam. Dolgozatomban e vegyületek szintézisét és fotokémiai vizsgálatát mutatom be (2. ábra).



2. ábra: A vizsgált fotolabilis védőcsoportok és a kemoterápiás hatóanyag szerkezete.

A három kumarinvázas fotolabilis védőcsoportot önfeláldozó linkeren keresztül kapcsoltam a hatóanyaghoz (3. ábra). Az első egy kék fénnel aktiválható dimetilamino-sztirollal kiterjesztett π -rendszerű kumarin (DMASt), melyet Lin és munkatársai írtak le 2018-ban.⁴ A második vegyület zöld fénnel aktiválható, melyet a kutatócsoportunk írt le (VIPY),⁵ ennek a π -rendszerét egy vinil-piridínium csoporttal terjesztettük ki. A harmadik fotolabilis linker, a 2020-ban López-Corrales és munkatársai⁶ által leírt, narancssárga fénnel aktiválható váz (COUPY), mely ciano-alkil-piridínium csoportot tartalmaz. Mindegyik kumarinszármazékról elmondható, hogy fotolízisük hatékony és számos funkciós csoport blokkolására alkalmasak.

A hatóanyag esetében fontos, hogy a blokkolt, prodrug formában hatástalan legyen. Ilyen kemoterápiás szer például a DNS replikációt és transzkripciót gátló topoizomeráz I inhibitor kamptotecin-származék az SN-38.⁷



3. ábra: A célmolekulák szerkezete

3. Irodalmi áttekintés

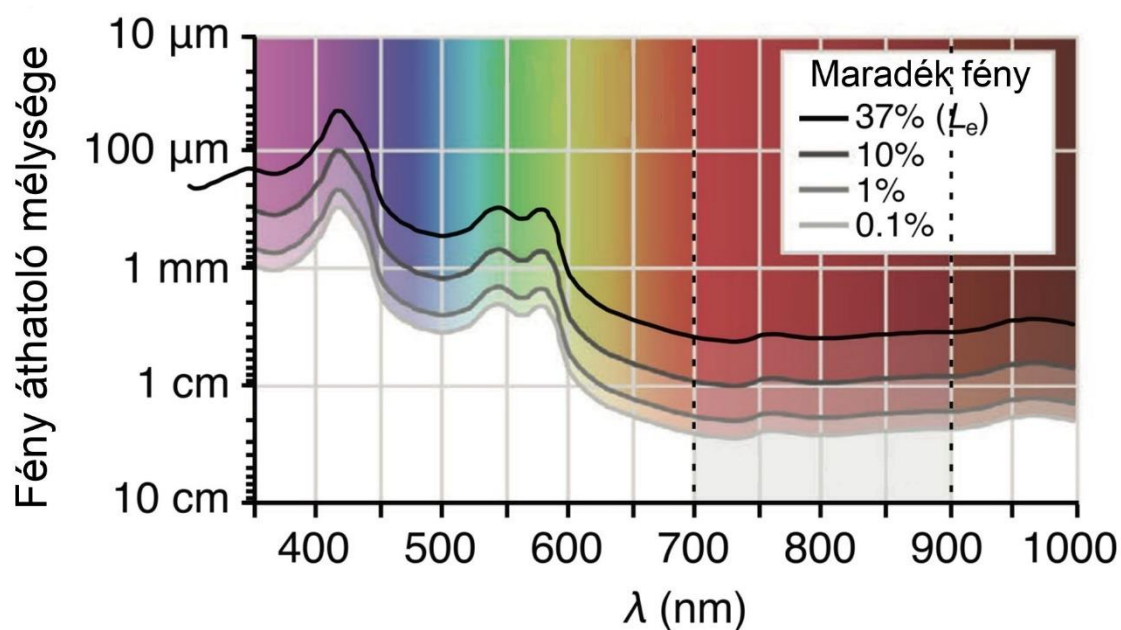
3.1. Fotolabilis vegyületek

A fotolabilis védőcsoportok (*photocage*-ek) felhasználhatóak arra, hogy nem-invazív módon kontrolláljuk egy adott molekula felszabadulását. Ilyen molekulák lehetnek például bioaktív anyagok, szintetikus prekursorok vagy fluoreszcens jelzővegyületek. Az első fotolabilis védőcsoportokat Baltrop⁸, Barton⁹, Woodward¹⁰ és Sheehan¹¹ írták le, míg a biológiai alkalmazásukat Engels¹², Schlaeger, Kaplan¹³ és munkatársaik ismertették. Azóta számos fotoaktiválható molekulát és rendszert fejlesztettek ki.

A fotoaktiválható védőcsoportokkal szembeni követelmények:

- a) olyan hullámhosszú fénnel kell, hogy aktiválhatóak legyenek, amelyet a rendszerben más molekulák nem nyelnek el, illetve nem indít be nemkívánatos mellékreakciókat,
- b) a fényre való elbomlás az alkalmazással kompatibilis időt vegyen igénybe,
- c) oldhatóknak és stabilaknak kell lenniük az alkalmazási közegben (például fiziológias közegben biológiai alkalmazás esetén),
- d) a bomlástermékek nem lehetnek reaktív vagy mérgező anyagok,
- e) a folyamatnak detektálhatónak kell lennie (például fluoreszcencia alapján).³

A legtöbb fotolabilis védőcsoport 300-400 nm közötti fényt képes elnyelni,¹⁴ azonban az UV tartományban történő aktiválásnak számos hátránya van, különösen biológiai rendszerekben. A rövid hullámhosszú UV fotonoknak elegendő energiájuk van kötések hasításhoz, valamint izomerizációs és átrendeződési reakciókat indukálhatnak számos szerves és szervetlen molekulában. Továbbá, a nagy energiájú UV fénynek nagyon alacsony az áthatolóképesége a szövetekben.¹⁵ A látható és a közeli infravörös fény jóval mélyebben tud behatolni a szövetekbe és sokkal kevesebb káros hatása van a biológiai rendszerekre nézve, amely rengeteg új alkalmazást tesz lehetővé, így például gyógyszerhatóanyagok célzott leadását.¹⁶



4. ábra: A fény áthatolóképessége¹⁷

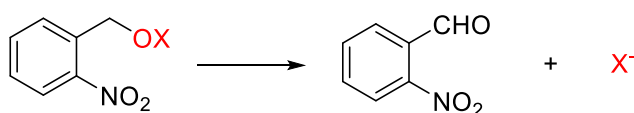
A biológiai és tervezett klinikai alkalmazás érdekében tehát elengedhetetlen a látható/NIR fénnel aktiválható fotolabilis védőcsoportok fejlesztése, amire kiemelt figyelem irányult az elmúlt évtizedben. Ennek ellenére az olyan védőcsoportok, melyeket a 600 nm feletti tartományban lehet aktiválni igen ritkák a szakirodalomban, és még az 500 nm felett aktiválható fotolabilis védőcsoportok tervezése is nagy kihívást jelent.³

3.2. Fontosabb fotolabilis vegyületek a kémiai biológiában

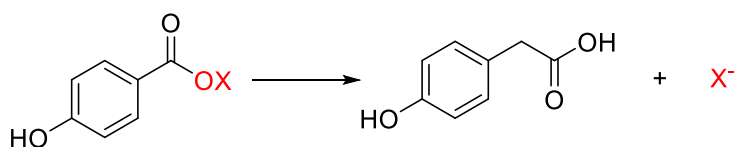
Az első, biológiai rendszerekben is széleskörűen alkalmazható fotolabilis védőcsoport felfedezése óta rengeteg kísérlet történt a fény, mint precíziós, noninvazív eszköz szervezetben történő alkalmazásának kiterjesztésére. Az utóbbi évtizedekben számos, biológiai célokra is használható fotolabilis vegyületet írtak le.^{13 14}

A kovalens kötések elhasítása nagy energiát igényel, így kezdetben UV fényvel biztosították ezt, viszont a fent felsorolt hátrányos tulajdonságok miatt szükségessé vált látható, illetve NIR fényvel aktiválható fotolabilis védőcsoportok kifejlesztése. Az 5. ábrán néhány UV (orto-nitrobenzil-, a hidroxifenacil-) és látható fényvel aktiválható (BODIPY- és a kumarin származékok) fotolabilis védőcsoport látható.¹⁸

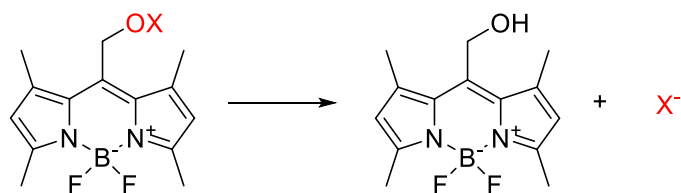
a, orto-nitrobenzil



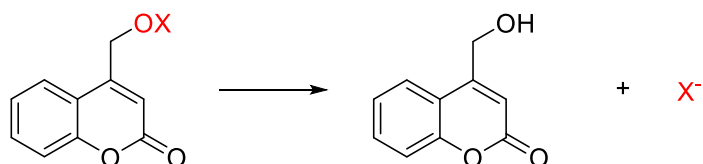
b, hidroxifenacil



c, BODIPY



d, kumarin

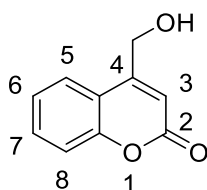


5. ábra: Fontosabb fotolabilis vegyületek és fotolízisük. X: távozócsoport.

Az ábrán bemutatott photocage-ek közül az orto-nitrobenzil és hidroxifenacil alapú fotolabilis vegyületek évtizedek óta ismertek, hátrányuk azonban, hogy csak nagy energiájú UV fénnel aktiválhatóak, és fotolízisük során káros melléktermékek keletkeznek, így a biológiai rendszerben történő alkalmazásuk korlátozott.¹⁴

A BODIPY származékok zöld fénnel (490-540 nm) is aktiválhatóak, nagy moláris abszorpciós koefficienssel és fotokémiai kvantumhasznosítási tényezővel rendelkeznek, viszont rossz vízdoldhatóságuk miatt biológiai rendszerekben csak korlátozottan alkalmazhatók. A BODIPY-kkel kapcsolatos kutatások jelentős része a vízdoldhatóságuk növelésére, illetve az abszorpciós hullámhosszuk vörösebb tartományba való eltolására irányult.

Az ábrán látható kumarin vegyületek a BODIPY-k mellett szintén ígéretesek a biológiai hasznosíthatóság szempontjából. A kumarinoknak általában közepes a moláris abszorpciós koefficiensük 350 nm környékén, ami az UV tartományba esik, viszont egyszerű funkcionálizálhatóságuknak köszönhetően ez az érték könnyen eltolható a látható tartományba, például a 7-es pozícióban elektronküldő csoport beépítésével. További batokróm eltolódást érhetünk el, ha a 3-as vagy 2-es helyzetben kiterjesztjük a π -elektronrendszert.^{4 19 20 6}



6. ábra: A kumarin alapváz.

A kumarinok további előnye, hogy hatékonyan bomlanak fényre, melynek során általában nem keletkeznek citotoxikus anyagok, emellett jó sötét stabilitással is rendelkeznek. A vegyületesalád előnyös tulajdonsága, hogy az egyfotonos gerjesztés esetén jellemző magas fotokémiai kvantumhasznosítási tényező mellett a többfotonos gerjesztésre is érzékenyen reagálnak, így vörös vagy közeli infravörös fénnel kétfotonos módszerrel gerjesztve alkalmasak lehetnek célzott hatóanyagleadásra a mélyebben fekvő szövetekben.³

3.3. Önfeláldozó linkerek

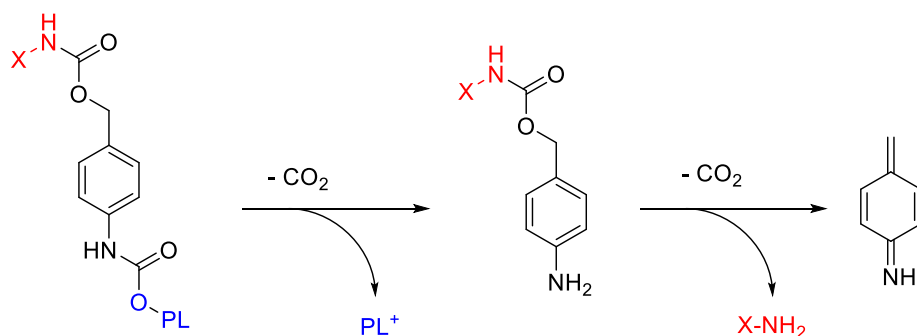
Az önfeláldozó linker (angolul: *self-immolative linker*) olyan molekulaegység, amelyekben egy specifikus stimulus hatására bekövetkező kaszkád folyamat eredményeként irreverzibilis kötés-hasadás történik, így lehetővé téve az aktív hatóanyag felszabadulását.²¹

A kötés-hasadást kiváltó stimulus lehet akár egy, az adott biológiai rendszerre jellemző tulajdonság, akár a tumorsejtek közvetlen közelében megváltozott kémiai környezet, például a pH, valamilyen enzim (pl. plazmin proteáz) koncentrációjának növekedése a tumorok körül,²² vagy valamilyen külső hatás, általában fény, amely előnyös könnyű hangolhatósága és szabályozhatósága miatt.

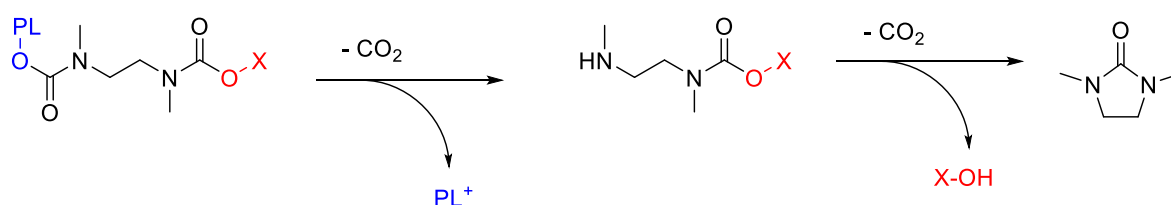
Az önfeláldozó linkerek funkciója a konjugátumok stabilitásának növelése, fizikai és kémiai tulajdonságainak (pl. vízoldhatóság vagy membránpermeabilitás) optimalizálása, és a fotolitikus reakció hatékonyságának növelése. A fény indukálta gyógyszerhatóanyag vagy biomolekula felszabadulás hatékonysága nagyban függ a fotolabilis védőcsoporttól, mert ez a kromofór meghatározza a hullámhosszselektivitást és a mechanizmust, ami alapján elbomlik a rendszer. A *photocage* szintén felelős lehet nem kívánt mellékreakciókért, valamint a szabaddá váló biológiailag aktív vegyülettel történő újra összekapcsolódásért (rekombináció), amely csökkenti a felszabadulás hatékonyságát. A fentiek miatt előnyös önfeláldozó linkerek beépítése, amelyek növelhetik a felszabadulás hatékonyságát és alkalmazásukkal csökkenthetők, elkerülhetőek a nemkívánt mellékreakciók.²³ Az 1981-es felfedezésük óta az önfeláldozó linkereket felhasználják prodrugoknál, kemoszensoroknál és gyógyszerhatóanyagok célba juttatására is.²¹

A 7. ábrán látható néhány gyakran alkalmazott önfeláldozó linker és a bomlási mechanizmusuk.

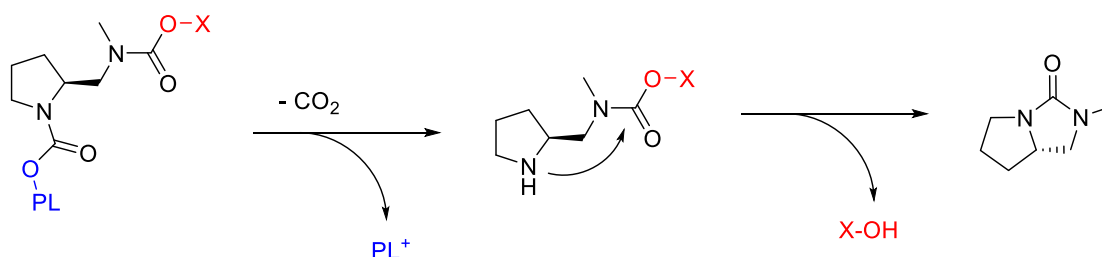
a, para-aminobenzil-karbamát (PABC) linker



b, etiléndiamin-karbamát linker



c, prolin-alapú linker



7. ábra: Önfeláldozó linkerek és fotolízisük. PL: fotolabilis molekularész, X: távozócsoport.

A PABC (para-aminobenzil-karbamát) linker elsősorban amin funkciós csoporton keresztül képes kapcsolódni a hatóanyaghoz, míg az etiléndiamin-karbamát linker főként fenolos hidroxilcsoport módosítására alkalmas. A prolin-alapú linkert 2020-ban írtak le.²⁴ Az etiléndiamin-karbamát linkeréhez hasonló bomlási mechanizmussal rendelkezik, viszont a gyűrűzáródás jóval gyorsabban megy végbe az etiléndiaminos linker bomlásánál és nem fenolos hidroxilcsoport blokkolására is alkalmas.

3.4. Kemoterápia, célzott hatóanyagleadás

A kemoterápia a rákos megbetegedések gyógyszeres kezelése, amit az 1940-es évek óta alkalmaznak.²⁵ Napjainkban a kemoterápia a sebészeti beavatkozások, sugárkezelés és a hormonterápia mellett az egyik leggyakrabban alkalmazott daganatellenes módszer.²⁶ A hatóanyagokat általában a kémiai szerkezetük és a hatásmechanizmusuk alapján szokták csoportosítani: alkilezőszerek, antimetabolitok, topoizomeráz I és II inhibitorok, mitózis inhibitorok és egyébek.²⁷ Az alkilezőszerek voltak az első rákterápiában alkalmazott anyagok, ezek keresztkapcsolják a DNS-láncokat, módosítva a nukleinsavak struktúráját és a funkcióját. Ilyen hatóanyagok például a mustárgáz származékok (ciklofoszfamid, melohalan), és néhány antibiotikum (bleomycin, mitomycin). Az antimetabolitok általában a nukleinsav anyagcserében részt vevő anyagok szerkezeti analógjai. Ezek a molekulák gátolják a DNS-szintézisben részt vevő enzimek működését. Az antimetabolitok közé tartoznak például az antifolátok (metotrexát, trimetrexát), fluoropirimidinek (5-fluorouracil, ftorafur). A topoizomeráz I és II inhibitorok a DNS szupertekercs állapotából való kicsavarásért felelős enzimek működését gátolják, így nem történik DNS replikáció. Ilyen hatóanyagok például a kamptotecin származékok (topotecan, irinotecan, SN-38) és egyes antibiotikumok (doxorubicin, daunorubicin). A mitózis inhibitorok a citoszolban a mikrotubulusokhoz kötődve fejtik ki a hatásukat, ezzel meggátolva a sejtosztódást. Ilyenek például a vinca alkaloidok, taxol-származékok vagy például a combretastatin.^{27 28}

A kemoterápia előnye, hogy olyan esetekben is alkalmazható, amikor a rákos sejtek nem egyetlen jól körül határolható helyen vannak a szervezetben, így alkalmazzák áttétek kialakulása ellen, vagy a műtéti beavatkozások után maradt rákos sejtek elpusztítására is. A szervezetbe juttatott hatóanyagnak azonban csak egy kis része fejt ki a hatását a megfelelő helyen, vagyis a tumorban. A citotoxikus gyógyszermolekulák a rákos sejtek mellett az egészséges sejteket is károsítják, ezzel súlyos mellékhatásokat okozva. A legtöbb kemoterápiás szer alkalmazhatóságát az alacsony mértékű hasznosulás és a nemkívánt mellékhatások korlátozzák.¹

A célzott hatóanyagleadó-rendszerekkel jelentősen növelhető a gyógyszermolekulák biológiai hasznosulása, továbbá növelhető a szövet- és sejtspecifitása, így kisebb dózis is elegendő azonos hatás mellett és csökkenthető a mellékhatásoknak az erőssége is. Az elmúlt

néhány évtizedben számos módszert dolgoztak ki a térben és időben kontrollált hatóanyag felszabadításra.¹

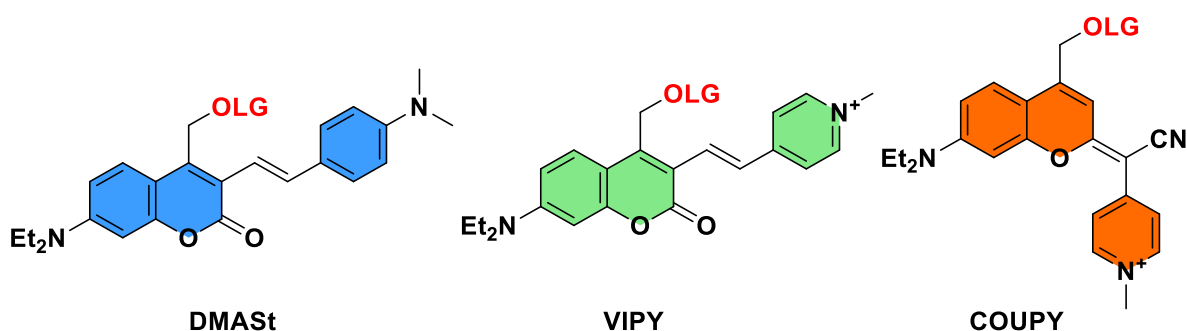
A legjobban kontrollálható hatóanyagleadó rendszerek valamilyen külső impulzust használnak a hatóanyag felszabadításra. A külső stimulust alkalmazó módszerek közül kiemelendők a fénnel aktiválható hatóanyagleadó rendszerek. A fény jól szabályozható térben és időben, a látható és a közeli infravörös tartományban nincs sejtkárosító hatása. Ezek az eljárások azon alapulnak, hogy a fény energiája kémiai energiává alakítható, például felhasználható kötésbontásra, vagy konformációváltozás inicializálására. Ezen az elven működik például a fotodinámiás terápia (PDT), vagy a fotoaktiválható kemoterápia (PACT).

A fotodinámiás terápia egy, a klinikai gyakorlatban is alkalmazott noninvazív rákterápiás módszer, melynek során egy fényérzékenyítőt juttatnak a szervezetbe, ami képes feldúsulni a daganat környékén. A fényérzékenyítő önmagában nem mérgező, viszont fény besugárzás hatására szingulett oxigén és egyéb reaktív oxigén gyökök (ROS) keletkeznek, amelyek károsítják a fehérjéket, az aminosavakat, lipideket, membránokat, sejtszervecskéket és sejthalált idéznek elő. A PDT hátránya, hogy az általában nagyméretű molekuláknak rossz a vízoldhatósága és gyakran átmeneti fémeket tartalmaznak, amik mérgezőek lehetnek. A módszer legfontosabb limitáló tényezője azonban a szilárd tumorokban alacsony O_2 koncentráció, mely nem teszi lehetővé a reaktív oxigén specieszek termelését. A PDT emiatt az ilyen tumoroknál nem alkalmazható.²⁹

A fény a reaktív oxigéngyökök képzésén túl alkalmazható molekulák módosítására és aktiválására is biológiai rendszerekben. Erre a célra felhasználhatók a már korábban említett fotolabilis védőcsoportok, amelyek képesek kioltani a kiválasztott (elsősorban kemoterápiás) gyógyszerhatóanyagok hatását. Ezt a módszert fotoaktiválható kemoterápiának nevezik (photoactivated chemotherapy - PACT). A hatóanyag inaktív prodrug formában jut el a célsejthez és a megfelelő hullámhosszú fénnel besugározva a fotolabilis védőcsoport lehasad, így a hatóanyag visszanyeri a bioaktivitását a kívánt helyen és időben.^{2 30} A PDT-vel szemben a PACT-hoz nincs szükség oxigén jelenlétére a szövetekben, így ez a módszer alkalmazható hipoxiás környezetben is, például szolid tumoroknál.³¹ Manapság a legtöbb fotoaktiválható rendszer UV, vagy látható fénnel aktiválható és a látható fénnel aktiválható molekulák is jellemzően ruténium, rénium, vagy platina komplexek, emiatt biológiai alkalmazásuk korlátozott.^{32 33}

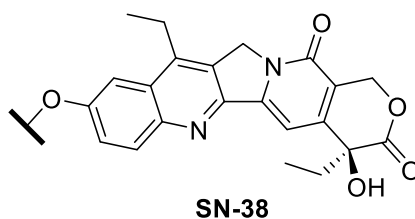
4. Célkitűzések

Kutatómunkám célja olyan vegyületek szintézise volt, melyek képesek látható fény hatására célzott hatóanyagleadásra. Ehhez három, kumarinvázra épülő fotolabilis molekulát vizsgáltam: a 3-as helyzetben dimetilamino-sztirollal szubsztituált DMASt névre, a szintén 3-as helyzetben módosított 4-vinilpiridínium egységet tartalmazó VIPY névre és a 2-es helyzetben az oxigén ciano-alkil-piridíniumra cserélésével kapott COUPY névre keresztelt vegyületeket (8. ábra).



8. ábra: a DMASt, VIPY és COUPY vegyületek, LG (leaving group): távozócsoport.

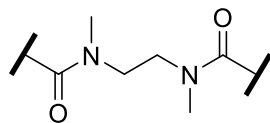
Kemoterápiás szernek egy kamptotecin származékot választottam, az SN-38-at, ami egy topoizomeráz I inhibitor. A hatóanyag kinolingyűrűjén található fenolos hidroxilcsoport blokkolásával elérhető az aktivitás csökkentése, ezért ezt választottuk az önfeláldozó linker csatlakozási pontjának.



9. ábra: A csatlakozási ponton keresztül blokkolt SN-38 szerkezete.

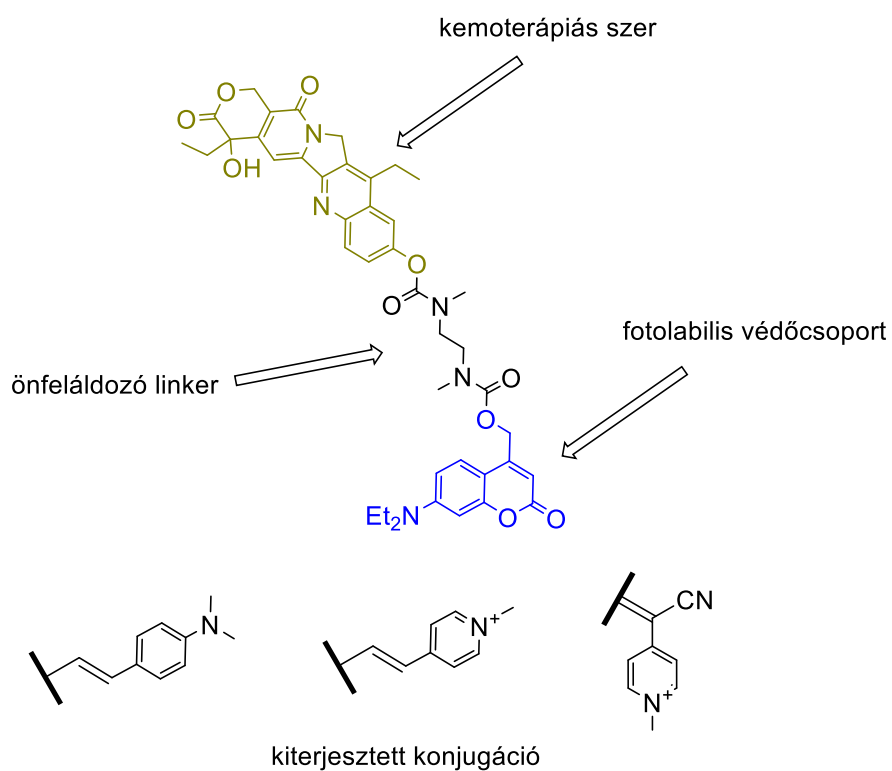
A fotolabilis linkereket és a kemoterápiás szert egy diamin-típusú önfeláldozó linkerrel kapcsoltam egymáshoz. Az önfeláldozó linker szerepe többszörös: egyrészt csökkenti a fotolízist követő rekombináció esélyét, másrészt „átalakítja” az egységeket összekötő funkciók csoportokat. Amennyiben a fotolabilis molekularészt közvetlenül kapcsoljuk a hatóanyaghoz, az így kialakult karbonátkötés rendkívül instabil, fiziológias közegben gyorsan elbomlik besugárzás nélkül is. Az önfeláldozó linkerrel elérhető, hogy a labilis karbonát helyett

fiziológiai környezetben stabil karbamátkötést alakítsunk ki, ami ráadásul a fotolízisre is jó hatással van.



öfeláldozó linker

10. ábra: Az öfeláldozó linker szerkezete.

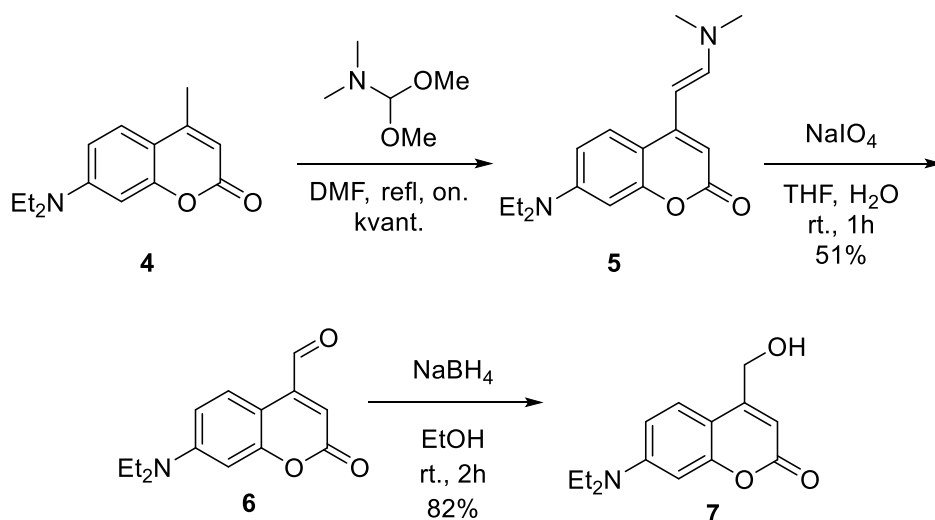


11. ábra: A célmolekulák egyes részei.

5. Saját eredmények

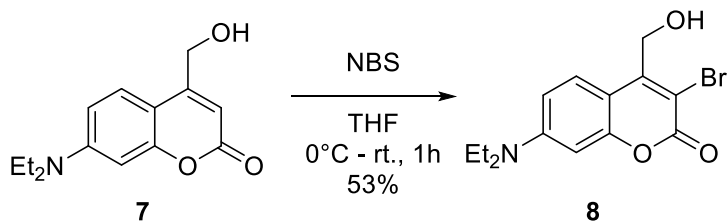
5.1. A célvegyületek szintézise

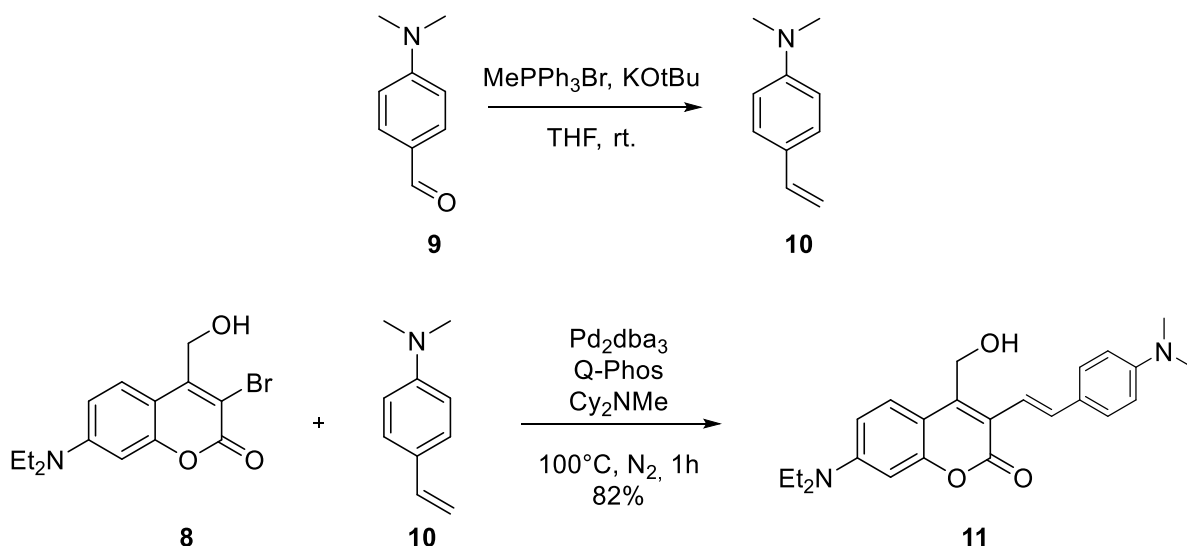
A *photocage*-ek szintézisét a 7-dietilamino-4-hidroximetilkumarin modul kialakításával kezdtem, az irodalomból ismert módon.³⁴ A kereskedelmi forgalomban kapható 7-dietilamino-4-metilkumarint *N,N*-dimetilformamid-dimetil-acetállal forraltam DMF-ben, majd a kapott terméket tetrahidrofurán és víz elegyében NaIO₄-tal oxidáltam. Az így előállított aldehidet NaBH₄-del redukáltam, így megkaptam a 7-dietilamino-4-hidroximetilkumarint (**7**) (12. ábra). Bár a szintézist követően szükséges volt az oxidáció utáni kromatográfia, a vegyületet több g-os tételben is elő lehet így állítani.



12. ábra: 7-dietilamino-4-hidroximetil kumarin szintézise.

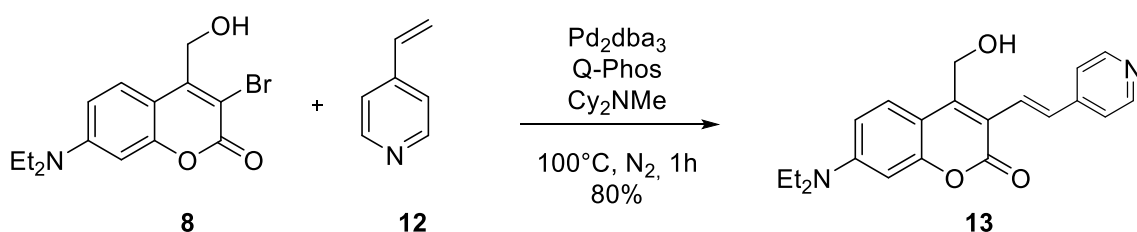
Ezt követően kiterjesztettem a kumarin π -elektronrendszerét úgy, hogy a hidroximetil-kumarint a 3-as pozícióban *N*-bróm-szukcinimiddel brómoztam tetrahidrofuránban, majd Heck-reakcióban hozzákapcsoltam az *N,N*-dimetil-4-vinil-anilint, amit *N,N*-dimetil-4-benzaldehdből metil-trifenilfoszfónium bromiddal Wittig reakcióval állítottam elő. Így megkaptam a **11**-es hidroximetil-kumarint (13. ábra).





13. ábra: A DMASt fotolabilis vegyületek kiindulóanyagának szintézise.

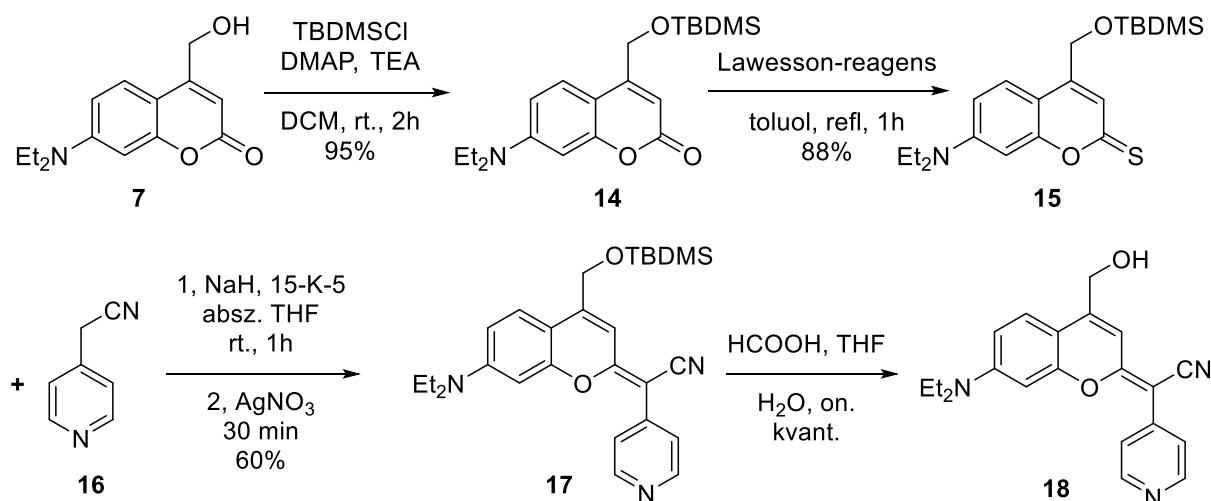
A zöld fényre aktiválható kumarin szintéziséhez a hidroximetil-kumarin alapváz π -elektronrendszerének kiterjesztését végeztem el úgy, hogy a 3-as pozícióban brómozott 6-os kumarin származékot 4-vinilpiridinnel kapcsoltam Heck reakcióban. Így megkaptam a VIPY alapvázat (14. ábra).



14. ábra: A VIPY fotolabilis vegyületek kiindulóanyagának szintézise.

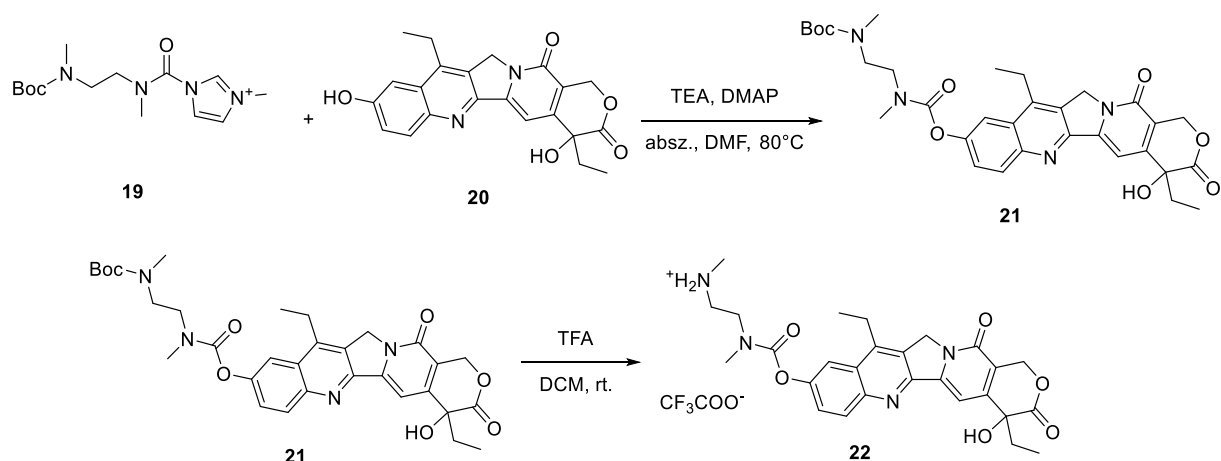
A narancssárga fényre aktiválható kumarin előállításához a 7-es kumarin származék hidroxilcsoportját TBDMS védőcsoporttal láttam el, majd Lawesson reagenssel a 2-es helyzetű lakton oxigént kénre cseréltem. Az így kapott tiokumarint 2-(piridin-4-il)acetonitrillel kondenzáltam a 2-es helyzetben NaH és 15-korona-5-éter fázistranszfer katalizátor jelenlétében. A kénhidrogén kilépéséhez szükség volt a nyers terméket ezüst-nitráttal kevertetni, ezt követően egy szűréssel eltávolítható volt az ezüst-szulfid. A védőcsoport eltávolítását először tetrabutil-ammonium-fluoriddal végeztem, viszont ezután szükség volt egy kromatográfiás lépésre. A kísérleteket többször is elvégezve megfigyeltem, hogy a **18**-as

kumarin-származék bomlik oszlopkromatográfia közben, így 40-50%-nál nagyobb termelést nem tudtam elérni. A TBDMS védőcsoport hangyasav, tetrahidrofuran és víz elegyében is eltávolítható, mely módszerrel nincs szükség kromatográfiára. Így egy extrakció és bepárlás után kvantitatívan megkaptam a COUPY alapvázat (15. ábra).



15. ábra: A COUPY fotolabilis vegyületek kiindulóanyagának szintézise.

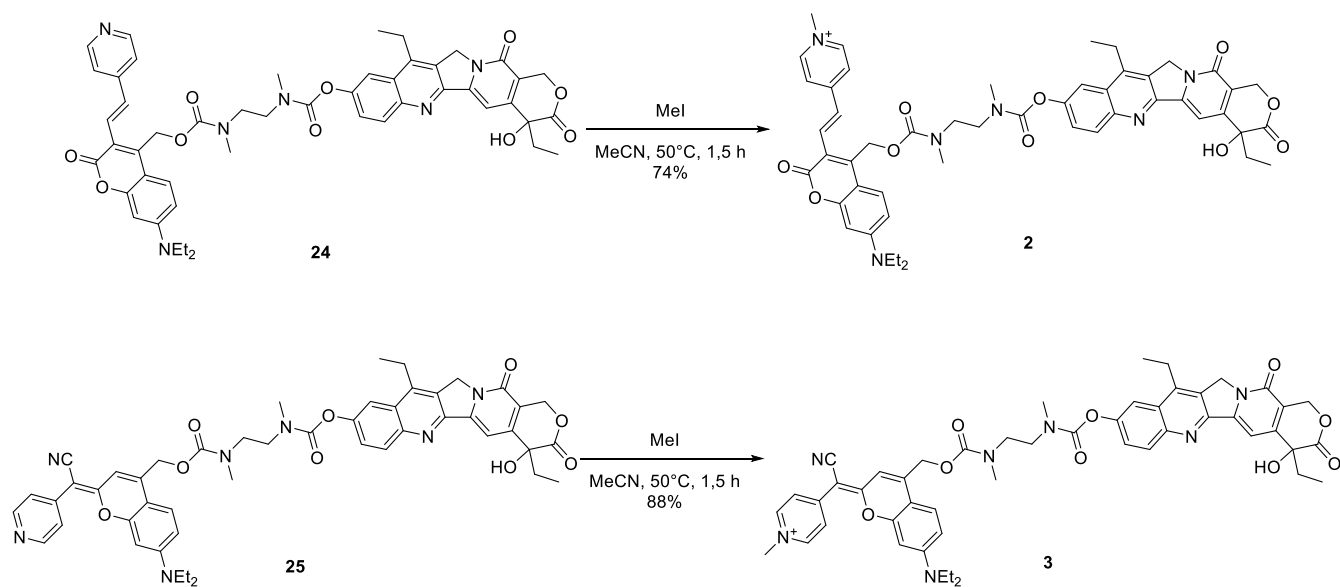
A különböző molekulaegységek összekapcsolását úgy terveztem megvalósítani, hogy először az SN-38-at módosítom az önfeláldozó linkerrel, majd az így kapott SN-38-linker vegyületet kapcsolom a megfelelő fotolabilis védőcsoporthoz. Az önfeláldozó linker a kutatócsoportban készen a rendelkezésemre állt. Ennek aktivált származékát (**19**) kapcsoltam az SN-38-hoz **TEA** és katalitikus mennyiségű **DMAP** jelenlétében kialakítva az első karbamát kötést, majd ezt követően **TFA**-val eltávolítottam a **Boc** védőcsoportot (16. ábra). A **22**, már az önfeláldozó linkert egy karbamátcsoporton keresztül tartalmazó hatóanyag ammóniumsó formájában akár hetekig eltartható, bázis hatására vagy semleges közegben azonban néhány perc alatt elbomlik.³⁵



16. ábra: SN-38-linker szintézise.

A szintézissor utolsó lépései között elvégeztem a hatóanyag-önfeláldozó linkerek összekapcsolását a fotolabilis molekuláreszkekkel, egy újabb karbamátkötésen keresztül. Fény hatására a karbamátkötések is elhasadnak, a keletkező, instabil karbamidsav-típusú vegyület szén-dioxid eliminációja mellett tovább bomlik a szabad aminra. A szintézishez szükség volt a szabad amin felszabadítására a karbamátkötés kialakítása érdekében, és egy olyan reaktív partnert kellett találnunk, amely gyorsabban reagál a szabad aminnal, mint hogy végbemenjen az önfeláldozódási reakció. Kutatócsoportunkban korábban megállapítottuk, hogy erre kiválóan alkalmasak a szukcinimidil-karbonát típusú aktivált vegyületek.³⁶

A fotolabilis vegyületeket ennek megfelelően DSC-vel aktiváltam, majd az aktivált kumarinszármazék és az SN-38 linker sztöchiometrikus elegyéhez DKM-ban lassan TEA DKM-os elegyét csepegtettem sötétben. A nyers termékeket oszlopkromatográfiával tisztítottam. A DMASt-t tartalmazó molekula esetén ez a lépés egyből az első célvegyületemet (1) eredményezte (17. ábra).

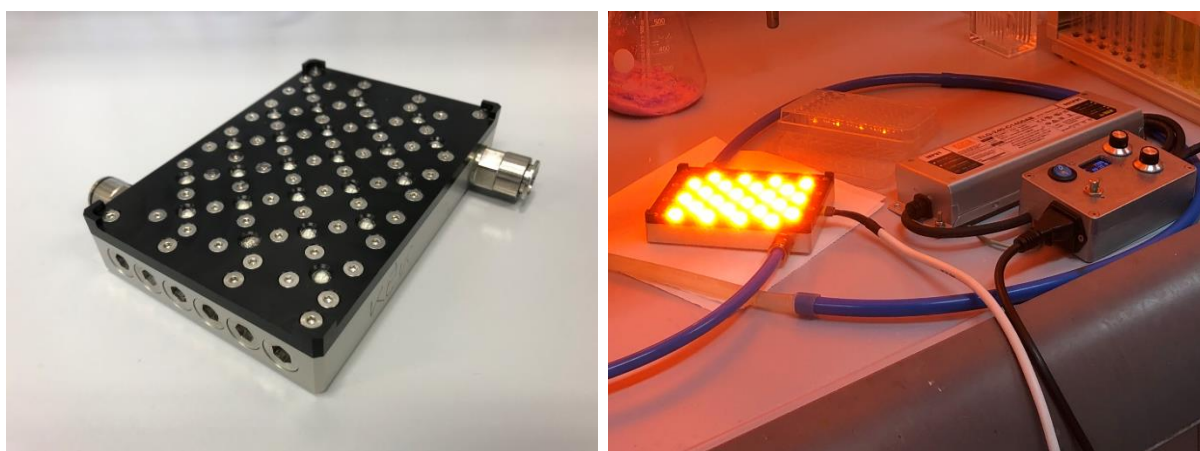


18. ábra: VIPY és COUPY kvaternerezés MeI-dal.

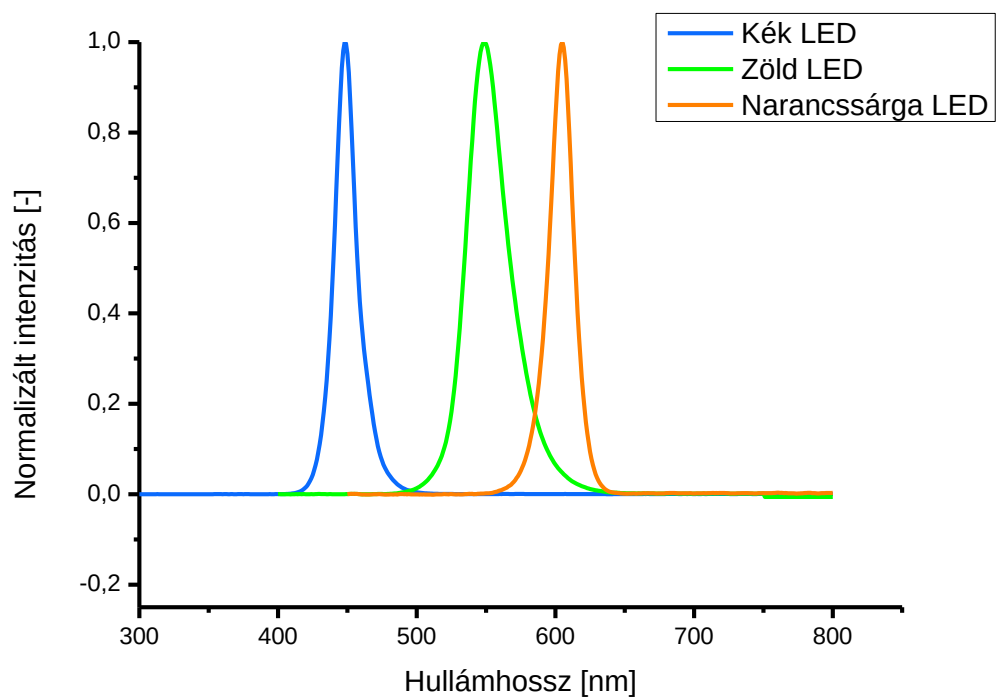
5.2. Fotokémiai vizsgálatok

A vegyületek fotolízisét az abszorpciós spektrumaik alapján, külön erre a célra gyártott kék, zöld, és narancssárga fényű LED-panelekkel végeztük. A panel teljesítménye (LED-enkénti névleges bemeneti teljesítmény: 4 W), azaz a használt fény intenzitása, valamint a besugárzás időtartama szabályozható (19. ábra). A vizsgált minták túlmelegedése elkerülhető a panelek vízhűtésével. A 20. ábrán láthatóak a LED-ek emissziós spektruma.

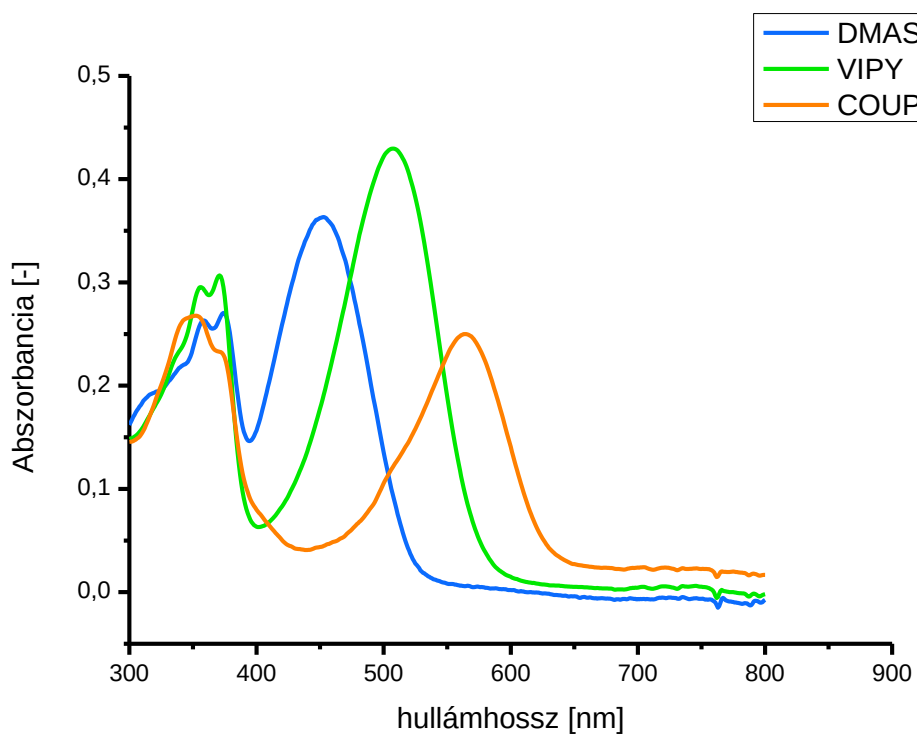
Az **1-3** molekulákból először acetonitriles törzsoldatokat készítettem, melyeknek a koncentrációja 1 mM volt. Az oldatok elkészítését sötétben végeztem.



19. ábra: A besugárzáshoz használt egyik LED-panel.

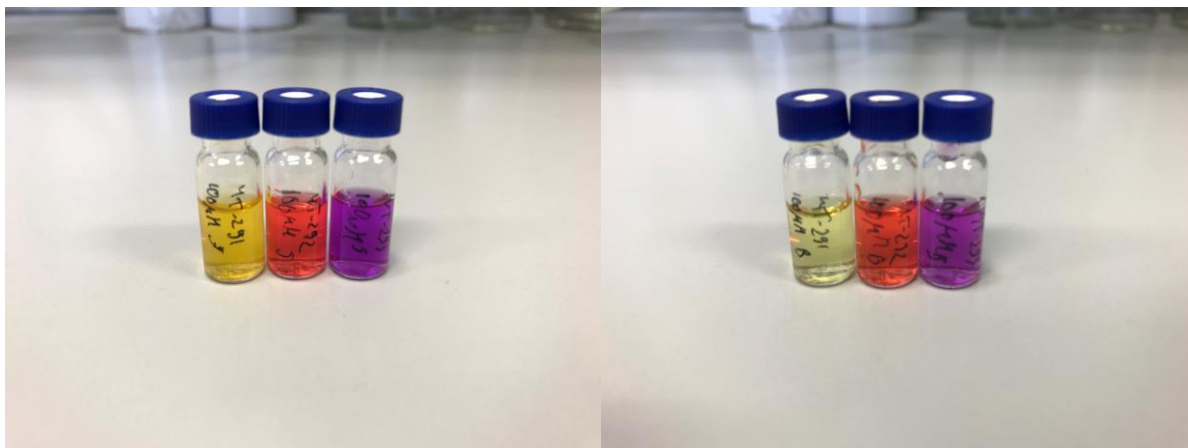


20. ábra: A LED-panelek emissziós spektrumai.



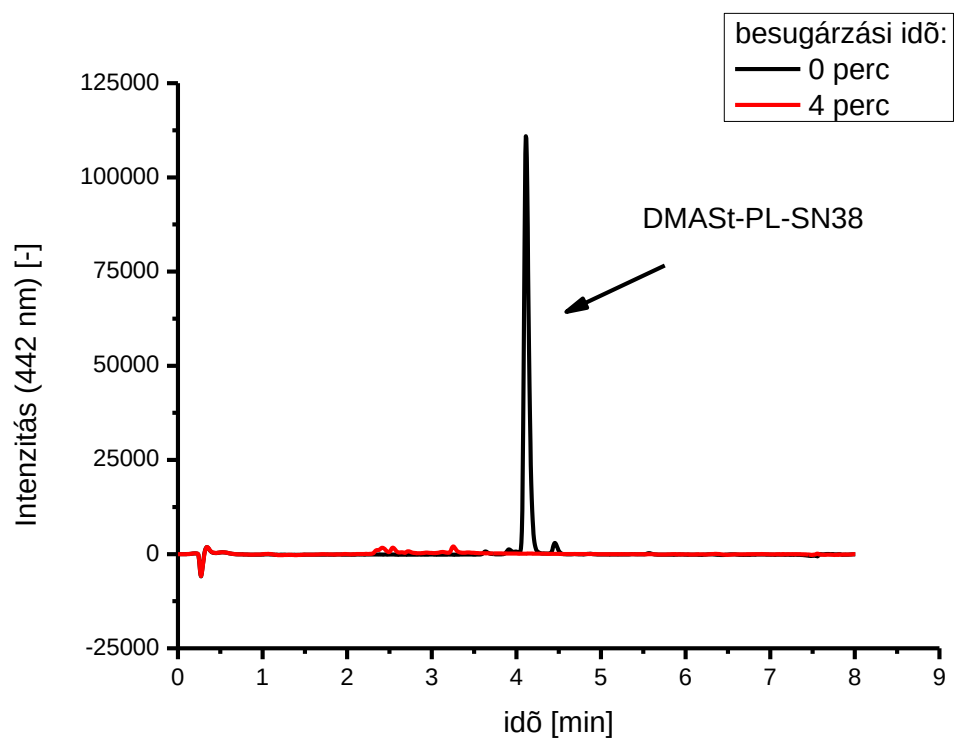
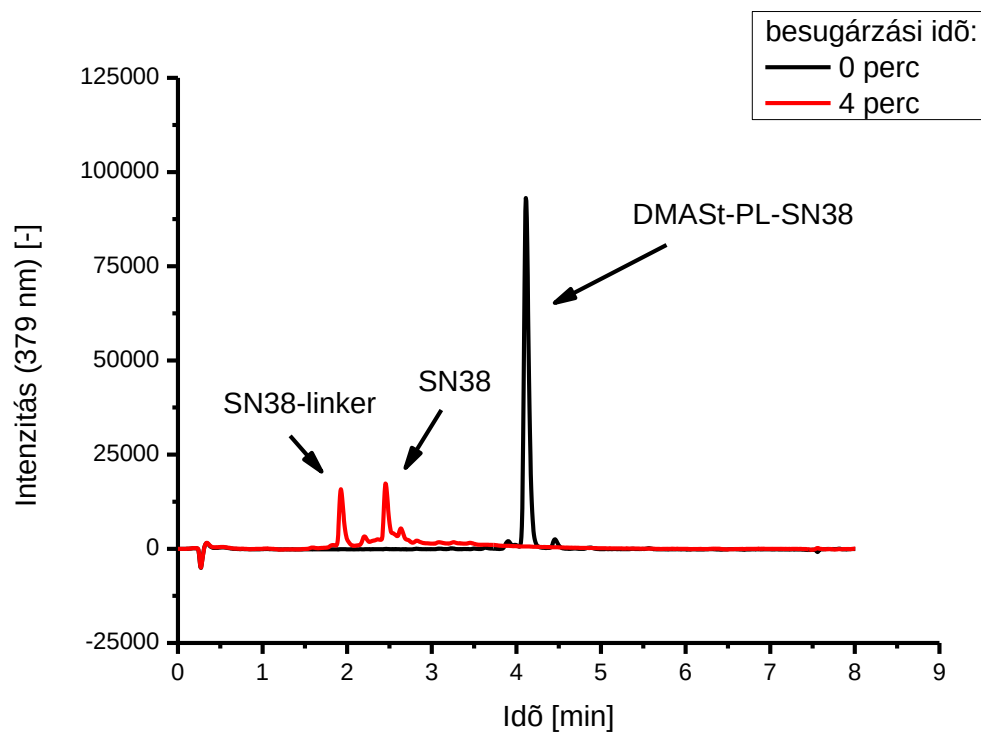
21. ábra: DMASt-PL-SN38 (1), VIPY-PL-SN38 (2), COUPY-PL-SN38 (3) abszorpciós spektruma.

Az abszorbancia méréshez 2 ml 10 μ M-os oldatokat készítettem vízzel, a DMASt esetében víz-MeCN 1:1 elegyet alkalmaztam a gyengébb vízoldhatósága miatt. Az abszorpciós maximumok 442 nm-nél (1), 507 nm-nél (2) és 568 nm-nél (3) találhatók, illetve jól látható az SN-38 abszorpciós maximuma 379 nm-nél mindegyik anyagnál (21. ábra).

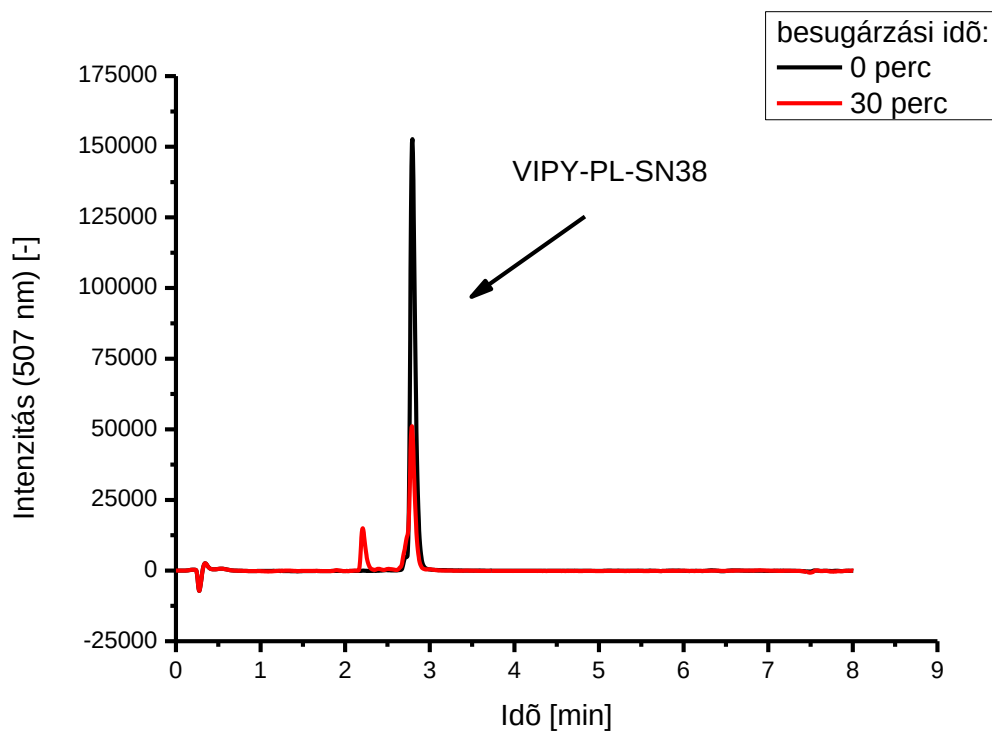
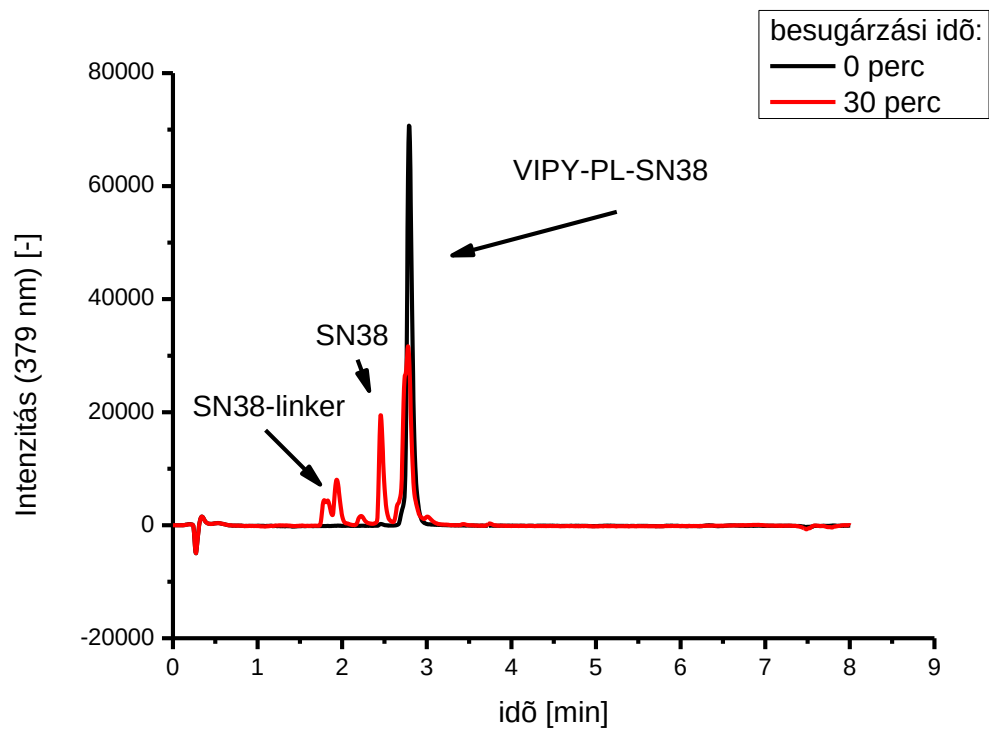


22. ábra: A minták besugárzás előtt és besugárzás után, balról jobbra DMASt-PL-SN38 (1), VIPY-PL-SN38 (2), COUPY-PL-SN38 (3).

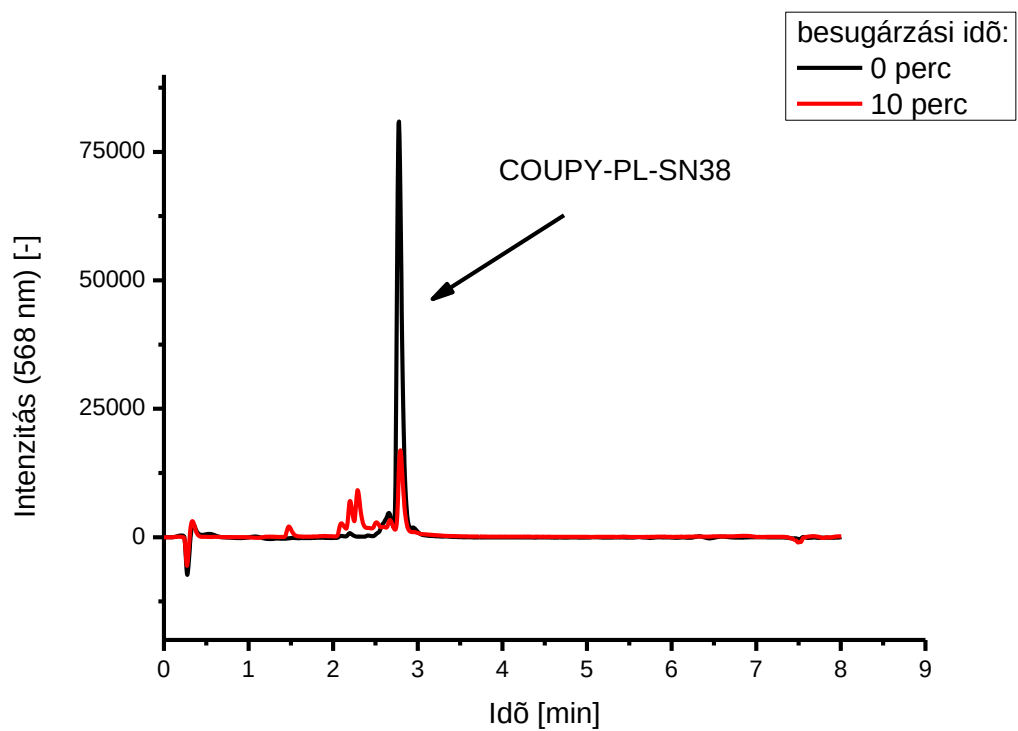
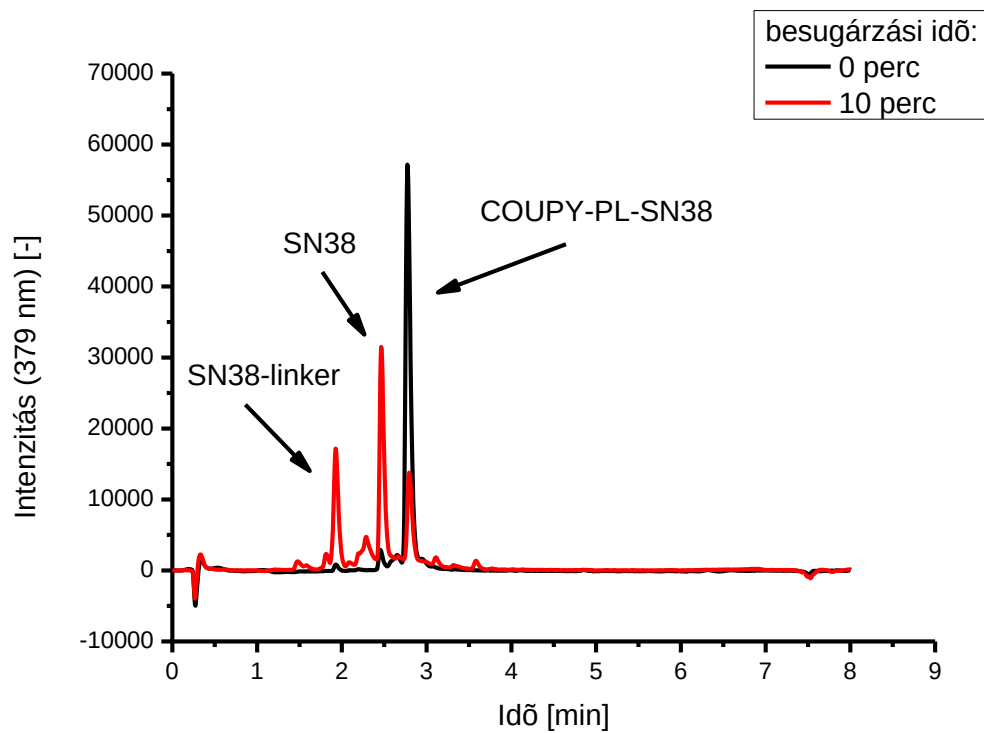
A fotolízisek követését a 6. fejezetben ismertetett HPLC-MS készülékkel végeztem el. A fotolízis mérések mellett minden egyes célvegyületnek megvizsgáltam a sötétstabilitását is, ezért minden mintaoldatból készítettem egy sötét és egy fénnel besugározandó mintát. Egyébiránt a két minta összetétele teljesen megegyezett. Az oldatkészítést ebben az esetben is minimális fény mellett végeztem, a sötét mintákat pedig elkészítés után alufóliába csomagolva, fénytől védett helyen tároltam. Az LC-MS mérésekhez 0,1 mM koncentrációjú oldatot készítettem a törzsoldatokból, víz-MeCN 9:1 arányban. A mintákat ezután a megfelelő LED-panellel besugároztam és HPLC-MS-el követtem a bomlásukat (23-25. ábra).



23. ábra: A DMASt-PL-SN38 HPLC-MS kromatogramjai 379 és 442 nm-en.

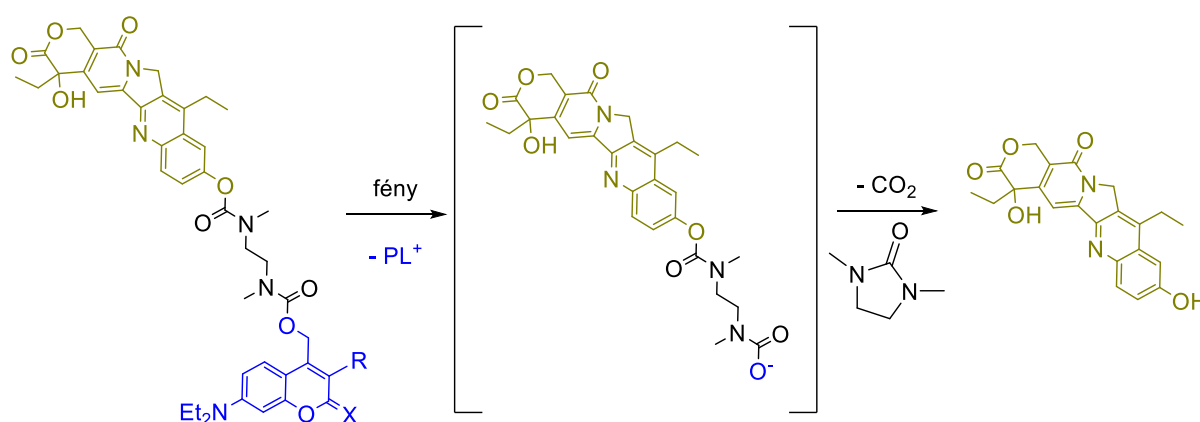


24. ábra: A VIPY-PL-SN38 HPLC-MS kromatogramjai 379 és 507 nm-en.



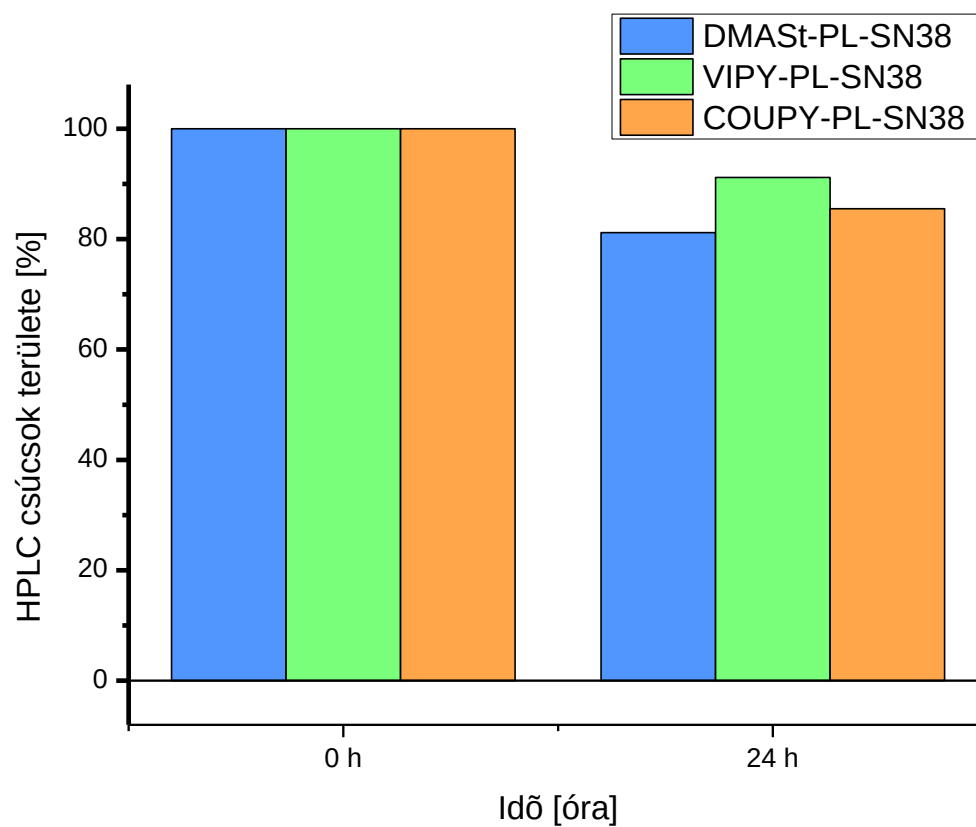
25. ábra: A COUPY-PL-SN38 HPLC-MS kromatogramjai 379 és 568 nm-en.

442 nm-en (DMASt-PL-SN38), 507 nm-en (VIPY-PL-SN38), illetve 568 nm-en (COUPY-PL-SN38) látható a kiindulási anyagok fogyása (23-25. ábra). 379 nm-en az SN-38 felszabadulás követhető nyomon. Minden esetben két újonnan megjelenő csúcs látható, amelyből a kb. 2,5 percnél található csúcs a tömegspektrum alapján a felszabadult hatóanyag (m/z: 393), 2 percnél pedig az SN-38-linker található (m/z: 507), mivel a mérés pillanatában az önfeláldozó linker lehasadása még nem játszódtott le teljesen a vizes közegben, mely nem tartalmazott puffert (26. ábra). Megállapítható tehát, hogy a kötéslehasadás és az önfeláldozó linker bomlása a várakozásoknak megfelelően történt minden esetben, a leggyorsabban a kék fényre történt a fotolízis a DMASt esetében, a leglassabbnak pedig a VIPY származék bizonyult.



26. ábra: A célmolekulák fotolízisének szemléltetése.

A sötét kontroll minták kromatogramjait az oldatkészítést követő 24 óra után mértem meg (27. ábra), a mérések idejét kivéve a mintákat fénytől védett helyen tároltam. Ilyen körülmények között a VIPY-PL-SN38 bizonyult a legstabilabbnak, kevesebb mint 10%-a bomlott el, míg a DMASt-PL-SN38-ból és a COUPY-PL-SN38-ból is kevesebb mint 20% bomlott el.



27. ábra: A célvegyületek stabilitásának vizsgálata fénymentes körülmények között.

6. Általános kísérleti adatok

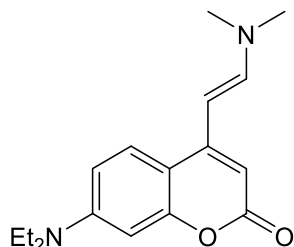
A reakciókban alkalmazott vegyszerek és oldószerek kereskedelmi forgalomban kaphatók (Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, Alfa Aesar, Reanal, Molar Chemicals, Fluorochem cégek termékei), amelyek előzetes tisztítás nélkül kerültek felhasználásra. A vízmentes oldószereket a megfelelő szárítószerrel desztillálva készítettük, és felhasználásig inert körülmények között tároltuk. A reakciók vékonyréteg kromatográfiás követéséhez Kieselgel 60 F254 VRK lapokat (Merck) használtunk, az alkalmazott eluenseket a megfelelő helyen tüntettem fel. A detektálást UV-lámpával végeztük, 254 és 365 nm-en. Néhány esetben káliumpermanganátot használtunk előhívószerként. Az oszlopkromatográfiás tisztításhoz Zeochem szilikagél (0,06–0,2 mm) használtunk. A flash kromatográfiás tisztításokat CombiFlash Rf+ készülékkel végeztük. A termelés meghatározása előtt a megtisztított anyagokat tömegállandóságig vákuumon szárítottuk.

A mikrohullámú reakciókat Anton Paar Monowave 300 típusú készülékben végeztem. A kapott anyagok tisztaságát és szerkezetét NMR spektroszkópiával és MS-mérésekkel is alátámasztottuk. A ^1H és ^{13}C NMR méréseket deuterált dimetilszulfidos, deuterált metanolos, deuterált acetonitriles vagy deuterio-kloroformos oldatokban végeztük, Varian Inova 500 MHz spektrométeren. A kémiai eltolódásoknál az adott oldószer jelét vettük referenciának, a kémiai eltolódásokat (δ) ppm-ben adtuk meg, a csatolási állandókat (J) Hz-ben. A felhasadások rövidítése: s (szingulett), d (dublett), t (triplett), q (kvartett), qv (kvintett), m (multiplett), br (széles). Feldolgozáshoz MestreNova kiértékelő programot használtunk. A reakciók követését Shimadzu LCMS-2020 műszeren végeztük (eluens: acetonitril/víz, 0,1% HCOOH).

7. A szintézisek részletes leírása

Egyes molekulák nmr spektrumai bonyolultságuk miatt egyelőre nem lettek kielemezve, ezekre később kerül majd sor.

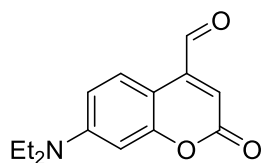
1. 7-dietilamino-4-dimetilaminovinilkumarin (5)



Összemértem 3,67 g (15,9 mmol) 7-dietilamino-4-metilkumarint, 4,2 ml (31,8 mmol, 3,79 g, 2 ekv.) dimetilformamid-dimetilacetált és 35 ml DMF-ot. A reakcióelegyet refluxhőmérsékleten egy éjszakán át reagáltattam. A reakció végén a lehűlt oldatot 100 ml telített vizes NaHCO_3 -ra öntöttem. A kiváló narancssárga csapadékot 3x60 ml DKM-nal extraháltam, majd vízzel, végül tömény sóoldattal mostam. A szerves fázist MgSO_4 -on szárítottam, majd bepároltam. A nyers terméket 20 ml etil-acetát és 80 ml hexán elegyében átkristályosítottam, szűrés és hexános mosás után az anyagot megszáritottam. Az anyagot további tisztítás nélkül alakítottam át a következő lépésben.

Termelés: 4,504 g (99 %)

2. 7-dietilamino-4-formilkumarin (6)



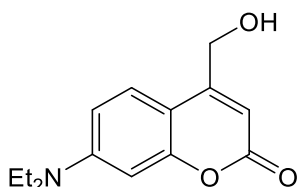
Kimértem 4,55 g (15,9 mmol) 5-ös számú anyagot és 60 ml THF-víz 1:1 elegyében feloldottam, majd az oldathoz 5,10 g (23,85 mmol, 1,5 ekv.) nátrium-metaperjodátot adagoltam. A reakcióelegyet 1,5 órán át szobahőmérsékleten kevertettem, a reakció végén a kivált csapadékot kiszűrtem, etil-acetáttal mostam. A leszűrt oldatot 3-szor telített vizes NaHCO_3 -tal extraháltam, majd egyszer $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ oldattal mostam. A szerves fázist MgSO_4 -on

szárítottam, a bepárlás után kapott nyerstermékelegyet oszlopkromatográfia segítségével tisztítottam (eluens: hexán-etil-acetát: 7:3). LC-MS és VRK alapján a termék tiszta volt.

Termelés: 1,99 g (51 %)

LRMS: $[M+H]^+$: $[C_{14}H_{16}NO_3]^+$ -ra számolt: 246, minta: 246.

3. 7-dietilamino-4-hidroximetilkumarin (7)



Kimértem 1,99 g (8,12 mmol) 6-os számú anyagot és 20 ml THF és 50 ml EtOH elegyében feloldottam, majd jeges hűtés mellett hozzáadtam 923 mg (24,4 mmol, 3 ekv.) NaBH₄-et. A reakcióelegyet 1 órán át szobahőmérsékleten kevertettem. Ezután az oldószer nagy részét bepároltam, majd 100 ml telített NaHCO₃-ra öntöttem, 3-szor DKM-nal extraháltam, majd tömény sóoldattal mostam. A szerves fázist MgSO₄-on szárítottam, majd bepároltam. LC-MS és NMR alapján tiszta terméket kaptam.

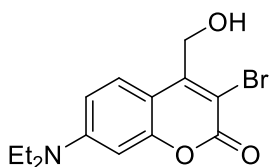
Termelés: 1,66 g (82 %)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,31 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 6,55 (dd, *J* = 9,0, 2,5 Hz, 1H), 6,48 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 6,26 (d, *J* = 1,3 Hz, 1H), 4,98 – 4,75 (m, 2H), 3,39 (q, *J* = 7,1 Hz, 4H), 1,30 – 1,11 (t, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 162,7, 156,1, 154,9, 150,5, 124,3, 108,6, 106,3, 105,4, 97,7, 60,8, 44,6, 12,4.

LRMS: $[M+H]^+$: $[C_{14}H_{18}NO_3]^+$ -ra számolt: 248, minta: 248.

4. 3-bróm-7-dietilamino-4-hidroximetil-kumarin (8)



Összemértem 309 mg (1,25 mmol) 7-es számú anyagot és 1,5 ml THF-t, majd jegyes hűtés közben hozzáadtam 200 mg (1,125 mmol, 0,9 ekv.) NBS-t és 9,4 mg (0,125 mmol, 0,1

ekv.) NH_4OAc -ot. A reakcióelegyet 1 órán át szobahőmérsékleten kevertettem. A reakció végén kapott oldatot kétszer extraháltam etil-acetáttal. A szerves fázist vízzel, majd tömény sóoldattal mostam, MgSO_4 -on szárítottam, majd bepároltam. Ezt flash kromatográfia segítségével tisztítottam meg (eluens: hexán-etil-acetát 3:7). LC-MS és NMR alapján tiszta terméket kaptam.

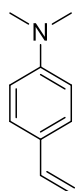
Termelés: 216,7 mg (53 %)

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7,66 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H), 6,62 (dd, $J = 9,2, 2,6$ Hz, 1H), 6,48 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 4,95 (s, 2H), 3,41 (q, $J = 7,1$ Hz, 4H), 1,21 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 158,3, 155,2, 150,8, 150,8, 126,4, 109,3, 107,5, 105,3, 97,3, 61,6, 44,8, 12,4.

LRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$: $[\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{BrNO}_3]^+$ -ra számolt: 326, minta: 326.

5. Dimetilamino-sztirol (10)



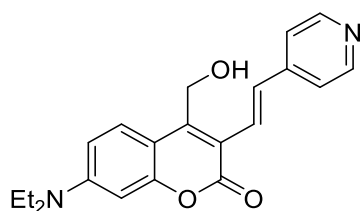
Összemértem 2,24 g (6,27 mmol 1,25 ekv.) metiltrifenilfoszfónium bromidot, 1,13 g (10,0 mmol, 2 ekv.) KOtBu -ot és 10 ml THF-t, majd az oldathoz 0,75 g (5,0 mmol) 4-dimetilaminobenzaldehyd THF-os oldatát (5 ml) csepegtettem. A reakcióelegyet 2 órán át szobahőmérsékleten kevertettem. A keletkező termékhez 10 ml MeOH-t adtam, a csapadékot kiszűrtem, etil-acetáttal mostam. A leszűrt oldatot vízzel mostam, majd kétszer etil-acetáttal extraháltam. Az összegyűjtött szerves fázisokat vízzel, majd tömény sóoldattal mostam. A szerves fázist MgSO_4 -on szárítottam, majd bepároltam. LC-MS és NMR alapján a termék mellett trifenilfoszfinoxid volt a termékben, 37:63 m/m% -arányban.

Termelés: 729 mg (99%)

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7,32 – 7,27 (d, 2H), 6,71 – 6,65 (d, 2H), 5,53 (dd, $J = 17,6, 1,1$ Hz, 1H), 5,01 (dd, $J = 10,9, 1,1$ Hz, 1H), 2,95 (s, 6H).

LRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$: $[\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}]^+$ -ra számolt: 148, minta: 148.

6. VIPY alapváz (13)



Bemértem 200 mg (0,61 mmol) **8**-as anyagot és feloldottam 4 ml absz. DMF-ban, majd hozzáadtam 28 mg (0,031 mmol, 0,05 ekv.) Pd₂dba₃-ot, 22 mg Q-Phost (0,031 mmol, 0,05 ekv.), 261 µl diciklohexilmetilamint (1,22 mmol, 238 mg, 2 ekv.), majd végül a 200 µl 4-vinilpiridint (1,85 mmol, 194,6 mg, 3 ekv.). A keletkezett elegyet 10 percig nitrogénnel inertizáltam, majd mikrohullámú reaktorban 1 órán át kevertettem 100 °C-on. A reakcióelegyet bepároltam, és flash kromatográfiával tisztítottam (eluens: DKM-MeOH 9:1). VRK és HPLC-MS alapján tiszta terméket kaptam.

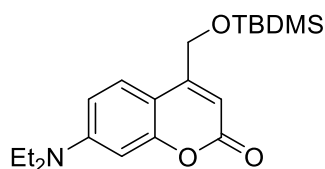
Termelés: 171 mg (80%)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8,47 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H), 7,70 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 7,62 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 7,37 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H), 7,27 (d, *J* = 6,3 Hz, 2H), 6,65 (dd, *J* = 9,2, 2,6 Hz, 1H), 6,48 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 4,97 (s, 2H), 3,43 (q, *J* = 7,1 Hz, 4H), 1,23 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃-CD₃OD 1:1) δ 161,7, 155,4, 150,9, 149,6, 149,2, 146,4, 130,7, 127,0, 125,8, 121,3, 115,0, 109,5, 108,4, 97,1, 62,4, 44,8, 12,4.

LRMS: számított [M+H]⁺ : [C₂₁H₂₃N₂O₃]⁺ m/z = 351 mért: 351

7. 4-(terc-butildimetilszilil)oximetil-7-dietilamino-kumarin (14)



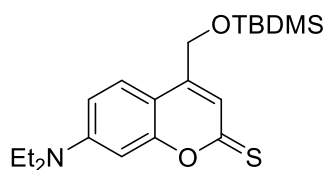
Bemértem 1,24 g (5,02 mmol) **7**-es anyagot és feloldottam 20 ml DKM-ban, majd hozzáadtam 1,51 g TBDMSCl-ot (10,04 mmol, 2,0 ekv.), 0,60 g imidazolt (10,04 mmol, 2,0 ekv.) és katalitikus mennyiségű DMAP-t (30,7 mg, 0,251 mmol, 0,05 ekv.). A reakcióelegyet 1 órán át reagáltattam, majd telített NH₄Cl-oldattal extraháltam. A szerves fázist MgSO₄-on

szárítottam, majd bepároltam. A nyersterméket flash kromatográfiával tisztítottam (eluens: hexán-etil-acetát: 9:1). VRK és HPLC-MS alapján tiszta terméket kaptam.

Termelés: 1,53 mg (85%)

HRMS: $[M+H]^+$: $[C_{20}H_{32}NO_3Si]^+$ -ra számolt: 362,2151, minta: 362,2148.

8. 4-(terc-butildimetilszilil)oximetil-7-dietilamino-tiokumarin (15)

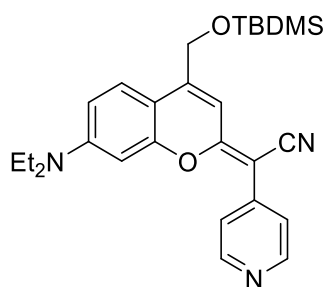


1500 mg (4,15 mmol) **14**-es anyagot feloldottam 20 ml toluolban, majd hozzáadtam 1680 mg (4,15 mmol, 1 ekv.) Lawesson-reagenst. Az elegyet 1 órán keresztül kevertettem nitrogén atmoszféra alatt, reflux hőmérsékleten, a reakciót HPLC-MS segítségével követtem. Ezután a reakcióelegyet bepároltam, és flash kromatográfiával tisztítottam (eluens: hexán-etilacetát 8:2).

Termelés: 1150 mg (74 %)

HRMS: $[M+H]^+$: $[C_{20}H_{32}NO_3Si]^+$ -ra számolt: 378,1923, minta: 378,1915.

9. COUPY-tercbutildimetilszilil alapváz (17)



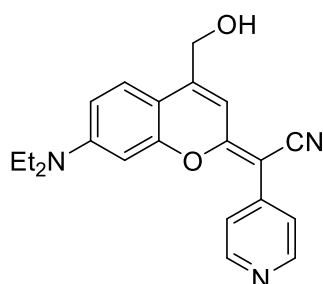
200 mg (0,53 mmol) **15**-ös anyagot feloldottam 4 ml absz, THF-ban, majd hozzáadtam 6 mg (0,027 mmol, 0,05 ekv.) 15-korona-5 étert, 56 mg (0,477 mmol, 0,9 ekv.) 4-piridilacetonitrilt és 50 mg (2,12 mmol, 4 ekv.) NaH-et. Az elegyet szobahőmérsékleten 1,5 órán keresztül kevertettem nitrogén atmoszféra alatt sötétben. Ezután a reakcióelegyet bepároltam, majd flash kromatográfiával tisztítottam (eluens: DKM-MeOH 99:1). A kapott termékelegyet feloldottam 5 ml DKM-ben és 90 mg (0,53 mmol, 1 ekv.) $AgNO_3$ -ot adtam

hozzá, majd 1 órán át kevertettem szobahőmérsékleten sötétben. Ezután a reakcióelegyet vízzel extraháltam. A szerves fázist MgSO_4 -on szárítottam, majd bepároltam.

Termelés: 149 mg (60%)

HRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$: $[\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_2\text{Si}]^+$ -ra számolt: 462,2577, minta: 462,2567.

10. COUPY alapváz (18)

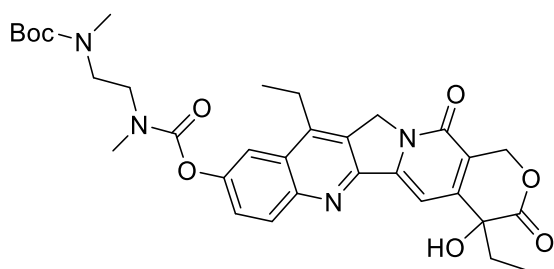


Összemértem 60 mg (0,11 mmol) **17**-es anyagot, 6 ml THF-t és 1 ml deszt. vizet és 3 ml hangyasavat. A reakcióelegyet egy éjszakán át szobahőmérsékleten kevertettem. A reakció végén az elegyhez DKM-t adtam és telített NaHCO_3 -os oldattal extraháltam. A szerves fázist MgSO_4 -on szárítottam, majd bepároltam. LC-MS-alapján a termék tiszta volt.

Termelés: 37 mg (99 %)

HRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$: $[\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{NO}_2]^+$ -ra számolt: 348,1712, minta: 348,1707.

11. Boc védett SN-38-linker (21)



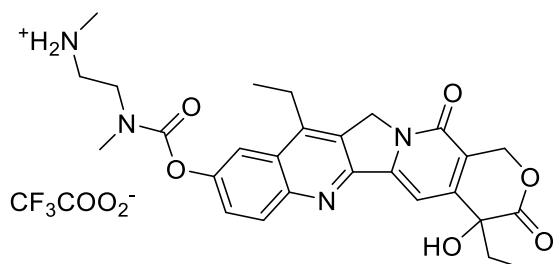
Összemértem 230 mg (0,54 mmol 1,2 ekv) **19**-es számú anyagot, 3 ml absz. DMF-t, 225 μl (1,62 mmol, 3 ekv.) TEA-t, majd 177 mg (0,45 mmol, 1 ekv.) SN-38-t és 1,6 mg (0,0162 mmol, 0,03 ekv.) DMAP-t adtam hozzá. A reakcióelegyet nitrogén atmoszféra alatt 1 órán át 80 °C-on kevertettem. A reakció végén bepároltam az oldatot, a kapott termékelegyet flash

kromatográfia segítségével választottam el (eluens: diklórmétán-metanol 99:1). LC-MS és NMR alapján a termék tiszta.

Termelés: 261 mg (96%)

HRMS: $[M+H]^+$: $[C_{32}H_{39}N_4O_8]^+$ -ra számolt: 607,2768, minta: 607,2767.

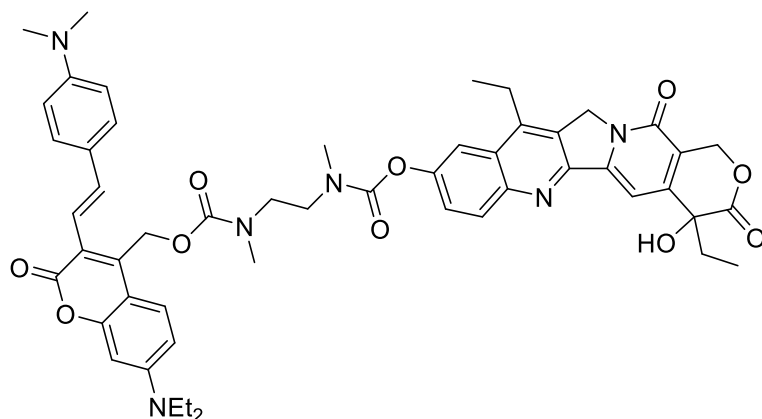
12. SN-38-linker (22)



A **21**-es anyagot (81 mg; 0,134 mmol) feloldottam 3 ml DKM-ban, majd hozzáadtam 1,3 ml TFA-at és 2 csepp vizet. A reakcióelegyet 1 órán át szobahőmérsékleten kevertettem. A reakcióelegyet bepároltam, majd további tisztítás nélkül felhasználtam a következő lépéshez.

HRMS: $[M]^+$: $[C_{27}H_{31}N_4O_6]^+$ -ra számolt: 507,2244, minta: 507,2227.

13. DMASSt-linker-SN-38 (1)



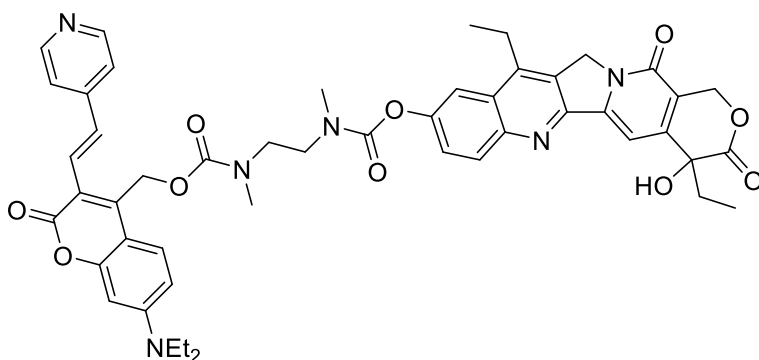
Kimértem 58 mg (0,15 mmol) **11**-es anyagot és 3 ml DKM-ban feloldottam, majd az oldathoz 85 μ l (0,60 mmol, 4 ekv.) TEA-t, és 95 mg (0,37 mmol, 2,5 ekv.) DSC-t adagoltam. A reakcióelegyet 2 órán át szobahőmérsékleten kevertettem sötétben, miután az LC-MS szerint végbement az aktiválás. A keletkezett termékhez DKM-t adagoltam, majd háromszor telített $NaHCO_3$ -tal extraháltam. A szerves fázist $MgSO_4$ -on szárítottam, majd bepároltam.

Az aktivált köztterméket és 90 mg **22**-es anyagot (0,15 mmol) anyagot összemértem és feloldottam 3 ml DKM-t, majd 85 µl TEA (0,60 mmol, 4 ekv.) adtam hozzá. A reakcióelegyet fél órán át szobahőmérsékleten kevertettem sötétben, a termék keletkezését LC-MS segítségével követtem. A reakció végén kapott oldatot bepároltam, majd a termékelegyet flash kromatográfia segítségével választottam el (eluens: DKM-MeOH 1:0-95:5). LC-MS és NMR alapján a termék tiszta.

Termelés: 60 mg (43%)

HRMS: $[M+H]^+$: $[C_{52}H_{57}N_6O_{10}]^+$ -ra számolt: 925,4136, minta: 925,4153.

14. VIPY-linker-SN-38 alapváz (24)



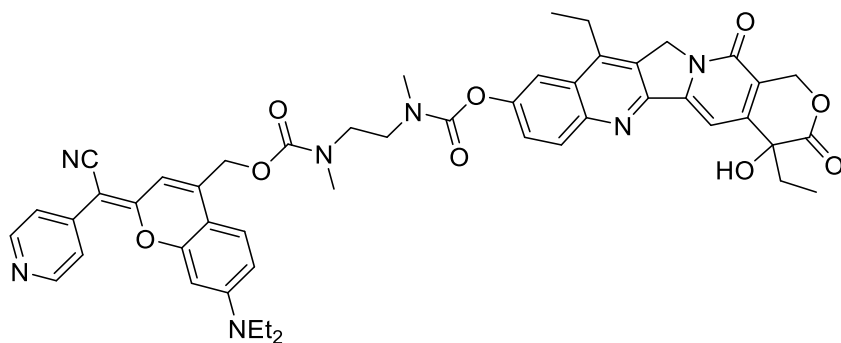
Kimértem 47 mg (0,134 mmol) **13**-as számú anyagot és 3 ml DKM-ban feloldottam, majd az oldathoz 75 µl (0,536 mmol, 4 ekv.) TEA-t, és 86 mg (0,34 mmol, 2,5 ekv.) DSC-t adagoltam. A reakcióelegyet 2 órán át szobahőmérsékleten kevertettem sötétben, miután az LC-MS szerint végbement az aktiválás. A keletkezett termékhez DKM-t adtam, majd háromszor telített $NaHCO_3$ -tal extraháltam. A szerves fázist $MgSO_4$ -on szárítottam, majd bepároltam.

Az aktivált köztterméket és 81 mg **22**-es anyagot (0,134 mmol) anyagot összemértem és feloldottam 3 ml DKM-t, majd 75 µl TEA (0,536 mmol, 4 ekv.) adtam hozzá. A reakcióelegyet fél órán át szobahőmérsékleten kevertettem sötétben, a termék keletkezését LC-MS segítségével követtem. A reakció végén kapott oldatot bepároltam, majd a termékelegyet flash kromatográfia segítségével tisztítottam meg (eluens: DKM-MeOH 1:0-95:5). LC-MS és NMR alapján a termék tiszta.

Termelés: 30 mg (25%)

HRMS: $[M+H]^+$: $[C_{49}H_{51}N_6O_{10}]^+$ -ra számolt: 883,3667, minta: 883,3690.

15. COUPY-linkerSN-38 alapváz (25)



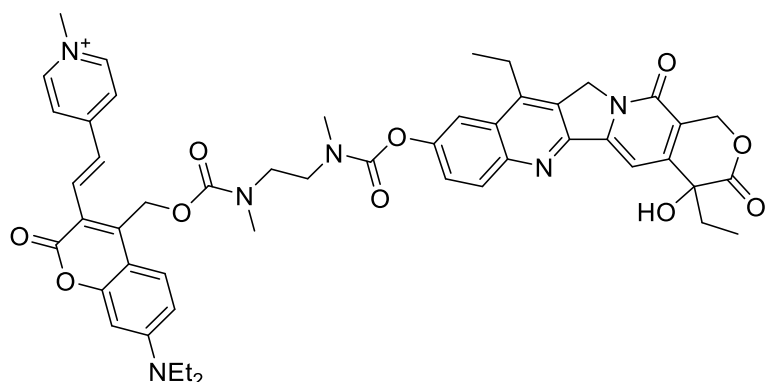
Kimértem 40 mg (0,12 mmol) **18**-as anyagot és 3 ml DKM-ban feloldottam, majd az oldathoz 67 μ l (0,48 mmol, 4 ekv.) TEA-t, és 77 mg (0,3 mmol, 2,5 ekv.) DSC-t adagoltam. A reakcióelegyet 2 órán át szobahőmérsékleten kevertettem sötétben, miután az LC-MS szerint végbement az aktiválás. A keletkezett termékhez DKM-t adtam, majd háromszor telített NaHCO_3 -tal extraháltam. A szerves fázist MgSO_4 -on szárítottam, majd bepároltam.

Az aktivált köztterméket és 73 mg **22**-es anyagot (0,12 mmol) anyagot összemértem és feloldottam 3 ml DKM-t, majd 67 μ l TEA (0,3 mmol, 4 ekv.) adtam hozzá. A reakcióelegyet fél órán át szobahőmérsékleten, sötétben kevertettem, a termék keletkezését LC-MS segítségével követtem. A reakció végén kapott oldatot bepároltam, majd a termékelegyet flash kromatográfia segítségével választottam el (eluens: DKM-MeOH 1:0-95:5). LC-MS és NMR alapján a termék tiszta.

Termelés: 38 mg (35%)

HRMS: $[\text{M}+\text{H}]^+$: $[\text{C}_{49}\text{H}_{50}\text{N}_7\text{O}_9]^+$ -ra számolt: 880,3670, minta: 880,3699.

16. VIPY-linker-SN-38 (2)



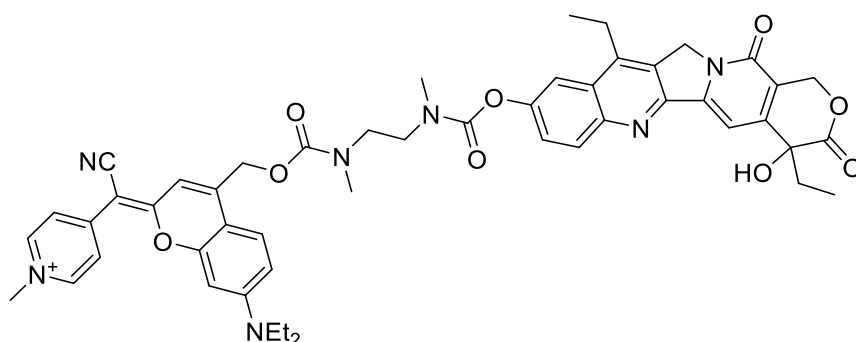
10 mg (0,012 mmol) **24**-es anyagot anyagot feloldottam 1 ml acetonitrilben, majd hozzáadtam 7 μ l (0,12 mmol, 17 mg, 10 ekv.) metil-jodidot. Az elegyet bombacsőben, 50 °C-

on 2 órán keresztül kevertetem. Szobahőmérsékletre hűtés után a reakcióelegyből kristályos lila színű anyag vált ki, amely VRK és HPLC-MS alapján tisztán terméknek bizonyult. A nyers terméket preparatív HPLC-vel tisztítottam TFA-s eluenssel.

Termelés: 8 mg (74%)

HRMS: $[M]^+$: $[C_{50}H_{53}N_6O_{10}]^+$ -ra számolt: 897,3823, minta: 897,3860.

17. COUPY-linker-SN-38 (3)



30 mg (0,034 mmol) **25**-ös anyagot feloldottam 1 ml acetonitrilben, majd hozzáadtam 21 μ l (0,34 mmol, 48 mg, 10 ekv.) metil-jodidot. Az elegyet bombacsőben, 50 °C-on 2 órán keresztül kevertetem. Szobahőmérsékletre hűtés után a reakcióelegyből kristályos lila színű anyag vált ki, amely VRK és HPLC-MS alapján tisztán terméknek bizonyult. A nyers terméket preparatív HPLC-vel tisztítottam TFA-s eluenssel.

Termelés: 27 mg (88%)

HRMS: $[M]^+$: $[C_{50}H_{52}N_7O_9]^+$ -ra számolt: 894,3827, minta: 894,3865.

8. Összefoglalás

Kutatómunkám során a célom olyan molekulák szintézisének kidolgozása volt, amelyek képesek látható fény hatására célzott hatóanyagfelszabadításra. Erre a célra három kiterjesztett π -elektronrendszerű kumarinvázis fotolabilis vegyületet kapcsoltam össze önfeláldozó linkerrel keresztül egy kemoterápiás szerhez. Sikeresen előállítottam egy kék, zöld és egy narancssárga fényre aktiválható konjugátumot, majd ezeknek felvettem az abszorpciós spektrumát és vizsgáltam a fotolízisüket HPLC-MS segítségével. A kék fényre aktiválható molekula (DMASt-PL-SN38) esetében felmerült vízdoldhatósági problémák miatt a biológiai felhasználása korlátozott, viszont a másik két konjugátum (COUPY-PL-SN38 és VIPY-PL-SN38) ígéretesnek bizonyult.

A kutatócsoport biológus tagjai SK-OV-3 (petefészekrák) sejtvonalon citotoxicitás vizsgálatot végeztek és megállapították, hogy a COUPY-PL-SN38 és VIPY-PL-SN38 vegyületek kiemelkedő sötétstabilitással bírnak, és a konjugátumokban nagy hatékonysággal gátolt a hatóanyag biológiai aktivitása (VIPY: >100x, COUPY: ~25x, IC₅₀ növekedés). Fény hatására sejtes környezetben sikeresen szabadították fel a topoizomeráz I gátló SN38-at a hatóanyag-konjugátumokból élő szervezetekre teljesen ártalmatlan zöld és narancs fénnel. A bevilágított konjugátumoknál közel azonos citosztatikus aktivitást állapítottak meg, mint a szabad hatóanyagnál, így a vegyületek kiválóan alkalmasak látható fénnel aktiválható kemoterápiára.

A szintézisút kidolgozása során a kis anyagmennyiségek a molekulák összetettsége miatt a karakterizálás még nem minden esetben történt meg, így további terveim között szerepel a molekulák nagyobb méretben történő előállítása, karakterizálása és részletesebb spektroszkópai vizsgálatok elvégzése.

9. Irodalomjegyzék

- (1) Bae, Y. H.; Park, K. Targeted Drug Delivery to Tumors: Myths, Reality and Possibility. *J. Control. Release* **2011**, *153* (3), 198–205..
- (2) Bonnet, S. Why Develop Photoactivated Chemotherapy? *Dalt. Trans.* **2018**, *47* (31), 10330–10343.
- (3) Weinstein, R.; Slanina, T.; Kand, D.; Klán, P. Visible-to-NIR-Light Activated Release: From Small Molecules to Nanomaterials. *Chemical Reviews*. October 30, 2020, pp 13135–13272.
- (4) Lin, Q.; Yang, L.; Wang, Z.; Hua, Y.; Zhang, D.; Bao, B.; Bao, C.; Gong, X.; Zhu, L. Coumarin Photocaging Groups Modified with an Electron-Rich Styryl Moiety at the 3-Position: Long-Wavelength Excitation, Rapid Photolysis, and Photobleaching. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, *57* (14), 3722–3726.
- (5) Bojtár, M.; Kormos, A.; Kis-Petik, K.; Kellermayer, M.; Kele, P. Green-Light Activatable, Water-Soluble Red-Shifted Coumarin Photocages. *Org. Lett.* **2019**, *21* (23), 9410–9414.
- (6) López-Corrales, M.; Rovira, A.; Gandioso, A.; Bosch, M.; Nonell, S.; Marchán, V. Transformation of COUPY Fluorophores into a Novel Class of Visible-Light-Cleavable Photolabile Protecting Groups. *Chem. - A Eur. J.* **2020**, *26* (69), 16222–16227.
- (7) Ebrahimnejad, P.; Dinarvand, R.; Sajadi, A.; Jaafari, M. R.; Nomani, A. R.; Azizi, E.; Rad-Malekshahi, M.; Atyabi, F. Preparation and in Vitro Evaluation of Actively Targetable Nanoparticles for SN-38 Delivery against HT-29 Cell Lines. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2010**, *6* (3), 478–485.
- (8) Barltrop, J. A.; Plant, P. J.; Schofield, P. Photosensitive Protective Groups. *Chem. Commun.* **1966**, No. 22, 822.
- (9) Barton, D. H. R.; Chow, Y. L.; Cox, A.; Kirby, G. W. 654. Photochemical Transformations. Part XIX. Some Photosensitive Protecting Groups. *J. Chem. Soc.* **1965**, No. 367, 3571.
- (10) Patchornik, A.; Amit, B.; Woodward, R. B. Photosensitive Protecting Groups. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92* (21), 6333–6335.
- (11) Barton, D. H. R.; Chow, Y. L.; Cox, A.; Kirby, G. W. 654. Photochemical Transformations. Part XIX. Some Photosensitive Protecting Groups. *J. Chem. Soc.* **1965**, No. 367, 3571.
- (12) Engels, J.; Schlaeger, E. J. Synthesis, Structure, and Reactivity of Adenosine Cyclic 3',5'-Phosphate-Benzyltriesters. *J. Med. Chem.* **1977**, *20* (7), 907–911.
- (13) Kaplan, J. H.; Forbush, B.; Hoffman, J. F. Rapid Photolytic Release of Adenosine 5'-Triphosphate from a Protected Analog: Utilization by the Sodium:Potassium Pump of Human Red Blood Cell Ghosts. *Biochemistry* **1978**, *17* (10), 1929–1935.
- (14) Klán, P.; Šolomek, T.; Bochet, C. G.; Blanc, A.; Givens, R.; Rubina, M.; Popik, V.; Kostikov, A.; Wirz, J. Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (1), 119–191.

- (15) Silva, J. M.; Silva, E.; Reis, R. L. Light-Triggered Release of Photocaged Therapeutics - Where Are We Now? *J. Control. Release* **2019**, 298 (October 2018), 154–176.
- (16) Ash, C.; Dubec, M.; Donne, K.; Bashford, T. Effect of Wavelength and Beam Width on Penetration in Light-Tissue Interaction Using Computational Methods. *Lasers Med. Sci.* **2017**, 32 (8), 1909–1918.
- (17) Pearson, S.; Feng, J.; Campo, A. Lighting the Path : Light Delivery Strategies to Activate Photoresponsive Biomaterials In Vivo. **2021**, 2105989.
- (18) Arkhipova, V.; Fu, H.; Hoorens, M. W. H.; Trinco, G.; Lameijer, L. N.; Marin, E.; Feringa, B. L.; Poelarends, G. J.; Szymanski, W.; Slotboom, D. J.; Guskov, A. Structural Aspects of Photopharmacology: Insight into the Binding of Photoswitchable and Photocaged Inhibitors to the Glutamate Transporter Homologue. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, 143 (3), 1513–1520.
- (19) Fournier, L.; Aujard, I.; Le Saux, T.; Maurin, S.; Beaupierre, S.; Baudin, J.; Jullien, L. Coumarinylmethyl Caging Groups with Redshifted Absorption. *Chem. – A Eur. J.* **2013**, 19 (51), 17494–17507.
- (20) Olson, J. P.; Banghart, M. R.; Sabatini, B. L.; Ellis-Davies, G. C. R. Spectral Evolution of a Photochemical Protecting Group for Orthogonal Two-Color Uncaging with Visible Light. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135 (42), 15948–15954.
- (21) Alouane, A.; Labruère, R.; Le Saux, T.; Schmidt, F.; Jullien, L. Self-Immolative Spacers: Kinetic Aspects, Structure-Property Relationships, and Applications. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, 54 (26), 7492–7509.
- (22) Chakravarty, P. K.; Carl, P. L.; Weber, M. J.; Katzenellenbogen, J. A. Plasmin-Activated Prodrugs for Cancer Chemotherapy. 2. Synthesis and Biological Activity of Peptidyl Derivatives of Doxorubicin. *J. Med. Chem.* **1983**, 26 (5), 638–644.
- (23) Tang, S.; Cannon, J.; Yang, K.; Krummel, M. F.; Baker, J. R.; Choi, S. K. Spacer-Mediated Control of Coumarin Uncaging for Photocaged Thymidine. *J. Org. Chem.* **2020**, 85 (5), 2945–2955.
- (24) Dal Corso, A.; Borlandelli, V.; Corno, C.; Perego, P.; Belvisi, L.; Pignataro, L.; Gennari, C. Fast Cyclization of a Proline-Derived Self-Immolative Spacer Improves the Efficacy of Carbamate Prodrugs. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2020**, 59 (10), 4176–4181.
- (25) Chabner, B. A.; Roberts, T. G. Chemotherapy and the War on Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, 5 (1), 65–72.
- (26) Miller, K. D.; Nogueira, L.; Mariotto, A. B.; Rowland, J. H.; Yabroff, K. R.; Alfano, C. M.; Jemal, A.; Kramer, J. L.; Siegel, R. L. Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* **2019**, 69 (5), 363–385.
- (27) Espinosa, E.; Zamora, P.; Feliu, J.; González Barón, M. Classification of Anticancer Drugs—a New System Based on Therapeutic Targets. *Cancer Treat. Rev.* **2003**, 29 (6), 515–523.
- (28) McLoughlin, E. C.; O’boyle, N. M. Colchicine-Binding Site Inhibitors from Chemistry to Clinic: A Review. *Pharmaceuticals* **2020**, 13 (1), 1–43.
- (29) Pham, T. C.; Nguyen, V.; Choi, Y.; Lee, S.; Yoon, J. Recent Strategies to Develop

- Innovative Photosensitizers for Enhanced Photodynamic Therapy. *Chem. Rev.* **2021**, acs.chemrev.1c00381.
- (30) Shi, H.; Sadler, P. J. How Promising Is Phototherapy for Cancer? *Br. J. Cancer* **2020**, *123* (6), 871–873.
 - (31) Harris, A. L. Hypoxia - A Key Regulatory Factor in Tumour Growth. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2* (1), 38–47.
 - (32) Van Rixel, V. H. S.; Ramu, V.; Auyeung, A. B.; Beztsinna, N.; Leger, D. Y.; Lameijer, L. N.; Hilt, S. T.; Le Dévédec, S. E.; Yildiz, T.; Betancourt, T.; Gildner, M. B.; Hudnall, T. W.; Sol, V.; Liagre, B.; Kornienko, A.; Bonnet, S. Photo-Uncaging of a Microtubule-Targeted Rigidin Analogue in Hypoxic Cancer Cells and in a Xenograft Mouse Model. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (46), 18444–18454.
 - (33) Dunkel, P.; Ilaš, J. Targeted Cancer Therapy Using Compounds Activated by Light. *Cancers (Basel)*. **2021**, *13* (13).
 - (34) Weinrich, T.; Gränz, M.; Grünewald, C.; Prisner, T. F.; Göbel, M. W. Synthesis of a Cytidine Phosphoramidite with Protected Nitroxide Spin Label for EPR Experiments with RNA. *European J. Org. Chem.* **2017**, *2017* (3), 491–496.
 - (35) Csorba Zsóka, Célzott hatóanyagleadásra képes, kék fénnel aktiválható fotolabilis vegyületek vizsgálata biológiai rendszerekben, BSc szakdolgozat, **2021**.
 - (36) Verkman András, Látható fénnel indukált, célzott hatóanyagleadásra és valós idejű optikai nyomonkövetésre képes konjugátumok előállítása, BSc szakdolgozat, **2019**.