



SZULFONILHIDRAZON MINT ÚJ KOVALENS KÖTŐELEM

OTDK DOLGOZAT

Garami Kristóf Noel

Gyógyszervegyészmérnök MSc hallgató

Témavezető:

Dr. Ábrányi-Balogh Péter

tudományos munkatárs

c. egyetemi docens

Konzulens:

Prof. Hazai László

egyetemi magántanár

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyészmérnöki és Biomérnöki kar

2023

Lezárva: 2023.01.08.

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés	2
2	Irodalmi áttekintés	3
2.1	Bevezetés a fotofarmakológiába	3
2.2	Fotoaffinitás jelölés	5
2.2.1	Azidok	7
2.2.2	Diazo- és diazóniumvegyületek	9
2.2.3	Diazirinek	11
2.2.4	Benzofenonok	12
2.3	Hidrazonok	14
3	Saját munka	17
3.1	A hidrazon típusának hatása	21
3.2	A fotoaffinitás jelölés körülményeinek optimalizálása	23
3.2.1	Az alkalmazott fény hullámhosszának optimalizálása	23
3.2.2	Fotoaffinitás jelölés besugárzási idejének optimalizálása	24
3.2.3	A fotoaffinitás jelöléshez használt puffer és pH optimalizálása	25
3.2.4	A GSH jelölés pontos helyének meghatározása	
3.3	Bővítés további hidrazon analógokra	27
3.3.1	Ketonokból előállított hidrazonok	27
3.3.2	Aldehydekből előállított származékok	29
3.3.3	Összehasonlítás hasonló méretű fotoaffinitás-jelölőkkel	31
3.4	Gyógyszerkémiail és kémiai biológiai szempontból releváns analógok előállítása	33
3.4.1	Kötőelemek	33
3.4.2	Szulfonil- vagy karbonilhidrazont tartalmazó biológiailag aktív molekulák	
3.5	A kutatás során használt analitikai módszerek	46
3.6	Fotoaktivációs reakciók kísérleti leírása	47
3.7	Elvégzett preparatív munka ismertetése	48
4	Összefoglalás	76
5	Felhasznált irodalom	77

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Dr. Ábrányi-Balogh Péternek** végtelen türelmét, segítőkészségét és rengeteg tanácsát, melyek végig kísérték az elmúlt években történő kutatásom során és lehetővé tették nagymértékű szakmai fejlődésemet. Továbbá hálával tartozom, hogy dolgozatom írása során bármikor számíthattam rá.

Szeretném kifejezni köszönetemet **Prof. Keserű György Miklósnak**, hogy kutatásom feltételeit megteremtette, és a TTK Gyógyszerkémiai Kutatócsoportban dolgozhattam.

Köszönettel tartozom a **TTK Gyógyszerkémiai Kutatócsoport** minden tagjának kutatásomban való segítségéért és támogatásáért.

Továbbá hálával tartozom belső konzulensemnek, **Prof. Hazai Lászlónak** kutatásomban való támogatásáért.

1 BEVEZETÉS

Napjainkban egyre bővül az olyan vegyületek gyógyszerkémiái és kémiai biológiai fejlesztése, melyek adott célfehérjéhez vagy egyéb más, a szervezetben található makromolekulához kovalens módon kapcsolódnak.^[1, 2] Rendkívül fontos, hogy egy hatóanyag a szervezetben hol, mikor, és hogyan fejti ki hatását, így ennek felderítésére komoly erőforrásokat fordítanak az alapkutatás során.^[3, 4, 5] Az elmúlt évtizedek kutatásai arra világítottak rá, hogy a kovalens kötődést eredményező módszerek közül számos eljárással rendkívül precízen és szelektíven befolyásolható a fehérjék működése, és a vegyületek kötődésének szabályozhatósága ma már nem kérdéses.^[6, 7, 8] Egy, már 50-60 éve ismert, de csak a 2010-es évektől igazán elterjedt eljárás a fotoaffinitás jelölés vagy fotocímkézés, mely során a kovalens kötődés egy fény hatására képződő reaktív köztitermék által valósul meg.^[9] Fotocímkézéshez azidokat, benzofenonokat, diazónium-származékokat, illetve diazirineket használnak reaktív kötőelemként, melyek gyökök, karbének vagy nitrének prekursorai.^[9]

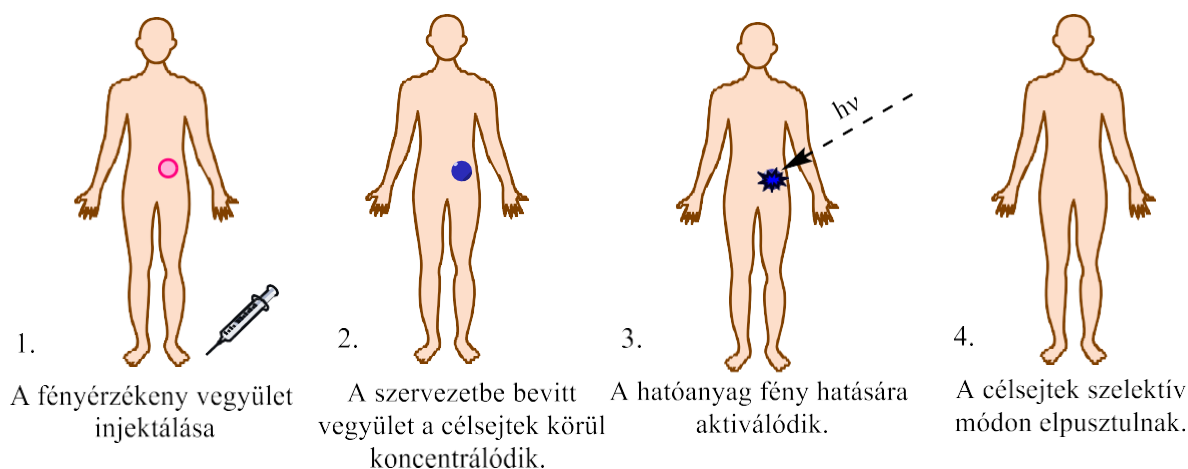
Kutatómunkám során egy, az előzőektől eltérő vegyületcsalád, a szulfonilhidrazonok fényre aktiválható kovalens kötőelemként való alkalmazhatóságát terveztem igazolni. Oxovegyületek és szulfonilhidrazidok reakciójában szulfonilhidrazonokat állítottam elő, és vizsgáltam reaktivitásukat vizes közegben fény megvilágítás hatására, különböző pH-n és pufferekben. Vizsgáltam az előállított vegyületekkel lejátszódó Bamford-Stevens/Shapiro reakció idő- és szubsztituensfüggését is. Ezen felül terveztem potenciálisan biológiailag aktív származékok előállítását is különböző fehérjecélpontok kovalens jelölése céljából.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Bevezetés a fotofarmakológiába

A fénnel kapcsolatos kutatások az elmúlt évtizedekben rendkívül elterjedtté váltak számos tudományterületen. A gyógyszerkutatás és a kémiai biológia területén is nagy figyelmet kaptak olyan jellegű törekvések, melyek során megfelelő hullámhosszú elektromágneses sugárzás hatására egy vegyület tulajdonságai tervezett és kívánt módon megváltoznak, és ezáltal felhasználhatóvá válik biológiai közegben, biológiai célpontokon.^[10, 11, 12] A gyógyszerkémia és gyógyszerészet ezen részét fotofarmakológiának vagy optofarmakológiának nevezik.^[13]

Az ágazat egyik jelentős részét képezi a fotodinamikus terápia, mely során a szervezetbe juttatott fényérzékenyítő vegyület fény és a jelenlevő oxigén hatására gyökké alakul vagy gyököket generál, melyek a kívánt sejtek szelektív elpusztulásához vezetnek (1. ábra).^[14]



1. ábra: Fotodinamikus terápia

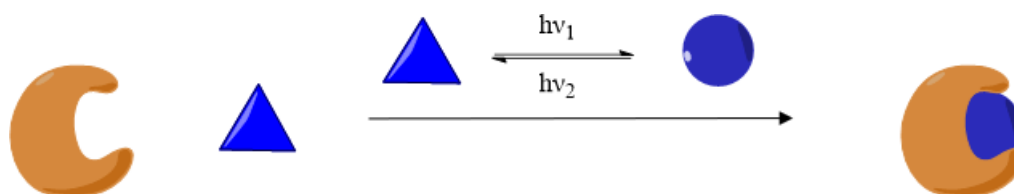
Az eljárás különleges esetekben, például a rákos sejteknél kívánatos lehet, azonban akár ekcéma vagy herpesz kezelésére is léteznek fotodinamikus terápián alapuló módszerek.^[15, 16]

Egy másik elterjedt fotofarmakológiai módszer a fotolabilis blokkolócsoporthoz tartozó anyagok alkalmazása, azaz a „photocage” eljárás, mely során egy hatóanyagot a megfelelő időben és helyen besugárzás hatására lehet felszabadítani egy fotolabilis molekularészlet irreverzibilis lehasításával, mely addig a hatóanyag biológiai aktivitását gátolja (2. ábra).^[17, 18] A célzott hatóanyag leadás a kemoterápiás eljárások során jelentős szereppel bír, ugyanis ezzel a mellékhatások feltehetően csökkennek, illetve a kívánt hatás felerősödik.^[18]



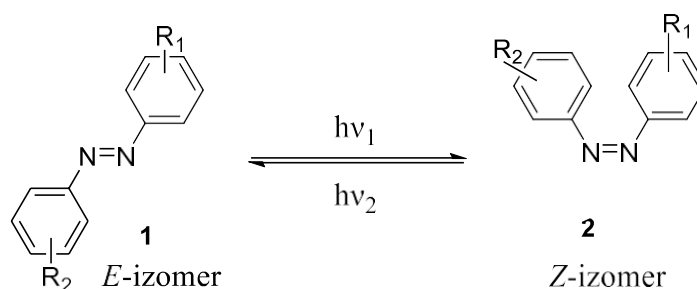
2. ábra: Photocage eljárás

Egy, az előzőektől eltérő módszer a „photoswitch” eljárás, mely során a hatóanyag fény hatására ki és be kapcsolható egy reverzibilis reakción keresztül, ami jellemzően például *E/Z* izomerizáció. A szerkezetváltozás következtében a molekula tulajdonságai is megváltoznak, így a hatóanyag inaktívan bekerülve a szervezetbe aktiválható, illetve szükség szerint deaktiválható a megfelelő energiájú fény használatával (3. ábra).^[19,20,21]



3. ábra: „Photoswitch” eljárás

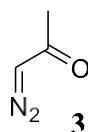
Receptorok vizsgálatára is alkalmasak ezek a molekulák, például nikotin receptorok vizsgálatára azobenzol-származékokat használtak (4. ábra).^[22]



4. ábra: Azobenzol-származékok fénykatalizált reverzibilis *E/Z* izomerizációja

2.2 Fotoaffinitás jelölés

A szervezetben végbemenő molekuláris kölcsönhatások megértéséhez szükséges a molekulákkal kölcsönható fehérjék azonosítása és sok esetben azok szerkezeti jellemzése, a kötődés által kialakult változások követése. A tapasztaltak értelmezése rendkívül fontos szerepet játszik új gyógyszerkéimiai, farmakológiai és kémiai biológiai kutatások sikerében.^[23] Egy erre alkalmas fotokémiai fehérjejelölő módszer a fotoaffinitás jelölés, amit Frank Westheimer már az 1960-as években bemutatott/alkalmazott a **3** diazoacetyl csoportot használva (5. ábra).^[24]



5. ábra: Diazoacetyl csoport szerkezete

A fotoaffinitás jelölés egy kémiai eljárás, melynek alkalmazása során többek között felismerhetünk és jellemezhetünk különböző receptorokat, fehérjéket, illetve tanulmányozni tudunk különböző ligandum-receptor kölcsönhatásokat is.^[25] Az eljárás szerkezetmeghatározó szerepe azokban az esetekben bír nagy jelentőséggel, amikor az egyéb, általánosabb módszerekkel (pl.: röntgen, NMR) ez nem valósítható meg (pl.: biológiai membránok vizsgálata), illetve amikor például mikroszkópos vizsgálatok elvégzéséhez irreverzibilis jelölés szükséges. A módszer lényege, hogy egy nagy affinitású próbavegyületet vagy hatóanyagot inert fényérzékeny csoporttal látunk el, amely fény megvilágítás hatására aktiválódik, és a célfehérjéhez kovalensen kapcsolódik (6. ábra). Fontos különbség a reaktív kovalens inhibitorok és jelölőkhöz képest, hogy fotoaktiválás nélkül a kötődés irreverzibilis, a besugárzás előtt a vegyület csak reverzibilisen kapcsolódik, tehát szabályozható a reaktivitása.



6. ábra: Fotocímkézés

A 6. ábrán az látható, hogy először egy reverzibilis reakcióban másodlagos kölcsönhatások alakulnak ki, amelyekért a próbavegyület nem kovalens szerkezeti egysége felel, majd fény megvilágítás hatására létrejön a kovalens kapcsolódás a hatóanyag és a célfehérje között. A fotoaffinitás kötőelem, melyet az amúgy reverzibilisen, és szelektíven a makromolekulához kötődő biológiailag aktív vegyületre (farmakofór) előzetesen ráépítünk, megvilágítás hatására

egy reaktív ágenssé alakul és a képződő reaktív intermedier képes a fehérjéhez irreverzibilisen hozzákötődni. A nem egyensúlyi kötődésnek köszönhetően a jelölés fennmarad, amíg az adott makromolekula le nem bomlik, vagy ki nem ürül a szervezetből, így a biológiailag aktív vegyület hatása potenciálisan felerősíthető a reverzibilis hatóanyagokhoz képest.

A fotocímkéhez használt fényre érzékeny csoport megválasztása fontos szempontok alapján történik.^[25] Rendkívül lényeges, hogy maradjon inert fotoaktiválás hiányában, illetve, hogy az affinitási egység aktiválása ne igényeljen szélsőséges körülményeket, mely a szervezetben lévő molekulákat károsítaná. Tehát ideális esetben a használt fény hullámhossza 350 nm-nél nagyobb, és a fotocímkéhez alkalmazott molekula viszonylag széles pH-tartományban stabil. Fontos, hogy az aktiválás hatására képződő köztitermék legyen kellően reaktív és rövid élettartamú. Továbbá a fotofór biológiailag aktív hatóanyagra kapcsolása nem szabad, hogy számottevően megváltoztassa annak affinitását, fehérjéhez kötődési képességét, mely nagyobb méretű, a szerkezeten nagyobb változtatást okozó fotoaktív csoportok használatakor merülhet fel problémaként. A túl nagy csoportok további hátránya, hogy esetleges sztérikus gátat is létrehozhatnak a fotocímkezés során, mely lassítja vagy akár gátolja a fotocímkézést (az élő szervezetet pedig minél rövidebb ideig szeretnénk kitenni a megvilágításnak). A kisméretű fotoaktív csoportok tehát általában előnyösebbnek bizonyulnak, azonban érdemes megjegyezni, hogy nincsen egy általánosan mindenre alkalmazható, univerzális fotocímkező vegyületcsalád. Kifejezetten érdekes lehet, ha egy bioaktív molekula szerkezetében fellelhető egy fényre érzékeny csoport, hiszen abban az esetben a szerkezet módosítása nélkül használható lehet fotocímkezésre.

A fotoaffinitás jelöléshez használt molekulákat megkülönböztethetjük a besugárzás hatására képződő reaktív csoportok prekursorai, illetve a létrejött reaktív csoport szabad elektronszáma szerint is. Fényre érzékeny csoportként jellemzően azidokat, diazirineket, diazónium vegyületeket (sókat), illetve benzofenon-származékokat szoktak használni, a belőlük *in situ* képződő reaktív csoport pedig jellemzően nitrén, karbén vagy gyök (1. táblázat).

1. táblázat: Fotocímkező vegyületcsaládok és a belőlük képződő reaktív intermedier

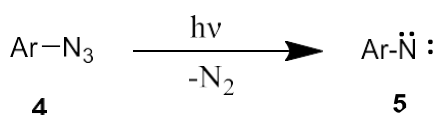
	azidok	diazóniumvegyületek	diazirinek	benzofenonok
Képződő reaktív csoport	nitrén	karbén	karbén	gyök

Érdemes megemlíteni, hogy az elektrofil kötőelemektől eltérően, amelyek specifikusan a fehérjék nukleofil aminosav oldalláncait képesek megjelölni, a fotoaffinitás kötőelemek az

oldallánc jellegétől függetlenül kötődhetnek, így szélesebb körben alkalmazhatóak. Ugyanakkor természetesen ezekben az esetekben még fokozottabban figyelni kell az off-target kölcsönhatások elkerülésére, tehát minél nagyobb affinitású vegyületet kell alkalmazni. Az egyes vegyületcsaládok esetén az alapvázon található különböző szubsztituensek nagymértékben befolyásolják a vegyületek tulajdonságait, így azok segítségével oldható meg a finomhangolás, mint például az aktivációhoz szükséges hullámhossz, vagy a bevilágításhoz szükséges idő. Az alábbiakban a fotoaffinitás jelöléshez alkalmazott vegyületcsaládokat mutatom be röviden.

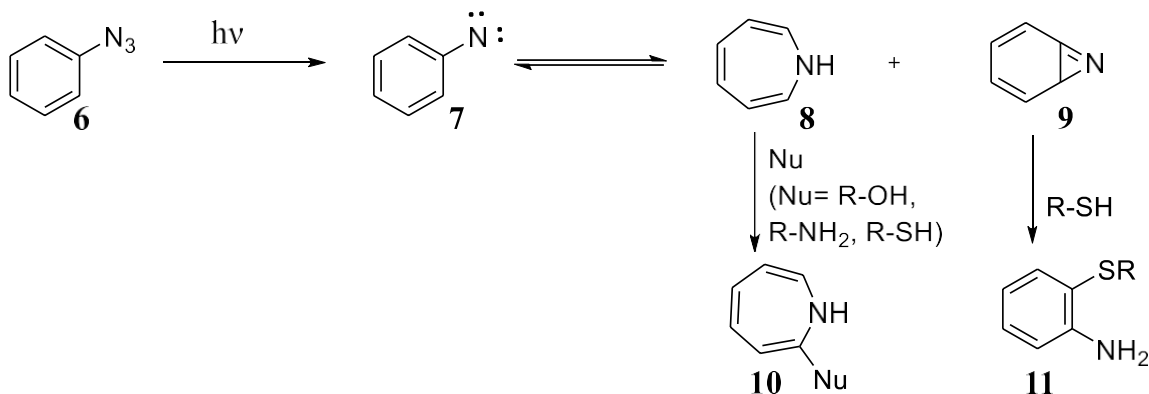
2.2.1 Azidok

Az azidok ($R-N_3$) fotocímkézésben való alkalmazásáról számos példát találhatunk a szakirodalomban.^[26] A vegyületcsalád elterjedését könnyű előállíthatóságának, illetve kémiai környezetben való inertségének köszönheti. Egy amino csoportot tartalmazó vegyület diazotálása során képződő diazóniumsó aziddá alakításával vagy egy halogén-származékon végrehajtott halogén-azid cserével kapható meg az azid-származék. A fény hiányában inaktív azid-származék megfelelő hullámhosszú fény hatására nitrént képez (7. ábra), ami a legtöbb alkalmazás esetén egy makromolekula C-H kötéseibe ékelődik be.



7. ábra: Nitrén képződése aril azidból

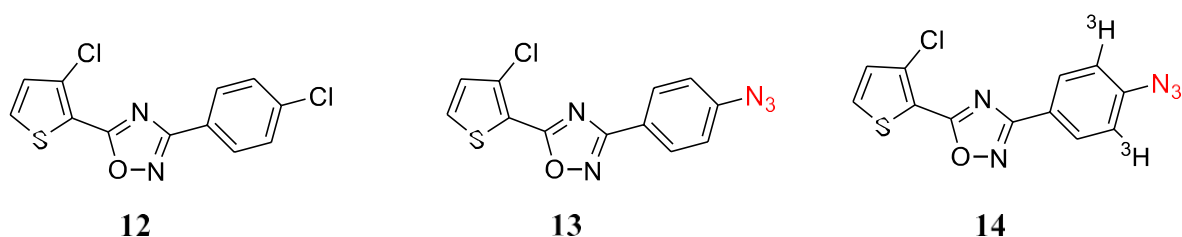
A képződő szinglet nitrén átalakulhat triplet nitrénné, illetve mellékreakcióként átrendeződhet dehidroazepinné vagy biciklusos benzazirinné (8. ábra).



8. ábra: Aril-azidból képződő nitrén átrendeződése²⁵

A nitrén a fotoaffinitás jelölés szempontjából kedvező módon nem aminosav-szelektív, míg az átrendeződés során képződő azepin (**8**) és biciklusos vegyület (**9**) megfelelő nukleofilokkal (cisztein, hisztidin, lizin) képes reagálni, azonban a képződő addukt sok esetben instabil proteolitikus környezetben. Az azidok közül fotoaffinitás jelöléshez az aril-származékokat (aril-csoport kedvezőbb tulajdonságokkal bír, mint egy alkil, vagy acil csoport), azon belül is a szubsztituált aril azidokat alkalmazzák, amelyek esetén az átrendeződéssel járó mellékreakciók mértéke jóval kisebb. A szubsztituálatlan aril azidok megvilágítása során képződő nitrén már említett intramolekuláris átrendeződései nem kívánatos mellékreakciók, melyek esetében a jelölési hatékonyság csökken (a legtöbb esetben nincs jelölés), hiszen önmagával reagál a kötőelem. A szubsztituált aril azidok esetében azonban a képződő nitrén nem alakul át (vagy csak sokkal lassabban), így esetükben az említett mellékreakció nem áll fenn, a C-H kötésekkel való reaktivitás viszont fennmarad.^[27] A jellemző szubsztitúciós mintázat a fluorral történő helyettesítés, fluorozott aril azid származékokat széleskörben használtak már fotocímkézések során.^[9,25] Az azidszármazékok nitrénné alakulásához szükséges fény hullámhossza jellemzően 300 nm alatti, melyet a sejtes közeg kevésbé tolerál. További hátránya a vegyületcsaládnak, hogy egyéb mellékreakciók is felléphetnek a fotocímkézés során, miszerint az azidok aminokká redukálódhatnak tiolok jelenlétében, illetve további hátrányuk, hogy a fotocímkéhez akár 2 órás besugárzásra is szükség lehet.^[28]

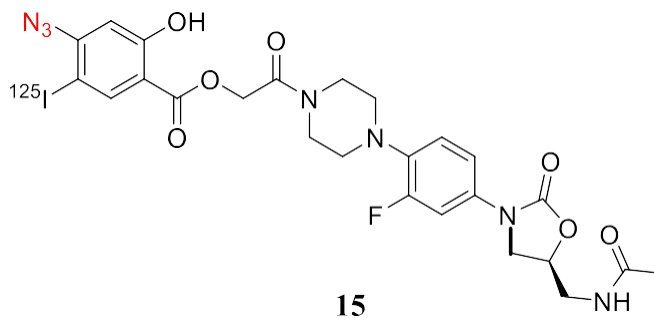
Az azidok alkalmazására példa egyes 3,5-diaril-1,2,3-oxadiazolok módosítása, amelyek az apoptózis, illetve a tumor növekedés szelektív inhibíciójára alkalmasak (9. ábra).^[29]



9. ábra: Tumornövekedés inhibíciójára alkalmas molekula (**12**) és annak módosított származékai (**13**, **14**)

A klór-azid csere a **12** oxadiazolon nem változtatta meg a molekula biológiai aktivitását, így az azidcsoport molekulába való beépítésével fotocímkézésre potenciálisan alkalmas molekulát állítottak elő, melynek tríciumszármazékát (**14**) besugározták mellrák tumorsejtek környezetében. A megvilágítás során sikeres keresztkapcsolást értek el, melynek köszönhetően azonosították **14** fehérjecélpontját, ami által racionális hatóanyagtervezésre nyílik lehetőség.²⁸

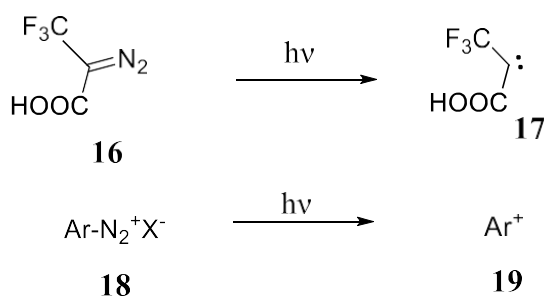
Az oxazolidinonok a szintetikus antibiotikumok egyik csoportját képezik, melyek a fehérjeszintézist lassítják a riboszóma megzavarásával. A zavarás pontos helyének és módjának meghatározására **15** azidot *Staphylococcus aureus* sejtekkel inkubálták, majd bevilágítás után feltérképezték a vegyület hatásmechanizmusát (10. ábra).^[25]



10. ábra: Biológiai aktív fotocímkézésre alkalmas molekula

2.2.2 Diazo- és diazóniumvegyületek

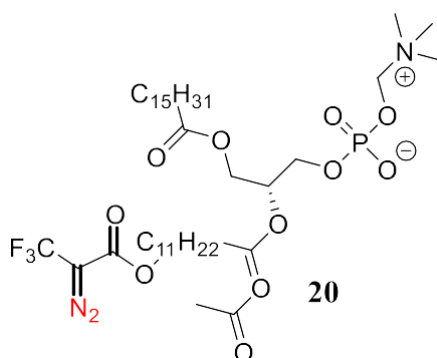
Az első fotoaffinitás jelölő molekula a diazoacetát volt, mely után számos diazoketont illetve aril diazóniumvegyületet szintetizáltak fotocímkéző reagensként kedvező fotokémiai tulajdonságaiknak köszönhetően. Az arildiazónium vegyületcsalád egyik kedvező tulajdonsága a diazónium csoport kis méretében rejlik, azonban az elektronszívó csoportot tartalmazó származékok esetén körülményesebb az előállításuk, ezek csak savas közegben stabilak. Viszont orto és para helyzetben elektronküldő szubsztituensek növelik a stabilitást és kedvező fotokémiai tulajdonságokat biztosítanak a vegyületeknek: a molekulák már 300 nm feletti hullámhosszú fényt is képesek abszorbeálni. Ezeket a vegyületeket használták már fehérjék jelöléséhez, a megvilágítás hatására karbén (**17**) vagy karbokation (**19**) köztitermék képződik és nitrogén gáz fejlődik (11. ábra).



11. ábra: Diazovegyület és diazóniumsó fragmentálódása besugárzás hatására

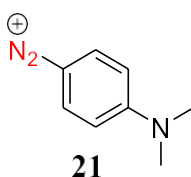
A diazoketonok karbént képeznek nitrogéngáz fejlődése közben, de emellett felléphet a fotocímkézés során egy nem kívánatos átrendeződés, miszerint a képződő karbén keténné alakul. Ez a savszármazék ugyan képes nitrogén-nukleofileket acilezni, azonban a jelölés a ketén esetében jóval kisebb mértékben megy végbe, mivel a ketén könnyen hidrolizál. Az alfa helyzetben található trifluormetilcsoport az átrendeződést nagy mértékben csökkenti, így azok a származékok igen népszerűek.

A biológiai membránok nagyrészt lipidekből és fehérjékből épülnek fel, melyek szerkezete és tulajdonságai további feltérképezésre szorulnak. Jelentős szerepük a sejtek védelme és számos esszenciális folyamatban vesznek részt, mint például a jeltovábbítás vagy az ionok, molekulák transzportja a membránon keresztül. Tanulmányozásuk által értékes információk birtokába juthatunk. Említést érdemel továbbá, hogy a membránban található fehérjék rendkívül fontos célpontok a gyógyszerkémiaiban. Lipid membránok szerkezetét vizsgálták diazónium vegyületekkel fotoaffinitás jelölés módszerét alkalmazva, amely során egy foszfolipid és a citokróm b5 között keresztkapcsolást sikerült létrehozni egy trifluormetil-diazoészterrel (12. ábra).^[30]



12. ábra: Diazoészter funkciós csoporttal módosított foszfolipid

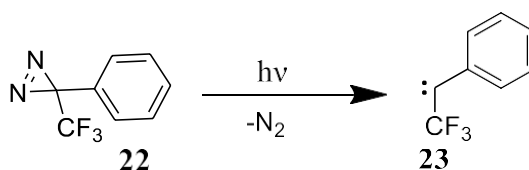
Emellett említést érdemel egy rendkívül egyszerű dimetilanilin-származék (21) (13. ábra), amelyet a nikotinos acetilkolin receptor fenciklidin kötőoldal irreverzibilis blokkolására használtak.^[31]



13. ábra: Diazóniumsó nikotinos acetilkolin receptor gátlására

2.2.3 Diazirinek

A diazirin egy háromtagú gyűrű, amelyben két nitrogén atom kettős kötással egymáshoz kapcsolódva és egy további szénatom található. Ez a szénatom kapcsolódik egy linkeren keresztül a nem kovalens vázhoz a fotoaffinitás jelölésre alkalmazott vegyületekben. A diazirinek fotokémiai reakció során történő karbénképződés már 1966-ban ismert volt (14. ábra), az aril diazirin vegyületcsaládot, mint fotocímkéhez használt reagenseket, először 1973-ban alkalmazták.^[32]

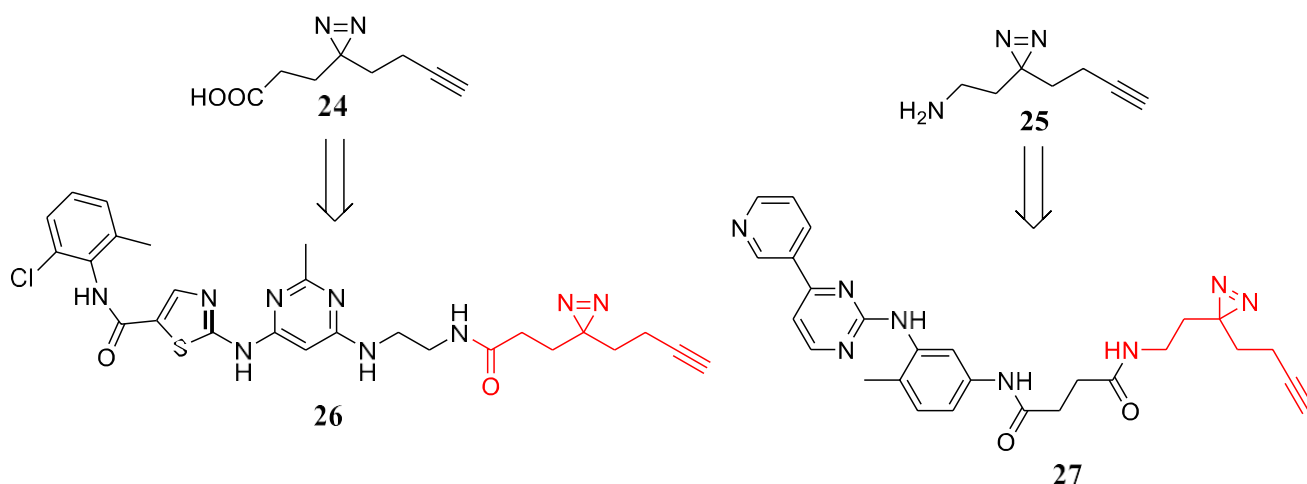


14. ábra: Karbén képződése diazirin-származékból egy reprezentatív példán keresztül

A fotokémiai fragmentálódás során szinglet karbén képződik, mely egy közeli aminosavhoz kovalens módon képes kapcsolódni.^[33] A diazirin és a diazo csoportok izomer viszonyban vannak egymással, így a megvilágítás hatására reaktív diazo vegyület képződhet, ami aztán tovább fragmentálódik karbénné. Tehát a diazovegyületekhez hasonló a reaktivitása, ugyanakkor besugárzás nélkül a hármas gyűrűs szerkezet stabilabb prekursor, mint a szabad diazo- vagy diazónium csoport. A diazirinek előállítása általában ketonokból történik bonyolult, több lépéses szintézisben. Az eljárás során először imint, majd diaziridint képeznek és ezt követően oxidatív dehidrogénezéssel alakítják ki a diazirint. Előnyükre szolgál azonban jó pH- és hőmérséklettűrő képességük, kis méretük, illetve inertségük biológiai környezetben fénybesugárzás hiányában.^[33] A gerjesztéshez szükséges fény hullámhossza már 350-380 nm körüli, az azidokhoz képest tehát a korábbiaknál kisebb energiájú fénnel is megvalósítható az aktiválás, illetve a jelölés szelektivitása is általában jobbnak bizonyul az eddig bemutatott vegyületcsaládokhoz képest. A legújabb kutatási eredmények arra utalnak, hogy feltételezhető a karboxi funkciós csoportok preferált jelölése.^[34] A diazirinszármazékok alapvetően két nagy csoportba sorolhatóak az alapján, hogy alifás vagy aromás csoportok kapcsolódnak a hármas gyűrű szénatomjához.^[34] A trifluorometil-arildiazirinek illetve a metil-etildiazirinek gyakran alkalmazott vegyületek fotocímkéhez.^[35] Az aril- és az alkildiazirinekből is karbén, illetve diazo-intermedierek képződnek besugárzás hatására, azonban eltérő mértékben. Az alkildiazirinek előnyös tulajdonsága, hogy a belőlük képződő alkil-diazo-

intermedierek szelektív módon lépnek reakcióba az aminosavak savas oldalláncaival, mely reaktivitás az aril-diazirinekre nem jellemző. A savszelektivitás eredményeként jó hatékonysággal képesek az alkil-diazirinek karbonsavakat tartalmazó membránfehérjéket vagy nagy negatív töltésű elektrosztatikus felülettel rendelkező fehérjék kovalens jelölésére, mint például a szarvasmarhaszérum-albumin. Míg az alkil-diazirinek jelölési hatékonysága erősen függ a pH-tól, addig az aril-diazirinek jelölési hatékonysága a pH-tól független.^[34]

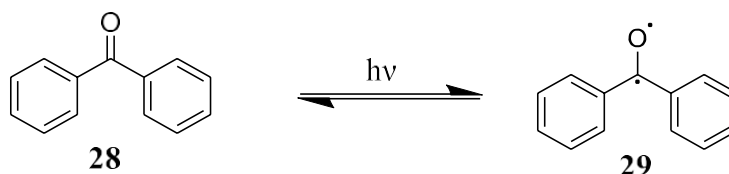
Klikk reakcióban és fotoaffinitás jelölésben alkalmazható diazirin-származékokat (**24**, **25**) kapcsoltak kismolekulás kináz inhibitorokhoz (**26**, **27**), melyekkel többféle kináz célpont azonosítását végezték el (15. ábra).^[36]



15. ábra: Klikk reakcióban alkalmazható diazirin-származékok kinázok fotocímkézéséhez

2.2.4 Benzofenonok

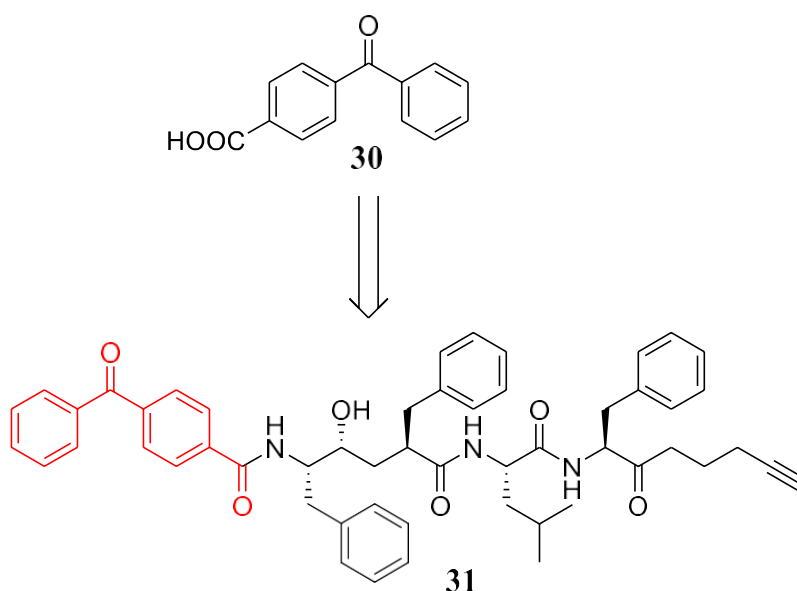
A benzofenon-származékok (diarilketonok) könnyű előállíthatósága, illetve viszonylag magas hullámhosszú fény (350-360 nm) hatására reaktív kettős gyökké alakulása lehetővé teszi a vegyületcsalád fotocímkézésben való alkalmazását. Érdekes megemlíteni, hogy acetofenonokkal is végeztek hasonló kísérleteket, de kevesebb sikerrel.^[37] A reaktív intermedier képződése a benzofenon-származékok esetén egy egyensúlyi folyamat, mely a címkézés hatékonyságát segítheti elő többszöri gerjesztés-relaxáció cikluson keresztül (16. ábra).^[28] A makromolekulához való kapcsolódás feltehetően úgy történik, hogy a képződött intermedier a makromolekulából kihalás egy hidrogéngyököt mellyel megszűnik a kettős gyök, és a képződött benzofenon gyök hozzákapcsolódik a létrejövő makromolekula gyökhöz.



16. ábra: Reaktív kettős gyök képződése benzofenonból

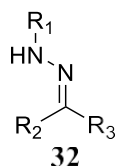
A benzofenonok mérete jóval nagyobb, mint egy azid vagy diazocsoporté, ami egyrészt befolyásolhatja a hozzákapcsolt próbavegyület affinitását, másrészt szterikus okokból megnehezítheti a gyökképződést és a gyök stabilizálásával csökkentheti a gyök reaktivitását. Továbbá sok esetben hosszabb ideig tartó megvilágítást igényelnek, mint a többi vegyületcsalád, melynek következtében felerősödhet a nem specifikus jelölés is, illetve a fehérjék denaturálódása. Emellett vízben való oldhatóságuk sok esetben csekély a két aromás gyűrű miatt, ami ugyancsak kedvezőtlen, hiszen a fotocímkézések túlnyomórészt vizes közegben történnek.^[25]

Egyes benzofenon-származékoknak a γ -szekretáz mesterséges inhibíciójában van szerepe. A γ -szekretáz egy integrált membránproteáz mely az amiloid prekursor fehérjét hasítja fel és így A β -fehérjéket szabadít fel, melyek jelentős szerepet játszanak az Alzheimer-kór patogenezisében. A γ -szekretáz inhibíciójával a folyamat lassítható, melyet korábban különböző benzofenon-származékokkal, például 4-benzoil-benzoéssal végzett fotocímkézésekkel meg is valósítottak (17. ábra).^[25]



2.3 Hidrazonok

A hidrazonok általános szerkezeti képlete: $RR_1-N=N=CR_2R_3$, két szomszédos nitrogénatom közül az egyik kettőskötéssel kapcsolódik egy szénatomhoz. Oxovegyületek (akár aldehidek akár ketonok) és hidrazin/hidrazid reakciójával állíthatóak elő, általában alkoholos közegben viszonylag egyszerűen, jó termeléssel. Az általunk alkalmazott hidrazonok (32) szerkezete a 18. ábrán látható, az R_1 csoport hidrazinból szintetizált hidrazonok esetében egy hidrogénatom, hidrazidokból szintetizált hidrazonok esetében pedig a kiindulási hidrazid szerkezetéből származik. Az R_2 és R_3 csoportok a kiindulási keton vagy aldehyd szerkezetétől függően lehetnek hidrogénatomok, alkil-, illetve arilcsoportok.

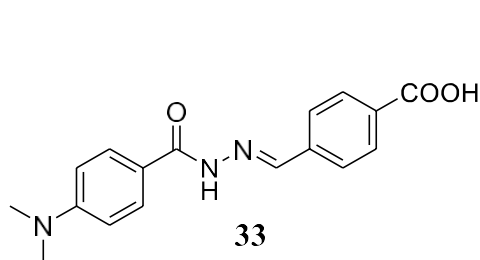


$R_1 = \text{H, alkil, aril, acil, szulfonil}$
 $R_2, R_3 = \text{H, alkil, aril}$

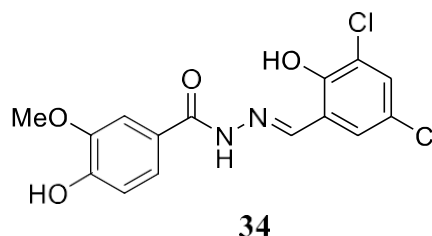
18. ábra: Az általunk alkalmazott hidrazonok általános szerkezete

A hidrazonok szerkezetét tekintve a szén-nitrogén kettős kötés a kettős kötésben részt nem vevő nitrogén magányos elektronpárjával konjugációba lép. Mindkét nitrogénatom nukleofil sajátságokkal bír, de az NH-csoport reaktívabb, mint a kettős kötésben résztvevő nitrogénatom, és savas tulajdonságú, viszonylag könnyen deprotonálható ($pK_a \approx 5-9$).^[38]

A vegyületcsalád felhasználása a gyógyszerkémiában igen széleskörű. Számos biológiailag aktív hidrazon, illetve szulfonilhidrazon ismert az irodalomban, többek között fájdalomcsillapító, gyulladáscsökkentő, antibakteriális, sőt rákellenes hatású vegyületek is (19. ábra).



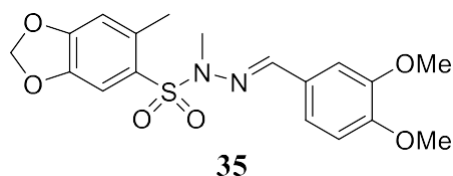
rákellenes hatás



antibakteriális hatás

19. ábra: Példa biológiailag aktív hidrazonokra^[39]

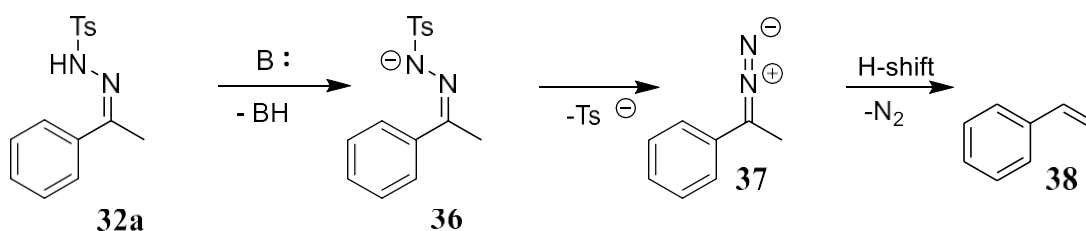
Nemrégiben szulfonilhidrazon-származékokat fejlesztettek foszfodiészteráz-4 (PDE4) inhibitoroként, melynek gátlása az asztma, illetve különböző gyulladásos betegségek kezelésére lehet alkalmas (20. ábra).^[40]



20. ábra: Potenciális PDE4 inhibitor

Egyes hidrazonnal módosított gyógyszerek esetén azt használják ki, hogy a hidrazon kötések semleges kémhatás esetén stabilak, azonban a lizoszóma savas közegében felhasadnak, és a hatóanyag felszabadul a sejtben, ahol kifejtheti hatását. Ennek egy felhasználása a rákgyógyászatban alkalmazott doxorubicin molekula maszkírozása hidrazonnal, amely így a sejten kívül nem hatásos, csak a megfelelő sejtbe juttatva.^[41] Néhány további biológiailag aktív szulfonilhidrazon a 3.5.2 fejezetben kerül részletesen ismertetésre.

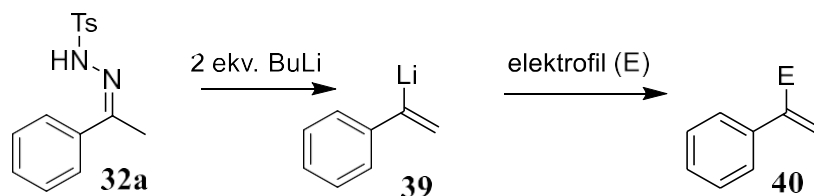
Hidrazonok diazóniumsóvá alakítása ismert reakció az irodalomban, melyek közül az egyik módszer fotokatalitikus módon megy végbe: tozilhidrazonból (**32a**) kiindulva diazovegyületet (**37**) kapunk, amely nitrogénvesztéssel olefinné alakulhat. (21. ábra). Ezt a reakciót William Randall Bamford és Thomas Stevens kutatók után nevezték el. A Bamford-Stevens reakció során erős bázist (pl.: NaOMe, KH, NaH) alkalmaznak (21. ábra).^[42]



21. ábra: Bamford-Stevens reakció

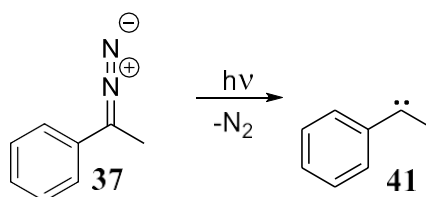
A hidrazon NH az erős bázis hatására deprotonálódik, majd egy eliminációs lépésben diazo vegyület képződik, melyből ezt követően egy nitrogén molekula kilépésével, majd 1,2-hidrid-shifttel alakul ki az olefin. Melléktermékként még *p*-toluolszulfonát anion marad az oldatban. A deprotonálás az ábrán feltüntetett helyen történik meg, a negatív töltés megjelenése (**36**) segíti elő a szulfonilcsoport távozását.

Az előzővel azonos kimenetelű, azonban némileg más körülmények között végbemenő eljárás a Shapiro-reakció, mely során a tozilhidrazonok szubsztituált alkénné (**40**) alakulása lítiáláson keresztül valósul meg (22. ábra).^[43]



22. ábra: Shapiro reakció

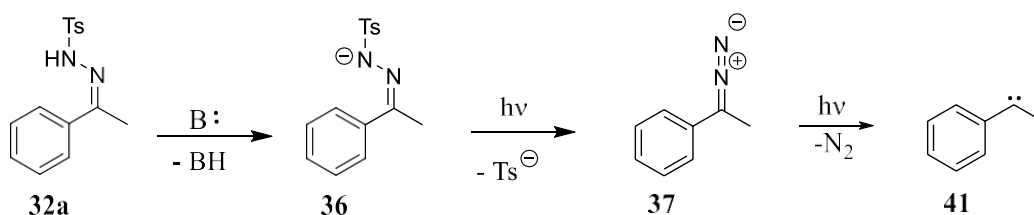
A fent említett két reakciót (Bamford-Stevens/Shapiro) elsősorban olefinek előállítására használták, ez okozta az elterjedésüket, azonban ha a képződő diazovegyületet megfelelő hullámhosszú fénnel megvilágítjuk, akkor *in situ* reaktív, rövid élettartamú karbén keletkezik (**41**), mely számos további felhasználást tesz lehetővé (23. ábra).



23. ábra: Karbén képződése diazovegyületből

3 SAJÁT MUNKA

Kutatómunkám célja egy új vegyületcsalád fejlesztése fotocímkzésben való alkalmazáshoz. A szakirodalom áttekintése alapján úgy gondoltam, hogy a hidrazon-származékok alkalmasak lehetnek erre a célra, kihasználva a Bamford-Stevens/Shapiro reakciót, amely során a képződő diazovegyület (**37**) fény hatására reaktív karbénné (**41**) alakul, ami képes lehet fehérjék aminosav oldalláncainak kovalens módosítására (24. ábra).

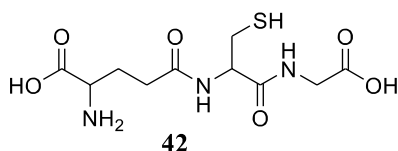


24. ábra: Karbénképződés diazóniumvegyületből fotokatalitikus reakcióban

A fotocímkzésben való alkalmazáshoz vezető vizsgálatok első lépései közé tartozik, hogy a kérdéses molekulát UV-fény besugárzás alá vetem egy gondosan kiválasztott reakciópartnerrel, és vizsgálom, hogy történik-e változás: változik-e a hidrazon mennyisége, és képződik-e addukt a választott vegyülettel.

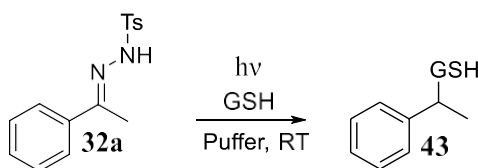
Előzetes megfontolások alapján a kutatócsoport számára rendelkezésre álló hidrazonok közül próbavegyületnek **32a** tozilhidrazont választottam, mellyel előzetes kísérletek során stabilitásvizsgálatot végeztem különböző pufferekben, és azt tapasztaltam, hogy a molekula PBS és TRIS pufferekben 7,4, 7,9 és 8,4-es pH-kon is több mint négy óráig stabil volt megvilágítás hiányában. Mivel a fotoaktiválás ideje a kísérletek során 15 perc körül volt, illetve az átlagos fehérjejelölési kísérletek ideje egy-két óra, ezért a négy órás stabilitást megfelelőnek találtuk.

Reakciópartnernek a glutationt (GSH) (**42**) választottam, ami egy tripeptid, és jól mintázza egy fehérje szerkezetét, továbbá rendszeresen alkalmazzák kovalens kötőelemek reaktivitásának vizsgálatára.^[44,45] Amennyiben a vizsgált hidrazon reagál vele, akkor jó eséllyel egy fehérjével is képes lesz majd a későbbiekben reakcióba lépni (25. ábra).



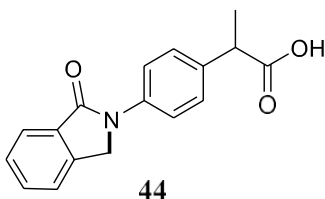
25. ábra: A glutation szerkezete

A GSH-n mind a karboxilcsoportok, mind a szabad amino- és tiolcsoport alkalmas lehet karbénnel történő reakcióra (26. ábra), így célul tűztem ki a kötőhelyek és arányuk meghatározását is.^[34]



26. ábra: Hidrazonok reakciója GSH-val

A hidrazon átalakulásának mértékét belső sztenderd módszerrel határoztam meg, a méréseket indoprofén (44) jelenlétében végeztem (27. ábra).

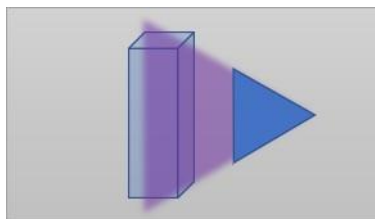


27. ábra: Az indoprofén szerkezete

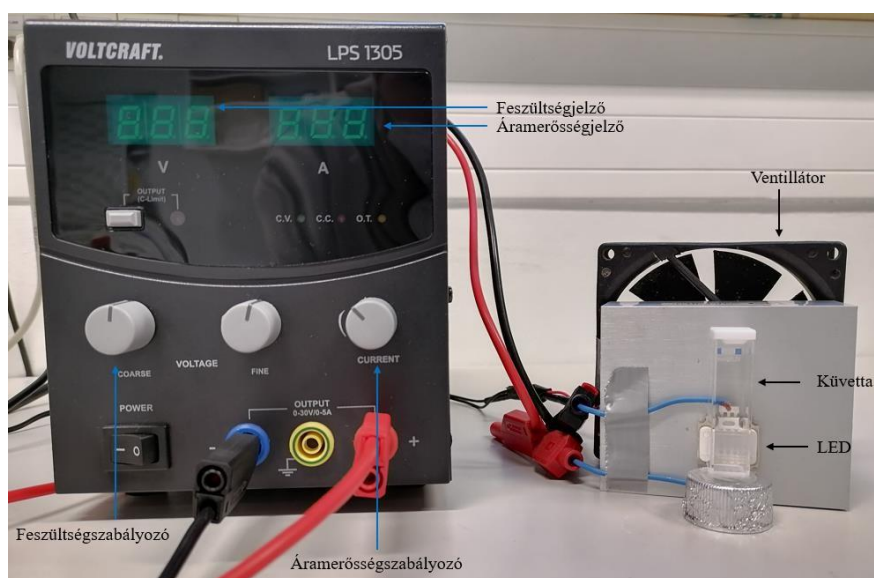
Azért az indoprofénre, mint belső sztenderdre esett a választás, mert a választott körülmények között inert maradt (a pufferben stabil volt, a GSH-val nem reagált, illetve a besugárzás hatására sem változott), továbbá az UV-kromatogramon is egy jól kivehető, a többtől elkülöníthető csúcsot adott. Említést érdemel, hogy az indoprofént a Pfizerben már 2014-től, kutatócsoportunkban pedig 2016 óta alkalmazzák GSH tesztek során.^[44, 45]

Először egy reprodukálható kísérleti beállítást kellett találnom a hidrazonok tesztelésére (oldhatóság, stabilitás, fotobomlás). A túlnyomórész vizet tartalmazó közegbe (95% puffer, 5% acetonitril) bemértem a hidrazont, a tripeptidet (GSH), továbbá az indoprofént, mint belső sztenderdet. Ezt követően az elegyet megvilágítottam UV-fénnyel (365 nm). A fotoaktivációs kísérleteket kezdetben egyszerű HPLC-MS mintásüvegekben próbáltam elvégezni, egy régi VRK-előhívó UV-lámpa használatával. Azt tapasztaltam, hogy az eredmények gyakran nem voltak reprodukálhatóak. Ennek oka az lehetett, hogy az üveg és a mintázata nem eresztette át

teljesen a fényt. A reprodukálhatóság érdekében ezt követően áttértem kvarcküvetta használatára, mely a fényt teljes egészében áteresztí, illetve a fénycsövet szabályozható hullámhosszon világító LED-re cseréltem. A reakció sematikus rajza a 28. ábrán, a valódi kísérleti elrendezés a 29. ábrán látható. A LED-et egy számítógép processzorhűtőre ragasztottam fel, és ventilátorral hűtöttem a túlmelegedés ellen és a szobahőmérséklet tartása érdekében.

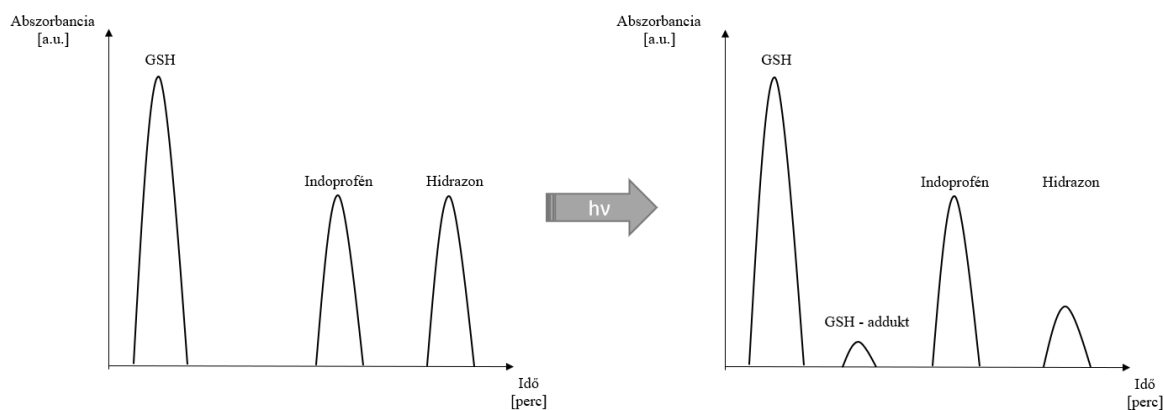


28. ábra: A megvilágítási reakció sematikus elrendezése



29. ábra: A bevilágítási kísérletek elrendezése

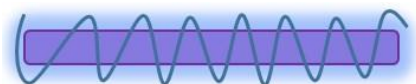
A kvarcküvetta fél cm-re a LED elé helyeztem, majd a küvetta és a fényforrást egy alufóliával bevont kartondobozzal fedtem le. Bizonyos idő után a mintát HPLC-MS berendezéssel vizsgáltam, és összehasonlítottam egy azonos összetételű, azonban bevilágítatlan mintával (30. ábra).



30. ábra: A megvilágítatlan, illetve a megvilágított minta sematikus UV-kromatogramja 254 nm-es hullámhosszon

Az 30. ábrán egy fotoaktiválás előtti és utáni minta sematikus UV-kromatogramja látható, melyeken a GSH, a GSH-addukt, az indoprofén illetve a hidrazon UV-csúcsát tüntettem fel. A belső sztenderdhez tartozó csúcs mindkét esetben ugyanakkora (az indoprofén besugárzás hatására nem fogyott), azonban szemmel láthatóan csökkent a hidrazon mennyisége a mintában a referenciához képest. A bevilágított mintában található hidrazon mennyiségét az indoprofén és a hidrazon csúcs alatti terület integrál (AUC – area under the curve) arányának a referencia megfelelő AUC arányával való összehasonlításával kaptam meg, melyből konverziót számoltam. A GSH a reakciók során a hidrazonhoz képest ötvenszeres feleslegben volt jelen, így a GSH-hoz tartozó csúcs változása a reakció során elhanyagolható. A minta kromatogramján a 30. ábrán feltüntetett csúcsokon felül látható volt még jellemzően több csúcs is: legtöbb esetben megfigyeltük a felszabaduló szulfonsavat, illetve kisebb, kevésbé jól kivehető csúcsokat, amik feltételezhetően bomlástermékek lehettek. Kis mértékben megfigyeltük továbbá a GSH dimerré történő oxidációját is ($2\text{GSH} + h\nu = \text{GS-SG}$), amely két tiolcsoport diszulfiddá alakulásával magyarázható. Az adduktot a kísérletek során tömegspektrometria segítségével azonosítottam.

Néhány fotoaktiválási reakciót áramlósos kémiai körülmények között is elvégeztünk. Egy átlátszó, bevonatmentes, 9 m hosszú fényáteresztő vezeték (FEP) tekertünk fel egy 40 cm hosszú 366 nm-es fényt kibocsátó UV fénycsőre, ez volt a reaktor (31. ábra). A kísérlethez egy Jasco PU-987 prep. HPLC pumpát használtunk, az összes reakciót nyomás alá helyezés nélkül és szobahőmérsékleten hajtottuk végre. Az áramlósos reakció sematikus rajza a 31. ábrán látható.



31. ábra: Az áramlások kémiai reakció elrendezése

A megvilágítási kísérletek részletei a „Kísérleti rész” -ben (3.6 fejezet) olvasható.

3.1 A hidrazon típusának hatása

A kísérleti elrendezés rögzítése után különböző szerkezettel rendelkező hidrazonokat vizsgáltam. A hidrazonszármazékok esetén három csoport, az R_1 , az R_2 és az R_3 csoport változtatható (18. ábra), a negyedik szubsztituensnek hidrogénnek kell lennie. Az első kísérletek esetén acetofenonból származtatott hidrazonokat vizsgáltam, melynek köszönhetően csak az R_1 csoport változott a molekulák szerkezetében. Úgy gondoltam, hogy a tozilhidrazonokon kívül érdemes a kísérletet elvégezni más szerkezeti elemeket tartalmazó hidrazonokkal is, ezzel feltérképezve a szerkezet és a reakciókészség közötti összefüggéseket.

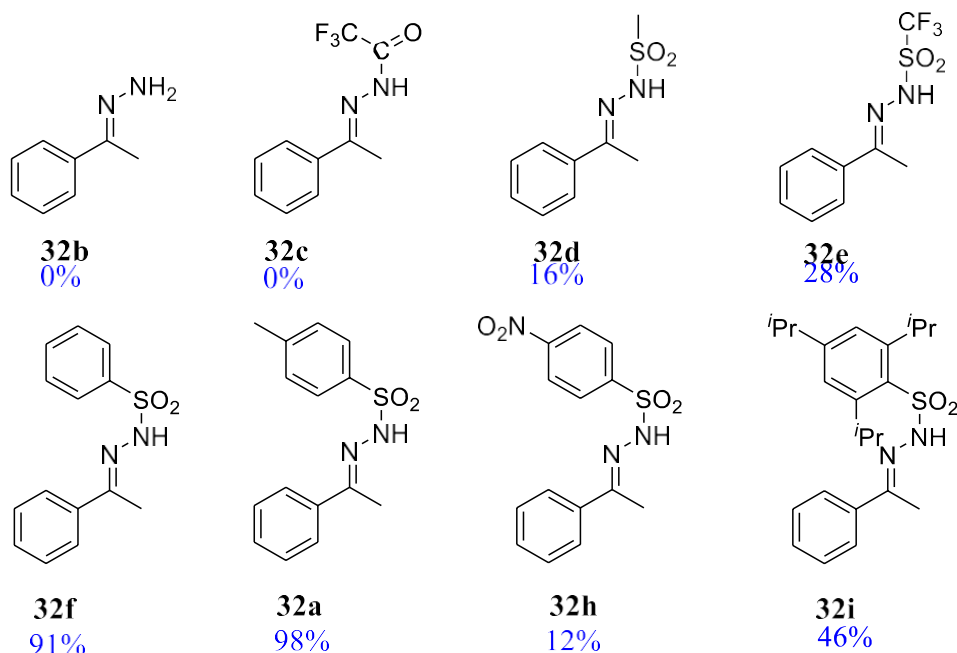
Az acetofenonból származtatott hidrazonok előállíthatók a keton és a hidrazin vagy hidrazid alkoholos közegben történő reakciójában, mely reakció lejátszódhat szobahőmérsékleten vagy forralásra, és némely esetekben savkatalízis is szükséges lehet (32. ábra).



32. ábra: Aceton reakciója hidrazinnal vagy hidrazidokkal

A kutatócsoport által korábban acetofenonból előállított vegyületek közül kiválasztottam nyolcat, melyekben az R_1 -csoport hidrogén, trifluoracetyl, metánszulfonil, trifluormetánszulfonil, benzolszulfonil, 4-toluolszulfonil, 4-nitrobenzolszulfonil, illetve 2,4,6-triizopropilbenzolszulfonil. Elvégeztem velük a besugárzási kísérleteket 50 mM koncentrációjú NaCl-ot tartalmazó 50 mM-os TRIS pH = 8,4-es pufferben 365 nm-en, 15 perces besugárzással, szobahőmérsékleten, 50 ekvivalens (9,30 mM) GSH és (0,1 mM)

indoprofén jelenlétében. A molekulák szerkezete és az elvégzett kísérletek során tapasztalt konverzió a 33. ábrán található.



33. ábra: Az R_1 szubsztituensek hatásának értelmezéséhez alkalmazott hidrazon-származékok. Kék színnel a besugárzás hatására történő konverziókat (a hidrazon fogyása) tüntettem fel.

Az eredményekből azt a következtetést vontuk le, hogy a szulfonil csoport elengedhetetlen a fotoaktivációs reakció működéséhez, nélküle a megvilágítás hatására nem változtak a vegyületek, a **32b** hidrazonnal és **32c** trifluoracetilhidrazonnal végzett kísérletek során nem történt átalakulás. Ha a szulfonil csoporton alifás (**32d**, **32e**), nagy térkitöltésű aromás (**32i**), vagy nitrofenil csoport helyezkedett el (**32h**), akkor a reakció gyenge vagy közepes konverzióval játszódtott le. Azonban, ha egy fenil (**32f**) vagy tozil (**32a**) csoport kapcsolódott a szulfonil kénatomhoz, akkor a reakció majdnem kvantitatív módon ment végbe. Az R_1 szubsztituens hatásának vizsgálata során tehát arra a következtetésre jutottam, hogy a tozil csoportot érdemes rögzíteni.

További kutatások során tervezzük azt is megvizsgálni, hogy amelyik molekulák esetén nem tapasztaltunk reakciót, vagy gyengébb konverzióval mentek végbe, a szobahőmérséklet helyett 37 °C-on megvalósítható-e a fotoaktiválás.

3.2 A fotoaffinitás jelölés körülményeinek optimalizálása

A fotoaktiválás körülményeinek (besugárzási hullámhossz, besugárzási idő, puffer, pH) optimalizálását a **32a** tozilhidrazonnal végeztem el.

3.2.1 Az alkalmazott fény hullámhosszának optimalizálása

Tekintettel arra, hogy az élő szervezetre a nagyobb hullámhosszú fény kisebb károsító hatással bír, célom volt minél nagyobb hullámhosszt találni, ami alkalmas lehet a fotoaktiválásra. A hullámhossz optimalizálásához különböző LED-eket (360 nm-től 585 nm-ig) használtam, az optimalizálási kísérleteket 50 mM koncentrációban NaCl-ot tartalmazó 50 mM-os 8,4-es pH-jú TRIS pufferben végeztem el 15 perces reakcióidő mellett, melyek eredményeit az 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat: Besugárzási kísérletek során elért konverzió különböző hullámhosszakon

Hullámhossz	360 nm	380 nm	405 nm	440 nm	520 nm	585 nm
Konverzió [%]	>99%	>99%	27%	0%	0%	0%

A különböző hullámhosszú fénnel elvégzett mérések alapján látható, hogy a 360 nm-es és a 380 nm-es fény hatására 15 perc alatt a próbamolekula teljesen elfogy. Ezzel ellentétben 405 nm-en a reakció csak kis mértékben, és nagyobb hullámhossztartományokban már egyáltalán nem megy végbe, ez esetekben a használt fény energiája már túl alacsony. További lehetőség lehet ebben az esetben is esetleg magasabb (de legfeljebb fiziológiás) hőmérsékletet is alkalmazni a jövőben. Mivel a reakció hasonlóan jól működött 360 és 380 nm-en is, utóbbit választottam optimumnak. Tekintettel arra, hogy a napjainkban széleskörűen használt diazirinek aktiválása is 312 és 360 nm-en történik, megállapítható, hogy a szulfonilhidrazonok némileg kedvezőbbek lehetnek, de legalábbis nem ártalmasabbak a bevilágítás hullámhossza szempontjából.

3.2.2 Fotoaffinitás jelölés besugárzási idejének optimalizálása

A megvilágítás idejének optimalizálását 50 mM koncentrációban NaCl-ot tartalmazó 50 mM-os 8,4-es pH-jú TRIS pufferben végeztem el, melyek eredményeit a 3. táblázat tartalmazza. Az időoptimalizálást továbbá áramlásos kémiai körülmények között is elvégeztem, mely kísérletek 8,4-es pH-jú TRIS pufferben és 366 nm-es hullámhosszon készültek (3. táblázat).

3. táblázat: Különböző időtartamú besugárzási kísérletek küvettás, és áramlásos (flow) körülmények között

Reakcióidő	1 perc	2 perc	3 perc	4 perc	5 perc	7 perc	9 perc	10 perc	15 perc	Relatív jelölési hatékonyság
Küvetta: 380 nm LED (Konverzió %)	10%	19%	52%	67%	80%	88%	96%	98%	>99%	1
Flow: 366 nm fénycső (Konverzió %)	89%	95%	n.a.	n.a.	99%	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,16

A küvettában végzett reakcióhoz szükséges aktiválási idő feltérképezése után a 10 perces reakcióidőt választottam optimumnak, hiszen ezen időtartam alatt a próbamolekula szinte teljesen elfogyott. Hosszabb időtartamot nem érdemes választani, hiszen a fehérjéket vagy akár élő sejteket a későbbiekben minél rövidebb ideig célszerű besugárzással terhelni. Érdemes ugyanakkor megjegyezni, hogy biológus együttműködőink igazolták egyes rákos sejtvonalak esetén, hogy a 15-20 perces besugárzás jelentős károsodást nem okoz.

Az áramlásos körülmények között megvalósított próbareakciók gyorsabbnak bizonyultak, itt a próbamolekula 1-2 perc után jelentős mértékben átalakult és 5 perc alatt teljesen elfogyott. Említést érdemel, hogy 2 perc és 5 perc után is nagyjából ugyanannyi addukt jelenlétét mértük, míg a küvettás reakcióban 5 perc alatt 4-szeresére, 10 perc alatt pedig 6-szorosára nőtt az addukt mennyisége. A küvettás és az áramlásos reakciót összehasonlítva megállapítható, hogy a küvettás reakció esetén nagyobb mértékben történt adduktképződés a GSH-val, viszont áramlásos körülmények között a reakciósebesség gyorsabbnak bizonyult. A továbbiakban küvettában dolgoztunk, az áramlásos reakciók további optimalizálása, kiterjesztése a kevésbé reaktív vegyületekre a kutatómunka jövőbeli célja lehet.

3.2.3 A fotoaffinitás jelöléshez használt puffer és pH optimalizálása

A puffer és a pH optimalizálása érdekében különböző pH-jú (7,4; 7,9 és 8,4) TRIS, illetve PBS pufferben végeztem megvilágítási kísérleteket 10 percig, 380 nm-es hullámhosszon, melyek eredményeit 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat: Puffer és pH optimalizálása a besugárzási kísérletekhez

	TRIS pH = 7,4	TRIS pH = 7,9	TRIS pH = 8,4	PBS pH = 7,4	PBS pH = 7,9	PBS pH = 8,4
Konverzió [%]	3%	86%	98%	82%	94%	95%

A különböző pH-jú pufferekben elvégzett kísérletek alapján látható, hogy a fotoaktiválás a 7,4-es pH-n sikerült a legkevésbé, míg a 8,4-es pH-n a legjobban. A TRIS puffer esetén nagyobb jelentőséget bír a pH a kísérletek alapján, ez a PBS pufferek esetében kisebb jelentőségű, azonban ott is van befolyása. A pH okozta különbségeket magyarázhatja, hogy a reakció során első lépésben történő N-H deprotonálódás feltételezhetően bázikusabb körülmények között könnyebben megy végbe. A TRIS pufferben található trisz-aminometán pKa értéke 8,07; a PBS pufferben található foszforsav pKa értékei pedig 2,16; **7,21**; 12,32. A pKa értékek közötti különbségek szolgálhatnak magyarázatul arra, hogy PBS pufferben már fiziológias körülmények között is képes a reakció lejátszódni, míg TRIS pufferben a reakció alig indul el. A fiziológiai körülményeket figyelembe véve a PBS-pufferben jobb végezni a kísérleteket, azonban megfigyeltük azt is, hogy TRIS pufferekben az addukt képződése nagyobb mértékben valósul meg, mint a PBS pufferekben. A legtöbb adduktképződést a 8,4-es pH-jú TRIS pufferben tapasztaltuk, a 7,9-es pH-jú TRIS pufferben pedig már csak fele annyi adduktot detektáltunk. A PBS pufferekben képződött addukt mennyisége a TRIS 8,4-es pH-jú pufferben képződő adduktnak csak 5-8%-a volt.

Az optimalizálási kísérletek alapján optimumnak az alábbi körülményeket választottam:

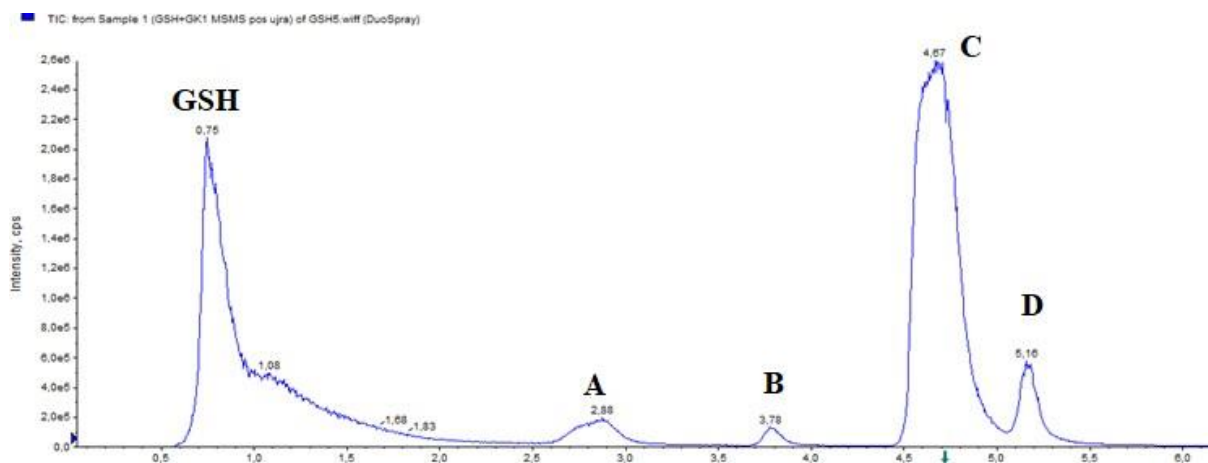
- reakcióidő: 10 perc
- hullámhossz: 380 nm
- puffer, pH: TRIS/PBS puffer, pH = 8,4.

Úgy döntöttünk, hogy a reakció kiterjesztése során előállított változatos szerkezetű hidrazon vegyületcsalád tesztelésére a TRIS puffert fogjuk alkalmazni, míg tényleges fehérjelöléshez tervezett vegyületek esetén a PBS puffert részesítjük előnyben.

3.2.4 A GSH-jelölés pontos helyének meghatározása

A **32a** kismolekulából a bevilágítás hatására képződő GSH-addukt szerkezetének meghatározásához a **32a** kismolekulát 50-szeres GSH-feleslegben bevilágítottam 10 percig 380 nm-en TRIS pH=8,4-es pufferben majd a bevilágítás utáni reakcióelegyet átadtuk LC-MSMS vizsgálatra a TTK MS Metabolika Kutatócsoport munkatársainak, majd a keletkező addukt fragmentációját vizsgáltuk (26. ábra).

A teljes ionkromatogramon (Total Ion Chromatogram, TIC, 34. ábra) 4 csúcsot kaptunk a GSH-n kívül, melyek közül a legintenzívebb csúcs esetén (C) a kismolekula igazoltan a ciszteinhez kötődik, ugyanis a fragmentációban azt figyeltük meg, hogy nincs kénhidrogén veszteség. A fragmentációs mintázat alapján a minor csúcsok (A, B, D) esetén minden csúcs esetében megfigyeltünk kénhidrogén veszteséget, és azt állapítottuk meg, hogy az első csúcs esetében a glutaminsav szabad aminjához (A), a másik két kis csúcs esetében (B, D) pedig a láncvégi karboxilcsoportokhoz kötődik a fragmens. Ez alapján azt a következtetést vontuk le, hogy elérhető tiol/tiolát, amino és karbonsav/karboxilát csoportok esetén a jelölés a cisztein aminosav kénatomját részesíti előnyben.



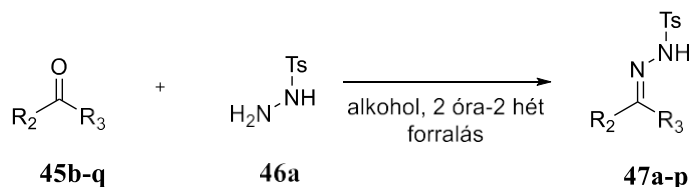
34. ábra: A GSH-jelöléshez tartozó teljes ionkromatogram

3.3 Bővítés további hidrazon analógokra

A továbbiakban a hidrazon „karbonil” szénatomján található R_2 és R_3 csoportok (21. ábra) hatásának vizsgálatához különböző tozilhidrazonokat állítottam elő, az alábbiakban az ezekkel elvégzett kísérleteket, és azok eredményeit mutatom be.

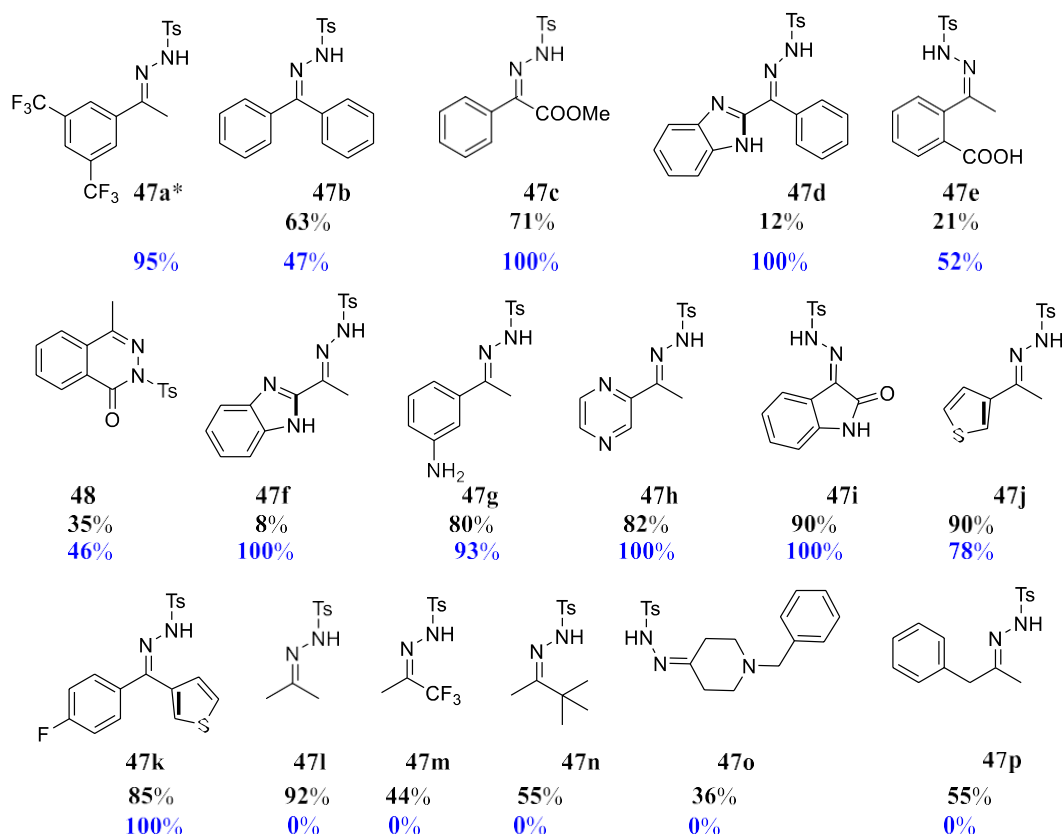
3.3.1 Ketonokból előállított hidrazonok

A kutatócsoport számára elérhető vegyszerek közül kiválasztottam 16 változatos szerkezetű ketont, melyekből elkészítettem a szulfonilhidrazon-származékokat. A keton és a tozilhidrazid reakcióját alkoholos közegben végeztem el szobahőmérsékleten vagy forralva, jellemzően néhány óra alatt (35. ábra). Ha a termék kivált a reakcióelegyből, akkor az elegyet lehűtöttem, és a szilárd csapadékot üvegszűrőn szűrtem. Amennyiben a termék nem vált ki a reakcióelegyből, akkor azt az elegy bepárlásával nyertem ki. A termék legtöbb esetben tisztán kristályosodott. Amennyiben mégis szennyezték reaktánsok vagy melléktermékek, kromatográfiás tisztítást alkalmaztam. A termékek szerkezetét HPLC-MS, ^1H és ^{13}C NMR mérésekkel igazoltam. Az új vegyületekről HRMS mérések készültek.



35. ábra: Hidrazon-származékok előállítása ketonokból

Olyan vegyületeket állítottam elő, amelyekben az R_2 és R_3 csoportok közül mindkettő aromás, mindkettő alifás, vagy egyik aromás és másik alifás. A molekulák szintézisét követően az optimalizált körülmények között fotoaktiválási reakciókat végeztem. A 36. ábrán az izolált molekulák szerkezete található a termelési értékekkel és az optimalizált körülmények között (380 nm, 10 perc, 8,4-es pH-jú TRIS puffer) végzett megvilágítások során elért konverzióval feltüntetve.



36. ábra: Ketonokból előállított hidrazonok szerkezete, a szintézisek hozama (fekete) és a megvilágítási reakcióik eredményei (kék) (*: A **47a** vegyület rendelkezésre állt a kutatócsoport számára, ezért nincs feltüntetve termelés.)

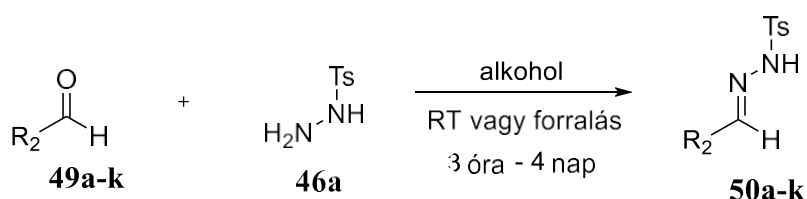
Amennyiben a hidrazon két alifás vagy benzil csoportot tartalmazott (**47l**, **47m**, **47n**, **47o**, **47p**), nem tapasztaltam jelentős változást a besugárzások során. Egy aromás, és egy alifás csoport esetén a reakció nagyon jó konverzióval végbement (**47a**, **47c**, **47g**, **47k**), azonban két aromás csoport esetében már csökkent reakciókészséget tapasztaltam (**47b**). A különböző heterociklusokat tartalmazó származékokkal végzett kísérletek is jó konverzióval játszódtak le (**47d**, **47f**, **47h**, **47i**, **47j**). Említést érdemel **47e** és **48**, amelyek ugyanazon szintézis kétféle terméke voltak. A szabad karbonsav csoport jelenlétében a fotoaktiválást kisebb hatékonysággal zajlott le, mint a szubsztitúlatlan fenilcsoport esetén, ami esetleg kapcsolatba hozható a vegyület savasságával, akár a karboxil csoport és a hidrazon közötti hidrogénhidas kölcsönhatással. A gyűrűzárt **48** esetén is közepes reaktivitást figyeltünk meg, ami arra utal, hogy a gyűrűs szerkezetben rögzítés gátló hatással bír, ugyanakkor érdekes, hogy az eltávolítható proton hiányában is lejátszódhat a reakció. Érdekes lehet tehát a jövőben olyan vegyületeken is kísérleteket végezni, amelyeken nincs hidrazon NH.

Összességében arra a következtetésre jutottam, hogy az aromás gyűrű legalább az egyik pozícióban elengedhetetlen ahhoz, hogy a reakció lejátszódjon. Ennek oka az lehet, hogy az

aromás gyűrű jobban stabilizálja a képződő diazovegyületet, majd a karbént, mint az alifás csoportok. Két aromás csoport esetén azonban feltételezhetően egy szterikus gátlás lép fel, melynek köszönhetően a pufferben található bázis kisebb mértékben fér hozzá a vegyülethez, és így kevésbé képes a nitrogént deprotonálni, hogy a reakció elinduljon. A bevilágítási kísérletek során a reaktív vegyületek esetén egyszeres adduktot detektáltam GSH jelenlétében.

3.3.2 Aldehidekből előállított származékok

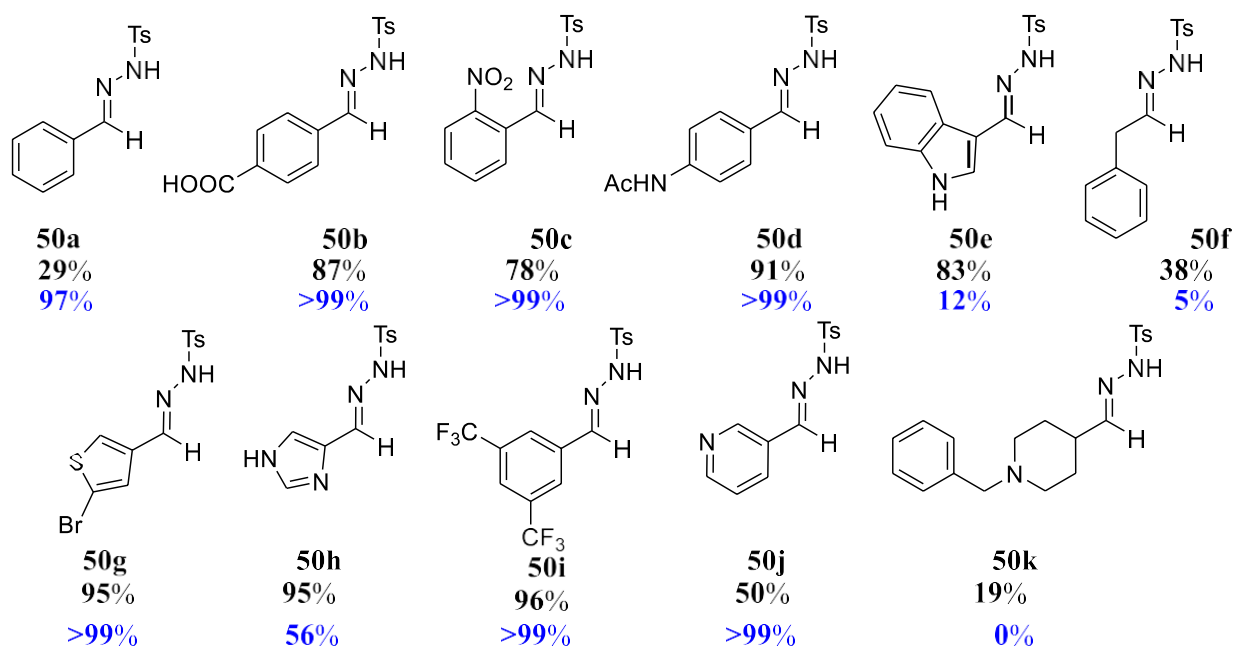
Ezt követően megvizsgáltam, hogy a reakció aldehidszármazékokkal is lejátszódik-e. Kiválasztottam a kutatócsoport számára elérhető vegyületek közül tizenegy változatos szerkezetű aldehidet (a tapasztalatok alapján itt már nagyrészt aromás származékokat), és előállítottam belőlük a hidrazon analógokat az aldehid és a tozilhidrazid (**46a**) reakciójában (37. ábra).



37. ábra: Hidrazon-származékok előállítása aldehidekből

Hasonlóképp a ketohidrazonokhoz, ha a termék kivált a reakcióelegyből, akkor az elegyet lehűtöttem, és a szilárd csapadékot üvegszűrőn szűrtem. Amennyiben a termék nem vált ki a reakcióelegyből, akkor azt bepárlással nyertem ki. Amennyiben mégis szennyezték reaktánsok vagy melléktermékek, kromatográfiás tisztítást alkalmaztam.

A molekulák szintézisét követően az optimalizált körülmények (380 nm, 10 perc, 8,4-es pH-jú TRIS puffer) között bevilágítottam ezeket az anyagokat. A 38. ábrán összefoglaltam az aldohidrazonok hozamait és a besugárzások során elért konverziót.



38. ábra: Aldehidekből előállított hidrazonok szerkezete, a szintézisek hozama (fekete) és a megvilágítási reakcióik eredményei (kék)

Az elvégzett kísérletek során azt tapasztaltam, hogy az aromás csoportot tartalmazó származékok a ketonokhoz hasonlóan az aldehidek esetében is jól működnek, a molekulák (50a, 50b, 50c, 50d, 50g, 50i, 50j) ezekben az esetekben gyakorlatilag teljesen átalakultak a fotoaktiválás hatására. Az indol (50e), illetve imidazol (50h) szerkezeti elemet tartalmazó vegyületek esetén a reakció gyengébb konverzióval ment végbe, mely a kapcsolódó csoport benzolénál rosszabb aromaticitásával lehet összefüggésben. A benzol gyűrűnél kis mértékben csökkent aromaticitással rendelkezik a tiofén és a piridin, az imidazol, illetve az indol aromaticitása szintén csökkent mértékű, melynek következtében a karbén képződése nem kedvező az aromás rendszer stabilizáló hatásának hiánya miatt. Azokban az esetekben, amikor alifás vagy benzil csoport kapcsolódott a molekulához (50f, 50k) a reakció nem, vagy csak nagyon alacsony konverzióval ment végbe.

A megvilágítási kísérleteket 50a-k molekulák esetén PBS 7,4; 7,9 és 8,4-es pH-jú pufferekben is elvégeztem, melyek eredményeit az 5. táblázat tartalmazza. A 8,4-es pH-jú TRIS puffer referencia alapot nyújtott, és így a teljes vegyülettárral összevethető adatokat kaptam. A 7,4-es pH-jú PBS pufferben a fiziológias körülmények miatt végeztem el a kísérleteket, 8,4-es pH-jú PBS pufferben pedig azért, mert a bázikusabb oldószer általában kedvezett a jelölés hatékonyságának.

5. táblázat: Besugárzási kísérletek különböző PBS pufferekben a **50a-50k** molekulákkal

Sorszám	PBS pH = 7,4	PBS pH = 7,9	PBS pH = 8,4
50a	95%	nincs adat	99%
50b	>99%	>99%	>99%
50c	>99%	>99%	>99%
50d	99%	97%	99%
50e	73%	84%	92%
50f	9%	13%	10%
50g	>99%	nincs adat	>99%
50h	49%	nincs adat	59%
50i	<99%	>99%	>99%
50j	>99%	nincs adat	>99%
50k	nincs reakció	nincs reakció	nincs reakció

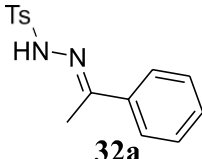
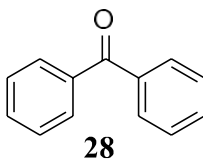
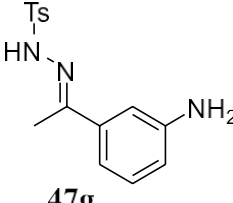
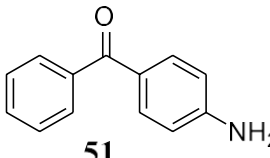
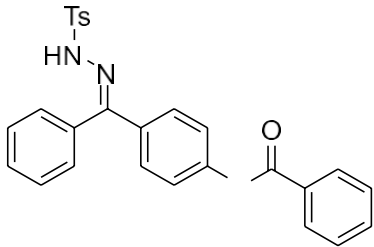
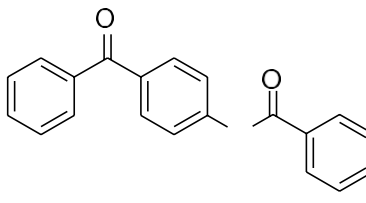
Az elvégzett kísérletek alapján azon molekulák esetében, amelyekkel a 8,4-es pH-jú TRIS pufferben végzett kísérletek jó konverzióval ment végbe (**50a, 50b, 50c, 50d, 50g, 50i, 50j**), a reakció többi pufferben hasonlóan jól működött. A 8,4-es pH-jú TRIS pufferben csak kevésbé, vagy egyáltalán nem reagáló molekulák esetében is gyakorlatilag hasonló eredményeket kaptam a különböző pufferekben végzett kísérletek során (**50f, 50h, 50k**), kivéve az indolcsoportot tartalmazó molekula esetében (**50e**): míg a 8,4-es pH-jú TRIS pufferben végzett kísérlet során 12%-os konverziót sikerült csak elérni, addig a PBS pufferekben elvégzett kísérletek ennél jóval nagyobb konverziót eredményeztek (rendre 73%; 84%; 92%), ami a biológiai alkalmazásnak kedvezhet.

3.3.3 Összehasonlítás hasonló méretű fotoaffinitás-jelölőkkel

Kutatómunkám során szerettem volna az általam előállított hidrazon-származékokat összehasonlítani már ismert fotoaffinitás kötőelemekkel is. A méretbeli hasonlóság miatt a benzofenonokat választottam. A hidrazon-származékok mérete is viszonylag nagy, de míg a benzofenonok jelölése gyökképződésen keresztül, addig a hidrazonoké karbénképződésen keresztül valósul meg, ami kevesebb mellékreakcióhoz vezethet. Néhány hasonló szerkezettel rendelkező molekula összehasonlítását végeztem el, feltételeztem, hogy a különböző működési

mechanizmus különböző reaktivitást is okoz majd. Az összehasonlítások a 6. táblázatban találhatóak.

6. táblázat: Analóg benzofenon-származékok és szulfonilhidrazon-származékok besugárzásának összehasonlítása

@380 nm, 10 perc Szerkezet	PBS pH = 7,4 Konverzió [%]	TRIS pH = 8,4 Konverzió [%]	Referencia	PBS pH = 7,4 Konverzió [%]
 32a	82%	98%	 28	nincs reakció
 47g	86%	93%	 51	nincs reakció
	>99%	>99%		60%

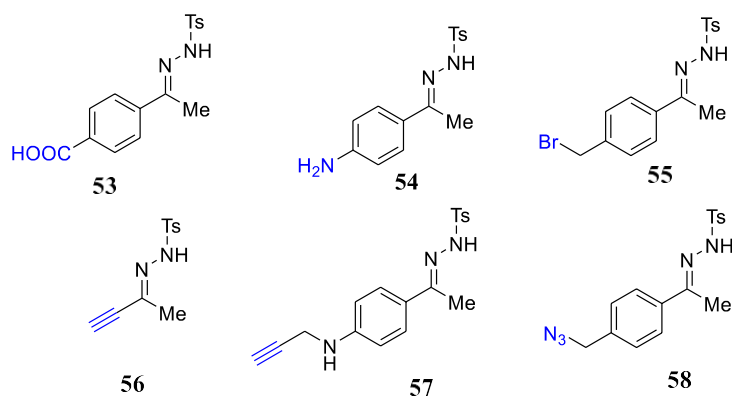
Azt tapasztaltam, hogy benzofenon-származékokkal ellentétben azonos körülmények között a hidrazonok jobb hatékonysággal működtek, sőt, míg a hidrazonok esetén minden esetben detektáltam a GSH adduktot, a benzofenonokkal ezt nem sikerült elérni. A szakirodalomban 350-360 nm-en aktiválják a benzofenonokat, és gyakran több mint 30 percig kell bevilágítani a molekulákat hatékony kapcsolás eléréséhez.^[28] Ezzel ellentétben a hidrazonok 380 nm-en tíz perc alatt teljesen átalakultak.

3.4 Gyógyszerkémiiai és kémiai biológiai szempontból releváns analógok előállítása

A kísérleti elrendezés összeállítását, a körülmények optimalizálását, illetve a szubsztituensek hatásának vizsgálatát követően gyógyszerkémiában és kémiai biológiában használható vegyületeket állítottam elő, és megvizsgáltam a fotoaktiválhatóságukat. Az alábbiakban ezeket ismertetem.

3.4.1 Kötőelemek

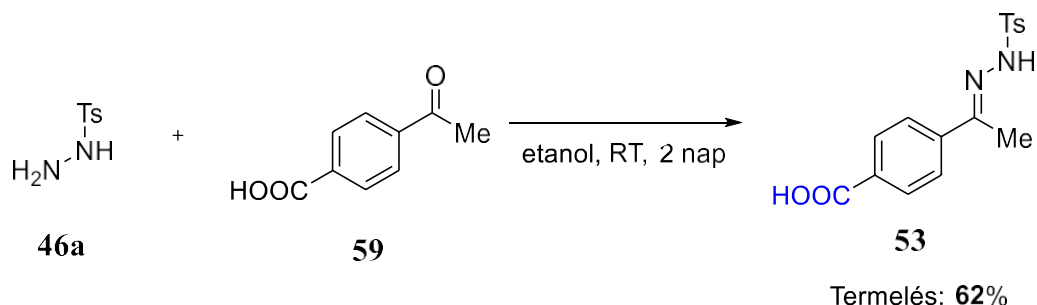
Egy új fotoaffinitás jelölő esetében érdemes azt olyan funkciós csoportokkal is felszerelni, melyeknek köszönhetően kötőelemként (warhead) kapcsolható lesz már létező, reverzibilisen kötődő biológiailag aktív molekulákra, melyek a szulfonilhidrazon szerkezeti részt nem tartalmazzák, azonban ezáltal alkalmassá válhatnak a fotocímkéhez. Ez a reaktív csoport jellemzően azid, acetilén, bromid, karbonsav, vagy amin szokott lenni. Ezek alapján előállítottam olyan vegyületeket, melyek a próbamolekula (**32a**) szerkezetét tartalmazzák, és acilezhetőek/képesek acilezni vagy alkilezni, továbbá akár részt venni egy azid-alkin klick reakcióban. Ezután elvégeztem velük a besugárzási kísérleteket az optimalizált körülmények között három különböző pufferben (10 perc, 380 nm, $\text{PBS}_{\text{pH}=7,4}$ / $\text{PBS}_{\text{pH}=8,4}$ / $\text{TRIS}_{\text{pH}=8,4}$). Az előállított kötőelemeket a 39. ábra tartalmazza.



39. ábra: Szintetizált szulfonilhidrazon kötőelemek

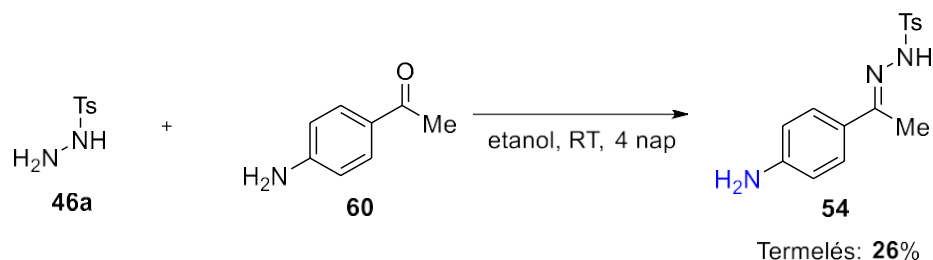
A szabad karbonsav funkciós csoportot tartalmazó vegyület (**53**) esetén 4-karboxiacetofenont (**59**) szobahőmérsékleten kevertettem 4-metilbenzolszulfonilhidraziddal

(**46a**), és jó termeléssel izoláltam **53** karboxi-származékot (40. ábra), amely mindhárom vizsgált pufferben teljes konverzióval reagált a megvilágítás hatására.



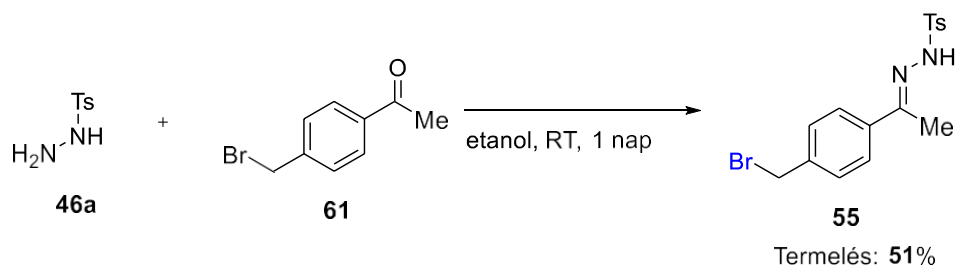
40. ábra: A szabad karboxilcsoportot tartalmazó vegyület (**53**) szintézise

A szabad amin funkciós csoportot tartalmazó vegyület (**54**) esetén 4-aminoacetofenont (**60**) szobahőmérsékleten kevertettem 4-metilbenzolszulfonilhidraziddal (**46a**), és alacsony termeléssel izoláltam **54** amino-származékot (41. ábra), amely mindhárom vizsgált pufferben magas konverzióval reagált a megvilágítás hatására: PBS_{pH=7,4}: 76%; PBS_{pH=8,4}: 89%; TRIS_{pH=8,4}: 95%-os fogyást sikerült elérni. A PBS-pufferben végzett besugárzások során kétféle GSH-jelölés történt, melyek azonosítása jövőbeni célunk.



41. ábra: A szabad aminocsoportot tartalmazó vegyület (**54**) szintézise

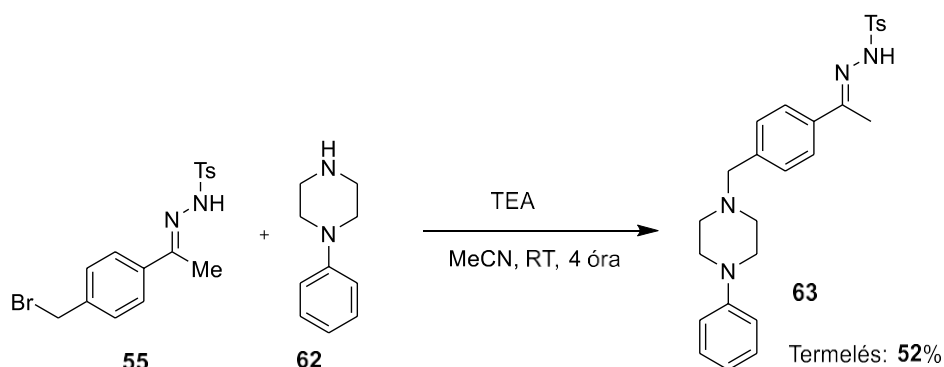
A brómot tartalmazó vegyület (**55**) esetén 4-brómacetofenont (**61**) szobahőmérsékleten kevertettem 4-metilbenzolszulfonilhidraziddal (**46a**), és közepes termeléssel izoláltam **55** bróm-származékot (42. ábra).



42. ábra: A brómot tartalmazó vegyület (**55**) szintézise

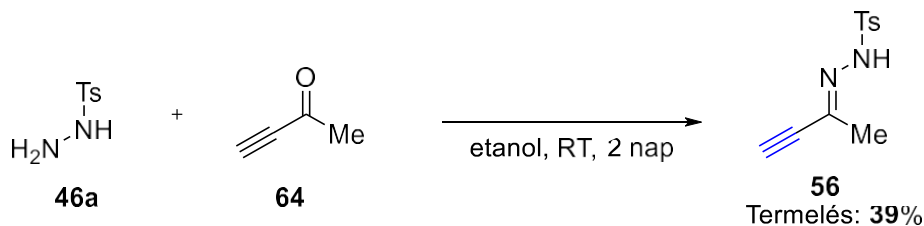
A vegyület a megvilágítási kísérletek során nem a kívánt módon reagált, hanem a GSH-t alkilezte teljes konverzióval, feltételezhetően a cistein tiolcsoportján. Ezért a kötőelemet hozzákapcsoltam egy farmakofórhoz (*N*-fenilpiperidin), és ezt az összetettebb vegyületet vizsgáltam.

A **55** bróm-származékot szobahőmérsékleten kevertettem *N*-fenilpiperidinnel (**62**), és közepes termeléssel izoláltam a várt terméket (**63**) (43. ábra), amely mindhárom vizsgált pufferben teljes konverzióval reagált a megvilágítás hatására, mellyel igazoltuk, hogy a **55**-brómszármazék kötőelemként használható.



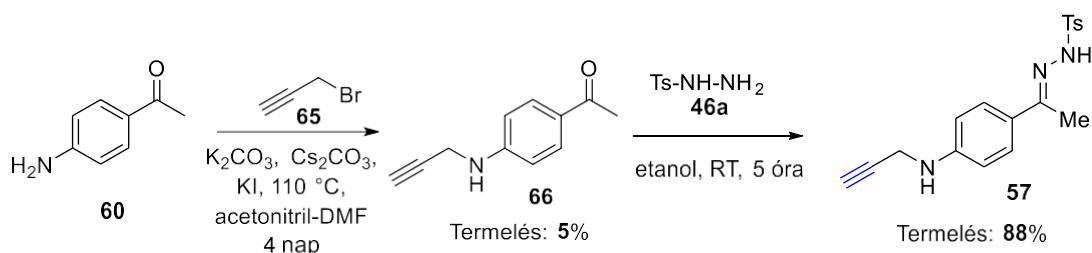
43. ábra: A piperidinszármazék (**63**) szintézise

Az egyik terminális acetilén csoportot tartalmazó vegyület esetén but-3-in-2-ont (**64**) szobahőmérsékleten kevertettem 4-metilbenzolszulfonilhidraziddal (**46a**), és közepes termeléssel izoláltam **56** acetilén-származékot (44. ábra), amely nem reagált egyik vizsgált pufferben sem a megvilágítás hatására, ami az aromás szerkezet hiányával magyarázható.



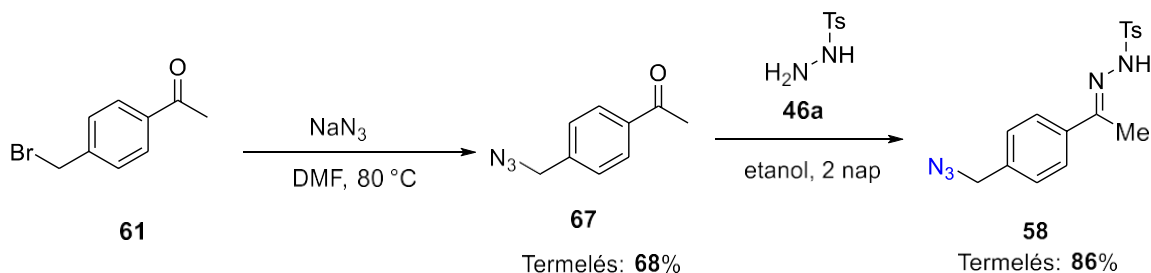
44. ábra: A szabad acetilént tartalmazó vegyület (**56**) szintézise

A másik acetilén funkciós csoportot tartalmazó vegyület esetén 4-aminoacetofenont (**60**) keverttem 110 °C-on propargil-bromiddal (**65**), majd a gyenge termeléssel izolált terméket (**66**) 4-metilbenzolszulfonilhidraziddal (**46a**) keverttem szobahőmérsékleten 5 óráig, és így jó termeléssel izoláltam **57** acetilén-származékot (45. ábra), amely mindhárom vizsgált pufferben teljes konverzióval reagált a megvilágítás hatására.



45. ábra: A szabad acetilént tartalmazó vegyület (**57**) szintézise

Az azid funkciós csoportot tartalmazó molekula esetén 1-(4-brómmetil)fenil)etán-1-ont (**61**) kevertettem 80 °C-on nátrium-aziddal, majd jó termeléssel izoláltam a várt terméket (**67**), és azt 4-metilbenzolszulfonilhidraziddal (**46a**) szobahőmérsékleten 2 napig kevertetve jutottam **58**-azidszármazékhoz (46. ábra), amely mindhárom vizsgált pufferben jó konverzióval reagált a megvilágítás hatására: PBS_{pH=7,4}: 88%; PBS_{pH=8,4}: 99%; TRIS_{pH=8,4}: 62%, azonban TRIS pufferben az azidcsoport aminná redukálódását tapasztaltam. Ez esetben érdekes lehet az utóbbi reakció további tanulmányozása, illetve egy azid-alkin klikk reakció termékének vizsgálata.



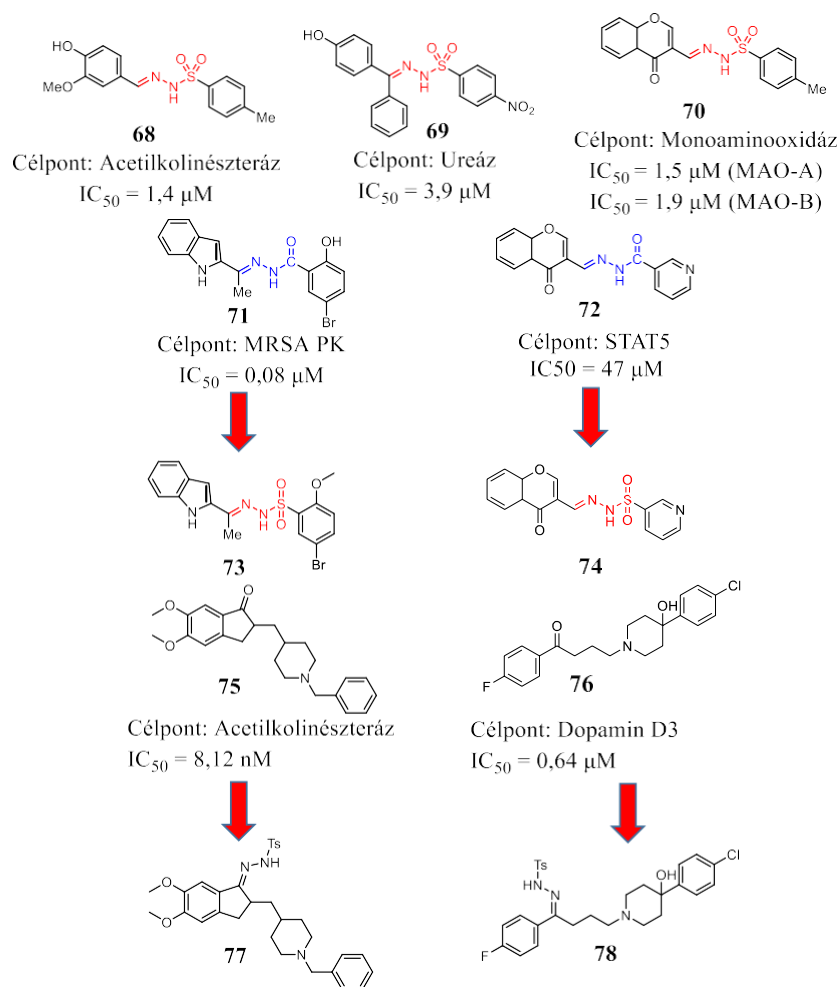
46. ábra: Az azidcsoportot tartalmazó vegyület (**58**) szintézise

3.4.2 Biológiai aktív szulfonilhidrazonok reaktivitásának vizsgálata terápiás fehérjecélpontokon

Az előző fejezetben ismertetett kötőelemek felszerelése egy biológiai aktív molekulára azt a veszélyt hordozza magában, hogy a szerkezet kibővítésével, megváltozásával a vegyület affinitása is megváltozik. Más fotocímkéző vegyületcsaládok, mint a diazirinek, vagy a benzofenonok biológiai aktív vegyületek szerkezetében nem fordulnak elő a szulfonilhidrazon szerkezeti egységgel ellentétben, ami viszont igen. Így a vegyületcsalád előnye lehet, hogy egy biológiai aktív vegyületet szerkezetének átalakítása, tehát kötőelem külön felszerelése nélkül aktiválhatóvá tehetjük fotocímkézéshez. Olyan biológiai aktív vegyületeket kerestem a szakirodalomban, amelyek szerkezetében a szulfonilhidrazon csoport, vagy esetleg a karbohidrazon csoport (amit szulfonilhidrazonra lehet cserélni) megtalálható.

Célunk volt, hogy olyan biológiailag aktív vegyületeket, amik reverzibilisen kötődnek valamilyen fehérjéhez, fénybesugárzással, tehát egy fotofarmakológiai módszerrel irreverzibilisen kötődővé alakítsam, ami a fehérje hatékonyabb gátlását segítheti elő. Egy karbonil-szulfonil csere esetén abban bízunk, hogy a szulfonil- és a karbonilhidrazon kellő mértékben bioizoszterek ahhoz, hogy a szerkezetváltozás ne okozzon jelentős aktivitásbeli változást. A szakirodalom tanulmányozása során öt biológiailag aktív vegyületet választottam ki, melyek a 47. ábrán láthatóak. Az egyes hatóanyagok alatt feltüntettem célpontjukat, illetve a vegyületek IC_{50} értékét (inhibitor koncentráció, mellyel 50%-os gátlás érhető el). Három vegyület önmagában fotoaffinitás jelölésre alkalmas szulfonilhidrazon egységet tartalmaz, míg két molekula esetén a hidrazon csoportot szulfonilhidrazonra terveztem cserélni.

Emellett célul tűztam ki annak vizsgálatát, hogy a donepezil és a haloperidol gyógyszerhatóanyagok esetén a keton funkciót szulfonilhidrazonná alakítva az affinitás mennyiben változik, illetve, hogy a fény hatására történő felszabadítás esetén történik-e fotoaffinitás jelölés.

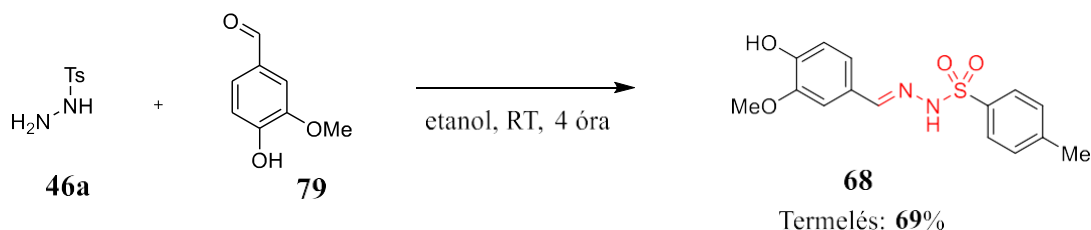


47. ábra: Biológiailag aktív molekulák, illetve tervezett szulfonilhidrazonok

A vegyületekhez szükséges alapanyagokat megrendeltük vagy szintetizáltam, és ezek segítségével nyertem a szulfonilhidrazon-származékokat. A molekulák előállítását követően elvégeztem a fotoaktiválási kísérletet GSH jelenlétében 380 nm-en. A kísérleteket különböző pufferekben hajtottam végre. Az alábbiakban egyenként mutatom be a vegyületeket, célpontjukat, előállításukat és tesztelésüket.

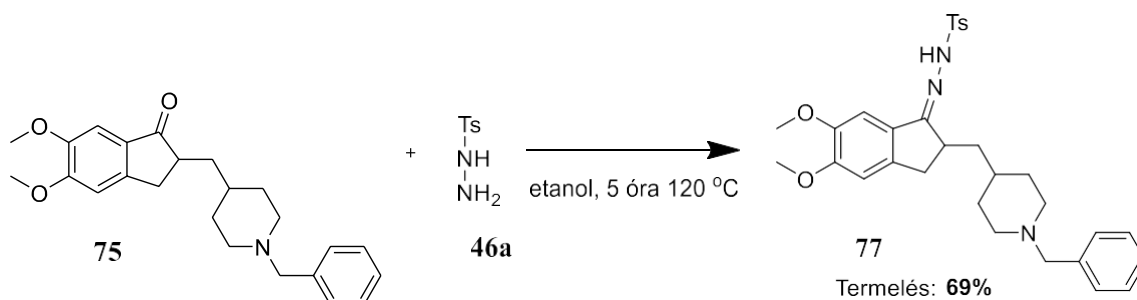
3.4.2.1 Acetilcolinészteráz

Az Alzheimer-kórban szenvedő betegek szervezetében acetilcolinészteráz enzim túlműködés lép fel, mely többek között a kognitív funkciók romlásához és demenciához vezethet. Az acetilcolinészteráz enzim gátlására rendelkezésre álló gyógyszerek száma csekély, és sokszor azok hatékonysága is megkérdőjelezhető. Az enzim gátlásával az acetilcolin hidrolízise lassítható, melynek következtében az acetilcolin koncentráció nő a szervezetben. Különböző szulfonilhidrazonokat állítottak elő nemrégiben, majd inhibíciós képességüket vizsgálták az acetilcolinészterázon.^[46] Azt találták, hogy **68** hidrazon-származék elég hatékony, az IC₅₀ értéke 1.4 µM. Így kiválasztottam, és előállítottam ezt a vegyületet vanillin (**79**) és tozilhidrazid (**46a**) reakciójával (48. ábra), majd elvégeztem a besugárzási kísérleteket, amely során mind a három típusú pufferben 100%-os konverziót tapasztaltam, mely eredmények összhangban vannak a korábbi tapasztalatainkkal, miszerint az aromás aldehidekből képzett hidrazonok jó reaktivitást mutattak.



48. ábra: Acetilcolinészteráz inhibitor (**68**) szintézise

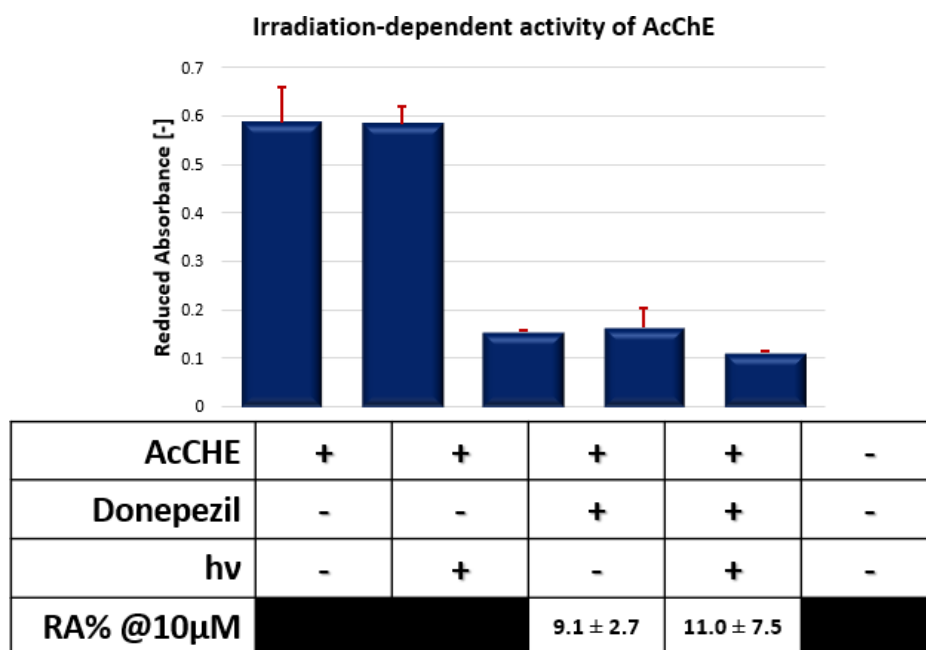
Ezután az acetilcolinészteráz inhibitoraként ismert donepezil (**75**) szulfonilhidrazonná való átalakítását is elvégeztem (49. ábra).



49. ábra: Donepezil származék (**77**) szintézise

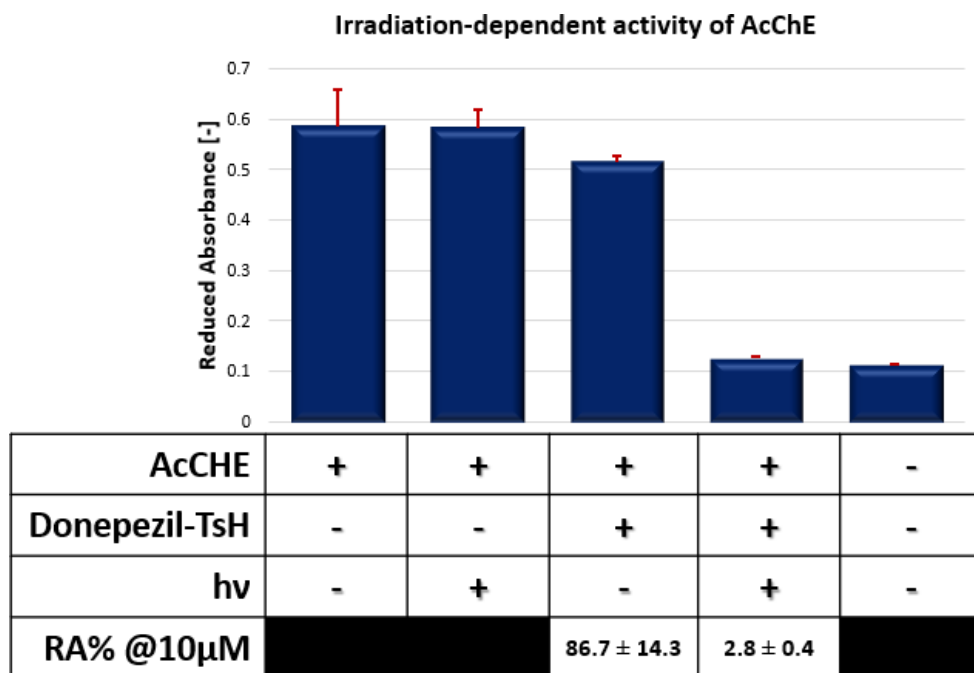
A hidrazon (**77**) $\text{PBS}_{\text{pH}=7,4}$ és $\text{PBS}_{\text{pH}=8,4}$ pufferekben teljesen elfogy a bevilágítás hatására, a GSH-addukt jelenlétét mindkét pH-n azonosítani tudtam az MS-ben.

A hidrazonná módosított donepezil (**77**) és **68** biológiai aktivitásának vizsgálatát egy acetilkolinészteráz inhibitor screening kit segítségével végeztem el, mely egy abszorbancia változáson alapuló mérési módszer (Acetylcholinesterase Inhibitor Screening Kit (MAK324) - Technical Bulletin (sigmaaldrich.com)). A módszer során az egyes minták abszorbanciáját vizsgáljuk meg 412 nm-en, és az alapján lehet következtetni az enzim aktivitására. A kísérletek eredményei az 50-52 ábrákon láthatóak. Azt tapasztaltuk, hogy önmagában a besugárzásnak nincsen hatása az enzimaktivitásra. Kontrollmérések alapján a donepezil gátló hatása egyértelmű (50. ábra; 3. oszlop), az inhibíciót a besugárzás nem befolyásolja a módosítatlan donepezil molekula esetében (50. ábra; 4. oszlop).



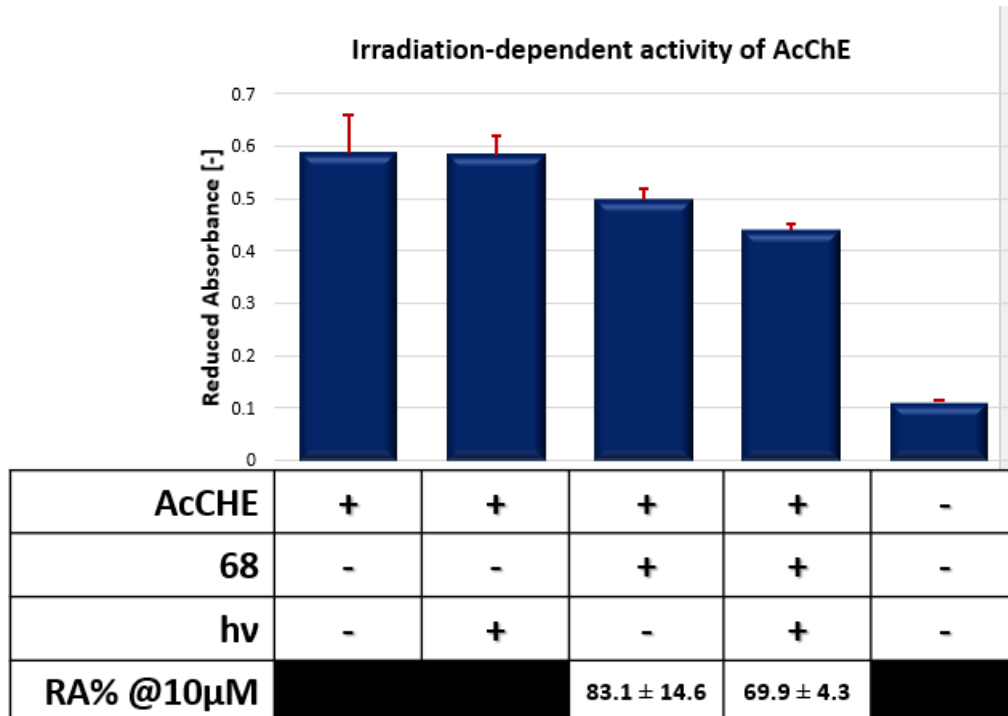
50. ábra: Donepezil gátló hatásának vizsgálata

A donepezil-tozilhidrazon (**77**) esetén bevilágítás nélkül az inhibíció elenyésző (maradó aktivitás 10 μM koncentrációban 86.7%, 51. ábra; 3. oszlop), azonban a bevilágítás hatására az inhibíció felerősödik (maradó aktivitás 10 μM koncentrációban 2.8%, 51. ábra; 4. oszlop).



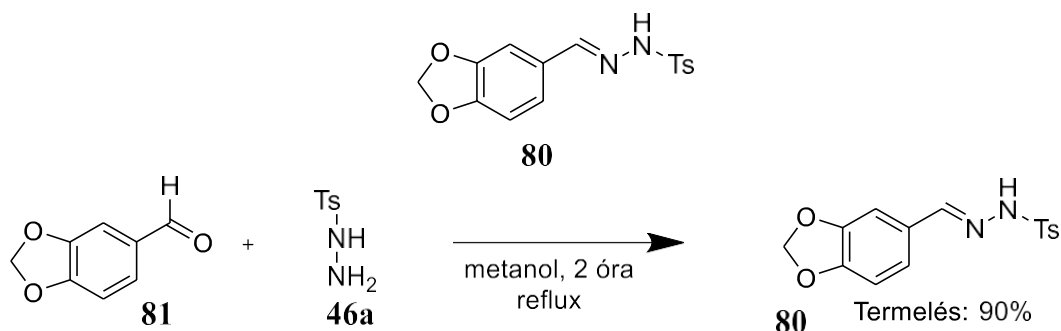
51. ábra: Donepezil-tozilhidrazon gátló hatásának vizsgálata

A **68** kismolekula esetében az inhibíciót nem sikerült igazolni még a bevilágítatlan minta esetén sem (52. ábra; 3. és 4. oszlop), annak ellenére, hogy a szakirodalom alapján reprodukált assayben működni kellene.



52. ábra: A **68** molekula gátló hatásának vizsgálata

A továbbiakban kiválasztottuk a **68** származékot tartalmazó publikációból a **80** hidrazont, majd szintetizáltam, és azzal is elvégeztem a biológiai kísérleteket, azonban ezen molekula esetén sem sikerült reprodukálni a cikkben közölt referenciaértékeket (53. ábra).

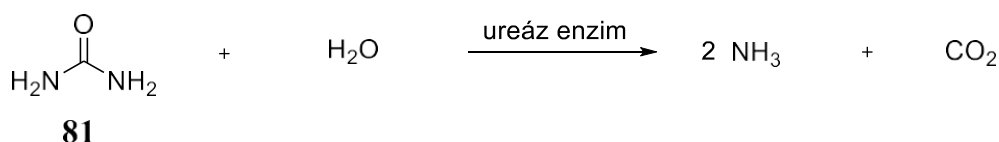


53. ábra: 80 hidrazon szerkezete és szintézise

Mivel az AChE és a donepezil-hidrazon esetében MS mérések nem készültek, az még igazolásra vár, hogy az inhibíciós hatást a kovalens kötődés, vagy photocage jelenség miatt különböző donepezilszármazékok (olefin- vagy alkoholszármazék) okozzák.

3.4.2.2 Ureáz

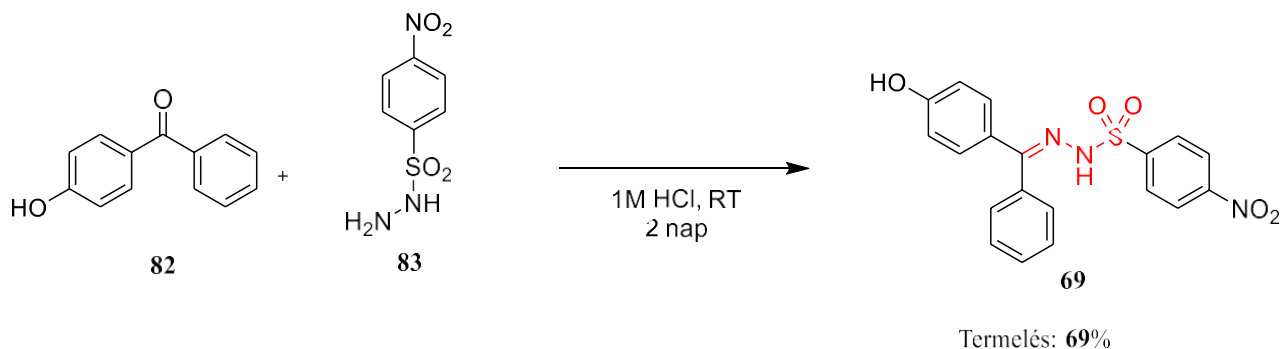
A fehérje metabolizmus végtermékeként képződő karbamid (urea) a vizelettel távozik. Az emberi szervezetben alaphelyzetben nem fordul elő az ureáz enzim, azonban különböző patogén baktériumok által megjelenhet, és elősegíti a karbamid (**76**) hidrolízisét szén-dioxiddá és ammóniává, melynek egyszerűsített reakcióegyenlete a 54. ábrán látható.^[47]



54. ábra: Karbamid hidrolízise

A képződő ammónia következtében a gyomorsavtermelés megnő, ami többek között gyomorfekélyhez vezethet. A képződő ammónia továbbá kellemetlen szagot ad a megfertőzött vizeletnek, mely az ammónia miatt immár lúgos kémhatású. A szervezetbe került ureáz enzim aktivitásának gátlása érdekében számos inhibitor fejlesztettek már, azonban napjainkban is folyamatos kutatások zajlanak kisebb méretű, költséghatékonyabb, és az emberi szervezetet kevésbé terhelő mellékhatásokkal rendelkező gyógyszerek fejlesztésére. A szakirodalomban talált ureáz inhibitorok közül kiválasztottam a **69** szulfonilhidrazon szerkezeti elemet tartalmazó molekulát.^[48] A vegyületet 4-hidroxibenzofenon (**82**) és 4-nitrobenzolszulfonilhidrazid (**83**) reakciójával előállítottam (55. ábra), majd elvégeztem vele a fotoaktiválási kísérleteket, melyek során alacsony és közepes konverzióval játszódtott le a

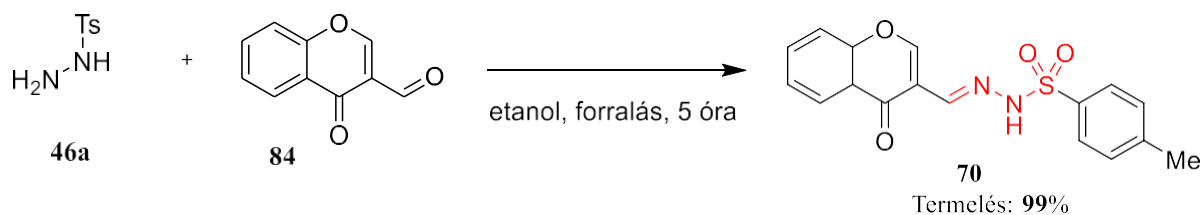
reakció: $\text{PBS}_{\text{pH}=7,4}$: 44%; $\text{PBS}_{\text{pH}=8,4}$: 40%; $\text{TRIS}_{\text{pH}=8,4}$: 26%. Erre magyarázatul szolgálhat a tapasztalat, miszerint az R_1 csoport feltérképezésekor a 4-nitrobenzol rontotta a reakció hatékonyságát, továbbá az R_2 és R_3 csoportok vizsgálatakor tapasztaltuk, hogy két aromás gyűrű feltételezhetően egy szterikus gát miatt szintén negatív hatással bír. Ureáz esetén még nem volt lehetőségünk biológiai mérések végzésére.



55. ábra: Ureáz inhibitor (**69**) szintézise

3.4.2.3 MAO

A mitokondrium külső felületén található monoamin-oxidáz (MAO) enzim, melynek két típusa létezik (MAO-A és MAO-B), és többek között a szerotonin, a dopamin, az adrenalin és a noradrenalin dezaminálódását, fenil-etil-amin származékok bomlását segíti elő. Az említett neurotranszmitterek túlműködése depresszióhoz, szorongáshoz vezethet, továbbá a Parkinson-kór egyik tüneteként is ismert. A MAO enzimek (mind a MAO-A, mind a MAO-B) gátlása kapcsán különböző kromonszármazékokat állítottak elő, melyek közül **70** hidrazon-származékot szintetizáltam.^[49] A reakcióban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**) és 3-formilkromont (**84**) forraltam, és kvantitatív termeléssel jutottam a **70** hidrazon-származékhoz (56. ábra). Ezután elvégeztem a fotoaktiválási kísérleteket, melyek során csökkent reakciókészséget tapasztaltam: $\text{PBS}_{\text{pH}=7,4}$: 18%; $\text{PBS}_{\text{pH}=8,4}$: 33%; $\text{TRIS}_{\text{pH}=8,4}$: 61%, melynek oka például az aromaticitás hiányában kereshető. Azonban a reakció megindulása miatt megállapítható, hogy feltehetően egy aromás gyűrűvel konjugált kettős kötéses rendszer is már alkalmas lehet a hidrazon aktiválására.

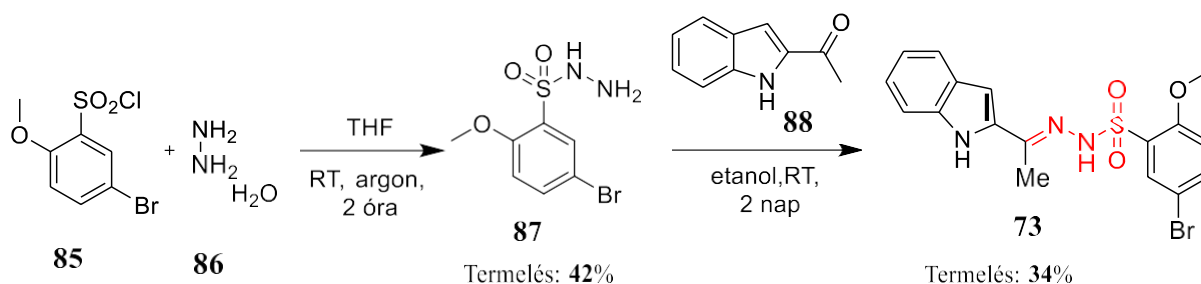


56. ábra: MAO inhibitor (**70**) szintézise

A szintetizált **70** molekulát intakt MS és emésztés utáni MSMS vizsgálatra adtuk le annak érdekében, hogy megállapítsuk a MAO-hoz történő kovalens kötődést. A mérések rámutattak, hogy a MAO-hoz a várttól eltérően nem a kromén szerkezeti részlet, hanem a tozil csoport kapcsolódott.

3.4.2.4 MRSA PK

Az elmúlt évtizedekben elterjedt az antibiotikumok használata, aminek következtében számos antibiotikumra (pl.: meticillin) rezisztens mutáns baktériumtörzs alakult ki. A meticillinrezisztens *staphylococcus aureus* (MRSA) baktérium fertőződés következtében súlyos esetekben szervi (pl.: vese, szív) elégtelenségek, akár halál is felléphet, így a gyógyszerkémia egy igen intenzíven kutatott területe az MRSA okozta megbetegedésekre alkalmas antibiotikumok fejlesztése. Egy módszer erre a célzottan bakteriális piruvát kináz (MRSA PK) enzim gátlása, mely például az irodalomban talált **71** karbohidrazon molekulával valósítható meg.^[50] A vegyület szulfonilhidrazon analógjának előállításához szükséges hidrazidot (**87**) hidrazin-hidrát (**86**) és a megfelelő szulfonil-klorid (**85**) reakciójában állítottam elő. Ezt követően **87** hidrazidot (2-indolil)-metilketonnal (**88**) reagáltatva kaptam a várt terméket (**73**) (57. ábra), és elvégeztem vele a besugárzási kísérleteket, melyek során megvilágítások során 10 perces reakcióidő mellett csak kis mértékű konverziót tapasztaltam, így a kísérleteket megismételtem 30 perces reakcióidővel, mely során már jó és kiváló konverziót tudtam elérni mind a három pufferben: PBS_{pH=7,4}: 72%; PBS_{pH=8,4}: 89%; TRIS_{pH=8,4}: 93%. A molekula kis mértékben csökkent reakciókészsége az indol benzolhoz képesti csökkent aromaticitásával magyarázható. Biológiai tesztelésre eddig még nem nyílt lehetőségünk.

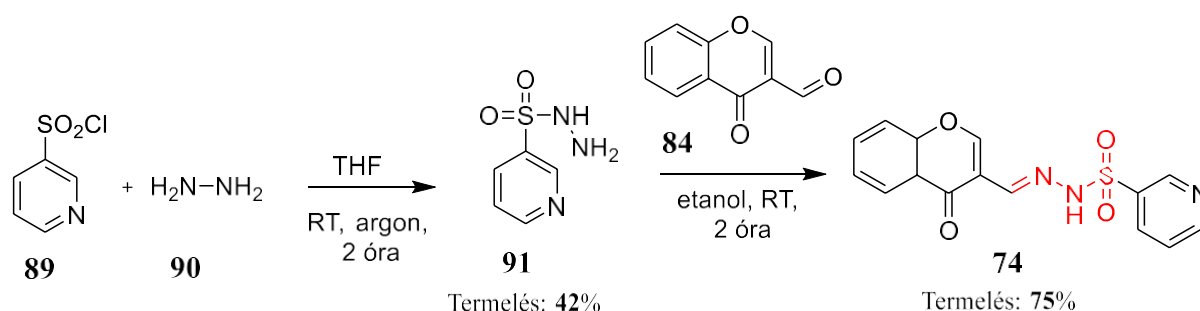


57. ábra: MRSA PK inhibitor (**73**) szintézise

3.4.2.5 STAT5

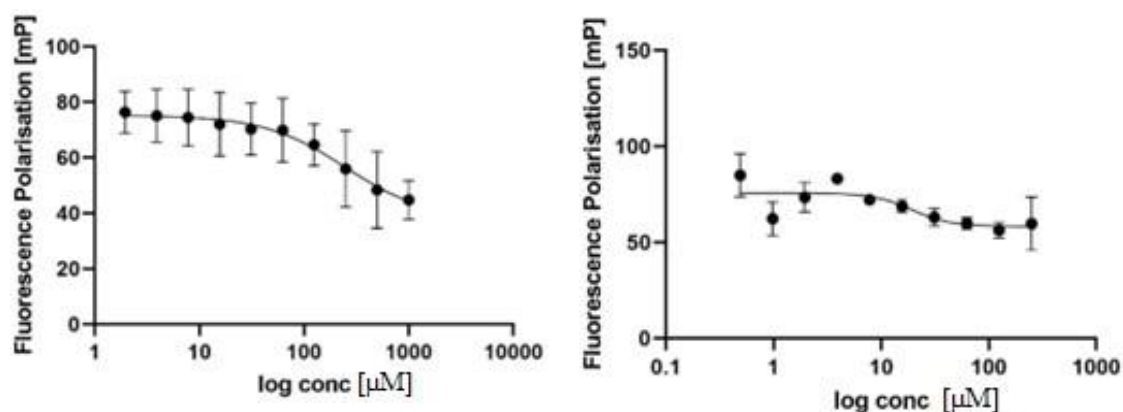
A STAT5 egy transzkripció faktor, ami többnyire sejtosztódásban, sejthalálban, illetve gyulladások kialakulásában résztvevő gének kifejeződését segíti. A STAT5 túlműködése sokat

osztódó, azonban életben maradó rákos sejtek (mell, prosztatata) kialakulásához vezethet. A STAT5 transzkripció faktor foszforilezést követően képes hatását kifejteni, ennek gátlása egy intenzíven kutatott terület.^[51] A szakirodalomban talált STAT5 inhibitor tulajdonsággal rendelkező karbohidrazon-származék (72) szulfonilhidrazon analógját állítottam elő.^[52] A piridin-3-szulfonil-klorid (89) és hidrazin (90) reakciójával előállított hidrazidot (91) a megfelelő ketonnal (84) kevertetve kaptam a 74 hidrazon-származékot (58. ábra), majd elvégeztem vele a fotoaktiválási kísérleteket, melyek alacsony és közepes konverzióval játszódtak el: PBS_{pH=7,4}: 21%; PBS_{pH=8,4}: 53%; TRIS_{pH=8,4}: 36%. Ennek okául szolgálhat a 70 kromonhoz hasonlóan az aromaticitás hiánya, illetve az elektronszívó heterociklus jelenléte a szulfonilcsoporton.



58. ábra: STAT5 inhibitor (74) szintézise

A 74 molekulával a továbbiakban felvettem két IC₅₀ görbét: az egyik esetben a bevilágítatlan kismolekulát, a másik esetben pedig a bevilágított kismolekulát alkalmaztam. Azt tapasztaltuk, hogy bevilágított minták IC₅₀ értéke nagyjából 20-szor jobb (19,4 μM) mint a bevilágítatlan mintáké (249,3 μM) (59. ábra).

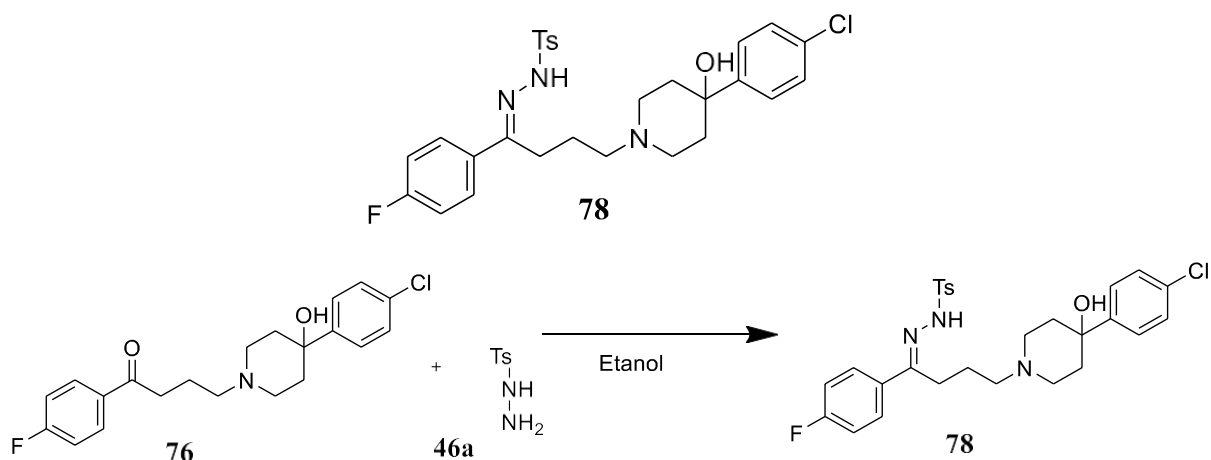


59. ábra: Bevilágítatlan és bevilágított 74 IC₅₀ görbéi

A továbbiakban az MS mérésekkel szeretnénk bizonyítani a kovalens kötődést a STAT5 fehérjéhez.

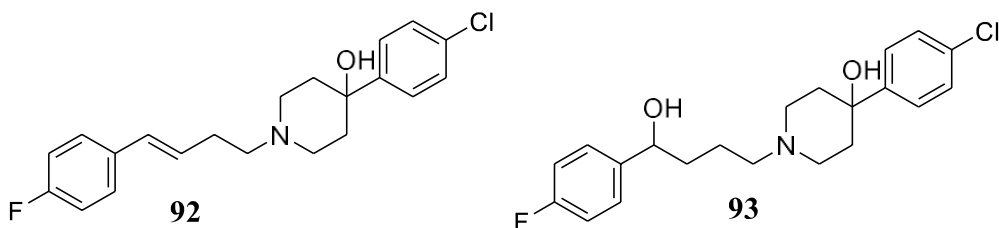
3.4.2.6 Dopamin D3

A haloperidol (**76**) egy neuroleptikumként alkalmazott gyógyszer, melynek előállítottam egy szulfonilhidrazon származékát (**78**), és vizsgáltam annak reaktivitását (60. ábra).



60. ábra: Haloperidol tozilhidrazon szerkezete és szintézise

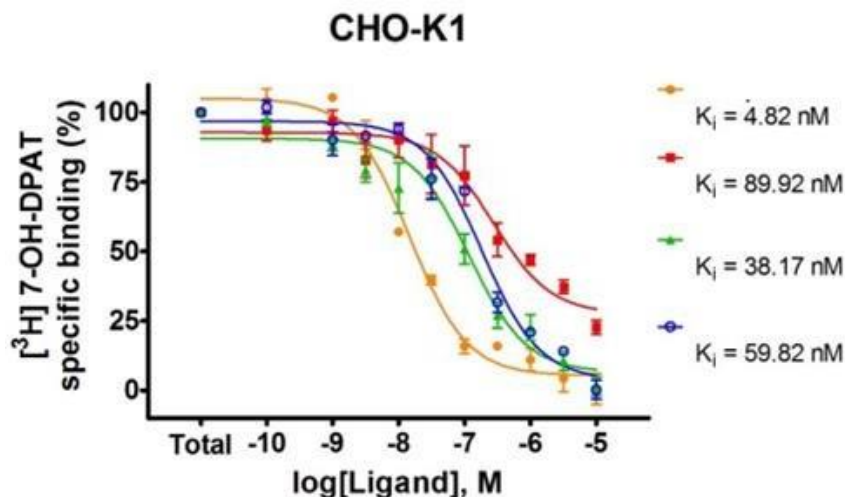
A szintetizált hidrazonszármazékkal (**78**) elvégeztem a bevilágítási kísérleteket a GSH-val PBS-pufferekben (PBS_{pH=7,4} és PBS_{pH=8,4}), melyek során azt tapasztaltam, hogy a hidrazon teljesen elfogy bevilágítás hatására, azonban a GSH-addukt tömegét nem láttuk az MS-ben. Azt figyeltük meg hogy a haloperidol esetén a molekula nagy mérete, illetve lipofilitása következtében a GSH-val (mely poláris) való közvetlen reakció visszaszorul, és a sokkal gyorsabb vízzel való reakció kerül előtérbe: a bevilágítás hatására hidrazon-elimináció következtében olefin (**92**), illetve az olefinre történő vízáddíció során pedig a megfelelő szekunder alkohol (**93**) keletkezik (61. ábra).



61. ábra: GSH jelölés során fellépő mellékreakciók termékei vizes közegben

Ezt követően a bevilágítási kísérleteket módosított körülmények között végeztem el: lecsökkentettem a víz mennyiségét a reakcióban, és azt acetonitrillel helyettesítettem. 420 μ l MeCN és 80 μ l víz alkalmazása esetén a GSH-adduktot azonosítani tudtuk. A víz csökkentésének következtében a hidrolízis mértéke, azonban ezzel együtt a hidrazon fogyása is lecsökken. (25%). A bevilágítási kísérleteket tiszta acetonitrilben elvégezve is hasonló eredményeket kaptam: a GSH-addukt megjelenik, azonban a kiindulási molekula fogyása csökken. Kutatócsoportunk fókuszában a dopamin receptor altípusok között a D3 szerepel.

Annak igazolására, hogy a vizes közegben bevilágítás hatására képződő vegyületkeverék (olefin, alkohol) is aktív a D3 receptoron, elküldtük különböző mintákat radioaktív ligandum alapú kötődési vizsgálatokra a Szegedi Biológiai Kutatóközpontba, és ott meghatározták az egyes minták kötődési állandóit (62. ábra).



62. ábra: Haloperidol és haloperidol-tozilhidrazon származékokkal végzett kötődési assay-k eredményei

A radioligand alapú kötődési assay eredményeiből az látható, hogy a haloperidol kötődése a receptorhoz a vártan megfelelően történik (sárga görbe). A hidrazonná módosított haloperidol (piros görbe) is kötődik, bár egy nagyságrenddel rosszabb mértékben. A vegyületkeverékekkel végzett kísérletek (zöld és kék görbe) pedig a 2 közti aktivitást mutatják, ami arra utalhat, hogy a módszerünk alkalmas lehet a D3 receptor működésének szabályozására, ugyanis a haloperidol molekula különböző méretű hidrazonokkal történő módosítása a molekula aktivitást eltérő mértékben ronthatja el, majd a bevilágítás hatására újra felerősíthető a biológiai hatás. Érdekes lehet a fehérje jelenlétében is megnézni a fotoaktiválást, és kimutatni a kovalens kötődést. Terveink között szerepel a D3-receptort izolálni (amely membránreceptor jellege miatt önmagában is kihívást jelent), majd tömegspektrométerrel kimutatni, hogy nem csak a photocage hatás, hanem kovalens kapcsolat is megvalósítható. Utóbbival a haloperidol reverzibilis hatását irreverzibilissé is tehetnénk.

3.5 A kutatás során használt analitikai módszerek

A Sigma-Aldrich Corporation vegyszereit használtam kutatásom során. Az ^1H és ^{13}C NMR spektrumok Varian Unity Inova 300 MHz és 500 MHz NMR berendezéssel készültek. A

csatolási állandókat (J) Hz-ben, az eltolódásokat (δ) ppm-ben tüntettem fel. A folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás készülékkel (HPLC-MS) végzett méréseket a Shimadzu LCMS-2020 készülékkel készítettem 50–1000 m/z tartományban, melyben Reprospher 100 C18 (5 μm ; 100 $\times$ 3 mm) oszlop, pozitív és negatív kettős ionforrás (DUIS $\pm$) és kvadrupól MS analizátor van. Ismert molekulákról ^1H NMR adatokat tüntetek fel, új vegyületekről pedig ^1H és ^{13}C NMR, továbbá olvadáspont adatokat tüntetek fel, melyek a Jasco SRS OptiMelt készülékkel készültek. Az új vegyületekről nagyfelbontású tömegspektrumok felvételét a jövőben tervezzük. A pufferek pH-jának ellenőrzését, illetve állítását a HI 2211 pH/ORP Hanna Instruments pH mérő eszközzel végeztem el.

3.6 Fotoaktivációs reakciók kísérleti leírása

Előkészítés lépései:

- TRIS pufferek elkészítése: 146,1 mg NaCl-ot és 394 mg Hyd-TRIS-t oldottam 50 ml RO (reverse osmosis) vízben, pH beállítását pedig tömény HCl/NaOH oldattal végeztem el.
- PBS pufferek elkészítése: 146,1 mg NaCl-ot és 445 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -t oldottam 50 ml RO vízben, a pH beállítását pedig tömény HCl/NaOH oldattal végeztem el.
- Indoprofén-oldat: 4 mM-os acetonitriles oldat (belső sztenderd). 1,00 mg indoprofént 889 μl acetonitrilben oldottam.
- GSH-oldat: 18,6 mM-os puffer-oldat elkészítése. 5 mg GSH-t 875 μl pufferben oldottam.
- Bevilágítandó anyag oldata: 7,5 mM-os acetonitriles oldat elkészítése.

A kísérlet menete:

A fent leírt oldatok elkészítése után elkészítettem egy törzsoldatot: Egy üvegcsébe 30 μl acetonitriles indoprofén oldatot, 30 μl acetonitriles bevilágítandó anyagot tartalmazó oldatot és 540 μl puffer oldat mértem. Ezt követően egy kvarcküvettába és egy LCMS-üvegcsébe bemértem 250–250 μl törzsoldatot, illetve 250–250 μl azonos pH-jú pufferrel készített GSH-oldatot. A kvarcküvettát elhelyeztem a LED elé, és elindítottam a megvilágítást. Az LCMS üvegcsének tartalmát megmértem a HPLC-MS készülékben, ezt a későbbiekben referenciaként

használtam. A megvilágítás befejezte után a kvarcküvetta tartalmát átpipettáztam egy LCMS-üvegcsébe, majd azt is megmértem, és összehasonlítottam a referenciából mért adatokkal.

A megvilágításokat különböző hullámhosszú nagy teljesítményű (high power) LED-ekkel végeztem, VOLTcraft LPS 1305 feszültségforrás segítségével. A kísérletek során a feszültséget 10 V-ra, az áramerősséget pedig 0,9 A-re állítottam.

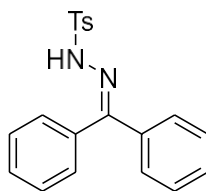
Áramlások reakció előkészítésének, elvégzésének menete:

Acetonitril (2 ml) és TRIS puffer (23 ml) elegyében 50 mg GSH-t, 1 mg (X)-t és 4,15 mg indoprofént oldottam fel, majd az elegy 5 ml-es részleteit használtam a megvilágításhoz.

A reakciótér egy 9 m hosszú, feltekert Fep vezeték volt, melynek térfogata 1,77 ml. A megvilágításhoz szükséges 366 nm-es fényt egy UV-cső biztosította. A fényforrás hűtését egy számítógép processzor hűtőventilátorával oldottuk meg. A kísérlethez egy Jasco PU-987 prep. HPLC pumpát használtam, és az összes reakciót nyomás alá helyezés nélkül és szobahőmérsékleten hajtottam végre.

3.7 Elvégzett preparatív munka ismertetése

3.7.1 *N'*-(difenilmetilén)-4-metil-benzolszulfonilhidrazid (**47b**)

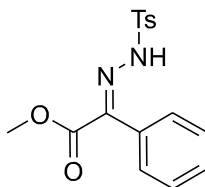


Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 1,02 g; 5,49 mmol), benzofenont (**45c**, 1,00 g; 5,49 mmol) és katalitikus mennyiségű *p*-toluolszulfonsavat 30 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet 70 °C-on kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 3 óra elteltével az elegyet lehűtöttem, és a szilárd csapadékot üvegszűrőn szűrtem.

Termelés: 1,21 g (63%), fehér por.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10,44 (s; 1H), 7,83 (d; $J = 8,3$ Hz, 2H), 7,58 – 7,50 (m; 3H), 7,43 (d; $J = 8,1$ Hz; 2H), 7,40 – 7,30 (m; 3H), 7,26 – 7,18 (m; 4H), 2,39 (s; 3H) ppm.

3.7.2 Metil-2-fenil-2-(2-tosilhidrazinilidén)acetát (47c)

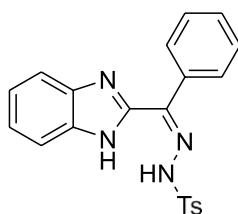


Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,37 g; 2,00 mmol) és metil 2-oxo-2-fenilacetátot (**45d**, 0,33 g; 2,00 mmol; 0,29 ml) 2 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet 70 °C-on kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 2 óra elteltével az elegyet lehűtöttem, és a szilárd csapadékot üvegszűrőn szűrtem.

Termelés: 0,48 g (71%), fehér por.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11,65 (s; 1H), 7,82 (d; $J = 8,0$ Hz; 2H), 7,63 – 7,22 (m; 7H), 3,88 (s; 3H), 2,39 (s; 3H) ppm.

3.7.3 *N'*-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)(fenil)metilén]-4-metilbenzolszulfonilhidrazid (47d)



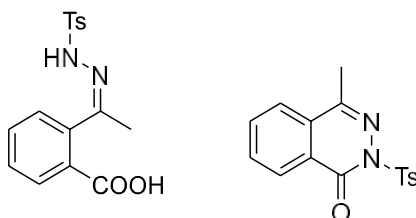
Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,42 g; 2,25 mmol), (1H-benzo[d]imidazol-2-il)(fenil)metanont (**45e**, 0,50 g; 2,25 mmol) és katalitikus mennyiségű *p*-toluolszulfonsavat 10 ml etanolban etanolban, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd egy hét elteltével további 100 mg hidrazid 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot adtam a reakcióelegyhez. További egy héttel később a szilárd csapadékot üvegszűrőn szűrtem.

Termelés: 0,10 g (12%), sárga por.

Olvadáspont: 165 °C

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13,19 (s; 1H), 7,84 (d; $J = 8,2$ Hz; 2H), 7,74 (d; $J = 3,1$ Hz; 1H), 7,72 (d; $J = 3,1$ Hz; 1H), 7,56 – 7,48 (m; 5H), 7,43 (d; $J = 8,2$ Hz; 2H), 7,38 (d; $J = 3,2$ Hz; 1H), 7,36 (d; $J = 3,3$ Hz; 1H), 2,37 (s; 3H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 144,76; 144,37; 140,13; 137,63; 136,39; 135,53; 131,35; 130,34; 130,24; 129,23; 128,79; 128,52; 127,72; 126,00; 124,36; 116,53; 21,50 ppm.

3.7.4 2-(1-(2-Tozilhidrazinilidén)etil)benzoesav (**47e**) és 4-metil-2-tozilftalazin-1(2H)-on (**48**)



Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,57 g; 3,05 mmol) és 2-acetilbenzoesavat (**45f**, 0,50 g; 3,05 mmol) 3 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd egy hét elteltével kromatografáltam, így jutottam a **47e** és a **48** termékekhez.

Termelés (**47e**): 0,21 g (21%), fehér por.

Olvadáspont: 75 °C

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.93 (s, 1H), 10.45 (s, 1H), 7.85 – 7.23 (m, 7H), 7.10 (m, $J = 7.5, 1.5$ Hz, 1H), 2.36 (s, 3H), 2.07 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 168.35, 157.07, 143.48, 140.98, 137.03, 132.01, 130.95, 130.14, 129.83, 129.32, 129.01, 127.74, 21.48, 19.34.

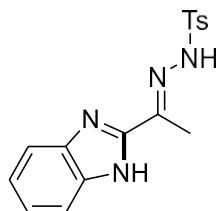
Termelés (**48**): 0,34 g (35%), fehér por.

Olvadáspont: 189 °C

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.17 (m, $J = 8.0, 1.0$ Hz, 1H), 8.06 – 7.97 (m, 3H), 7.94 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.86 (m, $J = 8.3, 6.3, 2.2$ Hz, 1H), 7.56 – 7.27 (m, 2H), 2.60 (s, 3H), 2.38 (s,

3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 157.91 , 146.34 , 146.13 , 135.64 , 134.57 , 133.19 , 130.20 , 129.83 , 129.17 , 127.53 , 127.03 , 126.97 , 21.62 , 19.53 .

3.7.5 *N'*-(1-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)etilidén)-4-metilbenzolszulfonilhidrazid (**47f**)



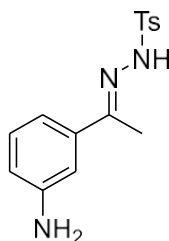
Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,12 g; 0,62 mmol és 1-(1H-benzo[d]imidazol-2-il)etán-1-on (**45g**, 0,10 g; 0,62 mmol) etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet 60 °C-on kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 4 óra elteltével az elegyet lehűtöttem, és a szilárd csapadékot üvegszűrőn szűrtem.

Termelés: 0,02 g (8%), barna por.

Olvadáspont: 167 °C

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12,32 (s; 1H), 10,89 (s; 1H), 7,97 (d; J = 8,1 Hz; 2H), 7,62 (d; J = 8,0 Hz; 1H), 7,52 (d; J = 8,0 Hz; 1H), 7,39 (d; J = 8,1 Hz; 2H), 7,23 (t; J = 7,8 Hz; 1H), 7,17 (t; J = 7,8 Hz; 1H), 2,35 (s; 3H), 2,31 (s; 3H) ppm; ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 149,78; 146,14; 144,01; 143,4; 136,57; 135,36; 129,95; 128,11; 124,12; 122,13; 119,81; 112,42; 21,44; 13,71 ppm.

3.7.6 *N'*-(1-(3-aminofenil)etilidén)-4-metilbenzolszulfonilhidrazid (**47g**)



Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 1,38 g; 7,40 mmol) és 3-aminoacetofenont (**45h**, 1,00 g; 7,40 mmol) oldottam 15 ml metanolban, majd a

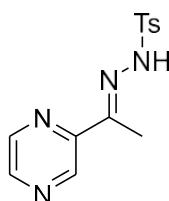
reakcióelegyet 60 °C-on kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 4 óra elteltével az elegyet lehűtöttem, és a szilárd csapadékot üvegszűrőn szűrtem.

Termelés: 1,79 g (80%), fehér por.

Olvadáspont: 171 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10,35 (s; 1H), 7,83 (s; 2H), 7,40 (s; 2H), 6,94 (d; J = 29,9 Hz; 2H), 6,67 (d; J = 55,5 Hz; 2H), 5,15 (s; 2H), 2,35 (s; 3H), 2,10 (s; 3H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 154,30; 148,98; 143,71; 138,54; 136,77; 129,89; 129,20; 128,06; 115,60; 114,40; 111,67; 21,48; 14,82 ppm.

3.7.7 4-Metil- N' -(1-(pirazin-2-il)etilidén)benzolszulfonil-hidrazid (**47h**)

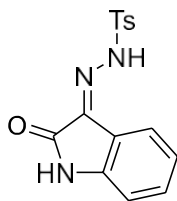


Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 1,53 g; 8,19 mmol) és 1-(pirazin-2-il)etán-1-ont (**45i**, 1,00 g; 8,19 mmol) 8 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 2 nap elteltével a reakcióelegyet bepároltam.

Termelés: 1,95 g (82%), fehér por.

Olvadáspont: 180 °C

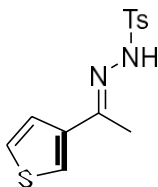
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,05 (s; 1H), 8,96 (s; 1H), 8,58 (s; 2H), 7,87 (d; J = 8,0 Hz; 2H), 7,41 (d; J = 8,0 Hz; 2H), 2,34 (s; 3H), 2,24 (s; 3H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 151,87; 150,18; 144,74; 144,11; 143,74; 142,16; 136,37; 130,07; 128,05; 21,45; 12,79 ppm.

3.7.8 3-Metil-*N'*-(2-oxoindolin-3-ilidén)benzolszulfonilhidrazid (**47i**)

Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 1,27 g; 6,80 mmol) és indolin-2-3-diont (izatin) (**45j**, 1,00 g; 6,80 mmol) 10 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 1 nap elteltével a szilárd csapadékot üvegszűrőn szűrtem.

Termelés: 1,93 g (90%); sárga por.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.52 (s, 1H), 10.75 (s, 1H), 8.01 – 7.69 (m, 3H), 7.52 – 7.39 (m, 2H), 7.37 – 7.27 (m, 1H), 7.11 – 6.97 (m, 1H), 6.92 – 6.71 (m, 1H), 2.38 (s, 3H).

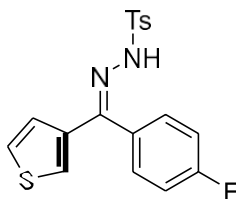
3.7.9 4-Metil-*N'*-(1-(tiofén-3-il)etilidén)benzolszulfonil-hidrazid (**47j**)

Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 1,64 g; 8,80 mmol) és 1-(tiofén-3-il)etán-1-on (**45k**, 1,11 g; 8,80 mmol) 10 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet 60 °C-on kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 4 óra elteltével az elegyet lehűtöttem, és a szilárd csapadékot üvegszűrőn szűrtem.

Termelés: 2,33 g (90%), fehér por.

Olvadáspont: 178 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,32 (s; 1H), 7,84 – 7,71 (m; 3H), 7,50 (dd; J = 5,1; 2,9 Hz; 1H), 7,40 (d; J = 8,0 Hz; 2H), 7,30 (dd; J = 5,1, 1,2 Hz; 1H), 2,36 (s; 3H), 2,14 (s; 3H) ppm;
 ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 150,59; 143,76; 140,92; 136,58; 129,85; 128,13; 127,25; 126,04; 125,66; 21,47; 15,27 ppm.

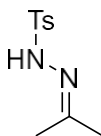
3.7.10 *N'*-((4-fluorfenil)tiofén-3-il)metilén)-4-metilbenzolszulfonilhidrazid (**47k**)

Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonil-hidrazidot (**46a**, 1,81 g; 9,70 mmol) és (4-fluorofenil)(tiofén-2-il)metanon (**45l**, 2,00 g; 9,70 mmol) 10 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet 80 °C-on kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 6 óra elteltével az elegy hűtése után üvegszűrő segítségével szűrtem a kivált csapadékot. Az anyalúgot kromatografáltam, így további terméket sikerült kinyernem.

Termelés: 3,10 g (85%), halványsárga por.

Olvadáspont: 110-112 °C

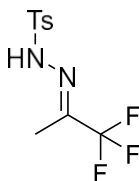
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.47 (s, 1H), 7.99 – 7.67 (m, 2H), 7.57 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 7.37 (dd, J = 14.4, 7.8 Hz, 5H), 7.21 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.97 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 6.69 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 2.37 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163.15 (d, J = 246.5 Hz), 149.92, 143.83, 142.70, 136.34, 131.60 (d, J = 8.8 Hz), 129.80, 129.61, 128.66 (d, J = 3.3 Hz), 128.33, 128.18, 128.01, 116.27 (d, J = 21.9 Hz), 62.47, 21.48.

3.7.11 4-Metil-*N'*-(propán-2-ilidén)benzolszulfonilhidrazid (**47l**)

Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 3,21 g; 17,24 mmol) és acetont (**45m**, 1,00 g; 17,24 mmol, 1,28 ml) 35 ml metanolban oldottam, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 4 óra elteltével az elegyet lehűtöttem, és a szilárd csapadékot üvegszűrőn szűrtem.

Termelés: 3,60 g (92%), halványsárga por.

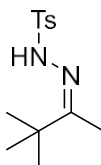
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9,95 (s; 1H); 7,72 (d; J = 8,3 Hz; 2H), 7,38 (d; J = 8,0 Hz; 2H), 2,38 (s; 3H), 1,79 (s; 3H), 1,78 (s; 3H) ppm.

3.7.12 4-Metil-*N'*-(1,1,1-trifluorpropán-2-ilidén)benzolszulfonilhidrazid (**47m**)

Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,37 g; 2,00 mmol) és 1,1,1-trifluorpropán-2-ont (**45n**, 0,22 g; 2,00 mmol) 2 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet 70 °C-on kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 5 óra elteltével az elegyet lehűtöttem, és a szilárd csapadékot üvegszűrőn szűrtem. Az alacsony termelés miatt az anyalúgot normál fázisú oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítottam, így további terméket sikerült kinyernem.

Termelés: 0,25 g (44%), fehér por.

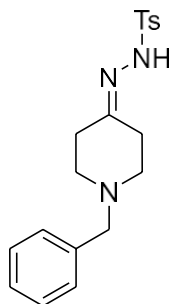
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,41 (s; 1H), 7,72 (d; *J* = 8,0 Hz; 2H), 7,43 (d; *J* = 8,0 Hz; 2H), 2,39 (s; 3H), 1,99 (s; 3H) ppm.

3.7.13 *N'*-(3,3-dimetilbután-2-ilidén)-4-metilbenzolszulfonilhidrazid (**47n**)

Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,37 g; 2,00 mmol) és 3,3-dimetil-2-butanont (**45o**, 0,20 g; 2,00 mmol) 2 ml metanolban oldottam, majd a reakcióelegyet 60 °C-on kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 2 óra elteltével az elegyet lehűtöttem, és a szilárd csapadékot üvegszűrőn szűrtem. Az alacsony termelés miatt az anyalúgot normál fázisú oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítottam, így további terméket sikerült kinyernem.

Termelés: 0.30 g (55%), fehér kristályos anyag.

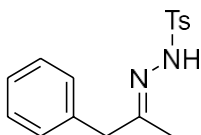
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,76 (s; 1H), 7,72 (d; *J* = 8,3 Hz; 2H), 7,38 (d; *J* = 8,0 Hz; 2H), 2,38 (s; 3H), 1,73 (s; 3H), 0,95 (s; 9H) ppm.

3.7.14 N'-(1-benzilpiperidin-4-ilidén)-4-metilbenzolszulfonilhidrazid (**47o**)

Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,37 g; 2,00 mmol) és 1-benzilpiperidin-4-ont (**45p**, 0,38 g; 2,00 mmol; 0,37 ml) 5 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 5 óra elteltével a szilárd csapadékot üvegszűrőn szűrtem.

Termelés: 0,26 g (36%), halványsárgásbarna por.

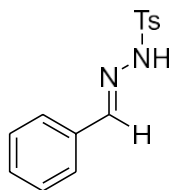
^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10,20 (s; 1H), 7,72 (d; $J = 7,9$ Hz; 2H), 7,39 (d; $J = 8,0$ Hz; 2H), 7,34 – 7,22 (m; 5H), 3,49 (s; 2H), 2,49 – 2,30 (m; 9H), 2,18 (t; $J = 5,7$ Hz; 2H) ppm.

3.7.15 4-Metil-N'-(1-fenilpropán-2-ilidén)benzolszulfonil-hidrazid (**47p**)

Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 1,42 g; 7,62 mmol) és 1-fenilpropán-2-ont (**45q**, 1,00 g; 7,62 mmol) 10 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 1 nap elteltével az elegyet lehűtöttem, és a szilárd csapadékot üvegszűrőn szűrtem.

Termelés: 1,26 g (55%), fehér por.

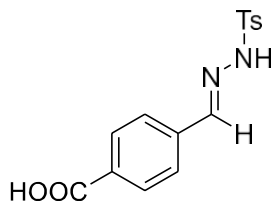
^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10,00 (s; 1H), 7,72 (d; $J = 7,9$ Hz; 2H), 7,39 (d; $J = 8,0$ Hz; 2H), 7,25 – 7,14 (m; 3H), 7,01 – 6,89 (m; 2H), 3,38 (s; 2H), 2,41 (s; 3H), 1,69 (s; 3H) ppm.

3.7.16 *N'*-benzilidén-4-metilbenzolszulfonilhidrazid (**50a**)

Egy egynyakú lombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 37 g; 2,00 mmol) és benzaldehidet (**49a**, 0,21 g; 2,00 mmol; 0,20 ml) 16 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 6 óra elteltével a reakcióelegyet bepároltam.

Termelés: 0,51 g (92%), fehér kristály.

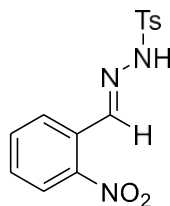
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,45 (s; 1H), 7,93 (s; 1H), 7,79 (d; J = 7,9 Hz; 2H), 7,62 – 7,48 (m; 2H), 7,48 – 7,31 (m; 5H), 2,35 (s; 3H) ppm.

3.7.17 4-((2-Tozilhidrazinilidén)metil)benzoesav (**50b**)

Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,19 g; 1,00 mmol) és 4-formil-benzoesavat (**49b**, 0,15 g; 1,00 mmol) 15 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 6 óra elteltével a reakcióelegyet bepároltam. A termék tömegét a lombikból való kikaparást követően mértem meg.

Termelés: 0,28 g (87%), fehér por.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,06 (s; 1H), 11,68 (s; 1H), 8,02 – 7,88 (m; 3H), 7,79 (d; J = 8,1 Hz; 2H), 7,68 (d; J = 8,1 Hz; 2H), 7,41 (d; J = 8,1 Hz; 2H), 2,35 (s; 3H) ppm.

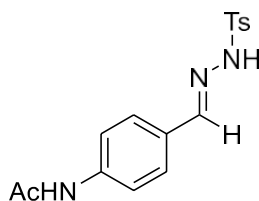
3.7.18 4-Metil-*N'*-(2-nitrobenzilidén)benzolszulfonilhidrazid (**50c**)

Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,19 g; 1,00 mmol) és 2-nitrobenzaldehydet (**49c**, 0,15 g; 1,00 mmol) 15 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet 70 °C-on kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 2 óra után a reakcióelegyet szűrtem, azonban a termék javarészt az anyalúgban maradt, így azt bepároltam.

Termelés: 0,25 g (78%), sárga por.

Olvadáspont: 145 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,91 (s; 1H), 8,30 (s; 1H), 8,02 (d; J = 8,1 Hz; 1H), 7,89 – 7,72 (m; 4H), 7,63 (t; J = 7,8 Hz; 1H), 7,42 (d; J = 7,9 Hz; 2H), 2,37 (s; 3H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 148,30; 144,12; 142,77; 136,55; 134,19; 131,13; 130,24; 128,46; 128,28; 127,63; 125,09; 21,47 ppm.

3.7.19 *N*-(4-(1-(2-toszilhidrazinilidén)etil)fenil)acetamid (**50d**)

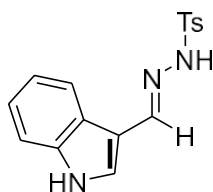
Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,19 g; 1,00 mmol) és 4-acetamido-benzaldehydet (**49d**, 0,16 g; 1,00 mmol) 15 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd a reakcióelegyet 1 nap elteltével bepároltam. A termék tömegét a lombikból való kikaparást követően mértem meg.

Termelés: 0,30 g (91%), fehér por.

Olvadáspont: 210 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,30 (s; 1H), 10,09 (s; 1H), 7,85 (s; 1H), 7,77 (d; J = 8,0 Hz; 2H), 7,62 (d; J = 8,3 Hz; 2H), 7,49 (d; J = 8,3 Hz; 2H), 7,40 (d; J = 7,9 Hz; 2H), 2,35 (s; 3H), 2,06 (s; 3H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 168,99; 147,32; 143,81; 141,43; 136,68; 130,08; 128,73; 127,92; 127,69; 119,32; 24,53; 21,45 ppm.

3.7.20 *N'*-((1H-indol-3-il)metilén)-4-metilbenzolszulfonilhidrazid (50e)

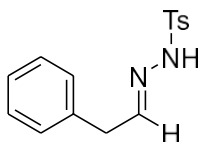


Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,19 g; 1,00 mmol) és 3-indolkarbaldehydet (**49e**, 0,15 g 1,00 mmol) 15 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd a reakcióelegyet 2 nap elteltével bepároltam. A termék tömegét a lombikból való kikaparást követően mértem meg.

Termelés: 0,26 g (83%), barna por.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,51 (s; 1H), 10,87 (s; 1H), 8,11 (s; 1H), 8,00 (d; J = 7,5 Hz; 1H), 7,83 (d; J = 8,0 Hz; 2H), 7,72 (d; J = 2,7 Hz; 1H), 7,51 – 7,31 (m; 3H), 7,27 – 7,03 (m; 2H), 2,33 (s; 3H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 145,48; 143,58; 137,39; 136,79; 130,84; 129,90; 127,83; 124,48; 123,04; 122,05; 120,96; 112,27; 111,57; 21,42 ppm.

3.7.21 4-Metil-*N'*-(2-feniletilidén)benzolszulfonilhidrazid (50f)



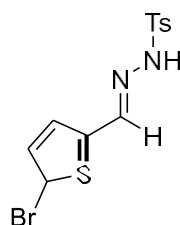
Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,19 g; 1,00 mmol) és 2-fenilacetaldehydet (**49f**, 0,12 g; 1,00 mmol, 0,12 ml) 15 ml etanolban oldottam,

majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd a reakcióelegyet 1 nap elteltével bepároltam, azután oszlopkromatográfiával tisztítottam.

Termelés: 0,11 g (38%), fehér por.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10,98 (s; 1H), 7,71 (d; J = 8,2 Hz; 2H), 7,42 (d; J = 8,0 Hz; 2H), 7,31 (t; J = 5,8 Hz; 1H), 7,27 – 7,15 (m; 3H), 7,05 – 6,96 (m; 2H), 3,42 (d; J = 5,8 Hz; 2H), 2,41 (s; 3H) ppm.

3.7.22 *N'*-((5-brómtiofén-3-il)metilén)-4-metilbenzolszulfonilhidrazid (50g)

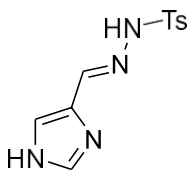


Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,19 g; 1,00 mmol) és 5-brómtiofén-3-karbaldehidet (**49g**, 0,19 g; 1,00 mmol, 0,12 ml) 15 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd a reakcióelegyet 1 nap elteltével bepároltam.

Termelés: 0,34 g (95%), sárgásbarna por.

Olvadáspont: 99-100 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,47 (s; 1H), 8,00 (s; 1H), 7,72 (d; J = 8,0 Hz; 2H), 7,42 (d; J = 8,0 Hz; 2H), 7,20 (s; 2H), 2,37 (s; 3H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 144.02, 141.72, 140.61, 136.32, 131.67, 131.63, 130.11, 127.64, 115.00, 21.45.

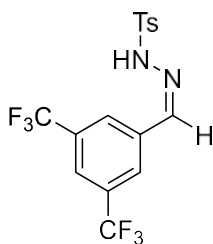
3.7.23 *N'*-((1H-imidazol-4-il)metilén)-4-benzolszulfonilhidrazid (**50h**)

Egy egynyakú gömblombikban 4-metilszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,19 g; 1,00 mmol) és 1H-imidazol-4-karbaldehydet (**49h**, 0,10 g; 1,00 mmol) 15 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 3 óra elteltével a reakcióelegyet bepároltam.

Termelés: 0,25 g (95%), halványbarna por.

Olvadáspont: 151 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,01 (s; 1H), 8,03 (s; 1H), 7,71 (d; J = 8,0 Hz; 2H), 7,64 (s; 1H), 7,44 – 7,24 (m; 3H), 2,35 (s; 3H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 143,89; 136,70; 136,59; 136,01; 135,63; 130,19; 127,46; 121,68; 21,44 ppm.

3.7.24 *N'*-(3,5-bis(trifluormetil)benzilidén)-4-metilbenzolszulfonilhidrazid (**50i**)

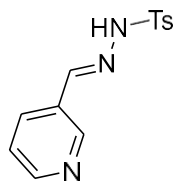
Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,19 g; 1,00 mmol) és 3,5-bis(trifluormetil)benzaldehydet (**49i**, 0,24 g; 1,00 mmol; 0,17 ml) 15 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd a reakcióelegyet 4 nap elteltével bepároltam.

Termelés: 0,40 g (96%), fehér por.

Olvadáspont: 120-122 °C

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11,99 (s; 1H), 8,19 (s; 2H), 8,11 (s; 1H), 8,07 (s; 1H), 7,78 (d; $J = 7,9$ Hz; 2H), 7,40 (d; $J = 8,0$ Hz; 2H), 2,35 (s; 3H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 144,18; 143,92; 136,94; 136,46; 131,46; 131,02; 130,17; 127,62 (2 jel egybecsúszva); 127,26; 125,32; 123,33; 121,71; 21,40 ppm.

3.7.25 4-Metil-*N'*-(piridin-3-ilmetilén)benzolszulfonilhidrazid (**50j**)

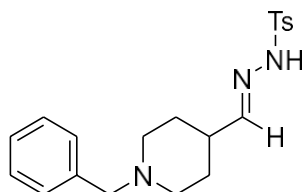


Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,19 g; 1,00 mmol) és nikotinaldehydet (**50j**, 0,11 g; 1,00 mmol) 15 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 3 óra elteltével az elegyet lehűtöttem, és a szilárd csapadékot üvegszűrőn szűrtem.

Termelés: 0,14 g (50%), fehér por.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11,66 (s; 1H), 8,71 (s; 1H), 8,57 (dd; $J = 4,8$; 1,7 Hz; 1H), 8,03 – 7,87 (m; 2H), 7,78 (d; $J = 7,9$ Hz; 2H), 7,42 (d; $J = 7,7$ Hz; 3H), 2,37 (s; 3H) ppm.

3.7.26 *N'*-((1-benzilpiperidin-4-il)metilén)-4-metilbenzolszulfonilhidrazid (**50k**)



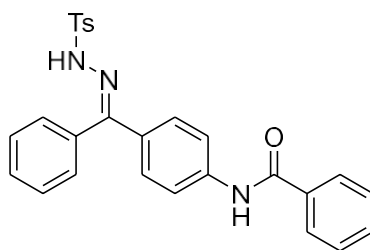
Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,09 g; 0,50 mmol) és *N*-benzilpiperidin-4-karbaldehydet (**49k**, 0,10 g; 0,50 mmol) 15 ml etanol és 10 ml metanol elegyében oldottam, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd a reakcióelegyet 4 nap elteltével bepároltam, azután pedig oszlopkromatográfiával tisztítottam a terméket.

Termelés: 0,04 g (19%), sárga gumiszerű anyag.

Olvadáspont: 45 °C

^1H NMR (300 MHz, Kloroform-*d*) δ 7,81 (d; J = 8,2 Hz; 2H), 7,46 – 7,18 (m; 7H), 7,09 (d; J = 5,1 Hz; 1H), 3,48 (s; 2H), 2,93 – 2,72 (m; 2H), 2,44 (s; 3H), 2,29 – 2,11 (m; 1H), 2,01 (t; J = 11,3, 2,7 Hz; 2H), 1,68 (m; J = 13,5, 3,8 Hz; 2H), 1,49 (m; J = 11,5, 3,7 Hz; 2H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, Kloroform-*d*) δ 154,98; 143,97; 135,38; 129,57; 129,21; 128,21; 127,89; 127,08; 63,23; 52,72; 38,69; 28,95; 21,62 ppm.

3.7.27 -(4-(fenil(2-tosilhidrazinilidén)metil)fenil)benzamid (47q)

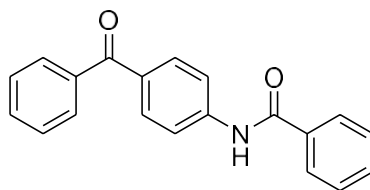


Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,09 g; 0,50 mmol) és *N*-(4-benzoilfenil)benzamidot (**52**, 0,15 g; 0,50 mmol) 20 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet 80 °C-on kevertettem. A reakcióelegyhez katalitikus mennyiségű *p*-toulolszulfonsavat adtam. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 6 óra elteltével az elegyet lehűtöttem, és a szilárd csapadékot üvegszűrőn szűrtem.

Termelés: 0,05 g (20%), fehér por.

Olvadáspont: 185°C

^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,38 (s, 1H), 10,30 (s, 1H), 8,10 – 7,90 (m, 2H), 7,83 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,76 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,59 (d, J = 7,0 Hz, 1H), 7,54 (q, J = 3,0, 2,2 Hz, 5H), 7,45 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,24 (dd, J = 8,1, 5,9 Hz, 4H), 2,41 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166,10, 154,91, 143,74, 141,02, 136,54, 135,16, 133,06, 132,70, 132,15, 129,86 (2jel), 129,25 (2jel), 128,83, 128,25, 128,17 (2jel), 120,23, 21,52.

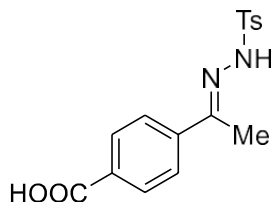
3.7.28 *N*-(4-benzoilfenil)benzamid (52)

Egy kétnyakú gömblombikban 4-aminobenzofenont (0,20 g; 1,00 mmol) és trietilamint (0,11 g; 1,10 mmol; 0,15 ml) 20 ml diklórmétánban oldottam, majd benzoil kloridot (0,15 g; 1 mmol; 0,13 ml) 5 ml diklórmétánban csepegettem az oldathoz 0 °C -on. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 1 nap elteltével a reakcióelegyet 20 ml vízzel, 20 ml telített NaHCO₃ oldattal és 20 ml cc. NaCl oldattal mostam. A szerves fázist Na₂SO₄-al szárítottam, és bepároltam.

Termelés: 0,21 g (70%), halványbarna por.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.63 (s, 1H), 8.07 – 7.96 (m, 4H), 7.80 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.77 – 7.72 (m, 2H), 7.71 – 7.47 (m, 6H).

3.7.29 4-(1-(2-Tozilhidrazinilidén)etil)benzoesav (53)

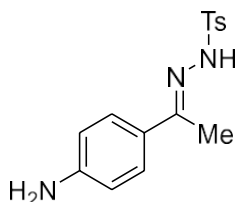


Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,37 g; 2,00 mmol) és 4-acetilbenzoesavat (**59**, 0,33 g; 2,00 mmol) 25 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 2 nap elteltével az elegy hűtése után üvegszűrő segítségével szűrtem a kivált csapadékot és oszlopkromatográfiával tisztítottam a terméket.

Termelés: 0,41 g (62%), fehér por.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13,00 (s; 1H), 10,69 (s; 1H), 7,92 (d; $J = 8,2$ Hz; 2H), 7,81 (d; $J = 8,0$ Hz; 2H), 7,73 (d; $J = 8,2$ Hz; 2H), 7,41 (d; $J = 8,0$ Hz; 2H), 2,36 (s; 3H), 2,19 (s; 3H) ppm.

3.7.30 *N'*-(1-(4-aminofenil)etilidén)-4-metilbenzolszulfonilhidrazid (54)

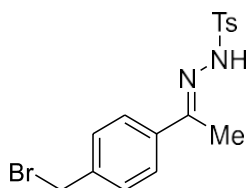


Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,37 g; 2,00 mmol) és 4-aminoacetofenont (**60**, 0,27 g; 2,00 mmol) 15 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 4 nap elteltével az elegyet lehűtöttem, és a szilárd csapadékot üvegszűrőn szűrtem.

Termelés: 0,16 mg (26%), fehér por.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10,05 (s; 1H), 7,79 (d; $J = 7,9$ Hz; 2H), 7,40 (d; $J = 7,9$ Hz; 2H), 7,33 (d; $J = 8,2$ Hz; 2H), 6,49 (d; $J = 8,2$ Hz; 2H), 5,42 (s; 2H), 2,37 (s; 3H), 2,06 (s; 3H) ppm.

3.7.31 *N'*-(1-(4-brómmetil)fenil)etilidén)-4-metilbenzolszulfonilhidrazid (55)



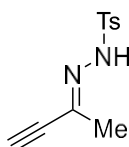
Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,19 g; 1,00 mmol) és 1-(4-(brómmetil)fenil)etán-1-ont (**61**, 0,21 g; 1,00 mmol) 15 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 1 nap elteltével az elegyet lehűtöttem, és a szilárd csapadékot üvegszűrőn szűrtem.

Termelés: 0,19 g (51%), fehér por.

Olvadáspont: 140 °C

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10,54 (s; 1H), 7,81 (d; $J = 8,0$ Hz; 2H), 7,61 (d; $J = 8,0$ Hz; 2H), 7,42 (m; 4H), 4,70 (s; 2H), 2,37 (s; 3H), 2,16 (s; 3H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 152,96; 143,84; 139,62; 137,76; 136,63; 129,93; 129,78; 128,04; 126,73; 34,40; 21,49; 14,71 ppm.

3.7.32 *N'*-(but-3-in-2-ilidén)-4-metilbenzolszulfonilhidrazid (56)

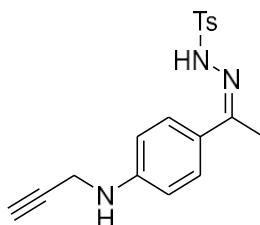


Egy egynyakú gömblombikban 4-metilszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,19 g; 1,00 mmol) és but-3-in-2-ont (**64**, 0,07 g; 1,00 mmol; 0,08 ml) oldottam 10 ml etanolban, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 2 nap elteltével a reakcióelegyet bepároltam, és kromatográfiával kinyertem a terméket.

Termelés: 0,09 g (39%), fehér por.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8,32 (d; $J = 2,7$ Hz; 1H), 7,83 (d; $J = 8,4$ Hz; 2H), 7,46 (d; 2H), 6,42 (d; $J = 2,7$ Hz; 1H), 2,39 (s; 3H), 2,17 (s; 3H) ppm.

3.7.33 4-Metil-*N'*-(1-(4-(prop-2-in-1-ilamino)fenil)etilidén)benzolszulfonilhidrazid (57)



Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,03 g; 0,17 mmol) és 1-(4-(prop-2-in-2-ilamino)fenil)etán-1-ont (**66**, 0,03 g; 0,17 mmol) 2,5 ml etanolban

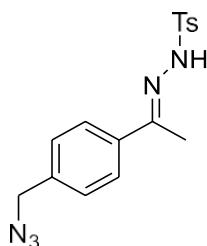
oldottam, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd a reakcióelegyet 5 óra elteltével bepároltam.

Termelés: 0,05 g (88%), sárga por.

Olvadáspont: 137 °C

^1H NMR (300 MHz, Kloroform-*d*) δ 7,94 (d; J = 8,0 Hz; 2H), 7,57 (d; J = 8,5 Hz; 2H), 7,33 (d; J = 8,0 Hz; 2H), 6,64 (d; J = 8,7 Hz; 2H), 3,97 (d; J = 2,5 Hz; 2H), 2,43 (s; 3H), 2,25 (t; J = 2,4 Hz; 1H), 2,12 (s; 3H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, Kloroform-*d*) δ 153,45; 148,13; 143,99; 135,52; 129,53; 128,15; 127,69; 127,30; 112,80; 80,44; 71,54; 33,33; 21,61; 13,16 ppm.

3.7.34 *N'*-(1-(4-(azidometil)fenil)etilidén)-4-metilszulfonilhidrazid (**58**)



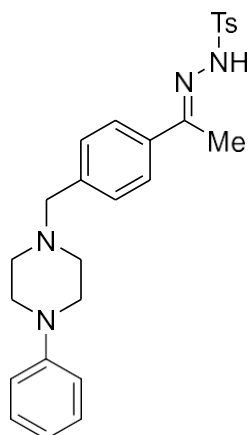
Egy egynyakú gömblombikban 4-metilszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,11 g; 0,60 mmol) és 1-(4-(azidometil)fenil)etán-1-ont (**67**, 0,11 g; 0,60 mmol) 10 ml etanolban oldottam, és a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd a reakcióelegyet 2 nap elteltével bepároltam.

Termelés: 0,18 g (86%), sárga por.

Olvadáspont: 100 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,54 (s; 1H), 7,82 (d; J = 7,9 Hz; 2H), 7,65 (d; J = 7,9 Hz; 2H), 7,47 – 7,26 (m; 4H), 4,45 (s; 2H), 2,36 (s; 3H), 2,18 (s; 3H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 153,09; 143,82; 137,62; 137,24; 136,65; 129,93; 128,86; 128,04; 126,75; 53,61; 21,48; 14,71 ppm.

3.7.35 4-Metil-*N'*-(1-(4-((4-fenilpiperazin-1-il)metil)fenil)etilidén)benzolszulfonilhidrazid
(63)



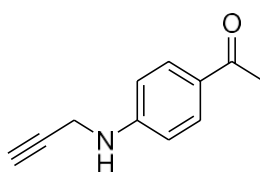
Egy egynyakú gömblombikban *N'*-(1-(4-brómmetil)fenil)etilidén)-4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,10 g; 0,26 mmol), 1-fenilpiperazint (**62**, 0,04 g; 0,26 mmol; 0,04 ml) és trietil-amint (26,31 mg; 0,26 mmol; 36,24 μ l) 5 ml acetnotitrilben oldottam, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 4 óra elteltével a reakcióelegyet bepároltam és oszlopkromatográfiával tisztítottam a terméket.

Termelés: 0,06 g (52%), halványrózsaszínes por.

Olvadáspont: 172 °C

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,82 (d; J = 8,1 Hz; 2H), 7,60 (d; J = 8,0 Hz; 2H), 7,42 (d; J = 8,1 Hz; 2H), 7,33 (d; J = 8,0 Hz; 2H), 7,26 – 7,12 (m; 2H), 6,91 (d; J = 8,2 Hz; 2H), 6,77 (t; J = 7,2 Hz; 1H), 3,53 (s; 2H), 2,56 – 2,45 (m; 8H), 2,37 (s; 3H), 2,18 (s; 3H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 153.48 , 151.44 , 143.74 , 139.90 , 136.70 , 136.66 , 129.89 , 129.32 , 128.02 , 126.33 , 119.22 , 115.81 , 62.01 , 52.99 , 48.63 , 21.47 , 14.72 . (1jellel kevesebb)

3.7.36 1-(4-(prop-2-in-2ilamino)fenil)etán-1-on (**66**)

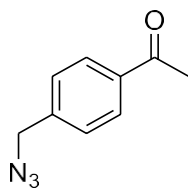


Egynyakú gömblombikban 4-aminoacetofenont (**60**, 0,81 g; 6,00 mmol), propargil bromidot (**65**, 0,18 g; 1,5 mmol; 0,13 ml) és kálium-karbonátot (0,42 g; 1,5 mmol) oldottam 10 ml acetonitrilben, majd a reakciót szobahőmérsékleten kevertettem. Egy nap elteltével további egy ekvivalens propargil-bromidot, és kálium-karbonátot adtam a reakcióelegyhez, majd a reakcióelegyet forralás közben kevertettem. További egy nap elteltével a reakcióelegyhez egy ekvivalens céziumkarbonátot, KI-ot, propargil bromidot, illetve 10 ml DMF-et adtam, és a reakcióelegyet 110 °C-on kevertettem. Két nap elteltével a terméket kromatográfiás módszerrel nyertem ki a reakcióelegyből.

Termelés: 48,00 mg (5%), fehér por.

^1H NMR (300 MHz, Kloroform- d) δ 7,89 (d; J = 8,4 Hz; 2H), 6,68 (d; J = 8,5 Hz; 2H), 4,45 (t; J = 6,0 Hz; 1H), 4,03 (dd; J = 6,2, 2,5 Hz; 2H), 2,54 (s; 3H), 2,28 (t, J = 2,5 Hz; 1H) ppm.

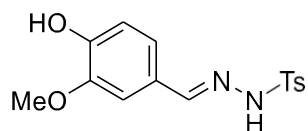
3.7.37 1-(4-(Azidometil)fenil)etán-1-on (**67**)



Egy egynyakú gömblombikban 1-(4-brómmetil)fenil)etanont (**61**, 0,51 g; 2,40 mmol) és nátrium azidot (0,19 g; 2,88 mmol) oldottam 25 ml DMF-ben, és a reakcióelegyet 80 °C-on kevertettem. Egy éjszakát keveredett melegítés közben. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd szobahőmérsékletre hűtve telített NH_4Cl oldatot adtam az elegyhez, és 3 x 30 ml hexán/dietil éter 1:1 arányú elegyével extraháltam. Ezt követően szárítottam nátrium-szulfáttal, majd bepároltam az elegyet, és kromatográfiával tisztítottam a terméket.

Termelés: 0,29 g (68%), halványsárga sűrűn folyó anyag.

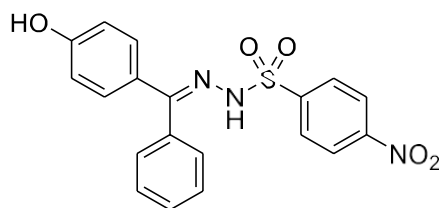
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7,99 (d; J = 8,1 Hz; 2H), 7,52 (d; J = 8,0 Hz; 2H), 4,57 (s; 2H), 2,59 (s; 3H) ppm.

3.7.38 *N'*-(4-hidroxi-3-metoxibenzilidén)-4-metilbenzolszulfonilhidrazid (68)

Egy egynyakú gömblombikban 4-metilbenzolszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,19 mg; 1,00 mmol) és vanilint (**79**, 0,15 g; 1,00 mmol) oldottam 15 ml etanolban, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 4 óra elteltével a reakcióelegyet bepároltam. A termék tömegét a lombikból való kikaparást követően mértem meg.

Termelés: 0,22 g (69%), sárgásbarna, ragacsos anyag.

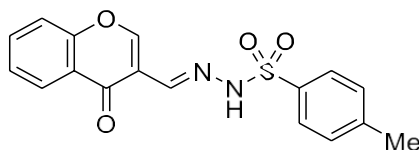
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,13 (s; 1H), 9,50 (s; 1H), 7,77 (d; $J = 3,5$ Hz; 2H), 7,74 (s; 1H), 7,40 (d; $J = 8,0$ Hz; 2H), 7,09 (s; 1H), 6,96 (dd; $J = 8,2, 1,9$ Hz; 1H), 6,76 (dd; $J = 8,1, 1,8$ Hz; 1H), 3,77 (s; 3H), 2,35 (s; 3H) ppm.

3.7.39 *N'*-((4-hidroxifenil)(fenil)metilén)-4-nitrobenzolszulfonilhidrazid (69)

Egy egynyakú gömblombikban 4-nitrobenzolszulfonilhidrazidot (**83**, 0,22 g; 1,00 mmol) és 4-hidroxibenzofenont (**82**, 0,20 g; 1,00 mmol) 15 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet 3 óra forralást követően bepároltam, azután 15 ml 1 M-os sósavban oldottam, és a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 2 nap elteltével a szilárd csapadékot üvegszűrőn szűrtem.

Termelés: 0,28 g (69%), sárga por.

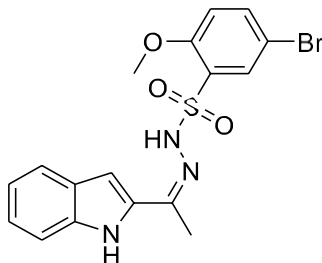
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10,77 (s, 1H), 9,90 (s, 1H), 8,53 – 8,40 (d, 2H), 8,24 – 8,11 (d, 2H), 7,44 – 7,19 (m, 5H), 7,17 – 7,02 (d, 2H), 6,98 – 6,82 (d, 2H).

3.7.40 4-Metil-*N'*-((4-oxo-4H-kromén-3-il)metilén)benzolszulfonilhidrazid (70)

Egy egynyakú gömblombikban 4-metilszulfonilhidrazidot (**46a**, 0,19 g; 1,00 mmol) és 3-formilkromont (**84**, 0,17 g; 1,00 mmol) 15 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet 70 °C-on kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 5 óra elteltével az elegyet lehűtöttem, és a szilárd csapadékot üvegszűrőn szűrtem.

Termelés: 0,34 g (99%), fehér por.

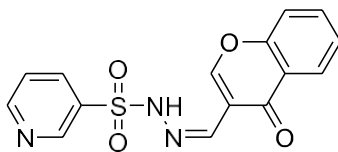
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,53 (s; 1H), 8,63 (s; 1H), 8,12 – 7,95 (m; 2H), 7,90 – 7,74 (m; 3H), 7,69 (d; *J* = 8,5 Hz; 1H), 7,53 (t; *J* = 7,7 Hz; 1H), 7,42 (d; *J* = 7,8 Hz; 2H), 2,37 (s; 3H) ppm.

3.7.41 *N'*-(1-(1H-indol-2-il)etilidén)-5-bróm-2-metoxibenzolszulfonilhidrazid (73)

Egy egynyakú gömblombikban 5-bróm-2-metoxibenzolszulfonilhidrazidot (**87**, 0,06 g; 0,36 mmol) és 1-(1H-indol-2-il)etán-1-ont (**88**, 0,10 g; 0,36 mmol) 10 ml etanolban oldottam, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 2 nap elteltével az elegyet lehűtöttem, és a szilárd csapadékot üvegszűrőn szűrtem.

Termelés: 0,05 g (34%), fehér por.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,79 (s; 1H), 10,49 (s; 1H), 7,95 (s; 1H), 7,77 (d; *J* = 8,5 Hz; 1H), 7,49 (d; *J* = 7,8 Hz; 1H), 7,39 (d; *J* = 7,9 Hz; 1H), 7,18 (d; *J* = 8,8 Hz; 1H), 7,10 (t; *J* = 7,2 Hz; 1H), 6,96 (t; *J* = 7,7 Hz; 1H), 6,81 (s; 1H), 3,89 (s; 3H), 2,28 (s; 3H) ppm.

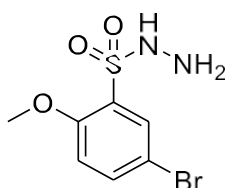
3.7.42 *N'*-((4-oxo-4H-kromén-3-il)metilén)piridín-3-szulfonilhidrazid (**74**)

Egy egynyakú gömblombikban 3-formilkromont (**84**, 0,08 g; 0,45 mmol) és piridin-3-szulfonilhidrazidot (**91**, 0,08 g; 0,45 mmol) oldottam 10 ml etanolban, majd a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 2 óra elteltével az elegyet lehűtöttem, és a szilárd csapadékot üvegszűrőn szűrtem.

Termelés: 0,12 g (75%), halványsárga por.

Olvadáspont: 192 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,82 (s; 1H), 9,05 (d; *J* = 2,3 Hz; 1H), 8,86 (dd; *J* = 4,8, 1,6 Hz; 1H), 8,71 (s; 1H), 8,30 (dt; *J* = 8,1, 1,9 Hz; 1H), 8,13 – 8,02 (m; 2H), 7,84 (ddd; *J* = 8,7, 7,1, 1,7 Hz; 1H), 7,73 – 7,61 (m; 2H), 7,53 (ddd; *J* = 8,1, 7,1, 1,1 Hz; 1H) ppm; ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 175,09; 156,16; 155,30; 154,14; 147,98; 141,25; 135,84; 135,74; 135,19; 126,59; 125,63; 124,89; 123,75; 119,16; 118,06 ppm.

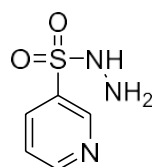
3.7.43 5-Bróm-2-metoxibenzolszulfonilhidrazid (**87**)

Egy kétnyakú gömblombikban hidrazin-hidrát (**86**, 0,06 g; 1,2 mmol, 0,58 ml) vizes oldatát lehűtöttem, és 5 ml THF-ben becsepegtettem az 5-bróm-2-metoxibenzolszulfonil-kloridot (**85**, 0,34 g; 1,20 mmol) erőteljes kevertetés közben. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettem. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd 3 óra elteltével a reakcióelegyet bepárooltam.

Termelés: 0,14 g (42%), fehér por. (van op az irodalomban)

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8,17 (s; 1H), 7,89 – 7,64 (m; 2H), 7,21 (d; $J = 8,6$ Hz; 1H), 4,21 (s; 2H), 3,89 (s; 3H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 156,00; 137,16; 132,94; 127,46; 115,42; 111,08; 56,70 ppm.

3.7.44 Piridin-3-szulfonilhidrazid (91)

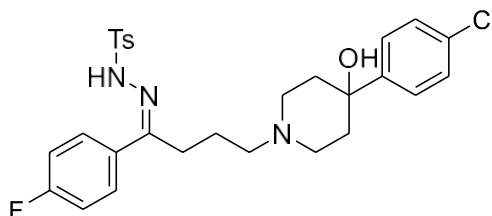


Egy kétnyakú gömblombikban hidrazin (**990**, 0,04 g; 1,15 mmol; 1,15 ml) 30 ml vizes oldatát lehűtöttem és 5 ml THF-ben becsepegtettem a piridin-3-szulfonil-kloridot (**89**, 0,20 g; 1,15 mmol) erőteljes kevertetés közben. Szobahőmérsékleten kevertettem a reakcióelegyet. A reakciót HPLC-MS mérésekkel követtem, majd a reakcióelegyet bepároltam 2 óra után, azután DKM-ban oldottam, és az elegyet vízzel extraháltam, majd szárítottam és a szerves fázist ismét bepároltam.

Termelés: 0,18 g (51%), fehér por.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8,63 (d; $J = 2,0$ Hz; 1H), 8,49 (dd; $J = 4,8, 1,6$ Hz; 1H), 7,83 (dt; $J = 7,8, 1,8$ Hz; 1H), 7,38 (dd; $J = 7,7, 4,8$ Hz; 1H) ppm; ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 153,50; 148,49; 136,09; 135,22; 124,55 ppm.

3.7.45 *N'*-(2-((1-benzilpiperidin-4-il)metil)-5,6-dimetoxi-2,3-dihidro-1H-indén-1-ilidén)-4-metilbenzolszulfonilhidrazid (78)



Haloperidol (**76**, 87,95 mg; 0,5 mmol) és 4-metilbenzolszulfonilhidrazon (**46a**, 93,12 mg, 0,5 mmol) elegyét 10 ml etanolban 80 °C-on kevertettem 4 napig. Ezt követően reakcióelegyhez katalitikus mennyiségű 1M-os sósavat, illetve katalitikus mennyiségű paratoluolszulfonsavat

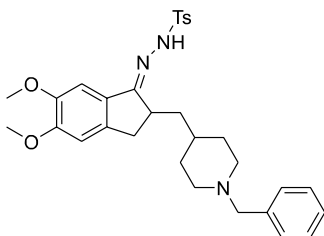
adtam, majd a reakcióelegyet 2 nap elteltével bepároltam, és kromatográfiás tisztítással jutottam a **78** termékhez.

Termelés: 375,4 mg (69%), fehér por.

Olvadáspont: 89°C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.05 (s, 1H), 7.82 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.31 (d, J = 4.4 Hz, 4H), 7.31 – 7.16 (m, 1H), 6.87 (d, J = 3.0 Hz, 2H), 3.85 – 3.66 (m, 6H), 3.49 (s, 2H), 3.42 – 3.24 (m, 2H), 2.97 (dd, J = 16.8, 7.3 Hz, 1H), 2.82 (dd, J = 23.8, 10.6 Hz, 2H), 2.67 – 2.50 (m, 1H), 2.36 (d, J = 13.2 Hz, 3H), 1.97 (s, 2H), 1.82 – 1.63 (m, 2H), 1.54 (d, J = 11.8 Hz, 1H), 1.34 (d, J = 14.3 Hz, 1H), 1.30 – 1.14 (m, 1H), 1.10 – 0.89 (m, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 166.25, 152.54, 149.21, 143.52, 140.88, 136.57, 129.71, 129.28, 129.02, 128.59, 128.17, 127.41, 108.52, 103.46, 56.03, 55.99, 53.49, 40.09 – 39.63 (2peaks), 37.67, 37.57, 35.03, 33.99, 33.03, 21.43.

3.7.46 *N'*-(4-(4-(4-klórifenil)-4-hidroxi-piperidin-1-yl)-1-(4-fluorofenil)butilidén)-4-metilbenzolszulfonilhidrazid (77)

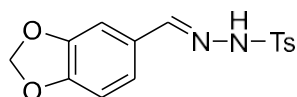


Donepezil (75; 189,8 mg; 0,5 mmol) és 4-metilszulfonilhidrazont (46a; 93,1 mg; 0,5 mmol) 10 ml etanolban oldottam bombacsőben, és a reakcióelegyet 120 °C-on kevertettem. 5 óra elteltével a reakcióelegyet bepároltam, és kromatográfiás tisztítással jutottam a **77** termékhez. Termelés: 208,1 mg (38%), fehér por.

Olvadáspont: 105 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7.83 – 7.67 (m, 4H), 7.66 – 7.57 (m, 2H), 7.46 – 7.38 (m, 2H), 7.33 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.22 – 7.10 (m, 2H), 5.23 (s, 1H), 3.04 – 2.64 (m, 6H), 2.45 – 2.26 (m, 7H), 1.91 – 1.76 (m, 2H), 1.65 (d, J = 13.5 Hz, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 166.25, 152.54, 149.22, 143.53, 140.89, 136.57, 129.71, 129.30, 129.02, 128.60, 128.17, 127.43, 108.52, 103.47, 56.01 (d, J = 2.4 Hz), 53.48, 37.67, 35.02, 33.98, 21.43.

3.7.47 N'-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmethilén)-4-metilbenzolszulfonilhidrazid (**80**)



Szintézis: benzo[d][1,3]dioxol-5-karbaldehid (**81**; 150,1 mg; 1 mmol) és 4-metilbenzolszulfonilhidrazid (**46a**; 186,2 mg; 1 mmol) elegyét kevertettem 10 ml metanolban refluxon, majd a reakcióelegyet 2 óra elteltével bepároltam.

Termelés: 286,5 mg (90%), fehér por.

4 ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatómunkám során sikeresen állítottam elő egy 40 hidrazonból álló vegyülettárat, és igazoltam, hogy tagjai fotoaktiválás hatására GSH-adduktot képeznek. A vegyületek szintézisét egyszerűen, általában jó termeléssel valósítottam meg. A fotoaktiválás hullámhosszát, a megvilágítás idejét, az alkalmazott pH-t és puffert optimalizáltam. Azt tapasztaltam, hogy a fotoaktiválás kedvező körülmények között valósítható meg: rövid bevilágítási idő (10 perc), a többi fotoaffinitás kötőelemhez képest magasabb hullámhossz (380 nm), semleges közeli pH. Azt is megállapítottam, hogy a szerkezet módosításával finomhangolható a fotoaktiválás, ugyanis csak alifás csoportokat tartalmazó hidrazonok esetén nem tapasztaltam reaktivitást, míg az aromás csoportot tartalmazó származékok általában jó konverzióval reagáltak, de több aromás csoport jelenléte a hidrazon szénatomján már sztérikus gátlást okozhat.

Előállítottam gyógyszerkémiai és kémiai biológiai szempontból releváns vegyületeket is, melyek egy része kötőelemként használható fel arra, hogy valamilyen kismolekulás nagyaffinitású próbavegyületre, hatóanyagra kapcsoljuk, és ezáltal azt fotoaktiválhatóvá tegyük. Előállítottam továbbá olyan biológiailag aktív szulfonilhidrazonokat, és biológiailag aktív karbohidrazonok szulfonilhidrazon analógjait, melyek potenciálisan alkalmazhatóak fotocímkéhez vagy photocage hatáson keresztüli fotoaktiváláshoz akár a szerkezet módosítása nélkül is. Gyógyszerkémiai fontos fehérjecélpontok széles skáláját vettem célba (acetilkolinészteráz, ureáz, monoaminoxidáz, piruvát kináz, STAT5, dopamine D3), és több esetben igazoltam a szulfonilhidrazonok előnyös hatását és alkalmazhatóságát.

További terveink között szerepel a kevésbé reaktív hidrazonok áramlásos körülmények közötti, illetve 37 °C-on történő aktiválása.

5 FELHASZNÁLT IRODALOM

1. Singh, J.; Petter, R. C.; Baillie, T. A.; Whitty, A., *Nat. Rev. Drug Disc.* **2011**, *10*, 307-317.
2. Keeley, A.; Petri, L.; Ábrányi-Balogh, P.; Keserű, G. M., *Drug Discov. Today* **2020**, *6*, 983-996.
3. Sutanto, F.; Konstantinidou, M.; Dömling, A., *RSC Med. Chem.* **2020**, *11*, 876-884.
4. Ghosh, A. K.; Samanta, I.; Mondal, A.; Liu, W. R., *ChemMedChem* **2019**, *14*, 889-906.
5. Kim, H.; Hwang, Y. S.; Kim, M.; Park, S. B., *RSC Med. Chem.* **2021**, *12*, 1037-1045.
6. Gehring, M.; Laufer, S. A., *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 5673-5724.
7. Vita, E. D., *Future Med. Chem.* **2021**, *13* (2), 193-210.
8. Halford, B.; *Chem. Eng. News*, **2020**, *98*, 28-33.
9. Kotzyba-Hibert, F.; Kapfer, I.; Goeldner, M., *Angew. Chem.*, **1995**, *34*, 1296-1312.
10. Banala, S.; Arvin, M. C.; Bannon, N. M.; Jin, X.-T.; Macklin, J. J.; Wang, Y.; Peng, C.; Zhao, G.; Marshall, J. J.; Gee, K. R.; Wokosin, D. L.; Kim, V. J.; McIntosh, J. M.; Contractor, A.; Lester, H. A.; Kozorovitskiy, Y.; Drenan, R. M.; Lavis, L. D., *Nature Methods* **2018**, *15*, 347-350.
11. Mortensen, M.; Huckvale, R.; Pandurangan, A. P.; Baker, J. R.; Smart, T. G., *Neuropharmacology* **2020**, *176*, 108135.
12. Velema, W. A.; Szymanski, W.; Feringa, B. L., *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2178-2191.
13. Chemi, G.; Brindisi, M.; Brogi, S.; Relitti, N.; Butini, S.; Gemma, S.; Campiani, G., *Future Med. Chem.* **2019**, *11*, 463-487.
14. Algorri, J. F.; Ochoa, M.; Roldán-Varona, P.; Rodríguez-Cobo, L.; López-Higuera, J. M., *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, 4447.
15. Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Peng, Q., *JNCI* **1998**, *90*, 889-905.
16. dos Santos, A. F.; de Almeida, D. R. Q.; Terra, L. F.; Baptista, M. S.; Labriola, L., *J. Cancer Metastasis Treat* **2019**, *5*, 25.
17. Josa-Culleré, L.; Llebaria, A., *ChemPhotoChem* **2021**, *5*, 296-314.
18. Bae, Y. H.; Park, J., *Control* **2011**, *153*, 198-205.
19. Cameron, D.; Eisler, S., *J. Phys. Org. Chem.* **2018**, *31*, e3858.
20. Fuchter, M. J., *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 11436-11447.

21. Goulet-Hanssens, A.; Eisenreich, F.; Hecht, S., *Adv. Mater.* **2020**, *32*, 1905966.
22. Sansalone, L.; Zhao, J.; Richers, M. T.; Ellis-Davies, G. C. R., *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 2812-2821.
23. Chowdhry, V.; Westheimer, F.H., *Annu. Rev. Biochem.* **1979**, *48*, 293-325.
24. Singh, A.; Thornton, E. R.; Westheimer, F. H., *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3006-8.
25. Sumranjit, J.; Chung, S., *Molecules* **2013**, *18*, 10425-10451.
26. Keana, J. F. W.; Cai, S. X., *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3640-3647.
27. Kepiro, M., Azidation technology: from photoaffinity labeling to molecular tattooing. PhD Thesis 2014, Eotvos Lorand University, Budapest, Hungary, 2014.
28. Vodovozova, E. L., *Biochemistry* **2007**, *72*, 1-20.
29. Leslie, B. J.; Hergenrother, P. J., *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1347-1360.
30. Xia, Y.; Peng, L., *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 7880-7929.
31. Kotzyba-Hibert, F.; Langenbuch-Cachat, J.; Jaganathen, J.; Goeldner, M.; Hirth, C., *FEBS Letters* **1985**, *182*, 297-301.
32. Smith, R. A.; Knowles, J. R., *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 5072-5073.
33. Zhang, T.; Ondrus, A., *Synlett* **2021**, *32*, 1053-1059.
34. West, A. V.; Muncipinto, G.; Wu, H.-Y.; Huang, A. C.; Labenski, M. T.; Jones, L. H.; Woo, C. M., *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 6691-6700.
35. Brunner, J.; Senn, H.; Richards, F. M., *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 3313-3318.
36. Li, Z.; Hao, P.; Li, L.; Tan, C. Y. J.; Cheng, X.; Chen, G. Y. J.; Sze, S. K.; Shen, H.-M.; Yao, S. Q., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8551-8556.
37. Murale, D. P.; Hong, S. C.; Haque, M. M.; Lee, J.-S., *Proteome Science* **2017**, *15*, 14.
38. Kalia, J.; Raines, R. T., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 7523-7526.
39. Wahbeh, J.; Milkowski, S., *SLAS Technol.* **2019**, *24*, 161-168.
40. Nunes, I. K. d. C.; de Souza, E. T.; Martins, I. R. R.; Barbosa, G.; Moraes Junior, M. O. d.; Medeiros, M. d. M.; Silva, S. W. D.; Balliano, T. L.; da Silva, B. A.; Silva, P. M. R.; Carvalho, V. d. F.; Martins, M. A.; Lima, L. M., *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *204*, 112492.
41. Wu, A. M.; Senter, P. D., *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1137-46.
42. Bamford, W. R.; Stevens, T. S., 924. *J. Chem. Soc.* **1952**, 4735-4740.
43. Shapiro, R. H.; Heath, M. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 5734-5735.
44. Ábrányi-Balogh, P.; Petri, L.; Imre, T.; Szijj, P.; Scarpino, A.; Hrast, M.; Mitrović, A.; Fonovič, U. P.; Németh, K.; Barreteau, H.; Roper, D. I.; Horváti, K.; Ferenczy, G. G.; Kos, J.; Ilaš, J.; Gobec, S.; Keserű, G. M., *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *160*, 94-107.

45. Flanagan, M. E.; Abramite, J. A.; Anderson, D. P.; Aulabaugh, A.; Dahal, U. P.; Gilbert, A. M.; Li, C.; Montgomery, J.; Oppenheimer, S. R.; Ryder, T.; Schuff, B. P.; Uccello, D. P.; Walker, G. S.; Wu, Y.; Brown, M. F.; Chen, J. M.; Hayward, M. M.; Noe, M. C.; Obach, R. S.; Philippe, L.; Shanmugasundaram, V.; Shapiro, M. J.; Starr, J.; Stroh, J.; Che, Y., *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10072-10079.
46. Fernandes, T. B.; Cunha, M. R.; Sakata, R. P.; Candido, T. M.; Baby, A. R.; Tavares, M. T.; Barbosa, E. G.; Almeida, W. P.; Parise-Filho, R., *Arch. Pharm.* **2017**, *350*, 1700163.
47. Lee, A., *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **1994**, *29*, 2-6.
48. Arshia; Begum, F.; Almandil, N. B.; Lodhi, M. A.; Khan, K. M.; Hameed, A.; Perveen, S., *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 1009-1022.
49. Ali, M.; Younus, H.; Al-Rashida, M.; Arshad, Z.; Maryum, T.; Gilani, M.; Alharthi, A.; Iqbal, J., *Bioorg. Chem.* **2017**, *75*.
50. Kumar, N. S.; Amandoron, E. A.; Cherkasov, A.; Finlay, B. B.; Gong, H.; Jackson, L.; Kaur, S.; Lian, T.; Moreau, A.; Labrière, C.; Reiner, N. E.; See, R. H.; Strynadka, N. C.; Thorson, L.; Wong, E. W.; Worrall, L.; Zoraghi, R.; Young, R. N., *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 7069-82.
51. Wingelhofer, B.; Maurer, B.; Heyes, E.C. *et al.* Pharmacologic inhibition of STAT5 in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **2018**, *32*, 1135–1146.
52. Kumaraswamy, A. A.; Todici, A.; Resetca, D.; Minden, M. D.; Gunning, P. T., *MedChemComm* **2012**, *3*, 22-27.