



Fluoreszcens ligandumok előállítása G-fehérje kapcsolt receptorok jelölésére

OTDK dolgozat

Szabó Renáta

gyógyszervegyész-mérnök MSc-hallgató

Témavezetők: **Dr. Ábrányi-Balogh Péter**, ELKH, TTK, SZKI
tudományos főmunkatárs, címzetes egyetemi docens

Dr. Németh András György, ELKH, TTK, SZKI
tudományos munkatárs

Konzulens: **Dr. Kupai József**, BME-VBK, SZKT
egyetemi docens

BME-VBK, SZKT



*Készült az ELKH Természettudományi Kutatóközpont Szerves Kémia Intézetének
Gyógyszerkémiai Kutatócsoportjában.*

Lezárva: 2023. január

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom a Gyógyszerkémiai Kutatócsoport vezetőjének, **Dr. Keserű György Miklósnak**, aki biztosította nekem a lehetőséget, hogy a csoport tagjaként elkészíthessem a dolgozatomat.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, először is **Dr. Ábrányi-Balogh Péternek**, a dolgozat elkészülése során nyújtott támogatásáért, valamint, hogy az évek során lehetőséget biztosított kutatásaim elvégzéséhez. Köszönetet mondok **Dr. Németh András György** témavezetőmnek, aki türelmével, szakmai és baráti segítségével, értékes útmutatásaival nagyban hozzájárult szakmai fejlődésemhez és sikeres eredményeimhez, illetve építő észrevételeivel és javaslataival segítette a dolgozat elkészülését. Hálával tartozom belső konzulensemnek, **Dr. Kupai Józsefnek**, akihez bármikor bizalommal fordulhattam személyes és szakmai kérdéseimmel, illetve kéréseimmel.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Kiss Dóra Juditnak**, aki a vegyületek tervezésében és a dokkolásokban nyújtott segítséget, valamint **Németh Krisztinának** és **Dr. Szabó Pálnak** a HRMS mérések kivitelezéséért. Szeretnék köszönetet mondani ezen felül **Kollár Leventének**, **Dr. Szilágyi Bencének**, **Szepesi Kovács Dénesnek**, **Varró Nikolettnek** a mindennapi munkában nyújtott segítségükért, valamint a **TTK Gyógyszerkémiai Kutatócsoport** valamennyi tagjának a jó munkahelyi légkör megteremtése mellett segítségükért, illetve támogatásukért.

A mikroszkópos vizsgálatok elvégzéséért köszönet illeti a KOKI Molekuláris Neurobiológiai Laboratórium munkatársait, **Dr. Prokop Susannet**, **Dr. Barna Lászlót**, **Dr. Katona Istvánt** és **Leszkó Dáriust**.

A dolgozat az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-22-2-III-BME-170 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Program, valamint a Richter Gedeon Centenárium Alapítvány Kutató Hallgató Ösztöndíj támogatásával készült.



TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1. Farmakológiai vonatkozású irodalmi áttekintés	8
2.1.1. Az opioidok és az opioid-válság	8
2.1.2. Az opioid-válság megfékezésének gyógyszerkémiái lehetőségei	10
2.1.3. G-fehérje kapcsolt receptorok	13
2.1.4. Az orexin, a D ₁ -dopamin és a κ -opioid receptor biokémiai működése	14
2.2. <i>In silico</i> és <i>in vitro</i> vizsgálatok áttekintése	17
2.2.1. Fehérjék és kismolekulák kölcsönhatásainak <i>in silico</i> vizsgálata	17
2.2.2. A kiválasztott ligandumok szerkezet–hatás összefüggéseinek vizsgálata	18
2.3. Szintetikus kémiai módszerek	22
2.3.1. Az ACT-462206 (OX ₁ , OX ₂) szintézise	22
2.3.2. Az SKF-83566 (D ₁ DR) anilin származék szintézise	23
2.3.3. A JD _{Tic} (KOR) szintézise	24
2.4. Fotoaffinitás jelölési technika	26
2.5. A kutatócsoportunk eddigi eredményei, a PharmacoS_{TORM}	28
3. CÉLKITŰZÉS	30
4. SAJÁT MUNKA	31
4.1. Számításos kémiai modellezés	31
4.1.1. A módosított ACT-462206 ligandumok dokkolásának eredményei	31
4.1.2. A módosított SKF-83566 ligandumok dokkolásának eredményei	33
4.2. A szintézisek részletes leírása, szintézistervek	35
4.2.1. A módosított ACT-462206 ligandumok szintézise	36
4.2.2. A módosított SKF-83566 ligandumok szintézise	39
4.2.3. A módosított JD _{Tic} ligandum szintézise	46
4.3. Biológiai mérések eredményei	52
5. KÍSÉRLETI RÉSZ	54
5.1. A dokkolás során alkalmazott vizsgálati módszerek	54
5.2. A szintézisek során alkalmazott vizsgálati módszerek	55
5.3. A szintetikus munkához tartozó receptek és analitikai vizsgálatok	56
6. ÖSSZEFOGLALÁS	75
7. IRODALOMJEGYZÉK	77
8. FÜGGELÉK	81
8.1. Dokkolás során kapott 3D ábrák és kölcsönhatástérképek	81
8.2. A szintézisek összefoglaló ábrái	90

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AMPA	2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav
BNI	binaltorfimin
Boc	<i>tert</i> -butoxi-karbonil
BOP	benzotriazol-1-iloxi[trisz(dimetil-amino)]foszfónium-hexafluorfoszfát
CB	kannabinoid
CDI	1,1'-karbonildiimidazol
TFE	2,2,2-trifluoretanol
CNS	központi idegrendszer
CuAAC	réz(I)-katalizált azid–alkin cikloaddíció
Sulfo-Cy5	szulfo-cianin-5
DA	dopamin
DIPEA	<i>N</i> -etil-diizopropil-amin
DKM	diklórmétán
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilszulfoxid
DOR	δ -opioid receptor
DORA	kettős hatású orexin receptor antagonist
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
ekv.	ekvivalens
FDA	Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hatósága
Fmoc	9-fluorenil-metiloxi-karbonil-csoport
GABA	γ -aminovajsav
GDP	guanozin-difoszfát
GNTI	5'-guanidinonaltrindol
GPCR	G-fehérje kapcsolt receptor
GTP	guanozin-trifoszfát
HATU	1-[bisz(dimetilamino)metilén]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol[4,5- <i>b</i>]piridínium-3-oxid-hexafluorfoszfát
HBTU	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil- <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)urónium-hexafluorfoszfát
HEAL	Segítség a függőség hosszú távú megszüntetésében (NIH társadalmi kezdeményezés)
HMBC	heteronukleáris többszörös kötés korrelációs spektroszkópia
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
K _i	inhibíciós állandó
KOKI	Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet
KOR	κ -opioid receptor

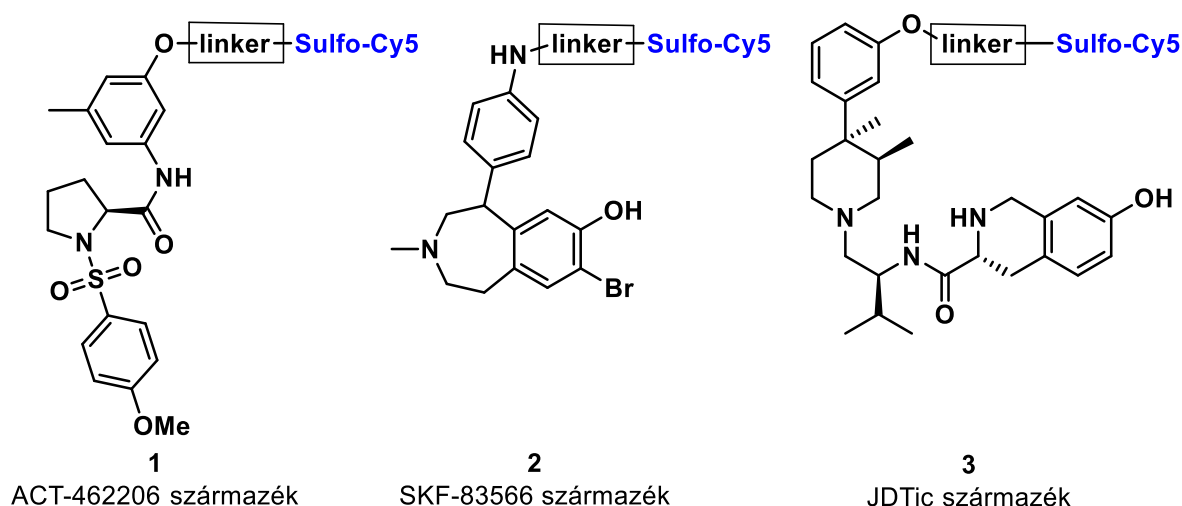
HPLC-MS	folyadékkromatográfiával összekapcsolt tömegspektrometria
LH	laterális hipotalamusz
MAGL	monoacilglicerín-lipáz
MD	molekuladinamika
Me ₆ TREN	trisz-2-(dimetilamino)etilamin
MOR	μ-opioid receptor
NAM	negatív allosztérikus modulátor
NBS	<i>N</i> -bróm-szukcinimid
NHS	<i>N</i> -hidroxí-szukcinimid
NIDA	Nemzeti Kábítószer-visszaélés elleni Intézet (USA)
NIH	Nemzeti Egészségügyi Intézet (USA)
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aszpartát
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	mágneses magrezonancia spektroszkópia
NOP	nociceptin opioid receptor
Ns	nozil
ORL	opioid-szerű receptor
OX	orexin
PAL	fotoaffinitás jelölés
PAM	pozitív allosztérikus modulátor
PPA	polifoszforsav
Py	piridínium
rt	szobahőmérséklet
SAR	szerkezet–hatás összefüggés
STORM	sztochasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópia
TEA	trietyl-amin
TFA	trifluorecetsav
THF	tetrahidrofurán
THPTA	trisz(benziltriazolilmetil)-amin
Tr	tritol
VRK	vékonyréteg kromatográfia
VTa	ventrális tegmentális terület

1. BEVEZETÉS

Az 1990-es évektől kezdődően drámaian megnőtt az opioidokkal történő visszaéléshez, illetve túladagoláshoz köthető kórházi kezelések és halálesetek száma. Az Egyesült Államokban 2021-ben közel 108 ezer ember halt meg vénnyköteles vagy tiltott opioid túladagolás következtében. A szerhasználati zavarokban szenvedők kezelésére eddig csak néhány μ -opioid receptort (MOR) célzó hatóanyag bizonyult hatásosnak, mint például a buprenorfin, a metadon vagy a naltrexon.¹ Ezek képesek voltak csökkenteni az opioidok utáni sóvárgást, valamint a visszaesés kockázatát. A kezelések azonban jelentős orvosi kapacitást igényelnek, illetve korlátozott a gyógyszerek hozzáférhetősége a túladagolás kockázata és a hosszútávú terápiás folyamat miatt. A kezelések hatékonyságának növelése érdekében napjainkban előtérbe kerültek az új terápiás célpontok azonosítására irányuló kutatások. Antagonistákkal kiváló gyógyszer-célpontnak bizonyultak a G-fehérje kapcsolt receptorok (GPCR) közül az orexin, a D₁-dopamin és a κ -opioid receptorok (KOR). Közös jellemzőjük, hogy az agyi jutalmazó, illetve megerősítő rendszer működésében játszanak fontos szerepet.²

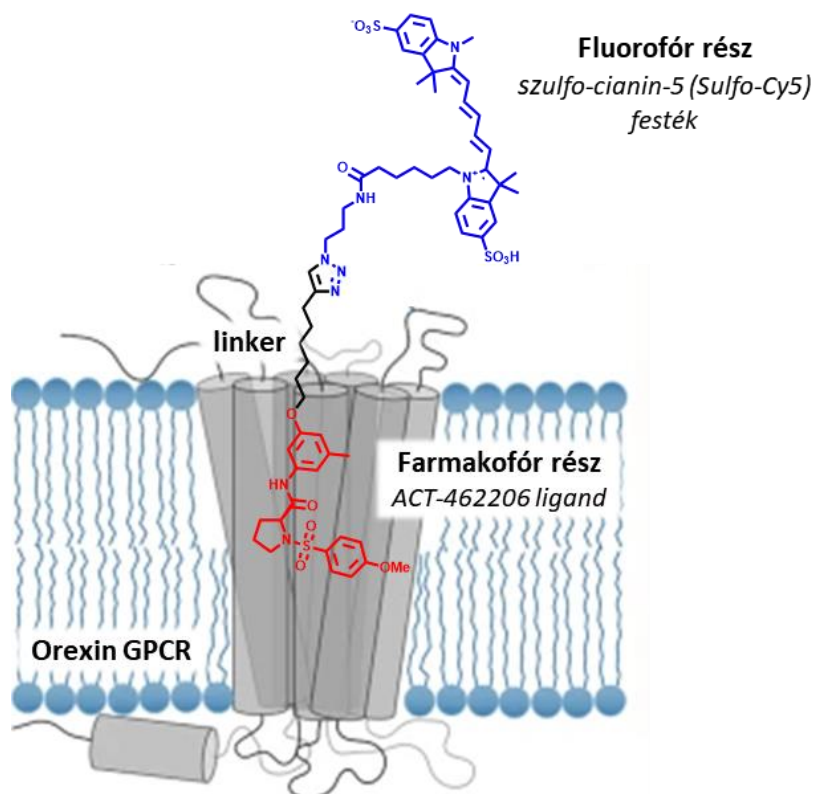
A gyógyszerkutatás során nemcsak a megfelelő hatóanyagok fejlesztése, hanem a fehérjék működésének megértése, valamint a szervezetben betöltött szerepük meghatározása is lényeges feladat. Kutatócsoportunk a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet (KOKI) Molekuláris Neurobiológiai Laboratóriumával együttműködve kidolgozott egy új, szuperfelbontású mikroszkópos eljárást, amelyben fluoreszcens festékkel jelölt molekulák segítségével nanométeres pontossággal lehet farmakológiai méréseket végezni receptorokon, ioncsatornákon vagy akár enzimeken is. A PharmacOStorm módszer segítségével a kutatók felfedezték, hogy a Richter Gedeon gyógyszergyár által fejlesztett kariprazin (Vraylar®/Reagila®) gyógyszer elsősorban a *Calleja*-szigetec elnevezésű agyterületen található szemcsesejtekhez kötődik.³ Ez a módszertani áttörés új utakat nyithat meg különböző betegségek neurobiológiai alapjainak megértésében, így hozzájárulhat az opioid-válság okozta túladagolás és függőség kezelésére irányuló megfelelő terápiás módszer kidolgozásához is.

Tudományos diákköri munkám során célul tűztem ki az orexin (1), a D₁-dopamin (2), valamint a κ -opioid (3) GPCR célpontra fókuszált, módosított ligandumok előállítását (1. ábra).



1. ábra: A tudományos diákköri munkám során előállítani kívánt fluoreszcens ligandumok

A ligandumokat egy linkeren keresztül a szulfo-cianin-5 (Sulfo-Cy5) fluoreszcens festékhez kapcsoltam, hogy lehetővé váljon a vegyületek kötődésének mikroszkópos vizsgálata biológiai rendszerekben (2. ábra).



2. ábra: Az orexin GPCR és az 1 fluoreszcens vegyület kötődésének sematikus ábrája

Annak érdekében, hogy a mikroszkópos vizsgálatok hatékonyságát növeljük, elő kívántam állítani az 1 és a 2 ligandumok fotoaktiválható linkerral összekötött, a fehérjéhez immáron irreverzibilisen kötődő analógjait is. A kiválasztott ligandumok pontos szerkezetét, továbbá a ligandum és a fluoreszcens festék összekapcsolásához szükséges linkert előzetesen *in silico* dokkolási kísérletekkel határoztam meg.

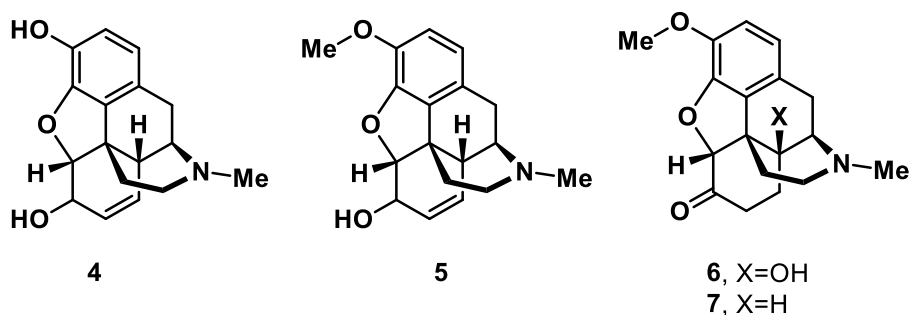
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Tudományos diákköri munkám során olyan GPCR célpontokra állítottam elő fluoreszcens festékkel jelölt farmakofór vegyületeket, amelyek új terápiás célpontként szolgálhatnak az opioid-függők hatékonyabb és biztonságosabb kezelésében. A következő fejezetben a témához kapcsolódó szakirodalomról adok áttekintést. Elsőként a dolgozat farmakológiai vonatkozású alapjait tárgyalom (2.1. fejezet), majd a számítógépes gyógyszertervezés szerkezetalapú megközelítését és az előállítani kívánt vegyületek alapjául szolgáló ligandumok szerkezet–hatás összefüggéseit mutatom be (2.2. fejezet). Ezt követően az általunk kiválasztott és később módosítani kívánt orexin, D₁-dopamin és KOR ligandumok szakirodalomban ismert szintéziseit foglalom össze (2.3. fejezet). Bemutatom továbbá a vegyületeink kovalens kötődéséhez felhasználható fotoaffinitás jelölési technikát (2.4. fejezet), valamint áttekintem a kutatócsoportunk által a PharmacOSTORM módszerrel elért eddigi eredményeket (2.5. fejezet).

2.1. Farmakológiai vonatkozású irodalmi áttekintés

2.1.1. Az opioidok és az opioid-válság

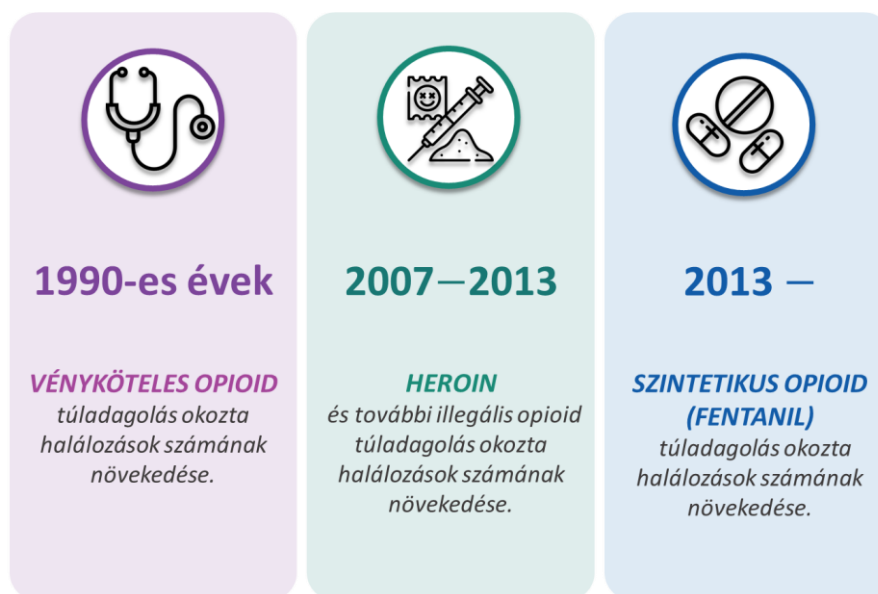
Az opioid-vegyületek, mint például a morfin (4), a kodein (5), az oxikodon (6, OxyContin[®]) vagy a hidrokodon (7, Vicodin[®]) a ma elérhető leghatékonyabb fájdalomcsillapítók közé tartoznak (3. ábra).⁴



3. ábra: A morfin (4), a kodein (5), az oxikodon (6) és a hidrokodon (7) szerkezeti képlete

Használatuk évről évre több millió betegnek segít elviselhetővé tenni a súlyos, elsősorban daganatos betegségek által előidézett krónikus fájdalmakat.⁵ A nem szakszerű vagy túlzott használatuk viszont súlyos következményekkel járhat. Az elsősorban μ -opioid receptoron teljes agonistaként kifejtett fájdalomcsillapító hatásuk mellett erős örömezzet is kiváltanak, így sok beteg válik függővé ezektől a szerektől.⁶ Az opioidok a függőség kialakítása mellett számos mellékhatással is rendelkeznek, mint zavartság, szedáció, izzadás, hányinger, székrekedés, légszomj vagy légzésdepresszió.⁷

Az opioid-származékok okozta függőség veszélyességét jól mutatja az Amerikai Egyesült Államokban egyre súlyosabb kereteket öltő közegészségügyi probléma, az opioid-válság (az angolszász szakirodalomban *opioid crisis*). A legfrissebb adatok szerint csak az Egyesült Államokban 1999 és 2020 között több mint 564 000 ember halt meg opioidok okozta túladagolásban, beleértve a vényköteles és tiltott szereket is.⁸ Többen, mint fegyveres erőszakban, autóbalesetben vagy AIDS-ben. A krízis első hulláma az opioidok orvosok által történő fokozott felírásával kezdődött az 1990-es években (4. ábra).⁹ Ekkor kritikus mértékben megnőtt a vényköteles opioidok elfogadottsága és használatuk krónikus, nem rákos eredetű fájdalmak, mint például hátfájás vagy ízületi porckopás kezelésében. A gyógyszerhasználat kockázatát és addiktív hatását jelentősen alábecsülték.



4. ábra: Az opioid-válság három hulláma és kialakulásuk elsődleges okai

A gyógyszereket forgalmazó cégeket a betegek félretájékoztatása miatt 2007-ben jelentős összegű pénzbüntetés kifizetésére kötelezték, és szigorították az opioidok háziorvos által történő felírásának szabályait is. Akik nem tudtak gyógyszerhez jutni, sokszor az olcsóbb és könnyebben hozzáférhető heroinhoz fordultak. A heroin használat elterjedésével kezdetét vette a krízis második hulláma (2007–2013),¹⁰ amelynek további káros következményeként egyre több HIV/AIDS-es, valamint hepatitisz B és C fertőzött beteget regisztráltak.¹¹ A válság következő, máig tartó harmadik hulláma 2013-ban kezdődött a fentanil megjelenésével, amely a heroinnál ötvenszer erősebb hatású szintetikus opioid-származék.¹² Az illegálisan előállított fentanil piaca továbbra is bővül, már megtalálható heroinnal, hamisított tablettákkal vagy akár kokainnal kombinálva is a feketepiacon.¹³

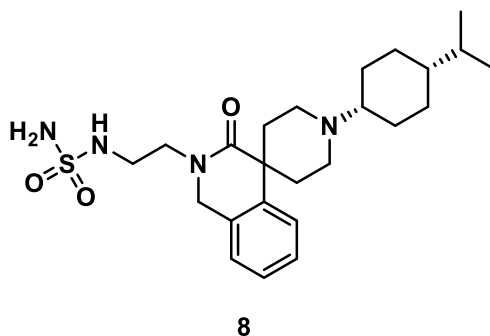
Habár az egyre aggasztóbb kereteket öltő opioid-válságot igyekeznek jogi intézkedésekkel korlátozni, a válság megfékezéséhez szükség van új tudományos megoldásokra is.¹⁴ Ennek érdekében az amerikai Nemzeti Egészségügyi Intézet (NIH)ⁱ 2018-ban elindította a HEALⁱⁱ nevű kezdeményezését, amely során az opioidokkal történő visszaélések megszüntetését két aspektusból közelítik meg.¹⁵ Egyrészt szükség van olyan fájdalomcsillapítók kifejlesztésére, amelyek nem rendelkeznek a jellemző súlyos és káros mellékhatásokkal. Másrészt fontos az opioid szerhasználati zavarokkal küzdő betegek kezelésére irányuló innovatív és hatékonyabb terápiák kidolgozása is, amelynek első lépése új fehérjecélpontok azonosítása.

2.1.2. Az opioid-válság megfékezésének gyógyszerkémiai lehetőségei

2.1.2.1. Új fájdalomcsillapítók kifejlesztése

A morfin felfedezése után a súlyos és kellemetlen mellékhatások kiküszöbölésére számos új hatóanyagot igyekeztek kifejleszteni.¹⁶ A fájdalomcsillapítás legfontosabb célpontját a MOR jelenti, így a kutatások is elsősorban erre a fehérjére irányultak. Sajnos az újonnan előállított gyógyszerjelöltek sem rendelkeztek kedvezőbb mellékhatásprofillal, mint az eddig ismert opioidok.¹⁷

Az egy receptoron ható gyógyszerek mellett léteznek kevert hatású vagy úgynevezett multifunkciós hatóanyagok is, amelyek egynél több receptoron fejtik ki hatásukat. *Ding* és munkatársai kifejlesztettek egy olyan MOR, valamint nociceptin receptoron (NOP) ható, kettős funkciójú agonistát (**8**), amely nociceptin/orfanin FQ peptid aktiválásán keresztül fokozza a MOR-agonista hatás által indukált analgéziát (fájdalomérzékelés hiánya) anélkül, hogy súlyos függőséggel kapcsolatos mellékhatásokat okozna (5. ábra).¹⁸



5. ábra: Az AT121 nevű bifunkcionális hatóanyag (**8**) szerkezeti képlete

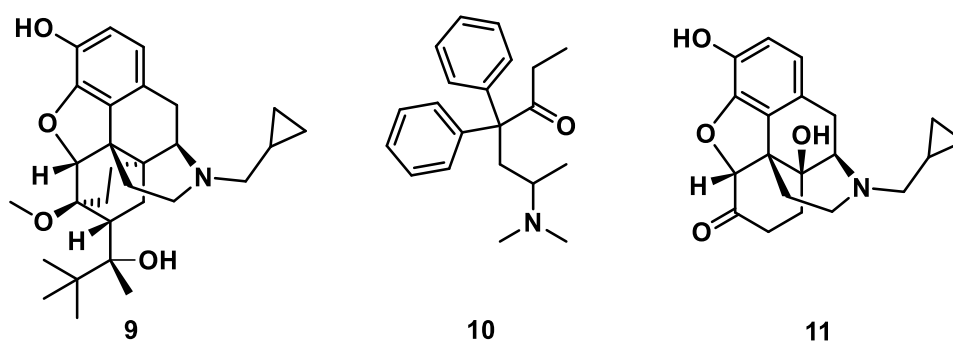
ⁱ National Institutes of Health

ⁱⁱ Helping to End Addiction Long-term (Segítség a függőség hosszú távú megszüntetésében)

Annak ellenére, hogy a forgalomban lévő kevert hatású opioidok már kevesebb mellékhatással rendelkeznek, mint a szelektív MOR agonisták, addikciót kiváltó mellékhatásaik miatt használatuk még mindig nem tekinthető teljesen biztonságosnak.¹⁸

2.1.2.2. Új terápiás célpontok meghatározása a függőség kezelésére

Az opioid használati zavar gyógyszeres kezelésére a három leggyakrabban alkalmazott gyógyszer a buprenorfin (**9**, Suboxone®), a metadon (**10**, Dolophine®) és a naltrexon (**11**, Revia®; 6. ábra).¹



6. ábra: A buprenorfin (**9**), a metadon (**10**) és a naltrexon (**11**) szerkezeti képlete

A buprenorfin a μ - és κ -, míg a metadon a μ -opioid receptoron ható agonistaként szubsztitúciós terápiában alkalmazható előnyösen. A detoxifikálás a kereszttolerancia elvén alapul, amely során az addiktív opioidot egy másikkal helyettesítik, majd az utóbbi adagolását fokozatosan elhagyják. A detoxifikálásnál azonban hátrányt jelent, hogy a teljes terápia további utókezelést igényel (adrenerg agonisták adagolása: klonidin vagy lofexidin).¹⁹ A naltrexon a MOR-on ható hosszú hatástartamú kompetitív antagonist, amely az agonistáknál nagyobb affinitásának köszönhetően leszorítja azokat a fehérje kötőhelyéről. Mivel a hatást már néhány perc alatt kiváltja, így sürgős esetben, életveszélyes állapot esetén alkalmazzák.

A MOR agonisták és antagonisták mellett az α_2 -adrenerg receptor agonisták (pl. klonidin)¹⁹ és az NMDA receptor antagonisták (pl. ketamin) használatosak egyes elvonási tünetek kezelésében.²⁰ A farmakoterápiás kezelés mellett elengedhetetlen a rendszeres pszichológiai tanácsadás és a szociális rehabilitáció a visszaesés elkerülése érdekében. Az elmúlt évtizedben az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hatósága (FDA)ⁱⁱⁱ két olyan buprenorfin-tartalmú készítményt is elfogadott, amelyekkel az állandó orvosi jelenlét és a gyógyszer naponta történő adagolása elhagyható. Az egyik a Sublocade® injekció, amely havonta egyszer adható be,²¹ a másik a Probuphine® szubdermális implantátum, amely hat hónapon keresztül képes állandó, alacsony dózisú buprenorfin adagolni a szervezetbe.²²

ⁱⁱⁱ Food and Drug Administration

Mindkét készítmény csak akkor alkalmazható, ha a kezelést már előzetesen nyálkahártyán keresztül felszívódó buprenorfinnal megkezdték.

Világszerte komoly igény mutatkozik arra, hogy a tudományos kutatások mihamarabb megoldást találjanak az opioid-válság enyhítésére. A kutatások gyorsítása érdekében az amerikai Nemzeti Kábítószer-visszaélés elleni Intézet (NIDA)^{iv} a szakirodalomban publikált adatok és belső tanulmányok alapján meghatározott tíz gyógyszerfejlesztési célpontot, amelyek ígéretesnek bizonyulhatnak az új terápiák kidolgozásában (1. táblázat).²³ A kiválasztott célpontok között kilenc GPCR és egy peptidhormon, a ghrelin szerepel. Közös tulajdonságuk, hogy az agyi jutalmazó folyamatok szabályozásában játszanak közvetett vagy közvetlen szerepet.^{2,24,25,26,27}

1. táblázat: NIDA által javasolt tíz legígéretesebb célpont az opioid-függőség kezelésére

Sorszám	Potenciális gyógyszerfejlesztési célpontok	Hatóanyag funkcionális
1.	OX₁ és OX_{1,2}	antagonista, DORA^v, NAM^{vi}
2.	D₃ dopamin receptor	parciális agonista, antagonista, PAM^{vii}, NAM
3.	KOR	antagonista, NAM
4.	mGlu_{2/3}	agonista, NAM
5.	CB₁ kannabinoid	antagonista, NAM
6.	GABA _B	agonista, PAM
7.	M ₅ -muszkarin	antagonista, NAM
8.	AMPA	antagonista, NAM, PAM
9.	NOP/ORL	agonista, antagonista, NAM, PAM
10.	Ghrelin	antagonista, NAM

Az új terápiák kifejlesztésének egyik fő akadálya a nagy felbontású fehérje szerkezetek korlátozott elérhetősége, amely nehezíti a releváns jelátviteli mechanizmusok atomi szintű megismerését. Az 1. táblázatban felsorolt tíz fehérje közül az orexin, a D₃ dopamin, a κ -opioid, az mGlu_{2/3} és a CB₁ receptorok esetén a fehérjék szerkezetét több ligandummal is meghatározták. Ez lehetővé teszi a fehérje–ligandum kölcsönhatások számítógépes modellezését, amely a racionális gyógyszertervezés alapjául szolgál.

^{iv} National Institute on Drug Abuse

^v kettős orexin receptor antagonista (DORA, dual orexin receptor antagonist)

^{vi} negatív allosztérikus modulátor

^{vii} pozitív allosztérikus modulátor

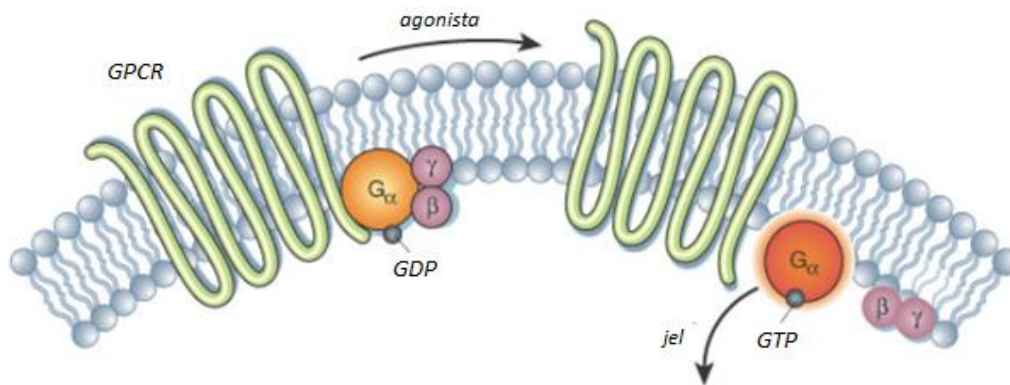
Mindezek alapján kutatócsoportunk a KOKI Molekuláris Neurobiológiai Laboratóriumával közösen az 1. táblázat 1–5. sorában szereplő receptorokat választotta a kutatás alapjául. Ezen fehérjék esetén célul tűztük ki fluoreszcens festékekkel módosított, reverzibilisen és irreverzibilisen is kötődő ligandumok számítógépes tervezését, szintézisét és mikroszkópos vizsgálatát biológiai rendszerekben. A központi idegrendszer (CNS)^{viii} jutalmazási rendszerének működése erősen összefügg a különböző dopaminerg funkciókkal,²⁸ valamint a D₁ dopamin receptorra (D₁DR) szelektív SKF-83566 ligandumot (**30**) már sikeresen kapcsolták BODIPY fluoreszcens festékhez.²⁹ Emiatt célul tűztük ki a D₁DR vizsgálatát is a PharmacostORM módszerrel. A tudományos diákköri munkám elkészítése során az orexin, a D₁ dopamin, valamint a κ -opioid GPCR-okkal foglalkoztam.

2.1.3. G-fehérje kapcsolt receptorok

A sejtmembránban található GPCR-ok a gyógyszerkutatás és az új terápiás, valamint farmakológiai eszközök fejlesztésének legnépszerűbb célpontjai közé tartoznak. A gyógyászatban betöltött jelentőségüket tükrözi, hogy az FDA által jelenleg jóváhagyott gyógyszerek mintegy egyharmada GPCR fehérjéket céloz.³⁰ Döntő szerepet játszanak mind a központi, mind a perifériás neurológiai és fiziológiai folyamatok szabályozásában.³¹ A jelátvitel feltétele, hogy a célsejtek érzékeljék a többi sejttől érkező kémiai jeleket, mint például a különböző neurotranszmittereket, hormonokat, biogén-aminokat, neuromodulátorokat. Ehhez a célsejteknek rendelkezniük kell a kémiai jeleket specifikusan felismerő kötőhelyekkel. Gyógyszerfejlesztés során a receptor funkcionális aktivitását jellemzően az ortosztérikus kötőhelyre, tehát a natív ligandum helyére kötődő molekulákkal szokták szabályozni, azonban a funkcionális válasz modulálására a kevésbé konzervált másodlagos/allosztérikus kötőhelyek is lehetőséget nyújtanak.³² Az allosztérikus modulátorok hatásukat tekintve lehetnek pozitív (PAM) vagy negatív (NAM) modulátorok, amelyek az ortosztérikus kötőhelytől eltérő helyre kötődve befolyásolják a receptor aktivitását.³³

A GPCR-ok fő egysége a hét transzmembrán domén (zöld hurok, 7. ábra), valamint a három extracelluláris és három intracelluláris hurok. A receptorok a perifériás és központi idegrendszerben (CNS) is expresszálódnak, funkcionálisan kapcsolódva a heterotrimer (α , β , γ) G-fehérjéhez (narancssárga és lila körök, 7. ábra).³⁴ A G-fehérjék speciális fehérjék, amelyek képesek megkötni a fehérje állapotától függően a guanozin-difoszfát (GDP, inaktív állapot) és a guanozin-trifoszfát (GTP, aktív állapot) nukleotidokat.

^{viii} central nervous system



7. ábra: A GPCR jelátvitelének sematikus ábrája

A GPCR-ok aktiválódásának mechanizmusa rendkívül bonyolult és ma is intenzíven kutatott terület. A legegyszerűbb magyarázat szerint egy külső jelzőmolekula (pl. agonista) kötődése konformáció változást okoz a GPCR-ban, amely kölcsönhatást eredményez a receptor és a közeli G-fehérje között. Ennek eredményeként a G-fehérje alegységei két részre disszociálnak: a GTP-hez kötött α alegységre és egy $\beta\gamma$ dimerre. Mindkét rész a plazmamembránon marad, de már nem kötődnek a receptorhoz, így lehetővé válik az oldalirányú diffúzió és kölcsönhatások kialakítása más membránfehérjékkel. A G-fehérjék mindaddig aktívak maradnak, amíg α alegységeik GTP-vel kapcsolódnak. A GTP GDP-vé történő hidrolízise inaktíválja a GPCR-t, amely során az alegységek felveszik az eredeti heterotrimer formát. Ily módon a sejtfelszínen lévő jel-receptor kölcsönhatások be- vagy kikapcsolhatják a G-fehérjéket.

A GPCR-célpontok indikációi közé sorolhatóak a jelentősebb központi-idegrendszeri betegségek (pl. *Alzheimer*-kór, skizofrénia, depresszió, kognitív deficit, szorongás, stb.), és egyéb betegségek, mint magas vérnyomás, cukorbetegség, vérmérgezés, rák, stb.³⁵

2.1.4. Az orexin, a D₁-dopamin és a κ -opioid receptor biokémiai működése

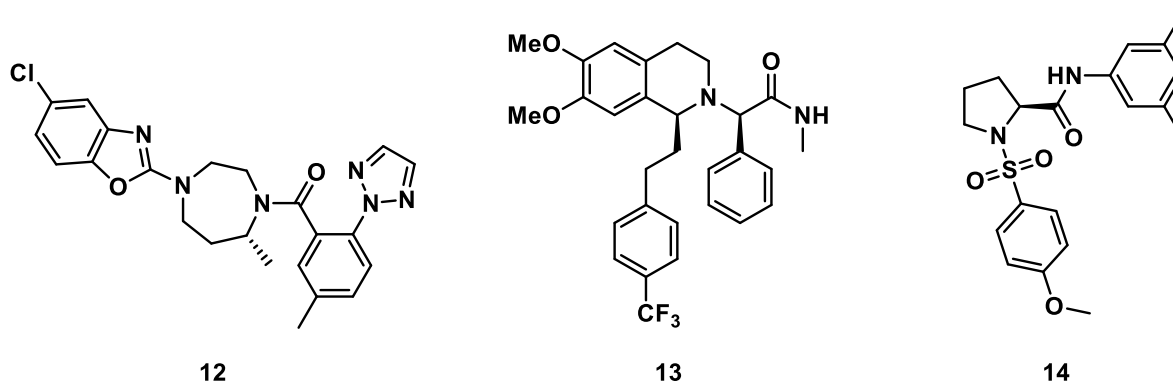
Ebben a fejezetben az orexin, a D₁-dopamin és a κ -opioid GPCR-okat mutatom be elsősorban az opioid-függőség kialakulásában betöltött vagy éppen a kezelésében alkalmazható szerepükre koncentrálni.

2.1.4.1. Az orexin receptorok (OX₁, OX₂)

Az orexin-A és orexin-B, vagy más néven hipokretin-1 és hipokretin-2 neuropeptideket egymástól függetlenül két kutatócsoport is felfedezte 1998-ban.³⁶ Az OX₁ receptornak nagyobb affinitása van az orexin-A-hoz, míg az OX₂ receptor szinte ugyanolyan affinitással rendelkezik mindkét neuropeptidhez. Az orexin-receptorok (OX₁, OX₂) az izgalmi és stresszel kapcsolatos folyamatokban szerepet játszó perifornikus és dorzomediális hipotalamuszban,³⁷ valamint a

jutalomkereső magatartásért felelős laterális hipotalamuszban (LH) találhatóak meg.²⁴ Harris és munkatársai egereken végzett kísérletekkel igazolták, hogy az LH modulálása kiemelt szerepet játszik a kábítószer-kereső magatartás visszaesésében.³⁸ A kábítószerfüggő egyén számára a visszaesés veszélye a gyógyulás legfőbb akadály. Számos tanulmány bizonyítja, hogy az orexin receptor antagonisták sikeresen megszüntették a jutalomszerzésre irányuló viselkedést.³⁹

Az eddigi kutatási eredmények alapján az orexin-rendszert moduláló agonisták elsődlegesen a narkolepszia (neurológiai alvászavar), míg az antagonisták az inszomnia (álmatlanság) kezelésében bizonyultak kifejezetten eredményesnek. A preklinikai tanulmányok alapján az alvás elősegítésében a szelektív orexin receptor antagonistákkal szemben hatékonyabbnak bizonyultak a kettős antagonisták (DORA).⁴⁰ Az FDA eddig két DORA-t hagyott jóvá a krónikus álmatlanság kezelésére: a suvorexantot (**12**, Belsomra®) 2014-ben⁴¹ és a lemborexantot (**13**, Dayvigo®) 2019-ben.⁴² A DORA-k kifejlesztése és tesztelése ma is felkapott kutatási területnek számít, számos vegyület, mint például az ACT-462206 (**14**) esetén a klinikai vizsgálatok még zajlanak (8. ábra).⁴³



8. ábra: A forgalomban lévő (**12**, **13**), valamint a klinikai vizsgálatokon tesztelt (**14**) DORA-k

Az orexin-rendszer részt vesz továbbá kóros neurológiai betegségek folyamataiban is, például a depresszió, az ischaemiás stroke, a kábítószer-függőség és az Alzheimer-kór kialakulásában.⁴⁴

2.1.4.2. A D₁-dopamin receptor (D₁DR)

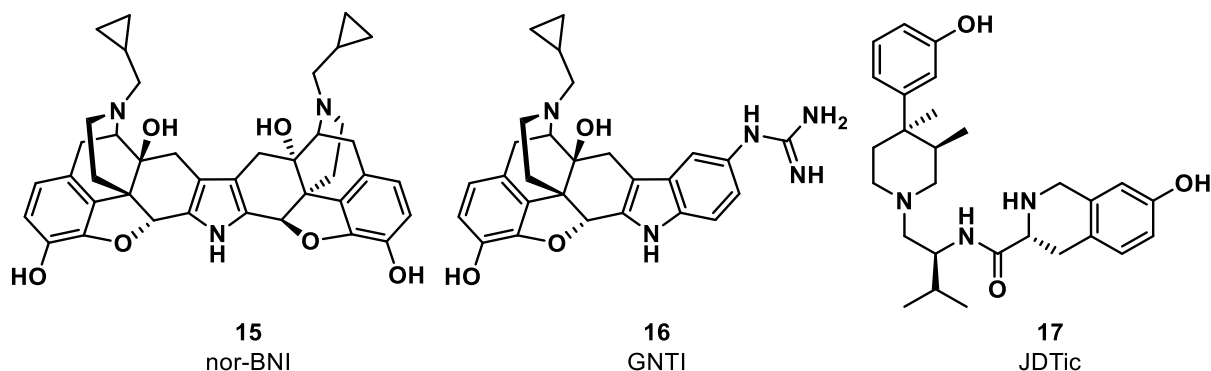
A D₁-dopamin receptor (D₁DR) a D₅-dopamin receptor mellett a D₁ receptorcsalád tagja. A dopamin (DA) az idegi jutalmazás elsődleges neurotranszmittere, amelyre az első meggyőző bizonyítékot Wise és munkatársai szolgáltatták.⁴⁵ Az opioidok képesek fokozni a jelátvitelt a középső agyban, az agytörzs tetején található ventrális tegmentális területen (VTA).^{46,47} Az így keletkezett magas számú DA a *nucleus accumbens*-be kerül, amely jutalmazó élmények során stimulálódik. Self és munkatársai leírták, hogy a mezolimbikus

D₁DR aktiválása egerekben gátolta a kábítószer-kereső magatartást.²⁸ Ezáltal a D₁DR agonisták potenciális gyógyszer-célpontként szolgálnak az opioidok okozta függőség kezelésében. A D₁ receptorok szabályozzák továbbá a memóriát, a tanulást és a neuronok növekedését, részt vesznek a mozgási aktivitásban, valamint modulálják a D₂-dopamin receptor által közvetített eseményeket.

2.1.4.3. A κ -opioid receptor (KOR)

Az opioid receptorok fontos célpontként szolgálnak a fájdalom kezelésében. Az endogén opioid peptidek és az exogén opioid gyógyszerhatóanyagok, illetve a kábítószeres hatását elsősorban az alábbi három különböző opioid receptor közvetíti: a μ - (MOR), a κ - (KOR) és a δ -opioid receptor (DOR).⁴⁸ A klinikailag használt kábító fájdalomcsillapítók elsősorban a MOR-on keresztül fejtik ki hatásukat. Habár még mindig őket tartják a súlyos fájdalomcsillapítás elsődleges eszközeinek, súlyos mellékhatásprofiljuk (függőség, légzésdepresszió, szedáció, stb) miatt alkalmazásukat egyre inkább korlátozzák.⁴⁹ A MOR agonisták káros hatásainak kiküszöbölése érdekében jelentős érdeklődés mutatkozott más, szelektív opioid receptor ligandumok kifejlesztésére. A DOR agonisták a súlyos görcsöket okozó mellékhatásaik miatt nem bizonyultak megfelelőnek.⁵⁰

A KOR agonisták és antagonisták esetén új terápiás alkalmazásokat ismertek fel, így még nagyobb érdeklődést váltottak ki.⁵¹ Annak dacára, hogy az elmúlt években számos KOR agonistát írtak le,^{52,53} a szelektív KOR antagonisták csak nagyon kevés figyelmet kaptak mint potenciális terápiás szerek. Az antagonisták a kábítószer megvonás által kiváltott negatív hatások blokkolásával képesek csökkenteni a megnövekedett gyógyszerbevitelt.⁵⁴ A két legtöbbet vizsgált hosszú hatású antagonista naltrexon-származék a **15** nor-binaltorfimin (nor-BNI) és az **16** 5'-guanidinonaltrindol (GNTI; 9. ábra). Az első nem opioid, szelektív és az eddigieknél erősebb KOR antagonista a **17** tetrahydroizokinolin egységet tartalmazó piperidinszármazék volt (JDTic).⁵⁵



9. ábra: A Nor-BNI (**15**), a GNTI (**16**) és a JDTic (**17**) szerkezeti képlete

A többi opioid receptor altípushoz képest a JD_{Tic} (17) molekula hosszú hatással, egy nagyságrenddel nagyobb affinitással és hozzávetőleg 1000-szeres szelektivitással rendelkezik a KOR-on (2. táblázat).

2. táblázat: A nor-BNI (15), a GNTI (16) és a JD_{Tic} (17) KOR iránti affinitásuk és szelektivitásuk összehasonlítása

Sorszám	Vegyület rövidítése	K _{i(k)} [nM]	K _{i(μ)} /K _{i(k)} [-]	K _{i(δ)} /K _{i(k)} [-]
1.	nor-BNI (15)	0,24	204	170
2.	GNTI (16)	0,18	125	257
3.	JD _{Tic} (17)	0,03	338	4935

A JD_{Tic} (17) csak a humán klinikai vizsgálatok 1. fázisáig jutott el a mellékhatásként kialakuló kamrai tahikardia miatt, amely a szívritmuszavar egyik típusa. Figyelemre méltó farmakológiai tulajdonságai miatt a JD_{Tic} (17) azonban továbbra is fontos ligandum a KOR kutatásában.^{56,57} A KOR szelektív antagonistái jelentős figyelmet kaptak további függőségek (alkohol, nikotin), depresszió, szorongásos zavarok vagy pszichózisos rendellenességek kezelésében is.⁵⁸

2.2. *In silico* és *in vitro* vizsgálatok áttekintése

2.2.1. Fehérjék és kismolekulák kölcsönhatásainak *in silico* vizsgálata

A fehérjék és kismolekulák kölcsönhatásainak *in silico* vizsgálata a gyógyszerkutatás keretében egyre fontosabb eszközzé vált, hiszen jelentős mennyiségű időt és pénzt képes megtakarítani a gyógyszerfejlesztési folyamatban.⁵⁹ A hatvanas évek elején a számítások elvégzésére alkalmas számítógépek megjelenésével fejlődésnek indultak a kvantitatív szerkezet-hatás összefüggéseket vizsgáló racionális eljárások. Módszertanilag ezeket a megközelítéseket két nagy csoportba oszthatjuk. Ha a célfehérje háromdimenziós szerkezete rendelkezésre áll, akkor szerkezetalapú, egyébként ligandumalapú gyógyszertervezésről beszélhetünk. A fehérjék szerkezetének kísérleti meghatározása elsősorban röntgenkristallográfiával, NMR-spektroszkópiával vagy krio-elektronmikroszkópiával (cryo-EM) lehetséges.^{60,61} Ha a fehérje szerkezete nem ismert, akkor a célfehérjével szekvenciálisan homológ, ismert szerkezetű fehérjén alapuló homológia modell elkészítése vagy az AlphaFold nevű mesterséges intelligencián alapuló program nyújthat segítséget a fehérje szerkezetének felderítésében.^{62,63} Ezek a modellek azonban esetleges pontatlanságuk miatt kisebb biztonsággal használhatóak fel a gyógyszertervezés során.

A szerkezetalapú gyógyszertervezés során egy molekula aktivitásának becslésére, illetve kötőmódjának leírására a dokkolás a legkézenfekvőbb módszer.⁶⁴ A dokkolással meghatározható a ligandum preferált térállása a fehérjében (pózok), valamint modellezhetőek az elektrosztatikus és a *van der Waals*-kölsönhatások, illetve a hidrogén-kötések is. A fehérje és a vizsgált ligandum között fellépő kölcsönhatás minőségét (kötődési szabadentalpia) dokkolási pontszámmal lehet jellemezni. Megfelelő pontozófüggvény használatával nemcsak az adott molekula különböző kötő konformációi hasonlíthatóak össze, hanem különböző molekulák vizsgálata is lehetővé válik, továbbá kiválaszthatóak lesznek az adott célfehérjén potenciálisan aktív szerkezetek is. Az első dokkolási módszerek a fehérjét a *Fischer* által javasolt „kulcs–zár” modellnek megfelelően merev, statikus egységként kezelték, amely messze áll a természetben tapasztalható viselkedéstől.⁶⁵ *Koshland* azt javasolta, hogy a pontosabb közelítés érdekében a fehérjét és a ligandumot a dokkolás során rugalmasnak kell tekinteni, hiszen a fehérje aktív helyének szerkezete a kismolekulával létrejövő kölcsönhatás miatt folyamatosan változik.⁶⁶ Tekintettel a számítógépes erőforrások korlátozottságára, a ma használt dokkoló algoritmusok többsége a ligandumot rugalmasnak, a receptort merevnek tekinti.⁶⁷ A dokkolás utáni további finomításhoz a rendszer időbeni változását leíró molekuladinamikai (MD) szimulációk alkalmazhatóak.⁶⁸

2.2.2. A kiválasztott ligandumok szerkezet–hatás összefüggéseinek (SAR)^{ix} vizsgálata

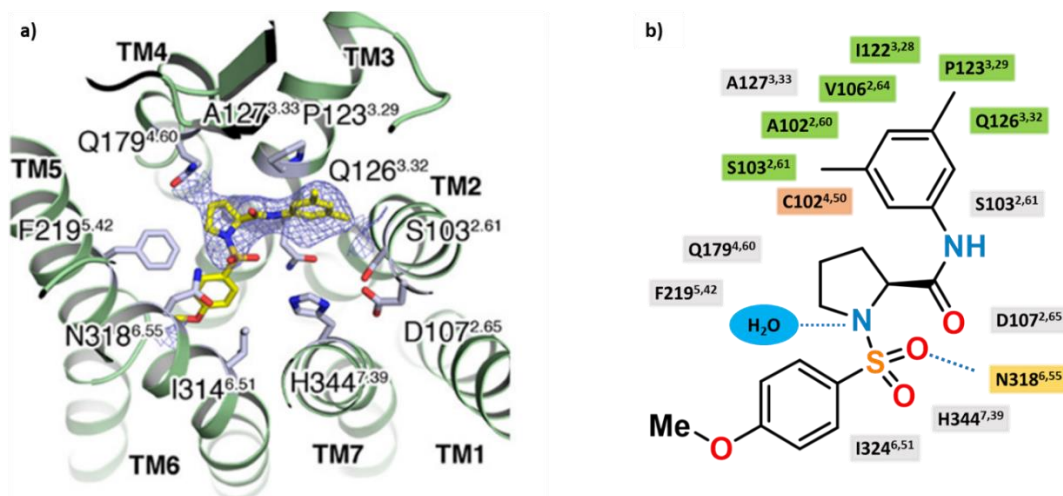
Ebben a fejezetben bemutatom az általunk fluoreszcens festékekkel módosítani kívánt ACT-462206 (2.2.2.1. *alfejezet*) és JD_{Tic} (2.2.2.3. *alfejezet*) antagonistá ligandumok *in silico* vizsgálatokkal alátámasztott szerkezet–hatás összefüggéseit. Az SKF-83566 molekula esetében az *in vitro* kísérletek eredményeiről számolok be, ugyanis a molekulával eddig még nem végeztek *in silico* vizsgálatokat (2.2.2.2. *alfejezet*).

2.2.2.1. Az ACT-462206 SAR elemzése

Rappas és munkatársai meghatározták tíz különböző antagonistá orexin receptorokkal (OX₁; OX₂) alkotott komplexének háromdimenziós szerkezetét egykristály-röntgendiffrakció segítségével.⁶⁹ Az ACT-462206 (**14**) az OX₁ fehérjével alkotott komplexében egy patkó alakú konformációt vesz fel (10. *ábra*).

^{ix} Structure–Activity Relationship

A 3,5-dimetilfenilamid rész az S103^{2,61}, A102^{2,60}, V106^{2,64}, I122^{3,28}, P123^{3,29}, és Q126^{3,32} aminosavak ^x (világoszöld, 10. ábra) által meghatározott hidrofób zsebben helyezkedik el.



10. ábra: A DORA ACT-462206 kötődése a humán OX₁ kristályszerkezetben
a) modellezés során készült ábra ⁶⁹ b) sematikus ábra

A dimetilfenil-egység a C102^{4,50} aminosavval ^{xi} (világosbarna, 10. ábra) való érintkezése miatt a vártnál kissé magasabbra tolja a gyűrűrendszert a zsebben. A pirrolidingyűrű szulfonamidcsoportja az extracelluláris oldal felé néz, ahol vízzel hidrogén-kötést hoz létre. A pirrolidingyűrűhöz kapcsolódó szulfonamid funkciós csoport egyik oxigénatomja az N318^{6,55} aminosavval (citromsárga, 10. ábra) alakít ki hidrogén-kötést. A 4-metoxifenilgyűrű közelében kialakuló kölcsönhatásokat nem tudták pontosan meghatározni. A ligandum kötődésében részt vevő fehérje egység, más néven kötőzseb a két orexin receptor esetében megegyezik.⁷⁰

2.2.2.2. Benzazepin-származékok SAR elemzése

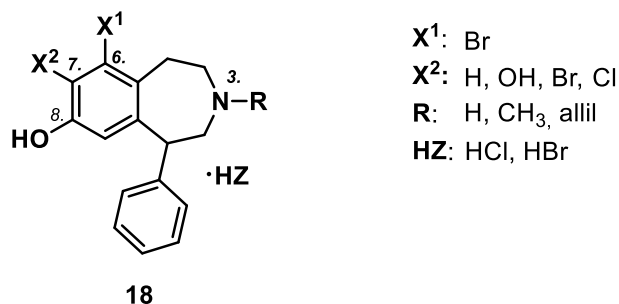
Az SKF-83566 molekula esetében szerkezet-hatás összefüggések elemzését változtatatosan szubsztituált 1-fenil-3-benzazepinek (**18**) *in vitro* vizsgálatával végezték el,⁷¹ számítógépes modellezéssel alátámasztott SAR elemzés nincs a szakirodalomban (11. ábra).

^x

A	Alanin	(Ala)
I	Izoleucin	(Ile)
P	Prolin	(Pro)
Q	Glutamin	(Gln)
S	Szerin	(Ser)
V	Valin	(Val)

^{xi}

C	Cisztein	(Cys)
N	Aszparagin	(Asn)



11. ábra: Változatosan szubsztituált 1-fenil-3-benzazepin-származékok (**18**)

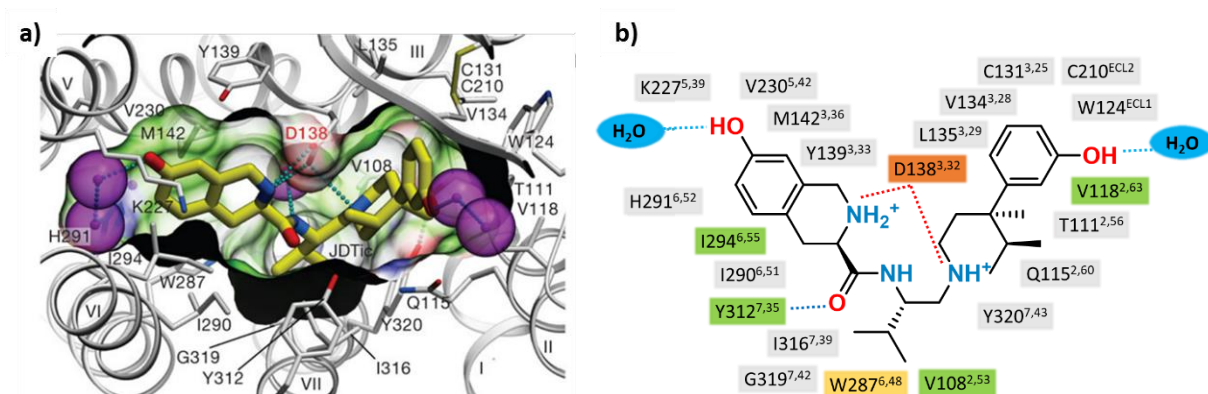
A SAR-vizsgálatok kimutatták, hogy a 7,8-dihidroxi-származékok erős és szelektív agonista hatást fejtenek ki a D₁ dopamin receptorokon. Az agonista hatás erősödik, ha a 6-os helyzetben halogént építünk be a molekulába.⁷² A 7-OH csoport hiányában a vegyületek antagonistá hatást fejtenek ki. A legnagyobb hatékonysággal kötődő, szelektív antagonisták a 3-as helyzetben metilcsoportot, míg a 7-es helyzetben halogént (Br, Cl) tartalmazó származékok. Ha a 3-as helyzetbe hosszabb telített alifás oldalláncot építettek be, akkor a vegyületek kisebb affinitást mutattak a receptor felé. Az *N*-allilcsoport az agonista jelleget erősen növeli, illetve hatására lipofilebb lesz a molekula és könnyebben átjut a vér–agy gáton keresztül a központi idegrendszerbe.

2.2.2.3. A JDTic SAR elemzése

A KOR és a JDTic kristályszerkezete a ligandum rendkívül szoros illeszkedését mutatja a receptor kötőhelyén.⁷³ A molekula protonált piperidin és tetrahydroizokinolin egységei a D138^{3,32} aminosavval^{xii} (*narancssárga*) sóhidakat (*piros szaggatott vonal*) alakít ki, amely V-alakú konformációba kényszeríti a molekulát (12. ábra). Míg a piperidin szerkezeti elem ionos kötése nélkülözhetetlen volt az antagonistá hatás létrejöttében, addig a tetrahydroizokinolin nitrogénjének szén-, oxigén- vagy kénatomra történő cseréje az affinitás csupán tíz-ötvenszeres csökkenésével járt. A SAR-vizsgálatok azt is kimutatták, hogy a molekula piperidin- és izokinolin-részein egyaránt fontosak a távoli hidroxilcsoportok, amelyek eltávolítása az affinitás körülbelül százszoros csökkenését eredményezte. Sokkal gyengébb hatást figyeltek meg a hidroxilcsoportok a metilezése vagy más poláris csoportokkal (pl. NO₂, NH₂, CONH₂, NHSO₂CH₃, stb.) történő helyettesítése során.⁵⁶ Ezek az eredmények a két hidroxilcsoport és a receptor közötti víz által közvetített hidrogén-kötések jelentőségére utalnak.

xii

D Aszparaginsav (Asp)



12. ábra: A nagy affinitású, szelektív JDTic antagonist kötődése a humán KOR kristályszerkezetben

a) modellezés során készült ábra⁷³ b) sematikus ábra

A JDTic kivételes altípus szelektivitásának szerkezeti alapja, hogy a kötőzsebben négy olyan aminosavval (I294^{6,55}, Y312^{7,35}, V108^{2,53}, V118^{2,63}, világoszöld, 12. ábra)^{xiii} lép kölcsönhatásba, amelyek a többi opioid receptorban nem találhatók meg. A nor-BNI (**15**) és a GNTI (**16**; 9. ábra; 17. oldal) *N*-ciklopropilmetil részéhez hasonlóan a JDTic izopropilcsoportja szintén mélyen behatol az ortosztérikus zsebbe, ahol hidrofób kölcsönhatást hoz létre a konzervált W287^{6,48} aminosav^{xiv} oldalláncával (citromsárga, 12. ábra). Ez a kölcsönhatás blokkolja a receptor aktiválásával kapcsolatos konformációs változásokat, amely az antagonist hatás kialakulásáért felelős. A JDTic-en és származékain végzett kiterjedt szerkezet–hatás összefüggések felderítése fontos betekintést engedett a JDTic kötődésének jellemzésébe és megértésébe.³⁸

^{xiii}

I	Izoleucin	(Ile)
Y	Tirozin	(Tyr)
V	Valin	(Val)

^{xiv}

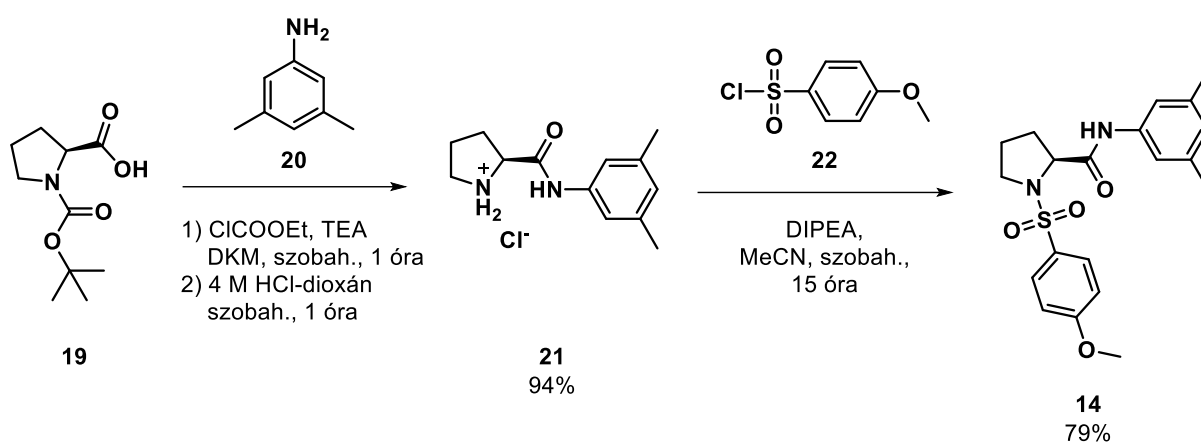
W	Triptofán	(Trp)
---	-----------	-------

2.3. Szintetikus kémiai módszerek

Az alábbi fejezetben az ACT-462206 (OX₁, OX₂) ligandum, az SKF-83566 (D₁DR) anilin, valamint a JD₁Tic (KOR) ligandum szakirodalomban szereplő szintéziseit mutatom be.

2.3.1. Az ACT-462206 (OX₁, OX₂) szintézise

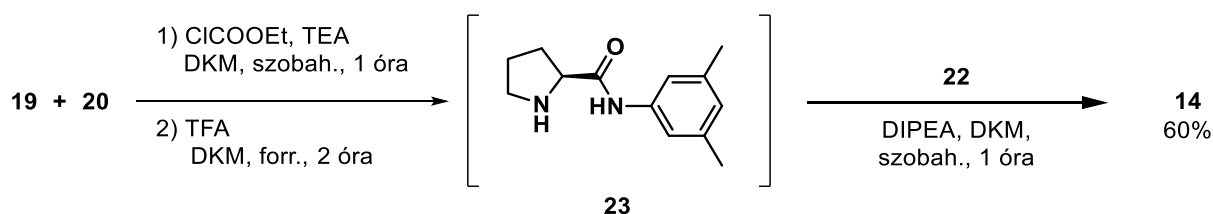
Az ACT-462206 nevű nem szelektív orexin-antagonistát két úton is előállíthatjuk az acilezés és a szulfonamid képzés sorrendjének tetszőleges megválasztásával.⁷⁴ Az egyik esetben először a *tert*-butoxikarbonil-csoporttal (Boc) védett L-valint (**19**) és a 3,5-dimetilanilint (**20**) kapcsolták etil-klórformiát és trietil-amin (TEA) jelenlétében (13. ábra).



13. ábra: Az ACT-462206 lineáris szintézise *N*-Boc-L-prolinból (**19**) kiindulva

Ezt követően a Boc védőcsoportot hidrogén-klorid 4 M-os dioxános oldatával eltávolították, és kinyerték a **21** sósavas sót. Végül 4-metoxibenzolszulfonil-kloriddal (**22**) szulfonamidot (**14**) képeztek DIPEA jelenlétében. A nyersterméket normál fázisú oszlopkromatográfia segítségével 79%-os termeléssel izolálták.

A **14** vegyület előállítását a 13. ábra szerinti szintézishez hasonló módon *egy-üst* reakcióban is megvalósították (14. ábra). Ekkor a Boc-védőcsoport eltávolítására trifluorecetsavat (TFA) használtak, a végterméket pedig etanol/metilciklohexán oldószerkelegyből történő átkristályosítással kapták meg 60%-os hozammal.



14. ábra: Az ACT-462206 (**14**) egy-üst szintézise *N*-Boc-L-prolinból (**19**) kiindulva

A másik esetben L-prolinból (**24**) először a **22** vegyülettel szulfonamidot képeztek nátrium-hidroxid jelenlétében (15. ábra), majd egy-üst reakcióban tionil-klorid és *N*-metilmorfolin (NMM) jelenlétében kapcsolták a **20** anilinnel.

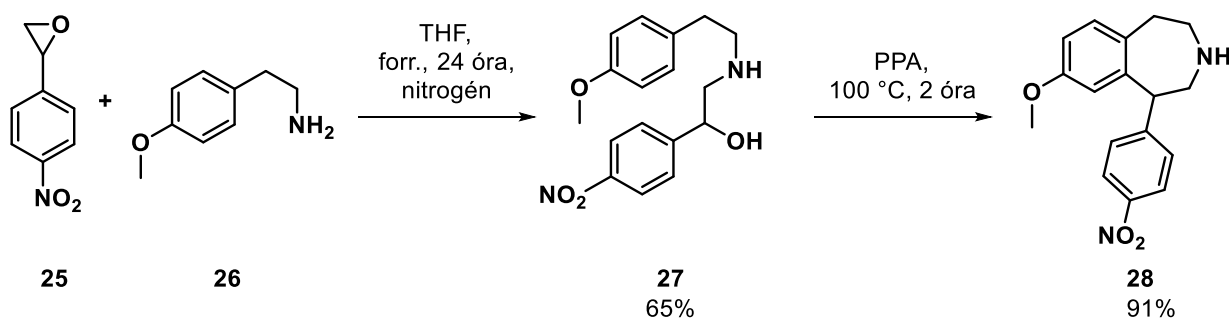


15. ábra: Az ACT-462206 (**14**) egy-üst szintézise L-prolinból (**24**) kiindulva

A tiszta **14** szulfonamidot izopropil-acetát/metilciklohexán oldószerkelegyből átkristályosítva 60%-os hozammal kapták meg.

2.3.2. Az SKF-83566 (D₁DR) anilin származék szintézise

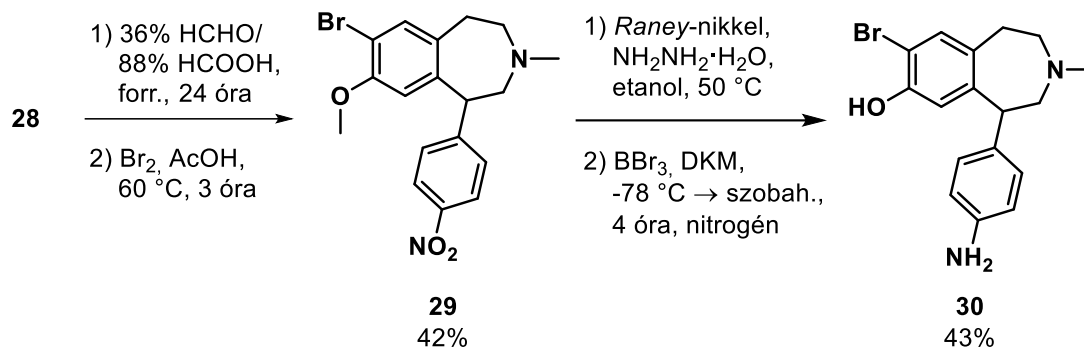
Ebben az alfejezetben az SKF-83566 anilin származék ismert szintézisét mutatom be. Az első lépésben 2-(4-nitrofenil)oxiránból (**25**) és 2-(4-metoxifenil)etánaminból (**26**) kiindulva állították elő a **27** vegyületet az oxirángyűrű felnyílásával járó *N*-alkilezésben (16. ábra).⁷⁵ A **27** köztitermékből polifoszorsavval (PPA) 100 °C-on alakították ki a tetrahydrobenzazepin-gyűrűt tartalmazó **28** származékot.



16. ábra: A **28** köztitermék előállítása az SKF-83566 anilin származék (**30**) szintézise során

A **28** szekunder aminocsoportját szelektíven metilezték hangyasav és formaldehid elegyében 24 órás forralással (17. ábra). A metoxicsoport melletti pozíciót szelektíven brómozták elemi brómmal ecetsavban.²⁹ Az így keletkezett monobrómozott származék (**29**) nitrocsoportját katalitikus transzfer hidrogénezéssel redukálták Raney-nikkel és hidrazin-hidrát

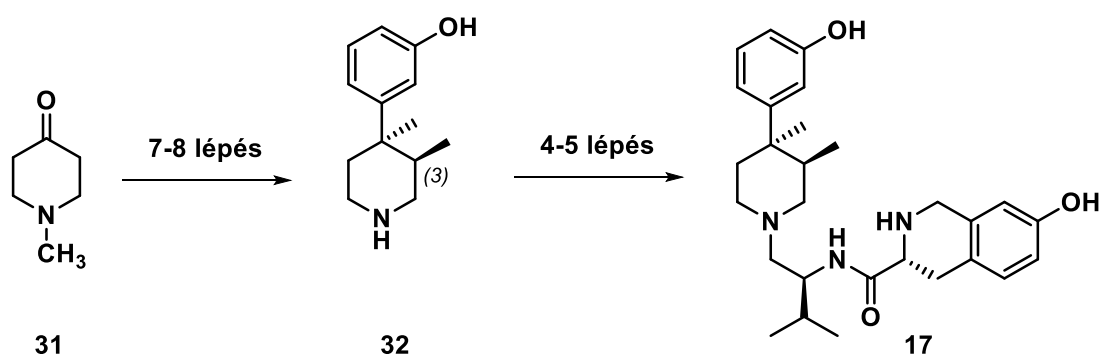
jelenlétében etanolban. Végül a metoxicsoport demetilezését bór-tribromiddal végezték inert körülmények között diklórmetánban, így jutottak a **30** célvegyülethez.



17. ábra: Az SKF-83566 amin származék (**30**) szintézise a **28** köztitermékéből kiindulva

2.3.3. A JDTic (KOR) szintézise

A JDTic (**17**) előállításához szükséges kulcsintermedier *transz*-3,4-dimetil-4-arilpiperidin származék (**32**) szintézise számos szintetikus kihívást hordoz (18. ábra). A szintézis egyik intermediere neurotoxicitást okoz, amely a *Parkinson*-kórhoz hasonló tünetekhez vezet.⁷⁶ A C3-metilcsoport sztereokémiájának szabályozásában csak mérsékelt szelektivitás érhető el, valamint a **32** előállítása jellemzően hosszú, 7–8 lépéses szintézisutat igényel. A **32** kulcsintermedier előállítására később több szintézisút is született, amely részben megoldotta ezeket a problémákat.^{77,78} A neurotoxicitást különböző védőcsoportok alkalmazásával kerülték el,⁷⁹ míg a többi problémát alternatív reakciólépésekkel igyekeztek kiküszöbölni.⁸⁰

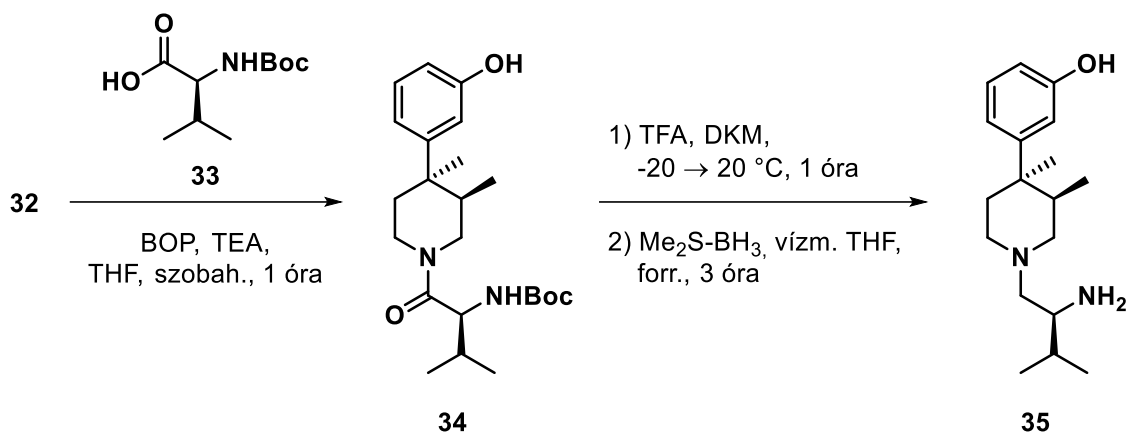


18. ábra: A szintézis kiindulási anyaga (**31**), a kulcsintermedier (**32**) és a JDTic (**17**) célvegyület

Thomas és munkatársai a **32** kulcsintermedierből kiindulva 5 lépésben állították elő a JDTic (**17**) célvegyületet.⁸¹ Először a **32** molekulát a **33** Boc-L-valinnal acilezték BOP^{xv} és TEA jelenlétében, majd a **34** vegyület Boc-védőcsoportját TFA-val eltávolították. Az így kapott

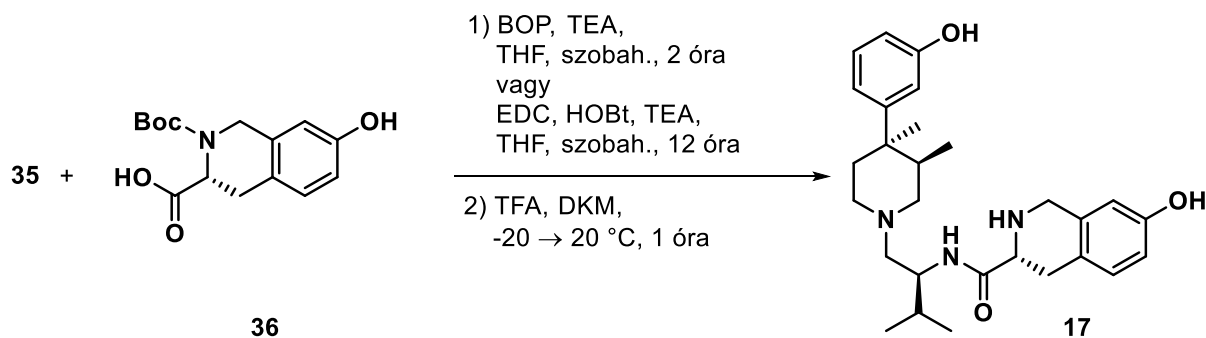
^{xv} benzotriazol-1-iloxi[tris(z(dimetil-amino))foszfónium-hexafluorofoszfát (BOP)

amidot borán-dimetil-szulfid komplex segítségével vízmentes körülmények között tetrahydrofuranban redukálták, így a **35** származékhoz jutottak (19. ábra). Egy szabadalom alapján az amidkötés redukciója diboránnal vízmentes tetrahydrofuranban két órán keresztül forralva is megvalósítható kvantitatív termeléssel.⁸²



19. ábra: A **32** kulcsintermedierből a **35** vegyület előállítása

Ezt követte a **35** amin kapcsolása BOP és TEA jelenlétében a **36** tetrahydroizokinolin karbonsavhoz (20. ábra). Ez az acilezés megvalósítható EDC és HOBt^{xvi} kapcsolószerek, valamint TEA jelenlétében is.⁸³ Végül a Boc-védőcsoportot TFA segítségével eltávolították. A publikált receptekben termelés adatokat nem tüntettek fel.⁸¹

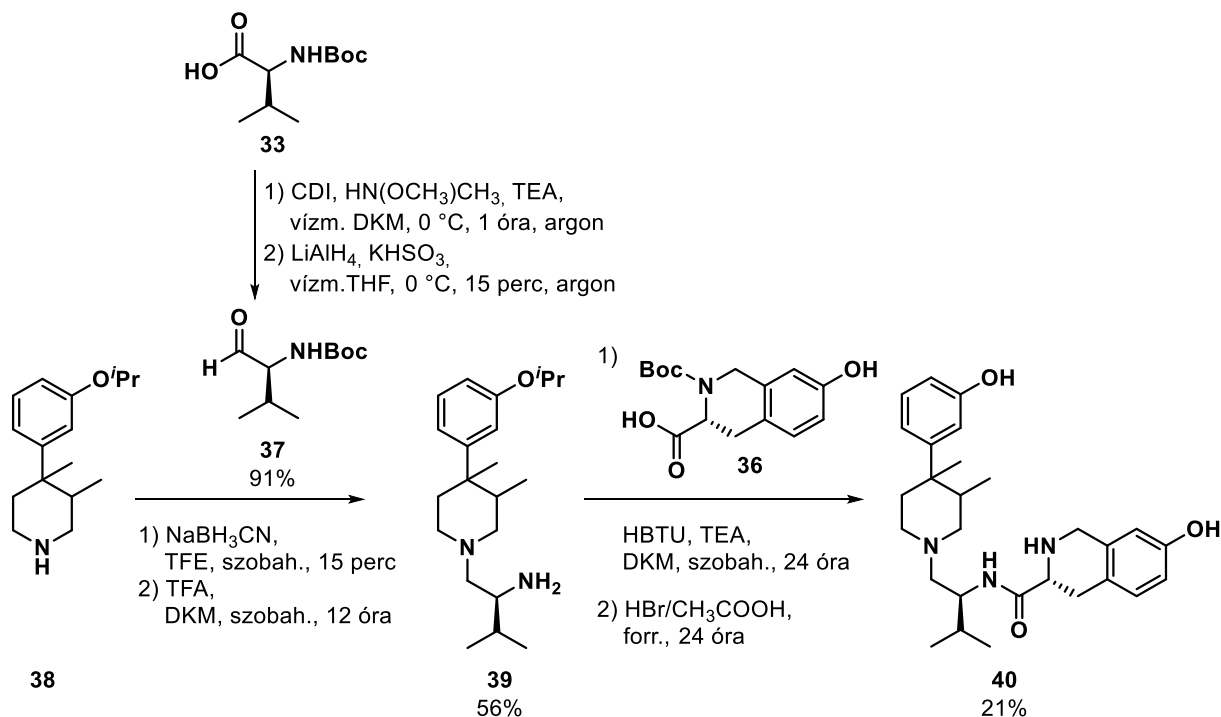


20. ábra: A **35** vegyületből az **17** célvegyület előállítása

Carroll és munkatársai a kulcsintermedier racém *O*-izopropilezett származékából (**38**) indultak ki, és 4 lépésben nyerték ki a **40** vegyületet (21. ábra).⁸³ Először Weinreb-amidot állítottak elő Boc-L-valinből (**33**) és *N,O*-dimetilhidroxil-aminból 1,1'-karbonildiimidazol (CDI) és TEA segítségével inert körülmények között,⁸⁴ majd az így kapott amidot lítium-alumínium-hidriddel redukálták a **37** aldehiddé. A **38** amint a **37** aldehiddel egy redukatív

^{xvi} etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC)
1-hidroxi-benzotriazol (HOBt)

aminálás során reagáltatták NaBH_3CN jelenlétében 2,2,2-trifluoetanolban (TFE). A Boc-védőcsoportot TFA-val távolították el, és 56%-os termeléssel izolálták a **39** származékot. A **39** primer amint és a **36** karbonsavat HBTU kapcsolószer^{xvii} és TEA jelenlétében reagáltatták, majd az izopropil- és Boc-védőcsoportot hidrogén-bromidos ecetsavval eltávolították és a **40** tetrahydroizokinolinhoz jutottak 21%-os termeléssel.



21. ábra: A **40** tetrahydroizokinolin előállítása a **38** piperidinből kiindulva

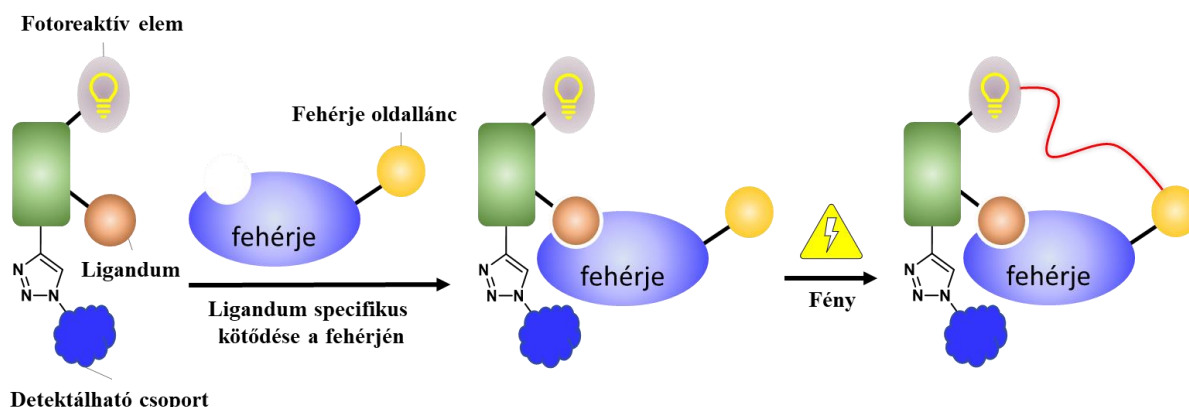
2.4. Fotoaffinitás jelölési technika

A modern gyógyszerkutatásban elterjedt eszközként alkalmazzák a fotoaffinitás jelölést (PAL), mivel egy hatékony módszert kínál az új gyógyszercélpontok és a molekuláris kölcsönhatások vizsgálatára, valamint segítségével azonosíthatóak a fehérjék új vagy alternatív kötőhelyei is.⁸⁵ A módszer számítógépes molekulamodellezéssel kiegészítve felhasználható ligandum–receptor komplexek tervezésére is.

A PAL során a vizsgálandó fehérjével specifikus és reverzibilis kölcsönhatásokat kialakító ligandumot egy fotoreaktív elemmel látják el, amely meghatározott hullámhosszú fénnel történő bevilágítás hatására kovalens kötést létesít a környezetében lévő fehérje oldalláncaival (22. ábra).⁸⁶ A ligandumhoz egy detektálható csoportot (radioaktív, fluoreszcens, immunoreaktív) is kapcsolhatunk, amellyel lehetővé válik a megjelölt fehérjék azonosítása, valamint a kötőhely szerkezetének és elhelyezkedésének vizsgálata. Erre egy robusztus lehetőséget kínál a napjainkban Nobel-díjjal elismert klikk-kémia,⁸⁷ ezen belül is

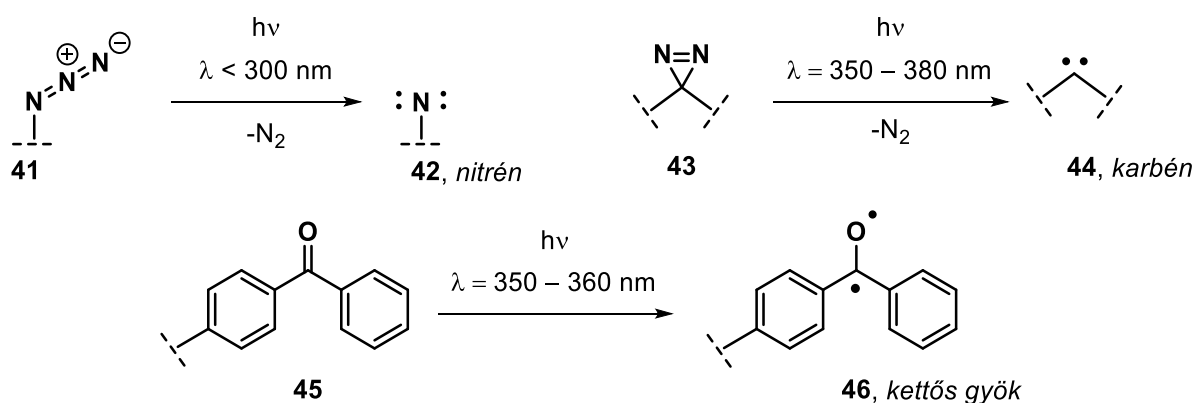
^{xvii} N,N,N',N' -tetrametil- O -(1H-benzotriazol-1-il)urónium-hexafluorfoszfát (HBTU)

leggyakrabban a réz(I)-sók által katalizált azid–alkin 1,3-dipoláris cikloaddíciót (CuAAC) alkalmazzák.⁸⁸



22. ábra: Fotoaffinitás jelölési kísérlet sematikus ábrája

A PAL-hez közkedvelt fotoreaktív csoportok az (aril)azidok (**41**), a diazirinek (**43**) és a benzofenonok (**45**), amelyek fotoaktiválási mechanizmusát a 23. ábra szemlélteti.^{89,90}



23. ábra: Fotoaffinitás jelölési mechanizmusok

Az (aril)azidokból (**41**) és a diazirinekből (**43**) fénnel történő besugárzás hatására, nitrogén eliminációt követően nitrén (**42**), illetve karbén (**44**) keletkezik. A benzofenonok (**45**) esetén az aktiválás során egy reaktív kettős-gyök (**46**) alakul ki. A három bemutatott fotoreaktív elem közül a diazirinek (**43**) alkalmazása a legelőnyösebb, mivel kis mérettel, nagy stabilitással rendelkeznek és a kovalens kötés kialakításához szükséges bevilágítás hullámhossza is megfelelő tartományba esik. Az (aril)azid (**41**) származékok hátránya, hogy a 300 nm hullámhossz alatti besugárzás erősen károsíthatja a fehérjéket, míg a benzofenonok (**45**) esetében a nagy térkitöltésű csoportok akadályozhatják a fehérjéhez való hozzáférésüket, valamint a hosszú besugárzási idejük miatt előfordulhat nem specifikus jelölés is.

A fotoaffinitás jelölésre alkalmas vegyületek előnye, hogy a kovalens kötést kontrollált körülmények között, tehát adott időben, meghatározott hullámhosszú fénnel bevilágítva lehet kialakítani. Emellett nem szükséges specifikus aminosav jelenléte, hiszen az X-H típusú kötésekbe (ahol X = O, N, NH, S) képesek beékelődni.

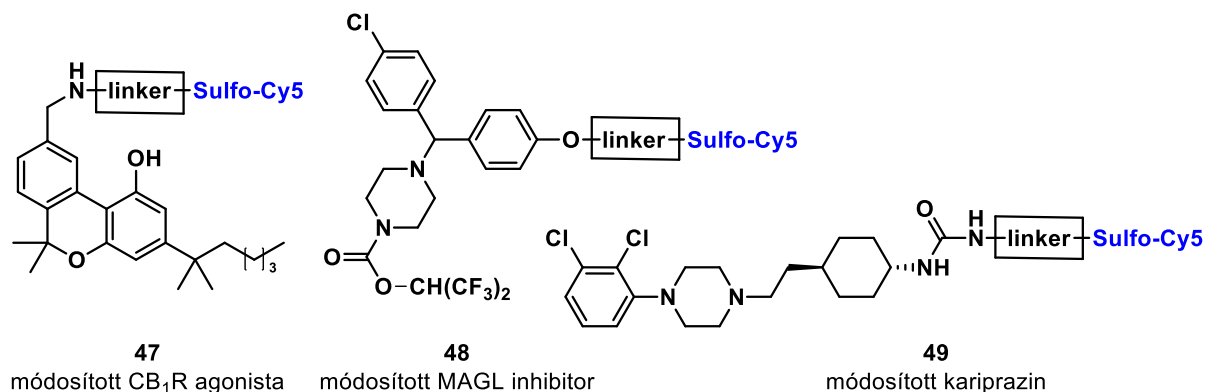
2.5. A kutatócsoportunk eddigi eredményei, a PharmacoSTORM

Kutatócsoportunk a KOKI Molekuláris Neurobiológiai Laboratóriumával együttműködve kidolgozott egy új szuperfelbontású mikroszkópos módszert, amellyel nanométeres pontossággal, egyenként lehet detektálni a különböző sejtekhez kötődő gyógyszermolekulákat. A PharmacoSTORM nevű technológiát, valamint a segítségével elért első eredményeket 2021-ben a *Nature Communications* folyóirat közölte.³

A gyógyszerek kötődésének vizsgálatára a leggyakrabban alkalmazott módszer az antitest alapú immunjelölés,⁹¹ valamint a radioligand alapú autoradiográfia.⁹² Az immunjelölés hátránya, hogy ritkán áll rendelkezésre érzékeny és specifikus antitest, valamint a nagy méretük miatt nehezen jutnak el a megfelelő helyre és találják meg a célfehérjét. A radioligand alapú autoradiográfiával pedig csak korlátozott térbeli felbontás érhető el. Ezek a módszerek tehát csak speciális esetben adnak lehetőséget arra, hogy a gyógyszermolekulák valós hatásmechanizmusa feltérképezhető legyen. A fluoreszcens festékkel jelölt gyógyszermolekulák és a STORM (Sztochasztikus Optikai Rekonstrukciós Mikroszkópia) szuperfelbontású képalkotásának együttes alkalmazása révén viszont olyan vizsgálati módszer vált elérhetővé, amely megkönnyíti és ezáltal új alapokra helyezheti a fehérjék működésének vizsgálatát.

A módszer kifejlesztéséhez az agyban leggyakrabban előforduló CB₁ kannabinoid (CB₁R) G-fehérje kapcsolt receptort használták fel. A hidroxikannabinol ligandumot egy alifás linkerrel keresztül szulfo-cianin-5 festékkel (Sulfo-Cy5) kapcsolva hozták létre a **47** fluoreszcens agonistát (24. ábra). A **47** ligandum szerkezetét előzetesen *in silico* dokkolási kísérletekkel tervezték meg. Ezt követően a módosított **47** ligandummal kötődési és funkcionális méréseket végeztek a CB₁R-on. A nagy affinitás mellett ($K_i = 3,5$ nM) a **47** vegyület kiváló szelektivitást is mutatott a CB₁ fehérjére nézve.

Egy másik kísérletsorozatban a PharmacoSTORM alkalmazhatóságát tesztelték egy, a Leideni Egyetemen előállított monoacilglicerín-lipáz (MAGL) inhibitor, valamint a skizofrénia és az I. típusú bipoláris zavar kezelésében sikeresen alkalmazott kariprazinnal. A ligandumokat ezúttal is szulfo-cianin-5-azid fluoreszcens festékhez (Sulfo-Cy5-azid; **48**, **49**)^{xviii} kapcsolták.



24. ábra: A PharmacoSTORM módszerrel eddig vizsgált fluoreszcens ligandumok

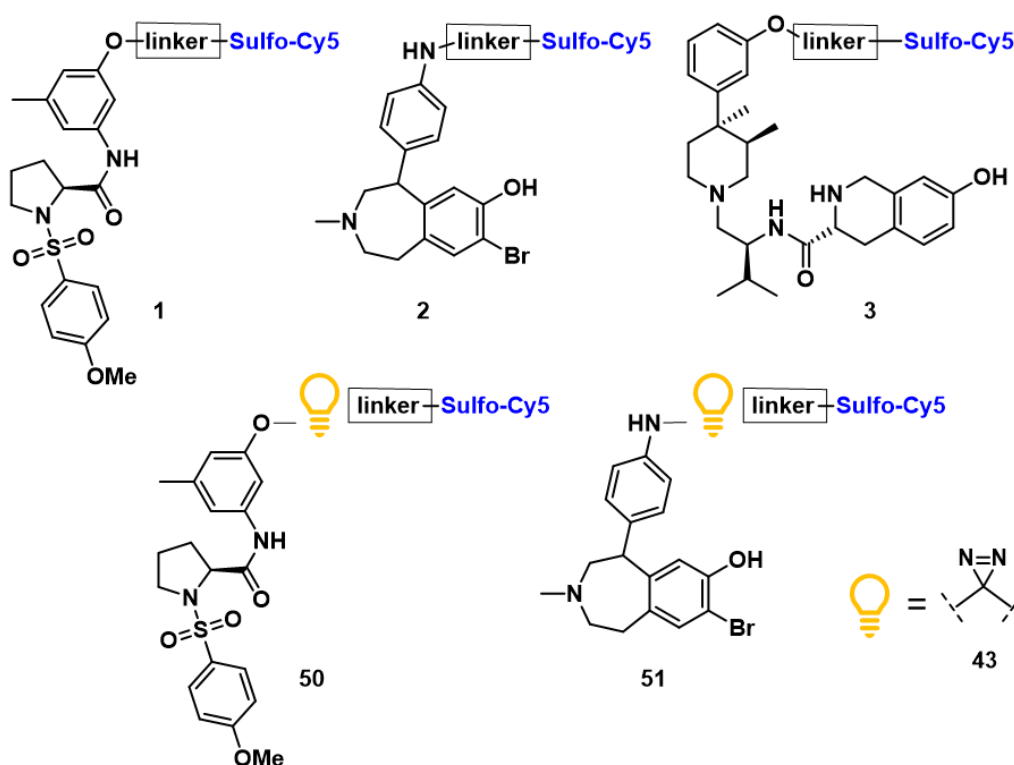
Az új eljárás segítségével felfedezték, hogy a kariprazin fő kötőhelyeként szolgáló D₃ dopamin receptorok a *Calleja*-szigetek szemcsesejtjeinek axonjain találhatók. Ez a felfedezés új utakat nyithat meg a kariprazin hatásmechanizmusának megértésében.

Összességében elmondható, hogy a PharmacoSTORM módszer széleskörű alkalmazhatóságát bebizonyították GPCR-ok, ioncsatornák és enzimek esetében is. Ezek az eredmények együttesen azt mutatják, hogy az eljárás új és hatékony lehetőséget kínál további pszichiátriai betegségek, mint például a bipoláris zavar, a szenvedélybetegség kialakulásának vizsgálatához, valamint az opioidok okozta függőség előfordulásának hátterében álló folyamatok megértéséhez és ezáltal a hatékony terápiás célpontok felfedezéséhez.

^{xviii} Sulfo-Cy5 szerkezeti képlete lsd. 7 vagy 90. oldal

3. CÉLKITŰZÉS

Tudományos diákköri munkám célja a kutatócsoportunk és a KOKI Molekuláris Neurobiológiai Laboratóriuma által nemrégiben kidolgozott PharmacoSTORM módszer felhasználása olyan fehérjecélpontok azonosítására, amelyek új terápiás lehetőséget kínálhatnak az opioid függők hatékonyabb kezelésére. A vizsgált receptorok kiválasztásánál figyelembe vettük a kísérleti úton meghatározott háromdimenziós szerkezetek elérhetőségét, amelyek szükségesek voltak az előzetes *in silico* vizsgálatok elvégzéséhez. A megfelelő farmakológiai funkcionalitás (agonista, antagonist), illetve a szintetikus megvalósíthatóság figyelembevételével minden receptorhoz kiválasztottunk egy-egy olyan ligandumot, amelyhez egy linkeren keresztül a mikroszkópai vizsgálatokhoz szükséges szulfo-cianin-5 fluoreszcens festéket hozzákapcsoltuk (25. ábra). További célunk volt fotoaffinitás jelölésre alkalmas származékok (50, 51) előállítása is diazirin egység (43) beépítésével. Ezekről a fotoaktiválható vegyületektől nagyobb hatékonyságot várunk a mikroszkópos vizsgálatok során, hiszen a megfelelő hullámhosszú fénnel történő bevilágítás hatására kovalensen képesek hozzákötődni a vizsgálandó fehérjéhez. Így a mikroszkópos vizsgálatok mintaelőkészítése során kevesebb fluoreszcens ligandum mosódik le és a mérés hatékonyabbá válik.



25. ábra: A tudományos diákköri munkám során modellezni, majd előállítani kívánt vegyületek általános szerkezete

4. SAJÁT MUNKA

Ebben a fejezetben először a számításos kémiai modellezésről számolok be (4.1. fejezet), majd a dokkolás során meghatározott szerkezetű vegyületek előállítását mutatom be (4.2. fejezet). Végül összefoglalom az előállított fluoreszcens ligandumokkal eddig rendelkezésre álló biológiai eredményeket (4.3. fejezet).

4.1. Számításos kémiai modellezés

Az orexin receptor, illetve D₁DR számításos kémiai modellezését Dr. Ábrányi-Balogh Péter és Dr. Kiss Dóra Judit segítségével végeztem el, míg a KOR esetén a pontos szerkezetet Dr. Kiss Dóra Judit határozta meg. A modellezés pontos menete, paraméterei, valamint az alkalmazott programok leírása megtalálható az 5.1. fejezetben.

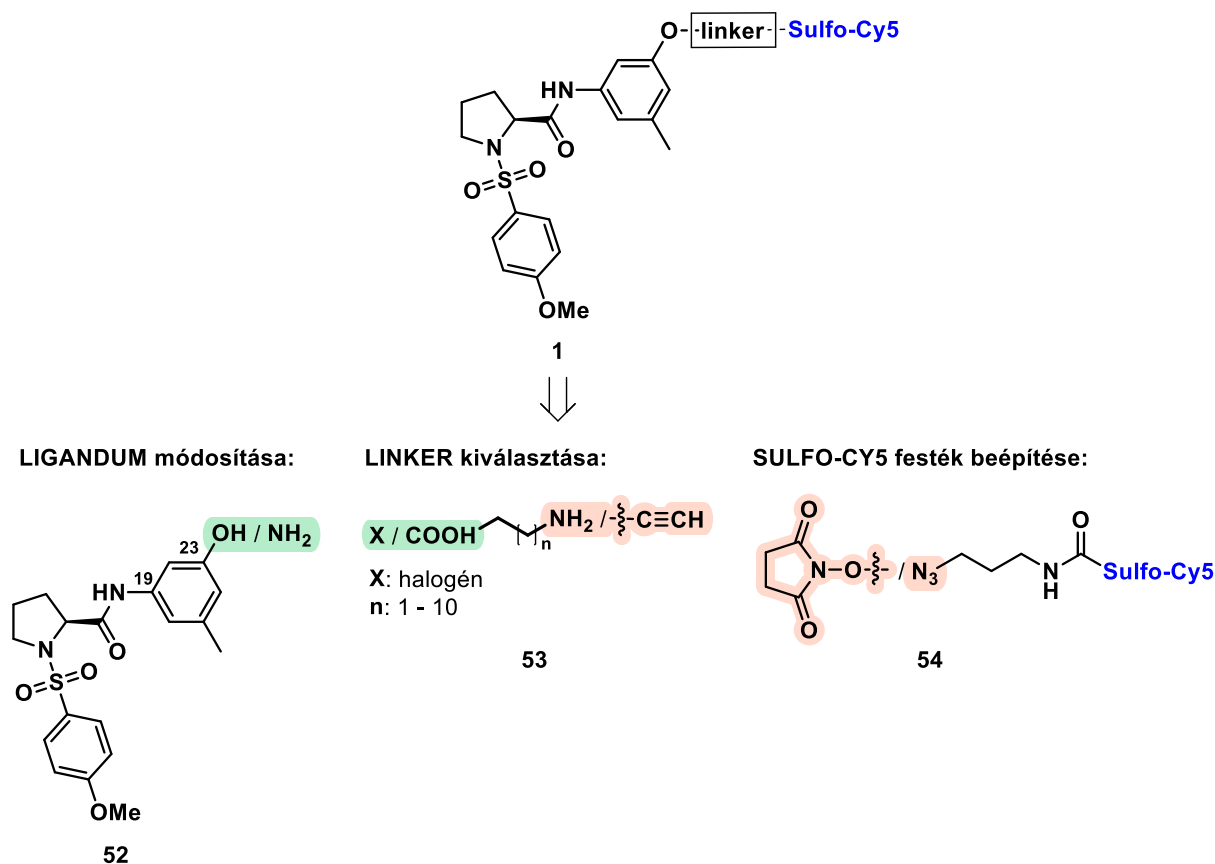
Először a rendelkezésre álló szakirodalom alapján megvizsgáltuk, hogy az adott fehérjék esetén mely ligandumokkal kristályosítva érhető el a GPCRdb adatbázisban a modellezéshez szükséges háromdimenziós szerkezet. Ezek alapján szintetikus szempontok szerint kiválasztottunk egy-egy olyan kismolekulát, amelyek szerkezetét úgy kívántuk módosítani, hogy egy alifás linkeren keresztül lehetővé váljon a szulfo-cianin-5 fluoreszcens festék kapcsolása. Ezt követően a ligandumot és a festéket összekötő alifás linker hosszát dokkolási kísérletekkel meghatároztuk. A linker megfelelő hossza kulcsfontosságú, ugyanis, ha túl rövid, akkor a festék nagy méretéből adódóan akadályozza a ligandum bejutását a kötőzsebbe. Túl hosszú linker alkalmazása esetén pedig a hidrofób alifás lánc feltekeredhet, nehezítve a ligandum specifikus kötődését a receptorban. Mindkét eset a vegyület adott fehérjével szembeni affinitásának számottevő csökkenéséhez vezethet. A kapcsolást szintetikus megfontolás alapján CuAAC^{xix} klikk-reakcióval vagy acilezéssel terveztük megvalósítani.

4.1.1. A módosított ACT-462206 ligandumok dokkolásának eredményei

Az ACT-462206 származék tervezése során elsőként meghatároztuk a ligandummal kristályosított OX₁ receptor háromdimenziós szerkezetéből (6TP4, aktív szerkezet, 5.1. fejezet, 6. táblázat),⁶⁹ hogy a molekula mely részén építhető be linkeren keresztül a festék anélkül, hogy a ligandum fehérjéhez való affinitása számottevően csökkenne. A linker beviteléhez a C23 atomon hidroxilcsoport kialakítása célszerű, mivel egy aminocsoport jelenléte a C19 atomhoz kapcsolódó aminocsoport acilezése során szelektivitási problémákhoz vezetne (52, 26. ábra). A hidroxilcsoportra a linkert alkilezéssel érdemes kapcsolnunk, hiszen így egy stabilabb, éter típusú kötés jön létre az acilezéssel kialakított észter kötéshez képest (53). A linker

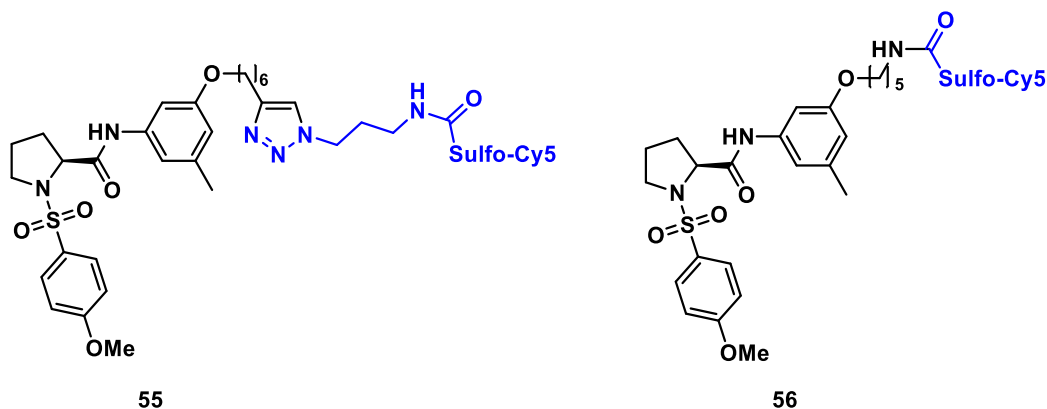
^{xix} réz(I)-katalizált azid–alkin cikloaddíció (copper-catalysed azide–alkyne cycloaddition)

festékkapcsoláshoz szükséges funkciós csoportja lehet amin vagy terminális acetilén (53), amelyhez a szulfo-cianin-5 festéket a kereskedelemben elérhető NHS-észterként vagy azidként kapcsolhatjuk (54).



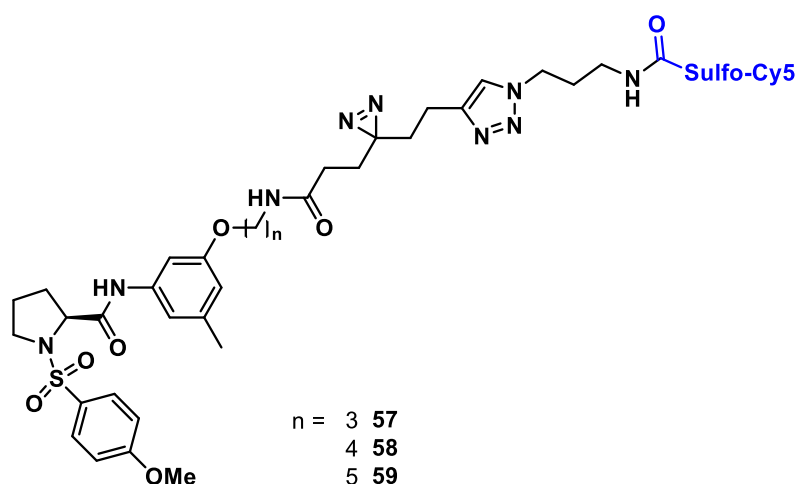
26. ábra: Az 1 módosított ACT-462206 ligandum tervezése

A linker hosszának tervezése során megvizsgáltuk a szulfo-cianin-5 festék klikk-reakcióval, illetve acilezéssel történő kapcsolásának a lehetőségét is. Az alábbi két szerkezettel kaptuk a legjobb eredményeket, mivel ekkor a festék nem akadályozta a módosított ligandum bejutását a fehérje kötőzsebébe (8.1.1. alfejezet; 59. ábra; a) és b) háromdimenziós szerkezet). Végül szintetikus megfontolások alapján választottuk ki az előállítani kívánt 55 célvegyületet (27. ábra).



27. ábra: A dokkolás során legjobbnak bizonyult fluoreszcens ACT-462206 ligandumok

Ezt követően elvégeztük a dokkolást a fotoaktiválható diazirin-egységet tartalmazó fluoreszcens ligandum esetén is (28. ábra), hogy meghatározzuk a ligandumot és a diazirin egységet összekötő linker hosszát. A függelékben az 8.1.1. alfejezetben szereplő 62–63. ábrákon is látszik, hogy a diazirin funkciós csoport csupán a három szénatomos linker esetén kerül kellően közel a fehérjéhez. Ez a közelség szükséges ahhoz, hogy adott hullámhosszú fény hatására kovalens kötést tudjon kialakítani egy erre megfelelő aminosav oldalláncával (8.1.1. alfejezet; 59. ábra; c) és d) háromdimenziós szerkezetek). Mindezek alapján az 57 fotoaktív fluoreszcens ligandum előállítását tűztük ki célul.



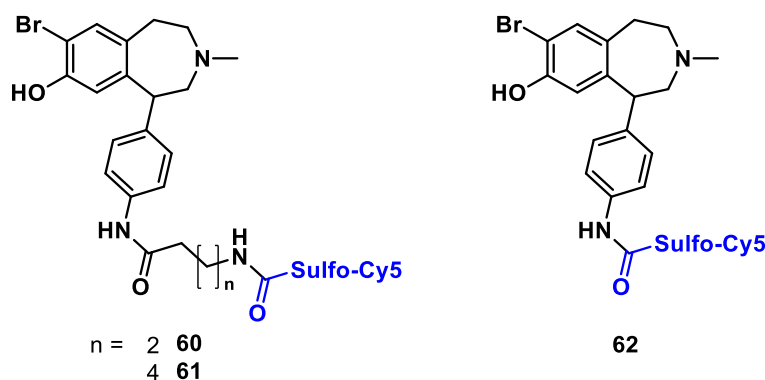
28. ábra: A fotoaktív egységet tartalmazó ACT-462206 ligandumok szerkezete

A dokkolásokból megállapítottuk, hogy az általunk fluoreszcens festékekkel módosított ligandumok az irodalmi részben tárgyalt (2.2.2.1. alfejezet) hidrofób kötőzsebben helyezkednek el, valamint a szulfonamid-funkciós csoport egyik oxigénatomja szintén hidrogén-kötést alakít ki az Asp318^{6,55} aminosavval (60–63. ábrák). A dokkolt szerkezetek esetén a módosított ligandumok és a humán OX₁ fehérje háromdimenziós szerkezeti ábrái, valamint a kölcsönhatástérképek a 8.1.1 alfejezetében megtalálhatóak.

4.1.2. A módosított SKF-83566 ligandumok dokkolásának eredményei

Az SKF-83566 ligandumot BODIPY festékekkel korábban már összekapcsolták, így a szakirodalomban leírt pozícióban módosítottuk a szerkezetet.²⁹ A BODIPY típusú festékek az Alexa Fluor 647, a Sulfo-Cy5 vagy a Biotium CF660 festékekkel szemben azonban nem képesek a STORM mérések alapjául szolgáló, úgynevezett „*blinking*” jelenségre, így szükséges volt egy új fluoreszcens molekula előállítása.⁹³ A felsorolt számunkra alkalmas festékek közül a Sulfo-Cy5 fluoreszcens festék a legkönnyebben elérhető és a legolcsóbb, így ezt alkalmaztuk a későbbiekben. A fehérjével történő tervezés során (7CRH, aktív szerkezet, 5.1. fejezet, 6. táblázat)⁹⁴ abban az esetben kaptuk a legjobb eredményeket, ha a fluoreszcens festéket

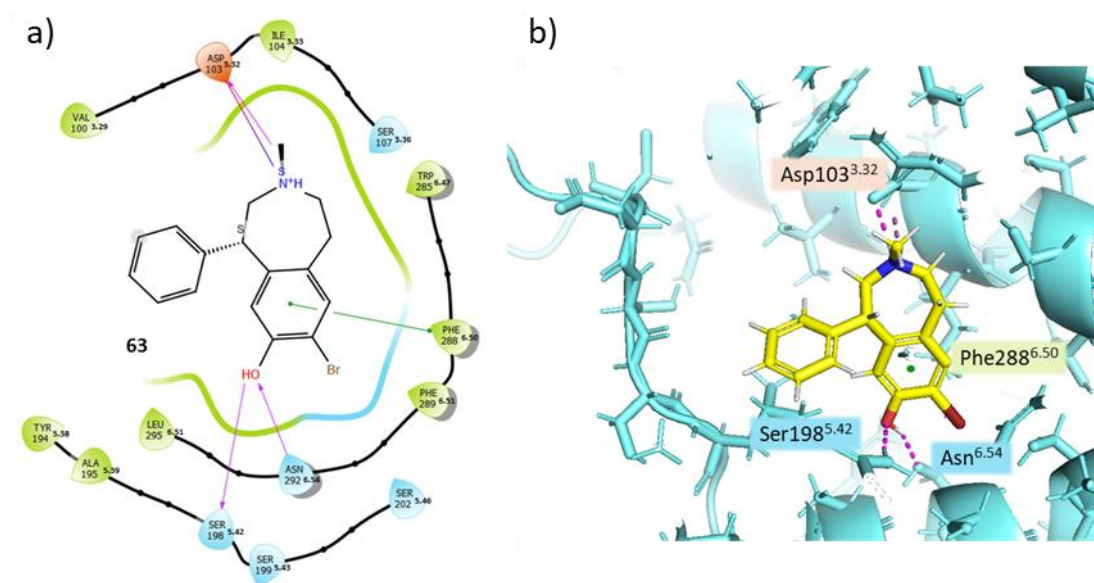
acilezéssel építettük be a molekulába. Ennek feltehetően az az oka, hogy a linker CuAAC^{xx} klikk-reakcióval történő kapcsolása során létrejövő 1,2,3-triazol-egység túl merevvé tette a szerkezetet. Megvizsgáltuk, hogy milyen hosszú szénláncú linker beépítésére van szükség, és azt az esetet is, amikor nem építünk be alifás linkert a molekulába (**62**). A dokkolások alapján a **61** molekula bizonyult a legjobbnak, mivel ekkor a festék optimális távolságban volt a receptor felszínétől (8.1.2. *alfejezet*; 64. *ábra*; a), b) és c) *háromdimenziós szerkezet*; illetve 65–67. *ábrák*).



29. *ábra*: A dokkolt fluoreszcens SKF-83566 ligandumok szerkezeti képletei

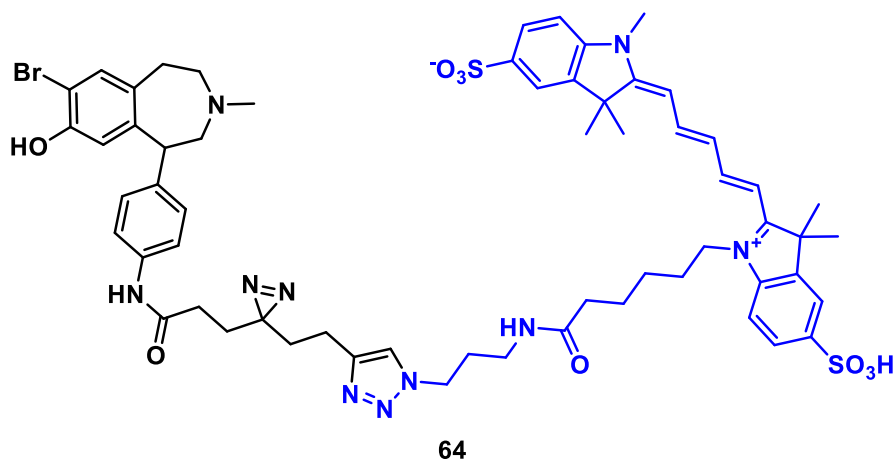
Eddig még nem végezték el az SKF-83566 molekula *in silico* SAR-vizsgálatát, így a következőkben bemutatom a modellezésből megállapítható kölcsönhatásokat a **63** ligandum és a D₁DR fehérje között (30. *ábra*). A **63** ligandum az Asp103^{3.32}, az Ile104^{3.33}, a Ser107^{3.36}, a Trp285^{6.47}, a Phe288^{6.50}, a Phe289^{6.51} és az Asn292^{6.54} aminosavak által kialakított kötőzsebben található. A tetrahydrobenzazepin nitrogénatomja protonált állapotban van jelen és képes elsőrendű ionos (*piros-kék*), valamint másodrendű hidrogén-kötést (*rózsaszín nyíl*) is kialakítani az Asp103^{3.32} aminosavval. A **63** molekula fenolos hidroxilcsoportja az Asn292^{6.54} és Ser198^{5.42} aminosavak oldalláncaival hidrogén-kötést alakít ki. Ezek a kölcsönhatások erősen rögzítik a molekulát a kötőzsebben. A tetrahydrobenzazepin aromás gyűrűje, illetve a Phe288^{6.50} aminosav aromás gyűrűje között kialakul egy π - π kölcsönhatás is (*zöld vonal*).

^{xx} réz(I)-katalizált azid–alkin cikloaddíció (copper-catalysed azide–alkyne cycloaddition)



30. ábra: Az SKF-83566 ligandum (63) SAR-elemzése *in silico* számítások alapján
a) kölcsönhatástérkép b) háromdimenziós ábra.

A fotoaktiválható diazirin egységet tartalmazó SKF-83566 ligandum tervezése során a **64** molekula bizonyult a legmegfelelőbbnek. Ebben az esetben is elvégeztük a dokkolást több lehetséges származékkal is, a részletes bemutatásra a dolgozatban nem térek ki. A **64** módosított ligandum háromdimenziós ábrája, illetve kölcsönhatástérképe a függelékben megtalálható (8.1.2. alfejezet; 64. ábra d) háromdimenziós szerkezet; illetve 68. ábra kölcsönhatástérkép).



31. ábra: A fotoreaktív diazirin egységet tartalmazó SKF-83566 ligandum (64) képlete

4.2. A szintézisek részletes leírása, szintézistervek

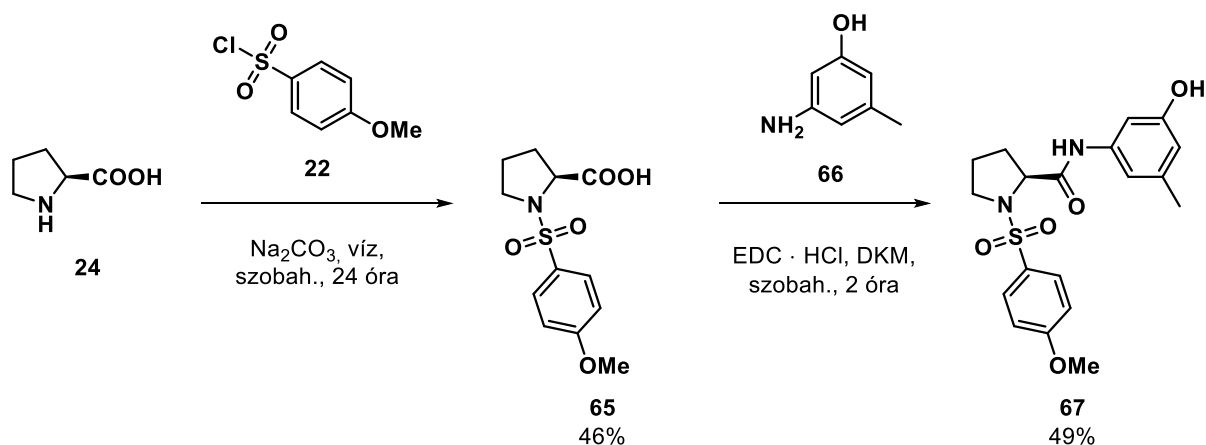
Ebben a fejezetben a fluoreszcens ACT-462206 ligandum (55; OX₁, OX₂), valamint a fluoreszcens SKF-83566 amin (61; D₁DR) és annak fluoreszcens fotoaktiválható származékának (64) szintézisét mutatom be. A fotoaktiválható linkerrel rendelkező ACT-462206 ligandum (57), valamint a fluoreszcens JD_{Tic} származék (113, KOR) előállítása még folyamatban van. Ezeknél a származékoknál a már megvalósított lépések után röviden

bemutatom a hátralévő szintetikus lépések tervét is. A reakciók előrehaladását HPLC-MS segítségével követtem. A tisztított termékeket ^1H , ^{13}C NMR és HRMS segítségével azonosítottam, illetve a szilárd anyagok esetén olvadáspont mérést is végeztem. Egyes esetekben a ^{13}C NMR és HRMS mérések még folyamatban vannak. A könnyebb áttekinthetőség érdekében a teljes szintézisutak vázlata megtalálható a 8. FÜGGELÉK 8.2. fejezetében (90–92. oldal).

4.2.1. A módosított ACT-462206 ligandumok szintézise

4.2.1.1. A fluoreszcens ACT-462206 ligandum (55) szintézise

A szulfo-cianin-5 fluoreszcens festékkal (Sulfo-Cy5) módosított ACT-462206 ligandum (55) szintézisének első lépéseként L-prolinból (24) és 4-metoxibenzolszulfonil-kloridból (22) kiindulva *O*-acilezéssel állítottam elő a 65 szulfonamidot 46%-os termeléssel. Ezt követően a 65 szulfonamid és 3-amino-5-metilfenol (66) *N*-acilezési reakciójában jutottam az 67 köztitermékhez 49%-os termeléssel (32. ábra). A 67 vegyület előállítása során HPLC-MS segítségével megfigyeltem egy kétszeresen acilezett melléktermék keletkezését, amely feltehetően a szabad fenolos OH-csoport acilezése során képződik. A 65 karbonsavat fordított, míg a 67 amidot normál fázisú flash kromatográfiával tisztítottam. Az 65 intermediert és a további származékok (67, 69, 55) a szakirodalomban eddig nem ismert, új vegyületek.

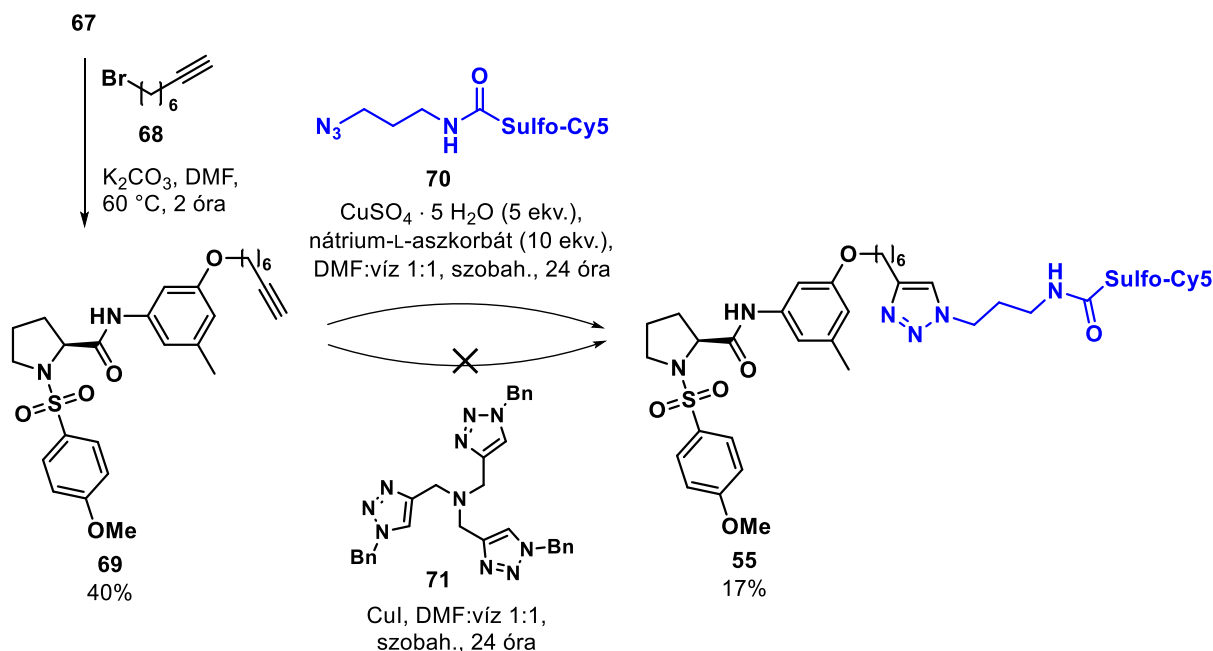


32. ábra: A 67 fenol előállítása L-prolinból (24) kiindulva

A 67 fenol és a 8-brómokt-1-in (68) *O*-alkilezési reakciójával beépítettem a festékkapcsoláshoz szükséges alifás linkert (33. ábra). Fordított fázisú flash kromatográfiás tisztítást követően a 69 terminális acetilént 40%-os hozammal izoláltam. A 69 alkint klikk-reakcióban kapcsoltam a szulfo-cianin-5-aziddal (Sulfo-Cy5-azid; 70)^{xxi} réz-szulfát-pentahidrát és nátrium-L-askorbát jelenlétében. Az így kapott 55 fluoreszcens

^{xxi} Sulfo-Cy5 szerkezeti képlete lsd. 7 vagy 90. oldal

festékekkel módosított ligandumot preparatív HPLC segítségével tisztítottam, majd liofilizálás után 17%-os termeléssel nyertem ki. Az alacsony termelés oka feltehetően az, hogy a klikk-reakciót kis méretben valósítottam meg a festék magas ára miatt, és preparatív HPLC-s tisztítás során nagy volt a fajlagos anyagveszteség.



33. ábra: A **67** közttermékből kiindulva a célvegyület (**55**) előállítása

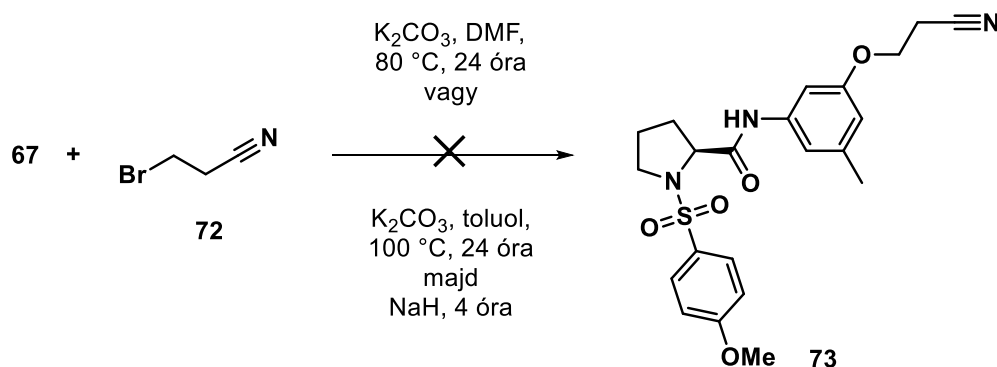
Az 1,2,3-triazol kialakításához szükséges réz(I)-katalizátort bevezethetjük réz(I)-sók formájában,⁹⁵ illetve elterjedt módszer, hogy a reakció gyorsításához különböző tercier amin típusú ligandumokat is használnak (pl. Me₆TREN, THPTA, stb).⁹⁶ Ennek megfelelően először réz(I)-jodid és trisz(benziltriazolilmetil)-amin (**71**, THPTA) segítségével végeztem el a klikk-reakciót. Ebben az esetben azonban feltehetően a réz(I)-jodid a terminális acetilén terminális C-H kötését jódozta, az így keletkezett reaktív intermedier pedig számos mellékreakcióhoz vezetett.⁹⁷ Emiatt a CuAAC^{xxii} katalitikus ciklushoz szükséges réz(I)-iont réz(II)-szulfát-pentahidrát és nátrium-L-aszkorbát *in situ* reakciójával képeztem.⁹⁸

4.2.1.2. A fotoaktív fluoreszcens ACT-462206 ligandum (**57**) szintézise

A fluoreszcens festékekkel (Sulfo-Cy5) módosított fotoaktív diazirin egységet is tartalmazó ACT-462206 ligandum (**57**) szintéziséhez elsőként előállítottam a **67** kiindulási anyagot a 32. ábrán látható módon. Ezt követően egy rövid, amin végű linker beépítése volt a célom, amelyhez a fotoaktiválható csoportot *N*-acilezéssel terveztem kapcsolni. A diazirint tartalmazó linker közvetlen kapcsolása nem lehetséges a **67** fenolhoz *O*-acilezéssel, ugyanis a diazirin ekkor nem kerül megfelelő pozícióba ahhoz, hogy egy fehérje oldalláncsal kovalens

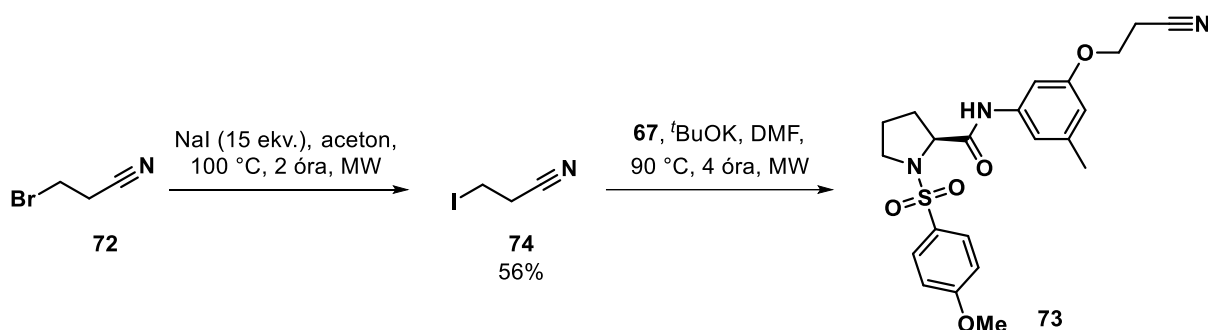
^{xxii} réz(I)-katalizált azid–alkin cikloaddíció (copper-catalysed azide–alkyne cycloaddition)

kötést tudjon kialakítani. Ezért megkíséreltem a **67** fenol *O*-alkilezését 3-brómpropionitrillel (**72**), azonban 3 ekvivalens alkilezőszer és 6 ekvivalens K_2CO_3 alkalmazása mellett 80 °C-on, 24 óra után sem tapasztaltam a kiindulási anyag (**67**) átalakulását (34. ábra). Az oldószert toluolra cseréltem, azonban 100 °C-on 24 órás reakcióidőt követően sem figyeltem meg konverziót. A reakcióelegyhez 3 ekvivalens NaH-et adtam, de továbbra sem történt változás.



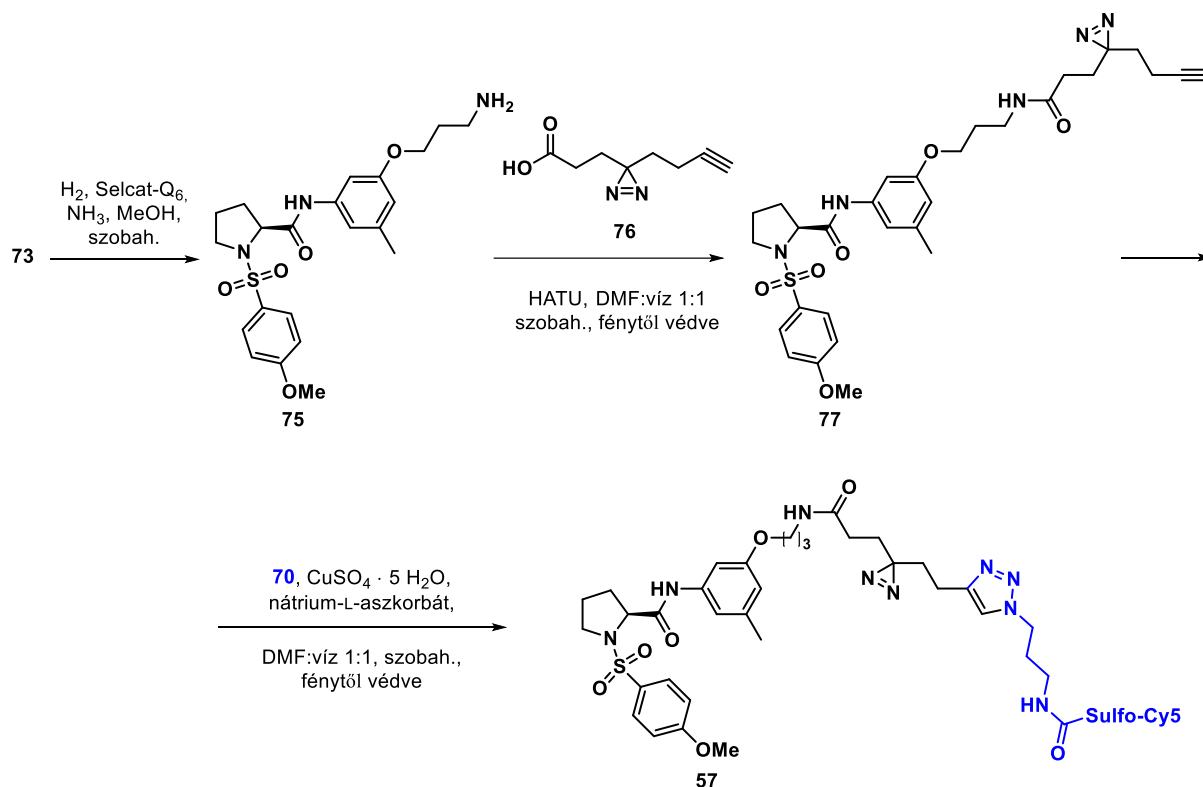
34. ábra: A **67** fenol 3-brómpropionitrillel (**72**) történő *O*-alkilezésére tett kísérletek

A sikertelen reakciók miatt a 3-brómpropionitrilt (**72**) Finkelstein-reakcióban a várhatóan reaktívabb 3-jódpropionitrillé (**74**) alakítottam,⁹⁹ és azzal kísértem meg a **67** fenol *O*-alkilezését (35. ábra). A **67** fenol és a várt termék (**73**) retenciós ideje a HPLC-MS készülékben megegyezett, így a reakció előrehaladásának vizsgálatára a **67** fenol és **73** nitril vegyületek relatív MS jelintenzitását hasonlítottam össze. Az *O*-alkilezés során azonban elélyes körülményeket alkalmazva is csak részleges konverziót sikerült elérnem, így ez a lépés további optimalizálást igényel.



35. ábra: A 3-jód-propionitril (**74**) előállítása, majd a **67** fenol *O*-alkilezése

A szintézis következő lépése a nitril-csoport (**73**) redukciója, amelyet katalitikus hidrogénezéssel kívánok megvalósítani Selcat-Q6 katalizátor segítségével ammónia atmoszférában (36. ábra).¹⁰⁰ A **76** diazirin-egységet tartalmazó karbonsavval HATU kapcsolószer jelenlétében tervezem a **75** amint acilezni, majd a **70** szulfo-cianin-5



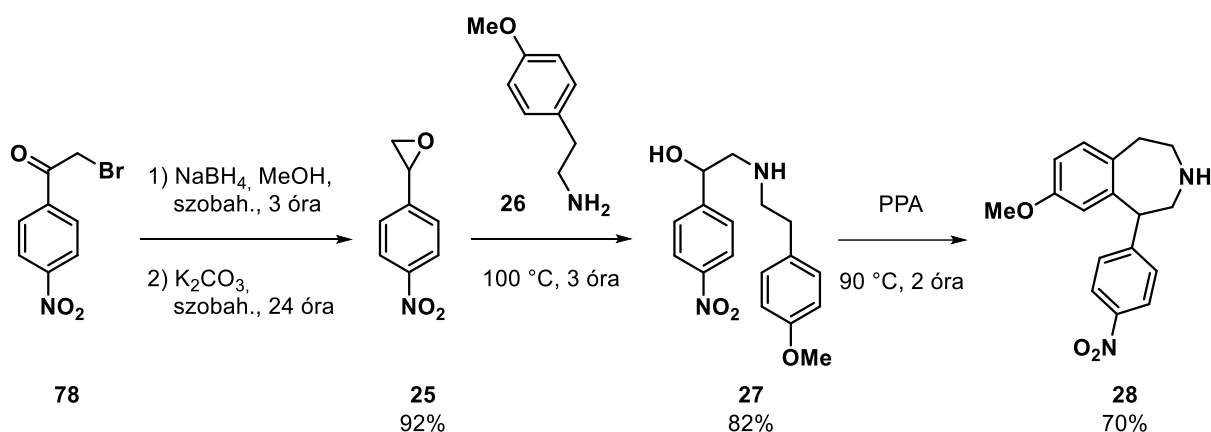
4.2.2. A módosított SKF-83566 ligandumok szintézise

4.2.2.1. Az SKF-83566 amin fluoreszcens származékának szintézise

A szintézis első három lépését a szakirodalomban ismertetett módon valósítottam meg (37. ábra). A **78** bróm-acetofenont nátrium-borohidriddel alkohollá redukáltam, amelyet egy-üst reakcióban K_2CO_3 segítségével egy intramolekuláris nukleofil szubsztitúcióban a **25** oxiránná alakítottam. A **25** oxiránt a feldolgozást követően tisztítás nélkül használtam fel a **26** amin alkilezésére oldószermentes körülmények között 100 °C-on.

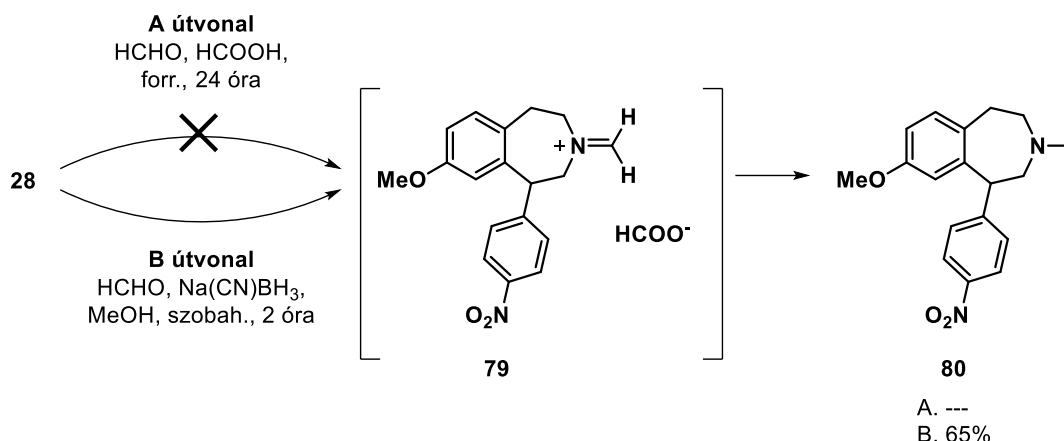
^{xxiii} Sulfo-Cy5 szerkezeti képlete lsd. 7 vagy 90. oldal

A keletkező **27** köztiterméket dietil-éteres eldörzsöléssel dolgoztam fel és tisztítás nélkül vittem tovább a következő lépésbe. A **27** vegyület intramolekuláris gyűrűzárását polifoszforsavval (PPA), vízkilépéssel járó reakcióban végeztem el. Teljes konverziót követően a reakcióelegy pH-ját 40%-os NaOH-oldattal 10–11 közé állítottam be, majd a **28** tetrahydrobenzazepin-származékot diklórmétános extrakcióval nyertem ki és további tisztítás nélkül használtam fel a **80** *N*-metil származék előállításához. Amennyiben a gyűrűzárás hőmérséklete 90 °C fölé emelkedett, melléktermékként megjelent a termék (**28**) foszfátja, amelyet nem tudtam visszaalakítani a **28** szekunder aminná.

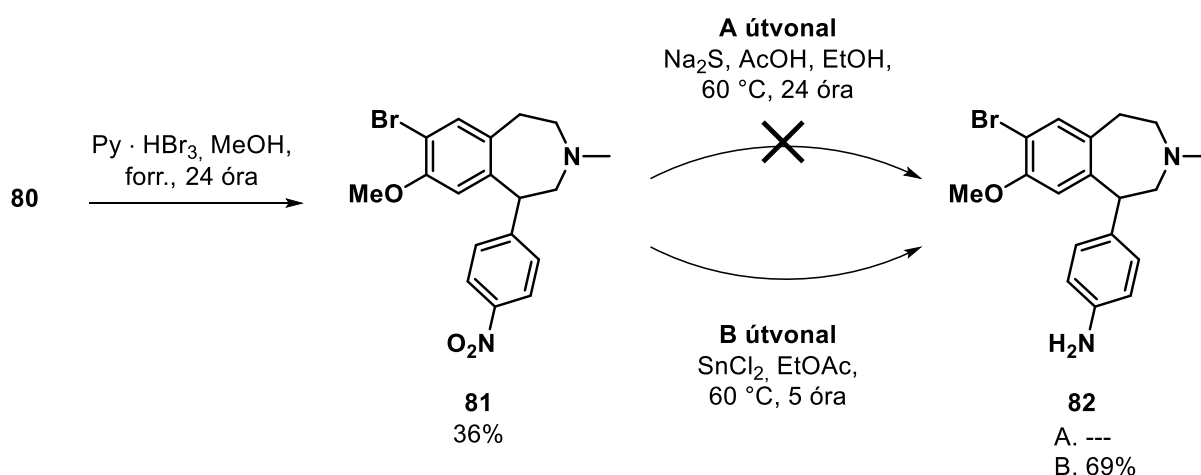


37. ábra: A **28** tetrahydrobenzazepin-származék előállítása

A következő lépésben a szekunder aminocsoportot kívántam metilezni, amelyre először a szakirodalomban gyakran alkalmazott *Eschweiler-Clarke*-reakciót próbáltam ki. A 38. ábrán bemutatott reakció során először az amin (**28**) a formaldehiddel *Schiff*-bázist (**79**) képez, majd a hidridforrásként hozzáadott hangyasavból képződő formiát az imint (**79**) tercier aminná (**80**) redukálja.^{101,102} Ezzel a módszerrel kikerülhető a metil-halogenidek alkalmazása esetén jellemző túlalkileződési mellékreakció, amely a nem kívánt kvaterner ammónium-sók képződéséhez vezet. A szakirodalomban leírt módszerrel azonban HPLC-MS alapján teljes konverzióval a **28** szekunder amin formilezett származéka keletkezett (**A útvonal**, 38. ábra). Emiatt a hangyasavat NaBH₃CN-re cseréltem, így szelektíven keletkezett a kívánt *N*-metilezett termék (**80**, **B útvonal**, 38. ábra). A feldolgozást követően a **80** tercier amint fordított fázisú flash kromatográfiával 65%-os termeléssel izoláltam.

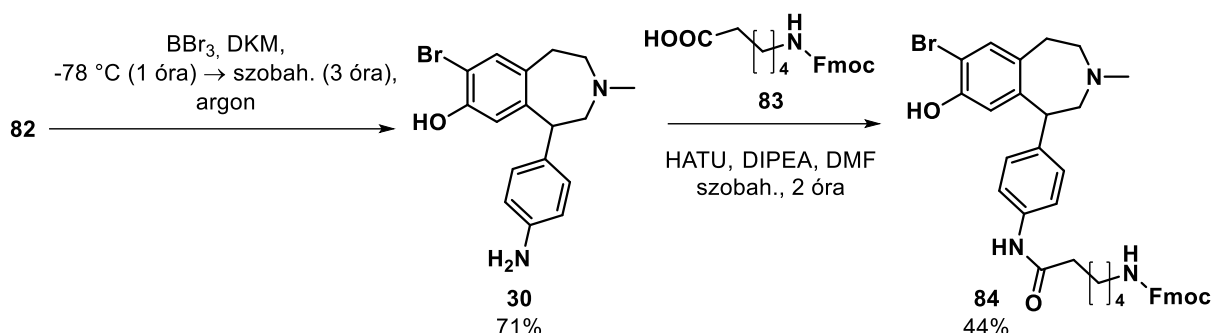
38. ábra: A **28** szekunder amin szelektív metilezése

Ezt követte a **80** tercier amin brómozása, amelyet a szakirodalomban elemi brómmal végeztek el. A mérgező és súlyos égési sérüléseket okozó elemi brómot a kedvezőbb piridínium-perbromidra kívántam cserélni (39. ábra). Ebben az esetben jelentős mennyiségű dibrómozott melléktermék keletkezett, azonban ezt normál fázisú flash kromatográfia segítségével sikerült elválasztanom a kívánt terméktől (**81**). A 36%-os termeléssel kapott **81** vegyület nitrocsoportjának redukciójára az irodalomban alkalmazott mérgező, valamint rákkeltő Raney-nikkelt és hidrazin-hidrátot először nátrium-szulfidra kívántam cserélni (**A útvonal**), azonban a kiindulási anyag átalakulása nem következett be. Ón(II)-klorid-dihidrát jelenlétében (**B útvonal**), azonban szelektíven keletkezett a kívánt **82** anilin, amelyet a feldolgozást és fordított fázisú flash kromatográfiát követően 69%-os termeléssel izoláltam.

39. ábra: A **82** anilin előállítása **80** nitroszármazékból kiindulva

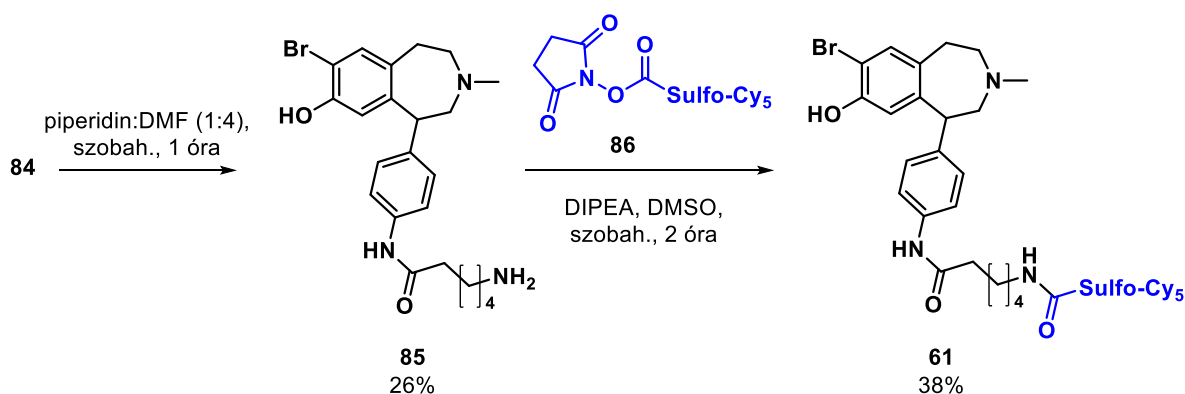
Ezt követően a szakirodalomban leírt módszernek megfelelően elvégeztem a **82** vegyület szelektív O-demetilezését bór-tribromiddal argon atmoszféra alatt DKM-ban, majd a feldolgozást követően 71%-os termeléssel kaptam meg a **30** SKF-83566 amint (40. ábra). A **30** amint a **83** Fmoc-védett karbonsavval HATU kapcsolószer jelenlétében reagáltatva építettem be az alifás linkert. A nyersterméket további feldolgozás nélkül, fordított fázisú flash

kromatográfiával tisztítottam, így jutottam 44%-os termeléssel a **84** savamidhoz. A **84** intermedier és a további származékok (**85**, **61**) új vegyületek.



40. ábra: A **84** savamid előállítása

Az Fmoc-védőcsoportot piperidin és dimetilformamid 1:4 arányú elegyében szobahőmérsékleten kevertetve távolítottam el, majd preparatív HPLC segítségével tisztán kaptam meg 26%-os termeléssel a **85** primer amint (41. ábra). A **85** vegyület esetén az ^1H és ^{13}C NMR mellett HMBC spektrumot is felvettünk, amely alátámasztotta, hogy az acilezés nem a fenolos hidroxilcsoporton, hanem az anilines aminocsoporton történt meg, valamint a brómozás és a demetilezés regioszelektivitását is bizonyítottuk. A **85** primer aminhoz acilezéssel kapcsoltam hozzá szulfo-cianin-5-NHS észterként (**86**)^{xxiv} a fluoreszcens festéket. Az elegyet feldolgozás nélkül, preparatív HPLC segítségével tisztítottam, majd liofilizálás után 38%-os termeléssel kaptam meg a **61** fluoreszcens ligandumot. Az alacsony termelések oka, hogy a reakciókat kis mennyiségben valósítottam meg, így nagy a preparatív HPLC okozta fajlagos anyagvesztés.

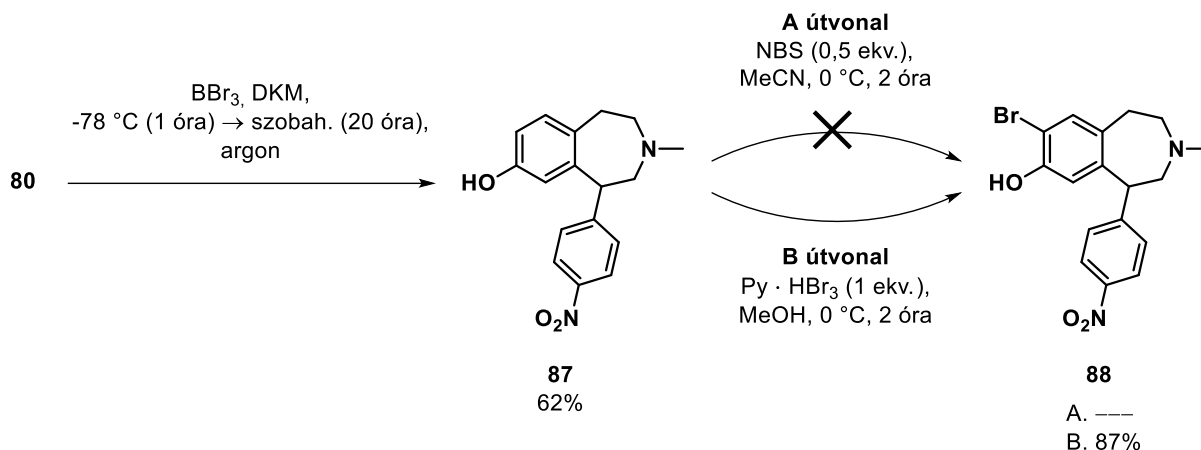


41. ábra: A **84** vegyületből kiindulva a fluoreszcens $D_1\text{DR}$ ligandum (**61**) előállítása

A 39. ábrán szereplő brómozás szelektivitásának javítása érdekében új szintézisutat kívántam kidolgozni a **61** fluoreszcens ligandum előállítására. Először a 39. ábrán előállított **80** vegyület *O*-demetilezését valósítottam meg bór-tribromiddal argon atmoszféra alatt

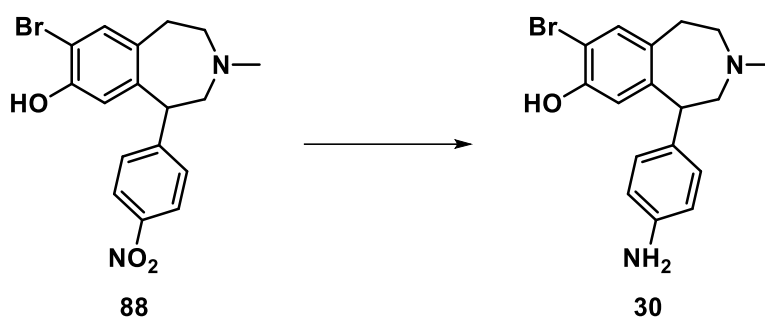
^{xxiv} Sulfo-Cy5 szerkezeti képlete lsd. 7 vagy 90. oldal

vízmentes DKM-ban, majd így jutottam az **87** fenol-származékhoz 62%-os termeléssel (42. ábra). A **87** fenol monobrómozását *N*-bróm-szukcinimiddel (NBS) kíséreltem meg (**A útvonal**, 42. ábra), azonban a várt monobrómozott termék mellett már 0,5 ekvivalens NBS hozzáadására is 1:1 arányban keletkezett egy dibrómozott melléktermék. Az NBS-et piridínium-perbromidra ($\text{Py} \cdot \text{HBr}_3$) cseréltem, amivel sokkal jobb szelektivitást sikerült elérnem (**B útvonal**, 42. ábra). A **B útvonal** során keletkezett terméket (**88**) fordított fázisú flash kromatográfiás tisztítást követően 87%-os hozammal sikerült izolálnom. A **87** és **88** származékok új vegyületek.



42. ábra: A **88** vegyület előállítása *O*-demetilezés és brómozás segítségével

A brómozást követően a nitrocsoport redukcióját először katalitikus hidrogénezéssel kíséreltem meg 10% palládiumot tartalmazó Selcat-Q6 jelenlétében, autoklávban, szobahőmérsékleten, amely során egy komplex termékelegy keletkezése mellett HPLC-MS segítségével csupán nyomokban figyeltem meg a várt terméket (**30**, 3. táblázat, 1. sor). Ugyanúgy komplex termékelegy keletkezését tapasztaltam, ha ón(II)-klorid-dihidráttal végeztem a reakciót etil-acetátban 75 °C-on, vagy, ha vasat és ammónium-kloridot alkalmaztam vízben szobahőmérsékleten (3. táblázat, 2–3. sor). Habár szerettem volna az irodalmi példában is szereplő mérgező és rákkeltő hidrazin-hidrát és *Raney*-nikkel alkalmazását elkerülni, a sikertelen redukciós próbálkozások miatt témavezetőm segítségével és fokozott odafigyeléssel ezt a reakciót is megkíséreltem (3. táblázat, 4. sor). A reakcióban 50 °C-on 24 óra alatt szelektíven, 30%-os konverzió mellett keletkezett egy ismeretlen, 262 Da molekulatömegű melléktermék, amelynek szerkezetét eddig még nem sikerült megfejtenünk. A legjobb eredményt nátrium-szulfid alkalmazásával értem el, amely során 80 °C-on 24 órás kevertetést követően teljes konverzióval, jelentős mennyiségű melléktermék megjelenése mellett ugyan, de főtermékként a várt amin (**30**) keletkezését figyeltem meg HPLC-MS-ben (3. táblázat, 5. sor). A reakcióelegy feldolgozását és fordított fázisú flash kromatográfiás tisztítását követően azonban nem sikerült izolálni a **30** vegyületet, így a 37–41. ábrán bemutatott szintézisutat követtem.

3. táblázat: A **88** vegyület nitrocsoportjának redukciója a **30** anilinné

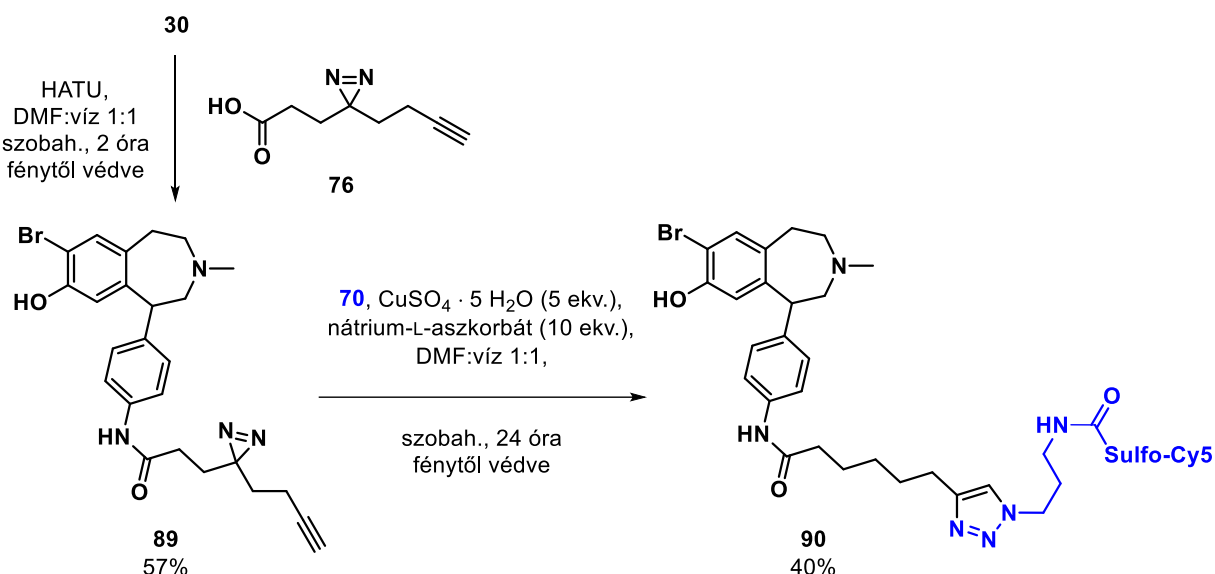
Sorszám	Reagens	Oldószer	Reakcióidő [óra]	Hőmérséklet [°C]	Megjegyzés
1.	Selcat-Q6, H ₂	MeOH	1	25	komplex reakcióelegy, nyomokban megjelent a termék
2.	SnCl ₂ · 2 H ₂ O	EtOAc	24	75	
3.	Fe, NH ₄ Cl	H ₂ O	24	25	
4.	N ₂ H ₄ · H ₂ O, Raney-nikkel	EtOH	24	50	30% konverzióval szelektíven a 262 Da tömegű anyag keletkezett
5.	Na ₂ S, AcOH	EtOH	24	80	komplex reakcióelegy, főtermék 30

4.2.2.2. A fotoaktív fluoreszcens SKF-83566 amin származék szintézise

A fluoreszcens festékekkel (Sulfo-Cy5) ellátott fotoaktív diazirin egységet is tartalmazó D₁DR ligandum (**64**) szintéziséhez első lépésben előállítottam az 4.2.2.1. pontban a 37–41. ábrákon bemutatott módon a **30** SKF-83566 amint. Ezt követően a fotoaktiválható diazirin egységet és a fluoreszcens festék kapcsolásához szükséges terminális hármass kötet is tartalmazó linkert (**76**) HATU segítségével, *N*-acilezési reakcióban kapcsoltam közvetlenül a **30** aminhoz (43. ábra). A **89** intermediert preparatív HPLC segítségével, fénytől védve tisztítottam. Az 57%-os termeléssel izolált **89** acetilént réz(II)-szulfát-pentahidrát és nátrium-L-aszkorbát jelenlétében klikk-reakcióban reagáltattam a **70** szulfo-cianin-5-aziddal (Sulfo-Cy5-azid)^{xxv}. A klikk-reakciót először a 4.2.1.1. pontban leírt recepthez hasonlóan valósítottam meg, 5 ekvivalens réz(II)-szulfát-pentahidrát és 10 ekvivalens nátrium-L-aszkorbát jelenlétében 24 órás reakcióidővel, szobahőmérsékleten. A reakcióban azonban a diazirin egység nitrogén-eliminációval történő bomlását figyeltem meg, a kiindulási anyag (**89**) és az előállítani kívánt termék (**64**) esetében is. A szakirodalomban ismert, hogy bizonyos esetekben a réz(I)-sók,¹⁰³ valamint a hőmérséklet emelkedése katalizálhatják a diazirin bomlását.¹⁰⁴ Problémát jelenthetett, hogy a reakcióedény érintkezett a működés közben

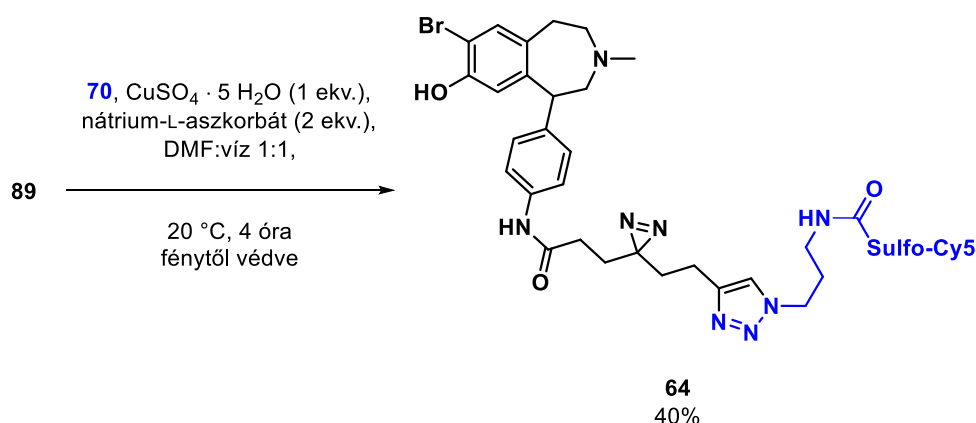
^{xxv} Sulfo-Cy5 szerkezeti képlete lsd. 7 vagy 90. oldal

felmelegedő mágneses keverővel. A diazirin egységet nem tartalmazó fluoreszcens ligandumot (**90**) feldolgozás nélkül preparatív HPLC segítségével tisztítottam, majd liofilizálással izoláltam 40%-os termeléssel. A **89** és **90** származékok új vegyületek.



43. ábra: A D_1DR fluoreszcens ligandumának (**90**) előállítása egy mellékreakció során

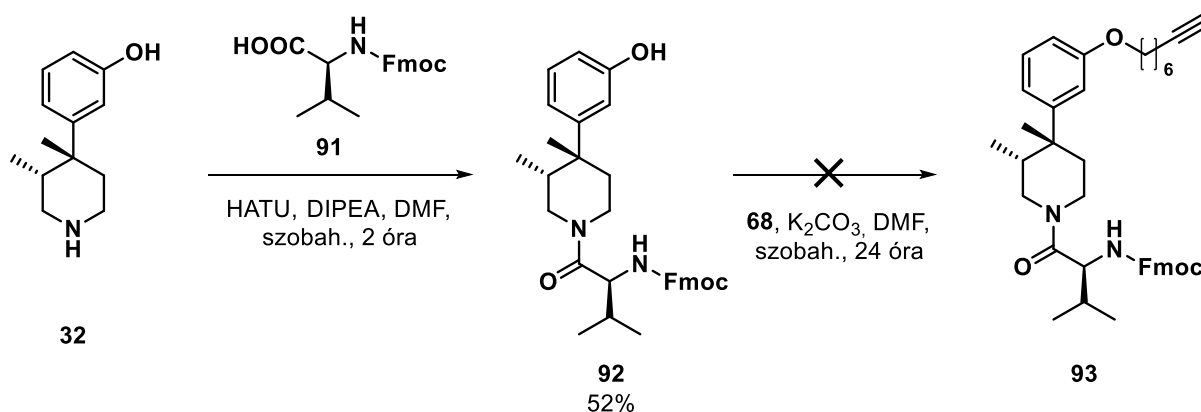
A diazirin bomlásának visszaszorítása miatt lecsökkentettem a réz(II)-szulfát-pentahidrát feleslegét 1, a nátrium-L-askorbát feleslegét 2 ekvivalensre és ügyeltem arra, hogy az elegy ne melegedjen 20°C fölé (44. ábra). A megváltozott reakciókörülmények között nem figyeltem meg a kiindulási diazirin (**89**) átalakulását, és a várt termék (**64**) bomlása is csak elhanyagolható mértékben történt meg. A reakcióelegyet feldolgozás nélkül, preparatív HPLC-vel tisztítottam, majd liofilizálással 40%-os termeléssel izoláltam a **64** fotoaktív fluoreszcens ligandumot, amely új vegyület.



44. ábra: A D_1DR fotoaktív fluoreszcens ligandumának (**64**) előállítása

4.2.3. A módosított JD_{Tic} ligandum szintézise

A fluoreszcens festékekkel módosított JD_{Tic} ligandum (**113**) szintézisének első lépéseként a **32** piperidint acileztem a **91** Fmoc-védett L-valinnal HATU és DIPEA jelenlétében (45. ábra). A nyerterméket fordított fázisú flash kromatográfiával tisztítottam, így jutottam 52%-os termeléssel a **92** amidhoz. A **92** amid és a további származékok (**97**, **98**, **100**, **102**, **109**) új vegyületek. A közepes termelés oka egy HPLC-MS segítségével megfigyelt, jelentős mennyiségben képződő diacilezett melléktermék. A szintézisút végén a fluoreszcens festék kapcsolását a molekula szerkezetéből adódóan csupán CuAAC^{xxvi} klikk-reakcióval tudjuk szelektíven megvalósítani, amihez terminális acetilén beépítésére van szükségünk. Ennek érdekében a **92** fenolt 8-brómokt-1-innel (**68**) alkileztem K₂CO₃ jelenlétében. A reakcióelegy 24 órás szobahőmérsékletű kevertetése során azonban az Fmoc-védőcsoport távozott a molekuláról, amelynek következtében a kialakuló szabad aminos csoport is alkileződött. Az O-alkilezési reakció során ügyeltem arra, hogy tiszta kiindulási anyagból (**92**) dolgozzak, hiszen a **92** piperidin-származék már nyomokban is elősegítheti az Fmoc-védőcsoport eliminációját.



45. ábra: A **32** piperidin-származék N-acilezése, majd az így kialakuló **92** amid O-alkilezése

Ezt követően olyan reakciókörülményt kerestem, amely mellett az Fmoc-védőcsoport nem távozik el a molekuláról és szelektíven megvalósítható a **92** fenol O-alkilezése. A védőcsoport eliminációját K₂CO₃ jelenlétében DMSO-ban, valamint NaH jelenlétében THF-ban teljes mértékben, míg DIPEA alkalmazásával MeCN-ben csak nyomokban figyeltem meg 90 perc elteltével (4. táblázat, 1–3. sor).

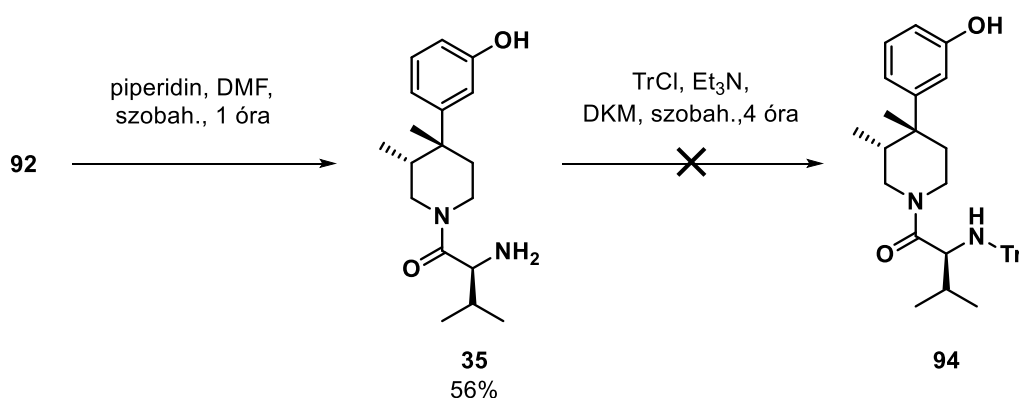
^{xxvi} réz(I)-katalizált azid–alkin cikloaddíció (copper-catalysed azide–alkyne cycloaddition)

4. táblázat: Megfelelő bázis keresése a **92** fenol **68** linkerrel történő O-alkilezéséhez

Sorszám ^a	Bázis minősége	Oldószer minősége	Fmoc-védőcsoport eliminációja
1.	K ₂ CO ₃	DMSO	kvantitatív
2.	DIPEA	MeCN	nyomokban
3.	NaH	THF	kvantitatív

^aReakciókörülmények: **93** (0,02 mmol; 11 mg); bázis (0,06 mmol); szobah.; 90 perc.

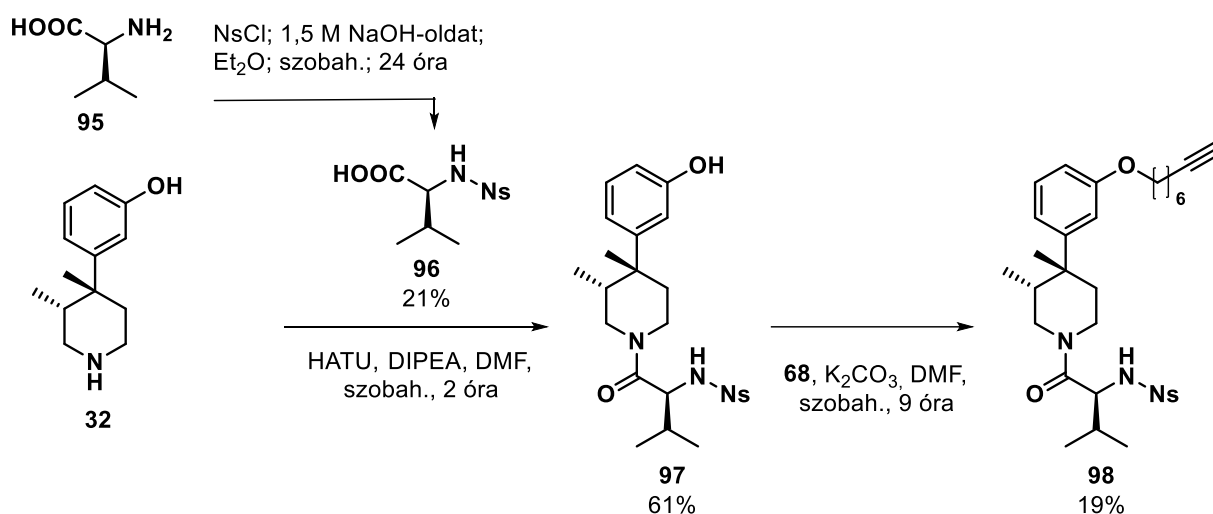
Ugyanakkor a következő O-alkilezési lépés feltehetően 90 percnél hosszabb reakcióidőt vagy magasabb hőmérsékletet is igényelhet, amely során előfordulhat, hogy az Fmoc-védőcsoport nagyobb mértékben eliminálódik DIPEA jelenlétében. Emiatt úgy döntöttem, hogy az Fmoc helyett másik védőcsoportot alkalmazok. Védőcsoport alkalmazása mindenképpen szükséges ahhoz, hogy később a **68** linkerrel történő O-alkilezési reakció szelektíven játszódjon le. A linker (**68**) későbbi bevitele sem jöhet szóba szelektivitási problémák miatt. A kereskedelemről beszerezhető kiindulási **32** amin a 2.3.3. *alfejezetben* (24. oldal, **18. ábra**) bemutatott okok miatt drága alapanyag, ezért a **92** Fmoc-védett aminról eltávolítottam a védőcsoportot piperidin és DMF 1:4 arányú elegyével. Az így keletkező aminra (**35**) egy másik védőcsoportot terveztem beépíteni. (46. ábra). Először a bázikus körülmények között is stabil tritil védőcsoporttal (Tr) próbálkoztam. A **35** amint tritil-kloriddal reagáltattam trietil-amin jelenlétében vízmentes DKM-ban. A reakció követése során HPLC-MS segítségével megfigyeltem két különböző monotritilezett, valamint egy ditritilezett származékot is. Ezeket fordított fázisú flash kromatográfia segítségével próbáltam elválasztani, azonban nem sikerült izolálnom a kívánt **94** terméket.



46. ábra: A **92** Fmoc-védőcsoportjának eltávolítása és a tritil-csoport bevitelének kísérlete

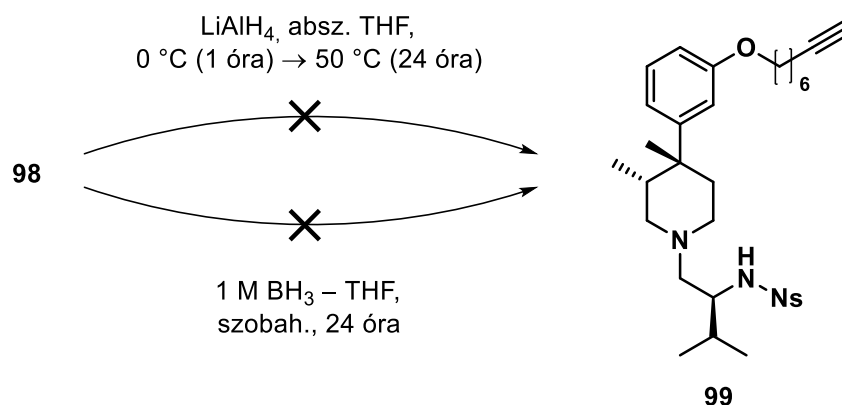
A tritil-csoport sikertelen bevitele után a bázikus körülmények között szintén stabil nozil-védőcsoportot (Ns) alkalmazását kíséreltem meg. Ebben az esetben először L-valinból (**95**) kiindulva nozil-kloriddal előállítottam a Ns-védett L-valint (**96**), amelyet feldolgozás után tisztítás nélkül használtam fel a következő lépésben (47. ábra). Ezt követően a **32** amint a

Ns-védett aminosavval (**96**) HATU és DIPEA jelenlétében *N*-acileztem. A **97** fenolt normál fázisú flash kromatográfiás tisztítást követően 61%-os termeléssel izoláltam. A **97** fenol 8-brómokt-1-innel (**68**) történő *O*-alkilezése során viszont kétféle monoalkilezett, valamint egy dialkilezett melléktermék is keletkezett HPLC-MS alapján. A bázist DIPEA-ra, illetve piridinre cseréltem, azonban egyik esetben sem keletkezett a kívánt termék (**98**), a **97** kiindulási anyag nem alakult át. Az alkilezőszer (**68**) adagoláskontrolljával sem sikerült a termék arányokon javítani, így feldolgozás nélkül fordított fázisú flash kromatográfia segítségével választottam el a kétféle mono-, illetve a dialkilezett mellékterméket, így 19%-os termeléssel izoláltam a **98** alkint. A termék (**98**) pontos szerkezetét ^1H , ^{13}C NMR-rel és HMBC mérésével ellenőriztem.



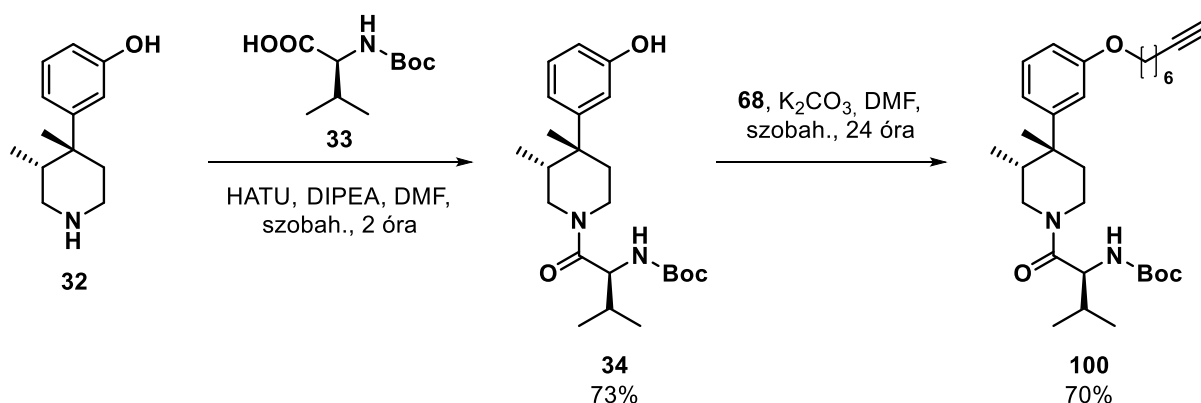
47. ábra: A **98** Ns-védett származék előállítás az **32** piperidinből kiindulva

Ezt követően a **98** savamid redukcióját vízmentes THF-ban, LiAlH_4 jelenlétében kíséreltem meg, azonban 0 °C-on, illetve 50 °C-on sem alakult át a kiindulási anyag (**98**) 1 és 24 óra után. A második esetben 1 M-os borán-THF-oldattal kíséreltem meg az amidcsoport redukcióját, azonban szelektíven teljes konverzióval egy ismeretlen, 617 Da molekulatömegű anyag keletkezett, amelynek szerkezetét eddig még nem sikerült megfejtenünk.



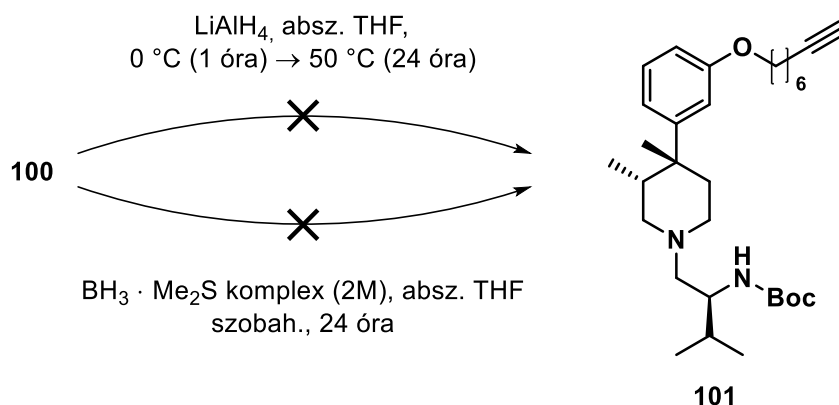
48. ábra: A **98** alkin amidcsoportjának redukciójára tett kísérletek

Mivel a Ns-védőcsoport jelenlétében az alkilezést csak alacsony termeléssel, a redukciót pedig egyáltalán nem sikerült megvalósítanom, így harmadik próbálkozásként Boc-védőcsoportot alkalmaztam. Elsőként a **32** amint acileztem *N*-Boc-L-valinnal (**33**) HATU és DIPEA jelenlétében (49. ábra). A **34** savamid mellett melléktermékként megjelent egy diacilezett-származék, amelyet fordított fázisú flash kromatográfia segítségével el tudtam választani a terméktől (**34**). Ezt követően a **34** fenolszármazékot 8-brómokt-1-innel (**68**) reagáltattam K_2CO_3 jelenlétében. A nyerterméket feldolgozás nélkül, fordított fázisú flash kromatográfia segítségével tisztítottam, így 70%-os termeléssel jutottam a **100** terminális acetilénhez.



49. ábra: A **32** piperidinből a **34** amid előállítás, majd alkilezése a **100** vegyületté

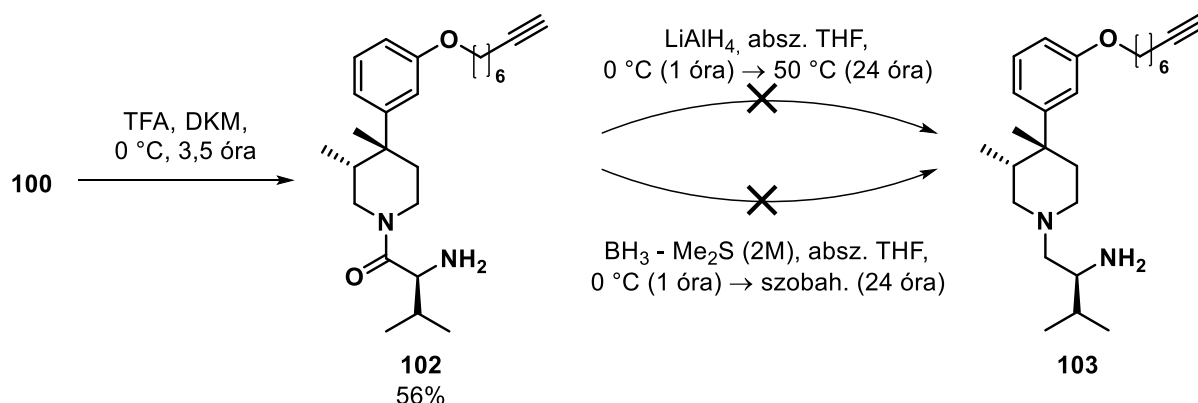
Ezt követően a **100** savamid amidcsoportjának redukcióját kívántam elvégezni, azonban egyik esetben sem jártam sikerrel. A 50. ábrán szereplő körülmények között, $LiAlH_4$ -del végeztem el először a redukciót, azonban komplex termékelegy keletkezett, amelyben HPLC-MS alapján csupán nyomokban volt jelen a kívánt **101** termék. A másik esetben 2 M-os borán–dimetil-szulfid absz. THF-os oldatával kíséreltem meg az amidcsoport redukcióját, azonban a keletkezett komplex termékelegyben nem volt kimutatható a **101** termék (50. ábra).



50. ábra: A **100** savamid amidcsoportjának redukciójára tett kísérletek

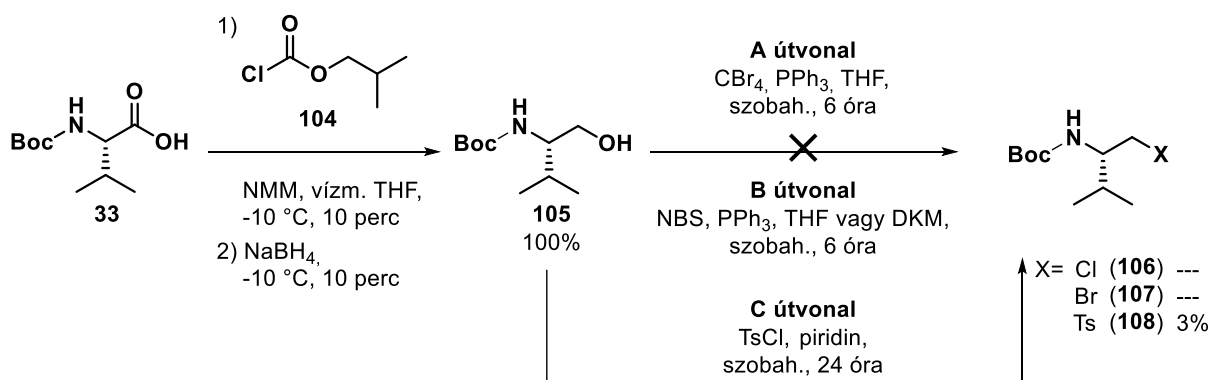
A redukcióra tett sikertelen próbálkozások miatt védőcsoport alkalmazása nélkül is megkíséreltem az amidcsoport redukcióját. A **100** savamidból kiindulva először eltávolítottam

a Boc-védőcsoportot TFA-val DKM-ban 3,5 óra alatt, majd a feldolgozást követően fordított fázisú flash kromatográfia után 56%-os termeléssel kaptam meg a **102** primer amint (51. ábra). Az amidcsoport redukciója során azonban egyik esetben sem keletkezett a várt termék (**103**). LiAlH_4 -et alkalmazva a kiindulási anyag bomlását, míg borán-dimetil-szulfid komplexszel komplex termékelegy keletkezését tapasztaltam.



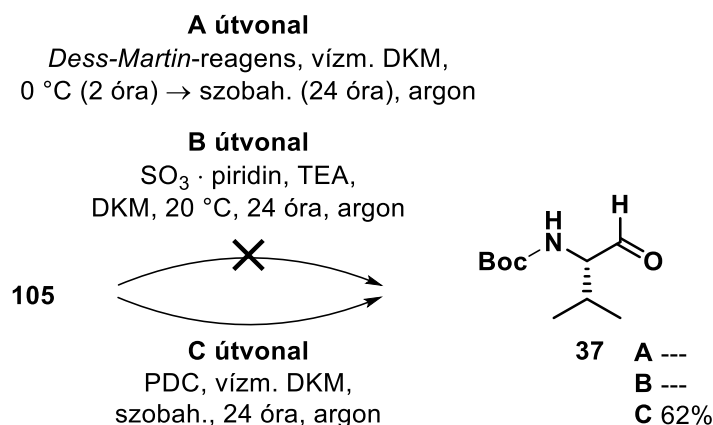
51. ábra: A **100** Boc-védőcsoportjának eltávolítása, majd az amidcsoport redukciója

Az amidcsoport sikertelen redukciója miatt új szintézistervet dolgoztam ki, amely során először az L-valint (**33**) redukálom alkohollá (**105**) és egy jó távozó csoport kialakítását követően *N*-alkilezéssel kapcsolom a **32** aminhoz. Első lépésként klórhangyasav-izopropilészterrel (**104**) NMM jelenlétében az L-valinból izopropilésztert képeztem, majd a feldolgozást követően nátrium-borohidriddel az észtert a **105** alkohollá redukáltam. Az alkoholból (**105**) szén-tetrabromid vagy *N*-brómszukcinimid segítségével sem keletkezett az előállítani kívánt alkil-halogenid (**106**, **107**; **A**, **B** útvonal; 52. ábra), tozil-kloriddal azonban sikerült kialakítani a megfelelő távozó csoportot (**108**, **C** útvonal). Ez a vegyület (**108**) azonban a reakció, illetve a feldolgozás során is bomlásnak indult, így csak alacsony hozammal, mindössze 3%-os termeléssel sikerült kinyernem a tiszta terméket (**108**). A vegyület bomlékonysága miatt nem használtam fel *N*-alkilezési reakcióban.



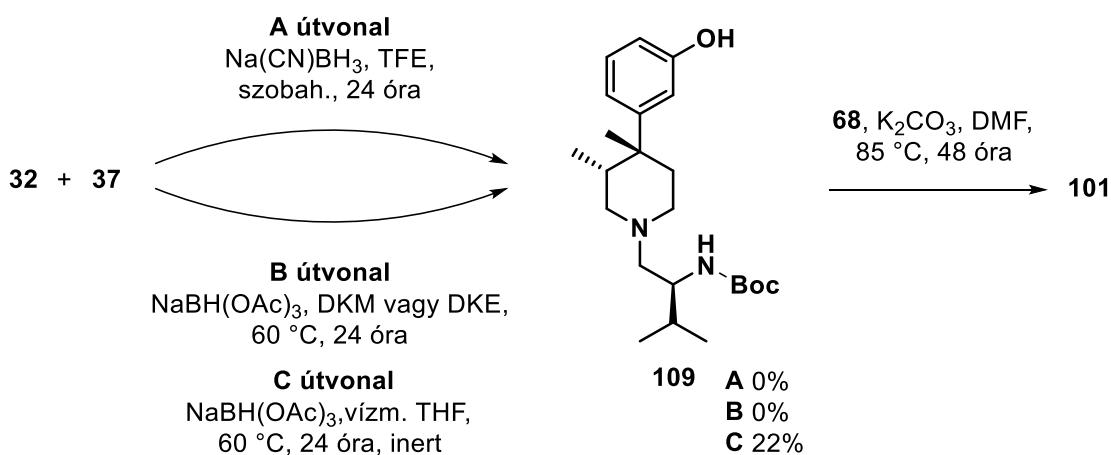
52. ábra: Az L-valinol (**105**) előállítása, majd jobb távozócsoport (Cl, Br, Ts) kialakítása

Az amidcsoport redukciójának kikerülésére az *N*-alkilezés mellett a másik lehetőség a **37** aldehid előállítása és felhasználása redukatív aminálási reakcióban. A **105** *N*-Boc-védett *L*-valinolból kiindulva *Dess-Martin*-reagenssel, illetve kén-trioxid piridinnel alkotott komplexével sem keletkezett a várt **37** aldehid (**A**, **B** útvonal, 53. ábra), míg piridínium-dikromát (PDC) alkalmazásával inert körülmények között sikerült szelektíven, 62%-os termeléssel előállítanom a **37** aldehidet (**C** útvonal, 53. ábra).



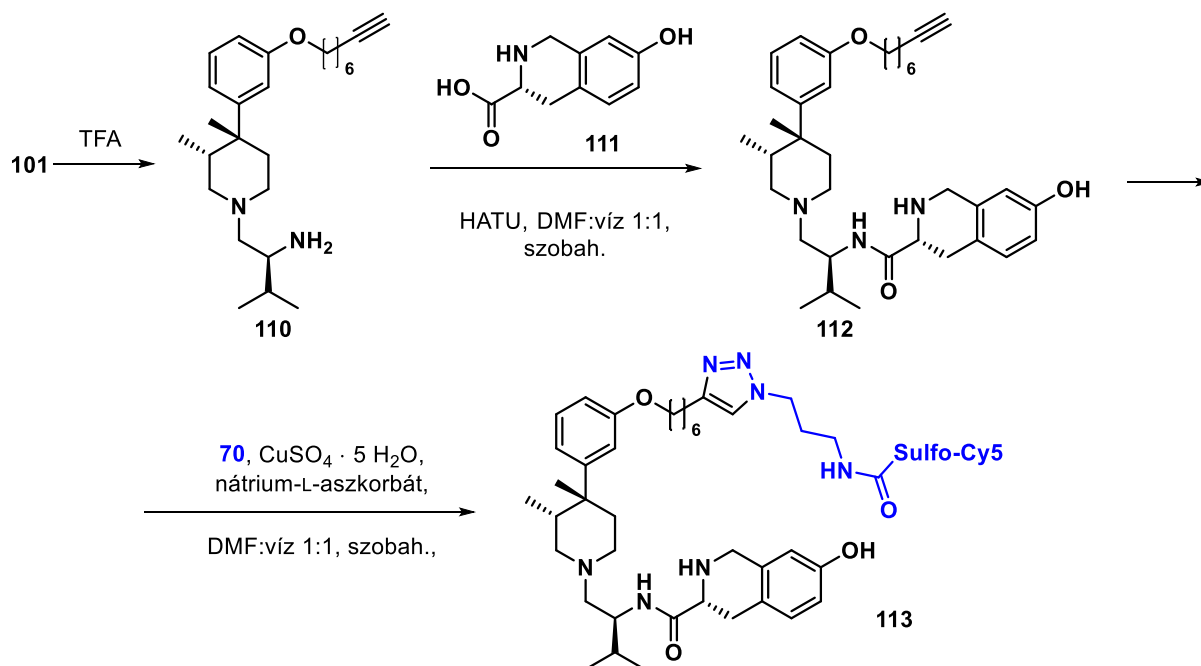
53. ábra: A **37** *L*-valinal előállítására tett kísérletek

A redukatív aminálást először NaBH₃CN jelenlétében kíséreltem meg, amely során 10%-os konverzióval, szelektíven keletkezett a várt **109** intermedier, azonban fordított fázisú flash kromatográfiával nem sikerült kinyernem a reakcióelegyből (**A** útvonal, 54. ábra). Nátrium-triacetoxi-borohidrid jelenlétében, DKM-ban szintén 10%-os konverzióval komplex termékelegyhez jutottam (**B** útvonal, 54. ábra). Inert körülmények között, vízmentes THF-ban teljes konverzió mellett a várt **109** tercier amin volt a főtermék (**C** útvonal, 54. ábra). A reakcióelegyet feldolgozás nélkül preparatív HPLC segítségével tisztítottam és 22%-os termelést értem el. Ezt követően 8-brómokt-1-innel (**68**), K₂CO₃ jelenlétében, DMF-ban 85 °C-on szelektív *O*-alkilezéssel jutottam a **101** terminális acetilénhez. A reakcióelegy feldolgozása, valamint a redukatív aminálás optimalizálása még folyamatban van.



54. ábra: A redukatív aminálás, majd a **109** fenol *O*-alkilezésének megvalósítása

A szintézis következő lépésében trifluorecetsavval eltávolítom a Boc-védőcsoportot, majd a **111** karbonsavval acilezem a **110** primer amint HATU segítségével (55. ábra). A szintézis utolsó lépéseként a fluoreszcens festéket (**70**) építem be a molekulába CuAAC^{xxvii} klikk-reakcióban réz(II)szulfát-pentahidrát, valamint nátrium-L-aszkorbát jelenlétében. További terveink között szerepel a **113** JD_{Tic} fotoaktív analógjának előállítása is.



55. ábra: A fluoreszcens JD_{Tic} ligandum (**113**) szintézisének befejező lépései

4.3. Biológiai mérések eredményei

Az elkészült és analitikai vizsgálatokkal jellemzett fluoreszcens ligandumokról a Eurofins vállalat radioligand-alapú kötődési vizsgálatokat végzett a kívánt fehérjéken, és meghatározta a vegyületek kötődési állandóit. Az 55 fluoreszcens OX₁ ligandum csupán közepes kötődési értékekkel rendelkezik az adott receptoron a **14** ACT-462206 referencia vegyülethez képest (5. táblázat, 1–2.sor). Feltételezésünk szerint a linker optimalizálása, azaz egy hidrofílebb PEG-származék linkerként történő alkalmazása javíthat a K_i értéken. Ezenkívül terveink között szerepel az eddig módosított **14** ligandumhoz képest jobb kötődési értékekkel rendelkező suvorexant (**12**, 8. ábra, 15. oldal) fluoreszcens származékának előállítása is (5. táblázat, 3. sor). A D₁ dopamin receptorhoz kötődő fluoreszcens ligandumok közül rendkívül jó kötődési értékkel rendelkezik a **90** fluoreszcens származék (5. táblázat, 4. sor), míg a **64** fotoaktív fluoreszcens ligandum jó, a **61** fluoreszcens ligandum közepes erősségű kötődést mutatott a **30** SKF-83959 referencia vegyülethez képest (5. táblázat, 5–7. sor).

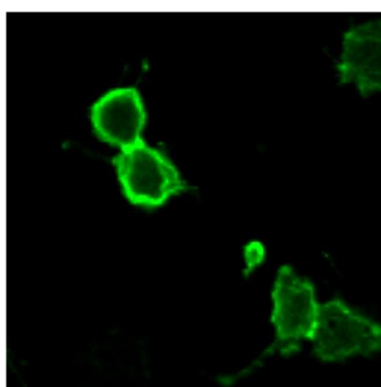
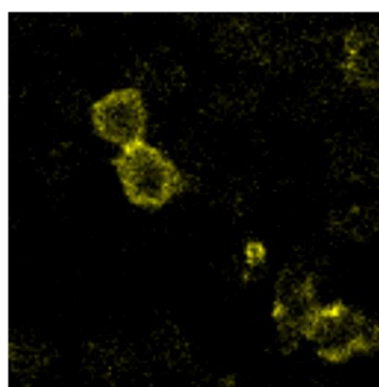
^{xxvii} réz(I)-katalizált azid–alkin cikloaddíció (copper-catalysed azide–alkyne cycloaddition)

5. táblázat: Az Eurofins vállalat által meghatározott K_i és IC_{50} értékek

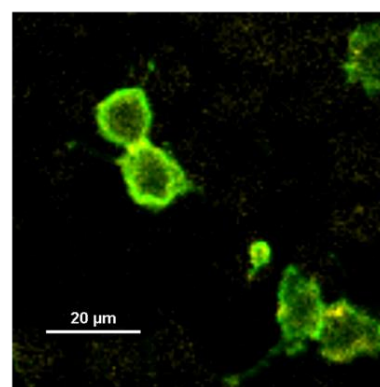
Sorszám	Receptor	Vegyület száma	Faj	K_i [nM]	IC_{50} [nM]
1.	OX ₁	55	ember	267	292
2.		14 (ref.)		60	30
3.		12		0,35	50
4.	D ₁ DR	90	ember	8,3	21
5.		64		72	179
6.		61		300	300
7.		30 (ref.)		0,3	---

A fluoreszcens **61** molekuláról a KOKI Molekuláris Neurobiológiai Laboratóriuma konfokális fluoreszcens mikroszkópos felvételeket is készített *N*-terminálison HA-taggal jelölt D₁ receptorral tranziensen transzfektált HEK293 sejtvonalon. A felvételeken látható a HA-tagre specifikus antitest zöld jelölése, amely a D₁ dopamin receptorokat mutatja. Ez egybeesik a fluoreszcens ligandum sárga jelölésével az adott koncentrációban, amely alátámasztja a **61** specifikus D₁DR jelölését és a megmaradt affinitást. A **61** fluoreszcens ligandum mutatta a legkisebb affinitást a radioligand alapú kötődési vizsgálatok során (5. táblázat), így a további fluoreszcens D₁DR ligandumoktól is hasonló eredményt várunk.

a) Anti-HA immunfestés

b) 100 nM **61**, 20 perc, 4°C

c) Összevont kép



56. ábra: A KOKI Molekuláris Neurobiológiai Laboratóriuma által készített konfokális fluoreszcens mikroszkópos felvételek

5. KÍSÉRLETI RÉSZ

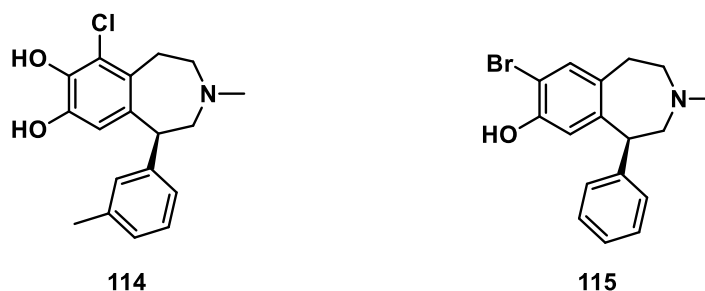
5.1. A dokkolás során alkalmazott vizsgálati módszerek

A szerkezeti elemzéshez a GPCRdb (G protein-coupled receptor database) adatbázisban rendelkezésre álló szerkezeteket használtuk fel (6. táblázat).

6. táblázat: A humán OX₁, D₁DR és KOR kristályszerkezetei

Sorszám	Fehérje	Ligandum	PDB kód	Felbontás [Å]	Hivatkozás ^{69,94,105}
1.	OX ₁	ACT-462206 (14)	6TP4	3,010	Rappas, M.; Ali, A.A.E. <i>et al</i> , <i>J. Med. Chem.</i> , 2020 , 63, 1528–1543.
2.	D ₁ DR	SKF-83959 (30)	7CRH	3,300	Xiao, P.; Yan, W. <i>et al</i> , <i>Cell</i> , 2021 , 184, 943–956.
3.	KOR	JDTic (113)	6VI4	3,300	Che, T.; English, J. <i>et al</i> , <i>Nat. Commun.</i> , 2020 , 11, 1145.

A D₁DR és az általunk vizsgálni kívánt SKF-83566 ligandum (**114**) háromdimenziós szerkezetét eddig még nem határozták meg, így szerkezeti hasonlóság alapján a 7CRH fehérje SKF83959 ligandummal (**115**) képzett komplexét vettük a számolásaink alapjául (57. ábra).



57. ábra: Az SKF-83959 (**114**) és az SKF-83566 (**115**) ligandum szerkezeti képlete

Egy szerkezet alapú modellezési feladat sikeres végrehajtása nem csak megfelelő számítási kapacitást és megbízhatóan működő programot igényel, hanem pontos kiindulási molekulaszervezeteket is. Még nagy felbontású szerkezetek esetén is szükség van a fehérje előkészítésére: hiányzó hidrogének pótlása, helytelen térszerkezetű oldalláncok kiigazítása vagy bizonyos protonált állapotok módosítása. Ennek érdekében elsőként elvégeztem a fehérje szerkezetének előkészítését a *Schrödinger Maestro Protein Preparation*, majd a *Minimization Macromodel* segédprogramjainak segítségével. A ligandumok dokkolásához 3D molekulaszervezetekre volt szükségem, amelyhez a *Schrödinger Ligprep* programját alkalmaztam (pH: 7±2). A *LigPrep* a 2D molekulaszervezetekből gyors és hatékony eljárással valódi 3D szerkezeteket épít fel, amely során képes figyelembe venni a tautomerizációból, ionizációból és sztereokémiai centrumokból származó variációkat is. Az előkészített fehérjeszerkezetből készítettem el a gridet (*Schrödinger Maestro Receptor Grid Generation*;

grid box mérete: 36×36×36 Å (6TP4); 20×20×20 Å (7CRH)), majd ebbe a szerkezetbe dokkoltam bele a vizsgálni kívánt szerkezeteket.

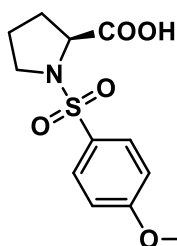
5.2. A szintézisek során alkalmazott vizsgálati módszerek

Kiindulási anyagként kereskedelmi forgalomból beszerezhető vagy a bemutatott reakcióutak alapján előállított anyagokat használtam. A vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatokhoz Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ lapot használtam, a VRK lapok kiértékelését 254 nm hullámhosszú fény segítségével végeztem UV-lámpa alkalmazásával. A kromatográfiás tisztításokat Teledyne ISCO CombiFlash Rf200 UV / VIS készülékkel végeztem. A tisztításhoz eluensként hexán–etil-acetát, illetve acetonitril–víz eluenskeverékeket, állófázisként 25–40 µm szemcseméretű flash szilikagélt alkalmaztam. A folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás (HPLC-MS) méréseket Shimadzu LCMS-2020 típusú készülékkel végeztem el 50–1000 m/z tartományban, amely Reprospher 100 C18-DE (5 µm; 100 × 3mm) oszlopot, pozitív és negatív kettős ionforrást (DUIS[±]) és kvadrupól MS analizátort tartalmaz. A gradiens elúció során 0,01% hangyasavat tartalmazó HPLC víz: HPLC acetonitril elegyet alkalmaztam mozgófázisként. Az NMR méréseket Unity Inova 300 MHz típusú készüléken vettem fel vagy Varian 500 (500 MHz) spektrométerrel készítették el a témavezetőim, tetrametil-szilán belső standard alkalmazásával deuterodimetil-szulfoxid, deuterokloroform vagy deuterioacetonitril oldószerekben. A kémiai eltolódás értékeket (δ) ppm-ben, míg a csatolási állandókat (J) Hz-ben tüntetem fel. A kémiai eltolódásokat a megfelelő deuterált oldószer, hidrogén jeléhez igazítottam. A ¹H NMR spektrumok leírásánál a következő jelöléseket használtam a multiplicitás jelölésére: s: szingulett, d: dublett, t: triplett, q: kvartett, m: multipllett, br: kiszélesedett jel. Bizonyos vegyületek analitikai vizsgálata még folyamatban van. A nagyfelbontású tömegspektrometriás méréseket Sciex TripleTOF 5600+ típusú DuoSpray ionforrással felszerelt nagyfelbontású tömegspektrométerrel (AB Sciex, CA, USA) a TTK Szerkezetkutató Központ MS Metabolomika Kutatólaboratóriumában végezték el. A mintákat acetonitrilben oldották, majd a folyamatos eluensáramba direkt injektálással juttatták be. Az ionizáció pozitív ESI (electrospray/elektroporlasztásos ionizáció) módban történt, a töltött részecskék szétválasztása kvadrupól – repülési idő hibrid analizátorral valósult meg. A vizsgálatot és kiértékelést TOF-MS módban végezték el, a detektálás MCP (multi-channel plate) detektorral történt. Az ismert vegyületek esetén ¹H NMR adatokat közlök. A még nem publikált vegyületek esetén ¹H és ¹³C NMR, illetve HRMS adatokat mutatok be.

5.3. A szintetikus munkához tartozó receptek és analitikai vizsgálatok

5.3.1. A fluoreszcens ACT-462206 ligandum szintézise

5.3.1.1. ((4-Metoxifenil)sulfonil)- L-prolin (65)



Az L-prolint (**24**; 3,5 mmol; 403 mg) feloldottam nátrium-karbonátot (445 mg; 4,2 mmol) tartalmazó vízben (10 ml), majd az oldathoz jeges-vizes hűtés közben 4 részletben, 1 óra alatt hozzáadtam a 4-metoxibenzolszulfonil-kloridot (**22**; 4,2 mmol; 868 mg). Az elegyet 24 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, majd az így kapott szuszpenziót 10 ml 1 M-os sósavval további 24 órát kevertettem. Ezt követően az elegyet 4 × 5 ml etil-acetáttal extraháltam. A szerves fázist nátrium-szulfáton szárítottam, majd szűrés után bepároltam. A nyersterméket fordított fázisú flash kromatográfiával tisztítottam (víz–MeCN; 0,01% hangyasav).

Termelés: 455 mg (46%), fehér olajos anyag.

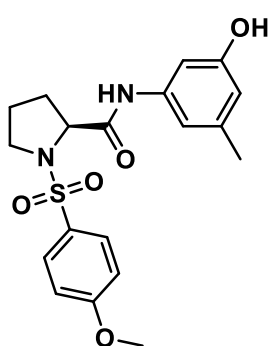
^1H NMR (300 MHz; CDCl_3) δ 8,52 (s; 1H); 7,85 – 7,79 (m; 2H); 7,05 – 6,89 (tt; 2H); 4,61 (ddd; J = 11,3; 7,7; 3,5 Hz; 1H); 4,24 (dd; J = 8,2; 3,6 Hz; 1H); 3,83 – 3,76 (m, 1H); 3,61 (dt; J = 9,9; 5,5 Hz; 1H); 3,50 (ddd; J = 9,8; 6,8; 4,2 Hz; 1H); 3,38 (dq; J = 6,6; 3,8; 3,2 Hz; 1H); 3,24 (m; 1H); 2,43 – 1,36 (m; 3H).¹⁰⁶

^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3) δ 175,4; 163,4; 129,8; 129,1; 114,5; 59,0; 55,7; 48,9; 30,7; 24,7.¹⁰⁶

$\text{HRMS}[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{mért}} = 286,0749$; $\text{HRMS}[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{számított}} = 286,0749$.

$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_5\text{S}$

5.3.1.2. (S)-N-(3-Hidroxi-5-metilfenil)-1-((4-metoxifenil)sulfonil)pirrolidin-2-karboxamid (67)



A 3-amino-5-metilfenolt (**66**; 1,33 mmol; 164 mg), a ((4-metoxifenil)sulfonil)-L-prolint (**65**; 1,596 mmol; 455 mg) és az EDC · HCl-t (1,729 mmol; 331 mg) feloldottam 10 ml diklórmétánban, majd 2 órát szobahőmérsékleten kevertettem. Ezt követően 10 ml 1,5 M-os sósavat adtam az elegyhez, és 3 × 10 ml etil-acetáttal extraháltam. Az egyesített szerves fázist nátrium-szulfáton szárítottam, majd szűrés után bepároltam. A nyersterméket normál fázisú flash kromatográfiával tisztítottam (hexán–EtOAc).

Termelés: 252 mg (49 %), sárga kristályok, op. 77–80 °C (hexán–EtOAc).

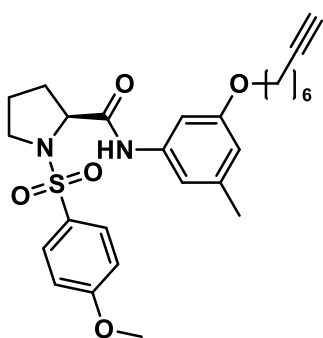
^1H NMR (300 MHz; CDCl_3) δ 8,77 (s; 1H); 7,90 (br; 1H); 7,79 (d; $J = 8,9$ Hz; 2H); 7,60 (s; 1H); 7,01 (d; $J = 8,9$ Hz; 2H); 6,58 (s; 1H); 6,47 (s; 1H); 4,17 (m; 1H); 4,10 (q; $J = 7,1$ Hz; 1H); 3,87 (s; 3H); 3,60 (ddd; $J = 10,4; 6,6; 3,7$ Hz; 1H); 3,25 (dt; $J = 9,9; 7,5$ Hz; 1H); 2,26 (s; 3H); 2,04 (s; 1H); 1,83 – 1,59 (m; 3H).

^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3) δ 171,0; 169,8; 163,4; 156,9; 139,7; 137,5; 129,8; 126,6; 114,40; 111,7; 104,1; 62,7; 55,4; 49,9; 29,8; 24,2; 21,0.

$\text{HRMS}[\text{M} + \text{H}]_{\text{mért}}^+ = 391,1327; \text{HRMS}[\text{M} + \text{H}]_{\text{számított}}^+ = 391,1327.$

$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$

5.3.1.3. (S)-1-((4-Metoxifenil)sulfonil)-N-(3-metil-5-(okt-7-in-1-iloxo)fenil)-pirrolidin-2-karboxamid (69)



Összemértem dimetilformamidban (4 ml) a **67** L-prolin származékot (0,30 mmol, 117 mg), a kálium-karbonátot (0,90 mmol; 124 mg) és a 8-brómokt-1-int (**68**; 0,45 mmol; 71 μl). Az elegyet 2 órán keresztül 60 °C-on kevertettem. Ezt követően hozzáadtam 15 ml vizet, és 3×15 ml etil-acetáttal extraháltam. Az egyesített szerves fázist 15 ml telített nátrium-klorid oldattal mostam, nátrium-szulfáton szárítottam, majd szűrés után bepároltam. A nyersterméket fordított fázisú flash kromatográfiával tisztítottam (víz–MeCN; 0,01% hangyasav).

Termelés: 60 mg (40%), sárga olaj.

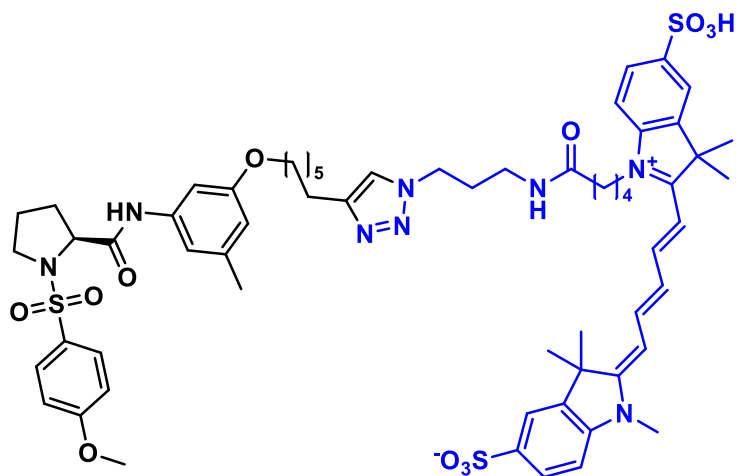
^1H NMR (300 MHz; CDCl_3) δ 8,69 (s; 1H); 7,81 (d; $J = 8,9$ Hz; 2H); 7,11 (s; 1H); 7,02 (d; $J = 8,9$ Hz; 2H); 6,90 (s; 1H); 6,50 (s; 1H); 4,14 (dd; $J = 8,7; 2,7$ Hz; 1H); 3,94 (t; $J = 6,4$ Hz; 2H); 3,88 (s; 3H); 3,60 (ddd; $J = 10,3; 7,1; 3,3$ Hz; 1H); 3,23 (td; $J = 9,7; 6,7$ Hz; 1H); 2,34 (dd; $J = 6,2; 3,1$ Hz; 1H); 2,29 (s; 3H); 2,20 (td; $J = 6,8; 2,6$ Hz; 2H); 1,94 (t; $J = 2,6$ Hz; 1H); 1,84 – 1,40 (m; 11H).

^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3) δ 169,1; 163,8; 159,7; 139,9; 138,4; 130,1; 127,3; 114,7; 112,9; 112,2; 103,2; 84,7; 68,3; 67,9; 63,1; 55,8; 50,2; 29,8; 29,3; 28,6; 28,5; 25,7; 24,6; 21,7; 18,5.

$\text{HRMS}[\text{M} + \text{H}]_{\text{mért}}^+ = 499,2260; \text{HRMS}[\text{M} + \text{H}]_{\text{számított}}^+ = 499,2266.$

$\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$

5.3.1.4. (E)-2-((2E,4E)-5-(1-(6-((3-(4-(6-(3-((S)-1-((4-Metoxifenil)sulfonil)-pirrolidin-2-karboxamido)-5-metilfenoxi)hexil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)propil)-amino)-6-oxohe-xil)-3,3-dimetil-5-szulfo-3H-indol-1-ium-2-il)penta-2,4-dien-1-ilidén)-1,3,3-trimetil-indolin-5-szulfonát (55)



Dimetilformamid és víz 1:1 arányú elegyében (1 ml) összemértem a **69** karboxamidot (0,0265 mmol; 13 mg), a réz-szulfát-pentahidrátot (0,1590 mmol; 33 mg), a nátrium-L-aszkorbátot (0,3180 mmol; 52 mg), valamint a szulfo-cianin-5-azid festéket (**70**; 0,0292 mmol; 22 mg), majd 24 órán át kevertetem szobahőmérsékleten. A reakcióelegyet további feldolgozás nélkül tisztítottam preparatív HPLC segítségével (víz–MeCN; 0,01% hangyasav). A megfelelő frakciókat liofilizálással oldószermentesítettem.

Termelés: 5,5 mg (17%), sötétkék kristályok.

^1H NMR (500 MHz; MeCN- d_3) δ 8,08 (t; J = 13,2 Hz; 2H); 7,81 (d; J = 1,6 Hz; 3H); 7,80 – 7,75 (m; 4H); 7,59 (s; 1H); 7,22 (dd; J = 8,3; 1,9 Hz; 2H); 7,10 – 7,06 (m; 2H); 6,99 (s; 1H); 6,89 (s; 1H); 6,53 (t; J = 12,4 Hz; 2H); 6,49 (s; 1H); 6,19 (t; J = 14,0 Hz; 2H); 5,35 – 5,33 (m; 1H); 4,27 (t; J = 7,0 Hz; 2H); 4,08 (dd; J = 8,4; 4,4 Hz; 2H); 3,97 (t; J = 7,4 Hz; 2H); 3,90 (t; J = 6,6 Hz; 2H); 3,83 (s; 3H); 3,25 – 3,18 (m; 2H); 3,06 (t; J = 6,7 Hz; 2H); 2,62 (d; J = 7,6 Hz; 2H); 2,23 (s; 3H); 2,13 – 2,06 (m; 4H); 1,89 – 1,68 (m; 4H); 1,66 (s; 15H); 1,63 – 1,50 (s; 1H); 1,45 – 1,31 (m; 5H); 1,30 – 1,23 (m; 6H); 0,84 (t; J = 6,5 Hz; 1H).

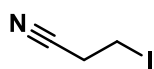
HRMS[$\text{M} + \text{H}$] $^+_{\text{mért}}$ = 1223,4974; HRMS[$\text{M} + \text{H}$] $^+_{\text{számított}}$ = 1223,4979.

HRMS[$\frac{\text{M}}{z} + \text{H}$] $^+_{\text{mért}}$ = 612,2523; HRMS[$\frac{\text{M}}{z} + \text{H}$] $^+_{\text{számított}}$ = 612,2568, ahol $z = 2$

$\text{C}_{62}\text{H}_{78}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{S}_3$

5.3.2. A fotoaktív fluoreszcens ACT-462206 ligandum szintézise

5.3.2.1. 3-Jód-propionitril (74)

 3-Bróm-propionitrilt (**72**; 1,7 mmol; 141 μ l) feloldottam acetonban (7 ml), majd hozzáadtam a nátrium-jodidot (25,5 mmol; 3,82 g). A heterogén reakcióelegyet 2 órán keresztül, 100 °C-on mikrohullámú körülmények között kevertettem, majd leszűrtem és bepároltam. Ezt követően hozzáadtam 15 ml vizet, és 3 $\times$ 15 ml dietil-éterrel extraháltam. A szerves fázist 15 ml telített nátrium-klorid oldattal mostam, nátrium-szulfáton szárítottam, majd szűrés után bepároltam.

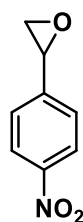
Termelés: 173 mg (56%), sötétbarna olaj.

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3) δ 3,28 (t; J = 7,0 Hz; 2H); 3,01 (t; J = 7,0 Hz; 2H).¹⁰⁷

$\text{C}_3\text{H}_4\text{NI}$

5.3.3. A fluoreszcens SKF-83566 ligandum szintézise

5.3.3.1. 2-(4-Nitrofenil)oxirán (25)

 A 2-bróm-1-(4-nitrofenil)etán-1-ont (**78**; 25,50 mmol; 5,003 g) feloldottam metanolban (100 ml), és jeges hűtés közben több részletben hozzáadtam a nátrium-borohidridet (28,05 mmol; 0,853 g). A reakcióelegyet szobahőmérsékleten 3 óráig kevertettem, majd hozzáadtam a kálium-karbonátot (28,05 mmol; 3,117 g), és 24 órán keresztül szintén szobahőmérsékleten kevertettem. Ezt követően hozzáadtam 100 ml vizet, és 3 $\times$ 50 ml dietil-éterrel extraháltam. Az egyesített szerves fázist 50 ml telített nátrium-karbonát oldattal mostam, nátrium-szulfáton szárítottam.

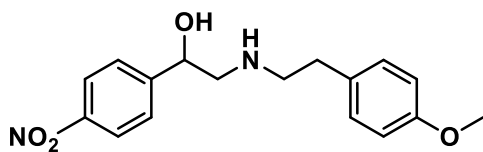
Termelés: 3,130 g (92%), törtfehér kristályok, op. 73–74°C (dietil-éter).

^1H NMR (500 MHz; CDCl_3) δ 8,21 (d; J = 8,8 Hz; 2H); 7,45 (d; J = 8,7 Hz; 2H); 3,96 (dd; J = 4,1; 2,5 Hz; 1H); 3,23 (dd; J = 5,5; 4,1 Hz; 1H); 2,78 (dd; J = 5,5; 2,5 Hz; 1H).¹⁰⁸

^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3) δ 147,9; 145,4; 126,4; 123,9; 51,8; 51,6.¹⁰⁸

$\text{HRMS}[\text{M} + \text{H}]_{\text{mért}}^+ = 166,0498$; $\text{HRMS}[\text{M} + \text{H}]_{\text{számított}}^+ = 166,0504$

$\text{C}_8\text{H}_7\text{NSO}_3$

5.3.3.2. A 2-((4-Metoxifenil)amino)-1-(4-nitrofenil)etán-1-ol (27)

A 25 oxiránhoz (18,85 mmol; 3,113 mg) hozzáadtam a 2-(4-metoxifenil)etánamint (26; 28,28 mmol; 4,147 ml). Argon atmoszféra alatt 100 °C-on kevertettem 3 órán át. Ezt követően eldörzsöltem 30 ml dietil-éterben, majd jeges hűtés mellett kevertettem 1 órát. A kivált kristályokat szűrtem, majd 4 × 20 ml dietil-éterrel mostam.

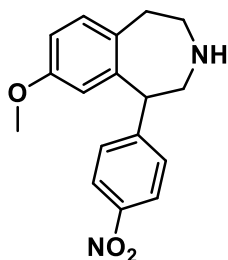
Termelés: 4,902 g (82%), fehér kristályok, op. 107–108 °C (dietil-éter).

^1H NMR (500 MHz; CDCl_3) δ 8,19 (d; J = 8,8 Hz; 2H); 7,52 (d; J = 8,7 Hz; 2H); 7,11 (d; J = 8,6 Hz; 2H); 6,85 (d; J = 8,6 Hz; 2H); 4,73 (dd; J = 9,1; 3,7 Hz; 1H); 3,79 (s; 3H); 2,98 – 2,91 (m; 2H); 2,86 (dt; J = 11,6; 6,8 Hz; 1H); 2,75 (dd; J = 6,8; 3,4 Hz; 2H); 2,61 (dd; J = 12,3; 9,2 Hz; 1H).

^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3) δ 158,3; 150,3; 147,4; 131,5; 129,7; 126,6; 123,7; 114,1; 70,7; 56,7; 55,4; 50,7; 35,6;

$\text{HRMS}[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{mért}} = 317,1495$; $\text{HRMS}[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{számított}} = 317,1501$

$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$

5.3.3.3. 8-Metoxi-1-(4-nitrofenil)-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzo[d]azepin (28)

A polifoszforsavat (3,50 g) felmelegítettem 90 °C-ra, majd ehhez adagoltam hozzá a 27 vegyületet (11,3 mmol; 3,575 g) kis mennyiségekben. Két órán keresztül kevertettem 90 °C-on, majd óvatosan hozzácsepegtettem 50 ml vizet és 40 m/m%-os NaOH oldattal beállítottam a pH-t 10–11 közé. Az így kapott vizes oldatot 3 × 30 ml diklórmétánnal extraháltam. Az egyesített szerves fázist 30 ml vízzel és 30 ml telített NaCl oldattal mostam, majd nátrium-szulfáton szárítottam, szűrtem és bepároltam. A következő szintetikus lépésben tisztítás nélkül használtam fel. Termelés: 2,36 g (70%), sötétbarna olaj.

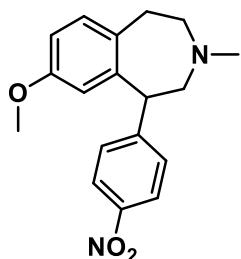
^1H NMR (300 MHz; CDCl_3) δ 8,18 (d; J = 8,8 Hz; 2H); 7,34 (d; J = 4,1 Hz; 2H); 7,08 (d; J = 8,2 Hz; 1H); 6,70 (dd; J = 8,2; 2,7 Hz; 1H); 6,29 (d; J = 2,6 Hz; 1H); 4,36 (d; J = 7,6 Hz; 1H); 3,71 (s; 3H); 3,13 (dd; J = 12,4; 7,8 Hz; 1H); 2,99 – 2,90 (m; 2H); 2,79 – 2,73 (m; 1H); 2,71 – 2,62 (m; 1H); 2,53 (dd; J = 11,0; 8,8 Hz; 1H); 2,40 (s; 3H).

^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3) δ 158,3; 150,5; 146,6; 143,8; 133,5; 131,1; 129,3; 123,8; 115,7; 110,9; 61,9; 57,8; 55,3; 50,4; 48,0; 35,4.

$\text{HRMS}[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{mért}} = 313,1546$; $\text{HRMS}[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{számított}} = 313,1552$

$\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$

5.3.3.4. 8-Metoxi-3-metil-1-(4-nitrofenil)-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzo[d]azepin (80)



A tetrahidro-1H-benzo[d]azepint (**28**; 6,5 mmol; 1,94 g) feloldottam metanolban (20 ml), majd hozzáadtam 0,620 ml 35 m/m%-os formaldehid oldatot (7,8 mmol) és 2,459 g nátrium-ciano-borohidridet (65 mmol). A reakcióelegyet 2 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, majd 20 ml vizet adtam hozzá, és 3×30 ml etil-acetáttal extraháltam. Az egyesített szerves fázist 20 ml telített nátrium-klorid oldattal mostam, nátrium-szulfáton szárítottam, szűrtem és bepároltam. A nyersterméket fordított fázisú flash kromatográfia segítségével tisztítottam (víz–MeCN; 0,01% hangyasav).

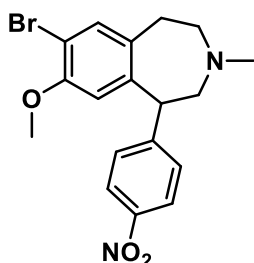
Termelés: 1,320 g (65%), sötétbarna olaj.

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8,17 (d; $J = 8,8$ Hz; 2H); 7,42 (d; $J = 8,7$ Hz; 2H); 7,10 (d; $J = 8,3$ Hz; 1H); 6,74 (dd; $J = 8,2$; 2,7 Hz; 1H); 6,49 (s; 1H); 4,42 (d; $J = 6,8$ Hz; 1H); 3,67 (s; 3H); 3,28 (m; 1H); 2,74 (dd; $J = 14,8$; 7,8 Hz; 1H); 2,66 (d; $J = 12,7$ Hz; 1H); 2,60 – 2,52 (m; 2H); 2,38 – 2,29 (m; 1H); 2,27 (s; 3H).

$\text{HRMS}[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{mért}} = 299,1397$; $\text{HRMS}[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{számított}} = 299,1317$

$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$

5.3.3.5. 7-Bróm-8-metoxi-3-metil-1-(4-nitrofenil)-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzo[d]azepin (81)



A tetrahidro-1H-benzo[d]azepint (**80**; 2,45 mmol; 765 mg) feloldottam metanolban (25 ml), majd hozzáadtam a piridínium-perbromidot (6,13 mmol; 1,96 g), és forraltam 24 órán keresztül. Ezt követően az elegyhez hozzáadtam 15 ml vizet, majd 3×30 ml etil-acetáttal extraháltam. Az egyesített szerves fázist 20 ml telített nátrium-klorid oldattal és 20 ml vízzel mostam, nátrium-szulfáton szárítottam, majd bepároltam. A nyersterméket normál fázisú flash kromatográfiával tisztítottam (hexán–EtOAc).

Termelés: 345 mg (36%), barna olaj.

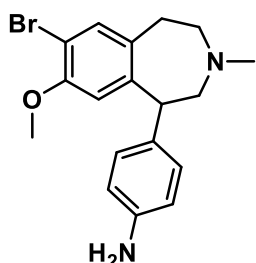
^1H NMR (300 MHz; CDCl_3) δ 8,19 (d; $J = 8,8$ Hz; 2H); 7,34 (s; 1H); 7,33 (d; $J = 8,8$ Hz; 2H); 6,35 (s; 1H); 4,34 (d; $J = 7,4$ Hz; 1H); 3,72 (s; 3H); 3,19 (dd; $J = 12,6$; 7,4 Hz; 1H); 2,99 – 2,85 (m; 2H); 2,82 – 2,62 (m; 1H); 2,57 (t; $J = 5,1$ Hz; 2H); 2,39 (s; 3H).

^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3) δ 154,4; 150,0; 146,6; 142,8; 135,0; 134,7; 129,1; 123,8; 113,4; 109,5; 61,4; 57,4; 56,3; 50,5; 48,0; 35,1.

$\text{HRMS}[\text{M} + \text{H}]_{\text{mért}}^+ = 391,0651$; $\text{HRMS}[\text{M} + \text{H}]_{\text{számított}}^+ = 391,0657$

$\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{BrN}_2\text{O}_3$

5.3.3.6. 4-(8-Metoxi-3-metil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzo[d]azepin-1-il)anilin (82)



A **81** tetrahidro-1H-benzo[d]azepint (0,53 mmol; 207 mg) feloldottam 10 ml etil-acetátban, majd hozzáadtam az ón(II)-klorid-dihidrátot (2,65 mmol; 502 mg) és 5 óráig 60 °C-on kevertettem. Ezt követően az elegyet 2 × 5 ml 5 m/m%-os nátrium-karbonáttal, az egyesített vizes fázist 3 × 10 ml etil-acetáttal, az egyesített szerves fázist pedig 10 ml telített nátrium-kloriddal és 10 ml vízzel extraháltam. A nyerstermék nem igényelt további tisztítást.

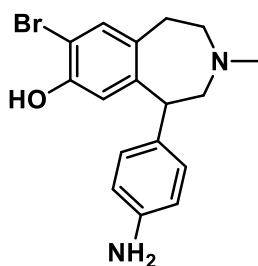
Termelés: 132 mg (69%), sötétbarna olaj.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,20 (s; 1H); 6,94 (d; $J = 7,9$ Hz; 2H); 6,68 (d; $J = 8,0$ Hz; 2H); 6,37 (s; 1H); 4,16 (d; $J = 8,9$ Hz; 1H); 3,63 (br; 2H); 3,07 (d; $J = 12,3$ Hz; 2H); 2,88 (m; 1H); 2,73 (dd; $J = 14,7$; 7,2 Hz; 2H); 2,38 (s; 3H); 2,30 (t; $J = 11,2$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 154,2; 145,5; 145,1; 134,3; 133,8; 132,1; 129,2; 115,5; 112,9; 108,5; 62,7; 56,8; 56,1; 48,1; 47,1; 34,3.

$\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{BrN}_2\text{O}$

5.3.3.7. 5-(4-Aminofenil)-8-bróm-3-metil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzo[d]azepin-7-ol (30)



A **82** anilint (0,287 mmol; 104 mg) vízmentes diklórmétánban (2 ml) feloldottam, majd óvatosan hozzácepegtettem a bórtribromid 1 M-os diklórmétános oldatát (1,148 mmol; 1,15 ml) -78 °C-on argon atmoszféra alatt. Az elegyet 1 óra után felengedtem szobahőmérsékletre és 3 órán keresztül kevertettem. Ezt követően az elegyet jeges hűtés mellett 15 ml vízzel megbontottam, majd 20 ml telített nátrium-hidrogén-karbonát oldatot adtam

hozzá. Az elegyet 3×10 ml etil-acetáttal extraháltam, majd az egyesített szerves fázist 10 ml telített nátrium-klorid oldattal, és 10 ml vízzel mostam, nátrium-szulfáton szárítottam, szűrtem és bepároltam. A következő szintetikus lépésben további tisztítás nélkül használtam fel.

Termelés: 70,8 mg (71%), világosbarna olaj.

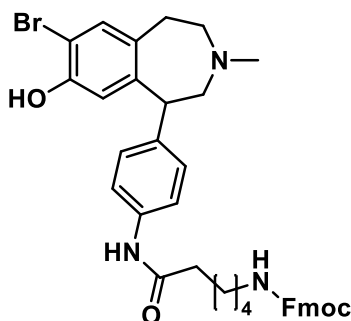
^1H NMR (300 MHz; DMSO- d_6) δ 7,20 (s; 1H); 6,94 (d; $J = 8,1$ Hz; 2H); 6,68 (d; $J = 8,0$ Hz; 2H); 6,37 (s; 1H); 4,17 (d; $J = 8,7$ Hz; 1H); 3,64 (br, 2H); 3,08 (d; $J = 12,5$ Hz; 2H); 2,91 (m; 1H); 2,81 – 2,63 (m; 2H); 2,38 (s; 3H); 2,34 (m, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz; DMSO- d_6) δ 151,9; 146,9; 146,2; 133,3; 132,7; 129,9; 128,6; 116,4; 114,1; 105,6; 62,8; 56,9; 47,6; 47,0; 33,8.

HRMS $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{mért}} = 347,0753$; HRMS $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{számított}} = 347,0759$

$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{BrN}_2\text{O}$

5.3.3.8. (9H-Fluorén-9-il)metil(6-((4-(7-bróm-8-hidroxi-3-metil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzo[d]azepin-1-il)fenil)amino)-6-oxohexil)karbamát (84)



A **83** karbonsavat (0,222 mmol; 79 mg), a HATU-t (0,222 mmol; 84 mg), valamint a DIPEA-t (0,606 mmol; 106 μl) feloldottam dimetilformamidban (5 ml), és 10 percig jeges hűtés alatt kevertetem. Ezt követően a **30** anilin (0,202 mmol; 70 mg) dimetilformamidos oldatához (5 ml) jeges hűtés közben lassan hozzácsepegtettem a karbonsavat is tartalmazó oldatot.

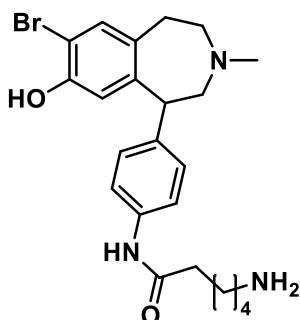
A reakcióelegyet 2 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertetem, majd további feldolgozás nélkül fordított fázisú flash kromatográfiával tisztítottam (víz–MeCN; 0,01% hangyasav).

Termelés: 60 mg (44%), sárga olaj.

MS $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{mért}} = 683$; MS $[\text{M} + \text{H}]^+_{\text{számított}} = 683$

$\text{C}_{38}\text{H}_{40}\text{BrN}_3\text{O}_4$

5.3.3.9. 6-Amino-*N*-(4-(7-bróm-8-hidroxi-3-metil-2,3,4,5-tetrahidro-1*H*-benzo[*d*]-azepin-1-il)fenil)hexánamid (85)



Az Fmoc-védett amint (**84**; 0,084 mmol; 57 mg) feloldtam dimetilformamidban (1,5 ml), és piperidint (365 µl) adtam hozzá, majd szobahőmérsékleten 1 órán át kevertetem. Ezt követően további feldolgozás nélkül fordított fázisú flash kromatográfiával tisztítottam (víz–MeCN; 0,01% hangyasav).

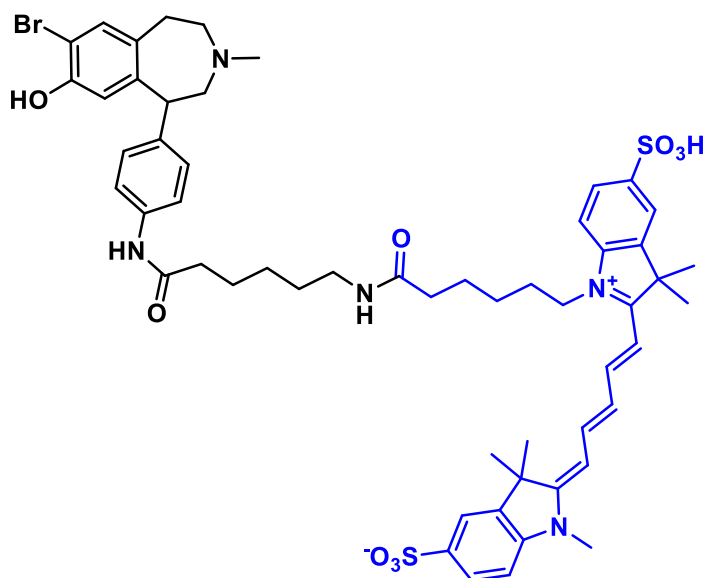
Termelés: 10 mg (26%), sárga olaj.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9,97 (br; 1H); 7,57 (d; J = 8,1 Hz; 2H); 7,23 (s; 1H); 7,07 (d; J = 8,2 Hz; 2H); 6,31 (s; 1H); 4,14 (t; J = 4,8 Hz; 1H); 2,87 – 2,78 (m, 4H); 2,65 (d; J = 11,5 Hz; 2H); 2,54 (s; 1H); 2,31 (t, J = 7,2 Hz; 2H); 2,26 (s; 3H); 1,65 – 1,51 (m; 5H); 1,34 (s; 3H).

HMBC (keresztcsúcsok): 7,57–(137,9; 119,6); 7,23–(152,6; 145,6; 106,3; 34,5); 7,07–(137,9; 128,7; 48,6); 6,31–(133,7; 106,3); 2,54–(42,4; 40,1); 2,31–(171,55); 2,26–(57,43; 62,7).

$\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{BrN}_3\text{O}_2$

5.3.3.10. (*E*)-2-((2*E*,4*E*)-5-(1-(6-(((4-(7-Bróm-8-hidroxi-3-metil-2,3,4,5-tetrahidro-1*H*-benzo[*d*]azepin-1-il)fenil)amino)-6-oxohexil)amino)-6-oxohexil)-3,3-dimetil-5-szulfó-3*H*-indol-1-ium-2-il)penta-2,4-dién-1-ilidén)-1,3,3-trimetilindolin-5-szulfonát (61)



Az amint (**85**; 0,02 mmol; 9 mg) feloldottam dimetilszulfoxidban (500 µl), majd hozzáadtam a DIPEA-t (0,06 mmol; 10 µl) és a szulfo-cianin-5-NHS-észter festéket (**86**; 0,02 mmol; 16 mg). A reakcióelegyet 2 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, és további feldolgozás nélkül preparatív HPLC segítségével tisztítottam (víz–MeCN; 0,01% hangyasav).

Termelés: 8 mg (38 %), sötétkék kristályok.

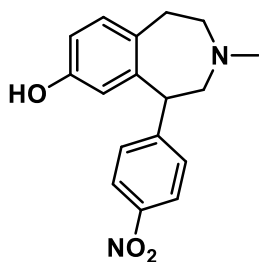
^1H NMR (500 MHz, MeCN- d_3) δ 8,40 (s; 1H); 8,09 (t; $J = 13,1$ Hz; 2H); 7,82 (s; 2H); 7,79 (dd; $J = 8,3$; 3,1 Hz; 2H); 7,48 (d; $J = 8,2$ Hz; 2H); 7,30 (s; 1H); 7,21 (s; 2H); 7,20 (s; 1H); 7,07 (d; $J = 8,3$ Hz; 2H), 6,54 (t; $J = 12,5$ Hz; 1H); 6,25 (s; 1H); 6,20 (dd; $J = 13,8$; 7,1 Hz; 2H); 5,33 (br; 1H); 4,79 (s; 1H); 4,71 (s; 1H); 4,16 (d; $J = 5,9$ Hz; 1H); 3,96 (t; $J = 7,5$ Hz; 2H); 3,88 (s; 1H); 3,51 (s; 3H); 2,92 – 2,88 (m; 2H); 2,71 – 2,66 (m; 2H); 2,30 (t; $J = 7,5$ Hz; 2H); 2,26 (s; 1H); 2,24 (s; 3H); 2,08 (t; $J = 7,4$ Hz; 2H); 1,73 (t; $J = 7,7$ Hz; 1H); 1,67 (s; 12H); 1,60 (dt; $J = 19,0$; 7,5 Hz; 2H); 1,41 (d; $J = 8,5$ Hz; 2H), 1,37 – 1,26 (m; 4H), 1,25 (s; 2H).

$\text{HRMS}[\frac{M}{z} + \text{H}]_{\text{mért}}^+ = 542,6815$; $\text{HRMS}[\frac{M}{z} + \text{H}]_{\text{számított}}^+ = 542,6821$, ahol $z = 2$

$\text{C}_{55}\text{H}_{66}\text{N}_5\text{O}_9\text{S}_2$

5.3.4. A fluoreszcens SKF-83566 ligandum szintézise során az alternatív útvonalakhoz tartozó vegyületek

5.3.4.1. 3-Metil-5-(4-nitrofenil)-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzo[d]azepin-7-ol (**87**)



A **80** metoxiszármazékot (0,977 mmol; 305 mg) feloldottam vízmentes diklórmetánban (10 ml), majd óvatosan hozzácepegtettem a bór-tribromid 1 M-os diklórmetános oldatát (3,91 mmol; 4,9 ml) -78 °C-on argon atmoszféra alatt. Az elegyet 1 óra után felengedtem szobahőmérsékletre, és még 20 órán keresztül kevertettem. Ezt követően az elegyet jeges

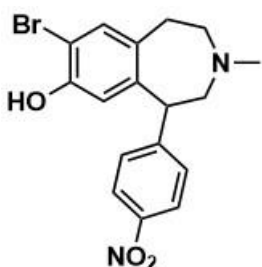
hűtés mellett 15 ml vízzel megbontottam, majd 20 ml telített nátrium-hidrogén-karbonát oldatot adtam hozzá. Az elegyet 3×10 ml etil-acetáttal extraháltam, majd az egyesített szerves fázist 2×10 ml telített nátrium-klorid oldattal és 10 ml vízzel mostam, nátrium-szulfáton szárítottam, szűrtem, és bepároltam. A következő lépésben tisztítás nélkül használtam fel.

Termelés: 276 mg (62%), sárga olaj.

$\text{MS}[\text{M} + \text{H}]_{\text{mért}}^+ = 299$

$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$

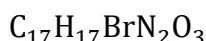
5.3.4.2. 8-Bróm-3-metil-5-(4-nitrofenil)-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzo[d]azepin-7-ol (88)



A **87** tetrahidro-1H-benzo[d]azepin-7-olt (0,62 mmol; 185 mg) feloldottam metanolban (2 ml), és jeges hűtés mellett hozzáadtam a piridínium-perbromidot (0,62 mmol; 198 mg), majd 4 órán keresztül kevertettem. A reakcióelegyhez 10 ml vizet adtam, és 3 × 10 ml etil-acetáttal extraháltam, majd az egyesített szerves fázist 2

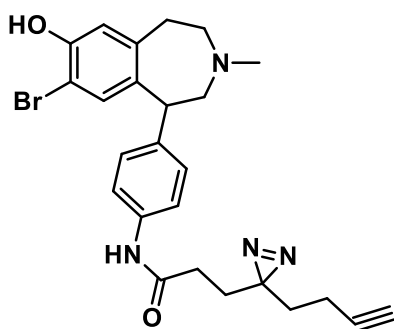
× 10 ml telített nátrium-klorid oldattal és 10 ml vízzel mostam, nátrium-szulfáton szárítottam, és bepároltam. A tisztítást fordított fázisú flash kromatográfia segítségével végeztem el (víz–MeCN; 0,01% hangyasav).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9,96 (br; 1H); 8,32 (d; J = 8,3 Hz; 2H); 8,14 (s; 1H); 7,53 (d; J = 8,3 Hz; 2H); 7,42 (s; 1H); 7,35 (d; J = 8,4 Hz; 1H); 7,13 – 6,89 (m; 1H); 6,12 (m, 1H); 4,87 (m; 1H); 3,58 (m; 2H); 2,92 (d; J = 8,5 Hz; 1H).



5.3.5. A fotoaktív fluoreszcens SKF-83566 ligandum szintézise

5.3.5.1. N-(4-(8-Bróm-7-hidroxi-3-metil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzo[d]azepin-1-il)fenil)-3-(3-(but-3-in-1-il)-3H-diazirin-3-il)propánamid (90)



A diazirin egységet tartalmazó karbonsavat (**89**; 0,01 mmol; 17 mg) és a HATU-t (0,01 mmol; 38 mg) feloldottam dimetilformamid és víz 1:1 arányú elegyében (1,0 ml), majd 10 percig jeges hűtés mellett kevertettem gondosan ügyelve arra, hogy ne érje fény. Ezt követően hozzáadtam a **30** anilint (0,05 mmol; 17 mg), majd 2 óráig szobahőmérsékleten

kevertettem. A reakcióelegyet feldolgozás nélkül fordított fázisú flash kromatográfia segítségével tisztítottam (víz–MeCN).

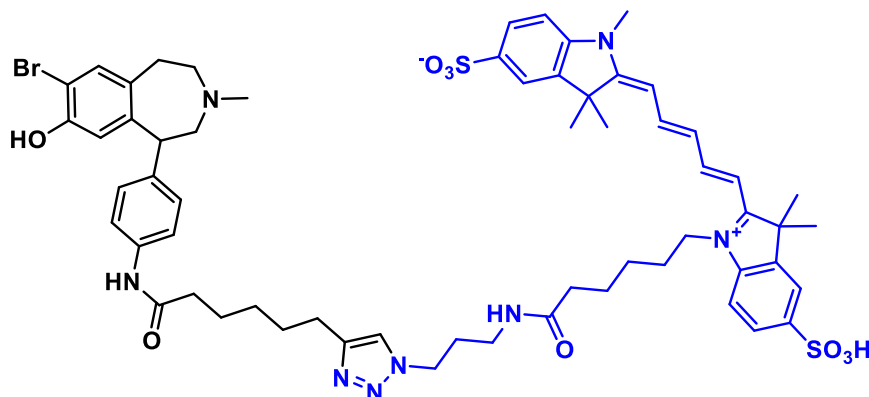
Termelés: 14 mg (57%), sárga olaj.

^1H NMR (500 MHz, MeCN- d_3) δ 8,47 (s; 1H); 7,53 (d; J = 8,1 Hz; 2H); 7,27 (s; 1H); 7,07 (d; J = 8,2 Hz; 2H); 6,22 (s; 1H); 4,38 (d; J = 8,9 Hz; 1H); 3,15 (t; J = 12,7 Hz; 2H); 3,07 – 2,94 (m; 2H); 2,75 (dd; J = 15,4; 7,1 Hz; 1H); 2,50 (t; J = 11,3 Hz; 1H); 2,43 (s; 3H); 2,19 – 2,14 (m; 4H); 1,66 – 1,59 (m; 5H).

^{13}C NMR (126 MHz, $\text{MeCN-}d_3$) δ 171,0; 153,0; 146,0; 138,5; 138,2; 134,4; 129,7; 120,7; 117,4; 107,3; 84,1; 70,4; 70,3; 62,4; 57,3; 47,6; 46,6; 33,6; 32,9; 31,6; 29,2; 29,0; 28,9; 13,7; 13,7.

$\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{BrN}_4\text{O}_2$

5.3.5.2. (E)-2-((2E,4E)-5-(1-(6-((3-(4-(6-((4-(7-Bróm-8-hidroxi-3-metil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzo[d]azepin-1-il)fenil)amino)-6-oxohexil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)propil)-amino)-6-oxohexil)-3,3-dimetil-5-szolfo-3H-indol-1-ium-2-il)penta-2,4-dién-1-ilidén)-1,3,3-trimetilindolin-5-szulfonát (91)

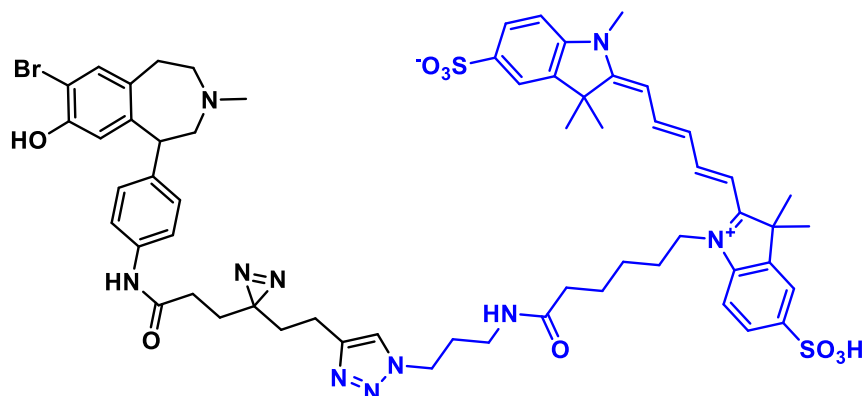


A **90** vegyületet (0,010 mmol; 5 mg) feloldottam DMF és víz 1:1 arányú elegyében (0,5 ml), majd hozzáadtam a réz-szulfát-pentahidrátot (0,050 mmol; 12,5 mg), a nátrium-L-aszkorbátot (0,100 mmol; 40 mg), valamint szulfo-cianin-5-azid festéket (**70**; 0,010 mmol; 9 mg). A tisztítást preparatív HPLC segítségével végeztem el (víz–MeCN; 0,01% hangyasav). A megfelelő frakciókat liofilizálással oldószermentesítettem.

$\text{HRMS}[\frac{\text{M}}{\text{z}} + \text{H}]_{\text{mért}}^+ = 597,2035$; $\text{HRMS}[\frac{\text{M}}{\text{z}} + \text{H}]_{\text{számított}}^+ = 542,2140$, ahol $z = 2$

$\text{C}_{60}\text{H}_{73}\text{BrN}_8\text{O}_9\text{S}_2$

5.3.5.3. (E)-2-((2E,4E)-5-(1-(6-((3-(4-(2-(3-(3-((4-(7-Bróm-8-hidroxi-3-metil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzo[d]azepin-1-il)fenil)amino)-3-oxopropil)-3H-diazirin-3-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)propil)amino)-6-oxohexil)-3,3-dimetil-5-szolfo-3H-indol-1-ium-2-il)penta-2,4-dién-1-ilidén)-1,3,3-trimetilindolin-5-szulfonát (64)



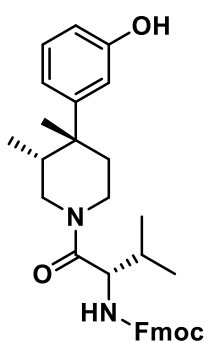
A **90** vegyületet (0,010 mmol; 5 mg) feloldottam dimetilformamid és víz 1:1 arányú elegyében (0,5 ml), majd hozzáadtam a réz-szulfát-pentahidrátot (0,010 mmol; 2,5 mg), a nátrium-L-aszkorbátot (0,020 mmol; 4 mg), valamint szulfo-cianin-5-azid festéket (**70**; 0,010 mmol; 9 mg). A tisztítást preparatív HPLC segítségével végeztem el (víz–MeCN; 0,01% hangyasav). A megfelelő frakciókat liofilizálással oldószermentesítettem.

$$MS[\frac{M}{2} + H]_{\text{mért}}^+ = 610; MS[\frac{M}{2} + H]_{\text{számított}}^+ = 610$$



5.3.6. A fluoreszcens JFTic ligandum szintézise

5.3.6.1. (9H-Fluorén-9-il)metil-((S)-1-((3R,4R)-4-(3-hidroxifenil)-3,4-dimetilpiperidin-1-il)-3-metil-1-oxobután-2-il)karbamát (92)

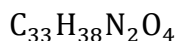


A karbonsavat (**91**; 1,8 mmol; 611 mg), a HATU-t (2,250 mmol; 856 mg), valamint a DIPEA-t (4,5 mmol; 784 µl) feloldottam dimetilformamidban (10 ml), és 10 percig jeges hűtés közben kevertettem. Ezt követően a **32** amin (1,500 mmol; 308 mg) 10 ml dimetilformamidos oldatához jeges hűtés közben, lassan hozzácsepegtettem a karbonsavat tartalmazó oldatot. A reakcióelegyet 2 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem,

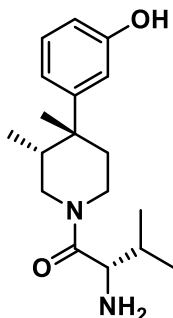
majd az elegyhez adtam 25 ml diklórmetánt. Az elegyet 15 ml telített nátrium-karbonát oldattal, majd 15 ml vízzel extraháltam, nátrium-szulfáton szárítottam, szűrtem, és bepárooltam. A nyersterméket normál fázisú flash kromatográfia segítségével tisztítottam (hexán–etil-acetát)

Termelés: 410 mg (52%), színtelen olaj.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,75 (dd; $J = 10,7$; 6,9 Hz; 2H); 7,62 (d; $J = 7,6$ Hz; 1H); 7,56 (t; $J = 6,9$ Hz; 1H); 7,39 (dt; $J = 7,5$; 1,5 Hz; 1H); 7,36 – 7,27 (m; 2H); 7,16 (q; $J = 8,3$ Hz; 2H); 6,77 (q; $J = 7,5$; 7,1 Hz; 2H); 6,69 (dd; $J = 7,9$; 2,4 Hz; 1H); 5,74 (d; $J = 9,1$ Hz; 1H); 4,66 (dt; $J = 14,5$; 11,4 Hz; 2H); 4,36 (dq; $J = 12,2$; 4,7; 3,8 Hz; 2H); 4,30 – 4,22 (m; 1H); 4,17 (q; $J = 7,2$; 6,2 Hz; 1H); 3,74 – 3,57 (m; 1H); 2,18 (dd; $J = 8,1$; 5,2 Hz; 1H); 2,12 – 1,92 (m; 2H); 1,76 – 1,55 (m; 1H), 1,37 (d; $J = 9,4$ Hz; 3H); 1,01 (dd; $J = 12,9$; 6,7 Hz; 3H); 0,93 (d; $J = 6,7$ Hz; 3H); 0,62 (dd; $J = 6,9$; 4,0 Hz; 3H).



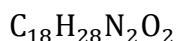
5.3.6.2. (S)-2-Amino-1-((3R,4R)-4-(3-hidroxifenil)-3,4-dimetilpiperidin-1-il)-3-metilbután-1-on (35)



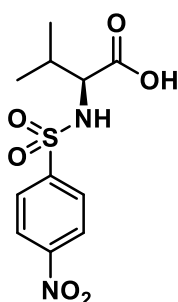
Az Fmoc-védett amint (**93**; 0,70 mmol; 369 mg) feloldottam dimetilformamidban (4 ml), és 1,037 ml piperidint adtam hozzá, majd szobahőmérsékleten 1 órán át kevertettem. Ezt követően további feldolgozás nélkül fordított fázisú flash kromatográfiával tisztítottam (víz–MeCN; 0,01% hangyasav).

Termelés: 120 mg (56%), fehér olaj.

$$MS[M + H]_{\text{mért}}^+ = 305; MS[M + H]_{\text{számított}}^+ = 305$$



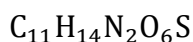
5.3.6.3. ((4-Nitrofenil)szulfonil)- L-valin (96)



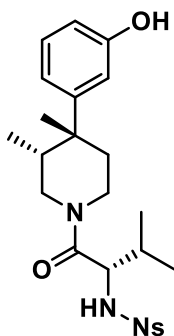
Az L-valint (**95**; 4 mmol; 469 mg) bemértem dietil-éter (20 ml) és 1,5 M-os nátrium-hidroxid-oldat (10 ml) elegyébe, majd jeges hűtés mellett óvatosan beadagoltam a nozil-kloridot (6 mmol; 1,33 g), majd 24 órát kevertettem szobahőmérsékleten. A reakcióelegyet 3×20 ml dietil-éterrel extraháltam, majd az egyesített szerves fázist 3×20 ml vízzel extraháltam. Az egyesített vizes fázist pH-ját 0,5 M-os sósavval pH = 2–3 közé állítottam be, majd 3×15 ml etil-acetáttal extraháltam. Az egyesített szerves fázist nátrium-szulfáton szárítottam, szűrtem, és bepároltam. Az így kapott termék nem igényelt további tisztítást.

Termelés: 251 mg (21%), fehér olaj.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12,66 (br; 1H); 8,39 (d; J = 8,8 Hz; 2H); 8,03 (d; J = 8,9 Hz; 2H); 3,64 – 3,58 (dd; J = 9,6 Hz; 6,0 Hz; 1H); 1,96 (tt; J = 12,8; 6,4 Hz; 1H); 0,82 (dd; J = 10,4; 6,8 Hz; 6H).¹⁰⁹



5.3.6.4. *N*-((*S*)-1-((3*R*,4*R*)-4-(3-Hidroxifenil)-3,4-dimetilpiperidin-1-il)-3-metil-1-oxobután-2-il)-4-nitrobenzolszulfonamid (97)



A karbonsavat (**96**; 0,825 mmol; 249 mg), a HATU-t (1,35 mmol; 514 mg), valamint a DIPEA-t (2,25 mmol; 392 μ l) feloldottam dimetilformamidban (5 ml), és 10 percig jeges hűtés alatt kevertettem. Ezt követően a **32** amin (0,750 mmol; 154 mg) dimetilformamidos oldatához (5 ml) jeges hűtés közben, lassan hozzácepegtettem a karbonsavat tartalmazó oldatot. A reakcióelegyet 2 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, majd az elegyhez adtam 25 ml diklórmetánt. Az elegyet 15 ml telített nátrium-karbonát oldattal, majd 15 ml vízzel extraháltam, nátrium-szulfáton szárítottam, szűrtem, és bepároltam. A nyersterméket normál fázisú flash kromatográfia segítségével tisztítottam (hexán–etil-acetát).

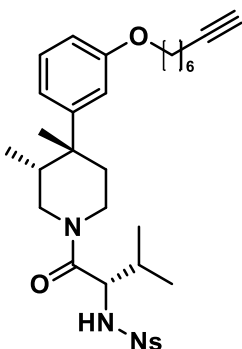
Termelés: 224 mg (61%), sárga olaj.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8,33 (d; J = 8,4 Hz; 1H); 8,22 (d; J = 8,4 Hz; 1H); 7,99 (t; J = 8,1 Hz; 2H); 7,17 (t; J = 7,9 Hz; 1H); 6,76 (d; J = 8,0 Hz; 1H); 6,67 (d; J = 6,9 Hz; 2H); 6,58 (s; 1H); 6,06 (d; J = 8,9 Hz; 1H); 5,85 (d; J = 9,3 Hz; 1H); 4,42 (d; J = 13,7 Hz; 1H); 3,58 (dd; J = 32,7; 13,9 Hz; 1H); 3,30 – 3,01 (m; 1H); 2,97 – 2,67 (m; 1H); 2,19 – 2,04 (m; 1H); 1,91 (s; 2H); 1,62 (td; J = 38,5; 37,8; 13,1 Hz; 1H); 1,32 (d; J = 10,1 Hz; 3H); 1,07 (s; 3H); 0,84 (d; J = 6,7; 3H); 0,31 (d; J = 6,9 Hz; 3H).

^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3) δ 168,9; 156,0; 150,41; 146,2; 129,8; 128,8; 124,1; 117,7; 113,3; 112,6; 58,4; 48,2; 44,3; 42,1; 38,8; 38,2; 31,73; 30,9; 30,4; 26,9; 26,4; 20,0; 16,6; 14,4.

$\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$

5.3.6.5. *N*-((*S*)-1-((3*R*,4*R*)-3,4-Dimetil-4-(3-(okt-7-in-1-iloxi)fenil)piperidin-1-il)-3-metil-1-oxobután-2-il)-4-nitrobenzolszulfonamid (98)

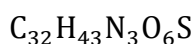


A **97** fenolszármazékot (0,183 mmol; 90 mg) feloldottam dimetilformamidban (2 ml), és óvatosan becsepegtettem a kálium-karbonát (0,132 mmol; 18 mg) és a 8-brómokt-1-in (**68**; 0,008 mmol; 12 μ l) 1 ml dimetilformamidos szuszpenzióját. Ezt követően az elegyet 90 °C-ra melegítettem, és 6 óráig kevertettem. A reakcióelegyet feldolgozás nélkül fordított fázisú flash kromatográfiával tisztítottam (víz–MeCN; 0,01% hangyasav).

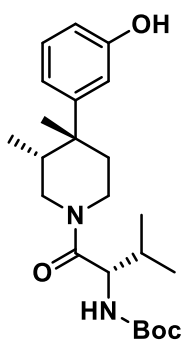
Termelés: 21 mg (19%), fehér olaj.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8,33 (d; $J = 8,8$ Hz; 1H); 8,22 (d; $J = 8,8$ Hz; 1H); 7,99 (dd, $J = 8,9$; 7,5 Hz; 2H); 7,17 (td; $J = 7,9$; 1,5 Hz; 1H); 6,68 (dt; $J = 3,1$; 1,7 Hz; 1H); 6,66 (d; $J = 2,3$ Hz; 1H); 6,58 (t; $J = 2,2$ Hz; 1H); 5,94 (dd, $J = 64,1$; 9,1 Hz; 1H); 5,09 (br; 1H); 4,08 (dd; $J = 9,2$; 4,1 Hz; 1H); 4,00 (d; $J = 3,0$ Hz; 1H); 3,98 – 3,94 (m; 1H); 3,63 (d; $J = 13,8$ Hz; 1H); 3,57 – 3,49 (m; 1H); 3,21 (d; $J = 13,6$ Hz; 1H); 3,16 – 3,04 (m; 1H); 2,87 (td; $J = 13,3$; 3,2 Hz; 1H); 2,76 (dd; $J = 13,4$; 3,1 Hz; 1H); 2,18 – 2,04 (m; 1H); 1,98 – 1,85 (m; 2H); 1,82 (m; 1H); 1,56 (dd; $J = 37,9$; 13,4 Hz; 1H); 1,33 (d; $J = 10,1$ Hz; 3H); 1,08 (dd; $J = 6,8$; 3,5 Hz; 3H); 0,84 (dd; $J = 10,7$; 6,8 Hz; 3H); 0,31 (dd; $J = 12,5$; 7,0 Hz; 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 169,3; 156,0; 150,8; 146,4; 129,6; 128,6; 124,2; 117,6; 112,9; 112,6; 102,6; 84,7; 68,4; 66,0; 63,9; 60,4; 45,84; 44,04; 43,1; 39,0; 38,5; 30,8; 30,6; 28,7; 28,5; 28,3; 27,0; 26,9; 20,0; 19,67; 18,42; 14,8.



5.3.6.6. *tert*-Butil-((*S*)-1-((3*R*,4*R*)-4-(3-hidroxifenil)-3,4-dimetilpiperidin-1-il)-3-metil-1-oxobután-2-il)karbamát (34)



A karbonsavat (**33**; 1,61 mmol; 349 mg), a HATU-t (1,606 mmol; 611 mg), valamint a DIPEA-t (4,38 mmol; 763 μl) feloldottam dimetilformamidban (10 ml), és 10 percig jeges hűtés alatt kevertettem. Ezt követően a **32** amin (1,46 mmol; 300 mg) dimetilformamidos oldatához (10 ml) jeges hűtés közben, lassan hozzácsepegtettem a karbonsavat tartalmazó oldatot. A reakcióelegyet 2 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem, majd az elegyet feldolgozás nélkül fordított fázisú flash kromatográfia segítségével tisztítottam (víz–MeCN; 0,01% hangyasav).

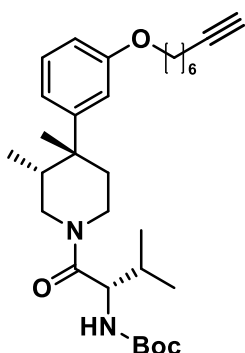
Termelés: 430 mg (73%), fehér kristályok; op. 92–93 °C (víz–MeCN).

^1H NMR (300 MHz; CDCl_3) δ 7,68 (br; 1H); 7,40 (br; 1H); 7,13 (td; $J = 7,9$; 5,4 Hz; 1H); 6,74 (s; 1H); 6,69 (t; $J = 7,9$ Hz; 2H); 5,42 (dd; $J = 9,3$; 2,9 Hz; 1H); 4,57 (dd; $J = 9,5$; 5,4 Hz; 1H); 4,31 (d; $J = 13,4$ Hz; 1H); 3,19 – 2,82 (m; 1H); 2,16 (q; $J = 8,8$ Hz; 2H); 1,94 (q; $J = 6,6$ Hz; 2H); 1,70 – 1,53 (m; 1H); 1,43 (s; 9H); 1,37 (s; 3H); 0,93 (d; $J = 6,8$ Hz; 3H); 0,88 (d; $J = 7,1$ Hz; 3H); 0,59 (d; $J = 6,8$ Hz; 3H).

^{13}C NMR (75 MHz; CDCl_3) δ 171,6; 156,8; 156,30; 150,7; 129,4; 117,0; 113,03; 79,9; 55,0; 48,4; 44,2; 42,3; 39,2; 39,1; 38,7; 38,3; 32,1; 30,4; 29,4; 27,0; 19,9; 17,5; 14,5.

$\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_4$

5.3.6.7. *terc*-Butil-((*S*)-1-((3*R*,4*R*)-3,4-dimetil-4-(3-(okt-7-in-1-iloxi)fenil)piperidin-1-il)-3-metil-1-oxobután-2-il)karbamát (100)



A **34** fenolszármazékot (1 mmol; 405 mg) feloldottam dimetilformamidban (10 ml), és hozzáadtam a kálium-karbonátot (3 mmol; 415 mg), valamint a 8-brómokt-1-int (**68**; 2,40 mmol; 378 μl). Ezt követően az elegyet 80 °C-ra melegítettem 24 óráig kevertettem, majd üvegszűrőn kiszűrtem a kálium-karbonát jelentős részét. A dimetilformamidos szűrletet 2–3 ml-re töményítettem, és további feldolgozás nélkül, fordított fázisú flash kromatográfiával tisztítottam (víz–

MeCN; 0,01% hangyasav).

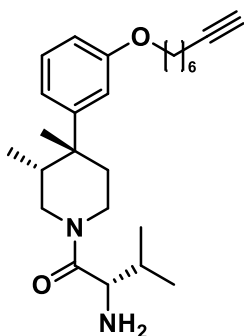
Termelés: 358 mg (70%), fehér olaj.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,21 (dd; J = 8,0; 3,3 Hz; 1H); 6,84 (d; J = 7,6 Hz; 1H); 6,78 (dd; J = 4,8; 2,7 Hz; 1H); 6,74 – 6,69 (m, 1H); 5,35 (dd; J = 19,4; 9,1 Hz; 1H); 4,12 (q; J = 7,2 Hz; 1H); 3,95 (td; J = 6,5; 2,9 Hz; 2H); 3,65 (t; J = 14,2 Hz; 1H); 3,16 (dd; J = 13,5; 3,1 Hz; 1H); 2,99 – 2,89 (m; 3H); 2,20 (dt; J = 6,8; 3,4 Hz; 3H); 2,04 (s; 1H); 1,94 (t; J = 2,6 Hz; 1H); 1,80 (t; J = 6,6 Hz; 2H); 1,61 – 1,45 (m; 4H); 1,40 (d; J = 4,3 Hz; 3H); 1,37 (s, 9H); 1,26 (t; J = 7,1 Hz; 1H); 1,02 (d; J = 6,7 Hz; 2H); 0,94 (d; J = 6,7 Hz; 2H); 0,89 (t; J = 6,6 Hz; 3H); 0,63 (t; J = 7,5 Hz; 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 171,4; 156,7; 156,2; 150,6; 129,3; 116,9; 112,9; 112,6; 79,7; 54,9; 54,4; 48,2; 44,1; 42,2; 39,1; 38,9; 38,2; 32,0; 31,7; 30,3; 29,3; 28,3; 28,3; 26,9; 26,6; 19,7; 19,4; 17,4; 16,9; 14,4; 13,7.

$\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_4$

5.3.6.7. (S)-2-Amino-1-((3R,4R)-3,4-dimetil-4-(3-(okt-7-in-1-iloxi)fenil)piperidin-1-il)-3-metilbután-1-on (102)



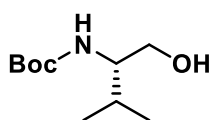
A **101** *N*-Boc-védett származékot (0,33 mmol; 167 mg) feloldottam diklórmetánban (10 ml), majd hozzácepegtettem a trifluorecetsavat (8,25 mmol; 624 μ l) 0 °C-on. A reakcióelegyet 3,5 órán keresztül kevertetem 0 °C-on, majd 3 $\times$ 10 ml vízzel extraháltam. A nyersterméket fordított fázisú flash kromatográfia segítségével tisztítottam (víz–MeCN; 0,01% hangyasav).

Termelés: 75 mg (56%), sárga olaj.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8,28 (br; 2H); 7,20 (dd; J = 9,5; 7,9 Hz; 1H); 6,84 – 6,80 (m; 1H); 6,72 (dt; J = 8,1; 2,4 Hz; 2H); 4,38 (dd; J = 19,2; 4,2 Hz; 1H); 4,26 (d; J = 13,5 Hz; 1H); 4,01 – 3,87 (m; 2H), 3,78 (d; J = 12,9 Hz; 1H); 3,46 (q; J = 13,0; 12,2 Hz; 1H); 3,20 (dd; J = 13,6; 3,0 Hz; 1H); 2,61 (s; 1H); 2,28 – 2,04 (m; 6H); 1,94 (t; J = 2,6 Hz; 1H); 1,84 – 1,42 (m; 6H); 1,39 (d; J = 5,6 Hz; 3H); 1,14 (dd; J = 9,9; 6,9 Hz; 3H); 1,03 (t; J = 7,7 Hz; 3H); 0,66 (d; J = 6,9 Hz; 1H); 0,60 (d; J = 6,9 Hz; 3H).

$\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_2$

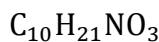
5.3.6.8. *tert*-Butil (S)-(1-hidroxi-3-metilbután-2-il)karbamát (105)



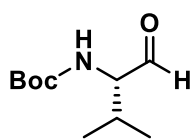
Az *N*-Boc védett L-valint (**33**; 5 mmol; 1,086 g) és az *N*-metilmorfolint (5 mmol; 550 μ l) vízmentes tetrahydrofuranban (5 ml) feloldottam, majd sós-jeges hűtés közben hozzácepegtettem a klór-hangyasav-izobutil-észtert (**104**; 5 mmol; 649 μ l), és 10 percig kevertetem. Ezt követően kiszűrtem a keletkező csapadékot, majd 3 $\times$ 5 ml tetrahydrofuránnal mostam a csapadékot. Ezt az elegyet sós-jeges vízzel lehűtöttem, majd hozzáadtam a nátrium-borohidridet (7,50 mmol; 284 mg), és 10 percig kevertetem. A reakcióelegyhez hozzáadtam 5 ml vizet, és 3 $\times$ 10 ml etil-acetáttal extraháltam, majd az egyesített szerves fázist 10 ml telített nátrium-klorid oldattal, és 10 ml vízzel extraháltam. A szerves fázist nátrium-szulfáton szárítottam, majd bepároltam. A nyerstermék nem igényelt további tisztítást.

Termelés: 1,020 g (100%), színtelen olaj.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 4,63 (br; 1H); 3,70 (br; 1H); 3,61 (m; 1H); 3,42 (br; 1H); 2,27 (br; 1H); 1,88 – 1,77 (m; 1H); 1,45 (s; 9H); 0,95 (dd; J = 9,9; 6,8 Hz; 6H).¹¹⁰



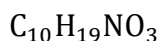
5.3.6.9. *tert*-Butil-(*S*)-(3-metil-1-oxobután-2-il)karbamát (37)



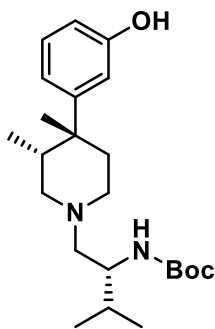
Az *N*-Boc védett alkoholt (**105**; 1,00 mmol; 203 mg) feloldottam száraz diklórmetánban (5 ml), és hozzáadtam a piridínium-dikromátot (1,50 mmol; 564 mg), és 24 órát kevertettem argon atmoszféra alatt. Ezt követően a fekete csapadékot üvegszűrőn szűrtem, és 2 × 5 ml diklórmetánnal mostam. Az oldószer bepárlása után etil-acetátban felvettem az anyagot, majd az így kivált csapadékot is leszűrtem egy üvegszűrőn, és 2 × 5 ml etil-acetáttal mostam. Az oldószert 2–3 ml-re bepárooltam, és az így kapott tömény oldatot átengedtem egy szilikagéllal töltött oszlopon, majd etil-acetáttal mostam.

Termelés: 124 mg (62%), szürkészöld olajos anyag.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9,64 (s; 1H); 5,07 (br; 1H); 1,45 (s; 9H); 4,28 – 4,19 (m; 1H); 2,35 – 2,22 (m; 1H); 1,03 (d; J = 6,9 Hz; 3H); 0,94 (d; J = 7,0 Hz; 3H).¹¹¹



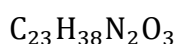
5.3.6.10. *tert*-Butil-((*R*)-1-((3*R*,4*R*)-4-(3-hidroxifenil)-3,4-dimetilpiperidin-1-il)-3-metilbután-2-il)karbamát (109)



A **32** amin (0,05 mmol; 10 mg), az aldehyd (**37**; 0,11 mmol; 22 mg) vízmentes tetrahydrofurános (0,5 ml) oldatát 30 percig szobahőmérsékleten keverttem, majd hozzáadtam a nátrium-triacetoxi-bórhidridet (0,15 mmol; 32 mg). Ezt követően felemeltem a hőmérsékletet 60 °C-ra és 24 órán keresztül keverttem. A reakcióelegyet feldolgozás nélkül, preparatív HPLC segítségével tisztítottam (víz–MeCN; 0,01% hangyasav).

Termelés: 4 mg (22%), színtelen olaj.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8,54 (s; 1H); 7,04 (t; J = 7,9 Hz; 1H); 6,83 (s; 1H); 6,67 (t; J = 9,4 Hz; 2H); 3,94 – 3,83 (m; 1H); 3,69 – 3,59 (m; 1H); 3,52 – 3,35 (m; 2H); 3,05 (d; J = 12,1 Hz; 1H); 2,79 (d; J = 11,2 Hz; 2H); 2,22 – 2,16 (m; 1H); 1,85 – 1,67 (m; 2H); 1,43 (s; 1H); 1,41 (s; 9H); 1,39 (s; 3H); 0,96 (d; J = 6,8 Hz; 6H), 0,72 (d; J = 7,1 Hz; 3H).



6. ÖSSZEFOGLALÁS

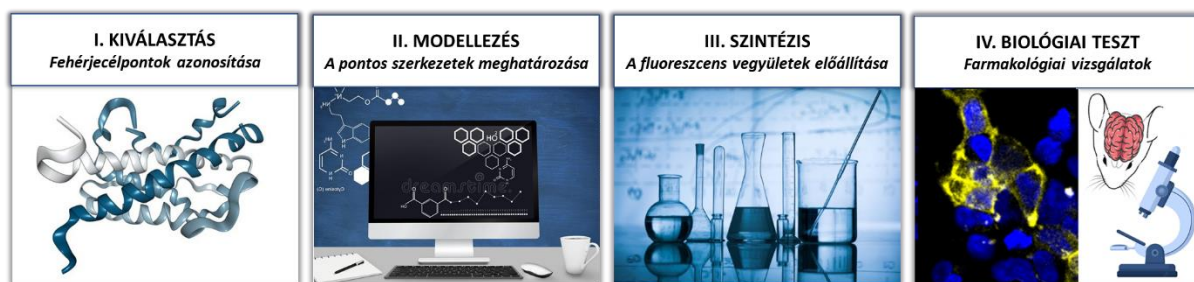
Az opioid-válság napjaink egyik legsúlyosabb közegészségügyi problémájának számít az Amerikai Egyesült Államokban. A 2021-es évben közel 108 ezer ember halt meg vénnyköteles vagy tiltott opioid túladagolás következtében. A szerhasználati zavarokban szenvedők kezelésére hatékonyan alkalmazható néhány μ -opioid receptort célzó hatóanyag, mint például a buprenorfin, a metadon vagy a naltrexon. A kezelések hátránya azonban, hogy jelentős orvosi kapacitást igényelnek, illetve korlátozott a gyógyszerek hozzáférhetősége a túladagolás kockázata és a hosszútávú terápiás folyamat miatt. Az innovatív és hatékonyabb terápiák kidolgozásának érdekében új fehérjecélpontok azonosítása szükséges, amelyre lehetőséget kínálhat a kutatócsoportunk és a KOKI Molekuláris Neurobiológiai Laboratóriuma által nemrégiben közösen kifejlesztett PharmacOSTORM módszer. Az új, superfelbontású mikroszkópos eljárás ötvözi az immunjelölés és a radioligand alapú autoradiográfia előnyeit és lehetővé teszi, hogy fluoreszcens festékekkel jelölt molekulák segítségével nanométeres pontosságú farmakológiai méréseket végezzünk receptorokon.

A tudományos diákköri munkám alapjául szolgáló orexin, D_1 dopamin, valamint κ -opioid receptorok ligandumainak kiválasztásánál az elérhető háromdimenziós fehérjeszerkezeteket vettem alapul (58. ábra). A szintetizálni kívánt fluoreszcens festékekkel módosított ligandumok pontos szerkezetét *in silico* dokkolási kísérletekkel határoztam meg. A ligandumok szerkezetét úgy módosítottam, hogy lehetővé váljon egy alifás linkeren keresztül a szulfo-cianin-5 fluoreszcens festék kapcsolása. Elsősorban a beépíteni tervezett linker hosszát optimalizáltam, hogy a módosított ligandum továbbra is képes legyen bejutni a fehérje kötőzsebébe és létre tudja hozni a kötődéshez szükséges specifikus kölcsönhatásokat. A mikroszkópos vizsgálatok hatékonyságának növelése érdekében célom volt fotoaktiválható diazirin egységet tartalmazó analógok előállítása is, amelyek az adott hullámhosszú fénnel történő bevilágítás után képesek kovalens kötést létrehozni a megfelelő fehérje oldalláncokkal.

Munkám során sikeresen szintetizáltam az 55 fluoreszcens DORA származékot ($OX_{1,2}$) 4 lépésben. A D_1 DR-ra tervezett 61 fluoreszcens ligandumot 10 lépésben, míg a 64 fotoaktiválható elemet is tartalmazó származékot 9 lépésben állítottam elő. A szintézis optimalizálása érdekében egy új stratégiát kívántam kidolgozni a 64 vegyület előállítására, amelyben elsősorban a brómozást kívántam szelektívvé tenni, és ezáltal javítani a termelésen. Ezt sikerült elérni, azonban a nitrocsoport redukcióját nem tudtam megvalósítani egyik szakirodalomban leírt módszerrel sem. A 113 fluoreszcens JDTic ligandum (KOR) előállítása során különböző védőcsoportokkal (Fmoc, Ns, Boc) rendelkező származékok esetén az

amidcsoport sikertelen redukciója miatt végül redukatív aminálással sikerült megvalósítanom a **109** tercier amin előállítását. A **113**, valamint a fotoaktiválható diazirin elemet tartalmazó **57** fluoreszcens ligandum szintézise még folyamatban van. A szintézisutakat részletesen bemutató ábrák megtalálhatóak a Függelék 8.2. fejezetében (90–92. oldal). A szintetikus munka során 18 új, az irodalomban eddig nem ismert vegyületet állítottam elő, amelyeket teljes analitikai szerkezetigazolással jellemeztem, illetve egyes esetekben a mérések még folyamatban vannak.

Az elkészült **55**, **61**, **64** és **90** fluoreszcens ligandumról a Eurofins vállalat radioligand-alapú kötődési vizsgálatokat végzett a megfelelő receptorokon, és meghatározta a vegyületek kötődési állandóit (K_i , IC_{50}). Az **55** OX_1 fluoreszcens ligandum kötődési értékei egy nagyságrenddel elmaradnak az eredeti, módosítatlan ligandumétól (**14**). Emiatt további terveink között szerepel a linker optimalizálása, az alifás linker hidrofílebb PEG-lánccra való cseréje, amely javíthat a K_i értékeken, illetve a jobb kötődési értékekkel rendelkező suvorexant (**12**) fluoreszcens származékának előállítása is. A D_1 dopamin receptorhoz kötődő vegyületek közül (**61**, **64**, **90**) kiemelkedő affinitással rendelkezik a **90** fluoreszcens származék. A **61** molekuláról a KOKI Molekuláris Neurobiológiai Laboratóriuma konfokális fluoreszcens mikroszkópos felvételeket készített, amelyeken látható a D_1DR -ok specifikus jelölése. Terveink között szerepel további konfokális fluoreszcens mikroszkópos felvételek, valamint a PharmacostORM mérések elvégzése, amelyet a KOKI Molekuláris Neurobiológiai Laboratóriumának munkatársai fogják elvégezni.



58. ábra: A tudományos diákköri munkám összefoglaló ábrája

7. IRODALOMJEGYZÉK

- (1) Schuckit, M. A. *N. Engl. J. Med.* **2016**, 375, 357–368.
- (2) Koob, G. F.; Le Moal, M. *Annu. Rev. Psychol.* **2008**, 59, 29–53.
- (3) Prokop, S.; Ábrányi-Balogh, P.; Barti, B.; Vámosi, M.; Zöldi, M.; Barna, L.; Urbán, G. M.; Tóth, A. D.; Dudok, B.; Egyed, A.; Deng, H.; Leggio, G. M.; Hunyady, L.; van der Stelt, M.; Keserű, G. M.; Katona, I. *Nat. Commun.* **2021**, 12, 1–19.
- (4) Pascoe, P. J. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **2000**, 30, 757–772.
- (5) Ballantyne, J. C.; Mao, J. N. *Engl. J. Med.* **2003**, 349, 1943–1953.
- (6) Hser, Y. I.; Evans, E.; Grella, C.; Ling, W.; Anglin, D. *Harv. Rev. Psychiatry* **2015**, 23, 76–89.
- (7) Imam, M. Z.; Kuo, A.; Ghassabian, S.; Smith, M. T. *Neuropharmacology* **2018**, 131, 238–255.
- (8) Széleskörű online adatok epidemiológiai kutatásokhoz **2021**, www.wonder.cdc.gov
- (9) Borsari, B.; Read, J. P. *J. Consult. Clin. Psychol.* **2019**, 87, 845–848.
- (10) Rudd R. A., Paulozzi L. J., Bauer M. J., B. R. W. et al *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2014**, 63, 867–72.
- (11) Lener, M. S. *Physiol. Behav.* **2016**, 176, 139–148.
- (12) O'Donnell, J. K.; Halpin, J.; Mattson, C. L. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2008**, 66, 43.
- (13) Mars, S. G.; Rosenblum, D.; Ciccarone, D. *Addiction* **2019**, 114, 774–780.
- (14) Donroe, J. H.; Socias, M. E.; Marshall, B. D. L. *Curr. Addict. Reports* **2018**, 5, 454–463.
- (15) NIH Office of the Director (OD) *Natl. Institutes Heal.* **2018**, 2–3.
- (16) Stein, C. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2018**, 27, 765–775.
- (17) Busserolles, J.; Lolignier, S.; Kerckhove, N.; Bertin, C.; Authier, N.; Eschaliere, A. *Pharmacol. Ther.* **2020**, 210, 107519.
- (18) Ding, H.; Kiguchi, N.; Yasuda, D.; Daga, P. R.; Polgar, W. E.; Lu, J. J.; Czoty, P. W.; Kishioka, S.; Zaveri, N. T.; Ko, M. C. *Sci. Transl. Med.* **2018**, 10, 1–12.
- (19) Gerra, G.; Marcato, A.; Caccavari, R.; Fontanesi, B.; Delsignore, R.; Fertonani, G.; Avanzini, P.; Rustichelli, P.; Passeri, M. *J. Subst. Abuse Treat.* **1995**, 12, 35–41.
- (20) Bisaga, A.; Popik, P. *Drug Alcohol Depend.* **2000**, 59, 1–15.
- (21) Pineo, T.; Goldman, J. D.; Swartzentruber, G.; Kanderi, T.; Qurashi, H.; Dimech, C. *Drug Alcohol Depend. Rep.* **2022**, 2, 100020.
- (22) Barnwal, P.; Das, S.; Mondal, S.; Ramasamy, A.; Maiti, T.; Saha, A. *Ther. Adv. Psychopharmacol.* **2017**, 7, 119–134.
- (23) Rasmussen, K.; White, D. A.; Acri, J. B. *Neuropsychopharmacology* **2019**, 44, 657–659.
- (24) DiLeone, R. J.; Georgescu, D.; Nestler, E. J. *Life Sci.* **2003**, 73, 759–768.
- (25) Raffa, R. B. *J. Clin. Pharm. Ther.* **2009**, 34, 623–629.
- (26) Todtenkopf, M. S.; Parsegian, A.; Naydenov, A.; Neve, R. L.; Konradi, C.; Carlezon, W. A. *J. Neurosci.* **2006**, 26, 11665–11669.
- (27) Edwards, A.; Abizaid, A. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2016**, 66, 33–53.
- (28) Self, D. W.; Barnhart, W. J.; Lehman, D. A.; Nestler, E. J. *Science* **1996**, 271, 1586–1589.
- (29) Bakthavachalam, V.; Baidur, N.; Madras, B. K.; Neumeyer, J. L. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 3235–3241.
- (30) Sriram, K.; Insel, P. A. *Mol. Pharmacol.* **2018**, 93, 251–258.
- (31) Overington, J. P.; Al-Lazikani, B.; Hopkins, A. L. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, 5, 993–996.
- (32) Christopoulos, A. *Mol. Pharmacol.* **2014**, 86, 463–478.

- (33) Nickols, H. H.; Conn, J. P. *Neurobiol. Dis.* **2014**, 61, 55–71.
- (34) Ladds, G.; Goddard, A.; Davey, J. *Trends Biotechnol.* **2005**, 23, 367–373.
- (35) Hauser, A. S.; Attwood, M. M.; Rask-Andersen, M.; Schiöth, H. B.; Gloriam, D. E. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, 16, 829–842.
- (36) Sakurai, T.; Amemiya, A.; Ishii, M.; Matsuzaki, I.; Chemelli, R. M.; Tanaka, H.; Williams, S. C.; Richardson, J. A.; Kozlowski, G. P.; Wilson, S.; Arch, J. R. S.; Buckingham, R. E.; Haynes, A. C.; Carr, S. A.; Annan, R. S.; McNulty, D. E.; Liu, W. S.; Terrett, J. A.; Elshourbagy, N. A.; Bergsma, D. J.; Yanagisawa, M. *Cell* **1998**, 92, 573–585.
- (37) Baldo, B. A.; Daniel, R. A.; Berridge, C. W.; Kelley, A. E. *J. Comp. Neurol.* **2003**, 464, 220–237.
- (38) Harris, G. C.; Wimmer, M.; Aston-Jones, G. *Nature* **2005**, 437, 556–559.
- (39) Aston-Jones, G.; Smith, R. J.; Sartor, G. C.; Moorman, D. E.; Massi, L.; Tahsili-Fahadan, P.; Richardson, K. A. *Brain Res.* **2010**, 1314, 74–90.
- (40) Morairty, S. R.; Revel, F. G.; Malherbe, P.; Moreau, J. L.; Valladao, D.; Wettstein, J. G.; Kilduff, T. S.; Borroni, E. *PLoS One* **2012**, 7, 39131.
- (41) Rhyne, D. N.; Anderson, S. L. *Ther. Adv. Drug Saf.* **2015**, 6, 189–195.
- (42) Scott, L. J. *Drugs* **2020**, 80, 425–432.
- (43) Boss, C.; Roch, C. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 2875–2887.
- (44) Burgess, C. R.; Scammell, T. E. *J. Neurosci.* **2012**, 32, 12305–12311.
- (45) Wise, R. A.; Rompre, P. P. *Annu. Rev. Psychol.* **1989**, 40, 191–225.
- (46) Moore, R. Y. *J. Comp. Neurol.* **1978**, 177, 665–683.
- (47) Di Chiara, G.; Imperato, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1988**, 85, 5274–5278.
- (48) Kreek, M. J. *Neurochem. Res.* **1996**, 21, 1469–1488.
- (49) Mayer, P.; Höllt, V. *Pharmacol. Ther.* **2001**, 91, 167–177.
- (50) Vanderah, T. W. *Clin. J. Pain* **2010**, 26, 10–15.
- (51) Aldrich, J. V.; McLaughlin, J. P. *AAPS J.* **2009**, 11, 312–322.
- (52) Glick, S. D.; Maisonneuve, I. M.; Raucci, J.; Sydney, A. *Brain Res.* **1995**, 681, 147–152.
- (53) Spealman, R. D.; Bergman, J. *Behav. Pharmacol.* **1994**, 5, 21–31.
- (54) Karkhanis, A.; Holleran, K. M.; Jones, S. R. 1st ed.; Elsevier Inc., **2017**, 136, ISSN 0074–7742.
- (55) Thomas, J. B.; Atkinson, R. N.; Rothman, R. B.; Fix, S. E.; Mascarella, S. W.; Vinson, N. A.; Xu, H.; Dersch, C. M.; Lu, Y. F.; Cantrell, B. E.; Zimmerman, D. M.; Carroll, F. I. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2687–2690.
- (56) Cai, T. B.; Zou, Z.; Thomas, J. B.; Brieady, L.; Navarro, H. A.; Carroll, F. I. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 1849–1860.
- (57) Cueva, J. P.; Cai, T. B.; Mascarella, S. W.; Thomas, J. B.; Navarro, H. A.; Carroll, F. I. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 7463–7472.
- (58) Beardsley, P. M.; Howard, J. L.; Shelton, K. L.; Carroll, F. I. *Psychopharmacology* **2005**, 183, 118–126.
- (59) Gupta, M.; Sharma, R.; Kumar, A. *Comput. Biol. Chem.* **2018**, 76, 210–217.
- (60) Krishnan, V.; Rupp, B. *eLS* **2012**. www.els.net
- (61) Kang, Y.; Kuybeda, O.; de Waal, P. W.; Mukherjee, S.; Van Eps, N.; Dutka, P.; Zhou, X. E.; Bartesaghi, A.; Erramilli, S.; Morizumi, T.; Gu, X.; Yin, Y.; Liu, P.; Jiang, Y.; Meng, X.; Zhao, G.; Melcher, K.; Ernst, O. P.; Kossiakoff, A. A.; Subramaniam, S.; Xu, H. E. *Nature* **2018**, 558, 553–558.
- (62) Hillisch, A.; Pineda, L. F.; Hilgenfeld, R. *Drug Discov. Today* **2004**, 9, 659–669.

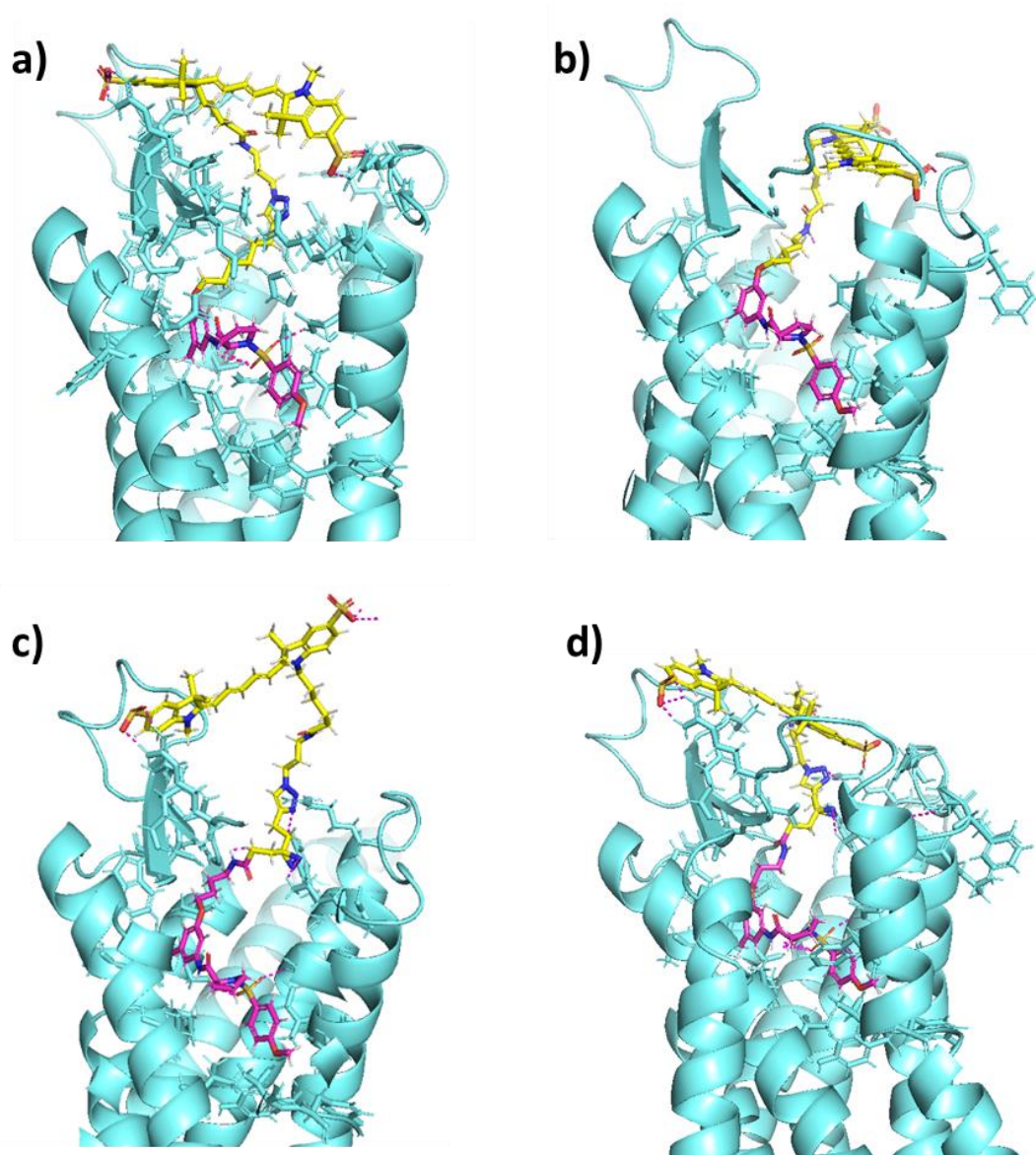
- (63) Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Židek, A.; Potapenko, A.; Bridgland, A.; Meyer, C.; Kohl, S. A. A.; Ballard, A. J.; Cowie, A.; Romera-Paredes, B.; Nikolov, S.; Jain, R.; Adler, J.; Back, T.; Petersen, S.; Reiman, D.; Clancy, E.; Zielinski, M.; Steinegger, M.; Pacholska, M.; Berghammer, T.; Bodenstein, S.; Silver, D.; Vinyals, O.; Senior, A. W.; Kavukcuoglu, K.; Kohli, P.; Hassabis, D. *Nature* **2021**, 596, 583–589.
- (64) Ortega, S. S.; Cara, L. C. L.; Salvador, M. K. *Drug Metabol. Drug Interact.* **2012**, 27, 199–207.
- (65) Fischer, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985–2993.
- (66) Koshland, D. E. *Science* **1963**, 142, 1533–1541.
- (67) Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1739–1749.
- (68) Choi, S. B.; Yap, B. K.; Choong, Y. S.; Wahab, H. *BMC Biol.* **2011**, 9, 71.
- (69) Rappas, M.; Ali, A. A. E.; Bennett, K. A.; Brown, J. D.; Bucknell, S. J.; Congreve, M.; Cooke, R. M.; Cseke, G.; De Graaf, C.; Doré, A. S.; Errey, J. C.; Jazayeri, A.; Marshall, F. H.; Mason, J. S.; Mould, R.; Patel, J. C.; Tehan, B. G.; Weir, M.; Christopher, J. A. *J. Med. Chem.* **2020**, 63, 1528–1543.
- (70) Yin, J.; Babaoglu, K.; Brautigam, C. A.; Clark, L.; Shao, Z.; Scheuermann, T. H.; Harrell, C. M.; Gotter, A. L.; Roecker, A. J.; Winrow, C. J.; Renger, J. J.; Coleman, P. J.; Rosenbaum, D. M. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, 23, 293–299.
- (71) Baindur, N.; Tran, M.; Neumeyer, J. L.; Niznik, H. B.; Guan, H. C.; Neumeyer, J. L. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 67–72.
- (72) Neumeyer, J. L.; Baindur, N.; Bakthavachalam, V.; Yuan, J.; Madras, B. K.; Kula, N. S.; Campbell, A.; Baldessarini, R. J. *Neurochem. Int.* **1992**, 20, 63–68.
- (73) Wu, H.; Wacker, D.; Mileni, M.; Katritch, V.; Han, G. W.; Vardy, E.; Liu, W.; Thompson, A. A.; Huang, X. P.; Carroll, F. I.; Mascarella, S. W.; Westkaemper, R. B.; Mosier, P. D.; Roth, B. L.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. *Nature* **2012**, 485, 327–332.
- (74) Tortoioli, S.; Marchal, D.; Kesselgruber, M.; Pabst, T.; Skranc, W.; Abele, S. *Org. Process Res. Dev.* **2014**, 18, 1759–1762.
- (75) Neumeyer, J. L.; Baindur, N.; Yuan, J.; Booth, G.; Niznik, H. B.; Seeman, P. *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 521–526.
- (76) Markey, S. P.; Schmuff, N. R. *Med. Res. Rev.* **1986**, 6, 389–429.
- (77) Werner, J. A.; Cerbone, L. R.; Frank, S. A.; Ward, J. A.; Labib, P.; Tharp-Taylor, R. W.; Ryan, C. W. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 587–597.
- (78) Mitch, C. H.; Leander, J. D.; Mendelsohn, L. G.; Shaw, W. N.; Wong, D. T.; Cantrell, B. E.; Johnson, B. G.; Reel, J. K.; Snoddy, J. D.; Takemori, A. E.; Zimmerman, D. M.; Lilly, E. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 2842–2850.
- (79) Cao, Y.; Li, B.; Ismail, N.; Smith, K.; Li, T.; Dai, R.; Deng, Y. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 12805.
- (80) Barnett, C. J.; Copley-Merriman, C. R.; Maki, J. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 4795–4800.
- (81) Thomas, J. B.; Atkinson, R. N.; Vinson, N. A.; Catanzaro, J. L.; Perretta, C. L.; Fix, S. E.; Mascarella, S. W.; Rothman, R. B.; Xu, H.; Dersch, C. M.; Cantrell, B. E.; Zimmerman, D. M.; Carroll, F. I. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 3127–3137.
- (82) Carroll, F. I.; Thomas, J. B.; Mascarella, W. S. Kappa opioid binding ligands. Pat. WO 2011/090473 A1, 2011.
- (83) Carroll, F. I.; Gichinga, M. G.; Kormos, C. M.; Maitra, R.; Runyon, S. P.; Thomas, J. B.; Mascarella, S. W.; Decker, A. M.; Navarro, H. A. *Bioorganic Med. Chem.* **2015**, 23, 6379–6388.
- (84) Skiles, J. W.; Miao, C.; Sorcek, R.; Jacober, S.; Mui, P. W.; Rosenthal, A. S.; Chow, G.; Skoog, M.; Keirns, J.; Weldon, S. M.; Possanza, G.; Letts, G.; Skiles, J. W.; Mui, P. W.; Skoog, M. J.

- Med. Chem.* **1992**, 35, 4795–4808.
- (85) Hashimoto, M.; Hatanaka, Y. *European J. Org. Chem.* **2008**, 2513–2523.
- (86) Sadakane, Y.; Hatanaka, Y. *Anal. Sci.* **2006**, 22, 209–218.
- (87) Castelveccchi, D.; Ledford, H. *Nature* **2022**, 601, 16–17.
- (88) Sumranjit, J.; Chung, S. J. *Molecules* **2013**, 18, 10425–10451.
- (89) Murale, D. P.; Hong, S. C.; Haque, M. M.; Lee, J. S. *Proteome Sci.* **2017**, 15, 1–34.
- (90) Peng, T.; Yuan, X.; Hang, H. C. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 21, 144–153.
- (91) Schnell, U.; Dijk, F.; Sjollem, K. A.; Giepmans, B. N. G. *Nat. Methods* **2012**, 9, 152–158.
- (92) Griem-Krey, N.; Klein, A. B.; Herth, M.; Wellendorph, P. *J. Vis. Exp.* **2019**, 1–11.
- (93) Remmel, M.; Scheiderer, L.; Butkevich, A. N.; Bossi, M. L.; Hell, S. W. *bioRxiv* **2022**, 2022.08.29.505670.
- (94) Xiao, P.; Yan, W.; Gou, L.; Zhong, Y. N.; Kong, L.; Wu, C.; Wen, X.; Yuan, Y.; Cao, S.; Qu, C.; Yang, X.; Yang, C. C.; Xia, A.; Hu, Z.; Zhang, Q.; He, Y. H.; Zhang, D. L.; Zhang, C.; Hou, G. H.; Liu, H.; Zhu, L.; Fu, P.; Yang, S.; Rosenbaum, D. M.; Sun, J. P.; Du, Y.; Zhang, L.; Yu, X.; Shao, Z. *Cell* **2021**, 184, 943–956.
- (95) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596–2599.
- (96) Candelon, N.; Lastécouères, D.; Diallo, A. K.; Ruiz Aranzaes, J.; Astruc, D.; Vincent, J. M. *Chem. Commun.* **2008**, 1, 741–743.
- (97) Goyard, D.; Praly, J. P.; Vidal, S. *Carbohydr. Res.* **2012**, 362, 79–83.
- (98) Rodionov, V. O.; Presolski, S. I.; Díaz, D. D.; Fokin, V. V.; Finn, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 12705–12712.
- (99) Finkelstein, H. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1910**, 43, 1528–1532.
- (100) Okaniwa, M.; Hirose, M.; Arita, T.; Yabuki, M.; Nakamura, A.; Takagi, T.; Kawamoto, T.; Uchiyama, N.; Sumita, A.; Tsutsumi, S.; Tottori, T.; Inui, Y.; Sang, B. C.; Yano, J.; Aertgeerts, K.; Yoshida, S.; Ishikawa, T. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 6478–6494.
- (101) Eschweiler, W. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1905**, 38, 880–882.
- (102) Clarke, H. T.; Gillespie, B.; Weisshaus, S. Z. *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, 55, 4571–4587.
- (103) Ollevier, T.; Carreras, V. *ACS Org. Inorg. Au* **2022**, 2, 83–98.
- (104) Liu, M. T. H. *Chem. Soc. Rev.* **1982**, 11, 127–140.
- (105) Che, T.; English, J.; Krumm, B. E.; Kim, K.; Pardon, E.; Olsen, R. H. J.; Wang, S.; Zhang, S.; Diberto, J. F.; Sciaky, N.; Carroll, F. I.; Steyaert, J.; Wacker, D.; Roth, B. L. *Nat. Commun.* **2020**, 11.
- (106) Itoh, T.; Matsuya, Y.; Enomoto, Y.; Ohsawa, A. *Tetrahedron* **2001**, 57, 7277–7289.
- (107) Wang, M. M.; Waser, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58, 13880–13884.
- (108) Huang, C.; Ma, W.; Zheng, X.; Xu, M.; Qi, X.; Lu, Q. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, 144, 1389–1395.
- (109) Ugwu, D. I.; Okoro, U. C.; Ukoha, P. O.; Okafor, S.; Ibezim, A.; Kumar, N. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 135, 349–369.
- (110) Deb, B.; Debnath, S.; Deb, A.; Maiti, D. K.; Majumdar, S. *Tetrahedron Lett.* **2017**, 58, 629–633.
- (111) Kitahata, S.; Chiba, T.; Yoshida, T.; Ri, M.; Iida, S.; Matsuda, A.; Ichikawa, S. *Org. Lett.* **2016**, 18, 2312–2315.

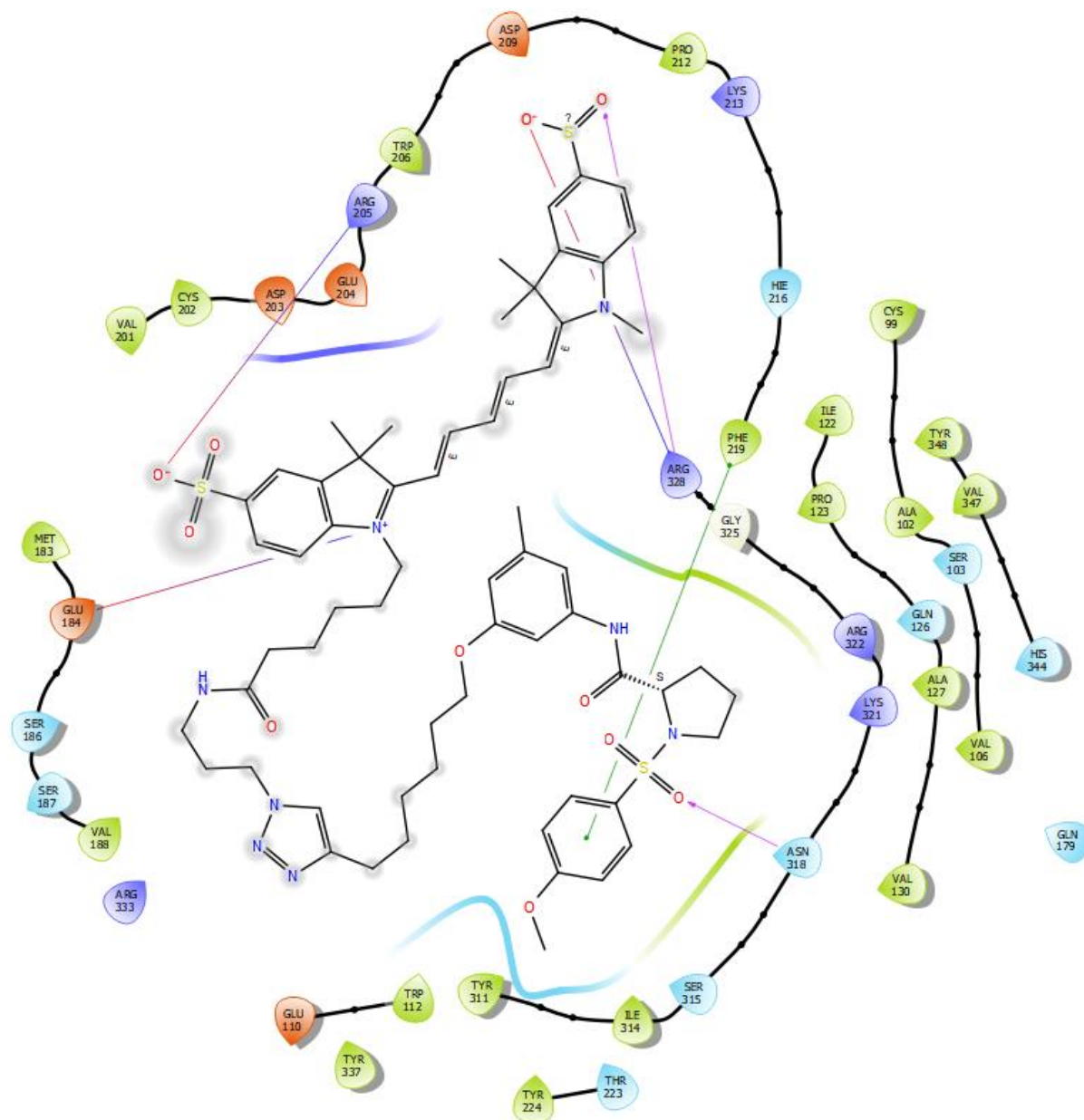
8. FÜGGELÉK

8.1. Dokkolás során kapott 3D ábrák és kölcsönhatástérképek

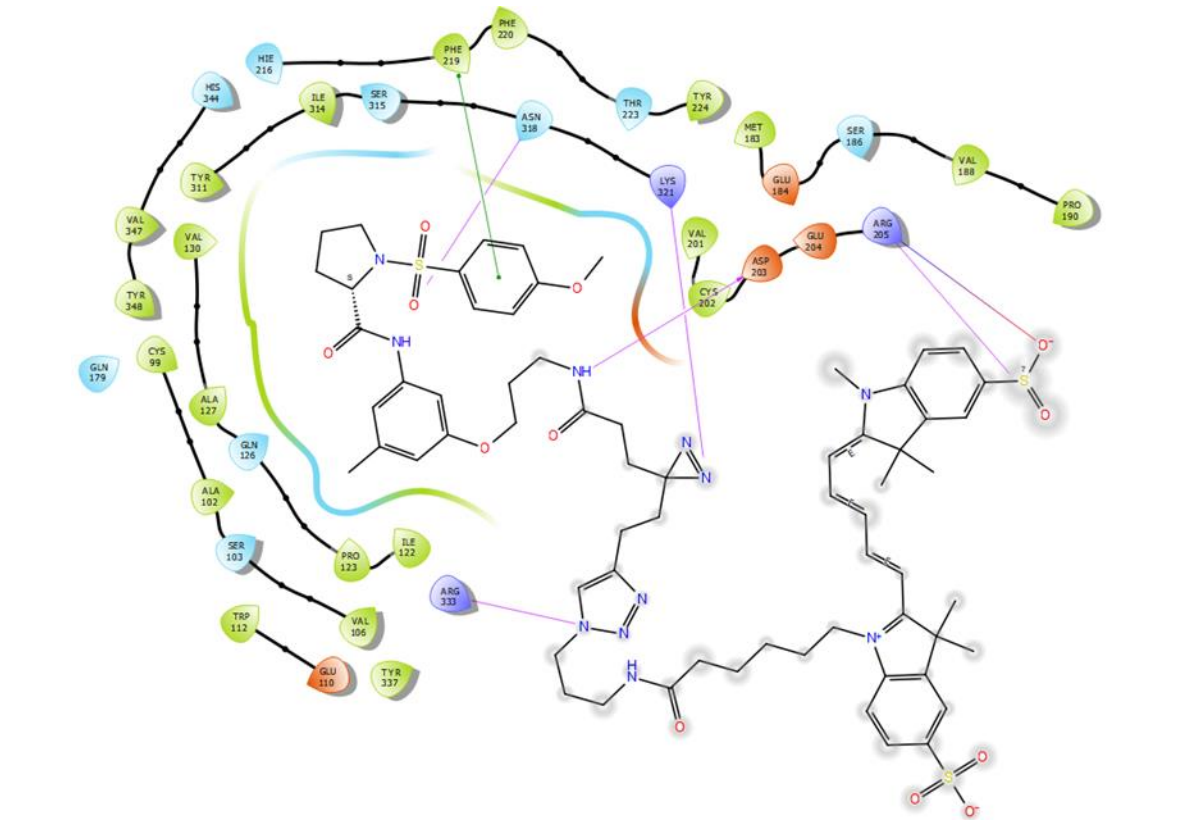
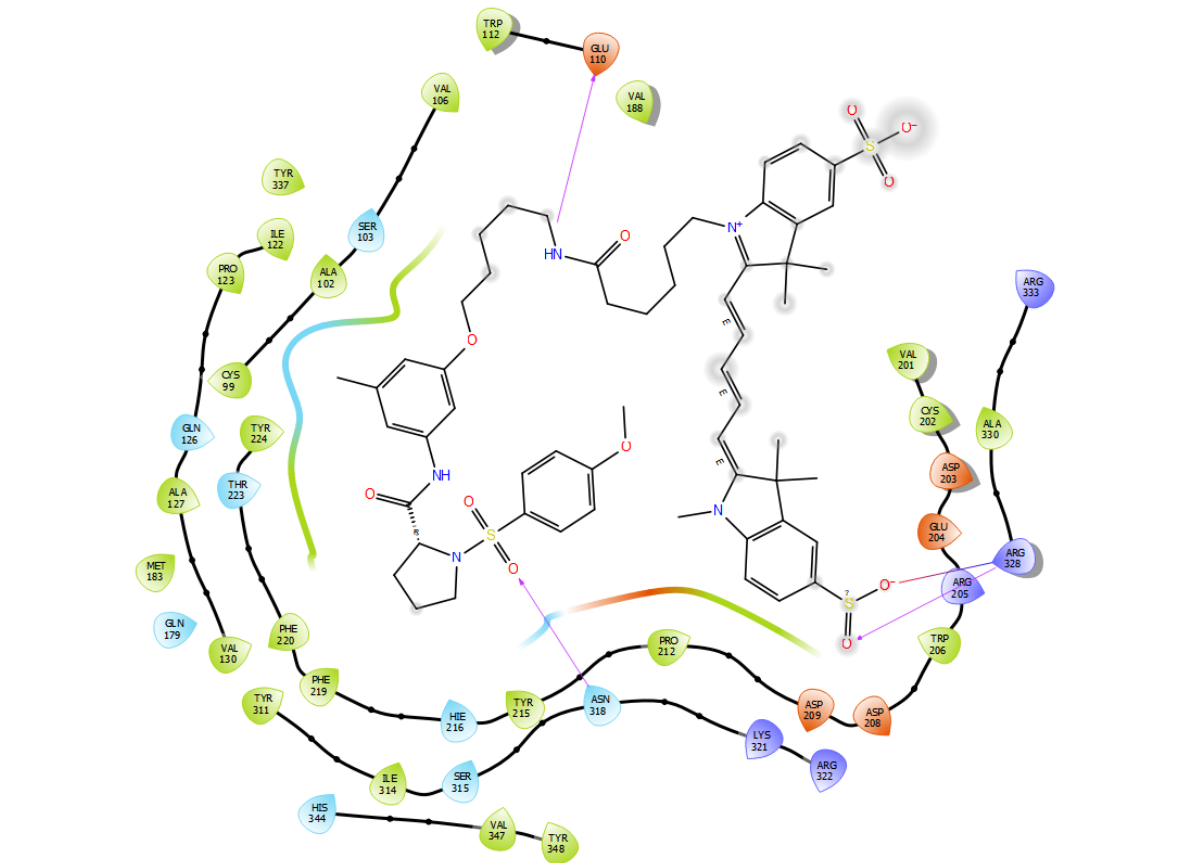
8.1.1. A módosított ACT-462206 ligandum dokkolása

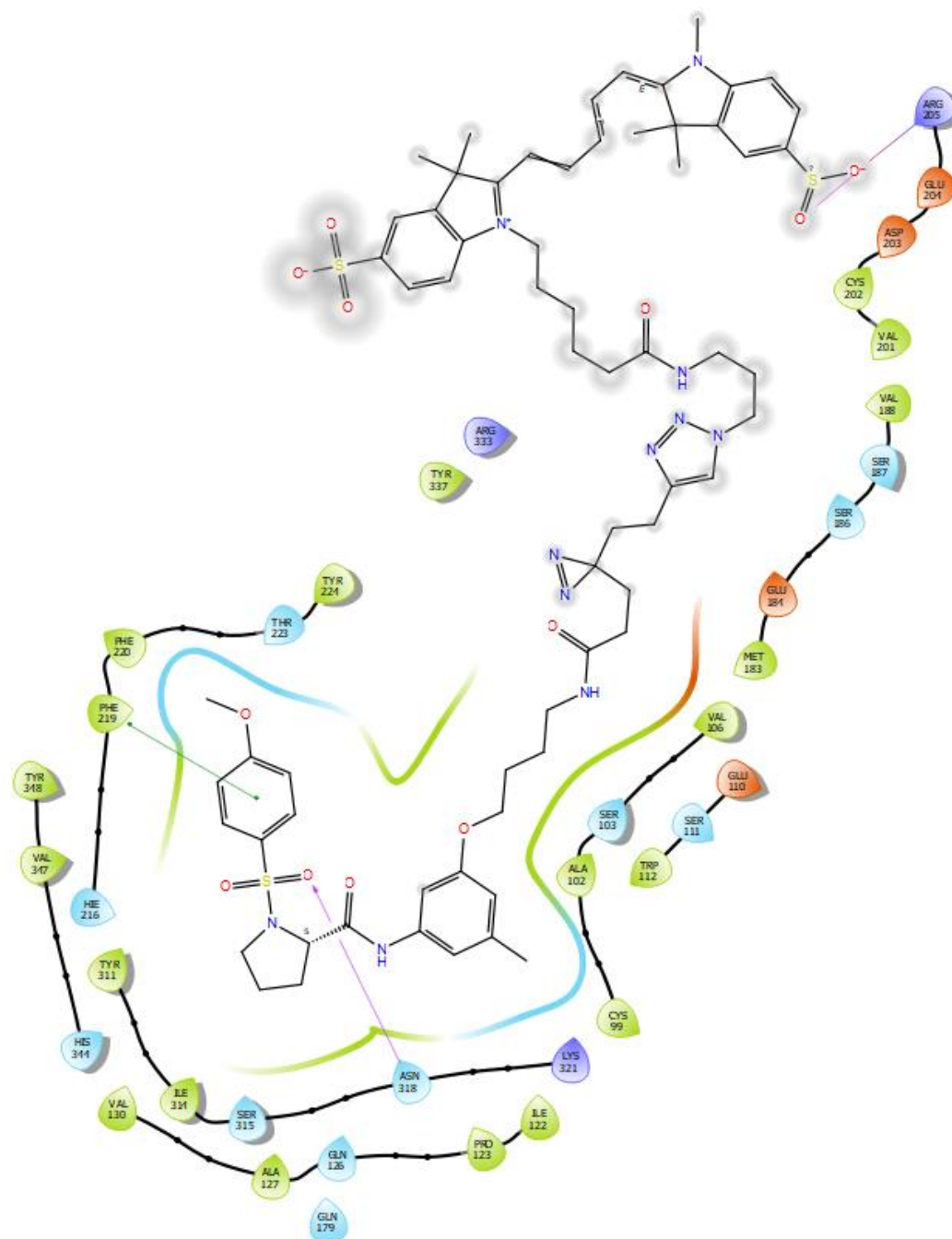


59. ábra: A módosított ACT-462206 ligandum dokkolása során kapott háromdimenziós ábrák
 a) 55; b) 56 c) 57; d) 58 módosított fluoreszcens ligandumok és az OX₁ fehérje (6TP4, aktív
 szerkezet, 5.1. fejezet, 6. táblázat)⁶⁹ szerkezete



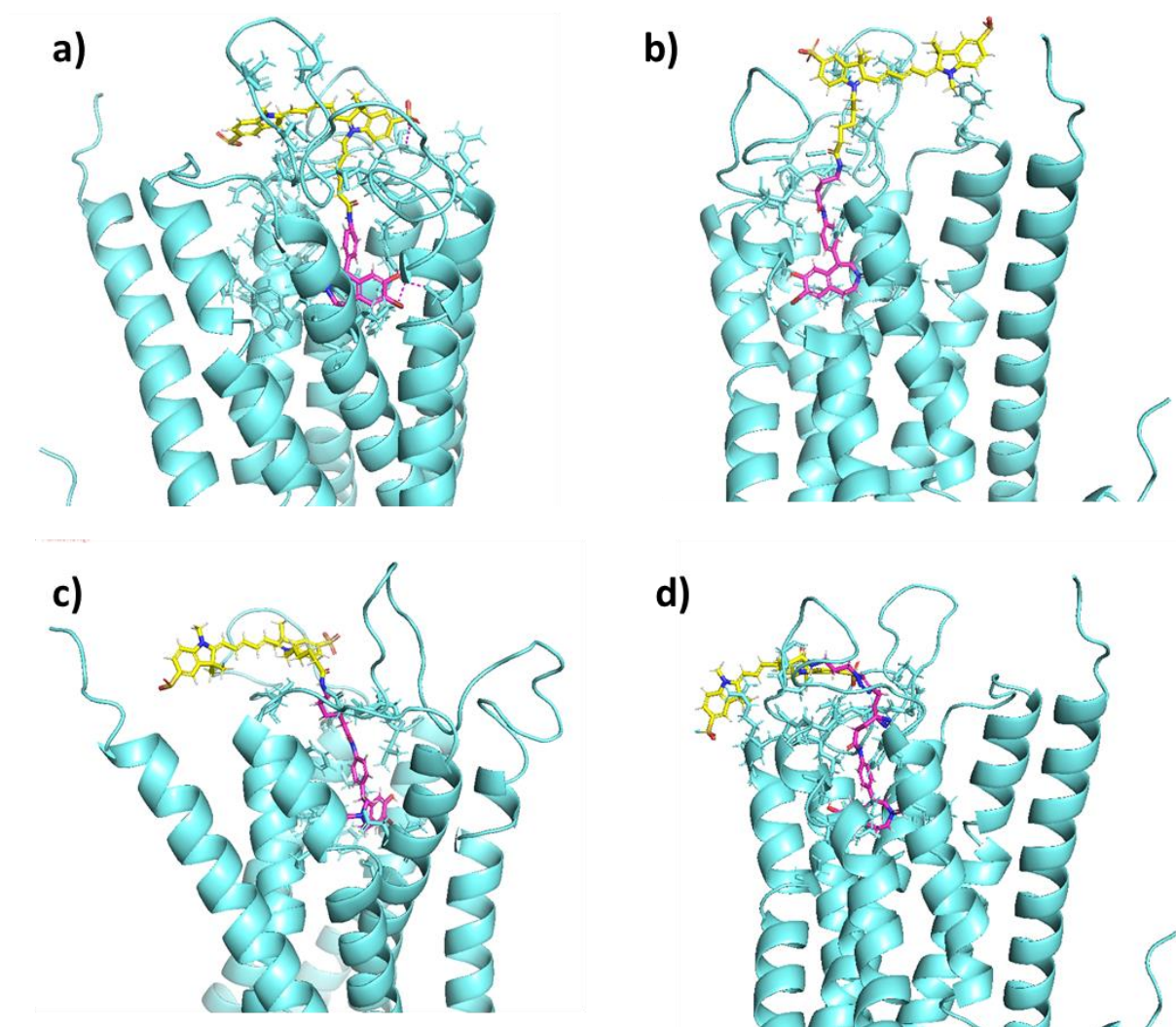
60. ábra: Az 55 dokkolása során kapott kölcsönhatástérkép





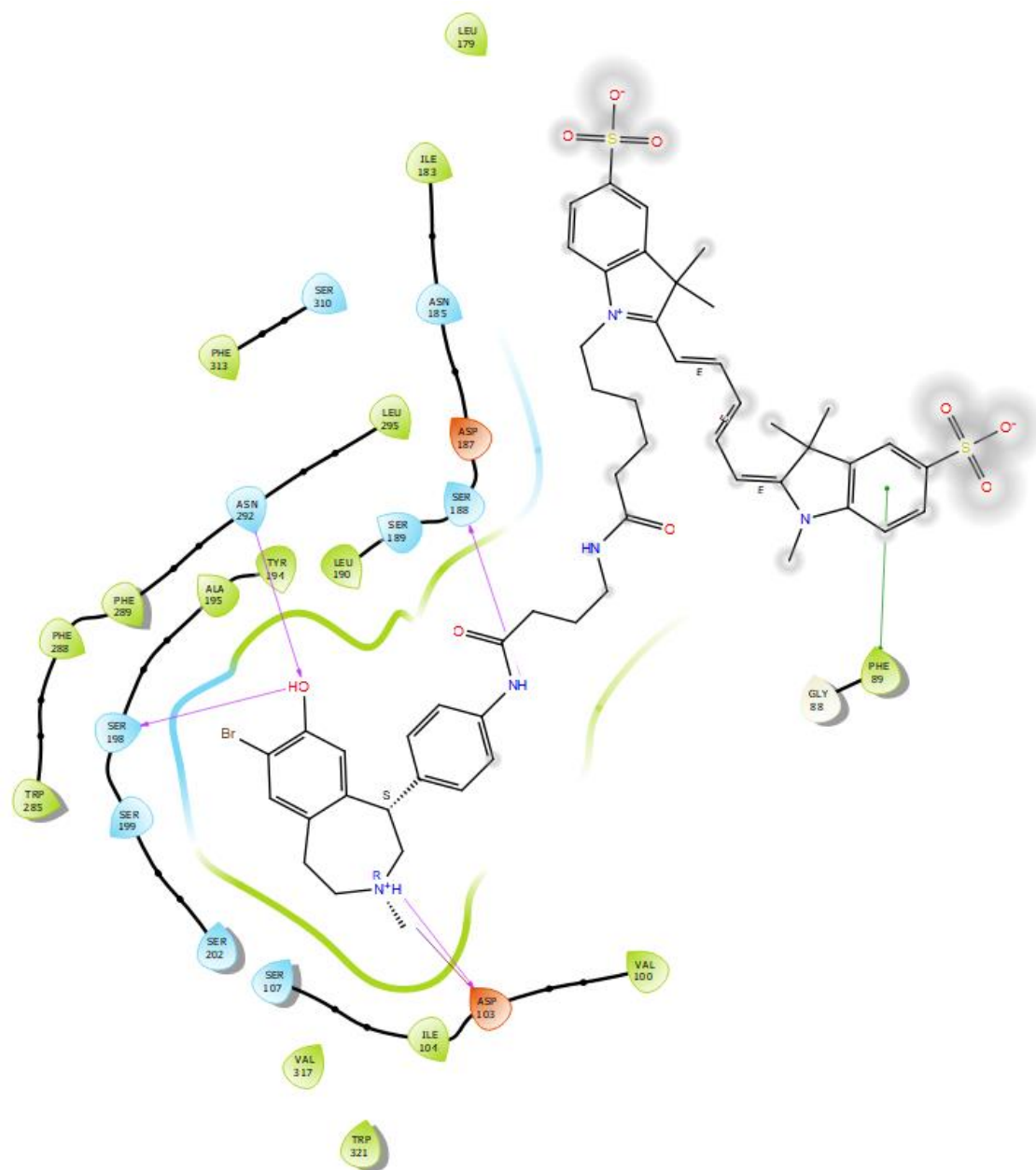
63. ábra: Az 58 dokkolása során kapott kölcsönhatástérkép

8.1.2. A módosított SKF-83566 ligandum dokkolása

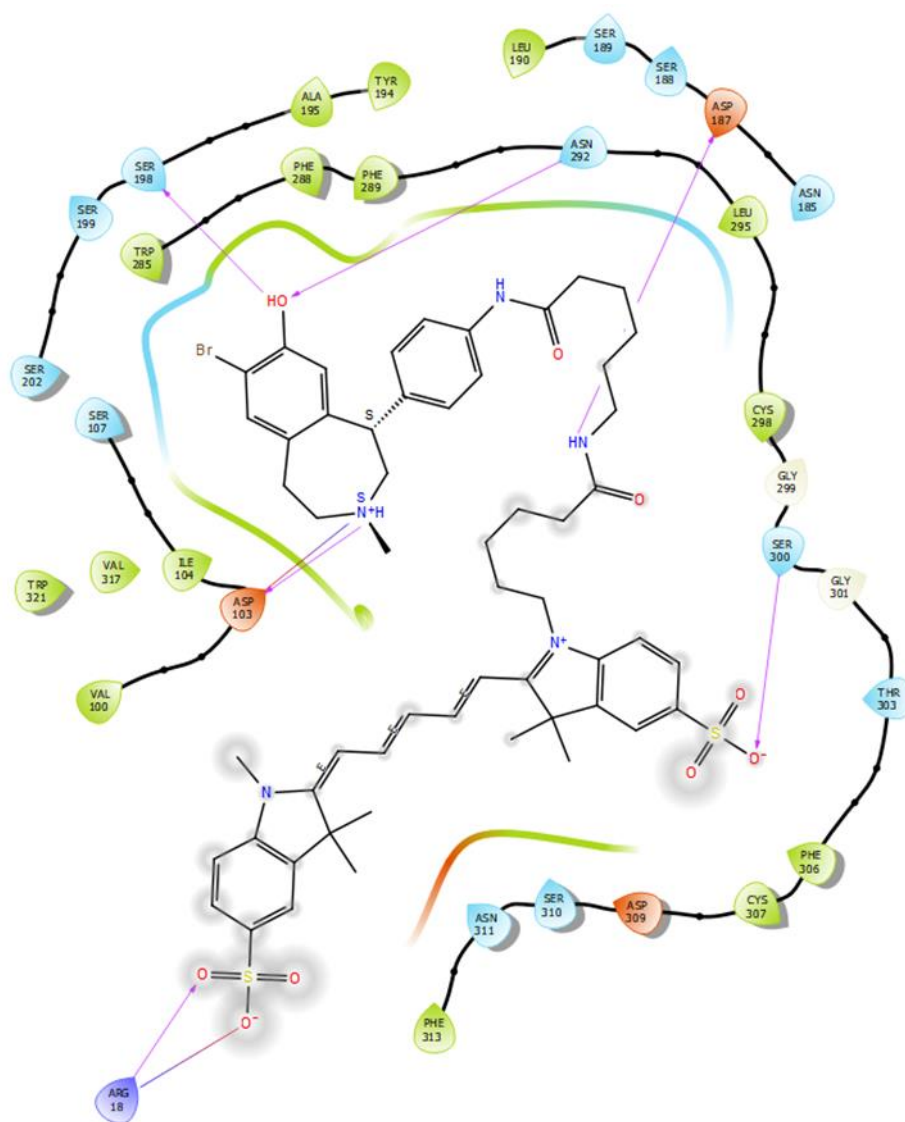


64. ábra: A módosított SKF-83566 ligandum dokkolása során kapott háromdimenziós ábrák

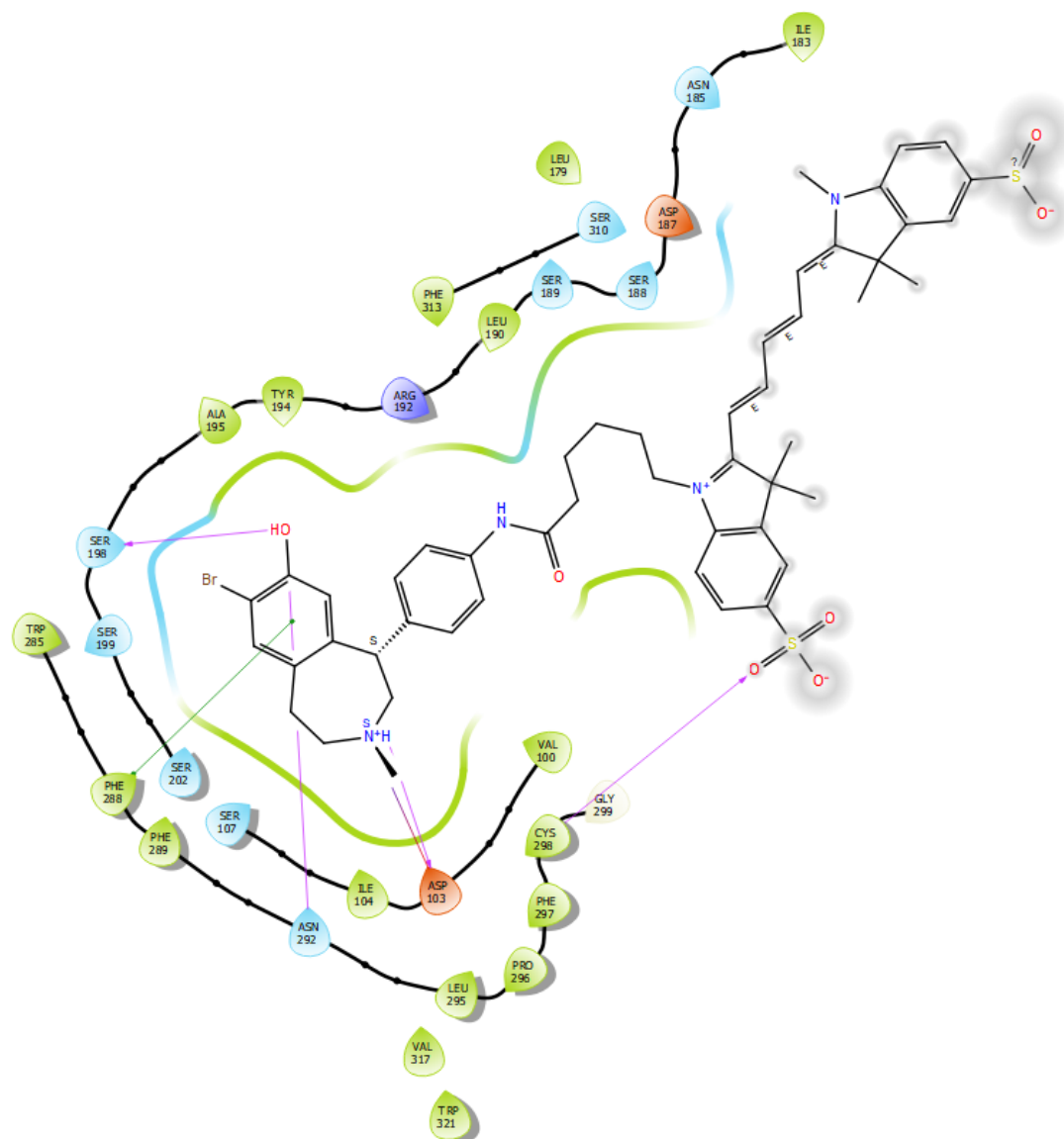
a) 62; b) 60 c) 61; d) 64 módosított fluoreszcens ligandumok és az D_1DR fehérje (aktív szerkezet, 5.1. fejezet, 6. táblázat)⁹³ szerkezete



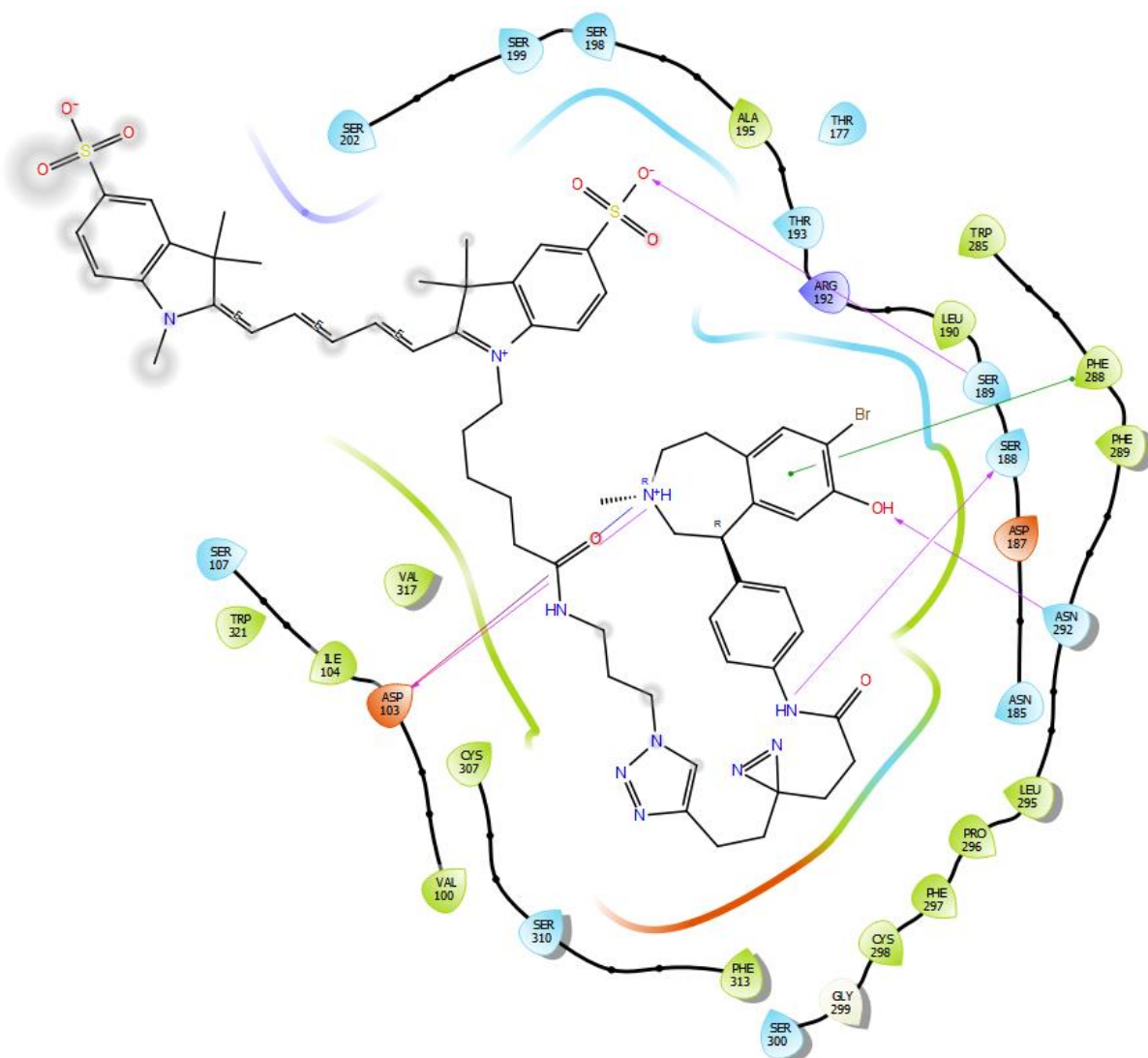
65. ábra: A 60 dokkolása során kapott kölcsönhatástérkép



66. ábra: A **61** dokkolása során kapott kölcsönhatástérkép



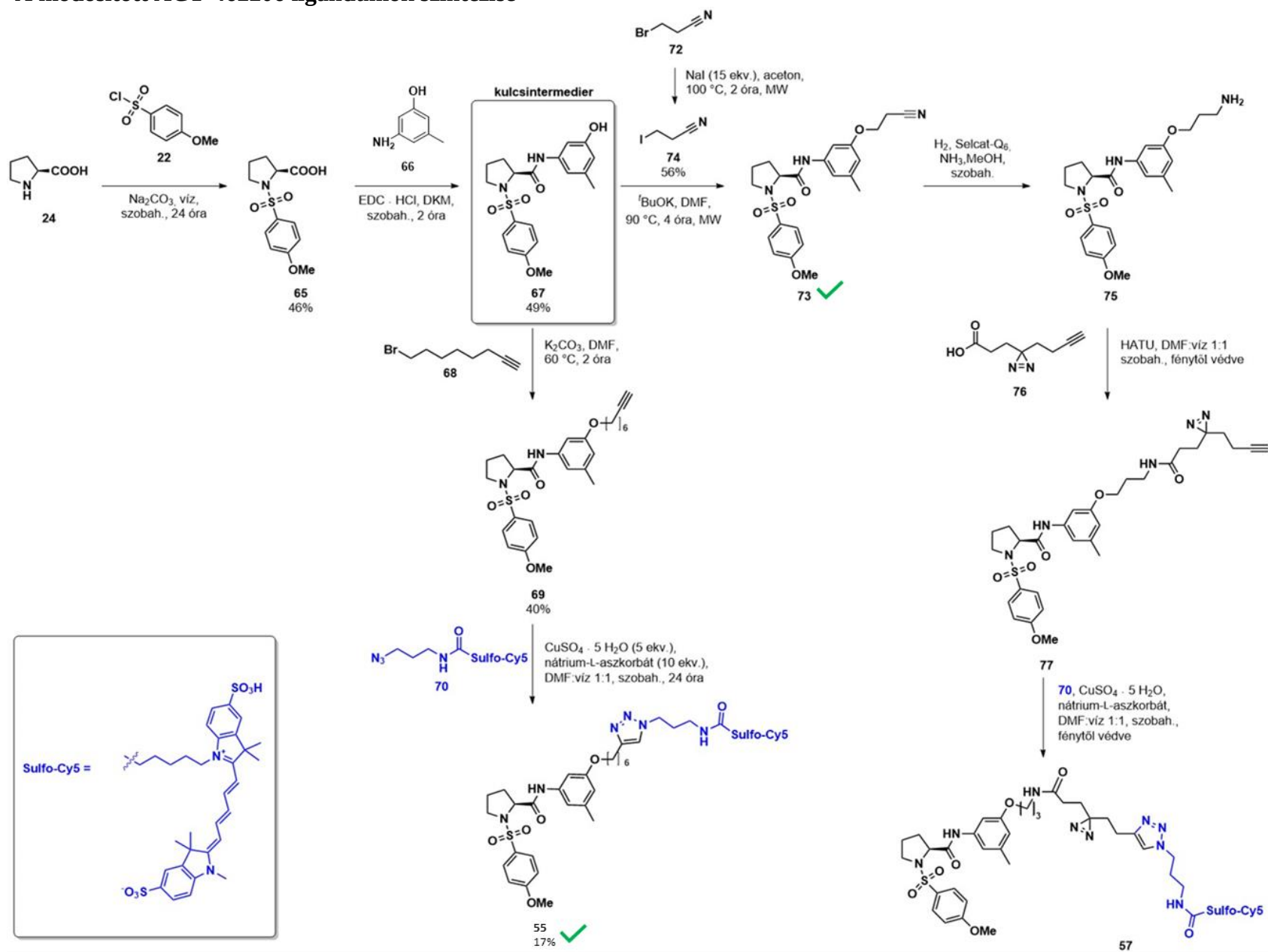
67. ábra: A 62 dokkolása során kapott kölcsönhatástérkép



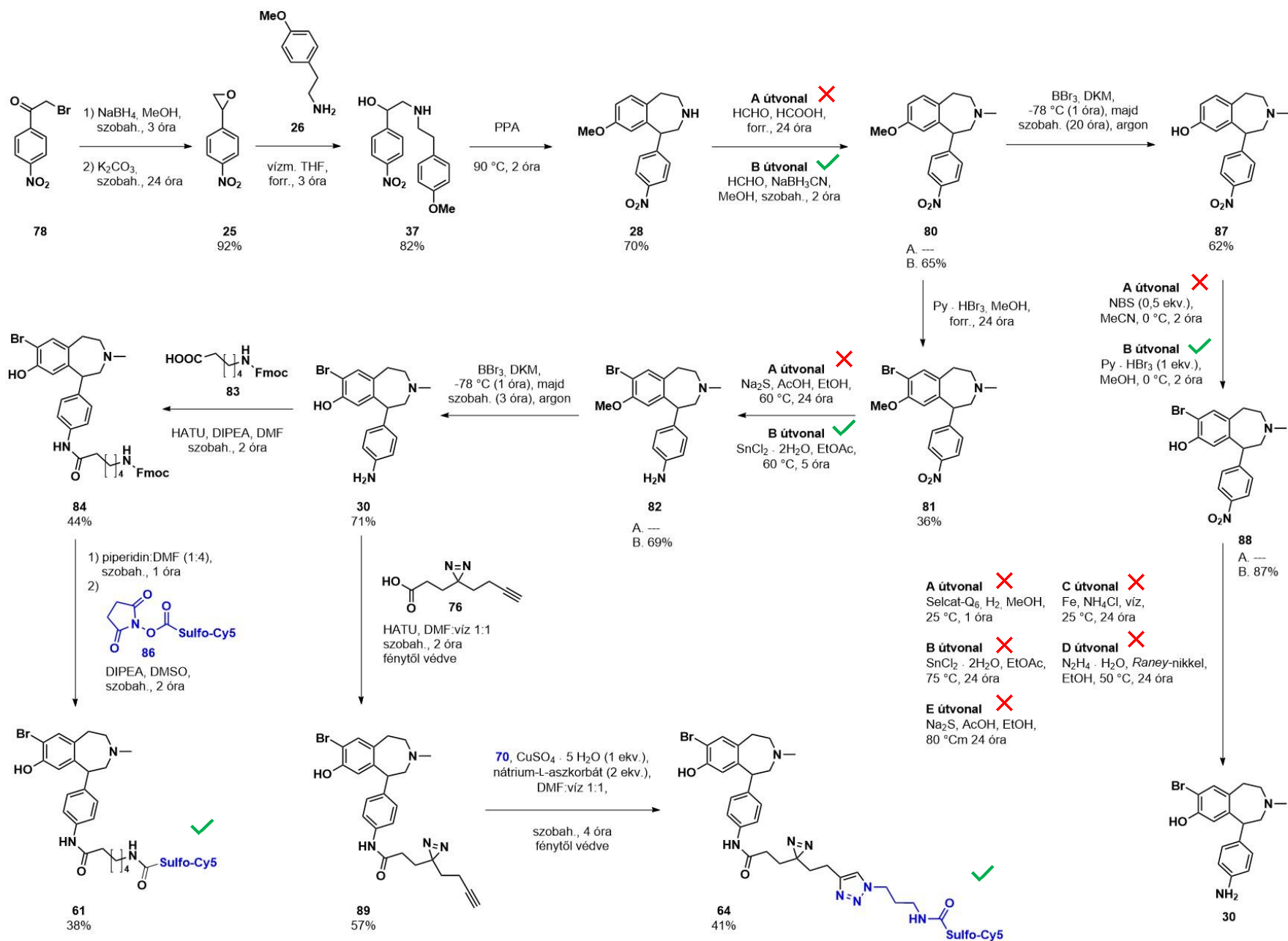
68. ábra: A 64 dokkolása során kapott kölcsönhatástérkép

8.2. Szintézisek összefoglaló ábrái

8.2.1. A módosított ACT-462206 ligandumok szintézise



8.2.2. A módosított SKF-83566 szintézise



8.2.3. A módosított JDTic szintézise

