

Nagy Stokes eltolódású, hatékonyan kioltott fluorogén jelzővegyületek szintézise

Tudományos Diákköri Dolgozat

Boczán Boldizsár

Témavezető: Dr. Kormos Attila

Tudományos munkatárs

Témavezető: Dr. Kele Péter

Tudományos főmunkatárs

Természettudományi Kutatóközpont, Szerves Kémiai Intézet,
Kémiai Biológia Kutatócsoport



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest
Természettudományi Kar
Kémia Intézet
2022

Dolgozat lezárása: 2022. január

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, *Dr. Kele Péter*nek a lehetőségért, hogy a szerves kémia, ezen belül a kémiai biológia területén elméleti és gyakorlati tudásomat elmélyíthettem.

Külön köszönöttem tartozom témavezetőmnek, *Dr. Kormos Attilának* és *Egyed Alexandrának*, hogy munkámat szakmailag irányították és akikhez bátran fordulhattam munkám során bárminemű tanácsért, segítségért. Továbbá szeretnék köszönetet mondani a Kémiai Biológia Kutatócsoport minden tagjának a jó hangulatú közösségért.

Külön köszönöttem tartozom anyagi támogatóimnak a Richter Gedeon Nyrt. Centenárium Alapítványnak, valamint a Kárpát Medencei Tehetségkutató Alapítványnak.

Végül szeretném hálámat kifejezni családomnak és barátaimnak a tanulmányaim során nyújtott feltétel nélküli támogatásért.

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás	2
Tartalomjegyzék	3
Rövidítésjegyzék	4
1. Bevezetés.....	5
2. Irodalmi bevezető.....	6
2.1 Bioortogonalitás	6
2.1.1 Fordított elektronigényű Diels–Alder reakció	6
2.1.2 Click-to-release reakciók	7
2.2 Fluoreszcens jelzővegyületek	9
2.3 Fluorogén jelzővegyületek.....	10
2.4 <i>In situ</i> kinon metid képződésen alapuló önjelölő fluorogének	12
3. Célkitűzések.....	13
4. Saját eredmények.....	15
4.1 Az izoforon-származék alapvázának előállítása.....	15
4.2 A dicianometilén-pirán-származék alapvázának előállítása	17
4.3 Kiterjesztett izoforon származék alapvázának előállítása	20
4.4 Kiterjesztett dicianometilén származék alapvázának előállítása	22
4.5 Az etiléndiamin önfeláldozó linker előállítása.....	23
4.6 A tetrazinszármazékok előállítása	24
4.7 A festékek összekapcsolása az önfeláldozó linkerrel	26
4.8 A festékek és a tetrazinszármazékok összekapcsolása	27
4.9 A click-to-release reakciók vizsgálata	29
5. Az eredmények összegzése	35
6. Kísérleti rész	36
6.1 Általános kísérleti rész.....	36
6.2 Szintézisek	37
6.3 A click to release reakció vizsgálata	58
Irodalomjegyzék	59

Rövidítésjegyzék

Boc	<i>tert</i> -butoxikarbonil-csoport
CDI	karbonil-diimidazol
DCM	diklórmétán
DHP	3,4-dihidro-2 <i>H</i> -pirán
DIPEA	etil-diizopropilamin
DMAP	4-dimetilamino-piridin
DMF	dimetil-formamid
DSC	<i>N,N'</i> -diszukcinimidil-karbonát
GSH	glutation
IEDDA	fordított-elektronigényű Diels–Alder reakció
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat
PPTS	piridínium-para-toluolszulfonát
TCO	<i>transz</i> -ciklooktén
TEA	trietyl-amin
p-TSA	para-toluolszulfonsav
Tf	trifluormetilszulfonil-csoport
Tz	tetrazin
THF	tetrahidrofurán
THP	(tetrahidro-2 <i>H</i> -pirán-2-il)oxi-csoport

1. Bevezetés

A fény egy olyan eszköz, amit számos tudományterületen előszeretettel használnak a klasszikus optikától kezdve az orvosbiológiai alkalmazásokig, mint például a fluoreszcens képalkotás vagy a fotodinámiai terápia (PDT).

A sejtekben zajló folyamatok fluoreszcenciával való követése a kémiai biológia területén kiemelt fontosságú. Jelentőségét jól mutatja, hogy 2008-ban a zöld fluoreszcens fehérje (GFP – Green Fluorescent Protein) felfedezését és biotechnológiai alkalmazásának kidolgozását Nobel-díjjal jutalmazták.¹ A fluoreszcens fehérjék fontossága megkérdőjelezhetetlen a biológiai folyamatok jobb megértésében, felhasználhatóságukat azonban korlátozza, hogy méretük gyakran összemérhető a vizsgálandó fehérjék méretével. A probléma megoldásaként az utóbbi években egyre nagyobb teret nyert a kismolekulás jelzővegyületek alkalmazása, melyek tulajdonságai szintetikusan finomhangolhatók, kis méretükből adódóan pedig a jelölni kívánt biomolekula szerkezetét, funkcióját nem, vagy csak kismértékben befolyásolják.²

A fluoreszcens vegyületekkel jelölt biomolekulákat legegyszerűbben mikroszkópos módszerekkel lehet detektálni, vizsgálni. Hagyományos fénymikroszkóppal azonban az Abbe-féle diffrakciós limit következtében 200 nm-en belül lévő jelölt objektumok nem különíthetők el egymástól.

A szuperfelbontású mikroszkópia (SRM) felfedezésével lehetővé vált biomolekulák, szerkezetek vizsgálata a diffrakciós limitet meghaladó felbontással is, mely technikák kifejlesztését 2014-ben ugyancsak Nobel-díjjal ismerték el.³

A fluoreszcens mikroszkópia során a jel-zaj arány igen fontos paraméter, mely nagymértékben meghatározza a felbontóképességet is. Ideális esetben az alkalmazott jelzővegyület a spektrum vörös tartományában gerjeszthető, így minimális autofluoreszcenciát eredményez. Fontos ezen kívül a nem specifikusan kötődő fluorofórok által kibocsátott jel minimalizálása is, mely fluorogén jelzővegyületek alkalmazásával érhető el. Mindemellett fontos, hogy a jelzővegyület alkalmas legyen a vizsgálandó biomolekulához történő szelektív és biokompatibilis (bioortogonális) konjugációra is.

A bioortogonalitás jelentőségét mutatja, hogy 2022-ben Carolyn Bertozzit a bioortogonális klikk reakciók kifejlesztéséért Nobel díjjal jutalmazták.⁴

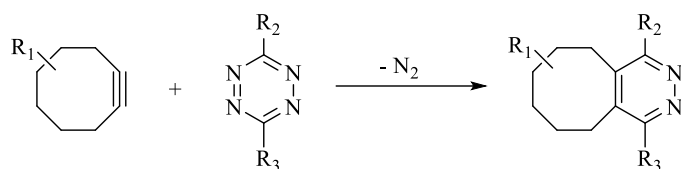
Tudományos diákköri munkám célja olyan, a vörös tartományban emittáló hatékonyan kioltott fluorogén jelzővegyületek fejlesztése, melyek bioortogonálisan alkalmazhatók.

2. Irodalmi bevezető

2.1 Bioortogonalitás

Élő szervezetekben való vizsgálatokra, biomolekulák módosítására a legalkalmasabbak azok a szervezetidegen, biológiailag és kémiaiilag is inert funkciós csoportok közt lejátszódó gyors és hatékony kémiai reakciók, melyek kizárólag egymással reagálva stabil kovalens kötést alakítanak ki, miközben sem a termékek, sem az esetleges melléktermékek nem toxikusak. Az ilyen reakciókat nevezzük bioortogonálisnak.⁵

Ezeknek a feltételeknek kevés reakció felel meg, melyek közül biokompatibilitását, reakciósebességét és szelektivitását tekintve kiemelkedik a tetrazinok és feszült gyűrűs alkének / alkinek fordított elektronigényű Diels–Alder reakciója (1. ábra).⁶



1. ábra Tetrazinok és feszült gyűrűs dienofilek fordított elektronigényű Diels-Alder reakciója

2.1.1 Fordított elektronigényű Diels–Alder reakció

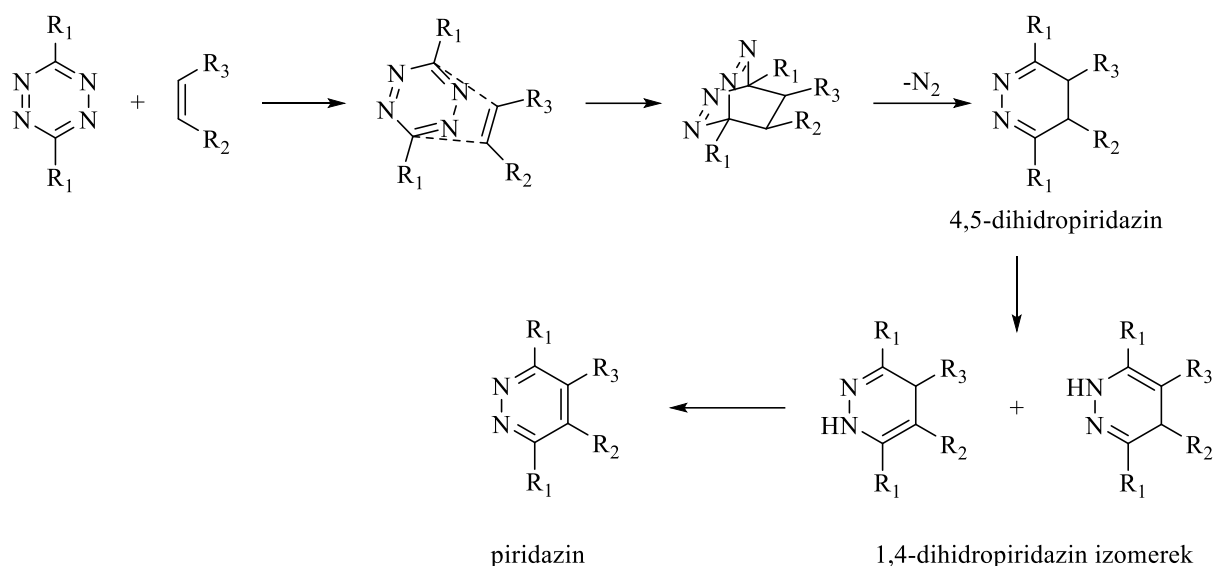
A normál elektronigényű Diels–Alder reakcióval ellentétben egy elektronban gazdag feszült gyűrűs dienofil (pl. ciklooktin vagy *transz*-ciklooktén) reagál egy elektronszegény diénnel (pl. tetrazin (Tz) származék) a fordított elektronigényű Diels–Alder reakcióban. A tetrazinok IEDDA reakciójában a dienofiltől függően piridazin- vagy dihidropiridazin-származék keletkezik. (2. ábra)

A határpálya elmélet (FMO) szerint az IEDDA reakció a dienofil legmagasabb energiájú betöltött (HOMO), illetve a dién legalacsonyabb energiájú betöltetlen (LUMO) molekulapályája közötti kölcsönhatás eredményeként játszódik le. A reakció sebessége a megfelelő HOMO-LUMO pályák közti energiárés csökkenésével növekszik.⁷

A reakció szerves oldószerekben, vízben és biológiai közegben is lejátszódik, és nem igényel aktiválást.⁷ A nagy reakciósebességnek köszönhetően a reagensek nagyon alacsony koncentrációban használhatók biomolekulákkal szelektív módosítására.⁷

Bioortogonális IEDDA reakciókban *transz*-ciklooktén (TCO) származékokat alkalmaznak leggyakrabban dienofilként azok nagy reaktivitása miatt. A Tz és TCO között

lejátszódó irreverzibilis folyamat N_2 gáz felszabadulásával jár, ami a reakció egyetlen mellékterméke.



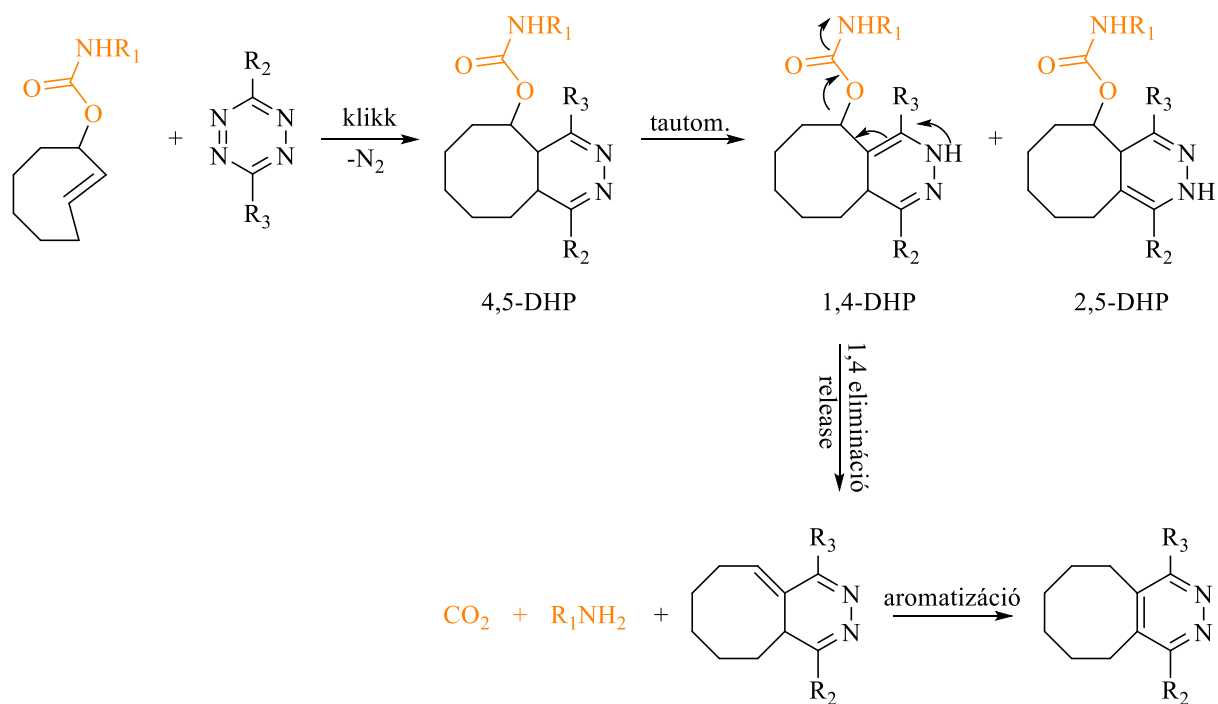
2. ábra Tetrazinok és *transz*-ciklooktének fordított elektronigényű Diels-Alder reakciója

2.1.2 Click-to-release reakciók

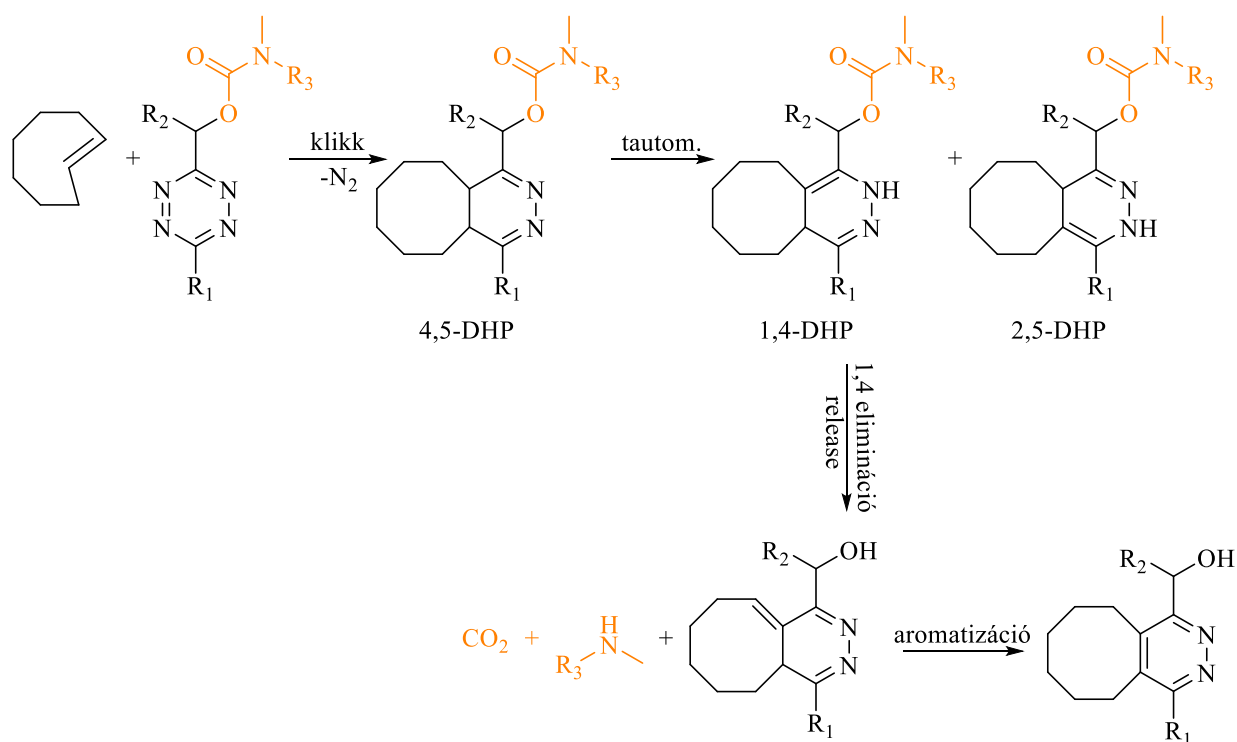
Tetrazinok és TCO-k reakciója nem csak kötés kialakítására alkalmas. Az ún. click-to-release reakciókban az IEDDA reakció olyan kaszkádfolyamatot indít el, melynek eredménye egy kötés hasadása. Az ilyen típusú reakciók egyre népszerűbbek a molekuláris biológia és az orvostudomány területén, mivel lehetőséget adnak kis effektormolekulák pl. hatóanyagok kémiai reakció által kontrollált felszabadítására.^{8,9}

A click-to-release típusú reakciókban a click lépésben keletkező 4,5-dihidropiridazin vizes közegben 1,4-dihidropiridazinná tautomerizálódik, melyből megtörténik a felszabaduló vegyület eliminációja, miközben piridazin keletkezik.

Mind a ciklooktén, mind a tetrazin viselkedhet aktivátorként, valamint egy biológiailag aktív vegyület aktivitását blokkoló linkerként is.¹⁰ Míg a TCO blokkoló hatását több publikáció is taglalja,^{11,12} addig a tetrazinok ilyen fajta használata kevésbé elterjedt.^{13,14,15}



3. ábra A TCO-ról való elimináció mechanizmusa

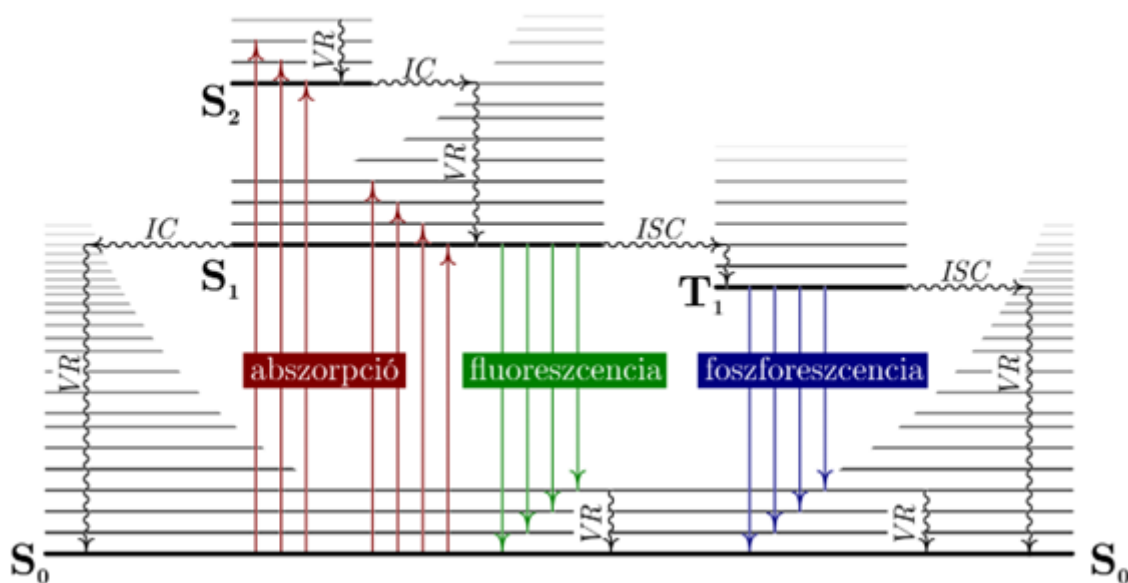


4. ábra A Tz-ról való elimináció mechanizmusa

2.2 Fluoreszcens jelzővegyületek

A fluoreszcencia olyan folyamat, mely során a molekula fény hatására magasabb energiájú állapotba jut, majd a gerjesztett állapotból fotonkibocsátás mellett tér vissza az alapállapotba.

A fotonemisszó mellett a gerjesztett állapotban egyéb relaxációs jelenségek is lejátszódhatnak, mint például belső konverzió (*internal conversion*, IC), vibrációs relaxáció (VR), vagy spinváltó átmenet (*intersystem crossing*, ISC). Ezek a folyamatok párhuzamosan játszódnak le, sebességi együtthatóik aránya határozza meg a fluoreszcens kvantumhatásfokot, mely a kibocsátott és elnyelt fotonok számarányát adja meg. Mivel a gerjesztett állapotban nem csak fotonemisszióval történik az energia leadása, a gerjesztő fény energiája magasabb, mint az emittált fotonoké. Ezt a különbséget az ún. Stokes-eltolódással lehet jellemezni mely az abszorpció és emissziós spektrum maximumai közti különbséget jelenti. A folyamatok energiaviszonyát és a relaxációs útvonalakat a Jablonski-diagram szemlélteti. (5. ábra)



5. ábra Jablonski-diagram

A fluoreszcencián alapuló módszerek előnye, a többi képalkotó módszerhez képest az olcsó detektáláson kívül, a jó idő- és térbeli felbontóképesség mellett a rendkívül érzékeny észlelhetőség. A fluoreszcens detektálás során elérhető jel-zaj arányt nagymértékben ronthatja a természetes fluorofórok (aromás aminosavak, porfirinek stb.) auto- és a feleslegben alkalmazott, nonspecifikusan kötődő jelzővegyületek háttérfluoreszcenciája.¹⁶

Míg az autofluoreszcencia hatékonyan kiküszöbölhető olyan festékek alkalmazásával, amelyek vörös tartomány felé eltolt gerjesztéssel rendelkeznek vagy nagy a Stokes-eltolódásuk, addig a háttérfluoreszcenciából eredő problémákat úgynevezett fluorogén jelzővegyületekkel lehet megoldani.¹⁷

A vörös tartomány felé eltolt gerjesztés azért is hatékony, mert az úgynevezett vízablakban (650-900 nm) a legnagyobb a szövetek áteresztőképessége, így mélyebb rétegek is vizsgálhatók.

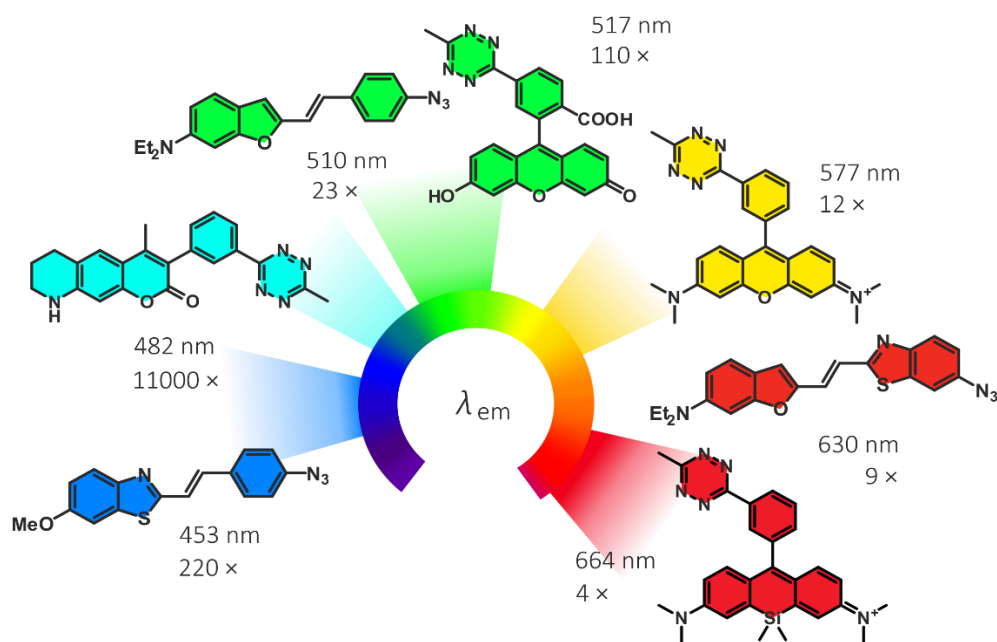
2.3 Fluorogén jelzővegyületek

A megfelelő jel-zaj arány kulcsfontosságú követelmény a modern szuperfelbontású mikroszkópiás technikáknál, azonban a fentebb említett auto- és háttérfluoreszcencia jelentős limitáló tényezők.

A háttérfluoreszcencia kiküszöbölésére legjobb módszer a fluorogén jelzővegyületek alkalmazása. A fluorogén vegyületek jellegzetessége, hogy a detektálás hullámhosszán nem, vagy alig mutatnak fluoreszcenciát, viszont egy specifikus reakció lejátszódásának köszönhetően, a jelölni kívánt molekulához kapcsolódva intenzíven fluoreszcensé válnak.¹⁸ Felépítésük és működésük alapján két csoportba sorolhatók.

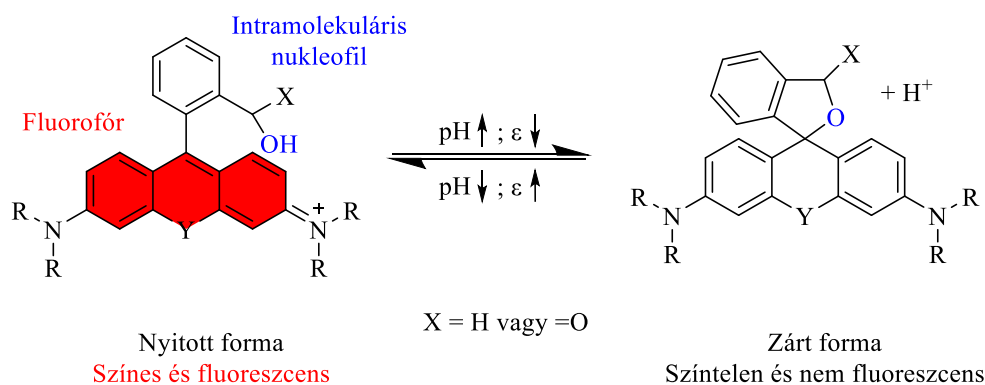
1. A fluorogén vegyület egy úgynevezett kioltó (quencher) csoporttal rendelkezik, mely a festékváz megváltoztatása nélkül tompítja a molekula fluoreszcenciáját, így ebben az állapotban ideális esetben nem bocsát ki fotont. Azonban, ha a kioltó csoport átalakul, akkor a kioltó hatás megszűnik, és a fluoreszcencia intenzitása a többszörösére növekszik. A kioltócsoport kémiai átalakítása ideális esetben összefügg a biomolekulához történő ligációs lépéssel.

Fluoreszcenciát tompító csoport például a tetrazin, melynek nagy előnye, hogy egyben bioortogonális reakciókban is alkalmazható. Csoportunk korábbi munkái és más irodalmi példák azonban rávilágítottak arra, hogy a tetrazinnak e moduláló hatása a vörös tartomány felé haladva egyre kevésbé érvényesül, ennek megfelelően jelentősen csökken a jelzővegyületek fluorogenicitása, ami a be és kikapcsolt állapotok emissziós intenzitásának hányadosa (6.ábra).¹⁹



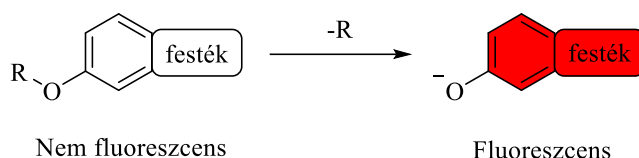
6. ábra A kioltás a vörös tartomány felé drasztikusan csökken

2. A fluorogén vegyületek második csoportjába azok a szerkezetek tartoznak, melyekben magukban a vegyületekben végbemenő szerkezeti átalakulások idéznek elő intenzitásnövekedéssel járó változásokat. Az ilyen típusú fluorogén vegyületek előnye a tetrazin kioltócsoporthal szemben, hogy a kioltás mértéke a gerjesztési hullámhossztól független. A leggyakrabban használt, ezen az elven működő vegyületek a 2'-szubsztituált rodaminok, melyek gyűrűzáródásra (spirolakton, spiroéter) képes funkciós csoportot (pl. karboxil, hidroximetil) tartalmaznak. Az ilyen vegyületekre jellemző, hogy csak nyílt formájukban mutatnak fluoreszcenciát (7. ábra). A két forma közötti egyensúlyt nagyban befolyásolja a közeg polaritása és kémhatása. Poláros, illetve savas közegben az egyensúly a fluoreszcens forma felé tolódik el.



7. ábra Általános szerkezetű rodaminok nyílt, illetve zárt formája

Ebbe a csoportba tartoznak az olyan donor-akceptor (D-A) típusú festékek is, ahol a donor fenolát. Ha a fenolos oxigén szubsztituált, akkor a vegyület nem fluoreszkál. Amennyiben valamilyen külső hatásra a blokkoló csoport lehasad, jelentős intenzitás növekedés következik be (8. ábra). Ezt a mechanizmust már számos irodalmi példában alkalmazták, a blokkoló csoport lehasítása történhet például reaktív szabad gyökökkel²⁰ vagy enzimmal.²¹

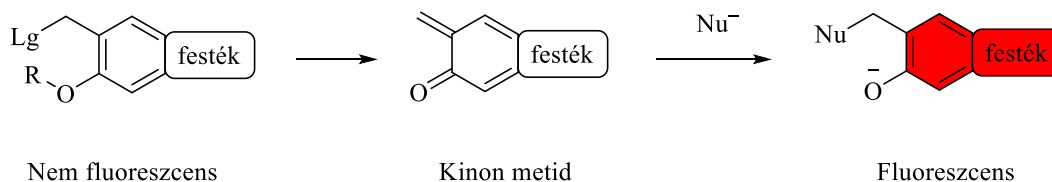


8. ábra Fenolátot tartalmazó D-A festékek fluorogenicitása

2.4 *In situ* kinon metid képződésen alapuló önjelölő fluorogének

A kinon metidek kivételesen nagy elektrofil képességgel rendelkező rövid életidejű vegyületek.²² Ezt a tulajdonságot kihasználva *in situ* keletkező kinon metid alapú fluorofórokkal megvalósítható biomolekulák kovalens jelölése, pl. enzimaktivitás *in vivo* követésére.²³

A háttérfluoreszcencia kiküszöbölésére a kinon metid kombinálható fenolát donort tartalmazó D-A festékekkel. Ezek hasonló elven működnek, mint a fentebb említett donor-akceptor festékek, azonban ebben az esetben a blokkoló csoport lehasítását követően – ami történhet például enzimmal – kialakul a reaktív kinon metid, ami kovalens kötést alakít ki egy közeli nukleofillal (például egy fehérje nukleofil aminosav oldallánca) és így jön létre a festék kovalensen kötött, fluoreszcens formája.^{24,25,26} (9. ábra)

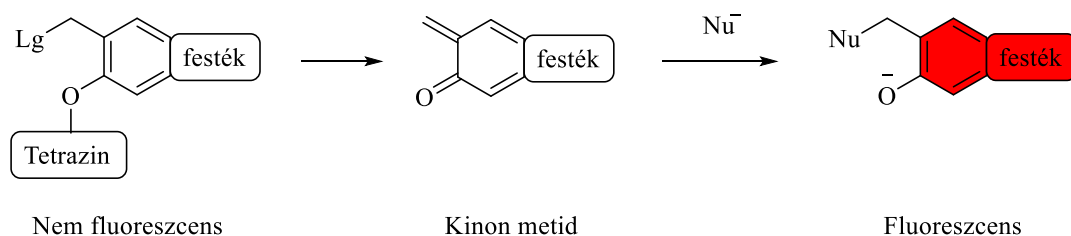


9. ábra *In situ* kinon metid alapú fluorigén jelzővegyületek működési elve

3. Célkitűzések

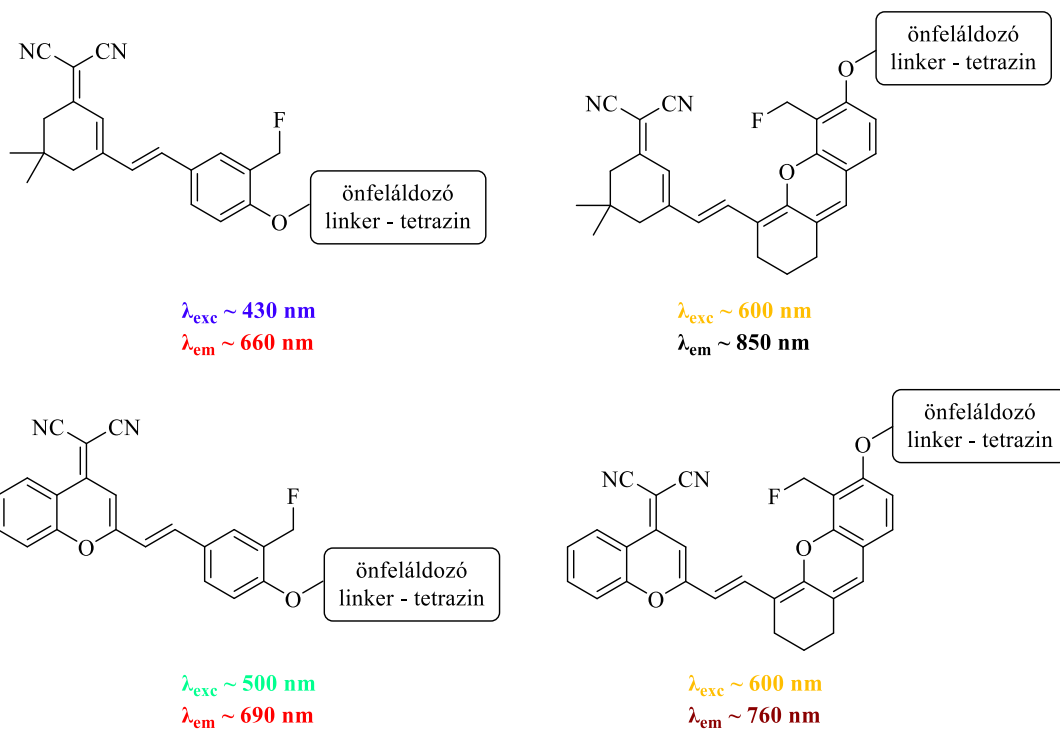
Kutatómunkám célja bioortogonálisan alkalmazható, hatékonyan kioltott festékek szintézise volt, amelyek vörös tartomány felé eltoltt emisszióval rendelkeznek. A tetrazint előszeretettel és sikeresen alkalmazzák bioortogonális, fluorogén vegyületekben, ám a biológiai vizsgálatok szempontjából előnyösebb vörös tartományban csekély mértékű fluorogenicitás érhető el segítségükkel. Kutatócsoportunkban számos próbálkozás történt ennek kiküszöbölésére, ^{27,28} mára azonban világossá vált, hogy a tetrazin nem alkalmas vörös fénnel gerjeszthető fluorofórok modulálására és más megoldást kell találni a problémára.

E kutatásokba bekapcsolódva olyan molekula előállítását tűztem ki célul, amiben kinon-metid kialakítására képes váz emisszióját oly módon blokkoljuk, hogy a blokkolócsoport távozása tetrazinon lejátszódó bioortogonális reakció eredménye legyen. Terveink szerint a tetrazinnak egy *transz*-ciklookténnel való reakciójában, egy kaszkádfolyamatban a festék lehasad (click-to-release),¹⁵ miközben kialakul a kinon metid. Ezután a köztes termékként képződő kinon metid kovalensen kötődik a jelölni kívánt fehérjének egy közeli, nukleofil részletéhez, amivel egyidőben kialakul a jelzővegyület emittáló formája (10. ábra).



10. ábra A célkitűzés általános működési elve

Alapvázként az irodalomban már leírt, nagy Stokes eltolódású, vörös tartományban emittáló fluorofórokat választottam. Ezek látható tartományba eső gerjeszthetőségüknek és nagy Stokes eltolódásuknak köszönhetően hatékonyan küszöbölik ki az autofluoreszcenciát, továbbá alkalmasak lehetnek több színű jelölési kísérletekben is. A tetrazin a festékekhez kapcsolódhat közvetlenül, vagy egy önfeláldozó linkeren keresztül. (11. ábra)



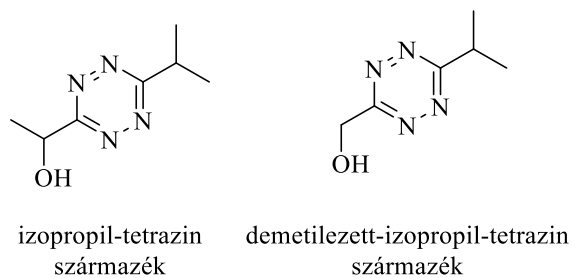
11.ábra Az alapvázak általánosan

A festékvázhoz választott önfeláldozó linker az 12. ábrán látható:



12. ábra A választott önfeláldozó linker

Eltérő tetrazinokat terveztem annak érdekében, hogy megtaláljam az ideális egyensúlyt a click-to-release reakció sebessége és a vegyület fiziológiás körülmények között mutatott stabilitása között. A tetrazinszármazékokat egy modellvegyületen tesztelte a kutatócsoportban Lövei Allegra Lili, s ezek alapján választottam ki a legígéretesebb származékokat. (13. ábra)

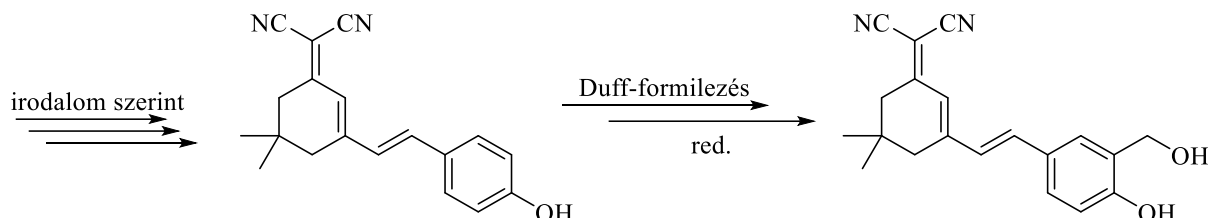


13.ábra Lehetséges tetrazinszármazékok

4. Saját eredmények

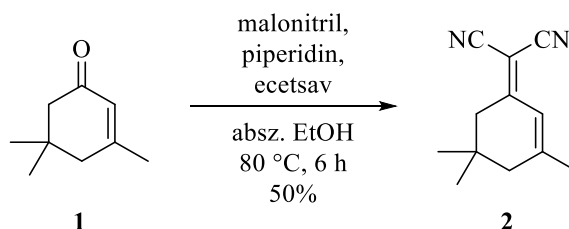
4.1 Az izoforon-származék alapvázának előállítása

Az alapváz előállítása az irodalomban leírt módon történt,²⁹ amiből formilezést követő redukcióval kapható a célkitűzésben szereplő alapváz. (14. ábra)



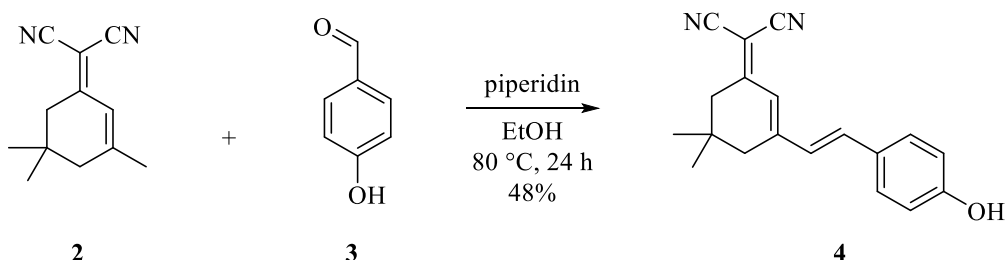
14. ábra A festékváz előállítása

Először a malonitril-származékot állítottam elő. Ehhez izoforonból (1) indultam ki és malonitril segítségével kondenzációs reakcióban nitrogén atmoszféra alatt előállítottam a 2 származékot. (15. ábra)



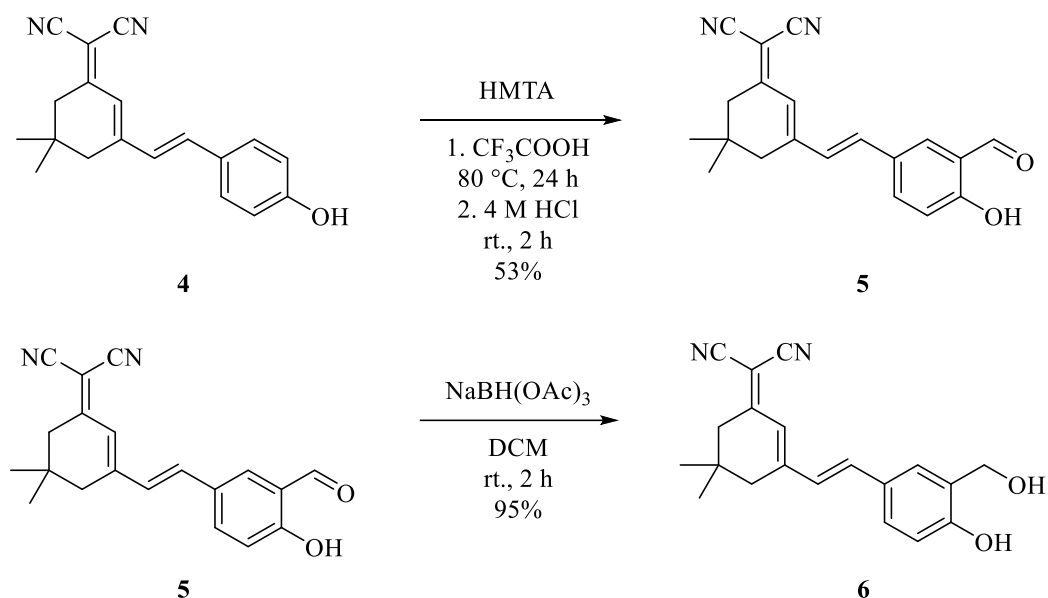
15. ábra A malonitril származék előállítása

Ezt követően Knoevenagel-kondenzációban kapcsoltam össze a 2 malonitril származékot 4-hidroxi-benzaldehiddel (3) nitrogén atmoszféra alatt és kaptam a 4 vegyületet 24 óra alatt. (16. ábra)



16. ábra

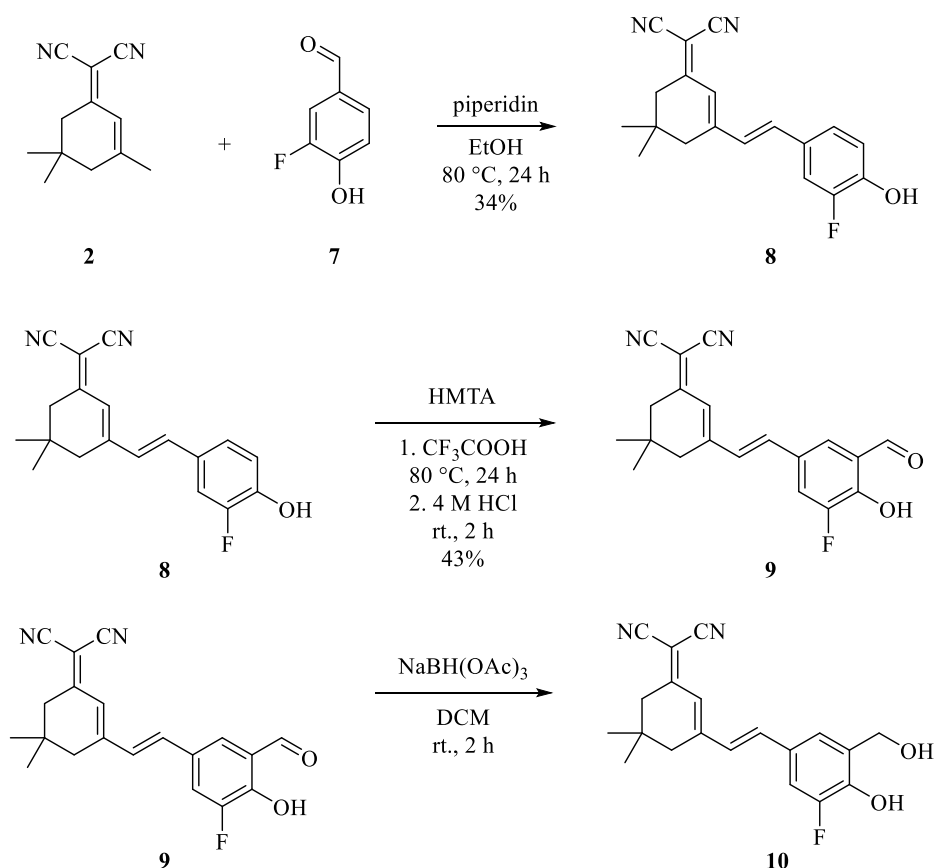
A **4** vegyületet Duff-formilezési reakcióban alakítottam tovább, először 24 órán keresztül forraltam HMTA jelenlétében trifluorecetsavban. A kialakult imin köztterméket sósav segítségével bontottam el két óra alatt és kaptam az **5** vegyületet. A végső festékvázhoz az aldehidszármazék redukciójával jutottam, ehhez nátrium-triacetoxi-borohidridet használtam, és két óra alatt kaptam a **6** izoforon-típusú festék alapvázat. (17. ábra)



17. ábra

Ahogy a későbbi mérésekből kiderül, fiziológiás pH-n nem deprotonálódik teljes mértékben a festék, így előállítottam egy 3-helyzetben fluorral szubsztituált származékot is, így csökkentve a fenolos hidroxilcsoport pK_a értékét.

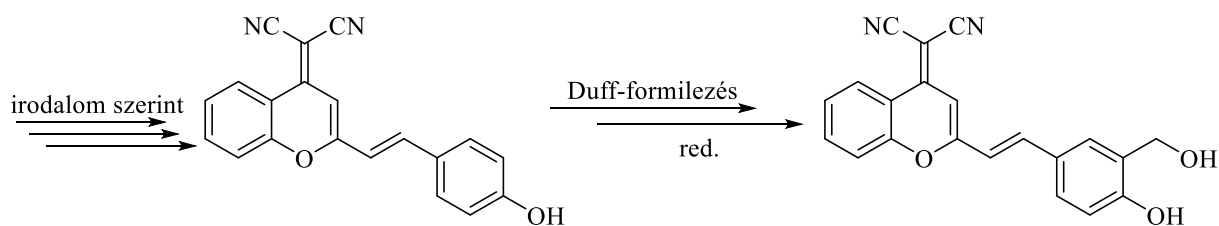
A **2** malonitril származékot 3-fluoro-4-hidroxi-benzaldehiddel (**7**) reagáltattam és kaptam a **8** származékot, majd a többi lépés a fentebb leírtakkal analóg módon történt. A **10** fluorozott származék LC-MS alapján keletkezett, azonban a tisztítás során nem sikerült izolálnom. (18. ábra)



18. ábra A fluorozott izoforon származék előállítása

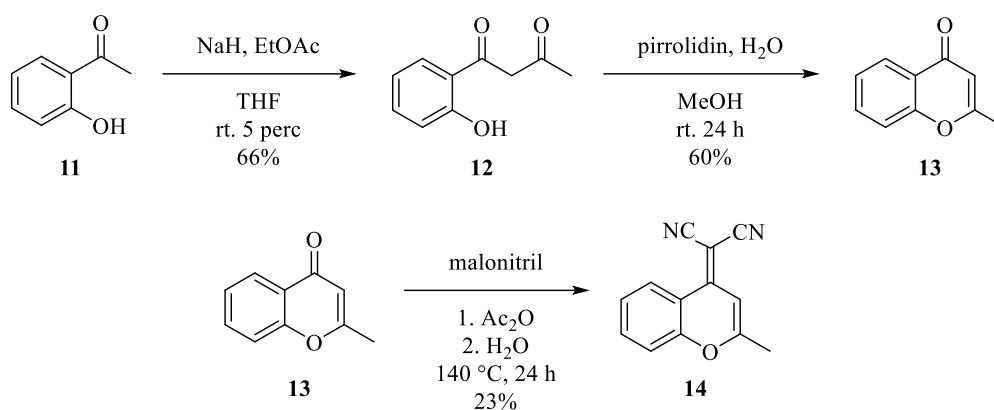
4.2 A dicianometilén-pirán-származék alapvázának előállítása

A dicianometilén-pirán-alapvázat a fentebb leírt izoforon példáján keresztül próbáltam meg előállítani. (19. ábra)



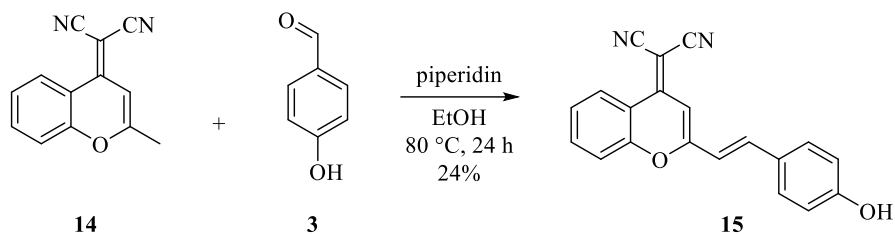
19. ábra A festékváz előállítása

Először a malonitril-származékot állítottam elő. 2-hidroxiacetofenonból (**11**) Claisen-kondenzációs reakcióban NaH és etil-acetát segítségével a **12** diketon vegyülethez jutottam.³⁰ A diketont tisztítás nélkül feloldottam metanolban, majd pirrolidint adtam hozzá és 24 órán át nitrogén alatt kevertetve kaptam a **13** vegyületet.³¹ Ezt követően malonitril segítségével egy kondenzációs reakcióban előállítottam a **14** malonitril származékot.³² (20. ábra)



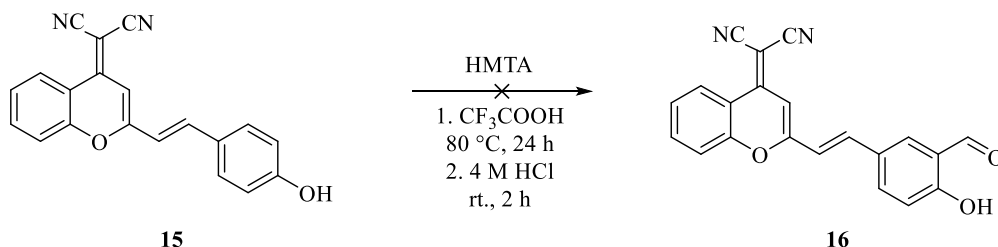
20. ábra A malonitril származék előállítása

A **14** malonitril származékot Knoevenagel-kondenzációban kapcsoltam össze a 4-hidroxi-benzaldehiddel (**3**) és kaptam a **15** vegyületet 24 óra alatt.³³ (21. ábra)



21. ábra

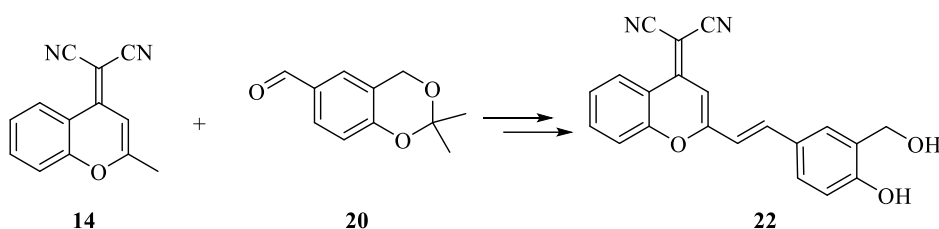
A **15** vegyületet megpróbáltam Duff-formilezési reakcióban tovább alakítani. Ehhez 24 órán keresztül forraltam HMTA jelenlétében trifluorecetsavban. A sósav hozzáadása előtt készített LC-MS minta azonban nem mutatott ki lehetséges imin köztitermékeket. A feldolgozást folytattam és sósav hozzáadása után 2 órán keresztül kevertettem szobahőmérsékleten. Az extrakciót követően készített LC-MS megerősítette a feltételezést, nem sikerült előállítani a **16** származékot. (22. ábra)



22. ábra

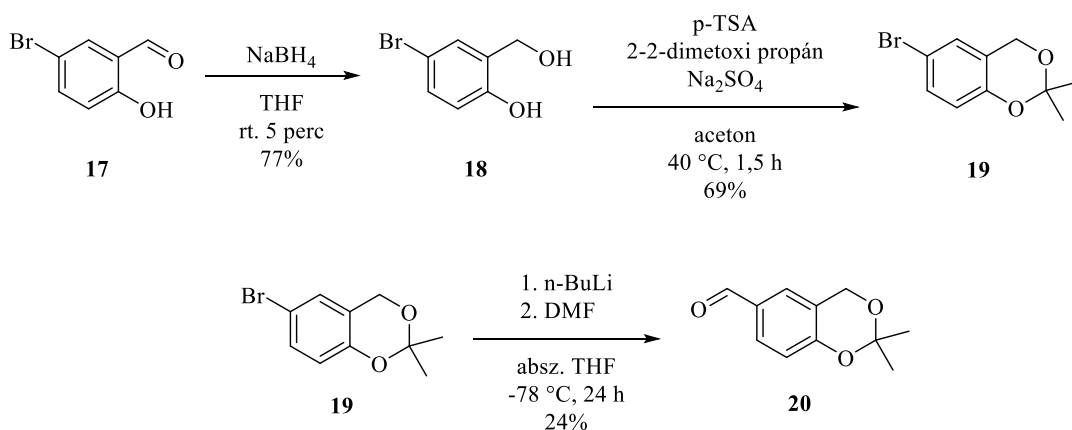
Következő próbálkozásban a reakciót alacsonyabb hőmérsékleten 65 °C-on kevertetve és 2 óránként követve próbáltam meg, azonban így sem sikerült sem köztterméket, sem végterméket kapnom, így más módon próbálkoztam tovább.

Mivel az alapváz formilezése nem járt sikerrel, megpróbáltam a hidroximetil-csoportot a festékváz kialakítása előtt bevinni, ehhez a **20** védett aldehidet választottam. (23. ábra)



23. ábra A hidroximetil-csoportot tartalmazó festékváz tervezett szintézise

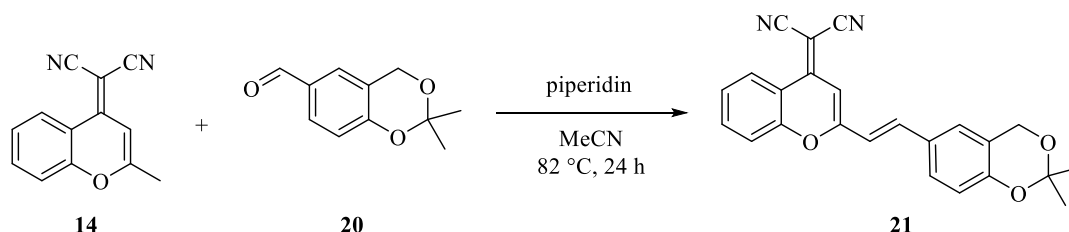
A **20** aldehid előállításához bróm-szalicil-aldehidből indultam ki (**17**), amit NaBH₄ segítségével a **18** szalicilalkohollá redukáltam.³⁴ Ezután kialakítottam az acetonid védőcsoportot, 2,2-dimetoxi-propán és p-TSA segítségével acetonos közegben Na₂SO₄ jelenlétében, így a **19** vegyülethez jutottam.³⁵ A festékváz kialakításához szükséges **20** aldehid előállításához frissen desztillált THF-ben reagáltattam a **19** brómvegyületet n-BuLi-mal -78 °C-on N₂ atmoszféra alatt 2 órán keresztül, majd N,N-dimetilformamidot adtam hozzá.³⁶ (24. ábra)



24. ábra Az aldehid előállítása

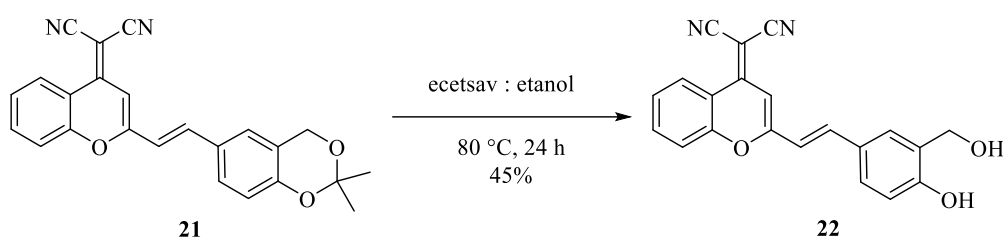
Mivel a **20** aldehidedet csak gyenge termeléssel sikerült előállítanom, ezért először megpróbáltam 1:1,1 malonitrilszármazék:aldehid arányban a reakciót, azonban így nagyobb részt a **14** vegyület kaptam vissza, termék csak minimális mennyiségben keletkezett.

Azonban, ha a **14** és a **20** vegyületet 1:1,6 arányban oldottam fel acetonitrilben katalitikus mennyiségű piperidin jelenlétében, főtermékként a **21** vegyületet kaptam 24 óra alatt, amit nem izoláltam, hanem rögtön hidrolizálni próbáltam a védőcsoportot. (25. ábra)



25. ábra Az összekapcsolás

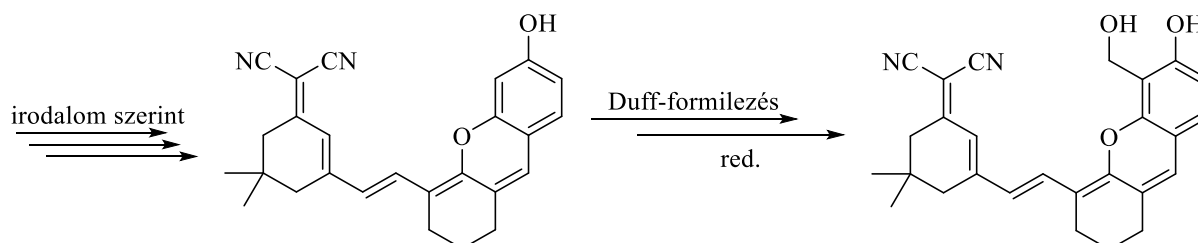
Az acetonid védőcsoport savas hidrolízisét megnehezítette, hogy mind a kiinduló anyag, mind a keletkező termék nehezen oldódott, így a vártnál magasabb hőmérsékletre és hosszabb reakcióidőre volt szükség. Végül 80 °C-on ecetsav:etanol 1:1 térfogatarányú elegyében egy éjszaka alatt lejátszódott a védőcsoport hidrolízise. (26. ábra)



26. ábra A védőcsoport hidrolízise

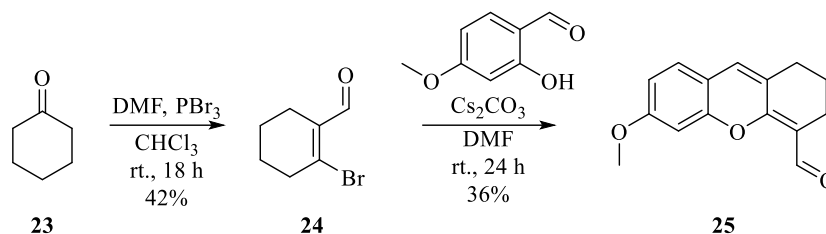
4.3 Kiterjesztett izoforon származék alapvázának előállítása

A festékváz előállítása az irodalomban leírt módon történt,³⁷ amiből formilezést követő redukcióval kapható a célkötésben szereplő alapváz. (27. ábra)



27. ábra A festékváz előállítása

A dihidroxantén váz előállításához először DMF és kloroform elegyéhez csepegtettem 0 °C-on PBr_3 -ot majd 45 percig kevertettem 0 °C-on, majd ciklohexanont (**23**) adtam hozzá és 18 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertetve kaptam a **24** vegyületet. Ehhez aztán 2-hidroxi-4-metoxi-benzaldehidet adva, DMF-ben kevertetve szobahőmérsékleten 24 órán át kaptam a **25** dihidroxantént. (28. ábra)



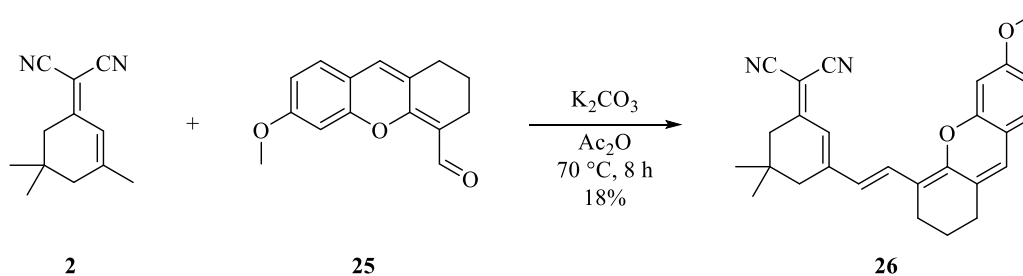
28. Ábra A dihidroxanténváz előállítása

A **25** vegyületet megpróbáltam kapcsolni a korábban előállított 2 malonitril származékkal először Ac_2O -ben 18 órán keresztül forralva. Az LC-MS szerint a reakció nem játszódott le, nem ionizáló melléktermékek keletkeztek.

Második próbálkozásom során N_2 atmoszféra alatt kevertettem, és LC-MS-sel követtem a reakciót. A reakció működött ugyan, de 6 óra után még mindig tartalmazott kiinduló anyagot, ezért másnapig kevertettem, ami idő alatt a termék elbomlott.

Harmadik próbálkozásom során enyhébb körülményeket választottam, így a **21** származék előállítási körülményeit alkalmaztam, MeCN-ben forralva katalitikus mennyiségű piperidin jelenlétében, azonban termék ebben az esetben nem keletkezett.

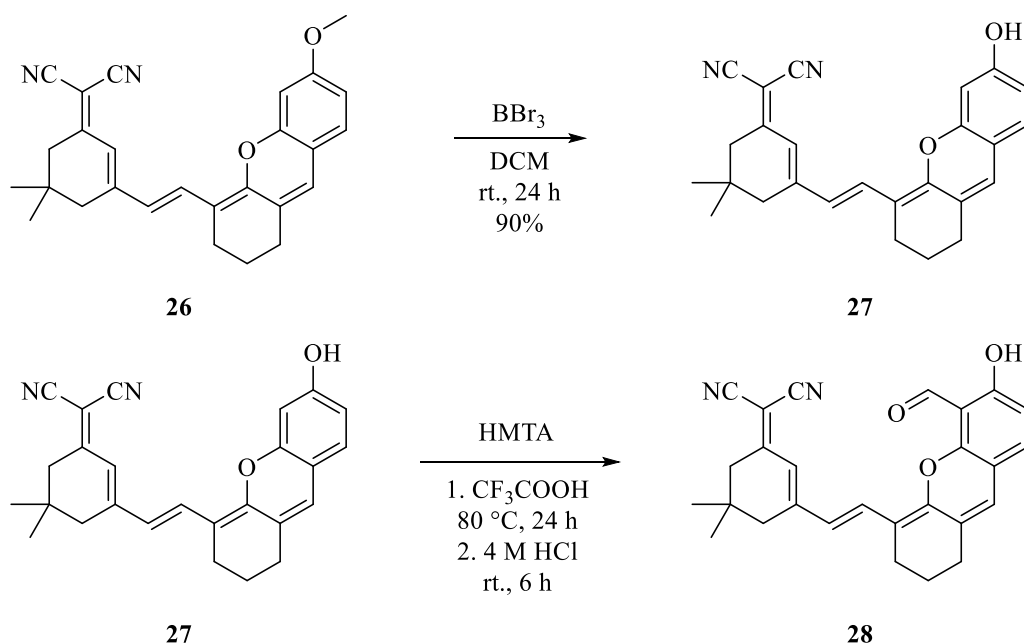
Negyedik próbálkozásom során nitrogén gázzal öblítettem folyamatosan a reakcióteret, a hőmérsékletet alacsonyabbra állítva folyamatosan követtem a reakciót. 8 óra után a termék mennyisége látszólag nem nőtt, ezért leállítottam a reakciót, így sikerült izolálni a **26** származékot. (29. ábra)



29. ábra Knoevenagel-kondenzáció

A **26** származékot ezt követően BBr_3 segítségével demetileztem, a kapott **27** fenolt Duff-formilezési reakcióban alakítottam tovább a **28** aldehiddé. (30. ábra)

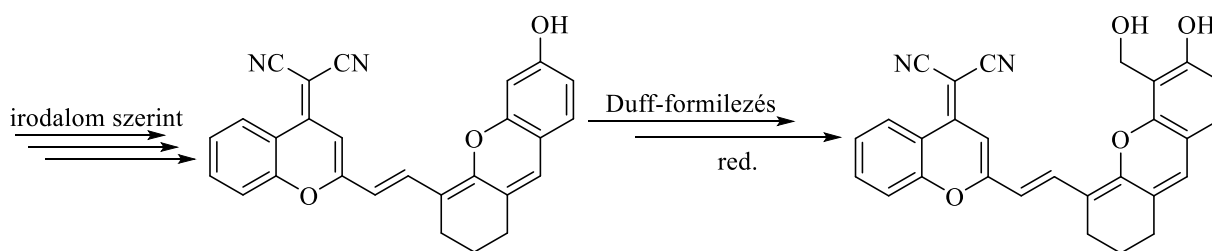
A formilezés során a köztitermék sósavas bontását LC-MS-en követve azt tapasztaltam, hogy a korábban alkalmazott két óra alatt még nem játszódott le teljesen a reakció, így egész éjszaka folytattam a reakciót. Sajnos másnap a reakcióelegy vizsgálata azt mutatta, hogy elbomlott a kívánt termék, így nem sikerült izolálnom a **28** vegyületet.



30. ábra A festékváz előállítása

4.4 Kiterjesztett dicianometilén származék alapvázának előállítása

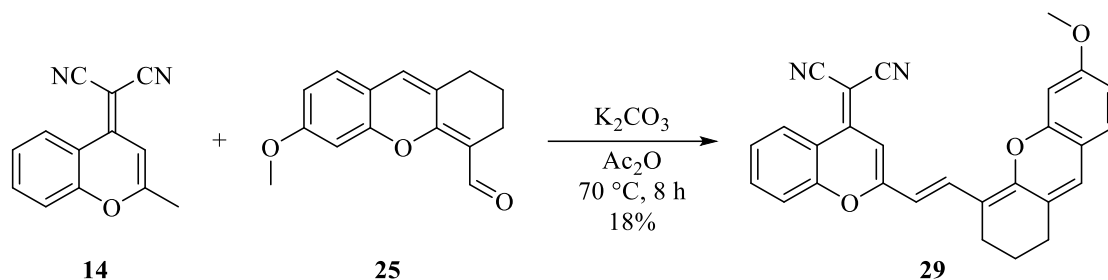
Az alapváz előállítása az irodalomban leírt módon történt,³⁸ amiből formilezést követő redukcióval kapható a célkötésben szereplő alapváz. (31. ábra)



31. ábra A festékváz előállítása

A **26** származék előállításában szerzett tapasztalataimat felhasználva a **14** és **25** vegyületek kondenzációja során nitrogén gázzal öblítettem a reakcióteret, és 70 °C-on

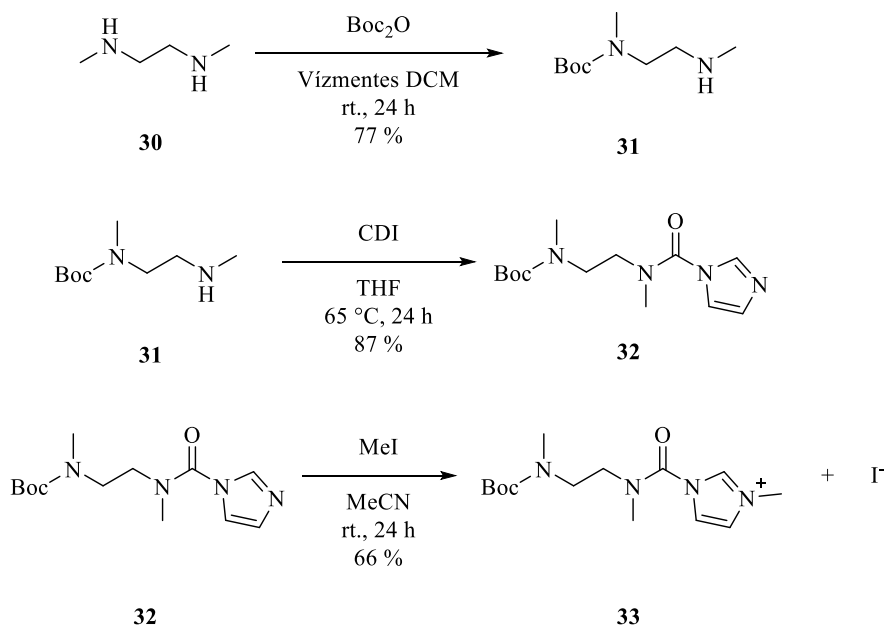
melegítve követtem a reakciót. 8 óra után a termék mennyisége látszólag nem nőtt, így feldolgozás után kaptam a **29** származékot. (32. ábra)



32. ábra Knoevenagel-kondenzáció

4.5 Az etiléndiamin önfeláldozó linker előállítása

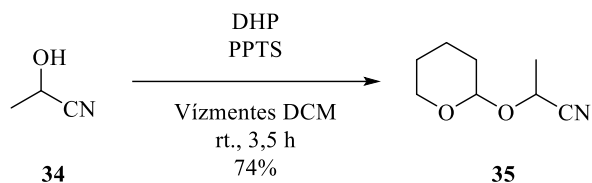
Az önfeláldozó linker előállításakor *N,N'*-dimetiletiléndiamint (**30**) vízmentes diklórmetánban feloldottam és di-*tert*-butil-dikarbonáttal reagáltattam egy éjszaka alatt, így jutottam a **31** vegyülethez.³⁹ Következő lépésben THF-ben feloldottam, majd 1,1'-karbonildimidazolt adtam hozzá és egy éjszakán át kevertettem.⁴⁰ Az így előállított **32** vegyületből metil-jodid segítségével a **33** aktivált származékot kaptam. (33. ábra)



33. ábra Az önfeláldozó linker előállítása

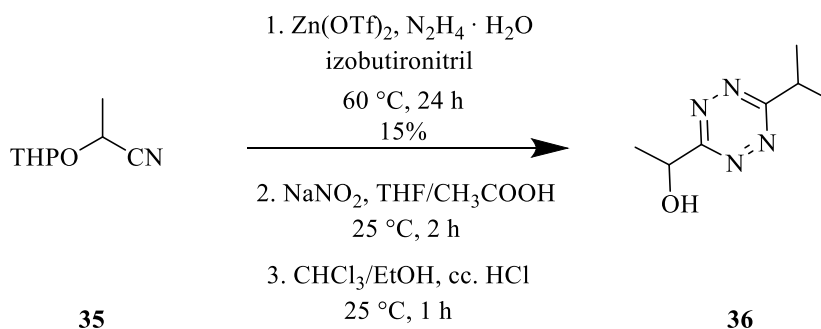
4.6 A tetrazinszármazékok előállítása

Munkám során két izopropil-tetrazinszármazékot állítottam elő. Az első izopropil származék előállításához laktonitrilt (**34**) THP védőcsoporttal láttam el. Ehhez a **34** hidroxipropionitrilt DHP-vel reagáltattam PPTS jelenlétében, 3,5 órán át, szobahőmérsékleten, végül vákuumdesztilláció segítségével izoláltam a **35** védett származékot (34. ábra).



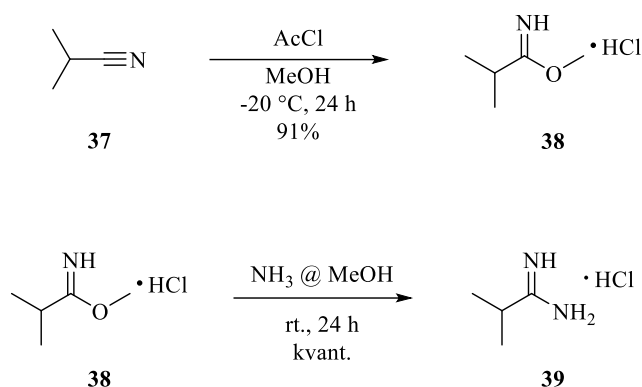
34. ábra THP-zett laktonitril előállítása

A **35** vegyületet izobutironitrillel és hidrazin-monohidráttal reagáltattam cink-triflát jelenlétében 60°C-on. 24 óra elteltével az elegyet THF-ecetsav elegyében oldottam fel, majd NaNO₂ segítségével oxidáltam a köztitermék dihidrotetrazint. Az így kapott THP-védett származékról sósav segítségével eltávolítottam a védőcsoportot, így megkaptam a **36** izopropil-tetrazinszármazékot.¹⁵(35. ábra).



35. ábra Izopropil-tetrazinszármazék előállítása

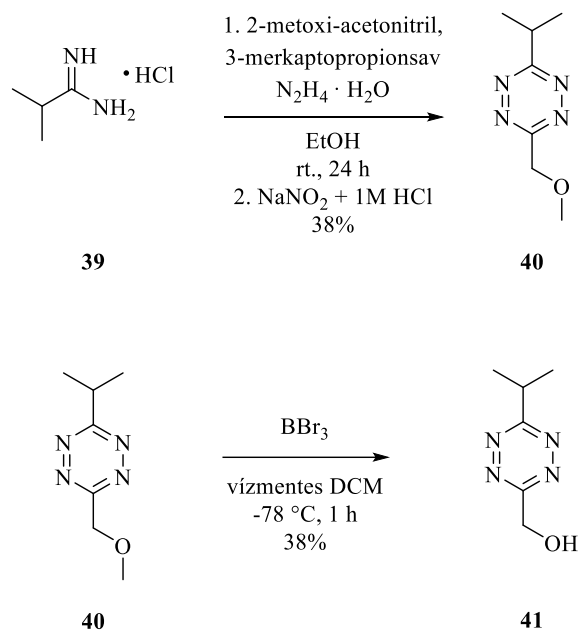
Egy olyan izopropil-tetrazinszármazékot is előállítottam, ami egy metil-csoportban különbözik a **36** izopropil-tetrazintól. Ehhez izobutironitrilt (**37**) oldottam metanolban, majd acetil-kloridot csepegtettem hozzá, így a **38** imidsavésztert kaptam, amit feloldottam ammóniás metanolban, majd szobahőmérsékleten kevertettem 24 órán át és így jutottam a **39** amidin származékhoz. (36. ábra)



36. ábra Az amidin származék előállítása

A **39** vegyületet 2-metoxiacetonitrillel és hidrazin-monohidráttal reagáltattam 3-merkaptopropánsav jelenlétében etanolos közegben. Ezt követően NaNO_2 vizes oldatát adtam a reakcióelegyhez, majd 1 M sósavval 3-asra állítottam a pH-t és így jutottam a **40** tetrazinhoz.

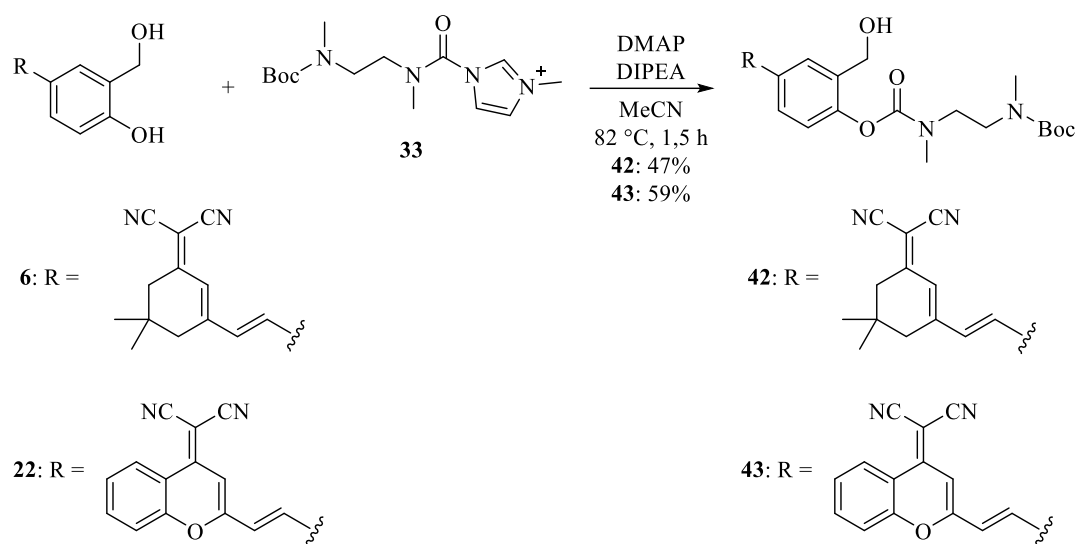
A metilcsoportot BBr_3 -dal távolítottam el $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on és így kaptam a célkitűzésben szereplő **41** tetrazint (37. ábra).¹⁴



37. ábra A demetilezett tetrazinszármazék előállítása

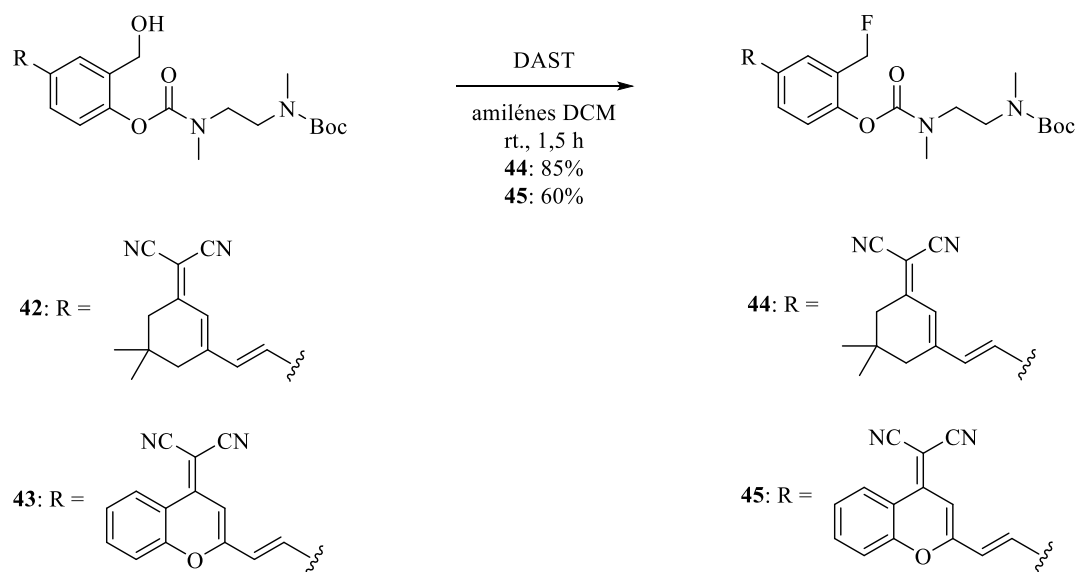
4.7 A festékek összekapcsolása az önfeláldozó linkerrel

A festékek (**6**, **22**) és az önfeláldozó linker összekapcsolásához először a **6** és **22** festéket acetonitrilben oldottam, és a **33** linkert 1:1,5 anyagmennyiség-arányban reagáltattam diizopropiletilamin és 4-dimetilaminopiridin jelenlétében, és főtermékként kaptam a **42** és **43** származékot. (38. ábra)



38. ábra Az önfeláldozó linker és a festék kapcsolása

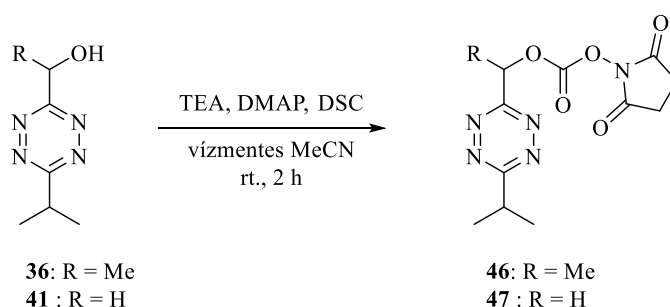
A sikeresen előállított, etiléndiamin linkerrel szubsztituált származékokat (**42**, **43**) feloldottam amilénnel stabilizált DCM-ban és dietilamino-kéntrifluorid (DAST) segítségével a hidroxilcsoportokat fluorra cseréltem (**44** és **45**). (39. ábra)



39. ábra A távozócsoport kialakítása

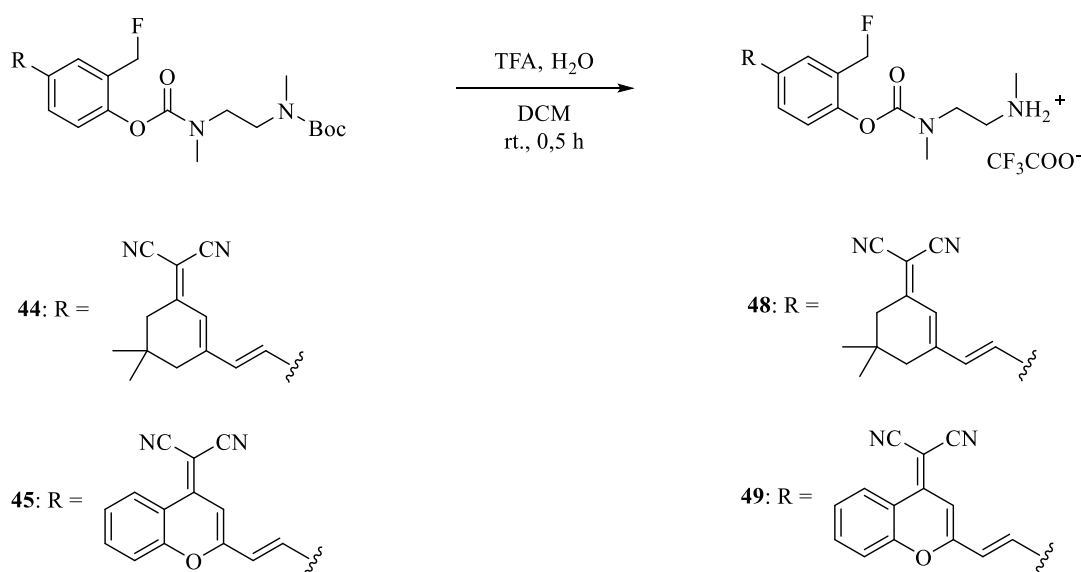
4.8 A festékek és a tetrazinszármazékok összekapcsolása

A tetrazinszármazékokat a kapcsolás előtt aktiválni kellett. Ehhez vízmentes acetonitrilben feloldottam a **36** és **41** származékokat, majd TEA-t, DMAP-ot és DSC-t adtam az elegyhez nitrogén atmoszféra alatt. Az aktiválás körülbelül 2 óra alatt lejártszódott, amit vékonyréteg-kromatográfia segítségével állapítottam meg. (40. ábra)



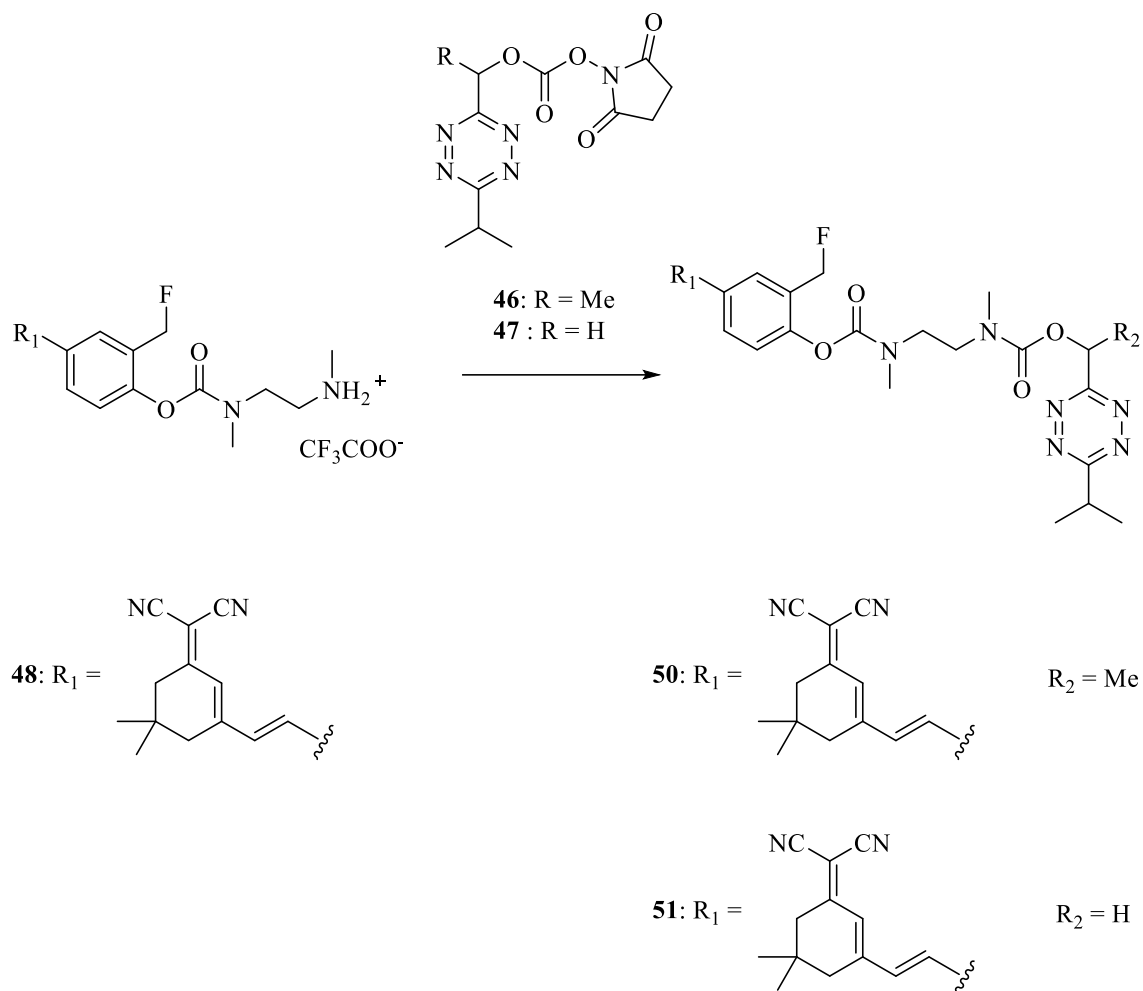
40. ábra A tetrazinszármazékok aktiválása

Az aktiválással egyidőben lehasítottam a **44** és **45** származékokról a Boc-védőcsoportot DCM-ban pár csepp víz jelenlétében TFA-val. (41. ábra)

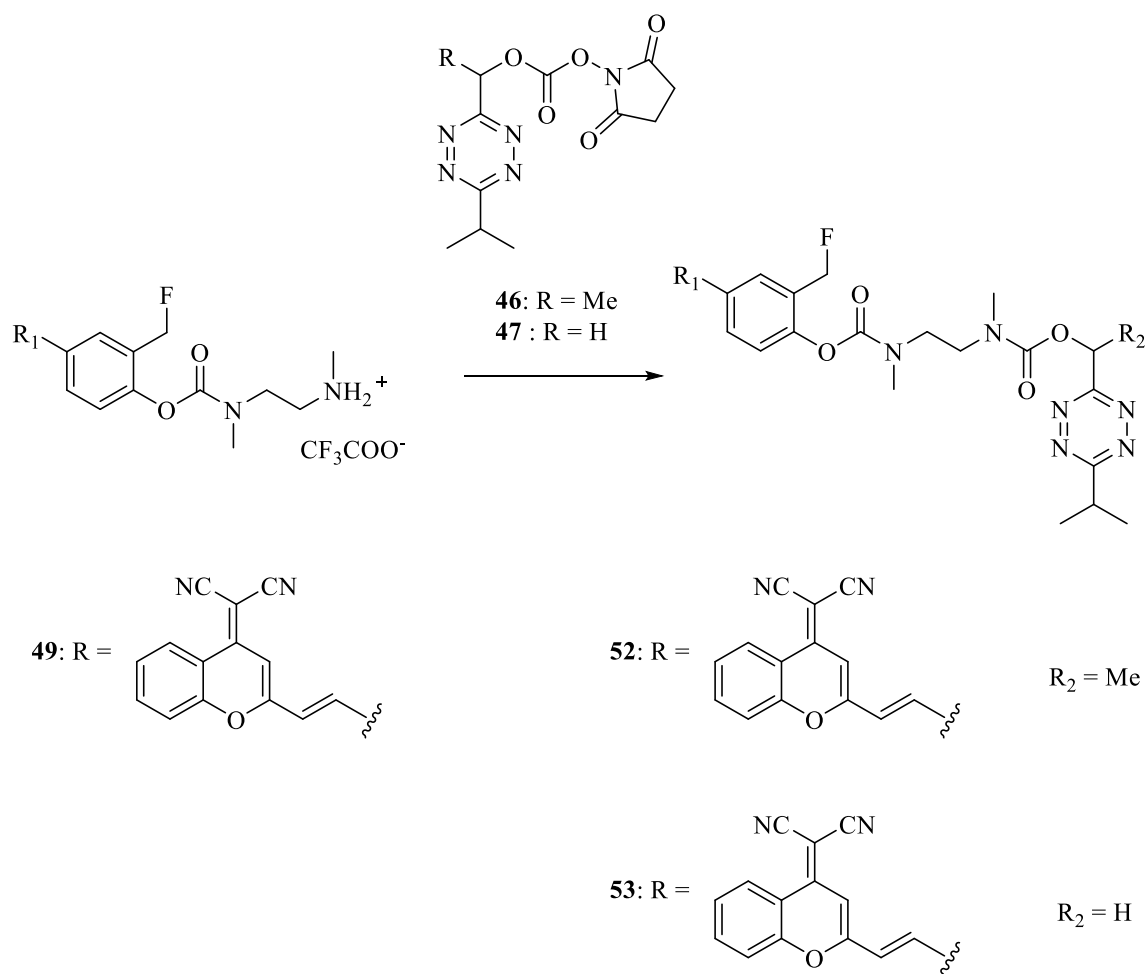


41. ábra A Boc-védőcsoport eltávolítása

A következő lépésként az aktivált tetrazinszármazékokat (**46**, **47**) feloldottam amilénnel stabilizált DCM-ban, majd TEA-t adtam hozzá. 10 perc kevertetés után a **48**, **49** vegyületeket is feloldottam amilénnel stabilizált DCM-ban, majd hozzácsepegtettem a tetrazinszármazékokhoz. (42., 43. ábra) A reakciók LC-MS szerint körülbelül 15 perc alatt lejátszódtak, s az így kapott festékeket (**50-53**) preparatív HPLC-vel tisztítottam.



42. ábra Az izoforon származékok összekapcsolása a tetrazinszármazékokkal

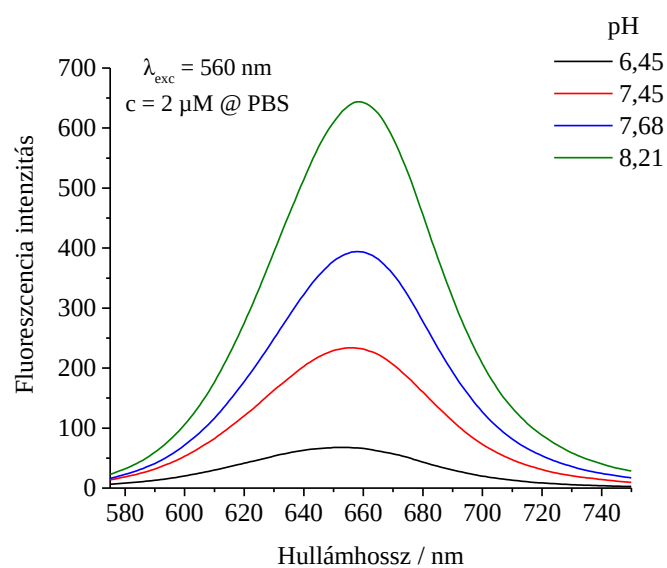


43. ábra Az dicianometilénszármazékok összekapcsolása a tetrazinszármazékokkal

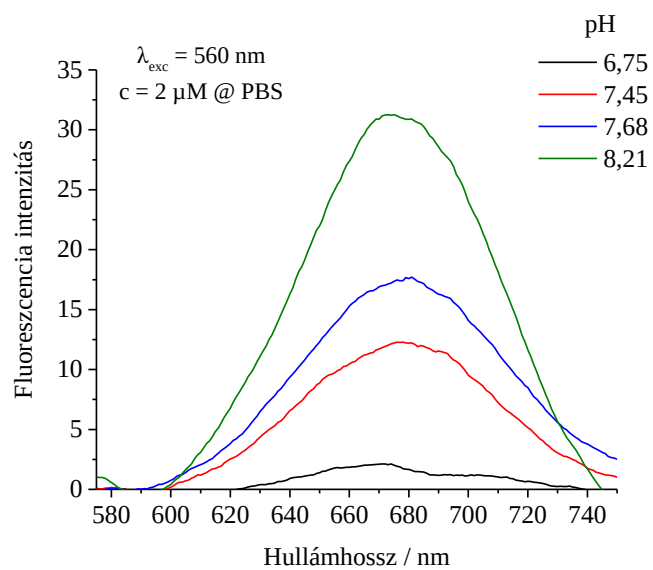
4.9 A click-to-release reakciók vizsgálata

Az előállított vegyületeken (**50-53**) először stabilitásvizsgálatot végeztem LC-MS segítségével PBS-ben és 10 mM GSH-t tartalmazó PBS-ben egyaránt pH = 7,4-en 37,0 °C-on. A vizsgálatok során e körülmények között a festékek mindegyike megfelelően stabilnak bizonyult.

A click-to-release reakció vizsgálata előtt a festék alapvázak (**6, 22**) fluoreszcenciáját megvizsgáltam különböző pH értékeken. Az ábrán látszik, hogy fiziológiás pH-n nem deprotonálódik teljes mértékben a festékmolekula, hiszen a pH növelésével a fiziológiás értéken túl is még nő fluoreszcencia intenzitása. (44., 45. ábra)

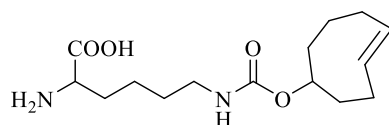


44. ábra A 6-os festék pH függő fluoreszcenciája



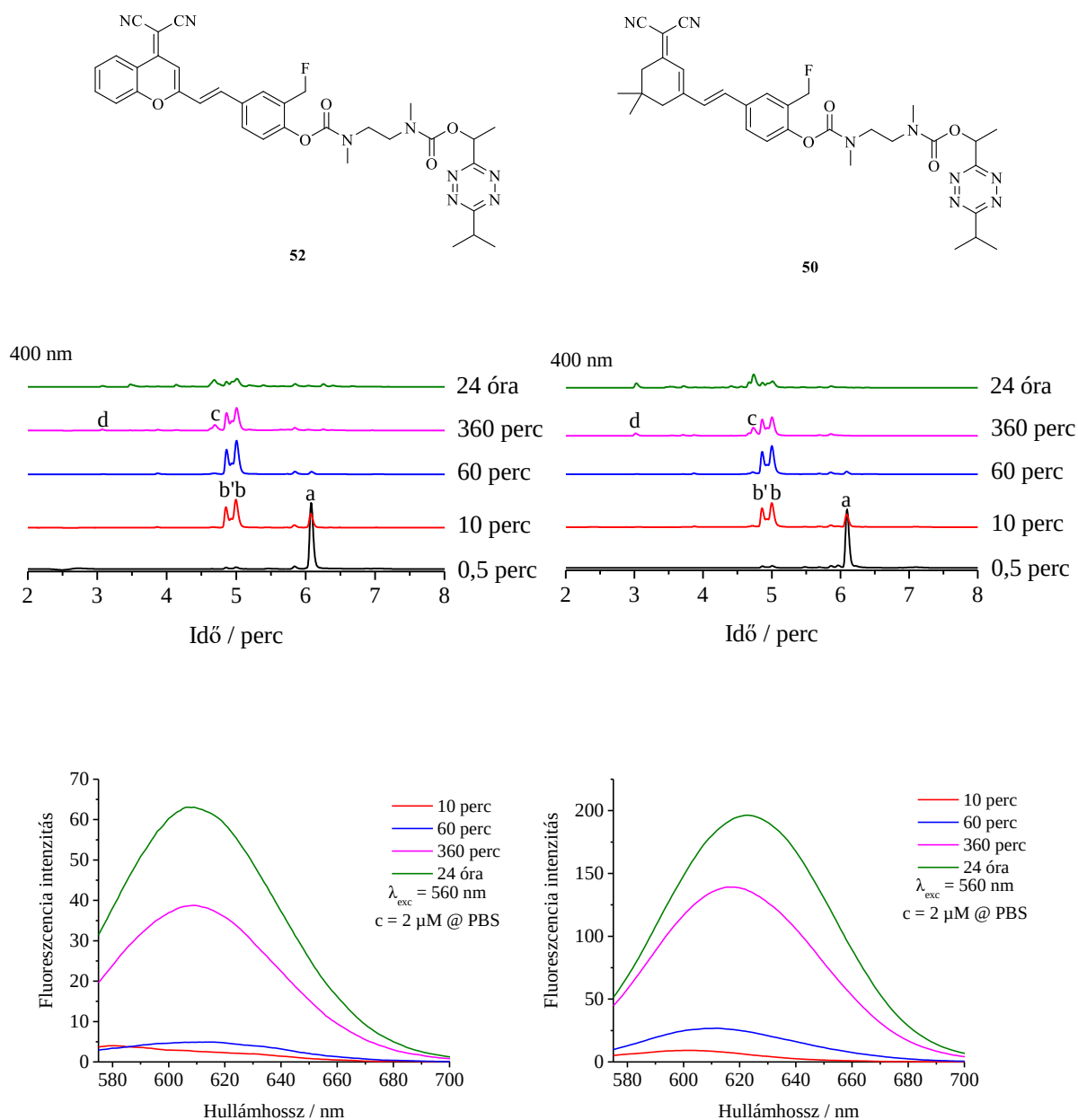
45. ábra A 22-es festék pH függő fluoreszcenciája

A click-to-release vizsgálatához a festékeket egy *transz*-ciklooktén származékkal, TCO-lizinnel reagáltattam. (46. ábra)

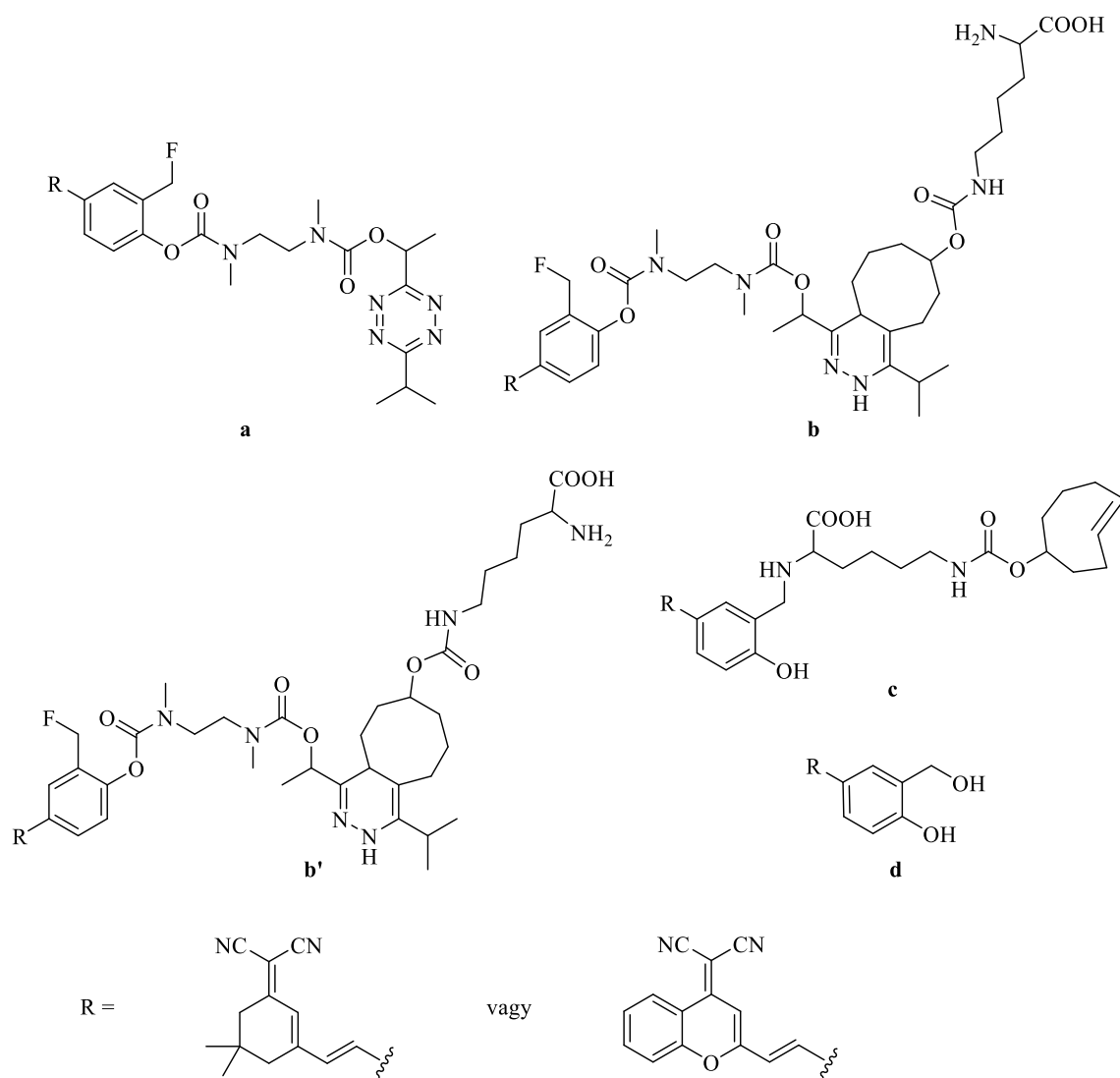


46. ábra TCO-lizin

Az LC-MS vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a klikk-reakció minden esetben gyorsan megtörtént, amit a klikkelt forma megjelenése mutat (**b**, **b'**), a release pedig az **52** festék esetében lassabban történt, mint az **50** festéknél. A fluoreszcencia spektrumokból kiolvasható, hogy az idő előrehaladtával a fluoreszcencia intenzitása nő, azonban más emissziós maximumot figyelhetünk meg, mint a **6** és **22** vegyületek pH függő fluoreszcencia vizsgálatánál. (47. ábra) A kromatogram különböző csúcsaihoz tartozó szerkezeteket az 48. ábrán mutatom be.

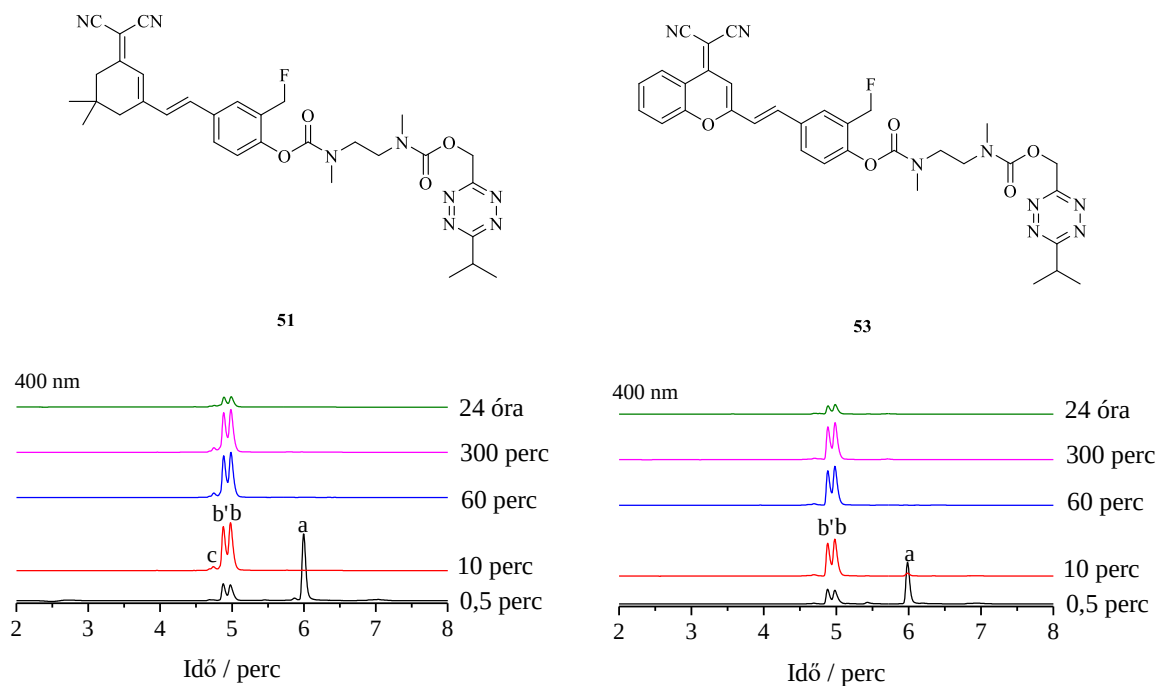


47. ábra 50 és 52 festék reakciója TCO-lizinnel

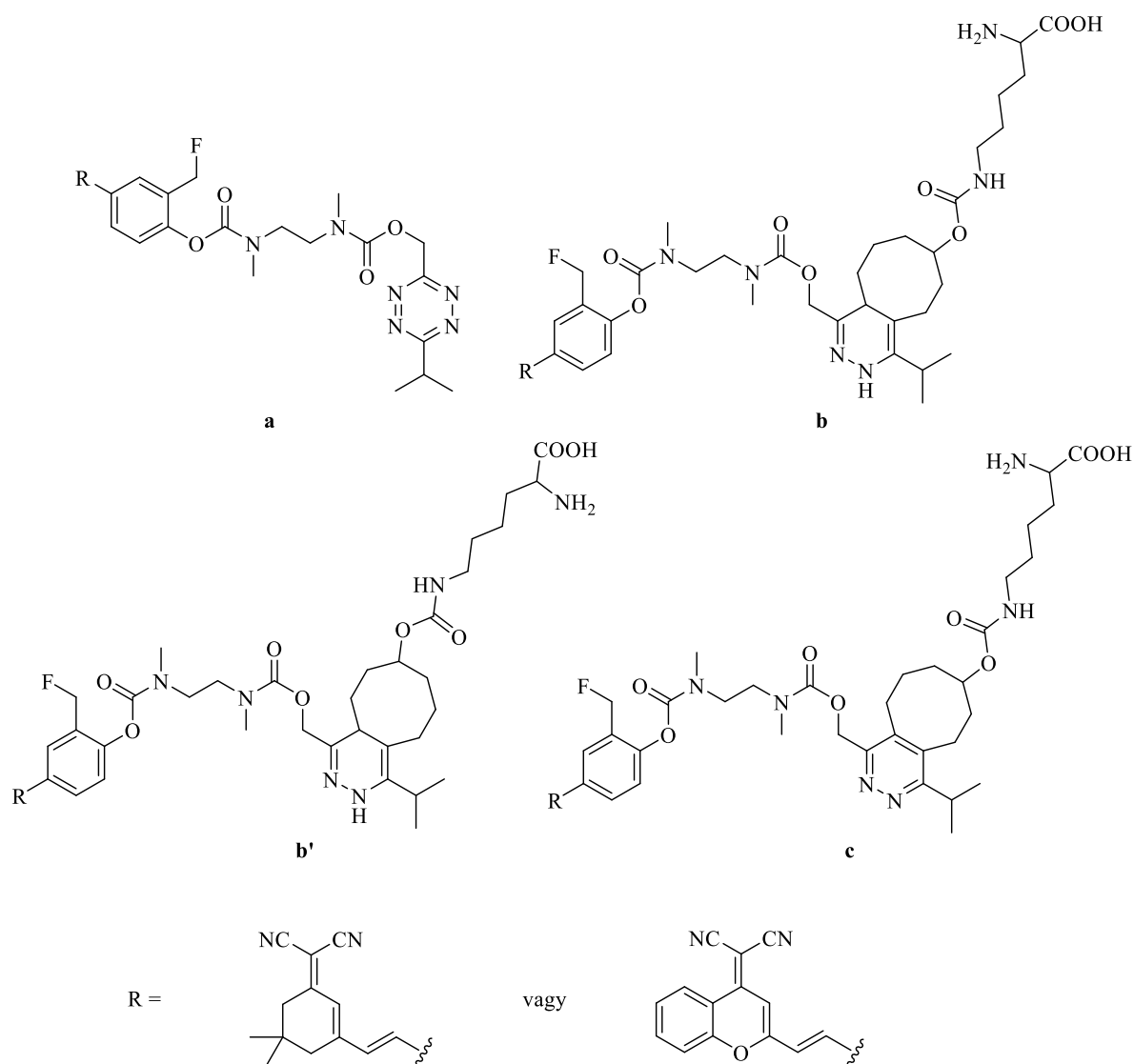


48. ábra A különböző csúcsokhoz tartozó szerkezetek

Az **51** és **53** egy metilcsoporttal kevesebbet tartalmazó származékok esetén a klikk-reakció még gyorsabb volt, azonban a release lépésre utaló származékot nem sikerült kimutatnunk, csak kevés piridazinná oxidálódott mellékterméket. (49. ábra) A kromatogram különböző csúcsaihoz tartozó szerkezeteket az 50. ábrán mutatom be.



49. ábra 51 és 53 festék reakciója TCO-lizinnel



50. ábra A különböző csúcsokhoz tartozó szerkezetek

A mérésből látható, hogy a click-to-release reakció az **50** és **52** származékoknál sikeresen lejátszódott, a release az **50** származéknál gyorsabb volt, az idő előrehaladtával nagyobb intenzitással emittált, azonban más hullámhosszon. Valószínűsítjük, hogy a kinon metid-lizin addukt a referenciavegyületéhez képest eltérő elektronikus tulajdonságainak köszönhető. Ennek megoldására terveim között szerepel a click-to-release reakció nagyobb méretben való vizsgálata, mely lehetőséget biztosítana a köztitermékek kinyerésére és analitikai vizsgálatára.

Az **51** és **53** származékoknál az irodalomban tapasztaltakkal összhangban¹⁴ a release sokkal lassabb.

5. Az eredmények összegzése

Munkám során sikeresen előállítottam a tervezett alapvázakból kettőt, az izoforon (**6**), és a dicianometilén-4*H*-pirán (**22**) származékot. A célkitűzésben szereplő további festék alapvázak előállítása is biztató utakon jár.

A pKa optimalizálása érdekében elkezdtem egy fluorral szubsztituált származék szintézisét is (**10**).

Sikeresen kapcsoltam a **6** és **22** vegyületet az etiléndiamin önfeláldozó linkerrel (**42,43**), majd kialakítottam a fluor távozó csoportot is a molekulákon (**44, 45**).

A tervezett tetrazinszármazékok mindegyikét sikerült előállítanom (**36, 41**) és kapcsolnom a festékekkel, így összesen 4 célterméken (**50-53**) vizsgáltam a click-to-release reakciót LC-MS-segítségével.

Az eredmények alapján a **50, 52** származékok esetén a release elfogadható gyorsasággal megtörténik, az **51, 53** származékok esetében lassabb reakciót tapasztaltam.

A fluoreszcencia intenzitása az idő előrehaladtával nő, azonban más hullámhosszon jelentkezik, mint a **6** és **22** származékok esetén, így ez további vizsgálatot igényel.

Terveim között szerepel a befejezetlen alapvázak szintézise, majd kapcsolása a különböző tetrazinszármazékokkal.

Az ígéretes festékeket ezután *in vitro* majd *in cellulo* fehérjejelölési kísérletekben tervezzük tesztelni.

6. Kísérleti rész

6.1 Általános kísérleti rész

A kiindulási anyagok a *Sigma-Aldrich*, a *Merck*, az *Alfa Aesar*, a *Fluka*, a *Reanal*, a *Romil*, a *Fluorochem* vagy a *Molar Chemicals* cégek termékei, melyeket további tisztítás nélkül használtam fel a reakciókban. A vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatokhoz *Merck Silica gel 60 F₂₅₄* lapokat használtam. A VRK vizsgálatok során alkalmazott eluensek összetétele mindig V/V értendő. A mintafoltokat általánosan 254/365 nm-en működő UV-lámpával vagy foszformolibdénsav etanos oldatával hívtam elő. Az anyagok flash oszlopkromatográfiás tisztítását *Zeochem* márkájú 25-40 µm szemcseméretű szilikával vagy *RediSep Rf C18 Gold* oszlopon és *Teledyne ISCO COMBI Flash* műszerrel végeztem. A szemipreparatív HPLC-s tisztításokat *Wufeng LC100* eszközön végeztem, amihez *Gemini C18-as* fordított fázisú oszlopot kapcsoltunk, (150 x 2,1 mm I.D.), állófázisa 5 µm 110 Å pórusmérettel rendelkező szilika. Az alkalmazott eluensek 0,1% HCOOH – víz és 0,1% HCOOH – acetonitril voltak.

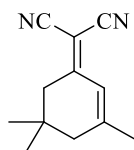
A fluoreszcencia méréseket *Jasco FP8300* spektrofluoriméteren végeztem 1 cm úthosszú kvarcküvetákban. A mérésekhez különböző pH-jú (6,45; 7,75; 7,68; 7,95; 8,21) PBS pufferoldatot használtam.

Az NMR mérések során a ¹H- és ¹³C-NMR spektrumok *Varian Inova 300*, illetve *500 MHz* spektrométerrel készültek. A kémiai eltolódás (δ) ppm-ben van megadva, a CDCl₃ vagy DMSO-*d*₆-ban készült minták esetén az oldószer jelét használtam referenciaként.

Az analitikai RP-HPLC-UV/Vis-MS mérések *SHIMADZU LCMS-2020 system* LC-MS készülékkel történtek, *Gemini C18* oszloppal (100 × 2.00 mm I.D.), amely állófázisa 5 µm szilika (110 Å pórusmérettel), illetve a spektrumok UV/Vis (220–800 nm) fotodióda sorral és ESI-MS detektorral kerültek felvételre. A lineáris gradiens elúció (0 min. 0 % B; 2,0 min. 100 % B; 2,5 min. 100 % B; 3,0 min. 0 % B; 4,0 min. 0 % B) az A eluenssel (0,1 % HCOOH, 5 % ACN és 94,9 % víz) és a B eluenssel (0,1 % HCOOH, 94,9 % MeCN és 5 % víz) zajlott, 0,5 ml/min áramlási sebesség mellett, 30°C-on. A minták HPLC minőségű víz és MeCN vagy MeOH elegyében oldva készültek (1:1 V/V) 0,5 mg/ml töménységgel.

6.2 Szintézisek

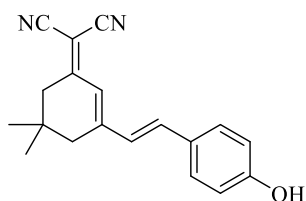
2-(3,5,5-trimetilciklohex-2-én-1-ilidén)malononitril (2)



Az izoforont (6,9 g, 0,05 mol) feloldottam 100 cm³ abszolút etanolban, majd malonitrilt (3,96 g, 0,06 mol) piperidint (0,5 cm³, 5 mmol) és ecetsavat (0,29 cm³, 5 mmol) adtam az elegyhez, és N₂ atmoszféra alatt forraltam 6 órán keresztül. Az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével távolítottam el. A nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (SiO₂, hexán : DCM = 1 : 3). A termék fehér szilárd anyag (4,623 g, 0,0249 mol, 50%).

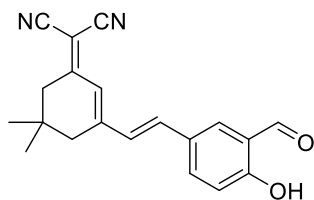
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6,56 – 6,54 (m, 1H), 3,29 (d, *J* = 1,1 Hz, 1H), 2,53 (s, 2H), 2,28 – 2,19 (m, 2H), 2,06 – 2,01 (m, 3H), 0,95 (s, 6H).

(*E*)-2-(3-(4-hidroxisztiril)-5,5-dimetilciklohex-2-én-1-ilidén)malononitril (4)



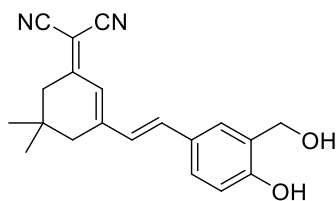
A **2** vegyületet (0,930 g, 5,4 mmol) feloldottam 60 cm³ etanolban, és 4-hidroxi-benzaldehidet (0,610 g, 5,4 mmol) adtam hozzá. 2 csepp piperidin jelenlétében N₂ atmoszféra alatt forraltam 24 órán keresztül. Az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével távolítottam el. A nyersterméket 50 cm³ DCM-ban oldottam, és 3 x 30 cm³ vízzel mostam. MgSO₄-on szárítottam a szerves fázist, majd szűrés után az oldószert rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam. A nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (SiO₂, hexán : EtOAc = 3 : 1). A termék halványvörös színű szilárd anyag (0,75 g, 2,6 mmol, 48%).

(E)-2-(3-(3-formil-4-hidroxisztiril)-5,5-dimetilciklohex-2-én-1-ilidén)malononitril (5)



A **4** vegyületet (0,46 g, 1,586 mmol) feloldottam 15 cm³ CF₃COOH-ban, majd hexametiléntetramint (0,44 g, 3,172 mmol) adtam hozzá és N₂ atmoszféra alatt forraltam 24 órán keresztül. Másnap 24 cm³ 4 M HCl-t adtam hozzá és 2 órán át kevertettem. Ezt követően 50 cm³ vizet és 50 cm³ DCM-t adtam hozzá és 6 x 50 cm³ DCM-nal mostam. A szerves fázist MgSO₄-on szárítottam, majd szűrés után az oldószert rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam. A nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (SiO₂, hexán : EtOAc = 1 : 1). A termék halványvörös színű szilárd anyag (0,268 g, 0,843 mmol, 53%).

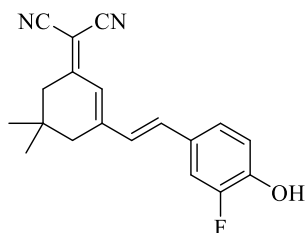
(E)-2-(3-(4-hidroxi-3-(hidroximetil)sztiril)-5,5-dimetilciklohex-2-én-1-ilidén)malononitril (6)



Az **5** vegyületet (50 mg, 0,157 mmol) feloldottam 2 cm³ DCM-ban és nátrium-triacetoxiborohidridet (72 mg, 0,346 mmol) adtam hozzá és 2 órán keresztül kevertettem szobahőmérsékleten. 5 cm³ DCM + pár csepp metanol segítségével rázótolcsérbe mostam és vízzel extraháltam. A szerves fázist MgSO₄-on szárítottam, majd szűrés után az oldószert rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam. A termék tisztítást nem igényelt, vörös színű szilárd anyag (47,8 mg, 0,150 mmol 95%).

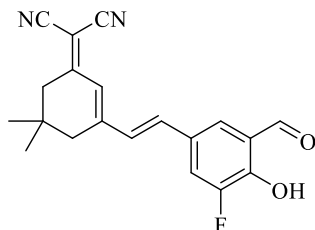
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,94 (br s, 1H), 7,66 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 7,43 (dd, J = 8,3, 2,3 Hz, 1H), 7,26 (d, J = 16,0 Hz, 1H), 7,16 (d, J = 16,0 Hz, 1H), 6,82 (s, 1H), 6,80 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 5,00 (br s, 1H), 4,48 (s, 2H), 2,60 (s, 2H), 2,54 (s, 2H), 1,01 (s, 6H).

(E)-2-(3-(3-fluoro-4-hidroxisztiril)-5,5-dimetilciklohex-2-én-1-ilidén)malononitril (8)



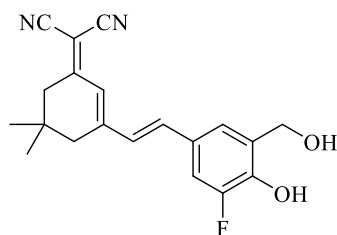
A **2** vegyületet (100 mg, 0,58 mmol) feloldottam 20 cm³ etanolban és 3-fluoro-4-hidroxi-benzaldehidet (81,3 mg, 0,58 mmol) adtam hozzá. Katalitikus mennyiségű piperidin jelenlétében N₂ atmoszféra alatt forraltam 24 órán keresztül. Az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével távolítottam el. A nyersterméket 25 cm³ DCM-ban oldottam és 3 x 20 cm³ vízzel mostam. MgSO₄-on szárítottam a szerves fázist, majd szűrés után az oldószert rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam. A nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (SiO₂, hexán : EtOAc = 3 : 1). A termék vörös színű szilárd anyag (51,4 mg, 0,167 mmol, 32%).

(E)-2-(3-(3-fluoro-5-formil-4-hidroxisztiril)-5,5-dimetilciklohex-2-én-1-ilidén)malononitril (9)



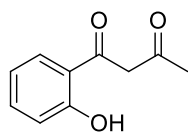
A **8** vegyületet (51,4 mg, 0,167 mmol) feloldottam 5 cm³ CF₃COOH-ban, majd hexametilén-tetramint (46 mg, 0,333 mmol) adtam hozzá és N₂ atmoszféra alatt forraltam 24 órán keresztül. Másnap 4 cm³ 4 M HCl-t adtam hozzá és 2 órán át kevertettem. Ezt követően 20 cm³ vizet és 20 cm³ DCM-t adtam hozzá és 3 x 30 cm³ DCM-nal mostam. A szerves fázist MgSO₄-on szárítottam, majd szűrés után az oldószert rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam. A nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (SiO₂, hexán : EtOAc = 1 : 1). A termék vörös színű szilárd anyag (24,1 mg, 0,072 mmol, 43%).

(E)-2-(3-(3-fluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil)sztiril)-5,5-dimetilciklohex-2-én-1-ilidén)malononitril (10)



A **9** vegyületet (24,1 mg, 0,072 mmol) feloldottam 5 cm³ DCM-ban és nátrium-triacetoxiborohidridet (30,5 mg, 0,144 mmol) adtam hozzá és 2 órán keresztül kevertettem szobahőmérsékleten. 5 cm³ DCM + pár csepp metanol segítségével rázótolcsérbe mostam és vízzel extraháltam. A szerves fázist MgSO₄-on szárítottam, majd szűrés után az oldószert rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam. A nyersterméket oszlopkromatográfiával próbáltam meg tisztítani, de tisztításkor nem sikerült izolálnom.

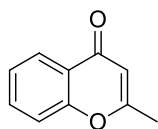
1-(2-hidroxifenil)bután-1,3-dion (12)



Szárítószekrényben szárított és N₂ áramban hűtött lombikban 9,0 cm³ vízmentes THF-ben szuszpendáltam NaH-et (3,52 g 60%-os ásványi olajban 88,2 mmol) N₂ alatt, majd EtOAc-ból (5,4 cm³, 22,0 mmol) absz. THF-ből (2,5 cm³) és 2-hidroxiacetofenonból (2,7 cm³ 22,0 mmol) készült elegyet csepegtettem a szuszpenzióhoz szobahőmérsékleten N₂ atmoszférában. A hozzáadagolás után még 5 percig kevertettem, majd kevés vízzel hígítottam, jégre öntöttem és 6M-os HCl-val kb. 6-osra állítottam a pH-t. Ezt az oldatot 2 x 50 cm³ és 1 x 30 cm³ dietil-éterrel extraháltam, valamint az egyesített szerves fázist 1 x 50 cm³ cc. NaCl-oldattal mostam, MgSO₄-on szárítottam. Szűrés után az oldószert rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam. A termék fehér színű szilárd anyag (2,593 g, 14,55 mmol 66%). A terméket tisztítás nélkül használtam fel a következő lépésben.

R_f: 0,52 (SiO₂, hexán : EtOAc = 3 : 1),

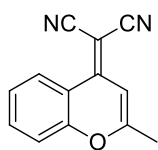
2-metil-4*H*-kromén-4-on (13)



A **12**-es vegyületet (2,568 g, 14,41 mmol) 144 cm³ metanolban feloldottam, pirrolidint (0,238 cm³, 2,88 mmol, 0,205 g) és vizet (0,026 cm³ 1,44 mmol) adtam hozzá és N₂ alatt szobahőmérsékleten kevertettem 24 órán át. Ezt követően a metanolt rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam. A nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (SiO₂, DCM : Metanol = 1 : 1). A termék barna színű szilárd anyag. (1,316 g, 8,22 mmol, 57%)

R_f : 0,63 (SiO₂, DCM : MeOH = 20 : 1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8,17 (dd, J = 7,9, 1,7 Hz, 1H), 7,62 (ddd, J = 8,6, 7,1, 1,7 Hz, 1H), 7,40 (dd, J = 8,5, 1,0 Hz, 1H), 7,36 (ddd, J = 8,1, 7,1, 1,1 Hz, 1H), 6,15 (q, J = 0,7 Hz, 1H), 2,37 (d, J = 0,8 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 178,0, 166,0, 156,4, 133,3, 125,5, 124,8, 123,5, 117,6, 110,5, 20,4.

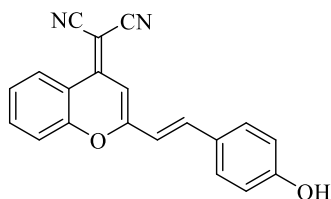
2-(2-metil-4*H*-kromén-4-ilidén)malononitril (14)



A **13**-as terméket (1,292 g, 7,96 mmol) és malonitrilt (0,636 g, 9,635 mmol) feloldottam 6,5 cm³ ecetsav-anhidridben és N₂ alatt 140 °C-on 24 órán át kevertettem. Az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével távolítottam el, majd 20 cm³ vizet adtam hozzá és 30 percig forraltam. Ezután extraháltam az oldatot 3 x 50 cm³ DCM-nal, majd Na₂SO₄-on szárítottam. Szűrés után az oldószert rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam. A nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (SiO₂, hexán : EtOAc = 3 : 1). A termék halványsárga szilárd anyag (0,390 g, 1,873 mmol, 24%).

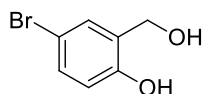
R_f : 0,46 (SiO₂, hexán : EtOAc = 3 : 1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8,92 (dd, J = 8,7, 1,5 Hz, 1H), 7,72 (ddd, J = 8,7, 7,3, 1,5 Hz, 1H), 7,49 – 7,42 (m, 2H), 6,72 (q, J = 0,7 Hz, 1H), 2,44 (d, J = 0,8 Hz, 3H).

2-((Z)-2-((E)-4-hidroxisztiril)-4H-kromén-4-ilidén)-2-isocianoacetonitril (15)



A **14** vegyületet (100 mg, 0,48 mmol) feloldottam 10 cm³ etanolban és 4-hidroxi-benzaldehidet (54,24 mg, 0,48 mmol) adtam hozzá. Katalitikus mennyiségű piperidin jelenlétében N₂ atmoszféra alatt forraltam 24 órán keresztül. Az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével távolítottam el. A nyersterméket 50 cm³ DCM-ban oldottam és 3 x 25 cm³ vízzel mostam. MgSO₄-on szárítottam a szerves fázist, majd szűrés után az oldószert rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam. A nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (SiO₂, hexán : EtOAc = 1 : 1). A termék halványvörös színű szilárd anyag (36,0 mg, 0,115 mmol, 24%)

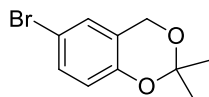
4-bróm-2-(hidroximetil)-fenol (18)



5-bróm-2-hidroxibenzaldehidet (2,01 g, 10mmol) feloldottam 30 cm³ THF és 1 cm³ víz elegyében, majd NaBH₄-et (0,189 g, 5 mmol) adtam hozzá, és feloldódás utáni 5 percig kevertettem. Kevés vizet adtam hozzá majd extraháltam 3 x 50 cm³ DCM-nal, majd MgSO₄-on szárítottam. Szűrés után a DCM-t rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam. A termék tisztán keletkezett, fehér szilárd por alakban (1,559 g, 7,68 mmol, 77%).

R_f : 0,37 (SiO₂, hexán : EtOAc = 3 : 1); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,64 (s, 1H), 7,40 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 7,19 (dd, J = 8,5, 2,6 Hz, 1H), 6,72 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 5,08 (t, J = 5,7 Hz, 1H), 4,45 (d, J = 5,3 Hz, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 153,3, 131,5, 129,6, 129,4, 116,6, 110,0, 57,6.

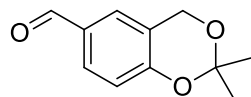
6-bróm-2,2-dimetil-4H-benzo-[d]-[1,3]-dioxin (19)



A **18**-as vegyületet (1,905 g, 9,38 mmol) feloldottam 30 cm³ acetonban, majd 2,2-dimetoxipropánt (5,00 g, 48,0 mmol, 5,90 cm³) adtam hozzá, illetve Na₂SO₄-et (4,92 g, 34,63 mmol), valamint para-toluolszulfonsavat (0,218 g, 1,266 mmol). 40 °C-on 90 percen keresztül kevertettem, majd az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével eltávolítottam. Ezt követően 30 cm³ EtOAc-ot és 30 cm³ vizet adtam hozzá és extraháltam 3 x 20 cm³ EtOAc-tal, az egyesített szerves fázist pedig telített NaCl oldattal mostam. MgSO₄-on szárítottam, majd szűrés után az EtOAc-ot rotációs vákuumbepárló segítségével távolítottam el. A nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (SiO₂, hexán : DCM = 1 : 1). A termék halványsárga szilárd anyag (1,564 g, 6,433 mmol, 69%).

R_f:0,60 (SiO₂, hexán : DCM= 1 : 1); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,25 (dd, *J* = 8,8, 2,3 Hz, 1H), 7,10 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 6,70 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 4,81 (s, 2H), 3,49 (s, 1H), 1,53 (s, 6H).

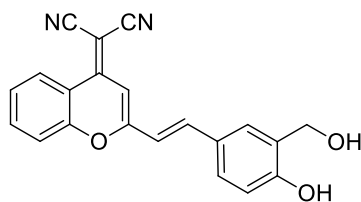
2,2-dimetil-4H-benzo[d][1,3]dioxin-6-karbaldehid (20)



A **19**-es vegyületet (0,7626 g, 3,14 mmol) feloldottam 20 cm³ frissen desztillált THF-ban, N₂ atmoszféra alatt. Ezt követően -78 °C-ra hűtöttem és beadagoltam az n-BuLi-ot (8,85 mmol 3,54 cm³, 2,5 M oldat hexánban), majd 2 órán át kevertettem. Addig feloldottam DMF-ot (3,342 g, 45,8 mmol, 3,54 cm³) 3,54 cm³ THF-ban, majd 2 óra letelte után hozzáadtam és egy éjszakán át hagytam felmelegedni. Ezt követően 100 cm³ dietil-étert adtam hozzá és 3 x 100 cm³ vízzel extraháltam, majd a szerves fázist cc. NaCl-dal mostam. MgSO₄-on szárítottam, majd az szűrés után a dietil-étert rotációs vákuumbepárló segítségével távolítottam el. A nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (SiO₂, hexán : DCM = 1 : 1). A termék halványsárga folyadék (0,142 g, 0,739 mmol, 24%).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9,86 (s, 1H), 7,70 (dd, *J* = 8,4, 2,0 Hz, 1H), 7,55 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H), 6,93 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 4,91 (s, 2H), 1,58 (s, 6H).

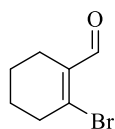
2-(2-(4-hidroxi-3-(hidroximetil)sztiril)-4H-kromén-4-ilidén)malononitril (22)



A **20**-as vegyületet (0,300 g 1,975 mmol) feloldottam 2 cm³ acetonitrilben, majd hozzáadtam a **14**-es (0,205 mg, 0,9875 mmol) vegyülethez. Végül piperidint (7,6 mg, 8,83 µl) adtam hozzá és 82 °C-on forraltam 24 órán át. Az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével eltávolítottam, majd az acetamid védőcsoportot 8:8 cm³ ecetsav:etanol elegyben való oldással és 80 °C-on való forralásával távolítottam el 24 óra alatt. A termék narancssárga szilárd anyag (0,153 g, 0,447 mmol, 45 %)

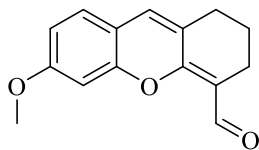
R_f:0,45 (SiO₂, DCM : MeOH= 20 : 1); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,10 (s, 1H), 8,74 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,91 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,81 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,76 – 7,71 (m, 2H), 7,60 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,51 (dd, *J* = 8,3, 2,2 Hz, 1H), 7,28 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 7,02 (s, 1H), 6,85 (t, *J* = 8,4 Hz, 1H), 5,07 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H), 4,49 (d, *J* = 4,6 Hz, 2H).

2-bromociklohex-1-én-1-karbaldehid (24)



3,73 cm³ (48,3 mmol) DMF és 16,7 cm³ kloroform elegyéhez cseppenként adtam 4,13 cm³ (43,5 mmol) PBr₃-ot 0°C-on. 45 percig kevertettem ezen a hőmérsékleten, majd 1,67 cm³ (16,13 mmol) ciklohexanont adtam az elegyhez, s ezt követően 18 órát kevertettem szobahőmérsékleten. Ezt követően körülbelül 50 cm³ jégre öntöttem, majd a pH-t NaHCO₃ segítségével 7-esre állítottam. Ezután 3 x 50 cm³ DCM-nal extraháltam, Na₂SO₄-on szárítottam. Szűrés után az oldószert rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam. A terméket tisztítás nélkül felhasználtam a következő lépésben (1,270 g, 6,72 mmol, 42%)

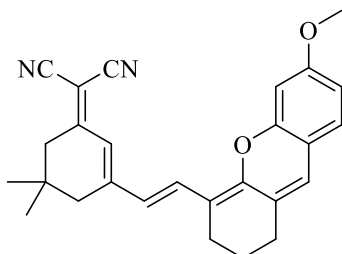
6-metoxi-2,3-dihidro-1*H*-xantén-4-karbaldehid (25)



A **24** vegyületet (430 mg, 2,27 mmol) feloldottam 13 cm³ DMF-ben és 2-hidroxi-benzaldehydet (288 mg, 1,89 mmol), valamint Cs₂CO₃-ot (1539 mg, 4,725 mmol) adtam hozzá és szobahőmérsékleten kevertettem 24 órán keresztül. A szilárd sókat szilikapadon szűrtem ki és DCM-nal mostam. A szűrletet többször extraháltam vízzel, majd MgSO₄-on szárítottam a szerves fázist, szűrés után az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével távolítottam el. A nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (SiO₂, DCM : EtOAc = 9 : 1). A termék citromsárga szilárd anyag (164 mg, 0,680 mmol, 36%).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,25 (s, 1H), 7,30 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 6,97 (s, 1H), 6,89 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 6,76 (dd, *J* = 8,5, 2,4 Hz, 1H), 3,81 (s, 4H), 2,59 – 2,53 (m, 2H), 2,30 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 1,63 (p, *J* = 6,1 Hz, 2H).

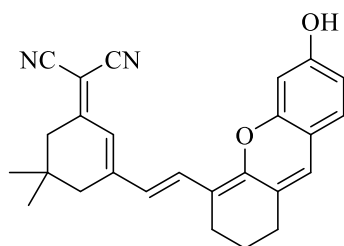
(*E*)-2-(3-(2-(6-metoxi-2,3-dihidro-1*H*-xantén-4-il)vinil)-5,5-dimetilciklohex-2-én-1-ilidén)malononitril (26)



A **25** vegyületet (68 mg, 0,279 mmol) feloldottam 10 cm³ Ac₂O-ban, majd K₂CO₃-at (77 mg, 0,5574 mmol) és a **2** vegyületet (62 mg, 0,3344 mmol) adtam hozzá és 80 °C-on melegítettem 8 órán keresztül. Az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével távolítottam el. Ezután 25 cm³ DCM-ban oldottam és 3 x 25 cm³ vízzel mostam. A nyersterméket fordított fázisú oszlopkromatográfiával tisztítottam. A termék mélylila szilárd anyag (20,6 mg, 0,050 mmol, 18%).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,63 (d, *J* = 15,6 Hz, 1H), 7,18 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 6,85 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 6,73 (s, 1H), 6,70 – 6,66 (m, 2H), 6,61 (d, *J* = 15,6 Hz, 1H), 3,81 (s, 3H), 2,57 (s, 2H), 2,56 (s, 2H), 2,46 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H), 1,71 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H), 1,04 (s, 6H).

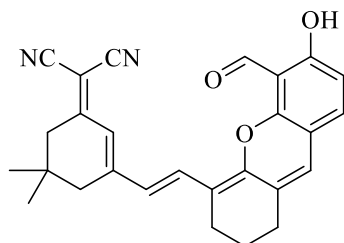
(E)-2-(3-(2-(6-hidroxi-2,3-dihidro-1*H*-xantén-4-il)vinil)-5,5-dimetilciklohex-2-én-1-ilidén)malononitril (27)



A **26** vegyületet (18 mg, 0,0416 mmol) feloldottam 2 cm³ DCM-ban és 0 °C-on BBr₃ 1M-es DCM-os oldatát (0,831 cm³) adtam az elegyhez. 24 órán keresztül kevertettem szobahőmérsékleten, majd jégre öntöttem és NaHCO₃-tal semlegesítettem. A vizes fázist DCM-nal extraháltam és az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével távolítottam el. A termék tisztítást nem igényelt, mélylila színű szilárd anyag. (14,83 mg, 0,0374 mmol, 90%)

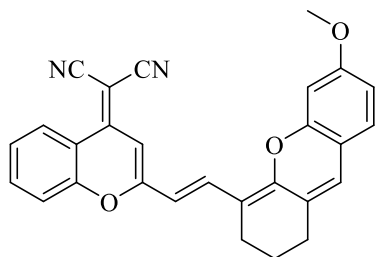
¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 10,01 (s, 1H), 7,61 (d, J = 15,5 Hz, 1H), 7,07 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 6,77 – 6,61 (m, 3H), 6,58 – 6,48 (m, 2H), 2,53 (s, 4H), 2,47 (s, 2H), 2,43 (t, J = 5,9 Hz, 2H), 1,75 – 1,63 (m, 2H), 1,02 (s, 6H).

(E)-2-(3-(2-(5-formil-6-hidroxi-2,3-dihidro-1*H*-xantén-4-il)vinil)-5,5-dimetilciklohex-2-én-1-ilidén)malononitril (28)



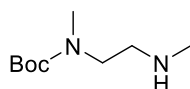
A **27** vegyületet (14,83 mg, 0,0374 mmol) 2 cm³ CF₃COOH-ban oldottam, majd hexametiléntetramint (10,7 mg, 0,0741 mmol) adtam hozzá és N₂ atmoszféra alatt forraltam 24 órán keresztül. Másnap 2 cm³ 4 M HCl-t adtam hozzá és 2 órán át kevertettem. Ezt követően 10 cm³ vizet és 10 cm³ DCM-t adtam hozzá és 3 x 20 cm³ DCM-nal mostam. A szerves fázist MgSO₄-on szárítottam, majd szűrés után az oldószert rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam.

(E)-2-(2-(2-(6-metoxi-2,3-dihidro-1H-xantén-4-il)vinil)-4H-kromén-4-ilidén)malononitril (29)



A **25** vegyületet (45 mg, 0,183 mmol) feloldottam 5 cm³ Ac₂O-ban, majd K₂CO₃-at (50,5 mg, 0,366 mmol) és a **14** vegyületet (46 mg, 0,220 mmol) adtam hozzá és 80 °C-on melegítettem 24 órán keresztül. Az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével távolítottam el. Ezután 25 cm³ DCM-ban oldottam és 3 x 25 cm³ vízzel mostam. A nyersterméket fordított fázisú oszlopkromatográfiával tisztítottam. A termék mélylila szilárd anyag (14,2 mg, 0,0330 mmol, 18%).

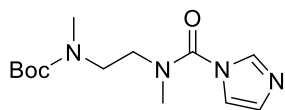
terc-butilmetil(2-(metilamino)etil)-karbamát (31)



N,N'-dimetilén-metilén-diamint (3,0 g, 34 mmol, 3,67 cm³) feloldottam 40 cm³ desztillált DCM-ban, majd N₂ atmoszféra alatt és 4 °C-ra hűtve Boc₂O-t (2,4 g, 11 mmol) 20 cm³ desztillált DCM-ban cseppenként adagoltam az elegybe. Hagytam felmelegedni és egy éjszakán át kevertettem. Az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével eltávolítottam. 50-50 cm³ vizet és EtOAc-ot adtam hozzá majd 2 x 50 cm³ EtOAc-tal extraháltam és az egyesített szerves fázist cc. NaCl-oldattal mostam. Na₂SO₄-on szárítottam, majd szűrés után az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével távolítottam el. A termék halványsárga olaj. (1,59 g, 8,45 mmol, 77%)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 3,32 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 2,87 (s, 3H), 2,72 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 2,45 (s, 3H), 1,45 (s, 9H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 79,4, 49,8, 48,4, 36,3, 34,7, 28,5.

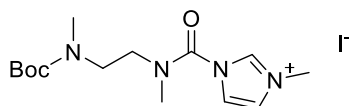
tert-butylmetil(2-(N-metil-1H-imidazol-1-karboxamido)etil)karbamát (32)



60 cm³ THF-ban feloldottam *N,N'*-karbonildiimidazolt (0,732 g, 4,5 mmol) majd hozzáöntöttem a **31**-es vegyülethez (0,740 g, 3,91 mmol). Egy éjszakát át kevertettem és melegítettem 65 °C-on. Az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével eltávolítottam. 100 cm³ DCM-t adtam hozzá, majd 3 x 100 cm³ vízzel extraháltam. Az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével távolítottam el. A nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (SiO₂, DCM : Metanol = 20 : 1). A termék sárgás-narancs olaj (0,964 g, 3,41 mmol, 87%).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,89 (s, 1H), 7,24 (s, 1H), 7,07 (s, 1H), 3,69 – 3,56 (m, 2H), 3,51 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H), 3,15 (s, 3H), 2,85 (s, 3H), 1,62 (s, 1H), 1,43 (s, 9H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 151,8, 137,0, 129,4, 118,1, 80,0, 47,8, 45,5, 37,4, 34,5, 28,4.

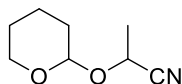
1-((2-((tert-butoxikarbonil)(metil)amino)etil)(metil)karbamoil)-3-metil-1H-imidazol-3-ium jodid (33)



A **32**-es vegyületet (0,664 g, 2,35 mmol) feloldottam 15 cm³ acetonitrilben, majd metil jodidot (3,33 g, 23,5 mmol, 1,46 cm³) adtam hozzá, és szobahőmérsékleten kevertettem 24 órát. Az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével távolítottam el. A termék tisztán keletkezett, sárga szilárd anyag (0,661 g, 1,56 mmol, 66%).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,68 – 9,48 (m, 1H), 8,06 – 7,88 (m, 1H), 7,86 (s, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,57 (s, 2H), 3,43 (s, 2H), 3,09 (s, 3H), 2,82 (s, 3H), 1,38 (s, 9H).

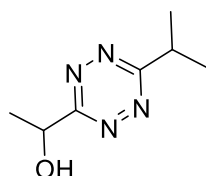
2-((tetrahydro-2H-pirán-2-il)oxi)propionitril (35)



Laktonitrilt (5,00 g, 70,34 mmol, 5,05 cm³) és dihidropiránt (8,88 g, 105,5 mmol, 9,6 cm³) feloldottam amilénnel stabilizált DCM-ban (50 cm³), és hozzáadtam piridínium paratoluolszulfonátot (1,767 g, 7,03 mmol). 4 órán át kevertettem szobahőmérsékleten. Ezt követően 50 cm³ DCM-t adtam hozzá és mostam vízzel, telített Na₂CO₃-oldattal, majd újra vízzel. A szerves fázist MgSO₄-on szárítottam. A nyersterméket vákuumdesztillációval tisztítottam. A tiszta frakciót 93-98 °C-on 16,4 mbar-on szedtem. A termék színtelen viszkózus folyadék (8,09 g, 52,13 mmol, 74%).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4,89 (dd, *J* = 4,2, 2,5 Hz, 1H), 4,79 (t, *J* = 3,2 Hz, 1H), 4,64 (q, *J* = 6,9 Hz, 1H), 4,38 (q, *J* = 6,9 Hz, 1H), 3,97 (td, *J* = 10,8, 3,0 Hz, 1H), 3,77 (ddd, *J* = 11,5, 8,7, 3,1 Hz, 1H), 3,66 – 3,60 (m, 1H), 3,59 – 3,51 (m, 1H), 1,87 – 1,51 (m, 18H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 120,0, 119,1, 99,1, 97,0, 62,7, 62,2, 61,6, 59,6, 30,1, 30,0, 25,2, 20,3, 19,7, 19,1, 18,5.

1-(6-izopropil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)etán-1-ol (36)

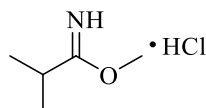


A THP-s laktonitrilt (932 mg, 6 mmol) feloldottam izobutílnitrilben (2,16 cm³, 24 mmol) majd Zn(OTf)₂-t (546 mg, 0,6 mmol) és hidrazin-monohidrátot (7,28 cm³, 60 mmol) adtam az elegyhez. 24 órán keresztül melegítettem 60 °C-on. Az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével távolítottam el. A terméket ezután 80-80 cm³ ecetsav-THF elegyében oldottam, 0 °C-ra hűtöttem. Ekkor NaNO₂-et (4,0 g, 56 mmol) oldottam fel 40 cm³ vízben és a tetrazinhoz csepegtettem. Két órás kevertetés után vizet adtam hozzá és kloroformmal extraháltam addig, amíg a vizes fázis el nem színtelenedett. Az ecetsav semlegesítéséhez NaHCO₃-tal addig extraháltam, amíg pezsgett az elegy. Na₂SO₄-on szárítottam, a szárítószerrel leszűrtem, majd rotációs vákuumbepárló segítségével eltávolítottam az oldószert. A nyersterméket 60 ml kloroformban és 30 ml etanolban oldottam, majd pár csepp cc. HCl-t adtam hozzá és 1 órán keresztül kevertettem. Az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével távolítottam el. A

terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (SiO₂, hexán : DCM). A termék rózsaszín viszkózus folyadék (153 mg, 0,922 mmol, 15%)

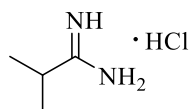
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5,42 (p, *J* = 6,6 Hz, 1H), 3,69 (hept, *J* = 6,9 Hz, 1H), 3,33 (d, *J* = 6,4 Hz, 1H), 1,78 (d, *J* = 6,7 Hz, 3H), 1,54 (d, *J* = 7,0 Hz, 6H).

metil izobutilimidát hidroklorid (38)



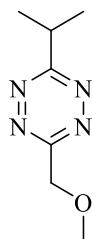
Feloldottam az izobutilnitrilt (2,6 cm³, 29 mmol) 20 cm³ metanolban, majd 0 °C-ra hűtöttem és 20 cm³ acetil-kloridot csepegtettem hozzá és a fagyasztóba tettem. Másnap háromszor hexánt pároltam le róla rotációs vákuumbepárló segítségével. A kivált fehér anyagot szűrtem és hideg éterrel mostam. A terméket (3,6 g, 26,27 mmol, 91%) tisztítás nélkül használtam fel a következő lépésben.

izobutirimidamid hidroklorid (39)



Feloldottam a **38** vegyületet (1,00 g, 7,30 mmol) ammóniás metanolban majd szobahőmérsékleten kevertettem 24 órán át. Másnap az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével eltávolítottam. A kivált fehér terméket (0,890 g, 7,30 mmol, 100%) tisztítás nélkül használtam fel a következő lépésben.

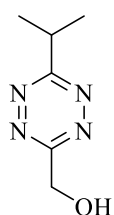
3-izopropil-6-(metoximetil)-1,2,4,5-tetrazin (40)



Feloldottam a **39** vegyületet (0,613 g, 5 mmol) 1,5 cm³ etanolban és 2-metoxi-acetonitrilt (1,5 cm³, 20 mmol) és 3-merkaptopropánsavat (435 µL, 5 mmol) adtam hozzá. Ezt követően 0 °C-ra hűtöttem és N₂ atmoszféra alatt hidrazin-monohidrátot (3 cm³, 60 mmol) csepegtettem hozzá, majd szobahőmérsékleten kevertettem 24 órán keresztül. Másnap a sárga oldatot 0 °C-ra hűtöttem és 5,2 g NaNO₂-et adtam hozzá feloldva 25 cm³ vízben. 1 M HCl-t csepegtettem hozzá addig, míg a pH körülbelül 3-4 lett. A vizes fázist extraháltam 5 x DCM-nal, majd az egyesített szerves fázist cc. NaCl-dal mostam. A szerves fázist MgSO₄-on szárítottam, majd szűrés után az oldószert rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam ügyelve a nyomás lassú csökkentésére, mert illékony a termék. A nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (SiO₂, hexán : DCM = 10 : 1). A termék rózsaszín viszkózus folyadék (0,319 g, 1,90 mmol, 38%).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5,05 (s, 2H), 3,68 (dt, J = 13,9, 7,0 Hz, 1H), 3,61 (s, 3H), 1,53 (d, J = 7,0 Hz, 6H).

(6-izopropil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)metanol (41)



Feloldottam a **41** tetrazinszármazékot (200 mg, 1,19 mmol) absz. DCM-ban, -78 °C-ra hűtöttem, majd cseppenként adagoltam hozzá N₂ atmoszféra alatt BBr₃ 1M-os DCM-os oldatát (4,8 cm³, 4,76 mmol), az oldat színe pirosról, barnává változott. 1 órát kevertettem ezen a hőmérsékleten, majd még fél órát szobahőmérsékleten. Ezután 5 cm³ metanolt csepegtettem hozzá, a kezdetben kivált narancssárga csapadék feloldódott és homogén rózsaszín oldatot kaptam. Az így kapott oldathoz vizet adtam és 5 x 30 cm³ DCM-nal extraháltam. Az egyesített szerves fázist MgSO₄-on szárítottam, majd szűrés után az oldószert rotációs vákuumbepárlóval

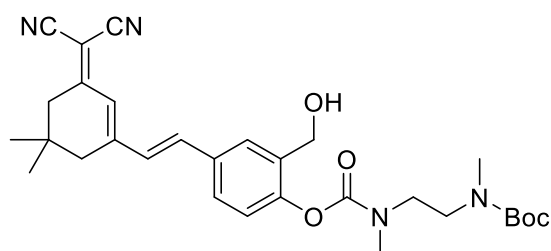
eltávolítottam. A nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (SiO₂, hexán : EtOAc = 3 : 1). A termék rózsaszín viszkózus folyadék (69,6 mg, 0,452 mmol, 38%).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5,21 (s, 2H), 3,69–3,54 (m, 1H), 3,23 (s, 1H), 1,48 (s, 3H), 1,46 (s, 3H).

Általános recept az etiléndiamin önfeláldozó linkert tartalmazó festékszarmazékok (42, 43) előállítására

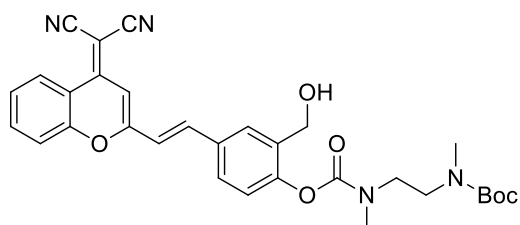
A **6** vagy **22** vegyületet (1 ekv.) feloldottam acetonitrilben (1 cm³/20 mg), majd a **33** linkert (1,5 ekv.), és DIPEA-t (3,5 ekv) valamint 4-dimetilamino-piridint (0,03 ekv.) adtam hozzá és 2 órán keresztül forraltam. Az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével távolítottam el. A nyersterméket fordított fázisú oszlopkromatográfiával tisztítottam.

tert-butil(4-(2-(3-(dicianometilén)-5,5-dimetilciklohex-1-én-1-il)vinil)-2-(hidroximetil)fenil) etán-1,2-diilbisz(metilkarbamát) (42)



A termék vörös szilárd anyag. (78,4 mg, 0,147 mmol, 47%)

tert-butil(4-(2-(4-(dicianometilén)-4*H*-kromén-2-il)vinil)-2-(hidroximetil)fenil)etán-1,2-diilbisz(metilkarbamát) (43)



A termék vörös szilárd anyag. (16,3 mg, 0,0293 mmol, 59%)

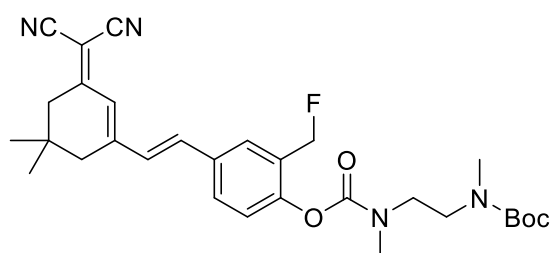
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8,93 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,78 – 7,70 (m, 2H), 7,62 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 7,58 – 7,52 (m, 2H), 7,46 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,17 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 6,88 (s, 1H),

6,80 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H), 5,30 (s, 1H), 4,71 – 4,52 (m, 2H), 3,64 – 3,48 (m, 4H), 3,20 – 2,89 (m, 6H), 1,46 (s, 9H).

Általános recept a fluor távozócsoport kialakítására (44, 45) vegyületek esetében.

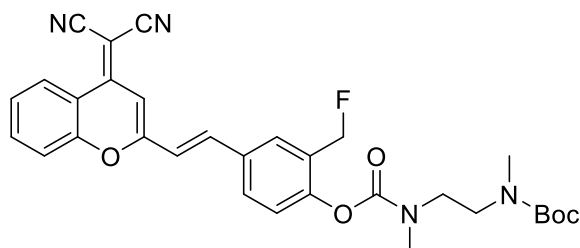
A **42** vagy **43** vegyületet (1 ekv.) feloldottam amilénnel stabilizált DCM (1 cm³/20 mg)-ban majd dietilamino-kéntrifluoridot (2,5 ekv.) adtam hozzá és nitrogén alatt kevertettem szobahőmérsékleten 1,5 órán át. DCM-nal hígítottam és vízzel mostam. A szerves fázist MgSO₄-on szárítottam, majd szűrés után az oldószert rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam. A nyersterméket fordított fázisú oszlopkromatográfiával tisztítottam.

***tert*-butil(4-(2-(3-(dicianometilén)-5,5-dimetilciklohex-1-én-1-il)vinil)-2-(fluormetil)fenil)etán-1,2-diilbisz(metilkarbamát) (44)**



A termék vörös szilárd anyag. (43,4 mg, 0,0810 mmol, 85%)

***tert*-butil(4-(2-(4-(dicianometilén)-4H-kromén-2-il)vinil)-2-(fluormetil)fenil)etán-1,2-diilbisz(metilkarbamát) (45)**

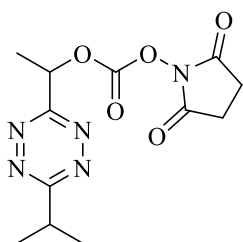


A termék vörös szilárd anyag. (30,0 mg, 0,0538 mmol, 60%)

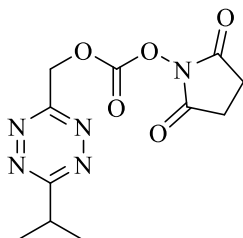
Általános recept az aktivált tetrazinok (46, 47) előállítására:

A **36** és **41** származékot (1 ekv.) feloldottam vízmentes acetonitrilben (10 cm³) N₂ alatt, majd az elegyhez adtam TEA-t (5 ekv.), DMAP-t (0,1 ekv.) és DSC-t (5 ekv.). Másfél óra elteltével rotációs vákuumbepárló segítségével eltávolítottam róla az oldószert, majd etil-acetátot adtam hozzá. Ötször mostam vízzel és ötször NaHCO₃-oldattal. MgSO₄-on szárítottam, leszűrtem, az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével eltávolítottam. A termékeket tisztítás nélkül használtam fel.

2,5-dioxopirrolidin-1-il (1-(6-izopropil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)etil)karbonát (46)



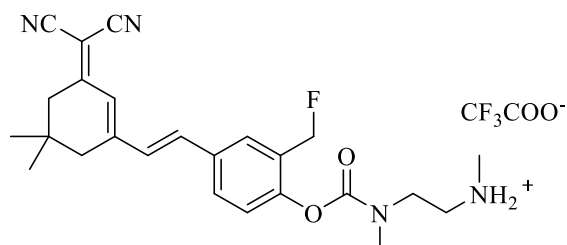
2,5-dioxopirrolidin-1-il ((6-izopropil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)metil)karbonát (47)



Általános recept Boc-védőcsoport eltávolítására (48, 49):

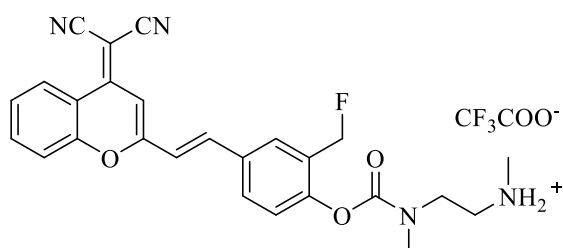
A **44** vagy **45** festékeket (1 ekv.) DCM-ben (5ml) oldottam, majd TFA-t (0,3 cm³) és vizet (2 csepp) adtam az elegyekhez. Két órás kevertetés elteltével rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam az oldószert és további tisztítás nélkül használtam fel a vegyületeket.

2-(((4-(2-(3-(dicianometilén)-5,5-dimetilciklohex-1-én-1-il)vinil)-2-(fluorometil)fenoxi)karbonil)(metil)amino)-N-metiletán-1-amínium-2,2,2-trifluoracetát (48)



A termék mélyzöld szilárd anyag.

2-(((4-(2-(4-(dicianometilén)-4H-kromén-2-il)vinil)-2-(fluorometil)fenoxi)karbonil)(metil)amino)-N-metiletán-1-amínium-2,2,2- trifluoracetát (49)

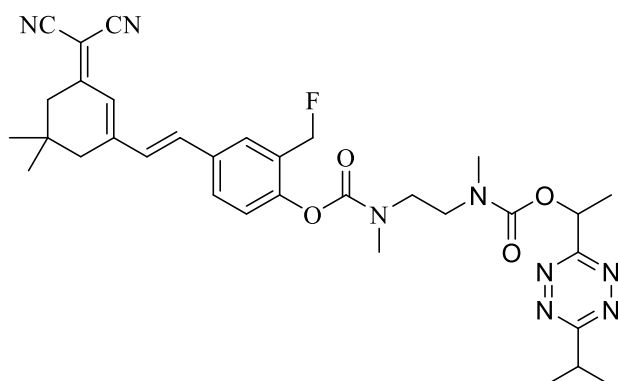


A termék mélyzöld szilárd anyag.

Általános recept a célkítűzésben szereplő festékek (50, 51, 52, 53) előállítására:

A **46** vagy **47** aktivált tetrazinokat (2 ekv) DCM-ben (10 ml) oldottam, majd TEA-t (1 ml) adtam hozzá és tíz percen keresztül kevertettem. **48** (1 ekv.) vagy **49** (1 ekv.) festéket feloldottam és a DCM-ben (5 ml) oldottam, majd állandó kevertetés mellett lassan a tetrazinos (**46** vagy **47**) elegyhez csepegtettem. 30 perc után LC-MS-t néztem róla és megállapítottam, hogy a reakció minden esetben sikeresen lejátszódott. Az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével távolítottam el. Preparatív HPLC-vel tisztítottam az anyagokat.

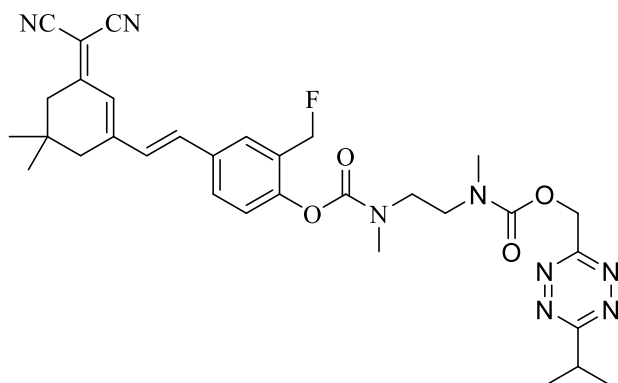
(E)-4-(2-(3-(dicianometilén)-5,5-dimetilciklohex-1-én-1-il)vinil)-2-(fluorometil)fenil(1-(6-izopropil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)etil)etán-1,2-diilbisz(metilkarbamát) (50)



A termék vörös szilárd anyag. (30,0 mg, 0,0349 mmol, 42%)

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,85 (s, 1H), 7,74 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 7,44 (d, J = 16,2 Hz, 1H), 7,32 (d, J = 16,4 Hz, 1H), 7,26 – 7,11 (m, 1H), 6,92 (s, 1H), 6,16 – 6,03 (m, 1H), 5,48 – 5,26 (m, 2H), 3,65 – 3,46 (m, 4H), 3,28 (s, 3H), 3,12 – 2,84 (m, 6H), 2,64 (s, 2H), 2,57 (s, 2H), 1,77 – 1,61 (m, 3H), 1,04 (s, 6H).

(E)-4-(2-(3-(dicianometilén)-5,5-dimetilciklohex-1-én-1-il)vinil)-2-(fluorometil)fenil((6-izopropil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)metil)etán-1,2-diilbisz(metilkarbamát) (51)



A termék vörös szilárd anyag. (23,2 mg, 0,0377 mmol, 32%)

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,84 (s, 1H), 7,73 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,42 (d, J = 16,1 Hz, 1H), 7,31 (d, J = 16,3 Hz, 1H), 7,18 (td, J = 22,7, 20,1, 8,4 Hz, 1H), 6,91 (s, 1H), 5,67 – 5,59 (m, 2H), 5,47 – 5,27 (m, 2H), 3,62 – 3,43 (m, 4H), 3,10 – 2,87 (m, 6H), 2,63 (s, 2H), 2,56 (s, 2H), 1,03 (s, 6H).

CN(C)COC(=O)N(C)CCOC(=O)c1ncnc(C)c1/C=C/c2cc(OC(=O)N(C)CCOC(=O)c3ncnc(C)c3)cc(F)c2C#N

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.74 (dd, J = 8,4, 1,4 Hz, 1H), 7.97 – 7.88 (m, 2H), 7.83 – 7.75 (m, 3H), 7.66 – 7.58 (m, 2H), 7.53 (d, J = 16,0 Hz, 1H), 7.31 – 7.18 (m, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.14 – 6.04 (m, 1H), 5.51 – 5.30 (m, 2H), 3.64 – 3.33 (m, 4H), 3.14 – 2.82 (m, 6H), 1.75 – 1.63 (m, 3H).

CN(C)COC(=O)N(C)COC(=O)Oc1ccc(cc1)/C=C/c2cc3c(c2)oc4ccccc4c3C(=N)C#N

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,75 (dd, J = 8,3, 1,3 Hz, 1H), 7,99 – 7,88 (m, 2H), 7,84 – 7,76 (m, 3H), 7,63 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,55 (d, J = 16,2 Hz, 1H), 7,37 – 7,23 (m, 1H), 7,08 (s, 1H), 5,67 – 5,61 (m, 2H), 5,51 – 5,32 (m, 2H), 3,64 – 3,44 (m, 4H), 3,27 (s, 3H), 3,11 – 2,87 (m, 6H), 1,46 – 1,38 (m, 6H).

6.3 A click to release reakció vizsgálata

A vizsgálatokhoz először törzsoldatokra volt szükségem. Először a festék 1 mM-os törzsoldatát készítettem el acetonitrilben. A GSH törzsoldat 10 mM-os volt és PBS-ben készült, a pH-t 0,2 M NaOH oldattal 7,4-re állítottam. A click to release vizsgálathoz 20 mM TCO-lizin törzsoldatot készítettem úgy, hogy először 100 mM-os oldatot készítettem 0,2 M NaOH-ban, majd ezt ötszörösére hígítottam PBS-sel.

Ezután stabilitásvizsgálatot végeztem PBS-ben és GSH-ban, pH = 7,4-en. 100 µL festék törzsoldathoz 500 µL PBS-t, valamint 400 µL acetonitrilt adtam.

A GSH stabilitásvizsgálat esetében 100 µL festék törzsoldathoz 500 µL GSH törzsoldatot, valamint 400 µL acetonitrilt adtam.

A click to release vizsgálatnál 100 µL festék törzsoldathoz 400 µL acetonitrilt és 450 µL PBS-t adtam, valamint 50 µL TCO-lizin törzsoldatot, úgy, hogy az 50 µL TCO-lizin törzsoldat közvetlenül az injektálás előtt került bele.

A méréseket 0, 10, 30, 60, 120, 240, 360 percenként végeztem, a mérések között 37 °C-on inkubáltam a festék oldatokat.

A mérés során az első egy percben a mintaáram nem került az MS detektorba. A lineáris gradiens elúció (0 min. 0 % B; 1 min. 0 % B; 6,0 min. 100 % B; 8,5 min. 100 % B; 9,0 min. 0 % B; 10,0 min. 0 % B) az *A* eluenssel (0,1 % HCOOH, 5 % ACN, 94,9 % víz) és a *B* eluenssel (0,1 % HCOOH, 94,9 % MeCN, 5 % víz) zajlott, 0,5 ml/min áramlási sebesség mellett, 30 °C-on.

Irodalomjegyzék

1. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2008/summary/>
2. Beatty, K. E. *Mol. BioSyst.* **2011**, 7, 2360-2367.
3. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2014/summary/>
4. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2022/press-release/>
5. Sletten, E. M., & Bertozzi, C. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, 48, 6974-6998.
6. Blackman, M. L., Royzen, M., & Fox, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 13518-13519.
7. Oliveira, B.; Guo, Z.; Bernardes, G.J.L. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46, 4895–4950.
8. Versteegen, R. M., Rossin, R., ten Hoeve, W., Janssen, H. M. & Robillard, M. S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 14112–14116.
9. Ji, X., Pan, Z., Yu, B., De La Cruz, L. K., Zheng, Y., Ke, B. & Wang, B., *Chem. Soc. Rev.*, **2019**, 48, 1077–1094.
10. Wang, J., Wang, X., Fan, X. & Chen, P. R., *ACS Cent. Sci.* **2021**, 7, 6, 929–943.
11. Ji, X., Pan, Z., Yu, B., De La Cruz, L. K., Zheng, Y., Ke, B., & Wang, B. *Chem. Soc. Rev.*, **2019**, 48 1077-1094.
12. Wang, J., Wang, X., Fan, X., & Chen, P. R. *ACS Cent. Sci.* **2021**, 7, 929-943.
13. Zhang, X., Xu, H., Li, J., Su, D., Mao, W., Shen, G., Li, L. & Wu, H., *Chem. Commun.*, **2021**, 58, 573-576
14. Wang, Y., Shen, G., Li, J., Mao, W., Sun, H., Feng, P., & Wu, H. *Org. Lett.* **2022**, 24, 5293-5297.
15. van Onzen, A. H., Versteegen, R. M., Hoebe, F. J., Pilot, I. A., Rossin, R., Zhu, T. & Robillard, M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142, 10955-10963.
16. Herner, A., Nikić, I., Kállay, M., Lemke, E. A., & Kele, P. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 3297-3306.
17. Cserép, G. B., Herner, A., & Kele, P. *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, 3, 042001.
18. Grimm, J. B., Heckman, L. M., & Lavis, L. D. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2013**, 113, 1-34.
19. Németh, E., Knorr, G., Németh, K., & Kele, P. *Biomolecules* **2020**, 10, 397.
20. Linden, G., Zhang, L., Pieck, F., Linne, U., Kosenkov, D., Tonner, R., & Vázquez, O. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, 58, 12868-12873.
21. Li, Y., Song, H., Xue, C., Fang, Z., Xiong, L., & Xie, H. *Chem. Sci.* **2020**, 11, 5889-5894.

22. Gnaim, S., & Shabat, D. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2970-2984.
23. Song, H., Li, Y., Chen, Y., Xue, C., & Xie, *Chem. - Eur. J.* **2019**, *25*, 13994-14002.
24. Ito, H., Kawamata, Y., Kamiya, M., Tsuda-Sakurai, K., Tanaka, S., Ueno, T., Komatsu, T., Hanaoka, K., Okabe, S., Miura, M., & Urano, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 15702–15706
25. Obara, R., Kamiya, M., Tanaka, Y., Abe, A., Kojima, R., Kawaguchi, T., Sugawara, M., Takahashi, A., Noda, T., & Urano, Y. *Angew. Chem.* **2020**, *133*, 2153–2157.
26. Kwan, D. H., Chen, H., Ratananikom, K., Hancock, S. M., Watanabe, Y., Kongsaree, P. T., Samuels, A. L., & Withers, S. G. *Angew. Chem* **2010**, *123*, 314–317.
27. Kormos, A., Koehler, C., Fodor, E. A., Rutkai, Z. R., Martin, M. E., Mező, G., Lemke, E. A., & Kele, P. *Chem. - Eur. J.* **2018**, *24*, 8841–8847.
28. Demeter, O., Fodor, E. A., Kállay, M., Mező, G., Németh, K., Szabó, P. T., & Kele, P. *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22*, 6382-6388.
29. Li, J. Z., Leng, T. H., Wang, Z. Q., Zhou, L., Gong, X. Q., Shen, Y. J., & Wang, C. Y. *J. Photochem. Photobiol., A* **2019**, *373*, 146-153.
30. Stubbing, L. A., Li, F. F., Furkert, D. P., Caprio, V. E., & Brimble, M. A. *Tetrahedron*, **2012**, *68*, 6948-6956.
31. Wen, S. S., Wang, J., Luo, Y. M., & Yang, H. *Tetrahedron*, **2014**, *70*, 9314-9320.
32. Huang, J., Jiang, Y., Li, J., Huang, J., & Pu, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2021**, *60*, 3999-4003.
33. Chang, M., Yan, C., Shi, L., Li, D., Fu, W., & Guo, Z. *Chin. Chem. Lett.* **2022**, *33*, 762-766.
34. Zeynizadeh, B., & Behyar, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2005**, *78*, 307-315.
35. Vendeville, J. B., Matters, R. F., Chen, A., Light, M. E., Tizzard, G. J., Chai, C. L., & Harrowven, D. C. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 4837-4840.
36. Gisch, N., Balzarini, J., & Meier, C. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1658-1667.
37. Wang, C., Hong, H., Chen, M., Ding, Z., Rui, Y., Qi, J., ... & Liu, Z. *Angew. Chem.* **2021**, *133*, 19903-19911.
38. Qi, Y., Huang, Y., Li, B., Zeng, F., & Wu, S. *Anal. chem.* **2018**, *90*, 1014-1020.
39. Kleemann, H. W., Heitsch, H., Henning, R., Kramer, W., Kocher, W., Lerch, U., Linz, W., Nickel, W. U., & Ruppert, D. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 559–567.
40. Pal, S., Mukherjee, M., Sen, B., Mandal, S. K., Lohar, S., Chattopadhyay, P., & Dhara, K. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 4410-4413.