



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Hipoxia aktivált fényérzékeny védőcsoportok tervezése és szintézise

Országos Tudományos Diákköri Dolgozat

Szerző:

Szeip Judit

IV. évf., Vegyészmérnök BSc

Témavezetők:

Dr. Cserép Balázs Gergely

Tudományos munkatárs, HUN-REN TTK, SZKI

Dr. Kele Péter

Tudományos főmunkatárs, HUN-REN TTK, SZKI

Konzulensek:

Dr. Németh Krisztina

Tudományos főmunkatárs, HUN-REN TTK, SZKI

Dr. Bell Evelin

adjunktus, BME Szerves Kémia és Technológia Tanszék

HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont

Szerves Kémiai Intézet, Kémiai Biológia Kutatócsoport

Budapest, 2025

Lezárva: 2024. 05. 26.

Tartalomjegyzék

1. Rövidítés jegyzék.....	2
2. Bevezetés	4
3. Irodalmi áttekintés	5
3.1. Célzott hatóanyagleadás	5
3.2. Fényérzékeny védőcsoportok	6
3.3. Tumorszövetek sajátosságai – a hipoxia	8
3.5. Redukció aktiválta fluorogén vegyületek	12
3.5.1. N-oxid típusú fluorogén vegyületek	12
3.5.2. Nitrocsoport redukcióján alapuló fluorogén vegyületek	15
3.6. Hipoxia aktivált kumarin fotolabilis védőcsoportok	16
4. Célkitűzés.....	18
5. Saját eredmények	20
5.1. Kumarin N-oxid védőcsoporttal ellátott modellvegyület	20
5.2. NTR enzimre specifikus fluorogén jelzővegyület	22
5.3. Kumarin N-oxid védőcsoporttal ellátott fluorogén modellvegyület.....	25
5.4. Nitrobenzilcsoporttal deaktivált (NTR specifikus) kumarin védőcsoport.....	30
6. Kísérleti rész	35
6.1. Általános	35
6.2. Kumarin N-oxid védőcsoporttal ellátott modellvegyület szintézise.....	36
6.3. NTR enzimre specifikus fluorogén jelzővegyület szintézise	39
6.4. Kumarin N-oxid védőcsoporttal ellátott fluorogén modellvegyület szintézise	41
6.5. Nitrobenzilcsoporttal deaktivált (NTR specifikus) kumarin védőcsoport szintézise	46
7. Összefoglalás	53
8. Köszönetnyilvánítás	54
9. Irodalomjegyzék	55

1. Rövidítés jegyzék

abs:	abszolútizált (vízmentes)
AQ4N:	[1,4-bis{[2-(dimetilamino- <i>N</i> -oxid)etil]amino}-5,8-dihidroxianthracén-9,10-dion]
Boc ₂ O:	di- <i>terc</i> -butil-dikarbonát
BODIPY:	boron dipirometán
CDI:	1,1'-karbonildiimidazol
CYP:	citokróm P-450
DCC:	<i>N,N'</i> -diciklohexilkarbodiimid
DCM:	diklórmétán
DMAP:	4-dimetilaminopiridin
DMF:	dimetilformamid
DMF-DMA:	<i>N,N'</i> -dimetilformamid dimetil acetál
DNS:	dezoxiribonukleinsav
DSC:	<i>N,N'</i> -diszukcinimidil karbonát
DTT:	ditiotreitol, 1,4-bisz-(szulfanil)-bután-2,3-diol
EDIPA:	<i>N</i> -etil-diizopropilamin
GSH:	glutathion
HAP:	hipoxia aktivált prodrugok
HEK-293T:	normál humán embrionális vesesejtek
HIF-1:	hipoxia indukált faktor (hypoxia inducible factor)
HPLC:	nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LC-MS:	folyadékkromatográfia tömegspektrometriával (<i>liquid chromatography–mass spectrometry</i>)

LG:	ligandum, távozó csoport (<i>leaving group</i>)
<i>m</i> -CPBA:	<i>meta</i> -klór-perbenzoesav
MTT:	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólium bromid
NADH:	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH:	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NTR:	nitroreduktáz enzim
PBS:	foszfáttal pufferelt sóoldat
PC:	<i>photocage</i>
PET:	fotoindukált elektrontranszfer folyamat
PPG:	<i>photolabile protecting group</i>
PR-104:	[3,5-dinitrobenzamid-2-mustard]
TBAF:	tetra- <i>N</i> -butilammónium-fluorid
TBDMS-Cl:	<i>terc</i> -butil-dimetil-szilil-klorid
TEA:	trietylamin
TFA:	trifluorecetsav
THF:	tetrahidrofurán
Tirapazamin:	[3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid]
UV:	ultraibolya sugárzás

2. Bevezetés

A rákos betegségek gyógyítása napainkban is aktívan kutatott terület, és folyamatosan jelennek meg az irodalomban új módszerek [1]. Ezek egy nagy csoportját teszik ki a célzott hatóanyagleadó rendszerek útján megvalósított gyógymódok [2]. Ezen módszerek célja, hogy eljuttathassuk a hatóanyagokat közvetlenül a rákos sejtekhez a szervezetben, kontrollálva a hatóanyag felszívódásának helyét és idejét, miközben minél kevesebb mellékhatás jelentkezik.

Léteznek már olyan hatóanyagok, amik a tumorsejtek és azok közvetlen környezetének a normálistól eltérő tulajdonságait kihasználva aktiválódnak. Ilyen tulajdonság lehet például az intracelluláris pH vagy a hipoxiás környezet. A hipoxiás környezet kihasználása kedvező lehetőséget nyújt, mivel egyértelmű kapcsolat áll fent a nitroreduktáz enzim túltermelése és a hipoxia mértéke között. Így az olyan prodrugok vagy akár hatóanyagleadó rendszerek, amik hipoxiás környezetben aktiválódnak a nitroreduktáz enzim specifikus reakciója során, nagyon effektívnek bizonyultak [3].

Egy másik megközelítése hatóanyagok deaktiválásának és későbbi célzott újra-aktiválásának, a fénnel eltávolítható csoportok alkalmazása. Ebben az esetben a fotolabilis védőcsoporttal ellátott konjugátum inaktív, a hatóanyag nem képes kifejteni tumorellenes hatását és ezzel párhuzamosan a negatív mellékhatásai sem jelentkeznek. Azonban a megfelelő hullámhosszú fénnel történő bevilágítás során a hatóanyag felszabadul, és újra citotoxikussá válik.

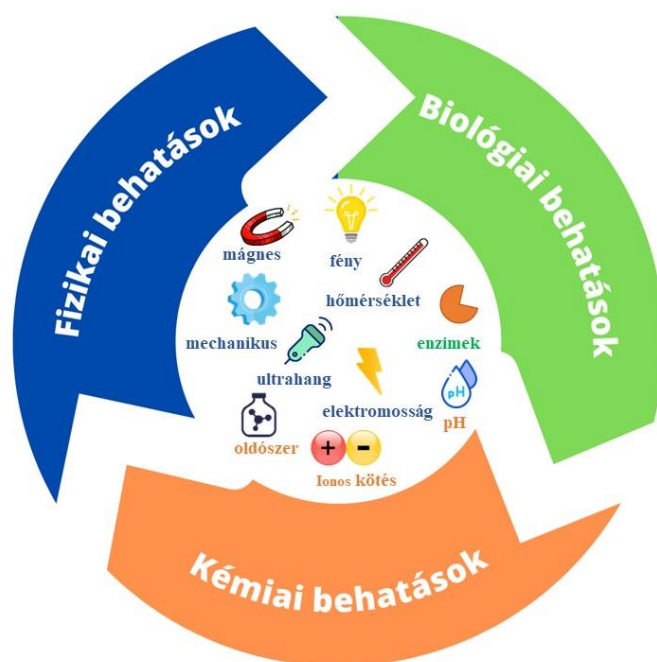
Kutatómunkám során e kettő módszer kombinálásával célokom olyan feltételeken fotoaktiválható vegyületek létrehozása, amik csak hipoxiás környezetben képesek aktiválódni, majd ez után tudnak reagálni a fénybesugárzásra és elengedni a hozzájuk kapcsolt hatóanyagot. Különböző modellvegyületeken keresztül igyekszem megtalálni a megfelelő hatóanyagleadó rendszert, melyekben a felszabadulás nyomon követésére fluorogén jelzővegyületeket tervezek felhasználni.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Célzott hatóanyagleadás

A rákos megbetegedések gyógyítása célzott hatóanyagleadó rendszerek útján aktívan kutatott terület [2]. A célzott hatóanyagleadás során a hatóanyag a kívánt helyre jut el és ott fejti ki a hatását akár elnyújtott intervallumon keresztül is. A technológia célja a terápiás index javítása, a gyógyszer hatékonyságának növelése és a mellékhatások megjelenésének csökkentése. Ehhez a vegyület valamilyen konjugátumként vagy hordozóhoz kötve kerül be a szervezetbe, majd a vérkeringésbe és eljut a test egy specifikus részére, a célzott területre. Itt a speciális kialakításának köszönhetően a hatóanyag felszabadul és effektíven hasznosul a kívánt helyen. Az így eljutatott molekulák helyileg, a probléma középpontjában tudják kifejteni a hatásukat [2].

Kemoterápia esetén két csoportba soroljuk a célzott hatóanyagleadást [4]. Létezik passzív megjelölés, ami a hatóanyag akkumulációján alapul a tumor környezetében. A molekula a vérkeringés útján jut el a kívánt helyig, ahol a hatóanyag kifejti hatását, de ez a módszer nem specifikus. Sok gyógyszer más szervekben is felhalmozódik, ami súlyos mellékhatásokkal járhat. Ezzel szemben az úgynevezett aktív megjelölés során valamilyen specifikus tulajdonság vagy a hatóanyag és a megcélzott sejt közötti reakció (általában ligandum-receptor kapcsolat) miatt a vegyület a rákos sejtekben dúsul. Ebben az esetben is a véráramon keresztül jut el a molekula a célzott területre, viszont a specifikus reakció miatt effektívebb a célzott hatóanyagbevitel. Ennek továbbfejlesztése az, amikor a hatóanyag kezdeti formában nem aktív, csak a célzott környezet (jelen esetben a rákos sejt) aktiválja a molekulát, például a lokálisan magas pH vagy bizonyos enzimek hatása. Másik típusa, amikor külső behatásra történik az aktiválás, például fény, hőmérséklet, mágneses tér, vagy ultrahang segítségével. (1. ábra)



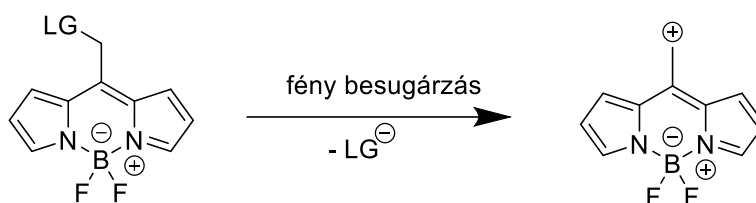
1. ábra: aktiválási lehetőségek [4]

3.2. Fényérzékeny védőcsoportok

A fénnel való aktiválás megvalósítható fényérzékeny védőcsoportok, vagyis fénnel szelektíven eltávolítható védőcsoportok alkalmazásával, melyeket az angol irodalomban *photocage*-nek (PC) vagy *photolabile protecting group*-nak (PPG) neveznek [5]. Ezek a vegyületek képesek effektíven inaktiválni a hatóanyagokat azok funkciós csoportjának blokkolásával. Hagyományosan UV fénnel távolíthatóak el, azonban a biológiai alkalmazhatóságuk érdekében a látható vagy a közeli infravörös fénnel minél hatékonyabban hasítható vegyületek fejlesztése intenzíven kutatott terület [6]. A fénnel történő aktiválás előnyös, mivel jó tér- és időbeli felbontóképességgel rendelkezik, könnyen áthatol a sejtmembránon, és gyorsan fel tudja szabadítani a PPG-hez kötött vegyületet. Fontos, hogy a molekulák az aktiválás előtt inerte legyenek, és csak a besugárzást követően engedjék el az általuk hordozott bioaktív hatóanyagot gyorsan és hatékonyan, illetve más toxikus melléktermék ne keletkezzen. További fontos tulajdonságaik a konjugátumoknak a jó oldhatóság, illetve a sötétben és fiziológias környezetben való stabilitás.

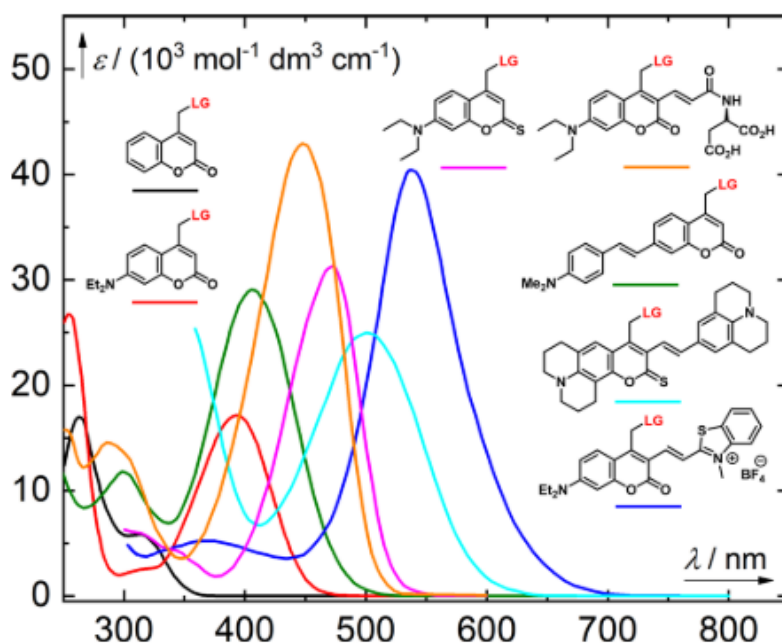
Az irodalomban sokféle, változatos szerkezetű fotolabilis védőcsoport létezik, többek között az *orto*-nitrobenzil, cianin típusú vagy boront tartalmazó, illetve kumarin- és xanténium-vázis vegyületek. [7] Az egyik legelterjedtebben használt a boron dipirometán, azaz BODIPY

(2. ábra), mely még jelenleg is aktívan fejlesztett *photocage* [8,9]. Jó tulajdonságai közé tartozik viszonylag egyszerű szintézise és a nagy hatékonysággal, zöld fénnel való hasíthatósága, melynek kihasználására az irodalomban már sokféle ligandumhoz (LG) kapcsolták. Hátránya azonban a rossz vízdékonysága, így fiziológiai körülmények közötti használhatósága korlátozott.



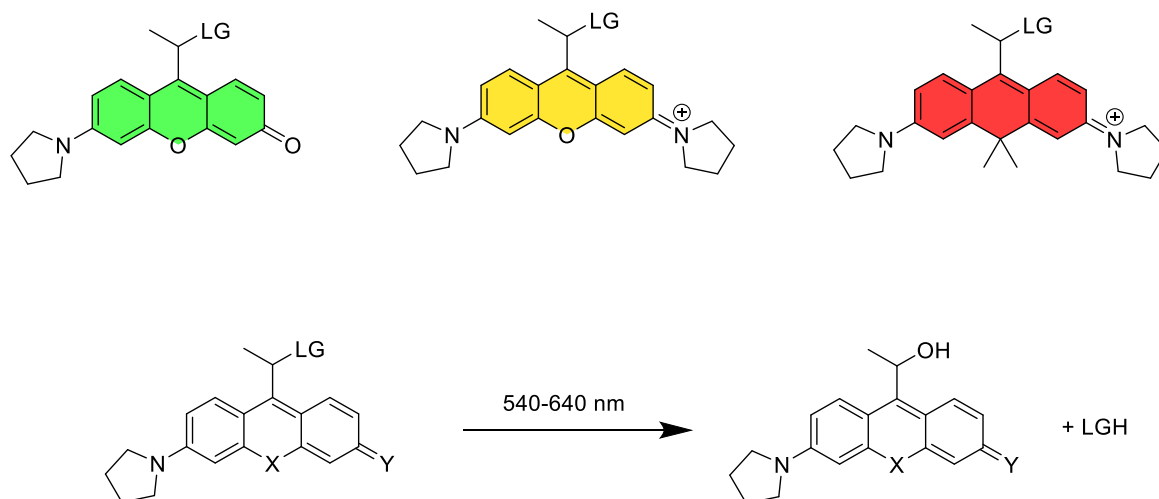
2. ábra: BODIPY PPG működése [9]

Kutatásom szempontjából a kumarin-vázzal rendelkező fotoaktiválható védőcsoportok bírnak különös fontossággal. Előnyük a nagy moláris abszorpciós koefficiens és a viszonylag magas kvantumhasznosítási tényező (így fénnel való besugárzás hatására effektíven engedik el a hozzájuk kapcsolt molekulát), illetve szintetikus szempontból a könnyű funkcionizálhatóság [5]. Bár az alapváz még csak UV fénnel hasítható, azonban 3-as vagy 7-es pozícióban módosítva ez a látható fény tartományába vihető (3. ábra). A biológiai alkalmazásokban legelterjedtebben a 7-dietilaminokumarin-származékokat használják, melyek kék fényre érzékenyek.



3. ábra: kumarin-vázas PPG-k [5]

A fotolabilis védőcsoportok terén az egyik legújabb fejlesztést a kutatócsoportunk által nemrégiben publikált xanténium-vázás PPG-k jelentik (4. ábra) [6]. Előnyük, hogy vízoldhatók, kis molekulatömegűek és abszorpciójuk a látható tartományba esik, zöld, narancssárga és vörös (550-640 nm) fénnel hasíthatók, szerkezetüktől függően. Többféle ligandummal (LG) is szintetizálhatók, ami több installációs lehetőséget biztosít. Ezek a ligandumok megfelelő hatékonysággal lehasíthatók fény besugárzás hatására, és a konjugációt biztosító kötés típusától függően karbonsavak, fenolok, és aminok felszabadulását eredményezi.



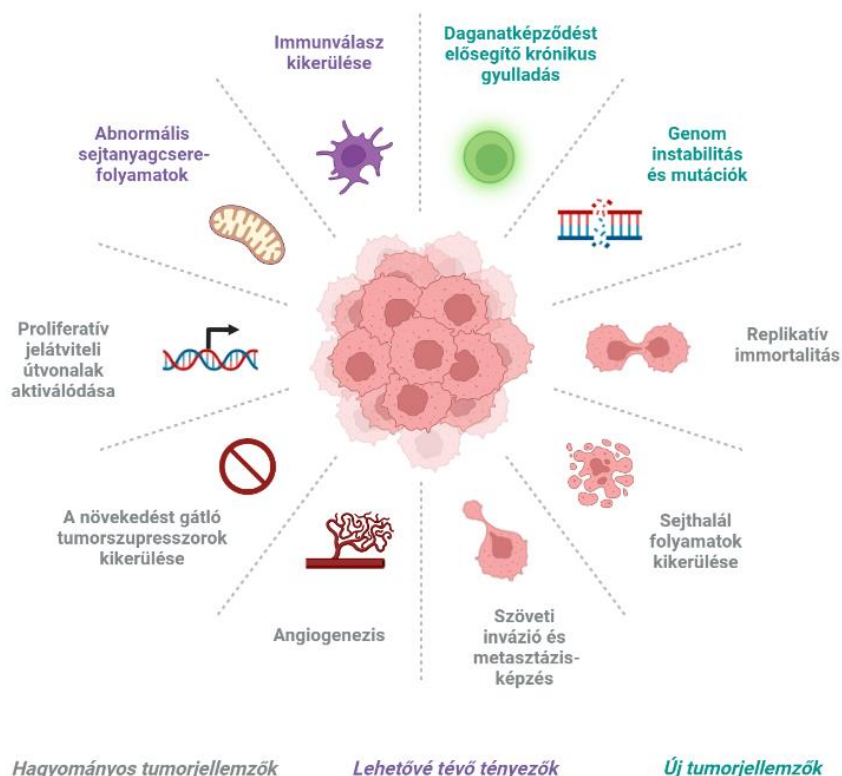
4. ábra: xanténium-vázás PPG-k [6]

3.3. Tumorszövetek sajátosságai – a hipoxia

A rákos megbetegedések a génállomány megváltozásán alapulnak. A sejtek mutálódnak, ami következtében onkogének és tumor szupresszorok keletkeznek. Ezek az elváltozott sejtek főként hat meghatározó tulajdonságban különböznek az egészséges sejtektől [10]. Ezek a változások a sejthalál folyamatok kikerülését, a proliferatív jelátviteli utak aktiválódását, a replikatív immortalitást, a növekedést gátló szupresszorok inaktivációját, a fokozott angienezist, illetve az invázióra és metasztázis-képzésre való képességet jelentik (5. ábra).

Az előrehaladott, rosszindulatú szolid daganatok egy fontos jellemzője a hipoxia [11]. Hipoxiás, azaz oxigénszegény körülmény alakul ki a legtöbb rákos szövet belsejében az oxigén-ellátás felborulása miatt. A hipoxia egyrészt a legfőbb oka, amiért a konvencionális sugárterápia és kemoterápia sok esetben eredménytelen a rákkal szembeni küzdelemben, másrészt mértéke jól jelzi a tumor előrehaladottságát. Mindezek miatt a hipoxiás körülmények között is hatékony, vagy éppen ennek hatására aktiválódó hatóanyagok kutatása jelenleg is aktív terület.

A tumorok jellemző tulajdonságai



5. ábra: tumorszövetek jellemző tulajdonságai [12]

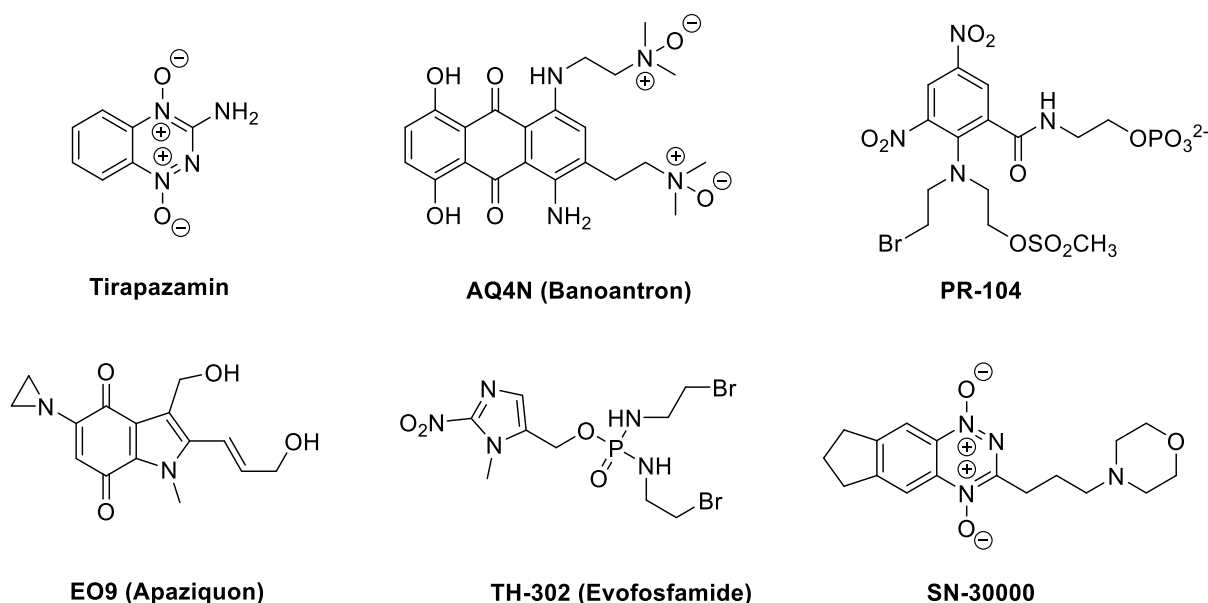
A hipoxiás állapot következménye olyan géntranszkripció indukálódása, amely normoxiás körülmények között nem jelenlévő fehérjék megjelenését vagy feldúsulását okozza. Ezt a folyamatot a hipoxia indukált faktor (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) transzkripciós faktor mediálja. Ennek a fehérjének nagy szerepe van a glükóz metabolizmusában, a véredényképzésben, a programozott sejthalálban, a tumor áttéteknél és a terápiás rezisztencia kialakulásában is. Hipoxiás körülmények esetében a HIF-1 hatására a sejtekben az oxidatív foszforiláció anaerob glikolízisre cserélődik, aktiválva a glükóz transzportereket és a glikolitikus enzimeket [11].

Hipoxiás körülmények között a tumorsejtek egy része elpusztul, de egy részük alkalmazkodik az oxigénhiányos állapothoz. Ezáltal egy még agresszívabb és ellenállóbb fenotípusa jön létre a tumornak. A hipoxia, pontosabban a HIF faktor képes leállítani bizonyos sejtciklusok működését, ezért a hipoxiás tumorsejtek szaporodási rátája kicsi. Ez eredményezi, hogy a sugár- és kemoterápia hatékonysága lecsökken, mivel azok csak szaporodásra képes sejtekre hatásosak. Pontosan ezért jelentős probléma a hipoxiás sejtek kezelése, mivel 2-3-szor

kevésbé érzékenyek a sugár- és kemoterápiára. Emellett az oxigénhiányos állapot hatására feldúsulnak az intracelluláris reduktáz enzimek, például megnő a nitroreduktáz enzim (NTR), a diaforáz enzimek és az azoreduktázok mennyisége [3]. Kutatásom szempontjából az NTR enzim a legjelentősebb, mely a flavint tartalmazó enzimek családjába tartozik és az aromás nitrovegyületek aminosavakká való átalakítást végzi NADH és NADPH felhasználásával. Ezeknek az enzimeknek normális állapotban a toxikus, nitrogént tartalmazó szerves vegyületek lebontásában van nagy szerepük. Ugyanakkor a reduktáz enzimek a hipoxiás rákos sejtekben az alternatív oxigénforrás biztosításáért is felelnek.

3.4. Hipoxia aktivált prodrugok

A hipoxia aktivált prodrugok (HAP) olyan bioreduktív hatóanyagok, amelyek szelektíven csak hipoxiás környezetben aktiválódnak, így jól tudják célba venni a szilárd tumorsejtek oxigénszegény régióit [12]. Speciális redukálószer, enzimek hatására redukálódnak és ennek következtében citotoxikus ágensekké alakulnak. Sokféle szerkezetű HAP létezik az irodalomban, beszélhetünk kinonvázis vegyületekről, aromás nitrovegyületekről, és léteznek *N*-oxid típusú molekulák is (6. ábra). Ideális esetben a bioreduktív molekuláknak nincsenek káros mellékhatásai az egészséges sejtekre. Továbbá közös bennük, hogy enzimatis redukció útján aktiválódnak, és aktív formában fejtik ki citotoxikus hatásukat a hipoxiás környezetben található tumor sejteken. A következőkben ezek néhány képviselőjét mutatom be.



6. ábra: hipoxia aktivált prodrugok [12]

Tirapazamin [12]

Az első hipoxia aktivált prodrug. Egy-elektron redukció során oxidatív gyök képződik a molekulából, ami bediffundál a hipoxiás régiókba és oxidatív károsodást okoz a tumor szövetekben. A gyökképződéses folyamatot a citokróm P-450 (CYP) reduktáz enzim katalizálja, hatásmechanizmusát tekintve pedig a DNS kettős szálának törését eredményezi. Továbbá jelentősegteljes változásokat okoz az energia metabolizmusban és hatással van az intracellurális pH-ra a tumorsejtekben. Preklinikai kutatásokban megállapították, hogy effektíven képes megakadályozni a tumorkolóniák kialakulását *in vitro*. Ezen kívül sejtciklusok leállítását, apoptózist és a HIF-1 α szabályozását okozza. Klinikai vizsgálatok során azonban kedvezőtlen mellékhatások jelentkeztek, például izomösszehúzódások, hányinger, hányás.

AQ4N [12,13]

Az AQ4N egy alifás *N*-oxid típusú prodrug, nincsen lényeges DNS kötő tulajdonsága, így nem is toxikus. Hipoxiás körülmények között 2 elektron és oxigén vesztes során egy köztterméken keresztül az aktív formájává alakul (AQ4). A folyamatot szintén a CYP enzim katalizálja. A redukált változata viszont hatással van a DNS-re, stabilizálja annak kettőshélixét, ami jelentősen megnöveli a DNS olvadás pontját. Ennek oka, hogy míg az AQ4 alkilamin oldallánca fiziológiás körülmények között pozitív töltésű, így elektrosztatikus reakcióba lép a DNS foszfátjával, addig az AQ4N-ben található *N*-oxid viszont negatív töltésű, így ez a reakció nem tud lejátszódni. Emellett az AQ4N jó fizikai tulajdonságokkal is rendelkezik: ikerionos szerkezetének köszönhetően jó a vízzoldhatósága, ami elősegíti a feldolgozhatóságát, vizes oldata 4 °C-on pedig akár 28 napig is eláll. A klinikai kutatások következményeként kiderült, hogy sugárterápiával vagy kemoterápiával való kombinálása jelentős javulást okoz a hatékonyságában. A normál szövetekre nem volt káros hatással.

PR-104 [12]

Ez a vegyület különbözik az eddig tárgyaltaktól, mivel itt a maszkolt, toxicitásért felelős fő funkciós csoport a nitrocsoporth. Hipoxiás körülmények között redukció útján az egyik nitrocsoporth hidroxilaminná, majd aminná alakul. Ilyen formában képes a DNS szálak között keresztkötéseket kialakítani és a toxikus hatását szelektíven a tumorsejtekben kifejteni. A redukció anaerob körülmények között játszódik le és a NADPH-citokróm P450 reduktáz

katalizálja. Emellett a PR-104 egy jó vízdékonyságú vegyület, mely enzimreakció során a foszfátcsoportját elveszti. Így átalakul egy lipofilebb formába (PR-104A), mely már nem képes távozni a sejtekből. Ugyanakkor a redukzív átalakulást más enzim is katalizálhatja, és a PR-104 érzékenysége függ az oxidáltságtól, a reduktáz aktivitásától és a DNS önjavító képességétől. Mindezekkel együtt a klinikai vizsgálatok során azonban kevés hatékonyságot mutatott a tumorsejtekkel szemben, továbbá egyértelmű mellékhatásokat okozott. Ugyanakkor a leukémia kezelésében sikeresnek bizonyult a használata.

3.5. Redukció aktiválta fluorogén vegyületek

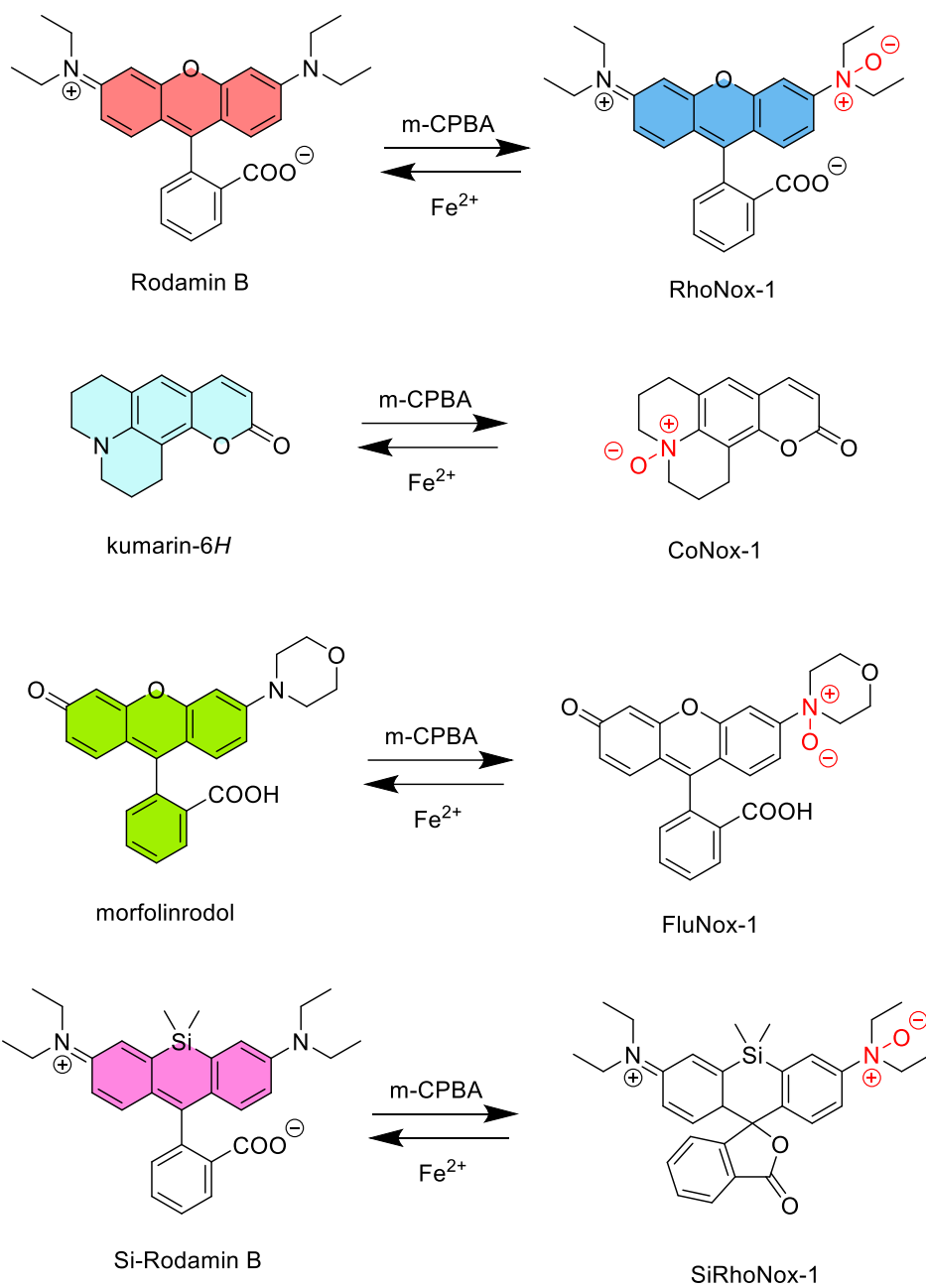
In vivo kísérletek esetén különösen előnyös úgynevezett fluorogén jelzővegyületek alkalmazása, mivel segítségével minimalizálható a háttérfluoreszcencia okozta zaj, így nagyban javítják fluoreszcens képalkotás minőségét. A fluorogén vegyületek eredetileg nem fluoreszcensek, de valamilyen reakció során azzá válnak. Az általam használni kívánt, redukció által aktivált fluorogén vegyületeket két csoportba sorolhatjuk: *N*-oxid kémián alapuló és az NTR enzim specifikus szubsztátján, a *p*-nitrobenzil egység redukcióján alapuló vegyületeket különböztethetünk meg.

3.5.1. *N*-oxid típusú fluorogén vegyületek

Ebbe a csoportba tartozó jelzővegyületek esetén *N*-oxid képzéssel „elrontjuk” egy fluoreszcens molekula emisszióját, vagyis detektálhatósági szempontból a molekulát inaktíváljuk [14,15]. A fluorogén jelleg abból következik, hogy a szervezetben ez az *N*-oxid származék képes redukálódni, ezáltal a vegyület visszanyeri a fluoreszcens jellegét és mikroszkóppal detektálhatóvá válik. Ezt a módszert alkalmazta Nagasawa és Hirayama a labilis Fe^{2+} ionok detektálására tumorsejtekben [14]. A vas rendkívül fontos szerepet játszik a szervezetben, részt vesz az oxigén ellátásban, az energiatermelésben. Az élő rendszerekben főleg fehérjékhez kötve található, de megtalálható úgynevezett labilis vasként is. A labilis vASFajták redox egyensúlyának szabályozása nagyon fontos, mivel a vas katalizálja a reaktív oxigén származékok keletkezését a sejtekben. Továbbá a kutatások során rájöttek, hogy a tumorsejtekben ez az egyensúly a Fe^{2+} ion felé van eltolva, így ennek a mérése megalapozottá vált.

RhoNox-1 [14] volt az első példa a Fe^{2+} ion detektálására, ahol *N*-oxid-típusú fluorogén vegyületet alkalmaztak. A módszer lényege, hogy az oxidáció miatt a nitrogén atomot izolálták a π -konjugált rendszertől azzal, hogy *N*-oxidot képeztek belőle, ezzel megszüntették a vegyület *push-pull* jellegét és egyben emisszióját is. Az inaktivált állapotban lévő vegyület Fe^{2+} ion hatására redukálódott és visszanyerték a fluoreszcens vegyületet. Ezzel sikerült megvalósítaniuk a Fe^{2+} szintjének mérését tumorsejtekben és analógiájára több hasonló fluorofórral is kipróbálták a technológiát: létrehoztak fluorogén kumarin (CoNox-1), morfolinorodol (FluNox-1) és Si-rodamin B (SiRhoNox-1) származékokat is, melyek sorban kék, zöld és mélyvörös elnyeléssel rendelkeztek (7. ábra). Közülük végül a SiRhoNox-1 bizonyult a leghatékonyabbnak, mivel hipoxiás körülmények között is képes volt a redox egyensúly eltolódásának kimutatására.

Az *N*-oxidok nem csak a Fe^{2+} inok jelenlétében képesek redukálódni, ugyanis H_2S hatására is vissza alakulnak fluoreszcens alakjukká. A H_2S a szervezetben fontos szerepet tölt be, így *in vitro* kísérletekben sóit szervesen redukálószerként is használják. Továbbá léteznek H_2S kimutatására használt fluorogén vegyületek, amik gyorsan és valós időben képesek detektálni a H_2S -t biológiai rendszerekben [16]. Ugyanis a fluorogén vegyület *N*-oxidja kevésbé vagy egyáltalán nem fluoreszcens, azonban a redukció során a vegyület visszanyeri erős fluoreszcenciáját, ezáltal jól detektálhatóvá válik.

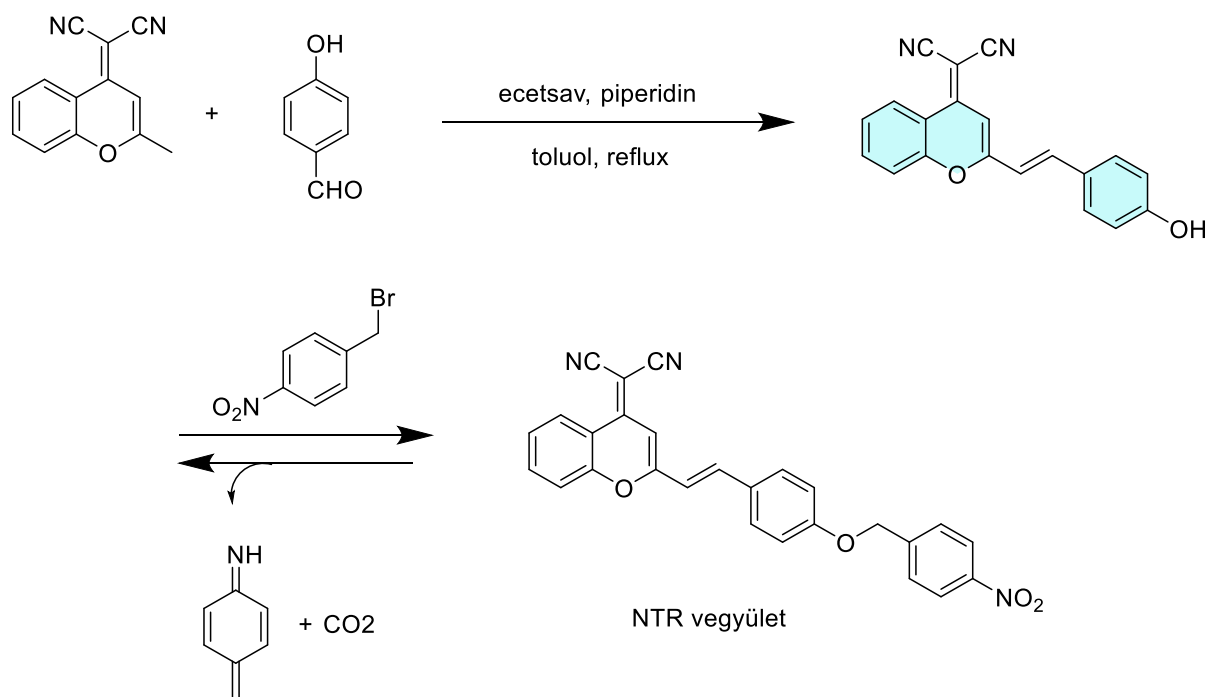


7. ábra: N-oxid típusú fluorogén vegyületek Fe^{2+} ion kimutatására [14]

3.5.2. Nitrocsoport redukcióján alapuló fluorogén vegyületek

Mivel a szolid tumorokban létrejövő hipoxiás körülmény összefügg a nitroreduktáz enzim túlexpressziójával, ezért olyan vegyületek tervezése, ami az NTR enzim hatására bekövetkező reakció útján tudja jelezni vagy mérni a hipoxia mértékét a tumorsejtekben igen célravezető [3].

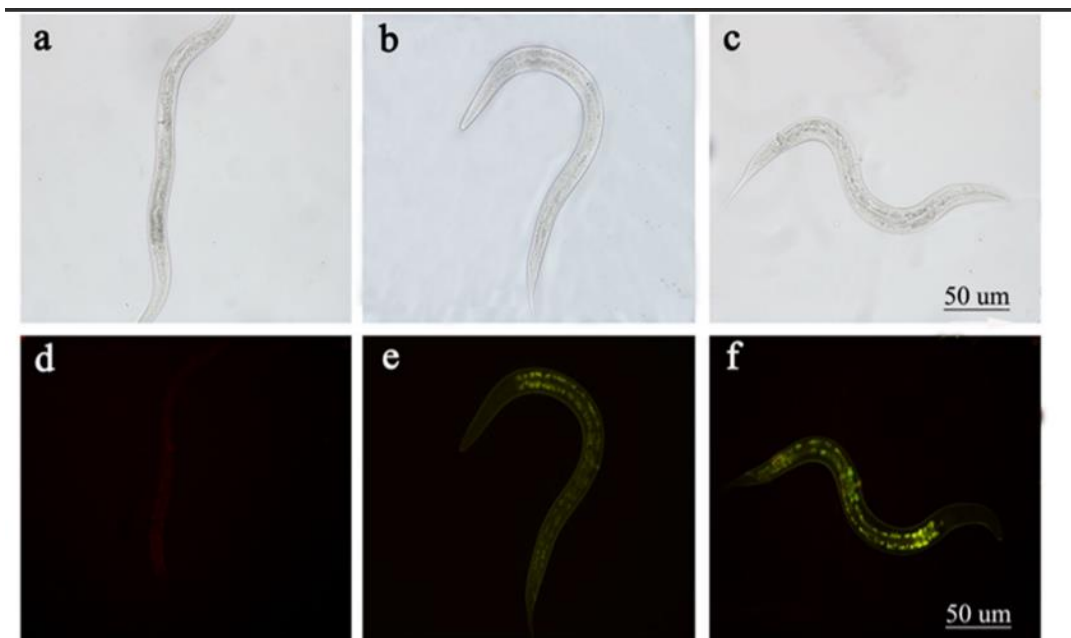
Jun Feng Zhang és munkatársai ilyen típusú fluorogén jelzővegyületet alkottak meg úgy, hogy egy ismert fluorofór hidroxilcsoportjához kapcsolták az NTR enzim szubsztrátját, a *p*-nitrobenzil csoportot. Mivel a választott fluorofór csak szabad OH-csoport esetében fluoreszcens, ezzel sikeresen letörték annak emisszióját. Az enzim specifikus reakcióban felismerte, és redukálta a nitrocsoportot, azonban a kialakuló amin nem stabil és egy azakinon-metid egység spontán lehasadt. Ezzel egyidejűleg visszakapták a szabad OH-csoportot és újra megjelent a vegyület fluoreszcenciája (8. ábra).



8. ábra: fluorogén NTR-aktiválta vegyület előállítása [3]

A molekulát vizsgálták *in vitro* körülmények között, 7,4-es pH értéken és 37 °C-on NTR jelenlétében és annak jelenléte nélkül DMSO/PBS pufferoldatban, illetve *in vivo* kísérleteket is végeztek élő *Caenorhabditis elegans* fonálférgeken. Bár az inaktivált forma is rendelkezett csekély emisszióval 660 nm környékén, az NTR enzim hatására bekövetkezett redukció során ez csak kis mértékben változott, míg a fluoreszcencia intenzitása jelentősen megnőtt 537 nm-

nél. Az *in vivo* kísérletek során megállapították, hogy a molekula jó érzékenységgel rendelkezik az NTR enzimre és toxikusnak sem bizonyult. A fonálféreg lárvák hozzáadott NTR és a NADH-nélkül nem mutattak semmilyen fluoreszcens jelet, azonban ezek hozzáadása után azonnal intenzív zöld fluoreszcens jel volt látható a bélrendszerénél (9. ábra).

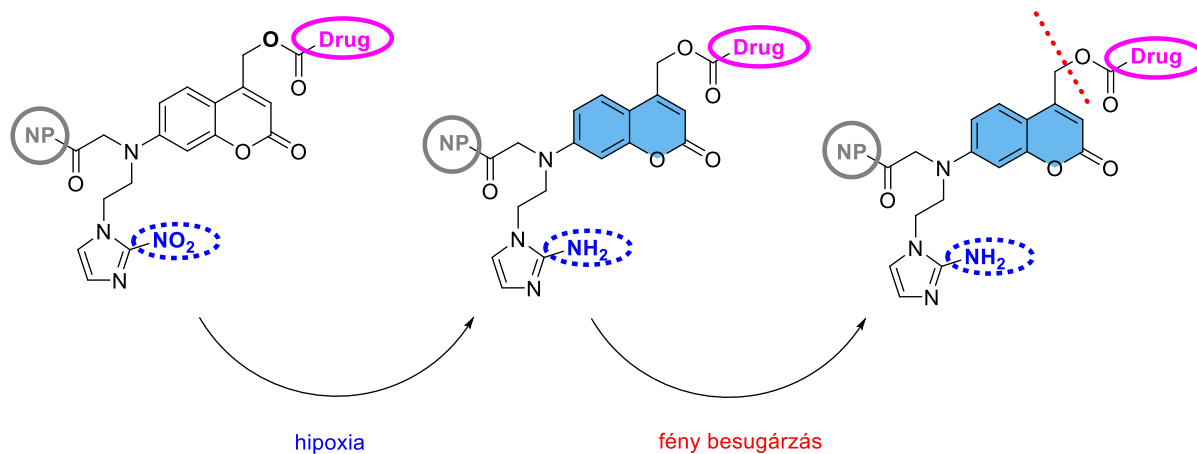


9. ábra: *in vivo* kísérletek fonálférgeken [3]

3.6. Hipoxia aktivált kumarin fotolabilis védőcsoportok

A célzott hatóanyagleadásnak egy kombinált módja, ha kihasználjuk a célzott terület tulajdonságait a hatóanyag felszabadításának kezdeti lépéseként, majd külső behatással aktiváljuk az inaktivált hatóanyagot. Ezzel a két lépésös rendszer létrehozásával a hatóanyagleadó rendszer még specifikusabbá tehető és javul a szelektivitása. Az irodalomban eddig egy ilyen, kumarin fotolabilis védőcsoportot alkalmazó rendszert írtak le, melyben a tumor sejtek hipoxiás körülményeit használják ki a hatóanyag felszabadításának elindításához, majd fénybesugárzás hatására aktiválják a bioaktív vegyületet [17]. Ehhez egy elektron-akceptor nitroimidazol egységet kapcsoltak egy rövid linkeren keresztül a fluorofórhoz (10. ábra). Az így kapott konjugátum nem volt toxikus a sejtekre és nem volt sem fluoreszcens, sem pedig fotoaktiválható, ugyanis a nitroimidazol egység fotoindukált elektrontranszfer (PET) folyamat révén biztosítja a gerjesztett molekula relaxációját. Azonban a tumorsejtekben a hipoxiás körülmény hatására a nitrocsoport aminocsoporttá alakult, így elvesztette ezt a

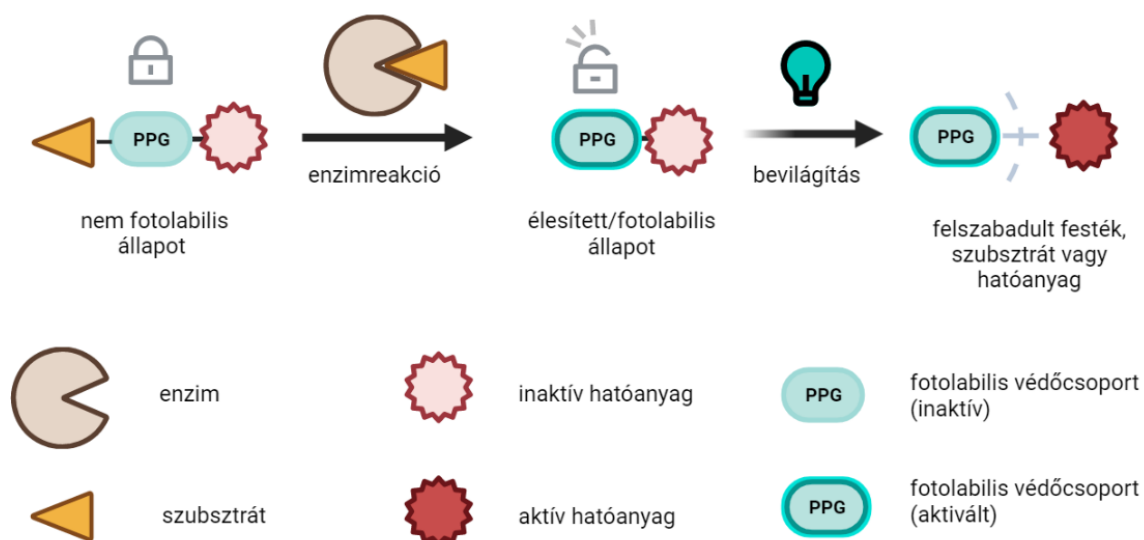
képességét és aktiválódott a kumarin. Így fénnel való besugárzás hatására már megtörtént a C–O kötéshasadás, aminek során a rákellenes vegyület (az ábrán „Drug”-ként jelölve) felszabadult.



10. ábra: kétlépcsős célzott hatóanyagleadás [17]

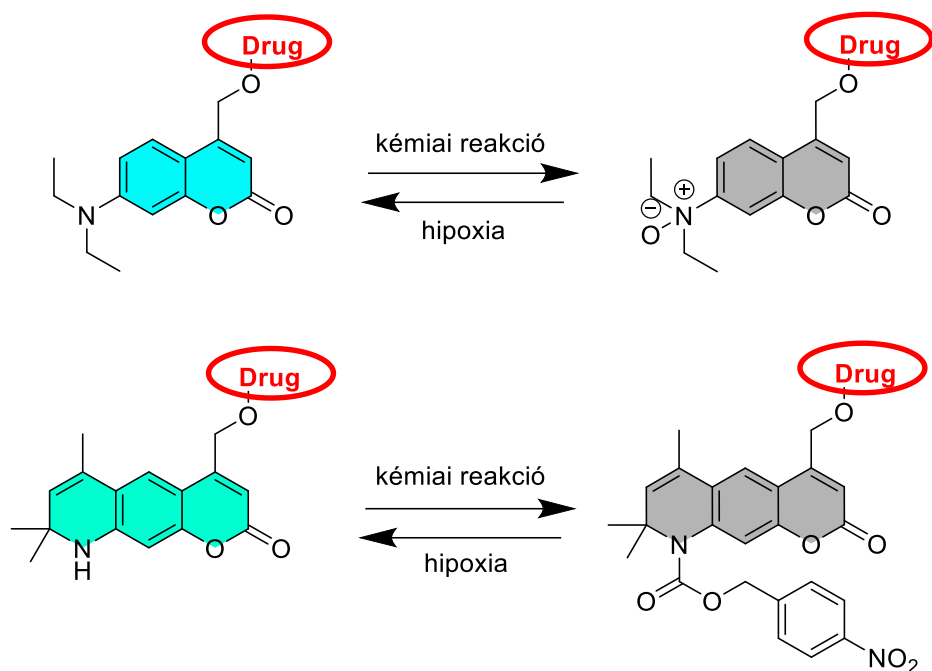
4. Célkitűzés

Kutatómunkám során olyan deaktivált fotolabilis védőcsoportok előállítása volt a célom, melyek csak hipoxiás (oxigénszegény) sejt környezetben alakulnak vissza aktív formájukba és válnak fénnel eltávolíthatóvá. Az ilyen rendszerek sematikus működését az 11. ábra szemlélteti.



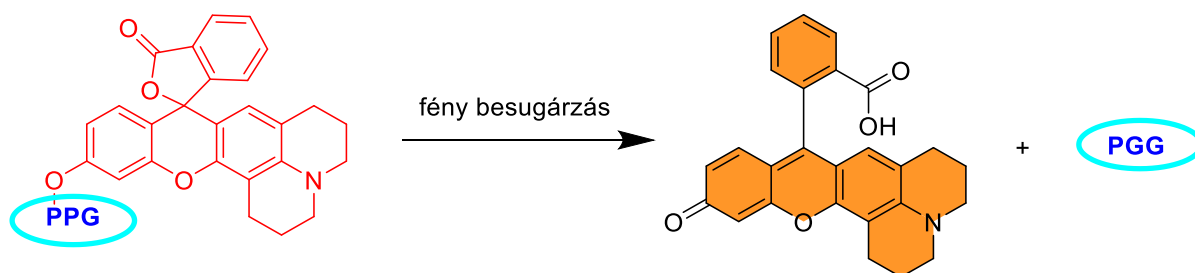
11. ábra: a feltételesen aktiválható hatóanyagleadó rendszerek működése [18]

A sejtek hipoxiás körülmények között nitroreduktáz (NTR) enzimet termelnek, melyek képesek aromás nitrovegyületek és *N*-oxidok redukálására. Az irodalomból ismert, hogy egyrészt a kumarin *N*-oxidok redukálószerekkel (pl. H_2S , NaHS) visszaalakíthatóak eredeti formájukba, és *N*-oxidként nem fluoreszcensek, így várhatóan fotolabilis jellegük is megszűnik. Másrészt a kumarinok 7-es pozíciójában lévő elektronküldő aminocsoport deaktiválható nitrobenzilcsoporttal is karbamát kötéson keresztül, mely az enzimes redukciót követően várhatóan azakinon-metid formájában spontán lehasad és így visszaáll a kumarin-váz fluoreszcens és fotolabilis tulajdonsága. Továbbá léteznek *N*-oxid típusú és nitrocsoporthoz tartozó redukcióján alapuló rákellenes vegyületek, melyek pont a tumor belső, hipoxiás sejtjeiben képesek redukció útján aktiválódni. Ezért a nitroreduktáz enzim reakciójára alapozva építettem fel a feltételesen fotoaktiválható kumarinváz molekuláimat (12. ábra)



12. ábra: a feltételesen fotoaktiválható kumarinvázás molekuláim működése

Az enzimreakciót követően az aktiválódott fotolabilis védőcsoportot bevilágítva a molekula szétesik a kumarinvázás védőcsoportra (PPG) és a szubsztrátra (12. ábrán „Drug-ként jelölve). Kísérleteim távolabbi céljaként többféle szubsztrát (rákellenes hatóanyag) kipróbálását terveztem, azonban a felszabadulás jó követhetősége érdekében elsőként egy rodol-típusú fluorogén jelzővegyületet használata volt a célom (13. ábra).

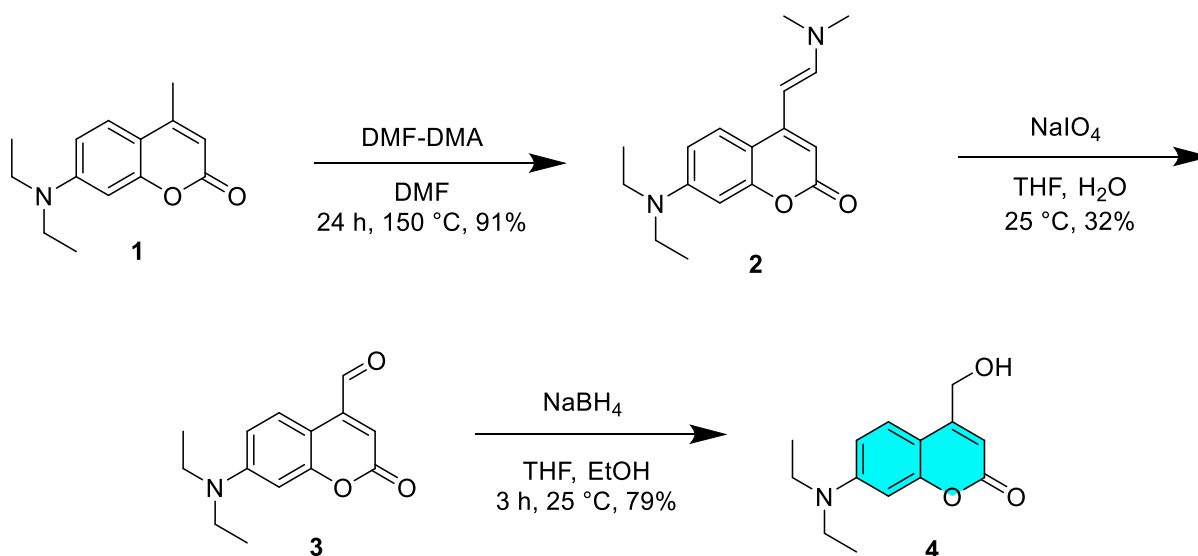


13. ábra: a rodol fluorogén jellege

5. Saját eredmények

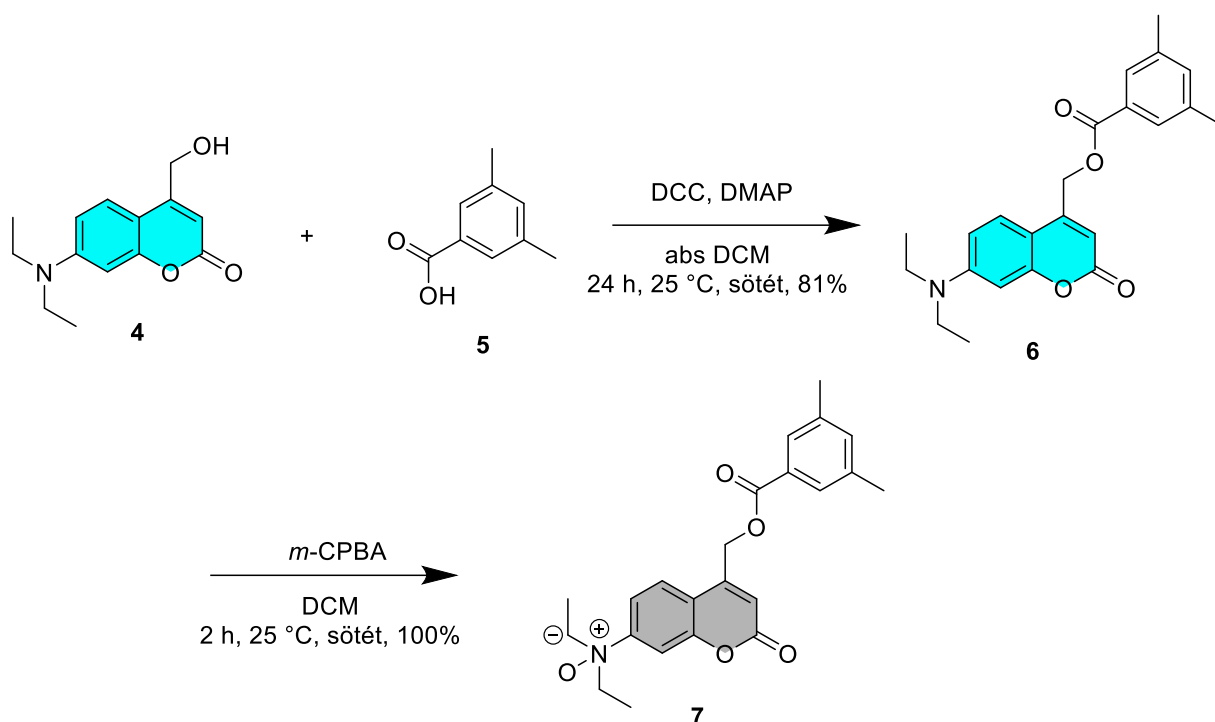
5.1. Kumarin *N*-oxid védőcsoporttal ellátott modellvegyület

Az első modellvegyületem esetében a 7-dietilamino-4-hidroximetilkumarin fotolabilis védőcsoport *N*-oxidként való deaktiválhatóságát, majd redukatív körülmények közötti újra aktiválhatóságát kívántam vizsgálni. Ehhez a szintézis során elsőként a kumarin váz 4-es helyzetében az irodalomban leírtak alapján [19] hidroximetilcsoportot alakítottam ki, több lépésen keresztül (14. ábra). Először a kereskedelmi forgalomban kapható 7-dietilamino-4-metilkumarint (**1**) DMF-DMA-lal reagáltattam, így kialakítva a **2** énamin származékot. Ebből nátrium perjodátos oxidációval aldehidet állítottam elő (**3**), végső lépésként pedig ezt az aldehidet nátrium-borohidriddel redukáltam a kívánt alkohollá. Az így megkapott molekula (**4**) fluoreszcens, kék fényt emittál, mely tulajdonságát a későbbiekben a detektálására is fel kívántam használni.



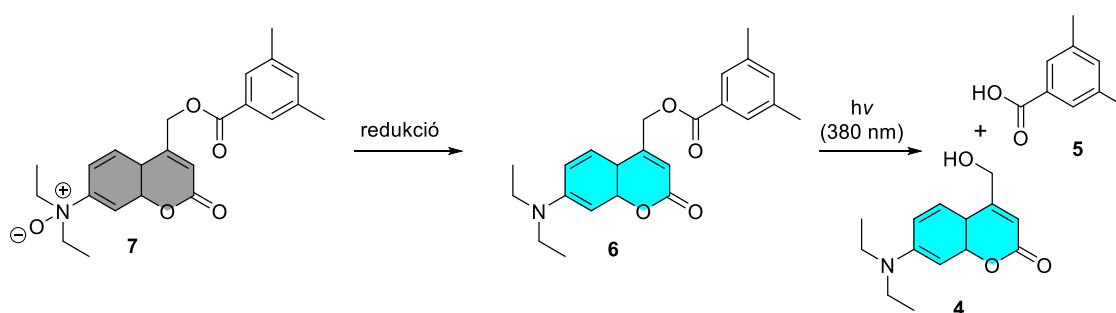
14. ábra: 7-dietilamino-4-hidroximetilkumarin (**4**) előállítása

A későbbi jelzővegyületek vagy gyógyszermolekulák helyettesítőjeként ehhez a kumarinvázhoz (**4**), mint védőcsoporthoz 3,5-dimetilbenzoesavat kapcsoltam DCC reagens és DMAP katalizátor jelenlétében. Ezt követően *N*-oxid funkciót (**7**) alakítottam ki a nitrogén atomon *m*-CPBA segítségével kvantitatív termeléssel (15. ábra).



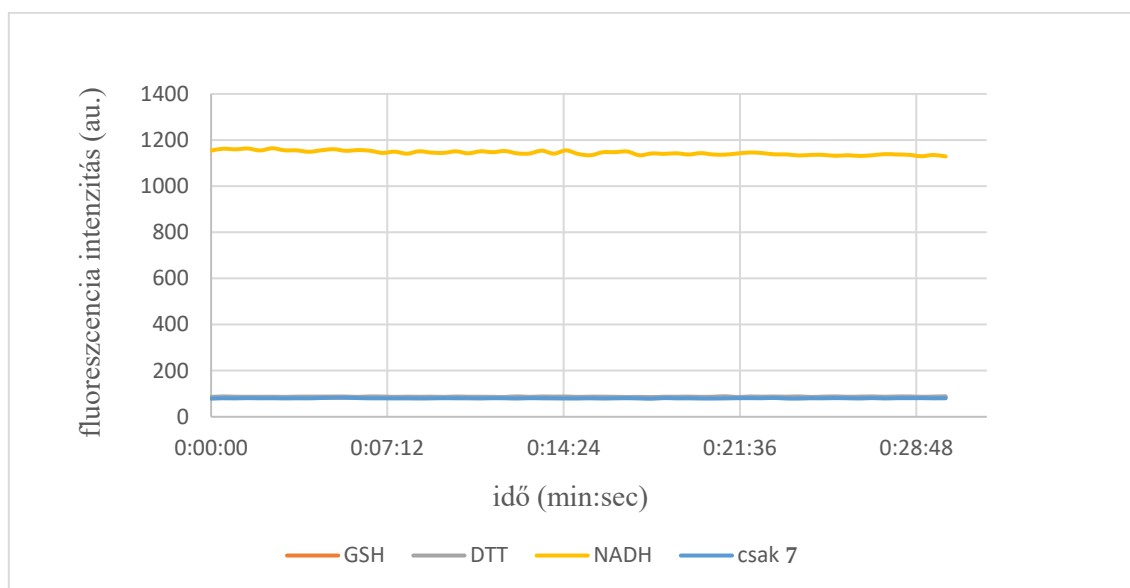
15. ábra: benzoészav kapcsolása **4**-hez és N-oxidá alakítása

Szemben a kiindulás vegyülettel az *N*-oxid származék (**7**) már nem fluoreszcens, ugyanis a nitrogén atom nemkötő elektronpárja már nem tud részt venni a konjugált rendszerben. Ez lehetőséget nyújt arra, hogy a redukció megtörténését és előrehaladását a fluoreszcencia intenzitásának mérésével kövessük. A **7** modellvegyületet *in vitro* fiziológiás körülmények között (PBS puffer, pH = 7,4) vizsgáltam, elsőként egy elterjedten használt enyhe szervesetlen redukálószer, az NaSH alkalmazásával. A reakció során a várakozásoknak megfelelően a deaktivált védőcsoport visszaalakult eredeti, fotolabilis formájába és kék fénnel (380 nm) besugározva lehasadt róla a benzoészav (16. ábra). A következő lépésben a sötétben való stabilitást, illetve a redukció nélküli bevilágítás melletti stabilitást vizsgáltam, és egyik esetben sem tapasztaltam bomlást vagy reakciót.



16. ábra: az *N*-oxid (**7**) modellvegyület redukciója és hasítása fénnel

Ezután a szerves, sejtes kísérletekben előforduló redukálószerrel szembeni stabilitást vizsgálta meg Dr. Németh Krisztina és Grád Anna, a csoport biológus tagjai. GSH és DTT esetében nem tapasztalták az *N*-oxid redukcióját, azonban NADH jelenlétében fluoreszcenciásan nem tudták követni a folyamatot, ugyanis annak intenzív emissziója zavarta az esetlegesen redukált, aktiválódott védőcsoport fluoreszcenciájának detektálását (17. ábra). Ez annak tekintetében, hogy az NTR enzim működéséhez NADH-ra van szükség, a későbbiekben nagyban megnehezítette volna a kísérleteket, így új modellvegyület tervezése és előállítása mellett döntöttünk.



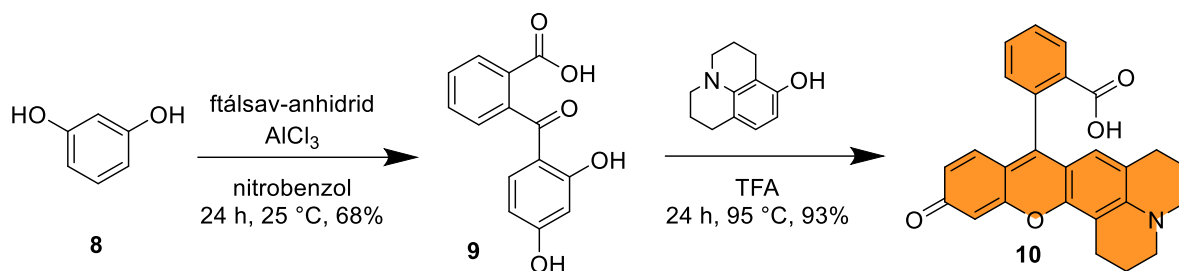
17. ábra: az *N*-oxid (7) modellvegyület stabilitása szerves redukálószerekkel szemben [20]

5.2. NTR enzimre specifikus fluorogén jelzővegyület

Mivel az első modellvegyület nem bizonyult megfelelőnek, így következő célom egy új, nitroreduktáz enzim által aktivált fluorogén, zöld fénnel gerjeszthető és narancssárga fénnel emittáló fluorogén jelzővegyület szintézise volt, melyen alapjául a kutatócsoportban már használt rodol [21] vegyület szolgált. Mivel ennek spektrális tulajdonságai nagyban eltérnek a NADH-étól, így felszabadulása várhatóan jól nyomon követhető lesz sejtes környezetben is. Az NTR enzim által való szelektív aktiválhatóságot pedig az irodalomban ismert nitrobenzil funkciós csoport felhasználásával kívántam megvalósítani [3].

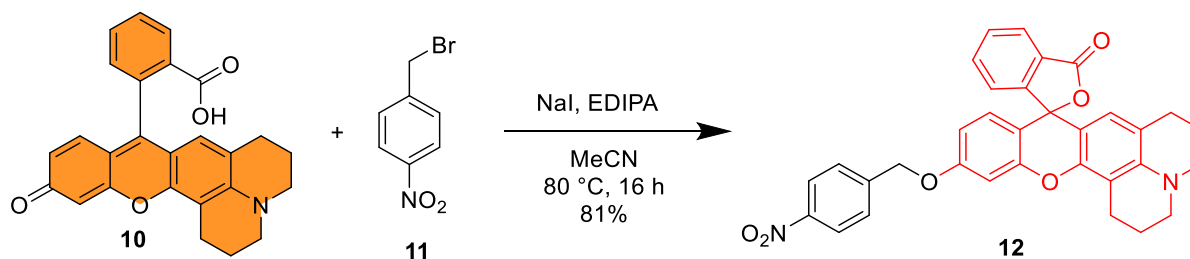
A rodol váz szintézisének a kiindulási alapanyagául a rezorcín (8) szolgált, amit ftálsavanhidrid és AlCl_3 segítségével a 9-es közti terméké alakítottam. Ezt trifluorecetsavban

8-hidroxi-jololidinnel reagáltatva nagyon jó termeléssel kaptam meg az intenzív piros színű festékmolekulát (**10**) (18. ábra).



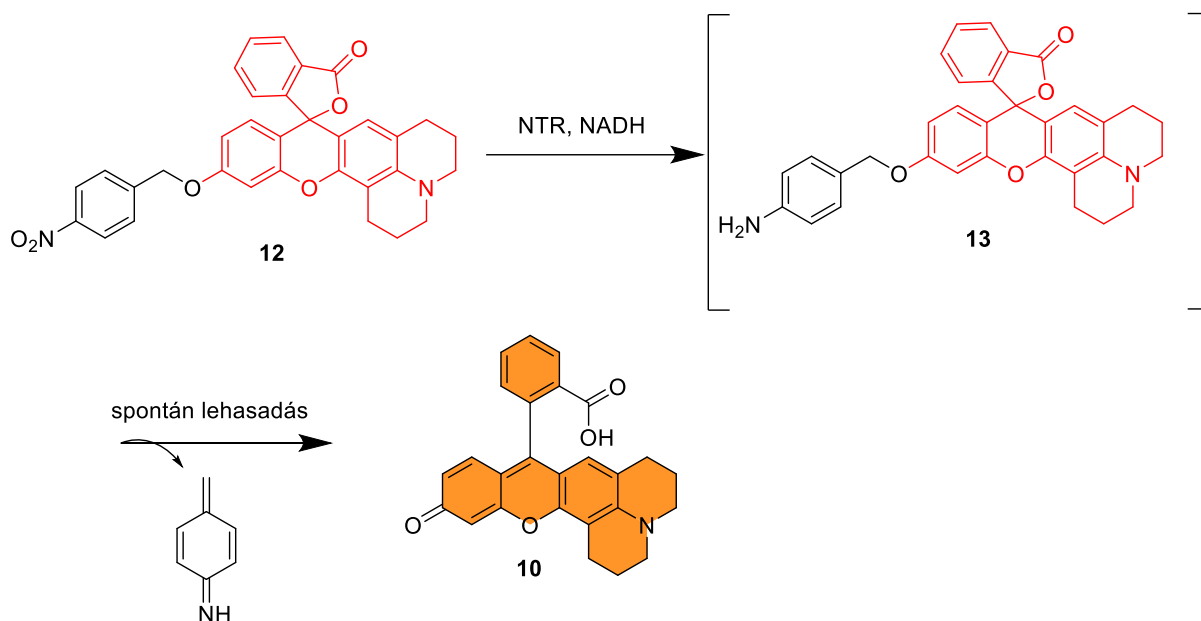
18.. ábra: a rodol jelzővegyület szintézise (**10**)

Először ehhez a fluorogén jelzővegyülethez az NTR specifikus szubsztrátját, a *p*-nitrobenzilcsoportot kapcsoltam. Ezt a reakciót nátrium-jodiddal végeztem EDIPA jelenlétében. A kapcsolás következtében a vegyület fluoreszcens jellege megszűnt (19. ábra).



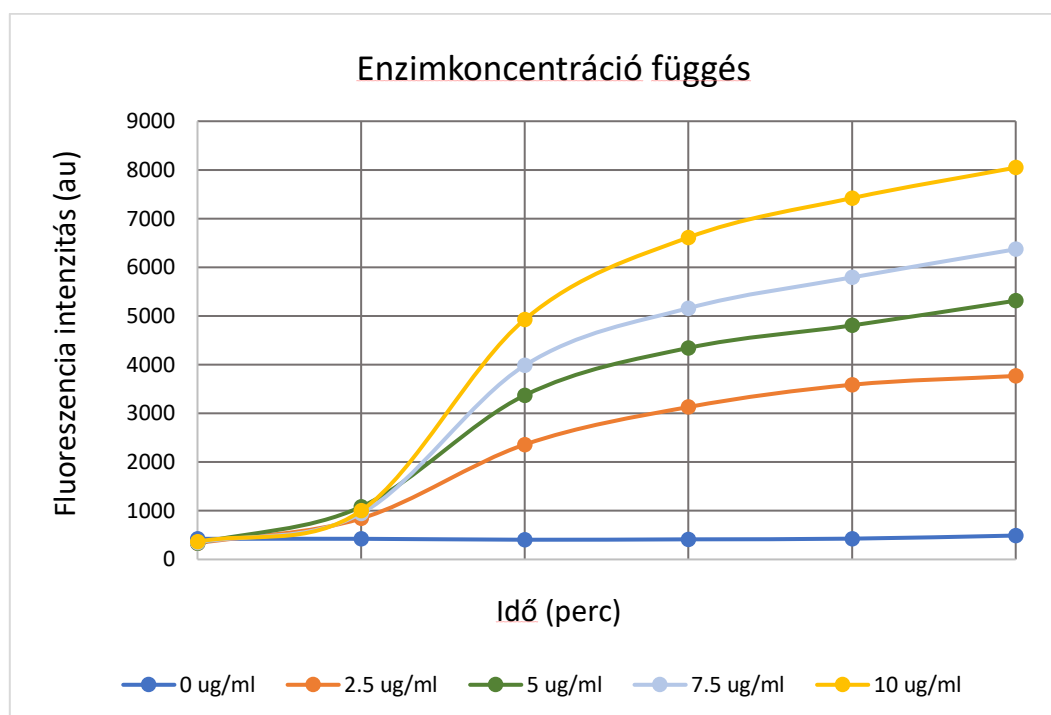
19. ábra: nitrobenzillel (**11**) módosított modellvegyület (**12**) előállítása

A sikeres szintézist a vegyület aktiválhatóságának vizsgálata követte, melynek folyamata az 20. ábrán látható: elsőként az enzim redukálja a nitrocsoportot, majd az aminocsoportot tartalmazó átmeneti termékről az azakinon-metid vegyület spontán lehasad, miközben felszabadul a fluoreszcens rodol.



20. ábra: **12** vizsgálata NTR jelenlétében

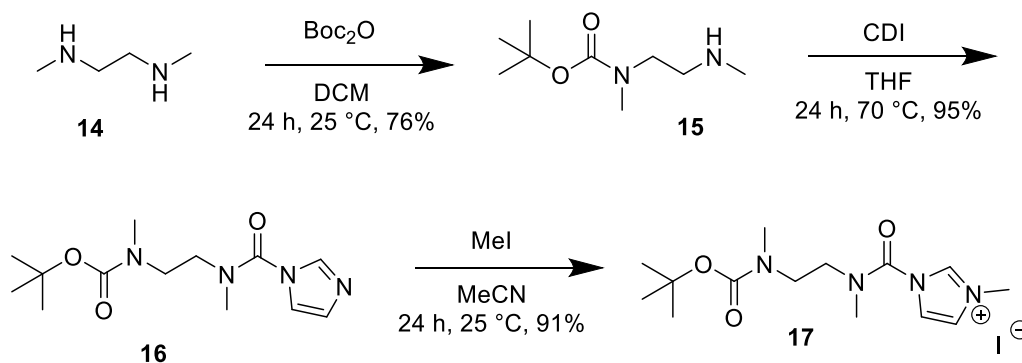
A vegyület aktiválását és a folyamat követését különböző enzim koncentrációk mellett Dr. Németh Krisztina és Grád Anna tanulmányozták (21. ábra), melynek során az enzimreakció sikeres lejátszódását és fluoreszcens modellvegyület felszabadulását tapasztalták.



21. ábra: **12** aktiválása különböző enzimkoncentrációk mellett [20]

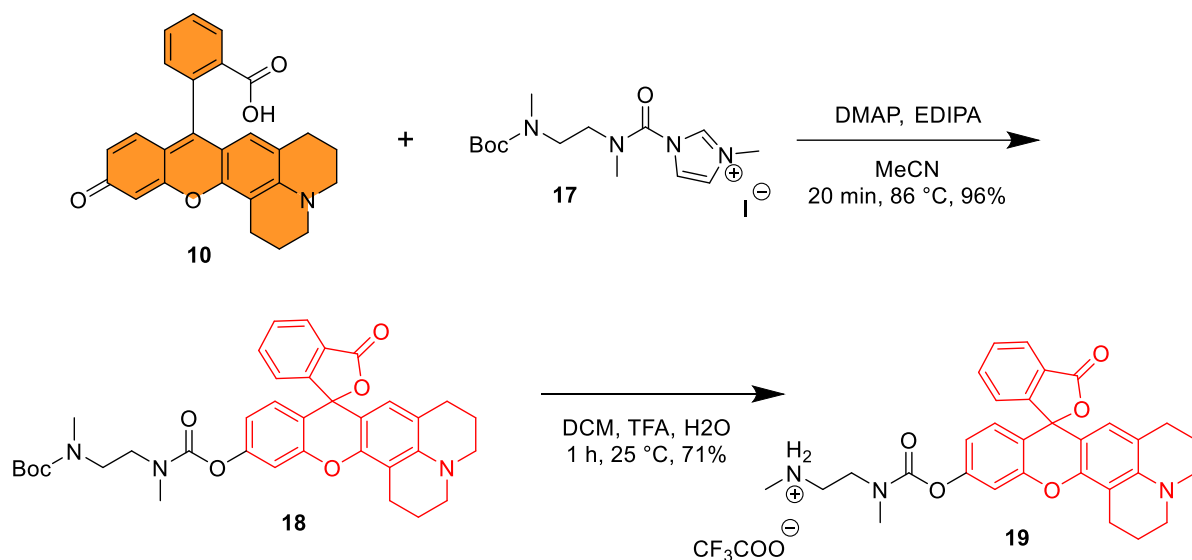
5.3. Kumarin *N*-oxid védőcsoporttal ellátott flourogén modellvegyület

Következő célom az eredetileg ígéretesnek mutatkozott kumarin *N*-oxid és a jó detektálhatóságot biztosító rodol (**10**) kombinálása volt. Ehhez a fluorogén jelzővegyülethez egy úgynevezett önfeláldozó linkeren (**17**) keresztül terveztem kapcsolni a kumarin védőcsoportot. Az önfeláldozó linker szerepe a két egység összekapcsolásán túl a konjugátum stabilitásának növelése (a karbamát kötés sokkal ellenállóbb fiziológiás közegben, mint a karbonát), és fizikai és kémiai tulajdonságaink (pl. oldhatóság) javítása. A választott etiléndiamin-típusú önfeláldozó linkert az irodalomban leírtak szerint állítottam elő [22] (22. ábra). Elsőként *N,N'*-dimetiletiléndiamin egyik aminocsoportját Boc védőcsoporttal láttam el (**15**), majd ezt követően CDI-lal reagáltattam. Az így kapott **16** köztiterméken végül metil-jodiddal alkileztem az imidazol nitrogénjét (**17**).



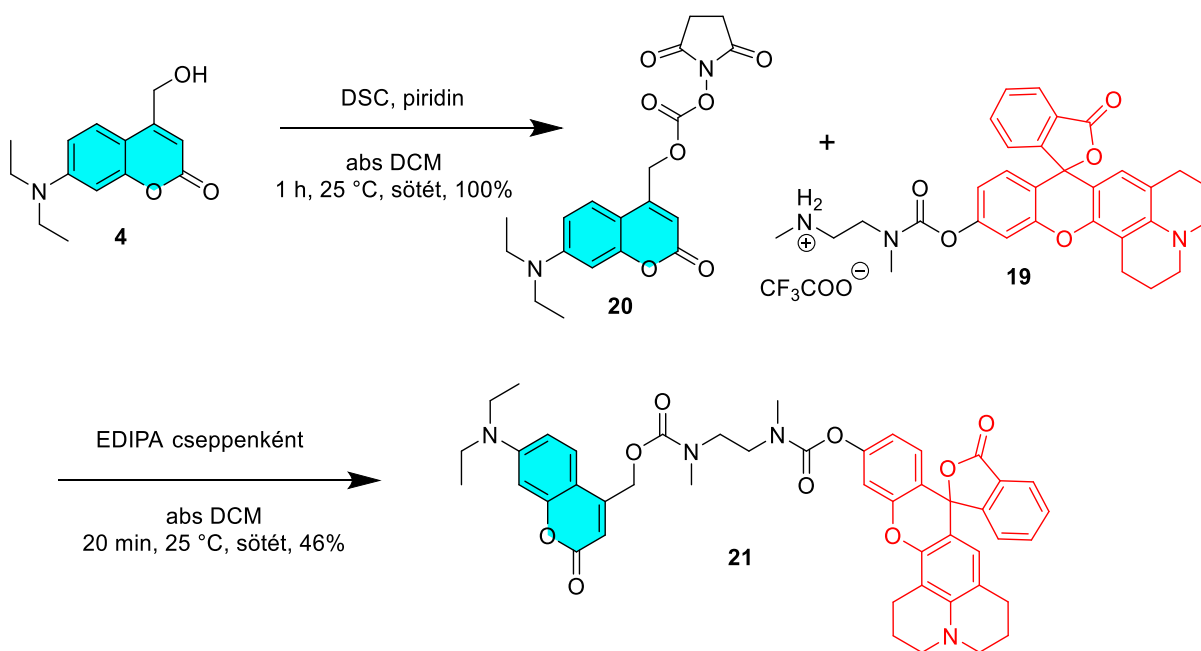
22. ábra: önfeláldozó linker (**17**) szintézise

Ezután kapcsoltam a rodol jelzővegyület (**10**) hidroxilcsoportjához a linkert DMAP katalizátor és EDIPA bázis jelenlétében. Majd a Boc védőcsoportot trifluorecetsav segítségével távolítottam el, így a kívánt terméket TFA só formájában (**19**) tudtam izolálni (23. ábra).



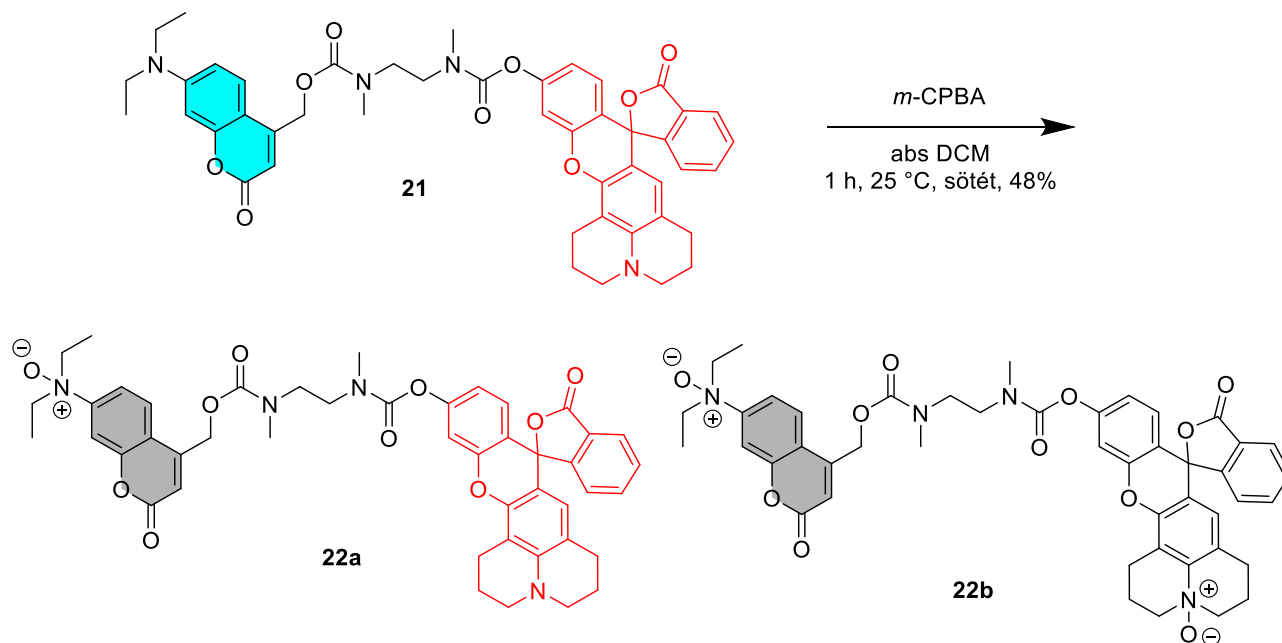
23. ábra: fluorogén vegyület (**10**) és az önfeláldozó linker (**17**) kapcsolása

Ezután a korábban előállított kumarinszármazék (**4**) hidroxilcsoportját aktiváltam *N,N'*-diszukcinimidil-karbonát segítségével (**20**), sötétben dolgozva, hogy fény hatására ne bomoljon el a fotolabilis vegyület (24. ábra). A **19** és **20** vegyületek összekapcsolását szintén végig sötétben dolgozva végeztem el. Az önfeláldozó linker idő előtti lehasadásának minimalizálása érdekében a kiindulási anyagok feloldása után a reakcióelegyhez az EDIPA bázis oldatát cseppenként adagoltam, így közepes termeléssel kapva a kívánt **21** konjugátumot.



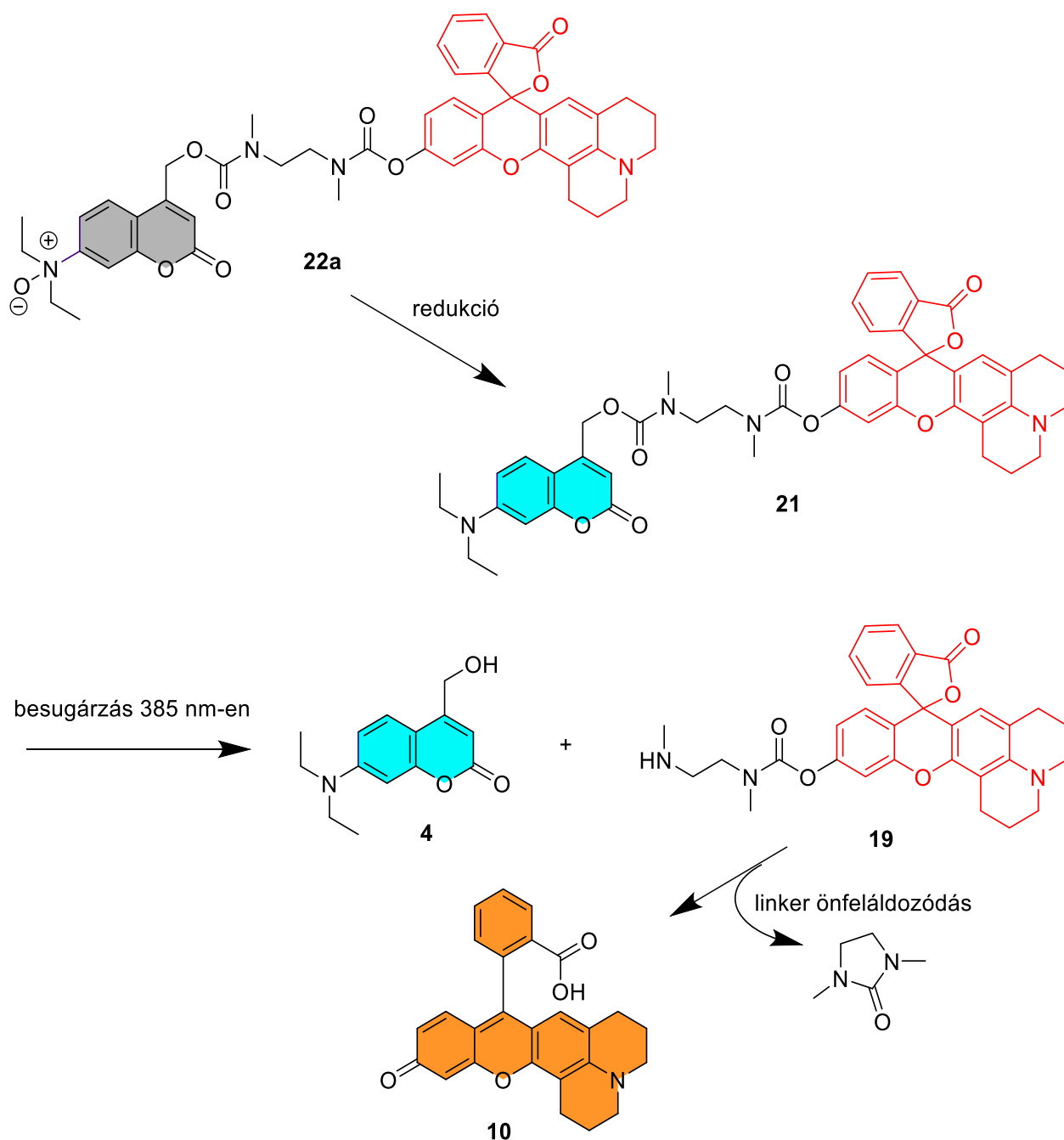
24. ábra: **21** konjugátum előállítása

Végül az *N*-oxid funkciót állítottam elő, ismét *m*-CPBA segítségével (25. ábra). A reakció előrehaladtát LC-MS segítségével követtem, melynek során egyszeresen és kétszeresen oxidált termék keletkezését (**22a** és **22b**) is tapasztaltam. A kívánt termékhez HPLC-s tisztítást követően közepes termeléssel jutottam.



25. ábra: **21** *N*-oxiddá alakítása

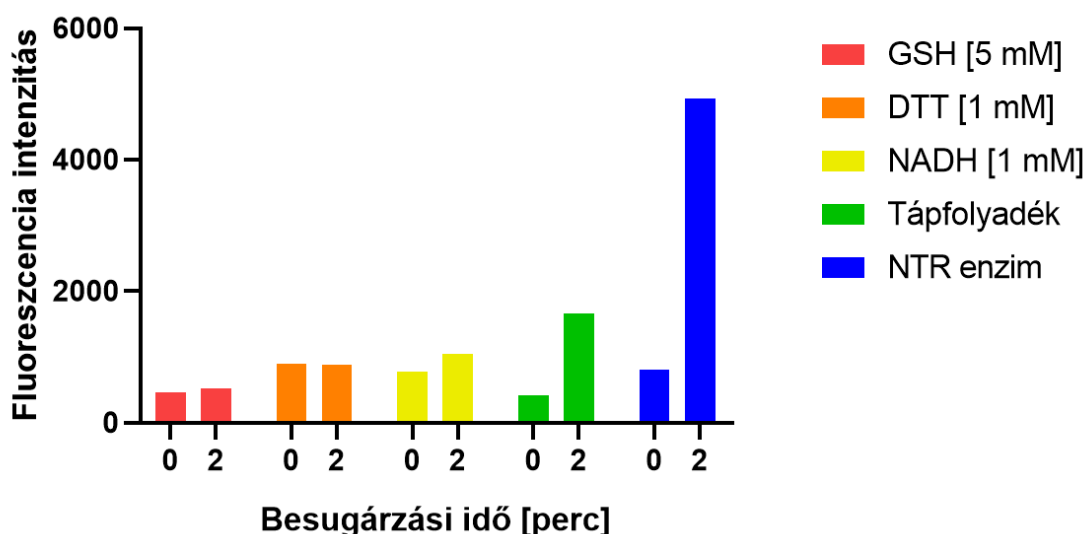
A **22a** modellvegyületet ebben az esetben is elsőként *in vitro* fiziológiás körülmények között (PBS puffer, pH = 7,4) vizsgáltam, ezúttal Na₂S-ot használva redukálószerként. A reakció során a várakozásoknak megfelelően a deaktivált védőcsoport visszaalakult eredeti, fotolabilis formájába és kék fénnel (380 nm) besugározva lehasadt róla a rodol (26. ábra), melynek megjelenő fluoreszcenciája jól követhetővé tette a folyamatot.



26. ábra: **22a** redukálása és fénnel történő bontása

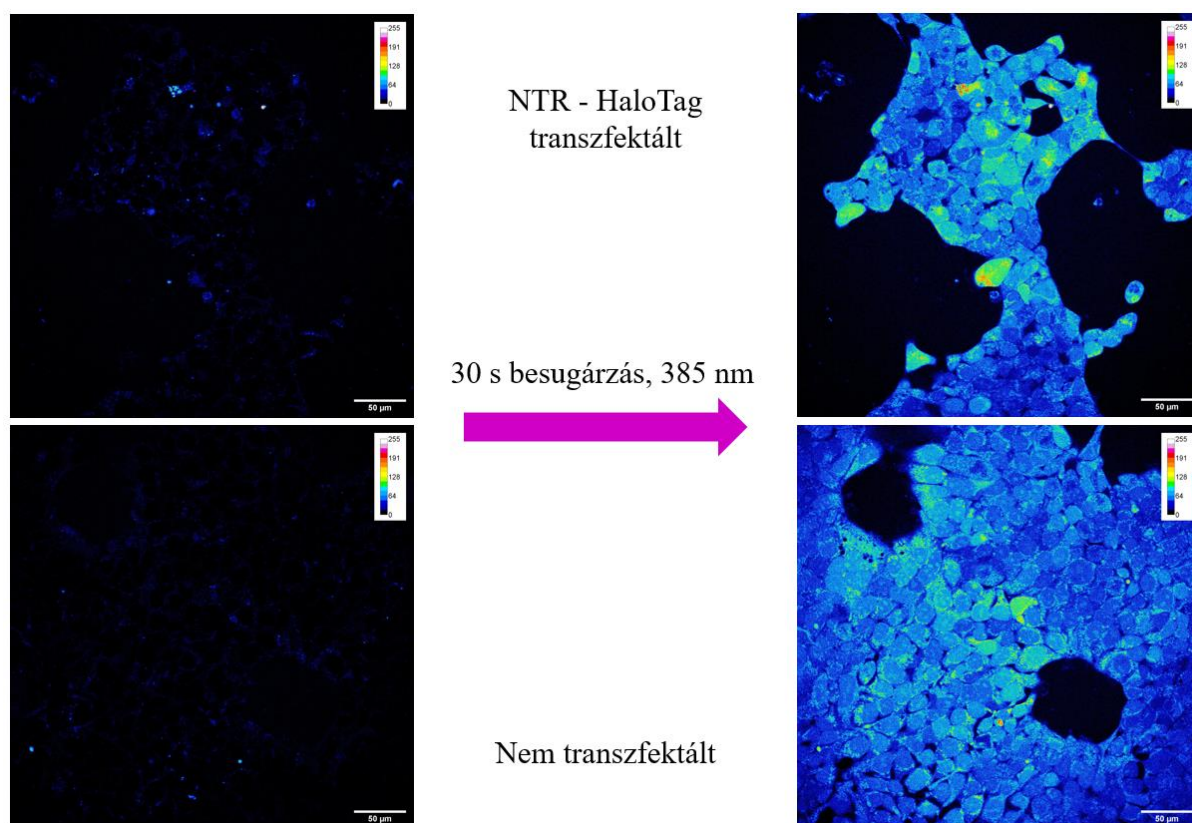
Ezután Dr. Németh Krisztina és Grád Anna *in vitro* körülmények között vizsgálta GSH, DTT, NADH, illetve az NTR enzim hatását. A konjugátum stabilnak mutatkozott a szerves redukálószerekkel szemben és 380 nm-es fénnel való besugárzást követően csak az NTR enzimet (és a működéséhez szükséges NADH-t) tartalmazó mintában tapasztaltunk szignifikáns növekedést a fluoreszcencia intenzitásában (27. ábra).

Egyéb redukálószeres hatása a fotolabilis konjugátumra



27. ábra: szerves redukálószeres és a 60 perces inkubációt követő 2 perces UV-fénnyel történő besugárzás hatása a feltételesen fotolabilis **22a** konjugátumra [100 μ M] [20]

A sikeres *in vitro* kísérleteket követően vizsgálták a modellvegyületet sejtes közegben is, elsőként annak citotoxikusságát HEK-293T sejtvonalon. Az MTT tesztek alapján megállapítható, hogy az anyag a vizsgált 1 – 10 μ M-os koncentrációban gyakorlatilag nem citotoxikus. A következő lépésben rekombináns technikával hipoxiás körülményeket modellező, nitroreduktáz enzimet kifejező HEK-293T sejtvonalat hoztak létre és ezen vizsgálták a feltételesen fotoaktiválható konjugátum viselkedését. A tapasztaltak alapján megtörténik a redukció, majd a besugárzás hatására felszabadul a rodol (besugárzás nélkül pedig nem). Azonban nem várt eredményként tapasztalták, hogy a nitroreduktáz enzimet nem túlexpresszálo mintában is megtörténik az *N*-oxid redukciója (28. ábra). Ennek oka lehet valamely más, a sejtekben jelen lévő oxidoreduktáz enzim, valamint az, hogy az *N*-oxid nem specifikus szubsztrátja az NTR enzimnek.



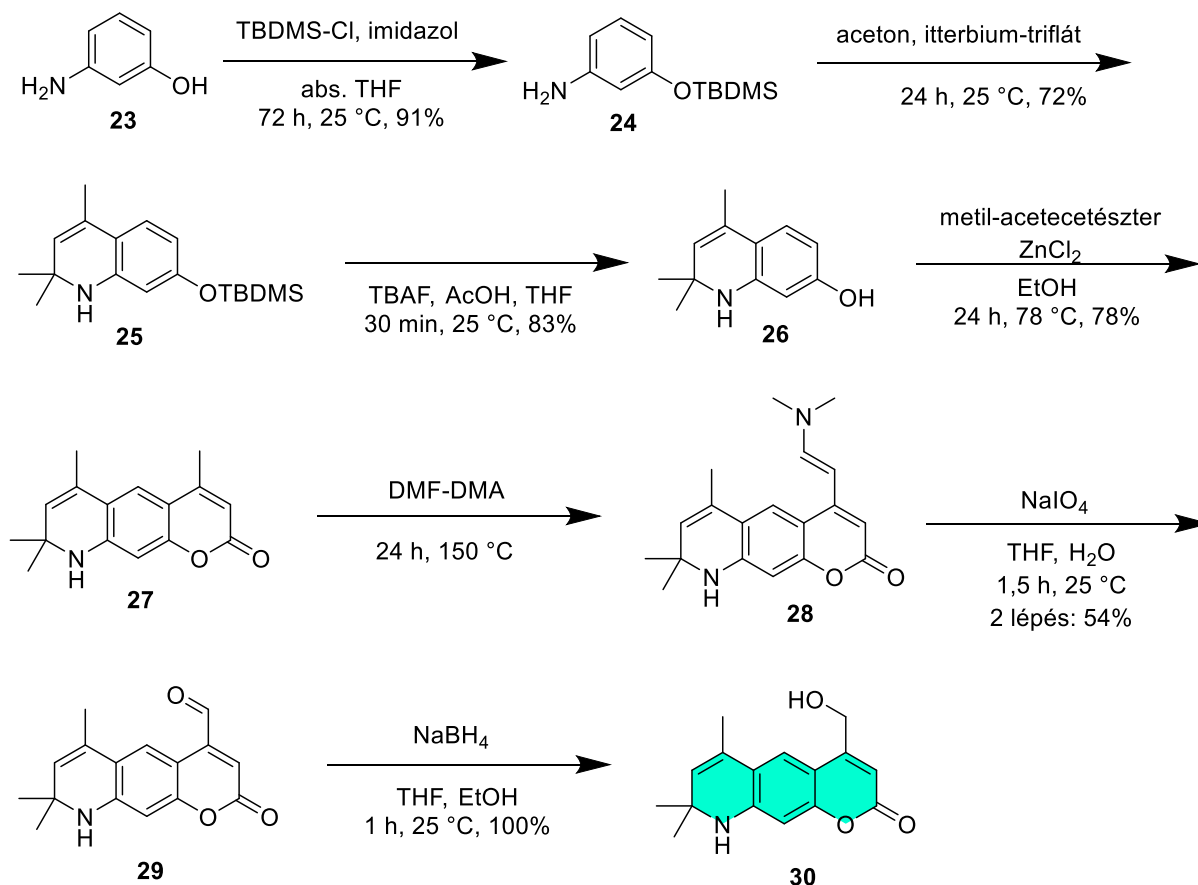
28. ábra: a feltételesen fotoaktiválható konjugátum vizsgálata HEK-293T sejteken, konfokális mikroszkóppal [20]

5.4. Nitrobenzilcsoporttal deaktivált (NTR specifikus) kumarin védőcsoport

Mivel a kumarin-*N*-oxid egység nem bizonyult szelektívnek az NTR enzimre, így kutatásom következő részeként céltom egy új, az enzim specifikus szubsztátjának számító *p*-nitrobenzil egység segítségével deaktivált kumarin előállítását. Ehhez egy olyan, az irodalomban ismert kumarinszármazékot terveztem felhasználni, melynek 7-es pozíciójában szabad NH található, így ehhez karbamát kötéssel keresztül kapcsolható a nitrobenzilcsoport [23]. Ekkor az aminocsoport elektronküldő hatása megfordul, és így a kumarinváz várhatóan elveszti mind fluoreszcens, mind fotolabilis védőcsoport tulajdonságát. Ezen túl a választott kumarin a 7-dietilaminokumarin származéknál nagyobb moláris abszorpciós koefficienssel és jobb kvantumhasznosítási tényezővel rendelkezik, így rövidebb besugárzási idő mellett jobb hatásfokkal lesz felszabadítható a hozzá kapcsolt vegyület.

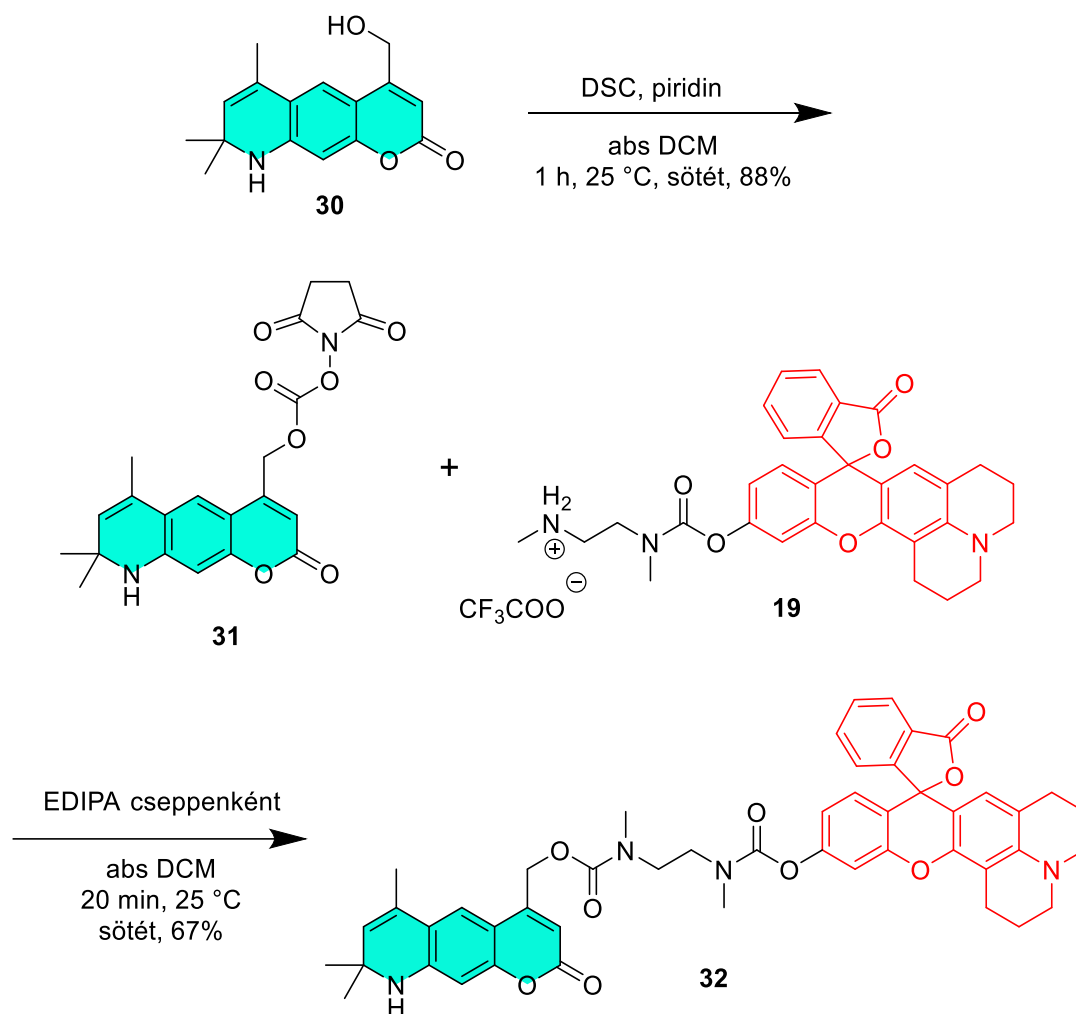
A kumarinváz szintézisét az irodalomban leírtak alapján végeztem el. A kiindulási 3-aminofenol (**23**) hidroxilcsoportját TBDMS-kloriddal védtem (**24**), ezután acetont, mint reagenst és egyben oldószert alkalmazva, Yb(OTf)₃ katalizátor segítségével alakítottam ki a

nitrogén atomot tartalmazó gyűrűt (**25**). Ezt követően TBAF-dal távolítottam el a védőcsoportot, majd ZnCl_2 katalizátor alkalmazásával metil-acetecetészterrel alakítottam ki a kumarin részt (**27**). Következőkben a szükséges hidroximetilcsoport kialakítását az előző kumarin-származéknál már bevált reakcióút analógiájára valósítottam meg. Így DMF-DMA reagenssel először énamint (**28**) alakítottam ki, melyet nátrium perjodátos oxidációs reakcióban alakítottam a megfelelő **29** aldehiddé, végül a kapott aldehidet nátrium-borohidriddel redukáltam a kívánt **30** alkohollá (29. ábra).



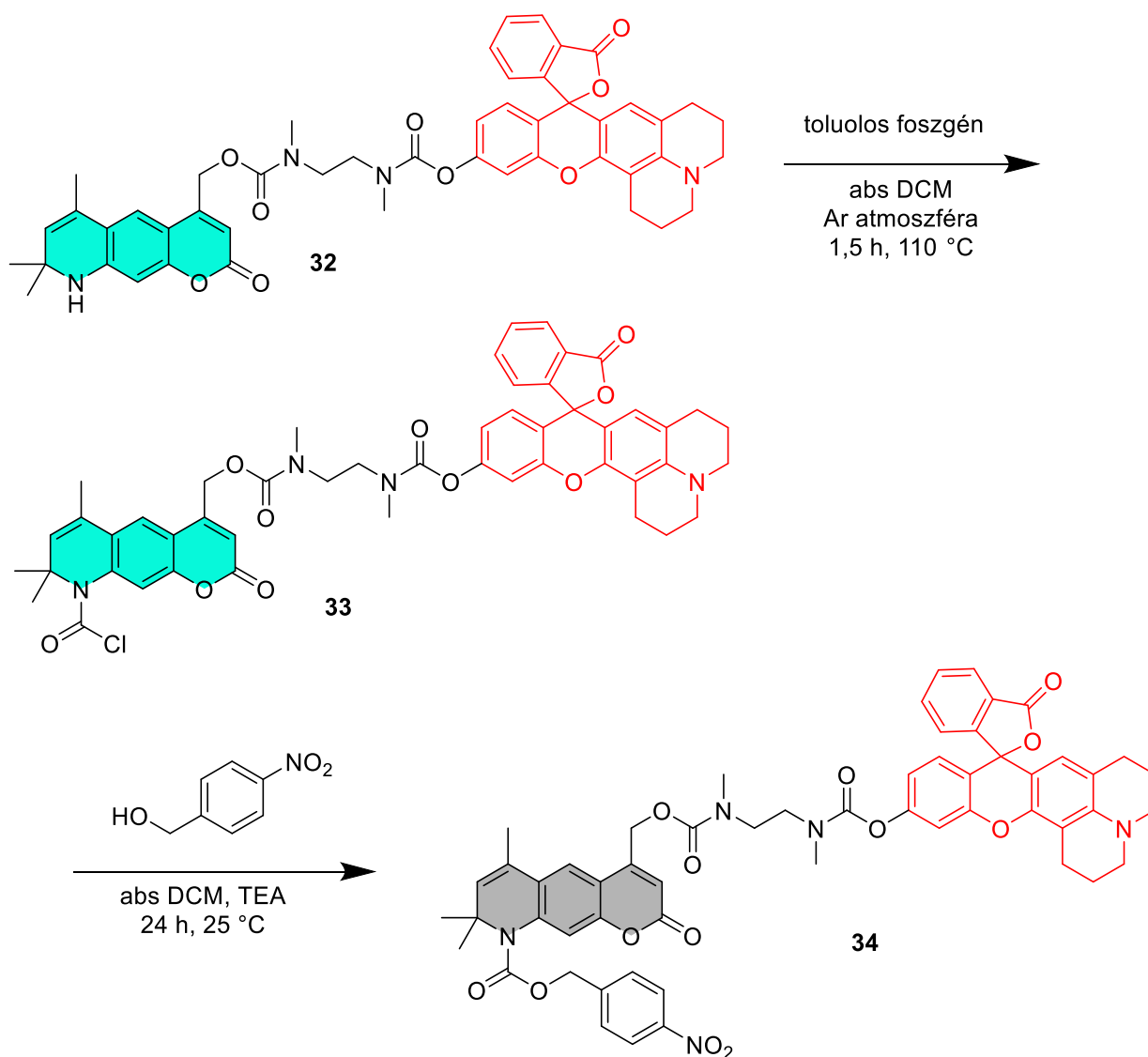
29. ábra: kumarin védőcsoport (**30**) szintézise

A kumarin hidroxilcsoportját az előzőkben már alkalmazott DSC-os módszerrel aktiváltam (**31**), és reakciókat innentől kezdve sötétben végeztem. A következő lépésben a már bemutatott, előzetesen önfeláldozó linkerrel ellátott fluorogén rodol jelzővegyületet (**19**) a fotolabilis védőcsoporthoz (**31**) kapcsoltam, így jutva a fénnel aktiválható **32** konjugátumhoz (30. ábra).



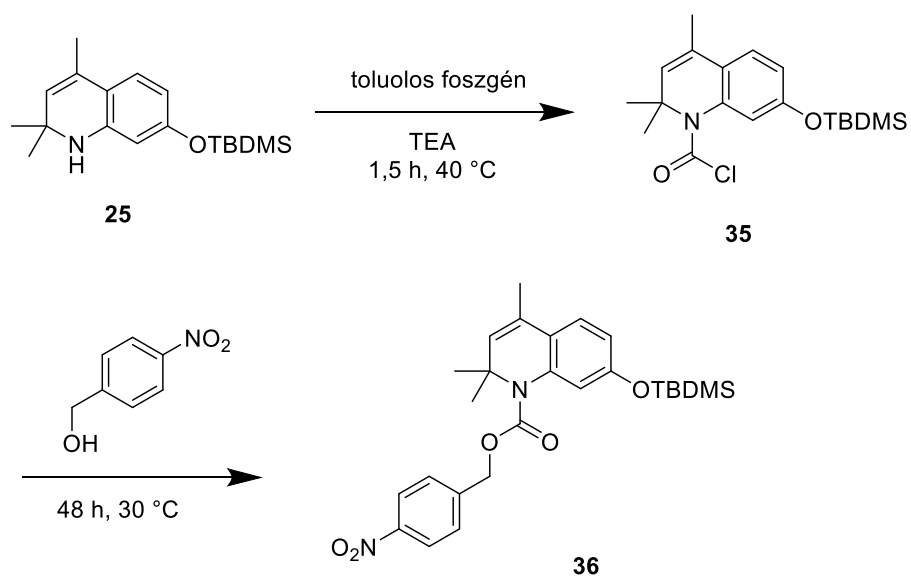
30. ábra: az aktivált kumarin védőcsoport (**31**) és a fluorogén jelzővegyület (**19**) kapcsolása

Ezt követte a *p*-nitrobenzilcsoport kapcsolása a kumarin nitrogén szubsztituenséhez karbamát kötésen keresztül. A kutatócsoport korábbi tapasztalatai alapján hasonló nitrogén atomok nehezen hozzáférhetők és vihetők reakcióba, így az aktiválásához foszgént használtam. Ehhez a **32** vízmentes oldatához argon atmoszféra alatt adagoltam a foszgén toluolos oldatát. A reakcióidő letelte után a reakcióelegyet engedtem szobahőmérsékletűre hűlni és a foszgén felesleget argon gáz átbuborékolatásával távolítottam el az oldószer bepárlása előtt. A **33** nyersterméket tisztítás nélkül használtam fel a következő reakcióban a *p*-nitrobenzilalkohollal (31. ábra). A várt **34** céltermék keletkezését LC-MS segítségével követtem. Ennek alapján a kívánt vegyület alacsony konverzióval keletkezett többféle melléktermék mellett, azonban mostanáig nem sikerült a kellő tisztasággal izolálnom a fotokémiai és enzimes kísérletekhez.



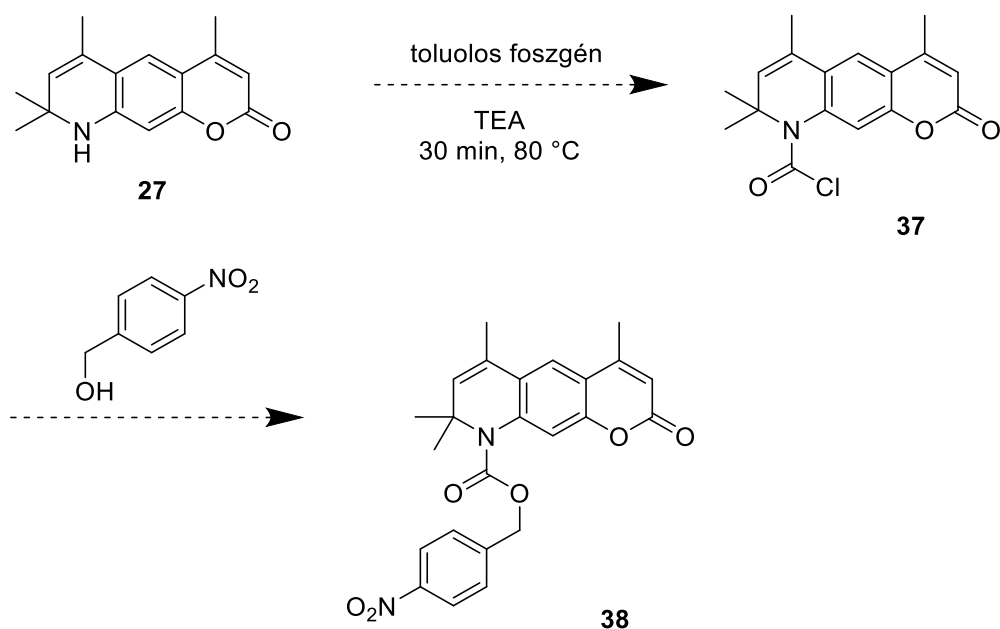
31. ábra: a nitrobenzilcsoporttal deaktivált (NTR specifikus) kumarin védőcsoport (**34**) szintézise

Munkám során terveztem a szintézissor több pontján is beépíteni a *p*-nitrobenzilcsoportot, elsőként a **25** vegyülethez szintén foszgénes aktiválás alkalmazásával. Ebben az esetben a TBDMS védőcsoport esetleges lehasadása miatt alacsonyabb hőfokon dolgoztam. A nyersterméket (**35**) ezúttal is tisztítás nélkül vittem a következő reakcióba a *p*-nitrobenzilalkohollal (32. ábra). A termék LC-MS alapján közepes mennyiségben keletkezett, de ebben az esetben sem sikerült tisztán izolálni a kívánt (**36**) vegyületet.



32. ábra: a *p*-nitrobenzilcsoport kapcsolása a **25** vegyületre

Következő tervem a kumarinváz kialakítása után, de még annak funkcionálizálása előtt a **27**-es vegyülethez kapcsolni a *p*-nitrobenzil funkciós csoportot (33. ábra), azonban idő hiányában a dolgozat leadásáig erre még nem került sor.



33. ábra: a *p*-nitrobenzil egység kapcsolási terve a **27**-es vegyülethez

6. Kísérleti rész

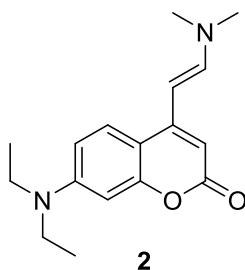
6.1. Általános

A munkám során a *Sigma-Aldrich*, *Merck*, *Alfa Aesar*, *Fluka*, *Reanal*, *Romil*, *Molar Chemicals* illetve a *Fluorochem* által kereskedelmi forgalomba hozott vegyszereket használtam fel, minden esetben tisztítás nélkül. A vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatokhoz *Merck* Silica gel 60 F₂₅₄ lapokat használtam, detektáláshoz 254 és 365 nm-en működő UV lámpát használtam fel, előhíváshoz néhány esetben káliumpermanganátot használtam fel. Az flash oszlopkromatográfiás tisztításokhoz *Zeochem* márkájú 25-40 µm szemcseméretű szilika állófázist és *Teledyne ISCO COMBI Flash Nextgen 300+* készüléket használtam. Manuális oszlopkromatográfia során *Zeochem* márkájú 60-200 µm szemcseméretű szilikát használtam. A fordított fázisú szemipreparatív HPLC tisztítást *Wufeng Chrom LC100 HPLC* készülékkel végeztem, *Phenomenex Jupiter C18* (250 × 21 mm I.D.) oszlopot használva, ami 110 Å pórusméretű 5 µm szemcseméretű szilika töltettel rendelkezik. A lineáris gradiens elúció (0 perc 5% B; 5 perc 5% B; 15 perc 50% B; 25 perc 100% B; 35 perc 100% B), az A eluens (0,1% TFA, 99,9% MeCN), B eluens (0,1% TFA, 99,9% víz), 20 ml/perc áramlási sebességgel. A termelés meghatározása előtt a megtisztított anyagokat tömegállandóságig vákuumon szárítottam. RP-HPLC-UV/Vis-MS méréseket *SHIMADZU LCMS-2020* system (LC-MS) készülékkel végeztem, ami *Gemini C18* oszlopon (100 × 2,00 mm I.D.), mely 110 Å pórusméretű 5 µm szilika töltettel rendelkezik. A detektálást UV/Vis (220-800 nm) fotódioda-sor és ESI-MS detektor végezte. A lineáris gradiens elúció (0 perc 0% B; 2,0 perc 100 % B; 2,5 perc 100 % B; 3,0 perc 0 % B; 4,0 perc 0 % B) az A eluenssel (0,1% HCOOH, 5 % MeCN és 94,9 % víz) és a B eluenssel (0,1 % HCOOH, 94,9 % MeCN és 5 % víz), 0,5 ml/perc áramlási sebesség 30 °C-on. A minták HPLC minőségű víz (99,9% víz 0,01% HCOOH) és MeCN (99,9%, 0,01% HCOOH) elegyében készültek (1:1 V/V), a készült oldatok töménysége ~0,1 – 0,5 mg/ml volt. Az NMR mérések *Varian Inova 500 MHz* spektrométerrel készültek. A minták deutero kloroformban, deutero metanolban és deutero dimetil-szulfoxidban készültek, a kémiai eltolódásokat (δ) ppm-ben adtam meg, minden esetben az adott oldószer jele lett referenciaként véve.

Az idő szűkössége, illetve néhány esetben a kapott tiszta termék kis mennyisége vagy rossz oldhatósága miatt még nem minden anyagról történt meg az NMR spektrumok felvétele. Ezek, illetve az új anyagokról a szerkezetigazoló HRMS mérések folyamatban vannak.

6.2. Kumarin *N*-oxid védőcsoporttal ellátott modellvegyület szintézise

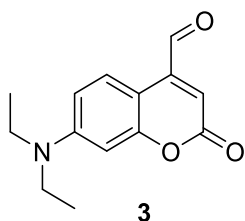
7-dietilamino-4-(2-(dimetilamino)vinil)-kumarin (2)



Kimértem 5,10 g (22,1 mmol, 1,0 ekv.) 7-dietilamino-4-metilkumarint és feloldottam 50 ml DMF-ban, majd hozzáadtam 5,80 ml (43,3 mmol, 2,0 ekv.) DMF-DMA-t. A reakcióelegyet 24 órán keresztül reflux hőmérsékleten (150 °C-os olajfürdőn) kevertettem. Rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottam az oldószert, majd a kapott anyagot 100 ml DCM-ban feloldottam és 100 ml telített NaHCO₃ oldattal mostam. A vizes fázist még kétszer 60 ml DCM-nal extraháltam. Az egyesített szerves fázisokat telített sóoldattal mostam, majd vízmentes Na₂SO₄-on szárítottam. Szűrés után az oldószert eltávolítottam, majd a terméket átkristályosítottam 20 ml EtOAc / 60 ml hexán elegyből. Végül nagyvákuumon szárítottam, és így 5,70 g szilárd termékhez jutottam (91%).

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

7-(dietilamino)-4-formilkumarin (3)

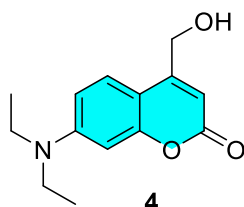


Az 5,70 g (20,1 mmol, 1 ekv.) 7-dietilamino-4-(2-(dimetilamino)vinil)-kumarint (2) feloldottam 20 ml THF-ban és 20 ml vízben, majd lassan hozzáadtam 6,40 g (30,0 mmol, 1,5 ekv.) NaIO₄-ot szobahőmérsékleten. A reakcióelegyet 1,5 órán át kevertettem, majd 100 ml

EtOAc-ot adtam hozzá, és leszűrtem a kivált szervesetlen sókat. Az oldószert eltávolítottam és 130 ml telített NaHCO₃ oldatot adtam hozzá, majd háromszor 100 ml DCM-nal extraháltam. A szerves fázist telített 100 ml telített sóoldattal mostam és vízmentes Na₂SO₄-on szárítottam. Szűrés után eltávolítottam az oldószert, majd a nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (hexán:EtOAc = 20% → 60%). Így jutottam 1,62 g termékhez (32%).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 10,04 (s; 1H); 8,36 (d; *J* = 9,1 Hz; 1H); 6,68 (dd; *J* = 9,1; 2,7 Hz; 1H); 6,54 (d; *J* = 2,7 Hz; 1H); 6,45 (s; 1H); 3,47 (q; *J* = 7,2 Hz; 4H); 1,23 (t; *J* = 7,2 Hz; 6H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 192,2; 161,5; 157,2; 149,9; 143,6; 127,1; 118,0; 110,8; 105,3; 100,1; 45,9; 12,3. LC-MS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ számolt: 246, mért: 246.

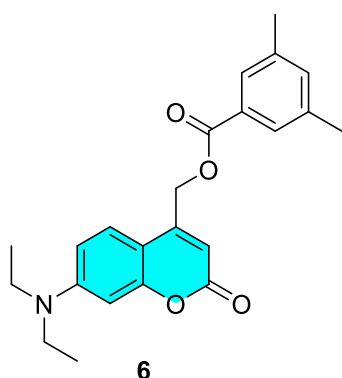
7-dietilamino-4-hidroxi-metilkumarin (4)



Az 1,62 g (6,4 mmol, 1,0 ekv.) 7-(dietilamino)-4-formilkumarint (3) feloldottam 20 ml THF-ban és 60 ml EtOH-ban. Jeges fürdővel lehűtöttem a reakcióelegyet 0 °C-ra és hozzáadagoltam 0,70 g (19,3 mmol, 3,0 ekv.) NaBH₄-et, majd három órán keresztül szobahőmérsékleten kevertettem. Ezt követően hozzáadtam 60 ml telített NaHCO₃ oldatot, majd leszűrtem a kivált csapadékot. A szűrletet háromszor 60 ml DCM-nal extraháltam, telített sóoldattal mostam és MgSO₄-on szárítottam. Szűrtem, majd eltávolítottam róla az oldószert, így 1,29 g (79%) citromsárga színű termékhez jutottam, mely további tisztítást nem igényelt.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 7,31 (d; *J* = 9,0 Hz; 1H); 6,55 (dd; *J* = 9,0; 2,3 Hz; 1H); 6,48 (d; *J* = 2,4 Hz; 1H); 6,26 (s; 1H); 4,82 (s; 2H); 3,39 (q; *J* = 7,1 Hz; 4H); 2,75 (s; 1H); 1,19 (t; *J* = 7,1 Hz; 6H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 162,9; 156,3; 155,1; 150,7; 124,5; 108,8; 106,5; 105,6; 97,9; 61,0; 44,9; 12,6. LC-MS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ számolt: 248, mért: 248.

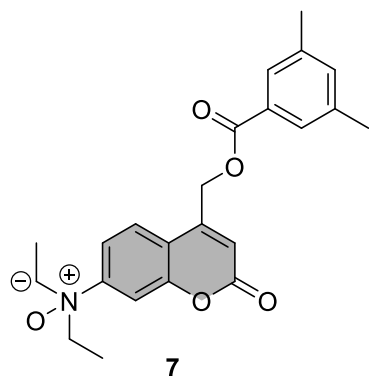
7-(diethylamino)-kumarin-4-il-3,5-dimetilbenzoát (6)



Végig sötétben dolgozva először kimértem 100 mg (0,40 mmol, 1,0 ekv.) 7-dietilamino-4-hidroximetilkumarint (**4**), 73 mg (0,49 mmol, 1,2 ekv.) 3,5-dimetilbenzoesavat, 100 mg (0,49 mmol, 1,2 ekv.) DCC-et és 10 mg (0,081 mmol, 0,2 ekv.) DMAP-t. Az egészet feloldottam 4 ml amilénnel stabilizált DCM-ban és 24 órán keresztül kevertettem szobahőmérsékleten. Ezt követően leszűrtem a reakcióelegyet, eltávolítottam az oldószert, majd kromatográfiásan tisztítottam (DCM:MeOH = 0% → 50%) a nyers terméket. 123 mg terméket kaptam (81%).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7,74 – 7,69 (m; 2H); 7,37 (d; J = 9,0 Hz; 1H); 7,25 – 7,21 (m; 1H); 6,60 (dd; J = 9,0; 2,6 Hz; 1H); 6,53 (d; J = 2,6 Hz; 1H); 6,26 (t; J = 1,3 Hz; 1H); 5,45 (d; J = 1,3 Hz; 2H); 3,42 (q; J = 7,1 Hz; 4H); 2,38 (s; 6H); 1,22 (t; J = 7,1 Hz; 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 166,3; 162,1; 156,4; 150,9; 149,8; 138,5; 135,4; 129,3; 127,6; 124,6; 108,9; 106,6; 106,3; 98,1; 77,2; 61,8; 44,9; 21,3; 12,6. LC-MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt: 380, mért: 380.

7-(diethylamino)-*N*-oxid-kumarin-4-il-3,5-dimetilbenzoát (7)

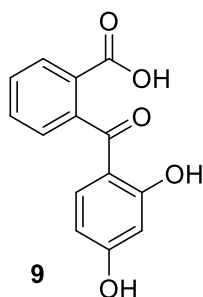


Bemértem 31 mg (0,08 mmol, 1,0 ekv.) 7-(dietilamino)-kumarin-4-il-3,5-dimetilbenzoátot (**6**) és 30 mg (1,1 mmol, 2,0 ekv.) *m*-CPBA-at, és feloldottam 2 ml DCM-ban. 2 órán keresztül kevertetem szobahőmérsékleten, majd kromatográfiásan tisztítottam (DCM:MeOH = 0% → 10%). 25 mg termék keletkezett (79%).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7,90 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 7,84 (dd, J = 8,7, 2,2 Hz, 1H), 7,70 – 7,67 (m, 3H), 7,23 (s, 1H), 6,63 (t, J = 1,4 Hz, 1H), 5,52 (s, 2H), 3,71 (m, 4H), 2,36 (s, 6H), 1,15 (t, J = 7,0 Hz, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 166,0, 159,7, 153,8, 153,2, 148,6, 138,6, 135,7, 128,7, 127,6, 124,2, 118,4, 117,5, 114,4, 112,0, 67,4, 61,3, 21,3, 8,4. LC-MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt: 396, mért: 396.

6.3. NTR enzimre specifikus fluorogén jelzővegyület szintézise

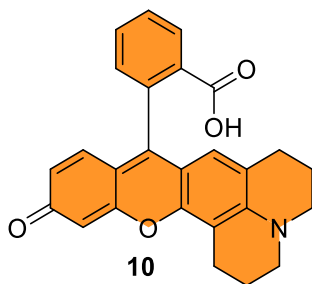
2-(2,4-dihidroxibenzoil)-benzoésav (**9**)



Összemértem egy gömblombikba 0,72 g (6,6 mmol, 1,0 ekv.) rezorcint és 1,00 g (6,8 mmol, 1,0 ekv.) ftálsavanhidridet, majd argonnal inertizáltam az atmoszférát. Hozzáadtam 12 ml nitrobenzolt, majd 2,01 g (15 mmol, 2,3 ekv.) AlCl_3 -ot. A reakcióelegyet argon atmoszféra alatt 24 órán keresztül kevertetem szobahőmérsékleten. Ezt követően 38 ml hexánt és 50 ml 0,5 M-os HCl oldatot adtam a reakcióelegyet, majd további 1,5 óráig kevertetem. Leszűrtem a kivált csapadékot (nyersterméket), majd kromatográfiásan tisztítottam (hexán:EtOAc = 0% → 50%). 1,23 g terméket kaptam (68%).

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 13,16 (s; 1H); 12,22 (s; 1H); 10,69 (s; 1H); 7,98 (d; J = 7,6 Hz; 1H); 7,66 (m; 2H); 7,40 (d; J = 7,3 Hz; 1H); 6,88 (d; J = 8,7 Hz; 1H); 6,26 (m; 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 200,7; 166,9; 165,2; 164,6; 140,2; 135,0; 132,5; 130,3; 129,9; 129,6; 127,7; 113,5; 108,5; 102,8. LC-MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt: 259, mért: 259.

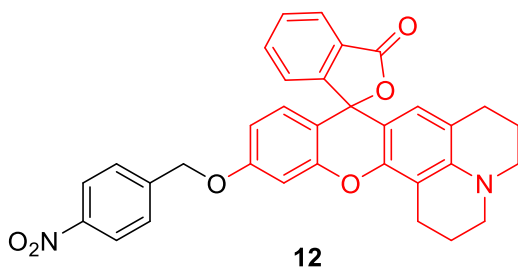
Rodol jelzővegyület (10)



240 mg (0,92 mmol, 1,0 ekv.) 2-(2,4-dihydroxibenzoil)-benzoesavhoz (**9**) hozzámértem 170 mg (0,92 mmol, 1,0 ekv.) 8-hidroxijulolidint és ezeket feloldottam 1,1 ml TFA-ban. 24 órán keresztül 95 °C-on kevertettem a reakcióelegyet, majd hagytam szobahőmérsékletűre hűlni. A TFA oldószert MeOH segítségével eltávolítottam rotációs vákuumbepárlón. A nyersterméket négyszer szonikáltattam dietil-éterrel, a folyadékot mindig dekantálva, így szárítás után 350 mg élénk piros színű terméket kaptam (93%).

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 + 5% TFA- d) δ 8,24 (dd; $J = 7,8$; 0,9 Hz; 1H); 7,84 (td; $J = 7,5$; 1,2 Hz; 1H); 7,78 (td; $J = 7,7$; 1,1 Hz; 1H); 7,41 (d; $J = 6,8$ Hz; 1H); 7,17 (d; $J = 2,2$ Hz; 1H); 7,04 (d; $J = 9,0$ Hz; 1H); 6,96 (dd; $J = 9,0$; 2,3 Hz; 1H); 6,79 (s; 1H); 3,63 (t; $J = 5,5$ Hz; 2H); 3,59 (t; $J = 5,6$ Hz; 2H); 3,07 – 2,94 (m; 2H); 2,69 (d; $J = 6,0$ Hz; 2H); 2,08 – 1,98 (m; 2H); 1,88 (d; $J = 3,5$ Hz; 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6 + 5% TFA- d) δ 166,3; 165,7; 157,9; 155,5; 153,8; 152,7; 133,6; 132,9; 131,2; 131,0; 130,7; 130,5; 130,4; 127,3; 126,7; 116,7; 115,5; 114,7; 105,3; 102,3; 51,4; 50,9; 26,9; 19,9; 19,3; 18,9. LC-MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt: 412, mért: 412.

p-nitrobenzillel módosított fluorogén jelzővegyület (12)



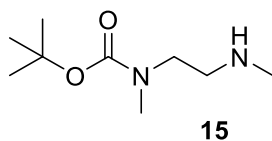
41 mg (0,10 mmol, 1,0 ekv.) **10** rodolszármazékot feloldottam 4 ml acetonban, majd 26 mg (0,12 mmol, 1,2 ekv.) 1-(brómmetil)-4-nitrobenzolt, 7,5 mg (0,05 mmol, 0,5 ekv.) NaI-ot és 90 μl (0,50 mmol, 5,0 ekv.) EDIPA bázist adtam hozzá. A reakcióelegyet 80 °C-on kevertettem

egy éjszakán át, majd rotációs vákuumbepárlón eltávolítottam róla az oldószert. A nyersterméket oszlopkromatográfiásan tisztítottam (DCM:MeOH = 0% → 10%), és 28 mg terméket kaptam piros színű szilárd anyag formájában (51%).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8,27 (d; J = 7,9 Hz; 1H); 8,03 (d; J = 8,6 Hz; 2H); 7,75 (t; J = 7,3 Hz; 1H); 7,70 (t; J = 7,4 Hz; 1H); 7,27 (s; 1H); 7,11 (d; J = 8,2 Hz; 2H); 6,89 – 6,72 (m; 3H); 6,42 (s; 1H); 5,18 (d; J = 12,7 Hz; 1H); 4,90 (d; J = 12,7 Hz; 1H); 3,47 – 3,42 (m; 4H); 2,98 – 2,82 (m; 2H); 2,58 (m; 2H); 2,05 (m; 2H); 1,93 (m; 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 165,3; 158,1; 151,5; 147,8; 141,9; 134,6; 133,7; 133,0; 131,4; 130,7; 130,0; 129,9; 129,9; 129,5; 129,0; 125,7; 123,6; 114,0; 112,2; 105,4; 104,1; 77,2; 65,9; 54,3; 50,9; 50,5; 42,5; 27,7; 20,9; 20,0; 19,9; 12,2. LC-MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt: 547, mért: 547.

6.4. Kumarin *N*-oxid védőcsoporttal ellátott flourogén modellvegyület szintézise

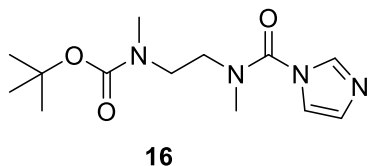
tert-butil metil(2-(metilamino)etil)karbamát (15)



Kimértem 1,20 ml (11,4 mmol, 5,0 ekv.) *N,N'*-dimetil-etiléndiamint és hozzáadtam 10 ml DCM-t, majd lehűtöttem a reakcióelegyet 5 °C-ra. Csepegtetőtölcséren keresztül hozzáadagoltam 0,50 g (2,3 mmol, 1,0 ekv.) di-*tert*-butil-dikarbonát 30 ml DCM-nal készült oldatát. Ezt követően 24 óráig szobahőmérsékleten kevertettem a reakcióelegyet, majd eltávolítottam róla az oldószert. A kapott nyersterméket feloldottam 100 ml EtOAc-ban és 100 ml telített Na_2CO_3 -tal, majd telített sóoldattal mostam, végül Na_2SO_4 -on szárítottam. Szűrés és az oldószer eltávolítása után 0,37 g terméket kaptam sűrű olaj formájában (76%).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 3,32 (t; J = 6,7 Hz; 2H); 2,97 (s; 3H); 2,72 (t; J = 6,7 Hz; 2H); 2,44 (s; 3H); 1,45 (s; 9H). ^{13}C NMR (125 MHz; CDCl_3): δ 155,9; 79,4; 49,7; 48,4; 36,3; 34,7; 28,5. LC-MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt: 189, mért: 189.

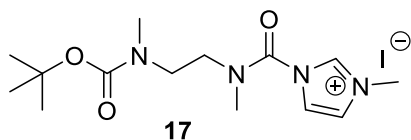
terc-butil metil-(2-(*N*-metil-1*H*-imidazol-1-karboxamido)etil)karbamát (16)



Kimértem 0,82 g (4,4 mmol, 1,0 ekv.) Boc védőcsoporttal ellátott *N,N'*-dimetil-etiléndiamint (**15**) és feloldottam 70 ml THF-ben, majd hozzáadtam 0,82 g (5,1 mmol, 1,2 ekv.) CDI-t és 24 órán át 70 °C-on keverettem. Eltávolítottam róla a THF-t, majd feloldottam 200 ml DCM-ban, ezután kétszer 200 ml desztillált vízzel, majd 100 ml telített sóoldattal mostam és Na₂SO₄-on szárítottam. Leszűrtem és bepároltam, majd kromatográfiásan tisztítottam (DCM:MeOH = 0% → 4%). 1,2 g olajat kaptam végtermékként (95%).

¹H NMR (500 MHz; CDCl₃): δ 7,90 (s; 1H); 7,25 (s; 1H); 7,07 (s; 1H); 3,66 (t; *J* = 7,1 Hz, 2H); 3,53 (t; *J* = 7,1 Hz, 2H); 3,17 (s; 3H); 2,85 (s; 3H); 1,43 (s; 9H). ¹³C NMR (126 MHz; CDCl₃): δ 151,8; 137,0; 129,4; 118,0; 79,9; 47,7; 45,4; 37,4; 34,5; 28,4. LC-MS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ számolt: 283, mért: 283.

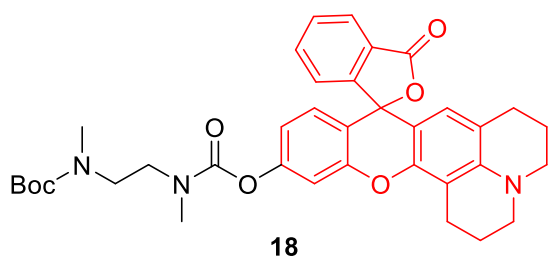
1-((2-((terc-butoxikarbonil)(metil)amino)etil)(metil)karbamoil)-3-metil-1*H*-imidazol-3-ium jodid (17)



1,20 g (4,2 mmol, 1,0 ekv.) *tert*-butil metil-(2-(*N*-metil-1*H*-imidazol-1-karboxamido)etil)karbamáthoz (**16**) hozzámértem 5,90 g (41,5 mmol, 10,0 ekv.) MeI-ot és 31 ml acetonitrilt. 24 órán keresztül kevertettem szobahőmérsékleten, majd bepároltam a reakcióelegyet, nagyvákuumon szárítottam. 1,62 g sárga szilárd terméket kaptam (91%), mely további tisztítást nem igényelt.

¹H NMR (500 MHz; CDCl₃): δ 9,90 (s; 1H); 7,79 (s; 2H); 4,26 (s; 3H); 3,71 (t; *J* = 6,8 Hz; 2H); 3,53 (t; *J* = 6,8 Hz; 2H); 3,31 (s; 3H); 2,90 (s; 3H); 1,43 (s; 9H). ¹³C NMR (126 MHz; CDCl₃): δ 156,2; 146,9; 136,6; 123,9; 121,0; 79,8; 49,1; 45,5; 37,9; 34,8; 28,2. LC-MS (ESI): *m/z* [M]⁺ számolt: 297, mért: 297.

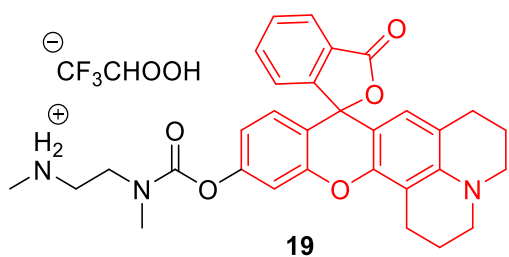
Boc-linkkerrel ellátott rodol (18)



Feloldottam 83 mg (0,2 mmol, 1,0 ekv.) **10** rodol jelzővegyületet és 86 mg (0,2 mmol, 1,0 ekv.) **17** aktivált önfeláldozó linkert 8 ml acetonitrilben, majd hozzáadtam 0,80 mg (6,5 μ mol, 0,033 ekv.) DMAP katalizátort és 0,1 ml (0,57 μ mol, 0,003 ekv.) EDIPA bázist. A reakcióelegyet 20 percig kevertetem szobahőmérsékleten, majd az oldószer bepárlása után kromatográfiásan tisztítottam (DCM:MeOH = 0% $\rightarrow$ 5%) a nyersterméket, így 120 mg vörös színű terméket kaptam (96%).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7,98 (d; J = 7,6 Hz; 1H); 7,63 (t; J = 7,5 Hz; 1H); 7,58 (t; J = 7,4 Hz; 1H); 7,19 – 7,16 (m; 1H); 7,09 (d; J = 2,0 Hz; 1H); 6,75 – 6,72 (m; 1H); 6,70 (d; J = 8,6 Hz; 1H); 6,13 (s; 1H); 3,56 – 3,42 (m; 4H); 3,16 (t; J = 5,6 Hz; 2H); 3,12 (d; J = 5,8 Hz; 2H); 3,11; 3,03 (s; 3H); 2,90 (2,92 – 2,89 (m; 5H); 2,60 – 2,44 (m; 2H); 2,03 – 1,97 (m; 2H); 1,89 – 1,83 (m; 2H); 1,46; 1,44 (s; 9H). LC-MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt: 626, mért: 626.

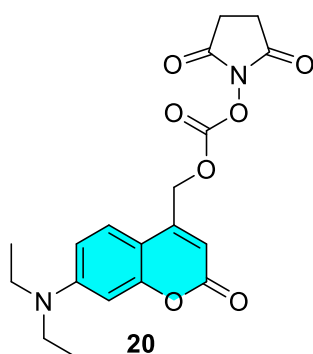
Önfeláldozó linkkerrel ellátott rodol (19)



Kimértem 40 mg (0,06 mmol, 1,0 ekv.) önfeláldozó linkkerrel kapcsolt festéket (**18**) és hozzáadtam 1,6 ml DCM-t, 0,8 ml TFA-at és 24 μ l desztillált vizet. Egy órán keresztül kevertetem szobahőmérsékleten. Eltávolítottam az oldószert, majd dietil-éterben szonikáltattam, végül nagyvákuumon zsírítottam. 37 mg vörös színű termékhez jutottam (71%).

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 8,36 (d; $J = 7,8$ Hz; 1H); 7,86 (t; $J = 7,4$ Hz; 1H); 7,83 – 7,77 (m; 2H); 7,42 (d; $J = 7,4$ Hz; 1H); 7,28 (d; $J = 6,9$ Hz; 1H); 7,22 (d; $J = 8,9$ Hz; 1H); 6,89 (s; 1H); 3,87 – 3,67 (m; 6H); 3,36 – 3,31 (m; 2H); 3,19 (s; 2H); 3,12 (t; $J = 6,3$ Hz; 2H); 3,07 (s; 1H); 2,78 (d; $J = 15,5$ Hz; 5H); 2,18 – 2,10 (m; 2H); 2,00 (d; $J = 5,4$ Hz; 2H). LC-MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt: 526, mért: 526.

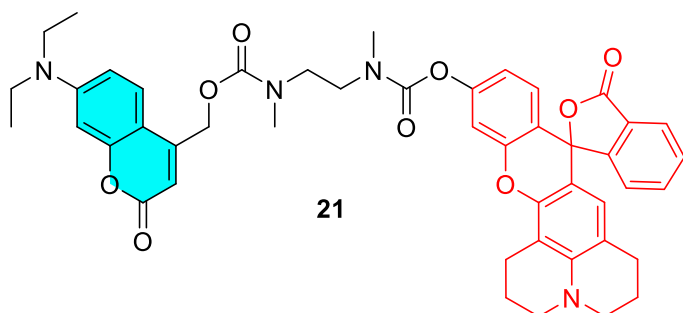
Aktivált 7-dietilamono-4-hidroximetilkumarin (20)



Végig sötétben dolgozva összemértem 89 mg (0,36 mmol, 1,0 ekv.) 7-dietilamono-4-hidroximetilkumarint (**4**), 32 mg (1,1 mmol, 3,0 ekv.) DSC-t, 10 ml amilénnel stabilizált DCM-t és 150 μl (1,8 mmol, 5,0 ekv.) piridint. A reakcióelegyet egy órán keresztül kevertetem szobahőmérsékleten. Ez után szintén végig sötétben háromszor 30 ml telített NaHCO_3 oldattal, majd 30 ml telített sóoldattal mostam, végül MgSO_4 -on szárítottam. Leszűrtem, eltávolítottam az oldószert, nagyvákuumon szárítottam, végig védve a terméket a fénytől. Kvantitatív termeléssel 145 mg terméket kaptam, melyből a szükséges mennyiséget azonnal, további tisztítás nélkül használtam fel.

LC-MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt: 389, mért: 389.

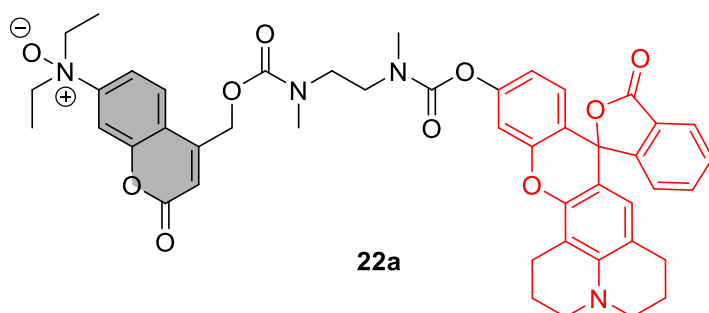
Kumarin védőcsoporttal konjugált rodol (21)



Végig sötétben dolgozva kimértem 19 mg-ot (0,05 mmol, 1,2 ekv.) az aktivált 7-dietilamino-4-hidroxi-metilkumarintból (**20**) és 26 mg-ot (0,04 mmol, 1,0 ekv.) az önfeláldozó linkerrel ellátott rodol jelzővegyületből (**19**). Inertizáltam az atmoszférát nitrogénnel, majd 36 µl EDIPA és 0,5 ml vízmentes DCM elegyét hozzácsöpögtettem 5 perc alatt, majd további 15 percig kevertettem szobahőmérsékleten a reakcióelegyet. A nyersterméket fénytől védve kromatográfiásan tisztítottam (DCM:MeOH = 0% → 10%) úgy, hogy a reakcióelegyet közvetlenül a kromatográfiás oszlop tetejére csepegtettem. Így 18 mg piros színű, szilárd terméket kaptam (46%).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7,99 (d; J = 7,6 Hz; 1H); 7,63 (m; 1H); 7,58 (m; 1H); 7,33 – 7,26 (m; 1H); 7,22 – 7,12 (m; 1H); 7,09 – 7,04 (m; 1H); 6,72 (s; 2H); 6,54 (m; 1H); 6,48 (m; 1H); 6,09 (m; 2H); 5,23 (s; 2H); 3,59 (m; 2H); 3,39 (q; J = 7,1 Hz; 4H); 3,14 (m; 6H); 3,08 – 3,03 (m; 4H); 2,87 (m; 2H); 2,59 – 2,44 (m; 2H); 2,07 – 1,96 (m; 4H); 1,86 (m; 2H); 1,19 (t; J = 7,1 Hz; 6H). LC-MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt: 799, mért: 799.

Kumarin *N*-oxiddal konjugált rodol (**22a**)

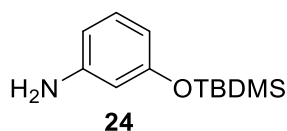


Végig sötétben dolgozva kimértem 6,0 mg (0,0075 mmol, 1,0 ekv.) **21** kumarinnal konjugált rodolt, feloldottam 1 ml amilénos DCM-ben, majd hozzáadtam 3,0 mg (0,012 mmol, 1,6 ekv.) *m*-CPBA-at. Egy óráig kevertettem a reakcióelegyet szobahőmérsékleten. Az oldószer eltávolítása után a nyersterméket HPLC kromatográfiával tisztítottam, szintén sötétben dolgozva. 3,0 mg piros színű terméket kaptam (48%).

LC-MS (ESI): m/z $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ számolt: 408, mért 408.

6.5. Nitrobenzilsoporttal deaktivált (NTR specifikus) kumarin védőcsoport szintézise

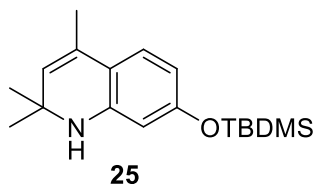
3-((*tert*-butildimetilszilil)oxi)anilin (24)



Kimértem 1,50 g (14 mmol, 1,0 ekv.) 3-aminofenolt, 10,7 g (69 mmol, 5,0 ekv.) TBDMS-kloridot, és 6,60 g (96 mmol, 7,0 ekv.) imidazolt, majd ezeket feloldottam 50 ml abs. THF-ban. A reakcióelegyet 72 órán keresztül kevertetem szobahőmérsékleten, majd ezt követően EtOH-t adtam hozzá. Az oldószer eltávolítása és kromatográfiásan tisztítás (hexán:DCM = 60% → 100%) után 2,78 g barna olajat kaptam termékként (91%).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 6,99 (m; 1H); 6,29 (m; 2H); 6,20 (m; 1H); 3,46 (brs; 2H); 0,99 (s; 9H); 0,20 (s; 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 156,9; 147,8; 130,1; 110,7; 108,7; 107,3; 25,9; 18,3; -4,2. LC-MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt: 224, mért: 224.

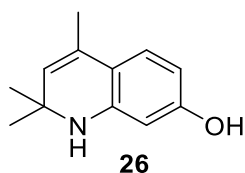
7-((*tert*-butildimetilszilil)oxi)-2,2,4-trimetil-1,2-dihidrokinolin (25)



Feloldottam 100 mg (0,17 mmol, 0,05 ekv.) $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ katalizátort 40 ml acetonban, majd hozzáadtam 750 mg (3,4 mmol, 1,0 ekv.) 3-((*tert*-butildimetilszilil)oxi)anilint (24). 24 óráig kevertetem szobahőmérsékleten a reakcióelegyet, majd bepároltam. A visszamaradt anyagot feloldottam 60 ml EtOAc-ban és kétszer 60 ml telített NaHCO_3 oldattal extraháltam, majd 40 ml telített sóoldattal mostam és MgSO_4 -on szárítottam. Leszűrtem, bepároltam, majd kromatográfiásan tisztítottam (hexán:EtOAc = 0% → 15%). 731 mg terméket kaptam (72%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 6,92 (d; $J = 8,2$ Hz; 1H); 6,15 (dd; $J = 8,2$; 2,4 Hz; 1H); 5,99 (d; $J = 2,4$ Hz; 1H); 5,20 (q; $J = 1,2$ Hz; 1H); 3,63 (brs; 1H); 1,97 (d; $J = 1,2$ Hz; 3H); 1,27 (s; 6H); 0,99 (s; 9H); 0,20 (s; 6H). ^{13}C NMR (125,7 MHz, CDCl_3): δ 156,1; 144,5; 128,3; 126,1; 124,5; 115,9; 108,9; 104,7; 51,9; 30,9; 25,7; 18,6; 18,2; -4,4. LC-MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt: 304, mért: 304.

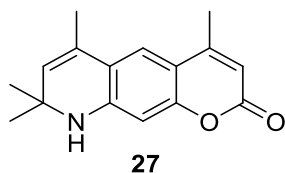
2,2,4-trimetil-1,2-dihidrokinolin-7-ol (26)



Kimértem 1,30 g (4,4 mmol, 1,0 ekv.) 7-((*tert*-butildimetilszilil)oxi)-2,2,4-trimetil-1,2-dihidrokinolint (**25**), 3,40 g (13 mmol, 3,0 ekv.) TBAF-ot és hozzáadtam 14 ml THF-t és 400 μ l ecetsavat. Fél óráig kevertettem a reakcióelegyet szobahőmérsékleten, majd hozzáadtam 70 ml telített NH_4Cl oldatot. Extraháltam ötször 40 ml DCM-nal, majd az egyesített szerves fázist mostam 50 ml telített sóoldattal, és MgSO_4 -on szárítottam. Bepároltam, majd kromatográfiásan tisztítottam (hexán:EtOAc = 0% $\rightarrow$ 40%). 0,68 g terméket kaptam (83%).

^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 8,91 (s; 1H); 6,72 (d; J = 8,2 Hz; 1H); 5,91 (d; J = 2,4 Hz; 1H); 5,88 (dd; J = 8,2; 2,4 Hz; 1H); 5,65 (s; 1H); 5,05 (s; 1H); 1,81 (d; J = 1,3 Hz; 3H); 1,15 (s; 6H). ^{13}C -NMR (126 MHz, DMSO-d_6): δ = 157,8; 145,5; 127,4; 124,9; 124,1; 112,7; 102,8; 99,0; 51,1; 30,9; 18,3. LC-MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt: 190, mért: 190.

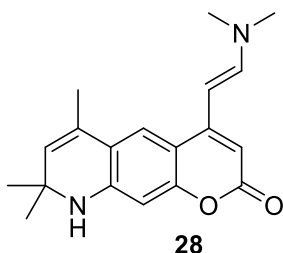
4,6,8-tetrametil-8,9-dihidro-2H-pirano[3,2-g]kinolin-2-on (27)



Bemértem egy gömblombikba 2,50 g (13,2 mmol, 1,0 ekv.) 2,2,4-trimetil-1,2-dihidrokinolin-7-olt (**26**) és 2,70 g (19,8 mmol, 1,5 ekv.) ZnCl_2 -ot, majd argon gázzal inertizáltam az atmoszférát. Feloldattam 25 ml EtOH-ban és hozzáadtam 2,2 ml metil-acetecetészert (19,8 mmol, 1,5 ekv.), majd 24 órán keresztül 78 $^\circ\text{C}$ -on kevertettem a reakcióelegyet. Másnap hagytam szobahőmérsékletűre hűlni, bepároltam az oldószert, majd oszlopkromatográfiás eljárással (hexán:EtOAc = 0% $\rightarrow$ 50%) tisztítottam a nyerste-terméket. 2,64 g zöld színű szilárd terméket kaptam (78%).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7,16 (s; 1H); 6,37 (s; 1H); 6,03 (s; 1H); 5,39 (s; 1H); 2,38 (s; 3H); 2,03 (s; 3H); 1,34 (s; 6H). LC-MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt: 256, mért: 256.

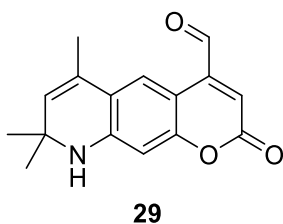
4-(2-(dimetilamino)vinil)-6,8,8-trimetil-8,9-dihidro-2H-pirano[3,2-g]kinolin-2-on (28)



Kimértem 220 mg (0,86 mmol, 1,0 ekv.) 4,6,8,8-tetrametil-8,9-dihidro-2H-pirano[3,2-g]kinolin-2-ont (**27**) és 210 g (0,70 mmol, 2,0 ekv.) DMF-DMA reagenst, majd hozzáadtam 2 ml DMF oldószert. 24 órán keresztül reflux hőmérsékleten (150 °C-os olajfürdőn) kevertettem a reakcióelegyet, majd bepároltam. Kvantitatív termeléssel kaptam 267 g terméket, melyet további tisztítás nélkül használtam fel a következő reakcióban.

LC-MS (ESI): m/z $[M+H]^+$ számolt: 311, mért: 311.

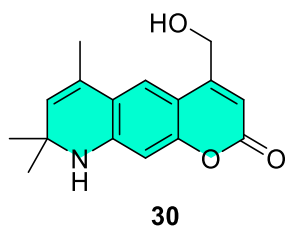
6,8,8-trimetil-2-oxo-8,9-dihidro-2H-pirano[3,2-g]kinolin-4-karbaldehid (29)



Kimértem 267 mg (0,86 mmol, 1,0 ekv.) 4-(2-(dimetilamino)vinil)-6,8,8-trimetil-8,9-dihidro-2H-pirano[3,2-g]kinolin-2-ont (**28**) és feloldottam 3 ml THF és 3 ml desztillált víz elegyében. Ezt követően lassan hozzáadagoltam 280 mg (1,29 mmol, 1,5 ekv.) NaIO₄-ot, és másfél óráig kevertettem szobahőmérsékleten a reakcióelegyet. Ezt követően kiszűrtem a keletkezett szervetlen sókat, majd eltávolítottam az oldószert bepárlással. A nyersterméket feloldottam 30 ml DCM-ban és 30 ml telített NaHCO₃ oldattal mostam. A vizes fázist háromszor 20 ml DCM-nal extraháltam, majd a szerves fázisokat egyesítettem és mostam 30 ml telített sóoldattal, majd MgSO₄-on szárítottam. Leszűrtem, bepároltam, majd kromatográfiásan tisztítottam (hexán:EtOAc = 0% → 60%). 177 mg sötét vörös színű terméket kaptam (76%).

LC-MS (ESI): m/z $[M+H]^+$ számolt: 270, mért: 270.

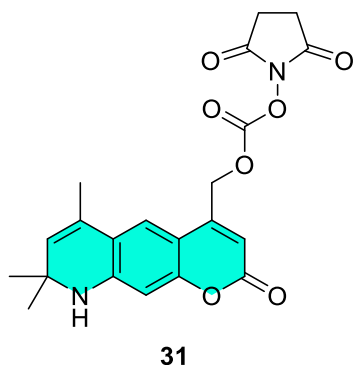
4-(hidroximetil)-6,8,8-trimetil-8,9-dihidro-2H-pirano[3,2-g]kinolin-2-on 3 (30)



Kimértem 52 mg (0,19 mmol, 1,0 ekv.) 6,8,8-trimetil-2-oxo-8,9-dihidro-2H-pirano[3,2-g]kinolin-4-karbaldehidet (**29**) és hozzáadtam 0,6 ml THF-t és 1,8 ml EtOH-t. Jeges vizes fürdővel 0 °C-ra hűtöttem a reakcióelegyet és hozzáadagoltam 37 mg (0,97 mmol, 5,0 ekv.) NaBH₄-et, majd 1 órán keresztül kevertettem a reakcióelegyet miközben hagytam szobahőmérsékletűre melegedni. A reakcióidő letelte után hozzáadtam a reakcióelegyhez 2 ml telített NaHCO₃ oldatot, és a kivált csapadékot leszűrtem. Az anyalúgot háromszor 5 ml DCM-nal extraháltam, majd az egyesített szerves fázisokat 5 ml telített sóoldattal mostam és MgSO₄-on szárítottam. Szűrés és bepárlás után kvantitatív termeléssel 53 mg termékhez jutottam (100%), mely további tisztítást nem igényelt.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 7,11 (s; 1H); 6,92 (m; 1H); 5,49 (t; *J* = 5,7 Hz; 1H); 5,41 (m; 1H); 4,68 (dd; *J* = 5,7; 1,2 Hz; 2H); 1,97 (d; *J* = 1,2 Hz; 3H); 1,24 (s; 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): δ = 161,1; 157,1; 155,2; 147,9; 128,8; 126,4; 118,5; 117,2; 106,0; 103,4; 97,1; 59,1; 51,9; 31,7; 18,3. LC-MS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ számolt: 272, mért: 272.

Aktivált 4-(hidroximetil)-6,8,8-trimetil-8,9-dihidro-2H-pirano[3,2-g]kinolin-2-on (31)

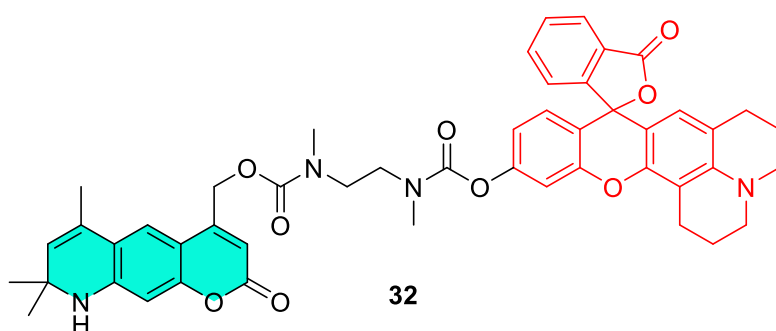


Végig sötétben dolgozva kimértem 84 mg (0,31 mmol, 1,0 ekv.) 4-(hidroximetil)-6,8,8-trimetil-8,9-dihidro-2H-pirano[3,2-g]kinolin-2-ont (**30**), 273 mg (0,93 mmol, 3,0 ekv.) DSC-t és 125 µl (1,55 mmol, 5,0 ekv.) piridint, majd hozzáadtam 8,5 ml amilénos DCM-t. 1 órán keresztül

keverttem a reakcióelegyet szobahőmérsékleten, majd 30 ml DCM-nal hígítottam. Szintén sötétben extraháltam háromszor 40 ml telített NaHCO_3 oldattal, mostam 30 ml telített sóoldattal, és MgSO_4 -on szárítottam. Szűrés és bepárlás után 113 mg termékhez jutottam (88%), melyből a szükséges mennyiséget további tisztítás nélkül azonnal felhasználtam a következő reakcióban.

LC-MS (ESI): m/z $[M+H]^+$ számolt: 413, mért: 413.

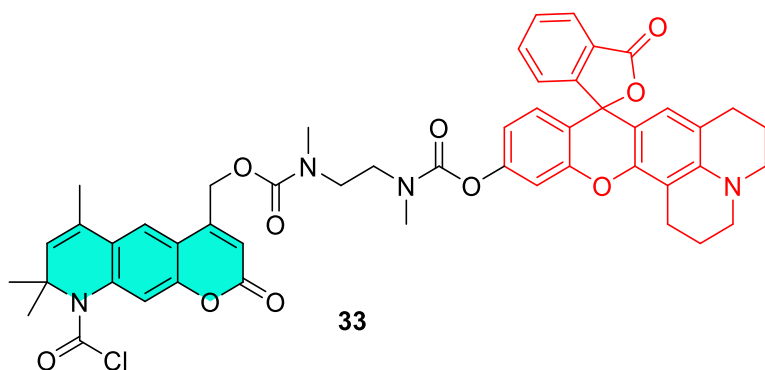
Kumarin védőcsoporttal konjugált rodol (32)



Végig sötétben dolgozva kimértem 27 mg-ot (0,04 mmol, 1,0 ekv.) az önfeláldozó linkerrel ellátott rodol jelzővegyületből (**19**) és 21 mg-ot (0,05 mmol, 1,2 ekv.) a **31** aktivált kumarin származékból. Argon gázzal inertizáltam a reakcióteret, majd feloldottam az anyagokat 1 ml vízmentes DCM-ban és 5 perc alatt hozzácsepegtettem 44 µl EDPIA 0,5 ml vízmentes DCM-nal készült oldatát, majd további 15 percig kevertettem szobahőmérsékleten a reakcióelegyet. Az oldószer eltávolítása után a nyersterméket oszlopkromatográfiásan tisztítottam (DCM:MeOH = 0% → 10%). 23 mg terméket kaptam (67%).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,98 (d; *J* = 7,5 Hz; 1H); 7,63 (t; *J* = 7,2 Hz; 1H); 7,58 (t; *J* = 7,4 Hz; 1H); 7,54 (s; 1H); 7,16 (d; *J* = 7,7 Hz; 1H); 7,08 – 7,02 (m; 2H); 6,76 – 6,65 (m; 2H); 6,33 (s; 1H); 6,15 – 6,01 (m; 2H); 5,28 (s; 2H); 3,59 – 3,54 (m; 2H); 3,20 – 3,08 (m; 6H); 3,05 (m; 4H); 2,90 – 2,82 (m; 2H); 2,57 – 2,45 (m; 2H); 2,09 – 1,98 (m; 4H); 1,96 (s; 3H); 1,85 (t; *J* = 6,2 Hz; 2H); 1,30 (s; 6H). LC-MS (ESI): *m/z* [M+H]⁺ számolt: 823, mért: 823.

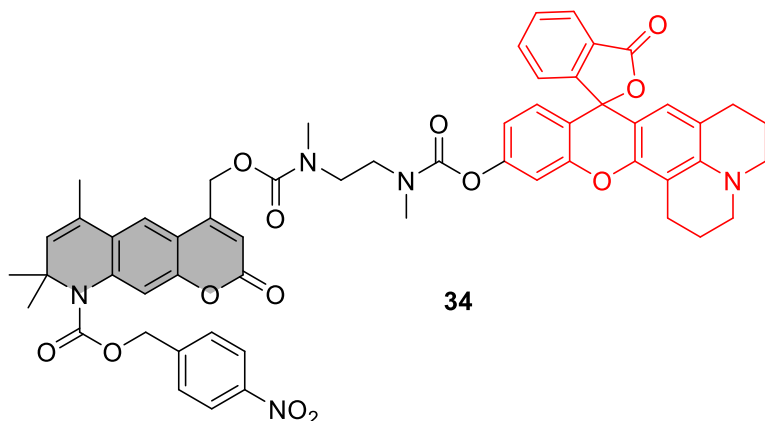
A kumarin – rodol konjugátum foszgénes aktiválása (33)



Kimértem 8,2 mg (10 μmol , 1,0 ekv.) **32** kumarin – rodol konjugátumot, azt atmoszférát argon gázzal inertizáltam, majd hozzáadtam 100 μl (193 μmol , 19,3 ekv.) toluolos foszgén oldatot. A reakcióelegyet másfélórán keresztül kevertettem 110 °C-on, majd hagytam lehűlni és a maradék foszgént argon átbuborékolatásával űztem ki az oldatból (NH_4OH oldatban elnyelve, ezzel semlegesítve). Az oldószer bepárlása után feldolgozás nélkül vittem tovább azonnal a következő reakcióba a terméket, kvantitatív termelést feltételezve.

LC-MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt: 885, mért: 885.

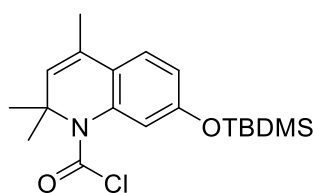
Deaktivált kumarin – rodol konjugátum (34)



Az előző lépésben kapott termékhez 2,3 mg (15 μmol , 1,5 ekv.) 4-nitrobenzil-alkoholt mértem, majd feloldottam 150 μl vízmentes DCM-ban, és 4 μl TEA-t adtam hozzá. A reakcióelegyet 24 órán keresztül kevertettem szobahőmérsékleten, majd az oldószer eltávolítása után oszlopkromatográfiásan (DCM:MeOH = 0% $\rightarrow$ 10%) próbáltam tisztítani a terméket, azonban nem sikerült tisztán izolálni.

LC-MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ számolt: 1002, mért: 1002.

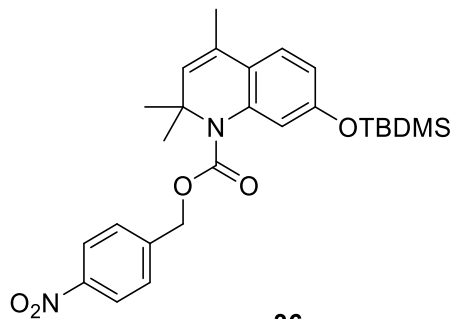
Foszgénrel aktivált 7-((*tert*-butildimetilszilil)oxi)-2,2,4-trimetil-1,2-dihidrokinolin (35)



35

Kimértem 303 mg (1,0 mmol, 1,0 ekv.) 7-((*tert*-butildimetilszilil)oxi)-2,2,4-trimetil-1,2-dihidrokinolint és argon gázzal inertizáltam az atmoszférát. Majd hozzáadtam 0,60 ml (1,2 mmol, 1,2 ekv.) toluolos foszgén oldatot és 0,40 ml (3 mmol, 3,0 ekv.) TEA-t és 2 ml acetonitrilt. A reakcióelegyet másfél órán keresztül kevertettem 40 °C-on. A reakcióidő letelte után a maradék foszgént argon átbuborékolatásával űztem ki az oldatból (NH₄OH oldatban elnyelve, ezzel semlegesítve). Ezután a nyersterméket tartalmazó oldatot azonnal, további feldolgozás nélkül vittem tovább a következő reakcióba.

4-nitrobenzil 7-((*tert*-butildimetilszilil)oxi)-2,2,4-trimetilkinolin-1(2*H*)-karboxilát (36)



36

Az előző lépésben kapott **35** nyerstermék oldatához 230 mg (1,5 mmol, 1,5 ekv.) 4-nitrobenzil-alkoholt adtam. A reakcióelegyet 48 órán át 30 °C-on kevertettem, majd az oldószer eltávolítása után kromatográfiásan tisztítottam (hexán:EtOAc = 0% → 50 %) a kapott anyagot, azonban a kívánt terméket nem sikerült izolálni.

LC-MS (ESI): m/z [M+H]⁺ számolt: 483, mért: 483.

7. Összefoglalás

Kutatómunkám során olyan feltételeken aktiválható fotolabilis védőcsoportok előállítása volt a célom, amelyek csak hipoxiás körülmények között alakulnak vissza aktív formájukba és válnak fénnel eltávolíthatóvá. Ehhez a nitroreduktáz enzim által felismert funkciós csoportok beépítését kíséreltem meg (*N*-oxid, *p*-nitrobenzilcsoport) fotoaktiválható kumarin-vázra olyan pozícióba, hogy megszűnjön annak fotolabilitása. Bár a végső, elképzeléseim szerint a leghatékonyabb ilyen védőcsoport előállítása még nem sikerült maradéktalanul, de a különböző szintézis utak jelentős részeredményekhez vezettek.

Elsőként sikeresen előállítottam egy *N*-oxid típusú deaktivált fotolabilis kumarin védőcsoportot, melyhez benzoésav származékot kapcsoltam távozó modellvegyületként (7). Ezután szintetizáltam egy NTR enzim által aktivált rodol típusú fluorogén jelzővegyületet (12), ami jobb alternatívája lett a benzoésavnak, mivel a felszabadulása könnyen követhető a megjelenő fluoreszcenciája miatt. A kettő kombinációjaként tervezett, kumarin *N*-oxid származékkal ellátott rodol (22a) stabilnak mutatkozott különböző szerves redukálószerekkel szemben, azonban az élő sejt kísérletek során a specifikussága az NTR enzimre nem bizonyult megfelelőnek. Így áttértem az NTR specifikus, *p*-nitrobenzillel deaktivált kumarin védőcsoport szintetizálására. Ennek részeként elvégeztem egy továbbfejlesztett kumarin-váz előállítását (30), aminek a 7-es pozíciójában szabad NH található, így ehhez karbamát kötésen keresztül kapcsolható a *p*-nitrobenzilcsoport. A korábban is használt kapcsolási reakcióval jó termeléssel előállítottam a fluorogén jelzővegyülettel kapcsolt fotoaktiválható konjugátumot (32), azonban a *p*-nitrobenzilcsoport beépítésével előállítandó célterméket (34) még nem sikerült tisztán izolálnom. A szintézisút több pontján is kísérletet tettem ennek a funkciós csoportnak a beépítésére, de idő hiányában még nem sikerült a kívánt eredményt elérnem. További céljaim között szerepel ennek a csoportnak az effektív beépítése a reakcióút egyik lépése során, illetve a sikeres szintézis és a biológiai kísérletek után távolabbi célom a fluorogén jelzővegyület rákellenes hatóanyagra való cseréje, illetve a kumarin-származék helyett nagyobb hullámhosszú fénnel hasítható xanténiumváz fluorofórok használata.

8. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném kifejezni hálámat és köszönetemet *Dr. Cserép Balázs Gergelynek* a rengeteg szakmai segítségért, amit kutatómunkám és a dolgozat írása közben nyújtott számomra. Sokat fejlődtem mellette szakmailag. Köszönöm a végtelen türelmét és elkötelezettségét, amivel felém és kérdéseim iránt fordult.

Továbbá köszönettel tartozom a Kémiai Biológia Kutatócsoport vezetőjének, *Dr. Kele Péternek* a lehetőségért, hogy csapatában dolgozhattam. Kivételes lehetőségekkel és értékes tapasztalatokkal gazdagodtam.

Köszönöm *Dr. Németh Krisztinának* és *Grád Annának* a biológiai vizsgálatokat, amivel elősegítették a kutatómunkám teljességét.

Végezetül pedig hálás vagyok a csoport *minden tagjának* a sok segítségért. Illetve szeretném megköszönni *szüleimnek és barátaimnak* a végtelen támogatásukat.

9. Irodalomjegyzék

- (1) Tsimberidou A. M.; Fountzilas E.; Nikanjam M.; Kurzrock R., *Cancer Treat. Rev.*, **2020**, 86, 102019.
- (2) Bae Y. H.; Park K., *J. of Contr. Rel.* Elsevier, **2011**, 153, 198–205.
- (3) Yang D.; Tian H. Y.; Zang T. N.; Li M.; Zhou Y.; Zhang J. F., *Sci. Rep.*, **2017**, 7, 9174.
- (4) Silva J. M.; Silva E.; Reis R. L., *J. of Contr. Rel.* Elsevier, **2019**, 298, 154–176.
- (5) Weinstain R.; Slanina T.; Kand D.; Klán P., *Chem. Rev.*, **2020**, 120, 13135–13272.
- (6) Egyed A.; Németh K.; Molnár T.; Kállay M.; Kele P.; Bojtár M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2022**, 145, 4026–4034.
- (7) Nani R. R.; Gorka A. P.; Nagaya T.; Kobayashi H.; Schnermann M. J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, 127, 13839–13842.
- (8) Umeda N.; Takahashi H.; Kamiya M.; Ueno T.; Komatsu T.; Terai T.; Hanaoka K.; Nagano T.; Urano Y., *ACS Chem. Biol.*, **2014**, 9, 2242–2246.
- (9) Slanina T.; Shrestha P.; Palao E.; Kand D.; Peterson J. A.; Dutton A. S.; Rubinstein N.; Weinstain R.; Winter A. H.; Klán P., *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, 139, 15168–15175
- (10) Hanahan D.; Weinberg R. A., *Cell Press*, **2000**; 100, 57–70.
- (11) Li Y.; Zhao L.; Li X. F., *Front Oncol.*, **2021**, 11, 700407.
- (12) Hallm. of Cancer Circ., BioRender.com, **2011**
- (13) Patterson L. H.; McKeown S. R., *British J. of Can.*, **2000**, 12, 1589–1593.
- (14) Hirayama T.; Tsuboi H.; Niwa M.; Miki A.; Kadota S.; Ikeshita Y.; Okuda K.; Nagasawa H., *Chem. Sci.*, **2017**, 8, 4858–4866.
- (15) Khatun S.; Biswas S.; Binoy A.; Podder A.; Mishra N.; Bhuniy, S., *J. Photo. Photobio. B.*, **2020**, 209, 111943.
- (16) Wu Z.; Feng Y.; Geng B.; Liu J.; Tang X., *RSC Adv.*, **2014**, 4, 30398–30401.
- (17) Lin Q.; Bao C.; Yang Y.; Liang Q.; Zhang D.; Cheng S.; Zhu L., *Adv. Mat.*, **2013**, 25, 1981–1986.
- (18) Csorba Zs.; Biotechnológia MSc TDK dolgozat, ELTE, **2023**

- (19) Weinrich T.; Gränz M.; Grünewald C.; Prisner T. F.; Göbel M. W., *Eur. J. Org. Chem.*, **2017**, 2017, 491–496.
- (20) Grád A.; Biotechnológia MSc diplomamunka, BME, **2023**
- (21) Bojtár M.; Németh K.; Domahidy F.; Knorr G.; Verkman A.; Kállay M.; Kele P., *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, 142, 15164–15171.
- (22) Pal S.; Mukherjee M.; Sen B.; Mandal S. K.; Lohar S.; Chattopadhyay P.; Dhara K., *Chem. Comm.*, **2015**, 51, 4410–4413.
- (23) Klimek R.; Asido M.; Hermanns V.; Junek S.; Wachtveitl J.; Heckel A., *Chem. Eur. J.*, **2022**, 28, e2022006.