ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σχεδιασμός, ανάπτυξη και αξιολόγηση νέων φθοροφόρων

Αδάμης Σ. Κωνσταντίνος

Επιβλέπων Καθηγητής: Νεοχωρίτης Κωνσταντίνος

HPAKAEIO 2023

UNIVERSITY OF CRETE DEPARTMENT OF CHEMISTRY

ISOLATION AND SYNTHESIS OF NATURAL PRODUCTS WITH BIOLOGICAL ACTIVITY



MASTER THESIS DIPLOMA

Design, development and evaluation of new fluorophores

Adamis S. Konstantinos

Master Thesis Supervisor: Neochoritis Constantinos

HERAKLION 2023

Εξεταστική Επιτροπή

Νεοχωρίτης Κωνσταντίνος

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Στρατάκης Μανώλης

Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ελευθεριάδης Νικόλαος

Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

||

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, για την υλικοτεχνική του υποστήριξη και τη φιλοξενία του όλα αυτά τα χρόνια, όσο και τους καθηγητές μου, για τις γνώσεις που μου προσέφεραν από την πρώτη κιόλας στιγμή.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, τον κ. Κωνσταντίνο Νεοχωρίτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε να εκπονήσω την μεταπτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριό του, την ανάθεση του θέματος αλλά και τη συνεχή διαθεσιμότητά του καθ' όλη τη διάρκεια της συμμετοχής μου στην ερευνητική του ομάδα.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον κ. Νικόλαο Ελευθεριάδη, που με στήριξε και με καθοδήγησε κατά τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριό του, με συνεχή προθυμία και όρεξη να με βοηθήσει σε κάθε νέο μου βήμα αλλά και τον κ. Μανώλη Στρατάκη που δέχτηκε να αφιερώσει λίγο από τον χρόνο του και να αξιολογήσει το παρόν δίπλωμα ειδίκευσης.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω στους υποψήφιους διδάκτορες Xiafong Lei και Μιχάλη Φραγκιαδάκη, για την συνεχή καθοδήγηση, την άψογη συνεργασία και τις πολύτιμες συμβουλές που έλαβα. Ένα μεγάλο μέρος της διατριβής μου το οφείλω σε εκείνους καθώς συνέβαλλαν σημαντικά στην εξέλιξη των εργαστηριακών μου ικανοτήτων και τη διεύρυνση των γνώσεων μου.

Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου και του τομέα της Οργανικής Χημείας για την ανεκτίμητη βοήθεια και το πολύ ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που δημιουργήσαμε.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη συνεχή υποστήριξη, δίνοντάς μου συνεχώς δύναμη και για το γεγονός ότι ήταν πάντοτε δίπλα μου.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικές πληροφορίες

Ονοματεπώνυμο: Αδάμης Κωνσταντίνος Ημερομηνία γέννησης: Ιούνιος 11, 1999 Εθνικότητα: Ελληνική E-mail: <u>konstantinos.s.adamis@gmail.com</u>

Εκπαίδευση

Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης στην οργανική χημεία

- Τοποθεσία: Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- Περίοδος: Σεπτέμβριος 2021- Σεπτέμβριος 2023
- Κατηγορία μεταπτυχιακού διπλώματος: Απομόνωση και σύνθεση φυσικών προϊόντων με βιολογική δραστικότητα
- Σχεδιασμός, ανάπτυξη και αξιολόγηση νέων φθοροφόρων ενώσεων
- Υπεύθυνος: Κ. Νεοχωρίτης, Επίκουρος καθηγητής

Μεταπτυχιακός βοηθός

- Τοποθεσία: Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- Περίοδος: Εαρινό εξάμηνο 2021-2022, Χειμερινό εξάμηνο 2022-2023
- Εργαστήριο: Εργαστήριο Οργανικής Χημείας ΙΙ και Εργαστήριο Φυσικοχημείας Ι
- Υπεύθυνος: Δρ. Α. Κουβαράκης και Δρ. Β. Παπαδημητρίου, Δρ. Ν. Στρατηγάκης

<u>Πτυχίο στην Χημεία</u>

- Τοποθεσία: Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- Περίοδος: Σεπτέμβριος 2017 Σεπτέμβριος 2021
- Βαθμός πτυχίου: 8.32/10

<u>Πτυχιακή εργασία</u>

- Τοποθεσία: Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- Περίοδος: Ιούνιος 2021 Σεπτέμβριος 2021
- Τίτλος πτυχιακής εργασίας: Πυρρένιο BODIPY ως υμένιο μεταφοράς ηλεκτρονίων
- Υπεύθυνος: Α. Κουτσολέλος

<u>Γλώσσες</u>

• Αγγλικά: Certificate of English Language Proficiency (C2)

CURICULUM VITAE

Personal Information

Name: Adamis Konstantinos

Date of birth: June 11, 1999

Nationality: Greek

E-mail: konstantinos.s.adamis@gmail.com

Education

M. Sc. In Organic Chemistry

- Location: Chemistry Department, University of Crete
- Time period: September 2021- September 2023
- Design, development and evaluation of new fluorophores
- Supervisor: C. Neochoritis

Laboratory assistant

- Location: Chemistry Department, University of Crete
- Time period: Spring semester 2021-2022 and winter semester 2022-2023
- Laboratory: Organic Chemistry Laboratory II & Physical Chemistry Laboratory I
- Supervisor: Dr. A. Kouvarakis and Dr. V. Papadimitriou, Dr. N. Stratigakis

Degree in Chemistry

- Location: Chemistry Department, University of Crete
- Time period: September 2017-September 2021
- Degree Grade: 8.32/10

Bachelor Thesis

- Location: Chemistry Department, University of Crete
- Time period: June 2021 September 2021
- Thesis title: Pyrene Bodipy as an electron transfer layer
- Supervisor: A. Coutsolelos

Language Skills

• English: Certificate of English Language Proficiency (C2)

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο σχεδιασμός, η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός νέων φθοριζουσών ουσιών, μεσώ αντιδράσεων πολλών συστατικών (Multicomponent reactions-MCRs), για την εύρεση νέων, ομοιοπολικών και μη, αναστολέων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων σκοπεύοντας ταυτόχρονα στην απεικόνιση αυτών με τεχνικές φασματοσκοπίας φθορισμού. Οι αντιδράσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι αντίδραση Groebke-Blackburn-Bienaymé (GBB-3CR), Passerini (P-3CR), Ugi-Tetrazole (UT-4CR) και Ugi Classical (U-4CR). Μεσώ τροποποίησης του μορίου της φλουορεσίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως αρχική φθορίζουσα ύλη, αλλά και άλλων, επιτεύχθηκε η ενσωμάτωσή της στους σκελετούς των συγκεκριμένων αντιδράσεων. Συμπληρωματικά, λήφθηκαν τα φάσματα απορρόφησης και εκπομπής των ενώσεων αυτών. Τα προϊόντα συντέθηκαν με σκοπό να διατηρούν την ιδιότητα του φθορισμού, αλλά μέσω του σκελετού τής κάθε αντίδρασης και των διαφόρων χαρακτηριστικών ομάδων που περιλαμβάνονται, να μπορούν να στοχεύουν επιλεκτικά και να επισημαίνουν διάφορους βιολογικούς στόχους.

Λεξεις-κλειδια: Φθορίζουσες ουσίες, ισονιτρίλιο, Φλουορεσίνη, κουμαρίνη, αντιδράσεις πολλών συστατικών (MCRs), Groebke-Blackburn-Bienaymé (GBB-3CR), Passerini (P-3CR), Ugi-Tetrazole (UT-4CR), Ugi Classical (U-4CR), φασματοσκοπία UV-Vis

Summary

The purpose of this work is the design, synthesis and characterization of new fluorescent substances, via Multicomponent Reactions (MCRs), aiming to find new, covalent and non-covalent, protein inhibitors for the imaging of those, by fluorescence spectroscopy techniques. The reactions that were used are the Groebke-Blackburn-Bienaymé (GBB-3CR), Passerini (P-3CR), Ugi-Tetrazole (UT-4CR) and the Ugi Classical (U-4CR) reactions. Through modification of the molecule of fluorescein, which was used as the initial fluorescent source, between others, its integration into the backbone of the specific reactions was achieved. In addition, the absorption and emission spectra of these compounds were obtained. The products were synthesized to retain their fluorescence capacity, but due to the backbone of each reaction and the different functional groups that are contained, to be able to selectively target and highlight various biological targets.

Keywords: Fluorescent substances, isocyanide, Fluorescein, coumarin, multicomponent reactions (MCRs), Groebke-Blackburn-Bienaymé (GBB-3CR), Passerini (P-3CR), Ugi-Tetrazole (UT-4CR), Ugi Classical (U-4CR), UV-Vis spectroscopy

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1 Εισαγωγή1
1.1 Εκπομπή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας μέσω φθορισμού και φωσφορισμού1
1.2 Φθορίζουσες ουσίες - Φλουορεσίνη3
1.3 Αντιδράσεις πολλών συστατικών5
1.4 Βιοαπεικόνιση7
2 Συζήτηση - Αποτελέσματα9
2.1 Μεθοδολογία – Προσέγγιση9
2.2 Σύνθεση παραγώγων μέσω MCR12
2.3 Φάσματα απορρόφησης και εκπομπής20
3 Συμπεράσματα
4 Πειραματικό μέρος31
4.1 Όργανα και πειρατικές τεχνικές31
4.2 Σύνθεση αιθανικού εστέρα φλουορεσίνης31
4.3 Σύνθεση ισονιτριλίων32
4.4 Σύνθεση παραγώγων μέσω αντιδράσεων πολλών συστατικών
4.5 Σύνθεση της 6i μέσω αντίδρασης Sonogashira37
4.6 Μετρήσεις απορρόφησης-φθορισμού38
5 Παράρτημα

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

DCM	Dichloromethane
CHCl ₃	Chloroform
CDCl ₃	Deuterated Chloroform
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Hz	Hertz
MCR	Multi Component Reaction
Μ	Molarity
h	Hours
rt	Room Temperature
O°	Degrees Celsius
PE	Petroleum Ether
EA	Ethyl Acetate
MeOH	Methanol
EtOH	Ethanol
Et ₃ N	Triethylamine
H ₂ SO ₄	Sulfuric Acid
NaCO ₃	Sodium Carbonate
NaHCO ₃	Sodium hydrogencarbonate
K ₂ CO ₃	Potassium Carbonate
Sc(OTf) ₃	Scandium Triflate
PdCl ₂ (PPh ₃) ₂	Bis(triphenylphosphine)palladium(II)dichloride
Cul	Copper(I) Iodide
(<i>i</i> -Pr)₂NH	Diisopropylamine
DMF	Dimethylformamide
ACN	Acetonitrile
UT-4CR	Ugi-Tetrazole Four Components Reaction
GBB-3CR	Groebke-Blackburn-Bienaymé
P-3CR	Passerini Three Components Reaction
U-4CR	Ugi Four Component Reaction
Uv-Vis	Ultra Violet – Visible
A	Absorption
A.U.	Absorption Units
RFU	Relative Fluorescence Units
nm	Nanometers
I	Liquid
aq	Aqua
TLC	Thin Layer Chromatography
GC-MS	Gas Chromatography – Mass Spectometer
NH ₄ CI	Ammonium Chloride

1 Εισαγωγή

Η χρήση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας για την ανάλυση, την ανίχνευση ή την ταυτοποίηση άγνωστων δειγμάτων, καθίσταται πλέον αναπόσπαστο κομμάτι των φυσικών επιστημών. Είναι κοινώς αποδεκτό ότι η φασματοσκοπία αποτελεί τα μάτια μας στον μικρόκοσμο ακόμα και σε υποατομικό επίπεδο, με αποτέλεσμα να βρίσκει αναρίθμητες εφαρμογές σε όλο το εύρος των φυσικών επιστημών, από την βιομηχανία μέχρι και την έρευνα. Η μεγαλύτερη, ίσως, εφαρμογή τέτοιων φαινομένων, απαρτίζεται κυρίως από φωτοφυσικά φαινόμενα, τα οποία στηρίζονται στο ορατό φως και καθιστούν δυνατή την όψη του μικρόκοσμου με γυμνό μάτι.

1.1 Εκπομπή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας μέσω φθορισμού και φωσφορισμού

Ίσως το πιο γνωστό και το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο φωτοφυσικό φαινόμενο ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας αποτελεί ŋ εκπομπή μέσω φθορισμού (fluorescence). Ο φθορισμός ίσταται η φωτονιακή, ή ακτινοβολούσα, διεργασία εκπομπής, δηλαδή αποβολής ενέργειας από το μόριο, μέσω ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (radiative decay). Σε συνδυασμό με τον φωσφορισμό (phosphorescence) συγκροτούν τις δύο επικρατέστερες φωτονιακές διαδικασίες. Άξιο αναφοράς είναι ότι ενέργεια μπορεί να απελευθερωθεί από το μόριο και με μη φωτονιακές διεργασίες (non-radiative decay). Σε αυτήν την περίπτωση η περίσσεια ενέργειας διοχετεύεται στην μεταφορική κίνηση, τις δονήσεις ή την περιστροφή γειτονικών μορίων μέσω κρούσεων. Μάλιστα καθιστά και την συνηθέστερη διαδικασία αποβολής ενέργειας. Η αποδιέγερση μέσω των δονήσεων του μορίου, συχνά αναφέρεται και ως δονητική χαλάρωση (vibrational relaxation). Τέλος, ένα διεγερμένο μόριο μπορεί επίσης και να διασπαστεί ή να λάβει μέρος σε κάποια χημική αντίδραση.

Στον φθορισμό, αυθόρμητη εκπομπή ακτινοβολίας συμβαίνει, αφότου η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία πάψει να υπόκειται στο δείγμα. Σε αντίθεση με τον φωσφορισμό, όπου η αυθόρμητη εκπομπή διατηρείται για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους, από κλάσματα δευτερολέπτων μέχρι και ώρες. Η κύρια διαφορά, δηλαδή, των δύο διεργασιών έγκειται στο γεγονός ότι η πρώτη μετατρέπει ταχύτατα την απορροφούσα ακτινοβολούσα σε επανεκπεμπόμενη, ενώ η τελευταία την αποθηκεύει επανεκπέμποντας την σε μικρές δόσεις και συνεπώς μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.1.0.



Εικόνα 1.1.0: Διάγραμμα Έντασης εκπεμπόμενης ακτινοβολίας-Χρόνου φθορισμού και φωσφορισμού.1

Η εικόνα 1.1.1 απεικονίζει την αλληλουχία των σταδίων που ακολουθούνται κατά την διαδικασία του φθορισμού. Αρχικά, απορροφάται ενέργεια από τα μόρια μεταβαίνοντας σε μία διεγερμένη κατάσταση. Μέρος της ενέργειας αυτής μεταφέρεται στο περιβάλλον, σε γειτονικά μόρια, μέσω κρούσεων. Συνεπώς έχουμε μια αρχική, μη ακτινοβολούσα, αποδιέγερση των μορίων μέχρι την χαμηλότερης ενέργειας δονητική κατάσταση της διεγερμένης ηλεκτρονιακής. Τα περιβάλλοντα μόρια, όμως, υπάρχει περίπτωση να μην μπορούν να απορροφήσουν την εναπομένουσα διαφορά ενέργειας μεταξύ της διεγερμένης και της θεμελιώδης ηλεκτρονιακής κατάστασης. Η διεγερμένη κατάσταση τότε μπορεί να επιβιώσει αρκετά, έτσι ώστε το μόριο να αποβάλλει την ενέργεια αυτή μέσω αυθόρμητης εκπομπής ακτινοβολίας, δηλαδή μέσω της εκπομπής ενός φωτονίου.



Εικόνα 1.1.1: Διάγραμμα Μοριακής δυναμικής ενέργειας-Διαπυρινική απόσταση, το οποίο απεικονίζει την εκπομπή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας μέσω φθορισμού.^{1, 2}

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο φθορισμός μαζί με τον φωσφορισμό, αποτελούν τις δύο κύριες φωτονιακές διεργασίες. Στην εικόνα 1.1.2 αναγράφονται, ομοίως με την εικόνα 1.1.1, τα στάδια κατά την διαδικασία εκπομπής ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας μέσω φωσφορισμού. Στην συγκεκριμένη περίπτωση τον βασικό ρόλο διαδραματίζει η ιδιοπεριστροφή (spin) των ηλεκτρονίων κατά τις διάφορες διεργασίες. Στην θεμελιώδη κατάσταση τα μόρια είναι συζευγμένα, οπότε η πολλαπλότητα του spin³ είναι 1 (S=0). Για τον λόγο αυτό η κατάσταση έχει την επωνυμία *singlet* και συμβολίζεται ως S₀. Το μηδέν συμβολίζει την θεμελιώδη κατάσταση. Για την πρώτη διεγερμένη ανάλογα με το spin του ηλεκτρονίου διακρίνονται δύο καταστάσεις, η S₁ και η T₁. Το "T" αντιστοιχεί στον όρο *triplet*, από την πολλαπλότητα της κατάστασης που είναι ίση με 3.

Τα αρχικά στάδια κατά τον φωσφορισμό είναι τα ίδια με τον φθορισμό, δηλαδή αρχικά διεγείρεται το μόριο, από την κατάσταση S_0 στην S_1 . Έπειτα συμβαίνει δονητική χαλάρωση, έως ότου η ενεργειακή κατάσταση του μορίου φτάσει στην ελάχιστης ενέργειας δονητική κατάσταση της S_1 . Η διαφοροποίηση, συμβαίνει στην περίπτωση

¹ Atkins, P., Paula, J. D. & Keeler, J. Atkins' Physical Chemistry. (Oxford University Press, 2022).

² Το διάγραμμα είναι αντιπροσωπευτικό για διατομικά μόρια

³ 2S+1, όπου S : ο κβαντικός αριθμός του συνολικού spin του μορίου

που η T₁ έχει κάποια δονητική κατάσταση, ενεργειακά πολύ κοντά στην ελάχιστης ενέργειας δονητική της S₁. Η T₁ είναι πάντα μικρότερης ενέργειας από την S₁, λόγω του κανόνα του Hund. Επομένως, αν ισχύει αυτό, το ηλεκτρόνιο μπορεί και αλλάζει το spin του, μεταπηδώντας στην T₁ κατάσταση, φαινόμενο που ονομάζεται διασυστημική διασταύρωση (intersystem crossing). Στην συνέχεια ακολουθεί μία επιπλέον δονητική χαλάρωση μέχρι την ελάχιστης ενέργειας δονητική κατάσταση της T₁. Στο σημείο αυτό, αν η διαφορά τη ενέργειας μεταξύ των καταστάσεων T₁ και S₀ δεν μπορεί να απορροφηθεί από το περιβάλλον, τότε η διεγερμένη κατάσταση μπορεί να επιβιώσει αρκετά, ώστε να συμβεί αποβολή της ενέργειας μέσω φωτονίου.



Internuclear separation

Εικόνα 1.1.2: Διάγραμμα Μοριακής δυναμικής ενέργειας-Διαπυρινική απόσταση, το οποίο απεικονίζει την εκπομπή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας μέσω φωσφορισμού.^{1, 2}

Η ιδιαιτερότητα στην περίπτωση αυτή είναι ότι η μετάβαση S₀—T₁, είναι απαγορευμένη. Συνεπώς, η ενέργεια παγιδεύεται στην κατάσταση T₁ και τα μόρια εκπέμπουν για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, απ' ότι στην περίπτωση του φθορισμού.

1.2 Φθορίζουσες ουσίες - Φλουορεσίνη

Ως φθορίζοντα χαρακτηρίζονται τα μόρια, τα οποία φέρουν την ιδιότητα του φθορισμού, δηλαδή απορροφούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και την επανεκπέμπουν με μεγαλύτερο μήκος κύματος. Τα βασικά μεγέθη που χαρακτηρίζουν τις φθορίζουσες ουσίες είναι :

- Μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης και εκπομπής: Το μέγιστο μήκος κύματος στο οποίο απορροφάει και εκπέμπει η ένωση.
- Συντελεστής μοριακής απορρόφησης, ε.
- Κβαντική απόδοση : Αριθμός φωτονίων που εκπέμπονται προς τον αριθμό φωτονίων που απορροφούνται.
- Χρόνος ημιζωής φθορισμού: Ο χρόνος που απαιτείται για να επέλθει κατά το ήμισυ απόσβεση στην ένταση φθορισμού.
- Μετατόπιση Stokes (Stokes' shift): Η διάφορα μεταξύ του μεγίστου απορρόφησης και μεγίστου εκπομπής.

Οι φθορίζουσες ουσίες γενικά κατατάσσονται σε 4 κατηγορίες: βιομόρια (κυρίως πρωτεΐνες), οργανικά μόρια, συνθετικά ολιγομερή και συστήματα πολλών συστατικών. Τα αμιγώς οργανικά, μη πρωτεϊνικά φθορίζοντα μόρια κατατάσσονται σε κατηγορίες με βάση την ομάδα που προκαλεί τον φθορισμό. Οι ομάδες αυτές καλούνται φθοροφόρες και οι πιο κοινές απεικονίζονται στην εικόνα 1.2.0.⁴



Εικόνα 1.2.0: Κατηγορίες οργανικών φθοριζόντων μορίων. a) Παράγωγα ξανθενίου, b) Παράγωγα κυανίνης (στρεπτοκυανινών, ημικυανινών, κυανινών κλειστής δομής), c) Παράγωγα σκαρενίου, d) Παράγωγα ναφθαλενίου, e) Παράγωγα κουμαρίνης, f) Παράγωγα οξαδιαζολίου, g) Παράγωγα ανθρακενίου, h) Παράγωγα πυρενίου, i) Παράγωγα οξαζίνης, j) Παράγωγα Ακριδίνης, k) Παράγωγα αρυλομεθανίου (διάρυλομεθανιου, τριάρυλομεθανιου).⁴

Μία από τις πιο γνωστές και πιο διαδεδομένες φθορίζουσες χρωστικές, μεταξύ άλλων, είναι και η φλουορεσίνη (fluorescein), εικόνα 1.2.1. Η φλουορεσίνη έχει την τρικυκλική δομή του Ξανθενίου, αλλά ανήκει στην κατηγορία των βαφών τριαρυλομεθανίου. Αποτελεί ένα κόκκινο λεπτόκοκο στερεό και εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 499 nm και μέγιστο εκμπομπής στα 520-525 nm.

⁴ Liu, J., Liu, C. & He, W. Fluorophores and their applications as molecular probes in living cells. *Current Organic Chemistry* **17**, 564–579 (2013).



Εικόνα 1.2.1: Δομή φλουορεσίνης.

Η ομάδα του καρβοξυλικού οξέως μπορεί να ειναι πρωτονιωμένη ή μη πρωτονιωμένη ανάλογα με την τιμή του pH του διαλύματος μέσα στο οποίο βρίσκεται η ένωση. Όταν η ομάδα αυτή έχει αποπρωτονιωθεί, η φλουορεσίνη βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ των δομών που παρουσιάζονται στο σχήμα 1.2.0.



Σχήμα 1.2.0: Ισορροπία μεταξύ των δομών που βρίσκεται το μόριο της φλουορεσίνης σε βασικό περιβάλλον.

Λόγω της ισορροπίας αυτής, τα μέγιστα απορρόφησης και εκπομπής της Φλουορεσίνης αλλάζουν ανάλογα με την τιμή του pH του διαλύματος στο οποίο βρίσκεται.

1.3 Αντιδράσεις πολλών συστατικών

Οι αντιδράσεις πολλών συστατικών (MCR) αναφέρονται σε διαδικασίες στις οποίες τουλάχιστον τρία διαφορετικά συστατικά αντιδρούν, προς την παραγωγή ενός κύριου προϊόντος, ανεξαρτήτως του μηχανισμού τους. Αποτελούν one-pot διαδικασίες και φέρουν μείζονος σημασίας στη σύγχρονη χημεία, καθώς διευκολύνουν τη δημιουργία περιβαλλοντικά φιλικών μετασχηματισμών. Έχουν πολλά οφέλη, όπως εξοικονόμηση χρόνου και ενέργειας, μείωση παραπροϊόντων και χρήση λιγότερων πόρων. Συνήθως απαιτούν χαμηλές θερμοκρασίες, μη τοξικούς διαλύτες, αποφεύγουν δαπανηρούς καταλύτες και αδρανείς συνθήκες. Στο σχήμα 1.3.0 απεικονίζεται η γραμμική και συγκλίνουσα σύνθεση σε σύγκριση με την σύνθεση βάσει MCRs.



Σχήμα 1.3.0: Α) Γραμμική σύνθεση και Συγκλίνουσα σύνθεση, Β) Σύνθεση μέσω MCR

Ένα από, ίσως, τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η αντίδραση Ugi-Classical τεσσάρων συστατικών (U-4CR). Αναφέρθηκε πρώτη φορά από τον Ivar Ugi το 1959.⁵ Σε αυτήν συμμετέχουν μία αμίνη, μία καρβονυλική ένωση, ένα ισονιτρίλιο και ένα καρβοξυλικό οξύ. Επίσης, η αντίδραση Ugi-Tetrazole τεσσάρων συστατικών (UT-4CR)⁶, η οποία είναι παραλλαγή της U-4CR, αντικαθιστώντας το καρβοξυλικό οξύ με μία πηγή αζιδίου, παράγοντας τετραζόλια. Έτσι προσφέρουν πρόσβαση σε βιβλιοθήκες τετραζολίων, τα οποία είναι βιοϊσοεστέρες των 1,5-αμιδίων και των καρβοξυλικών οξέων. Τα τετραζόλια είναι αρωματικοί ετεροκυκλικοί δακτύλιοι με δύο διπλούς δεσμούς, αποτελούμενοι από έναν άνθρακα και τέσσερα άτομα αζώτου. Συνήθως, οι αντιδράσεις Ugi διεξάγονται σε πολικούς, πρωτικούς διαλύτες. Εκτός από τις U-4CR και UT-4CR, η αντίδραση Passerini τριών συστατικών (P-3CR) είναι μέρος των MCRs και αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1921, από τον Mario Passerini.^{7,8} Μάλιστα αποτελεί την πρώτη αντίδραση πολλών συστατικών που ανακαλύφθηκε. Μία ακόμα αντίδραση, η οποία φέρει μεγάλη συνθετική αξία αποτελεί η αντίδραση Groebke-Blackburn-Bienaymé τριών συστατικών (GBB-3CR).^{9,10,11} Σε αυτή συμμετέχουν μια καρβονυλική ένωση, ένα ισονιτρίλιο και μία 2-αμινοπυριδίνη. Τα σχήματα των παραπάνω αντιδράσεων απεικονίζονται όλα στο σχήμα 1.3.1.



Σχήμα 1.3.1: Τα σχήματα των αντιδράσεων Ugi-Classical, Ugi-Tetrazole, Passerini και Groebke-Blackburn-Bienaymé.

⁵Ugi, I. Versammlungsberichte. Angew. Chem. 71, 386 (1959).

⁶ Ugi, I. The α-Addition of Immonium Ions and Anions to Isonitriles Accompanied by Secondary Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1**, 8–21 (1962).

1.4 Βιοαπεικόνιση

Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 1.0, τα φωτοφυσικά φαινόμενα μας δίνουν την δυνατότητα να δούμε τον μικρόκοσμο με γυμνό οφθαλμό. Αυτό ακριβώς επιτυγχάνεται και στον τομέα της βιοαπεικόνισης. Η βιοαπεικόνιση, ως όρος αναφέρεται σε όλες τις τεχνικές, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την επισήμανση βιομορίων και γενικά βιολογικών παραγόντων με σκοπό την απεικόνιση τους. Μία κοινή μέθοδος βιοαπεικόνησης, είναι και η χρήση φθοριζουσών ουσιών, σχήμα 1.4.0.



Σχήμα 1.4.0: Πρόσδεση μιας φθορίζουσας ομάδας ομοιοπολικά σε ένα βιολογικό παράγοντα-στόχο, μέσω είτε του ligand (affinity-based) ή της δραστικής ομάδας (activity-based)

Η σύζευξη τους επιλεκτικά σε κάποιο βιολογικο παράγοντα-στόχο μας επιτρέπει να το παρακολουθούμε (monitoring) μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού, εκμεταλλευόμενοι τον φθορισμό της. Οι φθορίζουσες ουσίες οι οποίες χρησιμοποιούνται για σκοπούς απεικόνισης χαρακτηρίζονται και ως επισημαστές (tags, reporters). Αυτό συνήθως γίνεται με κάποια δραστική ομάδα (warhead), η οποία επιτρέπει την ομοιοπολική σύνδεση στο στόχο. Με τον τρόπο αυτό, μας επιτρέπεται να ανιχνεύσουμε πιθανά φαινόμενα, να δούμε κατά πόσο και πότε λαμβάνουν μέρος, με αποτέλεσμα να έρχονται στο φως πολύπλοκοι μηχανισμοί, που σε διαφορετική περίπτωση θα χρειαζόντουσαν πολύ παραπάνω μελέτη.

Ένα παράδειγμα βιοαπεικόνισης είναι και οι βιοαισθητήρες (biosensors), οι οποίοι ανιχνεύουν διάφορα μέταλλα. Μέταλλα, όπως ο χαλκός, το νάτριο, το κάλιο. ο σίδηρος ή ο ψευδάργυρος συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές διεργασίες και καθίστανται απαραίτητα για την ομαλή λειτουργεία του οργανισμού. Πολλές ασθένειες σχετίζονται με την παρουσία ή την απουσία μετάλλων, παράδειγμα αποτελεί η σιδηροπενική αναιμία και η υπερσιδήρωση. Η σιδηροπενική αναιμία, που μάλιστα αποτελεί την πιο κοινή μορφή αναιμίας, χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια σιδήρου και η κλινική της εικόνα περιλαμβάνει συμπτώματα όπως, ωχρότητα, εύκολη κόπωση, δύσπνοια στην κόπωση, αίσθημα παλμών, γαστρίτιδα, κεφαλαλγία, εμβοές καθώς και στηθαγχικά ενοχλήματα σε ηλικιωμένους. Επιπλέον, η σιδηροπενική αναιμία μπορεί να προκαλέσει ατροφία θηλών της γλώσσας, χειλίτιδα, ευθραυστότητα νυχιών, επώδυνη δυσκαταποσία και μηνορραγία. Ο σίδηρος, όμως, δεν παύει να αποτελεί ένα τοξικό

⁷ Passerini, M. & Simone, L. Sopra gli isonitrili (I). Composto del p-isonitril-azobenzolo con acetone ed acido acetico. *Gazzetta Chimica Italiana* **51**, 126–129 (1921)

⁸ Passerini, M. & Simone, L. Sopra gli isonitril^í (I). Composto del p-isonitril-azobenzolo con acetone ed acido acetico. *Gazzetta Chimica Italiana* **51**, 181–189 (1921)

⁹ Groebke, K., Weber, L. & Mehlin, F. Synthesis of Imidazo[1,2-a] annulated Pyridines, Pyrazines and Pyrimidines by a Novel Three-Component Condensation. *Synlett*, 661–663 (1998).

¹⁰ Bienaymé, H. & Bouzid, K. A New Heterocyclic Multicomponent Reaction For the Combinatorial Synthesis of Fused 3-Aminoimidazoles. *Angewandte Chemie International Edition* **37**, 2234–2237 (1998).

¹¹ Blackburn, C., Guan, B., Fleming, P., Shiosaki, K. & Tsai, S. Parallel synthesis of 3-aminoimidazo[1,2-a]pyridines and pyrazines by a new three-component condensation. *Tetrahedron Letters* **39**, 3635–3638 (1998).

να ελέγχει αυστηρά την απορρόφησή του, πράγμα που ελαχιστοποιεί και τις βλαβερές του συνέπειες για τον οργανισμό. Στην περίπτωση, όμως που οι μηχανισμοί αυτοί απορυθμιστούν, αυξάνονται σημαντικά τα επίπεδα του ελεύθερο σιδήρου στο σώμα. Ο ελεύθερος σίδηρος είναι ένα προ-οξειδωτικό, δηλαδή το αντίθετο ενός αντιοξειδωτικού και μπορεί να προκαλέσει βλάβη στα κύτταρα, συνεπώς οξεία δηλητηρίαση και θάνατο. Συνεπώς, ανίχνευση τέτοιων μετάλλων, η διαλεύκανση των μηχανισμών τέτοιων ασθενειών και η εύρεση φαρμάκων είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση αυτών που πάσχουν από αυτές τις ασθένειες.

Ένα παράδειγμα φθορίζοντος βιοαισθητήρα είναι η χρωστική ACF27-Cu²⁺, εικόνα 1.4.0, η οποία σχεδιάστηκε από την ερευνητική ομάδα του Ren, με δύο φωτονιακές ιδιότητες.¹² Μία μη ενεργοποιημένη και ταυτόχρονα μη φθορίζουσα, λόγω της σπειροϋδραζιδικής του δομής και μία ενεργοποιημένη η οποία φθορίζει στα 627 nm. Όμως, ο φθορισμός στα 627 nm αυξάνεται σταδιακά με την αύξηση του Cu²⁺ και φτάνει σε 229 φορές αύξηση μετά την προσθήκη 200 mM Cu²⁺. Επιπλέον, δεν υπήρξε καμία αλλαγή στο φθορισμό παρουσία άλλων ιόντων, όπως Mn²⁺, Co²⁺ και Ca²⁺,υποδηλώνοντας την υψηλή επιλεκτικότητα Cu²⁺ και η καταλληλότητά του για ανάλυση Cu²⁺ σε κάποιο βιολογικό σύστημα. Ένα επιπλέον παράδειγμα βιοαισθητήρα Cu2+ σε ζωντανά κύτταρα, είναι αυτό του Karakus¹³, όπου συνδύασε φωσφορικές ομάδες με βαφές ροδαμίνης για τη σύνθεση ενός φθορίζοντος ανιχνευτή RhP με υψηλή επιλεκτικότητα και ευαισθησία στα ιόντα χαλκού. Ο ανιχνευτής RhP εμφανίζεται στη σταθερή ισομερή μορφή κλειστού δακτυλίου σε διαλύματα με pH 6,0-10,0, όντας άχρωμο σε αυτό το εύρος του pH. Ωστόσο, μετά την προσθήκη ιόντων χαλκού, το χρώμα του διαλύματος αλλάζει από άχρωμο σε ροζ και εμφανίζει μια κορυφή εκπομπής έντονου φθορισμού στα 584 nm με όριο ανίχνευσης 15 nM. Ο μηχανισμός ανίχνευσης του χαλκού με τη βαφή RhP, απεικονίζεται στο σχήμα 1.4.1.



Εικόνα 1.4.0:



Σχήμα 1.4.1: Μηχανισμός ανίχνευσης ιόντων Cu²⁺, με τη χρωστική RhP.

¹² Ren, T. *et al.* Rational Engineering of Bioinspired Anthocyanidin Fluorophores with Excellent Two-Photon Properties for Sensing and Imaging. *Anal. Chem.* **89**, 11427–11434 (2017).

¹³ Karakuş, E. A rhodamine based fluorescent chemodosimeter for the selective and sensitive detection of copper (II) ions in aqueous media and living cells. *Journal of Molecular Structure* **1224**, 129037 (2021).

2 Συζήτηση - Αποτελέσματα

Η φλουορεσίνη είναι μια εξαιρετικά «ευέλικτη» και ευρέως χρησιμοποιούμενη φθορίζουσα ένωση που έχει βρει τη θέση της σε διάφορες επιστημονικές, ιατρικές και βιομηχανικές εφαρμογές. Αυτή η οργανική βαφή, γνωστή για τον λαμπερό πράσινοκίτρινο φθορισμό της όταν εκτίθεται στο υπεριώδες ή μπλε φως, έχει διαδραματίσει καθοριστικό ρόλο σε τομείς όπως η οφθαλμολογία, όπου χρησιμοποιείται στην αγγειογραφία για την απεικόνιση των αιμοφόρων αγγείων στον αμφιβληστροειδή και τη διάγνωση οφθαλμικών διαταραχών. Επιπλέον, η φλουορεσίνη είναι αναπόσπαστο μέρος της μοριακής βιολογίας, χρησιμεύοντας ως ζωτικό εργαλείο για την επισήμανση βιομορίων όπως το DNA και οι πρωτεΐνες. Η ικανότητά της να εκπέμπει φως κατά τη διέγερση την καθιστά απαραίτητη στη μικροσκοπία φθορισμού και στην κυτταρική απεικόνιση, παρέχοντας στους ερευνητές πολύτιμες γνώσεις για τις κυτταρικές δομές και λειτουργίες. Για το λόγο αυτό, η παρούσα εργασία στοχεύει στην επέκταση της λειτουργικότητας της φλουορεσίνης. Η ενσωμάτωση της σε αντιδράσεις πολλών συστατικών στοχεύει στην διεύρυνση των ιδιοτήτων της και την ενσωμάτωση της σε νέες εφαρμογές.

2.1 Μεθοδολογία-Προσέγγιση

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε επιλέχθηκε έτσι ώστε να ενσωματωθεί η φλουορεσίνη με τον συντομότερο και αποδοτικότερο τρόπο στο κατά το πλείστον των αντιδράσεων πολλών συστατικών. Αυτό έγινε με την σύζευξη μιας ομάδας ισονιτριλίου, κάνοντας την έτσι συμβατή με όλες τις αντιδράσεις πολλών συστατικών που περιέχουν ισονιτρίλιο (IMCRs). Στα σχήματα 2.1.0 και 2.1.1 φαίνονται οι σημαντικότερες MCR που περιέχουν ή μη κάποιο ισονιτρίλιο, αντίστοιχα, ως ένα από τα συστατικά τους. Παρατηρούμε, ότι πλέον η χημεία των ισονιτριλίων έχει αναπτυχθεί σημαντικά στον τομέα των αντιδράσεων πολλών συστατικών συστατικών, που αποτελεί ίσως την πιο αντιπροσωπευτική πρώτη ύλη για τον παραπάνω σκοπό. Στο σχήμα 2.1.2 φαίνεται η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για την σύζευξη της ομάδας ισονιτρίλιου στη χρωστική.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μία κλασσική εστεροποίηση κατά Fischer του δινάτριου άλατος της φλουορεσίνης 1 με αιθανόλη και πυκνό θειικό οξύ. Όπως προαναφέρθηκε, η χαρακτηριστική ομάδα του ελεύθερου καρβοξυλικού οξέος αποτελεί συστατικό σε αντιδράσεις πολλών συστατικών, όπως η αντίδραση U-4CR και η αντίδραση P-3CR. Για τον σκοπό αυτό έγινε η προστασία του καρβοξυλικού οξέος μέσω εστεροποίησης προς την σύνθεση του αιθανικού εστέρα της φλουορεσίνης 2. Τέλος, έγινε μία αντίδραση Williamson της 2 με τον 3-ισοκυανοπροπυλο-4-μεθυλοβενζολοσουλφονικό εστέρα και όξινο ανθρακικό νάτριο, προς την παραγωγή του φθορίζοντος ισονιτριλίου 3a. Πέρα από την φλουορεσίνη, ως χρωστική χρησιμοποιήθηκε και η κουμαρίνη. Πρόκειται για μία εξίσου ευρέως διαδεδομένη χρωστική, γνωστή για το μπλε της χρώμα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η 7-υδροξυκουμαρίνη και η 4-μεθυλο-7υδροξυκουμαρίνη, με σκοπό να διευρύνουμε την ποικιλομορφία των υποστρωμάτων και τη σύνθεση ισονιτρίλιων που φθορίζουν σε διάφορα μήκη κύματος. Να σημειωθεί ότι η σύνθεση των ενώσεων 2 και 3a έγινε σε κλίμακα γραμμαρίων. Τέλος με τη παραπάνω συνθετική πορεία συντέθηκαν και τα ακόλουθα φθορίζοντα ισονιτρίλια, 3be, όπως φαίνεται στα σχήματα 2.1.2 και 2.1.3

Named Multi-Component Reactions (MCRs)

isocyanide-based MCRs (IMRs)



Σχήμα 2.1.0: Αντιδράσεις πολλών συστατικών, οι οποίες περιέχουν ισονιτρίλιο ως κάποιο συστατικό.

non-isocyanide based MCRs



Σχήμα 2.1.1: Αντιδράσεις πολλών συστατικών, οι οποίες δεν περιέχουν ισονιτρίλιο ως κάποιο συστατικό.



Σχήμα 2.1.2: Σύνθεση φθοριζόντων ισονιτρίλιων ως παράγωγα φλουορεσίνης, μέσω S_N2 αντιδράσεων τύπου Williamson για την παραγωγή των **3a-c** προϊόντων.



Σχήμα 2.1.3: Σύνθεση φθοριζόντων ισονιτρίλιων ως παράγωγα κουμαρίνης, μέσω S_N2 αντιδράσεων τύπου Williamson για την παραγωγή των **3d-e** προϊόντων.

2.2 Σύνθεση παραγώγων μέσω MCR

Το επόμενο στάδιο αποτελεί η σύνθεση των τελικών προϊόντων μέσω των αντιδράσεων πολλών συστατικών. Να σημειωθεί ότι στο στάδιο αυτό τα ισονιτρίλια χρησιμοποιήθηκαν χωρίς χρωματογραφικό διαχωρισμό. Οι αντιδράσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι αντιδράσεις GBB-3CR, UT-4CR, P-3CR και U-4CR, των οποίων τα γενικά σχήματα φαίνονται στο σχήμα 1.3.1. Στο σχήμα 2.2.0 απεικονίζονται οι σκελετοί των προϊόντων εφαρμόζοντας ως αρχική ύλη το ισονιτρίλιο της φλουορεσίνης (**3a**), όπου ήταν και η βασική αρχική ύλη για τις περισσότερες αντιδράσεις. Στα παρακάτω σχήματα παρατίθενται τα προϊόντα όλων των διαφορετικών αντιδράσεων με τις αντίστοιχες συνθήκες και αποδόσεις.



Σχήμα 2.2.0: Οι σκελετοί των αντιδράσεων GBB-3CR, UT-4CR, P-3CR και U-4CR με ενσωματωμένο το ισονιτρίλιο της φλουορεσίνης (**3a**).

Αρχικά, παρατίθεται η αντίδραση GBB-3CR, σχήμα 2.2.1, η οποία ως φορέα διαφοροποίησης έχει αποκλειστικά την αλδεΰδη. Όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα τα προϊόντα συντέθηκαν σε μέτριες αποδόσεις, ενώ λειτουργεί ικανοποιητικά για όλες τις αλδεΰδες που δοκιμάστηκαν, αρωματικές και αλειφατικές, με δότες και δέκτες ηλεκτρονίων σε διάφορες θέσεις, ενώ με τροποποίηση της πειραματικής διαδικασίας (βλέπε ενότητα 3) πάρθηκε και η ένωση 4g. Στην συγκεκριμένη περίπτωση προστέθηκε ως αρχική ύλη η ισοφθαλαλδεΰδη, η οποία περιέχει στο μόριο της δύο αλδεϋδικές ομάδες σε meta σχετικό προσανατολισμό. Έτσι, καταφέραμε να ενσωματώσουμε μία ελεύθερη αλδεϋδομάδα, χωρίς κάποιο στάδιο προστασίας και αποπροστασίας. Οι καρβονυλικές ομάδες, αποτελούν από τις πιο χρήσιμες συνθετικά ομάδες, λόγω της μεγάλης ευελιξίας τους σε οργανικούς μετασχηματισμούς και της πλούσιας χημείας που τις χαρακτηρίζει. Για το λόγο αυτό, η ενσωμάτωση τους εύκολα και με οικονομία σταδίων αποτελεί στόχο για την πρόσβαση σε περαιτέρω τροποποίηση του μορίου.



Σχήμα 2.2.1: Σύνθεση παραγώγων GBB-3CR.

Στο σχήμα 2.2.2, φαίνονται, ομοίως, τα προϊόντα των αντιδράσεων P-3CR. Παρατηρούμε εδώ ότι οι φορείς διαφοροποίησης είναι, εκτός της αλδεΰδης, κετόνες και καρβοξυλικά οξέα. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν και τα ισονιτρίλια **3c** και **3d**. Συντέθηκαν πέντε προϊόντα P-3CR σε μέτριες προς καλές αποδόσεις, με διάφορες αλδεΰδες και κετόνες, αρωματικές ή αλειφατικές και οξέα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ένωση **5e**, διότι αποτελεί έναν ομοιοπολικό αναστολέα. Ως οξύ στην ένωση **5e** χρησιμοποιήθηκε το 2-χλωροαιθανικό οξύ ή 2-χλωροοξικό οξύ, όπως είναι ευρέως γνωστό. Ο άνθρακας β του οξέος, αφού ενσωματωθεί στην τελική ένωση, μπορεί εύκολα να προσβληθεί από κάποιο πυρηνόφιλο – βιολογικό στόχο, μέσω μιας S_N2 αντίδρασης. Αυτό λαμβάνει χώρα συνήθως από κάποια θειολική ομάδα υπολείμματος κυστεΐνης ή κάποια υδροξυλική ομάδα σερίνης, και να προσδεθεί σε αυτή ομοιοπολικά, από όπου οφείλει και την ονομασία του ως αναστολέας. Τέλος από την ένωση **5b** παρατηρούμε ότι η αντίδραση είναι συμβατή και με την Boc αμάδα.



5e, 72%



Παρακάτω, απεικονίζονται τα προϊόντα της αντίδρασης UT-4CR, σχήμα 2.2.2. Οι φορείς διαφοροποίησης αποτελούν πέραν των καρβονυλικών ενώσεων και οι αμίνες, πρωτοταγείς και δευτεροταγείς. Χαρακτηριστικό της αντίδρασης αποτελεί η ορθογωνικότητα της, δηλαδή το γεγονός ότι λειτουργεί ικανοποιητικά για όλες τις λειτουργικές ομάδες που δοκιμάστηκαν, ακόμη και στις πιο σύνθετες πρώτες ύλες. Εύρος αλδευδών και αμινών, αλειφατικών και αρωματικών, πρωτοταγής και δευτεροταγής αμίνες με διάφορα ετεροάτομα, πολλαπλούς δεσμούς, δακτυλίους και διάφορα ισονιτρίλια δίνουν το επιθυμητό προϊόν. Άξιες αναφοράς είναι οι ενώσεις **6d** και **6e**, λόγω των τριπλών δεσμών που περιέχουν. Πρόσφατες ερευνητικές εργασίες των Sharpless¹⁴ και Meldal,¹⁵ έχουν αναδείξει την χημεία των τριπλών δεσμών. Αυτό οφείλεται κυρίως στην αντίδραση τους με αζίδια, που παρουσία καταλύτη χαλκού ή ρουθινίου αντίστοιχα, πορόκειται για μια τόσο αποδοτική αντίδραση που αποτελεί

¹⁴ Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. & Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 2596–2599 (2002).

 ¹⁵ Tornøe, C. W., Christensen, C. & Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **67**, 3057–3064 (2002).
¹⁶ Himo, F. *et al.* Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 210–216 (2005).

παράδειγμα «Χημείας Κλικ» (Click Chemistry). Ο όρος «Click Chemistry» αναφέρεται σε αντιδράσεις οι οποίες χαρακτηρίζονται για την αποδοτικότητα, την οικονομία ατόμων και την απλότητα τους. Οι αντιδράσεις αυτές ονομάζονται αντιδράσεις κυκλοπροσθήκης αζιδίου-αλκινίου (Azide-Alkyne Cycloaddition-AAC) και ανάλογα τον καταλύτη διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες, την καταλυόμενη από χαλκό (CuAAC) και την καταλυόμενη από ρουθίνιο (RuAAC).



Σχήμα 2.2.2: Σύνθεση παραγώγων UT-4CR

Μία ακόμα ιδιότητα που χαρακτηρίζει τις παραπάνω αντιδράσεις είναι η βιορθογωνικότητα τους. Δηλαδή η συμβατότητα του τους σε βιολογικά συστήματα και βιομόρια. Για τον λόγο αυτό ενώσεις με τριπλούς δεσμούς, όπως οι ενώσεις **6d** και **6e** αποτελούν, επίσης, ομοιοπολικούς αναστολείς σε πρωτεΐνες οι οποίες έχουν τροποποιηθεί και φέρουν ομάδες αζιδίου. Επιπλέον, έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό και για σκοπούς απεικόνισης, διότι δίνει την δυνατότητα ομοιοπολικής σύνδεσης βιομορίων με φθοροφόρα μόρια.



Σχήμα 2.2.3: Κυκλοπροσθήση αζιδίου-αλκινίου καταλυόμενη από χαλκό (Cu-AAC) και ο μηχανισμός που ακολουθεί.^{14,16}

Η ένωση **3e** συντέθηκε με σκοπό την σύνθεση ενός ακόμα σημαντικού ομοιοπολικού αναστολέα, της ένωσης **3i** Η σύνθεση της ένωσης **3i** έγινε με μία αντίδραση σύζευξης Sonogashira, όπως φαίνεται στο σχήμα 2.2.4. Με την ενδομοριακή αυτή κυκλοποίηση σχηματίστηκε ένας δακτύλιος τύπου διβένζοκυκλοοκτυνίου (Dibenzocyclooctyne-DBCO). Ο δακτύλιος αυτός παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον γιατί αποτελεί μια ακόμα πιο φιλική προς ο περιβάλλον, βιοορθογονική και οικονομική μέθοδο κλικ χημείας, λόγω της αντίδρασης του τριπλού δεσμού με αζίδια, απουσία κάποιου καταλύτη. Η αυξημένη τάση του τριπλού δεσμού, λόγω των συμπυκνωμένων δακτυλίων επάγει την αυθόρμητη κυκλοπροσθήκη αζιδίου-αλκινίου. Αυτή η κατηγορία κυκλοπροσθήκης ονομάζεται προωθούμενη λόγω τάσης (Stain Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition-SPAAC)^{717,18,19}.

¹⁷ Agard, N. J., Baskin, J. M., Prescher, J. A., Lo, A. & Bertozzi, C. R. A Comparative Study of Bioorthogonal Reactions with Azides. *ACS Chem. Biol.* **1**, 644–648 (2006).

¹⁸ Ning, X., Guo, J., Wolfert, M. A. & Boons, G.-J. Visualizing Metabolically Labeled Glycoconjugates of Living Cells by Copper-Free and Fast Huisgen Cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 2253–2255 (2008).

¹⁹ Codelli, J. A., Baskin, J. M., Agard, N. J. & Bertozzi, C. R. Second-Generation Difluorinated Cyclooctynes for Copper-Free Click Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 11486–11493 (2008).



Σχήμα 2.2.4: Σύνθεση της **6i**, μέσω αντίδρασης Sonogashira.

Στο σχήμα 2.2.5, φαίνονται διάφορα κυκλοοκτίνια για την αντίδραση AAC μαζί με τον συντελεστή ταχύτητας της αντίδρασης τους με βενζυλαζίδιο και τις αντίστοιχες ονομασίες. Η κινητική της αντίδρασης αποτελεί δευτέρας τάξης και όλες οι μετρήσεις έγιναν σε CD₃CN, εκτός από αυτών που επισημαίνονται με αστερίσκο(*), οι οποίες έχουν γίνει σε CD₃OD²⁰. Παρατηρούμε ότι διάφορες παράμετροι επηρεάζουν την ταχύτητα της αντίδρασης, όπως ηλεκτρονιακές και στερεοχημικές, με τις στερεοχημικές να υπερισχύουν. Η ένωση I του σχήματος 2.2.5 μάλιστα αποτελεί και το πρώτο παράδειγμα όπου κυκλοοκτίνιο αναπτύχθηκε για βιορθογονική χημεία, από την Carolyn R. Bertozzi ²¹.



²⁰ Gordon, C. G. *et al.* Reactivity of Biarylazacyclooctynones in Copper-Free Click Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 9199–9208 (2012).

²¹ Agard, N. J., Prescher, J. A. & Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15046–15047 (2004).

Σχήμα 2.2.5: Διάφορα κυκλοοκτίνια συγκρινόμενα για την δραστικότητα τους στην AAC αντίδραση με βενζυλαζίδιο, μέσω των συντελεστών ταχύτητας (M⁻¹·× s⁻¹).²⁰

Το κυκλοοκτύνιο **I**, εν συντομία "Oct", εμφανίζει μια σταθερά ρυθμού δεύτερης τάξης 2,4 × 10^{-3} M⁻¹ s⁻¹ για την αντίδραση με βενζυλαζίδιο. Αργότερα αποδείχθηκε ότι αυτό ο ρυθμός μπορεί να βελτιωθεί μέσω της εγκατάστασης ατόμων φθορίου στο η προπαργυλική θέση. Μονοφθοριωμένο κυκλοοκτίνιο (MOFO, II) εμφανίζει μια σταθερά ρυθμού δεύτερης τάξης 4,3 × 10^{-3} M⁻¹ s⁻¹, ενώ διφθοριωμένο κυκλοοκτίνιο (DIFO, **III**) αντιδρά με σταθερά ρυθμού 7,6 × 10^{-2} M⁻¹ s⁻¹ (1,8 φορές και 32 φορές ταχύτερα από το Oct, αντίστοιχα). Η ενίσχυση του ρυθμού επιδράσεις του στελέχους αποδείχθηκαν στη συνέχεια στο πλαίσιο διβενζοκυκλοοκτίνης (DIBO, **IV**), διβενζοαζακυκλοοκτίνιο (DIBAC, **V**) και διαρυλαζακυκλοοκτίνόνη (BARAC, 6), τα οποία αντίστοιχα αντιδρούν με τα αζίδια 24 φορές έως 375 φορές πιο γρήγορα από ό,τι παρατηρείται για το Oct. Καταλήγουμε, λοιπόν στο συμπέρασμα ότι η γρήγορη και εύκολη σύνθεση τέτοιων ενώσεων, όπως η **V** του σχήματος 2.2.5 είναι αναγκαία.

Τέλος στο σχήμα 2.2.6 παρατίθενται τα προϊόντα από την αντίδραση U-4CR. Εδώ παρατηρούμε ότι οι φορείς διαφοροποίησης αποτελούν πέραν των καρβονυλικών ενώσεων, μια πρωτοταγή αμίνη και το καρβοξυλικό οξύ. Συντέθηκαν τέσσερα παράγωγα Ugi-4CR σε μέτριες αποδόσεις. Όπως αναφέρθηκε και στην αντίδραση P-3CR, η ένωση 4b είναι ομοιοπολικός αναστολέας, ομοίως με την ένωση 2e. Επιπλέον και η ένωση 4d, αποτελεί έναν ομοιοπολικό αναστολέα πρωτεϊνών, ως δέκτης κατά Michael, ο οποίος επίσης μπορεί να προσβληθεί από ένα κατάλοιπο σερίνης ή κυστεΐνης.



7c, 43%

7d, 38%

Σχήμα 2.2.6: Σύνθεση παραγώγων Ugi-Classical.

2.3 Φάσματα απορρόφησης και εκπομπής

Στα πλαίσια του χαρακτηρισμού και της αξιολόγησης των φθοριζουσών ουσιών που συντέθηκαν, πάρθηκαν τα φάσματα απορρόφησης, αλλά και εκπομπής όλων των παραγώγων φλουορεσίνης. Παρακάτω, φαίνονται τα διαγράμματα των απορροφήσεων και των εκπομπών από τον αιθυλεστέρα της φλουορεσίνης (2), τα ενδιάμεσα ισονιτρίλια (3a-c), αλλά και των παραγώγων από τις αντιδράσεις P-3CR (5a-d), UT-4CR (6a-g και 6i) και U-4CR (7a-d).



Εικόνα 2.3.0: Διάγραμμα απορρόφησης και εκπομπής, αντίστοιχα, του αιθανικού εστέρα της φλουορεσίνης (2) και των ενδιαμέσων φθοριζόντων ισονιτριλίων (3a-c).



Εικόνα 2.3.1: Διάγραμμα απορρόφησης και εκπομπής, αντίστοιχα, των παραγώγων P-3CR (5a-d).



Εικόνα 2.3.2: Διάγραμμα απορρόφησης και εκπομπής, αντίστοιχα, των παραγώγων UT-4CR (6a-g και 6i).


Εικόνα 2.3.3: Διάγραμμα απορρόφησης και εκπομπής, αντίστοιχα, των παραγώγων U-4CR (7a-d).

Αρχικά μπορεί να παρατηρηθεί ότι το προφίλ της απορρόφησης αλλάζει χαρακτηριστικά. Από ένα κύριο μέγιστο στα 525 nm στον εστέρα της φλουορεσίνης, μετά την τροποποίηση του σε ισονιτρίλιο και στις MCR, παρουσιάζει τρία μέγιστα, δύο τοπικά και ένα ολικό, στα 435 nm, 485 nm και 460 nm, αντίστοιχα. Επιπλέον, αλλάζει και το προφίλ του φθορισμού το οποίο αποκτά ένα πλατώ με μέγιστο τα 560 nm και με μικρότερη σχετική ένταση φθορισμού από τον εστέρα. Οι μετρήσεις φθορισμού έγινα στα 460 nm σε όλες. Ενώ όλες οι ενώσεις έχουν τα ιδία μέγιστα απορρόφησης, μόνο μία διαφοροποιείται, η 6d η οποία ενώ εμφανίζει και αυτή τις χαρακτηριστικές κορυφές στο φάσμα απορρόφησης, εμφανίζει μέγιστο στα 525 nm. Η μέτρηση του φθορισμού της έγινε στα 525 nm με το αποτέλεσμα να φαίνεται στο σχήμα 2.3.2. Βλέπουμε ότι το προφίλ του φθορισμού διαφοροποιείται και αυτό από τις υπόλοιπες ενώσεις έχοντας μέγιστο στα 570 nm. Αυτή η διαφορά οφείλεται ενδεχομένως στο εκτεταμένο συζυγιακό σύστημα στο τμήμα του μορίου που προέρχεται από ην αλδεϋδη, σε συνδυασμό με την παρουσία φθορίων που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τις φωτοχημικές ιδιότητες. Όταν πάρθηκαν τα φάσματα των παραγώγων GBB-3CR (4a-h), παρατηρήθηκαν οι παραπάνω απορρογήσεις, εικόνα 2.3.4.



Εικόνα 2.3.4: Διάγραμμα απορρόφησης των παραγώγων GBB-3CR (4a-h).

Στην συγκεκριμένη περίπτωση ενώσεων βλέπουμε ότι όλες οι ενώσεις έχουνε διαφορετικές απορροφήσεις. Μάλιστα εμφανίζουν μία επιπλέον κορυφή, στα 525 nm, η οποία αποτελεί και μέγιστο σε κάποιες από αυτές. Πριν προχωρήσουμε στις περαιτέρω μελέτες να σημειωθεί ότι αρχικά ενώ είχε συντεθεί η ένωση 4a, διασπάστηκε κατά την διαδικασία συμπύκνωσης του διαλύτη προφανώς λόγω θερμοκρασίας (>50 °C). Επομένως, γνωρίζαμε ότι οι ενώσεις είναι θερμοευαίσθητες

από μία θερμοκρασία και πάνω. Επιπλέον, θεωρητικά, πρόκειται για φωτοευαίσθητες ενώσεις. Για να επαληθευτεί αυτή η υπόθεση, αφέθηκαν τρία vials με την ένωση 4a, με απουσια φωτός, απουσία ατμοσφαιρικού αέρα (αργό) και τέλος ένα εκτεθειμένο τόσο σε φως, όσο και στον ατμοσφαιρικό αέρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα vials αφέθηκαν για 3 εβδομάδες. Έπειτα πάρθηκαν τα φάσματα απορρόφησης και NMR, τα οποία απεικονίζονται στην εικόνα 2.3.4, αλλά και τα TLC των ενώσεων, τα οποία φέρουν, ίσως, την πιο άμεση ένδειξη για την αποικοδόμηση των προϊόντων.







Εικόνα 2.3.5: Διάγραμμα απορρόφησης και φάσματα NMR της ένωσης 4a μόλις συντέθηκε (πράσινο), αφού αφέθηκε τρεις εβδομάδες κάτω από συνθήκες περιβάλλοντος (κόκκινο), τρεις εβδομάδες κάτω από φως και αργό (μπλε) και κάτω από σκοτάδι και αέρα (ροζ). Τέλος, τα TLC των δειγμάτων.

Επιβεβαιώνεται, λοιπόν, με αυτό τον τρόπο ότι η επιπλέον κορυφή στα 525 nm, οφείλεται στην διάσπαση των ενώσεων και μάλιστα όσο μεγαλύτερη η διάσπαση, τόσο μεγαλύτερη και η κορυφή. Η εικόνα, επομένως, του σχήματος 2.3.4 οφείλεται στο γεγονός ότι όταν έγιναν οι μετρήσεις τα διάφορα παράγωγα βρισκόντουσαν σε διάφορα στάδια διάσπασης με αποτέλεσμα να παρατηρούνται διαφορετικές απορροφήσεις από το καθένα. Παρατηρείται ακόμη ότι κατά την διαδικασία διάσπασης των ενώσεων, αλλάζει η αναλογία των κορυφών. Να σημειωθεί ότι η μεταβολές των κορυφών δεν είναι ανάλογες. Οι κορυφές στα 435 nm και 460 nm ελαττώνουν σε ένταση, ενώ οι κορυφές στα 485 nm και 525 nm αυξάνουν, ενώ επιβεβαίωση αποτελεί και η παρουσία νέων κορυφών στο NMR. Στα TLC των δειγμάτων φαίνεται χαρακτηριστικά η ύπαρξη νέων ενώσεων, μέσω της οπτικής παρατήρησης επιπλέον κηλίδων (spot). Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι η διάσπαση λαμβάνει χώρα και σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ η παρουσία φωτός και οξυγόνου επιταχύνουν την διάβρωση.

Για την επεξεργασία των ενώσεων η συμπύκνωση γινόταν σε περιστροφικό αποστακτήρα κενού (rotavaporator) σε λουτρό στους 40 °C για 20 λεπτά, μέχρι δηλαδή να φύγει ο διαλύτης, με την σφαιρική φιάλη να φέρει αλουμινόχαρτο, και έπειτα σε αντλία κενού για 2-3 ώρες, μέχρι ξηρού, επίσης με αλουμινόχαρτο. Η φύλαξη τους γινόταν σε σκουρόχρωμα καφέ και τυλιγμένα με αλουμινόχαρτο vials, όπου ο αέρας έχει αντικατασταθεί με αργό και τοποθετημένα στην κατάψυξη στους -20 °C.

Τέλος στο σχήμα 2.3.5 φαίνονται και οι φθορισμοί των παραγώγων GBB-3CR. Οι φθορισμοί πάρθηκαν στα 460 nm, ενώ στα 525 nm μόρια δεν φθορίζουν. Μέγιστο φθορισμού αποτελούν και σε αυτή την περίπτωση τα 555 nm



Εικόνα 2.3.6: Διάγραμμα εκπομπής των παραγώγων GBB-3CR (4a-4h).

Στον παρακάτω πίνακα, πίνακας 2.3.0, φαίνονται συγκεντρωτικά τα μήκη κύματος μέγιστης απορρόφησης και εκπομπής μαζί με την μετατόπιση Stokes του κάθε παραγώγου φλουορεσίνης που συντέθηκε.

Παράγωγα	λ _{max} απορρόφησης (nm)	λ _{max} εκπομπής (nm)	Δλ _{max} (Μετατόπιση Stokes) (nm)
2	525	555	30
3a-c	460	560	100
4a-h	460	560	100
5a	460	545	85
5b-d	460	560	100
6a-c, 6e-g, 6i	460	560	100
6d	525	570	45
7a-d	460	560	100

Πίνακας 2.3.0: Τα μήκη κύματος μέγιστης απορρόφησης και εκπομπής των παραγώγων φλουορεσίνης.

Ένα επιπλέον πείραμα για τον χαρακτηρισμό και της εξαγωγής συμπερασμάτων σχετικά με τον φθορισμό των παραπάνω μορίων, ήταν η παρασκευή διαφόρων διαλυμάτων της ένωσης **6a**, σε διαφορετικούς διαλύτες και παρουσία οξέος ή βάσης. Για την ακρίβεια έγινε η παρασκευή 1,4 mM των παρακάτω διαλυμάτων :

- Ι. Εξανίου
- II. Τολουολίου
- III. Οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc)
- IV. Διχλωρομεθανίου (DCM)

- V. 3.3-διμεθυλβουταν-2-όλης
- VI. Ακετονιτριλίου (ACN)
- VII. Διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO)
- VIII. Ακετόνης
- ΙΧ. Μεθανόλης
- X. Μεθανόλης-υδροχλωρικού οξέος (HCl)
- XI. Μεθανόλης-τριεθυλαμίνης (Et₃N)



Εικόνα 2.3.7: Διάλυμα Ι-ΧΙ κάτω από υπεριώδες φως.

Παρατηρούμε, ότι στα διαλύματα V, IX και IV, ενισχύεται περισσότερο από όλους τους άλλους διαλύτες ο φθορισμός, πέραν του εξανίου που δε διαλύεται η ένωση. Αυτός συμβαίνει, διότι οι άλλοι διαλύτες μπορεί να συνεισφέρουν παραπάνω σε αποβολή ενέργειας με μη φωτονιακές διεργασίες και να ελαττώνουν το φθορισμό, σε σύγκριση με τις δύο αλκοόλες και το διχλωρομεθάνιο. Επιπλέον, με την προσθήκη οξέος το διάλυμα έγινε πράσινο, ενώ με την προσθήκη βάσης δεν παρατηρήθηκαν έντονες διαφορές, ίσως η ελαφριά μείωση του φθορισμού. Ένα ενδιαφέρον πόρισμα είναι ότι ενδεχομένως η προτωνιωμένη μορφή της **6a** έχει διαφορετικό χρώμα από την μη πρωτονιωμένη. Έτσι, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και ως δείκτης για την μέτρηση τιμών pH.

3 Συμπεράσματα

Στην παρούσα έρευνα έγινε χρήση μιας συνθετικής στρατηγικής, η οποία στόχευε στην ενσωμάτωση μιας ομάδας ισονιτριλίου σε φθορίζουσες ουσίες, όπως η φλουορεσίνη και η κουμαρίνη, με σκοπό την ένταξη τους σε αντιδράσεις πολλών συστατικών. Συντέθηκε μια ποικιλία από φθορίζοντα ισονιτρίλια και στη συνέχεια επιτεύχθει η εφαρμογή τους στις αντιδράσεις GBB-3CR, P-3CR, UT-4CR και U-4CR, το οποίο είχε ως αποτέλεσμα την εκτενή τροποποίηση τους. Απόρροια αυτού ήταν η γρήγορη και εύκολη προσθήκη νέων λειτουργικών ομάδων και κατ' επέκταση νέων ιδιοτήτων. Επίσης έγινε ο φασματοφωτομετρικός χαρακτηρισμός των παραγώγων φλουορεσίνης και διά μέσου αυτού βρέθηκε ότι τα παράγωγα της αντίδρασης GBB-3CR δεν είναι σταθερά σε συνθήκες περιβάλοντος, αντιθέτως με τα άλλα παράγωγα.

Η παραπάνω εργασία και η ανάπτυξη ενός πρακτικού, εύκολου και γρήγορου προτοκώλου για την σύνθεση νέων φθοριζουσών ενώσεων στοχεύει στην εύρεση μορίων-ανιχνευτών που στοχεύουν σε συγκεκριμένους βιολογικούς στόχους. Λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας μορίων που μπορούν να προκύψουν, είναι πλέον δυνατό να γίνει η σύνθεση ενός εκτενούς συνόλου ενώσεων με βιολογική δραστικότητα. Έτσι, εκμεταλευόμενοι τον φθορισμό τους να επιτευχθεί η απεικόνιση των επιθυμητών αυτών στόχων και συνεπώς η μελέτη τους σε ζωντανούς οργανισμούς.

Ένα παράδειγμα αποτελεί το γεγονός ότι οι ενώσεις που συντέθησαν ελέχθηκαν ως προς την ικανότητα αναστολής δίαφορων πρωτεϊνών και βρέθηκε ότι πολλές από αυτές αποτελούν μη ομοιοπολικούς αναστολείς της πρωτεΐνης 15-LOX-1. Μέσω της δεύμευσης των παραπάνω ενώσεων στην πρωτεϊνη επιτυγχάνεται ταυτόχρονα η αναστολή της, αλλά και η βιοαπεικόνιση της. Επίσης δοκιμάστηκαν και ως βιοαισθητήρες σε διάφορα μέταλλα. Η μελέτη αυτή βρίσκεται υπό εξέλιξη και λαμβάνει χώρα σε συνεργασία με το εργαστήριο του επίκουρου καθηγητή κ. Νικόλαου Ελευθεριάδη.

4 Πειραματικό μέρος

4.1 Όργανα και πειρατικές τεχνικές

Όλα τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες αγοράστηκαν από τη Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific, AK Scientific, Fluorochem, Abcr GmbH, Acros Organics και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) πραγματοποιήθηκε σε πλάκες επικαλυμμένες Millipore silica gel (πάχος 0,20 mm, μέγεθος σωματιδίου 25 μm). Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού καταγράφηκαν σε φασματόμετρα Bruker Avance 500 {¹H NMR (500 MHz), ¹³C NMR (125 MHz)}. Οι χημικές μετατοπίσεις για ¹Η NMR αναφέρθηκαν ως δ τιμές και οι σταθερές σύζευξης ήταν σε hertz (Hz). Οι ακόλουθες συντομεύσεις χρησιμοποιήθηκαν για την πολλαπλότητα του spin: $s = a π λ \dot{\eta}$, br $s = ε υρεία a π λ \dot{\eta}$, $d = \delta i π λ \dot{\eta}$, $t = τρ i π λ \dot{\eta}$, q = τετράδα, quin = κουιντέτο, dd = διπλή διπλής, m = πολλαπλή. Χημικές μετατοπίσεις για ¹³C NMR αναφέρθηκαν σε ppm σε σχέση με την κορυφή του διαλύτη. Φάσματα μάζας υψηλής ανάλυσης καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας LTQ-Orbitrap-XL (Thermo) 60000@m/z400. Ο αέριος χρωματογράφος σε ανάλυση (GC-MS) που χρησιμοποιήθηκε είναι τύπου Shimadzu Nexis GC-2030, ο οποίος είναι εφοδιασμένος με τριχοειδή στήλη MEGA-5 HT (30m × 0.25mm διάμετρο × 0.25 μm πάχος) και είναι συζευγμένος με 24 ανιχνευτή μάζας Shimadzu GCMS-QP2020NX. Τέλος, για την λήψη των φασμάτων απορρόφησης και εκπομπής χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο Varioscan Plate reader της Thermo Fisher Scientific.

Ο καθαρισμός των τελικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (flash column chromatography) με υλικό στήριξης SiO₂ (silica gel 60, SDS, 230-400 mesh ASTM) και χρήση αυτοματοποιημένου συστήματος χρωματογραφικού διαχωρισμού Reveleris™ Flash Chromatography System από την Grace. Ο έλεγχος των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC), είτε με λήψη φάσματος ¹Η NMR μέσα από την αντίδραση (*in situ*). Η ξήρανση των οργανικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με Na₂SO₄ και η συμπύκνωση των μιγμάτων με σκοπό την απομάκρυνση των διαλυτών σε περιστροφικό αποστακτήρα κενού.

4.2 Σύνθεση αιθανικού εστέρα φλουορεσίνης



Αιθανόλη (absolute, ≥99%), περάστηκε μέσα από κολώνα με SiO₂ υπό πίεση σε δοχείο με ενεργοποιημένα μοριακά κόσκινα 3Α και αφέθηκε για τρεις μέρες κάτω από ατμόσφαιρα αργού. Το δινάτριο άλας της φλουορεσίνης (1) (25 mmol, 1.0 ισοδύναμο) και η αιθανόλη (200 mL) προστέθηκαν σε προξηραμένη σφαιρική φιάλη. Έπειτα το μίγμα της αντίδρασης ψύχθηκε στους 0 °C και πυκνό H₂SO₄, 97% (5.0 mL) προστέθηκε στάγδην. Η αντίδραση αφέθηκε στους 85 °C, υπό κάθετο ψυκτήρα και

αδρανή ατμόσφαιρα αργού για 24 ώρες. Ακολούθησε εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό και επαναδιαλυτοποίηση του μίγματος σε CHCl₃. Απόσβεση του μίγματος με σταδιακή προσθήκη κορεσμένου υδατικού διαλύματος Na₂CO₃ μέχρι να σχηματιστούν δύο φάσης στους 0 °C και ανάδευση για 40 λεπτά, με σκοπό την εξουδετέρωση του H₂SO₄. Προσοχή στην προσθήκη του κορεσμένου υδατικού διαλύματος Na₂CO₃, γρήγορη προσθήκη προκαλεί ταχεία απελευθέρωση καυστικών αφρών και υπερχείλιση της φιάλης. Έπειτα οι δύο φάσεις μεταφέρθηκαν σε διαχωριστική χοάνη και η οργανική φάση εκχυλίστηκε με νερό (x4). Ακολούθησε και η εκχύλιση της υδατικής φάσης με CHCl₃ (x3). Οι συνδυασμένες οργανικές στιβάδες ξηράθηκαν με Na₂SO₄ και εξατμίστηκαν υπό κενό, προς σχηματισμό καθαρού του επιθυμητού προϊόντος (**2**) σε 87% απόδοση.

4.3 Σύνθεση ισονιτριλίων

	1. Ethyl formate reflux to rt, overnight	
H ₂ N _V OH -	>	CN _v OTs
~	2. TsCl, Et ₃ N	Λ
$X = -CH_{2^{-}}, -(CH_{2})_{4^{-}}, -CH_{2}CH_{2}O_{-}$	dry DCM	60-72% (89-92% purity)
	0 ^o C to rt, 5-7 h	

Η αμινοαλκοόλη (20.0 mmol, 1.0 ισοδύναμο) και ο φορμικός αιθυλεστέρας (13.0 mL) θερμάνθηκαν υπό κάθετο ψυκτήρα για 8 ώρες σε λουτρό ελαίου, προς σχηματισμό του αντίστοιχου φορμαμιδίου και στη συνέχεια αφέθηκε overnight υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, έγινε απομάκρυνση των πτητικών υλών με περιστροφικό αποστακτήρα κενού. Το αντίστοιχο φορμαμίδιο (7.5 mmol, 1.0 ισοδύναμο) διαλυτοποιήθηκε σε άνυδρο DCM (14.0 mL) υπό αργό και μετά την προσθήκη τριαιθυλαμίνης (45.0 mmol, 6.0 ισοδύναμα), το μίγμα της αντίδρασης ψύχθηκε στους 0 °C. Στη συνέχεια, προστέθηκε TsCl (22.5 mmol, 3.0 ισοδύναμα) και η αντίδραση αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5-7 ώρες. Ακολούθησε απόσβεση του μίγματος με κορεσμένο υδατικό διάλυμα Na₂CO₃ μέχρι να σχηματιστούν δύο φάσεις υπό έντονη ανάδευση στους 0 °C για 40 λεπτά. Έπειτα, οι δύο φάσεις μεταφέρθηκαν σε διαχωριστική χοάνη και η οργανική φάση εκχυλίστηκε με νερό (x3). Ακολούθησε και η εκχύλιση της υδατικής φάσης με DCM (x3). Οι συνδυασμένες οργανικές στιβάδες ξηράθηκαν με Na₂SO₄ και εξατμίστηκαν υπό κενό. Το ακατέργαστο προϊόν καθαρίστηκε με φιλτράρισμα μέσω silica gel σε ηθμό υπό κενό, χρησιμοποιώντας EtOAc (300 mL) ως διαλύτη έκλουσης. Στο υπερκείμενο διάλυμα EtOAc που προέκυψε προστέθηκε ενεργός άνθρακας. Το μείγμα αναδεύτηκε με σπάτουλα για 5 λεπτά και ξανά φιλτραρίστηκε μέσω celite σε ηθμό υπό κενό για την απομάκρυνση του ενεργού άνθρακα. Απομάκρυνση του διαλύτη σε περιστροφικό αποστακτήρα κενού έδωσε τα επιθυμητά ισονιτρίλια σε απόδοση 60-72%, με 89%-92% καθαρότητα (μέτρηση μέσω GC-MS).



Ο αιθανικός εστέρας της φλουορεσίνης (2) (15 mmol, 1.0 ισοδύναμο) προστέθηκε σε αυτόκλειστο δοχείο και διαλυτοποίηθηκε σε DMF (60 mL). Έπειτα, προστέθηκαν ο 3-ισοκυανοπροπυλο-4-μεθυλοβενζοσουλφονικός εστέρας (18 mmol, 1.2 ισοδύναμα) και το NaHCO₃ (30 mmol, 2.0 ισοδύναμα). Το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε στους 80 °C, υπό ανάδευση, overnight. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα αφέθηκε μέχρι να φτάσει θερμοκρασία δωματίου, μεταφέρθηκε ποσοτικά σε διαχωριστική χοάνη και εκχυλίστηκε με EtOAc/H₂O (x5), με σκοπό την απομάκρυνση του DMF. Ακολούθησε και η εκχύλιση της υδατικής φάσης με EtOAc (x1). Οι συνδυασμένες οργανικές στιβάδες ξηράθηκαν με Na₂SO₄ και εξατμίστηκαν υπό κενό. Το μίγμα της αντίδρασης καθαρίστηκε μέσω υγρής χρωματογραφίας στήλης με διαλύτες έκλουσης PE/EtOAc, δίνοντας το επιθυμητό προϊόν (**3a**) σε απόδοση 75%.



Ο αιθανικός εστέρας της φλουορεσίνης (2) (1 mmol, 1.0 ισοδύναμο) προστέθηκε σε αυτόκλειστο δοχείο και διαλυτοποίηθηκε σε DMF (4 mL). Έπειτα, προστέθηκαν ο 6ισοκυανοεξυλο-4-μεθυλβενζοσουλφονικός εστέρας (1.2 mmol, 1.2 ισοδύναμα) και το NaHCO₃ (2 mmol, 2.0 ισοδύναμα). Το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε στους 80 °C, υπό ανάδευση, overnight. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα αφέθηκε μέχρι να φτάσει θερμοκρασία δωματίου, μεταφέρθηκε ποσοτικά σε διαχωριστική χοάνη και εκχυλίστηκε με EtOAc/H₂O (x5), με σκοπό την απομάκρυνση του DMF. Ακολούθησε και η εκχύλιση της υδατικής φάσης με EtOAc (x1). Οι συνδυασμένες οργανικές στιβάδες ξηράθηκαν με Na₂SO₄ και εξατμίστηκαν υπό κενό. Το μίγμα της αντίδρασης καθαρίστηκε μέσω υγρής χρωματογραφίας στήλης με διαλύτες έκλουσης PE/EtOAc, δίνοντας το επιθυμητό προϊόν (**3b**) σε απόδοση 72%.



Ο αιθανικός εστέρας της φλουορεσίνης (2) (3 mmol, 1.0 ισοδύναμο) προστέθηκε σε αυτόκλειστο δοχείο και διαλυτοποίηθηκε σε DMF (12 mL). Έπειτα, προστέθηκαν ο 2-(2-ισοκυανοαιθοξυ)αιθυλ-4-μεθυλβενζοσουλφονικός εστέρας (3.6 mmol, 1.2 ισοδύναμα) και το NaHCO₃ (6 mmol, 2.0 ισοδύναμα). Το μίγμα της αντίδρασης αφέθητηςους 80 °C, υπό ανάδευση, overnight. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα αφέθηκε μέχρι να φτάσει θερμοκρασία δωματίου, μεταφέρθηκε ποσοτικά σε διαχωριστική χοάνη και εκχυλίστηκε με EtOAc/H₂O (x5), με σκοπό την απομάκρυνση του DMF. Ακολούθησε και τηςκχύλιση της υδατικής φάσης με EtOAc (x1). Οι συνδυασμένες οργανικές στιβάδες ξηράθηκαν με Na₂SO₄ και εξατμίστηκαν υπό κτης. Το μίγμα της αντίδρασης καθαρίστηκε μέσω υγρής χρωματογραφίας στήλης με διαλύτες έκλουσης PE/EtOAc, δίνοντας το επιθυμητό προϊόν (**3c**) σε απόδοση 79%.



Η 7-υδρόξυκουμαρίνη (3 mmol, 1.0 ισοδύναμο) προστέθηκε σε αυτόκλειστο δοχείο και διαλυτοποίηθηκε σε DMF (12 mL). Έπειτα, προστέθηκαν ο 3-ισοκυανοπρόπυλ-4μεθυλβενζοσουλφονικός εστέρας (6 mmol, 2.0 ισοδύναμα) και το NaHCO₃ (6 mmol, 2.0 ισοδύναμα). Το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε στους 80 °C, υπό ανάδευση, overnight. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα αφέθηκε μέχρι να φτάσει θερμοκρασία δωματίου, μεταφέρθηκε ποσοτικά σε διαχωριστική χοάνη και εκχυλίστηκε με EtOAc (x5), με σκοπό την απομάκρυνση του DMF. Ακολούθησε και η εκχύλιση της υδατικής φάσης με EtOAc/H₂O (x1). Οι συνδυασμένες οργανικές στιβάδες ξηράθηκαν με Na₂SO₄ και εξατμίστηκαν υπό κενό. Το μίγμα της αντίδρασης καθαρίστηκε μέσω υγρής χρωματογραφίας στήλης με διαλύτες έκλουσης PE/EtOAc, δίνοντας το επιθυμητό προϊόν (**3d**) σε απόδοση 82%.



Η 4-μεθυλο-7-υδροξυκουμαρίνη (1 mmol, 1.0 ισοδύναμο) προστέθηκε σε αυτόκλειστο δοχείο και διαλυτοποίηθηκε σε DMF (4 mL). Έπειτα, προστέθηκαν ο 3ισοκυανοπροπυλο-4-μεθυλβενζοσουλφονικός εστέρας (6 mmol, 2.0 ισοδύναμα) και το NaHCO₃ (6 mmol, 2.0 ισοδύναμα). Το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε στους 80 °C, υπό ανάδευση, overnight. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα αφέθηκε μέχρι να φτάσει θερμοκρασία δωματίου, μεταφέρθηκε ποσοτικά σε διαχωριστική χοάνη και εκχυλίστηκε με EtOAc/H₂O (x5), με σκοπό την απομάκρυνση του DMF. Ακολούθησε και η εκχύλιση της υδατικής φάσης με EtOAc (x1). Οι συνδυασμένες οργανικές στιβάδες ξηράθηκαν με Na₂SO₄ και εξατμίστηκαν υπό κενό. Το μίγμα της αντίδρασης καθαρίστηκε μέσω υγρής χρωματογραφίας στήλης με διαλύτες έκλουσης PE/EtOAc, δίνοντας το επιθυμητό προϊόν (**3e**) σε απόδοση 84%.

4.4 Σύνθεση παραγώγων μέσω αντιδράσεων πολλών συστατικών

Γενική μέθοδος για την αντίδραση Groebke-Blackburn-Bienaymé.



Σε ένα αναδευόμενο διάλυμα αλδεΰδης (0.7 mmol, 1.0 ισοδύναμο) σε MeOH (0.7 mL), προστέθηκε 2-αμινοπυριδίνη (0.7 mmol, 1.0 ισοδύναμο) και τριφλικό σκάνδιο (0.2 mmol, 0.3 ισοδύναμα), το μίγμα αφέθηκε για 20 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 45 °C. Ακολουθεί προσθήκη από το ισονιτρίλιο 3a (0.7 mmol, 1.0 ισοδύναμα). Το τελικό μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε υπό ανάδευση για 24-72 ώρες, στους 45 °C. Ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε χρωματογραφικός διαχωρισμός με διαλύτες έκλουσης PE/EtOAc/DCM/MeOH, δίνοντας τα επιθυμητά προϊόντα (4a-f, 4h) σε απόδοση 36-67%. Στην περίπτωση του προϊόντος 4g, το διάλυμα της αναδευόμενης ισοφθαλαλδεϋδης (1.4 mmol, 2.0 ισοδύναμα) σε MeOH (1.4 mL), ψύχθηκε στους 0 °C με παγόλουτρο και έγινε αργή στάγδην προσθήκη, υπό έντονη ανάδευση σε διάρκεια 30 λεπτών της επίσης διαλυμένης σε μεθανόλη (1.4 mL) 2-αμινοπυριδίνης (0.7 mmol, 1.0 ισοδύναμο). Το διάλυμα αφέθηκε στο παγόλουτρο, να φτάσει από τους 0 °C σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση για 24 h, με σκοπό τον πλήρη σχηματισμό της ενδιάμεσης απλής ιμίνης, έναντι της διπλής. Έπειτα, έγινε εξάτμιση του διαλύτη, επαναδιάλυση του στερεού σε MeOH (0.7 mL), προσθήκη του καταλύτη τριφλικού σκάνδιου (0.2 mmol, 0.3 ισοδύναμα) και του ισονιτριλίου 3a. Το μίγμα αφέθηκε συνολικά 48 ώρες να αντιδράσει, σε θερμοκρασία 45°C. Ακολούθησε χρωματογραφικός διαχωρισμός με διαλύτες έκλουσης PE/EtOAc/DCM/MeOH, δίνοντας το επιθυμητό προϊόν 4g σε απόδοση 41%.

Γενική μέθοδος για την αντίδραση Passerini.



Σε ένα αναδευόμενο διάλυμα της αλδεΰδης ή κετόνης (0.7 mmol, 1.0 ισοδύναμο) σε DCM (0.7 mL), προστέθηκε το καρβοξυλικό οξύ (0.7 mmol, 1,0 ισοδύναμο) και το μίγμα αφέθηκε για 5 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί προσθήκη από το αντίστοιχο ισονιτρίλιο (0.7 mmol, 1.0 ισοδύναμα). Το τελικό μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε υπό ανάδευση overnight σε θερμοκρασία δωματίου. Ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε χρωματογραφικός διαχωρισμός με διαλύτες έκλουσης PE/EtOAc/DCM/MeOH, δίνοντας τα επιθυμητά προϊόντα (5a-e) σε απόδοση 40-72%. Το προϊόν 5a να σημειωθεί ότι έγινε σε 0.1 mmol κλίμακα, δηλαδή σε ένα αναδευόμενο διάλυμα βενζαλδεϋσης (0.1 mmol, 1.0 ισοδύναμο) σε DCM (0.1 mL), προστέθηκε το (1S,2S)-2-φαινυλκυκλοπροπαν-1-καρβοξυλικό οξύ (0.1 mmol, 1,0 ισοδύναμο) και το μίγμα αφέθηκε για 5 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί προσθήκη του ισονιτριλίου 3a (0.1 mmol, 1,0 ισοδύναμα). Το τελικό μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε υπό ανάδευση overnight σε θερμοκρασία δωματίου. Ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε χρωματογραφικός διαχωρισμός με διαλύτες έκλουσης PE/EtOAc/DCM/MeOH, δίνοντας το επιθυμητό προϊόν 5a σε απόδοση 40%, ως μίγμα διαστερεομερών, αναλογίας 50:50.

Γενική μέθοδος για την αντίδραση Ugi-Tetrazole.



Σε ένα αναδευόμενο διάλυμα αλδεΰδης (0.5-1.0 mmol, 1.0 ισοδύναμο) σε MeOH (0.5-1.0 mL), προστέθηκε η αμίνη (0.5-1 mmol, 1.0 ισοδύναμο) και το μίγμα αφέθηκε για 20 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί προσθήκη από το αντίστοιχο ισονιτρίλιο (0.5-1 mmol, 1.0 ισοδύναμο) και τριμεθυλοσιλυλοαζίδιο (0.5-1 mmol, 1.0 ισοδύναμο) και τριμεθυλοσιλυλοαζίδιο (0.5-1 mmol, 1.0 ισοδύναμο). Το τελικό μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε υπό ανάδευση για 24-36 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου. Ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε χρωματογραφικός διαχωρισμός με διαλύτες έκλουσης στα προϊόντα **6a**-**c** και **6e-h** PE/EtOAc, ενώ στο προϊόν **6d** PE/EtOAc/DCM/MeOH, δίνοντας τα επιθυμητά προϊόντα (**6a, 6c-h**) σε απόδοση 36-67%. Στην περίπτωση του **6b** σε διαλύτη MeOH, η αντίδραση έμεινε στην ενδιάμεση ιμίνη, η οποία ήταν αδιάλυτη σε αυτήν. Για τον λόγο αυτό, προστέθηκαν 3 σταγόνες HCCl₃ και η θερμοκρασία αυξήθηκε στους 45 °C.

Γενική μέθοδος για την αντίδραση Ugi-Classical.



Σε ένα αναδευόμενο διάλυμα αλδεΰδης (0.3-0.7 mmol, 1.0 ισοδύναμο) σε MeOH (0.3-0.7 mL), προστέθηκε η αμίνη (0.3-0.5 mmol, 1.0 ισοδύναμο) και το μίγμα αφέθηκε για 20 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί προσθήκη από το αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ (0.3-0.5 mmol, 1.0 ισοδύναμο) και το ισονιτρίλιο **3a** (0.3-0.5 mmol, 1.0 ισοδύναμο) και το ισονιτρίλιο **3a** (0.3-0.5 mmol, 1.0 ισοδύναμο). Το τελικό μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε υπό ανάδευση για 24-48 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου. Ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε χρωματογραφικός διαχωρισμός με διαλύτες έκλουσης PE/EtOAc/DCM/MeOH, δίνοντας τα επιθυμητά προϊόντα (**7a-d**) σε απόδοση 38-49%.

4.5 Σύνθεση της 6i μέσω αντίδρασης Sonogashira.



Σε προξηραμένη δίλαιμη σφαιρική φιάλη που φέρει μαγνητικό αναδευτήρα και μπαλόνι αργού, προστέθηκε η ένωση **6e** (0.07 mmol, 1 ισοδύναμο), DMF (0.1 mL), PdCl₂(PPh₃)₂ (0.0014 mmol, 0.2 ισοδύναμα) και Cul (0.0014 mmol, 0.2 ισοδύναμα). Τέλος προστέθηκε και (*i*-Pr)₂NH (0.08 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης, προσθέτω EtOAc και μερικές σταγόνες υδατικό διάλυμα HCl 0.1 N, μέχρις ότου το διάλυμα να γίνει ελαφρώς όξινο. Ο έλεγχος γίνεται με πεχαμετρικό χαρτί. Στη συνέχεια το μίγμα μεταφέρεται σε μία διαχωριστική χοάνη και η οργανική φάση εκχυλίζεται με κορεσμένο διάλυμα NH₄Cl(x3). Επίσης, η υδατική φάση εκχυλίζεται με EtOAc (x1). Οι συνδυασμένες οργανικές στιβάδες ξηράθηκαν με Na₂SO₄ και εξατμίστηκαν υπό κενό. Το μίγμα της αντίδρασης καθαρίστηκε μέσω υγρής χρωματογραφίας στήλης με διαλύτες έκλουσης DCM/MeOH, δίνοντας το επιθυμητό προϊόν **6i** σε απόδοση 91%.

4.6 Μετρήσεις απορρόφησης-φθορισμού.

Παρασκευάστηκαν 3 πρότυπα διαλύματα για όλες τις ενώσεις. Το πρώτο διάλυμα S₁ είχε συγκέντρωση 0.1 M και όγκο 100 μL. Το δεύτερο διάλυμα S₂ παρασκευάστηκε με αραίωση του S₁ και είχε συγκέντρωση 2 mM και όγκο 0.1 mL. Το τρίτο διάλυμα S₃ παρασκευάστηκε με αραίωση του S₂ και είχε συγκέντρωση 200 μM και όγκο 200 μL. Η ποσότητα που ζυγίστηκε από κάθε ένωση διαλύθηκε σε 100 μL DMSO με αποτέλεσμα την παραγωγή του S₁. Για την παραγωγή του S₂ λήφθηκαν 2 μL από το S₁, τα οποία αραιώθηκαν σε τελικό όγκο 0.1 mL. Για την παραγωγή του S₃, λήφθηκαν 20μL από το S₂ και αραιώθηκαν σε τελικό όγκο 200 μL DMSO. Το διάλυμα S₃ της κάθε ένωσης χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για τη λήψη των φασμάτων εκπομπής και απορρόφησης. Αρχικά προσδιορίστηκε το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης με σάρωση της περιοχής 400-600 nm. Στη συνέχεια, το διάλυμα κάθε ένωσης ακτινοβολήθηκε με ακτινοβολία μήκους κύματος 460 nm ή 525 nm και λήφθηκαν τα φάσματα φθορισμού.

5 Παράρτημα

Ethyl 2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate



2, 87%

7838 mg, 87% yield, red solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.26 (dd, J = 7.8, 1.1 Hz, 1H), 7.71 (dtd, J = 16.4, 7.4, 1.0 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 6.91 (s, 2H), 6.81 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 4.00 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 0.92 (t, J = 7.1 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 175.61, 165.27, 157.89, 155.97, 134.19, 132.48, 131.25, 130.72, 130.64, 130.29, 129.86, 122.17, 114.98, 103.77, 61.47, 13.58. HRMS (ESI) m/z: [M+H]⁺: C₂₂H₁₆O₅+H, calculated 361.1076; found 361.1068.

Ethyl 2-(6-(3-isocyanopropoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate





4809 mg, 75% yield, orange powder. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.23 (dd, J = 7.9, 1.2 Hz, 1H), 7.68 (dtd, J = 29.9, 7.6, 1.3 Hz, 2H), 7.28 (dd, J = 7.5, 1.1 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 21.7 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 22.5 Hz, 1H), 6.72 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 6.50 (dd, J = 9.7, 1.9 Hz, 1H), 6.41 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 4.20 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 4.08 – 3.92 (m, 2H), 3.63 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.18 (tt, J = 5.9 Hz, 2H), 0.94 (t, J = 7.1 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.6, 165.2, 162.6, 158.8, 157.2 (t, J = 4.8 Hz), 154.0, 150.0, 134.1, 132.5, 131.2, 130.6, 130.3, 130.3, 129.9, 129.6, 129.1, 117.8, 115.2, 113.2, 105.7, 101.0, 64.3, 61.2, 38.2 (t, J = 6.3 Hz), 28.6, 13.6. HRMS (ESI) m/z: [M+H]⁺: C₂₆H₂₁NO₅+H, calculated 428.1492; found 428.1490.

Ethyl 2-(6-((6-isocyanohexyl)oxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate



3b, 72%

338 mg, 72% yield, red-brown powder. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.24 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.69 (dtd, *J* = 29.2, 7.5, 1.2 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 13.8 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 14.6 Hz, 1H), 6.72 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 6.53 (dd, *J* = 9.7, 1.5 Hz, 1H), 6.44 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 4.07 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 4.05 - 3.95 (m, 2H), 3.45 - 3.38 (m, 2H), 1.92 - 1.81 (m, 2H), 1.76 - 1.68 (m, 2H), 1.62 - 1.49 (m, 4H), 0.95 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.6, 165.3, 163.5, 158.9, 155.9 (t, *J* = 5.6 Hz), 154.2, 150.2, 134.2, 132.5, 131.2, 130.7, 1304, 130.2, 129.8, 129.6, 129.0, 117.6, 114.8, 113.6, 105.7, 100.7, 68.5, 61.3, 41.4

(t, J = 6.4 Hz), 28.9, 28.7, 26.0, 25.2, 13.6. HRMS (ESI) m/z: [M+H]⁺: C₂₉H₂₇NO₅+H, calculated 470.1962; found 470.1959.

Ethyl 2-(6-(2-(2-isocyanoethoxy)ethoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate



3c, 79%

1084 mg, 79% yield, yellow powder. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.20 (dd, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 7.66 (dtd, *J* = 30.5, 7.6, 1.3 Hz, 2H), 7.26 (dd, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 18.5 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 19.3 Hz, 1H), 6.74 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 6.47 (dd, *J* = 9.7, 1.9 Hz, 1H), 6.38 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 4.29 – 4.17 (m, 2H), 4.07 – 3.93 (m, 2H), 3.93 – 3.86 (m, 2H), 3.75 – 3.70 (m, 2H), 3.63 – 3.53 (m, 2H), 0.91 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.5, 165.2, 162.9, 158.8, 157.4 (t, *J* = 4.8 Hz), 153.9, 150.2, 134.0, 132.5, 131.1, 130.5, 130.2, 130.2, 129.7, 129.6, 128.9, 117.6, 115.0, 113.5, 105.5, 100.9, 69.4, 68.7, 67.9, 61.2, 41.6 (t, *J* = 6.9 Hz), 13.5. HRMS (ESI) m/z: [M+H]⁺: C₂₇H₂₃NO₆+H, calculated 458.1604; found 458.1598.

7-(3-isocyanopropoxy)-2H-chromen-2-one





564 mg, 82% yield, light grey solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.64 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.85 (dd, J = 8.5, 2.4 Hz, 1H), 6.82 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.27 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 4.18 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.70 – 3.62 (m, 2H), 2.23 – 2.17 (m, 2H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 161.5, 161.0, 157.0 (t, J = 5.3 Hz), 155.7, 143.4, 129.0, 128.9, 113.3, 112.8, 112.5, 101.5, 64.1, 38.3 (t, J = 6.5 Hz), 28.6.

7-(3-isocyanopropoxy)-4-methyl-2H-chromen-2-one



3e, 84%

197 mg, 84% yield, light grey solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.51 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.86 (dd, J = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 6.83 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.16 (q, J = 1.1 Hz, 1H), 4.18 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.66 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.40 (d, J = 1.1 Hz, 3H), 2.23 – 2.17 (m, 2H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 161.4, 161.2, 157.2 (t, J = 5.5 Hz), 155.3, 152.4, 125.7, 114.1, 112.4, 112.2, 101., 64.1, 38.4 (t, J = 6.6 Hz), 28.8, 18.7. HRMS (ESI) m/z: [M+H]⁺: C₁₄H₁₃NO₃+H, calculated 266.0788; found 266.0786.

Ethyl 2-(6-(3-((2-(4-chlorophenyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)amino)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate



4a, 38%

171 mg, 38% yield, red oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (dd, J = 7.9, 1.2 Hz, 1H), 8.04 (dt, J = 6.9, 1.1 Hz, 1H), 7.96 – 7.89 (m, 2H), 7.70 (dtd, J = 30.4, 7.6, 1.4 Hz, 2H), 7.53 (dt, J = 8.9, 0.9 Hz, 1H), 7.38 – 7.28 (m, 3H), 7.14 (ddd, J = 9.1, 6.7, 1.3 Hz, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.89 (d, J = 19.2 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 17.7 Hz, 1H), 6.77 (td, J = 6.8, 1.0 Hz, 1H), 6.67 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 6.53 (dd, J = 9.7, 2.0 Hz, 1H), 6.46 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.19 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 4.10 – 3.95 (m, 2H), 3.36 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 3.27 (dt, J = 6.5 Hz, 2H), 2.08 (tt, J = 6.3 Hz, 2H), 0.97 (t, J = 7.1 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.8, 165.4, 163.1, 158.9, 154.2, 150.3, 141.8, 135.4, 134.2, 133.2, 132.8, 132.6, 131.3, 130.8, 130.4, 130.4, 130.0, 129.7, 129.1, 128.8, 128.4, 125.5, 124.4, 122.3, 117.8, 117.7, 115.2, 113.5, 112.1, 105.8, 100.8, 66.5, 61.4, 44.9, 29.7, 13.7. HRMS (ESI) m/z: [M+H]⁺: C₃₈H₃₀CIN₃O₅+H, calculated 644.1947; found 644.1944.





4b, 40%

193 mg, 40% yield, red oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.26 (dd, *J* = 7.9, 1.2 Hz, 1H), 8.06 (dt, *J* = 6.8, 1.1 Hz, 1H), 7.90 – 7.84 (m, 2H), 7.71 (dtd, *J* = 30.3, 7.6, 1.4 Hz, 2H), 7.56 (dt, *J* = 9.1, 1.9 Hz, 1H), 7.53 – 7.48 (m, 2H), 7.33 (dd, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H), 7.17 (ddd, *J* = 9.0, 6.7, 1.2 Hz, 1H), 6.95 – 6.86 (m, 2H), 6.81 (td, *J* = 6.8, 1.0 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.68 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 6.56 (dd, *J* = 9.7, 2.0 Hz, 1H), 6.48 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 4.20 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 4.09 – 3.98 (m, 2H), 3.33 – 3.24 (m, 2H), 2.09 (tt, *J* = 6.2 Hz, 2H), 0.98 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.6, 165.2, 163.3, 159.1, 154.3, 151.1, 141.6, 135.0, 134.1, 133.0, 132.6, 131.6, 131.2, 130.5, 130.4, 130.3, 130.0, 129.7, 129.6, 129.1, 128.7, 125.8, 124.6, 122.4, 121.4, 117.6, 117.3, 113.7, 112.1, 105.6, 100.8, 66.4, 61.3, 44.8, 29.6, 13.6. HRMS (ESI) m/z: [M+H]⁺: C₃₈H₃₀BrN₃O₅+H, calculated 688.1442; found 688.1443.

Ethyl 2-(6-(3-((2-(4-acetoxyphenyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)amino)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate



4c, 48 %

224 mg, 48% yield, red oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.06 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.70 (dtd, J = 29.8, 7.5, 1.1 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.17 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.14 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.93 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 14.0 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 14.8 Hz, 1H), 6.79 (t, J = 6.7 Hz, 1H), 6.71 (dd, J = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 6.55 (dd, J = 9.6, 1.9 Hz, 1H), 6.47 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 4.20 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 4.07 – 3.99 (m, 2H), 3.29 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.29 (s, 3H), 2.12 – 2.06 (m, 2H), 0.97 (t, J = 7.1 Hz, 3H).¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.67, 169.41, 165.28, 163.22, 158.99, 154.25, 150.62, 150.04, 141.45, 135.23, 134.18, 132.56, 131.66, 131.20, 130.69, 130.39, 129.78, 129.68, 129.09, 128.13, 125.56, 124.41, 122.37, 121.75, 117.6, 117.4, 116.0, 115.0, 113.6, 112.1, 105.7, 100.8, 66.4, 61.3, 44.8, 29.7, 21.1, 13.6. HRMS (ESI) m/z: [M+H]⁺: C₄₀H₃₃N₃O₇+H, calculated 668.2391; found 668.2387.





4d, 67%

300 mg, 67% yield, red oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.24 (dd, *J* = 7.8, 1.1 Hz, 1H), 8.19 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.79 (dd, *J* = 7.6, 1.6 Hz, 1H), 7.75 – 7.61 (m, 3H), 7.33 (ddd, *J* = 8.3, 7.4, 1.7 Hz, 1H), 7.29 (dd, *J* = 7.5, 0.9 Hz, 1H), 7.23 (dd, *J* = 8.4, 7.4 Hz, 1H), 7.06 (td, *J* = 7.5, 0.7 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.90 – 6.82 (m, 3H), 6.80 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.62 (dd, *J* = 9.0, 2.4 Hz, 1H), 6.53 (dd, *J* = 9.7, 1.9 Hz, 1H), 6.44 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 4.07 – 3.92 (m, 4H), 3.84 (s, 3H), 3.08 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.88 (tt, *J* = 6.3 Hz, 2H), 0.96 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.7, 165.3, 163.3, 159.0, 156.1, 154.2, 150.7, 140.3, 134.2, 132.6, 131.5, 131.2, 130.7, 130.4, 130.4, 129.9, 129.8, 129.7, 129.0, 127.8, 125.6, 122.8, 121.7, 121.3, 117.6, 116.2, 115.0, 113.6, 112.9, 112.4, 111.9, 105.6, 100.7, 65.9, 61.3, 56.4, 44.1, 29.4, 13.6. HRMS (ESI) m/z: [M+H]⁺: C₃₉H₃₃N₃O₆+H, calculated 640.2448; found 640.2442. Ethyl 2-(6-(3-((2-(4-nitrophenyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)amino)propoxy)-3oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate



4e, 36%

165 mg, 36% yield, red oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.26 – 8.19 (m, 3H), 8.16 – 8.13 (m, 2H), 8.10 – 8.02 (m, 1H), 7.70 (dtd, J = 36.3, 7.6, 1.2 Hz, 2H), 7.55 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.34 (dd, J = 7.5, 0.9 Hz, 1H), 7.18 (ddd, J = 8.9, 6.7, 1.0 Hz, 1H), 6.94 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.89 (d, J = 22.3 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 23.1 Hz, 1H), 6.81 (td, J = 6.8, 0.8 Hz, 1H), 6.68 (dd, J = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 6.51 (dd, J = 9.7, 1.9 Hz, 1H), 6.44 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 4.29 – 4.18 (m, 1H), 4.06 – 3.98 (m, 2H), 3.34 – 3.29 (m, 2H), 2.14 (tt, J = 6.2 Hz, 2H), 0.97 (t, J = 7.1 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.7, 165.3, 163.0, 159.0, 154.2, 150.5, 146.5, 142.1, 140.9, 134.2, 133.9, 132.6, 131.2, 130.7, 130.5, 130.4, 129.8, 129.7, 129.2, 127.4, 127.3, 125.1, 123.9, 122.5, 118.0, 117.8, 115.2, 113.6, 112.5, 105.7, 100.8, 66.5, 61.4, 45.1, 29.8, 13.7. HRMS (ESI) m/z: [M+H]⁺: C₃₈H₃₀CN₄O₇+H, calculated 655.2193; found 655.2186.

Ethyl 2-(6-(3-((2-(naphthalen-2-yl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)amino)propoxy)-3oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate



4f, 62%

286 mg, 62% yield, red oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.41 (s, 1H), 8.24 (dd, J = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 8.10 (dd, J = 8.6, 1.6 Hz, 1H), 8.06 (ddd, J = 6.8, 1.5, 1.1 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.78 – 7.75 (m, 1H), 7.69 (dtd, J = 28.5, 7.6, 1.4 Hz, 2H), 7.56 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.44 – 7.36 (m, 3H), 7.28 (dd, J = 7.5, 1.1 Hz, 1H), 7.14 (ddd, J = 8.9, 6.7, 1.2 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 18.3 Hz, 1H), 6.83 (d, J = 17.6 Hz, 1H), 6.80 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.77 (td, J = 6.7, 0.9 Hz, 1H), 6.60 (dd, J = 9.0, 2.4 Hz, 1H), 6.54 (dd, J = 9.7, 1.9 Hz, 1H), 6.46 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 4.11 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 4.04 – 3.92 (m, 2H), 3.29 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.03 (tt, J = 6.1 Hz, 2H), 0.94 (t, J = 7.1 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.7, 165.3, 163.2, 159.0, 154.2, 150.7, 141.7, 136.2, 134.2, 133.6, 132.7, 132.5, 131.5, 131.2, 130.7, 130.4, 130.4, 130.0, 129.7, 129.7, 129.0, 128.2, 127.6, 126.2, 126.1, 126.0, 125.9, 125., 124.3, 122.4, 117.6, 117.4, 115.0, 113.6, 112.0, 105.6, 100.7, 66.4, 61.3, 44.8, 29.6, 13.6. HRMS (ESI) m/z: [M+H]⁺: C₄₂H₃₄CIN₃O₅+H, calculated 660.2498; found 660.2481.

Ethyl 2-(6-(3-((2-(3-formylphenyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)amino)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate



4g, 41%

183 mg, 41% yield, red oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 10.04 (s, 1H), 8.55 (dd, J = 2.1, 1.5 Hz, 1H), 8.33 (ddd, J = 7.7, 1.8, 1.2 Hz, 1H), 8.25 (dd, J = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 8.11 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 7.80 (ddd, J = 7.6, 1.7, 1.2 Hz, 1H), 7.70 (dtd, J = 31.0, 7.6, 1.3 Hz, 2H), 7.61 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.57 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.31 (dd, J = 7.6, 1.1 Hz, 1H), 7.21 (ddd, J = 9.0, 6.7, 1.1 Hz, 1H), 6.92 – 6.80 (m, 4H), 6.68 (dd, J = 9.0, 2.4 Hz, 1H), 6.55 (dd, J = 9.7, 1.9 Hz, 1H), 6.46 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 4.23 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 4.10 – 3.90 (m, 2H), 3.33 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.13 (tt, J = 6.3 Hz, 2H), 0.98 (t, J = 7.1 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 192.3, 185.8, 165.4, 163.1, 159.0, 154.2, 150.3, 141.7, 136.8, 134.3, 133.0, 132.6, 131.3, 130.8, 130.4, 130.4, 130.0, 129.7, 129.6, 129.5, 129.1, 128.8, 128.0, 127.9, 126.1, 125.1, 122.5, 117.8, 117.6, 115.2, 113.5, 112.5, 105.8, 100.9, 66.6, 61.4, 45.1, 29.8, 13.7. HRMS (ESI) m/z: [M+H]⁺: C₃₉H₃₁N₃O₆+H, calculated 638.2286; found 638.2297.

Ethyl 2-(6-(3-((2-cycloheptylimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)amino)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate



4h, 43%

190 mg, 43% yield, red oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (dd, *J* = 7.8, 1.1 Hz, 1H), 8.07 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 7.76 – 7.62 (m, 3H), 7.30 (dd, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 1H), 7.22 – 7.16 (m, 1H), 6.98 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 19.2 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 20.0 Hz, 1H), 6.82 (dd, *J* = 6.6 Hz, 1H), 6.74 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 6.55 (dd, *J* = 9.7, 1.9 Hz, 1H), 6.45 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 4.28 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 4.15 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 4.08 – 3.98 (m, 2H), 3.58 – 3.45 (m, 1H), 3.24 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.03 – 2.94 (m, 1H), 2.17 – 2.05 (m, 2H), 2.01 – 1.93 (m, 2H), 1.91 – 1.78 (m, 3H), 1.69 – 1.59 (m, 3H), 1.57 – 1.49 (m, 3H), 0.98 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.8, 165.3, 163.2, 163.2, 161.5, 159.0, 154.3, 150.5, 150.4, 134.3, 132.6, 131.3, 130.8, 130.4, 130.4, 130.0, 129.7, 129.1, 123.7, 122.5, 117.8, 115.2, 113.7, 105.8, 105.7, 100.9, 100.8, 66.5, 61.4, 45.9, 38.2, 34.9, 30.9, 29.9, 28.4, 27.8, 27.3, 26.4, 13.7. HRMS (ESI) m/z: [M+H]⁺: C₃₉H₃₉N₃O₅+H, calculated 630.2968; found 630.2962.

Ethyl 2-(3-oxo-6-(3-(2-phenyl-2-(((1S,2S)-2-phenylcyclopropane-1-carbonyl)oxy)acetamido)propoxy)-3H-xanthen-9-yl)benzoate



5a, 40%

190 mg, 40% yield, red solid. Mixture of diastereomers, ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃), (50:50), δ 8.31 – 8.24 (m, 2H), 8.12 – 8.05 (m, 2H), 7.77 – 7.68 (m, 5H), 7.57 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.48 - 7.27 (m, 14H), 7.25 - 7.21 (m, 1H), 7.08 - 7.03 (m, 2H), 6.98 -6.90 (m, 5H), 6.77 – 6.67 (m, 7H), 6.29 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.12 – 6.07 (m, 1H), 4.15 - 4.09 (m, 4H), 4.06 - 3.99 (m, 4H), 3.61 - 3.45 (m, 5H), 2.59 - 2.51 (m, 1H), 2.14 -1.99 (m, 6H), 1.66 – 1.60 (m, 2H), 1.42 – 1.37 (m, 1H), 0.98 (td, J = 7.1, 2.6 Hz, 6H), 0.90 – 0.86 (m, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 168.7, 165.2, 159.0, 135.4, 134.1, 133.7, 133.7, 132.6, 131.3, 130.7, 130.5, 130.3, 129.9, 129.2, 129.1, 129.0, 128.8, 128.8, 128.6, 128.6, 128.6, 128.5, 127.3, 127.2, 126.7, 126.7, 126.1, 126.1, 105.5, 100.9, 76.1, 66.9, 61.4, 36.7, 29.7, 27.0, 24.00, 17.6, 13.6. ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 172.0, 171.8, 168.8, 168.7, 168.7, 165.2, 165.2, 159.0, 154.6, 154.6, 139.5, 139.4, 135.6, 135.5, 134.1, 134.1, 133.7, 133.7, 132.6, 131.3, 130.7, 130.5, 130.4, 130.4, 129.9, 129.8, 129.2, 129.2, 129.2, 129.1, 129.1, 128.9, 128.8, 128.8, 128.7, 128.7, 128.6, 128.6, 127.3, 127.3, 126.8, 126.8, 126.2, 126.1, 117.7, 115.3, 114.3, 105.6, 100.9, 100.9, 76.1, 75.9, 75.9, 66.9, 66.8, 61.5, 36.8, 36.6, 29.7, 28.9, 28.9, 27.0, 27.0, 24.1, 24.1, 24.0, 17.8 17.8, 17.6, 13.7. HRMS (ESI) m/z: [M+H]+: C₄₃H₃₇N₁O₈+H, calculated 696.2597; found 696.2589.

Ethyl 2-(6-((2,2-dimethyl-4,7,10-trioxo-9,9-di(pyridin-2-yl)-3,8-dioxa-5,11diazatetradecan-14-yl)oxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate



5b, 42%

231 mg, 42% yield, red solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 10.65 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 10.64 (s, 1H), 8.43 (ddd, *J* = 4.9, 1.7, 1.1 Hz, 1H), 8.40 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 8.24 (dd, *J* = 7.9, 1.1 Hz, 1H), 7.74 – 7.64 (m, 6H), 7.29 (dd, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 1H), 7.17 (ddd, *J* = 7.0, 4.9, 1.2 Hz, 1H), 6.88 – 6.84 (m, 3H), 6.71 (dd, *J* = 9.0, 2.4 Hz, 1H), 6.55 (dd, *J* = 9.7, 1.9 Hz, 1H), 6.45 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 5.22 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.18 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 4.12 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 4.06 – 3.99 (m, 2H), 3.63 – 3.57 (m, 2H), 2.10 (tt, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.43 (s, 9H), 0.96 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.6, 169.3, 167.8, 165.3, 163.7, 159.0, 158.3, 156.0, 154.3, 150.8, 147.8, 147.8, 137.5, 134.2, 132.5, 131.2, 130.7, 130.4, 129.7, 129.6, 128.9, 122.9, 121.2, 117.4, 114.7,

114.1, 105.5, 100.6, 84.8, 80.1, 66.2, 61.3, 43.1, 36.2, 28.8, 28.3, 13.6. HRMS (ESI) m/z: [M+H]⁺: C₄₄H₄₂N₄O₁₀+H, calculated 787.2979; found 787.2974.

Ethyl 2-(6-(2-(2-(formyloxy)-3-hydroxy-2-methylpropanamido)ethoxy)ethoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate



5c, 56%

226 mg, 56% yield, orange solid. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.24 (dd, J = 7.9, 1.2 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 0.7 Hz, 1H), 7.70 (dtd, J = 28.8, 7.6, 1.2 Hz, 2H), 7.29 (dd, J = 7.6, 1.0 Hz, 2H), 7.01 (dd, J = 3.4, 2.8 Hz, 1H), 6.92 (dd, J = 9.0, 1.7 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 6.80 (ddd, J = 9.0, 2.3, 1.1 Hz, 1H), 6.56 (dd, J = 9.7, 1.9 Hz, 1H), 6.49 (t, J = 1.7 Hz, 1H), 4.40 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 4.27 – 4.22 (m, 3H), 4.06 – 3.99 (m, 2H), 3.89 – 3.84 (m, 2H), 3.63 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.52 – 3.45 (m, 2H), 1.41 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 0.98 (td, J = 7.1, 4.4 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.1, 173.5, 173.5, 165.3, 165.3, 163.7, 163.7, 161.0, 161.0, 159.1, 154.4, 151.6, 151.6, 134.2, 134.13, 132.6, 132.6, 131.2, 130.6, 130.6, 130.5, 130.5, 130.4, 129.8, 129., 129.4, 129.2, 117.6, 115.2, 115.1, 114.3, 114.2, 105.5, 101.0, 100.9, 77.3, 77.0, 76.8, 74.6, 74.5, 70.0, 70.0, 69.2, 69.2, 69.1, 69.1, 68.2, 61.5, 61.5, 39.0, 23.1, 13.7. HRMS (ESI) m/z: [M+H]⁺: C₃₁H₃₁NO₁₀+H, calculated 578.2026; found 578.2021.

Ethyl 2-(6-(3-(2-(benzoyloxy)-2-cyclopropylacetamido)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate



5d, 61%

265 mg, 61% yield, orange-red oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.24 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.04 (dd, *J* = 7.7, 2.1 Hz, 2H), 7.69 (dt, *J* = 26.3, 7.5 Hz, 2H), 7.51 (dd, *J* = 10.6, 4.1 Hz, 1H), 7.39 (td, *J* = 7.7, 3.5 Hz, 2H), 7.28 – 7.23 (m, 1H), 6.89 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.88 – 6.80 (m, 3H), 6.67 (dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1H), 6.55 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 6.46 (s, 1H), 4.80 (dd, *J* = 8.3, 2.9 Hz, 1H), 4.17 – 4.08 (m, 2H), 4.04 – 3.94 (m, 2H), 3.56 – 3.47 (m, 2H), 2.06 (tt, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.45 – 1.35 (m, 1H), 0.94 (td, *J* = 7.1, 2.6 Hz, 3H), 0.74 – 0.65 (m, 1H), 0.65 – 0.58 (m, 2H), 0.55 – 0.47 (m, 1H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.1, 169.7, 165.7, 165.2, 163.6, 158.9, 154.3, 151.3, 134.1, 133.4, 133.4, 132.5, 131.2, 130.6, 130.4, 130.3, 129.7, 129.7, 129.4, 129.3, 129.0, 128.4, 117.4, 114.9, 113.9, 113.8, 105.4, 100.8, 77.9, 66.8, 66.8, 61.3, 36.3, 28.8, 13.6, 13.1, 3.1, 2.9.

3-ethyl-1-oxo-1-((3-((2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy)propyl)amino)pentan-2-yl 2chloroacetate



5e, 72%

214 mg, 72% yield, pale yellow oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.62 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.83 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.40 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 6.24 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 5.35 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.21 – 4.01 (m, 4H), 3.59 – 3.50 (m, 2H), 2.11 – 1.96 (m, 2H), 1.53 – 1.41 (m, 2H), 1.38 – 1.30 (m, 1H), 1.28 – 1.19 (m, 2H), 0.93 (t, *J* = 7.7 Hz, 3H), 0.90 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 168.2, 165.2, 160.9, 160.2, 154.9, 142.4, 127.9, 112.3, 111.8, 111.7, 100.6, 75.9, 65.4, 42.6, 39.7, 35.7, 27.8, 21.2, 20.9, 10.6, 10.6.

Ethyl 2-(6-(3-(5-((benzylamino)(4-chlorophenyl)methyl)-1H-tetrazol-1yl)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate



6a, 61%

427 mg, 61% yield, orange powder. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.24 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.69 (dt, *J* = 28.4, 7.5 Hz, 2H), 7.37 – 7.14 (m, 11H), 6.91 – 6.79 (m, 2H), 6.76 (dd, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.55 (ddd, *J* = 8.9, 4.3, 2.5 Hz, 1H), 6.51 (dd, *J* = 9.7, 1.8 Hz, 1H), 6.42 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 5.15 (s, 1H), 4.50 – 4.28 (m, 2H), 4.06 – 3.97 (m, 2H), 3.97 – 3.87 (m, 2H), 3.71 (dd, *J* = 13.2, 6.2 Hz, 1H), 3.66 (dd, *J* = 13.2, 7.7 Hz, 1H), 2.43 (br s, 1H), 2.22 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 0.96 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.7, 165.2, 162.3, 158.8, 155.2, 154.0, 150.0, 138.4, 135.9, 134.6, 134.2, 132.6, 131.2, 130.7, 130.4, 130.3, 130.0, 129.7, 129.3, 129.1, 128.8, 128.6, 128.6, 128.3, 128.2, 127.6, 117.9, 115.4, 113.0, 113.0, 105.8, 100.9, 64.8, 61.3, 55.4, 55.4, 51.2, 44.3, 28.6, 13.6. HRMS (ESI) m/z: [M+H]⁺: C₄₀H₃₄ClN₅O₅+H, calculated 700.2321; found 700.2317.

Ethyl 2-(6-(3-(5-((benzylamino)(4-bromophenyl)methyl)-1H-tetrazol-1yl)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate



6b, 63%

235 mg, 63% yield, orange powder. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.22 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.67 (dt, J = 29.7, 7.5 Hz, 2H), 7.38 (dd, J = 8.1, 3.0 Hz, 2H), 7.30 – 7.14 (m, 8H), 6.85 (t, J = 9.6 Hz, 2H), 6.76 (dd, J = 2.7 Hz, 1H), 6.58 – 6.52 (m, 1H), 6.47 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 6.40 (s, 1H), 5.13 (s, 1H), 4.47 – 4.30 (m, 2H), 4.04 – 3.95 (m, 2H), 3.94 – 3.84 (m, 2H), 3.68 (dd, J = 13.2, 5.8 Hz, 1H), 3.62 (dd, J = 13.2, 8.1 Hz, 1H), 2.49 (br s, 1H), 2.20 (tt, J = 6.0 Hz, 2H), 0.94 (t, J = 7.1 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.4, 165.0, 162.4, 158.7, 155.1, 153.9, 150.3, 138.3, 136.3, 133.9, 132.5, 132.0, 131.0, 130.4, 130.3, 130.2, 129.6, 129.1, 129.0, 128.4, 128.4, 128.4, 128.1, 128.1, 127.4, 122.5, 117.6, 115.1, 113.1, 105.5, 100.7, 77.3, 64.8, 61.2, 55.3, 55.3, 51.0, 44.2, 28.4, 13.5. HRMS (ESI) m/z: [M+H]⁺: C₄₀H₃₄BrN₅O₅+H, calculated 744.1816; found 744.1816.

Ethyl 2-(6-(3-(5-(cyclopropyl(thiazolidin-3-yl)methyl)-1H-tetrazol-1-yl)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate



6c, 52%

223 mg, 52% yield, orange oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.23 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.68 (dt, *J* = 28.5, 6.8 Hz, 2H), 7.28 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 17.4 Hz, 1H), 6.72 (dd, *J* = 8.7, 1.8 Hz, 1H), 6.51 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 6.42 (s, 1H), 4.43 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 4.14 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 4.04 – 3.97 (m, 2H), 3.94 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 3.54 – 3.46 (m, 2H), 3.27 (dd, *J* = 12.3, 6.7 Hz, 1H), 3.05 (dt, *J* = 12.1, 5.9 Hz, 1H), 2.91 – 2.84 (m, 1H), 2.84 – 2.67 (m, 1H), 2.19 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 2.14 – 1.97 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.87 – 0.75 (m, 1H), 0.69 – 0.60 (m, 1H), 0.58 – 0.52 (m, 1H), 0.52 – 0.40 (m, 2H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.6, 173.0, 165.3, 163.2, 158.9, 154.2, 134.1, 132.5, 131.1, 130.7, 130.3, 129.8, 129.7, 129.0, 117.7, 115.0, 113.6, 113.6, 105.7, 100.7, 100.7, 69.6, 66.9, 61.3,

57.2, 55.3, 36.4, 29.6, 29.1, 14.2, 13.6, 6.1, 1.4. HRMS (ESI) m/z: $[M+H]^+$: C₃₃H₃₃N₅O₅S+H, calculated 612.2281; found 612.2273.

Ethyl 2-(6-(3-(5-((5-(2-chloro-5-(trifluoromethyl)phenyl)furan-2-yl)(prop-2-yn-1-ylamino)methyl)-1H-tetrazol-1-yl)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate



6d, 31%

242 mg, 31% yield, orange-red oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.64 (s, 1H), 8.25 (td, J = 7.9, 1.1 Hz, 1H), 7.81 – 7.59 (m, 4H), 7.30 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 6.98 – 6.88 (m, 4H), 6.85 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 6.76 (dd, J = 9.3, 2.0 Hz, 1H), 6.70 (dd, J = 9.0, 2.4 Hz, 1H), 6.58 (dd, J = 9.7, 1.9 Hz, 1H), 6.49 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 4.70 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 4.13 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 4.04 (ddd, J = 16.8, 9.0, 5.3 Hz, 2H), 3.99 (dd, J = 14.3, 7.2 Hz, 2H), 2.52 (tt, J = 6.2 Hz, 2H), 0.99 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 0.91 (t, J = 7.1 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.7, 165.3, 165.2, 162.8, 159.2, 157.6, 155.1, 154.3, 151.7, 142.9, 134.2, 134.0, 132.7, 132.5, 131.3, 131.2, 130.7, 130.6, 130.5, 130.3, 129.9, 129.8, 129.6, 129.4, 122.0, 117.8, 115.5, 115.1, 113.6, 105.6, 103.8, 101.0, 65.0, 61.4, 61.4, 45.2, 29.8, 13.7, 13.5. HRMS (ESI) m/z: [M+H]⁺: C₄₁H₃₁ClF₃N₅O₆+H, calculated 782.1988; found 782.1984.

Ethyl 2-(6-(3-(5-((2-bromophenyl))((2-ethynylphenyl)amino)methyl)-1H-tetrazol-1yl)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate



6e, 67 %

506 mg, 67% yield, brown-red oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (dd, *J* = 7.8, 1.0 Hz, 1H), 7.77 – 7.64 (m, 2H), 7.55 (dt, *J* = 8.8, 1.5 Hz, 2H), 7.36 – 7.27 (m, 2H), 7.22 – 7.16 (m, 1H), 7.10 – 7.01 (m, 1H), 6.88 – 6.75 (m, 3H), 6.67 – 6.52 (m, 3H), 6.49 – 6.40 (m, 2H), 6.34 – 6.28 (m, 1H), 5.68 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H), 4.79 – 4.67 (m, 2H), 4.11 – 3.96 (m, 4H), 3.43 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 2.47 (tt, *J* = 6.0 Hz, 2H), 0.97 (td, *J* = 7.1, 1.3 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.80, 185.78, 165.32, 162.34, 158.83, 154.87, 154.87, 154.00, 153.93, 149.92, 149.90, 146.07, 135.85, 135.81, 134.24,

134.21, 133.14, 133.01, 132.95, 132.57, 131.29, 131.26, 130.80, 130.61, 130.45, 130.43, 130.33, 130.29, 130.11, 130.08, 129.71, 129.15, 129.04, 129.01, 128.97, 128.84, 128.82, 123.23, 118.65, 118.52, 117.98, 115.43, 115.37, 113.29, 112.68, 110.81, 110.70, 108.09, 107.97, 105.90, 105.88, 101.32, 100.85, 84.32, 84.22, 79.71, 79.62, 64.61, 64.57, 61.41, 51.31, 51.27, 44.68, 44.66, 29.08, 29.04, 13.68. HRMS (ESI) m/z: $[M+H]^+$: C₄₁H₃₂BrN₅O₅+H, calculated 754.1665; found 754.1661.

Ethyl 2-(6-((6-(5-((benzylamino)(4-chlorophenyl)methyl)-1H-tetrazol-1yl)hexyl)oxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate



6f, 53%

275 mg, 53% yield, orange powder. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.24 (dd, *J* = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 7.69 (dtd, *J* = 29.0, 7.5, 1.3 Hz, 2H), 7.41 – 7.22 (m, 10H), 6.90 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 14.1 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H), 6.70 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 6.53 (dd, *J* = 9.7, 1.9 Hz, 1H), 6.44 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 5.12 (s, 1H), 4.21 – 4.06 (m, 2H), 4.06 – 3.92 (m, 4H), 3.77 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 3.72 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 2.49 (br s, 1H), 1.69 (td, *J* = 13.5, 6.7 Hz, 2H), 1.65 – 1.53 (m, 2H), 1.35 (dd, *J* = 14.9, 7.0 Hz, 2H), 1.22 – 1.12 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.7, 165.3, 163.5, 158.9, 154.9, 154.2, 150.3, 138.5, 136.2, 134.6, 134.2, 132.5, 131.2, 130.7, 130.9, 130.3, 129.8, 129.6, 129.3, 129.0, 128.9, 128.6, 128.3, 127.6, 117.6, 114.9, 113.7, 105.7, 100.7, 68.4, 61.3, 55.3, 51.2, 47.3, 29.1, 28.6, 26.0, 25.3, 13.6. HRMS (ESI) m/z: [M+H]⁺: C₄₃H₄₀CIN₅O₅+H, calculated 742.2791; found 742.2791.

Ethyl 2-(6-(2-(2-(5-(cyclopropyl((2,4-dichlorobenzyl)amino)methyl)-1H-tetrazol-1yl)ethoxy)ethoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate



6g, 71%

237 mg, 71% yield, orange powder. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.20 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.66 (dtd, *J* = 33.1, 7.6, 1.2 Hz, 2H), 7.31 – 7.19 (m, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.08 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H), 6.85 – 6.76 (m, 3H), 6.65 – 6.57 (m, 1H), 6.49 – 6.44 (m, 1H), 6.40 – 6.36 (m, 1H), 4.83 – 4.60 (m, 2H), 4.05 – 3.89 (m, 6H), 3.75 (s, 2H), 3.68 (dd, *J* = 14.0, 2.3 Hz, 1H), 3.57 (dd, *J* = 14.0, 1.0 Hz, 1H), 3.49 (dd, *J* = 9.1, 1.2 Hz, 1H), 2.17 (br s, 1H), 1.37 – 1.28 (m, 1H), 0.91 (td, *J* = 7.1, 2.2 Hz, 3H), 0.56 (s, 1H), 0.42 – 0.33 (m, 1H), 0.29 – 0.15 (m, 2H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.5, 165.1, 162.6, 158.7, 156.0, 153.9, 150.0, 135.1, 134.1, 134.0, 133.5, 132.5, 131.1, 130.9, 130.9, 130.5, 130.2, 130.2, 129.7, 129.6, 129.1, 128.9, 127.0, 117.6, 115.0, 113.2, 113.2, 105.8, 100.6, 100.6, 69.2, 69.1, 67.7, 61.2, 57.8, 48.3, 47.5, 15.0, 13.5, 4.8, 2.7. HRMS (ESI) m/z: [M+H]⁺: C₃₈H₃₅Cl₂N₅O₆+H, calculated 728.2043; found 728.2036.

7-(3-(5-((benzylamino)(4-chlorophenyl)methyl)-1H-tetrazol-1-yl)propoxy)-4methyl-2H-chromen-2-one



6h, 83%

209 mg, 83% yield, pale yellow oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.45 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 7.36 – 7.20 (m, 9H), 6.69 – 6.63 (m, 2H), 6.14 (s, 1H), 5.15 (s, 1H), 4.46 – 4.32 (m, 2H), 3.92 – 3.84 (m, 2H), 3.71 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H), 3.67 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H), 2.38 (d, *J* = 0.8 Hz, 3H), 2.22 (tt, *J* = 6.5 Hz, 2H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 160.9, 155.2, 154.8, 152.4, 138.3, 135.9, 134.3, 129.5, 129.0, 128.8, 128.4, 128.1, 127.3, 126.8, 125.6, 113.7, 111.9, 111.9, 101.2, 64.4, 55.2, 51.0, 44.3, 28.5, 18.5. HRMS (ESI) m/z: [M+H]⁺: C₂₈H₂₆ClN₅O₃+H, calculated 516.1797; found 516.1794.

Ethyl 2-[3-[3-[5-(2-azatricyclo[10.4.0.0⁴,9]hexadeca-1(16),4,6,8,12,14-hexaen-10-yn-3-yl)tetrazol-1-yl]propoxy]-6-oxoxanthen-9-yl]benzoate



6i, 91%

43 mg, 91% yield, orange-red oil ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.24 (dd, *J* = 7.5, 5.1 Hz, 1H), 7.75 – 7.60 (m, 2H), 7.60 – 7.52 (m, 2H), 7.39 – 7.33 (m, 1H), 7.33 – 7.26 (m, 2H), 7.22 – 7.15 (m, 1H), 7.13 – 6.99 (m, 1H), 6.90 – 6.74 (m, 3H), 6.70 – 6.56 (m, 2H), 6.54 – 6.38 (m, 2H), 6.36 – 6.26 (m, 1H), 5.78 – 5.65 (m, 1H), 4.84 – 4.65 (m, 2H), 4.18 – 3.92 (m, 4H), 2.55 – 2.39 (m, 2H), 1.07 – 0.89 (m, 3H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.7, 185.7, 165.3, 162.5, 162.5, 158.8, 154.8, 154.8, 154.0, 154.0, 150.1, 150.1, 147.0, 147.0, 135.8, 135.8, 135.7, 134.2, 134.2, 133.7, 133.6, 133.1, 132.6, 131.3, 131.2, 131.1, 130.9, 130.8, 130.8, 130.7, 130.5, 130.4, 130.4, 130.3, 130.3, 130.0, 129.7, 129.2, 129.2, 129.0, 129.0, 123.2, 119.0, 118.9, 118.8, 117.9, 115.3, 115.3, 113.5, 113.4, 113.0, 112.9, 112.8, 112.8, 111.3, 111.1, 107.8, 107.6, 107.4, 107.4, 105.8, 101.3, 100.9, 100.8, 80.0, 80.0, 79.9, 79.5, 79.4, 79.3, 64.8, 64.8, 64.7, 64.7, 64.6, 61.4, 51.4, 44.8, 44.7, 29.7, 29.7, 29.1, 29.0, 13.7.

Ethyl 2-(6-(3-(2-(N-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyacetamido)-3-methylbutanamido)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate



7a, 38%

123 mg, 38% yield, orange oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.83 – 7.57 (m, 2H), 7.30 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.01 – 6.84 (m, 3H), 6.80 – 6.68 (m, 1H), 6.54 (dd, *J* = 9.7, 1.9 Hz, 1H), 6.45 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 4.68 (s, 1H), 4.42 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 4.24 – 3.96 (m, 4H), 3.94 (dd, *J* = 12.3, 1.9 Hz, 1H), 3.80 – 3.66 (m, 1H), 3.60 – 3.51 (m, 2H), 3.52 – 3.38 (m, 5H), 3.34 – 3.10 (m, 1H), 2.69 – 2.51 (m, 1H), 2.51 – 2.36 (m, 1H), 2.10 – 1.97 (m, 2H), 1.85 – 1.66 (m, 2H), 1.08 – 0.91 (m, 6H), 0.86 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.8, 171.6, 171.2, 169.8, 169.6, 165.4, 165.4, 163.3, 163.0, 159.0, 158.9, 154.3, 154.2, 150.3, 150.1, 134.3, 134.3, 132.6, 131.3, 130.8, 130.5, 130.3, 130.0, 130.0, 129.8, 129.7, 129.7, 129.1, 129.0, 117.9, 117.8, 115.2, 115.1, 113.9, 113.8, 113.5, 113.4, 105.9, 105.8, 102.3, 100.9, 100.8, 100.8, 100.7, 74.0, 71.4, 66.8, 66.5, 66.4, 61.4, 61.4, 59.4, 59.3, 59.3, 59.2, 38.9, 36.7, 36.4, 36.4, 31.9, 31.9, 31.3, 29.0, 28.9, 26.7,

26.3, 26.2, 20.0, 19.8, 19.1, 18.7, 13.7. HRMS (ESI) m/z: $[M+H]^+$: C₃₆H₄₂N₂O₉+H, calculated 647.2969; found 647.2968.

Ethyl 2-(6-(3-(2-(4-bromophenyl)-2-(2-chloro-N-(2-fluoro-4methylphenyl)acetamido)acetamido)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate



7b, 49%

279 mg, 49% yield, orange oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.24 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.76 – 7.58 (m, 3H), 7.27 (ddd, *J* = 7.5, 1.9, 1.3 Hz, 1H), 7.23 – 7.20 (m, 2H), 7.00 (dd, *J* = 8.2, 1.3 Hz, 2H), 6.92 – 6.79 (m, 4H), 6.69 – 6.65 (m, 1H), 6.63 (dd, *J* = 8.9, 2.2 Hz, 2H), 6.49 (dd, *J* = 9.7, 1.9 Hz, 1H), 6.40 (dd, *J* = 1.8, 1.0 Hz, 1H), 6.00 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 4.11 (dt, *J* = 9.5, 6.1 Hz, 1H), 4.07 – 3.96 (m, 3H), 3.83 (s, 2H), 3.62 – 3.51 (m, 1H), 3.51 – 3.36 (m, 1H), 2.27 (s, 3H), 2.13 – 1.96 (m, 2H), 0.94 (td, *J* = 7.1, 0.9 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.6, 169.4, 167.1, 165.3, 163.3, 159.0, 154.2, 150.4, 142.5, 142.4 (d, *J* = 7.5 Hz), 134.3 (d, *J* = 2.9 Hz), 132.5, 132.3, 132.0, 131.8, 131.6, 131.4, 131.2, 130.9, 130.8, 130.4 (d, *J* = 10.6 Hz), 129.8, 129.6, 129.0, 125.6, 123.2, 122.7 (d, *J* = 12.5 Hz), 117.6, 116.6 (d, *J* = 20.0 Hz), 115.0, 113.6, 105.7, 101.0, 66.5, 64.6, 61.3, 42.4, 36.9, 28.8, 21.2, 13.6. HRMS (ESI) m/z: [M+H]⁺: C₄₂H₃₅BrClFN₂O₇+H, calculated 813.1378; found 813.1375.

Ethyl 2-(6-(3-(2-(3,3-dimethyl-N-(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)butanamido)-3,3-dimethoxypropanamido)propoxy)-3H-xanthen-9-yl)benzoate



7c, 43%

104 mg, 43% yield, orange oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.69 (dtd, *J* = 28.3, 7.5, 1.2 Hz, 3H), 7.29 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.94 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 6.90 – 6.85 (m, 3H), 6.74 (dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1H), 6.54 (dd, *J* = 9.7, 1.7 Hz, 1H), 6.44 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.37 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 5.20 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 4.62 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 4.12 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 4.07 – 3.98 (m, 2H), 3.50 (dt, *J* = 12.5, 4.9 Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.43 (s, 3H), 2.34 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 2.31 (d, *J* = 13.6 Hz, 1H), 2.06 (tt, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.25 (s, 3H), 1.05 (s, 9H), 0.96 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.7, 170.9, 167.0, 165.3, 163.3, 158.9, 154.2, 150.4, 141.1, 134.2, 132.5, 131.2, 130.7, 130.4, 130.3, 129.9, 129.7, 129.5, 129.0, 128.7, 127.0, 123.5, 119.1, 118.2, 117.7, 115.0, 113.7, 105.7, 103.6, 100.8, 72.2, 66.5, 61.3,

56.3, 55.8, 47.6, 36.4, 31.0, 29.7, 29.5, 28.8, 17.9, 13.6. HRMS (ESI) m/z: $[M+H]^+$: C₄₆H₄₈N₂O₁₁+H, calculated 805.3336; found 805.3335.

Ethyl 2-(6-(3-(2-(4-acetoxyphenyl)-2-(N-(2,6-dichloropyridin-3-yl)methacrylamido)acetamido)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate



7d, 38%

94 mg, 38% yield, orange oil. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.69 (dtd, *J* = 26.5, 7.5, 1.0 Hz, 3H), 7.46 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.28 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.91 – 6.84 (m, 6H), 6.71 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.54 (dd, *J* = 9.7, 1.8 Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.03 (s, 1H), 4.07 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.03 – 3.98 (m, 2H), 3.59 – 3.39 (m, 2H), 2.26 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.05 (tt, *J* = 13.4, 6.8 Hz, 2H), 0.97 (td, *J* = 7.1, 2.8 Hz, 1H). ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 185.5, 169.4, 169.2, 168.5, 165.3, 163.4, 159.0, 154.3, 151.1, 150.9, 150.8, 134.2, 133.0, 132.6, 131.2, 130.7, 130.4, 130.4, 129.7, 129.7, 129.1, 128.6, 122.0, 117.6, 115.1, 113.7, 113.7, 105.6, 100.9, 100.9, 77.3, 77.0, 76.8, 75.0, 66.6, 66.6, 61.4, 36.6, 36.6, 28.8, 21.1, 21.0, 13.6. HRMS (ESI) m/z: [M+H]⁺: C₄₄H₃₇Cl₂N₃O₉+H, calculated 822.1985; found 822.1942.

Ethyl 2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (2)





Ethyl 2-(6-(3-isocyanopropoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (3a)



Ethyl 2-(6-((6-isocyanohexyl)oxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (3b)



Ethyl 2-(6-(2-(2-isocyanoethoxy)ethoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (3c)


7-(3-isocyanopropoxy)-2H-chromen-2-one (3d)

7-(3-isocyanopropoxy)-4-methyl-2H-chromen-2-one (3e)



Ethyl 2-(6-(3-((2-(4-chlorophenyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)amino)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (4a)





Ethyl 2-(6-(3-((2-(4-bromophenyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)amino)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (4b)

Ethyl 2-(6-(3-((2-(4-acetoxyphenyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)amino)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (4c)





Ethyl 2-(6-(3-((2-(2-methoxyphenyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)amino)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (4d)

Ethyl 2-(6-(3-((2-(4-nitrophenyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)amino)propoxy)-3oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (4e)

8.4.6 8.2.4.6 8.4.4.6 <l







Ethyl 2-(6-(3-((2-(naphthalen-2-yl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)amino)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (4f)



Ethyl 2-(6-(3-((2-(3-formylphenyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)amino)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (4g)



Ethyl 2-(6-(3-((2-cycloheptylimidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)amino)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (4f)

8,259 8,245 8,245 8,245 8,245 8,325 8,



Ethyl 2-(3-oxo-6-(3-(2-phenyl-2-(((1S,2S)-2-phenylcyclopropane-1carbonyl)oxy)acetamido)propoxy)-3H-xanthen-9-yl)benzoate (5a)





Ethyl 2-(6-((2,2-dimethyl-4,7,10-trioxo-9,9-di(pyridin-2-yl)-3,8-dioxa-5,11-diazatetradecan-14-yl)oxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (5b)





Ethyl 2-(6-(2-(2-(formyloxy)-3-hydroxy-2-methylpropanamido)ethoxy)ethoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (5c)





Ethyl 2-(6-(3-(2-(benzoyloxy)-2-cyclopropylacetamido)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (5d)



3-ethyl-1-oxo-1-((3-((2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy)propyl)amino)pentan-2-yl 2chloroacetate (5e)



Ethyl 2-(6-(3-(5-((benzylamino)(4-chlorophenyl)methyl)-1H-tetrazol-1yl)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (6a)



Ethyl 2-(6-(3-(5-((benzylamino)(4-bromophenyl)methyl)-1H-tetrazol-1yl)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (6b)





Ethyl 2-(6-(3-(5-(cyclopropyl(thiazolidin-3-yl)methyl)-1H-tetrazol-1-yl)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (6c)



Ethyl 2-(6-(3-(5-((5-(2-chloro-5-(trifluoromethyl)phenyl)furan-2-yl)(prop-2-yn-1-ylamino)methyl)-1H-tetrazol-1-yl)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (6d)

79

Ethyl 2-(6-(3-(5-((2-bromophenyl))((2-ethynylphenyl)amino)methyl)-1H-tetrazol-1yl)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (6e)

8.261 8.261 8.263 8.254 8.255 8.256 8.256 8.256 8.256 8.256 8.256 8.257 8.256 8.256 8.256 8.256 8.257 8.256 8.257 8.257 8.257 8.257 8.257 8.256







Ethyl 2-(6-((6-(5-((benzylamino)(4-chlorophenyl)methyl)-1H-tetrazol-1yl)hexyl)oxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (6f)



Ethyl 2-(6-(2-(2-(5-(cyclopropyl((2,4-dichlorobenzyl)amino)methyl)-1H-tetrazol-1yl)ethoxy)ethoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (6g)









7-(3-(5-((benzylamino)(4-chlorophenyl)methyl)-1H-tetrazol-1-yl)propoxy)-4methyl-2H-chromen-2-one (6h)



Ethyl 2-[3-[3-[5-(2-azatricyclo[10.4.0.0⁴,9]hexadeca-1(16),4,6,8,12,14-hexaen-10-yn-3-yl)tetrazol-1-yl]propoxy]-6-oxoxanthen-9-yl]benzoate (6i)

P. 8248 <pP. 8248</p> P. 8248 <pP. 8



Ethyl 2-(6-(3-(2-(N-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyacetamido)-3-methylbutanamido)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (7a)





Ethyl 2-(6-(3-(2-(4-bromophenyl)-2-(2-chloro-N-(2-fluoro-4methylphenyl)acetamido)acetamido)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (7b)



** Tetramethylsilane (TMS)



Ethyl 2-(6-(3-(2-(3,3-dimethyl-N-(4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)butanamido)-3,3-dimethoxypropanamido)propoxy)-3H-xanthen-9-yl)benzoate (7c)





Ethyl 2-(6-(3-(2-(4-acetoxyphenyl)-2-(N-(2,6-dichloropyridin-3-yl)methacrylamido)acetamido)propoxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoate (7d)

