



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY



Imię i nazwisko autora rozprawy: mgr inż. Mateusz Daśko

Dyscyplina naukowa: Chemia

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim:

Projektowanie, synteza oraz badanie aktywności biologicznej amidosiarczanowych inhibitorów sulfatazy steroidowej zawierających w swojej konstytucji ugrupowania fosforowe lub wiązania C-F.

Tytuł rozprawy w języku angielskim:

Design, synthesis and biological evaluation of new steroid sulfatase inhibitors based on sulfamated analogs containing phosphate groups or C-F bonds.

Promotor	Promotor pomocniczy
<i>Podpis</i>	<i>podpis</i>
Prof. dr hab. inż. Janusz Rachoń	Dr hab. inż. Sebastian Demkowicz

Gdańsk, rok 2018



Z całego serca dziękuję

*mojej **Żonie Marcie**
za cierpliwość, wyrozumiałość
i za to, że zawsze mogę na Nią liczyć*

*oraz **Rodzicom**
za wsparcie i ciągłą wiarę we mnie.*

*Składam serdeczne podziękowania
moim promotorom,*

Panu Profesorowi dr. hab. inż. Januszowi Rachoniowi

oraz

Panu dr. hab. inż. Sebastianowi Demkowiczowi

*za zaangażowanie i wszelką pomoc jaką otrzymałem
podczas przygotowywania niniejszej pracy.*

Bardzo dziękuję

***całemu Zespołowi Katedry Chemii Organicznej
Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej
za życzliwość oraz każdą okazaną pomoc.***

*Bardzo dziękuję
Narodowemu Centrum Nauki
za wsparcie finansowe,
które umożliwiło mi realizację
celu badawczego niniejszej pracy.*



Spis treści

Spis treści.....	1
Wykaz skrótów i symboli.....	4
Streszczenie	5
Abstract	7
I CZĘŚĆ WPROWADZENIE	9
1. Wstęp	10
2. Sulfataza steroidowa (STS).....	12
3. Biologiczna rola STS	13
4. Miejsce aktywne i mechanizm działania STS	16
5. Inhibitory STS.....	20
5.1. Alternatywne substraty.....	20
5.2. Inhibitory odwracalne.....	21
5.3. Inhibitory nieodwracalne.....	23
5.3.1. Steroidowe inhibitory nieodwracalne	23
5.3.2. Niesteroidowe inhibitory nieodwracalne	26
5.4. Inhibitory fosforowe.....	31
6. Dokowanie molekularne.....	33
7. Atom fluoru w związkach biologicznie czynnych	37
7.1. Aspekt syntetyczny.....	38
7.2. Właściwości fizykochemiczne oraz farmakokinetyczne fluorków organicznych.....	39
7.3. Efekty steroelektronowe atomu fluoru oraz jego wpływ na konformację cząsteczki.....	40
7.4. Wpływ atomu fluoru na LogP oraz pKa cząsteczki	41
7.5. Selekttywne oddziaływania białko-ligand z udziałem wiązań C-F	42
8. Cel i zakres pracy	44
II CZĘŚĆ BADANIA WŁASNE	45
9. Uzasadnienie oraz opis podjętych badań.....	46
9.1. Modelowanie molekularne.....	47
9.1.1. Modelowanie molekularne amidosiarczanowych pochodnych 3-fenylokumaryny zawierających w swojej konstytucji ugrupowania fosforowe.....	48

9.1.2. Modelowanie molekularne amidosiarczanowych pochodnych 3-fenylokumaryny zawierających w swojej konstytucji wiązania C-F.....	51
9.1.3. Modelowanie molekularne N-acylowanych pochodnych 3-(4-aminofenylo)-kumaryny zawierających w swojej konstytucji ugrupowanie amidosiarczanowe oraz wiązania C-F.....	53
9.1.4. Modelowanie molekularne N-acylowanych pochodnych tyraminy zawierających w swojej konstytucji wiązania C-F.....	56
9.2. Synteza	59
9.2.1. Selektywna N- i O- fosforylacja	59
9.2.2. Synteza amidosiarczanowych pochodnych 3-fenylokumaryny zawierających w swojej konstytucji ugrupowania fosforowe	68
9.2.3. Synteza amidosiarczanowych pochodnych 3-fenylokumaryny zawierających w swojej konstytucji wiązania C-F.....	70
9.2.4. Synteza N-acylowanych pochodnych 3-(4-aminofenylo)-kumaryny zawierających w swojej konstytucji ugrupowanie amidosiarczanowe oraz wiązania C-F.....	71
9.2.5. Synteza N-acylowanych pochodnych tyraminy zawierających w swojej konstytucji wiązania C-F.....	72
9.3. Oznaczanie aktywności biologicznej.....	74
9.3.1. Aktywność biologiczna amidosiarczanowych pochodnych 3-fenylokumaryny zawierających w swojej konstytucji ugrupowania fosforowe.....	74
9.3.2. Aktywność biologiczna amidosiarczanowych pochodnych 3-fenylokumaryny zawierających w swojej konstytucji wiązania C-F.....	76
9.3.3. Aktywność biologiczna N-acylowanych pochodnych 3-(4-aminofenylo)-kumaryny zawierających w swojej konstytucji ugrupowanie amidosiarczanowe oraz wiązania C-F.....	77
9.3.4. Aktywność biologiczna N-acylowanych pochodnych tyraminy zawierających w swojej konstytucji wiązania C-F.....	80
10. Podsumowanie	82
III CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	93
11. Opis modelowania molekularnego	94
12. Opis syntez.....	95
12.1. Procedura syntezy 3-(dietoksy-fosforyloamino)-fenolu 95	96
12.2. Procedura syntezy 3-(dietoksy-fosforyloksy)-aniliny 96 oraz 1-(dietoksy-fosforyloamino)-3-(dietoksy-fosforyloksy)-benzenu 97 w obecności K ₂ CO ₃	96
12.3. Procedura syntezy 3-(5,5-dimetylo-2-okso-2λ ⁵ -[1,3,2]dioksyfosfin-2-yloamino)-fenolu 98	98
12.4. Procedura syntezy 3-(5,5-dimetylo-[1,3,2]dioksyfosfin-2-yloksy)-aniliny 99	98
12.5. Procedura syntezy 7-hydroksy-3-(4-nitrofenylo)-kumaryny 100	99

12.6. Procedura syntezy 3-(4-aminofenylo)-7-hydroksy-kumaryny 91	100
12.7. Ogólna procedura syntezy N-fosforylowanych pochodnych 3-(4-aminofenylo)-7-hydroksy-kumaryny 92a-h	101
12.8. Ogólna procedura syntezy N-fosforylowanych pochodnych 7-O-amidosiarczanu-3-(4-aminofenylo)-kumaryny Ia-h	107
12.9. Procedura syntezy 3-(4-aminofenylo)-7-(dimetoksy-fosforyloksy)-kumaryny 93	112
12.10. Ogólna procedura syntezy pochodnych 3-fenylo-7-hydroksy-kumaryny 101a-g	113
12.11. Ogólna procedura syntezy pochodnych 7-O-amidosiarczanu-3-fenylo-kumaryny IIa-g	117
12.12. Ogólna procedura syntezy N-acylowanych pochodnych 3-(4-aminofenylo)-7-hydroksy-kumaryny 102a-k	121
12.13. Ogólna procedura syntezy pochodnych 7-O-amidosiarczanu-3-(4-benzoiloamino-fenylo)-kumaryny i 7-O-amidosiarczanu-3-(4-fenyloacetyloamino-fenylo)-kumaryny IIIa-k	129
12.14. Ogólna procedura syntezy pochodnych N-acylowanych pochodnych tyraminy 103a-r	137
12.15. Ogólna procedura syntezy pochodnych N-acylowanych pochodnych amidosiarczanu tyraminy IVa-r	147
13. Opis badań biologicznych	158
13.1. Procedura izolacji enzymu.....	158
13.2. Procedura testu aktywności inhibicyjnej wobec wyizolowanego enzymu	158
13.3. Procedura testu z wykorzystaniem linii komórkowych	158
IV CZĘŚĆ - DODATKI.....	160
Wykaz rysunków	161
Wykaz tabel.....	163
Wykaz schematów	164
Literatura	165

Wykaz skrótów i symboli

17 β -HSD	-	dehydrogenaza 17 β -hydroksysteroidowa
Adiol	-	androstendiol
Adion	-	androstendion
DHEA	-	dehydroepiandrosteron
DHEAS	-	siarczan dehydroepiandrosteronu
DMA	-	<i>N,N</i> -dimetyloacetamid
DMF	-	<i>N,N</i> -dimetyloformamid
E1	-	estron
E1S	-	siarczan estronu
E2	-	estradiol
ER	-	receptor estrogenowy
FBS	-	płodowa surowica bydlęca
Her2	-	receptor nabłonkowego czynnika wzrostu II
IA	-	inhibitor aromatazy
Ka	-	stała dysocjacji kwasu
K _i	-	stała inhibicji
logP	-	logarytmiczny współczynnik podziału
NEt ₃	-	trietyloamina
NPS	-	siarczan <i>p</i> -nitrofenylu
PDB	-	eng. Protein Data Bank
PR	-	receptor progesteronowy
PY	-	pirydyna
STS	-	sulfataza steroidowa
THF	-	tetrahydrofuran
WHO	-	Światowa Organizacja Zdrowia
TLC	-	chromatografia cienkowarstwowa

Streszczenie

Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) estrogeny są jednymi z głównych czynników stymulujących wzrost nowotworów hormonozależnych, w związku z czym inhibitory enzymów, które są w stanie kontrolować produkcję estrogenów mogą mieć potencjalne znaczenie terapeutyczne w leczeniu chorób nowotworowych. Dlatego też, projektowanie oraz synteza nowych, skuteczniejszych środków wpływających na biosyntezę estrogenów stanowi ogromne wyzwanie dla współczesnej medycyny. W ostatnich latach liczne ośrodki naukowe na całym świecie prowadzą intensywne badania związane z poszukiwaniem nowych, skutecznych inhibitorów sulfatazy steroidowej (STS), która bierze udział w biosyntezie estrogenów, a także ich zastosowaniem w terapii przeciwko hormonozależnemu rakowi piersi.

W niniejszej pracy opisałem praktyczne metody syntezy, poprzedzone etapem modelowania molekularnego, czterech serii nowych inhibitorów STS należących do różnych klas związków obejmujących:

- a) amidosiarczanowe pochodne 3-fenylokumaryny zawierające w swojej konstytucji ugrupowania fosforowe (związki **Ia-h**);
- b) amidosiarczanowe pochodne 3-fenylokumaryny zawierające w swojej konstytucji wiązania C-F (związki **IIa-g**);
- c) *N*-acylowane pochodne 3-(4-aminofenylo)-kumaryny zawierające w swojej konstytucji ugrupowanie amidosiarczanowe oraz wiązania C-F (związki **IIIa-k**);
- d) *N*-acylowane pochodne tyraminy zawierające w swojej konstytucji ugrupowanie amidosiarczanowe oraz wiązania C-F (związki **IVa-r**).

Aktywność inhibicyjną wszystkich otrzymanych związków oznaczano w teście *in vitro* z wykorzystaniem STS wyizolowanej z łożyska ludzkiego. Dla wyselekcjonowanych pochodnych sprawdzono również właściwości cytotoksyczne wobec dwóch estrogenozależnych linii komórkowych: MCF-7 i T47D oraz dwóch linii komórkowych, których wzrost nie zależy od estrogenów: SkBr3 i MDA-MB-231.

Wyniki opisanych eksperymentów wskazują, że wśród pochodnych zawierających w swojej konstytucji zarówno ugrupowanie amidosiarczanowe jak i fosforowe, najskuteczniejszym inhibitorem STS okazał się związek **Ie**, dla którego wartość IC_{50} w teście enzymatycznym wyniosła $0.19 \mu\text{M}$ (wartość IC_{50} dla związku referencyjnego **V** wyniosła $1.38 \mu\text{M}$). W toku przeprowadzonych eksperymentów zaobserwowałem silną korelację

między parametrem logP a aktywnością biologiczną testowanych związków. Najwyższymi właściwościami inhibicyjnymi wobec STS charakteryzowały się pochodne posiadające w swojej strukturze silnie hydrofobowy rdzeń. W przypadku wszystkich pochodnych zawierających w swojej konstytucji wiązania C-F najwyższą aktywnością w teście enzymatycznym charakteryzowały się pochodne **IIIc** oraz **IIIj** (w obu przypadkach wartość IC_{50} wyniosła $0.18 \mu\text{M}$, natomiast wartość IC_{50} dla inhibitora referencyjnego **V** oznaczono na poziomie $1.38 \mu\text{M}$). Najwyższą aktywność antyproliferacyjną wykazał analog **IIIj** (wartości GI_{50} wobec komórek MCF-7 i T47D wyniosły odpowiednio 15.9 i $8.7 \mu\text{M}$). Jednakże, związek ten nie działał selektywnie wobec komórek estrogenozależnych i równie silnie hamował wzrost dwóch pozostałych linii komórkowych (wartości GI_{50} wobec komórek SkBr3 i MDA-MB-231 wyniosły odpowiednio 18.8 i $8.1 \mu\text{M}$). Dla porównania warto podkreślić, że związek referencyjny **V** nie wykazywał właściwości cytotoksycznych wobec żadnej z wykorzystanych nowotworowych linii komórkowych w zadanych stężeniach.

Zakres opisanych badań obejmuje również serię eksperymentów związanych z selektywną *N*- i *O*- fosforylacją układów zawierających jednocześnie w swojej konstytucji połączenia $C_{Ar}-OH$ oraz $C_{Ar}-NH_2$, których źródłem były wyniki uzyskane podczas syntezy fosforowych inhibitorów STS. Ponadto, niniejsza praca zawiera krótkie studium literaturowe dotyczące sulfatazy steroidowej, jej miejsca aktywnego, roli jaką odgrywa podczas biosyntezy steroidów estrogenowych oraz postępu w badaniach nad opracowywaniem inhibitorów tego enzymu. Poruszona została również kwestia wykorzystania technik modelowania molekularnego w projektowaniu związków o zastosowaniu terapeutycznym, strategii fluorowania związków biologicznie aktywnych oraz fosforylacji fenoli i aromatycznych amin w kontekście otrzymywania związków biologicznie czynnych.

Abstract

The World Health Organization (WHO) lists estrogens as one of the most important factors inducing the development of hormone-dependent tumors. Inhibitors of enzymes that are able to control the production of estrogens may have potential therapeutic relevance. One strategy for the treatment of hormone-dependent breast cancer involves inhibitors to prevent the synthesis of estrogens in peripheral tissues. In recent years, there has been intensive research toward finding novel effective inhibitors of steroid sulfatase (STS), an enzyme involved in the biosynthesis of estrogens in the mammary gland, as well as their application in therapy against hormone-dependent breast cancer.

The present work describes the computational design and convenient methods for the synthesis of four different series of STS inhibitors, including:

- phosphorylated derivatives of 3-phenyl-coumarin sulfamates (compounds **Ia-h**);
- fluorinated analogues of 3-phenyl-coumarin sulfamates (compounds **IIa-g**);
- N*-acylated derivatives of 3-(4-aminophenyl)-coumarin sulfamates containing C-F bonds (compounds **IIIa-k**);
- N*-acylated derivatives of tyramine sulfamates containing C-F bonds (compounds **IVa-r**).

The inhibitory effects of the synthesized compounds were evaluated using *in vitro* assay with STS isolated from the human placenta. In addition, selected compounds were tested against estrogen-dependent MCF-7 and T47D cells, as well as estrogen-independent MDA-MB-231 and SkBr3 cancer cell lines.

In the course of performed research, it was found that among the phosphorylated derivatives of 3-phenyl-coumarin sulfamates, the compound **Ie** produced the largest inhibitory effects, with IC_{50} values of 0.19 μ M (IC_{50} value of compound **V** was 1.38 μ M, used as a reference). Furthermore, a strong correlation between the IC_{50} and calculated LogP values of tested STS inhibitors was observed, which suggest the substantial participation of hydrophobic interactions for the enzyme-inhibitor complex stability. Compounds **IIIc** and **IIIj** demonstrated the highest inhibitory effect in the enzymatic STS assay, both with IC_{50} values of 0.18 μ M among the fluorinated analogues (IC_{50} value of compound **V** was 1.38 μ M, used as a reference). The compound **IIIj** exhibited the highest potency against the MCF-7 and T47D cell lines of 15.9 μ M and 8.7 μ M, respectively. However, it was not selective towards estrogen-dependent cells lines (the GI_{50} values in an assay with SkBr3 and MDA-MB-231

cells were 18.8 and 8.1 μM , respectively). In comparison, compound **V**, used as a reference, was inactive against all of the aforementioned cells.

In addition, the scope of the present work includes series of experiments with selective *N*- and *O*-phosphorylation of compounds containing in their constitutions both $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OH}$ and $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-NH}_2$ connections. Furthermore, the present work includes a brief study of the literature on steroid sulfatase, its active site, the role it plays in the biosynthesis of estrogenic steroids and progress in research on the development of inhibitors of this enzyme. Also discussed was the issue of the using of molecular modeling techniques in the design of compounds with potential therapeutic application as well as a strategy of fluorination and phosphorylation of the biologically active compounds.

I CZĘŚĆ

WPROWADZENIE

Rozdział 1

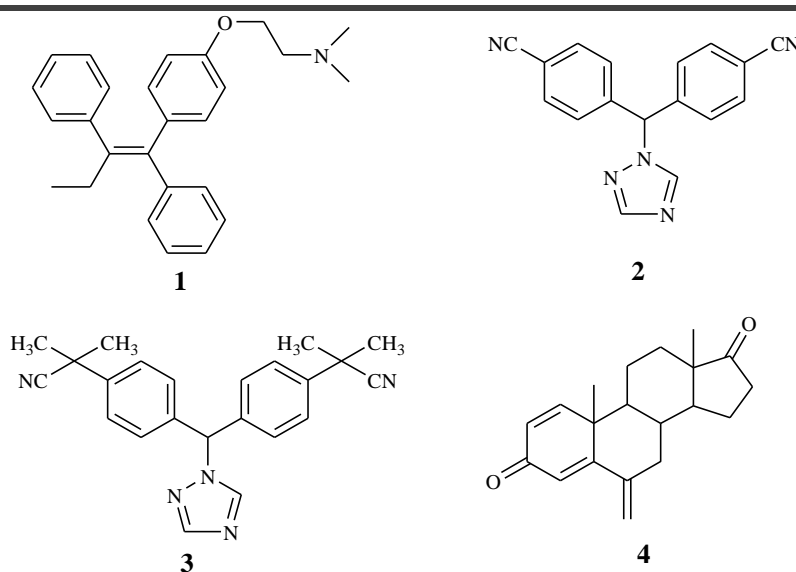
Wstęp

Rak piersi jest jedną z głównych przyczyn zgonów i najczęściej diagnozowanym typem nowotworu wśród kobiet na całym świecie. Prognozy amerykańskiej agencji *National Cancer Institute* (NCI) alarmują, iż w 2016 roku w samych Stanach Zjednoczonych zdiagnozowanych zostanie około 246 tysięcy nowych przypadków zachorowań na raka piersi wśród kobiet w okresie postmenopauzalnym, a około 40 tysięcy kobiet umrze z powodu tej choroby. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) wymienia estrogeny jako jedne z głównych czynników stymulujących wzrost nowotworów hormonozależnych. Od estrogenów zależny jest rozwój większości nowotworów, głównie piersi, prostaty i błony śluzowej macicy [1]. Dlatego też, projektowanie oraz synteza nowych, skuteczniejszych środków wpływających na biosyntezę estrogenów, stanowi ogromne wyzwanie dla chemii medycznej.

Od 1970 roku, kobietom po menopauzie ze zdiagnozowanym hormonozależnym nowotworem piersi podawano tamoksyfen **1**, działający jako antyestrogen blokujący receptor estrogenowy. Ponad trzy dekady temu rozwinięto inną klasę środków, które ograniczały dostępność estrogenów dla guza dzięki inhibicji enzymu - aromatazy, przekształcającego androstendion do estronu w końcowym etapie biosyntezy estrogenów. Badania nad tymi związkami doprowadziły do pomyślnego opracowania trzech inhibitorów aromatazy (IA) trzeciej generacji, niesteroidowych: letrozolu **2** i anastrozolu **3**, hamujących aromatazę selektywnie i odwracalnie oraz steroidowego eksemestanu **4**, będącego inhibitorem nieodwracalnym (**Rys.1.1**). Wszystkie trzy IA są dobrze tolerowane i szeroko stosowane w leczeniu klinicznym zaawansowanego raka piersi [2]. Jednakże wiele nowotworów piersi nie reaguje na terapię oparte o te leki. Istnieje zatem konieczność kontynuowania badań nad nowymi, skutecznymi środkami terapeutycznymi [3].

W ostatnich latach prowadzono intensywne badania związane z poszukiwaniem nowych, skutecznych inhibitorów sulfatazy steroidowej (STS), która bierze udział w biosyntezie estrogenów (poprzez hydrolizę ich siarczanowych form), a także ich zastosowaniem w terapii przeciwko hormonozależnemu rakowi piersi. Hipotezę zakładającą udział STS w uwalnianiu estrogenów potwierdza między innymi fakt, że dziesięciokrotnie większa ilość estronu (E1) w tkankach nowotworów piersi pochodzi z siarczanu estronu (E1S) a nie z androstendionu [4]. Ponadto, ekspresja STS jest ważnym czynnikiem

prognostycznym ludzkiego nowotworu piersi [5, 6]. Większość estrogenów pochodzących ze szlaku aromatazy jest przekształcana i magazynowana w organizmie w postaci siarczanów. Zasób siarczanów estrogenowych, choć biologicznie nieaktywnych, może znacząco przyczynić się do ogólnej estrogennej stymulacji wzrostu nowotworu [2] na drodze, katalizowanej przez STS, hydrolizy siarczanów steroidowych [np., siarczanu dehydroepiandrosteronu (DHEAS) i E1S], do ich aktywnych form [dehydroepiandrosteronu (DHEA) i E1] [3].



Rys.1.1. Struktura chemiczna tamoksyfenu **1**, letrozolu **2**, anastrozolu **3** i eksemestanu **4**.

Ze względu na znaczne podobieństwo do naturalnych substratów (siarczanów steroidowych), a także z powodu doskonałego powinowactwa do miejsca aktywnego enzymu, związki zawierające w swojej konstytucji ugrupowanie amidosiarczanowe są szeroko wykorzystywane jako inhibitory STS [7]. Niemniej jednak strategia polegająca na poprawie ich właściwości biologicznych poprzez wprowadzenie do struktury związku biologicznie czynnego atomów fluoru lub ugrupowań fosforoorganicznych nie została w pełni wykorzystana.

Powszechnie wiadomo, że obecność atomu fluoru w konstytucji związków znacznie wpływa na ich właściwości fizykochemiczne i aktywność biologiczną [8], natomiast pochodne fosforoorganiczne były już z powodzeniem wykorzystywane jako skuteczne inhibitory STS [9].

Rozdział 2

Sulfataza steroidowa (STS)

Sulfataza steroidowa działa poprzez hydrolizowanie aryłowych i alkilowych siarczanów steroidowych, co odgrywa kluczową rolę podczas tworzenia aktywnych biologicznie steroidów. Szerokie rozpowszechnienie STS w całym organizmie powoduje jej zaangażowanie w liczne procesy fizjologiczne. Chociaż struktura krystalograficzna sulfatazy steroidowej została ustalona, to stosunkowo niewiele wiadomo na temat regulacji ekspresji i aktywności tego enzymu. Badania nad regulacją i inhibicją STS stymulowane były przez jej istotną rolę w przyczynianiu się do rozwoju hormonozależnych nowotworów piersi i prostaty. STS powoduje hydrolizę m.in. E1S i DHEAS, odpowiednio do E1 i DHEA, które mogą być przekształcane w organizmie w steroidy wykazujące estrogenne właściwości (estradiol, androstendiol), indukujące wzrost guzów [3].

Gen dla ludzkiego STS umiejscowiony jest na krótszym ramieniu chromosomu X i zajmuje obszar 146kb. Jest zbudowany z 10 eksonów z intronami o wielkości od 102bp do 35kb [3]. Sklonowano i sekwencjonowano cDNA dla sulfatazy steroidowej, które koduje białko składające się z 583 reszt aminokwasowych z peptydem sygnałowym zawierającym 21-23 reszty aminokwasowe oraz czterema potencjalnymi miejscami glikozylacji, z czego dwa znajdują się na resztach asparaginy 47 i 259 [10, 11]. Inaktywacja genu STS wywołuje chorobę rybiej łuski X-chromosomalnej. W 80-90% przypadków, choroba ta jest wynikiem całkowitej delecji 146kb genu STS oraz istotnych regionów towarzyszących z dalszej części krótszego ramienia chromosomu X [12]. W niektórych przypadkach przyczyną choroby są mutacje w obrębie sekwencji kodującej gen STS, prowadzące do wytwarzania katalitycznie nieaktywnej STS [13, 14].

Aktywność STS została po raz pierwszy wykryta w mikrosomach wątroby szczura [15]. Dystrybucja tkankowa STS różni się znacząco u różnych ssaków. Zaobserwowano jej brak u świnki morskiej, a także w wątrobach niektórych torbaczy [3]. Uważa się, że u człowieka jest obecna niemal w całym organizmie w niewielkich ilościach, jednakże jej najwyższą ekspresję zaobserwowano w jądrach, jajnikach, nadnerczach, kościach, prostatie, skórze, mózgu, płucach płodu, trzewiach, błonie śluzowej macicy, limfocytach krwi obwodowej, aorticie, nerkach, łożysku oraz piersiach [16, 17].

Rozdział 3

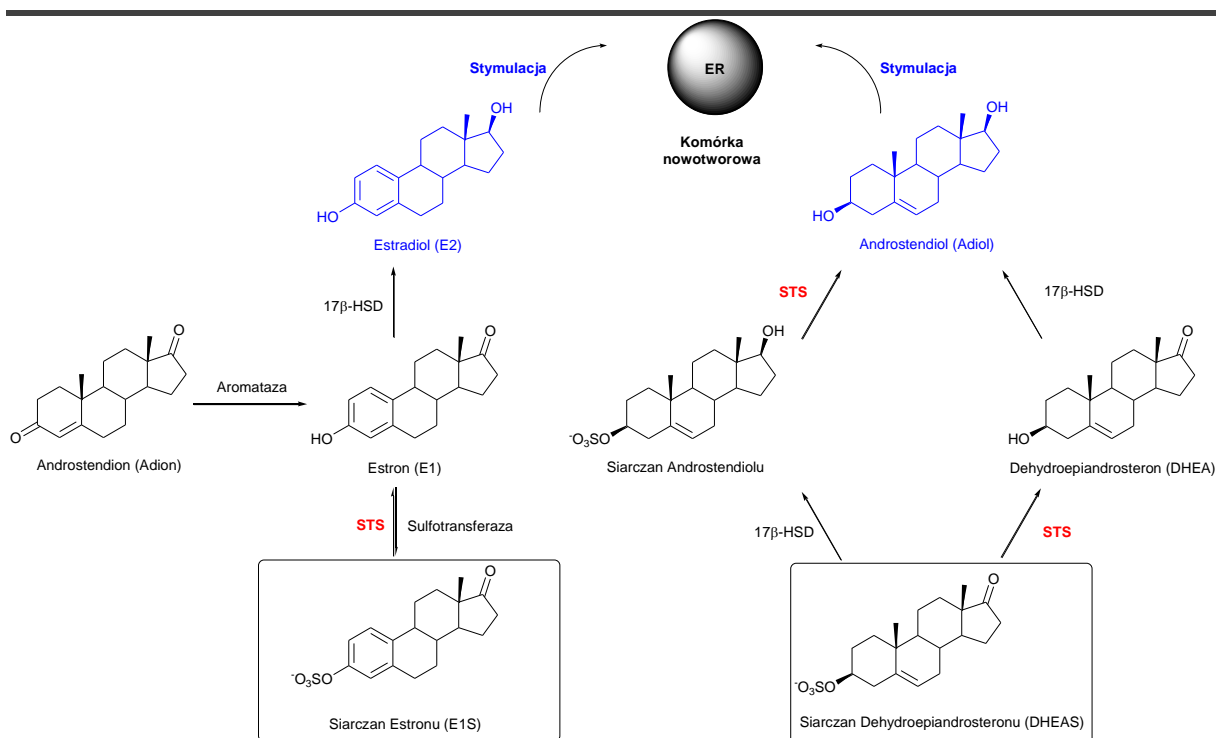
Biologiczna rola STS

Estrogeny odgrywają ważną rolę w stymulacji wzrostu nowotworów tkanek zależnych od hormonów, m.in. piersi i błony śluzowej macicy [18, 19]. Największe ryzyko i najwyższa zachorowalność na raka piersi występuje u kobiet po menopauzie, gdy zaprzestana zostaje produkcja estrogenów w jajnikach. Jednakże u pacjentek tych produkcja estrogenów w dalszym ciągu zachodzi poprzez obwodową konwersję androstendionu (Adionu) do E1 z udziałem kompleksu enzymatycznego aromatazy [20, 21]. U kobiet po menopauzie wskaźniki produkcji dla E1 i estradiolu (E2) mogą wynosić odpowiednio 40 $\mu\text{g} / 24 \text{ h}$ i 6 $\mu\text{g} / 24 \text{ h}$ [22]. Duża część powstających estrogenów może być przekształcana w pochodne siarczanowe na skutek działania sulfotransferazy estronowej oraz sulfotransferazy fenolowej. Taka modyfikacja sprawia, że charakter tych związków ulega zmianie z hydrofobowego na hydrofilowy [23-26]. Interesujące jest to, że siarczany estrogenowe mają bardzo niskie powinowactwo do receptorów estrogenowych (ER) i są one nieaktywne biologicznie, a także ich stężenie w krwioobiegu jest o wiele wyższe niż estrogenów niezwiązanych [27, 28]. Pochodne siarczanowe mogą wiązać się z albuminą, przez co mają dłuższy okres półtrwania we krwi (do 9 godzin) w porównaniu z okresem półtrwania E1 oraz E2 [29]. Wysokie stężenie E1S w krwioobiegu w połączeniu z wydłużonym okresem półtrwania dały podstawę hipotezie, że to E1S może być źródłem biologicznie czynnych estrogenów powstających na drodze szlaku STS [30-33].

Chociaż u kobiet po menopauzie stężenia E1 oraz E2 w układzie krążenia są niższe, to zarówno w nowotworowych, jak i prawidłowych tkankach piersi, stężenia estrogenów są dużo wyższe [34, 35]. Stężenia E1 oraz E2 w nowotworowych tkankach piersi może być nawet 10-krotnie większe niż w osoczu [28]. Interesujący jest fakt, że pomimo znacznie niższego poziomu estrogenów w osoczu u kobiet po menopauzie w porównaniu z kobietami przed menopauzą, ich stężenie w nowotworowych tkankach piersi jest podobne w obu grupach kobiet [36, 37]. Trwają badania nad ustaleniem źródła estrogenów w nowotworach piersi. Obecnie rozważane są dwie koncepcje, z czego jedna zakłada wychwytywanie estrogenów z układu krążenia i wiązanie ich z ER, natomiast według drugiej estrogeny są produkowane *in situ* z różnych estrogenowych prekursorów. Chociaż obie teorie są prawdopodobne, to fakt, że zarówno nowotwory ER pozytywne, jak i ER negatywne wykazują podobne stężenia

estrogenów, wskazuje, że lokalna synteza wnosi duży wkład w całkowity poziom estrogenów w tkankach nowotworowych [38, 39].

Można wyróżnić trzy szlaki enzymatyczne, które odpowiadają za tworzenie E2 z androgenowych prekursorów w tkankach piersi. Obejmują one szlak aromatazy, w którym Adion przekształcany jest do E1 oraz dehydrogenazy 17 β -hydroksysteroidowej (17 β -HSD) typu 1, redukującej E1 do E2 (**Schemat 3.1.**). Sulfataza steroidowa jest odpowiedzialna za hydrolizowanie kilku siarczanów steroidowych, takich jak E1S, DHEAS czy siarczan cholesterolu [3]. Wszystkie te enzymy zostały zidentyfikowane w nowotworowych tkankach piersi i błony śluzowej macicy [40, 41], jednak aktywność aromatazy wykrywana jest jedynie w 40-60% przypadków guzów piersi, natomiast aktywność STS jest obecna w większości nowotworów [40, 42]. Ponadto, aktywność STS wśród tych nowotworów jest znacznie wyższa niż aromatazy [40], co może tłumaczyć 10-krotnie większą ilość E1 pochodzącego ze szlaku sulfatazy niż ze szlaku aromatazy [4].



Schemat 3.1. Szlak biosyntezy steroidów estrogenowych z udziałem STS. Legenda: AR – aromataza, ST – sulfotransferaza, Adion – androstenedion, Adiol – androstendiol, 17 β -HSD – dehydrogenaza 17 β -hydroksysteroidowa.

Eksperymenty z wykorzystaniem techniki RT-PCR w czasie rzeczywistym wykazały, że ekspresja mRNA STS w nowotworach piersi jest znacznie podwyższona [43], co jest zgodne z obserwowaną, zwiększoną aktywnością STS w tej tkance. Badania kliniczne

wykazały, że ekspresja mRNA STS może być traktowana jako wskaźnik nawrotu u pacjentek z guzem piersi [44].

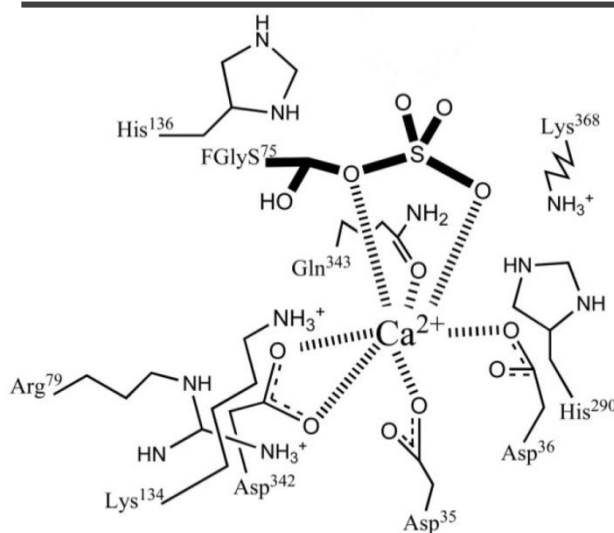
Równoległe z hydrolizą E1S do E1, STS jest zaangażowana również w przekształcanie DHEAS do DHEA, androgenu, który także może przyczyniać się do proliferacji komórek raka piersi i prostaty. Dynamiczne badania nad steroidami wykazały, że DHEA i DHEAS mogą działać jako prekursorzy steroidów z estrogennymi właściwościami, np. androstendiolu (Adiolu). Ponadto, istnieją dowody sugerujące, że DHEAS, DHEA oraz Adiol mogą stymulować proliferację komórek rakowych piersi *in vitro* i wywoływać nowotwory *in vivo*. Stężenie DHEAS stwierdzone w osoczu jest bardzo wysokie, gdyż jest to najobficiej wydzielany steroid przez korę nadnerczy [1]. Podobnie jak E1S, DHEAS ma długi okres półtrwania w osoczu (10-20 godzin), który jest zdecydowanie dłuższy niż niezwiązanego DHEA [45, 46]. Po hydrolizie DHEAS przez STS, DHEA może ulec redukcji do Adiolu, androgenowego steroidu, zdolnego do wiązania się z ER oraz powodującego mitogenezę [47]. Ze względu na duże stężenia prekursorów Adiolu, ten szlak STS może odgrywać istotną rolę w stymulacji rozwoju nowotworu piersi.

Rozdział 4

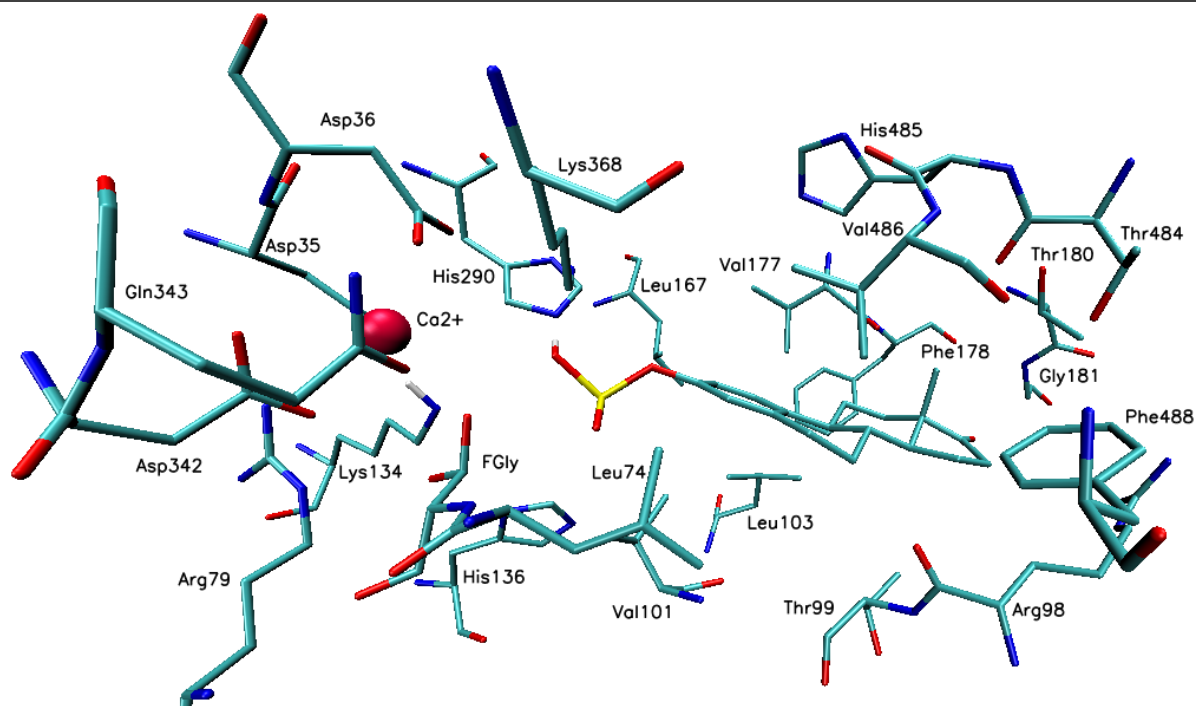
Miejsce aktywne i mechanizm działania STS

Sulfataza steroidowa jest związana z błonami retikulum endoplazmatycznego. Silnie hydrofobowy charakter STS przez długi czas utrudniał oczyszczanie tego białka. Dopiero wykorzystanie optymalnych rozpuszczalników i detergentów, które zapewniły odpowiednią ochronę struktury i funkcjonalnej integralności enzymu, zapobiegając niespecyficznym agregacjom, umożliwiło skuteczną

izolację i krystalizację ludzkiej sulfatazy steroidowej [48], a następnie ustalenie jej struktury krystalograficznej [49].

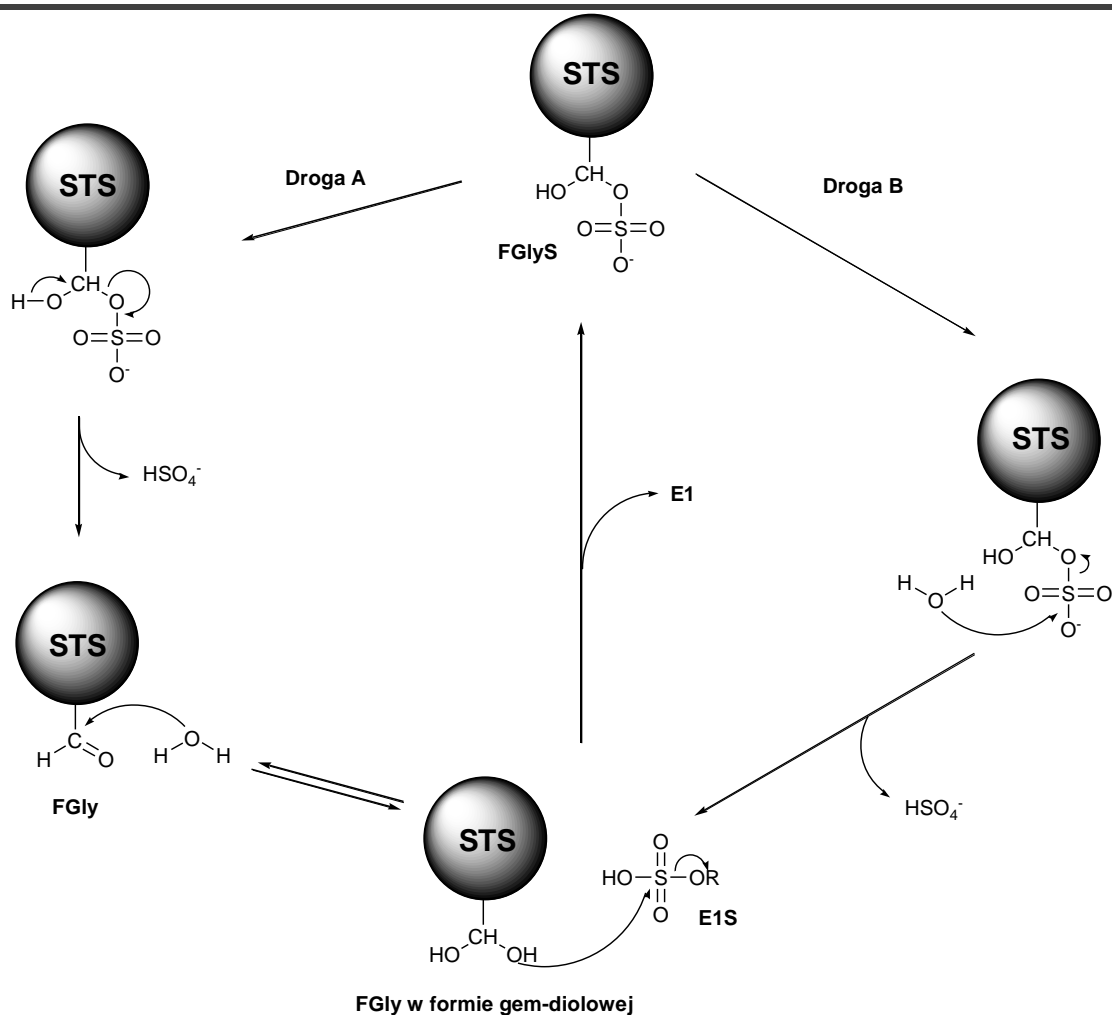


Rys.4.1. Struktura miejsca aktywnego STS [3].



Rys.4.2. Miejsce aktywne STS ze znajdującym się wewnątrz naturalnym substratem E1S.

Ze względu na bliskie pokrewieństwo sulfatazy steroidowej z arylosulfatazą A (ARSA) i arylosulfatazą B (ARSB), topologia miejsca aktywnego wszystkich trzech enzymów jest podobna. Cechą charakterystyczną wszystkich sulfataz jest podleganie modyfikacji posttranslacyjnej polegającej na konwersji jednej z reszt cysteinowych do formyloglicyny (FGly) [50-52].



Rys.4.3. Proponowany mechanizm enzymatycznej hydrolizy E1S przez STS.

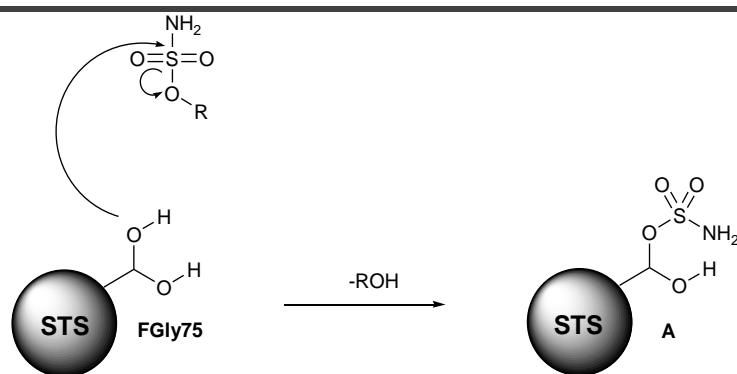
W stanie spoczynkowym STS w jej miejscu katalitycznym występuje siarczanowa forma gem-diolowa formyloglicyny (FGlyS), która koordynuje do dwuwartościowego kationu Ca^{2+} (Rys.4.1.). Regiony katalityczne STS oraz ARSA i ARSB wykazują wysoki stopień homologii. Wszystkie trzy enzymy posiadają dziewięć identycznych reszt aminokwasowych, które odgrywają istotną rolę w katalizowanej reakcji (trzy reszty kwasu asparaginowego, dwie reszty histydyny, dwie reszty lizyny, a także reszta argininy i FGlyS). W przypadku sulfatazy steroidowej są to konkretnie reszty: Asp35, Asp36, Asp342, His136, His290, Lys134, Lys368, Arg79 i FGly75. Jediną resztą różniącą region katalityczny STS od ARSA i ARSB

jest Gln343 (w przypadku ARSA i ARSB występuje reszta asparaginy). Dodatkowo, gdy naturalny substrat np. E1S, znajduje się w miejscu aktywnym STS, reszty aminokwasowe: Leu74, Arg98, Thr99, Val101, Leu103, Leu167, Val177, Phe178, Thr180, Gly181, Thr484, His485, Val486 i Phe488 otaczają rdzeń steroidowy, co sugeruje, że niektóre z nich mogą brać udział w rozpoznawaniu substratu za pomocą oddziaływań hydrofobowych (**Rys.4.2.**) [3].

Ze względu na to, iż występowanie formyloglicyny w formie gem-diolowej jest kluczowe podczas hydrolizy siarczanowych substratów przez ARSA i ARSB [53], prawdopodobny mechanizm konwersji E1S do E1 przez STS dobrze obrazuje **Rys.4.3.** Pierwszy etap reakcji enzymatycznej polega na utworzeniu wolnej, gem-diolowej formy formyloglicyny (FGly) z jej *O*-siarczanowej pochodnej (FGlyS). Może to następować na dwa sposoby:

- początkowo *O*-siarczanowa pochodna gem-diolowa formyloglicyny (FGlyS) rozpada się do formyloglicyny (FGly), a w kolejnym etapie reaguje z cząsteczką wody dając wolną, gem-diolową formę formyloglicyny (droga A);
- poprzez bezpośredni atak cząsteczki wody na atom siarki w *O*-siarczanowej pochodnej gem-diolowej formyloglicyny (droga B).

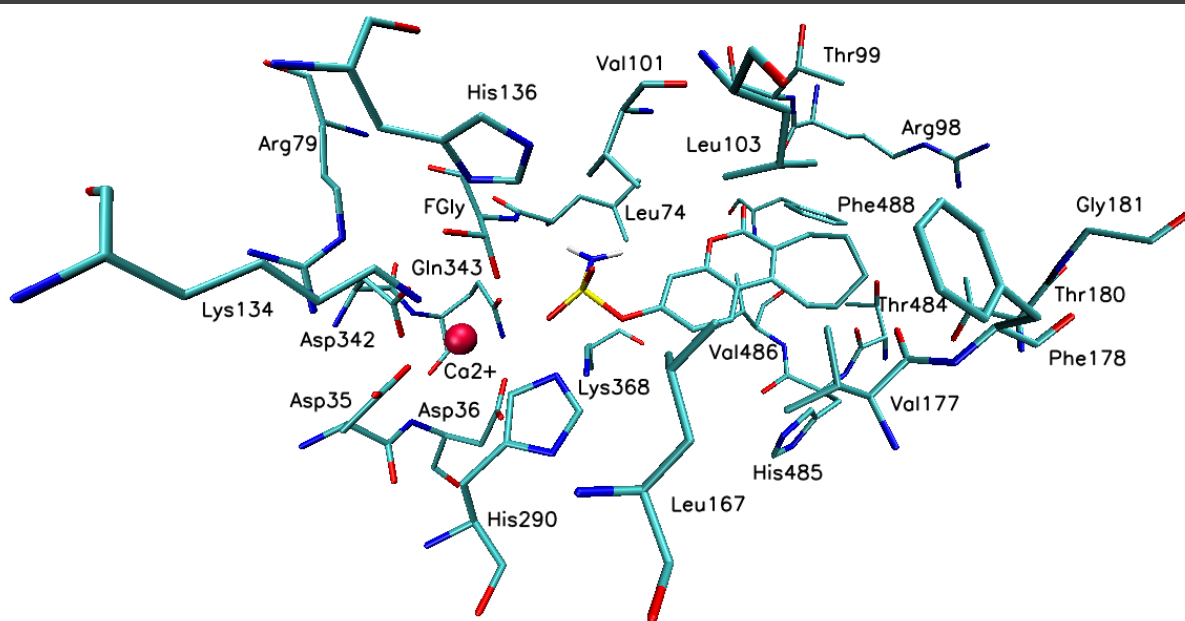
W kolejnym etapie jedna z dwóch wolnych grup hydroksylowych FGly w formie gem-diolowej atakuje atom siarki E1S uwalniając E1 i w konsekwencji regenerując strukturę *O*-siarczanowej pochodnej gem-diolowej formyloglicyny – FGlyS [3].



Rys.4.4. Proponowany mechanizm inhibicji STS przez inhibitory zawierające w swojej konstytucji ugrupowanie amidosiarczanowe (np. EMATE).

Dużą grupą inhibitorów STS, które zostały odkryte do tej pory, stanowią związki zawierające w swojej konstytucji ugrupowanie amidosiarczanowe (*rozdział 5*). Podstawnik amidosiarczanowy inhibitorów STS t.j. EMATE czy 667 COUMATE został wprowadzony

aby naśladować grupę siarczanową występującą w naturalnych substratach. W związku z tym prawdopodobny mechanizm inhibicji tego typu związków również angażuje resztę formylglicyny. Jeden z proponowanych mechanizmów inhibicji STS, (**Rys.4.4.**) przez inhibitory zawierające w swojej konstytucji podstawnik amidosiarczanowy, zakłada nukleofilowy atak na atom siarki inhibitora przez grupę hydroksylową formy gem-diolowej formylglicyny w miejscu aktywnym enzymu. Nie jest obecnie jasne, czy struktura (**A**) mogłaby być końcowym produktem inaktywacji enzymu, czy też podlega jeszcze dodatkowym modyfikacjom [3]. Na **Rys.4.5.** pokazano jeden z inhibitorów (667 COUMATE) znajdujący się w miejscu aktywnym STS.



Rys.4.5. Miejsce aktywne STS ze znajdującym się wewnątrz 667 COUMATE.

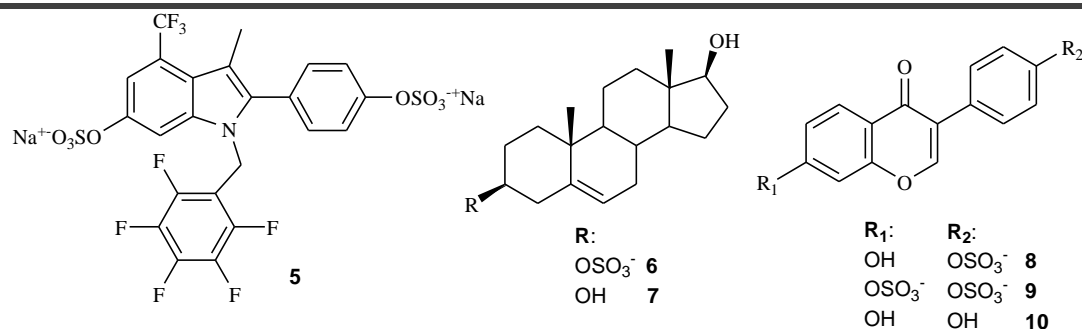
Rozdział 5

Inhibitory STS

Badania nad inhibicją sulfatazy steroidowej nadal znajdują się na wczesnym etapie rozwoju, a kliniczne wykorzystanie związków skierowanych przeciwko temu enzymowi jest ograniczone. Jednakże na świecie można zaobserwować duże zainteresowanie tym zagadnieniem i znaczna liczba zarówno steroidowych, jak i niesteroidowych, potencjalnych inhibitorów STS jest projektowana oraz badana, również na etapie badań klinicznych [54].

5.1. Alternatywne substraty

Inhibitory, które zawierają co najmniej jedną grupę siarczanową w swojej strukturze są projektowane aby współzawodniczyć w wiązaniu się do miejsca aktywnego sulfatazy steroidowej z naturalnymi substratami tego enzymu, np. E1S, co w konsekwencji utrudnia jego hydrolizę do E1. Związki takie są w zasadzie alternatywnymi substratami dla STS i oczekuje się, że ich grupa siarczanowa jest hydrolizowana przez enzym. Struktury chemiczne inhibitorów STS działających jako alternatywne substraty przedstawiłem na (Rys.5.1.).



Rys.5.1. Struktury chemiczne przykładowych inhibitorów STS działających jako alternatywne substraty.

Pierwszymi tego typu inhibitorami były związki z serii siarczanów 2-(hydroksyfenylo)-indolu, z których jeden t.j. związek **5** wykazywał wartość IC_{50} na poziomie $80 \mu\text{M}$ [55]. Zdolność do inhibicji STS została stwierdzona wśród kilku syntetycznych i naturalnie występujących steroidów, m.in. 3-siarczanu 5-androsten-3 β ,17 β -diolu **6** (stała inhibicji: $K_i = 2 \mu\text{M}$) [56]. Flawonoidy, takie jak 4'-siarczan daidzeiny **8** oraz 4',7-disiarczan daidzeiny **9**, również hamowały aktywność

sulfatazy steroidowej w sposób kompetytywny (K_i odpowiednio 5,9 i 1 μM) [57]. Znaczenie kliniczne związków **6**, **8** oraz **9** w leczeniu hormonozależnych nowotworów piersi jest jednak niewielkie, gdyż ich metabolity - androstendiol **7** oraz daidzeina **10** - wykazują właściwości estrogenowe [3].

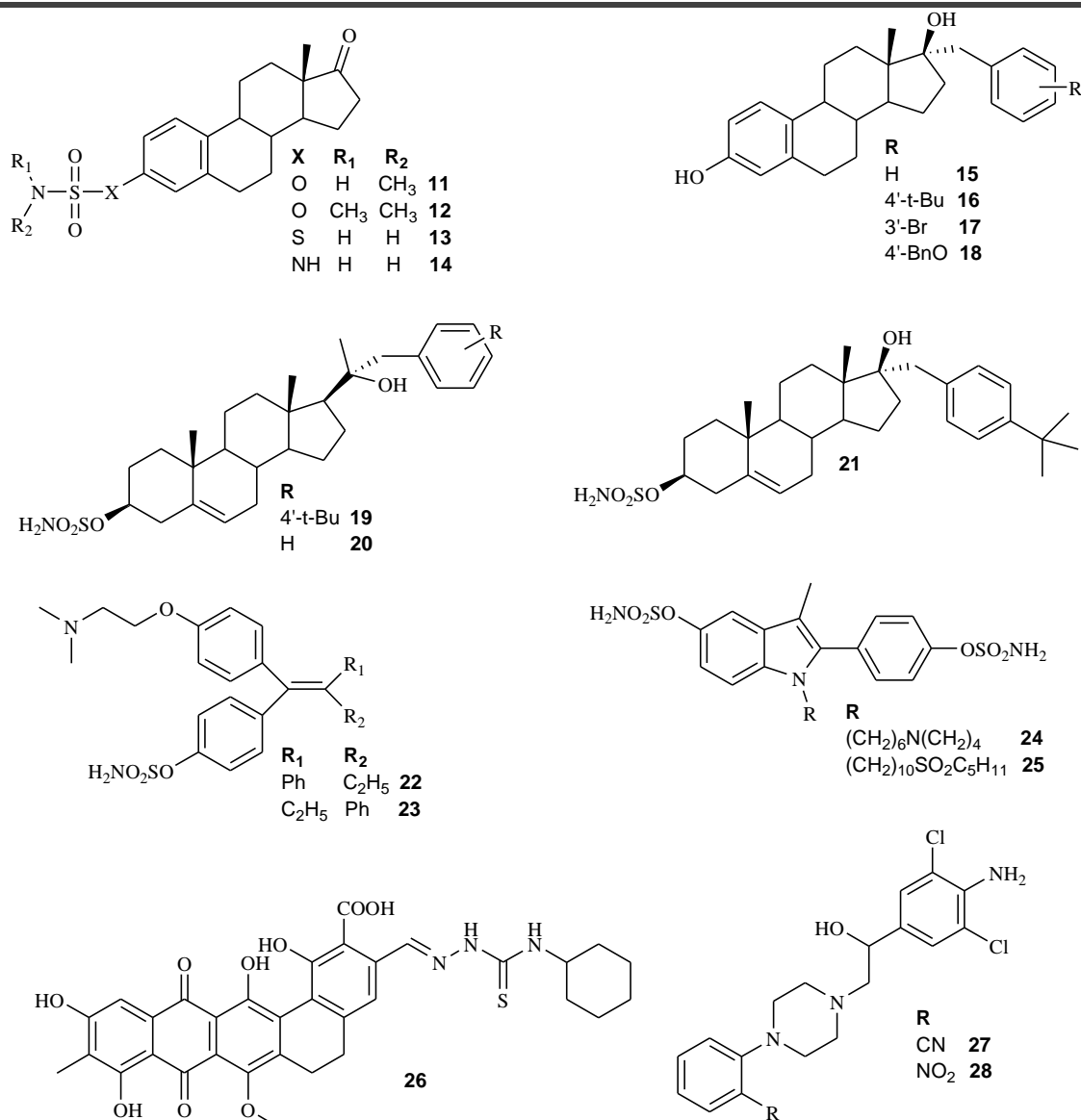
5.2. *Inhibitory odwracalne*

Jedną z pierwszych, przyjętych przez badaczy strategii dotyczących projektowania potencjalnych inhibitorów sulfatazy steroidowej było zastępowanie ugrupowania siarczanowego, występującego w E1S, resztami fosforanowymi, fosfonianowymi, sulfonianowymi, metylenosulfonianowymi, a także halogenkami sulfonylowymi oraz grupami: sulfonamidową i metylosulfonową. Większość z uzyskanych w ten sposób pochodnych E1 była projektowana, aby konkurować z E1S w wiązaniu się z miejscem aktywnym enzymu i pozostawać w nim w formie stabilnej, nie ulegając przemianie enzymatycznej [3]. Struktury chemiczne inhibitorów STS działających odwracalnie przedstawiłem na **Rys.5.2.**

Po odkryciu EMATE [rozdział 5.3] oraz w wyniku dalszych prac syntetycznych nad tym związkiem otrzymano pochodne **11** i **12**, które jednak w niewielkim stopniu hamowały odwracalnie aktywność STS [58], [59]. Zastępując w EMATE atom tlenu w położeniu 3 innymi heteroatomami [np. S **13** i N **14**] otrzymano jedynie słabe inhibitory tego typu [60]. Z drugiej zaś strony pochodne 17α -benzyloestradiolu **15** zawierające podstawniki 4'-t-butylo **16**, 3'-bromo **17** oraz 4'-benzyloksy **18** okazały się jednymi z najsilniej działających inhibitorów odwracalnych STS, jakie zostały odkryte do tej pory (wykazując IC_{50} pomiędzy 22 i 28 nM wobec komórek JEG-3) [61], [62]. Stwierdzono, że związek **16** jest jedynie 7-krotnie słabszym inhibitorem od EMATE w testach na transfekowanych komórkach HEK-293 [62]. Ze względu na występowanie niepożądanych właściwości estrogenowych wśród wielu 17α -podstawionych związków opartych na strukturze EMATE, zaprojektowano serię pochodnych androstenu i pregnenu z grupą amidosiarczanową **19-21**. Najlepszym inhibitorem odwracalnym STS w tej grupie był związek **21** ($IC_{50} = 46$ nM wobec komórek HEK-293), który dodatkowo nie wykazywał właściwości estrogenowych ani androgenowych w warunkach *in vitro* [63].

Inhibitorami kompetycyjnymi STS okazały się pochodne (E)- oraz (Z)-4-hydroksytamoksyfenu zawierające ugrupowanie amidosiarczanowe **22** i **23**. Badania z wykorzystaniem preparatu mikrosomalnego z wątroby szczurów wykazały, że dla izomeru (E) **22** $K_i = 35.9$ μM natomiast dla izomeru (Z) **23** K_i przekracza 500 μM [64], co może

świadczyć, że grupa amidosiarczanowa nie jest aktywowana podczas inhibicji jak to ma miejsce w przypadku EMATE.



Rys.5.2. Struktury chemiczne przykładowych inhibitorów odwracalnych STS.

Jako potencjalne inhibitory STS zaprojektowano związki oparte o strukturę 2-fenyloindolu **24** i **25**, które hamowały konwersję E1S do E1 w komórkach MCF-7 z IC₅₀ równym odpowiednio 0.3 μM i 0.2 μM [65]. Pomimo obecności ugrupowania amidosiarczanowego, mechanizm działania tych związków okazał się odmienny niż w przypadku innych inhibitorów posiadających tę grupę w swojej konstytucji.

Badania nad tiosemikarbazonowymi pochodnymi madurahydroksylaktonu skutkowały otrzymaniem serii inhibitorów, z których najlepszy - związek **26** - hamował aktywność STS w łożyskowym preparacie mikrosomalnym z K_i = 0.35 μM i IC₅₀ = 0.46 μM [66]. Również

chemicy z firmy Bayer zidentyfikowali w swojej bibliotece związków pochodne arylopiiperazyny **27** i **28**, które wykazały zdolność do inhibicji STS w preparacie białkowym z IC_{50} na poziomie odpowiednio 48 i 78 nM [3].

Oprócz wymienionych wyżej związków, które zostały zaprojektowane specjalnie w celu hamowania aktywności STS, również inne eksperymentalne i klinicznie wykorzystywane środki tj. danazol, octan nomegestrolu, demegeston i octan chlormadinonu, etynyloestradiol, 16 α -karbonitryl pregnenolonu, a także tibolon i tamoksyfen oraz ich metabolity wykazują właściwości inhibicyjne w stosunku do sulfatazy steroidowej [3].

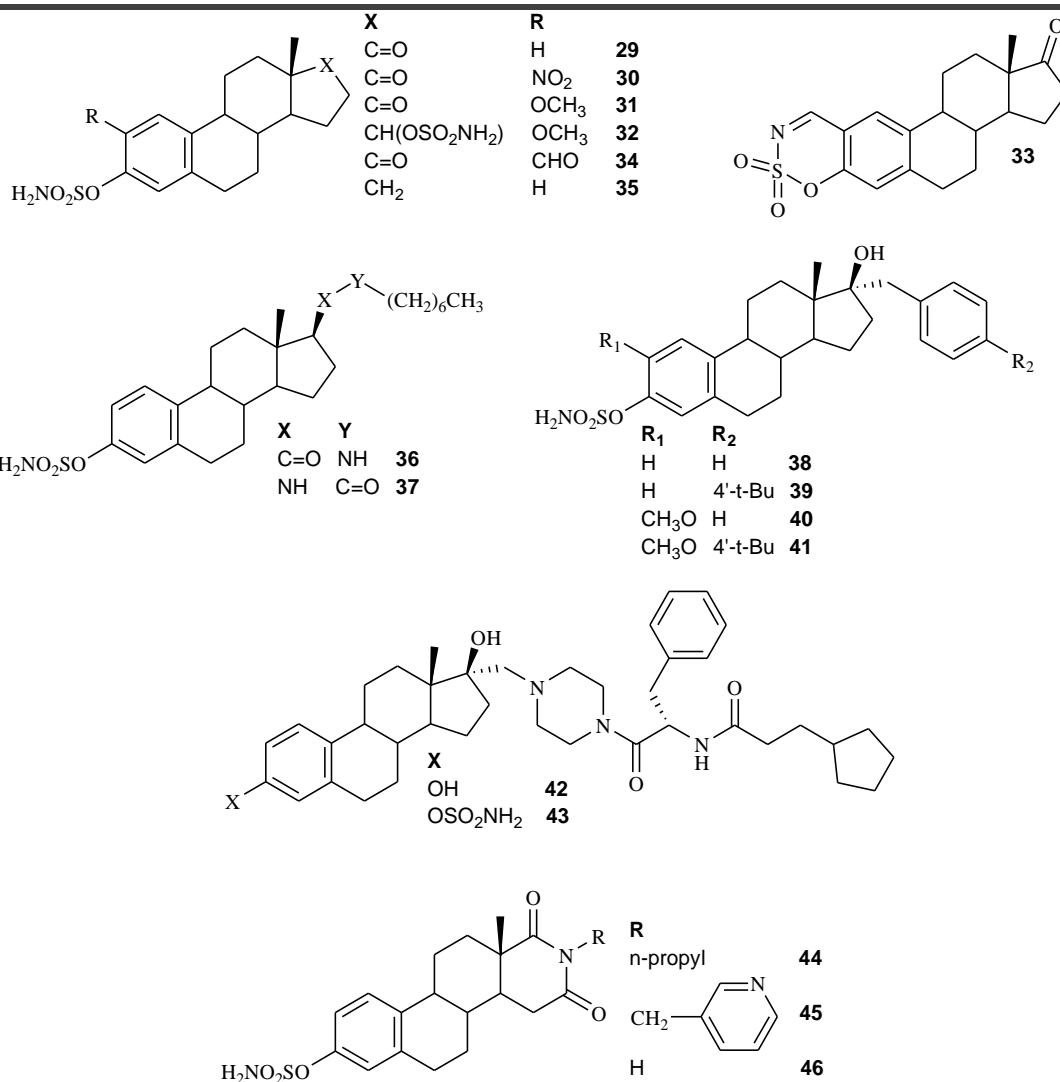
5.3. Inhibitory nieodwracalne

Większość dotychczas odkrytych inhibitorów STS działa w sposób nieodwracalny. Jednym z pierwszych inhibitorów, który wykazywał taki mechanizm inhibicji był EMATE **29**. Pomimo jego wyjątkowej siły działania oraz utrzymywania wysokiej aktywności po podaniu doustnym, nie może być stosowany w leczeniu hormonozależnego raka piersi ze względu na jego właściwości estrogenowe [67].

5.3.1. Steroidowe inhibitory nieodwracalne

Po odkryciu EMATE, w oparciu o jego strukturę projektowano inne steroidowe inhibitory nieodwracalne sulfatazy steroidowej, które wykazywałyby zredukowane właściwości estrogenowe w porównaniu ze związkiem macierzystym, a jednocześnie hamowałyby aktywność STS na podobnym poziomie. Struktury chemiczne steroidowych inhibitorów STS działających nieodwracalnie przedstawiłem na **Rys.5.3.**

Początkowo, podczas projektowania analogów EMATE przyjęto strategię wprowadzania dodatkowych ugrupowań (np. 2-propenylo-, n-propylo-, nitro-, metoksy-, cyjano- oraz halogenków) do pierścienia A w pozycję 2 i/lub 4 [68]. Analogi EMATE zawierające podstawniki elektronoakceptorowe w pierścieniu A wykazywały podobną lub wyższą aktywność *in vitro* (np. dla związku **30** $IC_{50} = 30$ nM w badaniach na mikrosomalnym preparacie pochodzącym z łożyska), w przeciwieństwie do pochodnych z dużymi podstawnikami alifatycznymi, które hamowały aktywność STS w mniejszym stopniu. Najlepszymi inhibitorami opartymi o strukturę EMATE ze zmodyfikowanym pierścieniem A były związki **31** i **32**, dla których IC_{50} wynosiło odpowiednio 30 nM [69] i 39 nM [70] w badaniach na łożyskowym preparacie mikrosomalnym.



Rys.5.3. Struktury chemiczne steroidowych inhibitorów nieodwracalnych STS.

Również steroidowe 2',3'- i 3',4'-oksataiazyny skutecznie hamowały sulfatazę steroidową [71]. W serii tych związków, inhibitorem o najwyższej aktywności okazał się związek **33** (IC₅₀ = 9 nM przeciwko STS w testach na linii komórkowej MCF-7), który jednocześnie wykazywał zredukowane właściwości estrogenowe. Mechanizm działania tego inhibitora nie został dokładnie poznany, jednakże prawdopodobnie jest on hydrolizowany bądź metabolizowany *in situ* do 2-formylo-EMATE **34**, który inaktywuje enzym w sposób podobny do EMATE.

Poszukując analogów EMATE, wykazujących ograniczone właściwości estrogenowe, poddano modyfikacji także pierścień D steroidowego rdzenia. Pierwszy tego typu inhibitor uzyskano przez redukcję grupy karbonylowej znajdującej się w pozycji 17. Związek **35** hamował aktywność STS na podobnym poziomie jak EMATE i wykazywał słabsze właściwości estrogenowe [69].

Wprowadzenie podstawników hydrofobowych do pierścienia DEMATE również doprowadziło do otrzymania inhibitorów o znacznie zredukowanych właściwościach estrogenowych przy zwiększonym potencjale inhibicyjnym. Pochodne **36** i **37**, które zawierały n-heptylowy łańcuch alifatyczny bardzo silnie hamowały aktywność STS (w przypadku obu związków $IC_{50} = 0.4$ nM w testach na komórkach MDA-MB-231). Badania na komórkach MCF-7, których proliferacja jest stymulowana obecnością estrogenów, wykazały brak znaczących właściwości estrogenowych związków **36** i **37**, nawet w stężeniach 2000-krotnie wyższych niż ich IC_{50} . Dodatkowy łańcuch hydrofobowy został zaprojektowany, aby pomóc zakotwiczyć inhibitory w błonach komórkowych, w których występuje STS [72].

Jak opisałem wcześniej [rozdział 5.2] modyfikacja estradiolu podstawnikami hydrofobowymi prowadzi do otrzymania odwracalnych inhibitorów STS. Gdy do dwóch takich związków (17α -benzylo-E2 **15** oraz 17α -(4'-t-butylo)-benzylo-E2 **16**) wprowadzono dodatkowe ugrupowanie amidosiarczanowe (związki **38** i **39**) otrzymano pochodne działające nieodwracalnie w sposób podobny do EMATE. Okazały się one odpowiednio 5- i 14-krotnie silniej hamować *in vitro* konwersję E1S do E1 w homogenacie transfekowanych komórek HEK-293 niż EMATE [73]. Testy wykazały, że związki **38** i **39** hamują aktywność STS, z odpowiednio 600 i 55 razy większą skutecznością niż ich fenolowe związki macierzyste **15** i **16**, co potwierdza kluczową rolę ugrupowania amidosiarczanowego w inaktywacji sulfatazy steroidowej. Ze względu na znaczny potencjał inhibicyjny pochodnych fenolowych, przypuszcza się, że po inaktywacji STS przez inhibitor **39**, uwolniony związek **16** hamuje odwracalnie pozostałą ilość sulfatazy steroidowej, która po inhibicji nieodwracalnej pozostała jeszcze aktywna. Niestety, związek **39** wykazuje właściwości estrogenowe, co uniemożliwia jego ewentualne wykorzystanie terapeutyczne [63, 74].

Po odkryciu, iż wprowadzenie do struktury EMATE grupy metoksylowej w pozycji 2 skutkuje redukcją estrogenowości [69], zaprojektowano związki **40** i **41** [75], które okazały się równie silnymi inhibitorami jak ich odpowiedniki pozbawione tego podstawnika: **38** i **39**. Ponadto inhibitor **41** nie wykazywał właściwości estrogenowych w testach *in vivo*.

Dalszy rozwój analogów estradiolu jako inhibitorów STS doprowadził do otrzymania dwóch serii 17α -piperazynometylowych pochodnych zawierających w pozycji 3 wolną grupę hydroksylową lub ugrupowanie amidosiarczanowe. W obu seriach, najwyższą aktywność wykazały związki posiadających ten sam rdzeń **42** i **43**. Przy stężeniu 1 nM pochodna **43** hamowała działanie sulfatazy steroidowej w 94 %, podobnie jak inhibitory **38** i **39**. Analog

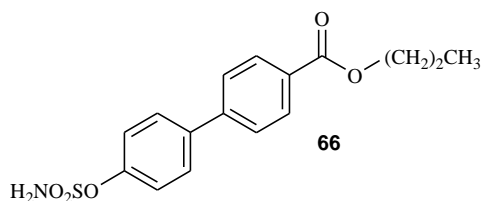
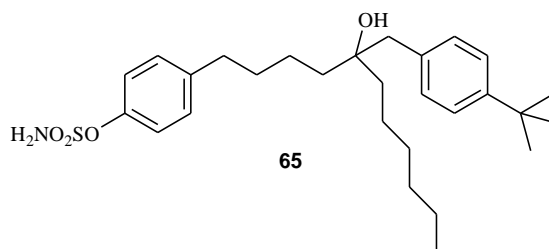
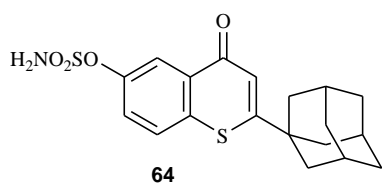
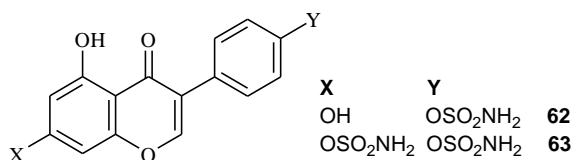
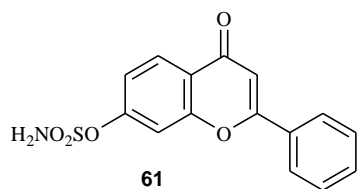
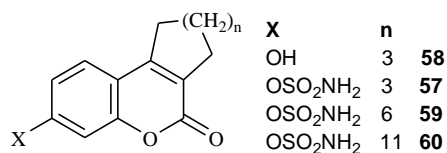
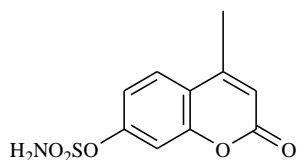
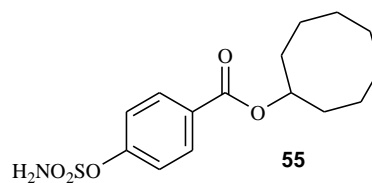
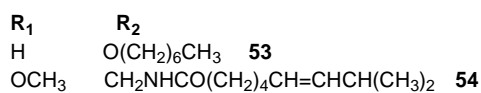
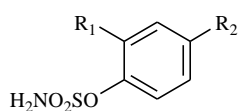
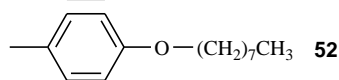
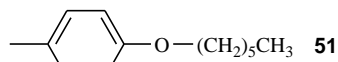
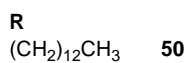
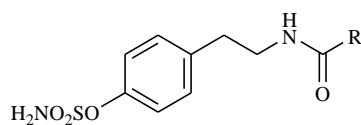
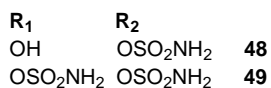
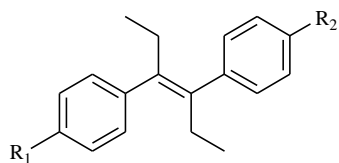
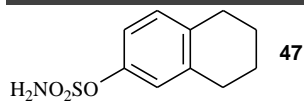
z wolną grupą hydroksylową **42** okazał się przy tym mniej skuteczny od inhibitorów **15** i **16** [76].

Kolejna modyfikacja związana była z rozmiarem pierścienia D EMATE, co doprowadziło do otrzymania szeregu *N*-podstawionych pochodnych piperydynodionu. Dwa związki: **44** i **45** charakteryzowały się wyjątkowo wysoką aktywnością inhibicyjną przeciwko STS z IC_{50} na poziomie 1 nM w testach na preparacie mikrosomalnym pochodzącym z łożyska (w tym samym badaniu IC_{50} dla EMATE wyniosło 18 nM) [77]. Analogiczna pochodna niepodstawiona na atomie azotu **46** także hamowała działanie STS w sposób porównywalny z EMATE ($IC_{50} = 20$ nM), co świadczy o tym, iż piperydynodion dobrze naśladuje pierścień D EMATE. W wyniku badań na szczurach ustalono, że po podawaniu doustnym przez 5 dni związków **44** i **45** w dawce 10 mg/kg/d, inhibicja STS w wątrobach wyniosła 99 % [78]. Stwierdzono również, iż wspomniane inhibitory są pozbawione właściwości estrogenowych.

5.3.2. Niesteroidowe inhibitory nieodwracalne

Od dawna wiadomo, że środki niesteroidowe oraz ich metabolity, zaprojektowane do potencjalnego wykorzystania terapeutycznego, w mniejszym stopniu wywołują niepożądane efekty endokrynologiczne *in vivo* niż ich steroidowe odpowiedniki. Początkową strategią projektowania niesteroidowych inhibitorów nieodwracalnych sulfatazy steroidowej (**Rys.5.4.**) była synteza związków, zawierających w swojej strukturze elementy naśladujące pierścienie A i B EMATE. Przykładami inhibitorów STS otrzymanych na drodze takiego podejścia były pochodne tetrahydronaftalenu oraz dietylostilbestrolu posiadające ugrupowania amidosiarczanowe: **47-49**. Analiza inhibicji wywoływanej przez te związki doprowadziła do wniosku, iż skondensowany układ wielu pierścieni nie jest niezbędny aby skutecznie hamować aktywność STS [3].

Jako skuteczne inhibitory STS zaprojektowano również *n*-alkanoilowane pochodne tyraminy z ugrupowaniem amidosiarczanowym. Najlepszy z tej serii, związek **50**, hamował aktywność sulfatazy steroidowej pochodzącej z ludzkich mikrosomów łożyskowych z $IC_{50} = 55.8$ nM [79]. Przypuszcza się, że fenyłowy pierścień tych pochodnych naśladuje pierścień A EMATE, podczas gdy ugrupowanie amidowe wpływa na inhibicję poprzez generowanie wiązań wodorowych [80]. Inne otrzymane analogii należące do tej klasy inhibitorów **51-54** cechowały się jedynie umiarkowaną zdolnością do hamowania aktywności STS w mikrosomach łożyskowych (obserwowano IC_{50} na poziomie 10-40 μ M) [69].



Rys.5.4. Struktury chemiczne niesteroidowych inhibitorów nieodwracalnych STS.

Stwierdzono, że inhibicję STS mogą wywołać również proste estry kwasu benzoesowego, pochodne benzenu i ketonów fenylowych z ugrupowaniem amidosiarczanowym. Jeden z takich związków, posiadający dodatkowy pierścień cyklooktylowy **55**, hamował aktywność STS z $IC_{50} = 170$ nM w łożyskowym preparacie mikrosomalnym [81].

Inhibitorami, których rdzeń miał naśladować pierścienie A i B EMATE, były bicykliczne kumaryny zawierające ugrupowanie amidosiarczanowe. Jeden z prostszych tego typu związków, **56**, hamował aktywność STS w komórkach MCF-7 z IC_{50} na poziomie 380 nM (3-krotnie silniej niż związek **47**). Podczas projektowania tej klasy inhibitorów, po raz pierwszy zwrócono uwagę na zależność pomiędzy wartościami pK_a macierzystych fenoli, a aktywnością ich pochodnych amidosiarczanowych. Stwierdzono, że obserwowana w przypadku amidosiarczanów kumaryny zwiększona zdolność do inhibicji STS - w stosunku do amidosiarczanu tetrahydronaftalenu - jest spowodowana obecnością nienasyconego pierścienia laktonowego, który obniża względną wartość pK_a reszty fenolowej uwalnianej po inaktywacji enzymu [82].

Kolejne badania nad amidosiarczanowymi pochodnymi kumaryny doprowadziły do wniosku, iż wprowadzenie hydrofobowych podstawników w pozycje 3 i/lub 4 kumarynowego rdzenia prowadzi do otrzymania bardziej aktywnych inhibitorów sulfatazy steroidowej. Dlatego też została opracowana seria tricyklicznych kumaryn zawierających ugrupowanie amidosiarczanowe. Najskuteczniejszy w tej serii, związek **57** (667 COUMATE), hamował STS w łożyskowym preparacie mikrosomalnym z $IC_{50} = 8$ nM (około 3-krotnie bardziej efektywnie niż EMATE) [83, 84]. Stwierdzono, że wartość K_i dla związku **57** wynosi 40 nM i jest znacznie mniejsza niż w przypadku EMATE ($K_i = 670$ nM) [84]. Odkrycie to doprowadziło do wniosku, iż zredukowana wartość IC_{50} dla tego niesteroidowego inhibitora w porównaniu z EMATE, jest spowodowana wyższym powinowactwem 667 COUMATE do miejsca aktywnego enzymu. Ponadto stwierdzono, że fenolowy prekursor kumarynowy **58** ($pK_a = 8.5$) jest lepszą grupą opuszczającą od E1 ($pK_a = 10$).

Powiększenie alifatycznego pierścienia tricyklicznych pochodnych kumaryny zawierających ugrupowanie amidosiarczanowe, doprowadziło do otrzymania związku **59** ($IC_{50} = 1$ nM w badaniach na mikrosomach łożyskowych) [85], który w warunkach *in vivo* nieznacznie skuteczniej hamował aktywność STS w wątrobie szczurów w porównaniu z 667 COUMATE (odpowiednio 89 % i 86 % inhibicji STS przy dawce doustnej 1 mg/kg). Niespodziewanie pochodna **60**, której IC_{50} w testach *in vitro* było 370-krotnie wyższe niż dla

związku **59**, okazała się najsilniejszym inhibitorem *in vivo* z całej serii tricyklicznych kumaryn (94 % inhibicji STS przy dawce doustnej 1 mg/kg) [85].

Ze względu na podobieństwo strukturalne naturalnie występujących flawonoidów do estrogenów, zaprojektowano serię pochodnych flawonów, izoflawonów i flawononów z ugrupowaniem amidosiarczanowym. Otrzymane inhibitory **61-63** okazały się jednak hamować aktywność STS w sposób umiarkowany [69, 86]. Badania nad tą klasą związków dały początek serii amidosiarczanów z rdzeniem chromenonowym i tiochromenonowym, wśród których związek **64** wyróżniał się wartością $IC_{50} = 0.34$ nM w testach na oczyszczonym enzymie [87, 88]. Jednakże w badaniach komórkowych, stwierdzono właściwości estrogenowe testowanego związku, gdyż stymulował on wzrost komórek MCF-7 [89].

Ze względu na wysoką skuteczność inhibitorów opartych na strukturze E2, t.j. związek **39**, opracowano szereg niesteroidowych analogów zawierających resztę arylową podstawioną w pozycji 4. Najlepszy inhibitor w tej serii, **65**, hamował aktywność sulfatazy steroidowej z $IC_{50} = 0.4$ nM i okazał się znacznie skuteczniejszy niż EMATE ($IC_{50} = 0.9$ nM) w badaniu na homogenacie komórek HEK-293 transfekowanych STS [74].

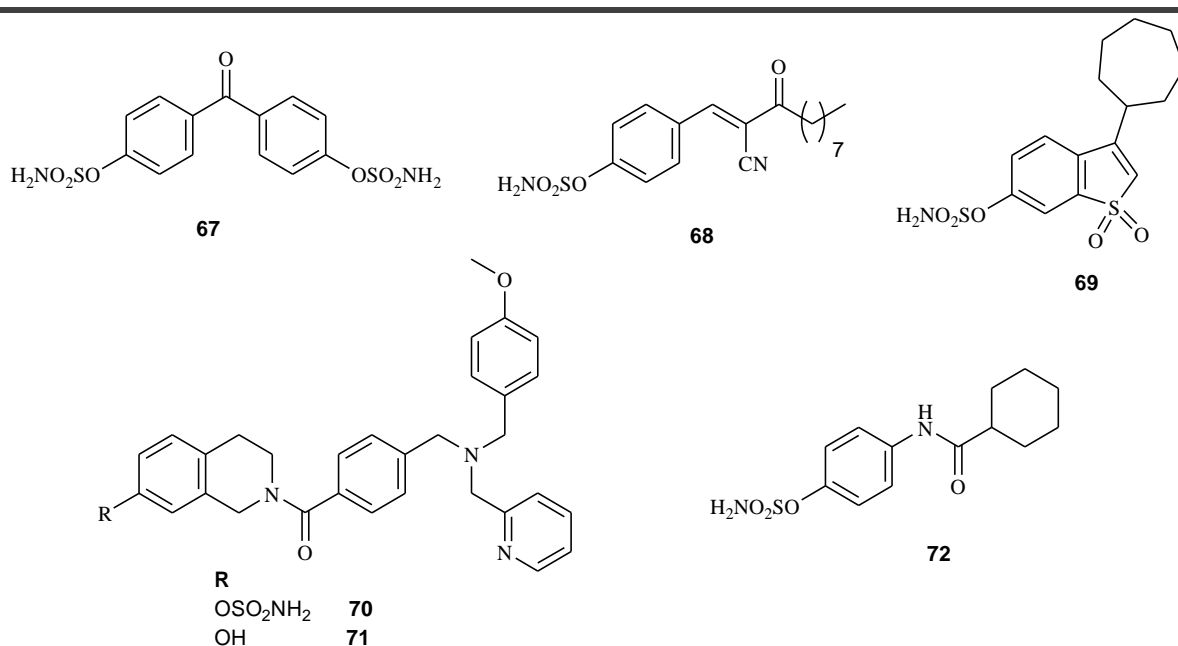
Słabymi inhibitorami sulfatazy steroidowej okazały się również pochodne bifenylu zawierające w swojej strukturze ugrupowanie amidosiarczanowe. Związek **66** hamował aktywność STS w łożyskowym preparacie mikrosomalnym z $IC_{50} = 3.5$ μ M [90].

Aktywność inhibicyjną wobec STS wykazują pochodne benzofenonu zawierające w swojej strukturze jedną lub dwie reszty amidosiarczanowe. Związek **67 (Rys.5.5.)** okazał się hamować aktywność STS na poziomie 98.7 % w teście *in vitro* z liniami komórkowymi MCF-7 oraz 84 % w teście *in vivo* w wątrobie szczurów [91]. Pomimo, że wprowadzenie do struktury benzofenonu jednego ugrupowania amidosiarczanowego sprzyja inhibicji enzymu to obecność dwóch znacznie poprawia skuteczną inaktywację STS [92].

Stosunkowo silnymi inhibitorami STS okazały się także pochodne winylobenzenu z resztą amidosiarczanową wprowadzoną w pozycję para, których przykładem jest analog **68**. Wartości IC_{50} dla wszystkich związków w serii zawierały się w przedziale od 12 do 99 nM w teście na rekombinowanej ludzkiej STS [93].

Wiele pochodnych benzotiofenu zawierających w swojej konstytucji ugrupowanie amidosiarczanowe zostało otrzymanych jako inhibitory STS. Ponad 60 tego typu związków przebadano pod kątem zdolności do hamowania aktywności STS w teście z linią komórkową JEG-3 będącą źródłem enzymu (wartości IC_{50} mieściły się w zakresie od 2.5 do 744 nM).

I tak na przykład aktywność analogu **69** była wysoka i zbliżona do 667 COUMATE **57** użytego jako związek odniesienia [94, 95].



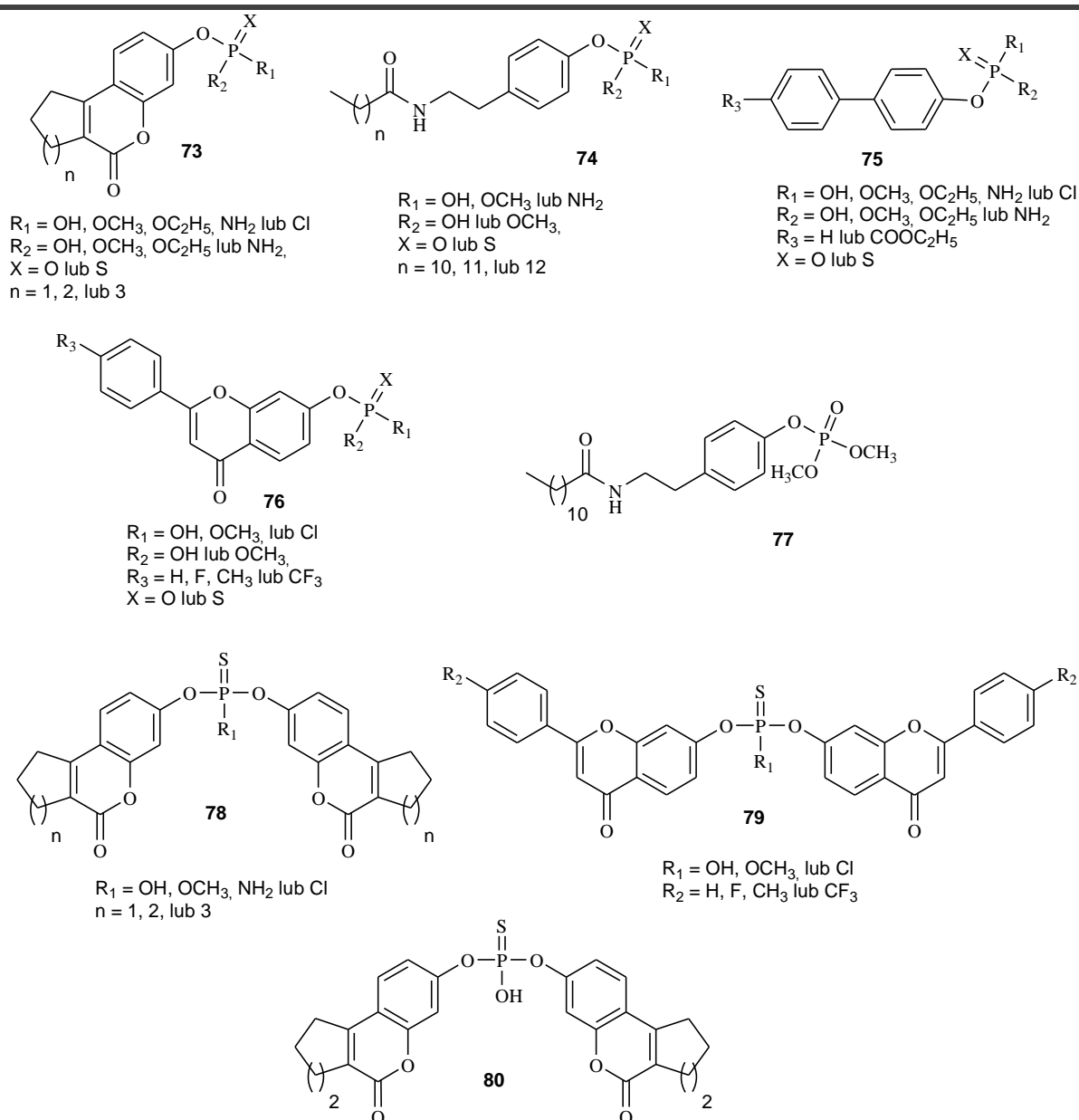
Rys.5.5. Struktury chemiczne niesteroidowych inhibitorów nieodwracalnych STS.

W ostatnim czasie otrzymano serię inhibitorów STS na bazie *N*-podstawionych pochodnych 1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny zawierających w swojej konstytucji ugrupowanie amidosiarczanowe. Najskuteczniejszym inhibitorem okazał się analog **70**, który hamował aktywność STS z IC₅₀ na poziomie 3.9 nM w teście z transfekowanymi komórkami HEK-293. Ponadto stwierdzono, że zarówno związek **70**, jak i jego fenolowy odpowiednik **71** nie wykazują niepożądanych właściwości estrogenowych wobec komórek T47D [96].

Wysoką aktywność inhibicyjną wobec STS stwierdzono również dla *N*-acylowanych pochodnych 4-aminofenolu zawierających w strukturze ugrupowania amidosiarczanowe. Najwyższą aktywność, w teście enzymatycznym na lizacie z komórek JEG-3 z podwyższoną ekspresją STS, oznaczono dla analogu **72**, który hamował pracę enzymu w 72.0 % oraz 55.7 % w stężeniach odpowiednio 20 μM oraz 10 μM. Ponadto, w eksperymencie z żywymi komórkami JEG-3, związek **72** hamował aktywność STS na poziomie 86.1 % przy stężeniu 10 μM, a wartość IC₅₀ wyniosła 0.421 μM, co świadczy o skutecznej penetracji błon biologicznych komórek nowotworowych JEG-3 [97].

5.4. Inhibitory fosforowe.

Strategia projektowania inhibitorów, polegająca na zastąpieniu ugrupowania siarczanowego znajdującego się w strukturze naturalnych substratów STS, nie ograniczyła się jedynie do wprowadzania podstawnika amidosiarczanowego. Do bardzo licznej klasy związków, która jest obecnie intensywnie rozwijana w zespole prof. Rachonia w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, należą pochodne zawierające w swojej konstytucji rozmaite grupy fosforowe, m.in. fosforanowe, amidofosforanowe, tiofosforanowe i amidotiofosforanowe.



Rys.5.6. Struktury chemiczne fosforowych inhibitorów STS.

W ostatnich latach otrzymano pokaźną bibliotekę nowych, fosforowych i tiofosforowych estrów tricyklicznych kumaryn **73** [98, 99], *N*-alkanoilowanych tyramin **74** [100], bifenyli **75** [101] i flawonów **76** [102] jako potencjalnych inhibitorów STS (**Rys.5.6.**). Wśród szerokiej gamy otrzymanych analogów, najwyższą aktywność inhibicyjną wobec enzymu wyizolowanego z łożyska ludzkiego oznaczono dla związku **77**, dla którego wartość IC_{50} wyniosła 390 nM. Chociaż mechanizm inhibicji wywoływanej przez analog **77** nie został poznany, to analizy z zakresu modelowania molekularnego wskazały na możliwość migracji całej grupy fosforanowej inhibitora lub metylacji jednej z reszt aminokwasowych (FGly75 – *rozdział 3*) biorących udział w reakcji enzymatycznej co prowadzi do inaktywacji STS [100].

W 2015 roku w tym zespole otrzymano dwie serie tiofosforowych pochodnych bikumaryn **78** [103] oraz biflawonów **79** [102]. Najwyższą aktywność inhibicyjną zaobserwowano dla związku **80**, który hamował STS z $IC_{50} = 860$ nM, w teście na oczyszczonym enzymie. Wyniki dokowania molekularnego sugerowały, że tego typu związki mogą być wiązane do miejsca aktywnego STS w sposób odmienny od pozostałych fosforowych inhibitorów STS – związków **73-77**. Wyniki modelowania molekularnego wskazały, że pochodne **78** i **79** mogą wiązać się i całkowicie wypełniać miejsce aktywne enzymu, zapobiegając hydrolizie naturalnych substratów [103].

Rozdział 6

Dokowanie molekularne

Obecnie liczba białek, dla których poznana została struktura trójwymiarowa szybko rośnie. Jest to spowodowane rozwojem technik umożliwiających wyznaczanie struktur przestrzennych biomolekuł, t.j. rentgenografia krystalograficzna [104].

Metody obliczeniowe stały się kluczowym etapem projektowania nowych środków terapeutycznych, zarówno podczas identyfikacji związków wiodących, jak i ich optymalizacji, a także jako element wirtualnego przeszukiwania struktur. Jedną z technik – dokowanie małych cząsteczek do miejsc aktywnych biomolekuł – była intensywnie rozwijana we wczesnych latach 80-tych XX wieku i nadal jest szeroko wykorzystywana przez świat nauki. Dokowanie molekularne stosuje się przede wszystkim podczas identyfikacji związków wiodących, gdy znana jest jedynie struktura celu molekularnego, np. białka i jego miejsca aktywnego. Podobne obliczenia są wykonywane w celu określenia właściwości i zachowania się struktur wiodących poddawanych procedurom optymalizacji w miejscu aktywnym biomolekuł przed ich syntezą [104].

Procedura dokowania molekularnego obejmuje przewidywanie konformacji ligandu oraz jego orientacji w obrębie miejsca wiązania biomolekuł. Można wyróżnić dwa podstawowe cele dokowania: możliwie dokładne modelowanie struktur oraz poprawne przewidywanie aktywności. Jednakże określanie właściwości odpowiedzialnych za działanie biologiczne ligandów a także wpływu modyfikacji strukturalnych na te właściwości jest często złożone i trudne do przewidzenia, szczególnie podczas symulacji komputerowych. W związku z tymi ograniczeniami dokowanie jest zazwyczaj wieloetapowym procesem, w którym każdy następny etap wprowadza dodatkową liczbę stopni złożoności.

Procedura rozpoczyna się od wykorzystania odpowiedniego algorytmu dokującego, który umieszcza ligand w miejscu aktywnym. Etap ten jest dość skomplikowany, gdyż nawet stosunkowo proste cząsteczki organiczne mogą charakteryzować się wieloma stopniami swobody konformacyjnej. Próbkowanie stopni swobody musi być przeprowadzone z dokładnością umożliwiającą identyfikację konformacji najlepiej dopasowanej do struktury receptora w możliwie krótkim czasie, aby ocenić tysiące konformacji podczas jednej analizy. Algorytmy dokujące związane są z funkcjami (tzw. scoring functions), które są odpowiednio definiowane, tak aby możliwie dokładnie określić potencjalną aktywność biologiczną na

podstawie oddziaływań pomiędzy ligandem a celem molekularnym. Pierwsze tego typu funkcje opierały się na przybliżonych obliczeniach dotyczących kształtu molekuł oraz komplementarności elektrostatycznej. Po wstępnej selekcji optymalnych struktur są one analizowane z wykorzystaniem bardziej złożonych systemów punktujących, które uwzględniają m.in. oddziaływania elektrostatyczne i van der Waalsa oraz efekty entropowe i solwatacyjne. Dodatkowe problemy, t.j.: ograniczona rozdzielczość struktur krystalograficznych, naturalna elastyczność i zmiany konformacyjne występujące podczas wiązania liganda oraz oddziaływania z cząsteczkami wody sprawiają, iż dokowanie molekularne jest procedurą wyjątkowo złożoną [104].

Jednym z programów zaprojektowanych z myślą o dokowaniu molekularnym oraz wirtualnych analizach przesiewowych jest AutoDock Vina. Wykorzystanie zaawansowanego algorytmu optymalizacji prowadzi do generowania struktur charakteryzujących się coraz dokładniejszym dopasowaniem. Ponadto, dzięki wielowątkowości, AutoDock Vina umożliwia znaczne skrócenie czasu analizy angażując w obliczenia wiele procesorów. Formatem plików strukturalnych w AutoDock Vina jest PDBQT, będący rozszerzeniem formatu PDB, który wykorzystywany jest również w AutoDock 4. Ta kompatybilność umożliwia łatwe użytkowanie Vina obejmujące m.in. przygotowanie plików startowych, definiowanie przestrzeni przeszukiwania i wizualizację wyników za pomocą oprogramowania opracowanego na potrzeby programu AutoDock (t.j. AutoDock Tools). Dodatkowo, ręczne wybieranie typów atomów i tworzenie plików mapowych z siatką współrzędnych, a także określanie parametrów przeszukiwania nie jest konieczne, gdyż AutoDock Vina oblicza je szybko i automatycznie, a wyniki analizy są odpowiednio grupowane przez program [105].

Jednym z pierwszych etapów poprzedzających procedurę dokowania jest przygotowanie odpowiednich modeli receptorów oraz zaprojektowanie struktur molekularnych ligandów.

Odpowiednie przygotowanie receptora do procedury dokowania składa się z wielu etapów. Podstawowa struktura biomolekuły najczęściej zapisana jest jako plik w formacie PDB, w której brak jest zdefiniowanych współrzędnych dla atomów wodoru. Ponadto znajdują się w nim informacje dotyczące ligandów wykrystalizowanych wspólnie z receptorem [106]. Typowa procedura przygotowawcza obejmuje:

1. Import struktury receptora wraz z wszystkimi ligandami do odpowiedniego programu.
2. Lokalizację cząsteczek wody, które biorą udział w wiązaniu ligandów i usunięcie wszystkich pozostałych.
3. Uproszczenie multimerycznych kompleksów:

- Określenie czy kompleks receptor – ligand jest dimerem lub innym multimerem,
 - Usunięcie zbędnych miejsc wiązania i duplikatów łańcuchów (jeśli struktura jest multimeryczna).
4. Modyfikację receptora, jonów metali i kofaktorów:
 - Naprawę poważnych błędów w strukturze receptora (szczególnie gdy występują w pobliżu miejsca aktywnego).
 - Sprawdzenie struktury receptora pod kątem jonów metali i kofaktorów.
 - Usunięcie wiązań z jonami metali i poprawa ich formalnych ładunków.
 - Definiowanie ładunków i typów atomów dla jonów metali.
 - Definiowanie długości wiązań i ładunków dla kofaktorów.
 - Korekcję orientacji grup funkcyjnych reszt aminokwasowych.
 5. Kontrolę i korekcję długości wiązań i formalnych ładunków dla ligandów.
 6. Kontrolę i korekcję stanów jonizacji oraz tautomeryzacji dla receptora i liganda.
 7. Optymalizację struktury – relaksacja wszelkich naprężeń wywołanych modyfikacjami struktury.
 8. Kończącą kontrolę przygotowanej struktury: sprawdzenie formalnych ładunków, stopnia sprotonowania i orientacji grup funkcyjnych tj. grup hydroksylowych czy amidowych oraz wody [106].

Wiele z wymienionych wyżej etapów przygotowania receptora można wykonać automatycznie za pomocą m.in. modułu Protein Preparation Wizard będącego częścią programu Maestro. Moduł ten umożliwia modyfikację surowej struktury receptora (m.in. uzupełnienie brakujących atomów wodoru, korekcję długości wiązań, ładunków oraz orientacji grup funkcyjnych) do stanu pozwalającego na wykorzystanie podczas procedury dokowania przeprowadzanej przez program AutoDock Vina [106].

Wiele programów zaprojektowanych na potrzeby modelowania molekularnego umożliwia przygotowanie struktur ligandów, które mają być dokowane do miejsc wiązania receptorów podczas procedury dokowania. Jednym z nich jest HyperChem, który jest wszechstronnym programem umożliwiającym modelowanie i edycję struktur z wykorzystaniem obliczeń z zakresu mechaniki molekularnej i kwantowej. HyperChem pozwala w sposób łatwy budować molekuly, a także monitorować efekty pracy dzięki prostemu interfejsowi graficznemu. Za pomocą odpowiednich narzędzi (Drawing Tool) możliwe jest konstruowanie dwuwymiarowej reprezentacji ligandów, a następnie generowanie ich trójwymiarowej struktury. Panel Model Builder umożliwia uzupełnianie

atomów wodoru, manipulację parametrami wiązań i kątów oraz ładunkami podczas budowy modelu. Ponadto HyperChem wyposażony jest w bazę aminokwasów i kwasów nukleinowych dzięki czemu można bardzo szybko tworzyć polimery zbudowane z wielu podjednostek [107].

Program HyperChem umożliwia również obliczenia właściwości, wygenerowanych i dobrze zdefiniowanych strukturalnie molekuł. Obliczenia te często wymagają doprowadzenia struktury liganda do stanu odpowiadającego minimum energetycznemu na powierzchni energii potencjalnej, dlatego też HyperChem jest wyposażony w szereg modułów optymalizujących geometrię cząsteczek. Odpowiednio przygotowane struktury molekuł mogą być wykorzystywane w obliczeniach z zakresu dynamiki molekularnej czy dokowania molekularnego [107].

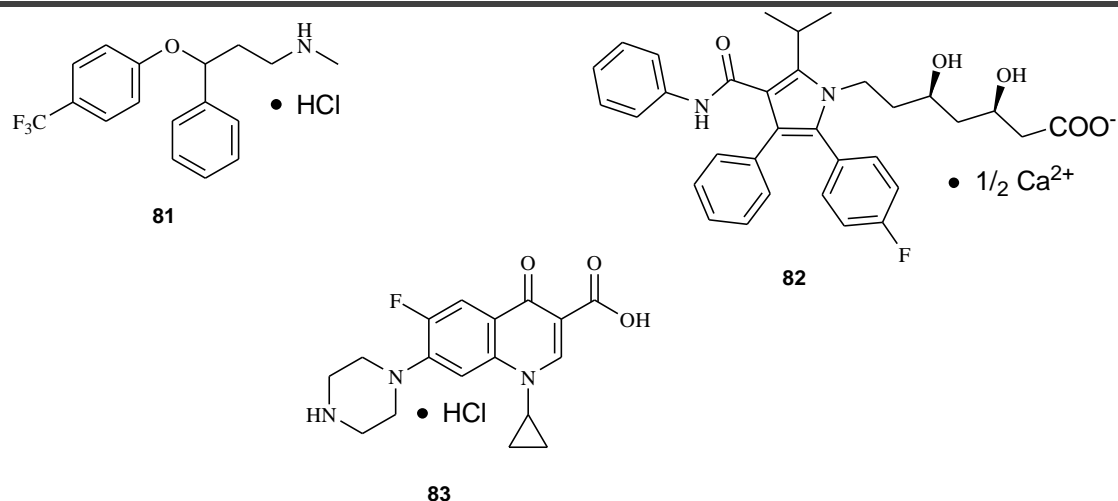
Chociaż AutoDock Vina może być użytkowany z wykorzystaniem oprogramowania AutoDock Tools, które umożliwia analizę i wizualizację wyników dokowania, to istnieje szereg narzędzi komputerowych zaprojektowanych z myślą o graficznej reprezentacji struktur molekularnych, np. program VMD.

VMD jest programem graficznym, służącym do wizualizacji systemów molekularnych, zwłaszcza biopolimerów tj. białka i kwasy nukleinowe. VMD umożliwia jednoczesną pracę nad dowolną liczbą struktur z wykorzystaniem szeregu stylów obrazowania i metod koloryzacji. Cząsteczki są wyświetlane w postaci jednej lub większej liczby „reprezentacji”, definiujących podzbiory atomów. Każdej z reprezentacji można przypisać indywidualny styl wizualizacji i kolory, a kontrola nad programem może być prowadzona zarówno poprzez interfejs graficzny, jak i tekstowy. VMD umożliwia również tworzenie wysokiej jakości obrazów, a także animacji symulacji dynamiki molekularnej [108].

Rozdział 7

Atom fluoru w związkach biologicznie czynnych

Wprowadzanie podstawników zawierających atomy fluoru do struktury związków biologicznie aktywnych stało się powszechną praktyką w rozwoju potencjalnych środków terapeutycznych. Chociaż do 1957 roku nie został opracowany żaden lek zawierający w swojej konstytucji atom fluoru to obecnie w sprzedaży dostępnych jest wiele środków terapeutycznych posiadających w swojej strukturze atom fluoru, stanowiących około 20 % wszystkich farmaceutyków [109-111]. Do 2007 roku najczęściej stosowanymi lekami zawierającymi w strukturze atom fluoru są: antydepresyjny Prozak **81**, obniżający poziom cholesterolu Lipitor **82** oraz antybakteryjny Ciprobay **83** (Rys.7.1.) [8].



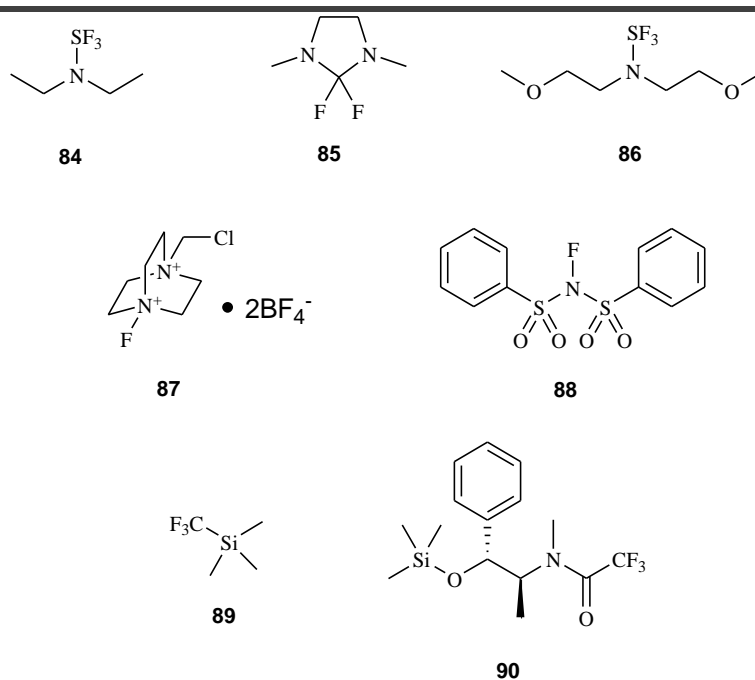
Rys. 7.1. Struktura chemiczna leków zawierających w strukturze atom fluoru.

Obecność atomu fluoru w konstytucji potencjalnego leku wpływa nie tylko na jego właściwości fizykochemiczne lecz również w dużym stopniu na wchłanianie, dystrybucję oraz wydalanie z organizmu. W ostatnim czasie stwierdzono również, że fluorowe analogi związków biologicznie czynnych charakteryzują się poprawioną stabilnością metaboliczną w organizmie (co ma związek z obniżeniem podatności na utlenianie grup funkcyjnych znajdujących się w sąsiedztwie atomu fluoru na drodze enzymatycznej oksydacji przeprowadzanej przez cytochrom P450) [112]. Chociaż efekty indukcyjne związane z wprowadzeniem fluorowanych podstawników (powodujące m.in. zmiany we właściwościach kwasowo-zasadowych) są bardzo dobrze poznane, to dopiero w ostatnim czasie zaobserwowano wpływ wiązań C-F na zdolność do wiązania się cząsteczki w miejscu

aktywnym celu molekularnego na drodze efektów stereoelektronowych lub bezpośredniego kontaktu z resztami aminokwasowymi białka [8].

7.1. Aspekt syntetyczny

Chociaż elementarny F_2 został otrzymany już w 1886 roku, to jego wysoka reaktywność na długo ograniczała możliwości fluorowania związków w preparatyce organicznej. Sytuacja ta uległa zmianie dopiero w latach siedemdziesiątych XX wieku, kiedy to opracowano selektywne środki fluorujące, które mogły być bezpiecznie wykorzystane w laboratoriach [113-115].



Rys. 7.2. Struktura chemiczna wybranych środków fluorujących.

Obecnie na rynku można odnaleźć wiele środków fluorujących dostępnych komercyjnie. Przykładami nukleofilowych reagentów wykorzystywanymi do tworzenia wiązań C-F są związki DAST **84** [116], DFI **85** [117] oraz Deoxofluor **86** [118] (Rys.7.2.). Odczynniki te pozwalają na transformację alkoholi w monofluorki, a także związki karbonylowe w gem-difluorki. Opracowano również odczynniki fluorujące o charakterze elektrofilowym zawierające w konstytucji ugrupowania R_2N-F lub R_3N^+-F , do których należą Slectfluor **87** oraz NFSI **88** [113]. Dogodną metodą wprowadzania grupy trifluorometylowej do konstytucji związków organicznych jest zastosowanie trimetylo-trifluorometylosilanu **89** [113] lub niedawno opracowanych reagentów na bazie trifluoroacetamidów, których

przykładem może być analog **90** [119]. Niestety, większość z tych reagentów jest dość droga i wykorzystywana jedynie w skali laboratoryjnej.

7.2. Właściwości fizykochemiczne oraz farmakokinetyczne fluorków organicznych

Ze wszystkich występujących pierwiastków, fluor charakteryzuje się najwyższą elektroujemnością. Wiązanie C-F jest jednym z najsilniejszych wśród wszystkich występujących wiązań chemicznych. Obecność atomu fluoru powoduje również wzmocnienie siły sąsiadujących wiązań pojedynczych C-C oraz osłabienie podwójnych wiązań allilowych C=C [120]. Bardzo niska polaryzowalność tego atomu wpływa również na siłę oddziaływań międzycząsteczkowych [121].

Obecnie atom wodoru bardzo często zastępuje się atomem fluoru w związkach organicznych o aktywności biologicznej. Wprowadzenie atomu fluoru do struktury cząsteczki wpływa znacznie na zmiany długości wiązań, objętość i promień van der Waalsa. Długość wiązania C-F (1.41 Å) jest w rzeczywistości o wiele bardziej zbliżona do wiązania C-O (1.43 Å) niż C-H (1.09 Å). Objętość van der Waalsa ugrupowania trifluorometylowego (CF₃) można porównać do tej obserwowanej w przypadku grupy etylowej (CH₃CH₂), jednakże kształt obu tych podstawników jest znacząco odmienny [8]. Pomimo doniesień [120] o zamienności grupy CF₃ i izopropylowej ((CH₃)₂CH), należy mieć na uwadze, że podstawnik izopropylowy ma znacznie większą objętość [122].

Bardzo ważnym elementem optymalizacji związków wiodących podczas projektowania potencjalnych leków jest bioizosteria. Odnosi się ona do możliwości wymiany poszczególnych atomów lub grup funkcyjnych na inne o podobnych rozmiarach i kształtach, bez zasadniczego wpływu na działanie biologiczne czy powinowactwo do celu molekularnego [123]. Przykładem bioizosterii podstawników, w której wykorzystuje się obecność ugrupowań fluoroorganicznych jest fragment fluorowinylowy (C=CHF) stosowany jako zamiennik wiązania peptydowego, dobrze dopasowany pod względem wielkości i geometrii [124]. Atom fluoru zajmuje w tym przypadku pozycję karbonylowego atomu tlenu, a planarność podstawnika zapewnia układ winylowy. Również połączenie C-CF₃ z powodzeniem stosowano jako zamiennik fragmentu C=O, co doprowadziło do wzrostu aktywności biologicznej w przypadku inhibitorów katepsyny K [125]. Możliwość efektywnej wymiany dipoli C-F oraz C-O wynika z faktu, że podlegają one podobnym polarnym interakcjom z sąsiadującymi dipolami.

Bioizosteryzm układów C-F oraz C-OH [126] i C-OCH₃ zaobserwowano również podczas optymalizacji inhibitorów trombiny (proteazy serynowej osocza krwi) biorącej udział w procesie krzepnięcia krwi [127]. Podobną aktywność związków obserwowano w przypadku gdy każda z wyżej wymienionych grup znajdowała się w analogicznej, centralnej części rdzenia inhibitora, co pozwalało im oddziaływać z resztami aminokwasowymi budującymi miejsce katalityczne enzymu. Jednakże, układy C-F, C-OH oraz C-OCH₃ mogą wykazywać charakter bioizosteryczny wówczas gdy spełnione są trzy warunki: 1) atomy fluoru i tlenu, na których zlokalizowana jest wysoka gęstość elektronowa, oddziałują z ugrupowaniami o niskiej gęstości elektronowej należącymi do reszt aminokwasowych tworzących miejsce aktywne białka lub kationami (które często występują w regionach katalitycznych enzymów); 2) grupa CH₃ nie wywołuje niekorzystnych oddziaływań sterycznych; 3) grupa OH znajduje się w sąsiedztwie akceptora wiązania wodorowego [8].

7.3. Efekty stereoelektronowe atomu fluoru oraz jego wpływ na konformację cząsteczki

Wymiana atomu wodoru na atom fluoru może wywołać głębokie zmiany konformacyjne zwłaszcza niewielkich cząsteczek organicznych. Zmiany te mogą wynikać nie tylko z rozmiaru atomu fluoru, ale również z wywoływanych efektów stereoelektronowych. Wpływ obecności atomu fluoru na konformację cząsteczki jest bardzo dobrze widoczny podczas porównania struktury geometrycznej ugrupowania metoksyfenylowego oraz trifluorometoksyfenylowego. Grupa metoksylova leży w płaszczyźnie pierścienia fenylowego, ponieważ orbital p atomu tlenu o hybrydyzacji sp² jest π-sprzężony z układem π-elektronowym pierścienia aromatycznego [8]. W odróżnieniu od grupy metoksylowej, grupa trifluorometoksylova znajduje się poza płaszczyzną pierścienia, co wynika nie tylko z jej większego rozmiaru, ale przede wszystkim z występujących efektów stereoelektronowych. Orientacja antiperiplanarna wiązań C-F w stosunku do wolnych par elektronowych atomu tlenu (w tym przypadku o hybrydyzacji sp³) skutkuje sprzężeniem n_O-σ*_{CF} z jednoczesnym wydłużeniem wiązań C-F [128]. Efekt ten zaburza sprzężenie pomiędzy atomem tlenu a układem π-elektronowym pierścienia aromatycznego, co eliminuje preferencję cząsteczki do przyjmowania konformacji płaskiej.

Również wprowadzenie atomu fluoru do pierścienia piperidyny wpływa na konformację cząsteczki oraz zmniejsza zasadowość atomu azotu [129]. Konformacja cząsteczki w protonowanej 3-fluoropiperidynie oraz 3,5-difluoropiperidynie sprzyja ułożeniu atomów fluoru w pozycji aksjalnej, podczas gdy w analogach deprotonowanych atomy fluoru

zajmują pozycje ekwatorialne [130, 131]. W orientacji aksjalnej polarne układy C-F oraz N⁺-H ulegają między sobą korzystnym oddziaływaniom dipolarnym. Te wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania są na tyle silne, że atomy fluoru znajdujące się w pozycji 3 protonowanej piperydyny preferują pozycję aksjalną pomimo występowania pewnych naprężeń sterycznych.

7.4. Wpływ atomu fluoru na LogP oraz pKa cząsteczki

Wchłanianie oraz dystrybucja potencjalnego leku w organizmie w dużej mierze zależy od stanu jonizacji cząsteczki oraz równowagi lipofilowo-hydrofilowej. Wzmocnienie właściwości lipofilowych związku biologicznie czynnego może poprawić jego zdolność do wiązania się z celem molekularnym w wyniku bardziej korzystnego podziału pomiędzy wysoce polarnym środowiskiem wodnym oraz mniej polarną częścią receptora. Dogodną miarą lipofilowości jest logarytmiczny współczynnik podziału (logP) między oktanołem a wodą przy pH = 7.4. Zazwyczaj wymiana atomu wodoru na atom fluoru prowadzi do wzrostu lipofilowości cząsteczki [132], przy czym, pojedyncze podstawienie podnosi wartość logP o około 0.25 jednostki. Większy wzrost logP obserwuje się zwykle, gdy atom fluoru wprowadzany jest w pobliżu zasadowego atomu azotu. Efekt indukcyjny wywołany przez atom fluoru wpływa na obniżenie zasadowości, przez co wzrasta stosunek liczby cząsteczek o charakterze neutralnym wobec tych, które uległy protonowaniu.

Jednakże istnieją pewne wyjątki, w przypadku których dodatkowo atom fluoru wpływa na obniżenie parametru logP cząsteczki. W niektórych przypadkach wartość logP ulega obniżeniu gdy atom fluoru wprowadzany jest w pobliżu atomu tlenu [132]. Spadek logP może wystąpić wówczas gdy odległość O...F jest mniejsza niż 3.1 Å. Nie jest to jednak reguła i dla przykładu zastąpienie grupy metoksyłowej połączonej z pierścieniem aromatycznym podstawnikiem trifluorometoksyłowym skutkuje wzrostem lipofilowości (np. wartość logP dla trifluorometoksybenzenu jest o 1.1 jednostki większa niż w przypadku metoksybenzenu) [8].

Obecność ugrupowań fluorowanych w konstytucji związków może powodować drastyczną zmianę właściwości kwasowo-zasadowych. Wprowadzenie atomu fluoru do struktury chemicznej związku silnie obniża właściwości zasadowe amin, co może znacznie wpływać na jego zdolność do przenikania przez błony biologiczne [133]. Obecnie opracowano skuteczne metody przewidywania zmian wartości pKa (gdzie Ka to stała dysocjacji sprzężonego kwasu) zasadowych układów aminowych pod wpływem interakcji z grupami funkcyjnymi zawierającymi atomy F, O, N oraz S [129, 134]. Dla przykładu,

wartości pKa systematycznie maleją po wprowadzeniu do struktury kolejnych atomów fluoru w serii związków $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}_2$ (10.7), $\text{FCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ (9.0), $\text{F}_2\text{CHCH}_2\text{NH}_2$ (7.3), $\text{F}_3\text{CCH}_2\text{NH}_2$ (5.7) [129]. Odpowiednia ilość atomów fluoru sąsiadujących z podstawnikiem aminowym może sprawić, że przy fizjologicznym pH grupa NH_2 występować będzie w formie niesprotonowanej, co może zapewnić większą biodostępność związku chemicznego w organizmie.

Związkami chemicznymi o aktywności biologicznej, dla których bardzo dobrze poznano wpływ zmian właściwości kwasowo-zasadowych na zdolność do wiązania się z miejscem aktywnym celu molekularnego na skutek wprowadzenia atomów fluoru są inhibitory anhidrazy węglanowej II (CAII) na bazie alifatycznych oraz aromatycznych sulfonamidów [135, 136]. Obecność atomu fluoru w bliskiej odległości do ugrupowania sulfonamidowego (RSO_2NH_2) powoduje wzrost kwasowości wiązania N-H, ułatwiając deprotonację cząsteczki oraz silniejsze wiązanie się powstałego anionu do jonu Zn^{2+} obecnego w regionie katalitycznym enzymu. Dla przykładu, jeden z inhibitorów CAII – metanosulfonamid (dla którego wartość pKa ≈ 10.5) hamuje pracę enzymu z $K_i = 10^{-4}$ M, natomiast dla jego bardziej kwaśnego, fluorowanego analogu – trifluorometanosulfonamidu (dla którego pKa ≈ 5.8) wartość $K_i = 2 \cdot 10^{-9}$ M [137].

7.5. Selekttywne oddziaływania białko-ligand z udziałem wiązań C-F

Obecnie, wydaje się oczywiste, że wprowadzenie atomu fluoru do struktury chemicznej farmaceutyku może wzmocnić jego selektywność oraz zdolność do specyficznego wiązania się z celem molekularnym. Ze względu na niewielkie rozmiary oraz wysoką elektroujemność, podstanik fluorowy zazwyczaj wykazuje preferencję do orientowania się w bliskiej odległości do dodatnio naładowanych regionów receptora [8]. Chociaż wiązanie C-F pod względem różnic w elektroujemności atomów jest zbliżone do wiązań C-O oraz C-N, to ugrupowanie C-F jest słabszym akceptorem wiązania wodorowego [138]. Organiczne fluorki charakteryzują się niewielkim powinowactwem do protonów. Pomimo to, możliwe jest tworzenie połączeń $\text{C-F}\cdots\text{H-X}$ (gdzie X = O, N, S), $\text{C-F}\cdots\text{H-C}\alpha$ (gdzie $\text{C}\alpha$ jest węglem α reszty aminokwasowej) oraz $\text{C-F}\cdots\text{C=O}$ zarówno w obrębie wiązań peptydowych głównego szkieletu aminokwasowego białka, jak i łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych (np. reszt Asn, Glu oraz Arg) na bazie oddziaływań polarnych [8, 139]. Występowanie tych dodatkowych oddziaływań może wpływać korzystnie na stabilizację powstałych kompleksów receptor-ligand. Spośród dużej liczby struktur znajdujących się w bazie PDB, zawierających wiązania C-F, można znaleźć liczne przykłady, w których potwierdzono występowanie

polarnych oddziaływań z udziałem atomu fluoru (na co wskazują odpowiednie odległości pomiędzy atomami oraz kąty pomiędzy wiązaniami) [8].

Z drugiej jednak strony, obecność atomu fluoru we fragmencie cząsteczki, który zajmuje w miejscu aktywnym enzymu region o wysokiej gęstości elektronowej, może niekorzystnie wpływać na zdolność wiązania z receptorem. Ponadto, wprowadzenie podstawników fluoroalkilowych do struktury potencjalnego leku, które w obrębie miejsca aktywnego receptora mają zajmować kieszenie lipofilowe bogate w układy aromatyczne, nie powodują istotnej poprawy w powinowactwie w porównaniu z alkilowymi łańcuchami o porównywalnych rozmiarach [8].

Należy jednak pamiętać, że wprowadzenie atomu fluoru do konstytucji związku o potencjalnej aktywności biologicznej wpływa nie tylko na zmianę w sposobie i sile wiązania się z celem molekularnym, ale również oddziałuje na właściwości fizykochemiczne cząsteczki, a także jej absorpcję, dystrybucję, metabolizm oraz wydalanie z organizmu.

Rozdział 8

Cel i zakres pracy

W ramach realizacji swej pracy doktorskiej w zespole naukowym prof. dr. hab. inż. Janusza Rachonia w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, otrzymałem zadanie:

- Dokonania przeglądu literatury z zakresu wiedzy na temat budowy i mechanizmu działania sulfatazy steroidowej (STS), a także funkcji jaką pełni w regulacji tworzenia biologicznie czynnych steroidów,
- Zebrania literatury dotyczącej znanych inhibitorów STS oraz ich wykorzystania jako potencjalnych leków w terapii hormonozależnego raka piersi,
- Dokonania literaturowego przeglądu związanego z zastosowaniem nowoczesnych technik modelowania molekularnego w projektowaniu związków o zastosowaniu terapeutycznym oraz strategii wprowadzania atomu fluoru do struktur związków biologicznie aktywnych w kontekście otrzymywania potencjalnych leków,
- Zaprojektowania struktur potencjalnych inhibitorów STS na bazie amidosiarczanowych, fosforowych oraz fluorowych pochodnych kumaryny i tyraminy z wykorzystaniem technik modelowania molekularnego,
- Przeprowadzenia syntez wybranych modeli amidosiarczanowych, fosforowych oraz fluorowych pochodnych kumaryny i tyraminy,
- Zbadania aktywności inhibicyjnej otrzymanych związków wobec STS wyizolowanej z łożyska ludzkiego, a następnie selekcji i oznaczenia właściwości cytotoksycznych dla wybranych pochodnych wobec nowotworowych linii komórkowych MCF-7, T47D, MDA-MB-231 oraz SkBr3,
- Przeprowadzenia szeregu eksperymentów związanych z selektywną *N*- i *O*-fosforylacją cząsteczek chemicznych, w których strukturze występują jednocześnie połączenia $C_{Ar}-OH$ oraz $C_{Ar}-NH_2$.

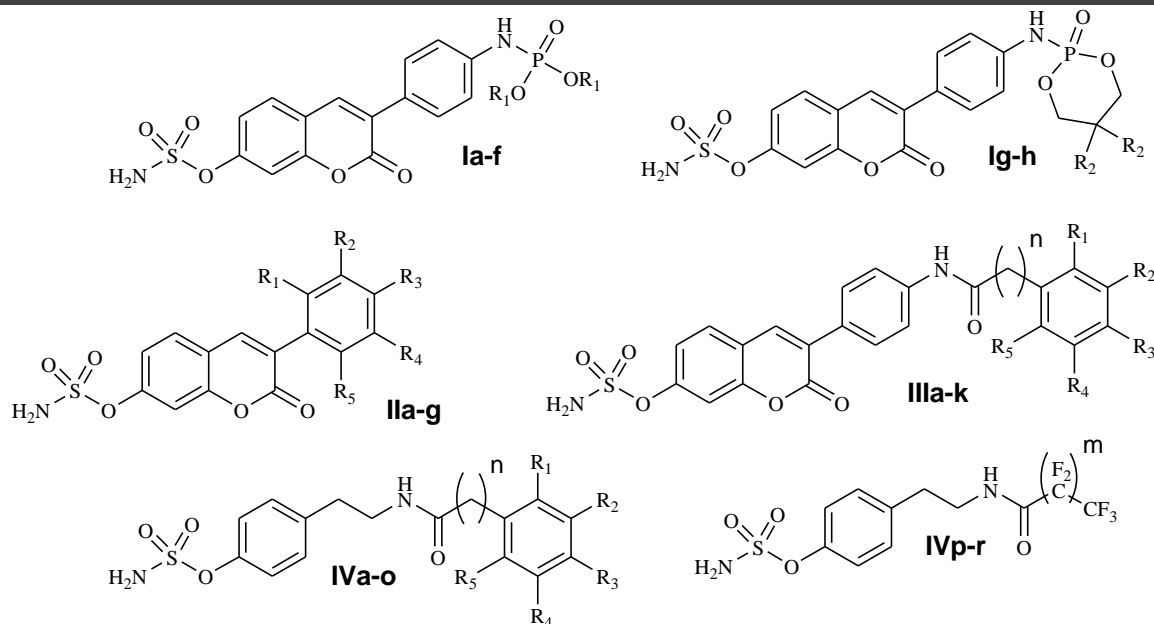
II CZĘŚĆ

BADANIA WŁASNE

Rozdział 9

Uzasadnienie oraz opis podjętych badań

Dotychczasowe badania przeprowadzone przez zespół prof. Janusza Rachonia z Katedry Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej nad nowymi inhibitorami STS (*patrz rozdział 5.4.*) jednoznacznie wskazały, że wśród szerokiej biblioteki otrzymanych związków najwyższą aktywnością inhibicyjną wobec STS charakteryzowały się związki oparte o rdzeń kumaryny i tyraminy. W związku z powyższym w toku podjętych przeze mnie badań realizowanych w ramach Studium Doktoranckiego Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, dysponując strukturą krystalograficzną miejsca aktywnego enzymu STS, w pierwszym etapie przeprowadziłem badania z zakresu dokowania molekularnego wybranych pochodnych kumaryny i tyraminy zawierających w swojej konstytucji ugrupowania fosforowe (związki **Ia-h**) lub wiązania C-F (związki **Ila-g**, **IIIa-k** i **IVa-r**) jako potencjalnych inhibitorów STS. Ogólne struktury badanych pochodnych przedstawiłem na **Rys.9.1.**



Rys. 9.1. Struktura ogólna otrzymanych amidosiarczanowych, *N*-fosforylowanych pochodnych 3-(4-aminofenilo)-kumaryny **Ia-h** ($R_1 = \text{Me, Et, } i\text{-Pr, } n\text{-Bu, Ph, Bn; } R_2 = \text{H, Me}$); amidosiarczanowych pochodnych 3-fenylkumaryny **IIa-g** ($R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 = \text{H, F, CF}_3, \text{OCF}_3$); amidosiarczanowych, *N*-acylowanych pochodnych 3-(4-aminofenilo)-kumaryny **IIIa-k** ($R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 = \text{H, F, CF}_3, \text{OCF}_3$; $n = 0, 1$) oraz amidosiarczanowych, *N*-acylowanych pochodnych tyraminy **IVa-r** ($R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 = \text{H, F, CF}_3, \text{OCF}_3$; $n = 0, 1$; $m = 8, 9$).

9.1. Modelowanie molekularne

Etap projektowania oraz syntezy chemicznej wszystkich serii związków poprzedziłem każdorazowo własnymi badaniami z zakresu dokowania molekularnego, które pozwoliły mi na wstępną ocenę zdolności do wiązania się danej klasy związków do miejsca aktywnego STS oraz selekcję zdefiniowanych struktur chemicznych potencjalnych inhibitorów w oparciu o wyznaczoną, wolną energię wiązania (będącą wynikiem pracy programu dokującego AutoDock Vina 1.1.2). Ponadto, wyniki w formie graficznej pozwoliły mi wytłumaczyć w jaki sposób zaprojektowane związki mogą wiązać się z enzymem, a także na zidentyfikowanie potencjalnych miejsc występowania oddziaływań pomiędzy atomami inhibitorów a resztami aminokwasowymi budującymi miejsce aktywne STS. Dane te stanowiły również wsparcie na etapie interpretacji wyników badań biologicznych.

Procedura dokowania molekularnego obejmowała cztery odrębne etapy:

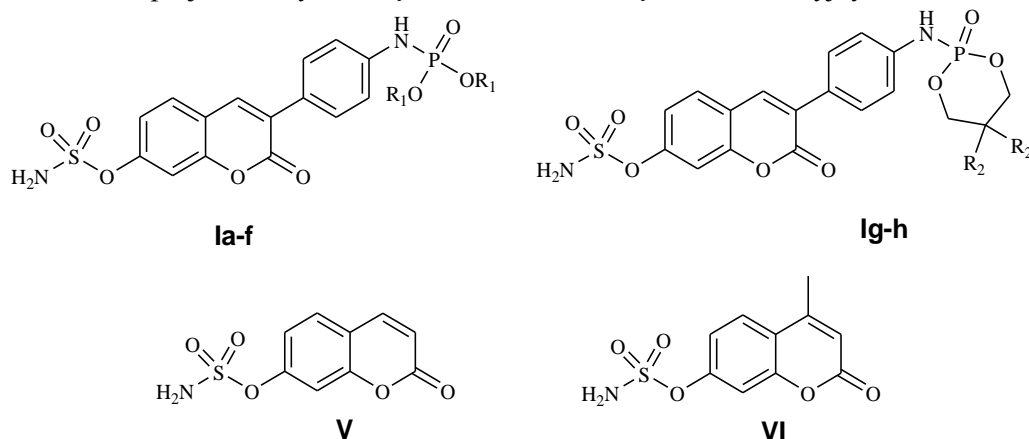
- a) Odpowiednie przygotowanie struktury ludzkiej sulfatazy steroidowej dostępnej w bazie PDB pod kodem 1P49.
- b) Przygotowanie struktur chemicznych ligandów (potencjalnych inhibitorów) oraz optymalizacja ich geometrii.
- c) Dokowanie molekularne zoptymalizowanych ligandów do przygotowanej struktury receptora.
- d) Zestawienie otrzymanych wyników a następnie ich analiza oraz graficzna wizualizacja.

9.1.1. Modelowanie molekularne amidosiarczanowych pochodnych 3-fenylokumaryny zawierających w swojej konstytucji ugrupowania fosforowe

Biorąc pod uwagę swoje doświadczenie w projektowaniu inhibitorów STS na bazie pochodnych fosforoorganicznych, których wysoka aktywność biologiczna została udokumentowana w licznych naszych publikacjach naukowych [98-103], postanowiłem przeprowadzić badania modelowania molekularnego nad serią związków zawierających w swojej konstytucji zarówno ugrupowanie amidosiarczanowe jak i reszty fosforowe. Jako rdzeń dla zaprojektowanych związków wybrałem kumarynę, która była już wcześniej wykorzystywana w otrzymywaniu inhibitorów STS. Ponadto, aby jak najbardziej przybliżyć geometrię cząsteczki kumaryny do układów steroidowych, w pozycję 3 wprowadziłem dodatkowy pierścień fenyłowy zawierający ugrupowanie aminowe. Dzięki obecności podstawnika NH_2 , mogłem w bardzo szybki i sprawny sposób wprowadzać do konstytucji rdzenia szereg różnych reszt fosforowych.

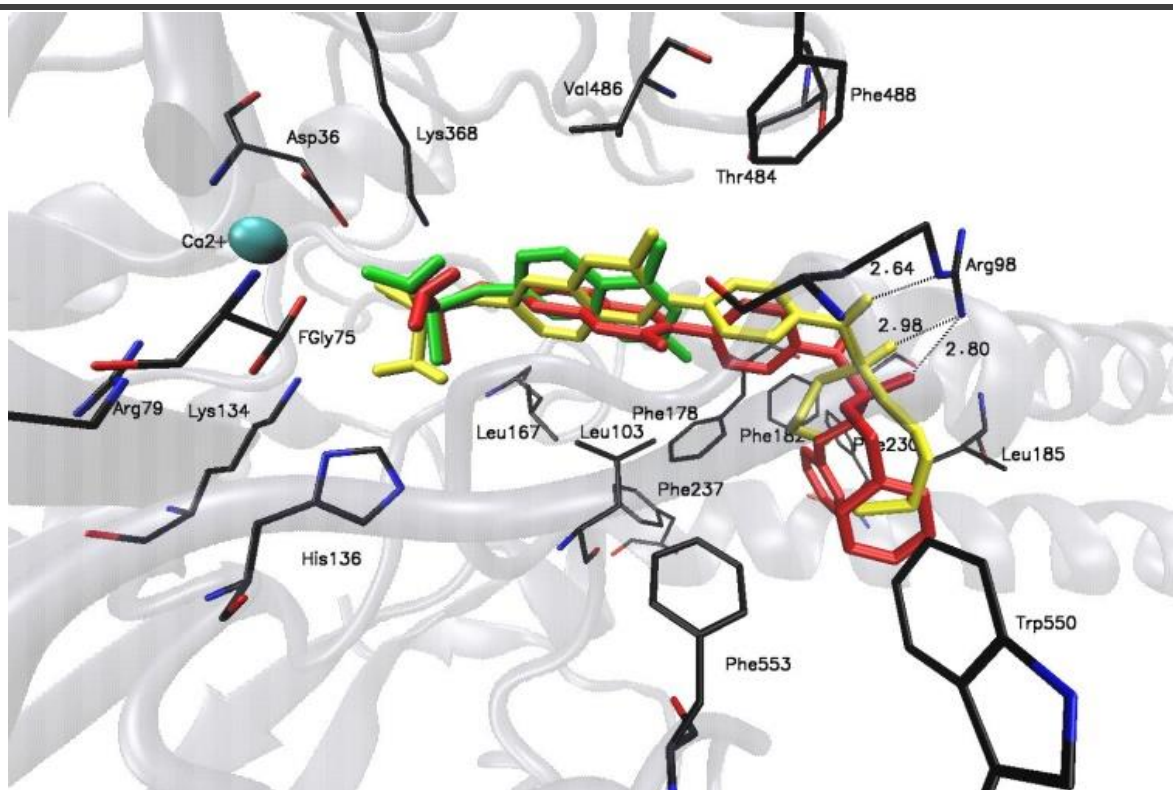
W celu określenia sposobu oraz siły wiązania do miejsca aktywnego enzymu, zaprojektowane struktury potencjalnych inhibitorów dokowałem do odpowiednio przygotowanej struktury krystalograficznej STS. Na podstawie danych obliczonych przez program AutoDock Vina 1.1.2 wyselekcjonowałem osiem struktur o najniższej energii wiązania (związki **Ia-h**). Szczegółowe dane otrzymane podczas eksperymentów dokowania molekularnego przedstawiłem w **Tabeli 9.1.** Wyznaczone przez program wartości energii wiązania wybranych analogów okazały się bardzo korzystne (w zakresie od -6.2 do -8.3 kcal/mol). W tym miejscu należy zwrócić uwagę, że wartości energii wiązania dla związków referencyjnych **V** oraz **VI** wyniosły odpowiednio -2.9 oraz -4.1 kcal/mol. Najlepszym dopasowaniem charakteryzował się związek **If**, dla którego wartość energii wiązania wyniosła -8.3 kcal/mol.

Tabela 9.1. Wyniki analiz dokowania molekularnego z wykorzystaniem programu AutoDock Vina 1.1.2 zaprojektowanych związków **Ia-h** oraz związków referencyjnych **V** i **VI**.

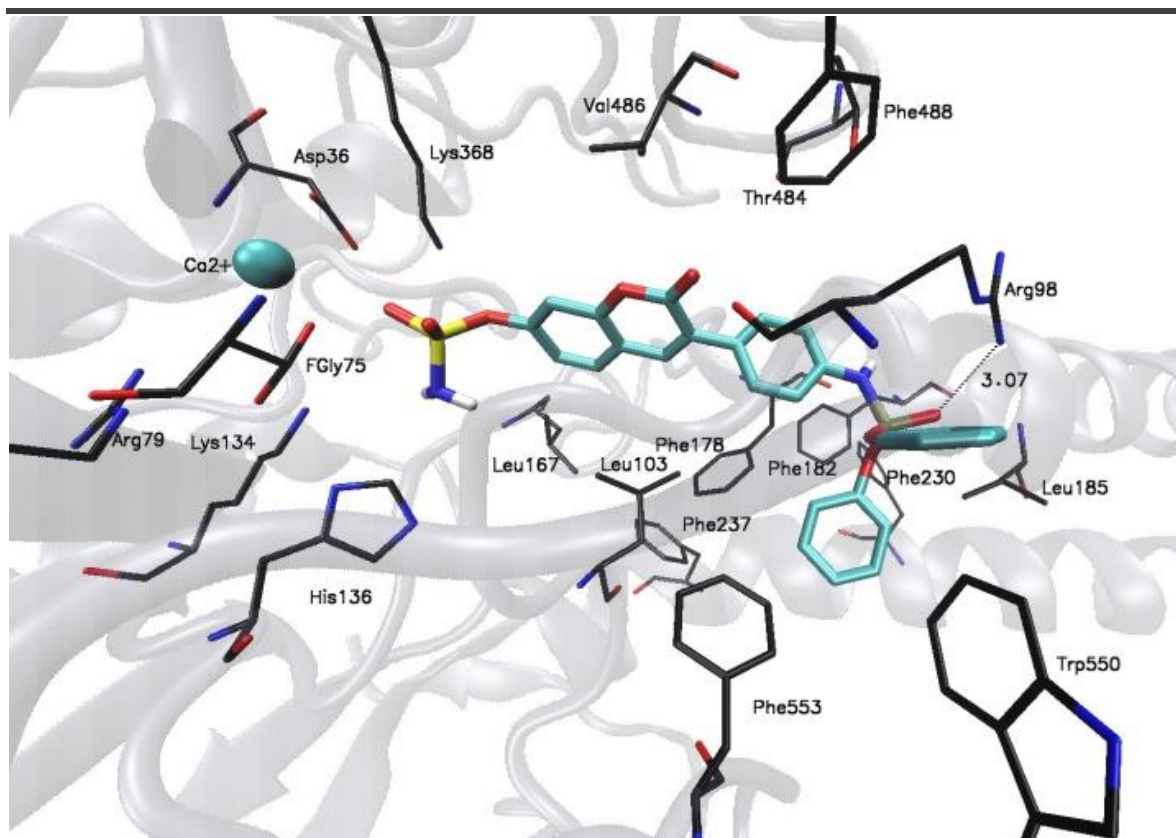


Nr związku	R_1	R_2	Energia wiązania [kcal mol ⁻¹]
Ia	Me	-	-6.4
Ib	Et	-	-6.6
Ic	<i>i</i> -Pr	-	-6.2
Id	<i>n</i> -Bu	-	-6.3
Ie	Ph	-	-6.7
If	Bn	-	-8.3
Ig	-	H	-7.8
Ih	-	Me	-7.9
V	-	-	-2.9
VI	-	-	-4.1

Na **Rys.9.2.** oraz **Rys.9.3.** przedstawiłem prawdopodobny sposób wiązania w miejscu aktywnym STS dla trzech zaprojektowanych cząsteczek **Id** (żółty), **Ie** (kolorowany CPK) oraz **If** (czerwony) wykazującej najniższą wartość energii wiązania. Wyniki badań dokowania molekularnego sugerują, że w przypadku tej klasy związków ugrupowanie amidosiarczanowe znajduje się w bliskiej odległości do koordynowanej przez jon Ca²⁺ reszty FGly75, podobnie jak ma to miejsce w przypadku związku referencyjnego **VI** (zielony). Wysoce hydrofobowe rdzenie zaprojektowanych pochodnych wraz z ugrupowaniem fosforowym są dobrze dopasowane do miejsca aktywnego STS (które tworzą liczne reszty aminokwasowe o charakterze lipofilowym: Leu103, Phe104, Leu167, Val177, Phe178, Phe182, Leu185, Phe230, Phe233, Phe237, Thr484, Val486, Phe488, Trp550 i Phe553). Ponadto, jak widać na **Rys.9.2.** oraz **Rys.9.3.**, ugrupowania fosforowe zaprojektowanych cząsteczek **Id**, **Ie** i **If** znajdują się w odległościach umożliwiających tworzenie wiązań wodorowych z grupami NH reszty aminokwasowej Arg98, co może stabilizować powstałe kompleksy enzym-inhibitor.



Rys.9.2. Miejsce aktywne STS ze znajdującymi się wewnątrz związkami **Id** (żółty), **If** (czerwony) oraz **VI** (zielony).

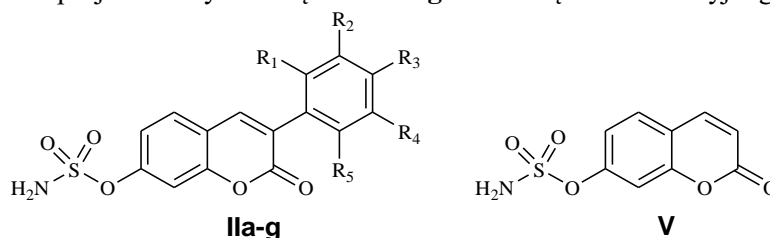


Rys.9.3. Miejsce aktywne STS ze znajdującymi się wewnątrz związkiem **Ie**.

9.1.2. Modelowanie molekularne amidosiarczanowych pochodnych 3-fenylokumaryny zawierających w swojej konstytucji wiązania C-F

W kolejnym etapie badań przeprowadziłem analizę z zakresu modelowania molekularnego dla związków, które w strukturze 3-fenylokumaryny posiadały dodatkowo ugrupowanie amidosiarczanowe oraz wiązania C-F, jako potencjalnych inhibitorów STS. Efektem mojej pracy było zaprojektowanie pochodnych 3-fenylokumaryny posiadających w swojej konstytucji atomy fluoru, ugrupowanie trifluorometylowe oraz trifluorometoksyłowe, t.j. związków **IIa-g** (Tabela 9.2.).

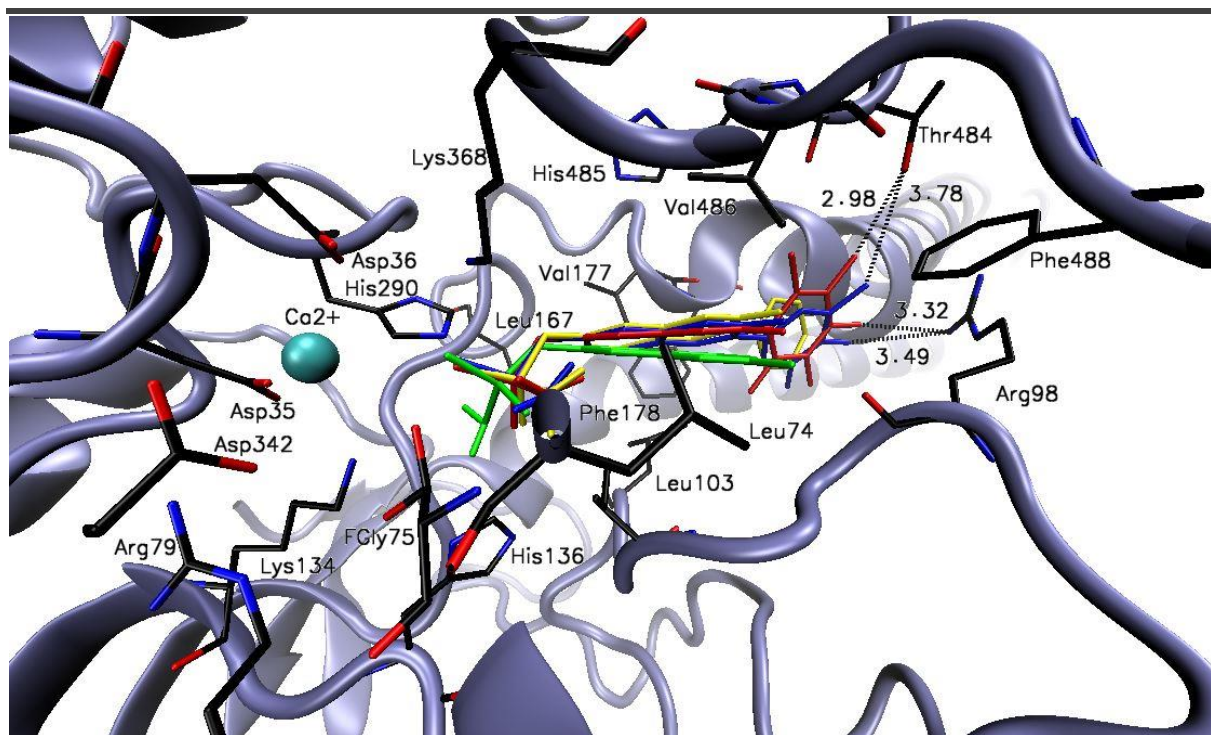
Tabela 9.2. Wyniki analiz dokowania molekularnego z wykorzystaniem programu AutoDock Vina 1.1.2 zaprojektowanych związków **IIa-g** oraz związku referencyjnego **V**.



Nr związku	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Energia wiązania [kcal/mol]
IIa	H	H	H	H	H	-6.7
IIb	H	F	F	H	H	-6.7
IIc	H	F	F	F	H	-6.8
IId	F	F	F	F	F	-6.9
IIe	CF ₃	H	H	CF ₃	H	-6.9
IIf	H	CF ₃	F	H	H	-6.2
IIg	H	H	OCF ₃	H	H	-7.5
V	-	-	-	-	-	-2.9

Badania z zakresu dokowania molekularnego potwierdziły dobre dopasowanie zaprojektowanych cząsteczek do miejsca aktywnego STS. Uzyskane wyniki sugerowały, że potencjalne inhibitory STS na bazie amidosiarczanowych pochodnych 3-fenylokumaryny zawierające wiązania C-F, wiążą się z enzymem w sposób analogiczny, jak ma to miejsce w przypadku opisanego w literaturze związku referencyjnego **V** (Rys.9.4.). Ugrupowanie amidosiarczanowe analizowanych cząsteczek skierowane jest w stronę reszty FGly75, koordynowanej do jonu Ca²⁺ i znajduje się w pobliżu innych katalitycznie istotnych reszt aminokwasowych: Asp35, Asp36, Arg79, Lys134, His136, His290, Asp342 oraz Lys368. Ponadto, podstawiony atomami fluoru pierścień fenyłowy kumarynowych rdzeni jest

otoczony przez kilka lipofilowych reszt aminokwasowych (Leu74, Arg98, Leu103, Leu167, Val177, Phe178, Thr484, His485, Val486 oraz Phe488), które mogą odpowiadać za rozpoznawanie potencjalnych substratów.



Rys.9.4. Miejsce aktywne STS ze znajdującymi się wewnątrz związkami **IIa** (żółty), **IIc** (niebieski), **IIId** (czerwony) oraz inhibitorem referencyjnym **V** (zielony).

Wyniki badań modelowania molekularnego wskazują, że zwiększenie właściwości hydrofobowych zaprojektowanych cząsteczek (co wynika z wprowadzenia podstawionego atomami fluoru pierścienia fenyłowego) ułatwia ich wiązanie do miejsca aktywnego enzymu na skutek tworzenia oddziaływań z lipofilowymi resztami aminokwasowymi. Na podstawie wartości energii wiązania (będącej wynikiem pracy programu AutoDock Vina 1.1.2) należy stwierdzić, że wszystkie badane związki charakteryzowały się bardzo dobrym dopasowaniem do miejsca aktywnego enzymu. Wyniki tych eksperymentów przedstawiłem w **Tabeli 9.2.** Dla wszystkich zaprojektowanych pochodnych **IIa-g** energie wiązania były wyjątkowo korzystne (w zakresie od -6.2 do -7.5 kcal/mol) i zdecydowanie lepsze w porównaniu ze związkiem referencyjnym **V** (-2.9 kcal/mol), w którego konstytucji brak jest pierścienia fenyłowego, odpowiedzialnego za tworzenie dodatkowych oddziaływań hydrofobowych w obrębie miejsca aktywnego STS. Najniższą energię wiązania wynoszącą -7.5 kcal/mol wyznaczyłem dla analogu **IIg**. Ponadto, uzyskane wyniki wskazują na niewielką odległość pomiędzy atomami fluoru potencjalnych inhibitorów, a dwoma resztami aminokwasowymi

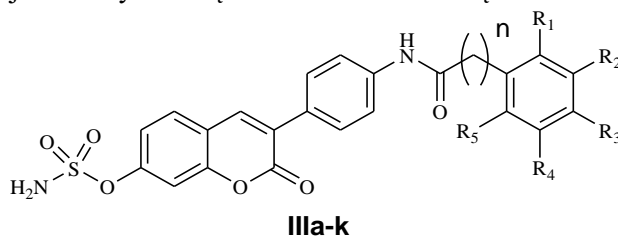
(Thr484 oraz Arg98), sugerując możliwość istnienia oddziaływań elektrostatycznych. Zwiększone właściwości lipofilowe oraz występowanie potencjalnych interakcji elektrostatycznych, w których bierze udział atom fluoru, mogą odpowiadać za wzrost stabilności kompleksu enzym-inhibitor i mieć kluczowy wpływ na aktywność inhibitorów **IIa-g**.

9.1.3. Modelowanie molekularne *N*-acylowanych pochodnych 3-(4-aminofenylo)-kumaryny zawierających w swojej konstytucji ugrupowanie amidosiarczanowe oraz wiązania C-F

Zachęcony dobrymi wynikami fluorowanych inhibitorów opartych o rdzeń 3-fenylokumaryny, postanowiłem w dalszym ciągu prowadzić badania nad rozwojem tej klasy związków. Wyniki analiz modelowania molekularnego sugerowały, że istnieje możliwość poprawy dopasowania potencjalnych inhibitorów do miejsca aktywnego enzymu poprzez wprowadzenie kolejnego pierścienia aromatycznego do struktury badanych modeli. Biorąc to pod uwagę, jak również mając na uwadze ewentualne przyszłe syntezy zaprojektowanych związków postanowiłem wykorzystać rdzeń 3-(4-aminofenylo)-7-hydroksy-kumaryny. Efektem mojej pracy było zaprojektowanie związków **IIIa-k** (**Tabela 9.3.**).

Na podstawie wyznaczonych przez program AutoDock Vina 1.1.2 wartości energii wiązania wyselekcjonowałem jedenaście *N*-acylowanych pochodnych 3-(4-aminofenylo)-kumaryny zawierających w swojej konstytucji ugrupowanie amidosiarczanowe oraz wiązania C-F (związki **IIIa-k**). Wartości energii wiązania związków (**Tabela 9.3.**) okazały się zdecydowanie korzystniejsze (w zakresie od -7.6 do -9.5 kcal/mol) w porównaniu z inhibitorami **IIa-g** oraz związkiem referencyjnym **V**. Spośród *N*-benzoiłowanych pochodnych 3-fenylokumaryny najniższą energią wiązania charakteryzował się związek **IIIc** (-8.9 kcal/mol), natomiast wśród *N*-fenyloacetylowanych pochodnych 3-fenylokumaryny najniższą energię wyznaczyłem dla związku **IIIh** (-9.5 kcal/mol).

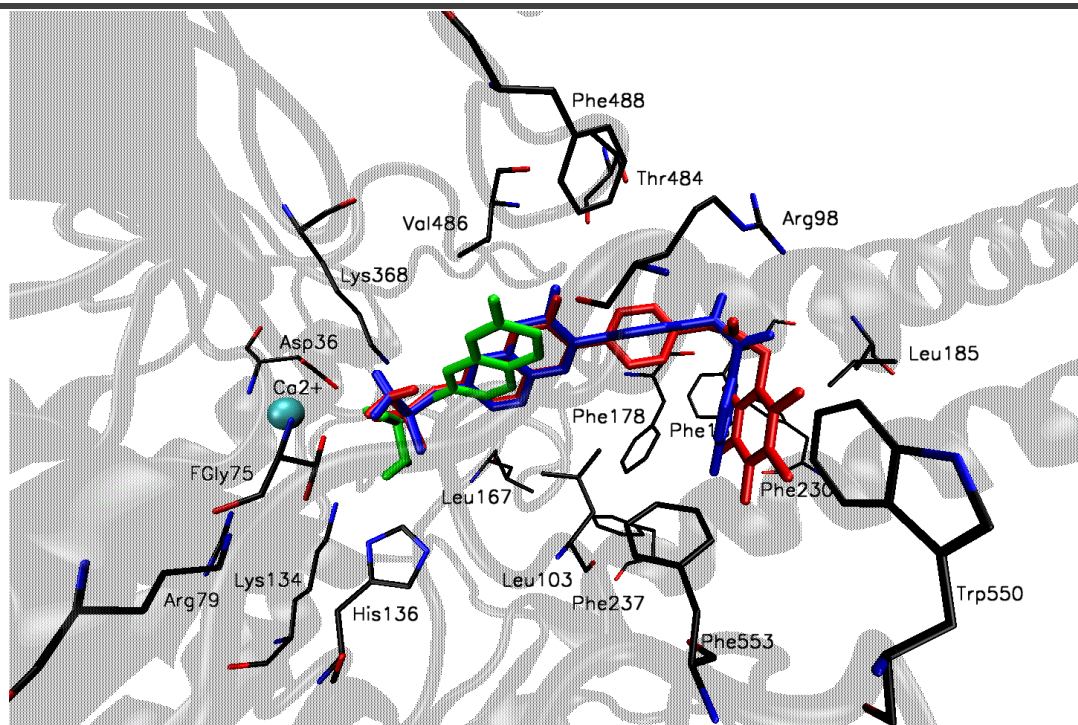
Tabela 9.3. Wyniki analiz dokowania molekularnego z wykorzystaniem programu AutoDock Vina 1.1.2 zaprojektowanych związków **IIIa-k** oraz związku referencyjnego **V**.



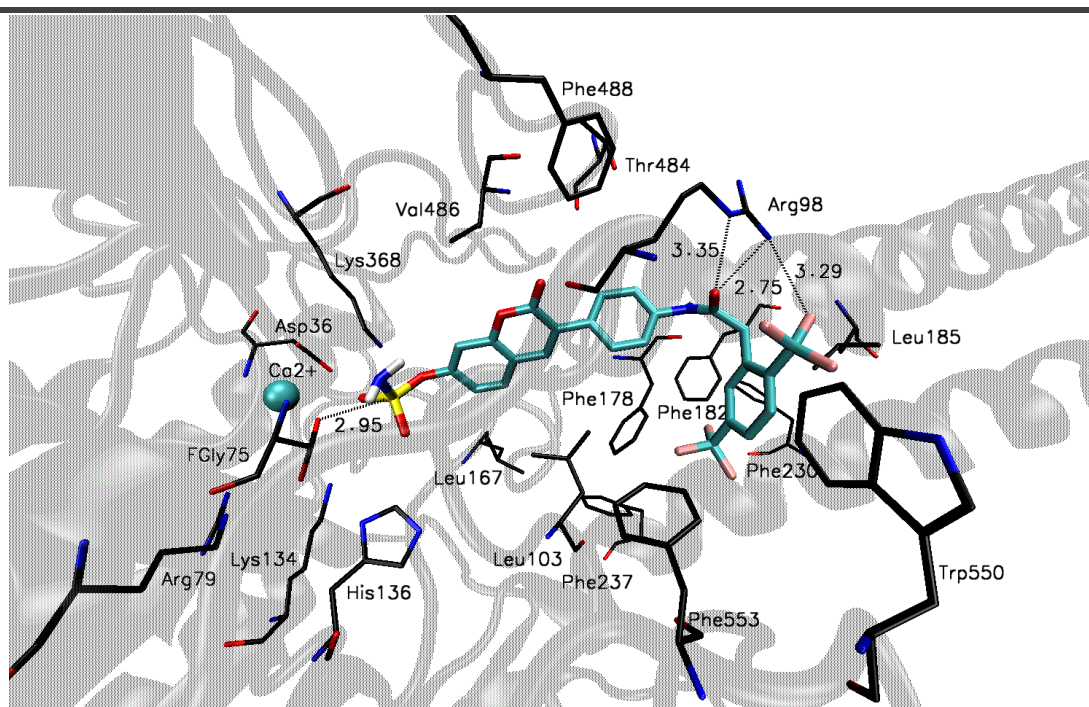
Nr związku	<i>n</i>	<i>R</i> ₁	<i>R</i> ₂	<i>R</i> ₃	<i>R</i> ₄	<i>R</i> ₅	Energia wiązania [kcal mol ⁻¹]
IIIa	0	H	H	H	H	H	-7.6
IIIb		H	H	F	H	H	-8.6
IIIc		H	F	F	H	H	-8.9
III d		F	F	F	F	F	-8.8
IIIe	1	H	H	H	H	H	-8.2
III f		H	F	F	H	H	-8.7
III g		H	F	F	F	H	-7.8
III h		F	F	F	F	F	-9.5
III i		H	CF ₃	F	H	H	-8.9
III j		CF ₃	H	H	CF ₃	H	-8.6
III k		H	H	OCF ₃	H	H	-8.4
V	-	-	-	-	-	-	-2.9

Na **Rys.9.5.** oraz **Rys.9.6.** przedstawiłem prawdopodobne kompleksy enzym-ligand utworzone w miejscu aktywnym STS bezpośrednio przed inaktywacją enzymu dla trzech wybranych, potencjalnych inhibitorów **IIIc** (niebieski), **IIIh** (czerwony), **IIIj** (kolorowany CPK). W toku swoich badań zauważyłem, że podobnie jak miało to miejsce przypadku związków **IIa-g**, również *N*-acylowane pochodne 3-fenylokumaryny dokują się w sposób podobny, jak ma to miejsce w przypadku opisanego w literaturze związku referencyjnego **V** (zielony). Ugrupowanie amidosiarczanowe inhibitorów skierowane jest w stronę reszty FGly75, koordynowanej do jonu Ca²⁺ oraz pozostałych katalitycznie istotnych reszt aminokwasowych. W przypadku wszystkich potencjalnych inhibitorów **IIIa-k** odległość pomiędzy atomem siarki i jednej z grup hydroksylowych FGly75 była niewielka (poniżej 3 Å). Ponadto, aromatyczne rdzenie zaprojektowanych związków były doskonale dopasowane do miejsca wiązania enzymu tworzonego przez lipofilowe reszty aminokwasowe. Wyniki modelowania molekularnego wskazały, że wysoka hydrofobowość rdzeni związków **IIIa-k**, wynikająca z obecności licznych układów aromatycznych, może sprzyjać ich wiązaniu do miejsca aktywnego enzymu poprzez utworzenie licznych oddziaływań hydrofobowych

z większą ilością reszt aminokwasowych o charakterze lipofilowym (Leu103, Phe104, Leu167, Val177, Phe178, Phe182, Leu185, Phe230, Phe233, Phe237, Thr484, Val486, Phe488, Trp550 oraz Phe553).



Rys.9.5. Miejsce aktywne STS ze znajdującymi się wewnątrz związkami **IIIc** (niebieski), **IIIh** (czerwony) oraz **V** (zielony).



Rys.9.6. Miejsce aktywne STS ze znajdującymi się wewnątrz związkiem **IIIj**.

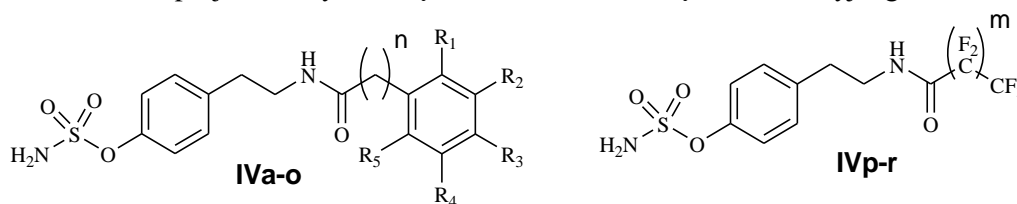
Co więcej, jak widać na przykładzie związku **IIIj** (**Rys.9.6.**), zarówno układ amidowy, jak i atomy fluoru potencjalnego inhibitora (w tym przypadku grupy $-CF_3$) znajdują się w bardzo bliskiej odległości od układu NH reszty aminokwasowej Arg98, co wskazuje na możliwość tworzenia oddziaływań stabilizujących kompleks enzym-ligand. Występowanie tych dodatkowych interakcji może mieć kluczowe znaczenie w wiązaniu potencjalnego inhibitora do miejsca aktywnego enzymu.

9.1.4. Modelowanie molekularne N-acylowanych pochodnych tyraminy zawierających w swojej konstytucji wiązania C-F

Kolejną klasą związków, dla których analizowałem wpływ atomów fluoru na aktywność inhibicyjną wobec STS były pochodne tyraminy. Zarówno amidosiarczanowe jak i fosforowe analogii tyraminy były już z powodzeniem wykorzystywane jako inhibitory STS [100]. Biorąc to po uwagę zaprojektowałem serię pochodnych **IVa-r** (**Tabela 9.4.**) zawierających w swej strukturze atomy fluoru, ugrupowanie trifluorometylowe, trifluorometoksyłowe lub grupę nitrową.

Korzystając z programu AutoDock Vina 1.1.2 wyznaczyłem wartości energii wiązania dla siedemnastu zaprojektowanych N-acylowanych pochodnych tyraminy (związki **IVa-r**). Szczegółowe dane otrzymane podczas etapu dokowania molekularnego przedstawiłem w **Tabeli 9.4.** Wartości energii wiązania wybranych związków okazały się satysfakcjonujące i mieściły się w zakresie od -4.4 do -6.7 kcal/mol (wartość energii wiązania dla związku referencyjnego **V** wyniosła -2.9 kcal/mol). Najniższą energią wiązania charakteryzował się analog **IVr**, dla którego wartość energii wiązania wyniosła -6.7 kcal/mol. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że związek **4g** jak również **4o** (tj. związki zawierające w swojej konstytucji ugrupowanie nitrowe) wykazywały wartości energii wiązania na poziomie odpowiednio -6.1 i -4.4 kcal/mol, a więc wartości porównywalne z pochodnymi zawierającymi atomy fluoru w projektowanych modelach.

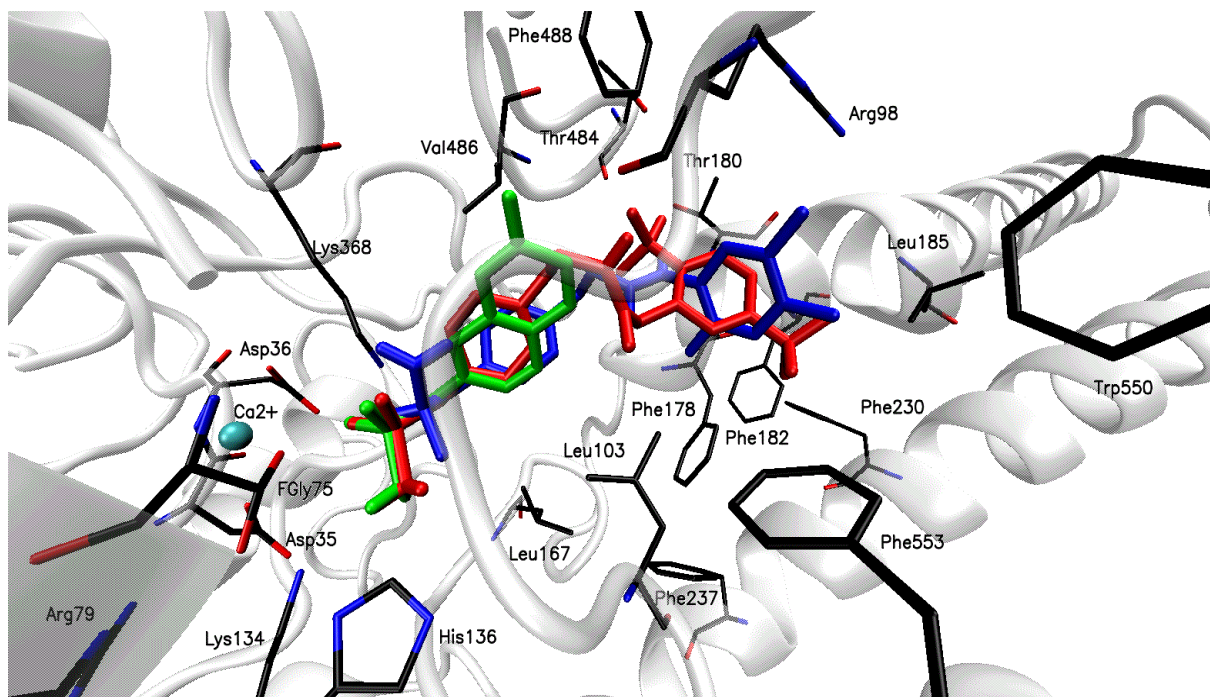
Tabela 9.4. Wyniki analiz dokowania molekularnego z wykorzystaniem programu AutoDock Vina 1.1.2 zaprojektowanych związków **IVa-r** oraz związku referencyjnego **V**.



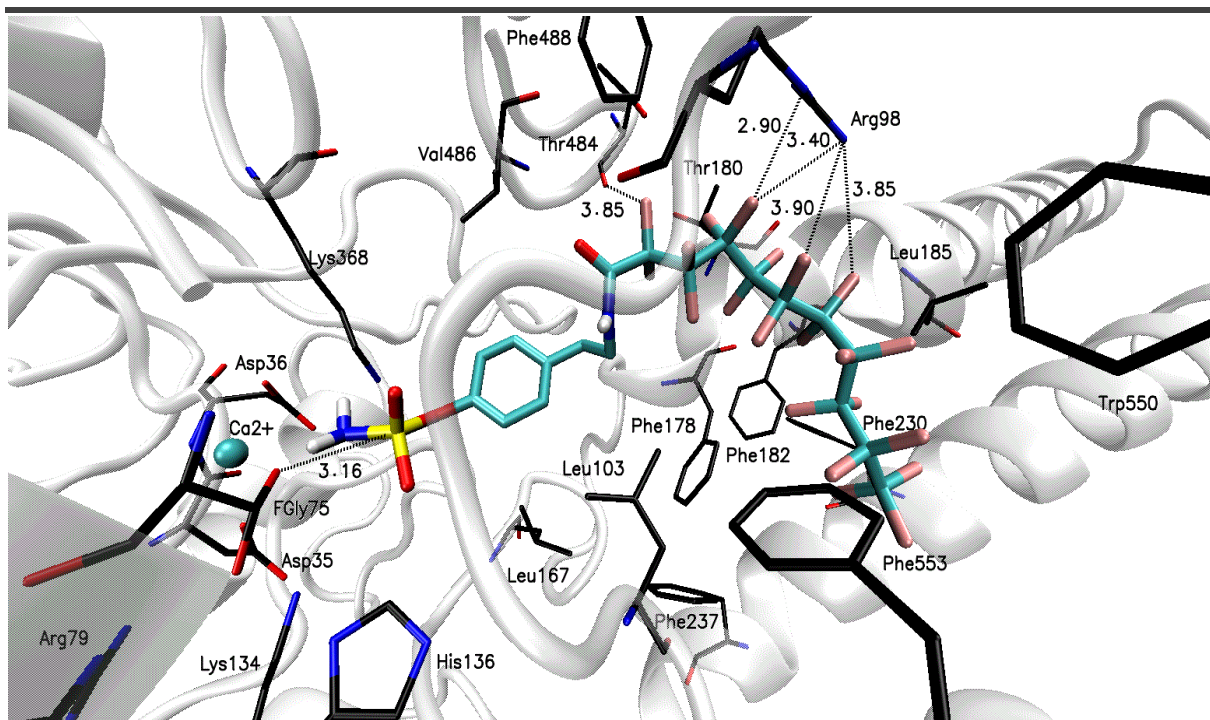
Nr związku	n	m	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Energia wiązania [kcal mol ⁻¹]
IVa	0		H	H	H	H	H	-5.5
IVb			H	H	F	H	H	-5.3
IVc			H	F	F	H	H	-5.6
IVd			F	H	F	F	H	-6.3
IVe			F	F	F	F	F	-6.0
IVf			H	H	CF ₃	H	H	-5.7
IVg			H	H	NO ₂	H	H	-6.1
IVh	1	-	H	H	H	H	H	-5.1
IVi			H	F	F	H	H	-5.4
IVj			H	F	F	F	H	-5.3
IVk			F	F	F	F	F	-5.9
IVl			H	CF ₃	F	H	H	-6.0
IVm			CF ₃	H	H	CF ₃	H	-6.3
IVn			H	H	OCF ₃	H	H	-5.5
IVo	H	H	NO ₂	H	H	-4.4		
IVp	-	8	-	-	-	-	-	-5.9
IVr	-	9	-	-	-	-	-	-6.7
V	-		-	-	-	-	-	-2.9

Prawdopodobne kompleksy enzym-ligand dla wybranych, potencjalnych inhibitorów **IVd** (niebieski), **IVm** (czerwony) oraz **IVr** (kolorowany CPK) przedstawiłem na **Rys.9.7.** oraz **Rys.9.8.** Również dla tej klasy związków zaobserwowałem, że ugrupowanie amidosiarczanowe (podobnie jak ma to miejsce w przypadku związku referencyjnego **V**) znajduje się w bezpośrednim kontakcie z koordynowaną do jonu Ca²⁺ resztą FGly75 (odległości pomiędzy atomami siarki zaprojektowanych analogów oraz grupy hydroksylowej FGly75 wynosiły około 3 Å) oraz pozostałymi katalitycznie istotnymi resztami aminokwasowymi (Asp35, Asp36, Arg79, Lys134, His136 and Lys368). Doskonałe dopasowanie do miejsca wiązania enzymu odpowiada za bliski kontakt fluorowanych, niepolarnych rdzeni potencjalnych inhibitorów z wieloma resztami aminokwasowymi o charakterze lipofilowym (Leu103, Phe104, Leu167, Val177, Phe178, Phe182, Leu185,

Phe230, Phe233, Phe237, Thr484, Val486, Phe488, Trp550 oraz Phe553), co sugeruje możliwość występowania licznych oddziaływań hydrofobowych.



Rys.9.7. Miejsce aktywne STS ze znajdującymi się wewnątrz związkami **IVd** (niebieski), **IVm** (czerwony) oraz **V** (zielony).



Rys.9.8. Miejsce aktywne STS ze znajdującymi się wewnątrz związkiem **IVr**.

Ponadto, można zauważyć (**Rys.9.8.**), że po związaniu potencjalnego inhibitora **IVr** przez enzym, atomy fluoru znajdują się w niewielkiej odległości do heteroatomów należących do dwóch reszt aminokwasowych budujących miejsce aktywne STS (ugrupowań NH reszty Arg98 oraz OH reszty Thr484). Ta niewielka odległość może świadczyć o występowaniu dodatkowych, elektrostatycznych oddziaływań stabilizujących kompleks enzym-inhibitor.

9.2. Synteza

W kolejnym etapie badań przystąpiłem do syntezy czterech serii potencjalnych inhibitorów STS, t.j. związków **Ia-h**, **Ila-g**, **IIla-k** oraz **IVa-r**. Syntezę zaprojektowanych pochodnych rozpocząłem od otrzymania amidosiarczanowych pochodnych 3-fenylokumaryny zawierających w swojej konstytucji ugrupowania fosforowe **Ia-h**. W związku z tym, że jeden z etapów syntezy związków **Ia-h** polegał na fosforylacji grupy $-NH_2$, swoją pracę syntetyczną poprzedziłem badaniami związanymi z selektywną *N*- oraz *O*-fosforylacją układów zawierających jednocześnie w swojej konstytucji połączenia $C_{Ar}-OH$ oraz $C_{Ar}-NH_2$.

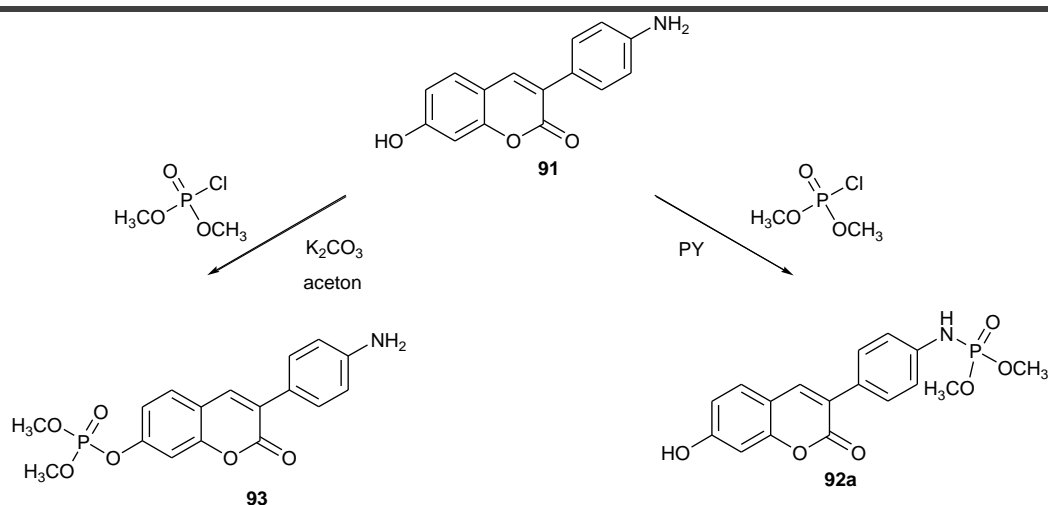
9.2.1. Selektywna *N*- i *O*-fosforylacja

Pochodne fosforoorganiczne stanowią liczną grupę związków, o których wiadomo, że wykazują różnorodną aktywność biologiczną. Cząsteczki, w których strukturze występuje ugrupowanie fosforowe były nie tylko z powodzeniem wykorzystywane w opracowywaniu terapii leczenia osteoporozy, ale również chorób wirusowych czy nowotworowych [9, 140]. W związku z powyższym, badania nad metodami selektywnego wprowadzania ugrupowań fosforowych do konstytucji związków biologicznie aktywnych, wydają się niezwykle istotne w kontekście otrzymywania nowych terapeutyków.

Jednym z etapów zaplanowanej syntezy pierwszej serii potencjalnych inhibitorów STS **Ia-h** była selektywna fosforylacja grupy aminowej w obecności układu fenolowego w cząsteczce 3-(4-aminofenilo)-7-hydroksy-kumaryny **91** (będącej jednym z półproduktów w syntezie związków **Ia-h** - rozdział 9.2.2.).

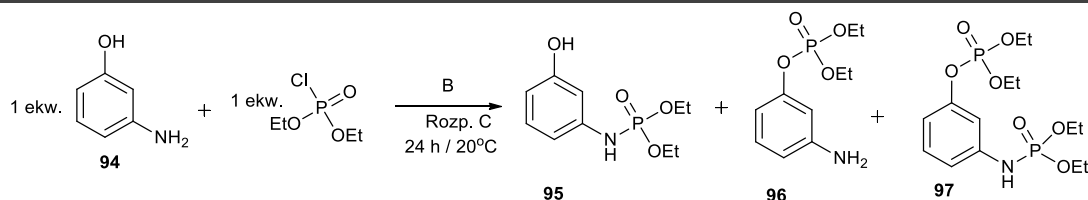
Istnieje wiele metod wprowadzania grup fosforowych do konstytucji związków organicznych. Mogą się one opierać na bezpośredniej fosforylacji (z wykorzystaniem chemii fosforu czterokoordinacyjnego) lub fosfitylacji (poprzez chemię fosforu trójkoordinacyjnego), a następnie utlenianiu powstałego fosforynu. Jedną z najczęściej wykorzystywanych metod wprowadzania podstawników fosforowych jest zastosowanie chlorofosforanów i chlorofosforynów.

Powodem mojego zainteresowania się tematem selektywnej fosforylacji układów, w których obok funkcji fenolowej występuje jednoczenie aromatyczna amina, była obserwacja poczyniona podczas syntezy analogu **92a**. Podczas fosforylacji 3-(4-aminofenylo)-7-hydroksy-kumaryny **91** chlorofosforanem dimetylu w obecności węgla potasu w acetonie z mieszaniny reakcyjnej wyizolowałem produkt *O*-fosforylacji **93** (Schemat 9.1.) z wydajnością 50 %. Sytuacja ta zmusiła mnie do opracowania innej, skutecznej metody fosforylacji aromatycznej aminy w obecności układu fenolowego (bez konieczności ochrony funkcji fenolowej).



Schemat 9.1. Fosforylacja 3-(4-aminofenylo)-7-hydroksy-kumaryny **91**.

Przedstawiony powyżej problem stał się powodem przeprowadzenia przeze mnie szeregu eksperymentów związanych z selektywną fosforylacją prostego układu aromatycznego zawierającego w swojej konstytucji grupy $-\text{OH}$ oraz $-\text{NH}_2$. Jako model do eksperymentów wybrałem 3-aminofenol **94**, który w różnorodnych warunkach poddawałem reakcjom z odpowiednimi pochodnymi chlorofosforanów i chlorofosforynów.



Schemat 9.2. Selektywna fosforylacja 3-aminofenolu **94** chlorofosforanem dietylu przez 24 godziny w temperaturze pokojowej wobec różnych zasad i rozpuszczalników.

Początkowo, jako środek fosforylujący zastosowałem chlorofosforan dietylu, który poddawałem reakcjom z 3-aminofenolem **94** przez 24 godziny w temperaturze pokojowej wobec różnych zasad oraz rozpuszczalników otrzymując produkty **95**, **96** i **97** (Schemat 9.2.). Uzyskane w toku przeprowadzonych eksperymentów wyniki zestawilem w Tabeli 9.5..

Tabela 9.5. Wyniki reakcji 4-aminofenolu **94** z chlorofosforanem dietylu przez 24 godziny w temperaturze pokojowej wobec różnych zasad oraz rozpuszczalników.

Nr eksp.	Zasada B	Rozp. C	Wydajność produktu 95	Wydajność produktu 96	Wydajność produktu 97
1	2.05 ekw. K ₂ CO ₃	Aceton	-	28 %	30 %
2	-	PY	78 %	-	-
3	1.05 ekw. NEt ₃	THF	81 %*	-	-

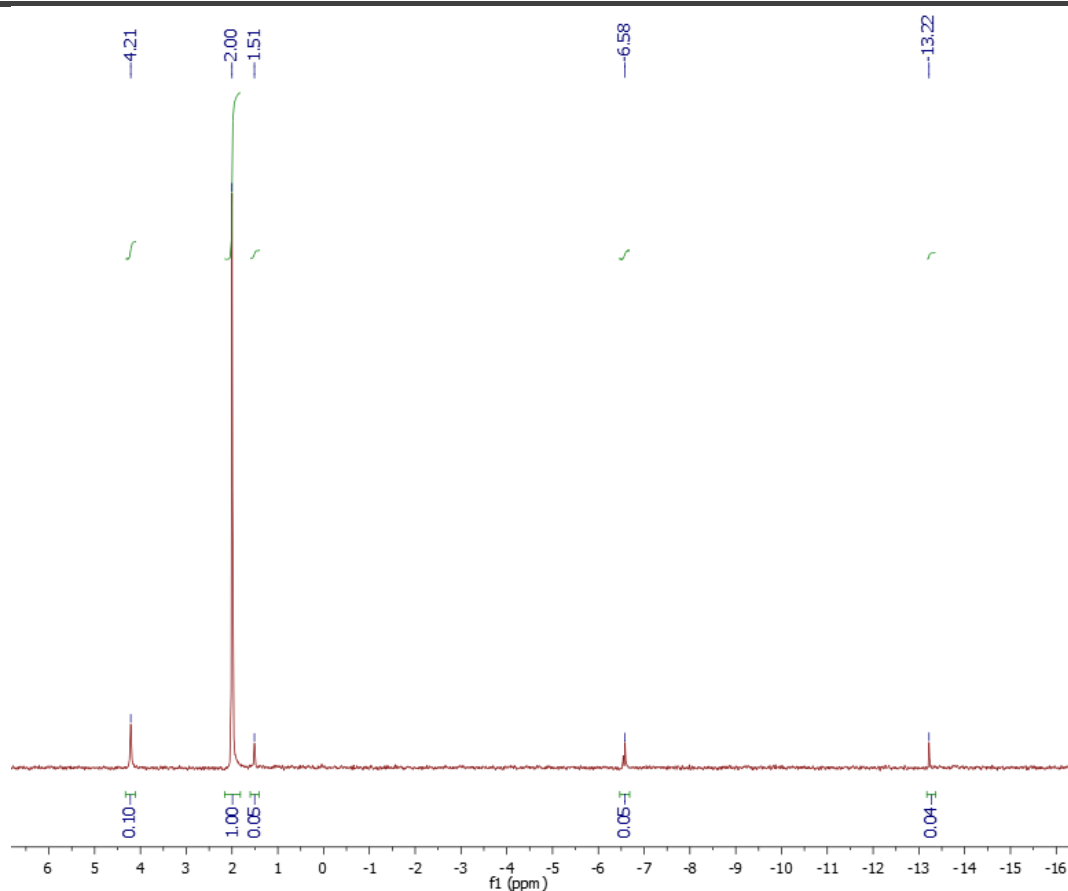
* wydajność wyznaczona na podstawie widma ³¹P NMR

W pierwszym etapie, przeprowadziłem eksperyment polegający na fosforylacji układu 3-aminofenolu **94** jednym ekwiwalem chlorofosforanu dietylu w bezwodnym acetonie wobec K₂CO₃ w temperaturze pokojowej. Po 24 godzinach prowadzenia reakcji w mieszaninie reakcyjnej powstał produkt *O*-fosforylacji **96**, który udało mi się wyizolować z wydajnością 28 %. Jednakże, poza pochodną **96**, na drodze chromatografii kolumnowej udało mi się wyizolować z wydajnością 30 % drugi produkt reakcji, t.j. związek **97**, fosforylowany zarówno na atomie tlenu jak i azotu. Struktury otrzymanych pochodnych **96** i **97** potwierdziłem na podstawie widm ¹H NMR i ³¹P NMR [δ (ppm): -6.41 dla związku **96** oraz δ (ppm): 1.58, -6.48 dla związku **97**].

Następnie, przeprowadziłem eksperyment polegający na reakcji 3-aminofenolu **94** z jednym ekwiwalem chlorofosforanu dietylu w bezwodnej pirydynie (PY) prowadząc reakcję przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Z tej mieszaniny reakcyjnej wyizolowałem na drodze chromatografii kolumnowej produkt *N*-fosforylacji **95** z wydajnością 78 %. Strukturę związku potwierdziłem na podstawie widm ¹H NMR i ³¹P NMR [δ (ppm): 2.27].

W kolejnym kroku, 3-aminofenol **94** traktowałem przez 24 godziny w temperaturze pokojowej jednym ekwiwalem chlorofosforanu dietylu wobec trietyloaminy (NEt₃) w bezwodnym tetrahydrofuranie (THF). Przebieg reakcji monitorowałem techniką chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na żelu krzemionkowym w układzie metanol : dichlorometan (1 : 20). Po 3 godzinach prowadzenia reakcji obraz chromatograficzny

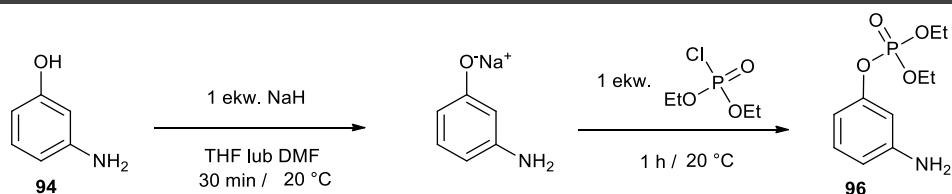
mieszaniny reakcyjnej przedstawiał dwie plamy (pochodzące od nieprzereagowanego 3-aminofenolu **94** oraz produktu *N*-fosforylacji **95**). Analiza widma ^{31}P NMR mieszaniny reakcyjnej (**Rys. 9.9.**) po 24 godzinach wskazała na obecność pięciu sygnałów fosforowych przy wartości przesunięcia chemicznego 4.21, 2.00, 1.51, -6.58, -13.22 ppm. Zdecydowanie najbardziej intensywny sygnał przy δ (ppm): 2.27 odpowiadał produktowi *N*-fosforylacji **95** (dodatek wzorca **95** do rurki NMR spowodował wzrost intensywności tego sygnału). Produktów powyższej reakcji nie izolowałem, jednakże wydajność powstałej pochodnej **95** oszacowałem na 81 % (na podstawie widma ^{31}P NMR mieszaniny reakcyjnej po 24 godzinach).



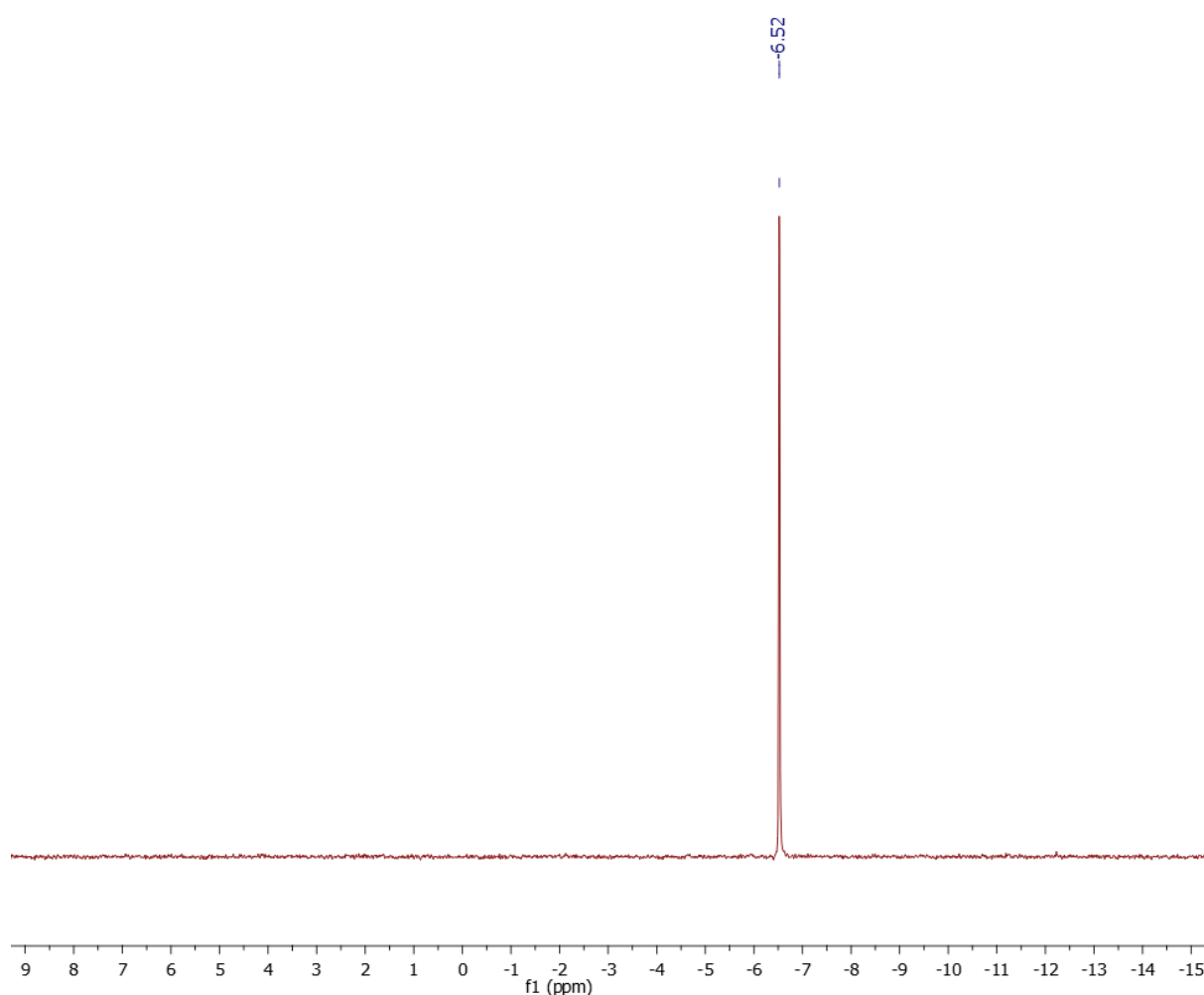
Rys.9.9. Widmo ^{31}P NMR po 24 godzinach reakcji 4-aminofenolu **94** z jednym ekwiwalentem chlorofosforanu dietylu wobec NEt_3 w bezwodnym THF w temperaturze pokojowej.

Biorąc pod uwagę wynik eksperymentu fosforylacji 3-aminofenolu **94** wobec K_2CO_3 , postanowiłem sprawdzić czy zwiększenie właściwości nukleofilowych grupy $-\text{OH}$ wpłynie na wydajność tworzenia się produktu *O*-fosforylacji **96**. W tym celu w pierwszej kolejności rozpuszczony w bezwodnym THF 3-aminofenol **94** potraktowałem wodorkiem sodu (NaH) generując w ten sposób anion fenolanowy (**Schemat 9.3.**). Następnie, po utworzeniu fenolanu, do mieszaniny wprowadziłem jeden ekwiwalent chlorofosforanu dietylu. Reakcję

fosforylacji prowadziłem przez 1 godzinę w temperaturze 20 °C, po której to wykonałem widmo ^{31}P NMR mieszaniny reakcyjnej. Zgodnie z oczekiwaniami na widmie manifestował się jeden główny sygnał rezonansowy odpowiadający grupie fosforowej produktu *O*-fosforylacji **96** przy wartości przesunięcia chemicznego -6.52 ppm (**Rys. 9.10**).

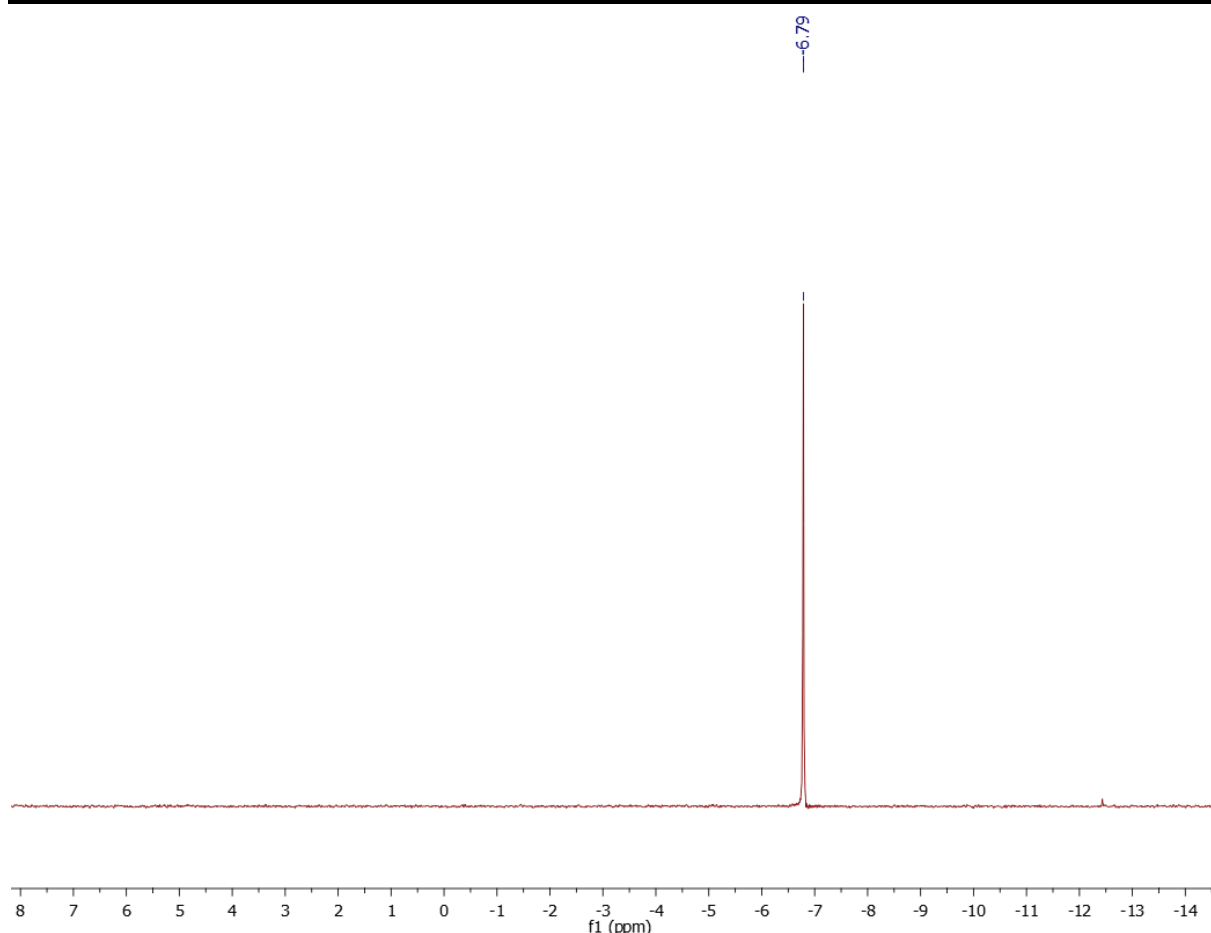


Schemat 9.3. Reakcja fosforylacji 3-aminofenolu **94** chlorofosforanem dietylu z wykorzystaniem NaH.



Rys.9.10. Widmo ^{31}P NMR po 1 godzinie reakcji fenolanu 4-aminofenolu **94** z jednym ekwiwalentem chlorofosforanu dietylu w bezwodnym THF w temperaturze pokojowej.

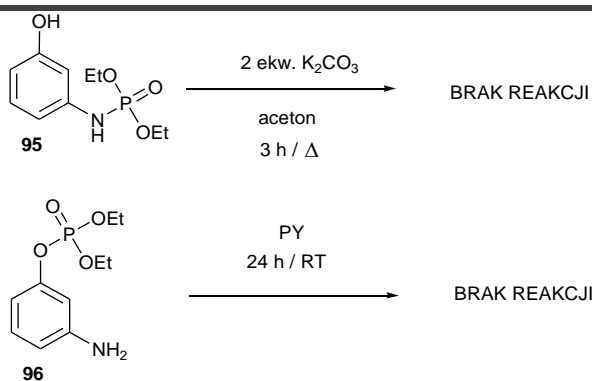
Analogiczną reakcję fosforylacji grupy fenolanowej przeprowadziłem gdy jako rozpuszczalnik wykorzystałem *N,N*-dimetyloformamid (DMF) (**Schemat 9.3.**). W tym przypadku również już po 1 godzinie od wprowadzenia chlorofosforanu dietylu do roztworu zgenerowanego fenolanu na widmie ^{31}P NMR obecny był jeden główny sygnał rezonansowy odpowiadający grupie fosforowej produktu *O*-fosforylacji **96** przy wartości przesunięcia chemicznego -6.79 ppm (**Rys. 9.11.**).



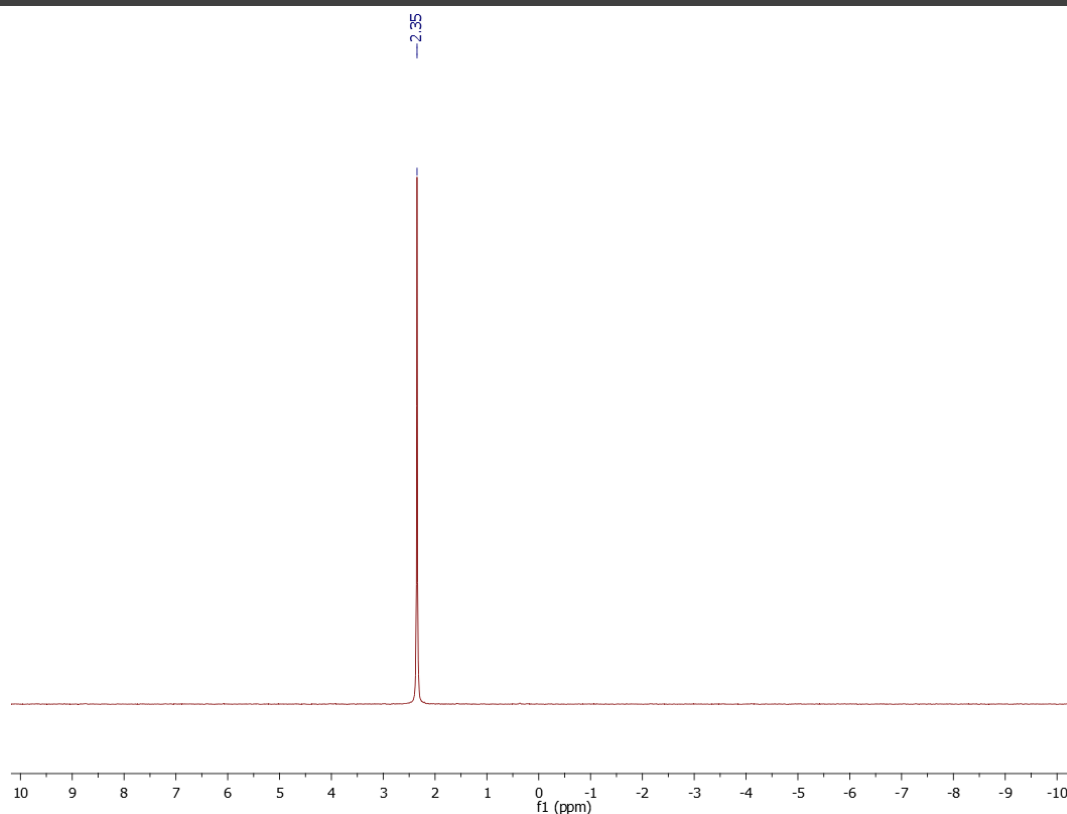
Rys.9.11. Widmo ^{31}P NMR po 1 godzinie reakcji fenolanu 4-aminofenolu **94** z jednym ekwiwalem chlorofosforanu dietylu w bezwodnym THF w temperaturze pokojowej.

Badania nad reakcjami fosforylacji układu 3-aminofenolu **94** skłoniły mnie do przeprowadzenia dwóch kolejnych eksperymentów związanych z możliwością transfosforylacji (**Schemat 9.4.**). W tym celu produkt *N*-fosforylacji **95** ogrzewałem przez trzy godziny w obecności K_2CO_3 . Widmo ^{31}P NMR (**Rys. 9.12.**) mieszaniny reakcyjnej wskazało na obecność jednego sygnału fosforowego o wartości przesunięcia chemicznego δ (ppm): 2.35, odpowiadającego związkowi **95**. Wynik tego eksperymentu wyklucza migrację reszty fosforowej z atomu azotu na atom tlenu w warunkach przeprowadzonego eksperymentu. Również traktowanie przez dobę w temperaturze pokojowej produktu

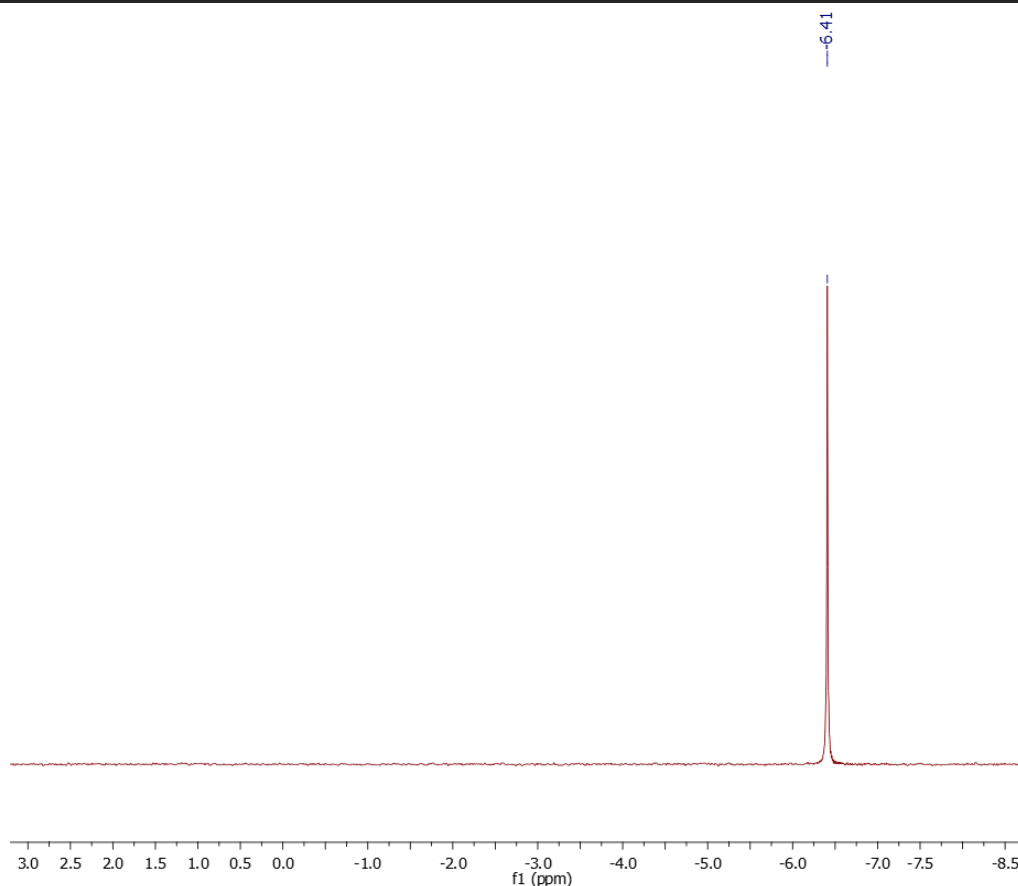
O-fosforylacji **96** bezwodną pirydyną nie spowodowało powstania pochodnej *N*-fosforylowanej **95**. Na widmie ^{31}P NMR (**Rys. 9.13.**) tej mieszaniny reakcyjnej manifestował się jeden sygnał rezonansowy o wartości przesunięcia chemicznego δ (ppm): -6.41. Wyniki powyższych eksperymentów jednoznacznie wskazują, że zarówno proces *O* jak i *N*-fosforylacji 3-aminofenolu **94** jest procesem bezpośrednim, a w powstałych produktach nie obserwuje się migracji ugrupowania fosforowego pomiędzy układem fenolowym i aminowym.



Schemat 9.4. Transfosforylacja związku **95** oraz **96**.

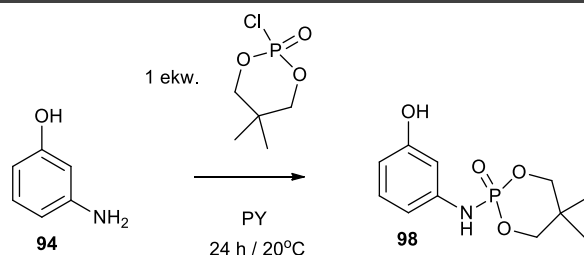


Rys.9.12. Widmo ^{31}P NMR po 3 godzinach ogrzewania pochodnej **95** wobec K_2CO_3 w bezwodnym acetonie.



Rys.9.13. Widmo ^{31}P NMR po 24 godzinach traktowania pochodnej **96** bezwodną pirydyną w temperaturze pokojowej.

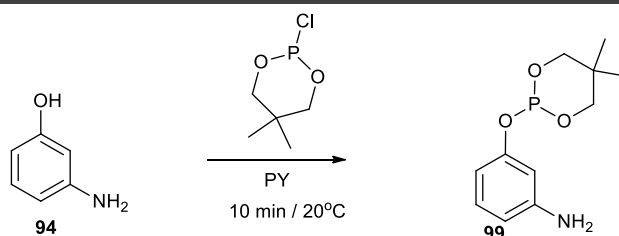
W kontekście otrzymywania potencjalnych inhibitorów STS **Ia-h**, gdzie jednym z etapów zaplanowanej syntezy była selektywna fosforylacja grupy aminowej w obecności układu fenolowego (rozdział 9.2.2.), postanowiłem sprawdzić czy istnieje możliwość selektywnej fosforylacji grupy $-\text{NH}_2$ stosując inne pochodne chlorofosforanów. W związku z powyższym przeprowadziłem reakcję fosforylacji 3-aminofenolu **94** z wykorzystaniem neopentylideno chlorofosforanu w bezwodnej pirydynie (**Schemat 9.5.**). Uzyskany wynik okazał się analogiczny do tego, jaki zaobserwowałem kiedy środkiem fosforylującym był chlorofosforan dietylu. Po 24 godzinach prowadzenia reakcji z jednym ekwiwalentem neopentylideno chlorofosforanu w temperaturze pokojowej w bezwodnej pirydynie otrzymałem ilościowo produkt *N*-fosforylacji **98** (którego strukturę potwierdziłem na podstawie widm ^1H NMR oraz ^{31}P NMR).



Schemat 9.5. Reakcja fosforylacji 3-aminofenolu **94** z wykorzystaniem neopentylidenochlorfosforanu w bezwodnej pirydynie.

W literaturze chemicznej znane są przykłady gdzie zarówno pierwszo jak i drugorzędową grupę hydroksylową (m.in. w nukleozydach), selektywnie fosfitylowano trójkoordynacyjnym, fosforowym odczynnikiem elektrofilowym w obecności grupy aminowej [141-143]. Jednakże, prace te dotyczą selektywnej fosfitylacji pierwszo oraz drugorzędowego alkoholu, a nie fenolu.

Zachęcony interesującymi wynikami związanymi z selektywną fosforylacją 3-aminofenolu **94** postanowiłem sprawdzić czy podobne wyniki uzyskam wykorzystując chemię trójkoordynacyjnego fosforu. W tym celu, 3-aminofenol **94** poddałem reakcji z neopentylidenochlorofosforynem w bezwodnej pirydynie otrzymując produkt *O*-fosfitylacji **99** (Schemat 9.6.), którego strukturę potwierdziłem na podstawie widm ¹H NMR oraz ³¹P NMR. Reakcja fosfitylacji była znacznie szybsza w porównaniu z reakcją fosforylacji, a wydajność wyizolowanego na drodze chromatografii kolumnowej produktu **99** wyniosła 79 %. Obserwacja przebiegu reakcji z wykorzystaniem ³¹P NMR wskazała na brak środka fosfitylującego w mieszaninie reakcyjnej już po 10 minutach od jego wprowadzenia do mieszaniny reakcyjnej. Powstanie produktu *O*-fosfitylacji **99** w reakcji 3-aminofenolu **94** z neopentylidenochlorofosforynem w pirydynie dowodzi, że koncepcja wykorzystania pochodnych fosforu trójkoordynacyjnego do syntezy *N*-fosfitylowanych analogów 3-(4-aminofenylo)-7-hydroksy-kumaryny nie może zostać zastosowana.



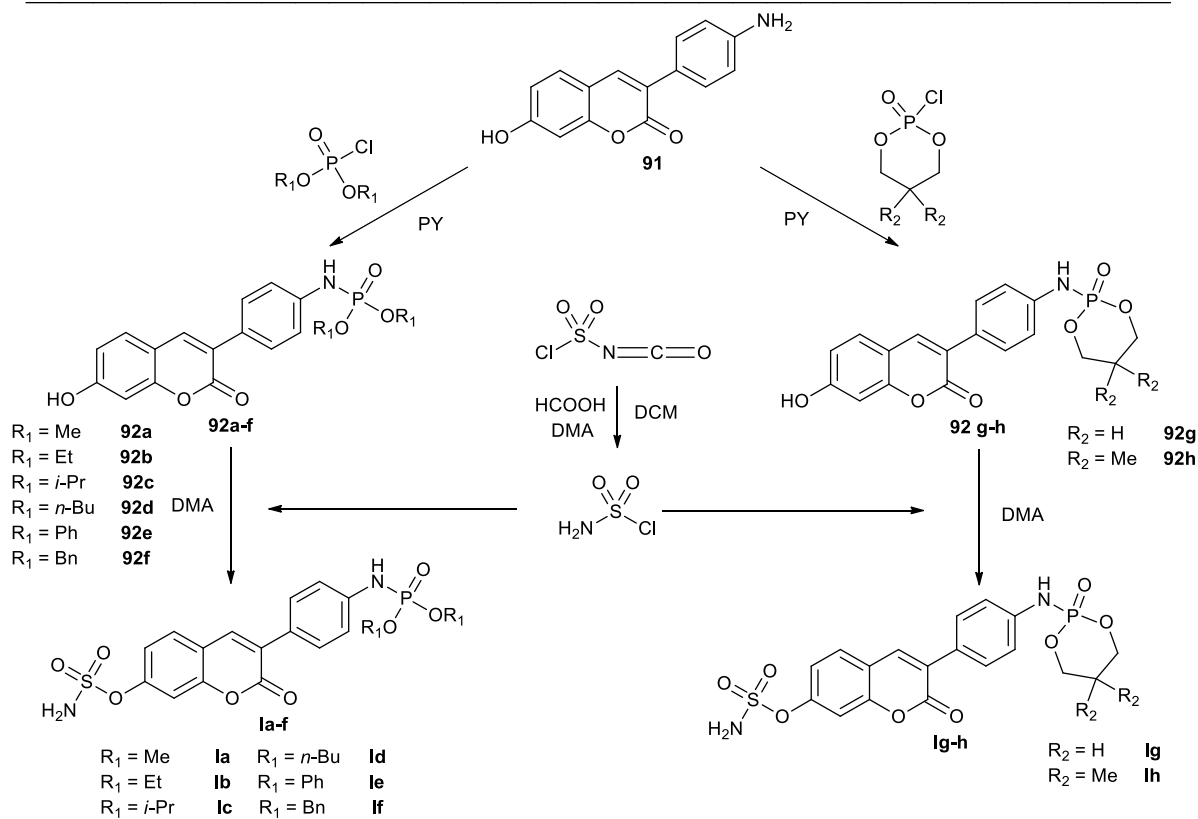
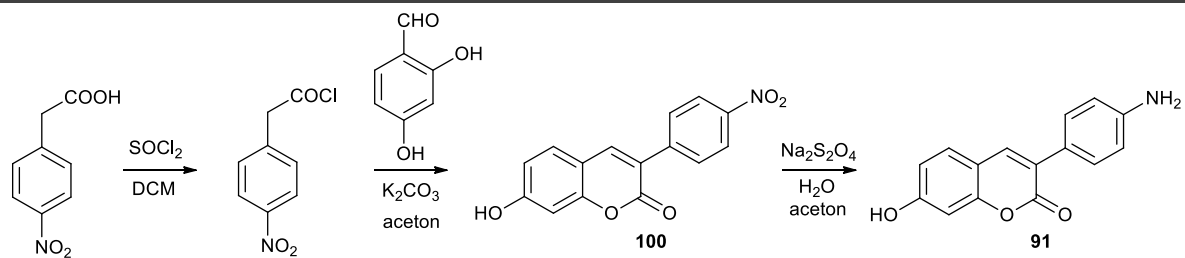
Schemat 9.6. Fosfitylacja 3-aminofenolu **94** z wykorzystaniem neopentylidenochlorfosforynu w bezwodnej pirydynie.

Na podstawie wszystkich wyników wyżej opisanych eksperymentów podjąłem decyzję, iż w celu wprowadzenia reszty fosforanowej na grupę aminową 3-(4-aminofenylo)-7-hydroksy-kumaryny **91** wykorzystam chemię czterokoordynacyjnego fosforu (stosując odpowiednie chlorofosforany dialkylowe w bezwodnej pirydynie).

9.2.2. Synteza amidosiarczanowych pochodnych 3-fenylokumaryny zawierających w swojej konstytucji ugrupowania fosforowe

Synteza zaprojektowanych związków **Ia-h** opierała się na trzech głównych etapach (**Schemat 9.7.**). Pierwszy etap syntezy pochodnych **Ia-h** polegał na otrzymaniu 3-(4-aminofenylo)-7-hydroksy-kumaryny **91**. W tym celu chlorek 4-nitrofenyloacetylu (otrzymany w reakcji kwasu 4-nitrofenylooctowego z chlorkiem tionylu) poddałem reakcji z 2,4-dihydroksybenzaldehydem w obecności węglanu potasu. Następnie, otrzymaną 7-hydroksy-3-(4-nitrofenylo)-kumarynę **100**, redukowałem do 3-(4-aminofenylo)-7-hydroksy-kumaryny **91** z wykorzystaniem podsiarczyny sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Produkt tej reakcji izolowałem z zadowalającą wydajnością 58 %.

Drugim etapem syntezy była selektywna fosforylacja grupy aminowej 3-(4-aminofenylo)-7-hydroksy-kumaryny **91**. Biorąc pod uwagę wyniki eksperymentów związanych z selektywną fosforylacją i fosfitylacją układu 3-aminofenolu, które wskazywały na brak możliwości zastosowania chlorków fosforynów jako środków służących do selektywnej fosfitylacji grupy aminowej (*rozdział 9.2.1.*), postanowiłem, że w celu *N*-fosforylacji 3-(4-aminofenylo)-7-hydroksy-kumaryny **91** zastosuję chlorofosforany. W wyniku reakcji 3-(4-aminofenylo)-7-hydroksy-kumaryny **91** z odpowiednimi chlorofosforanami, którą przeprowadziłem w bezwodnej pirydynie, izolowałem z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej, z dobrymi wydajnościami (60 – 78 %) pożądane pochodne **92a-h**. W ostatnim etapie, rozpuszczone w *N,N*-dimtyloacetamidzie (DMA) związki **92a-h** traktowałem $\text{H}_2\text{NSO}_2\text{Cl}$, otrzymując ostatecznie potencjalne inhibitory **Ia-h**, których struktury potwierdziłem na podstawie analizy widm ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{31}P NMR, IR oraz MS.

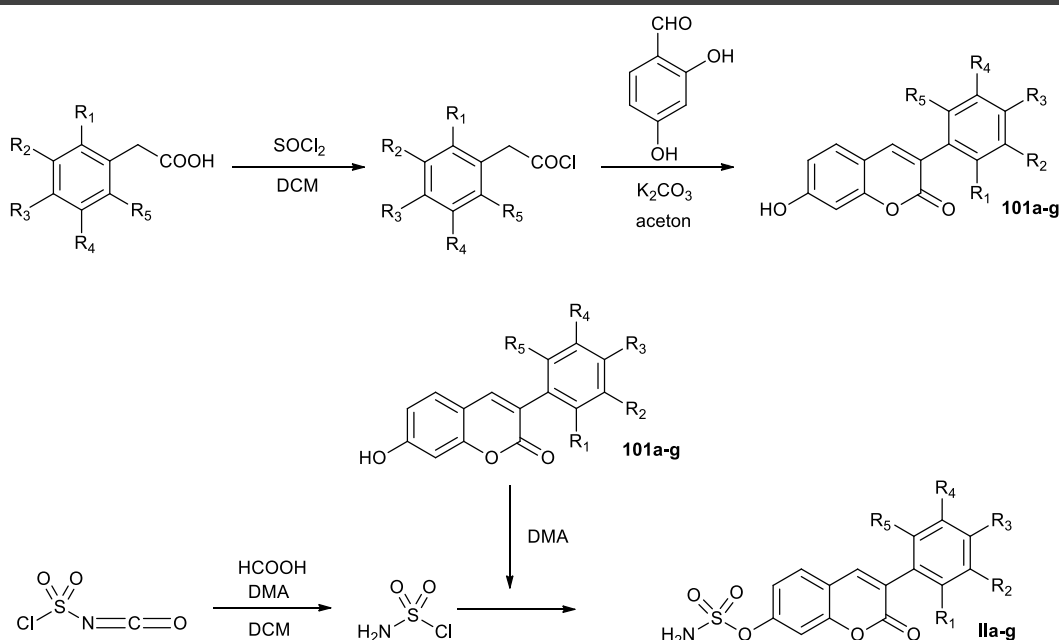


Nr związku	R_1	R_2
Ia	Me	-
Ib	Et	-
Ic	<i>i</i> -Pr	-
Id	<i>n</i> -Bu	-
Ie	Ph	-
If	Bn	-
Ig	-	H
Ih	-	Me

Schemat 9.7. Szlak syntezy potencjalnych inhibitorów **Ia-h** ($R_1 = \text{Me}, \text{Et}, i\text{-Pr}, n\text{-Bu}, \text{Ph}, \text{Bn}$; $R_2 = \text{H}, \text{Me}$).

9.2.3. Synteza amidosiarczanowych pochodnych 3-fenylokumaryny zawierających w swojej konstytucji wiązania C-F

Kolejnym krokiem na drodze realizacji zadań mojej pracy doktorskiej była synteza związków zawierających w swojej konstytucji ugrupowanie amidosiarczanowe oraz podstawniki fluorowe, jako potencjalnych inhibitorów STS. Pierwszą serią związków, jaką postanowiłem otrzymać na drodze syntetycznej były pochodne oparte o rdzeń 3-fenylokumaryny. Po etapie analiz z wykorzystaniem technik dokowania molekularnego rozpocząłem syntezę sześciu amidosiarczanowych analogów 3-fenylokumaryny zawierających w swojej konstytucji wiązania C-F (związki **IIb-g**) oraz jednego **IIa**, w którym takie wiązania nie występują. Wszystkie zaplanowane związki otrzymałem na drodze jednej procedury syntetycznej, którą przedstawiłem na **Schemacie 9.8.**



Nr związku	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
IIa	H	H	H	H	H
IIb	H	F	F	H	H
IIc	H	F	F	F	H
IId	F	F	F	F	F
IIe	CF ₃	H	H	CF ₃	H
IIf	H	CF ₃	F	H	H
IIg	H	H	OCF ₃	H	H

Schemat 9.8. Szlak syntezy potencjalnych inhibitorów **IIa-g** (R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ = H, F, CF₃, OCF₃).

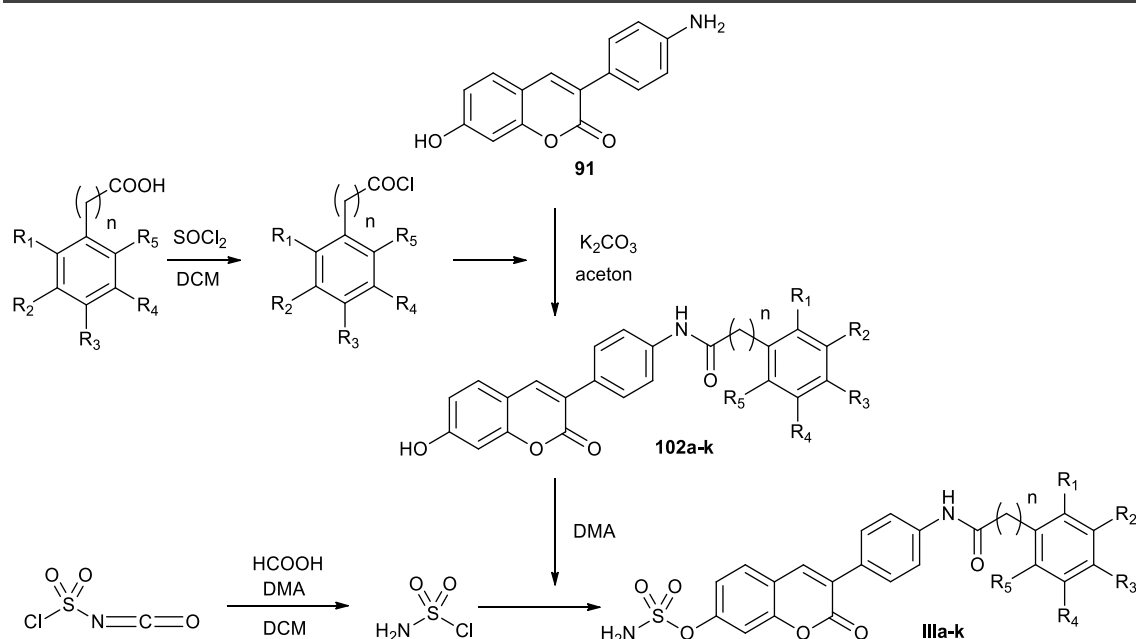
W pierwszym etapie syntezy chlorki kwasowe pochodnych kwasu fenyllooctowego (generowane w reakcji odpowiednich pochodnych kwasu fenyllooctowego z chlorkiem

tionylu) poddałem reakcji z 2,4-dihydroksybenzaldehydem w obecności węgla potasu, w wyniku której z dobrą wydajnością (62 – 80 %) otrzymałem pochodne 7-hydroksy-3-fenylokumaryny **101a-g**. Następnie, rozpuszczone w DMA związki **101a-g** traktowałem $\text{H}_2\text{NSO}_2\text{Cl}$ (otrzymanym *in situ* w reakcji izocyjanianu chlorosulfurylu z kwasem mrówkowym w obecności katalitycznej ilości DMA), otrzymując potencjalne inhibitory **IIa-g**. Wydajności tego etapu syntezy były wysokie i sięgały 90 %. Struktury otrzymanych związków **IIa-g** potwierdziłem na podstawie analizy widm ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR oraz MS.

9.2.4. Synteza *N*-acylowanych pochodnych 3-(4-aminofenylo)-kumaryny zawierających w swojej konstytucji ugrupowanie amidosiarczanowe oraz wiązania C-F

Wyniki analiz modelowania molekularnego sugerowały, iż w miejscu aktywnym STS znajduje się wystarczająco dużo miejsca aby do pierścienia fenyłowego 3-fenylokumaryny wprowadzić podstawnik o znacznie większej objętości. Wobec powyższego, postanowiłem podstawowy szkielet 3-fenylokumaryny rozbudować wprowadzając do struktury chemicznej związków dodatkowy, fluorowany pierścień aromatyczny poprzez wiązanie amidowe. Efektem mojej pracy była synteza jedenastu kolejnych potencjalnych inhibitorów STS (**IIIa-k**).

Koncepcja syntezy związków **IIIa-h** opierała się na dwóch etapach, które przedstawiłem na **Schemacie 9.9**. W pierwszym etapie związek **91** *N*-acylowałem chlorkami benzoilu lub fenyloacetylu zawierającymi w swojej konstytucji wiązania C-F w obecności węgla potasu. W wyniku tej reakcji z dobrą wydajnością (62 – 75 %) otrzymałem pochodne **102a-k**. Ostatnim etapem syntezy było wprowadzenie ugrupowania amidosiarczanowego do struktury związków **102a-k**. W tym celu, rozpuszczone w DMA związki **102a-k** traktowałem uprzednio zgenerowanym $\text{H}_2\text{NSO}_2\text{Cl}$, otrzymując potencjalne inhibitory **IIIa-k**. Struktury otrzymanych związków **IIIa-k** potwierdziłem na podstawie analizy widm ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR oraz MS.

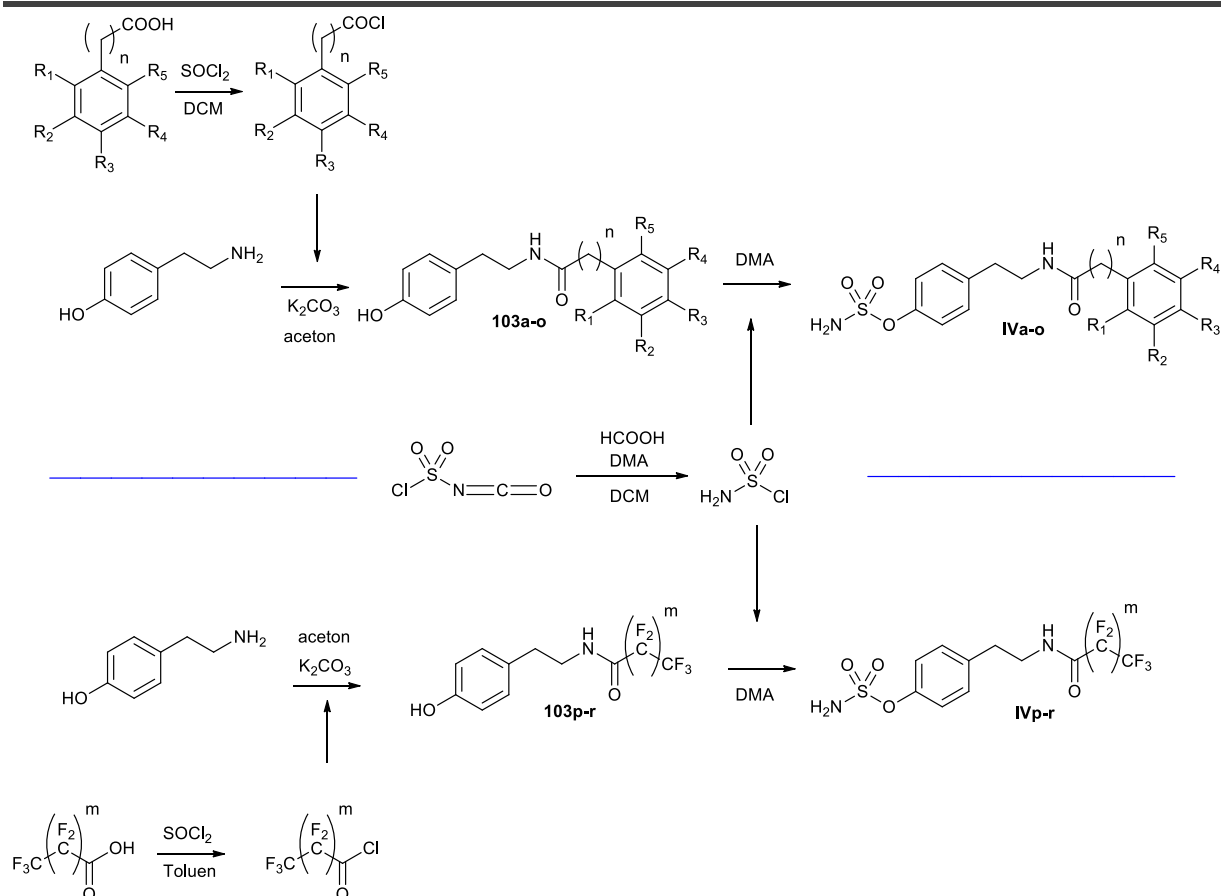


Nr związku	n	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
IIIa	0	H	H	H	H	H
IIIb		H	H	F	H	H
IIIc		H	F	F	H	H
IIId		F	F	F	F	F
IIIe		H	H	H	H	H
IIIf	1	H	F	F	H	H
IIIg		H	F	F	F	H
IIIh		F	F	F	F	F
IIIi		H	CF ₃	F	H	H
IIIj		CF ₃	H	H	CF ₃	H
IIIk		H	H	OCF ₃	H	H

Schemat 9.9. Schemat syntezy potencjalnych inhibitorów **IIIa-k** ($R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 = H, F, CF_3, OCF_3, NO_2; n = 0, 1$).

9.2.5. Synteza *N*-acylowanych pochodnych tyraminy zawierających w swojej konstytucji wiązania C-F

Po etapie badań modelowania molekularnego, sugerujących dobre dopasowanie zaprojektowanych analogów do miejsca aktywnego STS, rozpocząłem syntezę siedemnastu amidosiarczanowych analogów *N*-acylowanej tyraminy **IVa-r**, w przypadku których większość zawierała w swojej konstytucji wiązania C-F.



Nr związku	n	m	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅		
IVa	0		H	H	H	H	H		
IVb			H	H	F	H	H		
IVc			H	F	F	H	H		
IVd			F	H	F	F	H		
IVe			F	F	F	F	F		
IVf			H	H	CF ₃	H	H		
IVg			H	H	NO ₂	H	H		
IVh	1	-	H	H	H	H	H		
IVi			H	F	F	H	H		
IVj			H	F	F	F	H		
IVk			F	F	F	F	F		
IVl			H	CF ₃	F	H	H		
IVm			CF ₃	H	H	CF ₃	H		
IVn			H	H	OCF ₃	H	H		
IVo			H	H	NO ₂	H	H		
IVp			-	8	-	-	-	-	-
IVr			-	9	-	-	-	-	-

Schemat 9.10. Schemat syntezy potencjalnych inhibitorów **IVa-r** (R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ = H, F, CF₃, OCF₃, NO₂; n = 0, 1; m = 8, 9).

Wszystkie zaplanowane związki otrzymałem na drodze jednej procedury syntetycznej, przedstawionej na **Schemacie 9.10.** W pierwszym etapie syntezy, *N*-acylowane pochodne tyraminy **103a-r** otrzymałem na drodze reakcji chlorków perfluorodekanoilu i perfluoroundekanoilu oraz odpowiednich, fluorowanych pochodnych chlorków benzoilu lub fenyloactylu w obecności węglanu potasu. Następnie do otrzymanych związków **103a-r** wprowadziłem ugrupowanie amidosiarczanowe. W tym celu, rozpuszczone w DMA odpowiednie pochodne **103a-r** traktowałem uprzednio zgenerowanym $\text{H}_2\text{NSO}_2\text{Cl}$, otrzymując, po standardowym procesie izolacji, potencjalne inhibitory **IVa-r**. Struktury otrzymanych związków **IVa-r** potwierdziłem na podstawie analizy widm ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR oraz MS.

9.3. Oznaczanie aktywności biologicznej

Wyniki modelowania molekularnego projektowanych struktur postanowiłem zweryfikować na podstawie badań biologicznych. Po etapie projektowania i syntezy, aktywność inhibicyjną wszystkich otrzymanych związków oznaczano w teście *in vitro* (zgodnie ze znanymi procedurami [144], [145]) z wykorzystaniem STS, wyizolowanej z łożyska ludzkiego na drodze opisanej, trójstopniowej chromatografii [146] przy współpracy z grupą badawczą dr. Macieja Masłyka z Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego. Dla wyselekcjonowanych pochodnych zawierających w swojej konstytucji wiązania C-F sprawdzono również właściwości cytotoksyczne wobec dwóch estrogenozależnych linii komórkowych: MCF-7 i T47D oraz dwóch linii komórkowych, których wzrost nie zależy od estrogenów: SkBr3 i MDA-MB-231. Testy komórkowe zostały przeprowadzone przy współpracy z grupą badawczą profesora Andrzeja Składanowskiego z Katedry Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej.

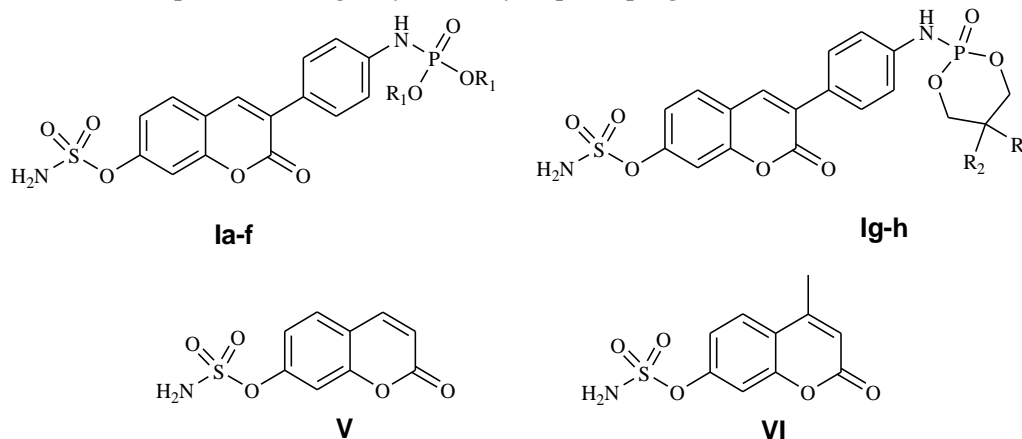
9.3.1. Aktywność biologiczna amidosiarczanowych pochodnych

3-fenylokumaryny zawierających w swojej konstytucji ugrupowania fosforowe

Wyniki testów enzymatycznych zebrane w **Tabeli 9.6.** wskazują, że wszystkie otrzymane związki **Ia-h** bardzo skutecznie hamują pracę enzymu (w zakresie od 0.78 do 0.19 μM). Dla porównania, dwa związki referencyjne, **V** oraz **VI**, hamowały pracę enzymu z IC_{50} na poziomie, odpowiednio 1.38 oraz 1.03 μM w tym samym teście biologicznym. Najwyższą aktywność inhibicyjną wobec STS wykazały związki zawierające w swojej konstytucji dwa dodatkowe pierścienie aromatyczne, **Ie** oraz **If** (dla których wartości IC_{50} wyniosły odpowiednio 0.19 i 0.24 μM). Wynik ten jest zgodny z danymi zebranymi w toku

modelowania molekularnego, gdyż najniższą wartość energii wiązania wyznaczyłem dla związku **If** (-8.3 kcal/mol).

Tabela 9.6. Wyniki analiz dokowania molekularnego z wykorzystaniem programu AutoDock Vina 1.1.2 oraz badań aktywności inhibicyjnej związków **Ia-h** oraz inhibitorów referencyjnych **V** i **VI** w teście *in vitro* na oczyszczonym enzymie pochodzącym z łożyska ludzkiego wraz z wyznaczoną wartością parametru LogP wyznaczonymi przez program ChemDraw Ultra 7.0.



Nr związku	R ₁	R ₂	Energia wiązania [kcal mol ⁻¹]	IC ₅₀ [μM]	LogP [-]
Ia	Me	-	-6.4	0.78 ± 0.07	2.01
Ib	Et	-	-6.6	0.51 ± 0.02	2.70
Ic	<i>i</i> -Pr	-	-6.2	0.47 ± 0.03	3.52
Id	<i>n</i> -Bu	-	-6.3	0.31 ± 0.03	4.43
Ie	Ph	-	-6.7	0.19 ± 0.02	5.37
If	Bn	-	-8.3	0.24 ± 0.05	5.56
Ig	-	H	-7.8	0.70 ± 0.05	1.89
Ih	-	Me	-7.9	0.45 ± 0.03	2.99
V	-	-	-2.9	1.38 ± 0.13	0.76
VI	-	-	-4.1	1.03 ± 0.23	0.94

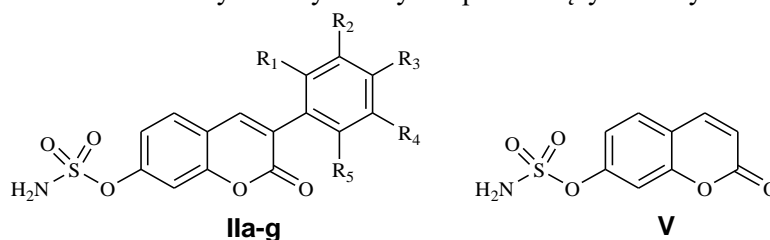
Co ciekawe, analizując aktywność biologiczną otrzymanych inhibitorów w odniesieniu do ich hydrofobowości, zaobserwowałem silną korelację pomiędzy wartościami IC₅₀ oraz wartościami parametru LogP, wyznaczonymi komputerowo przez program ChemDraw Ultra 7.0 (**Tabela 9.6.**). Wyniki tych analiz jednoznacznie wskazują, że wzrost hydrofobowości ugrupowania *N*-fosforylowego wpływa na wzmocnienie wiązania inhibitora do miejsca aktywnego enzymu, a co za tym idzie na wzrost jego aktywności inhibicyjnej. Struktura miejsca aktywnego STS, które zbudowane jest z licznych reszt aminokwasowych o charakterze lipofilowym, wskazuje na możliwość tworzenia się silnych oddziaływań hydrofobowych z niepolarnym rdzeniem inhibitorów, co w połączeniu z możliwością występowania potencjalnego wiązania wodorowego (pomiędzy układem P=O

oraz NH reszty Arg98), wpływa na siłę inhibicji. Wnioski zebrane w toku prac nad pochodnymi **Ia-h** stały się przedmiotem naszej publikacji w czasopiśmie *Medicinal Chemical Communications* [147].

9.3.2. Aktywność biologiczna amidosiarczanowych pochodnych 3-fenylokumaryny zawierających w swojej konstytucji wiązania C-F

Po etapie projektowania, a następnie syntezy, otrzymane związki **IIa-g** wraz z inhibiorem referencyjnym **V** zostały przebadane pod kątem zdolności hamowania pracy STS w teście enzymatycznym. Dane eksperymentalne zebrane w **Tabeli 9.7.**, jednoznacznie wskazują, że inhibitory **IIb** oraz **IIc** charakteryzowały się najwyższą aktywnością inhibicyjną wobec enzymu (IC_{50} dla obu związków wyniosło $0.27 \mu\text{M}$). Większość z otrzymanych pochodnych zdecydowanie skuteczniej hamowała pracę STS w porównaniu ze związkiem referencyjnym **V** ($IC_{50} = 3.50 \mu\text{M}$). Jedynie związek **IIe** okazał się znacznie mniej aktywny.

Tabela 9.7. Wyniki analiz dokowania molekularnego z wykorzystaniem programu AutoDock Vina 1.1.2 oraz badań aktywności inhibicyjnej otrzymanych inhibitorów **IIa-g** oraz związku referencyjnego **V** w teście *in vitro* na oczyszczonym enzymie pochodzącym z łożyska ludzkiego.



Nr związku	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	Energia wiązania [kcal/mol]	$IC_{50} [\mu\text{M}]$
IIa	H	H	H	H	H	-6.7	0.36 ± 0.022
IIb	H	F	F	H	H	-6.7	0.27 ± 0.020
IIc	H	F	F	F	H	-6.8	0.27 ± 0.021
IId	F	F	F	F	F	-6.9	0.28 ± 0.019
IIe	CF_3	H	H	CF_3	H	-6.9	4.18 ± 0.240
IIf	H	CF_3	F	H	H	-6.2	0.30 ± 0.019
IIg	H	H	OCF_3	H	H	-7.5	0.44 ± 0.020
V	-	-	-	-	-	-2.9	3.50 ± 0.320

Powyższe wyniki świadczą o tym, że wzrost właściwości hydrofobowych inhibitorów (wynikający z wprowadzenia do struktury podstawionego pierścienia fenyłowego) sprzyja wiązaniu inhibitorów do miejsca aktywnego STS poprzez tworzenie dodatkowych oddziaływań hydrofobowych z lipofilowymi resztami aminokwasowymi. Ponadto,

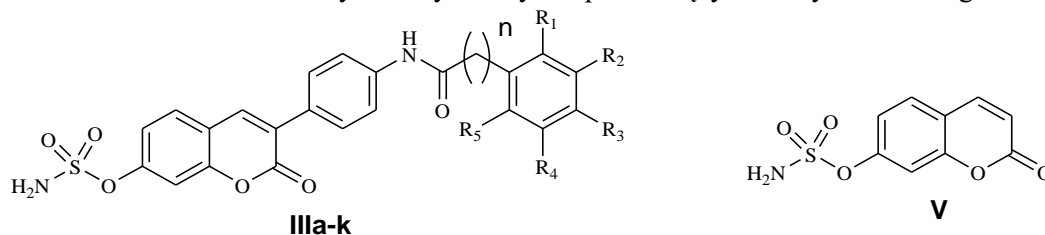
w większości przypadków, inhibitory zawierające w swojej konstytucji atomy fluoru wykazywały nieco silniejsze działanie w porównaniu ze związkiem **IIa**, w strukturze którego atom fluoru nie występuje. Opisane powyżej wyniki stały się przedmiotem publikacji naukowej w czasopiśmie *Chemical Biology & Drug Design* [148].

9.3.3. Aktywność biologiczna *N*-acylowanych pochodnych 3-(4-aminofenilo)-kumaryny zawierających w swojej konstytucji ugrupowanie amidosiarczanowe oraz wiązania C-F

Wszystkie otrzymane pochodne **IIIa-k** zostały początkowo przebadane w teście enzymatycznym z wykorzystaniem STS wyizolowanej z łożyska ludzkiego wraz ze związkami **IIb** i **IIc** (najbardziej aktywnymi wśród inhibitorów z serii **IIa-g**) a także związkiem referencyjnym **V**. Dane eksperymentalne uzyskane na podstawie testu enzymatycznego przedstawiłem w **Tabeli 9.8.**

Uzyskane wyniki badań jednoznacznie wskazują, że wszystkie otrzymane związki hamowały aktywność STS w znacznie większym stopniu niż związek referencyjny **V** ($IC_{50} = 1.38 \mu M$). Wśród *N*-benzoilowanych pochodnych 3-fenylokumaryny najwyższą aktywnością inhibicyjną charakteryzował się związek **IIIc** z wartością IC_{50} na poziomie $0.18 \mu M$ (co jest zgodne z wynikami analiz modelowania molekularnego), natomiast wśród *N*-fenyloacetylowanych najbardziej aktywny okazał się związek **IIIj** z IC_{50} również na poziomie $0.18 \mu M$ (wartość energii wiązania wyznaczona przez program AutoDock Vina wyniosła -8.6 kcal/mol). Najbardziej aktywne związki **IIIc** oraz **IIIj** okazały się nieco skuteczniej hamować aktywność STS od inhibitorów **IIb** oraz **IIc** (dla których IC_{50} wyniosły odpowiednio 0.28 oraz $0.29 \mu M$).

Tabela 9.8. Wyniki analiz dokowania molekularnego z wykorzystaniem programu AutoDock Vina 1.1.2 oraz badań aktywności inhibicyjnej związków **IIIa-k**, **IIb**, **IIc** oraz inhibitora referencyjnego **V** w teście *in vitro* na oczyszczonym enzymie pochodzącym z łożyska ludzkiego.



Nr związku	<i>n</i>	<i>R</i> ₁	<i>R</i> ₂	<i>R</i> ₃	<i>R</i> ₄	<i>R</i> ₅	Energia wiązania [kcal mol ⁻¹]	IC ₅₀ [μM]
IIIa	0	H	H	H	H	H	-7.6	0.49 ± 0.04
IIIb		H	H	F	H	H	-8.6	0.21 ± 0.01
IIIc		H	F	F	H	H	-8.9	0.18 ± 0.01
III d		F	F	F	F	F	-8.8	0.23 ± 0.01
IIIe		H	H	H	H	H	-8.2	0.26 ± 0.02
III f	1	H	F	F	H	H	-8.7	0.36 ± 0.03
III g		H	F	F	F	H	-7.8	0.30 ± 0.03
III h		F	F	F	F	F	-9.5	0.34 ± 0.03
III i		H	CF ₃	F	H	H	-8.9	0.38 ± 0.02
III j		CF ₃	H	H	CF ₃	H	-8.6	0.18 ± 0.01
III k		H	H	OCF ₃	H	H	-8.4	0.44 ± 0.02
IIb	-	-	-	-	-	-	-6.7	0.28 ± 0.02
IIc	-	-	-	-	-	-	-6.8	0.29 ± 0.02
V	-	-	-	-	-	-	-2.9	1.38 ± 0.13

Na podstawie wyników testu enzymatycznego, wyselekcjonowałem sześć najbardziej aktywnych, fluorowanych związków reprezentujących trzy różne grupy (**IIIb** oraz **IIIc**, **IIIg** oraz **IIIj**, **IIb** oraz **IIc**) w celu oznaczenia ich cytotoksyczności wobec czterech linii komórkowych (związek **V** został wykorzystany jako związek referencyjny). W panelu wykorzystanych linii komórkowych raka piersi znalazły się dwie linie hormonozależne (MCF-7 oraz T47D), a także dwie, których wzrost nie jest zależny od hormonów (SkBr3 oraz MDA-MB-231). Otrzymane wyniki przedstawiłem w **Tabeli 9.9.**

Tabela 9.9. Wyniki badań cytotoksyczności wybranych inhibitorów **IIIb**, **IIIc**, **IIIg**, **IIIj**, **IIb**, **IIc** oraz związku referencyjnego **V**.

Nr związku	<i>GI₅₀ [μM]</i>			
	<i>MCF-7</i>	<i>T47D</i>	<i>SkBr3</i>	<i>MDA-MB-231</i>
	<i>ER⁺; PR⁺; Her2⁺</i>	<i>ER⁺; PR⁺; Her2⁺</i>	<i>ER⁻; PR⁻; Her2⁻</i>	<i>ER⁻; PR⁻; Her2⁻</i>
IIIb	>100	>100	>100	>100
IIIc	>100	>100	>100	>100
IIIg	31.3 ± 6.9	13.7 ± 1.0	36.1 ± 0.3	11.7 ± 3.0
IIIj	15.9 ± 3.7	8.7 ± 0.1	18.8 ± 0.4	8.1 ± 1.7
IIb	30.0 ± 2.3	43.0 ± 1.7	>100	61.5 ± 3.9
IIc	32.6 ± 2.6	30.7 ± 3.9	61.3 ± 3.8	56.3 ± 0.6
V	>100	>100	>100	>100

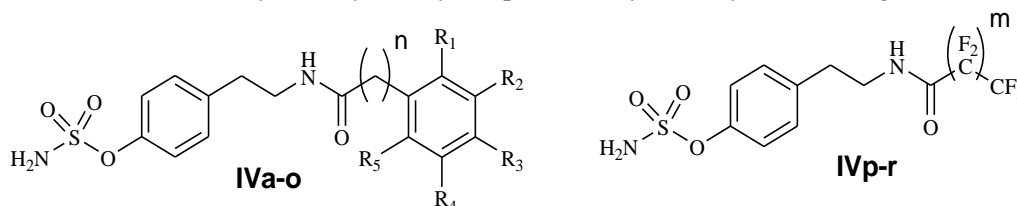
ER, receptor estrogenowy; PR, receptor progesteronowy; Her2 receptor nabłonkowego czynnika wzrostu 2.

Najwyższą antyproliferacyjną aktywnością charakteryzował się analog **IIIj** (wartości GI_{50} wobec komórek MCF-7 i T47D wyniosły odpowiednio 15.9 i 8.7 μM). Jednakże, związek ten nie działał selektywnie wobec estrogenozależnych linii komórkowych i równie silnie hamował wzrost komórek ER i PR ujemnych (wartości GI_{50} wobec komórek SkBr3 i MDA-MB-231 wyniosły odpowiednio 18.8 i 8.1 μM). Pomimo nieco niższej aktywności (zarówno w teście enzymatycznym, jak i z wykorzystaniem linii komórkowych) związki **IIb** i **IIc** okazały się selektywnie hamować wzrost komórek hormonozależnych (np. wartości GI_{50} dla pochodnej **IIc** wobec komórek ER i PR dodatnich: MCF-7 i T47D wyniosła odpowiednio 32.6 i 30.7 μM , natomiast wobec komórek ER i PR ujemnych: SkBr3 i MDA-MB-231 wyniosła odpowiednio 61.3 i 56.3 μM). Pomimo bardzo wysokiej aktywności w teście enzymatycznym, związki **IIIb** oraz **IIIc** praktycznie nie wykazały właściwości cytotoksycznych w zadanych stężeniach w stosunku do wybranych linii komórkowych (podobnie jak związek referencyjny **V**). Cały materiał doświadczalny zebrany podczas pracy nad serią fluorowanych, *N*-acylowanych pochodnych 3-(4-aminofenylo)-kumaryny zawierających w swojej konstytucji ugrupowanie amidosiarczanowe został opublikowany w czasopiśmie *European Journal of Medicinal Chemistry* [149].

9.3.4. Aktywność biologiczna N-acylowanych pochodnych tyraminy zawierających w swojej konstytucji wiązania C-F

Po etapie projektowania z wykorzystaniem technik komputerowych oraz syntezy nowych, potencjalnych inhibitorów STS **IVa-r**, wszystkie otrzymane pochodne zostały przebadane w teście z wykorzystaniem STS wyizolowanej z łożyska ludzkiego wraz ze związkiem referencyjnym **V**. Wyniki badań enzymatycznych przedstawiłem w **Tabeli 9.10.**

Tabela 9.10. Wyniki analiz dokowania molekularnego z wykorzystaniem programu AutoDock Vina 1.1.2 oraz badań aktywności inhibicyjnej związków **IVa-r** oraz inhibitora referencyjnego **V** w teście *in vitro* na oczyszczonym enzymie pochodzącym z łożyska ludzkiego.



Nr związku	n	m	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Energia wiązania [kcal mol ⁻¹]	IC ₅₀ [μM]
IVa			H	H	H	H	H	-5.5	54.02 ± 1.02
IVb			H	H	F	H	H	-5.3	17.74 ± 1.03
IVc			H	F	F	H	H	-5.6	5.39 ± 0.43
IVd	0		F	H	F	F	H	-6.3	8.62 ± 0.49
IVe			F	F	F	F	F	-6.0	2.91 ± 0.13
IVf			H	H	CF ₃	H	H	-5.7	8.59 ± 0.55
IVg			H	H	NO ₂	H	H	-6.1	17.55 ± 1.09
IVh		-	H	H	H	H	H	-5.1	18.82 ± 1.01
IVi			H	F	F	H	H	-5.4	83.45 ± 1.45
IVj			H	F	F	F	H	-5.3	16.43 ± 0.89
IVk	1		F	F	F	F	F	-5.9	4.72 ± 0.35
IVl			H	CF ₃	F	H	H	-6.0	9.78 ± 0.43
IVm			CF ₃	H	H	CF ₃	H	-6.3	3.88 ± 0.22
IVn			H	H	OCF ₃	H	H	-5.5	3.92 ± 0.26
IVo			H	H	NO ₂	H	H	-4.4	28.70 ± 1.00
IVp	-	8	-	-	-	-	-	-5.9	13.10 ± 0.77
IVr	-	9	-	-	-	-	-	-6.7	2.18 ± 0.22
V	-		-	-	-	-	-	-2.9	2.13 ± 0.13

Uzyskane wyniki badań wskazują, że nowo otrzymane związki hamują aktywność ludzkiej STS na umiarkowanym poziomie. Najwyższą aktywnością inhibicyjną charakteryzował się analog **IVr**, dla którego wartość IC₅₀ wyniosła 2.18 μM i była porównywalna ze związkiem referencyjnym **V** (IC₅₀ = 2.13 μM). Wynik ten jest zgodny

z danymi uzyskanymi podczas etapu dokowania molekularnego, które również wskazywały na najniższą wartość energii wiązania dla pochodnej **IVr** (-6.7 kcal/mol). Co ciekawe, większość związków, w których konstytucji znajdowało się wiązanie C-F, znacznie efektywniej hamowało aktywność enzymu niż ich pozbawiony atomu fluoru analog. Wartości IC_{50} dla dziewięciu z trzynastu fluorowanych inhibitorów znajdowały się na poziomie niższym niż 10 μM . Dla porównania, wartości IC_{50} dla pochodnych **IVa**, **IVg**, **IVh** i **IVo** (w których konstytucji atom fluoru nie występuje) wyniosły odpowiednio 54.02, 17.55, 18.82 i 28.70 μM . Obserwacja ta wydaje się potwierdzać korzystny wpływ wprowadzenia atomu fluoru na aktywność inhibicyjną amidosiarczanowych pochodnych opartych o rdzeń tyraminy. Materiał doświadczalny zebrany podczas pracy nad tą klasą związków jako inhibitorów STS stał się przedmiotem publikacji naukowej w czasopiśmie *Chemical Biology & Drug Design* [150].

Rozdział 10

Podsumowanie

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) wymienia estrogeny jako jedne z głównych czynników stymulujących wzrost nowotworów hormonozależnych, a inhibitory enzymów, które są w stanie kontrolować produkcję estrogenów, mogą mieć potencjalne znaczenie terapeutyczne. W ostatnich latach liczne ośrodki naukowe na całym świecie prowadzą intensywne badania związane z poszukiwaniem nowych, skutecznych inhibitorów sulfatazy steroidowej (STS), która bierze udział w biosyntezie estrogenów, jako nowego celu terapeutycznego w leczeniu nowotworów (ze szczególnym uwzględnieniem nowotworów piersi).

W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiłem wyniki badań z zakresu modelowania molekularnego, syntezy oraz oceny aktywności biologicznej nowych inhibitorów STS, jako związków o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych.

Na wstępie swojej pracy badawczej zaprojektowałem pokazną bibliotekę struktur, które poddałem badaniom modelowania molekularnego w zakresie dokowania molekularnego. Na podstawie otrzymanych wyników obliczeniowych wyselekcjonowałem grupy związków charakteryzujące się najlepszym dopasowaniem do miejsca aktywnego sulfatazy steroidowej. Te grupy związków w kolejnym etapie otrzymałem na drodze syntezy chemicznej. Aktywność inhibicyjną wszystkich otrzymanych pochodnych oznaczano w teście *in vitro* z wykorzystaniem STS, wyizolowanej z łożyska ludzkiego. Dla wyselekcjonowanych pochodnych sprawdziłem również właściwości cytotoksyczne wobec czterech nowotworowych linii komórkowych.

Wśród czterech serii potencjalnych inhibitorów STS znalazły się:

- a) amidosiarczanowe pochodne 3-fenylokumaryny zawierające w swojej konstrykcji ugrupowania fosforowe (związki **Ia-h**).
- b) amidosiarczanowe pochodne 3-fenylokumaryny zawierające w swojej konstrykcji wiązania C-F (związki **Ila-g**);
- c) *N*-acylowane pochodne 3-(4-aminofenylo)-kumaryny zawierające w swojej konstrykcji ugrupowanie amidosiarczanowe oraz wiązania C-F (związki **IIIa-k**);
- d) *N*-acylowane pochodne tyraminy zawierające w swojej konstrykcji ugrupowanie amidosiarczanowe oraz wiązania C-F (związki **IVa-r**);

Wyniki analiz modelowania molekularnego wskazywały, że wyselekcjonowane związki należące do każdej z wyżej wymienionych klas charakteryzowały się bardzo dobrym dopasowaniem do miejsca aktywnego enzymu, a sposób ich wiązania był analogiczny jak w przypadku inhibitora referencyjnego 7-*O*-amidosiarczan-kumaryny **V**. Każdorazowo wartości energii wiązania wyznaczone przez program dokujący AutoDock Vina (będące miarą siły wiązania cząsteczki przez enzym) były zdecydowanie niższe i korzystniejsze w porównaniu ze związkiem **V**. Ponadto, graficzna interpretacja wyników modelowania molekularnego wskazała, że wysoka stabilność potencjalnych kompleksów enzym-inhibitor wynika nie tylko z możliwości występowania licznych oddziaływań hydrofobowych pomiędzy silnie hydrofobowym rdzeniem zaprojektowanych cząsteczek i resztami aminokwasowymi o charakterze lipofilowym, ale również z możliwością tworzenia dodatkowych oddziaływań elektrostatycznych, na co wskazuje niewielka odległość pomiędzy atomami fluoru, układem amidowym oraz grupą P=O inhibitorów do niektórych reszt aminokwasowych znajdujących się w miejscu aktywnym STS (m.in. Arg98 oraz Thr484).

W kolejnym etapie swojej pracy wyniki modelowania molekularnego weryfikowałem na drodze eksperymentalnej, przeprowadzając syntezę pokaźnej biblioteki zaprojektowanych związków, t.j.:

- a) amidosiarczanowych pochodnych 3-fenylokumaryny zawierających w swojej konstytucji ugrupowanie fosforowe (związków **Ia-h**), modyfikując strukturę estru kwasu fosforowego (**osiem związków**);
- b) amidosiarczanowych pochodnych 3-fenylokumaryny zawierających w swojej konstytucji wiązania C-F (związków **IIa-g**), modyfikując strukturę podstawnika 3-fenylogowego w kumarynie (**siedem związków**);
- c) *N*-acylowanych pochodnych 3-(4-aminofenylo)-kumaryny zawierających w swojej konstytucji ugrupowanie amidosiarczanowe oraz wiązania C-F (związków **IIIa-k**), modyfikując strukturę podstawnika *N*-acylogowego w 3-(4-aminofenylo)-kumarynie (**jedenaste związków**);
- d) *N*-acylowanych pochodnych tyraminy zawierających w swojej konstytucji ugrupowanie amidosiarczanowe oraz wiązania C-F (związków **IVa-r**), modyfikując strukturę podstawnika *N*-acylogowego w tyraminie (**siedemnaście związków**).

W kolejnym etapie we współpracy z Katolickim Uniwersytetem Lubelskim oraz Katedrą Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej przeprowadziłem badania biologiczne otrzymanych związków.

Wśród pochodnych zawierających w swojej konstytucji zarówno ugrupowanie amidosiarczanowe, jak i fosforowe **Ia-h** najskuteczniejszymi inhibitorami STS okazały się związki: 7-*O*-amidosiarczan-3-[4-(difenoksy-fosforyloamino)-fenylo]-kumaryna, **Ie**, oraz 7-*O*-amidosiarczan-3-[4-(dibenzylksoxy-fosforyloamino)-fenylo]-kumaryna, **If**, (dla których wartości IC_{50} wyniosły odpowiednio **0.19** i **0.24** μM ; dla porównania wartość IC_{50} dla związku referencyjnego **V** w tym samym teście wyniosła **1.38** μM). W toku przeprowadzonych eksperymentów zaobserwowałem silną korelację pomiędzy parametrem $\log P$ a aktywnością testowanych związków. Wyniki tych analiz jednoznacznie wskazują, że wzrost hydrofobowości ugrupowania *N*-fosforylowego wpływa na wzmocnienie wiązania inhibitora do miejsca aktywnego enzymu, a co za tym idzie na jego właściwości inhibicyjne (patrz **Tabela. 9.6.**, związek **Ie** oraz **If**). Struktura miejsca aktywnego STS, zbudowanego z licznych reszt aminokwasowych o charakterze lipofilowym, sugeruje możliwość tworzenia się silnych oddziaływań hydrofobowych z niepolarnym rdzeniem inhibitorów, co w połączeniu z możliwością występowania potencjalnego wiązania wodorowego (pomiędzy układem P=O oraz NH reszty Arg98), wpływa na siłę inhibicji (patrz **Rys. 9.2.** oraz **Rys. 9.3.**, związki **Id**, **Ie** oraz **If**).

Z kolei wyniki eksperymentów biologicznych wskazały, że wśród otrzymanych inhibitorów zawierających w swojej konstytucji wiązania C-F (należących do serii **Ila-g**, **IIla-k** oraz **Iva-r**) najwyższą aktywnością w teście enzymatycznym charakteryzowały się amidosiarczanowe pochodne oparte o strukturę *N*-acylowanej 3-(4-aminofenylo)-kumaryny: **IIIc** (7-*O*-amidosiarczan-3-[4-(3,4-difluoro-benzoiloamino)-fenylo]-kumaryna) oraz **IIIj** (7-*O*-amidosiarczan-3-{4-[2-(2,5-bis-trifluorometylo-fenylo)-acetyloamino]-fenylo}-kumaryna) (w obu przypadkach wartość IC_{50} wyniosła **0.18** μM ; dla porównania wartość IC_{50} dla związku referencyjnego **V** w tym samym teście wyniosła **1.38** μM). W serii związków **Ila-g**, najskuteczniej aktywność enzymu hamowały związki: 7-*O*-amidosiarczan-3-(3,4-difluorofenylo)-kumaryna, **IIb**, oraz 7-*O*-amidosiarczan-3-(3,4,5-trifluorofenylo)-kumaryna, **IIc**, dla których wartość IC_{50} oznaczono na poziomie **0.27** μM w obu przypadkach (wartość IC_{50} dla związku referencyjnego **V** w tym samym teście wyniosła **3.50** μM). Nieco mniej aktywne okazały się amidosiarczanowe pochodne tyraminy **Iva-r**, dla których wyznaczone w teście enzymatycznym wartości IC_{50} mieściły się w zakresie od 2.18 do 83.45 μM .

W testach na wybranych, nowotworowych liniach komórkowych najwyższą aktywność antyproliferacyjną wykazał analog **IIIj** (wartości GI_{50} wobec komórek MCF-7 i T47D wyniosły odpowiednio 15.9 i 8.7 μM). Jednakże, związek ten nie działał selektywnie wobec komórek estrogenozależnych i równie silnie hamował wzrost dwóch pozostałych linii

komórkowych (wartości GI_{50} wobec komórek SkBr3 i MDA-MB-231 wyniosły odpowiednio 18.8 i 8.1 μM). Pomimo nieco niższej aktywności (zarówno w teście enzymatycznym, jak i z wykorzystaniem linii komórkowych) związki **IIb** i **IIc** okazały się selektywnie hamować wzrost komórek hormonozależnych (np. wartości GI_{50} dla pochodnej **IIc** wobec komórek ER i PR dodatnich: MCF-7 i T47D wyniosła odpowiednio 32.6 i 30.7 μM , natomiast wobec komórek ER i PR ujemnych: SkBr3 i MDA-MB-231 wyniosła odpowiednio 61.3 i 56.3 μM). Związek referencyjny **V** wykazał brak właściwości cytotoksycznych wobec badanych przez nas wybranych linii komórkowych.

Na uwagę zasługuje fakt, że w prezentowanych w niniejszej rozprawie doktorskiej wynikach badań w większości przypadków parametry uzyskane w eksperymentach modelowania molekularnego wykazują wysoką korelację z wynikami badań biologicznych.

W tym miejscu pragnę dodać, że prezentując wyniki powyższych badań na wielu konferencjach naukowych spotkałem się z uwagami, że w celu optymalizacji geometrii ligandów poddawanych procedurze dokowania molekularnego stosowałem zbyt mało zaawansowane metody obliczeniowe (t.j. metody mechaniki molekularnej MM+). Pragnę podkreślić, że we współpracy z zespołem prof. Tomasza Puzyna z Pracowni Chemometrii Środowiska Uniwersytetu Gdańskiego oraz prof. Jerzego Leszczyńskiego z Jackson State University (USA) przeprowadziliśmy szereg analiz obliczeniowych z zakresu modelowania molekularnego otrzymanych przeze mnie związków z zastosowaniem bardziej zaawansowanych metod optymalizacji geometrii ligandów (t.j. metody mechaniki kwantowej PM7 oraz DFT B3LYP/6-31++G*). Jednakże, wyniki uzyskane w tych eksperymentach, wskazały, że zarówno metody oparte o mechanikę molekularną (MM+), jak i mechanikę kwantową (PM7 oraz DFT B3LYP/6-31++G*) są równie skuteczne i mogą być z powodzeniem wykorzystywane w celu optymalizacji geometrii ligandów poprzedzającej procedurę dokowania molekularnego [151].

Biorąc pod uwagę fakt, że w części syntetycznej zetknąłem się z problemem selektywnej fosforylacji grupy aminowej wobec wolnej grupy fenolowej, zakres niniejszej rozprawy obejmował również serię eksperymentów z zakresu selektywnej *N*- oraz *O*-fosforylacji układu 3-aminofenolu **94** wobec różnorodnych odczynników fosforylujących i fosfitylujących. W toku podjętych badań stwierdziłem, że w zależności od warunków reakcji 3-aminofenolu **94** z chlorofosforanami dialkylowymi mamy do czynienia z reakcją fosforylacji atomu azotu lub tlenu. I tak na przykład, w reakcji 3-aminofenolu **94** z chlorofosforanem dietylu zarówno w bezwodnej pirydynie, jak i wobec NEt_3 w THF, zaobserwowałem selektywne powstawanie produktu *N*-fosforylacji **95**. W przeciwieństwie do

tego traktowanie 3-aminofenolu **94** w bezwodnej pirydynie neopentylideno chlorofosforem spowodowało powstanie wyłącznie produktu *O*-fosfitylacji. Z drugiej strony gdy 3-aminofenol **94** poddawałem reakcji z chlorofosforem dietylu w obecności K_2CO_3 w acetonie otrzymywałem mieszaninę produktów *O*-fosforylacji **96** oraz *N*- i *O*-fosforylacji **97**. Traktowanie wcześniej zgenerowanego fenolanu 3-aminofenolu **94** chlorofosforem dietylu skutkowało selektywnym powstawaniem produktu *O*-fosforylacji **96**. Na podstawie doświadczeń zebranych w tej serii eksperymentów opracowałem selektywną metodę fosforylacji atomu azotu w 3-(4-aminofenylo)-7-hydroksy-kumarynie **91**, bez konieczności ochrony funkcji fenolowej.



Niniejsza praca powstała przy wsparciu finansowym projektów badawczych koordynowanych przez **Narodowe Centrum Nauki**, za które bardzo dziękuję:

- a) Stypendium ETIUDA pt. „Projektowanie, synteza oraz badanie aktywności biologicznej nowych amidosiarczanowych inhibitorów sulfatazy steroidowej zawierających w swojej konstytucji ugrupowania fosforowe lub wiązania C-F” (stypendium nr 2017/24/T/NZ7/00271).
- b) Grant PRELUDIUM „Projektowanie, synteza oraz badanie aktywności biologicznej nowych inhibitorów sulfatazy steroidowej (STS) na bazie amidosiarczanowych pochodnych zawierających wiązania C-F” (grant nr 2015/19/N/NZ7/00938).
- c) Grant SONATA „Projektowanie, synteza oraz badanie aktywności biologicznej nowych inhibitorów Sulfatazy Steroidowej (STS) na bazie związków fosforoorganicznych” (grant nr 2011/03/D/NZ7/03985).

Podczas realizacji niniejszej rozprawy zostałem laureatem:

- a) Stypendium START 2018 Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.
- b) Stypendium Ministra za wybitne osiągnięcia dla doktorantów na rok akademicki 2017/2018.

Badania opisane w niniejszej rozprawie zostały przeprowadzone we współpracy z:

- a) Dr. Maciejem Masłykiem z Katedry Biologii Molekularnej Wydziału Biotechnologii i Nauk o Środowisku Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego (w zakresie badań aktywności inhibicyjnej otrzymanych związków wobec oczyszczonego enzymu);
- b) Prof. dr. hab. inż. Andrzejem Składanowskim oraz mgr. inż. Majusem Misiakiem z Katedry Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej (w zakresie badań cytotoksyczności otrzymanych związków).

Część zaprezentowanego w niniejszej pracy materiału doświadczalnego zostało przedstawione w następujących czterech publikacjach naukowych:

- a) Daško, M.; Przybyłowska, M.; Rachon, J.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Misiak, M.; Składanowski, A.; Demkowicz, S.; *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 128, 79-87;
- b) Daško, M.; Rachon, J.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Demkowicz, S.; *Chem. Biol. Drug Des.*, **2017**, 90, 156-161;
- c) Daško, M.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Aszyk, J.; Rachon, J.; Demkowicz, S.; *Med. Chem. Commun.*, **2016**, 7, 1146-1150;
- d) Demkowicz, S.; Daško, M.; Kozak, W.; Krawczyk, K.; Witt, D.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Rachon, J.; *Chem. Biol. Drug Des.*, **2016**, 87, 233-238;

oraz dwóch doniesieniach konferencyjnych:

- a) Daško, M.; Kozak, W.; Demkowicz, S.; Synthesis and Steroid Sulfatase Inhibitory Activity of N-phosphorylated 3-(4-aminophenyl)-coumarin-7-O-sulfamates (Plakat), *Progress in organic synthesis*; Gdańsk, czerwiec **2016**. Plakat został wyróżniony.
- b) Daško, M.; Kozak, W.; Demkowicz, S.; Rachoń, J.; Synteza oraz badanie aktywności biologicznej amidosiarczanowych inhibitorów sulfatazy steroidowej na bazie fluorowanych pochodnych 3-fenylokumaryny (Plakat), *58 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego*, Gdańsk, wrzesień **2015**.

Dorobek naukowy

Publikacje naukowe

1. Demkowicz, S.; Kozak, W.; Daško, M.; Rachon, J.; *Asian J. Org. Chem.*, **2018**, 7; 314-323.
2. Daško, M.; Przybyłowska, M.; Rachon, J.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Misiak, M.; Składanowski, A.; Demkowicz, S.; *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 128, 79-87.
3. Daško, M.; Rachon, J.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Demkowicz, S.; *Chem. Biol. Drug Des.*, **2017**, 90, 156-161.
4. Jagiello, K.; Sosnowska, A.; Supratik, K.; Demkowicz, S.; Daško, M.; Leszczynski, J.; Rachon, J.; Puzyn, T.; *Struct. Chem.*, **2017**, 28, 1017-1032.
5. Demkowicz, S.; Kozak, W.; Daško, M.; Rachon, J.; *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2016**, 16, 1359-1373.
6. Demkowicz, S.; Rachon, J.; Daško, M.; Kozak, W.; *RSC Adv.*, **2016**, 6, 7101-7112.
7. Daško, M.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Aszyk, J.; Rachon, J.; Demkowicz, S.; *Med. Chem. Commun.*, **2016**, 7, 1146-1150.
8. Demkowicz, S.; Daško, M.; Kozak, W.; Krawczyk, K.; Witt, D.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Rachon, J.; *Chem. Biol. Drug Des.*, **2016**, 87, 233-238.
9. Demkowicz, S.; Kozak, W.; Daško, M.; Masłyk, M.; Gielniewski, B.; Rachon, J.; *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, 101, 358-366.
10. Kozak, W.; Daško, M.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Rachon, J.; Demkowicz, S.; *Drug, Dev. Res.*, **2015**, 76, 450-462.
11. Demkowicz, S.; Kozak, W.; Daško, M.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Rachon, J.; *Drug Dev. Res.*, **2015**, 76, 94-104.
12. Kozak, W.; Daško, M.; Wołos, A.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Składanowski, A.; Misiak, M.; Rachon, J.; Demkowicz, S.; *RSC Adv.*, **2015**, 5, 32594-32603.
13. Kozak, W.; Daško, M.; Masłyk, M.; Gielniewski, B.; Rachon, J.; Demkowicz, S.; *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **2015**, 17, 1091-1096.
14. Kozak, W.; Daško, M.; Masłyk, M.; Pieczykolan, J.S.; Gielniewski, B.; Rachon, J.; Demkowicz, S.; *RSC Adv.*, **2014**, 4, 44350-44358.

Wystąpienia konferencyjne

1. Demkowicz, S.; Daško, M.; Kozak, W.; Recent Developments in Steroid Sulfatase Inhibitors as Anti-Cancer Agents (Komunikat), *Progress in organic synthesis*; Gdańsk, czerwiec **2016**.
2. Daško, M.; Kozak, W.; Demkowicz, S.; Synthesis and Steroid Sulfatase Inhibitory Activity of N-phosphorylated 3-(4-aminophenyl)-coumarin-7-O-sulfamates (Plakat), *Progress in organic synthesis*; Gdańsk, czerwiec **2016**.
3. Kozak, W.; Daško, M.; Demkowicz, S.; Phosphate and Thiophosphate Flavone Analogs as Steroid Sulfatase Inhibitors (Plakat), *Progress in organic synthesis*; Gdańsk, czerwiec **2016**.
4. Daško, M.; Kozak, W.; Demkowicz, S.; Rachoń, J.; Synteza oraz badanie aktywności biologicznej amidosiarczanowych inhibitorów sulfatazy steroidowej na bazie fluorowanych pochodnych 3-fenylokumaryny (Plakat), *58 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego*, Gdańsk, wrzesień **2015**.
5. Kozak, W.; Daško, M.; Demkowicz, S.; Rachoń, J.; Synteza oraz badanie aktywności biologicznej nowych inhibitorów sulfatazy steroidowej (STS) na bazie tiofosforowych pochodnych bikumaryny (Plakat), *58 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego*, Gdańsk, wrzesień **2015**.
6. Demkowicz, S.; Kozak, W.; Daško, M.; Rachoń, J.; Projektowanie, synteza oraz badanie aktywności biologicznych nowych inhibitorów STS na bazie fosforowych i tiofosforowych pochodnych bifenyli, kumaryny oraz N-alkaloilotyraminy (Wykład), *V Konferencja Kół Naukowych Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej*, Czarłina, kwiecień **2015**.
7. Daško, M.; Kozak, W.; Demkowicz, S.; Rachoń, J.; Synteza oraz badanie aktywności biologicznej inhibitorów sulfatazy steroidowej na bazie fosforoorganicznych pochodnych kumaryny (Plakat), *57 Konferencja PTChem i SITPChem*, Częstochowa, wrzesień **2014**.
8. Daško, M.; Deptuła, M.; Synteza pochodnych kumaryny i ich potencjalne zastosowanie w terapii hormonozależnych nowotworów piersi (Plakat), *IV Konferencja Kół Naukowych Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej*, Czarłina, kwiecień **2014**.



III CZĘŚĆ

EKSPERYMENTALNA

Rozdział 11

Opis modelowania molekularnego

Przed rozpoczęciem obliczeń dokowania molekularnego, struktury chemiczne inhibitorów przygotowano za pomocą programu HyperChem 8.0.7 Release (Hypercube, Inc., Gainesville, FL, USA). Każda ze struktur została zoptymalizowana z wykorzystaniem pola siłowego MM+ algorytmem sprzężonych gradientów Polak – Ribier kończącym się różnicą w energii nie większą niż 0.05 kcal/mol/Å. Struktura rentgenograficzna ludzkiej sulfatazy steroidowej (Protein Data Bank – 1P49) została przygotowana w następujący sposób: cząsteczki wody krystalicznej usunięto ze struktury; katalityczna reszta aminokwasowa FGly75 została przekształcona do formy gem–diolowej z wykorzystaniem modułu Protein Preparation Wizard będącego częścią pakietu Maestro (Schrödinger, LLC, Nowy Jork, NY, USA); atomy wodoru dodano do struktury i optymalizowano w polu siłowym OPLS-AA.

Dokowanie zoptymalizowanych ligandów do przygotowanej struktury ludzkiej sulfatazy steroidowej przeprowadzono z wykorzystaniem programu AutoDock Vina 1.1.2 (The Molecular Graphic Laboratory, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). Podczas wszystkich obliczeń dokujących zastosowano pudełko z siatką o rozmiarze 30 Å x 30 Å x 30 Å ze środkiem na atomie C_β reszty aminokwasowej 75.

Po procedurze dokowania molekularnego, dla poszczególnych ligandów, zostały wybrane najkorzystniejsze konformacje, dla których przygotowano modele 3D z wykorzystaniem programu VMD 1.9 (University of Illinois at Urbana – Champaign, Urbana, IL, USA).

Rozdział 12

Opis syntezy

Wszelkie substraty wykorzystywane do syntezy chemicznej były dostarczane przez firmę Aldrich lub otrzymywane chemicznie według dostępnych w literaturze procedur. Rozpuszczalniki organiczne były suszone i destylowane według standardowych procedur. Wykorzystywane szkło laboratoryjne było czyste, suche, jeśli tego wymagały warunki reakcji i szczelne konstrukcyjnie. Temperatury topnienia oznaczano na kriometrze Stuart Scientific SMP30. Do chromatografii kolumnowej wykorzystywano żel krzemionkowy 60 (230-400 mesh) (Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy). Chromatografia cienkowarstwowa TLC wykonywana była na płytkach z żelem krzemionkowym SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Niemcy). Do detekcji płytek TLC zastosowano lampę UV Spectroline model ENF-240C/FE emitującą światło o długości fali 254 nm oraz 365 nm. Widma NMR rejestrowano z użyciem spektrometrów: Varian Unity 500 MHz, Varian Gemini 200 MHz, a także Bruker Avance III HD 400 MHz. Przesunięcia chemiczne przedstawiano w ppm i odnoszono względem sygnałów rozpuszczalnika. Stałe sprzężenia podawano w hercach. Widma IR rejestrowano z wykorzystaniem urządzenia Nicolet 8700. Widma masowe wykonywano na aparacie Agilent 6540 Accurate Mass Q-TOF LC/MS System.

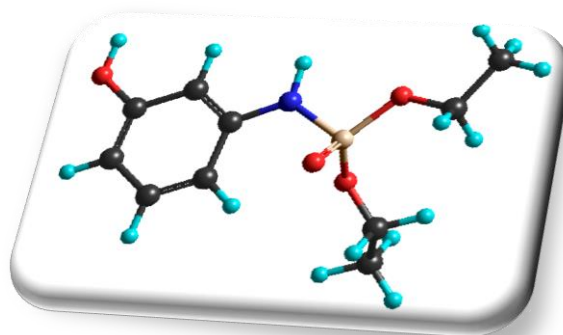
12.1. Procedura syntezy 3-(dietoksy-fosforyloamino)-fenolu 95

Do kolby kulistej o pojemności 10 mL zaopatrzonej w rurkę z chlorkiem wapnia zawierającej 0.2 g (1.8 mmol) 3-aminofenolu **94** rozpuszczonego w 2 mL bezwodnej pirydyny wprowadzono 0.32 g (1.8 mmola) chlorofosforanu dietylu. Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną pozostawiono na 24 h w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji pirydynę odparowano, a pozostałość oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej z wykorzystaniem mieszaniny chloroform : metanol w stosunku 50 : 1 jako eluent otrzymując czysty związek **95**.

3-(dietoksy-fosforyloamino)-fenol 95

Wydajność: 78 %.

Temperatura topnienia: olej.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) , δ (ppm): 7.89 (1H, s, OH), 7.09 (1H, t, $J = 8.1$ Hz, Ar-H), 6.76 (1H, s, Ar-H), 6.53 (2H, t, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 6.31 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, NH), 4.25-4.02 (4H, m, CH₂), 1.31 (6H, t, $J = 7.1$ Hz, CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 2.27.

12.2. Procedura syntezy 3-(dietoksy-fosforyloksy)-aniliny 96 oraz 1-(dietoksy-fosforyloamino)-3-(dietoksy-fosforyloksy)-benzenu 97 w obecności K₂CO₃

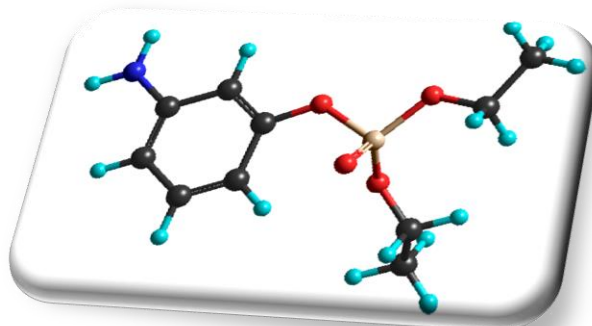
Do kolby kulistej o pojemności 25 mL zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną oraz rurkę z chlorkiem wapnia zawierającej 0.2 g (1.8 mmol) 3-aminofenolu **94** rozpuszczonego w 10 mL bezwodnego acetonu wprowadzono 0.52 g (3.6 mmol) bezwodnego K₂CO₃ a następnie 0.32 g (1.8 mmol) chlorofosforanu dietylu. Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną pozostawiono na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji aceton odparowano, a do pozostałości dodano 20 mL wody i ekstrahowano trzema porcjami octanu etylu (po 20 mL każda). Połączone ekstrakty organiczne suszono, a następnie odparowano rozpuszczalnik. Pozostałość oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej

z wykorzystaniem mieszaniny chloroform : metanol w stosunku 80 : 1 jako eluent izolując czyste związki **96** i **97**.

3-(dietoksy-fosforyloksy)-anilina 96

Wydajność: 28 %.

Temperatura topnienia: olej.



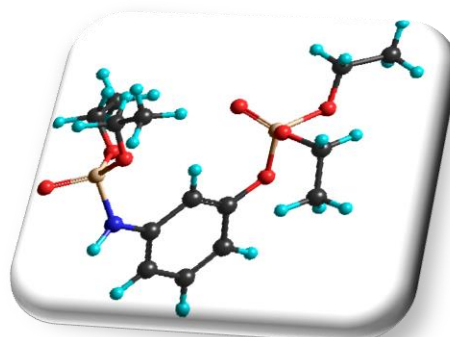
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) , δ (ppm): 7.10 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, Ar-H), 6.64-6.57 (2H, m, Ar-H), 6.50 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, Ar-H), 4.30-4.16 (4H, m, CH₂), 3.70 (2H, s, NH₂), 1.37 (6H, t, *J* = 7.0 Hz, CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) , δ (ppm): -6.41.

1-(dietoksy-fosforyloamino)-3-(dietoksy-fosforyloksy)-benzen 97

Wydajność: 30 %.

Temperatura topnienia: olej.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) , δ (ppm): 7.20 (1H, t, *J* = 8.2 Hz, Ar-H), 6.93-6.89 (1H, m, Ar-H), 6.87-6.81 (2H, m, Ar-H), 6.30 (1H, d, *J* = 9.2 Hz, NH), 4.30-4.05 (8H, m, CH₂), 1.41-1.30 (12H, m, CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) , δ (ppm): 1.58, -6.48.

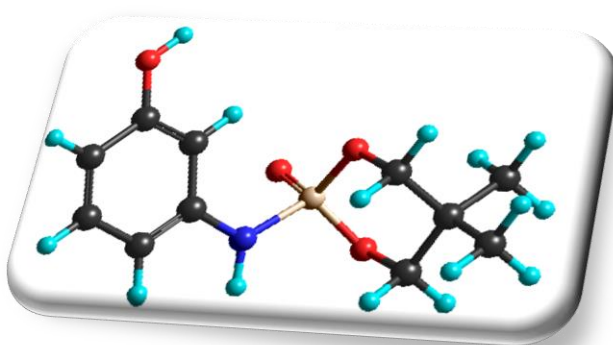
12.3. Procedura syntezy 3-(5,5-dimetylo-2-okso-2λ⁵-[1,3,2]dioksyfosfin-2-yloamino)-fenolu 98

Do kolby kulistej o pojemności 5 mL zaopatrzonej w rurkę z chlorkiem wapnia zawierającej 0.1 g (0.9 mmol) 3-aminofenolu **94** rozpuszczonego w 1 mL bezwodnej pirydyny wprowadzono 0.17 g (0.9 mmola) neopentylideno chlorofosforanu. Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną pozostawiono na 24 h w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji pirydynę odparowano, a pozostałość oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej z wykorzystaniem mieszaniny dichlorometan : metanol w stosunku 30 : 1 jako eluent otrzymując czysty związek **98**.

3-(5,5-dimetylo-2-okso-2λ⁵-[1,3,2]dioksyfosfin-2-yloamino)-fenol 98

Wydajność: 100 %.

Temperatura topnienia: olej.



¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 9.31 (1H, s, OH), 7.88 (1H, d, *J* = 10.6 Hz, NH), 6.98 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, Ar-H), 6.53 (1H, t, *J* = 2.1 Hz, Ar-H), 6.50-6.45 (1H, m, Ar-H), 6.33-6.27 (1H, m, Ar-H), 4.07-3.89 (4H, m, CH₂), 1.12 (3H, s, CH₃), 0.87 (3H, s, CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, DMSO), δ (ppm): -4.18.

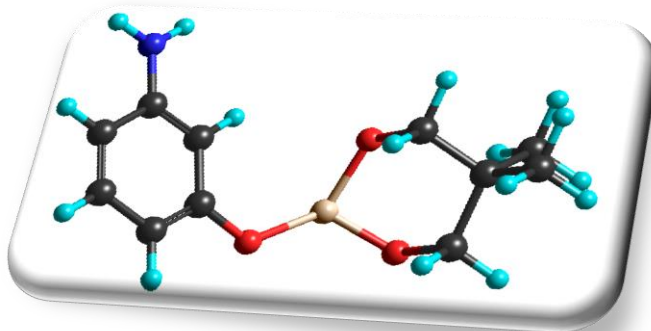
12.4. Procedura syntezy 3-(5,5-dimetylo-[1,3,2]dioksyfosfin-2-yloksy)-aniliny 99

Do kolby kulistej o pojemności 5 mL zaopatrzonej w rurkę z chlorkiem wapnia zawierającej 0.1 g (0.9 mmol) 3-aminofenolu **94** rozpuszczonego w 1 mL bezwodnej pirydyny wprowadzono 0.16 g (0.9 mmola) neopentylideno chlorofosforanu. Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną pozostawiono na 30 minut w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji pirydynę odparowano, a pozostałość oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej z wykorzystaniem dichlorometanu jako eluent otrzymując czysty związek **99**.

3-(5,5-dimetylo-[1,3,2]dioksyfosfin-2-yloksy)-anilina 99

Wydajność: 79 %.

Temperatura topnienia: olej.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.09 (1H, t, *J* = 7.9 Hz, Ar-H), 6.53-6.48 (1H, m, Ar-H), 6.46-6.41 (2H, m, Ar-H), 4.36-4.27 (2H, m, CH₂), 4.00-3.05 (2H, brs, NH₂), 3.49-3.40 (2H, m, CH₂), 1.33 (3H, s, CH₃), 0.81 (3H, s, CH₃).

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 114.95.

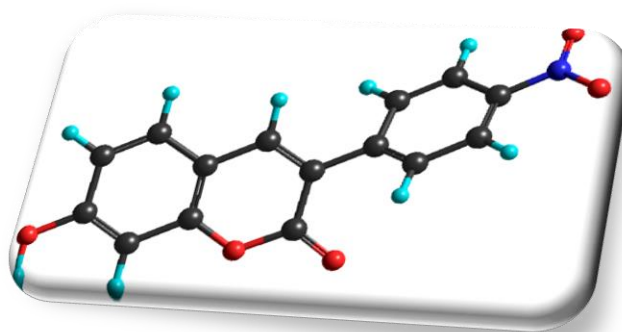
12.5. Procedura syntezy 7-hydroksy-3-(4-nitrofenylo)-kumaryny 100

Do wysuszonej kolby kulistej o pojemności 250 mL, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną oraz rurkę z chlorkiem wapnia, zawierającej 7.25 g (40 mmol) kwasu 4-nitrofenylooctowego oraz 33 mL dichlorometanu, wprowadzono 33 mL SOCl₂. Tak przygotowaną mieszaninę ogrzewano do wrzenia przez 4 h, a następnie schłodzono i odparowano rozpuszczalnik. Po rozpuszczeniu pozostałości w 200 mL acetonu, wprowadzono 5.52 g (40 mmol) 2,4-dihydroksybenzaldehydu oraz 22.08 g (160 mmol) bezwodnego K₂CO₃ i ogrzewano do wrzenia przez 4 h. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej i usunięciu rozpuszczalnika, pozostałość rozpuszczono w zimnej wodzie (400 mL) i zakwaszono kwasem solnym. Wytrącony osad surowego produktu odsączono i krystalizowano z etanolu otrzymując 7.7 g (27.2 mmol) 7-hydroksy-3-(4-nitrofenylo)-kumaryny **100**.

7-hydroksy-3-(4-nitrofenylo)-kumaryna **100**

Wydajność: 68 %.

Temperatura topnienia: 298-299 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.81 (1H, s, OH), 8.39 (1H, s, CH), 8.28 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 8.00 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 7.64 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 6.85 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 6.77 (1H, s, Ar-H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 162.9, 160.3, 156.1, 147.3, 143.9, 142.5, 131.3, 129.9, 124.0, 120.4, 114.4, 112.4, 102.5.

IR (KBr)/cm⁻¹ 3201, 1685, 1588, 1508, 1415, 1336, 1286, 1219, 1169, 1118, 993, 848.

HRMS (m/z) [M-H]⁻ obliczone 282.0402, zmierzone 282.0444.

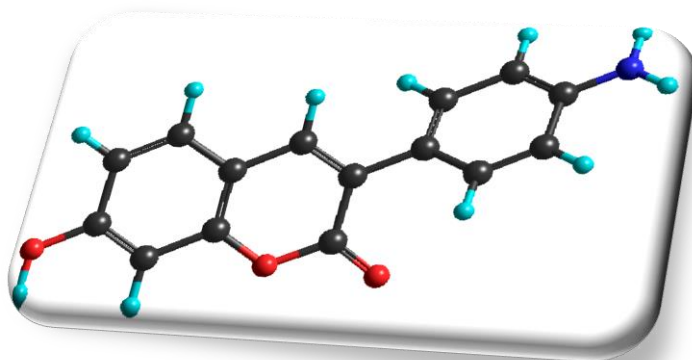
12.6. Procedura syntezy 3-(4-aminofenylo)-7-hydroksy-kumaryny **91**

W kolbie kulistej o pojemności 4000 mL, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, umieszczono 7.08 g (25 mmol) 7-hydroksy-3-(4-nitrofenylo)-kumaryny **100**, 1300 mL acetonu oraz 650 mL wody. Otrzymaną zawiesinę ogrzewano w temperaturze 50 °C (do momentu całkowitego rozpuszczenia 7-hydroksy-3-(4-nitrofenylo)-kumaryny **100**). Następnie, do klarownej mieszaniny reakcyjnej wprowadzono (w trzech porcjach) 43.53 g (250 mmol) Na₂S₂O₄ i całość ogrzewano do wrzenia przez 2 h. Po zakończeniu reakcji odparowano aceton. Wytrącony osad surowego produktu odsączono i krystalizowano z acetonu otrzymując 3.7 g (14.5 mmol) 3-(4-aminofenylo)-7-hydroksy-kumaryny **91**.

3-(4-aminofenylo)-7-hydroksy-kumaryna **91**

Wydajność: 58 %.

Temperatura topnienia: 292-295 °C
(z rozkładem).



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.45 (1H, s, OH), 7.94 (1H, s, CH), 7.53 (1H, d, J = 8.3 Hz, Ar-H), 7.41 (2H, d, J = 8.8 Hz, Ar-H), 6.77 (1H, d, J = 8.8 Hz, Ar-H), 6.71 (1H, s, Ar-H), 6.59 (2H, d, J = 8.8 Hz, Ar-H), 5.43 (2H, brs, NH₂).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 137.6, 137.5, 131.4, 126.0, 114.8, 106.5, 106.2, 99.9, 99.4, 90.6, 90.4, 89.6, 78.8.

IR (KBr)/cm⁻¹ 3338, 3278, 1670, 1608, 1565, 1507, 1467, 1333, 1284, 1211, 1162, 1132, 994, 846.

HRMS (m/z) [M-H]⁻ obliczone 252.0661, zmierzone 252.0705.

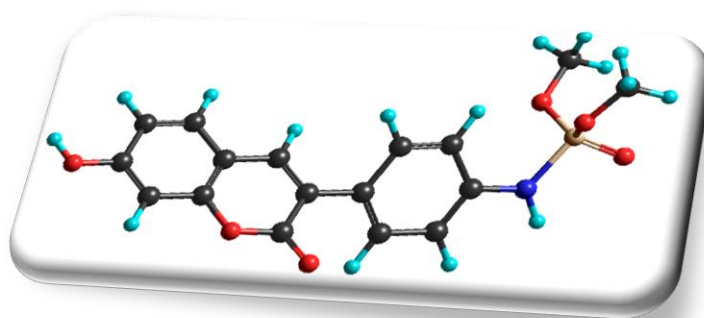
12.7. Ogólna procedura syntezy *N*-fosforylowanych pochodnych 3-(4-aminofenylo)-7-hydroksy-kumaryny **92a-h**

Do wysuszonej kolby kulistej o pojemności 10 mL, zawierającej 0.39 g 3-(4-aminofenylo)-hydroksy-kumaryny **91** rozpuszczonej w 4.5 mL bezwodnej pirydyny, wprowadzono 3.0 mmola odpowiedniego chlorku fosforylu (dostępnego komercyjnie lub otrzymanego na drodze procedury opisanej w literaturze [152, 153]). Tak przygotowaną mieszaninę utrzymywano przez 24 h w temperaturze pokojowej w atmosferze azotu. Po zakończeniu reakcji, pirydynę odparowano pod obniżonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczano na drodze chromatografii kolumnowej, używając jako eluent mieszaninę CH₂Cl₂ : MeOH w stosunku 50 : 1 otrzymując odpowiednią pochodną **92a-h**.

3-[4-(dimetoksy-fosforyloamino)-fenylo]-7-hydroksy-kumaryna 92a

Wydajność: 71 %.

Temperatura topnienia: 214-216 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.58 (1H, s, OH), 8.27 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, NH), 8.06 (1H, s, CH), 7.58 (3H, d, $J = 8.1$ Hz, Ar-H), 7.07 (2H, d, $J = 9.2$ Hz, Ar-H), 6.81 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, Ar-H), 6.75 (1H, s, Ar-H), 3.67 (6H, d, $J = 11.0$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 161.3, 160.7, 155.1, 141.2, 140.1, 130.2, 129.5, 128.0, 122.4, 117.2 (d, $J_{P-C} = 7.6$ Hz), 113.8, 112.6, 102.1, 53.4 (d, $J_{P-C} = 5.4$ Hz).

³¹P NMR (162 MHz, DMSO), δ (ppm): 5.05.

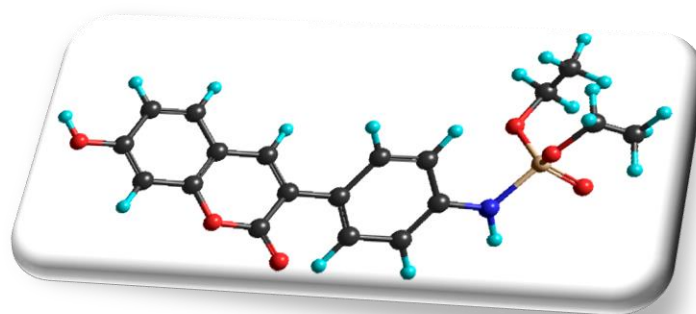
IR (KBr)/cm⁻¹ 3238, 1708, 1601, 1515, 1466, 1210, 1118, 969, 826, 623.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 362.0794, zmierzone 362.0809.

3-[4-(dietoksy-fosforyloamino)-fenylo]-7-hydroksy-kumaryna 92b

Wydajność: 75 %.

Temperatura topnienia: 217-219 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.60 (1H, s, OH), 8.20 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, NH), 8.07 (1H, s, CH), 7.57 (3H, dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 2.9$ Hz, Ar-H), 7.07 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 6.81 (1H, dd, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.3$ Hz, Ar-H), 6.74 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, Ar-H), 4.11-3.92 (4H, m, CH₂), 1.24 (6H, t, $J = 7.1$ Hz, CH₃).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 161.3, 160.7, 155.1, 141.5, 140.0, 130.2, 129.4, 127.8, 122.4, 117.2 (d, $J_{\text{P-C}} = 7.6$ Hz), 113.8, 112.6, 102.1, 62.5 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.1$ Hz), 16.5 (d, $J_{\text{P-C}} = 6.6$ Hz).

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO), δ (ppm): 2.12.

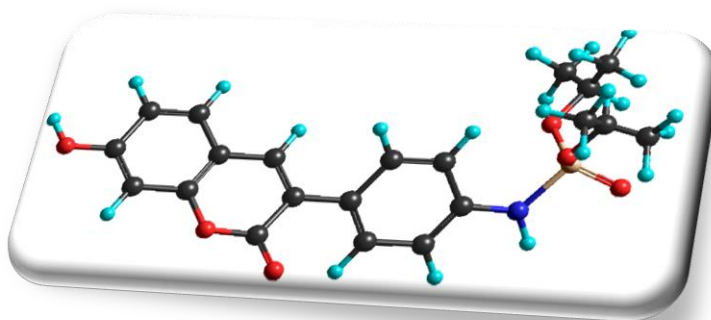
IR (KBr)/ cm^{-1} 3218, 1687, 1606, 1516, 1468, 1208, 1126, 964, 834, 624.

HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone 390.1107, zmierzone 390.1130.

3-[4-(diizopropylksoxy-fosforyloamino)-fenylo]-7-hydroksy-kumaryna 92c

Wydajność: 66 %.

Temperatura topnienia: 164-168 °C.



^1H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.58 (1H, s, OH), 8.12 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, NH), 8.07 (1H, s, CH), 7.61-7.54 (3H, m, Ar-H), 7.06 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 6.81 (1H, dd, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.3$ Hz, Ar-H), 6.74 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, Ar-H), 4.59-4.47 (2H, m, CH), 1.29 (6H, d, $J = 6.2$ Hz, CH_3), 1.19 (6H, d, $J = 6.2$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 161.3, 160.7, 155.0, 141.8, 140.0, 130.1, 129.3, 127.5, 122.4, 117.2 (d, $J_{\text{P-C}} = 7.6$ Hz), 113.8, 112.6, 102.1, 71.0 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.1$ Hz), 24.1 (d, $J_{\text{P-C}} = 4.4$ Hz), 23.9 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.1$ Hz).

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO), δ (ppm): -0.08.

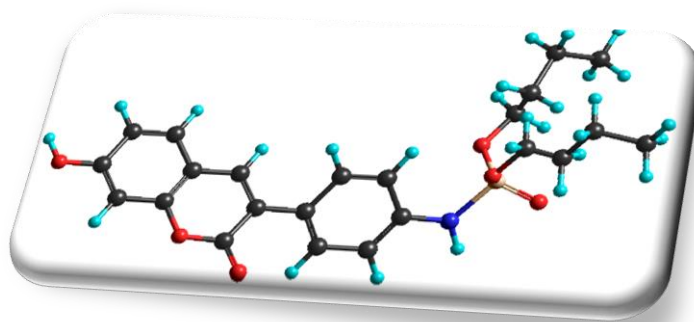
IR (KBr)/ cm^{-1} 3278, 1703, 1611, 1518, 1466, 1215, 1128, 958, 835, 624.

HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone 418.1420, zmierzone 418.1433.

3-[4-(di-*n*-butyloksy-fosforyloamino)-fenylo]-7-hydroksy-kumaryna 92d

Wydajność: 63 %.

Temperatura topnienia: 163-166 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.61 (1H, s, OH), 8.19 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, NH), 8.07 (1H, s, CH), 7.58 (3H, dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 3.0$ Hz, Ar-H), 7.06 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 6.81 (1H, dd, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.2$ Hz, Ar-H), 6.75 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, Ar-H), 4.05-3.87 (4H, m, CH₂), 1.58 (4H, quint, $J = 6.7$ Hz, CH₂), 1.34 (4H, sext, $J = 7.5$ Hz, CH₂), 0.86 (6H, t, $J = 7.4$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 161.4, 160.7, 155.1, 141.4, 140.0, 130.1, 129.4, 127.8, 122.4, 117.1 (d, $J_{P-C} = 7.5$ Hz), 113.8, 112.6, 102.1, 66.0 (d, $J_{P-C} = 5.3$ Hz), 32.2 (d, $J_{P-C} = 6.7$ Hz), 18.7, 13.9.

³¹P NMR (162 MHz, DMSO), δ (ppm): 2.45.

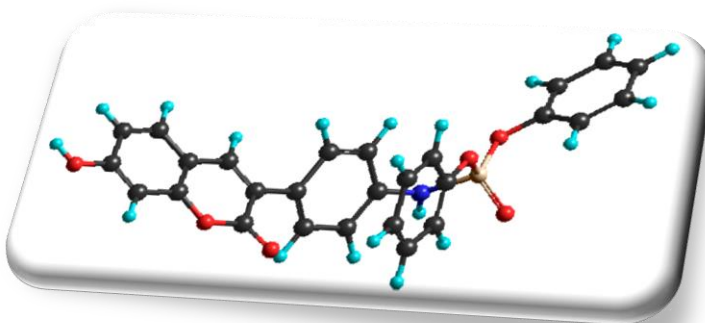
IR (KBr)/cm⁻¹ 3252, 1713, 1605, 1518, 1467, 1214, 1122, 966, 832, 622.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 446.1733, zmierzone 446.1759.

3-[4-(difenoksy -fosforyloamino)-fenylo]-7-hydroksy-kumaryna 92e

Wydajność: 78 %.

Temperatura topnienia: 230-232 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.61 (1H, s, OH), 9.04 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, NH), 8.11 (1H, s, CH), 7.66 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, Ar-H), 7.59 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 7.52-7.36 (4H, m, Ar-H), 7.35-7.16 (8H, m, Ar-H), 6.82 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, Ar-H), 6.76 (1H, s, Ar-H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 161.4, 160.6, 155.2, 150.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 6.3), 140.4, 140.1, 130.5, 130.2, 129.7, 128.8, 125.8, 122.2, 120.6 (d, $J_{\text{P-C}}$ = 4.7 Hz), 117.8 (d, $J_{\text{P-C}}$ = 8.1 Hz), 113.8, 112.6, 102.2.

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO), δ (ppm): -6.93.

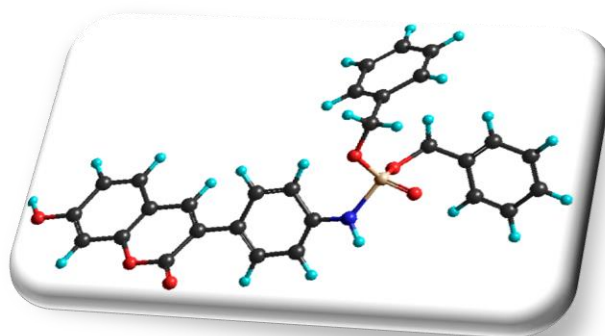
IR (KBr)/ cm^{-1} 3215, 1684, 1604, 1517, 1464, 1193, 1130, 956, 836, 624.

HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone 486.1107, zmierzone 486.1123.

3-[4-(dibenzylloksy -fosforyloamino)-fenylo]-7-hydroksy-kumaryna 92f

Wydajność: 78 %.

Temperatura topnienia: 245-250 °C.



^1H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.58 (1H, s, OH), 8.46 (1H, d, J = 9.5 Hz, NH), 8.07 (1H, s, CH), 7.58 (3H, dd, J = 8.6 Hz, J = 3.3 Hz, Ar-H), 7.40-7.29 (10H, m, Ar-H), 7.12 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 6.81 (1H, dd, J = 8.5 Hz, J = 2.3 Hz, Ar-H), 6.75 (1H, d, J = 2.2 Hz, Ar-H), 5.12-4.98 (4H, m, CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 161.4, 160.7, 155.1, 141.1, 140.1, 136.7 (d, $J_{\text{P-C}}$ = 7.75 Hz), 130.2, 129.4, 128.9, 128.7, 128.2, 128.1, 122.4, 117.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ = 7.7 Hz), 113.8, 112.6, 102.1, 67.9 (d, $J_{\text{P-C}}$ = 4.9 Hz).

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO), δ (ppm): 2.77.

IR (KBr)/ cm^{-1} 3215, 1704, 1605, 1518, 1456, 1199, 1127, 966, 843, 625.

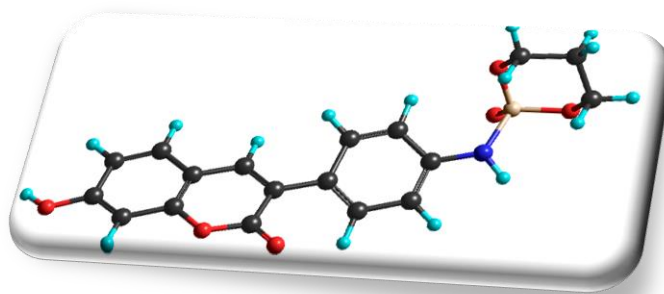
HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone 514.1420, zmierzone 514.1431.

3-{4-(2-okso-2λ⁵-[1,3,2]dioksyfosfin-2-yloamino)-fenylo}-7-hydroksy-kumaryna
92g

Wydajność: 60 %.

Temperatura topnienia: 263-266 °C

(z rozkładem).



¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.61 (1H, s, OH), 8.27 (1H, d, *J* = 10.8 Hz, NH), 8.07 (1H, s, CH), 7.58 (3H, dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.9 Hz, Ar-H), 7.08 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, Ar-H), 6.81 (1H, dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 2.3 Hz, Ar-H), 6.75 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, Ar-H), 4.46-4.29 (4H, m, CH₂), 2.13-1.86 (2H, m, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 161.3, 160.7, 155.1, 141.1, 140.1, 130.2, 129.5, 128.0, 122.4, 117.4 (d, *J*_{P-C} = 7.6 Hz), 113.8, 112.6, 102.1, 68.6 (d, *J*_{P-C} = 6.6 Hz), 26.2 (d, *J*_{P-C} = 6.9 Hz).

³¹P NMR (162 MHz, DMSO), δ (ppm): -4.11.

IR (KBr)/cm⁻¹ 3215, 1706, 1602, 1514, 1461, 1227, 1122, 961, 828, 632.

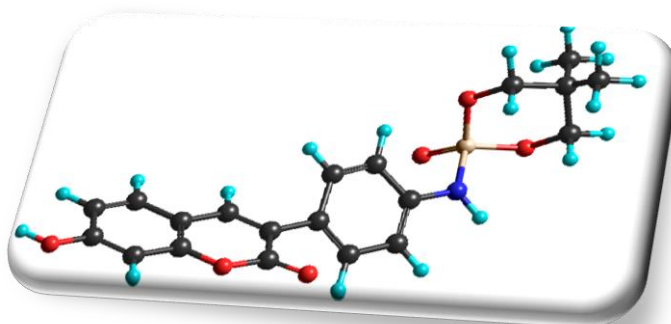
HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 374.0794, zmierzone 374.0805.

3-{4-(4,4-dimetylo-2-okso-2λ⁵-[1,3,2]dioksyfosfin-2-yloamino)-fenylo}-7-hydroksy-kumaryna
92h

Wydajność: 65 %.

Temperatura topnienia: 235-238 °C

(z rozkładem).



¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.61 (1H, s, OH), 8.24 (1H, d, *J* = 10.6 Hz, NH), 8.06 (1H, s, CH), 7.65-7.54 (3H, m, Ar-H), 7.10 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, Ar-H), 6.82

(1H, dd, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.3$ Hz, Ar-H), 6.75 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, Ar-H), 4.12-3.92 (4H, m, CH₂), 1.14 (3H, s, CH₃), 0.89 (3H, s, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 161.4, 160.7, 155.1, 141.1, 140.1, 130.2, 129.5, 128.2, 122.4, 117.7 (d, $J_{P-C} = 7.5$ Hz), 113.8, 112.6, 102.2, 77.2 (d, $J_{P-C} = 6.4$ Hz), 32.3 (d, $J_{P-C} = 5.9$ Hz), 21.6, 20.5.

³¹P NMR (162 MHz, DMSO), δ (ppm): -4.52.

IR (KBr)/cm⁻¹ 3234, 1713, 1606, 1518, 1468, 1218, 1123, 985, 833, 622.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 402.1107, zmierzone 402.1111.

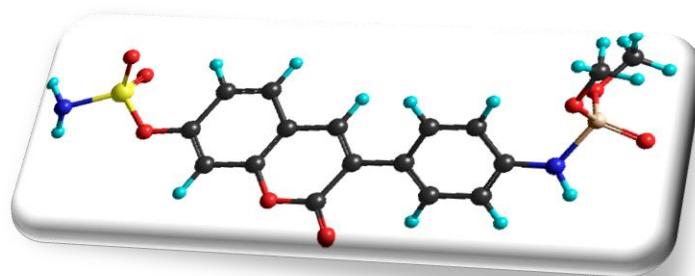
12.8. Ogólna procedura syntezy *N*-fosforylowanych pochodnych 7-*O*-amidosiarczanu-3-(4-aminofenilo)-kumaryny *Ia-h*

W kolbie kulistej o pojemności 10 mL zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną oraz rurkę z chlorkiem wapnia umieszczono 0.6 mL dichlorometanu i 0.16 mL izocyjanianu chlorosulfonylu. Do tak przygotowanego roztworu wprowadzono mieszaninę 0.075 mL kwasu mrówkowego i 1.9 μ L DMA. Całość ogrzewano w łaźni wodnej o temperaturze 35 °C. Po upływie 3.5 h, do wygenerowanego chloroamidosiarczanu dodano 1.3 mmola odpowiedniej pochodnej **92a-h** rozpuszczonej w 4.5 mL DMA. Po upływie 24 h, zawartość kolby przeniesiono do zlewki z wodą. Powstały osad surowego produktu odsączono i krystalizowano z acetonitrylu otrzymując odpowiednią pochodną **Ia-h**.

7-*O*-amidosiarczan-3-[4-(dimetoksy-fosforyloamino)-fenylo]-kumaryny *Ia*

Wydajność: 87 %.

Temperatura topnienia: 206-209 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.34 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, NH), 8.26 (2H, s, NH₂), 8.21 (1H, s, CH), 7.84 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 7.64 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, Ar-H), 7.36 (1H, s, Ar-H), 7.29 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, Ar-H), 7.10 (2H, d, $J = 7.7$ Hz, Ar-H), 3.67 (6H, d, $J = 11.2$ Hz, CH₃).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 160.0, 153.6, 152.2, 141.9, 138.8, 130.0, 129.8, 127.3, 126.5, 119.1, 118.5, 117.3 (d, $J_{\text{P-C}} = 7.6$ Hz), 109.9, 53.4 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.3$ Hz).

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO), δ (ppm): -4.92.

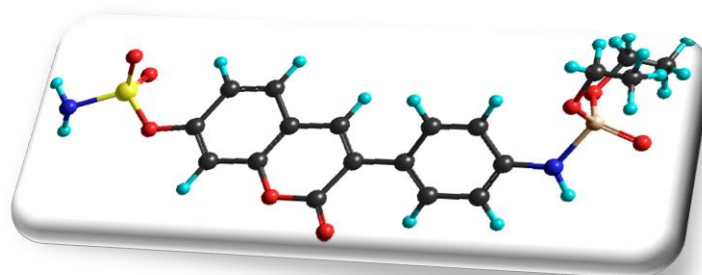
IR (KBr)/ cm^{-1} 3323, 1683, 1618, 1520, 1464, 1384, 1195, 1119, 931, 835, 771, 618.

HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone 441.0521, zmierzone 441.0534.

7-O-amidosiarczan-3-[4-(dietoksy-fosforyloamino)-fenylo]-kumaryny Ib

Wydajność: 84 %.

Temperatura topnienia: 206-208 °C.



^1H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.30-8.24 (3H, m, NH, NH₂), 8.22 (1H, s, CH), 7.84 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.63 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.35 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, Ar-H), 7.29 (1H, dd, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.3$ Hz, Ar-H), 7.10 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 4.11-3.94 (4H, m, CH₂), 1.24 (6H, t, $J = 7.1$ Hz, CH₃).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 160.0, 153.5, 152.2, 142.2, 138.7, 130.0, 129.7, 127.0, 126.5, 119.1, 118.5, 117.2 (d, $J_{\text{P-C}} = 7.6$ Hz), 109.9, 62.6 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.1$ Hz), 16.5 (d, $J_{\text{P-C}} = 6.6$ Hz).

^{31}P NMR (162 MHz, DMSO), δ (ppm): 1.98.

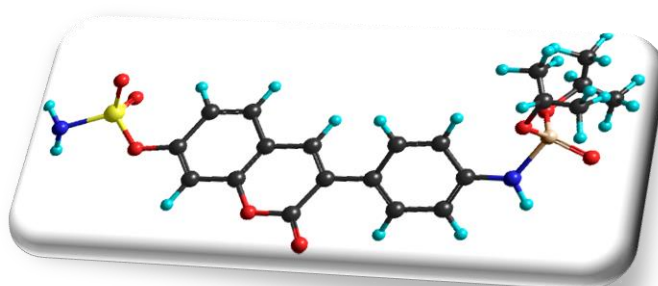
IR (KBr)/ cm^{-1} 3307, 1683, 1616, 1517, 1466, 1383, 1192, 1125, 932, 831, 773, 617.

HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone 469.0834, zmierzone 469.0854.

7-O-amidosiarczan-3-[4-(diizopropylloksy-fosforyloamino)-fenylo]-kumaryny Ic

Wydajność: 77 %.

Temperatura topnienia: 206-208 °C
(z rozkładem).



¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.26 (2H, s, NH₂), 8.22 (1H, s, CH), 8.20 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, NH), 7.84 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.63 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.35 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, Ar-H), 7.29 (1H, dd, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.3$ Hz, Ar-H), 7.09 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 4.61-4.48 (2H, m, CH), 1.30 (6H, d, $J = 6.2$ Hz, CH₃), 1.20 (6H, d, $J = 6.2$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 160.0, 153.5, 152.2, 142.5, 138.6, 130.0, 129.6, 126.8, 126.5, 119.1, 118.5, 117.2 (d, $J_{P-C} = 7.6$ Hz), 109.9, 71.1 (d, $J_{P-C} = 5.1$ Hz), 24.1 (d, $J_{P-C} = 4.4$ Hz), 23.9 (d, $J_{P-C} = 5.0$ Hz).

³¹P NMR (162 MHz, DMSO), δ (ppm): -0.24.

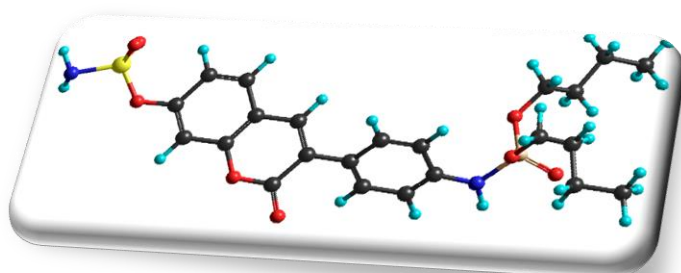
IR (KBr)/cm⁻¹ 3331, 1686, 1616, 1516, 1467, 1375, 1194, 1115, 935, 830, 775, 619.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 497.1148, zmierzone 497.1160.

7-O-amidosiarczan-3-[4-(di-n-butylloksy-fosforyloamino)-fenylo]-kumaryny Id

Wydajność: 90 %.

Temperatura topnienia: 206-208 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.30-8.24 (3H, m, NH, NH₂), 8.22 (1H, s, CH), 7.85 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.63 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.35 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, Ar-H), 7.29 (1H, dd, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.3$ Hz, Ar-H), 7.10 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 4.05-3.88 (4H, m, CH₂), 1.58 (4H, quint, $J = 6.8$ Hz, CH₂), 1.34 (4H, sext, $J = 7.7$ Hz, CH₂), 0.86 (6H, t, $J = 7.4$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 160.0, 153.5, 152.2, 142.1, 138.7, 130.0, 129.7, 127.0, 126.5, 119.1, 118.5, 117.2 (d, $J_{P-C} = 7.7$ Hz), 109.9, 66.1 (d, $J_{P-C} = 5.2$ Hz), 32.2 (d, $J_{P-C} = 6.7$ Hz), 18.7, 13.9.

³¹P NMR (162 MHz, DMSO), δ (ppm): 2.31.

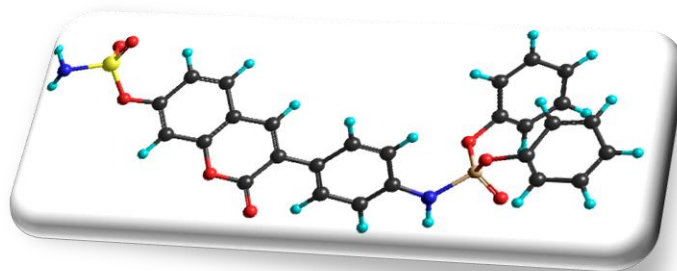
IR (KBr)/cm⁻¹ 3240, 1701, 1615, 1518, 1463, 1384, 1187, 1117, 928, 830, 777, 621.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 525.1461, zmierzone 525.1471.

7-O-amidosiarczan-3-[4-(difenoksy-fosforyloamino)-fenylo]-kumaryny Ie

Wydajność: 86 %.

Temperatura topnienia: 170-175 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 9.12 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, NH), 8.31-8.24 (3H, m, NH₂, CH), 7.85 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.72 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.47-7.39 (4H, m, Ar-H), 7.36 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, Ar-H), 7.33-7.21 (9H, m, Ar-H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 160.0, 153.6, 152.3, 150.4 (d, $J_{P-C} = 6.3$ Hz), 140.8, 139.1, 130.5, 130.1, 130.0, 128.1, 126.3, 125.9, 120.6 (d, $J_{P-C} = 4.7$ Hz), 119.2, 118.5, 117.8 (d, $J_{P-C} = 8.0$ Hz), 109.9.

³¹P NMR (162 MHz, DMSO), δ (ppm): -7.05.

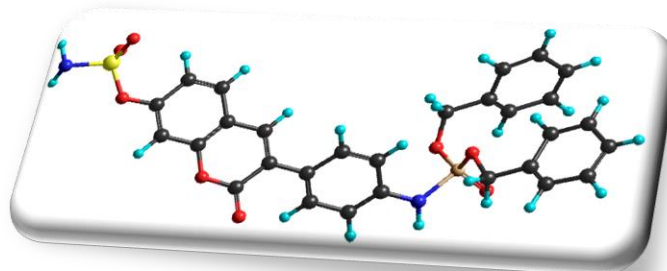
IR (KBr)/cm⁻¹ 3253, 1680, 1616, 1518, 1456, 1384, 1185, 1116, 941, 831, 763, 620.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 565.0835, zmierzone 565.0848.

7-O-amidosiarczan-3-[4-(dibenzyloksy-fosforyloamino)-fenylo]-kumaryny If

Wydajność: 92 %.

Temperatura topnienia: 171-176 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.54 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, NH), 8.27 (2H, s, NH₂), 8.21 (1H, s, CH), 7.85 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.63 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.41-7.32 (11H, m, Ar-H), 7.29 (1H, dd, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.3$ Hz, Ar-H), 7.14 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 5.13-4.96 (4H, m, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 160.0, 153.6, 152.2, 141.8, 138.8, 136.7 (d, $J_{P-C} = 7.57$ Hz), 130.0, 129.7, 128.9, 128.7, 128.2, 127.3, 126.5, 119.1, 118.5, 117.5 (d, $J_{P-C} = 7.7$ Hz), 109.9, 68.0 (d, $J_{P-C} = 4.7$ Hz).

³¹P NMR (162 MHz, DMSO), δ (ppm): 2.62.

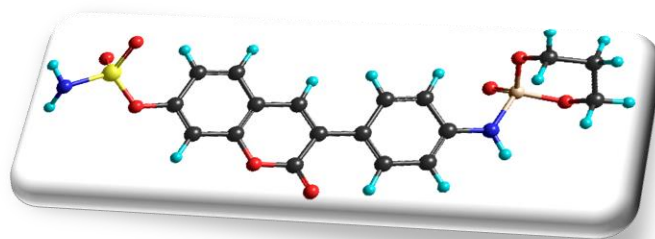
IR (KBr)/cm⁻¹ 3223, 1700, 1614, 1518, 1456, 1390, 1187, 1116, 938, 843, 759, 621.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 593.1148, zmierzone 593.1160.

*7-O-amidosiarczan-3-{4-(2-okso-2 λ^5 -[1,3,2]dioksyfosfin-2-yloamino)-fenylo}-kumaryny **Ig***

Wydajność: 82 %.

Temperatura topnienia: 214-216 °C
(z rozkładem).



¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.35 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, NH), 8.32-8.15 (3H, m, NH₂, CH), 7.85 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.65 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.36 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, Ar-H), 7.29 (1H, dd, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.3$ Hz, Ar-H), 7.11 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 4.47-4.28 (4H, m, CH₂), 2.15-1.86 (2H, m, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 160.0, 153.6, 152.2, 141.9, 138.8, 130.0, 129.8, 127.3, 126.5, 119.1, 118.5, 117.4 (d, $J_{P-C} = 7.6$ Hz), 109.9, 68.7 (d, $J_{P-C} = 6.2$ Hz), 26.22 (d, $J_{P-C} = 6.9$ Hz).

³¹P NMR (162 MHz, DMSO), δ (ppm): -4.29.

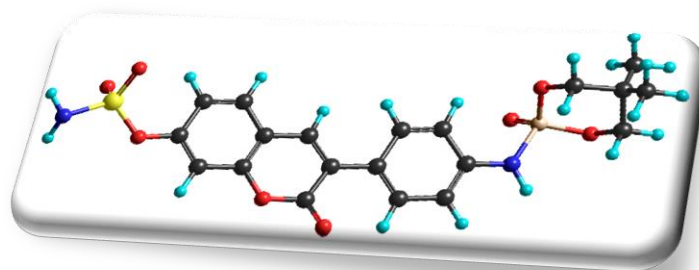
IR (KBr)/cm⁻¹ 3326, 1683, 1617, 1518, 1465, 1383, 1192, 1117, 930, 827, 771, 618.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 453.0521, zmierzone 453.0534.

*7-O-amidosiarczan-3-{4-(5,5-dimetylo-2-okso-2λ⁵-[1,3,2]dioksyfosfin-2-yloamino)-fenylo}-kumaryny **1h***

Wydajność: 88 %.

Temperatura topnienia: 226-227 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.31 (1H, d, *J* = 10.6 Hz, NH), 8.26 (2H, s, NH₂), 8.23 (1H, s, CH), 7.85 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, Ar-H), 7.65 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, Ar-H), 7.36 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, Ar-H), 7.29 (1H, dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 2.3 Hz, Ar-H), 7.13 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, Ar-H), 4.12-3.93 (4H, m, CH₂), 1.15 (3H, s, CH₃), 0.89 (3H, s, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 160.0, 153.6, 152.2, 141.8, 138.8, 130.0, 129.8, 127.4, 126.5, 119.1, 118.5, 117.6 (d, *J*_{P-C} = 7.6 Hz), 109.9, 77.2 (d, *J*_{P-C} = 6.4 Hz), 32.3 (d, *J*_{P-C} = 5.9 Hz), 21.6, 20.5.

³¹P NMR (162 MHz, DMSO), δ (ppm): -4.69.

IR (KBr)/cm⁻¹ 3328, 1686, 1614, 1518, 1468, 1384, 1188, 1112, 937, 834, 767, 620.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 481.0835, zmierzone 481.0848.

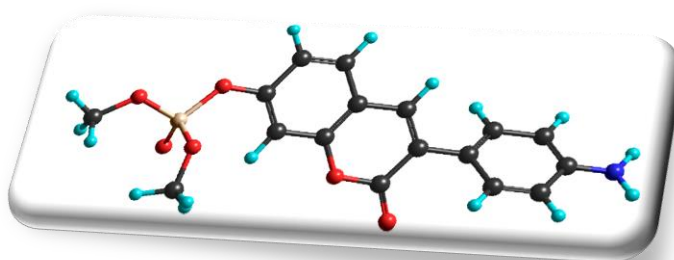
12.9. Procedura syntezy 3-(4-aminofenylo)-7-(dimetoksyfosforyloksy)-kumaryny **93**

Do wysuszonej kolby kulistej o pojemności 50 mL, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną oraz rurkę z chlorkiem wapnia, zawierającej 0.51 g (2.0 mmol) 3-(4-aminofenylo)-7-hydroksy-kumaryny **91** rozpuszczonej 20 mL acetonu oraz 0.55 g (4.0 mmol) bezwodnego K₂CO₃ wprowadzono 0.29 g (2.0 mmol) chlorofosforanu dimetylu i ogrzewano do wrzenia przez 4 h. Po zakończeniu reakcji, aceton odparowano pod obniżonym ciśnieniem, a pozostałość zawieszono w wodzie (20 mL). Wytrącony osad odsączono i oczyszczano na drodze chromatografii kolumnowej, używając jako eluent mieszaninę CH₂Cl₂ : MeOH w stosunku 50 : 1 otrzymując pożądaný produkt **93**.

3-(4-aminofenylo)-7-(dimetoksy-fosforyloksy)-kumaryna 93

Wydajność: 51 %.

Temperatura topnienia: 265-270 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.08 (1H, s, CH), 7.78 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.50 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.31-7.21 (2H, m, Ar-H), 6.66 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 3.85 (6H, d, $J = 11.4$, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 160.2, 153.5, 151.9 (d, $J_{P-C} = 6.6$ Hz), 149.3, 136.6, 129.9, 129.7, 126.6, 124.9, 122.3, 117.9, 111.0 (d, $J_{P-C} = 4.7$ Hz), 114.1, 107.8 (d, $J_{P-C} = 5.2$ Hz), 55.7 (d, $J_{P-C} = 6.3$ Hz).

³¹P NMR (162 MHz, DMSO), δ (ppm): -4.46.

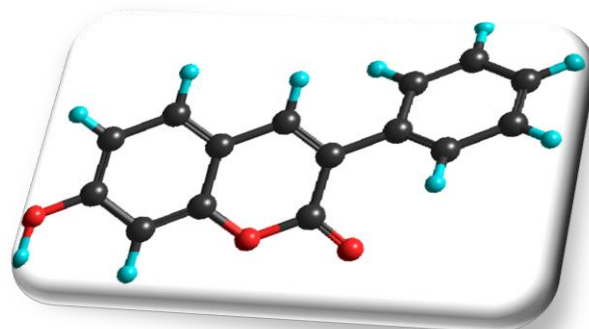
12.10. Ogólna procedura syntezy pochodnych 3-fenylo-7-hydroksy-kumaryny 101a-g

Do wysuszonej kolby kulistej o pojemności 25 mL, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną oraz rurkę z chlorkiem wapnia, zawierającej 2.0 mmola odpowiedniej pochodnej kwasu fenylooctowego oraz 1.65 mL dichlorometanu, wprowadzono 1.65 mL SOCl₂. Tak przygotowaną mieszaninę ogrzewano do wrzenia przez 4 h, a następnie schłodzono i odparowano rozpuszczalnik. Po rozpuszczeniu pozostałości w 10 mL acetonu, wprowadzono 0.28 g (2.0 mmol) 2,4-dihydroksybenzaldehydu oraz 1.11 g (8.0 mmol) bezwodnego K₂CO₃ i ogrzewano do wrzenia przez 4 h. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej i usunięciu rozpuszczalnika, pozostałość rozpuszczono w zimnej wodzie (20 mL) i zakwaszono kwasem solnym. Otrzymaną zawiesinę ekstrahowano octanem etylu (3 x 20 mL). Po wysuszeniu warstwy organicznej oraz odparowaniu rozpuszczalnika, surowy produkt krystalizowano z metanolu otrzymując odpowiednią pochodną **101a-g**.

3-fenyl-7-hydroksy-kumaryna **101a**

Wydajność: 80 %.

Temperatura topnienia: 210-212 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 11.00-10.20 (1H, brs, OH), 8.16 (1H, s, CH), 7.80-7.30 (6H, m, Ar-H), 6.90-6.70 (2H, m, Ar-H).

¹³C NMR (500 MHz, aceton-d₆), δ (ppm): 161.2, 160.2, 155.7, 140.7, 135.8, 130.1, 128.6, 128.4, 128.3, 123.7, 113.4, 113.0, 102.2.

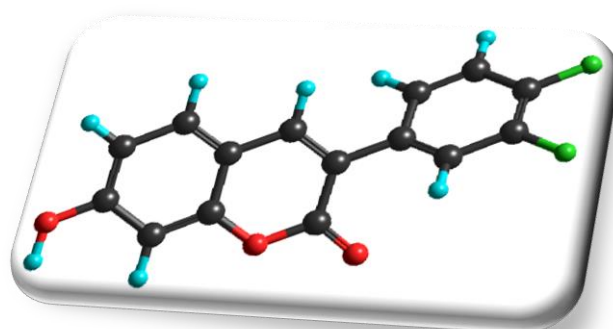
IR (KBr)/cm⁻¹ 3203, 1671, 1587, 1519, 1445, 1131, 858, 736, 632.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 318.0436, zmierzone 318.0469.

3-(3,4-difluorofenyl)-7-hydroksy-kumaryna **101b**

Wydajność: 73 %.

Temperatura topnienia: 288-289 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.70 (1H, s, OH), 8.24 (1H, s, CH), 7.82-7.76 (1H, m, Ar-H), 7.62-7.46 (3H, m, Ar-H), 6.83 (1H, dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 2.2$ Hz, Ar-H), 6.75 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, Ar-H).

¹³C NMR (200 MHz, DMSO), δ (ppm): 162.0, 160.2, 155.4, 149.6 (d, $^1J_{C-F} = 250$ Hz), 148.8 (d, $^1J_{C-F} = 250$ Hz), 142.2, 132.9 (m), 130.6, 125.6 (m), 120.2, 117.9, 117.5, 114.0, 112.2, 102.2.

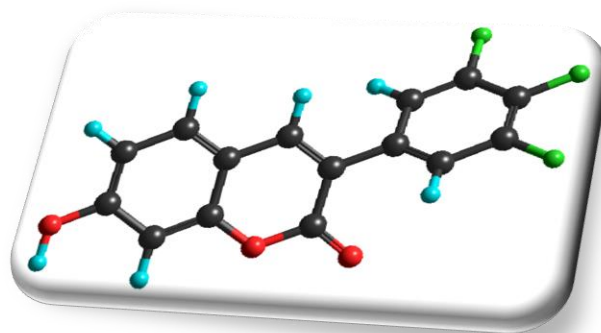
IR (KBr)/cm⁻¹ 3255, 1692, 1610, 1573, 1520, 1423, 1132, 1101, 862, 738, 629.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 275.0520, zmierzone 275.0551.

7-hydroksy-3-(3,4,5-trifluorofenylo)-kumaryna **101c**

Wydajność: 68 %.

Temperatura topnienia: 251-254 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.76 (1H, s, OH), 8.32 (1H, s, CH), 7.72 (2H, dd, $J = 9.3$ Hz, $J = 6.8$ Hz, Ar-H), 7.58 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 6.84 (1H, dd, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.2$ Hz, Ar-H), 6.76 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, Ar-H).

¹³C NMR (200 MHz, DMSO), δ (ppm): 162.4, 160.0, 155.5, 150.3 (d, $^1J_{C-F} = 245$ Hz), 142.9, 138.7 (d, $^1J_{C-F} = 250$ Hz), 132.2 (m), 130.8, 119.0, 114.2, 113.2 (m), 112.0, 102.2.

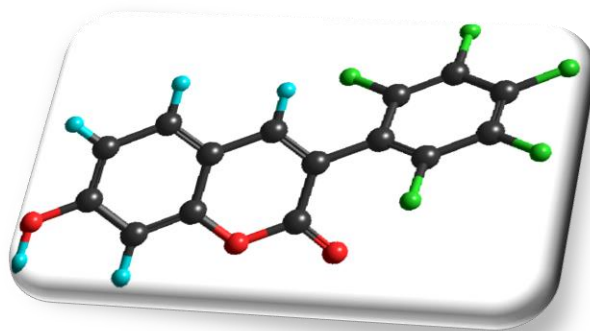
IR (KBr)/cm⁻¹ 3426, 1695, 1615, 1579, 1528, 1437, 1132, 1103, 858, 739, 628.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 293.0426, zmierzone 293.0443.

7-hydroksy-3-(2,3,4,5,6-pentafluorofenylo)-kumaryna **101d**

Wydajność: 74 %.

Temperatura topnienia: 225-227 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.92 (s, 1H, OH), 8.28 (1H, s, CH), 7.68-7.58 (1H, m, Ar-H), 6.92-6.74 (2H, m, Ar-H).

¹³C NMR (500 MHz, acetone-d₆), δ (ppm): 162.8, 158.4, 156.6, 146.8, 145.2 (d, $^1J_{C-F} = 247$ Hz), 141.4 (d, $^1J_{C-F} = 252$ Hz), 137.9 (d, $^1J_{C-F} = 250$ Hz), 130.8, 114.0, 111.8, 110.8 (m), 110.1, 102.7.

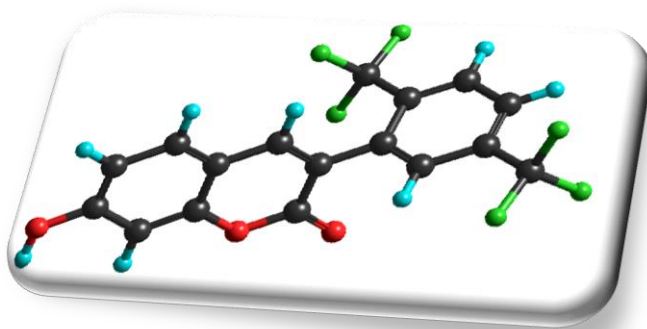
IR (KBr)/cm⁻¹ 3377, 1699, 1606, 1575, 1519, 1429, 1124, 1108, 851, 740, 630.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 329.0237, zmierzone 329.0271.

3-[2,5-bis(trifluorometylo)fenylo]-7-hydroksy-kumaryna 101e

Wydajność: 72 %.

Temperatura topnienia: 116-120 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.75 (1H, s, OH), 8.11-8.00 (4H, m, CH, Ar-H), 7.58 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 6.84 (1H, dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 2.2$ Hz, Ar-H), 6.80 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, Ar-H).

¹³C NMR (200 MHz, DMSO), δ (ppm): 162.2, 160.2, 155.8, 143.6, 135.9, 133.9-131.3 (m), 130.6, 130.0 (m), 128.1 (m), 126.4, 123.7 (q, $^1J_{C-F} = 274$ Hz), 120.4, 114.0, 111.4, 102.5.

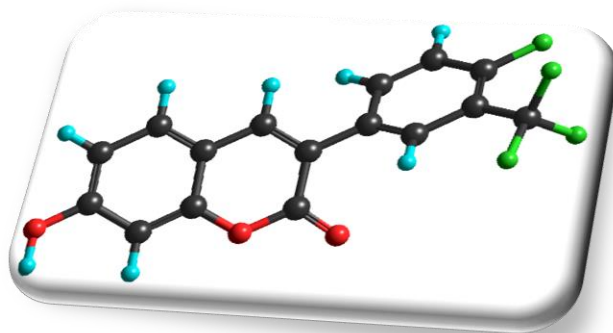
IR (KBr)/cm⁻¹ 3276, 1699, 1610, 1575, 1506, 1418, 1130, 1116, 843, 751, 625.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 375.0456, zmierzone 375.0536.

3-[4-fluoro-3-(trifluorometylo)fenylo]-7-hydroksy-kumaryna 101f

Wydajność: 65 %.

Temperatura topnienia: 241-244 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.71 (1H, s, OH), 8.31 (1H, s, CH), 8.12-8.04 (2H, m, Ar-H), 7.63-7.56 (2H, m, Ar-H), 6.86-6.82 (1H, m, Ar-H), 6.76 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, Ar-H).

¹³C NMR (200 MHz, DMSO), δ (ppm): 162.1, 160.4, 158.7 (d, $^1J_{C-F} = 211$ Hz), 155.5, 142.6, 135.4 (m), 132.5 (m), 130.7, 127.3 (m), 123.0 (q, $^1J_{C-F} = 272$ Hz), 120.0, 117.7, 117.3, 114.0, 112.2, 102.2.

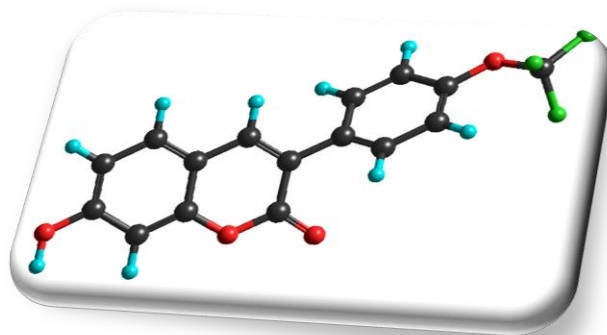
IR (KBr)/cm⁻¹ 3204, 1674, 1589, 1566, 1506, 1431, 1122, 1112, 846, 741, 630.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 325.0488, zmierzone 325.0525.

7-hydroksy-3-[4-(trifluorometoksy)fenylo]-kumaryna **101g**

Wydajność: 62 %.

Temperatura topnienia: 219-222 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.67 (1H, s, OH), 8.22 (1H, s, CH), 7.81 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 7.59 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 7.43 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 6.83 (1H, dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 2.2$ Hz, Ar-H), 6.76 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, Ar-H).

¹³C NMR (200 MHz, DMSO), δ (ppm): 161.9, 160.4, 155.5, 148.3, 142.1, 134.8, 130.6, 130.5, 121.1, 120.5 (q, $^1J_{C-F} = 256$ Hz), 113.9, 112.3, 102.2.

IR 3310, 1708, 1606, 1583, 1514, 1421, 1129, 1109, 848, 743, 631.

HRMS (m/z) $[M+H]^+$ obliczone 323.0531, zmierzone 323.0557.

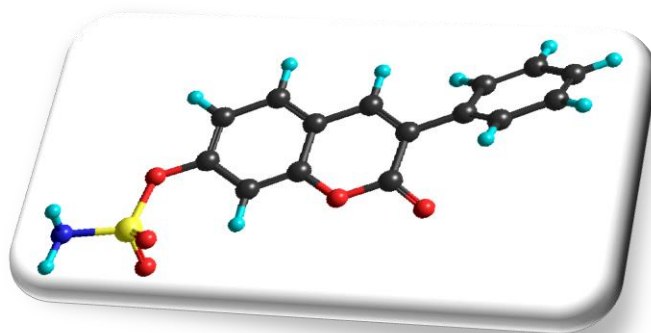
12.11. Ogólna procedura syntezy pochodnych 7-O-amidosiarczanu-3-fenylo-kumaryny **Ila-g**

W kolbie kulistej o pojemności 10 mL zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną oraz rurkę z chlorkiem wapnia umieszczono 0.6 mL dichlorometanu i 0.16 mL izocyjanianu chlorosulfonylu. Do tak przygotowanego roztworu wprowadzono mieszaninę 0.075 mL kwasu mrówkowego i 1.9 μ L DMA. Całość ogrzewano w łaźni wodnej o temperaturze 35 °C. Po upływie 3.5 h, do wygenerowanego chloroamidosiarczanu dodano 1.3 mmola odpowiedniej pochodnej 3-fenylo-7-hydroksykumaryny **101a-g** rozpuszczonej w 4.5 mL DMA. Po upływie 24 h, zawartość kolby przeniesiono do zlewki z wodą. Powstały osad surowego produktu odsączono i krystalizowano z acetonitrylu otrzymując odpowiednią pochodną **Ila-g**.

7-*O*-amidosiarczan-3-fenylo-kumaryny **IIa**

Wydajność: 90 %.

Temperatura topnienia: 198-201 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.40-8.20 (3H, m, NH₂, CH), 7.88 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, Ar-H), 7.80-7.60 (2H, m, Ar-H), 7.60-7.20 (5H, m, Ar-H).

¹³C NMR (500 MHz, aceton-d₆), δ (ppm): 159.5, 154.2, 152.7, 139.7, 135.1, 129.9, 128.9, 128.8, 128.5, 127.7, 119.0, 118.6, 110.0.

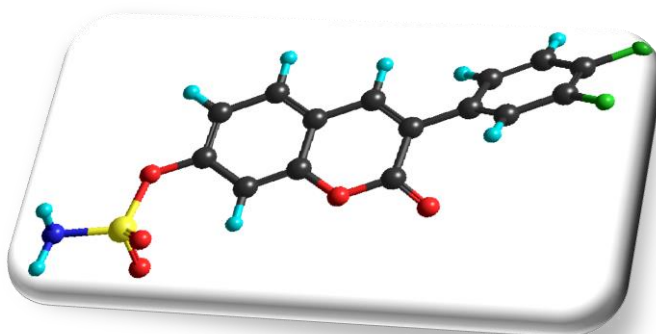
IR 3267, 3205, 1672, 1608, 1494, 1363, 1186, 1137, 757.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 318.0436, zmierzone 318.0469.

7-*O*-amidosiarczan-3-(3,4-difluorofenylo)-kumaryny **IIb**

Wydajność: 87 %.

Temperatura topnienia: 190-193 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.38 (1H, s, CH), 8.28 (2H, s, NH₂), 7.87-7.80 (2H, m, Ar-H), 7.64-7.52 (2H, m, Ar-H), 7.37 (1H, s, Ar-H), 7.28-7.34 (1H, m, Ar-H).

¹³C NMR (200 MHz, aceton-d₆), δ (ppm): 159.0, 154.0, 152.8, 150.2 (d, ¹*J*_{C-F} = 251 Hz), 149.6 (d, ¹*J*_{C-F} = 249 Hz), 140.1, 132.2 (m), 129.8, 125.4 (m), 125.0, 118.8, 117.9, 117.4 (m), 117.0, 109.8.

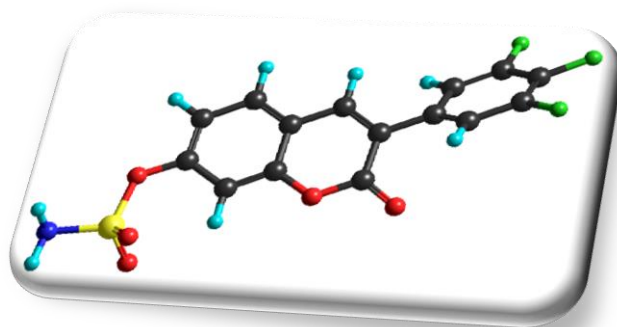
IR (KBr)/cm⁻¹ 3394, 3290, 1707, 1616, 1520, 1369, 1180, 1113, 1098, 750.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 354.0248, zmierzone 354.0277.

7-*O*-amidosiarczan-3-(3,4,5-trifluorofenylo)-kumaryny **IIC**

Wydajność: 85 %.

Temperatura topnienia: 185-187 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.44 (1H, s, CH), 8.29 (2H, s, NH₂), 7.84 (1H, d, J = 8.8 Hz, Ar-H), 7.79-7.72 (2H, m, Ar-H), 7.38 (1H, d, J = 2.0 Hz, Ar-H), 7.32 (1H, dd, J = 8.3 Hz, J = 2.0 Hz, Ar-H).

¹³C NMR (200 MHz, aceton-d₆), δ (ppm): 158.8, 154.1, 153.0, 150.5 (d, $^1J_{C-F}$ = 255 Hz), 140.9, 139.4 (d, $^1J_{C-F}$ = 252 Hz), 131.4 (m), 130.0, 123.9, 118.9, 117.8, 113.1 (m), 109.8.

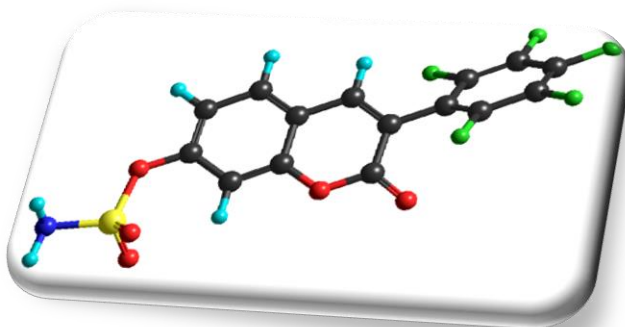
IR (KBr)/cm⁻¹ 3386, 3284, 1711, 1610, 1530, 1359, 1183, 1118, 1109, 765.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 372.0154, zmierzone 372.0184.

7-*O*-amidosiarczan-3-(2,3,4,5,6-pentafluorofenylo)-kumaryny **IId**

Wydajność: 82 %.

Temperatura topnienia: 157-160 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.48 (1H, s, CH), 8.30 (2H, s, NH₂), 7.93 (1H, d, J = 8.3 Hz, Ar-H), 7.50-7.25 (2H, m, Ar-H).

¹³C NMR (500 MHz, aceton-d₆), δ (ppm): 157.7, 155.1, 154.1, 146.2, 145.1 (d, $^1J_{C-F}$ = 248 Hz), 141.7 (d, $^1J_{C-F}$ = 253 Hz), 137.9 (d, $^1J_{C-F}$ = 251 Hz), 130.7, 119.5, 117.2, 114.6, 110.5, 110.1 (t, $^2J_{C-F}$ = 18 Hz).

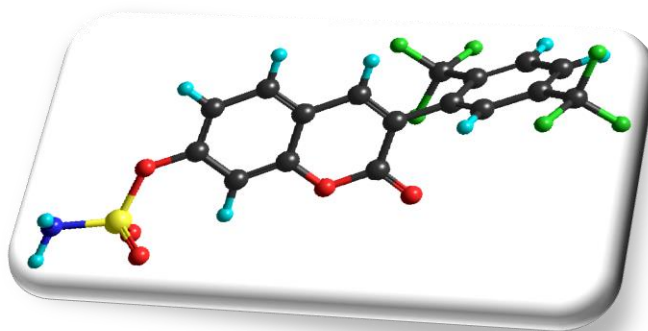
IR (KBr)/cm⁻¹ 3412, 3301, 1732, 1620, 1527, 1365, 1175, 1122, 1105, 750.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 407.9965, zmierzone 408.0019.

7-O-amidosiarczan-3-[2,5-bis(trifluorometylo)fenylo]-kumaryny *IIe*

Wydajność: 86 %.

Temperatura topnienia: 212-214 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.30 (2H, s, NH₂), 8.20 (1H, s, CH), 8.14-8.06 (3H, m, Ar-H), 7.86 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 7.43 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, Ar-H), 7.33 (1H, dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 2.2$ Hz, Ar-H).

¹³C NMR (200 MHz, aceton-d₆), δ (ppm): 159.0, 154.5, 153.1, 142.1, 135.1, 133.7-132.0 (m), 130.0, 129.2 (m), 127.7 (m), 126.2, 125.3, 123.5 (q, $^1J_{C-F} = 271$ Hz), 119.0, 117.3, 110.2.

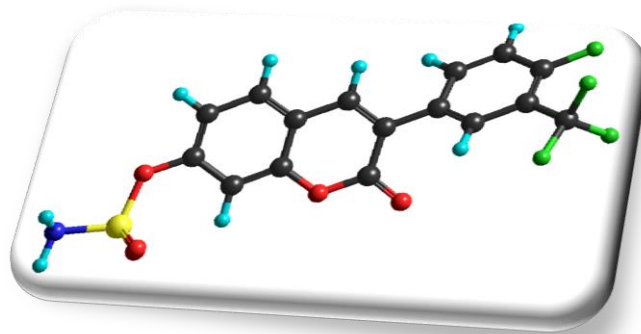
IR (KBr)/cm⁻¹ 3361, 3267, 1722, 1616, 1510, 1366, 1184, 1130, 1112, 752.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 454.0184, zmierzone 454.0308.

7-O-amidosiarczan-3-[4-fluoro-3-(trifluorometylo)fenylo]-kumaryny *IIf*

Wydajność: 79 %.

Temperatura topnienia: 173-176 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.44 (1H, s, CH), 8.29 (2H, s, NH₂), 8.16-8.08 (2H, m, Ar-H), 7.87 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 7.65 (1H, t, $J = 9.8$ Hz, Ar-H), 7.39 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, Ar-H), 7.32 (1H, dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 2.2$ Hz, Ar-H).

¹³C NMR (200 MHz, aceton-d₆), δ (ppm): 159.4 (d, $^1J_{C-F} = 256$ Hz), 159.2, 154.2, 152.9, 140.6, 135.1 (m), 131.7 (m), 129.9, 127.5 (m), 124.9, 122.8 (q, $^1J_{C-F} = 271$ Hz), 118.8, 118.0, 117.2, 116.8, 109.8.

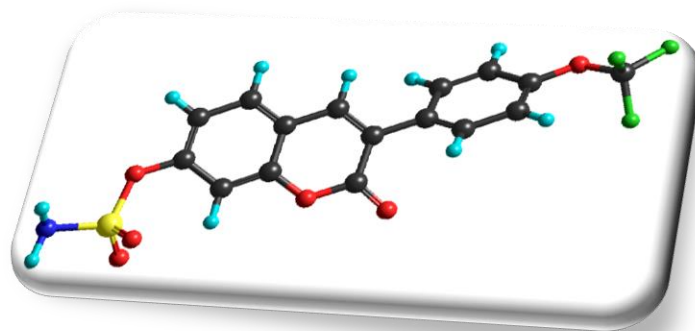
IR (KBr)/cm⁻¹ 3359, 3196, 1707, 1617, 1504, 1358, 1192, 1123, 1112, 755.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 404.0216, zmierzone 404.0254.

7-*O*-amidosiarczan-3-[4-(trifluorometoksy)fenylo]-kumaryny **IIg**

Wydajność: 88 %.

Temperatura topnienia: 190-193 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.36 (1H, s, CH), 8.27 (2H, s, NH₂), 7.89-7.84 (3H, m, Ar-H), 7.48 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 7.37 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, Ar-H), 7.31 (1H, dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 2.2$ Hz, Ar-H).

¹³C NMR (200 MHz, aceton-d₆), δ (ppm): 159.2, 154.1, 152.7, 149.1, 140.1, 134.0, 130.5, 129.7, 125.9, 120.7, 120.5 (q, $^1J_{C-F} = 256$ Hz), 118.8, 118.1, 109.8.

IR (KBr)/cm⁻¹ 3349, 3199, 1710, 1615, 1510, 1363, 1183, 1143, 1111, 753.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 402.0259, zmierzone 402.0310.

12.12. Ogólna procedura syntezy *N*-acylowanych pochodnych 3-(4-aminofenylo)-7-hydroksy-kumaryny **102a-k**

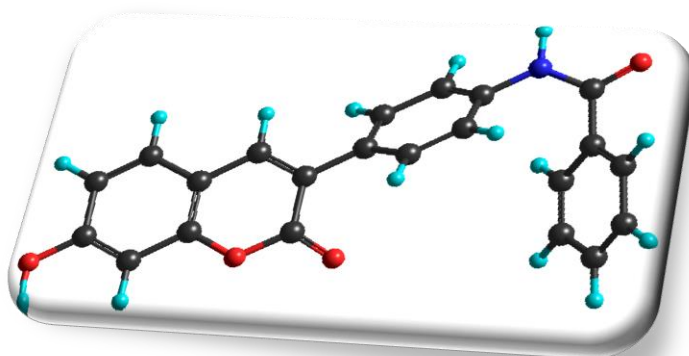
Do wysuszonej kolby kulistej o pojemności 10 mL, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną oraz rurkę z chlorkiem wapnia, zawierającej 2.0 mmola odpowiedniej pochodnej kwasu benzoowego lub fenyllooctowego oraz 1.65 mL dichlorometanu, wprowadzono 1.65 mL SOCl₂. Tak przygotowaną mieszaninę ogrzewano do wrzenia przez 4 h, a następnie schłodzono i odparowano rozpuszczalnik. Po rozpuszczeniu pozostałości w 10 mL acetonu, wprowadzono 0.51 g (2.0 mmol) 3-(4-aminofenylo)-7-hydroksy-kumaryny **91** oraz 1.1 g (8.0 mmol) bezwodnego K₂CO₃ i ogrzewano do wrzenia przez 4 h. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej i usunięciu rozpuszczalnika, pozostałość rozpuszczono w zimnej wodzie (20 mL) i zakwaszono kwasem solnym. Wytrącony osad surowego produktu odsączono i krystalizowano z metanolu lub etanolu otrzymując czyste pochodne **102a-k**.

3-(4-benzoiloamino-fenilo)-7-hydroksy-kumaryna 102a

Wydajność: 72 %.

Temperatura topnienia: 281-284 °C

(z rozkładem).



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.59 (1H, s, OH), 10.37 (1H, s, NH), 8.16 (1H, s, CH), 7.97 (2H, d, $J = 7.1$ Hz, Ar-H), 7.85 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 7.71 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 7.62-7.50 (4H, m, Ar-H), 6.82 (1H, dd, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.3$ Hz, Ar-H), 6.75 (1H, d, $J = 2.2$, Ar-H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 166.3, 161.8, 160.8, 155.5, 141.0, 139.7, 135.5, 132.4, 130.9, 130.6, 129.2, 129.1, 128.4, 122.4, 120.5, 114.1, 112.8, 102.4.

IR (KBr)/cm⁻¹ 3363, 3198, 1696, 1664, 1601, 1516, 1410. 1325, 1283, 1202, 1158, 1129, 988, 837.

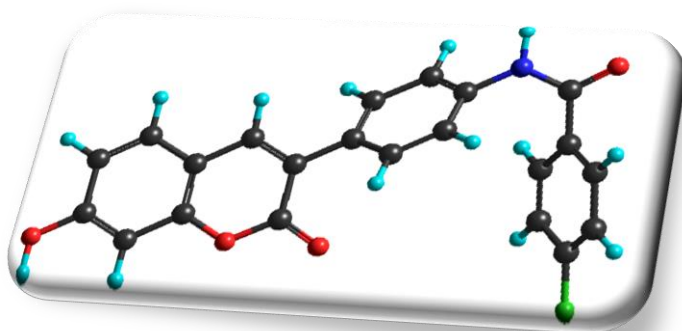
HRMS (m/z) [M-H]⁻ obliczone 356.0923, zmierzone 356.0960.

3-[4-(4-fluoro-benzoiloamino)-fenilo]-7-hydroksy-kumaryna 102b

Wydajność: 66 %.

Temperatura topnienia: 321-324 °C

(z rozkładem).



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.59 (1H, s, OH), 10.38 (1H, s, NH), 8.16 (1H, s, CH), 8.08-8.02 (2H, m, Ar-H), 7.83 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 7.71 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 7.59 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 7.40-7.34 (2H, m, Ar-H), 6.82 (1H, dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 2.4$ Hz, Ar-H), 6.75 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, Ar-H).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 164.4, 164.1 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 249$ Hz), 161.0, 160.1, 154.7, 140.2, 138.9, 131.2 (m). 130.5, 130.3, 129.8, 128.4, 121.7, 119.8, 115.3 (m), 113.3, 112.0, 101.7.

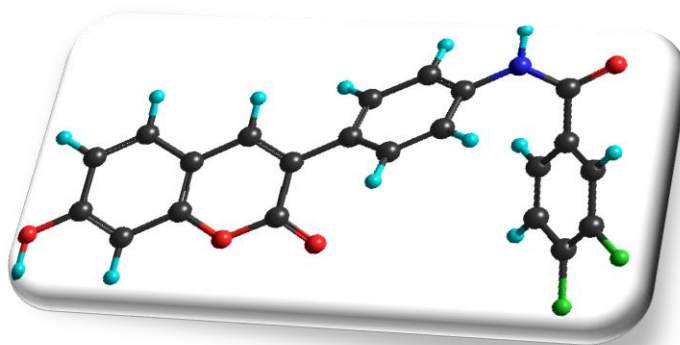
IR (KBr)/ cm^{-1} 3544, 3337, 1705, 1665, 1599, 1501, 1412, 1321, 1282, 1213, 1153, 1118, 990, 822.

HRMS (m/z) $[\text{M-H}]^-$ obliczone 374.0829, zmierzone 374.0883.

3-[4-(3,4-difluoro-benzoiloamino)-fenylo]-7-hydroksy-kumaryna 102c

Wydajność: 65 %.

Temperatura topnienia: 334-337 °C
(z rozkładem).



^1H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.61 (1H, s, OH), 10.44 (1H, s, NH), 8.18 (1H, s, CH), 8.16-8.00 (2H, m, Ar-H), 7.90-7.56 (6H, m, Ar-H), 6.88-6.76 (2H, m, Ar-H).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 163.2, 161.1, 159.7, 154.7, 150.0 (m), 147.8 (m), 140.3, 138.6, 132.1 (m), 130.5, 129.9, 128.5, 125.3 (m), 121.6, 119.9, 117.4 (m), 113.4, 112.0, 101.7.

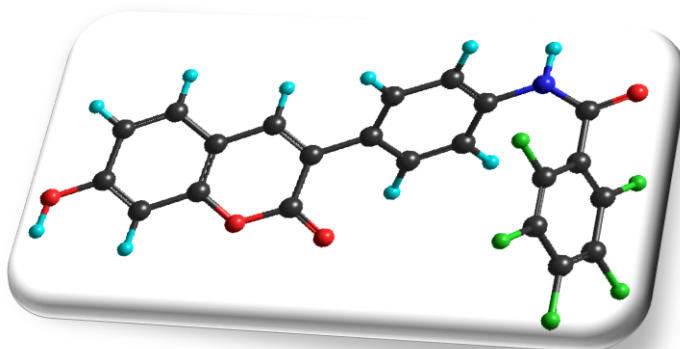
IR (KBr)/ cm^{-1} 3577, 3337, 1703, 1666, 1600, 1503, 1411, 1322, 1288, 1214, 1160, 1122, 994, 824.

HRMS (m/z) $[\text{M-H}]^-$ obliczone 392.0734, zmierzone 392.0777.

7-hydroksy-3-(4-pentafluorobenziloamino-fenylo)-kumaryna 102d

Wydajność: 62 %.

Temperatura topnienia: 243-245 °C
(z rozkładem).



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 11.11 (1H, s, OH), 10.61 (1H, s, NH), 8.17 (1H, s, CH), 7.78-7.68 (4H, m, Ar-H), 7.60 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 6.81 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, Ar-H), 6.75 (1H, s, Ar-H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 161.2, 160.0, 154.8, 143.1 (d, $^1J_{C-F} = 255$), 140.6, 137.6, 137.0 (d, $^1J_{C-F} = 252$ Hz), 131.4, 129.9, 129.1, 128.9, 121.4, 119.2, 113.4, 112.7 (m), 112.0, 101.7.

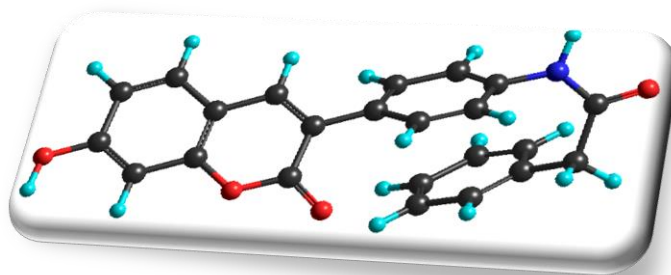
IR (KBr)/ cm^{-1} 3307, 3201, 1695, 1666, 1608, 1502, 1412, 1335, 1282, 1214, 1158, 1126, 992, 844.

HRMS (m/z) $[M-H]^-$ obliczone 446.0452, zmierzone 446.0502.

3-(4-fenyloacetyloamino-fenylo)-7-hydroksy-kumaryna 102e

Wydajność: 75 %.

Temperatura topnienia: 237-239 °C
(z rozkładem).



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.59 (1H, s, OH), 10.30 (1H, s, NH), 8.12 (1H, s, CH), 7.68-7.54 (5H, m, Ar-H), 7.36-7.28 (4H, m, Ar-H), 7.26-7.22 (1H, m, Ar-H), 6.80 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 6.73 (1H, s, Ar-H), 3.65 (2H, s, CH₂).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 169.9, 161.7, 160.8, 155.4, 140.8, 139.7, 136.6, 130.6, 130.5, 129.8, 129.3, 129.0, 127.3, 122.4, 122.4, 119.3, 114.1, 112.8, 102.4, 44.0.

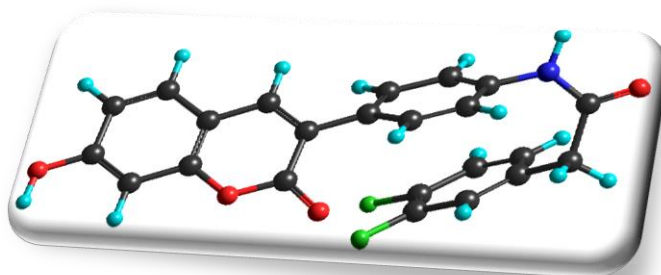
IR (KBr)/ cm^{-1} 3351, 3190, 1705, 1655, 1609, 1517, 1410, 1321, 1285, 1211, 1165, 1129, 991, 840.

HRMS (m/z) $[\text{M}-\text{H}]^-$ obliczone 370.1079, zmierzone 370.1092.

3-{4-[2-(3,4-difluoro-fenilo)-acetyloamino]-fenylo}-7-hidroksy-kumaryna 102f

Wydajność: 68 %.

Temperatura topnienia: 281-283 °C
(z rozkładem).



^1H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.58 (1H, s, OH), 10.30 (1H, s, NH), 8.12 (1H, s, CH), 7.68-7.62 (4H, m, Ar-H), 7.58 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 7.42-7.34 (2H, m, Ar-H), 7.20-7.14 (1H, m, Ar-H), 6.80 (1H, dd, $J = 8.8$ Hz, $J = 2.1$ Hz, Ar-H), 6.73 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, Ar-H), 3.67 (2H, s, CH_2).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 168.5, 161.0, 160.1, 154.7, 149.2 (d, $^1J_{\text{C-F}}$ 245), 148.5 (d, $^1J_{\text{C-F}}$ 244), 140.1, 138.9, 133.4 (m), 129.8, 128.6, 126.0 (m), 121.6, 118.7 (m), 118.1, 117.3, 117.0, 113.3, 112.0, 101.7, 42.0.

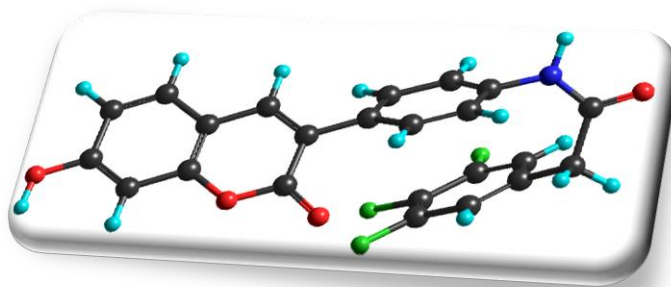
IR (KBr)/ cm^{-1} 3350, 3215, 1702, 1658, 1614, 1514, 1412, 1318, 1283, 1200, 1164, 1129, 994, 841.

HRMS (m/z) $[\text{M}-\text{H}]^-$ obliczone 406.0891, zmierzone 406.0929.

7-hydroksy-3-{4-[2-(3,4,5-trifluoro-fenilo)-acetyloamino]-fenylo}-kumaryna 102g

Wydajność: 67 %.

Temperatura topnienia: 280-282 °C
(z rozkładem).



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.58 (1H, s, OH), 10.31 (1H, s, NH), 8.12 (1H, s, CH), 7.68-7.60 (4H, m, Ar-H), 7.58 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 7.32-7.26 (2H, m, Ar-H), 6.80 (1H, dd, $J = 8.8$ Hz, $J = 2.0$ Hz, Ar-H), 6.74 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, Ar-H), 4.08 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 168.0, 161.0, 160.1, 154.7, 150.0 (d, $^1J_{C-F} = 252$ Hz), 140.2, 138.8, 135.2 (m), 133.0 (m), 129.8 (m), 128.6, 121.6, 118.7, 114.2, 113.8, 113.3, 112.0, 101.7, 41.8.

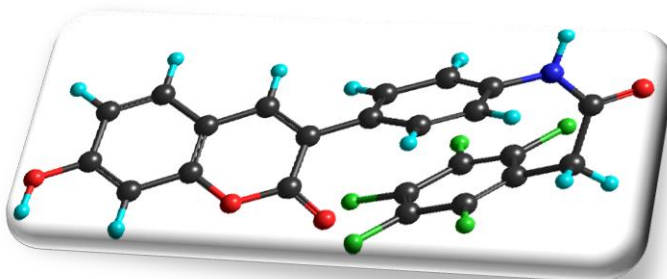
IR (KBr)/cm⁻¹ 3342, 3243, 1691, 1662, 1614, 1525, 1413, 1322, 1282, 1201, 1161, 1130, 993, 842.

HRMS (m/z) [M-H]⁻ obliczone 424.0797, zmierzone 424.0868.

7-hydroksy-3-[4-(2-pentafluorofenilo-acetyloamino)-fenylo]-kumaryna 102h

Wydajność: 73 %.

Temperatura topnienia: 291-293 °C
(z rozkładem).



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.59 (1H, s, OH), 10.50 (1H, s, NH), 8.13 (1H, s, CH), 7.70-7.60 (4H, m, Ar-H), 7.58 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 6.80 (1H, dd, $J = 8.8$ Hz, $J = 2.4$ Hz, Ar-H), 6.74 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, Ar-H), 3.92 (2H, s, CH₂).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 165.7, 161.0, 160.0, 154.7, 144.9 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 244$ Hz), 140.2, 138.6 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 234$ Hz), 138.5, 136.8 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 249$ Hz), 130.1, 129.8, 128.7, 121.5, 118.7, 113.3, 112.0, 109.9 (m), 101.6, 29.8.

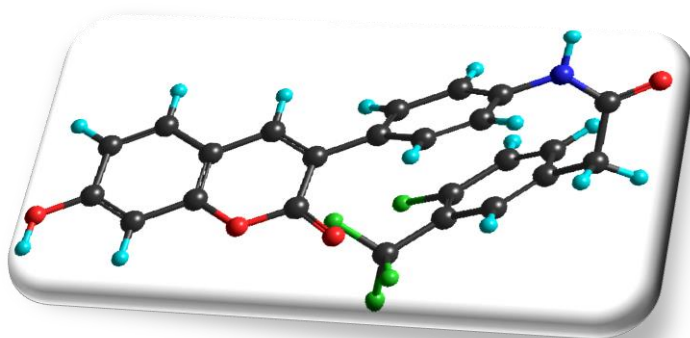
IR (KBr)/ cm^{-1} 3322, 3245, 1685, 1655, 1606, 1503, 1416, 1327, 1291, 1194, 1159, 1132, 1001, 842.

HRMS (m/z) $[\text{M-H}]^-$ obliczone 460.0608, zmierzone 460.0670.

3-{4-[2-(4-fluoro-3-trifluorometylo-fenilo)-acetyloamino]-fenilo}-7-hydroksy-kumaryna 102i

Wydajność: 62 %.

Temperatura topnienia: 267-271 °C
(z rozkładem).



^1H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.58 (1H, s, OH), 10.35 (1H, s, NH), 8.12 (1H, s, CH), 7.75 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, Ar-H), 7.74-7.62 (5H, m, Ar-H), 7.58 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 7.52-7.40 (1H, m, Ar-H), 6.81 (1H, dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 2.0$ Hz, Ar-H), 6.74 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, Ar-H), 3.80 (2H, s, CH_2).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 168.5, 161.0, 160.1, 157.7 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 252$ Hz), 154.7, 140.1, 138.8, 136.1 (m), 132.9 (m), 129.8, 128.6, 127.9 (m), 122.7 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 272$ Hz), 121.6, 120.0, 118.6, 117.1, 116.7, 113.3, 112.0, 101.6, 50.0.

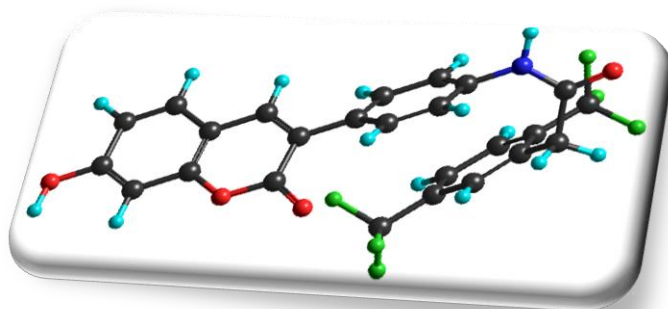
IR (KBr)/ cm^{-1} 3384, 3262, 1697, 1669, 1601, 1505, 1410, 1326, 1287, 1209, 1159, 1122, 990, 833.

HRMS (m/z) $[\text{M-H}]^-$ obliczone 456.0859, zmierzone 456.0872.

3-{4-[2-(2,5-bis-trifluorometylo-fenylo)-acetyloamino]-fenylo}-7-hydroksy-kumaryna 102j

Wydajność: 68 %.

Temperatura topnienia: 271-272 °C
(z rozkładem).



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.58 (1H, s, OH), 10.41 (1H, s, NH), 8.12 (1H, s, CH), 7.98-7.94 (2H, m, Ar-H), 7.89 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, Ar-H), 7.70-7.54 (5H, m, Ar-H), 6.80 (1H, dd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 2.4 Hz, Ar-H), 6.74 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, Ar-H), 4.09 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 167.5, 161.0, 160.1, 154.7, 140.2, 138.8, 135.6, 132.5, 131.8, 131.6, 130.6 (m), 129.8, 128.7, 127.0 (m), 124.4 (m), 123.7 (q, ¹*J*_{C-F} = 274 Hz), 123.5 (q, ¹*J*_{C-F} = 274 Hz), 121.6, 118.6, 113.3, 112.0, 101.7.

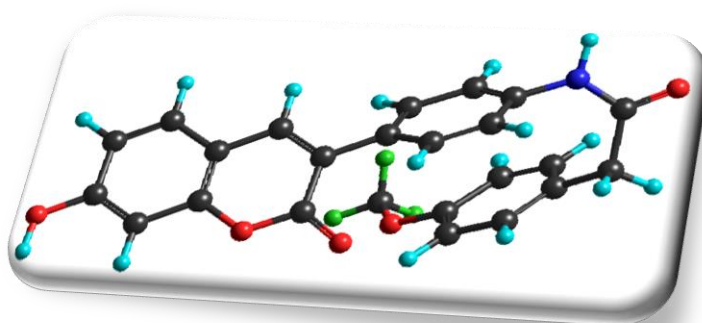
IR (KBr)/cm⁻¹ 3308, 3262, 1669, 1611, 1516, 1412, 1318, 1290, 1187, 1168, 1114, 997, 838.

HRMS (m/z) [M-H]⁻ obliczone 506.0827, zmierzone 506.0851.

7-hydroksy-3-{4-[2-(4- trifluorometoksy-fenylo)-acetyloamino]-fenylo}-kumaryna 102k

Wydajność: 70 %.

Temperatura topnienia: 261-262 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.58 (1H, s, OH), 10.33 (1H, s, NH), 8.12 (1H, s, CH), 7.68-7.62 (4H, m, Ar-H), 7.58 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, Ar-H), 7.45 (2H, d, *J* =

8.3 Hz, Ar-H), 7.32 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 6.80 (1H, dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 2.0$ Hz, Ar-H), 6.74 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, Ar-H), 3.71 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 168.8, 161.0, 160.1, 154.7, 147.1, 140.1, 138.9, 135.4, 131.0, 129.8, 128.6, 121.6, 120.9, 120.1 (q, $^1J_{C-F} = 256$ Hz), 118.6, 113.3, 112.0, 101.6, 44.9.

IR (KBr)/cm⁻¹ 3352, 3260, 1696, 1661, 1612, 1504, 1412, 1322, 1280, 1197, 1156, 1129, 991, 841.

HRMS (m/z) [M-H]⁻ obliczone 454.0902, zmierzone 454.0960.

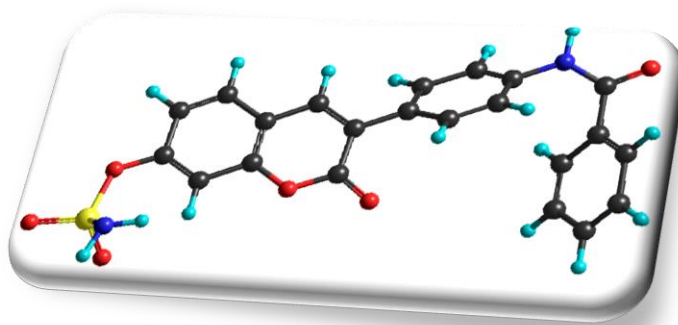
12.13. Ogólna procedura syntezy pochodnych 7-O-amidosiarczanu-3-(4-benzoiloamino-fenylo)-kumaryny i 7-O-amidosiarczanu-3-(4-fenylacetyloamino-fenylo)-kumaryny IIIa-k

W kolbie kulistej o pojemności 10 mL zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną oraz rurkę z chlorkiem wapnia umieszczono 0.6 mL dichlorometanu i 0.16 mL izocyjanianu chlorosulfonylu. Do tak przygotowanego roztworu wprowadzono mieszaninę 0.075 mL kwasu mrówkowego i 1.9 μ L DMA. Całość ogrzewano w łaźni wodnej o temperaturze 35 °C. Po upływie 3.5 h, do wygenerowanego chloroamidosiarczanu dodano 1.3 mmola odpowiedniej pochodnej **102a-k** rozpuszczonej w 4.5 mL DMA. Po upływie 24 h, zawartość kolby przeniesiono do zlewki z wodą. Powstały osad surowego produktu odsączono i krystalizowano z acetonitrylu otrzymując odpowiednią pochodną **IIIa-k**.

7-O-amidosiarczan-3-(4-benzoiloamino-fenylo)-kumaryny IIIa

Wydajność: 79 %.

Temperatura topnienia: 267-270 °C
(z rozkładem).



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.42 (1H, s, NH), 8.31 (1H, s, CH), 8.26 (2H, s, NH₂), 7.97 (2H, d, $J = 6.3$ Hz, Ar-H), 7.92-7.84 (3H, m, Ar-H), 7.80-7.74 (2H,

m, Ar-H), 7.66-7.52 (3H, m, Ar-H), 7.36 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, Ar-H), 7.29 (1H, dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 2.0$ Hz, Ar-H).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 166.4, 160.2, 153.9, 152.6, 140.4, 139.7, 135.5, 132.4, 130.4, 130.2, 129.5, 129.1, 128.4, 126.6, 120.5, 119.4, 118.7, 110.2.

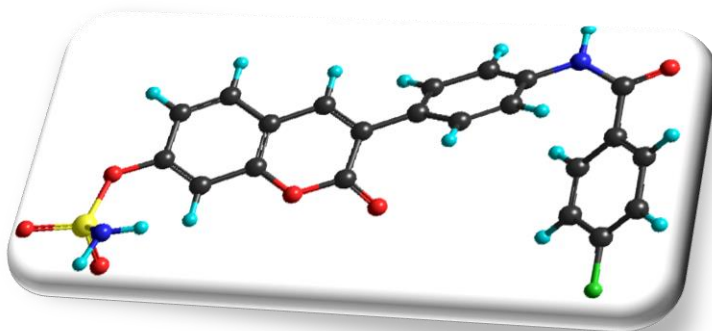
IR (KBr)/ cm^{-1} 3332, 3294, 1701, 1668, 1602, 1513, 1412, 1331, 1244, 1190, 1118, 979, 843.

HRMS (m/z) $[\text{M}-\text{H}]^-$ obliczone 435.0651, zmierzone 435.0655.

7-O-amidosiarczan-3-[4-(4-fluoro-benzoiloamino)-fenylo]-kumaryny IIIb

Wydajność: 85 %.

Temperatura topnienia: 255-258 °C.



^1H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.44 (1H, s, NH), 8.33 (1H, s, CH), 8.27 (2H, s, NH_2), 8.14-8.02 (2H, m, Ar-H), 7.96-7.72 (5H, m, Ar-H), 7.48-7.26 (4H, m, Ar-H).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 164.4, 164.1 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 249$ Hz), 161.0, 160.1, 159.4, 154.7, 153.2, 151.9, 140.2, 139.5, 139.0, 131.2, 130.4 (m), 129.6 (m), 128.6 (m), 125.8, 121.7, 119.8, 118.6, 117.9, 115.3 (m), 113.3, 112.0, 109.4, 101.7.

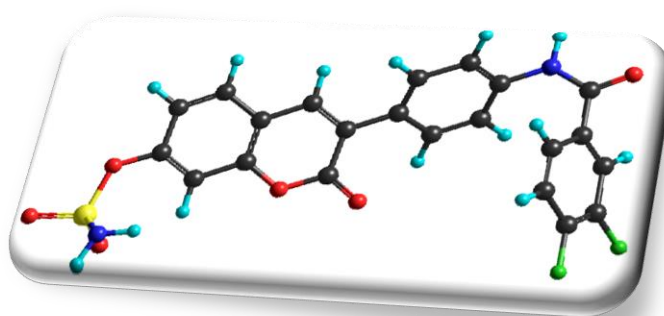
IR (KBr)/ cm^{-1} 3399, 3345, 1701, 1660, 1610, 1499, 1412, 1327, 1253, 1181, 1112, 993, 834.

HRMS (m/z) $[\text{M}-\text{H}]^-$ obliczone 453.0557, zmierzone 453.0608.

7-*O*-amidosiarczan-3-[4-(3,4-difluoro-benzoiloamino)-fenylo]-kumaryny **IIIc**

Wydajność: 88 %.

Temperatura topnienia: 258-260 °C
(z rozkładem).



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.62 (1H, s, NH), 8.33 (1H, s, CH), 8.27 (2H, s, NH₂), 8.20-8.00 (1H, m, Ar-H), 7.92-7.56 (7H, m, Ar-H), 7.40-7.26 (2H, m, Ar-H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 164.0, 160.1, 154.0, 152.6, 152.2 (d, $^1J_{C-F} = 252$ Hz), 149.8 (d, $^1J_{C-F} = 247$ Hz), 141.1, 139.8 (m), 132.8 (m), 130.5 (m), 129.6, 129.2, 126.5, 126.0, 120.6, 119.4, 118.3 (m), 114.1, 112.8, 110.1, 102.4.

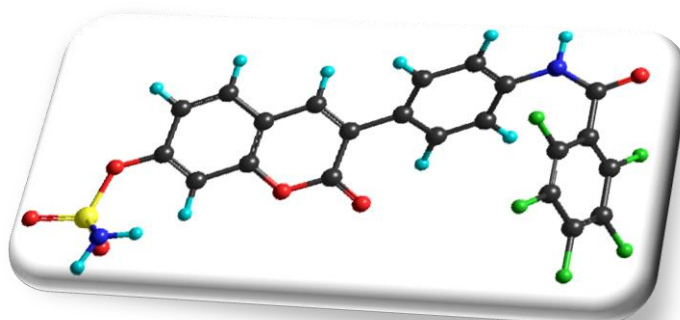
IR (KBr)/cm⁻¹ 3416, 3342, 1699, 1651, 1607, 1506, 1411, 1327, 1246, 1184, 1113, 991, 832.

HRMS (m/z) [M-H]⁻ obliczone 471.0462, zmierzone 471.0486.

7-*O*-amidosiarczan-3-(4-pentafluorobenzoylamino-fenylo)-kumaryny **III d**

Wydajność: 81 %.

Temperatura topnienia: 259-265 °C
(z rozkładem).



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 11.16 (1H, s, NH), 8.31 (1H, s, CH), 8.25 (2H, s, NH₂), 7.87 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 7.82-7.72 (4H, m, Ar-H), 7.36 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, Ar-H), 7.30 (1H, dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 2.4$ Hz, Ar-H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 161.2, 159.3, 154.8 (m), 153.3, 152.0, 143.1 (d, $^1J_{C-F} = 252$ Hz), 140.6, 139.4, 138.2, 137.6, 136.9 (d, $^1J_{C-F} = 247$ Hz), 131.4,

130.7, 129.9 (m), 129.2, 128.9, 125.6, 121.4, 119.2, 118.6, 117.8, 113.4, 112.0 (m), 109.4, 101.7.

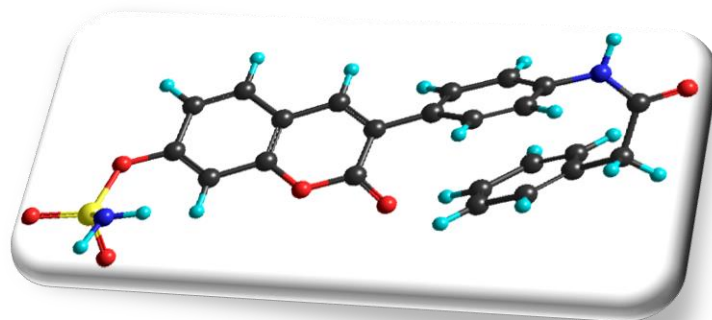
IR (KBr)/cm⁻¹ 3257, 3194, 1711, 1666, 1601, 1501, 1417, 1336, 1253, 1191, 1118, 994, 846.

HRMS (m/z) [M-H]⁻ obliczone 525.0180, zmierzone 525.0177.

7-O-amidosiarczan-3-(4-feniloacetyloamino-fenilo)-kumaryny IIIe

Wydajność: 85 %.

Temperatura topnienia: 208-210 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.30 (1H, s, NH), 8.26 (1H, s, CH), 8.24 (2H, s, NH₂), 7.84 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, Ar-H), 7.72-7.66 (4H, m, Ar-H), 7.36-7.22 (7H, m, Ar-H), 3.66 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 170.0, 160.1, 153.9, 152.6, 140.4, 139.6, 136.6, 130.4, 129.9, 129.8, 129.7, 129.6, 129.0, 127.3, 126.5, 119.4, 119.3, 118.7, 110.1, 44.0.

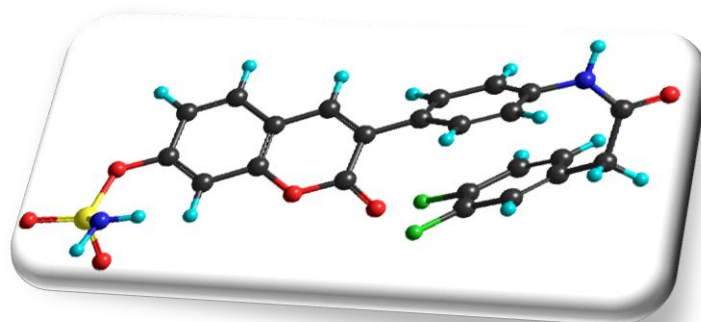
IR (KBr)/cm⁻¹ 3289, 3185, 1712, 1665, 1601, 1499, 1415, 1347, 1248, 1182, 1112, 991, 843.

HRMS (m/z) [M-H]⁻ obliczone 449.0807, zmierzone 449.0813.

7-*O*-amidosiarczan-3-{4-[2-(3,4-difluoro-fenilo)-acetyloamino]-fenylo}-
kumaryny **III_f**

Wydajność: 87 %.

Temperatura topnienia: 212-214 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.35 (1H, s, NH), 8.27 (1H, s, CH), 8.24 (2H, s, NH₂), 7.85 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 7.74-7.64 (4H, m, Ar-H), 7.44-7.36 (2H, m, Ar-H), 7.35 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, Ar-H), 7.28 (1H, dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 2.0$ Hz, Ar-H), 7.20-7.16 (1H, m, Ar-H), 3.69 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 168.7, 161.0, 159.4, 153.2, 151.8, 149.2 (d, $^1J_{C-F} = 244$ Hz), 148.4 (d, $^1J_{C-F} = 244$ Hz), 140.1, 139.5, 138.9, 133.4 (m), 129.8, 129.6 (m), 126.1 (m), 118.7 (m), 117.0, 116.5, 113.3, 109.4, 101.7, 42.0.

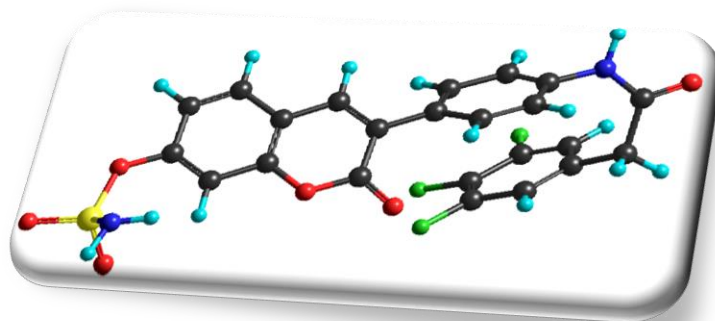
IR (KBr)/cm⁻¹ 3313, 3192, 1714, 1595, 1515, 1414, 1357, 1247, 1185, 1115, 992, 840.

HRMS (m/z) [M-H]⁻ obliczone 485.0619, zmierzone 485.0621.

7-*O*-amidosiarczan-3-{4-[2-(3,4,5-trifluoro-fenilo)-acetyloamino]-fenylo}-
kumaryny **III_g**

Wydajność: 90 %.

Temperatura topnienia: 216-219 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.35 (1H, s, NH), 8.27 (1H, s, CH), 8.24 (2H, s, NH₂), 7.84 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 7.74-7.64 (4H, m, Ar-H), 7.36-7.24 (4H, m, Ar-H), 3.72 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 168.1, 161.0, 159.4, 153.2, 151.8, 149.7 (d, ¹J_{C-F} = 250 Hz), 139.4, 138.9, 135.3 (m), 132.9 (m), 129.7 (m), 128.9 (m), 125.7, 118.7, 117.9, 114.0 (m), 109.4, 101.7, 41.8.

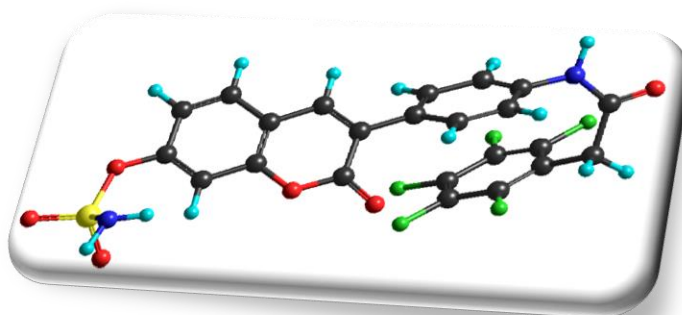
IR (KBr)/cm⁻¹ 3304, 3188, 1704, 1677, 1603, 1504, 1415, 1354, 1248, 1185, 1115, 991, 841.

HRMS (m/z) [M-H]⁻ obliczone 503.0525, zmierzone 503.0586.

7-O-amidosiarczan-3-[4-(2-(pentafluorofenylo-acetyloamino)-fenylo)]-kumaryny IIIh

Wydajność: 82 %.

Temperatura topnienia: 248-250 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.55 (1H, s, NH), 8.28 (1H, s, CH), 8.24 (2H, s, NH₂), 7.85 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, Ar-H), 7.73 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, Ar-H), 7.66 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, Ar-H), 7.35 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, Ar-H), 7.29 (1H, dd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 2.4 Hz, Ar-H), 3.93 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 165.8, 161.0, 159.4, 153.2, 151.9, 145.0 (d, ¹J_{C-F} = 245 Hz), 139.0, 138.3 (d, ¹J_{C-F} = 245 Hz), 132.2 (d, ¹J_{C-F} = 245 Hz), 129.4 (m), 129.0 (m), 125.7, 118.7, 117.9, 113.3, 110.4 (m), 109.4, 101.6, 29.9.

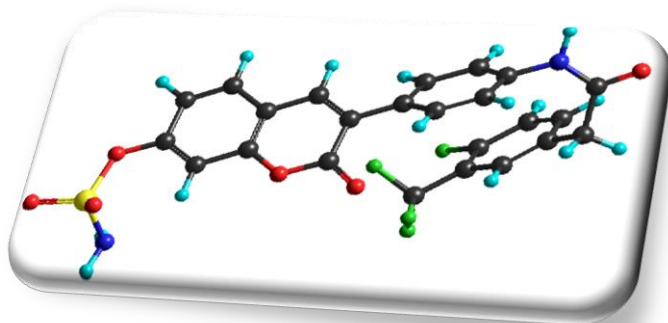
IR (KBr)/cm⁻¹ 3304, 3188, 1705, 1678, 1603, 1505, 1415, 1354, 1250, 1186, 1115, 991, 842.

HRMS (m/z) [M-H]⁻ obliczone 539.0336, zmierzone 539.0396.

7-O-amidosiarczan-3-{4-[2-(4-fluoro-3-trifluorometylo-fenylo)-acetyloamino]-fenylo}-kumaryny IIIi

Wydajność: 83 %.

Temperatura topnienia: 187-190 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.39 (1H, s, NH), 8.26 (1H, s, CH), 8.24 (2H, s, NH₂), 7.84 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 7.78-7.62 (6H, m, Ar-H), 7.52-7.44 (1H, m, Ar-H), 7.34 (1H, s, Ar-H), 7.28 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, Ar-H), 3.80 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 169.4, 160.1, 156.2 (d, $^1J_{C-F} = 245$ Hz), 153.9, 152.6, 140.9, 140.2, 139.7, 136.9 (m), 133.6 (m), 130.4 (m), 129.7 (m), 128.7 (m), 126.5, 123.5 (q, $^1J_{C-F} = 274$ Hz), 119.4, 118.0, 117.6 (m), 114.1, 110.1, 102.4, 42.3.

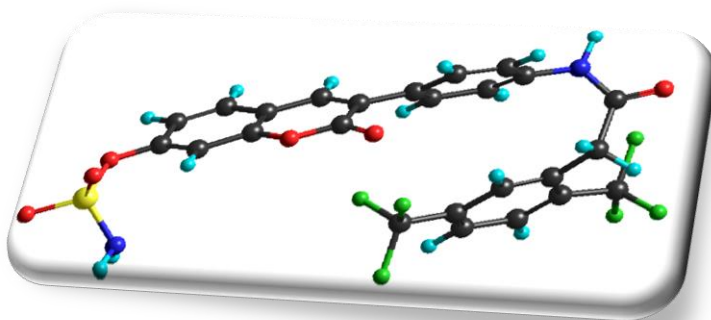
IR (KBr)/cm⁻¹ 3299, 3188, 1711, 1667, 1611, 1508, 1413, 1356, 1244, 1187, 1115, 991, 842.

HRMS (m/z) [M-H]⁻ obliczone 535.0587, zmierzone 535.0593.

7-O-amidosiarczan-3-{4-[2-(2,5-bis-trifluorometylo-fenylo)-acetyloamino]-fenylo}-kumaryny IIIj

Wydajność: 89 %.

Temperatura topnienia: 208-212 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.46 (1H, s, NH), 8.27 (1H, s, CH), 8.24 (2H, s, NH₂), 8.00-7.94 (2H, m, Ar-H), 7.89 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 7.85 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 7.71 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 7.66 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H),

7.35 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, Ar-H), 7.29 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 4.11 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 167.6, 161.0, 159.4, 153.2, 151.8, 140.2, 139.4, 138.9, 135.5, 130.5 (m), 129.6 (m), 129.0 (m), 127.0 (m), 125.7, 124.4 (m), 123.7 (q, $^1J_{C-F} = 274$ Hz), 123.5 (q, $^1J_{C-F} = 274$ Hz), 118.6 (m), 117.9, 113.3, 109.4, 101.7.

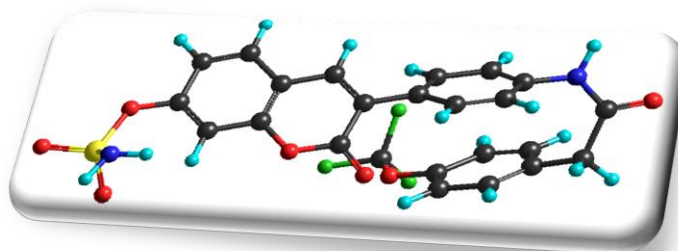
IR (KBr)/cm⁻¹ 3305, 3211, 1710, 1671, 1598, 1517, 1414, 1342, 1249, 1185, 1115, 991, 843.

HRMS (m/z) [M-H]⁻ obliczone 585.0555, zmierzone 585.0555.

7-O-amidosiarczan-3-{4-[2-(4-trifluorometoksy-fenilo)-acetyloamino]-fenylo}-kumaryny IIIk

Wydajność: 88 %.

Temperatura topnienia: 252-254 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 10.38 (1H, s, NH), 8.26 (1H, s, CH), 8.24 (2H, s, NH₂), 7.84 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 7.74-7.64 (4H, m, Ar-H), 7.45 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 7.36-7.30 (3H, m, Ar-H), 7.28 (1H, dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 2.0$ Hz, Ar-H), 3.72 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO), δ (ppm): 168.9, 161.0, 154.7, 153.2, 151.8, 147.1, 140.1, 139.5, 138.9, 135.3, 131.0, 129.6 (m), 129.1 (m), 125.8, 121.6, 120.9, 120.1 (q, $^1J_{C-F} = 255$ Hz), 118.6, 117.5, 113.3, 112.0, 109.4, 101.6, 42.3.

IR (KBr)/cm⁻¹ 3304, 3217, 1711, 1670, 1611, 1509, 1413, 1354, 1248, 1182, 1111, 991, 842.

HRMS (m/z) [M-H]⁻ obliczone 533.0630, zmierzone 533.0681.

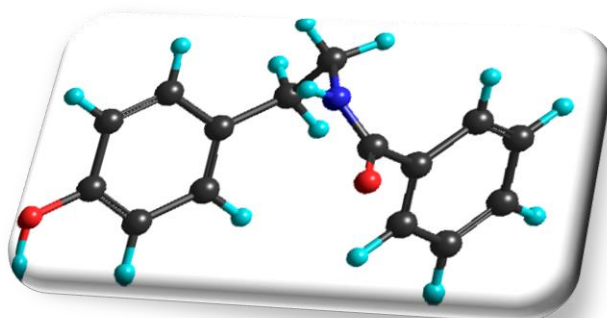
12.14. Ogólna procedura syntezy pochodnych *N*-acylowanych pochodnych tyraminy 103a-r

Do wysuszonej kolby kulistej o pojemności 10 mL, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną oraz rurkę z chlorkiem wapnia, zawierającej 2.0 mmola odpowiedniej pochodnej kwasu karboksylowego oraz 1.65 mL dichlorometanu lub toluenu, wprowadzono 1.65 mL SOCl₂. Tak przygotowaną mieszaninę ogrzewano do wrzenia przez 4 h, a następnie schłodzono i odparowano rozpuszczalnik. Po rozpuszczeniu pozostałości w 10 mL acetonu, wprowadzono 0.274 g (2.0 mmol) tyraminy oraz 1.1 g (8.0 mmol) bezwodnego K₂CO₃ i ogrzewano do wrzenia przez 4 h. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej i usunięciu rozpuszczalnika, pozostałość rozpuszczono w zimnej wodzie (20 mL). Otrzymaną zawiesinę ekstrahowano octanem etylu (3 x 20 mL). Po wysuszeniu warstwy organicznej oraz odparowaniu rozpuszczalnika, surowy produkt oczyszczano na drodze chromatografii kolumnowej, używając jako eluent mieszaninę CH₂Cl₂ : MeOH w stosunku 50 : 1 otrzymując odpowiednią pochodną **103a-r**.

4-(2-benzoiloamino-etylo)-fenol 103a

Wydajność: 60 %.

Temperatura topnienia: 157-159 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 9.21 (1H, s, OH), 8.52 (1H, t, *J* = 5.4 Hz, NH), 7.84-7.76 (2H, m, Ar-H), 7.54-7.40 (3H, m, Ar-H), 7.01 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, Ar-H), 6.67 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, Ar-H), 3.39 (2H, q, *J* = 8.3 Hz, CH₂), 2.71 (2H, t, *J* = 7.8 Hz, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 166.6, 156.1, 135.1, 131.5, 130.0, 129.9, 128.7, 127.6, 115.6, 41.7, 34.8.

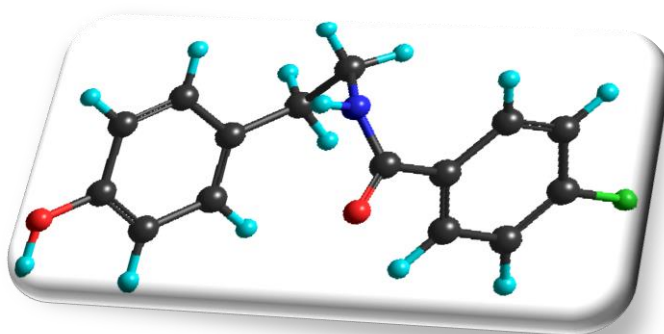
IR (KBr)/cm⁻¹ 3326, 1637, 1602, 1539, 1511, 1447, 1371, 1312, 1294, 1234, 1192, 1107, 1052, 1015, 823, 779, 565.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 242.1181, zmierzone 242.1203.

4-[2-(4-fluoro-benzoiloamino)-etylo]-fenol 103b

Wydajność: 58 %.

Temperatura topnienia: 157-161 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 9.16 (1H, s, OH), 8.54 (1H, t, $J = 4.9$ Hz, NH), 7.90-7.80 (2H, m, Ar-H), 7.30-7.20 (2H, m, Ar-H), 7.00 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 6.66 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 3.39 (2H, q, $J = 7.3$ Hz, CH₂), 2.70 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 165.5, 164.2 (d, $^1J_{C-F} = 248$ Hz), 156.1, 131.6 (m), 130.2 (m), 130.0, 129.9, 115.7 (m), 115.6, 41.8, 34.8.

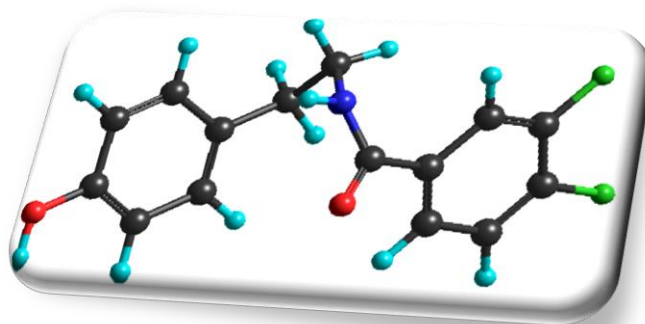
IR (KBr)/cm⁻¹ 3343, 1638, 1601, 1543, 1500, 1447, 1371, 1313, 1292, 1243, 1192, 1107, 1053, 1015, 824, 768, 566.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 260.1087, zmierzone 260.1099.

4-[2-(3,4-difluoro-benzoiloamino)-etylo]-fenol 103c

Wydajność: 52 %.

Temperatura topnienia: 147-150 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 9.17 (1H, s, OH), 8.63 (1H, t, $J = 5.4$ Hz, NH), 7.90-7.80 (1H, m, Ar-H), 7.75-7.65 (1H, m, Ar-H), 7.60-7.45 (1H, m, Ar-H), 7.01 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 6.66 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 3.39 (2H, q, $J = 8.3$ Hz, CH₂), 2.70 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 164.3, 156.1, 151.7 (d, $^1J_{C-F} = 250$ Hz), 149.6 (d, $^1J_{C-F} = 246$ Hz), 132.5 (m), 130.0, 129.9, 125.0 (m), 118.0 (m), 116.9 (m), 115.6, 41.8, 34.6.

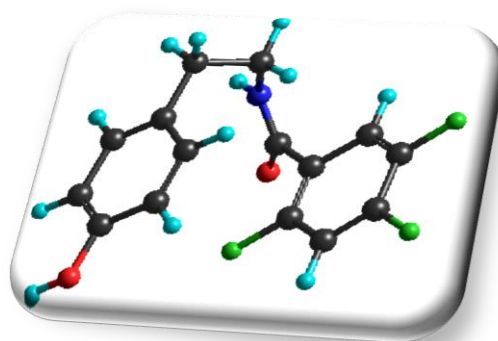
IR (KBr)/cm⁻¹ 3322, 1638, 1600, 1545, 1508, 1455, 1372, 1315, 1284, 1239, 1192, 1109, 1052, 1016, 822, 777, 555.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 278.0993, zmierzone 278.1013.

4-[2-(2,4,5-trifluoro-benzoiloamino)-etylo]-fenol **103d**

Wydajność: 59 %.

Temperatura topnienia: 132-137 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO) , δ (ppm): 9.18 (1H, s, OH), 8.45-8.35 (1H, m, NH), 7.70-7.55 (2H, m, Ar-H), 7.02 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 6.67 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 3.37 (2H, q, $J = 6.3$ Hz, CH₂), 2.69 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 162.0, 156.1, 155.2 (d, $^1J_{C-F} = 246$ Hz), 150.8 (d, $^1J_{C-F} = 252$ Hz), 146.4 (d, $^1J_{C-F} = 244$), 130.0, 129.7, 121.5 (m), 118.4 (m), 115.6, 107.3 (m), 41.8, 34.5.

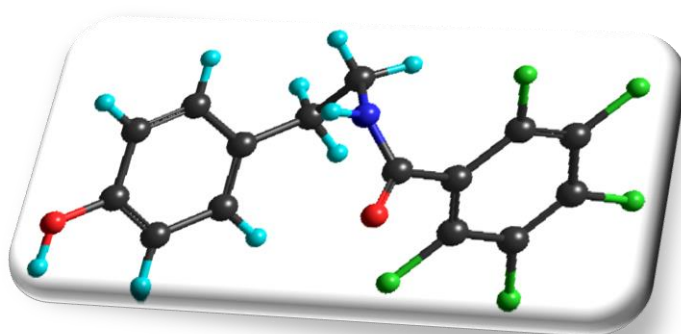
IR (KBr)/cm⁻¹ 3307, 1650, 1604, 1544, 1503, 1438, 1358, 1326, 1293, 1227, 1190, 1150, 1042, 1006, 827, 795, 570.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 296.0898, zmierzone 296.0905.

4-[2-(2,3,4,5,6-pentafluoro-benzoiloamino)-etylo]-fenol **103e**

Wydajność: 60 %.

Temperatura topnienia: 154-155 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO) , δ (ppm): 9.22 (1H, s, OH), 8.98 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, NH), 7.04 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 6.69 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 3.43 (2H, q, $J = 6.1$ Hz, CH₂), 2.70 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, CH₂).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 156.9, 156.2, 143.4 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 248$ Hz), 141.5 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 253$ Hz), 137.4 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 247$ Hz), 130.0, 129.4, 115.6, 113.2 (m), 41.7, 34.3.

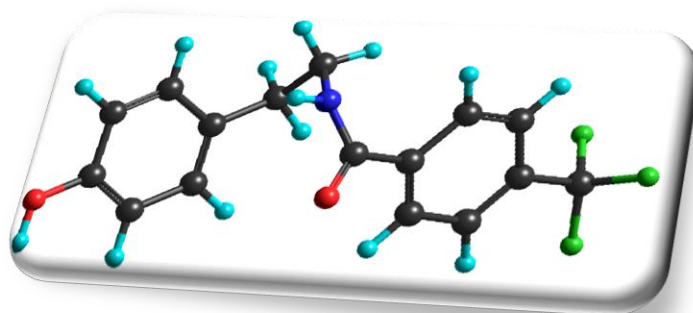
IR (KBr)/ cm^{-1} 3287, 1653, 1598, 1556, 1486, 1443, 1368, 1334, 1285, 1242, 1197, 1123, 1058, 984, 827, 781, 557.

HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone 332.0710, zmierzone 332.0722.

4-{2-[4-(trifluorometylo)-benzoiloamino]-etylo}-fenol 103f

Wydajność: 51 %.

Temperatura topnienia: 176-179 °C.



^1H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 9.18 (1H, s, OH), 8.76 (1H, t, $J = 5.4$ Hz, NH), 7.99 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, Ar-H), 7.84 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 7.02 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 6.67 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 3.42 (2H, q, $J = 7.8$ Hz, CH_2), 2.72 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 165.4, 156.1, 138.9, 131.5 (m), 130.0, 129.9, 128.5, 125.8 (m), 124.4 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 272$ Hz), 115.6, 41.8, 34.6.

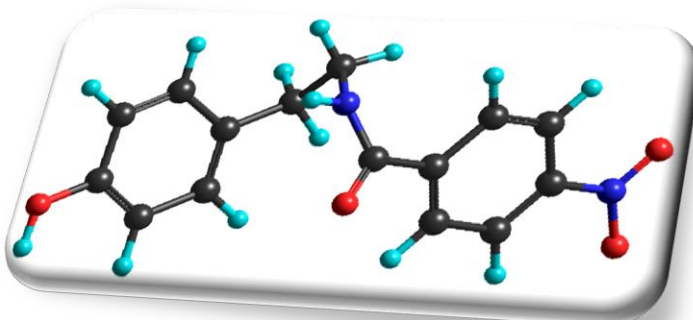
IR (KBr)/ cm^{-1} 3323, 1644, 1602, 1543, 1508, 1455, 1375, 1318, 1290, 1233, 1171, 1107, 1065, 1015, 822, 776, 567.

HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone 310.1055, zmierzone 310.1063.

4-[2-(4-nitro-benzoiloamino)-etylo]-fenol 103g

Wydajność: 47 %.

Temperatura topnienia: 180-183 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO) , δ (ppm): 9.21 (1H, s, OH), 8.87 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, NH), 8.32 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, Ar-H), 8.04 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, Ar-H), 7.03 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, Ar-H), 6.68 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, Ar-H), 3.45 (2H, q, $J = 6.6$ Hz, CH₂), 2.74 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 164.9, 156.1, 149.4, 140.7, 130.0, 129.8, 129.1, 124.0, 115.6, 41.9, 34.6.

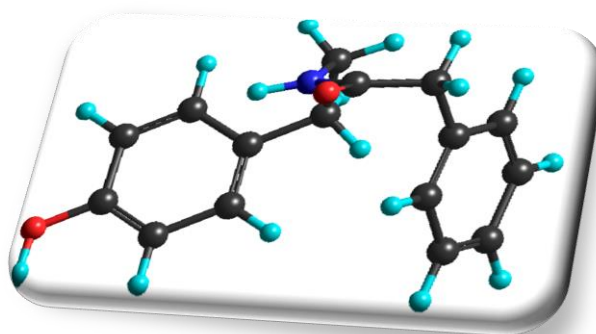
IR (KBr)/cm⁻¹ 3320, 1635, 1596, 1557, 1509, 1455, 1350, 1323, 1298, 1230, 1193, 1106, 1051, 1010, 824, 780, 561.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 287.1032, zmierzone 287.1051.

4-(2-fenylacetyloamino-etylo)-fenol **103h**

Wydajność: 58 %.

Temperatura topnienia: 115-117 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO) , δ (ppm): 9.16 (1H, s, OH), 8.17-8.00 (1H, m, NH), 7.35-7.15 (5H, m, Ar-H), 6.95 (2H, d, $J = 7.9$ Hz, Ar-H), 6.65 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 3.37 (2H, s, CH₂), 3.23 (2H, q, $J = 7.1$ Hz, CH₂), 2.57 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 170.4, 156.1, 136.9, 130.0, 129.9, 129.4, 128.6, 126.7, 115.5, 42.9, 41.1, 34.7.

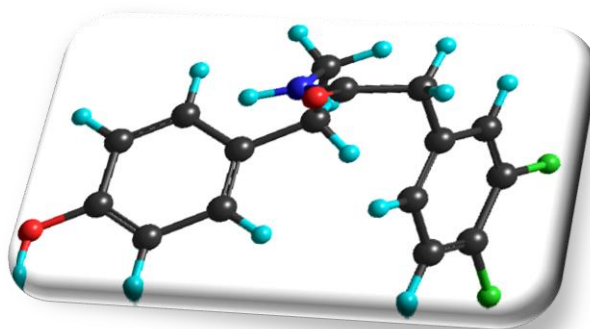
IR (KBr)/cm⁻¹ 3230, 1644, 1592, 1537, 1513, 1444, 1357, 1334, 1316, 1222, 1196, 1107, 1049, 1028, 824, 769, 554.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 256.1338, zmierzone 256.1350.

4-{2-[2-(3,4-difluoro-fenylo)-acetyloamino]-etylo}-fenol 103i

Wydajność: 55 %.

Temperatura topnienia: olej.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 9.17 (1H, s, OH), 8.10-8.04 (1H, m, NH), 7.38-7.22 (2H, m, Ar-H), 7.06-7.00 (1H, m, Ar-H), 6.93 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, Ar-H), 6.63 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, Ar-H), 3.37 (2H, s, CH₂), 3.18 (2H, q, $J = 6.8$ Hz, CH₂), 2.56 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 169.8, 156.1, 149.5 (d, $^1J_{C-F} = 245$ Hz), 148.8 (d, $^1J_{C-F} = 244$ Hz), 134.6 (m), 130.0, 129.8, 126.2 (m), 118.4 (m), 117.5 (m), 115.5, 41.7, 41.1, 34.7.

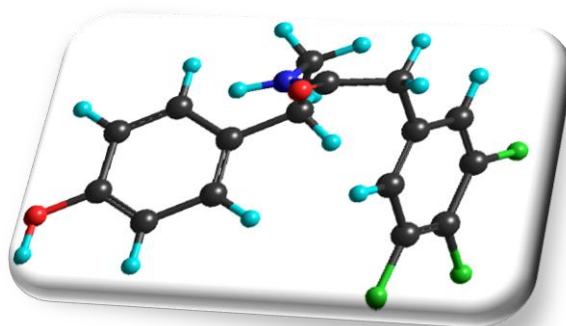
IR (KBr)/cm⁻¹ 3306, 1618, 1595, 1556, 1513, 1435, 1363, 1341, 1271, 1244, 1194, 1114, 1042, 965, 817, 770, 551.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 292.1149, zmierzone 292.1166.

4-{2-[2-(3,4,5-trifluoro-fenylo)-acetyloamino]-etylo}-fenol 103j

Wydajność: 52 %.

Temperatura topnienia: 142-144 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 9.20 (1H, s, OH), 8.09 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, NH), 7.19-7.11 (2H, m, Ar-H), 6.95 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 6.65 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 3.40 (2H, s, CH₂), 3.21 (2H, q, $J = 6.0$ Hz, CH₂), 2.58 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 169.3, 156.1, 150.4 (d, $^1J_{C-F} = 247$ Hz), 138.0 (q, $^1J_{C-F} = 247$ Hz), 134.1 (m), 129.9, 129.8, 115.5, 114.1 (m), 41.6, 41.1, 34.6.

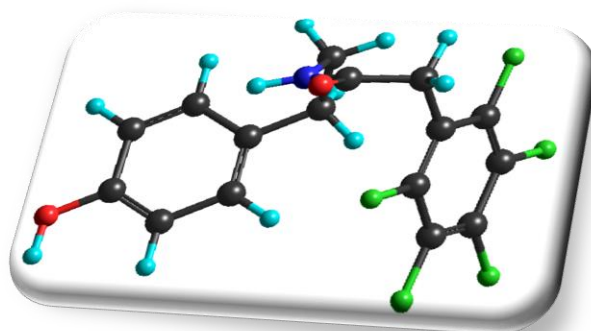
IR (KBr)/cm⁻¹ 3332, 1647, 1593, 1548, 1514, 1449, 1364, 1338, 1268, 1231, 1200, 1106, 1041, 983, 830, 797, 552.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 310.1055, zmierzone 310.1061.

4-{2-[2-(2,3,4,5,6-pentafluoro-fenylo)-acetyloamino]-etylo}-fenol 103k

Wydajność: 59 %.

Temperatura topnienia: olej.



¹H NMR (400 MHz, DMSO) , δ (ppm): 9.21 (1H, s, OH), 8.26 (1H, t, *J* = 5.5 Hz, NH), 6.98 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, Ar-H), 6.67 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, Ar-H), 3.59 (2H, s, CH₂), 3.22 (2H, q, *J* = 6.1 Hz, CH₂), 2.59 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 169.3, 156.2, 145.2 (d, ¹*J*_{C-F} = 248 Hz), 140.0 (d, ¹*J*_{C-F} = 253 Hz), 137.9 (d, ¹*J*_{C-F} = 247 Hz), 130.0, 129.6, 115.5, 113.7 (m), 41.0, 35.2, 30.3.

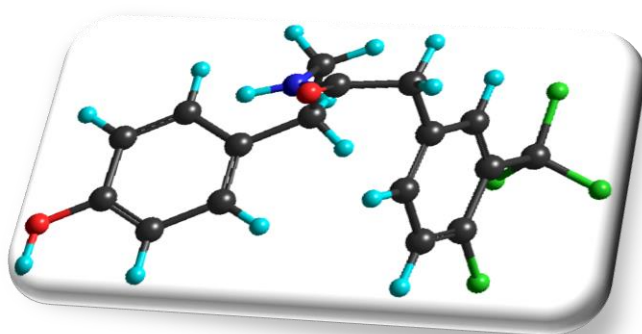
IR (KBr)/cm⁻¹ 3311, 1645, 1598, 1551, 1486, 1443, 1368, 1334, 1291, 1242, 1197, 1123, 1058, 999, 827, 788, 561.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 346.0866, zmierzone 346.0888.

4-{2-[2-(4-fluoro-3-trifluorometylo-fenylo)-acetyloamino]-etylo}-fenol 103l

Wydajność: 50 %.

Temperatura topnienia: 111-114 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO) , δ (ppm): 9.19 (1H, s, OH), 8.14 (1H, t, *J* = 5.5 Hz, NH), 7.67 (1H, m, Ar-H), 7.58-7.53 (1H, m, Ar-H), 7.47-7.40 (1H, m, Ar-H), 6.94

(2H, d, $J = 8.5$ Hz, Ar-H), 6.65 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, Ar-H), 3.48 (2H, s, CH₂), 3.21 (2H, q, $J = 6.0$ Hz, CH₂), 2.58 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 169.7, 158.1 (d, $^1J_{C-F} = 252$ Hz), 156.1, 136.1 (m), 134.0 (m), 129.9, 129.8, 128.0 (m), 123.2 (q, $^1J_{C-F} = 272$ Hz), 117.4 (m), 116.6 (m), 115.5, 41.4, 41.1, 34.7.

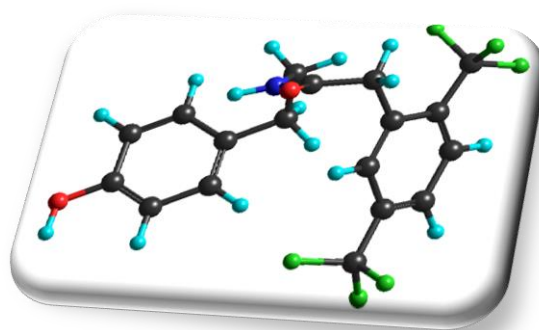
IR (KBr)/cm⁻¹ 3324, 1648, 1592, 1553, 1505, 1437, 1354, 1325, 1265, 1238, 1200, 1120, 1057, 1044, 825, 797, 562.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 342.1117, zmierzone 342.1132.

4-{2-[2-(2,5-bis-trifluorometylo-fenyl)-acetyloamino]-etylo}-fenol 103m

Wydajność: 62 %.

Temperatura topnienia: 112-114 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 9.19 (1H, s, OH), 8.20 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, NH), 7.96-7.82 (3H, m, Ar-H), 6.98 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, Ar-H), 6.67 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, Ar-H), 3.78 (2H, s, CH₂), 3.22 (2H, q, $J = 6.4$ Hz, CH₂), 2.59 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 168.7, 156.1, 136.7, 132.6 (m), 131.6 (m), 130.6 (m), 129.9, 129.8, 127.4 (m), 124.5 (m), 124.1 (q, $^1J_{C-F} = 275$ Hz), 123.9 (q, $^1J_{C-F} = 273$ Hz), 115.5, 41.3, 38.8, 34.8.

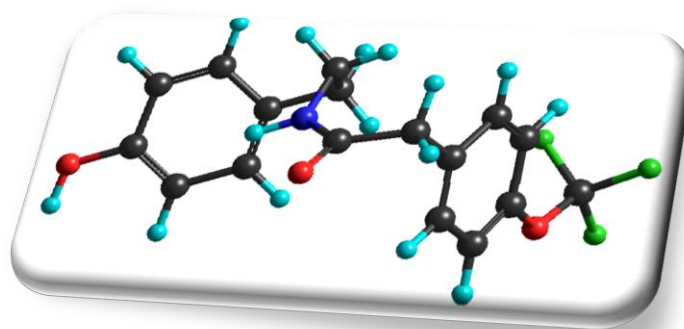
IR (KBr)/cm⁻¹ 3350, 1621, 1613, 1554, 1509, 1438, 1336, 1314, 1301, 1243, 1185, 1120, 1059, 1042, 844, 827, 562.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 392.1085, zmierzone 392.1101.

4-{2-[2-(4-trifluorometoksy-fenilo)-acetyloamino]-etylo}-fenol 103n

Wydajność: 47 %.

Temperatura topnienia: oil.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 9.20 (1H, s, OH), 8.13 (1H, t, $J = 5.4$ Hz, NH), 7.35-7.25 (4H, m, Ar-H), 6.95 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 6.66 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 3.42 (2H, s, CH_2), 3.21 (2H, q, $J = 6.2$ Hz, CH_2), 2.58 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, CH_2).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 170.0, 156.1, 136.5, 131.8, 131.2, 130.0, 129.9, 121.2, 120.6 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 256$ Hz), 115.5, 42.0, 41.1, 34.7.

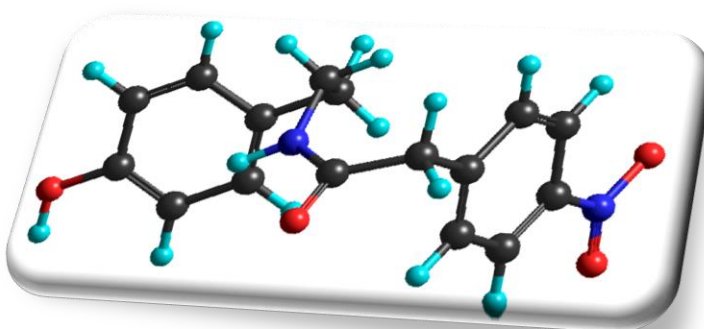
IR (KBr)/ cm^{-1} 3291, 1647, 1595, 1557, 1511, 1444, 1362, 1340, 1258, 1221, 1194, 1105, 1023, 821, 792, 535.

HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone 340.1161, zmierzone 340.1171.

4-{2-[2-(4-nitro-fenilo)-acetyloamino]-etylo}-fenol 103o

Wydajność: 51 %.

Temperatura topnienia: 155-157 °C.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 9.20 (1H, s, OH), 8.20 (1H, t, $J = 6.1$ Hz, NH), 8.17 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 7.47 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 6.95 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 6.65 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 3.55 (2H, s, CH_2), 3.23 (2H, q, $J = 6.2$ Hz, CH_2), 2.59 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, CH_2).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 169.2, 156.1, 146.7, 145.0, 130.7, 130.0, 129.8, 123.7, 115.5, 42.5, 41.1, 34.7.

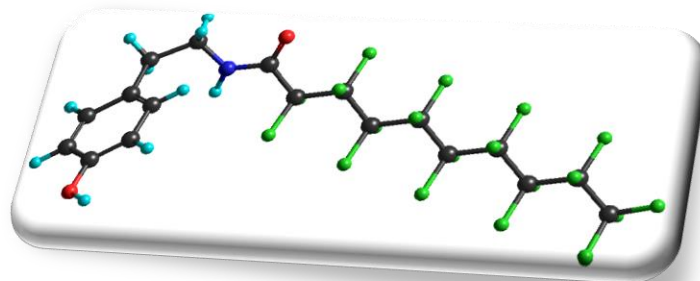
IR (KBr)/cm⁻¹ 3296, 1636, 1594, 1570, 1512, 1448, 1379, 1342, 1270, 1249, 1202, 1107, 1049, 992, 820, 805, 551.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 301.1188, zmierzone 301.1197.

4-(2-perfluorodekanoiloaminoetylo)-fenol 103p

Wydajność: 19 %.

Temperatura topnienia: 164-166 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO) , δ (ppm): 9.58-9.50 (1H, m, NH), 9.21 (1H, s, OH), 6.98 (2H, d, $J = 6.9$ Hz, Ar-H), 6.67 (2H, d, $J = 7.1$ Hz, Ar-H). 2.72-2.62 (2H, m, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 156.9 (t, $^2J_{C-F} = 25$ Hz), 156.2, 129.9, 128.9, 115.5, 115.0-105.0 (m), 41.7, 33.8.

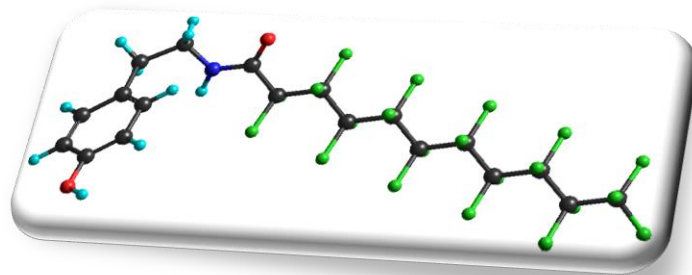
IR (KBr)/cm⁻¹ 3342, 1695, 1601, 1543, 1518, 1454, 1374, 1342, 1197, 1145, 1106, 1008, 928, 823, 780, 723, 624, 546.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 634.0486, zmierzone 634.0498.

4-(2-perfluoroundekanoiloaminoetylo)-fenol 103r

Wydajność: 18 %.

Temperatura topnienia: 165-169 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO) , δ (ppm): 9.59 (1H, t, $J = 5.6$ Hz, NH), 9.25 (1H, s, OH), 6.98 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 6.66 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 2.67 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, CH₂).

- ^{13}C NMR** (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 157.0 (t, $^2J_{\text{C-F}} = 26$ Hz), 156.2, 129.8, 128.9, 115.5, 115.0-105.0 (m), 41.7, 33.8.
- IR** (KBr)/ cm^{-1} 3353, 1697, 1600, 1541, 1516, 1455, 1374, 1344, 1198, 1145, 1083, 987, 895, 821, 780, 721, 635, 545.
- HRMS** (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone 684.0454, zmierzone 684.0480.

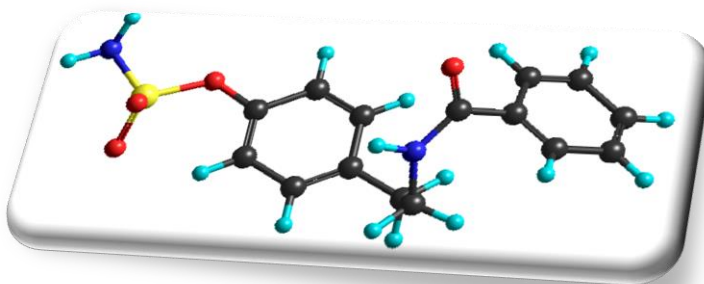
12.15. Ogólna procedura syntezy pochodnych N-acylowanych pochodnych amidosiarczanu tyraminy IVa-r

W kolbie kulistej o pojemności 10 mL zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną oraz rurkę z chlorkiem wapnia umieszczono 0.6 mL dichlorometanu i 0.16 mL izocyjanianu chlorosulfonylu. Do tak przygotowanego roztworu wprowadzono mieszaninę 0.075 mL kwasu mrówkowego i 1.9 μL DMA. Całość ogrzewano w łaźni wodnej o temperaturze 35 °C. Po upływie 3.5 h, do wygenerowanego chloroamidosiarczanu dodano 1.3 mmola odpowiedniej pochodnej **103a-r** rozpuszczonej w 4.5 mL DMA. Po upływie 24 h, zawartość kolby przeniesiono do zlewki z wodą. Powstały osad surowego produktu odsączono i oczyszczano na drodze chromatografii kolumnowej, używając jako eluent mieszaninę CH_2Cl_2 : MeOH w stosunku 50 : 1 otrzymując odpowiednią pochodną **IVa-r**.

Amidosiarczan 4-(2-benzoiloamino-etylo)-fenylu IVa

Wydajność: 84 %.

Temperatura topnienia: 164-166 °C.



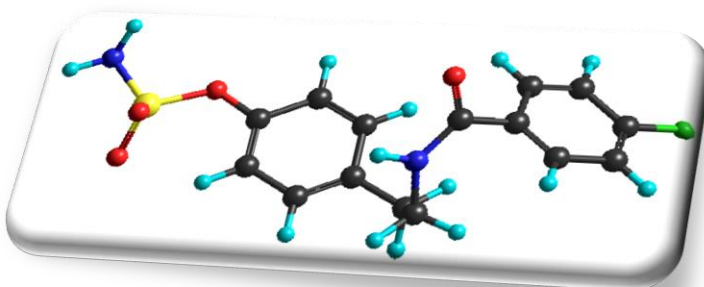
- ^1H NMR** (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.58 (1H, t, $J = 5.4$ Hz, NH), 7.94 (2H, s, NH_2), 7.54-7.42 (3H, m, Ar-H), 7.32 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, Ar-H), 7.20 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 3.48 (2H, q, $J = 7.3$ Hz, CH_2), 2.85 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, CH_2).
- ^{13}C NMR** (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 166.7, 149.0, 138.4, 135.0, 131.6, 130.3, 128.8, 127.6, 122.5, 41.2, 34.9.
- IR** (KBr)/ cm^{-1} 3376, 3155, 1627, 1552, 1502, 1363, 1311, 1175, 1150, 954, 870, 844, 722, 577.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 321.0909, zmierzone 321.0918.

Amidosiarczan 4-[2-(4-fluoro-benzoiloamino)-etylo]-fenylu IVb

Wydajność: 88 %.

Temperatura topnienia: 159-163 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.62 (1H, t, *J* = 5.4 Hz, NH), 7.95 (2H, s, NH₂), 7.92-7.86 (2H, m, Ar-H), 7.36-7.24 (4H, m, Ar-H), 7.20 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, Ar-H), 3.47 (2H, q, *J* = 7.8 Hz, CH₂), 2.85 (2H, t, *J* = 7.8 Hz, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 165.6, 164.3 (d, ¹*J*_{C-F} = 248 Hz), 149.0, 138.4, 131.4 (m), 130.3, 130.2 (m), 122.5, 115.7 (m), 41.3, 34.8.

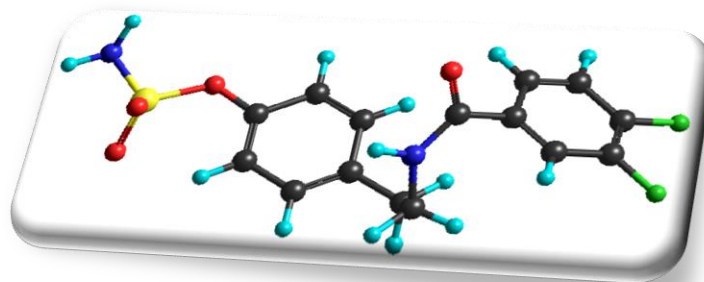
IR (KBr)/cm⁻¹ 3424, 3262, 1622, 1556, 1504, 1372, 1324, 1178, 1150, 930, 870, 854, 722, 575.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 339.0815, zmierzone 339.0831.

Amidosiarczan 4-[2-(3,4-difluoro-benzoiloamino)-etylo]-fenylu IVc

Wydajność: 80 %.

Temperatura topnienia: 129-131 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.71 (1H, t, *J* = 5.4 Hz, NH), 7.95 (2H, s, NH₂), 7.89-7.82 (1H, m, Ar-H), 7.74-7.68 (1H, m, Ar-H), 7.58-7.52 (1H, m, Ar-H), 7.32 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, Ar-H), 7.20 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, Ar-H), 3.47 (2H, q, *J* = 6.8 Hz, CH₂), 2.85 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, CH₂).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 164.5, 151.8 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 250$ Hz), 149.6 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 246$ Hz), 149.0, 138.3, 132.3 (m), 130.3, 125.0 (m), 122.5, 118.0 (m), 117.0 (m), 41.4, 34.7.

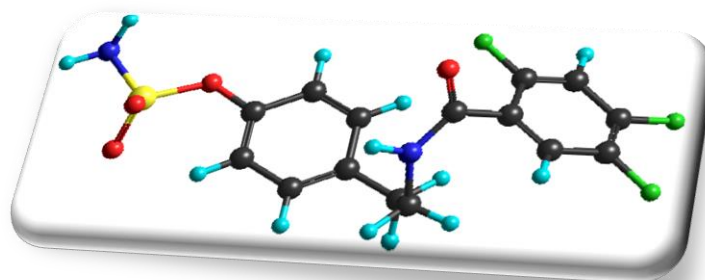
IR (KBr)/ cm^{-1} 3414, 3296, 1637, 1543, 1504, 1374, 1319, 1175, 1157, 936, 877, 848, 722, 570.

HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone 357.0721, zmierzone 357.0749.

Amidosiarczan 4-[2-(2,4,5-trifluoro-benzoiloamino)-etylo]-fenylu IVd

Wydajność: 78 %.

Temperatura topnienia: 116-118 °C.



^1H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.52 (1H, t, $J = 4.9$ Hz, NH), 7.95 (2H, s, NH_2), 7.70-7.62 (2H, m, Ar-H), 7.33 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 7.20 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 3.46 (2H, q, $J = 7.3$ Hz, CH_2), 2.83 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 162.2, 155.3 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 249$ Hz), 150.8 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 253$ Hz), 149.1, 146.4 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 244$ Hz), 138.1, 130.4, 122.5, 121.4 (m), 118.5 (m), 107.3 (m), 41.3, 34.6.

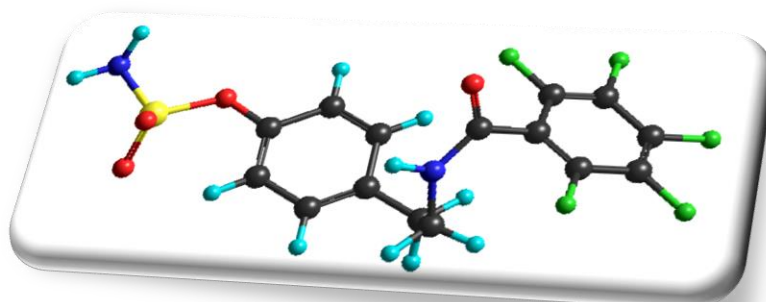
IR (KBr)/ cm^{-1} 3414, 3295, 1647, 1542, 1504, 1376, 1334, 1175, 1144, 946, 870, 845, 719, 569.

HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone 375.0626, zmierzone 375.0641.

Amidosiarczan 4-[2-(2,3,4,5,6-pentafluoro-benzoiloamino)-etylo]-fenylu IVe

Wydajność: 89 %.

Temperatura topnienia: olej.



¹H NMR (400 MHz, DMSO) , δ (ppm): 9.09 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, NH), 7.99 (2H, s, NH₂), 7.34 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.21 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 3.51 (2H, q, $J = 6.1$ Hz, CH₂), 2.85 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 157.0, 149.2, 143.5 (d, $^1J_{C-F} = 255$ Hz), 141.5 (d, $^1J_{C-F} = 257$ Hz), 137.8, 137.4 (d, $^1J_{C-F} = 253$ Hz), 130.4, 122.4, 113.0 (m), 41.3, 34.4.

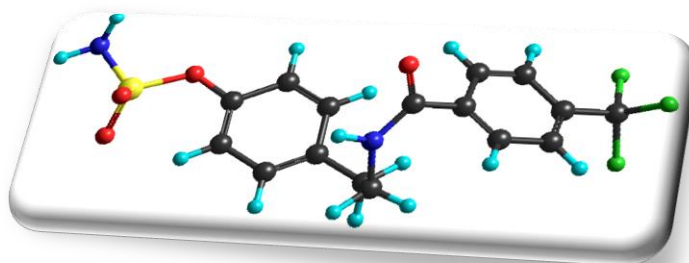
IR (KBr)/cm⁻¹ 3377, 3296, 1650, 1557, 1501, 1390, 1332, 1182, 1158, 955, 870, 851, 719, 573.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 411.0438, zmierzone 411.0455.

Amidosiarczan 4-{2-[4-(trifluorometylo)-benzoiloamino]-etylo}-fenylu IVf

Wydajność: 87 %.

Temperatura topnienia: 167-169 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO) , δ (ppm): 8.83 (1H, t, $J = 5.4$ Hz, NH), 8.01 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 7.95 (2H, s, NH₂), 7.85 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 7.33 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 7.20 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 3.50 (2H, q, $J = 7.8$ Hz, CH₂), 2.87 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 165.5, 149.1, 138.7, 138.3, 131.5 (m), 130.3, 128.5, 125.8 (m), 124.4 (q, $^1J_{C-F} = 272$ Hz), 122.5, 41.4, 34.7.

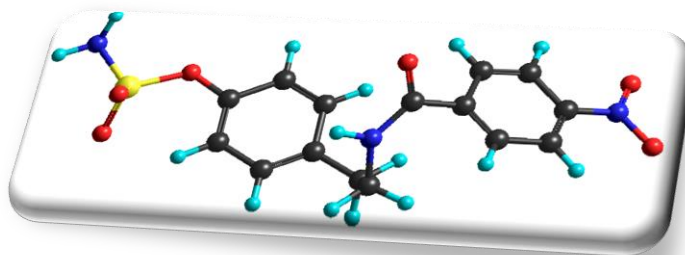
IR (KBr)/cm⁻¹ 3408, 3322, 1636, 1544, 1504, 1375, 1326, 1175, 1130, 948, 858, 846, 717, 573.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 389.0783, zmierzone 389.0796.

Amidosiarczan 4-[2-(4-nitro-benzoiloamino)-etylo]-fenylu IVg

Wydajność: 79 %.

Temperatura topnienia: 157-159 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.94 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, NH), 8.32 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, Ar-H), 8.05 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, Ar-H), 7.97 (2H, s, NH₂), 7.34 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.21 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 3.52 (2H, q, $J = 7.5$ Hz, CH₂), 2.89 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 165.1, 149.4, 149.1, 140.6, 138.2, 130.4, 129.1, 124.0, 122.5, 41.4, 34.6.

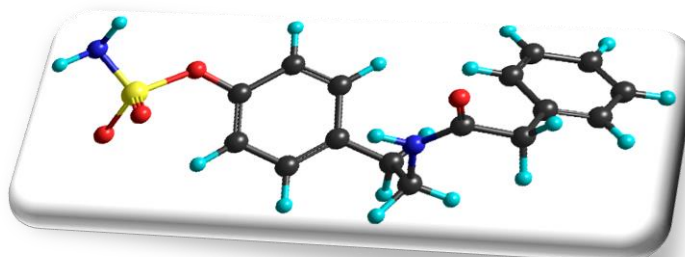
IR (KBr)/cm⁻¹ 3396, 3240, 1644, 1545, 1505, 1368, 1340, 1180, 1155, 944, 863, 850, 717, 566.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 366.0760, zmierzone 366.0781.

Amidosiarczan 4-[2-fenylacetamino-etylo]-fenylu IVh

Wydajność: 90 %.

Temperatura topnienia: 128-130 °C.



¹H NMR (500 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.11 (1H, t, $J = 5.4$ Hz, NH), 7.94 (2H, s, NH₂), 7.30-7.14 (9H, m, Ar-H), 3.37 (2H, s, CH₂), 3.26 (2H, q, $J = 6.8$ Hz, CH₂), 2.70 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 170.5, 149.0, 138.3, 136.8, 130.3, 129.4, 128.6, 126.8, 122.4, 42.9, 40.7, 34.8.

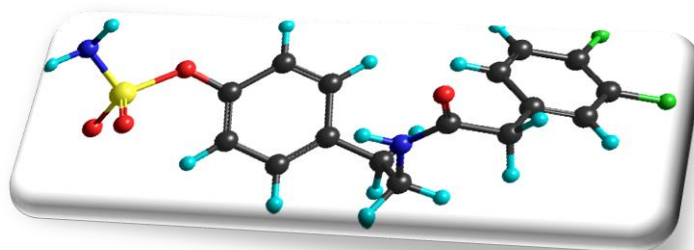
IR (KBr)/cm⁻¹ 3327, 3165, 1625, 1541, 1504, 1375, 1348, 1169, 1153, 942, 872, 844, 705, 561.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 335.1066, zmierzone 335.1076.

Amidosiarczan 4-{2-[2-(3,4-difluoro-fenylo)-acetyloamino]-etylo}-fenylu IVi

Wydajność: 79 %.

Temperatura topnienia: 115-117 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.17 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, NH), 7.96 (2H, s, NH₂), 7.39-7.27 (2H, m, Ar-H), 7.25 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 7.18 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.07-7.02 (1H, m, Ar-H), 3.40 (2H, s, CH₂), 3.28 (2H, q, $J = 5.9$ Hz, CH₂), 2.72 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 169.9, 149.5 (d, $^1J_{C-F} = 245$ Hz), 149.0, 148.8 (d, $^1J_{C-F} = 244$ Hz), 138.2, 134.5 (m), 130.3, 126.2 (m), 122.4, 118.4 (m), 117.5 (m), 41.7, 40.7, 34.8.

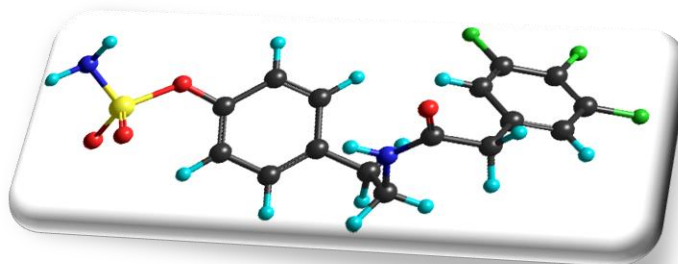
IR (KBr)/cm⁻¹ 3327, 3184, 1625, 1558, 1505, 1367, 1337, 1173, 1155, 931, 873, 841, 712, 561.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 371.0877, zmierzone 371.0901.

Amidosiarczan 4-{2-[2-(3,4,5-trifluoro-fenylo)-acetyloamino]-etylo}-fenylu IVj

Wydajność: 84 %.

Temperatura topnienia: 149-150 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.17 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, NH), 7.96 (2H, s, NH₂), 7.26 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.21-7.12 (4H, m, Ar-H), 3.42 (2H, s, CH₂), 3.29 (2H, q, $J = 6.1$ Hz, CH₂), 2.73 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 169.4, 150.3 (d, $^1J_{C-F} = 246$ Hz), 149.0, 138.2, 138.0 (d, $^1J_{C-F} = 247$ Hz), 134.0 (m), 130.3, 122.4, 114.1 (m), 41.6, 40.7, 34.7.

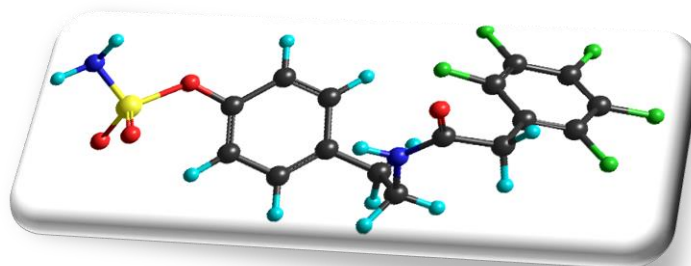
IR (KBr)/cm⁻¹ 3325, 3186, 1621, 1558, 1505, 1369, 1335, 1174, 1156, 931, 865, 842, 718, 564.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 389.0783, zmierzone 389.0794.

Amidosiarczan 4-{2-[2-(2,3,4,5,6-pentafluoro-fenilo)-acetyloamino]-etylo}-fenylu IVk

Wydajność: 72 %.

Temperatura topnienia: 164-168 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.35 (1H, t, *J* = 5.4 Hz, NH), 7.96 (2H, s, NH₂), 7.29 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, Ar-H), 7.19 (2H, d, *J* 8.5, Ar-H), 3.61 (2H, s, CH₂), 3.30 (2H, q, *J* = 6.2 Hz, CH₂), 2.74 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 167.1, 149.0, 145.4 (d, ¹*J*_{C-F} = 245 Hz), 139.8 (d, ¹*J*_{C-F} = 250 Hz), 138.1, 137.2 (d, ¹*J*_{C-F} = 249 Hz), 130.3, 122.4, 110.8 (m), 40.9, 35.2, 29.8.

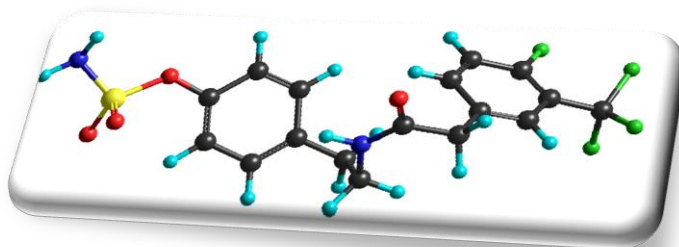
IR (KBr)/cm⁻¹ 3341, 3184, 1630, 1564, 1505, 1374, 1342, 1174, 1157, 930, 871, 840, 720, 565.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 425.0594, zmierzone 425.0623.

Amidosiarczan 4-{2-[2-(4-fluoro-3-trifluorometylo-fenylo)-acetyloamino]-etylo}-fenylu IVI

Wydajność: 89 %.

Temperatura topnienia: 140-141 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO) , δ (ppm): 8.22 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, NH), 7.96 (2H, s, NH₂), 7.67-7.62 (1H, m, Ar-H), 7.60-7.54 (1H, m, Ar-H), 7.47-7.41 (2H, m, Ar-H), 7.25 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.17 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, Ar-H), 3.50 (2H, s, CH₂), 3.29 (2H, q, $J = 6.1$ Hz, CH₂), 2.72 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 169.9, 158.1 (d, $^1J_{C-F} = 254$ Hz), 149.0, 138.2, 136.2 (m), 134.0 (m), 130.3, 128.0 (m), 123.2 (q, $^1J_{C-F} = 272$ Hz), 122.4, 117.3 (m), 116.6 (m), 41.3, 40.7, 34.8.

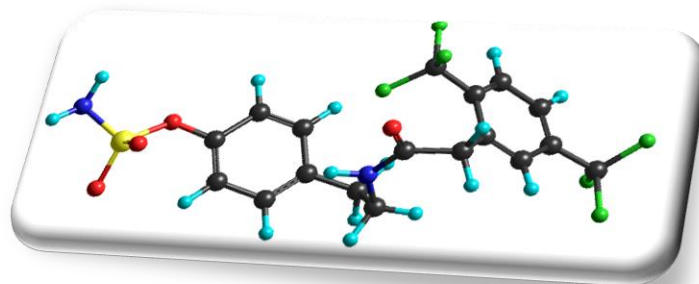
IR (KBr)/cm⁻¹ 3378, 3278, 1645, 1549, 1504, 1346, 1327, 1173, 1153, 929, 880, 842, 723, 548.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 421.0845, zmierzone 421.0854.

Amidosiarczan 4-{2-[2-(2,5-bis-trifluorometylo-fenylo)-acetyloamino]-etylo}-fenylu IVm

Wydajność: 82 %.

Temperatura topnienia: 164-166 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO) , δ (ppm): 8.28 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, NH), 7.96 (2H, s, NH₂), 7.95-7.82 (3H, m, Ar-H), 7.29 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.19 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 3.79 (2H, s, CH₂), 3.29 (2H, q, $J = 7.4$ Hz, CH₂), 2.73 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, CH₂).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 168.8, 149.0, 138.2, 135.6, 132.6 (m), 131.6 (m), 130.6 (m), 130.3, 127.4 (m), 124.6 (m), 124.1 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 275$ Hz), 123.9 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 273$ Hz), 122.5, 40.9, 38.8, 34.9.

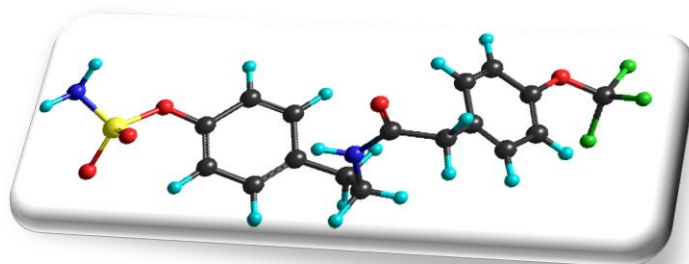
IR (KBr)/ cm^{-1} 3348, 3224, 1639, 1539, 1504, 1389, 1345, 1166, 1154, 937, 867, 852, 717, 559.

HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone 471.0813, zmierzone 471.0831.

Amidosiarczan 4-{2-[2-(4-trifluorometoksy-fenylo)-acetyloamino]-etylo}-fenylu IVn

Wydajność: 81 %.

Temperatura topnienia: 124-125 °C.



^1H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.20 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, NH), 7.96 (2H, s, NH_2), 7.36-7.23 (6H, m, Ar-H), 7.18 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 3.43 (2H, s, CH_2), 3.28 (2H, q, $J = 6.2$ Hz, CH_2), 2.73 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 170.1, 149.0, 147.4, 138.3, 136.4, 131.3, 130.3, 122.4, 121.3, 120.6 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 256$ Hz), 42.0, 40.7, 34.8.

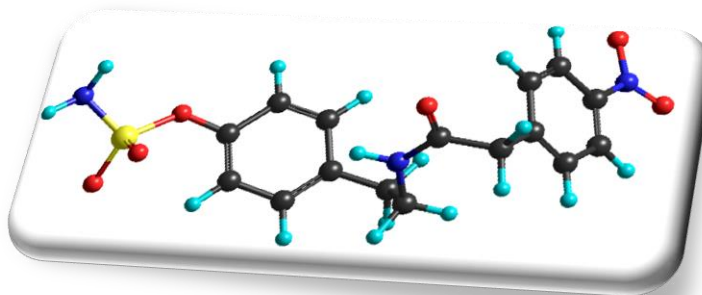
IR (KBr)/ cm^{-1} 3308, 3176, 1628, 1539, 1506, 1374, 1321, 1172, 1152, 937, 875, 842, 719, 558.

HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone 419.0889, zmierzone 419.0894.

Amidosiarczan 4-{2-[2-(4-nitro-fenylo)-acetyloamino]-etylo}-fenylu IVo

Wydajność: 86 %.

Temperatura topnienia: 155-158 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO) , δ (ppm): 8.28 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, NH), 8.18 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 7.97 (2H, s, NH₂), 7.50 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 7.26 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.18 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 3.57 (2H, s, CH₂), 3.30 (2H, d, $J = 6.2$ Hz, CH₂), 2.73 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 169.3, 149.0, 146.7, 144.9, 138.2, 130.8, 130.3, 123.7, 122.4, 42.5, 40.7, 34.8.

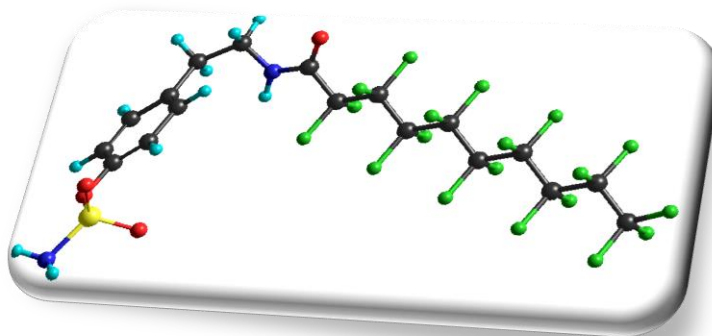
IR (KBr)/cm⁻¹ 3318, 3174, 1628, 1545, 1502, 1368, 1342, 1171, 1155, 930, 870, 841, 719, 553.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 380.0916, zmierzone 380.0939.

Amidosiarczan 4-(2-perfluorodekanoilamino)-etylo}-fenylu IVp

Wydajność: 89 %.

Temperatura topnienia: 152-155 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO) , δ (ppm): 9.63 (1H, t, $J = 5.5$ Hz, NH), 7.96 (2H, s, NH₂), 7.29 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, Ar-H), 7.19 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, Ar-H), 3.48-3.42 (2H, m, CH₂), 2.82 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 157.0 (t, $^2J_{C-F} = 26$ Hz), 149.2, 137.3, 130.3, 122.5, 115.0-105.0 (m), 41.2, 33.9.

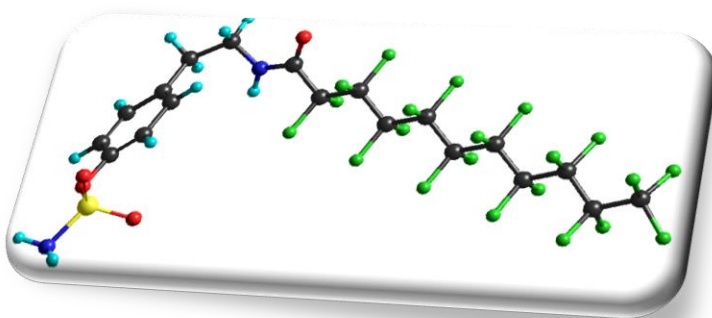
IR (KBr)/cm⁻¹ 3415, 3298, 1687, 1549, 1508, 1375, 1341, 1203, 1143, 957, 885, 841, 721, 554.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 713.0214, zmierzone 713.0222.

Amidosiarczan 4-(2-perfluoroundekanoilamino)-etylo}-fenylu IVr

Wydajność: 82 %.

Temperatura topnienia: 137-139 °C.



¹H NMR (400 MHz, DMSO), δ (ppm): 9.61 (1H, t, $J = 5.6$ Hz, NH), 7.95 (2H, s, NH₂), 7.29 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.20 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 3.45 (2H, q, $J = 7.1$ Hz, CH₂), 2.82 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, CH₂).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO), δ (ppm): 157.1 (t, $^2J_{C-F} = 25$ Hz), 149.2, 137.3, 130.2, 122.5, 115.0-105.0 (m), 41.2, 33.9.

IR (KBr)/cm⁻¹ 3377, 3329, 1689, 1549, 1508, 1374, 1344, 1201, 1145, 956, 887, 837, 722, 555.

HRMS (m/z) [M+H]⁺ obliczone 763.0182, zmierzone 763.0191.

Rozdział 13

Opis badań biologicznych

13.1. Procedura izolacji enzymu

Badania aktywności biologicznej *in vitro* otrzymanych inhibitorów przeprowadzono na sulfatazie steroidowej wyizolowanej z łożyska ludzkiego według następującej procedury:

1. Ludzkie łożysko pozbawiono wszelkich błon, a następnie homogenizowano w zimnym buforze Tris-HCl o pH 7.4, zawierającym 0.1 % Tritonu X-100 i 0.2 % NaN_3 .
2. Homogenat kilkakrotnie zamrażano i rozmrażano, a następnie odwirowano przy 100000 g przez 60 min.
3. Supernatant usunięto, a procedurę zaczynającą się od homogenizacji powtórzono pięciokrotnie.
4. Ostatecznie enzym oczyszczono na drodze trójstopniowej chromatografii z wykorzystaniem kolumn: DEAE-celuloza, Con A-Sefaroza i Bio-Gel A-1.5 oraz odpowiednich buforów.
5. Wszystkie etapy izolacji prowadzono w temperaturze 4 °C.

13.2. Procedura testu aktywności inhibicyjnej wobec wyizolowanego enzymu

Aktywność biologiczną inhibitorów oznaczono poprzez analizę przebiegu reakcji enzymatycznej z wykorzystaniem siarczanu p-nitrofenylu (NPS). Objętość końcowa mieszaniny reakcyjnej wynosiła 120 μL (pH = 7.25) i zawierała 0.8 μmol NPS, 40 μmol Tris-HCl oraz odpowiednią ilość enzymu. Po 60 minutach trwania reakcji, do mieszaniny reakcyjnej dodano 0.5 mL 1 M NaOH. Uwolniony p-nitrofenol oznaczano z wykorzystaniem spektrofotometru przy długości fali 405 nm.

13.3. Procedura testu z wykorzystaniem linii komórkowych

Wszystkie linie komórkowe: MCF-7 (ATCC® HTB-22™), T47D (ATCC ® HTB-133™), MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) oraz SkBr3 (ATCC® HTB-30™) hodowano z wykorzystaniem pożywki DMEM o wysokiej zawartości glukozy, zawierającej 10 % płodowej surowicy bydlęcej (FBS) i antybiotyki (penicylinę w stężeniu 62.6 $\mu\text{g/mL}$

i streptomycynę w stężeniu 40 $\mu\text{g/mL}$), bez dodatku czerwieni fenolowej. Komórki hodowano w wilgotnej atmosferze zawierającej 10 % CO_2 oraz 90 % powietrza w temperaturze 37 °C. W celu oznaczenia cytotoksyczności, komórki w logarytmicznej fazie wzrostu poddawano działaniu wskazanych stężeń badanych związków przez 120 h. Żywotność komórek określano przy użyciu testu MTT. Krzywe dawka-efekt wyznaczano z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) na podstawie dwóch niezależnych eksperymentów przeprowadzonych w czterech powtórzeniach.

IV CZĘŚĆ

DODATKI

Wykaz rysunków

Rys.1.1. Struktura chemiczna tamoksyfenu 1 , letrozolu 2 , anastrozolu 3 i eksemestanu 4	11
Rys.4.1. Struktura miejsca aktywnego STS [3].	16
Rys.4.2. Miejsce aktywne STS ze znajdującym się wewnątrz naturalnym substratem EIS.....	16
Rys.4.3. Proponowany mechanizm enzymatycznej hydrolizy EIS przez STS.	17
Rys.4.4. Proponowany mechanizm inhibicji STS, przez inhibitory zawierające w swojej konstytucji ugrupowanie amidosiarczanowe (np. EMATE).....	18
Rys.4.5. Miejsce aktywne STS ze znajdującym się wewnątrz 667 COUMATE.....	19
Rys.5.1. Struktury chemiczne przykładowych inhibitorów STS działających jako alternatywne substraty.....	20
Rys.5.2. Struktury chemiczne przykładowych inhibitorów odwracalnych STS.....	22
Rys.5.3. Struktury chemiczne steroidowych inhibitorów nieodwracalnych STS.....	24
Rys.5.4. Struktury chemiczne niesteroidowych inhibitorów nieodwracalnych STS.	27
Rys.5.5. Struktury chemiczne niesteroidowych inhibitorów nieodwracalnych STS.	30
Rys.5.6. Struktury chemiczne fosforowych inhibitorów STS.	31
Rys. 7.1. Struktura chemiczna leków zawierających w strukturze atom fluoru.	37
Rys. 7.2. Struktura chemiczna wybranych środków fluorujących.....	38
Rys. 9.1. Struktura ogólna otrzymanych amidosiarczanowych, <i>N</i> -fosforylowanych pochodnych 3-(4-aminofenylo)-kumaryny Ia-h ($R_1 = \text{Me, Et, } i\text{-Pr, } n\text{-Bu, Ph, Bn; } R_2 = \text{H, Me}$); amidosiarczanowych pochodnych 3-fenylokumaryny IIa-g ($R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 = \text{H, F, CF}_3, \text{OCF}_3$); amidosiarczanowych, <i>N</i> -acylowanych pochodnych 3-(4-aminofenylo)-kumaryny IIIa-k ($R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 = \text{H, F, CF}_3, \text{OCF}_3$; $n = 0, 1$) oraz amidosiarczanowych, <i>N</i> -acylowanych pochodnych tyraminy IVa-r ($R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 = \text{H, F, CF}_3, \text{OCF}_3$; $n = 0, 1$; $m = 8, 9$).....	46
Rys.9.2. Miejsce aktywne STS ze znajdującymi się wewnątrz związkami Id (żółty), If (czerwony) oraz VI (zielony).....	50
Rys.9.3. Miejsce aktywne STS ze znajdującymi się wewnątrz związkiem Ie	50

Rys.9.4. Miejsce aktywne STS ze znajdującymi się wewnątrz związkami IIa (żółty), IIc (niebieski), IIId (czerwony) oraz inhibitorem referencyjnym V (zielony).....	52
Rys.9.5. Miejsce aktywne STS ze znajdującymi się wewnątrz związkami IIIc (niebieski), IIIh (czerwony) oraz V (zielony).	55
Rys.9.6. Miejsce aktywne STS ze znajdującymi się wewnątrz związkiem IIIj	55
Rys.9.7. Miejsce aktywne STS ze znajdującymi się wewnątrz związkami IVd (niebieski), IVm (czerwony) oraz V (zielony).	58
Rys.9.8. Miejsce aktywne STS ze znajdującymi się wewnątrz związkiem IVr	58
Rys.9.9. Widmo ^{31}P NMR po 24 godzinach reakcji 4-aminofenolu 94 z jednym ekwiwalentem chlorofosforanu dietylu wobec NEt_3 w bezwodnym THF w temperaturze pokojowej.	62
Rys.9.10. Widmo ^{31}P NMR po 1 godzinie reakcji fenolanu 4-aminofenolu 94 z jednym ekwiwalentem chlorofosforanu dietylu w bezwodnym THF w temperaturze pokojowej.....	63
Rys.9.11. Widmo ^{31}P NMR po 1 godzinie reakcji fenolanu 4-aminofenolu 94 z jednym ekwiwalentem chlorofosforanu dietylu w bezwodnym THF w temperaturze pokojowej.....	64
Rys.9.12. Widmo ^{31}P NMR po 3 godzinach ogrzewania pochodnej 95 wobec K_2CO_3 w bezwodnym acetonie.	65
Rys.9.13. Widmo ^{31}P NMR po 24 godzinach traktowania pochodnej 96 bezwodną pirydyną w temperaturze pokojowej.....	66

Wykaz tabel

Tabela 9.1. Wyniki analiz dokowania molekularnego z wykorzystaniem programu AutoDock Vina 1.1.2 zaprojektowanych związków Ia-h oraz związków referencyjnych V i VI	49
Tabela 9.2. Wyniki analiz dokowania molekularnego z wykorzystaniem programu AutoDock Vina 1.1.2 zaprojektowanych związków IIa-g oraz związku referencyjnego V	51
Tabela 9.3. Wyniki analiz dokowania molekularnego z wykorzystaniem programu AutoDock Vina 1.1.2 zaprojektowanych związków IIIa-k oraz związku referencyjnego V	54
Tabela 9.4. Wyniki analiz dokowania molekularnego z wykorzystaniem programu AutoDock Vina 1.1.2 zaprojektowanych związków IVa-r oraz związku referencyjnego V	57
Tabela 9.5. Wyniki reakcji 4-aminofenolu 94 z chlorofosforanem dietylu przez 24 godziny w temperaturze pokojowej wobec różnych zasad oraz rozpuszczalników.....	61
Tabela 9.6. Wyniki analiz dokowania molekularnego z wykorzystaniem programu AutoDock Vina 1.1.2 oraz badań aktywności inhibicyjnej związków Ia-h oraz inhibitorów referencyjnych V i VI w teście <i>in vitro</i> na oczyszczonym enzymie pochodzącym z łożyska ludzkiego wraz z wyznaczoną wartością parametru LogP wyznaczonymi przez program ChemDraw Ultra 7.0.....	75
Tabela 9.7. Wyniki analiz dokowania molekularnego z wykorzystaniem programu AutoDock Vina 1.1.2 oraz badań aktywności inhibicyjnej otrzymanych inhibitorów IIa-g oraz związku referencyjnego V w teście <i>in vitro</i> na oczyszczonym enzymie pochodzącym z łożyska ludzkiego.....	76
Tabela 9.8. Wyniki analiz dokowania molekularnego z wykorzystaniem programu AutoDock Vina 1.1.2 oraz badań aktywności inhibicyjnej związków IIIa-k , IIb , IIc oraz inhibitora referencyjnego V w teście <i>in vitro</i> na oczyszczonym enzymie pochodzącym z łożyska ludzkiego.....	78
Tabela 9.9. Wyniki badań cytotoksyczności wybranych inhibitorów IIIb , IIIc , IIIg , IIIj , IIb , IIc oraz związku referencyjnego V	79
Tabela 9.10. Wyniki analiz dokowania molekularnego z wykorzystaniem programu AutoDock Vina 1.1.2 oraz badań aktywności inhibicyjnej związków IVa-r oraz inhibitora referencyjnego V w teście <i>in vitro</i> na oczyszczonym enzymie pochodzącym z łożyska ludzkiego.....	80

Wykaz schematów

Schemat 3.1. Szlak biosyntezy steroidów estrogenowych z udziałem STS. Legenda: AR – aromataza, ST – sulfotransferaza, Adion – androstenedion, Adiol – androstendiol, 17 β -HSD – dehydrogenaza 17 β -hydroksysteroidowa.....	14
Schemat 9.1. Fosforylacja 3-(4-aminofenilo)-7-hydroksy-kumaryny 91	60
Schemat 9.2. Selektywna fosforylacja 3-aminofenolu 94 chlorofosforanem dietylu przez 24 godziny w temperaturze pokojowej wobec różnych zasad i rozpuszczalników.....	60
Schemat 9.3. Reakcja fosforylacji 3-aminofenolu 94 chlorofosforanem dietylu z wykorzystaniem NaH.	63
Schemat 9.4. Transfosforylacja związku 95 oraz 96	65
Schemat 9.5. Reakcja fosforylacji 3-aminofenolu 94 z wykorzystaniem neopentylideno chlorofosforanu w bezwodnej pirydynie.	67
Schemat 9.6. Fosfitylacja 3-aminofenolu 94 z wykorzystaniem neopentylideno chlorofosforanu w bezwodnej pirydynie.....	67
Schemat 9.7. Szlak syntezy potencjalnych inhibitorów Ia-h ($R_1 = \text{Me, Et, } i\text{-Pr, } n\text{-Bu, Ph, Bn; } R_2 = \text{H, Me}$).....	69
Schemat 9.8. Szlak syntezy potencjalnych inhibitorów IIa-g ($R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 = \text{H, F, CF}_3, \text{OCF}_3$).....	70
Schemat 9.9. Schemat syntezy potencjalnych inhibitorów IIIa-k ($R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 = \text{H, F, CF}_3, \text{OCF}_3, \text{NO}_2; n = 0, 1$).	72
Schemat 9.10. Schemat syntezy potencjalnych inhibitorów IVa-r ($R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 = \text{H, F, CF}_3, \text{OCF}_3, \text{NO}_2; n = 0, 1; m = 8, 9$).....	73

Literatura

- [1] Foster, P.A.; Reed, P.A.; Purohit, A.; *Anticancer Agents Med. Chem.*, **2008**, 8, 732-738.
- [2] Woo, L.W.L.; Purohit, A.; Potter, B.V.L.; *Mol. Cel. Endocrinol.*, **2011**, 340, 175-185.
- [3] Reed, M.J.; Purohit, A.; Woo, L.W.L.; Newman, S.P.; Potter B.V.L.; *Endocr. Rev.*, **2005**, 26, 171-202.
- [4] Santner, S.J.; Feil, P.D., Santen, R.J.; *J. Clin. Endocrinol. Met.*, **1984**, 59, 29-33.
- [5] Utsumi, T.; Yoshimura, N.; Takeuchi, S.; Ando, J.; Maruta, M.; Maeda, K.; Harada, N.; *Cancer Res.*, **1999**, 59, 377-381.
- [6] Suzuki, T.; Nakata, T.; Miki, Y.; Kaneko, C.; Moriya, T.; Ishida, T.; Akinaga, S.; Hirakawa, H.; Kimura, M.; Sasano, H., *Cancer Res.*, **2003**, 63, 2762-2770.
- [7] Shah, R.; Singh, J.; Singh, D.; Singh Jaggi, A.; Singh, N.; *Eur. J. Med. Chem.*, **2016**, 114, 170-190.
- [8] Müller, K.; Faeh, C.; Diederich, F.; *Science*, **2007**, 317, 1881-1886.
- [9] Demkowicz, S.; Rachon, J.; Daško, M.; Kozak, W.; *RSC Adv.*, **2016**, 6, 7101-7112.
- [10] Yen, P.H.; Allen, E.; Marsh, B.; Mohandas, T.; Wang, N.; Taggart, R.T.; Shapiro, L.J.; *Cell*, **1987**, 49, 443-454.
- [11] Stein, C.; Hille, A.; Seidel, J.; Rijnbout, S.; Waheed, A.; Schmidt, B.; Geuze, H.; von Figura, K.; *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 13865-13872.
- [12] Shapiro, L.J.; Yen, P.; Pomerantz, D.; Martin, E.; Rolewic, L.; Mohandas, T.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1989**, 86, 8477-8481.
- [13] Basler, E.; Grompe, M.; Parenti, G.; Yates, J.; Ballabio, A.; *Am. J. Hum. Genet.*; **1992**, 50, 483-491.
- [14] Alperin, E.S.; Shapiro, L.J.; *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 20756-20763.
- [15] Dodgson, K.S.; Spencer, B.; Thomas, J.; *Biochem. J.*, **1953**, 56, 177-181.
- [16] Foster, P.A.; Chander, S.K.; Newman, S.P.; Woo, L.W.L.; Sutcliffe, O.B.; Bubert, C.; Zhou, D.; Chen, S.; Potter B.V.L.; Reed, M.J.; *Clin. Cancer Res.*, **2008**, 14, 6469-6477.

- [17] Miki, Y.; Nakata, T.; Suzuki, T.; Darnel, A.D.; Moriya, T.; Kaneko, C.; Hidaka, K.; Shiotsu, Y.; Kusaka, H.; Sasano, H.; *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2002**, 87, 5760-5768.
- [18] James, V.H.T.; Reed, M.J.; *Prog. Cancer Res. Ther.*, **1980**, 15, 48-65.
- [19] Bernstein, L.; Ross, R.K.; *Epidemiol. Rev.*, **1993**, 15, 48-65.
- [20] MacDonald, P.C.; Edman, C.D.; Hemsell, D.L.; Porter, J.C.; Siiteri, P.K.; *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **1978**, 130, 448-455.
- [21] Reed, M.J.; Hutton, J.D.; Baxendale, P.M.; James, V.H.T.; Jacobs, H.S.; Fisher, R.P.; *J. Steroid Biochem.*, **1979**, 11, 905-911.
- [22] Reed, M.J.; Murray, M.A.F.; The oestrogens, W: Hormones in blood, 3rd edition (red.) Gray, C.H.; James, V.H.T.; Academic Press: London, **1979**, 263-266.
- [23] Hobkirk, R.; *Trends Endocrinol. Metab.*, **1993**, 4, 69-74.
- [24] Falany, J.L.; Falany, C.N.; *Cancer Res.*, **1996**, 56, 1551-1555.
- [25] Falany, J.L.; Macrina, N.; Falany, C.N.; *Breast Cancer Res. Treat.*, **2002**, 74, 167-176.
- [26] Strott, C.A.; *Endocr. Rev.*, **2002**, 23, 703-734.
- [27] Noel, C.T.; Reed, M.J.; Jacobs, H.S.; James, V.H.T.; *J. Steroid Biochem.*, **1981**, 14, 1101-1105.
- [28] Pasqualini, J.R.; Gelly, C.; Nguyen, B.L.; Vella, C.; *J. Steroid Biochem.*, **1989**, 34, 155-163.
- [29] Ruder, H.J.; Loriaux, L.; Lipsett, M.B.; *J. Clin. Invest.*, **1972**, 51, 1020-1033.
- [30] Reed, M.J.; Purohit, A.; *Rev. Endocr. Rel. Cancer*, **1993**, 45, 51-62.
- [31] Reed, M.J.; Purohit, A.; Inhibition of steroid sulphatases, W: Design of enzyme inhibitors as drugs, vol.2 (red.) Sandler, M.; Smith, H.J.; Oxford University Press, **1994**, 481-494.
- [32] Reed, M.J.; Purohit, A.; Howarth, N.M.; Potter, B.V.L.; *Drugs Fut.*, **1994**, 19, 673-680.
- [33] Reed, M.J.; Purohit, A.; Woo, L.W.L.; Potter, B.V.L.; *Endocr. Rel. Cancer*, **1996**, 3, 9-23.
- [34] Bonney, R.C.; Reed, M.J.; Davidson, K.; Beranek, P.A.; James, V.H.T.; *Clin. Endocrinol.*, **1983**, 19, 727-739.

- [35] Van Landeghem, A.A.J.; Poortman, J.; Nabuurs, M.; *Cancer Res.*, **1985**, 45, 2900-2906.
- [36] Thijssen, J.H.H.; Blankenstein, M.A.; Miller, W.R.; Milewicz, A.; *Steroids*, **1987**, 50, 297-306.
- [37] Thijssen, J.H.H.; Blankenstein, M.A.; *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **1989**, 25, 1953-1959.
- [38] Fishman, J.; Nisselbaum, J.S.; Menendez-Botet, C.J.; Schwartz, M.K.; *J. Steroid Biochem.*, **1977**, 8, 893-896.
- [39] Edery, M.; Goussard, J.; Dehennin, L.; Scholler, R.; Reiffsteck, J.; Drosdowsky, M.A.; *Eur. J. Cancer*, **1981**, 17, 115-120.
- [40] James V.H.T.; McNeill, J.M.; Lai, L.C.; Newton, C.J.; Ghilchik, M.W., Reed, M.J.; *Steroids*, **1987**, 50, 269-279.
- [41] Yamamoto, T.; Kitawaki, J.; Urabe, M.; Honjo, H.; Tamura, T.; Noguchi, T.; Okada, H.; Sasaki, H.; Tada, A.; Terashima, Y.; Nakamura, J.; Yoshihama, M.; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1993**, 44, 463-468.
- [42] Tilson-Mallett, N.; Santner, S.J.; Feil, P.D.; Santen, R.J.; *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **1983**, 57, 1125-1128.
- [43] Utsumi, T.; Yoshimura, N.; Takeuchi, S.; Maruta, M.; Maeda, K.; Harada, N.; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2000**, 73, 141-145.
- [44] Utsumi, T.; Yoshimura, N.; Maruta, M.; Takeuchi, S.; Ando, J.; Maeda, K.; Harada, N.; *Breast Cancer*, **1999**, 6, 298-300.
- [45] Kroboth, P.D.; Salek, F.S.; Pittenger, A.L.; Fabian, T.J.; Frye, R.F.; *J. Clin. Pharmacol.*, **1999**, 39, 327-348.
- [46] Rosenfeld, R.S.; Rosenberg, B.J.; Fukushima, D.K.; Hellman, L.; *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **1975**, 40, 850-855.
- [47] Bonney, R.C.; Scanlon, M.J.; Reed, M.J.; Jones, D.L.; Beranek, P.A.; James, V.H.T.; *J. Steroid Biochem.*, **1984**, 20, 501-504.
- [48] Hernandez-Guzman, F.G.; Higashiyama, T.; Osawa, Y.; Ghosh, D.; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2001**, 78, 441-450.
- [49] Hernandez-Guzman, F.G.; Higashiyama, T.; Pangborn, W.; Osawa, Y.; Ghosh, D.; *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 22989-22997.

- [50] Schmidt, B.; Selmer, T.; Ingendoh, A.; v. Figurat, K.; *Cell*, **1995**, 82, 271-278.
- [51] Dierks, T.; Schmidt, B.; v. Figura, K.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, 11963-11986.
- [52] Selmer, T.; Hallmann, A.; Schmidt, B.; Sumper, M.; v. Figura, K.; *Eur. J. Biochem.*, **1996**, 238, 341-345.
- [53] Recksiek, M.; Selmer, T.; Dierks, T. Schmidt, B.; v. Figura, K.; Sulfatases, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 6096-6103.
- [54] Aidoo-Gyamfi, K.; Cartledge, T.; Shah, K.; Ahmed, S.; *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, **2009**, 9, 599-612.
- [55] Birnböck, H.; v. Angerer, E.; *Biochem. Pharmacol*, **1990**, 39, 1709-1713.
- [56] Evans, T.R.J.; Rowlands, M.G.; Jarman, M.; Coombes, R.C.; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1991**, 39, 493-499.
- [57] Wong, C.K.; Keung, W.M.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, 233, 579-583.
- [58] Howarth, N.M.; Purohit, A.; Reed, M.J.; Potter, B.V.L.; *J. Med. Chem.*, **1994**, 37, 219-221.
- [59] Woo, L.W.L.; Purohit, A.; Reed, M.J.; Potter, B.V.L.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, 7, 3075-3080.
- [60] Woo, L.W.L.; Lightowler, M.; Purohit, A.; Reed, M.J.; Potter, B.V.L.; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1996**, 57, 79-88.
- [61] Poirier, D.; Boivin, R.P.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, 8, 1891-1896.
- [62] Boivin, R.P.; Luu-The, V.; Lachance, R.; Labrie, F.; Poirier, D.; *J. Med. Chem.*, **2000**, 43, 4465-4478.
- [63] Ciobanu, L.C.; Boivin, R.P.; Luu-The, V.; Poirier, D.; *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2003**, 18, 15-26.
- [64] Chu, G.H.; Peters, A.; Selcer, K.W.; Li, P.K.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, 9, 141-144.
- [65] Golob, T.; Liebl, R.; v. Angerer, E.; *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, 10, 3941-3953.
- [66] Jütten, P.; Schumann, W.; Härtl, A.; Heinisch, L.; Gräfe, U.; Werner, W.; Ulbricht, H.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, 12, 1339-1342.

- [67] Elger, W.; Schwarz, S.; Hedden, A.; Reddersen, G.; Schneider, B.; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1995**, 55, 395-403.
- [68] Purohit, A.; Vernon, K.A.; Hummelinck, A.E.W.; Woo, L.W.L.; Hejaz, H.A.M.; Potter, B.V.L.; Reed, M.J.; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1998**, 64, 269-275.
- [69] Purohit, A.; Hejaz, H.A.M.; Woo, L.W.L.; v. Strien, A.E.; Potter, B.V.L.; Reed, M.J.; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1999**, 69, 227-238.
- [70] Raobaikady, B.; Purohit, A.; Chander, S.K.; Woo, L.W.L.; Leese, M.P.; Potter, B.V.L.; Reed, M.J.; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2003**, 84, 351-358.
- [71] Peter, R.H.; Chao, W.R.; Sato, B.; Shigeno, K.; Zaveri, N.T.; Tanabe, M.; *Steroids*, **2003**, 68, 97-110.
- [72] Li, P.K.; Chu, G.H.; Guo, J.P.; Peters, A.; Selcer, K.W.; *Steroids*, 63, 425-432.
- [73] Ciobanu, L.C.; Boivin, R.P.; Luu-The, V.; Labrie, F.; Poirier, D.; *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 2280-2286.
- [74] Ciobanu, L.C.; Luu-The, V.; Poirier, D.; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2002**, 80, 339-353.
- [75] Ciobanu, L.C.; Luu-The, V.; Martel, C.; Labrie, F.; Poirier, D.; *Cancer Res.*, **2003**, 63, 6442-6446.
- [76] Ciobanu, L.C.; Poirier, D.; *J. Comb. Chem.*, **2003**, 5, 429-440.
- [77] Fischer, D.S.; Woo, L.W.L.; Mahon, M.F.; Purohit, A.; Reed, M.J.; Potter, B.V.L.; *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, 11, 1685-1700.
- [78] Fischer, D.S.; Chander, S.K.; Woo, L.W.L.; Fenton, J.C.; Purohit, A.; Reed, M.J.; Potter, B.V.L.; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2003**, 84, 343-349.
- [79] Li, P.K.; Milano, S.; Kluth, L.; Rhodes, M.E.; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1996**, 59, 41-48.
- [80] Chu, G.H.; Milano, S.; Kluth, L.; Rhodes, M.; Boni, R.; Johnson, D.A.; Li, P.K.; *Steroids*, **1997**, 62, 530-535.
- [81] Patel, C.K.; Owen, C.P.; Ahmed, S.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2003**, 307, 778-781.

- [82] Woo, L.W.L.; Purohit, A.; Reed, M.J.; Potter, B.V.L.; *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 1349-1351.
- [83] Purohit, A.; Woo, L.W.L.; Barrow, D.; Hejaz, H.A.M.; Nicholson, B.V.L.; Potter, Reed, M.J.; *Mol. Cell. Endocrinol.*, **2001**, 171, 129-135.
- [84] Woo, L.W.L.; Purohit, A.; Malini, B.; Reed, M.J.; Potter, B.V.L.; *Chem. Biol.*, **2000**, 7, 773-791.
- [85] Malini, B.; Purohit, A.; Ganeshapillai, D.; Woo, L.W.L.; Potter, B.V.L.; Reed, M.J.; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2000**, 75, 253-258.
- [86] Hejaz, H.A.M.; PhD thesis, **1998**, University of Bath, Bath, United Kingdom.
- [87] Le Bail, J.C.; Lofth, H. Charles, L.; Pepin, D.; Habrioux, D.; *Steroids*, **2002**, 67, 1057-1064.
- [88] Nussbaumer, P.; Lehr, P.; Billich, A.; *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 4310-4320.
- [89] Nussbaumer, P.; Winiski, A.P.; Billich, A.; *J. Med. Chem.*, **2003**, 45, 5091-5094.
- [90] Ahmed, S.; James, K.; Owen, C.P.; Patel, C.K.; *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 2759-2772.
- [91] Hejaz, H.A.M.; Woo, L.W.L.; Purohit, A.; Reed, M.J.; Potter, B.V.L.; *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 2759-2772.
- [92] Nussbaumer, P.; Bilban, M.; Billich, A.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, 12, 2093-2095.
- [93] Ino, Y.; Amishiro, N.; Muramatsu, K.; Shiotsu, Y.; Murakata, C.; *World Pat. Appl.*, WO 2003020690, **2003**.
- [94] Lafay, J.; Rondot, B.; Carniato, D.; Bonnet, P.; Clerc, T.; Shields, J.; *U.S. Pat. Appl.*, US 2007021492 A1, **2007**.
- [95] Staehle, W.; Bruge, D.; Scholz, G.; Rondot, B.; Lafay, J.; *World Pat. Appl.*, WO 2008067892 A1, **2008**.
- [96] Ouellet, C.; Maltais, R.; Ouellet, É.; Barbeau, X.; Lagüe, P.; Poirier, D.; *Eur. J. Med. Chem.*, **2016**, 119, 169-182.
- [97] El Gamal, M.I.; Semreen, M.H.; Foster, P.A.; Potter, B.V.L.; *Bioorg. Med. Chem.*, **2016**, 24, 2762-2767.

- [98] Kozak, W.; Daško, M.; Masłyk, M.; Piczykolan, J.S.; Gielniewski, B.; Rachon, J.; Demkowicz, S.; *RSC Adv.*, **2014**, 4, 44350-44358.
- [99] Kozak, W.; Daško, M.; Masłyk, M.; Gielniewski, B.; Rachon, J.; Demkowicz, S.; *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **2015**, 17, 1091-1096.
- [100] Kozak, W.; Daško, M.; Wołos, A.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Składanowski, A.; Misiak, M.; Rachon, J.; Demkowicz, S.; *RSC Adv.*, **2015**, 5, 32594-32603.
- [101] Demkowicz, S.; Kozak, W.; Daško, M.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Rachon, J.; *Drug Dev. Res.*, **2015**, 76, 94-104.
- [102] Kozak, W.; Daško, M.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Rachon, J.; Demkowicz, S.; *Drug Dev. Res.*, **2015**, 76, 450-462.
- [103] Demkowicz, S.; Kozak, W.; Daško, M.; Masłyk, M.; Gielniewski, B.; Rachon, J.; *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, 101, 358-366.
- [104] Kitchen, D.B.; Decornez, H.; Furr, J.R.; Bajorath, J.; *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2004**, 3, 935-949.
- [105] Trott, O.; Olson, A.J.; *J. Computat. Chem.*, **2010**, 31, 455-461.
- [106] Sastry, G.M.; Adzhigirey, M.; Day, T.; Annabhimoju, R.; Sherman, W.; *J. Comp. Aided Mol. Des.*, **2013**, 27, 221-234.
- [107] HyperChem[®] Computational Chemistry, *Hypercube, Inc.*, Canada, **1996**.
- [108] Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K.; *J. Mol. Graph.*, **1996**, 14, 33-38.
- [109] Bégué, J.P.; Bonner-Delpon, D.; *J. Fluorine Chem.*, **2006**, 127, 992-1012.
- [110] Isanbor, C.; O'Hagan, D.; *J. Fluorine Chem.*, **2006**, 127, 303-319.
- [111] Kirk, K.L.; *J. Fluorine Chem.*, **2006**, 127, 1013-1029.
- [112] Park, B.K.; Kitteringham, N.R.; O'Neill, P.M.; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **2001**, 41, 443-470.
- [113] Kirsh, P.; *Modern Fluoroorganic Chemistry*, Wiley-VCH, **2004**.
- [114] Schlosser, M.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 5432-5446.
- [115] Dolbier Jr., W.R.; *J. Fluorine Chem.*, **2005**, 126, 157-163.
- [116] Middleton, W.J.; *J. Org. Chem.*, **1975**, 40, 574-578.

- [117] Hayashi, H.; Sonoda, H.; Fukumura, K.; Nagata, T.; *Chem. Commun.*, **2002**, 2002, 1618-1619.
- [118] Lal, G.S.; Pez, G.P.; Resaresi, R.J.; Prozonic, F.M.; Cheng, H.; *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 7048-7054.
- [119] Joubert, J.; Roussel, S.; Christophe, C.; Billard, T.; Langlois, B.R.; Vidal, T.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 3133-3136
- [120] Smart, B.E.; W: *Organofluorine Chemistry*, (red.) Banks, R.E.; Smart, B.E.; Tatlow, J.C.; Plenum, **1994**, 57-88.
- [121] Smart, B.E.; *J. Fluorine Chem.*, **2001**, 109, 3-11.
- [122] Leroux, F.; *ChemBioChem*, **2004**, 5, 644-649.
- [123] Patani, G.A.; LaVoie, E.J.; *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 3147-3176.
- [124] Zhao, K.; Lim, D.S.; Funaki, T.; Welch, J.T.; *Biorg. Med. Chem.*, **2003**, 11, 207-215.
- [125] Black, W.C.; Bayly, C.I.; Davis, D.E.; Desmarais, S.; Falgueyret, J.P.; Li, C.S.; Massé, F.; McKay, D.J.; Palmer, J.T.; Percival, M.D.; Robichaud, J.; Zamboni, R.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15, 4741-4744.
- [126] Biffinger, J.C.; Kim, H.W.; DiMagno, S.G.; *ChemBioChem*, **2004**, 5, 622-627.
- [127] Schweizer, E.; Hoffmann-Röder, A.; Schrärer, K.; Olsen, J.A.; Fäh, C.; Seiler, P.; Obst-Sander, U.; Wagner, B.; Kansy, M.; Diederich, F.; *ChemMedChem*, **2006**, 1, 611- 621.
- [128] Leroux, F.; Jeschke, P.; Schlosser, M.; *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 827-856.
- [129] Morgenthaler, M.; Schweizer, E.; Hoffmann-Röder, A.; Benini, F.; Martin, R.E.; Jaeschke, G.; Wagner, B.; Fischer, H.; Bendels, S.; Zimmerli, D.; Schneider, J.; Diederich, F.; Kansy, M.; Müller, K.; *ChemMedChem*, **2007**, 2, 1100-1115.
- [130] Snyder, J.P.; Chandrakumar, N.S.; Sato, H.; Lankin, D.C.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 544-545.
- [131] Sun, A.M.; Lankin, D.C.; Hardcastle, K.; Snyder, J.P.; *Chem. Eur. J.*, **2005**, 11, 1579-1591.
- [132] Böhm, H.J.; Banner, D.; Bendels, S.; Kansy, M.; Kuhn, B.; Müller, K.; Obst-Sander, U.; Stahl, M.; *ChemBioChem*, **2004**, 5, 637-643.
- [133] Avdeef, A.; *Curr. Top. Med. Chem.*, **2001**, 1, 277-351.

- [134] Perrin, D.D.; Dempsey, B.; Serjeant, E.P.; W: pKa Prediction for Organic Acids and Bases, Chapman & Hall, **1981**.
- [135] Kim, C.Y.; Chang, J.S.; Doyon, J.B.; Baird, T.T.; Fierke, C.A.; Jain, A.; Christianson, D.W.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 12125-12134.
- [136] Kirshnamurthy, V.M.; Bohall, B.R.; Kim, C.Y.; Moustakas, D.T.; Christianson, D.W.; Whitesides, G.M.; *Chem. Asian J.*, **2007**, 2, 94-105.
- [137] Maren, T.H.; Conroy, C.W.; *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 26233-26239.
- [138] Dunitz, J.D.; Taylor, R.; *Chem. Eur. J.*, **1997**, 3, 89-98.
- [139] Paulini, R.; Müller, K.; Diederich, F.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 1788-1805.
- [140] Demkowicz, S.; Kozak, W.; Daško, M.; Rachon, J.; *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2016**, 16, 1359-1373.
- [141] Dabkowski, W.; Kazimierczak, Ł.; *Tetra. Lett.*, **2009**, 50, 5035-5039.
- [142] Dabkowski, W.; Ozarek, A.; Tworowska, I.; *New J. Chem.*, **2005**, 29, 1396-1399.
- [143] Ohkubo, A.; Kuwayama, Y.; Kudo, T.; Tsunoda, H.; Seio, K.; Sekine, M.; *Org. Lett.*, **2008**, 10, 2793-2796.
- [144] Vaccaro, A.M.; Salvioli, R.; Muscillo, M.; Renola, L.; *Enzyme*, **1987**, 37, 115-126.
- [145] Woo, L.W.L.; Jackson, T.; Putey, A.; Cozier, G.; Leonard, P.; Acharya, K.R.; Chander, S.K.; Purohit, A.; Reed, M.J.; *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, 2155-2170.
- [146] Hernandez-Guzman, F.G.; Higashiyama, T.; Osawa, Y.; Ghosh, D.; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2001**, 78, 441-450.
- [147] Daško, M.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Aszyk, J.; Rachon, J.; Demkowicz, S.; *Med. Chem. Commun.*, **2016**, 7, 1146-1150.
- [148] Demkowicz, S.; Daško, M.; Kozak, W.; Krawczyk, K.; Witt, D.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Rachon, J.; *Chem. Biol. Drug Des.*, **2016**, 87, 233-238.
- [149] Daško, M.; Przybyłowska, M.; Rachon, J.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Misiak, M.; Składanowski, A.; Demkowicz, S.; *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 128, 79-87.
- [150] Daško, M.; Rachon, J.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Demkowicz, S.; *Chem. Biol. Drug Des.*, **2017**, 90, 156-161.
- [151] Jagiello, K.; Sosnowska, A.; Supratik, K.; Demkowicz, S.; Daško, M.; Leszczynski, J.; Rachon, J.; Puzyn, T.; *Struct. Chem.*, **2017**, 28, 1017-1032.

[152] Acharya, J.; Gupta, A.K.; Shakya, P.D.; Kaushik, M.P.; *Tetr. Lett.*, **2005**, 46, 5293–5295.

[153] Vothi, H.; Halm, S.; Nguyen, C.; Bae, I.; Kim, J.; *Fire Mater.*, **2014**, 38, 36–45.