

Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Organicznej

mgr inż. Witold Kozak

**PROJEKTOWANIE, SYNTEZA FOSFOROWYCH I
TIOFOSFOROWYCH POCHODNYCH KUMARYNY, BIFENYLU,
TYRAMINY ORAZ FLAWONOIDÓW I BADANIE ICH
AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ JAKO POTENCJALNYCH
INHIBITORÓW SULFATAZY STEROIDOWEJ (STS)**

Promotor: prof. dr hab. inż. Janusz Rachoń

Promotor pomocniczy: dr inż. Sebastian Demkowicz

Gdańsk 2017

Spis treści

Wykaz skrótów i symboli.....	4
I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	5
1. Wprowadzenie.....	6
2. Sulfataza steroidowa (STS).....	8
2.1. Budowa i właściwości.....	8
2.2. Lokalizacja STS	9
2.3. Inhibitory STS	10
3. Cel pracy	19
4. Reakcja fosforylacji fenoli	20
4.1. Reakcje fosforylacji i tiofosforylacji fenoli z wykorzystaniem chemii fosforu czterokoordynacyjnego	22
4.2. Reakcje fosforylacji fenoli z wykorzystaniem chemii fosforu trójkoordynacyjnego.....	27
4.3. Inne metody fosforylacji	35
5. Próby otrzymywania soli H-fosfonianu 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydro-7 <i>H</i> -cyklohepta[c]chromen-6-onu i 4-fenylofenolu z wykorzystaniem chemii fosforu trójkoordynacyjnego.....	36
6. Projektowanie, otrzymywanie oraz badania biologiczne fosforowych i tiofosforowych pochodnych kumaryn	56
6.1. Modelowanie molekularne fosforowych pochodnych kumarynowych	56
6.2. Modelowanie molekularne tiofosforowych pochodnych kumarynowych	60
6.3. Synteza fosforowych i tiofosforowych pochodnych kumarynowych	64
6.4. Wyznaczanie wartości IC_{50} fosforowych pochodnych kumarynowych	68
6.5. Wyznaczanie wartości IC_{50} tiofosforowych pochodnych kumarynowych	71
7. Projektowanie, otrzymywanie oraz badania biologiczne tiofosforowych pochodnych bikumarynowych.....	74
7.1. Modelowanie molekularne	74
7.2. Synteza tiofosforowych pochodnych bikumarynowych	77
7.3. Wyznaczanie wartości IC_{50} tiofosforowych pochodnych bikumarynowych.....	79
8. Projektowanie, otrzymywanie oraz badania biologiczne fosforowych i tiofosforowych pochodnych bifenyli	80



8.1.	Modelowanie molekularne fosforowych i tiofosforowych pochodnych bifenylu	82
8.2.	Synteza fosforowych i tiofosforowych pochodnych bifenylu.....	85
8.3.	Wyznaczanie wartości IC ₅₀ fosforowych i tiofosforowych pochodnych bifenylu	89
9.	Projektowanie, otrzymywanie oraz badania biologiczne fosforowych i tiofosforowych pochodnych tyraminy	92
9.1.	Modelowanie molekularne fosforowych i tiofosforowych pochodnych tyraminy	92
9.2.	Synteza fosforowych i tiofosforowych pochodnych tyraminy.....	97
9.3.	Wyznaczenie wartości IC ₅₀ fosforowych i tiofosforowych pochodnych tyraminy	100
10.	Projektowanie, otrzymywanie oraz badania biologiczne fosforowych i tiofosforowych pochodnych flawonoidowych	104
10.1.	Modelowanie molekularne fosforowych i tiofosforowych pochodnych flawonoidowych	104
10.2.	Synteza fosforowych i tiofosforowych pochodnych flawonoidowych	107
10.3.	Wyznaczanie wartości IC ₅₀ fosforowych i tiofosforowych pochodnych flawonoidowych	110
11.	Podsumowanie.....	112
II.	CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	118
12.	Aparatura, odczynniki i procedury eksperymentalne	119
12.1.	Przygotowanie struktury rentgenograficznej STS.....	119
12.2.	Oprogramowanie i warunki dokowania	120
12.3.	Oczyszczanie enzymu	120
12.4.	Test aktywności biologicznej <i>in vitro</i>	120
13.	Procedury otrzymywania poszczególnych związków	121
13.1.	Procedura otrzymywania bifenylloetylofosforanu (157).....	121
13.2.	Procedury otrzymywania fosforowych pochodnych kumarynowych (160a-160s) oraz pochodnych (164), (165) i (170)	121
13.3.	Procedury otrzymywania tiofosforowych pochodnych kumarynowych (162a-162w) oraz (163a-163f)	128
13.4.	Procedura otrzymywania tiofosforowych diestrów bikumarynowych (171a-171l)	136

13.5. Procedury otrzymywania fosforowych i tiofosforowych pochodnych bifenylowych (174a-174l), (174a'-174j'), (175a'-175d') oraz (176a-176d).....	139
13.6. Procedury otrzymywania fosforowych i tiofosforowych pochodnych tyraminy (179a-179e), (179a'-179f') oraz (180a-180c).....	149
13.7. Procedury otrzymywania fosforowych i tiofosforowych pochodnych flawonoidowych (185a-185p) oraz (186a-186i).....	156
14. Literatura	168

Wykaz skrótów i symboli

STS	Sulfataza steroidowa
E1	Estron
E1S	Siarczan estronu
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Siarczan dehydroepiandrosteronu
ER	Receptor estrogenowy
FGly	Formyloglicyna
Adiol	5-androstenodiol
EMATE	Amidosiarczan-3- <i>O</i> -estronu
ARSA	Arylosulfataza A
ARSB	Arylosulfataza B
E1-MTP	3-metylotiofosfonian estronu
TMSBr	Bromek trimetylosililowy
665-COUMATE	Amidosiarczan 4-okso-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -cyklopenta-[c][1]benzopiranu
E2	17 β -estradiol
E2S	Siarczan 17 β -estradiolu
17β-HSD	Dehydrogenaza 17 β -hydroksysteroidowa
ER	Receptor estrogenowy
<i>N,N</i>-DMA	<i>N,N</i> -dimetyloacetamid
HER2	Epitelialny czynnik wzrostu 2

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Wprowadzenie

Rak piersi jest najczęstszą chorobą nowotworową wśród kobiet w Polsce i na świecie. Tylko w Stanach Zjednoczonych nowotwór ten jest diagnozowany u prawie 250 tys. pacjentek rocznie [1]. Do grupy najwyższego ryzyka zalicza się kobiety w wieku 50-69 lat. Ogromną rolę w walce z nowotworem piersi odgrywa profilaktyka oraz wczesne wykrycie zmian patologicznych w tkankach. Regularne wykonywanie badania mammograficznego oraz USG piersi pozwala na wczesne wykrycie choroby oraz zastosowanie odpowiedniej terapii. Wyróżnia się dwa typy nowotworu piersi: hormonozależny (ER+) i hormononiezależny (ER-). Około 70% przypadków tej choroby ma podłoże hormonalne i jej rozwój zależy od estrogenu. Dzięki badaniom nad poznaniem mechanizmów procesu nowotworzenia, rozwija się tzw. terapia nowotworowa celowana. Rozwój raka skutkuje utratą kontroli przez organizm nad procesami metabolicznymi komórek, dlatego też każdy etap metabolizmu w komórce może być celem tej terapii. Metoda ta polega na działaniu na komórki zmienione chorobowo przy jednoczesnym braku inwazyjności w stosunku do zdrowych tkanek organizmu. W przypadku nowotworu hormonozależnego stosuje się terapię polegającą na blokowaniu receptorów estrogenowych (ER). Najpopularniejsze leki będące selektywnymi modulatorami receptorów estrogenowych (SERM) to np. tamoksyfen czy anastrozol. Ich stosowanie uratowało lub znacząco przedłużyło życie milionom kobiet. Niestety w trakcie terapii często okazuje się, że leki te przestają być skuteczne. Inną formą terapii jest stosowanie chemoterapeutyków będących inhibitorami aromatazy – enzymu odpowiadającego za konwersję androgenów w estrogeny. Okazuje się jednak, że powyższe metody leczenia nie zawsze są skuteczne, ponieważ dotychczas stosowane leki nie blokują wszystkich dróg syntezy estrogenu w organizmie kobiety oraz wykazują liczne skutki uboczne jak np. działanie hepatotoksyczne i neurotoksyczne czy objawy alergiczne. Ponadto wiele potencjalnych terapeutyków posiada właściwości estrogenowe co dyskwalifikuje je już na etapie badań biologicznych. Atrakcyjnym celem badań stała się w ostatnich latach sulfataza steroidowa (STS) – enzym odpowiedzialny za syntezę estronu z prekursorów obecnych w osoczu, takich jak siarczan estronu (E1S) czy siarczan dehydroepiandrosteronu (DHEAS) [2]. W przypadku raka piersi aktywność STS jest znacząco wyższa od aktywności biologicznej aromatazy, co wiąże się z wysoką ekspresją STS mRNA w guzach i w konsekwencji niekorzystnymi rokowaniami u chorych. Dwa potencjalne leki STX64 (6) (Rys. 3) [3] oraz STX213 (5) (Rys. 3) [4] dzięki silnym właściwościom inhibicyjnym,

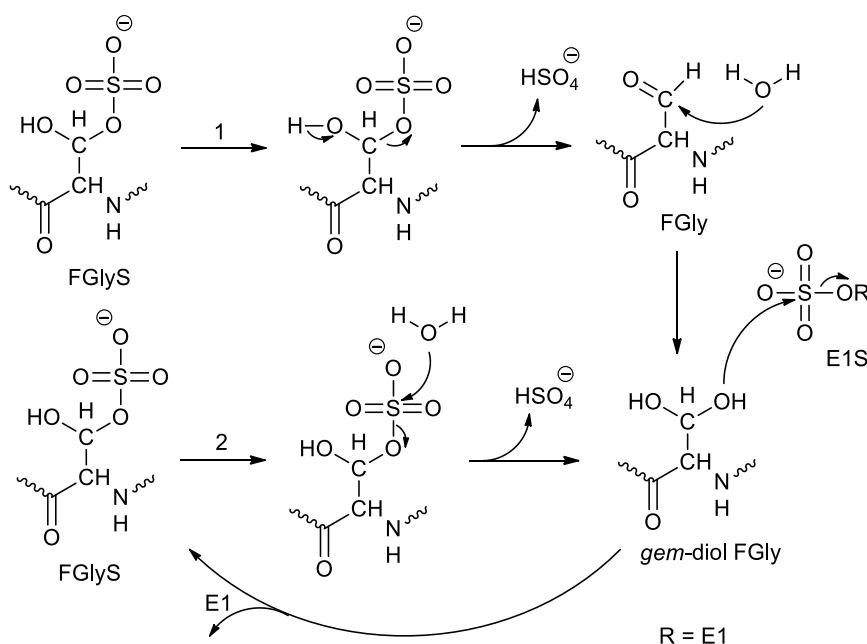
w połączeniu ze zwiększoną stabilnością *in vivo* i brakiem właściwości estrogenowych, znalazły się obecnie w I fazie badań klinicznych.

2. Sulfataza steroidowa (STS)

2.1. Budowa i właściwości

Sulfataza steroidowa (STS) należy do grupy 12 sulfataz wyizolowanych z organizmów ssaków [5, 6]. Jest białkiem o masie 62 kDa, zbudowanym z 587 aminokwasów [7], kodowanym przez gen STS. Gen ten jest pseudoautosomalny i znajduje się na dalszym, krótkim ramieniu chromosomu X w rejonie, który nie ulega inaktywacji. Gen składa się z 10 eksonów, które mają zasięg 146 kbp i są zbudowane z intronów o rozmiarze od 102 bp do 35 kbp. Sulfataza jest związana z szorstkim retikulum endoplazmatycznym komórek w organizmie ludzkim. W związku z redukującym charakterem cytoplazmy, ulega glikozylacji w jednym spośród czterech, obecnych w jej strukturze, potencjalnych miejsc ku temu przeznaczonych.

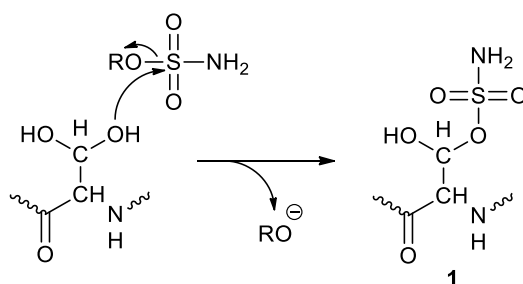
W obszarze katalitycznym STS znajduje się dziesięć fragmentów aminokwasowych: Arg35, Arg36, Arg79, Arg342, Fgły75, Gln343, His136, His290, Lys134 oraz Lys368. Udowodniono, że *gem*-diolowa forma formyloglicyny (FGly) bierze udział w hydrolizie siarczanów przez arylosulfatazę A (ARSA) i B (ARSB) [8]. Przepuszczalny mechanizm hydrolizy E1S do estronu (E1) przy udziale STS przedstawiłem na **rysunku 1**.



Rys. 1. Proponowany mechanizm hydrolizy siarczanu estronu przy udziale STS.

Hydroliza E1S może przebiegać według dwóch alternatywnych mechanizmów. Pierwszy z nich zakłada rozpad siarczanu acetalu formyloglicyny (FGlyS) na anion siarczanowy oraz formyloglicynę, która w reakcji z cząsteczką wody daje *gem*-diolową pochodną formyloglicyny. Drugi proponowany mechanizm zakłada w pierwszym etapie bezpośredni atak cząsteczki wody na atom siarki w FGlyS, co skutkuje powstaniem *gem*-diolowej pochodnej formyloglicyny, która w kolejnym etapie w reakcji z siarczanem estronu prowadzi do syntezy E1.

Ugrupowanie amidosiarczanowe obecne w znanych inhibitorach STS, naśladuje grupę siarczanową w E1S. Proponowany mechanizm inhibicji STS przez pochodną amidosiarczanową przedstawiłem na **rysunku 2**. Obejmuje on nukleofilowy atak grupy hydroksylowej *gem*-diolowej formy FGly na atom siarki obecny w strukturze inhibitora. W wyniku tego procesu powstaje pochodna (**1**), która może być ostatecznym produktem reakcji. W literaturze nie wyklucza się dalszych przemian pochodnej (**1**) mogących skutkować nieodwracalną dezaktywacją sulfatazy.



Rys. 2. Proponowany mechanizm inhibicji STS przez inhibitor amidosiarczanowy.

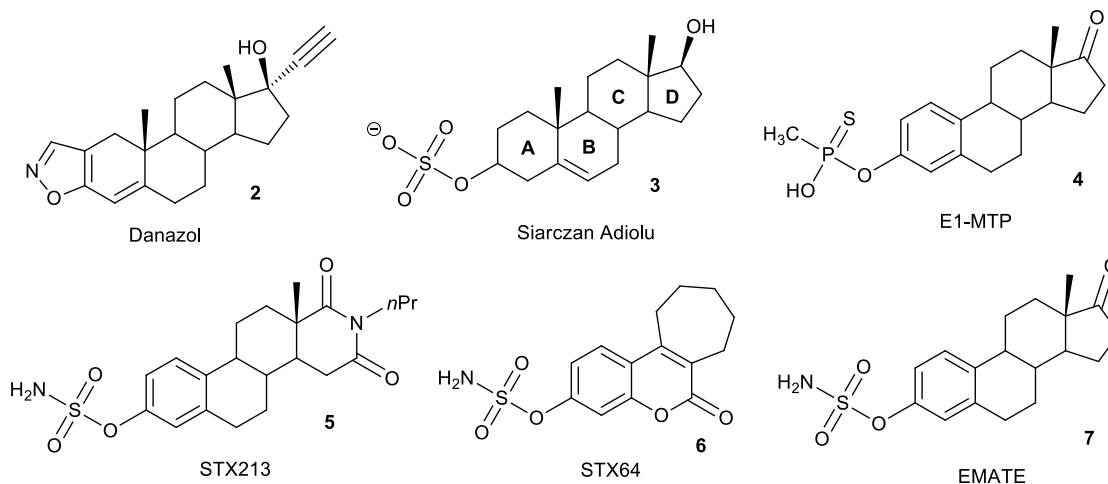
2.2. Lokalizacja STS

W 1954 roku zespół naukowy kierowany przez Dodgson'a po raz pierwszy udowodnił obecność STS w mikrosomach wątroby szczura [9]. W kolejnych latach aktywność sulfatazy wykryto w wielu narządach ssaków i tak np. w jądrach [10], jajnikach [11], leukocytach [12] i mózgu [13]. Dystrybucja STS w organach i tkankach ssaków jest różna i zależna od gatunku. Ciekawostką stanowi fakt, że sulfataza jest nieobecna w wątrobach świnki morskiej oraz niektórych torbaczy. Najbogatszym źródłem STS jest ludzkie łożysko. Do wykrywania enzymu w tkankach służą między innymi metody immunohistochemiczne, analiza biochemiczna produktów hydrolizy siarczanów różnych substratów oraz PCR z odwrotną transkryptazą (RT-PCR) [14].

W 1985 roku Partanen [15] udowodnił obecność STS w próbkach tkanek piersi pacjentek ze zdiagnozowanym nowotworem zarówno złośliwym oraz niezłośliwym. Dzięki możliwości izolacji czystego STS z ludzkiego łożyska, otrzymano monoklonalne i poliklonalne przeciwciała antygeny STS oraz rozwinięto metody immunohistochemiczne do badania lokalizacji STS w komórkach. Stosunkowo niedawno wykryto obecność STS w cytoplazmie komórek jajnika z rozwiniętym gruczolakiem [16], komórkach tkanki nabłonkowej endometrium [17], tkance mięśniowej gładkiej aorty [18] oraz w tkankach endometrium, będących we wczesnej fazie lutealnej [19]. Wysoką aktywność STS odnotowano w wątrobie i nadnerczach osób dorosłych. Stosując monoklonalne, znakowane przeciwciała (KW 1049) skierowane przeciwko sulfatazie wyizolowanej z łożyska, wykryto immunoreaktywność STS w komórkach nowotworowych raka piersi w 74% przypadków [20].

2.3. Inhibitory STS

Pierwszym inhibitorem STS był Danazol (**2**) (pochodna 17α -etynylo testosteronu). Związek ten posiada słabe właściwości inhibicyjne, został użyty w leczeniu endometriozy [21] (**Rys. 3**). Danazol (**2**) hamuje aktywność STS w mikrosomach łożyska ludzkiego w 60% przy stężeniu $10\ \mu\text{M}$ [22]. Kolejnym odkrytym inhibitorem był siarczan Adiolu (**3**), dla którego wyznaczono aktywność inhibicyjną względem STS, stała K_i (STS z mikrosomów łożyskowych) wyniosła $2\ \mu\text{M}$ [23] (**Rys. 3**). Poszukiwania nowych skutecznych inhibitorów STS doprowadziły do otrzymania 3-metylotiofosfonianu estronu (E1-MTP) (**4**) (**Rys. 3**), pierwszego związku specyficznego zaprojektowanego jako inhibitor STS. W toku przeprowadzonych badań na komórkach MCF-7 stwierdzono, że E1-MTP (**4**) ($IC_{50} = 90\ \text{nM}$) może konkurować z naturalnym substratem w miejscu aktywnym enzymu STS [24]. Największą zaletą E1-MTP (**4**) w porównaniu z siarczanem Adiolu (**3**) była jego stabilność w warunkach fizjologicznych.

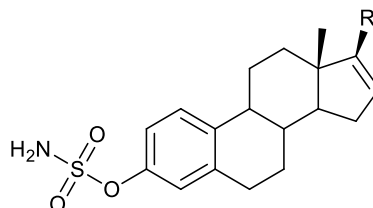


Rys. 3. Pierwsze steroidowe inhibitory STS.

Funkcjonalizacja grupy hydroksylowej ugrupowaniem amidosiarczanowym doprowadziła do otrzymania amidosiarczanu-3-*O*-estronu (EMATE) (**7**) (**Rys. 3**). Związek ten posiada bardzo silną aktywność inhibicyjną w stosunku do STS. EMATE (**7**) był pierwszym nieodwracalnym inhibitorem, którego aktywność biologiczna zależała od czasu i stężenia [25]. Pomimo wysokiej aktywności biologicznej, związek ten okazał się być niestabilny w warunkach fizjologicznych i posiadał silne właściwości estrogenowe, co uniemożliwiało jego wykorzystanie w terapii hormonozależnego raka piersi. Podjęto próby syntezy analogów tego związku i otrzymano serię pochodnych poprzez modyfikacje struktury w pierścieniu D. Tym sposobem odkryto STX213 (**5**) (**Rys. 3**) ($IC_{50} = 1$ nM). Dzięki tak silnym właściwościom inhibicyjnym, w połączeniu ze zwiększoną stabilnością *in vivo* i brakiem właściwości estrogenowych, STX213 (**5**) znalazł się obecnie w I fazie badań klinicznych [4]. Kolejnym silnym inhibitorem jest STX64 (**6**) (**Rys. 3**) ($IC_{50} = 8$ nM w mikrosomach łożyskowych) [3]. Podobnie jak STX213 (**5**), STX64 (**6**) nie wykazywał właściwości estrogenowych *in vitro* i *in vivo*, dlatego też został zakwalifikowany do badań klinicznych.

Dalsze modyfikacje pierścienia D w EMATE doprowadziły do otrzymania szeregu silnych inhibitorów STS (**Tabela 1**) [26]. Najaktywniejszą pochodną okazał się być związek (**8**) ($IC_{50} = 0.02$ nM).

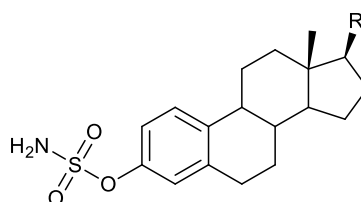
Tabela 1. Struktury chemiczne pochodnych E1 modyfikowanych w pozycji C-17 przebadanych na oczyszczonym STS [26].



Związek	R	IC ₅₀ (nM)
8	COCH ₃	0.02
9	3-pirydył	12.0
10	C(CH ₃) ₂ OH	13.0
EMATE	-	8.00

Redukcja wiązania podwójnego i zmiana podstawników w pozycji C-17 pozwoliła na otrzymanie związków (**11-15**) o aktywnościach biologicznych na poziomie IC₅₀ = 0.02-2.00 nM (**Tabela 2**) [27]. Zmniejszanie długości łańcucha alkilowego (pochodna **12** vs **13** vs **14**) oraz obecność wiązania podwójnego (pochodne **8** vs **11**) wpływały na podwyższenie aktywności biologicznej potencjalnego inhibitora.

Tabela 2. Struktury chemiczne pochodnych EMATE modyfikowanych w pozycji C-17, przebadanych na oczyszczonym STS [27].

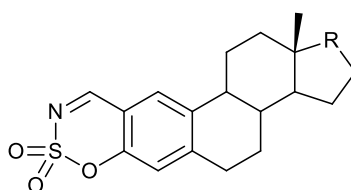


Związek	R	IC ₅₀ (nM)
11	COCH ₃	2.000
12	CH ₂ CH ₃	0.020
13	<i>n</i> -CH ₂ CH ₂ CH ₃	0.034
14	<i>n</i> -CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	0.096
15	=CHCH ₂ CH ₃ (<i>E</i>)	0.027

Interesującą grupę inhibitorów stanowią związki zawierające w swojej strukturze pierścień oksatiazynowy (**Tabela 3**) [28]. Najwyższą aktywność biologiczną wykazywała pochodna (**16**) (IC₅₀ = 9 nM). Modyfikacja pierścienia D pochodnych oksatiazynowych obniżyła aktywność biologiczną tych związków we wszystkich badanych przypadkach

(17-27). Wraz ze wzrostem długości hydrofobowego łańcucha alifatycznego aktywność inhibicyjna malała (pochodne **22** vs **23** vs **24**). W przypadku pochodnych (**20**) stwierdzono wpływ izomerii geometrycznej na aktywność biologiczną. Okazało się, że izomer *E* wykazuje słabą aktywność inhibicyjną względem STS ($IC_{50} = <1000$ nM), podczas gdy izomer *Z* charakteryzował się wartością IC_{50} na poziomie 58 nM. Wyższa aktywność biologiczna izomeru *Z* może być spowodowana korzystniejszym ułożeniem i dopasowaniem się struktury inhibitora w miejscu aktywnym enzymu.

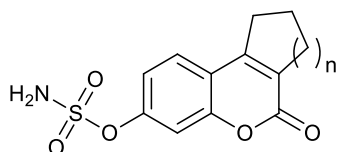
Tabela 3. Steroidowe pochodne oksatiazyny [28].



Związek	R	IC_{50} (nM)
16	C=O	9.0
17	HC-OAc	12
18	HC-OH	20
19	HC=CH-CH ₃ (<i>Z</i>)	63
20a	C=CHCH ₂ CH ₃ (<i>Z</i>)	58
20b	C=CHCH ₂ CH ₃ (<i>E</i>)	<1000
21	C=C=CH ₂	74
22	HC-CH ₃	45
23	HC-CH ₂ CH ₃	50
24	HC-(CH ₂) ₂ CH ₃	120
25	C=CH-CO ₂ Et	36
26	C=C(CN) ₂	22
27	HC-OCH ₃	35
EMATE 28	-	8

Ważną grupę inhibitorów amidosiarczanowych stanowią tricykliczne pochodne kumaryny (**Tabela 4**) [29]. Aktywność biologiczna tych związków rosła wraz ze wzrostem wielkości hydrofobowego, cyklicznego pierścienia alifatycznego. Najaktywniejszą pochodną była 6610-COUMATE (**33**) (IC_{50} 1 nM) (**Tabela 4**) mająca w swojej strukturze 10-członowy pierścień. Dalsze zwiększanie wielkości pierścienia alifatycznego skutkowało gorszym dopasowaniem do miejsca aktywnego enzymu oraz pogorszeniem aktywności biologicznej.

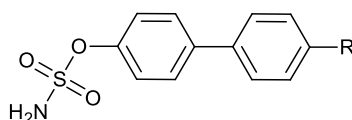
Tabela 4. Struktury inhibitorów STS na bazie tricyklicznych pochodnych kumaryny [29].



Związek	n	IC ₅₀ (nM)
29	1	200
30	2	70
6	3	8.0
31	4	30
32	5	2.4
33	6	1.0
34	7	13
35	8	60
36	9	75
37	10	370
EMATE 28	-	8.0

Kolejną serią potencjalnych inhibitorów STS są pochodne bifenyli (**Tabela 5**) [30]. Aktywność biologiczna związków (**38-42**) była na niskim poziomie i rosła wraz ze wzrostem hydrofobowości cząsteczki, osiągając IC₅₀ = 3.5 μM dla najaktywniejszej pochodnej (**41**).

Tabela 5. Struktury inhibitorów STS na bazie pochodnych bifenylu [30].

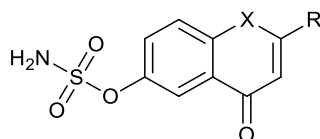


Związek	R	IC ₅₀ (μM)
EMATE	-	0.1
38	CN	6.7
39	COOMe	5.2
40	COOEt	4.2
41	COOPr	3.5
42	H	76

W 2003 roku Nussbaumer wraz ze współpracownikami otrzymali podstawione pochodne flawonoidów (**Tabela 6**), które okazały się być silnymi inhibitorami STS [31]. Wzrost długości łańcucha alkilowego prowadził do wzrostu aktywności inhibicyjnej (pochodna **43** vs **44**). Zastosowanie dużych, przestrzennych, hydrofobowych podstawników

znacznie polepszyło aktywność biologiczną w testach enzymatycznych (**45-49**). Ponadto zastąpienie atomu tlenu atomem siarki w szkielecie flawonoidowym poprawiło aktywność 16-krotnie (pochodna **48** vs **49**). Mimo niskich wartości IC_{50} pochodne (**48**) i (**49**) silnie stymulowały wzrost komórek nowotworowych linii MCF-7.

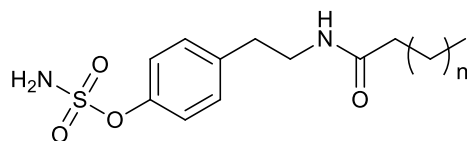
Tabela 6. Struktury inhibitorów STS na bazie amidosiarczanowych pochodnych flawonoidów [31].



Związek	X	R	IC_{50} (nM)
EMATE 28	-	-	56
43	O	<i>n</i> -CH ₂ CH ₂ CH ₃	722
44	O	<i>n</i> -CH ₂ (CH ₂) ₇ CH ₃	403
45	O	1,1-C(CH ₃) ₂ (CH ₂) ₇ CH ₃	78
46	O	C(CH ₃) ₃	22
47	O	4-pentabicyklo[2.2.2]okt-1-yl	11
48	O	1-adamantyl	5.6
49	S	1-adamantyl	0.34

Kolejną grupę inhibitorów STS stanowią pochodne tyraminy (**Tabela 7**). Związki te nie wykazywały właściwości estrogenowych [32]. Aktywność biologiczna otrzymanych związków rosła wraz ze zwiększaniem długości hydrofobowego łańcucha alkilowego. Najaktywniejszą pochodną była (**57**) ($IC_{50} = 56$ nM).

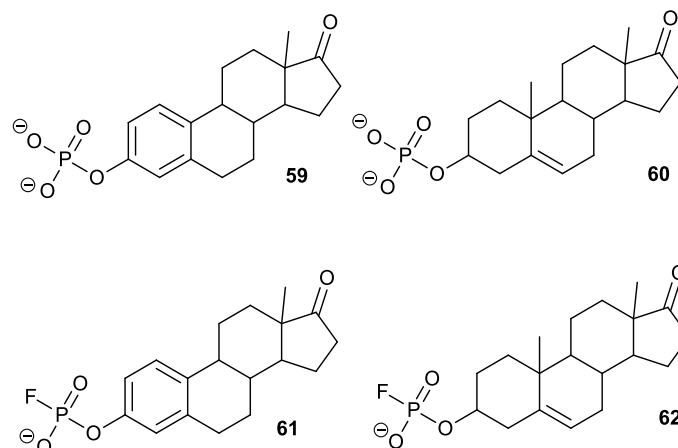
Tabela 7. Inhibitory STS na bazie pochodnych tyraminy [32].



Związek	n	IC ₅₀ (nM)
50	4	14300
51	5	1880
52	6	600
53	7	253
54	8	180
55	9	74
56	10	61
57	11	56
58	12	158

Oprócz szerokiej gamy związków siarkowych, które wykazują hamującą aktywność w stosunku do sulfatazy steroidowej, interesującą grupę stanowią inhibitory fosforowe [33]. Doniesienia literaturowe wskazują jednoznacznie na możliwość ich wykorzystania w terapii nowotworowej. Co więcej potencjał tej klasy związków nie został jak do tej pory w pełni wykorzystany.

Tak np. sole kwasów steroidofosforowych (**59-62**) (**Rys. 4**) okazały się być kompetycyjnymi inhibitorami STS w pH = 7.5. Zbadano ich właściwości inhibicyjne w zależności od pH, co miało na celu sprawdzenie, która forma związku odpowiada za efekt hamujący, monoanionowa czy dianionowa. Jak się okazało stała K_i dla fosforanu estronu i dehydroepiandrosteronu malała wraz ze spadkiem pH. Aktywność STS była hamowana najslabiej w pH = 8.5; najlepiej natomiast w pH = 6.0 (K_i odpowiednio 52.3 μ M i 170 nM). Podobną zależność stwierdzono w przypadku fosforanu dehydroepiandrosteronu, jego wartość K_i wynosiła 4.1 μ M i 110 nM przy pH odpowiednio 8.0 i 5.5. Inhibicję STS z wykorzystaniem fosforanu estronu i dehydroepiandrosteronu (**59**) i (**60**) (**Rys. 4**) badano w pH 6.0-7.5 (**Tabela 8**). W odróżnieniu od fosforanów, fluorofosforany (**61**) i (**62**) nie wykazywały znaczących różnic w wartościach stałych K_i w zależności od pH.

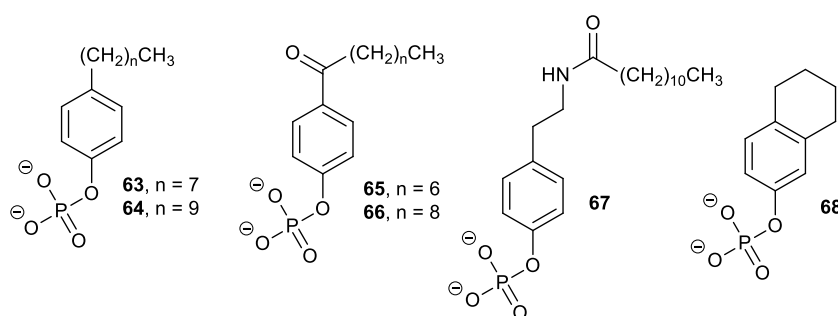


Rys. 4. Steroidowe sole kwasu fosforowego (**59-62**) jako inhibitory STS.

Tabela 8. Wartości stałych K_i (μM) w funkcji pH dla związków (**59-62**).

Związek	pH						
	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5
59	-	0.17	0.34	0.89	5.0	15.0	52.3
60	0.11	0.14	0.13	0.89	2.0	4.1	-
61	-	14.7	-	-	13.7	-	-
62	-	12.2	-	-	15.6	-	-

Kolejną grupę potencjalnych inhibitorów stanowiły sole niesteroidowych pochodnych kwasu fosforowego (**63-68**) (**Rys. 5**). Badano ich zdolność inhibycyjną, która w każdym przypadku zależała od wartości pH.



Rys. 5. Struktury chemiczne inhibitorów STS na bazie niesteroidowych fosforanów (**63-68**).

Z tej grupy związków inhibitorem o najslabszych właściwościach inhibycyjnych okazał się być fosforan tetrahydronaftylu (**68**), który charakteryzował się stałą K_i równą

odpowiednio 360 i 870 μM przy pH 7.0 i 7.5. Najaktywniejszym natomiast był fosforan *n*-laurylo tyraminy (**67**), jego stała K_i w pH = 7.5 wynosiła 3.6 μM (**Tabela 9**).

Tabela 9. Wartości stałych K_i (μM) w funkcji pH dla związków (**63**), (**65-68**).

Związek	pH	
	7.0	7.5
63	5.1	17
65	20.0	64.0
66	7.0	15.0
67	0.52	3.6
68	360	870

Reasumując, najlepiej poznane w literaturze chemiczne inhibitory STS, z punktu widzenia chemicznego, można podzielić na następujące grupy:

- amidosiarczany steroidowe – o szkielecie estronu czy estradiolu,
- amidosiarczany niesteroidowe – posiadające w swojej konstytucji fragmenty flawonoidowe, tyraminowe, antrachinonowe oraz fragmenty kumaryny czy bifenylu.

3. Cel pracy

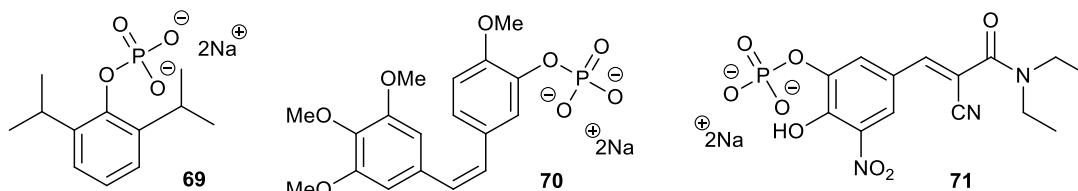
W ramach realizacji swojej pracy doktorskiej w zespole naukowym prof. dr. hab. inż. Janusza Rachonia w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, otrzymałem zadanie:

- dokonania przeglądu literatury z zakresu wiedzy na temat budowy i funkcji sulfatazy steroidowej (STS),
- zebrania literatury dotyczącej znanych inhibitorów STS oraz ich wykorzystania jako potencjalnych leków w terapii hormonozależnego raka piersi,
- zaprojektowania z użyciem techniki modelowania molekularnego nowych struktur potencjalnych inhibitorów STS – fosforowych i tiofosforowych pochodnych kumaryny, *N*-alkanoilotyraminy, bifenylu oraz flawonoidów,
- przeprowadzenia syntez wybranych modeli fosforowych i tiofosforowych pochodnych kumaryny, *N*-alkanoilotyraminy, bifenylu oraz flawonoidów,
- przebadania otrzymanych związków pod względem ich aktywności biologicznej na STS wyizolowanym z łożyska ludzkiego.

4. Reakcja fosforylacji fenoli

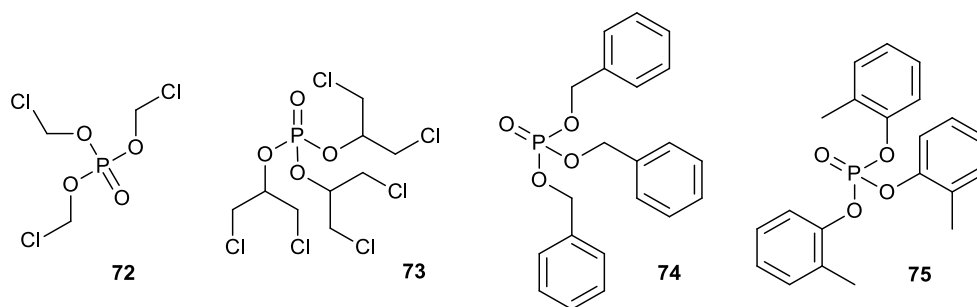
Moim podstawowym zadaniem syntetycznym było opracowanie prostej i wydajnej metody otrzymywania fosforowych, jak i tiofosforowych pochodnych kumaryn, bifenyli, tyramin oraz flawonoidów. W związku z powyższym, w pierwszym etapie realizacji mojej pracy doktorskiej przeprowadziłem badania literaturowe dotyczące metod fosforylacji fenoli.

Reakcja fosforylacji polega na przyłączeniu reszty fosforanowej do nukleofilowego atomu związku chemicznego. Zazwyczaj fosforylacji ulegają funkcje hydroksylowe, tiolowe czy aminowe prowadząc do odpowiednich estrów, tioestrów lub amidów kwasu fosforowego. Estry kwasu fosforowego pełnią wiele ważnych funkcji w organizmach żywych m. in. regulują funkcje białek [34]. Znajdują zastosowanie w syntezie kwasów nukleinowych, białek, węglowodanów, tłuszczu czy steroidów oraz w reakcji redukcji fenoli do arenów [35]. Przy użyciu fosforowych estrów fenoli można wyeliminować problemy związane z dystrybucją leku w obrębie organizmu. Reszta fosforowa może łatwo hydrolizować pod wpływem fosfatazy dając fenol i nieorganiczny fosforan [36]. Przykłady fenolowych proleków w postaci estrów kwasu fosforowego przedstawiłem na **rysunku 6**.



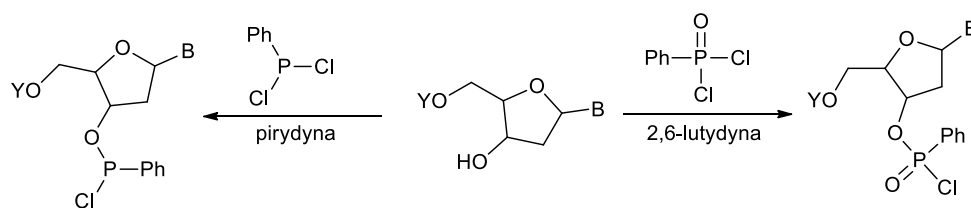
Rys. 6. Przykłady proleków na bazie fenolowych estrów kwasu fosforowego: Propofol (**69**), Combretastatin (**70**) oraz Entacapone (**71**).

Co więcej, warto wspomnieć, że związki fosforowe są świetnymi uniepalniaczami (**Rys. 7**) [37]. Wyróżnia się trzy kategorie tego typu związków: fosforany, fosfoniany i fosfiniany [38-39].



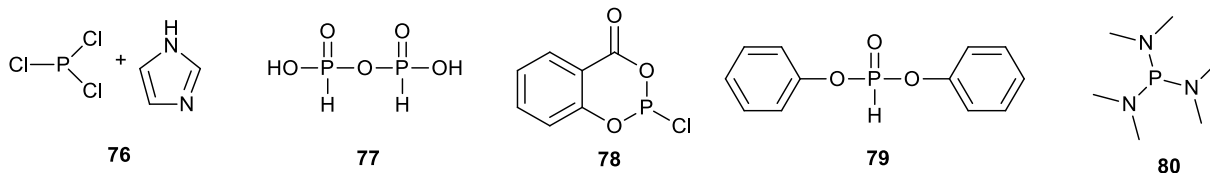
Rys. 7. Przykłady uniepalniaczy fosforanowych.

W literaturze chemicznej znane są dwa strategiczne podejścia fosforylacji grupy hydroksylowej: (a) reakcja z elektrofilem zawierającym czterokoordynacyjny atom fosforu (b) fosfitylacja tj. reakcja z elektrofilem zawierającym trójkoordynacyjny atom fosforu. W pierwszym przypadku pożądaný produkt otrzymuje się bezpośrednio, natomiast w drugim otrzymywany jest produkt fosfitylacji, który w następnym etapie należy utlenić. Powyższe podejścia syntetyczne można porównać przeprowadzając reakcje wprowadzania funkcji fosforowej do cząsteczki nukleozydu z wolną grupą hydroksylową w pozycji 3' (**Rys. 8**). Synteza z wykorzystaniem dichlorofenylofosforynu przebiegała błyskawicznie [40], podczas gdy reakcja z dichlorofenylofosforanem była zakończona po kilku godzinach [41]. Wyniki tych eksperymentów dowodzą, że trójkoordynacyjny atom fosforu jest znacznie lepszym centrum elektrofilowym niż czterokoordynacyjny atom fosforu.



Rys. 8. Schemat porównania dwóch podejść syntetycznych nukleotydów.

Ze względu na dynamiczny rozwój chemii oligonukleotydów, w literaturze chemicznej dostępny jest szereg odczynników fosfitylujących (**Rys. 9**) [42-46]. Ponadto w tym miejscu należy podkreślić, że reakcja fosfitylacji z następczym utlenianiem (najczęściej jodem w łagodnych warunkach) pozwala na otrzymanie produktów zawierających w swojej konstytucji wiązania P-N, P-S, P-F czy P-Se [47].



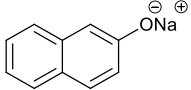
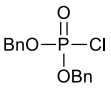
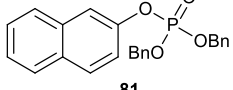
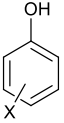
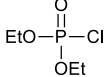
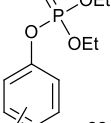
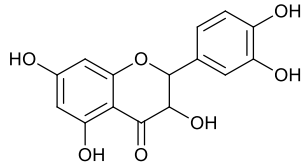
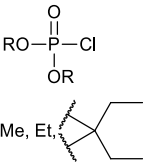
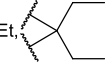
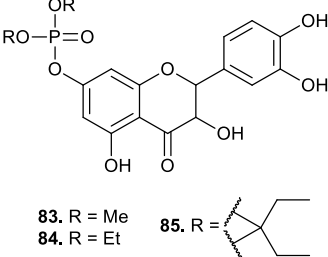
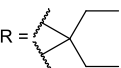
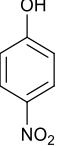
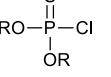
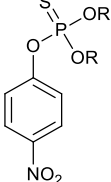
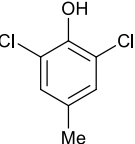
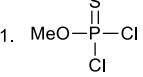
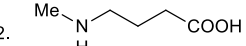
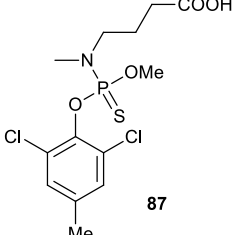
Rys. 9. Struktury chemiczne kilku popularnych odczynników fosfitylujących.

4.1. Reakcje fosforylacji i tiofosforylacji fenoli z wykorzystaniem chemii fosforu czterokoordynacyjnego

Reakcje fosforylacji z wykorzystaniem związków fosforu czterokoordynacyjnego obejmują szereg odczynników fosforylujących takich jak np. chlorofosforany czy chlorotiofosforany jak również kwasy fosforowe w obecności odczynników kondensujących np. DCC.

Chlorofosforany i chlorotiofosforany alkilowe są powszechnie wykorzystywanymi odczynnikami do fosforylacji grupy hydroksylowej zarówno w alkoholach jak i fenolach. Poniżej w **tabeli 10** zestawilem kilka literaturowych przykładów ich zastosowania do fosforylacji pochodnych fenoli.

Tabela 10. Literaturowe przykłady produktów reakcji fosforylacji fenoli z wykorzystaniem chlorofosforanów i chlorotiofosforanów alkilowych.

Nr	Substrat	Reagenty	Produkt	Wydajność reakcji
1			 81	80%
2	 X = Cl, Br, Me, NO ₂		 82 X = Cl, Br, Me, NO ₂	85-95%
3		 R = Me, Et, 	 83. R = Me 84. R = Et 85. R = 	18-26%
4		 R = Me, Et, <i>n</i> Pr, <i>i</i> Pr, <i>n</i> Bu, Ph	 86 R = Me, Et, <i>n</i> Pr, <i>i</i> Pr, <i>n</i> Bu, Ph	30-96%
5		1.  2. 	 87	78%

Jednym z pierwszych przykładów literaturowych chemicznej fosforylacji fenoli była praca opublikowana przez Athertona i współpracowników w 1945 roku dotycząca m. in. wprowadzania funkcji fosforowej do β -naftolu. Stosowanym odczynnikiem fosforylującym był chlorofosforan dibenzylu [48] (**Nr. 1, Tabela 10**). Chlorofosforan dibenzylu nie reagował bezpośrednio z β -naftolem. Z wielką łatwością biegła natomiast reakcja tego odczynnika z β -naftolanem sodu dając dibenzylfosforan β -naftyłu (**81**) z wydajnością 80%.

Innym przykładem wysoko wydajnej reakcji fosforylacji była zaproponowana przez Kaboudina dogodna, bezropuszczalnikowa metoda syntezy dietylofosforanów fenoli

w obecności tlenku magnezu (**Nr 2, Tabela 10**). Substratami w tej reakcji mogły być również α - i β -naftole. Pożądane produkty (**82**) otrzymywano z wydajnościami powyżej 85% [49].

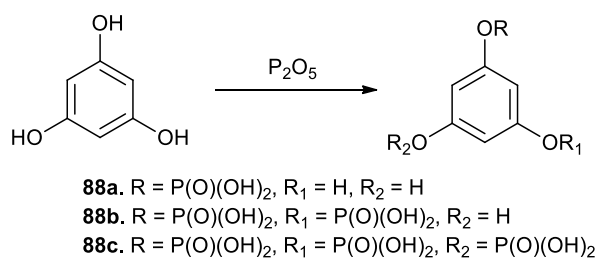
Zastosowanie dialkilochlorofosforanów w reakcji fosforylacji kwercetyny, flawonolu pochodzenia roślinnego, pozwoliło na selektywne wprowadzenie funkcji fosforowej do struktury tego związku w pozycję 7 (**Nr 3, Tabela 10**) [50]. Fosforowe pochodne kwercetyny budzą zainteresowanie pod kątem ich potencjalnej aktywności biologicznej. Reakcje prowadzono w dioksanie w obecności pirydyny, uzyskując produkty fosforylacji kwercetyny (**83-85**) z niskimi wydajnościami. Przy zastosowaniu reaktora mikrofalowego udało się poprawić efektywność procesu.

Przykładem syntetycznego użycia dialkilochlorotiofosforanów było ich wykorzystanie w otrzymywaniu dialkiloarylotiofosforanów *p*-nitrofenolu (**86**) (**Nr 4, Tabela 10**) – pochodnych popularnego insektycydu „Parathionu”. Reakcje prowadzono w czasie 3-5 godzin w acetonie w obecności węgla sodu, uzyskując produkty z wysokimi wydajnościami tj. powyżej 90% [51].

Park i współpracownicy zaprezentowali wydajną metodę syntezy amidometylotiofosforanu 1,5-dichloro-4-metylofenolu (**87**) (**Nr 5, Tabela 10**). W opisanej syntezie użyto dichlorometylotiofosforanu, którym traktowano 1,5-dichloro-4-metylofenol otrzymując odpowiedni chlorotiofosforan. Związek ten w kolejnym etapie traktowany kwasem *N*-metylo- ω -aminomasłowym prowadził do otrzymania amidometylotiofosforanu 1,5-dichloro-4-metylofenolu z wydajnością 78% [52].

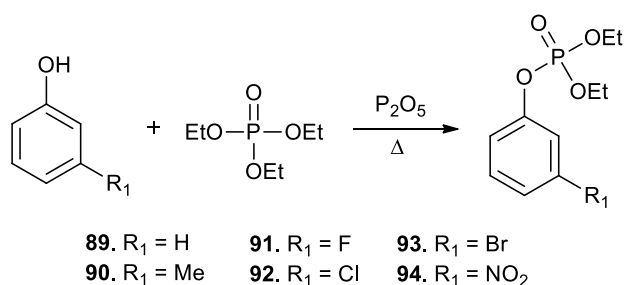
W tym miejscu należy dodać, że wyżej wymienione przykłady pokazują różne możliwości syntezy triestrów kwasu fosforowego. Pojawia się w związku z powyższym problem selektywnego rozszczepienia estrów alkilowych bez naruszenia estrów arylowych.

Tlenek fosforu (V) jest silnie higroskopijnym, białym ciałem stałym stosowanym najczęściej jako środek odwadniający. Odczynnik ten może być również z powodzeniem wykorzystany w reakcji fosforylacji, czego przykładem może być praca opublikowana w 2006 roku przez Toldy'ego. Artykuł dotyczył modyfikacji żywicy epoksydowej fosforowymi pochodnymi floroglucyny (**88**) i nanocząsteczkami montmorylonitu [53]. W zależności od zastosowanej ilości P_2O_5 otrzymywano mono-, di- lub trifosforowe pochodne floroglucyny (**Rys. 10**). Reakcję prowadzono w toluenie w temperaturze 80 °C przez 2 godziny.



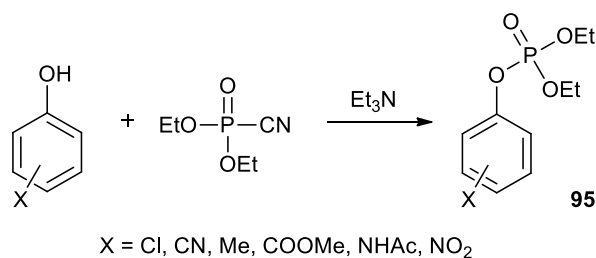
Rys. 10. Schemat fosforylacji floroglucyny.

Inną dogodną metodą wprowadzania funkcji fosforowej do fenoli jest reakcja trietylofosforanu z odpowiednim fenolem w obecności tlenku fosforu (V) [54]. Reakcja przebiegała w temperaturze 120 °C dając produkty (**89-94**) z wydajnościami rzędu 70-80% (**Rys. 11**). Biorąc pod uwagę fakt, że w reakcji fosforanu trietylu z P₂O₅, powstaje pirofosforan tetraetylu [55], należy przypuszczać, że w cytowanej wyżej metodzie jest on aktywnym reagentem.



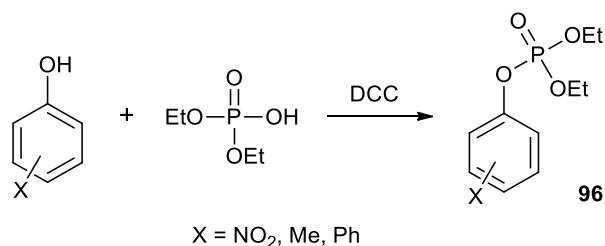
Rys. 11. Schemat syntezy dietylofosforanów fenolu.

Reakcja fenoli z cyjanofosforanem dietylu w obecności trietyloaminy prowadzi do powstania fosforowych pochodnych fenoli (**Rys. 12**). Reakcję prowadzono w łagodnych warunkach i w ciągu 30 minut otrzymano aryldietylofosforany (**95**) z wysokimi wydajnościami. Substratami tej reakcji mogą być zarówno fenole z podstawnikami elektronoakceptorowymi jak i elektronodonorowymi [56].



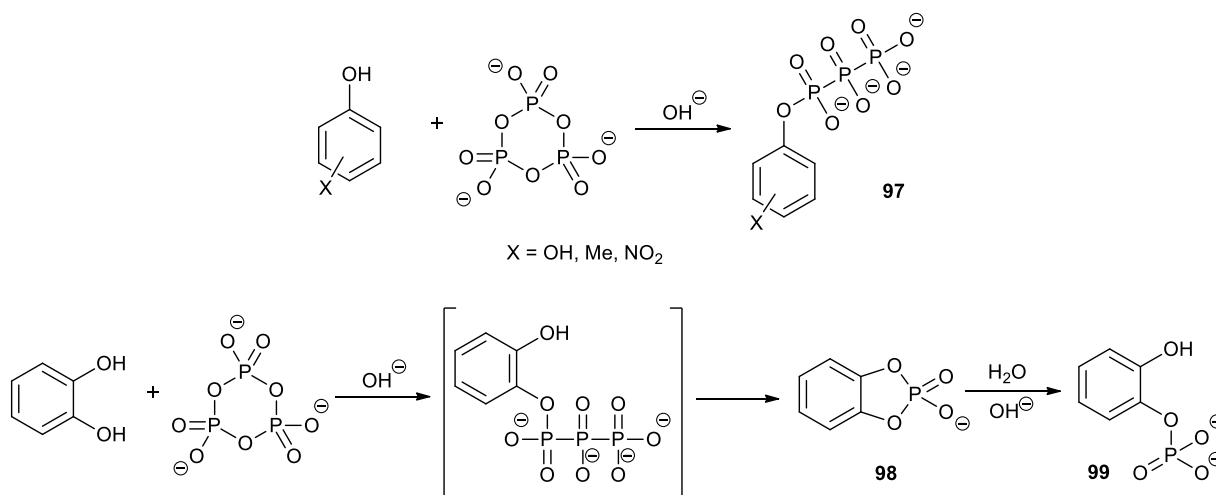
Rys. 12. Schemat syntezy dietylofosforanów fenoli przy udziale cyjanodietylfosforanu.

Sprzęganie fenoli z dietylofosforanem w obecności DCC prowadzi do otrzymania aryldietylfosforanów (**Rys. 13**) [57]. Tę metodę opracował Abe wraz ze współpracownikami w 1984 roku. Reakcje przebiegały w łagodnych warunkach z wydajnościami 3-74%, a ich warunki nie były optymalizowane. Otrzymane związki (**96**) zostały przebadane jako potencjalne inhibitory acetylocholinoesterazy.



Rys. 13. Schemat sprzęgania fenoli z dietylofosforanem w obecności DCC.

Cennym nieorganicznym związkiem do otrzymywania trifosforanów jest heksahydrat cyklotrifosforanu sodu. Inoue i współpracownicy z jego wykorzystaniem przeprowadzili syntezę fosforowych pochodnych fenoli [58] (**Rys. 14**). Głównymi produktami tej reakcji były trifosforany (**97**). Wyjątkiem był nietrwały produkt fosforylacji katecholu (**98**) powstający wskutek wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji trifosforanu, który w wyniku hydrolizy ulegał konwersji dając związek (**99**).



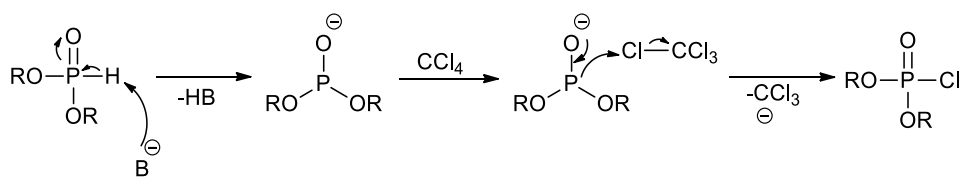
Rys. 14. Schemat syntezy pochodnych kwasu fosforowego z wykorzystaniem heksahydratu cyklotrifosforanu sodu.

4.2. Reakcje fosforylacji fenoli z wykorzystaniem chemii fosforu trójkoordynacyjnego

Reakcje fosforylacji z wykorzystaniem związków fosforu trójkoordynacyjnego obejmują: a) reakcję Athertona-Todda i jej modyfikacje, b) reakcje fosfitylacji i następcze utlenienie otrzymanego produktu przejściowego, c) reakcje, w których powstaje *in situ* halogenofosforan.

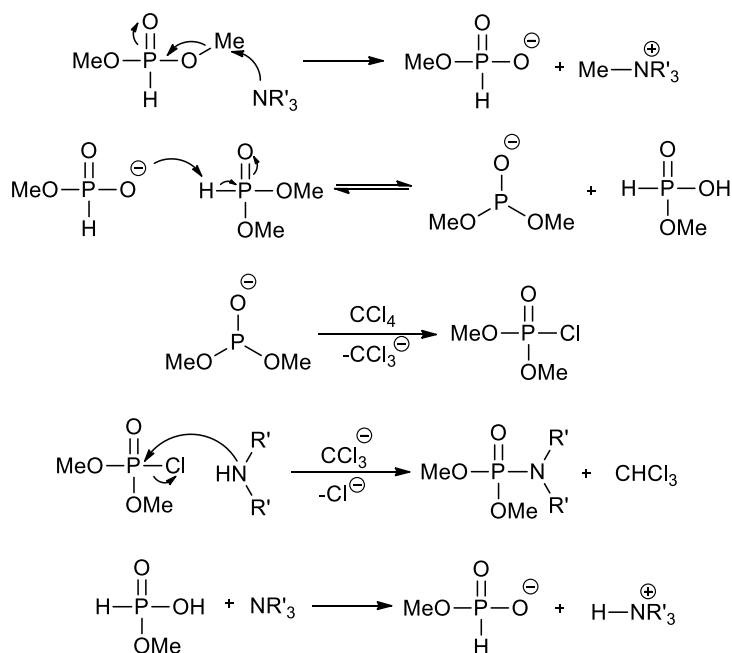
a) reakcja Athertona-Todda i jej modyfikacje

Opracowana w 1945 roku przez Athertona i Todda [59] nowa metoda fosforylacji amin polegała na reakcji fosforynu dialkylowego lub diarylowego z amoniakiem w tetrachlorku węgla. Warunki reakcji stopniowo optymalizowano i modyfikowano, co doprowadziło do powstania innych jej wariantów, w których nukleofilami były alkohole [60], aminy drugorzędowe [61], hydrazyna [62], azydki [63], cyjanki [63] czy rodanki [63]. Mechanizm reakcji Athertona-Todda nie został do tej pory jednoznacznie wyjaśniony. Koncepcję tego mechanizmu w dużej mierze opierają się na badaniach Steinberga z 1950 roku [64]. Według tej teorii pierwszy etap mechanizmu zakłada deprotonowanie fosforynu dialkilu, a następnie powstały nukleofil uczestnicząc w reakcji X-filowej substytucji z CCl₄ prowadzi do otrzymania chlorofosforanu, który jest aktywnym środkiem fosforylującym (**Rys. 15**).



Rys. 15. Ogólny schemat mechanizmu reakcji Athertona-Todda w oparciu o teorię Steinberga.

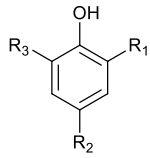
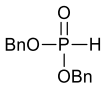
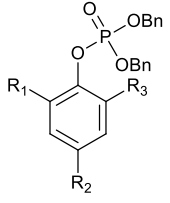
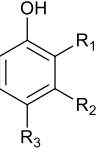
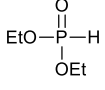
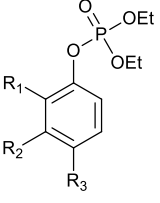
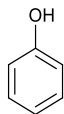
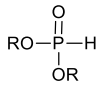
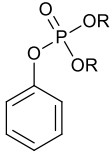
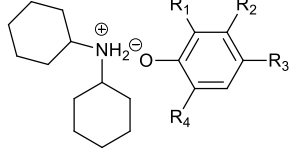
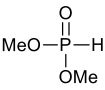
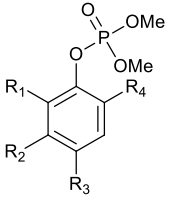
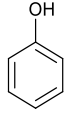
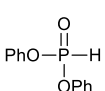
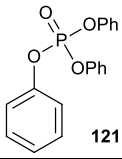
W późniejszych latach Troev i Roundhill uzupełnili teorię Steinberga sugerując etap alkirowania aminy przez fosforyn dimetylu zamiast jej protonowania [65-66]. Otrzymana w ten sposób sól fosforynu monometylu reaguje z drugim ekwiwalentem fosforynu dimetylu dając sól fosforynu dimetylu, która uczestnicząc w reakcji X-filowej substytucji z CCl_4 prowadzi do otrzymania chlorofosforanu (**Rys. 16**). Powstały chlorodimetylofosforan reaguje następnie z drugorzędową aminą dając amidodimetylofosforan.



Rys. 16. Schemat mechanizmu reakcji Athertona-Todda w oparciu o teorię Troeva i Roundhilla.

Przykłady literaturowe zebrane w **tabeli 11** obejmują wariant reakcji Athertona-Todda, w którym jako odczynników nukleofilowych używano fenoli.

Tabela 11. Literaturowe przykłady reakcji fosforylacji fenoli z wykorzystaniem H-fosfonianów.

Nr	Substrat	Reagenty	Produkt	Wydajność reakcji
1	 <p> $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H$ $R_1 = H, R_2 = F, R_3 = H$ $R_1 = OMe, R_2 = H, R_3 = OMe$ $R_1 = H, R_2 = CH_2CH_2OH, R_3 = H$ </p>		 <p> 100. $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H$ 101. $R_1 = H, R_2 = F, R_3 = H$ 102. $R_1 = OMe, R_2 = H, R_3 = OMe$ 103. $R_1 = H, R_2 = CH_2CH_2OH, R_3 = H$ </p>	88-97%
2	 <p> $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H$ $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = Me$ $R_1 = H, R_2 = Me, R_3 = H$ $R_1 = Me, R_2 = H, R_3 = H$ $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = OMe$ $R_1 = H, R_2 = OMe, R_3 = H$ $R_1 = OMe, R_2 = H, R_3 = H$ $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = NHAc$ $R_1 = H, R_2 = NHAc, R_3 = H$ </p>		 <p> 104. $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H$ 105. $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = Me$ 106. $R_1 = H, R_2 = Me, R_3 = H$ 107. $R_1 = Me, R_2 = H, R_3 = H$ 108. $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = OMe$ 109. $R_1 = H, R_2 = OMe, R_3 = H$ 110. $R_1 = OMe, R_2 = H, R_3 = H$ 111. $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = NHAc$ 112. $R_1 = H, R_2 = NHAc, R_3 = H$ </p>	78-96%
3		 <p>$R = Et, nBu$</p>	 <p> 113. $R = Et,$ 114. $R = nBu$ </p>	50%, 94%
4	 <p> $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H, R_4 = H$ $R_1 = H, R_2 = Me, R_3 = H, R_4 = H$ $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = Cl, R_4 = H$ $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = NO_2, R_4 = H$ $R_1 = C_5H_3N, R_2 = H, R_3 = H, R_4 = Cl$ $R_1 = Cl, R_2 = H, R_3 = Cl, R_4 = H$ </p>		 <p> 115. $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H, R_4 = H$ 116. $R_1 = H, R_2 = Me, R_3 = H, R_4 = H$ 117. $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = Cl, R_4 = H$ 118. $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = NO_2, R_4 = H$ 119. $R_1 = C_5H_3N, R_2 = H, R_3 = H, R_4 = Cl$ 120. $R_1 = Cl, R_2 = H, R_3 = Cl, R_4 = H$ </p>	50-70%
5			 <p>121</p>	72%

Szybka i wydajna reakcja selektywnej fosforylacji fenoli fosforynem dibenzylu w CCl_4 w obecności *N,N*-diizopropylaoetyloaminy i katalitycznych ilości

N,N-dimetyloaminopirydyny [67] została opracowana przez zespół naukowy Silverberga (**Nr 1, Tabela 11**).

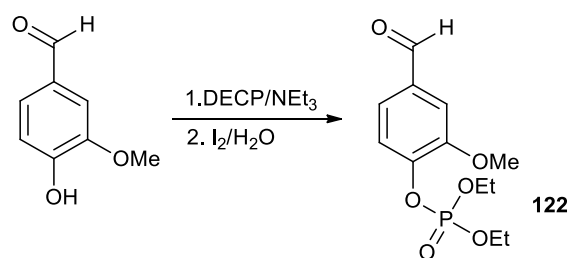
Podobną metodę fosforylacji fenoli fosforynem dietylu zaproponował Kenner i Williams [35]. Reakcje prowadzono w ciągu 12 godzin w temperaturze pokojowej w CCl_4 w obecności trietyloaminy otrzymując produkty (**104-112**) z wydajnościami powyżej 80% (**Nr 2, Tabela 11**). W następnym kroku otrzymane związki (**104-112**) były poddawane reakcji usunięcia funkcji fosforowej na drodze reakcji z sodem lub litem w ciekłym amoniaku.

Zwierzak [68] oraz Ilia [69] prowadzili podobne reakcje fosforylacji fenoli (według metody Athertona-Todda) biegnące w układzie dwufazowym $\text{CCl}_4:\text{NaOH}_{\text{aq}}$ w obecności katalitycznych ilości bromku tetrabutylamoniowego. Reakcje prowadzone były w temperaturze pokojowej przy użyciu nadmiaru fosforynu dialkylu lub difenyłu (**Nr 3 i Nr 5, Tabela 11**) z bardzo dobrymi wydajnościami.

Nieco inny wariant reakcji Athertona-Todda zastosował Purnanand. Otrzymał serię dimetyloarylofosforanów (**115-120**) na drodze reakcji soli dicykloheksyloamoniowych fenoli z fosforynem dietylu [70]. Reakcje prowadzono w CCl_4 przez 3-4 godziny izolując produkt z dobrymi wydajnościami rzędu 50-70% (**Nr 4, Tabela 11**).

b) reakcje fosfitylacji i następcze utlenienie otrzymanego produktu przejściowego

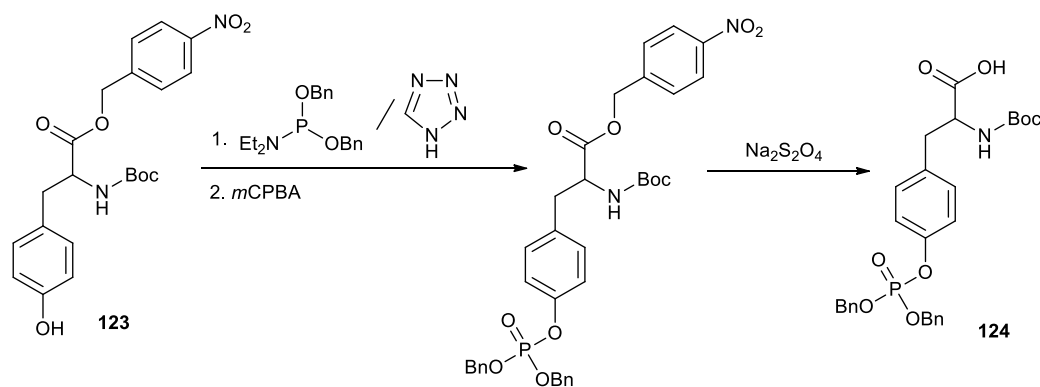
Dietylochlorofosforyn jest niezwykle cennym odczynnikiem wykorzystywanym w syntezie organicznej. Za jego pomocą można m. in. fosfitylować fenole, a po utlenieniu fosforynów otrzymać dietyloarylofosforany. W ten sposób zespół naukowy pod kierownictwem Jie w 2002 roku otrzymał dietylofosforan 4-formylo-2-metoksyfenolu (**122**) z wydajnością 71% [71] (**Rys. 17**).



Rys. 17. Schemat fosforylacji 4-formylo-2-metoksy fenolu z wykorzystaniem DECP.

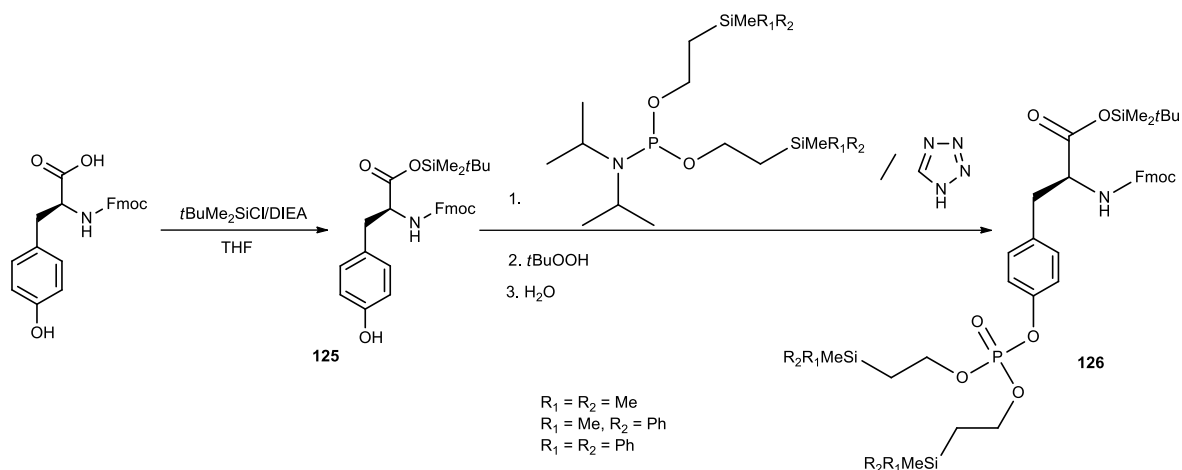
Wykorzystanie dialkiloamidofosforynów i 1*H*-tetrazolu jest niezwykle popularną metodą fosfitylacji nukleozydów [72-74]. Alkiloamidofosforyny pod wpływem 1*H*-tetrazolu ulegają protonowaniu na atomie azotu przez co związki te stają się bardzo podatne na atak nukleofilowy na atomie fosforu.

W 1989 roku zespół naukowy Perich'a zaproponował wydajną metodę otrzymywania fosforowej pochodnej Boc-tyrozyny na drodze reakcji *N*-chronionego estru *p*-nitrobenzylowego tyrozyny (**123**) z (BnO)₂PN(Et)₂ oraz 1*H*-tetrazolem, a następnie utleniania powstałego produktu fosfitylacji kwasem *m*-chloronadbenzoesowym [75] (**Rys. 18**). Związek (**124**) można następnie z powodzeniem wykorzystać do syntezy peptydów.



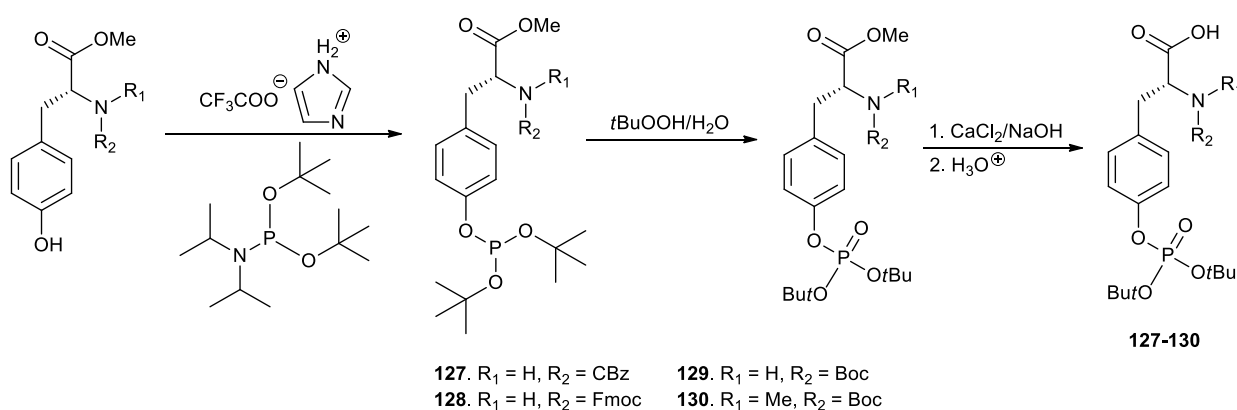
Rys. 18. Schemat otrzymywania dibenzylfosforanu Boc-tyrozyny (**124**).

Inną metodą otrzymywania fosforowych pochodnych tyrozyny była reakcja *N*-chronionej tyrozyny (**125**) z odpowiednim amidosyliloetylofosforynem oraz 1*H*-tetrazolem i utlenieniem tak powstałego produktu przejściowego do analogu mającego w swojej konstytucji czterokoordynacyjny atom fosforu (**126**) (**Rys. 19**) [76]. Funkcja fosforowa związku (**126**) okazała się być stabilna w warunkach deprotekcji osłony Fmoc, co daje możliwość użycia tego typu pochodnych w syntezie fosfopeptydów.



Rys. 19. Schemat syntezy fosforowej pochodnej Fmoc-tyrozyny (126).

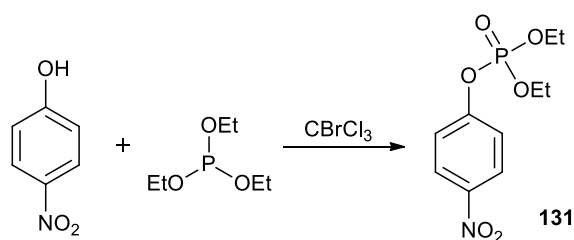
Powyższe dwie metody otrzymywania fosforowych pochodnych tyrozyny bazowały na aktywacji amidofosforynu $1H$ -tetrazolem. Biorąc pod uwagę fakt, że obecnie stężenie $1H$ -tetrazolu w komercyjnie dostępnych roztworach jest niewystarczające oraz, że $1H$ -tetrazol ma właściwości wybuchowe, zakres jego zastosowania w syntezie organicznej został znacznie ograniczony. W toku badań nad poszukiwaniem nowych związków mogących efektywnie zastąpić $1H$ -tetrazol okazało się, że trifluoroctan imidazolu świetnie się do tego celu nadaje, dając pożądane produkty (127-130) z podobnymi bądź wyższymi wydajnościami (Rys. 20) [77]. Trifluoroctan imidazolu można łatwo otrzymać z tanich odczynników chemicznych w większości laboratoriów.



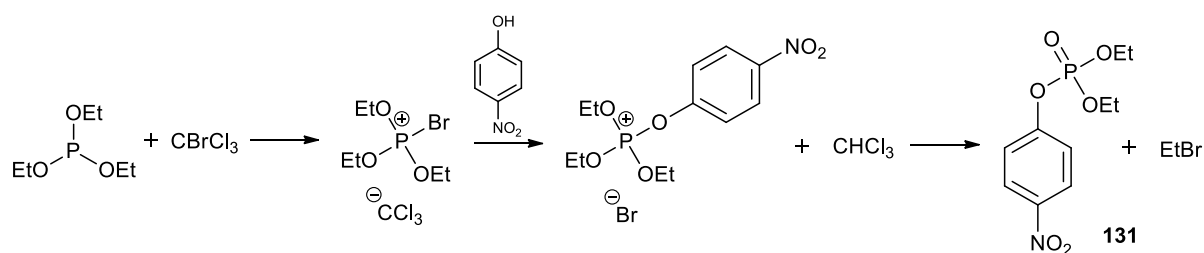
Rys. 20. Schemat syntezy diterbutylofosforowych pochodnych tyrozyny (127-130).

c) reakcje, w których powstaje *in situ* halogenofosforan

Reakcje polihalogenoalkanów z trialkilofosforinami po raz pierwszy opublikowano w 1946 roku [78]. Powyższa praca Kamai i współpracowników opisywała próby fosforylacji pochodnych fenoli. Jednym z przykładów jest reakcja 4-nitrofenolu z fosforiną trietylową wobec bromotrichlorometanu (**Rys. 21**). Proces prowadzono całą dobę w temperaturze 50-60 °C, otrzymując dietylofosforan 4-nitrofenylu (**131**) z wydajnością 82% [79]. Mechanizm tej reakcji przedstawiłem na **rysunku 22**.

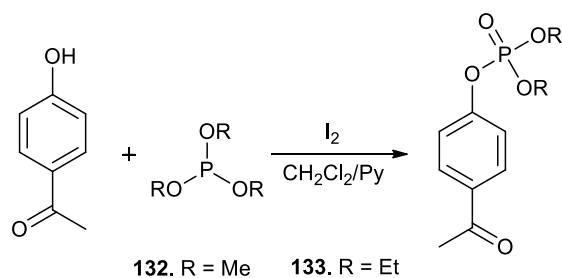


Rys. 21. Schemat syntezy dietylofosforanu 4-nitrofenylu w obecności bromotrichlorometanu.

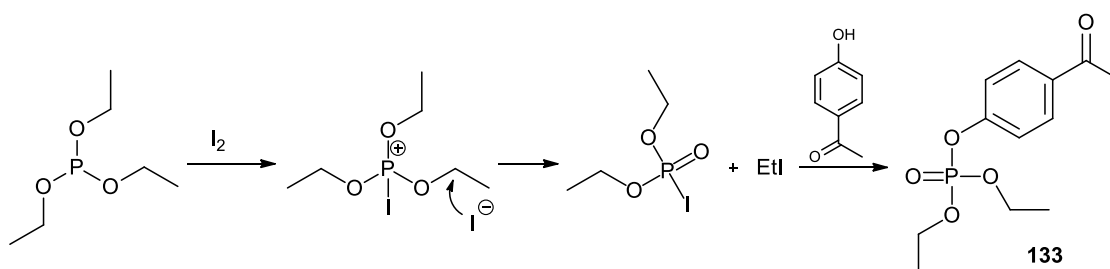


Rys. 22. Mechanizm otrzymywania dietylofosforanu 4-nitrofenylu (**131**).

W 1995 roku Widlanski i Stowell opracowali nową metodę fosforylacji wykorzystującą trialkilofosforiny (metylowy, etylowy), które w obecności jodu reagują z fenolami dając odpowiednie fosforany dialkiloarylowe (**Rys. 23**) [80]. W tej reakcji powstaje jodofosforan dialkiloarylowy, który jako dobry odczynnik elektrofilowy w reakcji z fenolami w pirydynie prowadzi do otrzymania dialkiloarylofosforanów (**132-133**) z wydajnościami powyżej 90%. Mechanizm tej reakcji przedstawiłem na **rysunku 24**.

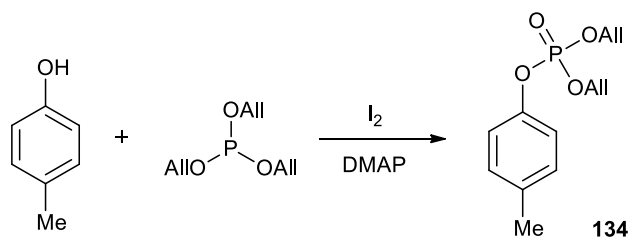


Rys. 23. Schemat syntezy dialkiloarylofosforanów w obecności jodu.

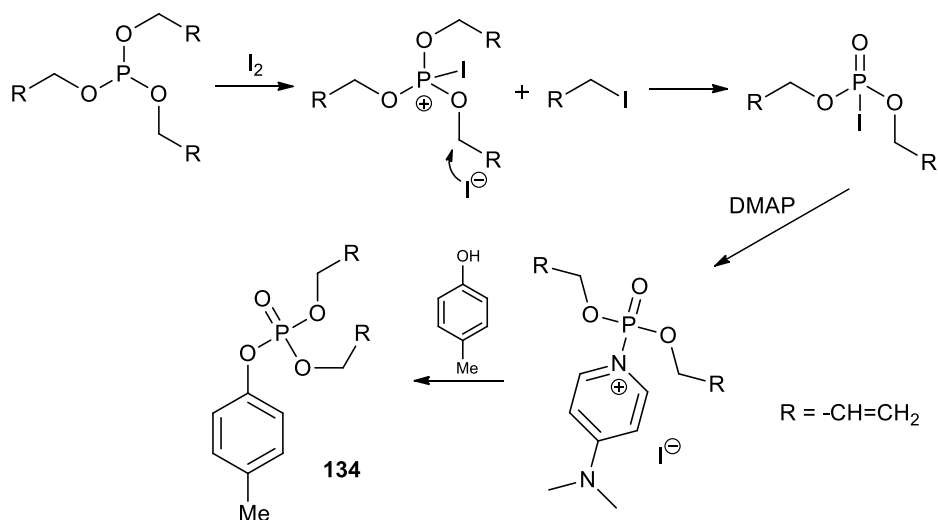


Rys. 24. Mechanizm otrzymywania dietylofosforanu 4-acetylofenylu (**133**).

Li i współpracownicy zmodyfikowali powyższą reakcję Widlanskiego i Stowella zastępując pirydynę 4-dimetyloaminopirydyną (DMAP) i przy jej wykorzystaniu otrzymali diallilofosforan *p*-krezolu (**Rys. 25**). Najwyższe wydajności produktu (**134**) uzyskano w temperaturze 0 °C stosując dwukrotny nadmiar jodu i DMAP w obecności 2.2 ekwiwalentu fosforynu triallilowego wobec jednego ekwiwalentu *p*-krezolu [81]. Mechanizm tej reakcji przedstawiłem na **rysunku 26**.



Rys. 25. Schemat fosforylacji *p*-krezolu fosforynem triallilu.



Rys. 26. Mechanizm otrzymywania diallilofosforanu 4-metylofenylu (**134**).

4.3. Inne metody fosforylacji

Oprócz szerokiej gamy chemicznych metod fosforylacji istnieje cały szereg reakcji wprowadzania funkcji fosforowej do struktury związku organicznego przy udziale enzymów, co zostało szeroko omówione w monografii Whitesides'a z 2002 roku [82].

5. Próby otrzymywania soli H-fosfonianu 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydro-7*H*-cyklohepta[c]chromen-6-onu i 4-fenylofenolu z wykorzystaniem chemii fosforu trójkoordynacyjnego

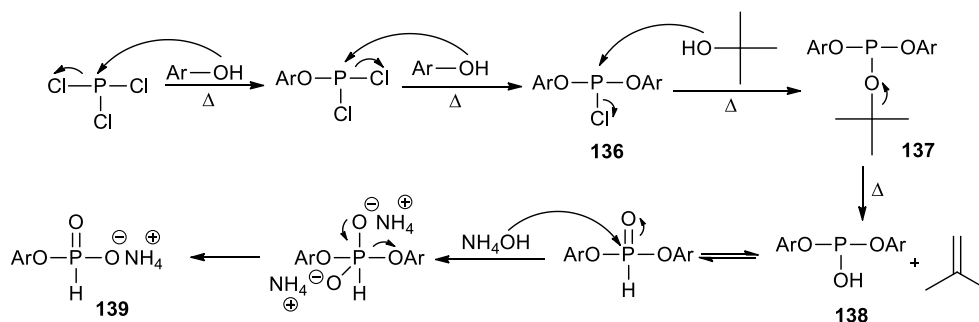
W oparciu o wnioski sformułowane we wstępie do rozdziału dotyczącego chemicznej fosforylacji fenoli (patrz: rozdział 3, str. 18), postanowiłem podjąć próby otrzymania fosforowych i tiofosforowych pochodnych kumarynowych z wykorzystaniem chemii fosforu trójkoordynacyjnego.

Odnosząc się do niezwykle interesującej pracy przeglądowej Stawińskiego i Kraszewskiego z 2002 roku dotyczącej ogromnego potencjału syntetycznego H-fosfonianów [83] (łatwa transformacja tych związków do: fosforanów, tiofosforanów, selenofosforanów czy też amidów kwasu fosforowego), zdecydowałem się z ich wykorzystaniem przeprowadzić syntezę pożądaných pochodnych fenolowych wybierając jako związki modelowe 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydro-7*H*-cyklohepta[c]chromen-6-on (**158c**) (otrzymany według procedury opisanej w rozdziale 6.3) oraz 4-fenylofenol.

Pierwszym eksperymentem była próba syntezy soli amonowej H-fosfonianu 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydro-7*H*-cyklohepta[c]chromen-6-onu (**135**) według bezrozpuszczalnikowej procedury opisanej w 1996 roku przez Ozolę i współpracowników [84].

Na podstawie tej publikacji jak również doniesień literaturowych [85] prawdopodobny mechanizm tego procesu przedstawiłem na **rysunku 27**.

Pierwszy etap zakłada nukleofilowy atak dwóch ekwiwalentów fenolu na atom fosforu w PCl_3 prowadzi do otrzymania diarylochlorofosforynu (**136**), który ulega kolejnemu podstawieniu nukleofilowemu przez *t*-butanol dając diarylo-*t*-butylofosforyn (**137**).

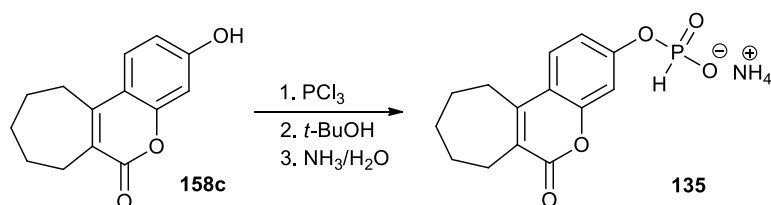


Rys. 27. Proponowany mechanizm otrzymywania soli amonowej H-fosfonianu arylu.

Związek ten ulega termicznemu rozkładowi z wydzieleniem izobutenu i diarylofosforynu (**138**). W kolejnym etapie jedna z funkcji estrowych ulega hydrolicy wobec nasyconego wodnego roztworu amoniaku dając sól amonową H-fosfonianu arylu (**139**).

W pierwszym etapie postanowiłem odtworzyć procedurę dla *p*-krezolu – jednego z modeli, na którym pracowali autorzy publikacji. Otrzymałem sól amonową H-fosfonianu *p*-krezolu z wydajnością 46% (wyd. lit. 87%), której strukturę potwierdziłem z wykorzystaniem spektroskopii ^1H i ^{31}P NMR.

Następnie przeprowadziłem tę samą bezrozpuszczalnikową reakcję na modelu (**158c**) (**Rys. 28**).



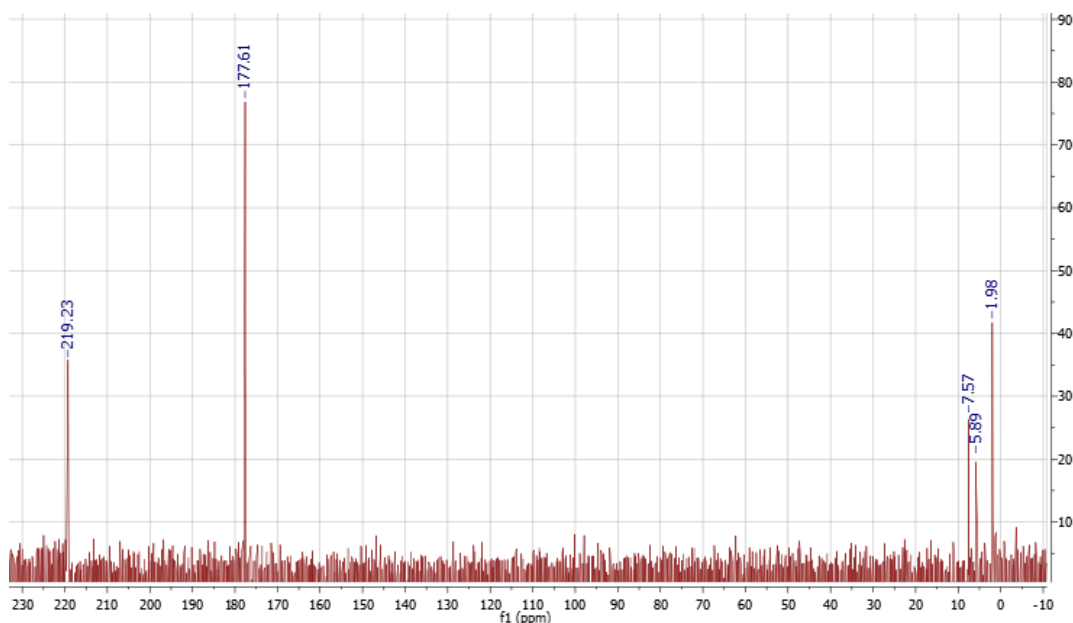
Rys. 28. Schemat otrzymywania soli amonowej H-fosfonianu 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydro-7*H*-cyklohepta[c]chromen-6-onu (**135**).

W tym celu do dwóch ekwiwaleńców stopionego związku (**158c**) dodałem jeden ekwiwaleńć świeżo destylowanego PCl_3 . Kolejnym krokiem było dodanie do mieszaniny reakcyjnej jednego ekwiwaleńću *tert*-butanolu, a następnie wylanie mieszaniny reakcyjnej do wodnego roztworu amoniaku. Powstały osad odsączyłem i zidentyfikowałem jako 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydro-7*H*-cyklohepta[c]chromen-6-on (**158c**), tj. wyjściowy substrat, który odzyskałem w około 80%.

W tym miejscu należy podkreślić, że autorzy publikacji, z której korzystałem, otrzymali według powyższej procedury syntetycznej sole amonowe H-fosfonianów fenoli: *o*- i *p*-krezoli oraz *p*-chlorofenolu. Fenol, *o*- i *p*-krezol oraz *p*-chlorofenol są związkami o temperaturach topnienia w przedziale 30-45 °C, podczas gdy 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydro-7*H*-cyklohepta[c]chromen-6-on (**158c**) topi się w temperaturze 198-199 °C. Znacznie wyższa temperatura topnienia używanej przeze mnie pochodnej kumaryny w stosunku do wymienionych wcześniej pochodnych fenoli, powodowała konieczność

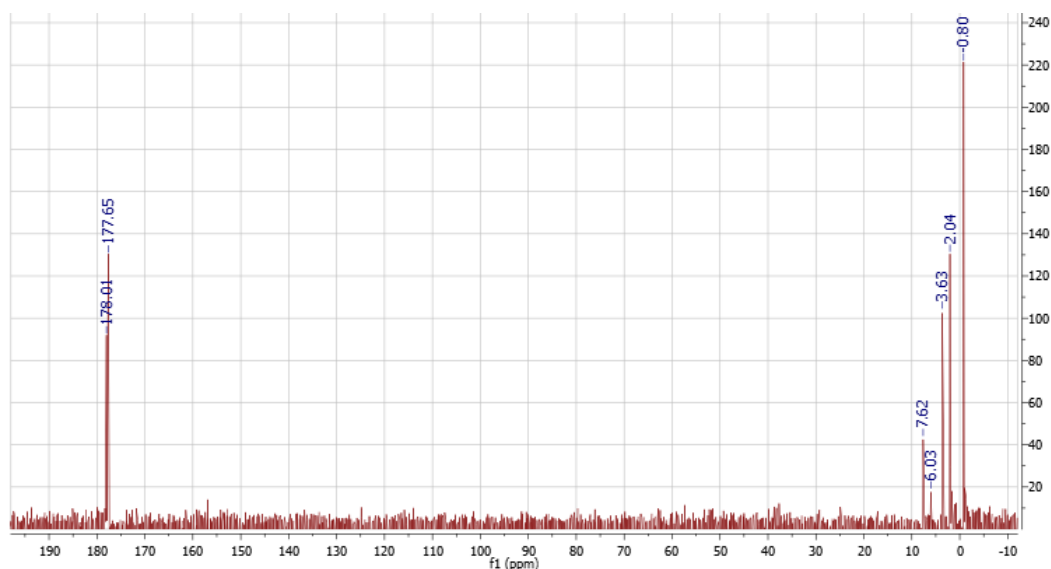
przewodzenia reakcji w wyższej temperaturze, co mogło wpłynąć niekorzystnie na jej przebieg.

W kolejnym eksperymencie zmodyfikowałem powyższą procedurę przeprowadzając tę samą reakcję w łagodniejszych warunkach, mianowicie w bezwodnym tetrahydrofuranie. W tym celu do dwóch ekwiwalentów związku (**158c**) rozpuszczonego w THF dodałem jeden ekwiwalent PCl_3 i całość ogrzewałem do wrzenia. Po 10 minutach prowadzenia reakcji zarejestrowałem pierwsze widmo ^{31}P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl_3) mieszaniny reakcyjnej (**Rys. 29**).



Rys. 29. Widmo ^{31}P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl_3) mieszaniny dwóch ekwiwalentów 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydro-7*H*-cyklohepta[c]chromen-6-onu (**158c**) i jednego ekwiwalentu PCl_3 po 10 minutach.

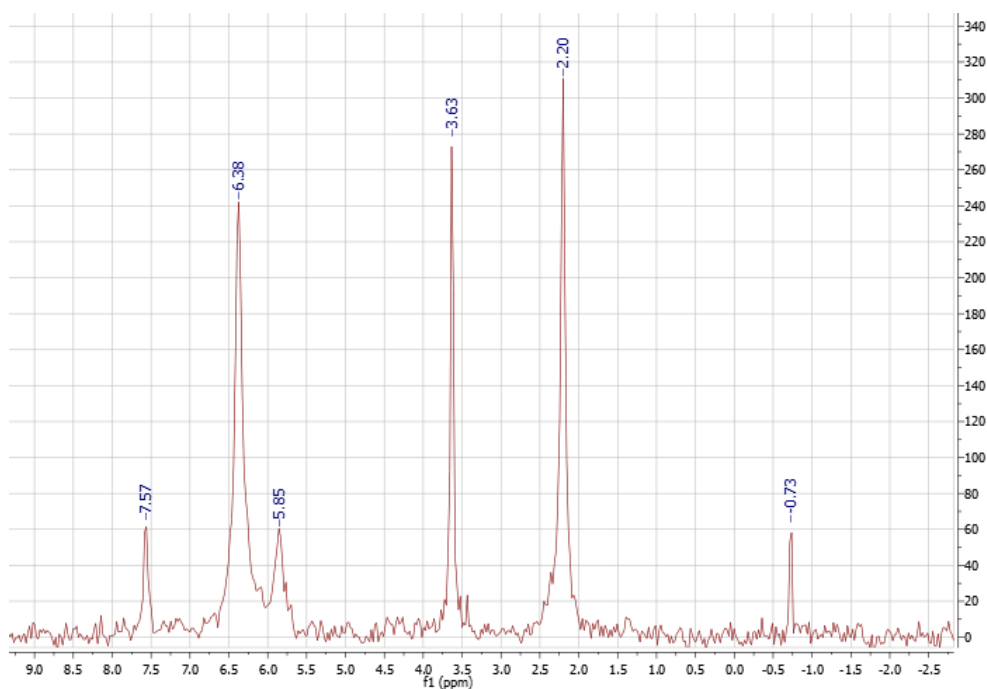
Na widmie tym zaobserwowałem sygnał od nieprzereagowanego PCl_3 (219.2 ppm), sygnał przy 177.6 ppm (przypuszczalnie dichlorokumarynofosforyn) oraz trzy niezidentyfikowane sygnały w przedziale 2-8 ppm o stosunkowo niskiej intensywności. Kolejne widmo ^{31}P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl_3) wykonałem po 90 minutach prowadzenia reakcji (**Rys. 30**).



Rys. 30. Widmo ^{31}P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl_3) mieszaniny dwóch ekwiwalentów 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydro-7*H*-cyklohepta[c]chromen-6-onu (**158c**) i jednego ekwiwalentu PCl_3 po 90 minutach.

Na widmie zaobserwowałem brak sygnału przy wartości przesunięcia chemicznego 219.2 ppm co świadczy o całkowitym przereagowaniu PCl_3 w badanej mieszaninie reakcyjnej. Zaobserwowałem również sygnał przy 178.0 ppm (przypuszczalnie chlorobikumarynofosforyn) oraz pojawiające się nowe niezidentyfikowane sygnały przy -0.8 ppm oraz przy 3.63 ppm.

Po dwóch godzinach prowadzenia reakcji w temperaturze wrzenia THF-u do mieszaniny dodałem jeden ekwiwalent *tert*-butanolu. Po 30 minutach zarejestrowałem widmo mieszaniny reakcyjnej ^{31}P NMR z odsprzęgnięciem spinów w deuterowanym chloroformie (**Rys. 31**).



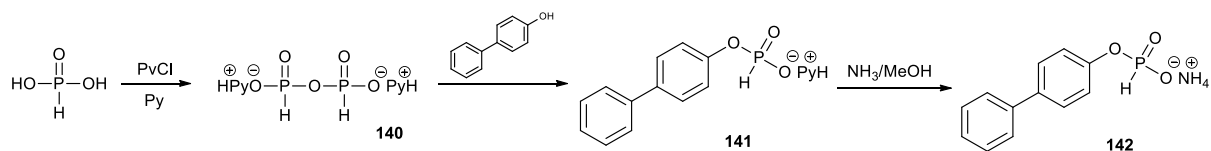
Rys. 31. Widmo ^{31}P NMR z odsprężaniem spinów (CDCl_3) mieszaniny reakcyjnej po dodaniu jednego ekwiwalentu *t*-butanolu po 30 minutach.

Zarejestrowane widmo przedstawione na **rysunku 31** wskazywało na brak sygnałów przy 177.6 i 178.0 ppm. Zaobserwowałem mieszaninę 6 niezidentyfikowanych związków mających w swojej strukturze atom fosforu. Na uwagę może zasługiwać fakt, że mamy tu do czynienia z dwiema parami trzech rezonansowych sygnałów fosforowych o porównywalnych intensywnościach (6.38; 3.63; 2.20 oraz 7.57; 5.85; -0.73). Obraz tego widma nie rokował łatwości izolacji ewentualnego oczekiwanego produktu jak również jego wysokiej wydajności.

W oparciu o wnioski wyciągnięte z dwóch powyższych eksperymentów stwierdzam, że procedura proponowana przez Ozolę i współpracowników nie nadaje się do otrzymywania soli amonowej H-fosfonianu 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydro-7*H*-cyklohepta[c]chromen-6-onu.

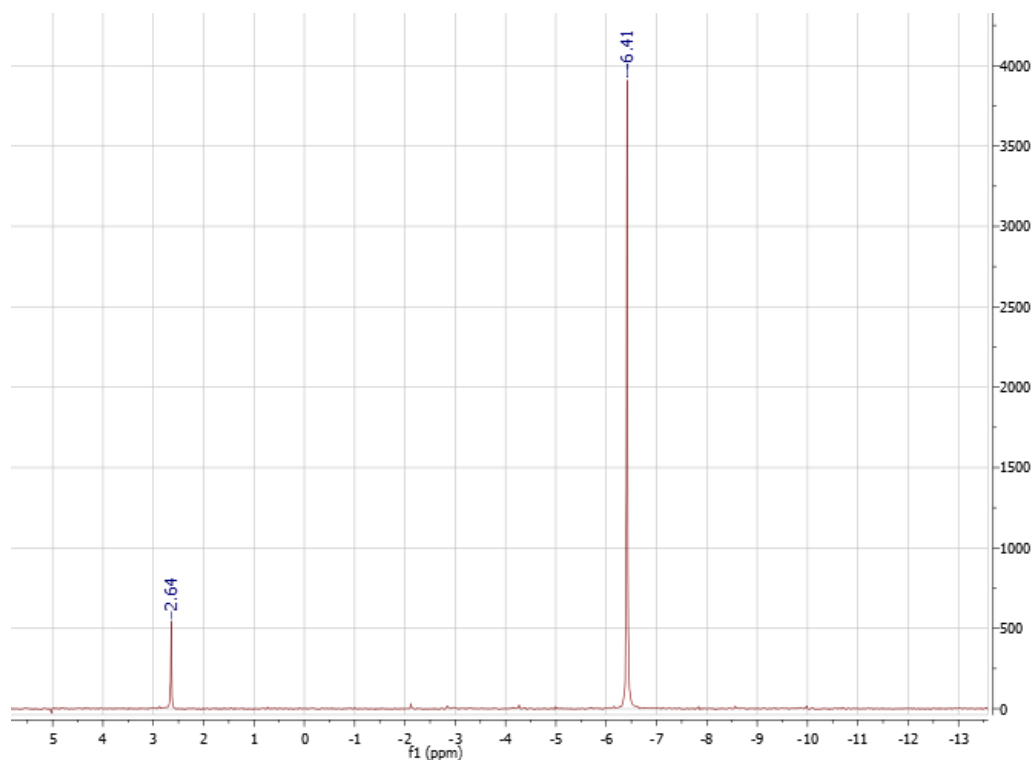
Innym znanym i niezwykle efektywnym podejściem wprowadzania funkcji H-fosfonianowej do struktury alkoholu alifatycznego jest metoda wykorzystująca H-pirofosfonian. Postanowiłem zweryfikować na drodze eksperymentalnej przydatność powyższej metody w reakcji otrzymywania soli amonowej H-fosfonianu bifenyłu (**142**) (**Rys. 32**). W tym celu przeprowadziłem eksperyment oparty na procedurze opisanej w 2009 roku przez Kraszewskiego i współpracowników [86].





Rys. 32. Schemat otrzymywania soli amonowej H-fosfonianu bifenylu (**142**) z wykorzystaniem H-pirofosfonianu pirydyny.

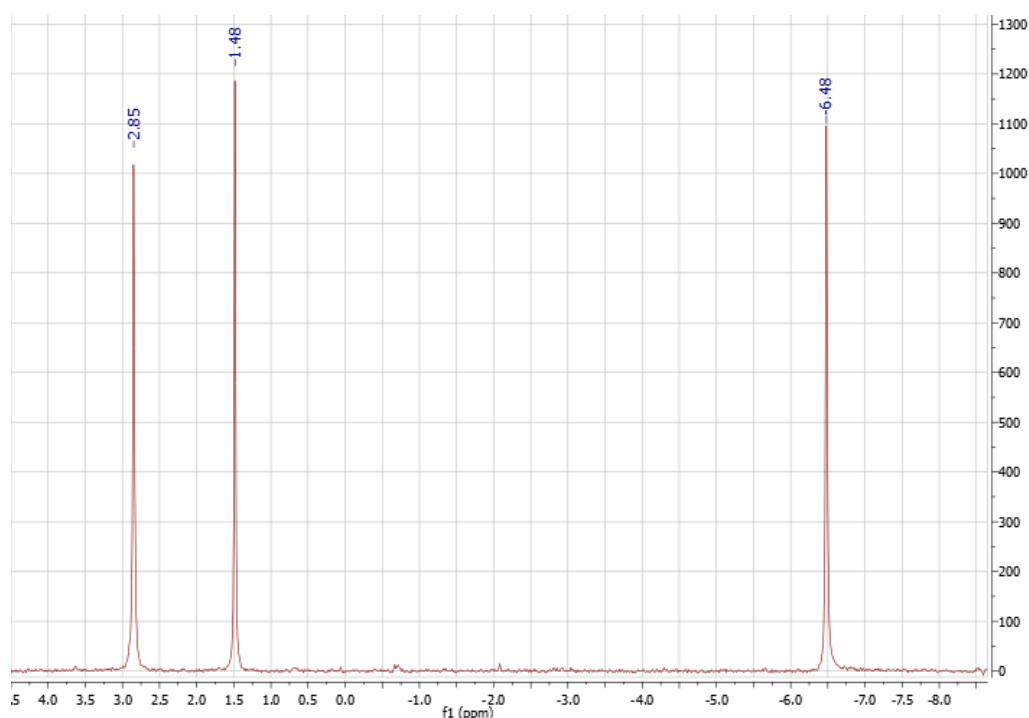
Eksperyment polegał na otrzymaniu *in situ* H-pirofosfonianu pirydyny (**140**) z jednego ekwiwalentu kwasu fosforawego i 0.55 ekwiwalentu chlorku kwasu piwalowego i poddaniu go reakcji z 0.5 ekwiwalentu 4-fenylofenolu. Postęp procesu badałem z wykorzystaniem spektroskopii ^{31}P NMR. Widmo ^{31}P NMR pierwszego etapu reakcji przedstawione na **rysunku 33** zarejestrowałem po 10 minutach.



Rys. 33. Widmo ^{31}P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl_3) reakcji jednego ekwiwalentu kwasu fosforawego z 0.55 ekwiwalentu PvCl po 10 minutach.

Zidentyfikowany sygnał przy 2.64 ppm pochodził od kwasu fosforawego, natomiast sygnał przy -6.41 ppm odpowiada H-pirofosfonianowi (**140**). Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodałem 0.5 ekwiwalentu 4-fenylofenolu i prowadziłem reakcję w temperaturze wrzenia pirydyny przez pół godziny. Po tym czasie zarejestrowałem widmo ^{31}P NMR na

rysunku 34. W przeciwieństwie do poprzednich eksperymentów obraz widma przedstawiał trzy sygnały rezonansowe przy wartościach przesunięcia chemicznego 2.85 ppm – kwas fosforawy, 1.48 ppm – sól pirydyniowa H-fosfonianu bifenyłu (**141**) oraz -6.48 ppm – H-pirofosfonian (**140**). W kolejnych eksperymentach przeprowadziłem optymalizację tego etapu reakcji i stwierdziłem, że stopień przereagowania H-pirofosfonianu (**140**) przy wydłużonym czasie prowadzenia reakcji czy zwiększaniu ilości 4-fenylofenolu nie zmienia się. Optymalna ilość 4-fenylofenolu w stosunku do użytej ilości kwasu fosforawego to 1 ekwiwalent. Reakcję prowadziłem w temperaturze wrzenia pirydyny (co znacznie przyspieszało jej postęp) przez 30 minut.



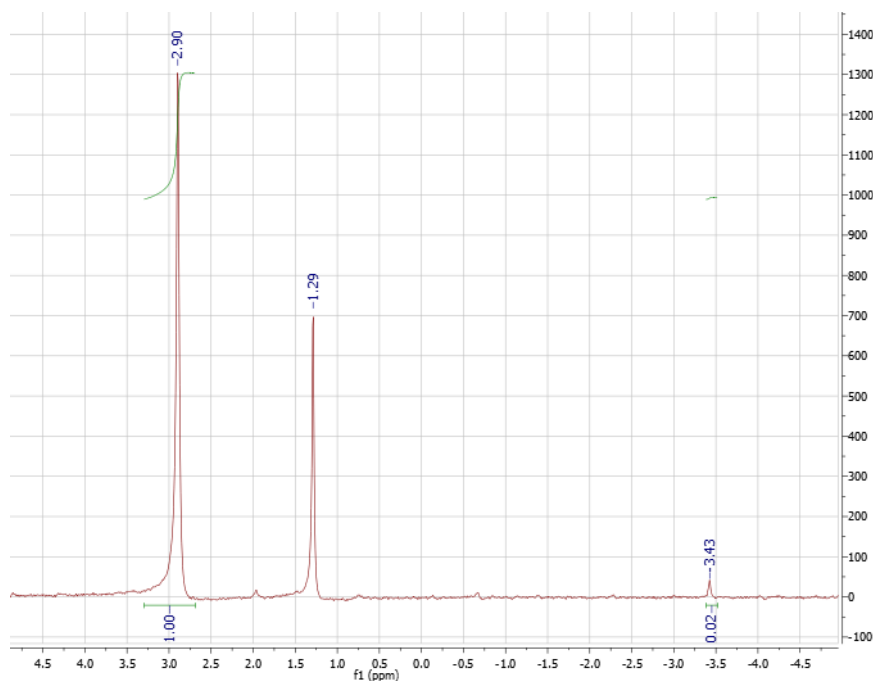
Rys. 34. Widmo ^{31}P NMR z odsprężaniem spinów (CDCl_3) po dodaniu półtora ekwiwalentu 4-fenylofenolu po 30 minutach prowadzenia reakcji w temperaturze wrzenia pirydyny.

Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej do temperatury pokojowej dodałem 5 mL wody i po 10 minutach mieszania odparowałem rozpuszczalnik na wyparce obrotowej. Całość poddałem oczyszczaniu z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej, izolując praktycznie ilościowo użyty do reakcji 4-fenylofenol.

W celu potwierdzenia czy sygnał przy 1.48 ppm odpowiada soli pirydyniowej H-fosfonianu bifenyłu (**141**) powtórzyłem ten eksperyment i po dodaniu 4-fenylofenolu, po 30 minutach prowadzenia reakcji traktowałem mieszaninę reakcyjną roztworem jodu

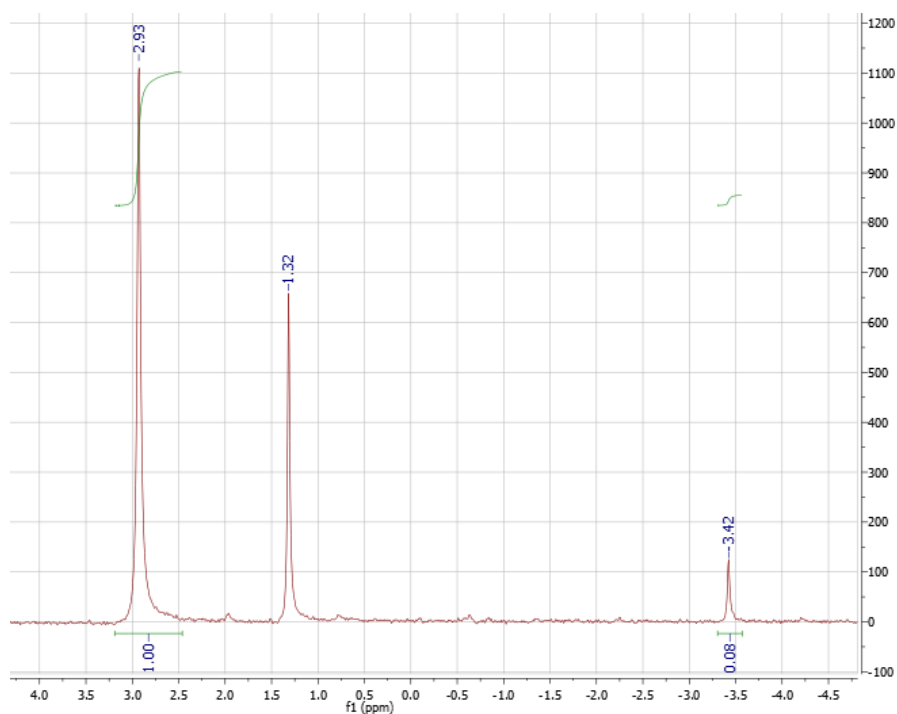
w wodzie (standardowa procedura utleniania H-fosfonianów do fosforanów). Następnie wykonałem kolejne widmo ^{31}P NMR tej mieszaniny reakcyjnej. Ponieważ posiadałem diwodorofosforan bifenyłu (otrzymany na drodze niezależnej syntezy) miałem nadzieję jednoznacznie zidentyfikować w mojej mieszaninie reakcyjnej ten związek.

Na widmie ^{31}P NMR (**Rys. 35**) zaobserwowałem brak sygnału przy -6.48 ppm, pojawił się natomiast sygnał o niskiej intensywności przy -3.43 ppm.



Rys. 35. Widmo ^{31}P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl_3) po dodaniu mieszaniny utleniającej.

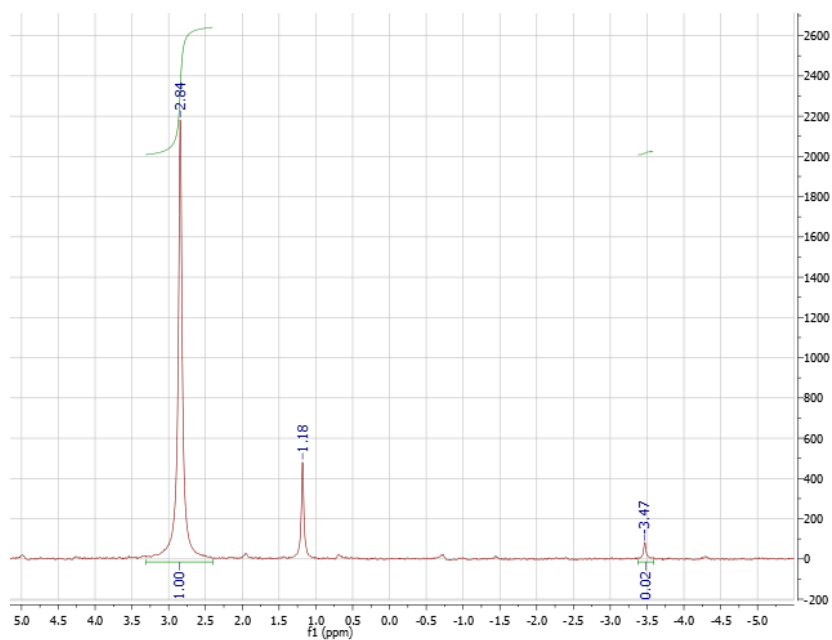
Do rurki NMR zawierającej badaną mieszaninę reakcyjną dodałem diwodorofosforanu bifenyłu (otrzymanego na drodze niezależnej syntezy) i wykonałem kolejne widmo ^{31}P NMR. Jak widać na **rysunku 36** intensywność sygnału przy -3.4 ppm wzrosła.



Rys. 36. Widmo ^{31}P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl_3) po dodaniu mieszaniny utleniającej oraz diwodoro fosforanu 4-fenylofenolu.

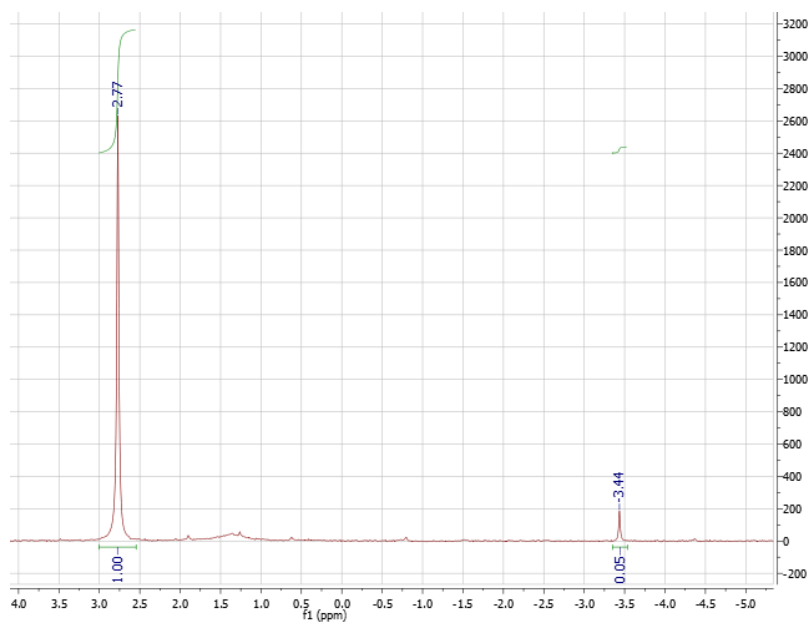
Na uwagę zasługuje fakt, że intensywność sygnału ^{31}P NMR przy 1.32 ppm w wyniku traktowania mieszaniny reakcyjnej jodem maleje, natomiast sygnału przy 2.93 ppm zdecydowanie wzrasta. Niższa intensywność sygnału przy 1.32 ppm mogłaby świadczyć, że jest to sygnał rezonansowy soli pirydyniowej H-fosfonianu bifenyłu (**141**), który utlenia się do fosforanu.

Następnie po 3 godzinach prowadzenia reakcji utleniania zarejestrowałem kolejne widmo ^{31}P NMR (**Rys. 37**), na którym zauważyłem, że intensywność sygnału przy -3.47 ppm nie wzrasta. Maleje natomiast intensywność sygnału przy 1.18 ppm i znacząco rośnie sygnał przy 2.84 ppm odpowiadający soli kwasu fosforawego.



Rys. 37. Widmo ^{31}P NMR z odsprężaniem spinów (CDCl_3) po dodaniu mieszaniny utleniającej po 3 godzinach.

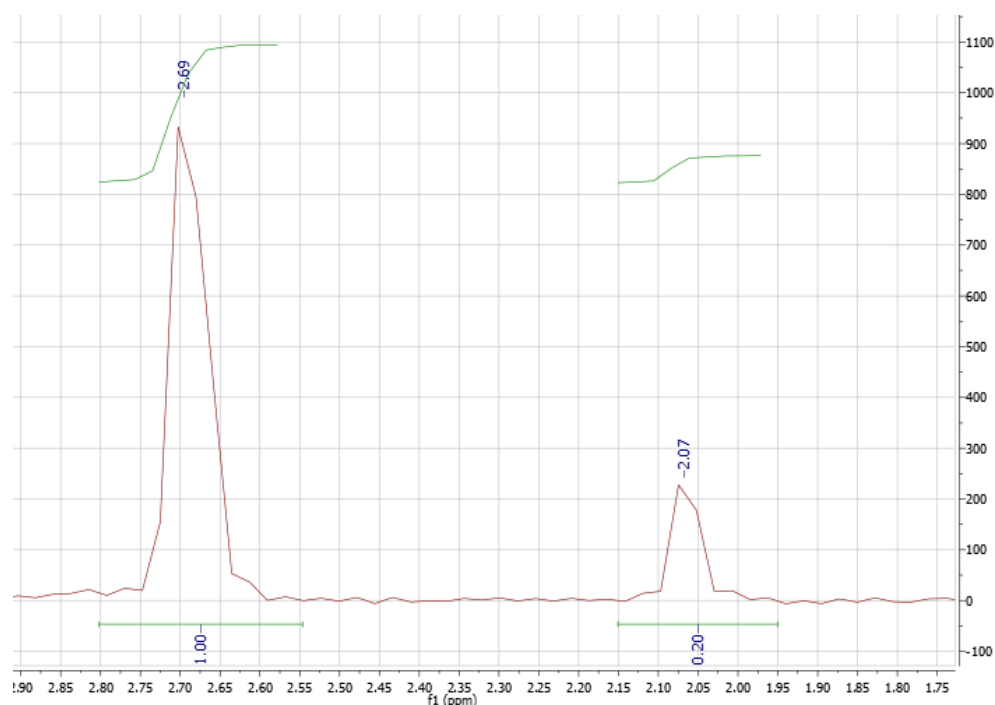
Postanowiłem wykonać widmo tej samej mieszaniny kolejnego dnia i okazało się, że sygnał odpowiadający prawdopodobnie soli pirydyniowej H-fosfonianu bifenyłu (**141**) zniknął (**Rys. 38**).



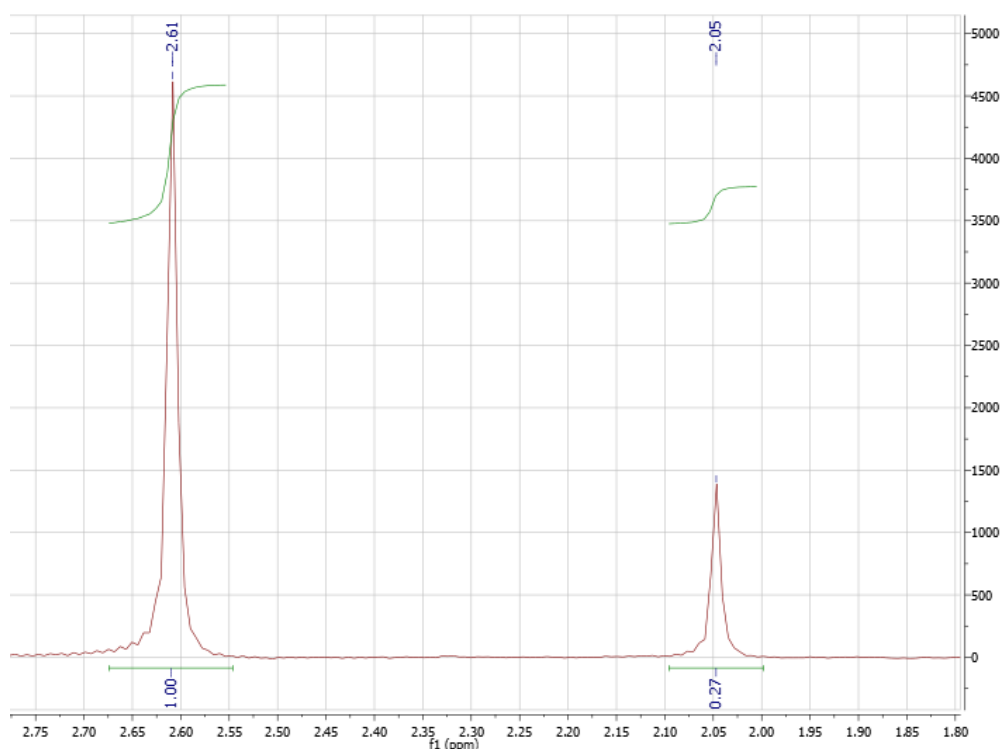
Rys. 38. Widmo ^{31}P NMR z odsprężaniem spinów (CDCl_3) po dodaniu mieszaniny utleniającej po 24 godzinach.

Niepokoiliły mnie jednak dwie obserwacje: a) dlaczego w badanych warunkach reakcji sól pirydyniowa H-fosfonianu bifenyłu (**141**) nie ulega całkowicie utlenieniu, jak również b) dlaczego obecny w środowisku reakcji kwas fosforawy nie ulega utlenieniu do kwasu fosforowego.

Aby wyjaśnić te obserwacje przeprowadziłem kolejny eksperyment który polegał na próbie utlenienia pirydynowego roztworu kwasu fosforowego jodem. Kolejne widma przedstawiają: widmo ^{31}P NMR mieszaniny reakcyjnej kwasu fosforowego w pirydynie po dodaniu jodu po 30 minutach (**Rys. 39**) (warunki reakcji identyczne jak przy próbie utlenienia mieszaniny reakcyjnej w poprzednim eksperymencie) i widmo ^{31}P NMR tej samej mieszaniny reakcyjnej po 24 godzinach (**Rys. 40**).



Rys. 39. Widmo ^{31}P NMR z odsprzęganiem spinów (CDCl_3) próby utlenienia kwasu fosforowego jodem w wodzie po 30 minutach.



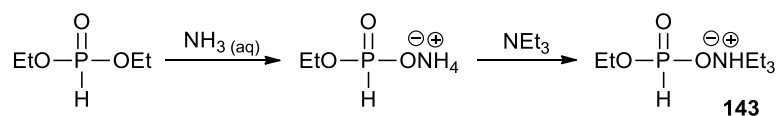
Rys. 40. Widmo ^{31}P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl_3) próby utlenienia kwasu fosforowego jodem w wodzie po 24 godzinach.

Wyniki tego eksperymentu pokazują, że roztwór kwasu fosforowego w pirydynie ulega w badanych warunkach utlenieniu jodem w nieznacznym stopniu. Reasumując wyniki przeprowadzonych eksperymentów stwierdzam, że powstająca sól pirydniowa H-fosfonianu bifenyli (**141**) podczas próby utleniania jodem do odpowiedniego fosforanu szybciej ulega hydrolizie niż utlenieniu dając kwas fosforawy oraz 4-fenylofenol.

Ponieważ metoda z zastosowaniem H-pirofosfonianu nie przyniosła pozytywnych rezultatów postanowiłem w swojej pracy badawczej spróbować wykorzystać popularną w ostatnich dekadach metodę mieszanych bezwodników. Podejście to jest świetnym narzędziem syntetycznym stosowanym w chemii oligonukleotydów.

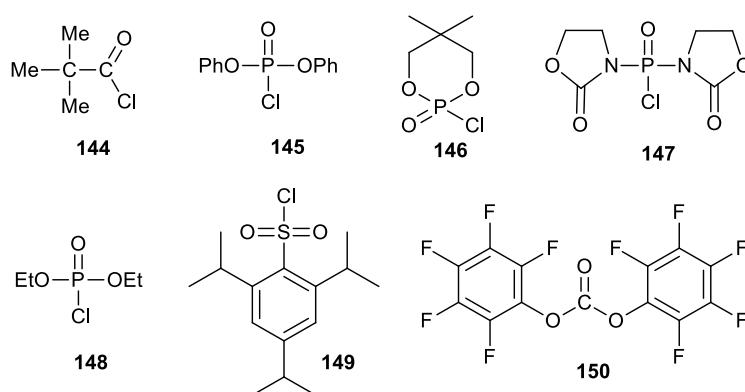
Pierwszym krokiem było otrzymanie z powszechnie dostępnego fosforynu dietylowego, soli trietyloamoniowej H-fosfonianu etylu (**143**) według schematu reakcji widocznego na **rysunku 41** [87]. Reakcja zakończyła się sukcesem, a strukturę produktu potwierdziłem wykonując widma ^1H i ^{31}P NMR.





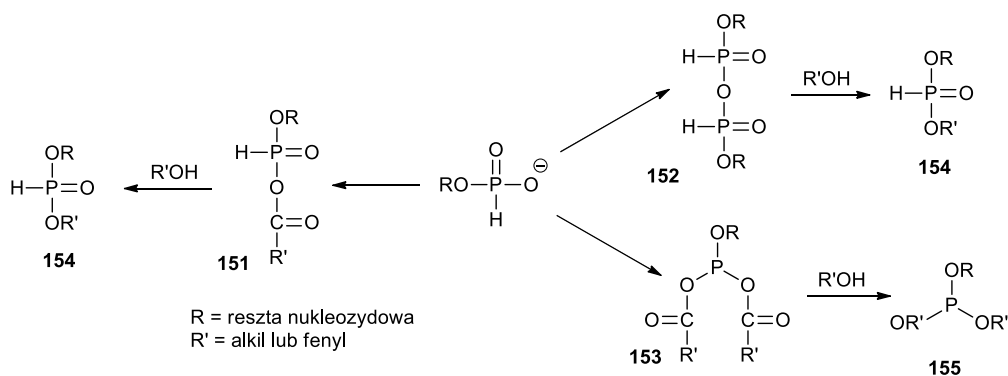
Rys. 41. Schemat otrzymywania soli trietyloamoniowej H-fosfonianu etylu (**143**).

W celu fosfitylacji alkoholi metodą mieszanych bezwodników, należy przeprowadzić sól trietyloamoniową H-fosfonianu etylu (**143**) w formę aktywną [88]. Monoestry H-fosfonianowe można aktywować *in situ* kilkoma różnymi sposobami przeprowadzając je w odpowiednie mieszane bezwodniki z udziałem chlorków kwasu karboksylowego, kwasu fosforowego, kwasu sulfonowego bądź węglanu bispentafluorofenyłu (**144-150**) (**Rys. 42**), które w reakcjach z solami monoestrów H-fosfonianowych dają reaktywne produkty przejściowe typu (**151-153**) [89-92].



Rys. 42. Odczynniki kondensujące stosowane w syntezie oligonukleotydów.

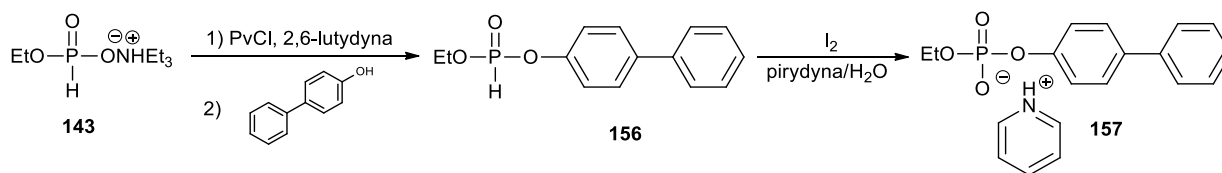
Najlepiej poznaną metodą aktywacji jest ta z udziałem chlorku kwasu piwalowego (**144**). W zależności od liczby ekwiwalentów odczynnika kondensującego możliwe jest otrzymanie trzech różnych związków przejściowych: mieszanego bezwodnika (**151**), H-pirofosfonianu (**152**) oraz fosforynu bisacylowego (**153**) (**Rys. 43**).



Rys. 43. Struktury chemiczne bezwodników możliwych do otrzymania *in situ* z monoestrów H-fosfonianowych.

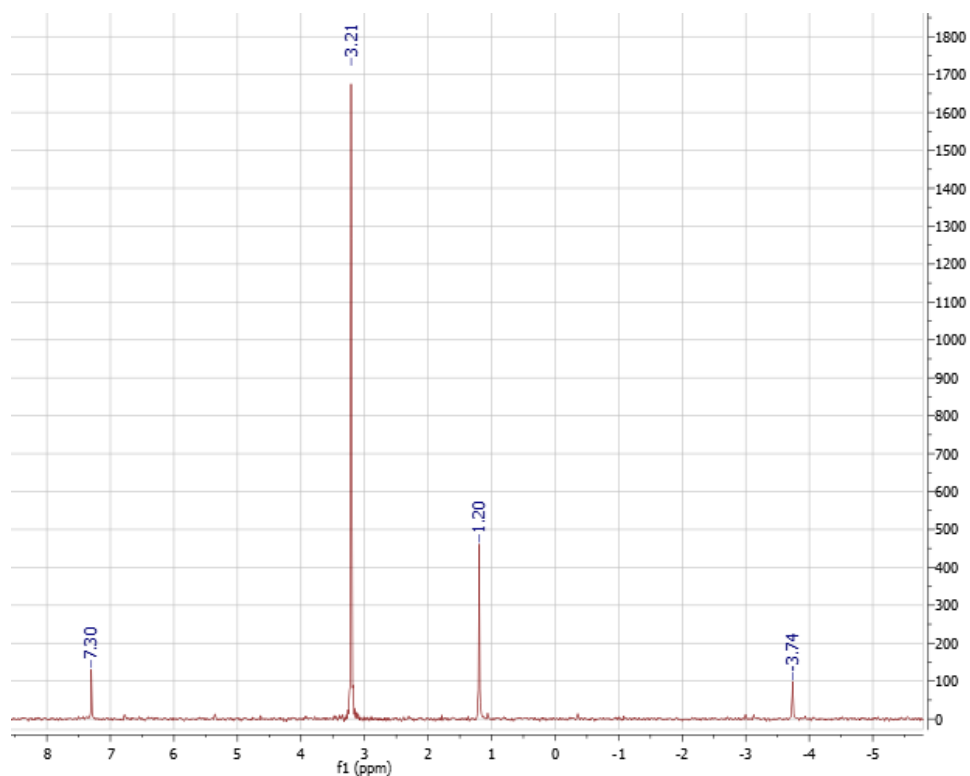
Wszystkie te mieszane bezwodniki mogą następnie reagować z alkoholami lub fenolami dając odpowiednie H-fosfoniany (**154**) bądź triestry kwasu fosforowego (**155**).

W świetle powyższych informacji, postanowiłem otrzymać H-fosfonian bifenylowoetylowy (**156**) [93], a następnie podjąć próby jego utlenienia do fosforanu (**157**) (**Rys. 44**).



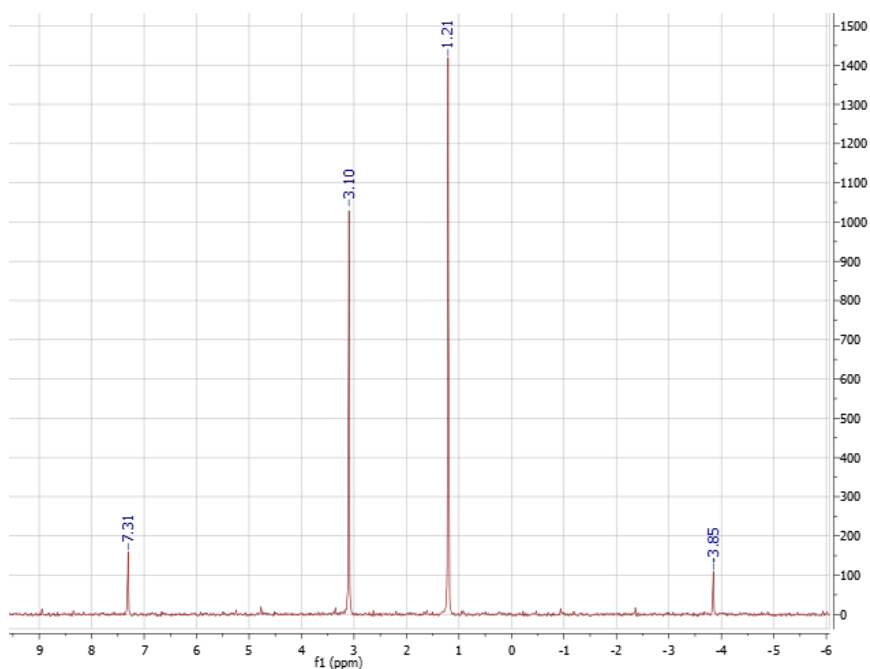
Rys. 44. Schemat próby otrzymywania bifenyloetylofosforanu (**157**).

W tym celu sól trietyloamoniową H-fosfonianu etylu (**143**) poddałem reakcji z 1.2 ekwiwalentu PvCl w obecności 3 ekwiwalentów 2,6-lutydyny w bezwodnym chlorku metylenu. Widmo ^{31}P NMR po tym etapie przedstawiłem na **rysunku 45**.



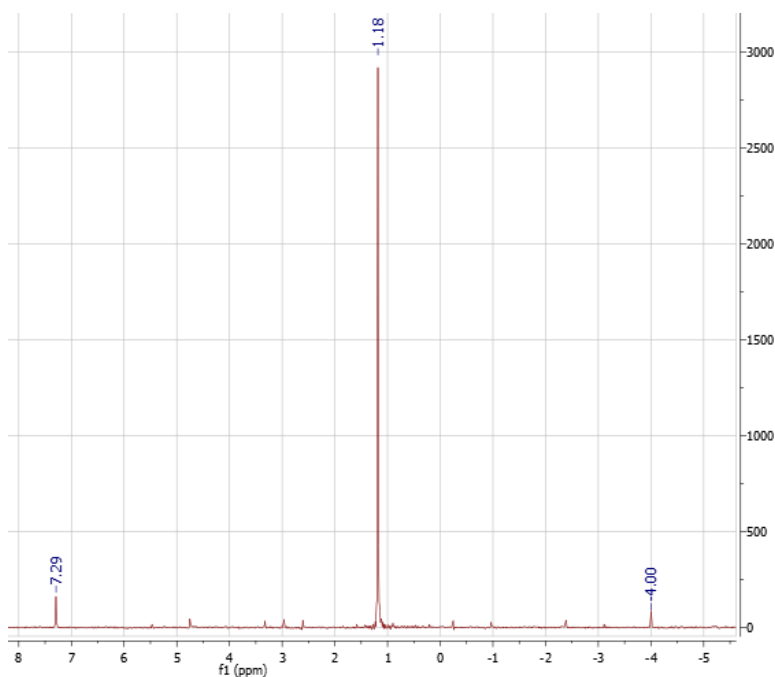
Rys. 45. Widmo ^{31}P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl_3) reakcji soli trietyloamoniowej H-fosfonianu etylu (**143**) z 1.2 ekwiwalentu PvCl w obecności 3 ekwiwalentów 2,6-lutydyny po 30 minutach.

Sygnal przy 3.21 ppm odpowiada substratowi – soli trietyloamoniowej H-fosfonianu etylu (**143**), a sygnal przy 1.20 ppm to prawdopodobnie powstający *in situ* mieszany bezwodnik kwasu piwalowego i fosforawego. W związku z niskim stopniem przereagowania substratu oraz faktem, że wraz z wydłużaniem czasu reakcji intensywność sygnału mieszanego bezwodnika nie wzrastała postanowiłem dodać kolejne 0.6 ekwiwalentu PvCl i zarejestrować widmo (**Rys. 46**).



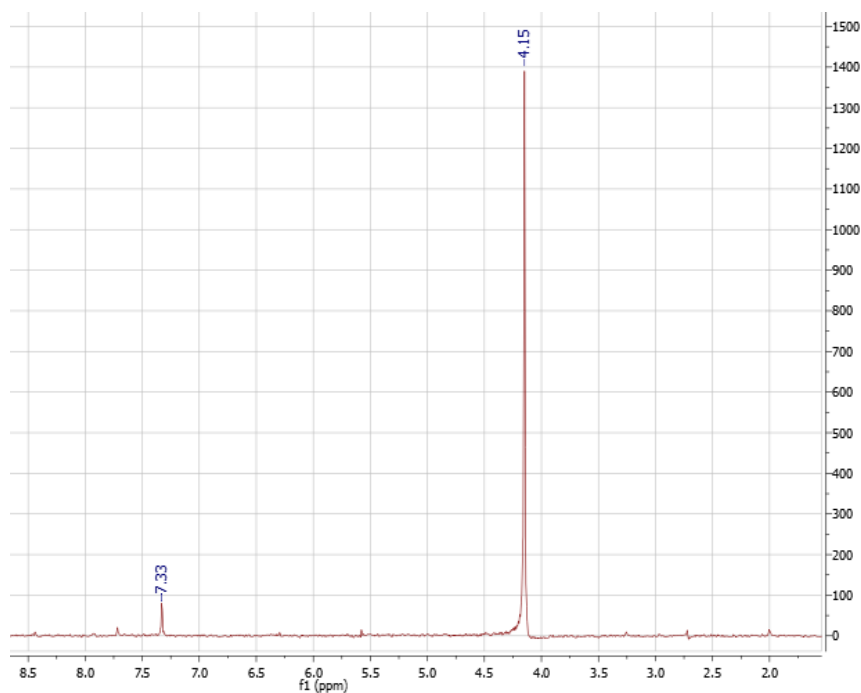
Rys. 46. Widmo ^{31}P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl_3) po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej 0.6 ekwiwalentu PvCl po pół godziny prowadzenia reakcji.

Intensywność sygnału mieszanego bezwodnika diametralnie wzrosła, lecz wciąż w mieszaninie reakcyjnej obecna była sól trietyloamoniowa H-fosfonianu etylu (**143**). Tym razem do mieszaniny reakcyjnej postanowiłem dodać 1.2 ekwiwalentu PvCl i zarejestrować ponownie widmo (**Rys. 47**).



Rys. 47. Widmo ^{31}P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl_3) po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej 1.2 ekwiwalentu PvCl po pół godziny prowadzenia reakcji.

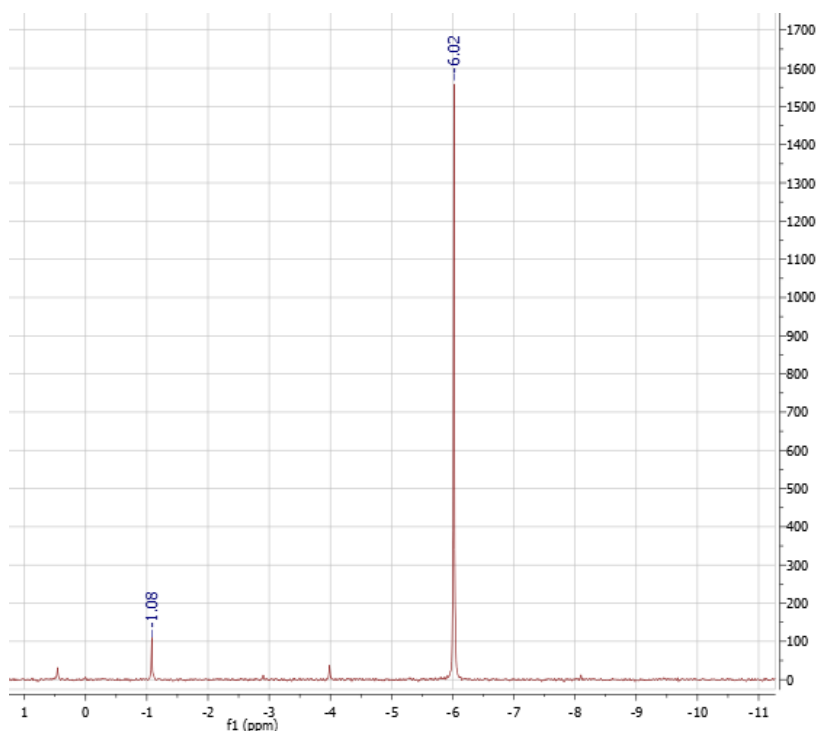
Na widmie manifestuje się intensywny sygnał rezonansowy przy 1.18 ppm odpowiadający bezwodnikowi fosfonowo-karboksyłowemu. Sygnał substratu zupełnie zniknął w związku z czym postanowiłem przeprowadzić kolejny etap reakcji. Do tak otrzymanej mieszaniny reakcyjnej dodałem 3 ekwiwalenty 4-fenylofenolu i po 15 minutach wykonałem widmo ^{31}P NMR (**Rys. 48**).



Rys. 48. Widmo ^{31}P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl_3) po dodaniu 4-fenylofenolu po 15 minutach.

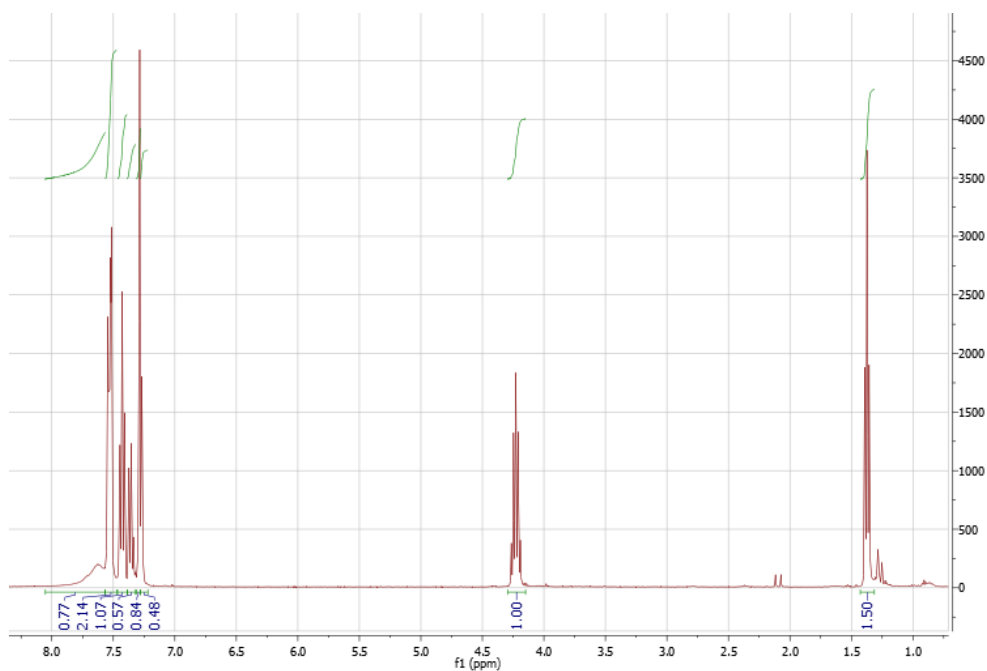
W porównaniu z widmem widocznym na **rysunku 47**, można zauważyć, że zniknął sygnał przy 1.21 ppm (prawdopodobnie odpowiadający mieszanemu bezwodnikowi), a pojawił się sygnał przy 4.15 ppm, przypuszczalnie odpowiadający bifenyloetylofosforynowi (**156**).

H-fosfoniany alkilowo-arylowe są wysoce reaktywne [94] stąd nie podjąłem się próby jego bezpośredniej izolacji z mieszaniny reakcyjnej. Postanowiłem utlenić *in situ* surowy produkt jodem w wodzie.

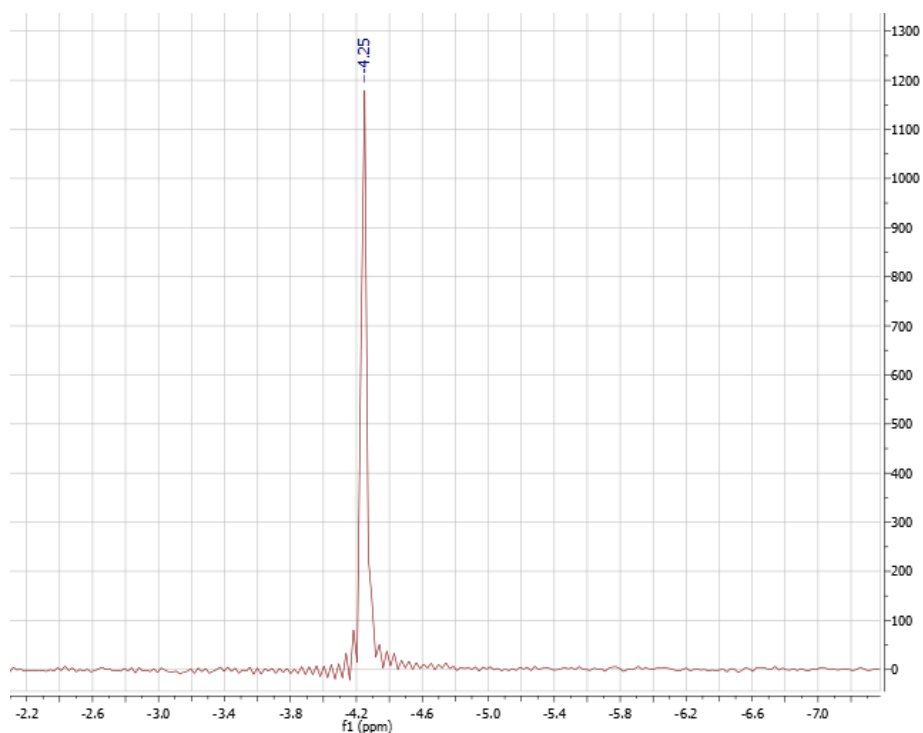


Rys. 49. Widmo ³¹P NMR z odsprężaniem spinów (CDCl₃) po utlenieniu mieszaniny reakcyjnej jodem w wodzie.

Na widmie na **rysunku 49** widać jeden sygnał przy -6.02 ppm, który prawdopodobnie odpowiada strukturze bifenyloetylofosforanu (**157**). Kolejnym krokiem była próba izolacji tego związku. Z mieszaniny reakcyjnej wytrąciłem osad przy pomocy octanu etylu, który po odsączeniu i scharakteryzowaniu okazał się być solą 2,6-lutydynową kwasu piwalowego (struktura potwierdzona widmem ¹H NMR). Po usunięciu soli izolowałem związek (**157**) z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie AcOEt:MeOH – 10:1 z wydajnością 75%. Strukturę związku potwierdziłem wykonując widma ¹H i ³¹P NMR (**Rys. 50 i 51**).



Rys. 50. Widmo ^1H NMR (CDCl_3) bifenyloetylofosforanu (**157**).



Rys. 51. Widmo ^{31}P NMR z odsprężaniem spinów (CDCl_3) bifenyloetylofosforanu (**157**).

W świetle powyższych rezultatów, stwierdzam, że jedynie reakcja wykorzystująca mieszane bezwodniki zakończyła się powodzeniem. W celu otrzymania innych pochodnych z wykorzystaniem tej metody muszę dysponować różnego rodzaju difosforinami co jest

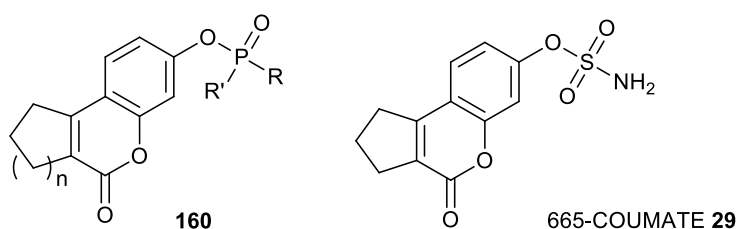
kłopotliwe. Ponadto kolejnym problemem może być otrzymanie pochodnych kwasu tiofosforowego, których synteza była przewidziana w projekcie, stąd też w dalszej pracy badawczej zdecydowałem się wykorzystać proste i tanie metody wprowadzania reszt kwasu fosforowego i tiofosforowego do struktury związków organicznych, oparte na wykorzystaniu chlorofosforanów i chlorotiofosforanów.

6. Projektowanie, otrzymywanie oraz badania biologiczne fosforowych i tiofosforowych pochodnych kumaryn

6.1. Modelowanie molekularne fosforowych pochodnych kumarynowych

Rozpoczynając realizację swojej rozprawy doktorskiej postanowiłem wykorzystać modelowanie molekularne w zakresie projektowania struktur potencjalnych inhibitorów STS posiadających w swojej konstytucji ugrupowanie fosforowe i tiofosforowe. W tym celu wykorzystałem komercyjnie dostępny program *Autodock Vina*, a jako związek referencyjny przyjąłem 665-COUMATE (**29**) – związek o udowodnionych właściwościach inhibicyjnych w stosunku do STS, posiadający w swojej strukturze fragment kumarynowy. Pierwszym zagadnieniem jakie postanowiłem rozstrzygnąć w ramach modelowania molekularnego było znalezienie zależności efektywności dopasowania badanych fosforowych modeli kumarynowych (**160**) do centrum aktywnego enzymu od wielkości pierścienia alifatycznego (**Tabela 12**).

Tabela 12. Struktury modelowe wybrane do dokowania molekularnego.

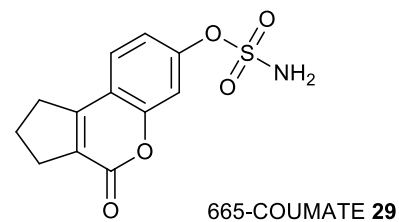
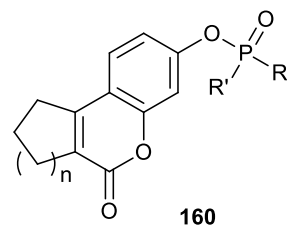


Nr	R	R'	n	Nr	R	R'	n	Nr	R	R'	n
160a	OEt	NH ₂	1	160g	NH ₂	NH ₂	1	160m	OMe	NH ₂	1
160b	OEt	NH ₂	2	160h	NH ₂	NH ₂	2	160n	OMe	NH ₂	2
160c	OEt	NH ₂	3	160i	NH ₂	NH ₂	3	160o	OMe	NH ₂	3
160d	OMe	OMe	1	160j	OEt	OEt	1	160p	OH	OH	1
160e	OMe	OMe	2	160k	OEt	OEt	2	160r	OH	OH	2
160f	OMe	OMe	3	160l	OEt	OEt	3	160s	OH	OH	3

Badania te pokazały, że pięcio-, sześć- i siedmioczłonowe hydrofobowe pierścienie alifatyczne obecne w strukturze projektowanych związków są w bliskim sąsiedztwie z resztami aminokwasowymi Leu74, Thr99, Val101, Leu103, Leu167, Val177, Phe178, His485 czy Phe488 znajdującymi się w miejscu aktywnym enzymu (**Rys. 52**). Najniższymi

wartościami energii kompleksu inhibitor-enzym odznaczały się pochodne kwasu fosforowego (160p-160s) (Tabela 13) odpowiednio -4.3; -4.7 oraz -4.9 kcal/mol.

Tabela 13. Wartości energii swobodnych wiązania kompleksów inhibitor-STS dla fosforowych pochodnych kumaryny.

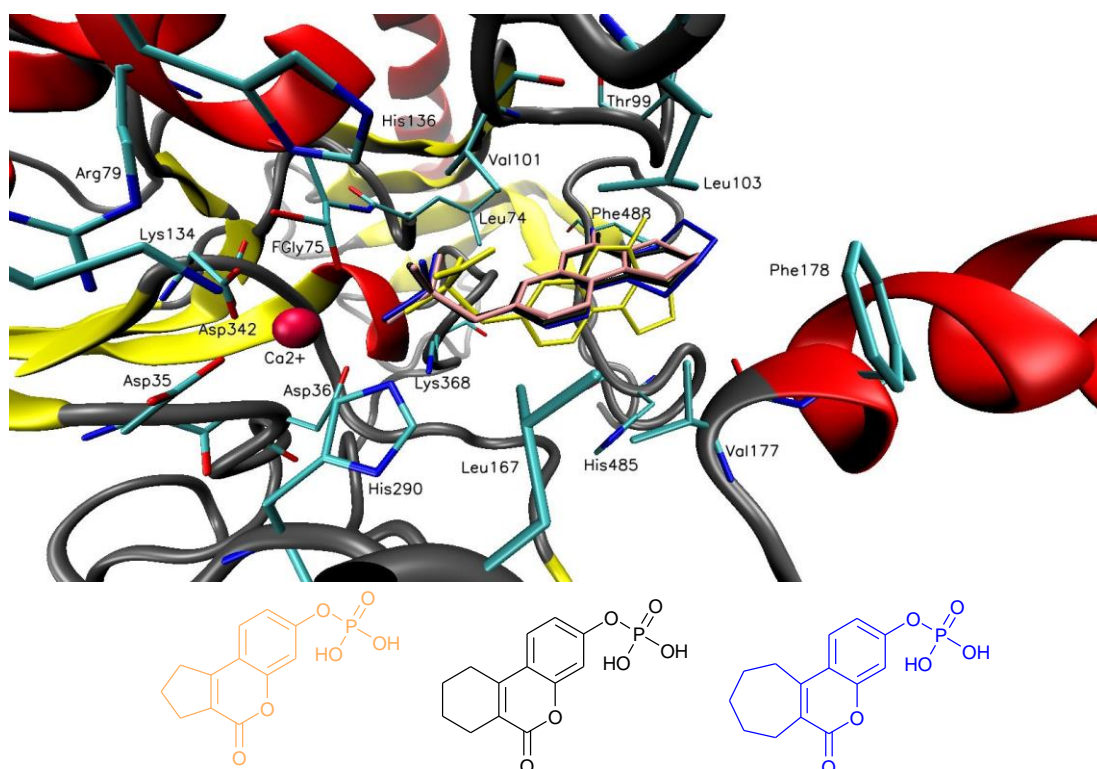


Nr	n	R	R'	Swobodna energia wiązania [kcal/mol]	Nr	n	R	R'	Swobodna energia wiązania [kcal/mol]
160a	1	OEt	NH ₂	-	160k	2	OEt	OEt	-
160b	2	OEt	NH ₂	-	160l	3	OEt	OEt	-
160c	3	OEt	NH ₂	-	160m	1	OMe	NH ₂	-4.8
160d	1	OMe	OMe	-2.0	160n	2	OMe	NH ₂	-2.5
160e	2	OMe	OMe	1.4	160o	3	OMe	NH ₂	-1.5
160f	3	OMe	OMe	0.8	160p	1	OH	OH	-4.3
160g	1	NH ₂	NH ₂	-2.3	160r	2	OH	OH	-4.7
160h	2	NH ₂	NH ₂	-2.2	160s	3	OH	OH	-4.9
160i	3	NH ₂	NH ₂	-2.5	29	-	-	-	-5.1
160j	1	OEt	OEt	-					

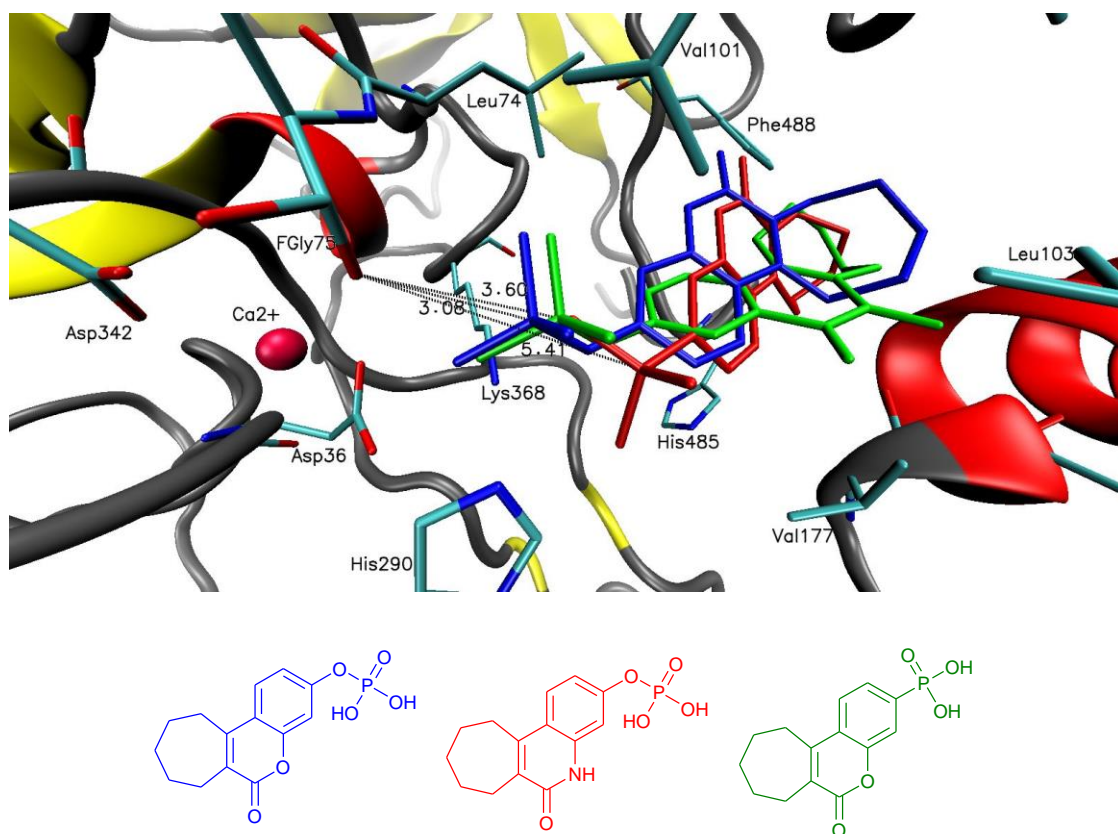


Powyższe rezultaty sugerują, że zwiększanie wielkości hydrofobowego pierścienia alifatycznego w badanych strukturach powinno poprawiać aktywność biologiczną w wyniku wzrostu oddziaływań hydrofobowych z resztami aminokwasowymi obecnymi w miejscu aktywnym STS. Co więcej, ułożenie grup fosforowych i ich odległość od formyloglicyny może sugerować ich istotną rolę w mechanizmie dezaktywacji enzymu (**Rys. 52**).

W kolejnym etapie badań postanowiłem sprawdzić jak w warunkach modelowania molekularnego zachowywać będą się pochodne (**165**) i (**170**) posiadające w swojej konstytucji ugrupowanie laktamowe (zamiast laktonowego) jak również funkcję fosfonową (zamiast reszty kwasu fosforowego). Wyniki badań modelowania komputerowego tych modeli pokazują, że obecność grupy fosfonowej lub funkcji laktamowej doprowadziła do podwyższenia wartości energii swobodnej wiązania kompleksu inhibitor-enzym do wartości odpowiednio -4.4 i -3.8 kcal/mol. Co więcej, odległość grupy funkcyjnej w pozycji 3 od FGly75 wynosiła 5.41 Å dla pochodnej fosfonowej (**170**) oraz 3.60 Å dla związku zawierającego w swojej konstytucji funkcję laktamową (**165**), co może wskazywać na gorsze dopasowanie tych analogów w miejscu aktywnym STS (**Rys. 53**).



Rys. 52. Wizualizacja wyników dokowania związków (**160p**) (brązowy), (**160r**) (czarny) i (**160s**) (niebieski) w miejscu aktywnym STS.

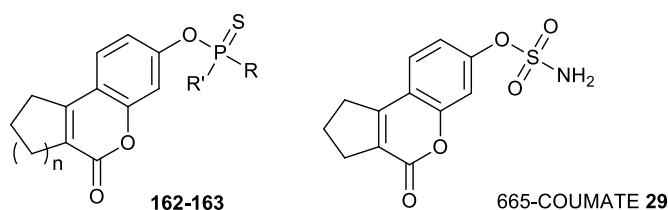


Rys. 53. Wizualizacja wyników dokowania związków (**160s**) (niebieski), (**165**) (czerwony) i (**170**) (zielony) oraz ich odległość od miejsca aktywnego.

6.2. Modelowanie molekularne tiofosforowych pochodnych kumarynowych

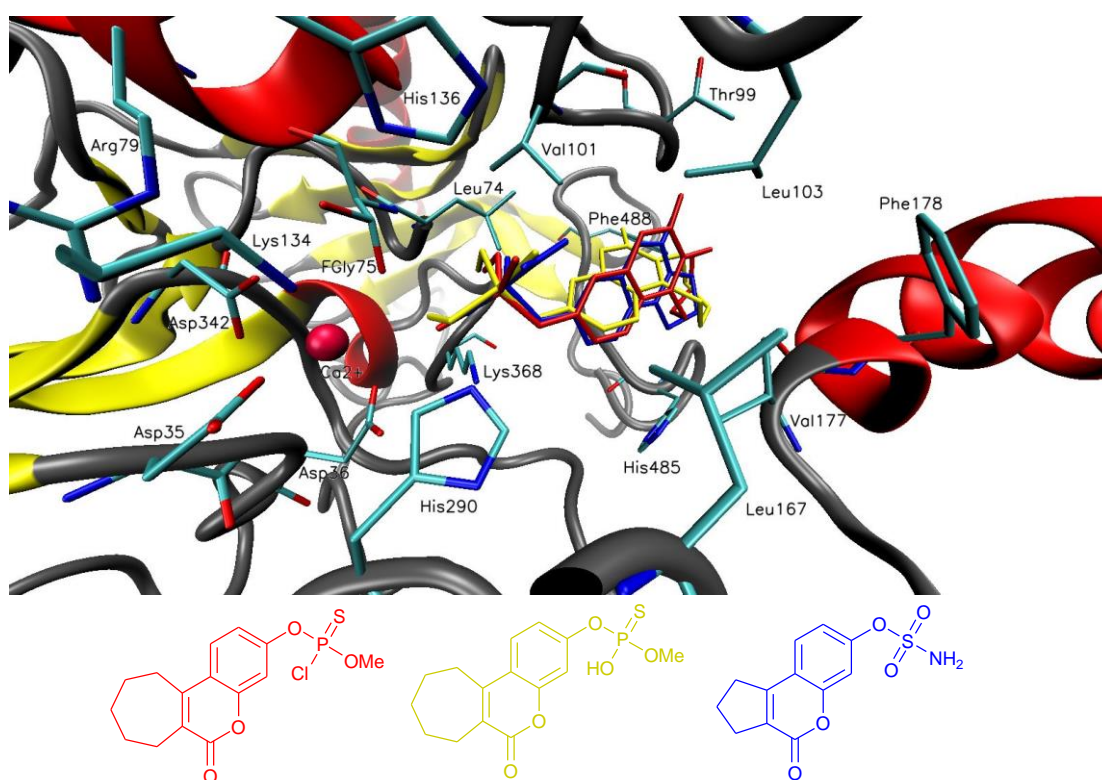
Kolejnym analizowanym przeze mnie zagadnieniem było znalezienie odpowiedzi na pytanie jakie wyniki badań modelowania molekularnego uzyskam przyjmując jako związki modelowe tiofosforowe pochodne kumaryny. Do tych badań wybrałem tiofosforowe pochodne (**162-163**) widoczne w **tabeli 14**.

Tabela 14. Struktury modelowe wybrane do dokowania molekularnego.



Nr	R	R'	n	Nr	R	R'	n	Nr	R	R'	n
162a	NH ₂	NH ₂	1	162j	OMe	NH ₂	1	162t	OMe	OH	1
162b	NH ₂	NH ₂	2	162k	OMe	NH ₂	2	162u	OMe	OH	2
162c	NH ₂	NH ₂	3	162l	OMe	NH ₂	3	162w	OMe	OH	3
162d	OEt	NH ₂	1	162m	OMe	OMe	1	163a	OEt	Cl	1
162e	OEt	NH ₂	2	162n	OMe	OMe	2	163b	OEt	Cl	2
162f	OEt	NH ₂	3	162o	OMe	OMe	3	163c	OEt	Cl	3
162g	OEt	OEt	1	162p	OEt	OH	1	163d	OMe	Cl	1
162h	OEt	OEt	2	162r	OEt	OH	2	163e	OMe	Cl	2
162i	OEt	OEt	3	162s	OEt	OH	3	163f	OMe	Cl	3

Rezultaty modelowania pokazały, że tiofosforowe pochodne kumaryny dokują się podobnie do związku referencyjnego (665-COUMATE) (**29**) (Rys. 54). Związki (**163f**) i (**162w**) wykazywały najlepsze dopasowanie w miejscu aktywnym enzymu (wartości energii wiązania odpowiednio -0.8 i -1.5 kcal/mol).

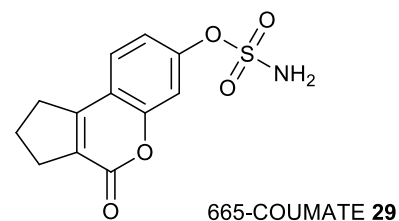
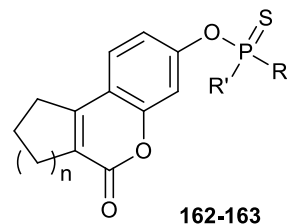


Rys. 54. Wizualizacja wyników dokowania związków (**163f**) (czerwony), (**162w**) (żółty) i 665-COUMATE (**29**) (niebieski).

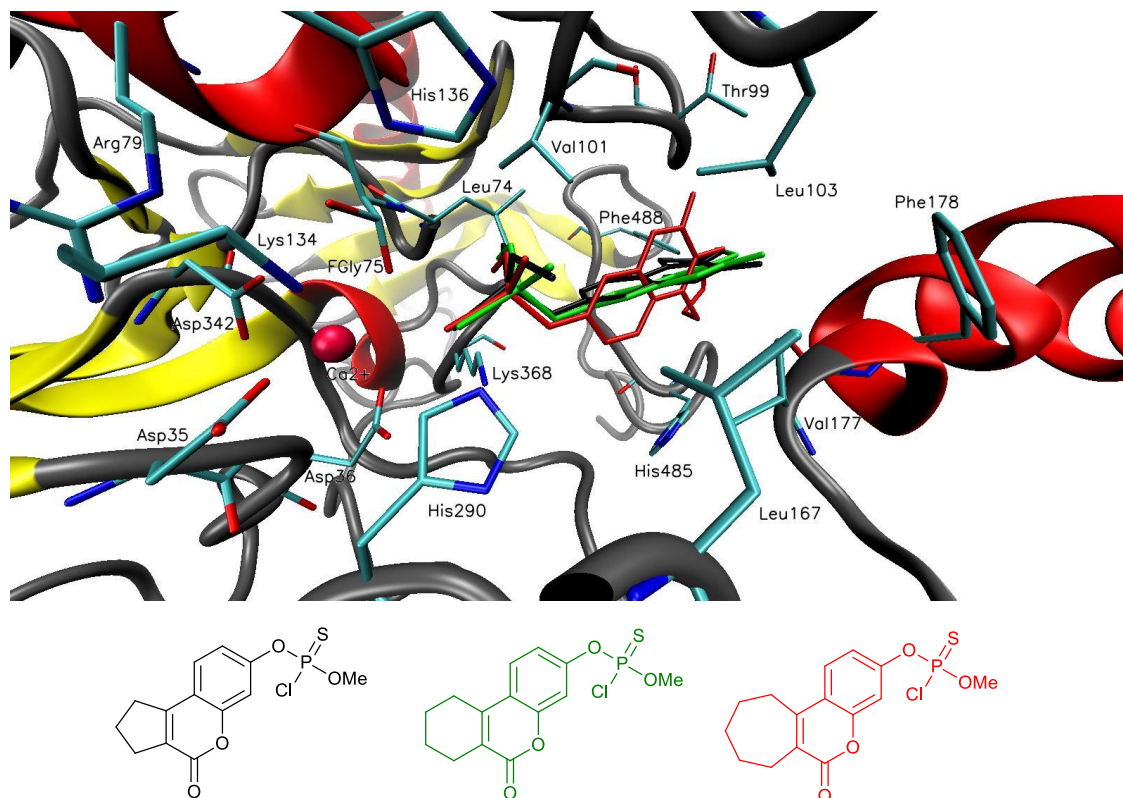
Obecny w strukturach modelowych związków pięcio-, sześć- i siedmioczłonowy hydrofobowy pierścień alifatyczny znajduje się w bliskiej odległości od lipofilowych reszt

aminokwasowych Leu74, Thr99, Val101, Leu103, Leu167, Val177, Phe178, His485 oraz Phe488 odpowiedzialnych za rozpoznawanie substratu. Biorąc pod uwagę wartości swobodnych energii wiązania kompleksu inhibitor-enzym tricyklicznych pochodnych kumarynowych można wyciągnąć wniosek, że wraz ze wzrostem lipofilowości cząsteczki stabilność tworzonego kompleksu inhibitor-enzym rośnie. W związku z czym wartości energii kompleksów mających w swojej strukturze siedmioczłonowe pierścienie alifatyczne były najniższe, a związki te wykazywały najlepsze dopasowanie w miejscu katalitycznym STS (np. wartości energii dla **(163d-163f)** wynosiły odpowiednio 0.4, -0.1 i -0.8 kcal/mol) (**Rys. 55**) (**Tabela 15**).

Tabela 15. Wartości energii swobodnych wiązania kompleksów inhibitor-STS dla tiofosforowych pochodnych kumaryny.



Nr	n	R	R'	Swobodna energia wiązania [kcal/mol]	Nr	n	R	R'	Swobodna energia wiązania [kcal/mol]
162a	1	NH ₂	NH ₂	-1.1	162o	3	OMe	OMe	1.6
162b	2	NH ₂	NH ₂	-1.5	162p	1	OEt	OH	-
162c	3	NH ₂	NH ₂	1.3	162r	2	OEt	OH	-
162d	1	OEt	NH ₂	-	162s	3	OEt	OH	-
162e	2	OEt	NH ₂	-	162t	1	OMe	OH	0.1
162f	3	OEt	NH ₂	-	162u	2	OMe	OH	1.5
162g	1	OEt	OEt	-	162w	3	OMe	OH	-1.5
162h	2	OEt	OEt	-	163a	1	OEt	Cl	-
162i	3	OEt	OEt	-	163b	2	OEt	Cl	-
162j	1	OMe	NH ₂	-1.3	163c	3	OEt	Cl	-
162k	2	OMe	NH ₂	-2.4	163d	1	OMe	Cl	0.4
162l	3	OMe	NH ₂	-1.5	163e	2	OMe	Cl	-0.1
162m	1	OMe	OMe	-	163f	3	OMe	Cl	-0.8
162n	2	OMe	OMe	-	29	-	-	-	-5.1



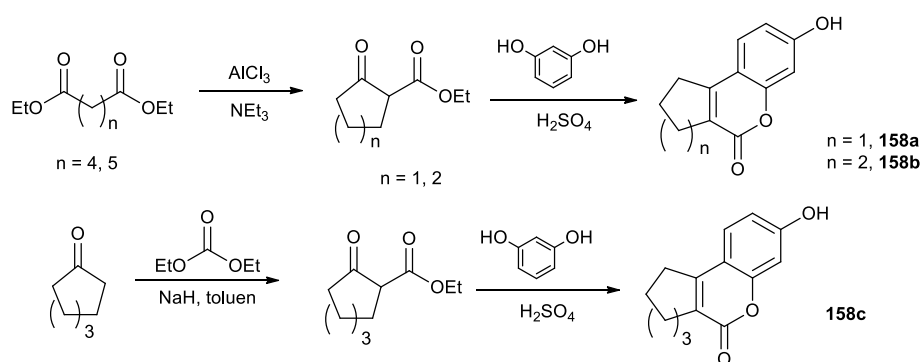
Rys. 55. Wizualizacja wyników dokowania związków **(163d)** (czarny), **(163e)** (zielony) i **(163f)** (czerwony).

Na podstawie wyników tej części badań można powiedzieć, że pochodne fosforowe i tiofosforowe dokowały się w miejscu aktywnym enzymu podobnie do związku referencyjnego (**29**). Dla pochodnych kwasu fosforowego wartości swobodnych energii wiązania kompleksu inhibitor-enzym kształtowały się w przedziale -4.9-0.8 kcal/mol. Związki o najniższej wartości energii swobodnej kompleksu to pochodne **(160p-160s)** (-4.3; -4.7; -4.9 kcal/mol). Wartości energii analogów tiofosforowych były wyższe i zawierały się w przedziale -2.8-1.6 kcal/mol. Najniższe wartości energii swobodnych uzyskałem dla związków **(163f)** i **(162k)** odpowiednio -0.8 i -2.4 kcal/mol.

6.3. Synteza fosforowych i tiofosforowych pochodnych kumarynowych

W celu weryfikacji wyników badań modelowania molekularnego postanowiłem przeprowadzić syntezę serii odpowiednich pochodnych i zbadać ich czynność biologiczną. Pracę badawczą rozpocząłem od syntezy substratów tj. 7-hydroksy-2,3-

dihydrocyklopenta[*c*]chromen-4(1*H*)-onu (**158a**), 3-hydroksy-7,8,9,10-tetrahydro-6*H*-benzo[*c*]chromen-6-onu (**158b**) oraz 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydrocyklohepta[*c*]chromen-6(7*H*)-onu (**158c**). W pierwszym etapie syntezy przygotowałem odpowiednie β-ketoestry jako substraty wyjściowe do syntezy pochodnych kumarynowych. 2-oksocyklopentakarboksylan etylu i 2-oksocykloheksakarboksylan etylu uzyskałem w reakcji odpowiednich diestrów kwasu adypinowego i pimelinowego z trietyloaminą w obecności chlorku glinu. 2-oksocykloheptakarboksylan etylu otrzymałem w reakcji cykloheptanonu z węglanem dietylu w obecności wodoru sodu. W kolejnym etapie traktowałem 2-oksocyklopentakarboksylan etylu, 2-oksocykloheksakarboksylan etylu oraz 2-oksocykloheptakarboksylan etylu rezorcyną w obecności kwasu siarkowego (VI) otrzymując odpowiednie produkty kondensacji Pechmanna (**158a-158c**). Szczegółowy schemat syntezy przedstawiłem na **rysunku 56**.

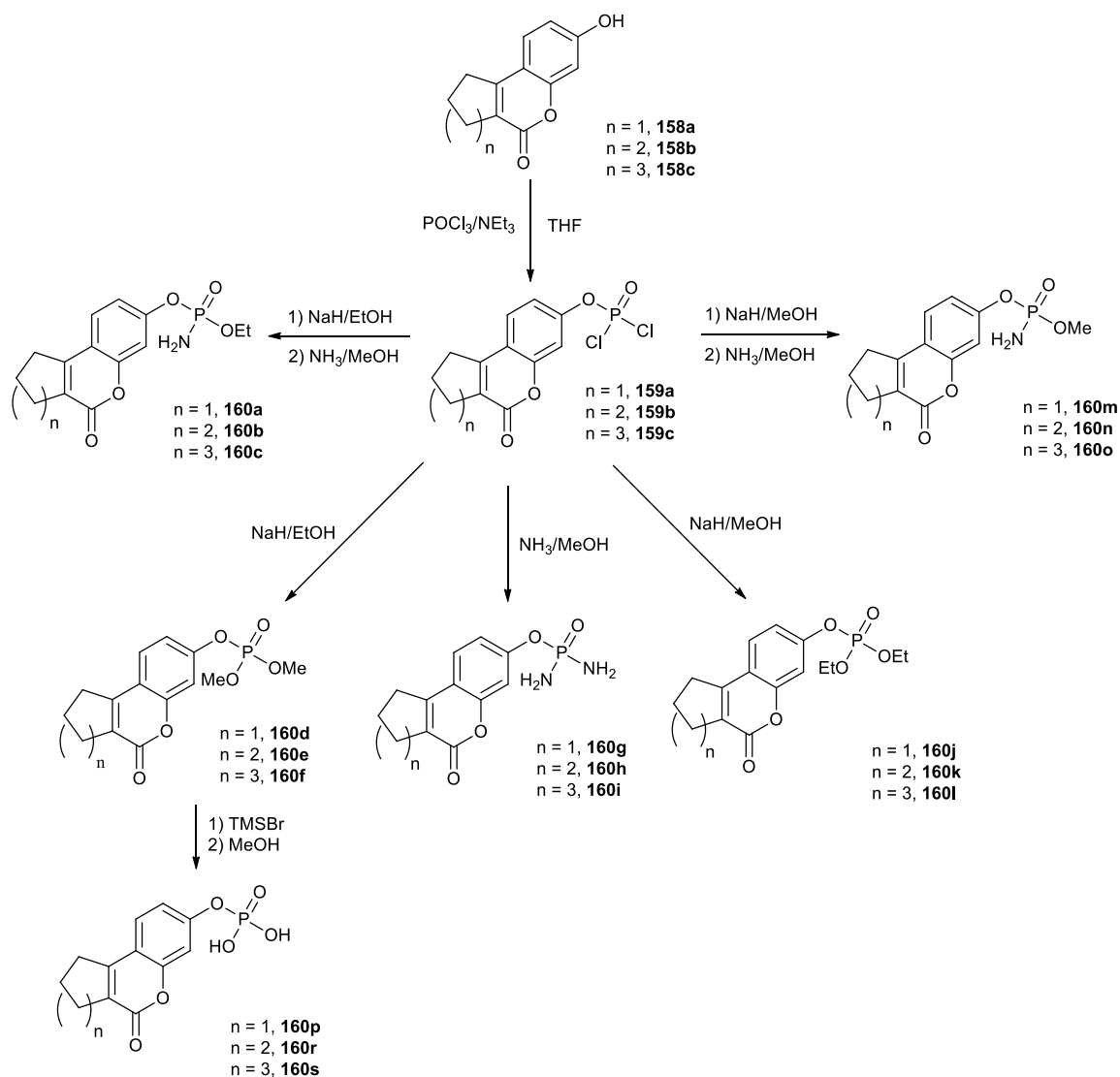


Rys. 56. Schemat syntezy 7-hydroksy-2,3-dihydrocyklopenta[*c*]chromen-4(1*H*)-onu, 3-hydroksy-7,8,9,10-tetrahydro-6*H*-benzo[*c*]chromen-6-onu i 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydrocyklohepta[*c*]chromen-6(7*H*)-onu (**158a-158c**).

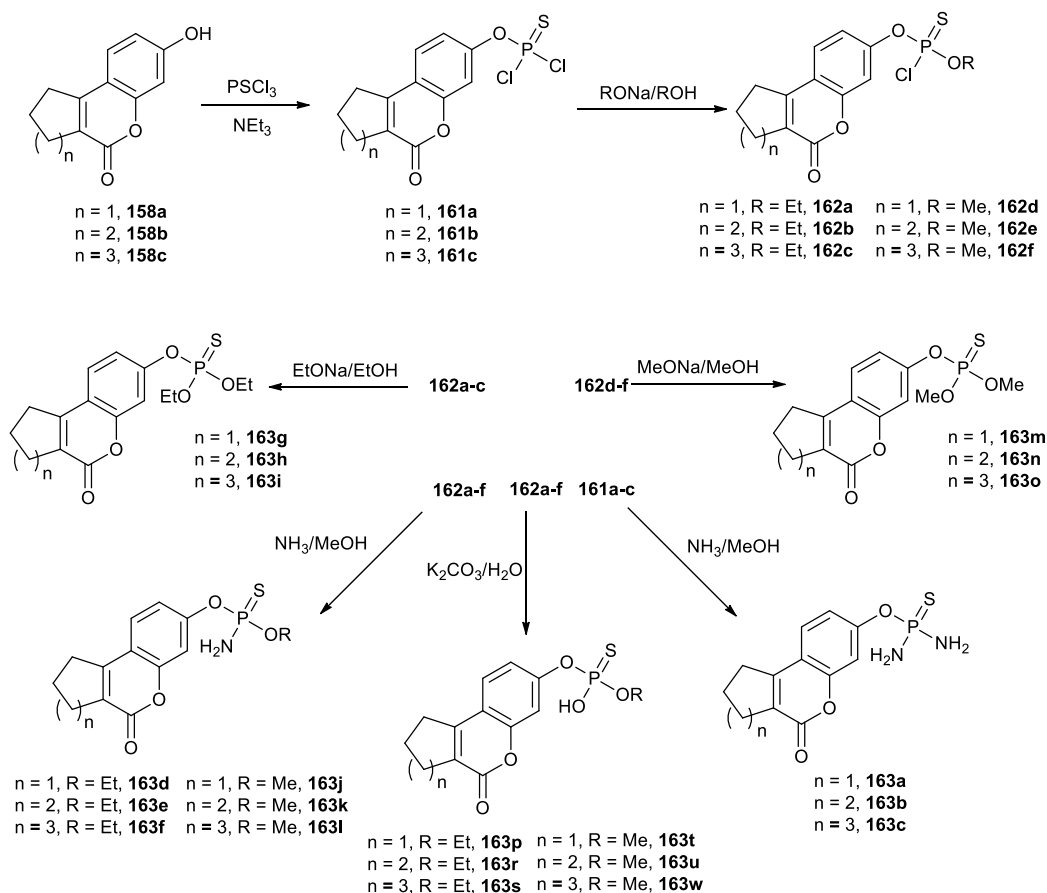
Kolejny etap syntezy obejmował funkcjonalizację grupy hydroksylowej otrzymanych tricyklicznych pochodnych kumarynowych odpowiednimi odczynnikami fosforylującymi lub tiofosforylującymi. W tym celu związki (**158a-158c**) traktowałem odpowiednio POCl_3 lub PSCl_3 w obecności trietyloaminy otrzymując *in situ* dichloropochodne (**159a-159c**) i (**161a-161c**). Następnie, po odsączeniu powstałego w wyniku reakcji chlorowodoru trietyloaminy, przesącz traktowałem roztworem amoniaku w metanolu lub roztworem odpowiedniego alkoholany sodu w alkoholu w różnych stosunkach molowych. Schematy wszystkich przeprowadzonych reakcji przedstawiłem na **rysunkach 57 i 58**. Wszystkie otrzymane przeze mnie pochodne kwasu fosforowego (**160a-160s**) oraz tiofosforowego (**162a-162w**) i (**163a-**

163f) tj.: estry, tioestry, amidy, tioamidy oraz chlorki kwasu tiofosforowego, otrzymywałem z dobrymi wydajnościami w przedziale 30-80%. Co więcej struktury tych pochodnych potwierdziłem na drodze analizy widm ^1H , ^{13}C i ^{31}P .

Synteza fosforowych i tiofosforowych pochodnych kumaryny (**Rys. 57** i **Rys. 58**) z wykorzystaniem chemii fosforu czterokoordynacyjnego zakończyła się całkowitym sukcesem. Reakcje biegły w stosunkowo krótkim czasie z zadawalającymi lub dobrymi wydajnościami i w związku z tym syntezę fosforowych i tiofosforowych pochodnych bifenyłu i tyraminy przeprowadziłem w podobny sposób.



Rys. 57. Schemat syntezy fosforowych pochodnych 7-hydroksy-2,3-dihydrocyclopenta[c]chromen-4(1H)-onu, 3-hydroksy-7,8,9,10-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-6-onu i 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydrocyclohepta[c]chromen-6(7H)-onu (**160a-160s**).

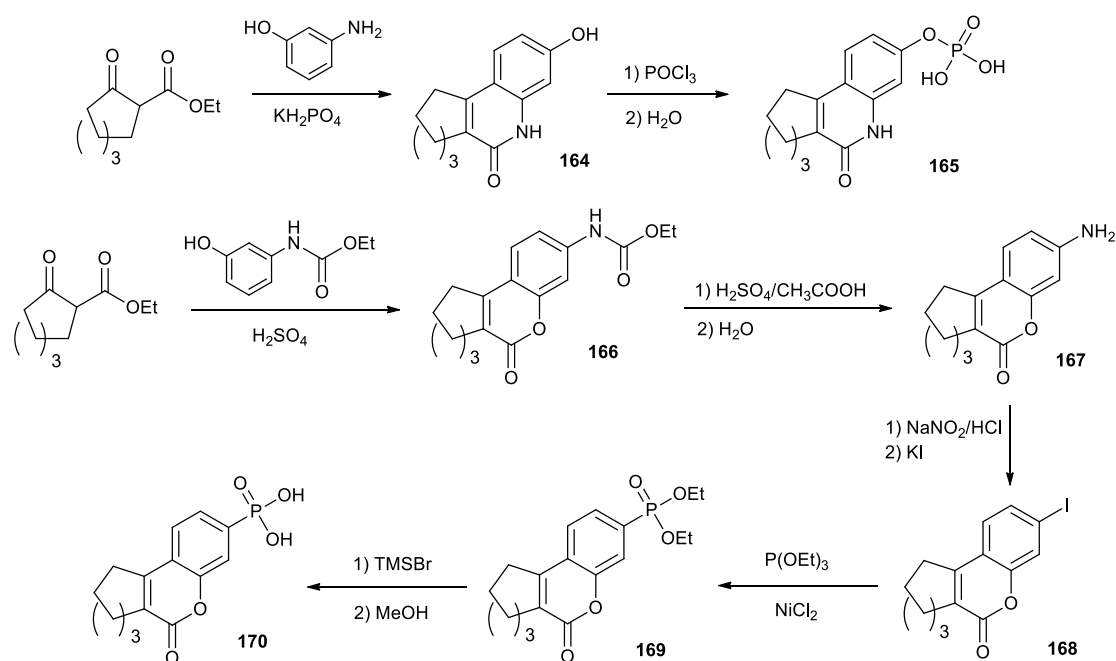


Rys. 58. Schemat syntezy tiofosforowych pochodnych 7-hydroksy-2,3-dihydrocyclopenta[c]chromen-4(1*H*)-onu, 3-hydroksy-7,8,9,10-tetrahydro-6*H*-benzo[c]chromen-6-onu i 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydrocyclohepta[c]chromen-6(7*H*)-onu (**163a-163f**) oraz (**162a-162w**).

W celu zbadania wpływu obecności ugrupowania laktamowego jak również funkcji fosfonowej w badanych modelach, na aktywność biologiczną tych związków, otrzymałem dodatkowo dwie pochodne (**165**) i (**170**). Szczegółowy schemat syntezy przedstawiłem na **rysunku 59**. Synteza wodorofosforanu 6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydro-5*H*-cyclohepta[c]chinolin-3-ylu (**165**) obejmowała dwa etapy: reakcję 2-okso-7,8,9,10,11-heksahydrocyclohepta[c]chromen-3-ylu (**164**) z 3-aminofenolem w obecności KH_2PO_4 oraz fosforylację grupy hydroksylowej otrzymanego związku (**164**). Synteza kwasu 6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyclohepta[c]chromen-3-ylfosfonowego (**170**) obejmowała kilka etapów. W pierwszym z nich *N*-chroniony aminofenol poddałem reakcji z 2-okso-7,8,9,10,11-heksahydrocyclohepta[c]chromen-3-ylu w obecności kwasu siarkowego (VI) otrzymując etylokarbaminian 6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyclohepta[c]chromen-3-ylu (**166**) z dobrą wydajnością. Deprotekcję grupy aminowej w etylokarbaminianie 6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyclohepta[c]chromen-3-ylu (**166**) prowadziłem w równomolowej mieszance

kwasu octowego i kwasu siarkowego (VI) otrzymując związek (**167**). Następnie wykorzystując reakcję Sandmeyera otrzymałem 3-jodo-8,9,10,11-tetrahydrocyklohepta[c]chromen-6(7*H*)-on (**168**) traktując związek (**167**) kwasem azotawym, a następnie jodkiem potasu. W kolejnym etapie związek (**168**) poddałem reakcji z fosforynem trietylu w obecności bezwodnego chlorku niklu otrzymując związek (**169**). Estry dietylowe kwasu fosfonowego (**169**) usuwałem przy użyciu bromku trimetylosililowego (TMSBr) otrzymując kwas 6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyklohepta[c]chromen-3-ylfosfonowy (**170**).

W tym miejscu należy dodać, że moim celem było otrzymanie konkretnych związków do badań biologicznych, a nie opracowanie efektywnej metody syntezy tych związków, dlatego też nie optymalizowałem warunków prowadzonych reakcji.



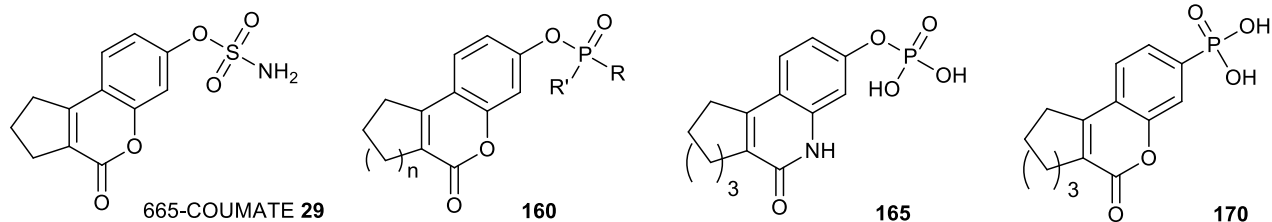
Rys. 59. Schemat syntezy laktamowej (**165**) i fosfonowej (**170**) pochodnej kumarynowej.

6.4. Wyznaczanie wartości IC_{50} fosforowych pochodnych kumarynowych

Aktywność biologiczną wszystkich otrzymanych związków względem STS określono w badaniach enzymatycznych z wykorzystaniem enzymu izolowanego z łożyska ludzkiego według metody dostępnej w literaturze [95]. Badania wykonywano w Instytucie

Biotechnologii Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego im. Jana Pawła II. Wyniki tych badań zebrałem w **tabeli 16**. Przedstawiają one rezultaty badań aktywności biologicznej otrzymanych fosforowych pochodnych tricyklicznych kumaryn (**160a-160s**).

Tabela 16. Aktywność biologiczna fosforowych pochodnych 7-hydroksy-2,3-dihydrocyklopenta[c]chromen-4(1*H*)-onu, 3-hydroksy-7,8,9,10-tetrahydro-6*H*-benzo[c]chromen-6-onu i 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydrocyklohepta[c]chromen-6(7*H*)-onu (**160a-160s**), (**165**), (**170**) oraz związku referencyjnego amidosiarczuanu 4-okso-2,3-dihydro-1*H*-cyklopenta-[c][1]benzopiranu (665-COUMATE) (**29**).



Nr	R	R'	n	IC ₅₀ [μM]	Nr	R	R'	n	IC ₅₀ [μM]
160a	OEt	NH ₂	1	81.1±7.2	160l	OEt	OEt	3	63.9±5.8
160b	OEt	NH ₂	2	111±7.6	160m	OMe	NH ₂	1	87.3±7.1
160c	OEt	NH ₂	3	108±10.1	160n	OMe	NH ₂	2	73.3±6.0
160d	OMe	OMe	1	74.7±6.2	160o	OMe	NH ₂	3	159±19.4
160e	OMe	OMe	2	98.4±7.0	160p	OH	OH	1	36.4±3.2
160f	OMe	OMe	3	47.5±4.1	160r	OH	OH	2	37.8±2.8
160g	NH ₂	NH ₂	1	87.8±7.7	160s	OH	OH	3	21.5±3.2
160h	NH ₂	NH ₂	2	110±8.4	165	-	-	-	79.2±8.2
160i	NH ₂	NH ₂	3	52.5±4.5	170	-	-	-	76.5±7.9
160j	OEt	OEt	1	73.0±5.2	29	-	-	-	1.01±0.3
160k	OEt	OEt	2	92.5±6.4					

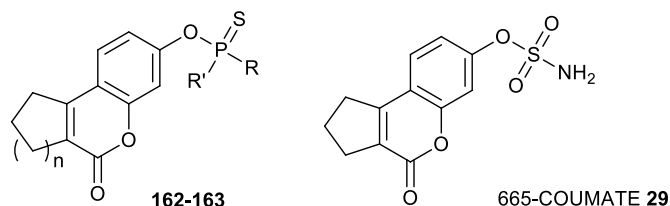
Oznaczone wartości IC_{50} , przedstawione w **tabeli 16** pokazują, że pochodne o najwyższych aktywnościach biologicznych zawierały w swojej strukturze hydrofobowy, siedmioczłonowy pierścień. Korelacja ta jest zauważalna dla prawie wszystkich otrzymanych związków. Związki (**160p**), (**160r**) i (**160s**) wykazywały najlepsze właściwości inhibicyjne. Ich wartości IC_{50} wynosiły odpowiednio 36.4, 37.8 i 21.5 μM (IC_{50} dla związku referencyjnego 665-COUMATE – 1.01 μM) (**29**). Związek (**170**) zawierający w swojej strukturze grupę fosfonową wykazywał dużo słabsze właściwości inhibicyjne w stosunku do (**160s**), co sugeruje, że dominującym mechanizmem inhibicji STS jest fosforylacja FGly75 w miejscu aktywnym enzymu, a aniony 7-hydroksy-2,3-dihydrocyklopenta[c]chromen-4(1*H*)-onu, 3-hydroksy-7,8,9,10-tetrahydro-6*H*-benzo[c]chromen-6-onu i 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydrocyklohepta[c]chromen-6(7*H*)-onu jako słabe zasady stanowią dobrą grupę opuszczającą w reakcji substytucji nukleofilowej na atomie fosforu.

Na uwagę zasługuje fakt, że wyniki badań biologicznych są w dobrej korelacji z wynikami modelowania molekularnego (**Tabela 16 vs 13**).

6.5. Wyznaczanie wartości IC_{50} tiofosforowych pochodnych kumarynowych

Zachęcony dobrymi wynikami badań enzymatycznych związków (**160a-160s**), postanowiłem sprawdzić czy zastąpienie ugrupowania fosforowego tiofosforowym w strukturze inhibitorów efektywnie wpłynie na poprawę ich aktywności biologicznej (**Tabela 17**).

Tabela 17. Aktywność biologiczna tiofosforowych pochodnych 7-hydroksy-2,3-dihydrocyklopenta[c]chromen-4(1*H*)-onu, 3-hydroksy-7,8,9,10-tetrahydro-6*H*-benzo[c]chromen-6-onu i 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydrocyklohepta[c]chromen-6(7*H*)-onu (**163a-163f**), (**162a-162w**) oraz związku referencyjnego (665-COUMATE) (**29**).



Nr	R	R'	n	IC ₅₀ [μM]	Nr	R	R'	n	IC ₅₀ [μM]
163a	OEt	Cl	1	57.8±4.6	162i	OEt	OEt	3	45.9±4.4
163b	OEt	Cl	2	44.3±3.7	162j	OMe	NH ₂	1	69.5±5.2
163c	OEt	Cl	3	32.9±3.0	162k	OMe	NH ₂	2	74.3±5.4
163d	OMe	Cl	1	61.8±5.3	162l	OMe	NH ₂	3	78.3±6.1
163e	OMe	Cl	2	34.9±3.4	162m	OMe	OMe	1	56.8±4.4
163f	OMe	Cl	3	13.3±1.5	162n	OMe	OMe	2	65.4±4.9
162a	NH ₂	NH ₂	1	65.8±5.2	162o	OMe	OMe	3	42.5±4.5
162b	NH ₂	NH ₂	2	75.9±6.1	162p	OEt	OH	1	161.1±9.4
162c	NH ₂	NH ₂	3	142±9.1	162r	OEt	OH	2	58.2±4.8
162d	OEt	NH ₂	1	68.4±5.4	162s	OEt	OH	3	38.3±3.2
162e	OEt	NH ₂	2	91.6±6.7	162t	OMe	OH	1	224.9±20.1
162f	OEt	NH ₂	3	98.0±7.7	162u	OMe	OH	2	58.7±4.3
162g	OEt	OEt	1	70.2±5.7	162w	OMe	OH	3	30.3±2.9
162h	OEt	OEt	2	73.9±5.2	29	-	-	-	1.01±0.3



W tym celu aktywność biologiczną otrzymanych przeze mnie związków (**162-163**) względem STS określono w badaniach enzymatycznych analogicznie do testów przeprowadzonych dla związków (**160**). Wyniki tych badań zebrałem w **tabeli 17**.

Na podstawie danych prezentowanych w **tabeli 17** można powiedzieć, że spośród tiofosforowych analogów kumaryny, najlepszymi okazały się być (**163f**) i (**162w**). Ich wartości IC_{50} wyniosły odpowiednio 13.3 i 30.3 μM (IC_{50} dla związku referencyjnego (**29**) – 1.01 μM). W toku prowadzonych badań stwierdziłem, że pochodne monochlorkowe (**163a-163f**) są stabilne przez wiele godzin w układzie THF/H₂O. Sugeruje to, że pochodna (**162w**), w warunkach badań aktywności biologicznej z wykorzystaniem enzymu, nie ulega hydrolizie lub ulega jej w małym stopniu, czego dowodem jest najwyższa aktywność (**163f**) w badanych warunkach. Podobnie jak w przypadku fosforowych analogów tricyklicznej pochodnej kumaryny, najlepszą aktywność biologiczną wykazują związki zawierające w swojej konstytucji hydrofobowy, siedmioczłonowy alifatyczny pierścień. Ponadto można zaobserwować, że w każdym przypadku związki zawierające podstawniki –OMe na atomie fosforu są efektywniejsze aniżeli związki z –OEt, co może wskazywać na lepsze dopasowanie tych struktur w miejscu aktywnym STS (pochodna **162h** vs **162m**). Na podstawie otrzymanych wyników można również stwierdzić, że wprowadzenie do związku grupy –NH₂ powoduje spadek jego aktywności biologicznej (pochodna **162f** vs **162l**).

Podsumowując wyniki, które przedstawiłem w **Tabelach 16 i 17** stwierdzam, że we wszystkich przypadkach tiofosforowe pochodne tricyklicznej kumaryny (**162-163**) wykazywały wyższą aktywność biologiczną w stosunku do STS od ich fosforowych analogów (**160**). W niektórych przypadkach ich aktywność była nawet dwukrotnie wyższa.

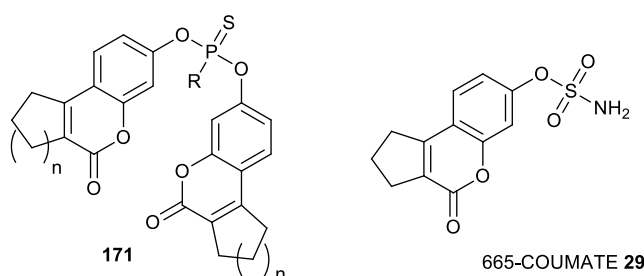
W tym miejscu pragnę dodać, że pomimo negatywnych wyników modelowania molekularnego dla niektórych związków (**Tabela 13 i 15**), przeprowadziłem ich syntezę i poddałem badaniom aktywności biologicznej. Warto zwrócić uwagę na fakt, że znacznie gorsze wyniki modelowania molekularnego tiofosforowych pochodnych kumarynowych, w stosunku do ich fosforowych odpowiedników (**Tabela 13 vs 15**), nie znajdują odzwierciedlenia w rezultatach badań biologicznych, które kształtują się zupełnie odwrotnie (**Tabela 16 vs 17**). Sytuacja ta jednoznacznie pokazuje, że do wyników badań modelowania molekularnego nie można podchodzić bezkrytycznie.

7. Projektowanie, otrzymywanie oraz badania biologiczne tiofosforowych pochodnych bikumarynowych

7.1. Modelowanie molekularne

W kolejnym etapie badań postanowiłem sprawdzić jak w warunkach modelowania molekularnego będą zachowywały się bikumarynowe pochodne kwasów tiofosforowych w stosunku do STS (**Tabela 18**).

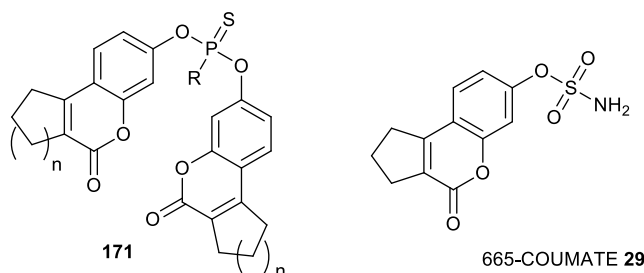
Tabela 18. Struktury modelowe wybrane do dokowania molekularnego.



Nr	R	n	Nr	R	n
171a	Cl	1	171g	OH	1
171b	Cl	2	171h	OH	2
171c	Cl	3	171i	OH	3
171d	OMe	1	171j	NH ₂	1
171e	OMe	2	171k	NH ₂	2
171f	OMe	3	171l	NH ₂	3

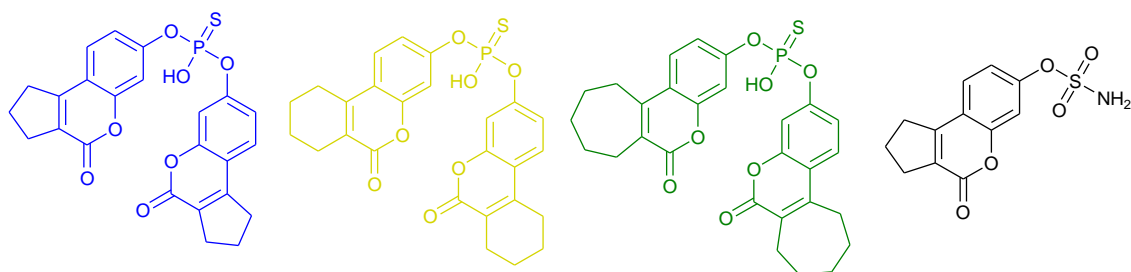
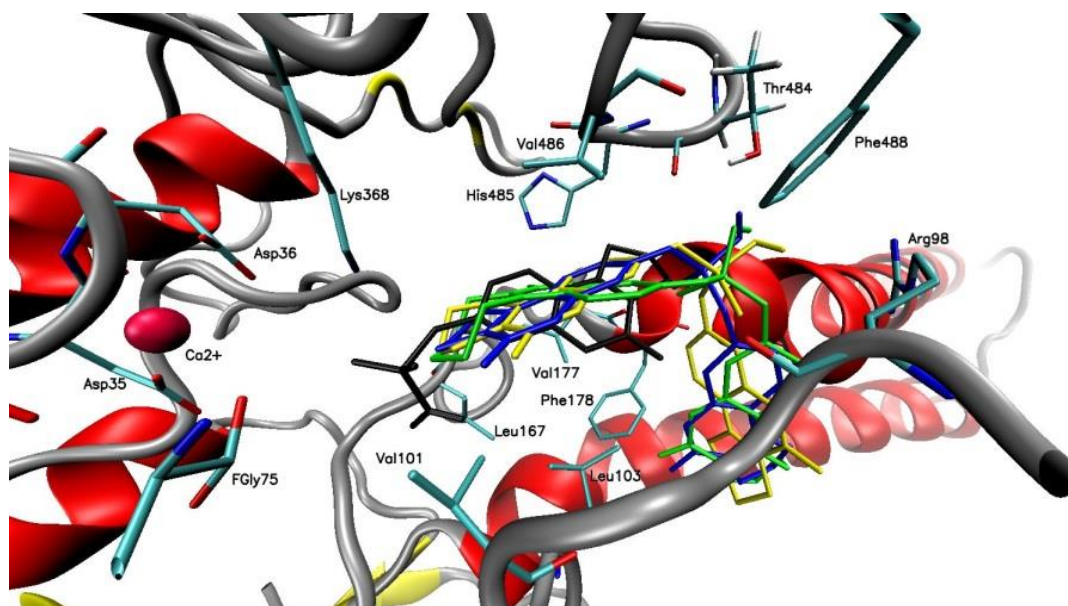
Wyniki badań modelowania molekularnego pokazują, że wartości energii swobodnych wiązania kompleksów inhibitor-enzym były najniższe w przypadku pochodnych chlorotiofosforanowych (**171a-171c**) oraz wodorotiofosforanowych (**171g-171i**) i zawierały się w przedziale -5.2 do -8.1 kcal/mol (**Tabela 19**).

Tabela 19. Wartości energii swobodnych wiązania inhibitor-enzym dla tiofosforowych diestrów 7-hydroksy-2,3-dihydrocyklopenta[c]chromen-4(1*H*)-onu, 3-hydroksy-7,8,9,10-tetrahydro-6*H*-benzo[c]chromen-6-onu i 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydrocyklohepta[c]chromen-6(7*H*)-onu (**171a-171l**).



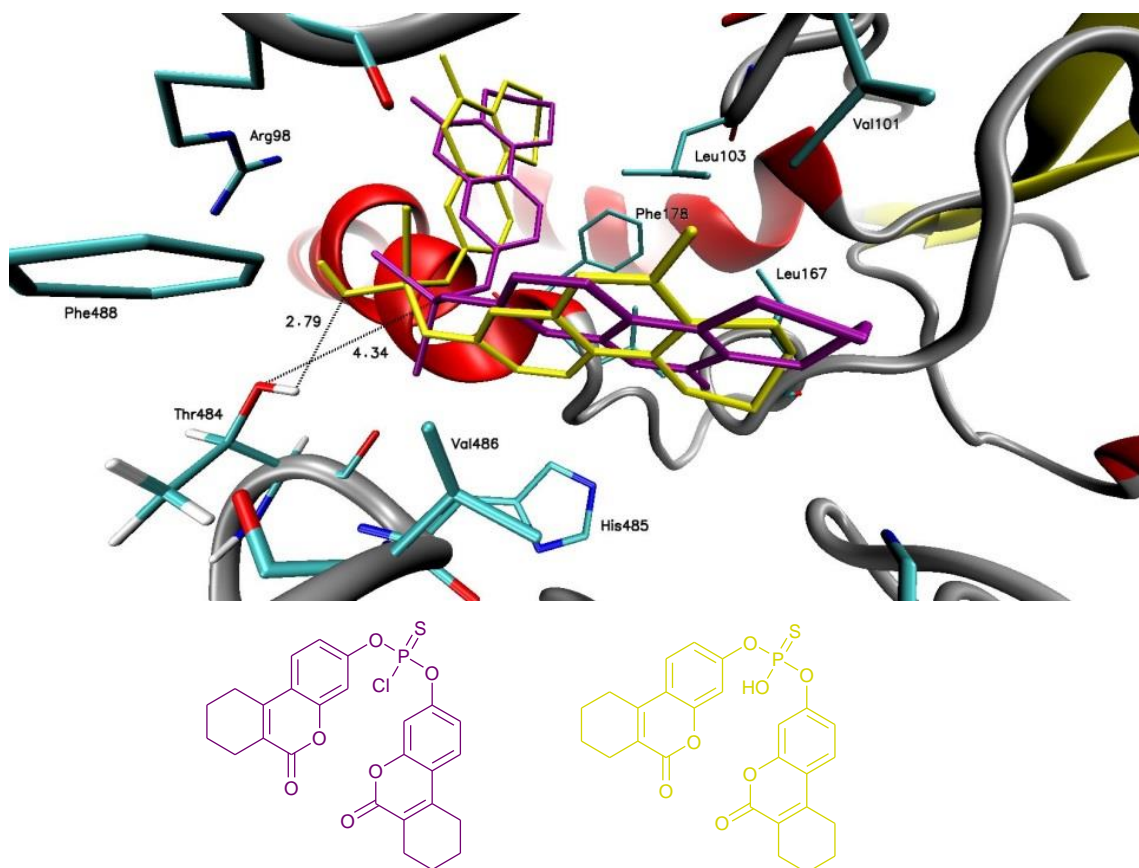
Nr	R	n	Swobodna energia wiązania [kcal/mol]	Nr	R	n	Swobodna energia wiązania [kcal/mol]
171a	Cl	1	-5.2	171h	OH	2	-8.1
171b	Cl	2	-6.2	171i	OH	3	-6.0
171c	Cl	3	-7.2	171j	NH ₂	1	-6.2
171d	OMe	1	-4.3	171k	NH ₂	2	-5.2
171e	OMe	2	-4.8	171l	NH ₂	3	-2.5
171f	OMe	3	-6.5	29	-	-	-5.1
171g	OH	1	-6.7				

Na **rysunku 60** przedstawiłem miejsce aktywne enzymu wraz z trzema najkorzystniejszymi ułożeniami wodorotiofosforanów bikumarynowych (**171g-171i**). Zaprojektowane inhibitory STS wykazują odmienny sposób dokowania w porównaniu z inhibitorami amidosiarczanowymi opisywanymi w literaturze (665-COUMATE) (**29**).



Rys. 60. Wizualizacja wyników dokowania związków (**171g**) (niebieski), (**171h**) (żółty), (**171i**) (zielony) i 665-COUMATE (**29**) (czarny) w miejscu aktywnym STS.

W tym przypadku jeden z kumarynowych fragmentów związku skierowany jest do środka miejsca aktywnego i ulega niepolarnym oddziaływaniom z hydrofobowymi resztami aminokwasowymi Arg98, Val101, Leu103, Leu167, Val177, Phe178, His485, Val486 i Phe488. Pozostała część bikumarynowego szkieletu ułożona jest natomiast na zewnątrz miejsca katalicznego enzymu. Badania z zakresu modelowania molekularnego wykazały najwyższy potencjał inhibicyjny dla pochodnych z sześcioczłonowym hydrofobowym pierścieniem alifatycznym (wartość energii wiązania kompleksu inhibitor-enzym dla (**171h**) wyniosła -8.1 kcal/mol). Badanie wpływu struktury pochodnych bikumarynowych na ich aktywność wykazało, że reszty tiofosforowe związków (**171g-171i**) skierowane były w stronę Thr484, z którą poprzez grupę hydroksylową obecną w ich strukturze mogą tworzyć wiązania wodorowe (**Rys. 61**).



Rys. 61. Odległość atomu fosforu związku (**171b**) (fioletowy) od reszty Thr484 oraz przewidywane wiązanie wodorowe pomiędzy Thr484, a analogiem (**171h**) (żółty).

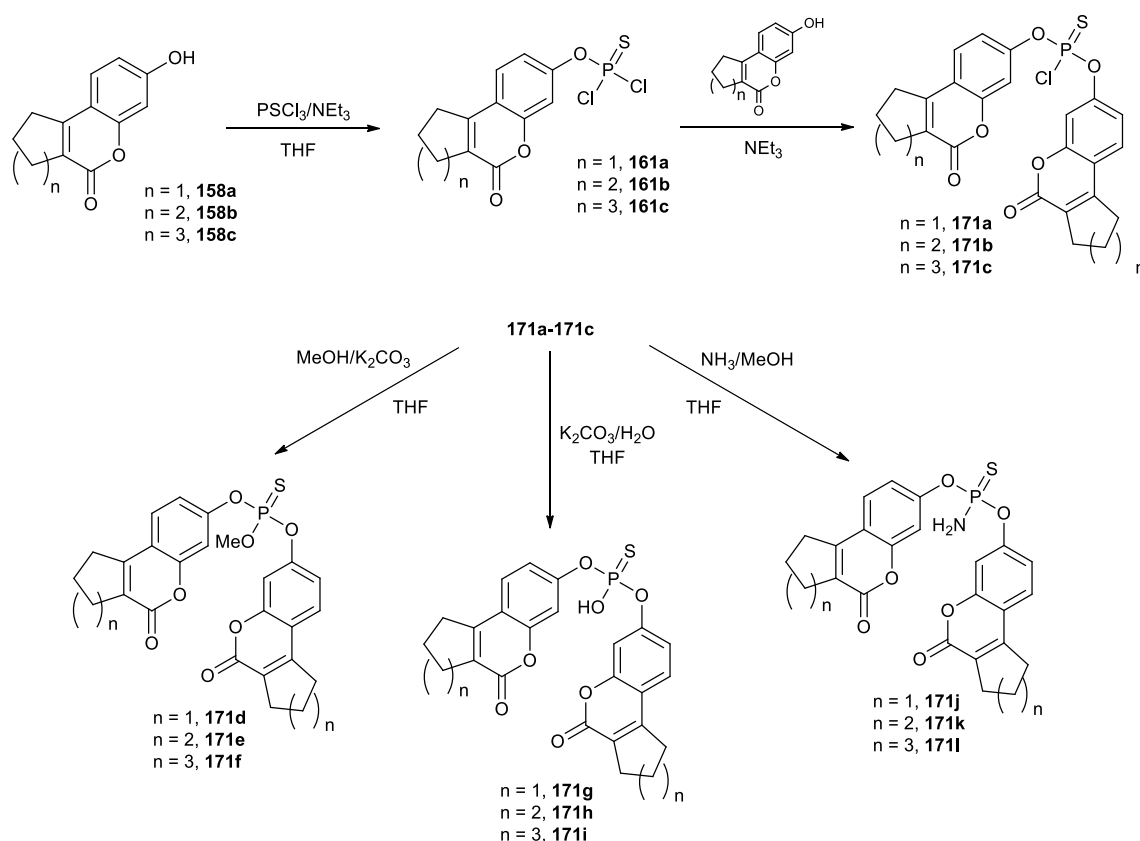
Oddziaływanie to może mieć kluczowy wpływ na efektywność wiązania i stabilność kompleksu inhibitor-enzym. Ponadto ułożenie reszt tiofosforowych w związkach (**171a-171c**) i ich odległości od grupy hydroksylowej Thr484 sugerują, że substytucja nukleofilowa na atomie fosforu może odgrywać decydującą rolę w mechanizmie dezaktywacji enzymu.

7.2. Synteza tiofosforowych pochodnych bikumarynowych

Zachęcony obiecującymi wynikami badań z zakresu modelowania molekularnego postanowiłem zweryfikować te wyniki na drodze eksperymentu. W tym celu przeprowadziłem syntezę tiofosforowych pochodnych bikumaryn (**171a-171l**). Pochodne kumaryny (**158a-158c**) traktowałem PSCl_3 w obecności trietyloaminy otrzymując dichloropochodne (**161a-161c**). Na tym etapie syntezy okazało się, że związki te są trwałe i możliwe jest ich oczyszczenie z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej. W kolejnym etapie oczyszczone dichloropochodne (**161a-161c**) traktowałem

kolejnym ekwiwalentem odpowiedniego analogu tricyklicznej pochodnej kumaryny w obecności NEt_3 w bezwodnym THF, otrzymując związki (**171a-171c**). Związki te poddawałem następnie reakcji z metanolem w obecności K_2CO_3 , wodnym roztworem K_2CO_3 lub roztworem $\text{NH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, otrzymując odpowiednio: tioestry metylowe (**171d-171f**), wodorotiofosforany (**171g-171i**) oraz tioamidy (**171j-171l**). Strukturę tak otrzymanych związków potwierdziłem na drodze analizy widm ^1H , ^{13}C , ^{31}P . Wydajności związków (**171a-171l**) otrzymywane według wyżej opisanej procedury zawierały się w przedziale 35-65%. Schematy wszystkich przeprowadzonych reakcji przedstawiłem na **rysunku 62**.

Podobnie jak w przypadku fosforowych i tiofosforowych pochodnych kumarynowych (**160**), (**162**) i (**163**) nie optymalizowałem warunków prowadzonych reakcji. Moim celem było otrzymanie czystych związków do badań biologicznych.

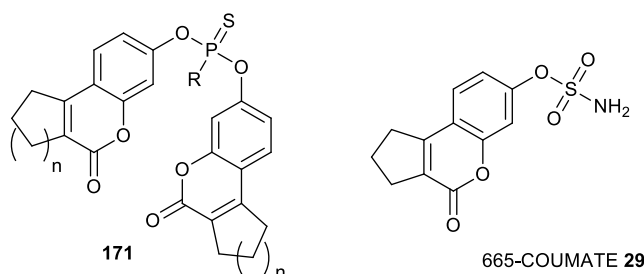


Rys. 62. Otrzymywanie tiofosforowych diestrów 7-hydroksy-2,3-dihydrocyklopenta[*c*]chromen-4(1*H*)-onu, 3-hydroksy-7,8,9,10-tetrahydro-6*H*-benzo[*c*]chromen-6-onu i 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydrocyklohepta[*c*]chromen-6(7*H*)-onu (**171a-171l**).

7.3. Wyznaczanie wartości IC_{50} tiofosforowych pochodnych bikumarynowych

Aktywność biologiczną otrzymanych przez mnie związków (**171**) względem STS określono w warunkach opisanych w badaniach enzymatycznych analogicznie do testów przeprowadzonych dla pochodnych (**160**), (**162**) oraz (**163**). Wyniki tych badań zebrałem w tabeli 20.

Tabela 20. Aktywność biologiczna tiofosforowych diestrów 7-hydroksy-2,3-dihydrocyklopenta[c]chromen-4(1*H*)-onu, 3-hydroksy-7,8,9,10-tetrahydro-6*H*-benzo[c]chromen-6-onu i 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydrocyklohepta[c]chromen-6(7*H*)-onu (**171a-171l**).



Nr	R	n	IC_{50} [μ M]	Nr	R	n	IC_{50} [μ M]
171a	Cl	1	33.8±4.6	171h	OH	2	0.86±0.1
171b	Cl	2	7.8±0.6	171i	OH	3	5.5±0.5
171c	Cl	3	7.0±0.7	171j	NH ₂	1	74.3±6.0
171d	OMe	1	75.0±6.8	171k	NH ₂	2	110±9.4
171e	OMe	2	14.8±1.6	171l	NH ₂	3	88.8±7.3
171f	OMe	3	6.8±0.7	29	-	-	1.01±0.3
171g	OH	1	26.9±3.4				

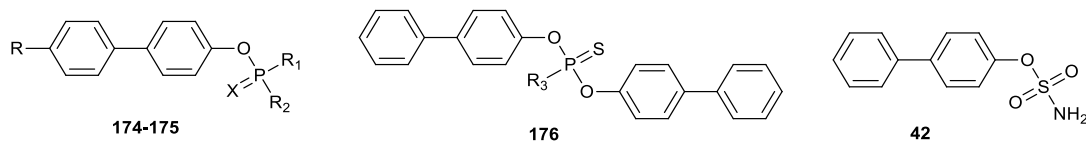
Na podstawie danych prezentowanych w tabeli 20 można powiedzieć, że otrzymane tiofosforowe pochodne bikumaryny (**171a-171l**) odznaczały się dobrymi właściwościami inhibicyjnymi względem STS, wśród których najlepszym związkiem okazał się być wodorotiofosforan-3-hydroksy-7,8,9,10-tetrahydro-6*H*-benzo[c]chromen-6-onu (**171h**) (IC_{50} = 860 nM) przy wartości IC_{50} dla związku referencyjnego w tym teście wynoszącym 1.01 μ M. Jego wysoka aktywność biologiczna, w porównaniu ze związkiem referencyjnym, może wynikać z możliwości tworzenia wiązania wodorowego pomiędzy tlenem grupy hydroksylowej inhibitora, a protonem grupy hydroksylowej Thr484, o czym wspominałem w rozdziale 7.1 – dotyczącym modelowania molekularnego tiofosforowych pochodnych bikumarynowych.

8. Projektowanie, otrzymywanie oraz badania biologiczne fosforowych i tiofosforowych pochodnych bifenyli

Bifenyl jest węglowodorem aromatycznym występującym naturalnie w smołe pogazowej, oleju mineralnym oraz gazie ziemnym. Powstaje w wyniku niecałkowitego spalania gazu ziemnego i węgla. Pochodne bifenyli były szeroko stosowane w syntezie pestycydów w tym polichlorowanych bifenyli. W oparciu o szkielet bifenyliowy otrzymano w ostatnich latach szereg związków o charakterze terapeutycznym, wykazujących działanie hipotensyjne [96], moczopędne [97], przeciwzapalne [98], przeciwpsychotyczne i przeciwlękowe [99] oraz przeciwbakteryjne [100]. Ponadto w oparciu o szkielet bifenyli otrzymano serię siarkowych, potencjalnych inhibitorów STS. Związki te następnie poddano badaniu aktywności biologicznej. Uzyskane wartości IC_{50} dla tej serii związków zawierały się w przedziale (6.7-76 μM) [30] (patrz: **Tabela 5**, str. 14).

Zachęcony wynikami badań biologicznych fosforowych i tiofosforowych pochodnych kumaryny (opisanych w poprzednim rozdziale) oraz wyżej wymienionymi danymi literaturowymi, postanowiłem wykorzystać szkielet bifenyliowy do zaprojektowania, syntezy oraz zbadania czynności biologicznej nowych fosforowych i tiofosforowych pochodnych bifenyli jako potencjalnych inhibitorów STS. Do tych badań wybrałem modele fosforowych i tiofosforowych pochodnych opartych o szkielet 4-fenylofenolu (**174**) oraz kwasu (*p*-hydroksyfenylo)benzoesowego (**175-176**) oraz jako związek referencyjny amidosiarczan 4-fenylofenolu (**42**) o udowodnionych właściwościach inhibicyjnych w stosunku do STS (**Tabela 21**).

Tabela 21. Struktury modelowe wybrane do dokowania molekularnego.



Nr	R	R ₁	R ₂	X	Nr	R	R ₁	R ₂	R ₃	X
174a	H	OMe	NH ₂	O	174d'	COOEt	OEt	NH ₂	-	S
174b	COOEt	OMe	NH ₂	O	174e'	H	OMe	OMe	-	S
174c	H	OEt	NH ₂	O	174f'	COOEt	OMe	OMe	-	S
174d	COOEt	OEt	NH ₂	O	174g'	H	OEt	OEt	-	S
174e	H	OMe	OMe	O	174h'	COOEt	OEt	OEt	-	S
174f	COOEt	OMe	OMe	O	174i'	H	NH ₂	NH ₂	-	S
174g	H	OEt	OEt	O	174j'	COOEt	NH ₂	NH ₂	-	S
174h	COOEt	OEt	OEt	O	175a'	H	OMe	Cl	-	S
174i	H	NH ₂	NH ₂	O	175b'	COOEt	OMe	Cl	-	S
174j	COOEt	NH ₂	NH ₂	O	175c'	H	OEt	Cl	-	S
174k	H	OH	OH	O	175d'	COOEt	OEt	Cl	-	S
174l	COOEt	OH	OH	O	176a	-	-	-	Cl	-
174a'	H	OMe	NH ₂	S	176b	-	-	-	OMe	-
174b'	COOEt	OMe	NH ₂	S	176c	-	-	-	NH ₂	-
174c'	H	OEt	NH ₂	S	176d	-	-	-	OH	-

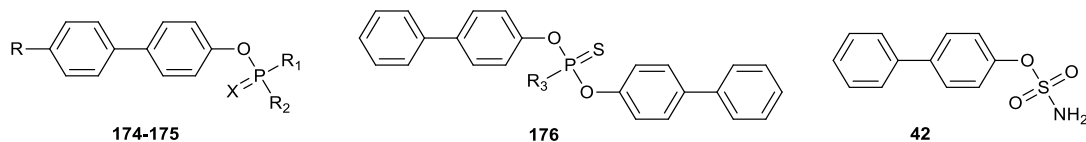
8.1. Modelowanie molekularne fosforowych i tiofosforowych pochodnych bifenyłu

Struktury chemiczne związków przygotowałem w programie *Portable HyperChem 8.0.7* (Hypercube Incorporation), a do stanu minimum energetycznego doprowadziłem je przy użyciu pola siłowego MM+ i nieliniowego gradientu sprzężonego Polaka-Ribieré'a. Dokowanie przygotowanych ligandów do struktury STS przeprowadziłem z użyciem programu *Autodock Vina 1.1.2* (Molecular Graphic Laboratory, Scripps Research Institute).

Nowo zaprojektowane związki wiązały się teoretycznie w miejscu aktywnym STS. Dokowania pochodnych (**174a-174l**), (**174a'-174j'**) oraz (**175a'-175d'**) do miejsca aktywnego STS pokazały, że mogą one przyjmować ułożenia podobne do naturalnego substratu enzymu tj. siarczanu estronu oraz do związku referencyjnego (amidosiarczanu 4-fenylofenolu) (**42**) (**Rys. 63**).

Funkcje fosforowe i tiofosforowe badanych związków skierowane były w stronę katalitycznego obszaru STS. Związkami, dla których wartości energii wiązania kompleksu inhibitor-enzym były najniższe okazały się estry dibifenyłowe kwasu tiofosforowego (**176a-176d**). Pochodne te wykazywały inny sposób dokowania do miejsca aktywnego enzymu co poskutkowało uzyskaniem niższych wartości energii wiązania (od -7.1 do -8.0 kcal/mol) (**Tabela 22**).

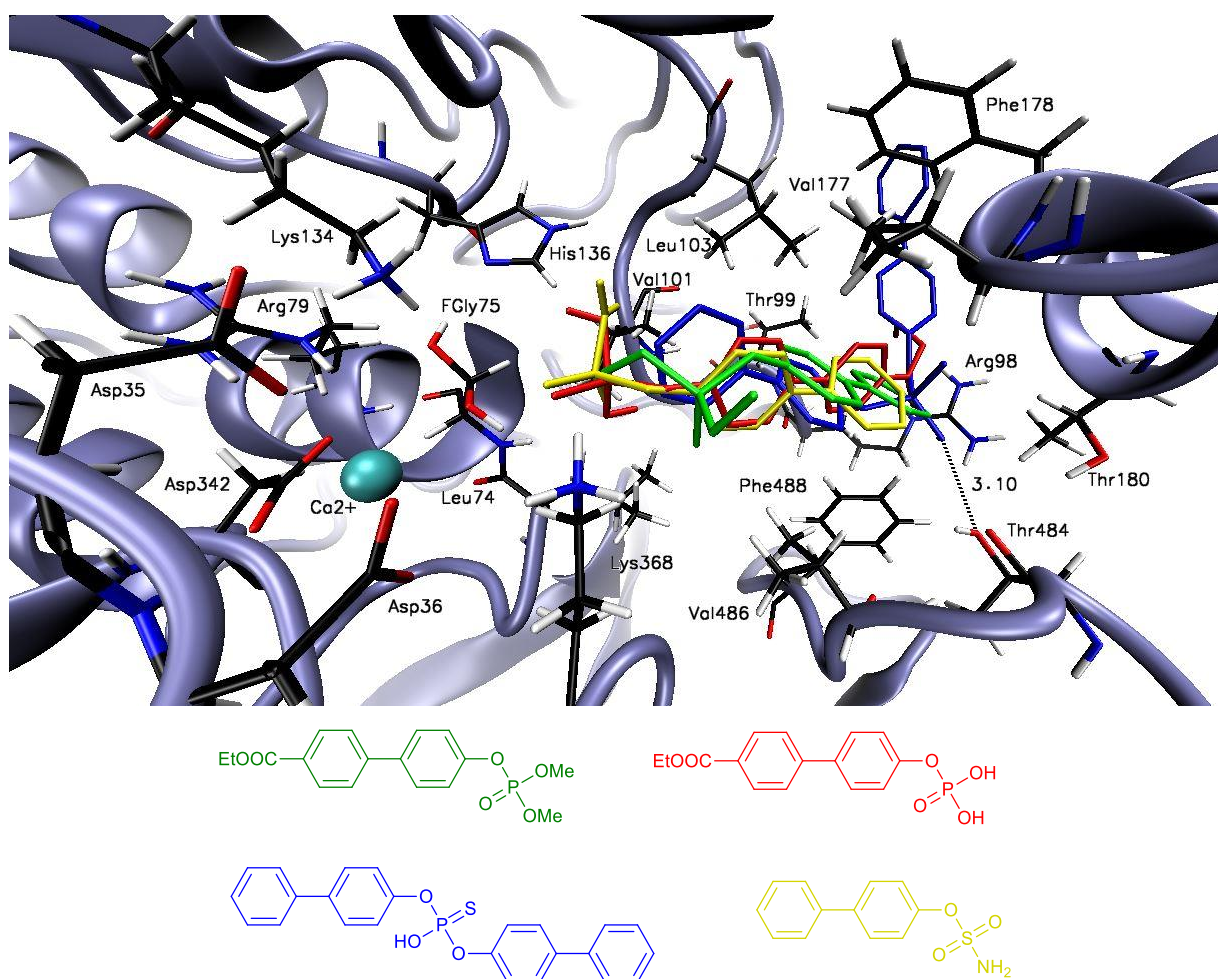
Tabela 22. Wartości energii swobodnych wiązania inhibitor-enzym dla fosforowych i tiofosforowych pochodnych bifenyli.



Nr	R	R ₁	R ₂	X	Swobodna energia wiązania [kcal/mol]	Nr	R	R ₁	R ₂	R ₃	X	Swobodna energia wiązania [kcal/mol]
174a	H	OMe	NH ₂	O	-4.0	174e'	H	OMe	OMe	-	S	2.3
174b	COOEt	OMe	NH ₂	O	-4.6	174f'	COOEt	OMe	OMe	-	S	-
174c	H	OEt	NH ₂	O	-3.3	174g'	H	OEt	OEt	-	S	-
174d	COOEt	OEt	NH ₂	O	-	174h'	COOEt	OEt	OEt	-	S	-
174e	H	OMe	OMe	O	-0.9	174i'	H	NH ₂	NH ₂	-	S	-1.4
174f	COOEt	OMe	OMe	O	-3.5	174j'	COOEt	NH ₂	NH ₂	-	S	-2.3
174g	H	OEt	OEt	O	-	175a'	H	OMe	Cl	-	S	0.6
174h	COOEt	OEt	OEt	O	-	175b'	COOEt	OMe	Cl	-	S	-0.6
174i	H	NH ₂	NH ₂	O	-2.3	175c'	H	OEt	Cl	-	S	-0.1
174j	COOEt	NH ₂	NH ₂	O	-4.9	175d'	COOEt	OEt	Cl	-	S	1.6
174k	H	OH	OH	O	-4.6	176a	-	-	-	Cl	-	-7.5
174l	COOEt	OH	OH	O	-5.1	176b	-	-	-	OMe	-	-7.1
174a'	H	OMe	NH ₂	S	0.5	176c	-	-	-	NH ₂	-	-7.3
174b'	COOEt	OMe	NH ₂	S	-1.7	176d	-	-	-	OH	-	-8.0
174c'	H	OEt	NH ₂	S	-	42						-5.2
174d'	COOEt	OEt	NH ₂	S	-							



Na uwagę zasługuje fakt, że sposób dokowania tych związków był podobny do sposobu dokowania pochodnych bikumaryny (**171a-171l**) (patrz: rozdział 7.1, str. 70). W badanych modelach jedna z reszt bifenylowych znajdowała się w centrum miejsca aktywnego enzymu i ulegała niepolarnym oddziaływaniom z resztami aminokwasowymi tworzącymi hydrofobową kieszeń (Leu74, Arg98, Arg99, Val101, Leu103, Val177, Phe178, Thr180, Thr484, Val486 i Phe488). Druga z reszt bifenylowych była zlokalizowana na zewnątrz miejsca aktywnego STS. Dla związku (**176d**) krótki dystans grupy OH do Thr484 (3.10 Å) zapewnia stabilizację w miejscu aktywnym przez tworzenie wiązań wodorowych co może mieć znaczący wpływ na inhibicję enzymu.

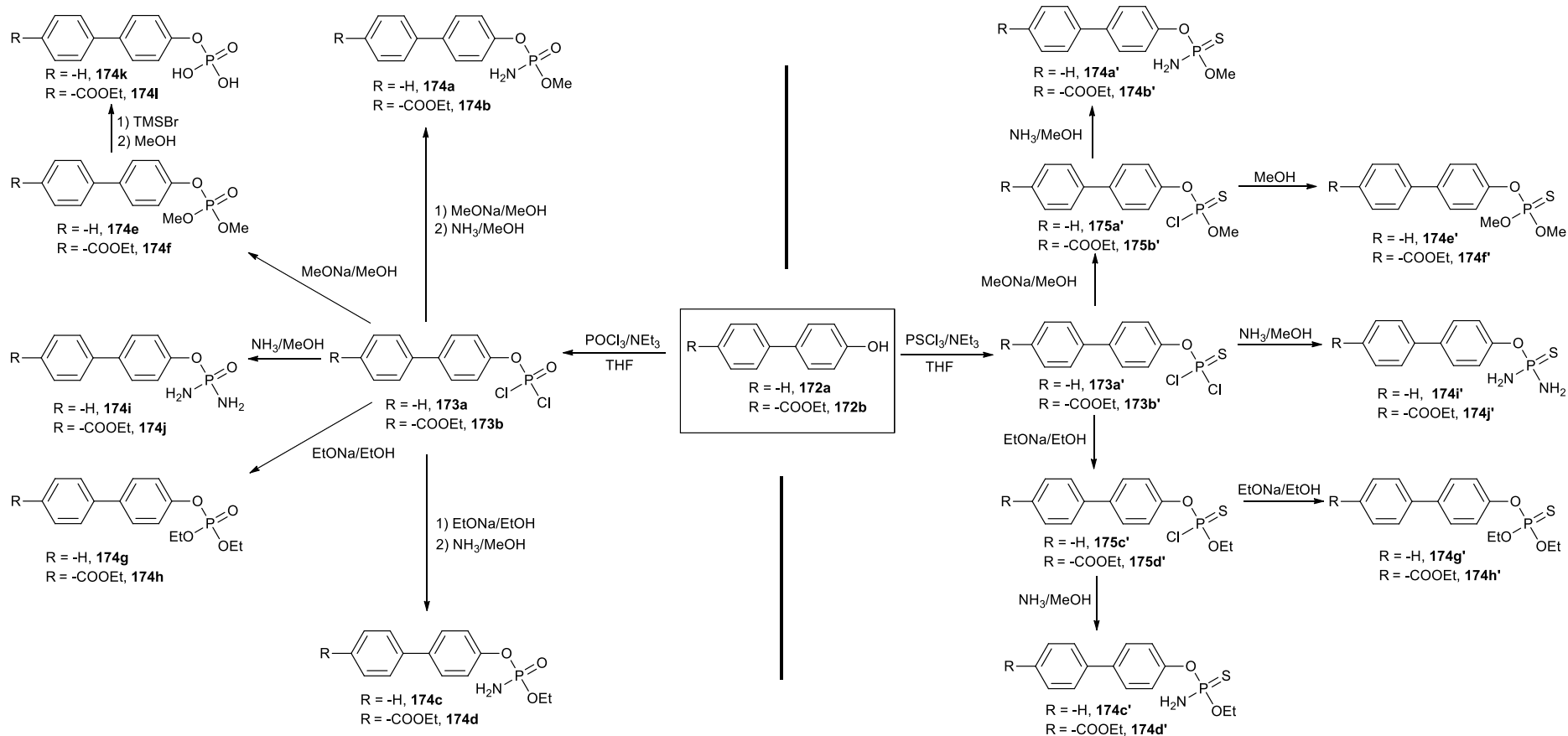


Rys. 63. Wizualizacja wyników dokowania inhibitorów do miejsca aktywnego STS. (**174f**) (zielony), (**174l**) (czerwony), (**176d**) (niebieski), amidosiarczan bifenył-4-ylu (**42**) (żółty).

8.2. Synteza fosforowych i tiofosforowych pochodnych bifenyli

W celu eksperymentalnej weryfikacji wyników, uzyskanych na drodze modelowania molekularnego, przeprowadziłem syntezę związków (**174-176**) oraz (**42**) (**Rys. 64**).

Pochodne bifenyli można otrzymać różnymi metodami takimi jak: reakcje sprzęgania Hiyamy [101], Hiyamy-Denmarka [102], Kumady [103], Negishiego [104], Suzukiego [105], Stillego [106], Ullmanna [107] czy reakcje fenylolitu z fluorobenzenem [108]. W swojej pracy syntetycznej jako substratów używałem komercyjnie dostępnych: 4-fenylofenolu (**172a**) oraz kwasu (*p*-hydroksyfenylo)benzoowego (**172b**). Ester etylowy kwasu (*p*-hydroksyfenylo)benzoowego otrzymałem na drodze bezpośredniej estryfikacji tego kwasu alkoholem etylowym.



Rys. 64. Schemat syntezy fosforowych i tiofosforowych pochodnych bifenyli-4-ylowych.

W kolejnym etapie związki (**172a**) i (**172b**) traktowałem trichlorkiem fosforylu lub tiofosforylu w obecności trietyloaminy w temperaturze 0 °C, otrzymując odpowiednie dichlorofosforany (**173a**) i (**173b**) lub dichlorotiofosforany bifenyłowe (**173a'**) i (**173b'**). Na uwagę zasługuje fakt, że (**173a'**) i (**173b'**) okazały się być stabilnymi związkami i możliwe było ich oczyszczanie z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej (Silica Gel; CH₂Cl₂:heksan 1:6). Otrzymane dichloropochodne (**173a**) i (**173b**) bez oczyszczania oraz (**173a'**) i (**173b'**) po uprzednim oczyszczeniu, traktowałem odczynnikami nukleofilowymi takimi jak MeONa/MeOH, EtONa/EtOH, lub NH₃/MeOH w różnych stosunkach stechiometrycznych otrzymując pokaźną bibliotekę związków fosforowych i tiofosforowych zawierających w swojej konstytucji estry metylowe, etylowe czy funkcję amidową. Dichlorki kwasów tiofosforowych (**173a'**) i (**173b'**) traktowane odpowiednio jednym ekwiwalentem metanolanu sodu w metanolu lub etanolanu sodu w etanolu dawały monochlorki kwasów tiofosforowych (**175a'**-**175d'**) z wydajnościami w przedziale (40-62%). Związki te podobnie jak dichlorotiofosforany okazały się być stabilne, w związku z czym byłem w stanie je oczyścić na drodze chromatografii kolumnowej (Silica Gel; heksan:AcOEt 3:2).

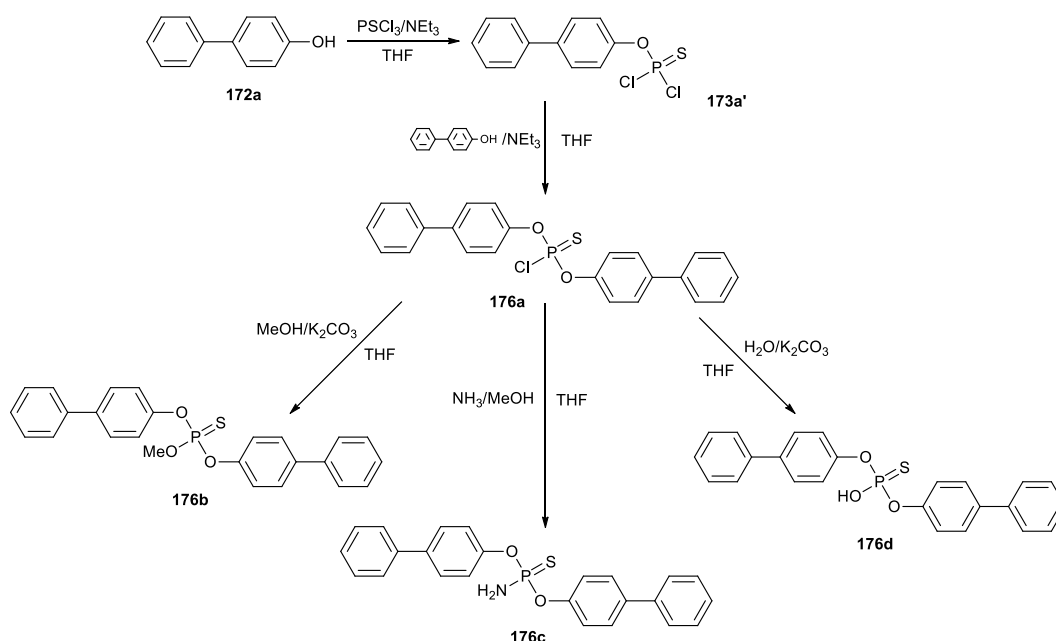
W kolejnym etapie prowadzonych syntez, estry dimetylowe kwasu fosforowego (**174e**) i (**174f**) traktowałem czterema ekwiwalentami TMSBr, a tak otrzymane estry trimetylosililowe traktując metanolem przeprowadziłem w odpowiednio diwodorofosforany (**174k**) i (**174l**) z wydajnościami około 75%. Na uwagę zasługuje fakt, że w opracowanej przeze mnie procedurze udało mi się selektywnie usunąć estry metylowe kwasu fosforowego bez naruszania estru etylowego kwasu karboksylowego.

W toku prowadzonych badań zaobserwowałem, że traktując monochlorek kwasu tiofosforowego (**175a'**) metanolem w obecności metanolanu sodu zachodziła transestryfikacja estru etylowego kwasu karboksylowego. Taka sytuacja nie występowała w przypadku pochodnej fosforowej (**174f**). Z przeprowadzonego eksperymentu wynika, że w przypadku zastosowania silnego nukleofila tj. metanolanu sodu, reakcja substytucji nukleofilowej na atomie fosforu konkuruje z reakcją transestryfikacji estru etylowego kwasu karboksylowego. Problem konkurencyjności reakcji udało mi się rozwiązać, kiedy jako odczynnik nukleofilowy zastosowałem metanol (znacznie słabszy nukleofil niż metanolan sodu), co umożliwiło mi skuteczne otrzymanie związku (**175a'**).

W celu dokładnej analizy relacji struktura-aktywność biologiczna, otrzymałem dodatkowo tiofosforowe pochodne 4-fenylofenolu (**176a-176d**), które wykazywały bardzo obiecujące rezultaty w badaniach modelowania molekularnego. Syntezę tych związków

przedstawiłem na **rysunku 65**. 4-fenylofenol traktowałem chlorkiem tiofosforu izolując dichlorotiofosforan bifenyli-4-ylu (**173a'**), który po oczyszczeniu traktowałem kolejnym ekwiwalentem 4-fenylofenolu (**172a**) w obecności trietyloaminy. W ten sposób otrzymałem ester di(bifenyli-4-ylu) kwasu tiofosforowego (**176a**) z wydajnością 55%. Związek ten przeprowadziłem następnie w metylotiofosforan (**176b**), amidotiofosforan (**176c**) oraz wodorotiofosforan (**176d**) w reakcji substytucji nukleofilowej na atomie fosforu stosując odpowiednie odczynniki nukleofilowe takie jak: MeOH/K₂CO₃, NH₃/MeOH i THF/H₂O/K₂CO₃. Jeśli chodzi o syntezę wodorotiofosforanu di(bifenyli-4-ylu) (**176d**), chlorotiofosforan di(bifenyli-4-ylu) (**176a**) rozpuściłem w tetrahydrofuranie i do tak otrzymanego roztworu dodałem wodnego roztworu węglanu potasu uzyskując homogeniczny układ, który pozostawiłem na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę reakcyjną odparowałem do sucha, pozostałość zawiesiłem w niewielkiej ilości metanolu i tak otrzymaną zawiesinę naniosłem na kolumnę chromatograficzną wypełnioną Silica Gelem. Kolumnę następnie przemywałem mieszaniną octan etylu:metanol 10:1 izolując kwas di(bifenyli-4-ylowy) (**176d**) z wydajnością 48%.

Podobnie jak w poprzednich rozdziałach dotyczących fosforowych i tiofosforowych pochodnych kumaryny moim celem było otrzymanie konkretnych związków do badań biologicznych, a nie opracowanie efektywnej metody ich syntezy, dlatego też nie optymalizowałem warunków prowadzonych reakcji.

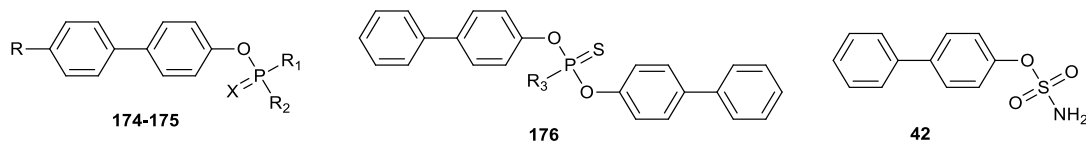


Rys. 65. Schemat syntezy tiofosforowych pochodnych di(bifenyli-4-ylowych).

8.3. Wyznaczanie wartości IC_{50} fosforowych i tiofosforowych pochodnych bifenyłu

W kolejnym etapie badań wszystkie otrzymane przeze mnie wszystkie pochodne kwasu bifenylofosforowego i bifenylotiofosforowego badane były *in vitro* w teście enzymatycznym. Wyniki tych badań zestawilem w **tabeli 23**. Analiza uzyskanych rezultatów zawartych w **tabeli 23** pokazuje, że bifenyłowe pochodne zarówno kwasu fosforowego jak i tiofosforowego (**174-175**) odznaczały się wartościami aktywności biologicznej w przedziale od 46.8 do 161.0 μM (wartość dla związku referencyjnego w tym samym teście wynosiła 91.4 μM).

Tabela 23. Aktywność biologiczna otrzymanych związków względem STS.



Nr	R	R ₁	R ₂	X	IC ₅₀ [μM]	Nr	R	R ₁	R ₂	R ₃	X	IC ₅₀ [μM]
174a	H	OMe	NH ₂	O	98.0±10.0	174i	H	NH ₂	NH ₂	-	O	125.6±14.9
174b	COOEt	OMe	NH ₂	O	132.4±16.8	174j	COOEt	NH ₂	NH ₂	-	O	139.6±20.9
174a'	H	OMe	NH ₂	S	86.6±6.4	174i'	H	NH ₂	NH ₂	-	S	97.2±9.0
174b'	COOEt	OMe	NH ₂	S	128.2±15.4	174j'	COOEt	NH ₂	NH ₂	-	S	117.7±14.1
174c	H	OEt	NH ₂	O	134.1±15.3	174k	H	OH	OH	-	O	101.7±13.9
174d	COOEt	OEt	NH ₂	O	115.9±11.5	174l	COOEt	OH	OH	-	O	69.3±7.8
174c'	H	OEt	NH ₂	S	95.6±8.6	175a'	H	OMe	Cl	-	S	51.2±4.7
174d'	COOEt	OEt	NH ₂	S	106.7±13.7	175b'	COOEt	OMe	Cl	-	S	53.5±5.8
174e	H	OMe	OMe	O	101.2±12.3	175c'	H	OEt	Cl	-	S	48.0±5.2
174f	COOEt	OMe	OMe	O	113.5±15.6	175d'	COOEt	OEt	Cl	-	S	46.8±6.6
174e'	H	OMe	OMe	S	69.2±6.4	176a	-	-	-	Cl	-	28.0±4.3
174f'	COOEt	OMe	OMe	S	161.0±20.3	176b	-	-	-	OMe	-	58.0±6.8
174g	H	OEt	OEt	O	103.8±10.8	176c	-	-	-	NH ₂	-	51.2±6.2
174h	COOEt	OEt	OEt	O	77.5±8.9	176d	-	-	-	OH	-	22.1±3.9
174g'	H	OEt	OEt	S	82.3±7.3	42	-	-	-	-	-	91.4±7.9
174h'	COOEt	OEt	OEt	S	108.6±13.9							



Najaktywniejszymi związkami z tej grupy były chlorotiofosforany metylowe oraz etylowe (**175a'**-**175d'**), dla których wyznaczone wartości IC_{50} zawierały się w przedziale 46.8-53.5 μ M. Wraz z wprowadzeniem do konstytucji związku drugiej funkcji alkoksylowej aktywność biologiczna ulegała pogorszeniu. Tak na przykład wyznaczone wartości IC_{50} dla estrów dimetylowych i dietylowych kwasów bifenylofosforowych (**174e'**-**174f'**) zawierały się w przedziale (69.2-161.0 μ M). Na uwagę zasługuje fakt, że pochodne posiadające w swojej konstytucji ugrupowanie etoksykarbonylowe w badanej grupie związków odznaczały się zdecydowanie gorszą czynnością biologiczną [patrz: IC_{50} dla (**174e'**) vs IC_{50} dla (**174f'**) oraz IC_{50} dla (**174g'**) vs IC_{50} (**174h'**)]. W przeciwieństwie do tego takiej zależności nie obserwowałem w przypadku zarówno estrów metylowych jak i etylowych kwasów bifenylochlorofosforowych [patrz: IC_{50} dla (**175a'**) vs IC_{50} (**175b'**) oraz IC_{50} dla (**175c'**) vs IC_{50} dla (**175d'**)].

W analizowanej grupie związków, związkami o najwyższej aktywności biologicznej okazały się być pochodne di(bifenyl-4-yłowe) (**176a-176d**). Dla dwóch związków, (**176a**) i jego pochodnej (**176d**), wyznaczone wartości IC_{50} wynosiły odpowiednio 28.0 i 22.1 μ M (aktywność biologiczna związku referencyjnego w tym teście wynosiła 91.4 μ M). Dobra aktywność chlorotiofosforanu di(bifenyl-4-yłu) (**176a**) oraz wodorotiofosforanu di(bifenyl-4-yłu) (**176d**) może wynikać w przypadku (**176a**) z możliwości nieodwracalnego wiązania się do miejsca aktywnego STS w reakcji substytucji nukleofilowej na atomie fosforu, a w przypadku (**176d**) z możliwości tworzenia wiązania wodorowego z resztą Thr484 w miejscu aktywnym STS (**Rys. 61**). Może to mieć decydujące znaczenie w mechanizmie inhibicyjnym i stabilizacji kompleksu inhibitor-enzym.

W tym miejscu pragnę dodać, że pomimo negatywnych wyników modelowania molekularnego dla struktur (**174d**), (**174g**), (**174h**), (**174c'**), (**174d'**), (**174f'**), (**174g'**) oraz (**174h'**) wykonałem syntezę tych związków i poddałem badaniom aktywności biologicznej. Zgodnie z rezultatami badań modelowania komputerowego, wyniki badań biologicznych tych związków nie wykazywały wysokich właściwości inhibicyjnych.

9. Projektowanie, otrzymywanie oraz badania biologiczne fosforowych i tiofosforowych pochodnych tyraminy

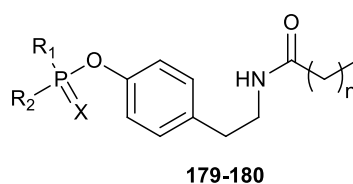
Aminy biogenne, m. in. tyramina, powstają *in vivo* w wyniku dekarboksylacji aminokwasów i biorą udział w wielu ważnych procesach w organizmach żywych, takich jak neurotransmisja, funkcjonowanie układu odpornościowego czy wzrost i różnicowanie komórek [109]. Ze względu na ich wysoką aktywność biologiczną, aminy te stanowią niezwykle atrakcyjną bazę do projektowania nowych związków o potencjalnych właściwościach terapeutycznych. W oparciu o szkielet tyraminy otrzymano szereg siarkowych inhibitorów STS, które następnie poddano badaniu aktywności biologicznej uzyskując bardzo obiecujące rezultaty [32] (patrz: **Tabela 7**, str. 15).

Zachęcony szerokim spektrum działania amin biogennych postanowiłem zaprojektować, następnie przeprowadzić syntezę szeregu fosforowych i tiofosforowych pochodnych tyraminy oraz zbadać czynność biologiczną tych nowych związków w aspekcie ich potencjalnych właściwości inhibicyjnych STS.

9.1. Modelowanie molekularne fosforowych i tiofosforowych pochodnych tyraminy

Do badań w zakresie modelowania molekularnego wybrałem następujące struktury: *O*-fosforylowe i *O*-tiofosforylowe pochodne *N*-alkanoilo tyraminy o różnej długości łańcucha alifatycznego tj. związki (**179-180**). Biorąc pod uwagę fakt, że wyniki badań biologicznych poprzednich modeli (fosforowe i tiofosforowe pochodne kumaryny oraz bifenyłu) pokazują, że najwyższe wartości IC_{50} wykazywały estry metylowe, amidometylotiofosforany i wolne kwasy fosforowe; dlatego też w tym etapie badań skoncentrowałem się na tego typu pochodnych (**Tabela 24**).

Tabela 24. Struktury modelowe (**179-180**) wybrane do dokowania molekularnego.

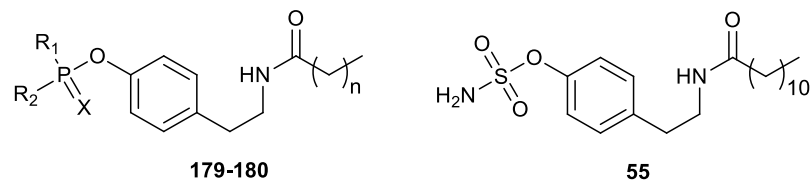


Nr	n	R ₁	R ₂	X	Nr	n	R ₁	R ₂	X
179a	10	OMe	OMe	O	180a	10	OH	OH	O
179b	11	OMe	OMe	O	180b	11	OH	OH	O
179c	12	OMe	OMe	O	180c	12	OH	OH	O
179d	10	OMe	NH ₂	O	179a'	10	OMe	OMe	S
179e	11	OMe	NH ₂	O	179b'	11	OMe	OMe	S
179f	12	OMe	NH ₂	O	179c'	12	OMe	OMe	S
179g	0	OMe	OMe	O	179d'	10	OMe	NH ₂	S
179h	9	OMe	OMe	O	179e'	11	OMe	NH ₂	S
179i	13	OMe	OMe	O	179f'	12	OMe	NH ₂	S

Badania z zakresu modelowania molekularnego (*Autodock Vina*) pokazały, że fosforowe i tiofosforowe pochodne *N*-alkanoilo tyraminowe są w stanie teoretycznie wiązać się w miejscu aktywnym STS. Nowo zaprojektowane związki układały się w obszarze katalitycznym enzymu podobnie do wybranego związku referencyjnego, znanego inhibitora STS tj. amidosiarczanu 4-(2-dodekanoiloamino-etylo)fenylu (**55**).

Na **rysunku 66** widać, że grupy fosforowe i tiofosforowe są skierowane w stronę formyloglicyny oraz znajdują się w bliskiej odległości innych reszt aminokwasowych obecnych w miejscu aktywnym tj. Asp35, Asp36, Arg79, Lys134, His136, His290, Asp342, Lys368. Wyznaczone na podstawie modelowania molekularnego wartości energii swobodnych wiązania kompleksu inhibitor-enzym zebrałem w **tabeli 25**. Na podstawie danych zawartych w **tabeli 25** można wnioskować, że wraz ze wzrostem długości łańcucha alifatycznego w szkielecie *N*-alkanoilo tyraminowym wartości energii swobodnych ulegają obniżeniu, co prowadzi do poprawy zdolności wiązania się tych związków do miejsca aktywnego STS.

Tabela 25. Wartości energii swobodnych wiązania kompleksów inhibitor-STS dla pochodnych *N*-alkanoilo tyraminy.

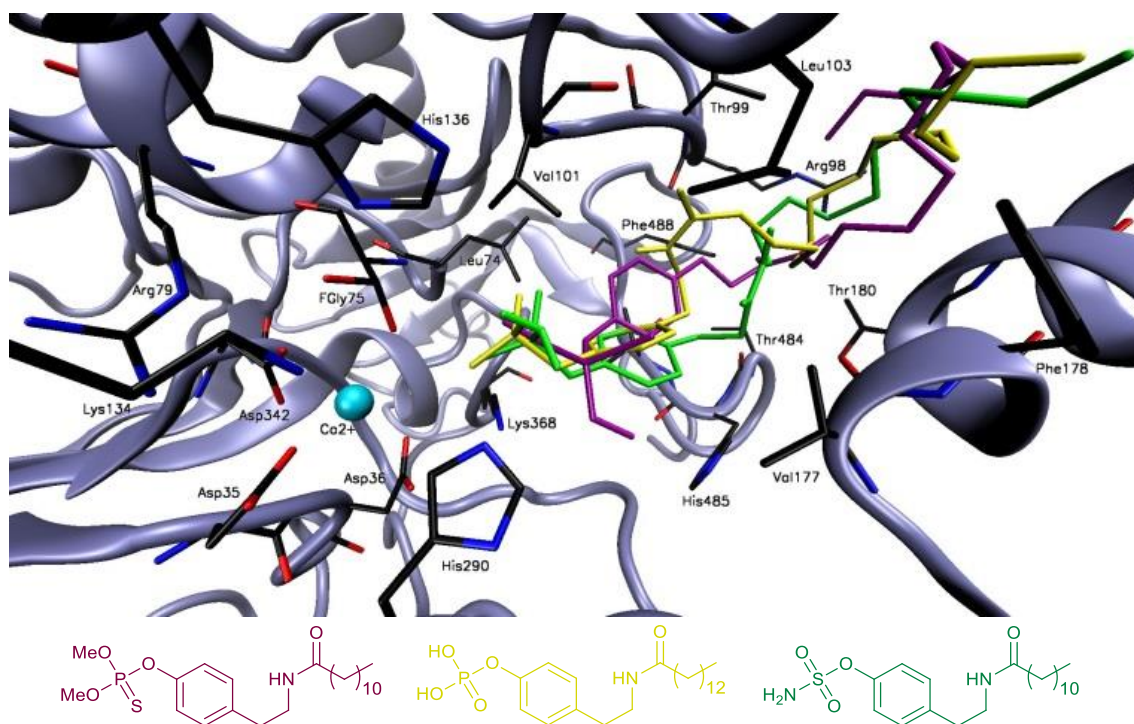


Nr	n	R ₁	R ₂	X	Swobodna energia wiązania [kcal/mol]	Nr	n	R ₁	R ₂	X	Swobodna energia wiązania [kcal/mol]
179a	10	OMe	OMe	O	-6.1	179b'	11	OMe	OMe	S	-
179b	11	OMe	OMe	O	-5.8	179c'	12	OMe	OMe	S	-
179c	12	OMe	OMe	O	-5.6	179d'	10	OMe	NH ₂	S	-
179d	10	OMe	NH ₂	O	-1.5	179e'	11	OMe	NH ₂	S	-5.4
179e	11	OMe	NH ₂	O	-	179f'	12	OMe	NH ₂	S	-
179f	12	OMe	NH ₂	O	-	180a	10	OH	OH	O	-6.0
179g	0	OMe	OMe	O	-0.6	180b	11	OH	OH	O	-6.0
179h	9	OMe	OMe	O	-5.2	180c	12	OH	OH	O	-5.9
179i	13	OMe	OMe	O	-4.8	55	-				-5.0
179a'	10	OMe	OMe	S	-						



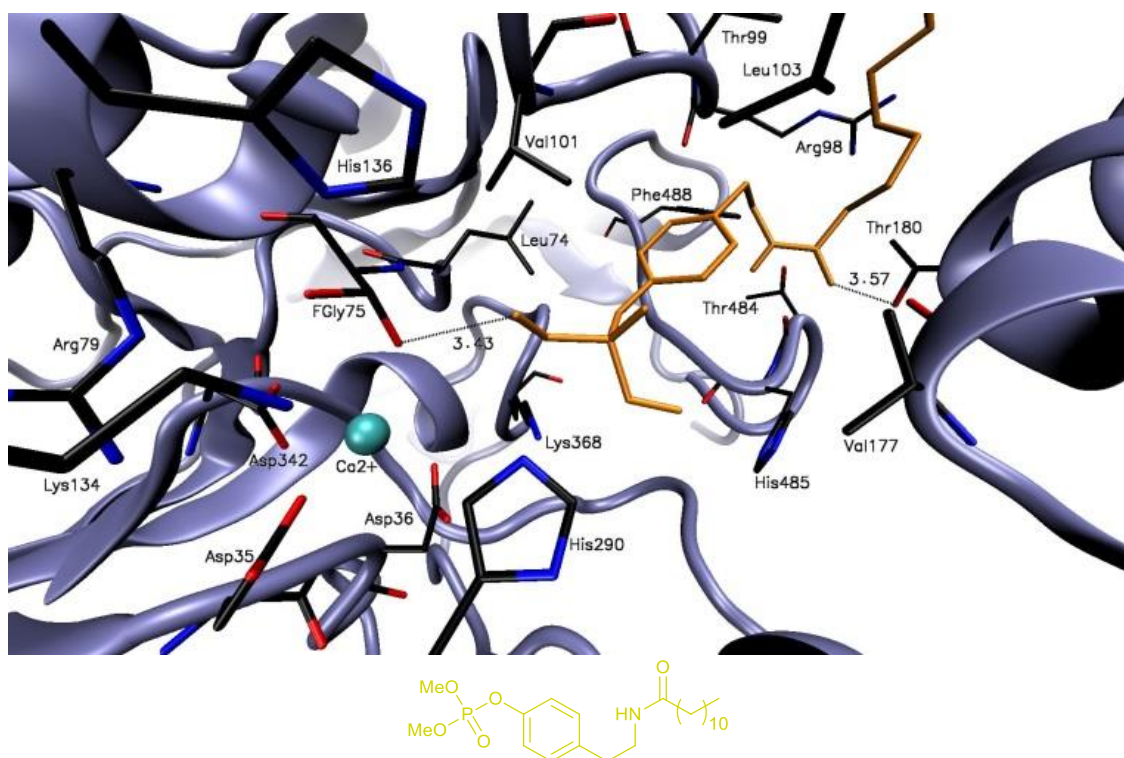
Co więcej, związki z tej samej grupy posiadające krótki łańcuch alifatyczny w swojej strukturze wykazywały słabe dopasowanie w miejscu aktywnym enzymu, co skutkowało podwyższeniem wartości swobodnej energii wiązania np. dla dimetylofosforanu 4-(2-acetyloamino-etylo)-fenylu (**179g**) wartość energii wiązania wynosiła -0.6 kcal/mol [dla dimetylofosforanu 4-(2-dodekanoiloamino-etylo)-fenylu (**179c**) wartość swobodnej energii wiązania wynosiła -5.6 kcal/mol (**Tabela 25**)]. Przeprowadzone eksperymenty dokowania pokazały, że optymalna długość łańcucha alifatycznego w *N*-alkanoilowych pochodnych tyraminy to 12-14 atomów węgla [przewidywane wartości energii wiązania kompleksu inhibitor-enzym takich struktur to -5.6 do -6.1 kcal/mol (**Tabela 25**)]. Wyniki te były porównywalne do wartości energii wiązania związku referencyjnego (**55**), która wynosiła -5.0 kcal/mol. Dokowanie związków o dłuższych lub krótszych łańcuchach alifatycznych skutkowało podwyższeniem wartości energii wiązania do miejsca aktywnego enzymu, co wiązało się ze zmniejszeniem stabilności kompleksu inhibitor-enzym (np. wartości energii swobodnej wiązania uzyskane w *Autodock Vina* dla dimetylofosforanu 4-(2-undekanoiloamino-etylo)-fenylu (**179h**) i 4-(2-pentadekanoiloamino-etylo)-fenylu (**179i**) wyniosły odpowiednio -5.2 i -4.8 kcal/mol). Wynika z tego, że związki z krótszym łańcuchem alifatycznym ulegają słabszym oddziaływaniom hydrofobowym z resztami aminokwasowymi w miejscu aktywnym STS. Podobnie pochodne z łańcuchami piętnastowęglowymi i dłuższymi ulegają słabszym oddziaływaniom hydrofobowym ze względu na stereochemiczne – swobody konformacyjnej.

W tym miejscu należy podkreślić, że część projektowanych struktur nie wykazywała dopasowania w miejscu aktywnym STS [**Tabela 25**, związki (**179e**), (**179f**), (**179a'**), (**179b'**), (**179c'**), (**179d'**) oraz (**179f'**)]. Może to być spowodowane fleksyjnością długich łańcuchów alifatycznych obecnych w konstytucji proponowanych struktur, które w warunkach modelowania molekularnego, posiadając swobodę konformacyjną nieefektywnie układają się w miejscu katalitycznym enzymu.



Rys. 66. Wizualizacja wyników dokowania inhibitorów do miejsca aktywnego STS. (**179a'**) (fioletowy), (**180c**) (żółty), amidosiarczan 4-(2-dodekanoiloamino-etylo)-fenylu (**55**) (zielony).

Wyniki badań z zakresu modelowania molekularnego pokazały, że strukturami o najlepszych zdolnościach wiązania się w miejscu aktywnym enzymu były diwodorofosforany i dimetylofosforany *N*-alkanoilowych pochodnych tyraminy. Wśród nich najniższą wartością energii swobodnej, -6.1 kcal/mol, charakteryzował się dimetylofosforan 4-(2-dodekanoiloamino-etylo)-fenylu (**179a**). Analizując interakcje inhibitor-enzym na poziomie atomowym, można zaobserwować, że kompleks STS ze związkiem (**179a**) może być stabilizowany przez słabe wiązanie wodorowe pomiędzy resztą acylową pochodnej (**179a**) i grupą hydroksylową Thr180 (3.57 Å) (**Rys. 67**). Co więcej, funkcja dimetylofosforanowa usytuowana jest w niewielkiej odległości grupy hydroksylowej reszty aminokwasowej FGly75 (3.43 Å). Estry metylowe kwasu fosforowego są znane jako odczynniki alkilujące, w związku z tym można postawić tezę, że FGly75 ulega metylowaniu pod wpływem dimetylofosforanu (**179a**) co może stanowić zasadniczą rolę w procesie hamowania aktywności enzymu.



Rys. 67. Wizualizacja dokowania pochodnej (**179a**) do miejsca aktywnego STS oraz jej odległość od FGly75.

9.2. Synteza fosforowych i tiofosforowych pochodnych tyraminy

W celu weryfikacji wyników badań modelowania molekularnego postanowiłem przeprowadzić syntezę fosforowych i tiofosforowych pochodnych tyraminy (**179-180**) oraz poddać te związki badaniom czynności biologicznej. Schemat przeprowadzanych syntez zamieściłem na **rysunku 68**.

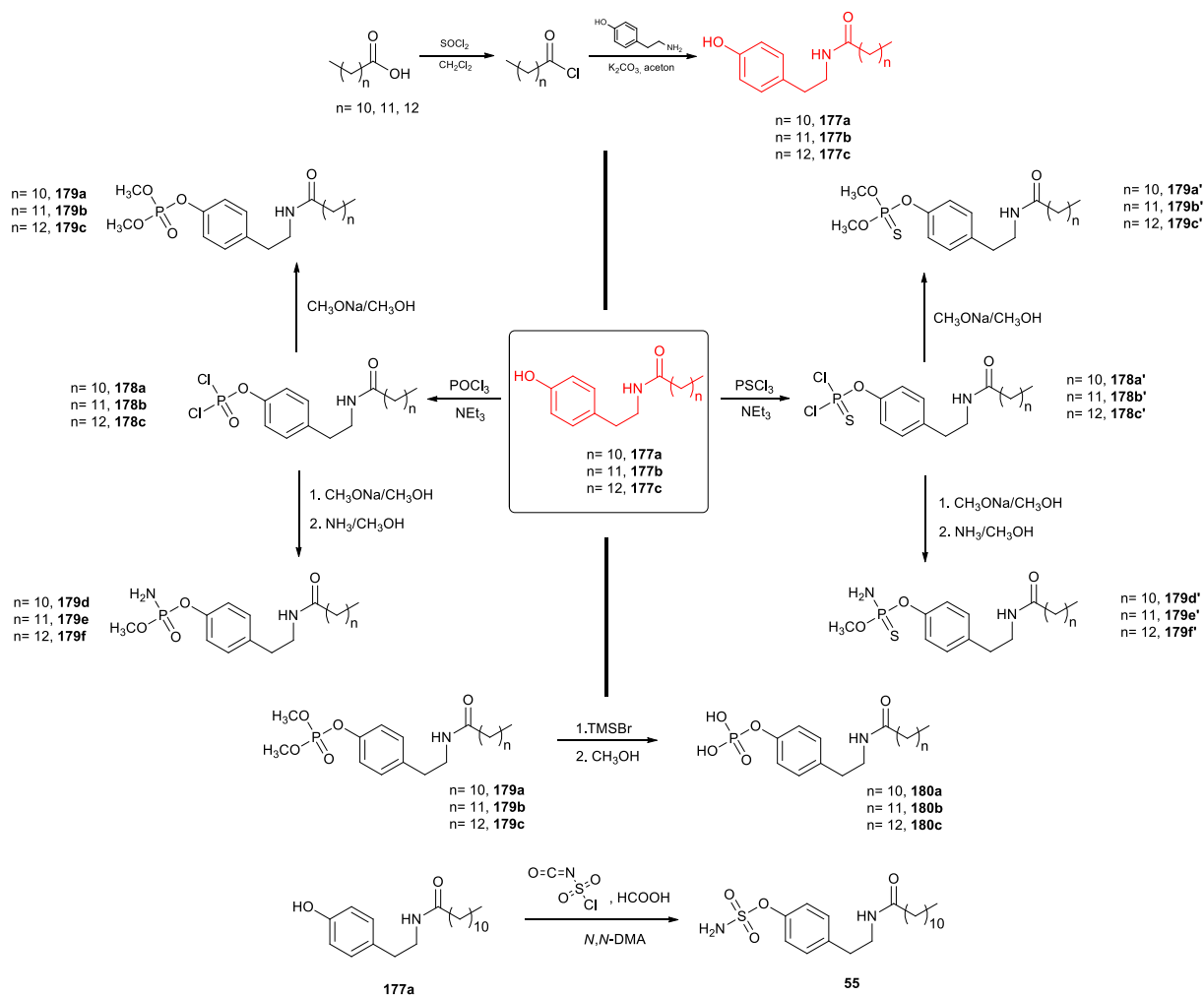
W literaturze chemicznej znanych jest wiele metod syntezy tyraminy takich jak: przegrupowanie Curtiusa azydku β -(*p*-hydroksyfenylo)propionylowego [110], uwodornienie (α -chloro- α -oksyimino)acetofenonu przy zastosowaniu katalizatora opartego na metalu przejściowym [111], dekarboksylacja tyrozyny [112] czy enzymatyczna dekarboksylacja z zastosowaniem dekarboksylazy tyrozynowej [113].

Szkielety *N*-alkanoilo tyraminowe (**177a-177c**) otrzymałem z wysoką wydajnością oraz czystością w reakcji chlorków kwasowych (otrzymywanych *in situ* z odpowiednich kwasów karboksylowych w reakcji z chlorkiem tionylu) z komercyjnie dostępnym 4-(2-aminoetylo)fenolem w obecności węgla potasu. W kolejnym etapie *N*-acylową pochodną tyraminy (**177a-177c**) traktowałem odpowiednio: jednym ekwiwalentem trichlorku

fosforylu wobec jednego ekwiwalentu trietyloaminy otrzymując dichlorofosforany *N*-acylotyraminy (**178a-178c**), bądź jednym ekwiwalentem trichlorku tiofosforylu otrzymując dichlorotiofosforany *N*-acylotyraminy (**178a'-178c'**). Postęp tych reakcji monitorowałem za pomocą spektroskopii ³¹P NMR i tak otrzymane dichlorofosforany oraz dichlorotiofosforany, po odsączeniu wytrąconego chlorowodoru trietyloaminy, bez dalszego oczyszczania używałem do kolejnego etapu syntezy. Dichlorofosforany *N*-alkanoilotyraminy (**178a-178c**) traktowane dwoma ekwiwalentami metanolanu sodu w metanolu dawały dimetylofosforany *N*-acylotyraminy (**180a-180c**) z wydajnościami 48-67%. Z kolei dichlorofosforany *N*-alkanoilotyraminy (**178a-178c**) traktowane jednym ekwiwalentem metanolanu sodu w metanolu przez 1 godzinę w temperaturze 0 °C, a następnie roztworem amoniaku w metanolu, dawały metyloamidofosforany *N*-alkanoilotyraminy (**179d-179f**) z wydajnościami 46-54%.

O-fosforylowane pochodne tyraminy (**180a-180c**) otrzymywałem, z wydajnościami w przedziale 45-65%, w wyniku reakcji *O*-dimetylofosforanów tyraminy (**179a-179c**) z trimetylobromosilanem, a następnie alkoholizy tak powstałych estrów trimetylosililowych metanolem.

Według analogicznej procedury otrzymałem dimetylotiofosforany *N*-alkanoilotyramin (**179a'-179c'**) z wydajnościami w przedziale 70-79% oraz amidometylotiofosforany *N*-alkanoilotyramin (**179d'-179f'**) z wydajnościami odpowiednio 76-83%. Synteza wszystkich otrzymanych fosforowych i tiofosforowych pochodnych tyraminowych nie była optymalizowana.



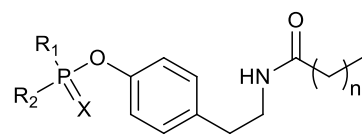
Rys. 68. Schemat syntezy fosforowych i tiofosforowych pochodnych *N*-alkanoilo tyraminy oraz związku referencyjnego (**55**).

W celu syntezy związku referencyjnego tj. amidosiarczanu 4-(2-dodekanoiloamino-etylo)-fenylu wykorzystywanego w badaniach biologicznych, amid kwasu [2-(4-hydroksyfenyl)-etylo] dodekanowego (**177a**) poddałem reakcji z H_2NSO_2Cl , otrzymanym *in situ* w reakcji izocyjanianu chlorosulfurylu i kwasu mrówkowego w obecności katalitycznych ilości *N,N*-dimetyloacetamidu (*N,N*-DMA) [114]. Związek (**55**) według tej procedury otrzymałem z wydajnością 91% (**Rys. 68**).

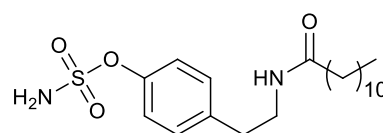
9.3. Wyznaczenie wartości IC_{50} fosforowych i tiofosforowych pochodnych tyraminy

Badanie aktywności biologicznej otrzymanych związków prowadzono z wykorzystaniem enzymu wyizolowanego z łożyska ludzkiego, oczyszczonego w trójstopniowej chromatografii kolumnowej według metod opisanych w literaturze [95]. Wyniki tych badań zebrałem w **tabeli 26**.

Tabela 26. Aktywność biologiczna otrzymanych związków oraz związku referencyjnego (**55**).



179-180



55

Nr	n	R ₁	R ₂	X	IC ₅₀ [μM]	Nr	n	R ₁	R ₂	X	IC ₅₀ [μM]
179a	10	OMe	OMe	O	0.39±0.04	179c'	12	OMe	OMe	S	84.75±7.1
179b	11	OMe	OMe	O	>>1000	179d'	10	OMe	NH ₂	S	15.10±2.4
179c	12	OMe	OMe	O	234.40±21.3	179e'	11	OMe	NH ₂	S	215.70±19.6
179d	10	OMe	NH ₂	O	1.31±0.25	179f'	12	OMe	NH ₂	S	111.90±18.5
179e	11	OMe	NH ₂	O	218.70±18.7	180a	10	OH	OH	O	68.84±5.9
179f	12	OMe	NH ₂	O	103.20±9.3	180b	11	OH	OH	O	23.31±2.1
179a'	10	OMe	OMe	S	76.90±6.2	180c	12	OH	OH	O	11.17±1.4
179b'	11	OMe	OMe	S	245.70±24.3	55	-				15.44±2.1



Wyniki badań biologicznych zebrane w **tabeli 26** wskazują, że pochodnymi o najlepszych aktywnościach biologicznych były związki, które w swojej strukturze zawierały dwunastowęglowy łańcuch alifatyczny [(**179a**), (**179d**), (**179a'**) oraz (**179d'**)]. Na uwagę zasługuje fakt, że wyniki badań biologicznych korelują z wynikami uzyskanymi na drodze modelowania molekularnego. Może to sugerować, że pochodne kwasu [2-(4-hydroksy-fenilo)-etylo]-dodekanowego (**177a**) wykazują lepsze powinowactwo do miejsca aktywnego enzymu. W przeciwieństwie do tego w przypadku diwodorofosforanów tj. związków (**180a-180c**) wzrost długości łańcucha alifatycznego poprawiał aktywność biologiczną i tak na przykład najlepszą aktywnością biologiczną odznaczał się diwodorofosforan 4-(2-tetradekanoiloamino-etylo)-fenylu (**180c**), jego IC_{50} wynosiło 11.17 μM . Wyniki te sugerują, że w przypadku pochodnych (**180a-180c**) zwiększanie hydrofobowości szkieletu *N*-alkanoilo tyraminowego (w granicach długości łańcucha reszty kwasu karboksylowego 12-14 atomów węgla), może sprzyjać lepszemu dokowaniu do miejsca aktywnego enzymu, co spowodowane jest możliwością tworzenia silniejszych oddziaływań hydrofobowych z lipofilowymi resztami aminokwasowymi w miejscu aktywnym STS.

Badając wpływ ugrupowania fosforowego i tiofosforowego na aktywność STS można wyróżnić dwa efekty. Pierwszy związany jest z alkilującymi właściwościami estrów metylowych, co sugeruje możliwość metylowania FGly75 (fosforany vs tiofosforany) [**Tabela 26**; (**179a**) vs (**179d**)]. Drugi efekt związany jest z możliwością występowania oddziaływań elektrostatycznych (np. wiązania wodorowe) z resztami aminokwasowymi obecnymi w obszarze katalitycznym STS [**Tabela 26**; (**179a**) vs (**179a'**)]. W toku badań okazało się, że związkiem wykazującym najlepsze właściwości inhibicyjne względem STS był dimetylofosforan 4-(2-dodekanoiloamino-etylo)-fenylu (**179a**), jego IC_{50} wynosiła 0.39 μM [dla związku referencyjnego (**55**) wartość ta wynosiła 15.44 μM]. W przeciwieństwie do funkcji tiofosforowej, grupa fosforowa może uczestniczyć w efektywnym tworzeniu oddziaływań elektrostatycznych z resztami aminokwasowymi obecnymi w miejscu aktywnym STS jako akceptor wiązania wodorowego (P=O). Wprowadzenie funkcji amidowej do struktury inhibitora obniża jego właściwości alkilujące, co skutkuje pogorszeniem właściwości inhibicyjnych amidometylofosforanu 4-(2-dodekanoiloamino-etylo)-fenylu (**179d**) ($IC_{50} = 1.31 \mu\text{M}$) względem analogu (**179a**). Natomiast w przypadku metyloamidotiofosforanu 4-(2-dodekanoiloamino-etylo)-fenylu (**179d'**) ($IC_{50} = 15.10 \mu\text{M}$), oddziaływania elektrostatyczne grupy aminowej w regionie katalitycznym STS odgrywają prawdopodobnie większą rolę niż właściwości alkilujące tego związku, co powoduje poprawę aktywności biologicznej w stosunku do (**179a'**).

W tym miejscu pragnę dodać, że pomimo negatywnych wyników modelowania molekularnego dla struktur (179e), (179f), (179a'), (179b'), (179c'), (179d') oraz (179f') wykonałem syntezę tych związków i poddałem badaniom aktywności biologicznej. Ich rezultaty pokazały, że np. w przypadku związków (179e) czy (179b') zgodnie z wynikami badań modelowania molekularnego, wyniki badań biologicznych były niezadowolające. W przypadku związku (179d') było natomiast odwrotnie; mimo negatywnego wyniku w badaniach modelowania molekularnego wartość IC_{50} dla tego związku wynosiła 15.10 μ M, a więc posiadał on lepsze właściwości inhibicyjne niż np. (179c), dla którego wyznaczona wartość energii wiązania kompleksu inhibitor-enzym wynosiła -5.6 kcal/mol.

10. Projektowanie, otrzymywanie oraz badania biologiczne fosforowych i tiofosforowych pochodnych flawonoidowych

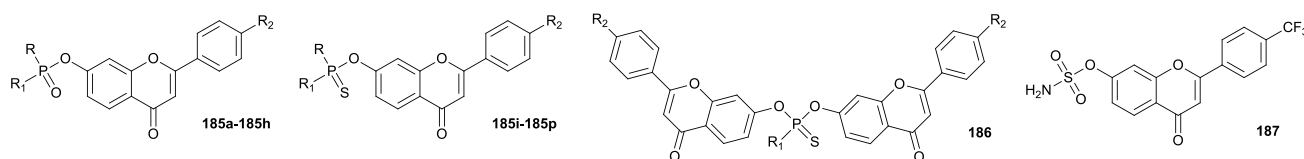
Flawony, oparte na szkielecie 2-fenylochromen-4-onu, należą do grupy flawonoidów – związków wzbudzających coraz szersze zainteresowanie naukowe. Można je wyodrębnić z owoców, warzyw, wina, herbaty czy kakao, w większości w postaci glikozydów i polimerów [115]. Flawonoidy zgromadzone są w tkankach roślin, co wiąże się z możliwością ich uczestnictwa w procesie fotosyntezy [116]. Zwiększona konsumpcja tych związków może chronić przed chorobami układu krążenia [117-118] i cukrzycą [119]. Co więcej, pochodne z rodziny flawonoidów wykazują działanie przeciwzapalne [120], antyalergiczne [121], przeciwnowotworowe [122-124], przeciwapagacyjne [125] czy przeciwmiażdżycowe [126]. Tak szerokie spektrum działania flawonoidów czyni je niezwykle atrakcyjnymi w zastosowaniu medycznym, zarówno prewencyjnym jak i terapeutycznym w leczeniu wielu chorób. Stwierdzono, że kilka naturalnych flawonoidów takich jak, kwercetyna, naringenina czy kemferol wykazują aktywność względem sulfatazy steroidowej [127].

W świetle powyższych faktów zdecydowałem się zaprojektować, otrzymać i zbadać aktywność biologiczną fosforowych i tiofosforowych pochodnych flawonoidowych względem STS.

10.1. Modelowanie molekularne fosforowych i tiofosforowych pochodnych flawonoidowych

Do badań z zakresu modelowania molekularnego wybrałem fosforowe i tiofosforowe pochodne flawonoidowe różniące się podstawnikiem R_2 w pierścieniu fenylovym (**Tabela 27**).

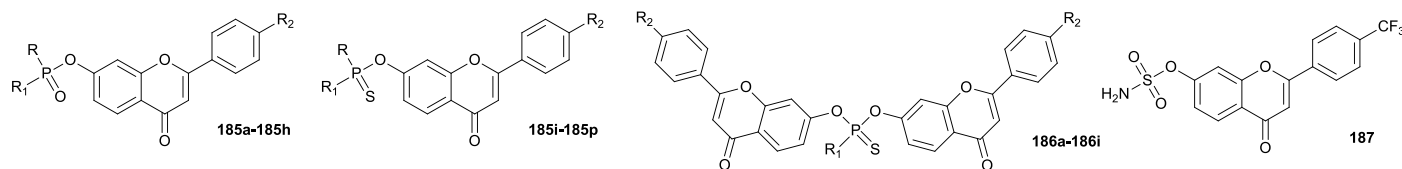
Tabela 27. Struktury modelowe wybrane do dokowania molekularnego.



Nr	R	R ₁	R ₂	Nr	R	R ₁	R ₂	Nr	R	R ₁	R ₂
185a	OMe	OMe	H	185k	OMe	Cl	CF ₃	186e	-	OMe	H
185b	OMe	OMe	F	185l	OMe	Cl	CH ₃	186j	-	OMe	F
185c	OMe	OMe	CF ₃	185m	OMe	OMe	H	186k	-	OMe	CF ₃
185d	OMe	OMe	CH ₃	185n	OMe	OMe	F	186l	-	OMe	CH ₃
185e	OH	OH	H	185o	OMe	OMe	CF ₃	186f	-	OH	H
185f	OH	OH	F	185p	OMe	OMe	CH ₃	186g	-	OH	F
185g	OH	OH	CF ₃	186a	-	Cl	H	186h	-	OH	CF ₃
185h	OH	OH	CH ₃	186b	-	Cl	F	186i	-	OH	CH ₃
185i	OMe	Cl	H	186c	-	Cl	CF ₃				
185j	OMe	Cl	F	186d	-	Cl	CH ₃				

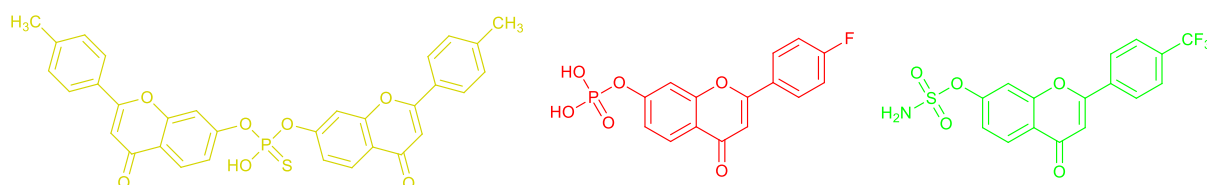
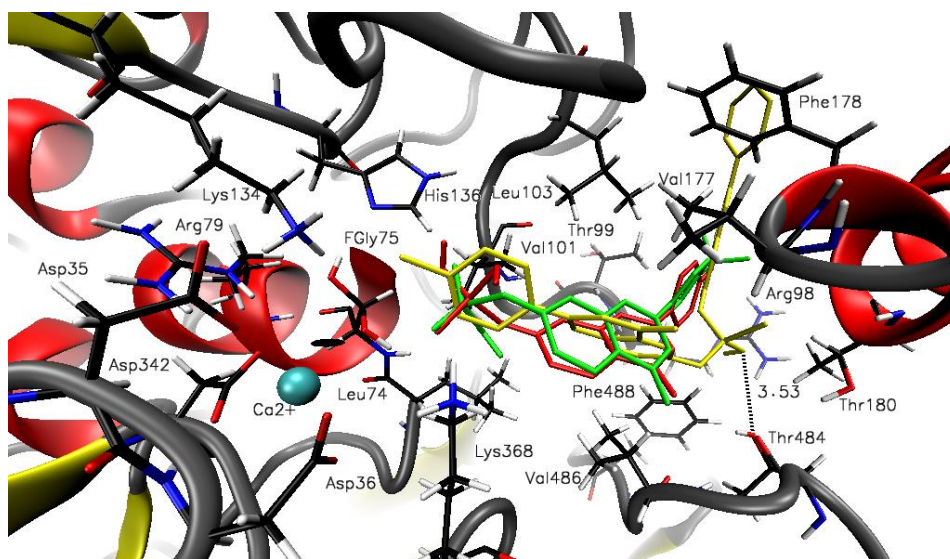
Wybrane pochodne flawonoidowe dokowały się w większości przynajmniej teoretycznie do miejsca aktywnego STS. Wartości swobodnych energii wiązania kompleksu inhibitor-enzym zawierały się w przedziale -3.2 do -4.6 kcal/mol i były porównywane z wartością energii swobodnej dokowania związku referencyjnego, tj. 7-*O*-amidosiarczanu 2-(4-trifluorometylo-fenylo)-chromen-4-onu (**187**), która wynosiła -5.2 kcal/mol. Podobnie jak w przypadku pochodnych kumarynowych i bifenylowych postanowiłem zaprojektować odpowiednie pochodne diestrowe dla których wartości energii swobodnych wiązania okazały się być najniższe (-6.2 do -7.0 kcal/mol). Wyznaczone na podstawie modelowania molekularnego wartości energii swobodnych wiązania kompleksu inhibitor-enzym zebrałem w **tabeli 28**. Jak widać na **rysunku 69** reszty fosforowe i tiofosforowe skierowane były w stronę formyloglicyny i znajdowały się w bliskości reszt aminokwasowych obecnych w miejscu katalitycznym enzymu. Jeśli chodzi o pochodne diestrowe, to podobnie jak w przypadku analogów kumarynowych i bifenylowych, jedna z reszt flawonoidowych usytuowana była w miejscu aktywnym enzymu, podczas gdy druga była skierowana na zewnątrz. Grupa hydroksylowa związku (**186i**) znajdowała się w bliskiej odległości (3.53 Å) od reszty Thr484 (**Rys. 69**) co może wskazywać na możliwość tworzenia wiązań wodorowych, dzięki którym inhibicja STS jest bardziej efektywna.

Tabela 28. Wartości energii swobodnych wiązania kompleksów inhibitor-STS dla fosforowych i tiofosforowych pochodnych flawonoidowych.



Nr	R	R ₁	R ₂	Swobodna energia wiązania [kcal/mol]	Nr	R	R ₁	R ₂	Swobodna energia wiązania [kcal/mol]	Nr	R	R ₁	R ₂	Swobodna energia wiązania [kcal/mol]
185a	OMe	OMe	H	-3.6	185k	OMe	Cl	CF ₃	-	186e	-	OMe	H	-6.8
185b	OMe	OMe	F	-4.2	185l	OMe	Cl	CH ₃	-	186j	-	OMe	F	-6.2
185c	OMe	OMe	CF ₃	-3.2	185m	OMe	OMe	H	-3.1	186k	-	OMe	CF ₃	-6.6
185d	OMe	OMe	CH ₃	-3.0	185n	OMe	OMe	F	-3.4	186l	-	OMe	CH ₃	-6.3
185e	OH	OH	H	-4.4	185o	OMe	OMe	CF ₃	-	186f	-	OH	H	-6.9
185f	OH	OH	F	-4.6	185p	OMe	OMe	CH ₃	-	186g	-	OH	F	-7.0
185g	OH	OH	CF ₃	-4.2	186a	-	Cl	H	-6.2	186h	-	OH	CF ₃	-6.7
185h	OH	OH	CH ₃	-4.3	186b	-	Cl	F	-6.4	186i	-	OH	CH ₃	-6.7
185i	OMe	Cl	H	-3.2	186c	-	Cl	CF ₃	-6.4	187	-	-	-	-5.2
185j	OMe	Cl	F	-3.5	186d	-	Cl	CH ₃	-6.3					





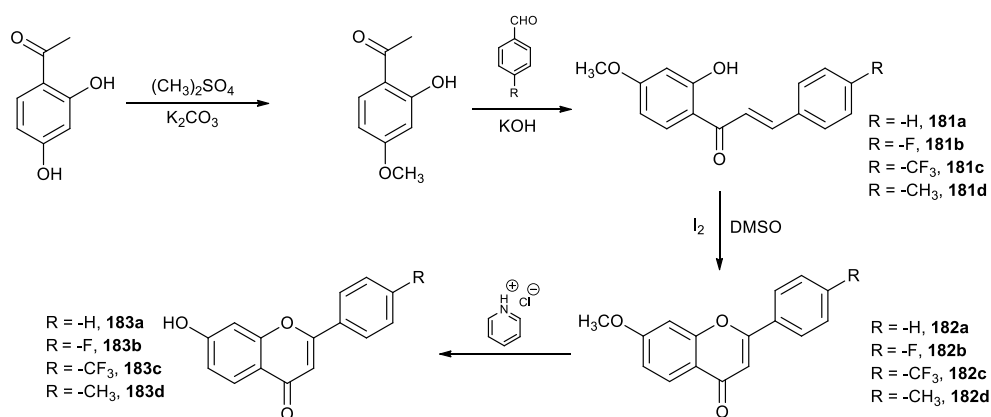
Rys. 69. Wizualizacja wyników dokowania związków (**186i**) (żółty), (**185f**) (czerwony) i 7-*O*-amidosiarczanu 2-(4-trifluorometylo-fenilo)-chromen-4-onu (**187**) (zielony) w miejscu aktywnym STS.

10.2. Synteza fosforowych i tiofosforowych pochodnych flawonoidowych

Synteza flawonów i ich pochodnych była przedmiotem intensywnych badań ostatnich dekad. Opisanych jest wiele metod otrzymywania tych związków takich jak np. kondensacja Claisena-Schmidta [128], przegrupowanie Baker-Venkataraman [129], reakcja Allana-Robinsona [130], reakcja Vilsmeiera-Haacka [131] czy zmodyfikowana reakcja Shotten-Baumana [132].

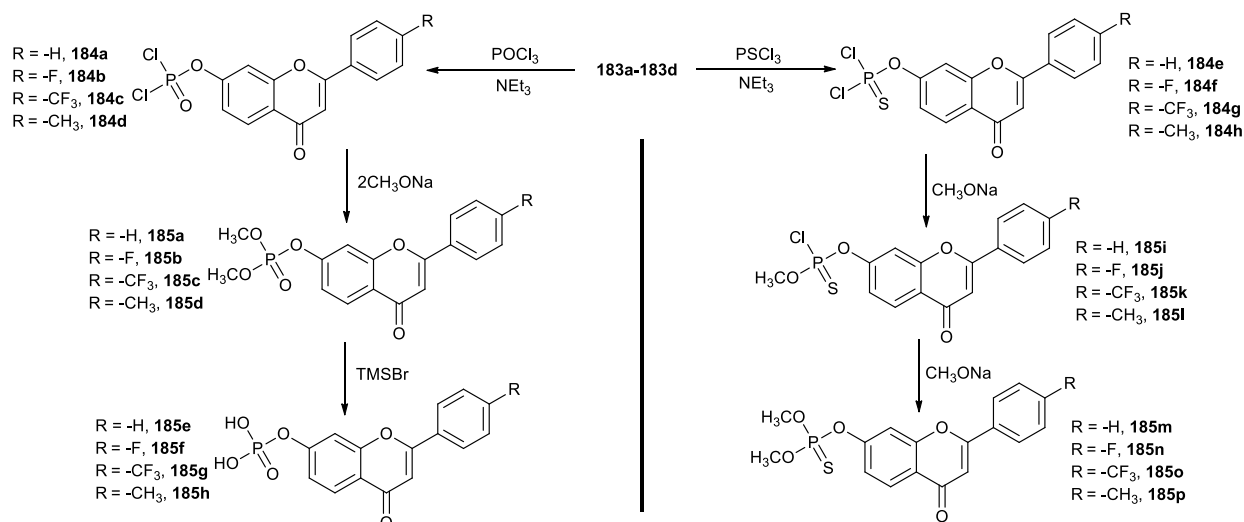
Zachęcony bardzo dobrymi wynikami badań aktywności biologicznej pochodnych flawonoidowych opisanych w literaturze chemicznej (**Tabela 6**), dokonałem syntezy zaprojektowanych wcześniej związków. Pierwszym krokiem była synteza czterech szkieletów flawonoidowych (**183a-183d**), którą rozpocząłem od przekształcenia komercyjnie dostępnego 2,4-dihydroksyaceto-fenonu w 2-hydroksy-4-metoksyaceto-fenon wykorzystując reakcję z siarczanem dimetylu w obecności węglanu potasu [133]. Kolejnym etapem była reakcja otrzymanego 2-hydroksy-4-metoksyaceto-fenonu z aldehydami aromatycznymi

w metanolem w roztworze wodorotlenku potasu. Otrzymane w ten sposób pochodne chalkonu (**181a-181d**) poddawałem reakcji cyklizacji w obecności jodu do 7-metoksyflawonów (**182a-182d**) [134]. Ostatnim etapem było usunięcie osłony metylowej na drodze reakcji z chlorowodorkiem pirydyny [135]. Szczegółowy schemat syntezy szkieletów flawonoidowych (**183a-183d**) przedstawiłem na **rysunku 70**.



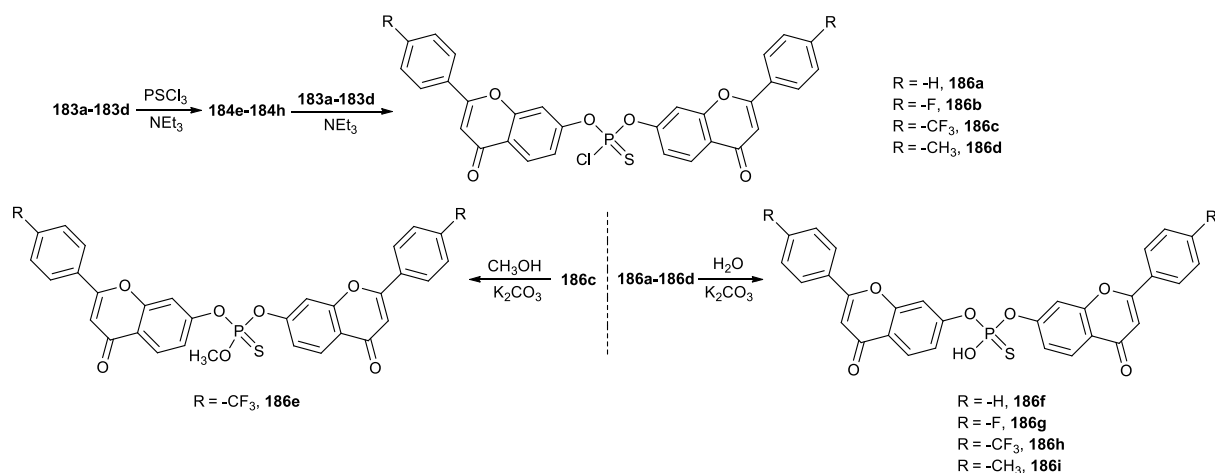
Rys. 70. Schemat syntezy szkieletów flawonoidowych.

Kolejnym krokiem była funkcjonalizacja grup hydroksylowych otrzymanych szkieletów flawonoidowych (**183a-183d**) (**Rys. 71**). Poprzednie badania obejmujące pochodne kumarynowe, bifenyłowe oraz tyraminowe pokazały, że najwyższe wartości aktywności biologicznej uzyskałem dla dimetylofosforanów, dimetylotiofosforanów, diwodorofosforanów i chlorometylotiofosforanów, stąd też zdecydowałem się na syntezę jedynie tych pochodnych. Związki (**183a-183d**) poddawałem reakcji z POCl₃ lub PSCl₃ w obecności trietyloaminy otrzymując *in situ* dichloropochodne (**184a-184h**). Związki te następnie traktowałem metanolanem sodu w różnym stosunkach stechiometrycznych otrzymując dimetylofosforany (**185a-185d**), chlorometylotiofosforany (**185i-185l**) oraz dimetylotiofosforany (**185m-185p**). Dimetylofosforany (**185a-185d**) przekształciłem w diwodorofosforany (**185e-185h**) w reakcji z bromkiem trimetylosylilowym, a następnie z metanolem.



Rys. 71. Schemat syntezy fosforowych i tiofosforowych pochodnych flawonoidowych.

W celu dokładniejszego zbadania relacji struktura-aktywność, dokonałem syntezy diestrów tiofosforowych (**186a-186i**). Szczegółowy schemat syntezy przedstawiłem na **rysunku 72**. W tym celu szkielety flawonoidowe (**183a-183d**) traktowałem PSCl₃ w obecności trietyloaminy, a otrzymane w ten sposób dichlorki (**184e-184h**) przekształcałem w monochlorki (**186a-186d**). W toku badań okazało się, że monochlorki (**186a, 186b, 186d**) są wysoce niestabilne i ulegają hydrolizie, stąd też syntezę pochodnych (**186f-186i**) prowadziłem bezpośrednio z monochlorków (**186a-186d**) w wodnym roztworze węgla potasu. Wyjątkiem był monochlorek (**186c**), który w tych samych warunkach był odporny na hydrolizę. W tym przypadku udało się otrzymać metylotiofosforową pochodną (**186e**) na drodze reakcji związku (**186c**) z metanolem w obecności węgla potasu.

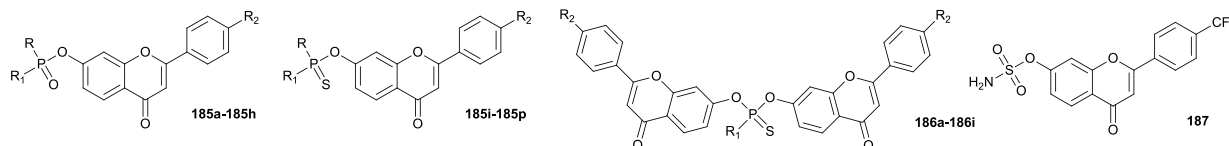


Rys. 72. Schemat syntezy diestrów flawonoidowych.

10.3. Wyznaczanie wartości IC_{50} fosforowych i tiofosforowych pochodnych flawonoidowych

W toku badań okazało się, że związki oparte na szkielecie 7-hydroksy-2-fenylo-4*H*-chromen-4-onu, 2-(4-fluorofenylo)-7-hydroksy-4*H*-chromen-4-onu, 7-hydroksy-2-(4-trifluorometylofenylo)-4*H*-chromen-4-onu oraz 7-hydroksy-2-(*p*-tolylo)-4*H*-chromen-4-onu modyfikowane różnymi funkcjami fosforowymi i tiofosforowymi w pozycji 7 cechowały się niską aktywnością biologiczną lub były nieaktywne (**Tabela 29**). Jedynie diwodorofosforany (**184e-184f**) oraz metylochlotiofosforany (**185i-185l**) wykazywały dobrą aktywność biologiczną w badaniu enzymatycznym. Najlepszymi spośród tych związków były: diwodorofosforan 2-(4-fluorofenylo)-4-okso-4*H*-chromen-7-ylu (**184f**) oraz metylochlotiofosforan 4-okso-2-(*p*-tolylo)-4*H*-chromen-7-ylu (**185l**). Ich wartości parametru IC_{50} wyniosły odpowiednio 29.0 i 38.4 μ M. Spośród wszystkich otrzymanych związków najaktywniejszymi okazały się być diestry flawonoidowe (**Tabela 29**). Związek (**186i**) – wodorotiofosforan bis-(4-okso-2-(*p*-tolylo)-4*H*-chromen-7-ylu) cechował się aktywnością biologiczną na poziomie 3.25 μ M, podczas gdy wartość ta dla związku referencyjnego w tym samym teście enzymatycznym wyniosła 8.50 μ M. Pomimo, że mechanizm inhibicji STS przez związek (**186i**) nie jest znany, modelowanie molekularne sugeruje możliwość tworzenia wiązań wodorowych między resztą Thr484 a grupą hydroksylową związku (**186i**). Podobnie jak w przypadku diestrowych pochodnych kumarynowych i bifenyłowych oddziaływania te mogą mieć kluczową rolę w stabilizacji kompleksu inhibitor-enzym co prowadzi do zwiększonej aktywności biologicznej tych związków.

Tabela 29. Aktywność biologiczna otrzymanych pochodnych flawonoidowych względem STS.



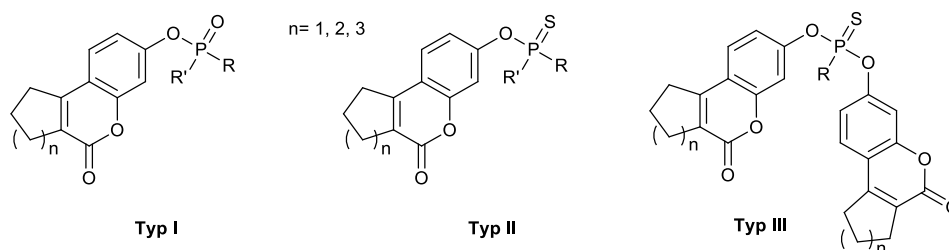
Nr	R	R ₁	R ₂	IC ₅₀ [μM]	Nr	R	R ₁	R ₂	IC ₅₀ [μM]	Nr	R ₁	R ₂	IC ₅₀ [μM]
185a	OMe	OMe	H	>500	185k	OMe	Cl	CF ₃	96.8±7.2	186e	OMe	H	33.5±2.3
185b	OMe	OMe	F	>500	185l	OMe	Cl	CH ₃	38.4±4.7	186j	OMe	F	-
185c	OMe	OMe	CF ₃	>500	185m	OMe	OMe	H	>500	186k	OMe	CF ₃	-
185d	OMe	OMe	CH ₃	>500	185n	OMe	OMe	F	>500	186l	OMe	CH ₃	-
185e	OH	OH	H	50.2±4.8	185o	OMe	OMe	CF ₃	>500	186f	OH	H	4.3±0.2
185f	OH	OH	F	29.0±4.4	185p	OMe	OMe	CH ₃	>500	186g	OH	F	4.5±0.2
185g	OH	OH	CF ₃	>500	186a	-	Cl	H	-	186h	OH	CF ₃	9.2±0.3
185h	OH	OH	CH ₃	>500	186b	-	Cl	F	-	186i	OH	CH ₃	3.2±0.2
185i	OMe	Cl	H	78.5±6.1	186c	-	Cl	CF ₃	4.3±0.2	187	-	-	8.5±0.3
185j	OMe	Cl	F	86.1±6.3	186d	-	Cl	CH ₃	-				

11. Podsumowanie

W ramach realizowanej pracy doktorskiej zaprojektowałem, przeprowadziłem syntezę i przebadalem szereg nowych fosforowych i tiofosforowych pochodnych: kumaryny, bifenylu, tyraminy oraz flawonoidów.

a) Fosforowe i tiofosforowe pochodne kumaryny

Nowe potencjalne inhibitory STS na bazie pochodnych kumaryny zostały zaprojektowane w oparciu o rdzeń 7-hydroksy-2,3-dihydrocyclopenta[c]chromen-4(1*H*)-onu, 3-hydroksy-7,8,9,10-tetrahydro-6*H*-benzo[c]chromen-6-onu i 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydrocyclohepta[c]chromen-6(7*H*)-onu funkcjonalizowany odpowiednim ugrupowaniem fosforowym lub tiofosforowym.



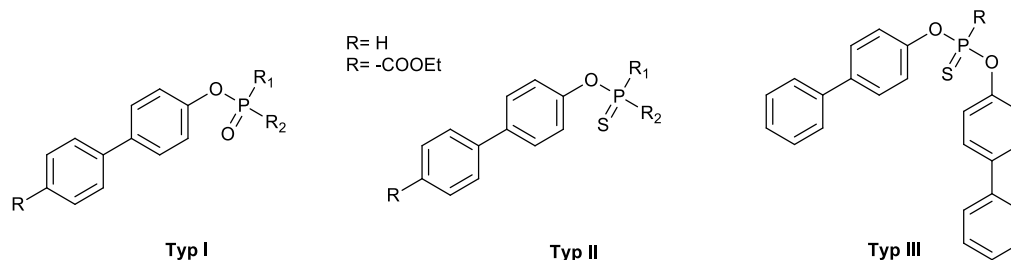
Rys. 73. Ogólne struktury chemiczne nowych inhibitorów na bazie fosforowych i tiofosforowych pochodnych kumaryny.

Synteza nowych potencjalnych inhibitorów STS została poprzedzona badaniami modelowania molekularnego, które wskazywały na wysoki potencjał inhibicyjny zaprojektowanych pochodnych. W toku przeprowadzonych badań stwierdziłem, iż teoretyczne wartości energii wiązania inhibitor-enzym były na zadowalającym poziomie i wykazywały zbliżoną wartość w porównaniu z inhibitorem referencyjnym – 665-COUMATE. Ponadto ułożenie ligandów w miejscu aktywnym STS potwierdziło ich wysoki stopień dopasowania dając szansę, przynajmniej teoretycznie, na efektywną ich rywalizację o miejsce w centrum aktywnym enzymu oraz skuteczną jego inaktywację. Ponadto, w toku przeprowadzonych badań zaobserwowałem również nowy, nieopisywany dotychczas sposób dokowania inhibitorów STS w miejscu katalitycznym charakterystyczny dla związków typu III. Wyselekcjonowane w toku dokowania molekularnego związki,

otrzymałem następnie na drodze syntezy chemicznej. Otrzymane związki zostały, we współpracy z Instytutem Biotechnologii Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego im. Jana Pawła II zbadane pod względem ich aktywności biologicznej względem STS wyizolowanym z łożyska ludzkiego.

b) Fosforowe i tiofosforowe pochodne bifenyłu

Badania z zakresu modelowania molekularnego udowodniły, iż nowo zaprojektowane związki na bazie fosforowych i tiofosforowych pochodnych 4-fenylofenolu oraz estru etylowego kwasu 4'-hydroksybifenylo-4-karboksyowego (Typ I oraz Typ II) wiązały się teoretycznie w miejscu aktywnym STS. Dokowanie nowych związków do miejsca aktywnego STS pokazało, że mogą one przyjmować ułożenia podobne do naturalnego substratu enzymu oraz do związku referencyjnego. Podobnie jak w przypadku bikumaryn, analogami dla których wartości energii wiązania kompleksu inhibitor-enzym były najniższe były tiofosforowe pochodne di-bifenylo-4-owe (Typ III). Związki te wykazywały inny sposób dokowania do miejsca aktywnego enzymu, oraz znacząco niższe wartości energii wiązania.



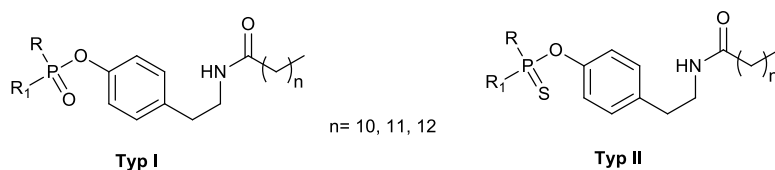
Rys. 74. Ogólne struktury chemiczne nowych inhibitorów na bazie fosforowych i tiofosforowych pochodnych bifenyłu.

Potencjalne, nowe inhibitory STS charakteryzujące się najniższymi wartościami energii wiązania inhibitor-enzym zostały wyselekcjonowane i otrzymane na drodze syntezy chemicznej (łącznie ponad 30 związków). Obejmowała ona stosunkowo prostą i efektywną metodę otrzymywania rdzeni inhibitorów jak również ich funkcjonalizacji odpowiednim ugrupowaniem fosforowym lub tiofosforowym. Następnie otrzymane pochodne zostały zbadane pod kątem ich aktywności biologicznych względem STS. Wyniki wykonanych oznaczeń wskazywały na umiarkowaną aktywność fosforowych i tiofosforowych analogów

bifenylu (Typ I oraz Typ II). Najwyższą aktywności biologiczną zaobserwowałem dla tiofosforowych analogów dibifenyl-4-owych (Typ III).

c) Fosforowe i tiofosforowe pochodne tyraminy

Badania z zakresu modelowania molekularnego pokazały, że fosforowe i tiofosforowe pochodne *N*-alkanoilo tyraminy są w stanie teoretycznie wiązać się w miejscu aktywnym STS. Nowo zaprojektowane inhibitory STS układały się w obszarze katalitycznym enzymu podobnie do wybranego związku referencyjnego, amidosiarczanu 4-(2-dodekanoiloamino-etylo)fenylu. Analizując wartości energii swobodnych wiązania kompleksu inhibitor-enzym, można wnioskować, że zwiększanie długości łańcucha alifatycznego w szkielecie *N*-alkanoilo tyraminowym skutkuje podwyższeniem zdolności wiązania się do miejsca aktywnego STS. Przeprowadzone eksperymenty dokowania pokazały, że optymalna długość łańcucha alifatycznego w *N*-alkanoilowych pochodnych tyraminy to 12-14 atomów węgla.



Rys. 75. Ogólne struktury chemiczne nowych inhibitorów na bazie fosforowych i tiofosforowych pochodnych bifenylu.

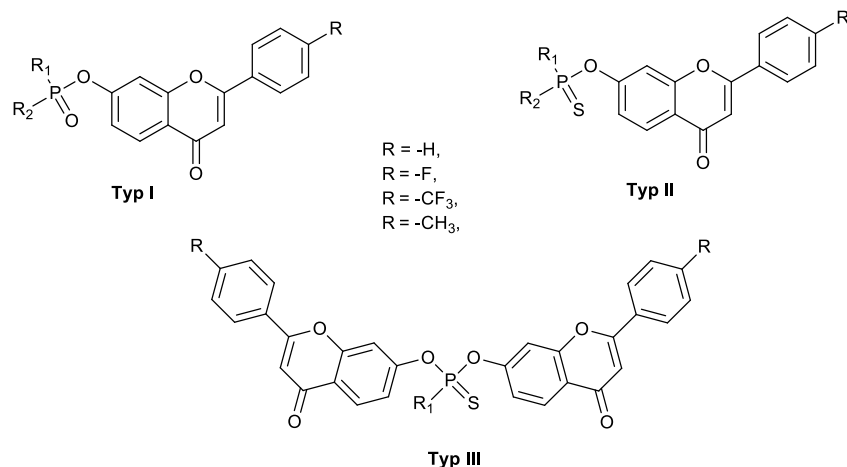
Wyselekcjonowane struktury potencjalnych inhibitorów STS o najbardziej obiecującym potencjale zostały następnie otrzymane w dwuetapowej syntezie obejmującej: reakcję acylowania atomu azotu tyraminy odpowiednimi chlorkami kwasowymi jak również reakcję funkcjonalizacji grupy hydroksylowej funkcją fosforową lub tiofosforową. W syntezie inhibitorów na bazie *N*-alkanoilo tyraminy otrzymałem pochodne, których grupy funkcyjne zapewniały najwyższą aktywność biologiczną dla uprzednio otrzymanych inhibitorów tj. diwodorofosforan, dimetylofosforan, chlorometylotiofosforan, dimetylotiofosforan, amidometylofosforan oraz amidometylotiofosforan.

Otrzymane fosforowe oraz tiofosforowe pochodne *N*-alkanoilo tyraminy (łącznie 15 związków) zostały następnie poddane badaniom aktywności biologicznej. Jako związek odniesienia wykorzystano amidosiarczan 4-(2-dodekanoiloamino-etylo)-fenylu. Wyniki testu enzymatycznego wskazywały, że pochodnymi o najlepszych aktywnościach biologicznych

były te zawierające w swoich strukturach dwunastowęglowy łańcuch alifatyczny. Zaobserwowałem, iż właściwości alkilujące dimetylofosforanów mają decydujące znaczenie dla wysokiej aktywności biologicznej związków względem STS. Ponadto udowodniono, że o wzroście aktywności biologicznej związków decyduje również możliwość tworzenia efektywnych oddziaływań elektrostatycznych z resztami aminokwasowymi obecnymi w miejscu aktywnym STS.

d) Fosforowe i tiofosforowe pochodne flawonoidów

Otrzymałem również serię fosforowych i tiofosforowych pochodnych flawonoidów. Przeprowadzone wstępne badania z zakresu modelowania molekularnego wskazywały na wysoki potencjał tej klasy związków. Jak się okazało nowe inhibitory na bazie 7-hydroksy-2-fenylo-4*H*-chromen-4-onu, 2-(4-fluorofenylo)-7-hydroksy-4*H*-chromen-4-onu, 7-hydroksy-2-(4-(trifluorometylo)fenylo)-4*H*-chromen-4-onu oraz 7-hydroksy-2-(*p*-tolylo)-4*H*-chromen-4-onu wykazywały wysokie powinowactwo do miejsca aktywnego enzymu i charakteryzowały się niskimi wartościami energii kompleksu inhibitor-enzym.



Rys. 76. Ogólne struktury chemiczne nowych inhibitorów na bazie fosforowych i tiofosforowych pochodnych flawonoidów.

Analiza struktur z wykorzystaniem technik modelowania molekularnego pozwoliła na wyselekcjonowanie związków o najwyższym teoretycznym potencjale. W kolejnym etapie otrzymałem 22 analogi, które zbadano pod kątem aktywności biologicznej względem sulfatazy steroidowej STS. Fosforowe i tiofosforowe pochodne flawonoidowe cechowały się

niską aktywnością biologiczną lub były nieaktywne. Spośród wszystkich otrzymanych związków najaktywniejszymi okazały się być diestry flawonoidowe.

Wyniki badań naukowych uzyskanych w ramach realizacji tej pracy doktorskiej były przedmiotem publikacji naukowych z listy JCR:

- 1) **Kozak, W.**; Daško, M.; Masłyk, M.; Pieczykolan, J.S.; Gielniewski, B.; Rachoń, J.; Demkowicz, S.; Phosphate tricyclic coumarin analogs as steroid sulfatase inhibitors: synthesis and biological activity. *RSC Adv*, **2014**, 4, 44350-44358.
- 2) **Kozak, W.**; Daško, M.; Masłyk, M.; Gielniewski, B.; Rachon, J.; Demkowicz, S. Synthesis and biological evaluation of thiophosphate tricyclic coumarin derivatives as steroid sulfatase inhibitors. *J Asian Nat Prod Res*, **2015**, 17, 1091-1096.
- 3) Demkowicz, S.; **Kozak, W.**; Daško, M.; Masłyk, M.; Gielniewski, B.; Rachon, J. Synthesis of bicoumarin thiophosphate derivatives as steroid sulfatase inhibitors. *Eur J Med Chem*, **2015**, 101, 358-366.
- 4) Demkowicz, S.; **Kozak, W.**; Daško, M.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Rachon J. Phosphate and thiophosphate biphenyl analogs as steroid sulfatase inhibitors. *Drug Dev Res*, **2015**, 76, 94-104.
- 5) **Kozak, W.**; Daško, M.; Wołos, A.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Składanowski, A.; Misiak, M.; Rachon, J.; Demkowicz, S. Synthesis and steroid sulfatase inhibitory activities of *N*-alkanoyl tyramine phosphates and thiophosphates. *RSC Adv*, **2015**, 5, 32594-32603.
- 6) **Kozak, W.**; Daško, M.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Rachon, J.; Demkowicz, S. Steroid Sulfatase Inhibitors Based on Phosphate and Thiophosphate Flavone Analogs. *Drug Dev Res*, **2015**, 76, 450-462.

Ponadto wyniki badań zaprezentowane zostały na konferencjach naukowych o znaczeniu krajowym i międzynarodowym:

- 1) Daško, M.; **Kozak, W.**; Demkowicz, S.; Rachoń, J.; Synteza oraz badanie aktywności biologicznej inhibitorów sulfatazy steroidowej na bazie fosforoorganicznych pochodnych kumaryny (wyróżniony plakat). 57 Zjazd PTChem i SITPChem, Częstochowa **2014**.
- 2) **Kozak, W.**; Demkowicz, S.; Rachoń, J.; Synteza oraz badanie aktywności biologicznej nowych inhibitorów sulfatazy steroidowej (STS) na bazie

fosforoorganicznych pochodnych tyraminy (plakat). 57 Zjazd PTChem i SITPChem, Częstochowa **2014**.

- 3) 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 PTChem i SITPChem, Gdańsk **2015**.
- 4) **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 PTChem i SITPChem, Gdańsk **2015**.
- 5) Daško, M.; **Kozak, W.**; Demkowicz, S. Synthesis and Steroid Sulfatase Inhibitory Activity of *N*-phosphorylated 3-(4-aminophenyl)-coumarin-7-*O*-sulfamates (wyróżniony plakat). Progress in Organic Synthesis, Gdańsk **2016**.
- 6) **Kozak, W.**; Daško, M.; Demkowicz, S. Phosphate and Thiophosphate Flavone Analogs as Steroid Sulfatase Inhibitors (plakat). Progress in Organic Synthesis, Gdańsk **2016**.

Dodatkowo jestem współautorem trzech innych prac opublikowanych również w czasopiśmie z listy JCR:

- 1) Demkowicz, S.; Daško, M.; **Kozak, W.**; Krawczyk, K.; Witt, D.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Rachon, J. Synthesis and biological evaluation of fluorinated 3-phenylcoumarin-7-*O*-sulfamate derivatives as steroid sulfatase inhibitors. *Chem Biol Drug Des*, **2016**, 87, 233-238.
- 2) Demkowicz, S.; Rachon, J.; Daško, M.; **Kozak, W.** Selected organophosphorus compounds with biological activity. Applications in medicine. *RSC Adv*, **2016**, 6, 7101-7112.
- 3) Demkowicz, S.; **Kozak, W.**; Daško, M.; Rachon, J. Phosphoroorganic Metal Complexes in Therapeutics. *Mini Rev Med Chem*, **2016**, 16, 1359-1373.

II. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

12. Aparatura, odczynniki i procedury eksperymentalne

Kwas adypinowy, pimelinowy, dodekanowy, tridekanowy, tetradekanowy, mrówkowy oraz kwas (*p*-hydroksyfenylo)benzoesowy *N,N*-DMA, izocyjanian chlorosulfurylu, chlorek tionylu, 4-hydroksyfenetylamina, węglan potasu, TMSBr, cykloheptanon, rezorcyna, trichlorek fosforylu, trichlorek tiofosforylu, trietyloamina oraz 4-fenylofenol były komercyjnie dostępne w katalogu Sigmay Aldrich. 2-oksocyklopentakarboksylan etylu, 2-oksocykloheksakarboksylan etylu i 2-oksocykloheptakarboksylan otrzymałem według standardowych procedur literaturowych. THF, metanol i etanol suszyłem i destylowałem według standardowych procedur. Temperatury topnienia związków (niekorygowane) badałem przy użyciu aparatu Stuart Scientific SMP30. Widma NMR wykonałem w Pracowni NMR Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej z użyciem aparatu Varian Unity Plus 500 MHz ($\text{CDCl}_3 = 7.26$ ppm dla ^1H , 77.0 dla ^{13}C , DMSO-d_6 2.49 ppm dla ^1H , 39.5 ppm dla ^{13}C , 85% $\text{H}_3\text{PO}_4 = 0$ dla ^{31}P). Stałe sprzężenia podałem w hercach. Widma IR wykonałem przy użyciu spektrometru Nicolet 8700. Analizę elementarną wykonałem przy użyciu aparatu Carlo Erba EA-1108. Izolację produktów stosując preparatywną chromatografię kolumnową prowadziłem z użyciem żelu krzemionkowego (230-400 mesh, Merck). Do chromatografii cienkowarstwowej stosowałem płytki SIL/G/UV254 (Macherey-Nagel).

12.1. Przygotowanie struktury rentgenograficznej STS

Krystaliczną strukturę ludzkiej sulfatazy steroidowej wprowadził Ghosh i współpracownicy w 2007 roku [136]. Strukturę rentgenograficzną tego białka pozyskałem z Protein Data Bank (accession code 1P49). Po wykonaniu standardowej procedury przygotowawczej takiej jak usunięcie ze struktury enzymu cząsteczek wody krystalicznej czy konwersji formyloglicyny do formy *gem*-diolowej, mogłem rozpocząć próby dokowania do miejsca aktywnego enzymu. Struktury ligandów przygotowałem w programie *Portable HyperChem 8.0.7* (Hypercube Incorporation), a do stanu minimum energetycznego doprowadziłem je przy użyciu pola siłowego MM+ i nieliniowego gradientu sprzężonego Polaka-Ribieré'a.

12.2. Oprogramowanie i warunki dokowania

Dokowanie przygotowanych ligandów do struktury STS przeprowadziłem z użyciem programu *Autodock Vina 1.1.2* (Molecular Graphic Laboratory, Scripps Research Institute). Podczas dokowania do wszystkich obliczeń zastosowałem pudełko z siatką o rozmiarze 25 Å x 25 Å x 25 Å ze środkiem na atomie C_β reszty aminokwasowej FGly75. Dla wybranych struktur ligandów o najniższych wartościach energii i najlepszym dopasowaniu sporządziłem modele 3D w programie *VMD 1.9* (University of Illinois at Urbana-Champaign).

12.3. Oczyszczanie enzymu

STS pozyskano z homogenizowanego łożyska ludzkiego i oczyszczano na drodze trójstopniowej chromatografii z wykorzystaniem kolumn DEAE-celuloza, Con A-Sefaroza i Bio-Gel A-1.5 oraz odpowiednich buforów. Wszystkie procedury izolacji prowadzono w temperaturze 4 °C.

12.4. Test aktywności biologicznej *in vitro*

Mieszanina reakcyjna o objętości 100 μL, zawierała 20 μM Tris-HCl o pH 7.4, 3 mM NPS, różne stężenia inhibitora (0.1-500 μM) oraz 5U oczyszczonego enzymu (1U jest to ilość enzymu, która hydrolizuje 100 μM siarczanu *p*-nitrofenylu (NPS) w 1 godzinę w temperaturze 37 °C). Reakcję prowadzono w temperaturze 37 °C przez 15 minut i zakończono poprzez dodanie 100 μL 1M NaOH. Absorbancję uwolnionego *p*-nitrofenolu oznaczano przy długości fali 405 nm przy użyciu spektrometru Microplate Reader Biotek ELx800 (SERVA). Wartości IC₅₀ obliczono przy użyciu programu *GraphPad Prism*. Wszystkie pomiary powtarzano trzykrotnie.

13. Procedury otrzymywania poszczególnych związków

13.1. Procedura otrzymywania bifenyloetylofosforanu (157)

W kolbie kulistej o pojemności 50 mL, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne oraz zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, sporządzono roztwór soli trietyloamoniowej H-fosfonianu etylu (**143**) (4.5 mmol) w 15 mL bezwodnego CH₂Cl₂. Następnie do tego roztworu wdroplono 2,6-lutydynę (13.5 mmol) oraz PvCl (13.5 mmol). Całość mieszano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu do mieszaniny reakcyjnej dodano 4-fenylofenol (**172a**) (13.5 mmol). Następnie po 10 minutach mieszania dodano 5 mL roztworu jodu, wody i pirydyny i mieszano przez kolejne pół godziny. Kolejnym krokiem było dodanie do mieszaniny reakcyjnej octanu etylu w takiej ilości, aby wypadł osad soli 2,6-lutydynowej kwasu piwalowego. Po odsączeniu osadu rozpuszczalniki odparowano na wyparce obrotowej, a produkt izolowano wykorzystując preparatywną chromatografię kolumnową w układzie AcOEt:MeOH 10:1.

Wydajność 75%, tt 168 °C; ¹H NMR δ_H (500 MHz, CDCl₃) 1.37 (3H, t, *J* 7.0, CH₃), 4.23 (2H, quin, *J* 7.4, CH₂), 7.23-7.31 (2H, m, Ar-H), 7.32-7.38 (1H, m, Ar-H), 7.39-7.46 (2H, t, *J* 7.4, Ar-H), 7.40-7.90 (1H, brs, OH), 7.49-7.57 (4H, m, Ar-H); ³¹P NMR δ_P (202 MHz, CDCl₃) - 4.25.

13.2. Procedury otrzymywania fosforowych pochodnych kumarynowych (160a-160s) oraz pochodnych (164), (165) i (170)

13.2.1. Ogólna procedura otrzymywania związków 160d-160f i 160j-160l

W kolbie kulistej o pojemności 25 mL, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne oraz zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, sporządzono roztwór odpowiedniego analogu tricyklicznej kumaryny (**158a-158c**) (2.3 mmol) w 7 mL bezwodnego THF. Następnie do roztworu ochłodzonego do temperatury 0 °C wdroplono trichlorek fosforylu (POCl₃) (2.3 mmol) oraz trietyloaminę (NEt₃) (2.3 mmol). Utrzymując temperaturę 0 °C całość mieszano przez 60 minut. Po upływie tego czasu odsączono osad chlorowodoru trietyloaminy. Następnie w kolbie płaskodennej przygotowano roztwór alkoholu sodu

poprzez rozpuszczenie wodoroku sodu (NaH) (4.6 mmol) w 10 mL bezwodnego metanolu lub etanolu. Tak przygotowany roztwór wkroplono do mieszaniny reakcyjnej ciągle mieszając i utrzymując chłodzenie. Po 30 minutach odparowano rozpuszczalnik, a pozostałość rozpuszczono w 10 mL CH₂Cl₂. Po odsączeniu osadu chlorku sodu ponownie odparowano rozpuszczalnik, a produkt izolowano wykorzystując preparatywną chromatografię kolumnową stosując CH₂Cl₂ jako fazę ruchomą.

Dietylofosforan 4-okso-1,2,3,4-tetrahydrocyclopenta[c]chromen-7-ylu 160j

Wydajność 37%, tt 80-81 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 1720, 1608, 1568, 1506, 1392, 1269, 1149, 1051, 1018, 897, 751, 666; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 1.26 (6H, t, *J* 7.3, CH₃), 2.1 (2H, quin, *J* 7.6, CH₂), 2.74 (2H, t, *J* 7.1, CH₂), 3.06 (2H, t, *J* 7.6, CH₂), 4.18 (4H, quin, *J* 7.8, CH₂), 7.21-7.27 (2H, m, Ar-H), 7.62 (1H, d, *J* 8.8, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 159.4, 156.5, 154.9, 152.6 (d, *J*_{P-C} 6.6), 127.5, 126.8, 117 (d, *J*_{P-C} 4.4), 116.2, 108.5 (d, *J*_{P-C} 5.3), 65.4 (d, *J*_{P-C} 6.2), 32.4, 30.9, 22.6, 16.6 (d, *J*_{P-C} 6.6); ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) -5.69.

Dietylofosforan 6-okso-7,8,9,10-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-3-ylu 160k

Wydajność 41%, olej; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 1720, 1608, 1573, 1508, 1388, 1261, 1159, 1048, 1016, 902, 749, 683; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) 1.36 (6H, t, *J* 7.1, CH₃), 1.76-1.88 (4H, m, CH₂), 2.56 (2H, t, *J* 6.1, CH₂), 2.75 (2H, t, *J* 5.9, CH₂), 4.17-4.29 (4H, m, CH₂), 7.14-7.19 (2H, m, Ar-H), 7.51 (1H, d, *J* 8.3, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 161.7, 152.9, 152.1 (d, *J*_{P-C} 6.6), 146.9, 124.6, 123.2, 117.6, 116.4 (d, *J*_{P-C} 5.3), 108.5 (d, *J*_{P-C} 5.7), 65.2 (d, *J*_{P-C} 6.1), 25.5, 24.2, 21.7, 21.5, 16.3 (d, *J*_{P-C} 7.0); ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl₃) -5.63.

Dietylofosforan 6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyclohepta[c]chromen-3-ylu 160l

Wydajność 35%, tt 88-90 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 1703, 1606, 1566, 1508, 1381, 1267, 1157, 1050, 1007, 897, 764, 683; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) 1.27 (6H, t, *J* 7.1, CH₃), 1.46-1.52 (2H, m, CH₂), 1.54-1.62 (2H, m, CH₂), 1.78-1.86 (2H, m, CH₂), 2.74-2.80 (2H, m, CH₂), 2.92-2.98 (2H, m, CH₂), 4.18 (4H, quin, *J* 7.3, CH₂), 7.18-7.24 (2H, m, Ar-H), 7.93 (1H, d, *J* 8.8, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 161.4, 154.1, 153.4, 152.5 (d, *J*_{P-C} 6.6), 127.7, 127.1, 117.4, 116.9 (d, *J*_{P-C} 4.8), 108.5 (d, *J*_{P-C} 5.3), 65.4 (d, *J*_{P-C} 6.1), 32.0, 28.1, 26.8, 25.8, 25.2, 16.6 (d, *J*_{P-C} 6.1); ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl₃) -5.69.

Dimetylofosforan 4-okso-1,2,3,4-tetrahydrocyclopenta[c]chromen-7-ylu 160d

Wydajność 43%, tt 147-148 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 1714, 1608, 1568, 1508, 1395, 1273, 1136, 1020, 899, 783, 667; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 2.1 (2H, quin, *J* 7.6, CH₂), 2.74 (2H, t, *J* 7.3, CH₂), 3.05 (2H, t, *J* 7.6, CH₂), 3.83 (6H, d, *J* 11.7, CH₃), 7.21-7.29 (2H, m, Ar-H), 7.61 (1H, d, *J* 8.3, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 159.4, 156.5, 154.9, 152.5 (d, *J*_{P-C} 6.4),

127.5, 126.8, 117 (d, J_{P-C} 4.8), 116.4, 108.5 (d, J_{P-C} 5.3), 55.8 (d, J_{P-C} 6.6), 32.4, 30.9, 22.6; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) -3.43.

Dimetylofosforan 6-okso-7,8,9,10-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-3-ylu 160e

Wydajność 48%, tt 79-81 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 1703, 1610, 1574, 1506, 1387, 1288, 1144, 1024, 906, 775, 683; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 1.77-1.88 (4H, m, CH_2), 2.53-2.59 (2H, m, CH_2), 2.72-2.78 (2H, m, CH_2), 3.88 (6H, d, J 11.2, CH_3), 7.12-7.20 (2H, m, Ar-H), 7.52 (1H, d, J 7.3, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 161.6, 152.9, 151.9 (d, J_{P-C} 6.6), 146.8, 124.7, 123.3, 117.8, 116.3 (d, J_{P-C} 4.8), 108.5 (d, J_{P-C} 5.3), 55.5 (d, J_{P-C} 6.1), 25.5, 24.2, 21.7, 21.5; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) -3.33.

Dimetylofosforan 6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyklohepta[c]chromen-3-ylu 160f

Wydajność 44%, tt 114-116 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 1705, 1608, 1566, 1500, 1379, 1268, 1140, 1035, 897, 773, 683; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 1.56-1.62 (2H, m, CH_2), 1.62-1.70 (2H, m, CH_2), 1.86-1.93 (2H, m, CH_2), 2.86-2.94 (4H, m, CH_2), 3.88 (6H, d, J 11.2, CH_3), 7.16-7.20 (2H, m, Ar-H), 7.63 (1H, d, J 9.8, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 162.0, 153.5, 153.4, 152.2 (d, J_{P-C} 6.1), 128.2, 125.6, 117.5, 116.3 (d, J_{P-C} 4.8), 108.7 (d, J_{P-C} 5.7), 55.4 (d, J_{P-C} 6.1), 32.2, 28.4, 27.0, 25.8, 25.2; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) -3.38.

13.2.2. Ogólna procedura otrzymywania związków 160a-160z i 160m-160o

W kolbie kulistej o pojemności 25 mL, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne oraz zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, sporządzono roztwór odpowiedniego analogu tricyklicznej kumaryny (**158a-158c**) (2.3 mmol) w 7 mL bezwodnego THF. Następnie do roztworu ochłodzonego do temperatury 0 °C wkroplono POCl_3 (2.3 mmol) oraz NEt_3 (2.3 mmol). Utrzymując temperaturę 0 °C całość mieszano przez 60 minut. Po upływie tego czasu odsączono osad chlorowodoru trietyloaminy. Następnie w kolbie płaskodennej przygotowano roztwór alkoholany sodu poprzez rozpuszczenie NaH (2.3 mmol) w 8 mL bezwodnego etanolu lub metanolu. Tak przygotowany roztwór wkroplono do mieszaniny reakcyjnej ciągle mieszając i utrzymując chłodzenie. Po upływie 30 minut do mieszaniny reakcyjnej dodano 5 mL roztworu $\text{NH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$. Po 15 minutach odparowano rozpuszczalnik, a pozostałość rozpuszczono w 10 mL CH_2Cl_2 . Po odsączeniu osadu chlorku amonu oraz chlorku sodu odparowano ponownie rozpuszczalnik a otrzymany surowy produkt krystalizowano z octanu etylu.

Amidoetylofosforan 4-okso-1,2,3,4-tetrahydrocyklopenta[c]chromen-7-ylu 160a

Wydajność 34%, tt 187-189 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3340, 1710, 1610, 1566, 1508, 1392, 1261, 1151, 1030, 940, 883, 714, 667; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 1.25 (3H, t, J 7.1, CH_3), 2.1

(2H, quin, J 7.6, CH₂), 2.74 (2H, t, J 7.3, CH₂), 3.06 (2H, t, J 7.8, CH₂), 4.06 (2H, m, CH₂), 5.19 (2H, d, J_{P-N} 7.3, NH₂), 7.17-7.25 (2H, m, Ar-H), 7.59 (1H, d, Ar-H); ¹³C NMR δ_C (125 MHz, DMSO) 158.9, 156.1, 154.2, 153.2 (d, J_{P-C} 6.2), 126.4, 125.4, 116.8 (d, J_{P-C} 4.8), 114.7, 107.8 (d, J_{P-C} 5.3), 62.2 (d, J_{P-C} 5.7), 31.7, 21.9, 16 (d, J_{P-C} 6.6); ³¹P NMR δ_P (202 MHz, DMSO) 8.02.

Amidoetylofosforan 6-okso-7,8,9,10-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-3-ylu 160b

Wydajność 36%, tt 167-170 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3354, 1695, 1609, 1558, 1506, 1387, 1257, 1161, 1034, 930, 891, 725, 683; ¹H NMR δ_H (500 MHz, DMSO) 1.24 (3H, t, J 7.1, CH₃), 1.70-1.77 (4H, m, CH₂), 2.40- 2.49 (2H, m, CH₂), 2.76-2.78 (2H, m, CH₂), 4.02-4.07 (2H, m, CH₂) 5.18 (2H, d, J_{P-N} 7.3, NH₂), 7.16-7.18 (2H, m, Ar-H), 7.70 (1H, d, J 8.0, Ar-H); ¹³C NMR δ_C (125 MHz, DMSO) 160.5, 152.7 (d, J_{P-C} 6.1), 152.0, 147.2, 125.1, 121.3, 116.6 (d, J_{P-C} 4.8), 116.1, 107.6 (d, J_{P-C} 4.8), 62.1 (d, J_{P-C} 5.3), 24.7, 23.6, 21.1, 20.7, 16.0 (d, J_{P-C} 7.0); ³¹P NMR δ_P (202 MHz, DMSO) 8.03.

Amidoetylofosforan 6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyklohepta[c]chromen-3-ylu 160c

Wydajność 32%, tt 163-165 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3316, 1687, 1608, 1566, 1508, 1382, 1246, 1169, 1039, 951, 889, 733, 681; ¹H NMR δ_H (500 MHz, DMSO) 1.25 (3H, t, J 7.1, CH₃), 1.40-1.60 (4H, m, CH₂), 1.75- 1.90 (2H, m, CH₂), 2.70-2.80 (2H, m, CH₂), 2.85-3.00 (2H, m, CH₂), 4.00-4.10 (2H, m, CH₂), 5.19 (2H, d, J_{P-N} 6.8, NH₂), 7.10-7.20 (2H, m, Ar-H), 7.88 (1H, d, J 8.8, Ar-H); ¹³C NMR δ_C (125 MHz, DMSO) 161.59, 154.33, 153.75 (d, J_{P-C} 6.2), 153.36, 127.03, 126.63, 117.39 (d, J_{P-C} 5.3), 116.52, 108.50 (d, J_{P-C} 5.3), 62.86 (d, J_{P-C} 5.7), 32.04, 28.06, 26.73, 25.92, 25.28, 16.72 (d, J_{P-C} 7.0); ³¹P NMR δ_P (202 MHz, DMSO) 8.03.

Amidometylofosforan 4-okso-1,2,3,4-tetrahydrocyklopenta[c]chromen-7-ylu 160m

Wydajność 36%, tt 164-166 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3323, 1707, 1610, 1510, 1394, 1263, 1155, 1049, 964, 887, 793, 664; ¹H NMR δ_H (500 MHz, DMSO) 2.1 (2H, quin, J 7.6, CH₂), 2.73 (2H, t, J 7.3, CH₂), 3.04 (2H, t, J 7.6, CH₂), 3.68 (3H, d, J 11.2, CH₃), 5.24 (2H, d, J_{P-N} 7.3, NH₂), 7.17-7.24 (2H, m, Ar-H), 7.58 (1H, d, J 8.3, Ar-H); ¹³C NMR δ_C (125 MHz, DMSO) 159.6, 156.7, 154.9, 153.8 (d, J_{P-C} 5.7), 127.1, 126.2, 117.5 (d, J_{P-C} 5.3), 115.5, 108.5 (d, J_{P-C} 5.3), 53.7 (d, J_{P-C} 5.7), 32.4, 30.9, 22.6; ³¹P NMR δ_P (202 MHz, DMSO) 14.09.

Amidometylofosforan 6-okso-7,8,9,10-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-3-ylu 160n

Wydajność 28%, tt 183-187 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3311, 1699, 1608, 1508, 1386, 1258, 1159, 1055, 960, 885, 789, 680; ¹H NMR δ_H (500 MHz, DMSO) 1.65-1.80 (4H, m, CH₂), 2.37-2.43 (2H, m, CH₂), 2.70-2.80 (2H, m, CH₂), 3.68 (3H, d, J 11.2, CH₃), 5.22 (2H, d, J_{P-N} 7.3, NH₂), 7.14-7.20 (2H, m, Ar-H), 7.69 (1H, d, J 8.3, Ar-H); ¹³C NMR δ_C (125 MHz, DMSO) 160.5,

152.6 (d, J_{P-C} 6.1), 152.0, 147.1, 125.1, 121.4, 116.6 (d, J_{P-C} 4.8), 116.2, 107.6 (d, J_{P-C} 5.3), 53.0 (d, J_{P-C} 5.7), 24.7, 23.6, 21.1, 20.7; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 9.35.

Amidometylofosforan 6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyklohepta[c]chromen-3-ylu 160o

Wydajność 34%, tt 181-184 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3301, 1689, 1606, 1506, 1379, 1248, 1161, 1043, 947, 891, 777, 681; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 1.40-1.65 (4H, m, CH_2), 1.75-1.90 (2H, m, CH_2), 2.70-2.80 (2H, m, CH_2), 2.85-3.00 (2H, m, CH_2), 3.68 (3H, d, J 11.7, CH_3), 5.22 (2H, d, J_{P-N} 7.3, NH_2), 7.10-7.20 (2H, m, Ar-H), 7.89 (1H, d, J 8.8, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 161.6, 154.3, 153.6 (d, J_{P-C} 6.1), 153.4, 127.1, 126.7, 117.4 (d, J_{P-C} 5.3), 116.6, 108.5 (d, J_{P-C} 5.3), 53.7 (d, J_{P-C} 5.7), 32.0, 28.1, 26.7, 25.9, 25.3; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 9.35.

13.2.3. Ogólna procedura otrzymywania związków 160g-160i

W kolbie kulistej o pojemności 25 mL, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne oraz zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, sporządzono roztwór odpowiedniego analogu tricyklicznej kumaryny (**158a-158c**) (2.3 mmol) w 7 mL bezwodnego THF. Następnie do roztworu ochłodzonego do temperatury 0 °C wkroplono POCl_3 (2.3 mmol) oraz NEt_3 (2.3 mmol). Utrzymując temperaturę 0 °C całość mieszano przez 60 minut. Po upływie tego czasu mieszaninę reakcyjną przesączono do kolby zawierającej 5 mL roztworu $\text{NH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ usuwając jednocześnie wytrącony wcześniej osad chlorowodoru trietyloaminy. Po 15 minutach mieszania w temperaturze pokojowej odparowano rozpuszczalnik, a osad krystalizowano z metanolu.

Diamidofosforan 4-okso-1,2,3,4-tetrahydrocyklopenta[c]chromen-7-ylu 160g

Wydajność 33%, tt 188-190 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3340, 1691, 1610, 1558, 1504, 1391, 1216, 1130, 972, 895, 729; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 2.1 (2H, quin, J 7.3, CH_2), 2.74 (2H, t, J 7.3, CH_2), 3.05 (2H, t, J 7.6, CH_2), 4.53 (4H, d, J_{P-N} 4.4, NH_2), 7.1-7.3 (2H, m, Ar-H), 7.54 (1H, d, J 8.0, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 159.8, 157, 155.1 (d, J_{P-C} 6.6), 154.9, 126.7, 125.5, 118.1 (d, J_{P-C} 5.3), 114.7, 108.8 (d, J_{P-C} 4.8), 32.4, 30.8, 22.7; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 16.01.

Diamidofosforan 6-okso-7,8,9,10-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-3-ylu 160h

Wydajność 46%, tt 188-191 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3364, 1683, 1610, 1562, 1504, 1386, 1217, 1140, 962, 893, 725; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 1.68-1.75 (4H, m, CH_2), 2.37-2.48 (2H, m, CH_2), 2.71-2.74 (2H, m, CH_2), 4.52 (4H, d, J_{P-N} 4.4, NH_2), 7.11-7.20 (2H, m, Ar-H), 7.61 (1H, d, J 8.8, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 161.4, 154.6 (d, J_{P-C} 6.6), 152.7, 148.0,

125.3, 121.4, 117.9 (d, J_{P-C} 5.3), 116.0, 108.5 (d, J_{P-C} 4.8), 25.3, 24.3, 21.8, 21.5; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 15.99.

Diamidofosforan 6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyklohepta[c]chromen-3-ylu 160i

Wydajność 41%, tt 187-189 °C (z rozkładem); ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3232, 1703, 1605, 1564, 1504, 1381, 1203, 1142, 949, 908, 729; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 1.46-1.49 (2H, m, CH_2), 1.55-1.58 (2H, m, CH_2), 1.79- 1.82 (2H, m, CH_2), 2.73-2.78 (2H, m, CH_2), 2.90-2.97 (2H, m, CH_2), 4.53 (4H, d, J_{P-N} 3.9, NH_2), 7.12-7.22 (2H, m, Ar-H), 7.83 (1H, d, J 8.8, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 161.8, 154.9 (d, J_{P-C} 6.6), 154.6, 153.4, 126.5, 126.2, 118.0 (d, J_{P-C} 5.3), 115.8, 108.8 (d, J_{P-C} 4.8), 32.1, 28.0, 26.7, 26.0, 25.4; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 16.02.

13.2.4. Ogólna procedura otrzymywania związków 160p-160s

W kolbie kulistej o pojemności 25 mL, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne oraz zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, sporządzono roztwór związku (**160d-160f**) (1 mmol) w 7 mL CH_2Cl_2 . Do tak sporządzonego roztworu wkraplano TMSBr (4 mmol) i mieszano przez godzinę w atmosferze azotu. Następnie odparowano rozpuszczalnik i dodano 5 mL metanolu. Ponownie odparowano rozpuszczalnik, a otrzymany osad krystalizowano z octanu etylu.

Diwodorofosforan 4-okso-1,2,3,4-tetrahydrocyklopenta[c]chromen-7-ylu 160p

Wydajność 75%, tt 217-219 °C (z rozkładem); ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 2652, 1653, 1601, 1560, 1504, 1392, 1219, 1134, 1084, 1019, 964, 882; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 2.09 (2H, quin, J 7.6, CH_2), 2.73 (2H, t, J 7.3, CH_2), 3.04 (2H, t, J 7.3, CH_2), 7.14-7.18 (2H, m, Ar-H), 7.55 (1H, d, J 8.3, Ar-H), 8.80-10.90 (2H, brs, OH); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 159.61, 156.72, 154.91, 154.28, 127.05, 125.96, 117.22 (d, J_{P-C} 5.3), 115.14, 108.08 (d, J_{P-C} 5.3), 32.33, 30.83, 22.58; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) -5.45.

Diwodorofosforan 6-okso-7,8,9,10-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-3-ylu 160r

Wydajność 77%, tt 244-248 °C (z rozkładem); ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 2655, 1651, 1604, 1564, 1504, 1388, 1223, 1138, 1105, 1038, 972, 885; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 1.69- 1.78 (4H, m, CH_2), 2.39 (2H, t, J 5.9, CH_2), 2.73 (2H, t, J 5.9, CH_2), 7.13-7.15 (2H, m, Ar-H), 7.66 (1H, d, J 8.8, Ar-H), 7.80-9.80 (2H, brs, OH); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 161.24, 153.81 (d, J_{P-C} 5.7), 152.73, 147.85, 125.69, 121.86, 117.05 (d, J_{P-C} 5.3), 116.51, 107.90 (d, J_{P-C} 5.3), 25.33, 24.30, 21.77, 21.43; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) -5.41.

Diwodorofosforan 6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyklohepta[c]chromen-3-ylu 160s

Wydajność 81%, tt 230-233 °C (z rozkładem); ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 2656, 1645, 1599, 1556, 1504, 1381, 1236, 1140, 1109, 1029, 953, 875; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 1.47-1.56 (4H, m,

CH₂), 1.75-1.85 (2H, m, CH₂), 2.76 (2H, t, *J* 4.9, CH₂), 2.94 (2H, t, *J* 4.9, CH₂), 7.13- 7.15 (2H, m, Ar-H), 7.85 (1H, d, *J* 9.5, Ar-H), 7.95-8.90 (2H, brs, OH); ¹³C NMR δ_C (125 MHz, DMSO) 161.62, 154.34, 153.40, 126.86, 126.60, 117.11 (d, *J*_{P-C} 5.3), 116.26, 108.15 (d, *J*_{P-C} 5.3), 32.03, 28.05, 26.72, 25.92, 25.28; ³¹P NMR δ_P (202 MHz, DMSO) -5.43.

13.2.5. Procedura otrzymywania 3-(hydroksy)-8,9,10,11-tetrahydro-5H-cyklohepta[c]chinolin-6(7H)-onu 164

W reaktorze teflonowym umieszczono 3-aminofenol (3 mmol), 2-oksocykloheptakarboksylian etylu (3 mmol) i diwodorofosforan potasu (KH₂PO₄) (0.3 mmol). Mieszaninę poddawano działaniu mikrofal przez 8 minut (400 W). Po tym czasie mieszaninę reakcyjną wylano do zimnej wody (40 mL), a wydzielony osad odsączono i krystalizowano z 2-propanolu.

Wydajność 58%, tt 310-314 °C (z rozkładem); ν_{max} (KBr)/cm⁻¹ 3151, 1651, 1607, 1540, 1514, 1450, 1394, 1323, 1256, 1190, 847, 751, 692, 661; ¹H NMR δ_H (500 MHz, DMSO) 1.44-1.83 (6H, m, CH₂), 2.71-2.96 (4H, m, CH₂), 6.54- 6.76 (2H, m, Ar-H), 7.65 (1H, d, *J* 8.8 Hz, Ar-H), 9.96 (1H, s, OH), 11.43 (1H, s, NH); ¹³C NMR δ_C (125 MHz, DMSO) 162.12, 158.86, 150.00, 139.60, 129.31, 125.72, 112.48, 111.53, 100.30, 32.08, 27.78, 26.31, 25.70, 25.04.

13.2.6. Procedura otrzymywania diwodorofosforanu 6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydro-5H-cyklohepta[c]chinolin-3-ylu 165

W kolbie kulistej o pojemności 25 mL, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne oraz zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, sporządzono roztwór POCl₃ (2.3 mmol) w 5 mL THF. Mieszaninę ochłodzono do temperatury 0 °C, a następnie wkroplono roztwór 3-(hydroksy)-8,9,10,11-tetrahydro-5H-cyklohepta[c]chinolin-6(7H)-onu (**164**) (2.3 mmol) w 7 mL THF oraz NEt₃ (2.3 mmol). Roztwór mieszano w atmosferze azotu przez godzinę. Po upływie tego czasu odsączono powstały osad chlorowodoru trietyloaminy i dodano 3 mL wody. Po upływie 2 godzin mieszaninę reakcyjną wylano do 50 mL wody i ekstrahowano gorącym octanem etylu (3 x 20 mL). Połączone warstwy organiczne suszono siarczanem magnezu, następnie odparowano rozpuszczalnik, a otrzymany osad krystalizowano z 2-propanolu.

Wydajność 20%, tt 219-222 °C (z rozkładem); ν_{max} (KBr)/cm⁻¹ 2614, 1666, 1604, 1558, 1512, 1459, 1396, 1370, 1325, 1242, 1195, 944, 862, 745, 679, 624; ¹H NMR δ_H (500 MHz, DMSO) 1.40-1.45 (2H, m, CH₂), 1.50-1.60 (2H, m, CH₂), 1.75-1.85 (2H, m, CH₂), 2.83-2.98 (4H, m, CH₂), 3.90- 6.80 (2H, brs, OH), 6.95-7.15 (2H, m, Ar-H), 7.81 (1H, d, *J* 9.3, Ar-H), 11.64 (1H, s, NH); ¹³C NMR δ_C (125 MHz, DMSO) 162.33, 152.84, 150.10, 139.25, 132.61,

126.18, 116.31, 115.16, 106.69, 32.45, 28.17, 26.44, 25.93, 25.53; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) -5.32.

13.2.7. Procedura otrzymywania kwasu 6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyklohepta[c]chromen-3-ylofosfonowego 170

W kolbie kulistej o pojemności 25 mL, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne oraz zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, sporządzono roztwór związku (**169**) (1 mmol) w 10 mL CH_2Cl_2 . Otrzymaną mieszaninę ochłodzono do temperatury 0 °C, a następnie wkroplono TMSBr (4 mmol). Roztwór mieszano w atmosferze azotu przez godzinę. Po odparowaniu rozpuszczalnika dodano 5 mL metanolu i ponownie odparowano. Otrzymany osad przemywano octanem etylu otrzymując końcowy produkt.

Wydajność 87%, tt 229-234 °C (z rozkładem); ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 2611, 1665, 1605, 1558, 1512, 1460, 1398, 1368, 1241, 1196, 945, 863, 743, 680, 622; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 1.45-1.55 (2H, m, CH_2), 1.57-1.65 (2H, m, CH_2), 1.80-1.85 (2H, m, CH_2), 2.75-2.85 (2H, m, CH_2), 2.95-3.05 (2H, m, CH_2), 7.47-7.6 (2H, m, Ar-H), 7.95 (1H, d, J 3.9, Ar-H), 8.8-11.6 (2H, brs, OH); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 161.34, 153.83, 152.00 (d, $J_{\text{P-C}}$ 19.8), 137.80 (d, $J_{\text{P-C}}$ 180.5), 130.04, 126.63 (d, $J_{\text{P-C}}$ 8.8), 125.45 (d, $J_{\text{P-C}}$ 14.9), 121.81, 118.80 (d, $J_{\text{P-C}}$ 10.5), 31.98, 27.84, 26.93, 25.69, 25.14; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 11.27.

13.3. Procedury otrzymywania tiofosforowych pochodnych kumarynowych (162a-162w) oraz (163a-163f)

13.3.1. Ogólna procedura otrzymywania związków 163a-163f

W kolbie kulistej o pojemności 25 mL, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne oraz zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, sporządzono roztwór odpowiedniego analogu tricyklicznej kumaryny (**158a-158c**) (2.3 mmol) w 7 mL bezwodnego THF. Następnie do roztworu ochłodzonego do temperatury 0 °C wkroplono trichlorek tiofosforu (PSCl_3) (2.3 mmol) oraz NEt_3 (2.3 mmol). Utrzymując temperaturę 0 °C całość mieszano przez 2,5 godziny po czym odsączono wydzielony chlorowodorek trietyloaminy. Następnie w kolbie płaskodennej przygotowano roztwór alkoholany sodu poprzez rozpuszczenie NaH (2.3 mmol) w 6 mL bezwodnego metanolu lub etanolu. Tak przygotowany roztwór wkroplono do mieszaniny reakcyjnej ciągle mieszając i utrzymując chłodzenie. Po godzinie odparowano rozpuszczalnik, a do pozostałości dodano CH_2Cl_2 . Po odsączeniu osadu chlorku sodu

ponownie odparowano rozpuszczalnik. Otrzymany surowy produkt oczyszczano za pomocą preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie CHCl_3 : eter naftowy 1:1.

Chloroetylotiofosforan 4-okso-1,2,3,4-tetrahydrocyklopenta[c]chromen-7-ylu 163a

Wydajność 75%, tt 133-134 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 1720, 1606, 1568, 1500, 1386, 1238, 1139, 1014, 896, 820, 659, 578; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 1.49 (3H, t, J 7.1, CH_3), 2.23 (2H, quin, J 7.6, CH_2), 2.93 (2H, t, J 7.3, CH_2), 3.08 (2H, t, J 7.6, CH_2), 4.45 (2H, m, CH_2), 7.21-7.31 (2H, m, Ar-H), 7.46 (1H, d, J 8.3, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 159.9, 155.6, 154.9, 151.7 (d, $J_{\text{P-C}}$ 9.2), 128, 126, 117.8 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.3), 117.3, 110.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.7), 67.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.5), 32.3, 30.9, 22.7, 15.9 (d, $J_{\text{P-C}}$ 8.8); ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 64.02.

Chloroetylotiofosforan 6-okso-7,8,9,10-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-3-ylu 163b

Wydajność 62%, tt 130-132 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 1714, 1608, 1575, 1497, 1386, 1259, 1134, 1016, 902, 810, 676, 595; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 1.49 (3H, t, J 7.1, CH_3), 1.75-1.95 (4H, m, CH_2), 2.59 (2H, t, J 5.9, CH_2), 2.78 (2H, t, J 6.1, CH_2), 4.35-4.50 (2H, m, CH_2), 7.20-7.30 (2H, m, Ar-H), 7.59 (1H, d, J 8.3, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 161.7, 153.0, 151.4 (d, $J_{\text{P-C}}$ 9.2), 146.9, 124.8, 124.2, 118.9, 117.8 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.5), 110.3 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.6), 67.7 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.4), 25.8, 24.5, 22.0, 21.7, 16.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 8.7); ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 64.07.

Chloroetylotiofosforan 6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyklohepta[c]chromen-3-ylu 163c

Wydajność 61%, tt 75-76 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 1711, 1604, 1566, 1504, 1375, 1260, 1133, 1004, 894, 822, 665, 585; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 1.49 (3H, t, J 7.1, CH_3), 1.60-1.80 (4H, m, CH_2), 1.90-2.00 (2H, m, CH_2), 2.75-3.00 (4H, m, CH_2), 4.30-4.50 (2H, m, CH_2), 7.15-7.30 (2H, m, Ar-H), 7.69 (1H, d, J 8.8, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 161.9, 153.3, 151.4 (d, $J_{\text{P-C}}$ 9.2), 128.8, 125.5, 118.3, 117.6 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.3), 110.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.3), 67.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.5), 32.2, 28.5, 27.1, 25.8, 25.1, 15.9 (d, $J_{\text{P-C}}$ 8.8); ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 63.90.

Chlorometylotiofosforan 4-okso-1,2,3,4-tetrahydrocyklopenta[c]chromen-7-ylu 163d

Wydajność 63%, tt 107-108 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 1719, 1606, 1569, 1498, 1384, 1268, 1136, 1019, 896, 820, 688, 579; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 2.22 (2H, quin, J 7.6, CH_2), 2.92 (2H, t, J 7.3, CH_2), 3.07 (2H, t, J 7.6, CH_2), 4.03 (3H, d, J 16.6, CH_3), 7.20-7.28 (2H, m, Ar-H), 7.46 (1H, d, J 8.8, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 159.8, 155.6, 154.9, 151.6 (d, $J_{\text{P-C}}$ 9.2), 128.1, 126.1, 117.7 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.3), 117.3, 110.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.3), 56.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.0), 32.3, 30.9, 22.7; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 66.09.

Chlorometylotiofosforan 6-okso-7,8,9,10-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-3-ylu 163e

Wydajność 60%, tt 103-106 °C; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 1712, 1606, 1575, 1504, 1384, 1258, 1134, 1022, 898, 811, 688, 571; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, CDCl_3) 1.76-1.92 (4H, m, CH_2), 2.54-2.62 (2H, m, CH_2), 2.72-2.80 (2H, m, CH_2), 4.03 (3H, d, J 16.6, CH_3), 7.16-7.28 (2H, m, Ar-H), 7.57 (1H, d, J 8.8, Ar-H); $^{13}\text{C NMR } \delta_{\text{C}}$ (125 MHz, CDCl_3) 161.5, 152.7, 151.1 (d, $J_{\text{P-C}}$ 9.2), 146.7, 124.7, 124.0, 118.8, 117.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 110.0 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.7), 56.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.5), 25.5, 24.3, 21.7, 21.5; $^{31}\text{P NMR } \delta_{\text{P}}$ (202 MHz, CDCl_3) 66.11.

Chlorometylotiofosforan 6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyklohepta[c]chromen-3-ylu 163f

Wydajność 63%, olej; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 1688, 1605, 1560, 1502, 1379, 1267, 1139, 1007, 880, 806, 687, 576; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, CDCl_3) 1.50-1.75 (4H, m, CH_2), 1.85-2.00 (2H, m, CH_2), 2.80-3.00 (4H, m, CH_2), 4.02 (3H, d, J 16.1, CH_3), 7.10-7.30 (2H, m, Ar-H), 7.69 (1H, d, J 8.8, Ar-H); $^{13}\text{C NMR } \delta_{\text{C}}$ (125 MHz, CDCl_3) 161.8, 153.3, 151.4 (d, $J_{\text{P-C}}$ 9.2), 128.8, 125.5, 118.4, 117.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.3), 110.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.7), 56.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.5), 32.2, 28.5, 27.1, 25.8, 25.1; $^{31}\text{P NMR } \delta_{\text{P}}$ (202 MHz, CDCl_3) 66.00.

13.3.2. Ogólna procedura otrzymywania związków 162g-162i i 162m-162o

W kolbie kulistej o pojemności 25 mL, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne oraz zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, sporządzono roztwór odpowiedniego monochlorku (**163a-163f**) (1 mmol) w 7 mL bezwodnego THF. Roztwór ochłodzono do temperatury 0 °C. Następnie w kolbie płaskodennej przygotowano roztwór alkoholanu sodu poprzez rozpuszczenie NaH (1 mmol) w 4 mL bezwodnego metanolu lub etanolu. Tak przygotowany roztwór wkroplono do mieszaniny reakcyjnej ciągle mieszając i utrzymując chłodzenie. Po godzinie odparowano rozpuszczalnik, a powstały osad rozpuszczono w 10 mL CH_2Cl_2 . Po odsączeniu osadu chlorku sodu ponownie odparowano rozpuszczalnik. Otrzymany surowy produkt oczyszczano za pomocą preparatywnej chromatografii kolumnowej stosując CH_2Cl_2 jako fazę ruchomą.

Dietylotiofosforan 4-okso-1,2,3,4-tetrahydrocyklopenta[c]chromen-7-ylu 162g

Wydajność 73%, tt 80-84 °C; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 1722, 1604, 1567, 1510, 1390, 1274, 1146, 1015, 963, 909, 817, 764, 638; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, CDCl_3) 1.38 (6H, t, J 7.1, CH_3), 2.21 (2H, quin, J 7.8, CH_2), 2.91 (2H, t, J 7.3, CH_2), 3.06 (2H, t, J 7.6, CH_2), 4.26 (4H, m, CH_2), 7.11-7.21 (2H, m, Ar-H), 7.41 (1H, d, J 8.8, Ar-H); $^{13}\text{C NMR } \delta_{\text{C}}$ (125 MHz, CDCl_3) 160.1, 155.9, 154.9, 152.6 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.5), 127.3, 125.8, 117.7 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 116.4, 109.7 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.3), 65.6 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.7), 32.3, 30.8, 22.7, 16.1 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.5); $^{31}\text{P NMR } \delta_{\text{P}}$ (202 MHz, CDCl_3) 63.75.

Dietylotiofosforan 6-okso-7,8,9,10-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-3-ylu 162h

Wydajność 82%, tt 86-87 °C; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 1699, 1608, 1573, 1504, 1386, 1276, 1159, 1014, 963, 901, 801, 753, 660; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, CDCl_3) 1.37 (6H, t, J 6.8, CH_3), 1.70-1.90 (4H, m, CH_2), 2.56 (2H, m, CH_2), 2.75 (2H, m, CH_2), 4.20-4.40 (4H, m, CH_2), 7.10-7.20 (2H, m, Ar-H), 7.52 (1H, d, J 8.3, Ar-H); $^{13}\text{C NMR } \delta_{\text{C}}$ (125 MHz, CDCl_3) 161.8, 152.8, 151.1 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.0), 147.0, 124.4, 123.2, 117.8, 117.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 109.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.3), 65.6 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.7), 25.5, 24.2, 21.8, 21.5, 16.1 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.0); $^{31}\text{P NMR } \delta_{\text{P}}$ (202 MHz, CDCl_3) 63.77.

Dietylotiofosforan 6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyklohepta[c]chromen-3-ylu 162i

Wydajność 79%, tt 69-70 °C; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 1707, 1606, 1566, 1505, 1391, 1265, 1139, 1008, 968, 896, 804, 776, 626; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, CDCl_3) 1.38 (6H, t, J 7.1, CH_3), 1.50-1.70 (4H, m, CH_2), 1.80-2.00 (2H, m, CH_2), 2.80-3.00 (4H, m, CH_2), 4.20-4.30 (4H, m, CH_2), 7.10-7.20 (2H, m, Ar-H), 7.64 (1H, d, J 8.8, Ar-H); $^{13}\text{C NMR } \delta_{\text{C}}$ (125 MHz, CDCl_3) 162.1, 153.5, 153.4, 152.4 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.5), 128.1, 125.2, 117.5, 109.7 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 65.6 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.7), 32.2, 28.4, 27.0, 25.9, 25.2, 16.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.5); $^{31}\text{P NMR } \delta_{\text{P}}$ (202 MHz, CDCl_3) 63.69.

Dimetylotiofosforan 4-okso-1,2,3,4-tetrahydrocyklopenta[c]chromen-7-ylu 162m

Wydajność 76%, tt 87-89 °C; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 1734, 1610, 1567, 1508, 1390, 1269, 1147, 1016, 880, 823, 764, 631; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, CDCl_3) 2.22 (2H, quin, J 7.6, CH_2), 2.92 (2H, t, J 7.6, CH_2), 3.06 (2H, t, J 7.6, CH_2), 3.88 (6H, d, J 14.2, CH_3), 7.11-7.27 (2H, m, Ar-H), 7.42 (1H, d, J 8.3, Ar-H); $^{13}\text{C NMR } \delta_{\text{C}}$ (125 MHz, CDCl_3) 160, 155.8, 155, 152.4 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.5), 127.5, 125.9, 117.6 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.3), 116.6, 109.7 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.3), 55.6 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.3), 32.3, 30.8, 22.7; $^{31}\text{P NMR } \delta_{\text{P}}$ (202 MHz, CDCl_3) 67.34.

Dimetylotiofosforan 6-okso-7,8,9,10-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-3-ylu 162n

Wydajność 81%, tt 99-101 °C; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 1701, 1608, 1575, 1498, 1387, 1259, 1148, 1024, 909, 807, 765, 640; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, CDCl_3) 1.78-1.90 (4H, m, CH_2), 2.54-2.60 (2H, m, CH_2), 2.74-2.78 (2H, m, CH_2), 3.88 (6H, d, J 13.7, CH_3), 7.08-7.16 (2H, m, Ar-H), 7.54 (1H, d, J 8.3, Ar-H); $^{13}\text{C NMR } \delta_{\text{C}}$ (125 MHz, CDCl_3) 161.7, 152.8, 152.0 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.0), 146.9, 124.5, 123.4, 118.0, 117.3 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.3), 109.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 55.6 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.7), 25.5, 24.2, 21.8, 21.5; $^{31}\text{P NMR } \delta_{\text{P}}$ (202 MHz, CDCl_3) 67.38.

Dimetylotiofosforan 6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyklohepta[c]chromen-3-ylu 162o

Wydajność 85%, olej; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 1702, 1606, 1568, 1502, 1377, 1265, 1139, 1030, 897, 818, 775, 623; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, CDCl_3) 1.55-1.70 (4H, m, CH_2), 1.85-1.95 (2H, m, CH_2), 2.85-3.00 (4H, m, CH_2), 3.88 (6H, d, J 14.2, CH_3), 7.05-7.20 (2H, m, Ar-H), 7.64 (1H, d, J 8.8, Ar-H); $^{13}\text{C NMR } \delta_{\text{C}}$ (125 MHz, CDCl_3) 162.1, 153.5, 153.4, 152.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.5),

128.2, 125.3, 117.6, 117.3 (d, J_{P-C} 5.3), 109.7 (d, J_{P-C} 4.8), 55.7 (d, J_{P-C} 5.7), 32.2, 28.4, 27.0, 25.8, 25.2; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 67.28.

13.3.3. Ogólna procedura otrzymywania związków 162d-162f i 162j-162l

W kolbie kulistej o pojemności 25 mL, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne oraz zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, sporządzono roztwór odpowiedniego monochloroku (**163a-163f**) (1 mmol) w 7 mL bezwodnego THF. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano 5 mL roztworu $\text{NH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$. Po 15 minutach odparowano rozpuszczalnik, a wytrącony osad rozpuszczono w 10 mL CH_2Cl_2 . Po odsączeniu osadu chlorku amonu ponownie odparowano rozpuszczalnik. Otrzymany surowy produkt oczyszczano za pomocą preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie CHCl_3 : CH_3COOEt 20:1.

Amidoetylotiofosforan 4-okso-1,2,3,4-tetrahydrocyklopenta[c]chromen-7-ylu 162d

Wydajność 65%, tt 140-141 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3250, 1716, 1608, 1560, 1507, 1388, 1270, 1147, 1028, 947, 871, 800, 750, 630; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 1.38 (3H, t, J 7.1, CH_3), 2.20 (2H, quin, J 7.6, CH_2), 2.9 (2H, t, J 7.3, CH_2), 3.04 (2H, t, J 7.6, CH_2), 3.47 (2H, brs, NH_2), 4.23 (2H, m, CH_2), 7.18-7.26 (2H, m, Ar-H), 7.39 (1H, d, J 8.3, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 160.3, 156, 154.9, 153 (d, J_{P-C} 7.5), 127.1, 125.7, 118 (d, J_{P-C} 4.8), 116.2, 109.9 (d, J_{P-C} 4.8), 64.4 (d, J_{P-C} 4.8), 32.3, 30.8, 22.7, 16.2 (d, J_{P-C} 8.3); ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 69.02.

Amidoetylotiofosforan 6-okso-7,8,9,10-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-3-ylu 162e

Wydajność 73%, tt 129-133 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3268, 1705, 1608, 1548, 1504, 1387, 1261, 1142, 1026, 938, 884, 797, 744, 631; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 1.37 (3H, t, J 6.8, CH_3), 1.70-1.90 (4H, m, CH_2), 2.55 (2H, t, J 6.1, CH_2), 2.73 (2H, t, J 6.1, CH_2), 3.56 (2H, d, J_{P-N} 3.9, NH_2), 4.10-4.30 (2H, m, CH_2), 7.10-7.20 (2H, m, Ar-H), 7.50 (1H, d, J 8.3, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 161.9, 152.7, 152.5 (d, J_{P-C} 7.5), 147.1, 124.3, 123.0, 117.8 (d, J_{P-C} 4.8), 117.6, 109.7 (d, J_{P-C} 5.3), 64.4 (d, J_{P-C} 5.3), 25.5, 24.2, 21.8, 21.5, 16.2 (d, J_{P-C} 8.3); ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 69.05.

Amidoetylotiofosforan 6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyklohepta[c]chromen-3-ylu 162f

Wydajność 74%, tt 121-123 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3272, 1678, 1610, 1532, 1505, 1379, 1267, 1146, 1003, 942, 867, 797, 735, 625; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 1.37 (3H, t, J 7.1, CH_3), 1.50-1.70 (4H, m, CH_2), 1.80-1.95 (2H, m, CH_2), 2.80-3.00 (4H, m, CH_2), 3.56 (2H, br s, NH_2), 4.20-4.30 (2H, m, CH_2), 7.10-7.30 (2H, m, Ar-H), 7.62 (1H, d, J 8.8, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 162.3, 153.7, 153.3, 152.7 (d, J_{P-C} 7.5), 127.9, 125.1, 117.8 (d, J_{P-C}

5.3), 117.3, 109.9 (d, J_{P-C} 5.3), 64.4 (d, J_{P-C} 5.3), 32.2, 28.4, 27.0, 25.9, 25.2, 16.2 (d, J_{P-C} 8.3); ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 69.00.

Amidometylotiofosforan 4-okso-1,2,3,4-tetrahydrocyclopenta[c]chromen-7-ylu 162j

Wydajność 67%, tt 123-125 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3259, 1717, 1608, 1558, 1508, 1390, 1266, 1148, 1032, 962, 871, 808, 752, 624; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 2.21 (2H, quin, J 7.6, CH_2), 2.90 (2 H, t, J 7.3, CH_2), 3.05 (2H, t, J 7.6, CH_2), 3.52 (2H, br s, NH_2), 3.85 (3H, d, J 14.2, CH_3), 7.18-7.26 (2H, m, Ar-H), 7.40 (1H, d, J 8.3, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 160.2, 156, 154.9, 152.9 (d, J_{P-C} 7.0), 127.2, 125.8, 117.9 (d, J_{P-C} 4.8), 116.3, 109.9 (d, J_{P-C} 4.8), 54.5 (d, J_{P-C} 5.3), 32.3, 30.8, 22.7; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 70.99.

Amidometylotiofosforan 6-okso-7,8,9,10-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-3-ylu 162k

Wydajność 76%, tt 123-125 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3239, 1694, 1608, 1558, 1500, 1386, 1259, 1153, 1031, 960, 883, 793, 751, 636; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 1.74-1.90 (4H, m, CH_2), 2.52-2.60 (2H, m, CH_2), 2.70-2.78 (2H, m, CH_2), 3.34 (2H, br s, NH_2), 3.84 (3H, d, J 14.2, CH_3), 7.14-7.22 (2H, m, Ar-H), 7.51 (1H, d, J 8.3, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 162.1, 153.0, 152.6, 147.3, 124.5, 123.3, 118.0, 117.9, 109.9 (d, J_{P-C} 5.2), 54.7 (d, J_{P-C} 5.2), 25.7, 24.5, 22.0, 21.8; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 71.02.

Amidometylotiofosforan 6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyclohepta[c]chromen-3-ylu 162l

Wydajność 72%, tt 115-118 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3250, 1683, 1606, 1559, 1500, 1387, 1261, 1154, 1035, 967, 875, 799, 754, 629; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 1.50-1.70 (4H, m, CH_2), 1.80-2.00 (2H, m, CH_2), 2.80-3.00 (4H, m, CH_2), 3.58 (2H, br s, NH_2), 3.83 (3H, d, J 14.2, CH_3), 7.10-7.30 (2H, m, Ar-H), 7.62 (1H, d, J 8.8, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 162.2, 153.6, 153.3, 152.7 (d, J_{P-C} 7.5), 128.0, 125.2, 117.7 (d, J_{P-C} 4.8), 117.4, 109.9 (d, J_{P-C} 4.8), 54.5 (d, J_{P-C} 4.8), 32.2, 28.4, 27.0, 25.9, 25.2; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 70.98.

13.3.4. Ogólna procedura otrzymywania związków 162p-162w

W kolbie kulistej o pojemności 25 mL, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne oraz zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, sporządzono roztwór odpowiedniego monochlorku (**163a-163f**) (1 mmol) w 7 mL bezwodnego THF. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano 10% roztwór K_2CO_3 w wodzie (1 mL). Roztwór mieszano przez 4 godziny, następnie odparowano, a surowy produkt oczyszczano za pomocą preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie AcOEt:MeOH 10:1.

Etylowodorotiofosforan 4-okso-1,2,3,4-tetrahydrocyclopenta[c]chromen-7-ylu 162p

Wydajność 72%, olej; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 3404, 1695, 1609, 1562, 1508, 1392, 1255, 1127, 1030, 950, 848, 626; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 1.13 (3H, t, J 7.1, CH_3), 2.10 (2H, quin, J 7.3, CH_2), 2.73 (2H, t, J 7.3, CH_2), 3.05 (2H, t, J 7.3, CH_2), 3.75-3.95 (2H, m, CH_2), 7.04-7.35 (2H, m, Ar-H), 7.47 (1H, d, J 8.3, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 160.0, 157.2, 156.7 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.0), 154.9, 126.2, 124.7, 117.0 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.7), 113.6, 108.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 61.7 (d, $J_{\text{P-C}}$ 6.1), 32.3, 30.8, 22.7, 16.1 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.9); ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 50.39.

Etylowodorotiofosforan 6-okso-7,8,9,10-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-3-ylu 162r

Wydajność 68%, tt 93-97 °C; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 3412, 1693, 1608, 1567, 1504, 1388, 1263, 1137, 1031, 947, 850, 626; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 1.13 (3H, t, J 7.1, CH_3), 1.60-1.80 (4H, m, CH_2), 2.35-2.45 (2H, m, CH_2), 2.65-2.85 (2H, m, CH_2), 3.80-4.00 (2H, m, CH_2), 7.03-7.14 (2H, m, Ar-H), 7.56 (1H, d, J 8.8, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 161.6, 156.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.0), 152.6, 148.2, 124.8, 120.6, 117.7 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.7), 114.9, 108.0 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.3), 61.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 6.1), 25.3, 24.3, 21.9, 21.5, 16.8 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.9); ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 50.38.

Etylowodorotiofosforan 6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyklohepta[c]chromen-3-ylu 162s

Wydajność 65%, tt 71-75 °C; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 3407, 1687, 1604, 1562, 1504, 1381, 1268, 1137, 1037, 943, 857, 625; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 1.14 (3H, t, J 7.1, CH_3), 1.40-1.65 (4H, m, CH_2), 1.75-1.85 (2H, m, CH_2), 2.70-3.00 (4H, m, CH_2), 3.80-4.00 (2H, m, CH_2), 7.05-7.25 (2H, m, Ar-H), 7.75 (1H, d, J 9.3, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 162.0, 156.6 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.0), 154.8, 153.3, 125.7, 125.6, 117.8 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.7), 114.6, 108.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.3), 61.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 6.6), 32.1, 28.0, 26.7, 26.1, 25.4, 16.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.9); ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 50.51.

Metylowodorotiofosforan 4-okso-1,2,3,4-tetrahydrocyklopenta[c]chromen-7-ylu 162t

Wydajność 32%, olej; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 3405, 1693, 1606, 1560, 1508, 1392, 1236, 1134, 1060, 975, 854; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 2.10 (2H, quin, J 7.3, CH_2), 2.73 (2H, t, J 7.3, CH_2), 3.05 (2H, t, J 7.3, CH_2), 3.47 (3H, d, J 13.2, CH_3), 7.10-7.26 (2H, m, Ar-H), 7.47 (1H, d, J 8.3, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 160.0, 157.2, 155.0, 152.4 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.5), 126.2, 124.7, 117.9, 113.7, 108.2, 53.0 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.0), 32.3, 30.8, 22.7; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 51.95.

Metylowodorotiofosforan 6-okso-7,8,9,10-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-3-ylu 162u

Wydajność 28%, olej; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 3400, 1686, 1604, 1560, 1504, 1380, 1234, 1139, 1070, 976, 858; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 1.69-1.77 (4H, m, CH_2), 2.39 (2H, t, J 6.1, CH_2), 2.76 (2H, t, J 6.1, CH_2), 3.46 (3H, d, J 13.2, CH_3), 7.09-7.18 (2H, m, Ar-H), 7.58 (1H,

d, J 8.8, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 161.6, 156.0 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.5), 152.7, 148.2, 124.8, 120.7, 117.7 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.7), 115.0, 108.0 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.3), 53.0 (d, $J_{\text{P-C}}$ 6.6), 25.3, 24.3, 21.9, 21.5; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 51.98.

Metylowodorotiofosforan 6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyklohepta[c]chromen-3-ylu 162w

Wydajność 25%, tt (z rozkładem); ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3400, 1686, 1604, 1560, 1504, 1380, 1234, 1139, 1070, 976, 858; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 1.45-1.70 (4H, m, CH_2), 1.75-1.95 (2H, m, CH_2), 2.70-3.05 (4H, m, CH_2), 3.47 (3H, d, J 13.2, CH_3), 7.05-7.30 (2H, m, Ar-H), 7.75 (1H, d, J 9.3, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 162.0, 156.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.0), 154.8, 153.4, 125.8, 125.7, 117.8 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.7), 114.7, 108.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.3), 53.0 (d, $J_{\text{P-C}}$ 6.6), 32.1, 28.0, 26.7, 26.1, 25.4; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 52.08.

13.3.5. Ogólna procedura otrzymywania związków 162a-162c

W kolbie kulistej o pojemności 25 mL, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne oraz zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, sporządzono roztwór odpowiedniego analogu tricyklicznej kumaryny (**158a-158c**) (2.3 mmol) w 7 mL bezwodnego THF. Następnie do roztworu ochłodzonego do temperatury 0 °C wkroplono PSCl_3 (2.3 mmol) oraz NET_3 (2.3 mmol). Utrzymując temperaturę 0 °C całość mieszano przez 2,5 godziny. Po upływie tego czasu mieszaninę reakcyjną przesączono do kolby zawierającej 5 mL roztworu $\text{NH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ usuwając tym samym wytrącony wcześniej osad chlorowodoru trietyloaminy. Po 15 minutach mieszania w temperaturze pokojowej odparowano rozpuszczalnik, a osad krystalizowano z metanolu.

Diamidotiofosforan 4-okso-1,2,3,4-tetrahydrocyklopenta[c]chromen-7-ylu 162a

Wydajność 49%, tt 175-178 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3294, 1699, 1602, 1552, 1500, 1390, 1234, 1125, 961, 872, 758, 629; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 2.1 (2H, quin, J 7.6, CH_2), 2.74 (2H, t, J 7.4, CH_2), 3.06 (2H, t, J 7.6, CH_2), 5.01 (4H, d, $J_{\text{P-N}}$ 3.6, NH_2), 7.15-7.30 (2H, m, Ar-H), 7.56 (1H, d, J 8.5, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 159.7, 157, 154.7, 154.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.5), 126.5, 125.8, 119.1 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 115.2, 109.9 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.3), 32.4, 30.9, 22.7; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 70.78.

Diamidotiofosforan 6-okso-7,8,9,10-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-3-ylu 162b

Wydajność 49%, tt 202-204 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3276, 1695, 1606, 1531, 1500, 1385, 1261, 1137, 958, 870, 744, 619; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 1.60-1.80 (4H, m, CH_2), 2.35-2.45 (2H, m, CH_2), 2.70-2.80 (2H, m, CH_2), 4.99 (4H, d, $J_{\text{P-N}}$ 3.4, NH_2), 7.10-7.25 (2H, m, Ar-H), 7.65 (1H, d, J 8.3, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 161.3, 154.0 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.5), 152.5,

148.0, 125.1, 121.7, 118.9 (d, J_{P-C} 5.3), 116.5, 109.7 (d, J_{P-C} 5.3), 25.4, 24.3, 21.8, 21.5; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 70.73.

Diamidotiofosforan 6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyklohepta[c]chromen-3-ylu 162c

Wydajność 42%, tt 176-178 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3333, 1675, 1610, 1531, 1505, 1379, 1233, 1145, 977, 866, 775, 625; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 1.44-1.53 (2H, m, CH_2), 1.55-1.62 (2H, m, CH_2), 1.78-1.86 (2H, m, CH_2), 2.74-2.82 (2H, m, CH_2), 2.94-3.00 (2H, m, CH_2), 5.00 (4H, d, J_{P-N} 8.8, NH_2), 7.10-7.30 (2H, m, Ar-H), 7.86 (1H, d, J 8.8, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 161.7, 154.5, 154.3 (d, J_{P-C} 7.0), 153.2, 126.8, 126.0, 119.0 (d, J_{P-C} 5.3), 116.3, 109.9 (d, J_{P-C} 5.3), 32.1, 28.1, 26.7, 26.0, 25.3; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 70.75.

13.4. Procedura otrzymywania tiofosforowych diestrów bikumarynowych (171a-171l)

13.4.1. Ogólna procedura otrzymywania związków 171a-171c

W kolbie kulistej o pojemności 25 mL, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne oraz zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, sporządzono roztwór dichlorku (**161a-161c**) (1 mmol) w 10 mL bezwodnego THF. Do tak przygotowanego roztworu wkroplono roztwór odpowiedniego analogu tricyklicznej kumaryny (**158a-158c**) (1 mmol) w THF, a następnie NEt_3 (1 mmol). Po 24 godzinach mieszania w atmosferze azotu odparowano rozpuszczalnik, a pożądany produkt izolowano z zastosowaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie $\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$ 15:1.

Chlorotiofosforan bis-4-okso-1,2,3,4-tetrahydrocyklopenta[c]chromen-7-ylu 171a

Wydajność 48%, tt 178-181 °C; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 2.24 (2H, quin, J 7.6, CH_2), 2.92 (2H, t, J 7.3, CH_2), 3.09 (2H, t, J 7.6, CH_2), 7.24-7.33 (2H, m, Ar-H), 7.50 (1H, d, J 8.3, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 159.9, 155.8, 154.8, 151.3 (d, J_{P-C} 9.7), 128.3, 126.3, 117.8 (d, J_{P-C} 5.3), 117.7, 110.2 (d, J_{P-C} 5.3), 32.4, 30.9, 22.7; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 58.36.

Chlorotiofosforan bis-6-okso-7,8,9,10-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-3-ylu 171b

Wydajność 55%, tt 163-168 °C (z rozkładem); ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 1.80-1.89 (4H, m, CH_2), 2.56-2.62 (2H, m, CH_2), 2.75-2.80 (2H, m, CH_2), 7.22-7.28 (2H, m, Ar-H), 7.61 (1H, d, J 8.8, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 161.7, 152.7, 150.9 (d, J_{P-C} 9.7), 147.1, 124.9, 124.2, 119.1, 117.6 (d, J_{P-C} 4.8), 110.1 (d, J_{P-C} 5.3), 25.6, 24.2, 21.6, 21.4; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 58.42.

Chlorotiofosforan bis-6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyklohepta[c]chromen-3-ylu 171c

Wydajność 43%, tt 185-189 °C; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 1.61-1.92 (6H, m, CH_2), 2.91-2.98 (4H, m, CH_2), 7.24-7.31 (2H, m, Ar-H), 7.73 (1H, d, J 8.8, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 161.7, 153.4, 153.2, 151.1 (d, $J_{\text{P-C}}$ 9.7), 129.1, 125.7, 118.8, 117.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 110.2, 32.2, 28.5, 27.1, 25.8, 25.1; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 58.16.

13.4.2. Ogólna procedura otrzymywania związków 171d-171f

W kolbie kulistej o pojemności 25 mL, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne oraz zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, sporządzono roztwór związku (**171a-171c**) (1 mmol) w 10 mL bezwodnego THF. Do tak przygotowanego roztworu dodano metanol (1 mmol) i K_2CO_3 (1 mmol). Po 24 godzinach mieszania w atmosferze azotu odparowano rozpuszczalnik, a pożądaný produkt izolowano z zastosowaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie heksan: CHCl_3 :AcOEt 10:1.

Metylotiofosforan bis-4-okso-1,2,3,4-tetrahydrocyklopenta[c]chromen-7-ylu 171d

Wydajność 62%, tt 175-179 °C (z rozkładem); ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 2.20-2.26 (2H, m, CH_2), 2.90-3.10 (4H, m, CH_2), 4.00 (3H, d, J 14.2, CH_3), 7.15-7.23 (2H, m, Ar-H), 7.45 (1H, d, J 7.8, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 159.9, 155.8, 154.9, 152.1, 127.8, 126.1, 117.6, 116.9, 109.8 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 56.5, 32.4, 30.8, 22.7; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 60.13.

Metylotiofosforan bis-6-okso-7,8,9,10-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-3-ylu 171e

Wydajność 60%, tt 184-188 °C; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 1.80-1.87 (4H, m, CH_2), 2.55-2.80 (4H, m, CH_2), 4.00 (3H, d, J 14.2, CH_3), 7.13-7.17 (2H, m, Ar-H), 7.56 (1H, d, J 8.3, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 161.6, 152.8, 151.6 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.5), 146.9, 124.7, 123.6, 118.3, 117.4 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 109.6 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 56.4 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.7), 25.5, 24.2, 21.7, 21.5; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 60.18.

Metylotiofosforan bis-6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyklohepta[c]chromen-3-ylu 171f

Wydajność 55%, tt 96-102 °C; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 1.59-1.71 (4H, m, CH_2), 1.88-1.93 (2H, m, CH_2), 2.88-2.96 (4H, m, CH_2), 4.00 (3H, d, J 14.2, CH_3), 7.14-7.20 (2H, m, Ar-H), 7.67 (1H, d, J 8.8, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 161.9, 153.4, 151.8 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.5), 128.5, 125.5, 118.0, 117.4, 109.8, 56.4, 32.2, 28.5, 27.0, 25.8, 25.1; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 59.96.

13.4.3. Ogólna procedura otrzymywania związków 171g-171i

W kolbie kulistej o pojemności 25 mL, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne oraz zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, sporządzono roztwór związku (**171a-171c**) (1 mmol)

w 10 mL bezwodnego THF. Do tak przygotowanego roztworu dodano wodny roztwór K_2CO_3 (0.5 mL). Po 24 godzinach mieszania w atmosferze azotu odparowano rozpuszczalnik, a pożądaný produkt izolowano z zastosowaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie AcOEt:MeOH 20:1.

Wodorotiofosforan bis-4-okso-1,2,3,4-tetrahydrocyklopenta[c]chromen-7-ylu 171g

Wydajność 34%, tt (z rozkładem); 1H NMR δ_H (500 MHz, CD_3OD) 2.20 (2H, quin, J 7.6, CH_2), 2.81 (2H, t, J 7.3, CH_2), 3.07 (2H, t, J 7.3, CH_2), 7.22-7.32 (2H, m, Ar-H), 7.46 (1H, d, J 8.8, Ar-H); ^{13}C NMR δ_C (125 MHz, CD_3OD) 161.0, 157.4, 155.1, 154.7, 125.6, 125.4, 118.0 (d, J_{P-C} 5.3), 114.8, 108.7 (d, J_{P-C} 5.3), 31.8, 30.1, 22.3; ^{31}P NMR δ_P (202 MHz, CD_3OD) 49.03.

Wodorotiofosforan bis-6-okso-7,8,9,10-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-3-ylu 171h

Wydajność 45%, tt (z rozkładem); 1H NMR δ_H (500 MHz, DMSO) 1.70-1.76 (4H, m, CH_2), 2.38-2.50 (2H, m, CH_2), 2.69-2.80 (2H, m, CH_2), 3.8-4.3 (1H, brs, OH) 7.16-7.21 (2H, m, Ar-H), 7.61 (1H, d, J 8.3, Ar-H); ^{13}C NMR δ_C (125 MHz, DMSO) 161.4, 155.2 (d, J_{P-C} 7.5), 152.6, 148.0, 125.1, 121.2, 117.8 (d, J_{P-C} 5.3), 115.8, 108.3 (d, J_{P-C} 5.3), 25.3, 24.3, 21.8, 21.5; ^{31}P NMR δ_P (202 MHz, DMSO) 46.00.

Wodorotiofosforan bis-6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyklohepta[c]chromen-3-ylu 171i

Wydajność 37%, tt (z rozkładem); 1H NMR δ_H (500 MHz, CD_3OD) 1.51-1.61 (4H, m, CH_2), 1.84-1.90 (2H, m, CH_2), 2.79-2.93 (4H, m, CH_2), 7.22-7.25 (2H, m, Ar-H), 7.67 (1H, d, J 8.8, Ar-H); ^{13}C NMR δ_C (125 MHz, CD_3OD) 162.8, 155.2, 154.9 (d, J_{P-C} 7.9), 153.1, 126.2, 125.2, 117.9 (d, J_{P-C} 5.3), 115.8, 108.7 (d, J_{P-C} 5.3), 31.9, 27.8, 26.3, 25.6, 25.0; ^{31}P NMR δ_P (202 MHz, CD_3OD) 48.50.

13.4.4. Ogólna procedura otrzymywania związków 171j-171l

W kolbie kulistej o pojemności 25 mL, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne oraz zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, sporządzono roztwór związku (**171a-171c**) (1 mmol) w 10 mL bezwodnego THF. Do tak przygotowanego roztworu dodano roztwór NH_3/CH_3OH (1 mL). Po godzinie mieszania w atmosferze azotu mieszaninę odparowano, a pożądaný produkt izolowano z zastosowaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie $CHCl_3:AcOEt$ 15:1.

Amidotiofosforan bis(4-okso-1,2,3,4-tetrahydrocyklopenta[c]chromen-7-ylu 171j

Wydajność 58%, tt 212-214 °C; 1H NMR δ_H (500 MHz, DMSO) 2.10 (2H, quin, J 7.3, CH_2), 2.74 (2H, t, J 7.1, CH_2), 3.06 (2H, t, J 7.1, CH_2), 6.45 (2H, d, J_{P-N} 7.3, NH_2), 7.27-7.36 (2H, m, Ar-H), 7.63 (1H, d, J 8.3, Ar-H); ^{13}C NMR δ_C (125 MHz, DMSO) 159.5, 156.6, 154.7,

152.9 (d, J_{P-C} 7.0), 127.2, 126.7, 118.5, 116.2, 109.7, 32.4, 30.9, 22.6; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 66.86.

Amidotiofosforan bis(6-okso-7,8,9,10-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-3-ylu 171k

Wydajność 60%, tt 205-209 °C (z rozkładem); ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 1.68-1.75 (4H, m, CH_2), 2.36-2.42 (2H, m, CH_2), 2.71-2.80 (2H, m, CH_2), 6.44 (2H, d, J_{P-N} 7.8, NH_2), 7.24-7.28 (2H, m, Ar-H), 7.70 (1H, d, J 8.8, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 161.0, 152.5, 151.4 (d, J_{P-C} 6.6), 147.7, 125.8, 122.5, 118.2, 117.6, 109.4, 25.4, 24.3, 21.7, 21.4; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 66.83.

Amidotiofosforan bis(6-okso-6,7,8,9,10,11-heksahydrocyklohepta[c]chromen-3-ylu 171l

Wydajność 52%, tt 240-244 °C (z rozkładem); ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 1.48-1.60 (4H, m, CH_2), 1.80-1.90 (2H, m, CH_2), 2.76-3.00 (4H, m, CH_2), 6.45 (2H, d, J_{P-N} 6.8, NH_2), 7.26-7.31 (2H, m, Ar-H), 7.95 (1H, d, J 8.3, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 161.5, 154.2, 153.2, 152.7 (d, J_{P-C} 6.6), 127.6, 126.7, 118.3 (d, J_{P-C} 4.8), 117.4, 109.7 (d, J_{P-C} 5.3), 32.1, 28.1, 26.8, 25.9, 25.2; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 66.76.

13.5. Procedury otrzymywania fosforowych i tiofosforowych pochodnych bifenyłowych (174a-174l), (174a'-174j'), (175a'-175d') oraz (176a-176d)

13.5.1. Procedura otrzymywania amidometylo oraz amidoetylofosforanowych pochodnych bifenyłu 174a-174d

Do roztworu POCl_3 (900 mg, 5.9 mmol) w bezwodnym THF (20 mL) ochłodzonego do temperatury 0 °C wkroplono mieszaninę pochodnej bifenył-4-yłowej (**172a-172b**) (5.9 mmol) w THF (10 mL) oraz trietyloaminę (594 mg, 5.9 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez jedną godzinę w atmosferze azotu. Po odsączeniu osadu chlorowodoru trietyloaminy dodano alkohol sodu (5.9 mmol) (świeżo przygotowany poprzez dodanie absolutnego metanolu lub etanolu do 60% NaH w oleju mineralnym). Po godzinie mieszania dodano 3 mL roztworu NH_3/MeOH . Po 30 minutach odparowano rozpuszczalnik, a pożądaný produkt uzyskano na drodze krystalizacji z octanu etylu.

Amidometylofosforan bifenył-4-ylu 174a

Wydajność 44%, tt 173-175 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3325, 3247, 1603, 1573, 1520, 1485, 1225, 1189, 922, 806; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 3.67 (3H, d, J 11.7, CH_3), 5.11 (2H, d, J_{P-N} 6.8, NH_2), 7.28 (2H, d, J 7.8, Ar-H), 7.34 (1H, t, J 7.3, Ar-H), 7.44 (2H, t, J 7.3, Ar-H), 7.61-

7.67 (4H, m, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 151.4 (d, $J_{\text{P-C}}$ 6.1), 140.2, 137.0, 129.6, 128.5, 128.0, 127.2, 121.4 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 53.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.7); ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 9.50. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{NO}_3\text{P}$: C, 59.32; H, 5.36; N, 5.32. Znaleziono: C, 59.40; H, 5.41; N, 5.38.

Amidometylofosforan 4'-(etoksykarbonylo)bifenyl-4-ylu 174b

Wydajność 25%, tt 134-136 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3331, 3251, 1703, 1601, 1568, 1527, 1493, 1272, 1233, 1186, 1110, 921, 806; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 1.32 (3H, t, J 6.8, CH_3), 3.67 (3H, d, J 11.2, CH_3), 4.32 (2H, q, J 6.8, CH_2), 5.14 (2H, d, $J_{\text{P-N}}$ 6.8, NH_2), 7.31 (2H, d, J 8.3, Ar-H), 7.71-7.80 (4H, m, Ar-H), 8.01 (2H, d, J 8.3, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 166.2, 152.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 6.1), 144.6, 135.5, 130.5, 129.2, 128.9, 127.4, 121.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.4), 61.4, 53.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.7), 14.9; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 9.45. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{NO}_5\text{P}$: C, 57.31; H, 5.41; N, 4.18. Znaleziono: C, 57.37; H, 5.46; N, 4.26.

Amidoetylofosforan bifenyl-4-ylu 174c

Wydajność 15%, tt 126-128 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3328, 3248, 1604, 1572, 1520, 1486, 1221, 1191, 1036, 954, 841, 770; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 1.25 (3H, t, J 7.3, CH_3) 4.01-4.08 (2H, m, CH_2), 5.07 (2H, d, $J_{\text{P-N}}$ 6.3, NH_2), 7.27 (2H, d, J 7.8, Ar-H), 7.34 (1H, t, J 7.3, Ar-H), 7.44 (2H, t, J 7.8, Ar-H), 7.61-7.66 (4H, m, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 151.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 6.6), 140.2, 136.8, 129.6, 128.5, 127.9, 127.2, 121.4 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.4), 62.6 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.7), 16.8 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.0); ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 8.20. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{NO}_3\text{P}$: C, 60.65; H, 5.82; N, 5.05. Znaleziono: C, 60.58; H, 5.89; N, 5.09.

Amidoetylofosforan 4'-(etoksykarbonylo)bifenyl-4-ylu 174d

Wydajność 25%, tt 143-145 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3343, 3253, 1707, 1606, 1564, 1525, 1492, 1396, 1277, 1224, 1184, 1032, 947, 837, 773; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 1.23-1.34 (6H, m, CH_3), 4.02-4.08 (2H, m, CH_2), 4.32 (2H, q, J 7.3, CH_2), 5.10 (2H, d, $J_{\text{P-N}}$ 5.8, NH_2), 7.31 (2H, d, J 8.3, Ar-H), 7.72-7.80 (4H, m, Ar-H), 8.01 (2H, d, J 7.8, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 166.2, 152.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 6.1), 144.6, 135.4, 130.4, 129.2, 128.9, 127.4, 121.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.4), 62.6 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.3), 61.4, 16.8 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.0), 14.9; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 8.14. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{NO}_5\text{P}$: C, 58.45; H, 5.77; N, 4.01. Znaleziono: C, 58.55; H, 5.83; N, 4.11.

13.5.2. Ogólna procedura otrzymywania dimetylo i dietylofosforanowych pochodnych bifenylu 174e-174h

Do roztworu POCl_3 (900 mg, 5.9 mmol) w bezwodnym THF (20 mL) ochłodzonego do temperatury 0 °C wkroplono mieszaninę pochodnej bifenyl-4-ylowej (**172a-172b**) (5.9 mmol) w THF (10 mL) oraz trietyloaminę (594 mg, 5.9 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano

przez jedną godzinę w atmosferze azotu. Po odsączeniu osadu chlorowodoru trietyloaminy dodano alkohol sodu (11.8 mmol) (świeżo przygotowany poprzez dodanie absolutnego metanolu lub etanolu do 60% NaH w oleju mineralnym). Po godzinie mieszania odparowano rozpuszczalnik, a pożądaný produkt izolowano z zastosowaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie heksan:AcOEt 3:2.

Dimetylofosforan bifenył-4-ylu 174e

Wydajność 45%, tt 44-45 °C; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 1603, 1519, 1485, 1281, 1221, 1194, 1009, 928, 841, 765; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, CDCl_3) 3.89 (6H, d, J 11.2, CH_3), 7.29 (2H, d, J 7.8, Ar-H), 7.33-7.46 (3H, m, Ar-H), 7.53-7.57 (4H, m, Ar-H); $^{13}\text{C NMR } \delta_{\text{C}}$ (125 MHz, CDCl_3) 150.3 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.0), 140.4, 138.6, 129.1, 128.7, 127.6, 127.3, 120.4 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 55.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.7); $^{31}\text{P NMR } \delta_{\text{P}}$ (202 MHz, CDCl_3) -2.87. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{P}$: C, 60.43; H, 5.43. Znaleziono: C, 60.49; H, 5.50.

Dimetylofosforan 4'-(etoksykarbonylo)bifenył-4-ylu 174f

Wydajność 65%, tt 59-60 °C; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 1705, 1608, 1523, 1493, 1279, 1217, 1183, 1023, 937, 842, 774; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, CDCl_3) 1.38-1.42 (3H, m, CH_3), 3.89 (6H, dd, J 11.2, CH_3), 4.36-4.41 (2H, m, CH_2), 7.31 (2H, d, J 8.3, Ar-H), 7.57-7.61 (4H, m, Ar-H), 8.09 (2H, d, J 8.3, Ar-H); $^{13}\text{C NMR } \delta_{\text{C}}$ (125 MHz, CDCl_3) 166.6, 150.9 (d, $J_{\text{P-C}}$ 6.6), 144.6, 137.4, 130.3, 129.6, 128.9, 127.1, 120.6 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 61.5, 55.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 6.1), 14.6; $^{31}\text{P NMR } \delta_{\text{P}}$ (202 MHz, CDCl_3) -2.95. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{P}$: C, 58.29; H, 5.47. Znaleziono: C, 58.34; H, 5.51.

Dietylofosforan bifenył-4-ylu 174g

Wydajność 40%, olej; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 1604, 1516, 1485, 1272, 1219, 1018, 927, 842, 764, 696; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, CDCl_3) 1.36-1.40 (6H, m, CH_3) 4.20-4.30 (4H, m, CH_2), 7.30 (2H, d, J 7.3, Ar-H), 7.32-7.37 (1H, m, Ar-H), 7.44 (2H, t, J 7.3, Ar-H), 7.54-7.57 (4H, m, Ar-H); $^{13}\text{C NMR } \delta_{\text{C}}$ (125 MHz, CDCl_3) 150.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.0), 140.5, 138.3, 129.0, 128.6, 127.6, 127.2, 120.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 64.9 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.7), 16.4 (d, $J_{\text{P-C}}$ 6.6); $^{31}\text{P NMR } \delta_{\text{P}}$ (202 MHz, CDCl_3) -5.07. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{P}$: C, 62.74; H, 6.25. Znaleziono: C, 62.70; H, 6.29.

Dietylofosforan 4'-(etoksykarbonylo)bifenył-4-ylu 174h

Wydajność 46%, tt 36-37 °C; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 1701, 1604, 1523, 1494, 1276, 1221, 1187, 1101, 1019, 931, 838, 769, 698; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, CDCl_3) 1.35-1.42 (9H, m, CH_3), 4.20-4.28 (4H, m, CH_2), 4.39 (2H, q, J 6.8, CH_2), 7.31 (2H, d, J 7.8, Ar-H), 7.57-7.62 (4H, m, Ar-H), 8.10 (2H, d, J 8.3, Ar-H); $^{13}\text{C NMR } \delta_{\text{C}}$ (125 MHz, CDCl_3) 166.7, 151.1 (d, $J_{\text{P-C}}$ 6.6), 144.7, 137.1, 130.3, 129.5, 128.8, 127.1, 120.7 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 64.9 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.7), 61.2, 16.4 (d,

J_{P-C} 6.6), 14.6; ^{31}P NMR δ_P (202 MHz, CDCl_3) -5.18. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{O}_6\text{P}$: C, 60.31; H, 6.13. Znaleziono: C, 60.40; H, 6.16.

13.5.3. Ogólna procedura otrzymywania diamidofosforanowych pochodnych bifenyli 174i-174j

Do roztworu POCl_3 (900 mg, 5.9 mmol) w bezwodnym THF (20 mL) ochłodzonego do temperatury 0°C wkroplono mieszaninę pochodnej bifenyli-4-ylowej (**172a-172b**) (5.9 mmol) w THF (10 mL) oraz trietyloaminę (594 mg, 5.9 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez jedną godzinę w atmosferze azotu. Po odsączeniu osadu chlorowodoru trietyloaminy dodano 3 mL roztworu NH_3/MeOH . Po 30 minutach odparowano rozpuszczalnik, a pożądy produkt uzyskano na drodze krystalizacji z metanolu.

Diamidofosforan bifenyli-4-yli 174i

Wydajność 34%, tt $233\text{-}235^\circ\text{C}$; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3341, 3223, 1597, 1560, 1518, 1483, 1404, 1241, 1167, 1019, 946, 839, 758; ^1H NMR δ_H (500 MHz, DMSO) 4.32 (4H, d, J_{P-N} 4.4, NH_2), 7.26 (2H, d, J 7.8, Ar-H), 7.30-7.36 (1H, m, Ar-H), 7.43 (2H, t, J 7.8, Ar-H), 7.58-7.63 (4H, m, Ar-H); ^{13}C NMR δ_C (125 MHz, DMSO) 152.4 (d, J_{P-C} 6.6), 140.4, 136.0, 129.6, 128.1, 127.8, 127.2, 121.9 (d, J_{P-C} 4.4); ^{31}P NMR δ_P (202 MHz, DMSO) 15.70. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2\text{P}$: C, 58.07; H, 5.28; N, 11.29. Znaleziono: C, 58.01; H, 5.34; N, 11.37.

Diamidofosforan 4'-(etoksykarbonylo)bifenyli-4-yli 174j

Wydajność 20%, tt $240\text{-}242^\circ\text{C}$; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3331, 3229, 1712, 1599, 1558, 1525, 1492, 1396, 1271, 1242, 1170, 1110, 1019, 948, 833, 765; ^1H NMR δ_H (500 MHz, DMSO) 1.31-1.34 (3H, m, CH_3), 4.32 (2H, q, J 6.8, CH_2), 4.41 (4H, d, J_{P-N} 3.9, NH_2), 7.30 (2H, d, J 8.3, Ar-H), 7.68-7.80 (4H, m, Ar-H), 7.99-8.02 (2H, m, Ar-H); ^{13}C NMR δ_C (125 MHz, DMSO) 166.2, 153.2 (d, J_{P-C} 6.6), 144.9, 134.6, 130.4, 129.0, 128.6, 127.3, 122.1 (d, J_{P-C} 4.4), 61.4, 14.9; ^{31}P NMR δ_P (202 MHz, DMSO) 15.75. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$: C, 56.25; H, 5.35; N, 8.75. Znaleziono: C, 56.32; H, 5.39; N, 8.83.

13.5.4. Ogólna procedura otrzymywania bifenyliowych pochodnych kwasu fosforowego 174k-174l

Do roztworu pochodnej (**174e-174f**) (1 mmol) w bezwodnym CH_2Cl_2 (7 mL) wkroplono TMSBr (4 mmol) i mieszano w atmosferze azotu przez godzinę. Po zateżeniu mieszaniny reakcyjnej dodano 5 mL metanolu. Następnie wszystkie rozpuszczalniki odparowano, a pozostałość przemywano gorącym octanem etylu otrzymując pożądy produkt.

Diwodorofosforan bifenyli-4-yli 174k

Wydajność 37%, tt 185-187 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 2770, 1600, 1483, 1403, 1165, 971, 842, 757; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 7.25 (2H, d, *J* 8.3, Ar-H), 7.32 (1H, t, *J* 7.3, Ar-H), 7.43 (2H, t, *J* 7.3, Ar-H), 7.60-7.64 (4H, m, Ar-H), 7.8-9.8 (2H, br s, OH); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 151.9 (d, *J*_{P-C} 6.6), 140.2, 136.6, 129.6, 128.5, 127.9, 127.2, 121.2 (d, *J*_{P-C} 4.8); ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) -5.04. Analiza elementarna dla: C₁₂H₁₁O₄P: C, 57.61; H, 4.43. Znaleziono: 57.71; H, 4.50.

Diwodorofosforan 4'-(etoksykarbonylo)bifenyl-4-ylu 174l

Wydajność 53%, tt 154-158 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 2762, 1710, 1600, 1490, 1399, 1272, 1165, 974, 836, 767; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 1.33 (3H, t, *J* 7.0, CH₃), 4.33 (2H, q, *J* 7.0, CH₂), 5.00-7.40 (2H, br s, OH), 7.28 (2H, d, *J* 8.7, Ar-H), 7.70-7.82 (4H, m, Ar-H), 8.01 (2H, d, *J* 8.3, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 166.2, 152.6, 144.6, 135.2, 130.5, 129.1, 128.9, 127.4, 121.3 (d, *J*_{P-C} 4.8), 61.4, 14.9; ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) -5.12. Analiza elementarna dla: C₁₅H₁₅O₆P: C, 55.91; H, 4.69. Znaleziono: C, 55.99; H, 4.74.

13.5.5. Ogólna procedura otrzymania chlorometylo i chloroetylotiofosforanowych pochodnych bifenylu 175a'-175d'

Do roztworu PSCl₃ (994 mg, 5.9 mmol) w bezwodnym THF (20 mL) ochłodzonego do temperatury 0 °C wkroplono mieszaninę pochodnej bifenyl-4-ylowej (**172a-172b**) (5.9 mmol) w THF (10 mL) oraz trietyloaminę (594 mg, 5.9 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez jedną godzinę w atmosferze azotu. Po odsączeniu osadu chlorowodoru trietyloaminy dodano alkohol sodu (5.9 mmol) (świeżo przygotowany poprzez dodanie absolutnego metanolu lub etanolu do 60% NaH w oleju mineralnym). Po godzinie mieszania odparowano rozpuszczalnik, a pożądany produkt izolowano z zastosowaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie eter naftowy:CHCl₃ 3:1.

Chlorometylotiofosforan bifenyl-4-ylu 175a'

Wydajność 60%, tt 70-73 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 1600, 1519, 1483, 1218, 1186, 1016, 931, 844, 760; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) 4.05 (3H, dd, *J* 16.1, CH₃), 7.26-7.49 (5H, m, Ar-H), 7.56-7.64 (4H, m, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 149.8 (d, *J*_{P-C} 9.7), 140.2, 139.7, 129.1, 128.8, 127.8, 127.3, 121.7 (d, *J*_{P-C} 5.3), 56.3 (d, *J*_{P-C} 7.5); ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl₃) 66.94. Analiza elementarna dla: C₁₃H₁₂ClO₂PS: C, 52.27; H, 4.05; S, 10.73. Znaleziono: C, 52.33; H, 4.12; S, 10.79.

Chlorometylotiofosforan 4'-(etoksykarbonylo)bifenyl-4-ylu 175b'

Wydajność 40%, tt 49-51 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 1701, 1608, 1523, 1491, 1275, 1210, 1182, 1106, 1023, 921, 834, 771; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) 1.42 (3H, t, *J* 6.8, CH₃), 4.04 (3H, d, *J* 16.6, CH₃), 4.41 (2H, q, *J* 7.3, CH₂), 7.35-7.38 (2H, m, Ar-H), 7.62-7.65 (4H, m, Ar-H),

8.12 (2H, d, J 8.3, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 166.6, 150.4 (d, $J_{\text{P-C}}$ 9.7), 144.4, 138.5, 130.4, 129.8, 128.9, 127.2, 121.9 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.3), 61.3, 56.4 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.5), 14.6; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 66.81. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{ClO}_4\text{PS}$: C, 51.83; H, 4.35; S, 8.65. Znaleziono: C, 51.92; H, 4.40; S, 8.72.

Chloroetylotiofosforan bifenyli-4-yli 175c'

Wydajność 62%, tt 61-64 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 1601, 1518, 1482, 1215, 1159, 1032, 930, 839, 762; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 1.48-1.53 (3H, m, CH_3) 4.41-4.51 (2H, m, CH_2), 7.34-7.39 (3H, m, Ar-H), 7.43-7.48 (2H, m, Ar-H), 7.57-7.64 (4H, m, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 149.8 (d, $J_{\text{P-C}}$ 9.7), 140.2, 139.6, 129.1, 128.7 (d, $J_{\text{P-C}}$ 1.8), 127.8, 127.4, 121.7 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 67.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.5), 15.9 (d, $J_{\text{P-C}}$ 8.8); ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 64.86. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{ClO}_2\text{PS}$: C, 53.76; H, 4.51; S, 10.25. Znaleziono: C, 53.70; H, 4.57; S, 10.33.

Chloroetylotiofosforan 4'-(etoksykarbonylo)bifenyli-4-yli 175d'

Wydajność 58%, tt 58-60 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 1709, 1608, 1519, 1491, 1276, 1208, 1166, 1101, 1025, 932, 837, 772; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 1.42 (3H, t, J 7.3, CH_3), 1.50 (3H, t, J 7.3, CH_3), 4.38-4.50 (4H, m, CH_2), 7.36-7.39 (2H, m, Ar-H), 7.63 (4H, d, J 7.3, Ar-H), 8.12 (2H, d, J 8.3, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 166.6, 150.4 (d, $J_{\text{P-C}}$ 9.7), 144.4, 138.4, 130.4, 129.7, 128.9, 127.2, 121.9 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 67.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.0), 61.3, 15.9 (d, $J_{\text{P-C}}$ 8.3), 14.6; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 64.72. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClO}_4\text{PS}$: C, 53.06; H, 4.71; S, 8.33. Znaleziono: C, 53.13; H, 4.80; S, 8.36.

13.5.6. Ogólna procedura otrzymywania amidometyli i amidoetylotiofosforanowych pochodnych bifenyli 174a'-174d'

Do roztworu odpowiedniego monochlorku (**175a'-175d'**) (2.9 mmol) w bezwodnym THF (5 mL) ochłodzonego do temperatury 0 °C dodano roztwór NH_3/MeOH (2 mL). Po pół godziny mieszania odparowano rozpuszczalnik, a pożądaný produkt izolowano z zastosowaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie eter naftowy: CHCl_3 1:3.

Amidometylotiofosforan bifenyli-4-yli 174a'

Wydajność 59%, tt 125-127 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3387, 3296, 1600, 1516, 1483, 1221, 1187, 912, 763, 695; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 3.70 (3H, d, J 13.7, CH_3), 5.73 (2H, d, $J_{\text{P-N}}$ 6.8, NH_2), 7.28-7.36 (3H, m, Ar-H), 7.45 (2H, t, J 7.8, Ar-H), 7.62-7.67 (4H, m, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 151.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.0), 140.1, 137.3, 129.6, 128.4 128.0, 127.3, 122.3 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 53.8 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.3); ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 72.93. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{NO}_2\text{PS}$: C, 55.90; H, 5.05; N, 5.02; S, 11.48. Znaleziono: C, 55.98; H, 5.11; N, 5.10; S, 11.54.

Amidometylotiofosforan 4'-(etoksykarbonylo)bifenyl-4-ylu 174b'

Wydajność 25%, tt 78-80 °C; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 3366, 3282, 1716, 1602, 1523, 1493, 1281, 1219, 1185, 1108, 908, 769, 709; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, CDCl_3) 1.41 (3H, t, J 6.8, CH_3), 3.47 (2H, s, NH_2), 3.86 (3H, d, J 14.2, CH_3), 4.40 (2H, q, J 6.8, CH_2), 7.32-7.35 (2H, m, Ar-H), 7.58-7.63 (4H, m, Ar-H), 8.10 (2H, d, J 8.3, Ar-H); $^{13}\text{C NMR } \delta_{\text{C}}$ (125 MHz, CDCl_3) 166.7, 151.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.0), 144.8, 137.3, 130.3, 129.5, 128.6, 127.1, 121.8 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 61.3, 54.4 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.3), 14.6; $^{31}\text{P NMR } \delta_{\text{P}}$ (202 MHz, CDCl_3) 71.13. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{NO}_4\text{PS}$: C, 54.69; H, 5.16; N, 3.99; S, 9.13. Znaleziono: C, 54.77; H, 5.23; N, 4.02; S, 9.18.

Amidoetylotiofosforan bifenyl-4-ylu 174c'

Wydajność 70%, tt 82-83 °C; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 3425, 3285, 1600, 1541, 1514, 1483, 1389, 1217, 1165, 1036, 942, 905, 840, 762, 626; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, DMSO) 1.40 (3H, t, J 6.8, CH_3), 3.44 (2H, s, NH_2), 4.21-4.29 (2H, m, CH_2), 7.30-7.37 (3H, m, Ar-H), 7.41-7.46 (2H, m, Ar-H), 7.56 (4H, d, J 8.8, Ar-H); $^{13}\text{C NMR } \delta_{\text{C}}$ (125 MHz, DMSO) 150.6 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.5), 140.6, 138.4, 129.0, 128.4, 127.5, 127.3, 121.7 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.4), 64.3 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.3), 16.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 8.3); $^{31}\text{P NMR } \delta_{\text{P}}$ (202 MHz, DMSO) 69.23. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{NO}_2\text{PS}$: C, 57.33; H, 5.50; N, 4.78; S, 10.93. Znaleziono: C, 57.29; H, 5.53; N, 4.73; S, 10.98.

Amidoetylotiofosforan 4'-(etoksykarbonylo)bifenyl-4-ylu 174d'

Wydajność 46%, tt 72-75 °C; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 3415, 3311, 1706, 1600, 1537, 1523, 1493, 1386, 1279, 1215, 1170, 1035, 950, 910, 837, 769, 637; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, CDCl_3) 1.37-1.43 (6H, m, CH_3), 3.48 (2H, s, NH_2), 4.21-4.28 (2H, m, CH_2), 4.37-4.42 (2H, m, CH_2), 7.33 (2H, d, J 8.3, Ar-H), 7.57-7.63 (4H, m, Ar-H), 8.01 (2H, d, J 7.3, Ar-H); $^{13}\text{C NMR } \delta_{\text{C}}$ (125 MHz, CDCl_3) 166.7, 151.3 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.5), 144.8, 137.2, 130.3, 129.4, 128.6, 127.1, 121.9 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 64.3 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 61.3, 16.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 8.3), 14.6; $^{31}\text{P NMR } \delta_{\text{P}}$ (202 MHz, CDCl_3) 69.21. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{NO}_4\text{PS}$: C, 55.88; H, 5.52; N, 3.83; S, 8.78. Znaleziono: C, 55.95; H, 5.60; N, 3.92; S, 8.85.

13.5.7. Ogólna procedura otrzymywania dimetylo i dietylotiofosforanowych pochodnych bifenylu 174e'-174h'

Do roztworu odpowiedniego monochloroku (**175a'**-**175d'**) (2.9 mmol) w bezwodnym THF (5 mL) ochłodzonego do temperatury 0 °C dodano alkoholany sodu (5.9 mmol) (świeżo przygotowany poprzez dodanie absolutnego metanolu lub etanolu do 60% NaH w oleju mineralnym). Po godzinie mieszania odparowano rozpuszczalnik, a pożądaný produkt izolowano z zastosowaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie heksan:AcOEt 2:1.

Dimetylotiofosforan bifenyl-4-ylu 174e'

Wydajność 30%, tt 36-37 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 1601, 1518, 1481, 1219, 1182, 1014, 932, 827, 762, 693; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) 3.89 (6H, d, *J* 14.2, CH₃), 7.25-7.28 (2H, m, Ar-H), 7.33-7.38 (1H, m, Ar-H), 7.44 (2H, t, *J* 8.3, Ar-H) 7.55-7.59 (4H, m, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 150.3 (d, *J*_{P-C} 7.5), 140.4, 138.7, 129.0, 128.6, 127.6, 127.3, 121.3 (d, *J*_{P-C} 4.8), 55.5 (d, *J*_{P-C} 5.7); ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl₃) 67.70. Analiza elementarna dla: C₁₄H₁₅O₃PS: C, 57.13; H, 5.14; S, 10.90. Znaleziono: C, 57.21; H, 5.20; S, 10.98.

Dimetylotiofosforan 4'-(etoksykarbonylo)bifenyl-4-ylu 174f'

Wydajność 48%, tt 54-56 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 1710, 1602, 1523, 1492, 1279, 1219, 1179, 1103, 1022, 931, 829, 771, 700; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) 1.41 (3H, t, *J* 7.3, CH₃), 3.89 (6H, d, *J* 13.7, CH₃), 4.40 (2H, q, *J* 7.3, CH₂), 7.26-7.29 (2H, m, Ar-H), 7.59-7.63 (4H, m, Ar-H), 8.10 (2H, d, *J* 8.3, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 166.7, 151.0, 144.7, 137.5, 130.3, 129.6, 128.8, 127.1, 121.6 (d, *J*_{P-C} 4.8), 61.3, 55.5 (d, *J*_{P-C} 5.7), 14.6; ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl₃) 67.65. Analiza elementarna dla: C₁₇H₁₉O₅PS: C, 55.73; H, 5.23; S, 8.75. Znaleziono: C, 55.79; H, 5.28; S, 8.82.

Dietylotiofosforan bifenyl-4-ylu 174g'

Wydajność 58%, olej; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 1604, 1514, 1483, 1213, 1165, 1017, 921, 842, 762, 696; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) 1.38-1.41 (6H, m, CH₃) 4.24-4.31 (4H, m, CH₂), 7.25-7.28 (2H, m, Ar-H), 7.33-7.37 (1H, m, Ar-H), 7.42-7.46 (2H, m, Ar-H) 7.56 (2H, d, *J* 8.3, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 150.5 (d, *J*_{P-C} 7.9), 140.5, 138.5, 129.0, 128.5, 127.6, 127.3, 121.4 (d, *J*_{P-C} 4.8), 65.4 (d, *J*_{P-C} 5.7), 16.2 (d, *J*_{P-C} 7.5); ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl₃) 64.16. Analiza elementarna dla: C₁₆H₁₉O₃PS: C, 59.61; H, 5.94; S, 9.95. Znaleziono: C, 59.69; H, 5.98; S, 10.01.

Dietylotiofosforan 4'-(etoksykarbonylo)bifenyl-4-ylu 174h'

Wydajność 48%, tt 44-47 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 1701, 1605, 1521, 1493, 1276, 1215, 1182, 1103, 1016, 928, 836, 770, 703; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) 1.37-1.43 (9H, m, CH₃), 4.23-4.31 (4H, m, CH₂), 4.40 (2H, q, *J* 7.3, CH₂), 7.26-7.30 (2H, m, Ar-H), 7.58-7.64 (4H, m, Ar-H), 8.10 (2H, d, *J* 8.3, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 166.7, 151.1 (d, *J*_{P-C} 7.5), 144.7, 137.3, 130.3, 129.5, 128.7, 127.1, 121.7 (d, *J*_{P-C} 4.8), 65.4 (d, *J*_{P-C} 5.7), 61.2, 16.2 (d, *J*_{P-C} 7.5), 14.6; ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl₃) 64.11. Analiza elementarna dla: C₁₉H₂₃O₅PS: C, 57.86; H, 5.88; S, 8.13. Znaleziono: C, 57.93; H, 5.92; S, 8.20.

13.5.8. Ogólna procedura otrzymywania diamidotiofosforanowych pochodnych bifenyli 174i'-174j'

Do roztworu PSCl_3 (994 mg, 5.9 mmol) w bezwodnym THF (20 mL) ochłodzonego do temperatury 0 °C wkroplono mieszaninę pochodnej bifenyli-4-yłowej (**172a-172b**) (5.9 mmol) w THF (10 mL) oraz trietyloaminę (594 mg, 5.9 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 3 godziny w atmosferze azotu. Po odsączeniu osadu chlorowodoru trietyloaminy dodano 3 mL roztworu NH_3/MeOH . Po 30 minutach odparowano rozpuszczalnik, a pożądaną produkt uzyskano na drodze krystalizacji z metanolu.

Amidotiofosforan bifenyli-4-yli 174i'

Wydajność 51%, tt 187-190 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3383, 3240, 1599, 1514, 1480, 1403, 1219, 1186, 1167, 1016, 885, 841, 773; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, DMSO) 4.88 (4H, d, $J_{\text{P-N}}$ 3.4, NH_2), 7.22-7.35 (3H, m, Ar-H), 7.42 (2H, t, J 7.3, Ar-H), 7.60-7.64 (4H, m, Ar-H); $^{13}\text{C NMR } \delta_{\text{C}}$ (125 MHz, DMSO) 151.9 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.9), 140.4, 136.6, 129.6, 128.0, 127.8, 127.2, 123.0 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8); $^{31}\text{P NMR } \delta_{\text{P}}$ (202 MHz, DMSO) 70.44. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{OPS}$: C, 54.54; H, 4.96; N, 10.60; S, 12.13. Znaleziono: C, 54.62; H, 5.03; N, 10.66; S, 12.19.

Amidotiofosforan 4'-(etoksykarbonylo)bifenyli-4-yli 174j'

Wydajność 44%, tt 183-185 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3379, 3242, 1710, 1599, 1523, 1489, 1397, 1273, 1221, 1186, 1168, 1116, 1022, 884, 834, 776; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, DMSO) 1.31-1.34 (3H, t, J 6.8, CH_3), 4.32 (2H, q, J 6.8, CH_2), 4.90 (4H, d, $J_{\text{P-N}}$ 3.9, NH_2), 7.31-7.34 (2H, m, Ar-H), 7.70-7.81 (4H, m, Ar-H), 8.01 (2H, d, J 8.8 Ar-H); $^{13}\text{C NMR } \delta_{\text{C}}$ (125 MHz, DMSO) 166.2, 152.7 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.6), 144.8, 135.1, 130.4, 129.1, 128.4, 127.4, 123.1 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 61.4, 14.9; $^{31}\text{P NMR } \delta_{\text{P}}$ (202 MHz, DMSO) 70.46. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3\text{PS}$: C, 53.56; H, 5.09; N, 8.33; S, 9.53. Znaleziono: C, 53.50; H, 5.12; N, 8.37; S, 9.62.

13.5.9. Procedura otrzymywania dichlorotiofosforanu bifenyli-4-yli 173a'

Do roztworu PSCl_3 (848 mg, 5.0 mmol) w bezwodnym THF (20 mL) ochłodzonego do temperatury 0 °C wkroplono mieszaninę pochodnej bifenyli-4-yłowej (5.0 mmol) w THF (10 mL) oraz trietyloaminę (505 mg, 5.0 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 3 godziny w atmosferze azotu. Po odsączeniu osadu chlorowodoru trietyloaminy odparowano rozpuszczalnik, a pożądaną produkt izolowano z zastosowaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie CH_2Cl_2 :heksan 1:6.

Wydajność 68%, tt 65-67 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 1599, 1516, 1482, 1210, 1189, 1159, 1015, 915, 838, 761; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, CDCl_3) 7.35-7.67 (9H, m, Ar-H); $^{13}\text{C NMR } \delta_{\text{C}}$ (125 MHz,

CDCl₃) 149.9 (d, *J*_{P-C} 14.0), 140.5, 139.9, 129.2, 128.9 (d, *J*_{P-C} 10.6), 128.0, 127.4, 121.9 (d, *J*_{P-C} 5.7); ³¹P NMR δ_P (202 MHz, CDCl₃) 55.08.

13.5.10. Procedura otrzymywania chlorotiofosforanu di(bifenyl-4-ylu)

176a

Do roztworu dichlorotiofosforanu bifenyl-4-ylu (**173a'**) (1.0 mmol) w bezwodnym THF (15 mL) dodano roztwór 4-fenylfenolu (**172a**) (1.0 mmol) w bezwodnym THF (10 mL) oraz trietyloaminę (1.0 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 24 godziny w atmosferze azotu. Po odsączeniu osadu chlorowodoru trietyloaminy odparowano rozpuszczalnik, a pozostałość przemywano na gorąco octanem etylu otrzymując pożądaną produkt.

Wydajność 55%, tt 210-212 °C; ν_{max} (KBr)/cm⁻¹ 1599, 1518, 1481, 1213, 1186, 1157, 1016, 945, 932, 841, 760; ¹H NMR δ_H (500 MHz, CDCl₃) 7.37-7.48 (10H, m, Ar-H), 7.57-7.65 (8H, m, Ar-H); ¹³C NMR δ_C (125 MHz, CDCl₃) 150.0 (d, *J*_{P-C} 10.1), 140.2, 139.9, 129.1, 128.8, 127.8, 127.4, 121.8 (d, *J*_{P-C} 5.3); ³¹P NMR δ_P (202 MHz, CDCl₃) 59.97. Analiza elementarna dla: C₂₄H₁₈ClO₂PS: C, 65.98; H, 4.15; S, 7.34. Znaleziono: C, 65.93; H, 4.22; S, 7.40.

13.5.11. Procedura otrzymywania metylofosforanu di(bifenyl-4-ylu)

176b

Do roztworu chlorotiofosforanu di(bifenyl-4-ylu) (**176a**) (1.0 mmol) w bezwodnym THF (15 mL) wkroplono metanol (1.0 mmol) i dodano węglan potasu (1.0 mmol). Mieszaninę reakcyjną utrzymywano w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 24 godziny. Po ochłodzeniu i odparowaniu rozpuszczalnika pożądaną produkt izolowano z zastosowaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie CH₂Cl₂:heksan 1:2.

Wydajność 34%, tt 123-125 °C; ν_{max} (KBr)/cm⁻¹ 1597, 1518, 1482, 1216, 1188, 1165, 1015, 913, 844, 764; ¹H NMR δ_H (500 MHz, CDCl₃) 4.02 (3H, dd, *J* 11.7, CH₃) 7.25-7.38 (6H, m, Ar-H), 7.45 (4H, t, *J* 7.8, Ar-H), 7.54-7.63 (8H, m, Ar-H); ¹³C NMR δ_C (125 MHz, CDCl₃) 150.3 (d, *J*_{P-C} 7.9), 140.4, 139.0, 129.1, 128.6, 127.7, 127.3, 121.5 (d, *J*_{P-C} 4.8), 56.0 (d, *J*_{P-C} 5.7); ³¹P NMR δ_P (202 MHz, CDCl₃) 61.08. Analiza elementarna dla: C₂₅H₂₁O₃PS: C, 69.43; H, 4.89; S, 7.41. Znaleziono: C, 69.51; H, 4.94; S, 7.47.

13.5.12. Procedura otrzymywania amidotiofosforanu di(bifenyl-4-ylu)

176c

Do roztworu chlorotiofosforanu di(bifenyl-4-ylu) (**176a**) (1.0 mmol) w bezwodnym THF (15 mL) dodano roztwór NH₃/MeOH (1 mL). Po godzinie mieszania odparowano rozpuszczalnik, a pożądaną produkt izolowano z zastosowaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie CHCl₃:AcOEt 10:1.

Wydajność 67%, tt 239-242 °C; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 3404, 3230, 1601, 1535, 1513, 1482, 1217, 1184, 1162, 1015, 915, 841, 760; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, DMSO) 6.21 (2H, t, $J_{\text{P-N}}$ 6.8, NH_2) 7.34-7.39 (6H, m, Ar-H), 7.46 (4H, t, J 7.3, Ar-H), 7.65-7.72 (8H, m, Ar-H); $^{13}\text{C NMR } \delta_{\text{C}}$ (125 MHz, DMSO) 151.0 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.0), 140.1, 137.6, 129.7, 128.5, 128.1, 127.3, 122.4 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.4); $^{31}\text{P NMR } \delta_{\text{P}}$ (202 MHz, DMSO) 67.33. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{NO}_2\text{PS}$: C, 69.05; H, 4.83; N, 3.36; S, 7.68. Znaleziono: C, 69.12; H, 4.89; N, 3.43; S, 7.70.

13.5.13. Procedura otrzymywania wodorotiofosforanu di(bifenyl-4-ylu) 176d

Do roztworu chlorotiofosforanu di(bifenyl-4-ylu) (**176a**) (1.0 mmol) w bezwodnym THF (15 mL) dodano wodny roztwór węglanu potasu (0.5 mL). Po 24 godzinach mieszania, odparowano rozpuszczalnik, a pożądaný produkt izolowano z zastosowaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie AcOEt:MeOH 20:1.

Wydajność 48%, tt 267-269 °C (z rozkładem); ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 3382, 1603, 1514, 1483, 1205, 1166, 1105, 1009, 903, 834, 757; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, DMSO) 7.27-7.32 (6H, m, Ar-H), 7.42 (4H, t, J 7.8, Ar-H), 7.55-7.63 (8H, m, Ar-H); $^{13}\text{C NMR } \delta_{\text{C}}$ (125 MHz, DMSO) 153.4 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.9), 140.6, 135.3, 129.6, 127.9, 127.6, 127.7, 121.8 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.3); $^{31}\text{P NMR } \delta_{\text{P}}$ (202 MHz, DMSO) 45.51. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{O}_3\text{PS}$: C, 68.89; H, 4.58; S, 7.66. Znaleziono: C, 68.94; H, 4.51; S, 7.72.

13.6. Procedury otrzymywania fosforowych i tiofosforowych pochodnych tyraminy (**179a-179e**), (**179a'-179f'**) oraz (**180a-180c**)

13.6.1. Procedura otrzymywania amidosiarczanu 4-(2-dodekanoiloamino-etylo)-fenyłu **55**

Mieszaninę kwasu mrówkowego (1.54 mmol) i *N,N*-DMA (0.016 mmol) dodano do roztworu izocyjanianu chlorosulfurylu (1.50 mmol) w bezwodnym CH_2Cl_2 (0.5 mL) i mieszano przez 3.5 godziny w temperaturze 40 °C. Następnie dodano 0.319 g (1.00 mmol) amidu kwasu [2-(4-hydroksy-fenylo)-etylo]-dodekanowego (**177a**) w 3.5 mL *N,N*-DMA. Całość mieszano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie wylano na wodę (10 mL). Po chwili wypadł biały osad, który odsączono, a pożądaný produkt (**55**) izolowano z zastosowaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie AcOEt: CHCl_3 1:30.

Wydajność 91%, tt 112-115 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3378, 3278, 1635, 1543, 1504, 1467, 1346, 1151, 879, 722; ¹H NMR δ_{H} (200 MHz, DMSO) 0.83 (3H, t, *J* 6.8, CH₃), 1.10-1.30 (16H, m, CH₂), 1.40-1.50 (2H, m, CH₂), 2.00 (2H, t, *J* 7.3, CH₂), 2.69 (2H, t, *J* 7.5, CH₂), 3.23 (2H, q, *J* 6.8, CH₂), 7.16 (2H, d, *J* 8.3, Ar-H), 7.25 (2H, d, *J* 8.3, Ar-H), 7.86 (1H, t, *J* 5.1, NH), 7.94 (2H, s, NH₂); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 172.8, 149.2, 138.6, 130.5, 122.7, 36.1, 35.2, 32.0, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 26.0, 22.8, 14.6; Analiza elementarna dla: C₂₀H₃₄N₂O₄S: C, 60.27; H, 8.60; N, 7.03; S, 8.05. Znaleziono: C, 60.31; H, 8.64; N, 7.11; S, 8.01.

13.6.2. Ogólna procedura otrzymywania pochodnych *N*-alkanoilo tyraminy 177a-177c

Do mieszaniny zawierającej kwas dodekanowy, tridekanowy lub tetradekanowy (15 mmol) w bezwodnym CH₂Cl₂ (15 mL) dodano SOCl₂ (12.8 mL). Mieszaninę reakcyjną utrzymywano w temperaturze wrzenia przez 2.5 godziny w atmosferze azotu. Po odparowaniu rozpuszczalnika do mieszaniny dodano 4-hydroksyfenetyloaminę (10 mmol) oraz węglan potasu (4.15 g, 30 mmol) w bezwodnym acetonie (20 mL) i utrzymywano w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 3 godziny. Po ochłodzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej odsączono osad, a przesącz odparowano. Otrzymaną pozostałość oczyszczano z zastosowaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie CH₂Cl₂:AcOEt 9:1.

Amid kwasu [2-(4-hydroksy-fenilo)-etylo]-dodekanowego 177a

Wydajność 65%, tt 88-91 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3301, 1635, 1547, 1516, 1463, 1242, 832, 721; ¹H NMR δ_{H} (200 MHz, CDCl₃) 0.86 (3H, m, CH₃), 1.15-1.38 (16H, m, CH₂), 1.45-1.65 (2H, m, CH₂), 2.13 (2H, t, *J* 7.1, CH₂), 2.74 (2H, t, *J* 6.6, CH₂), 3.52 (2H, q, *J* 6.2, CH₂), 5.35-6.50 (1H, br s, NH), 6.80-7.08 (4H, m, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 174.4, 155.4, 130.0, 129.9, 115.9, 41.3, 36.9, 34.9, 32.2, 29.9, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 26.1, 22.9, 14.4.

Amid kwasu [2-(4-hydroksy-fenilo)-etylo]-tridekanowego 177b

Wydajność 60%, tt 89-92 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3305, 1635, 1548, 1516, 1463, 1240, 834, 725; ¹H NMR δ_{H} (200 MHz, CDCl₃) 0.89 (3H, t, *J* 6.7, CH₃), 1.15-1.40 (18H, m, CH₂), 1.45-1.70 (2H, m, CH₂), 2.13 (2H, t, *J* 7.9, CH₂), 2.75 (2H, t, *J* 7.0, CH₂), 3.49 (2H, q, *J* 6.2, CH₂), 5.30-6.50 (1H, br s, NH), 6.77-7.08 (4H, m, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 174.4, 155.3, 130.1, 130.0, 115.9, 41.3, 36.9, 34.9, 32.2, 29.9, 29.9, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.3, 26.1, 25.0, 23.0, 14.4.

Amid kwasu [2-(4-hydroksy-fenilo)-etylo]-tetradekanowego 177c

Wydajność 72%, tt 95-98 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3295, 1635, 1546, 1516, 1464, 1246, 825, 728; ¹H NMR δ_{H} (200 MHz, CDCl₃) 0.88 (3H, t, *J* 5.8, CH₃), 1.10-1.45 (20H, m, CH₂), 1.48-1.70

(2H, m, CH₂), 2.13 (2H, t, *J* 7.4, CH₂), 2.74 (2H, t, *J* 7.0, CH₂), 3.49 (2H, q, *J* 6.3, CH₂), 5.30-5.70 (1H, br s, NH), 6.77-7.06 (4H, m, Ar-H); ¹³C NMR δ_C (125 MHz, CDCl₃) 174.4, 155.1, 130.3, 130.0, 115.8, 41.3, 36.8, 34.9, 34.0, 32.2, 29.9, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.3, 26.1, 25.0, 22.9, 14.4.

13.6.3. Ogólna procedura otrzymywania pochodnych dimetylofosforanowych 179a-179c

Do roztworu POCl₃ (92 mg, 0.6 mmol) w bezwodnym THF (10 mL) ochłodzonego do temperatury 0 °C wkroplono mieszaninę pochodnej *N*-alkanoilo tyraminy (**177a-177c**) (0.6 mmol) w THF (10 mL) oraz trietyloaminę (61 mg, 0.6 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez jedną godzinę w atmosferze azotu. Po odsączeniu osadu chlorowodoru trietyloaminy dodano metanolan sodu (1.2 mmol) (świeżo przygotowany poprzez dodanie absolutnego metanolu do 60% NaH w oleju mineralnym). Po godzinie mieszania odsączono powstały osad chlorku sodu, następnie odparowano rozpuszczalnik, a pożądaný produkt izolowano z zastosowaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie CH₂Cl₂:AcOEt 1:1.

Dimetylofosforan 4-(2-dodekanoiloamino-etylo)-fenylu 179a

Wydajność 67%, tt 44-46 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3301, 1635, 1549, 1508, 1464, 1222, 1034, 954, 719; ¹H NMR δ_H (200 MHz, CDCl₃) 0.88 (3H, t, *J* 6.6, CH₃), 1.05-1.25 (16H, m, CH₂), 1.45-1.70 (2H, m, CH₂), 2.16 (2H, t, *J* 7.9, CH₂), 2.80 (2H, t, *J* 6.6, CH₂), 3.49 (2H, d, *J* 5.8, CH₂), 3.88 (6H, d, *J* 11.2, CH₃), 5.70-5.90 (1H, br s, NH), 7.10-7.25 (4H, m, Ar-H); ¹³C NMR δ_C (125 MHz, CDCl₃) 173.8, 149.4, 136.1, 130.3, 120.2 (d, *J*_{P-C} 4.9), 55.2 (d, *J*_{P-C} 6.1), 40.9, 36.9, 35.5, 32.1, 29.6, 29.6, 29.5, 26.1, 22.9, 14.4; ³¹P NMR δ_P (202 MHz, CDCl₃) -2.89. Analiza elementarna dla: C₂₂H₃₈NO₅P: C, 61.81; H, 8.96; N, 3.28. Znaleziono: C, 61.93; H, 9.01; N, 3.21.

Dimetylofosforan 4-(2-tridekanoiloamino-etylo)-fenylu 179b

Wydajność 67%, tt 50-52 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3305, 1637, 1549, 1506, 1464, 1217, 1028, 945, 719; ¹H NMR δ_H (500 MHz, CDCl₃) 0.85-0.90 (3H, m, CH₃), 1.20-1.35 (18H, m, CH₂), 1.50-1.70 (2H, m, CH₂), 2.12 (2H, t, *J* 7.8, CH₂), 2.79 (2H, t, *J* 6.9, CH₂), 3.49 (2H, d, *J* 6.4, CH₂), 3.87 (6H, d, *J* 11.2, CH₃), 5.35-5.50 (1H, br s, NH), 7.15-7.22 (4H, m, Ar-H); ¹³C NMR δ_C (125 MHz, CDCl₃) 173.5, 149.4 (d *J*_{P-C} 6.6), 136.2, 130.3, 120.2 (d, *J*_{P-C} 4.8), 55.1 (d, *J*_{P-C} 5.7), 40.7, 37.0, 35.2, 32.1, 29.9, 29.7, 29.6, 29.5, 26.0, 22.9, 14.4; ³¹P NMR δ_P (202 MHz, CDCl₃) -2.87. Analiza elementarna dla: C₂₃H₄₀NO₅P: C, 62.56; H, 9.13; N, 3.17. Znaleziono: C, 62.70; H, 9.21; N, 3.23.

Dimetylofosforan 4-(2-tetradekanoiloamino-etylo)-fenylu 179c

Wydajność 48%, tt 55-57 °C; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 3305, 1637, 1548, 1508, 1464, 1221, 1035, 954, 719; ^1H NMR δ_{H} (200 MHz, CDCl_3) 0.88 (3H, t, J 6.6 CH_3), 1.15-1.40 (20H, m, CH_2), 1.45-1.75 (2H, m, CH_2), 2.13 (2H, t, J 7.1, CH_2), 2.79 (2H, t, J 6.7, CH_2), 3.49 (2H, q, J 6.2, CH_2), 3.87 (6H, d, J 11.7, CH_3), 5.30-5.55 (1H, br s, NH), 7.10-7.25 (4H, m, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 173.2, 149.2, 135.9, 130.0, 119.9 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 58.8, 54.9 (d, $J_{\text{P-C}}$ 6.1), 40.5, 36.8, 35.0, 31.9, 29.6, 29.5, 29.3, 25.7, 22.7, 14.1; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) -2.87. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{NO}_5\text{P}$: C, 63.27; H, 9.29; N, 3.07. Znaleziono: C, 63.38; H, 9.34; N, 3.02.

13.6.4. Ogólna procedura otrzymywania pochodnych dimetylotiofosforanowych 179a'-179c'

Do roztworu PSCl_3 (102 mg, 0.6 mmol) w bezwodnym THF (10 mL) ochłodzonego do temperatury 0 °C wkroplono mieszaninę pochodnej *N*-alkanoilo tyraminy (177a-177c) (0.6 mmol) w THF (10 mL) oraz trietyloaminę (61 mg, 0.6 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 3 godziny w atmosferze azotu. Po odsączeniu osadu chlorowodoru trietyloaminy, dodano metanolan sodu (1.2 mmol) (świeżo przygotowany poprzez dodanie absolutnego metanolu do 60% NaH w oleju mineralnym). Po dwóch godzinach mieszania odsączono powstały osad chlorku sodu, odparowano rozpuszczalnik, a pożądaný produkt izolowano z zastosowaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie CH_2Cl_2 :AcOEt 10:1.

Dimetylotiofosforan 4-(2-dodekanoiloamino-etylo)-fenylu 179a'

Wydajność 73%, tt 41-42 °C; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 3301, 1637, 1548, 1508, 1464, 1217, 1026, 947, 825, 719, 613; ^1H NMR δ_{H} (200 MHz, CDCl_3) 0.88 (3H, t, J 7.0, CH_3), 1.05-1.40 (16H, m, CH_2), 1.45-1.70 (2H, m, CH_2), 2.16 (2H, t, J 7.5, CH_2), 2.81 (2H, t, J 6.7, CH_2), 3.52 (2H, d, J 5.8, CH_2), 3.86 (6H, d, J 13.7, CH_3), 5.50-6.70 (1H, br s, NH), 7.05-7.20 (4H, m, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 173.7, 149.5, 136.2, 130.2, 121.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.5), 55.4 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.7), 40.9, 37.1, 35.3, 32.1, 29.9, 29.7, 29.6, 26.1, 22.9, 14.4; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 67.71. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{NO}_4\text{PS}$: C, 59.57; H, 8.63; N, 3.16; S, 7.23. Znaleziono: C, 59.50; H, 8.59; N, 3.21; S, 7.19.

Dimetylotiofosforan 4-(2-tridekanoiloamino-etylo)-fenylu 179b'

Wydajność 79%, tt 48-50 °C; ν_{\max} (KBr)/ cm^{-1} 3305, 1637, 1548, 1506, 1464, 1217, 1027, 945, 827, 719, 612; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 0.88 (3H, m, CH_3), 1.20-1.35 (18H, m, CH_2), 1.55-1.65 (2H, m, CH_2), 2.12 (2H, t, J 7.3, CH_2), 2.80 (2H, t, J 3.3, CH_2), 3.50 (2H, q, J 6.9, CH_2), 3.87 (6H, d, J 13.0, CH_3), 5.42 (1H, s, NH), 7.10-7.20 (4H, m, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 173.4, 149.5 (d, $J_{\text{P-C}}$ 7.4), 136.3, 130.1, 121.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.4), 55.4 (d, $J_{\text{P-C}}$

5.7), 40.7, 37.1, 35.3, 32.1, 29.9, 29.9, 29.7, 29.6, 29.5, 26.0, 22.9, 14.4; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 67.71. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{NO}_4\text{PS}$: C, 60.37; H, 8.81; N, 3.06; S, 7.01. Znaleziono: C, 60.49; H, 8.92; N, 3.12; S, 7.10.

Dimetylotiofosforan 4-(2-tetradekanoiloamino-etylo)-fenylu 179c'

Wydajność 70%, tt 52-55 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3305, 1637, 1548, 1506, 1464, 1217, 1028, 945, 827, 719, 611; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 0.88 (3H, t, J 6.8 CH_3), 1.20-1.35 (20H, m, CH_2), 1.55-1.65 (2H, m, CH_2), 2.12 (2H, t, J 7.3, CH_2), 2.80 (2H, t, J 6.8, CH_2), 3.50 (2H, q, J 6.4, CH_2), 3.86 (6H, d, J 13.6, CH_3), 5.43 (1H, s, NH), 7.10-7.20 (4H, m, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 173.4, 149.5, 136.3, 130.1, 121.2 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.8), 55.4 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.7), 40.7, 37.1, 35.3, 32.2, 29.9, 29.9, 29.7, 29.6, 29.5, 26.0, 22.9, 14.4; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 67.71. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{NO}_4\text{PS}$: C, 61.12; H, 8.98; N, 2.97; S, 6.80. Znaleziono: C, 61.21; H, 9.05; N, 2.89; S, 6.85.

13.6.5. Ogólna procedura otrzymywania pochodnych amidometylofosforanowych 179d-179f

Do roztworu POCl_3 (184 mg, 1.2 mmol) w bezwodnym THF (20 mL) ochłodzonego do temperatury 0 °C wkroplono mieszaninę pochodnej *N*-alkanoilo tyraminy (**177a-177c**) (1.2 mmol) w THF (10 mL) oraz trietyloaminę (122 mg, 1.2 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez jedną godzinę w atmosferze azotu. Po odsączeniu osadu chlorowodoru trietyloaminy dodano metanolan sodu (1.2 mmol) (świeżo przygotowany poprzez dodanie absolutnego metanolu do 60% NaH w oleju mineralnym). Po godzinie mieszania dodano 3 mL roztworu NH_3/MeOH . Po 30 minutach odparowano rozpuszczalnik, a pożądaný produkt izolowano z zastosowaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie AcOEt:MeOH 20:1.

Amidometylofosforan 4-(2-dodekanoiloamino-etylo)-fenylu 179d

Wydajność 54%, tt 134-136 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3322, 3239, 3132, 1646, 1537, 1508, 1470, 1224, 1047, 997, 928, 799, 718; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 0.83 (3H, t, J 7.3, CH_3), 1.15-1.30 (16H, m, CH_2), 1.43 (2H, t, J 6.8, CH_2), 2.00 (2H, t, J 7.3, CH_2), 2.64 (2H, t, J 6.3, CH_2), 3.20 (2H, q, J 6.8, CH_2), 3.61 (3H, d, J 11.2, CH_3), 5.00 (2H, d, $J_{\text{P-N}}$ 6.9, NH_2), 7.00-7.20 (4H, m, Ar-H), 7.85 (1H, t, J 5.4, NH); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 172.7, 150.1, 136.1, 120.8 (d, $J_{\text{P-C}}$ 4.3), 53.3 (d, $J_{\text{P-C}}$ 5.7), 40.8, 36.1, 35.1, 32.0, 29.7, 29.5, 29.4, 26.0, 22.8, 14.7; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 9.41. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{21}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$: C, 61.14; H, 9.04; N, 6.79. Znaleziono: C, 61.07; H, 9.16; N, 6.91.

Amidometylofosforan 4-(2-tridekanoiloamino-etylo)-fenylu 179e

Wydajność 46%, tt 130-133 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3319, 3238, 3130, 1646, 1537, 1508, 1469, 1228, 1043, 997, 937, 801, 719; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 0.84 (3H, t, *J* 6.8, CH₃), 1.15-1.30 (18H, m, CH₂), 1.44 (2H, t, *J* 6.4, CH₂), 2.00 (2H, t, *J* 7.8, CH₂), 2.64 (2H, t, *J* 7.4, CH₂), 3.21 (2H, q, *J* 6.3, CH₂), 3.62 (3H, d, *J* 11.8, CH₃), 5.00 (2H, d, *J*_{P-N} 6.9, NH₂), 7.05-7.20 (4H, m, Ar-H), 7.84 (1H, t, *J* 6.9, NH); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 172.7, 150.1 (d, *J*_{P-C} 6.2), 136.1, 130.3, 120.8 (d, *J*_{P-C} 4.8), 53.7 (d, *J*_{P-C} 5.7), 40.8, 36.1, 35.2, 32.0, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.4, 26.0, 22.8, 14.7; ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 9.40. Analiza elementarna dla: C₂₂H₃₉N₂O₄P: C, 61.95; H, 9.22; N, 6.57. Znaleziono: C, 62.09; H, 9.31; N, 6.69.

Amidometylofosforan 4-(2-tetradekanoiloamino-etylo)-fenylu 179f

Wydajność 51%, tt 136-139 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3325, 3239, 3127, 1646, 1537, 1508, 1471, 1232, 1045, 997, 928, 800, 718; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 0.84 (3H, t, *J* 7.3, CH₃), 1.15-1.30 (20H, m, CH₂), 1.44 (2H, t, *J* 5.9, CH₂), 2.00 (2H, t, *J* 7.4, CH₂), 2.64 (2H, t, *J* 7.3, CH₂), 3.21 (2H, q, *J* 7.3, CH₂), 3.62 (3H, d, *J* 11.2, CH₃), 5.00 (2H, d, *J*_{P-N} 6.8, NH₂), 7.05-7.20 (4H, m, Ar-H), 7.84 (1H, t, *J* 5.4, NH); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 172.7, 150.1, 136.1, 130.3, 120.8 (d, *J*_{P-C} 4.8), 53.3 (d, *J*_{P-C} 5.7), 40.8, 36.1, 35.2, 32.0, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.4, 25.6, 22.8, 14.7; ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 9.40. Analiza elementarna dla: C₂₃H₄₁N₂O₄P: C, 62.70; H, 9.38; N, 6.36. Znaleziono: C, 62.83; H, 9.44; N, 6.49.

13.6.6. Ogólna procedura otrzymywania pochodnych metyloamidotiofosforanowych 179d'-179f'

Do roztworu PSCl₃ (204 mg, 1.2 mmol) w bezwodnym THF (20 mL) ochłodzonego do temperatury 0 °C wkroplono mieszaninę pochodnej *N*-alkanoilo tyraminy (**177a-177c**) (1.2 mmol) w THF (10 mL) oraz trietyloaminę (122 mg, 1.2 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez jedną godzinę w atmosferze azotu. Po odsączeniu osadu chlorowodoru trietyloaminy dodano metanolan sodu (1.2 mmol) (świeżo przygotowany poprzez dodanie absolutnego metanolu do 60% NaH w oleju mineralnym). Po dwóch godzinach mieszania dodano 3 mL roztworu NH₃/MeOH. Po 30 minutach odparowano rozpuszczalnik, a pożądany produkt izolowano z zastosowaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie CH₂Cl₂:AcOEt 5:1.

Metyloamidotiofosforan 4-(2-dodekanoiloamino-etylo)-fenylu 179d'

Wydajność 83%, tt 88-90 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3357, 3282, 3100, 1620, 1552, 1506, 1469, 1209, 1037, 975, 907, 842, 812, 742, 696, 619; ¹H NMR δ_{H} (200 MHz, CDCl₃) 0.88 (3H, t, *J* 6.6, CH₃), 1.10-1.45 (16H, m, CH₂), 1.50-1.70 (2H, m, CH₂), 2.16 (2H, t, *J* 7.9, CH₂), 2.20-3.20 (2H, br s, NH₂), 2.82 (2H, t, *J* 7.1, CH₂), 3.52 (2H, d, *J* 5.6, CH₂), 3.40-3.60 (3H, m, CH₃), 5.80-6.00 (1H, br s, NH), 7.10-7.25 (4H, m, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃)

173.9, 149.7, 135.9, 130.0, 121.5 (d, J_{P-C} 4.8), 54.3, 40.9, 36.9, 35.2, 32.1, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 26.1, 22.9, 14.4; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 71.28. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{21}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_3\text{PS}$: C, 58.85; H, 8.70; N, 6.54; S, 7.48. Znaleziono: C, 58.92; H, 8.76; N, 6.60; S, 7.52.

Metyloamidotiofosforan 4-(2-tridekanoiloamino-etylo)-fenylu 179e'

Wydajność 82%, tt 91-95 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3350, 3299, 3100, 1622, 1548, 1506, 1466, 1209, 1043, 974, 909, 842, 812, 740, 694, 617; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 0.88 (3H, t, J 6.9, CH_3), 1.20-1.35 (18H, m, CH_2), 1.59 (2H, t, J 7.4 CH_2), 2.13 (2H, t, J 7.8, CH_2), 2.80 (2H, t, J 6.9, CH_2), 3.38 (2H, s, NH_2), 3.50 (2H, q, J 5.3, CH_2), 3.83 (3H, d, J 14.2, CH_3), 5.44 (1H, s, NH), 7.15-7.20 (4H, m, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 173.5, 149.7, 136.0, 130.0, 121.5 (d, J_{P-C} 4.9), 54.3 (d J_{P-C} 5.2), 40.7, 37.1, 35.3, 32.2, 29.9, 29.9, 29.7, 29.6, 29.5, 26.0, 22.3, 14.4; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 71.24. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_3\text{PS}$: C, 59.70; H, 8.88; N, 6.33; S, 7.24. Znaleziono: C, 59.64; H, 8.93; N, 6.40; S, 7.31.

Metyloamidotiofosforan 4-(2-tetradekanoiloamino-etylo)-fenylu 179f'

Wydajność 76%, tt 93-95 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3347, 3302, 3100, 1622, 1549, 1506, 1468, 1209, 1043, 974, 908, 842, 812, 740, 694, 617; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl_3) 0.88 (3H, t, J 6.8, CH_3), 1.20-1.35 (20H, m, CH_2), 1.55-1.70 (2H, m, CH_2), 2.13 (2H, t, J 7.3, CH_2), 2.80 (2H, t, J 6.8, CH_2), 3.37 (2H, s, NH_2), 3.50 (2H, q, J 6.4, CH_2), 3.83 (3H, d, J 14.2, CH_3), 5.42 (1H, s, NH), 7.15-7.20 (4H, m, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 173.5, 149.7 (d, J_{P-C} 7.9), 136.0, 130.0, 121.5 (d, J_{P-C} 4.9), 54.3 (d, J_{P-C} 5.3), 40.7, 37.1, 35.3, 32.2, 29.9, 29.9, 29.7, 29.6, 29.5, 26.0, 22.9, 14.4; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl_3) 71.25. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{23}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_3\text{PS}$: C, 60.50; H, 9.05; N, 6.13; S, 7.02. Znaleziono: C, 60.59; H, 9.12; N, 6.21; S, 7.09.

13.6.7. Ogólna procedura otrzymywania pochodnych kwasu fosforowego 180a-180c

Do roztworu pochodnej (**179a-179c**) (1 mmol) w bezwodnym CH_2Cl_2 (10 mL) wkroplono TMSBr (4 mmol) i mieszano w atmosferze azotu przez 1.5 godziny. Po zateżeniu mieszaniny reakcyjnej dodano 5 mL metanolu. Odparowano następnie wszystkie rozpuszczalniki, a pozostałość przemywano gorącym octanem etylu otrzymując pożądaną produkt.

Diwodorofosforan 4-(2-dodekanoiloamino-etylo)-fenylu 180a

Wydajność 78%, tt 102-104 °C (z rozkładem); ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 2914, 2848, 1687, 1516, 1280, 1223, 1167, 1069, 990, 832; ^1H NMR δ_{H} (200 MHz, DMSO) 0.83 (3H, m, CH_3), 1.10-1.35 (16H, m, CH_2), 1.40-1.60 (2H, m, CH_2), 2.02 (2H, t, J 7.1, CH_2), 2.65 (2H, t, J 6.9, CH_2), 3.22

(2H, d, J 5.8, CH₂), 2.80-4.80 (2H, br s, OH), 7.00-7.22 (4H, m, Ar-H), 7.85 (1H, m, NH); ¹³C NMR δ_C (125 MHz, DMSO) 172.8, 150.5 (d, J_{P-C} 6.6), 135.8, 130.5, 130.2, 120.6 (d, J_{P-C} 4.4), 40.9, 36.1, 35.1, 32.0, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 26.0, 22.8, 14.7; ³¹P NMR δ_P (202 MHz, DMSO) -5.06. Analiza elementarna dla: C₂₀H₃₄NO₅P: C, 60.13; H, 8.58; N, 3.51. Znaleziono: C, 60.24; H, 8.53; N, 3.69.

Diwodorofosforan 4-(2-tridekanoiloamino-etylo)-fenylu 180b

Wydajność 76%, tt 126-128 °C (z rozkładem); ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 2921, 2852, 1684, 1509, 1276, 1217, 1029, 986, 835; ¹H NMR δ_H (500 MHz, DMSO) 0.83 (3H, t, J 6.9, CH₃), 1.15-1.30 (18H, m, CH₂), 1.40-1.50 (2H, m, CH₂), 2.00 (2H, t, J 7.4, CH₂), 2.64 (2H, t, J 7.3, CH₂), 3.20 (2H, q, J 6.4, CH₂), 4.40-6.30 (2H, br s, OH), 7.00-7.20 (4H, m, Ar-H), 7.85 (1H, t, J 5.4, NH); ¹³C NMR δ_C (125 MHz, DMSO) 172.8, 150.5 (d, J_{P-C} 6.6), 135.8, 130.2, 120.6 (d, J_{P-C} 4.8), 40.9, 36.1, 35.1, 32.0, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 26.0, 22.8, 14.7; ³¹P NMR δ_P (202 MHz, DMSO) -5.06. Analiza elementarna dla: C₂₁H₃₆NO₅P: C, 61.00; H, 8.78; N, 3.39. Znaleziono: C, 61.13; H, 8.87; N, 3.46.

Diwodorofosforan 4-(2-tetradekanoiloamino-etylo)-fenylu 180c

Wydajność 64%, tt 124-126°C (z rozkładem); ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 2921, 2848, 1684, 1506, 1269, 1227, 1075, 996, 827; ¹H NMR δ_H (500 MHz, DMSO) 0.84 (3H, t, J 6.9, CH₃), 1.15-1.30 (20H, m, CH₂), 1.44 (2H, t, J 6.8, CH₂), 2.00 (2H, t, J 7.4, CH₂), 2.64 (2H, t, J 7.8, CH₂), 3.20 (2H, q, J 6.9, CH₂), 5.00-6.00 (2H, br s, OH), 7.00-7.20 (4H, m, Ar-H), 7.85 (1H, m, NH); ¹³C NMR δ_C (125 MHz, DMSO) 172.8, 150.5, 135.8, 130.2, 120.6 (d, J_{P-C} 4.4), 40.9, 36.0, 35.1, 32.0, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 26.0, 22.8, 14.6; ³¹P NMR δ_P (202 MHz, DMSO) -5.07. Analiza elementarna dla: C₂₂H₃₈NO₅P: C, 61.81; H, 8.96; N, 3.28. Znaleziono: C, 61.96; H, 9.04; N, 3.39.

13.7. Procedury otrzymywania fosforowych i tiofosforowych pochodnych flawonoidowych (185a-185p) oraz (186a-186i)

13.7.1. Procedura otrzymywania 2-hydroksy-4-metoksyacetofenonu

Do mieszaniny 2-4-dihydroksyacetofenonu (11.02 g, 72.46 mmol) i węglanu potasu (10.01 g, 72.46 mmol) w bezwodnym acetonie (250 mL) dodano siarczanu dimetylu (6.59 mL, 72.46 mmol) i utrzymywano w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 5h. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną schłodzono do temperatury pokojowej, przesączono i odparowano na

wyparce. Produkt izolowano z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w CHCl_3 .

13.7.2. Ogólna procedura otrzymywania chalconów 181a-181d

2-hydroksy-4-metoksyacetofenon (5.00 g, 30.11 mmol) i odpowiedni aldehyd aromatyczny (30.11 mmol) rozpuszczono w metanolu (50 mL), a następnie dodawano porcjami wodorotlenek potasu (90.33 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 4 godziny, a po upływie tego czasu wylano do wody i zakwaszono 3M roztworem HCl. Uzyskany osad odsączono, przemyto wodą i krystalizowano z metanolu.

1-(2-hydroksy-4-metoksyfenylo)-3-fenyloprop-2-en-1-on 181a

Wydajność 76%, tt 108-110 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3048, 3012, 2962, 1585, 1553, 1498, 1325, 1297, 1214, 1100, 965, 860, 828, 790; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, CDCl_3) 3.86 (3H, s, CH_3), 6.47-6.52 (2H, m, Ar-H), 7.42-7.45 (3H, m, Ar-H), 7.58 (1H, d, $J = 15.6$, CH), 7.64-7.67 (2H, m, Ar-H), 7.83 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H), 7.89 (1H, d, $J = 15.1$, CH), 13.47 (1H, s, OH); $^{13}\text{C NMR } \delta_{\text{C}}$ (125 MHz, CDCl_3) 192.1, 167.0, 166.5, 144.7, 135.0, 131.5, 130.9, 129.3, 128.8, 120.5, 114.3, 108.0, 101.3, 55.9.

3-(4-fluorofenylo)-1-(2-hydroksy-4-metoksyfenylo)prop-2-en-1-on 181b

Wydajność 67%, tt 112-114 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3080, 3047, 2851, 1634, 1570, 1503, 1364, 1280, 1210, 1123, 958, 837, 822, 784; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, CDCl_3) 3.87 (3H, s, CH_3), 6.47-6.52 (2H, m, Ar-H), 7.13 (2H, t, $J = 8.3$, Ar-H), 7.51 (1H, d, $J = 15.6$, CH), 7.63-7.67 (2H, m, Ar-H), 7.83 (1H, d, $J = 2.4$, Ar-H), 7.85 (1H, d, $J = 24.4$, CH), 13.42 (1H, s, OH); $^{13}\text{C NMR } \delta_{\text{C}}$ (125 MHz, CDCl_3) 191.8, 167.0, 166.5, 165.4 (d, $J_{\text{F-C}} = 252.0$), 143.3, 131.4, 131.3, 130.7 (d, $J_{\text{F-C}} = 8.8$), 120.2, 116.4 (d, $J_{\text{F-C}} = 22.0$), 114.2, 108.1, 101.3, 55.9.

1-(2-hydroksy-4-metoksyfenylo)-3-(4-trifluorometylofenylo)prop-2-en-1-on 181c

Wydajność 71%, tt 130-133 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 2969, 2938, 2851, 1640, 1578, 1507, 1370, 1320, 1225, 1108, 1015, 958, 837, 803; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, CDCl_3) 3.88 (3H, s, CH_3), 6.48-6.53 (2H, m, Ar-H), 7.64 (1H, d, $J = 15.6$, CH), 7.67-7.77 (4H, m, Ar-H), 7.83 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H), 7.88 (1H, d, $J = 15.1$, CH), 13.31 (1H, s, OH); $^{13}\text{C NMR } \delta_{\text{C}}$ (125 MHz, CDCl_3) 191.5, 167.1, 166.8, 142.5, 138.4, 132.2 (q, $J_{\text{F-C}} = 32.5$), 131.5, 128.8, 126.2 (q, $J_{\text{F-C}} = 4.0$), 125.1 (q, $J_{\text{F-C}} = 272.7$), 122.9, 114.2, 108.3, 101.3, 55.9.

1-(2-hydroksy-4-metoksyfenylo)-3-(*p*-tolylo)prop-2-en-1-on 181d

Wydajność 79%, tt 118-119 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3015, 2981, 2912, 1579, 1562, 1504, 1355, 1277, 1204, 1118, 987, 870, 828, 791; $^1\text{H NMR } \delta_{\text{H}}$ (500 MHz, CDCl_3) 2.40 (3H, s, CH_3), 3.85 (3H, s, CH_3), 6.45-6.52 (2H, m, Ar-H), 7.21-7.28 (2H, m, CH), 7.50-7.57 (3H, m, Ar-H),

7.80-7.90 (2H, m, Ar-H, CH), 13.52 (1H, s, OH); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl_3) 192.2, 166.9, 166.4, 144.8, 141.5, 132.3, 131.5, 130.0, 128.8, 119.4, 114.4, 107.9, 101.3, 55.8, 21.8.

13.7.3. Ogólna procedura otrzymywania pochodnych 7-metoksyflawonowych 182a-182d

Do roztworu chalkonu (**181a-181d**) (30 mmol) w DMSO (20 mL) dodano katalityczne ilości jodu (0.76 g, 3 mmol) i mieszano w temperaturze 140 °C przez 1 h. Po upływie tego czasu mieszaninę schłodzono do temperatury pokojowej i wylano do nasyconego, wodnego roztworu tiosiarczanu sodu. Surowy produkt odsączono, przemyto wodą i krystalizowano z metanolu.

7-metoksy-2-fenyl-4H-chromen-4-on 182a

Wydajność 62%, tt 99-102 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3024, 2945, 2844, 1648, 1625, 1604, 1450, 1354, 1012, 818, 768, 667; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 3.89 (3H, s, CH_3), 6.94 (1H, s, CH), 7.04 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H), 7.29 (1H, s, Ar-H), 7.54-7.59 (3H, m, Ar-H), 7.92 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H), 8.07 (2H, d, $J = 6.3$, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 177.1, 164.6, 162.8, 158.2, 132.3, 131.8, 129.8, 126.9, 117.8, 115.4, 107.4, 101.6, 56.8.

2-(4-fluorofenyl)-7-metoksy-4H-chromen-4-on 182b

Wydajność 69%, tt 161-164 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3080, 2994, 2849, 1626, 1604, 1585, 1508, 1436, 1416, 1354, 1164, 828, 810, 673; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 3.90 (3H, s, CH_3), 6.96 (1H, s, CH), 7.05 (1H, dd, $J = 8.8$, Ar-H), 7.31 (1H, s, Ar-H), 7.41 (2H, t, $J = 8.8$, Ar-H), 7.92 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H), 8.13-8.18 (2H, m, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 177.0, 165.7 (d, $J_{\text{F-C}} = 249.8$), 164.5, 161.8, 158.1, 129.5 (d, $J_{\text{F-C}} = 8.8$), 128.4, 126.8, 117.7, 116.8 (d, $J_{\text{F-C}} = 22.0$), 115.4, 107.3, 101.6, 56.7.

7-metoksy-2-(4-trifluorometylofenyl)-4H-chromen-4-on 182c

Wydajność 84%, tt 162-164 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3074, 3011, 2842, 1651, 1624, 1600, 1416, 1330, 1320, 1280, 1110, 1070, 850, 818; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 3.92 (3H, s, CH_3), 7.09 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H), 7.12 (1H, s, CH), 7.35 (1H, s, Ar-H), 7.92-7.97 (3H, m, Ar-H), 8.31 (2H, d, $J = 8.3$, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 177.0, 164.7, 161.0, 158.2, 135.8, 132.0 (q, $J_{\text{F-C}} = 32.0$), 127.7, 126.9, 126.6 (q, $J_{\text{F-C}} = 3.5$), 125.6 (q, $J_{\text{F-C}} = 272.2$), 117.8, 115.6, 109.0, 101.6, 56.8.

7-metoksy-2-(p-tolylo)-4H-chromen-4-on 182d

Wydajność 80%, tt 130-132 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3054, 2972, 2842, 1622, 1595, 1570, 1436, 1352, 1251, 1204, 1168, 1090, 851, 821; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 2.38 (3H, s, CH_3), 3.90 (3H, s, CH_3), 6.91 (1H, s, CH), 7.03-7.07 (1H, m, Ar-H), 7.31 (1H, s, Ar-H), 7.37 (2H, d,

$J = 6.3$, Ar-H), 7.90-8.10 (3H, m, Ar-H); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 177.1, 164.5, 163.0, 158.2, 142.6, 130.4, 129.0, 126.8, 117.8, 115.4, 106.8, 101.6, 56.8, 21.7.

13.7.4. Ogólna procedura otrzymywania pochodnych 7-hydroksyflawonowych 183a-183d

Odpowiednią pochodną 7-metoksyflawonową (**182a-182d**) (30 mmol) stapiano z chlorowodorkiem pirydyny (17.33 g, 150 mmol) i utrzymywano w temperaturze 180 °C przez 5 h. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną wylano na wodę i zakwaszono HCl. Powstały osad odsączono, przemyto wodą i krystalizowano z metanolu.

7-hydroksy-2-fenylo-4*H*-chromen-4-on 183a

Wydajność 90%, tt 247-248 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3060, 2785, 1623, 1574, 1540, 1473, 1381, 1249, 1092; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 6.89 (1H, s, CH), 6.92 (1H, dd, $J = 8.5$, Ar-H), 6.99 (1H, d, $J = 2.0$, Ar-H), 7.52-7.59 (3H, m, Ar-H), 7.87 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H), 8.02-8.06 (2H, m, Ar-H), 10.83 (1H, s, OH); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 177.1, 163.5, 162.6, 158.2, 132.2, 132.0, 130.0, 127.2, 126.8, 116.8, 115.8, 107.3, 103.2.

2-(4-fluorofenylo)-7-hydroksy-4*H*-chromen-4-on 183b

Wydajność 85%, tt 244-247 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3079, 2834, 1625, 1566, 1506, 1416, 1330, 1223, 1094; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 6.88 (1H, s, CH), 6.91 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H), 6.98 (1H, s, Ar-H), 7.38 (2H, t, $J = 8.5$, Ar-H), 7.86 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H), 8.09-8.14 (2H, m, Ar-H), 10.84 (1H, s, OH); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 177.0, 165.7 (d, $J_{\text{F-C}} = 249.8$), 163.5, 161.6, 158.1, 129.5 (d, $J_{\text{F-C}} = 9.2$), 128.5, 127.2, 116.8 (d, $J_{\text{F-C}} = 22.4$), 115.8, 107.2, 103.2, 56.7.

7-hydroksy-2-(4-trifluorometylofenylo)-4*H*-chromen-4-on 183c

Wydajność 88%, tt 249-251 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3062, 2830, 1623, 1559, 1507, 1416, 1320, 1224, 1097; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 6.92-6.96 (1H, m, Ar-H), 7.00-7.05 (2H, m, Ar-H, CH), 7.86-7.94 (3H, m, Ar-H), 8.27 (2H, d, $J = 8.3$, Ar-H), 10.90 (1H, s, OH); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 177.0, 163.7, 160.9, 158.2, 135.9, 131.9 (q, $J_{\text{F-C}} = 32.0$), 127.7, 127.3, 126.6 (q, $J_{\text{F-C}} = 4.0$), 125.6 (d, $J_{\text{F-C}} = 272.2$), 116.8, 116.0, 108.8, 103.3.

7-hydroksy-2-(*p*-tolylo)-4*H*-chromen-4-on 183d

Wydajność 89%, tt 282-285 °C; ν_{max} (KBr)/ cm^{-1} 3065, 2835, 1622, 1562, 1509, 1414, 1389, 1223, 1093; ^1H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 2.38 (3H, s, CH₃), 6.85 (1H, s, CH), 6.92 (1H, dd, $J = 8.8$, Ar-H), 6.99 (1H, d, $J = 2.0$, Ar-H), 7.36 (2H, d, $J = 8.3$, Ar-H), 7.86 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H), 7.95 (1H, d, $J = 8.3$, Ar-H), 10.82 (1H, s, OH); ^{13}C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 177.1, 163.4, 162.7, 158.1, 142.4, 130.3, 129.1, 127.2, 126.8, 116.8, 115.6, 106.6, 103.2, 21.7.

13.7.5. Ogólna procedura otrzymywania pochodnych 185a-185d

Do roztworu POCl₃ (92 mg, 0.6 mmol) w bezwodnym THF (10 mL) oziębionego do temperatury 0 °C wkrapiano roztwór 7-hydroksyflawonu (**183a-183d**) (0.6 mmol) w THF i trietyloaminę (61 mg, 0.6 mmol). Następnie całość mieszano przez jedną godzinę w atmosferze azotu. Po odsączeniu chlorowodoru trietyloaminy, dodano metanolan sodu (1.5 mmol) (świeżo przygotowany na drodze reakcji absolutnego metanolu z NaH). Po upływie godziny, odsączono wytrącony osad NaCl i odparowano rozpuszczalnik. Produkt izolowano z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w CHCl₃.

Dimetylofosforan 4-okso-2-fenylo-4*H*-chromen-7-ylu **185a**

Wydajność 68%, tt 97-99 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3074, 2960, 2856, 1637, 1613, 1570, 1278, 1148, 1039, 966, 889, 861, 767, 670; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) 3.91 (6H, d, $J = 11.2$, CH₃), 6.82 (1H, s, CH), 7.26 (1H, d, $J = 8.3$, Ar-H), 7.51 (4H, d, $J = 6.3$, Ar-H), 7.90 (2H, d, $J = 6.3$, Ar-H), 8.20 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 177.8, 164.1, 157.2, 154.8 (d, $J_{\text{P-C}} = 6.6$), 132.1, 131.6, 129.3, 127.9, 126.6, 121.3, 118.2 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.7$), 109.2 (d, $J_{\text{P-C}} = 4.4$), 107.7, 55.5 (d, $J_{\text{P-C}} = 6.1$); ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl₃) -3.78. Analiza elementarna dla: C₁₇H₁₅O₆P: C, 58.97; H, 4.37. Znaleziono: C, 59.01; H, 4.39.

Dimetylofosforan 2-(4-fluorofenylo)-4-okso-4*H*-chromen-7-ylu **185b**

Wydajność 54%, tt 145-147 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3081, 2962, 2920, 2856, 1636, 1612, 1511, 1285, 1236, 1153, 1029, 968, 890, 836, 768, 670; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) 3.93 (6H, d, $J = 11.7$, CH₃), 6.81 (1H, d, $J = 6.8$, CH), 7.21-7.28 (3H, m, Ar-H), 7.54 (1H, s, Ar-H), 7.93 (2H, dd, $J = 8.8$, Ar-H), 8.23 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 177.7, 166.1 (d, $J_{\text{F-C}} = 253.8$), 163.2, 157.1, 154.8 (d, $J_{\text{P-C}} = 6.6$), 128.8 (d, $J_{\text{F-C}} = 8.8$), 128.0, 127.8, 121.2, 118.3 (d, $J_{\text{P-C}} = 6.1$), 116.6 (d, $J_{\text{F-C}} = 22.4$), 109.1 (d, $J_{\text{P-C}} = 4.8$), 107.5, 55.5 (d, $J_{\text{P-C}} = 6.1$); ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl₃) -3.68. Analiza elementarna dla: C₁₇H₁₄FO₆P: C, 56.05; H, 3.87. Znaleziono: C, 56.09; H, 3.91.

Dimetylofosforan 4-okso-2-(4-trifluorometylofenylo)-4*H*-chromen-7-ylu **185c**

Wydajność 48%, tt 161-164 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3082, 2966, 2864, 1644, 1440, 1319, 1115, 1034, 1014, 873, 844, 830, 770; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) 3.86 (6H, d, $J = 11.7$, CH₃), 7.21 (1H, s, CH), 7.39 (1H, dd, $J = 8.8$, Ar-H), 7.72 (1H, d, $J = 1.0$, Ar-H), 7.94 (2H, d, $J = 8.3$, Ar-H), 8.10 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H), 8.35 (2H, d, $J = 8.3$, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 177.0, 161.8, 157.1, 154.9 (d, $J_{\text{P-C}} = 6.1$), 135.5, 132.1 (q, $J_{\text{F-C}} = 32.0$), 128.0, 127.8, 126.6 (q, $J_{\text{F-C}} = 3.5$), 124.5 (q, $J_{\text{F-C}} = 272.2$), 121.4, 119.0 (d, $J_{\text{P-C}} = 4.8$), 110.1 (d, $J_{\text{P-C}} = 4.8$), 109.2, 56.0 (d, $J_{\text{P-C}} = 6.1$); ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl₃) -3.64. Analiza elementarna dla: C₁₈H₁₄F₃O₆P: C, 52.19; H, 3.41. Znaleziono: C, 52.22; H, 3.39.

Dimetylofosforan 4-okso-2-(*p*-tolylo)-4*H*-chromen-7-ylu 185d

Wydajność 50%, tt 138-140 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3075, 2956, 2922, 2854, 1640, 1615, 1370, 1270, 1242, 1153, 1035, 973, 869, 854, 816; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) 2.46 (3H, s, CH₃), 3.93 (6H, d, $J = 11.2$, CH₃), 6.88 (1H, s, CH), 7.26 (1H, s, Ar-H), 7.34 (2H, d, $J = 7.8$, Ar-H), 7.54 (1H, d, $J = 2.0$, Ar-H), 7.83 (2H, d, $J = 8.3$, Ar-H), 8.24 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 177.8, 164.5, 157.2, 154.7 (d, $J_{\text{P-C}} = 6.6$), 142.9, 130.1, 128.7, 127.9, 126.5, 121.2, 118.1 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.7$), 109.2 (d, $J_{\text{P-C}} = 4.4$), 107.0, 55.5 (d, $J_{\text{P-C}} = 6.1$), 21.8; ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl₃) -3.68. Analiza elementarna dla: C₁₈H₁₇O₆P: C, 60.00; H, 4.76. Znaleziono: C, 60.08; H, 4.80.

13.7.6. Ogólna procedura otrzymywania pochodnych 185e-185h

Do roztworu dimetylofosforanu (**185a-185d**) (1 mmol) w bezwodnym CH₂Cl₂ (10 mL) oziębionego do temperatury 0 °C wkrapiano TMSBr (0.66 mL, 5 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano w atmosferze azotu przez 1.5 h. Następnie odparowano rozpuszczalnik i dodano metanol (5 mL). Całość odparowano, a otrzymany osad przemywano octanem etylu otrzymując pożądaną produkt.

Diwodorofosforan 4-okso-2-fenylo-4*H*-chromen-7-ylu 185e

Wydajność 74%, tt 251 °C (z rozkładem); ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3099, 3074, 1613, 1454, 1250, 1156, 1007, 945, 830, 774, 666; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 2.80-5.80 (2H, br s, OH), 7.03 (1H, s, CH), 7.29 (1H, dd, $J = 8.8$, Ar-H), 7.54-7.64 (4H, m, Ar-H), 8.03 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H), 8.10 (2H, d, $J = 6.8$, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 177.2, 163.3, 157.2, 156.6 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.7$), 132.5, 131.7, 129.8, 127.2, 127.0, 120.3, 119.1 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.7$), 109.3 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.3$), 107.6; ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) -5.60. Analiza elementarna dla: C₁₅H₁₁O₆P: C, 56.62; H, 3.48. Znaleziono: C, 56.60; H, 3.45.

Diwodorofosforan 2-(4-fluorofenylo)-4-okso-4*H*-chromen-7-ylu 185f

Wydajność 88%, tt 320 °C (z rozkładem); ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3099, 3088, 1601, 1504, 1241, 1165, 1011, 948, 835, 752, 660; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 2.60-4.40 (2H, br s, OH), 7.03 (1H, s, CH), 7.29 (1H, dd, $J = 8.8$, Ar-H), 7.42 (2H, t, $J = 8.8$, Ar-H), 7.57 (1H, d, $J = 1.5$, Ar-H), 8.03 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H), 8.18 (2H, dd, $J = 8.8$, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 177.1, 165.8 (d, $J_{\text{F-C}} = 250.7$), 162.4, 157.1, 156.6 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.7$), 129.7 (d, $J_{\text{F-C}} = 9.2$), 128.3, 127.2, 120.2, 119.1 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.7$), 117.0 (d, $J_{\text{F-C}} = 22.0$), 109.3 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.3$), 107.5; ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) -5.57. Analiza elementarna dla: C₁₅H₁₀FO₆P: C, 53.59; H, 3.00. Znaleziono: C, 53.57; H, 3.04.

Diwodorofosforan 4-okso-2-(4-trifluorometylofenylo)-4*H*-chromen-7-ylu 185g

Wydajność 73%, tt 243 °C (z rozkładem); ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3096, 3080, 1621, 1447, 1325, 1168, 1130, 1112, 952, 842, 666, 640; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 2.60-5.00 (2H, br s, OH), 7.17 (1H, s, CH), 7.30 (1H, dd, $J = 8.8$, Ar-H), 7.60 (1H, d, $J = 2.0$, Ar-H) 7.94 (2H, d, $J = 8.3$, Ar-H), 8.05 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H), 8.32 (2H, d, $J = 8.3$, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 177.1, 161.6, 157.2, 156.8 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.7$), 135.6, 132.0 (q, $J_{\text{F-C}} = 32.0$), 127.9, 127.2, 126.6 (q, $J_{\text{F-C}} = 3.5$), 125.6 (q, $J_{\text{F-C}} = 277.5$), 120.2, 119.3 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.7$), 109.3 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.3$), 109.1; ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) -5.59. Analiza elementarna dla: C₁₆H₁₀F₃O₆P: C, 49.76; H, 2.61. Znaleziono: C, 49.81; H, 2.65.

Diwodorofosforan 4-okso-2-(*p*-tolylo)-4*H*-chromen-7-ylu 185h

Wydajność 78%, tt 248 °C (z rozkładem); ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3097, 3077, 3033, 1609, 1448, 1254, 1165, 1015, 941, 837, 818, 657; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 2.49 (3H, s, CH₃), 2.60-5.20 (2H, br s, OH), 6.98 (1H, s, CH), 7.28 (1H, dd, $J = 8.8$, Ar-H), 7.38 (2H, d, $J = 8.3$, Ar-H), 7.56 (1H, d, $J = 2.0$, Ar-H), 7.99 (2H, d, $J = 8.3$, Ar-H), 8.02 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 177.1, 163.5, 157.1, 142.7, 130.4, 128.9, 127.1, 126.9, 120.3, 119.0 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.3$), 109.2 (d, $J_{\text{P-C}} = 4.8$), 106.9, 21.7; ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) -5.57. Analiza elementarna dla: C₁₆H₁₃O₆P: C, 57.84; H, 3.94. Znaleziono: C, 57.75; H, 3.89.

13.7.7. Ogólna procedura otrzymywania pochodnych 185i-185l

Do roztworu PSCl₃ (102 mg, 0.6 mmol) w bezwodnym THF (10 mL) oziębionego do temperatury 0 °C wkrapiano roztwór 7-hydroksyflawonu (**183a-183d**) (0.6 mmol) w THF i trietyloaminę (61 mg, 0.6 mmol). Następnie mieszano przez 3 godziny w atmosferze azotu. Po odsączeniu chlorowodoru trietyloaminy, dodano metanolan sodu (0.6 mmol) (świeżo przygotowany na drodze reakcji absolutnego metanolu z NaH). Po upływie godziny, odsączono wytrącony osad NaCl i odparowano rozpuszczalnik. Produkt izolowano z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie CHCl₃:heksan 1:1.

Chlorometylotiofosforan 4-okso-2-fenylo-4*H*-chromen-7-ylu 185i

Wydajność 77%, tt 102 °C (z rozkładem); ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3065, 2958, 1643, 1610, 1439, 1363, 1147, 1039, 966, 885, 812, 728, 645; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) 4.07 (3H, d, $J = 16.6$, CH₃), 6.96 (1H, s, CH), 7.34 (1H, d, $J = 8.3$, Ar-H), 7.54-7.59 (4H, m, Ar-H), 7.95 (2H, d, $J = 7.3$, Ar-H), 8.29 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 177.8, 164.6, 157.0, 154.0 (d, $J_{\text{P-C}} = 8.8$), 132.3, 131.4, 129.4, 128.0, 126.7, 122.0, 119.5 (d, $J_{\text{P-C}} = 4.8$), 110.9 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.7$), 107.7, 56.6 (d, $J_{\text{P-C}} = 7.0$); ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl₃) 65.33. Analiza elementarna dla: C₁₆H₁₂ClO₄PS: C, 52.40; H, 3.30; S, 8.74. Znaleziono: C, 52.45; H, 3.36; S, 8.72.

Chlorometylotiofosforan 2-(4-fluorofenylo)-4-okso-4*H*-chromen-7-ylu 185j

Wydajność 58%, tt 122 °C (z rozkładem); ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3065, 2958, 1637, 1613, 1439, 1371, 1141, 1032, 972, 890, 824, 726, 646; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) 4.06 (3H, d, $J = 16.1$, CH₃), 6.80 (1H, s, CH), 7.22 (2H, t, $J = 8.3$, Ar-H), 7.32 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H), 7.52 (1H, t, $J = 2.0$, Ar-H), 7.93 (2H, dd, $J = 8.8$, Ar-H), 8.26 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 177.5, 166.2 (d, $J_{\text{F-C}} = 254.2$), 163.2, 156.8 (d, $J_{\text{P-C}} = 1.8$), 153.9 (d, $J_{\text{P-C}} = 9.2$), 128.8 (d, $J_{\text{F-C}} = 8.8$), 128.0, 127.7, 122.1, 119.4 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.3$), 116.8 (d, $J_{\text{F-C}} = 22.4$), 110.8 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.7$), 107.7, 56.6 (d, $J_{\text{P-C}} = 7.0$); ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl₃) 65.32. Analiza elementarna dla: C₁₆H₁₁ClFO₄PS: C, 49.95; H, 2.88; S, 8.33. Znaleziono: C, 49.99; H, 2.91; S, 8.36.

Chlorometylofosforan 4-okso-2-(4-trifluorometylofenylo)-4H-chromen-7-ylu 185k

Wydajność 60%, tt 135-137 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3087, 2952 1639, 1615, 1442, 1371, 1127, 1028, 966, 890, 824, 704, 652; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) 4.07 (3H, d, $J = 16.6$, CH₃), 6.89 (1H, s, CH), 7.34 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H), 7.56 (1H, t, $J = 2.0$, Ar-H), 7.80 (2H, d, $J = 8.3$, Ar-H), 8.04 (2H, d, $J = 8.3$, Ar-H), 8.28 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 177.4, 162.4, 156.9, 154.1 (d, $J_{\text{P-C}} = 9.2$), 135.0, 133.6 (q, $J_{\text{F-C}} = 32.9$), 128.1, 127.0, 126.4 (q, $J_{\text{F-C}} = 4.0$), 124.9 (q, $J_{\text{F-C}} = 272.7$), 122.2, 119.7 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.3$), 111.0 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.7$), 109.2, 56.6 (d, $J_{\text{P-C}} = 7.0$); ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl₃) 65.32. Analiza elementarna dla: C₁₇H₁₁ClF₃O₄PS: C, 46.96; H, 2.55; S, 7.38. Znaleziono: C, 47.00; H, 2.51; S, 7.41.

Chlorometylofosforan 4-okso-2-(p-tolylo)-4H-chromen-7-ylu 185l

Wydajność 52%, tt 110-113 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3071, 2952, 2849, 1640, 1612, 1441, 1369, 1137, 1033, 969, 816, 717, 644; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) 2.46 (3H, s, CH₃), 4.07 (3H, d, $J = 16.6$, CH₃), 6.92 (1H, s, CH), 7.31-7.36 (3H, m, Ar-H), 7.55 (1H, t, $J = 2.0$, Ar-H), 7.84 (2H, d, $J = 8.3$, Ar-H), 8.28 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 177.7, 164.7, 156.9, 153.9, 143.1, 130.1, 128.6, 127.9, 127.6, 126.6, 122.1, 119.3, 110.9 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.7$), 107.1, 56.6 (d, $J_{\text{P-C}} = 7.0$), 21.8; ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl₃) 65.34. Analiza elementarna dla: C₁₇H₁₄ClO₄PS: C, 53.62; H, 3.71; S, 8.42. Znaleziono: C, 53.58; H, 3.70; S, 8.43.

13.7.8. Ogólna procedura otrzymywania pochodnych 185m-185p

Do roztworu chlorometylofosforanu (**185i-185l**) (0.6 mmol) w bezwodnym THF (10 mL) oziębionego do temperatury 0 °C dodano metanolan sodu (0.6 mmol) (świeżo przygotowany na drodze reakcji absolutnego metanolu z NaH). Po upływie godziny, odsączono wytrącony osad NaCl i odparowano rozpuszczalnik. Produkt izolowano z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie CHCl₃:heksan 2:1.

Dimetylofosforan 4-okso-2-fenylo-4H-chromen-7-ylu 185m

Wydajność 86%, tt 126-128 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3075, 2952, 2848, 1641, 1609, 1438, 1368, 1244, 1153, 1022, 970, 882, 825, 766; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) 3.91 (6H, d, $J = 14.2$, CH₃), 6.92 (1H, s, CH), 7.23-7.27 (1H, m, Ar-H), 7.45 (1H, t, $J = 2.0$, Ar-H), 7.51-7.56 (3H, m, Ar-H), 7.91-7.94 (2H, m, Ar-H), 8.23 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 177.9, 164.6, 157.1, 155.0 (d, $J_{\text{P-C}} = 7.0$), 132.3, 131.5, 129.4, 127.7, 126.7, 121.2, 119.4 (d, $J_{\text{P-C}} = 4.8$), 110.3 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.3$), 107.5, 55.8 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.7$); ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl₃) 66.77. Analiza elementarna dla: C₁₇H₁₅O₅PS: C, 56.35; H, 4.17; S, 8.85. Znaleziono: C, 56.42; H, 4.22; S, 8.79.

Dimetylotiofosforan 2-(4-fluorofenylo)-4-okso-4H-chromen-7-ylu 185n

Wydajność 83%, t 130-132 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3074, 2966, 2850, 1635, 1612, 1439, 1370, 1237, 1147, 1024, 973, 886, 813, 757; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 3.88 (6H, d, $J = 13.7$, CH₃), 7.08 (1H, s, CH), 7.32 (1H, dd, $J = 8.8$, Ar-H), 7.44 (2H, t, $J = 8.8$, Ar-H), 7.66 (1H, t, $J = 2.0$, Ar-H), 8.08 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H), 8.20-8.24 (2H, m, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 177.2, 165.9 (d, $J_{\text{F-C}} = 250.7$), 162.8, 156.9, 154.6 (d, $J_{\text{P-C}} = 7.0$), 129.8 (d, $J_{\text{F-C}} = 9.2$), 128.0, 127.5, 121.4, 119.8, 116.9 (d, $J_{\text{F-C}} = 22.0$), 111.1 (d, $J_{\text{P-C}} = 4.8$), 107.4, 56.3 (d, $J_{\text{P-C}} = 6.1$); ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 66.45. Analiza elementarna dla: C₁₇H₁₄FO₅PS: C, 53.69; H, 3.71; S, 8.43. Znaleziono: C, 53.75; H, 3.77; S, 8.46.

Dimetylotiofosforan 4-okso-2-(4-trifluorometylofenylo)-4H-chromen-7-ylu 185o

Wydajność 82%, tt 157-160 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3075, 2954, 2852, 1643, 1610, 1439, 1371, 1320, 1155, 1030, 962, 891, 835, 705; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) 3.91 (6H, d, $J = 13.7$, CH₃), 6.90 (1H, s, CH), 7.26 (1H, s, Ar-H), 7.47 (1H, t, $J = 2.0$, Ar-H), 7.80 (2H, d, $J = 8.3$, Ar-H), 8.05 (2H, d, $J = 8.3$, Ar-H), 8.24 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 177.6, 162.2, 157.0, 155.0 (d, $J_{\text{P-C}} = 7.0$), 135.1, 133.5 (q, $J_{\text{F-C}} = 32.9$), 127.8, 126.9, 126.3 (q, $J_{\text{F-C}} = 3.5$), 123.8 (q, $J_{\text{F-C}} = 272.2$), 121.5, 119.5 (d, $J_{\text{P-C}} = 4.8$), 110.3 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.3$), 109.0, 55.8 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.7$); ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl₃) 66.78. Analiza elementarna dla: C₁₈H₁₄F₃O₅PS: C, 50.24; H, 3.28; S, 7.45. Znaleziono: C, 50.21; H, 3.34; S, 7.48.

Dimetylotiofosforan 4-okso-2-(p-tolylo)-4H-chromen-7-ylu 185p

Wydajność 90%, tt 137-140 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3068, 2950, 2849, 1637, 1603, 1437, 1367, 1328, 1152, 1019, 962, 882, 818, 710; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 2.39 (3H, s, CH₃), 3.88 (6H, d, $J = 13.7$, CH₃), 7.02 (1H, s, CH), 7.31 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H), 7.39 (2H, d, $J = 8.3$, Ar-H), 7.65 (1H, s, Ar-H), 8.03 (2H, d, $J = 7.8$, Ar-H), 8.08 (1H, d, $J = 8.8$, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 177.0, 163.7, 156.9, 154.6, 142.9, 130.4, 128.7, 127.5, 127.0, 121.7, 119.6, 111.1, 107.0, 56.3 (d, $J_{\text{P-C}} = 6.1$), 21.8; ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 66.50.

Analiza elementarna dla: C₁₈H₁₇O₅PS: C, 57.44; H, 4.45; S, 8.52. Znaleziono: C, 57.47; H, 4.41; S, 8.50.

13.7.9. Ogólna procedura otrzymywania pochodnych 186a-186d

Do roztworu PSCl₃ (102 mg, 0.6 mmol) w bezwodnym THF (10 mL) wkrapiano roztwór 7-hydroksyflawonu (**183a-183d**) (1.2 mmol) w THF i trietyloaminę (122 mg, 1.2 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszanono w atmosferze azotu przez 24 godziny. Po odsączeniu chlorowodoru trietyloaminy odparowano rozpuszczalnik. Ze względu na łatwość hydrolizy, monochlorki (**186a**), (**186b**) oraz (**186d**) były wykorzystywane do dalszych syntez bez oczyszczania. Analog (**186c**) izolowano z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie CHCl₃:AcOEt 15:1.

Chlorotiofosforan bis-(4-okso-2-(4-trifluorometylofenylo)-4H-chromen-7-ylu) 186c

Wydajność 66%, tt 186-188 °C; ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3066, 2926, 1647, 1609, 1509, 1440, 1417, 1320, 1113, 959, 829; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl₃) 6.90 (2H, s, CH), 7.43 (2H, dt, *J* = 8.8, Ar-H), 7.62 (2H, t, *J* = 2.0, Ar-H), 7.80 (4H, d, *J* = 8.3, Ar-H), 8.05 (4H, d, *J* = 8.3, Ar-H), 8.34 (2H, d, *J* = 8.8, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃) 176.9, 162.2, 156.6, 153.5, 134.6, 134.0, 128.1, 126.7, 126.2, 122.4, 119.3, 110.9 (d, *J*_{P-C} = 5.7), 109.0; ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, CDCl₃) 57.00. Analiza elementarna dla: Analiza elementarna dla: C₃₂H₁₆ClF₆O₆PS: C, 54.21; H, 2.27; S, 4.52. Znaleziono: C, 54.28; H, 2.30; S, 4.55.

13.7.10. Procedura otrzymywania pochodnej 186e

Do roztworu chlorotiofosforanu (**186c**) (708 mg, 1.0 mmol) w bezwodnym THF (10 mL) dodano metanolu (0.04 mL, 1 mmol) oraz węgla potasu (138 mg, 1 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 24 h w atmosferze azotu, następnie przesączono i odparowano rozpuszczalnik. Produkt izolowano z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie CHCl₃:AcOEt 10:1.

Metylotiofosforan bis-(4-okso-2-(4-trifluorometylofenylo)-4H-chromen-7-ylu) 186e

Wydajność 36%, tt 191 °C (z rozkładem); ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3067, 2953, 1649, 1608, 1491, 1439, 1320, 1236, 1110, 1070, 964, 896, 825; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 4.10 (3H, d, *J* = 14.2, CH₃), 7.24 (2H, s, CH), 7.49 (2H, d, *J* = 8.3, Ar-H), 7.85 (2H, s, Ar-H), 7.93 (4H, d, *J* = 8.3, Ar-H), 8.16 (2H, d, *J* = 8.8, Ar-H), 8.36 (4H, d, *J* = 7.8, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 176.9, 161.6, 158.0, 156.8, 135.2, 132.2 (q, *J*_{F-C} = 32.0), 127.7, 126.6 (q, *J*_{F-C} = 16.7), 124.3 (q, *J*_{F-C} = 272.2), 121.8, 119.2, 111.3, 109.0, 57.3; ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 45.30. Analiza elementarna dla: C₃₃H₁₉F₆O₇PS: C, 56.26; H, 2.72; S, 4.55. Znaleziono: C, 56.22; H, 2.75; S, 4.56.

13.7.11. Ogólna procedura otrzymywania pochodnych 186f-186i

Do roztworu odpowiedniego chlorotiofosforanu (**186a-186d**) (1.0 mmol) w THF (10 mL) dodano wodny roztwór węglanu potasu (0.5 mL). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 24 h. Po odparowaniu rozpuszczalnika, produkt izolowano z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie AcOEt:MeOH 20:1.

Wodorotiofosforan bis-(4-okso-2-fenylo-4*H*-chromen-7-ylu) 186f

Wydajność 46%, tt 197 °C (z rozkładem); ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3065, 2952, 1620, 1492, 1438, 1373, 1241, 1145, 1092, 958, 840, 821; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 6.98 (2H, s, CH), 7.33 (2H, d, $J = 8.3$, Ar-H), 7.55-7.58 (6H, m, Ar-H), 7.66 (2H, s, Ar-H), 7.97 (2H, d, $J = 8.3$, Ar-H), 8.09 (4H, d, $J = 7.8$, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 177.0, 161.5, 158.0, 156.8, 132.1, 131.5, 130.1, 126.7, 126.2, 119.7, 119.2, 109.2, 107.2; ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 45.29. Analiza elementarna dla: C₃₀H₁₉O₇PS: C, 64.98; H, 3.45; S, 5.78. Znaleziono: C, 65.04; H, 3.49; S, 5.76.

Wodorotiofosforan bis-(4-okso-2-(4-fluorofenylo)-4*H*-chromen-7-ylu) 186g

Wydajność 38%, tt 238 °C (z rozkładem); ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3072, 2924, 1621, 1506, 1438, 1374, 1236, 1145, 1092, 958, 829; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 6.98 (2H, s, CH), 7.33 (2H, d, $J = 8.3$, Ar-H), 7.39 (4H, t, $J = 8.8$, Ar-H), 7.66 (2H, s, Ar-H), 7.97 (2H, d, $J = 8.8$, Ar-H), 8.14-8.19 (4H, m, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 176.9, 167.0, 162.0, 157.9 (d, $J_{\text{P-C}} = 7.8$), 156.8, 129.4 (d, $J_{\text{F-C}} = 8.7$), 128.1, 126.2, 119.7, 119.2, 116.6 (d, $J_{\text{F-C}} = 22.2$), 109.3 (d, $J_{\text{P-C}} = 5.3$), 107.1; ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 45.27. Analiza elementarna dla: C₃₀H₁₇F₂O₇PS: C, 61.02; H, 2.90; S, 5.43. Znaleziono: C, 60.95; H, 2.94; S, 5.48.

Wodorotiofosforan bis-(4-okso-2-(4-trifluorometylofenylo)-4*H*-chromen-7-ylu) 186h

Wydajność 38%, tt 253 °C (z rozkładem); ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3074, 2940, 1623, 1494, 1440, 1320, 1241, 1113, 1068, 958, 829; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 7.13 (2H, s, CH), 7.34 (2H, dd, $J = 8.8$, Ar-H), 7.70 (2H, s, Ar-H), 7.91 (4H, d, $J = 8.3$, Ar-H), 7.99 (2H, d, $J = 8.3$, Ar-H), 8.32 (4H, d, $J = 8.3$, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 176.9, 161.2, 158.1 (d, $J_{\text{P-C}} = 7.8$), 156.8, 135.5, 131.6 (q, $J_{\text{F-C}} = 32.2$), 127.6, 126.3, 124.2 (q, $J_{\text{F-C}} = 272.4$), 119.9, 119.2, 109.3, 108.7; ³¹P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 45.23. Analiza elementarna dla: C₃₂H₁₇F₆O₇PS: C, 55.66; H, 2.48; S, 4.64. Znaleziono: C, 55.74; H, 2.55; S, 4.67.

Wodorotiofosforan bis-(4-okso-2-(*p*-tolylo)-4*H*-chromen-7-ylu) 186i

Wydajność 41%, tt 203 °C (z rozkładem); ν_{\max} (KBr)/cm⁻¹ 3069, 2922, 1617, 1436, 1412, 1370, 1243, 1145, 1091, 957, 816; ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, DMSO) 2.48 (6H, s, CH₃), 6.93 (2H, s, CH), 7.30 (2H, d, $J = 8.8$, Ar-H), 7.36 (4H, d, $J = 7.8$, Ar-H), 7.64 (2H, s, Ar-H), 7.93-8.00 (6H, m, Ar-H); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, DMSO) 176.9, 163.0, 157.8, 156.8, 142.3,

130.1, 128.7, 126.6, 126.2, 119.4 (d, $J_{P-C} = 13.5$), 117.0, 109.3, 106.6, 21.5; ^{31}P NMR δ_{P} (202 MHz, DMSO) 45.28. Analiza elementarna dla: $\text{C}_{32}\text{H}_{23}\text{O}_7\text{PS}$: C, 65.97; H, 3.98; S, 5.50. Znalezienie: C, 66.05; H, 3.96; S, 5.55.

14. Literatura

1. Howlader, N.; Noone, A. M.; Krapcho, M.; Garshell, J.; Miller, D.; Altekruse, S. F.; Kosary, C. L.; Yu, M.; Ruhl, J.; Tatalovich, Z.; Mariotto, A.; Lewis, D. R.; Chen, H. S.; Feuer, E. J.; Cronin, K. A. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011*, National Cancer Institute.
2. James, V. H. T.; Reed, M. J. Steroid hormones and human cancer. *Prog Cancer Res Therapy*, **1980**, 14, 471-487.
3. Purohit, A.; Woo, L. W. L.; Potter B. V. L.; Reed, M. J. *In vivo* Inhibition of Estrone Sulfatase Activity and Growth of Nitrosomethylurea-induced Mammary Tumors by 667 COUMATE. *Cancer Res*, **2000**, 60, 3394-3396.
4. Foster, P. A.; Newman, S. P.; Chander, S. K.; Stengel, C.; Jhalli, R.; Woo, L. W. L.; Potter, B. V. L.; Reed, M. J.; Purohit, A. *In vivo* efficacy of STX213, a second generation steroid sulfatase inhibitor, for hormone-dependent breast cancer therapy. *Clin Cancer Res*, **2006**, 12, 5543-5549.
5. Bond, C.; Clements, P.; Ashby, S.; Collyer, C.; Harrop, S.; Hopwood, J.; Guss, J. Structure of a human lysosomal sulfatase. *Structure*, **1997**, 5, 277-289.
6. Ferrante, P.; Messali, S.; Meroni, G.; Ballabio, A. Molecular and biochemical characterisation of a novel sulphatase gene: aryl sulphatase G (ARSG). *Eur J Hum Genet*, **2002**, 10, 813-818.
7. Stein, C.; Hille, A.; Seidel, J.; Rijnbout, S.; Waheed, A.; Schmidt, B.; Geuze, H.; von Figura, K. Cloning and expression of human steroid-sulfatase. Membrane topology, glycosylation, and subcellular distribution in BHK-21 cells. *J Biol Chem*, **1989**, 264, 13865-13872.
8. Recksiek, M.; Selmer, T.; Dierks, T.; Schmidt, B.; von Figura, K. Sulfatases, trapping of the sulphated enzyme intermediate by substituting the active site formylglycine. *J Biol Chem*, **1998**, 273, 6096-6103.
9. Dodgson, K.; Spencer, B.; Thomas, J. Studies on sulphatases. 6. The localization of arylsulphatase in the rat-liver cell. *J Biochem*, **1954**, 56, 177-181.
10. Payne, A. H.; Mason, M.; Jaffe, R. B. Testicular steroid sulfatase. Substrate specificity and inhibition. *Steroids*, **1969**, 14, 685-704.

11. Clemens, J. W.; Kabler, H. L.; Sarap, J. L.; Beyer, A. R.; Li, P. K.; Selcer, K. W. Steroid sulfatase activity in the rat ovary, cultured granulosa cells and a granulosa cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **2000**, 75, 245-252.
12. Han, H. D.; Fencl, M. M.; Tulchinsky, D. Variations in estrone sulfatase activity in human leukocytes. *J Clin Endocrinol Metab*, **1987**, 65, 1026-1030.
13. Iwamori, M.; Moser, H. W.; Kishimoto, Y. Steroid sulfatase in brain: comparison of sulfohydrolase activities for various steroid sulfates in normal and pathological brains, including the various forms of metachromatic leukodystrophy. *J Neurochem*, **1976**, 27, 1389-1395.
14. Reed, M. J.; Purohit, A.; Woo, L. W. L.; Newman, S. P.; Potter, B. V. L. Steroid sulfatase: Molecular biology, regulation and inhibition. *Endocr Rev*, **2005**, 26, 171-202.
15. Partanen, S. Histochemistry of estrogen sulfatases in human breast diseases. *Virchows Arch (Cell Pathol)*, **1985**, 49, 53-60.
16. Okuda, T.; Saito, H.; Sekizawa, A.; Shimizu, Y.; Akamatsu, T.; Kushima, M.; Yanaihara, T.; Okai, T.; Farina, A. Steroid sulfatase expression in ovarian clear cell adenocarcinoma: immunohistochemical study. *Gynecol Oncol*, **2001**, 82, 427-434.
17. Ezaki, K.; Motoyama, H.; Sasaki, H. Immunohistologic localization of estrone sulfatase in uterine endometrium and adenomyosis. *Obstet Gynecol*, **2001**, 98, 815-819.
18. Nakamura, Y.; Miki, Y.; Susuki, T.; Nakata, T.; Darnel, A. D.; Mariya, T.; Tazawa, C.; Saito, H.; Ishibashi, T. S. T.; Yamada, S.; Sasano, H. Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in the atherosclerotic human aorta. *Am J Pathol*, **2003**, 163, 1329-1339.
19. Yanaihara, A.; Yanaihara, T.; Toma, Y.; Shimizu, Y.; Saito, H.; Okai, T.; Higashiyama, T.; Osawa, Y. Localization and expression of steroid sulfatase in human fallopian tubes. *Steroids*, **2001**, 66, 87-91.
20. Suzuki, T.; Nakata, T.; Miki, Y.; Kaneko, C.; Moriya, T.; Ishida, T.; Akinaga, S.; Hirakawa, H.; Kimura, M.; Sasano, H. Estrogen sulfotransferase and steroid sulfatase in human breast carcinoma. *Cancer Res*, **2003**, 63, 2762-2770.
21. Carlstrom, K.; Doberl, A.; Pousette, A.; Rannevik, G.; Wilking, N. Recent Results in Cancer Research. Eds. Lecrercq, G.; Toma, S.; Paridaems, R.; Heuson, J. C. *Acta Obstet Gynecol Scand*, **1984**, 123, 107-111.

22. Selcer, K. W.; Jagannathan, S.; Rhodes, M. E.; Li, P. K. Inhibition of placental estrone sulfatase activity and MCF-7 breast cancer cell proliferation by estrone-3-amino derivatives. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **1996**, 59, 83-91.
23. Nguyen, B. L.; Ferme, I.; Chetrite, G.; Pasqualini, J. R. Action of danazol on the conversion of estrone sulphate to estradiol and on the sulfatase activity in the MCF-7, T-47D and MDA-MB-231 human mammary-cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **1993**, 46, 17-23.
24. Duncan, L.; Purohit, A.; Howarth, N. M.; Potter, B. V. L.; Reed, M. J. Inhibition of estrone sulfatase activity by estrone-3-methylthiophosphonate: A potential therapeutic agent on breast cancer. *Cancer Res*, **1993**, 53, 298-303.
25. Woo, L. W. L.; Lightowler, M.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V. L. Heteroatom-substituted analogues of the active-site directed inhibitor estra-1,3,5(10)-trien-17-one-3-sulphamate inhibit estrone sulphatase by a different mechanism. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **1996**, 57, 79-88.
26. Tanabe, M.; Peters, R. H.; Chao, W. R.; Shigeno, K. Estrone sulfamate inhibitors of estrone sulfatase, and associated pharmaceutical compositions and methods of use. *Sri In-t, WO1999033858*, **1999**.
27. Peters, R. H.; Chao, W. R.; Sato, B.; Shigeno, K.; Zaveri, N. T.; Tanabe, M. Steroidal oxathiazine inhibitors of estrone sulfatase. *Steroids*, **2003**, 68, 97-110.
28. Woo, L. W. L.; Howarth, N. M.; Purohit, A.; Hatem, A. M.; Reed, M. J.; Potter, B. V. L. Steroidal and non-steroidal sulphamates as potent inhibitors of steroid sulphatase. *J Med Chem*, **1998**, 41, 1068-1083.
29. Malini, B.; Purohit, A.; Ganeshapillai, D.; Woo, L. W. L.; Potter, B. V. L.; Reed, M. J. Inhibition of steroid sulphatase activity by tricyclic coumarin sulphamates. *J Steroid Biochem. Mol Biol*, **2000**, 75, 253-258.
30. Ahmed, S.; James, K.; Owen, C. P.; Patel, C. K. Design, synthesis and biochemical evaluation of AC ring mimics as novel inhibitors of the enzyme estrone sulfatase (ES). *Bioorg Med Chem Lett*, **2002**, 12, 1343-1346.
31. Nussbaumer, P.; Winiski, A. P.; Billich, A. Estrogenic potential of 2-alkyl-4-(thio)chromenone 6-O-sulfamates: Potent inhibitors of human steroid sulfatase. *J Med Chem*, **2003**, 46, 5091-5094.
32. Li, P. K.; Milano, S.; Kluth, L.; Rhodes, M. E. Synthesis and sulfatase inhibitory activities of non-steroidal estrone sulfatase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **1996**, 59, 41-48.

33. Anderson, C.; Freeman, J.; Lucas, L. H.; Farley, M.; Dalhoumi, H.; Widlanski, T. S. Estrone sulfatase: Probing structural requirements for substrate and inhibitor recognition. *Biochemistry*, **1997**, 36, 2586-2594.
34. Boyer, P. D.; Krebs, E. G. Control by Phosphorylation, *The Enzymes 3rd edition*, **1986**, 17.
35. Kenner, G. W.; Williams, N. R. A Method of reducing Phenols to Aromatic Hydrocarbons. *J Chem Soc*, **1955**, 522-525.
36. Férriz, J. M.; Vinšová, J. Prodrug Design of Phenolic Drugs. *Curr Pharm Des*, **2010**, 16, 2033-2052.
37. Reemtsma, T.; Quintana, J. B.; Rodil, R.; García-López, M.; Rodríguez, I. Organophosphorus flame retardants and plasticizers in water and air. I. Occurrence and fate. *Trends Anal Chem*, **2008**, 27, 727-737.
38. van der Veen, I.; de Boer, J. Phosphorus flame retardants: Properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis. *Chemosphere*, **2012**, 88, 1119-1153.
39. Hergrenrother, P. M.; Thompson, C. M.; Smith Jr, J. G.; Connel, J. W.; Hinkley, J. A.; Lyon, R. E.; Moulton, R. Flame retardant aircraft epoxy resins containing phosphorus. *Polymer*, **2005**, 46, 5012-5024.
40. Letsinger, R. L.; Heavner, G. A. Synthesis of phosphoromonoamidate diester nucleotides *via* the phosphite-azide coupling method. *Tetrahedron Lett*, **1975**, 2, 147-150.
41. Reese, C. B.; Saffhill, R. Oligonucleotide synthesis *via* phosphotriester intermediates: the phenyl-protecting group. *Chem Commun*, **1968**, 767-768.
42. Garegg, P. J.; Regberg, T.; Stawinski, J.; Stromberg, R. Nucleoside hydrogenphosphonates in oligonucleotide synthesis. *Chem Scr*, **1986**, 26, 59-62.
43. Marugg, J. E.; Burik, A.; Tromp, M.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. A new and versatile approach to the preparation of valuable deoxynucleoside 3'-phosphite intermediates. *Tetrahedron Lett*, **1986**, 27, 2271-2274.
44. Stawinski, J.; Thelin, M. Nucleoside H-Phosphonates. XI. A Convenient Method for the Preparation of Nucleoside H-Phosphonates. *Nucleosides Nucleotides*, **1990**, 9, 129-135.
45. Jankowska, J.; Sobkowski, M.; Stawinski, J.; Kraszewski, A. Studies on aryl H-phosphonates. I. Efficient method for the preparation of deoxyribo- and ribonucleoside 3'-H-phosphonate monoesters by transesterification of diphenyl H-phosphonate. *Tetrahedron Lett*, **1994**, 35, 3355-3358.

46. Sekine, M.; Mori, H.; Hata, T. New type of chemical oxidative phosphorylation: Activation of phosphonate function by use of triisopropylbenzenesulfonylchloride. *Tetrahedron Lett*, **1979**, 20, 1145-1148.
47. Nifant'ev, E. E.; Grachev, M. K.; Burmistrov, S. Y. Amides of Trivalent Phosphorus Acids as Phosphorylating Reagents for Proton-Donating Nucleophiles. *Chem Rev*, **2000**, 100, 3755-3799.
48. Atherton, F. R.; Openshaw, H. T.; Todd, A. R. Studies on Phosphorylation. Part I. Dibenzyl Chlorophosphonate as a Phosphorylating Agent. *J Chem Soc*, **1945**, 382-385.
49. Kaboudin, B. Phosphorylation of Phenols with Diethyl Chlorophosphonate on the Surface of Magnesia. *J Chem Res*, **1999**, 402-403.
50. Nifant'ev, E. E.; Krymchak, M. S.; Kukhareva, T. S.; Vasyanina, L. K. Phosphates, Phosphinate, and Hydrophosphoryl Compound Derived from Flavonoid Dihydroquercetin. *Dokl Chem*, **2011**, 441, 330-333.
51. Fletcher, J. H.; Hamilton, J. C.; Hechenbleikner, I.; Hoeberg, E. I.; Sertl, B. J.; Cassaday, J. T. The Synthesis of Parathion and Some Closely Related Compounds. *J Am Chem Soc*, **1950**, 72, 2461-2464.
52. Park, K. Y.; Park, W. C.; Kim, Y. J.; Lee, Y. T. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Organophosphorus Fungicide Tolclofos-methyl. *Bull Korean Chem Soc*, **2003**, 24, 334-338.
53. Toldy, A.; Tóth, N.; Anna, P.; Marosi, G. Synthesis of phosphorus-based flame retardant systems and their use in an epoxy resin. *Polym Degrad Stab*, **2006**, 91, 585-592.
54. Kaboudin, B.; Mostafalu, R. Triethylphosphate/Phosphorus Pentoxide as an efficient reagent for the phosphorylation of phenols. *Phosphorus Sulfur Silicon*, **2012**, 187, 776-780.
55. Woodstock, W. H. Method of producing neutral esters of molecularly dehydrated phosphoric acids. US Pat. 2,402,703; **1946**.
56. Guzman, A.; Diaz, E. A convenient method for the phosphorylation of phenol with diethyl cyanophosphates. *Synth Commun*, **1997**, 27, 3035-3038.
57. Abe, T.; Yamada, Y.; Shigematsu, Y.; Fukami, J.; Fujimoto, Y.; Tatsuno T. Synthesis of phosphotriester by DCC and its biological activities. *Comp Biochem Physiol*, **1984**, 79, 237-242.

58. Inoue, H.; Baba, Y.; Miyajima, T.; Tsuchiko, M. Phosphorylation of phenols with *cyclo*-triphosphate. *Chem Pharm Bull*, **1992**, 40, 3127-3132.
59. Atherton, F. R.; Openshaw, H. T.; Todd, A. R. Studies on Phosphorylation. Part 11. The Reaction of Dialkyl Phosphites with Polyhalogen Compounds in Presence of Bases. A New Method for the Phosphorylation of Amines. *J Chem Soc*, **1945**, 660-663.
60. Bartoszewicz, A.; Kalek, M.; Stawinski, J. The Case for the Intermediacy of Monomeric Metaphosphate Analogues during Oxidation of H-Phosphonothioate, H-Phosphonodithioate, and H-Phosphonoselenoate Monoesters: Mechanistic and Synthetic Studies. *J Org Chem*, **2008**, 73, 5029-5038.
61. Bykov, Y.; Wagner, S.; Walter, O.; Döring, M.; Fisher, O.; Pospiech, D.; Köppl, T.; Altstädt, V. Synthesis of new dibenzo[*c.e*][1,2]oxaphosphorine 2-oxide containing diols based on diethanolamine. *Heteroat Chem*, **2012**, 23, 146-153.
62. Verner, J.; Potacek, M. Criss-cross Cycloadditions on Ketazines Derived from Alicyclic Ketones. *Molecules*, **2006**, 11, 34-42.
63. Shi, E.; Pei, C. Pseudohalogenation of Phosphites. *Synthesis*, **2004**, 18, 2995-2998.
64. Steinberg, G. M. Reactions of dialkyl phosphites. Synthesis of dialkyl chlorophosphates, tetraalkyl pyrophosphates and mixed orthophosphate esters. *J Org Chem*, **1950**, 15, 637-647.
65. Troev, K.; Kirilov, E. M. G.; Roundhill, D. M. A study of the Atherton-Todd reaction mechanism. *Bull Chem Soc Jpn*, **1990**, 63, 1284-1285.
66. Georgiev, E. M.; Kaneti, J.; Troev, K.; Roundhill, D. M. An *ab initio* study of the mechanism of the Atherton-Todd reaction between dimethyl phosphonate and chloro- and fluoro-substituted methanes. *J Am Chem Soc*, **1993**, 115, 10964-10973.
67. Silverberg, E. J.; Dillon, J. L.; Vemishetti, P. A simple, rapid and efficient protocol for the selective phosphorylation of phenols with dibenzyl phosphite. *Tetrahedron Lett*, **1996**, 37, 771-774.
68. Zwierzak, A. Organophosphorus esters. 10. Phase-Transfer-Catalysed Phosphorylation of Alcohols in a Two-Face System. *Synthesis Stuttgart*, **1976**, 5, 305-306.
69. Iliu, G.; Bilan, S.; Popa, A.; Iliescu, S.; Macarie, L.; Plesu, N. Fosforilarea derivatilor compusilor hidroxilici aromatici in sisteme multifazice. *Rev Chim-Bucharest*, **2005**, 56, 286-288.

70. Purnanand, Batra, B. S.; Pant, B. P. A convenient synthetic route to phosphate-esters from phosphites. *Tetrahedron Letters*, **1989**, 30, 1687-1688.
71. Jie, Z.; Rammoorthy, V.; Fischer, B. Diethyl Chlorophosphite: A Versatile Reagent. *J Org Chem*, **2002**, 67, 711-719.
72. Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. Deoxynucleoside phosphoramidites – A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett*, **1981**, 22, 1859-1862.
73. McBride, L. J.; Caruthers, M. H. N⁶(N-methyl-2-pyrrolidine amidine)deoxyadenosine – A new deoxynucleoside protecting group. *Tetrahedron Lett*, **1983**, 24, 2953-2956.
74. Barone, A. D.; Tang, J. Y.; Caruthers, M. H. *In situ* activation of bis-dialkylaminophosphines - a new method for synthesizing deoxyoligonucleotides on polymer supports. *Nucleic Acid Res*, **1984**, 12, 4051-4061.
75. Perich, W. J.; Johns R. B. Synthesis of O-Phosphotyrosine-Containing Peptides. 1. Synthesis of PTyr-Leu-Gly via Benzyl Phosphate Protection. *J Org Chem*, **1989**, 54, 1750-1752.
76. Chao, H.; Bernatowicz, M. S.; Reiss, P. D.; Matsueda, G. R. Synthesis and Application of Bis-Silylethyl-Derived Phosphate-Protected Fmoc-Phosphotyrosine Derivatives for Peptide Synthesis. *J Org Chem*, **1994**, 59, 6687-6691.
77. Gomez, C.; Chen, J.; Wang, S. Efficient synthesis of phosphotyrosine building blocks using imidazolium trifluoroacetate. *Tetrahedron Lett*, **2009**, 50, 6691-6692.
78. Burn, A. J.; Cadogan, J. I. G. The Reactivity of Organophosphorus Compounds. Part XII. A Novel Oxidation of Some Tervalent Compounds: Reduction of Carbon Tetrachloride to Chloroform by Trialkyl Phosphites. *J Chem Soc*, **1963**, 5788-5796.
79. Napier, R. P.; Gough, S. T. D. Oxidative phosphorylation of phenols and related compounds. *Org Prep Proc Int*, **1971**, 3, 117-120.
80. Stowell, J. K.; Widlanski, T. S. A new method for the phosphorylation of alcohols and phenols. *Tetrahedron Lett*, **1995**, 36, 1825-1826.
81. Li, S.; Ahmar, M.; Queneau, Y.; Soulere, L. A convenient method for phosphorylation using triallyl phosphite. *Tetrahedron Lett*, **2015**, 56, 4694-4696.
82. Whitesides, G. Formation and Cleavage of P-O Bonds. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Viley-VCH, **2002**, 895-930.
83. Stawinski, J.; Kraszewski, A. How To Get the Most Out of Two Phosphorus Chemistries. Studies on H-phosphonates. *Acc Chem Res*, **2002**, 35, 952-960.

84. Ozola, V.; Reese, C. B.; Song, Q. Use of Amomnium Aryl H-phosphonates in the preparation of nucleoside H-phosphonate building blocks. *Tetrahedron Lett*, **1996**, 37, 8621-8624.
85. Mark, V.; Van Wazer, J. R. Tri-*t*-butyl Phosphite and Some of Its Reactions. *J Org Chem*, **1964**, 29, 1006-1008.
86. Romanowska, J.; Szymańska-Michalak, A.; Pietkiewicz, M.; Sobkowski, M.; Boryski, J.; Stawinski, J.; Kraszewski, A. A new, efficient entry to non-lipophilic H-phosphonate monoesters – Preparation of anti-HIV nucleotide analogues. *Lett Org Chem*, **2009**, 6, 496-499.
87. Powles, N.; Atherton, J.; Page, M. I. Reactive intermediates in the H-phosphonate synthesis of oligonucleotides. *Org Biomol Chem*, **2012**, 10, 5940-5948.
88. Stawinski, J. Some Aspects of H-Phosphonate Chemistry. In Handbook of Organophosphorus Chemistry; Engel, R., Ed.; Marcel Dekker: New York, **1992**, 377-434.
89. Garegg, P. J.; Stawinski, J.; Strömberg, R. Nucleoside H-Phosphonates. VI. Reaction of Nucleoside Hydrogenphosphonates with Arenesulfonyl Chlorides. *J Chem Soc, Perkin Trans 2*, **1987**, 1209-1214.
90. Garegg, P. J.; Stawinski, J.; Strömberg, R. Nucleoside H-Phosphonates. VIII. Activation of Hydrogenphosphonate Monoesters by Chlorophosphates and Aryl Sulfonyl Derivatives. *J Org Chem*, **1987**, 52, 284-287.
91. Garegg, P. J.; Regberg, T.; Stawinski, J.; Strömberg, R. Nucleosides H-Phosphonates. V. The Mechanism of Hydrogenphosphonate Diester Formation Using Acyl Chlorides as Coupling Agents in Oligonucleotide Synthesis by the Hydrogenphosphonate Approach. *Nucleosides Nucleotides*, **1987**, 6, 655-662.
92. Stawinski, J.; Thelin, M. Studies on the activation pathway of phosphonic acid using acyl chlorides as activators. *J Chem Soc, Perkin Trans 2*, **1990**, 849-853.
93. Sobkowski, M.; Kraszewski, A.; Stawinski, J. Stereochemistry of internucleotide bond formation by the H-phosphonate method. Part 3: Investigations on a mechanism of assymetric induction. *Tetrahedron*, **2007**, 18, 2336-2348.
94. Kers, I.; Stawinski, J. Aryl H-phosphonates. 10. Synthesis of Nucleoside Phosphoroamidate and Nucleoside Phosphorothioamidate Analogues via H-phosphonamidate Intermediates. *Tetrahedron*, **1999**, 55, 11579-11588.
95. Vaccaro, A. M.; Salvioli, R.; Muscillo M.; Renola, L. Purification and properties of arylsulfatase C from human placenta. *Enzyme*, **1987**, 37, 115-126.

96. Kumar, J. R.; Jawahar, J.; Pathak, D. P. Synthesis of benzimidazole derivatives as anti-hypertensive agents. *Eur J Chem*, **2006**, 3, 278-285.
97. Yar, M. S.; Ansari, Z. H. Synthesis and *in vivo* diuretic activity of biphenyl benzothiazole-2-carboxamide derivatives. *Acta Pol Pharm Drug Res*, **2009**, 66, 387-392.
98. Deep, A.; Jain, S.; Sharma, P. C. Synthesis and anti-inflammatory activity of derivatives *N*-[5-(arylmethyl)-2-(aryl)-4-oxo-3-thiazolidinyl]-1,10-biphenyl-4-carboxamide derivatives. *Acta Pol Pharm Drug Res*, **2010**, 67, 63-67.
99. Ruggero, G.; Jones, C. K.; Hemstapat, K.; Nong, Y.; Echemendia, N. G.; Williams, L. C.; Paulis, T. D.; Conn, P. J. Biphenyl-indanone A, a positive allosteric modulator of the metabotropic glutamate receptor subtype 2, has antipsychotic- and anxiolytic-like effects in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, **2006**, 318, 173-185.
100. Deep, A.; Jain, S.; Sharma, P. C.; Verma, P.; Kumar, M.; Dora, C. P. Design and biological evaluation of biphenyl-4-carboxylic acid hydrazide-hydrazone for antimicrobial activity. *Acta Pol Pharm Drug Res*, **2010**, 67, 255-259.
101. Cornelissen, L.; Cirriez, V.; Vercruyse, S.; Riant, O. Coppercatalyzed Hiyama cross-coupling using vinylsilanes and benzylic electrophiles. *Org Lett*, **2014**, 16, 3024-3027.
102. Denmark, S. E.; Tymonko, S. A. Sequential cross-coupling of 1,4-bissilylbutadienes: synthesis of unsymmetrical 1,4-disubstituted 1,3-butadienes. *J Am Chem Soc*, **2005**, 127, 8004-8005.
103. Ackermann, L.; Kapdi, A. R.; Schulzke, C. Air-stable secondary phosphine oxide or chloride (pre)ligands for cross-couplings of unactivated alkyl chlorides. *Org Lett*, **2010**, 12, 2298-2301.
104. Liu, Z.; Dong, N.; Xu, M.; Sun, Z.; Tu, T. Mild Negishi cross-coupling reactions catalyzed by acenaphthoimidazolylidene palladium complexes at low catalyst loadings. *J Org Chem*, **2013**, 78, 7436-7444.
105. Dreher, S. D.; Lim, S. E.; Sandrock, D. L.; Molander, G. A. Organotrifluoroborates and monocoordinated palladium complexes as catalysts – A perfect combination for Suzuki-Miyaura coupling. *J Org Chem*, **2009**, 74, 3626-3631.
106. Mee, S. P. H.; Lee, V.; Baldwin, J. E. Stille coupling made easier - The synergic effect of copper(I) salts and the fluoride ion. *Angew Chem Int Ed*, **2004**, 43, 1132-1136.

107. Zhang, C.; Sun, Q.; Chen, H.; Tan, Q.; Xu, W. Formation of polyphenyl chains through hierarchical reactions: Ullmann coupling followed by cross-dehydrogenative coupling. *Chem Commun*, **2015**, 51, 495-498.
108. Zhu, F.; Wang, Z. X. Nickel-catalyzed cross-coupling of aryl fluorides and organozinc reagents. *J Org Chem*, **2014**, 79, 4285-4292.
109. Fernandez de Palencia, P.; Fernandez, M.; Luz Mohedano, M.; Ladero, V.; Quevedo, C.; Alvarez, M. A.; Lopez, P. Role of Tyramine Synthesis by Food-Borne *Enterococcus durans* in Adaptation to the Gastrointestinal Tract Environment. *Appl Environ Microbiol*, **2011**, 77, 699-702.
110. Li, Y.; Yang, F.; Xu, X.; Pan, S.; Wang, L.; Xia, C. Improved preparation of tyramine by Curtius Rearrangement. *Chin J Chem*, **2009**, 27, 433-436.
111. Tafesh, A.; Wood, B. F.; McDonough, J. A.; Mott, G. N. Process for the preparation of arylethylamines and substituted arylethylamines. **1993**, US Pat. 5220067.
112. Battersby, A. R.; Chrystal, E. J. T.; Staunton, J. Colchicine: studies on the ring expansion step focusing on the fate of the hydrogens at C-3 of autumnaline. *J Chem Soc*, **1980**, 1, 31.
113. Panufnik E.; Kanska, M. J. Enzymatic synthesis of isotopomers of tyramine labeled with deuterium and tritium. *Labelled Compd Radiopharm*, **2007**, 50, 85-89.
114. Geisler, J.; Schneider, F.; Lovis, K.; Holguin, F. L. Industrially applicable process for the sulfamoylation of alcohols and phenols, US Pat. 20030171346, **2003**.
115. Harborne, J. B.; Williams, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **2000**, 55, 481-504.
116. Mukohata, Y.; Nakabayashi, S.; Higashida, M. Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. *FEBS Lett*, **1978**, 85, 215-218.
117. Rimm, E. B.; Katan, M. B.; Ascherio, A. Relation between intake of flavonoids and risk of coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med*, **1996**, 125, 384-389.
118. Woodman, O. L.; Chan, E. C. Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **2004**, 31, 786-90.
119. Jachak, S. M. Herbal drugs as antidiabetic: an overview. *CRIPS*, **2002**, 3, 9-13.
120. Yao, L. H.; Jiang, Y. M.; Shi, J. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum Nutr*, **2004**, 59, 113-122.

121. Nakajima, T.; Imanishi, M.; Yamamoto, K. Inhibitory effect of baicalein, a flavonoid in Scutellaria Root, on eotaxin production by human dermal fibroblasts. *Planta Med*, **2001**, 67, 132-135.
122. Middleton, J. E.; Kandaswami, C.; Theoharides, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *The Flavonoids*, **1993**, 619-652.
123. Yang, C. S.; Landau, J. M.; Huang, M. T. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Ann Rev Nutr*, **2001**, 21, 381-406.
124. Lamson, D. W.; Brignall, M. S. Antioxidants in Cancer Therapy; Their Actions and Interactions With Oncologic Therapies. *Altern Med Rev*, **1999**, 4, 304-329.
125. Violi, F.; Pignatelli, P.; Pulcinelli, F. M. Synergism among flavonoids in inhibiting platelet aggregation and H₂O₂ production. *Circulation*, **2002**, 105, 53-54.
126. Steffen, Y.; Schewe, T.; Sies, H. Epicatechin protects endothelial cells against oxidized LDL and maintains NO synthase. *Biochem Biophys Res Comm*, **2005**, 331, 1277-1283.
127. Huang, Z.; Fasco, M. J.; Kaminsky, L. S. Inhibition of estrone sulfatase in human liver microsomes by quercetin and other flavonoids. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **1997**, 63, 9-15.
128. Sashidhara, K. V.; Avula, S. R.; Palnati, G. R.; Singh, S. V.; Srivastava, K.; Puri, S. K.; Saxena J. K. Synthesis and *in vitro* evaluation of new chloroquine-chalcone hybrids against chloroquine-resistant strain of *Plasmodium falciparum*. *Bioorg Med Chem Lett*, **2012**, 22, 5455-5459.
129. Mahal, H. S.; Venkataraman, K. Synthetical experiments in the chromone group. Part XIV. The action of sodamide on 1-acyloxy-2-acetonaphthones. *J Chem Soc*, **1934**, 10, 1767-1769.
130. Allan, J.; Robinson, R. An accessible derivative of chromonol. *J Chem Soc*, **1924**, 125, 2192-2195.
131. Su, W. K.; Zhu, X. Y.; Li, Z. H. First Vilsmeier-Haack synthesis of flavones using bis-(trichloromethyl) carbonate/dimethylformamide. *Org Prep Proced Int*, **2009**, 41, 69-75.
132. Singh, M.; Kaur, M.; Silakari, O. Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *Eur J Med Chem*, **2014**, 84, 206-239.

133. Nakazawa, K. Synthesis of Nuclear-substituted Flavonoids and Allied Compounds. IX. Synthesis of Tetramethyl Ether and Dimethyl Ether of Ginkgetin. *Chem Pharm Bull*, **1962**, 10, 1032-1038.
134. Kosmeder, J. W.; Moriarty, R. M.; Pezzuto, J. M.; Song, L. L.; Moon, R. C. Use of 4'-bromoflavone in a cancer chemopreventative composition and method. US Pat. 6,046,231; **2000**.
135. Kulkarni, P. P.; Kadam, A. J.; Mane, R. B.; Deasai, U. V.; Wadgaonkar, P. P. Demethylation of Methyl Aryl Ethers using Pyridine Hydrochloride in Solvent-free Conditions under Microwave Irradiation. *J Chem Res*, **1999**, 6, 394-395.
136. Ghosh, D. Human sulfatases: a structural perspective to catalysis. *Cell Mol Life Sci*, **2007**, 64, 2013-2022.

Spis rysunków

Rys. 1. Proponowany mechanizm hydrolizy siarczanu estronu przy udziale STS.....	8
Rys. 2. Proponowany mechanizm inhibicji STS przez inhibitor amidosiarczanowy.....	9
Rys. 3. Pierwsze steroidowe inhibitory STS.....	11
Rys. 4. Steroidowe sole kwasu fosforowego (59-62) jako inhibitory STS.....	17
Rys. 5. Struktury chemiczne inhibitorów STS na bazie niesteroidowych fosforanów (63-68).	17
Rys. 6. Przykłady proleków na bazie fenylowych estrów kwasu fosforowego: Propofol (69), Combretastatin (70) oraz Entacapone (71).....	20
Rys. 7. Przykłady uniepalniaczy fosforanowych.....	21
Rys. 8. Schemat porównania dwóch podejść syntetycznych nukleotydów.....	21
Rys. 9. Struktury chemiczne kilku popularnych odczynników fosfitylujących.....	22
Rys. 10. Schemat fosforylacji floroglucyny.....	25
Rys. 11. Schemat syntezy dietylofosforanów fenolu.....	25
Rys. 12. Schemat syntezy dietylofosforanów fenoli przy udziale cyjanodietylfosforanu....	26
Rys. 13. Schemat sprzęgania fenoli z dietylofosforanem w obecności DCC.....	26
Rys. 14. Schemat syntezy pochodnych kwasu fosforowego z wykorzystaniem heksahydratu cyklotrifosforanu sodu.....	27
Rys. 15. Ogólny schemat mechanizmu reakcji Athertona-Todda w oparciu o teorię Steinberga.....	28
Rys. 16. Schemat mechanizmu reakcji Athertona-Todda w oparciu o teorię Troeva i Roundhilla.....	28
Rys. 17. Schemat fosforylacji 4-formylo-2-metoksy fenolu z wykorzystaniem DECP.....	30
Rys. 18. Schemat otrzymywania dibenzylfosforanu Boc-tyrozyny (124).....	31
Rys. 19. Schemat syntezy fosforowej pochodnej Fmoc-tyrozyny (126).....	32
Rys. 20. Schemat syntezy ditertbutylfosforowych pochodnych tyrozyny (127-130).....	32
Rys. 21. Schemat syntezy dietylofosforanu 4-nitrofenylu w obecności bromotrichlorometanu.	33
Rys. 22. Mechanizm otrzymywania dietylofosforanu 4-nitrofenylu (131).....	33
Rys. 23. Schemat syntezy dialkiloarylofosforanów w obecności jodu.....	34
Rys. 24. Mechanizm otrzymywania dietylofosforanu 4-acetylofenylu (133).....	34
Rys. 25. Schemat fosforylacji <i>p</i> -krezolu fosforynem triallilu.....	34

Rys. 26. Mechanizm otrzymywania diallilofosforanu 4-metylofenylu (134).....	35
Rys. 27. Proponowany mechanizm otrzymywania soli amonowej H-fosfonianu arylu.....	36
Rys. 28. Schemat otrzymywania soli amonowej H-fosfonianu 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydro-7 <i>H</i> -cyklohepta[c]chromen-6-onu (135).....	37
Rys. 29. Widmo ³¹ P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl ₃) mieszaniny dwóch ekwiwalentów 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydro-7 <i>H</i> -cyklohepta[c]chromen-6-onu (158c) i jednego ekwiwalentu PCl ₃ po 10 minutach.....	38
Rys. 30. Widmo ³¹ P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl ₃) mieszaniny dwóch ekwiwalentów 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydro-7 <i>H</i> -cyklohepta[c]chromen-6-onu (158c) i jednego ekwiwalentu PCl ₃ po 90 minutach.....	39
Rys. 31. Widmo ³¹ P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl ₃) mieszaniny reakcyjnej po dodaniu jednego ekwiwalentu <i>t</i> -butanolu po 30 minutach.....	40
Rys. 32. Schemat otrzymywania soli amonowej H-fosfonianu bifenyli (142) z wykorzystaniem H-piروفosfonianu pirydyny.....	41
Rys. 33. Widmo ³¹ P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl ₃) reakcji jednego ekwiwalentu kwasu fosforowego z 0.55 ekwiwalentu PvCl po 10 minutach.....	41
Rys. 34. Widmo ³¹ P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl ₃) po dodaniu półtora ekwiwalentu 4-fenylofenolu po 30 minutach prowadzenia reakcji w temperaturze wrzenia pirydyny.....	42
Rys. 35. Widmo ³¹ P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl ₃) po dodaniu mieszaniny utleniającej.....	43
Rys. 36. Widmo ³¹ P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl ₃) po dodaniu mieszaniny utleniającej oraz diwodorofosforanu 4-fenylofenolu.....	44
Rys. 37. Widmo ³¹ P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl ₃) po dodaniu mieszaniny utleniającej po 3 godzinach.....	45
Rys. 38. Widmo ³¹ P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl ₃) po dodaniu mieszaniny utleniającej po 24 godzinach.....	45
Rys. 39. Widmo ³¹ P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl ₃) próby utlenienia kwasu fosforowego jodem w wodzie po 30 minutach.....	46
Rys. 40. Widmo ³¹ P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl ₃) próby utlenienia kwasu fosforowego jodem w wodzie po 24 godzinach.....	47
Rys. 41. Schemat otrzymywania soli trietyloamoniowej H-fosfonianu etylu (143).....	48
Rys. 42. Odczynniki kondensujące stosowane w syntezie oligonukleotydów.....	48
Rys. 43. Struktury chemiczne bezwodników możliwych do otrzymania <i>in situ</i> z monoestrów H-fosfonianowych.....	49

Rys. 44. Schemat próby otrzymywania bifenyloetylofosforanu (157).....	49
Rys. 45. Widmo ³¹ P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl ₃) reakcji soli trietyloamoniowej H-fosfonianu etylu (143) z 1.2 ekwiwalentu PvCl w obecności 3 ekwiwalentów 2,6-lutydyny po 30 minutach.....	50
Rys. 46. Widmo ³¹ P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl ₃) po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej 0.6 ekwiwalentu PvCl po pół godziny prowadzenia reakcji.	51
Rys. 47. Widmo ³¹ P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl ₃) po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej 1.2 ekwiwalentu PvCl po pół godziny prowadzenia reakcji.	52
Rys. 48. Widmo ³¹ P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl ₃) po dodaniu 4-fenylofenolu po 15 minutach.....	52
Rys. 49. Widmo ³¹ P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl ₃) po utlenieniu mieszaniny reakcyjnej jodem w wodzie.....	53
Rys. 50. Widmo ¹ H NMR (CDCl ₃) bifenyloetylofosforanu (157).	54
Rys. 51. Widmo ³¹ P NMR z odsprzęgnięciem spinów (CDCl ₃) bifenyloetylofosforanu (157).	54
Rys. 52. Wizualizacja wyników dokowania związków (160p) (brązowy), (160r) (czarny) i (160s) (niebieski) w miejscu aktywnym STS.	59
Rys. 53. Wizualizacja wyników dokowania związków (160s) (niebieski), (165) (czerwony) i (170) (zielony) oraz ich odległość od miejsca aktywnego.	60
Rys. 54. Wizualizacja wyników dokowania związków (163f) (czerwony), (162w) (żółty) i 665-COUMATE (29) (niebieski).	61
Rys. 55. Wizualizacja wyników dokowania związków (163d) (czarny), (163e) (zielony) i (163f) (czerwony).....	64
Rys. 56. Schemat syntezy 7-hydroksy-2,3-dihydrocyklopenta[c]chromen-4(1 <i>H</i>)-onu, 3-hydroksy-7,8,9,10-tetrahydro-6 <i>H</i> -benzo[c]chromen-6-onu i 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydrocyklohepta[c]chromen-6(7 <i>H</i>)-onu (158a-158c).....	65
Rys. 57. Schemat syntezy fosforowych pochodnych 7-hydroksy-2,3-dihydrocyklopenta[c]chromen-4(1 <i>H</i>)-onu, 3-hydroksy-7,8,9,10-tetrahydro-6 <i>H</i> -benzo[c]chromen-6-onu i 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydrocyklohepta[c]chromen-6(7 <i>H</i>)-onu (160a-160s).	66
Rys. 58. Schemat syntezy tiofosforowych pochodnych 7-hydroksy-2,3-dihydrocyklopenta[c]chromen-4(1 <i>H</i>)-onu, 3-hydroksy-7,8,9,10-tetrahydro-6 <i>H</i> -benzo[c]chromen-6-onu i 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydrocyklohepta[c]chromen-6(7 <i>H</i>)-onu (163a-163f) oraz (162a-162w).....	67
Rys. 59. Schemat syntezy laktamowej (165) i fosfonowej (170) pochodnej kumarynowej....	68

Rys. 60. Wizualizacja wyników dokowania związków (171g) (niebieski), (171h) (żółty), (171i) (zielony) i 665-COUMATE (29) (czarny) w miejscu aktywnym STS.	76
Rys. 61. Odległość atomu fosforu związku (171b) (purpurowy) od reszty Thr484 oraz przewidywane wiązanie wodorowe pomiędzy Thr484, a analogiem (171h) (żółty).	77
Rys. 62. Otrzymywanie tiofosforowych diestrów 7-hydroksy-2,3-dihydrocyklopenta[c]chromen-4(1 <i>H</i>)-onu, 3-hydroksy-7,8,9,10-tetrahydro-6 <i>H</i> -benzo[c]chromen-6-onu i 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydrocyklohepta[c]chromen-6(7 <i>H</i>)-onu (171a-171i).	78
Rys. 63. Wizualizacja wyników dokowania inhibitorów do miejsca aktywnego STS. (174f) (zielony), (174i) (czerwony), (176d) (niebieski), amidosiarczan bifenyli-4-ylu (42) (żółty)...	84
Rys. 64. Schemat syntezy fosforowych i tiofosforowych pochodnych bifenyli-4-ylowych. ...	86
Rys. 65. Schemat syntezy tiofosforowych pochodnych di(bifenyli-4-ylowych).	88
Rys. 66. Wizualizacja wyników dokowania inhibitorów do miejsca aktywnego STS. (179a') (fioletowy), (180c) (żółty), amidosiarczan 4-(2-dodekanoiloamino-etylo)-fenylu (55) (zielony).	96
Rys. 67. Wizualizacja dokowania pochodnej (179a) do miejsca aktywnego STS oraz jej odległość od FGly75.	97
Rys. 68. Schemat syntezy fosforowych i tiofosforowych pochodnych <i>N</i> -alkanoilo tyraminy oraz związku referencyjnego (55).	99
Rys. 69. Wizualizacja wyników dokowania związków (186i) (żółty), (185f) (czerwony) i 7- <i>O</i> -amidosiarczanu 2-(4-trifluorometylo-fenyl)-chromen-4-onu (187) (zielony) w miejscu aktywnym STS.	107
Rys. 70. Schemat syntezy szkieletów flawonoidowych.	108
Rys. 71. Schemat syntezy fosforowych i tiofosforowych pochodnych flawonoidowych.	109
Rys. 72. Schemat syntezy diestrów flawonoidowych.	109
Rys. 73. Ogólne struktury chemiczne nowych inhibitorów na bazie fosforowych i tiofosforowych pochodnych kumaryny.	112
Rys. 74. Ogólne struktury chemiczne nowych inhibitorów na bazie fosforowych i tiofosforowych pochodnych bifenyli.	113
Rys. 75. Ogólne struktury chemiczne nowych inhibitorów na bazie fosforowych i tiofosforowych pochodnych bifenyli.	114
Rys. 76. Ogólne struktury chemiczne nowych inhibitorów na bazie fosforowych i tiofosforowych pochodnych flawonoidów.	115

Spis tabel

Tabela 1. Struktury chemiczne pochodnych E1 modyfikowanych w pozycji C-17 przebadanych na oczyszczonym STS [26].....	12
Tabela 2. Struktury chemiczne pochodnych EMATE modyfikowanych w pozycji C-17, przebadanych na oczyszczonym STS [27].....	12
Tabela 3. Steroidowe pochodne oksatiazyny [28].....	13
Tabela 4. Struktury inhibitorów STS na bazie tricyklicznych pochodnych kumaryny [29]...	14
Tabela 5. Struktury inhibitorów STS na bazie pochodnych bifenylu [30].....	14
Tabela 6. Struktury inhibitorów STS na bazie amidosiarczanowych pochodnych flawonoidów [31].	15
Tabela 7. Inhibitory STS na bazie pochodnych tyraminy [32].	16
Tabela 8. Wartości stałych K_i (μM) w funkcji pH dla związków (59-62).	17
Tabela 9. Wartości stałych K_i (μM) w funkcji pH dla związków (63), (65-68).....	18
Tabela 10. Literaturowe przykłady produktów reakcji fosforylacji fenoli z wykorzystaniem chlorofosforanów i chlorotiofosforanów alkilowych.	23
Tabela 11. Literaturowe przykłady reakcji fosforylacji fenoli z wykorzystaniem H-fosfonianów.	29
Tabela 12. Struktury modelowe wybrane do dokowania molekularnego.	56
Tabela 13. Wartości energii swobodnych wiązania kompleksów inhibitor-STs dla fosforowych pochodnych kumaryny.	58
Tabela 14. Struktury modelowe wybrane do dokowania molekularnego.	60
Tabela 15. Wartości energii swobodnych wiązania kompleksów inhibitor-STs dla tiofosforowych pochodnych kumaryny.	63
Tabela 16. Aktywność biologiczna fosforowych pochodnych 7-hydroksy-2,3-dihydrocyklopenta[c]chromen-4(1 <i>H</i>)-onu, 3-hydroksy-7,8,9,10-tetrahydro-6 <i>H</i> -benzo[c]chromen-6-onu i 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydrocyklohepta[c]chromen-6(7 <i>H</i>)-onu (160a-160s), (165), (170) oraz związku referencyjnego amidosiarczanu 4-okso-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -cyklopenta-[c][1]benzopiranu (665-COUMATE) (29).	70
Tabela 17. Aktywność biologiczna tiofosforowych pochodnych 7-hydroksy-2,3-dihydrocyklopenta[c]chromen-4(1 <i>H</i>)-onu, 3-hydroksy-7,8,9,10-tetrahydro-6 <i>H</i> -benzo[c]chromen-6-onu i 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydrocyklohepta[c]chromen-6(7 <i>H</i>)-onu (163a-163f), (162a-162w) oraz związku referencyjnego (665-COUMATE) (29).	72

Tabela 18. Struktury modelowe wybrane do dokowania molekularnego.	74
Tabela 19. Wartości energii swobodnych wiązania inhibitor-enzym dla tiofosforowych diestrów 7-hydroksy-2,3-dihydrocyklopenta[c]chromen-4(1 <i>H</i>)-onu, 3-hydroksy-7,8,9,10-tetrahydro-6 <i>H</i> -benzo[c]chromen-6-onu i 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydrocyklohepta[c]chromen-6(7 <i>H</i>)-onu (171a-171l).	75
Tabela 20. Aktywność biologiczna tiofosforowych diestrów 7-hydroksy-2,3-dihydrocyklopenta[c]chromen-4(1 <i>H</i>)-onu, 3-hydroksy-7,8,9,10-tetrahydro-6 <i>H</i> -benzo[c]chromen-6-onu i 3-hydroksy-8,9,10,11-tetrahydrocyklohepta[c]chromen-6(7 <i>H</i>)-onu (171a-171l).	79
Tabela 21. Struktury modelowe wybrane do dokowania molekularnego.	81
Tabela 22. Wartości energii swobodnych wiązania inhibitor-enzym dla fosforowych i tiofosforowych pochodnych bifenylu.	83
Tabela 23. Aktywność biologiczna otrzymanych związków względem STS.	90
Tabela 24. Struktury modelowe (179-180) wybrane do dokowania molekularnego.	92
Tabela 25. Wartości energii swobodnych wiązania kompleksów inhibitor-STs dla pochodnych <i>N</i> -alkanoilo tyraminy.	94
Tabela 26. Aktywność biologiczna otrzymanych związków oraz związku referencyjnego (55).	101
Tabela 27. Struktury modelowe wybrane do dokowania molekularnego.	104
Tabela 28. Wartości energii swobodnych wiązania kompleksów inhibitor-STs dla fosforowych i tiofosforowych pochodnych flawonoidowych.	106
Tabela 29. Aktywność biologiczna otrzymanych pochodnych flawonoidowych względem STS.	111