

Imię i nazwisko autora rozprawy: **Karol Biernacki**
Dyscyplina naukowa: **Chemia**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: **Projektowanie, synteza oraz badanie aktywności biologicznej nowych inhibitorów sulfatazy steroidowej (STS) na bazie amidosiarczanowych pochodnych triazoli i oksadiazoli**

Tytuł rozprawy w języku angielskim: **Design, synthesis and biological evaluation of new steroid sulfatase (STS) inhibitors based on triazole and oxadiazole sulfamate derivatives**

Promotor

podpis

dr hab. inż. Sebastian Demkowicz, prof.
uczelni

Gdańsk, rok 2022

OŚWIADCZENIE

Autor rozprawy doktorskiej: **Karol Biernacki**

Ja, niżej podpisany(a), oświadczam, iż jestem świadomy(a), że zgodnie z przepisem art. 27 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (t.j. Dz.U. z 2021 poz. 1062), uczelnia może korzystać z mojej rozprawy doktorskiej zatytułowanej:

Projektowanie, synteza oraz badanie aktywności biologicznej nowych inhibitorów sulfatazy steroidowej (STS) na bazie amidosiarczanowych pochodnych triazoli i oksadiazoli do prowadzenia badań naukowych lub w celach dydaktycznych.¹

Świadomy(a) odpowiedzialności karnej z tytułu naruszenia przepisów ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych i konsekwencji dyscyplinarnych określonych w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2021.478 t.j.), a także odpowiedzialności cywilno-prawnej oświadczam, że przedkładana rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie.

Oświadczam, że treść rozprawy opracowana została na podstawie wyników badań prowadzonych pod kierunkiem i w ścisłej współpracy z promotorem **dr. hab. inż. Sebastianem Demkowiczem prof. uczelni**.

Niniejsza rozprawa doktorska nie była wcześniej podstawą żadnej innej urzędowej procedury związanej z nadaniem stopnia doktora.

Wszystkie informacje umieszczone w ww. rozprawie uzyskane ze źródeł pisanych i elektronicznych, zostały udokumentowane w wykazie literatury odpowiednimi odnośnikami, zgodnie z przepisem art. 34 ustawy o prawie autorskim i prawach pokrewnych.

Potwierdzam zgodność niniejszej wersji pracy doktorskiej z załączoną wersją elektroniczną.

Gdańsk, dnia

.....

Podpis doktoranta

Ja, niżej podpisany(a), wyrażam ~~zgode/nie wyrażam zgody~~* na umieszczenie ww. rozprawy doktorskiej w wersji elektronicznej w otwartym, cyfrowym repozytorium instytucjonalnym Politechniki Gdańskiej.

Gdańsk, dnia

.....

podpis doktoranta

*niepotrzebne usunąć

¹ Art. 27. 1. Instytucje oświatowe oraz podmioty, o których mowa w art. 7 ust. 1 pkt 1, 2 i 4–8 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, mogą na potrzeby zilustrowania treści przekazywanych w celach dydaktycznych lub w celu prowadzenia działalności naukowej korzystać z rozpowszechnionych utworów w oryginale i w tłumaczeniu oraz zwielokrotnić w tym celu rozpowszechnione drobne utwory lub fragmenty większych utworów.

2. W przypadku publicznego udostępniania utworów w taki sposób, aby każdy mógł mieć do nich dostęp w miejscu i czasie przez siebie wybranym korzystanie, o którym mowa w ust. 1, jest dozwolone wyłącznie dla ograniczonego kręgu osób uczących się, nauczających lub prowadzących badania naukowe, zidentyfikowanych przez podmioty wymienione w ust. 1.



OPIS ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Autor rozprawy doktorskiej: Karol Biernacki

Tytuł rozprawy doktorskiej w języku polskim: Projektowanie, synteza oraz badanie aktywności biologicznej nowych inhibitorów sulfatazy steroidowej (STS) na bazie amidosiarczanowych pochodnych triazoli i oksadiazoli

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Design, synthesis and biological evaluation of new steroid sulfatase (STS) inhibitors based on triazole and oxadiazole sulfamate derivatives

Język rozprawy doktorskiej: Polski

Promotor rozprawy doktorskiej: dr hab. inż. Sebastian Demkowicz, prof. PG

Data obrony: -

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku polskim: Sulfataza steroidowa, inhibitory sulfatazy steroidowej, nowotwór piersi, modelowanie molekularne, synteza organiczna,

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku angielskim: Steroid sulfatase, steroid sulfatase inhibitors, breast cancer, molecular modeling, organic synthesis

Streszczenie rozprawy w języku polskim: Niniejsza dysertacja dotyczy szeregu badań z wykorzystaniem technik modelowania molekularnego oraz metod syntezy nowych inhibitorów STS opartych o rdzenie pierścieni heterocyklicznych 1,2,3-triazolu oraz 1,2,4-oksadiazolu. Aktywność inhibicyjna otrzymanych pochodnych została oznaczona w testach *in vitro* z wykorzystaniem enzymu wyizolowanym z łożyska ludzkiego oraz znakowanym radioizotopowo siarczanem estronu, a także w teście komórkowych z wykorzystaniem linii nowotworowej MCF-7 stanowiącej źródło STS. Związki z serii pochodnych 1,2,3-triazolu, wykazujące najwyższą aktywność biologiczną, zostały zbadane w testach *in vivo* w celu oznaczenia aktywności przeciwnowotworowej w mysim modelu raka sutka

Streszczenie rozprawy w języku angielskim: This dissertation presents a series of experiments using molecular modeling techniques and synthesizing methods of new STS inhibitors based on 1,2,3-triazole and 1,2,4-oxadiazole heterocyclic ring. The inhibitory activity of the obtained derivatives was determined in *in vitro* tests using an enzyme isolated from human placenta and with radiolabelled estrone sulfate, and also in a cell test using the MCF-7 tumor line as a source of STS. The compounds from the series of 1,2,3-triazole derivatives, showing the highest biological activity, were tested *in vivo* to determine anti-tumor activity in a mouse breast cancer model

* *niepotrzebne skreślić*

** *dotyczy rozpraw doktorskich napisanych w innych językach, niż polski lub angielski*





Z całego serca chciałbym podziękować

***mojej Narzeczonej Natalii**
za wyrozumiałość i cierpliwość
oraz za to, że w trudnych chwilach
zawsze jest dla mnie wsparciem*

*oraz **kochanym Rodzicom**
za nieugiętą wiarę we mnie*

*Chciałbym serdecznie podziękować mojemu
promotorowi*

***dr. hab. inż. Sebastianowi
Demkowiczowi***

*za wszelką okazaną pomoc merytoryczną
oraz mentalną,
a także za wsparcie
bez którego niniejsza praca nie mogłaby
powstać*

oraz

***całemu zespołowi
Katedry Chemii Organicznej
Wydziału Chemicznego PG***

*za ogromną serdeczność i każdą okazaną
pomoc*

Spis treści

Wykaz skrótów i symboli.....	10
Streszczenie.....	12
Abstract.....	15

1 Część teoretyczna 19

1.1 Wstęp.....	20
1.2 Choroby nowotworowe.....	22
1.3 Nowotwory hormonozależne.....	24
1.3.1 Metody leczenia HDC.....	25
1.4 Hormony płciowe.....	29
1.4.1 Rola hormonów w organizmie człowieka.....	29
1.4.2 Szlak biosyntezy hormonów płciowych.....	29
1.5 Sulfataza steroidowa.....	32
1.5.1 Budowa enzymu STS.....	32
1.5.2 Mechanizm działania STS.....	33
1.5.3 Mechanizm dezaktywacji funkcji biologicznej STS.....	33

1.6 Inhibitory STS	37
1.6.1 Inhibitory STS – Alternatywne substraty.....	37
1.6.2 Nieodwracalne, steroidowe inhibitory STS.....	38
1.6.3 Nieodwracalne, niesteroidowe inhibitory STS	40
1.6.4 Irosustat – Badania kliniczne	41
1.6.5 Kolejne generacje inhibitorów STS oraz inhibitory dualne	43
1.6.6 Rozwój inhibitorów STS w Katedrze Chemii Organicznej Polite- chniki Gdańskiej.....	46
1.7 1,2,4-Oksadiazole	48
1.7.1 1,2,4-Oksadiazole – Historia, właściwości i zastosowanie	49
1.7.2 1,2,4-Oksadiazole – Metody syntezy	51
1.8 Triazole	53
1.8.1 1,2,3-Triazole – Historia, właściwości i zastosowanie.....	54
1.8.2 1,2,3-Triazole – Metody syntezy	57
1.9 Cel i zakres pracy	60

2 Badania własne 61

2.1 Uzasadnienie podjętych badań oraz opis planowanych eksperymentów	62
2.2 Modelowanie molekularne	63
2.3 Modelowanie molekularne amidosiarczanowych pochod- nych 1,2,3-triazolu	64
2.4 Synteza 1,4-diarylopodstawionych amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu	67



2.4.1	Optymalizacja warunków reakcji otrzymywania amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu	68
2.5	Badania biologiczne <i>in vitro</i> amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu	71
2.5.1	Badania <i>in vitro</i> amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu – test enzymatyczny	71
2.5.2	Badania <i>in vitro</i> amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu – test komórkowy	73
2.6	Badania biologiczne <i>in vivo</i> amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu	76
2.6.1	Badania biologiczne <i>in vivo</i> amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu – wyznaczenie Maksymalnej Tolerowanej Dawki	77
2.6.2	Badania biologiczne <i>in vivo</i> amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu – badania aktywności przeciwnowotworowej	80
2.7	Modelowanie molekularne amidosiarczanowych pochodnych 1,2,4-oksadiazolu	86
2.8	Synteza amidosiarczanowych pochodnych 1,2,4-oksadiazolu	89
2.8.1	Synteza <i>N</i> '-hydroksybenzenokarboksyimidoamidów	89
2.8.2	Synteza amidosiarczanowych pochodnych 4-(5-fenyl-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu	93
2.8.3	Synteza amidosiarczanowych pochodnych 4-(3-fenyl-1,2,4-oksadiazol-5-ilo)fenylu	93
2.8.4	Synteza amidosiarczanowych pochodnych 4-(5-benzyl-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu	94
2.8.5	Synteza amidosiarczanowych pochodnych 4-(5-(4-benzamidofenyl)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu oraz 4-(5-(4-(2-fenylacetamido)fenyl)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu	96



2.9 Badania biologiczne <i>in vitro</i> amidosiarczanowych pochodnych 1,2,4-oksadiazolu	98
---	----

Podsumowanie	100
--------------------	-----

Dorobek naukowy	106
-----------------------	-----

3 Część eksperymentalna 111

3.1 Modelowanie molekularne	112
-----------------------------------	-----

3.2 Synteza chemiczna	113
-----------------------------	-----

3.2.1 Aparatura	113
-----------------------	-----

3.2.2 Procedura otrzymywania 4-((trimetylosililo)etynylo)fenolu (26)	115
---	-----

3.2.3 Ogólna procedura otrzymywania pochodnych 4-(1-fenylo-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-ilo)fenolu 27a-ab	116
---	-----

3.2.4 Ogólna procedura otrzymywania amidosiarczanowych pochodnych 4-(1-fenylo-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-ilo)fenolu Ia-ab	130
---	-----

3.2.5 Ogólna procedura otrzymywania pochodnych <i>N</i> -hydroksybenzeno-karboksyimidoamidów 28 i 29	144
--	-----

3.2.6 Ogólna procedura otrzymywania pochodnych <i>N</i> -hydroksybenzeno-karboksyimidoamidów 30 i 31	146
--	-----

3.2.7 Ogólna procedura otrzymywania pochodnych 4-(5-fenylo-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenolu 32a-c oraz pochodnych 5-(4-metoksyfenylo)-3-fenylo-1,2,4-oksadiazolu 33a-b	148
---	-----

3.2.8 Ogólna procedura otrzymywania pochodnych 5-benzylo-3-(4-metoksyfenylo)-1,2,4-oksadiazolu 35a-c	151
---	-----

3.2.9 Ogólna procedura deprotekcji ugrupowania hydroksylowego za pomocą BBr ₃	153
--	-----

3.2.10 Procedura syntezy 4-(5-(4-aminofenylo)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenolu 37	156
---	-----



3.2.11	Ogólna procedura syntezy pochodnych <i>N</i> -(4-(3-(4-hydroksyfenylo)-1,2,4-oksadiazol-5-ilo)fenylo)benzamidu 38a-b oraz pochodnych <i>N</i> -(4-(3-(4-hydroksyfenylo)-1,2,4-oksadiazol-5-ilo)fenylo)-2-fenyloacetamidu 38c-e	157
3.2.12	Ogólna procedura otrzymywania amidosiarczanowych pochodnych 1,2,4-oksadiazolu IIa-c, IIIa-b, IVa-c, Va-b, VIa-c	161
3.3	Badania biologiczne	169
3.3.1	Izolacja i oczyszczanie enzymu	169
3.3.2	Procedura badania aktywności biologicznej w teście enzymatycznym	169
3.3.3	Procedura badania aktywności biologicznej w teście komórkowym ...	169
3.3.4	Przygotowanie roztworów inhibitorów do badań <i>in vivo</i>	170
3.3.5	Maksymalna Tolerowana Dawka (MTD).....	170
3.3.6	Opis badań aktywności przeciwnowotworowej wybranych związków mysim modelu raka sutka 67NR	170
3.3.7	Określenie poziomu estradiolu w osoczu krwi	171
3.3.8	Opis badania aktywności STS w komórkach wątroby oraz nowotworu	172
3.3.9	Analiza statystyczna.....	172
	Bibliografia	173

Wykaz skrótów i symboli

[³ H]-E1S	– Znakowany radioizotopowo siarczan estronu
17β-HSD	– Dehydrogenaza 17β-hydroksysteroidowa
ACN	– Acetonitryl
Adiol	– Androstenediol
Adiol-S	– Siarczan androstenediolu
ALT	– Aminotransferaza alaninowa
AST	– Aminotransferaza asparaginianowa
CDI	– 1,1'-Karbonylodiimidazol
CDK4	– Kinaza zależna od cyklin 4 (ang. <i>Cyclin-Dependent Kinase 4</i>)
CuAAC	– Reakcja cykloaddycji azydek-alken katalizowana kationami miedzi (ang. <i>Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition</i>)
DASI	– Dualne inhibitory aromataza-sulfataza (ang. <i>Dual Aromatase-Sulfatase Inhibitors</i>)
DCC	– <i>N,N'</i> -Dicykloheksylokarbodiimid
DCM	– Dichlorometan
<i>N,N</i> -DMA	– <i>N,N</i> -Dimetyloacetamid
DMF	– <i>N,N</i> -Dimetyloformamid
DHEA	– Dehydroepiandrosteron
DHEA-S	– Siarczan dehydroepiandrosteronu
DBU	– 1,8-Diazabicyklo(5.4.0)undek-7-en
E1-S	– Siarczan estronu
E2-S	– Siarczan estradiolu
EDC	– 1-Etylo-3-(3-dimetyloaminopropylo)karbodiimid
ER	– Receptor estrogenowy
GnRH	– Hormon uwalniający gonadotropiny (ang. <i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>)
HCT	– Hematokryt
HDBC	– Hormonozależny nowotwór piersi (ang. <i>Hormone Dependent Breast Cancer</i>)
HDC	– Hormonozależny nowotwór (ang. <i>Hormone Dependent Cancer</i>)
HEDMs	– Materiały o wysokiej gęstości energii (ang. <i>High Energy Density Materials</i>)
HER2	– Receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (ang. <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>)
HGB	– Hemoglobina
LnRH	– Hormon uwalniający hormon luteinizujący (ang. <i>Luteinizing-Hormone-Releasing Hormone</i>)



MTD	– Maksymalna Tolerowana Dawka
mTOR	– Ssaczy cel rapamycyny (ang. <i>Mammalian Target of Rapamycin Kinase</i>)
OATPs	– Polipeptydy transportujące aniony organiczne (ang. <i>Organic Anion Transporting Polypeptides</i>)
<i>PaAtsA</i>	– Arylosulfataza bakterii <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PARP	– Polimeraza (poli-ADP) rybozy (ang. <i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>)
RBC	– Liczba erytrocytów
SAR	– Analiza struktura-aktywność (ang. <i>Structure-Activity Relationship</i>)
SERM	– Selektywny modulator receptora estrogenowego (ang. <i>Selective Estrogen Receptor Modulator</i>)
SPF	– „Wolny od specyficznych patogenów” (ang. <i>Specific Pathogen Free</i>)
STS	– Sulfataza steroidowa
WHO	– Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i>)
WBC	– Liczba białych krwinek
T3P	– Bezwodnik kwasu propanofosfonowego
TBAF	– Fluorek tetrabutylamoniowy
TBTU	– Tetrafluoroboran 2-(1 <i>H</i> -benzotriazo-1-ilo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy
<i>t</i> -BuONO	– Azotyn <i>tert</i> -butylu
TGI	– Zahamowanie wzrostu guza (ang. <i>Tumor Growth Inhibition</i>)
TLC	– Cienkowarstwowa chromatografia cieczowa (ang. <i>Thin Layer Chromatography</i>)
TMSN ₃	– Azydek trimetylosililowy
TV	– Objętość guza (ang. <i>Tumor Volume</i>)

Streszczenie

Dynamiczny rozwój oraz nieustannie poszerzająca się wiedza na temat budowy i zasad funkcjonowania ludzkiego organizmu znacząco zrewolucjonizowały nauki medyczne, pozwalając na skuteczną diagnostykę oraz zwalczanie wielu schorzeń. Dzięki temu, osoby cierpiące na nieuleczalne, niegdyś śmiertelne schorzenia, dzisiaj mają szansę podjęcia efektywnej, nowoczesnej terapii oraz przezwyciężenia choroby. Niestety, pomimo wielu nowatorskich i przełomowych odkryć, które doprowadziły do opracowania szeregu nowoczesnych terapii medycznych, niezwykle skomplikowany i wieloetapowy proces kancerogenezy uniemożliwia opracowanie jednej, uniwersalnej metody leczenia chorób nowotworowych.

Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), każdego roku z powodu różnego rodzaju chorób, schorzeń czy nieszczęśliwych wypadków ginie około 55 milionów osób. Niepodważalnie najczęstszą przyczyną śmierci są choroby układu sercowo-naczyniowego powodujące rocznie zgon około 18 milionów ludzi (miażdżyca, choroby niedokrwienne serca, choroby wsierdzia, niewydolność serca, nowotwory serca itd.). Choroby nowotworowe powodują zaś śmierć około 10 milionów osób każdego roku. W świetle najnowszych badań rak piersi jest najczęściej występującym typem nowotworu w krajach wysoko rozwiniętych wśród kobiet w okresie post-menopauzalnym. Zgodnie z danymi prezentowanymi przez *International Agency for Research on Cancer*, w 2020 roku zdiagnozowano ponad 2,26 miliona nowych przypadków zachorowań na raka piersi, jak również odnotowano prawie 700 tys. zgonów z powodu tej choroby [1]. Wobec powyższego, opracowanie zupełnie nowych, skutecznych metod terapeutycznych, pozwalających na skuteczną walkę z nowotworem, jest jednym z kluczowych wyzwań współczesnej medycyny.

Udowodniono, że duża liczba nowotworów w swoim początkowym etapie rozwoju wykazuje charakter hormonozależny – nowotwór piersi, prostaty, endometrium, jajników (np. ponad 90% przypadków raka piersi wykazuje charakter zależny od steroidów [2]). WHO uznaje aktywne biologicznie hormony (estrogeny i androgeny) za jeden z głównych czynników odpowiedzialnych za stymulację proliferacji nowotworów hormonozależnych (HDC). Z tego powodu nowoczesne terapie skierowane przeciwko tym chorobom powinny wykorzystywać farmaceutyki, które skutecznie zmniejszają dostępność hormonów dla tkanek zmienionych nowotworowo. Dotychczasowe metody leczenia wykorzystujące głównie chemoterapeutyki, będące inhibitorami aromatazy lub selektywnymi modulatorami receptorów estrogenowych (SERM), często zawodzą.

Do chwili obecnej zidentyfikowano trzy szlaki enzymatyczne odpowiedzialne za tworzenie się aktywnych form estrogenów: szlak kompleksu enzymatycznego aromatazy, dehydrogenazy 17β -hydroksysteroidowej (17β -HSD) oraz sulfatazy steroidowej (STS). Co ważne, udowodniono, iż ilość estronu wytwarzanego z siarczanu estronu poprzez szlak enzymatyczny STS jest dziesięć-

ciokrotnie wyższa niż z androstendionu (poprzez enzym aromatazy) [3]. Dodatkowo aktywność STS w tkance raka piersi jest milion razy wyższa niż aktywność aromatazy [4]. Oznacza to, że STS staje się niezwykle ważnym, nowym celem molekularnym, który może przyczynić się do opracowania znacznie skuteczniejszej terapii przeciwko HDC i ich profilaktyki. W ciągu ostatnich kilku lat trwały intensywne badania nad pozyskaniem nowych, skutecznych inhibitorów STS. Niestety, większość substancji wykazujących wysoki poziom inhibicji enzymu posiadała niepożądane właściwości estrogenowe, które w świetle najnowszych badań stanowią główną przyczynę progresji HDC i są powodem negatywnych rezultatów badań klinicznych. W celu zniwelowania tych właściwości od kilku lat trwają prace nad otrzymaniem związków, które skutecznie naśladują steroidową budowę naturalnych substratów STS i jednocześnie nie wykazują właściwości estrogenowych.

W niniejszej pracy przedstawiłem szereg badań obejmujących projektowanie (z wykorzystaniem technik modelowania molekularnego) oraz syntezę nowych inhibitorów STS opartych o rdzenie pierścieni heterocyklicznych 1,2,3-triazolu oraz 1,2,4-oksadiazolu. Aktywność inhibicyjną otrzymanych pochodnych oznaczyłem w testach *in vitro* posługując się enzymem wyizolowanym z łożyska ludzkiego oraz znakowanym radioizotopowo siarczanem estronu, a także w teście komórkowych z wykorzystaniem linii nowotworowej MCF-7 stanowiącej źródło STS. Związki z serii pochodnych 1,2,3-triazolu wykazujące najwyższą aktywność biologiczną, zostały zbadane w testach *in vivo* w celu oznaczenia aktywności przeciwnowotworowej w mysim modelu raka sutka.

Wyniki przeprowadzonych badań udowodniły wysoki potencjał inhibicyjny wszystkich otrzymanych pochodnych. Spośród serii amidosiarczanowych pochodnych triazoli, pochodne **I-V** osiągnęły wartości parametru IC_{50} w teście komórkowym na poziomie nanomolowym. Amidosiarczan 4-(1-(3,5-difluorofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu wykazał największy potencjał, dla którego wartość parametru IC_{50} wyniosła 0,21 nM, charakteryzując się jednocześnie pięciokrotnie wyższą aktywnością od związku referencyjnego – **Irosustatu**. Otrzymane wyniki przeprowadzonych badań *in vivo* pięciu wyselekcjonowanych związków charakteryzujących się najwyższym potencjałem inhibicyjnym (**I-V**) potwierdziły, iż zsyntetyzowane inhibitory są zdolne do skutecznego zahamowania aktywności STS w tkankach nowotworu, wykazując jednocześnie brak niepożądanych skutków ubocznych w dawce 50 mg/kg masy ciała. Skutkiem tego w przeprowadzonych badaniach na zwierzętach uzyskano efekt terapeutyczny w postaci zahamowania wzrostu guza o 51% dla pochodnej amidosiarczanu 4-(1-(3,5-dichlorofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu (**V**).

W ramach przeprowadzonych badań biologicznych *in vitro* amidosiarczanowych pochodnych 1,2,4-oksadiazolu ustalono, iż wszystkie zaprojektowane związki charakteryzowały się bardzo wysokim potencjałem inhibicyjnym. Amidosiarczan 4-(5-(4-(2-(3-fluorofenylo)acetamido)fe-

nylo)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu wykazał najwyższą aktywność w teście komórkowym, osiągając wartość parametru IC_{50} na poziomie 1,10 nM (wartość IC_{50} **Irosustatu** w tym samym teście wyniosła 1,14 nM).

W niniejszej dysertacji opisałem również szereg eksperymentów syntetycznych procesu optymalizacji otrzymywania pochodnych azydobenzenu z odpowiedniej pochodnej soli diazoniowej, syntetyzowanej *in situ* z analogów aniliny z użyciem azotynu *tert*-butylu. Ponadto, przedstawiłem udoskonaloną metodę syntezy pochodnych *N*'-hydroksybenzenokarboksyimidoamidów z odpowiedniej pochodnej benzonitrylu w reakcji kondensacji z hydroksyloaminą.

Przedstawiona praca zawiera również studium literaturowe dotyczące historii HDC, a także podrozdziały poświęcone STS, jej roli w organizmie żywym oraz o postępach w rozwoju nowych inhibitorów tego enzymu. Ponadto, zaprezentowany został krótki przegląd literaturowy dotyczący pochodnych 1,2,4-oksadiazolu oraz 1,2,3-triazolu.

Abstract

The forceful development and constantly expanding knowledge about structure of the human body and its functioning, significantly revolutionized medical sciences allowing for effective diagnostic and to fight many diseases. For that reason, people suffering from incurable, formerly fatal diseases today have a chance to undertake effective, modern therapy and overcome illness. Regrettably, despite many breakthrough discoveries that have led to the development of a number of innovative medical therapies, the extremely complicated and multistage process of carcinogenesis, prevents the development of one unique cancer treatment method.

According to the World Health Organization (WHO), nearly 55 million people die every year due to various diseases, illnesses or accidents. Undeniably, the most common cause of death are cardiovascular diseases, causing death of roughly 18 million people annually (atherosclerosis, ischemic heart disease, endocardial disease, heart failure, heart cancer, etc.). Cancer account for the death of about 10 million people each year. According to the recent research, breast cancer is the most common type of tumor in post-menopausal women in highly-developed countries. Based on the data presented by the *International Agency for Research on Cancer*, in 2020 over 2.26 million new breast cancer cases were diagnosed, as well as nearly 700 thousands deaths due to this disease [1]. In view of the above, development of completely new, effective therapeutic methods, allowing for an effective fight against cancer, is one of the main challenges of modern medicine.

It has been proven that some of all tumors in their early stages of growth are hormone-dependent – breast, prostate and ovaries cancer, and endometrium (eg. over 90% of breast cancer cases are hormone-dependent [2]). WHO considers biologically active hormones (estrogens and androgens) to be one of the main factors responsible for the stimulation of hormone-dependent cancer (HDC) tissue growth. Consequently, modern therapies against these diseases should use pharmaceuticals, which effectively reduce the availability of hormones for neoplastic tissues. Nowadays, therapies using chemotherapeutic agents that are aromatase inhibitors or selective estrogen receptor modulators, often fail.

Three enzymatic pathways responsible for the formation of active forms of estrogens have been identified so far: the aromatase enzyme complex, 17β -hydroxysteroid dehydrogenase (17β -HSD) and steroid sulfatase (STS) pathway. Importantly, it has been proven that the amount of estrone produced from estrone sulfate *via* the STS enzymatic pathway is ten times higher than that from androstenedione (*via* the enzyme aromatase) [3]. Additionally, the activity of STS in breast cancer tissue is one million times higher than that of aromatase [4]. This means that STS is becoming an extremely attractive, new molecular target that could contribute to the

development of a much more effective therapy against HDC and their prevention. In the last few years, intensive research was carried out to obtain new, effective STS inhibitors. Unfortunately, most of the substances showing a high level of enzyme inhibition had undesirable estrogenic properties, which, in the light of the latest research, are the main cause of HDC progression and are the reason for the negative results of clinical trials. In order to eliminate these properties, work has been underway for several years to obtain compounds that effectively mimic the steroid structure of natural STS substrates and, at the same time, do not show estrogenic properties.

Herein, I have presented a series of experiments (using molecular modeling techniques) and synthesizing methods of new STS inhibitors based on 1,2,3-triazole and 1,2,4-oxadiazole heterocyclic ring. The inhibitory activity of the obtained derivatives was determined in *in vitro* tests using an enzyme isolated from human placenta and with radiolabelled estrone sulfate, and also in a cell test using the MCF-7 tumor line as a source of STS. The compounds from the series of 1,2,3-triazole derivatives, showing the highest biological activity, were tested *in vivo* to determine anti-tumor activity in a mouse breast cancer model.

Outcomes from conducted research showed the high inhibitory potential of all obtained derivatives. Amongst the series of triazole sulfamate derivatives, **I-V** analogues achieved the IC₅₀ value in cellular test at the nanomolar level. 4-(1-(3,5-Difluorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)phenyl sulfamate showed the greatest potential, having the IC₅₀ value of 0.21 nM, while being five times more active than the reference – **Irosustat**. The obtained *in vivo* results of five selected compounds with the highest inhibitory potential (**I-V**) proved, that the synthesized inhibitors are capable of effective inhibition of STS activity in tumor tissues without causing side effects in the dose of 50 mg/kg body weight. As a result, the therapeutic effect was achieved in animal studies in the form of tumor growth inhibition by 51% for the 4-(1-(3,5-dichlorophenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)phenyl sulfamate (**V**).

As part of the *in vitro* evaluation of 1,2,4-oxadiazole sulfamate derivatives, it was found that all designed compounds featured by high inhibitory potential. 4-(5-(4-(2-(3-Fluorophenyl)acetamido)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenyl sulfamate showed the highest activity in the cellular test, reaching the IC₅₀ value of 1.10 nM (The IC₅₀ value for **Irosustat** was 1.14 nM in the same assay).

In this dissertation I've described a series of synthetic experiments – optimizing process of azidobenzene preparation from a suitable diazonium salt derivative, obtained *in situ* from aniline analogues using *tert*-butyl nitrite. Moreover, I have presented an improved method for the synthesis of *N'*-hydroxybenzenecarboximidamide derivatives from the corresponding benzonitrile derivative by a condensation reaction with hydroxylamine.

In addition, the presented work also includes literature study on the history of HDC, as

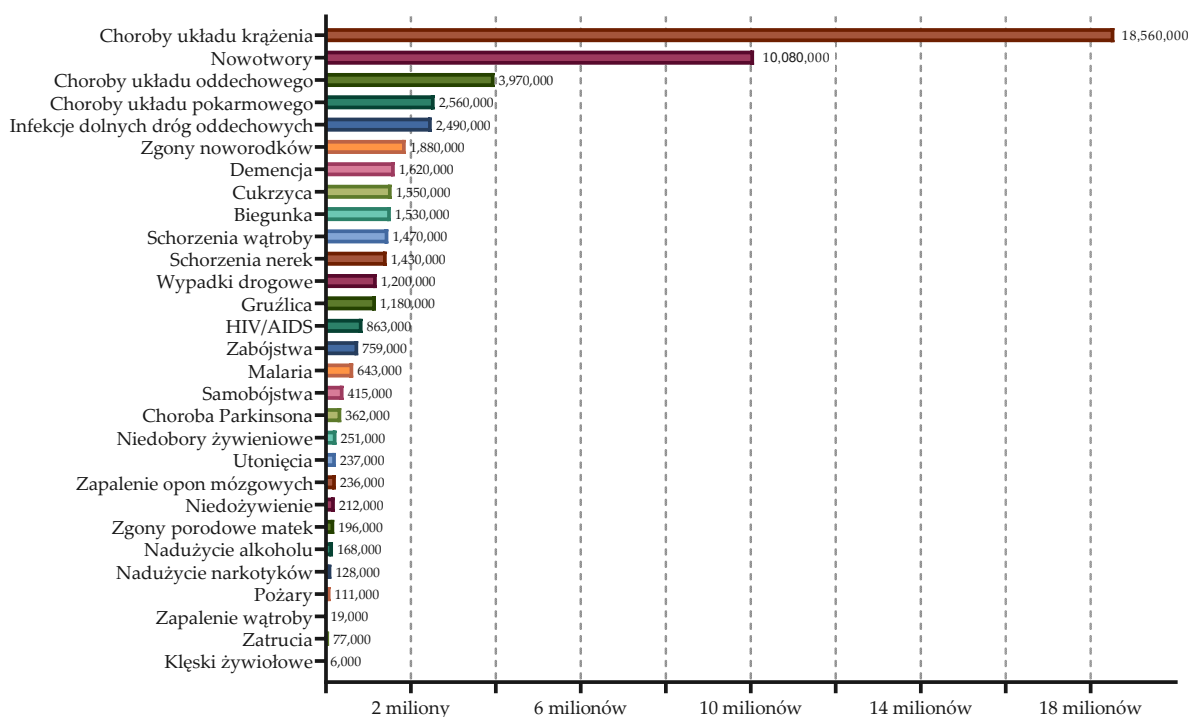
well as subsections on STS, its role in the living organism, and scientific advances regarding its inhibitors. In addition, a short literature review of the 1,2,4-oxadiazole and 1,2,3-triazole derivatives was presented.

Rozdział 1

Część teoretyczna

1.1 Wstęp

Według szacunków WHO w roku 2020 przedwcześnie życie straciło prawie 56 milionów osób. Przyczyną ponad 60% wszystkich zgonów były choroby niezakaźne, około 28% choroby zakaźne, śmiertelne schorzenia cięż, noworodków oraz choroby żywieniowe, a nieco ponad 10% urazy i wypadki. Według statystyk, za najwyższą liczbę zgonów odpowiedzialne są choroby układu krążenia. W ciągu ostatnich kilku lat, z nieznacznie malejącą tendencją, miażdżyca, choroby serca, zawał serca oraz jego niewydolność, zatory naczyń krwionośnych oraz udary powodowały śmierć około 18 milionów ludzi rocznie, stanowiąc prawie 25% wszystkich zgonów. Z drugiej zaś strony, w roku 2020 choroby nowotworowe spowodowały śmierć prawie 10 milionów osób, lokując się tym samym na drugim miejscu w tej niechlubnej klasyfikacji [5]. Przyczyny śmierci w 2020 roku zestawilem w postaci wykresu na **Rysunku 1.1**.



Rysunek 1.1: Przyczyny śmierci w 2020 roku

Jak się okazuje, choroby niezakaźne dominują nie tylko w danych statystycznych dotyczących śmiertelności na poziomie globalnym, ale także są odpowiedzialne za większość zgonów w krajach wysoko rozwiniętych. Śmierć osób spowodowana chorobami zakaźnymi, niedożywieniem, zgonami noworodków oraz matek w czasie porodowym i poporodowym są powszechne – aczkolwiek w niektórych państwach dominujące. W krajach Trzeciego Świata, np. w Kenii, główną przyczyną zgonów są choroby biegunkowe, zaś w Afryce Południowej oraz Botswanie to wirus

HIV odpowiada za większość spowodowanych śmierci. Dane statystyczne wskazują, iż w krajach o wysokim poziomie dochodowym, tego typu schorzenia mają niski odsetek śmiertelności [6].

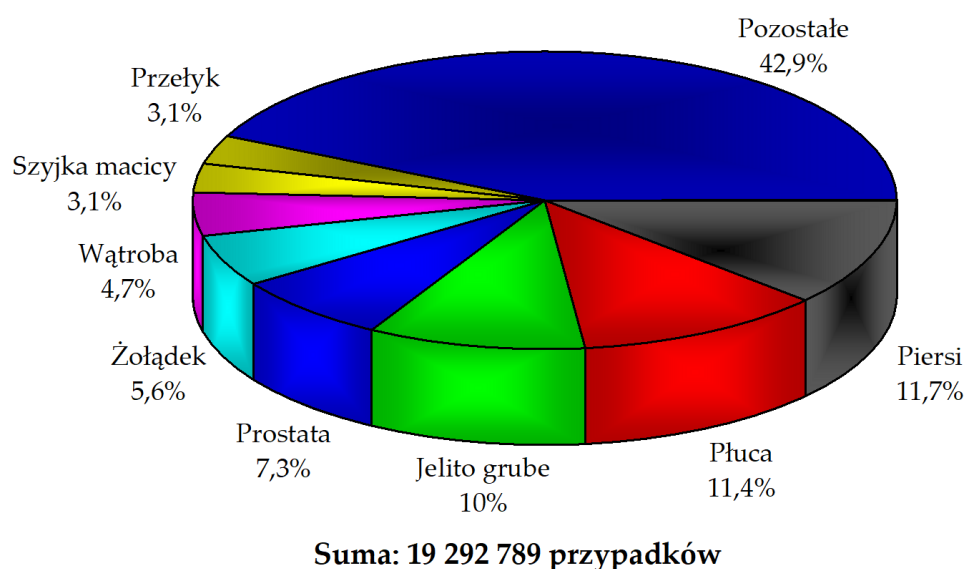
Według WHO, dotychczasowo scharakteryzowano około 13 000 różnych chorób oraz schorzeń zdrowotnych, z których choroby zakaźne stanowią najliczniejszą grupę. Najbardziej rozpozszechnionymi są:

1. Wirusowe zapalenie wątroby typu A, B oraz C, wywołane przez wirusa z rodziny *Hepatitis*, liczące obecnie około 600 milionów przypadków, powodujące śmierć około miliona osób każdego roku [7, 8],
2. Denga, wywołana przez wirusa *Denga Virus*, licząca około 400 milionów przypadków każdego roku, doprowadzająca do śmierci około 40 tysięcy osób rocznie [6],
3. Malaria, która wywoływana jest przez pasożyta z rodziny *Plasmodium*, z roczną ilością zachorowań liczącą około 250 milionów oraz około 700 tysięcy zgonów [9],
4. Choroby biegunkowe, spowodowane najczęściej infekcjami pasożytniczymi, wirusowymi oraz bakteryjnymi dróg pokarmowych, z częstotliwością występowania około 2,5 miliarda każdego roku, powodujące śmierć około 1,6 miliona osób rocznie [10].

Wszystkie, wyżej wymienione choroby zakaźne, występują głównie w krajach tropikalnych oraz sub-tropikalnych, dotykając w znacznej większości dzieci, szczególnie poniżej 5 roku życia. Powodem tak ogromnej ilości zachorowań jest w dużej mierze słabo rozwinięta profilaktyka zdrowotna oraz niedobór urządzeń higieniczno-sanitarnych.

1.2 Choroby nowotworowe

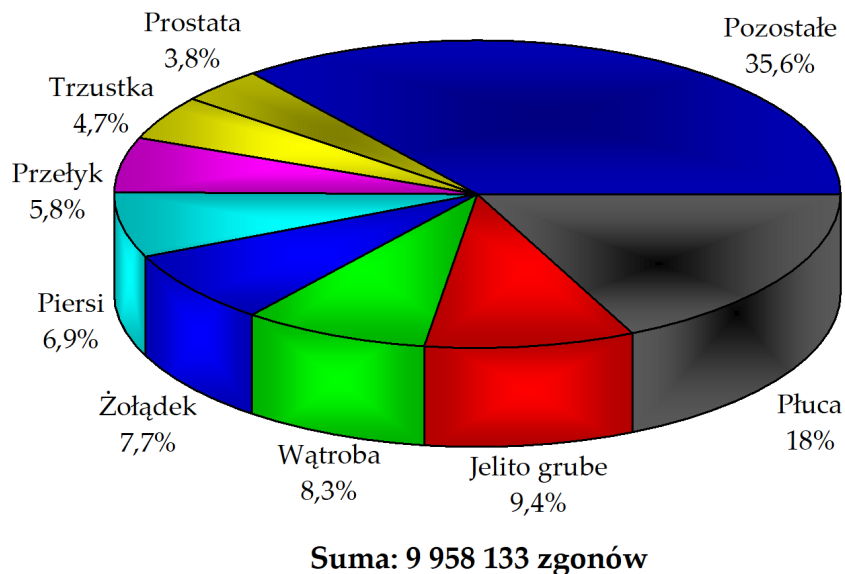
W świetle najnowszych danych opublikowanych przez *International Agency for Research on Cancer*, w 2020 roku choroby nowotworowe spowodowały śmierć blisko 10 milionów osób. Prawie połowa wszystkich zgonów dotyczy osób, które osiągnęły 70 lat lub więcej. W czasach starzejącego się społeczeństwa, w szczególności w krajach wysoko rozwiniętych, oraz nieustannie rosnącej populacji, ilość zachorowań na choroby nowotworowe oraz zgonów z nimi związanych będzie wzrastała. W ciągu ostatnich trzydziestu lat ich ilość wzrosła prawie o 70%. Niemniej jednak, analiza statystyczna pokazuje, iż odsetek ludzi, których śmierć spowodowana była zmianami nowotworowymi, powoli maleje [6].



Rysunek 1.2: Zachorowalność na choroby nowotworowe w 2020 roku – dane dotyczą skali światowej, osób w każdym wieku i obu płci

Jak podają dane statystyczne, nowotwór piersi jest najczęściej występującym typem nowotworu, który stanowi aż 11,7% wszystkich przypadków (około 2,3 miliona osób). Kolejno, najczęściej występującymi miejscami pojawiania się zmian nowotworowych są płuca, jelito grube oraz prostata (**Rysunek 1.2**).

Liczba zgonów spowodowana nowotworem piersi wyniosła 690 tysięcy w roku 2020, przy współczynniku śmiertelności na poziomie około 30,3% (**Rysunek 1.3**). Niemniej jednak, najwyższym współczynnikiem śmiertelności charakteryzuje się nowotwór trzustki, osiągając wartość aż 94%. Zmiany nowotworowe wątroby, międzybłonna, centralnego układu nerwowego oraz płuc wykazują równie złe rokowania (odpowiednio 92, 90, 85, 82 oraz 81%). Powodem tak wysokich współczynników śmiertelności są komplikacje spowodowane leczeniem oraz złośliwością tych nowotworów.



Rysunek 1.3: Zgony spowodowane chorobami nowotworowymi w 2020 roku – dane dotyczą skali światowej, osób w każdym wieku i obu płci

Choroby nowotworowe możemy podzielić na kilka grup. Jedną z nich są nowotwory hormonozależne (HDC). Jest to grupa guzów, których rozwój jest silnie uzależniony od obecności steroidów – głównie estrogenów oraz androgenów. Dalsza część niniejszej dysertacji będzie skupiać się na tym typie chorób nowotworowych, jako iż ich rozwój jest ściśle związany z funkcją biologiczną STS – enzymu będącego głównym przedmiotem prowadzonych przez mnie badań.

1.3 Nowotwory hormonozależne

Nowotwory hormonozależne to typ tkanek zmienionych nowotworowo, których wzrost i/lub przetrwanie silnie zależy od obecności hormonów płciowych. Około 60 lat temu zaobserwowano, iż podanie testosteronu lub jego kongeneru pacjentom, u których zdiagnozowano raka prostaty, powodowało znaczny wzrost aktywności tkanki nowotworowej. Z drugiej zaś strony, kiedy ograniczono dostęp hormonu komórkom nowotworowym zauważono znaczący regres – nowotwór nie przetrwał [11].

Niemniej jednak, pierwsze doniesienia literaturowe na temat HDC sięgają znacznie wcześniej. W roku 1896 dokonano fundamentalnego odkrycia. Otóż dr George Thomas Beatson spostrzegł, iż całkowite usunięcie jajników u kobiet ze zdiagnozowanym nowotworem piersi, powodowało silną regresję raka. W ramach prowadzonych przez niego badań okazało się, iż większość pacjentek uzyskała pozytywny efekt terapii dzięki owariektomii [12]. Odkrycie to było początkiem terapii hormonalnej. Historia HDC jest bardzo długa oraz niesamowicie obszerna w materiał literaturowy, pojawiający się od ponad 130 lat. Do dziś wyróżnia się kilka typów HDC:

1. Rak piersi, który jest najbardziej rozpowszechnionym typem nowotworu, najczęściej wykazuje silną zależność hormonalną stymulującą jego rozwój oraz przetrwanie. Głównie estrogen oraz progesteron odpowiadają za przyrost tkanki piersi zmienionej nowotworowo [13].
2. Rak prostaty, którego rozwój często zależy od stężenia androgenów, np. testosteronu i jego pochodnych.
3. Rak jajników (charakteryzujący się nadekspresją receptorów estrogenowych) może być stymulowany przez obecność estrogenu a także estradiolu.
4. Nowotwór macicy lub błony śluzowej macicy (endometrioza) są ekstremalnie wrażliwe na obecność żeńskich hormonów płciowych – estrogenu oraz progesteronu. Należy podkreślić, iż obecność tego pierwszego powoduje silny rozwój tkanki nowotworowej, zaś ten ostatni jest odpowiedzialny za silną inhibicję wzrostu raka oraz powoduje naturalne różnicowanie się komórek nabłonka. Oznacza to, iż kobiety, u których występuje owulacja (w skutek której produkowany jest progesteron) mają niską szansę zachorowalności na ten typ nowotworu [14].

1.3.1 Metody leczenia HDC

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat medycyna poczyniła ogromne postępy w leczeniu oraz profilaktyce HDC. Oprócz tradycyjnych metod leczenia obejmujących metody chirurgiczne oraz chemoterapię substancjami cytostatycznymi, obecnie opracowano szereg innych, niebędących tak inwazyjnymi i wyniszczającymi organizm. Najważniejszą z nich jest bezspornie terapia hormonalna. Obecnie na rynku farmaceutycznym dostępnych jest kilkanaście substancji leczniczych, których stosowanie prowadzi do obniżenia stężenia estrogenów i androgenów we krwi obwodowej w takim stopniu, aby uniemożliwić dalszy rozwój oraz przetrwanie rozwijającego się nowotworu. Pomimo wspólnego celu chemoterapeutyków w leczeniu HDC, mechanizm ich działania znacząco się różni. W leczeniu nowotworu prostaty obecnie stosowane są między innymi następujące substancje:

1. **Finasteryd** oraz **Dutasteryd** – substancje będące inhibitorami 5α -reduktazy [15, 16].
2. **Leuprorelina** i **Degareliks** – związki chemiczne będące agonistami oraz antagonistami GnRH (ang. *gonadotropin-releasing hormone*, hormon uwalniający gonadotropiny) i LHRH (ang. *luteinizing-hormone-releasing hormone*, hormon uwalniający hormon luteinizujący) [17, 18].
3. **Bikatulamid**, **Enzatulamid** oraz **Apalutamid** – substancje stosowane jako związki antagonistyczne receptora androgenowego [19, 20].

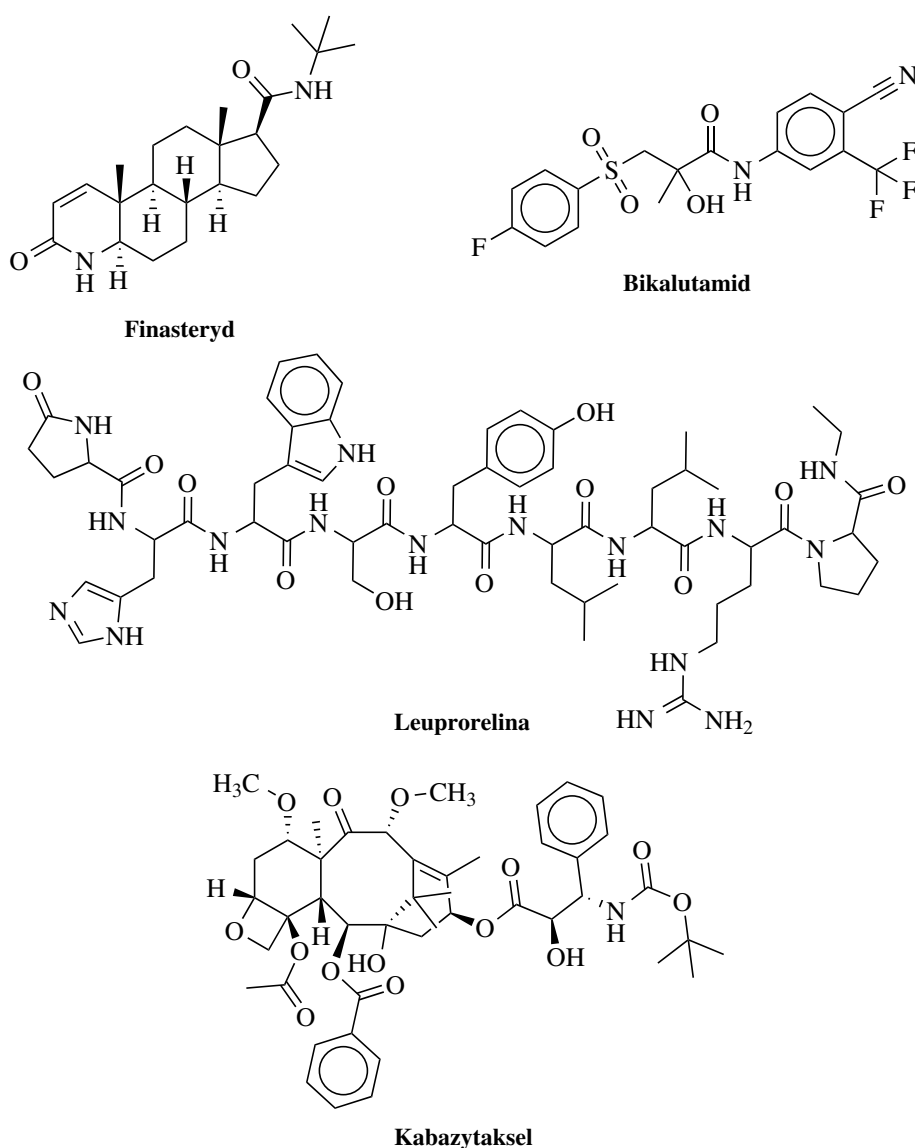
W przypadku wystąpienia oporności nowotworu na ww. substancje lecznicze, pacjentom podawane są najczęściej substancje immunoterapeutyczne lub związki cytostatyczne – **Sipuleucel-T**, **Kabazytaksel** czy **Paklitaksel** [21–23]. Struktury niektórych związków przedstawiłem na **Rysunku 1.4**.

Obecnie hormonozależny nowotwór piersi (HDBC) jest jednym z najczęściej występujących zmian nowotworowych na całym świecie (szczególnie u kobiet). Ponadto szacuje się, iż rozwój około 70-90% wszystkich przypadków zachorowań na ten typ nowotworu charakteryzuje się silną zależnością hormonalną, w szczególności we wczesnych etapach choroby [2]. Do dziś najpopularniejszą metodą leczenia nowotworu piersi jest terapia hormonalna, w której najczęściej stosowaną substancją aktywną jest **Tamoksyfen**, stosowany od lat 70-tych ubiegłego wieku, będący antagonistą receptora estrogenowego (ER) [24]. Ponadto, do stosowanych modulatorów ER drugiej generacji zaliczamy: **Raloksyfen**, **Toremifen** oraz **Fulwestrant** [25–27].

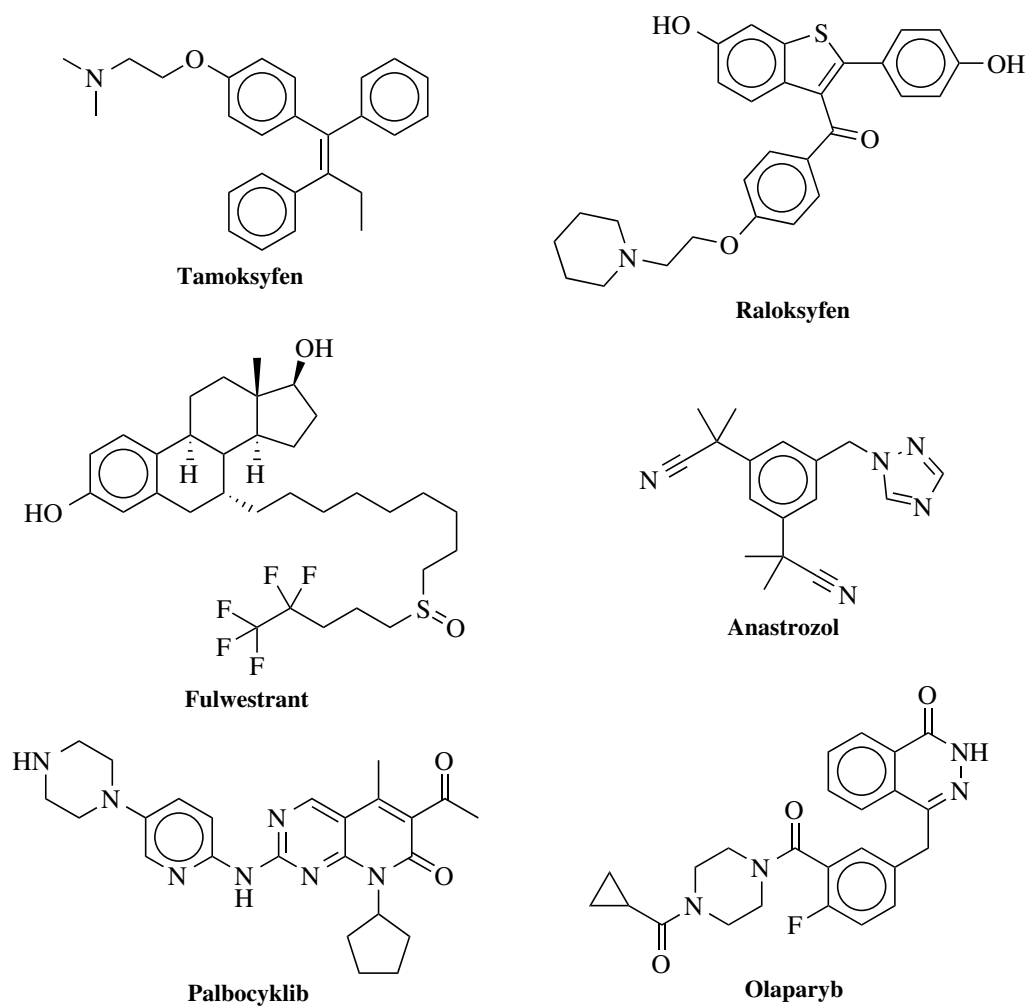
Innym, niezwykle istotnym celem molekularnym w leczeniu HDBC, jest kompleks aromatazy (syntetazy estrogenowej), którego rola biologiczna polega na aromatyzowaniu pierścienia

androgenów, powodując powstawanie estradiolu oraz estronu [28]. Obecnie na rynku dostępnych jest kilka inhibitorów tego enzymu. Do najczęściej stosowanych należą: **Anastrozol**, **Ekseme- stan** oraz **Letrozol** [29, 30].

Ponadto, do innych stosowanych w praktyce klinicznej związków możemy zaliczyć substancje, będące inhibitorami HER2 (ang. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) – **Tra- stuzumab emtanzyna** [31, 32], CDK4/6 (ang. *Cyclin-Dependent Kinase*) – **Palbocyklib**, **Rybocyklib** oraz **Abemacyklib** [33–39], mTOR (ang. *Mammalian Target of Rapamycin Ki- nase*) – **Ewerolimus** [40, 41], a także PARP (ang. *Poly (ADP Ribose) Polymerase*) – **Olapa-**



Rysunek 1.4: Substancje biologicznie aktywne stosowane w terapii hormonalnej nowotworu gruczołu krokowego



Rysunek 1.5: Substancje dostępne na rynku farmaceutycznym, stosowane w leczeniu HDBC

rib [42–45]. Struktury chemiczne wybranych związków, stosowanych w leczeniu HDBC, zostały przedstawione na **Rysunku 1.5**.

Pomimo tak szerokiej dostępności wielu farmaceutyków stosowanych w leczeniu HDC, naukowcy jak i lekarze do dziś borykają się z wieloma ograniczeniami wykorzystywanych obecnie terapii. Długotrwałe stosowanie preparatów zawierających substancje aktywne zaburzające gospodarkę hormonalną m.in. **Anastrozol**, **Letrozol**, **Eksemestan**, **Fulwestrant** czy **Tamoksyfen**, może prowadzić do poważnych skutków ubocznych, takich jak: zakrzepy krwi, udary, zaćma, utrata masy kostnej, wahania nastroju, ataki migreny, problemy z oddychaniem, uderzenia gorąca, depresja, ryzyko niewydolności i zawału serca, utrata libido i wysokie prawdopodobieństwo nawrotu nowotworu lub nawet utworzenia się nowych – endometrium lub macicy [27, 46–49]. Ponadto, w ramach prowadzonych badań naukowych udowodniono, iż długotrwałe stosowanie ww. substancji aktywnych prowadzi do powstawania mutacji, których efektem jest

pojawianie się oporności na terapię hormonalną, wynikającej z rekompensacji ilości estrogenów oraz androgenów we krwi obwodowej. Z tego też powodu, każdego dnia naukowcy starają się udoskonalić już istniejące metody lub też pracują nad całkowicie nieznanymi, nowatorskimi sposobami leczenia, w celu zniwelowania niepożądanych skutków ubocznych oraz zminimalizowania ryzyka nawrotu nowotworów.

1.4 Hormony płciowe

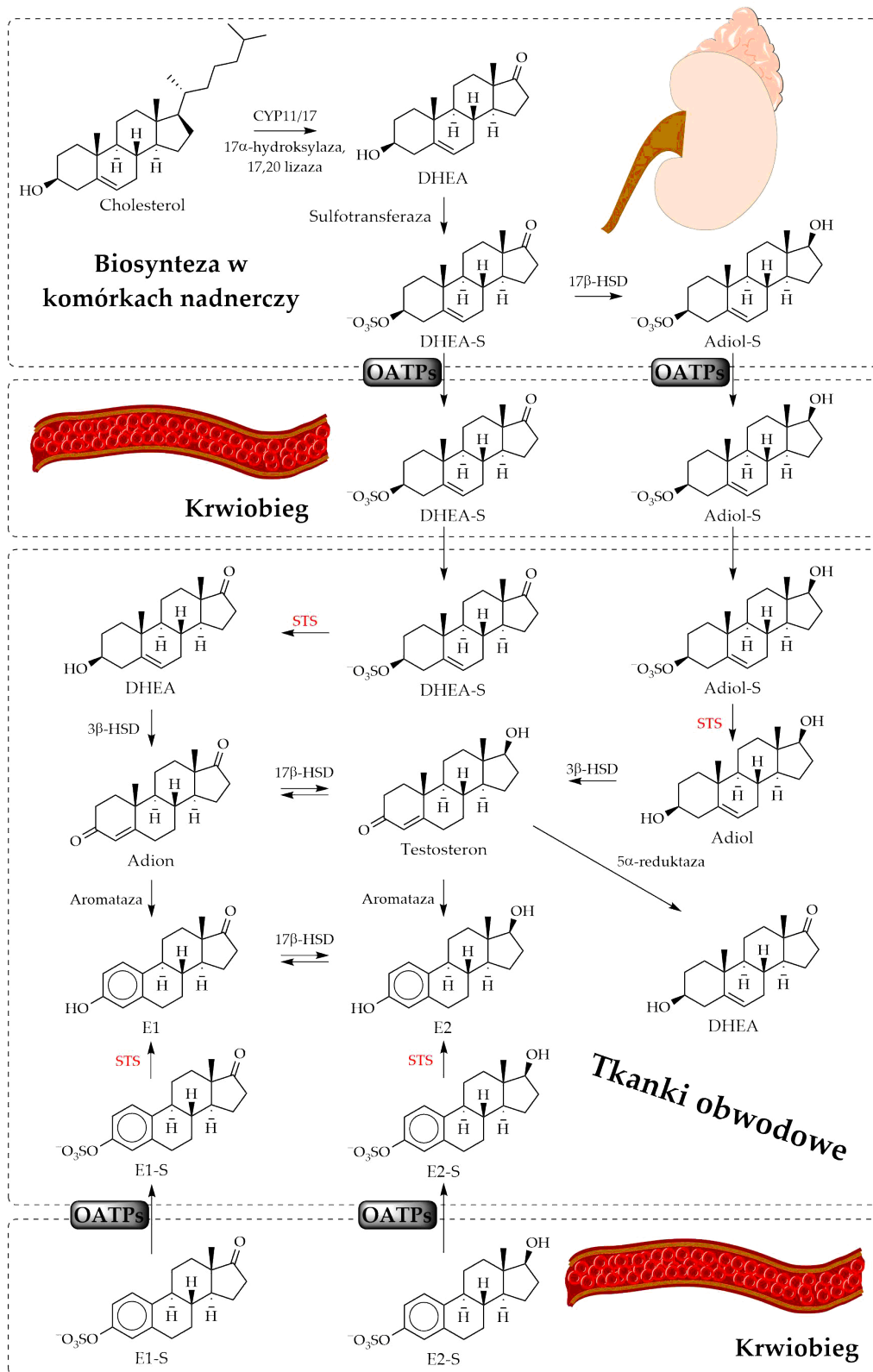
1.4.1 Rola hormonów w organizmie człowieka

Hormony należą do grupy związków sygnalizacyjnych, które odpowiadają za zachowanie oraz regulację procesów fizjologicznych w organizmie. U ludzi zidentyfikowano co najmniej 45 różnych hormonów, odpowiadających za utrzymanie homeostazy, których role do dziś nie zostały w pełni poznane, a wiedza na ich temat poszerza się nieustannie [50]. Jedną z istotnych grup hormonów są hormony płciowe, do których należą estron, estradiol, estriol oraz progesteron (żeńskie hormony płciowe, estrogeny), a także testosteron i androsteron (męskie hormony płciowe, androgeny). Hormony te pełnią fundamentalną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu, odpowiadając między innymi za szybkość przemiany metabolicznej, budowę pierwszo i drugorzędowych cech płciowych (u kobiet jak i u mężczyzn tę funkcję pełnią zarówno estrogeny oraz androgeny), a także biorą udział w biosyntezie białek, lipidów i prawidłowym utrzymaniu gospodarki mineralnej. Estrogeny (będące wazodylatorami) pełnią istotną rolę we właściwym funkcjonowaniu układu sercowo-naczyniowego oraz zmniejszają aktywację płytek krwi. Estradiol ma znaczący wpływ na poprawne funkcjonowanie osteoklastów i osteoblastów oraz regulację masy ciała (silnie redukuje tkankę tłuszczową). Estrogeny odpowiadają również za poprawną czynność układu nerwowego (biorą udział w biosyntezie przekaźników steroidowych). Androgeny zaś, wpływają na funkcjonowanie układu kostnego, nerwowego, mięśniowego, krwiotwórczego oraz sercowo-naczyniowego, a także regulują pracę prostaty oraz procesu spermatogenezy [51].

Niestety, ww. hormony płciowe są również odpowiedzialne za rozwój, wzmożoną proliferację oraz przetrwanie HDC (prostaty, endometrium, macicy, a w szczególności piersi) [52].

1.4.2 Szlak biosyntezy hormonów płciowych

Steroidogeneza u człowieka obejmuje procesy, w których siarczan steroidów (np. siarczan estronu (E1-S), siarczan androstenodiolu (Adiol-S) czy siarczan dehydroepiandrosteronu (DHEA-S)) uważane są za kluczowe czynniki endokrynologiczne odpowiedzialne za progresję HDC. Dotychczas zidentyfikowano trzy szlaki enzymatyczne odpowiedzialne za powstawanie aktywnych form estrogenowych: kompleksu aromatazy, dehydrogenazy 17β -hydroksysteroidowej oraz szlak STS. Prekursory steroidów takie jak DHEA-S oraz Adiol-S są biosyntetyzowane w nadnerczach z cholesterolu. Obecność grupy siarczanowej w formie soli znacząco zwiększa ich rozpuszczalność we krwi obwodowej, umożliwiając łatwy transport. Po dotarciu do komórek tkanki obwodowej, siarczan steroidów są transportowane do komórek przez OATPs. W tym



Rysunek 1.6: Szlak biosyntezy steroidów – androgenów oraz estrogenów

właśnie miejscu kluczową rolę odgrywa STS, powodując hydrolizę siarczanów steroidów (Adiol-S i DHEA-S, które są produkowane przez korę nadnerczy w największych ilościach) umożliwiając tym samym powstawanie ich biologicznie czynnych form (dehydroepiandrosteronu – DHEA, androstenediolu – Adiol), które mogą być w dalszej kolejności metabolizowane do steroidów, wykazujących silniejsze właściwości estrogenowe (tj. estronu, estradiolu oraz testosteronu). Ponadto, siarczanowe formy estronu (E1-S) oraz estradiolu (E2-S) biosyntetyzowane są np. w jajnikach czy tkance tłuszczowej, stanowiąc dodatkowy rezerwuar prekursorów steroidów, przekształcanych do aktywnych form poprzez szlak STS [53, 54] (szczegóły, **Rysunek 1.6**). Należy podkreślić, że wyłącznie STS jest odpowiedzialna za hydrolizę E1-S oraz DHEA-S [55]. Fakt ten w sposób jednoznaczny dowodzi, iż enzym ten pełni kluczową rolę w regulacji biosyntezy hormonów płciowych, a jego zahamowanie funkcji biologicznej, powinno przynieść znaczące korzyści terapeutyczne.

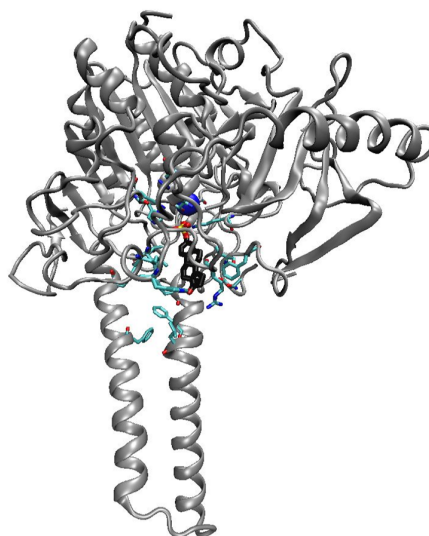
1.5 Sulfataza steroidowa

Sulfataza steroidowa jest enzymem odpowiedzialnym za hydrolizę siarczanów steroidów do ich biologicznie aktywnych form. W związku z tym, jest odpowiedzialna za indukowanie proliferacji HDC. STS jest szeroko rozpowszechniona w ciele człowieka, a zaburzenia jej dystrybucji prowadzą do wielu zmian patologicznych, w tym nowotworów oraz schorzeń o podłożu ginekologicznym [54]. Mutacje genetyczne, powodujące inaktywację genu kodującego enzym STS lub jego zmianę prowadzącą do ekspresji katalitycznie nieaktywnej sulfatazy, powodują chorobę tzw. rybiej łuski X-chromosomalnej [56–59].

Istotny jest również fakt, iż stężenie STS w komórkach nowotworowych jest znacznie wyższe, niż w ich odpowiednikach niezmiennych nowotworowo, powodując tym samym nasilenie enzymatycznej reakcji hydrolizy siarczanów steroidów w tkance raka. Ponadto, aktywność tego enzymu w komórkach HDC jest milion razy wyższa niż aromatazy [3, 4].

1.5.1 Budowa enzymu STS

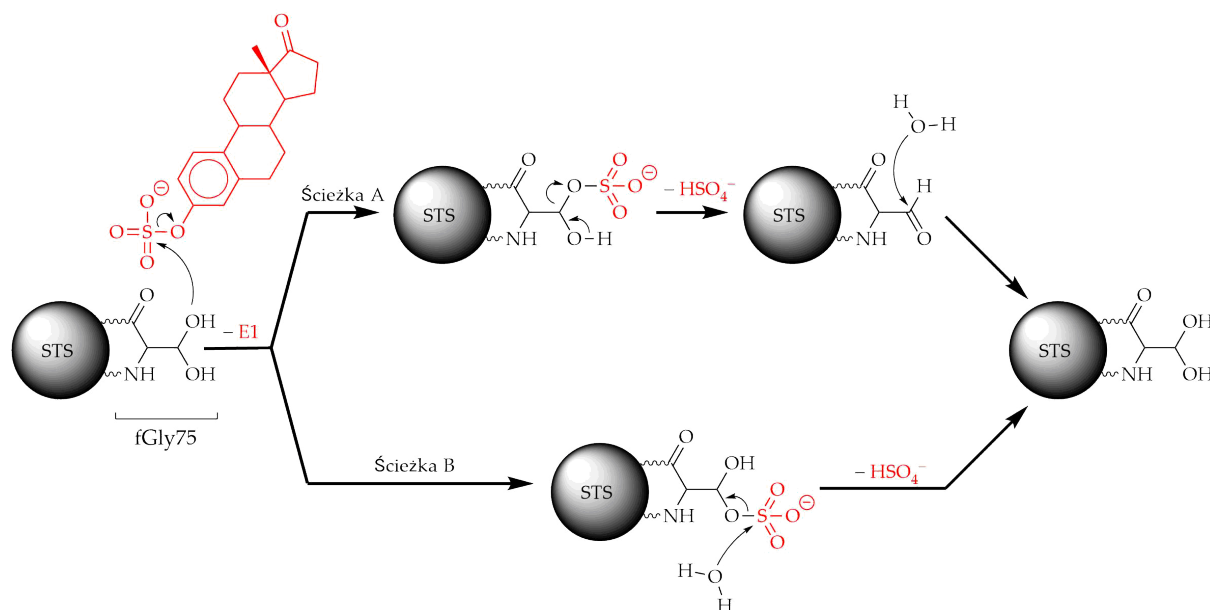
STS jest glikozylowanym białkiem związanym z błonami retikulum endoplazmatycznego, zbudowanym z 583 aminokwasów przypominającym kształt „grzyba” (**Rysunek 1.7**). Centrum aktywne STS składa się z dziewięciu katalitycznie istotnych aminokwasów, które odgrywają znaczącą rolę w przebiegu reakcji enzymatycznej: Asp35, Asp36, Arg79, Lys134, His136, His290, Asp342, Gly343 i Lys368. Dodatkowo, reszty aminokwasowe takie jak: Leu74, Arg98, Thr99, Val101, Leu103, Leu167, Val177, Phe178, Thr180, Gly181, Thr484 oraz Phe488 biorą udział w rozpoznawaniu naturalnego substratu STS, np. E1-S, w wyniku szeregu oddziaływań elektrostatycznych w szczególności hydrofobowych. Najistotniejszym aminokwasem znajdującym się w centrum aktywnym enzymu jest formylglicyna (fGly75), która odpowiedzialna jest za prawidłowy przebieg enzymatycznej reakcji hydrolizy siarczanowych prekursorów steroidów. W formie spoczynkowej enzymu, fGly75 występuje w postaci siarczanu swej *gem*-diolowej formy, koordynowanej przez kation wapnia.



Rysunek 1.7: Struktura przestrzenna STS wraz z zadokowanym naturalnym substratem E1-S (oznaczony kolorem czarnym) oraz z wyróżnionymi, katalitycznie istotnymi aminokwasami

1.5.2 Mechanizm działania STS

Ze względu na podobieństwo budowy centrum aktywnego STS do enzymów występujących u człowieka, których mechanizm reakcji enzymatycznych jest analogiczny i obecnie jest dobrze znany (arylosulfatazy A oraz B) [60], poglądowy przebieg reakcji można przedstawić następująco (**Rysunek 1.8**):



Rysunek 1.8: Proponowany mechanizm reakcji enzymatycznej STS

W pierwszym etapie następuje atak nukleofilowy grupy hydroksylowej *gem*-diolowej formy fGly75 na atom siarki ugrupowania siarczanowego substratu STS (np. E1-S), czego wynikiem jest utworzenie siarczanu formyloglicyny oraz aktywnego biologicznie steroidu (E1). W następnym etapie ma miejsce odtworzenie *gem*-diolowej formy fGly75. Ścieżka pierwsza (**A**, **Rysunek 1.8**) zakłada odejście anionu wodorosiarczanowego oraz utworzenie formyloglicyny, która następnie pod wpływem cząsteczki wody, przekształcana jest do swojej *gem*-diolowej formy. Ścieżka druga (**B**, **Rysunek 1.8**) zakłada bezpośredni atak nukleofilowy cząsteczki wody na atom siarki siarczanowej formy fGly75, w wyniku czego odtworzona zostaje jej *gem*-diolowa forma.

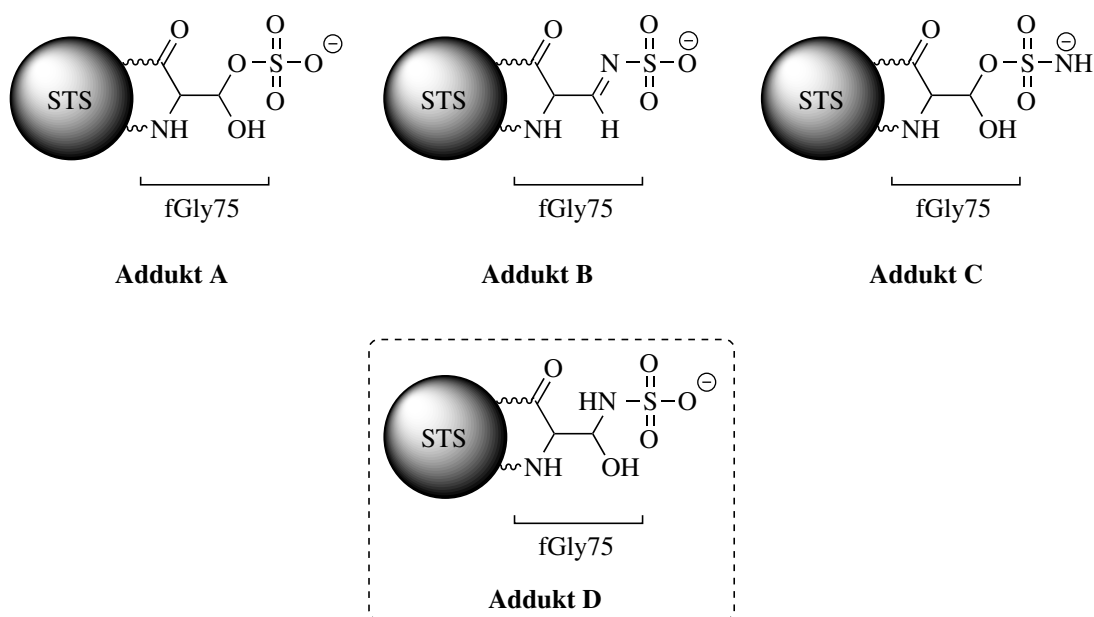
1.5.3 Mechanizm dezaktywacji funkcji biologicznej STS

Obecnie zakłada się, iż zahamowanie aktywności biologicznej STS spowodowane jest przeniesieniem grupy sulfamoylowej w centrum aktywnym enzymu na fGly75. Niestety, dokładny mechanizm inhibicji STS do dnia dzisiejszego nie został poznany i jednoznacznie udowodniony. Niemniej jednak, w ciągu ostatnich kilkunastu lat został poczyniony ogromny postęp w molek-

larnym zrozumieniu hamowania aktywności tego białka. Jak się okazuje, prace eksperymentalne z ludzkim enzymem sulfatazy są utrudnione z technicznych względów – STS jest związana z błoną retikulum endoplazmatycznego oraz może być heterogenicznie glikozylowana, co powoduje trudności w krystalizacji enzymu po jego dezaktywacji. W związku z powyższym, dotychczasowe badania mechanizmu reakcji enzymatycznej opierały się głównie na wykorzystaniu arylosulfatazy bakterii *Pseudomonas aeruginosa* (*PaAtsA*), która pełni analogiczną funkcję jak STS [61]. Otrzymane wyniki dostarczyły cennych informacji na temat dezaktywacji STS przy użyciu związków zawierających grupę amidosiarczanową, m.in. **Irosustatu** [62]. Przeprowadzone badania wskazały na nieodwracalny, zależny od czasu oraz stężenia mechanizm inhibicji STS. Jak się okazuje, zahamowanie aktywności biologicznej enzymu związane jest z rozerwaniem wiązania ArO-S, zachodzącym w obecności fGly75, z równoczesnym „multi-sulfamoilowaniem” STS (stechiometrycznie od 3 do 6 ugrupowań amidosiarczanowych na jeden enzym). Zjawisko to zostało szczegółowo wyjaśnione w pracy naukowej Williams’a i współpracowników z 2014 roku, w której autorzy opisują zjawisko odwracalnego amidosiarczanowania funkcji aminowych aminokwasów (lizyny oraz histydyny) obecnych w centrum aktywnym STS [63].

W roku 2019 prof. Barry Potter, będący autorem pionierskich prac poświęconych projektowaniu efektywnych inhibitorów STS, zaproponował alternatywny, choć nadal dyskusyjny mechanizm reakcji [64]. Dzięki wykorzystaniu metody wiszącej kropli, autorzy z powodzeniem otrzymali kryształ *PaAtsA* po inkubacji enzymu z **Irosustatem**, który odpowiedzialny był w eksperymencie za całkowitą inhibicję STS. Otrzymane wyniki, choć niekomplementarne z otrzymanymi przez zespół prof. Williams’a [61–63], przyniosły interesujący oraz istotny wgląd w poznanie mechanizmu hamowania aktywności białka. Analiza struktury krystalograficznej potwierdziła kowalencyjną zmianę w otoczeniu aminokwasu fGly75, bez modyfikacji w otoczeniach aminokwasów lizyny oraz histydyny w centrum aktywnym. Ponadto, gęstość elektronowa oznaczona za pomocą metod rentgenograficznych, posiadała charakterystyczną, tetragonalną formę znajdującą się w otoczeniu jonu Ca^{2+} połączoną z jedną z grup hydroksylowych aminokwasu fGly75, przy nienaruszonej strukturze drugiej grupy –OH.

Na podstawie otrzymanych wyników zaproponowano trzy formy, które mogą reprezentować trwałe, kowalencyjne związanie fGly75 z farmakoforem, odpowiedzialnym za dezaktywację enzymu (**Rysunek 1.9**). W oparciu o hipotezę zaproponowaną przez prof. Williams’a, z teoretycznego punktu widzenia najbardziej faworyzowaną formą adduktu był *N*-siarczan iminy (**Addukt B, Rysunek 1.9**). Jednak na podstawie wyników otrzymanych przez zespół prof. Barry’ego Pottera, forma ta została zakwestionowana co wynikało z obecności drugiej grupy hydroksylowej aminokwasu fGly75 połączonej w formę tetragonalną z ugrupowaniem amidosiarczanowym w otrzymanej strukturze krystalograficznej [64]. W związku z powyższym, najbardziej prawdopodobnymi adduktami zablokowanej *gem*-diolowej fGly75 są **Addukt C** oraz

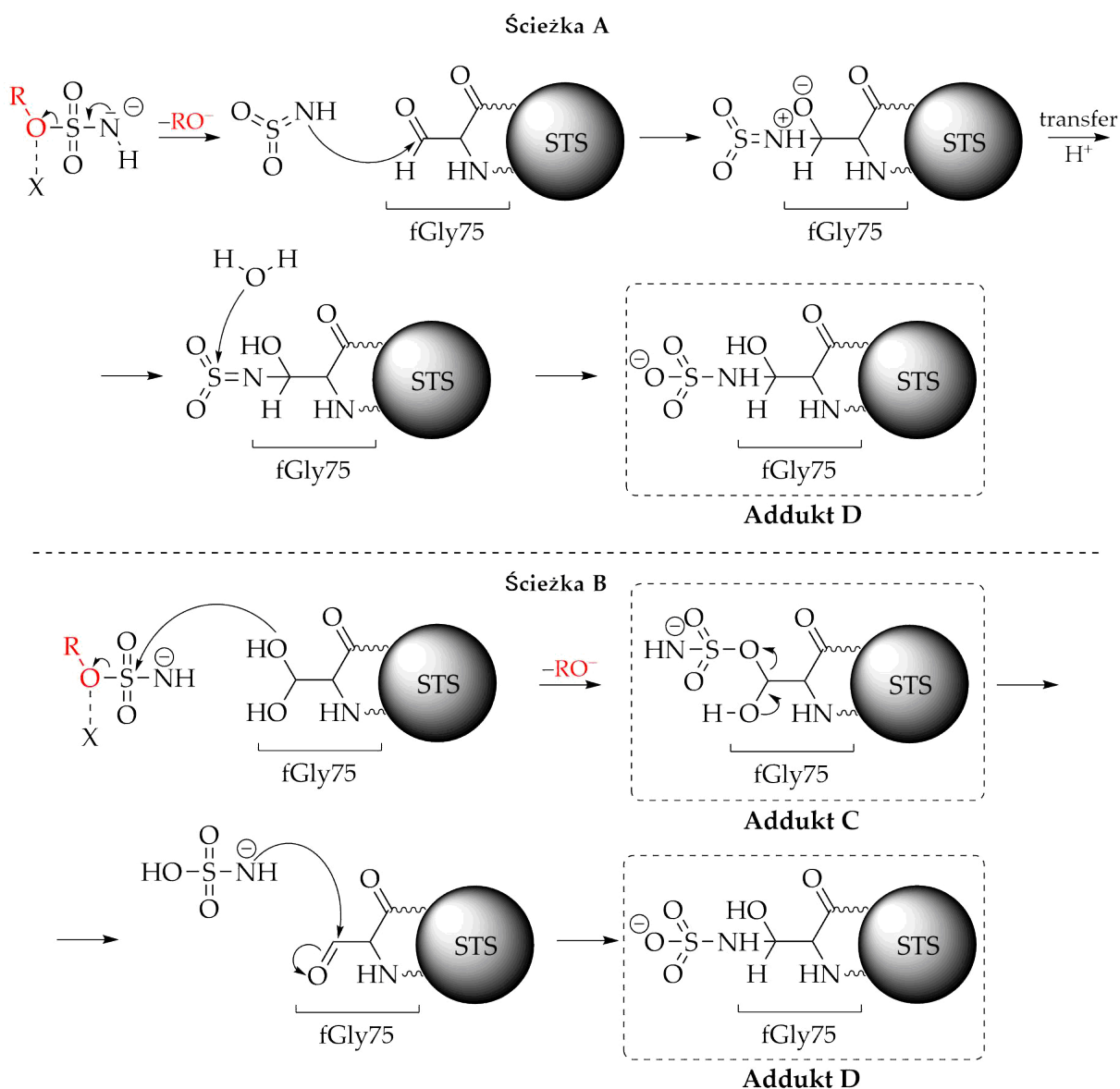


Rysunek 1.9: Proponowane formy fGly75 w centrum aktywnym STS po inkubacji z inhibitorem.

Addukt A – siarczan fGly w formie spoczynkowej, **Addukt B** – addukt fGly z ugrupowaniem amidosiarczanowym połączony przez wiązanie iminowe, **Addukt C** – addukt fGly z ugrupowaniem amidosiarczanowym połączony przez atom tlenu oraz **Addukt D** – addukt fGly z ugrupowaniem amidosiarczanowym połączony przez atom azotu. W powyższej grafice nie uwzględniono stereochemii atomu C β fGly75

Addukt D przedstawione na **Rysunku 1.9**. Niestety, w wyniku analizy danych otrzymanych metodą dyfrakcji rentgenowskiej, rozróżnienie połączenia ugrupowania amidosiarczanowego z fGly75 przez atom tlenu lub azotu okazało się niemożliwe. Niemniej jednak, na podstawie rozważań teoretycznych zasugerowano, iż połączenie kowalencyjne *gem*-diolowej fGly75 z funkcją amidosiarczanową poprzez atom tlenu jest niekorzystne z energetycznego punktu widzenia [63]. Oznacza to, iż najbardziej prawdopodobną formą występującą w nieaktywnej biologicznie STS jest **Addukt D** zobrazowany na **Rysunku 1.9**.

Wobec powyższego, mechanizm reakcji inhibicji STS można przedstawić następująco – **Ścieżka A** (**Rysunek 1.10**) zakłada w pierwszym etapie aktywację ugrupowania amidosiarczanowego inhibitora w obecności katalitycznie istotnych aminokwasów w centrum aktywnym STS, powodując utworzenie się ugrupowania sulfonylaminowego, które ulega reakcji z aldehydową formą fGly75. Powstały silnie elektrofilowy addukt ulega reakcji substytucji nukleofilowej z cząsteczką wody znajdującą się w centrum katalitycznym, prowadząc do utworzenia się **Adduktu D**. **Ścieżka B** natomiast (**Rysunek 1.10**), zakłada bezpośredni atak *gem*-diolowej formy fGly75 na atom siarki ugrupowania amidosiarczanowego inhibitora, co skutkuje utworzeniem **Adduktu C**. W kolejnym etapie, **Addukt C** może ulegać reakcji odwracalnej, uwalniając cząsteczkę sulfonamidu w formie zjonizowanej, odtwarzając tym samym aldehydową formę fGly75,



Rysunek 1.10: Proponowany mechanizm hamowania aktywności STS za pomocą amidosiarczanowych pochodnych fenoli. W celu jaśniejszego zobrazowania mechanizmu, stereochemia węgla C_β fGly75 nie została uwzględniona

która ulega reakcji z anionem sulfonamidowym, prowadząc finalnie do powstania **Adduktu D**. Prawdopodobne jest to, iż **Addukt D** może posiadać charakter równie odwracalny co **Addukt C** (**Rysunek 1.9**), aczkolwiek istnieje szansa zablokowania reakcji odwracalnej poprzez zmienioną stereochemię aminokwasu. Z drugiej zaś strony, obecność wiązania C_βfGly75-NH, może prowadzić do zakłócenia całej „maszyny” katalitycznej STS, powodując jej trwałą dezaktywację [64].

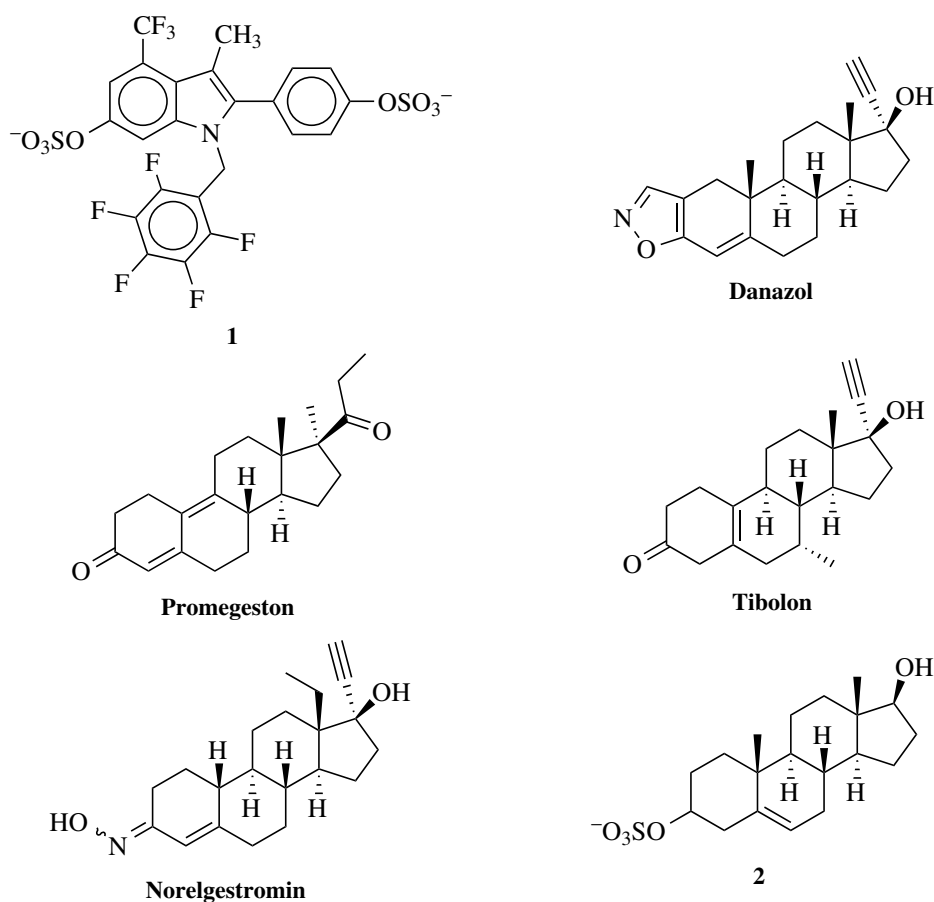
1.6 Inhibitory STS

W ciągu ostatnich trzydziestu lat wiele ośrodków naukowych na świecie prowadziło badania skoncentrowane na poszukiwaniu i rozwoju nowych, skutecznych inhibitorów STS. Do chwili obecnej inhibitory STS można podzielić na kilka kategorii: alternatywne substraty i steroidowe lub niesteroidowe inhibitory odwracalne/nieodwracalne. Na przestrzeni lat, naukowcom udało się otrzymać ogromną bibliotekę związków, wykazujących silne powinowactwo do STS charakteryzujących się zróżnicowaną budową oraz mechanizmem działania. Pomimo opracowania szeregu efektywnych inhibitorów, do dziś tylko jeden został włączony do badań klinicznych – **Irosustat** (wykorzystywany w leczeniu nowotworu piersi, prostaty oraz endometriumu). Niemniej jednak, w literaturze istnieje wiele doniesień sugerujących, iż inhibicja STS może mieć nie tylko korzystny wpływ w terapii HDC, ale również w leczeniu innych schorzeń, np. chorób neurodegeneracyjnych [65].

1.6.1 Inhibitory STS – Alternatywne substraty

Pierwszą klasą związków, zbadanych na początku lat 90-tych ubiegłego wieku, która wykazywała aktywność inhibicyjną wobec STS, była seria pochodnych siarczanów 2-(hydroksyfenylo)indolu, z której najaktywniejsza pochodna (**1**, **Rysunek 1.11**) wykazywała wartość IC_{50} na poziomie 80 μM [66]. W ciągu następnych kilku lat, pozyskano szereg inhibitorów STS z zarówno syntetycznych, jak i naturalnie występujących związków o budowie steroidowej, np. syntetyczny steroid **Danazol**, oraz pochodne progesteronu – **Promegeston**, **Tibolon** oraz **Norelgestromin** (**Rysunek 1.11**).

Pomimo tego, iż ww. związki są analogami steroidów, wykazywały one przeciętne właściwości inhibicyjne wobec STS. Niemniej jednak, są z powodzeniem stosowane w leczeniu endometriozy, w hormonalnej terapii menopauzalnej oraz są wykorzystywane jako środki antykoncepcyjne [67–69]. Najaktywniejszą pochodną pochodzącą z serii analogów steroidów był siarczan 5-androsteno-3 β ,17 β -diol-3-ylu wykazujący wartość IC_{50} równą 2 μM (**2**, **Rysunek 1.11**). Niestety, ograniczeniem dla zastosowania alternatywnych substratów, których budowa opiera się na strukturze steroidu, jest ich metabolizowanie *in vivo* prowadzące do formowania się cząsteczek posiadających właściwości estrogenowe. Z tej przyczyny posiadały one silny charakter mitogeny, ograniczający tym samym ich zastosowanie w terapii chorób nowotworowych o podłożu hormonozależnym.

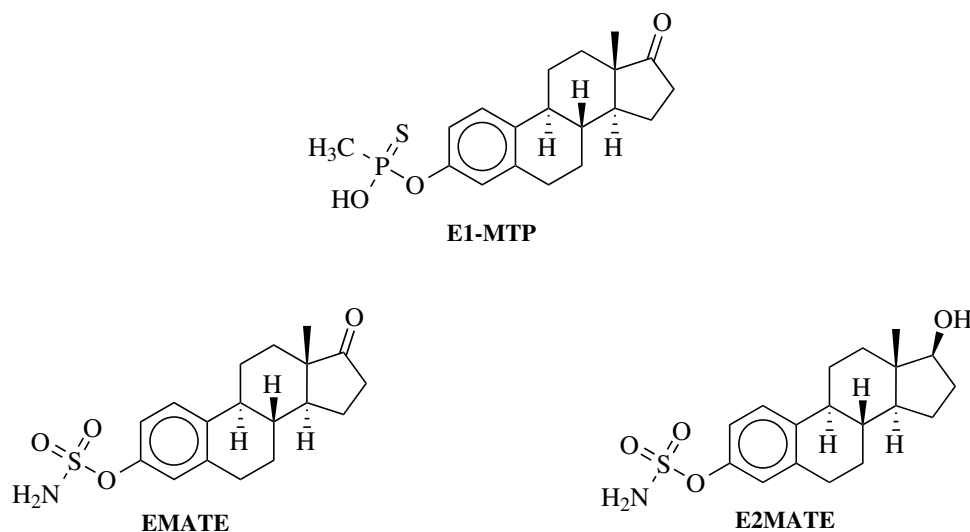


Rysunek 1.11: Struktury chemiczne inhibitorów STS o budowie steroidowej

1.6.2 Nieodwracalne, steroidowe inhibitory STS

W kolejnych latach, zintensyfikowano prace mające na celu zaprojektowanie oraz otrzymanie efektywnych, odwracalnych inhibitorów STS. Nieoceniony wkład w rozwój inhibitorów STS miał prof. Barry Victor Lloyd Potter z Uniwersytetu Oksfordzkiego. Jego zespół początkowo koncentrował się na zastąpieniu grupy siarczanowej naturalnych substratów STS jej analogami tj. ugrupowaniami fosfonowymi, metylootiofosforowymi, sulfonianowymi, sulfonamidowymi halogenkami sulfonylu i metylenosulfonianami [70–76]. Związki projektowane były w taki sposób, aby skutecznie konkurować z naturalnymi substratami STS przy jednoczesnym zachowaniu stabilności metabolicznej.

Jednym z pierwszych związków, wykazujących obiecujące właściwości inhibicyjne o charakterze odwracalnym był **E1-MTP (Rysunek 1.12)**, posiadający ugrupowanie metylootiofosforianowe. Związek ten zapoczątkował późniejszy rozwój inhibitorów steroidowych, zawierających w swojej strukturze chemicznej ugrupowania amidosiarczanowe. Jednym z największych od-



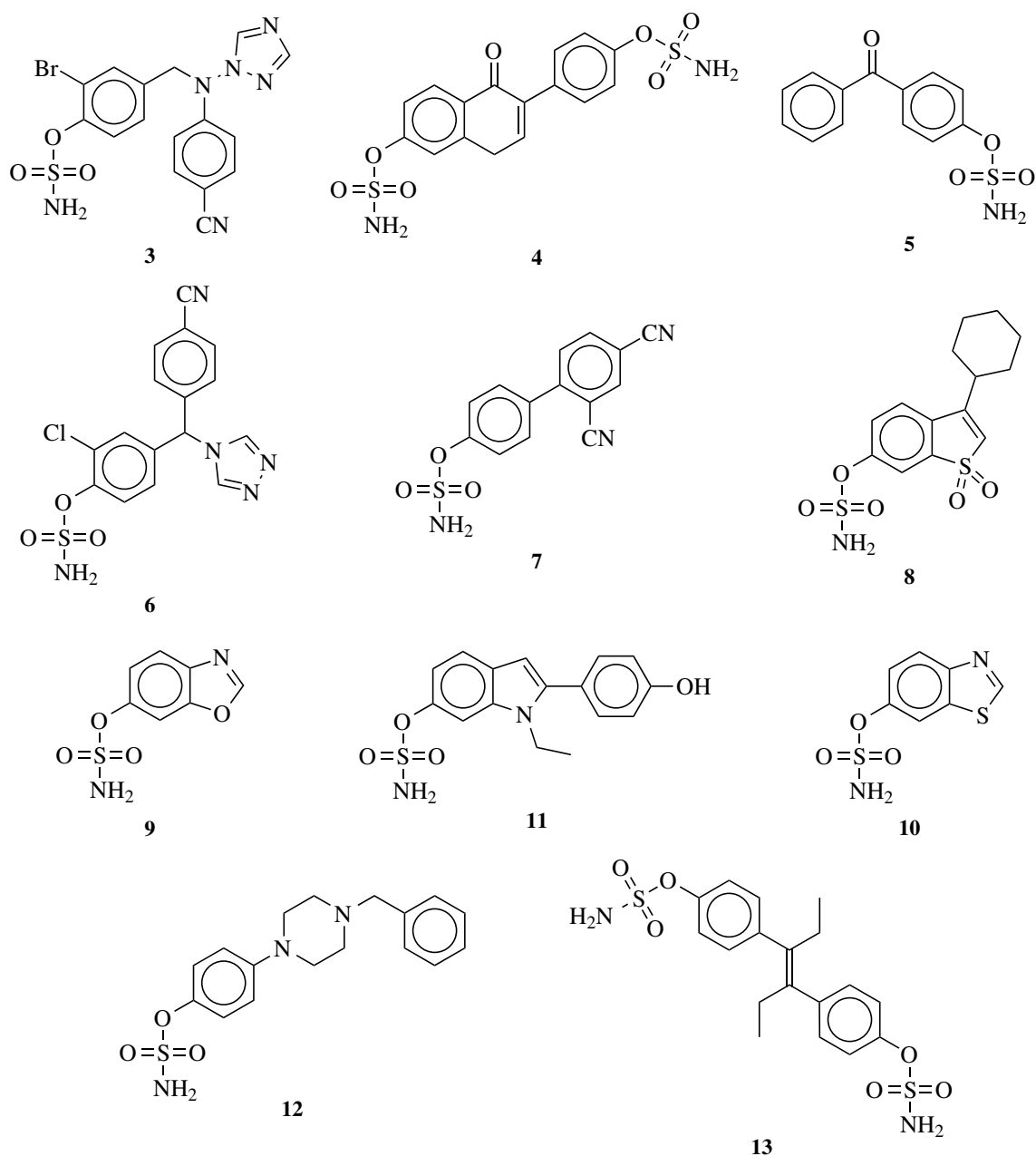
Rysunek 1.12: Struktury chemiczne wybranych inhibitorów STS

kryć w poszukiwaniu skutecznych inhibitorów STS było otrzymanie właśnie amidosiarczanu estronu (**EMATE**, **Rysunek 1.12**) oraz amidosiarczanu estradiolu (**E2MATE**, **Rysunek 1.12**). Związki te jako pierwsze charakteryzowały się nieodwracalnym mechanizmem inhibicji STS. **EMATE** wykazywał ekstremalnie wysoką skuteczność inhibicyjną, charakteryzując się wartością IC_{50} na poziomie 65 pM [77, 78]. Pomimo wysokiego potencjału **EMATE** nie został włączony do klinicznych badań eksperymentalnych, z powodu silnych właściwości estrogenowych jego metabolitu, wykazując 5-krotnie wyższą aktywność od etynyloestradiolu (powszechnie stosowanego środka antykoncepcyjnego) podczas prowadzonych badań *in vivo* [79].

Niemniej jednak, bardzo wysoki potencjał estrogeny **E2MATE** został wykorzystany w badaniach klinicznych w hormonalnej terapii zastępczej, w których to amidosiarczan estradiolu stosowany był jako pro-lek. Niestety, pomimo obiecujących wyników w I oraz II etapie badań klinicznych, w których udowodniono bezpieczny oraz bardzo dobrze tolerowany profil terapeutyczny **E2MATE**, dalsze eksperymenty zostały przerwane ze względu na dezaktywację spowodowaną transformacją metaboliczną zachodzącą na atomie węgla C17 [80, 81].

1.6.3 Nieodwracalne, niesteroidowe inhibitory STS

Właściwości estrogenowe inhibitorów STS w sposób negatywny wpływały na otrzymywane rezultaty prowadzonych badań *in vivo* oraz *in vitro*. Metabolity steroidowych analogów znacząco indukowały wzrost hormonozależnych komórek nowotworowych. Z tego powodu, rozpoczęto poszukiwania inhibitorów STS charakteryzujących się silnymi właściwościami inhibycyjnymi (najczęściej wynikającymi z obecności grupy amidosiarczanowej, odpowiedzialnej za



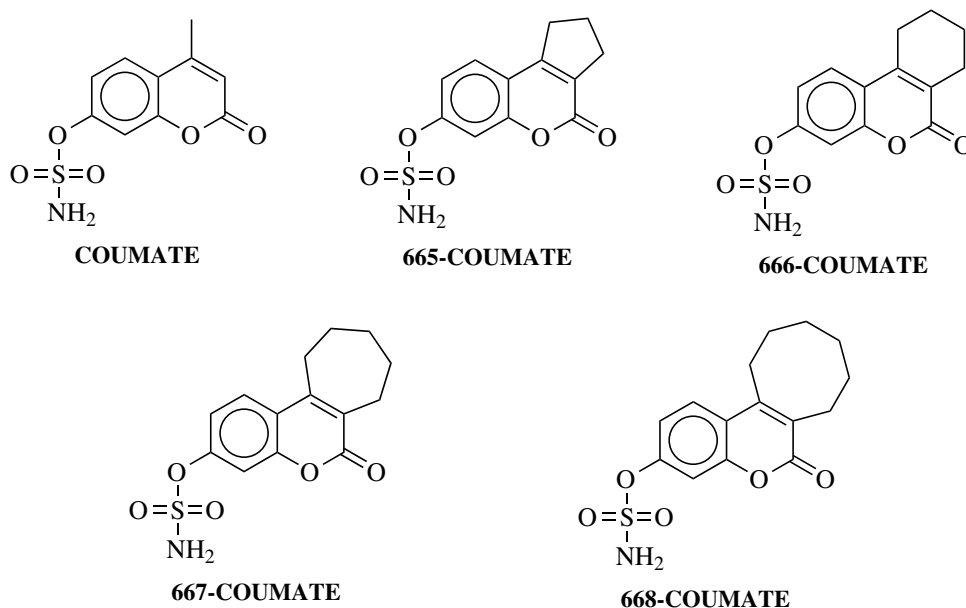
Rysunek 1.13: Przykłady amidosiarczanowych inhibitorów STS o budowie niesteroidowej

permanentne zablokowanie aktywności biologicznej enzymu), niewykazujących właściwości estrogenowych. Cel ten został osiągnięty dzięki przyjętej strategii projektowania związków o budowie silnie imitującej strukturę steroidów. W ramach prowadzonych badań naukowcom udało się pozyskać setki pochodnych, będących wysoce efektywnymi inhibitorami STS o budowie niesteroidowej, np. amidosiarczanowe pochodne benzofenonu, 1,2,4-triazolu, imidazolu, bifenolu, benzoksatiazolu, benzotiazolu, fenyloindolu, tiofenu, benzotiofenu, karboranu, adamantylu, tyraminy, flawonoidów, piperazyny oraz chromenonu (**Rysunek 1.13**) [65, 82–91].

Wśród amidosiarczanowych pochodnych inhibitorów STS, najbardziej obiecującymi pochodnymi były analogi 7-hydroksy-2-okso-2*H*-chromen-7-ylu. Pierwszym z nich, który wykazywał dobrą aktywność biologiczną w teście mikrosomalnym ($IC_{50} = 380$ nM), był amidosiarczan 4-metylo-2-okso-2*H*-chromen-7-ylu (**COUMATE**, **Rysunek 1.14**), zdolny do zablokowania aktywności STS w 90% w testach *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowej MCF-7 przy stężeniu 10 μ M [92]. Dalszy rozwój pochodnych kumaryn doprowadził do opracowania ich trójcyklicznych analogów, zawierających w strukturze nasycony pierścień alicykliczny składający się od pięciu do ośmiu atomów węgla (**Rysunek 1.14**) [93]. Spośród nich, najwyższą aktywnością charakteryzowały się pochodne **666-COUMATE** oraz **667-COUMATE** posiadające wartości IC_{50} w teście komórkowym na poziomie odpowiednio 70 nM oraz 8 nM. Jak się okazało, dalsze zwiększanie wielkości pierścienia alicyklicznego powodowało spadek aktywności (wartość IC_{50} dla **COUMATE-668**, **Rysunek 1.14** wyniosła 30 nM). Na podstawie otrzymanych wyników do dalszych eksperymentów wyselekcjonowano **667-COUMATE** (znany również pod nazwą **Irosustat**, **STX64** oraz **BN83495**), który w przeprowadzonych badaniach *in vitro* oraz *in vivo* nie wykazywał właściwości estrogenowych. [93].

1.6.4 Irosustat – Badania kliniczne

Irosustat jako jedyny ze wszystkich otrzymanych inhibitorów STS, został zakwalifikowany do etapu badań klinicznych, w których badano jego potencjał w leczeniu HDC (piersi, prostaty, macicy oraz endometrium). W przeprowadzonych badaniach klinicznych ustalono, iż aktywność STS we krwi obwodowej oraz komórkach raka piersi u kobiet w okresie postmenopauzalnym spadła do zaledwie 1% po pięciu dniach stosowania leku w dawce 20 mg/kg masy ciała [94]. Ponadto, podczas prowadzonych eksperymentów zaobserwowano spadek stężeń E1, E2, Adiolu, DHEA oraz, co ciekawe, testosteronu i androstendionu (średni spadek stężeń dla E1 – 57-76%, E2 – 38-39%, testosteronu – 27-30%, androstenedionu – 62-72%) [94]. W pierwszym etapie badań klinicznych z powodzeniem określono optymalną dawkę wynoszącą 40 mg/kg masy ciała (przy jednoczesnym nieosiągnięciu maksymalnej tolerowanej dawki, pomimo zastosowania dawki wynoszącej 80 mg/kg masy ciała) oraz zauważono niepożądane skutki uboczne w postaci



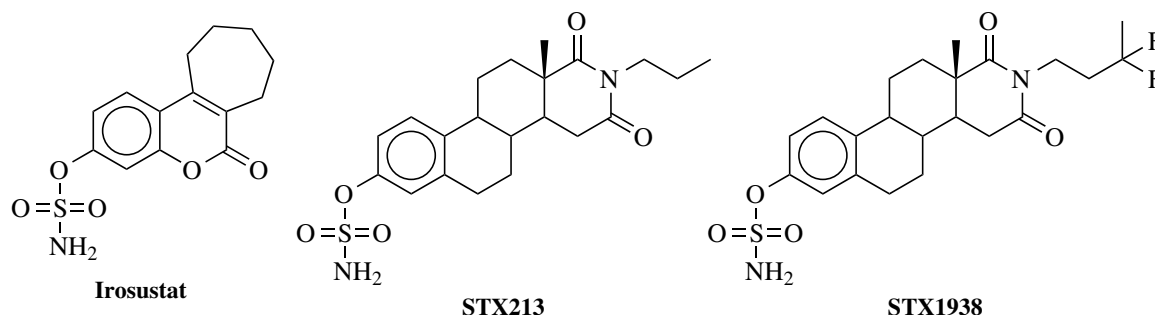
Rysunek 1.14: Struktury chemiczne inhibitorów STS na bazie amidosiarczanowych pochodnych 2-okso-2*H*-chromen-7-ylu

suchej skóry [95]. Uzyskane rezultaty wykazały, że terapia pacjentów leczonych przy wykorzystaniu inhibitora STS prowadziła do stabilizacji choroby oraz braku jej rozwoju w okresie od 24 do nawet 72 tygodni [95].

Stosowanie leków odpowiedzialnych za regulację ilości estrogenów w organizmie (głównie inhibitorów aromatazy) często prowadzi do powstawania swoistej oporności nowotworu na terapię hormonalną. Zjawisko to wynika z pojawiających się mutacji, odpowiedzialnych za podwyższenie stężenia STS oraz 17β-HSD w komórkach nowotworowych, zwiększających ilość wytwarzanych steroidów [96, 97]. W związku z powyższym, w II etapie badań klinicznych zastosowano terapię skojarzoną poprzez kombinację inhibitora aromatazy oraz **Irosustatu**. W toku prowadzonych eksperymentów udowodniono, iż terapia ta prowadziła do dłuższej stabilizacji choroby oraz braku progresji guza [98]. Badania kliniczne z udziałem **Irosustatu** zostały również przeprowadzone u pacjentów ze zdiagnozowanym zaawansowanym rakiem macicy, charakteryzującym się silną nadekspresją STS. Niestety, otrzymane wyniki terapii statystycznie nie różniły się od metod stosowanych obecnie (octan megestrolu), co było powodem wczesnego zakończenia badań klinicznych [99]. Dane literaturowe sugerują, iż zablokowanie funkcji enzymatycznej STS może być kluczowe w leczeniu nowotworu prostaty, jajników, pęcherza moczowego oraz jelita grubego. Niemniej jednak, przeprowadzenie wielu dodatkowych badań jest konieczne, w celu potwierdzenia stawianych hipotez [64, 100–103].

1.6.5 Kolejne generacje inhibitorów STS oraz inhibitory dualne

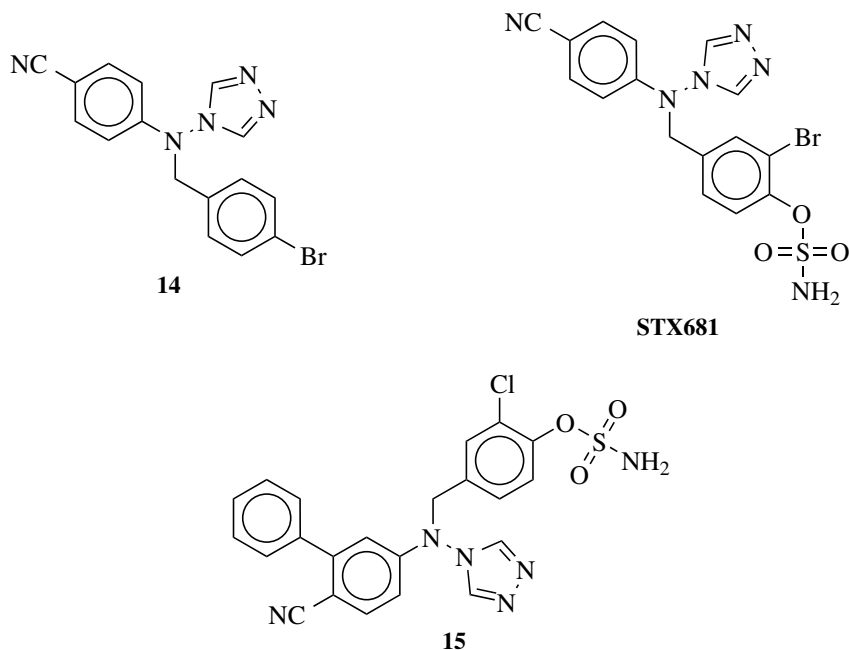
Wysoka wrażliwość tkanki zmienionej nowotworowo na obecność steroidów, których stężenie w skali pikomolarnej powoduje odpowiedź ER prowadząc do przyspieszenia rozrostu raka sprawia, iż projektowanie inhibitorów STS o lepszym profilu farmakodynamicznym i wyższej aktywności jest nadal silnie pożądane. Następtwem tego było otrzymanie steroidowych analogów *N*-propylopiperydynodionu (**STX213** oraz **STX1938**, **Rysunek 1.15**), które posiadały znacznie dłuższy okres działania niż **Irosustat** oraz charakteryzowały się znacznie wyższą aktywnością. W badaniach wykazano, iż po podaniu gryzoniom pojedynczej dawki **Irosustatu** w ilości 10 mg/kg masy ciała, STS odzyskała swoją aktywność w 50% już pod czterech dniach od podania, podczas gdy po podaniu takiej samej ilości **STX213**, czas ten wydłużył się do dwunastu dni [104]. Ponadto, inhibitory **STX213** oraz **STX1938** w ksenograftowym modelu raka piersi, były zdolne do zahamowania rozrostu nowotworu w 67%, podczas gdy **Irosustat** osiągnął rezultat na poziomie 50% [105]. Słabszy efekt działania spowodowany był niecałkowitym zablokowaniem aktywności STS przez **Irosustat**, pomimo stosowania takiej samej dawki [106]. Oznacza to, iż kompletna inhibicja STS jest niezbędna do osiągnięcia zadowalających rezultatów w leczeniu pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem wykazującym charakter hormonozależny.



Rysunek 1.15: Struktury chemiczne inhibitorów STS na bazie amidosiarczanowych pochodnych *N*-propylopiperydynodionu

Badania kliniczne potwierdziły wysoką efektywność terapii inhibitorem STS u pacjentów z HDBC. Ponieważ STS nie jest jedynym enzymem, który odpowiada za biosyntezę steroidów, a jest raczej jedną z możliwości ich formowania, kluczowe byłoby przeprowadzenie badań klinicznych, które polegałyby na zablokowaniu wszystkich możliwych szlaków steroidogenezy. Pomimo iż przeprowadzono wstępne badania, w których **Irosustat** był podawany wraz z inhibitorem aromatazy, korzystne byłoby stosowanie jednego związku wykazującego właściwości inhibicyjne wobec obu enzymów. Dotychczasowe badania sugerują, iż stosowanie jednego leku przynosi korzyści w badaniach klinicznych w porównaniu ze stosowaniem kilku leków, w szczególności kiedy dotyczą one ustalania efektów toksycznych. Ponadto, podejście oparte na zastosowaniu jednej substancji pozwoliłoby na uniknięcie interakcji między związkami i prowadziłoby do prostszych,

przedklinicznych badań skuteczności dawki. Co więcej, ponieważ nowotwory posiadają zdolność rozwijania oporności na stosowanie pojedynczych leków celowanych, zastosowanie substancji o właściwościach dualnych mogłoby przewyciężyć tę oporność [107].



Rysunek 1.16: Struktury chemiczne inhibitorów STS wykazujących aktywność wobec STS oraz kompleksu aromatazy

Pierwsze inhibitory dualne aromatazy-sulfatazy (DASI, ang. *Dual Aromatase-Sulfatase Inhibitors*) były projektowane na bazie pochodnych dihydroksyizoflawonu. Wprowadzenie ugrupowań amidosiarczanowych do struktury ww. związku umożliwiło zablokowanie funkcji enzymatycznej STS jak i aromatazy niestety na umiarkowanym poziomie [108–110]. Dalsze prace nad inhibitorami DASI doprowadziły do otrzymania amidosiarczanu 4-(((4-cyjanofenylo)(4H-1,2,4-triazol-4-ilo)amino)metylo)fenylu – w wyniku modyfikacji struktury związku 14 (silnego inhibitora aromatazy $IC_{50} = 0,5$ nM, **Rysunek 1.16**), polegającej na wprowadzeniu ugrupowania amidosiarczanowego w miejsce atomu bromu, zapewniając tym samym właściwości inhibicyjne wobec STS ($IC_{50} = 0,82$ nM) i nieznacznie obniżając aktywność wobec kompleksu aromatazy ($IC_{50} = 36$ nM). Testy *in vivo* udowodniły, iż związek ten zdolny był do zahamowania aktywności STS w 72% oraz aromatazy w 85% już po 24 godzinach od podania. Kolejne modyfikacje ww. związku doprowadziły do otrzymania bromowanej pochodnej w pozycji *orto* w stosunku do ugrupowania amidosiarczanowego – **STX681** (**Rysunek 1.16**). Jak się okazało, aktywność pochodnej wobec STS oraz aromatazy wzrosła kilkukrotnie, umożliwiając zahamowanie ich aktywności do poziomu odpowiednio 98 i 82% w testach *in vivo*. Ponadto, szereg eksperymentów z wykorzystaniem ksenograflowego, szczurzego modelu udowodnił wyższość stosowania związku

o charakterze dualnym, w zestawieniu z terapią skojarzoną. **STX681** wykazał znaczny stopień inhibicji wzrostu nowotworów wykazujących nadekspresję STS (MCF-7_{STS}) oraz aromatazy (MCF-7_A), podczas gdy **Irosustat** zdolny był do zahamowania wzrostu komórek MCF-7_{STS}, nie wykazując aktywności wobec MCF-7_A [111].

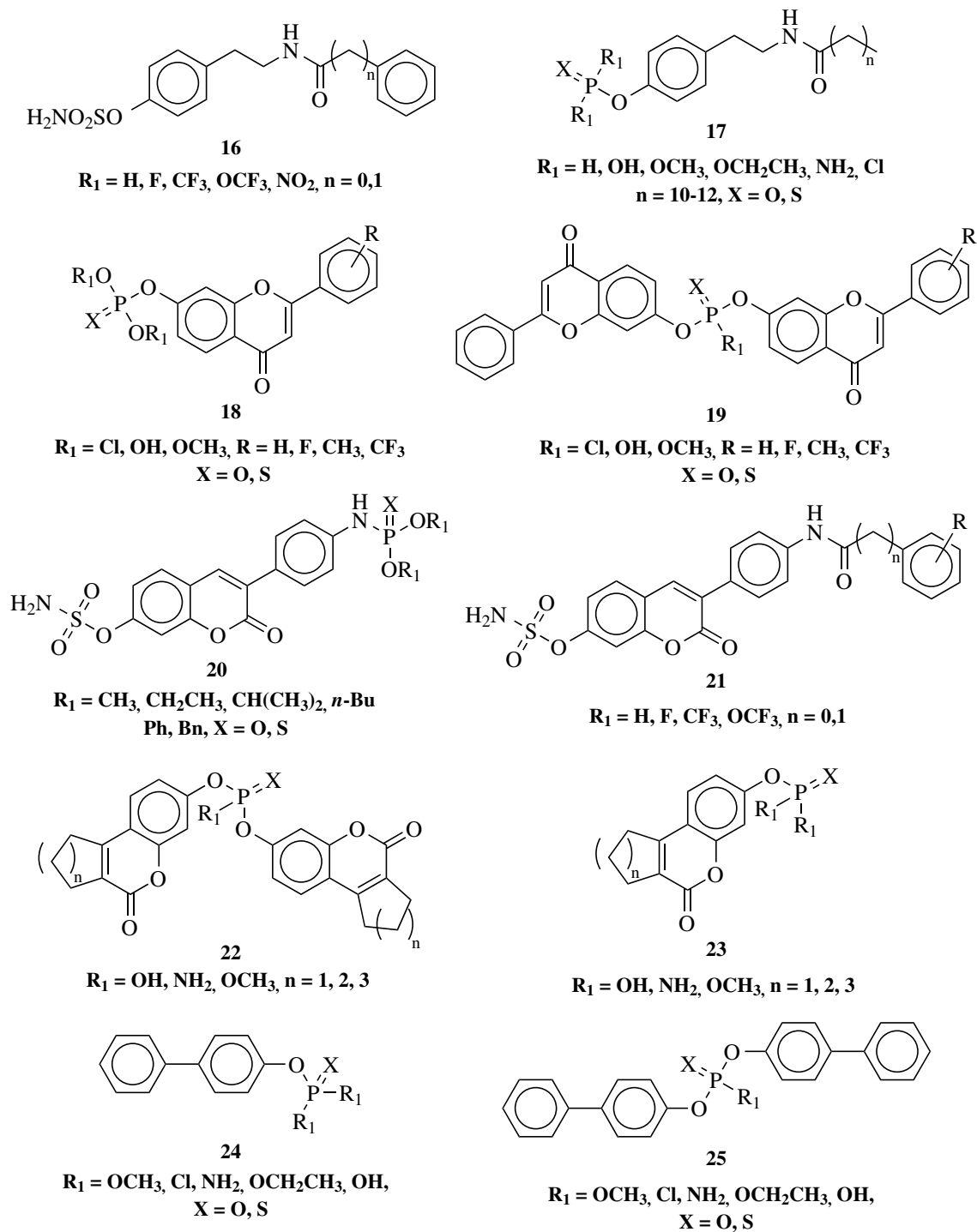
Kontynuacja ww. badań skutkowała otrzymaniem szerokiej gamy związków wykazujących podwójne właściwości inhibicyjne [112]. Jednym z nich, charakteryzującym się wysoką aktywnością biologiczną, był związek **15**, którego strukturę przedstawiłem na **Rysunku 1.16**. Testy komórkowe z udziałem linii nowotworowej JEG-3 wykazały, iż związek **15** posiadał wartość IC₅₀ na poziomie 830 pM oraz 15 pM wobec odpowiednio STS i kompleksu aromatazy.

1.6.6 Rozwój inhibitorów STS w Katedrze Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej

W ciągu ostatnich dziesięciu lat w zespole Katedry Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej prowadzono intensywne badania nad rozwojem nowych, skutecznych inhibitorów STS. Początkowo strategia projektowania inhibitorów zakładała wprowadzenie ugrupowań fosforanowych, amidofosforanowych, tiofosforanowych oraz amidotiofosforanowych jako farmakoforów, odpowiedzialnych za zahamowanie aktywności STS. Choć mechanizm dezaktywacji funkcji biologicznej STS przez ww. ugrupowania nie został do końca zbadany, eksperymenty z zakresu dokowania molekularnego wykazały, iż w centrum aktywnym enzymu istniała możliwość migracji grupy fosforanowej inhibitora lub też przeniesienia grupy metylowej na resztę aminokwasową fGly75. W kolejnych latach, zespół podjął się otrzymywania inhibitorów STS posiadających w swojej strukturze ugrupowanie amidosiarczanowe oraz rdzenie cząsteczek posiadające silnie elektroujemny atom fluoru.

Wśród zaprojektowanych związków można wyróżnić:

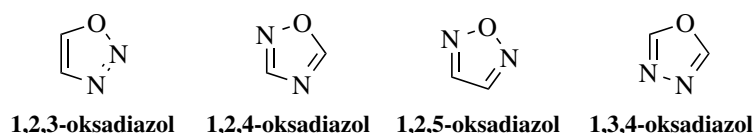
1. Amidosiarczanowe, fosforowe oraz tiofosforowe pochodne tyraminy zawierające w swojej strukturze podstawniki o zróżnicowanym charakterze (Struktury **16** i **17**, **Rysunek 1.17**) [113, 114]
2. Fosforanowe oraz tiofosforanowe pochodne flawonoidów oraz *bis*-flawonoidów (Struktury **18** i **19**, **Rysunek 1.17**) [115]
3. Analogi fosforanowe, tiofosforanowe oraz amidosiarczanowe kumaryn oraz *bis*-kumaryn (Struktury **20-23**, **Rysunek 1.17**) [116–122]
4. Fosforanowe oraz tiofosforanowe analogi bifenyli i *bis*-bifenyli (Struktury **24** oraz **25**, **Rysunek 1.17**) [123]



Rysunek 1.17: Struktury chemiczne inhibitorów STS zaprojektowane w zespole Katedry Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej

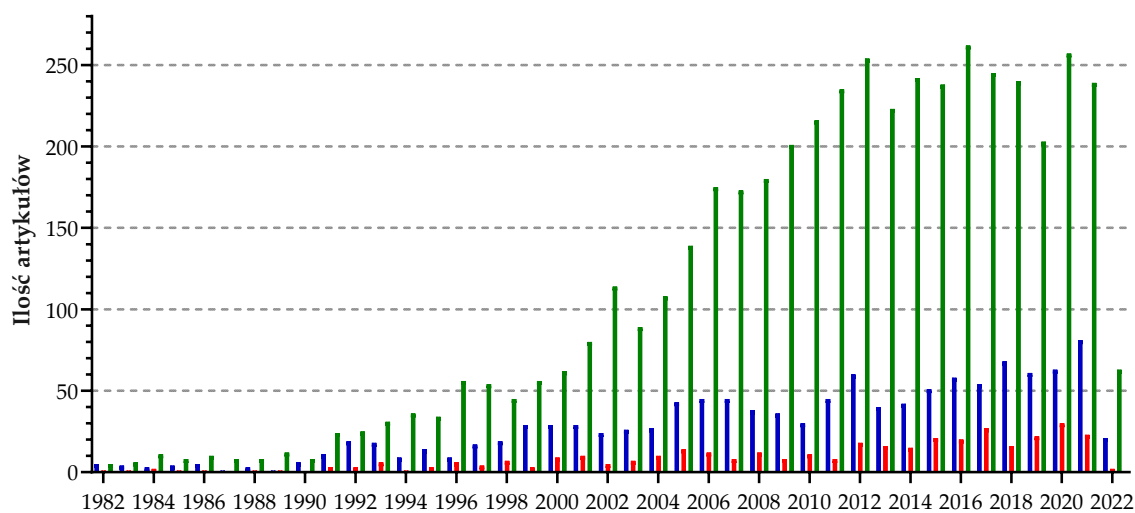
1.7 1,2,4-Oksadiazole

Oksadiazole to pięciocząłowe pierścienie heterocykliczne zawierające w swojej konstytucji jeden atom tlenu oraz dwa atomy azotu (dawniej znane były jako furadiazole). Ze względu na rozmieszczenie heteroatomów możemy wyróżnić cztery izomery oksadiazolu – 1,2,3-oksadiazol, 1,2,4-oksadiazol, 1,2,5-oksadiazol oraz 1,3,4-oksadiazol (**Rysunek 1.18**).



Rysunek 1.18: Struktury chemiczne izomerów oksadiazolu

Spośród nich, największym zainteresowaniem wśród naukowców cieszą się pochodne 1,3,4-oksadiazolu. Znalazły one szerokie zastosowanie nie tylko w medycynie (wykazując właściwości przeciwnowotworowe, przeciwpasożytnicze, przeciwgrzybowe, przeciwbakteryjne, przeciwgruźlicze i przeciwzapalne), ale również w pozostałych dziedzinach tj. w przemyśle materiałów scyntylacyjnych oraz barwników [124–128]. Ponadto, na podstawie analizy danych literaturowych *Web of Science* można wywnioskować, iż badania nad analogami 1,2,4-oksadiazolu intensywnie się rozwijają (**Rysunek 1.19**).



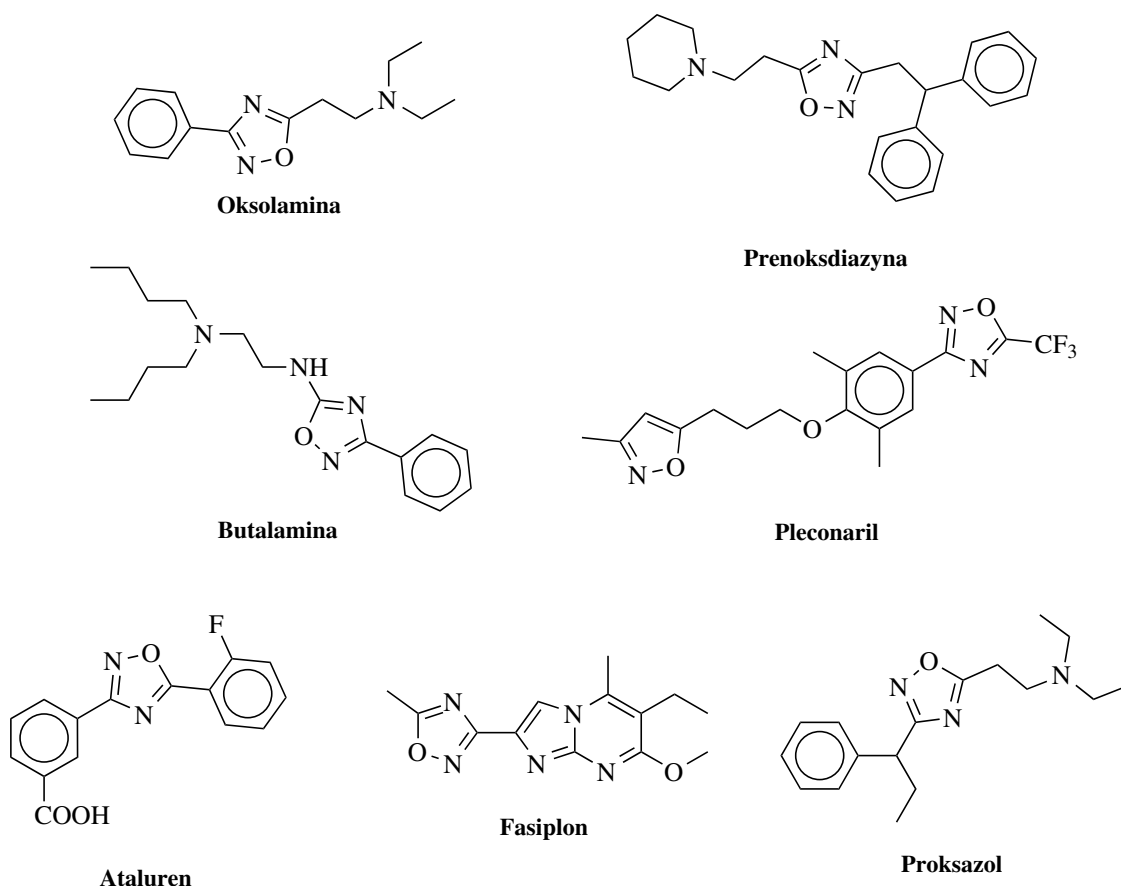
Rysunek 1.19: Ilość artykułów naukowych zawierających słowo kluczowe: „1,2,4-oksadiazol” (niebieski), „1,2,5-oksadiazol” (czerwony), „1,3,4-oksadiazol” (zielony) w latach 1960-2022 [129]

Z drugiej zaś strony, pochodne 1,2,5-oksadiazolu znalazły zastosowanie głównie jako materiały o wysokiej gęstości energii (ang. *High Energy Density Materials*, HEDMs), a także wykazały

właściwości cytotoksyczne [130–132]. Z powodu niestabilności chemicznej 1,2,3-oksadiazolu, co w konsekwencji prowadzi do powstawania pochodnych diazometanu, zastosowanie analogów tego izomeru zostało zbadane w niewielkim stopniu [133].

1.7.1 1,2,4-Oksadiazole – Historia, właściwości i zastosowanie

Pierwsze pochodne zawierające w swojej strukturze pierścień heterocykliczny 1,2,4-oksadiazolu zostały otrzymane na drodze syntetycznej przez Tiemann'a i Krügera w 1884 roku i zostały w owym czasie sklasyfikowane jako związki azoksymów, czy też furo[ab1]diazoli [134]. Potencjał aplikacyjny pochodnych oksadiazolu pozostawał przez długi czas niewykorzystany. Dopiero po 80 latach od odkrycia oksadiazoli naukowcy z powodzeniem przeprowadzili reakcję przegrupowania fotochemicznego ww. heterocykla [135, 136]. Badania biologiczne pochodnych 1,2,4-oksadiazolu rozpoczęły się z początkiem lat 40-tych ubiegłego wieku, gdzie po dwudziestu latach badań otrzymano *N,N*-dietylo-2-(3-fenyl-1,2,4-oksadiazol-5-ilo)etanaminę, związek



Rysunek 1.20: Struktury chemiczne komercyjnie dostępnych leków będących pochodnymi 1,2,4-oksadiazolu

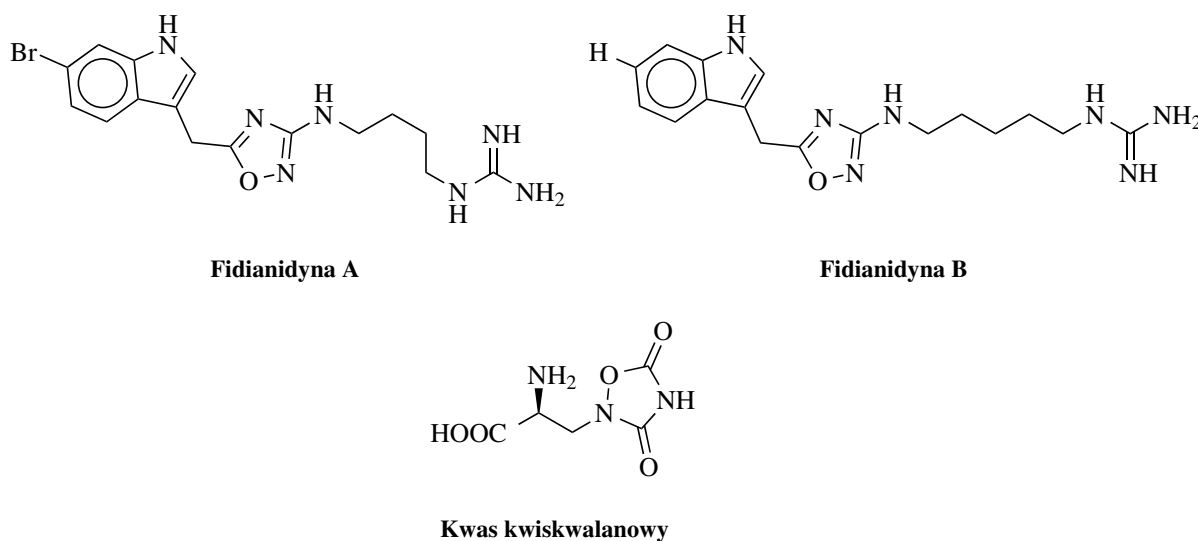
znany również pod nazwą **Oksolamina** (**Rysunek 1.20**) — lek typu First-In-Class stosowany w leczeniu przewlekłego kaszlu [137–139].

W ciągu ostatnich czterdziestu lat, analogi pierścienia heterocyklicznego 1,2,4-oksadiazolu zostały szeroko zbadane, czego wynikiem było otrzymanie związków wykazujących właściwości przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwdrgawkowe, przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwdepresyjne, przeciwingiogenne, przeciwbólowe, przeciwobrzękowe, przeciw pasożytnicze oraz inne. Ponadto wykazano, iż analogi heterocykla 1,2,4-oksadiazolu posiadają silne powinowactwo do deacetylazy sirtuiny, anhidrazy węglanowej, deacetylazy histonowej, kinaz RET, białek wiążących penicylinę, cyklooksygenaz, esteraz cholinowych, hipokretyny, a także do receptorów kappa opioidowych oraz estradiolowych [140–153]. Warto również zwrócić uwagę na fakt, iż niektóre pochodne 1,2,4-oksadiazolu znalazły zastosowanie jako HEDMs oraz supramolekularne ciecze krystaliczne [132, 154–156].

Ponadto, heterocykliczny pierścień 1,2,4-oksadiazolu wykazuje właściwości bioizosteryczne z ugrupowaniem estrowym oraz amidowym, których przyczyną jest zdolnością do tworzenia oddziaływań elektrostatycznych (w głównej mierze oddziaływań wodorowych). Ta właściwość jest szczególnie użyteczna w sytuacji kiedy obserwowana jest niestabilność ww. ugrupowań (przede wszystkim w układach biologicznych). Obecnie na rynku farmaceutycznym dostępnych jest kilka preparatów, których struktura chemiczna substancji aktywnej opiera się na heterocyklicznym pierścieniu 1,2,4-oksadiazolu tj, **Oksolamina**, **Prenoksdiazyna** (substancje przeciwkaszlowe), **Butalamina** (wazodylator), **Pleconaril** (substancja przeciwwirusowa), **Ataluren** (substancja stosowana w leczeniu dystrofii mięśniowej Duchenne’a), **Fasiplon** (substancja przeciwłękowa) oraz **Proksazol** (substancja stosowana w leczeniu zaburzeń czynnościowych układu pokarmowego [157–159]. Struktury ww. substancji aktywnych przedstawiłem na **Rysunku 1.20**).

Co ciekawe, 1,2,4-oksadiazol jest jedynym ze wszystkich czterech izomerów oksadiazolu, który występuje w związkach pochodzenia naturalnego. Otóż, w 2011 roku multidyscyplinarny zespół z Uniwersytetu Neapolskiego oraz Chińskiej Akademii Nauk w Szanghaju wyizolował dwie substancje alkaloidowe z morskiego ślimaka *Phidiana militaris*, nieopisane wówczas w literaturze naukowej – **Fidianidynę A** oraz **Fidianidynę B** (ang. *Phidianidine*, **Rysunek 1.21**) [160]. Naukowcom udało się ustalić, iż wspomniane alkaloidy posiadają właściwości cytotoksyczne wobec wybranych nowotworowych linii komórkowych, a także wykazują selektywne właściwości agonistyczne wobec fosfatazy białkowo-tyrozynowej 1B oraz receptora chemokiny 4 [161, 162].

Kolejnym przykładem związku naturalnego zawierającego w swojej konstytucji heterocykl 1,2,4-oksadiazolu jest kwas kwiskwalanowy (**Rysunek 1.21**) wyizolowany z nasion rośliny azjatyckiej *Quisqualis indica*. Ta alaninowa pochodna wykazuje silne powinowactwo do metabotropowych receptorów glutaminowych typu II oraz IV – atrakcyjnych celów molekularnych w



Rysunek 1.21: Struktury chemiczne pochodnych 1,2,4-oksadiazolu pochodzenia naturalnego

leczeniu udaru, epilepsji czy też chorób neurodegeneracyjnych [163, 164].

1.7.2 1,2,4-Oksadiazole – Metody syntezy

Dotychczas, naukowcom z całego świata udało się opracować kilka metod syntetycznych, umożliwiających otrzymanie analogów 1,2,4-oksadiazolu. Najbardziej popularne z nich obejmują reakcję pochodnych amidoksymowych z aktywowanymi formami kwasów karboksylowych oraz 1,3-dipolarną cykloaddycję pomiędzy nityrami a tlenkami nityli. Jedna z pierwszych metod, opisana prawie 140 lat temu, obejmowała reakcję pochodnej amidoksymu z chlorkiem kwasowym w bardzo wysokiej temperaturze (często poprzez stapianie ze sobą tych dwóch reagentów) [134]. Niemniej jednak, prowadzenie reakcji w tych warunkach skutkowało powstawaniem produktów ubocznych wytwarzanych m.in. w wyniku kondensacji dwóch cząsteczek amidoksymu. Metoda ta została udoskonalona poprzez wprowadzenie katalizatorów – fluorku tetrabutylamoniowego lub pirydyny [165]. Pomimo tego, reakcja kondensacji pochodnych amidoksymowych z kwasami karboksylowymi, posiadającymi aktywowaną funkcję kwasową, znalazła najszersze zastosowanie. W tego typu transformacjach, wykorzystywane są estry metylowe oraz etylowe kwasów karboksylowych, czy też ich formy anhydrydowe oraz kwasy karboksylowe aktywowane przy wykorzystaniu różnorodnych odczynników kondensujących (EDC, DCC, CDI, TBTU, T3P) [166–170]. Niestety, powyższe metody wykazują szereg ograniczeń, głównie wynikających z niskich wydajności reakcji oraz problemów z oczyszczaniem otrzymanej mieszaniny poreakcyjnej.

W ciągu ostatnich kilku lat, w procedurach otrzymywania pochodnych 1,2,4-oksadiazolu zaczęto stosowanie promieniowania mikrofalowego. Reakcja heterocyklizacji pomiędzy chlorkiem

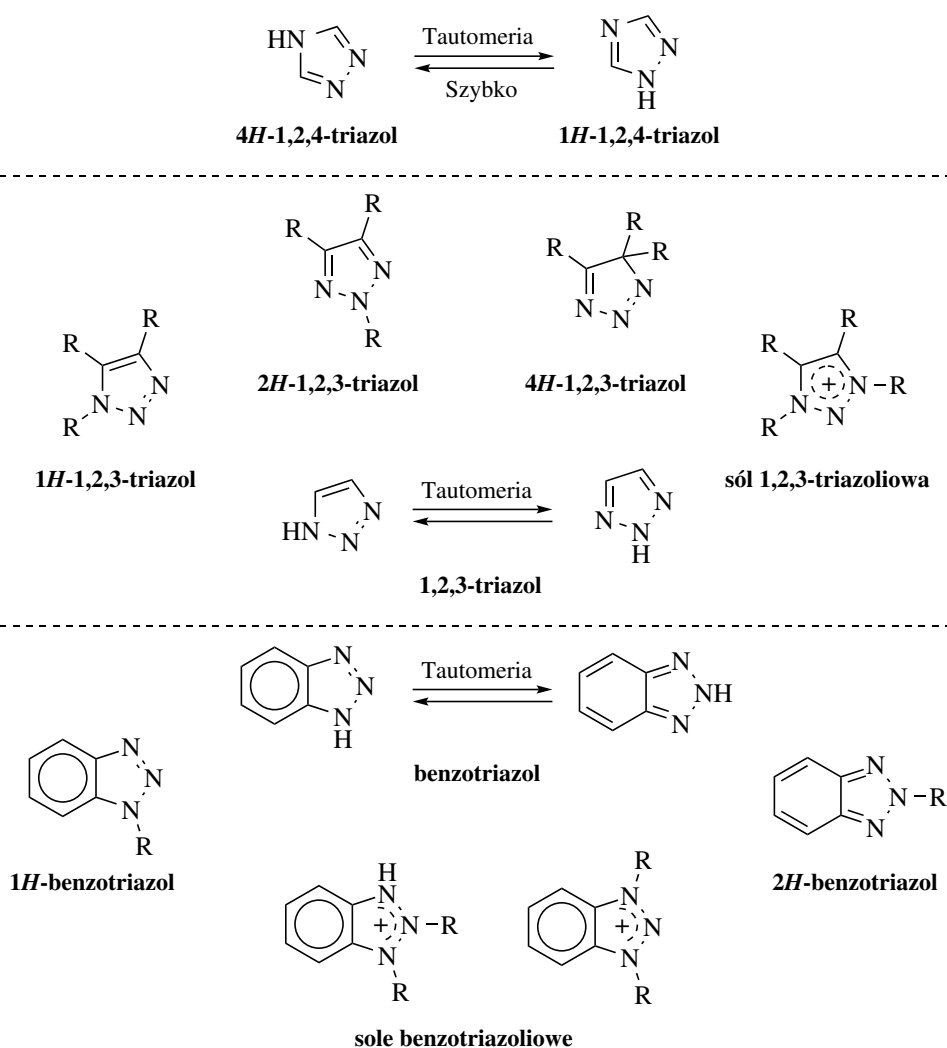
kwasu karboksylowego (lub też jego estrem, w szczególności metylowym) a amidoksymem, pozwoliła na otrzymanie 3,5-dipodstawionych pochodnych 1,2,4-oksadiazolu w nadzwyczaj krótkim czasie oraz z bardzo wysokimi wydajnościami [171, 172]. Ponadto, pomyślnie przeprowadzono reakcję pomiędzy arylową pochodną nityrylu oraz chlorowodorkiem hydroksyloaminy przy udziale promieniowania mikrofalowego oraz odpowiedniego katalizatora (MgO, CH₃COOH lub KF) otrzymując arylową pochodną amidoksymu. Pozwoliło to na opracowanie nieskomplikowanej, dwuetapowej procedury syntetycznej otrzymywania pochodnych 1,2,4-oksadiazolu [173–175].

W literaturze opisane są również metody otrzymywania pochodnych 1,2,4-oksadiazolu wykorzystujące reakcję 1,3-dipolarnej cykloaddycji pomiędzy nityrylami oraz tlenkami nityryli. Niestety, niska reaktywność wiązania potrójnego funkcji $-C\equiv N$ oraz wysokie prawdopodobieństwo powstawania niepożądanych produktów ubocznych (2-okso-1,2,5-oksadiazolu oraz 4-okso-1,2,4-oksadiazolu w wyniku reakcji dimeryzacji tlenków nityryli) eliminuje wykorzystanie powyższej procedury w skali przemysłowej [176–178].

Więcej informacji na temat metod syntezy analogów 1,2,4-oksadiazolu oraz ich zastosowania zostało zawartych we wspólnej pracy przeglądowej – **Biernacki K.**, Daśko M., Ciupak O., Kubiński K., Rachon J., Demkowicz S.; *Novel 1,2,4-Oxadiazole Derivatives in Drug Discovery. Pharmaceuticals* **2020**, *13*, E111

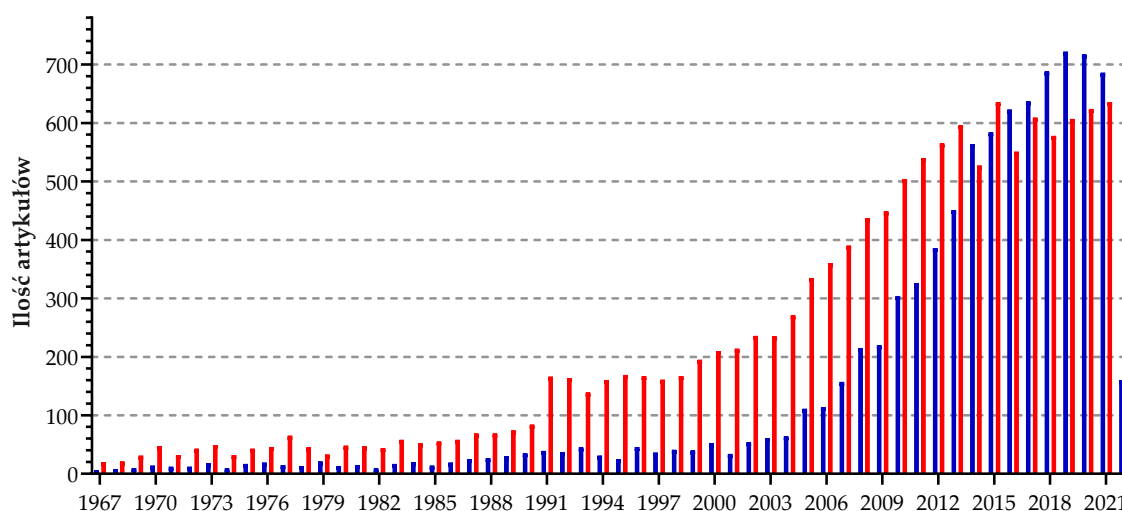
1.8 Triazole

Triazole to grupa związków heterocyklicznych o charakterze aromatycznym, składających się z trzech atomów azotu oraz dwóch atomów węgla, z których wszystkie posiadają hybrydyzację typu sp^2 . Z racji obecności trzech heteroatomów w strukturze pierścienia, triazole występują w postaci dwóch izomerów – 1,2,3-triazolu oraz 1,2,4-triazolu. 1,2,4-Triazole występują w postaci dwóch form izomerycznych, których rozdzielenie jest niezwykle utrudnione ze względu na bardzo szybko zachodzący proces tautomerizacji. Z drugiej zaś strony, związki 1,2,3-triazoli mogą być podzielone na monocykliczne związki 1,2,3-triazolu oraz benzotriazole (z których obydwa analogi mogą występować w postaci 3 różnych form), a także sole 1,2,3-triazoliowe (**Rysunek 1.22**).



Rysunek 1.22: Tautomeria pierścienia heterocyklicznego 1,2,4-triazolu, oraz klasyfikacja związków 1,2,3-triazolu

Na uwagę zasługują fakt, iż chemia związków triazolu oraz ich potencjał aplikacyjny od wielu lat przyciąga uwagę naukowców z całego świata, czego rezultatem jest ogromna ilość artykułów naukowych pojawiających się na temat zastosowania oraz otrzymywania tych właśnie pochodnych związków heterocyklicznych (**Rysunek 1.23**). Należy podkreślić, iż w ciągu ostatnich dwóch dekad, zainteresowanie pochodnymi 1,2,3-triazolu znacznie wzrosło, czego konsekwencją było opracowanie szeregu wydajnych metod ich otrzymywania (szczegóły patrz podrozdział 1.8.2).

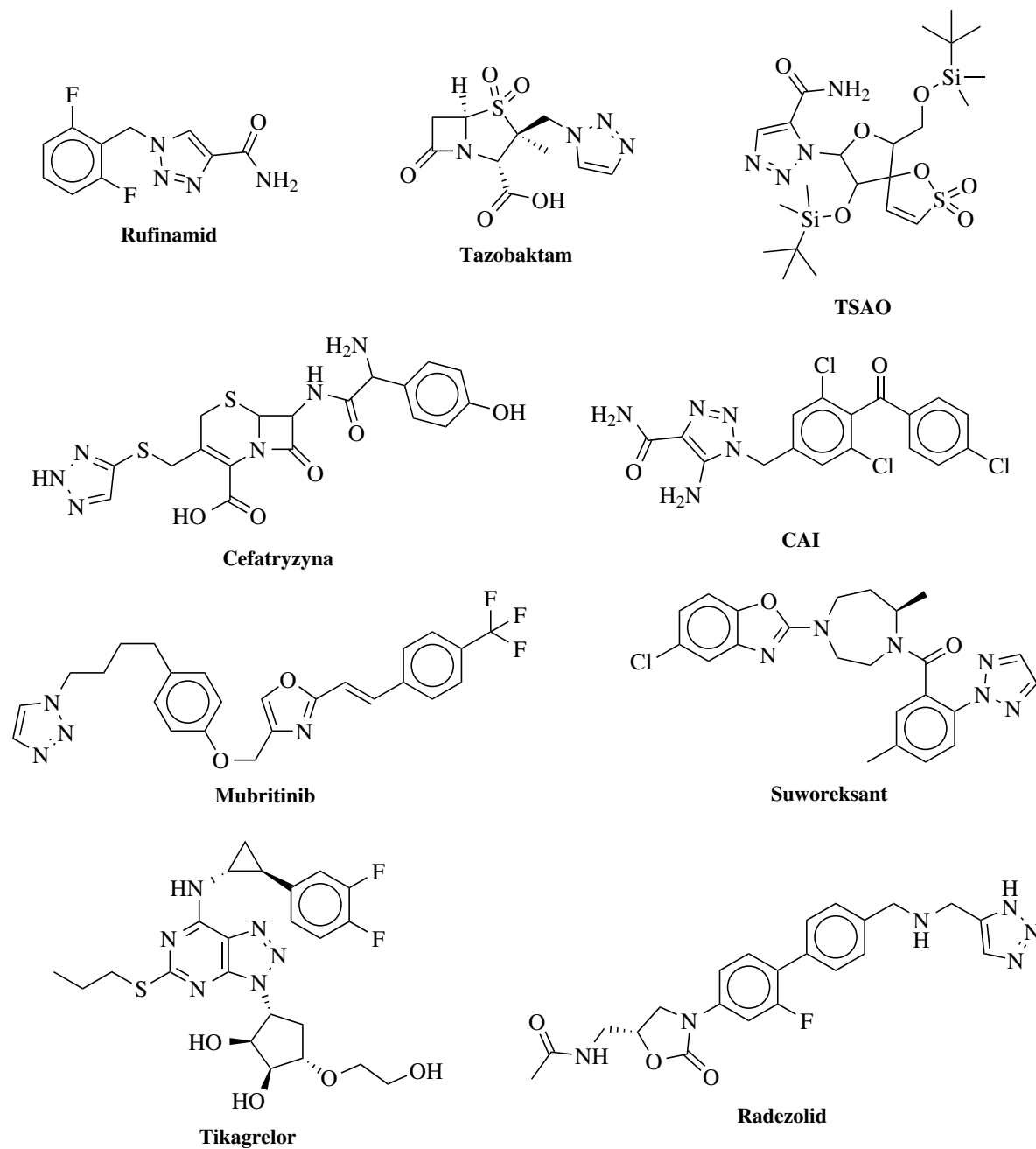


Rysunek 1.23: Ilość artykułów naukowych zawierających słowo kluczowe: „1,2,3-triazol” (niebieski) oraz „1,2,4-triazol” (czerwony) w latach 1965-2022 [129]

Notabene, związki których struktura opiera się na pierścieniu heterocyklicznym 1,2,4-triazolu, znalazły najszersze zastosowanie jako substancje przeciwgrzybicze. Powodem tego jest silna zdolność koordynacyjna tego heterocykla do kationów żelaza. Ponadto, analogi ww. pierścienia wykazują szereg innych właściwości biologicznych m.in. przeciwbakteryjne, przeciwgruźlicze, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwdrgawkowe, antyseptyczne i przeciwwirusowe [179–194]. Dodatkowo, niektóre pochodne 1,2,4-triazolu znalazły zastosowanie w przemyśle fotowoltaicznym, elektronicznym oraz w chemii materiałów [195].

1.8.1 1,2,3-Triazole – Historia, właściwości i zastosowanie

Przyjmuje się, iż określenie pierścienia heterocyklicznego „triazol” zostało wprowadzone przez Baldin’a w 1855 roku, kiedy to opisano związek składający się z dwóch atomów węgla, trzech atomów wodoru i trzech atomów azotu [196]. Od tamtego czasu naukowcom na całym świecie udało się otrzymać niezliczoną ilość pochodnych triazolu, znajdujących zastosowanie pra-



Rysunek 1.24: Struktury chemiczne komercyjnie dostępnych leków zawierających pierścień heterocykliczny 1,2,3-triazolu

wie w każdej dziedzinie nauki i gałęzi przemysłu. Pochodne 1,2,3-triazolu wykazały właściwości przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne, przeciwzapalne, przeciwgrzybicze, przeciwdepresyjne, przeciwwirusowe, przeciwgruźlicze, antyoksydacyjne oraz przeciwmalaryczne [197–211]. Obecnie na rynku farmaceutycznym dostępnych jest kilkanaście preparatów, w których skład wchodzi substancje aktywne zawierające w swojej strukturze pierścień 1,2,3-triazolu, np. **Rufinamid**

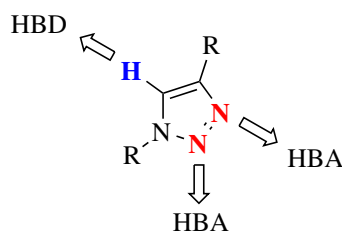
(lek przeciwdrgawkowy), **Tazobaktam**, **Cefatryzyna** (antybiotyki), **TSAO** (substancja stosowana w leczeniu wirusa HIV), **CAI** (substancja przeciwnowotworowa), **Mubitrinib** (substancja stosowana w leczeniu chorób nowotworowych – obecnie wycofana), **Suworeksant** (lek nasenny), **Radezolid** (lek stosowany w leczeniu wysypki bakteryjnej) oraz **Tikagrelor** (lek stosowany w profilaktyce udaru mózgu). Struktury ww. substancji przestawiłem na **Rysunku 1.24**. Co więcej, związki otrzymane w oparciu o rdzeń 1,2,3-triazolu znajdują zastosowanie również jako syntetyczne produkty pośrednie w gałęziach przemysłu takich jak agrochemia, chemia polimerów, kosmetyka, a także wykorzystywane są jako inhibitory korozji, dendrymery, ciecze krystaliczne, fotostabilizatory, pigmenty oraz chelatory [212–230].

Analogi triazolu zawdzięczają swoje szerokie zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym unikalnym właściwościom fizykochemicznym. W literaturze znane one są jako mimetyki ugrupowania amidowego, co wynika z występowania silnego momentu dipolowego pierścienia heterocyklicznego, który mieści się w zakresie 5,2-5,6 Debaja¹ oraz charakterystycznym właściwościom kwasowo-zasadowym. Precyzując, wartość parametru pK_a dla 1*H*-1,2,3-triazolu wynosi 9,26, zaś zasadowość heteroatomów obecnych w pierścieniu jest pomijalnie mała, silnie zależąca od podstawników w pozycjach 1, 4 oraz 5 [232]. Ponadto, zdolność pierścienia 1,2,3-triazolu do tworzenia wiązań wodorowych, oddziaływań elektrostatycznych typu van der Waals oraz π - π , znacząco wpłynęła na zainteresowanie tą grupą związków w chemii medycznej, jako iż posiadają silne powinowactwo do wiązania się z białkami.

Pod względem oddziaływań międzycząsteczkowych, 1,4-dipodstawione pochodne 1,2,3-triazolu wykazują silną preferencję do reszt hydrofobowych w centrum aktywnym enzymu. Ze względu na planarny i silny charakter aromatyczny (w szczególności w przypadku pochodnych 1,4-diarylopodstawionych), są one zaangażowane w oddziaływania elektrostatyczne z aminokwasami o podobnym charakterze – w szczególności z tryptofanem. Ponadto, atomy azotu N2 oraz N3 heterocykla triazolu służą również jako akceptory wiązania wodorowego (HBA), podczas gdy atom wodoru znajdujący się w pozycji 5, ze względu na silną polaryzację spowodowaną obecnością aż trzech heteroatomów, może zachowywać się jako donor wiązania wodorowego (HBD) (**Rysunek 1.25**) [233].

Należy również nadmienić, iż heterocykl triazolu charakteryzuje się szczególnie wysoką opornością na hydrolizę (zarówno kwasową jak i zasadową), środowisko utleniająco-redukujące (co jest dowodem na obecność silnego charakteru aromatycznego pierścienia) oraz degradację enzymatyczną. Pomimo iż w literaturze udowodniono formowanie się *N*-tlenku triazolu 1,5-dipodstawionych pochodnych w komórkach wątroby szczurów, to jednak nie zauważono tego typu transformacji dla 1,4-dipodstawionych analogów [234, 235].

¹W celu zestawienia, wartość momentu dipolowego acetamidu wynosi ok. 3,8 Debaja [231]



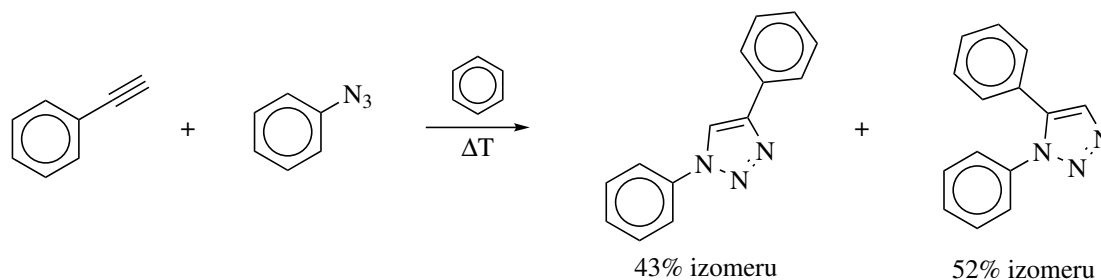
Rysunek 1.25: Potencjalne miejsca tworzenia się oddziaływań międzycząsteczkowych (wodorowych) w cząsteczce 1,4-dipodstawionego 1,2,3-triazolu

Pomimo tak wielu obiecujących właściwości, ilość preparatów leczniczych opierających się o strukturę heterocykła 1,2,3-triazolu jest zaskakująco mała. Może to oznaczać, iż nadal istnieją swego rodzaju ograniczenia, które sprawiają, że naukowcy odchodzą od wprowadzania triazolu do struktur chemicznych związków biologicznie aktywnych. Jak się okazuje, jeden z największych problemów leży w ograniczonej rozpuszczalności otrzymanych pochodnych (w szczególności 1,4-dipodstawionych) w roztworach wodnych. Jednocześnie wynika to z faktu, iż pomiędzy cząsteczkami związków w strukturze krystalicznej występują silne oddziaływania elektrostatyczne (typu π - π) znacznie obniżające ich rozpuszczalność. Niemniej jednak, problem ten może zostać rozwiązany, poprzez wprowadzenie dodatkowych ugrupowań zwiększających hydrofilowość struktury związku lub też transformację substancji aktywnej w rozpuszczalną formę soli.

1.8.2 1,2,3-Triazole – Metody syntezy

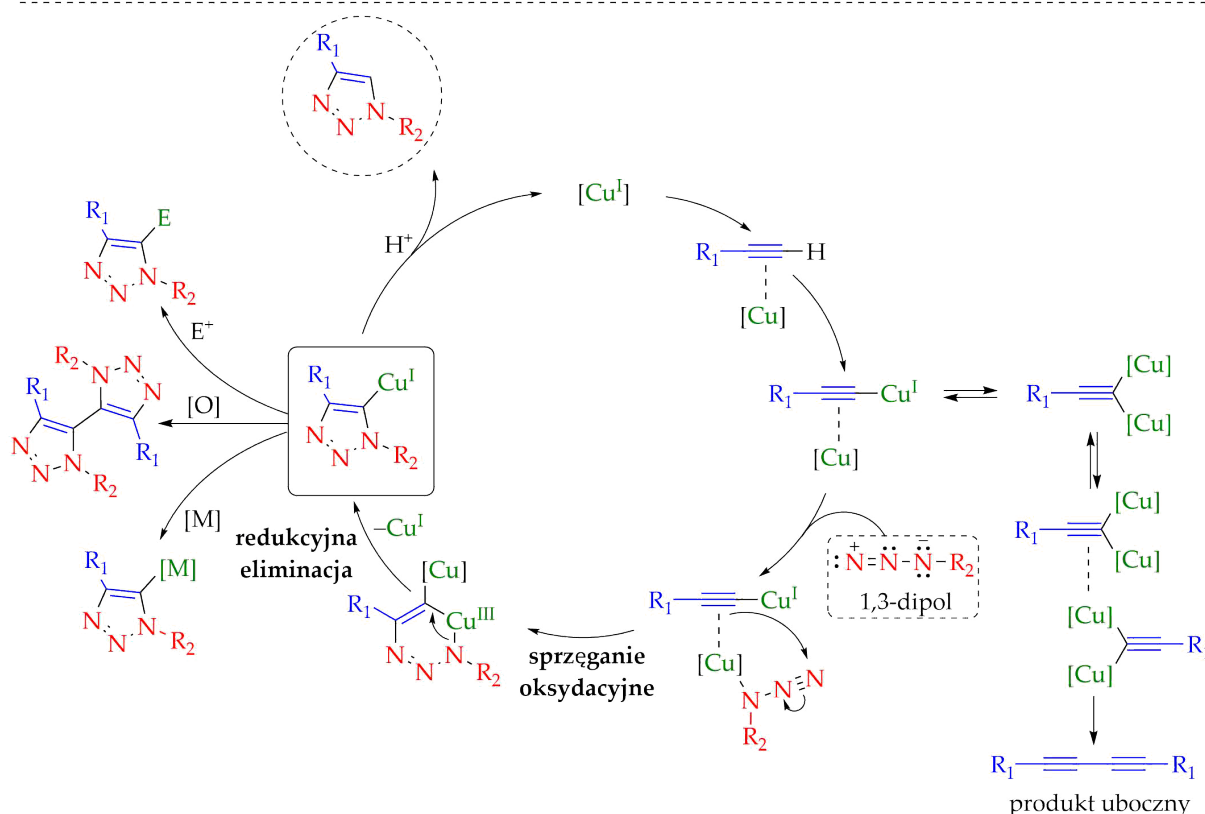
Reakcja 1,3-dipolarnej [3+2] cykloaddycji pomiędzy azydkiem a alkinem jest bez wątpienia najbardziej rozpowszechnioną oraz najszerszej opisaną w literaturze chemicznej metodą otrzymywania pochodnych 1,2,3-triazolu. Po raz pierwszy została ona szczegółowo przedstawiona przez niemieckiego chemika, profesora Rolfa Huisgena w latach 60-tych ubiegłego wieku. Niemniej jednak, pierwsze doniesienia na temat tego typu transformacji sięgają dalej wstecz, do roku 1893, kiedy to po raz pierwszy opisano reakcję pomiędzy azydkiem fenylu a but-2-ynodionianem dimetylu [236, 237]. Wprawdzie odkrycie reakcji heterocyklizacji pomiędzy azydkiem organicznym a alkinem było krokiem milowym w chemii heterocykli, wiele reakcji pomiędzy tymi reagentami jest z chemicznego punktu widzenia niepraktycznych. Powodem tego jest konieczność stosowania bardzo wysokich temperatur podczas prowadzenia reakcji oraz tworzenie się dwóch produktów – formy 1,4- oraz 1,5-dipodstawionej 1,2,3-triazolu (**Rysunek 1.26**).

Dopiero około 40 lat później, bo w 2002 roku, zespół profesora Karla Barryego Sharplessa z Kalifornijskiego Instytutu La Jolla opisał selektywną metodę otrzymywania 1,4-dipodstawionego 1,2,3-triazolu w reakcji cykloaddycji, poprzez zastosowanie katalitycznej ilości kationów mie-



Rysunek 1.26: Schemat reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydku fenylu oraz etynylobenzenu

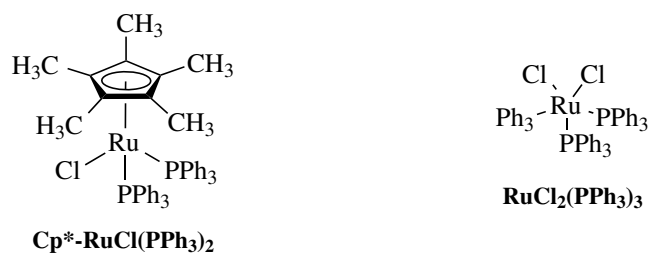
dzi(I), tworzonych w wyniku reakcji redukcji siarczanu(VI) miedzi(II) kwasem askorbinowym. W owym czasie, reakcja cykloaddycji azydek-alken katalizowana kationami miedzi (CuAAC , ang. *Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*) zaczęła być stosowana powszechnie nie tylko w chemii, ale również w niektórych obszarach nauk biologicznych oraz chemii materiałów, ze względu na bardzo łatwy proces syntetyczny, łatwość oczyszczania oraz wysoką wydajność prowadzonych reakcji [238–245]. Pomimo wielu badań, mechanizm reakcji CuAAC pozostaje nadal dyskusyjny. Nie do końca zbadany jest sposób chelatowania azydku do centrum kationu miedzi,



Rysunek 1.27: Proponowany mechanizm reakcji cykloaddycji CuAAC . Oznaczenie $[\text{Cu}]$ dotyczy kationów miedzi o bliżej nieokreślonym stopniu utlenienia, otoczonych różnymi ligandami

który od zawsze uważany był za proces determinujący szybkość reakcji chemicznej. Ponadto, niejasne pozostaje protonowanie triazolowego związku miedziorganicznego, będącego intermediatem w celu uzyskania produktu końcowego [239, 246, 247]. Proponowany mechanizm reakcji CuAAC zaprezentowałem na **Rysunku 1.27**.

Niespełna trzy lata później od opisanego metody CuAAC, profesor Valery Fokin wraz ze swoim zespołem przy współpracy z profesorem Sharplessem, opisał selektywną metodę otrzymywania izomeru 1,5-dipodstawionego 1,2,3-triazolu w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji [248, 249]. Metoda ta polegała na wykorzystaniu sterycznie zatłoczonych katalizatorów rutenu(II), których przykładem jest chlorek pentametylocyklopentadienyl-*bis*(trifenylfosfina)rutenu(II) ($\text{Cp}^*\text{-RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2$). Autorzy opisali, iż w przypadku stosowania tego typu katalizatorów, powstawanie izomeru 1,5-dipodstawionego-1,2,3-triazolu było jedynym produktem reakcji. Należy podkreślić, iż zastosowanie katalizatorów rutenowych, zawierających ligandy o mniejszym zatłoczeniu sterycznym, m.in. $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (dichlorku tris(trifenylfosfina)rutenu(II)) często prowadziło do powstawania mieszaniny izomerów 1,2,3-triazolu. Struktury ww. katalizatorów zaprezentowałem na **Rysunku 1.28**.



Rysunek 1.28: Struktura chemiczna katalizatora rutenowego stosowanego w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji

Do chwili obecnej, naukowcom udało się opracować szereg metod syntezy 1,2,3-triazolu, które nie opierają się na reakcji CuAAC. Polegają one na wykorzystaniu przeróżnych reagentów m.in. ketonów zawierających silną grupę elektronoakceptorową, 1,3-diketonów, β -ketoestrów, allenów, ketenów acetalu, aldehydów, nitryli, α -hydroksyiminohydrazonów, bis-hydrazonów 1,2-diektonów w obecności zasad (np. DBU, *tert*-butanolanu, piperidynonu) i wielu innych [250–261]. Ponadto, zastosowanie siarczanu(VI) miedzi(II) w środowisku redukującym nie jest jedynym podejściem do efektywnego przeprowadzenia reakcji CuAAC. Naukowcom udało się także zastosować inne katalizatory – tlenek miedzi(II), chlorek, bromek oraz jodek miedzi(I), a także kationy srebra(I) czy nanostruktury złota [214, 262–270]. Interesujący jest również fakt, iż z powodzeniem udało się przeprowadzić reakcję cykloaddycji z elementarną formą miedzi wykorzystując techniki mechanochemiczne [271].

1.9 Cel i zakres pracy

W ramach realizacji pracy doktorskiej w zespole dr. hab. inż. Sebastiana Demkowicza prof. PG w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej otrzymałem następujące zadania:

1. Przeprowadzenie przeglądu literaturowego z zakresu budowy oraz mechanizmu funkcjonowania STS.
2. Zebranie materiału literaturowego na temat dostępnych inhibitorów STS oraz ich wykorzystania w leczeniu HDC.
3. Dokonanie przeglądu literaturowego na temat właściwości, zastosowania oraz metod otrzymywania pochodnych 1,2,3-triazolu oraz 1,2,4-oksadiazolu.
4. Zaprojektowanie struktur nowych, potencjalnych inhibitorów STS na bazie amidosiarczanowych pochodnych 1,4-diarylopodstawionych 1,2,3-triazolu oraz 3,5-diarylopodstawionych 1,2,4-oksadiazolu wykorzystując techniki dokowania molekularnego.
5. Przeprowadzenie syntezy organicznej wyselekcjonowanych, potencjalnych inhibitorów STS na podstawie otrzymanych wyników dokowania molekularnego.
6. Przeprowadzenie szeregu doświadczeń eksperymentalnych mających na celu zoptymalizowanie warunków reakcji otrzymywania pochodnych azydków fenyłowych.
7. Przeprowadzenie badań optymalizacji warunków reakcji otrzymywania benzenokarboksyimidoamidów.
8. Przeprowadzenie badań aktywności biologicznej otrzymanych związków w teście enzymatycznym (wykorzystując enzym wyizolowany z łożyska ludzkiego) oraz komórkowym (wobec linii nowotworowej MCF-7).
9. Przeprowadzenie badań aktywności przeciwnowotworowej *in vivo* związków, charakteryzujących się najkorzystniejszymi wynikami w testach *in vitro*.

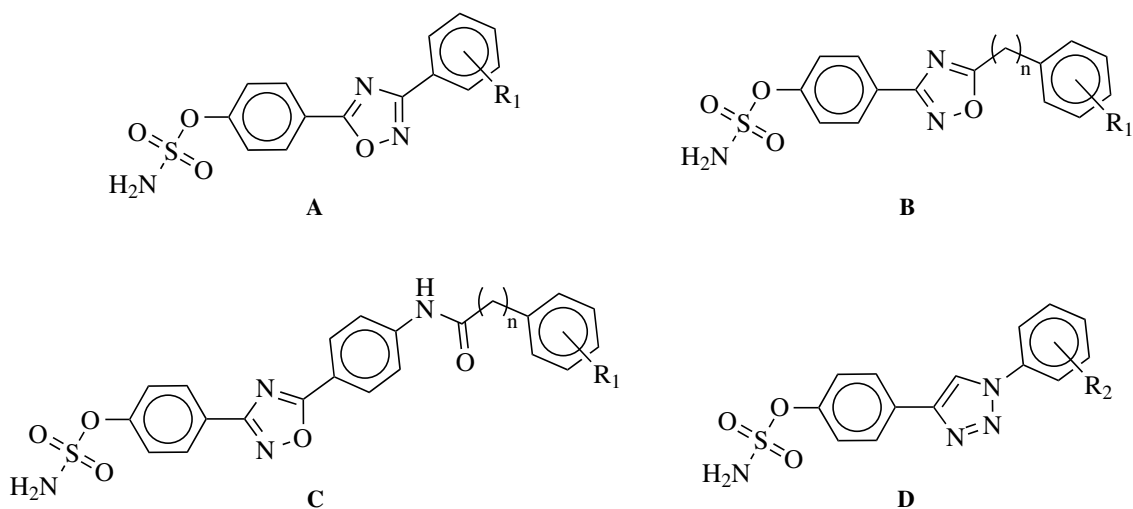
Rozdział 2

Badania własne

2.1 Uzasadnienie podjętych badań oraz opis planowanych eksperymentów

Dotychczasowe badania prowadzone w zespole dr. hab. inż. Sebastiana Demkowicza z Katedry Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej dotyczące rozwoju nowych, skutecznych inhibitorów STS mających potencjalne zastosowanie w leczeniu HDC, doprowadziły do otrzymania obszernej biblioteki związków charakteryzujących się zróżnicowaną aktywnością (patrz, podrozdział 1.6.6). Z doświadczenia zespołu jednoznacznie wynika, że na aktywność nowo otrzymanych związków wobec STS wpływ mają zarówno rodzaj farmakofora jak również budowa i właściwości rdzenia cząsteczki.

W ramach powierzonego mi zadania postanowiłem otrzymać szereg nowych związków będących potencjalnymi inhibitorami STS na bazie 1,4-diarylopodstawionych amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu oraz 3,5-diarylopodstawionych amidosiarczanowych pochodnych 1,2,4-oksadiazolu (**Rysunek 2.1**). Uzasadnieniem wyboru ww. pierścieni heterocyklicznych stanowiących rdzeń projektowanych inhibitorów był ich udokumentowany, szeroki zakres aktywności biologicznych (szczegóły: rozdział 1.7 oraz 1.8). Ponadto układ pierścieni aromatycznych proponowanych przeze mnie struktur chemicznych skutecznie imituje steroidową strukturę naturalnych substratów STS. Oznacza to, że istnieje wysokie prawdopodobieństwo, iż zaprojektowane związki o budowie niesteroidowej nie będą wykazywały silnych właściwości estrogenowych (będących główną przyczyną negatywnych wyników eksperymentalnych badań klinicznych) charakteryzując się jednocześnie wysoką aktywnością wobec STS.



Rysunek 2.1: Struktura ogólna amidosiarczanowych pochodnych 1,2,4-oksadiazolu (**A**, **B**, **C**; R₁ = H, F; n = 0, 1) oraz amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu (**D**; R₂ = H, F, CF₃, OCF₃, Cl, Br, I, CH₃, CH₂CH₃, CH(CH₃)₂, OCH₃, NO₂)

2.2 Modelowanie molekularne

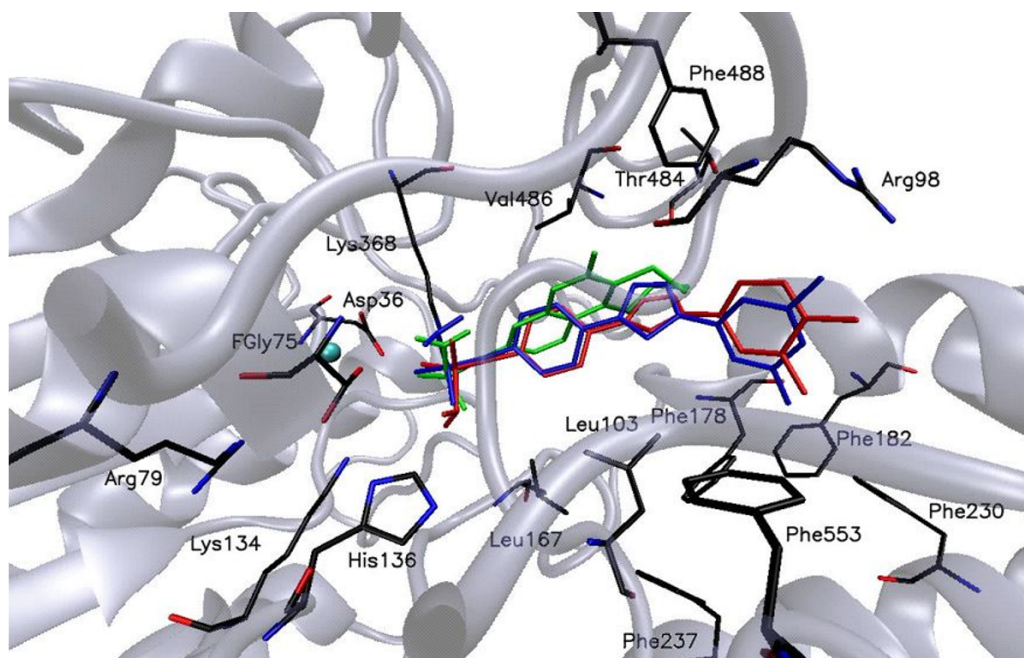
Przed przystąpieniem do syntezy organicznej, podjąłem się realizacji zadania polegającego na zaprojektowaniu struktur (z wykorzystaniem technik dokowania molekularnego) nowych inhibitorów STS na bazie amidosiarczanowych pochodnych 1,2,4-oksadiazolu oraz amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu zawierających w swojej konstytucji podstawniki o zróżnicowanym charakterze i późniejszej selekcji związków na podstawie wyliczonej swobodnej energii wiązania (będącej rezultatem pracy programu AutoDock Vina 1.1.2). Modelowanie molekularne stanowiło również doskonałe narzędzie badawcze, które umożliwiło mi przeprowadzenie analizy relacji struktura-aktywność (SAR), jak również pozwoliło na wyjaśnienie różnic poziomu aktywności inhibicyjnej otrzymanych pochodnych oraz identyfikację dodatkowych oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy resztami aminokwasowymi a inhibitorem w centrum katalitycznym enzymu. W skrócie, procedura eksperymentów dokowania molekularnego obejmowała następujące etapy:

1. Odpowiednie przygotowanie struktury enzymu pobranej z bazy PDB (PDB ID: 1P49).
2. Przygotowanie struktur potencjalnych inhibitorów STS i optymalizacja ich geometrii z użyciem oprogramowania HyperChem 8.0.7.
3. Wykonanie dokowania molekularnego geometrycznie zoptymalizowanych ligandów za pomocą oprogramowania AutoDock Vina 1.1.2. Eksperymenty dokowania każdego liganda przeprowadzono w pięciu powtórzeniach w celu zminimalizowania błędu obliczeniowego programu.
4. Interpretacja otrzymanych wyników: analiza otrzymanych swobodnych energii wiązań oraz graficzna wizualizacja sposobu dokowania ligandów.

2.3 Modelowanie molekularne amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu

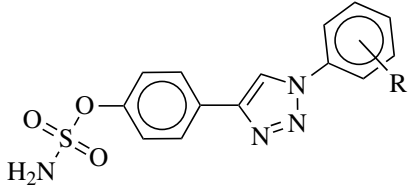
Intensywne badania nad rozwojem nowych inhibitorów STS prowadzone w zespole dr. hab. inż. Sebastiana Demkowicza definitywnie ukazały korzystny wpływ obecności atomów fluoru w strukturze chemicznej związku na jego właściwości biologiczne oraz fizykochemiczne. Na podstawie tych doświadczeń postanowiłem przeprowadzić szereg symulacji komputerowych polegających na zadokowaniu amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu zawierających w swojej konstytucji fluor lub też ugrupowania posiadające ten atom.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań komputerowych wyselekcjonowałem 13 nowych, amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu zawierających w swojej konstytucji atom fluoru (**Ia–m**, **Tabela 2.1**). Otrzymane wyniki badań modelowania molekularnego wskazywały na bardzo wysoki stopień dopasowania nowo zaprojektowanych związków do centrum katalitycznego enzymu (**Rysunek 2.2**). Obliczone przez program dokujący wartości swobodnych energii wiązania kompleksów inhibitor-enzym kształtowały się na zadowalającym poziomie w przedziale od $-5,3$ do $-7,1$ kcal/mol (odpowiednio dla związku **Im** i **Ih**; wartość swobodnej energii wiązania dla związku referencyjnego – **Irosustatu** wyniosła $-5,4$ kcal/mol, **Tabela 2.1**). Korzystne wartości swobodnych energii wiązania otrzymane dla nowo zaprojektowanych związków mogą

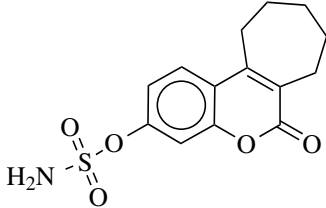


Rysunek 2.2: Graficzna wizualizacja wyników dokowania molekularnego związków **Id** (oznaczony na czerwono), **Ie** (oznaczony na niebiesko) oraz związku referencyjnego – **Irosustatu** (oznaczony na zielono)

Tablica 2.1: Wyniki dokowania molekularnego pochodnych 1,2,3-triazolu **Ia–ab** oraz związku referencyjnego – **Irosustatu**



Ia–ab

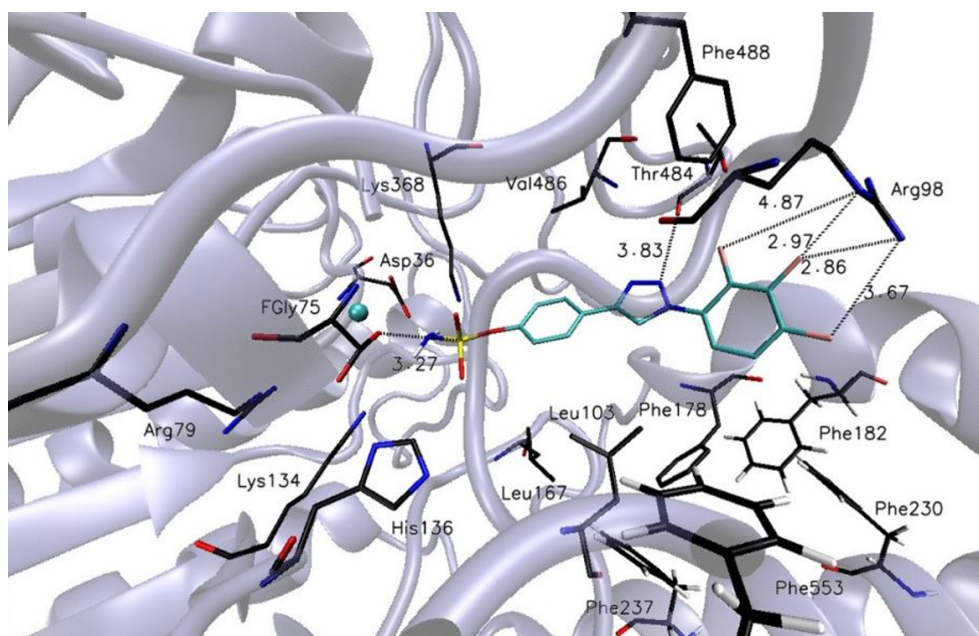


Irosustat

Nazwa	R	Swobodna energia wiązania [kcal/(mol)]
Ia	H	-6.1
Ib	4-F	-6.5
Ic	3-F	-6.3
Id	3,4-diF	-6.7
Ie	3,5-diF	-6.7
If	2,3,4-triF	-6.7
Ig	4-CF ₃	-5.9
Ih	3-CF ₃	-7.1
Ii	2-CF ₃	-6.2
Ij	3,5-diCF ₃	-6.6
Ik	2-CF ₃ -4-F	-6.4
Il	4-OCF ₃	-6.2
Im	2-OCF ₃	-5.3
In	3-Cl	-6.3
Io	3,5-diCl	-6.3
Ip	3-Br	-5.5
Ir	3,5-diBr	-5.1
Is	3-I	-5.5
It	3,5-diI	-3.8
Iu	3-CH ₃	-4.6
Iw	3,5-diCH ₃	-6.3
Ix	3-OCH ₃	-5.8
Iy	3,5-diOCH ₃	-4.5
Iz	3-CH ₂ CH ₃	-6.1
Iaa	3-CH(CH ₃) ₂	-5.8
Iab	3-NO ₂	-3.6
Irosustat	–	-5.4

wynikać z obecności dodatkowych oddziaływań hydrofobowych i hydrofilowych występujących między ligandem a resztami aminokwasowymi w centrum katalitycznym enzymu. W toku przeprowadzonych badań zaobserwowałem, iż nowo zaprojektowane inhibitory STS dokowały się w sposób analogiczny do związku referencyjnego – **Irosustatu**. Bardzo istotnym elementem wykonanych eksperymentów był fakt, iż ugrupowanie amidosiarczanowe zadokowanych inhibi-

torów znajdowało się w bliskim otoczeniu reszty fGly75, co jest niezbędne w celu skutecznego zahamowania biologicznej aktywności enzymu.

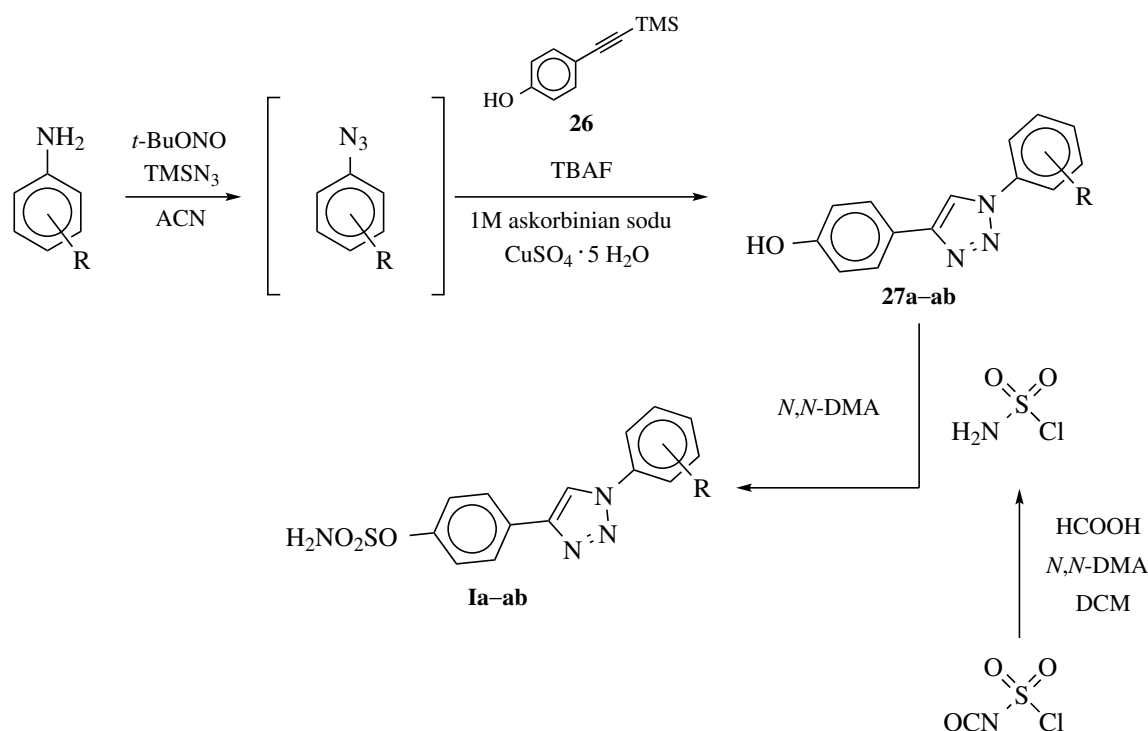


Rysunek 2.3: Graficzna wizualizacja kompleksu inhibitor-enzym dla związku **If**

Warto zauważyć, iż terminalne pierścienie aromatyczne dokowanych związków znajdowały się w sąsiedztwie aminokwasów o charakterze lipofilowym - Phe553, Phe237, Phe230, Phe182, Phe178, Leu103, co może sugerować występowanie dodatkowych oddziaływań hydrofobowych mających znaczący wpływ na wzrost aktywności inhibicyjnej związków (**Rysunek 2.2**). Dodatkowo, obecność pierścienia heterocyklicznego może prowadzić do występowania oddziaływań elektrostatycznych w centrum aktywnym enzymu. Odległość pomiędzy pierścieniem 1,2,3-triazolu związku **If** a aminokwasem Thr484 biorącym udział w rozpoznawaniu naturalnego substratu STS, była stosunkowo niewielka, sugerując pojawienie się dodatkowych oddziaływań elektrostatycznych stabilizujących kompleks ligand-białko (**Rysunek 2.3**). Ponadto dystans pomiędzy atomem fluoru w położeniu *meta* związku **If** a Arg98 był najmniejszy w porównaniu z pozostałymi atomami fluoru. W toku przeprowadzonych badań biologicznych okazało się, że to właśnie pochodne zawierające w swojej konstytucji podstawniki w pozycji *meta* w terminalnym pierścieniu aromatycznym w stosunku do ugrupowania amidosiarczanowego wykazywały najwyższą aktywność inhibicyjną (patrz szczegóły rozdział 2.5). Ta jakże istotna obserwacja była dla mnie podstawą do zaprojektowania kolejnej serii amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu, zawierających w swojej strukturze zróżnicowane podstawniki (w pozycji *meta*) w terminalnym pierścieniu aromatycznym tj. atomy chloru, bromu, jodu oraz ugrupowania metylowe, etylowe, izopropylowe, metoksyłowe oraz nitrowe, w celu zbadania ich wpływu na zdolność inhibicyjną potencjalnych inhibitorów.

2.4 Synteza 1,4-diarylopodstawionych amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu

Po przeprowadzeniu selekcji potencjalnych inhibitorów STS w oparciu o wyniki dokonywania molekularnego, w następnym etapie przystąpiłem do ich otrzymania na drodze syntezy chemicznej. W celu otrzymania pochodnych 1,2,3-triazoli zdecydowałem się wykorzystać reakcję 1,3-dipolarnej [3+2] cykloaddycji Huisgen'a CuAAC. Zaprojektowane związki otrzymałem wg. strategii przedstawionej na **Schemacie 2.1**.



Schemat 2.1: Strategia otrzymywania amidosiarczanowych pochodnych 4-(1-fenilo-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenolu **Ia-ab**; R = H, F, CF₃, OCF₃, Cl, Br, I, CH₃, CH₂CH₃, CH(CH₃)₂, OCH₃, NO₂

W pierwszej kolejności przystąpiłem do syntezy 4-((trimetylosililo)etynylo)fenolu (**26**), alkinowego produktu pośredniego niezbędnego w celu otrzymania zaprojektowanych związków. Związek **26** zsyntetyzowałem wykorzystując reakcję sprzężenia Sonogashiry pomiędzy 4-jodofenolem oraz trimetylosililoacetylenem [272]. Po izolacji otrzymanego produktu przystąpiłem do syntezy fenolowych rdzeni inhibitorów. W tym etapie, komercyjnie dostępną pochodną aniliny traktowałem azotynem *tert*-butylu (*t*-BuONO) w bezwodnym acetonitrylu (ACN) w temperaturze 0°C. Następnie, do mieszaniny reakcyjnej wprowadzałem azydek trimetylosililu (TMSN₃). Zabarwienie mieszaniny reakcyjnej uległo zmianie z bezbarwnej lub delikatnie żółtej na pomarańczową i z upływem czasu brunatnoczerwona. Reakcję kontynuowałem przez 4 godziny. Po-

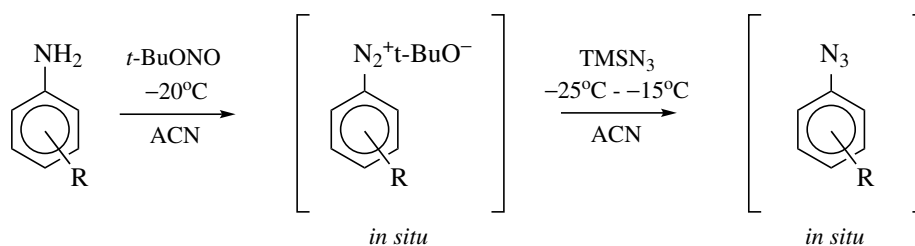
wstające produkty uboczne podczas formowania się pochodnej azydobenzenu nie wykazywały znaczącej reaktywności chemicznej. Z tego też powodu, zdecydowałem się zastosować syntezę typu „one-pot”, poprzez wprowadzenie kolejnych reagentów bez uprzedniej izolacji pochodnej azydku fenylu. Ta strategia pozwoliła mi na efektywne otrzymywanie fenolowych rdzeni inhibitorów. W tym celu, po otrzymaniu *in situ* pochodnej azydku do mieszaniny reakcyjnej wprowadziłem związek **26**, a następnie 1 M roztwór fluorku tetrabutylamoniowego (TBAF) w tetrahydrofuranie (THF) w celu deprotekcji ugrupowania alkinowego. Po upływie kilku minut do mieszaniny reakcyjnej wprowadziłem świeżo sporządzony 1 M wodny roztwór askorbinianu sodu oraz pentahydrat siarczanu(VI) miedzi(II). Tak przygotowane mieszaniny reakcyjne pozostawiałem w stanie mieszania przez noc. Kolejny etap obejmował izolację produktu poprzez wstępne zateżenie mieszaniny reakcyjnej i ekstrakcję z użyciem octanu etylu. Po odseparowaniu warstwy organicznej otrzymywałem surowe produkty **27a-ab**, które oczyszczałem poprzez rekrystalizację z ACN. Wydajności reakcji cykloaddycji były zadowalające i wahały się w granicach 35-82%.

W kolejnym etapie syntezy, rdzenie potencjalnych inhibitorów funkcjonalizowałem poprzez wprowadzenie ugrupowania amidosiarczanowego. Związki **27a-ab** traktowałem chlorkiem sulfamoilu otrzymanym *in situ* w wyniku reakcji izocyjanianu chlorosulfurylu z kwasem mrówkowym w obecności katalitycznych ilości *N,N*-DMA. Surowe produkty oczyszczałem poprzez rekrystalizację z ACN otrzymując finalne związki **Ia-ab** z wydajnościami w granicach od 50% do 86%.

2.4.1 Optymalizacja warunków reakcji otrzymywania amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu

Pomimo otrzymania fenolowych pochodnych 1,2,3-triazolu, większość wydajności reakcji CuAAC kształtowała się na przeciętnym poziomie (sięgającym około 60% głównie dla pochodnych zawierających w swojej konstytucji atomy fluoru). W wielu protokołach dostępnych w literaturze chemicznej wydajności reakcji CuAAC były wyższe i zależały w dużej mierze od stopnia skomplikowania struktury związku. Niemniej jednak w przypadku pochodnych niezawierających zróżnicowanych grup funkcyjnych, wydajności reakcji sięgały w przybliżeniu 90%. Z tego też powodu postanowiłem zbadać przyczynę relatywnie niższej efektywności otrzymywanych przeze mnie pochodnych.

W pierwszej kolejności podjąłem się optymalizacji wydajności reakcji otrzymywania niektórych azydków *in situ*. Nienaturalnym wydawało mi się, że reakcja podstawienia soli diazoniowej, prowadząca do uzyskania pochodnej azydku fenylu, zachodzi z intensywną zmianą barwy mimo, iż opisane w literaturze analogiczne pochodne azydkowe posiadały kolor biały lub odcienie żółtego. Wobec powyższego, w pierwszej kolejności postanowiłem przeprowadzić



Schemat 2.2: Schemat reakcji optymalizacji otrzymywania pochodnych azydków fenolowych *in situ* (R = 3-F (**27c**), 3,5-diF (**27e**), 2,3,4-triF (**27f**), 3-Cl (**27n**) oraz 3,5-diCl (**27o**))

szereg eksperymentów otrzymywania azydku fenylu obniżając temperaturę mieszaniny reakcyjnej z przy użyciu łaźni chłodzącej z suchym lodem (**Schemat 2.2**)¹. Początkowo temperaturę roztworu aniliny w ACN obniżałem do -20°C . Następnie wkraplałem, intensywnie mieszając, *t*-BuONO. Po tak wykonanym eksperymencie analiza TLC nie wykazała obecności substratu w mieszaninie reakcyjnej. W kolejnym etapie rozpocząłem ostrożnie wprowadzać do mieszaniny reakcyjnej TMSN_3 . Utrzymywanie temperatury na poziomie -20°C najczęściej uniemożliwiało przeprowadzenie transformacji – nie obserwowałem wydzielania się pęcherzyków gazu. Dopiero osiągnięcie temperatury około -13°C skutkowało zapoczątkowaniem reakcji. Kolejne porcje reagenta wprowadzałem wyłącznie w momencie zaprzestania wydzielania się cząsteczkowego azotu. Dzięki kontrolowanemu wkraplaniu azydku trimetylosililowego do mieszaniny reakcyjnej nie zaobserwowałem intensywnej zmiany zabarwienia podczas powstawania produktu. Mieszanina pozostawała bezbarwna lub bladożółta. Po całkowitym wkropleniu reagenta mieszaninę reakcyjną pozostawiłem w stanie mieszania na 15 minut w temperaturze -15°C . Do tak otrzymanej *in situ* pochodnej azydku fenylu wprowadzałem **26** oraz TBAF usuwając łaźnię chłodzącą i pozwalając samoczynnie ogrzać się mieszaninę reakcyjnej do temperatury pokojowej. Następnie, reakcję kontynuowałem w sposób analogiczny jak zostało to opisane w rozdziale 2.4. Wynikiem przeprowadzonego eksperymentu było otrzymanie fenolowych pochodnych **27c**, **27e**, **27n**, oraz **27o** z wydajnością około 90% i możliwość wydajnej syntezy również w skali kilkugramowej.

W toku prowadzonych eksperymentów zaobserwowałem również znaczące różnice w reaktywności poszczególnych pochodnych aniliny, szczególnie podczas syntezy azydku 2,3,4-trifluorofenylowego. W tym przypadku reakcja zachodziła gwałtownie z natychmiastowym wydzielaniem się pęcherzyków gazu już w -20°C podczas wprowadzania TMSN_3 do roztworu otrzymanej soli diazoniowej. Wobec powyższego, konieczne było obniżenie temperatury do -27°C w celu minimalizacji ryzyka powstawania produktów ubocznych. Podczas intensywnego wkraplania TMSN_3 temperatura reakcji wzrastała powodując zmianę zabarwienia mieszaniny reakcyjnej na kolor krwistoczerwony i otrzymywanie niepożądanych produktów ubocznych, które obserwowałem na

¹Kolbę zawierającą mieszaninę reakcyjną chłodziłem obniżając temperaturę eteru dietylowego za pomocą odpowiednich porcji suchego lodu.

podstawie analizy TLC mieszaniny reakcyjnej. Zjawisko to można wytłumaczyć zwiększoną podatnością pochodnej soli diazoniowej na reakcję aromatycznej substytucji nukleofilowej wynikającą z obecności grup (w tym przypadku atomów) posiadających silny efekt indukcyjny. Wobec powyższego, wydajność otrzymywania związku **27f** ukształtowała się na poziomie 70%.².

²W części eksperymentalnej, wydajności reakcji otrzymywania pięciu pochodnych po procesie optymalizacji, zostały podane w nawiasach



2.5 Badania biologiczne *in vitro* amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu

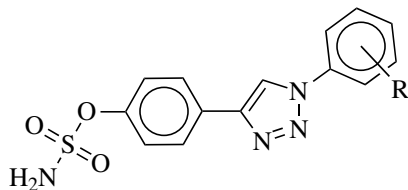
Dzięki współpracy z zespołem dr. hab. Macieja Masłyka z Wydziału Nauk Ścisłych i Nauk o Zdrowiu Instytutu Biotechnologii Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego, otrzymane na drodze syntezy chemicznej potencjalne inhibitory STS na bazie amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu zbadano pod kątem aktywności biologicznej w teście enzymatycznym, wykorzystującym znakowany radioizotopowo siarczan estronu ($[^3\text{H}]\text{-E1S}$). Na podstawie otrzymanych rezultatów wyselekcjonowałem związki o najbardziej obiecującym potencjale do dalszych testów *in vitro* tj. testu komórkowego z wykorzystaniem linii nowotworowej MCF-7. Związki testowano w trzech stężeniach – 100 nM, 10 nM oraz 1 nM, poddając selekcji pochodne na każdym etapie badań. Dla najbardziej aktywnych pochodnych wyznaczono wartość parametru IC_{50} i poddano je dalszym badaniom w testach *in vivo*.

2.5.1 Badania *in vitro* amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu – test enzymatyczny

W pierwszym etapie prowadzonych eksperymentów poddałem badaniom związki zawierające podstawniki w pozycji *meta* oraz dwie najbardziej aktywne pochodne wyselekcjonowane na podstawie testu screeningowego reprezentujące serię pochodnych fluorowanych (szczegółowy: Demkowicz S., Daško M., Rachon J., **Biernacki K.**, Aszyk J., Kozak W., Masłyk M., Kubiński K.; New potent STS inhibitors based on fluorinated 4-(1-phenyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)phenyl sulfamates. Synthesis and biological evaluation. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2020**, *22*, 1037-1044). Otrzymane wyniki jednoznacznie potwierdziły bardzo wysoki potencjał inhibicyjny wszystkich pochodnych (**Tabela 2.2**), które zdolne były do znaczącego obniżenia aktywności STS w stężeniu submikromolarnym (pozostała aktywność STS kształtowała się na poziomie od 11,78 do 55,11% odpowiednio dla **It** oraz **Iy** przy stężeniu inhibitora równym 0,5 μM)

Najwyższą aktywność biologiczną w teście enzymatycznym wykazały pochodne zawierające w swojej konstytucji atomy jodu (**Is** oraz **It**) oraz związek -diCl (**Io**). Ponadto, pochodne 1,2,3-triazolu zawierające ugrupowania alkilowe wykazały również stosunkowo wysoką aktywność (14,51% dla pochodnej **Iz**). Najniższą aktywność biologiczną w teście enzymatycznym wykazały analogi zawierające w strukturze ugrupowania bis-metylowe oraz bis-metoksyłowe osiągając odpowiednio wartości 52,45 oraz 55,11%.

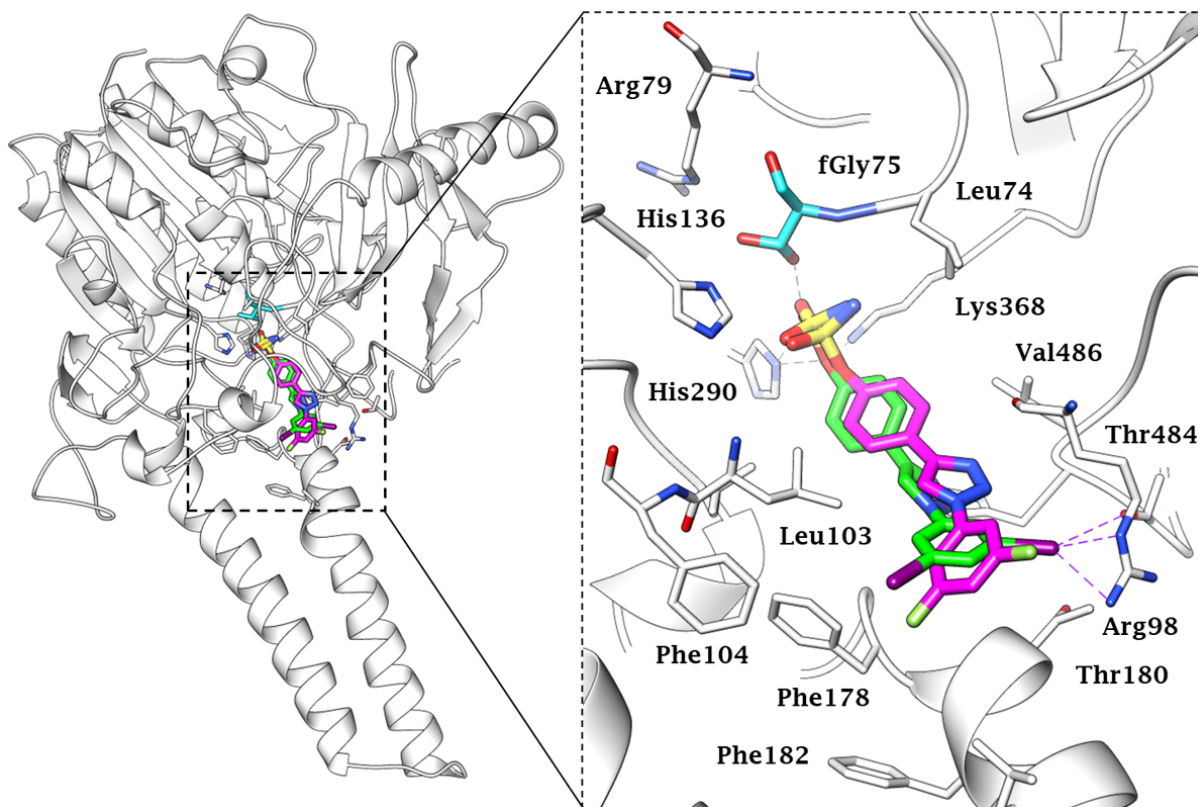
Na podstawie analizy SAR wywnioskowałem, iż zdolność inhibicyjna otrzymanych pochodnych zależy głównie od dwóch parametrów – hydrofobowości oraz rodzaju atomu halogenu

Tablica 2.2: Wyniki aktywności STS w radioizotopowym teście enzymatycznym przy stężeniu inhibitorów równym 0,5 μM **In-ab, Ic oraz Ie**

Nazwa	R	Pozostała aktywność STS [%]
In	3-Cl	19,49 \pm 0,97
Io	3,5-diCl	13,32 \pm 0,67
Ip	3-Br	24,05 \pm 1,20
Ir	3,5-diBr	28,88 \pm 1,44
Is	3-I	13,23 \pm 0,66
It	3,5-diI	11,78 \pm 0,59
Iu	3-CH ₃	34,23 \pm 1,71
Iw	3,5-diCH ₃	52,45 \pm 2,62
Ix	3-OCH ₃	43,35 \pm 2,17
Iy	3,5-OCH ₃	55,11 \pm 2,76
Iz	3-CH ₂ CH ₃	14,51 \pm 0,73
Iaa	3-CH(CH ₃) ₂	18,10 \pm 0,90
Iab	3-NO ₂	28,88 \pm 1,44
Ic	3-F	37,92 \pm 1,90
Ie	3,5-diF	17,34 \pm 0,87

w pozycji *meta*. Jak się okazało, usytuowanie fluorowca w pozycji *meta* powodowało wzrost hydrofobowej natury terminalnego pierścienia aromatycznego, co mogło wpływać na zwiększenie ilości interakcji typu van der Waals'a w centrum katalitycznym enzymu prowadząc tym samym do zwiększenia stabilności kompleksu białko-inhibitor. W rzeczy samej, amidosiarczanowe pochodne 1,2,3-triazolu zawierające atomy jodu (**Is** orz **It**) wykazywały najwyższą aktywność biologiczną. Na podstawie przeprowadzonych badań modelowania molekularnego zauważyłem, iż atomy jodu związku **It** znajdują się w bliskim otoczeniu Arg98 oraz Thr484 w centrum aktywnym STS (**Rysunek 2.4**). Tak bliskie usytuowanie tych atomów może powodować powstawanie oddziaływań halogenowych. Doniesienia literaturowe sugerują, iż tego typu interakcje biorą aktywny udział w stabilizowaniu układów biologicznych (typu białko-ligand), niemniej jednak ich wpływ jest wciąż dyskutowany [273–276].

Na podstawie otrzymanych wyników testu enzymatycznego do dalszej ewaluacji *in vitro* skierowałem wszystkie otrzymane amidosiarczanowe pochodne 1,2,3-triazoli.



Rysunek 2.4: Graficzna wizualizacja kompleksu inhibitor-enzym dla związku **Ie** oraz **It**

2.5.2 Badania *in vitro* amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu – test komórkowy

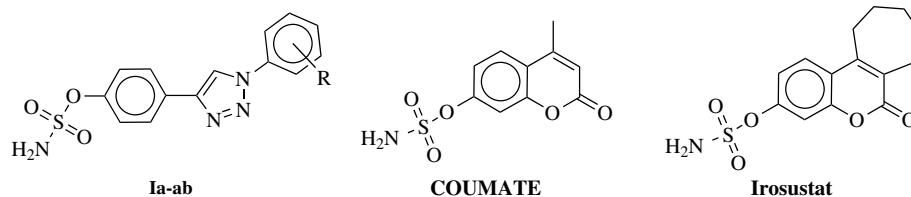
W pierwszym etapie przeprowadzonych badań komórkowych, wyznaczono zdolność do hamowania aktywności enzymu nowo zaprojektowanych związków przy stężeniu inhibitora równym 100 nM. Jak się okazało, znaczna większość zbadanych pochodnych była zdolna całkowicie zablokować aktywność enzymu (**Tabela 2.3**). Pozostała aktywność STS na poziomie 1% została zmierzona dla pochodnych **Ic**, **Ie**, **If** oraz **Il**. Jak się okazało, związki **Ia**, **Ib**, **Id**, **Ig**, **Ih**, **Ik**, **In-r**, **Is**, **Iu**, **Iz** oraz **Iaa** wykazywały również wysoką aktywność inhibicyjną i były zdolne do obniżenia aktywności sulfatazy steroidowej w 95%. Interesującym okazał się fakt, iż związek **It** posiadający najwyższą aktywność w teście enzymatycznym charakteryzował się znacznie niższą aktywnością w teście komórkowym w porównaniu z pozostałymi analogami 1,2,3-triazolu (osiągając poziom 18,7% aktywności STS przy stężeniu inhibitora równym 100 nM). Zjawisko to tłumaczy fakt, iż **It** posiada obniżoną zdolność do penetracji błony komórkowej co wynika z jego zwiększonej hydrofobowości spowodowanej obecnością aż dwóch atomów jodu. Warty odnotowania jest również fakt, iż związki referencyjne charakteryzowały się podobnym lub nieznacznie niższym poziomem aktywności inhibicyjnej (51,8% oraz 2,4% aktywności STS dla **COUMATE**

oraz **Irosustatu** przy stężeniu równym 100 nM).

W kolejnym etapie badań, przeprowadzono selekcję wybranych związków oraz wyznaczono ich aktywność inhibicyjną przy stężeniu inhibitora równym 10 nM. Aktywność biologiczna STS w komórkach MCF-7 przy stężeniu substancji aktywnej wynoszącym 10 nM kształtowała się na poziomie od 1% (dla pochodnych **Ic** oraz **Ie**) do 73,4% (**Iaa**). Związek referencyjny – **Irosustat** zdolny był zahamować aktywność STS o 87,1%.

W ostatnim etapie przeprowadzono badania aktywności biologicznej przy stężeniu inhibitora równym 1 nM. Pozostała aktywność STS mieściła się w zakresie od 13,6% (dla pochodnej **Ie**) do 79,4% (dla związku **Ip**). W tym samym teście biologicznym **Irosustat** osiągnął aktywność na poziomie 83,2%. W ostatnim etapie, dla pięciu najaktywniejszych pochodnych wyznaczono wartość parametru IC_{50} , który wyniósł 1,90; 1,71; 2,95 oraz 1,69 nM dla odpowiednio **In**, **Io**, **If**, **Ic** (wartość IC_{50} dla **Irosustatu** wyniosła 1,06 nM). Wyniki przeprowadzonego eksperymentu dla pochodnej **Ie** okazały się wyjątkowo obiecujące. Otóż wartość parametru IC_{50} dla ww. pochodnej wyniosła 0,21 nM co oznacza, iż związek ten wykazał 5-krotnie wyższą czynność biologiczną niż związek referencyjny (**Tabela 2.3**).

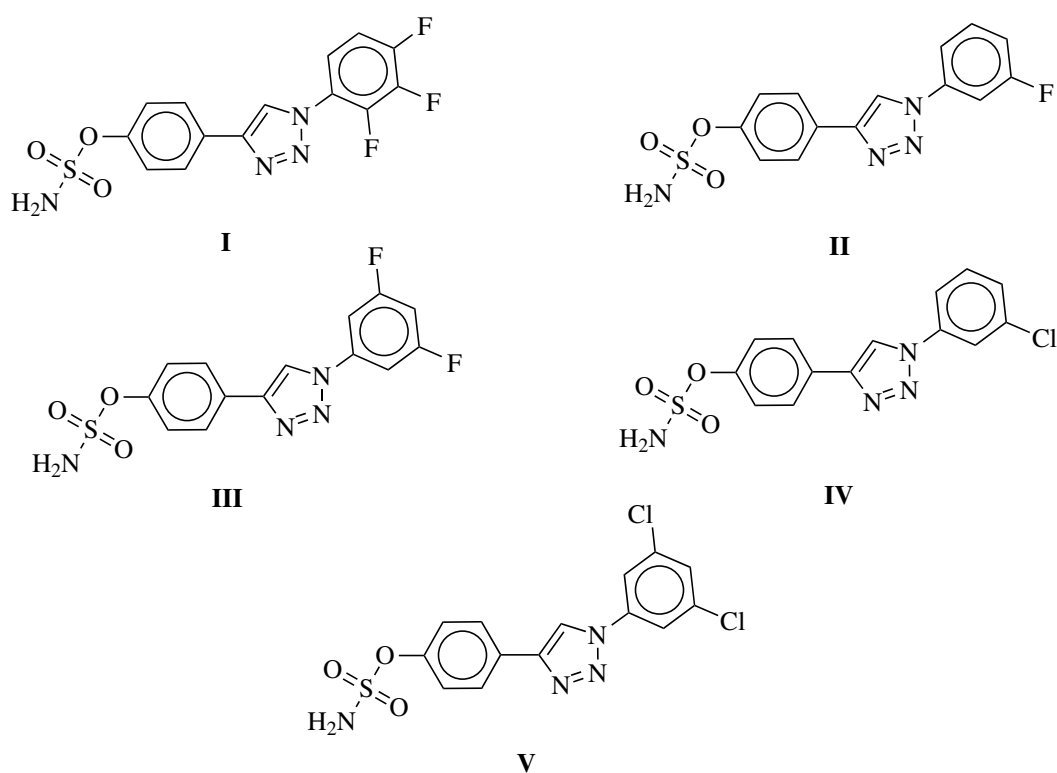
Tablica 2.3: Wyniki pozostałej aktywności STS w komórkach MCF-7 po inkubacji z inhibitorami STS oraz dwoma związkami referencyjnymi – **Irosustat** oraz **COUMATE**, przy stężeniu równym 100, 10 oraz 1 nM



Nazwa	R	Pozostała aktywność STS [%]			IC ₅₀ [nM]
		100 nM	10 nM	1 nM	
Ia	H	1,5 ± 0,05	46,6 ± 1,63	–	–
Ib	4-F	1,5 ± 0,05	60,2 ± 2,7	–	–
Ic	3-F	1,0 ± 0,04	1,0 ± 0,05	57,3 ± 3,44	1,69 ± 0,08
Id	3,4-diF	3,0 ± 0,14	–	–	–
Ie	3,5-diF	1,0 ± 0,05	1,0 ± 0,06	13,6 ± 0,48	0,21 ± 0,01
If	2,3,4-triF	1,0 ± 0,04	24,2 ± 1,45	38,9 ± 1,95	2,95 ± 0,13
Ig	4-CF ₃	2,9 ± 0,15	–	–	–
Ih	3-CF ₃	1,3 ± 0,06	59,9 ± 3,29	–	–
Ii	2-CF ₃	5,5 ± 0,3	–	–	–
Ij	3,5-diCF ₃	14,7 ± 0,88	–	–	–
Ik	2-CF ₃ -4-F	2,4 ± 0,13	48,2 ± 3,37	–	–
Il	4-OCF ₃	1,0 ± 0,03	9,5 ± 0,48	71,8 ± 4,67	–
Im	2-OCF ₃	15,5 ± 0,93	–	–	–
In	3-Cl	2,4 ± 0,07	28,1 ± 1,12	38,2 ± 1,34	1,90 ± 0,06
Io	3,5-diCl	2,0 ± 0,1	17,8 ± 0,62	63,7 ± 2,55	1,71 ± 0,05
Ip	3-Br	2,1 ± 0,07	39,9 ± 2,19	79,4 ± 4,76	–
Ir	3,5-diBr	8,3 ± 0,4	–	–	–
Is	3-I	2,0 ± 0,11	31,8 ± 1,59	67,5 ± 3,71	–
It	3,5-diI	18,7 ± 0,93	–	–	–
Iu	3-CH ₃	3,1 ± 0,12	–	–	–
Iw	3,5-diCH ₃	10,2 ± 0,61	–	–	–
Ix	3-OCH ₃	6,8 ± 0,24	–	–	–
Iy	3,5-diOCH ₃	34,3 ± 1,88	–	–	–
Iz	3-CH ₂ CH ₃	2,6 ± 0,08	–	–	–
Iaa	3-CH(CH ₃) ₂	2,4 ± 0,12	73,4 ± 4,77	–	–
Iab	3-NO ₂	5,9 ± 0,32	–	–	–
COUMATE	–	51,8 ± 3,36	–	–	–
Irosustat	–	2,4 ± 0,07	12,9 ± 0,77	16,8 ± 0,5	1,06 ± 0,03

2.6 Badania biologiczne *in vivo* amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu

W kolejnym kroku prowadzonych badań, wykonano szereg eksperymentów *in vivo* polegających na wyznaczeniu maksymalnej tolerowanej dawki (MTD) oraz aktywności przeciwnowotworowej w mysim modelu raka sutka dla pięciu związków – **Ic**, **Ie**, **If**, **In** oraz **Io**, które charakteryzowały się najwyższym potencjałem inhibicyjnym w przeprowadzonych testach *in vitro*.³ Niniejsze badania zrealizowałem przy współpracy z p. profesor Joanną Wietrzyk i jej zespołem z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk.

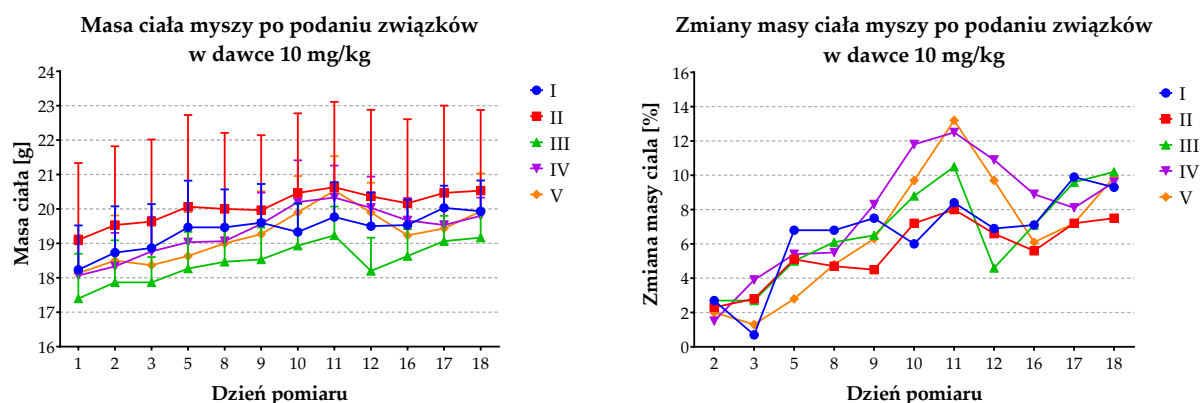


Rysunek 2.5: Struktury chemiczne inhibitorów wybranych do dalszej ewaluacji *in vivo*

³W celu wyróżnienia badanych związków w eksperymentach z udziałem zwierząt, oznaczenia wybranych pochodnych zostały zmienione. Konsekwentnie, związki **If**, **Ic**, **Ie**, **In** oraz **Io** będą w dalszej części dysertacji nazwane odpowiednio **I**, **II**, **III**, **IV** oraz **V**, **Rysunek 2.5**

2.6.1 Badania biologiczne *in vivo* amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu – wyznaczenie Maksymalnej Tolerowanej Dawki

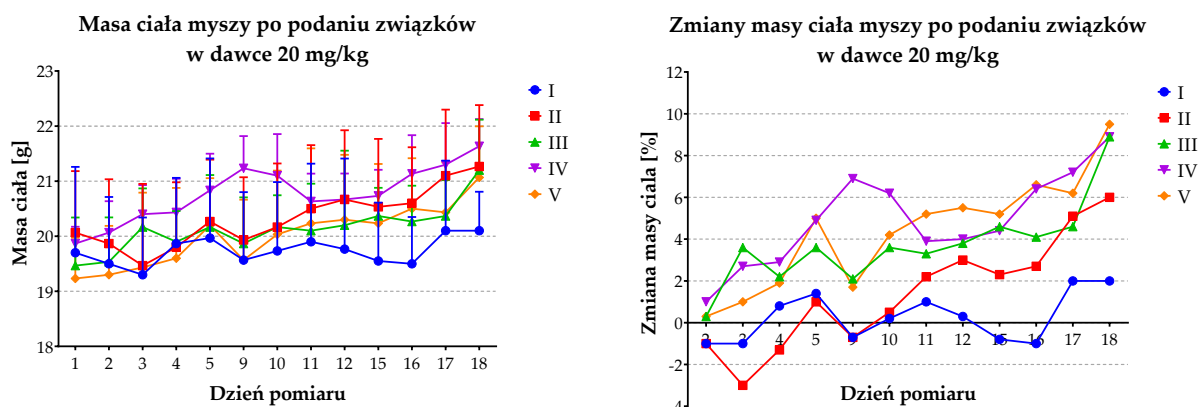
W pierwszym etapie przeprowadzono eksperyment polegający na ustaleniu MTD. Mysiom, podawano substancję aktywną w dawce 10 mg/kg masy ciała, pięć dni w tygodniu przez dwa tygodnie. Na zakończenie prac eksperymentalnych myszy zostały uśmiercone, a ich narządy wewnętrzne poddane ocenie makroskopowej.



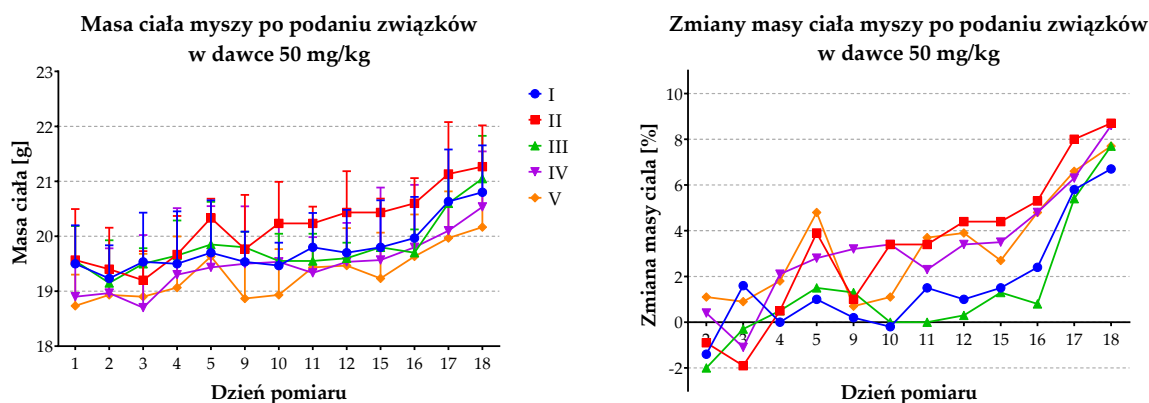
Rysunek 2.6: Masy ciała (z lewej) oraz zmiany masy ciała (z prawej) po podaniu badanych inhibitorów w dawce 10 mg/kg masy ciała

Podczas prowadzonych eksperymentów nie obserwowano toksycznego efektu badanych związków podczas stosowania dawki 10 mg/kg. Masa ciała myszy wzrastała (**Rysunek 2.6**), co wiązało się z naturalnym rozwojem zwierząt. Co więcej, behawiorystyka zwierząt nie uległa zmianie. Analiza makroskopowa głównych organów wewnętrznych również nie wykazała znaczących zmian (**Rysunek 2.9**).

Po analizie otrzymanych rezultatów badań, eksperyment kontynuowano ustalając kolejne dawki substancji aktywnych – 20 mg/kg oraz 50 mg/kg masy ciała. Ustalono, iż badane związki w tym zakresie stężeń nie wykazują efektu toksycznego. Analogicznie jak miało to miejsce w przypadku stosowania dawki 10 mg/kg, wzrost masy ciała myszy oraz zachowanie były naturalne (**Rysunek 2.7**, **Rysunek 2.8**). Aczkolwiek w przypadku myszy, którym podawany był związek **II**, zaobserwowano niewielki spadek masy ciała na początku prowadzonego eksperymentu (około 2%). Pomimo tej nieznaczącej utraty wagi, w dalszej części badań zwierzęta naturalnie przybierały na wadze (z wyjątkiem myszy, którym podawano związek **I** w dawce 20 mg/kg). Podczas trwania eksperymentu, w którym testowana była dawka 50 mg/kg masy ciała, zauważono jedynie niewielką zmianę w konsystencji odchodów. Sekcja zwierząt nie wykazała makroskopowych zmian narządów wewnętrznych (wątroba, nerki, jelita, śledziona, macica) ani zmian masy wy-

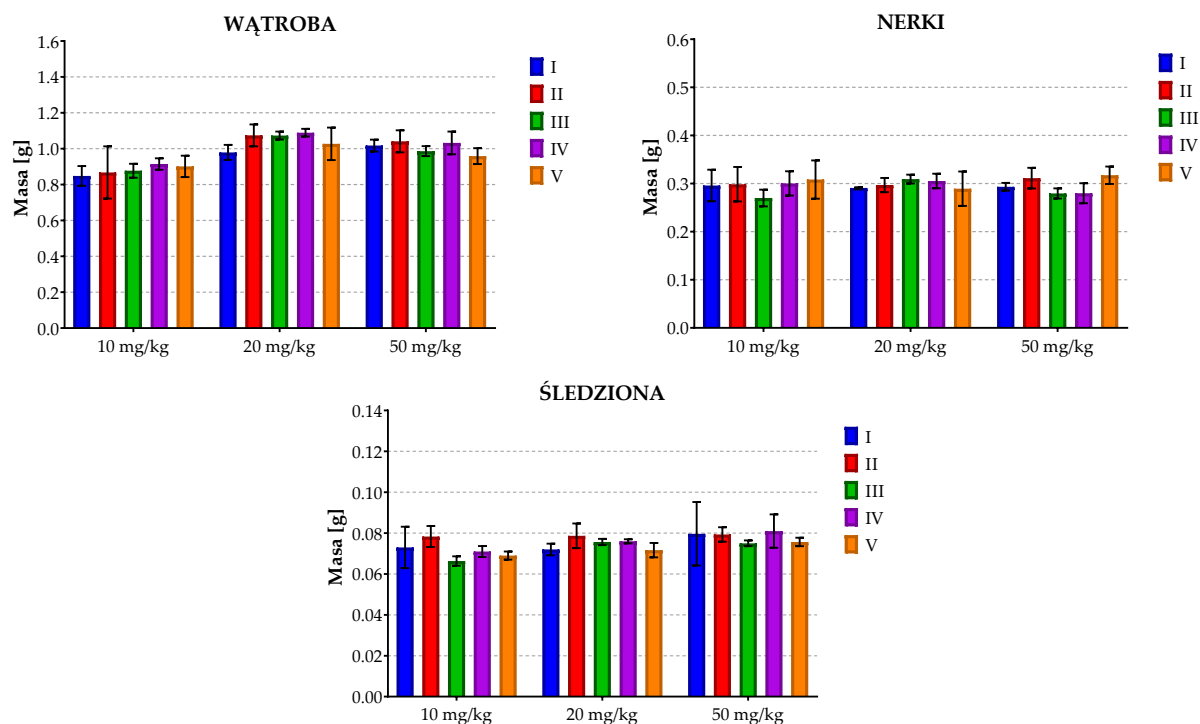


Rysunek 2.7: Masy ciała (z lewej) oraz zmiany masy ciała (z prawej) po podaniu badanych inhibitorów w dawce 20 mg/kg.



Rysunek 2.8: Masy ciała (z lewej) oraz zmiany masy ciała (z prawej) po podaniu badanych inhibitorów w dawce 50 mg/kg.

branych organów (**Rysunek 2.9**). Dodatkowo pod koniec eksperymentu badającego wpływ najwyższej ustalonej dawki (50 mg/kg masy ciała), myszom pobrano krew w celu wykonania badań morfologicznych, aby dokładniej ustalić wpływ testowanych związków na stan zdrowotny zwierząt. Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdziły, iż zaprojektowane inhibitory STS nie wpływają znacząco na skład krwi obwodowej, a parametry opisujące układ czerwono- i białokrwinkowy były w normie (**Tabela 2.4**).



Rysunek 2.9: Masy wybranych narządów pobranych podczas sekcji zwierząt przyjmujących dawki 10, 20 oraz 50 mg/kg masy ciała

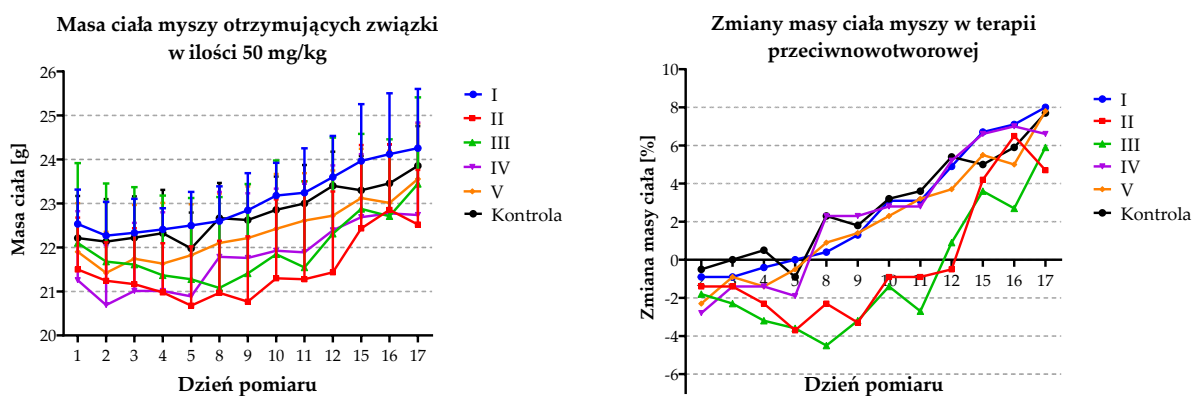
Tablica 2.4: Wyniki morfologii krwi myszy otrzymujących badane związki w dawce 50 mg/kg.

Grupa	WBC [10 ³ /μL]	LIMF [%]	MON [%]	GRAN [%]	RBC [10 ⁶ /μL]	HGB [g/dL]
Kontr.	5,9 ± 1,5	80,3 ± 5,4	4,4 ± 1	15,3 ± 6	8,5 ± 0,6	14,1 ± 1,1
I	4,9 ± 1,3	84,3 ± 2,3	3,4 ± 0,6	12,4 ± 1,7	8,8 ± 0,1	15,2 ± 0,2
II	4,2 ± 0,6	86,6 ± 0,2	2,9 ± 0,4	10,6 ± 0,2	8,9 ± 0,4	15,4 ± 0,5
III	4,0 ± 0,4	85,6 ± 2,6	3,3 ± 1	11,1 ± 1,9	9,2 ± 0,4	15,7 ± 0,5
IV	4,5 ± 0,3	83,5 ± 4,1	3,3 ± 0,6	13,2 ± 3,6	8,8 ± 0,1	15,1 ± 0,2
V	5,1 ± 1,6	85,7 ± 1,7	3,3 ± 0,5	11,0 ± 1,7	9,4 ± 0,4	16,4 ± 0,6

Grupa	HCT [%]	MCV [fL]	MCH [pg]	MCHC [g/dL]	RDW [%]	PLT [10 ³ /μL]
Kontr.	39,2 ± 1,6	48,3 ± 0,9	17 ± 0,3	35,3 ± 0,5	16,8 ± 1	482 ± 27
I	41,1 ± 0,5	46,9 ± 0,3	17,2 ± 0,2	36,7 ± 0,2	17,4 ± 0,3	522 ± 33
II	42 ± 1,9	47,2 ± 0,2	17,3 ± 0,1	36,6 ± 0,4	17,3 ± 0,2	596 ± 64
III	42,3 ± 1,3	46 ± 0,5	17,1 ± 0,2	37,2 ± 0,7	17,6 ± 0,7	511 ± 30
IV	41 ± 0,2	46,8 ± 0,2	17,3 ± 0,3	36,9 ± 0,5	17,9 ± 0,6	518 ± 49
V	44,1 ± 1,3	46,9 ± 0,5	17,4 ± 0,01	37,1 ± 0,4	17,5 ± 0,6	533 ± 34

2.6.2 Badania biologiczne *in vivo* amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu – badania aktywności przeciwnowotworowej

W kolejnym etapie prowadzonych badań wyznaczono aktywność przeciwnowotworową inhibitorów STS **I-V** w mysim modelu raka sutka. Myszy zaszczipiono (ortotopowo) komórkami nowotworu sutka 67NR. W momencie, gdy średnia objętość guzów wyniosła 50 mm³, myszy podzielono na 6 grup doświadczalnych. Następnie rozpoczęto terapię poprzez doustne podawanie substancji aktywnych w dawce ustalonej w teście MTD (50 mg/kg masy ciała) przez 17 dni. W trakcie prowadzonego eksperymentu myszy ważono (**Rysunek 2.10**) oraz badano objętość guza (TV) (**Rysunek 2.12**).



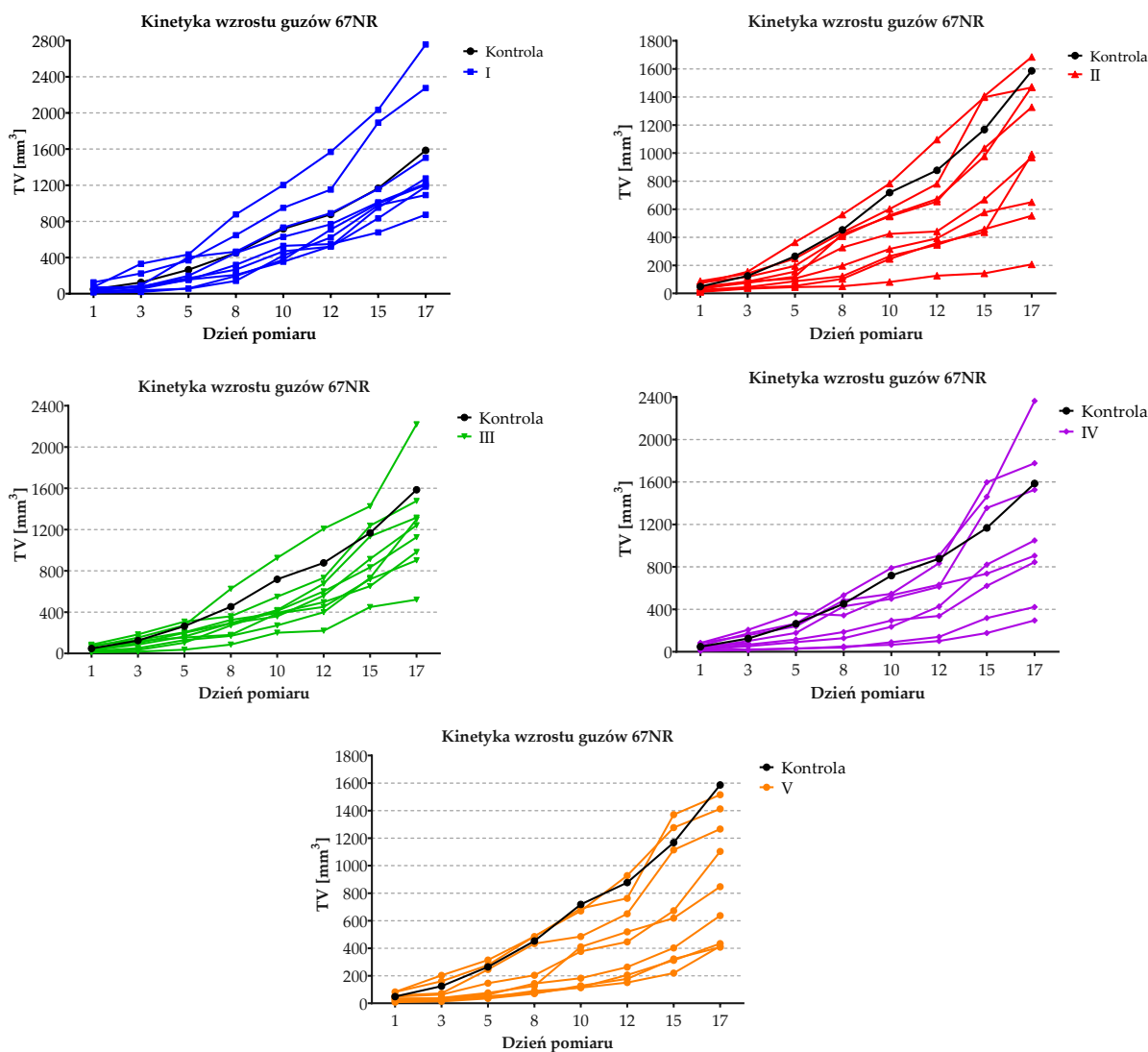
Rysunek 2.10: Masy ciała (z lewej) oraz zmiany masy ciała (z prawej) podczas podawania inhibitorów w dawce 50 mg/kg w terapii przeciwnowotworowej

W ramach eksperymentu zaobserwowano:

Związek **I** – 6 myszy słabo odpowiedziało na leczenie, zaś 1 mysz odpowiedziała w sposób znaczny – objętość guza była o ok. 50% mniejsza niż u grupy kontrolnej. W przypadku 2 myszy zaobserwowano dużo większe rozmiary tkanek nowotworowych niż średnia TV w grupie kontrolnej. W trakcie prowadzonego eksperymentu masa zwierząt wzrastała wraz ze wzrostem rozwijającej się tkanki nowotworowej (**Rysunek 2.11**).

Związek **II** – na terapię odpowiedziało 8 myszy. W tym u 5 rozmiar guza był mniejszy o ok. 50% w zestawieniu z TV w grupie kontrolnej. Podczas terapii początkowo obserwowano niewielki spadek masy ciała zwierząt (w przybliżeniu 4,5%). Jednakże, wraz z postępem eksperymentu masa ciała myszy zaczęła wzrastać (**Rysunek 2.11**).

Związek **III** – na leczenie odpowiedziało 8 myszy. W przypadku 3 z nich rozmiar guza był o ok. 50% mniejszy w porównaniu z TV w grupie kontrolnej. Rozmiar nowotworu u 1 myszy był



Rysunek 2.11: Aktywność przeciwnowotworowa inhibitorów STS w dawce 50 mg/kg – wykresy dla indywidualnych grup eksperymentalnych

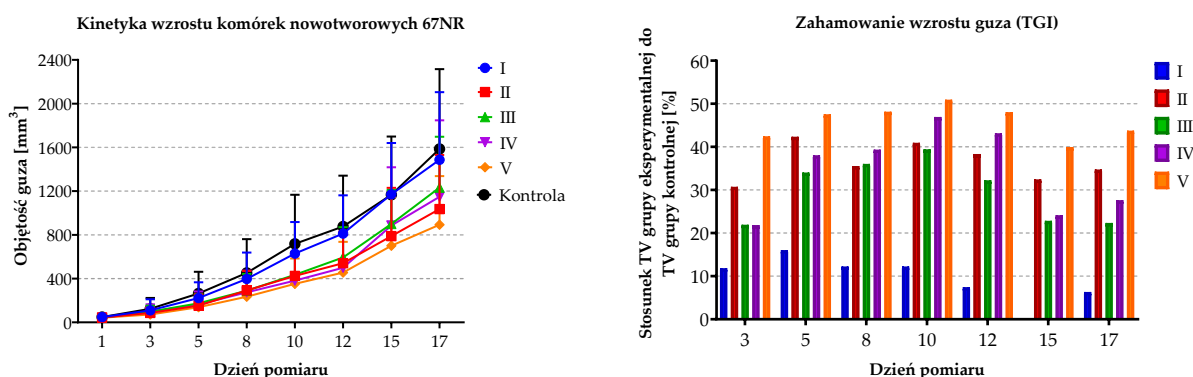
większy niż średnia objętość guza w grupie kontrolnej. Podczas terapii początkowo obserwowano niewielki spadek masy ciała myszy (ok. 3-5%). Jednakże, w kolejnych dniach eksperymentu masa ciała zwierząt zaczęła wzrastać wraz ze wzrostem tkanki nowotworowej (**Rysunek 2.11**).

Związek **IV** – na terapię odpowiedziało 7 myszy. W tym u 5 myszy rozmiar nowotworu był mniejszy o ok. 50% w zestawieniu z TV w grupie kontrolnej. Rozmiar guza u 1 myszy był znacznie większy niż średnia objętość w grupie kontrolnej. W trakcie prowadzonego eksperymentu masa ciała zwierząt wzrastała wraz rozwojem tkanki nowotworowej (**Rysunek 2.11**).

Związek **V** – na leczenie odpowiedziały wszystkie myszy. W tym u 5 z nich rozmiar nowotworu był mniejszy o ok. 50% w zestawieniu z TV w grupie kontrolnej. W trakcie prowadzonego

eksperymentu masa zwierząt wzrastała wraz ze wzrostem rozwijającej się tkanki nowotworowej (**Rysunek 2.11**).

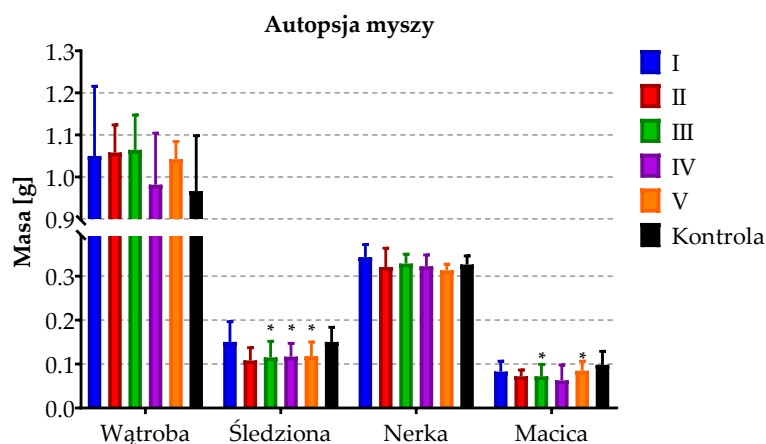
W oparciu o otrzymane rezultaty kinetyki wzrostu tkanki nowotworowej, w kolejnym kroku wyznaczono parametr zahamowania wzrostu guza (TGI). W toku prowadzonych badań okazało się, że związek **I** nie wykazał znaczącego wpływu na rozwój tkanki nowotworowej. Niemniej jednak związki **II-V** wykazały wysoką aktywność przeciwnowotworową, prowadząc do zahamowania wzrostu guza o odpowiednio 42, 39, 47 oraz 51% (**Rysunek 2.12**).



Rysunek 2.12: Kinetyka wzrostu guza 67NR (z lewej) oraz TGI (z prawej) u myszy leczonych doustnie badanymi związkami w dawce 50 mg/kg. N=9; analiza statystyczna: jednokierunkowy test wielokrotnych porównań ANOVA Dunnett. Wartość * $p < 0,05$ w zestawieniu z grupą kontrolną

Pod koniec eksperymentu przeprowadzono sekcję zwierząt. Próbkę krwi pobrano do analizy morfologicznej oraz biochemicznej, a także w celu oznaczenia poziomu estradiolu w osoczu krwi metodą ELISA. Podczas wykonywanej autopsji narządy wewnętrzne zostały pobrane, zważone i poddane analizie makroskopowej. Tkanki nowotworu oraz wątroby pobrano w celu ustalenia aktywności STS metodą radioizotopową.

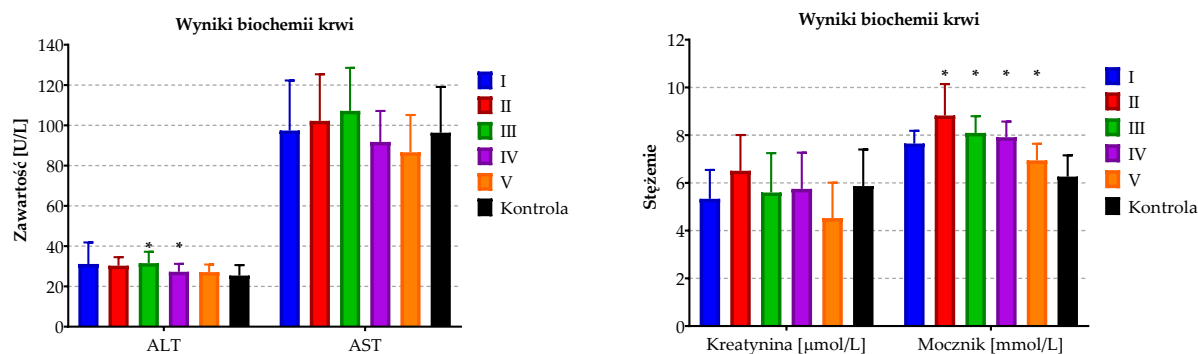
W wyniku przeprowadzonej analizy zaobserwowano powiększenie wątroby u zwierząt przyjmujących testowane związki (z wyjątkiem **IV**), co wiązało się ze wzrostem poziomów aminotransferazy alaninowej (ALT) oraz aminotransferazy asparaginianowej (AST) (**Tabela 2.5**). Dodatkowo u myszy, które poddane zostały leczeniu związkami **II-V** zauważono znaczące zmniejszenie masy śledziony. Powodem tego był spadek całkowitej liczby białych krwinek (WBC), a w szczególności limfocytów (w zestawieniu z grupą kontrolną oraz z grupą zdrowych myszy). Badania autopsji nie wykazały powiększenia się nerek. W przypadku myszy leczonych substancjami **II** oraz **IV** zaobserwowano nieznaczne zmniejszenie masy macicy. U wszystkich zwierząt z rozwijającym się nowotworem zaobserwowano wzrost liczby monocytów oraz granulocytów oraz wzrost odsetek białych krwinek. Jest to naturalne zjawisko zachodzące w przypadku rozwijających się stanów zapalnych współtowarzyszących chorobom nowotworowym (**Rysunek 2.13**).



Rysunek 2.13: Masy narządów podczas wykonania autopsji; * istotność statystyczna w zestawieniu z grupą kontrolną na podstawie testu U Manna-Whitneya; $p < 0,05$

Obniżona liczba erytrocytów (RBC) oraz nieznacznie obniżony poziom hemoglobiny (HGB) i hematokrytu (HCT) został również zaobserwowany w zestawieniu z poziomami tych parametrów u zdrowych myszy (**Tabela 2.5**). Niemniej jednak wyniki analizy wskazują, że nie wystąpiła znacząca różnica w otrzymanych rezultatach pomiędzy grupą kontrolną a grupami eksperymentalnymi, co może wskazywać, że badane związki nie miały znaczącego wpływu na układ krwinek czerwonych. Analiza biochemiczna krwi wykazała wzrost poziomu mocznika u zwierząt grup eksperymentalnych, co jest często obserwowanym zjawiskiem w chemioterapii nowotworów (**Rysunek 2.14**).

Co więcej, analiza immunoenzymatyczna osocza krwi wykazała spadek stężenia estradiolu w przypadku każdej grupy eksperymentalnej przyjmującej badane związki (**Rysunek 2.15**). Dodatkowo test radioizotopowy ujawnił bardzo wysoką zdolność inhibicyjną zaprojektowanych



Rysunek 2.14: Biochemia krwi myszy otrzymujących badane związki w dawce 50 mg/kg w terapii przeciwnowotworowej; * istotność statystyczna w zestawieniu z grupą kontrolną na podstawie testu U Manna-Whitneya; $p < 0,05$

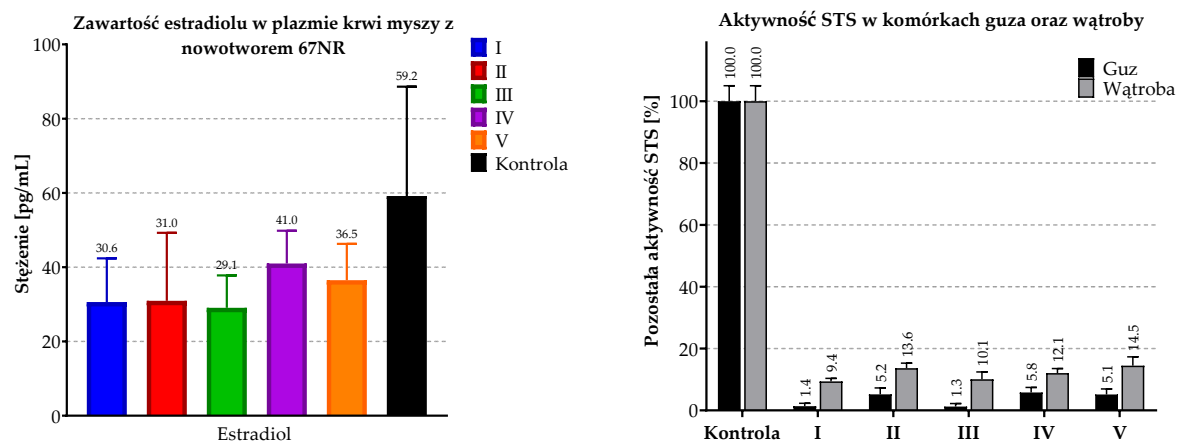
Tablica 2.5: Morfologia krwi myszy otrzymujących badane związki w dawce 50 mg/kg w terapii przeciwnowotworowej; * istotność statystyczna w zestawieniu z grupą kontrolną na podstawie testu U Manna-Whitneya; $p < 0,05$

Grupa	WBC [103/ μ L]	LIMF [103/ μ L]	MON [103/ μ L]	GRAN [103/ μ L]	LIMF [%]	MON [%]	GRAN [%]
Zdrowe myszy	5,9 \pm 1,5	4,7 \pm 1	0,2 \pm 0,1	0,9 \pm 0,6	80,3 \pm 5,4	4,4 \pm 1	15,3 \pm 6
Kontrola	7,7 \pm 3,5	5,2 \pm 2,7	0,7 \pm 0,2	1,9 \pm 0,7	66 \pm 5,2	9,3 \pm 2	24,7 \pm 3,8
I	6,1 \pm 2,1	4,4 \pm 1,8	0,5 \pm 0,1	1,3 \pm 0,4*	70,7 \pm 6,3	8,5 \pm 2,1	20,8 \pm 5,1
II	5,2 \pm 1,8	3,7 \pm 1,2	0,5 \pm 0,2	1,1 \pm 0,6*	71,5 \pm 8	9 \pm 2,5	19,6 \pm 5,9
III	4,8 \pm 1,1*	3,3 \pm 0,7	0,5 \pm 0,1*	1,1 \pm 0,5*	67,6 \pm 7,4	9,7 \pm 2,2	22,7 \pm 7
IV	5,2 \pm 1	3,7 \pm 0,7	0,5 \pm 0,1	1 \pm 0,4*	72,1 \pm 7,6	9,2 \pm 2,1	18,7 \pm 5,8*
V	5,2 \pm 1,4	3,7 \pm 1,3	0,5 \pm 0,1*	1,1 \pm 0,5*	70,3 \pm 9,3	8,6 \pm 1,4	21,1 \pm 8,2

Grupa	RBC [106/ μ L]	HGB [g/dL]	HCT [%]	MCV [fL]	MCH [pg]	MCHC [g/dL]	RDW [%]
Zdrowe myszy	8,5 \pm 0,6	14,1 \pm 1,1	39,2 \pm 1,6	48,3 \pm 0,9	17 \pm 0,3	35,3 \pm 0,5	16,8 \pm 1
Kontrola	7,7 \pm 0,5	13,9 \pm 0,6	35,6 \pm 1,8	46,4 \pm 0,8	18,2 \pm 0,4	39,2 \pm 0,6	18,9 \pm 0,6
I	7,4 \pm 0,4	13,4 \pm 0,6	34,6 \pm 1,6	47 \pm 1,2	18,2 \pm 0,4	38,6 \pm 0,5	19,2 \pm 1,2
II	7,4 \pm 0,7	13,5 \pm 0,9	35 \pm 2,4	47,4 \pm 2,8	18,3 \pm 0,9	38,6 \pm 0,6	19,1 \pm 1,5
III	7,5 \pm 0,5	13,3 \pm 0,8	34,7 \pm 2,1	46,4 \pm 0,7	17,8 \pm 0,3	38,3 \pm 0,4*	18,4 \pm 1
IV	7,6 \pm 0,8	13,5 \pm 1,1	35,9 \pm 3,2	47,1 \pm 1	17,7 \pm 0,5*	37,6 \pm 0,7*	18 \pm 0,5*
V	7,8 \pm 0,7	13,7 \pm 0,9	36,6 \pm 2,7	46,8 \pm 0,9	17,6 \pm 0,5*	37,6 \pm 0,6*	18,2 \pm 0,5*

Grupa	PLT [103/ μ L]	MPV [fL]	PDW [fL]	PCT [%]
Zdrowe myszy	482 \pm 27	5,7 \pm 0,1	26 \pm 2,4	0,276 \pm 0,02
Kontrola	516,1 \pm 169,5	5 \pm 0,3	31,4 \pm 8,7	0,254 \pm 0,08
I	573,1 \pm 95,6	4,9 \pm 0,1	25,6 \pm 3,8	0,280 \pm 0,04
II	508,6 \pm 69	5 \pm 0,1	26,9 \pm 4,8	0,255 \pm 0,04
III	463,1 \pm 74	5 \pm 0,1	29,3 \pm 4,6	0,233 \pm 0,035
IV	503,3 \pm 59,8	4,9 \pm 0,1	24,9 \pm 3	0,250 \pm 0,03
V	512,2 \pm 72,3	4,9 \pm 0,2	27,1 \pm 3,2	0,248 \pm 0,03

związków do hamowania STS w tkankach wątroby oraz guza. Okazało się, że aktywność wszystkich badanych pochodnych kształtowała się na zbliżonym poziomie (**Rysunek 2.15**) powodując zahamowanie aktywności sulfatazy steroidowej w komórkach guza nawet w 98,7% (dla związku **III**).

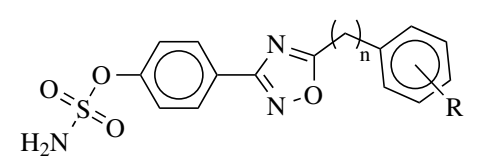


Rysunek 2.15: Pozostała aktywność STS w pobranych tkankach guza oraz wątroby myszy biorących udział w terapii (z lewej). Poziom estradiolu w osoczu myszy z nowotworem 67NR (z prawej) leczonym doustnie badanymi związkami w dawce 50 mg/kg. N=9; analiza statystyczna – test U Manna-Whitneya, $p < 0,05$.

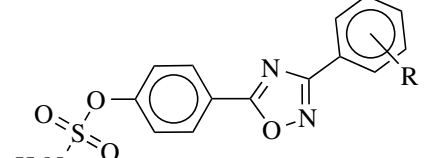
2.7 Modelowanie molekularne amidosiarczanowych pochodnych 1,2,4-oksadiazolu

W kolejnym kroku prowadzonych badań podjąłem się zadania obejmującego szereg eksperymentów komputerowych opartych na technikach dokowania molekularnego w celu zaprojektowania amidosiarczanowych pochodny 3,5-diarylopodstawionych-1,2,4-oksadiazolu, charakteryzujących się najlepszym dopasowaniem do centrum katalitycznego enzymu. Analogicznie jak miało to miejsce w przypadku pochodnych 1,2,3-triazolu, w pierwszej kolejności postanowiłem zaprojektować serię pochodnych zawierających w swojej konstytucji atomy fluoru. Ponadto, do-

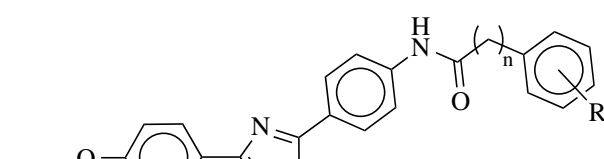
Tablica 2.6: Rezultaty dokowania molekularnego amidosiarczanowych pochodnych 1,2,4-oksadiazolu **IIa-c**, **IIIa-b**, **IVa-c**, **Va-b**, **VIa-c** oraz związku referencyjnego – **Irosustatu**



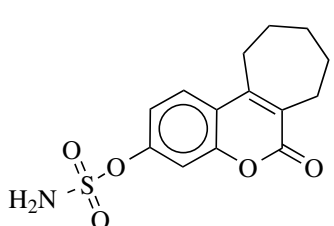
IIa-c, IVa-c



IIIa-b



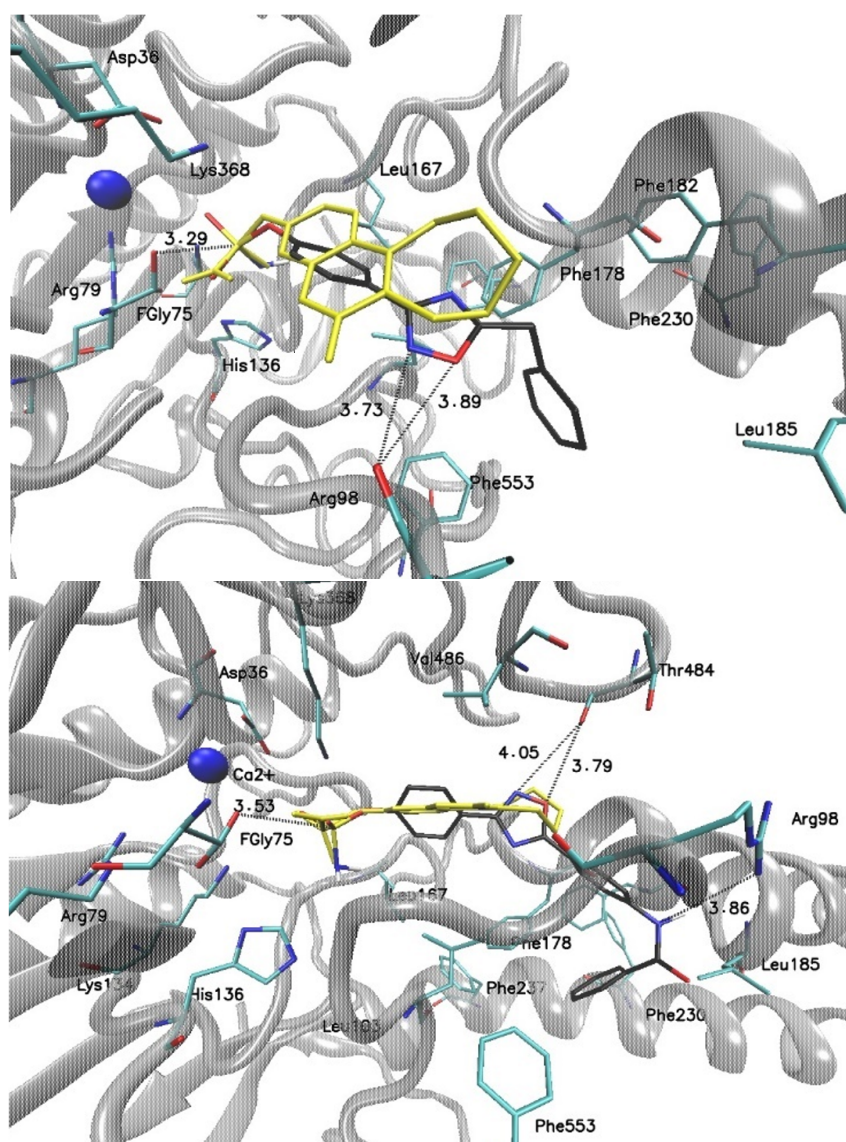
Va-b, VIa-c



Irosustat

Nazwa	R	n	Swobodna energia wiązania [kcal/mol]
IIa	H	0	-6,0
IIb	3-F	0	-5,6
IIc	4-NO ₂	0	-5,5
IIIa	H	0	-6,2
IIIb	3-F	0	-5,7
IVa	H	1	-6,5
IVb	3-F	1	-6,6
IVc	3,4-diF	1	-7,0
Va	H	0	-7,9
Vb	3-F	0	-7,5
VIa	H	1	-8,1
VIb	3-F	1	-8,0
VIc	3,4-diF	1	-7,9
Irosustat	-	-	-5,4

datkowym celem prowadzonych badań było zbadanie wpływu wprowadzenia ugrupowania metylenowego pomiędzy terminalnym pierścieniem aromatycznym a heterocyklem 1,2,4-oksadiazolu na aktywność inhibicyjną potencjalnych inhibitorów. „Wydłużenie” cząsteczki powodowało oddalenie terminalnego pierścienia aromatycznego od centrum aktywnego enzymu w obszar aminokwasów o charakterze hydrofobowym. Dodatkowe interakcje występujące pomiędzy pierścieniami aromatycznymi reszt aminokwasowych znajdującymi się w zewnętrznym obszarze centrum katalitycznego enzymu a pierścieniem aromatycznym potencjalnego inhibitora, mogą znacząco wpływać na stabilizację układu białko-ligand prowadząc to wzrostu aktywności biologicznej. Wobec powyższego, postanowiłem również zaprojektować pochodne 1,2,4-oksadiazolu zawierające



Rysunek 2.16: Wizualizacja struktury kompleksu inhibitor-enzym dla związków **IVa** (u góry) oraz **Va** (na dole). Kolorem żółtym oznaczono związek referencyjny – **Irosustat**

w swojej strukturze ugrupowania benzamidofenyłowe oraz fenyloacetamidowe w terminalnym pierścieniu aromatycznym.

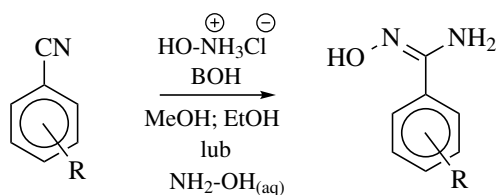
Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów wyselekcjonowałem 13 pochodnych 1,2,4-oksadiazolu. Wyniki badań dokowania molekularnego wskazały na wysoki stopień dopasowania zaprojektowanych związków do centrum aktywnego enzymu (**Rysunek 2.16**). Obliczone przez program dokujący wartości swobodnych energii wiązania kompleksów inhibitor-enzym kształtowały się na bardzo zadowalającym poziomie osiągając wartości w przedziale od $-5,6$ do $-8,1$ kcal/mol (**Tabela 2.6**). Wartość swobodnej energii wiązania dla związku referencyjnego wynosiła w tym przypadku $-5,4$ kcal/mol. Niższa wartość swobodnych energii wiązań może wynikać z dodatkowych interakcji stabilizujących układ ligand-enzym (np. typu van der Waalsa, oddziaływania wodorowe). Zaprojektowane związki z serii oksadiazolu dokowały się w bliskim otoczeniu fGly75, co ma kluczowe znaczenie w zachowaniu aktywności inhibicyjnej. W toku przeprowadzonych eksperymentów zauważyłem, iż wartości swobodnych energii wiązań pochodnych zawierających w swojej konstytucji trzy pierścienie aromatyczne (amidosiarczanowe pochodne 4-(5-(4-benzamidofenylo)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylo oraz 4-(5-(4-(2-fenyloacetamido)fenylo)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylo), były korzystniejsze niż w przypadku pozostałych analogów (**Tabela 2.6**). Oznacza to, iż tworzenie dodatkowych oddziaływań typu hydrofobowego, może mieć kluczowe znaczenie w rozpoznawaniu inhibitora przez enzym, jego wiązaniu oraz aktywności.

2.8 Synteza amidosiarczanowych pochodnych 1,2,4-oksadiazolu

Po dokonanej selekcji potencjalnych inhibitorów STS, w następnym kroku przystąpiłem do syntezy chemicznej. Zaprojektowane związki podzieliłem na cztery serie, które wymagały zróżnicowanego podejścia syntetycznego. Tworzenie pierścienia heterocyklicznego przeprowadzałem poprzez kondensację odpowiednich pochodnych *N'*-hydroksybenzenokarboksyimidoamidów z aktywowaną formą pochodnej kwasu benzoowego lub fenyllooctowego.

2.8.1 Synteza *N'*-hydroksybenzenokarboksyimidoamidów

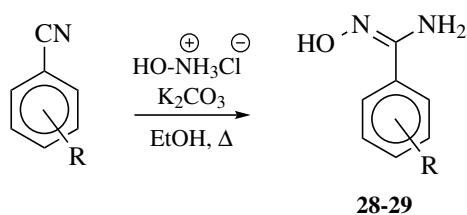
Pomimo wielu doniesień w literaturze chemicznej dotyczących otrzymywania zróżnicowanych pochodnych benzenokarboksyimidoamidów, synteza tych związków nie okazała się trywialna. W związku z tym, iż zapotrzebowanie ww. pochodnych było duże, postanowiłem opracować metodę, która pozwoliłaby mi na ich otrzymanie z wysoką wydajnością bez konieczności oczyszczania.



Schemat 2.3: Ogólny schemat otrzymywania pochodnych *N'*-hydroksybenzenokarboksyimidoamidów; BOH = K₂CO₃, NaHCO₃, NaH, TEA, DIPEA

Otóż najpopularniejszą metodą otrzymywania pochodnych benzenokarboksyimidoamidów jest reakcja odpowiedniej pochodnej nitrilu z hydroksyloaminą (występującej w formie chlorowodoru lub w postaci 50% wodnego roztworu) (**Schemat 2.3**). Doniesienia literaturowe wskazywały na wysoki stopień konwersji prowadzonych reakcji (powyżej 95%), często bez konieczności oczyszczania produktu [277]).

Reakcje otrzymywania dwóch pochodnych – *N'*-hydroksybenzenokarboksyimidoamidu (**28**) oraz 3-fluoro-*N'*-hydroksybenzenokarboksyimidoamidu (**29**) zachodziły z zadowalającym rezultatem. Otrzymałem je w reakcji pochodnej benzonitrylu z chlorowodorkiem hydroksyloaminy w obecności bezwodnego węgla potasu w absolutnym etanolu. Reakcję prowadziłem przez 16h, ogrzewając mieszaninę reakcyjną w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Odsączenie pozostałego osadu i odparowanie przesączu prowadziło do otrzymania czystych produktów z wysoką wydajnością (94-96%) (**Schemat 2.4**).



Schemat 2.4: Schemat otrzymywania pochodnych **28** (R = H), **29** (R = 3-F), **30** (R = 4-OH) oraz **31** (R = 4-OMe) **metodą I**

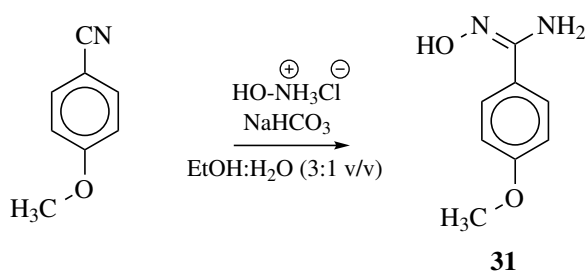
Inna sytuacja wystąpiła w przypadku pochodnych *N'*,4-dihydroksybenzenokarboksyimidoamidu (**30**) oraz 4-metoksy-*N'*-hydroksybenzenokarboksyimidoamidu (**31**). Reakcja w analogicznych warunkach zachodziła z niepełną konwersją. Analiza TLC mieszaniny reakcyjnej wskazywała na sporą ilość nieprzereagowanego substratu, pomimo używania nadmiaru chlorowodoru hydroksyloaminy oraz zasady (od 2,6 do aż 6 ekwiwalentów). Wydłużony czas reakcji powodował powstawanie bliżej niezidentyfikowanych produktów ubocznych, co prowadziło do znaczącego pogorszenia wydajności prowadzonej reakcji lub uniemożliwiało izolację czystego produktu. Ponadto okazało się, iż podczas oczyszczania mieszaniny reakcyjnej produkt degradował. Zateżnienie roztworu zawierającego surowy produkt powodowało zmianę jego zabarwienia z bladej żółtej na brunatnozieloną. Pomimo doniesień literaturowych sugerujących wysoką stabilność otrzymanego produktu obserwowałem odwrotne właściwości związku [277]. Dzięki zastosowaniu metody izolacji typu rozpuszczalnik-antyrozpuszczalnik przeprowadziłem krystalizację produktu bez konieczności zateżnienia mieszaniny reakcyjnej⁴. W wyniku tej operacji otrzymałem krystaliczną formę związku, aczkolwiek z zanieczyszczeniem na poziomie 15% w przypadku pochodnej 4-metoksy-*N'*-hydroksybenzenokarboksyimidoamidu oraz 4% w przypadku pochodnej *N'*,4-dihydroksybenzenokarboksyimidoamidu (**Rysunek 2.17**). Notabene, analogiczne zanieczyszczenia tworzyły się również w przypadku syntezy związków **28** oraz **29**, niemniej jednak ich ilości były znikome (w przybliżeniu 3% na podstawie analizy ¹H NMR).

Dzięki współpracy z panią dr. inż. Katarzyną Szwarz-Karabką z Laboratorium Magnetycznego Rezonansu Jądrowego Pracowni Badań Strukturalnych PG, na podstawie szczegółowych analiz widm ¹H NMR oraz HMBC i HSQC udało mi się ustalić, iż powstającym produktem ubocznym podczas prowadzenia reakcji otrzymywania pochodnej **30** był 4-metoksybenzamid. Na **Rysunku 2.17** przedstawiłem zarejestrowane widmo ¹H NMR otrzymanego w wyniku krystalizacji związku **31**. Zidentyfikowane sygnały o wartościach przesunięcia chemicznego 7,86; 7,20; 6,98 oraz 3,80 pochodziły od pochodnej benzamidowej. Fakt ten potwierdziłem poprzez porównanie literaturowego widma NMR oraz przeprowadzenie szeregu eksperymentów spektroskopowych

⁴Do mieszaniny reakcyjnej, po jej uprzednim przesączeniu, wprowadzałem eter naftowy w celu strącenia produktu z dodatkiem niewielkich ilości eteru dietylowego

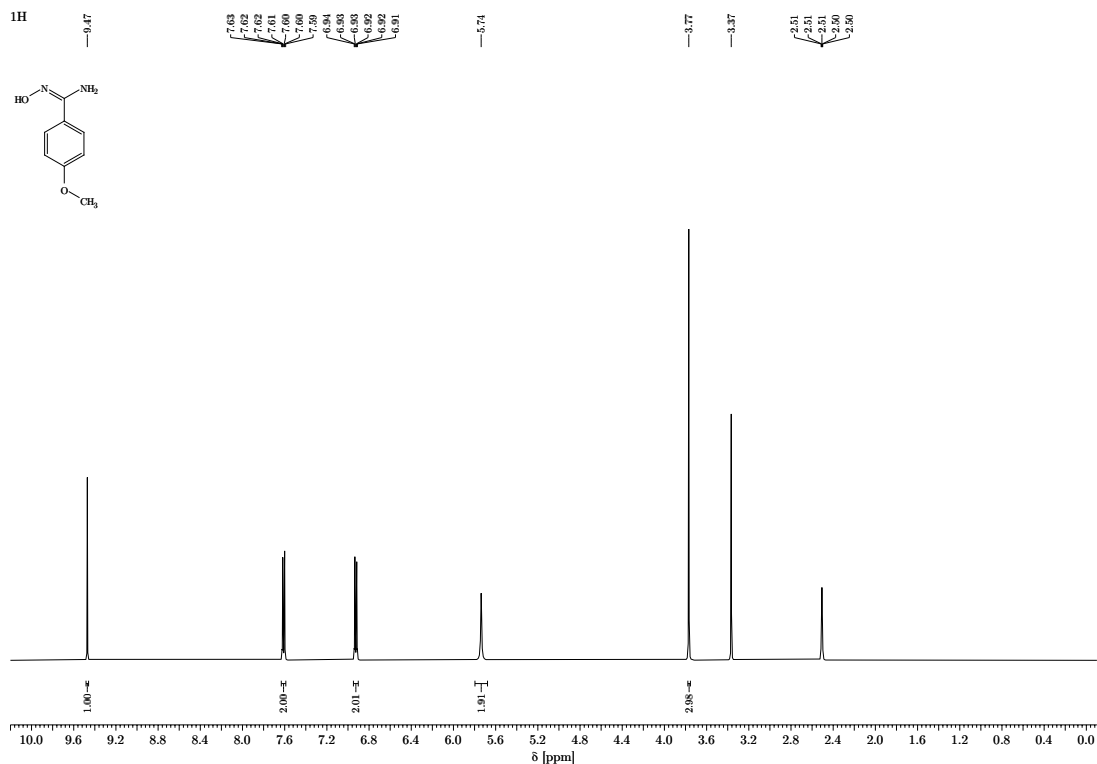
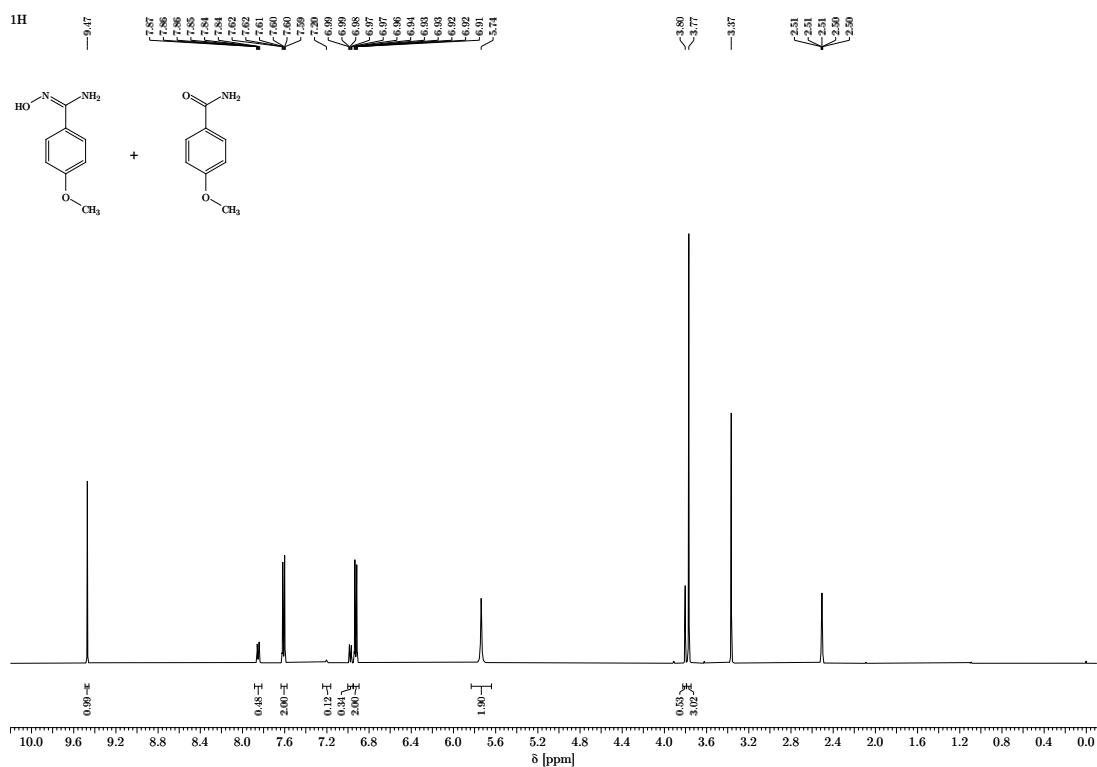
HMBC oraz HSQC (**Rysunek 2.17**).

W literaturze chemicznej znajduje się szereg informacji o powstawaniu benzamidów (jako produktu ubocznego) w reakcji otrzymywania *N'*-hydroksybenzenokarboksyimidoamidów **metodą I**. Węgierski zespół z Uniwersytetu Technologii i Ekonomii w Budapeszcie przeprowadził szeroko zakrojone badania w celu rozwiązania tego problemu [278]. Komplikację tą udało się przezwyciężyć poprzez zastosowanie cieczy jonowych jako rozpuszczalnika. Dzięki temu podejściu całkowicie wyeliminowano formowanie się pochodnych benzamidu. Niemniej jednak, taka strategia syntetyczna wymaga sporego nakładu finansowego, którym jest koszt cieczy jonowej, jak również wykazuje wiele niedogodności związanych z izolacją produktu z mieszaniny poreakcyjnej zawierającej ciecz jonową.



Schemat 2.5: Schemat otrzymywania 4-metoksy-*N'*-hydroksybenzenokarboksyimidoamidu (**31**) metodą II

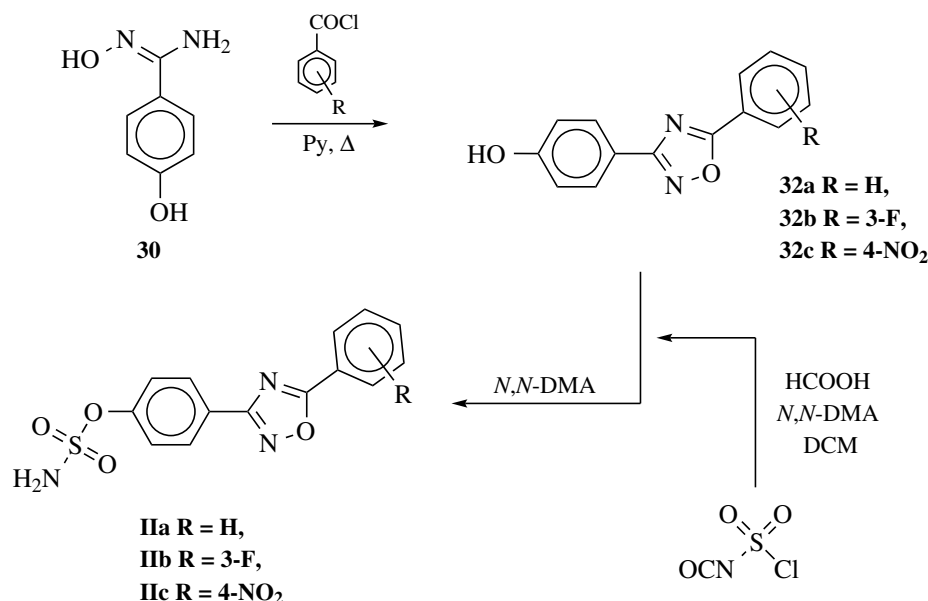
Biorąc pod uwagę informacje opisane w literaturze postanowiłem przeprowadzić eksperyment syntezy związku **31** stosując NaHCO₃ jako zasadę (**Schemat 2.5**) Po wprowadzeniu wodorowęglanu sodu do alkoholowego roztworu chlorowodoru hydroksyloaminy, natychmiastowo zaczęły wydzielać się pęcherzyki gazu bez konieczności podgrzewania mieszaniny reakcyjnej. Następnie, po 10 minutach wprowadziłem 4-metoksybenzonitryl i całość pozostawiłem w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 16h. Następnie mieszaninę reakcyjną ekstrahowałem dwukrotnie octanem etylu, po czym rozpuszczalnik odparowałem otrzymując żółtawy osad. Analiza ¹H NMR surowego produktu wykazała obecność niewielkiej ilości substratu. Dodatkowo nie zaobserwowałem powstawania 4-metoksybenzamidu. Surowy produkt udało się skutecznie oczyścić z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej. Proces otrzymywania pochodnych *N'*-hydroksybenzenokarboksyimidoamidów zoptymalizowałem poprzez wydłużenie czasu reakcji do 24h w temperaturze 80°C, czego skutkiem było otrzymanie czystych produktów bez konieczności stosowania preparatywnej chromatografii kolumnowej. Widmo ¹H NMR otrzymanego związku **31** przedstawiłem na **Rysunku 2.17**.



Rysunek 2.17: Widma spektroskopii ¹H NMR związku **31** otrzymanego **metodą I** (powyżej) oraz **metodą II** (poniżej)

2.8.2 Synteza amidosiarczanowych pochodnych 4-(5-fenyl-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu

W kolejnym etapie prowadzonych badań przystąpiłem do syntezy chemicznej amidosiarczanowych pochodnych 4-(5-fenyl-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu wyselekcjonowanych na podstawie przeprowadzonych eksperymentów z zakresu dokowania molekularnego. Potencjalne inhibitory STS otrzymałem według strategii syntetycznej przedstawionej na **Schemacie 2.6**.



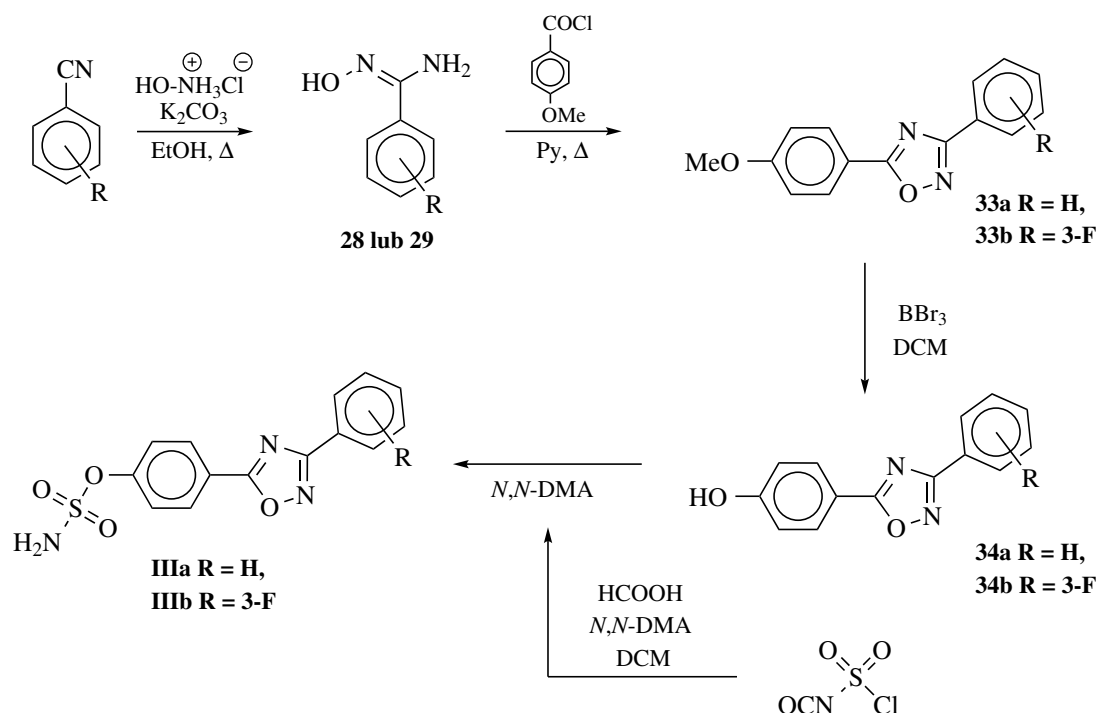
Schemat 2.6: Schemat otrzymywania amidosiarczanowych pochodnych 4-(5-fenyl-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu **IIa-c**

W pierwszej kolejności otrzymywałem fenolowe pochodne rdzeni inhibitorów (**32a-c**) w wyniku reakcji kondensacji związku **30** z odpowiednią pochodną chlorku kwasu benzoowego (otrzymywanego *in situ* w wyniku reakcji kwasu z chlorkiem tionylu) w bezwodnej pirydynie. W wyniku ogrzewania mieszaniny reakcyjnej przez 16h, otrzymałem pochodne fenolu **32a-c** z zadowalającą wydajnością (49-56%). W kolejnym etapie otrzymane pochodne poddałem reakcji z chlorkiem sulfamoilu generowanym *in situ* z chloroizocyjanianu siarczyny otrzymując finalne związki **IIa-c** z wydajnościami sięgającymi 56%.

2.8.3 Synteza amidosiarczanowych pochodnych 4-(3-fenyl-1,2,4-oksadiazol-5-ilo)fenylu

W kolejnym etapie prowadzonych badań przeprowadziłem syntezę zaprojektowanych amidosiarczanowych pochodnych 4-(3-fenyl-1,2,4-oksadiazol-5-ilo)fenylu. Moja strategia syntetycz-

na została przedstawiona na **Rysunku 2.7**:



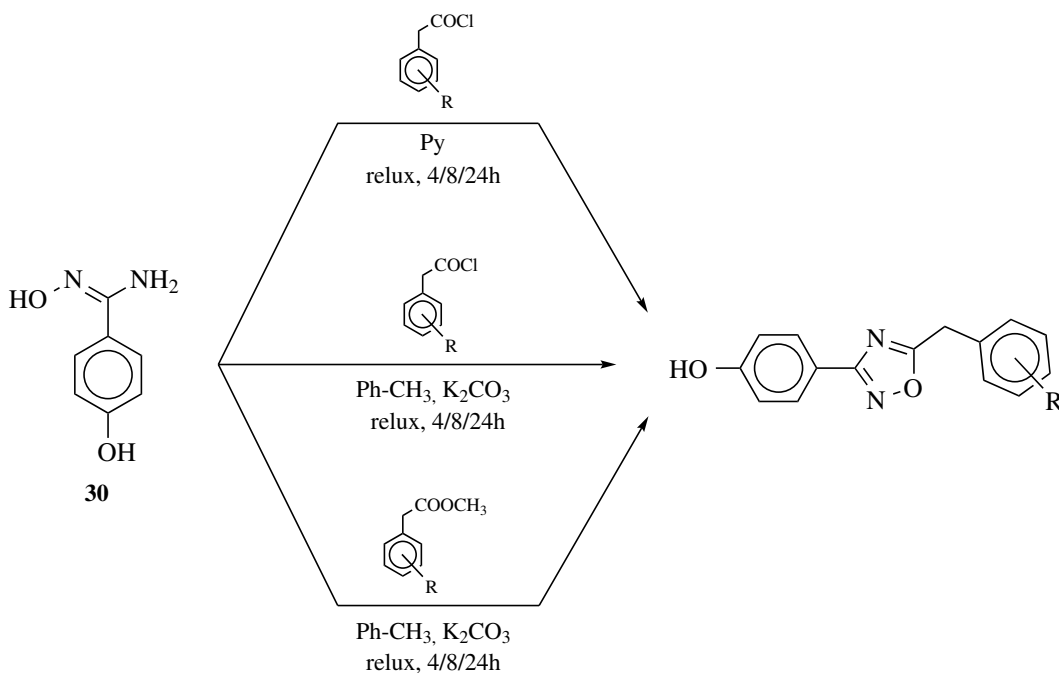
Schemat 2.7: Schemat otrzymywania amidosiarczanowych pochodnych 4-(5-fenyl-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu **IIIa-b**

W pierwszym etapie przeprowadziłem reakcję kondensacji chlorku kwasu *p*-metoksybenzoesowego z odpowiednimi pochodnymi *N'*-hydroksybenzenokarboksyimidoamidów (**28** oraz **29**) w bezwodnej pirydynie, otrzymując fenolowe rdzenie potencjalnych inhibitorów (**33a-b**) zawierające ochronę funkcji hydroksylowej. Na tym etapie syntezy chemicznej wydajności przeprowadzonych reakcji sięgały 64%. Następnie, otrzymane produkty poddałem reakcji z BBr_3 w celu usunięcia ochrony funkcji fenolowej. Na tym etapie prowadzenia syntezy wydajności procesów mieściły się w zakresie od 80 do 90%. Ostatni etap polegał na funkcjonalizacji ugrupowania hydroksylowego w celu wprowadzenia farmakoforu amidosiarczanowego. W wyniku reakcji fenolowych pochodnych **34a-b** z chlorkiem sulfamoylu wytwarzanym z chloroizocyjanianu siarczyny otrzymałem pożądane produkty (**IIIa-b**) z wydajnościami sięgającymi 60%.

2.8.4 Synteza amidosiarczanowych pochodnych 4-(5-benzylo-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu

Następnym krokiem prowadzonych badań było otrzymanie na drodze syntezy chemicznej amidosiarczanowych pochodnych 4-(5-benzylo-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu. W pierwszym etapie podjąłem się próby otrzymywania ww. związków stosując procedury syntetyczne opisane w

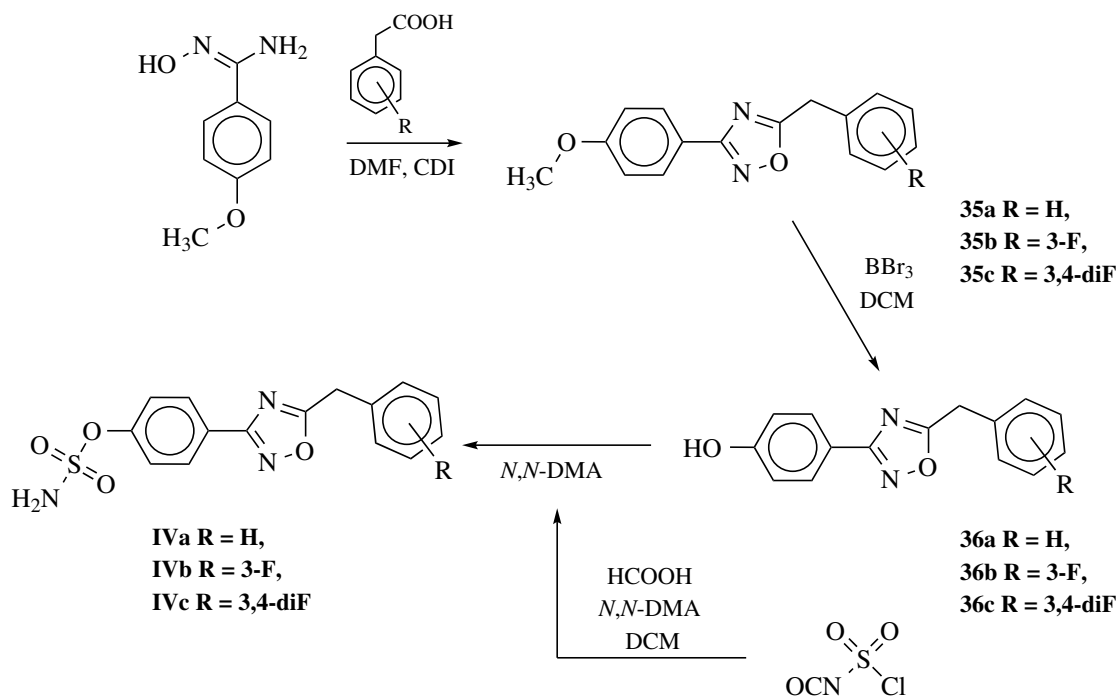
powyższych podrozdziałach 2.8.2 oraz 2.8.3. Niestety, w wyniku reakcji *N'*-hydroksybenzenokarboksyimidoamidu z generowaną *in situ* pochodną chlorku kwasu fenylooctowego na podstawie analizy TLC mieszaniny reakcyjnej obserwowałem powstawanie kilku produktów. Po wykonaniu kilku eksperymentów polegających na skróceniu czasu prowadzenia reakcji (do 12; 8 oraz 4 godzin) nie otrzymałem pożądanego produktu. Wobec powyższego, postanowiłem wykorzystać inne strategie syntetyczne opisane w literaturze chemicznej (**Schemat 2.8**)



Schemat 2.8: Schemat przeprowadzonych strategii syntetycznych w celu otrzymania pochodnych 4-(5-benzylo-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenolu

Początkowo przeprowadziłem reakcję kondensacji związku **30** z chlorkiem kwasowym lub estrem metylowym pochodnej kwasu fenylooctowego w obecności K₂CO₃ w bezwodnym toluenie. Niestety, w wyniku przeprowadzenia szeregu eksperymentów nie uzyskałem pożądanego wyniku. Na podstawie danych literaturowych wykonałem szereg badań polegających na aktywacji funkcji karboksylowej pochodnej kwasu fenylooctowego za pomocą CDI w bezwodnym DMF i następnie kondensacji otrzymanego *in situ* intermediatu z 4-metoksy-*N'*-hydroksybenzenokarboksyimidoamidem (**Schemat 2.9**)

W wyniku przeprowadzonych reakcji udało mi się otrzymać pożądanego produktu w postaci metoksylowych pochodnych **35a-c** z wydajnościami sięgającymi 64%. W kolejnym kroku przeprowadziłem deprotekcję ugrupowania fenolowego za pomocą BBr₃ w bezwodnym DCM, czego efektem było otrzymanie związków **36a-c** z wydajnościami w zakresie od 27 do 67%. Następnie, przeprowadziłem reakcje sulfamoilowania za pomocą chlorku sulfamoilu. Ostatni etap procedury

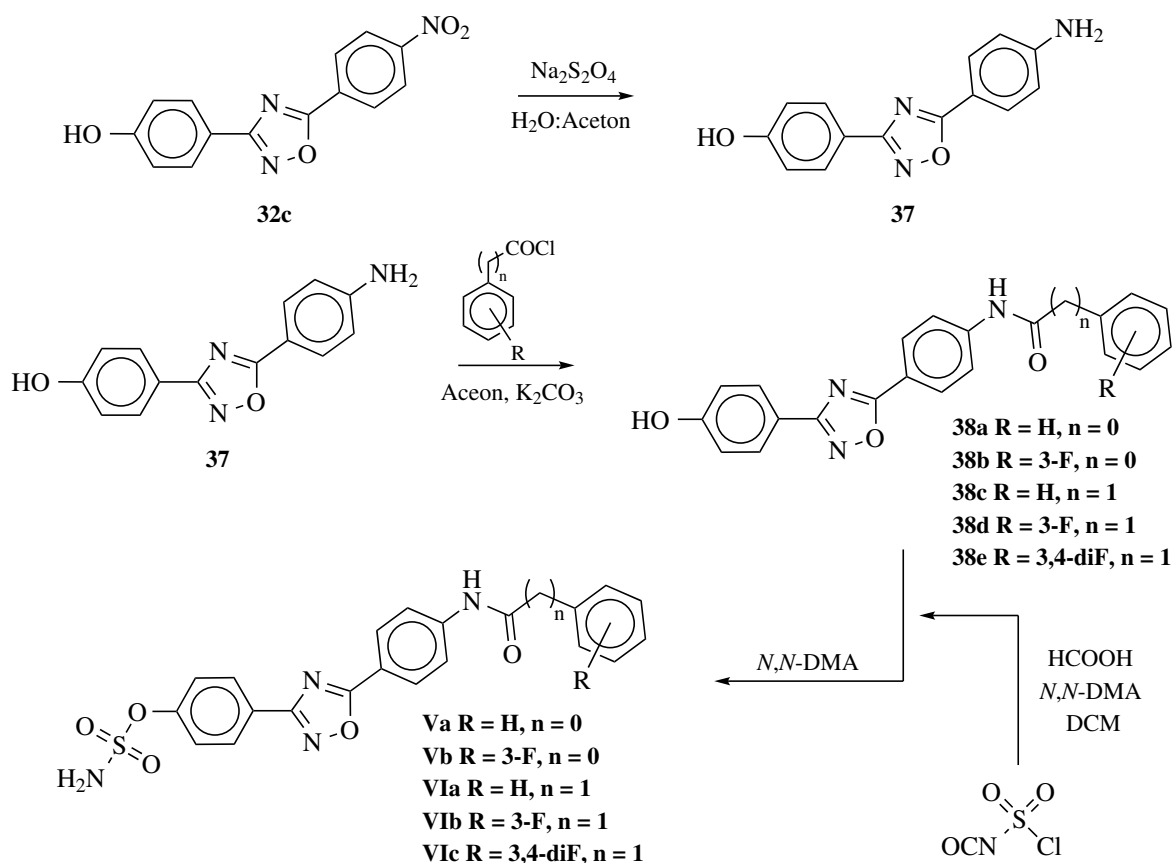


Schemat 2.9: Schemat otrzymywania amidosiarczanowych pochodnych 4-(5-benzyl-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu **IVa-c**

syntetycznej zachodził z wydajnościami sięgającymi 46%. Na tym etapie badań warunki reakcji nie były optymalizowane.

2.8.5 Synteza amidosiarczanowych pochodnych 4-(5-(4-benzamidofenyl)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu oraz 4-(5-(4-(2-fenylacetamido)fenyl)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu

W ostatnim etapie otrzymywania inhibitorów bazujących na strukturze 1,2,4-oksadiazolu, postanowiłem przeprowadzić syntezę amidosiarczanowych pochodnych 4-(5-(4-benzamidofenyl)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu oraz 4-(5-(4-(2-fenylacetamido)fenyl)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu. Strategia syntetyczna otrzymywania ww. analogów została przedstawiona na (**Schemacie 2.10**). W pierwszej kolejności podjąłem się redukcji grupy nitrowej do funkcji aminowej związku **32c** za pomocą ditionianu sodu jako reduktora. W wyniku reakcji otrzymałem czysty produkt **37** z wydajnością 48%.



Schemat 2.10: Schemat otrzymywania amidosulfonamidowych pochodnych 4-(5-(4-benzamidofenylo)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu oraz 4-(5-(4-(2-fenylacetamido)fenyl)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu **Va-b** oraz **V1a-c**

W kolejnym etapie przeprowadziłem reakcję acylowania funkcji aminowej. Dzięki wcześniejszym badaniom przeprowadzonym w zespole dr. hab. inż. Sebastiana Demkowicza, udało się opracować metodę selektywnego *N*-acylowania związków przy obecności wolnej grupy hydroksylowej z wykorzystaniem chlorków kwasowych. Wykorzystując nabytą przez zespół wiedzę, przeprowadziłem reakcję funkcjonalizacji grupy aminowej (wobec wolnej grupy hydroksylowej) w bezwodnym acetonie w obecności K_2CO_3 . Otrzymane produkty oczyszczałem poprzez krystalizację uzyskując fenolowe rdzenie potencjalnych inhibitorów **38a-e** z wydajnościami sięgającymi 70%. W ostatnim kroku prowadzonych eksperymentów syntetycznych, przeprowadziłem transformację ugrupowania fenolowego za pomocą chlorku sulfamoylu, w celu otrzymania funkcji amidosulfonamidowej. Ostatni etap reakcji przebiegał z wydajnościami sięgającymi 48%. Na tym etapie badań warunki reakcji nie były optymalizowane.

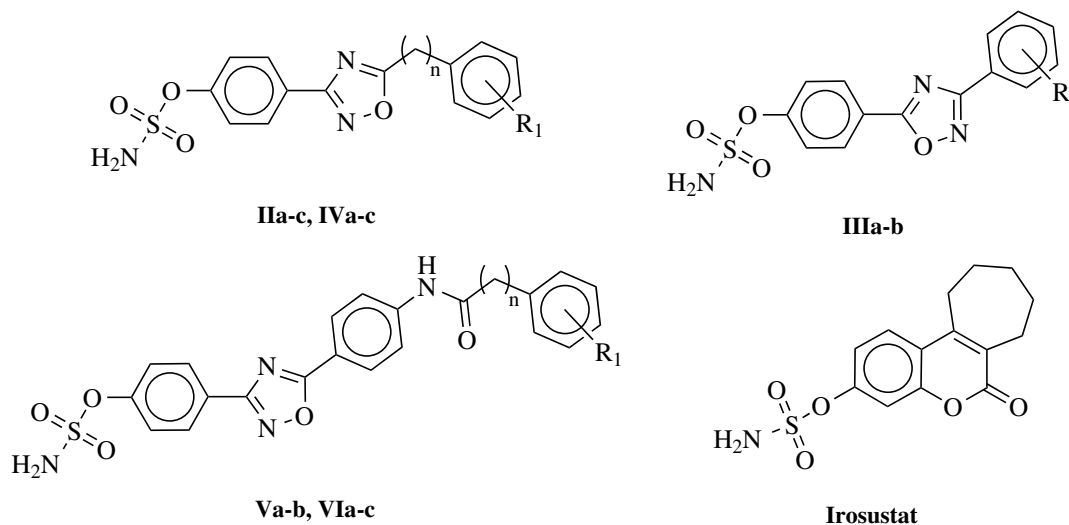
2.9 Badania biologiczne *in vitro* amidosiarczanowych pochodnych 1,2,4-oksadiazolu

W pierwszym etapie prowadzonych badań biologicznych we współpracy z zespołem dr. hab. Macieja Masłyka z Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego z udziałem związków na bazie pierścienia heterocyklicznego 1,2,4-oksadiazolu przeprowadzono wstępną ocenę potencjału inhibicyjnego otrzymanych pochodnych w teście enzymatycznym przy stężeniu inhibitora równym 0,5 μM . Wyniki testu biologicznego wskazały, iż badane związki są zdolne do zahamowania aktywności STS w przedziale od 74,24 do 97,64% (**Tabela 2.7**). W tym miejscu należy podkreślić, że aktywność związku referencyjnego w tym samym teście wynosiła 97,23%. Oznacza to, że wszystkie otrzymane związki hamowały aktywność enzymu na bardzo wysokim poziomie. Ponadto, pochodne **Va**, **Vb** oraz **VId** charakteryzowały się wyższą aktywnością od związku referencyjnego (aktywność STS wyniosła odpowiednio 2,65, 2,48, 2,36% oraz 2,77% dla **Irosustatu**). Na podstawie otrzymanych wyników badań, skierowałem wszystkie związki do kolejnego etapu ewaluacji aktywności biologicznej.

Przeprowadzone badania z wykorzystaniem linii nowotworowej MCF-7 wskazały, że zbadane pochodne charakteryzują się wyjątkowo wysokim poziomem inhibicji. Najwyższą aktywność wykazał związek **Va**, który hamował aktywność białka w 99,9; 93,27 oraz 42,02% przy stężeniu równym odpowiednio 100, 10 i 1 nM (**Tabela 2.7**). Należy podkreślić, iż związek **Va** osiągnął porównywalną wartość parametru IC_{50} w teście komórkowym co **Irosustat** (odpowiednio 1,10 nM oraz 1,14 nM).

Przeprowadzona analiza otrzymanych wyników aktywności biologicznej wskazywała na wysoką korelację danych eksperymentalnych z teoretycznymi wynikami modelowania molekularnego. Najwyższą aktywnością charakteryzowały się związki posiadające w swojej strukturze ugrupowania acylowe, co może sugerować, iż dodatkowe oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy pierścieniami aromatycznymi zaprojektowanych związków z hydrofilowymi aminokwasami znajdującymi się w zewnętrznej części centrum katalitycznego enzymu, odgrywają kluczową rolę w zachowaniu wysokiej aktywności biologicznej. Ponadto, na podstawie otrzymanych rezultatów zaobserwowałem, iż wprowadzenie dodatkowego ugrupowania metylenowego, pomiędzy terminalnym pierścieniem aromatycznym a heterocyklem 1,2,4-oksadiazolu nie wpływało znacząco na aktywność biologiczną (**Tabela 2.7**). Związki **VIa-c** uzyskały zbliżone wyniki w testach biologicznych do pochodnych **IIa-c** oraz **IIIa-b** (**Tabela 2.7**). Test z wykorzystaniem linii komórkowej MCF-7 ujawnił również, że amidosiarczanowe pochodne 4-(3-fenylo-1,2,4-oksadiazol-5-ilo)fenylu (**IIIa-b**) pomimo obiecujących wyników w teście enzymatycznym, wykazywały znacznie niższą aktywność biologiczną w teście komórkowym niż ich konstytucyjne izomery –

Tablica 2.7: Rezultaty dokowania molekularnego oraz badań aktywności biologicznej amidosiarczanowych pochodnych 3,5-diarylopodstawionych-1,2,4-oksadiazolu i związku referencyjnego - **Irosustatu** w badaniach *in vitro* w teście enzymatycznym i komórkowym



Nr związku	R	Swobodna energia wiązania [kcal/mol]	Aktywność STS przy 0,5 μ M [%]	Test komórkowy (MCF-7)			IC ₅₀ [nM]
				Aktywność STS przy 100 nM stężeniu inhibitora [%]	Aktywność STS przy 10 nM stężeniu inhibitora [%]	Aktywność STS przy 1 nM stężeniu inhibitora [%]	
IIa	H	-6.0	25.76	1.07	30.45	-	-
IIb	3-F	-5.6	18.28	1.00	28.58	-	-
IIc	4-NO ₂	-5.4	28.16	7.04	-	-	-
IIIa	H	-6.2	24.36	53.51	-	-	-
IIIb	3-F	-5.7	13.67	38.27	-	-	-
IVa	H	-6.5	21.62	6.50	33.49	-	-
IVb	3-F	-6.6	7.60	1.79	14.60	-	-
IVc	3,4-diF	-6.7	6.40	1.65	13.51	-	-
Va	H	-7.9	2.65	1.00	6.33	57.98	1.10
Vb	3-F	-8.0	2.48	1.92	5.33	99.00	7.26
VIa	H	-8.1	3.21	9.28	-	-	-
VIb	3-F	-8.1	2.36	1.03	12.78	98.33	5.16
VIc	3,4-diF	-7.9	3.01	1.23	15.78	-	-
Irosustat	-	-5.4	2.77	5.72	12.93	16.83	1.14

amidosiarczany 4-(5-fenyl-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu (**IIa-c**) (**Tabela 2.7**). Oznacza to, iż sposób podstawienia pierścienia heterocyklicznego 1,2,4-oksadiazolu jest kluczowy w celu zachowania wysokiej aktywności inhibicyjnej.

Podsumowanie

W przedstawionej dysertacji opisałem wyniki badań, które udało mi się zrealizować w ramach trwania 4-letniego Studium Doktoranckiego w Katedrze Chemii Organicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej. Zakres przeprowadzonych eksperymentów obejmował techniki dokowania molekularnego, syntezę chemiczną oraz wyznaczenie aktywności biologicznej potencjalnych inhibitorów STS w testach *in vitro* oraz *in vivo*.

Pracę badawczą można podzielić na dwa etapy. W pierwszym z nich podjąłem się zadania obejmującego zaprojektowanie struktur związków chemicznych na bazie 1,4-diaarylopodstawionych amidosiarcanowych pochodnych 1,2,3-triazolu, zawierających w swojej konstytucji ligandy o zróżnicowanym charakterze. Dzięki zastosowaniu technik dokowania molekularnego wyselekcjonowałem serię związków charakteryzujących się najlepszym dopasowaniem do centrum aktywnego enzymu oraz najkorzystniejszymi wartościami swobodnej energii wiązania. Następnie, przeprowadziłem syntezę chemiczną zaprojektowanych struktur wykonując szereg eksperymentów optymalizujących warunki reakcji. Ostatecznie, otrzymane związki poddałem badaniom *in vitro* w celu selekcji najbardziej aktywnych pochodnych, które w kolejnym kroku skierowałem do badań *in vivo* obejmujących wyznaczenie MTD oraz aktywności przeciwnowotworowej w mysim modelu raka sutka.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów dokowania molekularnego jednoznacznie uwiarydliły wysoki stopień dopasowania nowo zaprojektowanych związków do centrum aktywnego enzymu. Wartości swobodnych energii wiązań obliczonych przez program dokujący kształtowały się na obiecującym poziomie i były w większości przypadków zdecydowanie korzystniejsze w zestawieniu ze związkiem referencyjnym – **Irosustatem** (Tabela 2.1, strona 65). Co ważniejsze, graficzna wizualizacja otrzymanych rezultatów pozwoliła mi na zidentyfikowanie dodatkowych oddziaływań elektrostatycznych, wpływających na stabilność kompleksu inhibitor-enzym. Zgodnie z założeniem, heterocykliczne rdzenie inhibitorów znajdowały się w bliskim otoczeniu aminokwasu biorącego udział w rozpoznawaniu naturalnych substratów enzymu – Thr484, powodując powstawanie dodatkowych interakcji wpływających korzystnie na aktywność biologiczną (**Rysunek 2.3**, strona 66). Ponadto, usytuowanie ligandów w pozycji *meta* w terminalnym pierścieniu aromatycznym w stosunku do ugrupowania amidosiarczanowego wpływało najkorzystniej na zdolności inhibicyjne otrzymanych pochodnych. Powodem tego, było bliskie usytuowanie ligandu wobec aminokwasu Arg98, której dodatkowe oddziaływania z inhibitorem znacząco wpływały na stabilizację układu inhibitor-enzym (**Rysunek 2.4**, strona 73). Skutkiem tego, otrzymałem serię pochodnych zawierających podstawniki głównie w usytuowaniu *meta* w terminalnym pierścieniu aromatycznym.

W kolejnym etapie pracy otrzymane rezultaty dokowania molekularnego weryfikowałem eksperymentalnie poprzez przeprowadzenie syntezy zaprojektowanych związków i wyznaczenie ich aktywności biologicznej w teście enzymatycznym oraz komórkowym. Dzięki licznym przeprowadzonym przeze mnie eksperymentom, zoptymalizowałem warunki reakcji otrzymywania pochodnych azydku fenylu, które były niezbędne w celu otrzymania pożądaných układów heterocyklicznych. Okazało się, iż temperatura prowadzenia reakcji miała ogromny wpływ na wydajność otrzymywania pochodnych azydobenzenu w reakcji odpowiedniej soli diazoniowej z azydkiem trimetylosililowym. Poprzez obniżenie temperatury prowadzenia reakcji, udało mi się zwiększyć efektywność otrzymywania niektórych pochodnych w znacznym stopniu. Ponadto, sposób otrzymywania pochodnych azydku fenylu pozwolił mi na wykorzystanie syntezy typu *one pot* dzięki czemu efektywnie pozyskałem fenolowe rdzenie zaprojektowanych inhibitorów.

Następnie, dzięki współpracy z zespołem dr. hab. Macieja Masłyka z Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego, przeprowadzono szereg badań biologicznych z udziałem otrzymanych przeze mnie związków chemicznych. Początkowo, oznaczono zdolność inhibicyjną amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu w radioizotopowym teście enzymatycznym. Jak się okazało, wszystkie otrzymane pochodne silnie hamowały aktywność enzymu przy stężeniu równym 0,5 μM . Najaktywniejszym okazał się związek zawierający w swojej konstytucji dwa atomy jodu – amidosiarczan 4-(1-(3,5-dijodofenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu (**It**), powodując zahamowanie aktywności sulfatazy w około 98% (**Tabela 2.2**, strona 72). W kolejnym etapie przeprowadzono test komórkowy z wykorzystaniem linii nowotworowej MCF-7, przy stężeniu inhibitorów równym 100, 10 oraz 1 nM. W toku przeprowadzonych eksperymentów, udało się wyselekcjonować osiem pochodnych, które charakteryzowały się najwyższą aktywnością biologiczną. Związek **Ie**, hamował działanie enzymu w 86,4% przy stężeniu 1 nM (**Tabela 2.3**, strona 75). W tym samym teście **Irosustat** osiągnął wartość inhibicji na poziomie 83,2%. Dodatkowo, dla pięciu najbardziej obiecujących związków wyznaczono parametr IC_{50} , który wyniósł odpowiednio 1,90; 1,71; 2,95 oraz 1,69 nM dla związków **In**, **Io**, **If** i **Ic**. Ponadto, wartość IC_{50} dla amidosiarczanu 4-(1-(3,5-difluorofenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **Ie** była zaskakująco korzystna i wynosiła 0,21 nM (**Tabela 2.3**, strona 75).

W następnym kroku ewaluacji czynności biologicznych otrzymanych inhibitorów, postanowiłem przeprowadzić badania z udziałem zwierząt przy współpracy z zespołem prof. Joanny Wietrzyk z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk. Początkowo, przeprowadzony został eksperyment ustalający MTD dla związków **I-V**. W toku prowadzonych badań udało się ustalić, iż dawka 50 mg/kg masy ciała była bezpieczna i nie powodowała żadnych zmian w przyroście masy zwierząt (**Rysunek 2.8**, strona 78), behawiorystyce, a także nie powodowała zmian głównych narządów wewnętrznych, czy też układu czerwonego i białokrwinkowego (**Rysunek 2.9**, strona 79, **Tabela 2.4**, strona 79).

W ostatnim kroku badań biologicznych amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu, przeprowadzono eksperyment polegający na wyznaczeniu aktywności przeciwnowotworowej w mysim modelu raka sutka 67NR. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów okazały się być imponujące. Związki **II**, **III**, **IV** oraz **V**, były w stanie zahamować wzrost tkanki nowotworowej o odpowiednio 42, 39, 47 oraz 51% (**Rysunek 2.12**, strona 82). Podczas prowadzonych badań nie obserwowano toksycznego wpływu podawanych związków na ogólne zdrowie myszy. Ponadto, aktywność STS w pobranych tkankach nowotworu oraz wątroby była znikoma, potwierdzając skuteczne zablokowanie enzymu w wyniku podawanych substancji biologicznie aktywnych (**Tabela 2.15**, strona 85). Dodatkowo, stężenie estradiolu w plazmie krwi myszy zmniejszyło się znacząco co oznacza, iż uzyskany efekt terapeutyczny wynika ze skutecznego zablokowania aktywności biologicznej STS (**Tabela 2.15**, strona 85).

Drugi etap prowadzonych badań obejmował przeprowadzenie szeregu symulacji komputerowych (z wykorzystaniem technik dokowania molekularnego) w celu selekcji 3,5-diarylopodstawionych amidosiarczanowych pochodny 1,2,4-oksadiazolu, charakteryzujących się najkorzystniejszymi wartościami swobodnej energii wiązania. Jednym z założonych celów było zbadanie wpływu wprowadzenia ugrupowania metylenowego pomiędzy terminalnym pierścieniem aromatycznym a pierścieniem heterocyklicznym oraz ugrupowań benzamidowych czy też fenyloacetamidowych, na potencjał inhibicyjny projektowanych związków. W toku przeprowadzonych symulacji komputerowych wybrałem 13 pochodnych, których wartości swobodnej energii wiązania znajdowały się w granicach od $-6,0$ do $-8,1$ kcal/mol (**Tabela 2.16**, strona 87). Najkorzystniejsze wartości posiadały związki zawierające w swojej konstytucji dodatkowy pierścień aromatyczny, co wynikało z obecności oddziaływań lipofilowych występujących pomiędzy pierścieniem aromatycznym inhibitora a pierścieniami aromatycznymi reszt aminokwasowych znajdujących się w zewnętrznej części centrum katalitycznego enzymu.

W kolejnym etapie przystąpiłem do syntezy chemicznej zaprojektowanych, amidosiarczanowych pochodnych 1,2,4-oksadiazolu. W ramach prowadzonych badań syntetycznych opracowałem metodę otrzymywania pochodnych *N'*-hydroksybenzenokarboksyimidoamidów eliminując powstawanie produktu ubocznego w postaci pochodnej benzamidu. Dzięki ww. podejściu syntetycznemu otrzymywanie produktu reakcji kondensacji benzonitrylu z hydroksyloaminą zachodziło z ilościową wydajnością bez konieczności oczyszczania produktu.

W ostatnim kroku prowadzonych badań, przy współpracy z zespołem dr. hab. Macieja Małyka wyznaczono aktywność biologiczną otrzymanych pochodnych 1,2,4-oksadiazolu w teście enzymatycznym jak i komórkowym. Test enzymatyczny wykazał, iż wszystkie otrzymane pochodne były zdolne skutecznie zahamować aktywność STS. Amidosiarczan 4-(5-(4-(2-(3-fluorofenilo)acetamido)fenilo)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu (**VIb**) okazał się najaktywniejszą pochodną zdolną

obniżyć aktywność STS o 97,64% przy stężeniu równym 0,5 μM (**Tabela 2.7**, strona 99). Warto nadmienić, iż w tym samym teście **Irosustat** osiągnął aktywność rzędu 97,23%. W kolejnym kroku, wszystkie otrzymane pochodne zostały skierowane do badań *in vitro* w teście komórkowym z wykorzystaniem linii nowotworowej MCF-7. Najwyższą aktywność biologiczną wykazał związek **Va**, który charakteryzował się inhibicją enzymu na poziomie 99,90; 93,27 oraz 42,02%, przy stężeniu równym odpowiednio 100, 10 i 1 nM. Dodatkowo, związek ten osiągnął porównywalną wartość IC_{50} w teście komórkowym co **Irosustat** – odpowiednio 1,10 nM oraz 1,14 nM (**Tabela 2.7**, strona 99). W ramach przeprowadzonej analizy SAR okazało się, iż wykonane symulacje komputerowe były kompatybilne z otrzymanymi wynikami eksperymentalnymi. Najbardziej aktywne okazały się pochodne zawierające w swej konstytucji dodatkowy pierścień aromatyczny pochodzący od ugrupowania benzamidowego lub fenyloacetamidowego. Ponadto, na podstawie wyników badań biologicznych zaobserwowałem, iż sposób podstawienia pierścienia heterocyklicznego 1,2,4-oksadiazolu jest kluczowy w celu zachowania wysokiej aktywności biologicznej. Związki **IIIa-b**, pomimo obiecujących wyników w teście enzymatycznym wykazały znacząco niższe wartości inhibicji w testach komórkowych (**Tabela 2.7**, strona 99). W tym miejscu warto zaznaczyć, iż izomery konstytucyjne tych ww. pochodnych wykazywały znacznie wyższą czynność biologiczną w teście z udziałem linii nowotworowej MCF-7 (**IIa-c Tabela 2.7**, strona 99).

Niniejsze badania zaprezentowane w dysertacji zrealizowano dzięki finansowaniu poniższych projektów badawczych:

1. GRANT PRELUDIUM 19 pt. „Nowe inhibitory sulfatazy steroidowej na bazie amidosiarczanowych pochodnych 1,2,4-oksadiazoli” (nr 2020/37/N/NZ7/02535),
2. PROJEKT INKUBATOR INNOWACYJNOŚCI+ pt. „Steroid sulfatase inhibitors (STS) as potential chemotherapeutics for the treatment of hormone-dependent breast cancer” (nr CTWT/40/II+)

Opisane badania zostały przeprowadzone przy współpracy z:

1. zespołem dr. hab. Macieja Masłyka z Wydziału Nauk Ścisłych i Nauk o Zdrowiu Instytutu Biotechnologii Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego (zakres badań *in vitro*)
2. p. profesor Joanną Wietrzyk i jej zespołem z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk (zakres badań *in vivo*)

Materiał doświadczalny zaprezentowany w niniejszej dysertacji został opublikowany w następujących czasopismach:

1. **Biernacki K.**, Ciupak O., Daško M., Rachon J., Kozak W., Rak J., Kubiński K., Masłyk M., Martyna A., Śliwka-Kaszyńska M., Wietrzyk J., Świtalska M., Nocentini A., Supuran T. C., Demkowicz S.: Development of Sulfamoylated 4-(1-Phenyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)phenol Derivatives as Potent Steroid Sulfatase Inhibitors for Efficient Treatment of Breast Cancer *J. Med. Chem.* **2022**, 65, 5044-5056
2. **Biernacki K.**, Daško M., Ciupak O., Kubiński K., Rachon J., Demkowicz S.; Novel 1,2,4-Oxadiazole Derivatives in Drug Discovery. *Pharmaceuticals* **2020**, 13, E111
3. Demkowicz S., Daško M., Rachon J., **Biernacki K.**, Aszyk J., Kozak W., Masłyk M., Kubiński K.; New potent STS inhibitors based on fluorinated 4-(1-phenyl-1*H*-[1,2,3]triazol-4-yl)-phenyl sulfamates. Synthesis and biological evaluation. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2020**, 22, 1037-1044

oraz jednym międzynarodowym doniesieniu konferencyjnym:

1. **Karol Biernacki**, Mateusz Daśko, Janusz Rachon, Konrad Kubiński, Maciej Masłyk, Sebastian Demkowicz „New potent steroid sulfatase (STS) inhibitors based on fluorinated 4-(1-phenyl-1*H*-[1,2,3]triazol-4-yl)phenyl sulfamates. Synthesis and biological evaluation.” 21st European Symposium on Organic Chemistry, Wiedeń (Austria), 14-18 lipiec 2019, Sesja posterowa

Dorobek naukowy

ARTYKUŁY NAUKOWE:

1. **Biernacki K.**, Ciupak O., Daško M., Rachon J., Kozak W., Rak J., Kubiński K., Masłyk M., Martyna A., Śliwka-Kaszyńska M., Wietrzyk J., Świtalska M., Nocentini A., Supuran T. C., Demkowicz S.: Development of Sulfamoylated 4-(1-Phenyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)phenol Derivatives as Potent Steroid Sulfatase Inhibitors for Efficient Treatment of Breast Cancer *J. Med. Chem.* **2022**, 65, 5044-5056
DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c02220
IF: 7.446 (2020 r.) (Q1) JCR, SciteScore: 10.6 (2020 r.) (Q1) Scopus, MNiSW 2021: 200pkt.
2. Panuszko A., Pieloszczyk M., Kuffel A., Jacek K., **Biernacki K.**, Demkowicz S., Stangret J., Bruździak P.; Hydration of Simple Model Peptides in Aqueous Osmolyte Solutions *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 9350
DOI: 10.3390/ijms22179350
IF: 5.923 (2020 r.) (Q1) JCR, SciteScore: 6.0 (2020 r.) (Q1) Scopus, MNiSW 2019: 140pkt.
3. Daško M., Dołęga A., Siedzielnik M., **Biernacki K.**, Ciupak O., Rachon J., Demkowicz S.; Novel 1,2,3-Triazole Derivatives as Mimics of Steroidal System–Synthesis, Crystal Structures Determination, Hirshfeld Surfaces Analysis and Molecular Docking *Molecules* **2021**, 26, 4059
DOI: 10.3390/molecules26134059
IF: 4.411 (2020 r.) (Q2) JCR, SciteScore: 4.7 (2020 r.) (Q2) Scopus, MNiSW 2019: 100pkt.
4. Arthur-Baidoo E., Falkiewicz K., Chomicz-Mańka L., Czaja A., Demkowicz S., **Biernacki K.**, Kozak W., Rak J., Denifl S.; Electron-Induced Decomposition of Uracil-5-yl *O*-(*N,N*-dimethylsulfamate): Role of Methylation in Molecular Stability *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 2344
DOI: 10.3390/ijms22052344
IF: 4.556 (2019 r.) (Q1) JCR, SciteScore: 5.3 (2019 r.) (Q1) Scopus, MNiSW 2019: 140pkt.
5. Ciupak O., Daško M., **Biernacki K.**, Rachon J., Masłyk M., Kubiński K., Martyna A., Demkowicz S.; New potent steroid sulphatase inhibitors based on 6-(1-phenyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)naphthalen-2-yl sulphamate derivatives *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2021**, 36, 238-247
DOI: 10.1080/14756366.2020.1758692
IF: 4.473 (2019 r.) (Q1) JCR, SciteScore: 8.7 (2019 r.) (D1) Scopus, MNiSW 2019: 140pkt.
6. **Biernacki K.**, Daško M., Ciupak O., Kubiński K., Rachon J., Demkowicz S.; Novel 1,2,4-Oxadiazole Derivatives in Drug Discovery. *Pharmaceuticals* **2020**, 13, E111

DOI: 10.1080/14756366.2020.1858820

IF: 4.286 (2019 r.) (Q1) JCR, SciteScore: 5.4 (2019 r.) (Q1) Scopus, MNiSW 2019: 100pkt.

7. Daško M., Demkowicz S., **Biernacki K.**, Ciupak O., Kozak W., Masłyk M., Rachon J.; Recent progress in the development of steroid sulphatase inhibitors – examples of the novel and most promising compounds from the last decade. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020**, *35*, 1163-1184

DOI: 10.1080/14756366.2020.1758692

IF: 4.027 (2018 r.) (Q1) JCR, SciteScore: 4.00 (2018 r.) (Q1) Scopus, MNiSW 2019: 140pkt.

8. Demkowicz S., Daško M., Rachon J., **Biernacki K.**, Aszyk J., Kozak W., Masłyk M., Kubiński K.; New potent STS inhibitors based on fluorinated 4-(1-phenyl-1*H*-[1,2,3]triazol-4-yl)-phenyl sulfamates. Synthesis and biological evaluation. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2020**, *22*, 1037-1044

DOI: 10.1080/10286020.2019.1680642

IF: 1.091 (2018 r.) (Q3) JCR, SciteScore: 1.23 (2018 r.) (Q2) Scopus, MNiSW 2019: 40pkt.

9. Demkowicz S., Daško M., **Biernacki K.**, Harrous A., Rachon J., Kozak W., Martyna A., Masłyk M., Kubiński K., Boguszewska-Czubara A.; Novel steroid sulfatase inhibitors based on *N*-thiophosphorylated 3-(4-aminophenyl)-coumarin-7-*O*-sulfamates. *Drug Dev. Res.* **2019**, *80*, 857-866

DOI: 10.1002/ddr.21569

IF: 1.742 (2018 r.) (Q4) JCR, SciteScore: 2.43 (2018 r.) (Q2) Scopus, MNiSW 2019: 70pkt.

10. **Biernacki K.**, Kaczkowska E., Bruździak P.; Aqueous solutions of NMA, Na₂HPO₄, and NaH₂PO₄ as models for interaction studies in phosphate–protein systems. *J. Mol. Liq.* **2018**, *265*, 361-371

DOI: 10.1016/j.molliq.2018.05.104

IF: 4.513 (2018 r.) (Q1) JCR, SciteScore: 4.26 (2018 r.) (D1) Scopus, MNiSW 2019: 100pkt.

PROJEKTY:

1. „Nowe inhibitory sulfatazy steroidowej na bazie amidosiarczanowych pochodnych 1,2,4-oksadiazoli” [en. „New steroid sulfatase inhibitors based on 1,2,4-oxadiazole sulfamate derivatives”]

NCN grant No. 2020/37/N/NZ7/02535

Udział – Kierownik projektu 2021-2024 r.

Opiekun – dr hab. inż. Sebastian Demkowicz

2. „Projektowanie, synteza oraz badania aktywności biologicznej nowych inhibitorów proteazy SARS-Cov-2Mpro jako potencjalnych chemoterapeutyków w leczeniu COVID-19 [en. „Design, synthesis and biological evaluation of new SARS-Cov-2Mpro protease inhibitors as potential chemotherapeutic agents in the treatment of COVID-19”]
COMBATING CORONAVIRUS
Kier. Projektu – dr hab. inż. Sebastian Demkowicz
Udział – Wykonawca 01.09.2020-31.08.2021 r.
3. „Development of a novel and versatile synthesis of functionalized unsymmetrical alkynyl sulfanes and their application for a first total synthesis of Ajoene”
NCN grant No. 2015/19/B/ST5/03359
Kier. Projektu – prof. dr hab. inż. Dariusz Witt
Udział – Wykonawca. 2016-2019 r.
4. „Protein stability in aqueous solutions of osmolytes studied through complementary theoretical and experimental approach”
NCN grant No. 2013/11/B/NZ1/02258
Kier. Projektu. prof. dr hab. inż. Janusz Stangret
Udział – Wykonawca. 2013-2016 r.

PATENTY:

1. Demkowicz S., Daško M., **Biernacki K.**, Rachon J.; Amidosiarczanowe *N*-acylowane pochodne 4-[5-(4-aminofenylo)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo]fenolu, *N*-acylowane pochodne 4-[5-(4-aminofenylo)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo]fenolu, zastosowanie tych związków oraz sposób otrzymywania amidosiarczanowych *N*-acylowanych pochodnych 4-[5-(4-aminofenylo)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo]fenolu (en. *N*-acylamido sulfamate derivatives of 4-[5-(4-aminophenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]phenol, *N*-acylated derivatives 4-[5-(4-aminophenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]phenol, the use of these compounds and a method for the preparation of *N*-acylated sulfamated derivatives of 4-[5-(4-aminophenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]phenol.) (**2020 r.**) Patent polski nr. P.433939 (nr prawa patent 240686)
2. Demkowicz S., Daško M., **Biernacki K.**, Rachon J.; Amidosiarczanowe pochodne 4-(5-fenylo-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenolu, pochodne 4-(5-fenylo-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenolu, ich zastosowanie, oraz sposób otrzymywania amidosiarczanowych pochodnych 4-(5-fenylo-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenolu (en. Sulfamate derivatives of 4-(5-phenyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenol, 4-(5-phenyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenol derivatives, their application and preparation methods of

sulfamate derivatives of 4-(5-phenyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenol.) (2020 r.) Patent polski nr. P.433941 (nr prawa patent 240311),

3. Demkowicz S., Daško M., **Biernacki K.**, Rachon J.; Amidosiarczanowe pochodne 4-(5-benzylo-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenolu, pochodne 4-(5-benzylo-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenolu do zastosowania jako leki, oraz sposób otrzymywania amidosiarczanowych pochodnych 4-(5-benzylo-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenolu (en. 4-(5-benzyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenol sulfamate derivatives, 4-(5-benzyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenol derivatives for use as medicaments, and preparation methods of sulfamate derivatives of 4-(5-benzyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)phenol.) (2020 r.) Patent polski nr. P.433940 (nr prawa patent 240310)

KSIĄŻKI I SKRYPTY:

1. Alfuth J., **Biernacki K.** „Zbiór zadań z Chemii Organicznej” [en. „Organic Chemistry Workbook”], Wydawnictwo PG, Gdańsk 2020, Wydanie II ISBN: 978-83-7348-807-6
2. Alfuth J., **Biernacki K.** „Zbiór zadań z Chemii Organicznej” [en. „Organic Chemistry Workbook”], Wydawnictwo PG, Gdańsk 2020, Wydanie I ISBN: 978-83-7348-797-0

STAŻE NAUKOWE:

1. Staż naukowy w zespole prof. Claudiu T. Supuran, we Florencji (Uniwersytet Florencki, Wydział NEUROFARBA, Włochy), 09.2021-12.2021 finansowany ze środków „Zintegrowanego Programu Rozwoju Politechniki Gdańskiej”

KONFERENCJE NAUKOWE:

1. **Karol Biernacki**, Mateusz Daško, Janusz Rachon, Konrad Kubiński, Maciej Masłyk, Sebastian Demkowicz „New potent steroid sulfatase (STS) inhibitors based on fluorinated 4-(1-phenyl-1*H*-[1,2,3]triazol-4-yl)phenyl sulfamates. Synthesis and biological evaluation.” 21st European Symposium on Organic Chemistry, Wiedeń (Austria), 14-18 lipiec 2019, Sesja posterowa
2. Olga Ciupak, Mateusz Daško, **Karol Biernacki**, Janusz Rachoń, Maciej Masłyk, Konrad Kubiński, Aleksandra Martyna, Sebastian Demkowicz „Nowe inhibitory sulfatazy steroidowej

na bazie amidosiarczanowych pochodnych 6-(1-fenyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)naftaleno-2-ilu”
XIV Kopernikańskie seminarium doktoranckie, Toruń (Polska), 20-22 wrzesień 2021, Sesja
Posterowa

3. Eugene Arthur-Baidoo, Karina Falkiewicz, Lidia Chomicz-Mańka, Anna Czaja, Sebastian Demkowicz, **Karol Biernacki**, Witold Kozak, Janusz Rak, Stephan Denifl „Degradacja *N,N*-dimetyloamidosiarczanu 5-hydroksyuracylu indukowana przyłączeniem elektronu w fazie gazowej”
XIV Kopernikańskie seminarium doktoranckie, Toruń (Polska), 20-22 wrzesień 2021, Sesja
Posterowa
4. **Karol Biernacki** „Recent progress in the development of steroid sulfatase inhibitors”
Part of European BioTech Week Innovations is in our genes, Warszawa (forma zdalna), 27.09-
30.09.2021, Wystąpienie ustne

Rozdział 3

Część eksperymentalna

3.1 Modelowanie molekularne

W celu przeprowadzenia dokowania molekularnego, w pierwszym etapie przygotowano oraz zoptymalizowano geometrię struktur związków chemicznych będących potencjalnymi inhibitorami STS za pomocą programu HyperChem 8.0.7 (Hypercube, Inc., Gainesville, FL, USA). Wszystkie zaproponowane struktury zoptymalizowano wykorzystując pole siłowe Merck Molecular+ (and. *MM+ force field*) z algorytmem sprzężonych gradientów Polak-Ribière. Proces prowadzono do momentu uzyskania różnicy energii nie większej jak 0,025 kcal/(mol · Å). Tak przygotowane struktury użyto bezpośrednio w programie dokującym.

Strukturę rentgenograficzną STS pobrano z ogólnodostępnej bazy PDB (PDB ID: 1P49) i przygotowano w następujący sposób: usunięto cząsteczki wody oraz siarczanową formę *gem*-diolowej formyloglicyny. W kolejnym kroku wprowadzono do struktury STS fGly75 za pomocą oprogramowania Preparation Wizard, będącego częścią pakietu Maestro (Schrödinger, LLC, NY, USA) oraz brakujące atomy wodoru. Tak przygotowaną strukturę enzymu optymalizowano wykorzystując pole siłowe OPLS-AA w programie Maestro.

Dokowanie molekularne przeprowadzono za pomocą oprogramowania AutoDock Vina 1.1.2 (Molecular Graphics Laboratory, The Scripps Research Institute, La Jolla, Ca, USA). Struktury dokowano w pudle o wymiarach 25 x 25 x 25 Å – 30 x 30 x 30 Å, w zależności od wielkości cząsteczki potencjalnego inhibitora, mającego środek na atomie C_β fGly75. Dokowanie każdego ligandu przeprowadzono pięciokrotnie, selekcyjując za każdym razem ligand charakteryzujący się najlepszym dopasowaniem do centrum aktywnego enzymu. W ostatnim etapie wyniki zostały poddane ocenie wizualnej w celu wyboru optymalnego dopasowania.

Otrzymane wyniki zaprezentowano w postaci graficznych wizualizacji, które zostały wykonane z wykorzystaniem oprogramowania VMD 1.9 (University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL, USA).

3.2 Synteza chemiczna

3.2.1 Aparatura

Szkło laboratoryjne wykorzystane w pracy eksperymentalnej było czyste oraz, jeżeli wymagały tego warunki reakcji, osuszone za pomocą palnika Bunsena. Widma magnetycznego rezonansu jądrowego zostały wykonane przy użyciu spektrometru Bruker Avance III HD 400 MHz lub Varian Inova 500. Przesunięcia chemiczne zostały podane w wartości ppm względem sygnału resztkowego rozpuszczalnika (DMSO- d_6 = 2.50 ppm dla ^1H , 39.5 ppm dla ^{13}C , CDCl_3 = 7.26 ppm dla ^1H , 77.2 ppm dla ^{13}C , CD_3COCD_3 = 2.05 ppm dla ^1H , 29.8 ppm, 206.3 ppm dla ^{13}C). Stałe sprzężenia zostały podane w hercach. Widma spektroskopii mas zostały wykonane z wykorzystaniem aparatu Triple TOF 5600+ SCIEX Mass Spec. System. Temperatury topnienia zostały zmierzone za pomocą kriometru Stuart Scientific SMP30. Widma w podczerwieni zmierzono z wykorzystaniem aparatu Nicolet 8700 FTiR spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA) wyposażonego w przystawkę ATR wykonanej z diamentu. Każde z rejestrowanego widma zostało otrzymane poprzez uśrednienie 128 niezależnych skanów przy rozdzielczości 2cm^{-1} . Spektrometr był przepłukiwany suchym azotem w celu zminimalizowania wpływu pary wodnej oraz dwutlenku węgla.

Wszystkie substraty niezbędne do przeprowadzenia syntezy organicznej zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich (Merck) lub otrzymane na podstawie zmodyfikowanych danych literaturowych. Rozpuszczalniki organiczne były destylowane oraz suszone za pomocą standardowych metod. Preparatywna chromatografia kolumnowa została przeprowadzona z wykorzystaniem żelu krzemionkowego o średnicy 40-63 μM (230-400 mesh, SiliCycle Inc., 2500, Parc-Technologique Blvd, Quebec City, G1P4S6, Canada) 60 Å. Chromatografia cienkowarstwowa została wykonana przy użyciu płytek Polygram SIL G/UV254 (SiliCycle Inc., 2500, Parc-Technologique Blvd, Quebec City, G1P4S6, Canada).

Badania *in vivo* zostały przeprowadzone w warunkach SPF (ang. *specific pathogen free*) w instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu na podstawie uzyskanej zgody Lokalnej Komisji Etycznej Eksperymentów na Zwierzętach we Wrocławiu (nr zezwolenia: 77/2018), zgodnie z Dyrektywą 2010/63/UE Europejskiego Parlamentu i Rady w sprawie ochrony zwierząt laboratoryjnych wykorzystywanych do celów naukowych.

Zwierzęta przeznaczone do badań *in vivo* – 7-8 tygodniowe samice mysz Balb/c – zostały zakupione w Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Zwierzęta były przetrzymywane podczas badań w osobnych, odpowiednio wentylowanych klatkach w celu zapewnienia około 50%-owej wilgotności powietrza w temperaturze ok. 22°C z

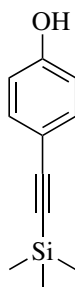
dostępem do pożywienia oraz wody *ab libitum*.

Morfologia krwi została wykonana za pomocą analizatora hematologicznego Mythic 18, PZ Cormay, zaś analiza biochemiczna za pomocą analizatora Cobas c111, Roche. Rozmiary guza zostały zmierzone za pomocą suwmiarki CD-15DCX (Mitutoyo Corp, Japonia).

Linia komórkowa raka sutka myszy 67NR została zakupiona w Barbara Ann Karmanos Cancer Institute, (Detroit, MI, USA). Komórki hodowano w wilgotnej atmosferze zawierającej 5% CO₂ w temperaturze 37°C w pożywce DMEM (Gibco, Wielka Brytania) z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej, wzmocnioną żelazem (ATCC) i uzupełnioną 2 mM L-glutaminy, 1% roztworem MEM 100X niezbędnych aminokwasów, 100 µL/mL streptomycyny (Sigma Aldrich, Merck) i 100 jednostek/mL penicyliny (Polfa Tarchomin SA, Polska).

3.2.2 Procedura otrzymywania 4-((trimetylosililo)etynylo)fenolu (26)

Do okrągłodennej, wysuszonej palnikiem kolby wprowadzono 230 mL bezwodnego ACN, 4-jodofenol (1 eq, 44 mmol, 9,68 g), trimetylosililoacetylen (1,5 eq, 66 mmol, 6,48 g), PdCl₂ (0,05 eq, 2,2 mmol, 0,390 g), Ph₃P (0,1 eq, 4,4 mmol, 1,15 g), CuI (0,025 eq, 1,1 mmol, 0,209 g) oraz TEA (7 eq, 308 mmol, 31,17 g). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 3 godziny. Następnie, roztwór ochłodzono, przesączono przez celit, a otrzymany przesącz zatężono na wyparce obrotowej. Otrzymany surowy produkt oczyszczono z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie AcOEt:heksan (1:4). Otrzymano 7,1 g (32,1 mmol, 73%) czystego produktu w postaci ciemnobrazowego, krystalicznego osadu.



4-((Trimetylosililo)etynylo)fenol **26**

Wydajność 73%

Temperatura topnienia: 63-66°C

ν_{\max} (ATR)/cm⁻¹ 3308, 2956, 2160, 1606, 1508, 1434, 1356, 1206, 826

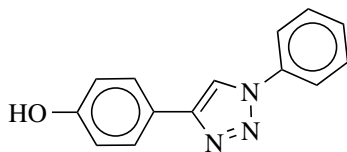
¹H NMR δ_{H} (400 MHz, CDCl₃) 7,38 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 6,77 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 6,00-3,40 (1H, brs, OH), 0,26 (9H, s, CH₃)

¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, CDCl₃) 155,8, 133,7, 115,5, 115,4, 105,1, 92,6, 0,1

HRMS (m/z) [M - H]⁻ obliczone: 189,0741, zmierzone: 189,0951

3.2.3 Ogólna procedura otrzymywania pochodnych 4-(1-fenyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenolu **27a-ab**

Do okrągłodennej kolby, wysuszonej uprzednio palnikiem, rozpuszczono odpowiednią pochodną aniliny (1 eq, 2,1 mmol) w bezwodnym ACN (6 mL), ochłodzono w łaźni lodowej po czym wprowadzono *t*-BuONO (1,2 eq, 2,52 mmol) i pozostawiono w stanie mieszania przez 10 minut w atmosferze gazu obojętnego. Następnie, powoli wkroplono TMSN₃ (1,1 eq, 2,31 mmol) w obniżonej temperaturze i mieszaninę reakcyjną mieszano przez 4 godziny w temperaturze pokojowej, zabezpieczając reakcję przed dostępem wilgoci. W kolejnym kroku, mieszaninę ochłodzono w łaźni lodowej, po czym dodano **26** (1 eq, 2,1 mmol) oraz 1 M roztwór TBAF w THF (1,1 eq, 2,31 mmol) i mieszano przez 30 minut. Następnie wprowadzono świeżo sporządzony 1 M wodny roztwór askorbinianu sodu (0,2 eq, 0,42 mmol) i CuSO₄ · H₂O (0,1 eq, 0,21 mmol). Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną pozostawiono w stanie mieszania przez 12 godzin. Następnie, rozpuszczalniki organiczne odparowano z wykorzystaniem wyparki obrotowej, a pozostałość rozpuszczono w AcOEt i przemyto dwukrotnie 0,1 M HCl. Warstwę organiczną oddzielono, wysuszone bezwodnym MgSO₄, odparowano, a otrzymaną w kolbie pozostałość rekrytalizowano z ACN otrzymując pożądane produkty.



4-(1-Fenyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27a**

Wydajność 67%

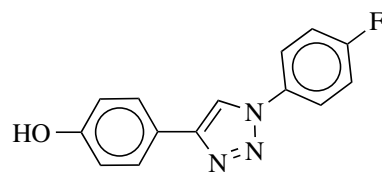
Temperatura topnienia: 191-193°C

ν_{max} (ATR)/cm⁻¹ 3444, 1616, 1491, 1414, 1357, 1228, 1040, 838

¹H NMR δ_{H} (400 MHz, DMSO-d₆) 9,67 (1H, s, OH), 9,12 (1H, s, CH), 7,95 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, Ar-H), 7,77 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ar-H), 7,63 (2H, t, *J* = 7,9 Hz, Ar-H), 7,51 (1H, t, *J* = 7,4 Hz, Ar-H), 6,89 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ar-H)

¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, DMSO-d₆) 158,1, 148,1, 137,2, 130,4, 129,0, 127,3, 121,7, 120,3, 118,6, 116,2

HRMS (*m/z*) [M + H]⁺ obliczone: 238,0980, zmierzone: 238,0998

4-(1-(4-Fluorofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27b**

Wydajność 66%

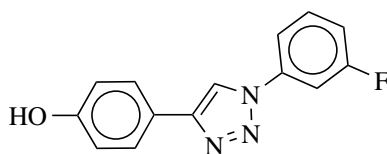
Temperatura topnienia: 246-248°C

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3450, 1616, 1494, 1410, 1354, 1224, 1041, 841

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,67 (1H, s, OH), 9,09 (1H, s, CH), 8,02-7,95 (2H, m, Ar-H), 7,75 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 7,53-7,43 (2H, m, Ar-H), 6,89 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 162,0 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 246$ Hz), 158,1, 148,2, 133,8 (m), 127,3, 122,7 (m), 121,6, 118,9, 117,2 (m), 116,2

HRMS (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ obliczone: 256,0886, zmierzone: 256,0907

4-(1-(3-Fluorofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27c**

Wydajność 67% (92%)

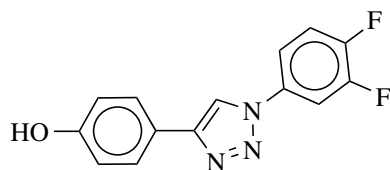
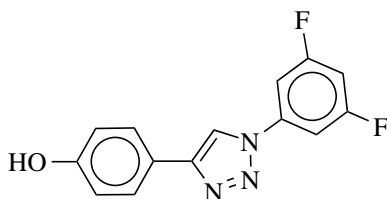
Temperatura topnienia: 222-224°C (z rozkładem)

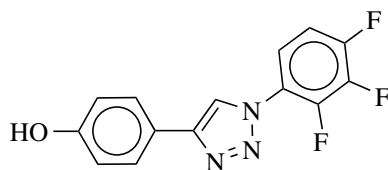
ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3102, 1617, 1494, 1400, 1374, 1229, 1053, 836

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,69 (1H, s, OH), 9,17 (1H, s, CH), 7,91-7,81 (2H, m, Ar-H), 7,75 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 7,72-7,62 (1H, m, Ar-H), 7,40-7,31 (1H, m, Ar-H), 6,90 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 162,9 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 246$ Hz), 158,2, 148,3, 138,4 (m), 132,3 (m), 127,3, 121,4, 118,7, 116,3, 116,2, 115,7 (m), 107,8 (m)

HRMS (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ obliczone: 256,0886, zmierzone: 256,0905

4-(1-(3,4-Difluorofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27d****Wydajność 67%****Temperatura topnienia:** 249-251°C (z rozkładem) ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3107, 1616, 1502, 1379, 1229, 1054, 842 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,69 (1H, s, OH), 9,12 (1H, s, CH), 8,16-8,06 (1H, m, Ar-H), 7,88-7,80 (1H, m, Ar-H), 7,78-7,68 (3H, m, Ar-H), 6,89 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 158,2, 150,2 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 247$ Hz), 149,6 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 247$ Hz), 148,3, 133,8 (m), 127,3, 121,4, 119,3 (m), 118,9, 117,2 (m), 116,2, 110,4 (m)**HRMS** (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ obliczone: 274,0792, zmierzone: 274,08124-(1-(3,5-Difluorofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27e****Wydajność 63% (89%)****Temperatura topnienia:** 214-216°C ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3333, 1627, 1493, 1408, 1331, 1216, 1029, 823 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,71 (1H, s, OH), 9,19 (1H, s, CH), 7,85-7,67 (4H, m, Ar-H), 7,47-7,35 (1H, m, Ar-H), 6,90 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 163,4 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 247$ Hz), 158,3, 148,4, 138,9 (m), 127,3, 121,2, 118,8, 116,3, 104,3 (m), 104,1 (m)**HRMS** (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ obliczone: 274,0792, zmierzone: 274,0812

4-(1-(2,3,4-Trifluorofenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27f**

Wydajność 38% (70%)

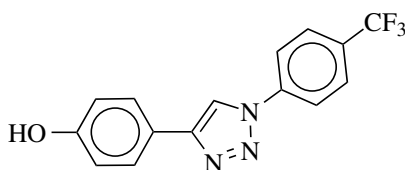
Temperatura topnienia: 214-218°C

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3179, 1613, 1489, 1374, 1229, 1036, 834

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,70 (1H, s, OH), 8,91 (1H, s, CH), 7,85-7,72 (3H, m, Ar-H), 7,68-7,57 (1H, m, Ar-H), 6,89 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 158,3, 150,9 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 248$ Hz), 147,8, 144,4 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 255$ Hz), 140,3 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 250$ Hz), 127,4, 123,1 (m), 121,8 (m), 121,2, 121,0 (m), 116,2, 113,7 (m)

HRMS (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ obliczone: 292,0698, zmierzone: 292,0727

4-(1-(4-(Trifluorometylo)fenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27g**

Wydajność 82%

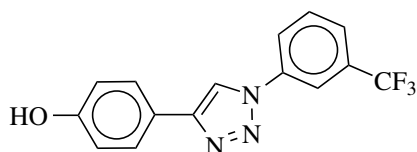
Temperatura topnienia: 251-253°C

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3365, 1615, 1497, 1413, 1319, 1223, 1037, 842

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,71 (1H, s, OH), 9,27 (1H, s, CH), 8,20 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, Ar-H), 8,02 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 7,77 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 6,90 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 158,2, 148,5, 140,0, 129,0 (m), 127,7 (m), 127,4, 124,3 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 272$ Hz), 121,3, 120,7, 118,7, 116,2

HRMS (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ obliczone: 306,0854, zmierzone: 306,0879

4-(1-(3-(Trifluorometylo)fenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27h**

Wydajność 56%

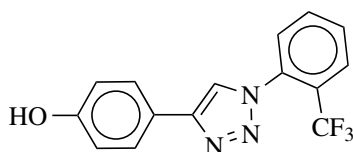
Temperatura topnienia: 183-186°C

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3104, 1617, 1502, 1459, 1374, 1217, 1051, 841

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,70 (1H, s, OH), 9,30 (1H, s, CH), 8,35-8,27 (2H, m, Ar-H), 7,90-7,85 (2H, m, Ar-H), 7,77 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 6,90 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 158,2, 148,4, 137,6, 131,8, 131,0 (m), 127,3, 125,5 (m), 124,2, 124,1 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 273$ Hz), 121,4, 118,9, 116,8 (m), 116,2

HRMS (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ obliczone: 306,0854, zmierzone: 306,0880

4-(1-(2-(Trifluorometylo)fenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27i**

Wydajność 50%

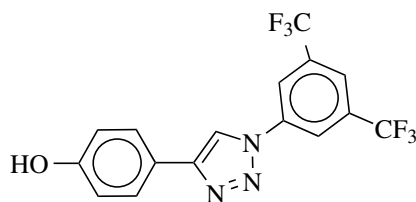
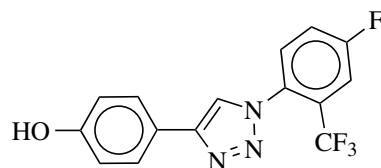
Temperatura topnienia: 169-171°C

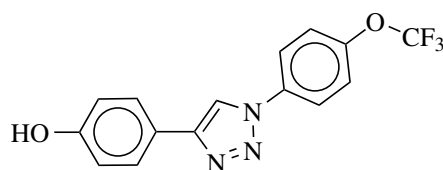
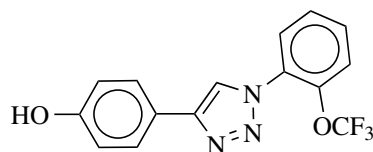
ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3446, 1615, 1493, 1415, 1357, 1230, 1037, 841

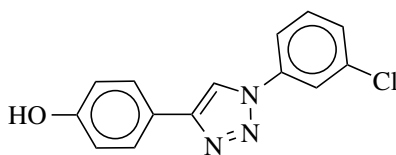
$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,67 (1H, s, OH), 8,83 (1H, s, CH), 8,10-7,72 (6H, m, Ar-H), 6,88 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 158,1, 147,3, 134,9 (m), 134,5, 131,6, 129,7, 128,0 (m), 127,3, 125,4 (m), 123,3 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 274$ Hz), 123,2, 121,4, 116,2

HRMS (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ obliczone: 306,0854, zmierzone: 306,0897

4-(1-(3,5-Bis(trifluorometylo)fenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27j****Wydajność 66%****Temperatura topnienia:** 270-272°C ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3172, 1615, 1492, 1426, 1361, 1223, 1054, 846 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,72 (1H, s, OH), 9,43 (1H, s, CH), 8,65 (2H, s, Ar-H), 8,26 (1H, s, Ar-H), 7,75 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 6,90 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 158,3, 148,6, 138,4, 132,3 (m), 127,3, 123,3 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 273$ Hz), 122,2 (m), 121,1, 120,8 (m), 119,1, 116,3**HRMS** (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ obliczone: 374,0728, zmierzone: 374,07574-(1-(4-Fluoro-2-(trifluorometylo)fenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27k****Wydajność 57%****Temperatura topnienia:** 180-182°C ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3092, 1614, 1499, 1430, 1379, 1227, 1050, 844 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,67 (1H, s, OH), 8,81 (1H, s, CH), 8,07-7,98 (1H, m, Ar-H), 7,95-7,81 (2H, m, Ar-H), 7,75 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 6,88 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 162,6 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 251$ Hz), 158,1, 147,3, 132,5 (m), 131,3 (m), 127,7 (m), 127,3, 123,4, 122,3 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 274$ Hz), 121,5 (m), 121,3, 116,2, 115,9 (m)**HRMS** (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ obliczone: 324,0760, zmierzone: 324,0792

4-(1-(4-(Trifluorometoksy)fenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **271****Wydajność** 69%**Temperatura topnienia:** 212-213°C ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3460, 1618, 1517, 1492, 1208, 1157, 1037, 839 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,69 (1H, s, OH), 9,16 (1H, s, CH), 8,09 (2H, d, $J = 9,1$ Hz, Ar-H), 7,76 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 7,65 (2H, d, $J = 8,3$ Hz, Ar-H), 6,89 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 158,1, 148,3, 148,2, 136,1, 127,3, 123,1, 122,2, 121,5, 120,5 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 257$ Hz), 118,9, 116,2**HRMS** (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ obliczone: 322,0803, zmierzone: 322,08314-(1-(2-(Trifluorometoksy)fenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27m****Wydajność** 70%**Temperatura topnienia:** 135-138°C ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3357, 1615, 1493, 1415, 1322, 1236, 1038, 841 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,68 (1H, s, OH), 8,87 (1H, s, CH), 7,92-7,54 (6H, m, Ar-H), 6,89 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 158,1, 147,5, 141,5, 132,0, 130,3, 129,3, 128,0, 127,3, 123,1, 122,2, 121,4, 120,2 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 259$ Hz), 116,2**HRMS** (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ obliczone: 322,0803, zmierzone: 322,0831

4-(1-(3-Chlorofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27n**

Wydajność 70% (89%)

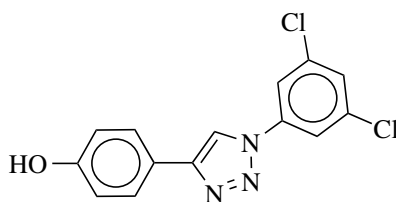
Temperatura topnienia: 208-209°C

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3458, 1616, 1591, 1466, 1222, 1175, 1040, 839, 681

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,70 (1H, s, OH), 9,19 (1H, s, CH), 8,07 (1H, t, $J = 2,0$ Hz, Ar-H), 7,98-7,93 (1H, m, Ar-H), 7,75 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 7,66 (1H, t, $J = 8,1$ Hz, Ar-H), 7,60-7,55 (1H, m, Ar-H), 6,89 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 158.2, 148.3, 138.2, 134.7, 132.1, 128.8, 127.3, 121.4, 120.1, 118.9, 118.7, 116.2

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 270,0434, zmierzone: 270,0547

4-(1-(3,5-Dichlorofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27o**

Wydajność 54% (86%)

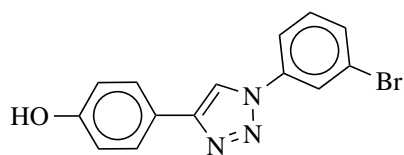
Temperatura topnienia: 241-244°C

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3126, 1614, 1591, 1471, 1226, 1177, 1057, 841, 662

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,72 (1H, s, OH), 9,24 (1H, s, CH), 8,08 (2H, d, $J = 1,8$ Hz, Ar-H), 7,76 (1H, t, $J = 1,8$ Hz, Ar-H), 7,73 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 6,89 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 158,3, 148,4, 138,8, 135,7, 128,3, 127,3, 121,2, 118,9, 116,3

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 304,0044, zmierzone: 304,0156

4-(1-(3-Bromofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27p**

Wydajność 78%

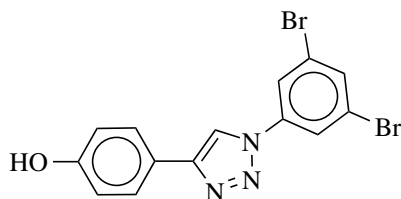
Temperatura topnienia: 200-202°C

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3457, 1616, 1594, 1480, 1221, 1176, 1035, 839, 682

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,69 (1H, s, OH), 9,20 (1H, s, CH), 8,20 (1H, t, $J = 1,9$ Hz, Ar-H), 8,03-7,97 (1H, m, Ar-H), 7,75 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 7,73-7,68 (1H, m, Ar-H), 7,59 (1H, t, $J = 8,1$ Hz, Ar-H), 6,89 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 158,2, 148,3, 138,3, 132,4, 131,7, 127,3, 122,9, 122,8, 121,4, 119,3, 118,7, 116,2

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 313,9929, zmierzone: 314,0044

4-(1-(3,5-Dibromofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27r**

Wydajność 48%

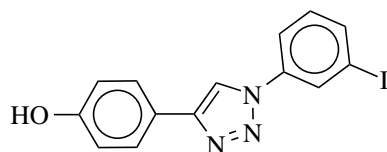
Temperatura topnienia: 222-226°C (z rozkładem)

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3120, 1616, 1586, 1502, 1231, 1173, 1056, 839, 662

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,72 (1H, s, OH), 9,25 (1H, s, CH), 8,24 (2H, d, $J = 1,7$ Hz, Ar-H), 7,99 (1H, t, $J = 1,6$ Hz, Ar-H), 7,73 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 6,89 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 158,2, 148,3, 139,0, 133,6, 127,3, 123,9, 122,0, 121,2, 118,9, 116,3

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 393,9014, zmierzone: 393,9142

4-(1-(3-Jodofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27s**

Wydajność 73%

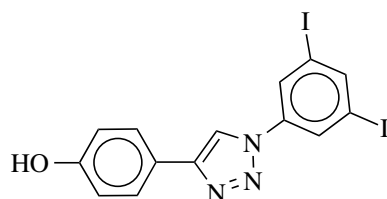
Temperatura topnienia: 190-194°C

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3064, 1616, 1583, 1480, 1224, 1171, 1055, 841, 671

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,69 (1H, s, OH), 9,18 (1H, s, CH), 8,33 (1H, t, $J = 1,8$ Hz, Ar-H), 8,02-7,97 (1H, m, Ar-H), 7,89-7,84 (1H, m, Ar-H), 7,75 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 7,41 (1H, t, $J = 8,0$ Hz, Ar-H), 6,89 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 158,1, 148,2, 138,1, 137,6, 132,2, 128,3, 127,3, 121,5, 119,6, 118,7, 116,2, 95,9

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 361,9790, zmierzone: 361,9930

4-(1-(3,5-Dijodofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27t**

Wydajność 56%

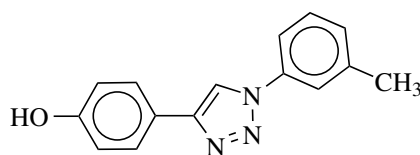
Temperatura topnienia: 241-243°C (z rozkładem)

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3122, 1614, 1572, 1500, 1225, 1169, 1050, 838, 663

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,71 (1H, s, OH), 9,22 (1H, s, CH), 8,35 (2H, d, $J = 1,4$ Hz, Ar-H), 8,21 (1H, t, $J = 1,4$ Hz, Ar-H), 7,73 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 6,88 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 158,2, 148,3, 144,5, 138,5, 127,7, 127,3, 121,3, 118,8, 116,2, 97,3

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 487,8757, zmierzone: 487,8908

4-(1-(3-Metylofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27u**

Wydajność 70%

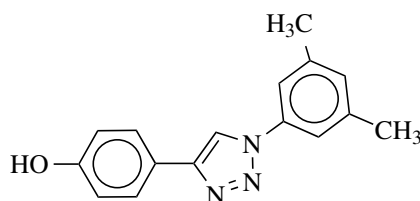
Temperatura topnienia: 215-218°C

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3071, 1614, 1592, 1486, 1220, 1174, 1064, 842, 678

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,67 (1H, s, OH), 9,09 (1H, s, CH), 7,80-7,71 (4H, m, Ar-H), 7,50 (1H, t, $J = 7,8$ Hz, Ar-H), 7,32 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, Ar-H), 6,88 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 2,44 (3H, s, CH₃)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 158,0, 148,0, 140,1, 137,2, 130,2, 129,6, 127,2, 121,7, 120,7, 118,5, 117,4, 116,2, 21,4

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 250,0980, zmierzone: 250,1126

4-(1-(3,5-Dimetylofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27w**

Wydajność 70%

Temperatura topnienia: 235-238°C

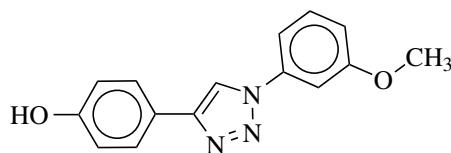
ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3021, 1618, 1592, 1487, 1213, 1172, 1069, 838, 676

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,66 (1H, s, OH), 9,06 (1H, s, CH), 7,75 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 7,57 (2H, s, Ar-H), 7,13 (1H, s, Ar-H), 6,88 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 2,39 (6H, s, CH₃)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 158,0, 148,0, 139,8, 137,1, 130,3, 127,2, 121,7, 118,5, 117,9, 116,2, 21,3

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 264,1137, zmierzone: 264,1283



4-(1-(3-Metoksyfenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27x**

Wydajność 76%

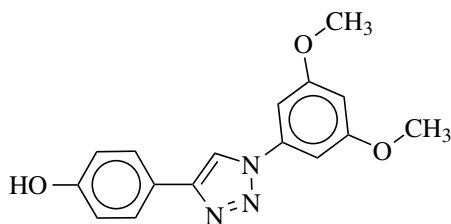
Temperatura topnienia: 231-233°C

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3076, 1610, 1594, 1489, 1225, 1167, 1064, 837, 679

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,67 (1H, s, OH), 9,13 (1H, s, CH), 7,76 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 7,55-7,50 (3H, m, Ar-H), 7,10-7,04 (1H, m, Ar-H), 6,89 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 3,88 (3H, s, CH_3)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 160,7, 158,1, 148,1, 138,2, 131,3, 127,3, 121,6, 118,7, 116,2, 114,7, 112,3, 105,9, 56,1

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 266,0930, zmierzone: 266,1076

4-(1-(3,5-Dimetoksyfenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27y**

Wydajność 35%

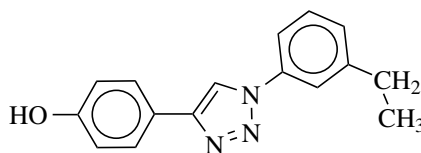
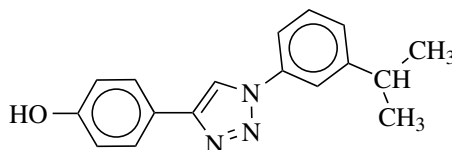
Temperatura topnienia: 190-193°C

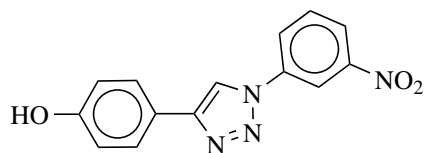
ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3120, 1615, 1593, 1493, 1231, 1153, 1062, 830, 676

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,67 (1H, s, OH), 9,13 (1H, s, CH), 7,75 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 7,13 (2H, d, $J = 2,2$ Hz, Ar-H), 6,89 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 6,62 (1H, t, $J = 2,2$ Hz, Ar-H), 3,86 (6H, s, CH_3)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 161,7, 158,1, 148,0, 138,7, 127,3, 121,6, 118,7, 116,2, 100,6, 98,6, 56,2

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 296,1035, zmierzone: 296,1189

4-(1-(3-Etylofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27z****Wydajność** 70%**Temperatura topnienia:** 188-189°C ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3148, 1611, 1591, 1498, 1233, 1177, 1069, 833, 689 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,67 (1H, s, OH), 9,11 (1H, s, CH), 7,82-7,72 (4H, m, Ar-H), 7,52 (1H, t, $J = 7,8$ Hz, Ar-H), 7,35 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, Ar-H), 6,89 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 2,74 (2H, q, $J = 7,6$ Hz, CH_2), 1,25 (3H, t, $J = 7,6$ Hz, CH_3) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 158,0, 148,0, 146,4, 137,2, 130,1, 128,4, 127,3, 121,7, 119,6, 118,6, 117,7, 116,2, 28,5, 15,9**HRMS** (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 264,1137, zmierzone: 264,12854-(1-(3-Izopropylofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27aa****Wydajność** 78%**Temperatura topnienia:** 153-155°C ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3118, 1613, 1591, 1495, 1224, 1173, 1064, 845, 664 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,67 (1H, s, OH), 9,13 (1H, s, CH), 7,83-7,73 (4H, m, Ar-H), 7,53 (1H, t, $J = 7,9$ Hz, Ar-H), 7,38 (1H, d, $J = 7,7$ Hz, Ar-H), 6,89 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 3,03 (1H, hept, $J = 6,9$ Hz, CH), 1,29 (6H, d, $J = 6,9$ Hz, CH_3) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 158,0, 151,0, 148,0, 137,3, 130,3, 127,3, 127,1, 121,7, 118,6, 118,3, 117,9, 116,2, 33,9, 24,2**HRMS** (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 278,1293, zmierzone: 278,1444

4-(1-(3-Nitrofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenol **27ab**

Wydajność 62%

Temperatura topnienia: 267-268°C (z rozkładem)

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3265, 1615, 1592, 1493, 1229, 1173, 1048, 836, 663

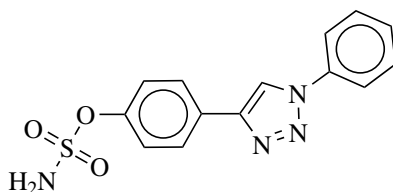
$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,71 (1H, s, OH), 9,37 (1H, s, CH), 8,76 (1H, t, $J = 2,1$ Hz, Ar-H), 8,44 (1H, dd, $J = 8,1, 2,1$ Hz, Ar-H), 8,33 (1H, dd, $J = 8,3, 2,2$ Hz, Ar-H), 7,93 (1H, t, $J = 8,2$ Hz, Ar-H), 7,77 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 6,90 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 158,2, 149,0, 148,5, 137,8, 132,0, 127,3, 126,2, 123,4, 121,3, 119,0, 116,3, 114,8

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 281,0675, zmierzone: 281,0821

3.2.4 Ogólna procedura otrzymywania amidosiarczanowych pochodnych 4-(1-fenyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenolu **Ia-ab**

Do kolby okrągłodennej, wysuszonej palnikiem i zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, wprowadzono 2 mL bezwodnego DCM oraz izocyjanian chlorosulfurylu (1,5 eq, 1,5 mmol) po czym dodano mieszaninę kwasu mrówkowego (1,5 eq, 1,5 mmol) i *N,N*-dimetyloacetamidu (0,016 eq, 0,016 mmol). Całość mieszano w temperaturze 40°C przez 3 godziny. Następnie roztwór odpowiedniej pochodnej 4-(1-fenyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenolu **27a-ab** (1 eq, 1 mmol) w *N,N*-DMA (5 mL) wprowadzono do mieszaniny reakcyjnej i mieszano przez noc w temperaturze pokojowej, zabezpieczając mieszaninę przed dostępem wilgoci. Następnie, mieszaninę reakcyjną przeniesiono do zlewki z wodą (50 mL), powstały osad odsączono, wysuszono na powietrzu i krystalizowano z ACN.



Amidosiarczan 4-(1-fenyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **Ia**

Wydajność 82%

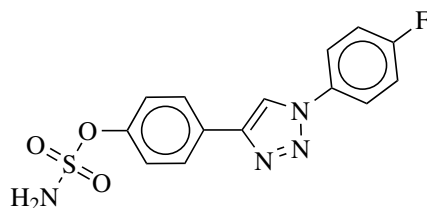
Temperatura topnienia: 230-232°C (z rozkładem)

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3446, 3110, 1491, 1372, 1230, 1175, 1041, 816, 756

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,34 (1H, s, CH), 8,08 (2H, s, NH_2), 8,03 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 7,97 (2H, d, $J = 7,6$ Hz, Ar-H), 7,66 (2H, t, $J = 7,9$ Hz, Ar-H), 7,54 (1H, t, $J = 7,4$ Hz, Ar-H), 7,43 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 150,4, 147,0, 137,1, 130,4, 129,3, 129,1, 127,2, 123,3, 120,5, 120,3

HRMS (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ obliczone: 317,0708, zmierzone: 317,0754

Amidosiarczan 4-(1-(4-fluorofenilo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **Ib**

Wydajność 78%

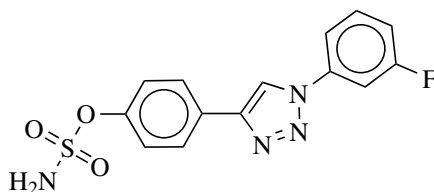
Temperatura topnienia: 235-236°C (z rozkładem)

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3331, 3163, 1494, 1373, 1229, 1176, 1056, 827, 759

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,32 (1H, s, CH), 8,09 (2H, s, NH_2), 8,05-7,96 (4H, m, Ar-H), 7,57-7,47 (2H, m, Ar-H), 7,43 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 162,2 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 246$ Hz), 150,4, 147,0, 133,6 (m), 129,1, 127,2, 123,3, 122,9 (m), 120,6, 117,3 (m)

HRMS (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ obliczone: 335,0614, zmierzone: 335,0676

Amidosiarczan 4-(1-(3-fluorofenilo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **Ic**

Wydajność 80%

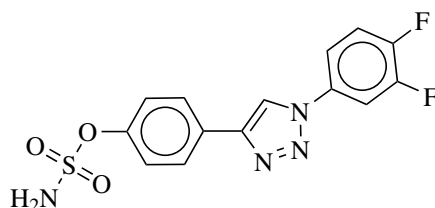
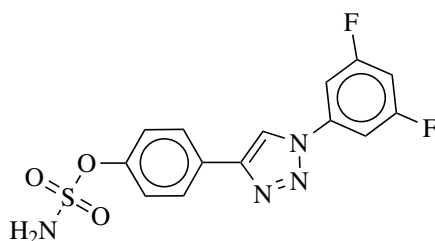
Temperatura topnienia: 232-234°C (z rozkładem)

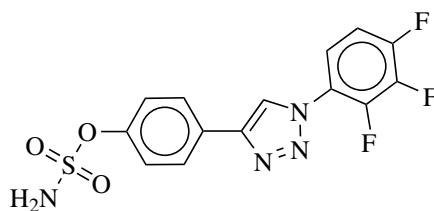
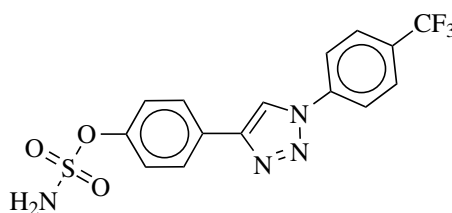
ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3345, 3155, 1495, 1375, 1235, 1152, 1054, 829, 757

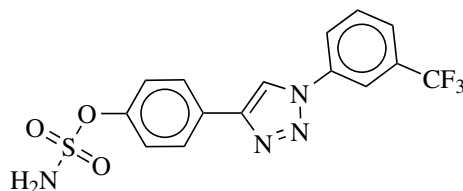
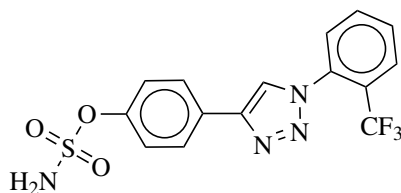
$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,39 (1H, s, OH), 8,09 (2H, s, NH_2), 8,02 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,92-7,81 (2H, m, Ar-H), 7,77-7,64 (1H, m, Ar-H), 7,48-7,34 (3H, m, Ar-H)

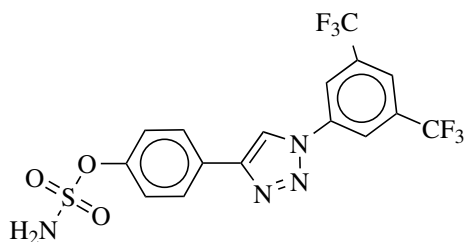
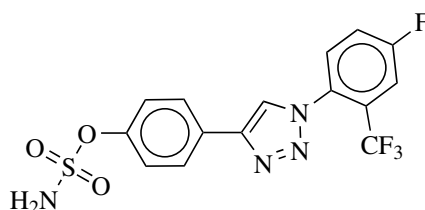
$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 162,9 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 245$ Hz), 150,5, 147,1, 138,3 (m), 132,4 (m), 128,9, 127,2, 123,4, 120,5, 116,4 (m), 116,0 (m), 108,0 (m)

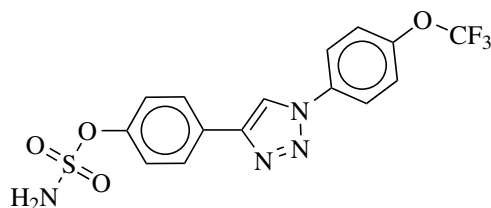
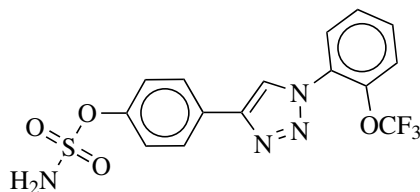
HRMS (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ obliczone: 335,0614, zmierzone: 335,0660

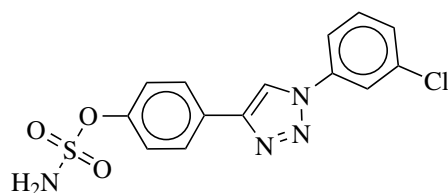
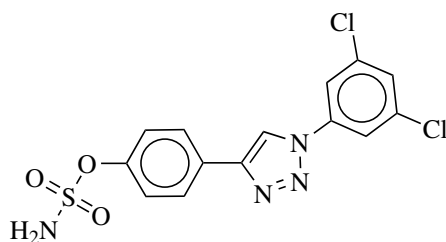
Amidosiarczan 4-(1-(3,4-difluorofenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **Id****Wydajność** 76%**Temperatura topnienia:** 225-227°C (z rozkładem) ν_{\max} (ATR)/cm⁻¹ 3370, 3152, 1496, 1372, 1231, 1154, 1054, 835, 758¹H NMR δ_{H} (400 MHz, DMSO-d₆) 9,35 (1H, s, CH), 8,18-8,11 (1H, m, Ar-H), 8,09 (2H, s, NH₂), 8,00 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ar-H), 7,90-7,82 (1H, m, Ar-H), 7,80-7,71 (1H, m, Ar-H), 7,43 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ar-H)¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, DMSO-d₆) 150,5, 150,2 (d, ¹*J*_{C-F} = 247 Hz), 149,8 (d, ¹*J*_{C-F} = 247 Hz), 147,1, 133,7 (m), 128,9, 127,2, 123,4, 120,7, 119,4 (m), 117,4 (m), 110,7 (m)**HRMS** (*m/z*) [M + H]⁺ obliczone: 353,0520, zmierzone: 353,0547Amidosiarczan 4-(1-(3,5-difluorofenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **Ie****Wydajność** 80%**Temperatura topnienia:** 227-228°C ν_{\max} (ATR)/cm⁻¹ 3343, 3155, 1493, 1376, 1227, 1157, 1056, 844, 756¹H NMR δ_{H} (400 MHz, DMSO-d₆) 9,42 (1H, s, CH), 8,09 (1H, s, NH₂), 7,99 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ar-H), 7,86-7,76 (2H, m, Ar-H), 7,51-7,40 (3H, m, Ar-H)¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, DMSO-d₆) 163,4 (d, ¹*J*_{C-F} = 247 Hz), 150,6, 147,2, 138,8 (m), 128,7, 127,2, 123,4, 120,6, 104,5 (m), 104,3 (m)**HRMS** (*m/z*) [M + H]⁺ obliczone: 353,0520, zmierzone: 353,0548

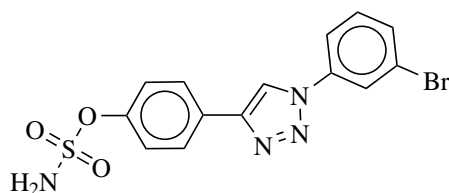
Amidosiarczan 4-(1-(2,3,4-trifluorofenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **If****Wydajność** 66%**Temperatura topnienia:** 215-216°C (z rozkładem) ν_{\max} (ATR)/cm⁻¹ 3353, 3151, 1490, 1383, 1239, 1155, 1042, 811, 755¹H NMR δ_{H} (400 MHz, DMSO-d₆) 9,15 (1H, s, CH), 8,09 (2H, s, NH₂), 8,05 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ar-H), 7,89-7,79 (1H, m, Ar-H), 7,70-7,59 (1H, m, Ar-H), 7,43 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ar-H)¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, DMSO-d₆) 151,0 (d, ¹*J*_{C-F} = 248 Hz), 150,6, 146,7, 144,4 (d, ¹*J*_{C-F} = 259 Hz), 140,2 (d, ¹*J*_{C-F} = 251 Hz), 128,6, 127,3, 123,5 (m), 123,3, 123,0 (m), 121,0 (m), 113,8 (m)**HRMS** (*m/z*) [M + H]⁺ obliczone: 371,0426, zmierzone: 371,0457Amidosiarczan 4-(1-(4-(trifluorometylo)fenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **Ig****Wydajność** 88%**Temperatura topnienia:** 186-190°C (z rozkładem) ν_{\max} (ATR)/cm⁻¹ 3356, 3135, 1493, 1376, 1231, 1160, 1039, 826, 756¹H NMR δ_{H} (400 MHz, DMSO-d₆) 9,50 (1H, s, CH), 8,22 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 8,10 (2H, s, NH₂), 8,07-8,00 (4H, m, Ar-H), 7,44 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ar-H)¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, DMSO-d₆) 150,6, 147,3, 139,8, 129,2 (m), 128,8, 127,8 (m), 127,2, 124,3 (q, ¹*J*_{C-F} = 272 Hz), 123,4, 120,9, 120,5**HRMS** (*m/z*) [M + H]⁺ obliczone: 385,0582, zmierzone: 385,0614

Amidosiarczan 4-(1-(3-(trifluorometylo)fenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **Ih****Wydajność 77%****Temperatura topnienia:** 213-214°C (z rozkładem) ν_{\max} (ATR)/cm⁻¹ 3323, 3144, 1494, 1361, 1209, 1159, 1050, 850, 759¹H NMR δ_{H} (400 MHz, DMSO-d₆) 9,52 (1H, s, CH), 8,37-8,26 (2H, m, Ar-H), 8,09 (2H, s, NH₂), 8,03 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ar-H), 7,95-7,85 (2H, m, Ar-H), 7,44 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ar-H)¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, DMSO-d₆) 150,5, 147,2, 137,5, 131,9, 131,1 (m), 128,9, 127,2, 125,8 (m), 124,4, 124,1 (q, ¹*J*_{C-F} = 273 Hz), 123,4, 120,7, 117,1 (m)**HRMS** (*m/z*) [M + H]⁺ obliczone: 385,0582, zmierzone: 385,0647Amidosiarczan 4-(1-(2-(trifluorometylo)fenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **Ii****Wydajność 73%****Temperatura topnienia:** 153-156°C ν_{\max} (ATR)/cm⁻¹ 3366, 3149, 1493, 1371, 1241, 1174, 1057, 818, 759¹H NMR δ_{H} (400 MHz, DMSO-d₆) 9,07 (1H, s, CH), 8,12-7,82 (8H, m, NH₂, Ar-H), 7,42 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ar-H)¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, DMSO-d₆) 150,5, 146,2, 134,6, 131,8, 129,8, 128,9, 128,0 (m), 127,3 (m), 127,2, 125,4 (m), 124,8, 123,3, 123,2 (q, ¹*J*_{C-F} = 274 Hz)**HRMS** (*m/z*) [M + H]⁺ obliczone: 385,0582, zmierzone: 385,0639

Amidosiarczan 4-(1-(3,5-bis(trifluorometylo)fenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenyłu **Ij****Wydajność** 79%**Temperatura topnienia:** 231-232°C (z rozkładem) ν_{\max} (ATR)/cm⁻¹ 3358, 3145, 1493, 1373, 1277, 1153, 1052, 808, 755¹H NMR δ_{H} (400 MHz, DMSO-d₆) 9,65 (1H, s, CH), 8,68 (2H, s, Ar-H), 8,30 (1H, s, Ar-H), 8,10 (2H, s, NH₂), 8,02 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ar-H), 7,45 (2H, d, *J* = 7,45 Hz, Ar-H)¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, DMSO-d₆) 150,6, 147,6, 138,3, 132,4 (m), 128,6, 127,2, 123,4, 123,3 (q, ¹*J*_{C-F} = 273 Hz), 122,6 (m), 121,1 (m), 121,0**HRMS** (*m/z*) [M + H]⁺ obliczone: 453,0456, zmierzone: 453,0511Amidosiarczan 4-(1-(4-fluoro-2-(trifluorometylo)fenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenyłu **Ik****Wydajność** 71%**Temperatura topnienia:** 210-211°C (z rozkładem) ν_{\max} (ATR)/cm⁻¹ 3252, 3172, 1491, 1386, 1269, 1133, 1052, 836, 750¹H NMR δ_{H} (400 MHz, DMSO-d₆) 9,05 (1H, s, CH), 8,12-7,82 (7H, m, Ar-H, NH₂), 7,42 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ar-H)¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, DMSO-d₆) 162,8 (d, ¹*J*_{C-F} = 251 Hz), 150,5, 146,2, 132,6 (m), 131,1 (m), 128,8, 127,6 (m), 127,2, 125,0, 123,3, 122,4 (q, ¹*J*_{C-F} = 274 Hz), 121,5 (m), 116,0 (m)**HRMS** (*m/z*) [M + H]⁺ obliczone: 403,0488, zmierzone: 403,0520

Amidosiarczan 4-(1-(4-(trifluorometoksy)fenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **II****Wydajność** 86%**Temperatura topnienia:** 224-225°C (z rozkładem) ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3317, 3158, 1494, 1373, 1269, 1153, 1053, 840, 758 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,38 (1H, s, CH), 8,14-8,06 (4H, m, Ar-H, NH_2), 8,03 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,68 (2H, d, $J = 8,3$ Hz, Ar-H), 7,44 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 150,5, 148,4, 147,1, 135,9, 129,0, 127,2, 123,3, 123,2, 122,4, 120,6, 120,5 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 257$ Hz)**HRMS** (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ obliczone: 401,0531, zmierzone: 401,0576Amidosiarczan 4-(1-(2-(trifluorometoksy)fenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **Im****Wydajność** 75%**Temperatura topnienia:** 169-171°C ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3250, 3158, 1490, 1390, 1256, 1156, 1059, 848, 753 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,12 (1H, s, CH), 8,10-7,90 (5H, m, Ar-H, NH_2), 7,81-7,65 (3H, m, Ar-H), 7,42 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 150,5, 146,4, 141,6, 132,2, 130,1, 129,4, 128,9, 128,0, 127,2, 123,9, 123,4, 123,1, 120,2 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 259$ Hz)**HRMS** (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ obliczone: 401,0531, zmierzone: 401,0561

Amidosiarczan 4-(1-(3-chlorofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **In****Wydajność** 80%**Temperatura topnienia:** 224-225°C (z rozkładem) ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3354, 1597, 1489, 1377, 1177, 1153, 1060, 936, 864, 729, 676 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,42 (1H, s, CH), 8,13-8,05 (3H, m, NH_2 , Ar-H), 8,05-7,96 (3H, m, Ar-H), 7,69 (1H, t, $J = 8,1$ Hz, Ar-H), 7,64-7,57 (1H, m, Ar-H), 7,43 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 150,5, 147,1, 138,1, 134,7, 132,2, 129,1, 128,9, 127,2, 123,4, 120,5, 120,3, 119,1**HRMS** (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 349,0162, zmierzone: 349,0268Amidosiarczan 4-(1-(3,5-dichlorofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **Io****Wydajność** 57%**Temperatura topnienia:** 237-238°C (z rozkładem) ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3336, 1586, 1477, 1373, 1178, 1158, 1058, 949, 872, 728, 664 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,46 (1H, s, CH), 8,13-8,05 (4H, m, NH_2 , Ar-H), 7,99 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 7,81 (1H, t, $J = 1,8$ Hz, Ar-H), 7,44 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 150,6, 147,1, 138,6, 135,8, 128,7, 128,6, 127,2, 123,4, 120,7, 119,1**HRMS** (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 382,9772, zmierzone: 382,9878

Amidosiarczan 4-(1-(3-bromofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **Ip**

Wydajność 83%

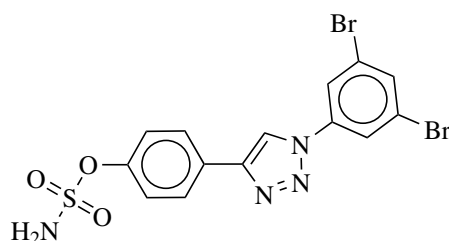
Temperatura topnienia: 212-213°C (z rozkładem)

ν_{\max} (ATR)/cm⁻¹ 3319, 1589, 1484, 1371, 1177, 1156, 1053, 951, 874, 730, 674

¹H NMR δ_{H} (400 MHz, DMSO-d₆) 9,42 (1H, s, CH), 8,22 (1H, t, $J = 1,9$ Hz, Ar-H), 8,09 (2H, s, NH₂), 8,04-7,99 (3H, m, Ar-H), 7,76-7,71 (1H, m, Ar-H), 7,61 (1H, t, $J = 8,1$ Hz, Ar-H), 7,43 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H)

¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, DMSO-d₆) 150,5, 147,1, 138,1, 132,4, 132,0, 128,9, 127,2, 123,4, 123,0, 122,9, 120,5, 119,4

HRMS (m/z) [M - H]⁻ obliczone: 392,9657, zmierzone: 392,9766

Amidosiarczan 4-(1-(3,5-dibromofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **Ir**

Wydajność 50%

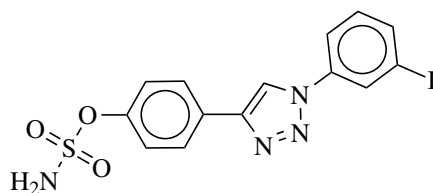
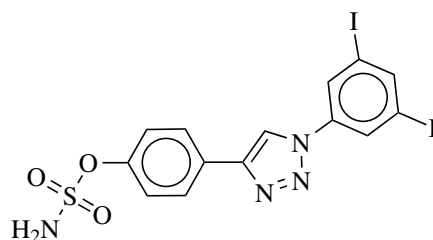
Temperatura topnienia: 228-229°C (z rozkładem)

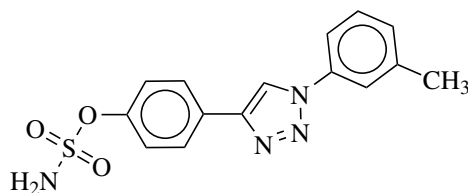
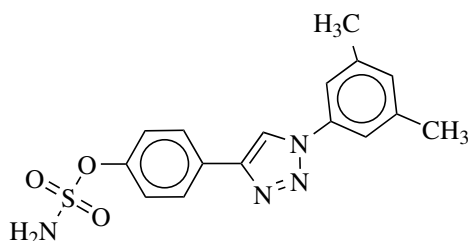
ν_{\max} (ATR)/cm⁻¹ 3334, 1578, 1497, 1373, 1178, 1155, 1053, 943, 872, 750, 663

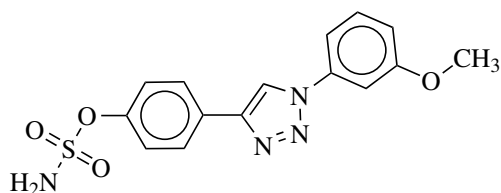
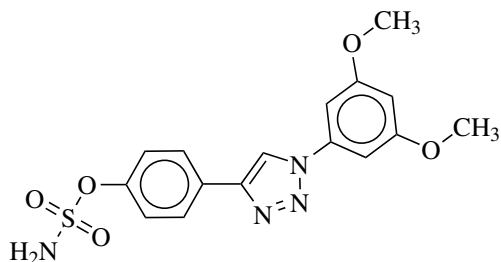
¹H NMR δ_{H} (400 MHz, DMSO-d₆) 9,46 (1H, s, CH), 8,26 (2H, d, $J = 1,6$ Hz, Ar-H), 8,09 (2H, s, NH₂), 8,02 (1H, t, $J = 1,6$ Hz, Ar-H), 7,99 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 7,44 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H)

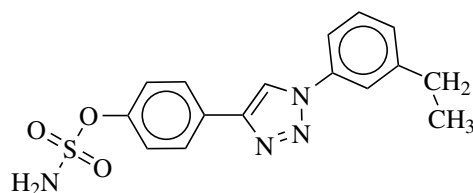
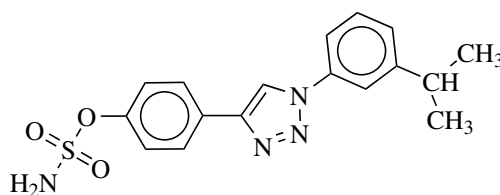
¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, DMSO-d₆) 150,6, 147,1, 138,8, 133,9, 128,7, 127,2, 123,9, 123,4, 122,2, 120,7

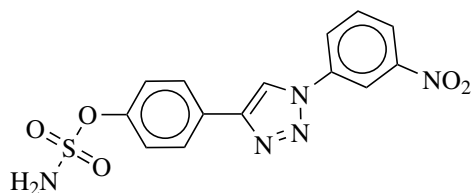
HRMS (m/z) [M - H]⁻ obliczone: 472,8742, zmierzone: 472,8868

Amidosiarczan 4-(1-(3-jodofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **Is****Wydajność** 73%**Temperatura topnienia:** 228-229°C (z rozkładem) ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3319, 1584, 1480, 1371, 1178, 1155, 1050, 951, 876, 759, 676 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,40 (1H, s, CH), 8,35 (1H, t, $J = 1,8$ Hz, Ar-H), 8,09 (2H, s, NH_2), 8,05-7,97 (3H, m, Ar-H), 7,92-7,86 (1H, m, Ar-H), 7,47-7,39 (3H, m, Ar-H) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 150,5, 147,0, 137,9, 137,8, 132,3, 129,0, 128,5, 127,2, 123,3, 120,4, 119,8, 96,0**HRMS** (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 440,9518, zmierzone: 440,9654Amidosiarczan 4-(1-(3,5-dijodofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **It****Wydajność** 60%**Temperatura topnienia:** 213-216°C (z rozkładem) ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3296, 1574, 1494, 1364, 1175, 1156, 1045, 955, 864, 761, 665 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,43 (1H, s, CH), 8,37 (2H, d, $J = 1,4$ Hz, Ar-H), 8,24 (1H, t, $J = 1,3$ Hz, Ar-H), 8,08 (2H, s, NH_2), 7,99 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 7,43 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 150,5, 147,1, 144,8, 138,4, 128,8, 127,9, 127,1, 123,4, 120,6, 97,4**HRMS** (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 566,8485, zmierzone: 566,8643

Amidosiarczan 4-(1-(3-metylofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **Iu****Wydajność** 52%**Temperatura topnienia:** 212-213°C (z rozkładem) ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3340, 1595, 1494, 1373, 1174, 1152, 1039, 947, 867, 759, 686 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,32 (1H, s, CH), 8,08 (2H, s, NH₂), 8,03 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 7,80 (1H, s, Ar-H), 7,76 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, Ar-H), 7,52 (1H, t, $J = 7,8$ Hz, Ar-H), 7,42 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 7,35 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, Ar-H), 2,45 (3H, s, CH₃) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 150,4, 146,9, 140,2, 137,0, 130,2, 129,9, 129,2, 127,1, 123,3, 120,9, 120,3, 117,6, 21,4**HRMS** (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 329,0708, zmierzone: 329,0851Amidosiarczan 4-(1-(3,5-dimetylofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **Iw****Wydajność** 76%**Temperatura topnienia:** 234-238°C (z rozkładem) ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3332, 1591, 1489, 1366, 1176, 1153, 1061, 948, 871, 758, 679 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,30 (1H, s, CH), 8,08 (2H, s, NH₂), 8,02 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,59 (2H, s, Ar-H), 7,42 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,16 (1H, s, Ar-H), 2,40 (6H, s, CH₃) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 150,4, 146,8, 139,9, 137,0, 130,5, 129,2, 127,1, 123,3, 120,2, 118,0, 21,4**HRMS** (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 343,0865, zmierzone: 343,1014

Amidosiarczan 4-(1-(3-metoksyfenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **Ix****Wydajność** 64%**Temperatura topnienia:** 210-212°C (z rozkładem) ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3298, 1608, 1483, 1370, 1177, 1153, 1061, 953, 871, 760, 681 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,35 (1H, s, CH), 8,08 (2H, s, NH₂), 8,02 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 7,57-7,51 (3H, m, Ar-H), 7,43 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 7,13-7,07 (1H, m, Ar-H), 3,89 (3H, s, CH₃) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 160,7, 150,4, 146,9, 138,1, 131,4, 129,1, 127,1, 123,3, 120,4, 114,9, 112,4, 106,1, 56,1**HRMS** (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 345,0658, zmierzone: 345,0810Amidosiarczan 4-(1-(3,5-dimetoksyfenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **Iy****Wydajność** 59%**Temperatura topnienia:** 225-227°C (z rozkładem) ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3331, 1597, 1480, 1373, 1178, 1152, 1068, 949, 874, 759, 676 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,35 (1H, s, CH), 8,08 (2H, s, NH₂), 8,01 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 7,43 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 7,15 (2H, d, $J = 2,2$ Hz, Ar-H), 6,65 (1H, t, $J = 2,2$ Hz, Ar-H), 3,87 (6H, s, CH₃) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 161,7, 150,4, 146,8, 138,5, 129,1, 127,1, 123,3, 120,4, 100,8, 98,7, 56,2**HRMS** (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 375,0763, zmierzone: 375,0919

Amidosiarczan 4-(1-(3-etylofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **Iz****Wydajność** 68%**Temperatura topnienia:** 223-225°C (z rozkładem) ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3314, 1589, 1484, 1371, 1178, 1154, 1053, 951, 874, 760, 692 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,33 (1H, s, CH), 8,08 (2H, s, NH₂), 8,03 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,83-7,74 (2H, m, Ar-H), 7,55 (1H, t, $J = 7,8$ Hz, Ar-H), 7,43 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,38 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, Ar-H), 2,75 (2H, q, $J = 7,6$ Hz, CH₂), 1,27 (3H, t, $J = 7,6$ Hz, CH₃) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 150,4, 146,9, 146,4, 137,1, 130,3, 129,2, 128,7, 127,1, 123,3, 120,3, 119,8, 117,9, 28,5, 15,9**HRMS** (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 343,0865, zmierzone: 343,1020Amidosiarczan 4-(1-(3-izopropylofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenylu **Iaa****Wydajność** 65%**Temperatura topnienia:** 202-204°C (z rozkładem) ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3335, 1584, 1486, 1372, 1175, 1153, 1055, 942, 869, 758, 692 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,34 (1H, s, CH), 8,08 (2H, s, NH₂), 8,04 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,83 (1H, t, $J = 1,9$ Hz, Ar-H), 7,80-7,75 (1H, m, Ar-H), 7,55 (1H, t, $J = 7,9$ Hz, Ar-H), 7,46-7,38 (3H, m, Ar-H), 3,04 (1H, hept, $J = 6,9$ Hz, CH), 1,29 (6H, d, $J = 6,9$ Hz, CH₃) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 151,1, 150,4, 146,9, 137,1, 130,4, 129,2, 127,3, 127,1, 123,3, 120,3, 118,4, 118,1, 33,9, 24,2**HRMS** (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 357,1021, zmierzone: 357,1176

Amidosiarczan 4-(1-(3-nitrofenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)fenyłu **Iab**

Wydajność 63%

Temperatura topnienia: 225-226°C (z rozkładem)

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3342, 1530, 1484, 1352, 1181, 1161, 1054, 925, 869, 749, 666

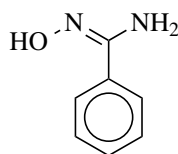
$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 9,59 (1H, s, CH), 8,79 (1H, t, $J = 2,1$ Hz, Ar-H), 8,47 (1H, dd, $J = 8,1, 2,1$ Hz, Ar-H), 8,37 (1H, dd, $J = 8,3, 2,2$ Hz, Ar-H), 8,09 (2H, s, NH_2), 8,04 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,95 (1H, t, $J = 8,2$ Hz, Ar-H), 7,44 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 150,6, 149,0, 147,3, 137,6, 132,1, 128,8, 127,2, 126,4, 123,7, 123,4, 120,7, 115,1

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 360,0403, zmierzone: 360,0553

3.2.5 Ogólna procedura otrzymywania pochodnych *N*-hydroksybenzenokarboksyimidoamidów **28** i **29**

Do okrągłodennej kolby, wysuszonej palnikiem wprowadzono 50 mL bezwodnego etanolu, odpowiednią pochodną benzonitrylu (1 eq, 42 mmol), bezwodny K_2CO_3 (1,3 eq, 54,6 mmol) oraz chlorowodorek hydroksyloaminy (1,3 eq, 54,6 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 3 godziny. Następnie, mieszaninę ochłodzono i wprowadzono ponownie bezwodny K_2CO_3 (1,3 eq, 54,6 mmol) oraz chlorowodorek hydroksyloaminy (1,3 eq, 54,6 mmol). Reakcję prowadzono przez noc w temperaturze wrzenia etanolu. W następnym etapie, pozostały osad odsączono, przemyto dwukrotnie etanolem, a otrzymany przesącz odparowano otrzymując pożądane, surowe produkty o akceptowalnej czystości.



N'-hydroksybenzenokarboksyimidoamid **28**

Wydajność 96%

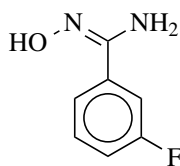
Temperatura topnienia: 78-81°C

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3464, 3362, 3224, 2955, 2855, 1649, 1588, 1456, 1379, 927, 819

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (500 MHz, DMSO- d_6) 9,64 (1H, s, OH), 7,71-7,64 (2H, m, Ar-H), 7,42-7,33 (3H, m, Ar-H), 5,81 (2H, s, NH_2)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (126 MHz, DMSO- d_6) 150,9, 133,4, 129,0, 128,2, 125,5

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 135,0558, zmierzone: 135,0562

3-Fluoro-*N'*-hydroksybenzenokarboksyimidoamid **29**

Wydajność 94%

Temperatura topnienia: 75-76°C

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3454, 3382, 3220, 2960, 2862, 1653, 1574, 1425, 1379, 1156, 1020, 930, 801

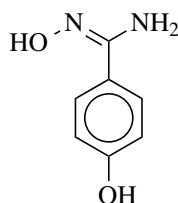
$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (500 MHz, DMSO- d_6) 9,79 (1H, s, OH), 7,53 (1H, dt, $J = 7,8, 1,2$ Hz, Ar-H), 7,46 (1H, ddd, $J = 10,8, 2,7, 1,6$ Hz, Ar-H), 7,41 (1H, td, $J = 8,0, 6,1$ Hz, Ar-H), 7,21 (1H, td, $J = 8,6, 8,2, 2,7$ Hz, Ar-H), 5,91 (2H, s, NH_2)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (126 MHz, DMSO- d_6) 162,1 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 242,3$ Hz), 149,9 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 2,8$ Hz), 135,8 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,1$ Hz), 130,2 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,4$ Hz), 121,5 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 2,7$ Hz), 115,7 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 21,1$ Hz), 112,2 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 23,2$ Hz)

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 153,0646, zmierzone: 153,0527

3.2.6 Ogólna procedura otrzymywania pochodnych *N*-hydroksybenzenokarboksyimidoamidów **30** i **31**

W okrągłodennej kolbie, rozpuszczono $\text{HCl} \cdot \text{NH}_2\text{OH}$ (2 eq, $n = 90$ mmol) w 80 mL mieszaniny $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (3:1 v/v). Następnie, do mieszaniny reakcyjnej porcjami wprowadzono NaHCO_3 (2 eq, $n = 90$ mmol) i pozostawiono w stanie mieszania przez okres 10 minut. Do tak przygotowanej mieszaniny reakcyjnej wprowadzono odpowiednią pochodną benzonitrylu (1 eq, $n = 45$ mmol) i pozostawiono w stanie mieszania przez 24 godziny w temperaturze 80°C . W kolejnym etapie, mieszanina została poddana dwukrotnie ekstrakcji octanem etylu. Warstwy organiczne połączono, wysuszono bezwodnym MgSO_4 i odparowano otrzymując czysty związek.



N',4-dihydroksybenzenokarboksyimidoamid **30**

Wydajność 97%

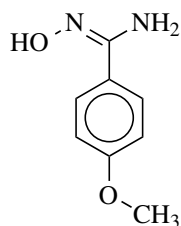
Temperatura topnienia: $200\text{-}202^\circ\text{C}$ (z rozkładem)

ν_{max} (ATR)/ cm^{-1} 3399, 3342, 3218, 3211, 2962, 2841, 1613, 1506, 1401, 1322, 1020, 972, 822

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (500 MHz, DMSO-d_6) 9,98-9,78 (1H, brs, Ar-OH), 9,78-9,51 (1H, brs, =N-OH), 7,50 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 6,78 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 6,36-6,15 (2H, brs, NH_2)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (126 MHz, DMSO-d_6) 159,0, 152,6, 127,4, 122,5, 115,1

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 151,0508, zmierzone: 151,0368



N'-hydroksy-4-metoksybenzenokarboksyimidoamid **31**

Wydajność 96%

Temperatura topnienia: 120-123°C

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 2944, 2842, 1615, 1534, 1435, 1322, 1142, 1021, 916, 801

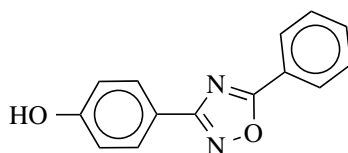
$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (500 MHz, DMSO- d_6) 7,60 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 6,92 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 5,74 (2H, s, NH_2), 3,76 (3H, s, OCH_3)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (126 MHz, DMSO- d_6) 159,8, 150,6, 126,8, 125,8, 113,5, 55,2

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 165,0664, zmierzone: 165,0762

3.2.7 Ogólna procedura otrzymywania pochodnych 4-(5-fenyl-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenolu **32a-c** oraz pochodnych 5-(4-metoksyfenyl)-3-fenyl-1,2,4-oksadiazolu **33a-b**

Do okrągłodennej kolby, wysuszonej palnikiem Bunsena, wprowadzono 6 mL bezwodnego DCM oraz odpowiednią pochodną kwasu benzoowego (1 eq, 7,1 mmol). Utrzymując warunki bezwodne, w kolejnym kroku dodano chlorek tionylu (10 eq, 71 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 3 godziny. W kolejnym korku, lotne substancje odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, aż do zaniku zapachu chlorku tionylu, po czym do otrzymanej pozostałości dodano 6 mL bezwodnej pirydyny oraz pochodną *N'*-hydroksybenzenokarboksymidoamidu (1,2 eq, 8,52 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez noc. Następnie, mieszaninę ochłodzono i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany surowy produkt rekrytalizowano z układu EtOH:H₂O.



4-(5-fenyl-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenol **32a**

Wydajność 56%

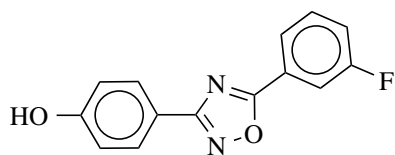
Temperatura topnienia: 184-185°C

ν_{\max} (ATR)/cm⁻¹ 3176, 1606, 1558, 1434, 1362, 1272, 1236, 1173, 838, 749, 682

¹H NMR δ_{H} (400 MHz, DMSO-d₆) 10,18 (1H, s, OH), 8,18 (2H, d, *J* = 7,0 Hz, Ar-H), 7,94 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ar-H), 7,74 (1H, m, Ar-H), 7,67 (2H, m, Ar-H) 6,96 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ar-H)

¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, DMSO-d₆) 174,9, 168,2, 160,4, 133,2, 129,5, 128,9, 127,8, 123,5, 116,8, 116,0

HRMS (*m/z*) [M - H]⁻ obliczone: 237,0664, zmierzone: 237,0752

4-(5-(3-Fluorofenylo)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenol **32b**

Wydajność 49%

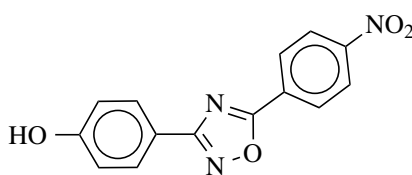
Temperatura topnienia: 209-210°C

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3207, 1566, 1440, 1364, 1281, 1241, 1201, 1176, 846, 759, 670

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 10,20 (1H, s, OH), 8,02 (1H, m, Ar-H), 7,98-7,96 (1H, m, Ar-H), 7,94 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,72 (1H, m, Ar-H), 7,59 (1H, m, Ar-H) 6,96 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 173,8 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 3,2$ Hz), 168,3, 162,3 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 245,8$ Hz), 160,5, 131,9 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,4$ Hz), 129,0, 125,5 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,7$ Hz), 124,2 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 2,9$ Hz), 120,2 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 21,1$ Hz), 116,6, 116,0, 114,6 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 24,1$ Hz)

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 255,0575, zmierzone: 255,0733

4-(5-(4-Nitrofenylo)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenol **32c**

Wydajność 56%

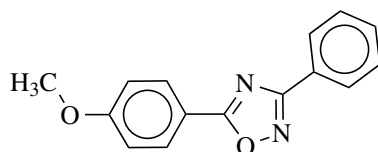
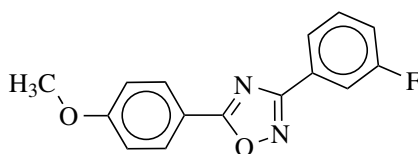
Temperatura topnienia: 256-260°C (z rozkładem)

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3419, 1593, 1562, 1516, 1428, 1336, 1276, 1169, 1104, 840, 746, 716

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, CD_3COCD_3) 8,54-8,48 (4H, m, Ar-H), 8,02 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, Ar-H), 7,05 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H)

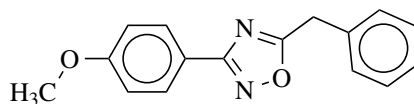
$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, CD_3COCD_3) 174,6, 169,9, 161,5, 151,3, 130,4, 130,2, 130,0, 125,3, 118,5, 116,8

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 282,0520, zmierzone: 282,0718

5-(4-Metoksyfenylo)-3-fenylo-1,2,4-oksadiazol **33a****Wydajność** 64%**Temperatura topnienia:** 93-94°C ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 1614, 1503, 1365, 1262, 1178, 1024, 838, 748, 690 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 8,15 (2H, d, $J = 9,0$ Hz, Ar-H), 8,10 (2H, m, Ar-H), 7,62 (3H, m, Ar-H), 7,21 (2H, d, $J = 9,0$ Hz, Ar-H), 3,89 (3H, s, CH_3) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 175,2, 168,1, 163,1, 131,5, 129,9, 129,2, 127,0, 126,3, 115,7, 115,0, 55,6**HRMS** (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ obliczone: 253,0972, zmierzone: 253,32643-(3-Fluorofenylo)-5-(4-metoksyfenylo)-1,2,4-oksadiazol **33b****Wydajność** 59%**Temperatura topnienia:** 121-122°C ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 1585, 1502, 1453, 1351, 1261, 1223, 1177, 1021, 862, 759 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 8,15 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, Ar-H), 7,94 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, Ar-H), 7,83 (1H, m, Ar-H) 7,67 (1H, m, Ar-H) 7,49 (1H, m, Ar-H) 7,21 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, Ar-H) 3,89 (3H, s, CH_3) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 175,5, 167,2 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 2,9$ Hz), 163,5, 162,2 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 244,9$ Hz), 131,5 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,3$ Hz), 140,0, 128,4 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,5$ Hz), 123,2 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 2,9$ Hz), 118,5 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 21,0$ Hz), 115,5, 115,0, 113,8 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 23,6$ Hz), 55,6**HRMS** (m/z) $[\text{M} + \text{H}]^+$ obliczone: 271,0878, zmierzone: 271,3292

3.2.8 Ogólna procedura otrzymywania pochodnych 5-benzyl-3-(4-metoksyfenilo)-1,2,4-oksadiazolu 35a-c

Do okrągłodennej kolby, wysuszonej palnikiem, wprowadzono 5 mL bezwodnego DMF oraz odpowiednią pochodną kwasu fenyllooctowego (1 eq, 3,02 mmol). Następnie do mieszaniny dodano CDI (1,1 eq, 3,32 mmol), po czym pozostawiono w stanie mieszania przez około 10 minut, zachowując warunki bezwodne. Po zaprzestaniu wydzielania się pęcherzyków gazu, do roztworu dodano *N*'-hydroksy-4-metoksybenzenokarboksyimidoamid (1,1 eq, 3,32 mmol) i reakcję mieszano w temperaturze 100°C przez 3 godziny. W kolejnym etapie, mieszaninę reakcyjną ochłodzono, przeniesiono do zlewki z lodem po czym ekstrahowano dwukrotnie AcOEt. Warstwy organiczne połączono, wysuszono bezwodnym MgSO₄ i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany surowy produkt oczyszczono za pomocą preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie DCM:heksan (1:1).



5-Benzyl-3-(4-metoksyfenilo)-1,2,4-oksadiazol **35a**

Wydajność 54%

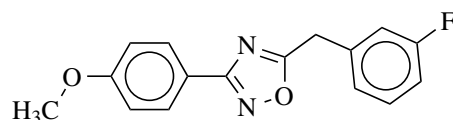
Temperatura topnienia: 76-78°C

ν_{\max} (ATR)/cm⁻¹ 1567, 1453, 1367, 1254, 1172, 1028, 894, 833, 726

¹H NMR δ_{H} (400 MHz, DMSO-d₆) 7,93 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, Ar-H), 7,42-7,36 (4H, m, Ar-H), 7,34-7,29 (1H, m, Ar-H), 7,10 (2H, d, *J* = 8,9 Hz, Ar-H), 4,42 (2H, s, CH₂), 3,83 (3H, s, OCH₃)

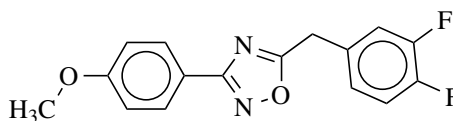
¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, DMSO-d₆) 178,5, 167,4, 161,7, 134,2, 129,1, 128,8, 128,7, 127,3, 114,6, 55,4, 32,0

HRMS (*m/z*) [M - H]⁻ obliczone: 265,0982, zmierzone: 265,1605

5-(3-Fluorobenzyl)-3-(4-metoksyfenylo)-1,2,4-oksadiazol **35b****Wydajność** 70%**Temperatura topnienia:** 77-79°C

¹H NMR δ_{H} (400 MHz, DMSO-*d*₆) 7,93 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, Ar-H), 7,43 (1H, td, $J = 7,9, 6,3$ Hz, Ar-H), 7,28 (1H, dd, $J = 10,0, 2,1$ Hz, Ar-H), 7,25 (1H, d, $J = 7,7$ Hz, Ar-H), 7,16 (1H, td, $J = 8,7, 2,6$ Hz, Ar-H), 7,10 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, Ar-H), 4,46 (2H, s, CH₂), 3,82 (3H, s, OCH₃)

¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, DMSO-*d*₆) 178,0, 167,5, 162,1 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 243,8$ Hz), 161,7, 136,8 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,0$ Hz), 130,7 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,4$ Hz), 128,7, 125,3 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 2,8$ Hz), 118,4, 116,1 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 21,9$ Hz), 114,6, 114,2 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 20,8$ Hz), 55,4, 31,5 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 1,7$ Hz)

5-(3,4-Difluorobenzyl)-3-(4-metoksyfenylo)-1,2,4-oksadiazol **35c****Wydajność** 64%**Temperatura topnienia:** 74-75°C **ν_{max} (ATR)/cm⁻¹** 1591, 1514, 1367, 1250, 1207, 1027, 830, 796, 745

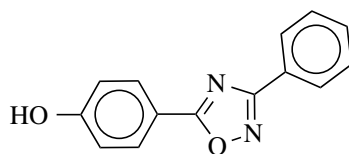
¹H NMR δ_{H} (400 MHz, DMSO-*d*₆) 7,92 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, Ar-H), 7,54 (1H, m, Ar-H), 7,45 (1H, m, Ar-H), 7,31-7,25 (1H, m, Ar-H), 7,10 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, Ar-H), 4,44 (2H, s, CH₂), 3,82 (3H, s, OCH₃)

¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, DMSO-*d*₆) 177,3, 167,4, 161,7, 149,2 (dd, $^1J_{\text{C-F}} = 245,8$ Hz, $^2J_{\text{C-F}} = 12,7$ Hz), 148,8 (dd, $^1J_{\text{C-F}} = 245,8$ Hz, $^2J_{\text{C-F}} = 12,7$ Hz), 138,8 (dd, $^3J_{\text{C-F}} = 6,4$ Hz, $^4J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz), 128,7, 126,2 (dd, $^3J_{\text{C-F}} = 6,6$ Hz, $^4J_{\text{C-F}} = 3,5$ Hz), 118,4 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 17,6$ Hz), 118,5, 117,9 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 17,1$ Hz), 114,6, 55,4, 31,0

HRMS (m/z) [M - H]⁻ obliczone: 301,0794, zmierzone: 301,0984

3.2.9 Ogólna procedura deprotekcji ugrupowania hydroksylowego za pomocą BBr₃

Do kolby okrągłodennej, wysuszonej palnikiem, wprowadzono 10 mL bezwodnego DCM oraz odpowiednią pochodną 5-benzylo-3-(4-metoksyfenylo)-1,2,4-oksadiazolu (**35a-c**) lub 5-(4-metoksyfenylo)-3-fenylo-1,2,4-oksadiazolu (**33a-b**) (1 eq, 2 mmol). Mieszaninę zabezpieczono przed dostępem wilgoci oraz ochłodzono w łaźni lodowej. Następnie wprowadzono BBr₃ (4 eq, 8 mmol) i reakcję pozostawiono przez noc w stanie mieszania w temperaturze pokojowej, w warunkach gazu obojętnego. W następstwie tego, mieszaninę przeniesiono do zlewki z wodą (ostrożnie) i ekstrahowano trzykrotnie octanem etylu. Warstwy organiczne połączono, przemyto nasyconym roztworem NaHCO₃, solanką, po czym wysuszono bezwodnym MgSO₄ i odparowano. Surowy produkt oczyszczono za pomocą preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie DCM:heksan (1:1) → DCM.



4-(3-Fenylo-1,2,4-oksadiazol-5-ilo)fenol **34a**

Wydajność 79%

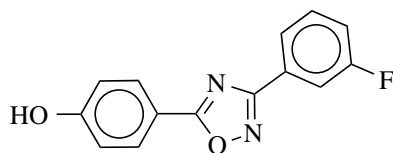
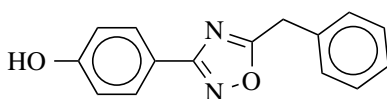
Temperatura topnienia: 172-173°C

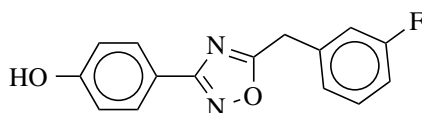
ν_{\max} (ATR)/cm⁻¹ 3226, 1614, 1501, 1446, 1362, 1286, 1238, 1172, 839, 749, 684

¹H NMR δ_{H} (400 MHz, DMSO-d₆) 10,52 (1H, s, OH), 8,11-8,07 (2H, m, Ar-H), 8,05 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,64-7,57 (3H, m, Ar-H), 7,01 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H)

¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, DMSO-d₆) 175,5, 168,0, 162,1, 131,5, 130,1, 129,2, 127,0, 126,4, 116,3, 114,2

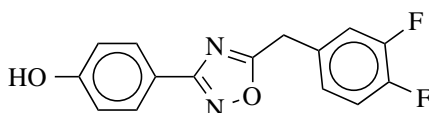
HRMS (m/z) [M - H]⁻ obliczone: 237,0669, zmierzone: 237,0772

4-(3-(3-Fluorofenyl)-1,2,4-oksadiazol-5-ilo)fenol **34b****Wydajność** 88%**Temperatura topnienia:** 179-180°C ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3486, 1578, 1499, 1454, 1348, 1288, 1180, 865, 758, 674 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 10,77-10,39 (1H, brs, OH), 8,04 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,92 (1H, d, $J = 7,9$ Hz, Ar-H) 7,81 (1H, m, Ar-H) 7,65 (1H, m, Ar-H), 7,48 (1H, m, Ar-H), 7,01 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 175,8, 167,2 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 3,0$ Hz), 162,1 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 244,8$ Hz), 162,2, 131,6 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,3$ Hz), 130,2, 128,6 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,5$ Hz), 123,3 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 2,9$ Hz), 118,4 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 21,0$ Hz), 116,3, 114,0, 113,7 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 23,6$ Hz)**HRMS** (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 255,0575, zmierzone: 255,06784-(5-Benzylo-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenol **36a****Wydajność** 27%**Temperatura topnienia:** 148-150°C ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3220, 1592, 1566, 1436, 1361, 1278, 1237, 1172, 839, 705 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 10,12 (1H, s, OH), 7,82 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,42-7,35 (4H, m, Ar-H), 7,34-7,29 (1H, m, Ar-H), 6,90 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 4,39 (2H, s, CH_2) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 178,3, 167,6, 160,3, 134,2, 129,0, 128,8, 128,8, 127,3, 116,8, 116,0, 32,0**HRMS** (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 251,0826, zmierzone: 251,0918

4-(5-(3-Fluorobenzyl)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenol **36b****Wydajność 39%****Temperatura topnienia:** 87-89°C

¹H NMR δ_{H} (400 MHz, DMSO-*d*₆) 10,12 (1H, s, OH), 7,81 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 7,43 (1H, dd, $J = 14,2, 7,9$ Hz, Ar-H), 7,27 (1H, dd, $J = 10,0, 2,0$ Hz, Ar-H), 7,24 (1H, d, $J = 7,7$ Hz, Ar-H), 7,16 (1H, td, $J = 8,6, 2,2$ Hz, Ar-H), 6,91 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 4,44 (2H, s, CH₂)

¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, DMSO-*d*₆) 177,8, 167,6, 162,1 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 243,9$ Hz), 160,3, 136,8 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,0$ Hz), 130,7 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,4$ Hz), 128,8, 125,3 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 2,8$ Hz), 116,8, 116,1 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 20,5$ Hz), 116,0, 114,2 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 20,8$ Hz), 31,5 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 1,9$ Hz)

4-(5-(3,4-Difluorobenzyl)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenol **36c****Wydajność 67%****Temperatura topnienia:** 121-122°C

ν_{max} (ATR)/ cm^{-1} 3352, 1613, 1563, 1520, 1435, 1279, 1210, 1169, 1116, 875, 832, 749

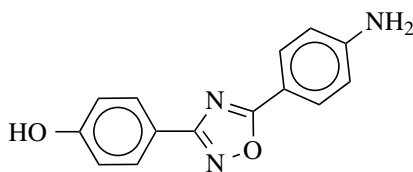
¹H NMR δ_{H} (400 MHz, DMSO-*d*₆) 10,11 (1H, s, OH), 7,80 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 7,52 (1H, ddd, $J = 11,7, 7,8, 2,2$ Hz, Ar-H), 7,44 (1H, dt, $J = 10,7, 8,5$ Hz, Ar-H), 7,30-7,22 (1H, m, Ar-H), 6,90 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 4,42 (2H, s, CH₂)

¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, DMSO-*d*₆) 177,8, 167,6, 169,9, 149,2 (dd, $^1J_{\text{C-F}} = 245,8$ Hz, $^2J_{\text{C-F}} = 12,7$ Hz), 148,8 (dd, $^1J_{\text{C-F}} = 245,8$ Hz, $^2J_{\text{C-F}} = 12,7$ Hz), 131,8 (dd, $^3J_{\text{C-F}} = 6,3$ Hz, $^4J_{\text{C-F}} = 3,9$ Hz), 128,8, 126,2 (dd, $^3J_{\text{C-F}} = 6,6$ Hz, $^4J_{\text{C-F}} = 3,5$ Hz), 118,4 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 17,6$ Hz), 117,7 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 17,1$ Hz) 116,8, 116,0, 31,0

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 287,0637, zmierzone: 287,0769

3.2.10 Procedura syntezy 4-(5-(4-aminofenylo)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenolu 37

W kolbie okrągłodennej zawieszono 4-(5-(4-nitrofenylo)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenol (**37**) (1 eq, 12,7 mmol, 3,60 g) w mieszaninie aceton:H₂O (315:630 mL). Następnie, mieszaninę powoli ogrzewano w celu rozpuszczenia substratu. W kolejnym kroku, Na₂S₂O₄ (10 eq, 127 mmol, 22,1 g) został dodany w niewielkich porcjach, po czym reakcję kontynuowano w temperaturze wrzenia przez około 3 godziny (do momentu całkowitej konsumpcji substratu na podstawie analizy TLC mieszaniny reakcyjnej). Następnie roztwór ochłodzono, zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem z wykorzystaniem wyparki obrotowej, a otrzymany osad odsączono i wysuszono na powietrzu otrzymując czysty produkt.



4-(5-(4-Aminofenylo)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenol 37

Wydajność 48%

Temperatura topnienia: 259-262°C (z rozkładem)

ν_{\max} (ATR)/cm⁻¹ 3394, 3320, 3110, 1605, 1565, 1504, 1361, 1234, 1168, 830, 764

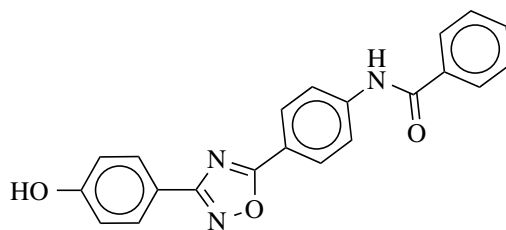
¹H NMR δ_{H} (400 MHz, DMSO-d₆) 10,16 (1H, s, OH), 7,88 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ar-H), 7,81 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ar-H), 6,92 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ar-H), 6,71 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ar-H), 6,14 (2H, s, NH₂)

¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, DMSO-d₆) 175,7, 167,8, 160,3, 153,6, 129,0, 117,6, 116,0, 113,7, 109,9

HRMS (*m/z*) [M - H]⁻ obliczone: 252,0778, zmierzone: 252,0889

3.2.11 Ogólna procedura syntezy pochodnych *N*-(4-(3-(4-hydroksyfenylo)-1,2,4-oksadiazol-5-ilo)fenylo)benzamid 38a-b oraz pochodnych *N*-(4-(3-(4-hydroksyfenylo)-1,2,4-oksadiazol-5-ilo)fenylo)-2-fenylacetamid 38c-e

Do kolby okrągłodennej, wysuszonej palnikiem i zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, wprowadzono 5 mL bezwodnego DCM, odpowiednią pochodną kwasu benzoowego lub fenyllooctowego (1 eq, 1,18 mmol) oraz chlorek tionylu (10 eq, 11,8 mmol). Reakcję ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 4 godziny. Następnie, lotne substancje odparowano, a do wytworzonego w wyniku reakcji chlorku kwasowego dodano 6 mL bezwodnego acetonu, bezwodny węglan potasu (4 eq, 4,72 mmol) oraz 4-(5-(4-aminofenylo)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenol (1 eq, 1,18 mmol). Reakcję zabezpieczono przed dostępem wilgoci i ogrzewano w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 4 godziny. W kolejnym kroku rozpuszczalnik odparowano, dodano wodę destylowaną i ostrożnie zakwaszono do pH = 2 za pomocą stężonego kwasu solnego. Pozostały osad odsączono, wysuszono i rekrytalizowano z układu EtOH:H₂O.



N-(4-(3-(4-Hydroksyfenylo)-1,2,4-oksadiazol-5-ilo)fenylo)benzamid **38a**

Wydajność 36%

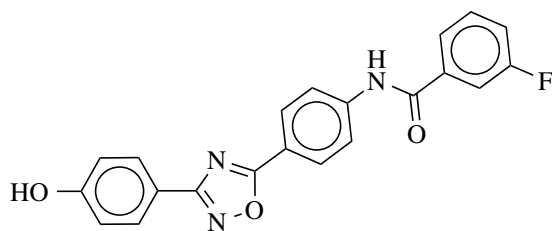
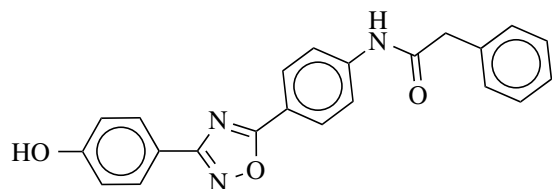
Temperatura topnienia: 277-278°C (z rozkładem)

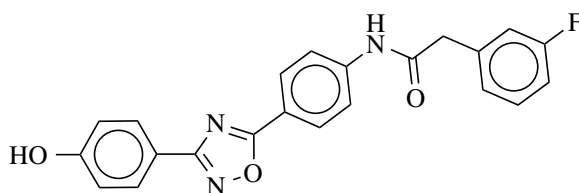
ν_{\max} (ATR)/cm⁻¹ 3116, 1661, 1599, 1503, 1357, 1319, 1274, 837, 764, 709

¹H NMR δ_{H} (400 MHz, DMSO-d₆) 10,66 (1H, s, NH), 10,16 (1H, s, OH), 8,18 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ar-H), 8,10 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, Ar-H), 8,00 (2H, d, *J* = 7,1 Hz, Ar-H), 7,94 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ar-H), 7,67-7,61 (1H, m, Ar-H), 7,60-7,54 (2H, m, Ar-H), 6,96 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ar-H)

¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, DMSO-d₆) 174,7, 168,1, 166,1, 160,4, 143,6, 134,5, 132,0, 128,9, 128,8, 128,5, 127,8, 120,3, 118,2, 116,9, 116,0

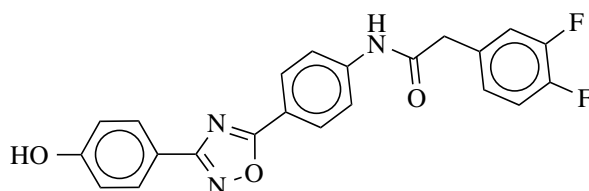
HRMS (*m/z*) [M - H]⁻ obliczone: 356,1040, zmierzone: 356,1217

3-Fluoro-*N*-(4-(3-(4-hydroksyfenylo)-1,2,4-oksadiazol-5-ilo)fenylo)benzamid **38b****Wydajność** 22%**Temperatura topnienia:** 291-292°C (z rozkładem) ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3288, 1658, 1574, 1500, 1412, 1359, 1271, 1167, 843, 763 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 10,71 (1H, s, NH), 10,16 (1H, s, OH) 8,19 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 8,08 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H) 7,93 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 7,88-7,79 (2H, m, Ar-H), 7,67-7,60 (1H, m, Ar-H), 7,53-7,46 (1H, m, Ar-H), 6,96 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 174,7, 168,1, 163,8 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 2,5$ Hz), 165,0 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 244,6$ Hz) 160,4, 143,3 136,8 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 6,9$ Hz), 130,8 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,0$ Hz), 128,9, 128,8, 124,1 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 2,8$ Hz), 120,4 118,9 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 21,1$ Hz) 118,5, 116,9, 116,0, 114,7 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 23,0$ Hz)**HRMS** (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 374,0946, zmierzone: 374,1128*N*-(4-(3-(4-Hydroksyfenylo)-1,2,4-oksadiazol-5-ilo)fenylo)-2-fenyloacetamid **38c****Wydajność** 42%**Temperatura topnienia:** 204-206°C (z rozkładem) ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3315, 1663, 1611, 1501, 1438, 1365, 1330, 1247, 1170, 842, 762 $^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 10,61 (1H, s, NH), 10,15 (1H, s, OH), 8,12 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,92 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, Ar-H), 7,88 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,38-7,32 (4H, m, Ar-H), 7,30-7,24 (1H, m, Ar-H), 6,95 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, Ar-H), 3,71 (2H, s, CH_2) $^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 174,7, 169,8, 168,1, 160,4, 143,5, 135,6, 129,2, 129,0, 128,9, 128,4, 126,7, 119,2, 117,9, 116,9, 43,4**HRMS** (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 370,1197, zmierzone: 370,1412

2-(3-Fluorofenyl)-*N*-(4-(3-(4-hydroksyfenylo)-1,2,4-oksadiazol-5-ilo)fenylo)acetamid **38d****Wydajność** 70%**Temperatura topnienia:** 215-218°C (z rozkładem)

¹H NMR δ_{H} (400 MHz, DMSO-*d*₆) 10,63 (1H, s, NH), 10,17 (1H, s, OH), 8,13 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 7,92 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 7,87 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,39 (1H, dt, $J = 8,0, 6,8$ Hz, Ar-H), 7,19 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, Ar-H), 7,14-7,07 (1H, m, Ar-H), 6,95 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 3,76 (2H, s, CH₂)

¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, DMSO-*d*₆) 174,6, 169,3, 168,1, 162,0 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 243,0$ Hz), 160,4, 143,4, 138,2 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 7,9$ Hz), 130,1 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,4$ Hz), 129,0, 128,9, 125,4 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 2,6$ Hz), 119,3, 118,0, 116,9, 116,1 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 21,7$ Hz), 116,0, 113,5 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 20,9$ Hz), 42,8 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 1,4$ Hz)

2-(3,4-Difluorofenyl)-*N*-(4-(3-(4-hydroksyfenylo)-1,2,4-oksadiazol-5-ilo)fenylo)acetamid **38e****Wydajność** 50%**Temperatura topnienia:** 217-220°C (z rozkładem) ν_{max} (ATR)/ cm^{-1} 3393, 1603, 1500, 1412, 1358, 1277, 1208, 1114, 844, 763

¹H NMR δ_{H} (400 MHz, DMSO-*d*₆) 10,61 (1H, s, NH), 10,15 (1H, s, OH), 8,13 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,92 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 7,87 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,46-7,36 (2H, m, Ar-H), 7,21-7,16 (1H, m, Ar-H), 6,95 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H) 3,75 (2H, s, CH₂)

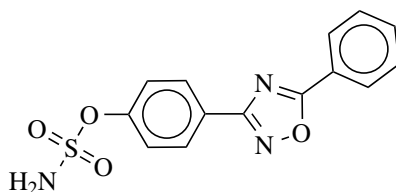
¹³C NMR δ_{C} (101 MHz, DMSO-*d*₆) 174,6, 169,2, 168,1, 160,4, 149,1 (dd, $^1J_{\text{C-F}} = 245,0$ Hz, $^2J_{\text{C-F}} = 12,6$ Hz), 148,4 (dd, $^1J_{\text{C-F}} = 244,4$ Hz, $^2J_{\text{C-F}} = 12,3$ Hz), 143,4, 133,1 (dd, $^3J_{\text{C-F}} = 6,3$ Hz, $^4J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz), 129,0, 128,9, 126,1 (dd, $^3J_{\text{C-F}} = 6,3$ Hz, $^4J_{\text{C-F}} = 3,4$ Hz), 119,3, 118,4 (d,

$^2J_{\text{C-F}} = 17,1 \text{ Hz}$), 118,0, 117,3 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 16,9 \text{ Hz}$), 116,9, 116,0, 42,0

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 406,1008, zmierzone: 406,1250

3.2.12 Ogólna procedura otrzymywania amidosiarczanowych pochodnych 1,2,4-oksadiazolu IIa-c, IIIa-b, IVa-c, Va-b, VIa-c

Do kolby okrągłodennej, wysuszonej palnikiem i zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, wprowadzono 2 mL bezwodnego DCM oraz izocyjanian chlorosulfurylu (2 eq, 2 mmol) po czym dodano mieszaninę kwasu mrówkowego (2 eq, 2 mmol) i katalityczną ilość *N,N*-dimetyloacetamidu. Całość mieszano w temperaturze 40°C przez 3 godziny. Następnie do mieszaniny reakcyjnej wprowadzono roztwór odpowiedniej fenolowej pochodnej 1,2,4-oksadiazolu (**32a-c**, **34a-b**, **36a-c**, **38a-e**) (1 eq, 1 mmol) w *N,N*-dimetyloacetamidzie (3 mL) i pozostawiono w stanie mieszania przez noc w temperaturze pokojowej, zabezpieczając mieszaninę przed dostępem wilgoci. Następnie roztwór przeniesiono do zlewki z wodą (50 mL), powstały osad odsączono, wysuszono na powietrzu i krystalizowano z ACN lub DCM.



Amidosiarczan 4-(5-fenyl-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu **IIa**

Wydajność 56% (rekrytalizacja z ACN)

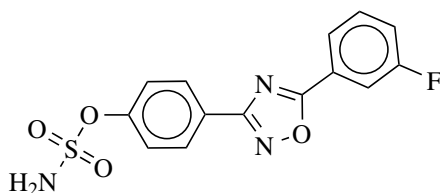
Temperatura topnienia: 166-167°C

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3301, 3193, 1607, 1556, 1493, 1425, 1376, 1206, 1155, 862, 758, 746

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 8,24-8,15 (6H, m, Ar-H, NH_2), 7,77-7,73 (1H, m, Ar-H), 7,71-7,64 (2H, m, Ar-H), 7,51 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 175,6, 167,6, 152,5, 133,5, 129,6, 128,9, 128,0, 124,3, 123,3, 123,0

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 316,0397, zmierzone: 316,0566

Amidosiarczan 4-(5-(3-fluorofenyl)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu **IIb**

Wydajność 47% (rekrytalizacja z ACN)

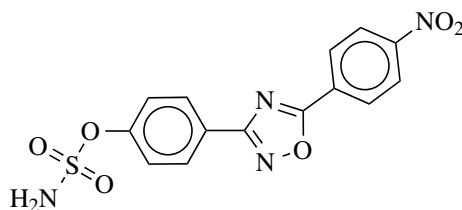
Temperatura topnienia: 181-183°C

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3398, 3296, 1565, 1491, 1363, 1204, 1159, 1127, 869, 769, 732

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 8,24-8,16 (4H, m, Ar-H, NH_2), 8,09-8,03 (1H, m, Ar-H), 8,00-7,97 (1H, m, Ar-H), 7,77-7,72 (1H, m, Ar-H), 7,65-7,60 (1H, m, Ar-H), 7,51 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 174,6 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 3,2$ Hz), 167,7, 161,8 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 245,8$ Hz), 152,6, 132,0 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,3$ Hz), 128,9, 125,2 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,7$ Hz), 124,3 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 3,0$ Hz), 124,1, 123,0, 120,5 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 21,1$ Hz), 114,7 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 24,2$ Hz)

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 334,0303, zmierzone: 334,0534

Amidosiarczan 4-(5-(4-nitrofenyl)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu **IIc**

Wydajność 50% (rekrytalizacja z ACN)

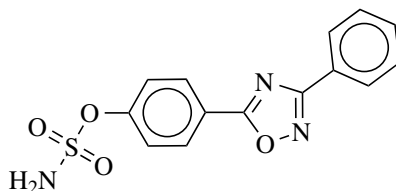
Temperatura topnienia: 253-254°C (z rozkładem)

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3361, 3189, 1567, 1417, 1382, 1346, 1188, 1155, 865, 852, 760, 720

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 8,52-8,38 (4H, m, Ar-H), 8,26-8,16 (4H, m, Ar-H, NH_2), 7,53 (4H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 174,0, 167,9, 152,7, 150,0, 129,5, 129,0, 128,6, 124,6, 124,0, 123,0

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 361,0248, zmierzone: 361,0615

Amidosiarczan 4-(3-fenyl-1,2,4-oksadiazol-5-ilo)fenylu **IIIa**

Wydajność 55% (rekrytalizacja z ACN)

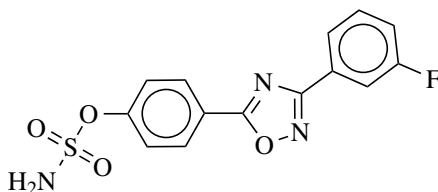
Temperatura topnienia: 173-174°C

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3382, 3286, 1619, 1500, 1358, 1174, 1154, 1135, 881, 853, 743, 719

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 8,33-8,24 (4H, m, Ar-H, NH_2), 8,14-8,07 (2H, m, Ar-H), 7,65-7,59 (3H, m, Ar-H), 7,58-7,54 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 174,7, 168,4, 153,7, 131,8, 130,0, 129,2, 127,1, 126,1, 123,1, 121,5

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 316,0397, zmierzone: 316,0565

Amidosiarczan 4-(3-(3-fluorofenyl)-1,2,4-oksadiazol-5-ilo)fenylu **IIIb**

Wydajność 60% (rekrytalizacja z ACN)

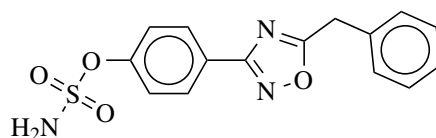
Temperatura topnienia: 180-181°C

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3370, 3274, 1612, 1454, 1367, 1349, 1155, 944, 880, 864, 773, 758

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 8,34-8,25 (4H, m, Ar-H, NH_2), 7,98-7,93 (1H, m, Ar-H), 7,87-7,82 (1H, m, Ar-H), 7,71-7,64 (1H, m, Ar-H), 7,56 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,53-7,46 (1H, m, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 175,0, 167,6 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 3,0$ Hz), 162,3 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 245,1$ Hz), 153,8, 131,7 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,3$ Hz), 130,0, 126,2 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,5$ Hz), 123,4 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 2,8$ Hz), 123,1, 121,3, 118,7 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 21,0$ Hz), 113,8 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 23,7$ Hz)

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 334,0303, zmierzone: 334,0505

Amidosiarczan 4-(5-benzylo-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu **IVa**

Wydajność 46% (rekrytalizacja z DCM)

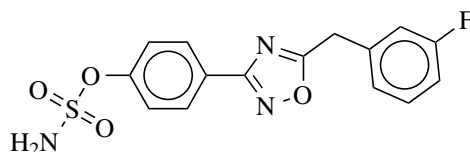
Temperatura topnienia: 165-166°C

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3282, 3011, 1560, 1372, 1180, 1149, 854, 749, 703

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 8,16 (2H, s, NH_2), 8,08 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,46 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,44-7,38 (4H, m, Ar-H), 7,33-7,30 (1H, m, Ar-H), 4,45 (2H, s, CH_2)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 179,1, 167,1, 152,4, 134,0, 129,1, 128,8, 128,8, 127,4, 124,3, 122,9, 32,0

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 330,0554, zmierzone: 330,0709

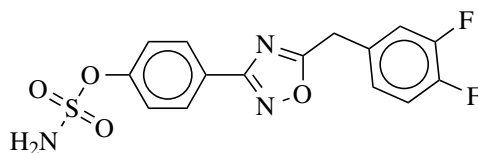
Amidosiarczan 4-(5-(3-fluorobenzylo)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu **IVb**

Wydajność 33% (rekrytalizacja z DCM)

Temperatura topnienia: 140-143°C

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 8,17 (2H, s, NH_2), 8,08 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,46 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,44-7,40 (1H, m, Ar-H), 7,30 (1H, d, $J = 10,0$ Hz, Ar-H), 7,26 (1H, d, $J = 7,7$ Hz, Ar-H), 7,17 (1H, td, $J = 8,7, 2,6$ Hz, Ar-H), 4,50 (2H, s, CH_2)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 178,6, 167,1, 162,1 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 243,9$ Hz), 152,4, 136,6 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,0$ Hz), 130,7 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,4$ Hz), 128,8, 125,4 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 2,8$ Hz), 124,3, 123,0, 116,1 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 22,0$ Hz), 114,3 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 20,8$ Hz), 31,6 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 2,0$ Hz)

Amidosiarczan 4-(5-(3,4-difluorobenzyl)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu **IVc**

Wydajność 38% (rekrytalizacja z DCM)

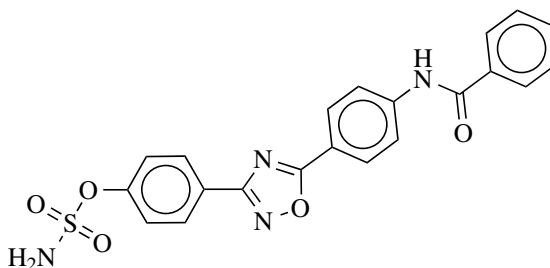
Temperatura topnienia: 143-144°C

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3295, 3067, 1566, 1377, 1284, 1181, 1150, 1116, 878, 751, 710

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 8,17 (2H, s, NH_2), 8,07 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, Ar-H), 7,54 (1H, m, Ar-H), 7,46 (3H, m, Ar-H), 7,33-7,26 (1H, m, Ar-H) 4,48 (2H, s, CH_2)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 178,6, 167,0, 152,4, 149,1 (dd, $^1J_{\text{C-F}} = 245,8$ Hz, $^2J_{\text{C-F}} = 12,7$ Hz), 148,9 (dd, $^1J_{\text{C-F}} = 245,5$ Hz, $^2J_{\text{C-F}} = 12,3$ Hz), 131,5 (dd, $^3J_{\text{C-F}} = 6,4$ Hz, $^4J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz), 128,8, 126,2 (dd, $^3J_{\text{C-F}} = 6,6$ Hz, $^4J_{\text{C-F}} = 3,5$ Hz), 123,0, 118,5 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 17,7$ Hz), 117,7 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 17,2$ Hz), 31,0

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 366,0365, zmierzone: 366,0582

Amidosiarczan 4-(5-(4-benzamidofenyl)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenylu **Va**

Wydajność 45% (rekrytalizacja z ACN)

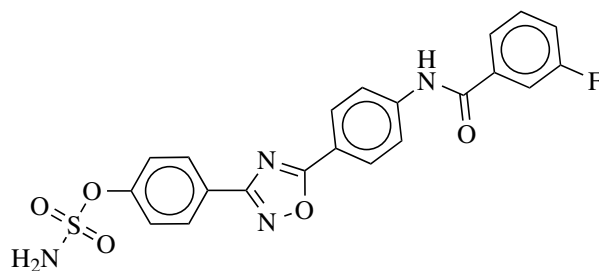
Temperatura topnienia: 241-243°C (z rozkładem)

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3305, 3199, 1663, 1523, 1365, 1317, 1155, 873, 844, 771

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 10,68 (1H, s, NH), 8,25-8,16 (6H, m, Ar-H, NH_2), 8,12 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 8,00 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 7,67-7,62 (1H, m, Ar-H), 7,61-7,55 (2H, m, Ar-H), 7,52 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 175,4, 167,5, 166,1, 152,5, 143,8, 134,5, 132,0, 128,9, 128,9, 128,5, 127,8, 124,5, 123,0, 120,3, 118,0

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 435,0768, zmierzone: 435,1004

Amidosiarczan 4-(5-(4-(3-fluorobenzamido)fenylo)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenyłu **Vb**

Wydajność 48% (rekrytalizacja z ACN)

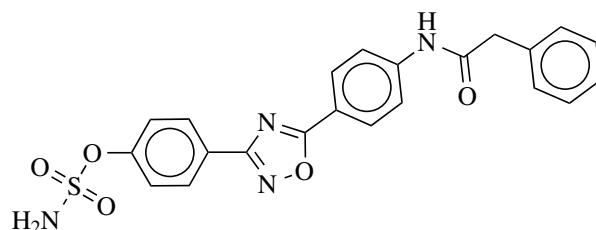
Temperatura topnienia: 251-253°C (z rozkładem)

ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3332, 3224, 1668, 1589, 1503, 1365, 1320, 1271, 1157, 873, 844, 772

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 10.72 (1H, s, NH), 8.24-8.14 (6H, m, Ar-H, NH₂), 8.10 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 7.86 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, Ar-H), 7.84-7.79 (1H, m, Ar-H), 7.67-7.60 (1H, m, Ar-H), 7.52 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 7.50-7.46 (1H, m, Ar-H)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 175.3, 167.5, 164.7 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 2.6$ Hz), 162.0 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 244.6$ Hz), 152.5, 143.5, 136.8 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 6.9$ Hz), 130.8 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8.0$ Hz), 129.0, 128.9, 124.5, 124.1 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 2.7$ Hz), 123.0, 120.4, 118.9 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 21.1$ Hz), 118.2, 114.7 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 23.0$ Hz)

HRMS (m/z) $[\text{M} - \text{H}]^-$ obliczone: 453,0674, zmierzone: 453,0927

Amidosiarczan 4-(5-(4-(2-fenylacetamido)fenylo)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenyłu **VIa**

Wydajność 39% (rekrytalizacja z ACN)

Temperatura topnienia: 217-220°C (z rozkładem)

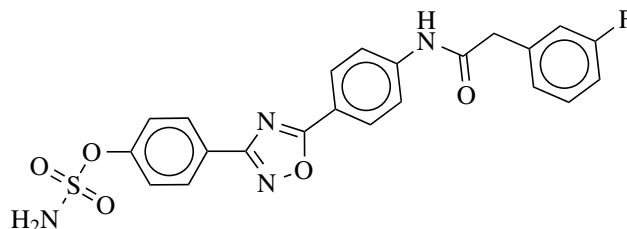
ν_{\max} (ATR)/ cm^{-1} 3263, 3062, 1671, 1604, 1504, 1416, 1353, 1154, 870, 848, 759

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 10.63 (1H, s, NH), 8.22-8.13 (6H, m, Ar-H, NH₂), 7.90 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, Ar-H), 7.51 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 7.39-7.31 (4H, m, Ar-H), 7.29-7.24 (1H, m, Ar-H), 3.72 (2H, s, CH₂)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 175.3, 169.9, 167.5, 152.4, 143.7, 135.5, 129.2, 129.1, 128.8,

128,4, 126,7, 124,5, 123,0, 119,3, 117,6, 43,4

HRMS (m/z) $[M - H]^-$ obliczone: 449,0925, zmierzone: 449,1170



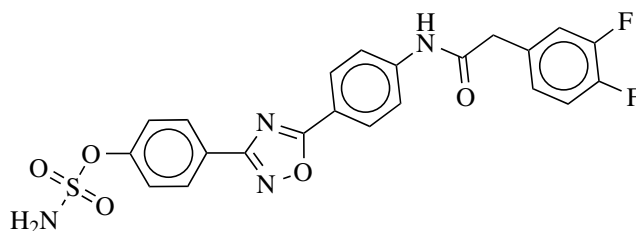
Amidosiarczan 4-(5-(4-(2-(3-fluorofenylo)acetamido)fenylo)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenyłu **VIb**

Wydajność 41% (rekrytalizacja z ACN)

Temperatura topnienia: 240-246°C (z rozkładem)

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 10,65 (1H, s, NH), 8,22-8,14 (6H, m, Ar-H, NH₂), 7,89 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,51 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 7,43-7,35 (1H, m, Ar-H), 7,23-7,16 (2H, m, Ar-H), 7,14-7,07 (1H, m, Ar-H), 3,76 (2H, s, CH₂)

$^{13}\text{C NMR}$ δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 175,3, 169,4, 167,5, 162,1 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 243,2$ Hz), 152,4, 143,6, 138,1 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,0$ Hz), 130,1 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,4$ Hz), 129,1, 128,8, 125,5 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 2,7$ Hz), 124,5, 123,0, 119,3, 117,7, 116,1 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 21,4$ Hz), 113,5 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 20,8$ Hz), 42,8 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 1,3$ Hz)



Amidosiarczan 4-(5-(4-(2-(3,4-difluorofenylo)acetamido)fenylo)-1,2,4-oksadiazol-3-ilo)fenyłu

VIc

Wydajność 38% (rekrytalizacja z ACN)

Temperatura topnienia: 228-229°C (z rozkładem)

ν_{max} (ATR)/ cm^{-1} 3398, 3239, 1667, 1603, 1515, 1411, 1376, 1179, 1151, 862, 768

$^1\text{H NMR}$ δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 10,63 (1H, s, NH), 8,21-8,13 (6H, m, Ar-H, NH₂), 7,88 (2H,

d, $J = 8,9$ Hz, Ar-H), 7,51 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,46-7,36 (2H, m, Ar-H), 7,22-7,16 (1H, m, Ar-H), 3,75 (2H, s, CH₂)

¹³C NMR δ_C (101 MHz, DMSO-d₆) 175,3, 169,3, 167,5, 152,4, 149,5 (dd, $^1J_{C-F} = 245,0$ Hz, $^2J_{C-F} = 12,7$ Hz) 148,5 (dd, $^1J_{C-F} = 244,4$ Hz, $^2J_{C-F} = 12,6$ Hz) 143,6, 133,1 (dd, $^3J_{C-F} = 6,3$ Hz, $^4J_{C-F} = 3,8$ Hz), 129,1, 128,8, 126,1 (dd, $^3J_{C-F} = 6,3$ Hz, $^4J_{C-F} = 3,3$ Hz), 124,5, 123,0, 119,3, 118,3 (d, $^2J_{C-F} = 17,1$ Hz), 117,7, 117,2 (d, $^2J_{C-F} = 16,9$ Hz), 42,0

HRMS (m/z) [M - H]⁻ obliczone: 485,0736, zmierzone: 485,1138

3.3 Badania biologiczne

3.3.1 Izolacja i oczyszczanie enzymu

Komórki łożyska ludzkiego pozbawiono membran i zhomogenizowano w schłodzonym buforze Tris o $\text{pH} = 7,4$, zawierającym 0,1% surfaktantu Triton X-100 oraz 0,02% NaN_3 . Otrzymany w ten sposób homogenat kilkukrotnie zamrażano oraz rozmrażano po czym odwirowano przy 100 000 g przez 60 minut. Otrzymany supernatant usunięto, a procedurę od homogenizacji do odwirowania powtórzono pięciokrotnie. Po przeprowadzeniu izolacji enzymu oczyszczono go na drodze trójstopniowej chromatografii z wykorzystaniem kolumn – DEAE-celuloza, Con A-Sefarosa oraz Bio-Gel A-1.5 z zastosowaniem odpowiednich buforów.

3.3.2 Procedura badania aktywności biologicznej w teście enzymatycznym

Wyznaczenie aktywności inhibicyjnej otrzymanych związków zostało przeprowadzone w mieszaninie reakcyjnej o objętości 100 μL zawierającej odpowiednio: 20 mM buforu Tris-HCl przy $\text{pH} = 7,4$, $[\text{}^3\text{H}]\text{-E1S}$ ($4 \cdot 10^4$ Bq, 3 nM), 500 μM badanego związku oraz 5 U oczyszczonego enzymu (1 U jest to ilość enzymu, która w ciągu godziny w temperaturze 37°C hydrolizuje 100 mM siarczanu *p*-nitrofenylu). Eksperymenty były prowadzone przez 3 godziny w temperaturze 37°C . Po inkubacji mieszanina reakcyjna (90 μL) została pobrana, a otrzymany w wyniku hydrolizy produkt został wyekstrahowany toluenem (0,5 mL). Aktywność STS została zmierzona za pomocą Radioluminometru MicroBeta (Perkin Elmer). Każdy eksperyment został przeprowadzony w trzech powtórzeniach.

3.3.3 Procedura badania aktywności biologicznej w teście komórkowym

Zdolność inhibicyjną STS otrzymanych związków w komórkach raka piersi MCF-7 oznaczono z wykorzystaniem metody opisanej w literaturze z niewielkimi modyfikacjami[77]. Komórki MCF-7, będące źródłem STS, zawieszono w zmodyfikowanej pożywce Eagle-Dulbecco zawierającej 10% bydlęcej surowicy płodowej i hodowano do uzyskania 80%-owej konfluencji. W celu przeprowadzenia eksperymentu komórki wysiano w 24-komorowych mikroplótkach (Nest Biotechnology) z gęstością $1 \cdot 10^5$ komórek w komorze (ilość komórek została określona za pomocą Counting Chamber firmy Bürker). Inkubację prowadzono przez 20 godzin w temperaturze 37°C

w wilgotnej atmosferze zawierającej 5% dwutlenku węgla w pożywce bez surowicy (0,5 mL) z dodatkiem ^3H -E1S wraz z inhibitorem (o stężeniu odpowiednio: 100, 10 oraz 1 nM) lub bez. Po przeprowadzonej inkubacji pożywkę (0,45 mL) usunięto z każdej komory, a utworzony na drodze hydrolizy estron (nierozpuszczalny w medium) wyekstrahowano za pomocą toluenu (4 mL). Aktywność sulfatazy zmierzono za pomocą radioluminometru MicroBeta (Perkin Elmer). Każdy z eksperymentów został przeprowadzony w trzech powtórzeniach.

3.3.4 Przygotowanie roztworów inhibitorów do badań *in vivo*

Określone ilości związków rozpuszczono początkowo w DMSO (5%), następnie w 50% PEG400. Tak rozpuszczone związki zostały podawane *per os*.

3.3.5 Maksymalna Tolerowana Dawka (MTD)

Grupie składającej się z trzech 7-8 tygodniowych samic myszy Balb/c podawano doustnie badane związki w ilości 10 mg/kg masy ciała, pięć dni w tygodniu przez dwa tygodnie. Masa ciała oraz zachowanie zwierząt były monitorowane codziennie. W oparciu o pierwszy etap podawane zostały kolejne dawki – 20 mg/kg oraz 50 mg/kg. Utrata masy ciała rzędu 15% oraz nietypowe zachowanie zwierząt było traktowane jako efekt toksyczny. Pod koniec każdego z przeprowadzonych eksperymentów zwierzęta zostały uśmiercone poprzez dyslokację kręgów szyjnych po czym przeprowadzono sekcję zwłok, a narządy zewnętrzne zostały poddane analizie makroskopowej. Wykonano również badania morfologiczne pobranych próbek krwi w celu dalszej oceny toksyczności. Na podstawie otrzymanych rezultatów ustalono dawkę MTD.

3.3.6 Opis badań aktywności przeciwnowotworowej wybranych związków mysim modelu raka sutka 67NR

Zdrowe myszy (60 zwierząt) Balb/c, zostały zaszczepione ortotopowo (dosutkowo) komórkami linii nowotworu sutka myszy 67NR (wykazującego ekspresję ER+) w ilości $1,5 \cdot 10^5$ komórek/mysz w 0,05 mL płynu Hanksa, otrzymanych z hodowli *in vitro*. Po osiągnięciu rozmiaru guza w przedziale 50-100 mm³ myszy zostały podzielone na równe grupy doświadczalne (po 9 myszy w każdej). Grupa kontrolna otrzymywała roztwór nie zawierający substancji aktywnej, natomiast grupy doświadczalne otrzymywały przez 14 dni 5 razy w tygodniu roztwór substancji badanej w dawce zoptymalizowanej w eksperymencie MTD. Trzy razy w tygodniu rozmiar guza był monitorowany za pomocą suwmiarki, po czym wyznaczano jego objętość (TV) zgodnie z

przedstawionym poniżej wzorem:

$$TV = \frac{a^2 \cdot b}{2} [mm^3] \quad (3.1)$$

gdzie:

a – dłuższy wymiar guza [mm],

b – krótszy wymiar guza [mm].

Na podstawie otrzymanych rezultatów objętości guza wyznaczono wartość zahamowania wzrostu guza (TGI) za pomocą poniższego wzoru:

$$TGI = - \left(\left(\frac{TV_T}{TV_C} \right) \cdot 100\% \right) - 100\% [\%] \quad (3.2)$$

gdzie:

TV_T – objętość guza myszy z grupy doświadczalnej [mm³],

TV_C – objętość guza myszy z grupy kontrolnej [mm³].

Na koniec eksperymentu myszy zostały uśmiercone poprzez dyslokację kręgow szyjnych po czym wykonano sekcję. Główne organy zostały zważone i poddane ocenie makroskopowej. Próbkę krwi (ok. 500 µL) pobrano do fiolek zawierających roztwór EDTA w celu wykonania analizy morfologicznej (Mythic 18 analyzer, Orphee) oraz biochemicznej (Cobas c111, Roche). Osocze otrzymano w wyniku odwirowania krwi przy 2500 g przez 15 minut w temperaturze 4°C w ciągu 1 godziny od pobrania. Próbkę tkanek wątroby oraz wykształconego nowotworu zostały pobrane w celu określenia aktywności STS metodą radioizotopową.

3.3.7 Określenie poziomu estradiolu w osoczu krwi

Poziom estradiolu w osoczu myszy oznaczono za pomocą testu immunoenzymatycznego (Estradiol ELISA, Demedic) zgodnie z protokołem producenta. Absorbancję (przy 450 nm) rejestrowano za pomocą Biotek Synergy H4 (Biokom, Polska).

3.3.8 Opis badania aktywności STS w komórkach wątroby oraz nowotworu

Pobrane tkanki nowotworu oraz wątroby poddano homogenizacji za pomocą odczynnika do lizy komórek CelLytic™ MT przeznaczonego dla tkanek ssaków (Sigma-Aldrich, Merck) zgodnie z protokołem producenta. Próbkę tkanek zważono, a następnie dodano odpowiednią ilość buforu ekstrakcyjnego utrzymując stosunek 20 mL odczynnika na 1 gram tkanki. Następnie, próbki poddano sonikacji w 5 cyklach po 10 sekund, po czym odwirowano przez 10 minut przy 14 000 g w celu osadzenia resztek tkanki. Stężenia białka całkowitego w otrzymanych lizatach oznaczono metodą Bradforda, a jako źródło aktywności STS w każdej reakcji wykorzystano 100 μ L białka całkowitego. Reakcje prowadzono przez 3 godziny w temperaturze 37°C z dodatkiem [3 H]-E1S ($4 \cdot 10^4$ Bq, 3 nM) i 20 nM buforu Tris-HCl przy pH = 7,4. Objętość mieszanin reakcyjnych rozcieńczono do 100 μ L za pomocą wody destylowanej. Po inkubacji zebrano 60 μ L każdej mieszaniny reakcyjnej, a produkt, który został utworzony w wyniku reakcji hydrolizy, wyekstrahowano toluenem (0,5 mL). Aktywność STS mierzono za pomocą radioluminometru MicroBeta (Perkin Elmer). Testy przeprowadzono w trzech powtórzeniach, Uzyskane wyniki zostały zestawione z wynikami grupy kontrolnej i przedstawione jako pozostała aktywność STS.

3.3.9 Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została przeprowadzona za pomocą oprogramowania STATISTICA v. 10.1 (StatSoft Inc., USA). Test Mann–Whitney U oraz jednoczynnikowa analiza wariancji (ang. *one-way* ANOVA) zostały wykonane za pomocą programu GraphPad Prism 7 zakładając współczynnik prawdopodobieństwa $p = 0,05$ jako istotny. Normalność danych objętości guza została przeanalizowana za pomocą testu Shapiro-Wilk.

Bibliografia

- (1) International Agency for Research on Cancer, <http://https://gco.iarc.fr/>, (Dostęp z dnia 28.04.2022).
- (2) Pasqualini, J. R. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2004**, *1654*, 123–143.
- (3) Santner, S. J.; Feil, P. D.; Santen, R. J. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **1984**, *59*, 29–33.
- (4) James, V.; McNeill, J.; Lai, L.; Newton, C.; Ghilchik, M.; Reed, M. *Steroids* **1987**, *50*, 269–279.
- (5) Roser, M.; Ritchie, H. *Our World in Data* **2021**, <https://ourworldindata.org/burden-of-disease>.
- (6) Roth, G. A. i in. *The Lancet* **2018**, *392*, 1736–1788.
- (7) Basra, S.; Anand, B. S. *World Journal of Hepatology* **2011**, *3*, 108–13.
- (8) Chung, R. T. i in. *Hepatology* **2015**, *62*, 932–954.
- (9) Dahalan, F. A.; Churcher, T. S.; Windbichler, N.; Lawniczak, M. K. *PLOS Pathogens* **2019**, *15*, e1008063.
- (10) Bernadeta Dadonaite, H. R.; Roser, M. *Our World in Data* **2018**, <https://ourworldindata.org/diarrheal-diseases>.
- (11) Huggins, C. B.; Med, B. N. Y. A. *Bulletin of the New York Academy of Medicine* **1963**, *39*, 752.
- (12) Beatson, G. T. *Transactions. Medico-Chirurgical Society of Edinburgh* **1896**, *15*, 153.
- (13) McGuire, W. L.; Horwitz, K. B.; Pearson, O. H.; Segaloff, A. *Cancer* **1977**, *39*, 2934–2947.



- (14) Yang, S.; Thiel, K. W.; Leslie, K. K. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **2011**, *22*, 145–152.
- (15) Musquera, M.; Fleshner, N. E.; Finelli, A.; Zlotta, A. R. *Expert Review of Anti-cancer Therapy* **2008**, *8*, 1073–1079.
- (16) Kim, E. H.; Brockman, J. A.; Andriole, G. L. *Asian Journal of Urology* **2018**, *5*, 28–32.
- (17) Leeuw, R. D.; Berman-Booty, L. D.; Schiewer, M. J.; Ciment, S. J.; Den, R. B.; Dicker, A. P.; Kelly, W. K.; Trabulsi, E. J.; Lallas, C. D.; Gomella, L. G.; Knudsen, K. E. *Clinical Cancer Research* **2015**, *21*, 795–807.
- (18) Millar, R. P.; Lu, Z. L.; Pawson, A. J.; Flanagan, C. A.; Morgan, K.; Maudsley, S. R. *Endocrine Reviews* **2004**, *25*, 235–275.
- (19) Scher, H. I. i in. *New England Journal of Medicine* **2012**, *367*, 1187–1197.
- (20) Ito, Y.; Sadar, M. D. *Research and Reports in Urology* **2018**, *10*, 23–32.
- (21) Bono, J. S. D.; Oudard, S.; Ozguroglu, M.; Hansen, S.; MacHiels, J. P.; Kocak, I.; Gravis, G.; Bodrogi, I.; MacKenzie, M. J.; Shen, L.; Roessner, M.; Gupta, S.; Sartor, A. O. *The Lancet* **2010**, *376*, 1147–1154.
- (22) Sims, R. B. *Journal of Cancer* **2011**, *2*, 357–359.
- (23) Dr., G. N.; Dr., J. R. *Pharmacy and Therapeutics* **2012**, *37*, 440.
- (24) Jordan, V. C. *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, *2*, 205–213.
- (25) Dowsett, M.; Johnston, S. R.; Iveson, T. J.; Smith, I. E. *The Lancet* **1995**, *345*, 525.
- (26) DeFriend, D. J.; Howell, A.; Nicholson, R. I.; Anderson, E.; Dowsett, M.; Mansel, R. E.; Blamey, R. W.; Bundred, N. J.; Robertson, J. F.; Saunders, C. *Cancer Research* **1994**, *54*, 408–14.
- (27) Vogel, V. G. i in. *JAMA* **2006**, *295*, 2727–2741.
- (28) Ghosh, D.; Griswold, J.; Erman, M.; Pangborn, W. *Nature* **2009**, *457*, 219–223.
- (29) Cohen, M. H.; Johnson, J. R.; Li, N.; Chen, G.; Pazdur, R. *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research* **2002**, *8*, 665–9.
- (30) Geisler, J. *British Journal of Cancer* **2011**, *104*, 1059–1066.



- (31) Gerratana, L.; Bonotto, M.; Bozza, C.; Ongaro, E.; Fanotto, V.; Pelizzari, G.; Puglisi, F. *Expert Opinion on Biological Therapy* **2017**, *17*, 365–374.
- (32) Amiri-Kordestani, L. i in. *Clinical Cancer Research* **2014**, *20*, 4436–4441.
- (33) Cristofanilli, M. i in. *The Lancet Oncology* **2016**, *17*, 425–439.
- (34) Finn, R. S.; Martin, M.; Rugo, H. S.; Jones, S.; Im, S.-A.; Gelmon, K.; Harbeck, N.; Lipatov, O. N.; Walshe, J. M.; Moulder, S.; Gauthier, E.; Lu, D. R.; Randolph, S.; Diéras, V.; Slamon, D. J. *New England Journal of Medicine* **2016**, *375*, 1925–1936.
- (35) Finn, R. S. i in. *Breast Cancer Research* **2016**, *18*, 1–14.
- (36) Hortobagyi, G. N. i in. *Annals of Oncology* **2018**, *29*, 1541–1547.
- (37) Tripathy, D. i in. *The Lancet Oncology* **2018**, *19*, 904–915.
- (38) Goetz, M. P. i in. *Journal of Clinical Oncology* **2017**, *35*, 3638–3646.
- (39) Sledge, G. W. i in. *Journal of Clinical Oncology* **2017**, *35*, 2875–2884.
- (40) Koboldt, D. C. i in. *Nature* **2012**, *490*, 61–70.
- (41) Piccart, M. i in. *Annals of Oncology* **2014**, *25*, 2357–2362.
- (42) Ashworth, A. *Journal of Clinical Oncology* **2008**, *26*, 3785–3790.
- (43) Zimmer, A. S.; Gillard, M.; Lipkowitz, S.; Lee, J. M. *Current Treatment Options in Oncology* **2018**, *19*, 1–19.
- (44) Scott, C. L.; Swisher, E. M.; Kaufmann, S. H. *Journal of Clinical Oncology* **2015**, *33*, 1397–1406.
- (45) Robson, M.; Im, S.-A.; Senkus, E.; Xu, B.; Domchek, S. M.; Masuda, N.; Delaloge, S.; Li, W.; Tung, N.; Armstrong, A.; Wu, W.; Goessl, C.; Runswick, S.; Conte, P. *New England Journal of Medicine* **2017**, *377*, 523–533.
- (46) Fisher, B.; Costantino, J. P.; Wickerham, D. L.; Redmond, C. K.; Kavanah, M.; Cronin, W. M.; Vogel, V.; Robidoux, A.; Dimitrov, N.; Atkins, J.; Daly, M.; Wieand, S.; Tan-Chiu, E.; Ford, L.; Wolmark, N. *Journal of the National Cancer Institute* **1998**, *90*, 1371–1388.
- (47) Gorin, M. B.; Day, R.; Costantino, J. P.; Fisher, B.; Redmond, C. K.; Wickerham, L.; Gomolin, J. E.; Margolese, R. G.; Mathen, M. K.; Bowman, D. M.; Kaufmann, D.; Dimitrov, N. V.; Singerman, L. J.; Bornstein, R.; Wolmark, N. *American Journal of Ophthalmology* **1998**, *125*, 493–501.



- (48) *The Lancet* **1998**, *351*, 1451–1467.
- (49) Jozwik, K. M.; Carroll, J. S. *Nature Reviews Cancer* **2012**, *12*, 381–385.
- (50) Gray, P. B.; McHale, T. S.; Carré, J. M. *Hormones and Behavior* **2017**, *91*, 52–67.
- (51) Aubead, N. M. *Reproductive Hormones* **2021**.
- (52) Foster, P.; Reed, M.; Purohit, A. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2008**, *8*, 732–738.
- (53) Mueller, J. W.; Gilligan, L. C.; Idkowiak, J.; Arlt, W.; Foster, P. A. *Endocrine Reviews* **2015**, *36*, 526–563.
- (54) Reed, M. J.; Purohit, A.; Woo, L. W.; Newman, S. P.; Potter, B. V. *Endocrine Reviews* **2005**, *26*, 171–202.
- (55) Purohit, A.; Dauvois, S.; Parker, M. G.; Potter, B. V.; Williams, G. J.; Reed, M. J. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1994**, *50*, 101–104.
- (56) Shapiro, L. J.; Yen, P.; Pomerantz, D.; Martin, E.; Rolewic, L.; Mohandas, T. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1989**, *86*, 8477.
- (57) Basler, E.; Grompe, M.; Parenti, G.; Yates, J.; Ballabio, A. *American Journal of Human Genetics* **1992**, *50*, 483.
- (58) Yen, P. H.; Allen, E.; Marsh, B.; Mohandas, T.; Wang, N.; Taggart, R. T.; Shapiro, L. J. *Cell* **1987**, *49*, 443–454.
- (59) Alperin, E. S.; Shapiro, L. J. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 20756–20763.
- (60) Recksiek, M.; Selmer, T.; Dierks, T.; Schmidt, B.; Figura, K. V. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 6096–6103.
- (61) Boltjes, I.; Czapinska, H.; Kahnert, A.; Bülow, R. V.; Dierks, T.; Schmidt, B.; Figura, K. V.; Kertesz, M. A.; Usón, I. *Structure* **2001**, *9*, 483–491.
- (62) Bojarová, P.; Denehy, E.; Walker, I.; Loft, K.; Souza, D. P. D.; Woo, L. W. L.; Potter, B. V. L.; McConville, M. J.; Williams, S. J. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 613–623.
- (63) Williams, S. J.; Denehy, E.; Krenske, E. H. *Journal of Organic Chemistry* **2014**, *79*, 1995–2005.



- (64) Potter, B. V. *Journal of Molecular Endocrinology* **2018**, *61*, T233–T252.
- (65) Foster, P. A. *Molecules* **2021**, *26*, 2852.
- (66) Birnböck, H.; von Angerer, E. *Biochemical Pharmacology* **1990**, *39*, 1709–1713.
- (67) Kuhl, H. *Climacteric* **2005**, *8*, 3–63.
- (68) Carlström, K.; Döberl, A.; Pousette, Å.; Rannevik, G.; Wilking, N. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* **1984**, *63*, 107–111.
- (69) Crosignani, P. G. i in. *BMC Women's Health* **2009**, *9*.
- (70) Purohit, A.; Howarth, N. M.; Potter, B. V.; Reed, M. J. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1994**, *48*, 523–527.
- (71) Purohit, A.; Williams, G. J.; Howarth, N. M.; Potter, B. V.; Reed, M. J. *Biochemistry* **1995**, *34*, 11508–11514.
- (72) Purohit, A.; Reed, M. J.; Morris, N. C.; Williams, G. J.; Potter, B. V. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1996**, *784*, 40–49.
- (73) Howarth, N. M.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V. *Steroids* **1997**, *62*, 346–350.
- (74) Howarth, N. M.; Purohit, A.; Robinson, J. J.; Vicker, N.; Reed, M. J.; Potter, B. V. *Biochemistry* **2002**, *41*, 14801–14814.
- (75) Anderson, C.; Freeman, J.; Lucas, L. H.; Farley, M.; Dalhoumi, H.; Widlanski, T. S. *Biochemistry* **1997**, *36*, 2586–2594.
- (76) Li, P.-K.; Pillai, R.; Young, B. L.; Bender, W. H.; Martino, D. M.; Lin, F. T. *Steroids* **1993**, *58*, 106–111.
- (77) Purohit, A.; Williams, G. J.; Howarth, N. M.; Potter, B. V.; Reed, M. J. *Biochemistry* **1995**, *34*, 11508–11514.
- (78) Howarth, N. M.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V. *Journal of Medicinal Chemistry* **1994**, *37*, 219–221.
- (79) Elger, W.; Schwarz, S.; Hedden, A.; Reddersen, G.; Schneider, B. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1995**, *55*, 395–403.
- (80) Elger, W.; Wyrwa, R.; Ahmed, G.; Meece, F.; Nair, H. B.; Santhamma, B.; Kileen, Z.; Schneider, B.; Meister, R.; Schubert, H.; Nickisch, K. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2017**, *165*, 305–311.



- (81) Chander, S. K.; Purohit, A.; Woo, L. W.; Potter, B. V.; Reed, M. J. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2004**, *322*, 217–222.
- (82) Hejaz, H. A.; Woo, L. W.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2004**, *12*, 2759–2772.
- (83) Woo, L. W. L.; Jackson, T.; Putey, A.; Cozier, G.; Leonard, P.; Acharya, K. R.; Chander, S. K.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53*, 2155–2170.
- (84) Ahmed, S.; James, K.; Owen, C. P. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2002**, *82*, 425–435.
- (85) Ahmed, S.; James, K.; Owen, C. P. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, *294*, 180–183.
- (86) Schreiner, E. P.; Wolff, B.; Winiski, A. P.; Billich, A. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13*, 4313–4316.
- (87) Kaise, A.; Ohta, K.; Endo, Y. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2017**, *25*, 6371–6378.
- (88) Kaise, A.; Ohta, K.; Shirata, C.; Endo, Y. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2017**, *25*, 6417–6426.
- (89) Shah, R.; Singh, J.; Singh, D.; Jaggi, A. S.; Singh, N. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *114*, 170–190.
- (90) Daško, M.; Demkowicz, S.; Biernacki, K.; Ciupak, O.; Kozak, W.; Masłyk, M.; Rachon, J. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2020**, *35*, 1163–1184.
- (91) Anbar, H. S.; Isa, Z.; Elounais, J. J.; Jameel, M. A.; Zib, J. H.; Samer, A. M.; Jawad, A. F.; El-Gamal, M. I. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2021**, *31*, 453–472.
- (92) Purohit, A.; Vernon, K. A.; Hummelinck, A. E. W.; Woo, L. W.; Hejaz, H. A.; Potter, B. V.; Reed, M. J. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1998**, *64*, 269–275.
- (93) Purohit, A.; Woo, L. W.; Barrow, D.; Hejaz, H. A.; Nicholson, R. I.; Potter, B. V.; Reed, M. J. *Molecular and Cellular Endocrinology* **2001**, *171*, 129–135.

- (94) Stanway, S. J.; Purohit, A.; Woo, L. W.; Sufi, S.; Vigushin, D.; Ward, R.; Wilson, R. H.; Stanczyk, F. Z.; Dobbs, N.; Kulinskaya, E.; Elliott, M.; Potter, B. V.; Reed, M. J.; Coombes, R. C. *Clinical Cancer Research* **2006**, *12*, 1585–1592.
- (95) Coombes, R. C.; Cardoso, F.; Isambert, N.; Lesimple, T.; Soulié, P.; Peraire, C.; Fohanno, V.; Kornowski, A.; Ali, T.; Schmid, P. *Breast Cancer Research and Treatment* **2013**, *140*, 73–82.
- (96) Higuchi, T.; Endo, M.; Hanamura, T.; Gohno, T.; Niwa, T.; Yamaguchi, Y.; Horiguchi, J.; Hayashi, S. I. *PLOS ONE* **2016**, *11*, e0155844.
- (97) Chanplakorn, N.; Chanplakorn, P.; Suzuki, T.; Ono, K.; Chan, M. S.; Miki, Y.; Saji, S.; Ueno, T.; Toi, M.; Sasano, H. *Breast Cancer Research and Treatment* **2010**, *120*, 639–648.
- (98) Palmieri, C.; Stein, R. C.; Liu, X.; Hudson, E.; Nicholas, H.; Sasano, H.; Guestini, F.; Holcombe, C.; Barrett, S.; Kenny, L.; Reed, S.; Lim, A.; Hayward, L.; Howell, S.; Coombes, R. C. *Breast Cancer Research and Treatment* **2017**, *165*, 343–353.
- (99) Pautier, P.; Vergote, I.; Joly, F.; Melichar, B.; Kutarska, E.; Hall, G.; Lisyanskaya, A.; Reed, N.; Oaknin, A.; Ostapenko, V.; Zvirbule, Z.; Chetaille, E.; Geniaux, A.; Shoaib, M.; Green, J. A. *International Journal of Gynecologic Cancer* **2017**, *27*, 258–266.
- (100) Day, J. M.; Purohit, A.; Tutill, H. J.; Foster, P. A.; Woo, L. W.; Potter, B. V.; Reed, M. J. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2009**, *1155*, 80–87.
- (101) Chura, J. C.; Blomquist, C. H.; Ryu, H. S.; Argenta, P. A. *Gynecologic Oncology* **2009**, *112*, 205–209.
- (102) Mungenast, F.; Aust, S.; Vergote, I.; Vanderstichele, A.; Sehouli, J.; Braicu, E.; Mahner, S.; Castillo-Tong, D. C.; Zeillinger, R.; Thalhammer, T. *Oncology Letters* **2017**, *13*, 4047–4054.
- (103) Denmeade, S.; George, D.; Liu, G.; Peraire, C.; Geniaux, A.; Baton, F.; Ali, T.; Chetaille, E. *European Journal of Cancer* **2011**, *47*, S499.
- (104) Foster, P. A.; Newman, S. P.; Chander, S. K.; Stengel, C.; Jhalli, R.; Woo, L. L.; Potter, B. V.; Reed, M. J.; Purohit, A. *Clinical Cancer Research* **2006**, *12*, 5543–5549.
- (105) Foster, P. A.; Chander, S. K.; Parsons, M. F.; Newman, S. P.; Woo, L. W.; Potter,



- B. V.; Reed, M. J.; Purohit, A. *Breast Cancer Research and Treatment* **2007**, *111*, 129–138.
- (106) Foster, P. A.; Woo, L. W.; Potter, B. V.; Reed, M. J.; Purohit, A. *Endocrinology* **2008**, *149*, 4035–4042.
- (107) Morphy, R.; Rankovic, Z. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 4961–4970.
- (108) Kellis, J. T.; Vickery, L. E. *Science* **1984**, *225*, 1032–1034.
- (109) Purohit, A.; Hejaz, H.; Woo, L.; van Strien, A.; Potter, B.; Reed, M. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1999**, *69*, 227–238.
- (110) Ibrahim, A. R.; Abul-Hajj, Y. J. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **1990**, *49*, 257–260.
- (111) Foster, P. A.; Chander, S. K.; Newman, S. P.; Woo, L. W.; Sutcliffe, O. B.; Bubert, C.; Zhou, D.; Chen, S.; Potter, B. V.; Reed, M. J.; Purohit, A. *Clinical Cancer Research* **2008**, *14*, 6469–6477.
- (112) Thomas, M. P.; Potter, B. V. L. *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *58*, 7634–7658.
- (113) Kozak, W.; Daško, M.; Wołos, A.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Składanowski, A.; Misiak, M.; Rachon, J.; Demkowicz, S. *RSC Advances* **2015**, *5*, 32594–32603.
- (114) Daško, M.; Rachon, J.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Demkowicz, S. *Chemical Biology and Drug Design* **2017**, *90*, 156–161.
- (115) Kozak, W.; Daško, M.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Rachon, J.; Demkowicz, S. *Drug Development Research* **2015**, *76*, 450–462.
- (116) Daško, M.; Przybyłowska, M.; Rachon, J.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Misiak, M.; Składanowski, A.; Demkowicz, S. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *128*, 79–87.
- (117) Daško, M.; Demkowicz, S.; Biernacki, K.; Harrous, A.; Rachon, J.; Kozak, W.; Martyna, A.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Boguszevska-Czubar, A. *Drug Development Research* **2019**, *80*, 857–866.
- (118) Daško, M.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Aszyk, J.; Rachon, J.; Demkowicz, S. *Med-ChemComm* **2016**, *7*, 1146–1150.
- (119) Demkowicz, S.; Daško, M.; Kozak, W.; Krawczyk, K.; Witt, D.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Rachon, J. *Chemical Biology and Drug Design* **2016**, *87*, 233–238.



- (120) Demkowicz, S.; Kozak, W.; Daško, M.; Masłyk, M.; Gielniewski, B.; Rachon, J. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *101*, 358–366.
- (121) Kozak, W.; Daško, M.; Masłyk, M.; Gielniewski, B.; Rachon, J.; Demkowicz, S. *Journal of Asian Natural Products Research* **2015**, *17*, 1091–1096.
- (122) Kozak, W.; Daško, M.; Masłyk, M.; Pieczykolan, J. S.; Gielniewski, B.; Rachon, J.; Demkowicz, S. *RSC Advances* **2014**, *4*, 44350–44358.
- (123) Demkowicz, S.; Kozak, W.; Daško, M.; Masłyk, M.; Kubiński, K.; Rachon, J. *Drug Development Research* **2015**, *76*, 94–104.
- (124) Bajaj, S.; Asati, V.; Singh, J.; Roy, P. P. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *97*, 124–141.
- (125) Bajaj, S.; Roy, P. P.; Singh, J. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2018**, *17*, 1869–1883.
- (126) Bala, S.; Saini, V.; Kamboj, S.; Prasad, D. N. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* **2012**, *17*, 84–89.
- (127) Khalilullah, H.; Ahsan, M. J.; Hedaitullah, M.; Khan, S.; Ahmed, B. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2012**, *12*, 789–801.
- (128) Salahuddin; Mazumder, A.; Yar, M. S.; Mazumder, R.; Chakraborty, G. S.; Ahsan, M. J.; Rahman, M. U. *Synthetic Communications* **2017**, *47*, 1805–1847.
- (129) WebOfScience, [http://www.webofknowledge.com./](http://www.webofknowledge.com/), (Dostęp z dnia 28.04.2022).
- (130) Boiani, M. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, *36*, 771–782.
- (131) Fershtat, L. L.; Makhova, N. N. *ChemPlusChem* **2020**, *85*, 13–42.
- (132) Wei, H.; He, C.; Zhang, J.; Shreeve, J. M. *Angewandte Chemie* **2015**, *127*, 9499–9503.
- (133) Nguyen, M. T.; Hegarty, A. F.; Elguero, J. *Angewandte Chemie International Edition* **1985**, *24*, 713–715.
- (134) Tiemann, F.; Krüger, P. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1884**, *17*, 1685–1698.
- (135) Newman, H. *Tetrahedron Letters* **1968**, *9*, 2421–2424.
- (136) Newman, H. *Tetrahedron Letters* **1968**, *9*, 2417–2420.



- (137) Anderson, G. W.; Faith, H. E.; Marson, H. W.; Winnek, P. S.; Roblin, R. O. *Journal of the American Chemical Society* **1942**, *64*, 2902–2905.
- (138) Silvestrini, B. *Minerva Medica* **1960**, *51*, 4091–4094.
- (139) Silvestrini, B.; Catanese, B. *Bollettino Chimico Farmaceutico* **1964**, 447–450.
- (140) Vaidya, A.; Jain, S.; Jain, P.; Jain, P.; Tiwari, N.; Jain, R.; Jain, R.; Jain, A. K.; Agrawal, R. K. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2016**, *16*, 825–845.
- (141) Pace, A.; Buscemi, S.; Piccionello, A. P.; Pibiri, I. *Advances in Heterocyclic Chemistry* **2015**, *116*, 85–136.
- (142) Dos Santos Filho, J. M.; de Queiroz e Silva, D. M. A.; Macedo, T. S.; Teixeira, H. M. P.; Moreira, D. R. M.; Challal, S.; Wolfender, J.-L.; Queiroz, E. F.; Soares, M. B. P. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2016**, *24*, 5693–5701.
- (143) Moniot, S.; Forgione, M.; Lucidi, A.; Hailu, G. S.; Nebbioso, A.; Carafa, V.; Barratta, F.; Altucci, L.; Giacché, N.; Passeri, D.; Pellicciari, R.; Mai, A.; Steegborn, C.; Rotili, D. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60*, 2344–2360.
- (144) Krasavin, M.; Shetnev, A.; Sharonova, T.; Baykov, S.; Tuccinardi, T.; Kalinin, S.; Angeli, A.; Supuran, C. T. *Bioorganic Chemistry* **2018**, *76*, 88–97.
- (145) Krasavin, M.; Shetnev, A.; Sharonova, T.; Baykov, S.; Kalinin, S.; Nocentini, A.; Sharoyko, V.; Poli, G.; Tuccinardi, T.; Presnukhina, S.; Tennikova, T. B.; Supuran, C. T. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *164*, 92–105.
- (146) Yang, F.; Shan, P.; Zhao, N.; Ge, D.; Zhu, K.; Jiang, C.-s.; Li, P.; Zhang, H. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2019**, *29*, 15–21.
- (147) Han, M.; Li, S.; Ai, J.; Sheng, R.; Hu, Y.; Hu, Y.; Geng, M. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2016**, *26*, 5679–5684.
- (148) O'Daniel, P. I. i in. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 3664–3672.
- (149) Shetnev, A.; Baykov, S.; Kalinin, S.; Belova, A.; Sharoyko, V.; Rozhkov, A.; Zenlenkov, L.; Tarasenko, M.; Sadykov, E.; Korsakov, M.; Krasavin, M. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 1699.
- (150) Yatam, S.; Gundla, R.; Jadav, S. S.; reddy Pedavenkatagari, N.; Chimakurthy, J.; B, N. R.; Kedam, T. *Journal of Molecular Structure* **2018**, *1159*, 193–204.



- (151) Cao, X.; Yao, Z.; Dou, F.; Zhang, Y.; Qiu, Y.; Zhao, S.; Xu, X.; Liu, X.; Liu, B.-F.; Chen, Y.; Zhang, G. *Chemistry and Biodiversity* **2019**, *16*, e1800599.
- (152) Brotschi, C.; Roch, C.; Gatfield, J.; Treiber, A.; Williams, J. T.; Sifferlen, T.; Heidmann, B.; Jenck, F.; Bolli, M. H.; Boss, C. *ChemMedChem* **2019**, *14*, 1257–1270.
- (153) Guerrero, M.; Urbano, M.; Kim, E.-K.; Gamo, A. M.; Riley, S.; Abgaryan, L.; Leaf, N.; Orden, L. J. V.; Brown, S. J.; Xie, J. Y.; Porreca, F.; Cameron, M. D.; Rosen, H.; Roberts, E. *Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *62*, 1761–1780.
- (154) Parra, M.; Hidalgo, P.; Alderete, J. *Liquid Crystals* **2005**, *32*, 449–455.
- (155) Xiong, H.; Yang, H.; Lei, C.; Yang, P.; Hu, W.; Cheng, G. *Dalton Transactions* **2019**, *48*, 14705–14711.
- (156) Yan, T.; Cheng, G.; Yang, H. *ChemPlusChem* **2019**, *84*, 1567–1577.
- (157) McDonald, C. M. i in. *The Lancet* **2017**, *390*, 1489–1498.
- (158) Coupar, I. M.; Hedges, A.; Metcalfe, H. L.; Turner, P. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1969**, *21*, 474–475.
- (159) Rotbart, H. A.; Webster, A. D. *Clinical Infectious Diseases* **2001**, *32*, 228–235.
- (160) Carbone, M.; Li, Y.; Irace, C.; Mollo, E.; Castelluccio, F.; Pascale, A. D.; Cimino, G.; Santamaria, R.; Guo, Y.-W.; Gavagnin, M. *Organic Letters* **2011**, *13*, 2516–2519.
- (161) Zhang, L.; Jiang, C.-S.; Gao, L.-X.; Gong, J.-X.; Wang, Z.-H.; Li, J.-Y.; Li, J.; Li, X.-W.; Guo, Y.-W. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2016**, *26*, 778–781.
- (162) Vitale, R. M.; Gatti, M.; Carbone, M.; Barbieri, F.; Felicità, V.; Gavagnin, M.; Florio, T.; Amodeo, P. *ACS Chemical Biology* **2013**, *8*, 2762–2770.
- (163) Kozikowski, A. P.; Steensma, D.; Varasi, M.; Pshenichkin, S.; Surina, E.; Wroblewski, J. T. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **1998**, *8*, 447–452.
- (164) Hermit, M. B.; Greenwood, J. R.; Bräuner-Osborne, H. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 34811–34817.
- (165) Gangloff, A. R.; Litvak, J.; Shelton, E. J.; Sperandio, D.; Wang, V. R.; Rice, K. D. *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, 1441–1443.



- (166) Amarasinghe, K. K.; Maier, M. B.; Srivastava, A.; Gray, J. L. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 3629–3631.
- (167) Augustine, J. K.; Vairaperumal, V.; Narasimhan, S.; Alagarsamy, P.; Radhakrishnan, A. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 9989–9996.
- (168) Rauf, A.; Sharma, S.; Gangal, S. *Acta Chimica Slovenica* **2009**, *56*, 369–372.
- (169) Kaboudin, B.; Malekzadeh, L. *Tetrahedron Letters* **2011**, *52*, 6424–6426.
- (170) Sureshbabu, V. V.; Hemantha, H. P.; Naik, S. A. *Tetrahedron Letters* **2008**, *49*, 5133–5136.
- (171) Kaboudin, B.; Saadati, F. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2005**, *42*, 699–701.
- (172) De Freitas, J. J. R.; de Freitas, J. C. R.; da Silva, L. P.; de Freitas Filho, J. R.; Kimura, G. Y.; Srivastava, R. M. *Tetrahedron Letters* **2007**, *48*, 6195–6198.
- (173) Adib, M.; Jahromi, A. H.; Tavoosi, N.; Mahdavi, M.; Bijanzadeh, H. R. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 2965–2967.
- (174) Rostamizadeh, S.; Ghaieni, H. R.; Aryan, R.; Amani, A. M. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 494–497.
- (175) Kaboudin, B.; Saadati, F. *Tetrahedron Letters* **2007**, *48*, 2829–2832.
- (176) Rajagopalan, P. *Tetrahedron Letters* **1969**, *10*, 311–312.
- (177) Quadrelli, P.; Invernizzi, A. G.; Falzoni, M.; Caramella, P. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 1787–1796.
- (178) Bokach, N. A.; Khripoun, A. V.; Kukushkin, V. Y.; Haukka, M.; Pombeiro, A. J. L. *Inorganic Chemistry* **2003**, *42*, 896–903.
- (179) Krishna, K. M.; Inturi, B.; Pujar, G. V.; Purohit, M. N.; Vijaykumar, G. S. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *84*, 516–529.
- (180) Whiting, M.; Muldoon, J.; Lin, Y. C.; Silverman, S. M.; Lindstrom, W.; Olson, A. J.; Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B.; Elder, J. H.; Fokin, V. V. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 1435–1439.
- (181) Aktas-Yokus, O.; Yuksek, H.; Gursoy-Kol, O.; Alpay-Karaoglu, S. *Medicinal Chemistry Research* **2015**, *24*, 2813–2824.
- (182) Bekircan, O.; Kahveci, B.; Küçük, M. *Turkish Journal of Chemistry* **2006**, *30*, 29–40.



- (183) Vijesh, A. M.; Isloor, A. M.; Shetty, P.; Sundershan, S.; Fun, H. K. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *62*, 410–415.
- (184) Hunashal, R. D.; Ronad, P. M.; Maddi, V. S.; Satyanarayana, D.; Kamadod, M. A. *Arabian Journal of Chemistry* **2014**, *7*, 1070–1078.
- (185) Wang, B. L.; Liu, X. H.; Zhang, X. L.; Zhang, J. F.; Song, H. B.; Li, Z. M. *Chemical Biology and Drug Design* **2011**, *78*, 42–49.
- (186) Al, A. A.; Hassa, A. A.; Makhlou, M. M.; Bräse, S. *Molecules* **2020**, *25*, 3036.
- (187) Zhou, C.; Wang, Y. *Current Medicinal Chemistry* **2012**, *19*, 239–280.
- (188) Goss, P. E. *Breast Cancer Research and Treatment* **1998**, *49*, S59–S65.
- (189) Millson, D. S.; Tepper, S. J.; Rapoport, A. M. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **2000**, *1*, 391–404.
- (190) Bektaş, H.; Ceylan, Ş.; Demirbaş, N.; Alpay-Karaoğlu, Ş.; Sökmen, B. B. *Medicinal Chemistry Research* **2013**, *22*, 3629–3639.
- (191) Al-Omar, M. A.; Al-Abdullah, E. S.; Shehata, I. A.; Habib, E. E.; Ibrahim, T. M.; El-Emam, A. A. *Molecules* **2010**, *15*, 2526–2550.
- (192) Plech, T.; Kaproń, B.; Łuszczki, J. J.; Wujec, M.; Paneth, A.; Siwek, A.; Kołaczowski, M.; Zołnierek, M.; Nowak, G. *Molecules* **2014**, *19*, 11279.
- (193) Paprocka, R.; Wiese, M.; Eljaszewicz, A.; Helmin-Basa, A.; Gzella, A.; Modzelewska-Banachiewicz, B.; Michalkiewicz, J. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2015**, *25*, 2664–2667.
- (194) Park, B. K.; Kitteringham, N. R.; Maggs, J. L.; Pirmohamed, M.; Williams, D. P. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2005**, *45*, 177–202.
- (195) Diaz-Ortiz, A.; Prieto, P.; Carrillo, J. R.; Martin, R.; Torres, I. *Current Organic Chemistry* **2015**, *19*, 568–584.
- (196) Kumari, M.; Tahlan, S.; Narasimhan, B.; Ramasamy, K.; Lim, S. M.; Shah, S. A. A.; Mani, V.; Kakkar, S. *BMC Chemistry* **2021**, *15*, 5.
- (197) De C. da Silva, F.; de Souza, M. C. B.; Frugulhetti, I. I.; Castro, H. C.; Souza, S. L. O.; de Souza, T. M. L.; Rodrigues, D. Q.; Souza, A. M.; Abreu, P. A.; Passamani, F.; Rodrigues, C. R.; Ferreira, V. F. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *44*, 373–383.



- (198) Giffin, M. J.; Heaslet, H.; Brik, A.; Lin, Y. C.; Cauvi, G.; Wong, C. H.; McRee, D. E.; Elder, J. H.; Stout, C. D.; Torbett, B. E. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51*, 6263–6270.
- (199) Cocklin, S.; Gopi, H.; Querido, B.; Nimmagadda, M.; Kuriakose, S.; Cicala, C.; Ajith, S.; Baxter, S.; Arthos, J.; Martín-García, J.; Chaiken, I. M. *Journal of Virology* **2007**, *81*, 3645–3648.
- (200) Brik, A.; Alexandratos, J.; Lin, Y. C.; Elder, J. H.; Olson, A. J.; Wlodawer, A.; Goodsell, D. S.; Wong, C. H. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1167–1169.
- (201) Yu, W.; Rao, Q.; Wang, M.; Tian, Z.; Lin, D.; Liu, X.; Wang, J. *Leukemia Research* **2006**, *30*, 575–582.
- (202) Peterson, L. B.; Blagg, B. S. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 3957–3960.
- (203) Nahrwold, M.; Bogner, T.; Eissler, S.; Verma, S.; Sewald, N. *Organic Letters* **2010**, *12*, 1064–1067.
- (204) Doiron, J.; Soultan, A. H.; Richard, R.; Touré, M. M.; Picot, N.; Richard, R.; Čuperlović-Culf, M.; Robichaud, G. A.; Touaibia, M. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *46*, 4010–4024.
- (205) Najafi, Z.; Mahdavi, M.; Saeedi, M.; Karimpour-Razkenari, E.; Edraki, N.; Sharifzadeh, M.; Khanavi, M.; Akbarzadeh, T. *Bioorganic Chemistry* **2019**, *83*, 303–316.
- (206) Rastegari, A.; Nadri, H.; Mahdavi, M.; Moradi, A.; Mirfazli, S. S.; Edraki, N.; Moghadam, F. H.; Larijani, B.; Akbarzadeh, T.; Saeedi, M. *Bioorganic Chemistry* **2019**, *83*, 391–401.
- (207) Lal, K.; Yadav, P. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2016**, *18*, 21–37.
- (208) Chu, X. M.; Wang, C.; Wang, W. L.; Liang, L. L.; Liu, W.; Gong, K. K.; Sun, K. L. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *166*, 206–223.
- (209) Zhang, S.; Xu, Z.; Gao, C.; Ren, Q. C.; Chang, L.; Lv, Z. S.; Feng, L. S. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *138*, 501–513.
- (210) Keri, R. S.; Patil, S. A.; Budagumpi, S.; Nagaraja, B. M. *Chemical Biology and Drug Design* **2015**, *86*, 410–423.
- (211) Zhang, B. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *168*, 357–372.

- (212) Borgati, T. F.; Alves, R. B.; Teixeira, R. R.; Freitas, R. P. D.; Perdigão, T. G.; Silva, S. F. D.; Santos, A. A. D.; Bastidas, A. D. J. O. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2013**, *24*, 953–961.
- (213) Worthington, P. A. *Pesticide Science* **1991**, *31*, 457–498.
- (214) Tao Wang, L.; hong Deng, C.; Dong, M.; fa Shi, L.; ping Zhang, J. *Journal of Iron and Steel Research, International* **2012**, *19*, 1–6.
- (215) Leung, T. Y. B.; Kang, M.; Corry, B. F.; Gewirth, A. A. *Journal of The Electrochemical Society* **2000**, *147*, 3326.
- (216) McNeill, K. S.; Cancilla, D. A. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **2008**, *82*, 265–269.
- (217) Hua, Y.; Flood, A. H. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 1262–1271.
- (218) Arseneault, M.; Wafer, C.; Morin, J. F. *Molecules* **2015**, *20*, 9263–9294.
- (219) Katritzky, A. R.; Song, Y.; Sakhuja, R.; Gyanda, R.; Meher, N. K.; Wang, L.; Duran, R. S.; Ciaramitaro, D. A.; Bedford, C. D. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2009**, *47*, 3748–3756.
- (220) Johnson, J. A.; Finn, M. G.; Koberstein, J. T.; Turro, N. J. *Macromolecular Rapid Communications* **2008**, *29*, 1052–1072.
- (221) Astruc, D.; Liang, L.; Rapakousiou, A.; Ruiz, J. *Accounts of Chemical Research* **2012**, *45*, 630–640.
- (222) Srividhya, D.; Manjunathan, S.; Thirumaran, S.; Saravanan, C.; Senthil, S. *Journal of Molecular Structure* **2009**, *927*, 7–13.
- (223) Balamurugan, S.; Yeap, G.-Y.; Mahmood, W. A. K. *Liquid Crystals* **2014**, *41*, 776–783.
- (224) Gallardo, H.; Ely, F.; Bortoluzzi, A. J.; Conte, G. *Liquid Crystals* **2005**, *32*, 667–671.
- (225) Miladinova, P. M.; Konstantinova, T. N. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy* **2015**, *50*, 229–239.
- (226) Kishorekumar, A.; Jaleel, C. A.; Manivannan, P.; Sankar, B.; Sridharan, R.; Panneerselvam, R. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2007**, *60*, 207–212.
- (227) Wolf, F. T. *Nature* **1960**, *188*, 164–165.



- (228) Khalil, I. A.; Mercer, E. I.; Wang, Z. X. *Plant Science* **1990**, *66*, 21–28.
- (229) Struthers, H.; Spingler, B.; Mindt, T. L.; Schibli, R. *Chemistry - A European Journal* **2008**, *14*, 6173–6183.
- (230) Zhang, G.; Wang, Y.; Wen, X.; Ding, C.; Li, Y. *Chemical Communications* **2012**, *48*, 2979–2981.
- (231) Kumler, W. D.; Porter, C. W. *Journal of the American Chemical Society* **1934**, *56*, 2549–2554.
- (232) Hansen, L. D.; West, B. D.; Baca, E. J.; Blank, C. L. *Journal of the American Chemical Society* **1968**, *90*, 6588–6592.
- (233) Massarotti, A.; Aprile, S.; Mercalli, V.; Grosso, E. D.; Grosa, G.; Sorba, G.; Tron, G. C. *ChemMedChem* **2014**, *9*, 2497–2508.
- (234) Aprile, S.; Galli, U.; Tron, G. C.; Grosso, E. D.; Travelli, C.; Grosa, G. *Data in Brief* **2020**, *28*, 105034.
- (235) Riva, B. i in. *Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *61*, 9756–9783.
- (236) Huisgen, R. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1963**, *2*, 633–645.
- (237) Padwa, A.; John, W. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1986**, *23*, 1899–1899.
- (238) Hein, J. E.; Fokin, V. V. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 1302–1315.
- (239) Haldón, E.; Nicasio, M. C.; Pérez, P. J. *Organic and Biomolecular Chemistry* **2015**, *13*, 9528–9550.
- (240) Bock, V. D.; Hiemstra, H.; Maarseveen, J. H. V. *European Journal of Organic Chemistry* **2006**, *2006*, 51–68.
- (241) Sokolova, N. V.; Nenajdenko, V. G. *RSC Advances* **2013**, *3*, 16212–16242.
- (242) Gramlich, P. M.; Wirges, C. T.; Manetto, A.; Carell, T. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 8350–8358.
- (243) El-Sagheer, A. H.; Brown, T. *Accounts of Chemical Research* **2012**, *45*, 1258–1267.
- (244) Yang, M.; Li, J.; Chen, P. R. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43*, 6511–6526.
- (245) Sumerlin, B. S.; Vogt, A. P. *Macromolecules* **2010**, *43*, 1–13.
- (246) Schulze, B.; Schubert, U. S. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43*, 2522.



- (247) Li, L.; Zhang, Z. *Molecules* **2016**, *21*, 1393.
- (248) Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 15998–15999.
- (249) Boren, B. C.; Narayan, S.; Rasmussen, L. K.; Zhang, L.; Zhao, H.; Lin, Z.; Jia, G.; Fokin, V. V. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 8923–8930.
- (250) Dheer, D.; Singh, V.; Shankar, R. *Bioorganic Chemistry* **2017**, *71*, 30–54.
- (251) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Organic Letters* **2008**, *10*, 3097–3099.
- (252) Ramachary, D. B.; Shashank, A. B. *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19*, 13175–13181.
- (253) Seus, N.; Gonçalves, L. C.; Deobald, A. M.; Savegnago, L.; Alves, D.; Paixão, M. W. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 10456–10463.
- (254) Li, W.; Wang, J. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 14186–14190.
- (255) Ahsanullah; Schmieder, P.; Kühne, R.; Rademann, J. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 5042–5045.
- (256) Kwok, S. W.; Fotsing, J. R.; Fraser, R. J.; Rodionov, V. O.; Fokin, V. V. *Organic Letters* **2010**, *12*, 4217–4219.
- (257) Belkheira, M.; Abed, D. E.; Pons, J. M.; Bressy, C. *Chemistry – A European Journal* **2011**, *17*, 12917–12921.
- (258) Ali, A.; Corrêa, A. G.; Alves, D.; Zukerman-Schpector, J.; Westermann, B.; Ferreira, M. A.; Paixão, M. W. *Chemical Communications* **2014**, *50*, 11926–11929.
- (259) Wu, L.; Chen, Y.; Luo, J.; Sun, Q.; Peng, M.; Lin, Q. *Tetrahedron Letters* **2014**, *55*, 3847–3850.
- (260) Quan, X. J.; Ren, Z. H.; Wang, Y. Y.; Guan, Z. H. *Organic Letters* **2014**, *16*, 5728–5731.
- (261) Cheng, G.; Zeng, X.; Shen, J.; Wang, X.; Cui, X. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52*, 13265–13268.
- (262) Hiroki, H.; Ogata, K.; Fukuzawa, S. I. *Synlett* **2013**, *24*, 843–846.
- (263) Shao, C.; Wang, X.; Xu, J.; Zhao, J.; Zhang, Q.; Hu, Y. *Journal of Organic Chemistry* **2010**, *75*, 7002–7005.



- (264) Jubeli, E.; Moine, L.; Barratt, G. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2010**, *48*, 3178–3187.
- (265) Shin, J. A.; Lim, Y. G.; Lee, K. H. *Journal of Organic Chemistry* **2012**, *77*, 4117–4122.
- (266) McNulty, J.; Keskar, K.; Vemula, R. *Chemistry – A European Journal* **2011**, *17*, 14727–14730.
- (267) McNulty, J.; Keskar, K. *European Journal of Organic Chemistry* **2012**, *2012*, 5462–5470.
- (268) Liu, P. N.; Li, J.; Su, F. H.; Ju, K. D.; Zhang, L.; Shi, C.; Sung, H. H.; Williams, I. D.; Fokin, V. V.; Lin, Z.; Jia, G. *Organometallics* **2012**, *31*, 4904–4915.
- (269) Rej, S.; Chanda, K.; Chiu, C.-Y.; Huang, M. H. *Chemistry – A European Journal* **2014**, *20*, 15991–15997.
- (270) Liu, P. N.; Siyang, H. X.; Zhang, L.; Tse, S. K. S.; Jia, G. *Journal of Organic Chemistry* **2012**, *77*, 5844–5849.
- (271) Cook, T. L.; Walker, J. A.; Mack, J. *Green Chemistry* **2013**, *15*, 617–619.
- (272) Demkowicz, S.; Filipiak, K.; Maslyk, M.; Ciepielski, J.; Pascual-Teresa, S. D.; Martín-Santamaría, S.; Pascual-Teresa, B. D.; Ramos, A. *RSC Advances* **2013**, *3*, 3697–3706.
- (273) Sarwar, M. G.; Dragisic, B.; Salsberg, L. J.; Gouliaras, C.; Taylor, M. S. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 1646–1653.
- (274) Voth, A. R.; Hays, F. A.; Ho, P. S. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*, 6188–6193.
- (275) Andrea, V.; P., H. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2007**, *7*, 1336–1348.
- (276) Auffinger, P.; Hays, F. A.; Westhof, E.; Ho, P. S. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**, *101*, 16789–16794.
- (277) Sinha, S.; Sravanthi, T. V.; Yuvaraj, S.; Manju, S. L.; Doble, M. *RSC Advances* **2016**, *6*, 19271–19279.
- (278) Vörös, A.; Mucsi, Z.; Baán, Z.; Timári, G.; Hermecz, I.; Mizsey, P.; Finta, Z. *Organic and Biomolecular Chemistry* **2014**, *12*, 8036–8047.

