

Imię i nazwisko autora rozprawy: **Olga Ciupak**

Dyscyplina naukowa: **Nauki Chemiczne**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: **Analogi strukturalne i koniugaty kwasu foliowego jako nowe inhibitory sulfatazy steroidowej (STS).**

Tytuł rozprawy w języku angielskim: **Structural analogs and conjugates of folic acid as novel steroid sulfatase (STS) inhibitors.**

Promotor	Promotor pomocniczy
<i>podpis</i>	<i>podpis</i>
dr hab. inż. Sebastian Demkowicz, prof. PG	dr inż. Mateusz Daśko

OŚWIADCZENIE

Autor rozprawy doktorskiej: Olga Ciupak

Ja, niżej podpisana, oświadczam, iż jestem świadoma, 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:

„Analogi strukturalne i koniugaty kwasu foliowego jako nowe inhibitory sulfatazy steroidowej (STS)”,

do prowadzenia badań naukowych lub w celach dydaktycznych.¹

Świadoma 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 oraz promotorem pomocniczym dr inż. Mateuszem Daśko.

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 doktorantki

Ja, niżej podpisana, wyrażam zgodę na umieszczenie ww. rozprawy doktorskiej w wersji elektronicznej w otwartym, cyfrowym repozytorium instytucjonalnym Politechniki Gdańskiej.

Gdańsk, dnia

.....
podpis doktorantki

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 zwielokrotniać 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: Olga Ciupak

Tytuł rozprawy doktorskiej w języku polskim: Analogi strukturalne i koniugaty kwasu foliowego jako nowe inhibitory sulfatazy steroidowej (STS).

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Structural analogs and conjugates of folic acid as novel steroid sulfatase (STS) inhibitors.

Język rozprawy doktorskiej: polski

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

Promotor pomocniczy rozprawy doktorskiej: dr inż. Mateusz Daśko

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku polskim: dokowanie molekularne, synteza chemiczna, sulfataza steroidowa, inhibitory, kwas foliowy, koniugaty

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku angielskim: molecular docking, chemical synthesis, steroid sulfatase, inhibitors, folic acid, conjugates

Streszczenie rozprawy w języku polskim: Niniejsza rozprawa doktorska dotyczy otrzymywania nowych inhibitorów sulfatazy steroidowej (STS) o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu nowotworów hormonozależnych i składa się z pięciu głównych części. Pierwsza z nich stanowi wstęp teoretyczny obejmujący opis budowy i mechanizm działania STS wraz z jej inhibitorami, informacje dotyczące kwasu foliowego (FA) i jego transportu w ciele człowieka, oraz tematykę koniugatów FA powiązaną z wykrywaniem i leczeniem nowotworów. W kolejnej części przedstawiony został cel oraz zakres prac. Potem następuje rozdział poświęcony badaniom własnym, w którym zaprezentowano wyniki dokowania molekularnego oraz metody syntezy 3 serii nowych, potencjalnych inhibitorów STS, w tym 2 serii cząsteczek zawierających w swojej budowie elementy strukturalne upodabniające je do FA. Ponadto, zawarto tam syntezę koniugatu STS-FA oraz wyniki badań biologicznych sprawdzających aktywność inhibicyjną otrzymanych związków, która zbadana została z wykorzystaniem enzymu STS oraz w testach z użyciem komórek MCF-7 i JEG-3. Dla wybranych związków przeprowadzono testy mające na celu ustalenie mechanizmu transportu tych cząsteczek do wnętrza komórki nowotworowej. Dwie ostatnie części stanowią podsumowanie oraz opis eksperymentu, gdzie przedstawiono dokowanie molekularne, syntezy chemiczne wraz z charakterystyką otrzymanych związków oraz procedury badań biologicznych.

Streszczenie rozprawy w języku angielskim: This dissertation deals with the preparation of novel steroid sulfatase (STS) inhibitors with potential applications in the treatment of hormone-dependent cancers and consists of five main parts. The first is a theoretical introduction including a description of the structure and mechanism of STS along with its inhibitors, information on folic acid (FA) and its transport in the human body, and the topic of FA conjugates related to cancer detection and treatment. The next section presents the purpose and scope of the work. This is followed by a chapter devoted to its own research, which presents the results of molecular docking and methods for the synthesis of 3 series of new potential STS inhibitors, including 2 series of molecules containing structural elements in their structure that make them similar to FA. The synthesis of an STS-FA conjugate is included, as well as the results of biological tests verifying the inhibitory activity of the obtained compounds, which were tested using the STS enzyme and in assays using MCF-7 and JEG-3 cells. For selected compounds, tests were carried out to determine the mechanism of transport of these molecules inside the cancer cell. The last two sections are a summary and description of the experiment, where molecular docking and chemical syntheses along with characterization of the obtained compounds and bioassay procedures are presented.

*Składam serdeczne podziękowania moim promotorom,
dr hab. inż. Sebastianowi Demkowiczowi
oraz
dr inż. Mateuszowi Daśko
za nieocenione wsparcie, wyrozumiałość, cierpliwość oraz
opiekę naukową.*

*Serdecznie dziękuję również
prof. dr hab. inż. Dariuszowi Witt
oraz
prof. dr hab. inż. Januszowi Rachoniowi
za wsparcie merytoryczne oraz poświęcony czas.*

*Dziękuję
dr inż. Katarzynie Szwarc-Karabyka
oraz
dr inż. Pawłowi Sowińskiemu
za wprowadzenie mnie w niesamowity świat Magnetycznego
Rezonansu Jądrowego.*

*Osobne podziękowania kieruję do
Pracowników Katedry Chemii Organicznej PG
za wszelką pomoc oraz cenne rady.*

*Dziękuję Koleżankom i Kolegom w szczególności:
Asi, Bartkowi N., Jankowi, Karolowi, Mikołajowi,
Bartkowi J. oraz Madzi
za przyjacielską atmosferę, niesamowite wsparcie w trudnych
chwilach oraz wiele inspirujących rozmów w 102.*

*Dziękuję również
kochanej Rodzinie, tacie Krzysztofowi, mamie Grażynce
oraz
młodszej siostrze Weronice
za ogromną wiarę we mnie i danie mi możliwości spełnienia
jednego z moich największych marzeń.*

*Dziękuję
Mateuszowi
za to, że był najlepszym wsparciem w najtrudniejszych dla
mnie chwilach oraz za to, że nigdy we mnie nie zwątpił.*

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

WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI	15
STRESZCZENIE	19
ABSTRACT	21
I CZĘŚĆ TEORETYCZNA	23
1.1 Wstęp	25
1.2 Nowotwory piersi	27
1.2.1 Statystyki dotyczące nowotworów piersi	27
1.2.2 Czynniki ryzyka	28
1.2.3 Klasyfikacja nowotworów piersi	30
1.3 Znaczenie biologicznie aktywnych hormonów w przypadku nowotworów piersi	32
1.3.1 Rys historyczny nowotworów hormonozależnych	32
1.3.2 Biosynteza biologicznie aktywnych hormonów	32
1.4 Sulfataza steroidowa	34
1.4.1 Sulfataza steroidowa – budowa, występowanie, charakterystyka	34
1.4.2 Mechanizm działania sulfatazy steroidowej	35
1.4.3 Inhibitory sulfatazy steroidowej	36
1.4.4 Mechanizm inhibicji sulfatazy steroidowej z wykorzystaniem amidosiarczanów	39
1.5 Kwas foliowy	42
1.5.1 Charakterystyka kwasu foliowego	42
1.5.2 Transport folianów w organizmach ludzkich	44
1.5.2.1 Zredukowane transportery folianów	44
1.5.2.2 Protonowe transportery folianów	45
1.5.2.3 Receptory kwasu foliowego	46
1.5.3 Receptory kwasu foliowego a nowotwory piersi	48
1.6 Zastosowanie pochodnych kwasu foliowego oraz jego koniugatów w wykrywaniu oraz leczeniu nowotworów	49
1.6.1 Obrazowanie	49
1.6.2 Leki przeciwnowotworowe	63
1.6.2.1 Budowa koniugatów o właściwościach przeciwnowotworowych	63
1.6.2.2 Przykłady koniugatów kwasu foliowego wykorzystywane w leczeniu nowotworów	69
1.6.2.2.1 Koniugaty kwasu foliowego z winblastyną	69
1.6.2.2.2 Koniugaty kwasu foliowego z mitomycyną C	77
1.6.2.2.3 Koniugaty kwasu foliowego z tubulizyną	84
II CEL I ZAKRES PRACY	88

III BADANIA WŁASNE	90
3.1 Uzasadnienie podjętych badań oraz opis planowanych eksperymentów	91
3.2 Pochodne amidosiarczanowe 6-(1-fenylo-1<i>H</i>-1,2,3-triazolo-4-ylo)naftaleno-2-yliu IA-L	94
3.2.1 Modelowanie molekularne pochodnych amidosiarczanowych 6-(1-fenylo-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-4-ylo)naftaleno-2-yliu IA-L	94
3.2.2 Synteza pochodnych amidosiarczanowych 6-(1-fenylo-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-4-ylo)-naftaleno-2-yliu IA-L	99
3.2.3 Badania biologiczne <i>in vitro</i> pochodnych amidosiarczanowych 6-(1-fenylo-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-4-ylo)naftaleno-2-yliu IA-L	101
3.5.1 Aktywność biologiczna pochodnych amidosiarczanowych 6-(1-fenylo-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-4-ylo)naftaleno-2-yliu IA-L – test enzymatyczny	101
3.5.2 Aktywność biologiczna pochodnych amidosiarczanowych 6-(1-fenylo-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-4-ylo)naftaleno-2-yliu IA-L – test komórkowy	102
3.3 Analogi kwasu foliowego zawierające w swojej strukturze ugrupowanie amidosiarczanowe	104
3.3.1 Modelowanie molekularne potencjalnych inhibitorów STS będących analogami kwasu foliowego zawierającymi w swojej strukturze ugrupowanie amidosiarczanowe	104
3.3.2 Synteza analogów kwasu foliowego zawierających w swojej strukturze ugrupowanie amidosiarczanowe	110
3.3.3 Badania biologiczne <i>in vitro</i> analogów kwasu foliowego – test enzymatyczny oraz komórkowy	119
3.4 Pochodne (S)-(2-fluoro-4-(4-(6-(sulfamiloksy)naftalen-2-ylo)-1<i>H</i>-1,2,3-1-ylo)benzoilo)-glutaminowe oraz pochodne (S)-(3-fluoro-5-(4-(6-(sulfamiloksy)naftalen-2-ylo)-1<i>H</i>-1,2,3-1-ylo)benzoilo)glutaminowe VIA-L	121
3.4.1 Modelowanie molekularne pochodnych (S)-(2-fluoro-4-(4-(6-(sulfamiloksy)naftalen-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-1-ylo)benzoilo)glutaminowych oraz pochodnych (S)-(3-fluoro-5-(4-(6-(sulfamiloksy)naftalen-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-1-ylo)benzoilo)glutaminowych VIA-L	121
3.4.2 Synteza pochodnych (S)-(2-fluoro-4-(4-(6-(sulfamiloksy)naftalen-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-1-ylo)benzoilo)glutaminowych oraz pochodnych (S)-(3-fluoro-5-(4-(6-(sulfamiloksy)naftalen-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-1-ylo)benzoilo)glutaminowych VIA-L	129
3.4.3 Badania biologiczne <i>in vitro</i> pochodnych (S)-(2-fluoro-4-(4-(6-(sulfamiloksy)naftalen-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-1-ylo)benzoilo)glutaminowych oraz pochodnych (S)-(3-fluoro-5-(4-(6-(sulfamiloksy)naftalen-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-1-ylo)benzoilo)glutaminowych VIA-L	133
3.5 Koniugat kwasu foliowego STS-FA	136
3.5.1 Synteza chemiczna koniugatu kwasu foliowego STS-FA	136
3.5.2 Badania biologiczne koniugatu kwasu foliowego	146
IV PODSUMOWANIE	150

V CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	159
5.1 Opis modelowania molekularnego	160
5.2 Synteza chemiczna	161
5.2.1 Aparatura oraz odczynniki	161
5.2.2 Procedura otrzymywania 6-((trimetylosililo)etynylo)naftolu (88)	162
5.2.3 Ogólna procedura otrzymywania pochodnych 6-(1-fenylo-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-4-ylo)-naftalen-2-olu (90 A-L)	162
5.2.4 Ogólna procedura otrzymywania amidosiarczanowych pochodnych 6-(1-fenylo-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-4-ylo)naftaleno-2-ylo (IA-L)	169
5.2.5 Procedura otrzymywania 4-aminobenzoesanu metylu (93)	175
5.2.6 Procedura otrzymywania 4-(4-(6-hidroksynaftaleno-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoesan metylu (95)	176
5.2.7 Procedura otrzymywania kwasu 4-(4-(6-hidroksynaftaleno-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoesowego (96)	177
5.2.8 Procedura otrzymywania (S)-(4-(4-(6-hidroksynaftaleno-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-1-yl)benzoilo)glutaminanu dimetylu (97)	178
5.2.9 Procedura otrzymywania (S)-(4-(4-(6-(sulfamiloksy)naftaleno-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminianu dimetylu (IIA)	179
5.2.10 Procedura otrzymywania kwasu (S)-(4-(4-(6-hidroksynaftaleno-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-1-yl)benzoilo)glutaminowego (98)	179
5.2.11 Procedura otrzymywania kwasu (S)-(4-(4-(6-(sulfamiloksy)naftaleno-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminowego (IIB)	180
5.2.12 Procedura otrzymywania 4-(2-metoksy-2-oksoetylo)benzoesanu metylu (100)	181
5.2.13 Procedura otrzymywania kwasu 2-(4-(metoksykarbonylo)fenylo)octowego (101)	182
5.2.14 Procedura otrzymywania 4-(7-hidroksy-2-okso-2 <i>H</i> -chromeno-3-ylo)benzoesanu metylu (102)	183
5.2.15 Procedura otrzymywania kwasu 4-(7-hidroksy-2-okso-2 <i>H</i> -chromeno-3-ylo)benzoesowego (103)	183
5.2.16 Procedura otrzymywania (S)-(4-(7-hidroksy-2-okso-2 <i>H</i> -chromeno-3-ylo)benzoilo)glutaminianu dimetylu (104) oraz (S)-(4-(7-hidroksy-2-okso-2 <i>H</i> -chromeno-3-ylo)benzoilo)glutaminian di- <i>tert</i> -butylu (105)	184
5.2.17 Procedura otrzymywania (S)-(4-(2-okso-7-(sulfamoiłoksy)-2 <i>H</i> -chromeno-3-ylo)-benzoilo)glutaminianu dimetylu (IIIA) oraz (S)-(4-(2-okso-7-(sulfamoiłoksy)-2 <i>H</i> -chromeno-3-ylo)benzoilo)glutaminianu di- <i>tert</i> -butylu (106)	186
5.2.18 Procedura otrzymywania kwasu (S)-(4-(2-okso-7-(sulfamoiłoksy)-2 <i>H</i> -chromeno-3-ylo)benzoilo)glutaminowego (IIIB)	187
5.2.19 Procedura otrzymywania kwasu 4-(((4-hidroksyfenylo)amino)metylo)benzoesowego (109)	188
5.2.20 Procedura otrzymywania kwasu 4-(((<i>tert</i> -butoksykarbonylo)(4-hidroksyfenylo)-amino)metylo)benzoesowego (110)	188
5.2.21 Procedura otrzymywania (S)-(4-(((<i>tert</i> -butoksykarbonylo)(4-hidroksyfenylo)-amino)metylo)benzoilo)glutaminianu dimetylu (111) oraz (S)-(4-(((<i>tert</i> -butoksykar-	

bonylo)(4-hydroksyfenylo)amino)metylo)benzoilo)glutaminianu di- <i>tert</i> -butylu (113)	189
5.2.22 Procedura otrzymywania (S)-(4-((<i>tert</i> -butoksykarbonylo)(4-(sulfamoksy)fenylo)amino)metylo)benzoilo)glutaminianu dimetylu (112) lub (S)-(4-((<i>tert</i> -butoksykarbonylo)(4-(sulfamoksy)fenetylo)amino)metylo)benzoilo)glutaminianu di- <i>tert</i> -butylu (114)	191
5.2.23 Procedura otrzymywania trifluorooctanu (S)- <i>N</i> -(4-((1,5-dimetoksy-1,5-diokso-pentan-2-ylo)karbamoilo)benzoilo)-2-(4-(sulfamiloksy)fenylo)etano-1-aminy (IVA) oraz trifluorooctan (S)- <i>N</i> -(4-((1,5-di- <i>tert</i> -butoksy-1,5-dioksopentan-2-ylo)karbamoilo)benzoilo)-2-(4-(sulfamiloksy)fenylo)etano-1-aminy (IVB)	192
5.2.24 Procedura otrzymywania kwasu 4-(7-hydroksy-4-oxo-4 <i>H</i> -chromeno-2-yl)benzoesowego (118)	193
5.2.25 Procedura otrzymywania (S)-(4-(7-hydroksy-4-okso-4 <i>H</i> -chromeno-2-ylo)benzoilo)glutaminianu dimetylu (120) oraz (S)-(4-(7-hydroksy-4-okso-4 <i>H</i> -chromeno-2-ylo)benzoilo)glutaminianu di- <i>tert</i> -butylu (121)	194
5.2.26 Procedura otrzymywania (S)-(4-(4-okso-7-(sulfamoiłoksy)-4 <i>H</i> -chromeno-2-ylo)-benzoilo)glutaminianu dimetylu (VA)	195
5.2.27 Procedura otrzymywania (S)-4-(4-okso-7-(sulfamoiłoksy)-4 <i>H</i> -chromeno-2-ylo)benzoilo)glutaminianu di- <i>tert</i> -butylu (122)	196
5.2.28 Procedura otrzymywania kwasu (S)-(4-(4-okso-7-(sulfamiloksy)-4 <i>H</i> -chromeno-2-ylo)benzoilo)glutaminowego (VB)	197
5.2.29 Procedura otrzymywania 4-amino-2-fluorobenzoesanu metylu (124) oraz 3-amino-5-fluorobenzoesanu metylu (132)	198
5.2.30 Procedura otrzymywania 2-fluoro-4-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoesanu metylu (126) oraz 3-fluoro-5-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoesanu metylu (134)	199
5.2.31 Procedura otrzymywania kwasu 2-fluoro-4-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoesowego (127) oraz kwasu 3-fluoro-5-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoesowego (135)	201
5.2.32 Procedura otrzymywania kwasu 4-(4-(6-((<i>tert</i> -butylodimetylosililo)oksy)naftaleno-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-1-ylo)-2-fluorobenzoesowego (128) oraz kwasu 3-(4-(6-((<i>tert</i> -butylodimetylosililo)oksy)naftaleno-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-1-ylo)-5-fluorobenzoesowego (136)	202
5.2.33 Ogólna procedura otrzymywania pochodnych estrowych (S)-(4-(4-(6-((<i>tert</i> -butylodimetylosililo)oksy)naftaleno-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-1-ylo)-2-fluorobenzoilo)-glutaminianu (129A-E) oraz pochodnych estrowych (S)-(3-(4-(6-((<i>tert</i> -butylodimetylosililo)oksy)naftaleno-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-1-ylo)-5-fluorobenzoilo)glutaminianu (137G-K)	203
5.2.34 Ogólna procedura otrzymywania pochodnych (S)-(4-(4-(6-((<i>tert</i> -butylodimetylosililo)oksy)naftaleno-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-1-ylo)-2-fluorobenzoilo)glutaminianu z wolną grupą OH (130A-E) oraz pochodnych (S)-(3-(4-(6-((<i>tert</i> -butylodimetylosililo)oksy)naftaleno-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-1-ylo)-5-fluorobenzoilo)glutaminianu z wolną grupą OH (139G-K)	211
5.2.35 Ogólna procedura otrzymywania estrowych pochodnych (S)-(2-fluoro-4-(4-(6-(sulfamiloksy)naftaleno-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminianu	

(VIA-E) oraz (S)-(3-fluoro-5-(4-(6-(sulfamiloksy)naftaleno-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminianu (VIG-K)	218
5.2.36 Procedura otrzymywania kwasu (S)-(2-fluoro-4-(4-(6-(sulfamiloksy)naftaleno-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminowego (VIF) oraz kwasu (S)-(3-fluoro-4-(5-(6-(sulfamiloksy)naftaleno-2-ylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)-glutaminowego (VIL)	225
5.2.37 Procedura otrzymywania dwusiarczku bis(2-hydroksyetylu) (140)	227
5.2.38 Procedura otrzymywania 2-((2-azidoetylo)disulfanylo)etanolu (141)	227
5.2.39 Procedura otrzymywania 4-((trimetylosililo)etynylo)fenolu (143)	228
5.2.40 Procedura otrzymywania 2-fluoro-4-(4-(4-hydroksyfenylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-ylo)benzoesanu metylu (144)	229
5.2.41 Procedura otrzymywania kwasu 2-fluoro-4-(4-(4-hydroksyfenylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-ylo)benzoesowego (145)	229
5.2.42 Procedura otrzymywania kwasu 4-(4-((<i>tert</i> -butylodimetylosililo)oksy)fenylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-ylo)-2-fluorobenzoesowego (146)	230
5.2.43 Procedura otrzymywania 4-(4-((<i>tert</i> -butylodimetylosililo)oksy)fenylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-ylo)-2-fluorobenzoesanu 2-((2-azidoetylo)disulfanylo)etylu (147)	231
5.2.44 Procedura otrzymywania 2-fluoro-4-(4-(4-hydroksyfenylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-ylo)benzoesanu 2-((2-azidoetylo)disulfanylo)etylu (148)	232
5.2.45 Procedura otrzymywania 2-((2-azidoetylo)disulfanylo)etylo-2-fluoro-4-(4-(4-(sulfamoyloksy)fenylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-ylo)benzoesanu etylu (149)	233
5.2.46 Procedura otrzymywania (S)-1- <i>tert</i> -butylo-5-(2,5-dioksopirrolidyn-1-ylo) 2-(((9 <i>H</i> -fluoren-9-ylo)metoksy)karbonylo)amino)pentanodioatu (152)	233
5.2.47 Procedura otrzymywania (S)- <i>tert</i> -butylo-2-(((9 <i>H</i> -fluoren-9-ylo)metoksy)karbonylo)amino)-5-(but-3-yn-1-yloamino)-5-oksopentanianu (153)	234
5.2.48 Procedura otrzymywania (S)-2-amino-5-(but-3-yn-1-yloamino)-5-oksopentanianu <i>tert</i> -butylu (154)	235
5.2.49 Procedura otrzymywania (S)-2-(4-(((2-amino-4-okso-3,4-dihydropterydyn-6-ylo)-metylo)amino)benzamido)-5-(but-3-yn-1-yloamino)-5-oksopentanianu <i>tert</i> -butylu (156)	235
5.2.50 Procedura otrzymywania (S)-2-((2-(4-(4-(((2-amino-4-okso-3,4-dihydropterydyn-6-ylo)metylo)amino)benzamido)-5-(<i>tert</i> -butoksy)-5-oksopentanamido)etylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-ylo)etylo)disulfanylo)etylo-2-fluoro-4-(4-(4-(sulfamoksy)fenylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-ylo)benzoesanu etylu (157)	236
5.2.51 Procedura otrzymywania trifluorooctanu (S)-2-(4-(((2-amino-4-okso-3,4-dihydropteridin-6-yl)metylo)amino)benzamido)-5-((2-(1-(2-((2-fluoro-4-(4-(4-(sulfamoyloksy)fenylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-ylo)benzoilo)oksy)etylo)disulfanylo)-etylo)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-ylo)etylo)amino)kwasu 5-oksopentanowego (VII)	238
5.3 Badania biologiczne	239
5.3.1 Procedura izolacji oraz oczyszczania enzymu	239
5.3.2 Procedura badania aktywności biologicznej wobec wyizolowanego enzymu	239
5.3.3 Procedura badania aktywności biologicznej z wykorzystaniem linii komórkowych MCF-7 oraz JEG-3	239
5.3.4 Procedura badania transportu związków do wnętrza komórek przez FRa	240

5.3.5 Procedura badania transportu związków do wnętrza komórek z wykorzystaniem testu PAMPA	240
5.4 Badania dotyczące szybkości uwalniania cząsteczki inhibitora z koniugatu STS-FA	241
5.4.1 Procedura pomiaru szybkości rozpadu wiązania disulfidowego pod wpływem DTT	241
BIBLIOGRAFIA	242
WYKAZ RYSUNKÓW	251
WYKAZ SCHEMATÓW	253
WYKAZ TABEL	255

Wykaz skrótów i symboli

$^3\text{H-E1S}$	-	Znakowany trytem siarczan estronu
24JKFBP	-	Komórki mięsaka transferowane ludzkim FR
17 β -HSD	-	Dehydrogenaza 17 β -hydroksysteroidowa
$^1\text{H NMR}$	-	Protonowy magnetyczny rezonans jądrowy
$^{13}\text{C NMR}$	-	Węglowy magnetyczny rezonans jądrowy
ACN	-	Acetonitryl
Adiol	-	Androstendiol
Adiol-S	-	Siarczan androstendiolu
Arom	-	Aromataza
BALB/C	-	Myszy laboratoryjne z niedoborem odporności
Boc	-	Grupa <i>tert</i> -butyloksykarbonylowa
CDI	-	1,1'-Karbonylodiimidazol
DBU	-	1,8-Diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en
DCC	-	<i>N,N'</i> -Dicykloheksylokarbodiimid
DCM	-	Dichlorometan
DHEA	-	Dehydroepiandrosteronu
DHEA-S	-	Siarczan dehydroepiandrosteronu
DIPEA	-	<i>N,N</i> -Diizopropylometyloamina
DNA	-	Kwas deoksyrybonukleinowy
DMA	-	<i>N,N</i> -Dimetyloacetamid
DMF	-	<i>N,N</i> -Dimetyloformamid
DMSO	-	Dimetylosulfotlenek
DTPA	-	Kwas dietylenotriaminopentaoctowy
DTT	-	Ditiotreitol
E1	-	Estron
E1S	-	Siarczan estronu
E2	-	Estradiol
E2S	-	Siarczan estradiolu
EDC	-	1-(3-Dimetyloaminopropyl)-3-etylokarbodiimid
EDT	-	Etano-1,2-ditiol
ER	-	Receptor estrogenowy

FA	-	Kwas foliowy
fGly	-	Formyloglicyna
fGlyS	-	Siarczan formyloglicyny
FR	-	Receptor kwasu foliowego
Fmoc	-	Grupa 9-fluorenylometoksykarbonylowa
GSH	-	Glutation
HBTU	-	Heksafluorofosforan 3-tlenku 1-[bis(dimetyloamino)metyleno]-1 <i>H</i> -benzotriazoliowego (z <i>ang.</i> <i>Hexafluorophosphate Benzotriazole Tetramethyl Uronium</i>)
HER2	-	Ludzki receptor naskórkowego czynnika wzrostu
IHC	-	Barwienie immunohistochemiczne (z <i>ang.</i> <i>Immunohistochemistry</i>)
J6456	-	Komórki chłoniaka
JEG-3	-	Ludzka linia komórkowa raka kosmówki
KB	-	Ludzka linia komórkowa raka nosogardzieli oraz naskórka
MCF-7	-	Ludzka linia komórkowa nowotworu piersi
MFS	-	Nadrodzina białek transportu błonowego (z <i>ang.</i> <i>Major Facilitator Superfamily</i>)
mRNA	-	Matrycowy kwas rybonukleinowy (z <i>ang.</i> <i>messenger RNA</i>)
NADHP	-	Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
NHE	-	Wymienniki sodowo-protonowe (wymienniki NHE)
PaAtsA	-	Arylosulfataza bakterii <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PARP	-	Polimeraza poli ADP-rybozy
PBS	-	Buforowana fosforanami sól fizjologiczna (z <i>ang.</i> <i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PCFT	-	Transport folianów strzężonych z folianem (z <i>ang.</i> <i>Proton-Coupled Folate Transporter</i>)
PDB	-	Bank struktur krystalograficznych (z <i>ang.</i> <i>Protein Data Bank</i>)
PET	-	Pozytonowa tomografia emisyjna (z <i>ang.</i> <i>Positron Emission Tomography</i>)
PR	-	Receptor progesteronowy
PLP	-	Fosforan pirydoksalu (z <i>ang.</i> <i>Pyridoxal phosphate</i>)
PyBOP	-	Heksafluorofosforan benzotriazolo-1-ylo-oksy-trispyrolidynofosfoniowy
RFC	-	Zredukowane transportery folianów (z <i>ang.</i> <i>Reduced Folate Carrier</i>)
RT	-	Temperatura pokojowa (z <i>ang.</i> <i>Room temperature</i>)
SAR	-	Analiza struktura-aktywność (z <i>ang.</i> <i>Structure-Activity Relationship</i>)
SPECT	-	Tomografia emisyjna pojedynczych fotonów (z <i>ang.</i> <i>Single-Photon Emission Computed Tomography</i>)

STS	-	Sulfataza steroidowa
WHO	-	Światowa Organizacja Zdrowia (z ang. <i>World Health Organization</i>)
TBTU	-	Tetrafluoroboran <i>O</i> -(benzotrizolo-1-ylo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy
TBAF	-	Fluorek tertabutyloamoniowy
TBTMG	-	2- <i>Tert</i> -butyl-1,1,3,3-tetrametyloguanidyna
<i>t</i> -BuONO	-	Azotyn <i>tert</i> -butylu
TEA	-	Trietyloamina
TFA	-	Kwas trifluorooctowy
THF	-	Tetrahydrofuran
TIPS	-	Triizopropylsolan
TPPTS	-	Sól trisodowa kwasu trifenylfosfino-3,3',3''-trisulfonowego
TLC	-	Cienkowarstwowa chromatografia cieczowa (z ang. <i>Thin Layer Chromatography</i>)
TMSN3	-	Azydek trimetylosililowy
qPCR	-	Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy, reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (z ang. <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)

Streszczenie

Zagadnienia związane z rozwojem nowotworów piersi, ze względu na nieznaną etiologię, zwracało uwagę zarówno wielu lekarzy jak i zespołów naukowych na przestrzeni ostatnich wieków. Pomimo prowadzenia wielowątkowych badań w tym temacie oraz wykorzystywania różnego rodzaju terapii, rak piersi wciąż pozostaje jedną z głównych przyczyn śmierci wśród kobiet na całym świecie. Według danych pochodzących z 2022 roku, kobiety stanowiły 9,7 miliona pacjentów z nowotworami, a w 23,8% przypadków były to guzy piersi. Kwestią wartą podkreślenia jest to, iż ok. 95% nowotworów w swojej początkowej fazie wzrostu wykazuje charakter hormonozależny. W konsekwencji tego, biologicznie aktywne steroidy, takie jak androgeny czy estrogeny, odgrywają kluczową rolę podczas proliferacji oraz wzrostu komórek nowotworowych. Z tego powodu wielu naukowców w swoich pracach skupia się nad stworzeniem strategii leczenia, która w sposób selektywny oraz efektywny będzie w stanie uniemożliwić dostarczanie aktywnych hormonów do komórek nowotworowych. Aktualnie jedna z głównych metod terapii przeciwnowotworowych opiera się na stosowaniu związków biologicznie czynnych, które są w stanie zablokować działanie białek odpowiedzialnych za transformację biologicznie nieaktywnych cząsteczek do ich aktywnych form. Jednym z takich enzymów jest sulfataza steroidowa (STS), która bierze udział w hydrolizie siarczanowych form steroidów do ich aktywnych biologicznie pochodnych. Od kilkunastu lat prowadzone są intensywne próby stworzenia nowych, skutecznych inhibitorów STS, które będą wykazywały wysoki poziom aktywności inhibicyjnej przy prezentowaniu małej ilości efektów niepożądanych. Niestety do tej pory wiele z takich związków charakteryzowało się właściwościami estrogenowymi, które pobudzają komórki nowotworowe do proliferacji. Związane było to między innymi z tym, iż cząsteczki te w swojej strukturze zawierały rdzenie steroidowe, dlatego kolejne noworozwijane, potencjalne farmaceutyki powinny zawierać w swojej strukturze rdzenie niesteroidowe. Dodatkowo wiele leków znajdujących się aktualnie na rynku farmaceutycznym, które posiadają właściwości cytotoksyczne, charakteryzuje się dość wysokim stopniem toksyczności ogólnoustrojowej oraz dużą ilością niepożądanych skutków ubocznych, co związane jest bezpośrednio z niski poziomem specyficzności. Z tego powodu, wiele zespołów naukowych podejmuje próbę stworzenia leku, który w sposób efektywny oraz selektywny będzie w stanie dotrzeć do komórek zmienionych chorobowo oraz w dalszej kolejności zablokować ich działanie. Z tego powodu, STS jest bardzo atrakcyjnym celem molekularnym dla rozwoju terapii nowotworów hormonozależnych, a opracowanie skutecznych oraz selektywnych inhibitorów tego enzymu jest ogromnym wyzwaniem dla współczesnej chemii medycznej. Faktem wartym podkreślenia jest również to, iż kluczowe znaczenie w tym przypadku może odegrać kwas foliowy, który jest związkiem niezbędnym dla szybko nowotworzących się komórek rakowych. Istotne znaczenie ma sam sposób dystrybucji tej cząsteczki w ciele ludzkim, gdyż dociera ona do wnętrza wszystkich komórek wykorzystując odpowiednie transportery m.in receptory kwasu foliowego w podtypie alfa. Charakteryzują się one bowiem tym, iż w przypadku zdrowych komórek ich poziom ekspresji jest niski, w przeciwieństwie do komórek nowotworowych. Fakt ten właśnie może zostać wykorzystany w celu opracowania leku, który będzie w sposób selektywny docierał do komórek nowotworowych. Dodatkowo biorąc pod uwagę to, że ekspresja receptorów kwasu foliowego ciągle rośnie wraz z rozwojem guza, można również założyć, że potencjalne leki będą również

skutecznie w leczeniu zaawansowanych stanów nowotworowych, a nowo opracowana metoda stanie się wysoce efektywną terapią celowaną.

W niniejszej pracy przedstawiłam studium literaturowe dotyczące budowy oraz mechanizmu działania sulfatazy steroidowej jak i jej inhibitorów wykorzystywanych w leczeniu nowotworów hormonozależnych. Ponadto, dokonałam przeglądu literatury dotyczącego kwasu foliowego oraz jego pochodnych wraz z charakterystyką transportu tych cząsteczek w ludzkim organizmie. Dodatkowo, zebrałam materiał literaturowy na temat otrzymywania oraz wykorzystywania koniugatów kwasu foliowego w wykrywaniu oraz leczeniu nowotworów posiadających nadekspresję receptorów kwasu foliowego.

Przedstawiona dysertacja zawiera również szereg badań wykorzystujących techniki dokowania molekularnego oraz metody syntezy trzech serii nowych, potencjalnych inhibitorów sulfatazy steroidowej, w tym dwóch serii cząsteczek zawierających w swojej budowie elementy strukturalne upodabniające je do kwasu foliowego. Ponadto, w pracy tej odnaleźć można wieloetapową syntezę koniugatu kwasu foliowego z inhibitorem sulfatazy steroidowej, a aktywność biologiczna wszystkich otrzymanych związków zbadana została w testach *in vitro* z wykorzystaniem wyizolowanego z ludzkiego łożyska enzymu STS oraz w testach komórkowych z użyciem linii komórkowej MCF-7 oraz JEG-3. Dodatkowo, w przypadku niektórych, wyselekcjonowanych związków przeprowadzono testy mające na celu ustalenie mechanizm transportu tych cząsteczek do wnętrza komórki nowotworowej.

Abstract

The issues related to the development of breast cancer, due to its unknown etiology, have attracted the attention of many doctors and research teams over the past centuries. Despite conducting multifaceted studies on this topic and using various types of therapies, breast cancer remains one of the leading causes of death among women worldwide. According to data from 2022, women accounted for 9.7 million cancer patients, of which 23.8% were breast tumors. It is worth emphasizing that approximately 95% of cancers in their early stages show a hormonally dependent character. As a result, biologically active steroids, such as androgens and estrogens, play a key role in the proliferation and growth of cancer cells. For this reason, many researchers focus on developing treatment strategies that will selectively and effectively prevent the delivery of active hormones to cancer cells. Currently, one of the main methods of cancer therapy involves the use of biologically active compounds capable of blocking the activity of proteins responsible for the transformation of biologically inactive molecules into their active forms. One such enzyme is steroid sulfatase (STS), which participates in the hydrolysis of steroid sulfate forms into their biologically active derivatives. For several years, intense efforts have been made to develop new, effective inhibitors of STS that would demonstrate a high level of inhibitory activity with minimal side effects. Unfortunately, many of these compounds have been characterized by estrogenic properties, which stimulate cancer cells to proliferate. This was partly due to the fact that these molecules contained steroid cores in their structure. Therefore, future potential pharmaceuticals should incorporate non-steroidal cores in their structure. Additionally, many drugs currently available in the pharmaceutical market, which possess cytotoxic properties used in cancer therapies, are associated with a high level of systemic toxicity and a significant number of side effects, which is directly linked to their low specificity. For this reason, many research teams are attempting to create a drug that will effectively and selectively target cancer cells and subsequently block their activity. Therefore, STS is a very attractive molecular target for the development of therapies for hormonally dependent cancers, and developing effective and selective inhibitors of this enzyme presents a huge challenge for modern medicinal chemistry. Another important point is that folic acid may play a crucial role in this context, as it is essential for rapidly proliferating cancer cells. The distribution of this molecule within the human body is significant because it reaches all cells using appropriate transporters, including folic acid receptors in the alpha subtype. These receptors are characterized by low expression levels in healthy cells, in contrast to cancer cells. This fact may be utilized to develop a drug that selectively targets cancer cells. Additionally, considering that the expression of folic acid receptors continues to increase as the tumor develops, it can also be assumed that potential drugs will be effective in treating advanced cancer stages, and the newly developed method will become a highly effective targeted therapy.

In this thesis, I present a literature study on the structure and mechanism of action of steroid sulfatase as well as its inhibitors used in the treatment of hormonally dependent cancers. Furthermore, I conducted a literature review on folic acid and its derivatives, along with a characterization of the transport of these molecules in the human body. Additionally, I gathered literature material on the production and use of folic acid conjugates in the detection and treatment of cancers that overexpress folic acid receptors.

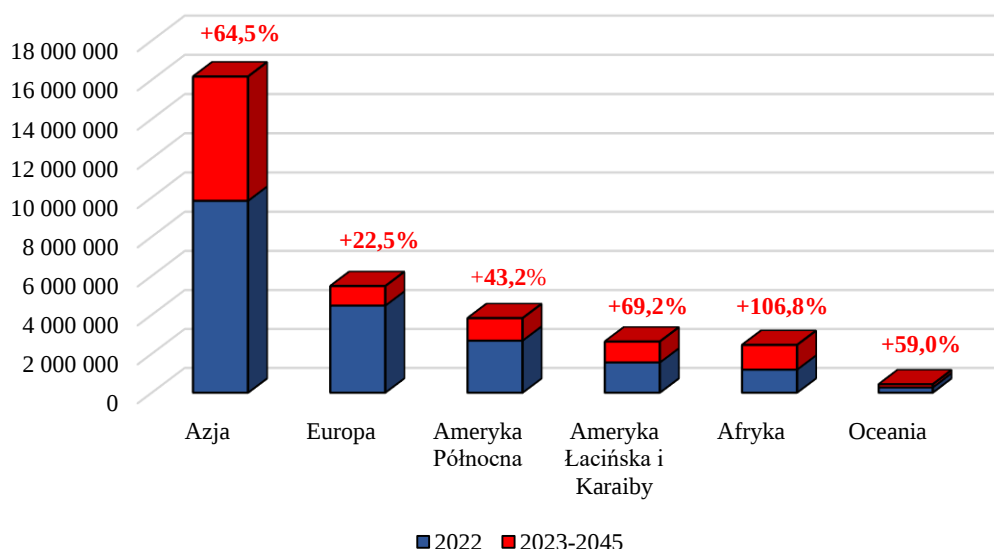
The presented dissertation also includes a series of studies using molecular docking techniques and the synthesis methods of three series of new potential steroid sulfatase

inhibitors, including two series of molecules containing structural elements resembling folic acid. Moreover, the thesis describes a multi-step synthesis of a folic acid conjugate with a steroid sulfatase inhibitor, and the biological activity of all the obtained compounds was evaluated in *in vitro* tests using the isolated STS enzyme from human placenta and in cell-based assays using the MCF-7 and JEG-3 cell lines. Additionally, for some selected compounds, tests were conducted to determine the mechanism of transport of these molecules into cancer cells.

I Część teoretyczna

1.1 Wstęp

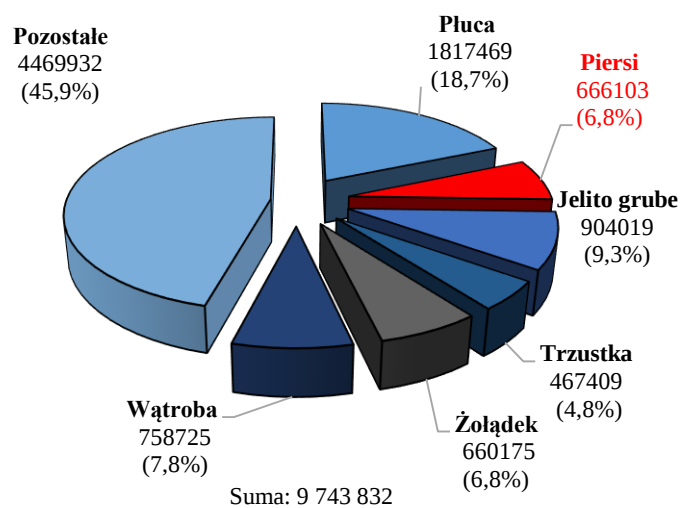
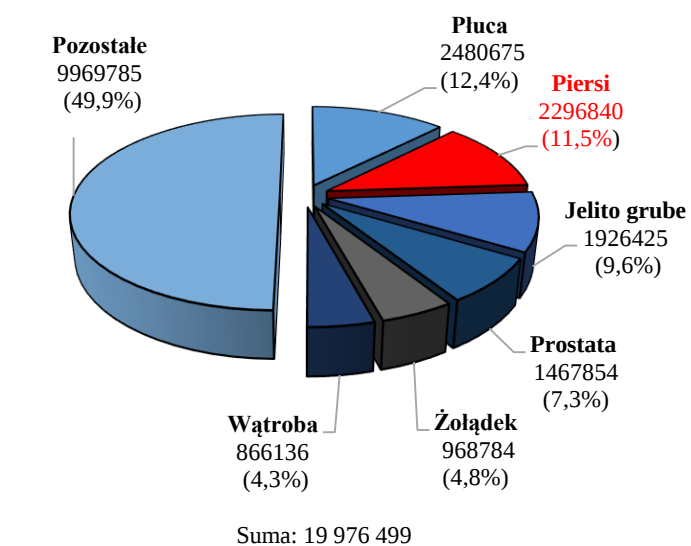
W dzisiejszych czasach występowanie nowotworów wśród ludzi stanowi bardzo poważny problem społeczny, zdrowotny oraz ekonomiczny. Zgodnie z aktualnymi statystykami, odpowiadają one za 16,8% wszystkich zgonów na całym świecie. Choroba ta powoduje trzy na dziesięć przedwczesnych zgonów z powodu chorób niezakaźnych w przedziale wiekowym od 30 do 69 roku życia i jest jedną z trzech głównych przyczyn zgonów w tej grupie wiekowej.[1] Według Międzynarodowej Agencji Badań Nad Nowotworami (*International Agency for Research on Cancer*) ilość zachorowań na nowotwory wszelkiego typu w roku 2045 wzrośnie o 12,6 miliona w stosunku do roku 2022 i wyniesie aż 32,6 miliona nowych przypadków. Szacuje się, że największy przyrost procentowy w ciągu 23 lat w stosunku do danych z 2022 roku wystąpi w Afryce i będzie się on plasował na poziomie aż 106,8%. Prognozuje się również, że na terenie Europy w latach od 2022 do 2045 zdiagnozowanych zostanie sumarycznie 5 476 168 nowych zachorowań[2]. Na **Rys. 1.1** zaprezentowano niepokojącą tendencję wzrostową nowych przypadków nowotworów dotyczącą wszystkich części świata.



Rys. 1.1 Szacowana liczba nowych przypadków nowotworów w latach 2022-2045 (obojsza płci).

Według danych pochodzących z roku 2022 przedstawionych na **Rys. 1.2** w ówczesnym roku u blisko 20 milionów pacjentów zdiagnozowane zostały choroby nowotworowe. Do najczęściej występujących typów tego schorzenia zaliczyć można guzy płuć, piersi, jelita grubego, prostaty oraz wątroby, które stanowiły aż 50% wszystkich przypadków. Z powodu tych chorób śmierć poniosło ok. 10 milionów ludzi na całym świecie (**Rys. 1.2**).

Wśród kobiet, które stanowiły 9,7 miliona pacjentów z nowotworami, najczęściej występującym nowotworem były guzy piersi i odpowiadały one za 23,8% nowych przypadków. Konsekwencją występowania tej jednostki chorobowej było 665 684 zgonów kobiet (15,4% wszystkich zgonów) na całym świecie. [1]

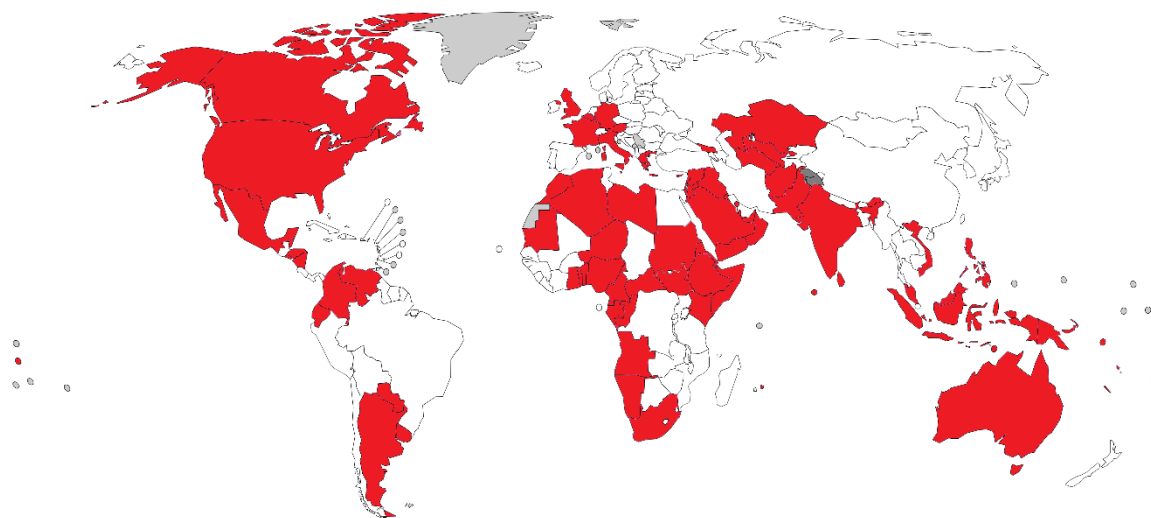


Rys. 1.2 Liczba nowych zachorowań na nowotwory (górny diagram) i zgonów (dolny diagram) w 2022 r. (u obojga płci, w każdym wieku) na całym świecie.

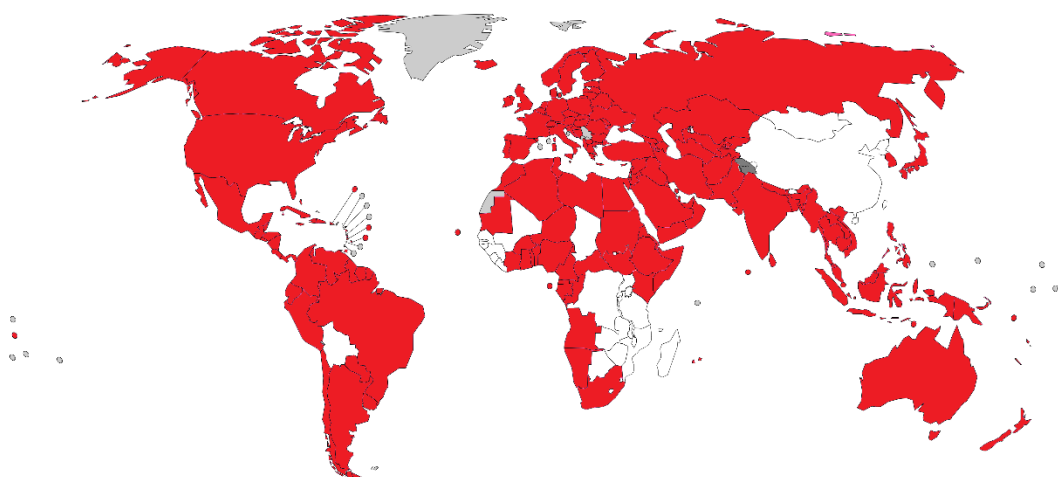
1.2 Nowotwory piersi

1.2.1 Statystyki dotyczące nowotworów piersi

Międzynarodowa Organizacja Zdrowia (*World Health Organization WHO*) sporządziła raport przedstawiający dane statystyczne pochodzące z roku 2022 (**Rys. 1.3** i **Rys. 1.4**) ukazujące najczęściej występujące typy nowotworów w danym państwie. Gdy pod uwagę weźmiemy całą populację dominującym typem nowotworu w 82 państwach był nowotwór piersi co plasuje go na pierwszym miejscu najczęściej występującej choroby tego typu. W przypadku statystyk dotyczących wyłącznie kobiet guzy piersi występują na pierwszym miejscu aż w 158 państwach i są główną przyczyną śmierci w 111 krajach.[2]

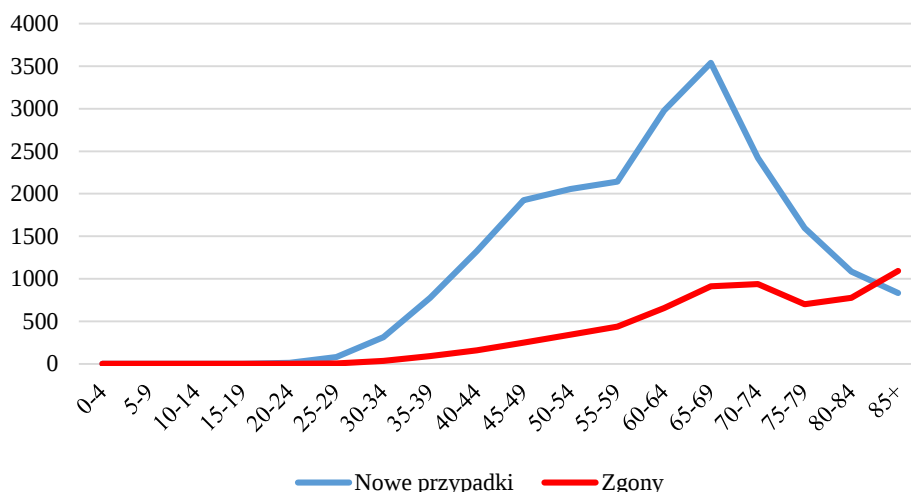


Rys. 1.3 Mapa świata pokazująca państwa (kolor czerwony), w których nowotwór piersi jest najczęściej występującym w całej populacji zarówno u kobiet jak i mężczyzn.



Rys. 1.4 Mapa świata pokazująca państwa (kolor czerwony), w których nowotwór piersi jest najczęściej występującym typem nowotworu u kobiet.

Również w Polsce problem nowotworów piersi jest zagadnieniem powszechnie występującym, gdyż Krajowy Rejestr Nowotworów przedstawił dane z 2021 roku, w których zawarte są informacje mówiące o tym, że sumaryczna ilość nowych przypadków zachorowań na nowotwory piersi wynosiła ok. 21 tysięcy. Dane te zaprezentowane zostały na **Rys. 1.5** i wskazują na tendencję wzrostową dotyczącą zarówno wykrywania nowych przypadków chorobowych jak i zgonów do przedziału wiekowego z zakresu od 65 do 70 roku życia. Jednak, co może wydawać się dość zaskakujące, odnotowane zostały również dwa przypadki bardzo młodych pacjentek tzn. z przedziału wiekowego od 15 do 19 roku życia.[3]



Rys. 1.5 Schemat przedstawiający ilość nowych zachorowań na nowotwory piersi wśród Polek (niebieski) oraz ilość zgonów (czerwony) w 2021.

1.2.2 Czynniki ryzyka

Wzrastająca zapadalność na choroby nowotworowe jest konsekwencją występowania różnych czynników ryzyka, czyli cech, stanów czy zachorowań, które w znaczny sposób zwiększają prawdopodobieństwo zachorowania na daną jednostkę chorobową.

Pierwszym i zarazem jednym z najistotniejszych czynników ryzyka w przypadku nowotworów piersi jest płeć, gdyż według najnowszych danych WHO przytłaczająca większość pacjentów z tego typu nowotworem to kobiety, a tylko 0,5-1% mężczyzn choruje na to schorzenie. Płeć żeńska stanowi uwarunkowanie bezpośrednio związane ze wzrostem ryzyka pojawienia się nowotworu, głównie ze względu na zwiększoną stymulację hormonalną. W przeciwieństwie do mężczyzn, u których poziom estrogenów jest nieznaczny, kobiece ciało, w tym komórki piersi, są szczególnie wrażliwe na działanie hormonów, a także na wszelkie zakłócenie ich równowagi.[4] Z tego powodu występowanie określonych zdarzeń, takich jak ciąża, karmienie piersią, czas pojawienia się pierwszej menstruacji oraz menopauzy wraz z towarzyszącymi im wahaniem hormonalnymi, są kluczowe pod względem potencjalnego początku zdarzeń rakotwórczych.

Liczne badania naukowe potwierdzają to, że istotnym czynnikiem ryzyka, który powoduje wzrost niebezpieczeństwa pojawienia się nowotworu piersi jest rozpoczęcie miesiączkowania dziewcząt w młodym wieku. [5] Początek miesiączkowania poniżej 11 roku życia uznawany jest za okoliczność sprzyjającą zachorowaniom w późniejszych latach życia.

Z kolei czynnikiem przyjmowanym za swoistego rodzaju ochronne jest pojawienie się pierwszego okresu w wieku 15 lat lub starszym, gdyż jest to powiązane z sumarycznie mniejszą ilością cykli menstruacyjnych w przeciągu całego cyklu rozrodczego kobiety, a co z tym związane z krótszą stymulacją hormonalną.[6] Ponadto, innym czynnikiem prewencyjnym jest opóźnienie miesiączkowania o rok, gdyż wiąże się ono z 5% zmniejszeniem ryzyka zachorowania na raka piersi w późniejszym okresie życia.[7]

Również posiadanie potomstwa ma wpływ na ryzyko wystąpienia guza piersi. Wykazuje ono jednak dwojaki charakter, mianowicie w okresie około połogowym ryzyko to jest znacznie zwiększone, ale z czasem maleje ono stopniowo, by w dłuższej perspektywie poród stał się specyficzną ochroną przed chorobą nowotworową.[8] W literaturze naukowej odnaleźć można badania mówiące o tym, że w porównaniu z nieródkami, kobiety, które donosiły chociaż jedną ciążę, są średnio o 25% mniej obciążone możliwością pojawienia się guza.[9] Ponadto, ochrona ta wzrasta wraz z liczbą ciąż donoszonych, i właśnie z tego powodu kobiety posiadające pięcioro lub więcej potomstwa mają o połowę mniejsze ryzyko zachorowania niż kobiety bezdzietne.[9], [10] Również istotnym aspektem jest sam wiek kobiety ciężarnej. Jest on ważnym czynnikiem, gdyż dowiedziono, że zajście w ciążę w młodym wieku oraz jej donoszenie mogą mieć pozytywne skutki zdrowotne w zakresie nowotworów piersi, a im młodszy wiek rodzącej tym ochrona przed zachorowaniem jest większa.[11]

Kolejnym czynnikiem ryzyka wartym odnotowania jest menopauza oraz czas w życiu kobiety, kiedy ona następuje. Według aktualnych danych, kobiety przechodzące naturalną menopauzę po 55 roku życia, są dwukrotnie bardziej narażone na rozwój raka piersi niż kobiety, które doświadczają menopauzy przed 45 rokiem życia.[12] Ważnym jest też fakt, iż każdy rok opóźnienia pojawienia się klimakterium wiąże się z 3% wzrostem ryzyka rozwinięcia się nowotworu.[13]

Drugim po płci najważniejszym czynnikiem ryzyka jest wiek. Częstość występowania raka piersi u pacjentek znacząco wrasta wraz z długością życia i obecnie ryzyko zachorowania w ciągu całego życia jest szacowane w stosunku 1 do 8 (12,5%). Ciekawym jest to, iż przed 49 rokiem życia szacowane ryzyko zachorowania na guza piersi wynosi 1 do 53, by w przedziale wiekowym od 50 do 59 roku życia wzrosnąć do stosunku 1 do 43 i ostatecznie w zakresie wiekowym od 60 do 69 wynieść 1 do 23. Ważnym jest również fakt, że najwyższy stopień ryzyka posiadają pacjentki powyżej 70 roku życia, gdyż prawdopodobieństwo pojawienia się choroby nowotworowej wynosi aż 1 do 15.[14]

Również wcześniejsze występowanie nowotworów piersi w rodzinie stanowi jeden z głównych czynników ryzyka, ponieważ badania naukowe donoszą, że istnieje duża zależność pomiędzy pacjentką, u której zdiagnozowano nowotwór a przeszłością chorobową jej najbliższych krewnych. Dane naukowe wskazują, iż dwukrotne podniesienie ryzyka zachorowania ma miejsce w momencie, gdy krewny pierwszego stopnia, czyli matka, siostra bądź córka, chorowały na nowotwór. Rodzinne zachorowania mogą być przypisywane wspólnemu miejscu zamieszkania, stylowi życia, ale prawdopodobnie co najważniejsze, wspólnym genom.[15] Szacuje się, że od 5 do 10% wszystkich przypadków raka piersi związanych jest z dziedziczną mutacją w autosomalnych genach dominujących. Dwie kluczowe mutacje występują w genach BRCA1 oraz BRCA2, które znajdują się na chromosomach 17 oraz 13 i ryzyko zachorowania na nowotwór u nosicieli tej mutacji wynosi 80-85%. Dodatkowo, uważa się, że łączna częstość występowania tej mutacji w populacji wynosi ok. 1,2 na 1000 kobiet.[16]

Ponadto, w literaturze można znaleźć doniesienia mówiące o tym, iż kobiety stosujące hormonalną terapię zastępczą w celu złagodzenia objawów menopauzy są wysoce narażone na nowotwory piersi.[17] Odnotowano, że ryzyko jest większe podczas stosowania preparatów zawierających zarówno estrogen jak i progesteron w porównaniu z chemoterapeutykami w których skład wchodzi jedynie sam estrogenem. Kobiety stosujące zastępczą terapię hormonalną, które zachorowały na schorzenia nowotworowe, cierpiały w głównej mierze na nowotwory z dodatnim receptorem estrogenowym o niskim stopniu złośliwości. Do najczęściej chorujących kobiet zaliczyć było można, te które rozpoczęły stosowanie tego typu leczenia bezpośrednio po menopauzie. Po zaprzestaniu tego typu terapii zwiększone ryzyko ustępuje w przeciągu dwóch lat. [17] Kilka publikacji naukowych wskazuje, że przyjmowanie niektórych leków przeciwdepresyjnych takich jak paroksetyny, trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne i selektywnie inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny mogą również sprzyjać rozwojowi nowotworów piersi.[18][19]

1.2.3 Klasyfikacja nowotworów piersi

Klasyfikacja nowotworów piersi jest niezwykle ważnym zagadnieniem, ponieważ jest ona bezpośrednio powiązana z wyborem potencjalnej drogi leczenia oraz przewidywanymi rokowaniami pacjenta. Nie istnieje jeden ogólny podział wariantów tej choroby ze względu na zbyt dużą ilość występujących zmiennych, jednak wyróżnić można tutaj klasyfikacje ze względu na: typ histopatologiczny, zróżnicowanie komórek, stopień zaawansowania choroby oraz status receptorów:

- Podział histopatologiczny: opiera się on na cechach widocznych w mikroskopii świetlnej próbek biopsyjnych. Wyróżnić tutaj można nowotwory *in situ* inaczej zwane nowotworami przedinwazyjnymi z ang. *Carcinoma in situ* (stanowią 15-30% przypadków, mają korzystne rokowania[20]) oraz nowotwory inwazyjne (stanowią 70-85% przypadków, najczęściej występującym rakiem w tej grupie jest inwazyjny rak przewodowy[21]).
- Podział ze względu na wygląd komórki: skupia się on na porównywaniu zróżnicowania komórek nowotworowych ze zdrowymi komórkami. Normalne komórki w zdrowym narządzie są niejednolite, co oznacza, że przybierają określone kształty oraz formy w zależności od pełnionej funkcji. Komórki rakowe tracą to zróżnicowanie, a podział komórkowy staje się niekontrolowany. Lekarze klasyfikują komórki te jako: dobrze zróżnicowane (o niskim stopniu złośliwości), średnio zróżnicowane (o średnim stopniu złośliwości) i słabo zróżnicowane (o wysokim stopniu złośliwości).[22]
- Podział ze względu na stopień zaawansowania choroby: wyróżnić tutaj można 5 stopni rozwoju choroby. Stopień zerowy jest tym najłagodniejszym, stopień pierwszy oraz drugi określane są jako wczesno inwazyjne, stopień trzeci odpowiada lokalnemu zaawansowaniu oraz stopień czwarty jest tym najwyżej zaawansowanym.[23]
- Podział ze względu na obecność oraz rodzaj receptorów: komórki raka piersi mogą, lecz nie muszą posiadać receptorów na swojej powierzchni, w cytoplazmie, bądź w jądrze komórkowym. Obecnie wśród trzech najważniejszych typów receptorów charakteryzujących komórki nowotworowe zaliczane są: receptor estrogenowy (ER), receptor progesteronowy (PR) i ludzki receptor naskórkowego czynnika wzrostu (HER2). Komórki z receptorami nazywane są ER dodatnimi (ER+), PR dodatnimi (PR+), HER2 dodatnimi (HER2+). Komórki bez poszczególnych receptorów określane

są odpowiednio receptorami ujemnymi. Dodatkowo wyróżnić można jeszcze typ komórek, który nie posiada żadnych receptorów i nazywany jest podstawowym lub potrójnie ujemnym (z ang. *triple-negative* TN). [21]

Tabela 1.1 Klasyfikacja podtypów nowotworów piersi.

Podtypy raka piersi	Luminalny A	Luminalny B		HER2+	TN
		HER2-	HER2+		
Typ receptora	ER+ PR+ HER2-	ER+ PR- HER2-	ER+ PR+/- HER2+	ER- PR- HER2+	ER- PR- HER2-
Częstotliwość przypadków (%)	40-50	20-30		15-20	10-20
Stopień histopatologiczny	Dobrze zróżnicowane	Umiarkowanie zróżnicowane		M mało zróżnicowane	M mało zróżnicowane
Prognozy	Dobre	Średnie		Słabe	Słabe
Proponowane terapie	Hommonoterapia	Hommonoterapia Chemioterapia	Hommonoterapia Chemioterapia Terapia celowana	Chemioterapia Terapia celowana	Chemioterapia Inhibitory PARP

W erze nowoczesnej medycyny klasyfikacja nowotworów piersi oparta jedynie na właściwościach histopatologicznych oraz klinicznych parametrach takich jak np. wielkość guza, zajęcie węzłów chłonnych, czy obecność przerzutów, to zdecydowanie za mało. Z tego właśnie powodu, aktualnie wiele badań naukowych koncentruje się na analizie profilu ekspresji genów oraz związanych z nimi czynnościami danego receptora. Pionierem takiego podejścia był Perou wraz ze współpracownikami, który blisko 25 lat temu opublikował nowatorską pracę, gdzie sklasyfikowano podtypy nowotworu piersi w oparciu o podobieństwo ekspresji genów, przy użyciu techniki mikromacierzy cDNA.[24] W oparciu o te badania ujawniono 4 główne podtypy nowotworów: luminal A, luminal B, HER2 oraz potrójnie ujemny.[21] Dane podsumowujące profil ekspresji i występowanie odpowiednich typów receptorów, częstotliwość przypadków, stopień histopatologiczny prognozy oraz proponowane terapie przedstawiono w **Tabeli 1.1**.

1.3 Znaczenie biologicznie aktywnych hormonów w przypadku nowotworów piersi

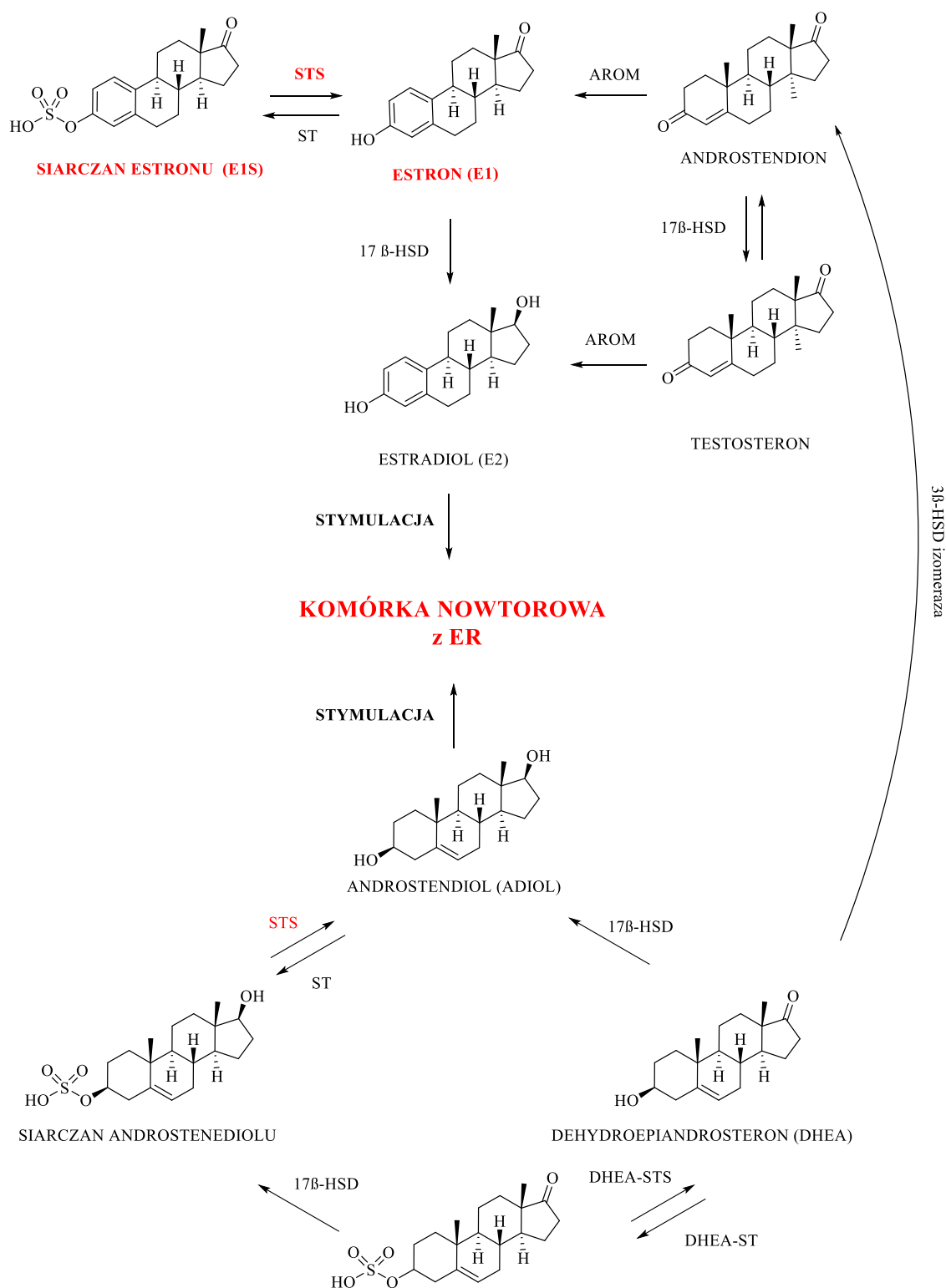
1.3.1 Rys historyczny nowotworów hormonozależnych

Aktualny stan wiedzy pozwala stwierdzić, iż steroidowe hormony płciowe, takie jak androgeny oraz estrogeny odgrywają jedną z kluczowych ról w patogenezie nowotworów piersi. Jednakże to naukowiec o nazwisku Schinzinger [25] w roku 1889 jako pierwszy postawił hipotezę mówiącą o hormonozależności nowotworów piersi, którą siedem lat później potwierdził Beatson przeprowadzając obustronną ovariectomię, czyli usunięcie jajników, u kobiety znajdującej się jeszcze w wieku przed menopauzalnym z nieoperacyjnym, nawracającym nowotworem tkanek miękkich piersi. Pacjentka ta po 8 miesiącach od operacji doświadczyła całkowitej reemisji choroby, co było wystarczającym dowodem potwierdzającym słuszność stanowiska obydwu naukowców.[26][27] Skorelowanie czynności jajników z przebiegiem choroby nowotworowej stanowiło kamień milowy w badaniach dotyczących guzów piersi, a lata 60-te XX wieku przyniosły kolejny przełom. Właśnie wtedy odkryto oraz opisano mechanizm łączenia się estradiolu z wewnątrzkomórkowym, białkowym receptorem, którym nazwany został receptorem estrogenowym (ER).[28] [29][30]

Obecnie wiadomo, iż ok. 95% nowotworów piersi, zarówno u kobiet, przed jak i po menopauzie, w swojej początkowej fazie ma charakter hormonozależny, gdzie hormon jakim jest estradiol odgrywa kluczową rolę w rozwoju oraz progresji guza. Prawdopodobnym jest, że kompleks hormonu oraz ER może pośredniczyć w aktywacji protoonkogenów oraz onkogenów, białek jądrowych, a także innych genów docelowych, a co z tym związane procesy wpływające na wewnątrzkomórkowe stężenia aktywnych biologicznie hormonów mogą mieć znaczący wpływ na etiologię choroby nowotworowej piersi.[31]

1.3.2 Biosynteza biologicznie aktywnych hormonów

Biosynteza biologicznie aktywnych hormonów zarówno androgenów jak i estrogenów w komórkach nowotworowych odbywa się z udziałem trzech głównych enzymów, którymi są: aromataza (Arom), dehydrogenaza 17 β -hydroksysteroidowa (17 β -HSD) oraz sulfataza steroidowa (STS) (**Schemat 1.1**).[32] Każdemu z tych enzymów przypisane jest odmienne zadanie. Mianowicie, aromataza odpowiedzialna jest za przekształcanie androgenów oraz testosteronu w estrogeny, 17 β -HSD redukuje estron (E1) do estradiolu (E2), siarczanu dehydroepiandrosteronu (DEHAS) do siarczanu androstendiolu, dehydroepiandrosteronu (DHEA) do androstendiolu oraz androstendion do testosteronu. Sulfataza steroidowa odpowiedzialna jest za konwersję siarczanu estronu (E1S) do estronu, siarczanu dehydroepiandrosteronu do DHEA oraz siarczanu androstendiolu do androstendiolu. Są to bardzo istotne transformacje, gdyż zmieniają charakter związku z charakteru hydrofilowego na hydrofobowy. Zgodnie z badaniami, w przeciwieństwie do estronu, E1S ma bardzo niskie powinowactwo do receptorów estrogenowych. Dodatkowo stężenie krążącego we krwi E1S jest 5-10 krotnie wyższe od sprzężonego z nim E1 oraz E1S jest swoistą rezerwą do tworzenia biologicznie aktywnych steroidów, gdyż ma dłuższy czas półtrwania we krwi niż E1 lub E2, ponieważ ma zdolność wiązania się z albuminami.

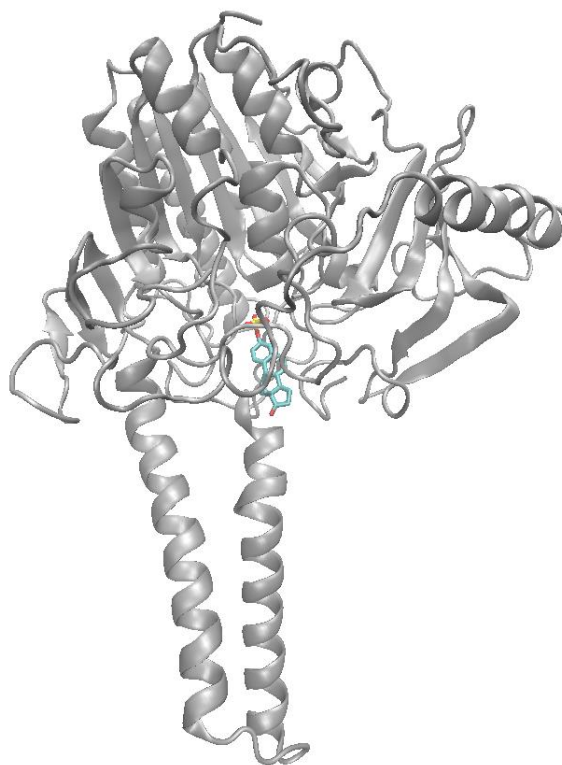


Schemat 1.1 Szlak biosyntezy biologicznie aktywnych hormonów (ST – sulfotransferaza steroidowa).

1.4 Sulfataza steroidowa

1.4.1 Sulfataza steroidowa – budowa, występowanie, charakterystyka

Sulfataza steroidowa (STS) (**Rys. 1.6**) jest enzymem odgrywającym kluczową rolę w biosyntezie steroidów w organizmie ludzkim. Jest ona odpowiedzialna za hydrolizę siarczanowych form hormonów, które są nieaktywne biologicznie, do ich biologicznie aktywnych pochodnych. [32][33]



Rys. 1.6 Struktura STS oraz jej naturalnego substratu (E1S) związanego w miejscu aktywnym enzymu.

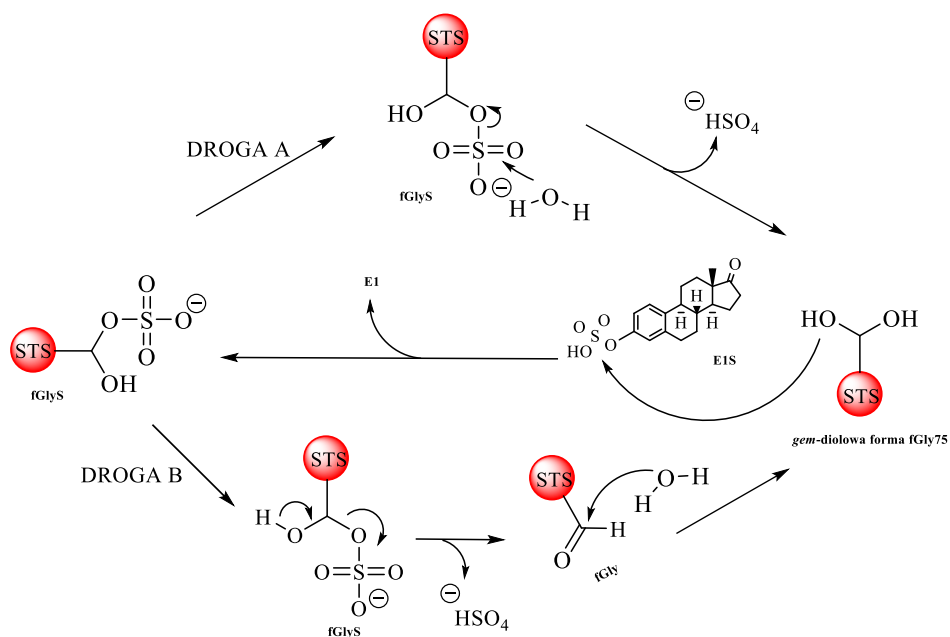
STS występuje powszechnie w całym organizmie, bowiem jest ona zaangażowana w liczne procesy fizjologiczne oraz patologiczne. Jej dystrybucja tkankowa różni się znacznie między odmiennymi gatunkami ssaków, jednak w przypadku ludzi najwyższą aktywność tego enzymu stwierdzono w łożysku. Odnaleźć można ją jednak jeszcze w nadnerczach, jajnikach, jądrach, prostatie, skórze czy też w mózgu.[34] Enzym ten znajduje się również w tkankach raka prostaty czy piersi oraz w nowotworowych liniach komórkowych np. LNCaP, DU-145, PC-3, MCF-7, JEG-3.[35]

W roku 2001 zespół Francisco G Hernandez-Gurmana jako pierwszy oczyścił, wykrył i scharakteryzował sulfatazę steroidową pochodzącą z ludzkiego łożyska.[36] Według tych naukowych doniesień STS jest glikozylowanym białkiem zbudowanym z 583 aminokwasów w tym 21 reszt N-końcowego peptydu sygnałowego.[37] Enzym ten jest integralnym białkiem błonowym, głównie związanym z retikulum endoplazmatycznym, ale mniejsze ilości powiązane są z aparatem Golgiego, otoczkami jądrowymi czy powierzchnią samej komórki.[35] STS kształtem swym przypomina „grzyba”, gdyż zbudowana jest z dwóch domen: globularnej części o charakterze polarnym oraz

hydrofobowej domeny w skład, której wchodzić dwie antyrównoległe helisy.[38] Najistotniejsza część tego enzymu, czyli jego miejsce aktywne zlokalizowane jest jednak na granicy tych dwóch domen i w jego skład wchodzi 9 istotnych reszt aminokwasowych, które biorą udział w odpowiedzi enzymatycznej: Asp35, Asp36, Arg79, Lys134, His136, His290, Asp342, Gln343 oraz Lys368. Jednak najważniejszym aminokwasem w rejonie katalitycznym jest bez wątpienia fGly75, która powstaje podczas posttranslacyjnej modyfikacji reszty cysteinowej.[39] To właśnie ona bierze bezpośredni udział w mechanizmie hydrolizy siarczanowych pochodnych steroidów, a w stanie wolnym fGly75 przybiera siarczanową *gem*-diolową formę, do której skoordynowany jest dwuwartościowy jon wapnia. Warto jest też zaznaczyć, że podczas procesu wiązania substratu do centrum aktywnego kluczową rolę mogą odgrywać następujące reszty aminokwasowe: Leu74, Arg98, Thr99, Val101, Leu103, Leu167, Val177, Phe178, Thr180, Gly181, Thr484 oraz Phe488. Rozpoznanie naturalnego substratu (np. E1S **Rys. 1.6** oraz **Rys. 1.8**) z wykorzystaniem wcześniej już wymienionych aminokwasów odbywać się może na drodze tworzenia szeregu oddziaływań elektrostatycznych i hydrofobowych.

1.4.2 Mechanizm działania sulfatazy steroidowej

Przypuszczalny mechanizm reakcji hydrolizy siarczanowych pochodnych steroidów z wykorzystaniem STS przedstawiony został na **Schemacie 1.2**. W proponowanym mechanizmie reakcji enzymatycznej mogą występować dwie odmienne ścieżki. Ścieżka A rozpoczyna się od degradacji *O*-siarczanowej *gem*-diolowej pochodnej formyloglicyny (fGlyS) poprzez nukleofilowy atak cząsteczki wody na atom siarki, w wyniku czego uzyskiwana jest jej *gem*-diolowa forma. Początek ścieżki B ma miejsce w momencie odejścia anionu wodorosiarczanowego od cząsteczki fGlyS. W wyniku tego otrzymywana jest fGly, która w wyniku działania cząsteczki wody, zostaje przekształcana w swoją *gem*-diolową formę. Odtworzenie fGlyS odbywa się poprzez reakcję S_N2 fGly75 na swój naturalny substrat, np. E1S, w wyniku czego uwolniona zostaje niesiarczanowa pochodna steroidowa (np.E1).[40]



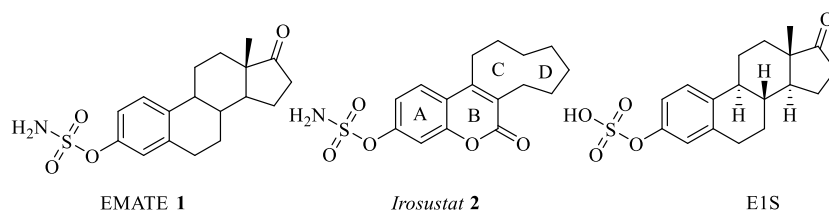
Schemat 1.2 Proponowany mechanizm hydrolizy siarczanowych pochodnych steroidów z wykorzystaniem STS.

1.4.3 Inhibitory sulfatazy steroidowej

Jednym z podejść w leczeniu hormonozależnych nowotworów piersi jest stosowanie inhibitorów zapobiegającym syntezie estrogenów w tkankach obwodowych.[39] W ostatnich latach wiele grup badawczych podejmowało ten temat w swoich badaniach naukowych czego skutkiem jest opracowanie bogatej biblioteki związków wykazujących właściwości inhibicyjne w stosunku do STS. Jednak czynnikiem limitującym zastosowanie tych substancji w praktyce klinicznej są występujące często liczne skutki uboczne, w tym estrogenowe właściwości metabolitów prowadzące do stymulacji wzrostu guza.

Podjęcie do projektowania skutecznych inhibitorów STS obejmuje trzy różne kategorie związków: alternatywne substraty, inhibitory odwracalne i inhibitory nieodwracalne. Innym podziałem, który można zastosować w przypadku inhibitorów STS jest wyodrębnienie pochodnych o rdzeniu steroidowym oraz niesteroidowym.

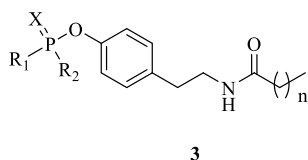
Początkowy rozwój inhibitorów STS opierał się na syntezie analogów steroidowych. Najbardziej znaczący przełom w procesie projektowania tych struktur nastąpił podczas zamiany grupy siarczanowej, naturalnie wstępującej w siarczanie estronu, na grupę amidosiarczanową. Otrzymanie związku zawierającego w swojej konstytucji właśnie to ugrupowanie stało się kamieniem milowym w rozwoju pochodnych wykazujących wysoce inhibicyjną aktywność wobec STS. Jedną z pierwszych pochodnych tego typu był EMATE **1** (**Rys. 1.7**). Hamował on działanie enzymu w komórkach MCF-7 z wartością IC_{50} na poziomie 65 pM.[41] Niemniej jednak, zastosowanie tego związku jako środka terapeutycznego w leczeniu nowotworów hormonozależnych okazało się ograniczone ze względu na bardzo silne właściwości estrogenowe jego metabolitu.



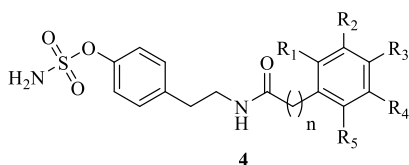
Rys. 1.7 Struktura chemiczna EMATE 1, *Irosustatu 2* oraz E1S.

W celu uniknięcia potencjalnych ograniczeń wynikających ze stosowania inhibitorów STS opartych o rdzenie steroidowe, zaprojektowano i otrzymano szereg związków będących niesteroidowymi pochodnymi zawierającymi ugrupowanie amidosiarczanowe. Teoretycznie, pozwala to unikać niebezpieczeństwa związanego z ewentualnymi cechami estrogenowymi ich metabolitów, jednak może również powodować zmniejszenie zdolności wiązania tych pochodnych w miejscu aktywnym enzymu. W literaturze odnaleźć można inhibitory o rdzeniach tyraminy, triazolu, bifenylu, flawonu, kumaryny i wielu innych, które zostały opisane jako silne inhibitory STS.[42] Spośród tej grupy bardzo obiecujące wyniki uzyskały pochodne kumarynowe, zaprojektowane w grupie badawczej prof. Pottera. Zastosowali oni bowiem modyfikacje struktury polegającej na wprowadzeniu dodatkowego pierścienia alifatycznego, w wyniku czego uzyskali szereg pochodnych trójcyklicznych, których rdzenie strukturalnie naśladowały pierścienie ABC naturalnego substratu E1S. Przykładem takiego związku był *Irosustat 2* (**Rys. 1.7**) znany również pod nazwą 667-COUMATE lub STX-64. Związek ten dotarł do drugiej fazy badań klinicznych, jednak do chwili obecnej na rynku farmaceutycznym nie znajduje się żaden inhibitor STS.

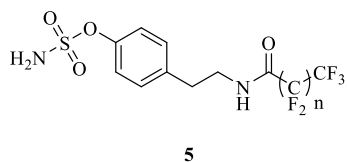
W ostatnich latach w zespole dr hab. inż. Sebastiana Demkowicza z Katedry Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej, prowadzono szeroko zakrojone badania nad syntezą nowych cząsteczek, które charakteryzować się miały wysoką aktywnością inhibicyjną wobec STS. Przez ponad dekadę stworzono bogatą bibliotekę związków, które w swojej strukturze zawierały farmakofory fosforanowe, amidofosforanowe, tiofosforanowe, amidotiofosforanowe oraz amidosiarczanowe, które miały brać udział w mechanizmie deaktywacji enzymu. Ponadto, związki te w swojej konstytucji zawierały różnego rodzaju rdzenie takie jak: rdzeń tyraminowy[43][44], flawonowy, *bis*-flawonowy[45], kumarynowy[46]–[50], *bis*-kumarynowy[51], bifenylowy, *bis*-bifenylowy[52] czy triazolowy[53]. Ogólne struktury tych pochodnych zostały przedstawione na **Rys. 1.8**.



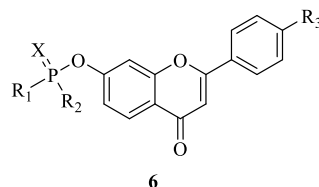
$R_1/R_2 = \text{OH}, \text{NH}_2, \text{OCH}_3, \text{X} = \text{S}, \text{O}, n = 10/11/12$



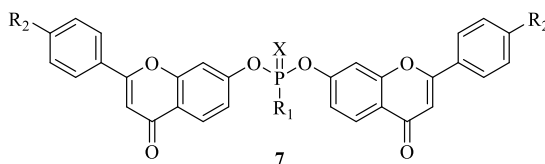
$R_{1-5} = \text{H}, \text{F}, \text{CF}_3, \text{OCF}_3, \text{NO}_2, n = 0/1$



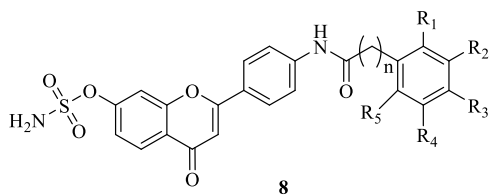
$n = 8/9$



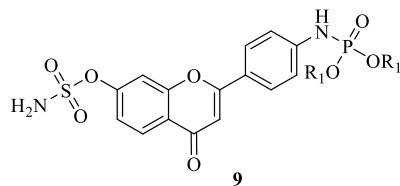
$R_1 = \text{OCH}_3, \text{OH}, \text{Cl}, R_2 = \text{OCH}_3, \text{OH}, \text{X} = \text{S}, \text{O},$
 $R_3 = \text{H}, \text{F}, \text{CH}_3, \text{CF}_3$



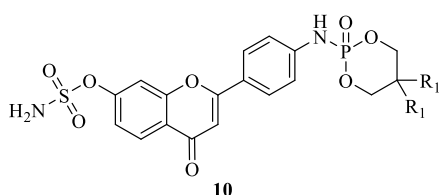
$R_1 = \text{OCH}_3, \text{OH}, \text{Cl}, \text{X} = \text{S}, \text{O},$
 $R_2 = \text{H}, \text{F}, \text{CH}_3, \text{CF}_3$



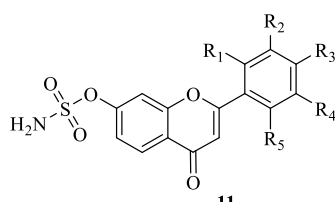
$R_{1-5} = \text{H}, \text{F}, \text{CF}_3, \text{OCH}_3, \text{NO}_2$
 $n = 0/1$



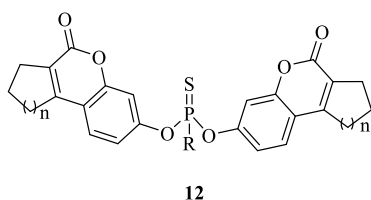
$R_1 = \text{CH}_3, \text{CH}_3\text{CH}_2, (\text{CH}_3)_3\text{CH}, \text{CH}_3(\text{CH}_2)_3, \text{Ph}, \text{Bn}$



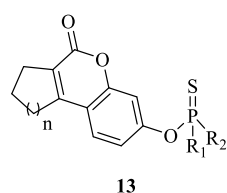
$R_1 = \text{H}, \text{Me}$



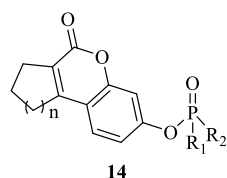
$R_{1-5} = \text{H}, \text{F}, \text{CF}_3, \text{OCF}_3$



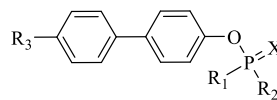
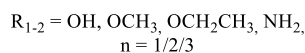
$R = \text{Cl}, \text{OH}, \text{OCH}_3, \text{NH}_2$
 $n = 1/2/3$



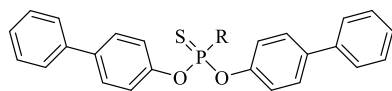
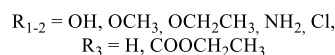
$R_1 = \text{Cl}, \text{NH}_2, \text{OH},$
 $R_2 = \text{OCH}_3, \text{OCH}_2\text{CH}_3, \text{NH}_2$
 $n = 1/2/3$



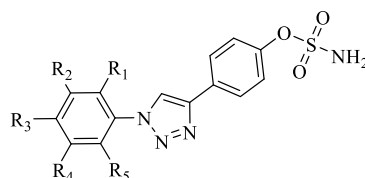
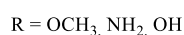
14



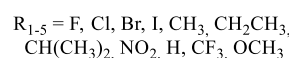
15



16



17



Rys. 1.8 Inhibitory STS otrzymane w zespole dr hab. inż. Sebastiana Demkowicza w Katedrze Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej.

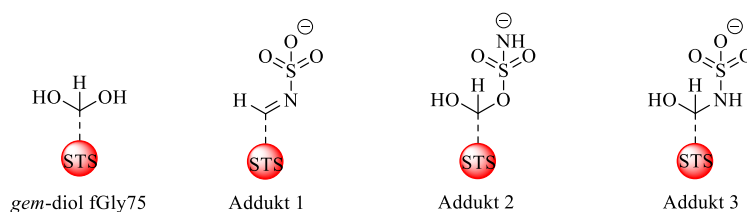
Jedna z najnowszych prac zespołu dr hab. inż. Sebastiana Demkowicza, pochodząca z 2022, dotyczyła sulfamoiowych pochodnych 4-(1-fenyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)fenolu (Struktura 17, Rys. 1.8). Związki opisane w tej pracy charakteryzowały się bardzo dobrymi właściwościami inhibitoryjnymi STS zarówno w testach enzymatycznych jak i komórkowych, z użyciem linii komórkowej ludzkiego raka piersi (MCF-7). Związek, który zawierał trzy podstawniki fluorowe (Rys 1.8 R_1 , R_2 oraz R_3), wykazał najlepsze z całej grupy badanych cząsteczek właściwości hamujące działanie enzymu STS. Jego wartość IC_{50} w porównaniu ze związkiem referencyjnym, jakim był *Irosustat*, była pięciokrotnie lepsza (0,21 vs 1,06 nM). Te bardzo dobre wyniki testów *in vitro* skłoniły naukowców do przeprowadzenia dalszych badań, konsekwencją czego było zbadanie pięciu najlepiej rokujących pochodnych w testach *in vivo* wykorzystujących myszy model raka gruczołu sutkowego 67NR. Najwyższą aktywność przeciwnowotworową wykazał związek z dwoma atomami chloru w swojej budowie w położeniu R_2 oraz R_4 . Zahamował on bowiem wzrost guza o 51% przy dawkowaniu równym 50 mg/kg. Dodatkowo, co bardzo ważne, związek ten nie wykazał żadnych skutków ubocznych oraz nie był toksyczny.[53]

1.4.4 Mechanizm inhibicji sulfatazy steroidowej z wykorzystaniem amidosiarczanów

Mechanizm działania sulfatazy steroidowej do tej pory został dobrze poznany w przeciwieństwie do sposobu inhibicji tego enzymu z wykorzystaniem amidosiarczanowych pochodnych. Przez lata wiele grup badawczych starało się odkryć sposób w jaki amidosiarczanowy farmakofor blokuje działanie STS. Postulowano kilka mechanizmów, jednak ostatecznie, żaden z nich nie został definitywnie udowodniony. Wczesne prace, również ta pochodząca z roku 2000 autorstwa Woo i współpracowników, sugerowała znaczący udział reszty lizyny oraz histydyny w mechanizmie reakcji enzymatycznej, której końcowym produktem miał być ten zawierający podstawniki amidosiarczanowe na wyżej wymienionych resztach aminokwasowych.[54] Z czasem jednak uznano, że najbardziej istotny w procesie inhibicji jest udział reszty aminokwasowej fGly75. Dokonano tego między innymi na podstawie badań dokowania molekularnego, gdzie zauważono niewielką odległość pomiędzy wcześniej już wymienioną resztą fGly75, zarówno w formie uwodnionej jak i aldehydowej, a resztą

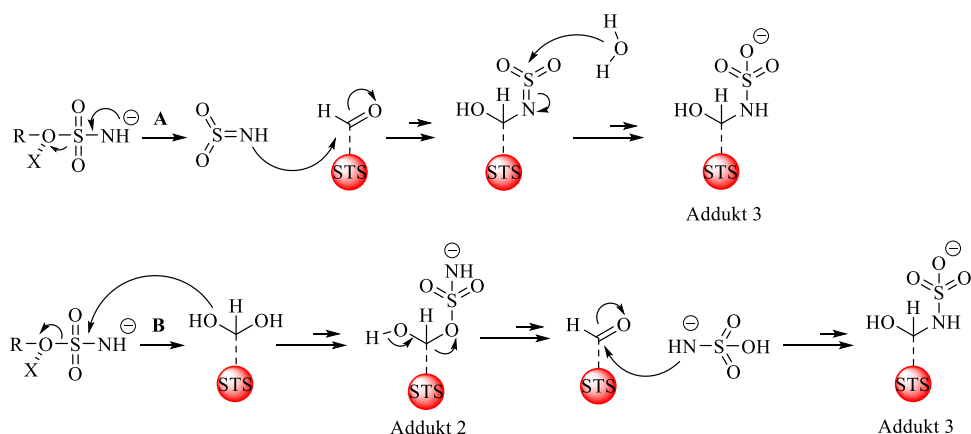
sulfamoiłową *Irosustatu* oraz innych potencjalnych inhibitorów STS.[55] Warto jednak zaznaczyć, że wszelkiego rodzaju badania, które nie są prowadzone *in silico* są utrudnione ze względu na budowę samego enzymu, a dokładnie jego połączenia z błoną oraz to, że może być ona heterogenicznie glikozylowana. Jest to swoistego rodzaju utrudnieniem podczas próby krystalizacji tego enzymu po jego dezaktywacji, dlatego wiele testów prowadzone było z wykorzystaniem bakteryjnej arylosulfatazy *Pseudomonas aeruginosa* (PaAtsA), z tego względu, iż ona również odpowiada za hydrolizę arylowych siarczanów i może być uznawana za odpowiednik ludzkiej sulfatazy. Wykorzystanie tego modelu wniosło wiele cennych informacji między innymi to, że inaktywacja z wykorzystaniem amidosiarczanów zależna jest od czasu oraz stężenia, a mechanizm z ich użyciem jest nieodwracalny. Stan ten powiązany jest z rozerwaniem wiązania ArO-S, zachodzącym podczas reakcji z fGly75. Dodatkowo, w tym czasie zachodzi zjawisko odwracalnego „multisulfonowania” STS, które polega na przeniesieniu od 3 do 6 grup amidosiarczanowych na reszty aminokwasowe lizyny i histydyny znajdujące się w centrum aktywnym. Fakt ten opisany został dość szczegółowo w pracy autorstwa Williamsona.[56]

Ogromny wkład naukowy w poznanie mechanizmu inaktywacji sulfatazy steroidowej włożył angielski uczone Barry Potter wraz ze swoim zespołem. Udało się im otrzymać kryształ PaAtsA wraz z zainkludowanym *Irosustatem*, który w tym eksperymencie całkowicie zahamował działanie enzymu. Badania wykorzystujące techniki biologii strukturalnej, które przeprowadzono dowiodły występowaniu zmienionej gęstości elektronowej w okolicy fGly75, co ciekawe bez jakichkolwiek modyfikacji w obrębie lizyny czy histydyny, jak wcześniej sugerował Woo czy w później Bojarov. Dodatkowo, udało się ustalić za pomocą badań rentgenograficznych, że gęstość ta przyjmuje kształt tetragonalny, a jedna z grup OH jest wolna. Na podstawie powyższych informacji udało się przedstawić trzy propozycje trwałych, kowalencyjnych połączeń fGly75 z resztą amidosiarczanową **Rys. 1.9**.



Rys. 1.9 Formyloglicyna75 w *gem*-diolowej oraz proponowane połączenia fGly57 wraz z resztą amidosiarczanową po zajściu inhibicji w centrum aktywnym enzymu.

Wyróżnić tutaj można było jako pierwszy Addukt 1 (**Schemat 1.3**), który jest *N*-siarczanem iminy. Struktura ta początkowo została zaproponowana przez Williamsona, jednak w świetle dodatkowych informacji między innymi obecność wolnej grupy OH w produkcie inhibicji, należało odrzucić tę propozycję. Kolejną możliwością był Addukt 2 (**Schemat 1.3**), gdzie występuje wiązanie tlen-siarka, a w Addukcie 3 (**Schemat 1.3**), można wyróżnić wiązanie typu azot-siarka. Wykorzystując jedynie dane krystalograficzne, nie da się z całą pewnością ustalić, czy ma się do czynienia z Adduktem 2 czy 3 jednak na podstawie rozważań teoretycznych można było wnioskować, że połączenie przez atom tlenu jest niekorzystne z energetycznego punktu widzenia. Warto jest również zaznaczyć, że zarówno Addukt 2 jak i 3 występują w połączeniu z *gem*-diolową formą fGly, co oznacza, że obecna jest tam jedna wolna grupa hydroksylowa. Podsumowując, korzystając z powyższych rozważań najbardziej prawdopodobną formą biorącą udział w dezaktywacji STS jest Addukt 3.[57]



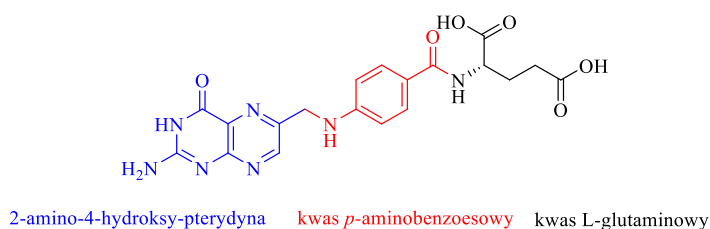
Schemat 1.3 Dwie alternatywne możliwości mechanizmu inhibicji STS.

Na podstawie powyższych informacji zaproponowano dwa możliwe mechanizmy inhibicji STS, które zaprezentowano na **Schemacie 1.3**. Znajdują się tam dwie alternatywne ścieżki. Ścieżka A rozpoczyna się od przekształcenia ugrupowania amidosiarczanowego zawartego w inhibitorze. Aktywacja ta ma charakter katalityczny, gdyż biorą w niej udział reszty aminokwasowe budujące centrum aktywne enzymu. To one oddziałując na inhibitor wymuszają powstanie sulfonyloaminy, która następnie przeprowadza atak na karbonylowy atom węgla. Powstały w ten sposób produkt pośredni podatny jest na nukleofilowy atak cząsteczki wody w wyniku którego powstaje produkt finalny. Ścieżka B początek swój ma w momencie ataku wolnej pary elektronowej pochodzącej z grupy hydroksylowej *gem*-diolowej formy fGly75 na atom siarki znajdujący się w farmakoforze inhibitora. W taki oto sposób powstaje Addukt 2, który ulega wewnątrzcząsteczkowemu transferowi atomu wodoru, czego konsekwencją jest powstanie cząsteczki sulfonoamidu w formie zjonizowanej. Dodatkowo w ten sposób odtwarzana jest aldehydowa forma fGly, która ulega reakcji z nowo powstałym anionem tworząc finalnie Addukt 3.[57]

1.5 Kwas foliowy

1.5.1 Charakterystyka kwasu foliowego

Właściwości fizjologiczne kwasu foliowego (FA) zostały odkryte już w latach 30-tych XX wieku przez badaczkę Lucy Wills. Zajmowała się ona badaniami kobiet w ciąży oraz tropikalnej anemii i dokonała kluczowej obserwacji podczas próby leczenia tych schorzeń dietą wzbogaconą o drożdże piwowskie oraz wątrobę, co później doprowadziło do identyfikacji kwasu foliowego jako bardzo istotnego składnika odżywczego.[58] Jednak dopiero w roku 1941 zespołowi H. K. Mitchella udało się wyizolować kwas foliowy z liści szpinaku na drodze ekstrakcyjnej.[59] Tutaj właśnie można doszukiwać się etymologii nazwy tego związku chemicznego, gdyż „folic” pochodzi od łacińskiego słowa *folium*, czyli liść. Innymi historycznymi nazwami FA, które warto wymienić są to czynnik *L. casei*, witamina Bc ze względu na badania przeprowadzane na kurczętach czy witamina M po eksperymentach przeprowadzanych na małpach.[60] W połowie lat 40-tych zespołowi biochemików nazywanych „chłopcami od kwasu foliowego” pracujących w laboratorium Lederle'a w Pearl River udało się zsyntezować kwas foliowy w jego krystalicznej formie, co umożliwiło szczegółową ocenę właściwości fizykochemicznych tego związku.[61]



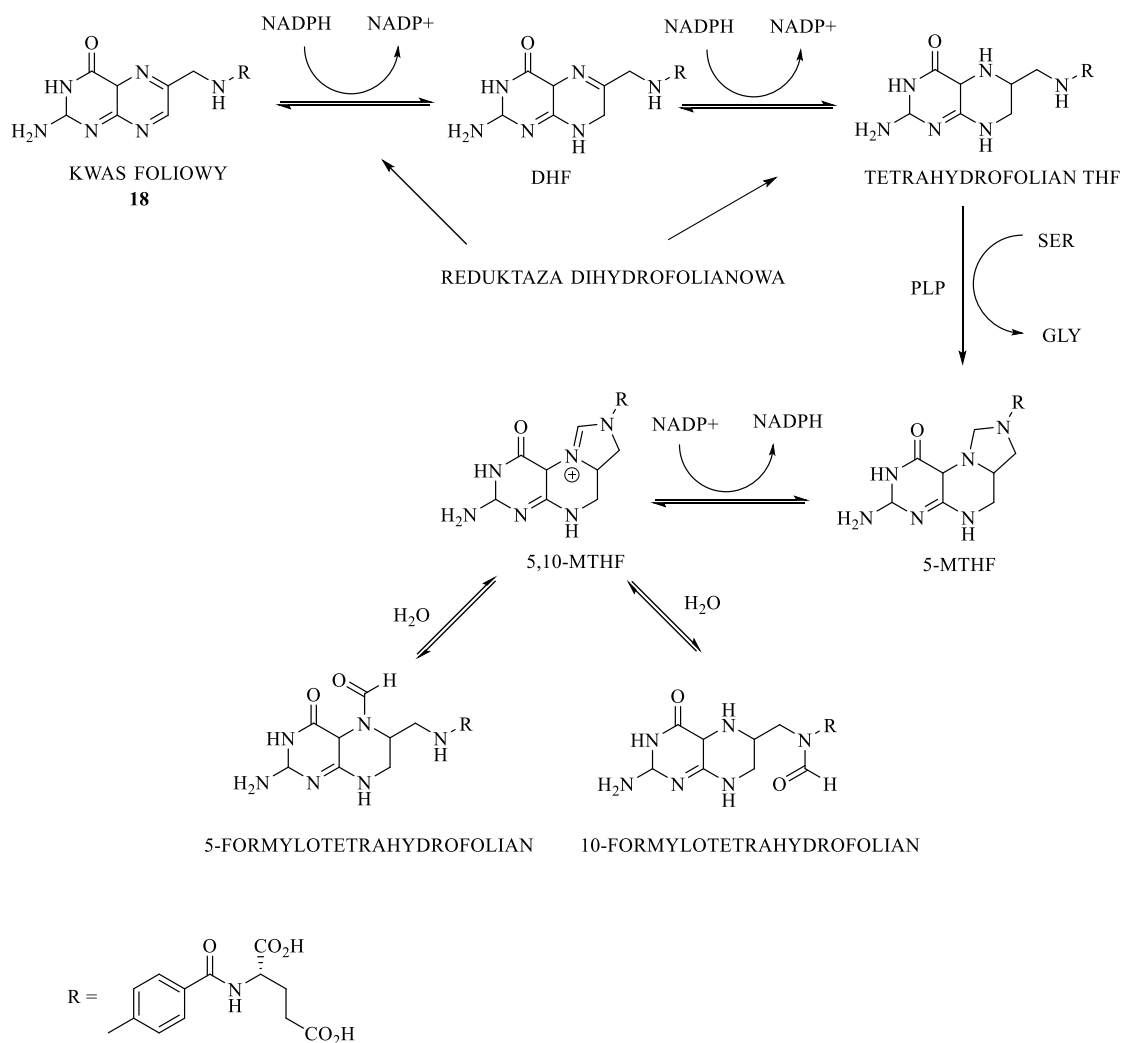
18

Rys. 1.10 Struktura chemiczna kwasu foliowego 18.

Kwas foliowy 18 (FA) (Rys. 1.10) znany jest również jako rozpuszczalna w wodzie witamina B9 lub jako kwas *N*-[*p*-{[(2-amino-4-hydroksy-6-ptyrydynylo)metylo]amino}benzoilo]-L-glutaminowy. Częsteczka FA składa się z reszty 2-amino-4-hydroksy-ptyrydyny, która połączona jest mostkiem metylenowym C(9)-N(10) z fragmentem pochodzącym od kwasu *p*-aminobenzoesowego, który kolejno przez wiązanie amidowe połączony jest z resztą kwasu L-glutaminowego. FA zaliczany jest do dość obszernej grupy związków jaką są foliany. Zbiór ten zawiera w sobie wiele form kwasu foliowego i powiązanych z nim związków. Wymienić tutaj można m.in. dihydrofolian (DHF), tetrahydrofolian (THF), 5,10-metylenohydrofolian (5,10-MTHF), 5-metylenotetrahydrofolian (5-MTHF), kwas lewofolinowy, folacyna, pochodne mono czy poliglutaminowe.

Jedną z podstawowych, a za razem bardzo ważną informacją na temat FA, jest to, iż nie jest on syntezowany w organizmie człowieka *de novo*. Jednak bakterie bytujące w jelitach ludzkich są go w stanie wytworzyć w dość niewielkich ilościach. Z tego powodu głównym źródłem folianów jest dieta, a w szczególności warzywa liściaste takie jak szpinak, sałata czy kapusta oraz żółtka jaj, drożdże piwowskie czy wątroba. Warto jednak zaznaczyć, że syntetyczna forma kwasu foliowego charakteryzuje się większą stabilnością termiczną niż naturalnie występujące foliany i właśnie z tego powodu w wielu krajach produkty, takie jak chleb, makaron, ryż czy płatki śniadaniowe, są sztucznie wzbogacane o tę witaminę.[62]

Co więcej, kwas foliowy w organizmach ssaków redukowany jest do tetrahydrofolianu przez reduktazę dihydrofolianową w dwóch etapach, przy użyciu NADPH jako kofaktora. Późniejsza transformacja tetrahydrofolianu prowadzi do powstania 5,10-MTTHF, 5-formylotetrahydrofolianu (5-formylo-THF) oraz 10-formylotetrahydrofolianu (10-formylo-THF). Ta biotransformacja przedstawiona została na **Schemacie 1.4** i jest ona bardzo istotna ze względu na fakt, że wszystkie funkcje biologiczne są wykonywane przez tetrahydrofolian oraz jego pochodne, a nie przez sam kwas foliowy.



Schemat 1.4 Biotransformacja kwasu foliowego w organizmach ssaków.

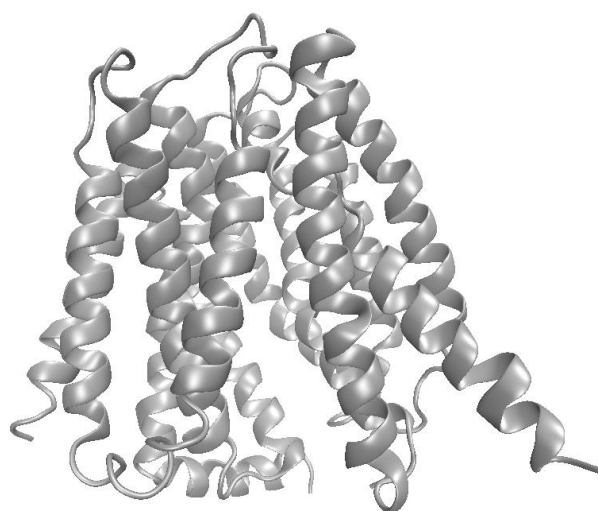
Ponadto, kwas foliowy pełni różnego rodzaju istotne funkcje w ludzkim organizmie, między innymi jest ważnym kofaktorem w metabolizmie jednowęglowym (z ang. *one-carbon metabolism*) oraz bierze udział w biosyntezie podstawowych składników kwasów nukleinowych tj. puryn i tymidyn. Co więcej, jest on pośrednio zaangażowany w proces metylacji DNA, białek, neuroprzekaźników czy lipidów.[62][63] Ważny jest również fakt, iż z niedoborem kwasu foliowego wiązane są negatywne skutki zdrowotne w tym wady cewy nerowej, choroby układu krążenia czy nowotwory.[62]

1.5.2 Transport folianów w organizmach ludzkich

Foliany w organizmie ludzkim występują w formie wysoce hydrofilowych cząsteczek, przez co nie są w stanie w łatwy sposób dyfundować przez błony biologiczne.[64] Z tego powodu muszą one wykorzystywać specjalnego rodzaju systemy transportowe, aby dostać się do wnętrza komórek. Korzystają one w tym celu z: zredukowanych transporterów folianów (z ang. *Reduced Folate Carrier* (RFC)), receptorów folianów (z ang. *Folate Receptors* (FR)) oraz transporterów folianów sprzężonych z protonem (z ang. *Proton-Coupled Folate Transporter* (PCFT)).[65]

1.5.2.1 Zredukowane transportery folianów

Do tej pory najlepiej poznaną grupą nośników pochodnych kwasu foliowego są zredukowane transportery folianów RFC (**Rys. 1.11**). Należą one do rodziny MFS (z ang. *Major Facilitator Superfamily*) będących białkami transportującymi substancje rozpuszczone. Ponadto, RFC są głównym szlakiem dostarczania folianów z surowicy oraz przestrzeni pozakomórkowej do większości komórek. Występują one powszechnie w łożysku, białych krwinkach, nerkach, płucach, szpiku kostnym, hepatocytach, jelicie cienkim, okrężnicy, komórkach nabłonkach splotu naczyniówkowego czy w błonie podstawno-bocznej nabłonka kanalików nerwowych.[66]

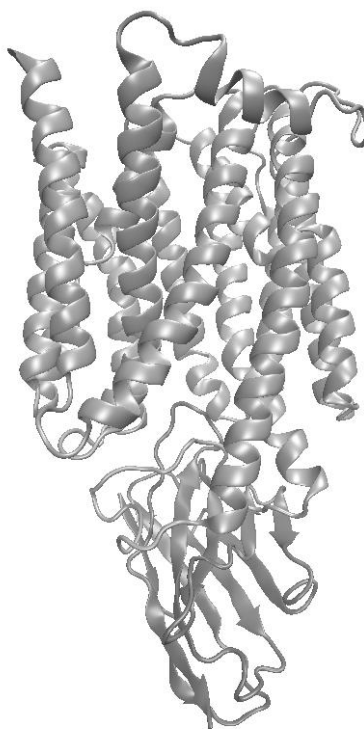


Rys. 1.11 Struktura krystalograficzna RFC.

Czwartorzędowa struktura białka RFC charakteryzuje się obecnością 12 domen transbłonowych, gdzie zarówno C- jak i N-końce są skierowane do cytoplazmy. Ponadto, każda z tych domen funkcjonuje jako niezależna jednostka transmembranowa, a w 4, 5, 7, 8, 10 oraz 11 domenie znajdują się aminokwasy zawierające reszty tiolowe, które prawdopodobnie odpowiadają za tworzenie „kieszeni” wiążącej substraty.[67] Warto zaznaczyć, że RFC ma niskie powinowactwo do kwasu foliowego w porównaniu do jego zredukowanych metabolitów, gdzie powinowactwo to jest 50 do 100 razy wyższe w przypadku tych drugich. Bardzo istotną informacją jest również to, że optimum działania tego transportera to pH ok. 7, a obniżenie tej wartości powoduje zmniejszenie transportu za pośrednictwem RFC, stając się niemal niemożliwym przy pH poniżej 6,0-6,5, z wyjątkiem przypadków nadekspresji tego białka.[68]

1.5.2.2 Protonowe transportery folianów

W 2006 roku po raz pierwszy opisane zostały protonowe transportery folianów PCFT (**Rys. 1.12**).[66] Jest to białko zawierające dwanaście domen transmembranowych z C- oraz N-końcami zorientowanymi do cytoplazmy i dużą glikozylowaną pętlą zewnątrzkomórkową.[69] W odróżnieniu od RFC optimum pH działania tego nośnika znajdują się w przedziale od 5,5 do 7,3, a powyżej tej wartości transport z wykorzystaniem tego nośnika nie ma już miejsca. [70]

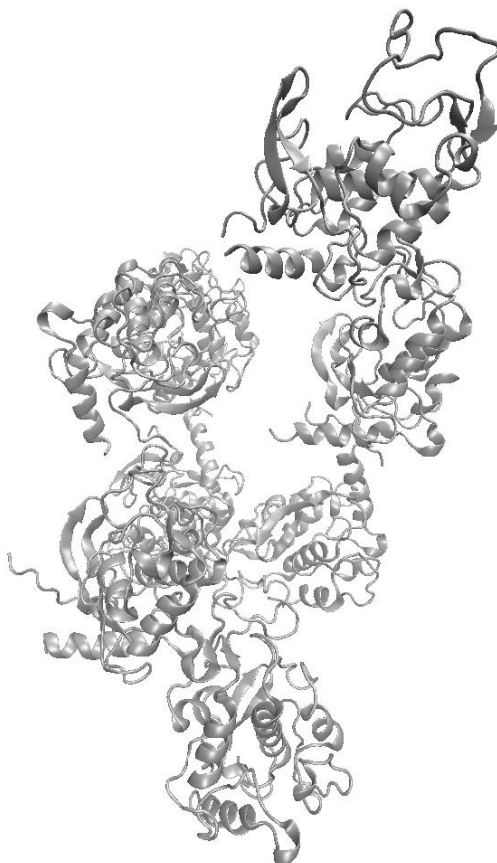


Rys. 1.12 Struktura krystalograficzna PCFT.

Istotnym faktem jest również to, iż przenoszenie to odbywa się na drodze symportu folianowo-protonowego, czyli transportu aktywnego, w trakcie którego cząsteczce (w postaci dwuwartościowego anionu folianowego) przechodzącej przez błonę towarzyszą dwa protony. Cechą łączącą PCFT z RFC jest stereospecyficzność dla zredukowanych folianów, a w tym przypadku najwyższy poziom powinowactwa występuje do 5-formylotetrahydrofolian.[66] Ponadto, wysoka ekspresja PCFT występuje w enterocytach, (najwyższa w proksymalnym odcinku jelita czczego oraz dwunastnicy), kanalikach nerkowych, hepatocytach, łożysku i siatkówce.[71] PCFT można również odnaleźć w jelicie ślepym i okrężnicy, jadrach, mózgu, płucach czy żołądku, ale już w znacznie mniejszych ilościach. [72] W proksymalnym odcinku jelita czczego, gdzie wchłanianie folianów jest na najwyższym poziomie, występują jelitowe wymienniki sodowo-protonowe (wymienniki NHE) i to właśnie one odpowiadają za generowanie pH 5,8-6,0, które jak już wspomniano jest optymalne dla PCFT.[65]

1.5.2.3 Receptory kwasu foliowego

Receptory kwasu foliowego w organizmie ludzkim występują w postaci trzech izoform: α , β oraz γ . Są to bogate w cysteinę glikoproteiny, które od 70 do 80% posiadają taką samą sekwencję reszt aminokwasowych, jednak podtypy te różnią się między sobą wzorcami ekspresji.[73]

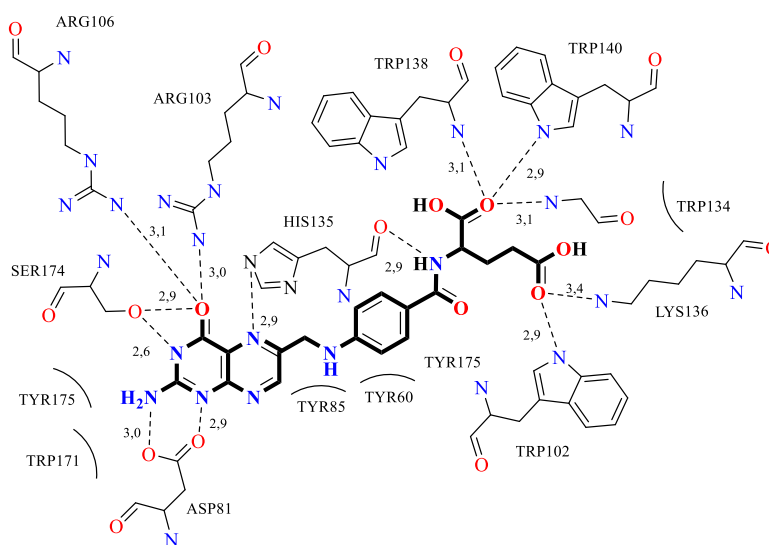


Rys. 1.13 Struktura krystalograficzna FR.

Ponadto, charakteryzują się one wysokim powinowactwem do kwasu foliowego oraz 5-metylotetrahydrofolianu, a niższym do innych, zredukowanych pochodnych folianów. Transport aktywny z wykorzystaniem tych nośników odbywa się na drodze endocytozy, a warunkami optymalnymi dla działania tych jednostek jest pH równe bądź wyższe od 5. Dodatkowo, wewnątrzkomórkowe, kwaśne środowisko endosomu wpływa korzystnie na uwalnianie folianów, które następnie dostają się do cytoplazmy z wykorzystaniem PCTF.[63]

W 2013 w czasopiśmie *Nature* ukazał się artykuł naukowy autorstwa Chena oraz współpracowników opisujący rozpoznanie kwasu foliowego przez jego receptory na podstawie budowy strukturalnej FR α (**Rys. 1.13**), która cechuje się globularną budową, w skład której wchodzi cztery długie α -helisy ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$), dwie krótkie ($\alpha 4$, $\alpha 5$) oraz cztery krótkie β -kartki ($\beta 1-4$) oraz wiele regionów pętli. Sama struktura trzeciorzędowa FR α jest stabilizowana poprzez występowanie ośmiu wiązań disiarczkowych pochodzących od szesnastu reszt cysteinowych. Wyróżnić tutaj można trzy prawdopodobne miejsca glikozylacji i są to Asn47, Asn139 oraz Asn179. Najistotniejszym jednak miejscem tego receptora jest obszar wiązania folianów, który przyjmuje kształt długiej kieszeni. Tylne części miejsca aktywnego tworzona

jest przez helisy $\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$ oraz pętle amino-końcową. Z kolei $\beta 1$ oraz $\beta 2$ zamykają tę kieszeń od dołu, a pętle $\alpha 1$ - $\alpha 2$ oraz $\alpha 3$ - $\alpha 4$ od lewej oraz górnej części. Po prawej stronie znajdują się $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 3$ oraz $\beta 4$. [63] Częsteczka kwasu foliowego znajdująca się w miejscu aktywny zorientowana jest w ten sposób w przestrzeni, że jego pterydynowa część zadokowana jest głęboko w ujemnie naładowanej części tej kieszeni, a część glutaminowa wystaje z dodatnio naładowanego fragmentu. Naukowcom udało się również zaobserwować wyraźną gęstość elektronową dla kwasu foliowego oraz otaczających go reszt aminokwasowych, co z kolei pozwoliło na dokładne ustalenie oddziaływań występującymi pomiędzy tymi dwoma strukturami. Wyróżnić tutaj można wiązania wodorowe jak i oddziaływania hydrofobowe, które występują w odniesieniu zarówno do części pterydynowej, jak i tej pochodzącej od kwasu *p*-aminobenzoowego. Po pierwsze bicykliczny pierścień pterydynowy ułożony jest pomiędzy równoległymi łańcuchami bocznymi Tyr85 oraz Trp171, dodatkowo mając po swojej lewej stronie resztę Tyr175. Po drugie, atomy azotu oraz tlenu, pochodzące z tej części cząsteczki, tworzą dość liczne oddziaływania wodorowe między innymi z grupą karboksylową pochodzącą z Asp81, z grupą hydroksylową Ser174, z resztami guanidowymi Arg103 oraz Arg106 oraz z łańcuchem bocznym His135. Kolejno warto nadmienić, że reszta His135 stabilizuje również wiązanie peptydowe, oddziałując na znajdujący się tam atom azotu. Następne rozległe interakcje obserwuje się w obrębie reszty kwasu glutaminowego i są to oddziaływania z resztami takimi jak: Trp138, Trp140, Lys136, Gly137 i Trp102. Wszystkie te oddziaływania przedstawione zostały na **Rys 1.14**. Udowodniono również, że najczęstszy metabolit kwasu foliowego, czyli 5-metylotetrahydrofolian, dokuje się w centrum aktywnym FR w bardzo podobny sposób zachowując podstawowy mechanizm rozpoznawania FA przez FR. [63]



Rys. 1.14 Oddziaływania pomiędzy FA a resztami aminokwasowymi w centrum aktywnym FR α .

Warto zaznaczyć, że wśród trzech izoform to podtyp α występuje najczęściej w ludzkim organizmie, jednak bardzo istotną informacją jest to, iż w normalnych, zdrowych tkankach poziom jego ekspresji jest dość niski. Receptor ten odnaleźć można w komórkach nabłonkowych łożyska, piersi, płuc, kanalików prokatalinowych nerek, splotu naczyniówkowego, jajników, macicy, szyjki macicy i gruczołów ślinowych. [74]–[76] Z kolei, podtyp β ulega ekspresji w łożysku i dojrzałych komórkach mielomonocytnych. [77]–[79], a FR γ tylko w komórkach limfoidalnych. [80]

1.5.3 Receptory kwasu foliowego a nowotwory piersi

Receptory kwasu foliowego okazały się w ostatnich latach niezwykle interesującym celem molekularnym w kontekście wykorzystania ich jako potencjalnych transporterów związków przeciwnowotworowych. Zastosowanie receptorów kwasu foliowego jako transporterów leków, jest związane z różnym poziomem ich ekspresji zarówno w zdrowych tkankach jak i tych zmienionych nowotworowo. Temat ten został zgłębiany przez wykonanie znacznej ilości badań z wykorzystaniem m.in. technik immunohistochemii z użyciem przeciwciał monoklonalnych, testów wiązania ligandów folianowych, pomiaru poziomów mRNA za pomocą qPCR i cytometrii przepływowej. Badania te wykazały, że ekspresja FR α w normalnych tkankach ograniczona jest jedynie do powierzchni luminalnej nerek, jelit, płuc, siatkówki, łożyska oraz spłotu naczyniowego i znajduje się ona na dość niskim poziomie. Dodatkowo, bardzo istotnym faktem jest to, iż we wszystkich normalnych tkankach, z wyjątkiem nerek, receptory te ograniczają się do apikalnej powierzchni komórek nabłonka, która nie ma bezpośredniego kontaktu z naczyniami krwionośnymi, w których mogą krążyć foliany czy inne środki mogące wykorzystać tę drogę transportu.[81] W przeciwieństwie do lokalizacji receptorów kwasu foliowego w tkance prawidłowej, w wielu typach nowotworów nabłonkowych FR α ulega wysokiej ekspresji. Komórki nowotworowe charakteryzują się również utratą polaryzacji, na którą składa się morfologiczna, strukturalna oraz funkcjonalna organizacja danej komórki, a konsekwencją tych zmian jest łatwy kontakt FR α z krwioobiegiem. Odpowiednim przykładem, który warto tu przytoczyć jest nabłonkowy rak jajnika, gdyż wykazuje on nadekspresję FR α w ponad 90% przypadków. Również w co trzecim guzie piersi wykrywa się nadekspresję tego typu transportera.[82]

Hartmann wraz ze współpracownikami[83], w 2007 roku, zaprezentował bardzo ciekawe wyniki badań dotyczące powiązania nadekspresji receptora folianów ze złymi rokowaniami w przypadku raka piersi. Przeprowadzili oni testy na grupie 63 chorych kobiet. Trzydzieści trzy z nich stanowiły grupę źle rokującą, gdzie nawrót choroby nastąpił w okolicach dwóch lat, a pozostałe trzydzieści stanowiły grupę wolną od wznowienia choroby od siedmiu lat. Badane kobiety były zróżnicowane między sobą pod wieloma względami m. in. statusem węzłów chłonnych, obecnością lub brakiem receptorów estrogenowych czy wcześniejszym sposobem leczenia. Testy te wykazały, że nie można wyznaczyć bezpośredniej korelacji pomiędzy statusem węzłowym, receptora estrogenowego czy stopniem zaawansowania choroby a ekspresją FR α . Jednak co jest bardzo istotne odkryli oni silną zależność pomiędzy intensywną nadekspresją receptora folianowego a wczesnym nawrotem choroby. Wyniki te sugerują, że analiza ekspresji FR w pierwotnych rakach piersi może być bardzo cennym źródłem informacji dotyczących przyszłych rokowań pacjenta.

1.6 Zastosowanie pochodnych kwasu foliowego oraz jego koniugatów w wykrywaniu oraz leczeniu nowotworów

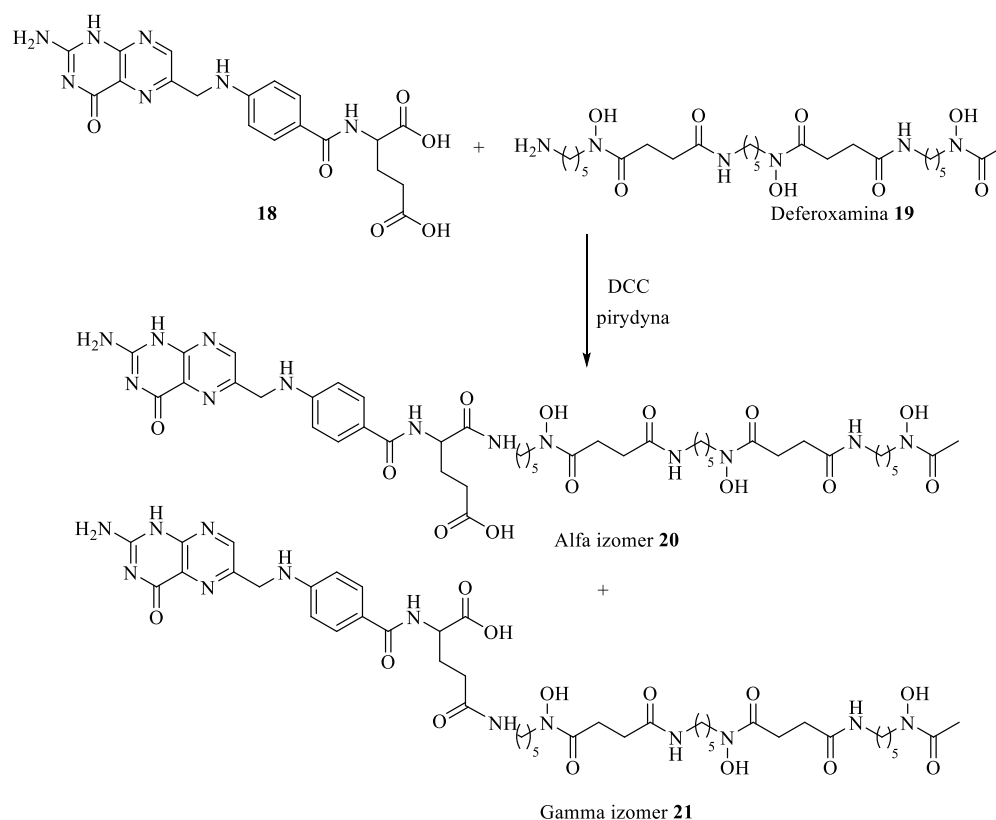
Pochodne kwasu foliowego będące jego koniugatami są tematem intensywnie zgłębianym już od wielu lat przez wiele grup badawczych. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się tematy powiązane z nowotworami ze względu na to, iż nadal istnieje duży nacisk na zaprojektowanie skutecznych farmaceutyków, które charakteryzować się będą dużą swoistością i selektywnością w stosunku do komórek nowotworowych, a tym samym ograniczoną toksycznością wobec komórek zdrowych. Dodatkowo koniugaty FA mogą być stosowane w diagnostyce chorób nowotworowych jako radioznaczniki, co również może pozwolić wykryć w szybki i nieinwazyjny sposób komórki zmienione chorobowo. Obydwa wyżej wymienione zastosowania opierają się na zjawisku nadekspresji receptorów kwasu foliowego typu alfa, które ma często miejsce w przypadku komórek zmienionych nowotworowo.

1.6.1 Obrazowanie

Jednym z bardzo istotnych zastosowań koniugatów kwasu foliowego w obrębie tematyki nowotworowej, jest wykorzystanie ich jako odczynników obrazujących obecność komórek zmienionych chorobowo znajdujących się w organizmie ludzkim. Jest to bardzo ważna kwestia ponieważ dostępność skutecznej a zarazem nieinwazyjnej diagnostyki chorób ma kluczowe znaczenie dla ich leczenia oraz, co z tym związane, z poprawą jakości życia pacjentów. Badania użyteczności receptorów folianowych ujawniły obiecujący potencjał tych transporterów w połączeniu z odpowiednimi radiofarmaceutykami na bazie FA ze względu na nadekspresję receptorów folianowych w komórkach rakowych oraz zdolność do wiązania i wnikania kwasu foliowego i jego pochodnych do tych komórek. Zaletami podejścia z wykorzystaniem koniugatów FA jako „koni trojańskich” jest niewątpliwie ich mały rozmiar, stabilność w dość szerokim zakresie temperatur i wartości pH, możliwość modyfikacji struktur chemicznych w dość szerokim zakresie oraz brak immunogenności. Aktualnie w zakresie tej tematyki największym zainteresowaniem cieszą się znaczniki SPECT oparte na emisji pojedynczych fotonów (z ang. *Single-Photon Emission Computed Tomography*) oraz radioznaczniki PET związane z emisją pozytonową (z ang. *Positron Emission Tomography*) właśnie na bazie pochodnych kwasu foliowego.[84]

Jednym z pierwszych radiokoniugatów typu SPECT, który można odnaleźć w literaturze był ten będący pochodną deferoksaminy **21** (**Schemat 1.5**), która odpowiedzialna była za chelatowanie radioizotopu ^{67}Ga emitującego promieniowanie γ . Związek ten został otrzymany na drodze prostej reakcji sprzęgania kwasu foliowego z deferoksaminą **19** z wykorzystaniem odczynnika sprzęgającego jakim jest *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid (DCC). W wyniku tej syntezy uzyskane zostały dwa izomery, odpowiednio stworzone z udziałem α oraz γ grupy karboksylowej. Pochodne te zostały rozdzielone za pomocą chromatografii anionowymiennej z użyciem gradientu NH_4HCO_3 , by w dalszej kolejności cząsteczki te mogłyby zostać zbadane pod kątem rozpoznawalności przez FR. Wyniki analiz wiązania konkurencyjnego mówiły jasno, że tylko jeden z izomerów (izomer γ) rozpoznawany jest przez receptory alfa, a występujące tam oddziaływanie jest porównywalne z powinowactwem niesprężonego kwasu foliowego. W dalszej kolejności koniugat γ **21** został znakowany radionuklidem $^{67}\text{Ga}^{3+}$ (z wykorzystaniem acetyloacetonianu galu) i przetestowany pod kątem wychwytu poprzez komórki KB (linia komórkowa ludzkiego raka nosogardzieli oraz naskórka), charakteryzujące się nadekspresją receptora FA. Wyniki tych badań wskazywały na

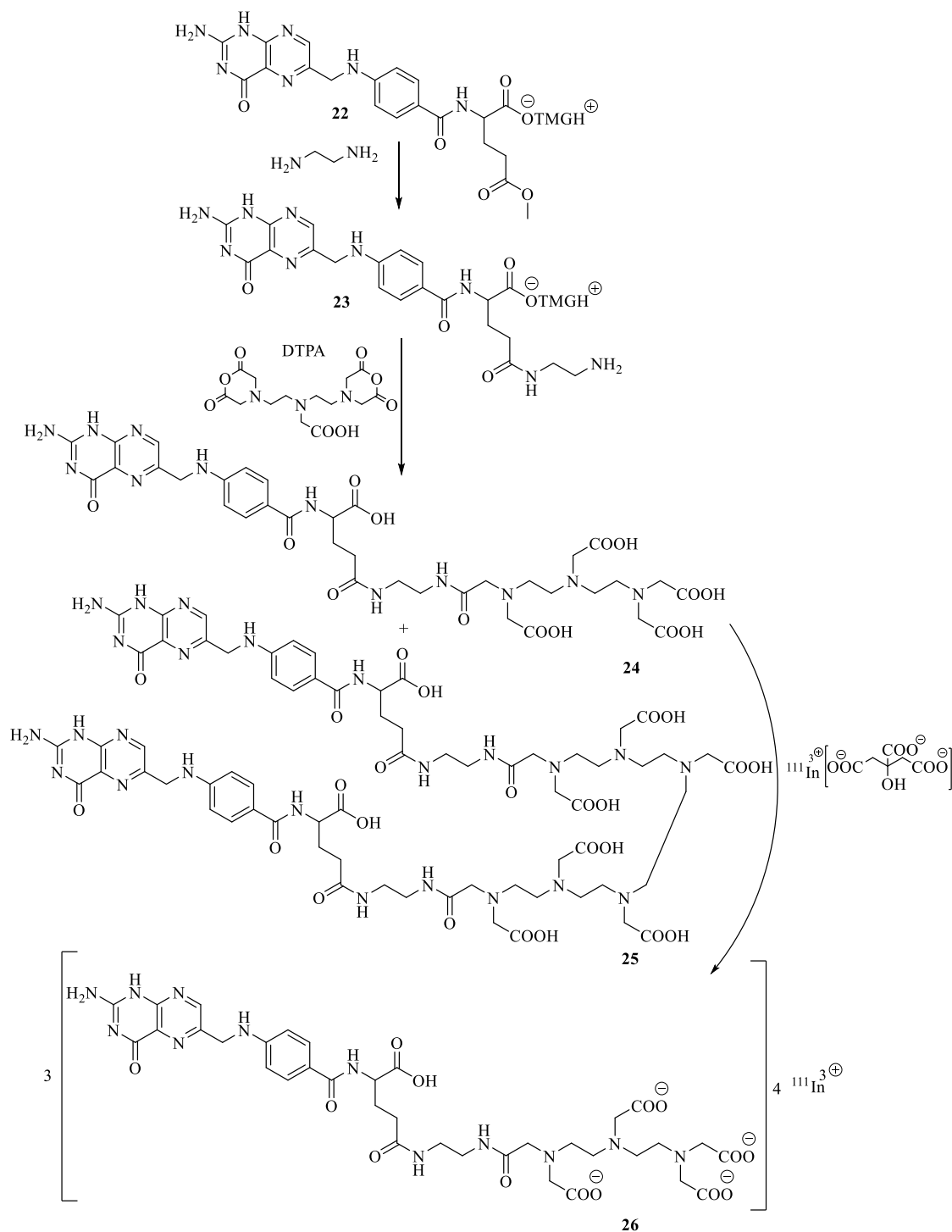
akumulację radiokoniugatu w komórkach nowotworowych oraz na to, że zależna jest ona od czasu, temperatury i stężenia. Dodatkowo zauważono, iż występowała swoista konkurencja pomiędzy nowo otrzymaną cząsteczką a kwasem foliowym w odniesieniu do transportera FA.[85] Uzyskując tak pozytywne wyniki badań zdecydowano o ich kontynuacji z wykorzystaniem już mysiego modelu guza KB. Badania te dowiodły kierunkowe działanie radiokoniugatu i co za tym idzie jego akumulację w komórkach nowotworowych, jednak skutkiem ubocznym stosowania tego potencjalnego znacznika było jego znaczne wydalenie przez wątrobę i drogi żółciowe oraz gromadzenie się tego związku w jamie brzusznej.[86]



Schemat 1.5 Szlak otrzymywania koniugatu deferoksaminy z kwasem foliowy.

Konsekwencją powyższych negatywnych wyników końcowych była modyfikacja poprzedniej struktury i zaprojektowanie bardziej hydrofilowego znacznika w skład którego wchodziła reszta kwasu dietylenotriaminopentaoctowego (DTPA) oraz ^{111}In . Pochodna ta jedynie w ok. 3% akumulowała się w jamie otrzewnej.[87] Otrzymana została ona na drodze trzyetapowej syntezy, która rozpoczęła się od reakcji L-metylofolianu tetrametyloguanidyny γ (TMGH – 1,1,3,3-tetrametyloguanidynian) **22** z etylenodiaminą w wyniku której uzyskano pochodną **23**, która w kolejnym etapie potraktowana została DTPA. Produktami tej transformacji był zarówno oczekiwany produkt, czyli koniugat FA-DPTA **24** jak i produkt poboczny jakim był bis folian **25**. Ostatnim etapem tej syntezy było otrzymanie, z dużą wydajnością radiochemiczną, finalnego znacznika **26** i odbyło się ono na drodze wymiany ligandu z cytrynianem indu-111. Cały przebieg syntezy został przedstawiony na **Schemacie 1.6**. [88] Pochodna **26** dała bardzo dobre wyniki na etapie badań przedklinicznych, dlatego naturalnym było przeprowadzenie dalszych badań już na etapie klinicznym. Rezultaty tych analiz wskazywały na to, iż znacznik gromadzi się w FR-dodatnich nowotworach złośliwych u pacjentów z rakiem jajnika oraz endometrium, podczas gdy radioaktywność w normalnych

tkankach i narządach na podwyższonym poziomie zaobserwowana została w nerkach, wątrobie oraz śledzionie.[89]

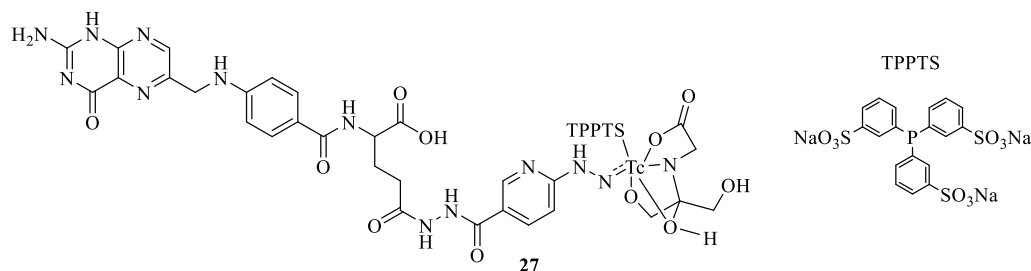


Schemat 1.6 Szlak syntezy radiokoniugatu na bazie ^{111}In .

Prawdopodobnie najczęściej wykorzystywanym w praktyce szpitalnej radionuklidem jest $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Ten metastabilny izomer jądrowy technetu cechuje się bardzo dobrymi właściwościami fizycznego rozpadu (promieniowanie γ : $E=140$ keV, $t_{1/2} = 6$ h), niskim kosztem produkcji oraz możliwością generowania go już w budynku szpitalnym. Został on

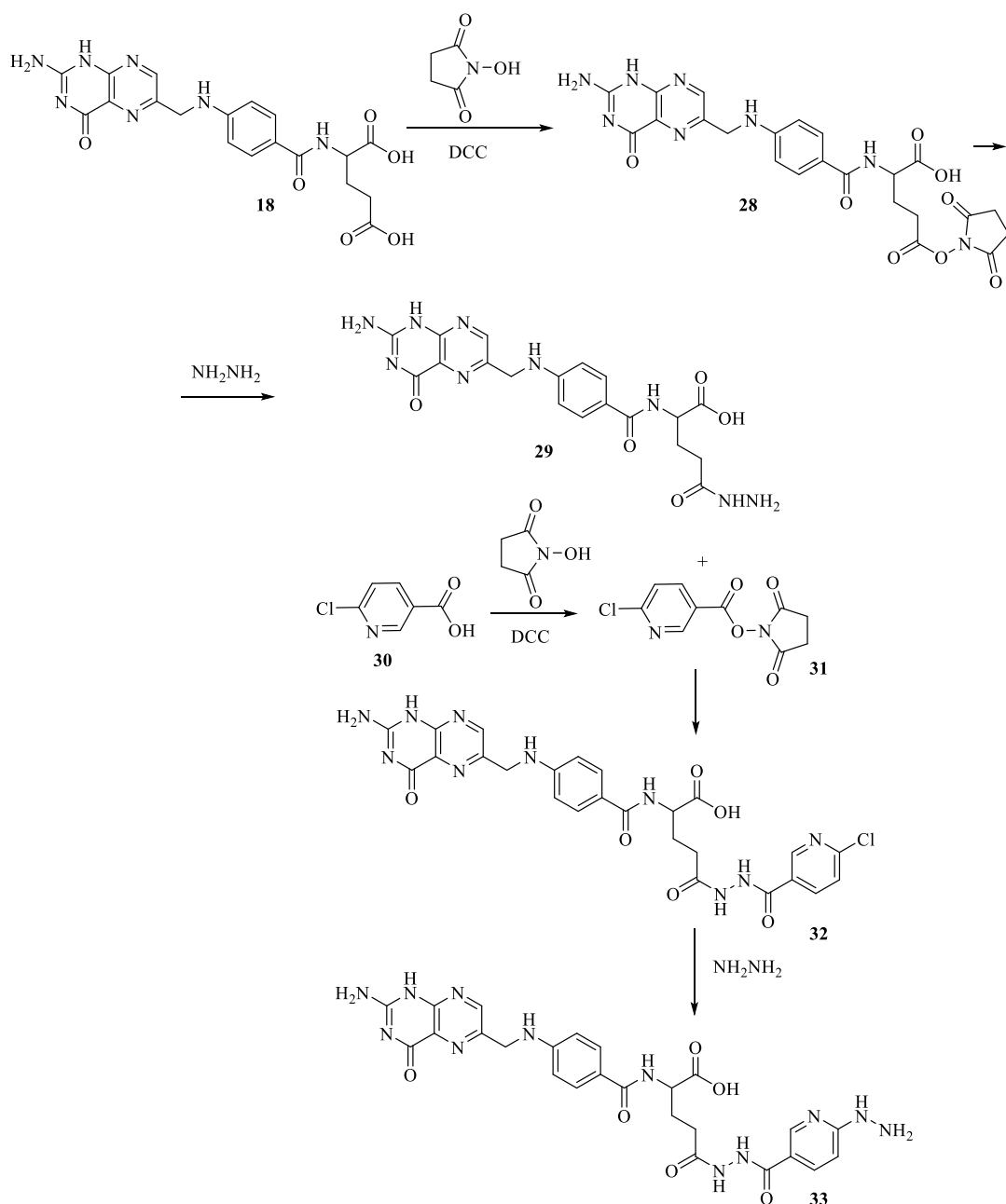
odkryty jako produkt cyklotronowego bombardowania molibdenu, w wyniku którego otrzymywano molibden-99, który po 2,75 dnia rozpadał się właśnie do ^{99m}Tc . To właśnie ten dłuższy czas połowicznego rozpadu pozwala na wysyłkę ^{99}Mo do placówek medycznych, gdzie ^{99m}Tc jest wyodrębniany i wykorzystywany do radiosyntezy odpowiednika odczynnika obrazującego.

W roku 1998 zespół W. Guo zaprezentował nowy rodzaj radiokoniugatu, który w swojej budowie posiadał wyżej opisanym radionuklid **27** (Rys. 1.15).



Rys. 1.15 Wzór strukturalny ^{99m}Tc -HYNIC-FA **27**.

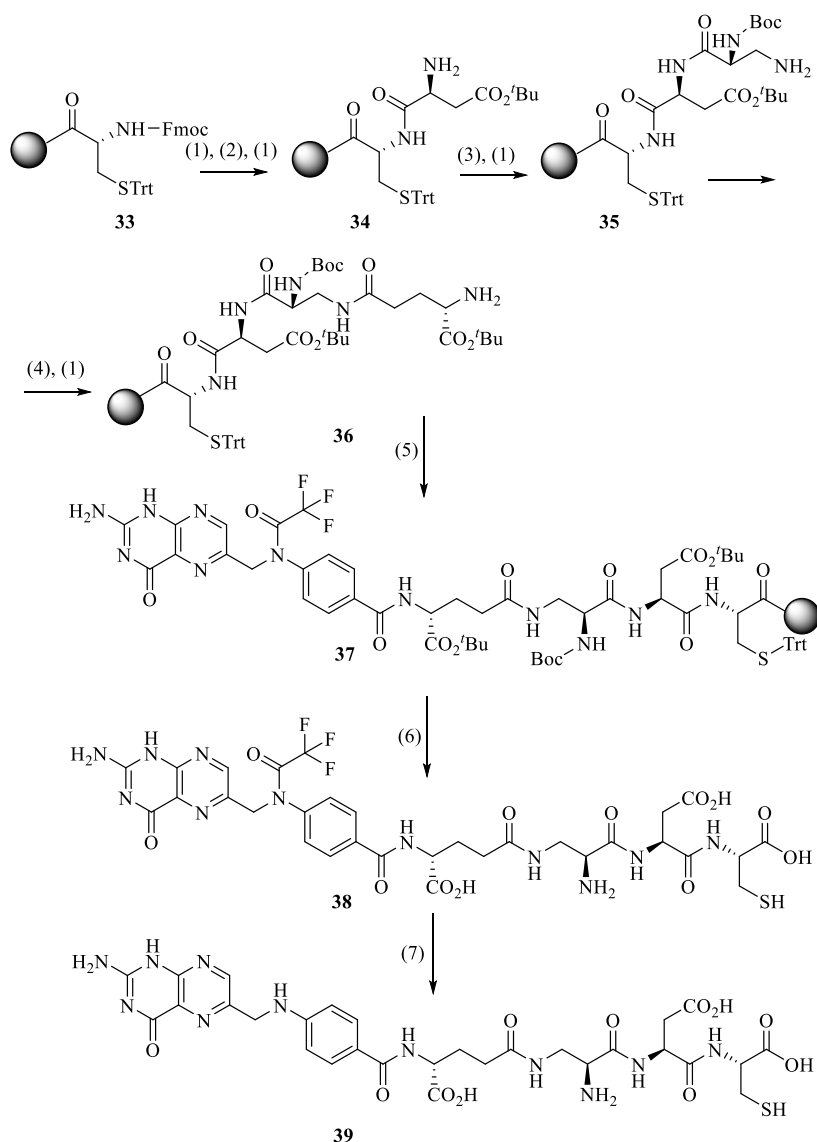
Natomiast, szlak otrzymania koniugatu HYNIC-Folate **33** został przedstawiony na Schemacie 1.7 i składał się on z pięciu etapów. Krok pierwszy polegał na reakcji kwasu foliowego **18** z *N*-hydroksysukcynoimidem w obecności odczynnika sprzęgającego jakim jest DCC. Tak aktywowana pochodna **28** w dalszym etapie reagowała z hydrazyną w wyniku czego otrzymano produkt pośredni **29**, który kolejno poddano reakcji z aktywowaną pochodną kwasu 6-chloronikotynowego **31**. Etap końcowy tej syntezy polegał na wymianie atomu chloru znajdującego się przy terminalnym pierścieniu aromatycznym **32** na podstawnik będący pochodną hydrazyny. Tak otrzymany koniugat **33** poddany został radiosyntezie w wyniku której otrzymany został finalny znacznik **27**, gdzie wokół centrum metalicznego oprócz wcześniej opisanej cząsteczki znajdowały się także koligandy jak tricyna oraz sól trisodowa kwasu trifenylofosfino-3,3',3''-trisulfonowego (TPPTS), które w znaczący sposób miały wpłynąć na stopień hydrofilowości tego związku.[90]



Schemat 1.7 Szlak syntezy koniugatu HYNIC-Folate 33.

Wyniki badań przedklinicznych z wykorzystaniem tej pochodnej zostały przeprowadzone na myszach posiadających podskórne guzy 24JKFBP, czyli komórki mięsaka transferowane ludzkim FR. Wykazały one znaczą specyficzność w stosunku do receptorów kwasu foliowego ($\sim 17,8$ %ID/g po 4 godzina od iniekcji), która malała do poziomu tła po wstrzyknięciu myszom nadmiaru FA, co wskazuje na selektywność koniugatu HYNIC-folate 27 w stosunku do receptorów FA.

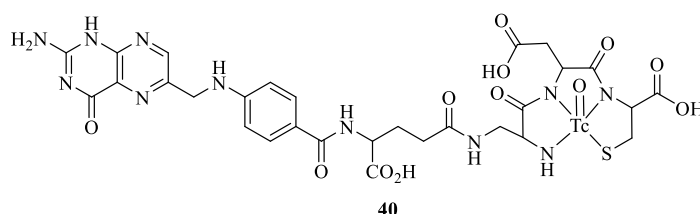
Kolejnym znacznikiem na bazie technetu oraz kwasu foliowego jest $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC20 40 (**Rys. 1.16**), który został po raz pierwszy otrzymany w roku 2002 przez Christopher P. Leamona wraz z zespołem. Częsteczka EC20 39 (**Schemat 1.8**) została otrzymana z wykorzystaniem techniki syntezy peptydów na fazie stałej, a jej produkcja składa się z siedmiu etapów, które zostały przedstawione na **Schemacie 1.8**.



Schemat 1.8 Szlak otrzymywania EC20 **39** (1) 20% piperidyna, DMF; (2) Fmoc-Asp(O^tBu)-OH, PyBop, DIPEA, DMF; (3) Boc-Dap(Fmoc)-OH, PyBop, DIPEA, DMF; (4) Fmoc-D -Glu-O^tBu, PyBop, DIPEA, DMF; (5) *N*¹⁰ -TFA-Pte-OH, DIPEA, DMSO; (6) TFAA, HSCH₂CH₂SH, ^tPr₃SiH; (7) H₄NOH, pH = 10,3.

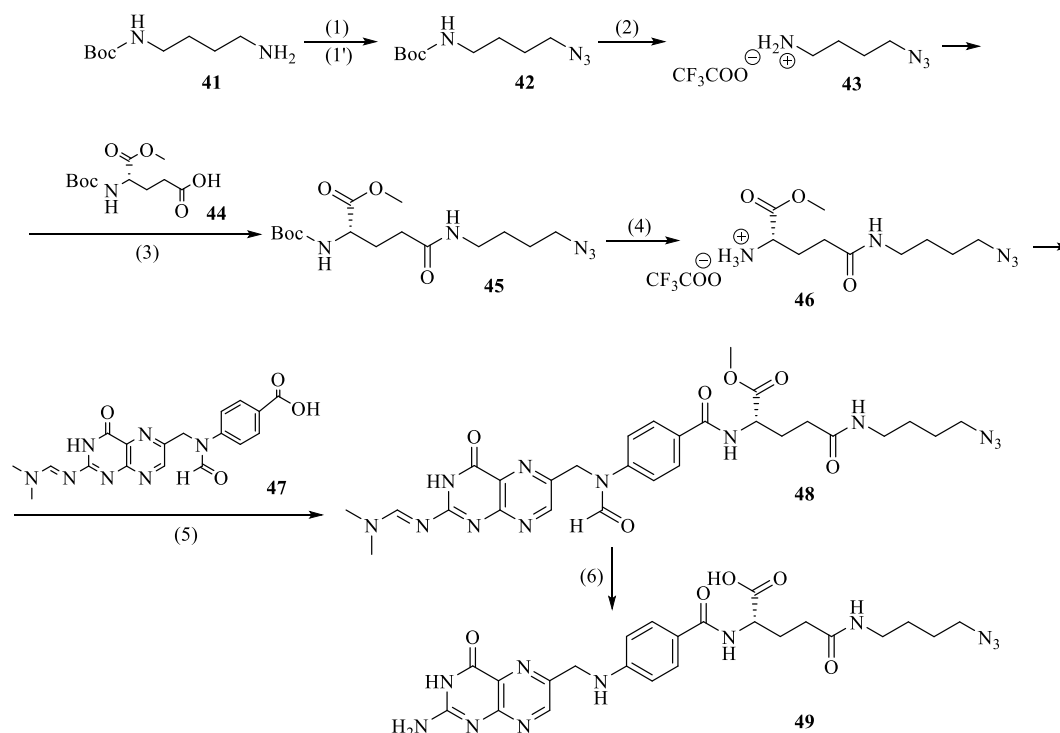
Cząsteczka **40** w swojej strukturze zawiera, krótką sekwencje peptydów (Cys-Asp-Dap-D-Glu-Pte), która jest odpowiedzialna za chelatowanie atomu technetu.[91] Badania *in vivo* przeprowadzone na modelu myszy BALB/c, które posiadały FR(+) guzy M109, wykazały wysoki wychwyt tych cząsteczek przez komórki nowotworowe (~17,7 %ID/g, 4 h po iniekcji) oraz to, że są wydalone głównie przez nerki. Powyższe wyniki skłoniły naukowców do kontynuowania badań, które również przyniosły bardzo dobre rezultaty. Mianowicie, przeprowadzono testy na 154 pacjentach z potwierdzonym lub podejrzanym nowotworem, z co najmniej jedną zmianą o wielkości minimum 1,5 cm. Wyniki wskazywały na dobrą tolerancję radiokoniugatu, który został wychwycony przez komórki rakowe u 68% pacjentów, gdzie dla porównania wyniki barwienia immunohistochemicznego (IHC), które opierają się na poszukiwaniu antygenów plasowały się na poziomie 67%, a zgodność pomiędzy dwoma metodami wynosiła 72% w przypadku pozytywnych wyników oraz 38% negatywnych wyników. Zgodność ta jednak była zbyt niska, ale różnice mogły wynikać ze zbyt długiego

czasu pomiędzy pobraniem próbki a pomiarem, niejednorodna ekspresją FR w zmianach nowotworowych. Jednak to pilotażowe badanie wykazało, że związek ^{99m}Tc -EC20 **40**, można uznać za bezpieczny i dobrze tolerowany oraz to, że ta nieinwazyjna procedura może być przydatna w selekcji pacjentów, którzy mogą odnieść korzyści płynące z terapii ukierunkowanej na FR.[92]



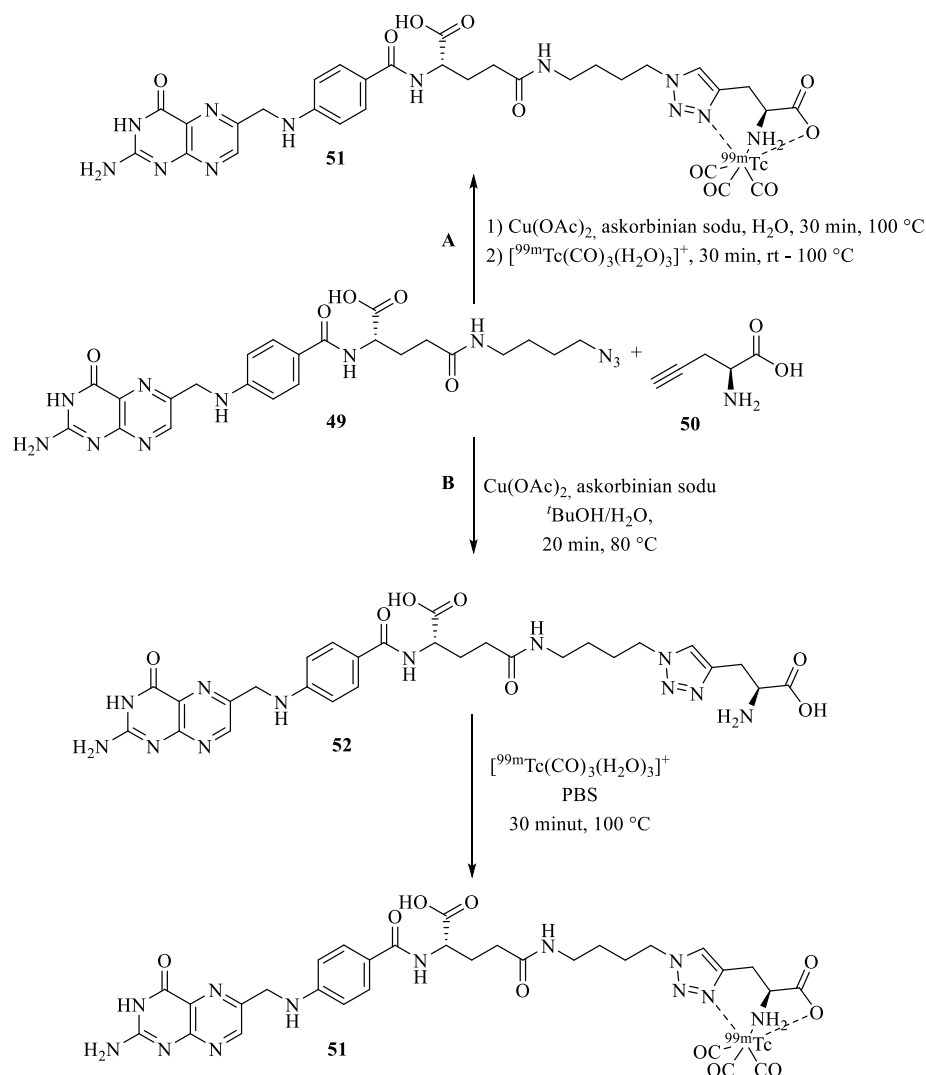
Rys. 1.16 Struktura ^{99m}Tc -EC20 **40**.

W literaturze odnaleźć można również radioznaczniki, które syntezowane zostały z wykorzystaniem reakcji typu „click”, dzięki między innymi, której Barry Sharpless w 2022 został laureatem Nagrody Nobla. Takie podejście zaprezentowane zostało w publikacji autorstwa Thomasa Mindta, gdzie z wykorzystaniem jednego prekursora udało się otrzymać szereg sond różnego typu, które mogą być wykorzystywane do obrazowania nowotworów.[93] Substratem wyjściowym do wszystkich dalszych przekształceń był związek **49**, którego synteza została przedstawiona na **Schemacie 1.9** rozpoczynająca się od reakcji zamiany grupy aminowej w związku **41** na grupę azydkową **42**, w dalszym etapie zostało przeprowadzenie usunięcia grupy *tert*-butyloksykarbonylowej (Boc) oraz reakcja sprzęgania związku **43** z podwójnie chronioną pochodną kwasu glutaminowego **44** i ponowne usunięcie grupy Boc ze związku **45**. Tak otrzymana pochodna **46**, poddana została reakcji z kwasem *N*2-*N*,*N*-dimetyloaminometyleno-10-formylopterydynowym **47** z wykorzystaniem odczynnika sprzęgającego jakim jest heksafluorofosforan 3-tlenku 1-[bis(dimetyloamino)metyleno]-1*H*-benzotriazoliowego (HBTU). Ostatnim etapem tej syntezy było usunięcie wszystkich grup ochronnych za pomocą wodnego roztworu NaOH. Całkowita wydajność tej 6 etapowej syntezy wynosiła 80%. Bardzo ciekawą kwestią z syntetycznego punktu widzenia było to, że autorzy tej publikacji natrafili na problem podczas drugiej reakcji sprzęgania. Początkowo próbowali oni otrzymać żądany produkt z wykorzystaniem 1,1'-karbonyldiimidazolu (CDI), ale wydajność tej reakcji wyniosła jedynie od 2 do 15% pomimo modyfikowania tej metody. Również zastosowanie DCC czy też 1-(3-dimetyloaminopropyl)-3-etylokarbodiimidu (EDC) nie dało oczekiwanych rezultatów dopiero zastosowanie HBTU oraz odpowiednia modyfikacja pozostałych warunków reakcji, czyli rodzaju rozpuszczalnika, wysokość temperatury oraz czasu trwania reakcji pozwoliła otrzymać oczekiwany produkt z wydajnością rzędu 90%.[94]



Schemat 1.9 Szlak syntezy prekursora **49**. Warunki reakcji (1) Tf_2O , NaN_3 , $\text{DCM}/\text{H}_2\text{O}$, 0°C -rt, (1') K_2CO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$; (2) TFA/DCM (1:5), rt; (3) HBTU , TEA , DMF , 0°C -rt; (4) TFA/DCM (1:7), rt (5) HBTU , TEA , DMF , 0°C -rt; (6) 1M NaOH , rt.

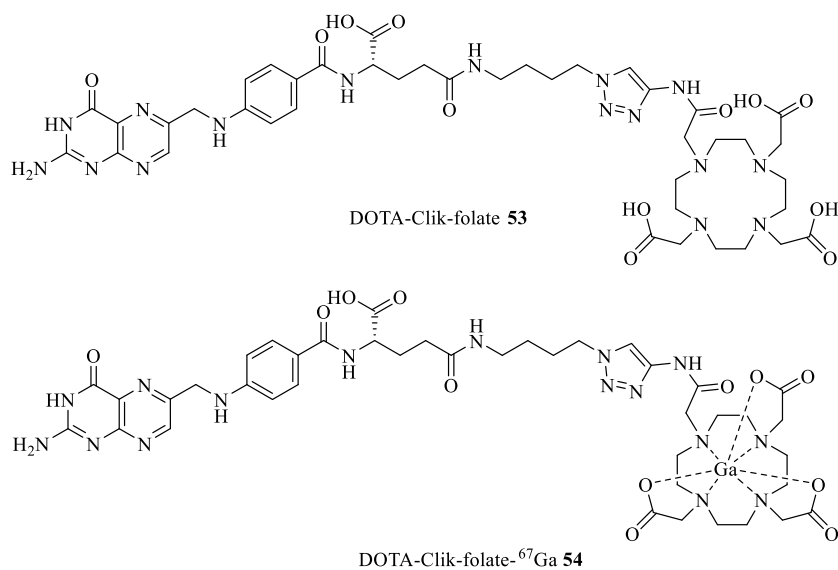
Ciekawym przykładem pochodzącym również z tego artykułu jest radioznacznik **51** (**Schemat 1.10**) zawierający w swojej strukturze organometaliczny element $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ przedstawiony na **Schemacie 1.10**. Przekształcenie prekursora **49** (**Schemat 1.9**) w gotowy znacznik odbywało się na dwa sposoby, które przedstawione zostały na **Schemacie 1.10**. Pierwsza ścieżka polegała na reakcji typu „one-pot” związku **49** z L-propargyloglicyna **50** w obecności octanu miedzi(II) oraz askorbinianu sodu. Reakcja ta przebiegała w roztworze wodnym, przez 30 minut w temp. 100°C , po czym całość układu doprowadzona została do temp. otoczenia by w kolejnym kroku dodać $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$. Całość ponownie została doprowadzona do temp 100°C , by po 30 minutach zakończyć tę radiosyntezę z wydajnością powyżej 90%. W alternatywnej ścieżce syntezy produkt reakcji typu „click” został wyizolowany i oczyszczony (w obydwu reakcjach zastosowano te same odczynniki chemiczne, a jedynie czym różniły się te dwie ścieżki na tym etapie to rodzajem rozpuszczalnika oraz długością trwania reakcji i temperaturą). W drugim przypadku było to odpowiednio mieszanina butanolu oraz wody, reakcja biegła przez 20 minut w temp 80°C . Reakcja ta zaszła z wydajnością 96%, a gotowy produkt pośredni **52** poddano reakcji z $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$, w obecności buforu PBS. Końcowa reakcja chelatowania trwała 30 minut i biegła w temp. 100°C . [94]



Schemat 1.10 Szlak otrzymywania dwoma metodami radiokoniugatu zawierającego w swojej strukturze element metaloorganiczny $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ **51**.

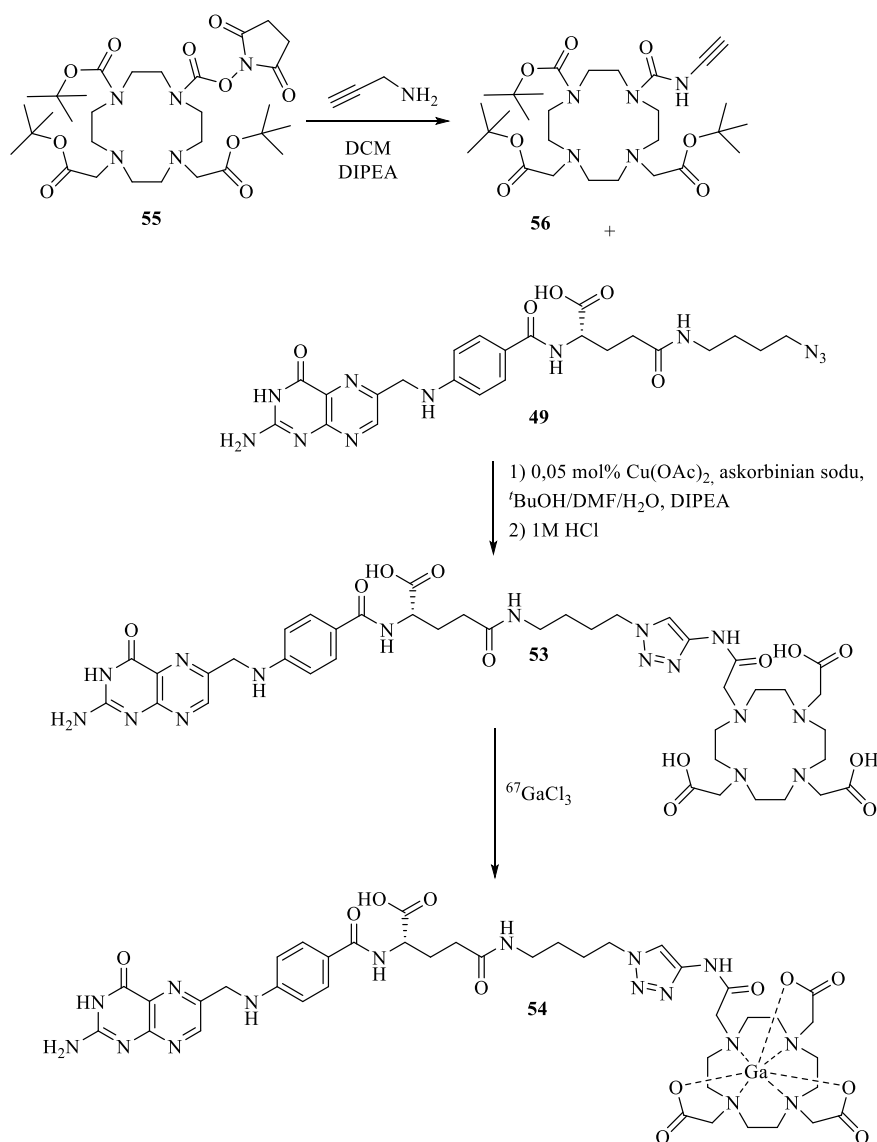
Związek **51** został zbadany w testach *in vivo* z wykorzystaniem myszy posiadających ludzkie guzy jamy nosowogardzielowej z FR(+). Wyniki pomiarów wskazywały na pobór tej pochodnej przez komórki w ok. 50%, z czego jedna trzecia wszystkich cząsteczek została zinternalizowana. Dodatkowo eksperyment blokowania transportu poprzez FR z wykorzystaniem nadmiaru kwasu foliowego spowodowały spadek radioaktywności do mniej niż 1% co dowodzi wychwytu specyficznego dla FR.[95]

Kolejnymi bardzo interesującym związkiem pochodzącym z publikacji Mindta jest DOTA-Click-folate **53** przedstawiony na **Rys. 1.17**, który został również otrzymany z wykorzystaniem prekursora **49** (**Schemat 1.12**). W swojej budowie zawiera on dwunastocząłowy pierścień DOTA, w skład którego wchodzi między innymi cztery atomy azotu. Fragment ten odpowiedzialny jest za kompleksowanie jonów lantanowców. W powyższej publikacji atomem takim jest gal, jednak w literaturze odnaleźć można również przykłady z wykorzystaniem indu czy lutetu.[96]



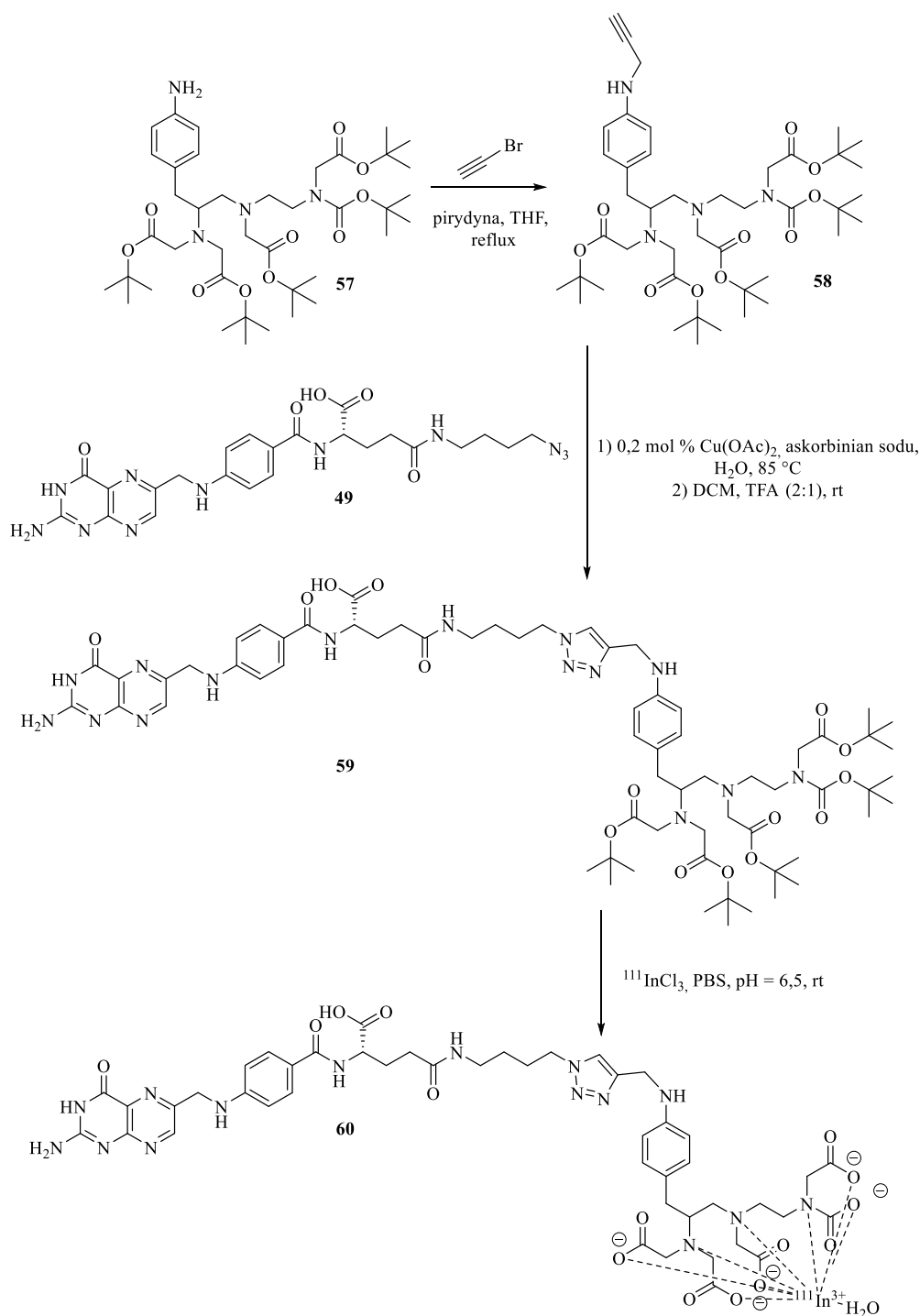
Rys. 1.17 Przedstawiający strukturę dwóch koniugatów zawierających w swojej budowie fragment DOTA.

Pochodna DOTA-Clik-folate **53** została otrzymana na drodze dwuetapowej syntezy przedstawionej na **Schemacie 1.11** i rozpoczyna się ona reakcją DOTA-NHS **55** z propargiloaminą w obecności DIPEA. Kolejnym etapem tej ścieżki syntetycznej była reakcja cykloaddycji z wykorzystaniem prekursora **49**. Uzyskanie pierścienia 1,2,3-triazolowego odbyło się z w obecności octanu miedzi(II), DIPEA i askorbinianu sodu w pierwszym etapie reakcji oraz 1 M roztworu kwasu chlorowodorowego w etapie drugim, który pozwolił na usunięcie grup ochronnych. W taki sposób udało się uzyskać koniugat kwasu foliowego **53** z wydajnością 45%. Finalna reakcja chelatowania została przeprowadzona z użyciem chlorku galu-67 oraz roztworu buforowego octanu sodu, prowadzona była ona przez 30 minut w temperaturze 85 °C po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodano Na-DTPA w celu usunięcia wolnych radionukleoidów. Finalnie produkt **54** otrzymano w wydajnością radiochemiczną powyżej 90%.



Schemat 1.11 Szlak syntezy koniugatu DOTA-Clik-folate-⁶⁷Ga **54**.

Następnym przykładem radiokoniugatu z wyżej wymienianej publikacji jest związek **60** przedstawiony na **Schemacie 1.12**. Częsteczka ta jest pochodną *p*-NH₂-Bn-DTPA **57** i uzyskana została ona poprzez przeprowadzenie trzech reakcji. Ścieżka syntetyczna otrzymania tej pochodnej rozpoczyna się od reakcji *p*-NH₂-Bn-DTPA **57** z bromkiem propargilu, która przebiegła z wydajnością 55%. Kolejno ma miejsce reakcja cykloaddycji, w której ponownie wykorzystany został prekursor **49** oraz katalizator miedziowy i askorbinian sodu. W tym przypadku reakcja trwała jedynie 25 minut, a etap deprotekcji z wykorzystaniem wodnego roztworu HCl przebiegł ilościowo. Końcowa reakcja radiosyntezy zaszła z wykorzystaniem ¹¹¹InCl₃ w obecności PBS jako buforu (pH = 6,5). Trwała ona 1 h i przebiegała w temperaturze pokojowej by końcowo uzyskać radiokoniugat **60** z wydajnością powyżej 95%.

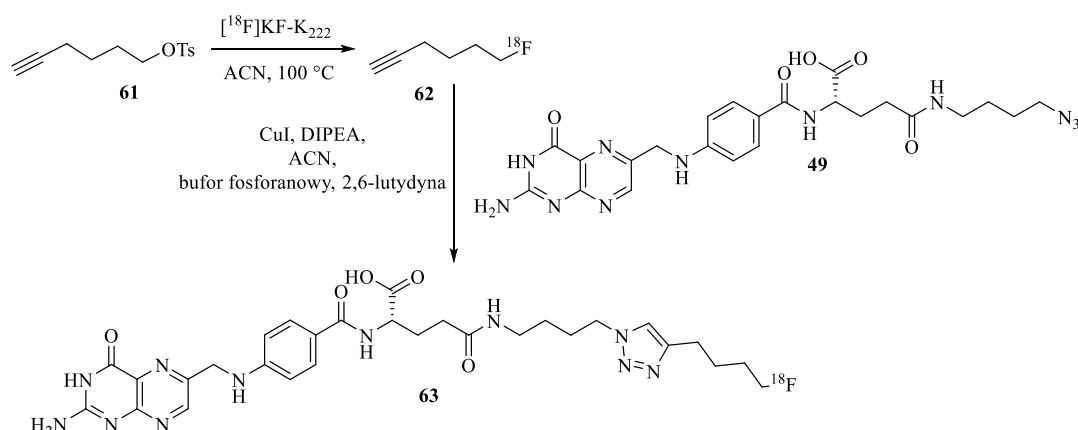


Schemacie 1.12 Szlak syntezy koniugatu FA-(γ)-pNHBnDTPA- ^{111}In **60**.

Testy *in vitro* oraz *in vivo* dla koniugatu DOTA-Klik-folate- ^{67}Ga **54** (Schemat 1.11) oraz koniugatu FA-(γ)-pNHBnDTPA- ^{111}In **60** (Schemat 1.12) zostały przeprowadzone w taki sam sposób. Pierwsze z nich polegały na sprawdzeniu możliwości wychwytu potencjalnych radioznaczników przez komórki KB (linia komórkowa ludzkiego raka nosogardzieli oraz naskórka) z nadekspresją FA. Wyniki dla obu sond SPECT były zbieżne i wynosiły ok. 50% całkowitej radioaktywności, z czego 1/3 cząsteczek została zinternalizowana. Ponadto, eksperymenty z zastosowaniem nadmiaru FA spowodowały całkowitą blokadę internalizacji, udowadniając w ten sposób wychwyt specyficzny dla FR. Dodatkowo przeprowadzono badania

na myszach z ksenografami guza KB. Wskazały one na gromadzenie się sond w znacznych ilościach w guzach, jednak pewne ilości związków DOTA-Clik-folate-⁶⁷Gal **54** (Schemat 1.11) oraz koniugatu FA-(γ)-pNHBnDTPA-¹¹¹In **60** (Schemat 1.12) zostały znalezione w nerkach, które posiadały FR(+). Jednak spośród metalicznych znaczników gromadziły się one w niewielkich ilościach w wątrobie oraz jelitach.

Wszystkie opisane do tej pory radiokoniugaty należały do grupy SPECT, jednak jak to zostało wspomniane już wcześniej wyróżnić można jeszcze jedną grupę znaczników na bazie FA jaką są pochodne typu PET (związane z emisją pozytonową). Są one bardzo istotną grupą ze względu na to, iż są one najdokładniejszą nieinwazyjną metodą wykrywania nowotworów w szczególności w postaci dość małych przerzutów. Przedstawicielem tej grupy jest radioznacznik również zsyntezowany z wykorzystaniem reakcji typu „click”. Struktura tego związku zaprezentowana została na Schemacie 1.13 wraz ze sposobem jego otrzymywania. Również w tym przypadku substratem wyjściowym był prekursor **49**, który prezentowany był w tym rozdziale już kilkakrotnie. Sama radiosynteza składała się tylko dwóch kroków, gdzie w pierwszym etapie z bardzo dobrą wydajnością radiochemiczną (70-85%) otrzymywany został 6-¹⁸F-fluoro-1-heksyn **62**, który w etapie kolejnym ulegał reakcji cykloaddycji katalizowanej CuI w wyniku, której otrzymano finalny znacznik **63**.



Schemat 1.13 Szlak otrzymywania koniugatu **63** zawierającego w swojej strukturze ¹⁸F.

Związek ten w testach *in vivo* badany był z wykorzystaniem myszy z guzem KB. Badania te wykazały stosunkowo wysoki stopień specyficzności względem FR, gdyż poziom wychwytu wyniósł ~3 %ID/g 45 minut po inkubacji. Jednakże, silnie lipofilowy charakter cząsteczki spowodował wysoką akumulację radioaktywności w żółci (>600 %ID/g, 45 minut po inkubacji) oraz w przewodzie pokarmowym. W celu zastosowania tego konkretnego znacznika PET w praktyce laboratoryjnej wskazanym jest wprowadzenie pewnych modyfikacji w strukturze cząsteczki, które w znaczący sposób wpłynęły by na polarność tego związku.[97]

Podsumowując, w literaturze jak i w diagnostyce laboratoryjnej wyróżnić można wiele radioznaczników o zróżnicowanej budowie. Otrzymanie wielu z nich było niewątpliwie ogromnym wyzwaniem z syntetycznego punktu widzenia. Funkcjonalizacja pochodnych FA poprzez wykorzystanie tylko jednej grupy funkcyjnej będącej częścią kwasu glutaminowego nie było trywialnym zadaniem, zwłaszcza biorąc pod uwagę bardzo słabą rozpuszczalność FA i jego produktów pośrednich. Z tego powodu podejście opierające się na syntezie z wykorzystaniem pochodnych, w których grupy karboksylowe reszty kwasu glutaminowego nie były chronione oraz rozdziale otrzymanych izomerów alfa i gamma pochodnej kwasu glutaminowego, zostało w większości wyparte poprzez wykorzystanie odpowiednio alfa

chronionych pochodnych kwasu glutaminowego. Dodatkowo, zastosowano podczas syntezy reakcje typu „click”, które pozwoliły ułatwić samą procedurę syntetyczną i w wielu przypadkach podnieść wydajność otrzymywania gotowego radioznacznika.

1.6.2 Leki przeciwnowotworowe

1.6.2.1 Budowa koniugatów o właściwościach przeciwnowotworowych

Leczenie wszelkiego rodzaju nowotworów jest bardzo skomplikowanym i złożonym procesem polegającym w ogromnym uproszczeniu na unicestwieniu komórek rakowych bez jednoczesnego uszkodzenia komórek zdrowych. Bez wątpienia jest to ogromnym wyzwaniem, z którym nie radziło sobie wiele tradycyjnych chemoterapeutyków. Związki te w wielu przypadkach nie wykazywały selektywności w stosunku do komórek guza w wyniku czego oprócz oczekiwanych rezultatów terapii, wywoływały również niekorzystne efekty uboczne. W ciągu ostatnich trzech dekad projektowanie oraz synteza potencjalnych leków przeciwnowotworowych przeszły diametralną zmianę szczególnie jeśli chodzi o selektywność oraz specyficzność tych związków właśnie względem tkanek zmienionych nowotworowo.[98] Jednym z nowoczesnych podejść do projektowania leków jest synteza związków, które w swojej budowie zawierają konkretny lek, który związany jest hydrofilowym łącznikiem z ligandem odpowiedzialnym za specyficzność cząsteczki oraz jej wychwyt przez komórki nowotworowe. Schematyczny rysunek takiego koniugatu przedstawiony został na **Rys. 1.18**.



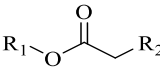
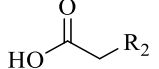
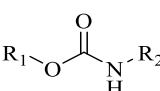
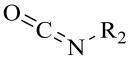
Rys. 1.18 Ogólna budowa koniugatu leku przeciwnowotworowego z odpowiednim ligandem.

Pierwszym bardzo istotnym elementem koniugatu projektowanego jako potencjalny prolek jest bez wątpienia ligand. Jego zadaniem jest zwiększenie selektywności, swoistości oraz powinowactwa do docelowego miejsca działania substancji aktywnej w ciele pacjenta. Projektowanie tego elementu powinno odbywać się w oparciu o bardzo dobre poznanie celu molekularnego potencjalnego leku oraz jego otoczenia, ze szczególnym uwzględnieniem typów receptorów występujących w jego sąsiedztwie. Związanie proleku z wybranym receptorem transportującym go do wnętrza komórki możliwe jest dzięki zastosowaniu cząsteczek wykazujących powinowactwo do tego transportera. W literaturze odnaleźć można bardzo bogatą bibliotekę związków pełniących tę rolę rozpoczynając od białek, peptydów, naturalnych ligandów receptorów komórkowych takie jak lektyna czy hormony. Do tej grupy zaliczyć można również białka transportowe dla substancji endogennych (cholesterol LDL czy transferryna), jak też cząsteczki pochodzące z patogenów lub toksyn, takie jak peptydy przenikające komórki fuzogenne. Ponadto, kwasy nukleinowe takie jak aptamery, małe cząsteczki będące witaminami (np. kwas foliowy) czy niektórymi cukrami (np. mannoza) sprawdzają się doskonale w roli ligandów wiążących się z odpowiednimi receptorami na powierzchni komórki.[99]

Kolejnym fragmentem wchodzącym w skład koniugatu jest łącznik inaczej nazywany *linkerem*, którego rolą jak sama nazwa wskazuje jest wiązać ligand z substancją aktywną. Ponadto, jego zadaniem jest zwiększenie hydrofilowości całej cząsteczki, jak również zapobieganie niepożądanym reakcjom wewnątrzcząsteczkowym oraz zmniejszenie kirensu wątrobowego (współczynnika oczyszczania).[100] Bardzo ważnym jest również to, iż łącznik powinien umożliwiać specyficzne, wewnątrzkomórkowe uwalnianie cząsteczki leku pod wpływem określonych warunków środowiskowych. Za to zadanie odpowiedzialna jest część łącznika jaką jest wiązanie labilne. Przykłady takich połączeń przedstawione zostały w **Tabeli 1.2** wraz z czynnikiem dzięki, któremu wiązanie to zostaje rozczepione.[101], [102]

Tabela 1.2 Przykłady wiązań labilnych wykorzystywanych w koniugatach wraz z warunkami powodującymi rozczepienie cząsteczki i produktami rozpadu.

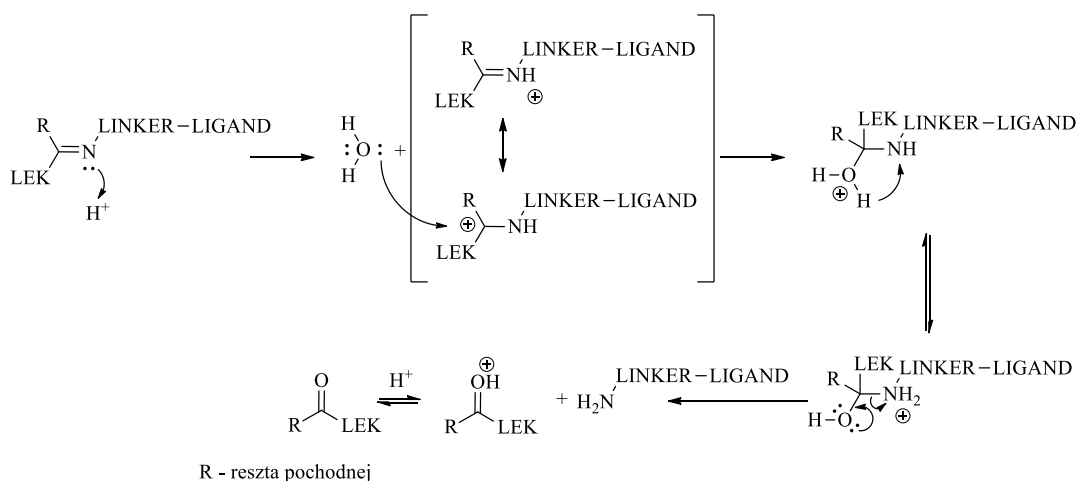
Nr	Typ połączenia	Struktura	Warunki rozczepienia	Produkt rozpadu
1	Hydrazon		pH kwasowe	
2	Cis-asconityl		pH kwasowe	
3	Ortoester		pH kwasowe	
4	Acetal/ketal		pH kwasowe	
5	Imina		pH kwasowe	
6	Disulfid		Redukcja (wymiana z GSH)	
7	Azo		Redukcja	
8	Val-Cit		Enzymatyczne (proteaza)	
9	β -Glukuronid		Enzymatyczne (glukozydaza)	

10	Ester		Enzymatyczne (esteraza) + pH kwasowe	 R ₁ -OH
11	Karbaminian		Enzymatyczne (cytochrom P450 + esteraza)	 R ₁ -OH

Aktywność koniugatów w dużym stopniu skorelowana jest ze zdolnością uwalniania substancji aktywnej poprzez rozpad wiązania labilnego w miejscu docelowym. Głównym zadaniem cząsteczki jest dotrzeć w stanie niezmienionym z układu naczyniowego do wnętrza guza, w przeciwnym razie, gdy uwolnienie nastąpi wcześniej może mieć miejsce sytuacja nieswoistej toksyczności dla normalnych komórek. Z tego właśnie powodu związki te projektowane są w taki sposób by aktywować się pod wpływem specjalnych warunków rozpadu i wyróżnić można tutaj trzy główne typy rozpadu jakimi są: rozczepienie wrażliwe na zmiany pH, rozczepienie redukcyjne oraz rozczepienie enzymatyczne.

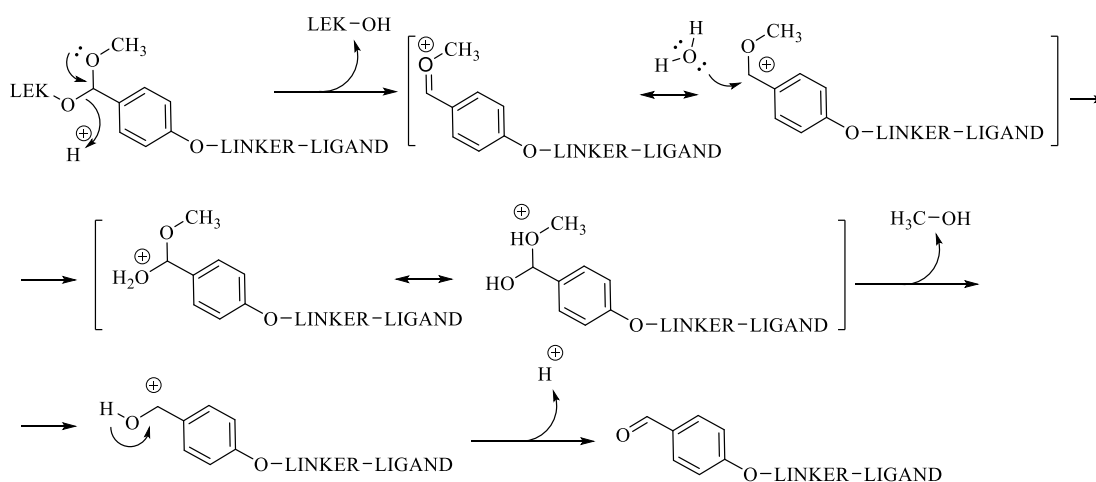
Pierwszą grupą połączeń labilnych, które warto omówić są łączniki wrażliwe są na zmiany pH, które często ulegają rozpadowi pod wpływem kwaśnego środowiska. Sprzyjającymi warunkami dla takiej sytuacji jest środowisko tkanki nowotworowej, które charakteryzuje się lekko kwaśnym odczynem w porównaniu z tkanką prawidłową. Wartość pH wewnątrz komórki rakowej jest ok. 0,5-1,0 jednostki niższa niż w normalnych komórkach ze względu na wysokie tempo konwersji glukozy do mleczanu.[103] Najczęściej stosowanymi strukturami ulegającymi rozkładowi w tych warunkach są hydrazony, które wykazują wyższą stabilność w warunkach fizjologicznych w porównaniu z kwaśnymi warunkami w komórkach nowotworowych.[104] Są one bardzo istotnymi elementami, które wniosły duży wkład w rozwoju koniugatów przeciwciał oraz leków, jednak badania *in vivo* wykazały, że są one niestabilne podczas krążenia w krwioobiegu oraz powodują występowanie znacznych skutków ubocznych np. mogą być toksyczne dla wątroby. Pierwszym prolekiem, będącym koniugatem przeciwciała monoklonalnego zawierającego połączenie hydrazonowe w swojej strukturze, który został wprowadzony na rynek był *Mylotarg*. Jednak w związku ze skutkami ubocznymi został on wycofany z rynku farmaceutycznego w roku 2007. Z drugiej strony jednak, wykazano, że stabilność wiązania hydrazonowego może być regulowana przez rodzaj podstawnika w pobliżu tego wiązania więc daje to duże możliwości wprowadzenia korzystnych modyfikacji w przyszłości.[105]

Przykładowy mechanizm uwalniania substancji aktywnej z proleku zawierającego połączenie iminowe został przedstawiony na **Schemacie 1.14**. Składa się on z pięciu głównych etapów i rozpoczyna się od ataku wolnej pary elektronowej atomu azotu na jon H⁺, w wyniku czego na tym atomie pojawia się ładunek dodatni. Ten związek pośredni posiada strukturę rezonansową, gdzie ładunek dodatni zlokalizowany jest na atomie węgla i to na niego prowadzony jest atak nukleofilowy wolnej pary elektronowej pochodzącej z cząsteczki wody. W kolejnym etapie następuje przeniesienie protonu z atomu tlenu na atom azotu oraz pojawienie się wiązania podwójnego pomiędzy atomem tlenu a węglem oraz uwolnienie ligandu połączanego z linkerem. W konsekwencji tego otrzymywany jest wolny lek z ładunkiem dodatnim, który w ostatnim etapie ulega deprotonacji.



Schemacie 1.14 Mechanizm uwalniania leku z cząsteczki koniugatu zawierającego linker iminowy.

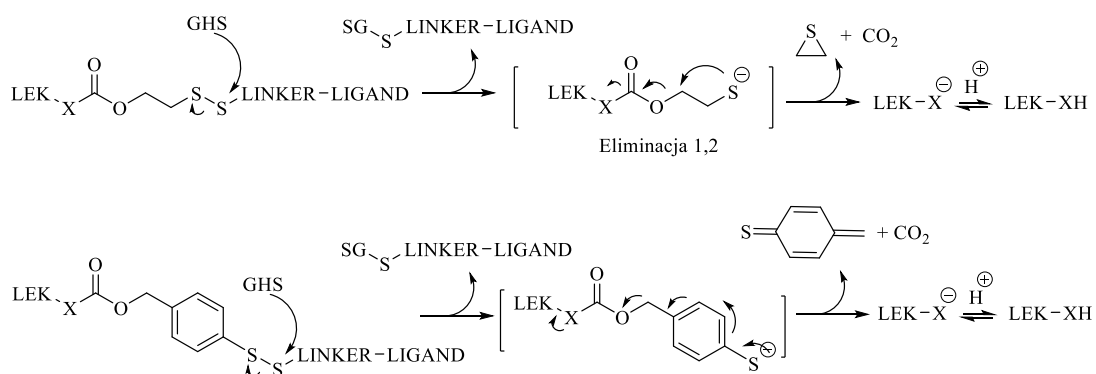
Innymi labilnymi wiązaniami wrażliwymi na zmianę środowiska są połączenia iminowe, ortoestrowe, *cis*-asonitylowe czy acetalowe. Te ostatnie są bardzo obiecującymi strukturami wrażliwymi na kwaśne środowisko, ponieważ udowodniono, że spadek pH o jedną jednostkę powoduje aż 10-krotny wzrost szybkości rozpadu tego połączenia.[106] Mechanizm uwalniania cząsteczki z proleku zawierającego w swojej strukturze połączenie acetalowe został przedstawiony na **Schemacie 1.15**. Rozpoczyna się on od ataku pary elektronowej na jon wodorowy w czego konsekwencji powstaje m.in. finalny lek posiadający grupę hydroksylową. Z kolei druga część koniugatu uzyskuje początkowo ładunek dodatni zlokalizowany na atomie tlenu, który w wyniku struktury rezonansowej zostaje przeniesiony na atom węgla tworząc karbokation, z którym oddziałuje wolna para elektronowa cząsteczki wody. W konsekwencji tego powstaje produkt pośredni początkowo z ładunkiem dodatnim na atomie tlenu pochodzącym od przyłączonej cząsteczki wody, który ulega przeniesieniu na atom tlenu grupy metoksyłowej w wyniku transferu protonu. Kolejno cząsteczka metanolu opuszcza związek a ładunek dodatni zlokalizowany zostaje na atomie węgla. W etapie końcowym grupa hydroksylowa ulega deprotonacji tworząc resztę karbonylową.



Schemacie 1.15 Mechanizm uwalniania leku z cząsteczki koniugatu zawierającego linker acetalowym.

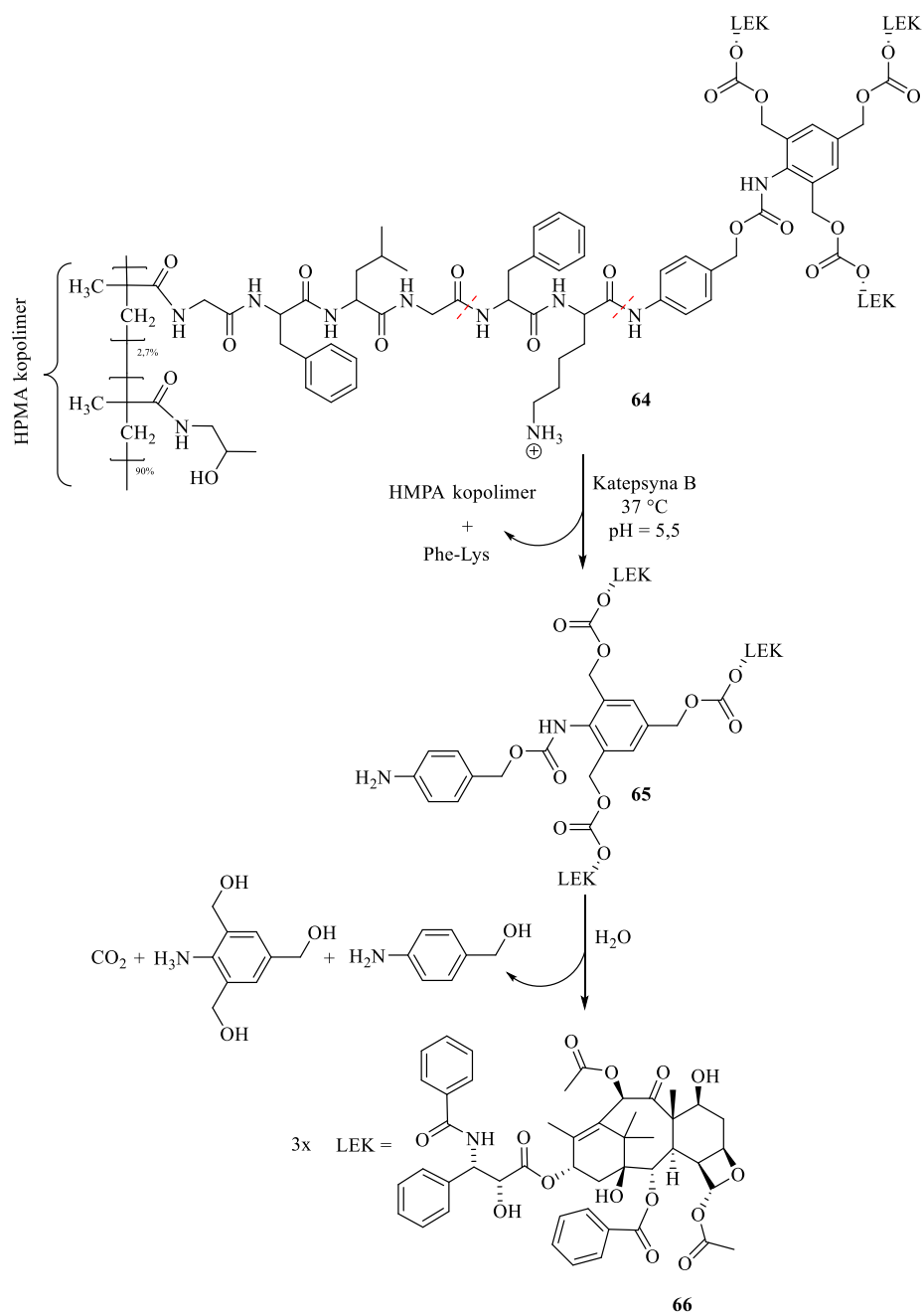
W przypadku kolejnego typu połączeń, czyli wiązań labilnych ulegających rozpadowi pod wpływem warunków redukcyjnych, wiele wiązań tego rodzaju ulega rozpadowi pod

wpływem działania glutationu (GSH). Glutation nazywany inaczej γ -glutamylcysteinylglycyną jest tripeptydem powszechnie występujących w organizmach żywych, przy czym jest najbardziej rozpowszechnionym i najobficiej występującym tiolem wewnątrzkomórkowym. Jego głównym zadaniem biochemicznym jest redukcja, która opiera się na wykorzystaniu grupy tiolowej będącej resztą cysteiny. Bardzo istotnym faktem jest to, iż stężenie glutationu jest zwykle podwyższone w komórkach nowotworowych piersi, jajników, głowy, szyi oraz płuc, w przeciwieństwie do nowotworów mózgu oraz wątroby, które jest niższe w porównaniu z tkankami wolnymi od choroby. Dodatkowo, wewnątrzkomórkowe stężenie w cytoplazmie komórki, będące na poziomie 2-10 mM, jest znacznie wyższe niż poziomy pozakomórkowe więc potencjał redukujący jest prawie zawsze znacznie wyższy wewnątrz niż na zewnątrz komórki.[107] Doskonałym przykładem wiązania labilnego, które ulega rozpadowi pod wpływem GSH jest mostek disiarczkowy, który jest stabilnym połączeniem podczas krążenia cząsteczki w krwioobiegu i płynach śródmiąższowych, a rozpadającym się wewnątrzkomórkowo.[108] Łączniki oparte na disulfidach są tymi, które można zaliczyć do najczęściej wykorzystywanych, a sama redukcja może być dwoma odrębnymi mechanizmami eliminacji 1,2 lub 1,6, które zostały przedstawione na **Schemacie 1.16**.



Schemacie 1.16 Mechanizmy uwalniania leku z cząsteczki koniugatu zawierającego mostek disiarczkowy.

Ostatnią grupą połączeń labilnych w prolekach są wiązania, które ulegają rozczepieniu pod wpływem reakcji enzymatycznej. W organizmie ludzkim występuje bogata gama różnego rodzaju enzymów hydrolitycznych, które zdolne są do cięcia połączeń w cząsteczkach, które są wyspecjalizowane w działaniu tzn. dany enzym przypisany jest swoim działaniem do danej grupy związków chemicznych. Dobrym przykładem koniugatu, którego substancja aktywna może zostać uwolniona pod wpływem działania takiego typu białka jest koniugat **64** zawierający w swojej budowie trzy cząsteczki leku jakim jest Paklitaksel **66** (**Schemat 1.17**). Mechanizm uwalniania tego leku został przedstawiony na **Schemacie 1.17**. Obywa się on pod wpływem działania katepsyny B, czyli lizosomalnej proteazy cysteinowej, która odgrywa ważną rolę w protolizie wewnątrzkomórkowej. Dodatkowo w niektórych typach nowotworów, w zmianach przednowotworowych oraz w różnych innych stanach patologicznych ludzkiego ciała odnotowano wzrost jej aktywności w stosunku do tkanek zdrowych.[109]

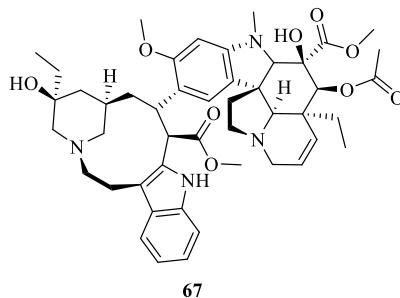


Schemat 1.17 Mechanizm uwalniania enzymatycznego Paklitaksenu **66**. Wszystkie aminokwasy w tej strukturze miały konfigurację L.

1.6.2.2 Przykłady koniugatów kwasu foliowego wykorzystywane w leczeniu nowotworów

1.6.2.2.1 Koniugaty kwasu foliowego z winblastyną

Winblastyna (z *lac.* *vinblastinum*) **67**, której struktura została przedstawiona na **Rys. 1.19**, zaliczana jest do naturalnych alkaloidów barwinka różyczkowego (z *lac.* *Catharanthus roseus*) z którego została wyizolowana w 1958 roku. Mechanizm jej działania polega na wiązaniu się z tubuliną, co prowadzi do zahamowania powstawania mikrotubul i w konsekwencji zaburza proces tworzenia wrzeciona podziałowego co zatrzymuje mitozę w fazie metafazy.

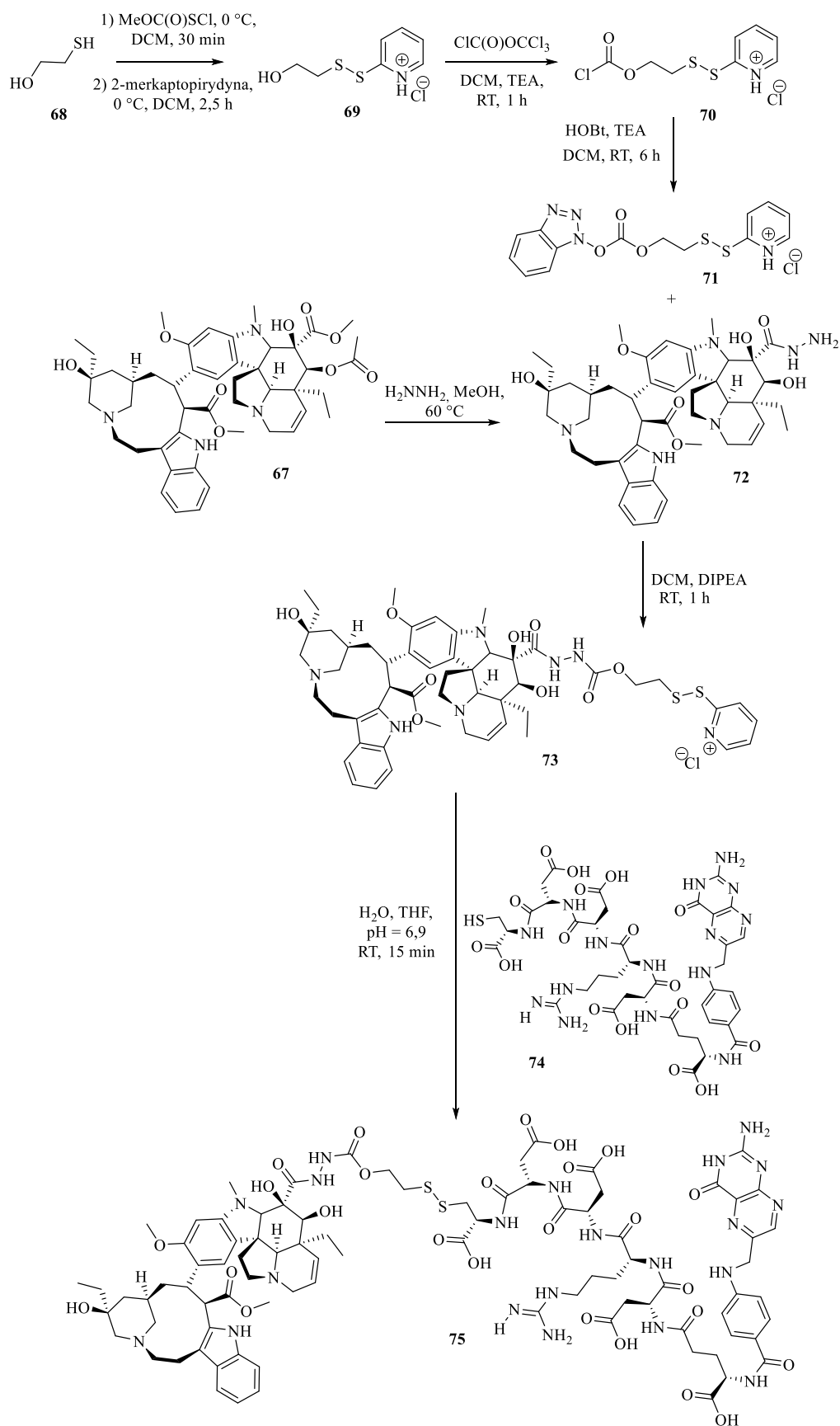


Rys.1.19 Struktura Winblastyny **67**.

Pierwsze próby oceny właściwości medycznych tego związku miały miejsce podczas badań prowadzonych na królikach. Mianowicie, zwierzętom podano ekstrakt z wyżej wymienionej rośliny w celu zbadania przypuszczalnych właściwości przeciwcukrzycowych i to właśnie wtedy po raz pierwszy ujawniono potencjał winblastyny jako środka chemioterapeutycznego. Eksperyment ten zakończył się śmiercią zwierząt spowodowaną infekcją bakteryjną powiązaną z brakiem białych krwinek. Od tego czasu, związek ten cieszył się bardzo dużym zainteresowaniem zarówno naukowców jak i lekarzy. Ponadto, od prawie pięćdziesięciu lat stosowana jest ona w onkologii klinicznej w leczeniu między innymi chłoniaka Hodgkina, chłoniaków nieziarnistych, nowotworów piersi, mięsaka Kaposiego, raka nerokowokomórkowego i nowotworu jąder.[110]

W literaturze odnaleźć można szereg folianowych koniugatów zawierających w swojej strukturze fragment pochodzący od winblastyny. Zostały one przedstawione w **Tabeli 1.3** i charakteryzują się tym, iż różnią się one między sobą rodzajem linkera oraz sposobem rozpadu wiązania labilnego. Pierwszym, a zarazem prawdopodobnie najważniejszym związkiem z tej grupy jest pochodna EC145 **75** (**Schemat 1.18**), która w swojej budowie zawiera wiązanie disulfidowe oraz jednostki peptydowe odpowiedzialne za dystansowanie fragmentu substancji aktywnej od fragmentu kwasu foliowego. Synteza tej pochodnej przedstawiona została na **Schemacie 1.18** i rozpoczyna się ona w momencie przekształcenia 2-merkaptotetanolu **68** w pochodną pirydynową **69** za pomocą chlorku metoksykarbonylosulfenylu oraz 2-merkaptopirydyny. Tak otrzymany produkt pośredni **69** potraktowany został difosgenem w obecności trietyloaminy (TEA) oraz DCM. Reakcja ta biegła w temperaturze pokojowej przez 1 h. Produkt tej reakcji nie został wyizolowany, tylko został *in situ* potraktowany HOBT w obecności TEA. Uzyskano w ten sposób związek **71** z wydajnością 75%. Warto zaznaczyć, że pochodna ta jest związkiem powszechnie wykorzystywanym w tworzeniu koniugatów kwasu foliowego, a jej zastosowanie ułatwia proces syntezy zapewniając dobre wydajności etapów pośrednich oraz stabilność końcowego produktu.

Kolejny fragment związku EC145 **75** zsyntezowany został z wykorzystaniem komercyjnie dostępnej winlastyny **67**, która poddana została reakcji z hydrazyną w obecności MeOH. Konsekwencją tego było uzyskanie pochodnej **72**, która w kolejnym etapie została sprzęgnięta ze związkiem **71**. Reakcja ta przebiegła z wydajnością 80% dając ester 2-(winblastynylo)hydrazynokarboksylowy kwasu 2-pirydyloeditioetylowego **73**, który został oczyszczony z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej. Kończącym etapem tej dość rozbudowanej syntezy była reakcja z pochodną kwasu foliowego **74**, która została uzyskana na drodze syntezy peptydów na fazie stałej. Przebiegła ona w temperaturze pokojowej w mieszaninie wody oraz THF przy pH równym 6,9. Reakcja trwała zaledwie kwadrans i pozwoliła otrzymać czysty produkt końcowy **75** z wydajnością 70%.[111]



Schemacie 1.18 Szlak syntezy otrzymywania EC145 75.

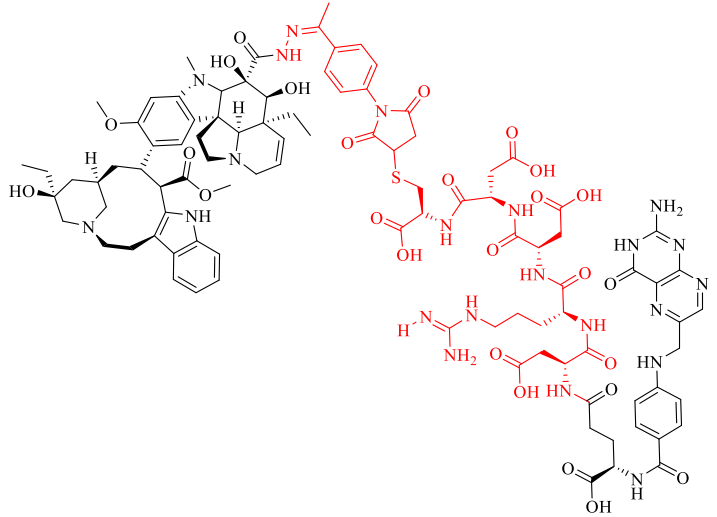
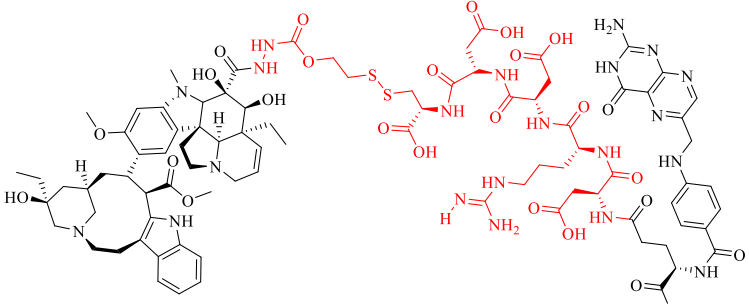
Wiązaniem labilnym w EC145 jak wspomniano powyżej jest mostek disiarczkowy, który w środowisku endosomalnym ulega rozpadowi, co zostało potwierdzone podczas badania mechanizmu rozpadu w laboratoryjnym eksperymencie bez wykorzystania komórek. Uwolnienie substancji aktywnej z proleku odbyło się w 1 mM roztworze EC145, w obecności buforu PBS (pH = 7,4) oraz 20 mM czynnika redukującego jakim był GSH w temp 37 °C. Całkowite rozczepienie wiązania disulfidowego nastąpiło w ciągu 6 h ($t_{1/2}$ = 1 h) poprzez mechanizm eliminacji 1,2, który przedstawiony został w podrozdziale 1.6.2.1 na **Schemacie 1.16**. Tworzenie wolnego leku zostało potwierdzone poprzez wykorzystanie chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas. Warto zaznaczyć, że podczas braku czynnika redukującego w wyżej wymienionej mieszaninie, związek EC145 był stabilny ponad 24 h. Ponadto, dowiedziono, że podobne profile uwalniania uzyskano również z wykorzystaniem innych czynników redukujących ditiotreiolem (DTT), który spowodował jeszcze szybszy rozpad niż przy użyciu GSH, gdyż czas półtrwania wynosił zaledwie 5 minut.[111]

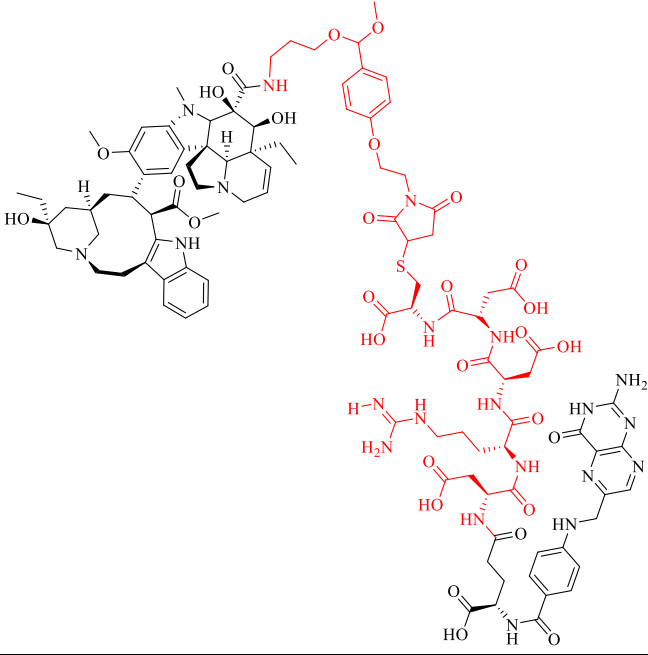
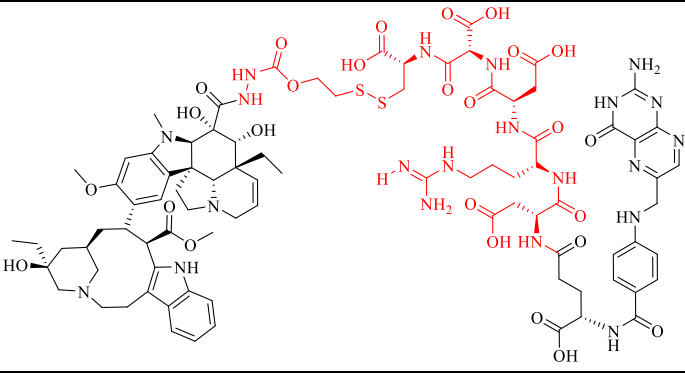
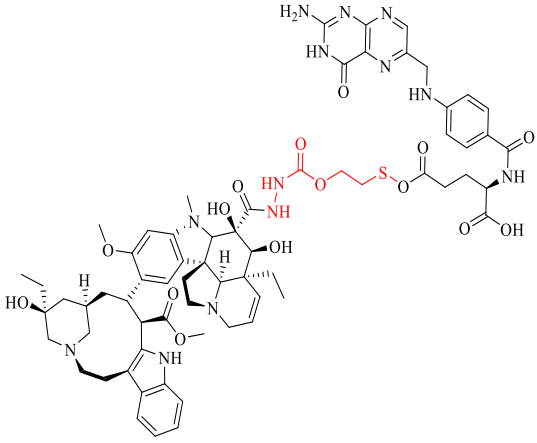
EC145 został przetestowany w badaniach przedklinicznych na wielu modelach zwierzęcych. Wyniki tych badań wykazały działania przeciwnowotworowe przeciwko guzom FR-dodatnim. Testy te prowadzone były między innymi na nagich myszach posiadających podskórne ludzkie ksenografy (np. agresywny model chłoniaka J6456) z dodatnim receptorem kwasu foliowego. U wszystkich osobników odnotowano całkowitą odpowiedź i wyleczenie, a u większości również brak nawrotu choroby. Aktywności EC145 nie towarzyszyła zauważalna utrata masy ciała ani degeneracja tkanek narządów głównych. Dodatkowo wykonano testy sprawdzające selektywność tego proleku z wykorzystaniem nadmiaru kwasu foliowego, które wykazały specyficzność proleku względem RF. Podczas tych badań wykazano, że niesprężony lek okazał się całkowicie nieaktywny, gdy był podawany na nietoksycznych poziomach dawkowania, bądź tylko marginalnie aktywny w przypadku wysoce toksycznych ilościach dawek.[112] Konsekwencją bardzo dobrych wyników badań przedklinicznych była kontynuacja testów na poziomie badań klinicznych i z tego powodu EC145 w roku 2006, stał się pierwszym koniugatem kwasu foliowego, który dotarł do tego etapu badań klinicznych. Badania fazy IIb dotyczące niedrobnokomórkowego raka płuc z zastosowaniem samego EC145 oraz kombinacji EC145 wraz z docetakselem i samego docetakselu zakończone zostały w 2015 roku (CTI:NCT01577654). Połączenie tych dwóch substancji skutkowało poprawą przeżycia wolnego od progresji o 7,1 miesiąca oraz przeżycia całkowitego wynoszącego 10,9 miesiąca. Badania fazy III oceniające EC145 w skojarzeniu z Doxilem w leczeniu raka jajnika odpornego na platynę zostały zawieszone w 2014 roku, czego powodem był brak poprawy przeżywania wolnego od progresji.[113]

W **Tabeli 1.3** zebrano inne koniugaty kwasu foliowego zawierające w swojej strukturze winblastynę opisane w literaturze naukowej. Związki te różnią się między sobą rodzajem łącznika oraz wiązania labilnego, chociaż najczęściej występującym jest już wcześniej wymieniane wiązanie disiarczkowe. Pochodne ECO265, ECO272, ECO276 różnią się między sobą obecnością grup metylowych w rejonie wiązania disiarczkowego. Powoduje to zwiększenie stabilności oraz spadek szybkości rozczepienia łącznika niż było to w przypadku związków niezmodyfikowanych. Czas półtrwania ECO265 przy wykorzystaniu 8 mM DTT, pH = 7,4, 37 °C wynosił 1 h, dla ECO272 30 minut, a dla ECO276 8 h przy zachowaniu tych samych warunków. Ponadto, EC195 ulegał połowicznemu rozpadowi w 45 minut przy użyciu GSH, a w mniej niż 5 minut przy wykorzystaniu DTT, a sam związek był w roztworze buforowym PBS stabilny przez ponad 24 h. EC193 oraz EC140 są stabilne w neutralnym pH, jednak jego obniżenie do warunków lekko kwaśnych (pH = 5-6) powoduje ich rozpad odpowiednio w 25 minut oraz 5,5 h. Podsumowując, wprowadzając różnego rodzaju

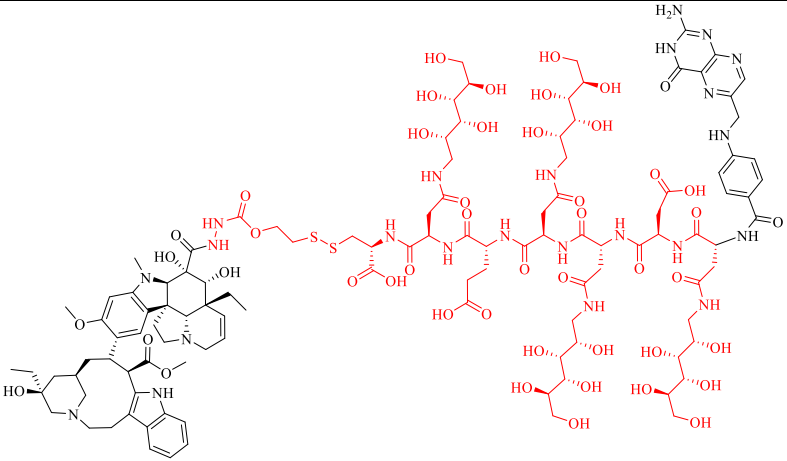
modyfikację do elementu łącznika można wpływać w sposób bezpośredni zarówno na trwałość samego proleku oraz na czas uwolnienia substancji aktywnej w miejscu docelowym w ciele pacjenta.

Tabela 1.3 Przykłady koniugatów kwasu foliowego zawierającego w swojej strukturze winblastynę.

Nazwa	Struktura	Warunki rozczepienia
EC140		Zależne od pH
EC145		Redukcja (eliminacja 1,2)

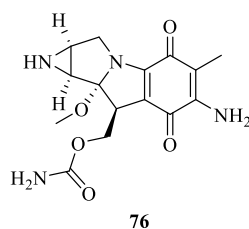
EC193		Zależne od pH
EC195		Redukcja (eliminacja 1,2)
EC216		Redukcja (eliminacja 1,2)

ECO265		Redukcja (eliminacja 1,2)
ECO272		Redukcja (eliminacja 1,2)
ECO276		Redukcja (eliminacja 1,2)
ECO489		Redukcja (eliminacja 1,2)

ECO492		Redukcja (eliminacja 1,2)
--------	--	--

1.6.2.2.2 Koniugaty kwasu foliowego z mitomycyną C

Mitomycyna C **76** przedstawiona na **Rys. 1.20**, została odkryta w latach 50-tych XX wieku przez japoński zespół mikrobiologów w kulturach fermentacyjnych *Streptomyces caespitosus*. Związek ten jest inhibitorem replikacji DNA, który jest w stanie związać się kowalencyjnie z matrycą DNA, co powoduje brak możliwości jej rozplecenia.[114] Właśnie z powodu takich właściwości pochodna ta charakteryzuje się szerokim spektrum działania przeciwnowotworowego. Wykazano bowiem, że jest skutecznym farmaceutykiem w leczeniu nowotworów żołądka, piersi, trzustki, szyjki macicy, głowy oraz szyi czy pęcherza moczowego. Jednak szybkie usuwanie mitomycyny C z organizmu oraz toksyczność dla zdrowych tkanek sprawiają, że jej zastosowanie kliniczne jest ograniczane.



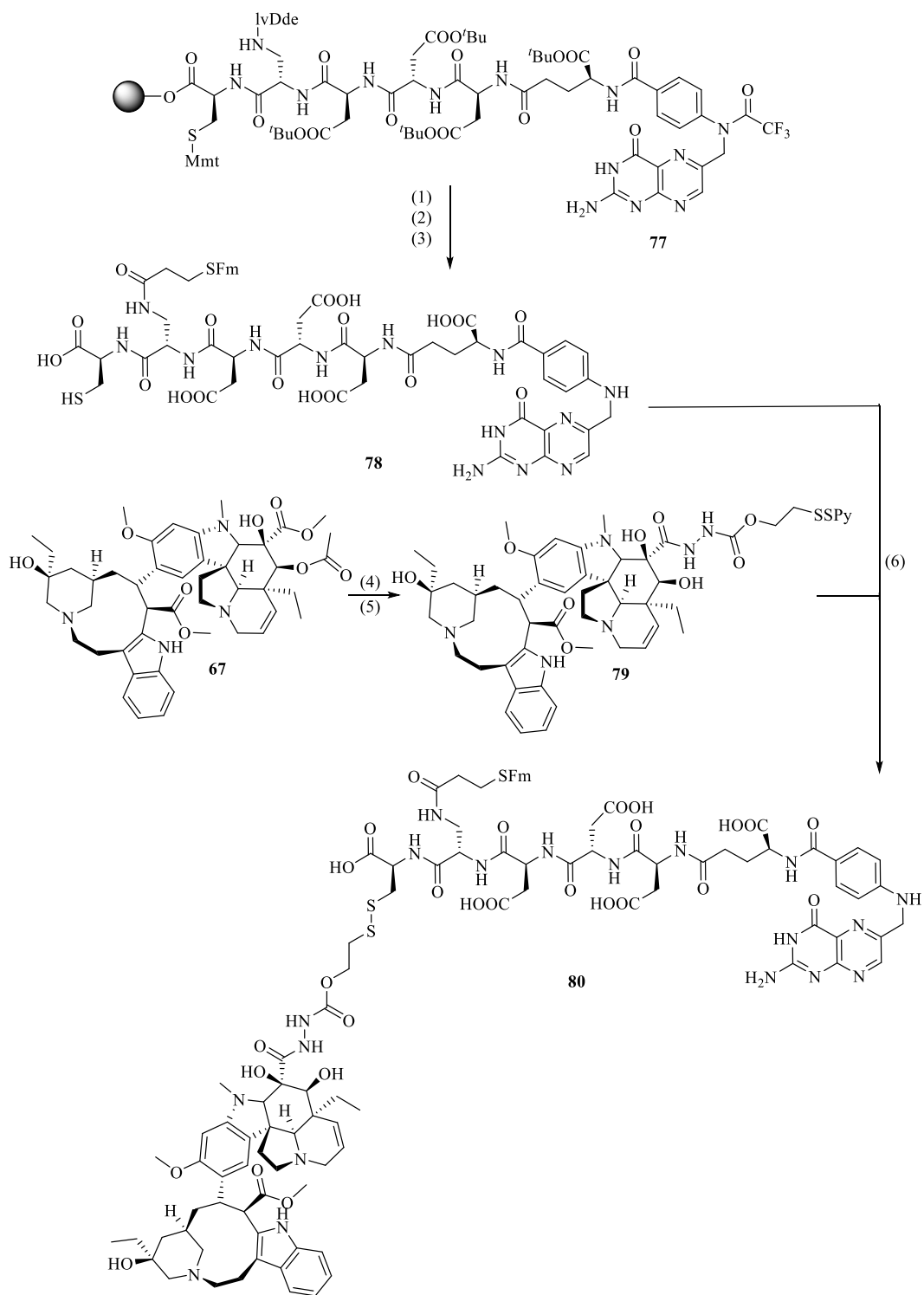
Rys. 1.20 Wzór strukturalny mitomycyny C.

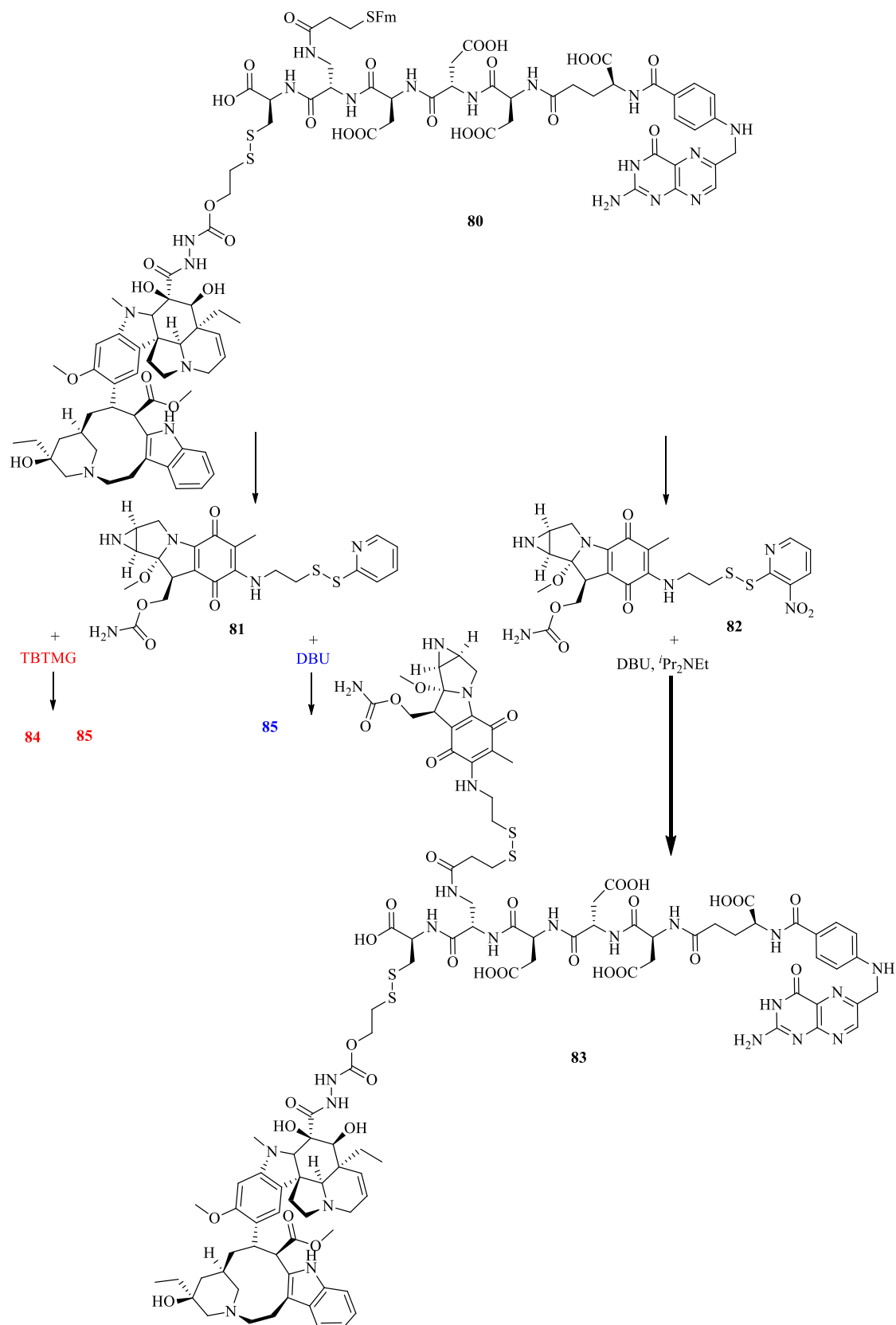
W celu poprawienia specyficzności potencjalnych farmaceutyków zawierających w swojej strukturze fragment pochodzący od mitomycyny C względem komórek nowotworowych zastosowano strategię projektowania koniugatów tego związku z kwasem foliowym. Przedstawiciele tej grupy zostali zaprezentowani w **Tabeli 1.4**. Pierwszym przykładem takiego związku jest EC72, który w swojej strukturze zawiera mostek disiarczkowy, który jak już wcześniej wykazano jest często stosowanym rodzajem wiązania labilnego. Związek ten został zbadany zarówno w testach *in vitro* na linii komórkowej zawierającej FR(+), co dało dobre wyniki, jak i na modelu zwierzęcym, które przedstawiły dobrą aktywność przeciwnowotworową, bez widocznej toksyczności czy patologicznej degeneracji zdrowych tkanek.[115]

Innym bardzo ciekawym przykładem tego typu koniugatu jest związek EC110, który jako łącznik wykorzystuje łańcuch węglowy. Usunięcie mostku disiarczkowego spowodowało brak możliwości rozpadu i co za tym idzie uwolnienia substancji aktywnej. Co ciekawe związek ten nie wykazał aktywności przeciwnowotworowej przy zastosowaniu takiej samej dawki jak w przypadku jego odpowiednika, czyli EC72. W jednoznaczny sposób wskazuje to, iż etap rozczepienia jest jednym z ważniejszych momentów w trakcie działania proleku. Niestety potencjał terapeutyczny EC72 zmniejszał się wraz ze wzrostem wielkości guza podskórnego. Dlatego naturalną kontynuacją tych badań było zaprojektowanie nowego koniugatu z pewnymi modyfikacjami. Takim związkiem był EC118, który oprócz redukowalnego wiązania disiarczkowego posiadał w swojej budowie wiązanie hydrazonowe, które ulega rozczepieniu w środowisku kwaśnym. Zmiany te wpłynęły korzystnie na właściwości medyczne tej pochodnej, gdyż stosując ją nastąpiła znaczna poprawa w stosunku do prób leczenia podskórnych nowotworów M109 w stosunku do wykorzystania związku EC72.[116]

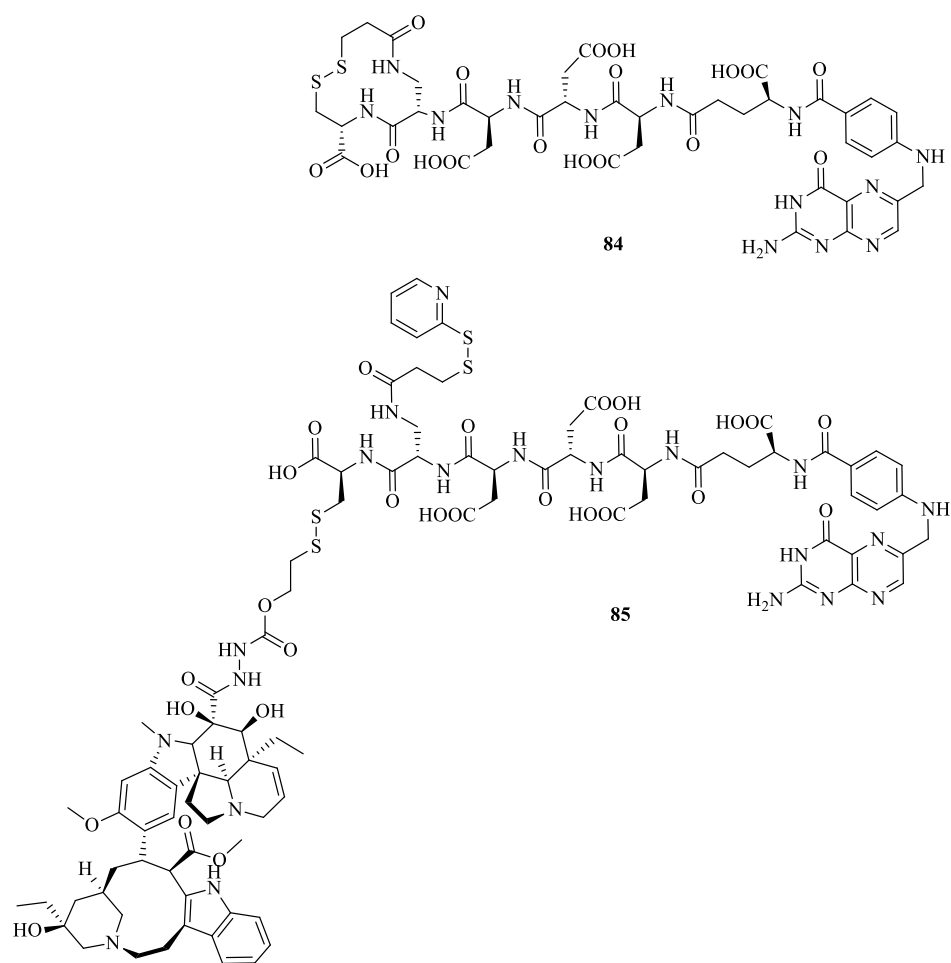
Z onkologicznego punktu widzenia najbardziej obiecującymi związkami często są środki wykazujące aktywność wobec więcej niż jednego celu molekularnego (tzw. „multi-targeting agents”). Przedstawicielem tej grupy, który co warto zaznaczyć został otrzymany jako pierwszy z tego typów, jest związek ECO225 **83** (**Schemat 1.19**), który łączy kwas foliowy z mitomycyną C oraz winblastyną. Jego synteza została przedstawiona na **Schemacie 1.19**. Ta

wieloetapowa droga syntetyczna rozpoczyna się od otrzymania pochodnej kwasu foliowego połączonego z peptydowym linkerem **77**, gdzie wszystkie grupy funkcyjne są chronione. Związek **77** został otrzymany z wykorzystaniem techniki syntezy peptydów na fazie stałej. Łącznik peptydowy znajdujący się w tej cząsteczce, pełni nie tylko funkcję scalającą substancje aktywne z kwasem foliowym, ale również odpowiada za odpowiedni poziom hydrofilowości i tłumia pasywną dyfuzję przez błonę komórkową, dzięki czemu zmniejsza niepożądane dostarczanie tego proleku do komórek nie posiadających RF. Grupa tiolowa cysteiny, która początkowo zabezpieczona była grupą zawierającą S-metanotiosulfonian metylu (MmTS), jest pierwszym miejscem przyłączenia kolejnych fragmentów cząsteczki, a zarazem miejscem stworzenia wiązania labilnego w dalszej drodze syntetycznej. Drugie miejsce łączenia uzyskano poprzez reakcje grupy aminowej z FmocS(CH₂)₂COOH (Fmoc - grupa 9-fluorenylometoksykarbonylowa). Równolegle prowadzone były reakcje modyfikacji winblastyny **67** poprzez reakcje z hydrazyną w etapie pierwszym oraz z PySS(CH₂)₂OC(O)O^tBu w etapie kolejnym. Tak przygotowany związek **79**, poddany został reakcji z wcześniej otrzymaną pochodną **78**. Reakcja ta prowadzona była w roztworze woda : THF i przebiegła z wydajnością rzędu 75%. W ten sposób uzyskano pierwsze wiązanie disulfidowe z wykorzystaniem atomu siarki pochodzącego od reszty cysteinowej. Następnym zadaniem syntetycznym niezbędnym do uzyskania gotowego koniugatu było usunięcie grupy Fm-S. Tutaj wykonano kilka prób w celu optymalizacji metody, gdyż niektóre z nich kończyły się ograniczonym sukcesem. Mianowicie, usunięcie grupy Fmoc przy użyciu pirydyny przebiegało dość powoli i generowało wiele produktów ubocznych, dlatego spróbowano wykorzystać 2-*tert*-butyl-1,1,3,3-tetrametyloguanidynę (TBTMG) zamiast pirydyny jednak spowodowało to powstanie złożonej mieszaniny pożądanego produktu oraz dwóch produktów ubocznych w postaci cyklicznego disulfidu **84** oraz 2-pirydylodisulfidowej pochodnej **85** (**Rys. 1.21**). Kolejnym ciekawym pomysłem było zastosowanie 1,8-diazabicyklo(5.4.0)undek-7-enu (DBU) jako silnej, nienukleofilowej zasady. W obecności związku **80** te nowatorskie warunki pozwoliły w czasie krótszym od pięciu minut uzyskać mieszaninę oczekiwanego produktu oraz 2-pirydylodisulfidowej pochodnej. Finalnie drugie połączenie disulfidowe zostało uzyskane z użyciem pochodnej **82** zawierającej w swojej strukturze grupę nitrową, która odpowiedzialna jest za efekt silnego wyciągania elektronów z pierścienia aromatycznego. Dodatkowo do mieszaniny reakcyjnej dodana została diizopropylamina oraz DBU. W ten oto sposób reakcja zakończyła się w przeciągu pięciu minut z wydajnością 88%.^[117]



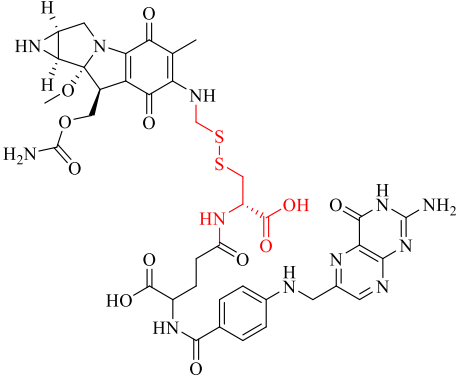
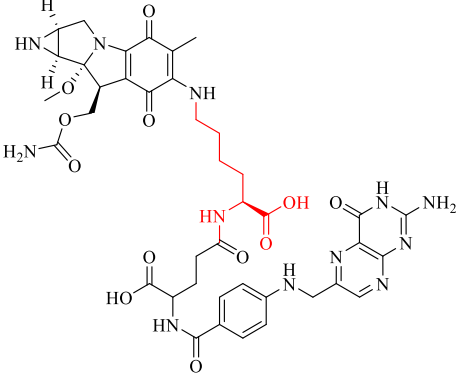
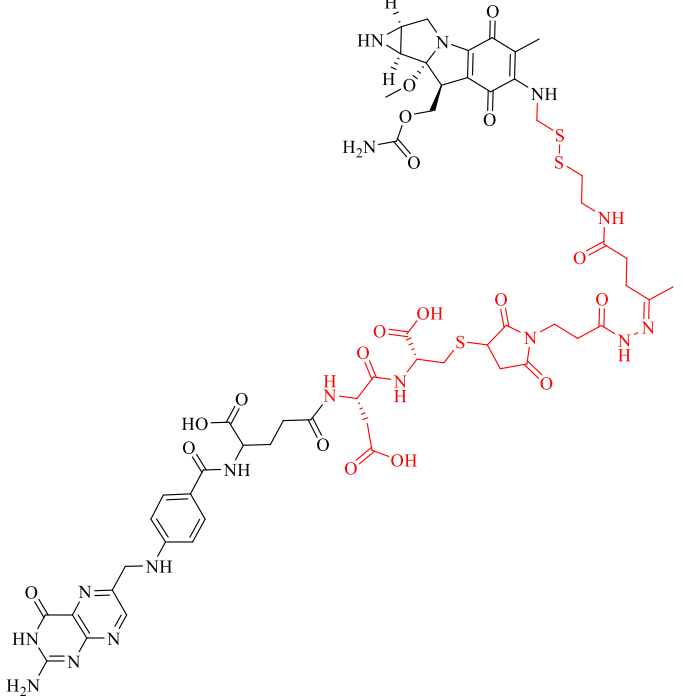


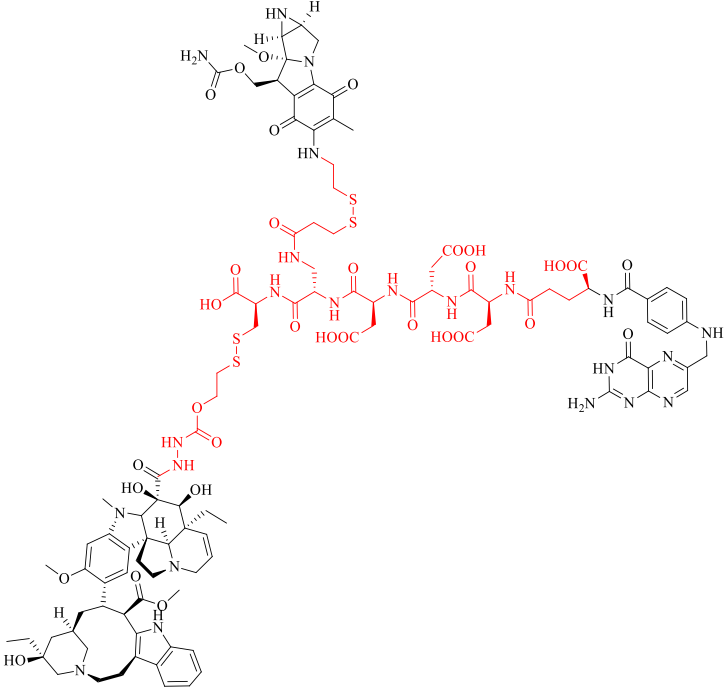
Schemat 1.19 Szlak otrzymywania pochodnej ECO255 **83**. Warunki reakcji (1) 2% NH_2NH_2 , DMF, 5 min, rt (2) $\text{FmS}(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$, PyBoP, $i\text{-Pr}_2\text{NEt}$, DMF (3) TFA, H_2O , TIPS, EDT (4) THF/ H_2O (1:1) (5) NH_2NH_2 , MeOH, 15 h (6) $\text{PySS}(\text{CH}_2)_2\text{OC}(\text{O})\text{OBt}$, TEA, DCM, 83%



Rys. 1.21 Produkty uboczne syntezy pochodnej ECO255 **83**.

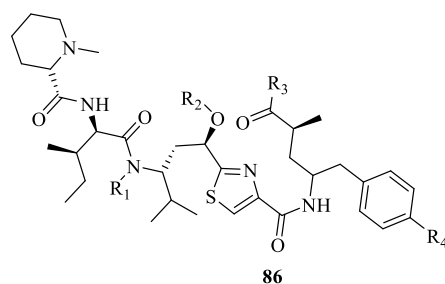
Tabela 1.4 Przykłady koniugatów kwasu foliowego zawierającego w swojej strukturze mitomycyne C.

Nazwa	Struktura	Warunki rozczepienia
EC72		Redukcja (eliminacja 1,2)
EC110		Nierozczepiany
EC118		Redukcja (eliminacja 1,2)

ECO225		Redukcja (eliminacja 1,2)
--------	--	--------------------------------------

1.6.2.2.3 Koniugaty kwasu foliowego z tubulizyną

Tubulizyny są rodziną związków pierwotnie wyizolowanych ze szczepu mykobakterii *Archangium gephyra* i *Angiococcus disciformis* w roku 2000 przez zespół Höflea.[118] Charakteryzują się one właściwościami przeciwnowotworowymi, antyangiogennymi i antyproliferacyjnymi ukierunkowanymi na mikrotubule. Wzór strukturalny tubulizyn został przedstawiony na **Rys. 1.22.**, a w **Tabeli 1.5.** zostały zaprezentowane różnego rodzaju warianty tej substancji.



Rys. 1.22 Wzór ogólny tubulizyny **86**.

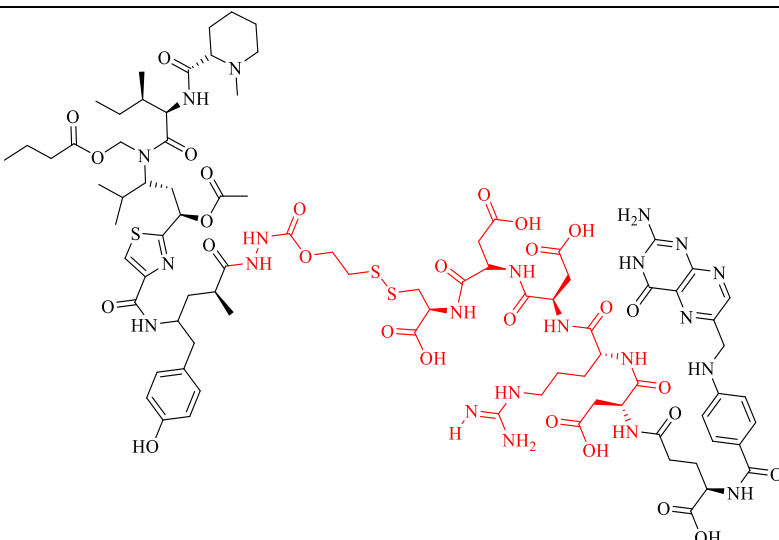
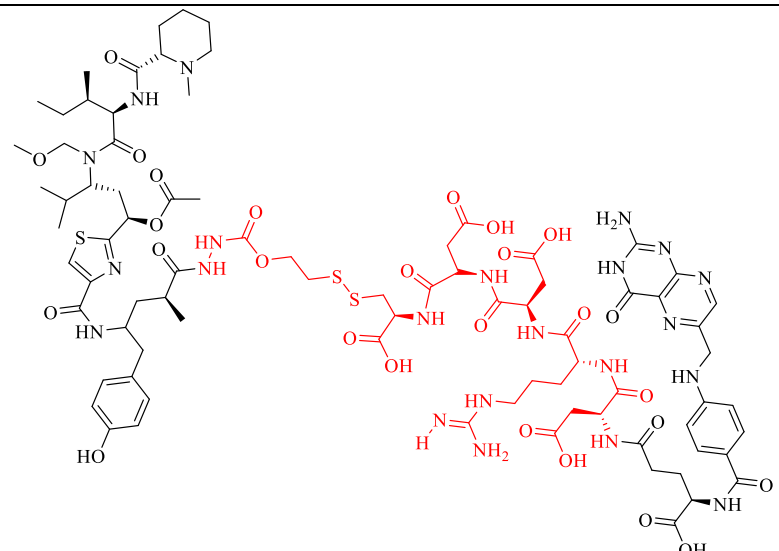
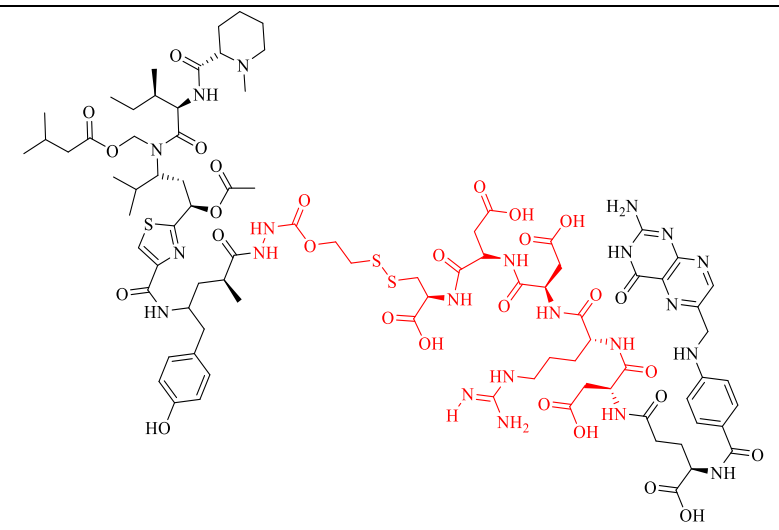
Tabela 1.5. Różne typu tubulizyny.

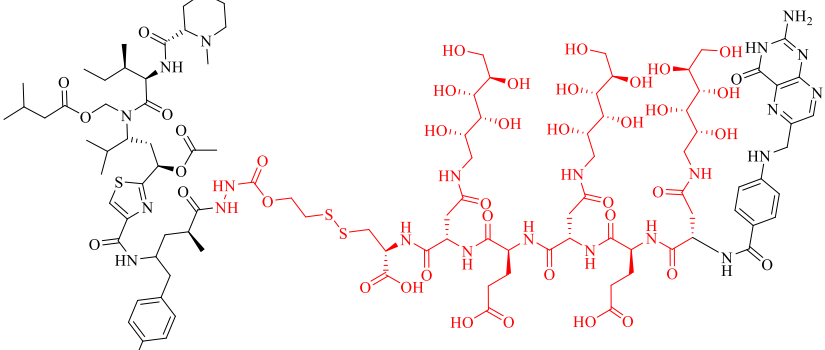
Tubulizyna	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
A	CH ₂ OC(O)CH ₂ CH(CH ₃) ₃	Ac	H	OH
B	CH ₂ OC(O)CH ₂ CH ₂ CH ₃	Ac	OH	OH
D	CH ₂ OC(O)CH ₂ CH(CH ₃) ₃	Ac	H	H
H	CH ₂ OC(O)CH ₃	Ac	H	H
U	H	Ac	H	H
V	H	H	H	H

Tubulizyny charakteryzują się silną aktywnością w testach *in vitro* jednak ich zastosowanie terapeutyczne jest ograniczone przez występowanie wysokiego stopnia toksyczności w testach *in vivo*. Między innymi z tego powodu zaproponowano, aby ukierunkować ich działanie poprzez połączenie ich z ligandem celującym jakim jest kwas foliowy. W literaturze odnaleźć można cztery koniugaty, które w swojej strukturze zawierają tego rodzaju pochodne (**Tabeli 1.6.**). Związek ECO305 jest hydrazidem tubulizyny B zawierający ten sam rodzaj łącznika peptydowego co pochodna EC145. Związek ten w badaniach *in vivo* z wykorzystaniem komórek KB wykazał wartość IC₅₀ na poziomie 7 nM.[119] Kolejnym koniugatem jakim jest cząsteczka ECO510, będąca pochodną tubulizyny A, wykazała podobne wartości IC₅₀ jak cząsteczka EC305, jednak te dwa koniugaty charakteryzowały się różną skutecznością w dawce 0,5 µmol/kg. Koniugat ECO510 wykazał bardzo dobrą aktywność przeciwnowotworową, a u 80% zwierząt wystąpił całkowity zanik choroby. W tej samej dawce ECO305 prezentował umiarkowaną aktywność przeciwnowotworową, gdy dawkowanie zwiększono do 10 µmol/kg, odpowiedź organizmów była znacząca, gdyż guzy wszystkich myszy zniknęły po ok. 80 dniach. Warto jest podkreślić fakt, iż cząsteczki te różni jedynie obecność lub brak jednej grupy metylowej w łańcuchu węglowym podstawnika R₁. W **Tabeli 1.6** znajdują się również związek ECO317, będący pochodną eteru metylowego tubulizyny B. Wykazywał on mniejsze aktywności zarówno w testach *in vivo* czy *in vitro* niż pochodna EC305 nawet po zwiększeniu dawki do 2

$\mu\text{mol/kg}$. [120] Ostatnim przykładem tego rodzaju koniugatu jest związek EC1456 zawierający w sobie ligand peptydowy drugiej generacji. Aktywność tego związku została zbadana z wykorzystaniem komórek FR(+) KB, a wyniki testu IC_{50} wyniosły 1,5 nM. Ciekawym jest jednak fakt, że dokonano również pomiarów L-enancjomeru tego związku, a wynik, który otrzymano był identyczny, co świadczy o tym, iż uwalnianie leku z tego typu koniugatu opartego na łącznikach disulfidowych nie jest zależna od stereospecyficzności fragmentu będącego linkerem. W badaniach tych również potwierdzono specyficzność tego związku poprzez wykorzystanie kwasu foliowego jako ligandu konkurencyjnego w stosunku do receptorów folianowych. Prace nad tą pochodną były kontynuowane w testach *in vivo*, gdzie oceniano aktywności przeciwnowotworową na mysim modelu guza KB z FR(+). Gryzoniom tym podawana była dawka potencjalnego proleku w ilości 2 $\mu\text{mol/kg}$ trzy razy w tygodniu przez 14 dni. Zwierzęta te podzielone zostały na trzy podgrupy, a leczenie rozpoczęto, gdy wielkości guzów były następujące: 224-312 mm^3 , 389-617 mm^3 oraz 640-821 mm^3 . Wyniki jakie otrzymano po 14 dniach były następujące: guzy nieleczonych osobników osiągnęły rozmiary rozmiar ok. 1500 mm^3 , a w przypadku zwierząt objętych dawkowaniem leczenie było 100% skuteczne i wszystkie myszy, nie zależnie od początkowej wielkości guza, zostały wyleczone. Co również ważne, masa myszy nie uległa zmianie w sposób znaczący ani podczas trwania terapii ani po jej zakończeniu. Warto dodać, że związek ten dotarł do I fazy badań klinicznych. [121]

Tabela 1.6 Przykłady koniugatów kwasu foliowego zawierającego w swojej strukturze tubulizynę.

Nazwa	Struktura	Warunki rozczepienia
ECO305		Redukcja (eliminacja 1,2)
ECO317		Redukcja (eliminacja 1,2)
ECO510		Redukcja (eliminacja 1,2)

EC1456		Redukcja (eliminacja 1,2)
--------	--	---------------------------------

Podsumowując, temat koniugatów kwasu foliowego z substancjami o charakterze przeciwnowotworowym jest zakresem nauki, który warto eksplorować, gdyż daje on zarówno ogromne możliwości modyfikacji struktur, które można projektować na wiele sposobów, jak i wnioskować można, że jest też zakresem, gdzie już w tym momencie odniesiono wiele sukcesów na polu uzyskiwania przyszłych proleków.

II Cel i zakres pracy

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

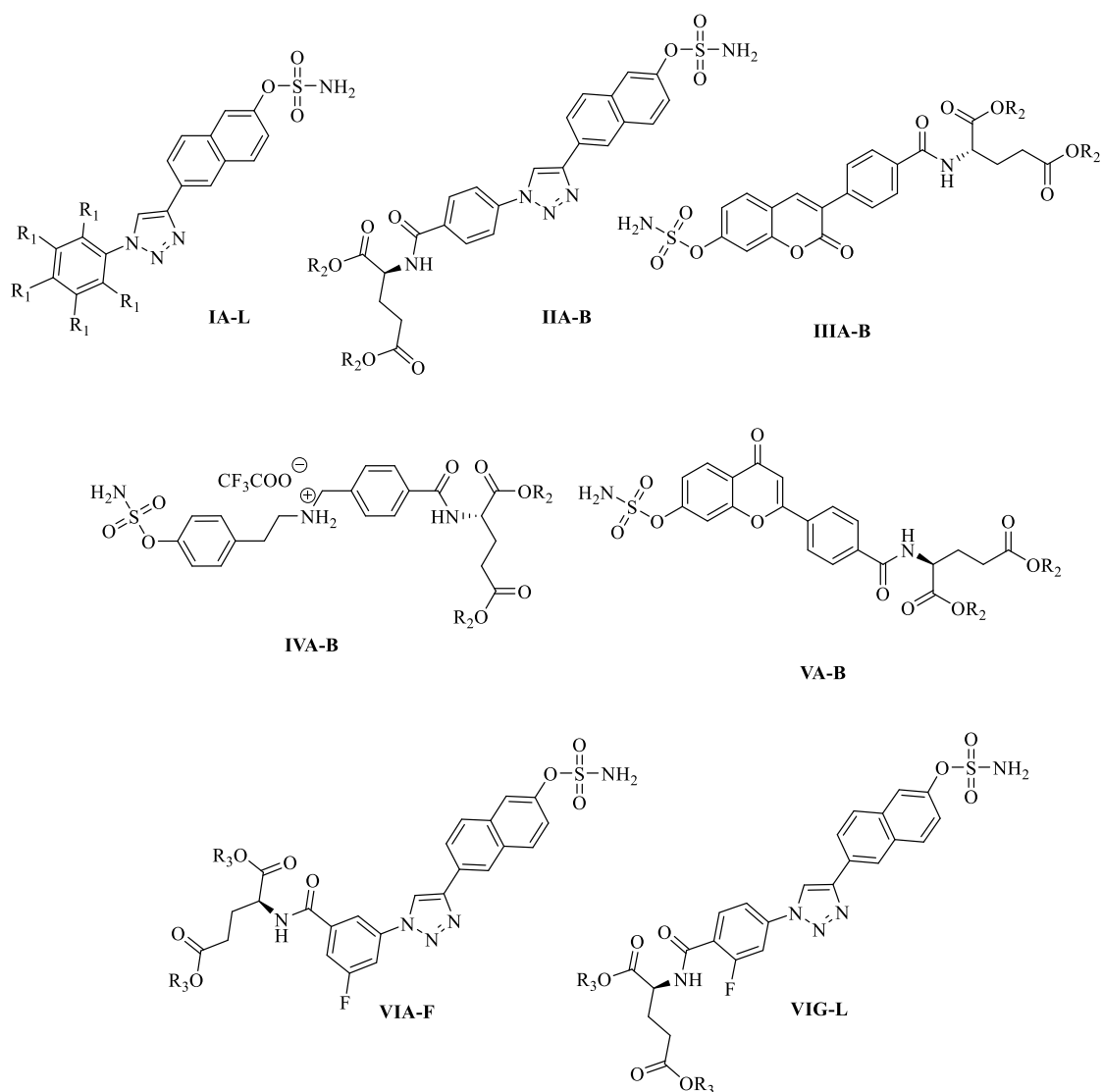
1. Wykonanie przeglądu literatury z zakresu budowy oraz mechanizmu działania STS.
2. Zgromadzenie informacji na temat opisanych w literaturze inhibitorów STS oraz ich zastosowania w leczeniu nowotworów hormonozależnych.
3. Dokonanie przeglądu literaturowego na temat kwasu foliowego wraz z jego pochodnymi oraz przedstawienie charakterystyki transportu tych cząsteczek w ludzkim organizmie.
4. Zebranie materiału literaturowego na temat syntezy oraz wykorzystania koniugatów kwasu foliowego w wykrywaniu oraz leczeniu nowotworów posiadających nadekspresję receptorów kwasu foliowego.
5. Zaprojektowanie struktur chemicznych dla trzech serii potencjalnych inhibitorów STS, w tym dwóch serii cząsteczek zawierających w swojej budowie elementy strukturalne upodabniające je do kwasu foliowego korzystając z techniki dokowania molekularnego.
6. Przeprowadzenie syntezy wyselekcjonowanych na podstawie wyników badań *in silico*, potencjalnych inhibitorów STS, których aktywność biologiczna zostanie oceniona w teście enzymatycznym z wykorzystaniem STS wyizolowanego z ludzkiego łożyska oraz w badaniach komórkowych wykorzystujących linie nowotworowe MCF-7 oraz JEG-3.
7. Zaprojektowanie struktury oraz szlaku syntetycznego koniugatu kwasu foliowego z wyselekcjonowanym inhibitorem STS.
8. Przeprowadzenie wieloetapowej syntezy w celu otrzymania koniugatu FA z inhibitorem STS, którego aktywność biologiczna zostanie oceniona w teście na wyizolowanym enzymie, w testach komórkowych oraz w badaniach selektywności i swoistości tego związku względem receptorów kwasu foliowego w podtypie α .

III Badania własne

3.1 Uzasadnienie podjętych badań oraz opis planowanych eksperymentów

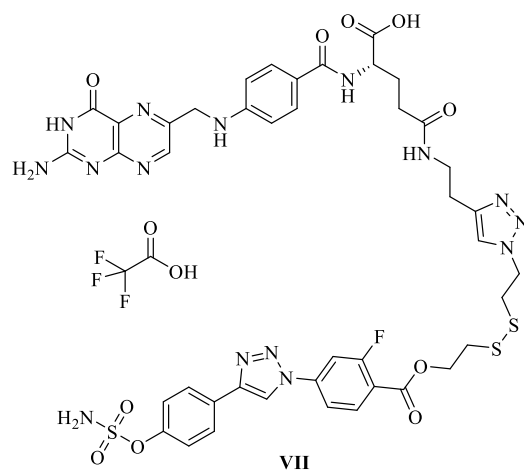
Synteza inhibitorów STS charakteryzujących się korzystnymi właściwościami biologicznymi bez wywoływania negatywnych skutków ubocznych od lat cieszy się dużym zainteresowaniem wielu zespołów naukowych. Co warto podkreślić, również w grupie badawczej dr hab. inż. Sebastiana Demkowicza z Katedry Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej, od przeszło dekady, trwają prace z zakresu tej tematyki. Zaowocowały one do tej pory opracowaniem bogatej biblioteki związków o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu nowotworów hormonozależnych (patrz podrozdział 1.4.3). Z wieloletniego doświadczenia członków zespołu wynika, iż poziom aktywności nowo otrzymanych związków wobec STS wiązany jest bezpośrednio, zarówno z rodzajem zastosowanego farmakofora, jak i rdzenia samej cząsteczki.

W związku z chęcią poprawy właściwości terapeutycznych już otrzymanych inhibitorów STS poprzez zwiększenie ich selektywności wobec komórek nowotworowych w toku podjętych przeze mnie badań realizowanych w ramach dyscypliny Nauk Chemicznych Szkoły Doktorskiej Politechniki Gdańskiej, postanowiłam zaprojektować i otrzymać szereg nowych związków będących potencjalnymi inhibitorami STS zawierających fragmenty strukturalne upodabniające je do struktury kwasu foliowego (m.in. resztą kwasu glutaminowego) (związki **IIA-B**, **IIIA-B**, **IVA-B**, **VA-B** oraz **VIA-L**, **Rys. 3.1**) oraz koniugat kwasu foliowego z inhibitorem STS (STS-FA) (związek **VII**, **Rys. 3.2**). W ramach syntezy inhibitorów STS otrzymałam amidosiarczanowe pochodne 1,2,3-triazolu, kumaryny, flawonów, tyraminy, a uzasadnieniem wyboru powyższych rdzeni była ich potwierdzona aktywność biologiczna. Dodatkowo, rdzenie te są układami pierścieni aromatycznych, które skutecznie imitują steroidową strukturę naturalnych substratów STS. Jednak fakt, że nie są one steroidami zmniejsza ryzyko wystąpienia skutków ubocznych wynikających z właściwości estrogenowych. Dodatkowo, przed syntezą jednej z pierwszych serii związków **IIA-B**, otrzymałam serię **IA-L** (**Rys. 3.1**), w której pierścień fenyłowy połączony z ugrupowaniem amidosiarczanowym (występujący pierwotnie w tego typu inhibitorach STS otrzymanych w grupie badawczej dr hab. inż. Sebastiana Demkowicza) zastąpiony został układem zawierającym naftalen. Badania te przeprowadzono w celu oceny czy taka zmiana strukturalna, upodabniająca cząsteczki do kwasu foliowego, w którym również występuje układ dwóch skondensowanych sześciocząłowych pierścieni, nie wpłynie negatywnie na aktywność względem STS.



Rys. 3.1 Struktura ogólna amidosiarczanowych pochodnych **IA-L** (R₁ = H, F, Cl, Br), **IIA-B**, **IIIA-B**, **IVA-B**, **VA-B** (R₂ = H, Me), **VIA-L** (R₃ = H, Me, Et, ⁱPr, ^tBu, Bn).

Z drugiej strony, struktura koniugatu kwasu foliowego z potencjalnym inhibitorem STS, bazującym na pierścieniu 1,2,3-triazolu oraz farmakoforze amidosiarczanowym, została wybrana przeze mnie bazując na wieloletnim doświadczeniu zespołu prof. Demkowicza z zakresu inhibitorów STS oraz na podstawie dokładnego przestudiowania tematyki koniugatów kwasu foliowego z uwzględnieniem wyboru linkera zawierającego w swojej konstytucji labilne wiązanie umożliwiające uwolnienie inhibitora STS po dotarciu koniugatu do wnętrza komórki nowotworowej.



Rys. 3.2 Struktura chemiczna otrzymanego koniugatu kwasu STS-FA **VII**.

3.2 Pochodne amidosiarczanowe 6-(1-fenyl-1*H*-1,2,3-triazolo-4-yl)-naftaleno-2-ylu **IA-L**

3.2.1 Modelowanie molekularne pochodnych amidosiarczanowych 6-(1-fenyl-1*H*-1,2,3-triazolo-4-yl)naftaleno-2-ylu **IA-L**

Etap syntezy chemicznej każdej serii potencjalnych inhibitorów STS poprzedziłam przeprowadzeniem badań z zakresu dokowania molekularnego co pozwoliło wyselekcjonować związki, które wykazywały najkorzystniejsze wartości swobodnej energii wiązania, a co za tym idzie prezentowały one teoretycznie największą zdolność do wiązania się w miejscu aktywnym STS (badania te przeprowadziłam z użyciem programu AutoDock Vina 1.1.2.). Ponadto, testy te były bardzo dobrym sposobem pozwalającym na przeprowadzenie analizy relacji struktura-aktywność (SAR), gdyż w łatwy sposób można było sprawdzić potencjalne interakcje pomiędzy resztami aminokwasowymi budującymi miejsce aktywne STS, a poszczególnymi atomami wchodzącymi w skład danego inhibitora. Etap ten był również bardzo pomocny podczas analizy wyników badań biologicznych i interpretacji różnic pomiędzy aktywnościami poszczególnych związków w danej serii. Część z zaprojektowanych związków zostało dodatkowo zadokowane do receptora kwasu foliowego.

Procedura dokowania molekularnego obejmowała następujące odrębne etapy:

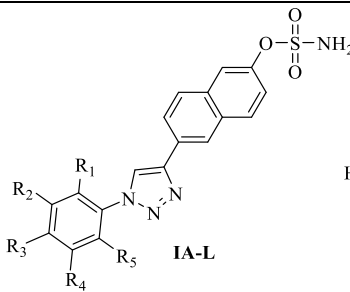
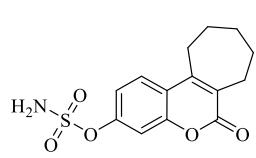
- 1) Odpowiednie przygotowanie struktury enzymu STS oraz struktury receptora kwasu foliowego w podtypie α pobranych z bazy Protein Data Bank (PDB) ((PDB ID:1P49 (STS) oraz 4LRH (FR α)).
- 2) Przygotowanie struktur potencjalnych inhibitorów STS i optymalizacja ich geometrii z użyciem programu HyperChem 8.0.7.
- 3) Przeprowadzenie dokowania molekularnego zoptymalizowanych ligandów do przygotowanej struktury enzymu oraz receptora z wykorzystaniem oprogramowania AutoDock Vina 1.1.2.
- 4) Zestawienie otrzymanych wyników poprzez wykonanie analizy otrzymanych wartości swobodnych energii wiązania oraz graficzna ich wizualizacja (z wykorzystaniem oprogramowania VMD 1.9).

Dodatkowo z użyciem programu Discovery Studio Visualiser v20.1.0.19295 zidentyfikowałam potencjalnie występujące interakcje pomiędzy ligandami a STS oraz FR α .

Jak wcześniej wspomniano prace nad syntezą serii związków **IIA-B** poprzedziłam otrzymaniem serii **IA-L**, w której pierścień fenylowy połączony z ugrupowaniem amidosiarczanowym zastąpiłam układem zawierającym naftalen. Badania te przeprowadziłam w celu oceny czy taka zmiana strukturalna, upodabniająca cząsteczki do FA, nie wpłynie negatywnie na aktywność względem STS w porównaniu z wcześniej otrzymanymi w grupie badawczej dr hab. inż. Sebastiana Demkowicza inhibitorami STS, w których połączony z ugrupowaniem amidosiarczanowym był jedynie pierścień fenylowy. Prace nad tą serią związków rozpoczęłam od przeprowadzenia badań komputerowych, których konsekwencją było wybranie dwunastu amidosiarczanowych pochodnych 1,2,3-triazolu zawierających w swojej konstytucji m.in. atomy halogenów znajdujące się w różnych pozycjach terminalnego pierścienia aromatycznego. Na podstawie otrzymanych wyników obliczeniowych i analizy wartości swobodnej energii wiązania każdego połączenia ligand-enzym, wyselekcjonowałam

dwanaście struktur dla potencjalnych inhibitorów STS (związki **IA-L**). Szczegółowe dane wygenerowane przez program Auto Dock Vina 1.1.2 zawarłam w **Tabeli 3.1**.

Tabela 3.1 Wyniki analizy dokowania molekularnego związków **IA-L** oraz związku referencyjnego – *Irosustatu* otrzymane z wykorzystaniem oprogramowania Auto Dock Vina 1.1.2.

 IA-L  <i>Irosustat</i>						
Nr związku	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Swobodna energia wiązania [kcal/mol]
IA	H	H	H	H	H	-7,4
IB	H	F	H	H	H	-7,7
IC	H	Cl	H	H	H	-6,4
ID	H	Br	H	H	H	-6,3
IE	H	H	F	H	H	-7,6
IF	H	H	Cl	H	H	-7,6
IG	H	H	Br	H	H	-6,0
IH	F	H	H	H	H	-8,0
II	Cl	H	H	H	H	-7,9
IJ	Br	H	H	H	H	-8,0
IK	H	F	H	F	H	-7,9
IL	F	F	F	H	H	-8,3
<i>Irosustat</i>	-	-	-	-	-	-5,4

Wartości swobodnej energii wiązania dla proponowanych struktur potencjalnych inhibitorów **IA-L** okazały się korzystne i mieściły się w zakresie od -6,0 do -8,3 kcal/mol, przy czym warto zwrócić uwagę na to, iż błąd pomiaru dla wykorzystywanego programu wynosi ok. 2,85 kcal/mol. Ponadto, prezentowane wyniki osiągały wartości niższe niż związek referencyjny, a najkorzystniejszą wartość swobodnej energii wiązania wykazała pochodna **IL** (-8,3 kcal/mol), co może sugerować, że związek ten teoretycznie zdolny jest do stworzenia najbardziej stabilnego kompleksu ligand-enzym w jego centrum aktywnym. Dodatkowo, w celu wykrycia potencjalnych interakcji ligand-białko, które mogłyby wpływać w znaczny sposób na stabilizację powstałego kompleksu, przeprowadziłam symulacje z wykorzystaniem oprogramowania BIOVIA, Dassault Systeme, Discovery Studio Visualiser, których wyniki zaprezentowałam w **Tabeli 3.2**.

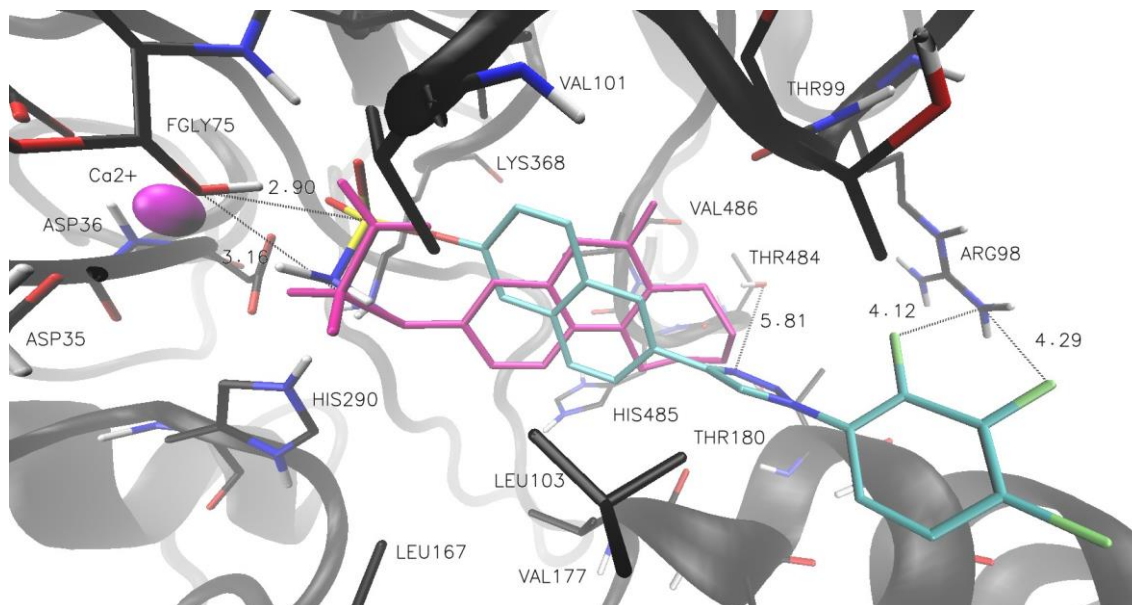
Tabela 3.2 Interakcje ligand – STS (wraz z dystansem [Å]) dla związków **IA-L** zidentyfikowane przy użyciu oprogramowania BIOVIA, Dassault Systemes, Discovery Studio Visualiser wraz z ich schematycznym rozmieszczeniem dla związku **II**.

Nr związku	π -Alkil	Alkil	π -Siarka	Wiązanie wodorowe	Wiązanie wodorowe z węglem	π -Kation	π -Sigma
IA	LEU103 (6,16, 6,50); VAL486 (5,86); VAL101 (4,93, 6,33); VAL177 (6,12)	–	HIS290 (5,76); HIS136 (6,93)	THR165 (4,11)	–	–	–
IB	LEU103 (6,13, 6,47); VAL486 (5,50, 6,07); VAL101 (5,31), VAL177 (5,50, 5,57)	–	HIS290 (6,00)	FGLY75 (4,18), LYS368 (5,02)	HIS136 (5,74, 7,12)	–	–
IC	LEU103 (5,91); VAL486 (6,16); VAL101 (5,43); VAL177 (5,43, 5,63)	ARG98 (2,99), TRP550 (6,97)	HIS290 (5,75); HIS136 (7,13)	–	HIS136 (6,04)	ARG98 (4,40)	–
ID	LEU103 (5,51); VAL101 (4,85); VAL177 (4,85, 5,55)	ARG98 (3,08); TRP550 (6,86)	HIS290 (5,79); HIS136 (7,11)	–	–	ARG98 (4,83)	–
IE	ARG98 (4,57, 6,35); VAL177 (6,26); VAL486 (5,36), VAL101 (6,07)	–	HIS290 (5,43); HIS136 (6,78)	LYS134 (6,65); ASP36 (4,96); GLN343 (5,61)	THR165 (5,41)	–	VAL101 (4,93)
IF	ARG98 (4,74); VAL177 (6,49); VAL101 (5,81), VAL486 (5,37)	–	HIS290 (5,29); HIS136 (6,73)	LYS134 (5,37), THR165 (4,20)	–	–	VAL101 (4,78)
IG	ARG98 (4,95); VAL177 (5,24, 5,96), VAL486 (5,30), VAL101 (6,42)	LEU185 (5,88)	HIS290 (4,87, 5,32); HIS136 (6,72)	LYS368 (5,58), LYS134 (6,45), GLN343 (5,45), ASP36 (4,95), ASP35	HIS136 (5,58)	–	VAL101 (5,29)

				(4,95)			
IH	LEU103 (6,23, 6,49); VAL486 (6,21); VAL101 (5,38); VAL177 (5,49, 5,69)	–	HIS290 (5,96); HIS136 (7,09)	FGLY75 (4,25, 5,14); LYS368 (3,69)	HIS136 (5,74)	–	–
II	PHE178 (4,53); LEU103 (6,27, 6,56); VAL177 (5,46, 5,79); VAL486 (5,96), VAL101 (5,42)	–	HIS290 (6,01); HIS136 (7,08)	LYS368 (5,15)	HIS136 (5,73)	–	–
IJ	PHE178 (4,48); LEU103 (6,15, 6,43), VAL177 (5,50, 5,67); VAL486 (6,08); VAL101 (5,34)	–	HIS290 (5,92); HIS136 (7,05)	LYS368 (5,18); FGLY75 (3,04, 4,27)	HIS136 (5,69)	ARG98 (4,90)	–
IK	LEU103 (6,18, 6,60); VAL486 (5,95); VAL101 (5,40); VAL177 (5,26, 5,68)	–	HIS290 (5,91); HIS136 (7,05)	ARG98 (5,14)	HIS136 (5,67)	–	–
IL	VAL177 (4,32); VAL486 (5,09, 5,61); LEU74 (6,53)	–	HIS290 (5,57)	–	–	–	VAL101 (5,12)
Irosustat	VAL177 (6,51); VAL486 (4,87, 5,08) VAL101 (5,09)	–	HIS290 (5,73); HIS136 (6,84)	LYS368 (5,49); FGLY75 (3,04)	HIS136 (6,03)	–	VAL486 (4,67)

Badania obliczeniowe dowiodły, że pochodne **IA-L** są w stanie tworzyć szereg różnego rodzaju oddziaływań, w tym takie jak: π -alkilowe, alkilowe, π -siarkowe, wiązanie wodorowe, wiązanie wodorowe z węglem, π -kationowe albo π -sigma (**Tabela 3.2**). Obecność tych potencjalnych oddziaływań może w pozytywny sposób wpływać na stabilność tworzących się kompleksów, a związkami, które teoretycznie są w stanie tworzyć największą ilość możliwych oddziaływań okazały się pochodne **IE**, **IF** oraz **IG**. Jednakże, oprócz wspomnianych wyżej interakcji niezwykle ważnym aspektem, w przypadku inhibitorów opartych na farmakoforze amidosiarczanowym, jest ich zdolność do ulegania reakcji substytucji nukleofilowej na atomie siarki. Tak jak wspomniano w podrozdziale 1.4.4 mechanizm inhibicji STS nie został całkowicie potwierdzony i nadal pozostaje tematem dyskusji, jednak prawdopodobnie amidosiarczanowa grupa funkcyjna może zostać przeniesiona na resztę fGly75, co może doprowadzić do nieodwracalnej inhibicji enzymu. Z tego powodu wykonałam wizualizacje związku **IL** (dla którego wyznaczono najniższą wartość swobodnej energii wiązania), z wykorzystaniem oprogramowania VMD 1.9, przedstawioną na **Rys. 3.3**. Na wizualizacji dostrzec można, iż amidosiarczanowa grupa inhibitora (która bezpośrednio odpowiada za inhibicję enzymu), znajduje się w rejonie katalitycznym STS w niedalekiej odległości od reszty fGly75 oraz to, że stabilizowana jest przez oddziaływanie π -siarka z HIS290 (odległość pomiędzy atomem siarki **IL** a grupą OH fGly75 wynosi 2,9 Å). Właśnie z tego powodu można przypuszczać, że związek ten, pomimo mniejszej ilości innych, teoretycznych oddziaływań elektrostatycznych wskazanych przez program dokujący, może okazać się najbardziej efektywnym potencjalnym inhibitorem. Dodatkowo, można zauważyć, że rdzeń związku **IL** jest dobrze dopasowany do miejsca aktywnego enzymu i stabilizowany jest przez obecność reszt aminokwasowych takich jak Leu103, Leu167, Phe178, Phe182, Phe237, Val486, Phe488 i Phe553. Wartym podkreślenia, jest też niewielka odległość pomiędzy atomem fluoru związku **IL**, a atomami azotu reszty Arg98, które mogą indukować oddziaływania elektrostatyczne (4,12 i 4,29 Å, które nie zostały zidentyfikowane przez program BIOVIA). Z drugiej też strony,

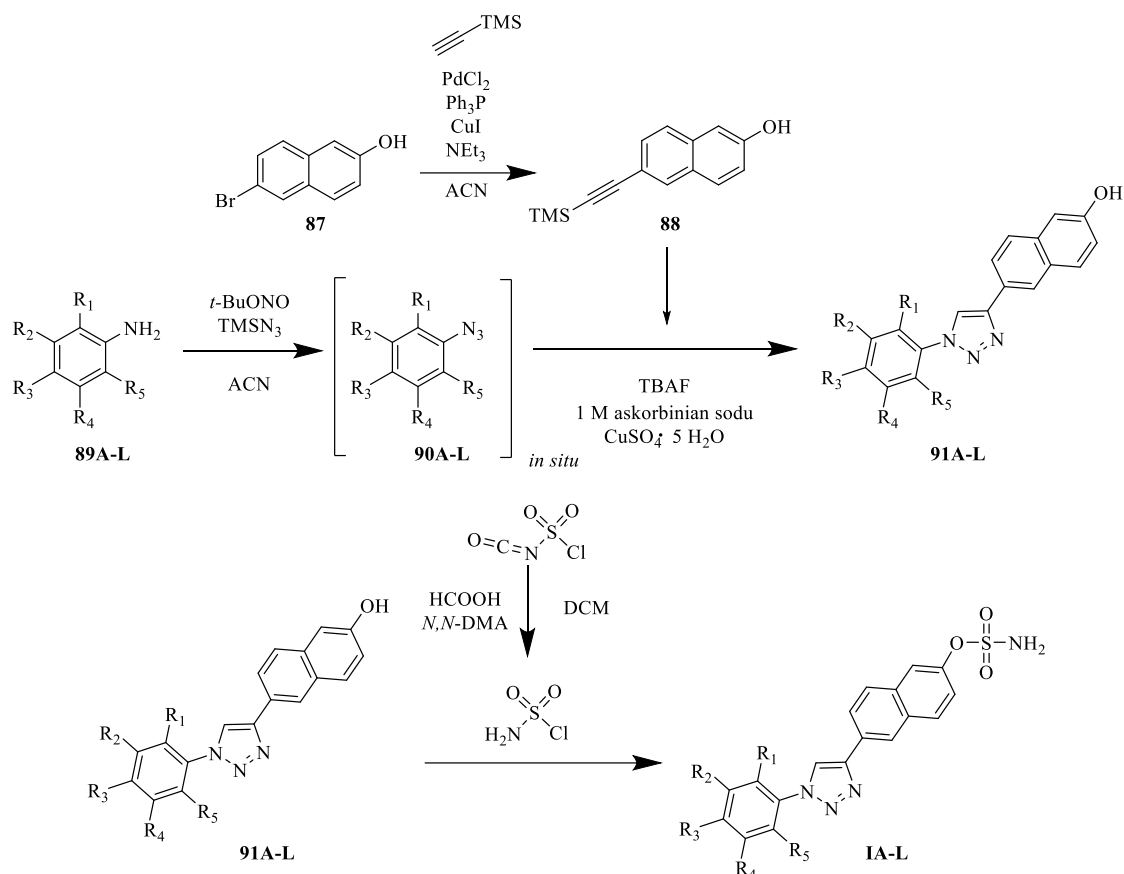
obecność atomu fluoru w strukturze cząsteczki, może mieć kluczowe znaczenie dla jego zwiększonej zdolności do ulegania reakcji enzymatycznej. Wysoce elektroujemne atomy fluoru jako podstawniki wyciągające elektrony, wpływają na obniżenie pKa cząsteczki, czyniąc ją lepszą grupą opuszczającą w reakcji substytucji nukleofilowej na atomie siarki. Ponadto, badania dokowania molekularnego wykazały, że pierścień triazolowy związku **II**, znajduje się blisko reszty Trp484, co sugeruje dodatkową interakcję, w tym wiązanie wodorowe pomiędzy grupą OH Trp484 a atomem azotu w pierścieniu (5,81 Å).



Rys. 3.3 Miejsce aktywne STS z zadokowanym związkiem **II** (kolory CPK) oraz z *Irosustatem* (różowy) wraz z odległościami od fGly75, ARG98 oraz THR484 (Å).

3.2.2 Synteza pochodnych amidosiarczanowych 6-(1-fenylo-1*H*-1,2,3-triazolo-4-ylo)naftaleno-2-yliu **IA-L**

Po etapie badań z zakresu modelowania molekularnego przystąpiłam do syntezy potencjalnych inhibitorów STS **IA-L**, których szlak syntetyczny został przedstawiony na **Schemacie. 3.1**.



Schemat 3.1 Szlak otrzymywania pochodnych **IA-L**.

Otrzymywanie zaprojektowanych pochodnych rozpocząłam od reakcji sprzęgania Sonogashiry pomiędzy 6-bromo-2-naftolen **87** a trimetylosililoacetylenem i otrzymania pochodnej **88** przy zadowalającej wydajności reakcji wynoszącej 64%. Kolejny krok mojej pracy obejmował przygotowanie dwunastu pochodnych 6-(1-fenylo-1*H*-1,2,3-triazol-4-ylo)naftalen-2-olu **91A-L**. Związki te zostały otrzymane w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji z wykorzystaniem odpowiednich azydków **90A-L**, które uzyskane zostały z komercyjnie dostępnych pochodnych aniliny **89A-L** w reakcji z *t*-BuONO (gdzie sole diazoniowe oraz pochodne azydkowe generowane były *in situ*) oraz TMSN₃. Otrzymane pochodne **90A-L** poddałam reakcji ze związkiem **88** w obecności TBAF, siarczany miedzi(II) i askorbinianu sodu. Dzięki temu udało mi się uzyskać pochodne 6-(1-fenylo-1*H*-1,2,3-triazol-4-ylo)naftalen-2-olu **91A-L**, które ostatecznie zostały przekształcone w amidosiarczanowe pochodne 6-(1-fenylo-1*H*-1,2,3-triazolo-4-ylo)naftaleno-2-yliu **IA-L** na drodze reakcji z chlorkiem sulfamoylu. Związek ten był generowany *in situ* w reakcji izocyjanianu chlorosulfuryli z kwasem mrówkowym oraz katalitycznej ilości *N,N*-DMA. Wydajności reakcji dla finalnych produktów

mieściły się w przedziale od 26 do 70%. W **Tabeli 3.3** zestawiałam wydajności wszystkich przeprowadzonych reakcji.

Tabela 3.3 Wydajności wszystkich reakcji syntezy pochodnych amidosiarczanowych 6-(1-fenylo-1*H*-1,2,3-triazolo-4-ylo)-naftaleno-2-yłu **IA-L**.

Nr związku	Wydajność [%]	Nr związku	Wydajność [%]	Nr związku	Wydajność [%]
88	64	91I	62	IF	40
91A	64	91J	68	IG	45
91B	43	91K	39	IH	34
91C	45	91L	13	II	40
91D	42	IA	70	IJ	52
91E	74	IB	43	IK	37
91F	74	IC	67	IL	26
91G	62	ID	34		
91H	47	IE	36		

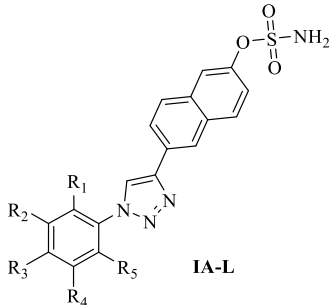
3.2.3 Badania biologiczne *in vitro* pochodnych amidosiarczanowych 6-(1-fenyl-1*H*-1,2,3-triazolo-4-yl)naftaleno-2-ylu **IA-L**

Wszystkie wyniki badań biologicznych, które zostaną zaprezentowane w mojej rozprawie doktorskiej uzyskane zostały dzięki współpracy z zespołem pod kierownictwem dr hab. Macieja Małyka z Wydziału Nauk Ścisłych i Nauk o Zdrowiu Instytutu Biotechnologii Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego. Wszystkie związki, które zaprojektowałam z wykorzystaniem dokowania molekularnego i otrzymałam na drodze syntezy chemicznej zostały zbadane pod kątem aktywności inhibicyjnej STS w teście enzymatycznym wykorzystującym znakowany radioizotopowo siarczan estronu ($[^3\text{H}]$ -E1S). Następnie przeprowadzone zostały badania komórkowe z wykorzystaniem linii MCF-7. Związki te testowane były w wykorzystaniu trzech różnych stężeń (100 nM, 10 nM oraz 1 nM) i poddawane były selekcji po każdym etapie testów. Końcowo dla najbardziej obiecujących pochodnych wyznaczone zostało IC_{50} .

3.2.3.1 Aktywność biologiczna pochodnych amidosiarczanowych 6-(1-fenyl-1*H*-1,2,3-triazolo-4-yl)naftaleno-2-ylu **IA-L** – test enzymatyczny

Test enzymatyczny został przeprowadzony z wykorzystaniem enzymu STS wyizolowanego z ludzkiego łożyska, a stężenie potencjalnych inhibitorów wyniosło 0,5 μM . Wyniki tych badań przedstawione zostały w **Tabeli 3.4**. Prezentowane dane wskazały na to, iż wszystkie związki skutecznie hamowały aktywność sulfatazy steroidowej, a wartości mierzonej po eksperymencie pozostałej aktywności STS mieściły się w zakresie od 7,98 do 27,17%.

Tabela 3.4 Wyniki testów enzymatycznych przedstawiające efekt inhibicji STS związków **IA-L** (przy stężeniu 0,5 μM inhibitorów).

						
Nr związku	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Pozostała aktywność STS [%]
IA	H	H	H	H	H	24,50 ± 1,36
IB	H	F	H	H	H	17,40 ± 0,87
IC	H	Cl	H	H	H	9,66 ± 0,48
ID	H	Br	H	H	H	9,62 ± 0,48
IE	H	H	F	H	H	23,75 ± 1,22
IF	H	H	Cl	H	H	18,71 ± 0,94
IG	H	H	Br	H	H	23,07 ± 1,15
IH	F	H	H	H	H	27,17 ± 1,36

II	Cl	H	H	H	H	16,93 ± 0,83
IJ	Br	H	H	H	H	15,93 ± 0,80
IK	H	F	H	F	H	14,03 ± 0,70
IL	F	F	F	H	H	7,98 ± 0,40

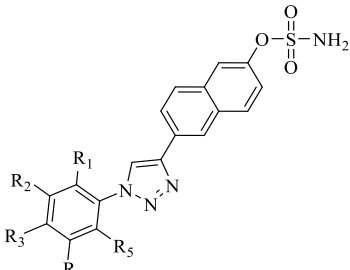
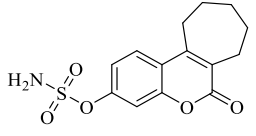
Otrzymane wyniki wskazały, że najbardziej aktywną pochodną okazał się związek **IL** (z pozostałą aktywnością STS na poziomie 7,98%) zawierający w swojej strukturze aż trzy atomy fluoru. Wynik ten był zbliżony z danymi otrzymanymi podczas badań dokowania molekularnego, gdzie swobodna energia wiązania tego związku była najniższa i wynosiła -8,4 kcal/mol. Dodatkowo, podczas analizy wyników biologicznych zauważyłam fakt, iż wraz z mniejszą ilością atomów halogenów w terminalnym pierścieniu inhibitora aktywność badanego związku wobec STS malała. Obserwacja ta może potwierdzać wcześniej wysunięty wniosek dotyczący zmiany wartości pKa względem różnej ilości halogenów w danym związku, tzn. im większa liczba podstawników wyciągających elektrony tym niższe pKa i co za tym idzie większa podatność na reakcje substytucji nukleofilowej na atomie siarki. Dodatkowo, zauważyłam, że uzyskane wyniki mogą również sugerować, że pozycja podstawnika halogenowego w pierścieniu aromatycznym może mieć kluczowe znaczenie dla sił oddziaływań występujących w badanych związkach. Wnioskować można również, że sama obecność heteropodstawnika w pozycji R₁ lub R₂ ma duży wpływ na wzrost siły inhibicyjnej. Warto jednak dodać, że sam rodzaj tego heteroatomu nie ma aż tak dużego znaczenia, jeśli chodzi o wpływ na aktywność STS.

3.2.3.2 Aktywność biologiczna pochodnych amidosiarczanowych 6-(1-fenilo-1*H*-1,2,3-triazolo-4-yl)naftaleno-2-ylu **IA-L** – test komórkowy

Kolejnym etapem badań biologicznych był eksperyment z wykorzystaniem linii komórkowej MCF-7. W trakcie tych badań udało się określić poziom zahamowania STS przy zastosowaniu trzech różnych poziomów stężeń potencjalnych inhibitorów. Komórki te początkowo inkubowano z wykorzystaniem stężenia 100 nM inhibitorów, a szczegółowe dane przedstawiono w **Tabeli 3.5**. Uzyskane wyniki pokazały, że wszystkie związki skutecznie hamowały działanie STS, a najlepszym okazała się pochodna **IK** (5,43% pozostałej aktywności STS) oraz **IL** (5,29% pozostałej aktywności STS). Warto zauważyć, że w strukturze tych pochodnych w położeniu R₁, R₂ lub R₃ bądź we wszystkich jednocześnie znajduje się atom fluoru. Ponadto, aktywność inhibicyjna tych związków okazała się nieco wyższa przy zadanym stężeniu niż *Irosustatu* (5,72%) użytego jako związek referencyjny. Do kolejnego etapu badań zakwalifikowanych zostało sześć najbardziej aktywnych pochodnych **IG-L**, dla których pozostała aktywność STS przy stężeniu 100 nM inhibitora wynosiła mniej niż 10%. Na tym etapie badań stężenie inhibitorów obniżono dziesięciokrotnie (10 nM) w porównaniu do pierwszego eksperymentu, a najlepsze wyniki zanotowano dla związków **II**, **IK** oraz **IL** (odpowiednio pozostała aktywność STS wynosiła 42,09%, 42,01% i 27,48%). Do ostatniego etapu badań zakwalifikowano związki, dla których pozostała aktywność STS przy stężeniu 10 nM inhibitora wynosiła mniej niż 50% (związki **II**, **IK** oraz **IL**), a następnie powtórzono eksperyment przy stężeniu 1 nM inhibitora. Dodatkowo wyznaczony został parametr IC₅₀. Wyniki tych badań wskazały, że analizowane związki zaliczyć można do grupy bardzo silnych inhibitorów STS charakteryzującymi się niskimi wartościami IC₅₀ wynoszącymi 30,14, 17,02 oraz 15,97 nM odpowiednio dla **II**, **IK** oraz **IL** (parametr IC₅₀ wyznaczony dla *Irosustatu* wynosił 1,14 nM). Podsumowując, wszystkie otrzymane przeze mnie pochodne wykazały

aktywność biologiczną w stosunku do STS, jednak to te zawierające atomy fluoru w swojej strukturze przejawiały najwyższą aktywność inhibicyjną. Tak jak wcześniej wspomniałam może mieć to kluczowe znaczenie przy tworzeniu oddziaływań elektrostatycznych z Arg98 znajdującej się w centrum aktywnym tego enzymu. Poparciem dla tego stwierdzenia są wyniki badań dokowania molekularnego. Uzyskane wyniki dla pochodnych amidosiarczanowych 6-(1-fenyl-1*H*-1,2,3-triazolo-4-yl)naftaleno-2-ylu mogą być bardzo obiecujące w kolejnych etapach badań przedklinicznych, m.in., w testach *in vivo*. Powyższy materiał eksperymentalny stał się podstawą publikacji naukowej w czasopiśmie *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* (Ciupak O., Daśko M., Biernacki K., Rachoń 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).[122]

Tabela 3.5 Pozostała aktywność STS w komórkach MCF-7 po inkubacji ze związkami **IA-L** i *Irosustatem* w stężeniach 100, 10 i 1 nM inhibitora oraz wyznaczony parametr IC₅₀.

  Ref. <i>Irosustat</i>									
Nr	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Pozostała aktywność STS [%]			IC ₅₀ [nM]
						100 [nM]	10 [nM]	1 [nM]	
IA	H	H	H	H	H	15,52 ± 0,78	–	–	–
IB	H	F	H	H	H	12,22 ± 0,61	–	–	–
IC	H	Cl	H	H	H	22,05 ± 1,10	–	–	–
ID	H	Br	H	H	H	20,59 ± 1,03	–	–	–
IE	H	H	F	H	H	11,32 ± 0,57	–	–	–
IF	H	H	Cl	H	H	13,25 ± 0,66	–	–	–
IG	H	H	Br	H	H	8,68 ± 0,43	59,86 ± 2,99	–	–
IH	F	H	H	H	H	8,80 ± 0,44	55,84 ± 2,79	–	–
II	Cl	H	H	H	H	7,44 ± 0,37	42,09 ± 2,10	84,32 ± 4,22	30,14 ± 1,51
IJ	Br	H	H	H	H	7,30 ± 0,37	59,45 ± 2,97	–	–
IK	H	F	H	F	H	5,43 ± 0,27	42,01 ± 2,10	79,30 ± 3,96	17,02 ± 0,85
IL	F	F	F	H	H	5,29 ± 0,26	27,48 ± 1,37	99,00 ± 4,95	15,97 ± 0,80
Ref	–	–	–	–	–	5,72 ± 0,29	12,93 ± 0,65	16,83 ± 0,84	1,14 ± 0,06

3.3 Analogi kwasu foliowego zawierające w swojej strukturze ugrupowanie amidosiarczanowe

3.3.1 Modelowanie molekularne potencjalnych inhibitorów STS będących analogami kwasu foliowego zawierającymi w swojej strukturze ugrupowanie amidosiarczanowe

Zachęcona dobrymi wynikami otrzymanej przeze mnie poprzedniej serii inhibitorów STS oraz po potwierdzeniu, że zamiana pierścienia fenyloвого połączonego z ugrupowaniem amidosiarczanowym na naftalen nie powoduje utraty aktywności inhibicyjnej względem STS, postanowiłam w dalszym ciągu prowadzić badania nad rozwojem tej klasy związków. W przypadku nowej grupy cząsteczek skupiłam się na dwóch aspektach: 1) ocenie zmiany rdzenia cząsteczki oraz 2) wprowadzeniu reszty kwasu glutaminowego jako elementu upodabniającego cząsteczki do FA, na zarówno potencjalną moc tworzenia kompleksu ligand-STs (oraz co za tym idzie mocy inhibicji) oraz na możliwość wykorzystania receptorów kwasu foliowego jako potencjalnej drogi transportu cząsteczek do wnętrza komórki. Rodzaje rdzeni cząsteczek zostały wybrane na podstawie doświadczeń zespołu dr hab. inż. Sebastiana Demkowicza dotyczącego tematyki inhibitorów STS. Biorąc je pod uwagę postanowiłam rozpocząć pracę nad cząsteczkami zawierającymi w swojej konstytucji układy 1,2,3-triazolu, kumaryny, flawonów oraz tyraminy.

Pracę nad nowymi związkami ponownie rozpoczęłam od przeprowadzenia badań dokowania molekularnego, jednak w tym przypadku, oprócz wykonywania obliczeń dotyczących stabilności kompleksów STS-ligand, przeprowadziłam dodatkowe analizy, gdzie obliczyłam wartość energii swobodnej wiązania przykładowych cząsteczek z FR α (kod PDB: 4lrh). Efektem tego etapu pracy było zaprojektowanie związków **IIA-B**, **IIIA-B**, **IVA-B**, **VA-B**, na bazie rdzeni 1,2,3-triazolu, kumaryny, flawonu oraz tyraminy zawierających w swojej strukturze resztę kwasu glutaminowego w postaci wolnego kwasu karboksylowego oraz estru metylowego, które zaprezentowane zostały w **Tabeli 3.6**.

Tabela 3.6 Wyniki analizy dokowania molekularnego związków **II-V-A-B**, *Irosustatu* oraz FA otrzymanych z wykorzystaniem oprogramowania Auto Dock Vina 1.1.2.

Nr związku	R	Swobodna energia wiązania [kcal/mol]	
		STS	FR α
IIA	Me	-6,0	-8,4
IIIB	H	-6,9	-8,4
IIIA	Me	-6,2	-9,1
IIIB	H	-7,0	-7,9
IVA	Me	-6,6	-8,0
IVB	H	-6,4	-9,5
VA	Me	-4,8	-9,3
VB	H	-7,0	-9,0
<i>Irosustat</i>	-	-5,4	-
FA	-	-	-10,5

Korzystając z programu AutoDock Vina 1.1.2 wyznaczyłam wartości swobodnej energii wiązania dla ośmiu zaprojektowanych związków w stosunku do STS oraz FR α . Wyniki te okazały się satysfakcjonujące i wskazały, że analizowane cząsteczki są w stanie teoretycznie wiązać się z miejscem aktywnym zarówno STS jak FR α . W przypadku dokowania ligandów do struktury STS mieściły się one w zakresie od -4,8 do -7,0 kcal/mol, a w przypadku modelowania z wykorzystaniem FR α zakres ten wynosił od -7,9 do -9,5 kcal/mol. Wartości te oscylowały w pobliżu wartości swobodnej energii wiązania wyznaczonych dla związków referencyjnych (nieco niższe w porównaniu z wartością swobodnej energii wiązania FA z FR α), co mogło świadczyć o tym, że związki te z jednej strony potencjalnie mogą charakteryzować się

dobrymi właściwościami inhibycyjnymi wobec STS, a także mogą być teoretycznie transportowane do wnętrza komórki z wykorzystaniem szlaku FR α .

Po pozytywnym zakończeniu tej części symulacji przesłam do identyfikacji potencjalnych oddziaływań w powstałych kompleksach. Również w tym przypadku sprawdzałam dwa cele molekularne, czyli STS oraz FR α a szczegółowe dane zestawione zostały w **Tabeli 3.7** oraz w **Tabeli 3.8**.

Tabela 3.7 Interakcje ligand-STS (wraz z dystansem [Å]) dla związków **II-IVA-B** zidentyfikowane przy użyciu oprogramowania BIOVIA, Dassault Systemes, Discovery Studio Visualiser wraz z ich schematycznym rozmieszczeniem dla związku **IIB**.

Interakcje - van der Waals - Oddziaływania wodorowe - Oddziaływania wodorowe z węglem π-Siarka π-Alkil IIB					
Nr	π -Alkil	π -Siarka	Wiązanie wodorowe	Wiązanie wodorowe z węglem	π -Sigma
IIA	VAL486 (6,47), VAL101 (4,85, 6,21), VAL177 (6,09), LEU103 (5,58, 6,23)	HIS290 (6,03), HIS136 (7,26)	TRP555(5,06)	HIS136 (5,86)	THR99 (4,95)
IIB	VAL486 (6,27), LEU103 (5,32, 5,74), VAL177 (4,84, 5,44), VAL101 (5,32)	HIS290 (5,96), HIS136 (7,06)	TRP555 (5,30), LYS368 (4,86), FGLY75 (3,25)	HIS136 (5,95)	-
IIIA	ARG98 (5,89), VAL486 (6,25), LEU103 (5,23, 6,03), VAL101 (5,32), VAL177 (5,06)	HIS290 (5,83), HIS290 (5,83)	LYS368 (4,91), ARG98 (4,77)	GLY181 (4,09)	THR99 (4,73)
IIIB	VAL177 (4,84, 5,60), VAL101 (5,46), LEU103 (5,37, 6,02), VAL486 (6,19)	HIS136 (7,14), HIS290 (6,06)	LYS368 (5,04)	HIS136 (5,73)	-
IVA	VAL177 (4,15), VAL486 (5,45) ARG98 (3,69)	HIS290 (6,01)	ARG98 (6,13, 7,27), LYS368 (5,62)	-	VAL486 (3,98)
IVB	-	HIS290 (6,18)	THR484 (4,68), LYS368 (5,59)	PHE488 (5,60)	-
VA	VAL486 (6,05), VAL101 (6,30, 4,85), LEU103 (5,97, 6,32),	HIS136 (6,85), HIS290 (5,81)	ARG98 (4,42), LYS368 (5,13)	HIS136 (5,75)	-

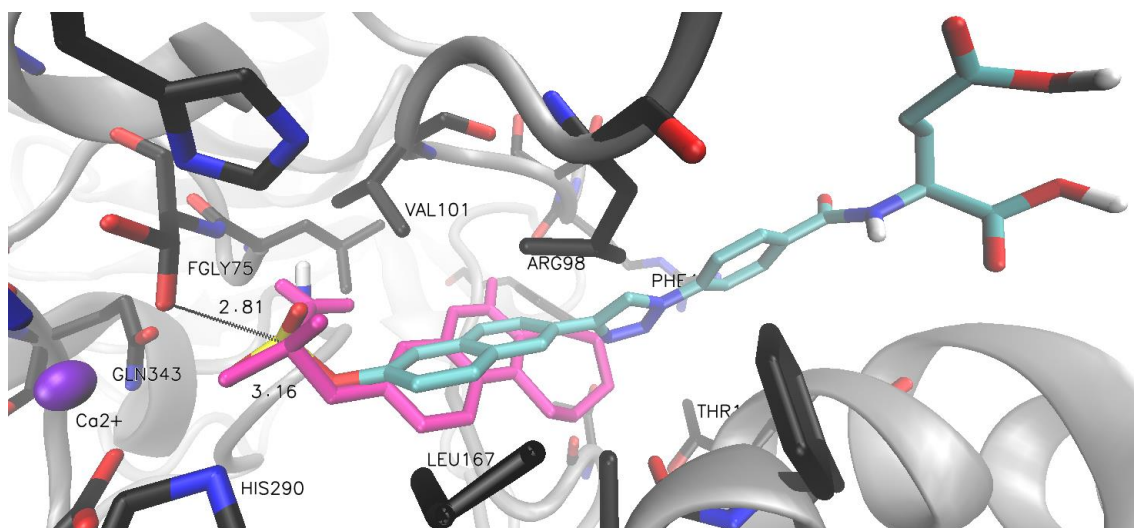
	VAL177 (6,07)				
VB	ARG98 (6,03), VAL486 (5,71), VAL177 (5,11), VAL101 (5,39, 6,33), LEU103 (5,66)	HIS136 (6,79), HIS290 (5,91)	LYS368 (5,37), HIS290 (4,76),	GLY181 (4,06), HIS136 (5,74)	-

Tabela 3.8 Interakcje ligand-FR α (wraz z dystansem [$\text{\AA}$]) dla związków **II-IVA-B** zidentyfikowane przy użyciu oprogramowania BIOVIA, Dassault Systemes, Discovery Studio Visualiser wraz z ich schematycznym rozmieszczeniem dla związku **IIB**.

Interakcje - van der Waals - Odziaływania wodorowe - Odziaływania wodorowe z węglem π - Kation π-π IIB								
Nr	Wiązanie wodorowe	Wiązanie wodorowe z węglem	π - Kation	π - π	π - π T kształt	π -Sigma	π -Alkil	π - Siarka
IIA	LYS136 (5,14), PHE78 (5,69)	HIS135 (5,58)	HIS135 (4,89)	TRP140 (6,51), TRP60 (4,04, 6,11)	TRP102 (5,73,5,73)	-	-	-
IIB	THR82 (3,58, 3,78)	TRP140 (5,13), THR82 (3,93)	HIS135 (5,98)	TRP140 (5,03), TRP60 (4,27, 4,36)	-	-	-	-
IIIA	SER174 (3,81), TYR175 (4,66), ASP 81 (4,14)	SER174 (3,95), TRP171 (4,48)	-	TYR85 (4,19), TRP171 (4,69, 5,93, 4,61), TYR60 (4,40, 4,61)	TRP102 (4,67)	-	-	-
IIIB	ASP81 (3,48)	TRP138 (5,48)	HIS135 (4,78, 4,83)	TYR60 (3,98, 5,26)	-	TRP102 (3,90)	-	-
IVA	GLY137 (3,36), TRP102 (4,85), SER57 (4,11), LYS54 (6,54, 6,75)	ALA52 (3,82)	-	TRP102 (4,56)	TRP102 (4,34)	-	TRP64 (6,14)	-

IVB	GLY137 (2,00), TRP140 (2,18), LYS54 (2,43, 2,61), ALA52 (3,08), SER2,12)HIS135 (1,80), TRP102 (2,22)	LYS136 (3,69), ALA52 (3,62)	HIS135 (4,89)	TRP64 (5,18)	TRP102 (5,73,5,73)	TYR60 (3,89)	TRP64 (6,18)	-
VA	GLY137 (3,22), TRP138 (5,04, 5,72), TRP140 (5,21), GLU86 (4,68)	-	-	TYR60 (4,29, 4,38), TRP171 (5,88)	-	-	-	-
VB	TRP138 (5,05), TRP140 (5,28), GLY137 (3,99)	-		TRP171 (5,98, 7,35), TRP60 (4,43, 4,68), TRP140 (7,09), TRP102 (6,06)	-	TRP140 (4,46)	-	-

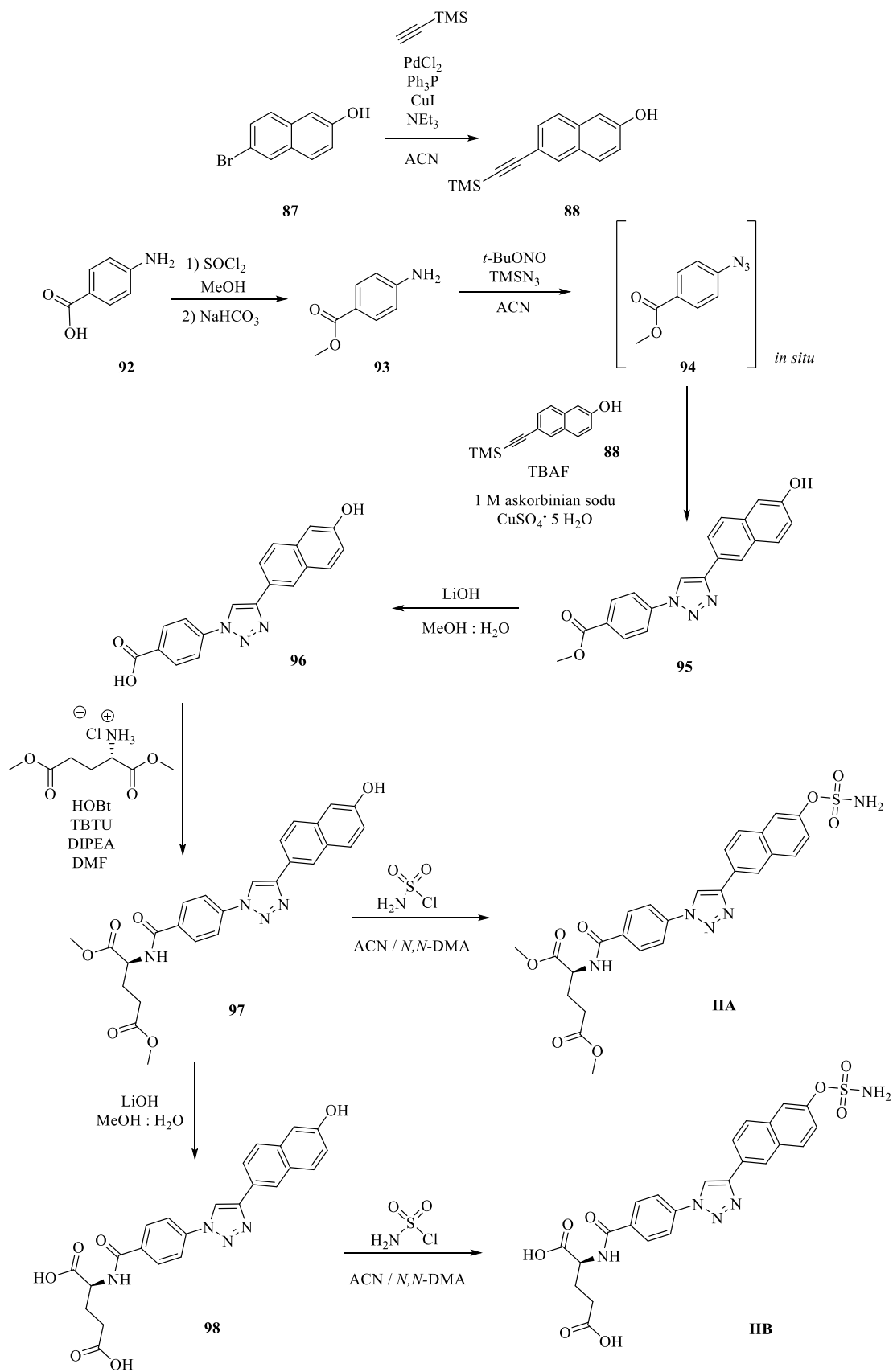
Zebrane przeze mnie wyniki badań dowiodły, iż proponowane związki są w stanie stworzyć szereg silnych oddziaływań zarówno w stosunku do STS jak i FR α . W przypadku kompleksów STS-ligand, są to oddziaływania typu: π -alkil, π -siarka, π -sigma, wodorowe czy oddziaływania wodorowe z węglem. Żaden z proponowanych związków nie wyróżniał się szczególnie małą czy nadmiernie dużą ilością interakcji w porównaniu z innymi pochodnymi tej serii. W przypadku par ligand-FR α , sytuacja była analogiczna tzn. nie występował żaden związek silnie się wyróżniający. Jednak w przypadku kompleksów z FR α zidentyfikować można większą ilość różnych oddziaływań, które nie miały miejsca w przypadku kompleksów STS, m.in. oddziaływania typu π - π , π -kation, czy oddziaływania typu π - π , ale w kształcie litery T. Taka ilość potencjalnych oddziaływań dawała dobre prognozy w stosunku do zdolności wiązania się cząsteczek z FR α . Jednak kluczową kwestią w kontekście osiągnięcia wysokiej aktywności inhibicyjnej wobec STS przez cząsteczki była sama odległość pomiędzy farmakoforem a resztą fGly75 znajdującą się w miejscu aktywnym STS. Dystans ten został sprawdzony dla pochodnej **IIB** co przedstawia **Rys. 3.4**. Odległość pomiędzy atomem siarki grupy amidosiarczanowej potencjalnego inhibitora **IIB** a atomem tlenu fGly75 wyniosła 2,81 Å, a dla związku referencyjnego wynosiła 3,16 Å. Świadczyć to może o dużym prawdopodobieństwie inhibicji STS zgodnie z mechanizmem zaproponowanym w podrozdziale 1.4.4. Dodatkowo, związek ten znajduje się w bliskich odległościach względem reszt aminokwasowych takich jak Asp36, His136, Lys368, Trp555, His290, Leu167, Trp180, Phe484, Arg98, Val101, Gln343, Val484, Val177 czy Leu103, co może powodować dobrą stabilizację w miejscu aktywnym enzymu.



Rys. 3.4 Miejsce aktywne STS z zadokowanym związkiem **IIB** (koloru CPK) oraz z *Irosustatem* (różowy) wraz z odległościami od fGly75 (Å).

3.3.2 Synteza analogów kwasu foliowego zawierających w swojej strukturze ugrupowanie amidosiarczanowe

Kolejny etap moich badań w ramach przygotowywania rozprawy doktorskiej rozpoczął od syntezy, która przeprowadzona została z zaproponowaniem czterech różnych strategii syntetycznych mających na celu otrzymanie czterech podserii inhibitorów zawierających różne rdzenie. Strategie te przedstawiłam na **Schematach 3.2, 3.3, 3.5 oraz 3.6**.



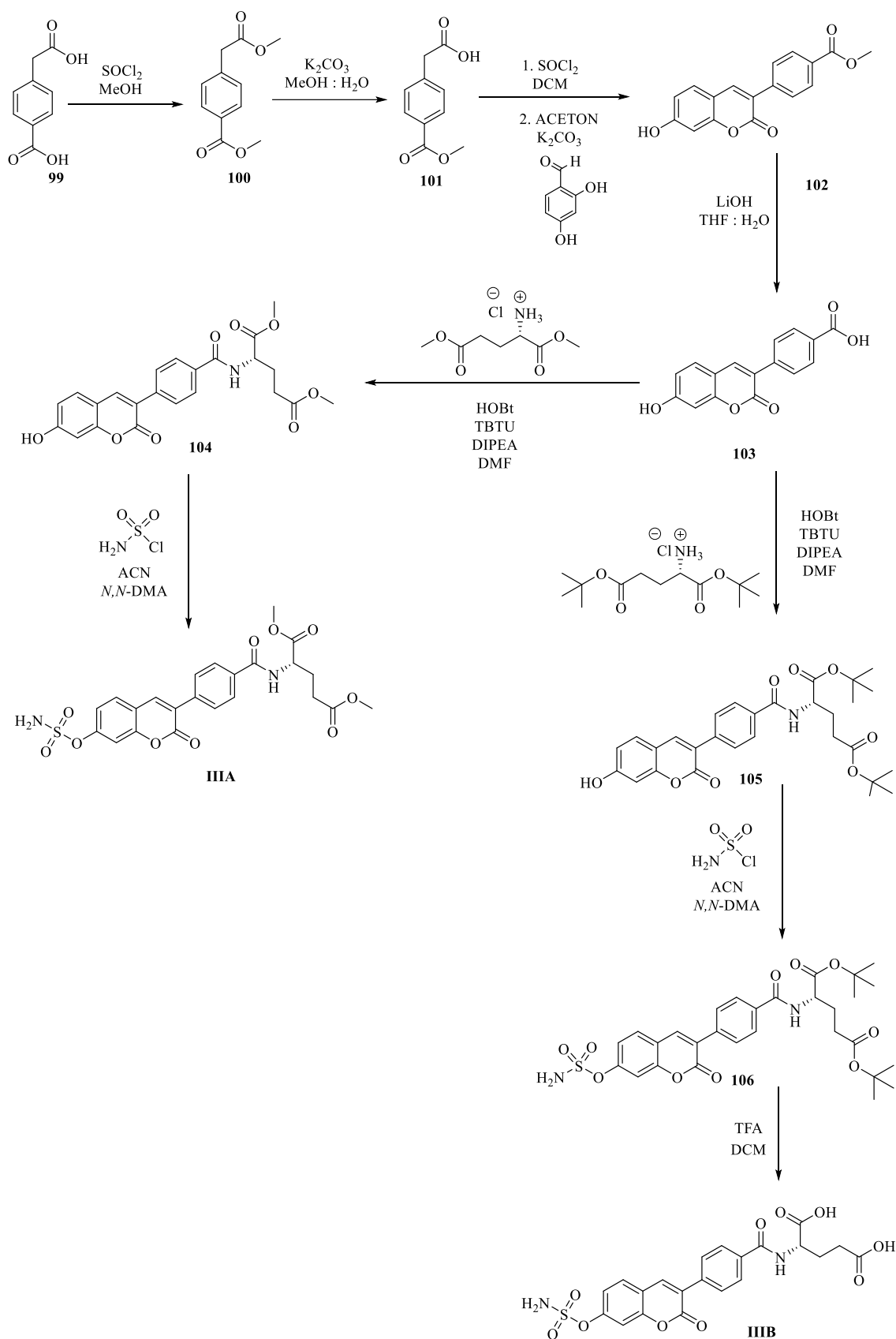
Schemat 3.2 Szlak syntezy pochodnych **IIA** oraz **IIB**.

Otrzymywanie zaprojektowanych pochodnych **IIA** oraz **IIB**, zawierających w swojej strukturze pierścień triazolowy, rozpoczęłam od reakcji sprzęgania Sonogashiry pomiędzy 6-bromo-2-naftolem **87** a trimetylosililoacetylenem analogicznie jak to miało miejsce w podrozdziale 2.4. W kolejnym kroku, początkowo chciałam użyć otrzymanej pochodnej **88** do reakcji typu „click” z wykorzystaniem bezpośrednio kwasu *para*-aminobenzoowego **92**, jednak próba ta zakończyła się niepowodzeniem. Po etapie reakcji, generowanego *in situ* azydki z pochodną **88** na płytce TLC zaobserwowałam powstawanie licznych produktów ubocznych tej reakcji. Z tego powodu postanowiłam przeprowadzić kwas *para*-aminobenzoowy **92** w ester metylowy, co udało mi się z wykorzystaniem klasycznej reakcji estryfikacji, gdzie reagentami był metanol oraz chlorek tionylu. W taki oto sposób otrzymałam związek **93**, który następnie z sukcesem wykorzystałam do reakcji cykloaddycji ze związkiem **88** otrzymując pochodną **95** z wydajnością 69%. Następnie przeprowadziłam reakcję hydrolizy z wykorzystaniem roztworu wodorotlenku litu, a produkt wyizolowałam z ilościową wydajnością. Kolejną pochodną **96** użyłam w reakcji sprzęgania z estrem dimetylowym kwasu L-glutaminowego, gdzie odczynnikami sprzęgającymi były HOBt, TBTU, a formę zasady pełniła DIPEA. Reakcja ta przebiegła z zadowalającą wydajnością 60% dając produkt **97**, który został następnie użyty jako substrat do dwóch różnych reakcji. Pierwszą z nich była reakcja otrzymania pochodnej **IIA**, którą przeprowadziłam z zastosowaniem mianowanego roztworu komercyjnie dostępnego chlorku sulfamoilu w acetonitrylu (ACN). Wykorzystanie roztworu mianowanego pozwoliło zoptymalizować warunki reakcji amidosiarczanowania, dzięki czemu produkt **IIA** uzyskany został z wydajnością 80%. Następnie, w celu uzyskania drugiego produktu finalnego **IIB**, przeprowadziłam hydrolizę pochodnej **97**, która przebiegła z ilościową wydajnością. Ostatecznie związek **98** poddany został amidosiarczanowaniu, w wyniku czego otrzymałam drugi produkt końcowy **IIB**. Przebieg tej syntezy został zaprezentowany na **Schemacie 3.2** a wydajności poszczególnych reakcji zaprezentowałam w **Tabeli 3.9**.

Tabela 3.9 Wydajności wszystkich reakcji przedstawionych na **Schemacie 3.2**.

Nr związku	Wydajność [%]	Nr związku	Wydajność [%]	Nr związku	Wydajność [%]
93	98	97	60	IIB	86
95	69	IIA	80		
96	90	98	92		

W dalszej kolejności opracowałam metodę syntezy związków **IIIA** oraz **IIIB**, które były pochodnymi kumaryny zawierającymi w swojej strukturze resztę kwasu glutaminowego.

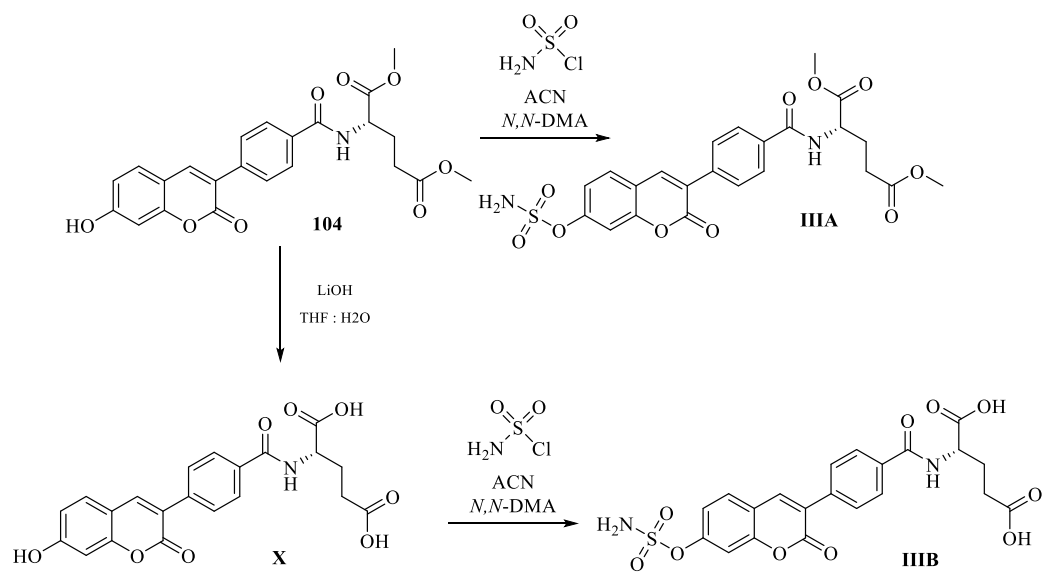


Schemat 3.3 Szlak syntezy pochodnych **IIIA** oraz **IIIB**.

Procedurę syntetyczną rozpoczęłam od reakcji otrzymywania estru dimetylowego **100** z wykorzystaniem kwasu *para*-karboksyfenylooctowego **99**. Transformacja ta prowadzona była z wykorzystaniem chlorku tionylu oraz metanolu i przebiegła z wydajnością ilościową. Następnie przeprowadziłam serię eksperymentów mającą na celu doprowadzenie do selektywnej hydrolizy jednej grupy estrowej stosując różnego rodzaju zasady oraz ilości ich ekwiwalentów. Najlepsza wydajność selektywnej hydrolizy została osiągnięta w przypadku wykorzystania węglanu potasu w ilości 1.1 eq. Po zoptymalizowaniu tej reakcji, produkt pośredni **101** przekształciłam *in situ* w chlorek kwasowy, który następnie traktowałam 2,4-dihydroksybenzaldehydem otrzymując pochodną **102** zawierającą w swojej konstytucji układ kumaryny. Następnie przeprowadziłam hydrolizę ugrupowania estrowego wykorzystując wodny roztwór wodorotlenku litu, która ponownie zaszła w wydajnością ilościową. Produkt pośredni **103** został poddany przeze mnie reakcji sprzęgania z chlorowodorkiem estru dimetylowego kwasu L-glutaminowego dając produkt pośredni **104**. Początkowo związek ten chciałam wykorzystać do dwóch reakcji, gdzie pierwszą z nich była końcowa reakcja amidosiarczanowania w celu otrzymania związku **IIIA**. Drugą z nich miała być reakcja hydrolizy estrów metylowych (związek **X**, **Schemat 3.4**), po czym następować miała reakcja amidosiarczanowania. Obydwie z tych reakcji zakończyły się sukcesem, jednak problem pojawił się w momencie próby przeprowadzenia reakcji amidosiarczanowania pochodnej po hydrolizie estrów metylowych bowiem reakcja ta zatrzymywała się w pewnym jej etapie, o czym świadczyły wyniki monitorowania tej reakcji z wykorzystaniem chromatografii TLC. Pomimo, próby poprawy konwersji substratu tej reakcji poprzez zwiększenie ilości ekwiwalentów użytego chlorku sulfamoilu, nie udało się uzyskać całkowitego przereagowania substratu. Zazwyczaj taka sytuacja nie jest problemem syntetycznym, jednak tutaj trudną kwestią była próba oddzielenia związków znajdujących się w mieszaninie reakcyjnej, gdyż próby krystalizacji kończyły się wynikiem negatywnym, a próba rozdzielania tych związków z wykonaniem kolumny chromatograficznej również okazała się nieskuteczna ze względu na zbliżoną polarność substratu i produktu. Przebieg reakcji zakończonej niepowodzeniem został zaprezentowany na **Schemacie 3.4**. Z tego powodu postanowiłam zmodyfikować procedurę syntetyczną na etapie sprzęgania związku **103** tym razem z pochodną di-*tert*-butylową kwasu glutaminowego uzyskując w ten sposób pochodną **105**, która poddana została przeze mnie reakcji amidosiarczanowania (**Schemat 3.3**). Po wprowadzonej modyfikacji udało się wyizolować pochodną **106** na drodze krystalizacji. W celu uzyskania produktu końcowego **IIIB**, ostatecznie usunęłam grupy *tert*-butylowe z użyciem kwasu trifluorooctowego (TFA). Cały przebieg syntezy został przedstawiony na **Schemacie 3.3**, a wydajności poszczególnych reakcji zostały zebrane w **Tabeli 3.10**.

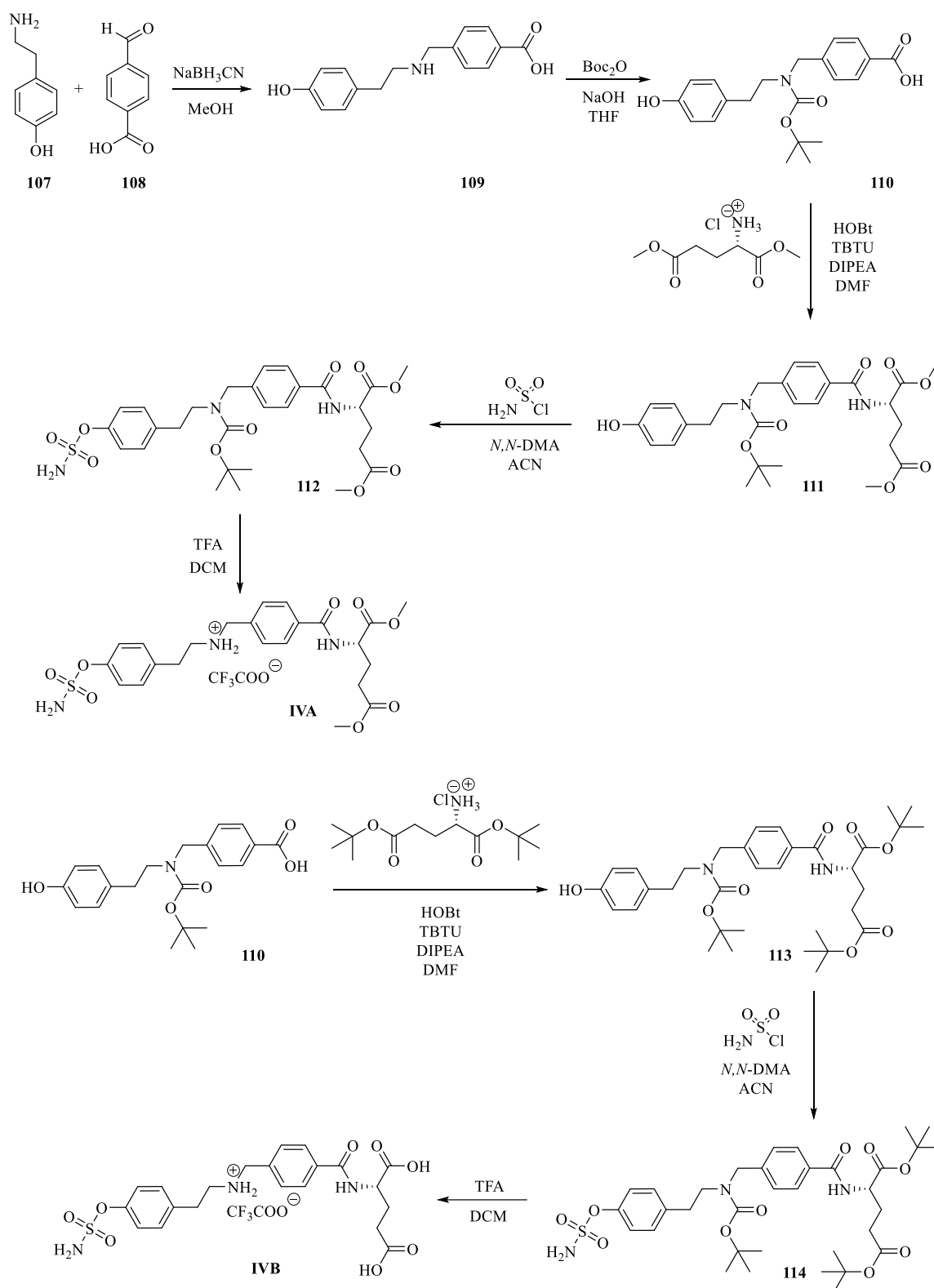
Tabela 3.10 Wydajności wszystkich reakcji przedstawionych na **Schemacie 3.3**.

Nr związku	Wydajność [%]	Nr związku	Wydajność [%]	Nr związku	Wydajność [%]
100	98	103	86	106	77
101	65	104	78	IIIA	81
102	80	105	64	IIIB	86



Schemat 3.4 Przebieg planowanej syntezy związku **IIIB**, która zakończyła się niepowodzeniem.

W ramach kontynuacji prac syntetycznych otrzymałam dwie kolejne pochodne, **IVA** oraz **IVB**, zawierające w swojej strukturze rdzeń tyraminowy. Szlak tej syntezy został przedstawiony na **Schemacie 3.5**.



Schemat 3.5 Szlak syntezy pochodnych **IVA** oraz **IVB**.

Prace z tą grupą związków rozpoczęłam od reakcji redukcyjnego aminowania w wyniku czego otrzymałam związek **109**. W kolejnym etapie przeprowadziłam reakcję acylowania pochodnej **109** w celu ochrony grupy aminowej z wykorzystaniem ugrupowania Boc. Działanie to spowodowało, iż reakcja sprzęgania pochodnej **110** zaszła bez większych trudności i pozwoliła mi wyizolować pochodną **111** z wydajnością 45%. Kolejnymi etapami syntezy były reakcja amidosiarczanowania oraz reakcja usunięcia grupy ochronnej Boc z wykorzystaniem TFA. W taki sposób uzyskałam produkt końcowy **IVA** w postaci soli kwasu trifluorooctowego. Syntezę pochodnej **IVB** przeprowadziłam według procedury syntetycznej opracowanej dla związku **IIIB** z wykorzystaniem estru di-*tert*-butylowego kwasu L-glutaminowego oraz pochodnej **110**. Po otrzymaniu produktu pośredniego **113** przeprowadziłam jego amidosiarczanowanie otrzymując związek **114**. Ostatecznie, reakcja z TFA umożliwiła mi otrzymanie związku końcowego **IVB**.

Tabela 3.11 Wydajności wszystkich reakcji przedstawionych na **Schemacie 3.5**.

Nr związku	Wydajność [%]	Nr związku	Wydajność [%]	Nr związku	Wydajność [%]
109	81	112	83	114	79
110	90	IVA	96	IVB	95
111	45	113	52		

Otrzymywanie kolejnych związków końcowych **VA** oraz **VB**, będącymi pochodnymi flawonów rozpoczęłam od reakcji kondensacji aldolowej pomiędzy związkami **115** oraz **116** (**Schemat 3.6**). Uzyskany w ten sposób związek **117** poddałam transformacji z wykorzystaniem jodu w DMSO, która pozwoliła mi na uzyskanie cząsteczki **118** z rdzeniem flawonowym. Wszystkie wyżej opisane reakcje zostały przeprowadzone zgodnie z procedurami zawartymi w publikacji autorstwa O. L. Kobzara i współpracowników o tytule „Carboxylated chalcones and related flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase”. [123] Następnie przeprowadziłam reakcję usunięcia grupy metylowej z wykorzystaniem chlorowodoru pirydyny. W ten sposób otrzymałam pochodną **119**. W kolejnym kroku, pochodna **119** została wykorzystana do dwóch reakcji sprzęgania z estrami dimetyłowymi oraz di-*tert*-butylowymi kwasu L-glutaminowego. Dalsza część syntez była analogiczna do opisanych już wcześniej w tym rozdziale i obejmowała reakcje amidosiarczanowania oraz usunięcia estrów *tert*-butylowych. Wydajności poszczególnych reakcji przedstawiono w **Tabeli 3.12**.

Tabela 3.12 Wydajności wszystkich reakcji przedstawionych na **Schemacie 3.6**.

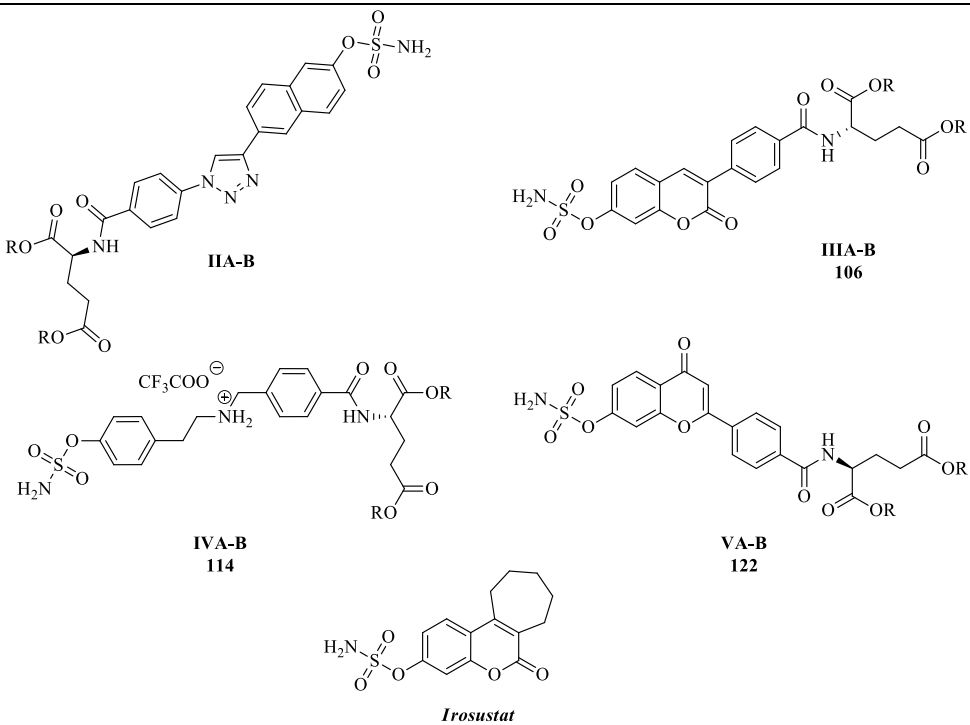
Nr związku	Wydajność [%]	Nr związku	Wydajność [%]
119	68	121	86
120	61	122	56
VA	51	VB	61



3.3.3 Badania biologiczne *in vitro* analogów kwasu foliowego – test enzymatyczny oraz komórkowy

Po zakończeniu etapu syntezy chemicznej zostały przeprowadzone testy enzymatyczne z wykorzystaniem sulfatazy steroidowej, która została wyizolowana z ludzkiego łożyska, a stężenie potencjalnych inhibitorów jakie zostało wykorzystane w tym teście wynosiło 10 μM . Jako że produkty pośrednie **106**, **114** oraz **122** posiadały w swojej konstytucji ugrupowanie amidosiarczanowe, postanowiłam uwzględnić je w eksperymentach biologicznych. Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w **Tabeli. 3.13**. Zebrane dane wskazują na to, iż związki pochodzące z grupy pochodnych tyraminowych **IVA** oraz **IVB** nie wykazują żadnej aktywności inhibicyjnej, dlatego zostały wykluczone z kolejnych etapów badań. Pozostała aktywność STS dla reszty związków zawierała się w przedziale od 4,35 do 79,38%. Na tym etapie badań najlepszą aktywność wykazały związki **IIIA** (pochodna kumarynowa) oraz **122** (pochodna flawonowa), które uzyskały wyniki kolejno 4,35% oraz 8,17% pozostałej aktywności STS, gdzie związek referencyjny osiągnął wartość 6,31%.

Tabela 3.13 Pozostała aktywność STS w teście na wyizolowanym enzymie oraz w teście komórkowym z wykorzystaniem komórek JEG-3 po inkubacji ze związkami **IIA-B**, **IIIA-B**, **IVA-B**, **VA-B**, **106**, **114**, **122** i *Irosustatem* oraz wyznaczony parametr IC_{50} .

				
Nr związków	R	Pozostała aktywność STS [%] – testy enzymatyczny	Pozostała aktywność STS [%] – testy komórkowy	IC_{50} [nM]
		10 μM	0,1 μM	
IIA	Me	79,28 $\pm$ 4,81	-	-
IIB	H	25,28 $\pm$ 2,78	95,24 $\pm$ 5,71	1436 $\pm$ 244
IIIA	Me	4,35 $\pm$ 0,20	91,47 $\pm$ 5,59	2655 $\pm$ 671
IIIB	H	30,36 $\pm$ 0,83	88,86 $\pm$ 4,71	>5000
106	^t Bu	41,75 $\pm$ 2,53	-	-

IVA	Me	100,00 ± 3,62	-	-
IVB	H	100,00 ± 7,42	-	-
114	^t Bu	21,84 ± 0,51	88,59 ± 8,86	4336 ± 649
VA	Me	44,84 ± 2,00	-	-
VB	H	74,09 ± 3,20	-	-
122	^t Bu	8,17 ± 1,03	93,78 ± 4,27	>20000
Irosustat	-	6,31 ± 1,18	18,59 ± 0,50	2,7 ± 0,2

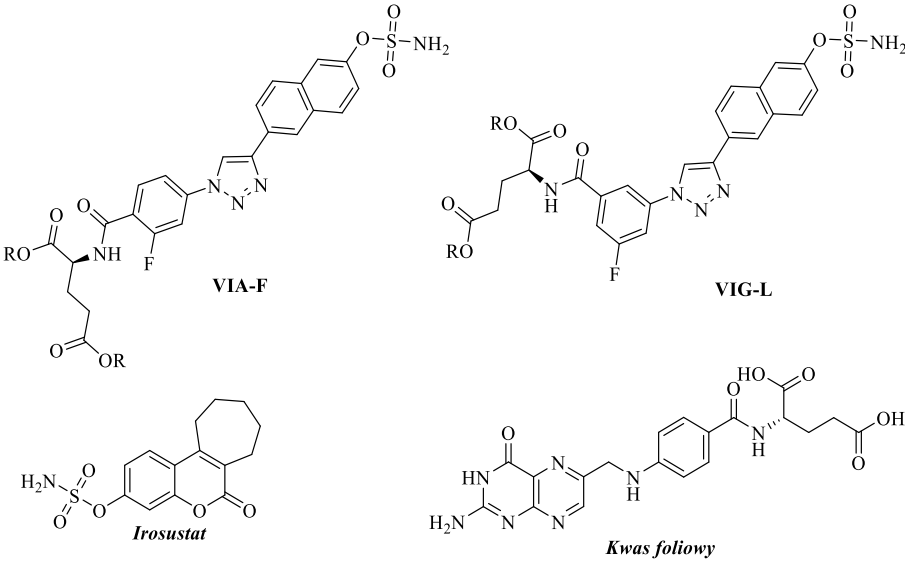
Kolejnym etapem badań biologicznych były testy komórkowe z wykorzystaniem linii komórkowej JEG-3. Do testów tych wyselekcjonowałam pięć związków, dla których pozostała aktywność STS przy stężeniu inhibitorów 10 µM w teście enzymatycznym mieściła się poniżej 40%. W ramach eksperymentu komórkowego wyznaczony został parametr IC₅₀. Najniższa wartość tego parametru została wyznaczona dla pochodnej **IIB** zawierającej w swojej strukturze pierścień triazolowy (wartość IC₅₀ na poziomie 1436 nM). Niespodziewanie, związek **122**, który charakteryzował się jednym z najwyższych stopni zahamowania STS w teście enzymatycznym, w teście komórkowym okazał się nieaktywny. Może to świadczyć o niestabilności metabolicznej tego związku w komórkach lub o problemie z jego transportem do wnętrza komórki. Niestety, pomimo najwyższej aktywności pochodnej **IIB** okazała się ona znacznie niższa w porównaniu z aktywnością *Irosustatu* (wartość IC₅₀ na poziomie 2,7 nM). W celu próby poprawy aktywności tej klasy związków opartych o rdzeń triazolowy postanowiłam zmodyfikować ich strukturę poprzez wprowadzenie do ich konstytucji atomu fluoru. Jak dowiedziałam podczas badań nad pierwszą serią inhibitorów **I** opisanych w rozdziale 3.2.3, wprowadzenie atomów fluoru może znacząco wpłynąć na poprawę aktywności inhibicyjnej względem STS. Ponadto, w ramach rozszerzenia badań postanowiłam otrzymać serię związków, w ramach których reszty kwasu glutaminowego obecne będą w postaci różnego rodzaju estrów (metylowego, etylowego, *izo*-propylowego, *tert*-butylowego, benzyłowego), a także pozycja samej reszty kwasu glutaminowego będzie zmieniona.

3.4 Pochodne (2-fluoro-4-(4-(6-(sulfamiloksy)naftalen-2-ylo)-1*H*-1,2,3-1-ylo)benzoilo)glutaminowe oraz pochodne (3-fluoro-5-(4-(6-(sulfamiloksy)naftalen-2-ylo)-1*H*-1,2,3-1-ylo)benzoilo)glutaminowe VIA-L

3.4.1 Modelowanie molekularne pochodnych (2-fluoro-4-(4-(6-(sulfamiloksy)naftalen-2-ylo)-1*H*-1,2,3-1-ylo)benzoilo)glutaminowych oraz pochodnych (3-fluoro-5-(4-(6-(sulfamiloksy)naftalen-2-ylo)-1*H*-1,2,3-1-ylo)benzoilo)glutaminowych VIA-L

Po uzyskaniu wyników testów biologicznych związków **IIA-B**, **IIIA-B**, **IVA-B**, **VA-B**, **106**, **114**, **122** i ich dogłębnym przanalizowaniu zdecydowałam, że dalsze badania będę kontynuować z wykorzystaniem rdzeni triazolowych, jako tych które charakteryzowały się najniższą wartością parametru IC₅₀ w teście komórkowym. Na podstawie wcześniej nabytych doświadczeń, zdecydowałam o wprowadzeniu atomu fluoru w pozycje 3 przy terminalnym pierścieniu aromatycznym. Moja decyzja poparta była wystąpieniem możliwych interakcji pomiędzy tym halogenem a resztami aminokwasowymi w centrum katalitycznym STS, co z kolei pozwoliłoby na stworzenie stabilnego kompleksu enzym-inhibitor. Ponadto, chciałam sprawdzić czy rodzaj ugrupowania estrowego oraz samo położenie reszty kwasu glutaminowego przy terminalnym pierścieniu aromatycznym może wpłynąć na wartość aktywności inhibicji oraz na to czy dane cząsteczki będą mogły przedostać się do wnętrza komórki wykorzystując mechanizm angażujący FR α . Z wyżej wymienionych powodów ponownie postanowiłam rozpocząć swoje prace od przeprowadzenia dokowania molekularnego z wykorzystania oprogramowania AutoDock Vina 2.1.1. Otrzymane wyniki zaprezentowałam w **Tabeli 3.14**.

Tabela 3.14 Wyniki analizy dokowania molekularnego związków **VIA-L** oraz związków *Irosustatu* i *FA* otrzymanych z wykorzystaniem oprogramowania Auto Dock Vina 1.1.2.

			
Nr	R	Swobodna energia wiązania [kcal/mol]	
		STS	FR α
VIA	Me	-6,5	-10,4
VIB	Et	-7,4	-9,0

VIC	ⁱ Pr	-7,6	-9,5
VID	^t Bu	-4,1	-9,5
VIE	Bn	-7,1	-9,0
VIF	H	-7,5	-11,0
VIG	Me	-6,9	-10,3
VIH	Et	-7,5	-9,8
VII	ⁱ Pr	-6,4	-9,0
VIJ	^t Bu	-7,8	-9,8
VIK	Bn	-9,7	-9,8
VIL	H	-7,8	-10,9
Irosustat	-	-5,4	-
FA		-	-10,9

Zarówno w przypadku STS jak i FR α , wykorzystanych jako cele molekularne, wyniki które otrzymałam były zadawalające, gdyż były zbliżone do wartości związków referencyjnych (*Irosustat* -5,4 kcal/mol, *FA* -10,9 kcal/mol), a w niektórych przypadkach były nawet korzystniejsze. Kolejnym bardzo ważnym etapem moich badań była identyfikacja możliwych interakcji ligand-cel molekularny z wykorzystaniem oprogramowania BIOVA. W przypadku kompleksów ligand-STs wykryto wiele możliwych oddziaływań, takich jak: wiązania wodorowe, wiązania wodorowe z węglem, π -siarka, π -alkil, metal-akceptor, π - π , π -kation czy też halogenowe. Ostatni typ oddziaływań teoretycznie mógł w bardzo intensywny sposób wpłynąć na trwałość powstałego kompleksu, dlatego bardzo dobrą informacją była możliwość pojawienia się takiej interakcji w przypadku pochodnych **VID**, **VIE**, **VIG** oraz **VIK**. Wyniki tych analiz zostały podsumowane w **Tabeli 3.15**. Również w przypadku kompleksów ligand-FR α wykryto szereg możliwych interakcji, które zostały zaprezentowane w **Tabeli 3.16**. W tym przypadku były to oddziaływania typu wiązania wodorowe, wiązania wodorowe z węglem, π -siarka, π -alkil, π -sigma, π - π , π - π w kształcie litery T, π -kation, halogenowe oraz oddziaływania o charakterze negatywnym. Dodatkowo sprawdziłam również odległość pomiędzy atomem siarki przykładowego związku **VIK** oraz atomem tlenu w reszcie fGly75 sulfatazy steroidowej, co zostało przedstawione na **Rys. 3.5**. Wyniosła ona 3,02 Å, co jest korzystne, gdyż odległość pomiędzy atomem tlenu a atomem siarki związku referencyjnego wyniosła 3,16 Å, dlatego można było sądzić, że inhibicja poprzez udział reszty amidosiarczanowej będzie mogła mieć miejsce.

Tabela 3.15 Interakcje ligand – STS dla związków **VIA-L** (wraz z dystansem [Å]) zidentyfikowane przy użyciu oprogramowania BIOVIA, Dassault Systemes, Discovery Studio Visualiser oraz schemat oddziaływań dla związku **VIK**.

Interakcje - van der Waals - Wiązanie wodorowe - Wiązanie wodorowe z węglem - Halogen π-Siarka π-π π-π w kontekście litery T π-Alkil									
Nr	Wiązania wodorowe	Wiązania wodorowe z węglem	π -Siarka	π -Alkil	π -Sigma	Metal-akceptor	π - π	π -Kation	Halogen
VIA	LYS368(5,24), HIS346 (4,90), HIS485 (5,13)	GLY181 (3,22)	HIS346 (5,37)	LEU103 (5,36), VAL486 (6,14), VAL177 (4,76)	PHE104 (5,21), VAL177 (4,04)	-	-	-	-
VIB	ARG98 (5,45), LYS368 (5,19, 5,79)	GLY181 (3,24, 4,07), HIS136 (6,10)	HIS290 (5,85)	ARG98 (4,93), VAL486 (5,26), VAL177 (5,19, 5,74), VAL101 (5,41)	-	CA600 (3,30)	-	-	-
VIC	FGLY75 (4,14, 4,82), LYS368 (4,82)	HIS136 (5,94)	HIS290 (6,00)	VAL177 (4,46, 5,02), VAL101 (5,66), VAL486 (6,51), LEU103 (5,43, 5,54, 6,07)	-	-	PHE178 (4,50)	-	-
VID	FGLY75 (3,22), LYS368 (4,93)	HIS136 (5,80)	HIS136 (6,94), HIS290	VAL177 (4,51, 4,92),	-	CA600 (3,38)	PHE233 (5,40), TRP555	ARG98 (5,29)	GLY181 (2,91), PHE178

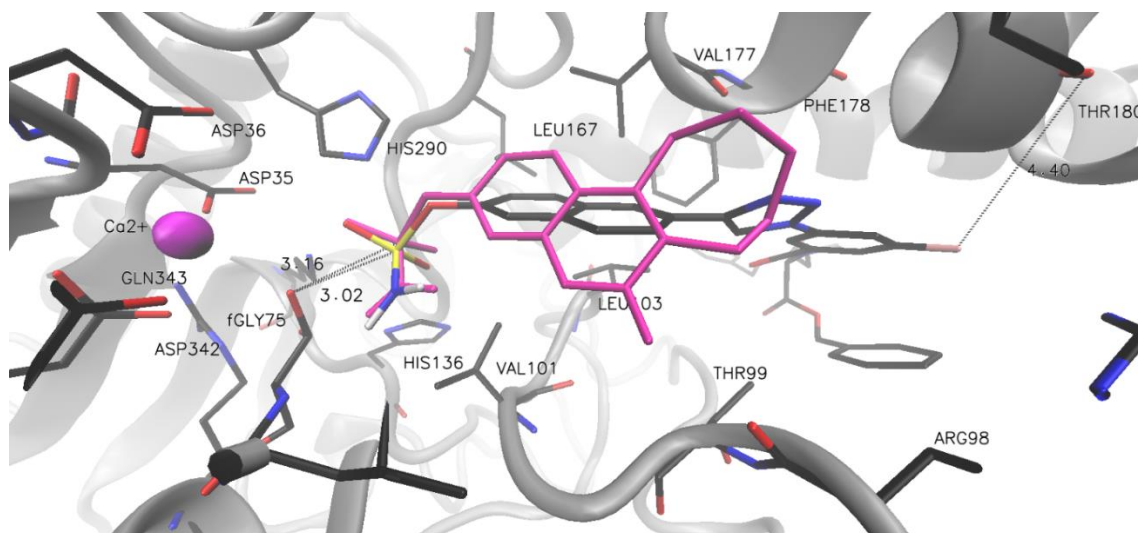
			(4,93)	VAL101 (5,55), LEU103 (5,34, 4,59, 6,06), VAL486 (6,44)			(5,22)		(4,20)
VIE	THR165 (4,12), LYS368 (5,66), ARG98 (3,95, 5,05, 6,26)	GLY181 (3,66)	HIS136 (6,70)	LEU185 (5,56), TRP550 (7,03), VAL177 (4,77, 5,57), VAL486 (5,34), VAL101 (5,70)	-	CA600 (2,69)	-	-	THR180 (4,00)
VIF	LYS368 (5,80), GLU349 (4,16), HIS485 (5,74), FGLY75 (4,42)	-	-	VAL486 (6,50), LE103 (6,15)	THR99 (5,09)	-	-	-	-
VIG	ARG98 (5,39), FGLY75 (4,27), LYS368 (5,24)	PHE178 (4,48), HIS136 (5,78)	HIS290 (5,97), HIS136 (6,88)	VAL101 (5,44), LEU103 (6,62), VAL486 (5,58), VAL177 (5,35, 5,66)	-	-	-	-	THR180 (4,69)
VIH	ARG98 (5,70), HIS290 (6,95), LYS368 (5,49)	-	HIS136 (6,03), HIS290 (6,95)	PHE104 (6,27), PHE233 (5,07), TRP555 (4,36), VAL177 (5,29, 5,70), VAL101 (5,25), LEU103 (6,07, 6,35), VAL486 (6,12)	-	-	-	-	-
VII	ARG98 (5,16), LYS368 (5,37), FGLY75 (3,13)	HIS136 (5,74)	HIS136 (6,67), HIS290 (5,83)	TRP550 (6,80), VAL486 (5,34), VAL101 (5,45),	PHE233 (5,05)	-	-	-	-

				VAL177 (5,27, 5,72), PHE182 (5,25), PHE178 (5,00)					
VIJ	ARG98 (6,33), FLGy75 (4,12), LYS368 (5,14)	HIS136 (5,69), GLY181(3,45), THR180 (3,94)	HIS290 (6,03), HIS136 (6,87)	VAL486 (5,27), VAL177 (5,00, 5,44), VAL101 (5,78)	-	-	PHE233 (5,63), PHE104 (6,83), TRP550 (6,60)	ARG98 (3,65)	-
VIK	FGLY75 (3,08,4,27), LYS368 (5,22), ARG98 (5,86)	HIS136 (5,84)	HIS136 (6,91), HIS290 (6,00)	VAL486 (5,94), LEU130 (6,19, 6,47), VAL101 (5,36), VAL177 (5,22, 5,62)	-	-	TRP500 (6,36), TRP555 (4,39)	-	THR180 (4,40), GLY181 (4,28)
VIL	HIS346 (5,29), HIS486 (5,02), LYS368 (5,45, 5,64)	GLY181 (3,46), HIS290 (4,09)	HIS346 (5,81)	VAL486 (5,14, 6,01), VAL171 (4,61, 5,29)	-	-	-	-	-

Tabela 3.15 Interakcje ligand – FR α dla związków **VIA-L** (wraz z dystansem [Å]) zidentyfikowane przy użyciu oprogramowania BIOVIA, Dassault Systemes, Discovery Studio Visualiser oraz schemat oddziaływań dla związku **VIK**.

Interakcje - van der Waals - Wiązania wodorowe π-π π-π w kształcie litery T										
Nr	Wiązania wodorowe	Wiązania wodorowe z węglem	π -Siarka	π -Alkil	π -Sigma	π - π	π -Kation	Halogen	π - π T kształt	Neg.
VIA	SER101 (5,13), TRP102 (4,48), ASP81 (4,44)	SER174 (3,67), TYR60 (5,31)	TYR85 (4,53)	-	-	TRP102 (5,67), TYR60 (4,16), TRP171 (6,74, 4,65, 3,90), TYR85 (6,05, 4,88)	-	-	-	ASP81 (5,01)
VIB	TRP140 (5,17), PHE78 (5,47)	HIS135 (5,28)	-	LYS136 (5,40)	-	TRP102(5,36), TYR60 (4,07, 6,10)	HIS135 (6,10)	-	-	-
VIC	TRP140 (4,93), THR82 (3,98)	-	-	-	-	TRP102 (5,27), TYR60 (4,05, 4,78), TRP140 (5,49)	HIS135 (5,66)	-	-	-
VID	PHE78 (5,90), TRP140 (5,04), GLY137 (3,34)	-	-	LYS136 (4,16)	-	TYR60 (4,07, 4,59), TRP102 (5,88)	HIS135 (5,65)	-	TRP140 (5,11)	-
VIE	SER174 (3,78), TRP102 (5,24)	TRP171 (4,89), SER174 (3,80)	-	TRP140 (6,17)	-	TRP171 (4,61, 5,61), TYR85 (5,22), TRP102 (5,75, 6,16), TRP60 (4,49)	-	-	TRP140 (6,52)	-
VIF	GLY137 (3,52),	SER174 (3,45)	TYR175 (4,65)	-	-	TRP102 (5,53), TYR60	-	-	-	-

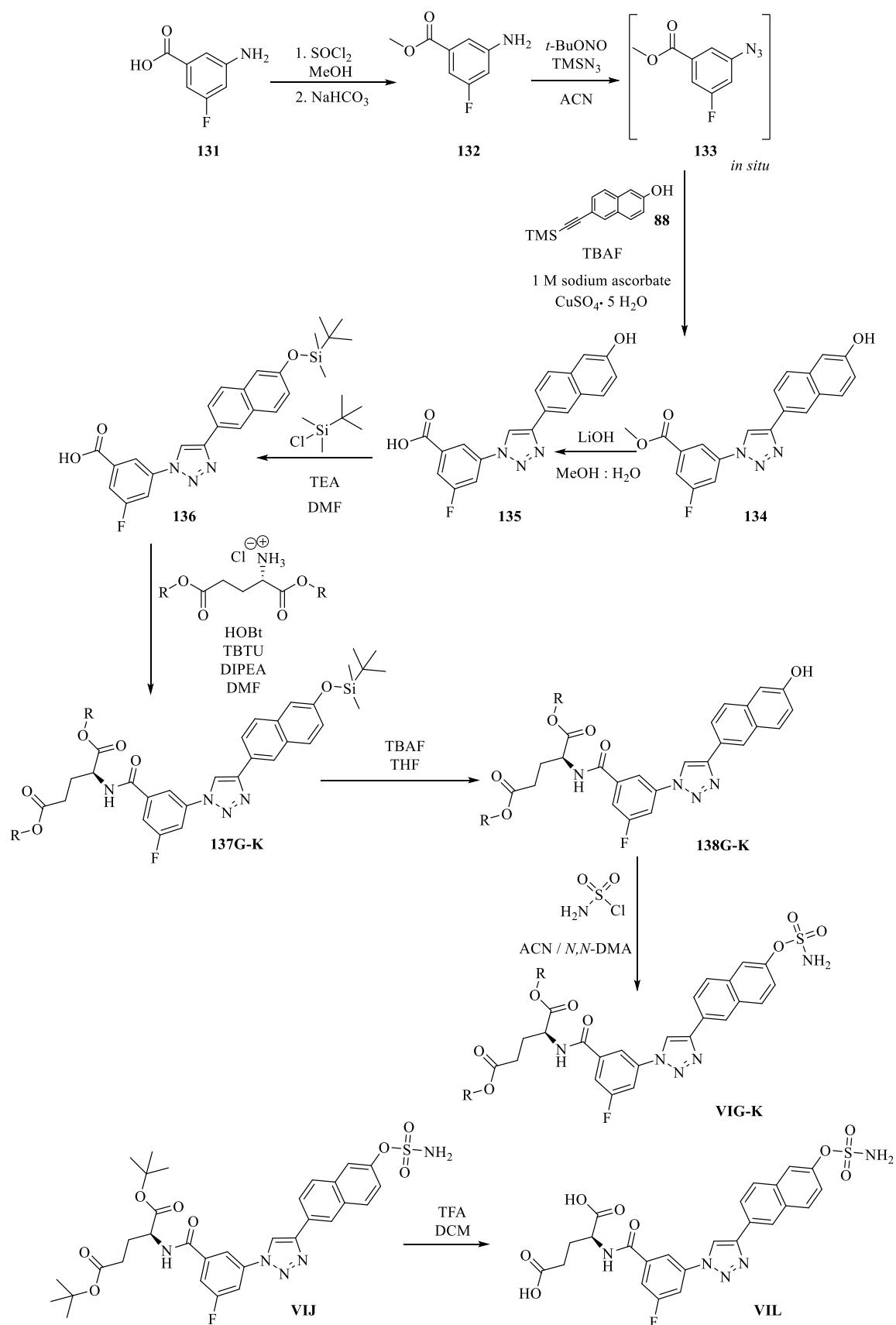
	TRP138 (5,24), HIS135 (6,23), SER101 (4,76), SER174 (4,04)					(4,14), TRP171 (4,48, 4,94, 7,16), TYR85 (4,57, 6,64)				
VIG	TRP138 (5,59), GLY137 (3,44), TRP140 (4,86), ASP81 (3,40), PHR78 (5,30)	TYR60 (4,81), HIS135 (7,21), TYR60 (4,81), TRP171 (3,71)	-	-	-	TRP102 (6,41), TYR60 (4,21, 4,46)	HIS135 (5,80, 5,93)	-	TRP140 (4,74, 5,94)	-
VIH	HIS135 (5,75), ARG103 (6,37)	TYR60(4,80)	-	TRP171 (5,11), TYR85 (4,52), TYR175 (5,31), ARG61 (6,64)	TYR60 (4,80)	TRP102 (4,34, 5,95), TYR60 (4,34), HIS135 (5,84)	-	-	TRP140 (4,20, 4,90)	-
VII	TRP140 (5,27), ASP81 (3,59), PHE78 (5,28)	THR82 (3,14)	-	-	-	TYR60 (4,16, 4,51), TRP140 (4,76, 5,47)	-	-	-	TRP171 (5,40)
VIJ	SER101 (3,82, 4,93), ASP81 (4,09), PHE78 (5,40)	TRP102 (4,86). TRP82 (3,11)	-	ARG61 (7,10)	-	TP171 (5,93, 7,03), TYR60 (4,36, 4,96)	-	-	TRP140 (6,78)	TRP171 (5,15)
VIK	GLY137 (3,93)	-	-	-	-	TRP102 (6,04, 6,68), TRP60 (4,17, 5,48), TRP171 (6,81, 8,08)	-	-	TRP140 (560)	-
VIL	TRP138 (4,86, 5,92), ASP81 (3,51), TRP140 (5,36)	-	-	-	-	TRP102 (6,41), TRP60 (4,12, 4,37, 5,16). HIS135 (6,00)	HIS13 (5,90)	-	TRP140 (4,70)	TRP171 (5,31)



Rys. 3.5 Miejsce aktywne STS z zadokowanym związkiem **VIK** (koloru CPK) oraz z *Irosustatem* (różowy) wraz z odległościami od fGly75 (Å).

3.4.2 Synteza pochodnych (2-fluoro-4-(4-(6-(sulfamiloksy)naftalen-2-yl)-1*H*-1,2,3-1-yl)benzoilo)glutaminowych oraz pochodnych (3-fluoro-5-(4-(6-(sulfamiloksy)naftalen-2-yl)-1*H*-1,2,3-1-yl)benzoilo)glutaminowych **VIA-L**

Po zaprojektowaniu struktur nowych inhibitorów w oparciu o wyniki dokowania molekularnego oraz sprawdzeniu możliwości wystąpienia interakcji pomiędzy ligandami a STS oraz FR α , w kolejnym etapie przystąpiłam do otrzymywania ich na drodze syntezy chemicznej według procedur przedstawionych na **Schematach 3.7** oraz **3.8**. W celu uzyskania związków mających imitować kwas foliowy, nauczona doświadczeniem związany z trudnością przeprowadzenia reakcji typu „click” z wykorzystaniem pochodnej kwasowej, prace nad tą serią związków rozpocząłam od reakcji estryfikacji kwasu 4-amino-2-fluorobenzoowego **123**, która zaszła z wydajnością ilościową (**Schemat 3.7**). Otrzymany w ten sposób związek **124**, po przekształceniu w pochodną z grupą azydkową **125**, wykorzystałam w reakcji 1,3-dipolarnej [3+2] cykloaddycji Huisgena CuAAC z pochodną **88**, dzięki czemu uzyskałam oczekiwany rdzeń **126**. Następnie pochodną **126** poddałam reakcji hydrolizy z użyciem wodnego roztworu wodorotlenku litu uzyskując w ten oto sposób związek **127**, który posiadał wolną grupę hydroksylową i karboksylową. W dalszej kolejności próbowałam przeprowadzić reakcję sprzęgania z odpowiednią pochodną kwasu L-glutaminowego z wykorzystaniem takich samych warunków jak było to przedstawione na **Schemacie 3.2**, jednak miałam dużą trudność z wyodrębnieniemżądanego produktu z mieszaniny poreakcyjnej, która była złożonym zbiorem kilku związków. Prawdopodobnie obecność grupy hydroksylowej związku **127**, która mogła brać udział w tej reakcji sprawiała, że była ona nieselektywna i prowadziła do powstania mieszaniny produktów. Z tego powodu postanowiłam w pierwszej kolejności ochronić grupę hydroksylową z wykorzystaniem chlorku *tert*-butyloдимetylосililowego. Początkowo spodziewałam się, że grupa ochronna zostanie wprowadzona zarówno na grupie COOH jak i OH, dlatego moim kolejnym krokiem miała być reakcja selektywnego usunięcia jednej z nich. Jednak okazało się, że w przypadku zastosowania substratu **127**, głównym produktem reakcji sililowania był produkt **128**, dzięki czemu nie było konieczności selektywnego usuwania reszty sililowej z grupy karboksylowej. Następnie mając już tak przygotowany substrat **128** przeprowadziłam pięć reakcji sprzęgania z różnymi rodzajami estrów kwasu L-glutaminowego (zastosowane w postaci chlorowodorków) w obecności HOBt, TBTU oraz DIPEA. Były to pochodne: dimetylowe, dietylowe, di-*izo*-propylowe, di-*tert*-butylowe oraz dibenzylowe. Uzyskane pochodne **129A-E**, w dalszej kolejności poddałam szybkiej reakcji usunięcia ochrony sililowej z użyciem fluorku *tetra*-*n*-butyloamoniowego (TBAF), a uzyskane w ten sposób produkty pośrednie **130A-E** poddałam finalnej reakcji z wykorzystaniem chlorku sulfamoiłu. W ten sposób otrzymałam pięć końcowych związków (**VIA-E**) z dobrymi wydajnościami. Dodatkowo jeden z końcowych produktów jakim był **VID**, został przeze mnie wykorzystany w reakcji otrzymania pochodnej z wolnymi grupami COOH w łańcuchu pochodzącym od kwasu glutaminowego **VIF**. Transformacja ta przeprowadzona została z wykorzystaniem kwasu trifluorooctowego i zakończyła się bardzo dobrą wydajnością. Otrzymanie pochodnych **VIG-L** odbył się w sposób analogiczny i został zaprezentowany na **Schemacie 3.8**.



Schemat 3.8 Szlak syntezy pochodnych **VIG-L** (R = Me, Et, ⁱPr, ^tBu, Bn).

Tabela 3.17 Wydajności wszystkich reakcji przedstawionych na **Schemacie 3.7** oraz **Schemacie 3.8**.

Nr związku	Wydajność [%]	Nr związku	Wydajność [%]	Nr związku	Wydajność [%]
124	92	130E	79	137J	63
126	76	VIA	81	137K	59
127	96	VIB	76	138G	52
128	88	VIC	90	138H	91
129A	56	VID	82	138I	89
129B	64	VIE	94	138J	85
129C	61	132	89	138K	93
129D	62	134	94	VIG	79
129E	69	135	73	VIH	81
130A	95	136	96	VII	79
130B	96	137G	80	VIJ	86
130C	85	137H	64	VIK	81
130D	83	137I	59	VIL	92

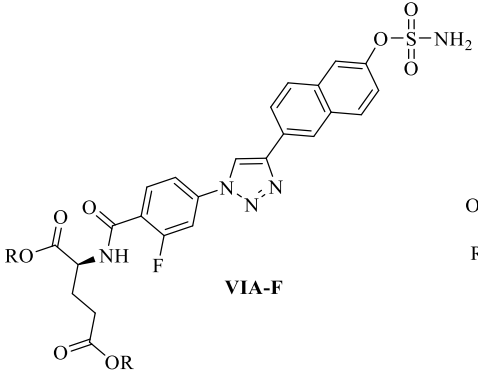
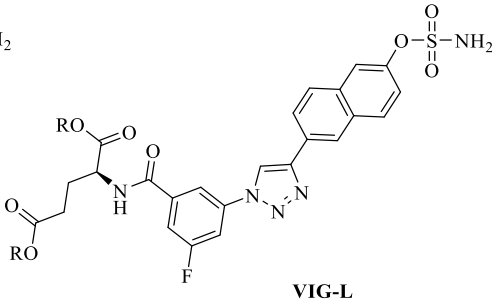
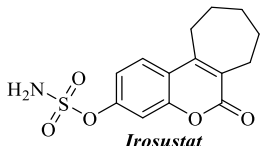
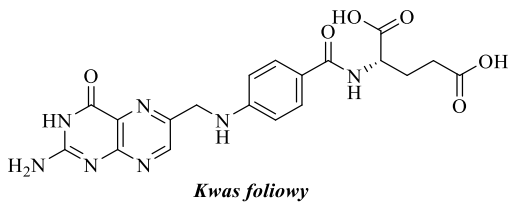
3.4.3 Badania biologiczne *in vitro* pochodnych (2-fluoro-4-(4-(6-(sulfamiloxy)naftalen-2-yl)-1*H*-1,2,3-yl)benzoilo)glutaminowych oraz pochodnych (3-fluoro-5-(4-(6-(sulfamiloxy)naftalen-2-yl)-1*H*-1,2,3-yl)benzoilo)glutaminowych **VIA-L**

Po pozytywnie zakończonym etapie syntezy chemicznej i uzyskaniu dwunastu pochodnych, związki te zostały poddane badaniom biologicznym, które ponownie zostały wykonane w ramach współpracy z zespołem dr hab. Macieja Małyka z Wydziału Nauk Ścisłych i Nauk o Zdrowiu Instytutu Biotechnologii Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego. W pierwszym etapie badań *in vitro* związki **VIA-L** zostały poddane testowi na wyizolowanym enzymie STS. Badania te zostały przeprowadzone z wykorzystaniem trzech różnych stężeń potencjalnych inhibitorów i wynosiły one kolejno 10 μM , 1 μM oraz 0,1 μM . W wyniku analiz mogłam stwierdzić, że wszystkie związki posiadają aktywność inhibicyjną względem STS. W przypadku stężenia inhibitora na poziomie 10 μM zakres pozostałej aktywności STS wynosił od 10,6 do 53,9%, a związek referencyjny osiągnął wartość 6,31%. Najlepsze wyniki uzyskały związki **VII**, **VIJ**, **VIK** (13,59, 10,63, 12,97%). W kolejnej serii badań stężenie inhibitorów było dziesięciokrotnie niższe i w tym przypadku wyniki mniej różnicowały się między sobą, dodatkowo warto zaznaczyć, że najlepsze wartości należy przypisać związkom **VII**, **VIJ**, **VIK** (kolejno 17,70, 15,46, 17,58%). W przypadku zastosowywania stężenia inhibitora na poziomie 0,1 μM najlepszy wynik osiągnął związek **VIK** i było to 20,52%, a drugim w kolejności związkiem był **VIJ**, który osiągnął wynik prawie dwukrotnie gorszy (39,72%). Warto zwrócić uwagę, że ponownie najlepsze wartości osiągnęły związki, które należą do grupy pochodnych, gdzie łańcuch pochodzący od kwasu glutaminowego znajduje się w położeniu meta względem terminalnego pierścienia triazolowego.

Do kolejnego etapu badań, czyli do testu komórkowego z wykorzystaniem linii komórkowej JEG-3, wybrano jedenaście pochodnych, gdyż związek **VID** został wyeliminowany ze względu na problemy z jego rozpuszczalnością przez co wyniki mogły nie być wiarygodne. W przypadku tego badania związkiem, który ponownie okazał się najbardziej aktywnym była pochodna **VIK**, której wynik pozostałej aktywności STS wyniósł 41,43% przy zastosowaniu stężenia inhibitora na poziomie 1 μM . Wartości jakie osiągnęły pozostałe związki zawierały się w przedziale od 47,9 do 82%, przy czym wartość pozostałej aktywności STS wyznaczonej dla *Irosustatu* wyniosła 18,59%. Na tym etapie zauważyć można pewną tendencję, polegającą na tym, iż generalnie niższe wartości pozostałej aktywności STS wyznaczone zostały dla związków z grupy **VIG-VIL** w porównaniu z grupą **VIA-F** (poza parą **VIF** oraz **VIL**, gdzie tendencja ta jest odwrócona). Tutaj również warto zaznaczyć, że wyniki dokowania molekularnego przedstawione w **Tabeli 3.9** w podrozdziale 3.9 również charakteryzowały się takimi zależnościami tzn. wyniki grupy **VIG-VIL** w stosunku do grupy **VIA-VIF** były zasadniczo lepsze. Z powyższych informacji można wysunąć wniosek, że pozycja reszty kwasu glutaminowego w terminalnym pierścieniu aromatycznym ma znaczenie i w tym przypadku preferowane jest położenie meta w stosunku do pierścienia triazolowego. Wyznaczenie parametru IC_{50} , ponownie wskazało na najniższą wartość dla związku **VIK** (22 nM vs 2,7 nM *Irosustatu*). Wartość energii wiązania wyznaczona dla tego związku podczas dokowania molekularnego do STS również była najniższa (-9,7 kcal/mol) spośród wszystkich analizowanych pochodnych co mogło sugerować już na etapie badań *in silico*, iż związek ten będzie aktywny w stosunku do STS. Dodatkowo warto zaznaczyć, że również podczas tego badania zaobserwować można wyższą aktywność pochodnych grupy **VIG-K**, co potwierdza pozytywny wpływ położenia reszty kwasu glutaminowego w pozycji meta w stosunku do pierścienia triazolowego. Dane uzyskane podczas badań biologicznych zostały podsumowane

w **Tabeli 3.18**. Warto jednak zaznaczyć, że wprowadzenie atomu fluoru wpłynęło w pozytywny sposób na aktywność biologiczną związków. Można to zaobserwować porównując pochodną **IIA** (**Tabela 3.9** podrozdział 3.14) oraz związek **VIA** (**Tabela 3.17**), gdyż jedyną różnicą pomiędzy tymi dwoma strukturami była obecność lub brak atomu fluoru, a wynik w teście enzymatycznym, podczas gdy wartość stężenia inhibitora w obydwu przypadkach wynosiła 10 μM , wyniósł odpowiednio 79,28 % oraz 24,86 % pozostałej aktywności STS. W tym przypadku, wprowadzenie atomu halogenu poprawiło wynik około 3 krotnie, z tego powodu zaprojektowanie związków **VIA-K** zawierających dodatkowy atom fluoru w swojej konstytucji było bardzo dobrym pomysłem. Dodatkowo warto zaznaczyć, że związki **VIA** oraz **VIE** zostały wyeliminowane z etapu badań IC_{50} ze względu na problemy z rozpuszczalnością w medium komórkowym.

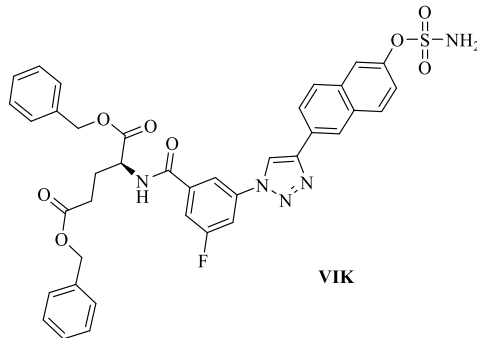
Tabela 3.18 Wyniki badań biologicznych *in vitro* dla pochodnych **VIA-L**.

 VIA-F  VIG-L  Irosustat  Kwas foliowy						
Nr	R	Pozostała aktywność STS [%] - test enzymatyczny			Pozostała aktywność STS [%] - test komórkowy	IC_{50} [nM]
		10 μM	1 μM	0,1 μM	1 μM	
VIA	Me	24,86 $\pm$ 4,26	39,91 $\pm$ 1,23	100,00 $\pm$ 4,49	82,04 $\pm$ 4,71	-
VIB	Et	26,3 $\pm$ 0,89	41,50 $\pm$ 5,40	100,00 $\pm$ 2,81	68,18 $\pm$ 5,91	1259 $\pm$ 209,8
VIC	ⁱ Pr	38,28 $\pm$ 4,22	68,24 $\pm$ 3,66	100,00 $\pm$ 4,23	76,7 $\pm$ 10,09	1393 $\pm$ 209,4
VID	^t Bu	53,89 $\pm$ 9,12	81,39 $\pm$ 3,39	84,32 $\pm$ 5,33	-	-
VIE	Bn	30,99 $\pm$ 3,15	54,51 $\pm$ 5,63	76,98 $\pm$ 9,56	61,43 $\pm$ 2,76	-
VIF	H	16,95 $\pm$ 7,46	65,22 $\pm$ 3,39	92,44 $\pm$ 9,12	68,47 $\pm$ 2,13	689 $\pm$ 302,6
VIG	Me	17,08 $\pm$ 19,91	41,9 $\pm$ 20,61	99,64 $\pm$ 6,47	76,48 $\pm$ 2,33	3035 $\pm$ 685
VIH	Et	15,18 $\pm$ 1,50	33,73 $\pm$ 0,86	90,15 $\pm$ 5,70	66,36 $\pm$ 1,28	362 $\pm$ 82,3
VII	ⁱ Pr	13,59 $\pm$ 2,50	17,70 $\pm$ 1,36	66,70 $\pm$ 4,13	56,84 $\pm$ 0,56	179 $\pm$ 42,2
VIJ	^t Bu	10,63 $\pm$ 1,50	15,46 $\pm$ 0,54	39,72 $\pm$ 2,25	47,91 $\pm$ 2,62	393 $\pm$ 292
VIK	Bn	12,97 $\pm$ 4,57	17,58 $\pm$ 2,60	20,52 $\pm$ 2,08	41,43 $\pm$ 1,23	22 $\pm$ 3,7
VIL	H	16,31 $\pm$ 0,88	52,99 $\pm$ 5,20	93,3 $\pm$ 8,06	76,28 $\pm$ 1,03	600 $\pm$ 238

Ref	-	6,31 ± 1,18	5,11 ± 1,07	6,46 ± 1,35	18,59 ± 0,50	2,7 ± 0,2
-----	---	-------------	-------------	-------------	--------------	-----------

Co ważne, pochodne **IIA-B**, **IIIA-B**, **IVA-B**, **VA-B**, **VIA-L** projektowane były w taki sposób, aby zawierały elementy strukturalne upodabniające je do kwasu foliowego (obecność dodatkowej reszty kwasu glutaminowego) co miało wpłynąć na zapewnienia skutecznego i selektywnego transportu poprzez FR α . W celu sprawdzenia tego założenia wykonano dodatkowy test, w którym komórki JEG-3 inkubowano w pożywce nasyconej kwasem foliowym. Komórki te posiadają oczywiście receptory FR α , a nasycenie ich kwasem foliowym (1 mM) miało spowodować, zablokowanie możliwości tej drogi transportu. Wynik analizy (**Tabela 3.19**) po zastosowaniu tego zabiegu i inkubacji komórek wraz z 1 mM FA oraz związkiem **VIK** wskazał na to, że wartość pozostałej aktywności STS nie uległa zmianie. Taki wynik nie wyklucza możliwości wiązania **VIK** z FR α i jego transportu z jego udziałem. Jednak brak zmiany stopnia zahamowania STS w obecności FA wskazuje, że związek ten dostaje się do komórki na drodze jeszcze innego mechanizmu lub bezpośrednio poprzez dyfuzję przez błonę biologiczną, co należałoby w przyszłości potwierdzić poprzez wykonanie dodatkowych badań, np. testu PAMPA, który pozwala określić czy dana cząsteczka może dostawać się do wnętrza komórki w sposób pasywny poprzez błonę komórkową.

Tabela 3.19 Prezentująca wyniki testu dotyczącego badania selektywności drogi docierania analogów kwasu foliowego do komórek zawierających receptory kwasu foliowego.

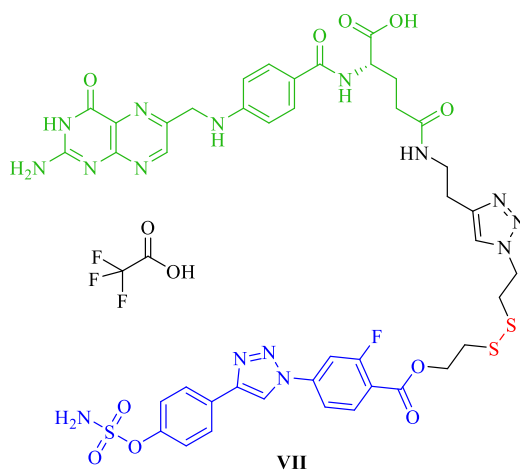
 VIK		
Numer związku	Pozostała aktywność STS w obecności inhibitora o stężeniu 1 μ M [%]	Pozostała aktywności STS w obecności inhibitora o stężeniu 1 μ M oraz 1 mM kwasu foliowego [%]
VIK	42	44

Materiał eksperymentalny dotyczący tej serii związków jest podstawą manuskryptu, który znajduje się aktualnie w recenzji w czasopiśmie *The European Journal of Medicinal Chemistry*.

3.5 Koniugat kwasu foliowego STS-FA

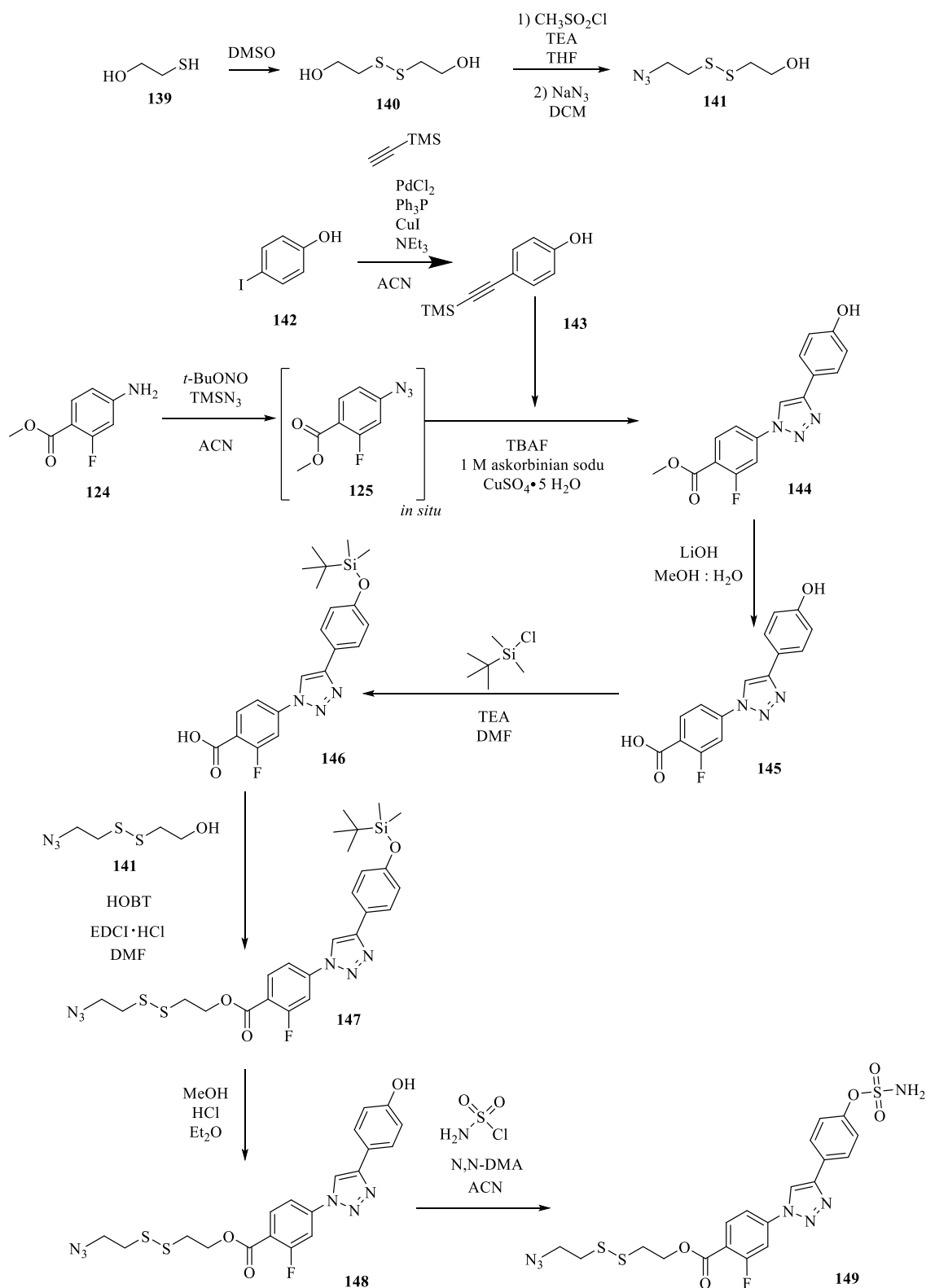
3.5.1 Synteza chemiczna koniugatu kwasu foliowego STS-FA

Kolejnym, a zarazem moim ostatnim wyzwaniem syntetycznym podczas realizacji tej rozprawy doktorskiej było otrzymanie koniugatu kwasu foliowego z inhibitorem STS. W budowie tej cząsteczki wyróżnić można trzy główne elementy: 1) amidosiarczanowy inhibitor, który oparty jest o rdzeń 1,2,3-triazolu (kolor niebieski), 2) relatywnie krótki linker w skład którego wchodzi między innymi sześć jednostek CH_2 oraz pierścień triazolowy (kolor czarny) oraz wiązanie disulfidowe (kolor czerwony), 3) kwas foliowy (zielony) (**Rys. 3.6**). Część odpowiedzialna za inhibicję zaprojektowana została na podstawie wyników analiz pochodzących zarówno z tej rozprawy z części badań własnych poprzednio otrzymanych serii jak i doświadczenia całego zespołu dr hab. inż. Sebastiana Demkowicza ze szczególnym uwzględnieniem publikacji z roku 2022 o tytule: „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”. Na tej podstawie jako najlepszy kandydat do sprzęgania z kwasem foliowy został wybrany związek zawierający rdzeń triazolowy, a także atom fluoru w pierścieniu terminalnym w pozycji meta w stosunku do pierścienia triazolowego. Dzięki temu podstawnikowi wystąpić może teoretycznie większa ilość oddziaływań elektrostatycznych, które w pozytywny sposób będą mogły wpłynąć na stabilność kompleksu inhibitor-STS, już po jego uwolnieniu wewnątrz komórki nowotworowej. Za rozpad koniugatu po jego transporcie do komórki odpowiedzialne jest wiązanie labilne jakim jest połączenie disulfidowe, które rozpada się wewnątrz komórki pod wpływem działania GSH zgodnie z mechanizmem przedstawionym na **Schemacie 1.16** w podrozdziale 1.6.2.1. W skład linkera wchodzi również pierścień triazolowy, który jest efektem metody syntezy w oparciu o reakcję typu „click”, co pozwala łączyć w dość łatwy sposób duże fragmenty przyszłego koniugatu FA-STS.



Rys. 3.6 Struktura STS-FA VII.

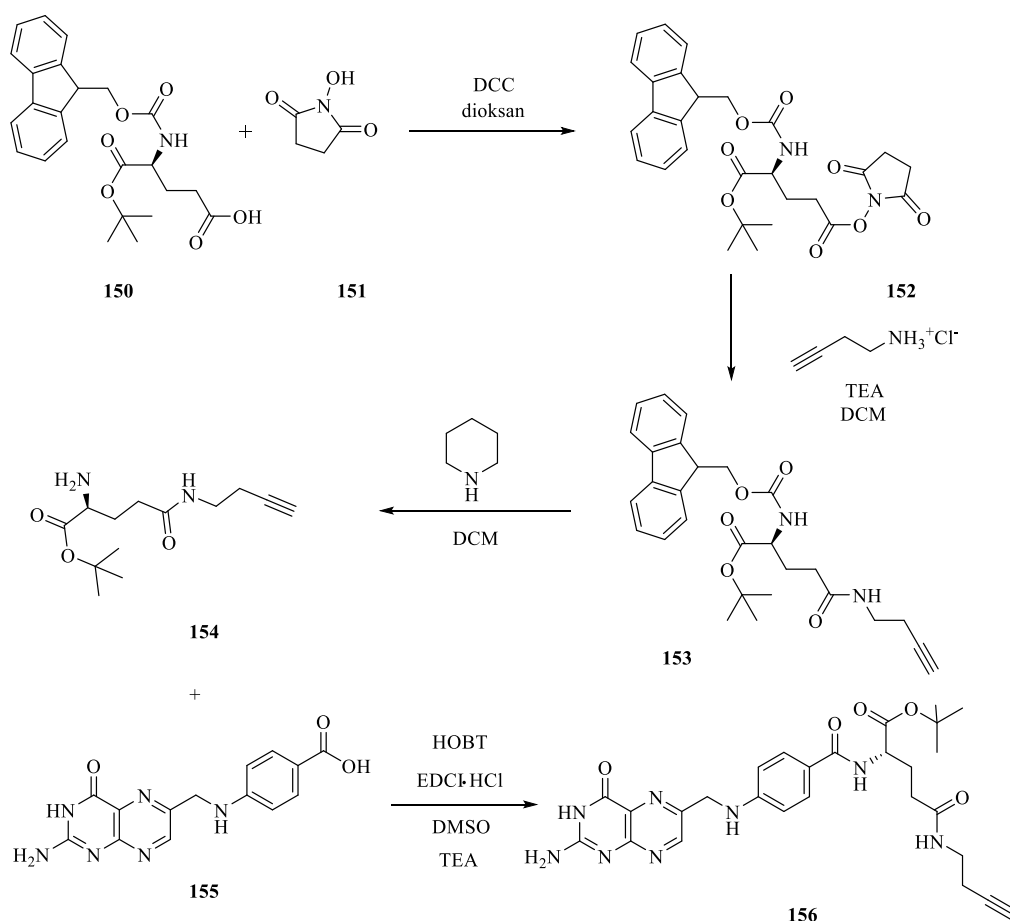
Ten dość złożony problem syntetyczny postanowiłam podzielić na trzy główne etapy, w których moim zadaniem było otrzymanie: 1) fragmentu zawierającego inhibitor połączony z częścią linkera, w skład którego wchodziło m.in. wiązanie disulfidowe oraz terminalna grupa azydkowa, 2) kwasu foliowego połączony z drugą częścią linkera zakończonego resztą acetylenową, 3) połączenie dwóch powyższych elementów.



Schemat 3.9 Szlak syntetyczny otrzymywania pochodnej **149**.

Pracę nad otrzymaniem pierwszego fragmentu koniugatu (związek **149**) przedstawiłam na **Schemacie 3.9**. Syntezę tę rozpocząłam od reakcji 2-merkaptioetanolu, która prowadzona była w roztworze dimetylosulfotlenu (DMSO), dzięki czemu uzyskałam produkt pośredni **140**, zawierający w swojej strukturze mostek disiarczkowy i dwie wolne grupy OH. Moim kolejnym

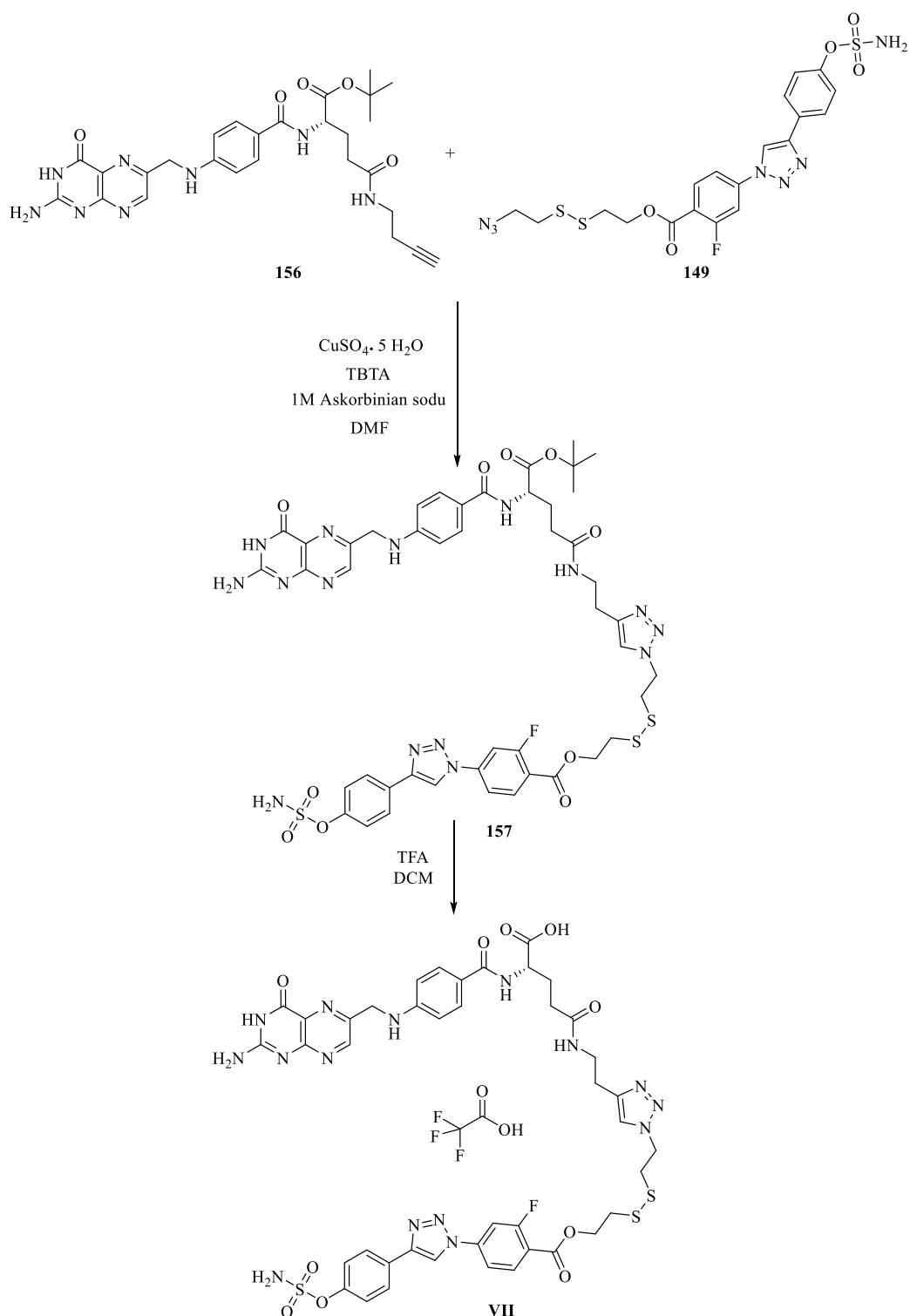
zadaniem było uzyskanie pochodnej azydkowej **141**, co odbyło się na drodze dwuetapowej reakcji z wykorzystaniem chlorku metanosulfonylu oraz TEA w etapie pierwszym oraz azydku sodu w etapie drugim. Reakcja ta zaszła z wydajnością równą 30%, co było zadowalające na tym etapie syntezy. Następnie zajęłam się przygotowaniem części związku zawierającej inhibitor STS, który uwolniony miał zostać po rozpadzie cząsteczki wewnątrz komórki nowotworowej. W tym przypadku część reakcji była analogiczna do tych, które prowadziłam już wcześniej, gdyż pierwszą reakcją była reakcja Sonogashiry, gdzie substratem wyjściowym był *para*-jodofenol **142**. Otrzymana w ten sposób pochodna **143**, została następnie wykorzystana w reakcji typu „click” ze związkiem **125**, otrzymanym *in situ* z aminy **124**. Konsekwencją tego było uzyskanie rdzenia przyszłego inhibitora, który w kolejnym etapie poddałam hydrolizie otrzymując związek z wolną grupą COOH **145**. Następnie ponownie zastosowałam strategię ochronną z wykorzystaniem grupy *tert*-butyldimetylosilowej otrzymując związek **146**, który następnie poddałam reakcji sprzęgania z użyciem wcześniej otrzymanego związku **141**. Dzięki temu uzyskałam pochodną **147**, na którą zadziałałam HCl w Et₂O w celu usunięcia grupy ochronnej. Reakcja ta zaszła z bardzo dobrą wydajnością równą 92%. Kończącym etapem przygotowania cząsteczki mającej zawierającą fragment inhibitora była reakcja amidosiarczanowania, która zaszła z wykorzystaniem 2M roztworu chlorku sulfamoilu w acetonitrylu. W ten oto sposób otrzymałam związek **149** z wydajnością 88%.



Schemat 3.10 Szlak syntetyczny otrzymywania pochodnej **156**.

W dalszej kolejności zajęłam się przygotowaniem cząsteczki będącej fragmentem łącznika oraz częścią pochodzącą od samego kwasu foliowego (związek **156**). Przebieg tych

transformacji został zaprezentowany na **Schemacie 3.10**. W tym przypadku prace rozpoczęłam od aktywacji grupy karboksylowej związku **150** poprzez wykorzystanie *N*-hydroksysukcynoimidu **151** oraz odczynnika sprzęgającego jakim było DCC. Związek **152** wykorzystałam do dalszych syntez bez uprzedniego jego oczyszczania, a kolejną reakcją, którą przeprowadziłam była ta z wykorzystaniem chlorowodoru propalgiloaminy, dzięki czemu uzyskałam pochodną z nowym wiązaniem amidowym i wiązaniem potrójnym na końcu łańcucha związku **153**. Następnie pochodną tą potraktowałam piperydyną w celu usunięcia grupy ochronnej Fmoc. W tym przypadku transformacja zaszła z wydajnością 72% i pozwoliła otrzymać pochodną **154**, która została wykorzystana w reakcji sprzęgania ze związkiem **155**, dzięki czemu udało mi się uzyskać pochodną kwasu foliowego **156**, chronioną na grupie alfa karboksylowej za pomocą za pomocą elementu *tert*-butoksyłowego.



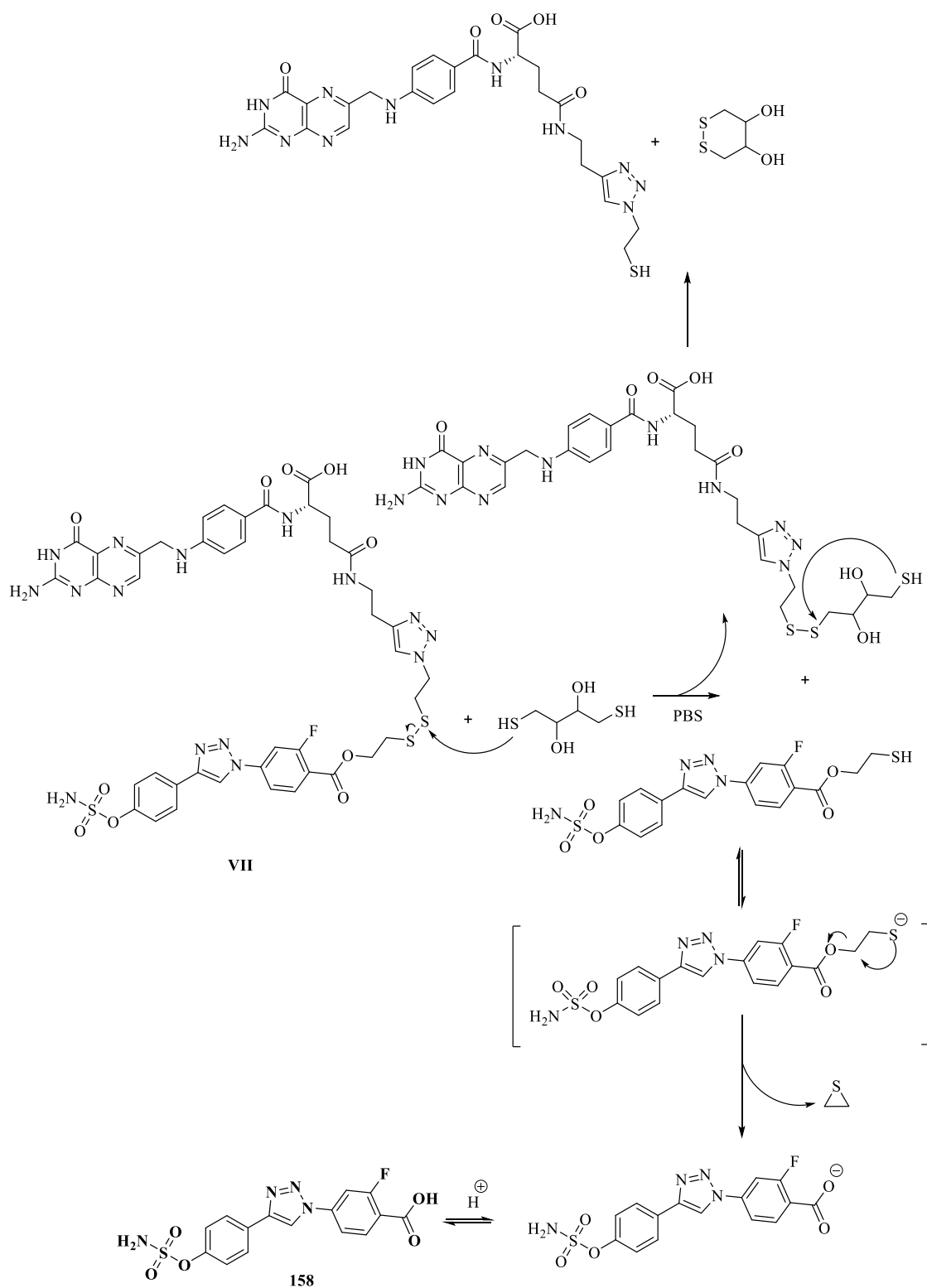
Schemat 3.11 Szlak otrzymywania związku **VII**.

Końcowe reakcje sprzęgania dwóch wcześniej otrzymanych fragmentów zostały przedstawione na **Schemacie 3.11**, na którym pochodna **156** została poddana transformacji typu „click” z wcześniej przygotowanym związkiem **149**. Dzięki temu uzyskałam pochodną **157** będącą już koniugatem kwasu foliowego, jednak związek ten chroniony był nadal na grupie alfa

karboksylowej reszty kwasu glutaminowego. Usunięcie grupy ochronnej i uzyskanie finalnego koniugatu kwasu foliowego **VII** za pomocą roztworu TFA w DCM przebiegło ilościowo.

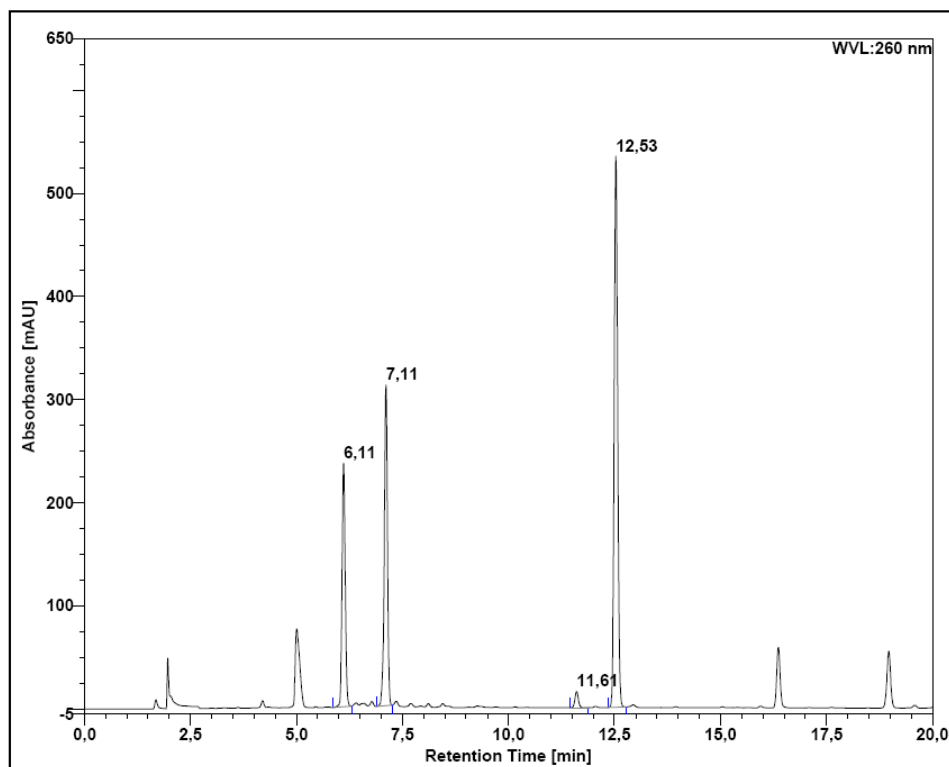
Tabela 3.20 Wydajności wszystkich reakcji przedstawionych na **Schematach 3.9, 3.10, 3.11**.

Nr związku	Wydajność [%]	Nr związku	Wydajność [%]	Nr związku	Wydajność [%]
140	59	146	79	154	72
141	30	147	42	156	33
143	76	148	92	157	82
144	80	149	88	VII	99
145	92	153	75		

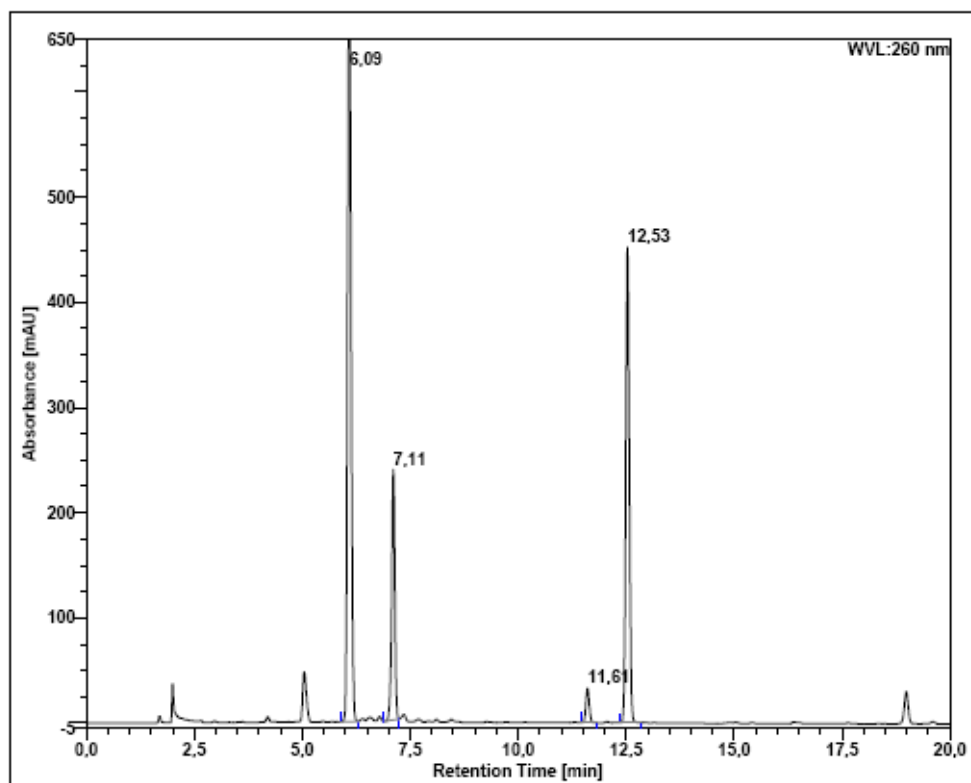


Schemat 3.12 Przedstawiający proponowany mechanizm rozpadu **koniugatu VII** pod wpływem DTT.

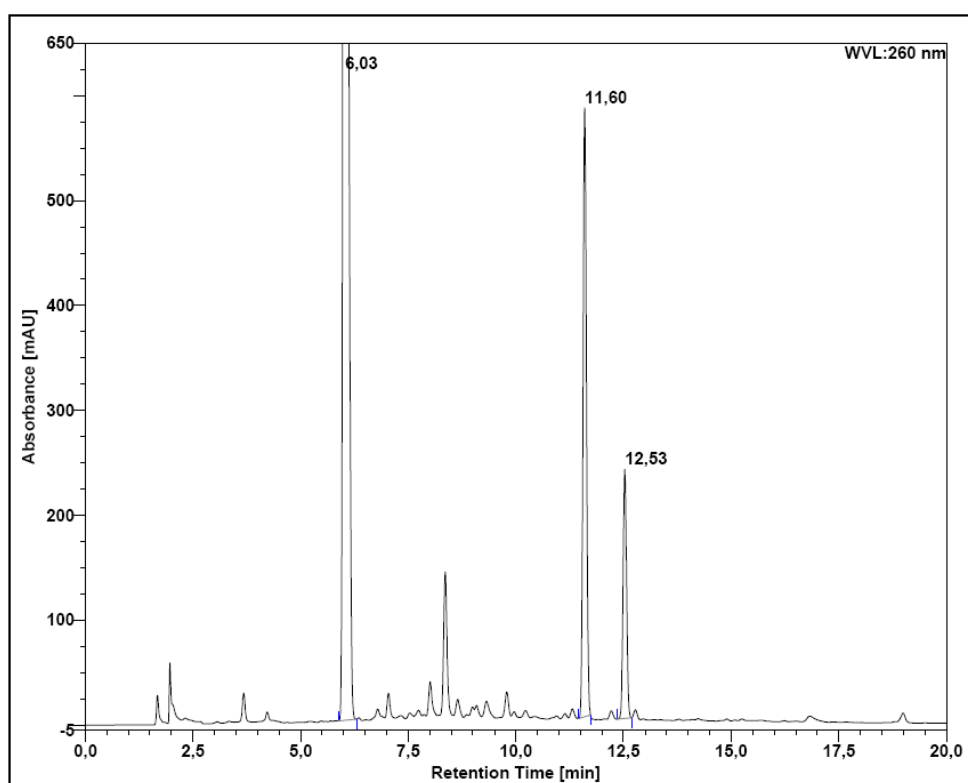
Dodatkowo przeprowadzono eksperyment pozwalający określić czy otrzymany koniugat **VII** ulega rozpadowi według zamierzonego mechanizmu oraz wyznaczyć czas w jakim nastąpi całkowity rozpad wiązania labilnego i uwolnienie inhibitora. Badanie to polegało na stworzeniu w fiołce warunków odpowiadającym tym, które mają miejsce w komórce nowotworowej i zostało to osiągnięte poprzez zastosowanie buforu fosforanowego o pH = 7,0 oraz ditiotreitolu (DTT), zastosowanego jako analog GSH, który powoduje rozpad wiązania SS. Po rozpuszczeniu **koniugatu VII** w mieszaninie DMSO/PBS (v:v 1:9), dodano go do roztworu DTT również rozpuszczonego w tej samej mieszaninie. Uzyskaną w taki sposób próbkę utrzymywano w temp. 37 °C i co pewien czas dokonywano analizy HPLC. Monitorowano tam obecność sygnału pochodzącego od samego koniugatu oraz sygnałów pochodzących od jego fragmentów już po rozpadzie. Całkowity zanik sygnału **związku VII** miał miejsce po 72 h, a proponowany mechanizm rozpadu tej cząsteczki został przedstawiony na **Schemacie 3.12**. Na **Rys 3.7, 3.8, 3.9** oraz **3.10** przedstawiono chromatogramy, które wykonano kolejno po 5 min., 1 h, 24 h oraz po 72 h od rozpoczęcia analizy. Prezentują one postępujący w czasie rozpad cząsteczki **VII**. Na każdym z tych chromatogramów znajduje się sygnał o czasie retencji 12,53 pochodzący od cząsteczki **koniugatu VII**, który w trakcie trwania eksperymentu traci na intensywności. Na kolejnych chromatografach pojawiając się jednak nowe sygnały o czasie retencji 6,11 oraz 7,11 min. pochodzące prawdopodobnie od fragmentów kwasu foliowego oraz produktu pośredniego z inhibitorem STS zawierającym jeszcze wolną grupę SH po rozpadzie mostka disulfidowego. Po 24 godzinach pojawia się intensywny pik o czasie retencji 11,60, który należy do uwolnionego z cząsteczki FA-STs inhibitora **158** powstałego po rozpadzie grupy estrowej produktu pośredniego (co zostało potwierdzone wykonaniem widma mas tego sygnału). Intensywność tego sygnału rośnie proporcjonalnie do zaniku sygnału od koniugatu **VII** (12,53 min) oraz produktu pochodnej pośredniej inhibitora (7,11 min), które po 72 h obecne są w mieszaninie reakcyjnej w niewielkiej ilości.



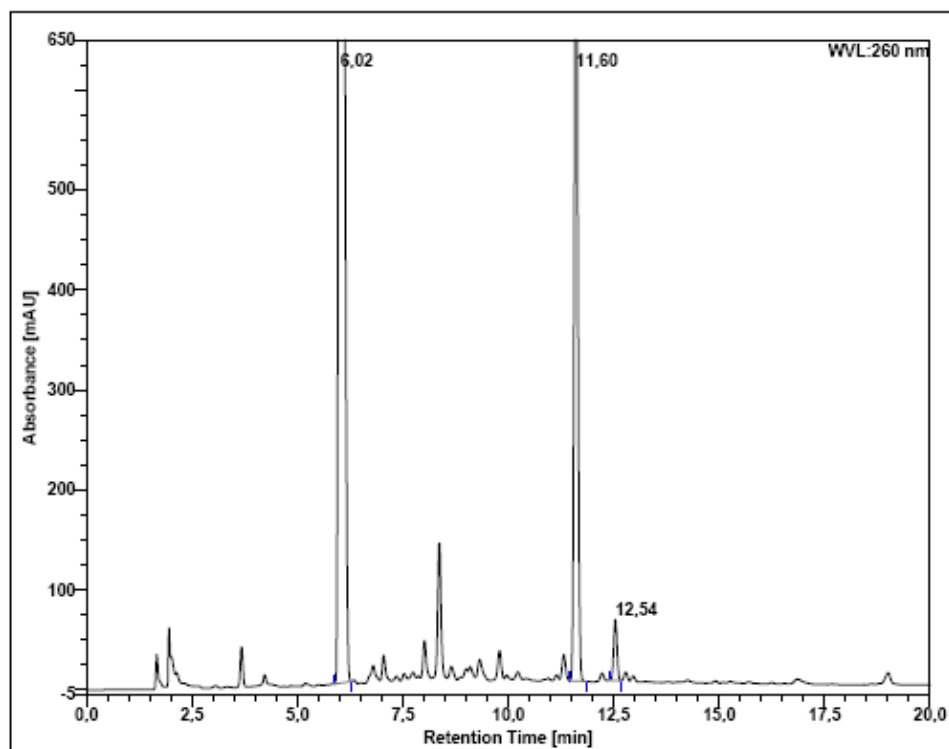
Rys. 3.7 Chromatograf wykonany po 5 minutach.



Rys. 3.8 Chromatograf wykonany po 1 h.



Rys. 3.9 Chromatograf wykonany po 24 h.



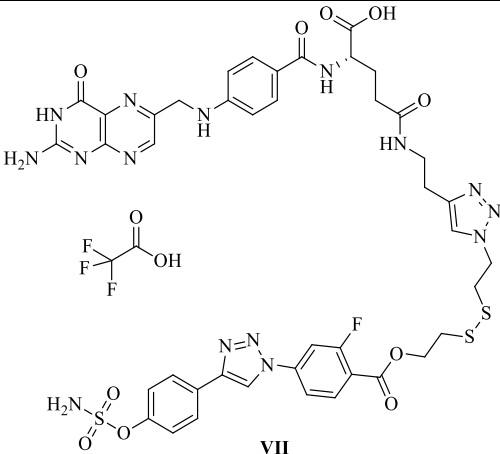
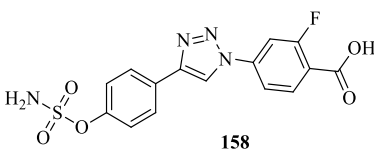
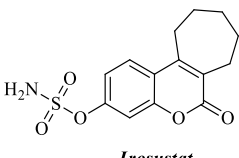
Rys. 3.10 Chromatograf po 72 h.

3.5.2 Badania biologiczne koniugatu kwasu foliowego

W celu sprawdzenia poprawności założenia dotyczącego działania koniugatu FA-STS **VII** jako inhibitora sulfatazy steroidowej, który miał trafiać do komórek nowotworowych w sposób selektywny, wykonano kilka testów biologicznych. Badania te ponownie odbyły się we współpracy z zespołem dr hab. Macieja Masłyka z Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego. Testy te zostały podzielone na dwie kategorie, pierwszą z nich były te, które oceniały zdolność inhibicyjną otrzymanych cząsteczek wobec STS. W drugim przypadku celem było sprawdzenie mechanizmu transportu tych molekuł do wnętrza komórek nowotworowych.

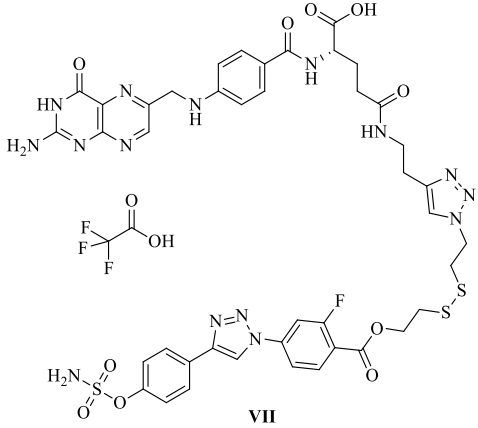
Pierwszy z testów sprawdzających właściwości inhibicyjne wobec STS otrzymanych cząsteczek był ten polegający na zbadaniu inhibicji na wyizolowanym enzymie, w sposób analogiczny jak to miało miejsce przy wcześniej prezentowanych związkach. W badaniu tym oprócz samego koniugatu **VII** zbadane zostały dodatkowo dwie cząsteczki: pochodna **158** (**Tabela 3.20**), która jest związkiem uwolnionym po rozpadzie koniugatu wewnątrz komórki nowotworowej (pod wpływem glutationu) oraz *Irosustat* jako związek referencyjny. Wyniki tych testów zaprezentowane zostały w **Tabeli 3.20** i wskazują na to, iż zarówno związek **VII** jak i pochodna **158** są dobrymi inhibitorami STS, gdyż poziom pozostałej aktywności tego enzymu, z wykorzystaniem stężenia związków na poziomie 10 μM , w każdym przypadku jest bardzo zbliżony. Najlepszy wynik osiągnęła cząsteczka **158** z wartością 6,24%, jednak rezultat tego testu dla koniugatu **VII**, był bardzo zbliżony, gdyż wynosił 6,73%. Warto też podkreślić, że na tym etapie badań wartości te są praktycznie takie same jak dla związku referencyjnego (6,31%). Następnie obniżono stężenie inhibitora 10-krotnie uzyskując następujące wyniki: 11,80%, 17,00% oraz 5,11% kolejno dla związku **VII**, **158** oraz *Irosustatu*. Wyniki te wskazują na to, iż aktywność koniugatu oraz uwolnionego inhibitora są praktycznie takie same. Ostatnim stężeniem jakie zbadano w tym teście było 0,1 μM . Badanie to wykazało, że związki również na takim poziomie stężeń są aktywne, gdyż koniugat **VII** zahamował działanie sulfatazy na poziomie 36,50% a związek **158** na poziomie 58,29%. Po zakończeniu tego etapu badań, kolejnym testem był ten wykorzystujący linie komórkową JEG-3. Również w tym przypadku otrzymane wyniki potwierdziły aktywność inhibicyjną związków, gdyż pozostała aktywność STS wynosiła 41,90% oraz 41,66% kolejno dla związku **VII** oraz **158**, a związek referencyjny osiągnął wartość 18,59% (wszystkie związki badano przy stężeniu 0,1 μM). Wartości IC_{50} , wyznaczone dla związków **VII** oraz **158** wyniosły 32,0 oraz 8,5 nM kolejno dla koniugatu **VII** oraz pochodnej **158** i okazały się nieco gorsze w porównaniu z związkiem referencyjnym ($\text{IC}_{50} = 2,70$ nM). Niemniej jednak aktywność inhibicyjna związków **VII** oraz **158** okazała się bardzo dobra, dlatego w kolejnym kroku przeprowadzone zostały badania nad mechanizmem transportu tych związków.

Tabela 3.21 Wyniki badań *in vitro* dla koniugatu **VII** oraz związku **158**.

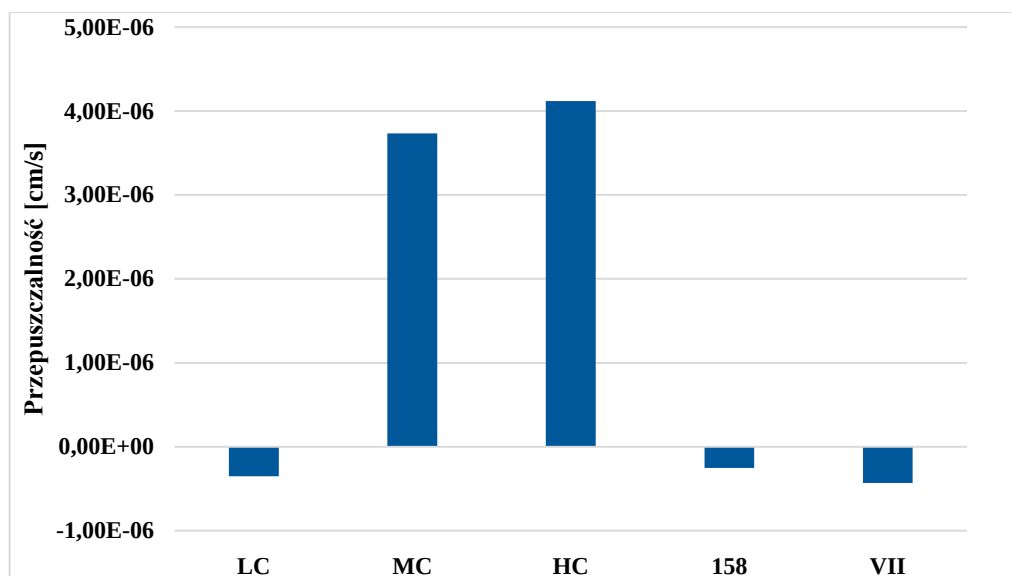
 VII  158  <i>Irosustat</i>					
Numer związku	Pozostała aktywność STS na wyizolowanym enzymie [%]			Pozostała aktywność STS w teście komórkowym JEG-3 [%]	IC ₅₀ [nM]
	10 [μM]	1 [μM]	0,1 [μM]	0,1 [μM]	
VII	6,73 ± 0,61	11,80 ± 0,38	36,50 ± 1,89	41,90 ± 0,95	32,0 ± 8,80
158	6,24 ± 1,01	17,00 ± 1,21	58,29 ± 5,39	41,66 ± 3,59	8,5 ± 0,93
<i>Irosustat</i>	6,31 ± 1,18	5,11 ± 1,07	6,46 ± 1,35	18,59 ± 0,50	2,70 ± 0,20

Po potwierdzeniu aktywności inhibicyjnej, w kolejnym etapie badań, podjęto próbę wyjaśnienia jaką drogą koniugat **VII** może docierać do wnętrza komórki nowotworowej. Warto przypomnieć, iż komórki nowotworowe wykazują znaczne zapotrzebowanie na kwas foliowy w porównaniu z komórkami prawidłowymi z powodu szybkiej proliferacji oraz szybkiego ich wzrostu. Dlatego też, często występuje w nich nadekspresja receptorów kwasu foliowego w podtypie alfa, który w zdrowych komórkach jest na niskim poziomie. W celu sprawdzenia czy związek **VII** może dostawać się do komórki przy udziale tego receptora wykonano test opierający się na wysyceniu tych receptorów wykorzystując kwas foliowy o stężeniu 1 mM (tak jak to miało miejsce w podrozdziale 3.4.3). Badanie to polegało na teście porównawczym, gdzie komórki JEG-3 podzielona na dwie podgrupy, jedną były komórki inkubowane jedynie z koniugatem **VII**, a drugą grupą były te inkubowane z koniugatem **VII** oraz kwasem foliowym. Wyniki tej analizy zostały przedstawione w Tabeli 3.21 i wskazują one na porównywalną aktywność związku **VII** w obecności i bez kwasu foliowego, co nie wyklucza jego transportu z wykorzystaniem receptorów kwasu foliowego, ale wskazuje, że może on dostawać się do wnętrza komórki na drodze dodatkowych mechanizmów lub poprzez dyfuzję przez błonę komórkową.

Tabela 3.22 Wyniki badań transportu koniugatu **VII** przez receptor FR α .

 VII		
Numer związku	Pozostała aktywność STS w obecności inhibitora o stężeniu 1 μ M [%]	Pozostała aktywności STS w obecności inhibitora o stężeniu 1 μ M oraz 1 mM kwasu foliowego [%]
VII	34	34

Tą ostatnią możliwość wykluczono przeprowadzając test PAMPA, który wskazał, że zarówno koniugat **VII** jak i związek **158** nie są w stanie przeniknąć przez błonę. Test PAMPA, jest eksperymentem sprawdzającym szybkość przenikania przez sztuczną błonę cząsteczek, gdzie wykorzystywane są 3 zewnętrzne wzorce, charakteryzujące się różną prędkością wnikania (cm/s). Są to cząsteczki: szybko, średnio i wolno docierające do wnętrza komórki. W przypadku tego eksperymentu zarówno związek **158** jak i koniugat **VII** uzyskały wyniki z zakresu cząsteczek słabo przenikających błonę, gdyż osiągnęły one kolejno wartości równe $-2,52 \cdot 10^{-7}$ oraz $-4,34 \cdot 10^{-7}$ cm/s, gdzie wartość referencyjna dla związku słabo transportowanego wynosiła $-3,52 \cdot 10^{-7}$ cm/s. Wyniki te zostały zaprezentowane na **Rys. 3.7** i wskazują na to, że inhibitory te muszą pokonywać inną drogę do wnętrza komórki, np. może to być transport oparty na anionowych transporterach związków organicznych[124]–[126], jednak aby tego dowieść należałoby przeprowadzić dodatkowe badania biologiczne.



Rys. 3.7 Prezentujący szybkość przenikania przez sztuczną błonę cząsteczek: LC – związek, przechodzący z małą prędkością, MC – związek, przechodzący ze średnią prędkością, HC – związek przechodzący z dużą prędkością, **158** oraz koniugat **VII**.

IV Podsumowanie

W przedstawionej dysertacji opisałam wyniki badań, które realizowałam w zespole dr hab. inż. Sebastiana Demkowicza, prof. uczelni, w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej. Zakres przeprowadzonych przeze mnie badań obejmował techniki dokowania molekularnego, syntezę chemiczną, ocenę aktywności biologicznej nowych inhibitorów STS i koniugatu STS-FA w testach *in vitro* oraz próbę ustalenia drogi docierania wybranych związków do wnętrza komórki nowotworowej.

Moją pracę badawczą można podzielić na trzy główne etapy, gdzie każdy z nich obejmował fazę projektowania, syntezy oraz oceny biologicznej otrzymanych związków, gdzie sumarycznie udało mi się otrzymać bogatą bibliotekę nowych cząsteczek, w tym 36 finalnych pochodnych.

W pierwszym etapie badań podjęłam się próby otrzymania nowych inhibitorów STS, które w swojej budowie zawierały pierścień naftalenowy oraz różnego rodzaju halogenowe podstawniki. Zadanie to miało na celu sprawdzenie czy dodanie kolejnego pierścienia aromatycznego do konstytucji tego typu inhibitorów nie wpłynie negatywnie na aktywność biologiczną tych cząsteczek. Dzięki zastosowaniu technik dokowania molekularnego udało mi się wyselekcjonować serię dwunastu pochodnych, charakteryzujących się najkorzystniejszymi wartościami energii swobodnej wiązania oraz najlepszym dopasowaniem w miejscu katalitycznym STS. Wartości energii swobodnej tych związków mieściły się w zakresie od -6,0 do -8,3 kcal/mol, gdzie wartość związku referencyjnego wynosiła -5,4 kcal/mol. Dodatkowo, w celu wykrycia potencjalnych interakcji ligand-enzym, które w sposób znaczący mogły wpłynąć na stabilność tych kompleksów, przeprowadziłam uzupełniające symulacje z wykorzystaniem oprogramowania BIOVIA, Dassault Systeme, Discovery Studio Visualiser, których wyniki wskazały na możliwość pojawienia się szeregu różnego rodzaju dodatkowych oddziaływań. Ponadto, graficzna interpretacja modelowania molekularnego wybranego związku **II** (charakteryzującego się najniższą wartością energii swobodnej) wskazała, że stabilność potencjalnego kompleksu ligand-enzym wynika nie tylko z licznych oddziaływań pomiędzy rdzeniem cząsteczki a resztami aminokwasowymi STS, a również małą odległością pomiędzy grupą hydroksylową formyloglicyny75 a atomem siarki wchodzącym w skład ugrupowania amidosiarczanowego.

W kolejnym etapie wyniki dokowania molekularnego weryfikowałam na drodze eksperymentalnej przeprowadzając syntezę serii dwunastu amidosiarczanowych pochodnych 6-(1-fenylo-1*H*-1,2,3-triazolo-4-yl)naftaleno-2-ylu.

Następnie, dzięki współpracy z zespołem dr hab. Macieja Masłyka z Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego, dokonałam oceny aktywności biologicznej otrzymanych związków chemicznych w testach *in vitro*. Przeprowadzone badania obejmowały testy na wyizolowanym enzymie STS z zastosowaniem 0,5 μ M stężenia potencjalnych inhibitorów. Ten przesiewowy test enzymatyczny, przeprowadzony przy użyciu STS wyizolowanego z ludzkiego łożyska wykazał, że wszystkie nowo zsyntezowane inhibitory **IA-L** były w stanie skutecznie hamować działanie STS. Wśród nich najwyższą aktywność inhibicyjną wykazał związek **II** (7,98% pozostałej aktywności STS) zawierający w swojej strukturze trzy atomy fluoru. W kolejnym etapie wykonano testy z wykorzystaniem linii komórkowej MCF-7, podczas którego najwyższą inhibicję STS zaprezentowały pochodne **II**, **IK** oraz **IL**. Wartość IC_{50} dla nich wynosiła odpowiednio 30,14, 17,02 oraz 15,97 nM (wartość IC_{50} dla *Irosustatu* wynosiła 1,14 nM). Przedstawione wyniki wykazały, że amidosiarczanowe pochodne 6-(1-fenylo-1*H*-1,2,3-triazolo-4-yl)naftaleno-2-ylu mogą być bardzo obiecującymi środkami przeciwnowotworowymi a ich potencjał terapeutyczny powinien zostać w przyszłości sprawdzony w dalszych badaniach *in vivo*. Ponadto, dane eksperymentalne pochodzące z testu enzymatycznego jak i tego na linii

komórkowej, sugerują silną korelację pomiędzy obecnością heteroatomów w budowę inhibitora a jego aktywnością biologiczną. Jest to szczególnie widoczne w przypadku potencjalnie tworzących się oddziaływań pomiędzy atomem fluoru a resztą Arg98, co może wpływać w sposób bezpośredni na podatność na podstawienie nukleofilowe na atomie siarki grupy amidosiarczanowej co może mieć kluczowe znaczenie dla właściwości hamujących działanie STS. Ten materiał eksperymentalny stał się podstawą publikacji naukowej w czasopiśmie *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* (Ciupak O., Daško M., Biernacki K., Rachon J., Maslyk M., Kubiński K., Martyna A., Demkowicz S.; New potent steroid sulphatase inhibitors based on 6-(1-phenyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)naphthalen-2-yl sulphamate derivatives J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 2021, 36, 238-247).[122]

W drugiej części badań eksperymentalnych otrzymałam dwie serie związków, których struktura została zaprojektowana, aby imitować cząsteczkę kwasu foliowego. Prace te można było podzielić na dwa etapy, gdzie w pierwszym moim zadaniem było wyselekcjonowanie najlepiej dopasowanego rdzenia zawierającego w swojej budowie między innymi resztę kwasu glutaminowego, która również wchodzi w skład kwasu foliowego. Badania te rozpoczęłam ponownie od przeprowadzenia modelowania molekularnego pochodnych triazolowych, kumarynowych, flawonowych oraz tyraminowych, jednak w tym przypadku dokowanie miało miejsce zarówno do enzymu jakim jest sulfataza steroidowa jak i do receptora kwasu foliowego w podtypie alfa. W obydwu przypadkach wartości swobodnej energii wiązania były dobre, zawierające się w przedziałach od -4,8 do -7,0 kcal/mol w przypadku kompleksów ligand-STS (*Irosustat* -6,3 kcal/mol), a w przypadku połączeń ligand-FR α był to przedział od -7,9 do -9,5 kcal/mol (FA -10,5 kcal/mol). Również w tym przypadku wykonałam dodatkowe symulacje sprawdzające możliwość wystąpienia różnego rodzaju oddziaływań pomiędzy zaprojektowanymi cząsteczkami a dwoma wyżej wymienionymi celami molekularnymi. Zarówno wyniki dokowania molekularnego jak i dodatkowych badań *in silico* wskazywały na to, że pochodne te mogą cechować się dobrymi właściwościami inhibicyjnymi jak i tym, że będą mogły w sposób selektywny docierać do komórek nowotworowych.

Po zakończeniu eksperymentów obliczeniowych przeszłam do pracy syntetycznej, polegającej na otrzymaniu amidosiarczanowych pochodnych różniących się między sobą rodzajem rdzenia cząsteczki. Z bardzo dobrymi wydajnościami przeprowadziłam szereg reakcji wchodzących w skład czterech szlaków syntetycznych. Między innymi były to reakcje optymalizacji reakcji, gdzie udało się opracować nową, łatwiejszą i co najistotniejsze bardziej wydajną reakcję amidosiarczanowania.

W następnym kroku otrzymane cząsteczki zostały poddane ocenie w testach biologicznych *in vitro*. Ponownie w tego rodzaju badaniach została zmierzona wartość pozostałej aktywności STS zarówno w teście na wyizolowanym enzymie jak i z wykorzystaniem linii komórkowej JEG-3. W badaniu enzymatycznym najlepszy wynik osiągnęła pochodna kumarynowa **IIIA** z wartością 4,13%, jednak już w przypadku testu komórkowego najlepszy wynik IC₅₀ przypisany został cząsteczce będącej pochodną triazolową **IIB** i wynosił on 1436 nM.

Konsekwencją powyższych wyników oraz wcześniej zgromadzonych doświadczeń zdecydowałam, iż trzecia seria moich związków opierać się będzie na bazie pierścienia triazolowego, a związki w swojej konstytucji oprócz reszty kwasu glutaminowego będą również zawierały elektroujemny atom fluoru. Warto dodać, że seria ta składała się z dwunastu pochodnych, gdzie występowało sześć par izomerów różniących się między sobą położeniem łańcucha kwasu glutaminowego przy terminalnym pierścieniu aromatycznym, a także rodzajem ugrupowania estrowego na reszcie tego kwasu.

Również w przypadku tej grupy związków prace nad nimi rozpoczęłam od badań obliczeniowych, które wskazały, że cząsteczki posiadające łańcuch kwasu L-glutaminowego w pozycji meta w stosunku do pierścienia triazolu w większości będą tworzyły stabilniejsze kompleksy ligand-STS ze względu na niższe wartości swobodnej energii wiązania, przy czym zakres dla wszystkich pochodnych tej serii mieścił się w przedziale od -4,1 do -9,7 kcal/mol a najlepszy wynik prezentowała pochodna **VIK**. Dodatkowo warto zaznaczyć, że cząsteczki te wykazywały dobre powinowactwo do miejsca aktywnego FA.

Następnie przeprowadziłam szereg reakcji chemicznych, które pozwoliły mi uzyskać dwanaście potencjalnych inhibitorów STS, które również zostały sprawdzone pod kątem właściwości biologicznych. Wyniki tych badań wskazały na dobre właściwości inhibicyjne tych cząsteczek, gdyż w teście na wyizolowanym enzymie cząsteczką, która osiągnęła najlepszy wynik była pochodna **VIK** (20,52% pozostałej aktywności przy zastosowaniu inhibitora o stężeniu 0,1 μ M). Ten sam związek wypadł najkorzystniej w teście komórkowym osiągając wynik IC_{50} na poziomie 22 nM. Niestety, wynik eksperymentu z zastosowaniem 1 mM FA mającego na celu sprawdzenie drogi transportu wskazał, że cząsteczki docierają do wnętrza komórki inną drogą niż poprzez wyżej wymienione receptory. Sposób tego transportu powinien zostać rozwinięty w badaniach w przyszłości. Na podstawie tej części materiału eksperymentalnego przygotowany został manuskrypt, który aktualnie znajduję się na etapie recenzji w czasopiśmie *The European Journal of Medicinal Chemistry*.

Ostatnim etapem mojej pracy badawczej było zaprojektowanie, synteza oraz ocena biologiczna koniugatu kwasu foliowego STS-FA **VII**. Praca syntetyczna w przypadku cząsteczki **VII**, była dość skomplikowana ze względu na swój wieloetapowy charakter. Zakończyła się ona jednak sukcesem i dzięki temu można było przeprowadzić szereg badań biologicznych sprawdzających właściwości inhibicyjne, zarówno samego koniugatu jak i uwolnionego inhibitora, jak i sposób transportu tego związku do wnętrza komórki, a także potwierdzić mechanizm rozpadu koniugatu w eksperymencie z DTT. Wyniki badań biologicznych zarówno na wyizolowanym enzymie jak i w teście komórkowym wskazały, że zarówno cząsteczka **koniugatu VII** jak i inhibitor **158**, czyli cząsteczka uwalniana po rozpadzie wiązania SS, posiadają bardzo dobre właściwości inhibicyjne. Sam czas redukcji mostu disiarczkowego w eksperymencie z wykorzystaniem DTT trwał ok. 72 h, ale wartym podkreślenia jest fakt, iż po tym czasie sam inhibitor nadal był stabilny. Podjęto się również próby ustalenia drogi docierania koniugatu do wnętrza komórek nowotworowych, które posiadają nadekspresję receptorów kwasu foliowego w podtypie alfa. Wykonano testy, które ustaliły, iż cząsteczka ta prawdopodobnie nie dociera do wnętrza komórek poprzez wyżej wymienione receptory ani poprzez pasywny transport przez błonę i z tego względu temat ten powinien zostać zgłębniony w przyszłości. Na podstawie uzyskanego materiału dotyczącego **związku VII** aktualnie przygotowana jest kolejny manuskrypt.

Niniejsza praca powstała przy wsparciu finansowym projektu badawczego koordynowanego przez **Narodowe Centrum Nauki**, za które bardzo dziękuję:

1. Grant PRELUDIUM: „Nowy typ analogów i koniugatów kwasu foliowego o potencjalnym zastosowaniu w terapii nowotworów hormono zależnych” (nr 2021/41/N/NZ7/01851)

Opisane badania zostały przeprowadzone przy współpracy z:

1. Zespołem dr. hab. Macieja Małyka z Wydziału Nauk Ścisłych i Nauk o Zdrowiu Instytutu Biotechnologii Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego (zakres badań *in vitro*).
2. Zespołem prof. dr hab. Janusza Raka z Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego (zakres badań rozpadu koniugatu kwasu foliowego oraz analizy masowej).

Materiał doświadczalny zaprezentowany w niniejszej dysertacji został opublikowany w następującym czasopiśmie:

1. **Ciupak O.**, Daško M., Biernacki K., Rachon J., Małyk 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; *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **2021**, 36, 238-247

oraz trzech doniesieniach konferencyjnych, w tym jednym o zasięgu międzynarodowym:

1. **Ciupak O.**, Daško M., Biernacki K., Demkowicz S., Rachoń J., Datta M., Rak J., Małyk M., Kubiński K.; Structural analogs of folic acid as novel steroid sulfatase (STS) inhibitors. The European Federation of Medicinal Chemistry Young Medicinal Chemists' Symposium, Rzym (Włochy), 04.09-06.09.2024, Sesja posterowa
2. **Ciupak O.**, Biernacki K., Walter M., Daško M., Rachoń J., Demkowicz S.; Analogi strukturalne kwasu foliowego jako nowe inhibitory sulfatazy steroidowej (STS). 64 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Lublin (Polska), 11.09-16.09.2022, Sesja posterowa
3. **Ciupak O.**, Daško M., Biernacki K., Rachoń J., Małyk M., Kubiński K., Aleksandra M., Demkowicz S.; Nowe inhibitory sulfatazy steroidowej na bazie amidosiarczanowych pochodnych 6-(1-fenilo-1*H*-1,2,3-traizolo-4-ylo)naftalen-2-yłu. XIV Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Toruń (Polska), 20.09-22.09.2021, Sesja posterowa

W ramach tej rozprawy doktorskiej planowanym jest przygotowanie minimum dwóch kolejnych publikacji naukowych.

ARTYKUŁY NAUKOWE:

1. Ievtukhov V., Mońka M., **Ciupak O.**, Bylińska I., Bojarski P., Krzemiński K., Sedriuk E. I.; Experimental evidence of the excited-state mixing in the blue emitter for organic light-emitting diodes; *Journal of Materials Chemistry C*, **2025**, 13, 68-80.
2. Rybczyńska M., Hoffman Estera, Kozakiewicz K., Mońka M., Grzywacz D., **Ciupak O.**, Liberek B., Bojarski P., Serdiuk E. I.; Charge separation control in organic photosensitizers for photocatalytic water splitting without sacrificial electron donors; *Journal of Catalysis*, **2024**, 435, 115539.
3. Datta M., Szczyrba A., Zdrowowicz M., Wyrzykowski D., **Ciupak O.**, Demkowicz S., Izadi F., Denifl S., Rak J.; Surprising Radiolytic Stability of 8-Thiomethyladenine in an Aqueous Solution; *Journal of Physical Chemistry B*, **2024**, 128, 3621-3630.
4. Walter M., **Ciupak O.**, Biernacki K., Rachoń J., Witt D., Demkowicz S.; Convenient and efficient *N*-methylation of secondary amines under solvent-free ball milling conditions; *Scientific reports*, **2024**, 14, 8810.
5. Mońka M., Gogoc S., Kozakiewicz K., Ievtukhov V., Grzywacz D., **Ciupak O.**, Kubicki A., Bojarski P., Data P., Serdiuk E. I.; Application of the Heavy-Atom Effect for (Sub)microsecond Thermally Activated Delayed Fluorescence and an All-Organic Light-Emitting Device with Low-Efficiency Roll-off; *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2024**, 16, 15107-15120.
6. Biernacki K., **Ciupak O.**, Daśko M., Rachoń J., Flis D., Budka J., Inkielewicz-Stępnia I., Czaja A., Rak J., Demkowicz S.; Development of potent and effective SARS-CoV-2 main protease inhibitors based on maleimide analogs for the potential treatment of COVID-19; *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **2024**, 39, 2290910.
7. Izadi F., Szczyrba A., Datta M., **Ciupak O.**, Demkowicz S., Rak J., Denifl S.; Electron-Induced Decomposition of 5-Bromo-4-thiouracil and 5-Bromo-4-thio-2'-deoxyuridine: The Effect of the Deoxyribose Moiety on Dissociative Electron Attachment; *Molecular Sciences*, **2023**, 24, 8706.
8. Biernacki K., **Ciupak O.**, Daśko 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; *Journal of Medicinal Chemistry*, **2022**, 65, 5044-5056.
9. Daśko M., Dołęga A., Siedzielnik M., Biernacki K., **Ciupak O.**, Rachoń 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.
10. **Ciupak O.**, Daśko 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; *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **2021**, 36, 238-247.

11. Biernacki K., Daśko M., **Ciupak O.**, Kubiński K., Rachoń J., Demkowicz S.; Novel 1,2,4-Oxadiazole Derivatives in Drug Discovery; *Pharmaceuticals*, **2020**, 13, 111.
12. Daśko, 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.; *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **2020**, 35, 1163–1184.

PROJEKTY:

1. „Nowy typ analogów i koniugatów kwasu foliowego o potencjalnym zastosowaniu w terapii nowotworów hormono zależnych.”
Projekt PRELUDIUM (nr 2021/41/N/NZ7/01851)
Udział – kierownik
Opiekun projektu – dr hab. inż. Sebastian Demkowicz
25.01.2022-25.01.2025 r.
 2. „Breaking bad w materiałach organicznych: czy emitery do OLED łamią zasady fotofizyki?”
Projekt SONATA (nr 2020/39/D/ST5/03094)
Udział – wykonawca
Kierownik projektu – dr hab. Illia E. Serdiuk (Uniwersytet Gdański)
28.11.2022-28.10.2024 r.
 3. „Projektowanie, synteza oraz badania aktywności biologicznej nowych inhibitorów proteazy SARS-Cov-2Mpro jako potencjalnych chemoterapeutyków w leczeniu COVID19.”
COMBATING CORONAVIRUS
Udział – wykonawca
Kierownik projektu – dr hab. inż. Sebastian Demkowicz
01.09.2020-31.08.2021 r.
 4. „Inhibitory sulfatazy steroidowej na bazie amidosiarczanowych pochodnych 4-(1-fenylo-1*H*-[1,2,3]triazol-4-yl)-fenolu jako potencjalne środki przeciwnowotworowe.”
Projekt TANGO (TANGO-IV-A/0004/2019-00)
Udział – wykonawca
Kierownik projektu – dr inż. Mateusz Daśko
01.10.2020-31.12.2022
 5. „Radiosensybilizujące pochodne zasad pirymidynowych lub purynowych: spektrometria mas i metody kwantowochemiczne w badaniach nad oddziaływaniami z niskoenergetycznymi elektronami w fazie gazowej, klastrach z wodą oraz roztworze.”
Projekt CEUS-UNISON
Udział – wykonawca
-

Kierownik projektu – prof. dr hab. Janusz Rak (Uniwersytet Gdański)
12.07.2021-12.07.2025 r.

ZGŁOSZENIA PATENTOWE:

1. Serdiuk E. I., Ievtukhov V., **Ciupak O.**, Mońka M.; Związki organiczne wykazujące aktywowaną termicznie opóźnioną fluorescencję, sposób ich otrzymywania oraz zastosowanie oraz kompozycja wykazująca aktywowaną termicznie opóźnioną fluorescencję oraz jej zastosowanie; 2024, Patent polski nr P.448129
2. Biernacki K., **Ciupak O.**, Daśko M., Rachoń J., Demkowicz S.; Peptydowe pochodne 1-(3-hydroksypropylo)-1*H*-pirolo-2,5-dionu, zastosowanie medyczne tych związków oraz sposób ich otrzymywania; 2023, Patent polski nr P.445129
3. Biernacki K., **Ciupak O.**, Daśko M., Rachoń J., Demkowicz S.; Peptydowe pochodne 1-(2-hydroksyetylo)-1*H*-pirolo-2,5-dionu, zastosowanie medyczne tych związków oraz sposób ich otrzymywania; 2023, Patent polski nr P.445128

KONFERENCJE NAUKOWE:

1. **Ciupak O.**, Daśko M., Biernacki K., Demkowicz S., Rachoń J., Datta M., Rak J., Masłyk M., Kubiński K.; Structural analogs of folic acid as novel steroid sulfatase (STS) inhibitors. The European Federation of Medicinal Chemistry Young Medicinal Chemists' Symposium, Rzym (Włochy), 04.09-06.09.2024, Sesja posterowa
2. Biernacki K., **Ciupak O.**, Walter M., Rachoń J., Demkowicz S.; Derivatives of 3,5-diaryl-substituted 1,2,4-oxadiazole as new potential steroid sulfatase inhibitors. The European Federation of Medicinal Chemistry Young Medicinal Chemists' Symposium, Rzym (Włochy), 04.09-06.09.2024, Sesja posterowa
3. Datta M., Szczyrba A., Zdrowowicz M., **Ciupak O.**, Demkowicz S., Rak J.; Stationary radiolysis of adenine derivative – a potential radiosensitizer. Modeling and Design of Molecular Materials 2022, Gdańsk (Polska) 19.06-22.06.2022, Sesja posterowa
4. Datta M., Zdrowowicz M., **Ciupak O.**, Demkowicz S., Szczyrba A., Rak J.; Modified 2'-deoxyadenosine as potential radiosensitizer – synthesis and stationary radiolysis. International Conference on Radiation in Various Fields of Research Montenegro (Czarnogóra), 13.06-17.06.2022, Sesja posterowa
5. Biernacki K., **Ciupak O.**, Walter M., Rachoń J., Demkowicz S.; Pochodne 3,5-diarylopodstawionych 1,2,4-oksadiazolu jako nowe, potencjalne inhibitory sulfatazy steroidowej. 64 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Lublin (Polska), 11.09-16.09.2022, Sesja posterowa
6. Walter M., **Ciupak O.**, Biernacki K., Rachoń J., Demkowicz S.; Mechanochemiczne *N*-metylowanie amin drugorzędowych na drodze redukcyjnej aminacji.

64 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Lublin (Polska), 11.09-16.09.2022, Sesja posterowa

7. **Ciupak O.**, Biernacki K., Walter M., Daśko M., Rachoń J., Demkowicz S.; Analogi strukturalne kwasu foliowego jako nowe inhibitory sulfatazy steroïdowej (STS).
64 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Lublin (Polska), 11.09-16.09.2022, Sesja posterowa
8. **Ciupak O.**, Daśko M., Biernacki K., Rachoń J., Maślyk M., Kubiński K., Aleksandra M., Demkowicz S.; Nowe inhibitory sulfatazy steroïdowej na bazie amidosiarczanowych pochodnych 6-(1-fenilo-1*H*-1,2,3-triazolo-4-yl)naftalen-2-ylu.
XIV Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Toruń (Polska), 20.09-22.09.2021, Sesja posterowa

V Część eksperymentalna

5.1 Opis modelowania molekularnego

Struktury chemiczne 3D wszystkich inhibitorów przygotowano z wykorzystaniem programu HyperChem 8.0.7 Release (Hypercube, Inc., Gainesville, FL, USA). Przed przeprowadzeniem dokowania każda z cząsteczek została zoptymalizowana z wykorzystaniem pola siłowego MM+ algorytmem sprzężonych gradientów Polak-Ribier kończącym się różnicą energii nie większą niż 0,05 kcal/(mol*Å). Strukturę rentgenowską ludzkiego STS oraz receptora kwasu foliowego (FR α) pozyskano z Protein Data Bank (PDB ID:1P49 (STS) oraz 4LRH (FR α)) i zostały one przygotowane przy użyciu standardowych procedur. W przypadku enzymu STS ze struktury usunięto cząsteczki wody oraz usunięto siarczanową formę *gem*-diolowej formyloglicyny. Następnie do enzymu dodano fGly75 za pomocą oprogramowania Preparation Wizard, będącego częścią pakietu Maestro (Schrödinger, LLC, NY, USA) oraz dodano brakujące atomy wodoru. W taki sposób przygotowaną strukturę STS zoptymalizowano z użyciem pola siłowego OPLS-AA w programie Maestro. Optymalizacja struktury FR α odbywała się w ten sam sposób pomijając etap związany z formyloglicyną.

Obliczenia dokowania zoptymalizowanych ligandów do przygotowanych struktur STS oraz FR α przeprowadzono z użyciem programu AutoDock Vina 1.1.2 (The Molecular Graphic Laboratory, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). Podczas wszystkich dokowań do struktury STS zastosowano pudełko z siatką o rozmiarze 30 Å x 30 Å x 30 Å ze środkiem na atomie C β reszty aminokwasowej 75, a w przypadku FR α ze środkiem na Ca reszty aminokwasowej 135.

Po zakończeniu dokowania molekularnego, dla wybranych cząsteczek, z wykonane zostały modele 3D z użyciem programu VMD 1.9 (University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL, USA)

5.2 Synteza chemiczna

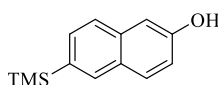
5.2.1 Aparatura oraz odczynniki

Widma magnetycznego rezonansu jądrowego zostały wykonane przy użyciu spektrometru Varian Inova 500 MHz lub Bruker Avance III HD 400 MHz. Przesunięcia chemiczne zostały podane względem sygnału resztowego 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) a stałe sprzężenia zostały podane w hercach. Widma mas zostały wykonane na aparacie Agilent 6540 Accurate Mass Q-TOF LC/MS System oraz TripleTOF 5600+ (SCIEX, Framingham, MA, USA). Widma IR zostały zarejestrowane 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 2 cm^{-1} . Spektrometr był przepłukiwany suchym azotem w celu zminimalizowania wpływu pary wodnej oraz dwutlenku węgla. Temperatury topnienia mierzone były z użyciem kriometru Stuart Scientific SMP30. Do chromatografii kolumnowej wykorzystywano żel krzemionkowy 60 (230-400 mesh) (Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy). Chromatografię typu "Flash" przeprowadzano przy użyciu wkładów Büchi FlashPure (nieregularny żel krzemionkowy $10\text{ }\mu\text{m}$) w systemie chromatograficznym Büchi Pure z wbudowanym detektorem UV oraz ELSD. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) została wykonana przy użyciu płytek Polygram SIL G/UV254 (SiliCycle Inc., 2500, Parc-Technologique Blvd, Quebec City, G1P4S6, Canada). Analiza LC-MS została zarejestrowana przy użyciu Nexera X2 Ultrapformance Liquid Chromatography (UHPLC) sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas Triple TOF 5600+ (SCIEX), wyposażonym w interfejs duo-electrospray, pracującym w trybie jonizacji dodatniej. Analizy HPLC oznaczano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami RP-HPLC, przy użyciu chromatografu Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific) i kolumny analitycznej Wakopak Handy ODS ($150 \times 4,6\text{ mm}$).

Wszelkie odczynniki chemiczne wykorzystane do syntezy chemicznej zakupione zostały w firmie Sigma-Aldrich (Merck), Chemat, Fluorochem lub uzyskane według dostępnych w literaturze procedur. Rozpuszczalniki organiczne suszone oraz destylowane były według standardowych metod. Stosowane szło było czyste i jeśli wymagały tego warunki reakcji, to było suszone z wykorzystaniem palnika Bunsena.

5.2.2 Procedura otrzymywania 6-((trimetylosililo)etynylo)naftolu (**88**)

Do suchej kolby okrągłodennej wprowadzono 6-bromo-2-naftol **87** (1 eq, 24,50 mmol, 5,47 g), trimetylosililoacetylen (1,6 eq, 39,20 mmol, 3,85 g), PdCl₂ (0,05 eq, 1,23 mmol, 0,22 g), Ph₃P (0,1 eq, 2,45 mmol, 0,64 g), CuI (0,025 eq, 0,63 mmol, 0,12 g), TEA (7 eq, 171,50 mmol, 25,59 g) oraz 125 mL bezwodnego ACN. Całość mieszano w temperaturze wrzenia przez 3 h. Kolejno, mieszaninę reakcyjną ochłodzono, roztwór przesączono przez celit, a uzyskany w ten sposób przesącz odparowano na wyparce obrotowej. Otrzymany surowy produkt oczyszczano z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie AcOEt : heksan (1 : 4). Uzyskano w ten sposób związek **88** w postaci pomarańczowego, krystalicznego ciała stałego.



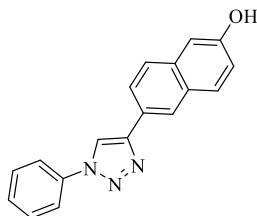
6-((Trimetylosililo)etynylo)naftol **88**

Wydajność	64%
Temperatura topnienia	92-94 °C
¹H NMR	δ _H (500 MHz, CDCl ₃) 7,96 (1H, s, Ar-H), 7,73-7,70 (1H, m, Ar-H), 7,61 (1H, d, <i>J</i> = 8,5 Hz, Ar-H), 7,49 (1H, dd, <i>J</i> = 8,5, 1,6 Hz, Ar-H), 7,14-7,11 (2H, m, Ar-H), 5,55-4,53 (1H, brs, OH) 0,31 (9H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ _c (125 MHz, CDCl ₃) 154,1, 134,2, 132,0, 129,9, 129,3, 128,3, 126,3, 118,4, 118,1, 109,6, 105,7, 93,8, 0,1
IR	(KBr)/cm ⁻¹ 3245, 2166, 1602, 1506, 1248, 941, 836, 703
HRMS	[M-H] obliczone: 239,1155, zmierzone: 239,0897

5.2.3 Ogólna procedura otrzymywania pochodnych 6-(1-fenylo-1*H*-1,2,3-triazolo-4-ylo)naftalen-2-olu (**90 A-L**)

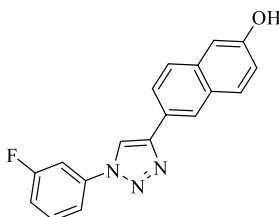
Do wysuszonej kolby okrągłodennej wprowadzono odpowiednią pochodną aniliny **89A-L** (1 eq, 2,63 mmol) oraz 6,1 mL suchego ACN. Następnie cały układ reakcyjny ochłodzono korzystając z łaźni z lodem po czym dodano *t*-BuONO (1,2 eq, 3,16 mmol) i mieszano przez 10 minut w atmosferze gazu obojętnego. Po tym czasie, ostrożnie wkroplono TMSN₃ (1,1 eq, 2,89 mmol). Po zakończeniu wkraplania mieszaninę reakcyjną doprowadzono do temperatury otoczenia i mieszano przez 4 h. Po tym czasie do kolby dodano 6-((trimetylosililo)etynylo)naftol **88** (1 eq, 2,63 mmol) oraz 1 M roztwór TBAF w THF (1,1 eq, 2,89 mmol) i mieszano w temp. 0 °C przez 30 minut. Następnie przygotowano świeży 1 M roztwór askorbinianu sodu (0,2 eq, 0,53 mmol) oraz CuSO₄ · 5H₂O (0,1 eq, 0,26 mmol) po czym dodano je do mieszaniny reakcyjnej i mieszano w temperaturze pokojowej przez 12 h. Po upływie tego czasu, zawartość kolby zatężono z wykorzystaniem wyparki obrotowej, a otrzymany surowy produkt rozpuszczono w 30 mL octanu etylu i przemyto trzykrotnie 0,1 M

roztworem HCl. Kolejną fazę organiczną suszono z wykorzystaniem MgSO₄, następnie odparowano a pozostałość w kolbie rekrytalizowano z użyciem ACN w celu uzyskaniażądanego produktu **91A-L**.



6-(1-Fenyl-1*H*-1,2,3-triazolo-4-ylo)naftalen-2-ol **91A**

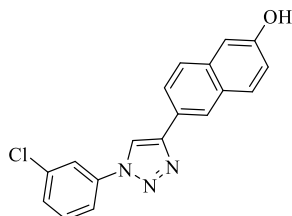
Wydajność	64%
Temperatura topnienia	228-230 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d ₆) 9,87 (1H, s, OH), 9,35 (1H, s, CH), 8,39 (1H, s, Ar-H), 8,02-7,96 (3H, m, Ar-H), 7,86 (1H, d, <i>J</i> = 8,8 Hz, Ar-H), 7,82 (1H, d, <i>J</i> = 8,7 Hz, Ar-H), 7,65 (2H, t, <i>J</i> = 7,9 Hz, Ar-H), 7,53 (1H, t, <i>J</i> = 7,4 Hz, Ar-H), 7,18 (1H, d, <i>J</i> = 2,3 Hz, Ar-H), 7,15 (1H, dd, <i>J</i> = 8,7, 2,4 Hz, Ar-H)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d ₆) 156,2, 148,2, 137,2, 134,9, 130,4, 130,2, 129,1, 128,2, 127,3, 125,0, 124,4, 124,3, 120,4, 119,8, 119,7, 109,3
IR	(KBr)/cm ⁻¹ 3293, 3137, 1598, 1504, 1228, 1036, 871, 683
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 288,1132, zmierzone: 288,3504



6-(1-(3-Fluorofenyl)-1*H*-1,2,3-triazolo-4-ylo)naftalen-2-ol **91B**

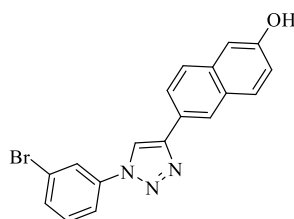
Wydajność	43%
Temperatura topnienia	219-220 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d ₆) 9,88 (1H, s, OH), 9,40 (1H, s, CH), 8,37 (1H, s, Ar-H), 7,95 (1H, dd, <i>J</i> = 8,5, 1,7 Hz, Ar-H), 7,93-7,80 (4H, m, Ar-H), 7,70 (1H, td, <i>J</i> = 8,3, 6,5 Hz, Ar-H), 7,38 (1H, tdd, <i>J</i> = 8,5, 2,5, 0,7 Hz, Ar-H), 7,18 (1H, d, <i>J</i> = 2,1 Hz, Ar-H), 7,15 (1H, dd, <i>J</i> = 8,7, 2,4 Hz, Ar-H)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d ₆) 162,9 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 245,1 Hz), 156,3, 148,3, 138,4 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 10,5 Hz), 134,9, 132,4 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 9,2 Hz),

	130,2, 128,1, 127,3, 124,8, 124,3, 119,9, 119,8, 116,3 (d, $^4J_{C-F} = 3,0$ Hz), 115,8 (d, $^2J_{C-F} = 21,0$ Hz), 109,3, 107,9 (d, $^2J_{C-F} = 26,5$ Hz)
IR	(KBr)/cm ⁻¹ 3251, 3125, 2352, 1600, 1498, 1231, 1033, 870, 677
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 306,1038, zmierzone: 306,3540



6-(1-(3-Chlorofenylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-4-ylo)naftalen-2-ol **91C**

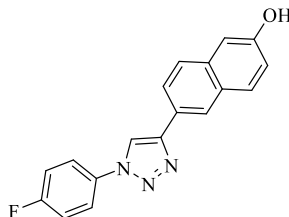
Wydajność	45%
Temperatura topnienia	229-231 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,88 (1H, s, OH), 9,43 (1H, s, CH), 8,37 (1H, s, Ar-H), 8,12 (1H, t, <i>J</i> = 2,0 Hz, Ar-H), 8,01 (1H, ddd, <i>J</i> = 8,1, 2,0, 0,9 Hz, Ar-H), 7,95 (1H, dd, <i>J</i> = 8,5, 1,7 Hz, Ar-H), 7,86 (1H, d, <i>J</i> = 8,8 Hz, Ar-H), 7,82 (1H, d, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H), 7,68 (1H, t, <i>J</i> = 8,1 Hz, Ar-H), 7,59 (1H, ddd, <i>J</i> = 8,1, 1,9, 0,9 Hz, Ar-H), 7,19-7,17 (1H, m, Ar-H), 7,15 (1H, dd, <i>J</i> = 8,7, 2,4 Hz, Ar-H)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d 6) 156,3, 148,3, 138,2, 134,9, 134,7, 132,2, 130,2, 128,9, 128,1, 127,3, 124,8, 124,3, 120,2, 119,9, 119,8, 118,9, 109,3
IR	(KBr)/cm ⁻¹ 3254, 3129, 2345, 1598, 1221, 1035, 869, 679
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 321,0669, zmierzone: 322,3397



6-(1-(3-Bromofenylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-4-ylo)naftalen-2-ol **91D**

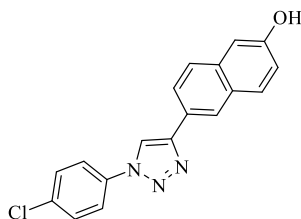
Wydajność	42%
Temperatura topnienia	226-228 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,88 (1H, s, OH), 9,43 (1H, s, CH), 8,37 (1H, s, Ar-H), 8,24 (1H, s, Ar-H), 8,04 (1H, d, <i>J</i> = 8,1 Hz, Ar-H), 7,95 (1H, d, <i>J</i> = ,2 Hz, Ar-H), 7,86 (1H, d, <i>J</i> = 8,8 Hz, Ar-H), 7,82 (1H, d, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H), 7,72 (1H, d, <i>J</i> = 7,8 Hz,

	Ar-H), 7,61 (1H, t, $J = 8,0$ Hz, Ar-H), 7,18 (1H, s, Ar-H), 7,15 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, Ar-H)
^{13}C NMR	δ_{c} (125 MHz, DMSO- d_6) 156,3, 148,3, 138,3, 134,9, 132,4, 131,8, 130,2, 128,1, 127,3, 124,8, 124,3, 123,0, 122,9, 119,9, 119,8, 119,3, 109,3
IR	(KBr)/ cm^{-1} 3271, 3130, 2922, 2350, 1583, 1489, 1034, 782
HRMS	$[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone: 366,0237, zmierzone: 366,3458



6-(1-(4-Fluorofenylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-4-ylo)naftalen-2-ol **91E**

Wydajność	74%
Temperatura topnienia	237-239 °C (z rozkładem)
^1H NMR	δ_{H} (500 MHz, DMSO- d_6) 9,86 (1H, s, OH), 9,33 (1H, s, CH), 8,37 (1H, s, Ar-H), 8,06-8,00 (2H, m, Ar-H), 7,96 (1H, dd, $J = 8,5, 1,5$ Hz, Ar-H), 7,86 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,82 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 7,52 (2H, t, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,17 (1H, s, Ar-H), 7,15 (1H, dd, $J = 8,8, 2,3$ Hz, Ar-H);
^{13}C NMR	δ_{c} (125 MHz, DMSO- d_6) 162,1 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 245,8$ Hz), 156,2, 148,2, 134,9, 133,8 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 2,8$ Hz), 130,1, 128,2, 127,3, 125,0, 124,4, 124,2, 122,8 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,8$ Hz), 120,0, 119,8, 117,3 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 23,3$ Hz), 109,2
IR	(KBr)/ cm^{-1} 3651, 3199, 3124, 2920, 2347, 1614, 1507, 1039, 802
HRMS	$[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone: 306,1038, zmierzone: 306,3524



6-(1-(4-Chlorofenylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-4-ylo)naftalen-2-ol **91F**

Wydajność	74%
Temperatura topnienia	256-257 °C (z rozkładem)
^1H NMR	δ_{H} (500 MHz, DMSO- d_6) 9,86 (1H, s, OH), 9,38 (1H, s, CH), 8,37 (1H, s, Ar-H) 8,03 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, Ar-H), 7,95 (1H, dd,

¹³C NMR

$J = 8,5, 1,6 \text{ Hz, Ar-H}$), 7,86 (1H, d, $J = 8,8 \text{ Hz, Ar-H}$), 7,82 (1H, d, $J = 8,6 \text{ Hz, Ar-H}$), 7,73 (2H, d, $J = 8,9 \text{ Hz, Ar-H}$), 7,17 (1H, s, Ar-H), 7,15 (1H, dd, $J = 8,7, 2,3 \text{ Hz, Ar-H}$)

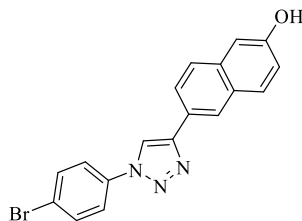
δ_c (125 MHz, DMSO- d_6) 156,3, 148,3, 136,0, 134,9, 133,4, 130,4, 130,2, 128,2, 127,3, 124,9, 124,4, 124,3, 122,1, 119,8, 109,3

IR

(KBr)/ cm^{-1} 3286, 3119, 2294, 1611, 1550, 1032, 831

HRMS

$[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone: 322,0742, zmierzone: 322,3345



6-(1-(4-Bromofenyl)-1H-1,2,3-triazolo-4-yl)naftalen-2-ol **91G**

Wydajność

62%

Temperatura topnienia

254-256 °C (z rozkładem)

¹H NMR

δ_H (500 MHz, DMSO- d_6) 9,86 (1H, s, OH), 9,38 (1H, s, CH), 8,37 (1H, s, Ar-H), 7,99-7,93 (3H, m, Ar-H), 7,88-7,80 (4H, m, Ar-H), 7,17 (1H, s, Ar-H), 7,15 (1H, dd, $J = 8,7, 2,4 \text{ Hz, Ar-H}$)

¹³C NMR

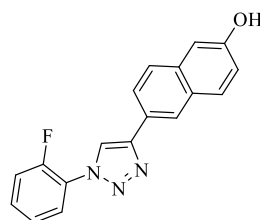
δ_c (125 MHz, DMSO- d_6) 156,3, 148,3, 136,4, 134,9, 133,3, 130,2, 128,1, 127,3, 124,9, 124,4, 124,3, 122,3, 121,7, 119,8, 119,7, 109,3

IR

(KBr)/ cm^{-1} 3470, 3119, 1612, 1495, 1200, 1030, 867, 810

HRMS

$[\text{M}+\text{H}]^+$ obliczone: 366,0237, zmierzone: 366,3154



6-(1-(2-Fluorofenyl)-1H-1,2,3-triazolo-4-yl)naftalen-2-ol **91H**

Wydajność

47%

Temperatura topnienia

207-208 °C (z rozkładem)

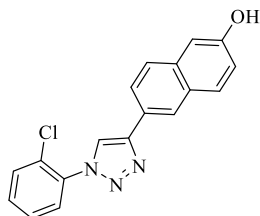
¹H NMR

δ_H (500 MHz, DMSO- d_6) 9,86 (1H, s, OH), 9,12 (1H, d, $J = 1,9 \text{ Hz, CH}$), 8,41 (1H, s, Ar-H), 8,02-7,91 (2H, m, Ar-H), 7,83 (2H, dd, $J = 20,5, 8,7 \text{ Hz, Ar-H}$), 7,68-7,58 (2H, m, Ar-H), 7,54-7,45 (1H, m, Ar-H), 7,19-7,09 (2H, m, Ar-H)

¹³C NMR

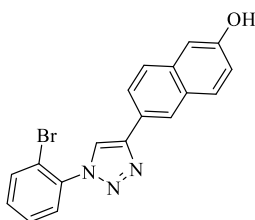
δ_c (125 MHz, DMSO- d_6) 156,3, 154,3 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 250,8 \text{ Hz}$),

	147,8, 134,8, 131,8 (d, $^2J_{C-F} = 7,8$ Hz), 130,2, 128,2, 127,3, 126,5, 126,1 (d, $^3J_{C-F} = 3,7$ Hz), 125,3 (d, $^2J_{C-F} = 11,0$ Hz), 124,8, 124,4, 122,9 (d, $^3J_{C-F} = 4,1$ Hz), 119,8, 117,8, 117,6, 108,9 (KBr)/cm ⁻¹ 3177, 1614, 1511, 1048, 864, 819
IR	
HRMS	[M+H] obliczone: 306,1038, zmierzone: 306,3529



6-(1-(2-Chlorofenylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-4-ylo)naftalen-2-ol **91I**

Wydajność	62%
Temperatura topnienia	104-106 °C
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,86, (1H, s, OH), 9,08 (1H, s, CH), 8,39 (1H, s, Ar-H), 7,96 (1H, dd, $J = 8,5, 1,6$ Hz, Ar-H), 7,90-7,75 (4H, m, Ar-H), 7,73-7,59 (2H, m, Ar-H), 7,21-7,11 (2H, m, Ar-H)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d 6) 156,3, 147,4, 135,1, 134,9, 132,2, 131,1, 130,2, 129,0, 128,9, 128,8, 128,2, 127,3, 124,9, 124,4, 124,3, 123,7, 119,8, 109,3
IR	(KBr)/cm ⁻¹ 3133, 1616, 1493, 1493, 1196, 1050, 862, 804
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 322,0742, zmierzone: 322,3377

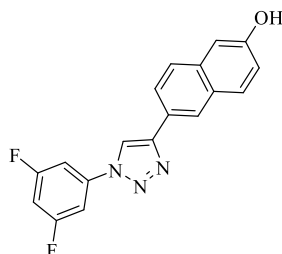


6-(1-(2-Bromofenylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-4-ylo)naftalen-2-ol **91J**

Wydajność	68%
Temperatura topnienia	105-107 °C
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,86 (1H, s, OH), 9,05 (1H, s, CH), 8,39 (1H, s, Ar-H), 7,97-7,95 (2H, m, Ar-H), 7,83 (2H, dd, $J = 18,6, 8,7$ Hz, Ar-H), 7,77 (1H, dd, $J = 7,8, 1,6$ Hz), 7,67 (1H, td, $J = 7,7, 1,4$ Hz, Ar-H), 7,60 (1H, td, $J = 7,7, 1,4$ Hz, Ar-H), 7,21-7,18 (1H, m, Ar-H), 7,14 (1H, dd, $J = 8,8, 2,4$ Hz, Ar-H)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d 6) 156,2, 147,3, 136,8, 134,9, 134,2,

IR
HRMS

132,5, 130,2, 129,5, 129,2, 128,2, 127,3, 125,0, 124,4, 124,3,
123,7, 119,8, 119,4, 109,3
(KBr)/cm⁻¹ 3135, 1611, 1493, 1283, 1048, 909
[M+H]⁺ obliczone: 366,0237, zmierzone: 366,3130



6-(1-(3,5-Difluorofenyl)-1H-1,2,3-triazolo-4-yl)naftalen-2-ol **91K**

Wydajność
Temperatura topnienia
¹H NMR

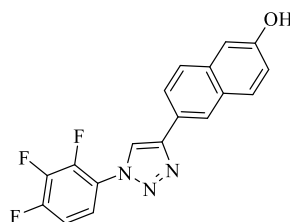
39%
210-212 °C (z rozkładem)
δ_H (500 MHz, DMSO-d₆) 9,88 (1H, s, OH), 9,43 (1H, s, CH),
8,35 (1H, s, Ar-H), 7,95-7,80 (4H, m, Ar-H), 7,46 (1H, tt, *J* =
9,2, 2,2 Hz, Ar-H), 7,20-7,17 (2H, m, Ar-H), 7,15 (1H, dd, *J* =
8,7, 2,4 Hz, Ar-H)

¹³C NMR

δ_c (125 MHz, DMSO-d₆) 163,2 (dd, ¹*J*_{C-F} = 246,9, ³*J*_{C-F} = 14,6
Hz), 156,4, 148,4, 138,9 (t, ³*J*_{C-F} = 13,3 Hz), 135,0, 130,2, 128,1,
127,4, 124,6, 124,4, 124,2, 120,0, 119,9, 109,3, 104,4, 104

IR
HRMS

(KBr)/cm⁻¹ 3128, 1607, 1482, 1303, 1050, 911
[M+H]⁺ obliczone: 324,0943, zmierzone: 324,3554



6-(1-(2,3,4-Trifluorofenyl)-1H-1,2,3-triazolo-4-yl)naftalen-2-ol **91L**

Wydajność
Temperatura topnienia
¹H NMR

13%
105-107 °C
δ_H (500 MHz, DMSO-d₆) 9,88 (1H, s, OH), 9,43 (1H, s, CH),
8,35 (1H, s, Ar-H), 7,95-7,80 (4H, m, Ar-H), 7,46 (1H, tt, *J* =
9,2, 2,2 Hz, Ar-H), 7,20-7,17 (2H, m, Ar-H), 7,15 (1H, dd, *J* =
8,7, 2,4 Hz, Ar-H)

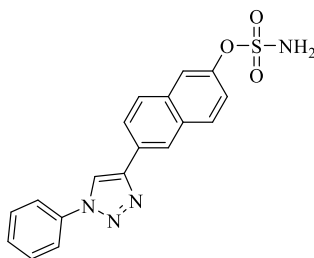
¹³C NMR

δ_c (125 MHz, DMSO-d₆) 163,2 (dd, ¹*J*_{C-F} = 246,9, ³*J*_{C-F} = 14,6
Hz), 156,4, 148,4, 138,9 (t, ³*J*_{C-F} = 13,3 Hz), 135,0, 130,2, 128,1,
127,4, 124,6, 124,4, 124,2, 120,0, 119,9, 109,3, 104,4, 104

IR	(KBr)/cm ⁻¹ 3128, 1607, 1482, 1303, 1050, 911
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 324,0943, zmierzone: 324,3554

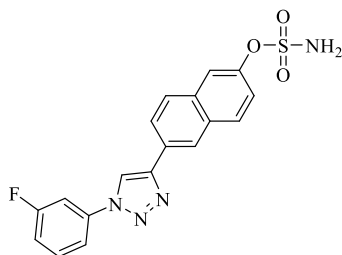
5.2.4 Ogólna procedura otrzymywania amidosiarczanowych pochodnych 6-(1-fenyl-1*H*-1,2,3-triazolo-4-yl)naftaleno-2-ylu (**IA-L**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną oraz rurkę z chlorkiem wapnia, wprowadzono 0,5 mL DCM, izocyjanian chlorosulfurylu (1 eq, 1,50 mmol), kwas mrówkowy (1,05 eq, 1,54 mmol) oraz katalityczną ilość *N,N*-DMA (0,11 eq, 0,0016 mmol), po czym doprowadzono układ reakcyjny do temperatury 40 °C i mieszano przez 3,5 h. Następnie, odpowiednie pochodne **9IA-L** rozpuszczono w *N,N*-DMA i tak przygotowany roztwór dodano do mieszaniny reakcyjnej. Układ reakcyjny mieszano przez noc w temperaturze otoczenia. Następnego dnia, zawartość kolby przeniesiono do zlewki z 50 mL wody, w wyniku czego strącono osad, który w dalszej kolejności odsączono i przemyto wodą destylowaną. Otrzymany surowy produkt rekrystalizowano z użyciem ACN otrzymując pożądaný produkt **IA-L**.



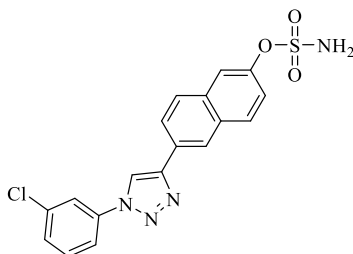
Amidosiarczan 6-(1-fenyl-1*H*-1,2,3-triazolo-4-yl)naftalen-2-ylu **IA**

Wydajność	70%
Temperatura topnienia	210-211 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,47 (1H, s, CH), 8,59 (1H, s, Ar-H), 8,16 (1H, dd, <i>J</i> = 8,6, 1,5 Hz, Ar-H), 8,15-8,10 (4H, m, Ar-H, NH ₂), 8,00 (2H, d, <i>J</i> = 7,6 Hz, Ar-H), 7,88 (1H, d, <i>J</i> = 2,2 Hz, Ar-H), 7,67 (2H, t, <i>J</i> = 7,9 Hz, Ar-H), 7,54 (1H, t, <i>J</i> = 7,4 Hz, Ar-H), 7,51 (1H, dd, <i>J</i> = 8,9, 2,4 Hz, Ar-H)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d 6) 148,5, 147,6, 137,1, 133,4, 131,9, 130,5, 130,4, 129,3, 129,1, 128,4, 125,0, 124,0, 122,9, 120,6, 120,5, 119,8
IR	(KBr)/cm ⁻¹ 3119, 2915, 2358, 1595, 1352, 1168, 759, 672
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 367,0860, zmierzone: 367,3750



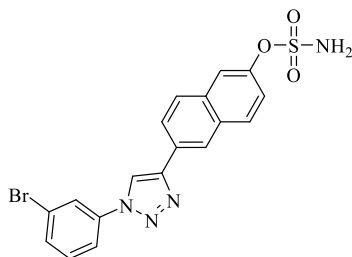
Amidosiarczan 6-(1-(3-fluorofenyl)-1*H*-1,2,3-triazolo-4-yl)naftalen-2-ylu **IB**

Wydajność	43%
Temperatura topnienia	210-212 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,52 (1H, s, CH), 8,58 (1H, s, Ar-H), 8,18-8,06 (5H, m, Ar-H, NH ₂), 7,96-7,86 (3H, m, Ar-H), 7,72 (1H, q, <i>J</i> = 7,4 Hz, Ar-H), 7,50 (1H, dd, <i>J</i> = 8,9, 2,2 Hz, Ar-H), 7,41 (1H, td, <i>J</i> = 8,7, 2,3 Hz, Ar-H)
¹³C NMR	δ _c (125 MHz, DMSO- _d 6) 162,9 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 245,2 Hz), 148,6, 147,7, 138,3, (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 10,5 Hz), 133,5, 132,4 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 9,1 Hz), 131,9, 130,5, 129,2, 128,2, 125,0, 124,1, 122,9, 120,8, 119,8, 116,4 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 3,0 Hz), 116,0 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 21,0 Hz), 108,0 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 26,5 Hz)
IR	(KBr)/cm ⁻¹ 3120, 2560, 1600, 1358, 1173, 782, 673
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 385,0766 , zmierzone: 385,3810



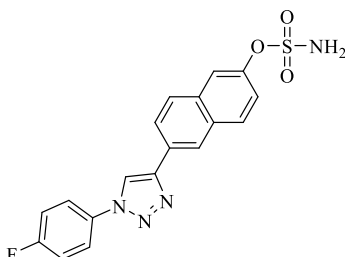
Amidosiarczan 6-(1-(3-chlorofenyl)-1*H*-1,2,3-triazolo-4-yl)naftalen-2-ylu **IC**

Wydajność	67%
Temperatura topnienia	214-216 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,53 (1H, s, CH), 8,57 (1H, s, Ar-H), 8,16-8,07 (6H, m, Ar-H, NH ₂), 8,01 (1H, dd, <i>J</i> = 7,9, 1,2 Hz, Ar-H), 7,88 (1H, d, <i>J</i> = 2,1 Hz, Ar-H), 7,69 (1H, t, <i>J</i> = 8,1 Hz, Ar-H), 7,61 (1H, dd, <i>J</i> = 8,0, 0,8 Hz, Ar-H), 7,51 (1H, dd, <i>J</i> = 8,9, 2,3 Hz, Ar-H)
¹³C NMR	δ _c (125 MHz, DMSO- _d 6) 148,5, 147,7, 138,1, 134,7, 133,5, 132,2, 131,9, 130,5, 129,2, 129,0, 128,2, 124,9, 124,1, 122,9, 120,8, 120,3, 119,8, 119,0
IR	(KBr)/cm ⁻¹ 3132, 2915, 2376, 1591, 1381, 1177, 784, 676
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 401,0470, zmierzone: 401,3646



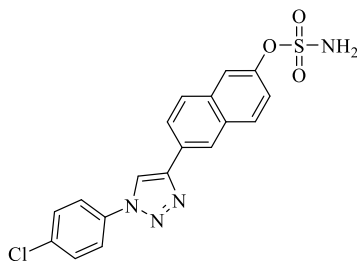
Amidosiarczan 6-(1-(3-bromofenylo-1H-1,2,3-triazolo-4-ylo)naftalenu-2-ylu) **ID**

Wydajność	34%
Temperatura topnienia	219-221 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) 9,55 (1H, s, CH), 8,58 (1H, s, Ar-H), 8,26 (1H, t, <i>J</i> = 1,8 Hz, Ar-H), 8,16-8,09 (5H, m, Ar-H, NH ₂), 8,06 (1H, dd, <i>J</i> = 8,1, 1,2 Hz, Ar-H), 7,88 (1H, d, <i>J</i> = 2,1 Hz, Ar-H), 7,75 (1H, d, <i>J</i> = 8,0 Hz, Ar-H), 7,63 (1H, t, <i>J</i> = 8,1 Hz, Ar-H), 7,50 (1H, dd, <i>J</i> = 8,9, 2,3 Hz, Ar-H)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) 148,6, 147,7, 138,2, 133,5, 132,4, 132,0, 131,9, 130,5, 129,2, 128,2, 124,9, 124,1, 123,0, 122,99, 122,90, 120,9, 119,8, 119,4
IR	(KBr)/cm ⁻¹ 3298, 3171, 2363, 1484, 1368, 1182, 800
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 444,9965 , zmierzone: 445,3408



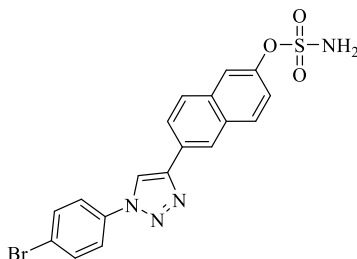
Amidosiarczan 6-(1-(4-fluorofenylo-1H-1,2,3-triazolo-4-ylo)naftalenu-2-ylu) **IE**

Wydajność	36%
Temperatura topnienia	226-227 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) 9,44 (1H, s, CH), 8,57 (1H, s, Ar-H), 8,17-8,09 (5H, m, Ar-H, NH ₂), 8,07-8,01 (2H, m, Ar-H), 7,88 (1H, dd, <i>J</i> = 2,0 Hz, Ar-H), 7,58-7,46 (3H, m, Ar-H)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) 162,2 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 245,9 Hz), 148,5, 147,6, 133,7 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2,8 Hz), 133,4, 131,9, 130,5, 129,1, 128,4, 125,0, 124,0, 122,9 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 5,0 Hz), 122,8, 120,9, 119,8, 117,3 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 23,3 Hz)
IR	(KBr)/cm ⁻¹ 3314, 3159, 1515, 1357, 1180, 838
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 385,0766, zmierzone: 385,3823



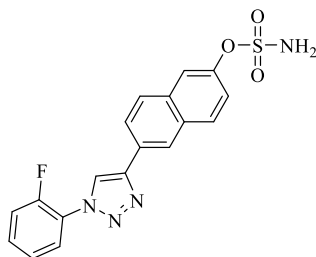
Amidosiarczan 6-(1-(4-chlorofenylo-1*H*-1,2,3-triazolo-4-ylo)naftalenu-2-ylu **IF**

Wydajność	40%
Temperatura topnienia	226-229 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,49 (1H, s, CH), 8,58 (1H, s, Ar-H), 8,15-8,09 (5H, m, Ar-H, NH ₂), 8,04 (2H, d, <i>J</i> = 8,9 Hz, Ar-H), 7,88 (1H, d, <i>J</i> = 2,2 Hz, Ar-H), 7,75 (2H, d, <i>J</i> = 8,8 Hz, Ar-H), 7,50 (1H, dd, <i>J</i> = 8,9, 2,4 Hz, Ar-H)
¹³C NMR	δ _c (125 MHz, DMSO- _d 6) 148,5, 147,7, 135,9, 133,52, 133,48, 131,9, 130,5, 130,4, 129,2, 128,3, 125,0, 124,1, 122,9, 122,2, 120,7, 119,7
IR	(KBr)/cm ⁻¹ 3372, 3269, 1502, 1352, 1173, 813
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 401,0470, zmierzone: 401,3596



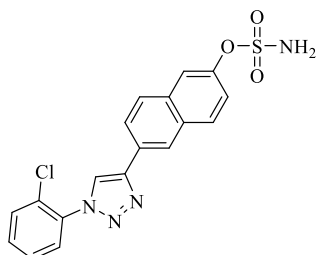
Amidosiarczan 6-(1-(4-bromofenylo-1*H*-1,2,3-triazolo-4-ylo)naftalenu-2-ylu **IG**

Wydajność	45%
Temperatura topnienia	234-235 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,50 (1H, s, CH), 8,58 (1H, s, Ar-H), 8,16-8,10 (5H, m, Ar-H, NH ₂), 7,97 (2H, d, <i>J</i> = 8,9 Hz, Ar-H), 7,89-7,86 (3H, m, Ar-H), 7,50 (1H, dd, <i>J</i> = 8,9, 2,3 Hz, Ar-H)
¹³C NMR	δ _c (125 MHz, DMSO- _d 6) 148,5, 147,7, 136,3, 133,5, 133,4, 131,9, 130,5, 129,2, 128,2, 125,0, 124,1, 122,9, 122,4, 121,9, 120,7, 119,7
IR	(KBr)/cm ⁻¹ 3378, 3273, 3143, 1498, 1144, 710;
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 445,3490, zmierzone: 446,9945



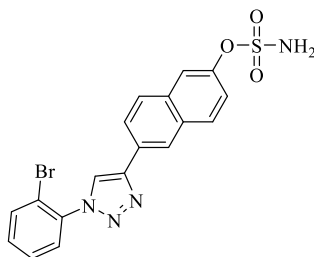
Amidosiarczan 6-(1-(2-bromofenilo-1H-1,2,3-triazolo-4-ylo)naftalenu-2-ylo) **II**

Wydajność	34%
Temperatura topnienia	206-207 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,50 (1H, d, <i>J</i> = 1,8 Hz, CH), 8,61 (1H, s, Ar-H), 8,21-8,06 (5H, m, Ar-H, NH ₂), 7,95 (1H, td, <i>J</i> = 7,9, 1,1 Hz, Ar-H), 7,88 (1H, d, <i>J</i> = 2,0 Hz, Ar-H), 7,70-7,60 (2H, m, Ar-H), 7,55-7,45 (2H, m, Ar-H)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d 6) 154,5 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 250,9 Hz), 148,5, 147,2, 133,5, 131,9, 130,5, 129,1, 128,2, 126,5, 126,1 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 3,8 Hz), 125,3 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 10,5 Hz), 125,1, 124,1, 123,8 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 4,1 Hz), 122,9, 119,7, 117,8, 117,6
IR	(KBr)/cm ⁻¹ 3398, 3277, 3148, 1502, 1111, 728
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 385,0766, zmierzone: 385,3785



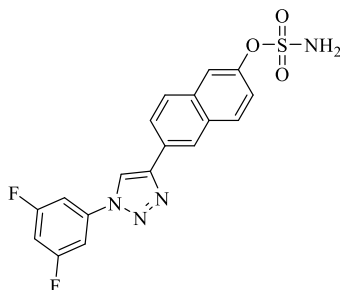
Amidosiarczan 6-(1-(2-chlorofenilo-1H-1,2,3-triazolo-4-ylo)naftalenu-2-ylo) **II**

Wydajność	40%
Temperatura topnienia	176-178 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,21 (1H, s, CH), 8,60 (1H, s, Ar-H), 8,21-8,06 (5H, m, Ar-H, NH ₂), 7,88 (1H, d, <i>J</i> = 2,2 Hz, Ar-H), 7,83 (2H, td, <i>J</i> = 7,7, 1,7 Hz, Ar-H), 7,62 (2H, m, Ar-H), 7,50 (1H, dd, <i>J</i> = 8,9, 2,4 Hz, Ar-H)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d 6) 170,8, 148,5, 146,8, 135,0, 133,5, 132,3, 132,0, 131,1, 130,5, 129,1, 129,0, 128,9, 128,3, 125,0, 124,6, 124,1, 122,9, 119,7
IR	(KBr)/cm ⁻¹ 3242, 3162, 3027, 1728, 1493, 1120, 721
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 401,0470, zmierzone: 401.3615



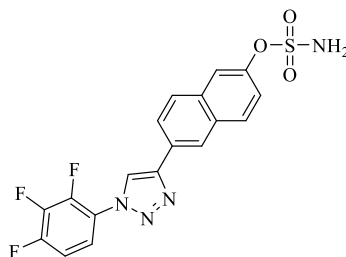
Amidosiarczan 6-(1-(2-bromofenilo-1H-1,2,3-triazolo-4-ylo)naftalenu-2-ylu **IJ**

Wydajność	52%
Temperatura topnienia	188-189 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,19 (1H, s, CH), 8,60 (1H, s, Ar-H), 8,20-8,06 (5H, m, Ar-H, NH ₂), 7,98 (1H, dd, <i>J</i> = 8,0, 1,3 Hz, Ar-H), 7,88 (1H, d, <i>J</i> = 2,2 Hz, Ar-H), 7,79 (1H, dd, <i>J</i> = 7,8, 1,6 Hz, Ar-H), 7,68 (1H, td, <i>J</i> = 7,6, 1,4 Hz, Ar-H), 7,61 (1H, td, <i>J</i> = 7,7, 1,7 Hz, Ar-H), 7,50 (1H, dd, <i>J</i> = 8,9, 2,4 Hz, Ar-H)
¹³C NMR	δ _c (125 MHz, DMSO- _d 6) 153,7, 150,4, 137,9, 133,1, 132,2, 132,1, 131,4, 129,0, 128,9, 128,5, 126,2, 125,8, 124,7, 122,1, 120,7, 118,7, 115,5, 114,9
IR	(KBr)/cm ⁻¹ 3307, 3146, 3052, 1605, 1491, 1370, 929
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 444,9965, zmierzone: 445,3399



Amidosiarczan 6-(1-(3,5-difluorofenilo-1H-1,2,3-triazolo-4-ylo)naftalenu-2-ylu **IK**

Wydajność	37%
Temperatura topnienia	214-215 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,55 (1H, s, CH), 8,56 (1H, s, Ar-H), 8,19-8,05 (5H, m, Ar-H, NH ₂), 7,88 (1H, d, <i>J</i> = 2,1 Hz, Ar-H), 7,85 (2H, dd, <i>J</i> = 7,8, 2,0 Hz, Ar-H), 7,51 (1H, dd, <i>J</i> = 8,8, 2,3 Hz, Ar-H), 7,46 (1H, dt, <i>J</i> = 9,2, 2,2 Hz, Ar-H)
¹³C NMR	δ _c (125 MHz, DMSO- _d 6) 163,3 (dd, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 247,0 Hz, ³ <i>J</i> _{C-F} = 14,6 Hz), 148,6, 147,7, 138,8 (t, ³ <i>J</i> _{C-F} = 13,2 Hz), 133,6, 131,9, 130,5, 129,3, 128,0, 124,9, 124,2, 122,9, 121,0, 119,8, 104,8, 104,5, 104
IR	(KBr)/cm ⁻¹ 3296, 3153, 3052, 1627, 1473, 1357, 916
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 403,0671, zmierzone: 403,3818

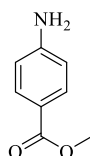


Amidosiarczan 6-(1-(2,3,4-trifluorofenylo-1*H*-1,2,3-triazolo-4-ylo)naftalenu-2-ylu **1L**

Wydajność	26%
Temperatura topnienia	198-200 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,27 (1H, d, <i>J</i> = 1,6 Hz, CH), 8,61 (1H, s, Ar-H), 8,20-8,07 (5H, m, Ar-H, NH ₂), 7,91-7,83 (2H, m, Ar-H), 7,67 (1H, qd, <i>J</i> = 9,8, 2,2 Hz, Ar-H), 7,50 (1H, dd, <i>J</i> = 8,9, 2,3 Hz, Ar-H)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d 6) 152,4-152,1 (m), 149,9-149,6 (m), 148,6, 147,3, 145,9-145,6 (m), 143,3-143,0 (m), 141,7-141,2 (m), 139,2-138,7 (m), 133,5, 131,9, 130,5, 129,2, 127,9, 125,0, 124,3, 123,8 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 3,3 Hz), 123,0 (dd, ³ <i>J</i> _{C-F} = 8,3, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 3,7 Hz), 122,9, 121,1 (dd, ³ <i>J</i> _{C-F} = 8,5, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 4,0 Hz), 119,7, 113,8 (dd, ² <i>J</i> _{C-F} = 18,6, ³ <i>J</i> _{C-F} = 3,8 Hz)
IR	(KBr)/cm ⁻¹ 3262, 3175, 3021, 1618, 1509, 1384, 915
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 421,0577, zmierzone: 421,3945

5.2.5 Procedura otrzymywania 4-aminobenzoesanu metylu (**93**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej, zaopatrzonej w rurkę z chlorkiem wapnia, dodano kwas 4-aminobenzoesowy (1eq, 7,23 mmol, 0,99 g) oraz 25 mL suchego MeOH. Następnie mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temp. 0 °C z wykorzystaniem łaźni lodowej. Po osiągnięciu tej temperatury, ostrożnie wdroplono chlorek tionylu (3eq, 21,69 mmol, 1,58 mL). Kolejno, układ reakcyjny doprowadzono do temperatury otoczenia i pozostawiono mieszając przez 12 h. Po zakończeniu reakcji odparowano rozpuszczalnik z wykorzystaniem wyparki obrotowej, a pozostałość w kolbie trzykrotnie zalano świeżą porcją metanolu, który również usunięto korzystając z rotatora. Następnie do kolby dodano nasycony roztwór NaHCO₃ oraz DCM. Następnie trzykrotnie wykonano ekstrakcję, a połączone warstwy organiczne wysuszono z użyciem MgSO₄. W kolejnym kroku odparowano DCM otrzymując czysty, pożądany produkt **93** w postaci beżowego ciała stałego.

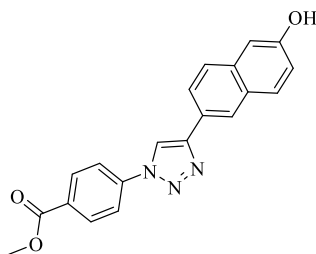


4-Aminobenzoatan metylu **93**

Wydajność	98%
Temperatura topnienia	109-110 °C
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 7,62 (2H, d, <i>J</i> = 8,7 Hz, Ar-H), 6,54 (2H, d, <i>J</i> = 8,7 Hz, Ar-H), 5,96 (2H, bs, NH ₂), 3,71 (3H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d 6) 166,76, 153,93, 131,51, 116,12, 113,07, 51,58

5.2.6 Procedura otrzymywania 4-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)-benzoatan metylu (**95**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej wprowadzono pochodną **93** (1 eq, 4,16 mmol, 0,629 g) oraz 20 mL suchego ACN. Następnie cały układ reakcyjny ochłodzono, korzystając z łaźni z lodem, po czym dodano *t*-BuONO (1,2 eq, 4,99 mmol, 0,59 mL) i całość mieszano przez 10 minut w atmosferze gazu obojętnego. Po tym czasie, ostrożnie wkroplono TMSN₃ (1,1 eq, 4,48 mmol, 0,59 mL). Po zakończeniu wkraplania, mieszaninę reakcyjną doprowadzono do temperatury otoczenia i mieszano przez 4 h. Po tym czasie, do kolby dodano 6-((trimetylosililo)etynylo)naftol **88** (1 eq, 4,16 mmol, 0,90 g) oraz 1 M roztwór TBAF w THF (1,1 eq, 4,48 mmol, 4,48 mL) i mieszano w temp. 0 °C przez 30 minut. Następnie przygotowano świeży 1 M roztwór askorbinianu sodu (0,2 eq, 0,83 mmol, 0,16 g, V_{H2O} = 0,83 mL) oraz CuSO₄ · 5H₂O (0,1 eq, 0,42 mmol, 0,104 g) po czym dodano je do kolby. Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 12 h. Po upływie tego czasu, w kolbie pojawił się osad, który odsączono i przemyto zimnym ACN otrzymując czysty produkt **95** w postaci jasnożółtego ciała stałego.



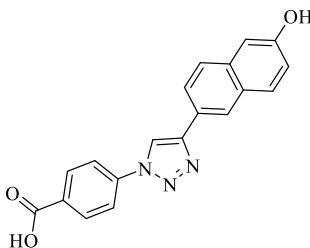
4-(4-(6-Hydroksynaftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoatan metylu **95**

Wydajność	69%
Temperatura topnienia	> 250 °C (z rozkładem)

¹H NMR	δ_{H} (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,90 (1H, bs, OH), 9,46 (1H, s, CH), 8,36 (1H, bs, Ar-H), 8,18 (2H, d, J = 8,8 Hz, Ar-H), 8,13 (2H, d, J = 8,8 Hz, Ar-H), 7,94 (1H, dd, J = 8,5, 1,7 Hz, Ar-H), 7,84 (1H, d, J = 8,8 Hz, Ar-H), 7,80 (1H, d, J = 8,6 Hz, Ar-H), 3,88 (3H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ_{C} (125 MHz, DMSO- _d 6) 165,80, 156,30, 148,45, 140,27, 134,92, 131,51, 130,17, 129,69, 128,08, 127,31, 124,67, 124,35, 124,30, 120,12, 119,80, 119,74, 109,25, 52,87

5.2.7 Procedura otrzymywania kwasu 4-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoesowego (**96**)

Do okrągłodennej kolby, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, wprowadzono pochodną **95** (1 eq, 2,89 mmol, 1,00 g), 50 mL wody, 50 mL MeOH oraz wodorotlenek litu (10 eq, 28,90 mmol, 0,70 g). Następnie całość doprowadzono do temperatury 50 °C i w tych warunkach pozostawiono na 2,5 h. Po tym czasie, korzystając z wyparki obrotowej zredukowano ilość rozpuszczalników. Następnie, zawartość kolby zakwaszono z użyciem 1 M HCl do uzyskania czerwonej barwy papierka uniwersalnego. W wyniku tego w kolbie pojawił się osad, który następnie odsączono i przepłukano dużą ilością wody destylowanej. W ten sposób otrzymano produkt **96** w postaci beżowego ciała stałego.

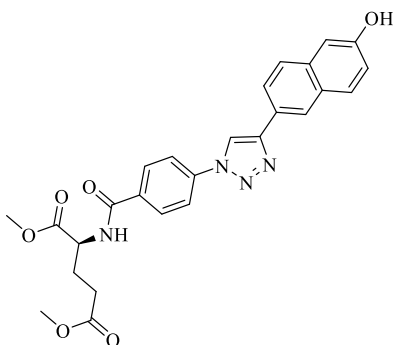


Kwas 4-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoesowy **96**

Wydajność	90%
Temperatura topnienia	> 250 °C °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ_{H} (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,44 (1H, s, CH), 8,37 (1H, s, Ar-H), 8,16 (2H, d, J = 8,7 Hz, Ar-H), 8,07 (2H, d, J = 8,7 Hz, Ar-H), 7,95 (1H, dd, J = 8,5, 1,7 Hz, Ar-H), 7,84 (1H, d, J = 8,9 Hz, Ar-H), 7,80 (1H, d, J = 8,6 Hz, Ar-H), 7,16 (1H, d, J = 2,4 Hz, Ar-H), 7,14 (1H, dd, J = 8,7, 2,4 Hz, Ar-H)
¹³C NMR	δ_{C} (125 MHz, DMSO- _d 6) 167,27, 156,35, 148,35, 139,36, 134,90, 131,43, 130,12, 128,08, 127,28, 124,77, 124,31, 119,84, 119,81, 119,74, 109,26

5.2.8 Procedura otrzymywania (S)-(4-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-yl)benzoilo)glutaminanu dimetylu (**97**)

Do wysuszonej, zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, kolby okrągłodennej wprowadzono 15 mL bezwodnego DMF, związek **96** (1 eq, 2,40 mmol, 0,80 g), chlorowodorek esteru dimetylowego kwasu L-glutaminowego (2 eq, 4,80 mmol, 1,02 g) oraz DIPEA (6 eq, 14,40 mmol, 2,50 mL). Następnie mieszaninę ochłodzono w łaźni lodowej. Po osiągnięciu temp. 0 °C wprowadzono do kolby HOBt (2 eq, 4,80 mmol, 0,65 g) i TBTU (2 eq, 4,80 mmol, 1,54 g). Następnie, reakcję utrzymywano w temp. 0 °C przez 15 minut, a później doprowadzono do temperatury otoczenia. W kolejnym kroku układ reakcyjny mieszano przez 1,5 h w atmosferze gazu obojętnego. Po upływie tego czasu, kolbę umieszczono na wyparce obrotowej w celu pozbycia się rozpuszczalnika. Następnie, zawartość kolby rozpuszczono w octanie etylu i przepłukano kolejno nasyconym roztworem kwasu cytrynowego, nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu oraz solanką, po czym warstwę organiczną wysuszono z wykorzystaniem bezwodnego MgSO₄ i odsączono, a uzyskany przesącz odparowano na rotatorze. Surowy produkt oczyszczano z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie MeOH : DCM (1 : 100) otrzymując oczekiwany produkt **97**.



(S)-(4-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-yl)benzoilo)glutaminanu dimetylu **97**

Wydajność	60%
Temperatura topnienia	233-235 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d ₆) 9,87 (1H, s, OH), 9,45 (1H, s, CH), 8,95 (1H, d, <i>J</i> = 7,4 Hz, NH), 8,37 (1H, d, <i>J</i> = 1,7 Hz, Ar-H), 8,18-8,09 (4H, m, Ar-H), 7,95 (1H, dd, <i>J</i> = 8,5, 1,7 Hz, Ar-H), 7,85 (1H, d, <i>J</i> = 8,8 Hz, Ar-H), 7,81 (1H, d, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H), 7,16 (1H, d, <i>J</i> = 2,4 Hz, Ar-H), 7,13 (1H, dd, <i>J</i> = 8,7, 2,4 Hz, Ar-H), 7,13 (1H, dd, <i>J</i> = 8,7, 2,4 Hz, CH), 3,65 (3H, s, CH ₃), 3,58 (3H, s, CH ₃), 2,21-2,09 (1H, m, CH), 2,14-1,94 (1H, m, CH)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d ₆) 173,13, 172,60, 166,01, 156,27, 148,37, 139,14, 134,90, 133,67, 130,16, 129,79, 128,12, 127,31, 124,79, 124,32, 119,83, 119,80, 119,75, 109,26, 52,51, 52,49, 51,86, 30,39, 26,15

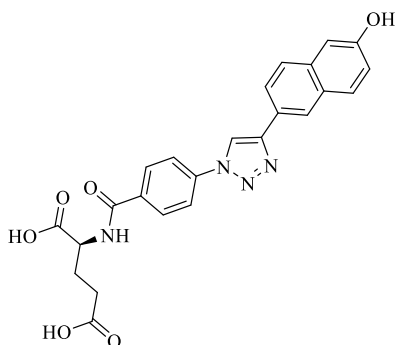
5.2.9 Procedura otrzymywania (S)-(4-(4-(6-(sulfamiloksy)naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminianu dimetylu (**IIA**)

Do suchej okrągłodennej kolby wprowadzono związek **97** (1 eq, 0,25 mmol, 120 mg) oraz 1 mL bezwodnego *N,N*-DMA. Następnie kolbę umieszczono w łaźni lodowej na 10 minut. Po tym czasie do przygotowanej mieszaniny wkroplono 2 M roztwór chlorku sulfamoiłu w ACN (3 eq, 0,75 mmol, 0,38 mL). Po zakończeniu wkraplania usunięto łaźnię lodową i doprowadzono układ do temperatury otoczenia. Następnie, reakcję mieszano w atmosferze gazu obojętnego przez 15 minut. Po tym czasie zawartość kolby przeniesiono do zlewki z wodą, w wyniku czego wytrącił się osad, który odsączono i przemyto zimną wodą destylowaną. Surowy produkt krystalizowano z układu octan etylu : DCM otrzymując produkt **IIA** w postaci jasnożółtego ciała stałego.

Wydajność	80%
Temperatura topnienia	204-206 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,57 (1H, s, CH), 8,96 (1H, d, <i>J</i> = 7,3 Hz, NH), 8,58 (1H, s, Ar-H), 8,18-8,06 (9H, m, ArH, NH ₂), 7,86 (1H, d, <i>J</i> = 2,3 Hz, Ar-H), 7,48 (1H, dd, <i>J</i> = 8,9, 2,4 Hz, Ar-H), 4,54-4,48 (1H, m, CH), 3,66 (3H, s, CH ₃), 3,58 (3H, s, CH ₃), 2,21-2,10 (1H, m, CH), 2,09-1,99 (1H, m, CH)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d 6) 173,13, 172,60, 166,00, 148,51, 147,75, 139,07, 133,82, 133,47, 131,90, 130,49, 129,82, 129,16, 128,18, 124,96, 124,12, 122,90, 120,70, 119,95, 119,76, 52,50, 51,87, 30,39, 26,15
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 568,1502, zmierzone: 568,2371

5.2.10 Procedura otrzymywania kwasu (S)-(4-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-yl)benzoilo)glutaminowego (**98**)

Do okrągłodennej kolby, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, wprowadzono pochodną **97** (1 eq, 0,51 mmol, 250 mg), 50 mL wody, 50 mL MeOH oraz wodorotlenek litu (10 eq, 5,10 mmol, 123 mg). Następnie całość doprowadzono do temperatury 50 °C i w tych warunkach pozostawiono na 2,5 h. Po tym czasie, korzystając z wyparki obrotowej zredukowano ilość rozpuszczalników. Następnie, zawartość kolby zakwaszono z użyciem 1M HCl do uzyskania czerwonej barwy papierka uniwersalnego. W wyniku tego w kolbie pojawił się osad, który następnie odsączono i przepłukano dużą ilością wody destylowanej. W ten sposób otrzymano produkt **98** w postaci beżowego ciała stałego.

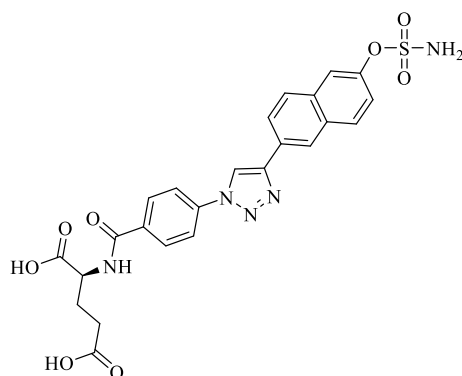


Kwas (S)-4-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1H-1,2,3-triazolo-1-yl)benzoilo)glutaminowy **98**

Wydajność	92%
Temperatura topnienia	235-237 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO-d ₆) 12,47 (2H, bs, COOH), 9,92 (1H, s, OH), 9,46 (1H, s, CH), 8,82 (1H, d, <i>J</i> = 7,6 Hz, NH), 8,37 (1H, s, Ar-H), 8,17-8,08 (4H, m, Ar-H), 7,95 (1H, dd, <i>J</i> = 8,5, 1,8 Hz, Ar-H), 7,84 (1H, d, <i>J</i> = 8,8 Hz, Ar-H), 7,80 (1H, d, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H), 7,16 (1H, d, <i>J</i> = 2,3 Hz, Ar-H), 7,13 (1H, dd, <i>J</i> = 8,8, 2,4 Hz, Ar-H), 4,43 (1H, ddd, <i>J</i> = 9,8, 7,6, 4,9 Hz, CH), 2,38 (2H, t, <i>J</i> = 7,5 Hz, CH ₂), 2,17-2,06 (1H, m, CH), 2,02-1,91 (1H, m, CH)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO-d ₆) 174,30, 173,76, 165,90, 156,30, 148,36, 139,03, 134,89, 134,01, 130,14, 129,75, 128,10, 127,30, 124,79, 124,32, 119,80, 119,76, 109,26, 52,55, 30,91, 26,39

5.2.11 Procedura otrzymywania kwasu (S)-4-(4-(6-(sulfamilo)ksynaftaleno-2-ylo)-1H-1,2,3-triazolo-1-yl)benzoilo)glutaminowego (**IIB**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej wprowadzono związek **99** (1 eq, 0,22 mmol, 103 mg) oraz 1 mL bezwodnego *N,N*-DMA. Następnie kolbę umieszczono w łaźni lodowej na 10 minut. Po tym czasie do przygotowanej mieszaniny wkroplono 2 M roztwór chlorku sulfamiloilu w ACN (3 eq, 0,66 mmol, 0,33 mL). Po zakończeniu wkraplania usunięto łaźnię lodową i doprowadzono układ do temperatury otoczenia. Następnie, reakcję mieszano w atmosferze gazu obojętnego przez 15 minut. Po tym czasie zawartość kolby przeniesiono do zlewki z wodą, w wyniku czego wytrącił się osad, który odsączono i przemyto zimną wodą destylowaną. Surowy produkt krystalizowano z układu octan etylu : heksan otrzymując produkt **IIB** w postaci jasnobrązowego ciała stałego.

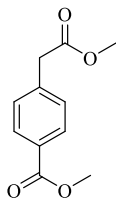


Kwas (S)-(4-(4-(6-(sulfamiloxy)naftaleno-2-ylo)-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminowy **11B**

Wydajność	86%
Temperatura topnienia	196-198°C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,55 (1H, s, CH), 8,81 (1H, d, <i>J</i> = 7,4 Hz, NH), 8,57 (1H, s, Ar-H), 8,17-8,05 (9, m, Ar-H, NH ₂), 7,85 (1H, s, Ar-H), 7,48 (1H, dd, <i>J</i> = 8,9, 2,4 Hz, Ar-H), 4,48-4,38 (1H, m, CH), 2,38 (2H, t, <i>J</i> = 7,4 Hz, CH ₂), 2,17-2,07 (1H, m, CH), 2,02 -1,94 (1H, m, CH)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d 6) 174,29, 173,76, 165,92, 148,50, 147,74, 134,15, 133,47, 131,90, 130,49, 129,78, 129,16, 124,97, 124,12, 122,89, 120,70, 119,92, 119,80, 119,75, 52,51, 37,89, 34,93, 30,84, 26,34, 21,86
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 540,1118 , zmierzone: 540,2037

5.2.12 Procedura otrzymywania 4-(2-metoksy-2-oksoetylo)benzoesanu metylu (**100**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej, zaopatrzonej w rurkę z chlorkiem wapnia, wprowadzono kwas 4-(karboksymetylo)benzoesowy (1 eq, 16,70 mmol) oraz 60 mL bezwodnego MeOH. Następnie cały układ reakcyjny umieszczono w łaźni z lodem. Po osiągnięciu temp. 0 °C rozpoczęto ostrożne wkraplanie chlorku tionylu (2,5 eq, 41,75 mmol). Po zakończeniu wkraplania, łaźnię lodową usunięto, a reakcję mieszano w temperaturze pokojowej przez 12 h. Po tym czasie odparowano rozpuszczalnik z wykorzystaniem rotatora, by następnie do kolby dodać trzy porcje świeżego metanolu, które ponownie zostały oparowane, uzyskując w taki sposób czysty produkt **100** w postaci żółtego oleju.

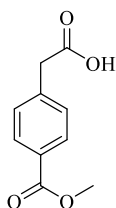


4-(2-Metoksy-2-oksoetylo)benzoesanu metylu **100**

Wydajność	98%
Temperatura topnienia	olej
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 7,89 (2H, d, <i>J</i> = 7,9 Hz, Ar-H), 7,40 (2H, d, <i>J</i> = 7,9 Hz, Ar-H), 3,82 (3H, s, CH ₃), 3,77 (2H, s, CH ₂), 3,60 (3H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d 6) 200,80, 200,72, 171,51, 166,49, 140,36, 130,26, 129,61, 128,65, 52,49, 52,25, 21,15, 14,48

5.2.13 Procedura otrzymywania kwasu 2-(4-(metoksykarbonylo)fenylo)octowego (**101**)

Do okrągłodennej kolby wprowadzono K₂CO₃ (1,1 eq, 17,60 mmol, 2,43 g), 10 mL wody oraz 10 mL MeOH. Po uzyskaniu klarownego roztworu do mieszaniny wprowadzono związek **100** (1 eq, 16,00 mmol, 2,88 g). Całość mieszano przez 24 h w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu, mieszaninę rozpuszczalników odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość znajdującą się w kolbie zalano wodą i ekstrahowano z wykorzystaniem octanu etylu. Warstwy organiczne połączono ze sobą, wysuszono z wykorzystaniem MgSO₄ i odparowano na rotatorze odzyskując nieprzereagowany substrat. Następnie zakwaszono warstwę wodną stosując 1 M roztwór HCl. W następnym kroku, ponownie przeprowadzono ekstrakcję z wykorzystaniem octanu etylu, a uzyskaną w ten sposób fazę organiczną wysuszono i odparowano otrzymując produkt **101** w postaci białego ciała stałego.



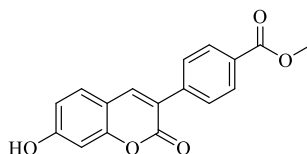
2-(4-(Metoksykarbonylo)fenylo)octowy **101**

Wydajność	65%
Temperatura topnienia	111-112 °C
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 7,91 (2H, d, <i>J</i> = 8,3 Hz, Ar-H), 7,42 (2H, d, <i>J</i> = 8,3 Hz, Ar-H), 3,85 (3H, s, CH ₃), 3,69 (2H, s, CH ₂)

¹³C NMR	δ_c (125 MHz, DMSO- _{d6}) 172,56, 166,56, 141,10, 130,30, 129,52, 128,41, 52,51, 40,93
---------------------------	---

5.2.14 Procedura otrzymywania 4-(7-hydroksy-2-okso-2*H*-chromeno-3-ylo)benzoesanu metylu (**102**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną oraz rurkę z chlorkiem wapnia, wprowadzono związek **101** (1 eq, 5,15 mmol, 1,00 g) oraz 10 mL suchego DCM. Następnie ostrożnie wkropiono chlorek tionylu (2,5 eq, 12,88 mmol, 0,94 mL). Mieszaninę reakcyjną doprowadzono do temperatury wrzenia i mieszano w tych warunkach przez 5 h. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a zawartość kolby zalano trzema porcjami świeżego DCM i ponownie odparowano je z wykorzystaniem rotatora. Następnie do kolby dodano 2,4-dihydroksybenzaldehyd (1 eq, 5,15 mmol, 0,71 g), K₂CO₃ (4 eq, 20,60 mmol, 2,85 g) oraz 15 mL acetonu. W kolejnym kroku, mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 12 h. Następnie ponownie odparowano rozpuszczalnik i wykonano ekstrakcję z wykorzystaniem octanu etylu. Fazy organiczne połączono, wysuszono bezwodnym MgSO₄ i odparowano rozpuszczalnik uzyskując czysty produkt **102** w postaci żółtego ciała stałego.



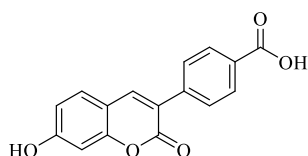
4-(7-Hydroksy-2-okso-2*H*-chromeno-3-ylo)benzoesan metylu **102**

Wydajność	80%
Temperatura topnienia	199-201 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ_H (500 MHz, DMSO- _{d6}) 10,74 (1H, bs, OH), 8,31 (1H, s, Ar-H), 8,02 (2H, d, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H), 7,88 (2H, d, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H), 7,64 (1H, d, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H), 6,85 (1H, dd, <i>J</i> = 8,5, 2,3 Hz, Ar-H), 6,78 (1H, d, <i>J</i> = 2,1 Hz, Ar-H), 3,90 (3H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ_c (125 MHz, DMSO- _{d6}) 166,35 162,19, 160,01, 155,62, 142,66, 140,12, 130,62, 129,41, 129,17, 128,98, 121,21, 114,01, 112,29, 102,18, 52,62

5.2.15 Procedura otrzymywania kwasu 4-(7-hydroksy-2-okso-2*H*-chromeno-3-ylo)benzoesowego (**103**)

Do kolby okrągłodennej, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, wprowadzono pochodną **101** (1eq, 3,36 mmol, 1,00 g), 35 mL wody, 35 mL MeOH oraz wodorotlenek litu (10 eq, 33,60 mmol, 0,80 g). Następnie całość doprowadzono do temperatury 50 °C i mieszając w tych warunkach pozostawiono na 2,5 h. Po tym czasie, korzystając z wyparki obrotowej

zredukowano ilość rozpuszczalników. W kolejnym kroku, zawartość kolby zakwaszono z użyciem 1 M HCl do uzyskania czerwonej barwy papierka uniwersalnego. W wyniku tego w kolbie pojawił się osad, który następnie odsączono i przepłukano dużą ilością wody destylowanej. Surowy produkt oczyszczano z wykorzystaniem kolumny preparatywnej w układzie DCM : MeOH : CH₃COOH (100 : 5 : 1). W ten sposób otrzymano produkt **102** w postaci jasnożółtego ciała stałego.

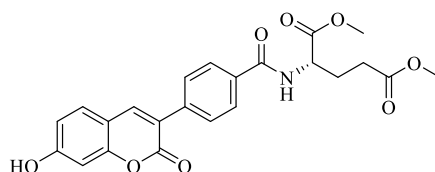


Kwas 4-(7-Hidroksy-2-okso-2*H*-chromeno-3-ylo)benzoesowy **103**

Wydajność	86%
Temperatura topnienia	> 250 °C
¹ H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 13,01 (1H, bs, COOH), 10,70 (1H, bs, OH), 8,27 (1H, s, Ar-H), 7,97 (2H, d, <i>J</i> = 8,5 Hz, Ar-H), 7,82 (2H, d, <i>J</i> = 8,5 Hz, Ar-H), 7,61 (1H, d, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H), 6,82 (1H, dd, <i>J</i> = 8,4, 2,3 Hz, Ar-H), 6,75 (1H, d, <i>J</i> = 2,2 Hz, Ar-H)
¹³ C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d 6) 167,52, 162,19, 160,37, 155,58, 142,59, 139,82, 130,74, 130,39, 129,47, 128,72, 121,42, 114,04, 112,31, 102,23

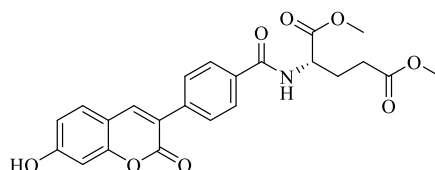
5.2.16 Procedura otrzymywania (S)-(4-(7-hydroksy-2-okso-2*H*-chromeno-3-ylo)benzoilo)glutaminianu dimetylu (**104**) oraz (S)-(4-(7-hydroksy-2-okso-2*H*-chromeno-3-ylo)benzoilo)glutaminianu di-*tert*-butylu (**105**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej, zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, wprowadzono 15 mL bezwodnego DMF, związek **103** (1eq, 2,40 mmol, 0,68 g), chlorowodorek esteru dimetylowego kwasu L-glutaminowego (2 eq, 4,80 mmol, 1,02 g) lub chlorowodorek estru di-*tert*-butylowego kwasu L-glutaminowego (2 eq, 4,80 mmol, 1,42 g) oraz DIPEA (6 eq, 14,40 mmol, 2,50 mL). Następnie mieszaninę ochłodzono w łaźni lodowej. Po osiągnięciu temp. 0 °C wprowadzono do kolby HOBt (2 eq, 4,80 mmol, 0,65 g) i TBTU (2eq, 4,80 mmol, 1,54 g). W kolejnym kroku, reakcję utrzymywano w temp. 0 °C przez 15 minut, a później doprowadzono do temperatury otoczenia. Następnie układ reakcyjny mieszano przez 1,5 h w atmosferze gazu obojętnego. Po upływie tego czasu, kolbę umieszczono na wyparce obrotowej w celu pozbycia się rozpuszczalnika, a uzyskaną zawartość kolby rozpuszczono w octanie etylu i przepłukano kolejno nasyconym roztworem kwasu cytrynowego, nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu oraz solanką, po czym warstwę organiczną wysuszone z wykorzystaniem bezwodnego MgSO₄, odsączono i odparowano na rotatorze. Surowy produkt **104** lub **105** oczyszczano z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie MeOH : DCM (1 : 100).



(*S*)-4-(7-Hydroksy-2-okso-2*H*-chromeno-3-ylo)benzoilo)glutaminianu dimetylu **104**

Wydajność	78%
Temperatura topnienia	122-124 °C
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 10,69 (1H, bs, OH), 8,81 (1H, d, <i>J</i> = 7,4 Hz, NH), 7,93 (2H, d, <i>J</i> = 8,5 Hz, Ar-H), 7,81 (2H, d, <i>J</i> = 8,5 Hz, Ar-H), 7,62 (1H, d, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H), 6,83 (1H, dd, <i>J</i> = 8,5, 2,3 Hz, Ar-H), 6,76 (1H, d, <i>J</i> = 2,2 Hz, Ar-H), 4,52-4,41 (1H, m, CH), 3,64 (3H, s, CH ₃), 3,57 (3H, s, CH ₃), 2,46 (2H, t, <i>J</i> = 7,7 Hz, CH ₂), 2,18-2,07 (1H, m, CH), 2,07-1,93 (1H, m, CH)
¹³C NMR	δ _c (125 MHz, DMSO- _d 6) 173,14, 172,68, 166,66, 166,59, 162,03, 160,31, 155,55, 142,34, 138,61, 133,19, 130,71, 128,50, 127,79, 121,58, 113,97, 112,34, 102,19, 52,44, 52,41, 51,85, 30,39, 26,14, 24,91

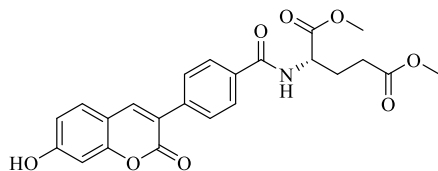


(*S*)-4-(7-Hydroksy-2-okso-2*H*-chromeno-3-ylo)benzoilo)glutaminianu dimetylu **104**

Wydajność	64%
Temperatura topnienia	101-102 °C
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 10,69 (1H, bs, OH), 8,65 (1H, d, <i>J</i> = 7,6 Hz, NH), 8,26 (1H, s, Ar-H), 7,92 (2H, d, <i>J</i> = 8,1 Hz, Ar-H), 7,80 (2H, <i>J</i> = 8,1 Hz, Ar-H), 7,62 (1H, <i>J</i> = 8,5 Hz, Ar-H), 6,82 (1H, dd, <i>J</i> = 8,5, 2,3 Hz, Ar-H), 6,75 (1H, d, <i>J</i> = 2,3 Hz, Ar-H), 4,33 (1H, ddd, <i>J</i> = 9,8, 7,4, 5,0 Hz, CH), 2,34 (2H, t, <i>J</i> = 7,5 Hz, CH ₂), 2,10-1,98 (1H, m, CH), 1,97-1,85 (1H, m, CH), 1,40 (9H, s, CH ₃), 1,37 (9H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ _c (125 MHz, DMSO- _d 6) 172,00, 171,52, 166,69, 162,03, 160,34, 155,56, 142,32, 138,48, 133,53, 130,71, 128,48, 127,76, 121,63, 113,98, 112,36, 102,19, 81,08, 80,26, 52,97, 31,82, 28,18, 28,12, 26,37

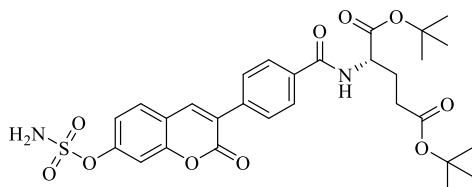
5.2.17 Procedura otrzymywania (S)-(4-(2-okso-7-(sulfamoiloksy)-2H-chromeno-3-ylo)benzoilo)glutaminianu dimetylu (**IIIA**) oraz (S)-(4-(2-okso-7-(sulfamoiloksy)-2H-chromeno-3-ylo)benzoilo)glutaminianu di-*tert*-butylu (**106**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej wprowadzono związek **104** (1 eq, 0,63 mmol, 277 mg) lub **105** (1 eq, 0,38 mmol, 199 mg) oraz 1 mL bezwodnego *N,N*-DMA. Następnie kolbę umieszczono w łaźni lodowej na 10 minut. Po tym czasie do przygotowanej mieszaniny wkroplono 2 M roztwór chlorku sulfamoilu w ACN (3 eq, 1,89 mmol lub 1,14 mmol, 0,95 mL lub 0,57 mL). Po zakończeniu wkrapiania usunięto łaźnię lodową i doprowadzono układ do temp. otoczenia. Następnie, reakcja mieszana była w atmosferze gazu obojętnego przez 15 minut. Po tym czasie zawartość kolby przeniesiono do zlewki z wodą, w wyniku czego wytrącił się osad, który odsączono i przemyto zimną wodą destylowaną. Surowy produkt krystalizowano z układu octan etylu : DCM otrzymując produkt **IIIA** lub **106**.



(S)-(4-(7-Hydroksy-2-okso-2H-chromeno-3-ylo)benzoilo)glutaminianu dimetylu **104**

Wydajność	77%
Temperatura topnienia	144-146 °C
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) 8,85 (1H, d, <i>J</i> = 7,4 Hz, NH), 8,39 (1H, s, Ar-H), 8,27 (2H, s, NH ₂), 7,96 (2H, d, <i>J</i> = 8,2 Hz, Ar-H), 7,84 (2H, d, <i>J</i> = 8,2 Hz, Ar-H), 4,53-4,42 (1H, m, CH), 3,64 (3H, s, CH ₃), 3,57 (3H, s, CH ₃), 2,50-2,43 (2H, m, CH ₂), 2,18-2,08 (1H, m, CH), 2,05-1,98 (1H, m, CH)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) 172,96, 172,51, 166,92, 159,94, 154,06, 152,44, 140,97, 138,69, 133,77, 130,16, 128,99, 127,67, 125,60, 118,85, 118,19, 52,61, 51,43, 30,71, 25,99
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 519,1073, zmierzone: 519,1868



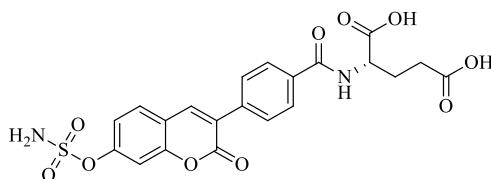
(S)-(4-(2-Okso-7-(sulfamoiloksy)-2H-chromeno-3-ylo)benzoilo)glutaminianu di-*tert*-butylu **106**

Wydajność	81%
Temperatura topnienia	155-157 °C
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) 8,69 (1H, d, <i>J</i> = 7,5 Hz, NH), 8,39 (1H,

	s, Ar-H), 8,26 (2H, bs, NH ₂), 7,95 (2H, d, <i>J</i> = 8,0 Hz, Ar-H), 7,89 (1H, d, <i>J</i> = 8,5 Hz, Ar-H), 7,84 (2H, d, <i>J</i> = 8,0 Hz, Ar-H), 7,37 (1H, s, Ar-H), 7,30 (1H, d, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H), 4,39-4,28 (1H, m, CH), 2,34 (t, <i>J</i> = 7,6 Hz, 2H), 2,04 (1H, dq, <i>J</i> = 13,6, 7,1 Hz, CH), 1,92 (1H, dq, <i>J</i> = 14,8, 8,0 Hz, CH), 1,40 (9H, s, CH ₃), 1,38 (9H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ _c (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) 172,00, 171,49, 166,62, 159,69, 154,02, 152,77, 141,17, 137,79, 134,18, 130,53, 128,91, 127,83, 126,00, 119,17, 118,19, 109,91, 81,10, 80,26, 52,99, 31,82, 28,18, 28,11, 26,37
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 603,2012, zmierzone: 603,4749

5.2.18 Procedura otrzymywania kwasu (S)-(4-(2-okso-7-(sulfamoiloksy)-2*H*-chromeno-3-ylo)-benzoilo)glutaminowego (**IIIB**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej wprowadzono związek **106** (1eq, 0,41 mmol, 247 mg), 4,1 mL TFA oraz 12,3 mL DCM. Całość mieszano przez 3 h w temp. pokojowej. Po tym czasie, lotne składniki mieszaniny odparowano z użyciem wyparki obrotowej. Następnie zawartość kolby zalano trzykrotnie świeżym DCM, który później odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując czysty produkt **IIIB**.

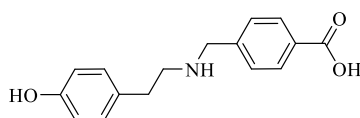


Kwas (S)-(4-(2-Okso-7-(sulfamoiloksy)-2*H*-chromeno-3-ylo)benzoilo)glutaminowy **IIIB**

Wydajność	86%
Temperatura topnienia	168-170 °C
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) 12,26 (2H, s, COOH), 8,70 (1H, d, <i>J</i> = 7,6 Hz, NH), 8,38 (1H, s, Ar-H), 8,28 (2H, bs, NH ₂), 7,96 (2H, d, <i>J</i> = 7,9 Hz, Ar-H), 7,96 (1H, d, <i>J</i> = 7,9 Hz, Ar-H), 7,84 (2H, d, <i>J</i> = 8,0 Hz, Ar-H), 7,37 (1H, s, Ar-H), 7,30 (1H, d, <i>J</i> = 8,5 Hz, Ar-H), 4,55-4,22 (1H, m, CH), 2,36 (2H, t, <i>J</i> = 7,5 Hz, CH ₂), 2,18-2,02 (1H, m, CH), 2,03-1,90 (1H, m, Ar-H)
¹³C NMR	δ _c (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) 174,35, 173,85, 166,51, 159,69, 154,02, 152,75, 141,15, 137,77, 134,19, 130,53, 128,53, 127,82, 126,00, 119,17, 118,19, 109,91, 52,45, 30,86, 26,37
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 491,0760, zmierzone: 491,1546

5.2.19 Procedura otrzymywania kwasu 4-(((4-hydroksyfenylo)amino)metylo)benzoesowego (**109**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej, zabezpieczonej przed dostępem wilgoci rurką z chlorkiem wapnia, wprowadzono 4-karboksybenzaldehyd **108** (1 eq, 21,31 mmol, 3,20 g), tyraminę (0,85 eq, 18,11 mmol, 2,48 g) oraz 75 mL bezwodnego MeOH. Następnie mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temp. 0 °C w łaźni z lodem. Po osiągnięciu tej temperatury ostrożnie wkropiono roztwór cyjanoborowodoru sodu (1,3 eq, 27,70 mmol, 1,74 g) w 25 mL suchego MeOH. Po zakończeniu wkrapiania, łaźnię z lodem usunięto, a układ w temperaturze pokojowej mieszano przez 12 h. Po tym czasie odsączono powstały osad i przemyto go kilkukrotnie zimnym MeOH uzyskując czysty, oczekiwany produkt **109** w postaci białego ciała stałego.

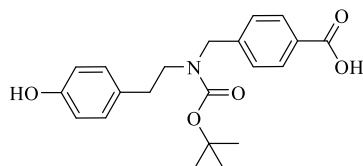


Kwas 4-(((4-hydroksyfenylo)amino)metylo)benzoesowy **109**

Wydajność	81%
Temperatura topnienia	> 250 °C
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _{d6}) 9,60-8,70 (1H, bs, OH), 7,85 (2H, d, <i>J</i> = 8,2 Hz, Ar-H), 7,39 (2H, d, <i>J</i> = 8,2 Hz, Ar-H), 6,95 (2H, d, <i>J</i> = 8,4 Hz, Ar-H), 6,63 (2H, d, <i>J</i> = 8,5 Hz, Ar-H), 3,79 (2H, s, CH ₂), 2,70-2,64 (2H, m, CH ₂), 2,64-2,58 (2H, m, CH ₂)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _{d6}) 198,41, 167,84, 155,90, 130,67, 129,81, 129,60, 128,32, 115,49, 52,78, 51,01, 35,23

5.2.20 Procedura otrzymywania kwasu 4-(((*tert*-butoksykarbonylo)(4-hydroksyfenylo)-amino)metylo)benzoesowego (**110**)

Do kolby okrągłodennej wprowadzono NaOH (2,1 eq, 7,75 mmol, 0,31 g) oraz 7,8 mL wody. Następnie do tak przygotowanego roztworu dodano związek **109** (1 eq, 3,69 mmol, 1,00 g). W kolejnym kroku ochłodzono całość z wykorzystaniem łaźni lodowej by później wkropić roztwór diwęglanu di-*tert*-butylu (1,2 eq, 4,42 mmol, 0,97 g) w 10,3 mL THF. Po zakończeniu wkrapiania, usunięto łaźnię lodową, doprowadzono układ reakcyjny do temp. otoczenia i mieszano go przez 12 h w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu, rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie do zawartości kolby dodano wodę oraz eter dietylowy i przeprowadzono ekstrakcję. Fazę wodą zakwaszono roztworem kwasu cytrynowego do pH ok. 4. Później ponownie wykonano ekstrakcję, w tym przypadku wykorzystując octan etylu jako fazę organiczną, którą następnie wysuszono z wykorzystaniem bezwodnego MgSO₄. Po przesaczeniu i odparowaniu rozpuszczalnika z użyciem rotatora, uzyskano czysty związek **110**.

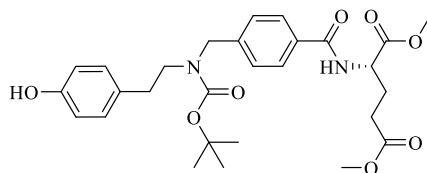


Kwas 4-(((*tert*-butoksykarbonylo)(4-hydroksyfenylo)amino)metylo)benzoesowy **110**

Wydajność	90%
Temperatura topnienia	168-172 °C
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,00-8,75 (1H, bs, OH), 7,89 (2H, d, <i>J</i> = 8,2 Hz, Ar-H), 7,31 (2H, d, <i>J</i> = 8,2 Hz, Ar-H), 7,31 (2H, d, <i>J</i> = 8,2 Hz, Ar-H), 6,93 (2H, d, <i>J</i> = 8,4 Hz, Ar-H), 6,66 (2H, d, <i>J</i> = 8,5 Hz, Ar-H), 4,38 (2H, s, CH ₂), 3,31 (2H, t, <i>J</i> = 7,5 Hz, CH ₂), 2,63 (2H, t, <i>J</i> = 7,5 Hz, CH ₂), 1,37 (9H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d 6) 171,95, 171,55, 166,85, 156,12, 155,40, 142,67, 133,14, 133,10, 133,05, 130,01, 129,45, 128,08, 127,62, 127,19, 115,62, 81,08, 80,12, 79,22, 52,87, 49,23, 49,09, 31,75, 28,24, 28,10, 26,26

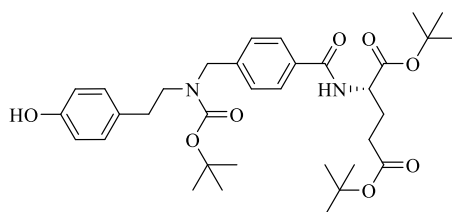
5.2.21 Procedura otrzymywania (*S*)-(4-(((*tert*-butoksykarbonylo)(4-hydroksyfenylo)amino)metylo)benzoilo)glutaminianu dimetylu (**111**) oraz (*S*)-(4-(((*tert*-butoksykarbonylo)(4-hydroksyfenylo)amino)metylo)benzoilo)glutaminianu di-*tert*-butylu (**113**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej, zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, wprowadzono 15 mL bezwodnego DMF, związek **110** (1eq, 1,35 mmol, 0,50 g), chlorowodorek esteru dimetylowego kwasu L-glutaminowego (2 eq, 2,70 mmol, 0,57 g) lub chlorowodorek estru di-*tert*-butylowego kwasu L-glutaminowego (2 eq, 2,70 mmol, 0,80 g) oraz DIPEA (6 eq, 8,10 mmol, 1,40 mL). W kolejnym kroku, mieszaninę ochłodzono w łaźni lodowej. Po osiągnięciu temp. 0 °C wprowadzono do kolby HOBt (2 eq, 2,70 mmol, 0,36 g) i TBTU (2 eq, 2,70 mmol, 0,87 g). Następnie, reakcję utrzymywano w temp. 0 °C przez 15 minut, a później doprowadzono do temp. otoczenia. W kolejnym kroku, układ reakcyjny mieszano przez 1,5 h w atmosferze gazu obojętnego. Po upływie tego czasu, kolbę umieszczono na wyparce obrotowej w celu pozbycia się rozpuszczalnika. Następnie, zawartość kolby rozpuszczono w octanie etylu i przepłukano kolejno nasyconym roztworem kwasu cytrynowego, nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu oraz solanką, po czym warstwę organiczną wysuszono z wykorzystaniem MgSO₄, przesączono i odparowano na rotatorze. Surowy produkt oczyszczano z wykorzystaniem chromatografii typu Flash jako eluentu używając mieszaniny octan etylu : heksan (1 : 1), uzyskując czysty produkt **111** lub **113**.



(S)-4-(((*Tert*-butoxycarbonyl)(4-hydroksyfenylo)amino)metylo)benzoilo)glutaminian dimetylu **111**

Wydajność	45%
Temperatura topnienia	olej
¹H NMR	δ_{H} (500 MHz, DMSO- d_6) 8,88 (1H, s, OH), 8,45 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, NH), 7,82 (2H, d, $J = 8,2$ Hz, Ar-H), 7,30 (2H, d, $J = 8,1$ Hz, Ar-H), 6,93 (2H, d, $J = 8,3$ Hz, Ar-H), 6,66 (2H, d, $J = 8,3$ Hz, Ar-H), 4,49 (1H, td, $J = 8,5, 5,6$ Hz, CH), 4,38 (2H, s, CH ₂), 3,64 (3H, s, CH ₃), 3,58 (3H, s, CH ₃), 3,30 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, CH ₂), 2,64 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, CH ₂), 2,43 (2H, t, $J = 7,6$ Hz, CH ₂), 2,13 (1H, qt, $J = 21,1, 10,5$ Hz, CH), 2,03 (1H, ddd, $J = 16,4, 14,4, 7,3$ Hz, CH), 1,38 (9H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ_{C} (125 MHz, DMSO- d_6) 172,99, 172,44, 166,96, 159,21, 155,29, 142,92, 133,17, 133,21, 129,88, 129,59, 128,05, 127,48, 115,74, 79,40, 65,18, 52,40, 52,13, 51,65, 49,13, 30,57, 28,53, 26,42

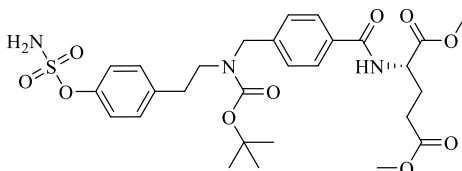


(S)-4-(((*Tert*-butoxycarbonyl)(4-hydroksyfenylo)amino)metylo)benzoilo)glutaminian di-*tert*-butylu **113**

Wydajność	52%
Temperatura topnienia	olej
¹H NMR	δ_{H} (500 MHz, DMSO- d_6) 9,17 (1H, s, OH), 8,54 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, NH), 7,82 (2H, d, $J = 7,8$ Hz, Ar-H), 7,29 (2H, d, $J = 7,8$ Hz, Ar-H), 7,01-6,85 (2H, m, Ar-H), 6,65 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, Ar-H), 4,42-4,33 (2H, m, CH ₂), 4,33-4,26 (1H, m, CH), 3,33-3,27 (1H, m, CH), 3,26-3,20 (1H, m, CH), 2,66-2,54 (2H, m, CH ₂), 2,31 (2H, t, $J = 8,0$ Hz, CH ₂), 2,07-1,96 (1H, m, CH), 1,95-1,81 (1H, m, CH), 1,38 (9H, s, CH ₃), 1,36-1,32 (18 H, bs, CH ₃)
¹³C NMR	δ_{C} (125 MHz, DMSO- d_6) 171,97, 171,51, 166,87, 156,14, 155,32, 142,71, 133,14, 133,11, 131,56, 129,99, 129,41, 128,10, 127, 62, 127,22, 115,51, 81,05, 80,21, 79,27, 52,98, 31, 84, 28,39, 28,14, 28,09, 26,35

5.2.22 Procedura otrzymywania (S)-4-((*tert*-butoksykarbonylo)(4-(sulfamoksy)fenetylo)-amino)metylo)benzoilo)glutaminianu dimetylu (**112**) lub (S)-4-((*tert*-butoksykarbonylo)(4-(sulfamoksy)fenetylo)amino)metylo)benzoilo)glutaminianu di-*tert*-butylu (**114**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej wprowadzono związek **111** (1 eq, 0,38 mmol, 200 mg) lub **113** (1 eq, 0,33 mmol, 200 mg) oraz 1 mL bezwodnego *N,N*-DMA. Następnie kolbę umieszczono w łaźni lodowej na 10 minut. Po tym czasie do przygotowanej mieszaniny wkroplono 2 M roztwór chlorku sulfamoylu w ACN (3 eq, 1,14 mmol lub 0,99 mmol, 0,57 mL lub 0,50 mL). Po zakończeniu wkraplania usunięto łaźnię lodową i doprowadzono układ do temp. otoczenia. Następnie, reakcję mieszano w atmosferze gazu obojętnego przez 15 minut. Po tym czasie zawartość kolby przeniesiono do zlewki z wodą, w wyniku czego wytrącił się osad, który odsączono i przemyto zimną wodą destylowaną. Surowy produkt oczyszczano za pomocą chromatografii typu Flash jako eluentu używając mieszaniny octan etylu : heksan (3 : 7) uzyskując czysty produkt **112** lub **114**.



(S)-4-((*Tert*-butoksykarbonylo)(4-(sulfamoksy)fenetylo)amino)metylo)benzoilo)glutaminian dimetylu **112**

Wydajność

83%

Temperatura topnienia

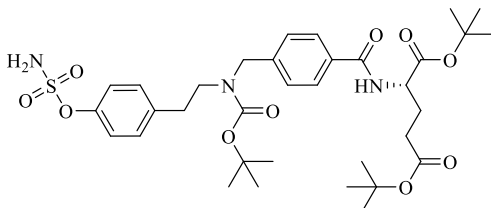
olej

¹H NMR

δ_H (500 MHz, DMSO- d_6) 8,46 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, NH), 7,83 (2H, d, $J = 8,2$ Hz, Ar-H), 7,70 (2H, s, NH₂), 7,31 (1H, d, $J = 8,1$ Hz, Ar-H), 7,22 (2H, d, $J = 7,5$ Hz, Ar-H), 7,18 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 4,55-4,46 (1H, m, CH), 4,42 (2H, s, CH₂), 3,65 (3H, s, CH₃), 3,58 (3H, s, CH₃), 3,38 (2H, t, $J = 7,6$ Hz, CH₂), 2,77 (2H, t, $J = 7,6$ Hz, CH₂), 2,43 (2H, t, $J = 7,9$ Hz, CH₂), 2,22-2,09 (1H, m, CH), 2,08-1,98 (1H, m, CH), 1,38 (9H, s, CH₃)

¹³C NMR

δ_C (125 MHz, DMSO- d_6) 173,15, 172,72, 166,90, 149,08, 137,95, 132,83, 130,40, 128,21, 128,12, 127,66, 127,29, 122,45, 115,57, 79,46, 61,02, 52,42, 51,86, 30,20, 28,45, 26,14

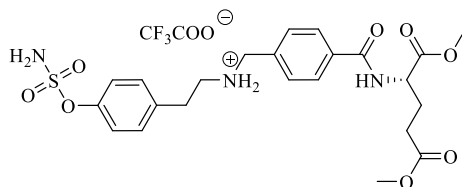


(S)-4-(((*Tert*-butoksykarbonylo)(4-(sulfamoksy)fenetylo)amino)metylo)benzoilo)glutaminian di-*tert*-butylu **114**

Wydajność	79%
Temperatura topnienia	olej
¹ H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 8,55 (1H, d, <i>J</i> = 7,6 Hz, NH), 7,92 (2H, s, NH ₂), 7,83 (2H, d, <i>J</i> = 7,7 Hz, Ar-H), 7,32 (2H, d, <i>J</i> = 7,9 Hz, Ar-H), 7,28-7,20 (2H, m, Ar-H), 7,17 (2H, d, <i>J</i> = 8,3 Hz, Ar-H), 4,42 (2H, d, <i>J</i> = 6,8 Hz, CH ₂), 4,36-4,18 (1H, m, CH), 2,92 (1H, s, CH), 2,83-2,70 (3H, m, CH ₂ CH), 2,31 (3H, t, <i>J</i> = 7,6 Hz, CH ₂), 2,13-1,95 (1H, m, CH), 1,93-1,79 (1H, m, CH)
¹³ C NMR	δ _c (125 MHz, DMSO- _d 6) 171,88, 171,51, 166,94, 148,92, 138,86, 130,34, 128,11, 127,64, 127,25, 81,02, 80,22, 79,51, 52,98, 31,77, 28,38, 28,17, 28,02, 26,32,

5.2.23 Procedura otrzymywania trifluorooctanu (*S*)-*N*-(4-((1,5-dimetoksy-1,5-dioksopentan-2-ylo)karbamoilo)benzoilo)-2-(4-(sulfamiloksy)fenylo)etano-1-aminy (**IVA**) oraz trifluorooctanu (*S*)-*N*-(4-((1,5-di-*tert*-butoksy-1,5-dioksopentan-2-ylo)karbamoilo)benzoilo)-2-(4-(sulfamiloksy)fenylo)etano-1-aminy (**IVB**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej wprowadzono związek **112** (1 eq, 0,25 mmol, 150 mg) lub **114** (1 eq, 0,22 mmol, 150 mg), 2,5 mL TFA oraz 7,5 mL DCM. Całość mieszano przez 1 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, lotne składniki mieszaniny odparowano z użyciem wyparki obrotowej. Następnie zawartość kolby zalano trzykrotnie świeżym DCM, który później odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując czysty produkt **IVA** lub **IVB**.

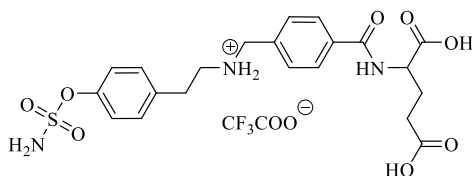


Trifluorooctan (*S*)-*N*-(4-((1,5-dimetoksy-1,5-dioksopentan-2-ylo)karbamoilo)benzoilo)-2-(4-(sulfamiloksy)fenylo)etano-1-aminy **IVA**

Wydajność	96%
Temperatura topnienia	180-181 °C
¹ H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,21 (2H, bs, NH ₂ ⁺), 8,83 (1H, d, <i>J</i> = 7,4 Hz, NH), 7,99 (2H, s, NH ₂), 7,93 (2H, d, <i>J</i> = 8,0 Hz, Ar-H), 7,59 (2H, d, <i>J</i> = 8,2 Hz, Ar-H), 7,31 (2H, d, <i>J</i> = 8,7 Hz, Ar-H), 7,22 (2H, d, <i>J</i> = 8,5 Hz, Ar-H), 4,53-4,38 (1H, m, CH), 4,26 (2H, s, CH ₂), 3,63 (3H, s, CH ₃), 3,56 (3H, s, CH ₃), 3,15 (2H, dd, <i>J</i> = 10,4, 6,4 Hz, CH ₂), 2,96 (2H, dd, <i>J</i> = 10,4, 6,3 Hz, CH ₂), 2,45 (2H, t, <i>J</i> = 7,5 Hz, CH ₂), 2,16-2,06 (1H, m, CH), 2,05-1,92 (1H, m, CH),
¹³ C NMR	δ _c (125 MHz, DMSO- _d 6) 173,10, 172,61, 166,49, 158,82, 158,52, 149,45, 135,85, 135,74, 134,47, 130,36, 130,29, 128,25, 122,83,

HRMS

52,49, 51,81, 50,04, 47,91, 31,35, 30,36, 26,15
[M+H]⁺ obliczone: 508,1748 , zmierzone: 508,2563



Trifluoroctan (S)-N-(4-((1,5-di-*tert*-butoksy-1,5-dioksopentan-2-ylo)karbamoylo)benzoilo)-2-(4-(sulfamilo)ksy)fenylo)etano-1-aminy **IVB**

Wydajność

95%

Temperatura topnienia

164-165 °C

¹H NMR

δ_H (500 MHz, DMSO-_d6) 9,07-9,04 (2H, bs, NH₂⁺), 8,67 (1H, d, *J* = 7,7 Hz, NH), 7,98 (2H, s, NH₂), 7,94 (2H, d, *J* = 8,1 Hz, Ar-H), 7,58 (2H, d, *J* = 8,1 Hz, Ar-H), 7,32 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, Ar-H), 7,23 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, Ar-H), 4,39 (1H, ddd, *J* = 9,9, 7,6, 4,9 Hz, CH), 4,26 (2H, t, *J* = 5,8 Hz, CH₂), 3,15 (2H, q, *J* = 8,4, 6,6 Hz, CH₂), 3,00-2,89 (2H, m, CH₂), 2,34 (2H, t, *J* = 7,5 Hz, CH₂), 2,16-2,04 (1H, m, CH), 2,00-1,87 (1H, m, CH)

¹³C NMR

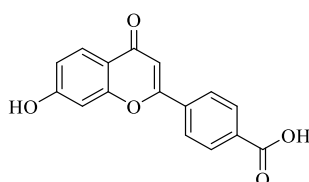
δ_c (125 MHz, DMSO-_d6) 179,78, 178,24, 174,45, 173,91, 166,60, 148,82, 133,45, 130,34, 128,77, 128,76, 127,81, 122,53, 52,67, 51,93, 50,46, 49,84, 34,26, 31,28

HRMS

[M+H]⁺ obliczone: 480,1435 , zmierzone: 480,2153

5.2.24 Procedura otrzymywania kwasu 4-(7-hydroksy-4-oxo-4*H*-chromeno-2-yl)benzoesowego (**118**)

Do kolby okrągłodennej wprowadzono związek **117** (1 eq, 2,03 mmol, 0,6 g) oraz chlorowodorek pirydyny (10 eq, 20,3 mmol, 2,34 g). Całość mieszano przez 5 h w temperaturze 180 °C. Po tym czasie całość ochłodzono do temp. 100 °C i dodano 50 mL. Kolejno otrzymany osad, odsączono, przepukano dużą ilością wody i wysuszono. Surowy produkt rekrystalizowano z wykorzystaniem MeOH uzyskując czysty produkt **118**.



Kwas 4-(7-hydroksy-4-oxo-4*H*-chromeno-2-yl)benzoesowy **118**

Wydajność

68%

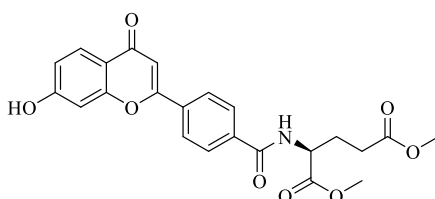
Temperatura topnienia

> 250 °C

¹H NMR	δ _H (400 MHz, DMSO- _d 6) 13,28 (1H, bs, COOH), 10,89 (1H, bs, OH), 8,19 (2H, d, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H), 8,08 (2H, d, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H), 7,90 (1H, d, <i>J</i> = 8,7 Hz, Ar-H), 7,90 (1H, d, <i>J</i> = 8,7 Hz, Ar-H), 7,02 (1H, d, <i>J</i> = 2,2 Hz, Ar-H), 7,00 (1H, s, Ar-H), 6,95 (1H, dd, <i>J</i> = 8,7, 2,3 Hz, Ar-H)
¹³C NMR	δ _C (101 MHz, DMSO- _d 6) 176,80, 167,10, 163,42, 161,26, 158,00, 135,63, 133,56, 130,28, 127,08, 126,85, 116,66, 115,74, 108,35, 103,05

5.2.25 Procedura otrzymywania (S)-(4-(7-hydroksy-4-okso-4*H*-chromeno-2-ylo)benzoilo)-glutaminianu dimetylu (**120**) oraz (S)-(4-(7-hydroksy-4-okso-4*H*-chromeno-2-ylo)-benzoilo)glutaminianu di-*tert*-butylu (**121**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej, zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, wprowadzono 15 mL bezwodnego DMF, związek **119** (1 eq, 1,42 mmol lub 1,35 mmol, 0,40 g lub 0,38 g), chlorowodorek esteru dimetylowego kwasu L-glutaminowego (2 eq, 2,48 mmol, 0,52 g) lub chlorowodorek estru di-*tert*-butylowego kwasu L-glutaminowego (2 eq, 2,70 mmol, 0,80 g) oraz DIPEA (6 eq, 8,52 lub 8,10 mmol, 1,50 mL lub 1,41 mL). Mieszaninę ochłodzono w łaźni lodowej. Po osiągnięciu temp. 0 °C wprowadzono do kolby HOBt (2 eq, 2,48 mmol lub 2,70 mmol, 0,34 g lub 0,36 g) i TBTU (2eq, 2,48 mmol lub 2,70 mmol, 0,80 g lub 0,89 g). Następnie, reakcję utrzymywano w temp. 0 °C przez 15 minut, a później doprowadzono do temperatury otoczenia. W kolejnym kroku układ reakcyjny mieszano przez 3 h w atmosferze gazu obojętnego. Po upływie tego czasu, kolbę umieszczono na wyparce obrotowej w celu pozbycia się rozpuszczalnika. Następnie, zawartość kolby rozpuszczono w octanie etylu i przepłukano kolejno nasyconym roztworem kwasu cytrynowego, nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu oraz solanką, po czym warstwę organiczną wysuszono z wykorzystaniem MgSO₄, przesączono i odparowano na rotatorze. Surowy produkt oczyszczano z wykorzystaniem chromatografii preparatywnej wykorzystując jako eluent mieszaninę DCM : MeOH (100 : 6 lub 100 : 3), uzyskując czysty produkt **120** lub **121**.

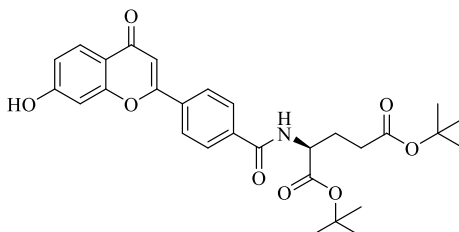


(S)-(4-(7-Hydroksy-4-okso-4*H*-chromeno-2-ylo)benzoilo)glutaminian dimetylu **120**

Wydajność	61%
Temperatura topnienia	164-166 °C
¹H NMR	δ _H (400 MHz, DMSO- _d 6) 10,87 (1H s, OH), 8,97 (1H, d, <i>J</i> = 7,4 Hz, NH), 8,20 (2H, d, <i>J</i> = 8,7 Hz, Ar-H), 8,05 (2H, d, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H), 7,91 (1H, d, <i>J</i> = 8,7 Hz, Ar-H), 7,06-7,02 (2H, m, Ar-H), 6,95 (1H, dd, <i>J</i> = 8,7, 2,3 Hz, Ar-H), 4,51 (1H, ddd, <i>J</i> = 9,6, 7,3,

¹³C NMR

5,3 Hz, CH), 3,67 (2H, s, CH₃), 3,60 (3H, s, CH₃), 2,50-2,42 (2H, m, CH₂), 2,50-2,42 (1H, m, CH), 2,12-1,98 (1H, m, CH)
δ_c (101 MHz, DMSO-d₆) 176,85, 173,19, 172, 62, 166,30, 163,44, 161,31, 158,01, 136,26, 134,45, 128,66, 127,08, 126,56, 116,65, 115,72, 108,04, 103,16, 52,50, 51,84, 30,46, 26,10



(S)-4-(7-Hydrokso-4-okso-4H-chromeno-2-ylo)benzoilo)glutaminian di-*tert*-butylu **121**

Wydajność

86%

Temperatura topnienia

189-190 °C

¹H NMR

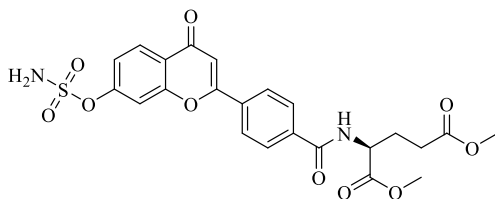
δ_H (400 MHz, DMSO-d₆) 10,84 (1H, s, OH), 8,81 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, NH), 8,20 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, Ar-H), 8,05 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, Ar-H), 7,91 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ar-H), 7,08-7,02 (2H, m, Ar-H), 6,95 (1H, dd, *J* = 8,7, 2,3 Hz, Ar-H), 4,37 (1H, ddd, *J* = 9,8, 7,4, 5,1 Hz, CH), 2,37 (2H, t, *J* = 7,5 Hz, CH₂), 2,18-2,04 (1H, m, CH), 2,01-1,87 (1H, m, CH), 1,43 (9H, s, CH₃), 1,40 (9H, s, CH₃)

¹³C NMR

δ_c (101 MHz, DMSO-d₆) 176,79, 171,96, 171,43, 166,33, 163,36, 161,45, 157,88, 136,47, 134,31, 128,56, 127,015, 126,05, 126,69, 116,65, 115,68, 108,06, 103,11, 81,15, 80,28, 53,14, 31,85, 28,20, 28,12, 26,37

5.2.26 Procedura otrzymywania (S)-4-(4-okso-7-(sulfamoiłoksy)-4H-chromeno-2-ylo)-benzoilo)glutaminianu dimetylu (**VA**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej wprowadzono związek **120** (1 eq, 0,29 mmol, 127 mg) oraz 1 mL bezwodnego *N,N*-DMA. Następnie kolbę umieszczono w łaźni lodowej na 10 minut. Po tym czasie do przygotowanej mieszaniny wdroplono 2 M roztwór chlorku sulfamoiłu w ACN (3 eq, 0,87 mmol, 0,43 mL). Po zakończeniu wkraplania usunięto łaźnię lodową i doprowadzono układ do temperatury otoczenia. Następnie, reakcję mieszało w atmosferze gazu obojętnego przez 15 minut. Po tym czasie zawartość kolby przeniesiono do zlewki z wodą, w wyniku czego pojawiła się warstwa olejowa. W dalszym kroku, przeprowadzono ekstrakcję z wykorzystaniem octanu etylu, a otrzymane warstwy organiczne połączono i wysuszono z wykorzystaniem bezwodnego MgSO₄. Po odsączeniu środka suszącego przesącz odparowano. Otrzymany surowy produkt oczyszczano z wykorzystaniem chromatografii preparatywnej, gdzie eluentem była mieszanina octan etylu : PE (50 : 50), uzyskując w ten sposób oczekiwany produkt **VA**.

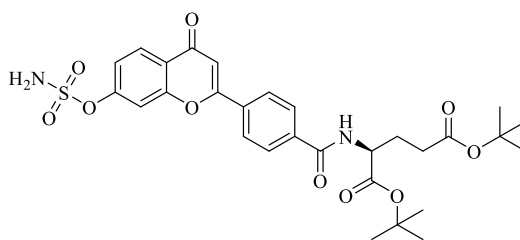


(*S*)-4-(4-(4-Okso-7-(sulfamoiloksy)-4*H*-chromeno-2-ylo)benzoilo)glutaminian dimetylu VA

Wydajność	51%
Temperatura topnienia	150-151 °C
¹H NMR	δ _H (400 MHz, DMSO- _d 6) 8,99 (1H, d, <i>J</i> = 7,4 Hz, NH), 8,35 (2H, s, NH ₂), 8,27 (2H, d, <i>J</i> = 8,7 Hz, Ar-H), 8,15 (1H, d, <i>J</i> = 8,7 Hz, Ar-H), 8,08 (2H, d, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H), 7,79 (1H, d, <i>J</i> = 2,2 Hz, Ar-H), 7,42 (1H, dd, <i>J</i> = 8,7, 2,2 Hz, Ar-H), 7,23 (1H, s, Ar-H), 4,51 (1H, ddd, <i>J</i> = 9,5, 7,3, 5,3 Hz, CH), 3,67 (3H, s, CH ₃), 3,60 (3H, s, CH ₃), 2,50-2,43 (2H, m, CH ₂), 2,25-2,10 (1H, m, CH), 2,10-1,98 (1H, m, CH)
¹³C NMR	δ _c (101 MHz, DMSO- _d 6) 176,81, 173,18, 172,61, 166,20, 162,33, 156,62, 154,49, 136,69, 133,99, 128,62, 127,27, 126,73, 122,06, 120,32, 111,78, 108,62, 52,54, 51,86, 30,41, 26,13
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 519,1073 , zmierzone: 519,1906

5.2.27 Procedura otrzymywania (*S*)-4-(4-okso-7-(sulfamoiloksy)-4*H*-chromeno-2-ylo)-benzoilo)glutaminianu di-*tert*-butylu (**122**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej wprowadzono związek **121** (1 eq, 0,57 mmol, 300 mg) oraz 1 mL bezwodnego *N,N*-DMA. W kolejnym kroku dodano NaH (1 eq, 0,57 mmol). Następnie kolbę umieszczono w łaźni lodowej na 10 minut. Po tym czasie do przygotowanej mieszaniny wkroplono 2 M roztwór chlorku sulfamoilu w ACN (3 eq, 1,71 mmol, 0,86 mL). Po zakończeniu wkraplania usunięto łaźnię lodową i doprowadzono układ do temperatury otoczenia. Następnie, reakcję mieszano w atmosferze gazu obojętnego przez 15 minut. Po tym czasie zawartość kolby przeniesiono do zlewki z wodą, w wyniku czego pojawiła się warstwa olejowa. Kolejno, przeprowadzono ekstrakcję z wykorzystaniem octanu etylu, a uzyskane warstwy organiczne połączono i wysuszono z wykorzystaniem MgSO₄. Po odsączeniu środka suszącego przesącz odparowano. Otrzymany surowy produkt rekrytalizowano z użyciem mieszaniny CH₃Cl : PE otrzymując czysty związek **122**.

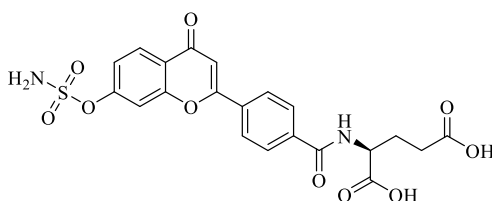


(*S*)-4-(4-Okso-7-(sulfamoyloxy)-4*H*-chromeno-2-ylo)benzoilo)glutaminianu di-*tert*-butylu **122**

Wydajność	56%
Temperatura topnienia	157-158 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) 8,83 (1H, d, <i>J</i> = 7,5 Hz, NH), 8,36 (2H, s, NH ₂), 8,27 (2H, d, <i>J</i> = 8,4 Hz, Ar-H), 8,16 (1H, d, <i>J</i> = 8,7 Hz, Ar-H), 8,08 (2H, d, <i>J</i> = 8,4 Hz, Ar-H), 7,79 (1H, d, <i>J</i> = 2,3 Hz, Ar-H), 7,42 (1H, dd, <i>J</i> = 8,7, 2,3 Hz, Ar-H), 7,22 (1H, s, CH), 4,38 (1H, ddd, <i>J</i> = 9,8, 7,4, 5,1 Hz, CH), 2,37 (2H, t, <i>J</i> = 7,5 Hz, CH ₂), 2,14-2,02 (1H, m, CH), 2,03-1,87 (1H, m, CH), 1,43 (9H, s, CH ₃), 1,40 (9H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ _C (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) 176,92, 172,02, 171,29, 166,19, 162,50, 156,54, 154,48, 136,08, 134,01, 128,74, 127,24, 126,80, 122,07, 120,35, 111,94, 108,49, 81,28, 80,38, 53,01, 31,86, 28,24, 28,13, 29,37
HRMS	[<i>M</i> + <i>H</i>] ⁺ obliczone: 603,2012, zmierzone: 603,2936

5.2.28 Procedura otrzymywania kwasu (*S*)-4-(4-okso-7-(sulfamoyloxy)-4*H*-chromeno-2-ylo)benzoilo)glutaminowego (**VB**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej wprowadzono związek **122** (1eq, 0,23 mmol, 140 mg), 2,5 mL TFA oraz 7,5 mL DCM. Całość mieszano przez 3 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, lotne składniki mieszaniny odparowano z użyciem wyparki obrotowej. Następnie do układu dodano Et₂O, po czym umieszczono kolbę w łaźni ultra dźwiękowej przez 5 minut. Ciecz znajdującą się nad osadem zdekantowano, a surowy produkt rekrytalizowano z użyciem ACN otrzymując produkt **VB**.



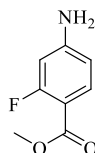
Kwas (*S*)-4-(4-okso-7-(sulfamoyloxy)-4*H*-chromeno-2-ylo)benzoilo)glutaminowy **VB**

Wydajność	61%
Temperatura topnienia	172-175 °C (z rozkładem)

¹H NMR	δ_{H} (400 MHz, DMSO- d_6) 12,40 (2H, bs, OH), 8,85 (1H, d, J = 7,7 Hz, NH), 8,36 (2H, s, NH ₂), 8,27 (2H, d, J = 8,2 Hz, Ar-H), 8,15 (1H, d, J = 8,7 Hz, Ar-H), 8,09 (2H, d, J = 8,3 Hz, Ar-H), 7,79 (1H, d, J = 2,2 Hz, Ar-H), 7,42 (1H, dd, J = 8,7, 2,3 Hz, Ar-H), 7,22 (1H, s, Ar-H), 4,45 (1H, ddd, J = 9,9, 7,6, 4,9 Hz, CH), 2,39 (2H, t, J = 7,5 Hz, CH ₂), 2,27-2,08 (1H, m, CH), 2,06-1,88 (1H, m, CH)
¹³C NMR	δ_{C} (101 MHz, DMSO- d_6) 176,87, 174,29, 173,68, 166,03, 162,41, 156,68, 154,37, 137,01, 133,89, 128,63, 127,22, 126,83, 122,01, 120,37, 112,07, 108,49, 52,49, 30,87, 26,32
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 491,0760, zmierzone: 491,1544

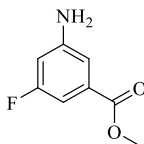
5.2.29 Procedura otrzymywania 4-amino-2-fluorobenzoesu metylu (**124**) oraz 3-amino-5-fluorobenzoesu metylu (**132**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej, zaopatrzonej w rurkę z chlorkiem wapnia, wprowadzono kwas 4-amino-2-fluorobenzoesowy lub kwas 5-amino-2-fluorobenzoesowy (1eq, 19,40 mmol, 2,66 g) oraz 25 mL suchego MeOH. Następnie mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temp. 0 °C z wykorzystaniem łaźni lodowej. Po osiągnięciu tej temperatury, ostrożnie wkroplono chlorek tionylu (3 eq, 58,20 mmol, 4,25 mL). Kolejno, układ reakcyjny doprowadzono do temperatury otoczenia i mieszano przez 12 h. Po zakończeniu reakcji odparowano rozpuszczalnik z wykorzystaniem wyparki obrotowej, a pozostałość w kolbie trzykrotnie zalano świeżą porcją MeOH, którą również usunięto korzystając z rotatora. Następnie przeprowadzono ekstrakcję z roztworem NaHCO₃ oraz octanem etylu. Fazy organiczne połączono, wysuszono z wykorzystaniem MgSO₄ oraz odparowano na rotatorze otrzymując czysty, pożądaný produkt **124** lub **132**.



4-Amino-2-fluorobenzoesau metylu **124**

Wydajność	92%
Temperatura topnienia	108-111 °C
¹H NMR	δ_{H} (500 MHz, DMSO- d_6) 7,58 (1H, t, J = 8,7 Hz, Ar-H), 6,40 (1H, dd, J = 8,7, 2,1 Hz, Ar-H), 6,35-6,25 (3H, m, Ar-H, NH ₂), 3,73 (3H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ_{C} (125 MHz, DMSO- d_6) 163,83 (d, $^1J_{\text{C-F}}$ = 245,7 Hz), 164,52 (d, $^3J_{\text{C-F}}$ = 4,2 Hz), 155,93 (d, $^3J_{\text{C-F}}$ = 12,9 Hz), 133,63 (d, $^3J_{\text{C-F}}$ = 3,2 Hz), 109,80 (d, $^4J_{\text{C-F}}$ = 1,3 Hz), 103, 89 (d, $^2J_{\text{C-F}}$ = 9,9 Hz), 100,01 (d, $^3J_{\text{C-F}}$ = 25,2 Hz), 57,70

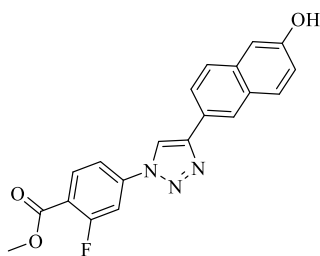


3-Amino-5-fluorobenzoesan metylu **132**

Wydajność	94%
Temperatura topnienia	109-111°C
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 7,04 (1H, dd, <i>J</i> = 2,1, 1,4 Hz, Ar-H), 6,75 (1H, ddd, <i>J</i> = 9,3, 2,4, 1,4 Hz, Ar-H), 6,56 (1H, dt, <i>J</i> = 11,4, 2,3 Hz, Ar-H), 5,77 (2H, bs, NH ₂), 3,81 (3H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ _c (125 MHz, DMSO- _d 6) 166,22 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 3,6 Hz), 163,46 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 240,3 Hz), 151,60 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 11,6 Hz), 132,24 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 10,2 Hz), 111,14 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 1,8 Hz), 104,47 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 24,4 Hz), 102,41 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 23,9 Hz), 52,63

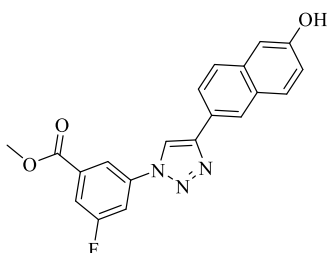
5.2.30 Procedura otrzymywania 2-fluoro-4-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoesanu metylu (**126**) oraz 3-fluoro-5-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoesanu metylu (**134**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej wprowadzono pochodną **124** lub **132** (1 eq, 11,82 mmol, 2,00 g) oraz 50 mL suchego ACN. Następnie cały układ reakcyjny ochłodzono, korzystając z łaźni z lodem, po czym dodano *t*-BuONO (1,2 eq, 14,18 mmol, 1,70 mL) i całość mieszano przez 10 minut w atmosferze gazu obojętnego. Po tym czasie, ostrożnie wkroplono TMSN₃ (1,1 eq, 13,00 mmol, 1,71 mL). Po zakończeniu wkraplania, mieszaninę reakcyjną doprowadzono do temperatury otoczenia i pozostawiono w stanie mieszania przez 1 h. Po tym czasie, do kolby dodano 6-((trimetylosililo)etynylo)naftol **88** (1 eq, 11,82 mmol, 2,56 g) oraz 1 M roztwór TBAF w THF (1,1 eq, 13,00 mmol, 13 mL) i mieszano w temp. 0 °C przez 30 minut. Następnie przygotowano świeży 1 M roztwór askorbinianu sodu (0,2 eq, 2,36 mmol, 0,45 g, V_{H2O} = 2,36 mL) oraz CuSO₄ · 5H₂O (0,1 eq, 1,18 mmol, 0,30 g) po czym dodano je do kolby. Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 12 h. Po upływie tego czasu, w kolbie pojawił się osad, który odsączono i przemyto zimnym ACN otrzymując czysty produkt **126** lub **134**.



2-Fluoro-4-(4-(6-hydroxynaphthalen-2-yl)-1H-1,2,3-triazolo-1-yl)benzoic acid methyl ester **126**

Wydajność	76%
Temperatura topnienia	245-246 °C
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,90 (1H, s, OH), 9,47 (1H, s, CH), 8,34 (1H, s, Ar-H), 8,24-7,66 (6H, m, Ar-H), 7,27-7,09 (2H, m, Ar-H), 3,88 (3H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d 6) 163,57 (d, ³ J _{C-F} = 3,6 Hz), 161,95 (d, ¹ J _{C-F} = 259,1 Hz), 153,36, 148,52, 141,21 (d, ³ J _{C-F} = 10,8 Hz), 134,96, 134,11, 130,19, 128,07, 127,35, 124,47, 124,30 (d, ³ J _{C-F} = 20,3 Hz), 119,81, 117,74 (d, ² J _{C-F} = 10,1 Hz), 115,60 (d, ⁴ J _{C-F} = 3,1 Hz), 109,27, 108,66 (d, ² J _{C-F} = 27,8 Hz), 53,00

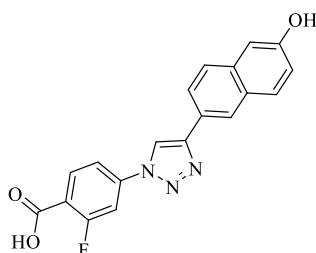


3-Fluoro-5-(4-(6-hydroxynaphthalen-2-yl)-1H-1,2,3-triazolo-1-yl)benzoic acid methyl ester **134**

Wydajność	73%
Temperatura topnienia	>250 °C
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,94 (1H, s, OH), 9,49 (1H, s, CH), 8,35 (2H, s, Ar-H), 8,17 (1H, d, <i>J</i> = 9,2 Hz, Ar-H), 7,92 (1H, d, <i>J</i> = 8,5 Hz, Ar-H), 7,86-7,73 (3H, m, Ar-H), 7,26-7,06 (2H, m, Ar-H), 3,92 (3H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d 6) 164,72 (d, ⁴ J _{C-F} = 3,0 Hz), 162,72 (d, ¹ J _{C-F} = 246,9 Hz), 156,37, 148,46, 138,49 (d, ³ J _{C-F} = 10,4 Hz), 134,94, 133,65 (d, ³ J _{C-F} = 8,7 Hz), 130,16, 128,08, 127,29, 124,58, 124,32, 124,22, 119,87, 119,81, 116,28 (d, ⁴ J _{C-F} = 2,4 Hz), 115,88 (d, ² J _{C-F} = 23,4 Hz), 112,01 (d, ² J _{C-F} = 26,9 Hz), 109,26, 53,54

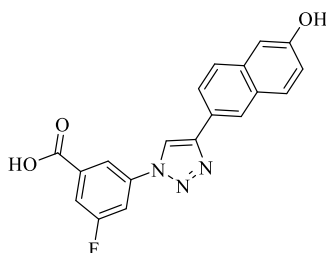
5.2.31 Procedura otrzymywania kwasu 2-fluoro-4-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoowego (**127**) oraz kwasu 3-fluoro-5-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoowego (**135**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, wprowadzono pochodną **126** lub **134** (1eq, 8,26 mmol, 3,00 g), 200 mL wody, 200 mL MeOH oraz wodorotlenek litu (10 eq, 82,60 mmol, 1,98 g). Następnie całość doprowadzono do temperatury 50 °C i w tych warunkach mieszając pozostawiono na 2,5 h. Po tym czasie, korzystając z wyparki obrotowej zredukowano ilość rozpuszczalników. Następnie, zawartość kolby zakwaszono z użyciem 1 M roztworu HCl do uzyskania czerwonej barwy papierka uniwersalnego. W wyniku tego w kolbie pojawił się osad, który następnie odsączono i przepłukano dużą ilością wody destylowanej. W ten sposób otrzymano produkt **127** lub **135**.



Kwas 2-fluoro-4-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoowy **127**

Wydajność	96%
Temperatura topnienia	248-246 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) 13,51 (1H, bs, COOH), 9,91 (1H, s, OH), 9,50 (1H, s, CH), 8,37 (1H, s, Ar-H), 8,14 (1H, t, <i>J</i> = 8,2 Hz, Ar-H), 8,03 (1H, dd, <i>J</i> = 11,5, 2,1 Hz, Ar-H), 7,99 (1H, dd, <i>J</i> = 8,5, 2,1 Hz, Ar-H), 7,94 (1H, dd, <i>J</i> = 8,5, 1,7 Hz, Ar-H), 7,85 (2H, dd, <i>J</i> = 18,2, 8,7 Hz, Ar-H), 7,18 (1H, d, <i>J</i> = 2,3 Hz, Ar-H), 7,15 (1H, dd, <i>J</i> = 8,7, 2,4 Hz, Ar-H)
¹³C NMR	δ _c (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) 164,67 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 3,4 Hz), 162,12 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 258,3 Hz), 156,37, 148,53, 140,95 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 10,8 Hz), 134,99, 134,32, 130,23, 128,11, 127,40, 124,55, 124,34 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 17,5 Hz), 119,92, 119,86, 119,17 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 10,4 Hz), 115,62 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 3,7 Hz), 109,29, 108,74 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 27,8 Hz)

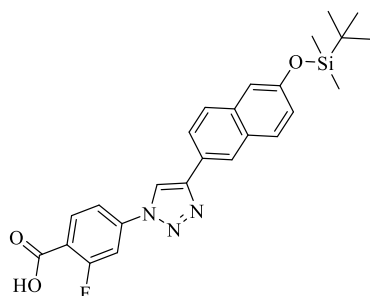


Kwas 3-fluoro-5-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoowy **135**

Wydajność	96%
Temperatura topnienia	226-228 °C (z rozkładem)
¹ H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 13,73 (1H, bs, COOH), 9,96 (1H, s, OH), 9,54 (1H, s, CH), 8,37 (2H, d, <i>J</i> = 8,1 Hz, Ar-H), 8,17 (1H, d, <i>J</i> = 8,9 Hz, Ar-H), 7,94 (1H, d, <i>J</i> = 8,3 Hz, Ar-H), 7,83 (1H, d, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H), 7,78 (2H, dd, <i>J</i> = 12,8, 8,8 Hz, Ar-H), 7,29-7,11 (2H, m, Ar-H)
¹³ C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d 6) 165,77 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2,5 Hz), 162,74 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 246,4 Hz), 156,35, 148,44, 138,43 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 10,4 Hz), 135,18 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 8,3 Hz), 134,92, 130,92, 128,08, 127,30, 124,63, 124,35, 124,23, 119,98, 119,83, 116,53 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2,0 Hz), 116,00 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 22,7 Hz), 111,70 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 27,0 Hz), 109,28

5.2.32 Procedura otrzymywania kwasu 4-(4-(6-((*tert*-butylodimetylosililo)oksy)naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)-2-fluorobenzoowego (**128**) oraz kwasu 3-(4-(6-((*tert*-butylodimetylosililo)oksy)naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)-5-fluorobenzoowego (**136**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej wprowadzono związek **127** lub **135** (1 eq, 5,96 mmol, 2,00 g), TMSCl (3 eq, 17,88 mmol, 1,94 g), TEA (3 eq, 17,88 mmol, 2,50 mL) oraz 120 mL bezwodnego DMF. Całość mieszano przez 12 h w temperaturze pokojowej w atmosferze gazu obojętnego. Po upływie tego czasu do kolby dodano 100 mL 1 M roztworu HCl. Następnie przeprowadzono ekstrakcję z wykorzystaniem octanu etylu. Kolejno warstwy organiczne połączono, wysuszono z wykorzystaniem MgSO₄, przesączono, a rozpuszczalnik organiczny odparowano z wykorzystaniem rotatora. Surowy produkt oczyszczono z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej z użyciem mieszaniny DCM : MeOH (100 : 5) jako eluentu uzyskując w ten sposób oczekiwany produkt **128** lub **136**.

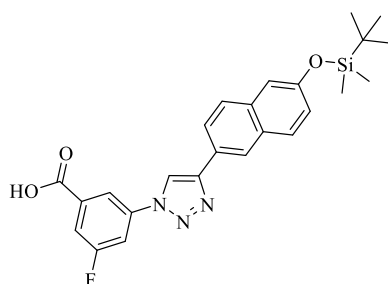


Kwas 4-(4-(6-((*tert*-butylodimetylosililo)oksy)naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)-2-fluorobenzoowy **128**

Wydajność	88%
Temperatura topnienia	> 250 °C
¹ H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 13,58 (1H, bs, COOH), 9,55 (1H, s, CH), 8,44 (1H, s, Ar-H), 8,14 (1H, t, <i>J</i> = 8,2 Hz, Ar-H), 8,03

¹³C NMR

(1H, dd, $J = 11,5, 2,1$ Hz, Ar-H), 8,01-7,98 (2H, m, Ar-H), 7,97-7,92 (2H, m, Ar-H), 7,35 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, Ar-H), 7,18 (1H, dd, $J = 8,8, 2,5$ Hz, Ar-H), 1,00 (9H, s, CH₃), 0,27 (3H, s, CH₃)
 δ_c (125 MHz, DMSO-*d*₆) 164,69 (d, $^3J_{C-F} = 3,0$ Hz), 162,09 (d, $^1J_{C-F} = 258,4$ Hz), 153,90, 148,32, 140,87 (d, $^3J_{C-F} = 10,9$ Hz), 134,62, 134,30, 130,33, 129,30, 128,06, 125,80, 124,32 (d, $^3J_{C-F} = 20,1$ Hz), 123,05, 120,25, 119,38 (d, $^2J_{C-F} = 10,1$ Hz), 115,62 (d, $^4J_{C-F} = 3,3$ Hz), 115,09, 108,76 (d, $^2J_{C-F} = 28,0$ Hz), 26,05, 18,48, -4,00



Kwas 3-(4-(6-((*tert*-butylodimetylosililo)oksy)naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)-5-fluorobenzoesowy **136**

Wydajność

80%

Temperatura topnienia

241-242 °C

¹H NMR

δ_H (500 MHz, DMSO-*d*₆) 13,85 (1H, bs, COOH), 9,60 (1H, s, CH), 8,42 (1H, s, Ar-H), 8,37 (1H, s, Ar-H), 8,20 (1H, d, $J = 9,3$ Hz, Ar-H), 8,02 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, Ar-H), 7,98 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 7,97-7,90 (2H, m, Ar-H), 7,34 (1H, d, $J = 1,9$ Hz, Ar-H), 7,17 (1H, dd, $J = 8,8, 2,2$ Hz, Ar-H), 1,00 (9H, s, CH₃), 0,27 (6H, s, CH₃)

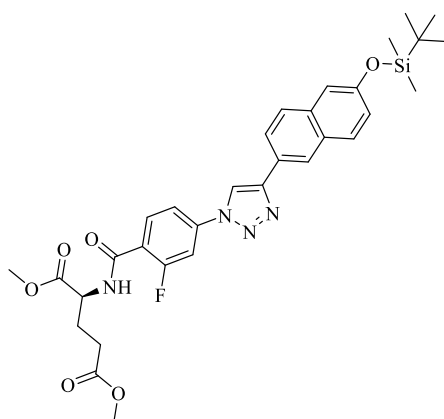
¹³C NMR

δ_c (125 MHz, DMSO-*d*₆) 165,79 (d, $^4J_{C-F} = 2,9$ Hz), 162,75 (d, $^1J_{C-F} = 246,3$ Hz), 153,84, 128,24, 138,45, 138,37, 135,39 (d, $^3J_{C-F} = 8,1$ Hz), 134,56, 130,28, 129,30, 127,98, 125,90, 124,39, 124,18, 123,00, 120,31, 116,61, 116,07 (d, $^2J_{C-F} = 22,3$ Hz), 115,06, 111,72 (d, $^2J_{C-F} = 26,8$ Hz), 26,03, 18,46, -4,02

5.2.33 Ogólna procedura otrzymywania pochodnych estrowych (S)-(4-(4-(6-((*tert*-butylodimetylosililo)oksy)naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)-2-fluorobenzo-ilo)glutaminianu (**129A-E**) oraz pochodnych estrowych (S)-(3-(4-(6-((*tert*-butylodimetylosililo)oksy)-naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)-5-fluorobenzo-ilo)glutaminianu (**137G-K**)

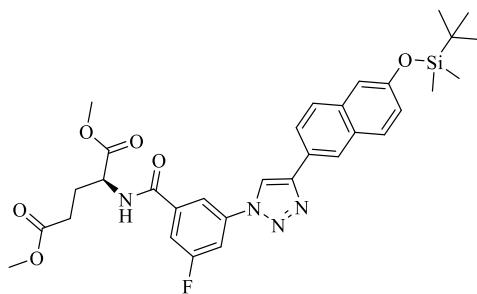
Do wysuszonej kolby okrągłodennej, zabezpieczonej przed dostępem wilgoci, wprowadzono 15 mL bezwodnego DMF, związek **128** lub **136** (1eq, 1,08 mmol), odpowiedni chlorowodorek esteru kwasu L-glutaminowego (2 eq, 2,16 mmol) oraz DIPEA (6 eq, 6,48 mmol). Mieszaninę ochłodzono w łaźni lodowej. Po osiągnięciu temperatury 0 °C

wprowadzono do kolby HOBt (2 eq, 2,16 mmol) i TBTU (2eq, 2,16 mmol). Następnie, reakcję utrzymywano w temperaturze 0 °C przez 15 minut, a później doprowadzono do temperatury otoczenia. W kolejnym kroku układ reakcyjny mieszano przez 3 h w atmosferze gazu obojętnego. Po upływie tego czasu, kolbę umieszczono na wyparce obrotowej w celu pozbycia się rozpuszczalnika. Następnie, zawartość kolby rozpuszczono w octanie etylu i przepłukano kolejno nasyconym roztworem kwasu cytrynowego, nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu oraz solanką, po czym warstwę organiczną wysuszono z wykorzystaniem MgSO_4 przesączono i odparowano na rotatorze. Surowy produkt oczyszczano z wykorzystaniem chromatografii preparatywnej stosując jako eluent mieszaninę DCM : MeOH (100 : 1), uzyskując czysty produkt **129A-E** lub **137G-K**.



(S)-(4-(4-(6-((*Tert*-butylodimetylosililo)oksy)naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)-2-fluorobenzoylo)glutaminian dimetylu **129A**

Wydajność	56%
Temperatura topnienia	168-170 °C
^1H NMR	δ_{H} (500 MHz, DMSO-d_6) 9,51 (1H, s, CH), 8,90 (1H, d, $J = 7,0$ Hz, NH), 8,44 (1H, s, Ar-H), 8,06-7,92 (5H, m, Ar-H), 7,88 (1H, t, $J = 8,0$ Hz, Ar-H), 7,35 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, Ar-H), 7,17 (1H, dd, $J = 8,8, 2,4$ Hz, Ar-H), 4,54 (1H, ddd, $J = 9,5, 7,5, 5,1$ Hz, CH), 3,70 (3H, s, CH_3), 3,62 (3H, s, CH_3), 2,50-2,48 (2H, m, CH_2), 2,20-2,11 (1H, m, CH), 2,09-1,96 (1H, m, CH), 1,00 (9H, s, CH_3), 0,27 (6H, s, CH_3)
^{13}C NMR	δ_{C} (125 MHz, DMSO-d_6) 173,09, 172,22, 163,69, 160,07 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 251,2$ Hz), 153,91, 148,30, 139,57 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 10,6$ Hz), 134,63, 132,32, 132,29, 130,32, 129,32, 128,04, 125,88, 124,42, 124,24, 123,59 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 14,7$ Hz), 123,05, 120,26, 115,88 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 3,3$ Hz), 115,10, 108,30 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 27,9$ Hz), 52,57, 52,36, 51,89, 30,22, 26,24, 26,05, 18,48, -3,99



(*S*)-3-(4-(6-((*Tert*-butylodimetylosililo)oksy)naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)-5-fluorobenzoilo)glutaminian dimetylu **137G**

Wydajność

62%

Temperatura topnienia

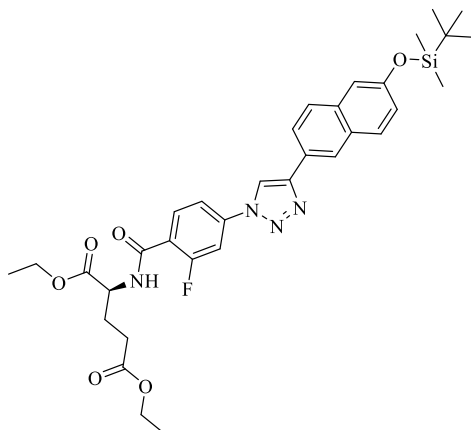
140-144 °C

¹H NMR

δ_H (500 MHz, DMSO-*d*₆) 9,49 (1H, s, CH), 9,11 (1H, d, *J* = 7,3 Hz, NH), 8,45 (1H, s, Ar-H), 8,39 (1H, s, Ar-H), 8,11 (1H, d, *J* = 9,2 Hz, Ar-H), 7,99 (1H, dd, *J* = 8,6, 1,2 Hz, Ar-H), 7,95-7,88 (2H, m, Ar-H), 7,84 (1H, d, *J* = 8,7 Hz, Ar-H), 7,32 (1H, d, *J* = 1,9 Hz, Ar-H), 7,14 (1H, dd, *J* = 8,9, 2,2 Hz, Ar-H), 4,56-4,46 (1H, m, CH), 3,66 (3H, s, CH₃), 3,57 (3H, s, CH₃), 2,50 (2H, m, CH₂), 2,21-2,10 (1H, m, CH), 2,04 (1H, m, CH), 0,97 (9H, s, CH₃), 0,24 (6H, s, CH₃)

¹³C NMR

δ_C (125 MHz, DMSO-*d*₆) 173,10, 172,35, 164,73 (d, ⁴*J*_{C-F} = 2,5 Hz), 162,65 (d, ¹*J*_{C-F} = 246,0 Hz), 153,84, 148,20, 138,33 (d, ³*J*_{C-F} = 10,7 Hz), 137,58 (d, ³*J*_{C-F} = 7,9 Hz), 134,56, 130,29, 129,29, 128,01, 125,87, 124,39, 124,29, 123,01, 120,38, 115,43 (d, ⁴*J*_{C-F} = 2,7 Hz), 115,06, 114,72 (d, ²*J*_{C-F} = 23,0 Hz), 110,80 (d, ²*J*_{C-F} = 26,6 Hz), 52,67, 52,56, 51,86, 30,33, 26,10, 26,06, 18,45, -4,02



(*S*)-4-(4-(6-((*Tert*-butylodimetylosililo)oksy)naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)-2-fluorobenzoilo)glutaminian dietylu **129B**

Wydajność

64%

Temperatura topnienia

170-172 °C

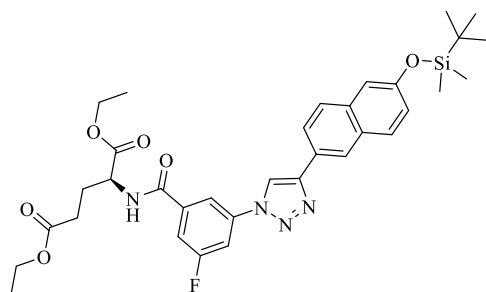
¹H NMR

δ_H (500 MHz, DMSO-*d*₆) 9,52 (1H, s, CH), 8,88 (1H, d, *J* = 7,3 Hz, NH), 8,45 (1H, s, Ar-H), 8,07-7,91 (5H, m, ar-H), 7,87 (1H,

¹³C NMR

t, $J = 8,0$ Hz, Ar-H), 7,35 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, Ar-H), 7,18 (1H, dd, $J = 8,8$, $2,4$ Hz, Ar-H), 4,54-4,46 (1H, m, CH), 4,16 (2H, qd, $J = 7,1$, $2,8$ Hz, CH₂), 4,08 (2H, q, $J = 7,1$ Hz, CH₂), 2,50-2,46 (2H, m, CH₂), 2,20-2,10 (1H, m, CH), 2,05-1,95 (1H, m, CH), 1,23 (3H, t, $J = 7,1$ Hz, CH₃), 1,20 (3H, t, $J = 7,1$ Hz, CH₃), 1,01 (9H, s, CH₃), 0,28 (6H, s, CH₃)

δ_c (125 MHz, DMSO-d₆) 172,60, 171,72, 163,72, 160,04 (d, $^1J_{C-F} = 251,3$ Hz), 153,89, 148,28, 139,51 (d, $^3J_{C-F} = 10,6$ Hz), 136,62, 132,24 (d, $^3J_{C-F} = 3,8$ Hz), 130,31, 129,32, 128,04, 125,88, 124,43, 124,23, 123,69 (d, $^2J_{C-F} = 14,9$ Hz), 120,25, 115,87 (d, $^4J_{C-F} = 3,2$ Hz), 115,09, 108,29 (d, $^2J_{C-F} = 27,8$ Hz), 61,22, 60,45, 52,17, 30,34, 26,20, 26,05, 18,47, 14,55, 14,51, -3,99



(*S*)-3-(4-(6-((*Tert*-butylodimetylosililo)oksy)naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)-5-fluorobenzoilo)glutaminian dietylu **137H**

Wydajność

59%

Temperatura topnienia

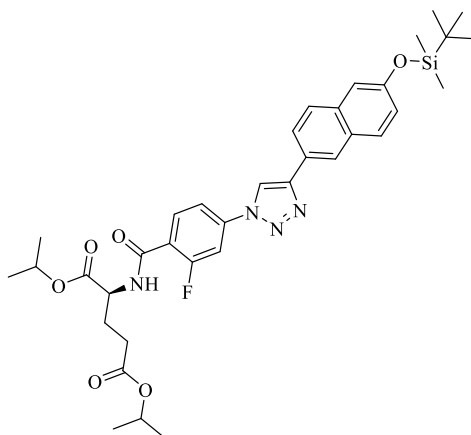
136-138 °C

¹H NMR

δ_H (500 MHz, DMSO-d₆) 9,53 (1H, s, CH), 9,11 (1H, d, $J = 7,3$ Hz, NH), 8,46 (1H, d, s, Ar-H), 8,43 (1H, d, s, Ar-H), 8,14 (1H, dt, $J = 9,3$, $2,1$ Hz, Ar-H), 8,02 (1H, dd, $J = 8,6$, $1,6$ Hz, Ar-H), 7,95 (2H, dd, $J = 8,8$, $5,2$ Hz, Ar-H), 7,88 (1H, dd, $J = 8,7$, $1,7$ Hz, Ar-H), 7,35 (1H, d, $J = 2,3$ Hz, Ar-H), 7,18 (1H, dd, $J = 8,8$, $2,4$ Hz, Ar-H), 4,51 (1H, ddd, $J = 9,5$, $7,2$, $5,4$ Hz, CH), 4,15 (2H, tt, $J = 7,1$, $3,6$ Hz, CH₂), 4,07 (2H, q, $J = 7,1$ Hz, CH₂), 2,50-2,49 (2H, m, CH₂), 2,16 (1H, tt, $J = 13,3$, $6,7$ Hz, CH), 2,05 (1H, ddd, $J = 16,8$, $14,3$, $7,4$ Hz, CH), 1,22 (3H, t, $J = 7,1$ Hz, CH₃), 1,18 (3H, t, $J = 7,1$ Hz, CH₃), 1,00 (9H, s, CH₃), 0,27 (6H, s, CH₃)

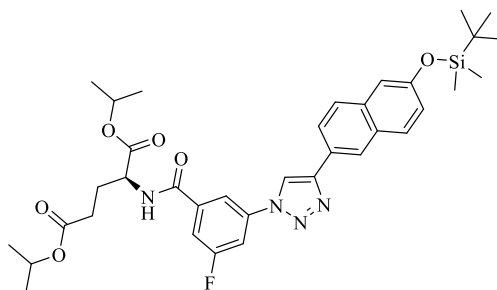
¹³C NMR

δ_c (125 MHz, DMSO-d₆) 172,62, 171,91, 164,77 (d, $^4J_{C-F} = 2,5$ Hz), 162,68 (d, $^1J_{C-F} = 246,1$ Hz), 153,86, 148,22, 138,36 (d, $^3J_{C-F} = 10,5$ Hz), 137,69 (d, $^3J_{C-F} = 8,0$ Hz), 134,59, 130,30, 129,32, 128,01, 125,91, 124,42, 124,21, 123,01, 120,38, 115,44 (d, $^4J_{C-F} = 2,4$ Hz), 125,07, 114,71 (d, $^2J_{C-F} = 23,1$ Hz), 110,76 (d, $^2J_{C-F} = 26,9$ Hz), 61,22, 60,45, 52,80, 30,60, 26,14, 26,03, 18,47, 14,54, -4,01



(S)-4-(4-(6-((*Tert*-butylodimetylosililo)oksy)naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)-2-fluorobenzoilo)glutaminian di-izo-propylu **129C**

Wydajność	61%
Temperatura topnienia	100-102 °C
¹H NMR	δ_{H} (500 MHz, DMSO- d_6) 9,51 (1H, s, CH), 8,84 (1H, d, J = 8,0 Hz, NH), 8,45 (1H, s, Ar-H), 8,05-8,01 (1H, m, Ar-H), 8,00 (1H, dd, J = 5,2, 1,9 Hz, Ar-H), 7,98-7,93 (3H, m, Ar-H), 7,86 (1H, t, J = 8,0 Hz, Ar-H), 7,35 (1H, d, J = 2,4 Hz, Ar-H), 7,18 (1H, dd, J = 8,8, 2,5 Hz, Ar-H), 5,02-4,92 (1H, m, CH), 4,96-4,86 (1H, m, CH), 4,44 (1H, ddd, J = 9,6, 7,4, 5,2 Hz, CH), 2,47-2,41 (2H, m, CH ₂), 2,17-2,06 (1H, m, CH), 2,02-1,91 (1H, m, CH), 1,24 (6H, t, J = 6,6 Hz, CH ₃), 1,20 (6H, d, J = 6,2 Hz, CH ₃), 1,01 (9H, s, CH ₃), 0,28 (6H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ_{C} (125 MHz, DMSO- d_6) 172,08, 141,22 163,69, 160,01 (d, $^1J_{\text{C-F}}$ = 249,9 Hz), 153,90, 148,27, 139,48 (d, $^3J_{\text{C-F}}$ = 10,5 Hz) 134,62, 132,19, 132,16, 130,32, 129,33, 128,05, 124,43, 124,23, 123,81 (d, $^2J_{\text{C-F}}$ = 15,1 Hz), 123,05, 120,28, 115,91 (d, $^4J_{\text{C-F}}$ = 3,4 Hz), 108,33 (d, $^2J_{\text{C-F}}$ = 27,6 Hz), 68,69, 67,75, 52,58, 30,71, 26,20, 26,07, 22,06, 22,00, 21,96, 18,49, -3,97



(S)-3-(4-(6-((*Tert*-butylodimetylosililo)oksy)naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)-5-fluorobenzoilo)glutaminian di-izo-propylu **137I**

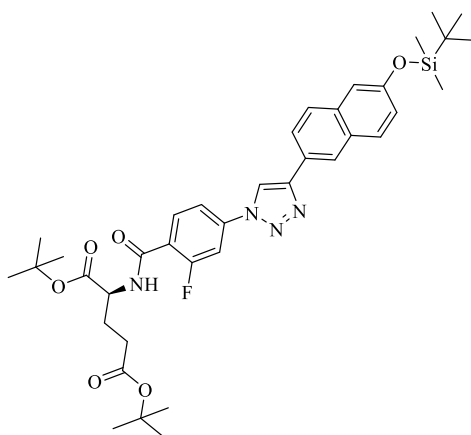
Wydajność	63%
Temperatura topnienia	89-90 °C

¹H NMR

δ_H (500 MHz, DMSO- d_6) 9,60 (1H, s, OH), 8,48 (1H, s, CH), 8,02 (2H, dt, $J = 38,8, 1,41$ Hz, Ar-H), 7,93 (1H, dd, $J = 7,4, 1,5$ Hz, Ar-H), 7,89 (1H, dt, $J = 7,8, 1,4$ Hz, Ar-H), 7,77 (1H, dd, $J = 7,5, 1,4$ Hz, Ar-H), 7,59 (1H, dd, $J = 7,5, 1,4$ Hz, Ar-H), 7,43 (1H, dd, $J = 7,5, 1,4$ Hz, Ar-H), 7,29 (1H, dt, $J = 8,1, 1,6$ Hz, Ar-H), 7,15 (1H, t, $J = 1,5$ Hz, Ar-H), 4,95-4,90 (1H, m, CH), 4,90-4,83 (1H, m, CH), 4,31 (1H, t, $J = 7,6$ Hz, CH), 2,47 (2H, t, $J = 5,3$ Hz, CH₂), 2,42-2,36 (1H, m, CH), 2,35-2,28 (1H, m, CH), 1,38 (6H, d, $J = 5,5$ Hz, CH₃), 1,34 (6H, d, $J = 5,5$ Hz, CH₃), 1,07 (9H, s, CH₃), 0,30 (9H, s, CH₃)

¹³C NMR

δ_C (125 MHz, DMSO- d_6) 174,13, 174,04, 166,87 (d, $^4J_{C-F} = 3,7$ Hz), 162,05 (d, $^1J_{C-F} = 262,3$ Hz), 156,10, 154,59, 138,56 (d, $^3J_{C-F} = 6,7$ Hz), 135,94 (d, $^3J_{C-F} = 6,7$ Hz), 134,82, 131,43, 130,95, 128,89, 128,46, 123,95, 122,06, 120,07, 119,50, 118,72, 115,44 (d, $^2J_{C-F} = 27,7$ Hz), 114,26, 112,58 (d, $^2J_{C-F} = 26,7$ Hz), 71,33, 70,05, 53,97, 30,67, 25,96, 25,66, 22,55, 18,48, -0,98



(S)-4-(4-(6-((*Tert*-butyldimetylosililo)oksy)naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)-2-fluorobenzoilo)glutaminian di-*tert*-butylu
129D

Wydajność

62%

Temperatura topnienia

111-113 °C

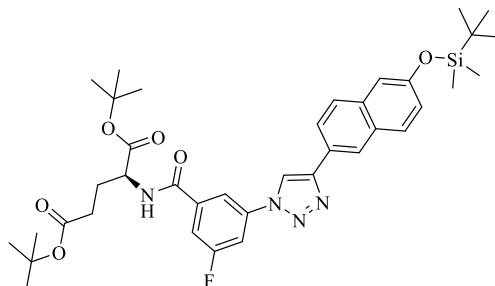
¹H NMR

δ_H (500 MHz, DMSO- d_6) 9,50 (1H, s, CH), 8,75 (1H, d, $J = 6,1$ Hz, NH), 8,42 (1H, s, Ar-H), 8,07-7,89 (5H, m, Ar-H), 7,84 (1H, t, $J = 8,0$ Hz, Ar-H), 7,32 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, Ar-H), 7,15 (1H, dd, $J = 8,8, 2,4$ Hz, Ar-H), 4,35 (1H, ddd, $J = 9,7, 7,4, 5,0$ Hz, CH), 2,41-2,26 (2H, m, CH₂), 2,13-1,98 (1H, m, CH), 1,96-1,81 (1H, m, CH), 1,43 (9H, s, CH₃), 1,39 (9H, s, CH₃), 0,98 (9H, s, CH₃), 0,25 (6H, s, CH₃)

¹³C NMR

δ_C (125 MHz, DMSO- d_6) 171,93, 170,98, 163,61, 160,00 (d, $^1J_{C-F} = 251,1$ Hz), 153,87, 148,25, 139,42 (d, $^3J_{C-F} = 10,6$ Hz), 134,60, 132,19 (d, $^4J_{C-F} = 4,1$ Hz), 130,31, 129,31, 128,03, 125,87, 124,40, 124,20, 123,88 (d, $^2J_{C-F} = 14,9$ Hz), 123,03, 120,25,

115,83 (d, $^4J_{C-F} = 3,4$ Hz), 115,08, 108,25 (d, $^2J_{C-F} = 27,7$ Hz), 81,31, 80,29, 52,97, 31,58, 28,19, 28,08, 26,38, 26,03, 18,46



(S)-3-(4-(6-((*Tert*-butylodimetylosilo)oksy)naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)-5-fluorobenzoilo)glutaminian di-*tert*-butylu **137J**

Wydajność

63%

Temperatura topnienia

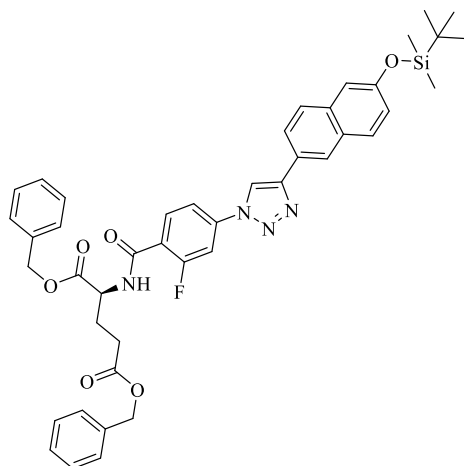
99-102 °C

^1H NMR

δ_{H} (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9,50 (1H, s, CH), 8,95 (1H, d, $J = 7,4$ Hz, NH), 8,43 (1H, s, Ar-H), 8,39 (1H, s, Ar-H), 8,11 (1H, dt, $J = 9,3, 2,2$ Hz, Ar-H), 7,99 (1H, dd, $J = 8,5, 1,7$ Hz, Ar-H), 7,92 (2H, dd, $J = 8,8, 5,0$ Hz, Ar-H), 7,86-7,77 (1H, m, Ar-H), 7,32 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, Ar-H), 7,15 (1H, dd, $J = 8,8, 2,4$ Hz, Ar-H), 4,38 (1H, ddd, $J = 9,7, 7,4, 5,0$ Hz, CH), 2,37 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, CH₂), 2,07 (1H, ddd, $J = 13,4, 7,8, 5,4$ Hz, CH), 1,94 (1H, ddt, $J = 14,1, 9,7, 7,2$ Hz, CH), 1,41 (9H, s, CH₃), 1,38 (9H, s, CH₃), 0,98 (9H, s, CH₃), 0,25 (6H, s, CH₃)

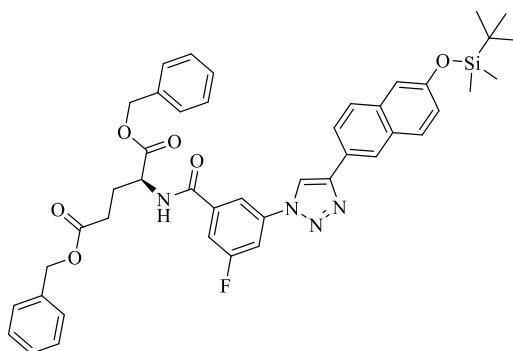
^{13}C NMR

δ_{C} (125 MHz, DMSO- d_6) 171,93, 171,19, 164,72 (d, $^4J_{C-F} = 2,5$ Hz), 162,66 (d, $^1J_{C-F} = 245,9$ Hz), 153,86, 148,21, 138,33 (d, $^3J_{C-F} = 10,5$ Hz), 137,88 (d, $^3J_{C-F} = 7,8$ Hz), 134,58, 130,31, 129,31, 128,02, 125,91, 124,42, 124,20, 123,03, 120,41, 115,43 (d, $^4J_{C-F} = 3,0$ Hz), 115,07, 114,68 (d, $^2J_{C-F} = 22,9$ Hz), 110,71 (d, $^2J_{C-F} = 26,8$ Hz), 81,34, 80,31, 53,25, 31,79, 28,19, 28,11, 26,34, 26,04, 18,47, -4,01,



(*S*)-4-(4-(6-((*Tert*-butylodimetylosililo)oksy)naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)-2-fluorobenzoilo)glutaminian dibenzylu
129E

Wydajność	69%
Temperatura topnienia	114-115 °C
¹H NMR	δ_{H} (500 MHz, DMSO- d_6) 9,52 (1H, s, CH), 8,95 (1H, d, $J = 6,3$ Hz, NH), 8,45 (1H, s, Ar-H), 8,03 (1H, dd, $J = 11,1, 2,0$ Hz, Ar-H), 7,99 (1H, dd, $J = 10,3, 1,9$ Hz, Ar-H), 7,98-7,93 (3H, m, Ar-H), 7,85 (1H, t, $J = 8,0$ Hz, Ar-H), 7,41-7,31 (10H, m, Ar-H), 7,18 (1H, dd, $J = 8,8, 2,4$ Hz, Ar-H), 5,20 (2H, d, $J = 3,8$ Hz, CH ₂), 5,12 (2H, s, CH ₂), 4,60 (1H, ddd, $J = 9,6, 7,4, 5,1$ Hz, CH), 2,62-2,53 (2H, m, CH ₂), 2,33-2,14 (1H, m, CH), 2,11-1,99 (1H, m, CH), 1,01 (9H, s, CH ₃), 0,28 (6H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ_{C} (125 MHz, DMSO- d_6) 172,48, 171,59, 163,81, 160,05 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 251,3$ Hz), 153,90, 148,29, 139,55 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 10,7$ Hz), 136,57, 136,36, 134,63, 132,27, 132,24, 130,32, 129,33, 128,89, 128,88, 128,73, 128,54, 128,46, 128,37, 128,27, 128,04, 127,96, 127,87, 127,06, 128,86, 125,89, 124,43, 124,24, 123,62 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 14,7$ Hz), 123,05, 120,27, 115,84 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 3,4$ Hz), 115,10, 108,30 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 27,7$ Hz), 67,15, 66,05, 52,53, 30,42, 26,11, 18,48, -3,98

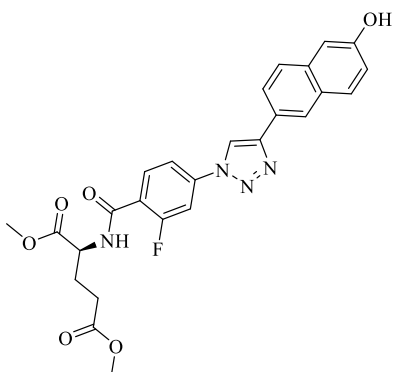


(*S*)-3-(4-(6-((*Tert*-butylodimetylosililo)oksy)naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)-5-fluorobenzoilo)glutaminian dibenzylu **137K**

Wydajność	52%
Temperatura topnienia	108-110 °C
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,50 (1H, s, CH), 9,14 (1H, d, <i>J</i> = 7,2 Hz, NH), 8,43 (1H, s, Ar-H), 8,39 (1H, s, Ar-H), 8,11 (1H, d, <i>J</i> = 9,1 Hz, Ar-H), 7,99 (1H, d, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H), 7,92 (2H, dd, <i>J</i> = 17,7, 8,9 Hz, Ar-H), 7,87-7,78 (2H, m, Ar-H), 7,45-7,26 (10H, m, Ar-H), 7,22-7,08 (1H, m, Ar-H), 5,15 (2H, s, CH ₂), 5,07 (2H, s, CH ₂), 2,56 (2H, t, <i>J</i> = 7,4 Hz, CH ₂), 2,30-2,14 (1H, m, CH), 2,14-1,98 (1H, m, Ar-H), 0,98 (9H, s, CH ₃), 0,25 (6H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d 6) 172,51, 171,75, 164,90 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2,4 Hz), 162,64 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 246,1 Hz), 154,00, 147,75, 138,33 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 10,1 Hz), 137,64 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 7,5 Hz), 136,49, 136,33, 134,62, 131,85, 130,31, 129,45, 128,87, 128,84, 128,52, 128,45, 128,39, 128,26, 128,02, 127,30, 126,82, 125,88, 124,41, 142,27, 123,05, 120,41, 120,07, 119,82, 115,15, 114,71 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 18,8 Hz), 110,86 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 14,7 Hz), 66,60, 66,03, 52,82, 30,53, 26,04, 19,02, -4,00

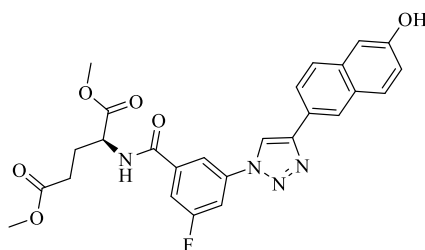
5.2.34 Ogólna procedura otrzymywania pochodnych (S)-(4-(4-(6-((*tert*-butylo-dimetylosililo)oksy)naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)-2-fluorobenzoilo)glutaminianu z wolną grupą OH (**130A-E**) oraz pochodnych (S)-(3-(4-(6-((*tert*-butylo-dimetylosililo)oksy)naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)-5-fluorobenzoilo)glutaminianu z wolną grupą OH (**139G-K**)

Do kolby okrągłodennej wprowadzono związek **129A-E** lub **138G-K** (1 eq, 8,24 mmol) oraz 10 mL THF. Następnie całość ochłodzono z wykorzystaniem łaźni lodowej. Po osiągnięciu temperatury 0 °C ostrożnie wkroplono 1 M TBAF w THF (1 eq, 8,24 mmol) po czym usunięto łaźnię z lodem. Całość pozostawiono mieszając w temperaturze pokojowej przez 1 h. Po tym czasie odparowano rozpuszczalnik i wykonano ekstrakcje z użyciem octanu etylu oraz 0,5 M roztworu HCl. W następnym kroku połączono warstwy organiczne, wysuszono je bezwodnym MgSO₄, przesączono i odparowano z wykorzystaniem rotatora uzyskując czysty, oczekiwany produkt **130A-E** lub **139G-K**.



(*S*)-(2-Fluoro-4-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminian dimetylu **130A**

Wydajność	95%
Temperatura topnienia	194-195 °C
¹H NMR	δ_{H} (500 MHz, DMSO- d_6) 10,17 (1H, s, OH), 9,63 (1H, s, CH), 8,97 (1H, d, $J = 7,4$ Hz, NH), 8,38 (1H, s, Ar-H), 8,07 (1H, dd, $J = 11,0, 2,0$ Hz, Ar-H), 8,01 (1H, dd, $J = 8,4, 2,0$ Hz, Ar-H), 7,96 (1H, dd, $J = 8,5, 1,7$ Hz, Ar-H), 7,86 (2H, dd, $J = 17,5, 8,6$ Hz, Ar-H), 7,80 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 7,26-7,16 (2H, m, Ar-H), 4,51 (1H, ddd, $J = 9,5, 7,4, 5,1$ Hz, CH), 3,69 (3H, s, CH ₃), 3,61 (3H, s, CH ₃), 2,49-2,47 (2H, m, CH ₂), 2,23-2,08 (1H, m, CH), 2,06-1,93 (1H, m, CH)
¹³C NMR	δ_{C} (125 MHz, DMSO- d_6) 173,11, 172,23, 163,75, 160,09 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 251,4$ Hz), 156,59, 148,53, 139,58, 134,27, 130,04, 128,06, 127,31, 124,56, 124,42, 124,28, 123,51 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 14,7$ Hz), 119,99, 120,12, 115,79 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 3,4$ Hz), 109,36, 108,24 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 27,9$ Hz), 58,03, 52,57, 52,36, 51,90, 30,23, 26,17, 23,56, 19,67, 13,94



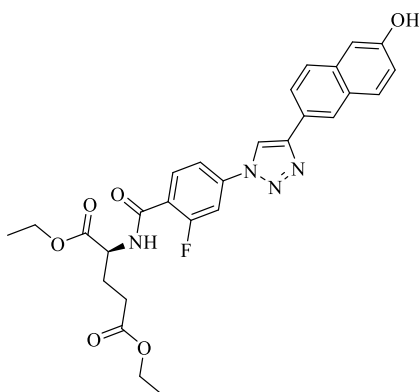
(*S*)-(3-Fluoro-5-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminian dimetylu **138G**

Wydajność	91%
Temperatura topnienia	188-190 °C
¹H NMR	δ_{H} (500 MHz, DMSO- d_6) 9,87 (1H, s, OH), 9,46 (1H, s, CH), 9,11 (1H, d, $J = 7,2$ Hz, NH), 8,39 (1H, s, Ar-H), 8,36 (1H, s, Ar-H), 8,11 (1H, d, $J = 9,2$ Hz, Ar-H), 7,94 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, Ar-H), 7,84 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 7,81 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 7,13 (2H, dd, $J = 13,8, 5,0$ Hz, Ar-H), 4,52 (1H, dt, $J =$

¹³C NMR

9,1, 7,2 Hz, CH), 3,66 (3H, s, CH₃), 3,57 (3H, s, CH₃), 2,50 (2H, m, CH₂), 2,15 (1H, td, *J* = 13,4, 7,6 Hz, CH), 2,07-1,91 (1H, m, CH)

δ_c (125 MHz, DMSO-*d*₆) 173,10, 172,35, 164,74 (d, ⁴*J*_{C-F} = 2,5 Hz), 156,31, 148,40, 138,36 (d, ³*J*_{C-F} = 10,7 Hz), 137,58 (d, ³*J*_{C-F} = 7,9 Hz), 131,92, 130,17, 128,10, 127,34, 124,64, 124,35, 124,27, 120,07, 119,81, 115,39 (d, ⁴*J*_{C-F} = 2,4 Hz), 114,67 (d, ²*J*_{C-F} = 22,8 Hz), 110,77 (d, ²*J*_{C-F} = 26,9 Hz), 109,25, 52,68, 52,55, 51,86, 30,34, 26,11



(*S*)-(2-Fluoro-4-(4-(6-hydroxynaphthalen-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-yl)benzoilo)glutaminian dietylu **130B**

Wydajność

96%

Temperatura topnienia

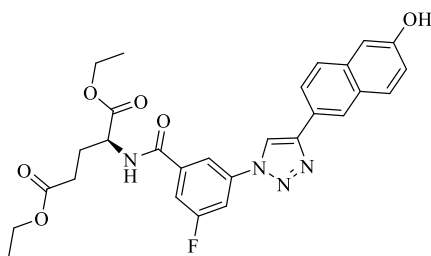
170-172 °C (z rozkładem)

¹H NMR

δ_H (500 MHz, DMSO-*d*₆) 9,89 (1H, s, OH), 9,49 (1H, s, CH), 8,88 (1H, d, *J* = 7,7 Hz, NH), 8,38 (1H, s, Ar-H), 8,04 (1H, dd, *J* = 11,0, 2,1 Hz, Ar-H), 7,99 (1H, dd, *J* = 8,4, 2,1 Hz, Ar-H), 7,99 (1H, dd, *J* = 8,4, 2,1 Hz, Ar-H), 7,96 (1H, dd, *J* = 8,5, 1,7 Hz, Ar-H), 7,88 (1H, d, *J* = 3,0 Hz, Ar-H), 7,87 (1H, d, *J* = 3,9 Hz, Ar-H), 7,86-7,81 (1H, m, Ar-H), 7,19 (1H, d, *J* = 2,4 Hz, Ar-H), 7,16 (1H, dd, *J* = 8,8, 2,4 Hz, Ar-H), 4,53-4,46 (1H, m, CH), 4,16 (2H, qd, *J* = 7,1, 2,8 Hz, CH₂), 4,08 (2H, q, *J* = 7,1 Hz, CH₂), 2,50-2,44 (2H, m, CH₂), 2,20-2,08 (1H, m, CH), 2,06-1,93 (1H, m, CH), 1,23 (3H, t, *J* = 7,1 Hz, CH₃), 1,20 (3H, t, *J* = 7,1 Hz, CH₃)

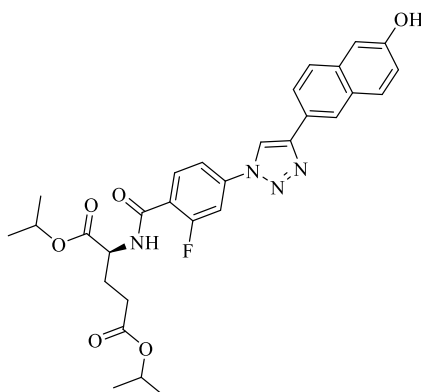
¹³C NMR

δ_c (125 MHz, DMSO-*d*₆) 172,60, 171,72, 163,73, 160,04 (d, ¹*J*_{C-F} = 251,3 Hz), 156,36, 148,48, 139,54 (d, ³*J*_{C-F} = 10,7 Hz), 134,98, 132,23 (d, ³*J*_{C-F} = 3,8 Hz), 130,18, 128,13, 127,37, 124,64, 124,40, 124,29, 123,65 (d, ²*J*_{C-F} = 14,8 Hz), 119,69, 119,86, 115,86 (d, ⁴*J*_{C-F} = 3,1 Hz), 108,26 (d, ²*J*_{C-F} = 27,7 Hz), 61,22, 60,45, 52,46, 30,44, 26,23, 15,53



(S)-(3-Fluoro-5-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminian dimetylu **138H**

Wydajność	89%
Temperatura topnienia	160-164 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ_{H} (500 MHz, DMSO- d_6) 9,90 (1H, s, OH), 9,49 (1H, s, CH), 9,11 (1H, d, $J = 7,2$ Hz, NH), 8,41 (1H, s, Ar-H), 8,39 (1H, s, Ar-H), 8,14 (1H, dd, $J = 9,3, 2,0$ Hz, Ar-H), 7,96 (1H, dd, $J = 8,5, 1,5$ Hz, Ar-H), 7,85 (3H, dd, $J = 19,1, 8,7$ Hz, Ar-H), 7,24-7,12 (2H, m, Ar-H), 4,55-4,43 (1H, m, CH), 4,15 (2H, q, $J = 7,1$ Hz, Ar-H), 4,07 (2H, q, $J = 7,1$ Hz, Ar-H), 2,50-2,48 (2H, m, CH ₂), 2,16 (1H, td, $J = 13,3, 7,7$ Hz, CH), 2,11-1,99 (1H, m, CH), 1,22 (3H, t, $J = 7,1$ Hz, Ar-H), 1,18 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H)
¹³C NMR	δ_{C} (125 MHz, DMSO- d_6) 172,64, 171,91, 164,79 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 2,3$ Hz), 162,68 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 246,0$ Hz), 156,33, 148,43, 138,38 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 10,7$ Hz), 137,69 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,0$ Hz), 134,95, 130,19, 128,12, 127,37, 124,67, 124,38, 124,30, 120,10, 119,84, 115,42 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 2,4$ Hz), 114,68 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 23,5$ Hz), 110,77 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 26,6$ Hz), 109,28, 61,23, 60,45, 52,80, 30,60, 26,13, 14,54



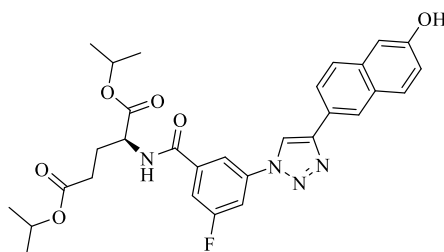
(S)-(2-Fluoro-4-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminian di-izo-propyly **130C**

Wydajność	85%
Temperatura topnienia	190-191 °C
¹H NMR	δ_{H} (500 MHz, DMSO- d_6) 9,88 (1H, s, OH), 9,47 (1H, s, CH), 8,84 (1H, d, $J = 7,4$ Hz, NH), 8,38 (1H, s, Ar-H), 8,07-8,01 (1H, m, Ar-H), 8,00-7,91 (2H, m, Ar-H), 7,90-7,76 (3H, m, Ar-H), 7,18 (1H, d, $J = 2,3$ Hz, Ar-H), 7,15 (1H, dd, $J = 8,7, 2,4$ Hz, Ar-

¹³C NMR

H), 5,01-4,94 (1H, m, CH), 4,94-4,87 (1H, m, CH), 4,45 (1H, ddd, $J = 9,6, 7,4, 5,1$ Hz, CH), 2,48-2,41 (2H, m, CH₂), 2,17-2,07 (1H, m, CH), 2,02-1,92 (1H, m, CH), 1,23 (6H, t, $J = 6,7$ Hz, CH₃), 1,20 (6H, d, $J = 6,3$ Hz, CH₃)

δ_c (125 MHz, DMSO-_{d6}) 172,09, 171,23, 163,72, 160,03 (d, $^1J_{C-F} = 251,3$ Hz), 156,36, 148,48, 139,51 (d, $^3J_{C-F} = 10,6$ Hz), 134,98, 132,19, 132,16, 130,18, 128,11, 127,37, 124,65, 124,40, 124,30, 123,74 (d, $^2J_{C-F} = 14,9$ Hz), 129,98, 129,86, 115,85 (d, $^4J_{C-F} = 3,0$ Hz), 109,31, 108,27 (d, $^2J_{C-F} = 27,7$ Hz), 68,68, 67,75, 52,58, 30,73, 26,26, 26,20, 22,05, 22,00, 21,96



(*S*)-(3-Fluoro-5-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminian dimetylu **138I**

Wydajność

91%

Temperatura topnienia

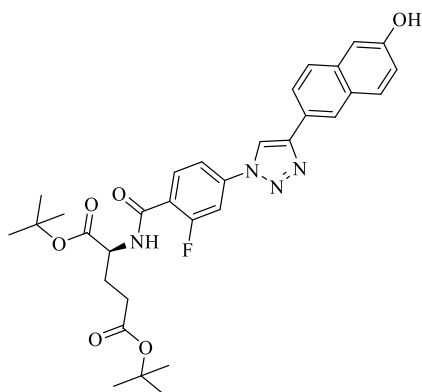
188-190 °C (z rozkładem)

¹H NMR

δ_H (500 MHz, DMSO-_{d6}) 9,91 (1H, s, OH), 9,48 (1H, s, CH), 9,07 (1H, d, $J = 7,2$ Hz, NH), 8,42 (1H, s, Ar-H), 8,38 (1H, s, Ar-H), 8,13 (1H, dt, $J = 9,3, 1,9$ Hz, Ar-H), 7,96 (1H, dd, $J = 8,5, 1,5$ Hz, Ar-H), 7,90-7,85 (2H, m, Ar-H), 7,83 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 7,24-7,07 (2H, m, Ar-H), 4,95 (1H, dt, $J = 11,6, 5,8$ Hz, CH), 4,90 (1H, td, $J = 12,4, 6,1$ Hz, CH), 4,46 (1H, ddd, $J = 9,5, 7,2, 5,5$ Hz, CH), 2,46 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, CH₂), 2,13 (1H, td, $J = 13,3, 7,6$ Hz, CH), 2,08-1,97 (1H, m, CH), 1,26-1,20 (6H, m, CH₃), 1,18 (6H, d, $J = 6,3$ Hz, CH₃)

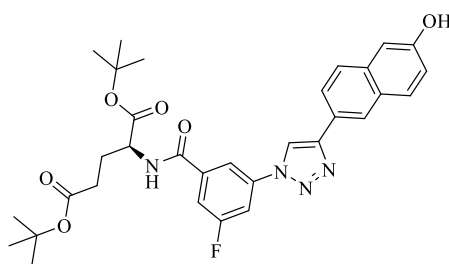
¹³C NMR

δ_c (125 MHz, DMSO-_{d6}) 172,12, 171,46, 164,82 (d, $^4J_{C-F} = 2,3$ Hz), 162,68 (d, $^1J_{C-F} = 246,1$ Hz), 156,33, 148,43, 138,37 (d, $^3J_{C-F} = 10,9$ Hz), 137,74 (d, $^3J_{C-F} = 7,8$ Hz), 134,95, 130,20, 128,12, 124,66, 124,38, 124,30, 120,10, 119,84, 115,41 (d, $^4J_{C-F} = 2,0$ Hz), 114,67 (d, $^2J_{C-F} = 22,9$ Hz), 110,75 (d, $^2J_{C-F} = 26,9$ Hz), 109,28, 68,72, 67,76, 52,90, 30,87, 26,26, 26,12, 22,01, 22,05, 21,97



(S)-(2-Fluoro-4-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminian di-*tert*-butylu **130D**

Wydajność	83%
Temperatura topnienia	192-193 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ_{H} (500 MHz, DMSO- d_6) 9,87 (1H, s, OH), 9,46 (1H, s, CH), 8,74 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, NH), 8,36 (1H, s, Ar-H), 8,01 (1H, dd, $J = 10,6, 2,3$ Hz, Ar-H), 7,98-7,90 (2H, m, Ar-H), 7,85 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, Ar-H), 7,81 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, Ar-H), 7,16 (1H, s, Ar-H), 7,13 (1H, d, $J = 9,3$ Hz, Ar-H), 4,55-3,90 (1H, m, CH), 2,43-2,25 (2H, m, CH ₂), 2,11-1,98 (1H, m, CH), 1,97-1,80 (1H, m, CH), 1,42 (9H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ_{C} (125 MHz, DMSO- d_6) 171,93, 170,98, 163,62, 160,01 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 251,1$ Hz), 156,35, 148,46, 139,46 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 10,7$ Hz), 134,96, 132,16 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 15,5$ Hz), 130,18, 128,11, 127,35, 124,63, 124,37, 124,28, 123,87, 123,75, 119,87 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 9,7$ Hz), 115,79 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 3,2$ Hz), 109,28, 108,21 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 27,6$ Hz), 81,31, 80,29, 52,98, 31,58, 28,18, 28,09, 26,39

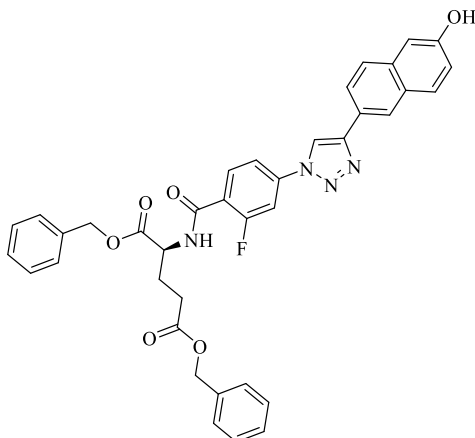


(S)-(3-Fluoro-5-(4-(6-hydroksynaftaleno-2-ylo)-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminian di-*tert*-butylu **138J**

Wydajność	85%
Temperatura topnienia	186-188 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ_{H} (500 MHz, DMSO- d_6) 9,88 (1H, s, OH), 9,46 (1H, s, CH), 8,95 (1H, d, $J = 7,4$ Hz, NH), 8,39 (1H, s, Ar-H), 8,36 (1H, s, Ar-H), 8,10 (1H, d, $J = 9,2$ Hz, Ar-H), 7,94 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, Ar-H), 7,82 (3H, dd, $J = 19,4, 8,7$ Hz, Ar-H), 7,23-7,08 (2H, m, Ar-H), 4,45-4,24 (1H, m, CH), 4,45-4,24 (2H, m, CH ₂), 2,16-

¹³C NMR

2,01 (1H, m, CH), 1,99-1,86 (1H, m, CH), 1,41 (9H, s, CH₃), 1,38 (9H, s, CH₃)
 δ_c (125 MHz, DMSO-_d6) 171,92, 171,18, 164,74, 162,64 (d, $^1J_{C-F}$ = 246,2 Hz), 156,30, 138,34 (d, $^3J_{C-F}$ = 10,7 Hz), 137,88, 137,79, 134,92, 130,17, 128,10, 127,34, 124,64, 124,32 (d, $^3J_{C-F}$ = 9,6 Hz), 120,07, 119,81, 115,38 (d, $^4J_{C-F}$ = 2,5 Hz), 110,67 (d, $^2J_{C-F}$ = 27,2 Hz), 109,25, 81,34, 80,31, 53,24, 31,78, 28,18, 28,10, 26,33



(S)-2-Fluoro-4-(4-(6-hydroxynaphthalen-2-yl)-1H-1,2,3-triazolo-1-yl)benzoilo)glutaminian dibenzylu **130E**

Wydajność

79%

Temperatura topnienia

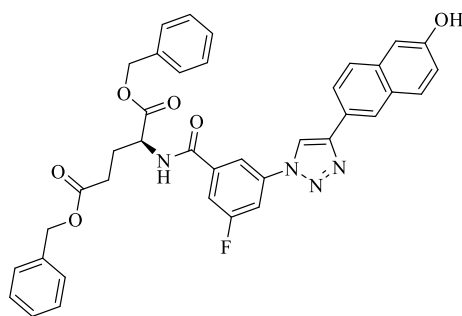
160-163 °C (z rozkładem)

¹H NMR

δ_H (500 MHz, DMSO-_d6) 9,90 (1H, s, OH), 9,46 (1H, s, CH), 8,95 (1H, d, J = 7,3 Hz, NH), 8,36 (1H, s, Ar-H), 8,01 (1H, d, J = 11,0 Hz, Ar-H), 7,94 (2H, t, J = 8,7 Hz, Ar-H), 7,83 (3H, dd, J = 19,1, 9,0 Hz, Ar-H), 7,43-7,25 (10H, m, Ar-H), 7,14 (2H, dd, J = 14,2, 5,5 Hz, Ar-H), 5,26-5,12 (2H, m, CH₂), 5,09 (2H, s, CH₂), 4,64-4,51 (1H, m, CH), 2,57 (2H, ddd, J = 20,5, 13,8, 6,5 Hz, CH₂), 2,18 (1H, td, J = 13,3, 7,5 Hz, CH), 2,03 (1H, td, J = 14,6, 8,6 Hz, CH)

¹³C NMR

δ_c (125 MHz, DMSO-_d6) 174,47, 171,59, 163,82, 160,04 (d, $^1J_{C-F}$ = 257,2 Hz), 156,33, 148,46, 139,53 (d, $^3J_{C-F}$ = 8,6 Hz), 136,53, 136,32, 133,95, 132,30, 132,15, 130,18, 128,87, 128,53, 128,45, 128,26, 128,10, 127,36, 124,60, 124,37, 124,27, 123,51 (d, $^2J_{C-F}$ = 14,8 Hz), 119,92, 119,84, 115,77 (d, $^4J_{C-F}$ = 2,7 Hz), 109,28, 108,23 (d, $^2J_{C-F}$ = 27,9 Hz), 66,63, 66,03, 52,50, 30,38, 26,11

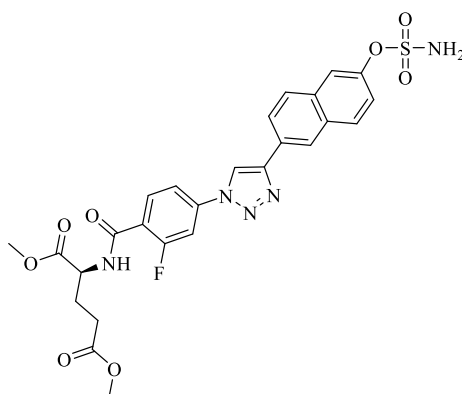


(*S*)-(3-Fluoro-5-(4-(6-hydroxynaphthaleno-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-yl)benzoilo)glutaminian dibenzylu **138K**

Wydajność	93%
Temperatura topnienia	154-156 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ_{H} (500 MHz, DMSO- d_6) 9,88 (1H, s, OH), 9,46 (1H, s, CH), 9,14 (1H, d, $J = 7,3$ Hz, NH), 8,39 (1H, s, Ar-H), 8,37 (1H, s, Ar-H), 8,11 (1H, ddd, $J = 19,9, 10,9, 8,9$ Hz, Ar-H), 8,02-7,91 (1H, m, Ar-H), 7,83 (3H, dd, $J = 18,9, 8,9$ Hz, Ar-H), 7,38-7,28 (11H, m, Ar-H), 7,18-7,11 (2H, m, Ar-H), 5,17 (2H, s, CH ₂), 5,11-5,02 (2H, m, CH ₂), 4,65-4,54 (1H, m, CH), 2,56 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, CH ₂), 2,26-2,15 (1H, m, $J = 13,2, 7,7$ Hz, CH), 2,15-2,03 (1H, m, CH)
¹³C NMR	δ_{C} (125 MHz, DMSO- d_6) 172,51, 171,75, 164,92 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 2,5$ Hz), 162,64 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 246,1$ Hz), 156,31, 148,41, 138,35 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 10,7$ Hz), 137,64 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 7,8$ Hz), 136,50, 163,33, 134,93, 130,18, 128,86, 128,53, 128,45, 128,39, 128,39, 128,26, 128,10, 127,36, 127,05, 126,84, 126,64, 124,20, 115,42 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 2,5$ Hz), 114,68 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 23,3$ Hz), 110,78 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 25,0$ Hz), 109,26, 66,60, 66,05, 52,82, 30,53, 26,05

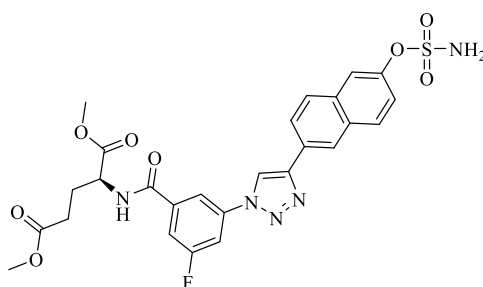
5.2.35 Ogólna procedura otrzymywania estrowych pochodnych (*S*)-(2-fluoro-4-(4-(6-(sulfamiloxy)naphthaleno-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-yl)benzoilo)glutaminianu (**VIA-E**) oraz (*S*)-(3-fluoro-5-(4-(6-(sulfamiloxy)naphthaleno-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-yl)benzoilo)glutaminianu (**VIG-K**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej wprowadzono odpowiednio związek **130A-E** lub **138G-L** (1 eq, 0,20 mmol) oraz 1 mL bezwodnego *N,N*-DMA. Następnie kolbę umieszczono w łaźni lodowej na 10 minut. Po tym czasie do przygotowanej mieszaniny wkroplono 2 M roztwór chlorku sulfamoiu w ACN (3 eq, 0,60 mmol). Po zakończeniu wkraplania usunięto łaźnię lodową i doprowadzono układ do temperatury otoczenia. Następnie, reakcja mieszana była w atmosferze gazu obojętnego przez 15 minut. Po tym czasie zawartość kolby przeniesiono do zlewki z wodą, w wyniku czego wytrącił się osad, który odsączono i przemyto zimną wodą destylowaną. Surowy produkt krystalizowano z układu octan etylu : DCM otrzymując produkt **VIA-E** oraz **VIG-L**.



(S)-(2-Fluoro-4-(4-(6-(sulfamiloxy)naftaleno-2-ylo)-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminian dimetylu **VIA**

Wydajność	81%
Temperatura topnienia	188-189 °C
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO-d ₆) 9,58 (1H, s, CH), 8,91 (1H, d, <i>J</i> = 7,5 Hz, NH), 8,56 (1H, s, Ar-H), 8,17-8,06 (5H, m, Ar-H, NH ₂), 8,02 (1H, dd, <i>J</i> = 10,9, 2,1 Hz, Ar-H), 7,97 (1H, dd, <i>J</i> = 8,4, 2,0 Hz, Ar-H), 7,90-7,80 (2H, m, Ar-H), 7,48 (dd, <i>J</i> = 8,9, 2,3 Hz, 1H), 4,55-4,46 (1H, m, CH), 3,67 (3H, s, CH ₃), 3,59 (3H, s, CH ₃), 2,17-2,04 (1H, m, CH), 2,01-1,88 (1H, m, CH) (CH ₂ pod dmso)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO-d ₆) 173,09, 172,22, 163,69, 160,01 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 251,4 Hz), 148,59, 147,84, 139,51, 139,42, 133,53, 132,32, 132,29, 130,53, 129,23, 128,00, 124,91, 124,18, 123,67 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 14,7 Hz), 122,94, 120,90, 119,77, 115,94 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 3,4 Hz), 108,37 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 27,9 Hz), 52,58, 52,31, 51,90, 30,17, 26,17
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 586,1408, zmierzone: 586,2314



(S)-(3-Fluoro-5-(4-(6-(sulfamiloxy)naftaleno-2-ylo)-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminian dimetylu **VIG**

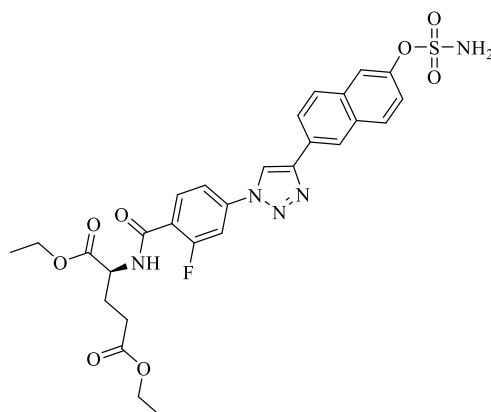
Wydajność	79%
Temperatura topnienia	138-140 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO-d ₆) 9,56 (1H, s, CH), 9,12 (1H, d, <i>J</i> = 7,2 Hz, NH), 8,57 (1H, s, Ar-H), 8,38 (1H, s, Ar-H), 8,20-8,01 (5H, m, NH ₂ , Ar-H), 7,93-7,78 (2H, m, Ar-H), 7,48 (1H, d, <i>J</i> = 10,1 Hz, Ar-H), 4,52 (1H, dd, <i>J</i> = 14,4, 7,3 Hz, Ar-H), 3,66 (3H, s,

¹³C NMR

CH₃), 3,58 (3H, s, CH₃), 2,52-2,49 (2H, m, CH₂), 2,15 (1H, td, $J = 13,6, 7,5$ Hz, CH), 2,04 (1H, dq, $J = 14,5, 7,4$ Hz, CH)
 δ_c (125 MHz, DMSO-_d6) 172,27, 172,36, 164,72 (d, $^4J_{C-F} = 2,4$ Hz), 162,65 (d, $^1J_{C-F} = 246,4$ Hz), 148,51, 147,77, 138,27 (d, $^3J_{C-F} = 10,7$ Hz), 137,58 (d, $^3J_{C-F} = 7,9$ Hz), 133,49, 138,87, 130,50, 129,19, 128,02, 124,90, 124,16, 122,90, 120,98, 119,71, 115,49 (d, $^4J_{C-F} = 2,7$ Hz), 114,81 (d, $^2J_{C-F} = 23,0$ Hz), 110,87 (d, $^2J_{C-F} = 26,7$ Hz), 52,69, 52,56, 51,87, 30,34, 26,10

HRMS

[M+H]⁺ obliczone: 586,1408, zmierzone: 586,227



(S)-(2-Fluoro-4-(4-(6-(sulfamiloxy)naftaleno-2-ylo)-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminian dietylu **VIB**

Wydajność

76%

Temperatura topnienia

136-138 °C (z rozkładem)

¹H NMR

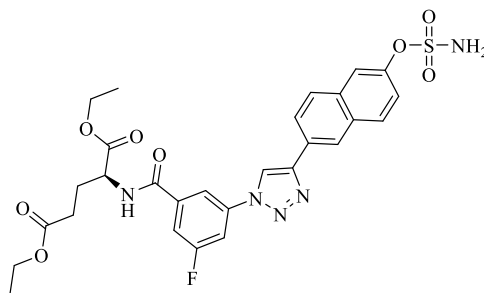
δ_H (500 MHz, DMSO-_d6) 9,57 (1H, s, CH), 8,89 (1H, d, $J = 6,5$ Hz, NH), 8,56 (1H, s, Ar-H), 8,17-8,06 (5H, m, Ar-H), 7,99 (2H, dd, $J = 26,5, 9,3$ Hz, Ar-H), 7,90-7,78 (2H, m, Ar-H), 7,48 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, Ar-H), 4,52-4,37 (1H, m, $J = 7,1$ Hz, Ar-H), 4,18-4,09 (2H, m, $J = 4,7$ Hz, CH₂), 4,05 (2H, q, $J = 13,8, 6,8$ Hz, CH₂), 2,42-2,30 (2H, m, $J = 6,5$ Hz, CH₂), 2,16-2,01 (1H, m, CH), 2,04-1,84 (1H, m, CH)

¹³C NMR

δ_c (125 MHz, DMSO-_d6) 172,59, 171,71, 163,71, 159,98 (d, $^1J_{C-F} = 251,1$ Hz), 148,56, 147,82, 139,41 (d, $^3J_{C-F} = 10,4$ Hz), 133,51, 133,23, 131,88, 130,51, 129,21, 127,93, 124,90, 124,17, 123,79 (d, $^2J_{C-F} = 16,6$ Hz), 122,92, 120,89, 119,74, 115,94 (d, $^4J_{C-F} = 2,7$ Hz), 108,26, 108,37 (d, $^2J_{C-F} = 29,6$ Hz), 61,22, 60,45, 52,39, 30,40, 26,54, 14,49

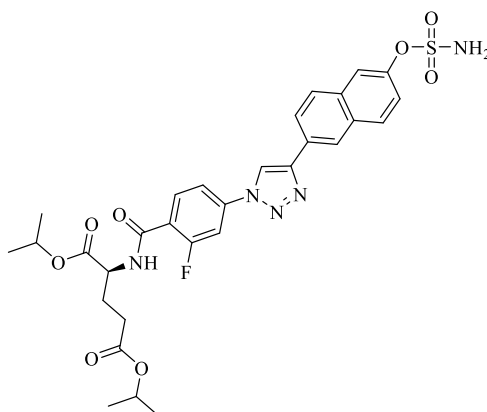
HRMS

[M+H]⁺ obliczone: 614,1721, zmierzone: 614,2634



(*S*)-(3-Fluoro-5-(4-(6-(sulfamiloxy)naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminian dietylu **VIIH**

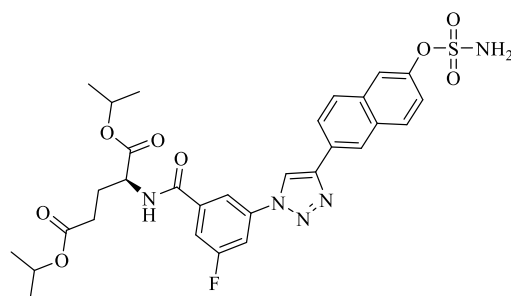
Wydajność	81%
Temperatura topnienia	160-164 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,57 (1H, s, CH), 8,97 (1H, d, <i>J</i> = 13,7 Hz, NH), 8,57 (1H, s, Ar-H), 8,48-8,37 (1H, m, Ar-H), 8,17-8,05 (6H, m, Ar-H), 7,97-7,82 (2H, m, Ar-H), 7,48 (1H, dd, <i>J</i> = 8,9, 2,0 Hz, Ar-H), 4,60-4,41 (1H, m, CH), 4,13 (2H, q, <i>J</i> = 6,9 Hz, CH ₂), 4,04 (2H, q, <i>J</i> = 7,1 Hz, CH ₂), 2,41 (2H, q, <i>J</i> = 7,2 Hz, CH ₂), 2,16-2,07 (1H, m, CH), 1,99 (1H, tdd, <i>J</i> = 24,5, 15,8, 8,6 Hz, CH), 1,99 (3H, tdd, <i>J</i> = 24,5, 15,8, 8,6 Hz, CH ₃), 1,16 (3H, t, <i>J</i> = 7,1 Hz, CH ₃)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d 6) 174,27, 173,53, 166,48 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2,7 Hz), 162,65 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 246,5 Hz), 148,54, 147,77, 138,28 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 10,7 Hz), 137,70 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 8,7 Hz), 133,49, 131,88, 130,50, 129,149, 128,04, 124,91, 124,17, 122,91, 121,00, 119,75, 115,49, 115,49 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 1,4 Hz), 114,79 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 25,7 Hz), 110,84 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 26,3 Hz), 61,22, 60,44, 52,66, 30,84, 26,37, 14,52
HRMS	[<i>M</i> + <i>H</i>] ⁺ obliczone: 614,1721, zmierzone: 614,2615



(*S*)-(2-Fluoro-4-(4-(6-(sulfamiloxy)naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminian di-*izo*-propyly **VIC**

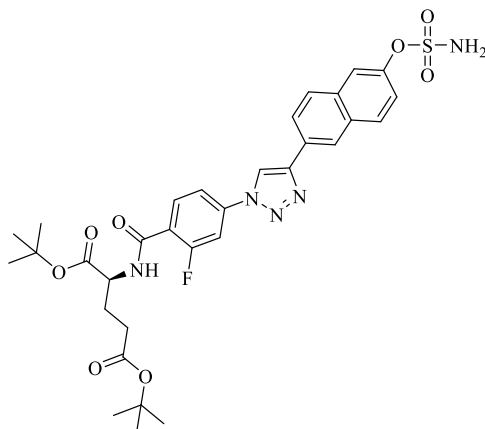
Wydajność	90%
Temperatura topnienia	170-172 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,58 (1H, s, CH), 8,85 (1H, d, <i>J</i> = 7,4

	Hz, NH), 8,56 (1H, s, Ar-H), 8,11 (5H, m, $J = 5,8$ Hz, Ar-H), 8,02 (1H, d, $J = 10,9$ Hz, Ar-H), 7,96 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, Ar-H), 7,89-7,81 (2H, m, Ar-H), 7,48 (1H, $J = 8,8$ Hz, Ar-H), 4,99-4,91 (1H, m, CH), 4,93-4,85 (1H, m, CH), 4,41 (1H, ddd, $J = 10,2, 7,3, 5,1$ Hz, CH), 2,46-2,38 (2H, m, CH ₂), 2,15-2,01 (1H, m, CH), 2,01-1,89 (1H, m, CH), 1,21 (6H, t, $J = 6,8$ Hz, CH ₃), 1,17 (6H, d, $J = 6,3$ Hz, CH ₃)
¹³C NMR	δ_c (125 MHz, DMSO-d ₆) 172,07, 171,22, 163,67 (d, $^4J_{C-F} = 2,9$ Hz), 159,96 (d, $^1J_{C-F} = 252,0$ Hz), 148,55, 147,81, 139,39 (d, $^3J_{C-F} = 9,6$ Hz), 133,51, 132,17, 131,87, 130,50, 129,21, 128,00, 124,89, 124,15, 123,94, 123,78, 122,53, 120,89, 119,75, 115,94, 108,37 (d, $^2J_{C-F} = 28,6$ Hz), 68,67, 67,73, 52,81, 30,66, 26,14, 22,01, 21,98, 20,91
HRMS	$[M+H]^+$ obliczone: 642,2034, zmierzone: 642,3005



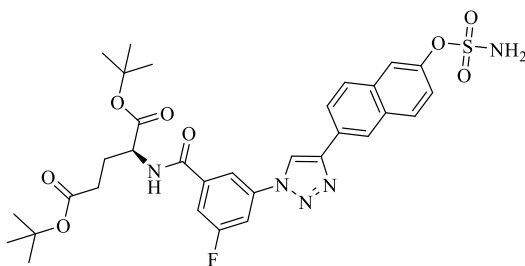
(S)-(3-Fluoro-5-(4-(6-(sulfamiloksy)naftaleno-2-yl)-1H-1,2,3-triazolo-1-yl)benzoilo)glutaminian di-izo-propylu VII

Wydajność	79%
Temperatura topnienia	160-162 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ_H (500 MHz, DMSO-d ₆) 9,58 (1H, s, CH), 9,05 (1H, d, $J = 6,0$ Hz, NH), 8,57 (1H, s, Ar-H), 8,40 (1H, s, Ar-H), 8,25-8,02 (6H, m, Ar-H), 7,86 (2H, s, Ar-H), 7,48 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, Ar-H), 5,00-4,81 (2H, m, CH), 4,54-4,34 (1H, m, H), 2,47-2,34 (2H, m, CH ₂), 2,18-2,05 (1H, m, CH), 2,02 (1H, d, $J = 7,2$ Hz, CH), 1,19 (6H, t, $J = 6,1$ Hz, CH ₃), 1,16 (6H, d, $J = 5,1$ Hz, CH ₃)
¹³C NMR	δ_c (125 MHz, DMSO-d ₆) 172,09, 171,43, 164,75 (d, $^4J_{C-F} = 2,0$ Hz), 162,64 (d, $^1J_{C-F} = 246,5$ Hz), 148,54, 147,77, 138,28 (d, $^3J_{C-F} = 10,8$ Hz), 137,74 (d, $^3J_{C-F} = 7,6$ Hz), 133,50, 131,88, 130,50, 129,20, 124,90, 124,15, 122,92, 121,02, 119,74, 115,50 (d, $^4J_{C-F} = 2,3$ Hz), 114,78 (d, $^2J_{C-F} = 20,4$ Hz), 110,83 (d, $^2J_{C-F} = 26,8$ Hz), 109,26, 68,70, 67,73, 52,88, 30,85, 26,11, 22,03, 21,99, 21,95
HRMS	$[M+H]^+$ obliczone: 642,2034, zmierzone: 642,2940



(S)-(2-Fluoro-4-(4-(6-(sulfamiloksy)naftaleno-2-ylo)-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminian di-*tert*-butylu **VID**

Wydajność	82%
Temperatura topnienia	166-168 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,57 (1H, s, CH), 8,76 (1H, d, <i>J</i> = 7,5 Hz, NH), 8,56 (1H, s, Ar-H), 8,12 (3H, d, <i>J</i> = 7,3 Hz, NH ₂ , Ar-H), 7,99 (2H, ddd, <i>J</i> = 10,1, 9,6, 1,7 Hz, Ar-H), 7,85 (2H, dd, <i>J</i> = 13,7, 5,1 Hz, Ar-H), 7,48 (1H, dd, <i>J</i> = 8,9, 2,2 Hz, Ar-H), 4,34 (1H, ddd, <i>J</i> = 9,5, 7,6, 5,3 Hz, CH), 2,40-2,28 (2H, m, CH ₂), 2,04 (1H, td, <i>J</i> = 13,2, 7,6 Hz, CH), 1,95-1,74 (1H, m, CH), 1,42 (9H, s, CH ₃), 1,39 (9H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d 6) 171,92, 170,96, 163,60, 159,96 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 251,1 Hz), 148,55, 147,81, 139,34 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 10,8 Hz), 133,51, 132,20, 132,15, 131,87, 130,51, 129,21, 128,00, 124,90, 124,16, 123,99 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 15,0 Hz), 122,52, 120,88, 119,75, 115,93 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 3,3 Hz), 108,36 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 27,8 Hz), 81,33, 80,31, 52,96, 31,57, 28,18, 28,08, 26,37
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 670,2347, zmierzone: 670,3339



(S)-(3-Fluoro-5-(4-(6-(sulfamiloksy)naftaleno-2-ylo)-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminian di-*tert*-butylu **VIJ**

Wydajność	86%
Temperatura topnienia	150-154 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,59 (1H, s, CH), 8,95 (1H, d, <i>J</i> = 7,4 Hz, NH), 8,58 (1H, s, Ar-H), 8,40 (1H, s, Ar-H), 8,20-8,05 (5H, m, NH ₂ , Ar-H), 7,93-7,80 (2H, m, Ar-H), 7,48 (2H, dd, <i>J</i> = 8,9,

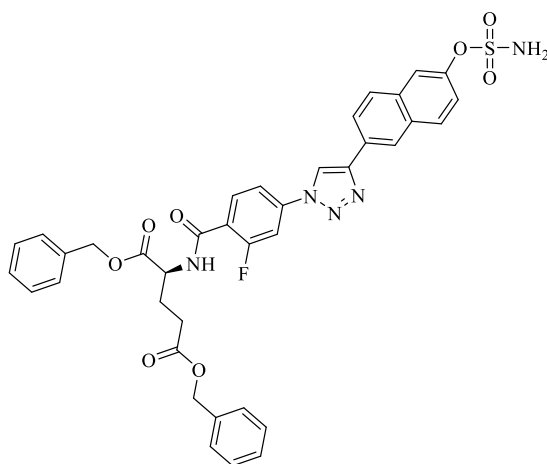
¹³C NMR

2,3 Hz, Ar-H), 4,47-4,32 (1H, m, CH), 2,37 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, CH₂), 2,10-2,01 (1H, m, CH), 2,00-1,87 (1H, m, CH), 1,42 (9H, s, CH₃), 1,38 (9H, s, CH₃)

δ_c (125 MHz, DMSO-_d6) 174,27, 173,52, 164,63, 162,66 (d, $^1J_{C-F} = 245,9$ Hz), 156,30, 148,40, 156,30, 148,40, 138,12 ($^2J_{C-F} J = 10,6$ Hz), 131,92, 128,10, 127,15, 124,65, 124,35, 124,26, 120,04, 119,79, 115,38, 114,63 (d, $^2J_{C-F} = 23,2$ Hz), 110,61 (d, $^2J_{C-F} = 26,6$ Hz), 109,24, 60,18, 55,30, 52,69, 49,01, 30,83, 26,35, 21,14, 14,48

HRMS

[M+H]⁺ obliczone: 670,2347, zmierzone: 670,3412



(S)-(2-Fluoro-4-(4-(6-(sulfamiloxy)naftaleno-2-ylo)-1H-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminian dibenzylu
VIE

Wydajność

94%

Temperatura topnienia

184-186 °C (z rozkładem)

¹H NMR

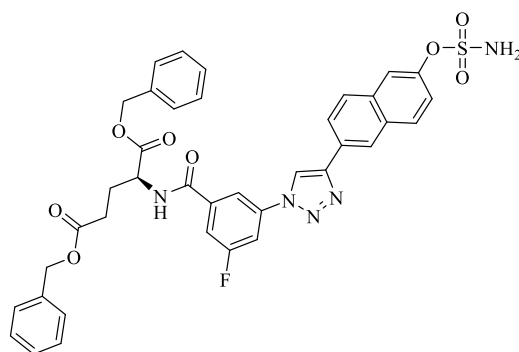
δ_H (500 MHz, DMSO-_d6) 9,58 (1H, s CH), 8,96 (1H, d, $J = 7,3$ Hz, NH), 8,57 (1H, s Ar-H), 8,17-8,06 (4H, m, NH₂, Ar-H), 7,99 (4H, dd, $J = 30,2, 9,7$ Hz, Ar-H), 7,84 (2H, dd, $J = 16,5, 8,5$ Hz, Ar-H), 7,49 (1H, d, $J = 7,1$ Hz, Ar-H), 7,42-7,23 (10H, m, Ar-H), 5,22-5,13 (2H, m, CH₂), 5,09 (2H, s, CH₂), 4,58 (1H, dd, $J = 13,5, 8,3$ Hz, CH), 2,58-2,51 (2H, m, CH₂), 2,18 (1H, td, $J = 13,1, 7,3$ Hz, CH), 2,03 (1H, td, $J = 14,7, 8,5$ Hz, CH)

¹³C NMR

δ_c (125 MHz, DMSO-_d6) 172,47, 171,58, 163,80, 160,00 (d, $^1J_{C-F} = 251,7$ Hz), 148,56, 147,83, 139,45 (d, $^3J_{C-F} = 10,4$ Hz), 136,53, 136,32, 133,52, 132,27, 132,22, 131,88, 130,52, 129,22, 128,87, 128,54, 128,46, 128,36, 128,26, 128,00, 124,90, 124,17, 123,69 (d, $^2J_{C-F} = 14,8$ Hz), 122,93, 120,88, 119,76, 115,91 (d, $^4J_{C-F} = 3,3$ Hz), 108,37 (d, $^2J_{C-F} = 28,3$ Hz), 66,63, 66,03, 52,49, 30,37, 26,11

HRMS

[M+H]⁺ obliczone: 738,1095, zmierzone: 738,3069

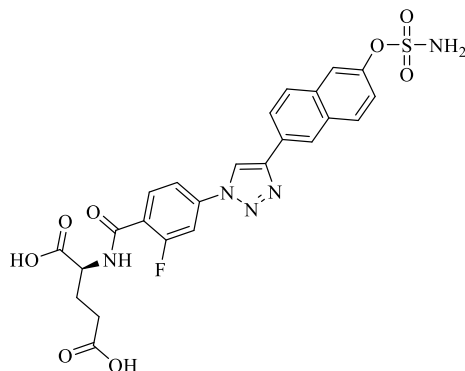


(*S*)-(3-Fluoro-5-(4-(6-(sulfamiloxy)naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminian dibenzylu **VIK**

Wydajność	81%
Temperatura topnienia	168-170 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,58 (1H, s, CH), 9,14 (1H, d, <i>J</i> = 7,2 Hz, NH), 8,58 (1H, s, Ar-H), 8,40 (1H, s, Ar-H), 8,18-8,06 (6H, m, <i>J</i> = 5,2 Hz, NH ₂ , Ar-H), 7,89-7,80 (2H, m, Ar-H), 7,48 (1H, dd, <i>J</i> = 8,9, 2,1 Hz, Ar-H), 7,41-7,23 (10H, m, Ar-H), 5,16 (2H, s, CH ₂), 5,07 (2H, s, CH ₂), 4,68-4,41 (1H, m, CH), 2,56 (2H, t, <i>J</i> = 7,5 Hz, CH ₂), 2,24-2,15 (1H, m, CH), 2,13-2,04 (1H, m, CH)
¹³C NMR	δ _c (125 MHz, DMSO- _d 6) 172,51, 171,74, 164,82, 162,63 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 245,9 Hz), 148,57, 147,63, 136,41 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 21,0 Hz), 133,49, 131,90, 130,51, 129,22, 128,87, 128,85, 128,53, 128,46, 128,40, 128,26, 128,03, 124,93, 124,18, 124,18, 122,92, 121,04, 119,73, 115,56, 66,60, 66,03, 52,82, 30,58, 25,91
HRMS	[<i>M</i> + <i>H</i>] ⁺ obliczone: 738,1095, zmierzone: 738,3111

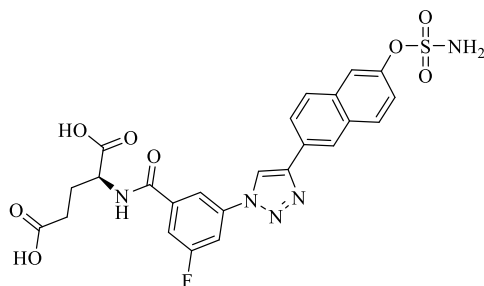
5.2.36 Procedura otrzymywania kwasu (*S*)-(2-fluoro-4-(4-(6-(sulfamiloxy)naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminowego (**VIF**) oraz kwasu (*S*)-(3-fluoro-4-(5-(6-(sulfamiloxy)naftaleno-2-ylo)-1*H*-1,2,3-triazolo-1-ylo)benzoilo)glutaminowego (**VIL**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej wprowadzono związek **VID** lub **VIJ** (1eq, 0,22 mmol, 150 mg), 2,5 mL TFA oraz 7,5 mL DCM. Całość mieszano przez 3 h w temp. pokojowej. Po tym czasie, lotne składniki mieszaniny odparowano z użyciem wyparki obrotowej. Następnie do układu dodano Et₂O, po czym umieszczono kolbę w łaźni ultradźwiękowej przez 5 minut. Ciecz znajdującą się nad osadem zdekantowano, a surowy produkt rekrystalizowano z użyciem octanu etylu oraz heksanu otrzymując produkt **VIF** lub **VIL**.



Kwas (S)-2-fluoro-4-(4-(6-(sulfamiloksy)naftaleno-2-yl)-1H-1,2,3-triazolo-1-yl)benzoil)glutaminowy VI F

Wydajność	89%
Temperatura topnienia	104-106°C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO-d ₆) 12,33 (2H, bs, COOH), 9,59 (1H, s, <i>J</i> = 9,1 Hz, CH), 8,72 (1H, d, <i>J</i> = 7,4 Hz, NH), 8,57 (1H, s, Ar-H), 8,12 (4H, d, <i>J</i> = 7,2 Hz, NH ₂ , Ar-H), 8,01 (1H, d, <i>J</i> = 11,0 Hz, Ar-H), 7,99-7,93 (2H, m, Ar-H), 7,87 (2H, dd, <i>J</i> = 8,2, 5,0 Hz, Ar-H), 7,48 (1H, dd, <i>J</i> = 8,9, 2,0 Hz, Ar-H), 4,42 (1H, dd, <i>J</i> = 13,4, 8,5 Hz, CH), 2,43-2,33 (2H, m, CH ₂), 2,09 (1H, dt, <i>J</i> = 12,8, 7,5 Hz, CH), 1,92 (1H, dt, <i>J</i> = 14,6, 8,1 Hz, CH)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO-d ₆) 174,27, 173,36, 163,40, 158,05 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 245,4 Hz), 148,54, 147,61, 139,36 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 10,4 Hz), 133,51, 132,34, 132,31, 130,88, 130,51, 129,21, 127,99, 124,84, 124,16, 123,85 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 15,5 Hz), 122,93, 120,90, 119,75, 115,90 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2,8 Hz), 108,35 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 27,9 Hz), 52,44, 30,66, 26,50
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 558,1095, zmierzone: 558,1956



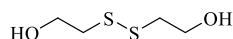
Kwas (S)-3-fluoro-5-(4-(6-(sulfamiloksy)naftaleno-2-yl)-1H-1,2,3-triazolo-1-yl)benzoil)glutaminowy VII L

Wydajność	92%
Temperatura topnienia	100 – 101 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO-d ₆) 12,94 (2H, bs, COOH), 9,57 (1H, s, CH), 8,98 (1H, d, <i>J</i> = 7,4 Hz, NH), 8,57 (1H, s, Ar-H), 8,41 (1H, s, Ar-H), 8,12 (6H, s, NH ₂ , Ar-H), 7,86 (2H, s, Ar-H), 7,48 (1H, d, <i>J</i> = 8,9 Hz, Ar-H), 4,52-4,38 (1H, m, CH), 2,39 (2H, t, <i>J</i> = 7,3 Hz, CH ₂), 2,16-2,08 (1H, m, CH), 1,97 (1H, m, CH)

¹³C NMR	δ _c (125 MHz, DMSO-d ₆) 174,27, 173,53, 164,60 (d, ⁴ J _{C-F} = 2,2 Hz), 162,65 (d, ¹ J _{C-F} = 246,1 Hz), 148,53, 147,76, 138,26 (d, ⁴ J _{C-F} = 10,5 Hz), 137,93 (d, ⁴ J _{C-F} = 7,9 Hz), 133,50, 131,88, 130,51, 129,20, 128,05, 124,92, 124,16, 121,02, 119,75, 115,50 (d, ⁴ J _{C-F} = 2,1 Hz), 114,79 (d, ² J _{C-F} = 23,2 Hz), 110,76 (d, ² J _{C-F} = 26,5 Hz), 52,70, 30,82, 26,34
HRMS	[M+H] ⁺ obliczone: 558,1095, zmierzone: 558,1962

5.2.37 Procedura otrzymywania dwusiarczku bis(2-hydroksyetylu) (**140**)

Do kolby okrągłodennej, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, wprowadzono 2-merkaptetanol (1 eq, 96,00 mmol, 6,75 mL) oraz 30 mL DMSO. Układ reakcyjny doprowadzono do temperatury 80 °C i mieszano w tych warunkach przez 12 h. Po upływie tego czasu, reakcję ochodzono i do kolby wprowadzono solankę. Następnie przeprowadzono ekstrakcję z użyciem octanu etylu, a uzyskane warstwy organiczne połączono, wysuszono bezwodnym Na₂SO₄, przesączono i odparowano z użyciem wyparki obrotowej. Surowy produkt oczyszczono z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej używając jako eluentu mieszaniny heksan : octan etylu (90 : 10) otrzymując oczekiwany produkt **140**.



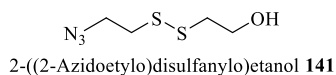
Dwusiarezek bis(2-hydroksyetylu) **140**

Wydajność	59%
Temperatura topnienia	25-26 °C
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO-d ₆) 4,85 (2H, t, J = 5,5 Hz, OH), 3,60 (4H, q, J = 6,6 Hz, CH ₂), 2,77 (4H, t, J = 6,6 Hz, CH ₂)
¹³C NMR	δ _c (125 MHz, DMSO-d ₆) 59,97, 41,50

5.2.38 Procedura otrzymywania 2-((2-azidoetylo)disulfanylo)etanolu (**141**)

Do kolby okrągłodennej wprowadzono **140** (1eq, 26,80 mmol, 4,13 g), TEA (1,2 eq, 32,16 mmol, 4,5 mL) oraz 17 mL THF. Następnie przygotowano roztwór chlorku metanosulfonylu (1 eq, 26,80 mmol, 2,07 mL) w 8,5 mL THF, który w kolejnym kroku ostrożnie wkroplono do mieszaniny reakcyjnej. Całość mieszano przez 3 h w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu do kolby dodano 100 mL wody by kolejno przeprowadzić ekstrakcję z wykorzystaniem octanu etylu. Uzyskane warstwy organiczne połączono, wysuszono z wykorzystaniem bezwodnego Na₂SO₄, przesączono i odparowano z użyciem wyparki obrotowej. Pozostałość znajdującą się w kolbie rozpuszczono w 17 mL DMF, następnie do kolby wprowadzono azydek sodu (3 eq, 80,40 mmol, 5,23 g) i doprowadzono mieszaninę reakcyjną do temp. 60 °C, po czym całość mieszano przez 12 h. Po upływie tego czasu do kolby wprowadzono 100 mL wody i ponownie przeprowadzono ekstrakcję z użyciem

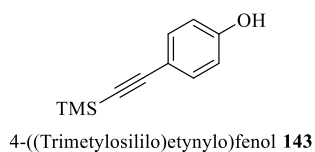
octanu etylu. Uzyskane warstwy organiczne połączone, wysuszono z użyciem bezwodnego Na₂SO₄, przesączono i odparowano z wykorzystaniem wyparki obrotowej. Surowy produkt oczyszczano poprzez preparatywną chromatografię kolumnową jako eluent stosując mieszaninę eter naftowy : octan etylu (60 : 40) otrzymując oczekiwany produkt **141**.



Wydajność	30%
Temperatura topnienia	olej
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO-d ₆) 4,88 (1H, t, <i>J</i> = 5,4 Hz, OH), 3,71-3,55 (4H, m, CH ₂), 2,91 (2H, t, <i>J</i> = 6,5 Hz, CH ₂), 2,80 (2H, t, <i>J</i> = 6,4 Hz, CH ₂),
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO-d ₆) 59,79 49,58, 41,50, 37,35

5.2.39 Procedura otrzymywania 4-((trimetylosililo)etynylo)fenolu (**143**)

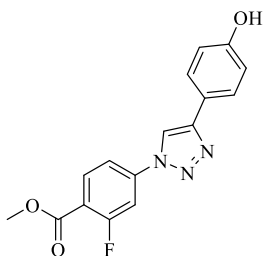
Do wysuszonej kolby okrągłodennej wprowadzono 4-jodofenol **142** (1 eq, 49,54 mmol, 10,90 g), trimetylosililoacetylen (1,6 eq, 79,26 mmol, 11,20 mL), PdCl₂ (0,05 eq, 2,48 mmol, 0,44 g), Ph₃P (0,1 eq, 4,95 mmol, 1,30 g), CuI (0,025 eq, 1,24 mmol, 0,24 g), TEA (7 eq, 346,78 mmol, 48,60 mL) oraz 250 mL bezwodnego ACN. Całość ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 3 h. Kolejno, mieszaninę reakcyjną ochłodzono, roztwór przesączono przez celit, a uzyskany w ten sposób przesącz odparowano na wyparce obrotowej. Otrzymany surowy produkt oczyszczano z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej w układzie AcOEt : heksan (1 : 4). Uzyskano w ten sposób związek **143** w postaci brązowego, krystalicznego ciała stałego.



Wydajność	76%
Temperatura topnienia	63-66 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO-d ₆) 9,90 (1H, s, OH), 7,25 (2H, d, <i>J</i> = 8,6 Hz, OH), 6,72 (d, <i>J</i> = 8,6 Hz, 1H), 0,17 (9H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO-d ₆) 158,62, 133,70, 116,03, 112,91, 106,46, 91,79, 0,50

5.2.40 Procedura otrzymywania 2-fluoro-4-(4-(4-hydroksyfenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-benzoesu metylu (**144**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej wprowadzono pochodną **124** (1 eq, 11,82 mmol, 2,00 g) oraz 50 mL suchego ACN. Następnie cały układ reakcyjny ochłodzono, korzystając z łaźni z lodem, po czym dodano *t*-BuONO (1,2 eq, 14,18 mmol, 1,69 mL) i całość mieszano przez 10 minut w atmosferze gazu obojętnego. Po tym czasie, ostrożnie wkroplono TMSN₃ (1,1 eq, 13,00 mmol, 1,71 mL). Po zakończeniu wkraplania, mieszaninę reakcyjną doprowadzono do temperatury otoczenia i mieszano przez 1 h. Po tym czasie, do kolby dodano 4-((trimetylosililo)etynylo)fenol **143** (1 eq, 11,82 mmol, 2,25 g) oraz 1 M roztwór TBAF w THF (1,1 eq, 13,00 mmol, 13,00 mL) i mieszano w temperaturze 0 °C przez 30 minut. Następnie przygotowano świeży 1 M roztwór askorbinianu sodu (0,2 eq, 2,36 mmol, 0,47 g, V_{H₂O} = 2,36 mL) oraz CuSO₄ · 5H₂O (0,1 eq, 1,18 mmol, 0,29 g) po czym dodano je do kolby. Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 12 h. Po upływie tego czasu, w kolbie pojawił się osad, który odsączono i przemyto zimnym ACN otrzymując czysty produkt **144**.



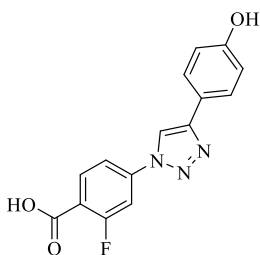
2-Fluoro-4-(4-(4-hydroksyfenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)benzoesan metylu **144**

Wydajność	80%
Temperatura topnienia	210-214 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d ₆) 9,71 (1H, s, OH), 9,25 (1H, s, CH), 8,11 (1H, t, <i>J</i> = 8,2 Hz, Ar-H), 8,00 (1H, dd, <i>J</i> = 11,7, 2,1 Hz, Ar-H), 7,95 (1H, dd, <i>J</i> = 8,6, 2,1 Hz, Ar-H), 7,72 (2H, d, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H), 6,87 (2H, d, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H), 3,87 (3H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ _c (125 MHz, DMSO- _d ₆) 162,62 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 3,8 Hz), 161,95 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 258,8 Hz), 158,27, 148,50, 141,29 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 11,0 Hz), 134,13 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 4,0 Hz), 127,32, 121,11, 118,74, 117,73 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 10,1 Hz), 116,25, 115,64 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 3,5 Hz), 108,67 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 27,8 Hz), 53,02

5.2.41 Procedura otrzymywania kwasu 2-fluoro-4-(4-(4-hydroksyfenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)benzoesowego (**145**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, wprowadzono pochodną **144** (1eq, 8,52 mmol, 2,67 g), 200 mL wody, 200 mL MeOH oraz wodorotlenek litu

(10 eq, 85,20 mmol, 2,05 g). Następnie całość doprowadzono do temperatury 50 °C i w tych warunkach pozostawiono na 2,5 h. Po tym czasie, korzystając z wyparki obrotowej zredukowano ilość rozpuszczalników. Następnie, zawartość kolby zakwaszono z użyciem 1M roztworu HCl do uzyskania czerwonej barwy papierka uniwersalnego. W wyniku tego w kolbie pojawił się osad, który następnie odsączono i przepłukano dużą ilością wody destylowanej. W ten sposób otrzymano produkt **145**.

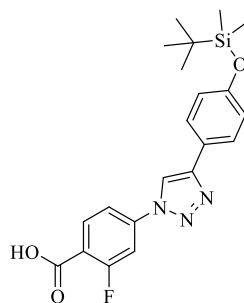


Kwas 2-fluoro-4-(4-(4-hydroksyfenilo)-1*H*-1,2,3-triazol-1-ylo)benzoesowy **145**

Wydajność	92%
Temperatura topnienia	> 250 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 13,48 (1H, bs, COOH), 9,72 (1H, s, OH), 9,24 (1H, s, CH), 8,09 (1H, t, <i>J</i> = 8,2 Hz, Ar-H), 8,00-7,85 (2H, m, Ar-H), 7,72 (2H, d, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H), 6,87 (2H, d, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H)
¹³C NMR	δ _c (125 MHz, DMSO- _d 6) 164,63 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 3,2 Hz), 162,09 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 258,3 Hz), 158,27, 148,46, 140,97 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 10,9 Hz), 134,25 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 2,0 Hz), 127,32, 121,15, 119,00 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 10,4 Hz), 1818,73, 116,25, 115,51 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 3,6 Hz), 108,62 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 27,8 Hz)

5.2.42 Procedura otrzymywania kwasu 4-(4-((*tert*-butyldimetylosililo)oksy)fenilo)-1*H*-1,2,3-triazol-1-ylo)-2-fluorobenzoesowy (**146**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej wprowadzono związek **145** (1 eq, 1,42 mmol, 1,28 g), TMSCl (3 eq, 4,26 mmol, 0,46 g), TEA (3 eq, 4,26 mmol, 0,60 mL) oraz 20 mL bezwodnego DMF. Całość mieszano przez 12 h w temperaturze pokojowej w atmosferze gazu obojętnego. Po upływie tego czasu do kolby dodano 100 mL 1 M roztworu HCl. Następnie przeprowadzono ekstrakcję z wykorzystaniem octanu etylu. Kolejno warstwy organiczne połączono, wysuszono z wykorzystaniem bezwodnego MgSO₄, przesączono, a rozpuszczalnik organiczny odparowano z wykorzystaniem rotatora. Surowy produkt oczyszczono z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej z użyciem mieszaniny DCM : MeOH (100 : 5) jako eluentu uzyskując w ten sposób oczekiwany produkt **146**.

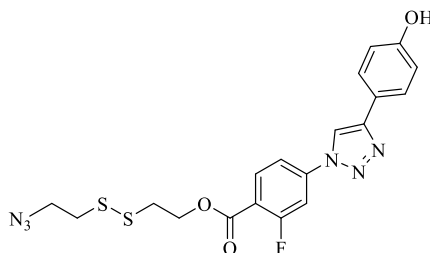


Kwas 4-(4-((*tert*-butylodimetylosilo)oksy)fenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-1-ylo)-2-fluorobenzoowy **146**

Wydajność	79%
Temperatura topnienia	> 250 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 13,52 (1H, bs, COOH), 9,32 (1H, s, CH), 8,09 (1H, t, <i>J</i> = 8,2 Hz, Ar-H), 8,01-7,88 (2H, m, Ar-H), 7,80 (2H, d, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H), 0,94 (9H, s, CH ₃), 0,20 (6H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d 6) 164,63 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 3,3 Hz), 162,08 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 258,1 Hz), 155,88, 148,00, 140,89 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 10,6 Hz), 134,26 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2,0 Hz), 127,35, 123,68, 120,92, 119,36, 119,19 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 10,3 Hz), 115,53 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 3,6 Hz), 108,66 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 28,0 Hz), 25,98, 18,40, -4,10

5.2.43 Procedura otrzymywania 4-(4-((*tert*-butylodimetylo-sililo)oksy)fenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-1-ylo)-2-fluorobenzoesanu 2-((2-azidoetylo)disulfanylo)etylu (**147**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej wprowadzono związek **146** (1 eq, 0,51 mmol, 0,21 g), **141** (2 eq, 1,02 mmol, 0,18 g), HOBT (1,5 eq, 0,77 mmol, 0,10 g), EDCI · HCl (1,5 eq, 0,77 mmol, 0,15 g), TEA (1,5 eq, 0,77 mmol, 0,10 mL) oraz 6 mL bezwodnego DMF. Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 12 h. Po upływie tego czasu do kolby dodano octan etylu, po czym warstwę organiczną przemyto nasyconym roztworem NaHCO₃ oraz 1 M roztworem HCl. Następnie frakcję organiczną wysuszono z wykorzystaniem bezwodnego MgSO₄, przesączono i odparowano. Surowy produkt oczyszczano z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej, gdzie jako elument zastosowano mieszaninę PE : octan etylu w zmiennych ilościach (od 100 : 0 do 50 :50). Uzyskano w ten sposób dwa produkty **147**.

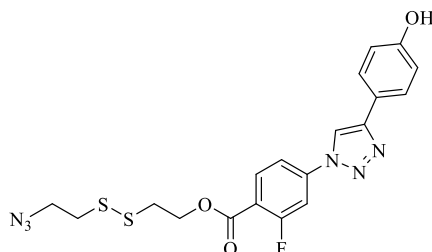


2-Fluoro-4-(4-(4-hydroksyfenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-1-ylo)-benzoesan 2-((2-azidoetylo)disulfanylo)etylu **148**

Wydajność	42%
Temperatura topnienia	98-100 °C
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,33 (1H, s, CH), 8,12 (1H, t, <i>J</i> = 8,2 Hz, Ar-H), 8,06-7,93 (2H, m, Ar-H), 7,79 (2H, d, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H), 4,55 (2H, t, <i>J</i> = 6,2 Hz, CH ₂), 3,61 (2H, t, <i>J</i> = 6,4 Hz, CH ₂), 3,14 (2H, t, <i>J</i> = 6,2 Hz, CH ₂), 2,96 (2H, t, <i>J</i> = 6,4 Hz, CH ₂), 0,94 (9H, s, CH ₃), 0,20 (6H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ _c (125 MHz, DMSO- _d 6) 162,82 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 4,0 Hz), 162,06 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 259,6 Hz), 155,91, 148,06, 141,36 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 10,9 Hz), 134,11, 127,36, 123,61, 120,92, 119,35, 117,66 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 10,0 Hz), 115,66 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 3,6 Hz), 108,74 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 27,7 Hz), 63,39, 49,58, 37,28, 36,67, 25,98, 18,40, -4,10

5.2.44 Procedura otrzymywania 2-fluoro-4-(4-(4-hydroksyfenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-benzoesanu 2-((2-azidoetylo)disulfanylo)etylu (**148**)

Do kolby okrągłodennej wprowadzono **147** (1 eq, 0,33 mmol, 0,19 g), 4 mL MeOH oraz 4 ml HCl w Et₂O. Całość mieszano przez 4 h w temperaturze pokojowej, a po upływie tego czasu do kolby dodano 60 mL nasyconego NaHCO₃. Uzyskaną mieszaninę ekstrahowano z wykorzystaniem octanu etylu, by następnie połączone warstwy organiczne wysuszyć z użyciem bezwodnego MgSO₄ i przesączono. W kolejnym etapie odparowano rozpuszczalnik z wykorzystaniem rotatora uzyskując oczekiwany produkt **148**.

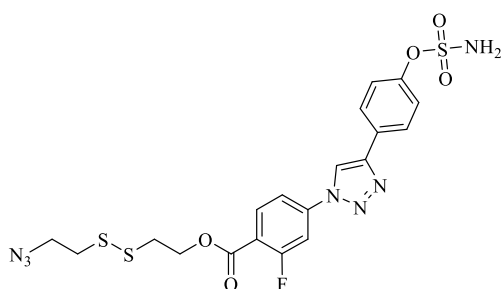


2-Fluoro-4-(4-(4-hydroksyfenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-benzoesan 2-((2-azidoetylo)disulfanylo)etylu **148**

Wydajność	92 %
Temperatura topnienia	135-137 °C (z rozkładem)
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,72 (1H, s, OH), 9,27 (1H, s, CH), 8,13 (1H, t, <i>J</i> = 8,2 Hz, Ar-H), 8,07-7,89 (2H, m, Ar-H), 7,73 (2H, d, <i>J</i> = 8,7 Hz, Ar-H), 6,87 (2H, d, <i>J</i> = 8,7 Hz, Ar-H), 4,56 (2H, t, <i>J</i> = 6,2 Hz, CH ₂), 3,61 (2H, t, <i>J</i> = 6,4 Hz, CH ₂), 3,15 (2H, t, <i>J</i> = 6,3 Hz, CH ₂), 2,96 (2H, t, <i>J</i> = 6,5 Hz, CH ₂)
¹³C NMR	δ _c (125 MHz, DMSO- _d 6) 162,85 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 4,3 Hz), 162,0 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 259,5 Hz), 158,28, 148,51, 141,41 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 11,3 Hz), 134,11, 127,33, 121,08, 118,77, 117,65, 116,26, 115,69 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 3,7 Hz), 108,74 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 27,2 Hz), 63,39, 49,56, 37,27, 36,67

5.2.45 Procedura otrzymywania 2-((2-azidoetylo)disulfanylo)etylo-2-fluoro-4-(4-(4-(sulfamoiłoksy)-fenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-1-ylo)benzoesanu etylu (**149**)

Do wysuszonej kolby okrągłodennej wprowadzono związek **148** (1 eq, 0,48 mmol, 220 mg) oraz 3 mL bezwodnego *N,N*-DMA. Następnie kolbę umieszczono w łaźni lodowej na 10 minut. Po tym czasie do przygotowanej mieszaniny wdroplono 2 M roztwór chlorku sulfamoiłu w ACN (3 eq, 1,45 mmol, 0,73 mL). Po zakończeniu wkraplania usunięto łaźnię lodową i doprowadzono układ do temperatury otoczenia. Następnie, reakcja mieszana była w atmosferze gazu obojętnego przez 15 minut. Po tym czasie zawartość kolby przeniesiono do zlewki z wodą, w wyniku czego wytrącił się osad, który odsączono i przemyto zimną wodą destylowaną uzyskując czysty produkt **149**.

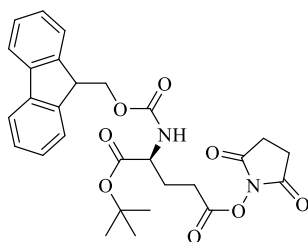


2-((2-Azidoetylo)disulfanylo)etylo-2-fluoro-4-(4-(4-(sulfamoiłoksy)fenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-1-ylo)benzoesan etylu **149**

Wydajność	88%
Temperatura topnienia	151-152 °C
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 9,48 (1H, s, CH), 8,14 (1H, t, <i>J</i> = 8,1 Hz, Ar-H), 8,08 (2H, s, NH ₂), 8,03 (1H, d, <i>J</i> = 13,5 Hz, Ar-H), 7,99 (2H, d, <i>J</i> = 8,2 Hz, Ar-H), 7,42 (2H, d, <i>J</i> = 8,4 Hz, Ar-H), 4,56 (2H, t, <i>J</i> = 6,2 Hz, CH ₂), 3,62 (2H, t, <i>J</i> = 6,5 Hz, CH ₂), 3,15 (2H, t, <i>J</i> = 6,2 Hz, CH ₂), 2,96 (2H, t, <i>J</i> = 6,4 Hz, CH ₂)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d 6) 162,82 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 3,8 Hz), 162,02 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 259,7 Hz), 150,57, 147,30, 141,24 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 10,9 Hz), 134,14, 128,59, 127,20, 123,40, 120,53, 117,86 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 9,9 Hz), 115,82 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 3,6 Hz), 108,93 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 27,4 Hz), 63,42, 49,57, 37,28, 36,67

5.2.46 Procedura otrzymywania (S)-1-*tert*-butylo-5-(2,5-dioksopirrolidyn-1-ylo) 2-(((9*H*-fluoren-9-ylo)metoksy)karbonylo)amino)pentanodioatu (**152**)

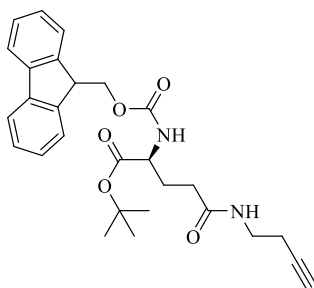
Do kolby okrągłejdennej wprowadzono związek **150** (1 eq, 11,20 mmol, 4,77 g), **151** (1eq, 11,20 mmol, 1,29 g), DCC (1eq, 11,20 mmol, 2,30 g) oraz 100 mL dioksanu. Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 4 h. Po upływie tego czasu odsączono powstały osad, a otrzymany przesącz odparowano z wykorzystaniem rotatora. Uzyskany w ten sposób surowy produkt wykorzystano w kolejnym etapie syntezy bez uprzedniego oczyszczania.



(*S*)-1-*Tert*-butylo-5-(2,5-dioksopirrolidyn-1-ylo) 2-((((9*H*-fluoren-9-ylo)metoksy)karbonylo)amino)pentanodioat **152**

5.2.47 Procedura otrzymywania (*S*)-*tert*-butylo-2-((((9*H*-fluoren-9-ylo)metoksy)karbonylo)-amino)-5-(but-3-yn-1-yloamino)-5-oksopentanianu (**153**)

Do kolby okrągłodennej wprowadzono surowy produkt **152** (1eq, 11,20 mmol, 5,85 g), chlorowodorek propalgiloaminy (1,1 eq, 12,30 mmol, 1,13 g), TEA (1,1 eq, 12,30 mmol, 1,72 mL) oraz 100 mL DCM. Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 2 h, po czym mieszaninę reakcyjną ekstrahowano z użyciem 1 M roztworu HCl. Następnie, połączone warstwy organiczne wysuszono z wykorzystaniem bezwodnego MgSO₄, przesączono, a rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany surowy produkt oczyszczono z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii kolumnowej z użyciem mieszaniny rozpuszczalników DCM : MeOH (100 : 2) jako eluentu uzyskując w ten sposób czysty, oczekiwany produkt **153**.



(*S*)-*Tert*-butylo-2-((((9*H*-fluoren-9-ylo)metoksy)karbonylo)-amino)-5-(but-3-yn-1-yloamino)-5-oksopentanian **153**

Wydajność

75%

Temperatura topnienia

104-105 °C (z rozkładem)

¹H NMR

δ_H (500 MHz, DMSO-*d*₆) 8,00 (1H, t, *J* = 5,8 Hz, NH), 7,88 (2H, d, *J* = 7,5 Hz, Ar-H), 7,71 (2H, d, *J* = 7,5 Hz, Ar-H), 7,68 (1H, d, *J* = 7,8 Hz, Ar-H), 7,40 (2H, t, *J* = 7,6 Hz, Ar-H), 7,31 (2H, t, *J* = 7,5 Hz, Ar-H), 4,35-4,11 (3H, m, CH₂, CH), 3,87 (1H, ddd, *J* = 9,4, 7,8, 5,0 Hz, CH), 3,13 (2H, q, *J* = 6,7 Hz, CH₂), 2,80 (1H, t, *J* = 2,6 Hz, CH), 2,25 (2H, td, *J* = 7,1, 2,7 Hz, CH₂), 2,15 (2H, t, *J* = 7,7 Hz, CH₂), 2,03-1,86 (1H, m, CH), 1,83-1,70 (1H, m, CH), 1,37 (9H, s, CH₃)

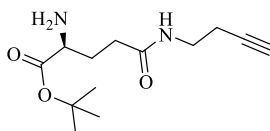
¹³C NMR

δ_C (125 MHz, DMSO-*d*₆) 171,85, 171,74, 156,53, 144,25, 141,17,

130,69, 127,52, 125,71, 121,23, 83,72, 80,99, 72,50, 66,07, 52,97, 46,60, 38,18, 31,89, 28,64, 28,64, 27,09, 19,21

5.2.48 Procedura otrzymywania (S)-2-amino-5-(but-3-yn-1-yloamino)-5-oksopentanianu *tert*-butylu (**154**)

Do kolby okrągłodennej wprowadzono związek **153** (1 eq, 2,10 mmol, 1,00 g) oraz 11 mL DCM. Następnie przygotowano roztwór piperydyny (9 eq, 18,90 mmol, 1,87 mL) w 18 mL DCM, który powoli wdroplono do kolby. Całość w temperaturze pokojowej mieszano przez 2 h. Po uływie tego czasu odparowano rozpuszczalnik a surowy produkt oczyszczono z wykorzystaniem chromatografii typu flash wykorzystując jako eluent mieszaninę DCM : MeOH (100 : 7), uzyskując w ten sposób oczekiwany produkt **154**.

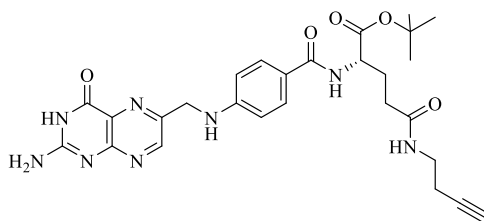


(S)-2-Amino-5-(but-3-yn-1-yloamino)-5-oksopentanian *tert*-butylu **154**

Wydajność	72%
Temperatura topnienia	olej
¹H NMR	δ _H (500 MHz, DMSO- _d 6) 7,97 (1H, t, <i>J</i> = 5,9 Hz, NH), 3,20-3,00 (3H, m, CH ₂ , CH), 2,79 (1H, t, <i>J</i> = 2,6 Hz, CH), 2,24 (2H, tt, <i>J</i> = 7,2, 1,8 Hz, CH ₂), 2,12 (2H, t, <i>J</i> = 7,8 Hz, CH ₂), 1,83-1,67 (1H, m, CH), 1,60 (2H, bs, NH ₂), 1,58-1,48 (1H, m, CH), 1,39 (9H, s, CH ₃)
¹³C NMR	δ _C (125 MHz, DMSO- _d 6) 177,65, 172,30, 82,73, 79,33, 73,08, 51,56, 51,56, 36,04, 32,06, 31,01, 28,14, 22,70

5.2.49 Procedura otrzymywania (S)-2-(4-(((2-amino-4-okso-3,4-dihydropterydyn-6-ylo)metylo)amino)benzamido)-5-(but-3-yn-1-yloamino)-5-oksopentanianu *tert*-butylu (**156**)

Do okrągłodennej kolby wprowadzono związek **155** (1 eq, 12,10 mmol, 3,78 g), **154** (1,25 eq, 15,13 mmol, 3,71 g), HOBt (1,5 eq, 18,15 mmol, 2,45 g), EDCI · HCl (1,5 eq, 18,15 mmol, 3,48 g), TEA (1,5 eq, 18,15 mmol, 2,54 mL) oraz 20 mL DMSO. Całość mieszano w temperaturze 40 °C przez 12 h. Po upływie tego czasu do kolby dodano 20 mL MeOH oraz 200 mL Et₂O. Następnie całość mieszano przez 1 h w łaźni z lodem w celu wytrącenia osadu, który następnie odsączono i wysuszono. Uzyskany w ten sposób surowy produkt rozpuszczono w 10 mL DMSO i wlało do gorącego roztworu EtOH : H₂O w stosunku 50 : 50. Gorący roztwór przesączono, a przesącz pozostawiono do krystalizacji. W kolejnym kroku uzyskany produkt odsączono i przepłukano ostrożnie zimną mieszaniną EtOH/H₂O oraz samą wodą uzyskując czysty produkt **156**.



(*S*)-2-(4-(((2-Amino-4-okso-3,4-dihydropterydyn-6-ylo)metylo)amino)benzamido)-5-(but-3-yn-1-yloamino)-5-oksopentanian *tert*-butylu **156**

Wydajność 33%

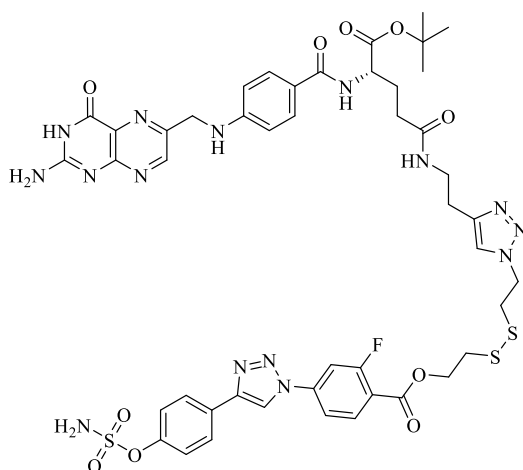
Temperatura topnienia 121-123 °C (rozkład)

¹H NMR δ_H (500 MHz, DMSO-*d*₆) 11,45 (1H, bs, NH), 8,63 (1H, s, Ar-H), 8,17 (1H, d, *J* = 7,4 Hz, NH), 8,01 (1H, t, *J* = 5,8 Hz, NH), 7,63 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 6,93 (1H, t, *J* = 6,1 Hz, NH), 6,93 (2H, bs, NH₂), 6,62 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 4,47 (2H, d, *J* = 6,1 Hz, CH₂), 4,23-4,15 (1H, m, CH), 8,17 (2H, d, *J* = 7,4 Hz, CH₂), 2,78 (1H, t, *J* = 2,7 Hz, CH), 2,23 (2H, td, *J* = 7,2, 2,6 Hz, CH₂), 2,20-2,11 (2H, m, CH₂), 2,02-1,95 (1H, m, CH), 1,90-1,82 (1H, m, CH), 1,37 (9H, s, CH₃)

¹³C NMR δ_C (125 MHz, DMSO-*d*₆) 172,08, 171,99, 166,85, 154,29, 151,20, 149,06, 149,01, 129,42, 128,33, 121,70, 111,62, 82,70, 80,76, 72,47, 53,33, 46,30, 40,77, 38,17, 32,23, 28,12, 26,90, 19,16

5.2.50 Procedura otrzymywania (*S*)-2-((2-(4-(4-(((2-amino-4-okso-3,4-dihydropterydyn-6-ylo)metylo)amino)benzamido)-5-(*tert*-butoksy)-5-oksopentanamido)etylo)-1*H*-1,2,3-triazol-1-ylo)etylo)disulfanylo)etylo-2-fluoro-4-(4-(4-(sulfamoksy)fenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-1-ylo)benzoesanu etylu (**157**)

Do kolby okrągłodennej wprowadzono związek **156** (1 eq, 0,19 mmol, 104 mg), **149** (1,1 eq, 0,21 mmol, 110 mg), TBTA (0,02 eq, 0,00038 mmol, 2 mg) oraz 3,16 mL bezwodnego DMF. Następnie cały układ płukano argonem przez kilka minut, by w kolejnym kroku dodać do kolby rozpuszczony w wodzie CuSO₄ · 5H₂O (0,3 eq, 0,057 mmol, 14 mg) oraz askorbinian sodu (1 eq, 0,19 mmol, 37 mg, V_{H₂O} = 0,19 mL). Całość mieszana była w temperaturze pokojowej w atmosferze argonu przez 3 h. Po upływie tego czasu do kolby dodano 10 mL H₂O w wyniku czego w kolbie pojawił się osad, który odsączono i przepłukano ostrożnie zimną wodą oraz ACN uzyskując oczekiwany produkt **157**.



(S)-2-((2-(4-(((2-Amino-4-okso-3,4-dihydropterydyn-6-ylo)metylo)amino)benzamido)-5-(*tert*-butoksy)-5-oksopentanamido)etylo)-1*H*-1,2,3-triazol-1-ylo)etylo)disulfanylo)etylo-2-fluoro-4-(4-(4-(sulfamoksy)fenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-1-ylo)benzoesan etylu **157**

Wydajność

82%

Temperatura topnienia

121-123 °C (rozkład)

¹H NMR

δ_H (500 MHz, DMSO- d_6) 11,40 (1H, bs, NH), 9,49 (1H, s, CH), 8,63 (1H, s, Ar-H), 8,18-8,16 (1H, m, NH), 8,14-8,13 (1H, m, NH), 8,08 (2H, d, NH₂), 8,05-7,93 (5H, m, Ar-H), 7,88 (1H, s, CH), 7,63 (2H, d, $J = 8,9$ Hz, Ar-H), 7,42 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, Ar-H), 6,93 (1H, t, $J = 5,8$ Hz, NH), 6,93 (2H, bs, NH₂), 6,61 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, Ar-H), 4,59 (2H, t, $J = 6,7$ Hz, CH₂), 4,53 (2H, t, $J = 6,2$ Hz, CH₂), 4,46 (2H, d, $J = 5,8$ Hz, CH₂), 4,20-4,16 (1H, m, CH), 3,27-3,25 (2H, m, CH₂), 3,24-3,20 (2H, m, CH₂), 3,14-3,11 (2H, m, CH₂), 2,71 (2H, d, $J = 2,5$ Hz, CH₂), 2,19-2,12 (2H, m, CH₂), 2,00-1,95 (1H, m, CH), 1,88-1,84 (1H, m, CH), 1,37 (9H, s, CH₃)

¹³C NMR

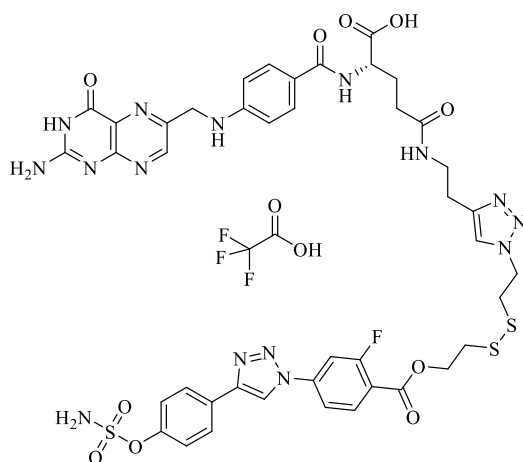
δ_C (125 MHz, DMSO- d_6) 172,04, 171,89, 166,82, 162,76 (d, $^3J_{C-F} = 4,6$ Hz), 162,03 (d, $^1J_{C-F} = 259,5$ Hz), 151,19, 150,56, 149,19, 148,93, 147,30, 141,23 (d, $^3J_{C-F} = 11, 1$ Hz), 134,16, 129,41, 128,59, 127,21, 123,40, 122,97, 121,73, 120,56, 117,87 (d, $^3J_{C-F} = 10,1$ Hz), 115,85 (d, $^4J_{C-F} = 2,9$ Hz), 111,60, 108,96 (d, $^2J_{C-F} = 27,4$ Hz), 82,70, 80,71, 73,32, 63,39, 53,31, 48,36, 46,11, 38,87, 38,17, 37,62, 36,52, 36,23, 32,25, 31,20, 28,12, 26,86, 25,95, 19,18

HRMS

[M+H]⁺ obliczone: 1088,3084, zmierzone: 1088,4587

5.2.51 Procedura otrzymywania trifluorooctanu (*S*)-2-(4-(((2-amino-4-okso-3,4-dihydropteridin-6-yl)metylo)amino)benzamido)-5-((2-(1-(2-((2-fluoro-4-(4-(4-(sulfamoyloksy)fenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-1-ylo)benzoilo)oksy)etylo)disulfanylo)ety-lo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ylo)etylo)amino)kwasu 5-oksopentanowego (**VII**)

Do okrągłodennej kolby wprowadzono związek **157** (1 eq, 0,09 mmol, 100 mg), 9 mL DCM oraz 3 mL TFA. Całość mieszało w temperaturze pokojowej przez 3 h. Po upływie tego czasu rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie do kolby dodano Et₂O i umieszczono kolbę w łaźni lodowej na 15 minut. Następnie odfiltrowano otrzymany osad uzyskując oczekiwany produkt końcowy **VII**.



Trifluorooctan (*S*)-2-(4-(((2-amino-4-okso-3,4-dihydropteridin-6-yl)metylo)amino)benzamido)-5-((2-(1-(2-((2-fluoro-4-(4-(4-(sulfamoyloksy)fenylo)-1*H*-1,2,3-triazol-1-ylo)benzoilo)oksy)etylo)disulfanylo)ety-lo)-1*H*-1,2,3-triazol-4-ylo)etylo)amino)kwasu 5-oksopentanowego **VII**

Wydajność

99%

Temperatura topnienia

154-156 °C (rozkład)

¹H NMR

δ_H (500 MHz, DMSO-*d*₆) 12,43 (2H, bs, NH₂⁺), 9,48 (1H, s, CH), 8,81 (1H, bs, Ar-H), 8,17-8,16 (1H, m, NH), 8,14-8,12 (1H, m, NH), 8,08 (2H, s, NH₂), 8,05-7,94 (5H, m, Ar-H), 7,91 (1H, s, CH), 7,63 (2H, d, *J* = 7,6 Hz, Ar-H), 7,41 (d, *J* = 8,2 Hz, Ar-H), 6,62 (2H, d, *J* = 6,8 Hz, Ar-H), 7,07 (4H, bs, NH₂, NH₂⁺), 4,58 (2H, t, *J* = 6,2 Hz, CH₂), 4,52 (2H, t, *J* = 5,9 Hz, CH₂), 4,50 (2H, bs, CH₂), 4,52 (1H, bs, CH), 3,27-3,18 (2H, m, CH₂), 3,16-3,06 (2H, m, CH₂), 2,74-2,66 (2H, m, CH₂), 2,16 (2H, t, *J* = 7,1 Hz), 2,09-1,98 (1H, m, CH), 1,95-1,78 (1H, m, CH)

¹³C NMR

δ_c (125 MHz, DMSO-*d*₆) 174,29, 172,11, 172,05, 166,71, 162,81 (d, ³*J*_{C-F} = 4,6 Hz), 161,90 (d, ¹*J*_{C-F} = 228,5 Hz), 151,11, 150,58, 147,31, 141,24 (d, ³*J*_{C-F} = 10,9 Hz), 134,17, 129,41, 128,59, 127,22, 123,40, 121,88, 120,57, 117,88 (d, ³*J*_{C-F} = 9,7 Hz), 115,85 (d, ⁴*J*_{C-F} = 2,9 Hz), 111,72, 108,97 (d, ²*J*_{C-F} = 26,5 Hz), 72,51, 65,36, 63,38, 52,61, 48,51, 39,12, 38,17, 37,53, 36,50, 32,38, 26,89, 25,99, 19,19, 15,60

HRMS

[M+H]⁺ obliczone: 1032,2458, zmierzone: 1032,3770

5.3 Badania biologiczne

5.3.1 Procedura izolacji oraz oczyszczania enzymu

Testy sprawdzające aktywność biologiczną otrzymanych inhibitorów przeprowadzono z wykorzystaniem sulfatazy steroidowej wyizolowanej z ludzkiego łożyska. Enzym ten został przygotowany do przeprowadzenia tego testu w następujący sposób:

- 1) Komórki łożyska ludzkiego pozbawiono błon i zhomogenizowano w zimnym buforze Tris-HCl o pH = 7,4, zawierającym 0,1% surfaktantu Triton X-100 oraz 0,02% NaN_3 .
- 2) Otrzymany w ten sposób homogenat kilkakrotnie zamrażano oraz rozmrażano, by kolejno odwirować go przy 100 000 g przez 1 h.
- 3) Uzyskany supernatant usunięto, a procedurę od momentu homogenizacji do odwirowywania powtarzano pięciokrotnie.
- 4) Po zakończeniu etapu izolacji enzymu oczyszczono go na drodze trójstopniowej chromatografii z użyciem kolumn: DEAE-celuloza, Con A-Sefaroza oraz Bio-Gel A-1,5 z wykorzystaniem odpowiednich buforów.
- 5) Wszystkie etapy izolacji sulfatazy steroidowej przeprowadzono w temp. 4 °C.

5.3.2 Procedura badania aktywności biologicznej wobec wyizolowanego enzymu

Oznaczenie aktywności inhibicyjnej otrzymanych związków zostało przeprowadzone w mieszaninie reakcyjnej o objętości 100 μL składającej się z: 20 mM Tris-HCl pH = 7,4, 3 nM radioznakowanego [^3H] siarczanu estronu, odpowiedniego stężenia badanego inhibitora oraz 5 U oczyszczonego enzymu (1U to ilość enzymu, która hydrolizuje 100 nM radioznakowanego [^3H] siarczanu estronu) w ciągu 30 minut w temp. 37 °C). Badania prowadzone były przez 30 minut w temp. 37 °C. Po tym czasie pobrano 90 μL z każdej studzienki, a produkt utworzony w trakcie hydrolizy [^3H] siarczanu estronu ekstrahowano toluenem (0,5 mL). Następnie 0,3 mL toluenu zostało połączone z 0,3 mL cieczy scyntylicyjnej. W ostatnim kroku pozostałą aktywność STS mierzono przy użyciu radioluminometru MicroBeta (Prekin Elmer). Test ten został wykonany w trzech powtórzeniach.

5.3.3 Procedura badania aktywności biologicznej z wykorzystaniem linii komórkowych MCF-7 oraz JEG-3

Hamowanie aktywności STS z użyciem linii komórkowych MCF-7 oraz JEG-3 mierzono zgodnie z procedurą opisaną w publikacji autorstwa Purohita i współpracowników.[41] Komórki zawieszono w pożywce Dulbecco Modified Eagle Medium uzupełnionej o 10% płodowej surowicy bydlęcej i hodowano do momentu uzyskania 80% konfluencji. Następnie komórki te wysiano do 96-dołkowych mikropłytek (Nest Biotechnology) w gęstości $2 \cdot 10^4$ komórek/dołek. W celu zapewnienia stałej ilości komórek w każdej próbce reakcyjnej ilość ich określono przy użyciu komory liczącej firmy Bruker lub Scepter 3.0 Handheld Automated Cell Counter. Następnie, prowadzono inkubację przez 20 h w temp. 37 °C w inkubatorze z 5% CO_2 , w pożywce bez surowicy (0,1 mL) z dodatkiem [^3H] siarczanu estronu oraz odpowiedniego stężenia inhibitora lub bez niego. Po przeprowadzonej inkubacji zebrano pożywkę zawierającą produkty reakcji STS (0,09 mL z każdej studzienki), a produkt wyizolowano z mieszaniny poprzez ekstrakcję z toluenem (0,5 mL). Aktywność STS wyrażana jako poziom radioaktywności mierzono przy użyciu radioluminometru MicroBeta (Prekin

Elmer). Test komórkowy przeprowadzono w trzech powtórzeniach, a wartość IC₅₀ została obliczona przy użyciu programu GraphPad Prism.

5.3.4 Procedura badania transportu związków do wnętrza komórek przez FR α

Procedura ta była analogiczna do metodyki przedstawionej w podrozdziale 5.5.3 z tą różnicą, iż w teście sprawdzającym możliwość wykorzystania FR α , jako selektywnej drogi transportu, przeprowadzono inkubację komórek z pożywką dodatkowo zawierającą 1 mM kwasu foliowego.

5.3.5 Procedura badania transportu związków do wnętrza komórek z wykorzystaniem testu PAMPA

Badanie sprawdzające możliwość transportu wybranych związków przez błonę komórkową przeprowadzony został z wykorzystaniem testu PAMPA, który składał się z następujących etapów:

- 1) W oddzielnych próbkach wirowych przygotowano po 500 μ L 500 μ M związków badanych rozpuszczonych w DMSO wraz z 475 μ L PBS. Dodatkowo przygotowano kontrole przepuszczalności, które rozcieńczono do 500 μ L, po czym pobrano z nich 24 μ L, które zmieszano z 475 μ L PBS.
- 2) Następnie w oddzielnych próbkach przygotowano po 200 μ M wzorców równowagi dla każdego testowanego związku oraz roztworów kontrolnych. W tym celu zmieszano po 80 μ L 500 μ M związków z 120 μ L PBS. Kolejno, w osobnej próbce wymieszano 5 μ L DMSO wraz z 245 μ L PBS, które stanowić będą ślepą próbę kontrolną.
- 3) W kolejnym kroku dodano 300 μ L PBS do studzienek na płytce akceptora.
- 4) Następnie dodano 5 μ L 4% lecytyny w dodekanie bezpośrednio do membran dołków znajdujących się na płytkach donora oraz po 200 μ L 500 μ M związku badanego oraz 500 μ M kontroli przepuszczalności.
- 5) W dalszym kroku ostrożnie umieszczono płytkę donora w dołkach płytki akceptora i inkubowano w temp. 37 °C przez 18 h.
- 6) Po tym czasie ostrożnie usunięto płytkę donora i zebrano ciecz ze studzienek płytki akceptora, które następnie zostały przeanalizowane poprzez wykonanie widma absorbancji w zakresie od 200 do 500nm. Końcowo korzystając z poniższego wzoru wyznaczono przepuszczalność dla każdego badanego związku.

$$P_e = C \times -\ln\left(1 - \frac{OD_A}{OD_E}\right) \left[\frac{cm}{s}\right]$$

P_e - współczynnik przepuszczalności

C – 7,72 x 10⁻⁷

OC_A - absorbancja roztworu akceptora minus próba ślepa

OC_E – absorbancja wzorca równowagi minus próba ślepa

5.4 Badania dotyczące szybkości uwalniania cząsteczki inhibitora z koniugatu STS-FA

5.4.1 Procedura pomiaru szybkości rozpadu wiązania disulfidowego pod wpływem DTT

Test sprawdzający szybkość wiązania disulfidowego pod wpływem DTT przeprowadzony został w następujący sposób:

- 1) Przygotowano 0,08 mM roztwór **Związku VII** w mieszaninie DMSO : PBS (1 : 9).
- 2) Przygotowano 8,00 mM roztwór DTT w mieszaninie DMSO : PBS (1 : 9).
- 3) Pobrano po 700 μL z każdego przygotowanych roztworów. Zmieszano je ze sobą i umieszczono w łaźni o temp. 37 °C.
- 4) Po 5 min., 30 min., 1 h, 24 h, 48 h oraz 72 h wykonywano nastrzyki po 70 μL każdy.
- 5) Analizę HPLC wykonywano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie odwróconych faz RP-HPLC, przy użyciu chromatografu Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific) i kolumny Wakopak Hanndy ODS (150 x 4,6 mm). Fazę ruchomą stanowił układ rozpuszczalników A i B, stosowany w 20-minutowym gradiencie 0-100% fazy B, gdzie: A - 0,1% HCOOH w wodzie; B - 80% ACN. Objętościowe natężenie przepływu eluentów wynosiło 1 ml/min. Detekcję przeprowadzono przy długości fali 260 nm.
- 6) Analiza LC-MS została zarejestrowana przy użyciu Nexera X2 Ultraperformance Liquid Chromatography (UHPLC) sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas Triple TOF 5600+ (SCIEX), wyposażonym w interfejs duo-electrospray, pracującym w trybie jonizacji dodatniej. Warunki chromatograficzne jakie zostały zastosowane to: kolumna C18 (Kinetex Phenomenex; C18; 2,1 x 150 mm; 2,6 μm , 100 Å) z szybkością przepływu równą 0,3 ml/min i objętością iniekcji 35 μL ; program analizy został ustawiony na liniowy gradient 0-100% fazy B przez 20 minut i 25 °C; faza A: 0,1% HCOOH w wodzie dejonizowanej, faza B: 80% ACN w wodzie dejonizowanej. Podczas analizy eluent był kierowany do odpadów przez 1 minutę po wstrzyknięciu. Warunki MS: napięcie rozpylania wynosiło -4,5 kV, temperatura źródła wynosiła 300 °C, a ciśnienie gazu nebulizatora (N_2) wynosiło 25 psi.

BIBLIOGRAFIA

- [1] F. Bray *et al.*, “Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 74, no. 3, pp. 229–263, 2024, doi: 10.3322/caac.21834.
- [2] “<https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype>.” (dostęp z dnia 01.09.2024 r.).
- [3] “<https://onkologia.org.pl/pl/raporty>.” (dostęp z dnia 01.09.2024 r.).
- [4] S. Łukasiewicz *et al.*, “Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies— An Updated Review,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, p. 4287, 2021, doi: 10.3390/cancers13174287.
- [5] T. J. Key, P. K. Verkasalo, and E. Banks, “Epidemiology of breast cancer,” *Lancet Oncol.*, vol. 2, no. 3, pp. 133–140, 2001, doi: 10.1016/S1470-2045(00)00254-0.
- [6] J. L. Kelsey and L. Bernstein, “Epidemiology and prevention of breast cancer,” *Annu. Rev. Public Health*, vol. 17, no. 61, pp. 47–67, 1996, doi: 10.1146/annurev.pu.17.050196.000403.
- [7] N. Hamajima *et al.*, “Menarche, menopause, and breast cancer risk: Individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies,” *Lancet Oncol.*, vol. 13, no. 11, pp. 1141–1151, 2012, doi: 10.1016/S1470-2045(12)70425-4.
- [8] J. S. Ellis *et al.*, “Gingival sequestration of amlodipine and amlodipine-induced gingival overgrowth,” *Lancet*, vol. 341, no. 8852, pp. 1102–1103, 1993, doi: 10.1016/0140-6736(93)92470-E.
- [9] P. M. Layde *et al.*, “The independent associations of parity, age at first full term pregnancy, and duration of breastfeeding with the risk of breast cancer,” *J. Clin. Epidemiol.*, vol. 42, no. 10, pp. 963–973, 1989, doi: 10.1016/0895-4356(89)90161-3.
- [10] M. Ewertz *et al.*, “Age at first birth, parity and risk of breast cancer: A meta-analysis of 8 studies from the nordic countries,” *Int. J. Cancer*, vol. 46, no. 4, pp. 597–603, 1990, doi: 10.1002/ijc.2910460408.
- [11] J. L. Kelsey, M. D. Gammon, and E. M. John, “Reproductive and hormonal risk factors. Reproductive Factors and Breast Cancer,” *Epidemiologic Rev.*, vol. 15, no. 1, pp. 36–47, 1993, doi: 10.1093/oxfordjournals.epirev.a036115.
- [12] K. Mcpherson, C. M. Steel, and J. M. Dixon, “ABC of breast diseases: Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics,” *Bmj*, vol. 321, no. 7270, p. 1198, 2000, doi: 10.1136/bmj.321.7261.624.
- [13] C. Group, H. Factors, and B. Cancer, “Erratum. Breast cancer and hormone replacement therapy: Collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer (The Lancet (1997) Oct 11 (1047)),” *Lancet*, vol. 350, no. 9089, p. 1484, 1997, doi: 10.1016/S0140-6736(97)08233-0.
- [14] A. McGuire *et al.*, “Effects of age on the detection and management of breast cancer,” *Cancers (Basel)*, vol. 7, no. 2, pp. 908–929, 2015, doi: 10.3390/cancers7020815.
- [15] P. D. P. Pharoah *et al.*, “Family history and the risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis,” *Int. J. Cancer*, vol. 71, no. 5, pp. 800–809, 1997, doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19970529)71:5<800::AID-IJC18>3.0.CO;2-B.
- [16] E. Washbrook, “Risk factors and epidemiology of breast cancer,” *Women’s Heal. Med.*,

-
- vol. 3, no. 1, pp. 8–14, 2006, doi: 10.1383/wohm.2006.3.1.8.
- [17] S. A. Narod, “Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer,” *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 8, no. 11, pp. 669–676, 2011, doi: 10.1038/nrclinonc.2011.110.
 - [18] A. Steingart *et al.*, “Antidepressant medication use and breast cancer risk: A case-control study,” *Int. J. Epidemiol.*, vol. 32, no. 6, pp. 961–966, 2003, doi: 10.1093/ije/dyg155.
 - [19] K. J. Wernli *et al.*, “Antidepressant medication use and breast cancer risk,” *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.*, vol. 18, no. February, pp. 284–290, 2009, doi: 10.1002/pds.1791.
 - [20] K. Kerlikowske, “Epidemiology of ductal carcinoma in situ,” *J. Natl. Cancer Inst. - Monogr.*, no. 41, pp. 139–141, 2010, doi: 10.1093/jncimonographs/lgq027.
 - [21] R. G. do Nascimento and K. M. Otoni, “Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know?,” *Mastology*, vol. 30, pp. 1–8, 2020, doi: 10.29289/2594539420202000024.
 - [22] “<https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/breast-cancer-grades.html>.” (data dostępu 01.09.2024 r.) .
 - [23] R. Crane and C. R. Baker, “Breast cancer treatment,” *Nurse Pract. Forum Curr. Top. Commun.*, vol. 10, no. 3, pp. 145–153, 1999.
 - [24] C. M. Perou *et al.*, “Molecular portraits of human breast tumours,” *Nature*, vol. 406, no. 6797, pp. 747–752, 2000, doi: 10.1038/35021093.
 - [25] A. Schinzinger, “Ueber carcinoma mammae,” in *18th Congress of the German Society for Surgery. Beilage zum Centralblatt für Chirurgie*, 1889, pp. 55–56.
 - [26] George Beatson, “On treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases,” *Lancet*, vol. 2, pp. 104–107, 1896.
 - [27] Thomson Alexis, “Analysis of cases in which oophorectomy was performed for inoperable carcinoma of the breast,” *Br. J. Menag.*, vol. 8, p. 118, 1902.
 - [28] E. V. Jensen *et al.*, “A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 59, no. 2, pp. 632–638, 1968, doi: 10.1073/pnas.59.2.632.
 - [29] D. Toft and J Gorski, “A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization” *J. Exptl. Med*, vol. 50, no. 1963, p. 29, 1963, doi: 10.1073/pnas.55.6.1574.
 - [30] B. W. O’Malley and A. R. Means, “Female steroid hormones and target cell nuclei,” *Obstet. Gynecol. Surv.*, vol. 29, no. 10, pp. 720–722, 1974, doi: 10.1097/00006254-197410000-00013.
 - [31] J. R. Pasqualini, “The selective estrogen enzyme modulators in breast cancer: a review,” *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1654, no. 2, pp. 123–143, 2004, doi: 10.1016/j.bbcan.2004.03.001.
 - [32] R. Shah *et al.*, “Sulfatase inhibitors for recidivist breast cancer treatment: A chemical review,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 114, pp. 170–190, 2016, doi: 10.1016/j.ejmech.2016.02.054.
 - [33] P. A. Foster, “Steroid sulphatase and its inhibitors: Past, present, and future,” *Molecules*, vol. 26, no. 10, pp. 1–21, 2021, doi: 10.3390/molecules26102852.
-

-
- [34] Y. Miki *et al.*, "Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human adult and fetal tissues," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 87, no. 12, pp. 5760–5768, 2002, doi: 10.1210/jc.2002-020670.
- [35] R. Maltais and D. Poirier, "Steroid sulfatase inhibitors: A review covering the promising 2000-2010 decade," *Steroids*, vol. 76, no. 10–11, pp. 929–948, 2011, doi: 10.1016/j.steroids.2011.03.010.
- [36] F. G. Hernandez-Guzman *et al.*, "Purification, characterization and crystallization of human placental estrone/dehydroepiandrosterone sulfatase, a membrane-bound enzyme of the endoplasmic reticulum," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 78, no. 5, pp. 441–450, 2001, doi: 10.1016/S0960-0760(01)00119-4.
- [37] C. Stein *et al.*, "Cloning and Expression of Human Steroid-sulfatase," *J. Biol. Chem.*, vol. 264, no. 23, pp. 13865–13872, 1989, doi: 10.1016/s0021-9258(18)80080-1.
- [38] D. Ghosh, "Human sulfatases: A structural perspective to catalysis," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 64, no. 15, pp. 2013–2022, 2007, doi: 10.1007/s00018-007-7175-y.
- [39] C. R. Ireson *et al.*, "Pharmacokinetics of the nonsteroidal steroid sulphatase inhibitor 667 COUMATE and its sequestration into red blood cells in rats," *Br. J. Cancer*, vol. 91, no. 7, pp. 1399–1404, 2004, doi: 10.1038/sj.bjc.6602130.
- [40] M. J. Reed *et al.*, "Steroid sulfatase: Molecular biology, regulation, and inhibition," *Endocr. Rev.*, vol. 26, no. 2, pp. 171–202, 2005, doi: 10.1210/er.2004-0003.
- [41] A. Purohit *et al.*, "Inactivation of Steroid Sulfatase by an Active Site-Directed Inhibitor, Estrone-S-O-Sulfamate," *Biochemistry*, vol. 34, no. 36, pp. 11508–11514, 1995, doi: 10.1021/bi00036a025.
- [42] M. Daško *et al.*, "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.*, vol. 35, no. 1, pp. 1163–1184, 2020, doi: 10.1080/14756366.2020.1758692.
- [43] W. Kozak *et al.*, "Synthesis and steroid sulfatase inhibitory activities of N-alkanoyl tyramine phosphates and thiophosphates," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 41, pp. 32594–32603, 2015, doi: 10.1039/c5ra01614b.
- [44] M. Daško *et al.*, "Synthesis and biological evaluation of N-acylated tyramine sulfamates containing C-F bonds as steroid sulfatase inhibitors," *Chem. Biol. Drug Des.*, vol. 90, pp. 156–161, 2017, doi: 10.1111/cbdd.12931.
- [45] W. Kozak *et al.*, "Steroid Sulfatase Inhibitors Based on Phosphate and Thiophosphate Flavone Analogs," *Drug Dev. Res.*, vol. 76, no. 8, pp. 450–462, 2015, doi: 10.1002/ddr.21281.
- [46] S. Demkowicz *et al.*, "Synthesis and Biological Evaluation of Fluorinated 3-Phenylcoumarin-7-O-Sulfamate Derivatives as Steroid Sulfatase Inhibitors," *Chem. Biol. Drug Des.*, vol. 87, no. 2, pp. 233–238, 2016, doi: 10.1111/cbdd.12652.
- [47] W. Kozak *et al.*, "Synthesis and biological evaluation of thiophosphate tricyclic coumarin derivatives as steroid sulfatase inhibitors," *J. Asian Nat. Prod. Res.*, vol. 17, no. 11, pp. 1091–1096, 2015, doi: 10.1080/10286020.2015.1054815.
- [48] W. Kozak *et al.*, "Phosphate tricyclic coumarin analogs as steroid sulfatase inhibitors: Synthesis and biological activity," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 84, pp. 44350–44358, 2014, doi: 10.1039/c4ra07135b.
- [49] M. Daško *et al.*, "Novel steroid sulfatase inhibitors based on N-thiophosphorylated 3-(4-
-

-
- aminophenyl)-coumarin-7-O-sulfamates,” *Drug Dev. Res.*, vol. 80, no. 6, pp. 857–866, 2019, doi: 10.1002/ddr.21569.
- [50] M. Daško *et al.*, “Synthesis and biological evaluation of fluorinated N-benzoyl and N-phenylacetoyl derivatives of 3-(4-aminophenyl)-coumarin-7-O-sulfamate as steroid sulfatase inhibitors,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 128, pp. 79–87, 2017, doi: 10.1016/j.ejmech.2017.01.028.
- [51] S. Demkowicz *et al.*, “Synthesis of bicoumarin thiophosphate derivatives as steroid sulfatase inhibitors,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 101, pp. 358–366, 2015, doi: 10.1016/j.ejmech.2015.06.051.
- [52] S. Demkowicz *et al.*, “Phosphate and thiophosphate biphenyl analogs as steroid sulfatase inhibitors,” *Drug Dev. Res.*, vol. 76, no. 2, pp. 94–104, 2015, doi: 10.1002/ddr.21245.
- [53] K. Biernacki *et al.*, “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.*, vol. 65, no. 6, pp. 5044–5056, 2022, doi: 10.1021/acs.jmedchem.1c02220.
- [54] L. L. Woo *et al.*, “Potent active site-directed inhibition of steroid sulphatase by tricyclic coumarin-based sulphamates,” *Chem. Biol.*, vol. 7, no. 10, pp. 773–791, Oct. 2000, doi: 10.1016/S1074-5521(00)00023-5.
- [55] L. W. L. Woo *et al.*, “Structure-activity relationship for the first-in-class clinical steroid sulfatase inhibitor Irosustat (STX64, BN83495),” *ChemMedChem*, vol. 6, no. 11, pp. 2019–2034, 2011, doi: 10.1002/cmdc.201100288.
- [56] S. J. Williams, E. Denehy, and E. H. Krenske, “Experimental and theoretical insights into the mechanisms of sulfate and sulfamate ester hydrolysis and the end products of type i sulfatase inactivation by aryl sulfamates,” *J. Org. Chem.*, vol. 79, no. 5, pp. 1995–2005, 2014, doi: 10.1021/jo4026513.
- [57] B. V. L. Potter, “Steroid sulphatase inhibition via aryl sulphamates: Clinical progress, mechanism and future prospects,” *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 61, no. 2, pp. T233–T252, 2018, doi: 10.1530/JME-18-0045.
- [58] L. Willis, “Treatment of pernicious anemia of pregnancy and tropical anemia: with special reference to yeast extract as a curative agent,” *Br. J. Menag.*, vol. 1, p. 1059, 1931.
- [59] H. K. Mitchell, E. E. Snell, R. J. Williams, “The concentration of ‘FOLIC ACID,’” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 63, p. 2284, 1941, doi: 10.1021/ja01853a512.
- [60] A. D. Welch, “Folic acid: discovery and the exciting first decade,” *Perspect. Biol. Med.*, vol. 27, no. 1, pp. 64–75, 1983, doi: 10.1353/pbm.1983.0006.
- [61] R. B. Angier *et al.*, “Synthesis of a compound identical with the L. casei factor isolated from liver,” *Science (80-.)*, vol. 102, no. 2644, pp. 227–228, 1945, doi: 10.1126/science.102.2644.227.
- [62] K. S. Crider, L. B. Bailey, and R. J. Berry, “Folic acid food fortification-its history, effect, concerns, and future directions,” *Nutrients*, vol. 3, no. 3, pp. 370–384, 2011, doi: 10.3390/nu3030370.
- [63] C. Chen *et al.*, “Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors,” *Nature*, vol. 500, no. 7463, pp. 486–489, 2013, doi: 10.1038/nature12327.
- [64] F. Coppedè, V. Lorenzoni, and L. Migliore, “The reduced folate carrier (RFC-1) 80A>G polymorphism and maternal risk of having a child with down syndrome: A meta-
-

-
- analysis,” *Nutrients*, vol. 5, no. 7, pp. 2551–2563, 2013, doi: 10.3390/nu5072551.
- [65] Y. Shulpekova *et al.*, “The concept of folic acid in health and disease,” *Molecules*, vol. 26, no. 12, pp. 1–29, 2021, doi: 10.3390/molecules26123731.
- [66] S. K. Desmoulin *et al.*, “The human proton-coupled folate transporter: Biology and therapeutic applications to cancer,” *Cancer Biol. Ther.*, vol. 13, no. 14, pp. 1355–1373, 2012, doi: 10.4161/cbt.22020.
- [67] Z. Hou *et al.*, “Localization of a substrate binding domain of the human reduced folate carrier to transmembrane domain 11 by radioaffinity labeling and cysteine-substituted accessibility methods,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 43, pp. 36206–36213, 2005, doi: 10.1074/jbc.M507295200.
- [68] R. Zhao *et al.*, “A Prominent Low-pH Methotrexate Transport Activity in Human Solid Tumors: Contribution to the Preservation of Methotrexate Pharmacologic Activity in HeLa Cells Lacking the Reduced Folate Carrier,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 10, no. 2, pp. 718–727, 2004, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-1066-03.
- [69] E. S. Unal *et al.*, “N-linked glycosylation and its impact on the electrophoretic mobility and function of the human proton-coupled folate transporter (HsPCFT),” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1778, no. 6, pp. 1407–1414, 2008, doi: 10.1016/j.bbamem.2008.03.009.
- [70] A. Qiu *et al.*, “Identification of an Intestinal Folate Transporter and the Molecular Basis for Hereditary Folate Malabsorption,” *Cell*, vol. 127, no. 5, pp. 917–928, 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.09.041.
- [71] A. Qiu *et al.*, “Rodent intestinal folate transporters (SLC46A1): Secondary structure, functional properties, and response to dietary folate restriction,” *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, vol. 293, no. 5, pp. 1669–1679, 2007, doi: 10.1152/ajpcell.00202.2007.
- [72] M. Hiraoka and Y. Kagawa, “Genetic polymorphisms and folate status,” *Congenit. Anom. (Kyoto)*, vol. 57, no. 5, pp. 142–149, 2017, doi: 10.1111/cga.12232.
- [73] Y. Lu and P. S. Low, “Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 54, pp. 675–693, 2002, doi: 10.1016/s0169-409x(02)00042-x.
- [74] M. R. Buist *et al.*, “Distribution of OV-TL 3 and MOv18 in normal and malignant ovarian tissue,” *J. Clin. Pathol.*, vol. 48, no. 7, pp. 631–636, 1995, doi: 10.1136/jcp.48.7.631.
- [75] R. Veggian *et al.*, “Immunohistochemical reactivity of a monoclonal antibody prepared against human ovarian carcinoma on normal and pathological female genital tissues,” *Tumori*, vol. 75, no. 5, pp. 510–513, 1989, doi: 10.1177/030089168907500524.
- [76] S. D. Weitman *et al.*, “Distribution of the Folate Receptor GP38 in Normal and Malignant Cell Lines and Tissues,” *Cancer Res.*, vol. 52, no. 12, pp. 3396–3401, 1992.
- [77] M. Ratnam *et al.*, “Homologous Membrane Folate Binding Proteins in Human Placenta: Cloning and Sequence of a cDNA,” *Biochemistry*, vol. 28, no. 20, pp. 8249–8254, 1989, doi: 10.1021/bi00446a042.
- [78] J. F. Ross *et al.*, “Folate receptor type β is a neutrophilic lineage marker and is differentially expressed in myeloid leukemia,” *Cancer*, vol. 85, no. 2, pp. 348–357, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19990115)85:2<348::AID-CNCR12>3.0.CO;2-4.
- [79] N. Nakashima-Matsushita *et al.*, “Selective expression of folate receptor β and its possible role in methotrexate transport in synovial macrophages from patients with
-

-
- rheumatoid arthritis,” *Arthritis Rheum.*, vol. 42, no. 8, pp. 1609–1616, 1999, doi: 10.1002/1529-0131(199908)42:8<1609::AID-ANR7>3.0.CO;2-L.
- [80] F. Shen *et al.*, “Identification of a Novel Folate Receptor, a Truncated Receptor, and Receptor Type β in Hematopoietic Cells: cDNA Cloning, Expression, Immunoreactivity, and Tissue Specificity,” *Biochemistry*, vol. 33, no. 5, pp. 1209–1215, 1994, doi: 10.1021/bi00171a021.
- [81] A. Cheung *et al.*, “Targeting folate receptor alpha for cancer treatment,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 32, pp. 52553–52574, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.9651.
- [82] Q. R. J. G. Tummers *et al.*, “Intraoperative imaging of folate receptor alpha positive ovarian and breast cancer using the tumor specific agent EC17,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 22, pp. 32144–32155, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.8282.
- [83] L. C. Hartmann *et al.*, “Folate receptor overexpression is associated with poor outcome in breast cancer,” *Int. J. Cancer*, vol. 121, no. 5, pp. 938–942, 2007, doi: 10.1002/ijc.22811.
- [84] C. Müller and R. Schibli, “Folic acid conjugates for nuclear imaging of folate receptor-positive cancer,” *J. Nucl. Med.*, vol. 52, no. 1, pp. 1–4, 2011, doi: 10.2967/jnumed.110.076018.
- [85] S. Wang *et al.*, R. J. Lee, C. J. Mathias, M. A. Green, and P. S. Low, “Synthesis, Purification, and Tumor Cell Uptake ^{67}Ga -feferoxamine--folate, a potential radiopharmaceutical for tumor imaging,” *Bioconjug Chem.*, vol. 7, no. 1, pp. 56–62, 1996, doi: 10.1021/bc9500709.
- [86] C. J. Mathias *et al.*, “Receptor-mediated targeting of ^{67}Ga -deferoxamine-folate to folate-receptor-positive human KB tumor xenografts,” *Nucl. Med. Biol.*, vol. 26, no. 1, pp. 23–25, 1999, doi: 10.1016/S0969-8051(98)00076-6.
- [87] C. J. Mathias *et al.*, “Indium-111-DTPA-folate as a potential folate-receptor-targeted radiopharmaceutical,” *J. Nucl. Med.*, vol. 39, no. 9, pp. 1579–1585, 1998.
- [88] Wang, Susan *et al.*, “Design and Synthesis of [^{111}In]DTPA-Folate for Use as a Tumor-Targeted Radiopharmaceutical,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 8, pp. 673–679, 1997, doi: 10.1021/bc9701297.
- [89] B. A. Siegel *et al.*, “Evaluation of ^{111}In -DTPA-folate as a receptor-targeted diagnostic agent for ovarian cancer: Initial clinical results,” *J. Nucl. Med.*, vol. 44, no. 5, pp. 700–707, 2003.
- [90] W. Guo, G. H. Hinkle, and R. J. Lee, “ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Folate: A novel Receptor -Based Targeted Radiopharmaceutical for Tumor Imaging,” *J. Nucl. Med.*, vol. 40, no. 9, pp. 1563–1569, 1999.
- [91] C. P. Leamon *et al.*, “Synthesis and biological evaluation of EC20: A new folate-derived, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -based radiopharmaceutical,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 13, no. 6, pp. 1200–1210, 2002, doi: 10.1021/bc0200430.
- [92] R. E. Fisher *et al.*, “Exploratory study of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC20 imaging for identifying patients with folate receptor-positive solid tumors,” *J. Nucl. Med.*, vol. 49, no. 6, pp. 899–906, 2008, doi: 10.2967/jnumed.107.049478.
- [93] T. L. Mindt *et al.*, “A ‘click chemistry’ approach to the efficient synthesis of multiple imaging probes derived from a single precursor,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 20, no. 10, pp. 1940–1949, 2009, doi: 10.1021/bc900276b.
- [94] H. Struthers *et al.*, “‘Click-to-Chelate’: Design and Incorporation of Triazole-Containing
-

-
- Metal-Chelating Systems into Biomolecules of Diagnostic and Therapeutic Interest,” doi: 10.1002/chem.200702024.
- [95] T. L. Mindt *et al.*, “‘Click-to-chelate’: In vitro and in vivo comparison of a $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -labeled N(τ)-histidine folate derivative with its isostructural, clicked 1,2,3-triazole analogue,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 19, no. 8, pp. 1689–1695, 2008, doi: 10.1021/bc800183r.
- [96] C. Müller *et al.*, “Evaluation of a novel radiofolate in tumour-bearing mice: Promising prospects for folate-based radionuclide therapy,” *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 36, no. 6, pp. 938–946, 2009, doi: 10.1007/s00259-008-1058-9.
- [97] T. L. Ross *et al.*, “Fluorine-18 click radiosynthesis and preclinical evaluation of a new ^{18}F -labeled folic acid derivative,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 19, no. 12, pp. 2462–2470, 2008, doi: 10.1021/bc800356r.
- [98] K. H. Altmann, “Conjugates (SMDCs) - Can they be better than ADCs?,” *Chimia (Aarau)*, vol. 72, no. 3, pp. 154–155, 2018, doi: 10.2533/chimia.2018.154.
- [99] S. Muro, “Challenges in design and characterization of ligand-targeted drug delivery systems,” *J. Control. Release*, vol. 164, no. 2, pp. 125–137, 2012, doi: 10.1016/j.jconrel.2012.05.052.
- [100] C. Zhuang *et al.*, “Small molecule-drug conjugates: A novel strategy for cancer-targeted treatment,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 163, pp. 883–895, 2019, doi: 10.1016/j.ejmech.2018.12.035.
- [101] B. Batra *et al.*, “Folic acid biosensors: A review,” *Process Biochem.*, vol. 92, no. January, pp. 343–354, 2020, doi: 10.1016/j.procbio.2020.01.025.
- [102] S. Binauld and M. H. Stenzel, “Acid-degradable polymers for drug delivery: A decade of innovation,” *Chem. Commun.*, vol. 49, no. 21, pp. 2082–2102, 2013, doi: 10.1039/c2cc36589h.
- [103] Y. Zhou *et al.*, “Overcoming Barriers in Photodynamic Therapy Harnessing Nanogenerators Strategies,” *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 20, no. 14, pp. 5673–5694, 2024, doi: 10.7150/ijbs.100317.
- [104] J. Kalia and R. T. Raines, “Hydrolytic stability of hydrazones and oximes,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 47, no. 39, pp. 7523–7526, 2008, doi: 10.1002/anie.200802651.
- [105] P. R. Hamann *et al.*, “Gemtuzumab ozogamicin, a potent and selective anti-CD33 antibody - Calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 13, no. 1, pp. 47–58, 2002, doi: 10.1021/bc010021y.
- [106] D. Lelièvre, H. Chabane, and A. Delmas, “Simple and efficient solid-phase synthesis of unprotected peptide aldehyde for peptide segment ligation,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 39, no. 52, pp. 9675–9678, 1998, doi: 10.1016/S0040-4039(98)02267-9.
- [107] V. I. Lushchak, “Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions,” *J. Amino Acids*, vol. 2012, pp. 1–26, 2012, doi: 10.1155/2012/736837.
- [108] J. Wang *et al.*, “Disulfide Linkage: A Potent Strategy in Tumor-Targeting Drug Discovery,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 19, no. 18, pp. 2976–2983, 2012, doi: 10.2174/092986712800672030.
- [109] R. Erez *et al.*, “Enhanced cytotoxicity of a polymer-drug conjugate with triple payload of paclitaxel,” *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 17, no. 13, pp. 4327–4335, 2009, doi: 10.1016/j.bmc.2009.05.028.
-

-
- [110] P. Dhyan et al., "Anticancer potential of alkaloids: a key emphasis to colchicine, vinblastine, vincristine, vindesine, vinorelbine and vincamine," *Cancer Cell Int.*, vol. 22, no. 1, pp. 1–20, 2022, doi: 10.1186/s12935-022-02624-9.
- [111] I. R. Vlahov et al., "Design and regioselective synthesis of a new generation of targeted chemotherapeutics. Part 1: EC145, a folic acid conjugate of desacetylvinblastine monohydrazide," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 16, no. 19, pp. 5093–5096, 2006, doi: 10.1016/j.bmcl.2006.07.030.
- [112] J. A. Reddy et al., "Preclinical evaluation of EC145, a folate-Vinca alkaloid conjugate," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 9, pp. 4434–4442, 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0033.
- [113] A. Rana and S. Bhatnagar, "Advancements in folate receptor targeting for anti-cancer therapy: A small molecule-drug conjugate approach," *Bioorg. Chem.*, vol. 112, no. February, p. 104946, 2021, doi: 10.1016/j.bioorg.2021.104946.
- [114] Tomasz Maria, "Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective)," *Chem. Biol.*, pp. 575–579, 1995.
- [115] C. P. Leamon et al., "Synthesis and biological evaluation of EC72: A new folate-targeted chemotherapeutic," *Bioconjug. Chem.*, vol. 16, no. 4, pp. 803–811, 2005, doi: 10.1021/bc049709b.
- [116] J. A. Reddy et al., "Folate receptor specific anti-tumor activity of folate-mitomycin conjugates," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 58, no. 2, pp. 229–236, 2006, doi: 10.1007/s00280-005-0151-z.
- [117] I. R. Vlahov et al., "An assembly concept for the consecutive introduction of unsymmetrical disulfide bonds: Synthesis of a releasable multidrug conjugate of folic acid," *J. Org. Chem.*, vol. 72, no. 16, pp. 5968–5972, 2007, doi: 10.1021/jo070411z.
- [118] F. Sasse et al., "Tubulysins, new cytostatic peptides from myxobacteria acting on microtubuli. Production, isolation, physico-chemical and biological properties," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 53, no. 9, pp. 879–885, 2000, doi: 10.7164/antibiotics.53.879.
- [119] C. P. Leamon et al., "Folate targeting enables durable and specific antitumor responses from a therapeutically null tubulysin B analogue," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 23, pp. 9839–9844, 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2341.
- [120] J. A. Reddy et al., "In vivo structural activity and optimization studies of folate-tubulysin conjugates," *Mol. Pharm.*, vol. 6, no. 5, pp. 1518–1525, 2009, doi: 10.1021/mp900086w.
- [121] J. A. Reddy et al., "Pre-clinical evaluation of EC1456, a folate-tubulysin anti-cancer therapeutic," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-27320-5.
- [122] O. Ciupak et al., "New potent steroid sulphatase inhibitors based on 6-(1-phenyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)naphthalen-2-yl sulphamate derivatives," *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 36, no. 1, pp. 238–247, 2021, doi: 10.1080/14756366.2020.1858820.
- [123] O. L. Kobzar et al., "Carboxylated chalcones and related flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase," *Med. Chem. Res.*, vol. 32, no. 8, pp. 1804–1815, 2023, doi: 10.1007/s00044-023-03109-8.
- [124] G. Grosser et al., "Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology Transport of steroid 3-sulfates and steroid 17-sulfates by the sodium- dependent organic anion transporter SOAT (SLC10A6)," vol. 179, no. September 2017, pp. 20–25, 2018, doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.09.013.
-

-
- [125] M. Karlgren *et al.*, “Classification of Inhibitors of Hepatic Organic Anion Transporting Polypeptides (OATPs): Influence of Protein Expression on Drug – Drug Interactions,” 2012.
- [126] L. C. Gilligan *et al.*, “Estrone Sulfate Transport and Steroid Sulfatase Activity in Colorectal Cancer : Implications for Hormone Replacement Therapy,” vol. 8, no. March, pp. 1–10, 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00103.

WYKAZ RYSUNKÓW

Rys. 1.1	Szacowana liczba nowych przypadków nowotworów w latach 2022-2045 (obojsza płci).	25
Rys. 1.2	Liczba nowych zachorowań na nowotwory (górny diagram) i zgonów (dolny diagram) w 2022 r. (u obojsza płci, w każdym wieku) na całym świecie.	26
Rys. 1.3	Mapa świata pokazująca państwa (kolor czerwony), w których nowotwór piersi jest najczęściej występującym w całej populacji.	27
Rys. 1.4	Mapa świata pokazująca państwa (kolor czerwony), w których nowotwór piersi jest najczęściej występującym typem nowotworu u kobiet.	27
Rys. 1.5	Schemat przedstawiający ilość nowych zachorowań na nowotwory piersi wśród Polek (niebieski) oraz ilość zgonów (czerwony) w 2021.	28
Rys. 1.6	Struktura STS oraz jej naturalnego substratu (ES1) związanego w miejscu aktywnym enzymu.	34
Rys. 1.7	Struktura chemiczna EMATE 1, Irosustatu 2 oraz E1S.	37
Rys. 1.8	Inhibitory STS otrzymane w zespole dr hab. inż. Sebastiana Demkowicza w Katedrze Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej.	39
Rys. 1.9	Formyloglicyna ⁷⁵ w <i>gem</i> -diolowej oraz proponowane połączenia fGly ⁵⁷ wraz z resztą amidosiarczanową po zajściu inhibicji w centrum aktywnym enzymu.	40
Rys. 1.10	Struktura chemiczna kwasu foliowego 18.	42
Rys. 1.11	Struktura krystalograficzna RFC.	44
Rys. 1.12	Struktura krystalograficzna PCFT.	45
Rys. 1.13	Struktura krystalograficzna FR.	46
Rys. 1.14	Oddziaływania pomiędzy FA a resztami aminokwasowymi w centrum aktywnym FR α	47
Rys. 1.15	Wzór strukturalny ^{99m} Tc-HYNIC-FA 27.	52
Rys. 1.16	Struktura ^{99m} Tc-EC20 40.	55
Rys. 1.17	Przedstawiający strukturę dwóch koniugatów zawierających w swojej budowie fragment DOTA.	58
Rys. 1.18	Ogólna budowa koniugatu leku przeciwnowotworowego z odpowiednim ligandem.	63
Rys. 1.19	Struktura Winblastyny 67.	69
Rys. 1.20	Wzór strukturalny Mitomycyny C.	77
Rys. 1.21	Produkty uboczne syntezy pochodnej ECO255 83.	81
Rys. 1.22	Wzór ogólny tubulizyny 86.	84
Rys. 3.1	Struktura ogólna amidosiarczanowych pochodnych IA-L (R ₁ = H, F, Cl, Br), IIA-B, IIIA-B, IVA-B, VA-B (R ₂ = H, Me), VIA-L (R ₃ = H, Me, Et, ⁱ Pr,	92

	^t Bu, Bn).	
Rys. 3.2	Struktura chemiczna otrzymanego koniugatu kwasu STS-FA VII	93
Rys. 3.3	Miejsce aktywne STS z zadokowanym związkiem II (koloru CPK) oraz z <i>Irosustatem</i> (różowy) wraz z odległościami od fGly75, ARG98 oraz THR484 (Å).	98
Rys. 3.4	Miejsce aktywne STS z zadokowanym związkiem IIB (koloru CPK) oraz z <i>Irosustatem</i> (różowy) wraz z odległościami od fGly75 (Å).	109
Rys. 3.5	Miejsce aktywne STS z zadokowanym związkiem VIK (koloru CPK) oraz z <i>Irosustatem</i> (różowy) wraz z odległościami od fGly75 (Å).	128
Rys. 3.6	Struktura FA-STs VII	136
Rys. 3.7	Chromatograf wykonany po 5 minutach.	143
Rys. 3.8	Chromatograf wykonany po 1h.	144
Rys. 3.9	Chromatograf wykonany po 24 h.	144
Rys. 3.10	Chromatograf wykonany po 72 h.	145
Rys. 3.11	Prezentujący szybkość przenikania przez sztuczną błonę cząsteczek: LC – związek przechodzący z małą prędkością, MC – związek, przechodzący ze średnią prędkością, HC – związek przechodzący z dużą prędkością, 158 oraz koniugat VII	149

WYKAZ SCHEMATÓW

Schemat 1.1	Szlak biosyntezy biologicznie aktywnych hormonów (ST – sulfotransferaza steroidowa).....	33
Schemat 1.2	Proponowany mechanizm hydrolizy siarczanowych pochodnych steroidów z wykorzystaniem STS.....	36
Schemat 1.3	Dwie alternatywne możliwości mechanizmu inhibicji STS.	41
Schemat 1.4	Biotransformacja kwasu foliowego w organizmach ssaków.	43
Schemat 1.5	Szlak reakcji otrzymywania koniugatu deferoksaminy z kwasem foliowy. ..	50
Schemat 1.6	Szlak syntezy radiokoniugatu na bazie ^{111}In	51
Schemat 1.7	Szlak syntezy koniugatu HYNIC-Folate 33	53
Schemat 1.8	Szlak otrzymywania EC20 39 (1) 20% piperidyna, DMF; (2) Fmoc-Asp(O ^t Bu)-OH, PyBop, DIPEA, DMF; (3) Boc-Dap(Fmoc)-OH, PyBop, DIPEA, DMF; (4) Fmoc-D -Glu-O ^t Bu, PyBop, DIPEA, DMF; (5) N^{10} -TFA-Pte-OH, DIPEA, DMSO; (6) TFAA, HSCH ₂ CH ₂ SH, $^i\text{Pr}_3\text{SiH}$; (7) H ₄ NOH, pH = 10,3.	54
Schemat 1.9	Szlak syntezy prekursora 49 . Warunki reakcji (1) Tf ₂ O, NaN ₃ , DCM/H ₂ O, 0 °C – rt, (1') K ₂ CO ₃ , CuSO ₄ *5H ₂ O, MeOH/ H ₂ O; (2) TFA/ DCM (1:5), rt; (3) HBTU, TEA, DMF, 0 °C – rt; (4) TFA/DCM (1:7), rt (5) HBTU, TEA, DMF, 0 °C – rt; (6) 1M NaOH, rt.	56
Schemat 1.10	Szlak otrzymywania dwoma metodami radiokoniugatu zawierającego w swojej strukturze element metaloorganiczny [$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] ⁺ 51	57
Schemat 1.11	Szlak syntezy koniugatu DOTA-Clik-folate- ^{67}Ga 54	59
Schemat 1.12	Szlak syntezy koniugatu FA-(γ)-pNHBnDTPA- ^{111}In 60	60
Schemat 1.13	Szlak otrzymywania koniugatu zawierającego w swojej strukturze ^{18}F 63 . ..	61
Schemat 1.14	Mechanizm uwalniania leku z cząsteczki koniugatu zawierającego linker iminowy.	66
Schemat 1.15	Mechanizm uwalniania leku z cząsteczki koniugatu zawierającego linker hemiacetalowy.	66
Schemat 1.16	Szlak mechanizmów uwalniania leku z cząsteczki koniugatu zawierającego mostek disiarczkowy.	67

Schemat 1.17	Mechanizm uwalniania enzymatycznego Paklitaksenu 66 . Wszystkie aminokwasy w tej strukturze miały konfigurację L.	68
Schemat 1.18	Szlak syntezy otrzymywania EC145 75	71
Schemat 1.19	Szlak otrzymywania pochodnej ECO255 83 . Warunki reakcji (1) 2% NH ₂ NH ₂ , DMF, 5 min, rt (2) FmS(CH ₂) ₂ CO ₂ H, PyBoP, ⁱ Pr ₂ NEt, DMF (3) TFA, H ₂ O, TIPS, EDT (4) THF/H ₂ O (1:1) (5) NH ₂ NH ₂ , MeOH, 15 h (6) PySS(CH ₂) ₂ OC(O)OBt, TEA, DCM, 83%.	80
Schemat 3.1	Szlak syntezy pochodnych IA-L	99
Schemat 3.2	Szlak syntezy pochodnych IIA oraz IIB	111
Schemat 3.3	Szlak syntezy pochodnych IIIA oraz IIIB	113
Schemat 3.4	Przebieg planowanej syntezy, która zakończyła się niepowodzeniem.	115
Schemat 3.5	Szlak syntezy pochodnych IVA oraz IVB	116
Schemat 3.6	Szlak syntezy pochodnych VA oraz VB	118
Schemat 3.7	Szlak syntezy pochodnych VIA-F (R = Me, Et, ⁱ Pr, ^t Bu, Bn).	130
Schemat 3.8	Szlak syntezy pochodnych VIG-L (R = Me, Et, ⁱ Pr, ^t Bu, Bn).	131
Schemat 3.9	Szlak syntetyczny otrzymywania pochodnej 149	137
Schemat 3.10	Szlak syntetyczny otrzymywania pochodnej 156	138
Schemat 3.11	Szlak otrzymywania związku VII	140
Schemat 3.12	Przedstawiający proponowany mechanizm rozpadu koniugatu VII pod wpływem DTT.	142

WYKAZ TABEL

Tabela 1.1	Klasyfikacja podtypów nowotworów piersi.	31
Tabela 1.2	Przykłady wiązań labilnych wykorzystywanych w koniugatach wraz z warunkami powodującymi rozczepienie cząsteczki i produktami rozpadu.	64
Tabela 1.3	Przykłady koniugatów kwasu foliowego zawierającego w swojej strukturze winblastynę.	73
Tabela 1.4	Przykłady koniugatów kwasu foliowego zawierającego w swojej strukturze mitomycyne C.	82
Tabela 1.5	Różne typu tubulizyny.	84
Tabela 1.6	Przykłady koniugatów kwasu foliowego zawierającego w swojej strukturze tubulizynę.	86
Tabela 3.1	Wyniki analizy dokowania molekularnego związków IA-L oraz związku referencyjnego – <i>Irosustatu</i> otrzymane z wykorzystaniem oprogramowania Auto Dock Vina 1.1.2.	95
Tabela 3.2	Interakcje ligand – STS (wraz z dystansem [Å]) dla związku IL zidentyfikowane przy użyciu oprogramowania BIOVIA, Dassault Systemes, Discovery Studio Visualiser (typ oddziaływań: zielony – van der Waals, czerwony – niekorzystne, szary – metal-akceptor, fioletowy – π – sigma, żółty – π -siarka, różowy – π -alkil).	96
Tabela 3.3	Wydajności wszystkich reakcji syntezy pochodnych amidosiarczanowych 6-(1-fenyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-4-yl)-naftaleno-2-ylu IA-L	100
Tabela 3.4	Wyniki testów enzymatycznych przedstawiające efekt inhibicji STS związków IA-L (przy stężeniu 0,5 μ M inhibitorów).	101
Tabela 3.5	Pozostała aktywność STS w komórkach MCF-7 po inkubacji ze związkami IA-L i <i>Irosustatem</i> w stężeniach 100, 10 i 1 nM inhibitora oraz wyznaczony parametr IC ₅₀	103
Tabela 3.6	Wyniki analizy dokowania molekularnego związków II-V-A-B , <i>Irosustatu</i> oraz FA otrzymanych z wykorzystaniem oprogramowania Auto Dock Vina 1.1.2.	105
Tabela 3.7	Interakcje ligand – STS (wraz z dystansem [Å]) zidentyfikowane przy użyciu oprogramowania BIOVIA, Dassault Systemes, Discovery Studio Visualiser.	106
Tabela 3.8	Interakcje ligand – FR α (wraz z dystansem [Å]) zidentyfikowane przy użyciu oprogramowania BIOVIA, Dassault Systemes, Discovery Studio	107

	Visualiser.	
Tabela 3.9	Wydajności wszystkich reakcji przedstawionych na Schemacie 3.2.	112
Tabela 3.10	Wydajności wszystkich reakcji przedstawionych na Schemacie 3.3.	114
Tabela 3.11	Wydajności wszystkich reakcji przedstawionych na Schemacie 3.5.	117
Tabela 3.12	Wydajności wszystkich reakcji przedstawionych na Schemacie 3.6.	117
Tabela 3.13	Pozostała aktywność STS w teście na wyizolowanym enzymie oraz w teście komórkowym z wykorzystaniem komórek JEG-3 po inkubacji ze związkami IIA-B, IIIA-B, IVA-B, VA-B, 106, 114, 122 i <i>Irosustatem</i> oraz wyznaczony parametr IC ₅₀	119
Tabela 3.14	Wyniki analizy dokowania molekularnego związków VIA-L oraz związków <i>Irosustatu</i> i <i>FA</i> otrzymanych z wykorzystaniem oprogramowania Auto Dock Vina 1.1.2.	121
Tabela 3.15	Interakcje ligand – STS (wraz z dystansem [Å]) zidentyfikowane przy użyciu oprogramowania BIOVIA, Dassault Systemes, Discovery Studio Visualiser.	123
Tabela 3.16	Interakcje ligand – FR α (wraz z dystansem [Å]) zidentyfikowane przy użyciu oprogramowania BIOVIA, Dassault Systemes, Discovery Studio Visualiser.	126
Tabela 3.17	Wydajności wszystkich reakcji przedstawionych na Schemacie 3.7 oraz Schemacie 3.8.	132
Tabela 3.18	Wyniki badań biologicznych <i>in vitro</i> dla pochodnych VIA-L.	135
Tabela 3.19	Prezentująca wyniki testu dotyczącego badania selektywności drogi docierania analogów kwasu foliowego do komórek zawierających receptory kwasu foliowego.	135
Tabela 3.20	Wydajności wszystkich reakcji przedstawionych na Schematach 3.9, 3.10, 3.11.	141
Tabela 3.21	Wyniki badań <i>in vitro</i> dla koniugatu VII oraz związku 158.	147
Tabela 3.22	Wyniki badań transportu koniugatu VII przez receptor FR α	148
