

Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Jacek Kujawski

**SYNTEZA I WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE
NIEKTÓRYCH SKONDENSOWANYCH
POCHODNYCH PIRAZOLU**



**Praca przedstawiona
Radzie Wydziału Farmaceutycznego
Uniwersytetu Medycznego
im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
celem uzyskania stopnia
doktora nauk farmaceutycznych**

**Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie
Chemii Organicznej
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

Promotor: dr hab. Marek K. Bernard

Poznań 2013

Słowa kluczowe: pochodne pirazolu, substytucja nukleofilowa, NMR, DFT, aktywność cytotoksyczna, $\log P$

Panu

dr. hab. Markowi K. BERNARDOWI,
Promotorowi pracy, za wskazanie tematu,
opiekę naukową, inspirujące uwagi i niezwykle
gorliwą pomoc w trakcie prowadzenia badań oraz
przygotowania rozprawy,

Panu

Prof. dr. hab. Lucjuszowi ZAPRUTKO,
Kierownikowi Katedry i Zakładu Chemii Organicznej,
Dziekanowi Wydziału Farmaceutycznemu UMP
za umożliwienie wykonania pracy,

składam serdeczne podziękowania

Państwu

dr. hab. Andrzejowi GZELLI, dr Annie FROELICH
oraz mgr. Marcinowi KOWIELOWI
za analizę rentgenostrukturalną związków,

Panom

Prof. dr hab. MARKOWI PYDZIE oraz
mgr. Marcinowi SKOTNICKIEMU
za analizę DSC,

Paniom

dr hab. Izabeli MUSZALSKIEJ,
dr Agnieszce SOBCZAK oraz
mgr Monice LEŚNIEWSKIEJ
za pomiar log *P* metodą HPLC

Paniom

Prof. dr hab. Marii RYBCZYŃSKIEJ,
dr Ewie TOTOŃ,
dr Ewie IGNATOWICZ
za badania biologiczne

Panu

dr. Markowi DOSKOCZOWI
za inspirację w obszarze chemii
obliczeniowej i pomoc w badaniach
in silico

i wszystkim ludziom dobrej woli

składam serdeczne podziękowania

The fact that Science walks forward on two feet, namely theory and experiment...

(Nauka kroczy naprzód na dwóch nogach, a mianowicie na teorii i eksperymencie...)

Richard Andrews Millikan - laureat Nagrody Nobla z fizyki (23.05.1924)

Praca finansowana była ze środków grantu promotorskiego Narodowego Centrum Nauki **N N401 642340**. Powstała ona również przy wsparciu stypendium dla doktorantów Wielkopolski uzyskanego przez Doktoranta w ramach programu: „*Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski*” (2011, 2012), Poddziałanie **8.2.2** „Regionalne Strategie Innowacji”, Działanie **8.2**, Priorytet **VIII**, Program Operacyjny Kapitał Ludzki (**PO KL**).

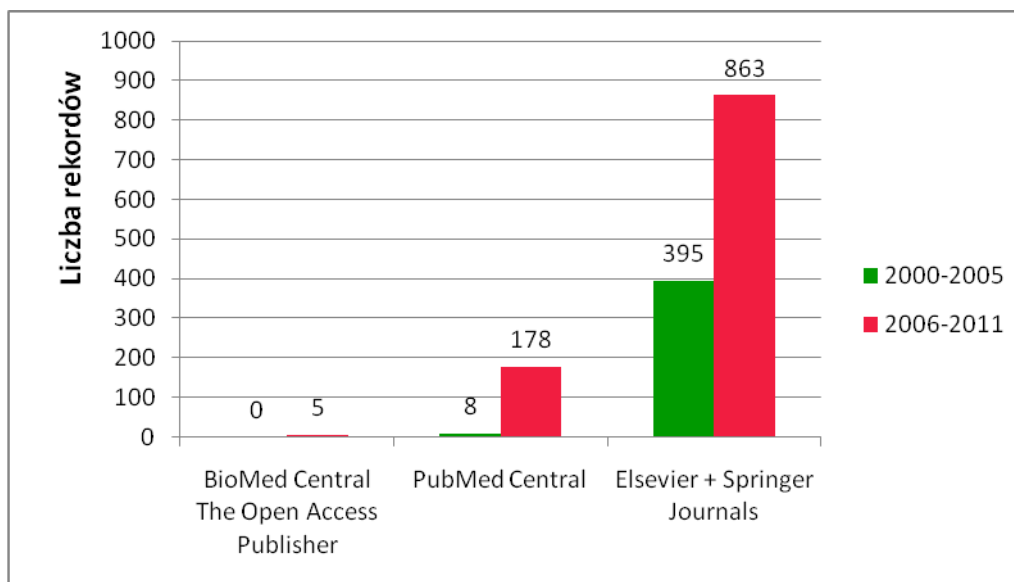
SPIS TREŚCI

1.	WSTĘP	7
2.	OTRZYMYWANIE I WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE PIRAZOLU I JEGO SKONDENSOWANYCH POCHODNYCH	9
2.1.	Struktura i synteza pirazolu i jego pochodnych	9
2.2.	Hydrofilowość i hydrofobowość układów pirazolowych	12
2.3.	Struktura i otrzymywanie indazolu	17
2.4.	Synteza innych skondensowanych pochodnych pirazolu	24
2.5.	Aktywność biologiczna pochodnych pirazolu	30
2.5.1.	Aktywność przeciwnowotworowa pochodnych pirazolu i ich skondensowanych analogów	30
2.5.2.	Aktywność systemów pirazolowych w obrębie ośrodkowego układu nerwowego	40
3.	CEL PRACY	45
4.	OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA	48
4.1.	Synteza i właściwości spektralne otrzymywanych pochodnych	48
4.2.	Aktywność biologiczna otrzymanych indazolopochodnych	73
4.2.1.	Analiza chemoinformatyczna	73
4.2.2.	Analiza molekularna w modelu <i>in vitro</i>	75
4.3.	Obliczenia teoretyczne dotyczące otrzymywanych indazolopochodnych oraz badania dotyczące interakcji związku 41 z niskocząsteczkowymi ligandami	80
4.3.1.	Optymalizacja geometrii związków 35-41 i 43-44	80
4.3.2.	Interakcje związku 41 z jonami magnezu	82
4.4.	Wyznaczanie współczynnika podziału ($\log P$) otrzymanych indazolopochodnych	97
4.5.	Termoanaliza związku 35	101
5.	CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	104
6.	WNIOSKI	125
7.	STRESZCZENIE	127
8.	SUMMARY	129
9.	PIŚMIENNICTWO	131
10.	SUPLEMENT	140

1. WSTĘP

Zagadnienie mechanizmu działania leków jest podstawowym i bodajże najbardziej istotnym problemem, jakim zajmuje się intensywnie rozwijająca się farmakologia. Zrozumienie, w jaki sposób dana substancja lecznicza wywołuje zmiany czynności komórki, tkanki, narządu czy organizmu umożliwia efektywne i bardziej bezpieczne stosowanie leków, a w niektórych stanach patologicznych pozwala na lepsze zrozumienie zmian biochemicznych zachodzących w przebiegu danej jednostki chorobowej. Podanie leku powoduje wystąpienie odpowiedzi ze strony komórek czy tkanek. Substancja lecznicza, działając na określoną tkankę, może zwiększyć lub hamować jej czynność. Analiza interakcji lek-receptor nierozzerwalnie wiąże się z ogólnie rozumianą ciekawością ludzką, czego naturalną konsekwencją są nieustanne próby odnajdywania nowych substancji leczniczych podejmowane na całym świecie. W dynamicznym nurcie poszukiwania nowych leków znamienne rolę odgrywa interesująca gałąź wiedzy, jaką jest chemia medyczna. W swym podstawowym znaczeniu istnieje od kilku tysięcy lat. Ludzie poszukiwali sposobów leczenia chorób, używając do tego celu surowców naturalnych, głównie roślin. Wiele substancji roślinnych było i jest źródłem związków wiodących w poszukiwaniu leków. Obecnie leki naturalne stanowią część asortymentu środków farmaceutycznych dostępnych na rynku, a zawarte w nich związki organiczne są nadal obiektem prowadzonych badań naukowych.¹ Dzięki postępowi zarówno w metodach syntezy, rozdziału, jak i w technikach biochemicznych, począwszy od końca lat czterdziestych XX wieku stało się możliwe bardziej racjonalne podejście w poszukiwaniu leków - jako element tych badań wprowadzono tzw. *racjonalne projektowanie leków* (rationalized drug design). Metody poszukiwania nowych substancji o potencjalnym działaniu terapeutycznym, przewidywanie ich aktywności biologicznej i działania toksycznego oraz metodyka badań naukowych nowych produktów leczniczych przeszły w minionym czasie rewolucyjne zmiany. Istotnym wyzwaniem w poszukiwaniu nowych leków jest znalezienie *struktury wiodącej*.¹ W tym kontekście interesującym obiektem badań realizowanych w licznych ośrodkach naukowych całego świata są układy azolowe, w tym również związki zawierające pierścień **pirazolu** i jego skondensowane pochodne.² W minionej dekadzie bowiem odnotować można istotny wzrost liczby publikacji poświęconych tematyce aktywnych biologicznie związków zawierających system pirazolu (**Rys. 1.1**). Ową nadal utrzymującą się tendencję doskonale obrazuje poniższy diagram przedstawiający dokonaną przez autora rozprawy analizę porównawczą obejmującą lata 2000-2011 i uwidaczniającą

liczbę rekordów powstałych po wpisaniu w poszczególnych bazach danych (PubMed Central, Elsevier-Springer, BioMed Central –The Open Access Publisher) angielskich zwrotów „pyrazole” i „biological activity”.^{3,4}

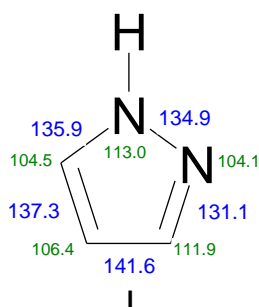


Rys. 1.1. Liczba rekordów powstałych po wpisaniu w poszczególnych bazach danych (PubMed Central, Elsevier-Springer, BioMed Central) „pyrazole” i „biological activity”.

2. OTRZYMYWANIE I WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE PIRAZOLU I JEGO SKONDENSOWANYCH POCHODNYCH

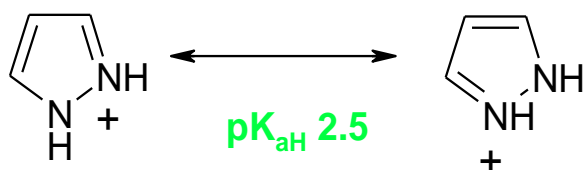
2.1. Struktura i synteza pirazolu i jego pochodnych

Wśród licznych przedstawicieli pięciocłonowych systemów azaheterocyklicznych wyróżnić można planarny pierścień pirazolu **I** (Rys. 2.1), który, będąc bioizosterem pirolu¹, stanowi interesujący obiekt badań pod kątem jego właściwości chemicznych^{5,6,7} i biologicznych.^{8,9} Jego struktura zobrazowana powyżej oraz właściwości elektronowe determinują określoną reaktywność omawianego diazolu: pozycja 4 podatna jest na atak czynników elektrofilowych, natomiast 3 i 5 – na substytucję nukleofilową.² Pirazol jest znacznie słabszą zasadą niż jego 1,3-diaza-analog, imidazol (pK_{aH} pirazolu=2,5; pK_{aH} imidazolu=7,0). Wynika to z faktu, iż ładunek dodatni w jonie pirazoliowym w mniejszym stopniu ulega delokalizacji niż to ma miejsce w przypadku kationu imidazoliowego.³



Rys. 2.1. Struktura pierścienia pirazolu; długości wiązań wyrażone w Å zaznaczono na niebiesko, a kąty dwuścienne określone w stopniach – na czerwono.

Niepodstawiony pirazol wykazuje kwasowość porównywalną z imidazolem (pK_a pirazolu=14,21; pK_a imidazolu=14,52). Zasadowość systemu pirazolowego wynika z symetrii jego kationu (Rys. 2.2) występującego w dwóch równoważnych formach tautomerycznych.



Rys. 2.2. Kwasowość pierścienia pirazolowego.

Pierścień pirazolowy w widmie ^1H NMR opisywany jest przez sygnały pochodzące od jego protonów: trzech związanych z systemem aromatycznym oraz jednego związanego pirolowym atomem azotu (**Tabela 2.1**). W widmie ^{13}C NMR odnotować z kolei można trzy sygnały pochodzące od atomów węgla tworzących układ aromatyczny.

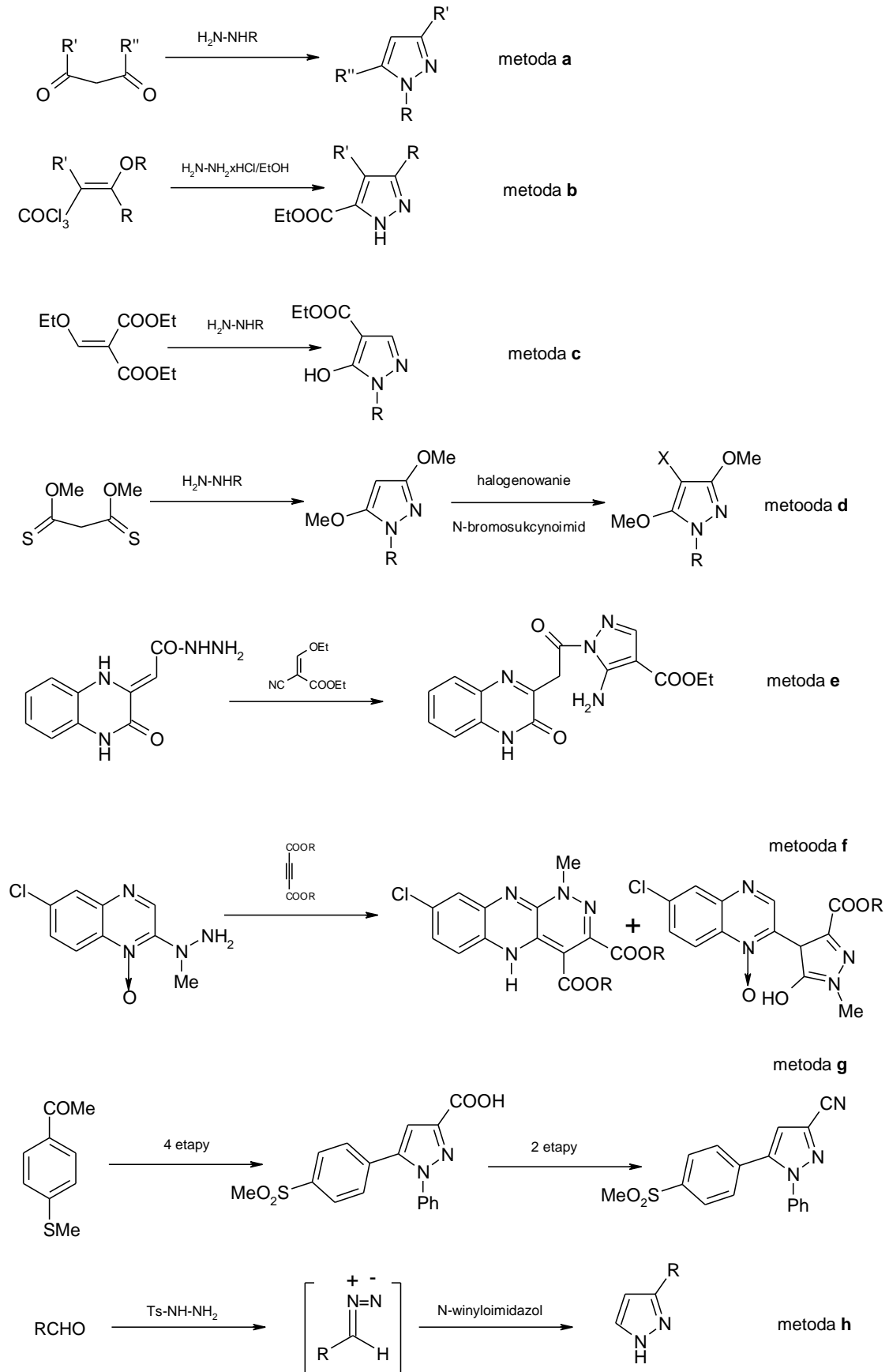
^1H NMR (CCl_4)		^{13}C NMR (CD_2Cl_2)	
Lokant	δ [ppm]	Lokant	δ [ppm]
H-1	12,64	C-3	134,6
H-3	7,61	C-4	105,8
H-4	6,31	C-5	134,6
H-5	7,61	---	---

Tabela 2.1. Charakterystyka spektralna NMR 1H-pirazolu.

Klasyczna synteza pirazolu opiera się na addycji nukleofilowej ugrupowania hydrazynowego do β -diketonu.^{10,11} Znane są również inne metody syntezy podstawionych pochodnych pirazolu, a mianowicie (**Schemat 2.1**):^{10,11}

- z trichlorometylowych pochodnych ketonów zawierających układ β -alkoksywinyłu (metoda **b**),
- z estrów dietylowych kwasu etoksymetylenomalonowego (metoda **c**),
- z estrów dimetylowych kwasu ditiomalonowego (metoda **d**),
- z estru etylowego kwasu etoksymetylenocyjanooctowego (metoda **e**),
- z układów acetylenodikarboksylowych (metoda **f**),
- z C5-niepodstawionych pochodnych pirazolu (metoda **g**),
- w wyniku cykloaddycji [3+2] diazapo pochodnych do systemów zawierających peryferyjne nienasycone ugrupowanie (metoda **h**).

Schemat 2.1



2.2. Hydrofilowość i hydrofobowość układów pirazolowych

Jednym ze sposobów modyfikacji danej struktury wiodącej skutkującej zmianą jednego z parametrów fizykochemicznych badanej cząsteczki np. azolu, w tym: jej wielkości i kształtu, rozkładu gęstości elektronowej, hydrofilności i lipofilowości, pK_a (kwasowości) oraz reaktywności, jest wykorzystanie m.in. zjawiska *bioizosteryzmu*. Jak wspomniano powyżej, układy pirazolowe rzadko są spotykane w świecie naturalnym, jednakże stanowią one bioizostery ważnych z punktu widzenia współczesnej chemii medycznej pochodnych pirolu, a mianowicie: puryny i pirymidyny. Badanie zależności pomiędzy budową a działaniem substancji farmakologicznie aktywnej określane jest skrótem *SAR* (*structure-activity relationship*), a ich ocena ilościowa opisywana jest kwantyfikatorem *QSAR*.¹ Owo podejście zostało zapoczątkowane w latach 60. XX wieku przez C. Hascha i T. Fujitę.¹² Przyjęli oni założenie, że jedynie związki o optymalnych właściwościach hydrofilowo-hydrofobowych są zdolne do przekroczenia jednej z wielu barier (błon) biologicznego ustroju i skutecznego związania się ze swoistym dla danego ligandu receptorem w odpowiednim czasie i w odpowiedniej ilości (stężeniu). Odpowiedź na aktywność substancji leczniczej jest w przybliżeniu proporcjonalna do prawdopodobieństwa dojścia cząsteczki leku do miejsca receptorowego, dawki środka biologicznie aktywnego i dostępnością farmaceutyczną ksenobiotyku zawartego w danej postaci leku. Z kolei prawdopodobieństwo dotarcia leku do miejsca receptorowego jest zależne w głównej mierze od równowagi hydrofilowo-hydrofobowej pomiędzy ligandem a środowiskiem jego oddziaływania, która to determinowana jest energią swobodną analizowanej cząsteczki. Miarą zmiany jej energii swobodnej powodującej jej ruch z jednej fazy do drugiej jest tzw. *stała hydrofobowa* (π). Parametr ten zdefiniować można jako różnicę logarytmów dziesiętnych *współczynników podziału*, wyznaczonych dla układu *n*-oktanol/woda, związku zawierającego podstawnik „X” (P_X) i pochodnej niepodstawionej (P_H), tzn. $\pi = \log P_X - \log P_H$.¹³ Warto przy tym nadmienić, iż dystrybucja substancji w układzie dwufazowym: ciecz-ciecz, o której decydują oddziaływania międzycząsteczkowe występujące pomiędzy daną substancją i fazą niepolarną, jest miarą *lipofilowości*. *Hydrofobowość* natomiast jest następstwem oddziaływań o charakterze przyciągającym między grupami niepolarnymi (pierścieniami, łańcuchami węglowodorowymi) cząsteczek danej substancji powodujących ich agregację w środowisku polarnym (najczęściej wodnym) i jest ona integralnym elementem lipofilowości, która jest

pojęciem bardziej ogólnym.¹³ Istotne znaczenie współczynnika podziału ($\log P$) w racjonalnym projektowaniu leków znajduje swoje odbicie w znaczącym rozwoju eksperymentalnych metod jego wyznaczania, w tym z użyciem technik TLC^{14,15} oraz HPLC^{16,17}, jak również w metodologii szacowania jego wartości z wykorzystaniem różnorodnych aplikacji będących narzędziami stosowanymi w *komputerowym projektowaniu leków* (CADD - computer-aided drug design), jak np. ALOGPS, ACD Lab/ChemSketch, Pallas, ChemBioOffice.^{12,18} Studia nad wpływem konwersji strukturalnej poszczególnych bibliotek chemicznych na ich wartość $\log P$ stanowią interesujący kierunek badań współczesnej chemii związków heterocyklicznych, w tym i pirazolu. W dalszej części rozdziału przedstawiono przykłady wykorzystania parametru $\log P$ w projektowaniu leków.

W przypadku pochodnej przedstawionej w **Tabeli 2.2** zmiana charakteru podstawników R^1 bądź R^2 na bardziej zasadowy (polarny) skutkuje znaczącym obniżeniem obliczonej za pomocą aplikacji komputerowych wartości współczynnika podziału (CLog P), jednakże zależność ta nie ma charakteru liniowego.¹⁹ Jednocześnie należy zaznaczyć, że konwersja podstawników w omawianym szeregu związków, pomimo iż nie pozostaje bez wpływu na inhibicję nienukleozydowej odwrotnej transkryptazy HIV (NNRTI), nie można wykazać liniowości relacji CLog P –aktywność. W omawianej bibliotece pochodnych indeks cytotoksyczności (IC₅₀) przyjmuje wartości odpowiednio: 0,66; >50; 9,8; >100; >10 oraz >10 $\mu\text{mol/l}$. Parametr $\log P$ w kontekście analizy QSAR należy interpretować bardziej jako deskryptor dostępności farmaceutycznej i uwalniania analitu z danej postaci leku oraz jego biodostępności i nie jest on jedynym determinantem skutecznego wiązania się związku ze swoistym dla niego receptorem.

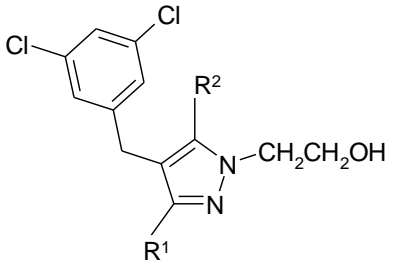
	$R^1 = \text{Et}$	$R^2 = \text{Et}$	CLog $P = 4,3$
	$R^1 = \text{Et}$	$R^2 = \text{NH}_2$	CLog $P = 2,7$
	$R^1 = \text{Et}$	$R^2 = \text{NMe}_2$	CLog $P = 4,0$
	$R^1 = \text{Et}$	$R^2 = \text{H}_2\text{NCONH}_2$	CLog $P = 2,2$
	$R^1 = \text{Ph}$	$R^2 = \text{Me}$	CLog $P = 4,9$
	$R^1 = \text{NH}_2$	$R^2 = \text{Me}$	CLog $P = 2,2$

Tabela 2.2. Wpływ podstawników R^1 i R^2 na wartość parametru Clog P –aktywność NNRTI.

Z kolei modyfikacje podstawników w pozycji 2 bądź 4 systemu fenyloвого pochodnych (2,4-dimetoksy-fenylo)-3-(1,3-difenylo-1H-pirazol-4-ylo)-propenononu (**Tabela 2.3**) wykazują nieznaczny wpływ na wartość parametru CLog *P*, aczkolwiek podstawienie tegoż pierścienia w pozycji *orto* i *para* skutkuje zmianą wartości analizowanego współczynnika, szczególnie jeśli następuje ono ugrupowaniami metoksyłowymi.²⁰ W omawianym przypadku badano wpływ danego podstawnika na aktywność: przeciwzapalną w modelu *in vitro* (pomiar stężenia dwóch cytokin istotnych z punktu widzenia procesu zapalnego: TNF α i interleukiny-6), antyoksydacyjną (test DPPH - zdolność do redukcji purpurowego roztworu 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu do bezbarwnej postaci hydrazynowej użytego wskaźnika) oraz przeciwdrobnoustrojową. Spośród wymienionych w **Tabeli 2.3** związków jedynie monopodstawiona *p*-chloropochodna wykazała najistotniejsze działanie biologiczne, ale przy tym cechowała się większą toksycznością. Wszystkie wymienione jednak substancje wytypowano jako materiał wyjściowy (struktury wiodące) do dalszych badań nakierowanych na optymalizację aktywności oraz toksyczności.²⁰

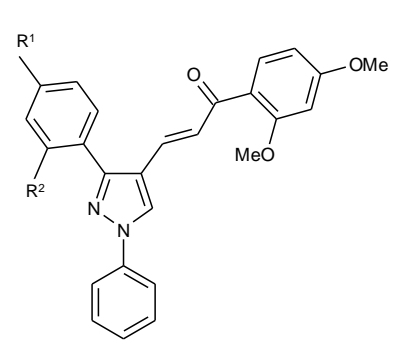
	R ¹ = H	R ² = H	CLog <i>P</i> = 4,2
	R ¹ = Me	R ² = H	CLog <i>P</i> = 4,5
	R ¹ = OMe	R ² = H	CLog <i>P</i> = 4,1
	R ¹ = Cl	R ² = H	CLog <i>P</i> = 4,8
	R ¹ = Cl	R ² = Cl	CLog <i>P</i> = 5,4
	R ¹ = OMe	R ² = OMe	CLog <i>P</i> = 3,9

Tabela 2.3. Wpływ podstawników R¹ i R² na wartość parametru Clog *P*–aktywność przeciwzapalna, antyoksydacyjna i przeciwdrobnoustrojowa.

Podobnie podstawienie atomów wodoru peryferyjnych ugrupowań aromatycznych i heteroaromatycznych atomami fluoru bądź grupą trifluorometylową prowadzi do znacznego zwiększenia lipofilowości poszczególnych, co znalazło również swoje odbicie we wzroście ich aktywności przeciwwirusowej HIV-1 (**Tabela 2.4**).²¹

	$R^1 = a$	$R^2 = A$	$X = H$	$CLog P = 2,7$
	$R^1 = b$	$R^2 = A$	$X = H$	$CLog P = 4,8$
	$R^1 = a$	$R^2 = B$	$X = H$	$CLog P = 1,3$
	$R^1 = c$	$R^2 = B$	$X = F$	$CLog P = 3,8$
	$R^1 = d$	$R^2 = A$	$X = F$	$CLog P = 3,9$
	$R^1 = e$	$R^2 = B$	$X = F$	$CLog P = 2,3$

Tabela 2.4. Wpływ podstawników R^1 i R^2 na wartość parametru $CLog P$ – aktywność przeciwwirusowa HIV-1.

Wpływ modyfikacji poszczególnych podstawników na parametr $\log P$ jest obiektem badań także w aspekcie analizy SAR dotyczących skondensowanych pochodnych pirazolu. Podstawienie atomami fluorowca bądź systemami aryłowymi pierścienia aromatycznego związanego z ugrupowaniem 2-amino-3-nitropirazolo[1,5-a]pirymidyny (**Tabela 2.5**) skutkuje niewielkimi fluktuacjami wartości $CLog P$, aczkolwiek obecność podstawnika metylenohydrazynowego powoduje już znaczące obniżenie jego wartości, jednakże nie koreluje to bezpośrednio ze zmianą aktywności przeciwwirusowej (wirus Coxsackiego B₃) analizowanej biblioteki pochodnych.²²

	$R = C_6H_4-2,4-Cl-5-NO_2$	$n = 0$	$CLog P = 2,8$
	$R = Ph$	$n = 0$	$CLog P = 2,5$
	$R = C_6H_4-4-F$	$n = 0$	$CLog P = 2,3$
	$R = NH-NH_2$	$n = 1$	$CLog P = 0,4$
	$R = NH-NH-C_6H_4-4-F$	$n = 1$	$CLog P = 2,6$
	$R = N(CH_2CH_2)_2NCHPh_2$	$n = 1$	$CLog P = 3,7$

Tabela 2.5. Wpływ podstawników R^1 i R^2 na wartość parametru $CLog P$ – aktywność przeciwwirusowa (wirus Coxsackiego B₃).

Zmiana polarności oraz charakteru elektronodawczego/elektronobiorczego podstawników R¹-R² związanych z systemem pirymido[1,2-b]indazolu (**Tabela 2.6**) również pozostaje bez większego wpływu na wartość deskryptora lipofilowości, jednakże już obecność ugrupowania *p*-toluilowego (R³) manifestuje się istotnym jej wzrostem, przy czym stwierdzono, iż najbardziej optymalną aktywność cytostatyczną względem linii komórkowej nabłonkowego ludzkiego raka płuc (A-549) wykazywały hetareny o log *P* oscylującym wokół poziomu 6,4.²³

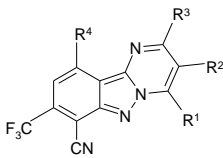
	R ¹ = CF ₃	R ² = H	R ³ = Ph	R ⁴ = Ph	CLog <i>P</i> = 6,4
	R ¹ = CF ₃	R ² = H	R ³ = CF ₃	R ⁴ = Ph	CLog <i>P</i> = 6,7
	R ¹ = CF ₃	R ² = H	R ³ = <i>p</i> -CH ₃ C ₆ H ₄	R ⁴ = Ph	CLog <i>P</i> = 8,0
	R ¹ = OH	R ² = COOEt	R ³ = H	R ⁴ = Ph	CLog <i>P</i> = 5,1
	R ¹ = NH ₂	R ² = COOEt	R ³ = H	R ⁴ = Ph	CLog <i>P</i> = 4,6
	R ¹ = NH ₂	R ² = COOEt	R ³ = H	R ⁴ = CF ₃	CLog <i>P</i> = 4,6

Tabela 2.6. Wpływ podstawników R¹-R⁴ na wartość parametru Clog *P*–aktywność względem linii komórkowej nabłonkowego ludzkiego raka płuc (A-549).

Z kolei substytucja ugrupowania aminowego pochodnych indazolu przedstawionych w **Tabeli 2.7** pierścieniem aromatycznym spowodowała znaczący wzrost wartości CLog *P*, co szczególnie daje się zauważyć w przypadku związku posiadającego grupę trifluorometylową w pozycji *para* podstawnika fenyłowego. Odnotowano przy tym pewną korelację ze wzrostem aktywności badanych pochodnych hamujących aktywność kinazy KDR uczestniczącej w regulacji wzrostu poziomu czynnika wzrostu VEGF oraz procesu nowotworowej angiogenezy.²⁴ Warto przy tym nadmienić, iż naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) jest najsilniejszym i najbardziej swoistym czynnikiem wzrostu komórek śródbłonka i wywołuje swój biologiczny efekt poprzez wiązanie się z receptorami o wysokim powinowactwie należącymi do rodziny receptorów kinazy tyrozyny, przy czym znane są dwa receptory VEGF: VEGFR-1 (*fl t/fms-like tyrosine kinase*) oraz wymieniony powyżej VEGFR-2 (KDR, *kinase insert domen-containing receptor*).²⁴

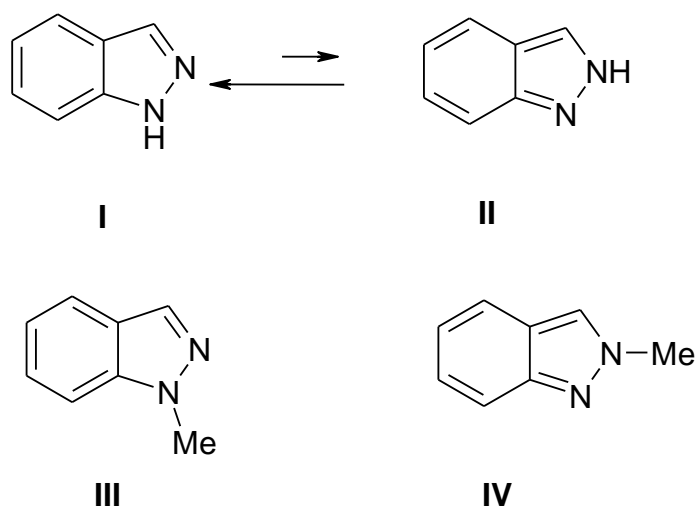
	R = H	CLog <i>P</i> = 3,1
	R = Et	CLog <i>P</i> = 4,4
	R = <i>n</i> -Bu	CLog <i>P</i> = 4,9
	R = 3-OMe-C ₆ H ₄	CLog <i>P</i> = 5,8
	R = 4-OMe-C ₆ H ₄	CLog <i>P</i> = 5,8
	R = 4-CF ₃ -C ₆ H ₄	CLog <i>P</i> = 6,9

Tab. 2.7. Wpływ podstawników R na wartość parametru Clog *P*–aktywność względem receptora KDR w przebiegu procesu nowotworowej angiogenezy.

2.3. Struktura i otrzymywanie indazolu

Najprostszym skondensowanym analogiem pirazolu jest indazol (benzo[d]pirazol, 1,2-benzodiazol). Związek ten może występować w dwóch formach tautomerycznych (**Schemat 2.2**) jako 1*H*-indazol (**I**) oraz 2*H*-indazol (**II**) (izoindazol).² Równowaga tautomeryczna przesunięta jest w kierunku 1*H*-indazolu, jednakże 2-podstawione pochodne indazolu są trwałymi związkami (np. **IV**) i stanowią interesujący obiekt badań.²⁵

Schemat 2.2



Pierścień indazolowy w widmie ¹H NMR opisywany jest przez sygnały pochodzące od jego protonów: pięciu związanych z systemem aromatycznym oraz jednego związanego pirolowym atomem azotu (**Tabela 2.8**). W jego widmie ¹³C NMR odnotować natomiast można sygnały pochodzące od atomów węgla tworzących skondensowany układ aromatyczny. Ponadto 1*H*-indazol wykazuje słabsze właściwości zasadowe (p*K*_{aH}=1,25) w

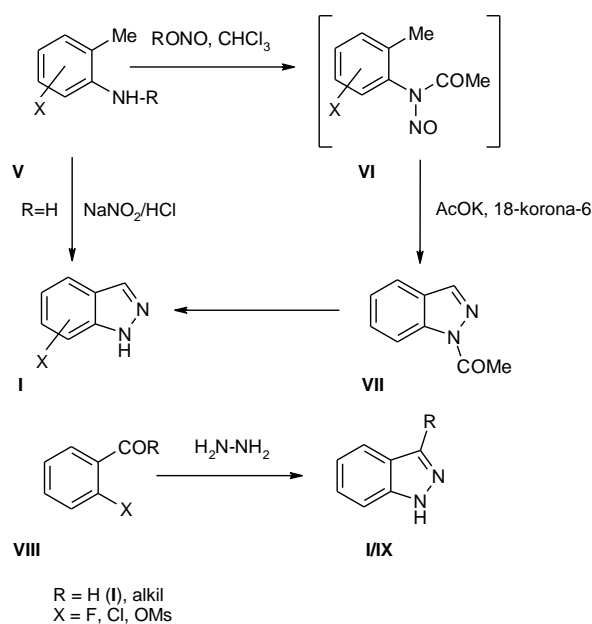
porównaniu z pirazolem, a kwasowość atomu wodoru przy pirolowym atomie azotu, w porównaniu do pirazolu, jest znacznie większa ($pK_a=13,86$) w wyniku większej delokalizacji oraz obniżenia gęstości elektronowej w systemie heterocyklicznym z uwagi na obecność skondensowanego pierścienia benzenowego.²

¹ H NMR (<i>d</i> ₆ -DMSO)		¹³ C NMR (<i>d</i> ₆ -DMSO)	
Lokant	δ [ppm]	Lokant	δ [ppm]
H-3	8,08	C-3	133,4
H-4	7,77	C-4	120,4
H-5	7,11	C-5	120,1
H-6	7,35	C-6	125,8
H-7	7,55	C-7	110,0

Tabela 2.8. Charakterystyka spektralna NMR 1*H*-indazolu.

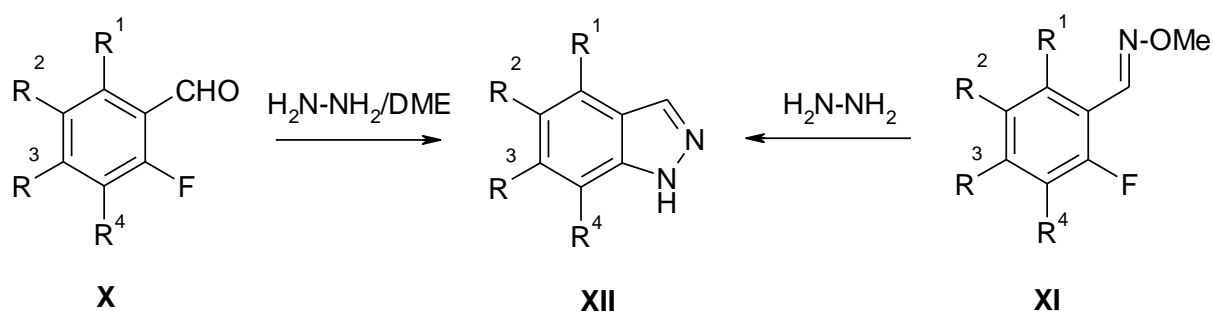
Metodyka syntezy pierścienia indazolowego opiera się na dwuazowaniu pochodnych *o*-toluidyny bądź alkinylaniliny z następczą cyklizacją do układu 1,2-diazolu.²⁵ Podobnym ze względu na mechanizm sposobem jest nitrozowanie *N*-acetylowych podstawionych pochodnych aniliny **V** (Schemat 2.3). Układ indazolu można także otrzymać w reakcji *o*-podstawionych pochodnych benzaldehydu **VIII** z hydrazyną.^{25,26}

Schemat 2.3



W kontekście wykorzystania hydrazyny jako czynnika nukleofilowego w syntezie indazolopochodnych interesującą metodą jest jej reakcja z pochodnymi *o*-fluorobenzaldehydu **X** bądź *O*-metylooksymów **XI** (Schemat 2.4) umożliwiającą otrzymywanie skondensowanych pochodnych pirazolu **XII**.²⁶

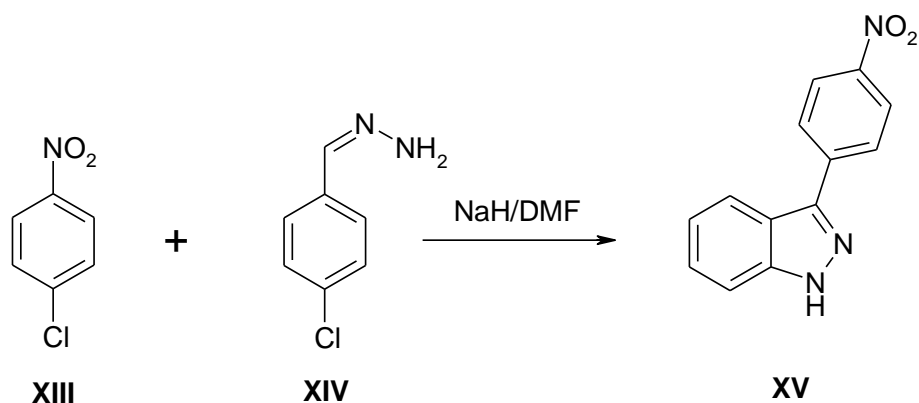
Schemat 2.4



$R^1, R^2, R^3, R^4 = H, Cl, Br$

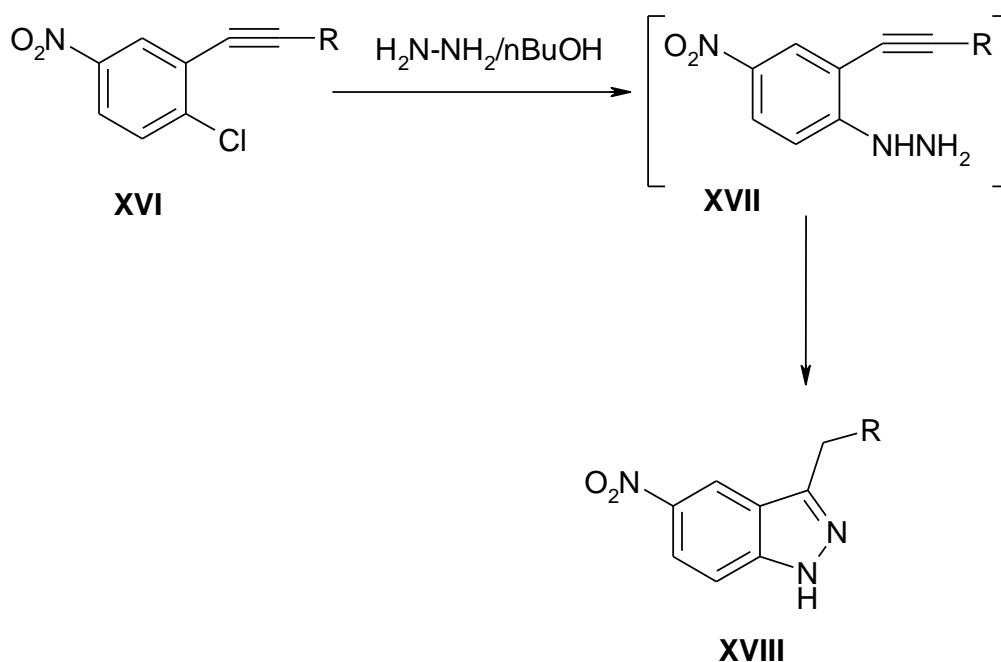
Formowanie pięścienia indazolowego może ponadto nastąpić na drodze cyklocondensacji zachodzącej pomiędzy *p*-halogenopochodnymi nitrobenzenu **XIII** a aromatycznymi hydrazonami **XIV** (Schemat 2.5).²⁶ Annulacja następuje na drodze *zastępczego podstawienia atomu wodoru* (VNS)²⁷ z jednoczesną eliminacją atomu chloru.

Schemat 2.5



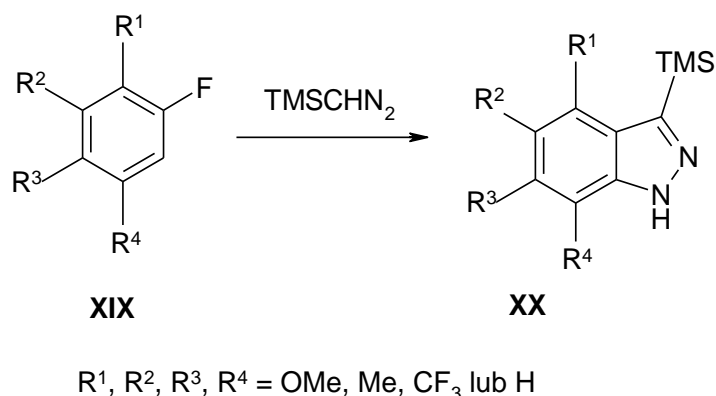
Z kolei użycie *o*-chloroalkinyloarenów **XVI** (Schemat 2.6) w reakcji Michaela pozwala na uzyskiwanie 3-alkilowych podstawionych pochodnych indazolu **XVIII**.²⁶

Schemat 2.6



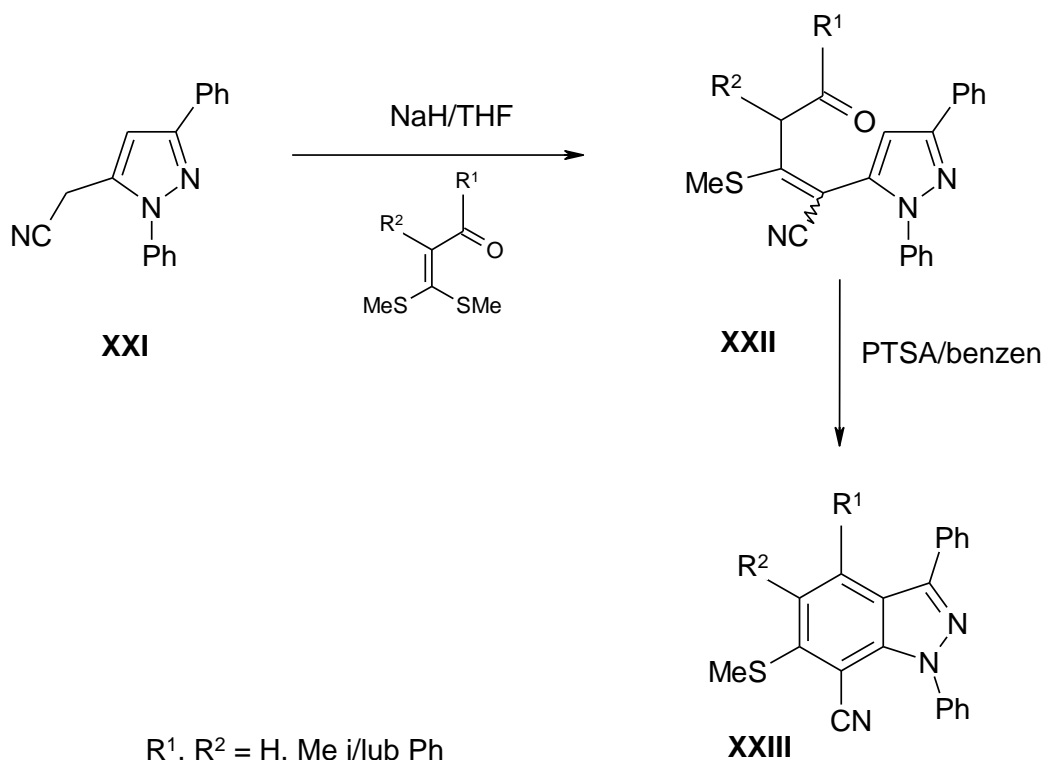
Warto również nadmienić, iż w syntezie układów indazolowych wykorzystuje się również reakcje cykloaddycji [3+2]²⁸ zachodzące pomiędzy m.in. halogenopochodnymi benzenu a trimetylosilyldiazometanem w obecności zasady z utworzeniem mieszaniny reakcyjnej (Schemat 2.7).²⁶

Schemat 2.7



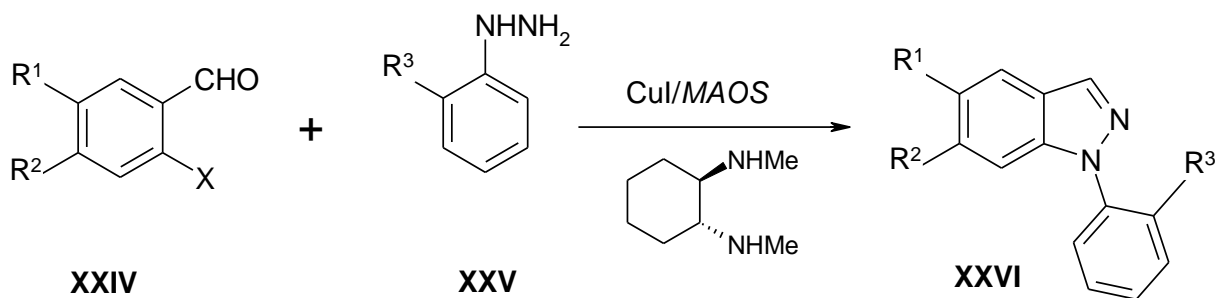
Annulacja [3+2] 1,3-difenylo-5-nitrylometylopirazolu **XXI** z ditioacetalami α -oksoketenów prowadzi do funkcjonalizowanych pochodnych indazolu. Przykład wspomnianej przemiany zobrazowano na Schemacie 2.8.²⁶

Schemat 2.8



W procesie otrzymywania wybranych benzenowych analogów pirazolu wykorzystywane są kompleksy oraz sole niektórych metali, np. palladu czy miedzi. Przykładem takiej przemiany może być reakcja *o*-podstawionych halogenowych pochodnych benzenu **XXIV** z aromatycznymi układami hydrazyny **XXV**, która – w warunkach syntezy wspomagananej mikrofalowo (*MAOS* - microwave-assisted organic synthesis)²⁹ - w obecności katalitycznej ilości jodku miedzi (I) oraz ligandu diaminowego daje indazolopochodną **XXVI** (Schemat 2.9).²⁶

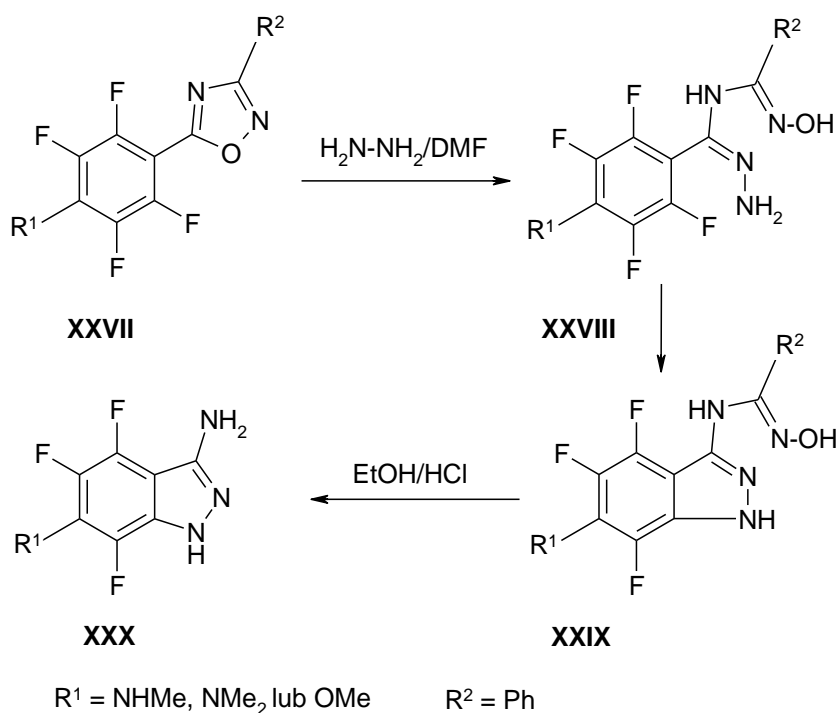
Schemat 2.9



$\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3 = \text{F}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}, \text{H}$ i/lub OMe

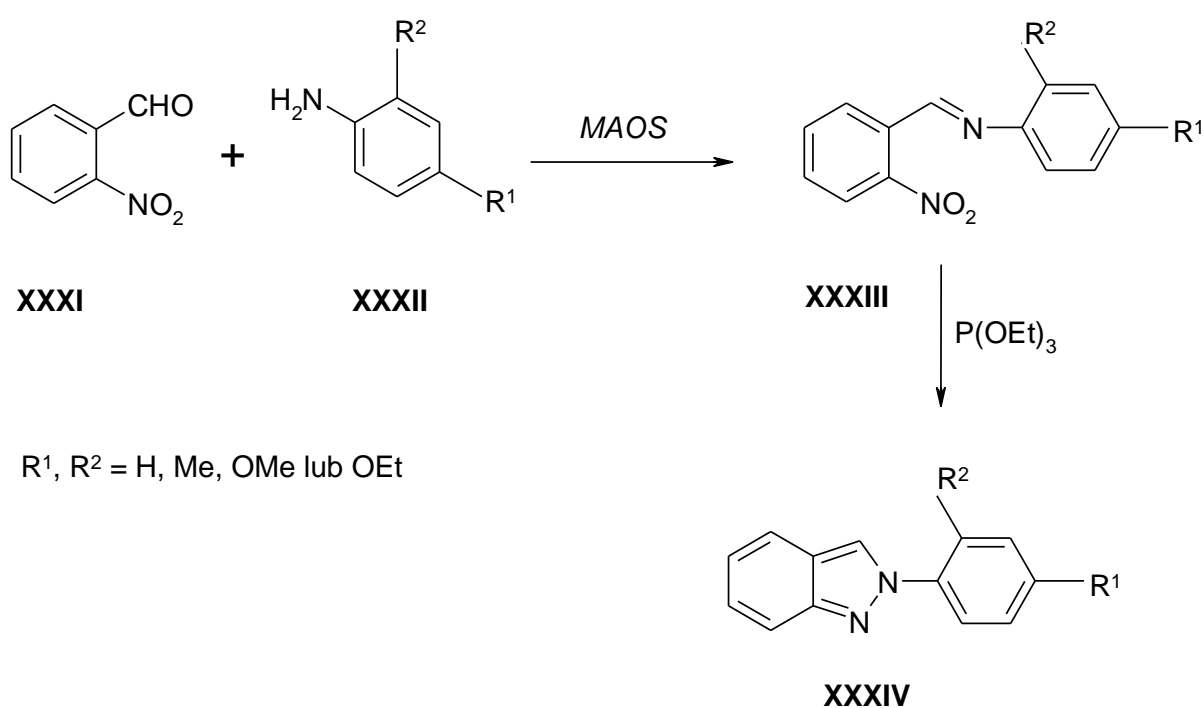
Kluczowym elementem syntezy układu indazolu w większości przedstawionych powyżej przemianach jest dobudowanie pierścienia pirazolowego do układów aromatycznych. Alternatywą i równie skuteczną metodą może być utlenianie 4-hydroksyimino-6,6-dimetylo-1-fenyl-4,5,6,7-tetrahydroindazolu za pomocą kwasu polifosforowego (PPA, ang. polyphosphoric acid) do 5,6-dimetoksy-1-fenylindazolu, a także przegrupowanie pierścienia hetero aromatycznego typu ANRORC (Addition of Nucleophile, Ring Opening and Ring Closure)³⁰. Przykładem tej ostatniej przemiany jest przegrupowanie następujące w reakcji 5-tetrafluorofenyl-1,2,4-oksadiazolu **XXVII** z hydrazyną (Schemat 2.10).²⁶

Schemat 2.10



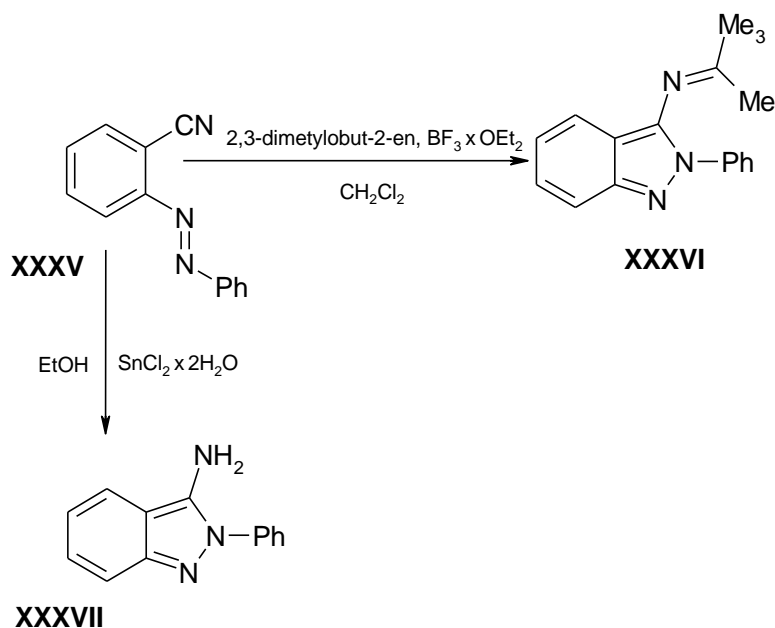
W obszarze zainteresowania współczesnej chemii organicznej znajdują się również techniki zmierzające do optymalizacji syntezy N2-podstawionych pochodnych indazolu. W porównaniu do metodyki przedstawionej na **Schemacie 2.9** zastosowanie reakcji podstawionych pochodnych *o*-nitrobenzaldehydu **XXXI** z wybranymi pierwszorzędowymi aminami aromatycznymi **XXXII**, poprzez etap utworzenia układów azometinowych **XXXIII** (zasad Schiffa), skutkuje, w warunkach promieniowania mikrofalowego (*MAOS*), uzyskaniem azahetarenów **XXXIV** (**Schemat 2.11**).³¹

Schemat 2.11



Podobnie cyklizacja 2-(fenyloazo)benzonitrylu **XXXV**, w zależności od użytych kwasów Lewisa, prowadzi do uzyskania odmiennych podstawionych izoindazoli **XXXVI** i **XXXVII** (**Schemat 2.12**).²⁶

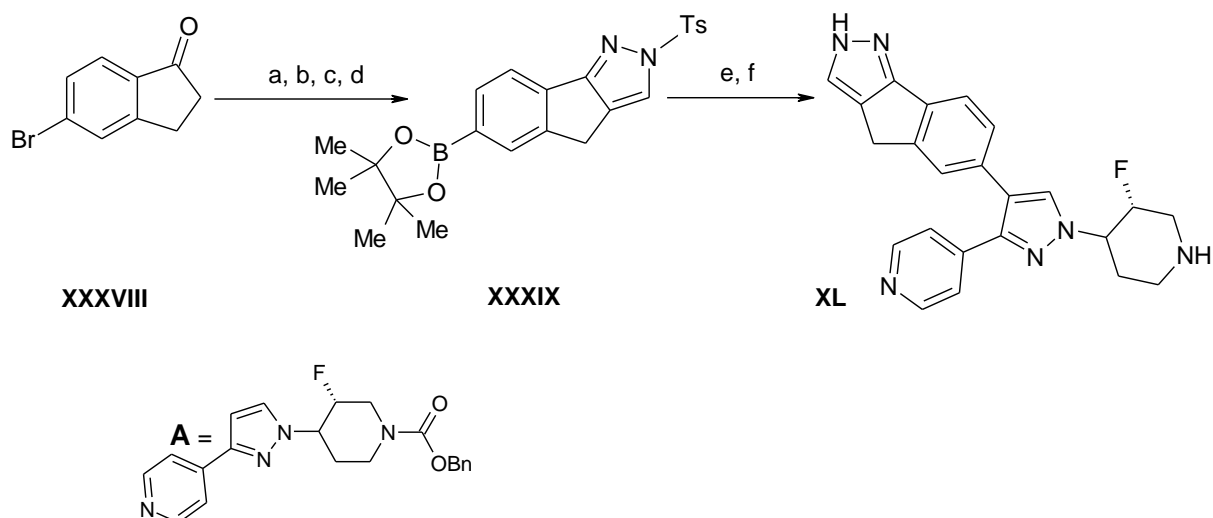
Schemat 2.12



2.4. Synteza innych skondensowanych pochodnych pirazolu

Skondensowane systemy pirazolu są rzadko spotykane w świecie naturalnym. Połączenia te są bioizosterami jednych z najważniejszych związków naturalnych, a mianowicie indolu i puryny.³² Z tego względu stanowią ważny kierunek poszukiwań nowych substancji biologicznie aktywnych.^{1,33} Szeroki zakres działania wyżej wymienionych związków uzasadnia celowość dalszej optymalizacji dobudowania pierścienia pirazolowego do układów cyklicznych. Wykorzystywana w tym celu hydrazyna stosowana jest do otrzymywania skondensowanych pochodnych indanu (Schemat 2.13)³⁴ bądź izokumaryny (Schemat 2.14).³⁵

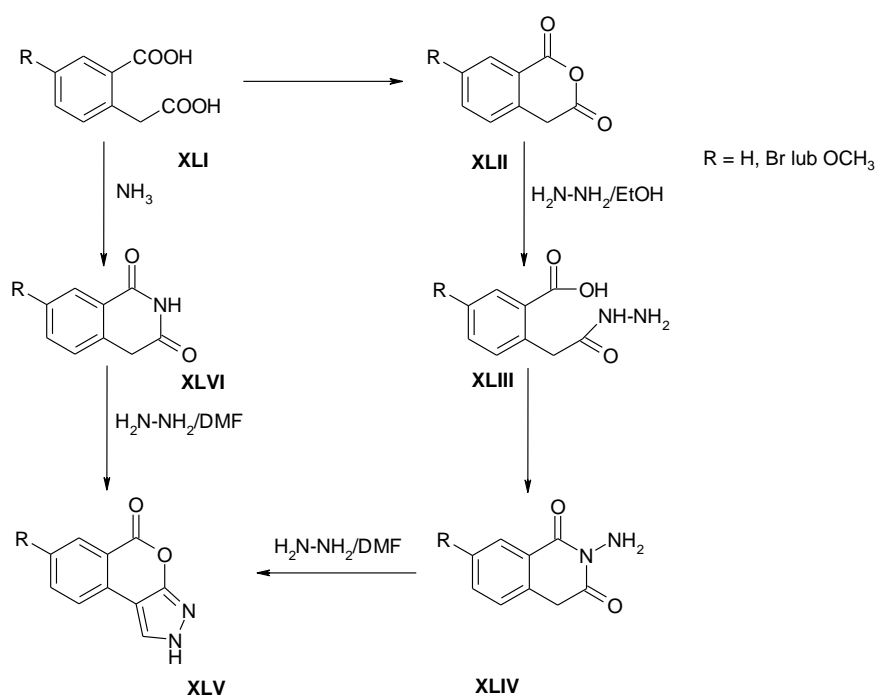
Schemat 2.13



a = DMF-DMA/toluen, b = H₂N-NH₂/AcOH, EtOH, c = NaH, TsCl/THF, d = bis(pinakolato)diboron, PdCl₂(dppf), e = **A**, Pd(Ph₃)₄, K₂CO₃/DME-woda, potem roztwór (1 mol/dm³) NaOH; dppf - 1,1'-bis(difenylofosfino)ferrocen, DME - eter dimetylowy

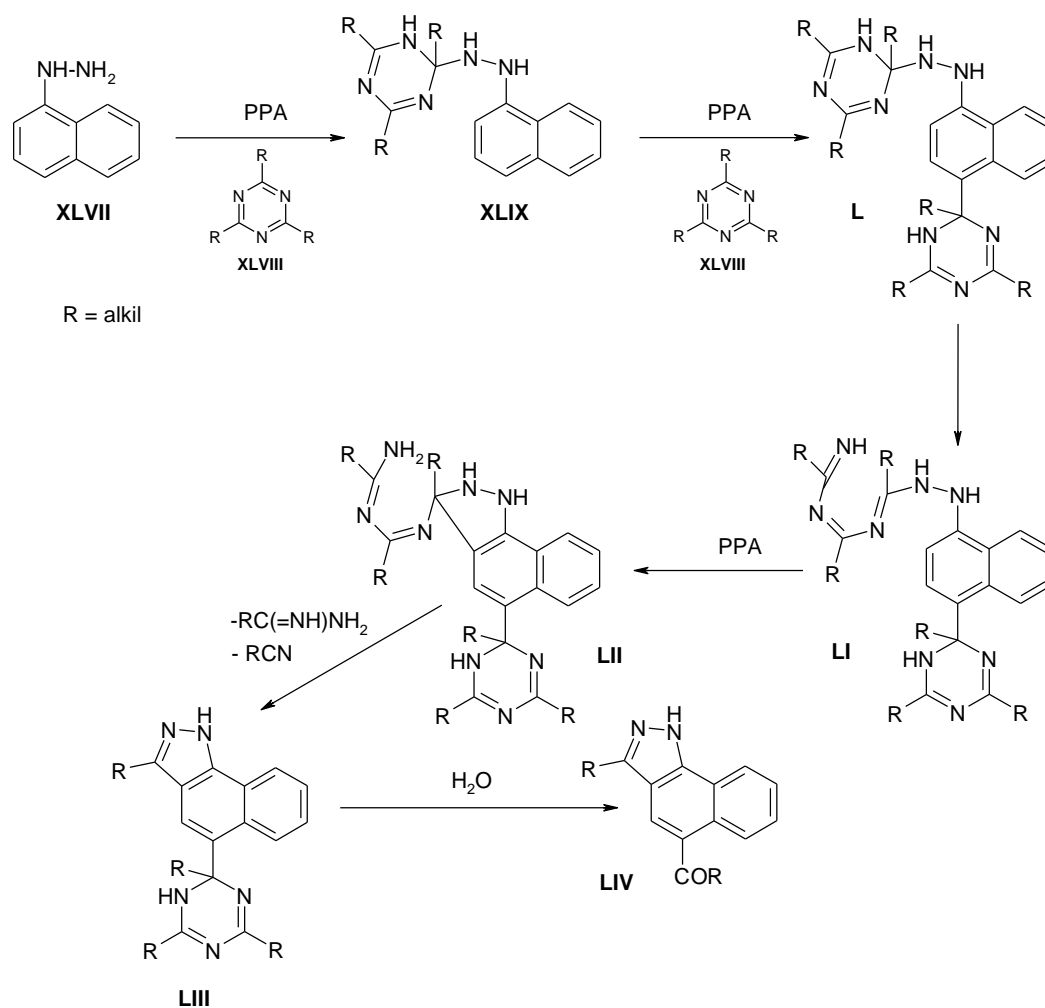
Pierwsze z wymienionych pochodnych (**Schemat 2.13**) wykazywały działanie inhibicyjne w stosunku do kinazy B-Raf biorącej udział w procesie nowotworzenia.³⁴ Z kolei uzyskane pochodne izokumaryny (**Schemat 2.14**) stanowiąc mogą struktury wiodące układów o potencjalnej aktywności przeciwwirusowej (HIV-1) oraz przeciwnowotworowej.³⁵

Schemat 2.14



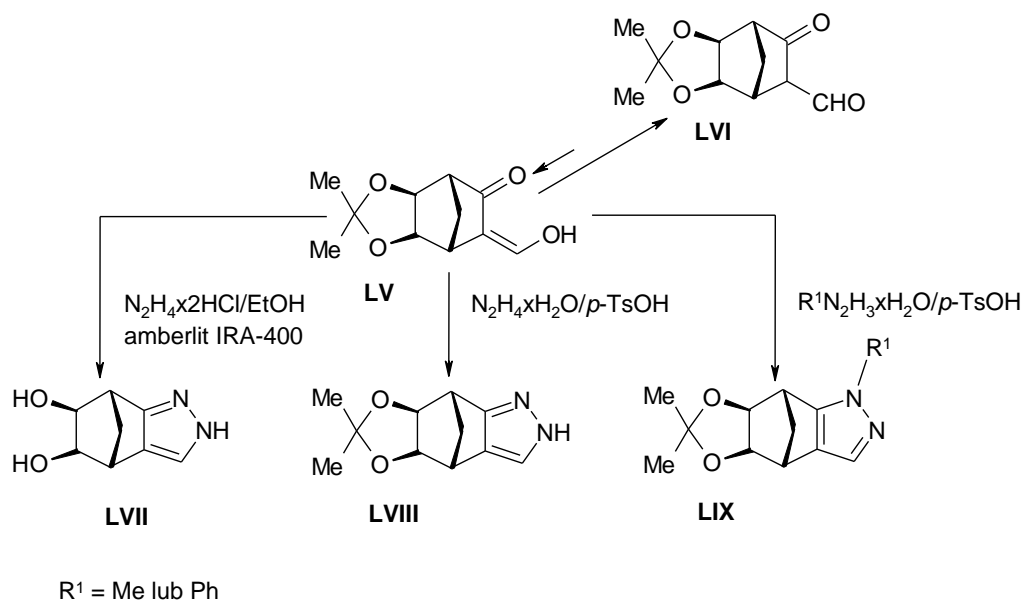
Reakcja 1-naftylohydrazyny **XLVII** z alkilowymi pochodnymi 1,3,5-triazyny **XLVIII** w obecności kwasu polifosforowego, biegnąca poprzez otwarcie pierścienia triazyny z następczą recyklizacją, pozwala na uzyskanie pochodnych dihydrotriazyny **LIII**, których hydroliza prowadzi do układów benzo[g]indazolowych **LIV** (Schemat 2.15).³⁶

Schemat 2.15



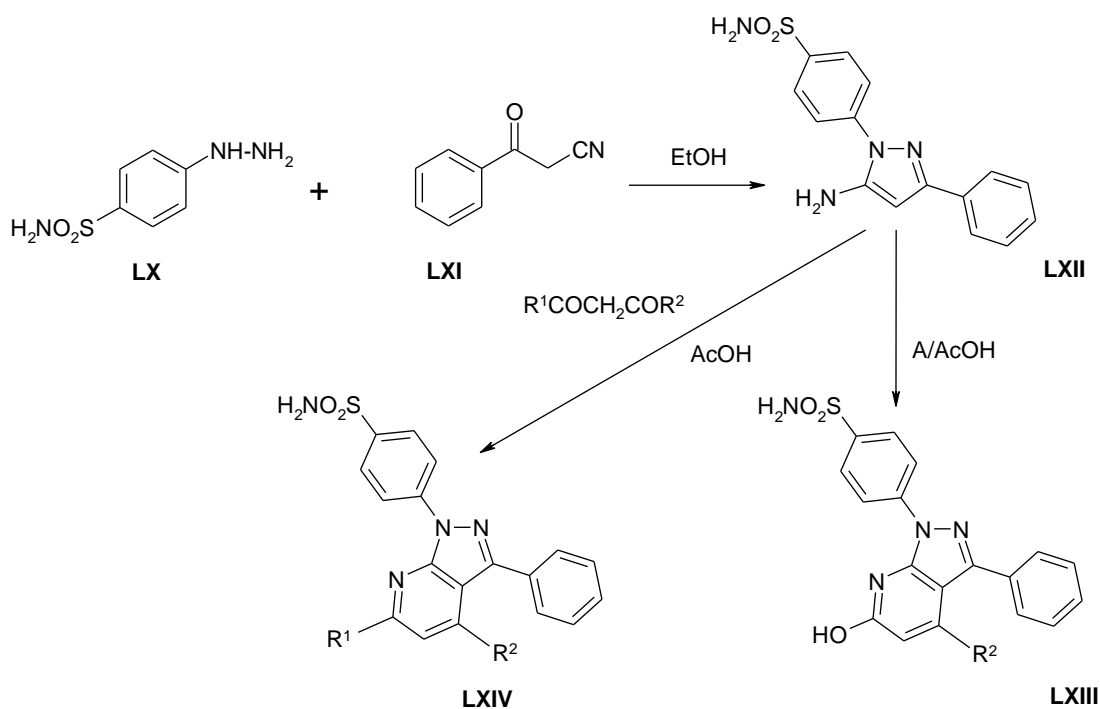
Nukleofilowy atak hydrazyny na układ β -diketonu wykorzystywany jest także do modyfikacji pierścienia pochodnych norbornenu **LV-LVI** (Schemat 2.16).³⁷

Schemat 2.16



Powyższe rozważania wskazują, iż annulacja związków heteroaromatycznych prowadząca do układów policyklicznych stanowi interesujący kierunek badań współczesnej syntezy organicznej. Wykorzystuje się przy tym niejednokrotnie właściwości chemiczne β -diketonów wykazujące istotne powinowactwo do odpowiednich grup zasadowych (jak np. $-\text{NH}-\text{NH}_2$, $-\text{NH}_2$), których nukleofilowość determinuje obecność niesparowanych elektronów orbitalu p atomu azotu.

Schemat 2.17

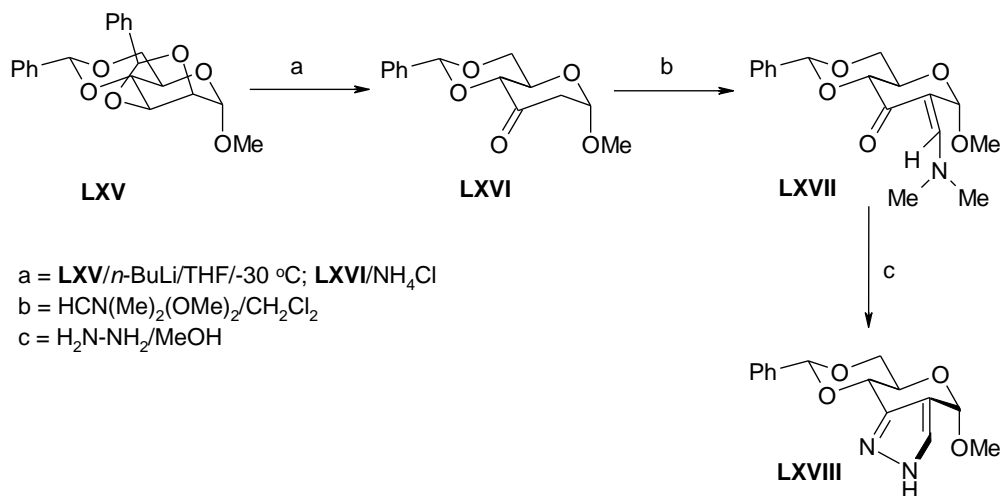


A = acetyloctan etylu, malonian dietylu,
lub cyjanooctan etylu

R¹, R² = CH₃, CF₃, Ph lub OH

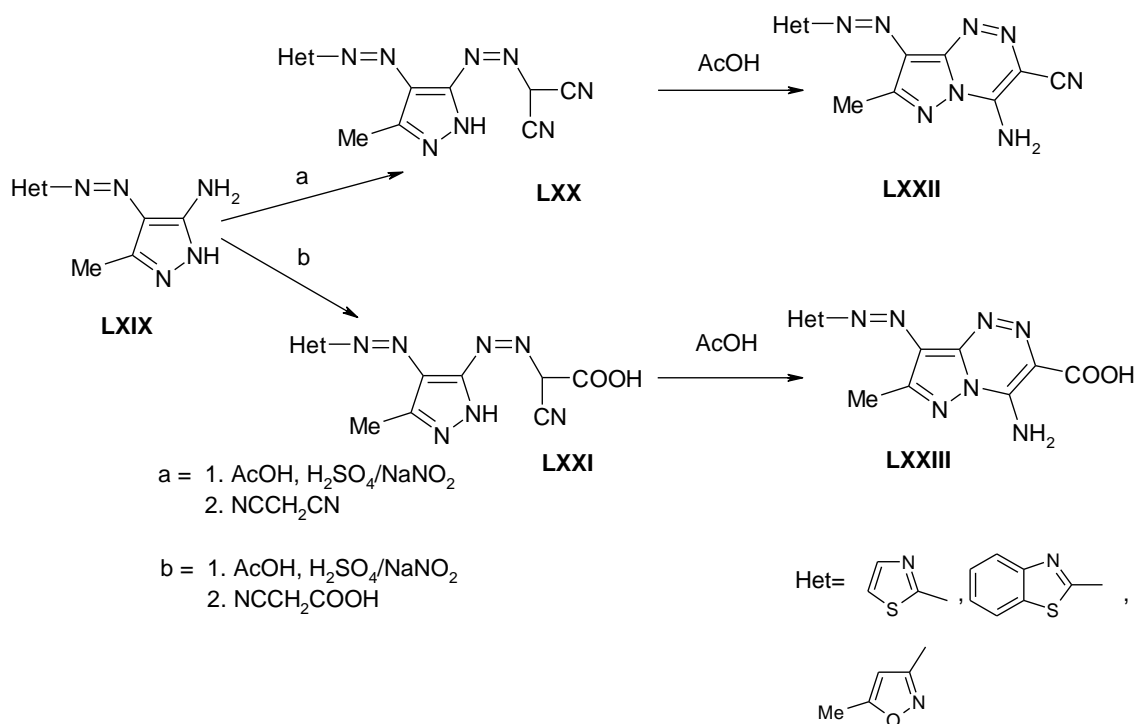
Owe oddziaływania typu nukleofil-elektrofil wykorzystywane są również w syntezie szeregu pochodnych pirazolo[3,4-b]pirydyny **LXIII-LXIV** (Schemat 2.17), w której istotną rolę odgrywa atak ugrupowania aminowego pirazolopochodnej **LXII** do acetylooctanu etylu, malonianu dietylu, cyjanooctanu etylu bądź odpowiednich 1,3-diketonów³⁸, lub biblioteki pirazolopiranozydów **LXVIII**, w otrzymywaniu których jako substancję wyjściową zastosowano metylo-2,3:4,6-di-*O*-benzylideno- α -D-mannopiranozyd **LXV** (Schemat 2.18).³⁹

Schemat 2.18



Skondensowane pochodne pirazolu o szerokim spektrum aktywności biologicznej można otrzymać przez dwuazowanie aminopochodnych pirazolu. Przykładem jest przedstawiona na **Schemacie 2.19** synteza pochodnych pirazolo[5,1-*c*][1,2,4]triazyny **LXXII-LXXIII**, w której otrzymywane *ex tempore* w mieszaninie reakcyjnej sole diazoniowe ulegają sprzężeniu z malononitrylem bądź cyjanooctanem etylu. Przejściowo powstające związki **LXX** lub **LXXI** ulegają cyklizacji pod wpływem kwasu.⁴⁰

Schemat 2.19

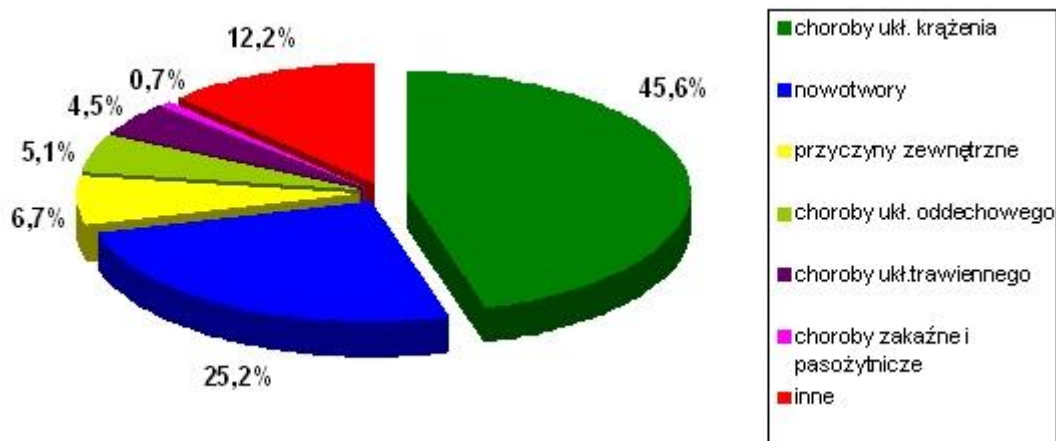


2.5. Aktywność biologiczna pochodnych pirazolu

Związki heterocykliczne stanowią podstawę budowy większości obecnie stosowanych leków. Charakteryzuje je szerokie spektrum aktywności biologicznej.^{1,33} Wśród nich ważną grupę stanowią pochodne pirazolu i jego skondensowanych analogów. W tej grupie związków znajdują się substancje o działaniu: przeciwnowotworowym,^{8,42-44} przeciwwirusowym,^{45,46} przeciwbakteryjnym,⁴⁷⁻⁵⁰ przeciwzapalnym,⁵¹⁻⁵⁴ czy też antyestrogenowym.⁵⁵ Znalazły one również zastosowanie w leczeniu otyłości,⁵⁶ choroby Alzheimera^{57,58} i Parkinsona⁵⁹ oraz innych schorzeń. Z uwagi na profil naukowy Katedry i Zakładu Chemii Organicznej szerszego omówienia wymagają pochodne pirazolu o aktywności przeciwnowotworowej oraz działające na poziomie ośrodkowego układu nerwowego.

2.5.1. Aktywność przeciwnowotworowa pochodnych pirazolu i ich skondensowanych analogów

Pomimo stałego postępu medycyny nowotwory złośliwe przyczyniają się do śmierci milionów ludzi na całym świecie, zajmując drugie miejsce na liście przyczyn zgonów, rzy czym odsetek zgonów z powodu nowotworów ciągle wzrasta. Epidemiologia nowotworów opisuje i analizuje fenomen ciągłego wzrostu liczby zachorowań na nie.⁶⁰ W Polsce notuje się rocznie prawie 138 500 nowych zachorowań i ponad 91 500 zgonów z powodu nowotworów, a u około 390 000 osób chorobę nowotworową odnotowano już na początku XXI wieku. Na każde 100 000 osób w polskiej populacji u ponad 330 zdiagnozowano nowotwór, a ponad 240 przegrywa walkę z rakiem.⁶¹ Podobnie jak w większości krajów, tak również w Polsce, choroby serca i nowotwory złośliwe są pierwszą i drugą przyczyną zgonów, stanowiąc razem około 70% wszystkich przyczyn, z czego nowotwory złośliwe ponad 25% (**Rys. 2.3**).⁶²



Rys. 2.3. Struktura przyczyn zgonów w Polsce w 2008 r.

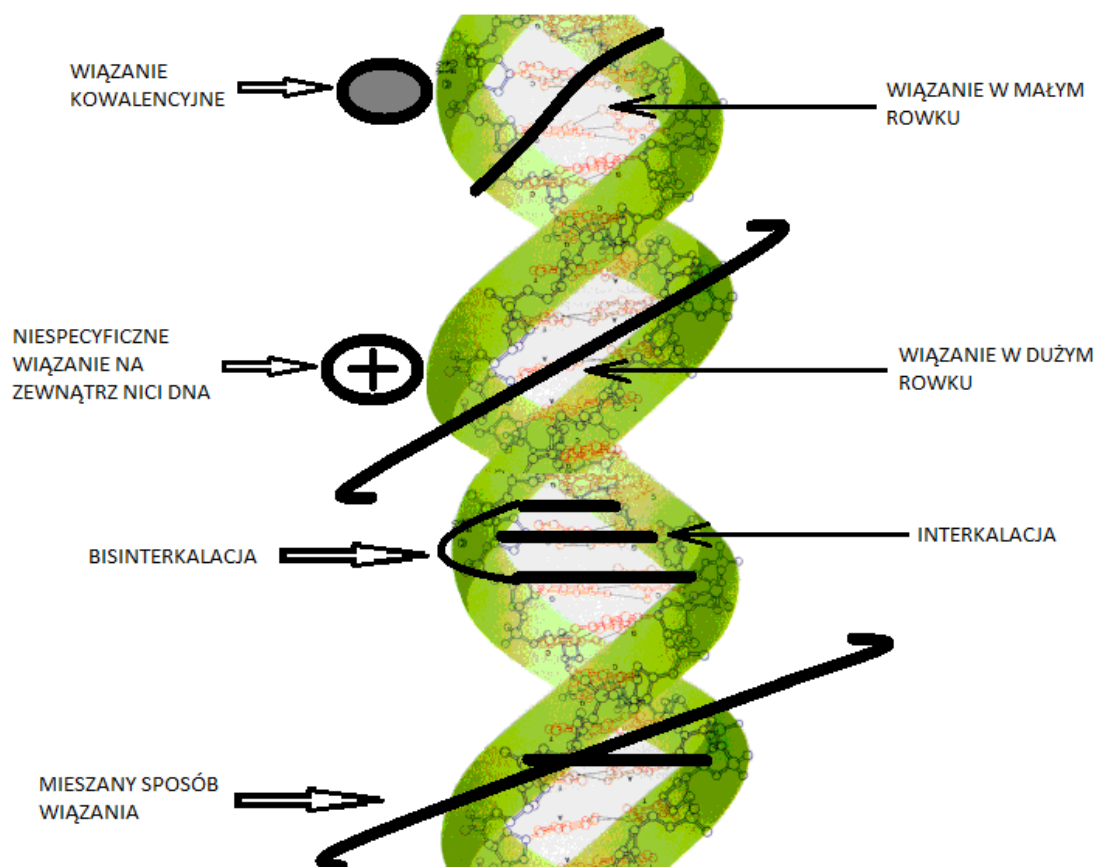
Nowotwory złośliwe stanowią istotny problem nie tylko w starszych grupach wiekowych, ale są główną przyczyną przedwczesnej umieralności przed osiągnięciem 65. roku życia. U mężczyzn najczęściej zachorowań notuje się między 60. a 79. rokiem życia, u kobiet tendencja ta zauważalna jest już od 50 roku życia aż po wiek 79 lat.⁶¹ Statystyki Unii Europejskiej z lat 2006-2007 wskazują, że odnośnie umieralności na nowotwory złośliwe Polska plasuje się w niechlubnej czołówce, odnotowując jeden z najwyższych współczynników w całej Europie.^{60,62} Ponadto współczynniki umieralności na nowotwory u mężczyzn na ogół są wyższe niż u kobiet. Walka z chorobami nowotworowymi stanowi także duże wyzwanie dla polityki zdrowotnej Wielkopolski. W 2007 roku do Wielkopolskiego Rejestru Nowotworów zgłoszono 12765 nowych zachorowań (tj. 6338 przypadków u mężczyzn oraz 6427 u kobiet) i 8280 zgonów z przyczyn nowotworu złośliwego. Przypuszcza się jednak, że wskaźnik zachorowań jest znacznie wyższy i wynosi 13900 przypadków.^{60,63,64} W Wielkopolsce nowotwory stanowią drugą przyczynę śmierci, a w przypadku kobiet w grupie wiekowej do 64 lat alarmujący jest fakt, że to właśnie nowotwory są wiodącą przyczyną zgonów. Wysokie zagrożenie populacji w Wielkopolsce nowotworami spowodowane jest głównie starzeniem się społeczeństwa, ekspozycją na czynniki ryzyka (przede wszystkim dym tytoniowy, złe odżywianie, zanieczyszczenie środowiska) oraz opóźnieniem wdrażania populacyjnych programów wczesnej diagnostyki i leczenia. Badania epidemiologiczne wskazują, że mężczyźni już od grupy wiekowej 20-44 najczęściej zapadają na nowotwory płuc, co wiąże się z nałogiem palenia papierosów.⁶⁰ Utrzymującym się trendem wśród kobiet jest rejestrowanie największej liczby zachorowań na nowotwory złośliwe piersi, które stanowią

także główną przyczynę śmierci pań po 50. roku życia.^{63,64} Ratunkiem dla wszystkich chorych może być rozwój medycyny i technologii prowadzący do opracowania nowych metod leczenia i wprowadzanie ich do kanonów terapii. Uzasadnia to ciągle poszukiwania przez naukowców nieznanymi substancjami leczniczymi o właściwościach przeciwnowotworowych. Duże nadzieje w leczeniu nowotworów pokłada się w uzyskiwaniu substancji aktywnych z grupy pochodnych pirazolu.

Obecnie stosowane leki przeciwnowotworowe wykazują wielokierunkowe mechanizmy działania.^{32,41} Wpływają hamująco na podziały komórkowe, powodują uszkodzenia DNA, blokują proces transkrypcji i translacji, przyczyniając się w końcowym etapie do indukcji apoptozy komórek nowotworowych. Oporność komórek nowotworowych na leki zmusza naukowców do ciągłego poszukiwania nowych substancji, co już wielokrotnie podkreślano, jak również modyfikacji już istniejących związków w celu wykorzystywania ich w celowanej terapii przeciwnowotworowej. Dla wielu leków przeciwnowotworowych celem terapeutycznym jest podwójna helisa DNA.⁶⁵ Mechanizm działania najczęściej polega na bezpośrednim oddziaływaniu z tą makromolekułą lub na zapobieganiu prawidłowej relaksacji struktury DNA poprzez zahamowanie działania topoisomerazy.⁶⁶

Istnieje kilka mechanizmów, za pomocą których możliwe jest przyłączenie się ligandu do struktury DNA (**Rys. 2.4**): interkalacja, bisinterkalacja, wiązanie w małym lub dużym rowku, wiązanie kowalencyjne z elementami strukturalnymi nici, niespecyficzne wiązanie na zewnątrz nici DNA oraz mieszany sposób wiązania.^{32,41} Wiązanie ligandu z helisą DNA może mieć charakter kowalencyjny lub niekowalencyjny. Interkalacja jest oddziaływaniem niekowalencyjnym, podczas którego ligand jest ustawiany sztywno w położeniu prostopadłym do osi spirali. Powoduje to rozsuniecie planarnie ułożonych par zasad, a tym samym zniekształcenie szkieletu cukrowo-fosforanowego makromolekuły. Oddziaływanie to na ogół nie zrywa wiązań wodorowych Watsona-Cricka, natomiast rozplata nić DNA w miejscu wiązania z ligandem. Rozbicie regularnej struktury helikalnej zakłóca wiązanie kwasu nukleinowego z enzymami z grupy topoisomerazy i polimerazy DNA. Topoisomerazy odpowiadają za stopień skrętości spirali DNA i biorą udział w ważnych dla komórki procesach takich jak: replikacja, transkrypcja, segregacja chromosomów podczas mitozy. Polimerazy z kolei katalizują wydłużanie łańcucha DNA w kierunku 5' do 3'. Interkalacja prowadzi do zmiany topologii DNA, zaburzenia replikacji i przez to podziału komórki lub mutacji

punktowych z przesunięciem ramki odczytu. Ostatecznie interkalacja może indukować proces programowej śmierci komórki, czyli apoptozę. Warto przy tym nadmienić, iż związki interkalujące wykazują szczególną preferencję do obszarów DNA bogatych w guaninę i cytozynę. W swej strukturze winny zawierać płaski, sztywny układ zbudowany z 3-4 skondensowanych pierścieni aromatycznych lub heteroaromatycznych. Ich wysokość maksymalnie może wynosić 0,34 nm, a optymalna powierzchnia 0,28 nm², co odpowiada 3-4 skondensowanym pierścieniom aromatycznym. W swej budowie zawierają często łańcuchy aminoalifatyczne pełniące ważną rolę w procesie wiązania z helisą DNA. Wszystkie interkalatory mają charakter polarny i wykazują dużą delokalizację ładunku. Są dobrymi akceptorami elektronów, w przeciwieństwie do zasad nukleotydów będącymi dobrymi ich donorami.^{32,33}



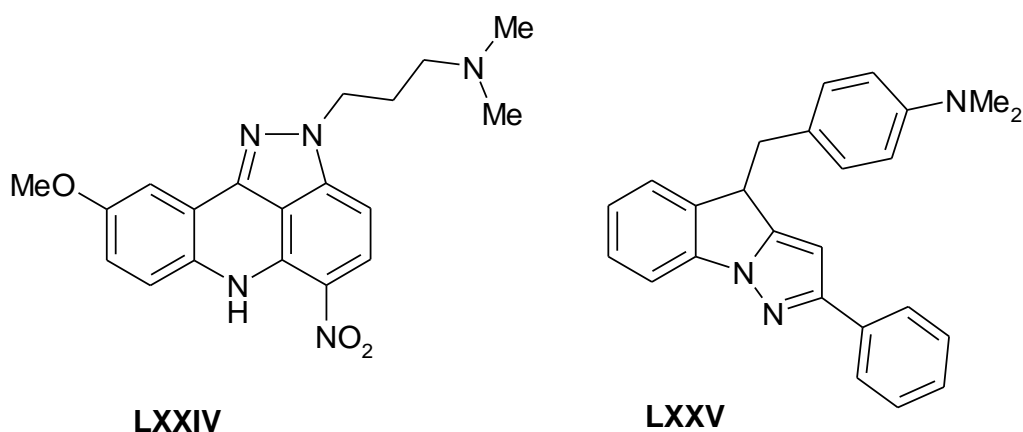
Rys. 2.4. Sposoby oddziaływania ksenobiotyków z DNA.³²

Z obecnego stanu wiedzy wynika, iż interkalacja DNA przez ksenobiotyki stanowi pierwszy etap w szeregu zdarzeń prowadzących ostatecznie do uszkodzenia DNA według innych

mechanizmów.^{32,41} Wśród biologicznych właściwości interkalatorów zatem należy wymienić: zahamowanie aktywności topoizomeraz, stabilizowanie struktury tzw. G-kwadruleksów, wywoływanie mutacji i indukcję wspomnianej apoptozy.^{41,67072}

Pirazoloakrydyny (np. **LXXIV** na **Schemacie 2.20**) to nowa grupa potencjalnych czynników przeciwnowotworowych o charakterze interkalatorów wykazująca szerokie spektrum działania cytotoksycznego na komórki nowotworowe: raka piersi, okrężnicy, płuc.⁷² W komórkach białaczkowych powodują powstawanie podwójnych i pojedynczych złamań w helisie DNA, przez co hamują syntezę DNA, RNA i produkcję białek. Sugeruje się, iż cytotoksyczność tych związków wynika z wiązania się ze helisą DNA i uniemożliwianiem przyłączenia się enzymów uczestniczących w replikacji, naprawie i transkrypcji. Dowiedziono, iż pirazoloakrydyny hamują topoizomerazy I i II, nie powodują jednak stabilizacji kowalencyjnego kompleksu enzymu z DNA.⁷³

Schemat 2.20



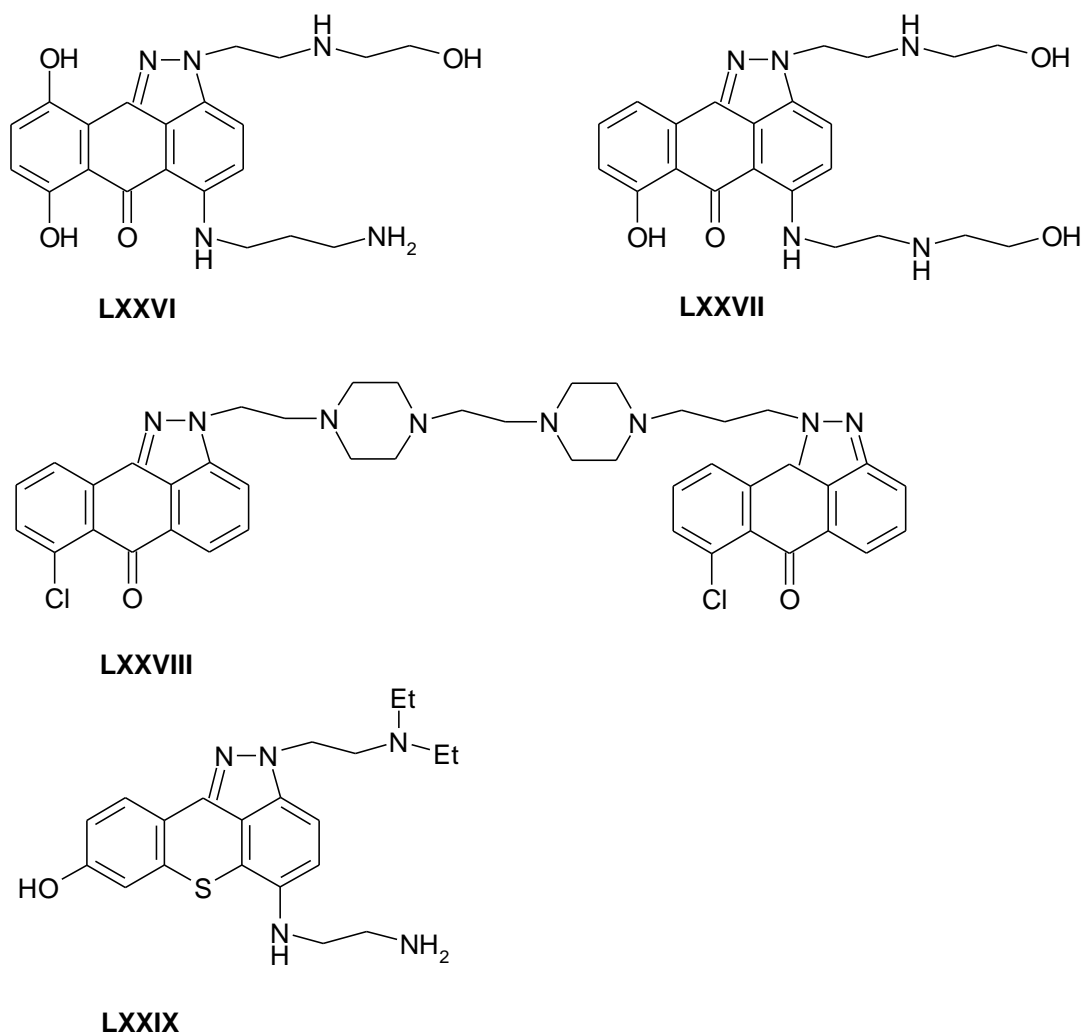
Pochodne pirazolo[1,5-a]indolu (np. **LXXV** na **Schemacie 2.20**) to syntetyczne interkalatory, a także inhibitory topoizomerazy I i/lub II. Związki powodują zahamowanie wzrostu zarówno komórek nowotworów litych jak i białaczkowych. Wykazywana przez nie aktywność jest porównywalna z działaniem kamptotecyny.⁷⁴

Antrapirazole to interkalatory działające przeciwnowotworowo. Badani klinicznie przedstawiciele tej grupy związków, tj. piroksantron **LXXVI** i lozoksantron **LXXVII** (**Schemat 2.21**) w małym stężeniu hamują wzrost komórek raka piersi, prostaty,

płaskonabłonkowego krtani (FaDu) oraz komórek białaczkowych (K562) poprzez blokowanie topoisomerazy II, jednak w innych typach komórek nowotworowych wykazują małą aktywność.⁷⁵⁻⁷⁷

Aktywność bisantrapirazoli (np. **LXXVIII** na **Schemacie 2.21**) związana jest z silniejszym wiązaniem z helisą DNA, dzięki posiadaniu przez nie dwóch części interkalujących oraz łączącego je łańcucha, który lokuje się w rowku DNA. Płaskie cząsteczki antrapirazolowe poprzez interkalację predysponują strukturę DNA do złamań. Ponadto związki należące do tej grupy stabilizują kompleks topoisomeraza typu II:DNA.⁷⁷

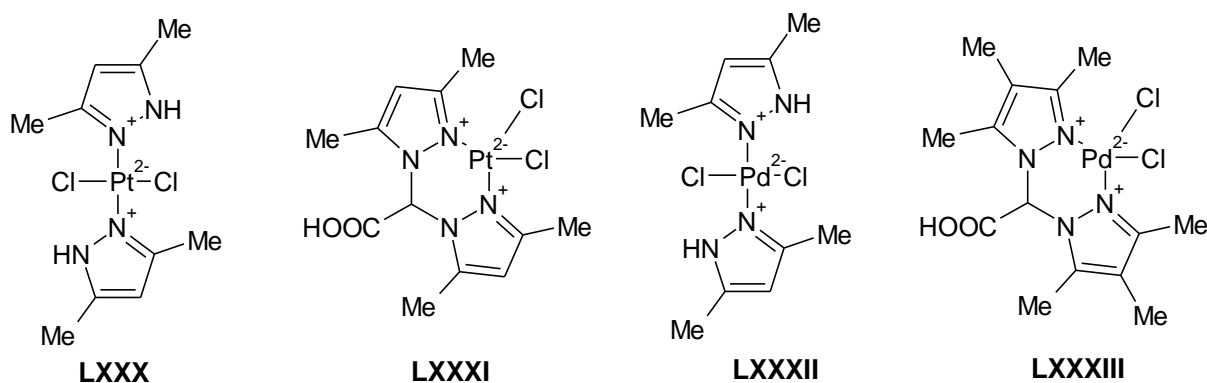
Schemat 2.21



Z kolei pochodne 2H-[1]benzotiopirano[4,3,2-cd]indazolu (np. **LXXIX** na **Schemacie 2.21**) należą do syntetycznych, interkalujących czynników przeciwnowotworowych wykazujących szerokie spektrum działania przeciw komórkom nowotworowym: białaczki, raka skóry, płuc, okrężnicy i piersi.⁷⁸

Pirazol łatwo tworzy kompleksy z metalami przejściowymi (**Schemat 2.22**), a wiele koordynacyjnych związków platyny oraz palladu z pochodnymi pirazolu wykazuje działanie przeciwnowotworowe, przy czym stwierdzono, iż związki palladu (**LXXXII-LXXXIII**) są aktywniejsze niż związki platyny (**LXXX-LXXXI**).^{8,42,43}

Schemat 2.22

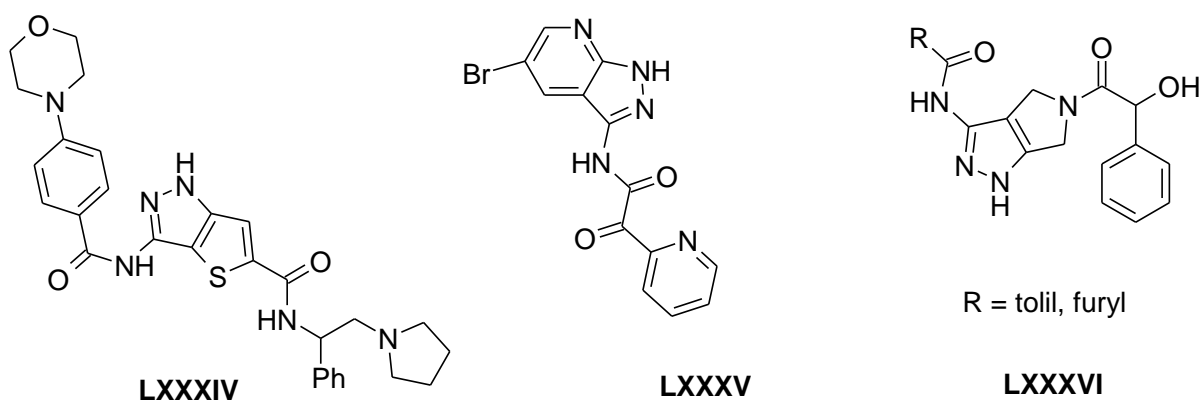


Kinazy białek, odrywające rolę regulatorową w procesach mitozy, są ważnymi elementami szlaków sygnalizacyjnych komórek. Zakłócenia przekazywania sygnałów są prawdopodobnie spowodowane zaburzeniami regulacji i nieprawidłowymi substancjami kontrolującymi te enzymy. Celowana terapia bazująca na inhibicji kinaz staje się nowym orężem walki z rakiem.⁷⁹ Najlepiej zbadaną grupą kinaz są kinazy tyrozynowe (TKs), które dzielone są na dwie grupy: receptorowe kinazy tyrozynowe (RTKs) i niereceptorowe kinazy tyrozynowe (NRTKs). Homologami grupy TKs są kinazy serotoninowo-tyrozynowe (kinazy TKL). Większość receptorów kinaz nie jest wystarczająco selektywna wobec konkretnej kinazy. W związku z tym, zamiast konkretnej kinazy w piśmiennictwie podaje się receptor dla związku hamującego kinazę.

Pochodne 3-amino-1H-tieno[3,2-c]pirazoli mają zdolność hamowania kinazy Aurora, co warunkuje ich działanie przeciwnowotworowe.⁸⁰ Badania wykazały, iż związek **LXXXIV** (**Schemat 2.23**) ma właściwości antyproliferacyjne, a ponadto wykazuje korzystne właściwości farmakokinetyczne i dobrą efektywność.⁸⁰

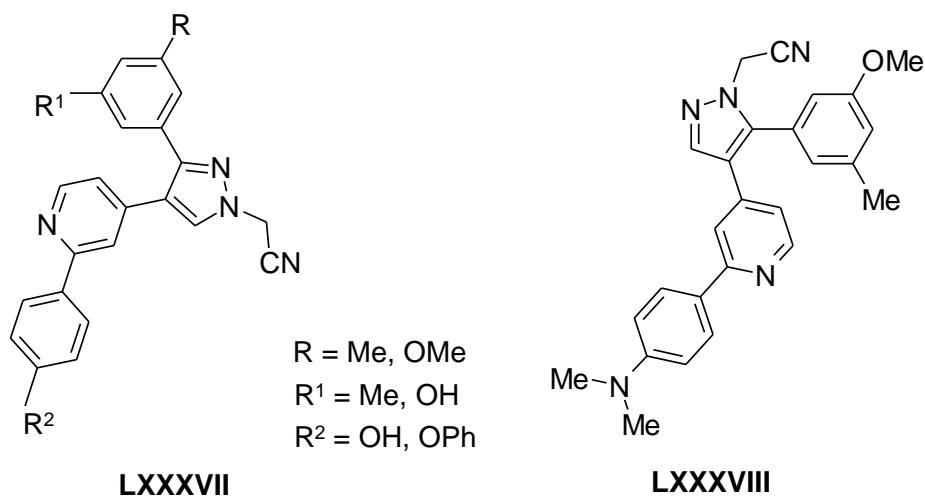
Do inhibitorów wspomnianych kinaz Aurora o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym należą pochodne 3-aminopirazoli (**Schemat 2.23**), zwłaszcza takie posiadające ugrupowanie 1,4,5,6-tetrahydropirolu lub pirazolo[3,4]-pirydyny (**LXXXV-LXXXVI**).⁸¹

Schemat 2.23



Przeprowadzone badania *in vitro* na grupie 60 linii komórek rakowych potwierdziły istotną aktywność przeciwnowotworową związków **LXXXVII-LXXXVIII** (**Schemat 2.24**).⁸¹

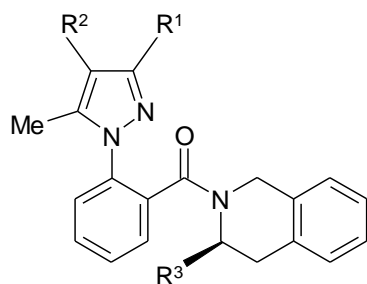
Schemat 2.24



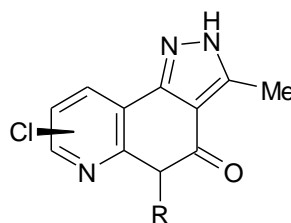
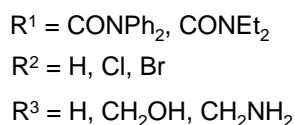
Pochodne fenylopirazolu **LXXXIX** (Schemat 2.25) działają jako selektywne inhibitory białek antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-x, których nadekspresja występuje w wielu typach nowotworów w celu ochrony przed chemo- i radioterapią. Związki te wiążąc te białka powodują ich inaktywację i zwiększają tym samym skuteczność terapii przeciwnowotworowej.⁸²

Pochodne pirazolochinoliny **XC** (Schemat 2.25) mogą wpływać na komórki nowotworowe poprzez zahamowanie kinazy 1 punktu kontrolnego (CHK1). Enzymy te zostają aktywowane w wyniku uszkodzenia materiału genetycznego i odpowiadają za opóźnienie wejścia komórki w stadium mitozy, a tym samym pozwalają na usunięcie błędów przez systemy naprawcze. Inhibitory kinazy CHK1 w uszkodzonych komórkach nowotworowych powodują wznowienie cyklu komórkowego i zezwalają na przedwczesne rozpoczęcie mitozy, co ostatecznie wiedzie do śmierci komórki.⁸³ Ponadto sugeruje się, iż związki te mogą wspomagać chemioterapię poprzez uwrażliwienie komórek nowotworowych z deficytem białka p53 na czynniki niszczące strukturę DNA.⁸⁴

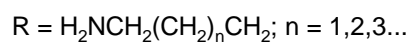
Schemat 2.25



LXXXIX



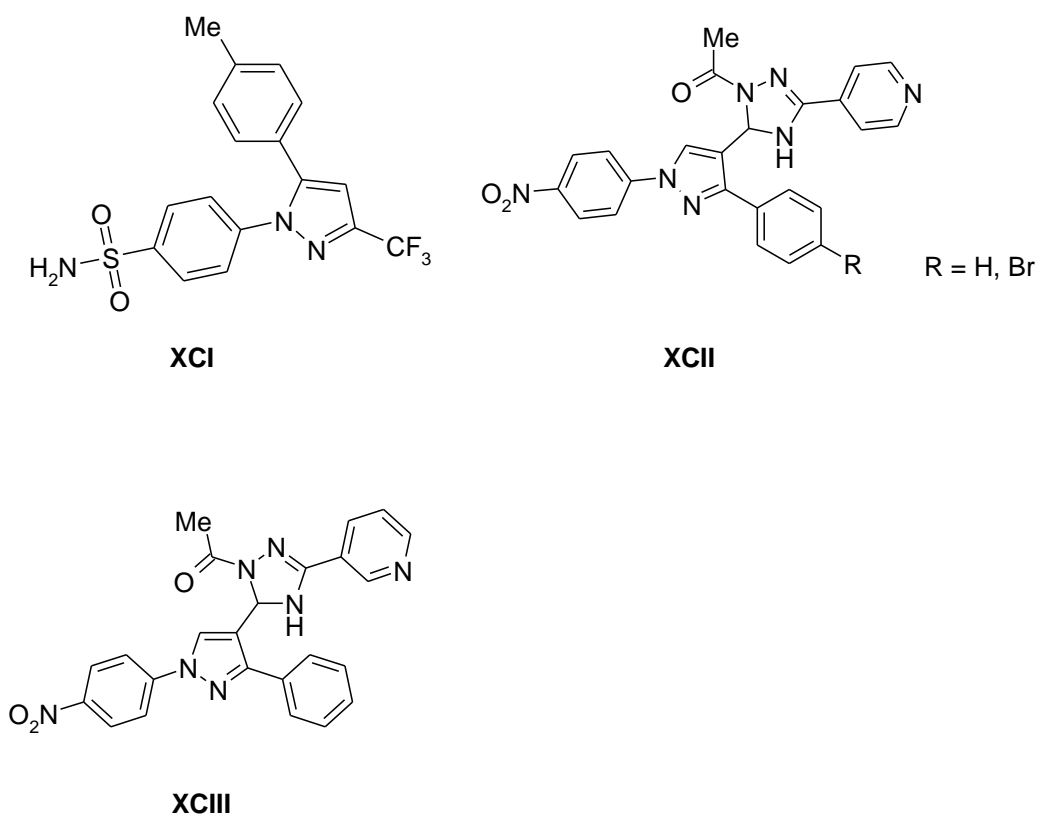
XC



Obecnie w większości terapii nowotworowych stosowane są środki całkowicie uśmiercające komórki nowotworowe, a nie tylko hamujące proliferację guza. Związki te są jednak toksyczne, a ponadto obserwuje się oporność nowotworów na leki, co przyczynia do

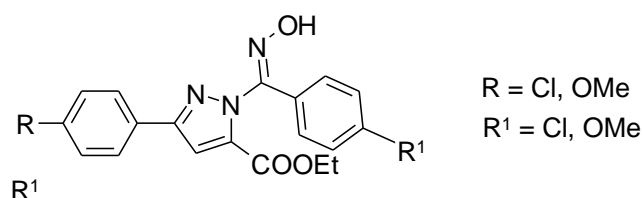
ograniczonego stosowania tych medykamentów.⁸⁵ Jedną z grup stosowanych leków są leki hamujące angiogenezę, czyli tworzenie się nowych naczyń krwionośnych w oparciu o już istniejące, co ma znaczenie dla wzrostu guza i zaistnienia przerzutów.⁸⁵ Pierwszym zastosowanym w nowotworach lekiem z grupy antyangiogeników był inhibitor TNP-470, będący analogiem antybiotyku fumagiliny. Jest on nadal stosowany w terapii wielu nowotworów. Antyangiogeniczne właściwości mają także niektóre leki przeciwnowotworowe jak alkaloidy *Vinca*, taksoidy i cisplatyna, a także szereg środków z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych jak aspiryna, indometacyna czy Celecoxib **XCI** (**Schemat 2.26**).⁸⁵ Mechanizm działania cytostatycznego Celecoxibu polega na zwiększeniu stężenia endostatyny w osoczu krwi, która z kolei jest inhibitorem angiogenezy. Ponieważ Celecoxib jest pochodną pirazolu, odkrycie jego właściwości cytostatycznych spowodowało zwiększenie zainteresowania tą klasą azoli wśród naukowców zajmujących się poszukiwaniem nowych leków przeciwnowotworowych. Otrzymano szereg trójpodstawionych pochodnych pirazolu (**Schemat 2.26**), z których związki **XCII-XCIII** wykazały obiecującą aktywność cytostatyczną wobec linii komórkowych MCF7, NCI-H460 i SF268.⁸⁵

Schemat 2.26



Podczas choroby nowotworowej zachodzą zjawiska podkreślanej już apoptozy, ale także autofagii, które są zaplanowanymi programami śmierci komórek. Ten drugi proces odgrywa znaczącą rolę we wzroście komórek nowotworowych. Pomimo, iż stosowanie związków kontrolujące proces autofagii budzi kontrowersje co do sensowności i celowości, zajęto się syntezą takich pochodnych pirazoli, które mogłyby być skuteczne jako stymulatory wspomnianych wyżej procesów. Otrzymano przy tym serię nowych systemów pirazoli (**Schemat 2.27**) typu **XCIV** zawierających ugrupowanie oksymu zdolnych do hamowania proliferacji komórek rakowych linii A549.⁸⁶

Schemat 2.27



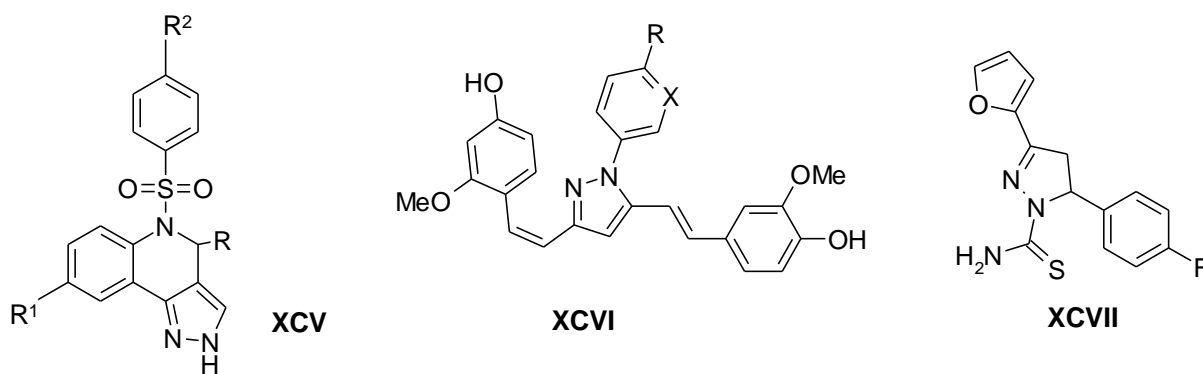
XCIV

2.5.2. Aktywność systemów pirazolowych w obrębie ośrodkowego układu nerwowego

Układ nerwowy stanowi interesujący punkt uchwytu środków leczniczych stosowanych we współczesnej farmakoterapii, szczególnie w leczeniu zaburzeń sfery psychicznej oraz kognitywnej, tak bardzo dotkliwych w funkcjonowaniu grupy społecznej będącej szczególnie w podeszłym wieku, borykającej się niejednokrotnie z jakościowym i ilościowym pogorszeniem się sprawności funkcji umysłowych.^{87,88} Stanowi to jedno z objawów tzw. zaburzeń otępiennych, których najczęstszą przyczyną jest choroba Alzheimera.⁸⁸ W przebiegu tejże choroby stwierdza się w chorobowo zmienionej tkance nerwowej wewnątrzkomórkowe wiązki neurofibryli, które zawierają bogate w reszty fosforanowe neurofibrylarne białka *tau*. Z kolei w przestrzeni pozakomórkowej odnotowuje się obecność płytek i włókien *amyloidu* powstającego z jego białka prekursorowego (*APP-Amyloid Protein Precursor*). Za powstanie amyloidu odpowiedzialne są enzymy β -sekreazy i γ -sekreazy, które obecnie stanowią punkt

wyjścia do badań nowych leków w terapii choroby Alzheimera.⁸⁸ Badania nad zastosowaniem pirazolopochodnych typu **XCV**⁵⁷ (**Schemat 2.28**) we współczesnej farmakoterapii pozwoliły na otrzymanie układów heterocyklicznych wykazujących aktywność antagonistyczną w stosunku do γ -sekreazy, a więc mogących mieć zastosowanie w leczeniu choroby Alzheimera. W badaniach nad pochodnymi pirazolochinoliny stwierdzono, że szczególnie korzystna dla działania farmakologicznego jest obecność podstawnika alkilowego w pozycji 4 oraz chlorowca bądź grupy trifluorometylowej w pozycji para pierścienia fenyłowego.⁵⁷ Związkiem, który wykazuje korzystne właściwości w leczeniu choroby Alzheimera jest kurkumina.⁵⁹ Jak wspomniano wyżej, niektóre pochodne pirazolu posiadają właściwości antyagregacyjne w stosunku do białka APP poprzez hamowanie γ -sekreazy. Dlatego zainteresowano się połączeniami pirazolu i kurkuminy, które mogą wykazywać silniejsze działanie i większą skuteczność w leczeniu choroby Alzheimera. Otrzymane związki przebadano w modelach *in vivo* i *in vitro* pod względem hamowania agregacji białka *tau*, zdolności do depolimeryzacji białka *tau* oraz powinowactwa do białka A β ₄₂. Największą zdolność do hamowania agregacji białka *tau* wykazały związki typu **XCVI** (**Schemat 2.28**).⁵⁸

Schemat 2.28



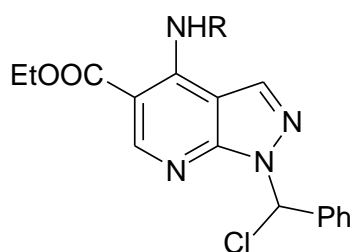
R = H, Me, cyklopropyl
R¹ = H, F
R² = Cl, CF₃

R = Me, Cl
X = C, N

W ostatnich latach stwierdzono, iż niektóre N1-tiokarbamoilo-3,5-diarylo-4,5-dihydro-(1H)-pirazole są inhibitorami monoaminooksydazy (MAO), zwłaszcza jej izoformy A, co

predysponować by je mogło do zastosowania w terapii zespołu Parkinsona, drugą co do częstości zachorowań choroby neurodegeneracyjnej. Na podstawie badania do zdolności hamowania MAO, ustalono, że obecność fluoru jest istotna dla działania związku. Z badanych połączeń najbardziej skutecznym inhibitorem MAO (**Schemat 2.28**) okazał się związek **XCVII**.⁵⁹ Stymulowanie zatem ośrodkowego układu nerwowego stanowi obecnie istotną techniką wykorzystywaną w leczeniu chorób degeneracyjnych. Właściwościami tymi cechują się również pochodne (**Schemat 2.29**) pirazolo[3,4-b]pirydyny (np. **XCVIII**) należące do selektywnych antagonistów receptorów adenozynowych A₁.⁸⁹

Schemat 2.29

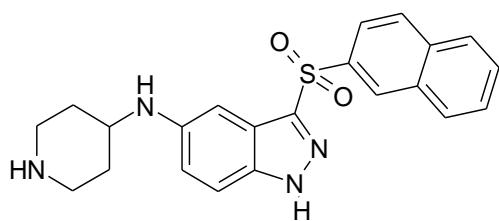


R = cyklopropyl, cyklopentyl

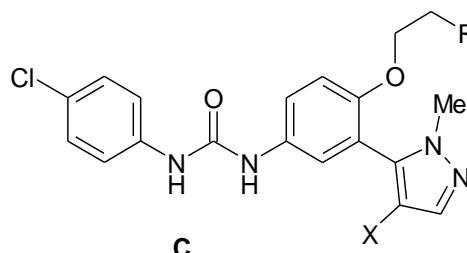
XCVIII

Istotną rolę z punktu widzenia właściwości kognitywnych oraz psychicznych organizmu ludzkiego odgrywają receptory serotoninerdyczne zlokalizowane w tkance mózgowej, a w szczególności jeden z jego 15 podtypów - 5-HT₆. Zastosowanie ich agonistów bądź antagonistów skutkuje niejednokrotnie poprawą cech psychosomatycznych pacjentów. Z tego też powodu heterocykliczne ligandy receptorów 5-HT₆ znajdują swoje zastosowanie w terapii schizofrenii, zaburzeń poznawczych czy choroby Alzheimera.⁹⁰ Jednym z takich ligandów jest pochodna **XCIX** (**Schemat 2.30**). Zamiana położenia ugrupowania aminowego z pozycji 5 indazolu na 6 bądź 7 powoduje znaczący spadek powinowactwa.

Schemat 2.30



XCIX



C

X = H, Cl lub Br

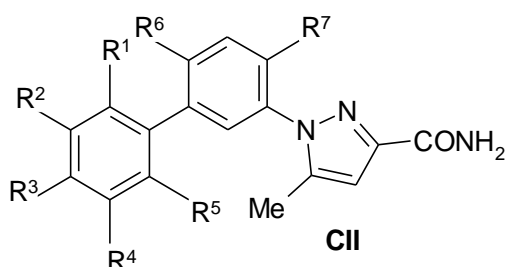
R =

Podobną aktywność względem receptorów 5-HT_{2A} oraz 5-HT_{2C} wykazują pochodne o ogólnym wzorze **C** (Schemat 2.30).⁹¹ Wykazano przy tym, iż zastąpienie atomu fluorowca w pozycji 4 pirazolu atomem wodoru skutkuje zwiększeniem powinowactwa analizowanego związku do receptorów 5-HT_{2A} oraz wzrostem aktywności sedatywnej. Ten ostatni efekt może się przełożyć na wykorzystanie tego typu związków w terapii bezsenności.

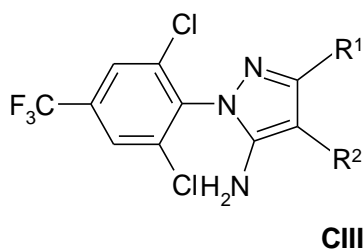
Inny mechanizm oddziaływania na układ nerwowy wykazują pochodne pirazolo[4,3-c]chinolin-3-(3H)-onu (**CI**), które stanowią ligandy dla receptorów benzodiazepinowych i poprzez przestrzenne zmiany wpływają na przepuszczalność błony neuronalnej dla jonów chlorkowych (Schemat 2.31).⁹²

Modulacją funkcjonowania kanałów sodowych (Na_v1.7 oraz Na_v1.8) zależnych od napięcia z kolei cechują się bifenyłowe amidowe pochodne pirazolu **CII** (Schemat 2.31), które, jako inhibitory tych kanałów (a w szczególności Na_v1.7), wykazują zdolność znoszenia zjawiska bólu neuropatycznego.^{88,93}

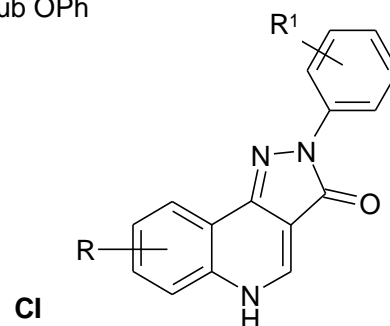
Schemat 2.31



R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ = H, CF₃, OCF₃, OCH₂CF₃, OCH₂CH₂CF₃ lub OPh



R¹, R² = CN, SCN, SCF₃, OCH₃ lub NO₂



R, R¹ = H, Cl, OCH₃ lub NO₂

Na podstawie badań *in silico* stwierdzono, że pochodne pirazolu o strukturze przedstawionej wzorem **CIII** (Schemat 2.31) mogą wykazywać powinowactwo do podjednostki β_3 receptorów GABA-ergicznyc⁹⁴.

Przedstawiona w niniejszym rozdziale charakterystyka szerokiego spektrum aktywności biologicznej kolejnych bibliotek systemów pirazolowych niewątpliwie uzasadnia celowość poszukiwania nowych tego typu połączeń i stanowiła myśl przewodnią doktoranta motywującą go do realizacji celów badawczych przedłożonej dysertacji.

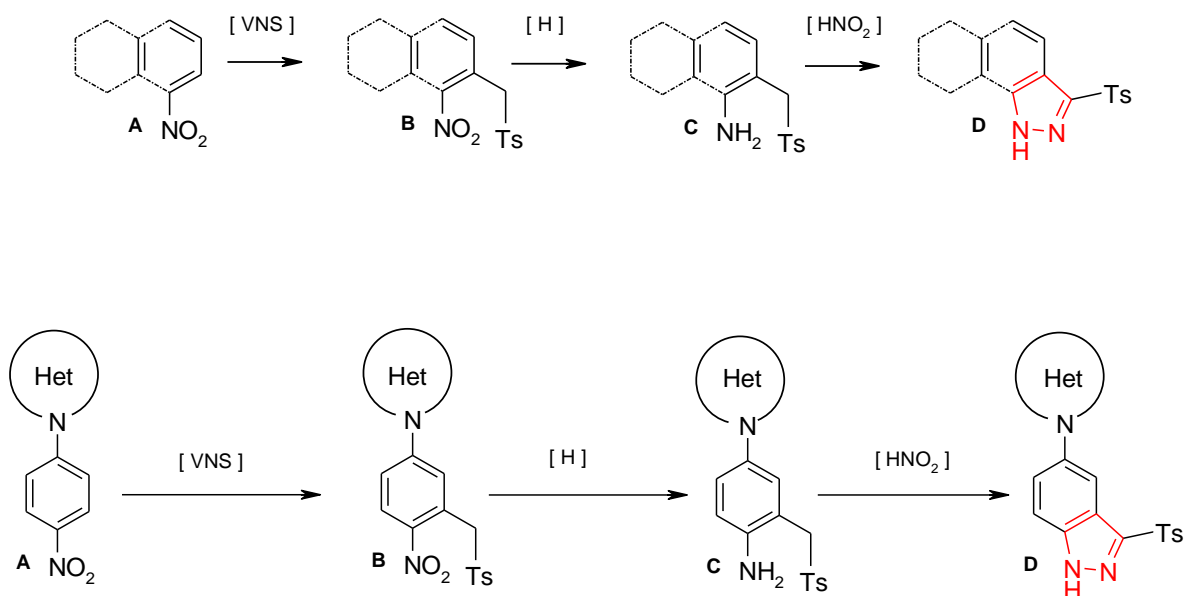
3. CEL PRACY

Aktywność biologiczna skondensowanych pochodnych pirazolu omówiona w niniejszej dysertacji, jak również prowadzone w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu badania dotyczące aromatycznej substytucji nukleofilowej (w tym VNS) w wybranych układach azaheterocyklicznych, w tym pochodnych ftalazyny⁹⁵ i pirydazynonu⁹⁶, a także doniesienia literaturowe wskazujące na zastosowanie VNS do otrzymywania skondensowanych związków heterocyklicznych^{27,97} skłoniły autora pracy do syntezy biblioteki wybranych pochodnych heterocyklicznych z dobudowanym pierścieniem pirazolu. Rosnący odsetek zachorowalności populacji światowej na schorzenia nowotworowe zainspirował autora do wykorzystania podstawienia nukleofilowego do otrzymania pirazolopochodnych o potencjalnej aktywności cytostatycznej. Przesłanką do ich syntezy była również wstępna ocena ich aktywności biologicznej dokonana za pomocą aplikacji *PASS Inet*^{98,99}, na podstawie której wytypowano substraty do poszczególnych etapów syntezy.

Pomimo licznych, omówionych uprzednio, metod syntezy pochodnych pirazolu, otrzymywanie indazolu i skondensowanych układów heterocyklicznych zawierających ten pierścień jako jeden z elementów wiąże się z pewnymi komplikacjami.² W popularnej metodzie dobudowania układu pirazolu polegającej na dwuazowaniu *o*-toluidyny do uzyskania satysfakcjonujących wydajności wymagana jest obecność podstawnika dezaktywującego w pierścieniu, do którego dołączony jest pirazol (zwykle grupa nitrowa w przypadku benzenu), którego brak implikuje konieczność długotrwałego ogrzewania mieszaniny reakcyjnej. Mając powyższe na względzie, uznano, że otrzymanie produktów reakcji VNS może okazać się interesujące z punktu widzenia reakcji zamykania pierścienia pirazolu. Założono przy tym ciąg reakcji (**Schemat 3.1**) zmierzających do pozyskania skondensowanych i dimerycznych systemów heterocyklicznych z dobudowanym układem pirazolu. Zgodnie z przyjętymi założeniami rolę podstawnika dezaktywującego winna przejąć grupa arylosulfonowa związana z mostkiem metylenowym. Determinowana w ten sposób zwiększona kwasowość protonów metylenowych skutkować powinna zarazem wzrostem podatności grupy CH₂ na etap annulacji. Istotnym w przebiegu prac badawczych będzie również etap selektywnej redukcji grupy nitrowej uzyskanych produktów VNS i utworzenie

odpowiedniej aminy, poddanej z kolei następczemu dwuazowaniu połączoneму z procesem cyklizacji i formowania pierścienia indazolu.

Schemat 3.1



Ponadto zaplanowane wykorzystanie nowoczesnych technik chemoinformatyki doskonale wpisujący się w nurt racjonalnego projektowania leków pozwoli na wyznaczenie stabilnych energetycznie konformerów zsyntetyzowanych finalnych produktów oraz symulacji ich wiązania się z niskcząsteczkowymi ligandami (w tym z ważnymi z punktu widzenia biologii komórki jonami, jak np. Mg^{2+}). Dane z piśmiennictwa wskazują, że w tego typu związkach pierścienie systemu heterocyklicznego oraz położonego peryferyjnie ugrupowania nie są do siebie w pełni koplanarne i pozostaje w zgodzie z wynikami badań naukowych prowadzonych w stosunku do układów heterocyklicznych o udokumentowanych właściwościach przeciwnowotworowych.³³

Cennym uzupełnieniem otrzymanych w toku realizacji prac badawczych wyników będzie również próba wyznaczenia dla nich współczynnika podziału ($\log P$) metodami eksperymentalnymi (w tym techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej) oraz ich korelacja z danymi uzyskanymi przy użyciu dostępnego w Katedrze oprogramowania.^{12,18}

Istotną fazą pracy będzie również skierowanie wybranych indazolopochodnych do wstępnych badań mających na celu określenie ich profilu cytotoksyczności w modelu *in vitro* z zastosowaniem ludzkich komórek nowotworowych.

4. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

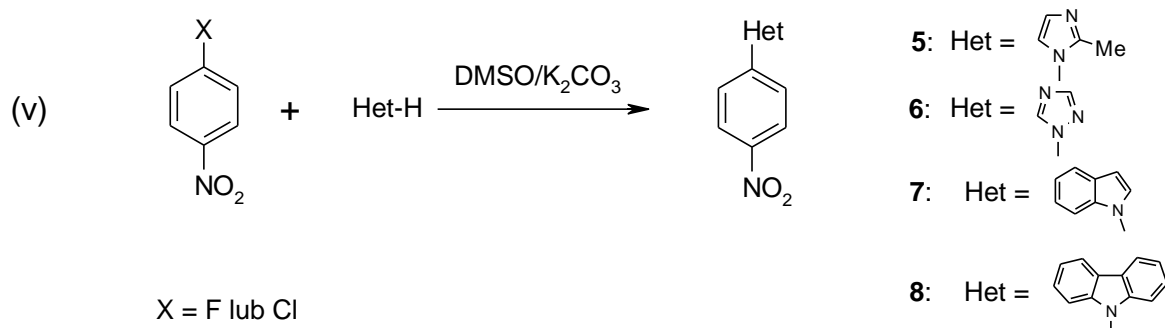
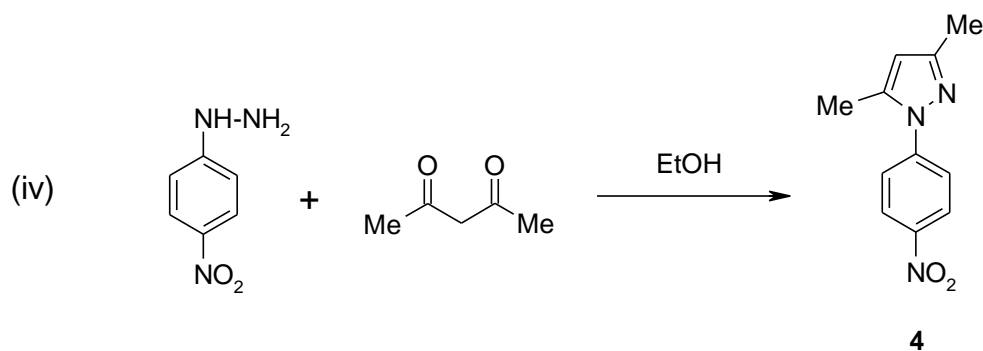
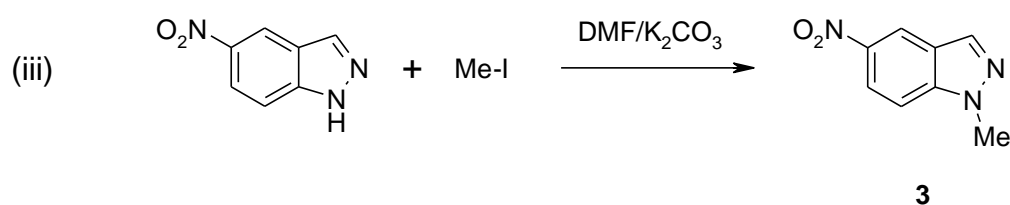
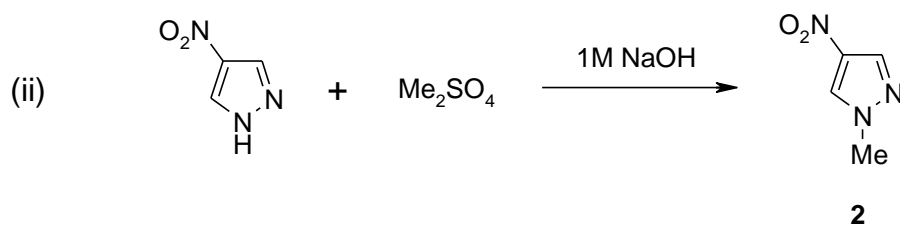
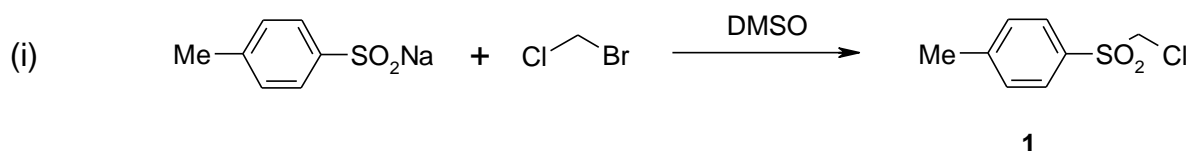
4.1. Synteza i właściwości spektralne otrzymywanych pochodnych

W celu realizacji przyjętych założeń do następczych przemian VNS zgodnie z metodą literaturową¹⁰⁰ zsyntetyzowano (**Schemat 4.1**) prekursor karboanionu **1** (sulfon chlorometylowo-*p*-toluilowy), który otrzymano z soli sodowej kwasu *p*-toluenosulfonowego i bromochlorometanu. Również wyjściowe nitroareny **2-8** uzyskano na podstawie dostępnego piśmiennictwa.¹⁰¹⁻¹⁰⁸ Do syntezy azoli **5-8** wykorzystano warunki klasycznego aromatycznego podstawienia nukleofilowego w obecności słabej zasady. Reakcje te, pomimo iż wymagały stosunkowo długotrwałego ogrzewania (19–34 godz.), pozwoliły na wyizolowanie N-podstawionych produktów z mieszaniny reakcyjnej z satysfakcjonującą wydajnością (57–70%). Wydaje się, że ta metodologia może konkurować z literaturową procedurą opartą na cyklizacji do skondensowanych układów heterocyklicznych, a wykorzystującą drogę pochodne palladu, w której wybrane N-arylowe pochodne azoli uzyskiwano z wydajnościami na poziomie 15–96%.¹⁰⁸

Z uwagi na to, iż przyspieszenie szybkości reakcji można też uzyskać poprzez zastosowanie promieniowania mikrofalowego jako czynnika grzewczego, pochodną **8** postanowiono otrzymać (**Schemat 4.1**) także na drodze tzw. *syntezy wspomaganej mikrofalowo* (MAOS). W dobie troski o naturalne środowisko tego typu metody syntezy cieszą się stale rosnącą popularnością, gdyż zmniejszają zużycie rozpuszczalników oraz reagentów.¹⁰⁹⁻¹¹⁰ W omawianym przypadku reakcję prowadzono w warunkach tzw. *katalizy międzyfazowej* (PTC - *phase-transfer catalysis*).¹¹¹ Stwierdzono jednak, że dziewięćgodzinne ogrzewanie mieszaniny reakcyjnej promieniowaniem mikrofalowym prowadziło do niejednorodnego produktu. Analiza TLC mieszaniny wykazała obecność czterech plam o współczynnikach R_f (octan etylu) wynoszących odpowiednio: 0,83 (prawdopodobnie karbazol), 0,49 (prawdopodobnie **8**), 0,51 (prawdopodobnie **9**) i 0,47. Biorąc pod uwagę zadawalającą wydajność klasycznej syntezy pochodnej karbazolu **8**, dalszy rozdział tej mieszaniny uznano za bezcelowy.

Klasyczna addycja nukleofilowa (**Schemat 4.1**) *p*-nitrofenylohydrazyny do zastosowanego w reakcji acetyloacetonu umożliwiła otrzymanie dimetylowej pochodnej pirazolu **4** z wydajnością 74%.

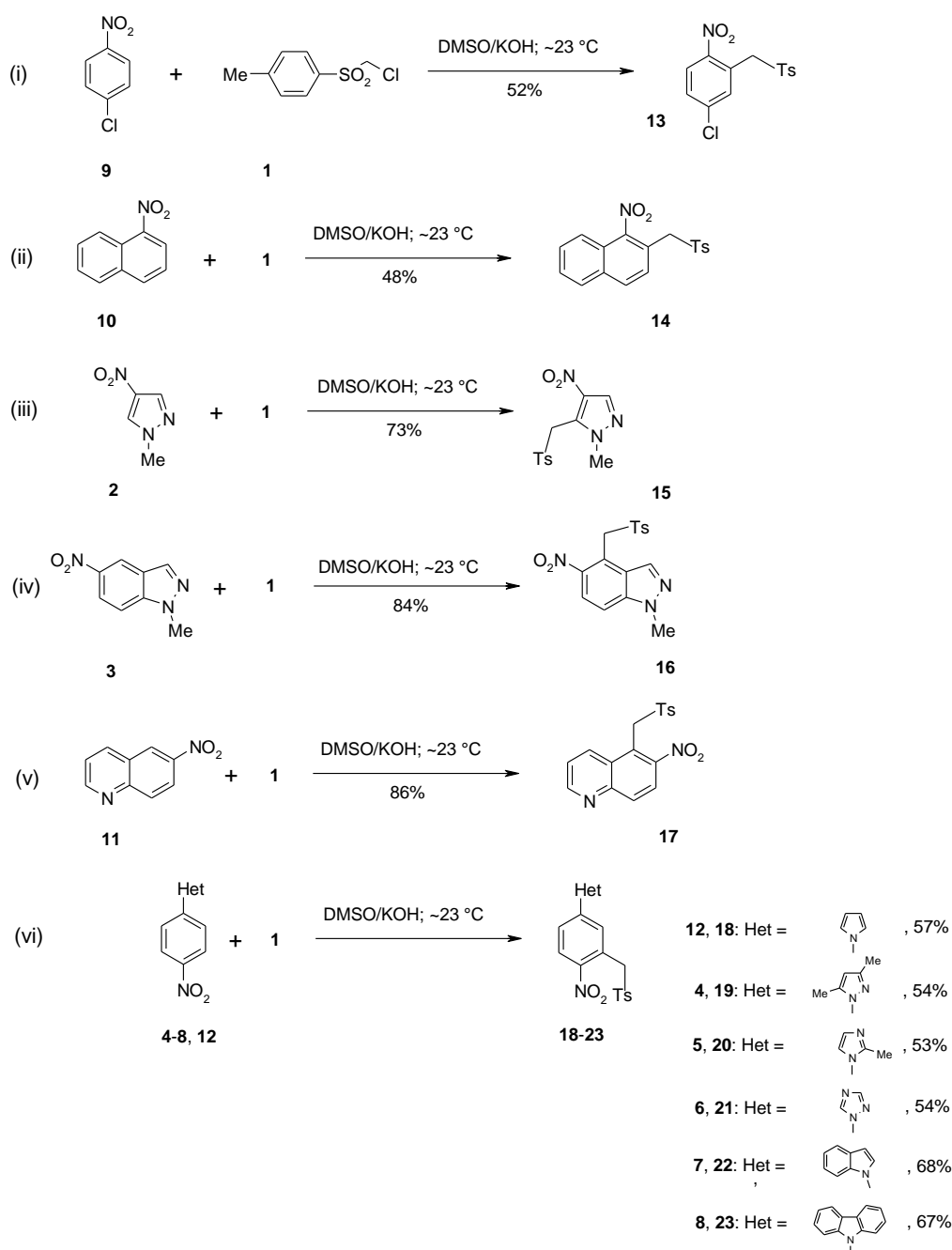
Schemat 4.1



Strukturę związków **1-8** potwierdzono na podstawie pomiaru temperatury topnienia oraz w oparciu o widma protonowego rezonansu magnetycznego, jak również o dane z piśmiennictwa.¹⁰⁰⁻¹⁰⁸

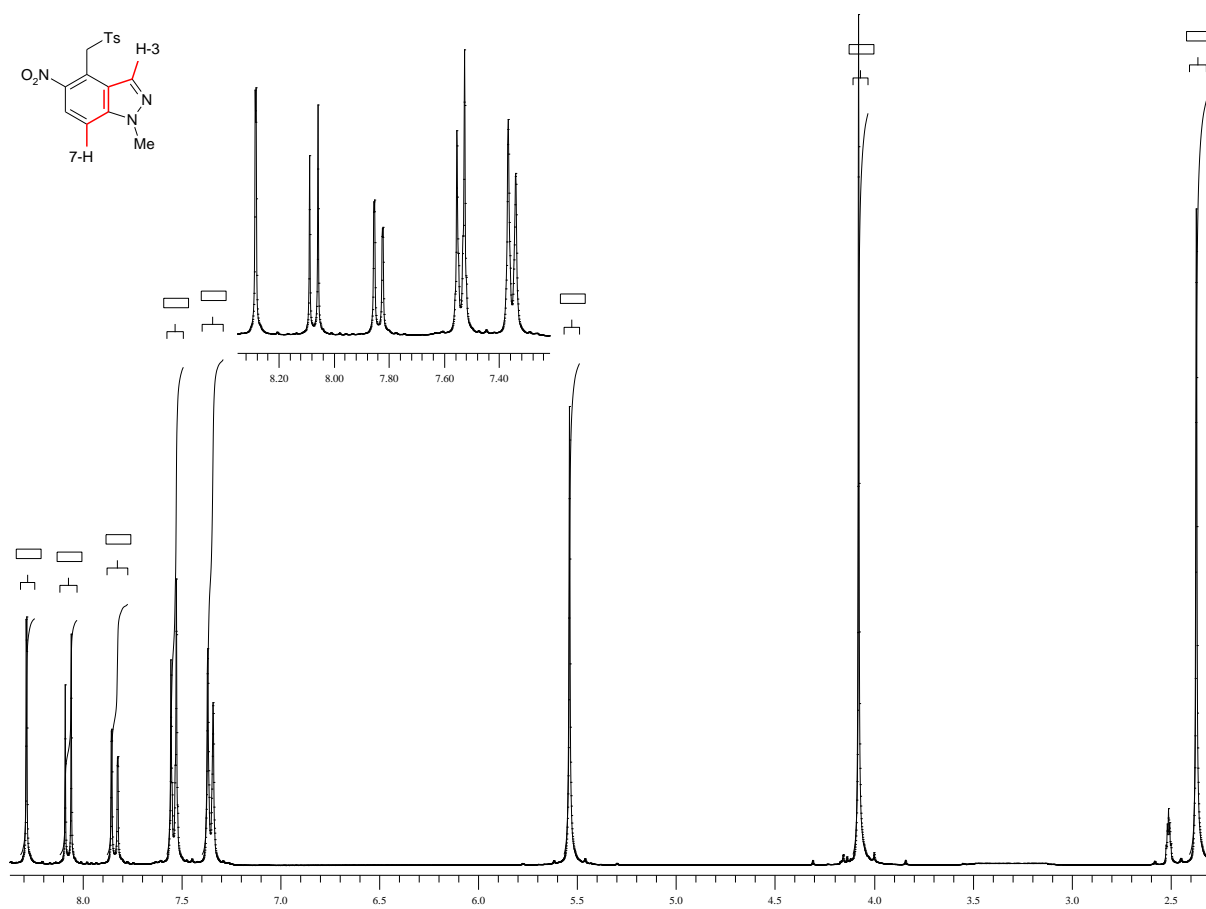
W kolejnym etapie przeprowadzono reakcję zastępczego podstawienia nukleofilowego atomu wodoru (VNS) nitroarenów **2-12** i sulfonu **1** (Schemat 4.2). W wyniku tych reakcji otrzymano produkty podstawienia w pozycji *orto* do grupy nitrowej **13-23**, których tożsamość potwierdzono na podstawie widm NMR, MS oraz w oparciu o analizę elementarną.

Schemat 4.2



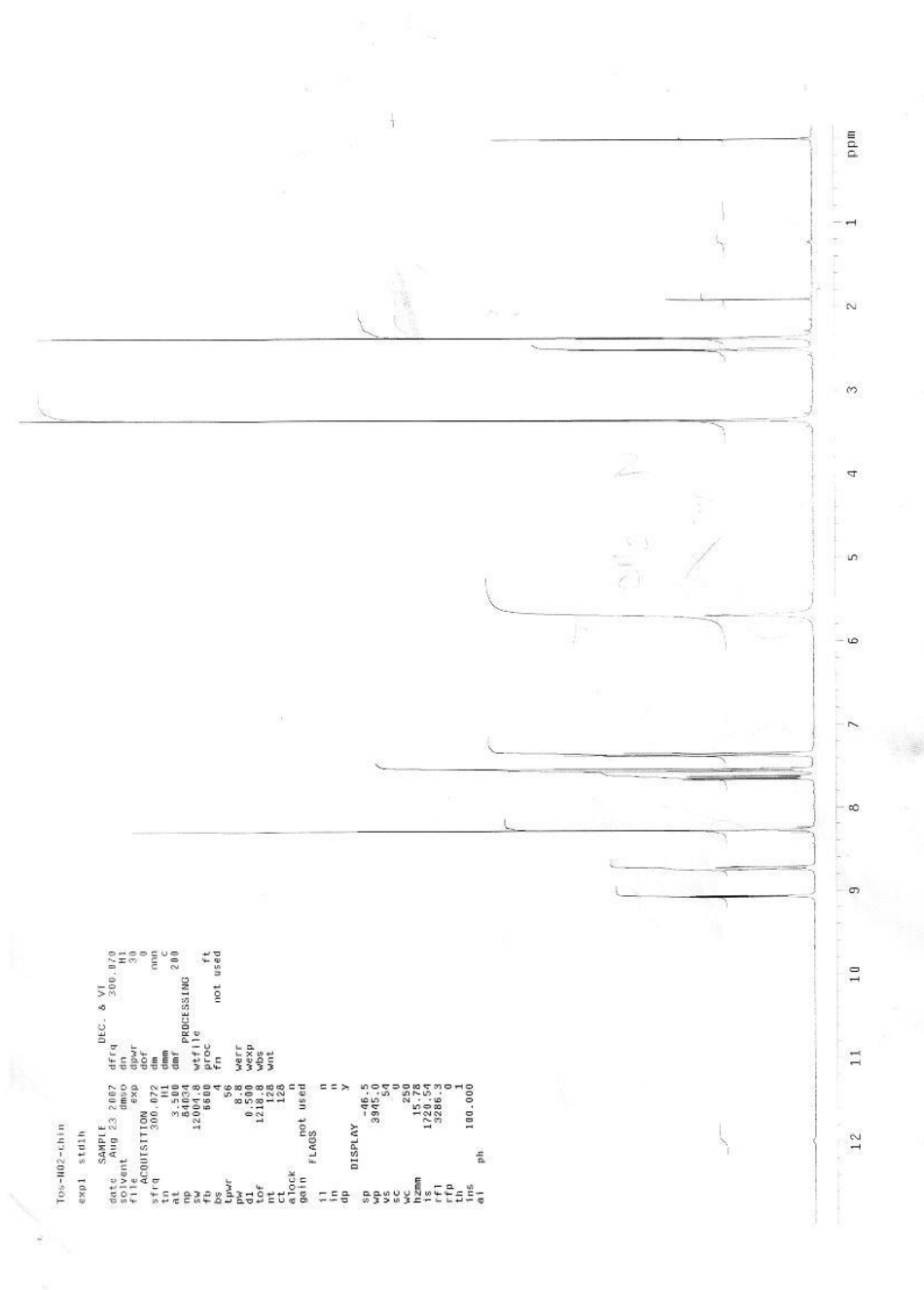
Produkty VNS **13–17** oraz **17** otrzymano, stosując metodykę literaturową^{97,100,112-115}, a ich struktury potwierdzono w oparciu o porównanie temperatur topnienia i widma ¹H NMR.

Widmo ¹H NMR związku **16** (**Rys. 4.1**) wykazuje charakterystyczny obraz *ortho*-dwupodstawionego indazolu z ugrupowaniami w pozycjach 4 i 5, a mianowicie dwa sygnały przy 7,84 i 8,07 ppm. Pierwszy z nich jest podwójnym dubletem o stałych sprzężeniach $J=9$ i 0,9 Hz, drugi - dubletu o stałej sprzężenia $J=9$ Hz. Pojawienie się dodatkowego sprzężenia o niewielkiej wartości w sygnale przy 7,84 ppm spowodowane jest oddziaływaniem typu zig-zag z protonem 3-H (zaznaczonym na czerwono na **Rys. 4.1**). Ten ostatni sygnał jest również dubletem o sprzężeniu 0,9 Hz. Na podstawie widma można również przypisać podwójny dublet do protonu 7-H, a dublet do protonu 6-H. Dwa multiplety w zakresie 7,40–7,60 ppm oraz singlet przy 2,37 ppm pochodzą od protonów grupy tosylowej, natomiast singlet przy 5,54 ppm odpowiada protonowi grupy metylenowej, a singlet przy 4,08 ppm ugrupowaniu N–metylowemu.

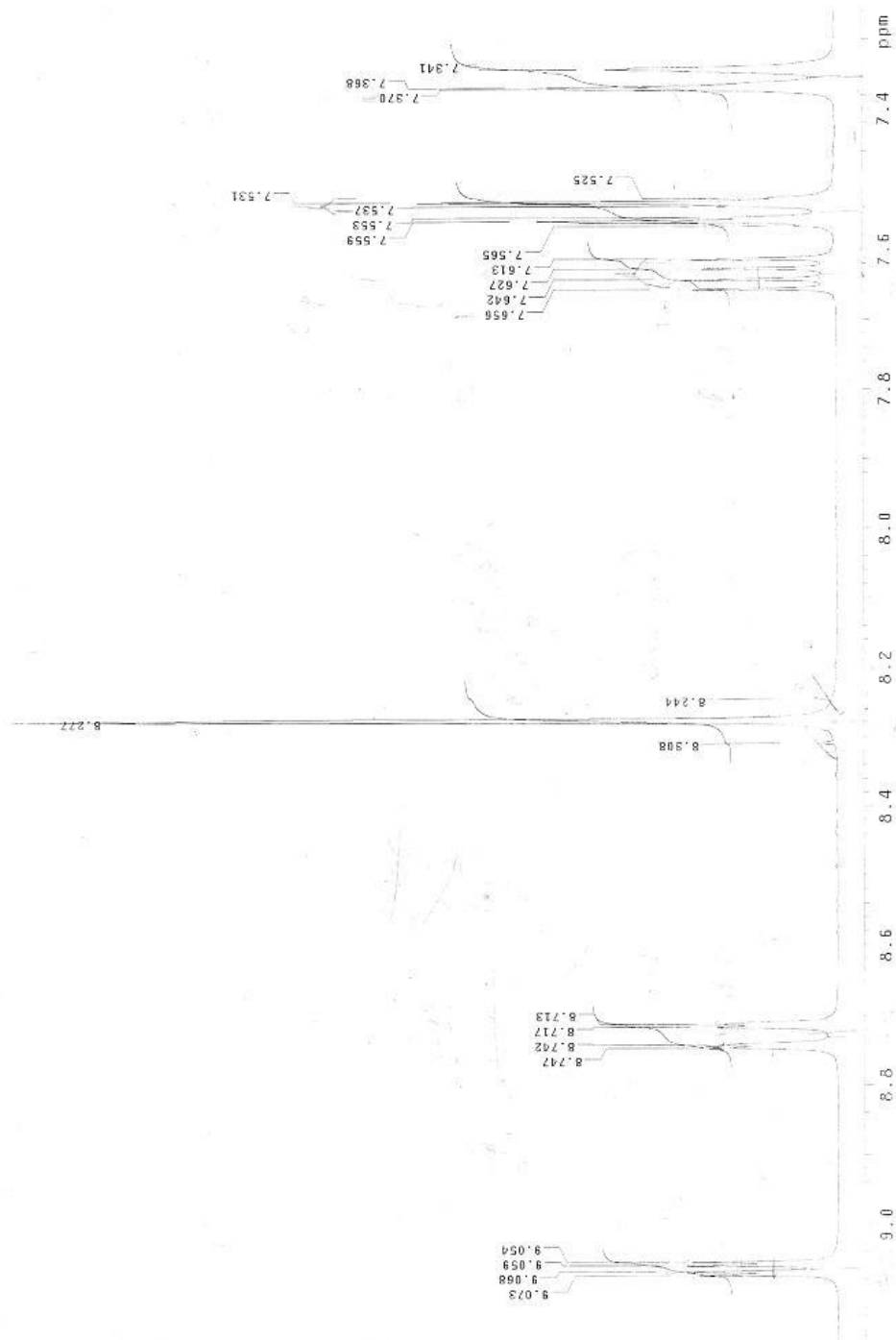


Rys. 4.1. Widmo ¹H NMR związku **16**.

Charakterystyka spektralna pochodnej chinoliny **17** (Rys. 4.2 a i b) wykazuje podobieństwo z danymi literaturowymi dotyczącymi jej analogu zawierającego, zamiast grupy tosyłowej, ugrupowanie $-\text{SO}_2\text{Ph}$.^{100,113} Singlet (przy 2,39 ppm) oraz dwa multiplety (w zakresie 7,34–7,37 oraz 7,53–7,60 ppm) charakterystyczne są odpowiednio dla grupy metylowej oraz pierścienia fenyłowego tosyłu. Z kolei cztery podwójne dublety przy wartościach przesunięcia chemicznego wynoszące odpowiednio: 7,64; 8,28; 8,71 oraz 9,06 ppm odpowiadają kolejnym protonom pierścienia chinoliny, tj. 3-H, 8-H i 7-H, 2-H oraz 4-H.



Rys. 4.2 a. Widmo ^1H NMR związku **17**.

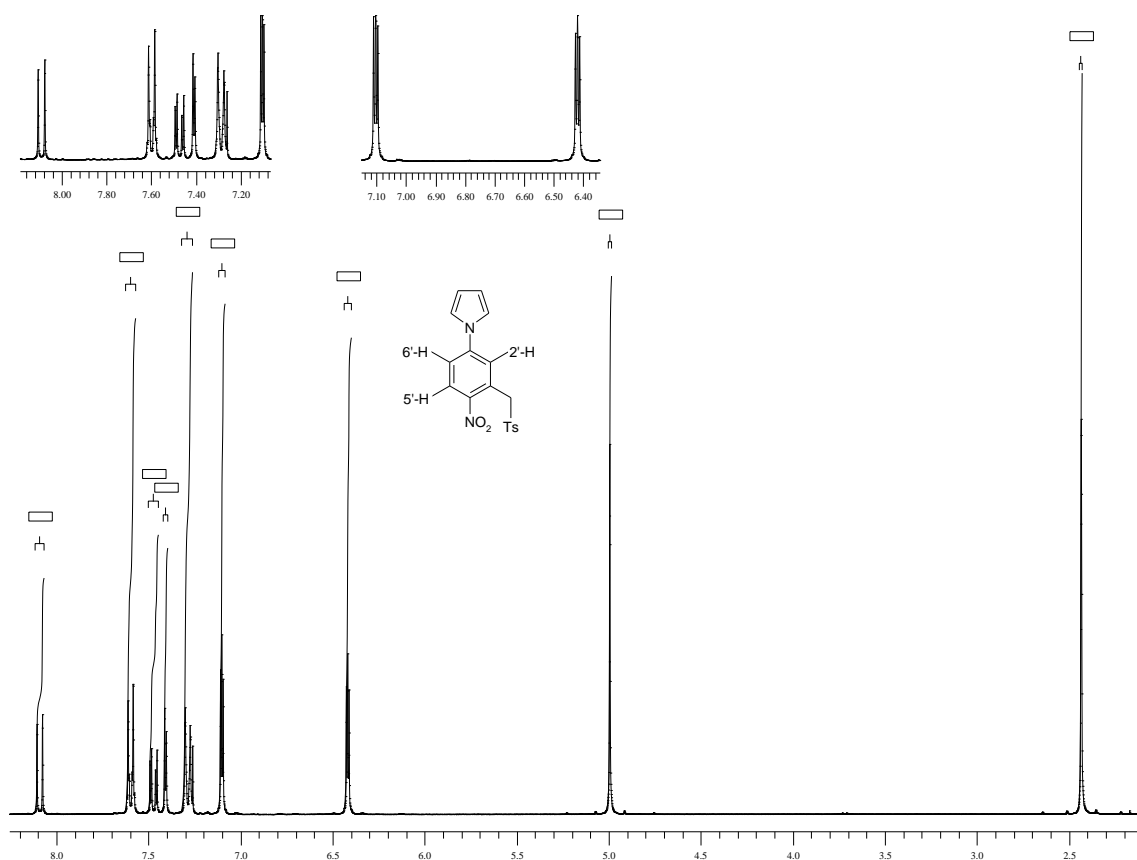


Rys. 4.2 b. Widmo ^1H NMR związku 17.

Osobną grupę substratów do późniejszych reakcji VNS stanowiły związki heteroaromatyczne z ugrupowaniem N-(4-nitrofenylovym) **4-8, 12**. W przypadku tych związków podstawienie możliwe było jedynie w pierścieniu 4-nitrofenylovym w pozycji *orto* do grupy nitrowej.

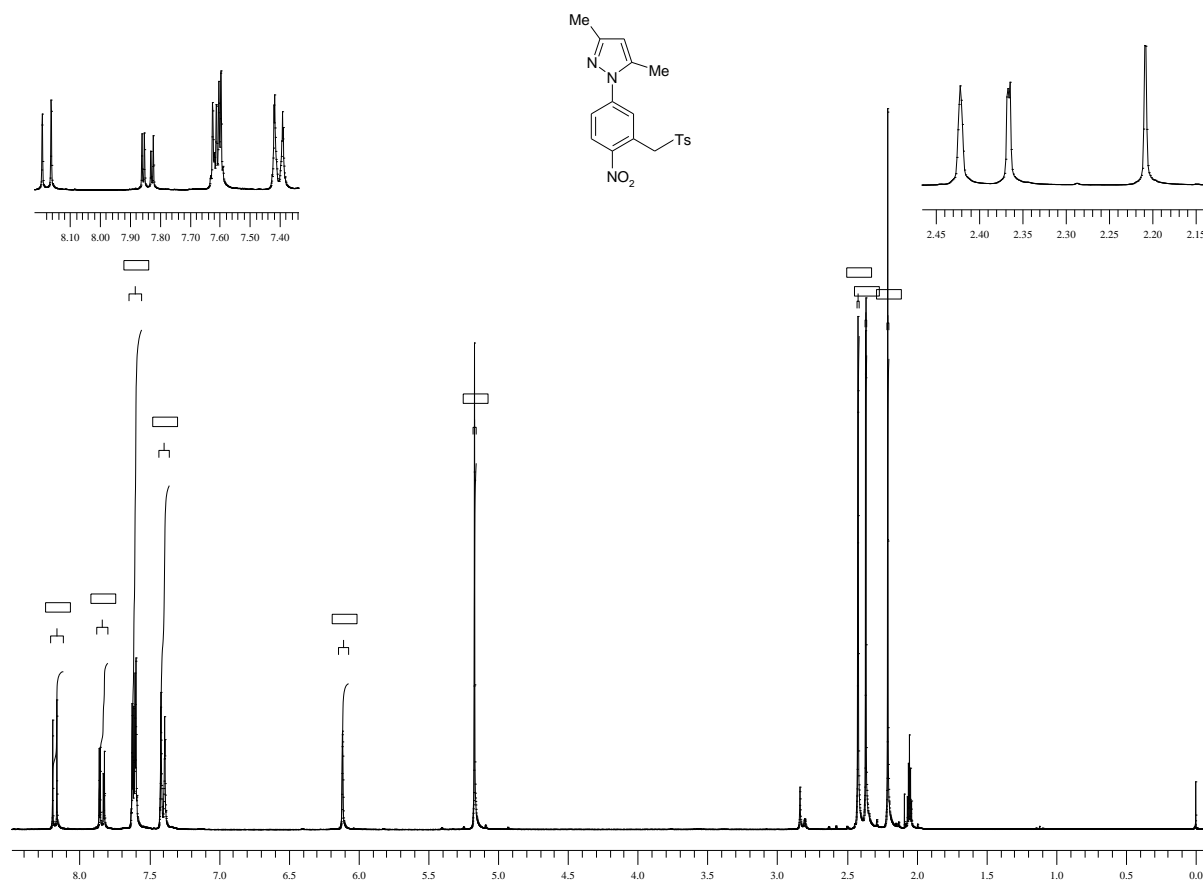
Budowę produktów VNS **18-23** potwierdzono w oparciu o widma ^1H i ^{13}C NMR, MS oraz wyniki analizy elementarnej. Wszystkie widma ^1H NMR wymienionych produktów charakteryzują się obecnością singletu dla protonów metylenowych w zakresie 5–5,5 ppm. Ponadto w widmie każdego ze związków 18-23 pojawia się charakterystyczny dla układu spinowego AMX trójpodstawionego pierścienia benzenowego zestaw trzech sygnałów, a mianowicie dublet z $J=2$ Hz odpowiadający protonowi 2'-H (7,41–7,95 ppm), podwójny dublet z $J=9$ i 2 Hz odpowiadający protonowi 6'-H (7,48–8,17 ppm) oraz dublet z $J=9$ Hz charakteryzujący proton 5'-H (8,10–8,34 ppm).

W widmie ^1H NMR związku **18** (Rys. 4.3) obecne są także dwa charakterystyczne multiplety dla protonów 3-H i 4-H (ok. 6,4 ppm) 2-H i 5-H (ok. 7,1 ppm) pirolu.



Rys. 4.3. Widmo ^1H NMR związku **18**.

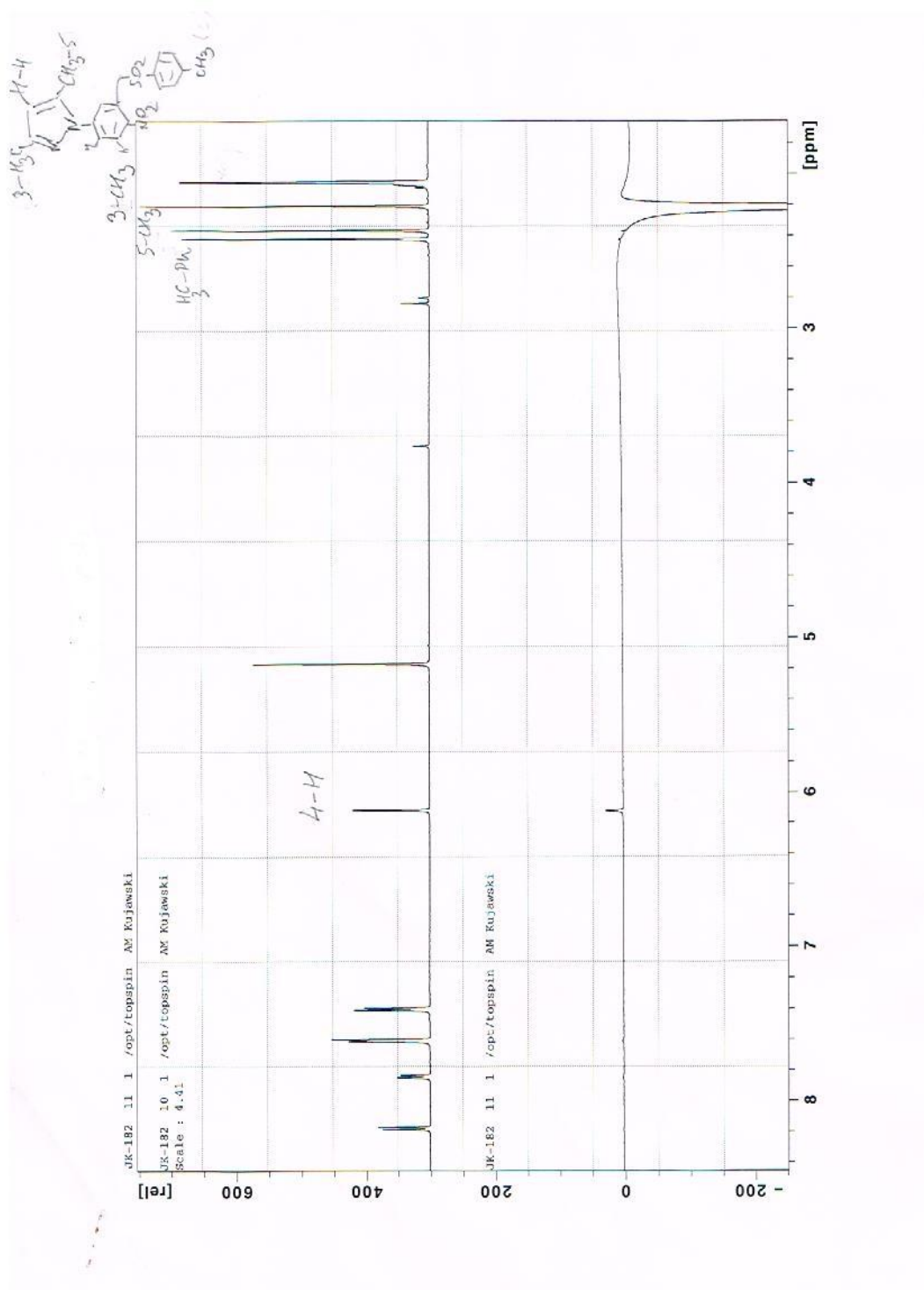
W widmie ^1H NMR pochodnej pirazolu **19** (Rys. 4.4) odnaleźć można singlet protonu 4-H (6,11 ppm), a także trzy singlety grup metylowych w zakresie 2,20–2,42 ppm. Sygnały tych grup przypisano na podstawie różnicowych widm NOE (Rys. 4.5 a-c).



Rys. 4.4. Widmo ^1H NMR związku **19**.

I tak naświetlanie próbki częstotliwością singletu przy 2,20 ppm prowadzi jedynie do wzmocnienia singletu protonu 4-H przy 6,11 ppm. Z kolei naświetlanie próbki częstotliwością singletu przy 2,36 ppm skutkuje wzmocnieniem trzech sygnałów, a mianowicie singletu 4-H, podwójnego dubletu przy 7,84 ppm oraz multipletu przy około 7,60 ppm. Ten ostatni multiplet składa się z dubletu dla protonu 2'-H oraz multipletu AA'XX' protonów 2''-H i 6''-H grupy tosyłowej. Rezultatem naświetlenia próbki częstotliwością singletu przy 2,42 ppm jest wzmocnienie multipletu przy około 7,40 ppm. Powyższe wyniki pozwoliły na jednoznaczne przypisanie singletów w zakresie 2,20–2,40 ppm, a mianowicie: singlet przy 2,20 ppm do grupy metylowej związanej z pozycją 3 pirazolu, przy 2,36 ppm do 5-CH₃ i przy

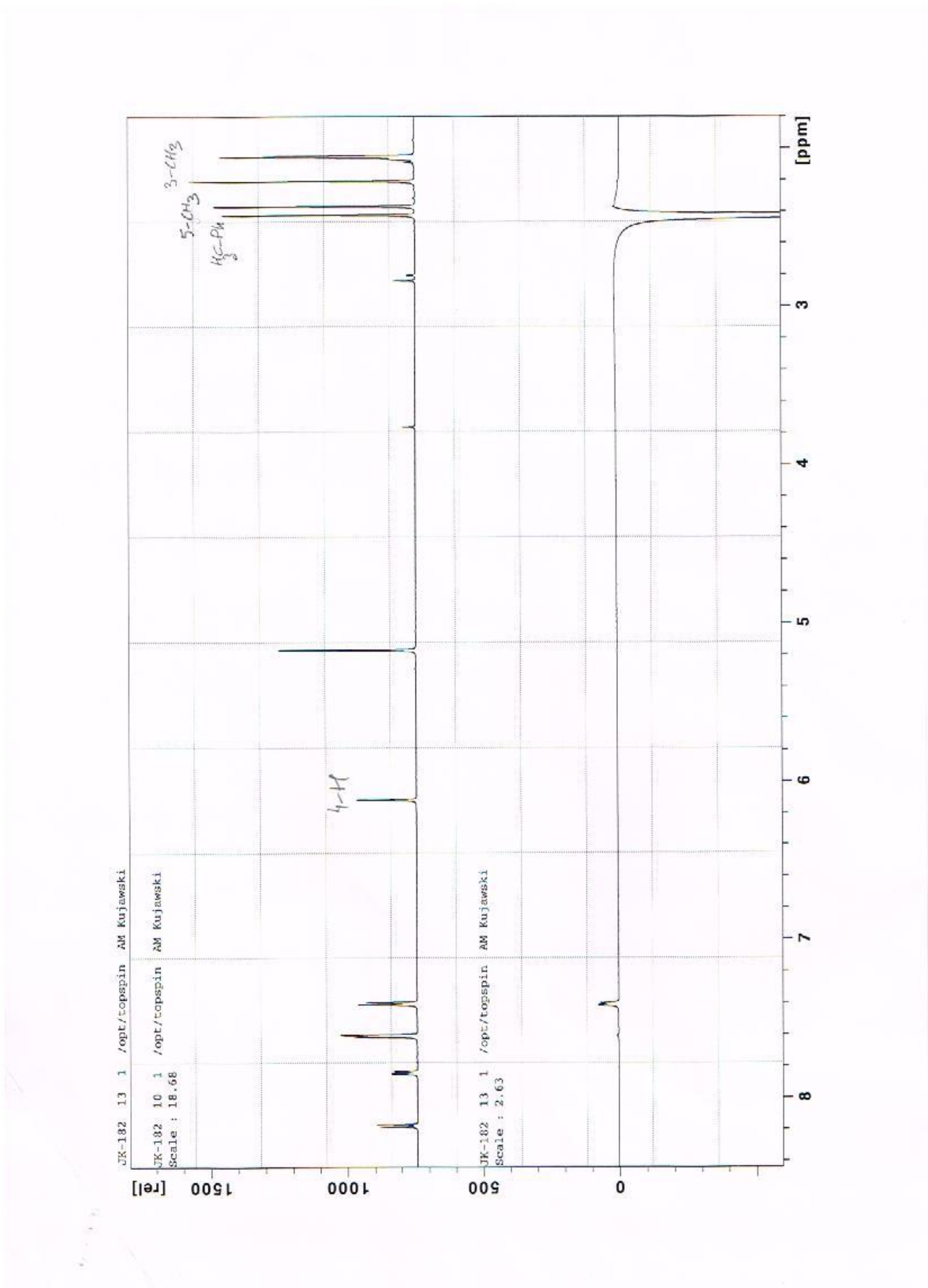
2,42 ppm do 4''-CH₃. Oddziaływania pomiędzy poszczególnymi protonami bądź grupami protonów przedstawiono na **Rysunku 4.6**.



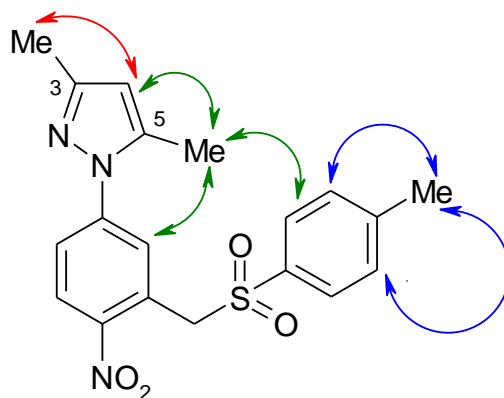
Rys. 4.5 a. Różnicowe widmo NOE związku 19 po naświetleniu częstotliwością sygnału grupy 3-CH₃.



Rys. 4.5 b. Różnicowe widmo NOE związku 19 po naświetleniu częstotliwością sygnału grupy 5-CH₃.



Rys. 4.5 c. Różnicowe widmo NOE związku 19 po naświetleniu częstotliwością sygnału grupy H₃C-Ph.



19

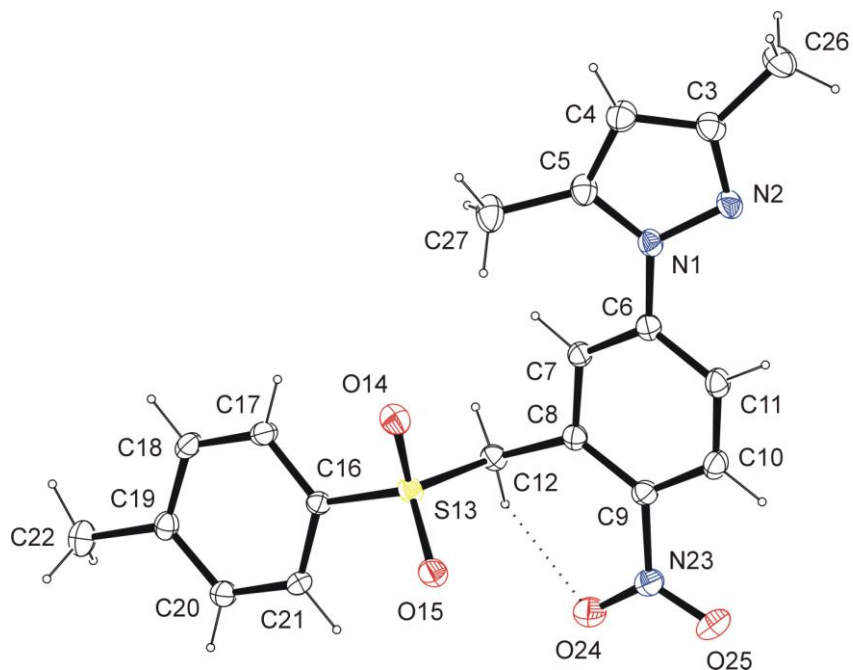
Rys. 4.6. Na kolorowo zaznaczono oddziaływania pomiędzy poszczególnymi protonami bądź grupami protonów w związku **19**.

Dla związku **19** wykonano dodatkowo badania rentgenograficzne. Studia te wykazały interesujące cechy strukturalne tego związku (**Rys. 4.6-4.7**):

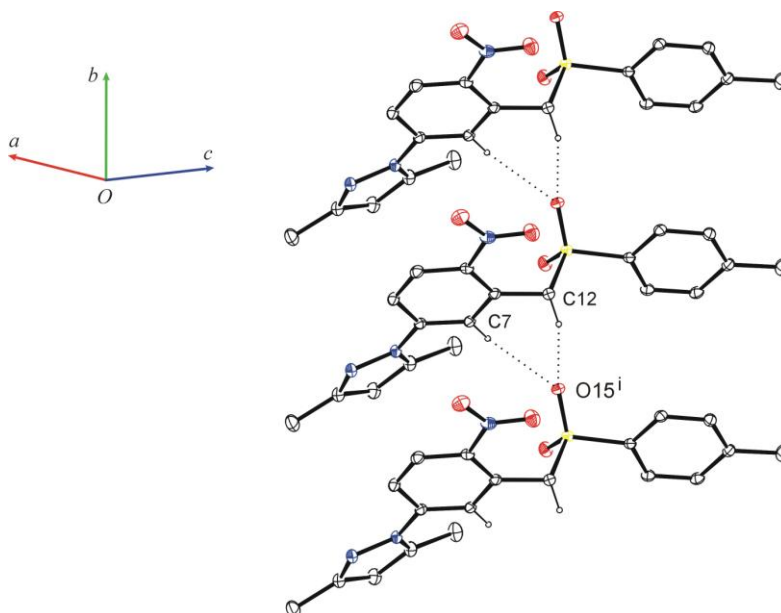
- Pierścień N-fenyłowy (C6-C11 na **Rys. 4.6**) i pierścień fenyłowy grupy tosyłowej (C16-C21) ustawiają się względem siebie niemal równolegle, a kąt dwuścienny pomiędzy ich uśrednionymi płaszczyznami wynosi zaledwie $5,54(15)^\circ$. Natomiast płaszczyzny tych pierścieni są znacznie odchylone od płaszczyzny pierścienia pirazolu – kąty dwuścienne wynoszą odpowiednio $27,98(12)$ i $30,59(12)^\circ$.
- Mimo, że grupa 9-nitrowa leży w płaszczyźnie pierścienia N-fenyłowego, odległość międzyatomowa C9–N23 wynosi $1,473(3)$ Å, co odpowiada normalnej długości pojedynczego wiązania C_{ar} –NO₂, $1,468(1)$ Å,¹¹⁶ Wskazuje to na brak sprzężenia tej grupy z układem fenyłowym.
- Grupa nitrowa związana jest wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem wodorowym z grupą metylenową C12–H12A···O24–N23 (**Tabela 4.1**). Być może obecność tego wiązania, stabilizującego cząsteczkę, wpływa na obniżenie zdolności sprzężenia grupy nitrowej z pierścieniem N-fenyłowym.
- W sieci krystalograficznej cząsteczki **19** (**Rys. 4.7**) łączą się trójcentrowymi wiązaniami wodorowymi C7–H7···O15ⁱ···H12B–C12 w łańcuchy narastające wzdłuż osi y.

Obecność słabych wiązań wodorowych, zarówno wewnątrz- jak i międzycząsteczkowych, w kryształach związku **19**, w których zaangażowane są atomy wodoru grupy metylenowej, jest

ciekawym i rzadko obserwowanym zjawiskiem. Możliwość utworzenia się tego typu wiązań jest najprawdopodobniej związana z podwyższoną kwasowością protonów CH₂ i będzie przedmiotem dalszych badań w najbliższej przyszłości.



Rys. 4.7. Obraz przestrzenny ORTEP cząsteczki związku 19.



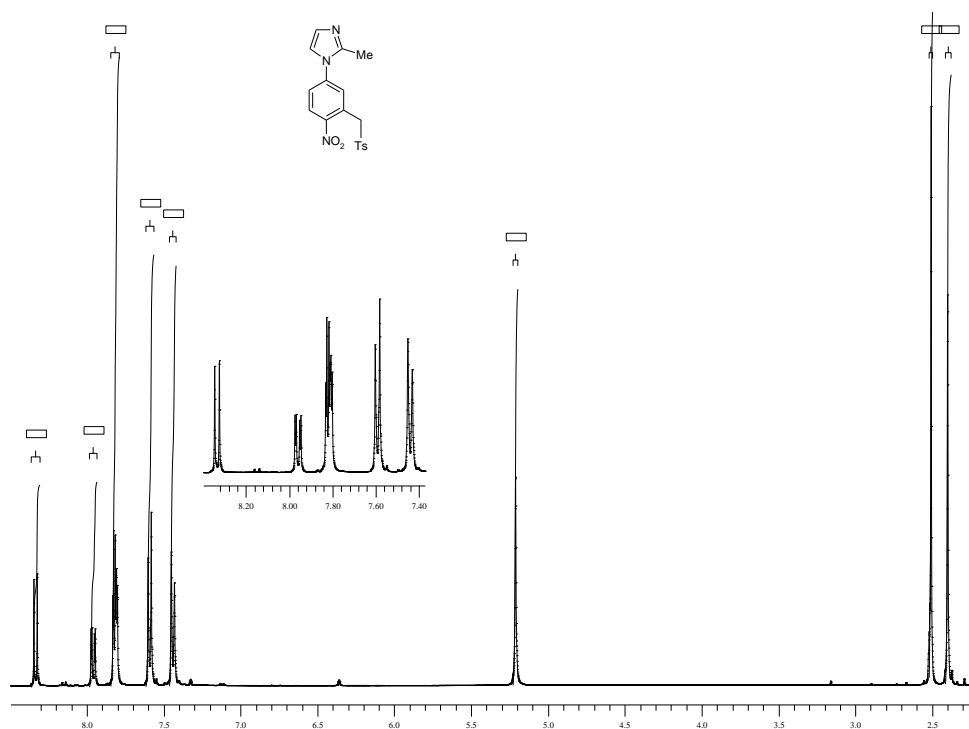
Rys. 4.8. Wiązania wodorowe w sieci kryształu związku 19.

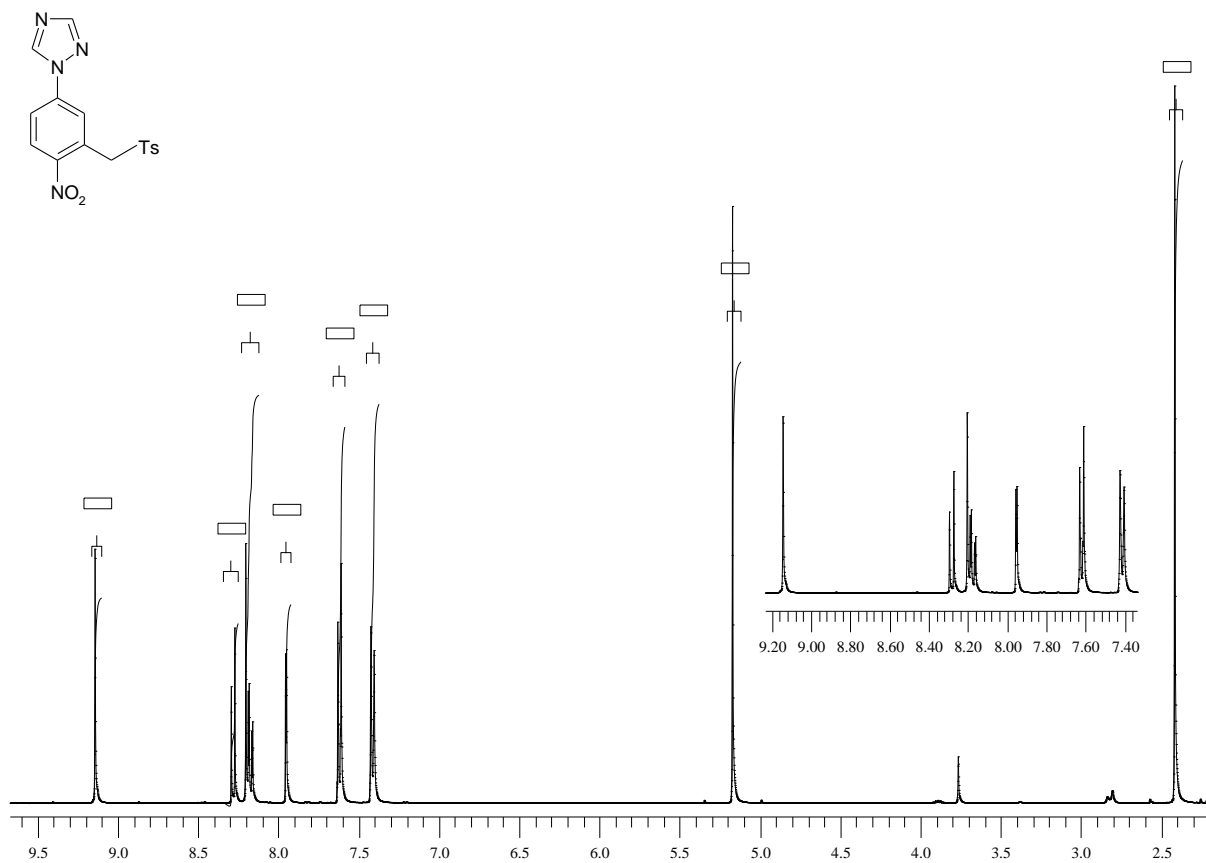
Tabela 4.1. Wiązania wodorowe w związku 19.

Wiązania wodorowe międzycząsteczkowe	Donor-H (Å)	H···Akceptor (Å)	Donor···Akceptor (Å)	Donor-H···Akceptor (°)
C12-H12A···O24	0.95(3)	2.25(2)	2.809(3)	116.7(18)
C7-H7···O15 ⁱ	0.97	2.55	3.466(3)	157
C12-H12B···O15 ⁱ	0.97	2.55	3.466(3)	157

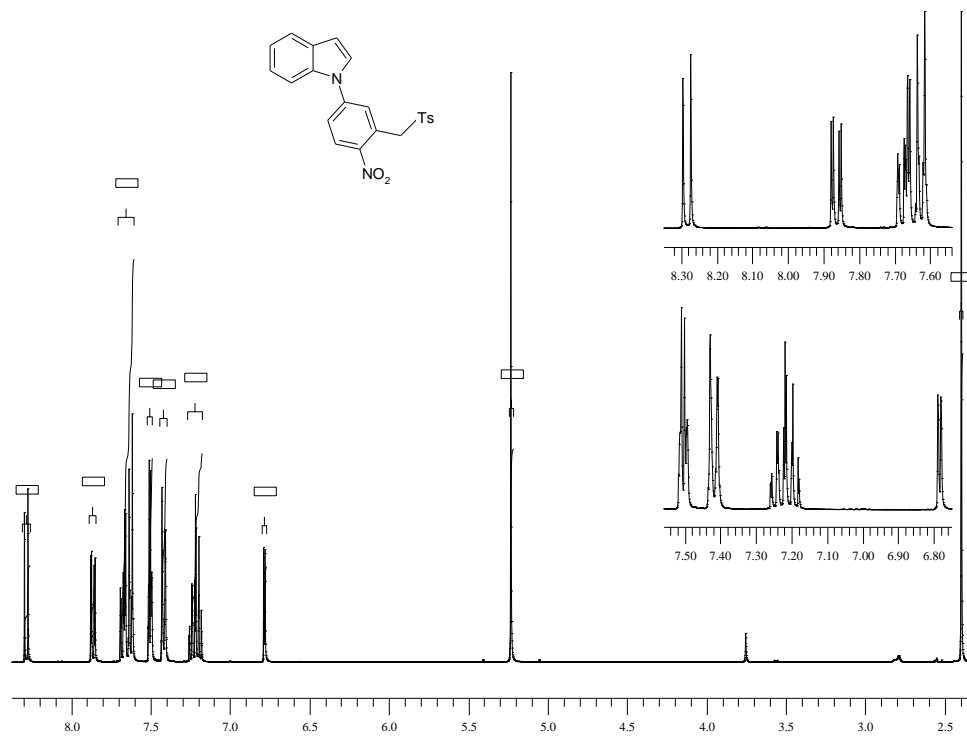
kod symetrii: ⁽ⁱ⁾ x,1+y,z

W widmie ¹H NMR pochodnej imidazolu **20** dwa dublety protonów 4-H i 5-H nakrywają się z dubletem protonu 2'-H (**Rys. 4.9**), tworząc razem multiplet. Wskutek tego niemożliwe było obliczenie stałych sprzężenia. Obok singletu grupy metylowej tosyłu (2,41 ppm) obserwuje się również singlet grupy metylowej podstawionej w pozycji 2 układu imidazolowego (2,51 ppm).

**Rys. 4.9. Widmo ¹H NMR związku 20.**



Rys. 4.10. Widmo ^1H NMR związku 21.

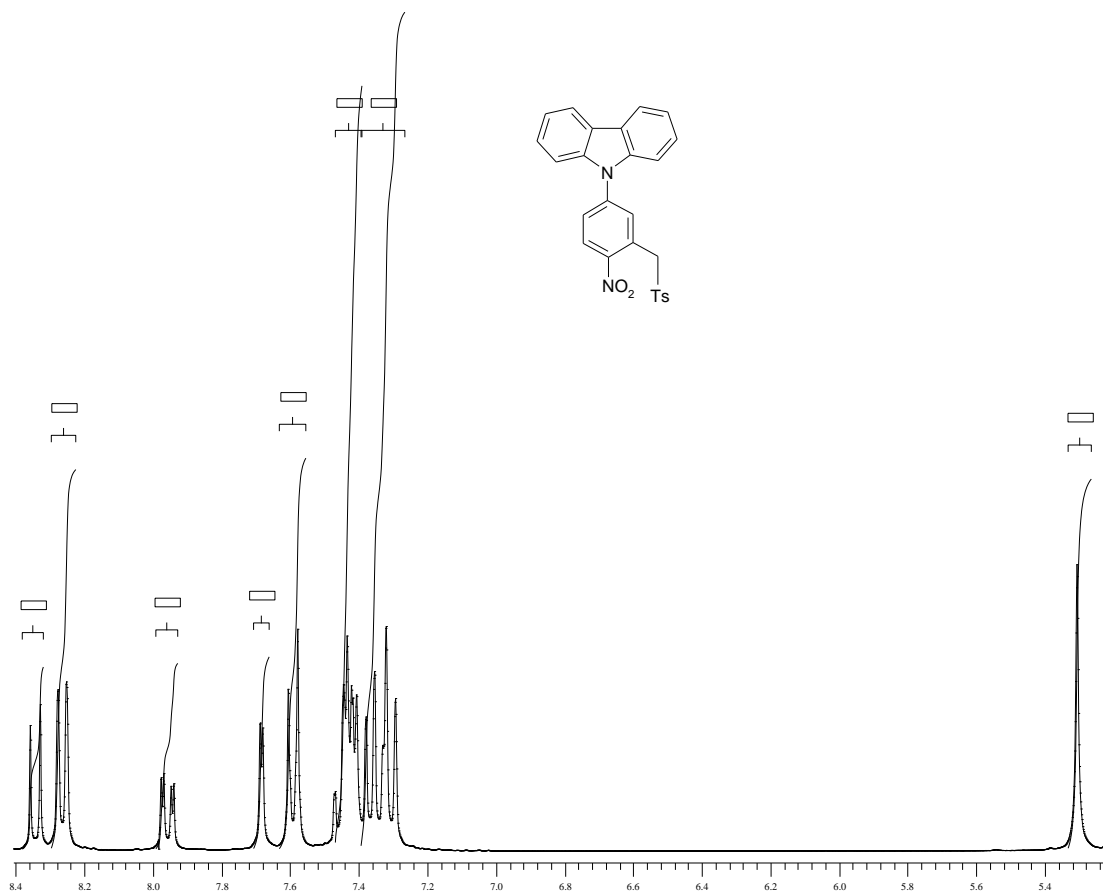


Rys. 4.11. Widmo ^1H NMR związku 22.

Oprócz sygnałów wspólnych dla tej grupy związków widmo ^1H NMR związku **21** (Rys. 4.10) zawiera dwa singlety w zakresie aromaticznym przy 8,20 i 9,14 ppm odpowiadające protonom 3-H i 5-H triazolu.

W widmie ^1H NMR pochodnej indolu **22** występują dwa multiplety AA'XX' (przy 7,40–7,44 oraz 7,62–7,64 ppm) *para*-podstawionego nitrobenzenu (Rys. 4.11). Na szczególną uwagę zasługuje ponadto dublet dubletów przy 6,78 ppm charakterystyczny dla protonu 3-H indolu – widoczne jest przy tym słabe sprzężenie zig-zag z protonem 7-H.

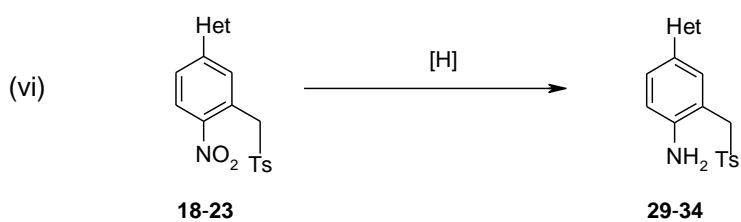
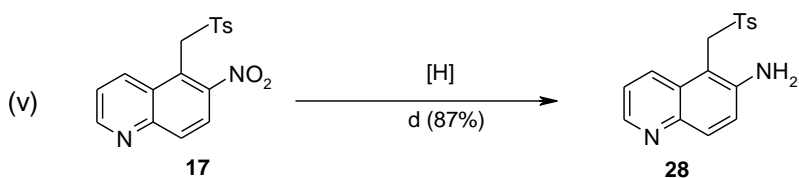
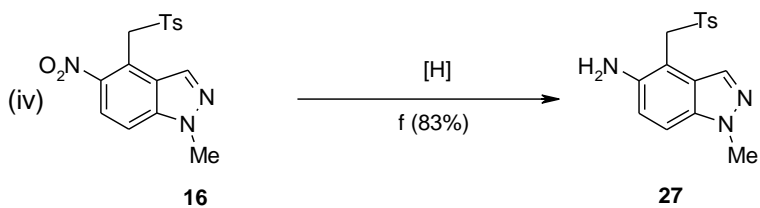
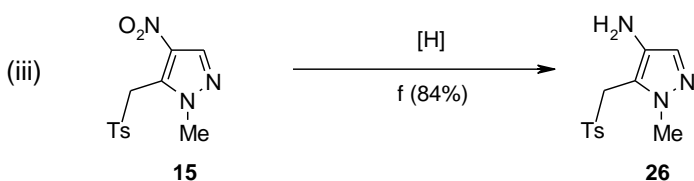
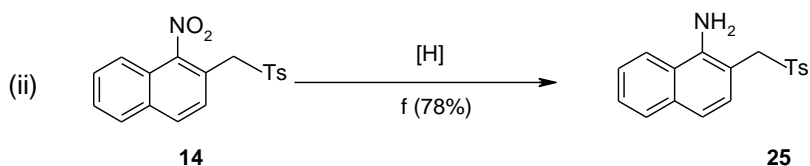
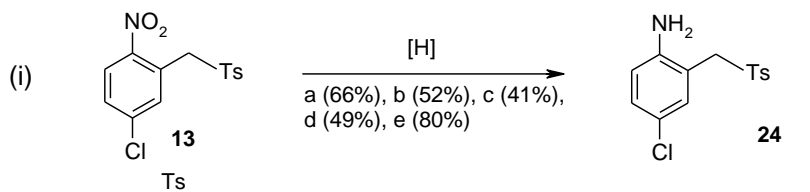
Warto przy tym nadmienić, że w widmie ^1H NMR pochodnej karbazolu **23** sygnały pochodzące od protonów ugrupowania tosyłowego nakładają się (Rys. 4.12) na multiplety protonów systemu karbazolowego, co jest charakterystyczne dla tego typu skondensowanych arenów.²⁷



Rys. 4.12. Widmo ^1H NMR związku **23**.

Kolejnym etapem prowadzonych badań była selektywna redukcja grupy nitrowej uzyskanych produktów VNS **13-23** do aminowej (**Schemat 4.3**) z utworzeniem pochodnych **24-34**, których tożsamość ustalono w oparciu o charakterystykę spektralną NMR, MS oraz analizę elementarną. Wcześniejsze badania prowadzone w Katedrze nad ciśnieniową redukcją wodorem produktów reakcji VNS w obecności katalizatora platynowego wykazały, że istotną trudność w tym procesie stanowi całkowite lub częściowe uwodornienie ugrupowania sulfonowego.¹¹⁷ Prowadziło to do trudno rozdzielających się mieszanin produktów. W niniejszej pracy reakcję uwodornienia powtórzono na związku **13**, stosując jedynie niewielkie nadciśnienie wodoru i prowadząc syntezę w temperaturze pokojowej. Jednak w mieszaninie poreakcyjnej ponownie stwierdzono obecność niejednorodnego produktu. Udało się go oczyścić na drodze chromatografii flash (FC). Mimo dobrej wydajności produktu **24** (66%), proces oczyszczania był niewdzięcznym etapem syntezy - okazał się czasochłonny i podrażał metodę. W związku z tym przeprowadzono szereg prób poszukiwania bardziej odpowiedniej metodyki otrzymywania pochodnych aminowych. Do redukcji użyto klasyczne metody wykorzystujące sproszkowane żelazo w kwasie octowym (metoda **b**) albo chlorek cyny lub cynę w obecności kwasu solnego (metody: **c** i **d**), jednakże wydajności tych metod redukcji okazały się niższe niż uwodornienie w obecności katalizatora (41-52%). W przypadku redukcji w obecności cyny lub jej chlorku przyczyną była obecność w mieszaninie poreakcyjnej koloidalnych soli cyny, które stwarzały istotne trudności na etapie wyodrębniania i oczyszczania produktów reakcji. Ponadto metoda **b** wymagała długiego czasu reakcji (15 dni.)

Schemat 4.3



Metody redukcji:

- a: H_2/PtO_2
- b: Fe/AcOH
- c: $\text{SnCl}_2/\text{AcOH-HCl}$
- d: Sn/HCl
- e: $\text{H}_2\text{N-NH}_2 \cdot \text{xH}_2\text{O}/\text{Pd-C}$
- f: $\text{H}_2\text{N-NH}_2 \cdot \text{xH}_2\text{O}/\text{Ni-Ra}$

18, 29: Het = , e (53%)

19, 30: Het = , e (72%)

20, 31: Het = , e (78%)

21, 32: Het = , e (46%)

22, 33: Het = , e (71%)

23, 34: Het = , f (30%)

W konsekwencji konieczne było znalezienie innego reagenta, którego zastosowanie pozwoliłoby na bardziej efektywną redukcję grupy nitrowej. Dane z piśmiennictwa wskazywały, iż redukcja wybranych nitroarenów, a w szczególności pochodnych nitrobenzenu lub indazolu, z użyciem wodzianu hydrazyny wobec katalizatora palladowego przebiega z wysokimi wydajnościami rzędu 80%.¹¹⁸ Zastosowanie wodzianu hydrazyny w obecności 10%-owego palladu na węglu jako katalizatora w środowisku alkoholowym (metoda e, związki **13-23**) pozwoliło na skrócenie czasu reakcji do kilku godzin i zaowocowało wzrostem wydajności amin **24**, **29-33** do ponad 80%. Zastosowanie tejże metodyki w przypadku nitropochodnych **16** i **17** zakończyło się niepowodzeniem z powodu ich znikomej rozpuszczalności w alkoholu. Okazało się jednak, że pochodną indazolu **16** można efektywnie uwodornić do aminy **27**, stosując mieszaninę rozpuszczalników - metanolu i THF - oraz nikiel Raneya jako katalizator. Bardzo dobra wydajność reakcji wynosząca 83% zachęciła autora do zastosowania tej metody do pozostałych pochodnych nitrowych **14**, **15** i **23**. Tylko w przypadku pochodnej karbazolu nie zdołano uzyskać satysfakcjonującego wyniku (wydajność 30%). Spowodowane było to bardzo słabą rozpuszczalnością produktu **34** w powyższej mieszaninie rozpuszczalników, co nastęrczało trudności w oddzieleniu tego produktu od nieorganicznego katalizatora. Próby redukcji **23** w innych rozpuszczalnikach bądź mieszaninach rozpuszczalników nie doprowadziły do znaczącej zmiany w wydajności reakcji.

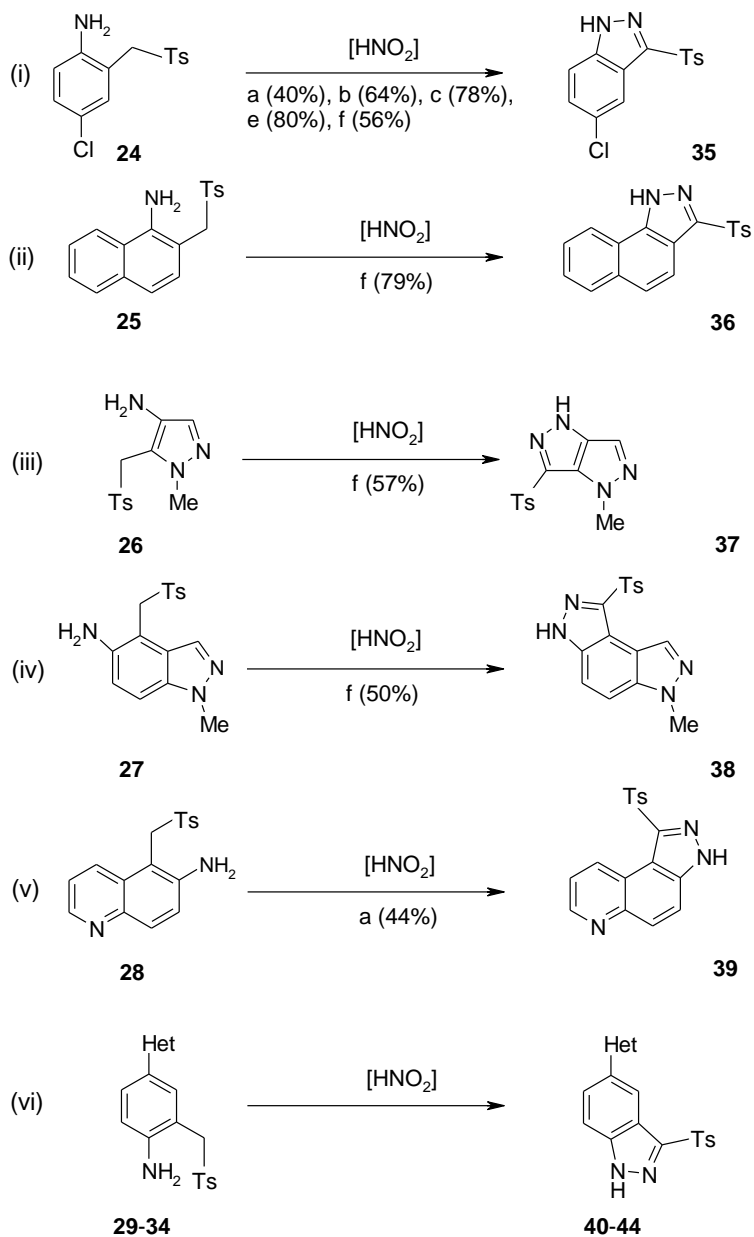
Podobnie jak dla nitropochodnych **13-23**, budowę produktów uwodornienia **24-34** potwierdzono w oparciu o widma ¹H i ¹³C NMR, a także widma IR. W widmach ¹H NMR związków **24-34** obserwowano podobne sygnały jak w widmach nitropochodnych **13-23** z następującymi zmianami:

- Pojawienie się przeważnie poszerzonego singletu ugrupowania NH₂ w okolicy 5 ppm; jedynie w przypadku pochodnej indazolu **27** singlet ten obserwowano przy 13,38 ppm.
- Przesunięcie położenia singletu protonów metylenowych w kierunku pola o niższym natężeniu (4,20–4,70 ppm) spowodowane brakiem grupy nitrowej i jej odsłaniającego efektu.
- Przesunięcie sygnałów układu ABX 1,2,4-trójpodstawionego fenylu (związki **24**, **29-34**) również w kierunku pól o wyższym natężeniu. Przyczyna jest podobna jak powyżej - brak osłaniającego efektu grupy nitrowej; ponadto grupa aminowa,

aczkolwiek w efekcie indukcyjnym odciąga elektrony z układu aromatycznego, jednakże w efekcie mezomerycznym stanowi podstawnik elektronodawczy, co przekłada się na dodatkowe przesłanianie pozostałych protonów pierścienia fenyłowego.


Kolejnym etapem pracy była cyklizacja uzyskanych amin **24-34** do utworzenia produktów z dobudowanym pierścieniem pirazolu **40-41**, **43-44** (Schemat 4.4). Pomimo iż istnieje wiele metod syntezy pochodnych pirazolu, otrzymywanie indazolu i skondensowanych układów heterocyklicznych zawierających ten pierścień jako jeden z elementów jest znacznie trudniejsze. Najczęściej stosowana metoda dobudowania systemu pirazolu polega na dwuazowaniu *o*-toluidyny, jednakże do uzyskania satysfakcjonujących wydajności konieczna jest obecność podstawnika dezaktywującego w pierścieniu fenyłowym.² W przypadku benzenu jest to zwykle grupa nitrowa. Brak takiego ugrupowania, względnie obecność podstawnika słabiej dezaktywującego (np. chlor), powoduje, że reakcja nie zachodzi bądź konieczne jest długotrwałe, nawet kilkudniowe ogrzewanie mieszaniny reakcyjnej. W tym kontekście produkty reakcji VNS zdają się być bardzo dobrymi substratami do reakcji zamykania pierścienia pirazolu. Rolę podstawnika dezaktywującego przejmuje tutaj grupa m.in. arylosulfonowa, która przyłączona jest do ugrupowania metylenowego zamiast do pierścienia benzenowego. W ten sposób zwiększona jest kwasowość protonów metylenowych, a zarazem podatność grupy CH₂ na reakcje cyklizacji.⁹⁷ Warto przy tym nadmienić, iż dotychczas otrzymywane z wykorzystaniem reakcji VNS pochodne pirazolu wykazywały aktywność na poziomie ośrodkowego układu nerwowego.⁹⁰


Schemat 4.4





Metody cyklizacji:


- a: NaNO₂/HCl
- b: azotyn izepentyłu/AcOH-benzen/TBAB
- c: azotyn izepentyłu/AcOH-NH₄Cl/TBAB
- d: azotyn izepentyłu/AcOH
- e: azotyn izepentyłu/NH₄Cl-THF-AcOH
- f: azotyn izepentyłu/SiO₂-AcOH


29, 40: Het =  , d (80%), e (80%), f (56%)

30, 41: Het =  , d (80%), f (52%)

31, 42: Het =  , f (ok. 40%, niejednorodny)

32, 43: Het =  , d (80%)

33, 44: Het =  , f (47%)

34, 45: Het =  , f (ok. 12%, niejednorodny)

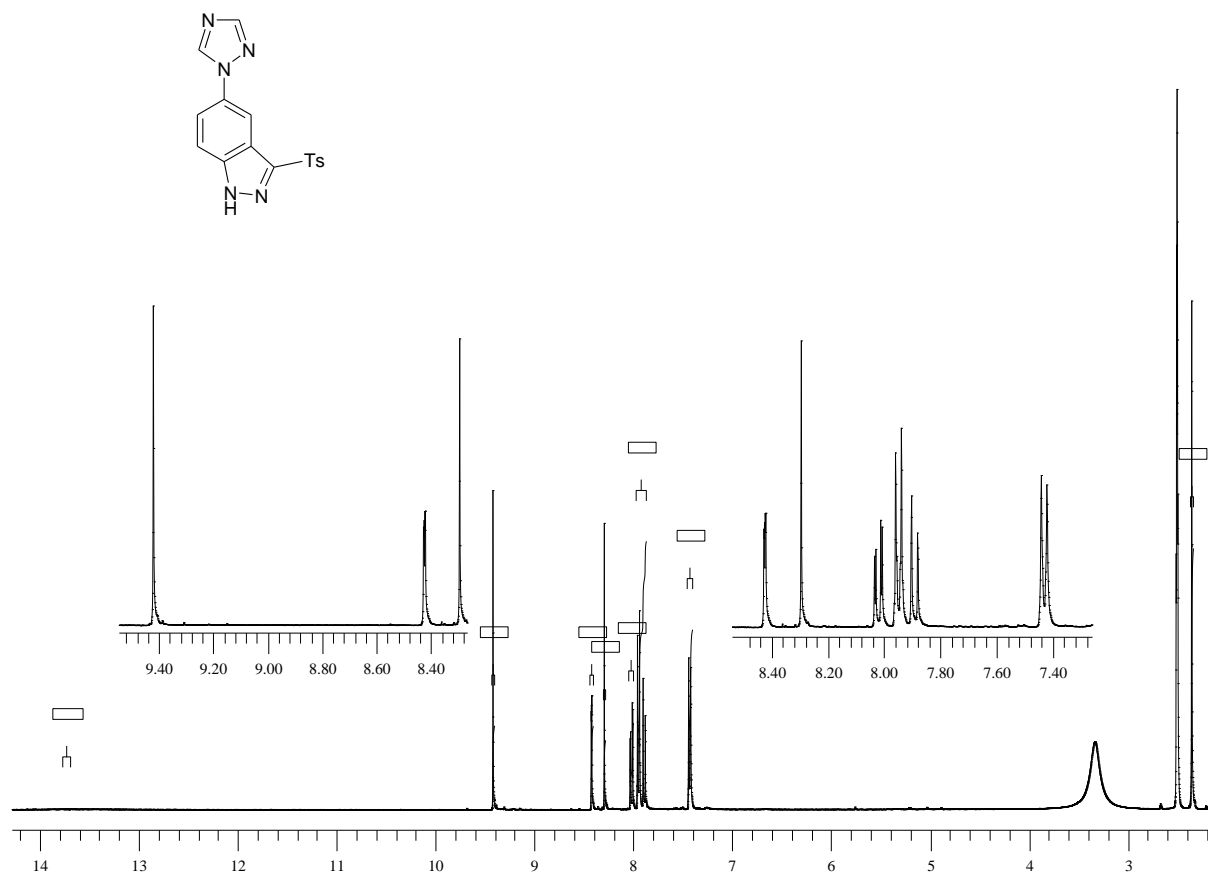
Zastosowanie klasycznych technik dwuazowania (NaNO_2/HCl) w obniżonej temperaturze (metoda **a**) amin **24** i **28** pozwoliło na uzyskanie odpowiednich indazolopochodnych **35**^{97,112} i **39**, aczkolwiek produkty powstawały ze średnimi (**35**) bądź niskimi (**39**) wydajnościami. Przyczynę tego zjawiska upatrywać należy w niskiej rozpuszczalności wyjściowych amin w środowisku wodnym. Nadmienić należy, iż związek **39** był już uprzednio otrzymany za pomocą klasycznej metody, lecz autorzy zmuszeni byli do użycia bardzo dużej objętości rozpuszczalników w celu prowadzenia syntezy w możliwie jednorodnym środowisku.⁹⁷ Aczkolwiek zastosowanie warunków reakcji PTC, w obecności katalitycznej ilości bromku *tert*-butyloamoniowego (TBAB), połączone ze zmianą czynnika dwuazującego na azotyn izopentylu (metoda **b**: azotyn izopentylu/AcOH, benzen/TBAB, metoda **c**: azotyn izopentylu/ NH_4Cl , AcOH/THF) pozwoliło na wzrost wydajności otrzymywania **35** i **39** do 78%, jednakże wiązało się prowadzeniem reakcji przez 1-2,5 godziny, a w mieszaninie stwierdzono obecność ubocznego produktu będącego rezultatem wymiany grupy diazoniowej na hydroksylową. Dobre wydajności (ok. 80%) uzyskiwano, prowadząc dwuazowanie amin **29**, **30** i **32** azotynem izoamylu w obecności lodowatego kwasu octowego w obniżonej temperaturze (metoda **d**). W przypadku amin **24** i **30** szczególnie korzystny okazał się dodatek THF i NH_4Cl do kwasu octowego. W ten sposób wydajność produktów **35**, **40** i **41** udało się podnieść do 80%. Wydajność procesu cyklizacji jednakże była nadal niezadowalająca dla amin **25-27** i **33-34** (powyżej 40%). Bardziej satysfakcjonujące wyniki udało się uzyskać, stosując dwuazowanie azotynem izopentylu i prowadząc reakcję na podłożu stałym w reaktorze mikrofalowym. Substancje wyjściowe adsorbowano na żelu krzemionkowym, a żel zwilżono niewielką objętością kwasu octowego i cyklizację wykonano w kolbach ciśnieniowych. W ten sposób udało się podnieść wydajność reakcji dla skondensowanych pochodnych pirazolu **36-38** i **44** nawet do 79%.

Mimo zastosowania natomiast różnorodnych metod dwuazowania-cyklizacji nie udało się otrzymać pochodnej imidazolu **42** oraz karbazolu **45** w postaci analitycznie czystej. Widma ^1H NMR mieszaniny poreakcyjnej (metoda **f**) wykazywała obecność tych produktów (odpowiednio ok. 40% i 12%), jednak próby ich oczyszczenia nie powiodły się.

Tożsamość finalnych indazolopochodnych potwierdzono za pomocą widm NMR, MS, IR i analizy elementarnej. Zasadnicze różnice w obrębie widm ^1H NMR produktów cyklizacji w porównaniu z widmami wyjściowych amin to:

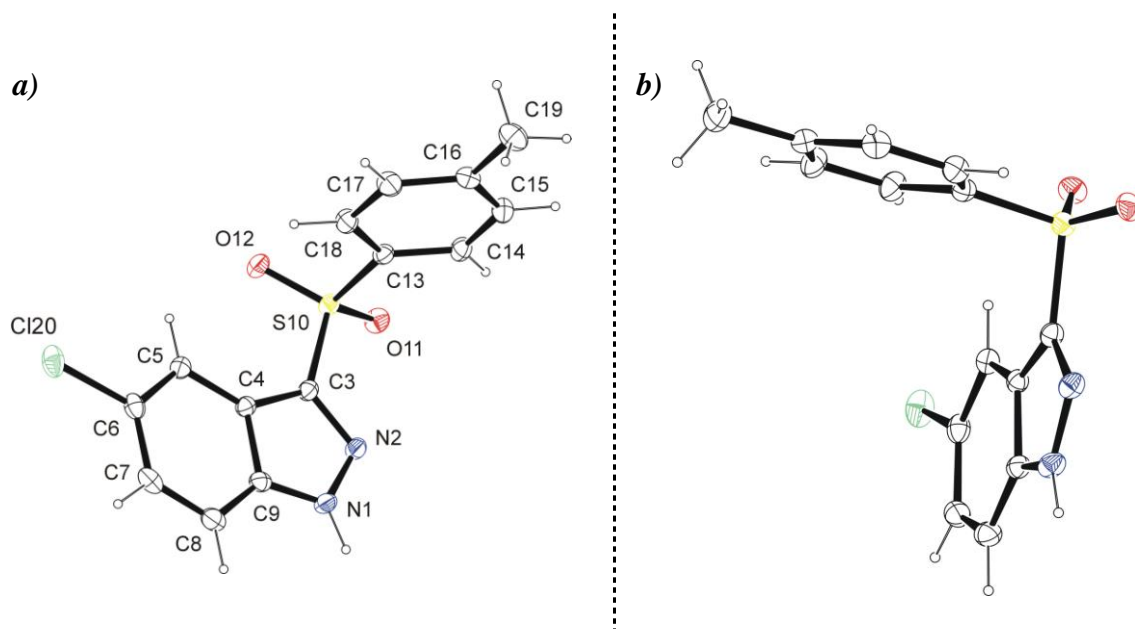
- Obecność szerokich singletów, niejednokrotnie bardzo rozmytych, odpowiadających jednemu protonowi NH, które ulegały wygaszeniu po wytrząśnięciu z D_2O ; brakowało natomiast singletu pochodzącej od grupy aminowej.
- Brak singletów protonów metylenowych (w zakresie ok. 4,20–4,70 ppm),
- Pojawienie się słabego sprzężenia *para* ($J=0,8$ Hz) w sygnałach protonów 4-H' i 7-H' pochodnych **35**, **40**, **41**, **43-44**, które obserwowane są jako dublet dubletów zamiast dubletu, jak w przypadku wyjściowych amin.

Przykładowe widmo pochodnej po cyklizacji (**43**) przedstawiono na **Rys. 4.13**.

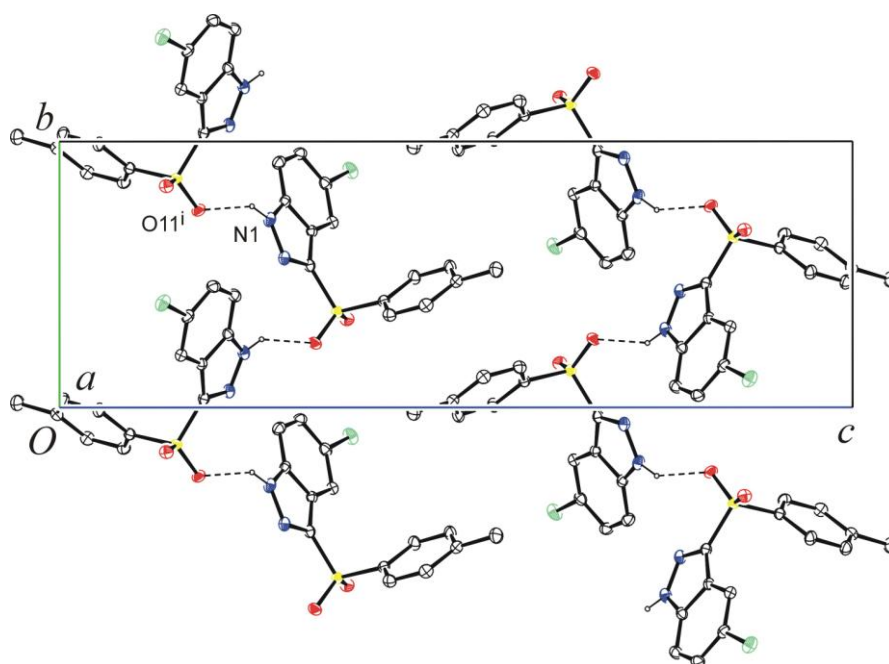


Rys. 4.13. Widmo ^1H NMR związku **43**.

Związek **35** wykazywał obiecującą aktywność przeciwnowotworową. Z tego powodu ciekawym wydawało się uzyskanie parametrów strukturalnych tej pochodnej, co w przyszłości mogłoby być pomocne przy ustalaniu jej mechanizmu działania (oszacowanie wiązania się z miejscem aktywnym odpowiedniego receptora) i ewentualnych zmianach w jej budowie. Analiza rentgenostrukturalna związku **35** wykazała, że płaszczyzny, na których leżą pierścienie indazolu i podstawionego benzenu, tworzą kąt dwuścienny $81,62(7)^\circ$ (**Rys. 4.14** i **4.15**). Ponadto w sieci kryształu związku **35** (**Tabela 4.2**) cząsteczki związane osią śrubową 2_1 łączą się wiązaniami wodorowymi $N1-H1 \cdots O11^i$ w łańcuchy narastające wzdłuż osi y (**Rys. 4.15**). W wiązaniach tych biorą udział pirolowy atom azotu i atom tlenu grupy sulfonowej.



Rys. 4.14. Obraz przestrzenny cząsteczki związku **35** przedstawionej w dwóch rzutach ORTEP a i b.



Rys. 4.15. Wiązania wodorowe w sieci kryształu związku 35.

Tabela 4.2. Wiązania wodorowe w związku 35.

Wiązania wodorowe międzycząsteczkowe	Donor-H (Å)	H···Akceptor (Å)	Donor···Akceptor (Å)	Donor-H···Akceptor (°)
N1-H1···O11	0.89(4)	2.06(5)	2.848(3)	147(4)

kod symetrii: ⁽¹⁾ 1-x,0.5+y,0.5-z

4.2. Aktywność biologiczna otrzymanych indazolopochodnych

4.2.1 Analiza chemoinformatyczna

Jak już wspomniano wcześniej, szerokie spektrum aktywności biologicznej pochodnych pirazolu staje się inspiracją do poszukiwania nowych substancji leczniczych zawierających ten układ heterocykliczny, w tym związków o działaniu przeciwnowotworowym. Poszukiwanie połączeń o aktywności przeciwnowotworowej jest szczególnie ważne w dobie wzrostu zachorowalności na schorzenia nowotworowe.⁶⁰⁻⁶⁴ W celu doboru związków wyjściowych wykorzystywanych w syntezie posłużono się aplikacją *PASS Inet*^{98,99} porównującą charakterystyczne elementy budowy badanego związku ze znanymi związkami referencyjnymi o określonej aktywności, a zgromadzonymi w stale rozbudowywanej bazie. Na podstawie dokonanej analizy porównawczej oszacowane zostaje prawdopodobieństwo (Pa) wystąpienia danego działania. Program *PASS* obecnie pozwala na jednoczesne przewidywanie licznych efektów farmakologicznych, mechanizmów działania, działań niepożądanych, czy toksycznych (np. mutagenność, teratogenność) i wykorzystano go do oszacowania aktywności biologicznej związanej z procesami nowotworzenia (**Tabela 4.3**).

Aktywność biologiczna	Przewidywana aktywność biologiczna Pa							
	Numer badanego związku							
	35	36	37	38	39	40	43	44
Hamująca aktywność kompleksu CDK2/ Cyklina A	0,24	0,22	0,69	0,59	0,21	0,78	0,52	0,57
Antymitotyczna	0,12	0,27	0,15	0,34	0,10	0,89	0,41	0,31
Hamująca aktywność fosfodiesterazy cAMP	0,36	0,26	0,27	0,29	0,25	0,69	0,49	0,27
Hamująca aktywność kinazy p38 MAP	--	0,26	0,05	0,45	0,24	0,56	0,61	0,39
Hamująca aktywność kinazy Abl	0,10	0,11	0,11	0,14	0,14	0,40	0,23	0,11
Hamująca aktywność kompleksu CDK/Cykliny	0,69	0,10	0,69	0,58	0,53	0,67	0,64	0,54
Antagonista cAMP	0,98	0,65	0,65	0,59	0,78	0,89	0,71	0,55
Hamująca aktywność kinaz Syk	0,21	0,45	0,21	0,20	0,32	0,45	0,44	0,20
Hamująca aktywność polimerazy RNA bezpośrednio zależnej od DNA	0,89	0,73	0,76	0,67	0,74	0,97	0,90	0,61

Tabela 4.3. Aktywność biologiczna 35-41, 43-44 wygenerowana za pomocą programu *PASS*.

4.2.2. Analiza molekularna w modelu *in vitro*

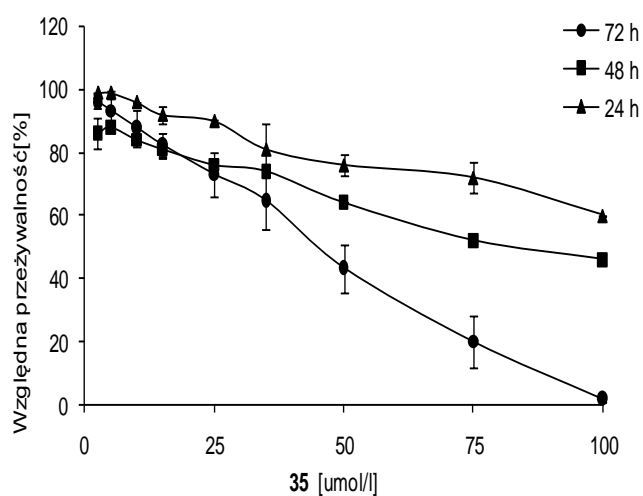
Analiza profilu aktywności przeciwnowotworowej indazolopochodnych **35-41**, **43-44** zestawiona w **Tabeli 4.3**, pomimo szerokiej rozpiętości jej prawdopodobieństwa, uzasadniła podjęcie próby oszacowania aktywności cytostatycznej uzyskanych w pracy związków. Do wstępnych badań, z użyciem ludzkich komórek nowotworowych HT29 (raka okrężnicy), wytypowano pochodne **35** i **39** jako przedstawicieli układów mniej i bardziej skondensowanych.¹¹⁹

Efekty cytotoksyczne *in vitro* związków **35** i **39** badano przy użyciu testu MTT oraz przeprowadzając analizę zmian poziomu białek biorących udział w programowanej śmierci komórki z wykorzystaniem technik elektroforezy, Western Blot i immunoidentyfikacji z zastosowaniem odpowiednich przeciwciał oraz badając zmiany cyklu komórkowego oraz przeprowadzając mikroskopową ocenę morfologii jąder badanych komórek nowotworowych. Stopień uszkodzenia DNA pod wpływem badanych substancji badano z wykorzystaniem techniki *Comet assay*.

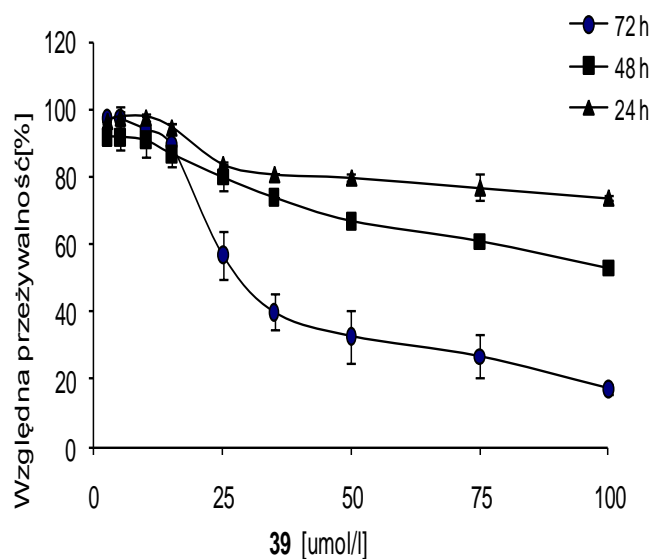
Zaobserwowano, analizując uzyskane testem MTT wyniki, różnice w sile działania związków w zależności od ich budowy chemicznej. Pochodna **35** wykazywała silniejszą aktywność cytotoksyczną w porównaniu z **39**. Wyznaczona wartość indeksu cytotoksyczności (IC_{50}) dla badanej linii wynosiła odpowiednio (**Tabela 4.4** oraz **Rys. 4.16 a-b**): $29,9 \pm 3,5 \mu\text{mol/l}$ (**35**), $37,3 \pm 2,0 \mu\text{mol/l}$ (**39**). Dodatkowo wykazano potencjał proapoptotyczny obu pochodnych poprzez wykazanie pofragmentowanych jąder użytych w testach komórek techniką mikroskopii fluorescencyjnej z zastosowaniem barwnika DAPI oraz określono kierunek zmian w cyklu życiowym z wykorzystaniem techniki cytometrii przepływowej. Uzyskane dane na temat cytotoksyczności oraz aktywności proapoptotycznej badanych pochodnych **35** i **39** stały się przesłanką do wyjaśnienia drogi indukcji apoptozy oraz konsekwencji zjawiska interkalacji tych związków w cząsteczkę DNA, co stanowiło kolejny cel badań.

Badany związek	IC ₅₀ ±SD
35	29,9±3,5
39	37,3±2,0

Tabela 4.4. Aktywność cytotoksyczna 35 i 39 w modelu komórkowym HT29; SD-odchylenie standardowe.



Rys. 4.16 a. Przeżywalność komórek HT29 pod wpływem 35.



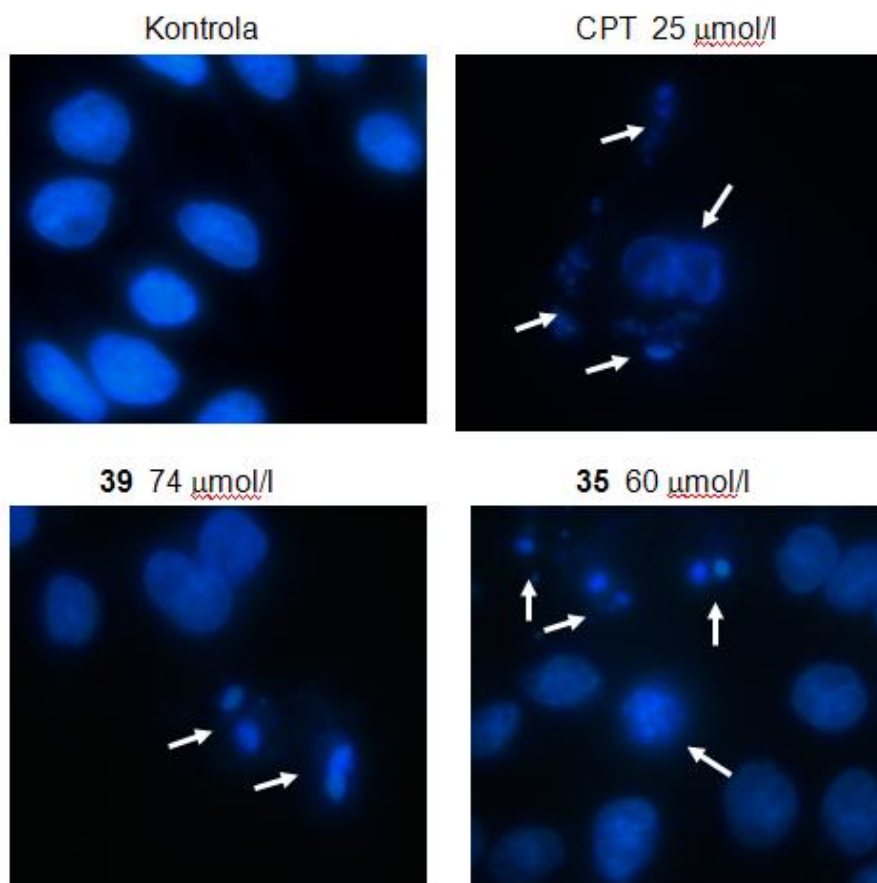
Rys. 4.16 b. Przeżywalność komórek HT29 pod wpływem 39.

Badania objęły także analizę poziomu białek biorących udział w programowanej śmierci komórki oraz ocenę stopnia fragmentacji DNA pod wpływem działania cyklicznych pochodnych pirazolu. W pierwszym etapie oceniono wpływ **35** i **39** na poziom białek promujących i hamujących apoptozę. Konstytutywny poziom białek, tj. proapoptotycznego (Bax) i antyapoptotycznego (Bcl-2) pod wpływem działania badanych związków analizowano za pomocą technik: elektroforezy, Western Blot i immunoidentyfikacji z zastosowaniem odpowiednich przeciwciał. Poziom proapoptotycznego białka Bax w komórkach HT29 poddanych 24-godzinnemu działaniu związków **35** i **39** wzrastał w stosunku do próby kontrolnej. W celu oszacowania poziomu białka Bcl-2 w badanych komórkach zastosowano te same stężenia badanych związków i taki sam przebieg eksperymentu. Z uzyskanych danych wynika, że w komórkach HT29 poddanych inkubacji w obecności **35** i **39** dochodzi do zmniejszenia kumulacji białka Bcl-2 w porównaniu z próbą kontrolną. Podobnie jak w przypadku białka Bax, dla Bcl-2 obserwowano fakt, że działanie każdego ze związków nasilało się wraz ze wzrostem stężenia. Jako kontrolę pozytywną procesu apoptozy zastosowano komórki HT29 traktowane przez 24 godziny kamptotecyną (CPT). Stężenie CPT (25 $\mu\text{mol/l}$) dla badanej populacji komórek wyznaczono doświadczalnie w oparciu o dane literaturowe. Odnotowano przy tym wzrost poziomu białka Bax i spadek poziomu białka Bcl-2. Jako białko referencyjne do oceny ilości nałożonego materiału zastosowano GAPDH. Stwierdzono zatem, iż pochodna **35** charakteryzuje się większą aktywnością proapoptotyczną wobec badanej linii niż pochodna **39** - obserwowano ten sam efekt wzrostu kumulacji białka Bax oraz obniżenia ilości Bcl-2 przy niższym stężeniu (90 $\mu\text{mol/l}$). Związek **39** wymagał zastosowania wyższego stężenia (110 $\mu\text{mol/l}$) w celu osiągnięcia porównywalnego rezultatu. Przeprowadzona analiza poziomu białek Bax i Bcl-2 sugeruje, że zastosowane stężenia obu związków mają znaczenie dla indukcji procesu apoptozy, co koreluje z wynikami otrzymanymi w ocenie cyklu komórkowego oraz mikroskopowej ocenie morfologii jąder komórek.

W kolejnym etapie badań w komórkach HT29 traktowanych przez 24 godziny związkami **35** i **39** wykazano, stosując technikę Western Blot, zmiany w poziomie białka PARP1 w porównaniu do stanu wyjściowego, jaki ustalono dla komórek nieekspozowanych. Białko to odgrywa istotną rolę w sygnalizacji komórkowej i jest markerem naprawy uszkodzonego DNA.³³ W komórkach kierowanych do apoptozy białko PARP jest rozcinane na dwa

polipeptydy o masach odpowiednio: 89 i 24 kDa. Na podstawie uzyskanych wyników wyciągnięto wniosek, że pod wpływem działania obu stosowanych związków dochodzi do rozcięcia białka p116 PARP1 do formy krótszej. Wskazuje to na ewidentną aktywność proapoptotyczną materiału badawczego.

Nieodwracalne uszkodzenia DNA powstałe przypuszczalnie w procesie interkalacji **35** i **39** do DNA badanych komórek linii HT29 wykazano, stosując technikę *Comet assay*. Użyta technika, choć pozwoliła na oszacowanie stopnia uszkodzeń DNA w komórce wywołanych obecnością **35** i **39**, nie umożliwia jednak wykrycia apoptozy. Na tym etapie badań zaobserwowano, że zarówno **35**, **39** jak i kamptotecyna we wszystkich zastosowanych stężeniach znacząco wywołują wzrost uszkodzeń DNA, natomiast nie wykazano różnicy w aktywności biologicznej badanych związków (**Rys. 4.17**).



Rys. 4.17. Ocena morfologii jąder komórek linii HT29 pod wpływem działania **35** i **39** (DAPI, powiększenie 1000x); strzałki wskazują powstałe ciała proapoptotyczne.

Uzyskane dane w zakresie proapoptycznego profilu badanych pochodnych wydają się być obiecujące, aczkolwiek na obecnym etapie nie wyjaśniają w pełni mechanizmu ich działania. W przyszłości zasadna jest zatem kontynuacja prac badawczych mających na celu ocenę zjawiska interkalacji tych związków w cząsteczkę DNA, jednakże mogą być one limitowane znikomą rozpuszczalnością analitu w środowisku wodnym.

Oprócz związków **35** i **39**, których wyniki badań biologicznych przedstawiono powyżej, prowadzone są obecnie badania nad aktywnością przeciwnowotworową kolejnych połączeń otrzymanych w dysertacji. Istotną trudność jednakże w badaniach tego związku stanowi jego niska rozpuszczalność w wodzie i możliwości do wykorzystania w badaniach biologicznych rozpuszczalnikach chemicznych.

4.3. Obliczenia teoretyczne dotyczące otrzymywanych indazolopochodnych oraz badania dotyczące interakcji związku 41 z niskocząsteczkowymi ligandami¹

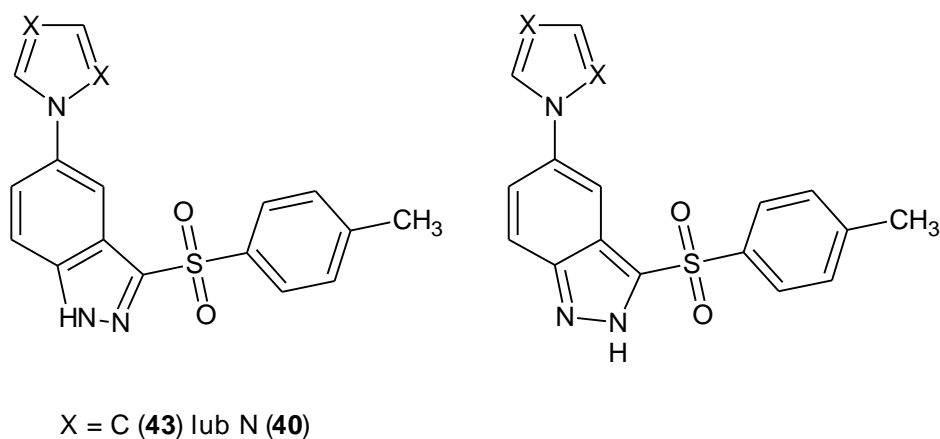
4.3.1. Optymalizacja geometrii związków 35-41 i 43-44

Skuteczne związanie się ligandu ze specyficznym dla niego receptorem oparte na wzajemnym dopasowaniu się elementów strukturalnych determinuje określoną odpowiedź na poziomie komórkowym oraz wiąże się z odpowiednim efektem klinicznym i, niejednokrotnie, toksycznym.¹ Mając na względzie aspekty steryczne badanych związków, dla pochodnych 35-4, 43-44 przeprowadzono analizę konformacyjną w celu znalezienia minimum globalnego cząsteczki. Hiperpowierzchnię energii potencjalnej skanowano, wykonując cykle losowań wartości kątów, wokół których możliwa byłaby swobodna rotacja. Optymalizację do zaniku częstości urojonych przy pomocy programu *Gaussian G09*^{120,121} przeprowadzono z zastosowaniem metody funkcjonału gęstości elektronowej DFT.¹²² Zdecydowano się na postać funkcjonału korelacyjno-wymennego B3LYP¹²³, ze względu na doskonałą zgodność z wynikami doświadczalnymi.^{124,125} Jako funkcje bazy zastosowano 6-31G(d,p)¹²⁶. Tożsamość minimum potwierdzono za pomocą analizy wibracyjnej do zaniku częstości urojonych. Następnie dla zminimalizowanych układów przeprowadzono optymalizację z użyciem dyskretnych modeli rozpuszczalnikowych (PCM)^{127,128} uwzględniających wpływ pierwszej sfery solwatacyjnej i środowiska, w którym dokonano charakterystyki spektralnej NMR analitu. Energię trwałych konformerów 35-41 oraz 43-44 przedstawiono w **Tabeli 4.5**. Ponadto, jak wykazały obliczenia teoretyczne (metoda SP - *single point*), energia przeniesienia protonu między dwoma tautomerami (**Rys. 4.18**) w przypadku pochodnych 35-41 oraz 43-44 osiąga wartość poniżej ok. 21 kJ/mol (5 kcal/mol), zatem uznać ją można za zanedbywalną. Przeprowadzone obliczenia wykazały także, że pierścienie heterocykliczne oraz ugrupowania tosyłowego nie są do siebie w pełni koplanarne, co jest zbieżne z wynikami badań naukowych prowadzonych na podobnych układach heterocyklicznych o udokumentowanych właściwościach przeciwnowotworowych.^{82,84}

¹Autor chciałby podziękować Panu **dr. Markowi Dorskocowi** za istotną pomoc w opracowaniu wyników analizy NMR.

Energia cząsteczki ¹²¹	kJ/mol
35	-4354153,82
36	-3944738,36
37	-3696156,56
38	-11939558,00
39	-3780393,20
40	-4399707,57
41	-13280284,15
43	-10493169,66
44	-10925405,16

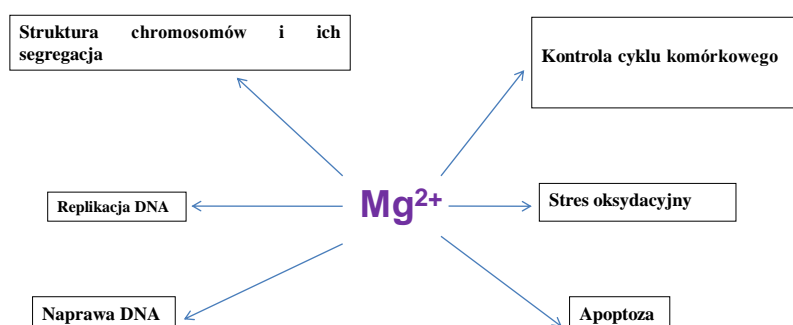
Tabela 4.5. Energia zoptymalizowanych konformerów związków 35-41, 43-45.



Rys. 4.18. Możliwe tautomery 40-41 oraz 43-45 przedstawione na przykładzie związków 40 i 43.

4.3.2. Interakcje związku **41** z jonami magnezu

Oddziaływania pomiędzy jonami metalu a cząsteczkami ksenobiotyków bądź istotnych z punktu widzenia współczesnej farmakoterapii makromolekuł odgrywają istotną rolę w biologii ustroju żywego.^{1,13,124} Magnez jest najczęściej spotykanym dwuwartościowym kationem w płynach ustrojowych organizmu człowieka. Bierze udział w regulacji wielu reakcji biochemicznych, a w szczególności mających miejsce w procesach proliferacji, różnicowania angiogenezy i apoptozy (**Rys. 4.19**).¹²⁹ Może więc wpływać na proces nowotworzenia na drodze oksydacyjnych zmian w DNA lub poprzez zaburzenie mechanizmu naprawy DNA.



Rys.4.19. Udział jonów magnezu w procesach biochemicznych.¹²⁹

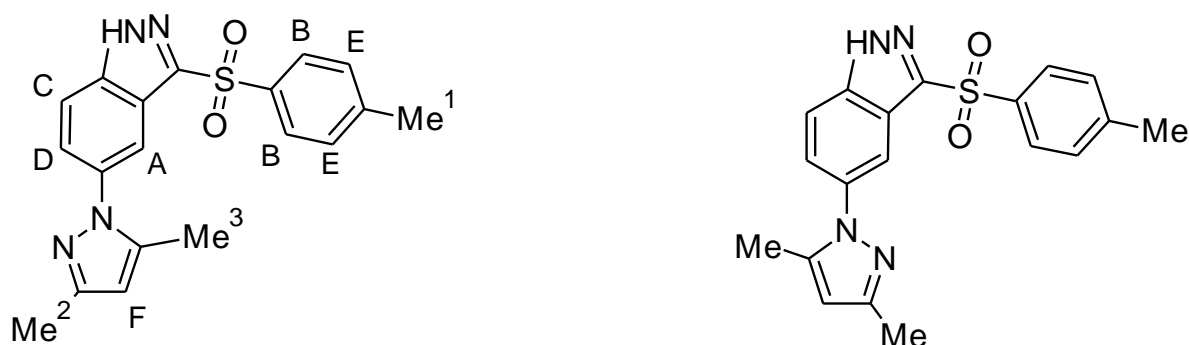
Badania tego typu oddziaływań można przeprowadzać z zastosowaniem różnych metod analitycznych, w tym: MS¹³⁰, IR¹³⁰⁻¹³², RAMAN¹³², skaningowej spektroskopii tunelowej (STS)¹³³. W tym aspekcie interesujące są także metody oparte na spektroskopii NMR pozwalające na rejestrację dwóch istotnych parametrów: przesunięcia chemicznego (δ), jak również stałej sprężenia (J). Przy oddziaływaniach słabych nie obserwuje się wyraźnego

sprzężenia pomiędzy jonem metalu a cząsteczką, jednak możliwe jest zaobserwowanie zmiany jej geometrii (energii), która to z kolei może. Zmiany poszczególnych konformerów skutkują fluktuacją w oparciu o równanie Karplusa skutkują zmianą kąta dwuściennego H-C-C-H, co wpływa na stałą sprzężenia. Niezwykle cennych informacji w tym obszarze dostarczają obliczenia kwantowo-chemiczne, szczególnie uwzględniające model rozpuszczalnikowy i sferę solwatacyjną jonów. Pozwalając na szybką wizualizację otrzymanych wyników, metody te bardziej oddają obraz procesów, jakie zachodzą w rozpuszczalnikach.¹³⁴⁻¹³⁶

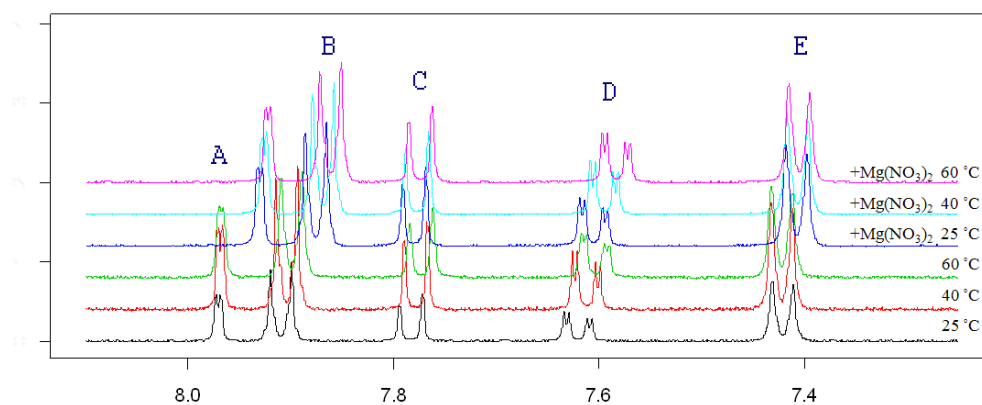
Do badań wybrano związek **41**, który obecnie znajduje się w badaniach *in vitro*, na działanie przeciwnowotworowe. Związek ten posiada w swojej strukturze ugrupowania mogące wchodzić w interakcje z jonami magnezowymi, co może być podstawą mechanizmu jego działania.

W tym też celu na podstawie różnic w przesunięciach pików w widmach ¹H NMR wykonanych w różnych warunkach termicznych dla pochodnej **41** oraz w obecności soli magnezu Mg(NO₃)₂·6 H₂O, wyznaczono miejsca w cząsteczce **41**, które są zdolne do oddziaływania z jonami magnezu oraz cząsteczkami rozpuszczalnika (DMSO).

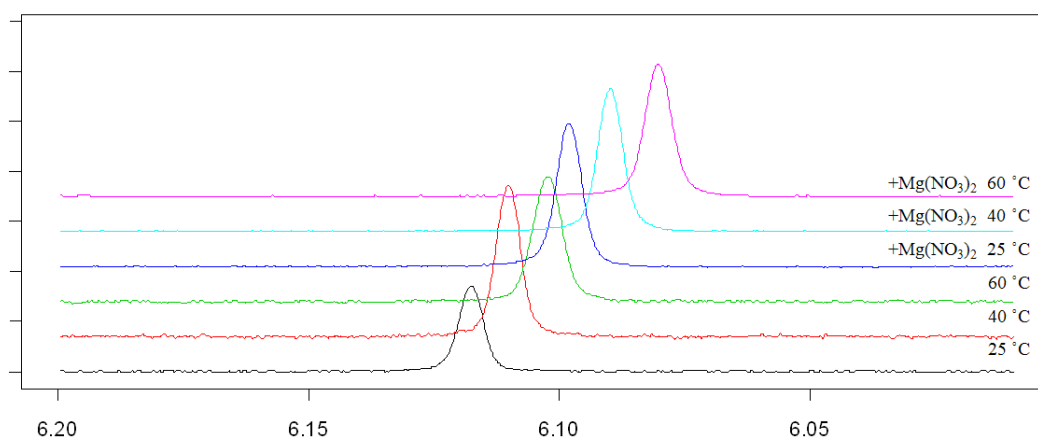
Wykonano analizę ¹H NMR dla związku **41** z i bez dodatku jonów magnezu, w temperaturach 25, 40 oraz 60 °C. Przesunięcia chemiczne (ppm) przypisano następującym lokantom (**Rys. 4.20**): **A** 7,97; **B** 7,93-7,89; **C** 7,78; **D** 7,62; **E** 7,44-7,40; **F** 6,12; **Me¹** 2,35; **Me³** 2,30; **Me²** 2,21; **NH** 14,13 (zanika po dodaniu D₂O). Zmiany przesunięć chemicznych powstałe na skutek dodania soli magnezu zobrazowane są na **Rys. 4.21 a-c**.



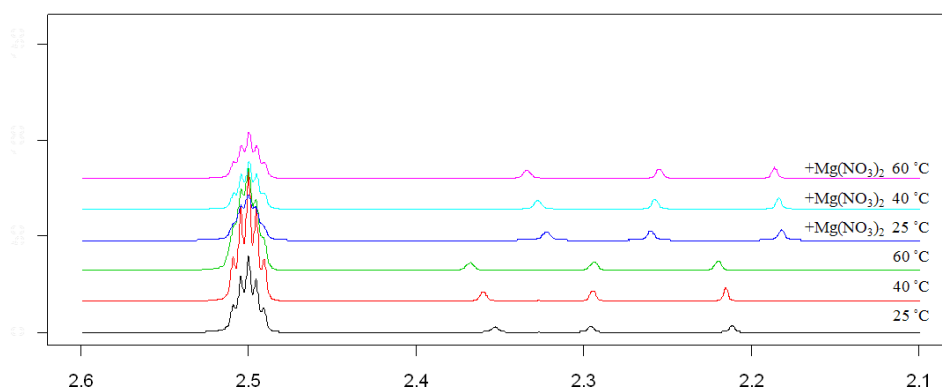
Rys. 4.20. Dwa możliwe konformery pochodnej 41.



Rys. 4.21 a. Fragment aromatyczny widm ^1H NMR związku 41 zarejestrowanych w temperaturach 25, 40 i 60 °C z dodatkiem i bez soli magnezu.



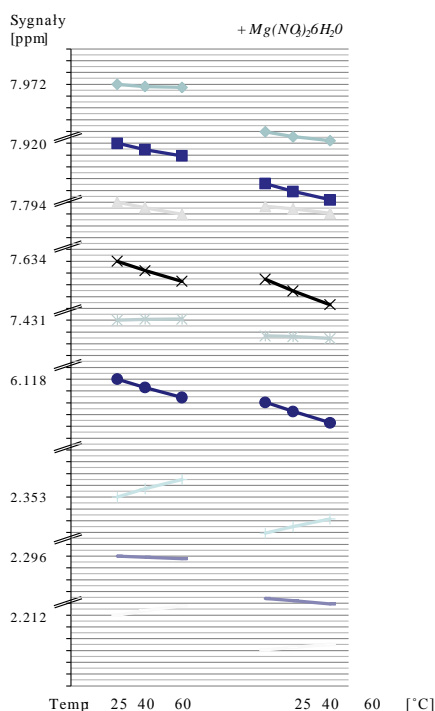
Rys. 4.21 b. Singlet protonu 4-H pirazolu 41 w widmach ^1H NMR pochodnej 41 zarejestrowanych w temperaturach 25, 40 i 60 °C z dodatkiem i bez dodatku soli magnezu.



Rys. 4.21 c. Fragment alifatyczny widm ^1H NMR związku **41 zarejestrowany w różnych temperaturach 25, 40 i 60 °C z dodatkiem i bez dodatku soli magnezu.**

Na **Rys.4.21 a-c** pominięto położenie sygnału wody (3,316 ppm) z uwagi na to, iż zmiany jego położenia są duże w porównaniu z pozostałymi sygnałami i dla temperatury 40 oraz 60 °C wynoszą one odpowiednio: 0,080 i 0,174 ppm. Po dodaniu soli magnezu natomiast zmiany te wyznaczone w temperaturach 25, 40, 60 °C przedstawiają się następująco: 0,355; 0,259 i 0,140 ppm (w odniesieniu do sygnału wody w temp. 25 °C w DMSO). Owe znaczące przesunięcia wartości sygnałów są spowodowane wzrostem stężenia cząsteczek wody (użycie hydratu magnezu) w analizowanych próbach oraz spowodowaną tym samym niewielką zmianą pH. Wraz ze wzrostem temperatury wartości pozostałych przesunięć chemicznych zmieniają się w kierunku wyższych częstotliwości (mniejszych wartości ppm). Położenie jednego z sygnałów grupy tosyłowej ulega istotnym zmianom ($\Delta=0,011$ ppm), drugi sygnał natomiast praktycznie nie ulega fluktuacjom ($\Delta=0,001$ ppm). Świadczy to o tym, iż w jej otoczeniu dochodzi do znaczących oddziaływań ze środowiskiem. Ponadto sygnały pochodzące od protonów grupy **F** również ulegają dużym zmianom ($\Delta=0,015$ ppm), co może wskazywać na możliwość oddziaływania pierścienia aromatycznego, przy którym proton **F** występuje, z rozpuszczalnikiem. Brak wyraźnych zmian położenia sygnałów pochodzących od protonu **A** ($\Delta=0,003$ ppm) determinowane jest najprawdopodobniej względami sterycznymi i wynikać może ze sterycznego przesłaniania przez ugrupowania tosyłu i pirazolu. Sygnały pochodzące od protonów grup **C** i **D** indazolopochodnej **41** istotnie zmieniają swoje położenie (odpowiednio: $\Delta=0,010$ i 0,017 ppm), co sugeruje wysoki poziom oddziaływań ze środowiskiem (jonami magnezu bądź rozpuszczalnikiem). Zmiany położenia

sygnałów odnoszących się do grup metylowych (Me^1 , Me^2) są największe i związane są z wysoką podatnością na oddziaływania oraz możliwością ich rotacji. Zmiany poszczególnych sygnałów w funkcji temperatury zobrazowane są na **Rys. 4.22**.



Rys. 4.22. Zmiany przesunięć chemicznych sygnałów protonów w widmach ^1H NMR związku **41 bez dodatku i z dodatkiem soli magnezu.**

Wyciągnięte powyżej wnioski wydają się być słuszne przy założeniu, że wraz ze wzrostem temperatury położenie linii referencyjnej DMSO pozostaje niezmiennie z uwagi na jego wysokie stężenie (14 mol/dm^3). Analiza zmian położenia przesunięć chemicznych pochodzących wszystkich protonów **41** pozwala wysnuć wniosek, iż linia referencyjna prawdopodobnie nie posiada stałej pozycji przy zmianie temperatury. Nie mogąc bazować na zmianach sygnału rozpuszczalnika, skupiono się na zmianach odległości pomiędzy analizowanymi sygnałami protonów **41**. Przyjęto przy tym założenie, że odległość pomiędzy sygnałami posiadającymi zbliżone wartości ich zmian będą cechowały się stałą odległością pomiędzy nimi. Oznacza to, że, jeżeli jeden sygnał będzie osiągał wyższe wartości, a drugi będzie nie będzie ulegał fluktuacjom lub jego przesunięcie chemiczne będzie osiągać mniejsze wartości, wówczas wzajemna odległość między sygnałami będzie rosła.

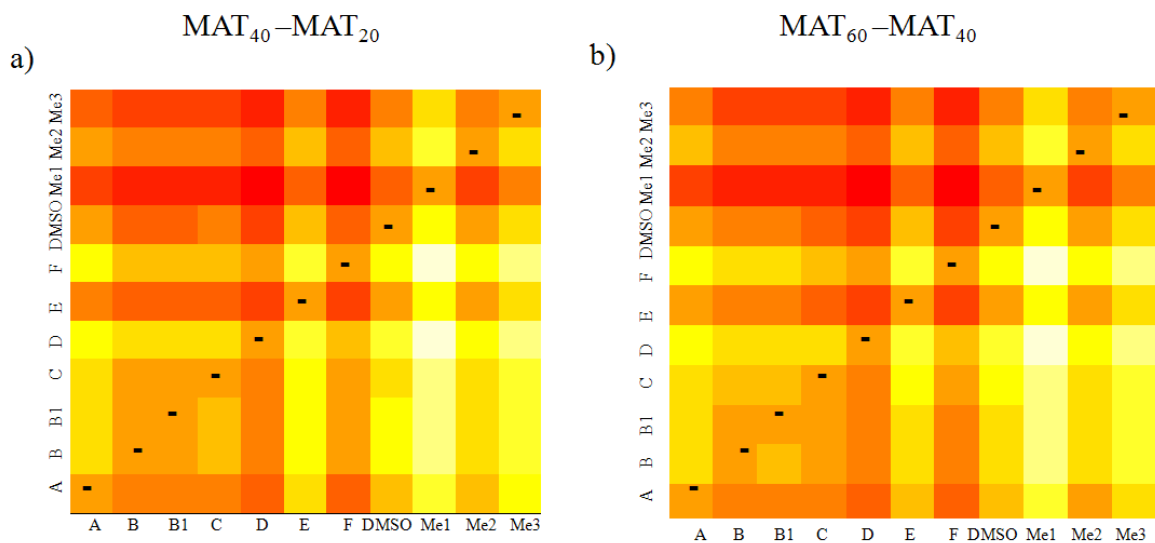
Zanalizowano 11 sygnałów widm NMR wykreślonych w temperaturze 25 °C pochodzących od grup: **A**, **B**, **B1** (dwa sygnały tego samego multipletu celem weryfikacji przyjętej metody) **C**, **D**, **E**, **F** oraz sygnał rozpuszczalnika (DMSO), a także trzech grup metylowych (kolejno **Me¹**, **Me²**, **Me³**). Następnym etapem było zbudowanie odpowiedniej macierzy odległości pomiędzy sygnałami (**MAT**) o wymiarach 11x11. Analogicznie postępowano wobec wyników analizy widm NMR wykreślonych w temperaturach 40 i 60 °C. Kolejnym krokiem było odpowiednie odjęcie macierzy w celu wizualizacji zmian odległości w przesunięciu chemicznym, która następuje pod wpływem temperatury. W wyniku działań na macierzach odnoszących się do temperatur 40 i 20 °C uzyskano macierz MAT40–MAT20 (**Tabela 4.6**), natomiast dla temperatur 60 i 40 °C otrzymano MAT60–MAT40 (**Tabela 4.7**). Analiza stabelaryzowanych wartości liczbowych może nastręczać trudności, dlatego też zaproponowano wizualizację wyników w postaci macierzy, w których wartości liczbowe zostały zastąpione kolorami (**Rys. 4.23-4.24**). Niemalże całkowita zbieżność położenia sygnałów multipletów grup **B** i **B1** świadczy o poprawności przyjętych założeń. Na barwnych wykresach sygnały związane z ugrupowaniami **D** i **E** cechują się większą intensywnością koloru odpowiadającym protonom pierścieniu centralnego, co potwierdza wrażliwość termiczną tych pozycji. Sygnały grup **E** i **Me¹** odpowiadają fragmentowi grupy tosyłowej, -C-C(CH₃)-C, oraz wchodzącej w jej skład grupy metylowej (**Me³**). Grupy metylowa oraz tosyłowa ze wzrostem temperatury ulegają coraz silniejszej rotacji, co skutkuje zmianą udziału poszczególnych konformerów w analizie NMR. Przyjęcie wymienionych założeń daje podstawy do opracowania szybkiej metody oszacowania miejsc wiążących analizowanego związku z uzyskaniem bardzo dobrych wyników.

Sygnaty	A	B	B1	C	D	E	F	DMSO	Me ¹	Me ²	Me ³
A	-	0,0035	0,0035	0,0027	0,0061	-0,0027	0,0052	-0,0019	-0,0091	-0,0010	-0,0059
B	-0,0035	-	0,0000	-0,0008	0,0026	-0,0062	0,0017	-0,0054	-0,0126	-0,0045	-0,0094
B1	-0,0035	0,0000	-	-0,0008	0,0026	-0,0062	0,0017	-0,0054	-0,0126	-0,0045	-0,0094
C	-0,0027	0,0008	0,0008	-	0,0034	-0,0054	0,0025	-0,0046	-0,0118	-0,0037	-0,0086
D	-0,0061	-0,0026	-0,0026	-0,0034	-	-0,0088	-0,0009	-0,0080	-0,0152	-0,0071	-0,0120
E	0,0027	0,0062	0,0062	0,0054	0,0088	-	0,0079	0,0008	-0,0064	0,0017	-0,0032
F	-0,0052	-0,0017	-0,0017	-0,0025	0,0009	-0,0079	-	-0,0071	-0,0143	-0,0062	-0,0111
DMSO	0,0019	0,0054	0,0054	0,0046	0,0080	-0,0008	0,0071	-	-0,0072	0,0009	-0,0040
Me ¹	0,0091	0,0126	0,0126	0,0118	0,0152	0,0064	0,0143	0,0072	-	0,0081	0,0032
Me ²	0,0010	0,0045	0,0045	0,0037	0,0071	-0,0017	0,0062	-0,0009	-0,0081	-	-0,0049
Me ³	0,0059	0,0094	0,0094	0,0086	0,0120	0,0032	0,0111	0,0040	-0,0032	0,0049	-

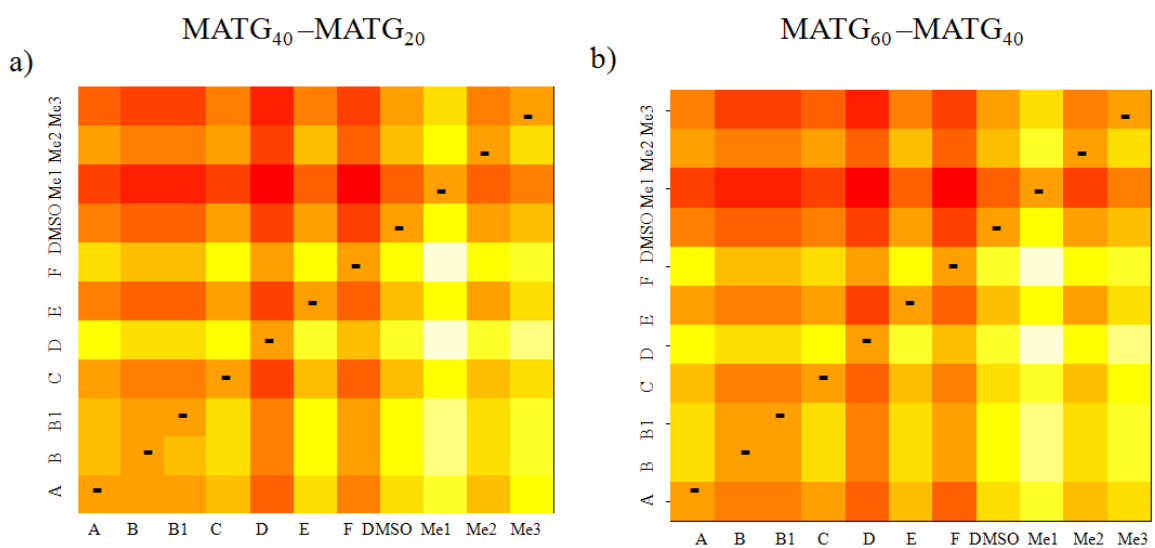
Tabela 4.6. Zmiany przesunięć chemicznych (ppm) pomiędzy sygnałami w widmie ¹H NMR wyznaczonym dla 41 w temperaturze 40 i 20 °C (MAT₄₀–MAT₂₀).

Sygnaty	A	B	B1	C	D	E	F	DMSO	Me ¹	Me ²	Me ³
A	-	0,0045	0,0042	0,0049	0,0083	-0,0009	0,0076	-0,0008	-0,0085	0,0004	-0,0048
B	-0,0045	-	-0,0003	0,0004	0,0038	-0,0054	0,0031	-0,0053	-0,0130	-0,0041	-0,0093
B1	-0,0042	0,0003	-	0,0007	0,0041	-0,0051	0,0034	-0,0050	-0,0127	-0,0038	-0,0090
C	-0,0049	-0,0004	-0,0007	-	0,0034	-0,0058	0,0027	-0,0057	-0,0134	-0,0045	-0,0097
D	-0,0083	-0,0038	-0,0041	-0,0034	-	-0,0092	-0,0007	-0,0091	-0,0168	-0,0079	-0,0131
E	0,0009	0,0054	0,0051	0,0058	0,0092	-	0,0085	0,0001	-0,0076	0,0013	-0,0039
F	-0,0076	-0,0031	-0,0034	-0,0027	0,0007	-0,0085	-	-0,0084	-0,0161	-0,0072	-0,0124
DMSO	0,0008	0,0053	0,0050	0,0057	0,0091	-0,0001	0,0084	-	-0,0077	0,0012	-0,0040
Me ¹	0,0085	0,0130	0,0127	0,0134	0,0168	0,0076	0,0161	0,0077	-	0,0089	0,0037
Me ²	-0,0004	0,0041	0,0038	0,0045	0,0079	-0,0013	0,0072	-0,0012	-0,0089	-	-0,0052
Me ³	0,0048	0,0093	0,0090	0,0097	0,0131	0,0039	0,0124	0,0040	-0,0037	0,0052	-

Tabela 4.7. Zmiany przesunięć chemicznych (ppm) pomiędzy sygnałami w widmie ¹H NMR związku 41 w temperaturze 60 i 40 °C (MAT₆₀–MAT₄₀).

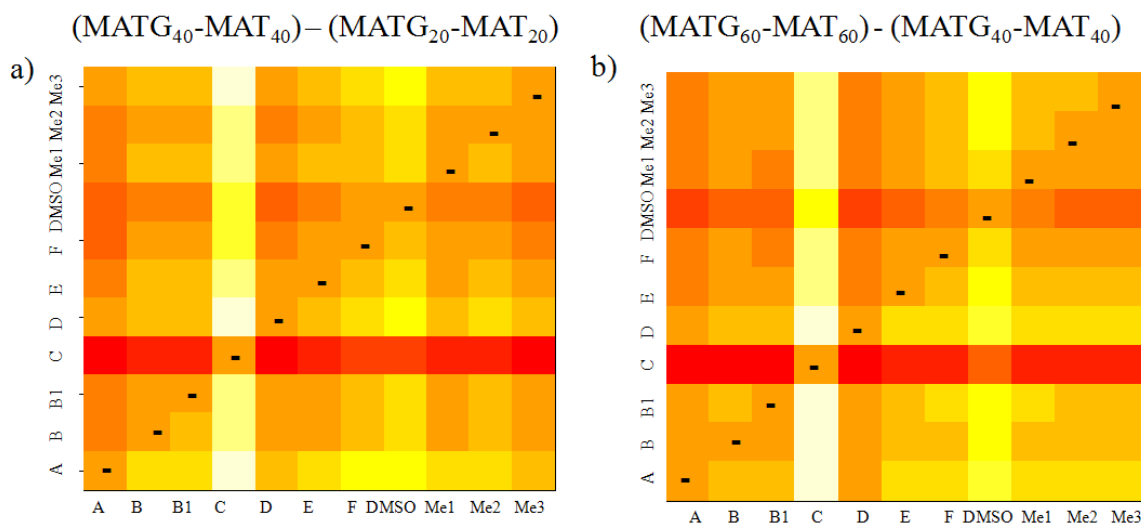


Rys. 4.23. Wizualizacja danych zawartych w Tabelach 4.4 i 4.5: a) kolor czerwony: $\delta=0,0152$ ppm, kolor biały: $-0,0152$ ppm; b) kolor czerwony: $\delta=0,0186$ ppm, kolor biały: $-0,0186$ ppm.

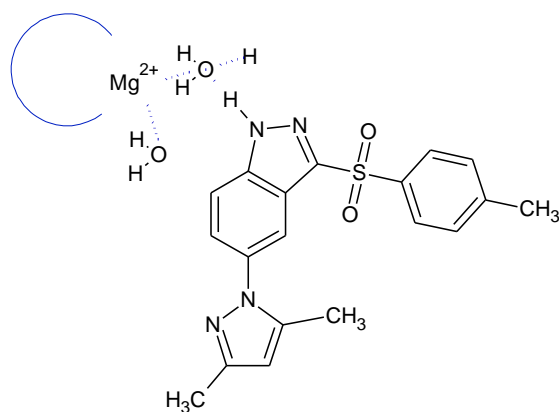


Rys. 4.24. Różnice zmian przesunięć chemicznych w sygnałach widm NMR zarejestrowanych w różnych temperaturach: a) kolor czerwony: $\delta=0,0156$ ppm, kolor biały: $-0,0156$ ppm b) kolor czerwony: $\delta=0,0186$ ppm, kolor biały: $-0,0186$ ppm.

Porównanie położenie sygnałów przed dodaniem i po dodaniu soli magnezu w różnych warunkach termicznych daje się prześledzić w klasyczny sposób, w ujęciu tabelarycznym na drodze analizy wartości liczbowych, lub na drodze graficznej wizualizacji, co pozwala na znacznie szybszą interpretację wyników. W celu określenia wpływu soli magnezu na zmianę wartości przesunięć chemicznych w funkcji temperatury, różnice macierzy obrazujących odległości pomiędzy analizowanymi sygnałami zdefiniowano poniższymi wzorami (I i II):
 I: $(\text{MATG}_{40}-\text{MAT}_{40})-(\text{MATG}_{20}-\text{MAT}_{20})$, II: $(\text{MATG}_{60}-\text{MAT}_{60})-(\text{MATG}_{40}-\text{MAT}_{40})$.
 Otrzymane wyniki zestawiono w formie graficznej (**Rys. 4.25**). Oba zestawienia prowadzą do wniosku, iż przesunięcie chemiczne protonu pochodzącego od pozycji **C** zmienia najbardziej swoje względne położenie po dodaniu soli magnezu. Można przypuszczać, iż kompleksowanie jonu magnezu ma miejsce w pozycji bliskiej temu protonowi, co przedstawiono na **Rys. 4.26**. Zmiana przesunięcia chemicznego protonu pochodzącego od pozycji **C** pociąga za sobą także niewielką zmianę przesunięcia związanego z protonem w pozycji **A** (położonego w pozycji *para* w stosunku do protonu NH pirazolu), poprzez układ wiązań sprzężonych. Położenie względne sygnałów DMSO także ulega zmianie po dodaniu soli magnezu, zatem cząsteczki DMSO solwują jony magnezu.

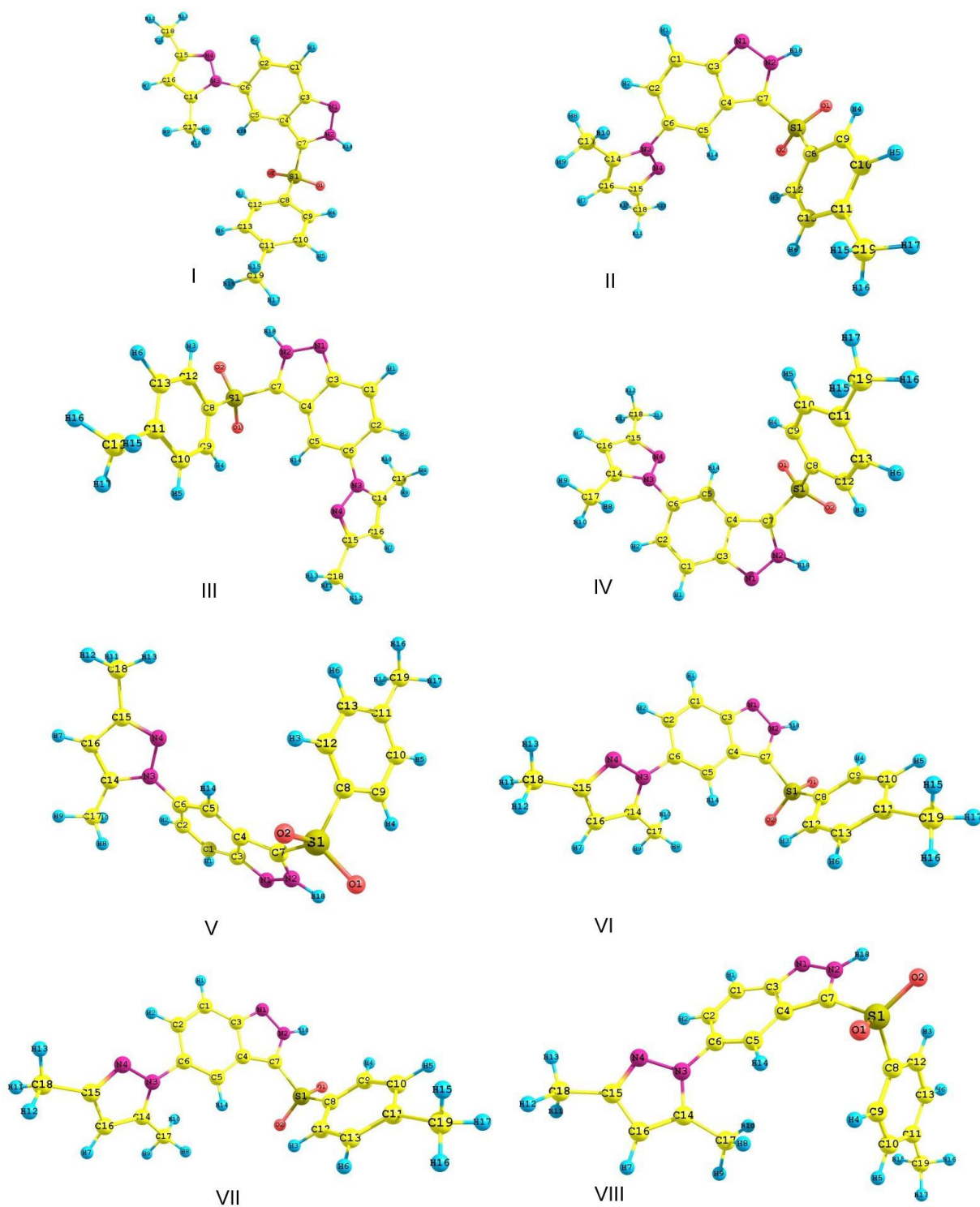


Rys. 4.25. Porównanie zasięgu zmian sygnałów NMR związku 41 przed i po dodaniu soli magnezu: a) kolor czerwony: $\delta=0,0049$ ppm, kolor biały: $-0,0049$ ppm b) kolor czerwony: $\delta=0,0044$ ppm, kolor biały: $-0,0044$ ppm.



Rys. 4.26. Prawdopodobna struktura kompleksu pochodnej **41 z jonami magnezu.**

W celu potwierdzenia otrzymanych wyników, dokonano obliczeń przy pomocy programu *Gaussian G09*¹²⁰. Obliczenia teoretyczne przesunięcia chemicznego w cząsteczce **41** zostały wykonane dla wszystkich znalezionych minimów energetycznych podczas zmiany kąta N20-N19-C6-C5 oraz C9-S10-C13-C14 (konformery **I–VIII** na **Rys. 4.27**). Uzyskane wyniki przesunięcia chemicznego (baza IGLO-II¹³⁷) dla poszczególnych protonów korespondują z eksperymentalnymi danymi sygnałów i cechują się dużą dokładnością (linia rezonansowa dla DMSO wyznaczona metodą B3LYP/6-31G(d,p)//B3LYP/IGLO-II przyjęła wartość 31,54833 ppm). Jedynie dla motywu N-H błąd względny sięga wartości 3 ppm, co spowodowane jest ruchliwością protonu oraz zjawiskiem dynamicznej równowagowej wymiany protonu w sferze solwatacyjnej. Dużym błędem w obliczeniach cechuje się także położenie atomu wodoru D (H2) (błąd względny wynosi ok. 0,4 ppm dla struktury w minimum globalnym). Przyczyny tego należy upatrywać w efektach solwatacyjnych, które decydują o położeniu systemu dimetylopirazolowego. W przypadku konformerów **I–IV**, w których atom wodoru D znajduje się w pobliżu atomu azotu pierścienia pirazolowego, obliczone błędy nie przekraczają 0,09 ppm. W sytuacji kiedy atom wodoru D znajduje się w sąsiedztwie grupy metylowej, błędy te wynoszą już ok. 0,4 ppm.



Rys. 4.27. Wizualizacja wybranych zoptymalizowanych konformerów związku 41. Struktury I-VIII zostały zoptymalizowane przy pomocy metody DFT-B3LYP/6-31G(d,p) z uwzględnieniem modelu rozpuszczalnikowego PCM.

Ponadto obliczenia uwzględniające populacje poszczególnych konformerów wykazują większą korelację z wynikami eksperymentalnymi w przypadkach, w których konformacja jest istotna dla przesłania protonów. W pozostałych przypadkach są zbliżone do rezultatów otrzymanych dla konformeru, który ma największy udział w populacji (17%) (**Tabela 4.8**).

Konformer /Kąt dwuścienny [stopnie]	I	II	V	VI	III	VII	IV	VIII
C-S-C-C	97,49	98,27	99,20	96,46	-99,21	-97,48	-98,52	-97,48
N-N-C-C	-141,00	-38,25	39,90	140,79	-39,89	141,01	38,24	140,99
Występowanie [%]	15,3	8,6	9,9	17,2	9,9	15,3	8,6	15,3

Tabela 4.8. Wykaz parametrów geometrycznych konformerów I–VIII z uwzględnieniem kątów dwuściennych C–S–C–C and N–N–C–C.

Analizę porównawczą obliczonych przesunięć chemicznych poszczególnych konformerów I–VIII z wynikami uzyskanymi na drodze eksperymentalnej przedstawia **Tabela 4.9**, natomiast rozkład błędów względnych ich przesunięć chemicznych przedstawiono w **Tabeli 4.10**.

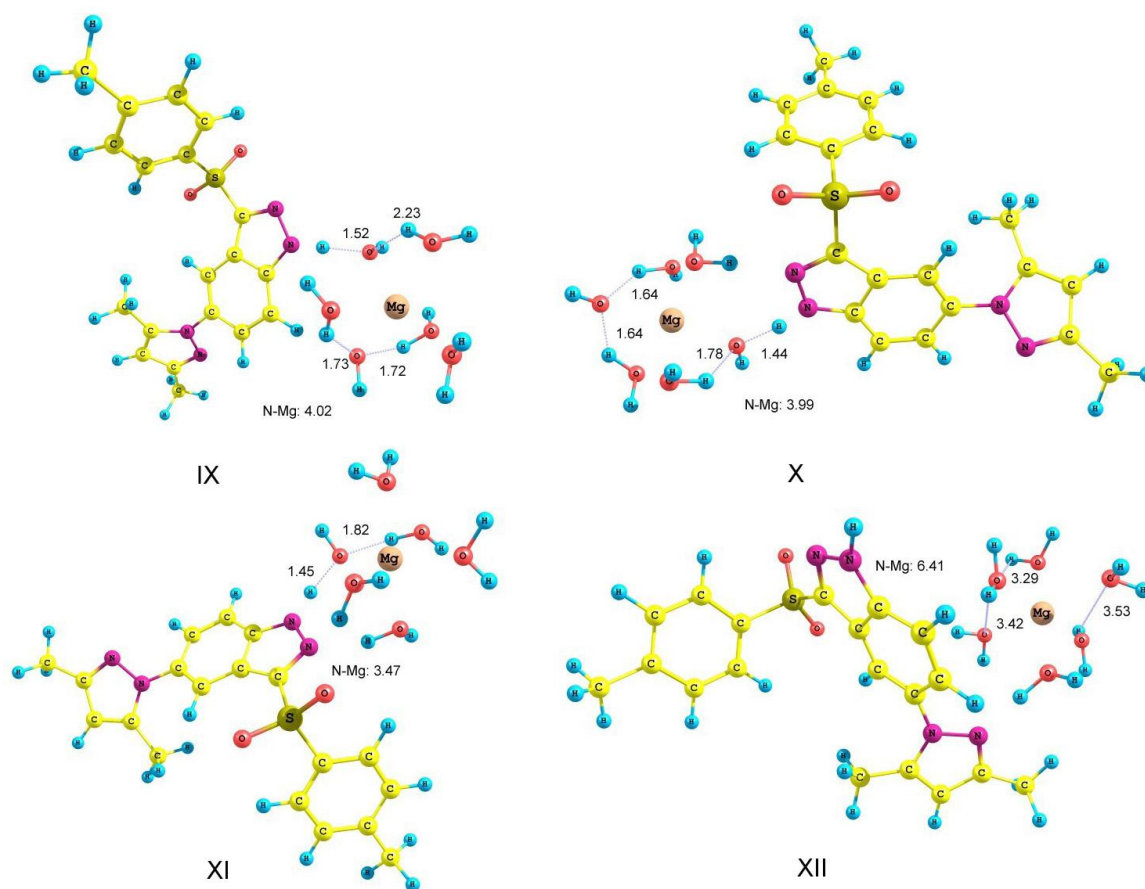
Konformer/Lokant	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	Średnia wartość	Wartość eksperymentalna
Me ¹	2,35	2,31	2,37	2,32	2,37	2,35	2,31	2,35	2,34	2,35
Me ²	2,22	2,26	2,26	2,21	2,26	2,22	2,26	2,22	2,24	2,21
Me ³	2,42	2,29	2,33	2,46	2,33	2,42	2,29	2,42	2,38	2,3
A	7,99	8,36	8,32	7,97	8,32	7,99	8,36	7,99	8,12	7,97
B	8,19	8,15	8,21	8,15	8,21	8,19	8,15	8,19	8,18	7,91
C	8,04	8,03	8,04	8,05	8,04	8,04	8,04	8,04	8,04	7,78
D	8,02	7,71	7,66	8,02	7,66	8,02	7,71	8,02	7,90	7,62
E	7,60	7,56	7,64	7,55	7,64	7,60	7,55	7,60	7,59	7,42
F	6,25	6,22	6,24	6,23	6,24	6,25	6,22	6,25	6,24	6,12
NH	11,27	11,36	11,35	11,26	11,35	11,27	11,36	11,27	11,30	14,3

Tabela 4.9. Teoretyczne i eksperymentalne wartości przesunięć chemicznych (ppm) konformerów I–VIII.

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	Wartość średnia
0,001	-0,036	0,017	-0,029	0,017	0,001	-0,037	0,001	-0,007
0,014	0,053	0,050	0,002	0,050	0,014	0,052	0,014	0,026
0,116	-0,007	0,026	0,158	0,026	0,117	-0,008	0,116	0,084
0,021	0,393	0,352	-0,001	0,352	0,022	0,387	0,021	0,146
0,284	0,238	0,304	0,238	0,304	0,284	0,236	0,284	0,272
0,262	0,254	0,257	0,267	0,257	0,262	0,255	0,262	0,261
0,400	0,087	0,039	0,404	0,039	0,401	0,086	0,400	0,276
0,185	0,136	0,218	0,131	0,218	0,185	0,130	0,185	0,173
0,132	0,100	0,122	0,109	0,122	0,132	0,100	0,132	0,120
-3,027	-2,945	-2,951	-3,038	-2,951	-3,027	-2,940	-3,027	-2,999

Tabela 4.10. Błędy względne obliczonych przesunięć chemicznych konformerów I–VIII.

Rozważania dotyczące zmian teoretycznego przesunięcia chemicznego związku **41** w kompleksie z magnezem wiążą się z trudnością zastosowania analizy konformacyjnej wraz z właściwym oszacowaniem różnych miejsc oddziaływania z jednoczesnym uwzględnieniem sfery solwatacyjnej dla jonów Mg. Z tego też powodu optymalizacja kompleksu związku **41** z jonami magnezu (baza cc-pVTZ^{138,139}) została przeprowadzona w następujących układach (**Rys. 4.28**): **41-Mg(OH)₂x4H₂O (IX)**, **41-Mg(OH)₂x4H₂O (X, drugi izomer)**, **41-Mg(OH)⁺x5H₂O (XI)**, **41-Mg²⁺x6H₂O (XII)**.



Rys. 4.28. Kompleksy związku 41 z jonami Mg²⁺. Struktury IX-XII zostały zoptymalizowane przy pomocy metody DFT-B3LYP/6-31G(d,p) z uwzględnieniem modelu rozpuszczalnikowego PCM.

Szczegółowa analiza przesunięcia chemicznego protonów związanych z lokantami C, D, A dla konformerów **IX–XII** przed i po kompleksowaniu (**Tabela 4.11**) wskazuje na największą jego zmianę w stosunku do protonu związanego z pozycją C. Jednocześnie można przyjąć

hipotezę, że konformer, w którym atom magnezu znajduje się bliżej pierścienia pirazolu indazolopochodnej **41**, najbardziej odpowiada uzyskanym danym eksperymentalnym.

Lokanty	EXP.	IX	X	XI	XII	E1	E2	E3	E4	$\Delta\delta$	E
B/B¹	7,88	8,18	8,176	8,296	8,194	4	4	5	4	8,21	4
A	7,93	8,232	8,25	8,084	8,251	4	4	2	7	8,27	4
D	7,78	7,766	7,905	8,034	7,804	0	2	3	0	7,87	1
C	7,61	9,687	7,834	7,875	7,845	24	3	3	3	8,31	8
E	7,41	7,554	7,562	7,657	7,584	2	2	3	2	7,59	2
F	6,1	6,223	6,228	6,215	6,241	2	2	2	2	6,23	2
Me¹	2,32	2,345	2,453	2,416	2,39	1	6	4	3	2,40	3
Me²	2,26	2,33	2,359	2,366	2,3	3	4	5	2	2,34	3
Me³	2,18	2,23	2,226	2,226	2,31	3	2	2	6	2,25	3

Tabela 4.11. Eksperymentalne (EXP.) i teoretyczne (konformery IX-XII) wartości przesunięć chemicznych w widmach ¹H NMR kompleksu pochodnej **41** z jonami magnezu, procentowe błędy względne (E1-E4), średnia wartość przesunięć ($\Delta\delta$) oraz średni błąd względny (E).

Omówione powyżej wyniki analizy eksperymentalnej NMR oraz obliczeń kwantowo-mechanicznych pozwalają wnioskować, iż **Rys. 4.26** przedstawia najbardziej prawdopodobną strukturę kompleksu związku **41** z jonami magnezu.

4.4. Wyznaczanie współczynnika podziału ($\log P$) otrzymanych indazolopochodnych

Biorąc pod uwagę opisane uprzednio badania biologiczne przeprowadzone dla związków **35** i **39**, interesującym zdawało się być zbadanie niektórych ich właściwości fizykochemicznych mogących mieć wpływ na ewentualną możliwość skierowania ich do kolejnych wstępnych testów przedklinicznych. Ważną cechą substancji będącej potencjalnym kandydatem na lek jest jej lipofilność.^{12,18} Parametr ten ma istotny wpływ na absorpcję, dystrybucję, metabolizm, eliminację i toksyczność badanego związku (właściwości ADME/Tox) oraz aktywność farmakologiczną. Tradycyjną metodą oceny lipofilności jest wyznaczanie współczynnika podziału badanej substancji pomiędzy niemieszające się fazy niepolarną i polarną. W tym celu jako fazy wykorzystuje się *n*-oktanol i wodę.

W dysertacji przeprowadzone zostały teoretyczne obliczenia $\log P$ dla związków **35-37**, **39-41**, a ich wyniki porównano z rezultatami badań doświadczalnych. Wykorzystano w tym celu zoptymalizowane uprzednio konformery związków **35-37**, **39-41** oraz dostępne oprogramowanie, w tym^{12,18}: *ACD Lab/ChemSketch*, *ALOGPS*, *MLOGP*, *KOWWIN*, *XLOGP3* (ostatnie cztery programy zaimplementowane są do platformy *VCCLAB*¹⁴⁰). Wyniki obliczeń zestawiono w **Tabeli 4.12**. Ich rozbieżność wynika z różnych algorytmów obliczeniowych wykorzystywanych przez wymienione oprogramowanie, które szerzej opisane jest piśmiennictwie.^{12,18}

Analizowana substancja	ACD <i>Lab/ChemSketch</i>	ALOGPS	MLOGP	KOWWIN	XLOGP3
35	2,86	3,11	3,32	3,04	3,67
36	3,08	3,10	3,00	3,32	3,82
37	1,37	1,61	3,15	1,41	2,79
39	3,12	3,12	2,72	3,05	3,45
40	4,80	4,20	3,88	4,22	4,78
41	1,97	1,96	2,48	2,18	2,70

Tabela 4.12. Obliczony dla związków 35-37, 39-41 współczynnik podziału ($\log P$).

Celem weryfikacji danych teoretycznych postanowiono przeprowadzić oznaczenie $\log P$ metodami eksperymentalnymi. Zdecydowano się w tym względzie na wykorzystanie metod o mechanizmie podziałowym - technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC^{141,142}, wykorzystując w tym celu chromatograf cieczowy HPLC Merck Hitachi L-6000A Pump z detektorem UV LC3. Do wykreślenia krzywej wzorcowej wytypowano następujące substancje: anilina, benzen, toluen, **9**, 9-etylo-3-nitro-9H-karbazol (9-Et-3-NO₂-karbazol w Tabeli 4.14), **10**, alkohol benzylový, naftalen oraz acetofenon. Jako fazę ruchomą użyto mieszaninę^{141,142}: acetonitryl–metanol–KH₂PO₄ (pH 6,7; stężenie 20 mmol/dm³)=3:1:3, natomiast jako fazę stacjonarną - kolumnę Lichrospher RP-18 (250x4mm, 5 μm). Na podstawie średniego czasu retencji trzech nastrzyków (Tabela 4.13) dla każdej substancji wyznaczono parametry: k' oraz $\log k'$. Wartości $\log P$ użytych wzorców uzyskano z piśmiennictwa¹⁴¹ oraz baz danych: *eMolecules*¹⁴³, *ChemSpider*¹⁴⁴. Z uwagi na znikomą rozpuszczalność związku **39** w użytej fazie ruchomej pochodnej chinoliny nie uwzględniono w dalszych badaniach.

Analizowana substancja	Poszczególne czasy retencji			Średni czas retencji z 3 nastrzyków
35	4,225	4,279	4,181	4,228
36	7,546	7,555	7,566	7,556
37	2,471	2,519	2,477	2,489
40	2,218	2,258	2,232	2,238
41	4,884	4,898	4,873	4,885

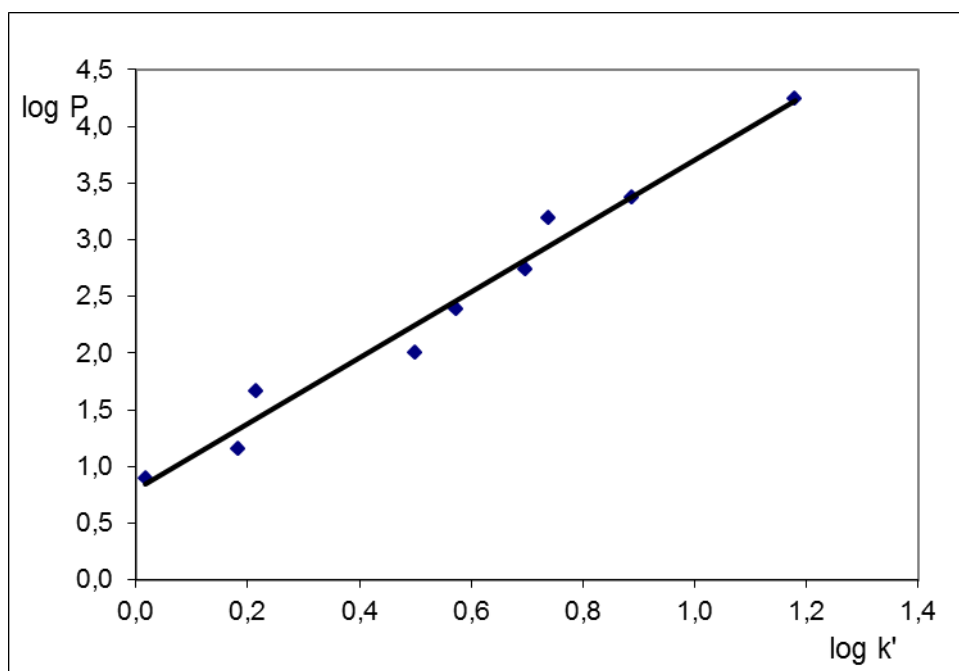
Tabela 4.13. Czasy retencji w analizie HPLC związków 35-37, 40-41.

n=9						
Wzorce	log k'	k'	RT	log P	Parametry krzywej	
					y=ax+b	
					a	2,917847682
anilina	0,0176487	1,0415	2,215	0,9	błąd	0,396196318
benzen	0,4992308	3,1567	4,51	2,01	b	0,789098315
toluen	0,6975266	4,9834	6,492	2,74	błąd	0,259827862
					sa	0,16752487
					sb	0,10986379
					sy	0,175780765
9	0,5739512	3,7493	5,153	2,39	ta	17,41740007
9-Et-3-NO ₂ - karbazol	1,1799963	15,1355	17,507	4,25	tb	7,18251499
10	0,7384298	5,4756	7,026	3,19	r	0,988658672
alk.benzylowy	0,1823173	1,5217	2,736	1,16		
naftalen	0,8874514	7,7171	9,458	3,37		
acetofenon	0,2162085	1,6452	2,87	1,66		
Ekstrapolacja wyników						
			RT	k'	log k'	log P
	35		4,228	2,896774194	0,461915	2,136894885
	36		7,556	5,9640553	0,775542	3,052010755
	37		2,489	1,294009217	0,111937	1,11571451
	40		2,238	1,062672811	0,0264	0,866128237
	41		4,885	3,502304147	0,544354	2,377439959

Tabela 4.14. Wyniki pomiaru log P metodą HPLC; n-liczba pomiarów, RT-czas retencji,

$$k' = (t - t_0) / t_0; t_0 - \text{martwy czas retencji.}$$

Na podstawie uzyskanych dla substancji wzorcowych wyników wykreślono krzywą kalibracyjną (Rys. 4.29) o stosunkowo wysokim współczynniku regresji ($r=0,99$). na podstawie której metodą ekstrapolacji oszacowano wartości log P badanych związków (Tabela 4.14).



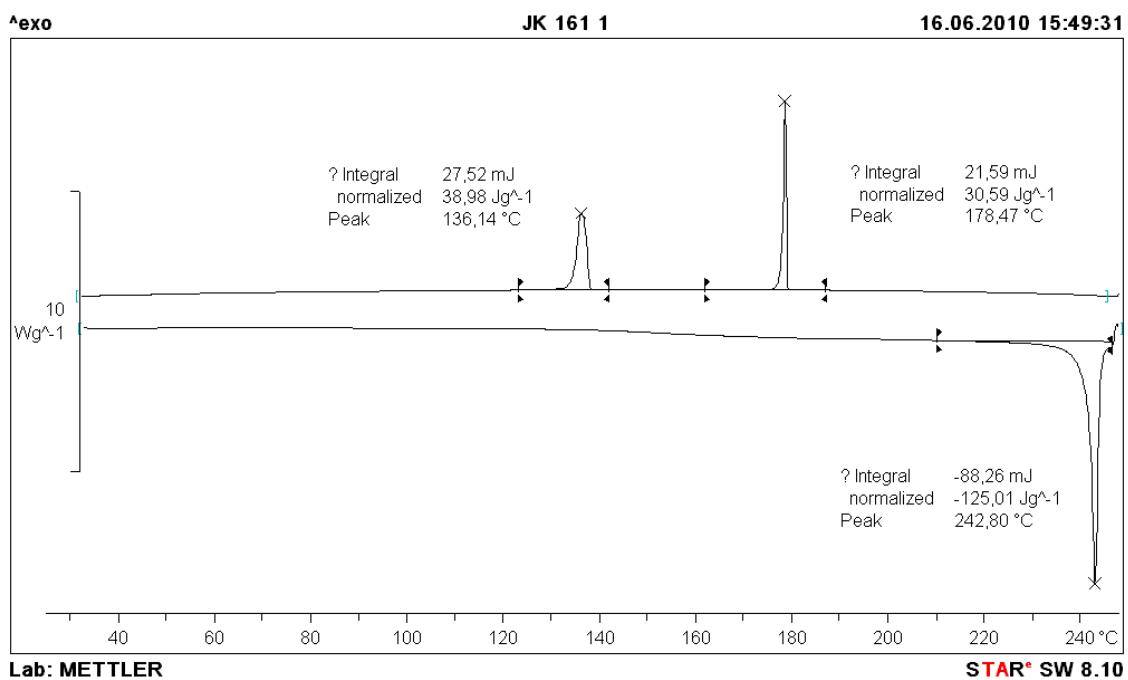
Rys. 4.29. Krzywa kalibracyjna pomiaru $\log P$ metodą HPLC uzyskana dla wzorców; parametry równania krzywej zdefiniowane są w Tabeli 4.14.

Na podstawie uzyskanych danych stwierdzono, iż największą korelację wyników analizy eksperymentalnej $\log P$ z rezultatami obliczeń zaobserwować można w przypadku związków **35-37, 41**. Pozostałe rozbieżności wynikać mogą z różnorodnych algorytmów obliczeniowych implementowanych w wykorzystanych programach komputerowych (analiza teoretyczna $\log P$) oraz niedoskonałości fazy ruchomej (pomiar HPLC). W przyszłości próby zamierza się rozszerzyć na pozostałe związki otrzymane podczas realizacji pracy doktorskiej wraz z modyfikacją fazy ruchomej, jak również planuje się, w zakresie badań *in silico*, skorzystanie z metodyki *uczenia maszynowego (machine-learning techniques)*.^{145,146}

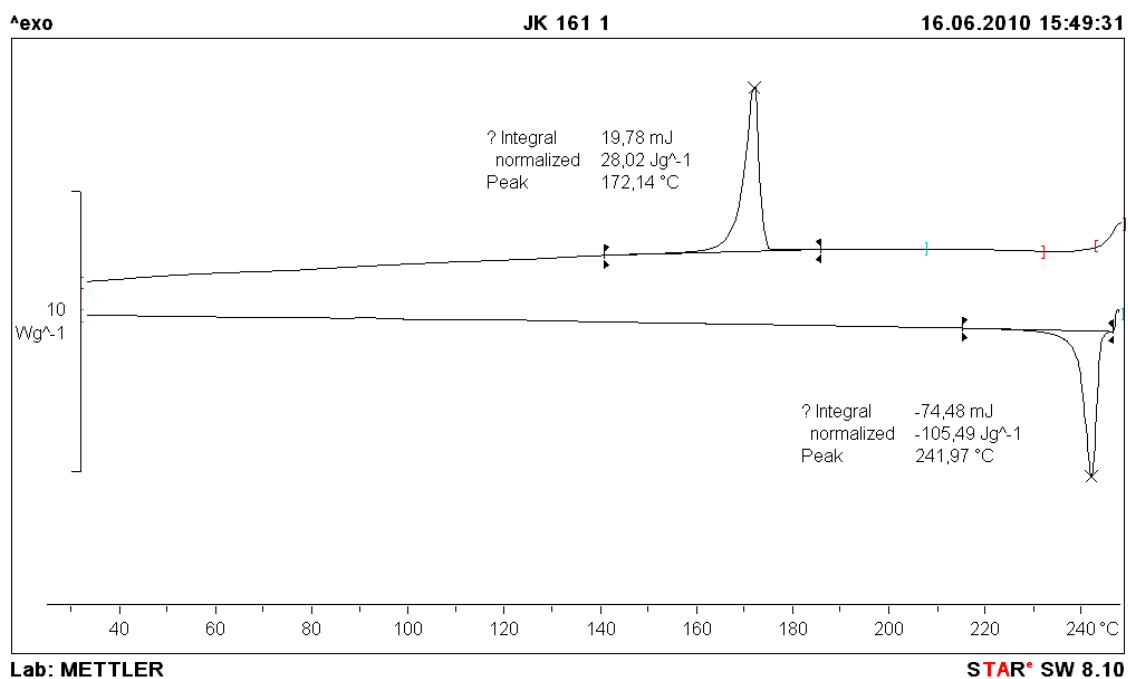
4.5. Termoanaliza związku 35

W końcowej części pracy podjęto badania kalorymetryczne związku 35 metodą DSC (*Differential Scanning Calorimetry*, różnicowa analiza kalorymetryczna). Analiza miała na celu oszacowanie możliwości otrzymania różnej postaci krystalicznej (bądź amorficznej) związku 35, a związana była z ogólnie niską rozpuszczalnością tej grupy związków w rozpuszczalnikach powszechnie używanych w badaniach farmakologicznych i przedklinicznych.

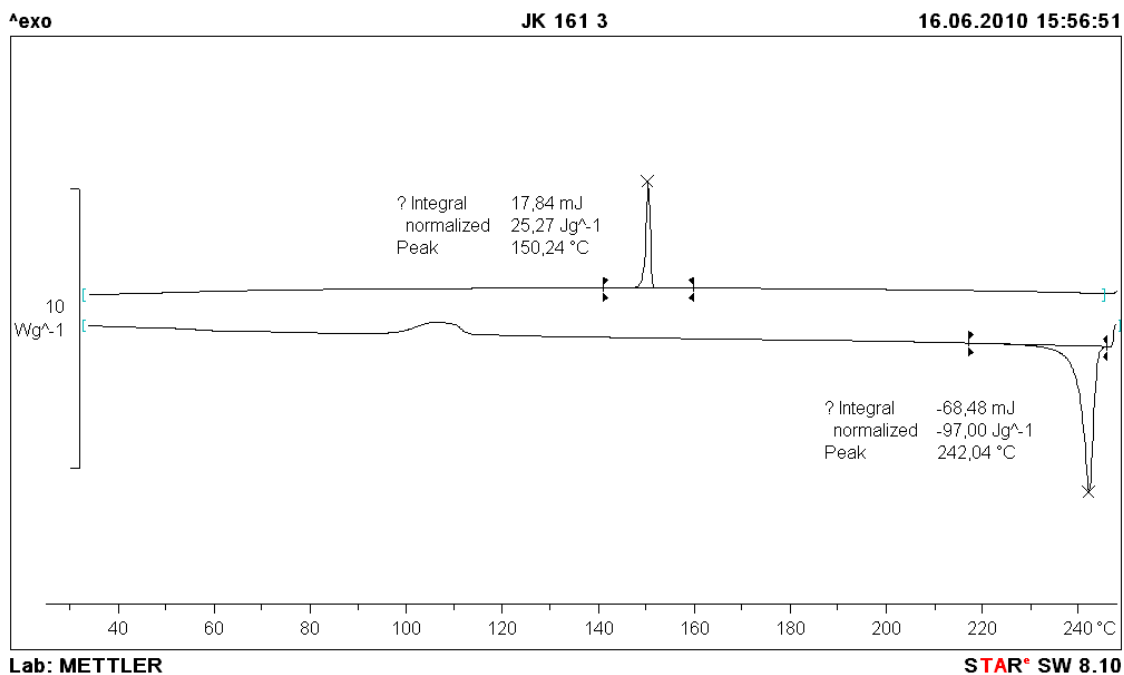
Rys. 4.30 przedstawia zmianę strumienia cieplnego w funkcji temperatury. Podczas pierwszego podgrzewania widoczny jest pik endotermiczny związany z topnieniem związku ($T_m=242\text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta H=125\text{ J/g}$). Pik związany z topnieniem związku podczas ogrzewania (**Rys. 4.31 i 4.32**) jest mniejszy ($\Delta H=105$ i 97 J/g). Wynika to z historii próbki - na **Rys. 4.30** widoczny jest diagram związku 35 wykrytowanego z roztworu, w doświadczeniu drugim i trzecim natomiast dochodzi do krystalizacji podczas chłodzenia. Wówczas to pojawiają się egzotermiczne piki związane z krystalizacją związku (chłodzenie). W doświadczeniu pierwszym (**Rys. 4.30**) związek chłodzono z szybkością $10\text{ }^\circ\text{C/min}$, w doświadczeniu drugim - $50\text{ }^\circ\text{C/min}$, a w ostatnim - ponownie $10\text{ }^\circ\text{C/min}$. Podczas chłodzenia ze zmianą szybkości w czasie drugiego i trzeciego chłodzenia dochodzi do zaniknięcia plików egzotermicznych i do przesunięcia piku (na **Rys. 4.31** $T=172\text{ }^\circ\text{C}$, na **Rys. 4.32** $T_1=150\text{ }^\circ\text{C}$). Nie ustalono przyczyny tego zjawiska, ale powstałe piki są związane z procesem krystalizacji. Pomocne w tym względzie może okazać się zastosowanie w najbliższej przyszłości technik *modulowanej analizy DSC*.



Rys. 4.30. Analiza DSC związku 35 - doświadczenie pierwsze.



Rys. 4.31. Analiza DSC związku 35 - doświadczenie drugie.



Rys. 4.32. Analiza DSC związku 35 - doświadczenie trzecie.

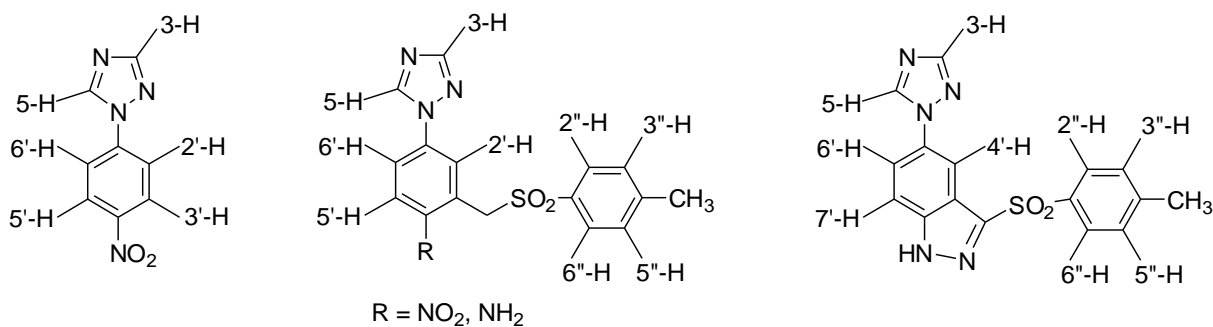
Wykazano przy tym, iż badany związek **35**, występując w postaci krystalicznej, podczas zmian w komórce elementarnej w funkcji temperatury przechodzi przez tzw. *przejścia szkliste*, jednakże nie można otrzymać jego postaci amorficznej.

5. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Przebieg przeprowadzanych reakcji oraz jednorodność uzyskanych produktów sprawdzano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC), wykorzystując płytki chromatograficzne pokryte żel krzemionkowym Kieselgel 60F₂₅₄ firmy Merck. Plamy na rozwiniętych chromatografach uwidaczniano wykorzystując światło lampy UV o długości fali $\lambda=254$ nm i 360 nm. Temperatury topnienia wyznaczano na aparacie Bötius i są one nieskorygowane. Widma ¹H NMR wykonano na aparacie Varian Gemini 300VT (300MHz) lub Bruker VNMRS-400 (400MHz), stosując tetrametylosilan (TSM) jako wzorzec wewnętrzny, z kolei widma ¹³C NMR wykonano przy częstotliwości 75 MHz. Wartość przesunięć chemicznych δ podano w ppm, a stałe sprzężenia *J* w Hz. Niskorozdzielcze widmo masowe (EI MS) wykonano na aparacie AMD 402. Badanie spektralne w podczerwieni (IR) wykonano na aparacie Specord 75-IR.

Obliczenia teoretyczne prowadzone były w oparciu o dostęp do klastra obliczeniowego Reef zlokalizowanego w Poznańskim Centrum Superkomputerowo-Sieciowym, PCSS (grant obliczeniowy nr 92/2011) z użyciem programu *Gaussian G09*.¹²⁰

System numeracji protonów w opisie widm ¹H NMR na przykładzie pochodnych 1,2,4-triazolu:



Do reakcji użyto oczyszczonych i suchych rozpuszczalników. Dimetylsulfotlenek (DMSO) odwodniono za pomocą sit molekularnych. Dimetyloformamid absolutny (DMF) był handlowym produktem firmy Fluka, przechowywanym nad sitami i w atmosferze gazu obojętnego.

Związki: 4-nitropirazol (**2**), 5-nitroindazol (**3**), *p*-chloronitrobenzen (**9**), 1-nitronaftalen (**10**), 6-nitrochinolina (**11**), 4-(nitrofenylo)-1*H*-pirol (**12**), *p*-fluoronitrobenzen, 2-metyloimidazol, 1,2,4-triazol, 1*H*-indol, 9*H*-karbazol, jodek metylu, *p*-nitrofenylohydrazyna, acetyloaceton oraz siarczan (VI) dimetylu były związkami komercyjnie dostępnymi (firma Sigma Aldrich).

Pomiar kalorymetryczny (DSC) dla pochodnej **35** dokonany został na aparacie DSC 820 firmy Mettler Toledo AG przez zespół naukowy Katedry Technologii Postaci Leku UMP (dr hab. Marek Pyda, prof. PR oraz mgr Marcin Skotnicki). Kalorymetr został skalibrowany za pomocą indu, określając temperaturę topnienia ($T_f=156,6$ °C) i ciepło topnienia ($\Delta H_f=28,54$ J/g). Pomiarów dokonano w aluminiowym tyglu o pojemności 40 μ l, jako odnośnik użyto tygla aluminiowego o zbliżonej masie. Próbkę o masie 0,706 mg ogrzewano z szybkością 10 °C/min i chłodzono z następującymi szybkościami: 10, 50 i 10 °C/min w zakresie temperatur od 25 °C do 245 °C, przy przepływie azotu: 30 ml/min. Wyniki opracowano za pomocą programu STAR[®] v. 8.1 (Mettler-Toledo). Materiał do badań odważano na wadze precyzyjnej MXA 5/1 firmy Radwag z dokładnością do 1 μ g.

Badania rentgenograficzne monokryształu **19** i **35** wykonane zostały w Pracowni Rentgenostrukturalnej przez zespół naukowy Katedry Chemii Organicznej UMP (dr hab. Andrzej Gzella, dr Anna Froelich, mgr Marcin Kowiel) na dyfraktometrze rentgenowskim typu KM-4 z wyposażeniem firmy KUMA Diffraction.

Pomiar współczynnika podziału ($\log P$) został wykonany przez zespół naukowy Katedry Chemii Farmaceutycznej UMP (dr hab. Izabela Muszalska, dr Agnieszka Sobczak, mgr Monika Leśniewska) na chromatografii HPLC Merck Hitachi L-6000A Pump z detektorem UV LC3 (254 nm). Jako fazę ruchomą użyto mieszaninę^{141,142}: acetonitryl–metanol– KH_2PO_4 (pH 6,7; stężenie 20 mmol/dm³)=3:1:3, natomiast jako fazę stacjonarną - kolumnę Lichrospher RP-18 (250x4mm, 5 μ m). Przepływ wynosił 1,5 ml/min.

Badania biologiczne pochodnych **35** i **39**, z użyciem ludzkich komórek nowotworowych HT29 (raka okrężnicy), zostały przeprowadzone przez zespoły naukowe Katedry Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej (prof. dr hab. Maria Rybczyńska, dr Ewa Totoń) oraz Katedry Biochemii Farmaceutycznej (dr Ewa Ignatowicz) UMP i swym zakresem obejmowały testy: MTT, technikę mikroskopii fluorescencyjnej z zastosowaniem barwnika

DAPI, technikę cytometrii przepływowej, analizę poziomu białek biorących udział w apoptozie komórki (Bax i Bcl-2) w odniesieniu do kamptotecyny oraz ocenę stopnia fragmentacji DNA, w tym techniki: elektroforezy, Western Blot i immunoidentyfikacji z zastosowaniem odpowiednich przeciwciał.

5.1. Synteza substratów.

5.1.1. Synteza sulfonu chlorometylowo-*p*-toluילowego (1).

Mieszaninę 4-toluenosulfonianu sodu (35,60 g; 0,20 mol) i bromochlorometanu (31 g; 0,24 mol) w DMSO (100 cm³) ogrzewano na łaźni wodnej przez 4 godziny. Po tym czasie mieszaninę ochłodzono i wylano do wody, a następnie ekstrahowano dichlorometanem (5x100 cm³). Wyciąg organiczny przemyto wodą i, po osuszeniu MgSO₄, rozpuszczalnik oddestylowano. Po krystalizacji pozostałości w CCl₄ otrzymano 41 g związku **1** (57%) w postaci bezbarwnych kryształów o temp. topn. 79–81 °C (lit. 80–81 °C).¹⁰⁰

5.1.7. Otrzymywanie związku 2.

Do ciepłej (ok. 30 °C) zawiesiny 4-nitropirazolu (3,55 g; 0,03 mol) w 50 ml jednomolowego roztworu NaOH dodawano porcjami siarczan dimetylu (4,02 g; 31,8 mmol; 3,02 cm³), a następnie mieszano przez 1 godzinę, a następnie mieszaninę wychłodzono w łaźni lodowej. Wytrącony osad odsączono, przemyto wodą, osuszono i przekrystalizowano w etanolu, uzyskując **2**.

1-Metylo-4-nitro-1*H*-pirazol (2)

Błyszczące płytki (2,3 g; 76 %) o temp. topn. 91–92 °C (EtOH, lit.¹⁰⁷ 92–93 °C).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3,99 (s, 3H, CH₃); 8,06 (s, 1H, 5-H); 8,16 (s, 1H, 3-H).

5.1.4. Otrzymywanie związku 3.

Do roztworu 5-nitroindazolu (1,63 g, 10 mmol) w DMF (30 cm³) dodano sproszkowanego bezwodnego węglanu potasu (4,70 g, 34 mmol), następnie wkroplono jodek metylu (0,62 cm³, 10 mmol). Mieszaninę reakcyjną intensywnie mieszano w temperaturze pokojowej przez 3 godziny, a następnie wylano na 60 cm³ wody. Wytrącony osad przesączono przez celit, celit

przemyto acetonem i rozpuszczalnik oddestylowano. Suchą pozostałość przekrystalizowano z metanolu, uzyskując **3**.

1-Metylo-5-nitroindazol (3)

Jasnożółte igły (0,97 g, 55%) o temp. topn. 158–161 °C (MeOH, lit.¹⁰⁴ 160–163 °C) (MeOH).

5.1.5. Otrzymywanie związku 4.

Do ciepłego roztworu *p*-nitrofenylohydrazyny (2,0 g; 20 mmol) w etanolu (25 cm³) dodano w jednej porcji acetyloaceton (2,06 cm³; 20 mmol), a następnie rozcieńczony roztwór kwasu solnego (1,5 cm³ stężonego roztworu HCl w 4,0 cm³ wody) i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 30 min. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną pozostawiono do ochłodzenia do temperatury pokojowej, a następnie wytrącony osad przesączono i przekrystalizowano z etanolu, otrzymując związek **4**.

3,5-Dimetylo-1-(4-nitrofenylo)-1*H*-pirazol (4)

Jasnożółte igły (2,2 g; 74%) o temp. topn. 97–100 °C (EtOH, lit.¹⁰⁵ 154–156 °C).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2,31 (s, 3H, CH₃, Ts); 2,43 (s, 3H, CH₃); 6,01 (s, 1H, 4-H); 7,67 (dd, *J*=9 i 2 Hz, 2H, 3'-H i 5'-H); 8,32 (dd, *J*=9 i 2 Hz, 2H, 2'-H i 6'-H).

5.1.2. Reakcje otrzymywania nitroarenów 5-7.

Do roztworu 10 mmol 2-metyloimidazolu (0,82 g), 1,2,4-triazolu (0,69 g), indolu (1,17 g) w DMSO (25 cm³) dodano *p*-fluoronitrobenzen (10 mmol, 1,41 g), a następnie sproszkowanego bezwodnego węgla potasu (10 mmol, 1,38 g) i intensywnie mieszano w temp. ok. 80 °C przez 24 (2-metyloimidazol), 44 (1,2,4-triazol) lub 19 (indol) godzin, a następnie wylano do wody (20 cm³). Wytrącony osad przesączono, przemyto wodą i przekrystalizowano.

2-Metylo-1-(4-nitrofenylo)-1*H*-imidazol (5)

Żółtozielone płytki (1,20 g; 59%) o temp. topn. 137–138 °C (MeOH, lit.¹⁰¹ 138–140 °C).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 2,45 (s, 3H, CH₃), 7,08 (d, *J*=4,5 Hz, 1H, 4-H lub 5-H imidazol), 7,09 (d, *J*=4,5 Hz, 1H, 4-H lub 5-H imidazol), 7,49–7,54 (m, 2H, 2'-H i 6'-H), 8,36–8,41 (m, 2H, 3'-H i 5'-H).

MS (*m/z*, %): 203 (100), 156 (21), 116 (28), 88 (23).

1-(4-Nitrofenylo)-1,2,4-1*H*-triazol (6)

Kremowe płytki (0,92 g; 61%) o temp. topn. 128–130 °C (EtOH, lit.¹⁰² 167–169 °C).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,92–7,95 (m, 2H, 2'-H i 6'-H), 8,18 (s, 1H, 3-H), 8,40–8,44 (m, 2H, 3'-H i 5'-H), 8,72 (s, 1H, 5-H).

MS (m/z, %): 190 (100), 136 (28), 105 (2), 90 (21), 63 (15).

1-(4-Nitrofenylo)-1*H*-indol (7)

Żółty drobnokrystaliczny proszek (1,63 g; 69%) o temp. topn. 128–130 °C (EtOH, li.¹⁰³ 131–132°C).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 6,78 (dd, *J*=3 i 0,8 Hz, 1H, 3-H), 7,23 (td, *J*=9 i 1 Hz, 1H, 5-H), 7,30 (td, *J*=9 i 1 Hz, 1H, 6-H), 7,38 (d, *J*=3 Hz, 1H, 2-H), 7,64–7,72 (m, 4H, 4-H i 7-H oraz 2'-H i 6'-H), 8,38–8,42 (m, 2H, 3'-H i 5'-H).

MS (m/z, %): 238 (100), 191 (48), 165 (4), 139 (1), 95 (4), 63 (3).

5.1.3. Otrzymywanie związku 8.

Metoda a

Do roztworu karbazolu (1,67 g, 10 mmol) oraz *p*-chloronitrobenzenu **9** (1,57 g, 10 mmol) w DMSO (25 cm³) dodano sproszkowanego bezwodnego węgla potasu (1,38 g, 11 mmol) i intensywnie mieszano, ogrzewając w temp. ok. 150 °C przez 43 godziny, a następnie ciecz zdekantowano do wody (30 cm³). Wytrącony osad przesączono, przemyto wodą i przekrystalizowano z mieszaniny etanol–aceton 7:4, otrzymując związek **8**.

9-(4-Nitrofenylo)-9*H*-karbazol (8)

Żółte płytki (2,0 g; 70%) o temp. topn. 209–212 °C z rozkładem (EtOH–aceton 7:4, lit.¹⁰⁶ 209–211 °C).

¹H NMR (300 MHz, aceton-*d*₆) δ: 7,35 (ddd, *J*=8; 7 i 0,9 Hz, 2H, 3-H i 6-H karbazol); 7,48 (ddd, *J*=8; 7 i 1 Hz, 2H, 2-H i 7-H karbazol); 7,58 (ddd, *J*=8; 0,9 i 0,7 Hz, 2H, 1-H i 8-H karbazol); 7,96–8,01 (m, 2H, 2'-H i 6'-H benzen); 8,24 (ddd, *J*=8; 0,9; 0,7 Hz, 2H, 4-H i 5-H karbazol); 8,54–8,59 (m, 2H, 3'-H i 5'-H benzen).

MS (m/z, %): 288 (100), 241 (11), 166 (0,4), 120 (3), 63 (0,4).

Metoda b

Do roztworu karbazolu (0,87 g; 5 mmol) oraz *p*-chloronitrobenzenu **9** (0,78 g; 5 mmol) w DMF (8 cm³) dodano sproszkowanego bezwodnego węglanu potasu (2,8 g; 20 mmol) i intensywnie mieszano, ogrzewając w warunkach MAOS (współczynnik przenikania kolby KT=169, t_{\min} =100 °C, t_{\max} =120 °C, P=500 W) przez 9 godzin, a następnie ciecz zdekantowano do wody (30 cm³). Wytrącony osad przesączono. Analiza TLC mieszaniny wykazała obecność czterech plam o współczynnikach R_f (octan etylu) wynoszących odpowiednio: 0,83 (prawdopodobnie karbazol), 0,49 (prawdopodobnie **8**), 0,51 (prawdopodobnie **9**) i 0,47. Rozdzielenie mieszaniny na drodze chromatografii kolumnowej nie powiodło się.

5.2. Reakcje nitroarenów 2-12 z prekursorem karboanionu 1.

Zawiesinę 5 mmol nitroarenu: **2** (0,63 g), **3** (0,89 g), **4** (1,08 g), **5** (1,86 g), **6** (1,79 g), **7** (2,03 g), **8** (1,44 g), **9** (0,79 g), **10** (0,87 g), **11** (0,87 g), **12** (0,94 g) oraz 5 mmoli sulfonu **1** (1,02 g) wymieszano w DMSO (10 cm³) i dodano sproszkowany KOH (2,0 g), jednocześnie mieszając i chłodząc zimną wodą. Mieszanie kontynuowano przez: 45 min (**8**, **11**, **12**); 1 godz. (**2**, **4**, **6**); 1 godz. 25 min (**10**); 1 godz. 30 min (**7**, **9**); 1 godz. 45 min (**5**); 2 godz. (**3**). Mieszaninę reakcyjną wylano na 2% kwas solny (100 cm³) i ekstrahowano za pomocą dichlorometanu. Połączone frakcje dichlorometanowe przemyto wodą i osuszono bezwodnym siarczanem magnezu. Pozostałość po odparowaniu rozpuszczalnika przekrystalizowano.

4-Chloro-2-(4-(metylofenylosulfonyl)metylo)-1-nitrobenzen (**13**)

Jasnobrązowe płytki (0,85 g; 52%) o temp. topn. 144–146 °C z rozkładem (benzen, lit.¹¹² 143–145 °C).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 2,40 (s, 3H, CH₃); 4,53 (s, 2H, CH₂); 6,85 (d, J =2 Hz, 1H, 3-H); 7,39-7,46 (m, 2H, 3'-H i 5'-H, Ts); 7,55-7,67 (m, 2H, 2'-H i 6'-H, Ts); 7,84 (dd, J =9 Hz i 3 Hz, 1H, 5-H); 7,97-8,09 (d, 1H, 6-H).

2-(4-Metylofenylosulfonylometylo)-1-nitronaftalen (**14**)

Brązowe słupki (0,82 g, 48%) o temp. topn. 174–176 °C (EtOH, lit.^{147,148} 175–176 °C).

1-Metylo-5-[(4-metylofenylo)sulfonyl]metylo]-4-nitro-1*H*-pirazol (**15**)

Piaskowe słupki (1,48 g; 73%) o temp. topn. 170–171 °C (EtOH, lit.¹¹⁵ 168–169 °C).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 2,44 (s, 3H, CH_3 , Ts); 4,09 (s, 3H, N-CH_3); 4,94 (s, 2H, CH_2); 7,27–7,31 (m, 2H, 3'-H i 5'-H, Ts); 7,56–7,58 (m, 2H, 2'-H i 6'-H, Ts); 8,01 (s, 1H, H-3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 21,7; 38,7; 51,3; 128,4; 129,9; 135,9.

MS (m/z, %): 295 (100), 249 (14), 197 (12), 169 (2), 155 (36), 140 (61), 91 (23), 65 (10).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ (295,31):

obliczono:	C 48,81	H 4,44	N 14,23
znaleziono:	C 48,47	H 4,12	N 13,89.

1-Metylo-4-(4-metylofenylosulfonylometylo)-5-nitro-1H-indazol (16)

Żółte błyszczące igły (1,45 g; 84%) o temp. topn. 228–230 °C (AcOH).

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 2,37 (s, 3H, CH_3); 4,08 (s, 3H, N-CH_3); 5,54 (s, 2H, CH_2); 7,35–7,37 (m, 2H, Ts); 7,56–7,60 (m, 2H, Ts); 7,84 (dd, $J=9$ i 0,9 Hz, 2H, 7-H); 8,07 (d, $J=9$ Hz, 1H, 6-H); 8,28 (d, $J=0,9$ Hz, 1H, 3-H).

MS (m/z, %): 345 (30), 299 (4), 190 (100), 159 (8), 91 (42), 65 (34).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ (345,37):

obliczono:	C 55,44	H 4,48	N 12,37
znaleziono:	C 55,07	H 4,19	N 11,98.

5-(4-Metylofenylosulfonylometylo)-6-nitrochinolina (17)

Ceglastoczerwony, mikrokrystaliczny proszek (1,47 g; 86%) o temp. topn. 242–245 °C (AcOH).

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 2,39 (s, 3H, CH_3); 5,65 (s, 2H, CH_2); 7,34–7,37 (m, 2H, Ts); 7,53–7,60 (m, 2H, Ts); 7,64 (dd, $J=9$ i 4 Hz, 1H, 3-H); 8,28 (dd, $J=10$ i 9 Hz, 2H, 8-H i 7-H); 8,71 (dd, $J=9$ i 1 Hz, 1H, 2-H); 9,06 (dd, $J=7$ i 1 Hz, 1H, 4-H).

1-[3-(4-Metylofenylosulfonylometylo)-4-nitrofenylo]-1H-pirol (18)

Beżowe słupki (1,92 g; 57%) o temp. topn. 179–180 °C (EtOH).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2,44 (s, 3H, CH_3), 5,00 (s, 2H, CH_2), 6,41–6,43 (m, 2H, 3-H i 4-H), 7,09–7,12 (m, 2H, 2-H i 5-H), 7,26–7,31 (m, 2H, 3''-H i 5''-H), 7,41 (d, $J=2$ Hz, 1H, 2'-H), 7,48 (dd, $J=9$ i 2 Hz, 1H, 6'-H), 7,58–7,62 (m, 2H, 2''-H i 6''-H), 8,10 (d, $J=9$ Hz, 1H, 5'-H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 145,4; 143,8; 134,8; 130,0; 128,6; 128,5; 127,6; 124,3; 119,6; 119,0; 112,7; 77,5; 77,00; 76,7; 58,7; 21,8.

MS (m/z, %): 356 (100), 310 (10), 230 (5), 201 (99), 155 (40), 91 (45).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym C₁₈H₁₆N₂O₄S (356,40):

obliczono: C 60,66 H 4,53 N 7,86

znaleziono: C 60,28 H 4,24 N 7,49.

3,5-Dimetylo-1-[3-(4-metylofenylosulfonylometylo)-4-nitrofenylo]-1H-pirazol (19)

Białe igły o temp. topn. (1,04 g; 54 %) 142–143 °C (EtOH).

¹H NMR (300 MHz, aceton-*d*₆) δ: 2,20 (s, 3H, 3-CH₃); 2,36 (s, 3H, 5-CH₃); 2,42 (s, 3H, CH₃, Ts); 5,17 (s, 2H, CH₂); 6,11 (s, 1H, 4-H); 7,38-7,43 (m, 2H, 3''-H i 5''-H); 7,59-7,63 (m, 3H, 2'-H, 2''-H i 6''-H); 7,84 (dd, *J*=9 i 2 Hz, 1H, 6'-H); 8,18 (d, *J*=9 Hz, 1H, 5'-H).

¹³C NMR (75 MHz, aceton-*d*₆) δ: 151,0; 147,6; 146,1; 144,3; 141,1; 136,5; 130,7; 129,2; 128,5; 127,5; 125,8; 124,1; 110,0; 58,7; 30,3; 21,5; 13,5.

MS (m/z, %): 385 (67), 339 (9), 230 (100), 185 (22), 139 (18), 91 (42).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym C₁₉H₁₉N₃O₄S (385,4):

obliczono: C 59,21 H 4,97 N 10,90

znaleziono: C 58,87 H 4,68 N 10,54.

2-Metylo-1-[3-(4-metylofenylosulfonylometylo)-4-nitrofenylo]-1H-imidazol (20)

Pomarańczowe płytki (1,73 g; 53%) o temp. topn. 143–145 °C (*i*-PrOH).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2,41 (s, 3H, CH₃, Ts); 2,51 (s, 3H, CH₃, imidazol); 5,21 (s, 2H, CH₂); 7,42–7,43 (m, 2H, 3''-H i 5''-H); 7,57–7,60 (m, 2H, 2''-H i 6''-H); 7,80–7,83 (m, 3H, 4-H, 5-H i 2'-H); 7,96 (dd, *J*=9 i 2 Hz, 6'-H); 8,33 (d, *J*=9 Hz, 1H, 5'-H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 149,5; 145,2; 145,0; 137,6; 134,7; 131,3; 130,1; 128,1; 127,8; 127,2; 124,8; 122,4; 119,3; 56,8; 21,1; 11,2.

MS (m/z, %): 371 (100), 354 (17), 216 (20), 155 (24), 91 (50).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym C₁₈H₁₇N₃O₄S (371,41):

obliczono: C 58,21 H 4,61 N 11,31

znaleziono: C 57,85 H 4,32 N 10,93.

1-[3-(4-Metylofenylosulfonylometylo)-4-nitrofenylo]-1,2,4-1H-triazol (21)

Jasnobrażowe igły (1,82 g; 54%) o temp. topn. 187–190 °C (*i*-PrOH).

^1H NMR (400 MHz, aceton- d_6) δ : 2,42 (s, 3H, CH₃), 5,17 (s, 2H, CH₂), 7,40–7,43 (m, 2H, 3''-H i 5''-H), 7,61–7,64 (m, 2H, 2''-H i 6''-H), 7,95 (d, $J=2$ Hz, 1H, 2'-H), 8,17 (dd, $J=9$ i 2 Hz, 6'-H), 8,20 (s, 1H, 3-H), 8,28 (d, $J=9$ Hz, 1H, 5'-H), 9,14 (s, 1H, 5-H).

^{13}C NMR (75 MHz, aceton- d_6) δ : 206,4; 154,0; 146,2; 143,4; 140,7; 136,3; 130,7; 129,2; 128,3; 126,8; 125,4; 120,6; 58,8; 30,0.

MS (m/z, %): 358 (9), 312 (34), 203 (100), 155 (40), 91 (89).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym C₁₆H₁₄N₄O₄S (358,37):

obliczono:	C 53,62	H 3,94	N 15,63
znaleziono:	C 53,43	H 3,69	N 15,27.

1-[3-(4-Metylofenylosulfonylometylo)-4-nitrofenylo]-1H-indol (22)

Żółte igły (2,37 g; 68%) o temp. topn. 139–141 °C (EtOH).

^1H NMR (400 MHz, aceton- d_6) δ : 2,40 (s, 3H, CH₃), 5,23 (s, 2H, CH₂), 6,78 (dd, $J=3$ i 0,8 Hz, 1H, 3-H), 7,20 (td, $J=8$, 7 i 1 Hz, 1H, 5-H), 7,24 (td, $J=8$, 7 i 1 Hz, 1H, 6-H), 7,40–7,44 (m, 2H, 3''-H i 5''-H), 7,51 (d, $J=3$ Hz, 1H, 2-H), 7,49–7,52 (m, 1H, 4-H), 7,62–7,64 (m, 2H, 2''-H i 6''-H), 7,66 (d, $J=2$ Hz, 1H, 2'-H), 7,67–7,69 (m, 1H, 7-H), 7,86 (dd, $J=9$ i 2 Hz, 6'-H), 8,29 (d, $J=9$ Hz, 1H, 5'-H).

^{13}C NMR (75 MHz, aceton- d_6) δ : 163,1; 147,4; 146,0; 136,1; 136,0; 122,0; 110,5; 106,7; 59,3; 25,0; 20,9.

MS (m/z, %): 406 (100), 376 (4), 280 (2), 251 (32), 207 (22), 155 (5), 91 (9).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym C₂₂H₁₈N₂O₄S (406,45):

obliczono:	C 65,01	H 4,46	N 6,89
znaleziono:	C 65,40	H 4,17	N 6,50.

9-[3-(4-Metylofenylosulfonylometylo)-4-nitrofenylo]-9H-karbazol (23)

Jasnożółte igły (1,53 g, 67 %) o temp. topn. 231–233 °C (EtOH–aceton 7:4).

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 2,32 (s, 3H, CH₃, Ts); 5,31 (s, 2H, CH₂); 7,27–7,48 (m, 8H, Ts+karbazol); 7,57–7,60 (m, 2H, Ts); 7,69 (d, $J=8$ Hz, 1H, 2'-H); 7,96 (dd, $J=9$ i 2 Hz, 1H, 6'-H); 8,27 (ddd, $J=8$; 7 i 0,9 Hz, 2H, karbazol); 8,34 (d, $J=8$ Hz, 1H, 5'-H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ : 146,9; 145,1; 140,9; 139,0; 134,7; 131,3; 130,0; 128,2; 127,7; 127,2; 126,6; 125,4; 123,4; 121,2; 120,7.

MS (m/z, %): 456 (100), 409 (0,9), 301 (10), 256 (21), 166 (9), 91 (7).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym C₂₆H₂₀N₂O₄S (456,5):

obliczono: **C** 68,41 **H** 4,42 **N** 6,14
znaleziono: **C** 68,79 **H** 4,71 **N** 5,84.

5.3. Redukcja nitrowych produktów VNS do odpowiednich amin.

Metoda a (H₂/PtO₂)

W kolbie dwuszyjnej zaopatrzonej w septum rozpuszczono nitrową pochodną **13** (0,62 g; 2 mmol) w etanolu (40 cm³) lub THF (20 cm³), a następnie dodano katalizator Adamsa-Shrinera (PtO₂, 10 mg). Z kolby usunięto powietrze i napełniono ją wodorem, powtarzając ten proces dwukrotnie, po czym mieszano, stosując niewielkie nadciśnienie wodoru, przez 1–2 godz. (dłuższe mieszanie nie powodowało przyrostu ilości produktu). Po tym czasie mieszaninę przesączono, rozpuszczalnik oddestylowano, a pozostałość poddano flash-chromatografii (FC) na żelu krzemionkowym (230–400 mesh), używając mieszaniny heksan–octan etylu 2:1 jako eluentu.

Metoda b (Fe/AcOH)

Nitrową pochodną **13** (0,63 g; 2 mmol), względnie **14** (0,68 g; 2 mmol) rozpuszczono na ciepło w kwasie octowym (11 cm³). Do powstałego roztworu dodano sproszkowanego żelaza (2,1 g) i mieszano przez godzinę. Następnie mieszaninę pozostawiono na 15 dni w temperaturze pokojowej, co pewien czas mieszając i ogrzewając w celu rozpuszczenia wytrącającego się osadu organicznego. Po tym czasie mieszaninę zubożyto roztworem 10% NaOH i ekstrahowano CH₂Cl₂ (3x75 cm³). Połączone wyciągi organiczne przemyto wodą i osuszono MgSO₄. Rozpuszczalnik oddestylowano, a pozostałość krystalizowano.

Metoda c (SnCl₂/AcOH-HCl)

Nitrową pochodną **13** (0,32 g; 1 mmol) rozpuszczono w gorącej mieszaninie kwasu octowego (7cm³) i stężonego kwasu solnego (2 cm³), a następnie dodano SnCl₂ (0,96 g) i ogrzewano w temperaturze wrzenia przez 1,5 godz. Po ochłodzeniu ekstrahowano CH₂Cl₂ (3x75 cm³), połączone ekstrakty organiczne przemyto kilkakrotnie wodą i suszono MgSO₄. Pozostałość, po oddestylowaniu rozpuszczalnika, krystalizowano z etanolu.

Metoda d (Sn/HCl)

Nitrowe pochodne **13** (0,90 g; 3,1 mmol) bądź **17** (1,06 g; 3,1 mmol) zawieszono w metanolu (20 cm³). Do powstałego roztworu dodano sproszkowanej Sn (1,3 g), dolano stęż. roztworu kwasu solnego (8 cm³), mieszano i ogrzewano przez 8 godz. Po tym czasie mieszaninę zobojętniono roztworem 10% NaOH, przesączono przez celit, a sorbent przemyto acetonem (20 cm³). Następnie z klarownego przesączu oddestylowano rozpuszczalniki organiczne, a wodną zawiesinę ekstrahowano CH₂Cl₂ (3x75 cm³). Połączone wyciągi organiczne przemyto wodą i osuszono MgSO₄. Rozpuszczalnik oddestylowano, a pozostałość przekrystalizowano z etanolu.

Metoda e (H₂N-NH₂xH₂O/Pd-C)

Do ciepłego roztworu 7 mmol nitroarenu: **13** (2,40 g), **18** (2,49 g), **19** (2,70 g), **20** (2,60 g); **21** (2,51 g), względnie **22** (2,85 g) w izopropanolu (**34**, **35**; 80 cm³), metanolu (**36**; 20 cm³), etanolu (**24**, **33**, **37**; 120 cm³) wkroplono wodzian hydrazyny (4,49 cm³; 8,2 mmol), dodano katalizatora palladowego 10 % Pd/C (0,21 g) i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną odpowiednio przez: 5 (**22**), 8 (**13**, **19**, **20**) lub 11 (**21** i **18**) godzin, a następnie mieszaninę przesączono przez celit, oddestylowano rozpuszczalnik, a uzyskaną suchą pozostałość przekrystalizowano.

Metoda f (H₂N-NH₂xH₂O/Ni-Ra)

Do roztworu 7 mmol nitroarenu: **14** (2,39 g), **15** (2,07 g), **16** (2,42 g) i **18** (3,20 g) w mieszaninie 75 ml THF i 115 ml metanolu dodano 12 ml wodzianu hydrazyny (d=1,032 g/ml) oraz 50 ml zawiesiny niklu Raneya. Ogrzewano pod chłodnicą zwrotną odpowiednio przez 10 (**14**, **15**), 15 (**18**) lub 20 minut (**16**), a następnie mieszaninę przesączono przez celit, oddestylowano rozpuszczalnik, a pozostałość przekrystalizowano.

4-Chloro-2-(4-metylofenylosulfonylometylo)anilina (24)

Metoda a

Bładożółte igły (0,39 g; 66%) o temp. topn. 130–131 °C (EtOH, lit.⁹⁷ 137–138 °C).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 2,40 (s, 3H, CH₃); 4,54 (s, 2H, CH₂); 5,26 (bs, 2H, NH₂, znika po dodaniu D₂O); 6,62 (d, *J*=8 Hz, 1H, 6-H); 6,85 (d, *J*=2 Hz, 1H, 3-H); 7,02 (dd, *J*=8 i 3Hz, 1H, 5-H); 7,39–7,42 (m, 2H, 3'-H i 5'-H, Ts); 7,67–7,69 (m, 2H, 2'-H i 6'-H, Ts).

IR (KBr) cm⁻¹: ~3400–3300 (NH₂).

Metoda b. Wyd. 0,31 g (52%)

Metoda c. Wyd. 0,12 g (41%)

Metoda d. Wyd. 0,14 g (49%)

Metoda e. Wyd. 0,19 g (80%)

1-Amino-2-[(4-metylofenylo)sulfonylometylo]naftalen (25)

Metoda f

Jasnożółte płytki (1,70 g; 78%) o temp. topn. 208–209 °C (AcOH).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2,38 (s, 3H, CH₃); 4,77 (s, 2H, CH₂); ~ 5,60 (bs, 2H, NH₂, zanika po dodaniu D₂O); 6,92 (d, *J*=8 Hz, 1H, 3-H lub 4-H); 6,99 (d, *J*=8 Hz, 1H, 3-H lub 4-H); 7,35–7,37 (m, 2H, 3'-H i 5'-H); 7,38–7,45 (m, 2H, 6-H i 7-H); 7,67–7,71 (m, 3H, 5-H, 2'-H i 6'-H); 8,13 (d, *J*=8 Hz, 1H, 8-H).

IR (KBr) cm⁻¹: ~3400–3300 (NH₂).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 21, 1; 57, 8; 115,8; 117,3; 122,6; 124,2; 126,1; 127,7; 128,2; 129,5; 130,4.

MS (m/z, %): 311 (5), 156 (100), 128 (19), 91 (14), 65 (12), 39 (3).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym C₁₈H₁₇NO₂S (311,40):

obliczono: C 69,43 H 5,50 N 4,50

znaleziono: C 69,15 H 5,61 N 4,32.

4-Amino-1-metylo-5-[(4-metylofenylo)sulfonylometylo]-1H-pirazol (26)

Metoda f

Ceglaste słupki (1,56 g; 84%) o temp. topn. 136–140 °C (EtOH).

¹H NMR (400 MHz, aceton-*d*₆) δ: 2,46 (s, 3H, CH₃, Ts); 3,47 (s, 3H, N-CH₃); 4,54 (s, 2H, CH₂); ok. 4,5 (bs, 2H, NH₂, zanika po dodaniu D₂O); 6,96 (s, 1H, 3-H); 7,42–7,44 (m, 2H, 3'-H i 5'-H); 7,65–7,68 (m, 2H, 2'-H i 6'-H).

IR (KBr) cm⁻¹: ~3400–3300 (NH₂).

MS (m/z, %): 265 (100), 221 (2), 200 (2), 149 (2), 110 (84), 91 (5), 56 (25), 55 (5).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym C₁₂H₁₅N₃O₂S (265,33):

obliczono: C 54,32 H 5,70 N 15,84

znaleziono: C 54,71 H 5,52 N 15,54.

5-Amino-1-metylo-4-(4-metylofenylosulfonylometylo)-1H-indazol (27)

Metoda f

Brunatne pryzmy o temp. topn. 108–112 °C (AcOH) (wydajność 1,83 g; 83%).

¹H NMR (400 MHz, aceton-*d*₆) δ: 2,40 (s, 3H, N-CH₃); 3,56 (bs, 3H, N-CH₃); 6,12 (s, 2H, CH₂); 7,43–7,45 (m, 2H, 3'-H i 5'-H); 7,70 (dd, *J*=9 i 2 Hz, 1H, 7-H); 7,84 (d, *J*=9 Hz, 1H, 6-H); 7,99–8,01 (m, 2H, 2'-H i 6'-H); 8,19 (d, *J*=2 Hz, 1H, 3-H); 13,38 (bs, 2H, NH₂, zanika po dodaniu D₂O).

IR (KBr) cm⁻¹: ~3400–3300 (NH₂).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym C₁₆H₁₇N₃O₂S (326,37):

obliczono:	C 60,63	H 5,33	N 13,12
znaleziono:	C 60,26	H 5,14	N 13,43.

6-Amino-5-(4-metylofenylosulfonylometylo)chinolina (28)

Metoda d

Żółte, drobnokrystaliczne słupki (0,82 g; 87%) o temp. topn. 243–245 °C (EtOH–AcOEt 7:2).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2,40 (s, 3H, CH₃); 5,12 (s, 2H, CH₂); 6,45 (bs, 2H, NH₂, znika po dodaniu D₂O); 7,36–7,39 (m, 2H, 3"-H i 5"-H); 7,50 (d, *J*=9 Hz, 1H, 7-H); 7,69–7,74 (m, 2H, 2"-H i 6"-H); 7,77 (dd, 1H, *J*=9 i 4 Hz, 1H, 3-H); 8,77 (d, 1H, *J*=4 Hz, 1H, 4-H); 8,82 (d, *J*=9 Hz, 1H, 2-H).

IR (KBr) cm⁻¹: ~3400–3300 (NH₂).

1-[4-Amino-3-(4-metylofenylosulfonylometylo)fenylo]-1*H*-pirol (29)

Metoda e

Beżowe płytki (1,22 g; 53%) o temp. topn. 152–153 °C (MeOH).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2,45 (s, 3H, CH₃), 4,29 (bs, 2H, NH₂, zanika po dodaniu D₂O), 4,35 (s, 2H, CH₂), 6,22–6,24 (m, 2H, 3-H i 4-H), 6,46 (d, *J*=2 Hz, 1H, 2'-H), 6,63–6,65 (m, 2H, 2-H i 5-H), 6,80 (d, *J*=9 Hz, 1H, 5'-H), 7,14 (dd, *J*=9 i 2 Hz, 1H, 6'-H), 7,30–7,33 (m, 2H, 3"-H i 5"-H), 7,62–7,65 (m, 2H, 2"-H i 6"-H).

IR (KBr) cm⁻¹: ~3400–3300 (NH₂).

MS (m/z, %): 326 (25), 171 (100), 91 (11), 18 (61).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym C₁₈H₁₈N₂O₂S (326,41):

obliczono:	C 66,23	H 5,56	N 8,58
znaleziono:	C 65,62	H 5,37	N 8,84.

1-[4-Amino-3-(4-metylofenylosulfonylometylo)fenylo]-3,5-dimetylo-1*H*-pirazol (30)

Metoda e

Białe płytki (1,79 g, 72%) o temp. topn. 72–74 °C (EtOH).

¹H NMR (300 MHz, aceton-*d*₆) δ: 2,00 (s, 3H, CH₃); 2,16 (s, 3H, CH₃); 2,42 (s, 3H, CH₃, Ts); 4,58 (s, 2H, CH₂); 5,03 (bs, 2H, NH₂, znika po dodaniu D₂O); 5,93 (s, 1H, 4-H); 6,84 (d, *J*=2 Hz, 1H, 2'-H); 6,91 (d, *J*=8 Hz, 1H, 5'-H); 7,15 (dd, *J*= 9 i 2 Hz, 1H, 6'-H); 7,41–7,44 (m, 2H, 3''-H i 5''-H); 7,72–7,76 (m, 2H, 2''-H i 6''-H).

IR (KBr) cm⁻¹: ~3400–3300 (NH₂).

MS (m/z, %): 355 (20), 290 (0,9), 275 (0,5), 200(100), 117 (2), 91 (4).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym C₁₉H₂₁N₃O₂S (355,4):

obliczono: C 64,20 H 5,95 N 11,82

znaleziono: C 64,59 H 5,76 N 11,98.

1-[4-Amino-3-(4-metylofenylosulfonylometylo)fenylo]-2-metylo-1*H*-imidazol (31)

Metoda e

Jasnozielone płytki (1,86 g; 78%) o temp. topn. 104–107 °C (EtOH).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2,11 (s, 3H, CH₃ imidazol); 2,39 (s, 3H, CH₃ Ts); 4,62 (s, 2H, CH₂); ~5,51 (bs, 2H, NH₂, zanika po dodaniu D₂O); 6,72 (d, *J*=9 Hz, 1H, 5'-H); 6,74 (d, *J*=2,4 Hz, 1H, 2'-H); 7,01 (d, *J*=12 Hz, 1H, 4-H lub 5-H); 7,02 (d, *J*=12 Hz, 1H, 4-H lub 5-H); 7,05 (dd, *J*= 9 i 2,4 Hz, 1H, 6'-H); 7,39–7,41 (d, 2H, 3''-H i 5''-H); 7,66–7,68 (m, 2H, 2''-H i 6''-H).

IR (KBr) cm⁻¹: ~3400–3300 (NH₂).

MS (m/z, %): 341 (19), 276 (2), 186 (100), 159 (15), 91 (13).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym C₁₈H₁₉N₃O₂S (341,43):

obliczono: C 63,32 H 5,61 N 12,31

znaleziono: C 63,72 H 5,33 N 12,68.

1-[4-Amino-3-(4-metylofenylosulfonylometylo)fenylo]-1,2,4-1*H*-triazol (32)

Metoda e

Kremowe płytki (1,95 g; 46%) o temp. topn. 169–172 °C (*i*-PrOH).

¹H NMR (400 MHz, aceton-*d*₆) δ: 2,42 (s, 3H, CH₃), 4,56 (s, 2H, CH₂), 5,11 (bs, 2H, NH₂, zanika po dodaniu D₂O), 6,94 (d, *J*=9 Hz, 1H, 5'-H), 7,25 (d, *J*=2,5 Hz, 1H, 2'-H), 7,41–7,43

(m, 2H, 3''-H i 5''-H), 7,51 (dd, $J=9$ i $J=2,5$ Hz, 1H, 6'-H), 7,74–7,76 (m, 2H, 2''-H i 6''-H), 7,99 (s, 1H, 3-H), 8,57 (s, 1H, 5-H).

IR (KBr) cm^{-1} : ~3400–3300 (NH_2).

MS (m/z, %): 329 (25), 174 (100), 147 (9), 120 (18), 91 (19), 65 (15).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ (328,39):

obliczono: **C** 58,52 **H** 4,91 **N** 17,06

znaleziono: **C** 58,91 **H** 4,62 **N** 17,42.

1-[4-Amino-3-(4-metylofenylosulfonylometylo)fenylo]-1H-indol (33)

Metoda e

Biały drobnokrystaliczny proszek (1,90 g; 71%) o temp. topn. 186–189 °C (EtOH).

^1H NMR (400 MHz, aceton- d_6) δ : 2,44 (s, 3H, CH_3), 4,59 (s, 2H, CH_2), 5,07 (s, 2H, NH_2 , zanika po dodaniu D_2O), 6,56 (dd, $J=3$ i 0,8 Hz, 1H, 3-H), 6,89 (d, $J=2$ Hz, 1H, 2'-H), 6,98–7,12 (m, 4H, 4-H, 6-H, 7-H, 5'-H), 7,15 (d, $J=3$ Hz, 1H, 2-H), 7,22 (dd, $J=9$ i 2 Hz, 1H, 6'-H), 7,44–7,46 (m, 2H, 3''-H i 5''-H), 7,59 (td, $J=8$, 7 i 1 Hz, 1H, 6-H), 7,73–7,76 (m, 2H, 2''-H i 6''-H).

IR (KBr) cm^{-1} : ~3400–3300 (NH_2).

MS m/z (jon, %): 376 (37), 312 (1), 219 (7), 111 (3), 91 (2).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ (376,47):

obliczono: **C** 70,19 **H** 5,35 **N** 7,44

znaleziono: **C** 70,47 **H** 5,06 **N** 7,05.

9-[3-(4-Metylofenylosulfonylometylo)-4-aminofenylo]-9H-karbazol (34)

Metoda f

Białe igły (0,90 g; 30%) o temp. topn. 230–232 °C (AcOH).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 2,36 (s, 3H, CH_3), 4,49 (s, 2H, CH_2); 6,72 (d, $J=2$ Hz, 1H, 2'-H); 6,99 (d, $J=8$ Hz, 2H, 2-H i 7-H, karbazol); 7,10 (d, $J=8$ Hz, 1H, 5'-H); 7,22–7,35 (m, 7H arom.); 7,68–7,70 (m, 2H, 2''-H i 6''-H); 8,08 (d, $J=7$ Hz, 2H, 1-H i 8-H, karbazol); NH_2 nieobserwowany.

IR (KBr) cm^{-1} : ~3400–3300 (NH_2).

MS (m/z, %): 426 (39), 271 (100), 254 (6), 91 (18), 65 (12).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym $C_{26}H_{22}N_2O_2S$ (426,53):

obliczono: **C** 73,21 **H** 5,20 **N** 6,57

znaleziono: **C** 72,60 **H** 4,92 **N** 6,85.

5.4. Cyklizacja amin do odpowiednich indazolopochodnych.

Metoda a ($NaNO_2/HCl$)

Aminową pochodną odpowiednio: **24** (0,13 g; 0,44 mmol) bądź **28** (0,14 g; 0,44 mmol) zawieszono w 4% roztworze kwasu solnego (50 cm³), po ochłodzeniu w łaźni lodowej do 0 °C dodano kroplami wodny roztwór $NaNO_2$ (0,05 g w 3 cm³ wody), utrzymując temperaturę w granicach 0–5 °C i mieszano w tej temperaturze przez 45 minut. Mieszaninę reakcyjną zobojętniono 5% roztworem $NaOH$ i ekstrahowano CH_2Cl_2 (3x30 cm³). Połączone wyciągi organiczne przemyto wodą i osuszono $MgSO_4$. Po oddestylowaniu rozpuszczalnika pozostałość krystalizowano.

Metoda b (azotyn izopentylu/ $AcOH$ -benzen/ $TBAB$)

Do roztworu aminowej pochodnej **24** (0,09 g; 0,3 mmol) rozpuszczonej w kwasie octowym (30 cm³) dodano katalityczną ilość bromku *tert*-butyloamoniowego ($TBAB$), benzen (10 cm³), a następnie, intensywnie mieszając i chłodząc w łaźni lodowej do temp. 0 °C, wkraplano przez 30 min azotyn izopentylu (0,04 ml; 0,33 mmol), po czym kontynuowano mieszanie w temp. 0–5 °C przez 1 godz. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną zobojętniono stęż. roztworem amoniaku wobec papierka lakmusowego i ekstrahowano CH_2Cl_2 (3x30 cm³). Połączone wyciągi organiczne przemyto wodą i osuszono $MgSO_4$. Po oddestylowaniu rozpuszczalnika pozostałość krystalizowano.

Metoda c (azotyn izopentylu/ $AcOH-NH_4Cl$ / $TBAB$)

Do roztworu aminowej pochodnej **24** (0,04 g; 0,16 mmol) zawieszonej w 50 % roztworze NH_4Cl oraz kwasu octowego (10:1), dodano katalityczną ilość $TBAB$ oraz THF (10 cm³), a następnie, intensywnie mieszając i chłodząc w łaźni lodowej do temp. 0 °C, wkroplono w azotyn izopentylu (0,02 ml; 0,162 mmol), po czym kontynuowano mieszanie w temp. 0–5 °C przez 2,5 godz. Mieszaninę reakcyjną zobojętniono stęż. roztworem amoniaku wobec papierka lakmusowego i ekstrahowano CH_2Cl_2 (3x30 cm³). Połączone wyciągi organiczne

przemyto wodą i osuszono MgSO₄. Po oddestylowaniu rozpuszczalnika pozostałość krystalizowano.

Metoda d (azotyn izopentyli/AcOH)

Do ochłodzonego (0 °C) roztworu 0,3 mmol aminy: **29** (0,11 g), **30** (0,10 g) bądź **31** (0,11 g) w lodowatym kwasie octowym (19 cm³) dodano kroplami roztwór azotynu izopentyli (0,04 cm³; 0,33 mmol), po czym, utrzymując temperaturę w granicach 0–5 °C, mieszano w tej temperaturze przez 1,5 (**30**), 2 (**31**) lub 3 (**29**) godziny. Mieszaninę reakcyjną zobojętniono 25% roztworem amoniaku wobec papierka lakmusowego i ekstrahowano dichlorometanem (5x30 cm³). Połączone wyciągi organiczne przemyto wodą i osuszono MgSO₄. Po oddestylowaniu rozpuszczalnika pozostałość przekrystalizowano.

Metoda e (azotyn izopentyli/THF-AcOH)

Do roztworu aminy **30** (0,11 g; 0,32 mmol) w THF (20 cm³) dodano lodowaty kwas octowy (2 cm³), a następnie, po ochłodzeniu do ok. 0 °C, wkroplono roztwór azotynu izopentyli (0,04 cm³; 0,32 mmol). Następnie mieszano w temperaturze 0–5 °C przez 3 godziny. Po tym czasie dodano THF (20 cm³), a mieszaninę reakcyjną przesączono przez celit. Po oddzieleniu rozpuszczalnika pozostałość (**41**) przekrystalizowano z kwasu octowego.

Metoda f (azotyn izopentyli/SiO₂-AcOH)

W niewielkiej ilości acetonu rozpuszczono 0,9 mmol aminy: **24** (0,27 g), **25** (0,28 g), **26** (0,24 g), **27** (0,28 g), **29** (0,29 g), **30** (0,32 g), **31** (0,31 g), **33** (0,34 g), **34** (0,38 g) i zaadsorbowano na żelu krzemionkowym (0,70 g), a następnie zwilżono niewielką ilością (poniżej 1 cm³) kwasu octowego. Dodano 0,24 ml azotanu izopentyli (1,8 mmol, d=0,872 g/ml), zamknięto w kolbie ciśnieniowej i ogrzewano w reaktorze mikrofalowym PLAZMATRONIKA RM800 przez 5 (**24**, **26**, **30**), 8 (**25**) lub 10 minut (**27**, **32**, **30**, **31**, **34**). Warunki reakcji: współczynnik przenikania promieniowania KT=240, T_{min}=100 °C, T_{max}=110 °C, P=400 W. Mieszaninę ekstrahowano dichlorometanem (3x30 cm³), a rozpuszczalnik, po odsączeniu żelu, oddestylowano, a pozostałość przekrystalizowano.

5-Chloro-3-(4-metylofenylosulfonylo)-1H-indazol (35)

Metoda a

Żółte igły (0,05 g; 40%) o temp. topn. 247–249 °C (EtOH, lit.⁹⁷ 242–244 °C).

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 2,41 (s, 1H, CH₃); 7,42–7,45 (m, 2H, Ts); 7,53 (dd, $J=9$ i 2 Hz, 1H, 6-H); 7,75 (dd, $J=9$ i 0,6 Hz, 1H, 7-H); 7,91–7,95 (m, 2H, Ts); 8,04 (dd, $J=2$ i 0,6 Hz, 1H, 4-H); 14,4 (bs, 1H, NH, zanika po dodaniu of D₂O).

IR (KBr) cm^{-1} : ~3200–3100 (N–H).

MS (m/z, %): 306 (89), 242 (81), 199 (8), 139 (30), 124 (24), 91 (100).

Metoda b. Wyd. 0,06 g (64%)

Metoda c. Wyd. 0,08 g (78%)

Metoda f. Wyd. 0,15 g (56%)

3-[4-Metylofenylosulfonylo]-1H-benzo[g]indazol (36)

Metoda f

Jasnożółte słupki (0,23 g; 79%) o temp. topn. 220–223 °C (EtOH).

^1H NMR (400 MHz, aceton- d_6) δ : 2,39 (s, 3H, CH₃); 7,42–7,44 (m, 2H, Ts); 7,67–7,74 (m, 2H, naftalen); 7,79 (d, $J=9$ Hz, 1H, 9-H); 7,99–8,01 (m, 2H, Ts); 8,08 (m, 1H, naftalen); 8,14 (d, $J=9$ Hz, 5-H); 8,49 (m, 1H, naftalen).

MS (m/z, %): 322 (100), 258 (41), 242 (2), 215 (7), 183 (32), 167 (14), 140 (44), 127 (12), 111 (2), 91 (28), 65 (5).

IR (KBr) cm^{-1} : ~3200–3100 (N–H).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym C₁₈H₁₄N₂O₂S (322,38):

obliczono: **C** 67,06 **H** 4,38 **N** 8,69

znaleziono: **C** 67,32 **H** 4,19 **N** 8,87.

1-Metylo-6-(4-metylofenylosulfonylo)-4H-pirazolo[4,3-c]pirazol (37)

Metoda f

Kremowe płytki (0,14 g; 57%) o temp. topn. 148–150 °C (MeOH).

^1H NMR (400 MHz, aceton- d_6) δ : 2,42 (s, 3H, CH₃); 4,17 (s, 3H, N-CH₃); 7,43–7,46 (m, 2H, Ts); 7,52 (s, 1H, 3-H); 7,93–7,96 (m, 2H, Ts); ~12,5 (bs, 1H, NH, zanika po dodaniu D₂O).

IR (KBr) cm^{-1} : ~3200–3100 (N–H).

MS (m/z, %): 276(100), 248(2), 211(10), 183(4), 155(2), 121(7), 91(90), 67(11), 43(3).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym C₁₂H₁₂N₄O₂S (276,31):

obliczono: **C** 52,16 **H** 4,38 **N** 20,28

znaleziono: **C** 52,57 **H** 4,17 **N** 20,49.

1-Metylo-4-(4-metylofenylosulfonylo)-6*H*-pirazolo[4,3-*e*]indazol (38)

Metoda f

Białe igły (0,15 g; 50%) o temp. topn. 207–210 °C (EtOH).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2,33 (s, 3H, CH₃, Ts); 4,16 (s, 1H, N-CH₃); 7,38–7,41 (m, 2H, Ts); 7,67 (d, *J*=9 Hz, 1H, 7-H lub 8-H); 7,83 (d, *J*=9 Hz, 1H, 7-H lub 8-H); 7,88–7,91 (m, 2H, Ts); 8,50 (s, 1H, 3-H); 14,44 (s, 1H, NH, indazol, zanika po dodaniu D₂O).

IR (KBr) cm⁻¹: ~3200–3100 (N–H).

MS (m/z, %): 326 (100), 262 (17), 171 (7), 144 (41), 91 (19), 41 (7).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym C₁₆H₁₄N₄O₂S (326,37):

obliczono:	C 58,68	H 4,42	N 17,37
znaleziono:	C 58,25	H 4,13	N 17,74.

5-(4-Metylofenylosulfonylo)-7*H*-pirazolo[4,3-*f*]chinolina (39)

Metoda a

Kremowe słupki (0,06 g; 44%) o temp. topn. 238–240 °C (EtOH).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2,39 (s, 1H, CH₃); 7,45–7,48 (m, 2H, Ts); 7,78 (dd, *J*=8 i 4 Hz, 1H, 3-H); 7,91–7,94 (m, 2H, Ts); 8,02 (s, 2H, 8-H i 9-H); 8,94 (dd, *J*=4 i 2 Hz, 1H, 2-H); 9,41 (dd, *J*=8 i 2 Hz, 1H, 4-H); ~ 15,0 (bs, 1H, NH, zanika po dodaniu of D₂O).

IR (KBr) cm⁻¹: ~3200–3100 (N–H).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym C₁₇H₁₃N₃O₂S (323,4):

obliczono	C 63,13	H 4,05	N 13,00
znaleziono	C 63,38	H 4,34	N 12,65.

3-[(4-Metylofenylosulfonylo)-5-(pirol-1-ilo)]indazol (40)

Metoda d

Jasnobezowe płytki (0,086 g; 80%) o temp. topn. 238–241 °C (AcOH).

¹H NMR (400 MHz, aceton-*d*₆) δ: 2,39 (s, 3H, CH₃), 6,34 (dd, *J*=2 i 2 Hz, 2H, 3-H i 4-H), 7,30–7,34 (m, 2H, 2-H i 5-H); 7,41–7,43 (m, 2H, 3''-H i 5''-H), 7,74 (dd, *J*=9 i 2 Hz, 1H, 6'-H), 7,82 (dd, *J*=9 i 0,8 Hz, 1H, 7'-H), 8,01–8,04 (m, 2H, 2''-H i 6''-H), 8,15 (dd, *J*=2 i 0,8 Hz, 1H, 4'-H), ~13,1 (bs, 1H, NH, zanika po dodaniu D₂O).

IR (KBr) cm⁻¹: ~3200–3100 (N–H).

MS (m/z, %): 337 (69), 183 (73), 155 (29), 101 (11), 91 (32), 41 (9).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym $C_{18}H_{15}N_3O_2S$ (337,40):

obliczono: **C** 64,08 **H** 4,48 **N** 12,45

znaleziono: **C** 64,14 **H** 4,77 **N** 12,81

Metoda e. Wyd. 0,088 g (80%)

Metoda f. Wyd. 0,090 g (29%)

3-[(4-Metylofenylosulfonyl)-5-(3,5-dimetylopirazol-1-ilo)]indazol (41)

Metoda d

Białe płytki (0,09 g; 80%) o temp. topn. 189–192 °C (EtOH).

1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 2,21 (s, 3H, 3-CH₃); 2,30 (s, 3H, 5-CH₃); 2,35 (s, 3H, CH₃, Ts); 6,12 (s, 1H, 4-H); 7,40–7,44 (m, 2H, 3''-H i 5''-H); 7,62 (dd, $J=9$ i 2 Hz, 1H, 6'-H); 7,78 (dd, $J=8$ i 0,7 Hz, 1H, 7'-H); 7,89–7,93 (m, 2H, 2''-H i 6''-H); 7,97 (dd, $J=2$ i 0,7 Hz, 1H, 4'-H); 14,13 (bs, 1H, NH, indazol, zanika po dodaniu D₂O).

IR (KBr) cm^{-1} : ~3200–3100 (N–H).

MS (m/z, %): 366 (100), 324 (6), 227 (5), 211 (29), 143 (8), 91 (17).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym $C_{19}H_{18}N_4O_2S$ (366,4):

obliczono: **C** 62,28 **H** 4,95 **N** 15,29

znaleziono: **C** 62,39 **H** 4,67 **N** 15,00.

Metoda f. Wyd. 0,17 g (52%)

3-(4-Metylofenylosulfonylometylo)-5-(1,2,4-triazol-1-ilo)indazol (43)

Metoda d

Jasnobeżowe igły (0,091 g; 80%) o temp. topn. 299–304 °C z rozkładem (EtOH).

1H NMR (400 MHz, aceton- d_6) δ : 2,36 (s, 3H, CH₃), 7,42–7,44 (m, 2H, 3''-H i 5''-H), 7,89 (dd, $J=9$ i 0,8 Hz, 1H, 7'-H), 7,94–7,96 (m, 2H, 2''-H i 6''-H), 8,02 (dd, $J=9$ i 2 Hz, 1H, 6'-H), 8,30 (s, 1H, 3-H), 8,42 (dd, $J=2$ i 0,8 Hz, 1H, 4'-H), 9,42 (s, 1H, 5-H), ~13,7 (bs, 1H, NH, zanika po dodaniu D₂O).

IR (KBr) cm^{-1} : ~3200–3100 (N–H).

MS (m/z, %): 339 (100), 275 (21), 200 (8), 91 (49).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym $C_{16}H_{13}N_5O_2S$ (339,37):

obliczono: **C** 56,63 **H** 3,86 **N** 20,64

znaleziono: **C** 57,02 **H** 3,68 **N** 20,26.

3-[(4-Metylofenylosulfonylo]-5-(indol-1-ilo)]indazol (44)

Metoda f

Czarne płytki (0,16 g; 47%) o temp. topn. 177–180 °C (EtOH).

^1H NMR (400 MHz, aceton- d_6) δ : 2,33 (s, 3H, CH₃); 6,93 (d, $J=9$ Hz, 1H, 2-H); 7,17–7,23 (m, 6H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H+Ts); 7,30 (d, $J=3$ Hz, 1H, 3H); 7,36–7,42 (m, 2H, Ts); 7,81–7,87 (m, 1H, 6'-H); 7,90–8,02 (m, 2H, 4'-H i 7'-H); ~13,5 (bs, 1H, NH, indazol, zanika po dodaniu D₂O).

IR (KBr) cm^{-1} : ~3200–3100 (N–H).

MS (m/z, %): 387 (100), 359 (27), 179 (28), 55 (35).

Analiza elementarna dla związku o wzorze sumarycznym C₂₂H₁₇N₃O₂S (387,45):

obliczono: **C** 68,45 **H** 4,52 **N** 10,55

znaleziono: **C** 68,08 **H** 4,23 **N** 10,94.

Pochodnych imidazolu **42** i karbazolu **45** nie udało się otrzymać w postaci analitycznie czystej. Widma ^1H NMR mieszanin poreakcyjnych wykazywały obecność tych produktów (odpowiednio ok. 40% i 12 %), jednak próby ich oczyszczenia nie powiodły się.

5.5. Kompleksowanie związku 41 z jonami magnezu.

Sporządzono dwa roztwory (**A** i **B**): roztwór **A**: w niewielkiej fiolce rozpuszczono 0,30 mg związku **41** w 0,2 cm³ d_6 -DMSO, roztwór **B**: w niewielkiej fiolce rozpuszczono 0,041 g Mg(NO₃)₂·6H₂O w 0,4 cm³ d_6 -DMSO (roztwór przyjmuje stężenie 0,4 mol/dm³). Następnie przygotowano próbki: (1) 0,2 cm³ roztworu **A** zmieszano z 0,4 cm³ d_6 -DMSO (wzorzec), (2) 0,2 cm³ roztworu **A** zmieszano z 0,4 cm³ roztworu **B**. Po tej operacji dla próbek (1) i (2) wykonano widma ^1H NMR w temperaturze 25, 40 i 60 °C.

6. WNIOSKI

1. W pracy wykazano, iż techniki aromatycznej substytucji nukleofilowej, w tym *zastępczej substytucji nukleofilowej atomu wodoru* (VNS), są wartościowym elementem strategii syntezy skondensowanych pochodnych pirazolu o potencjalnej aktywności cytostatycznej. Struktury wiodące zostały wytypowane na podstawie komputerowej predykcji aktywności biologicznej planowanych do otrzymania analogów pirazolu za pomocą aplikacji *PASS Inet*.
2. Istotne zwiększenie wydajności selektywnej redukcji *orto*-podstawionych produktów VNS do odpowiednich amin uzyskano, wykorzystując do tego celu uwodornienie grupy nitrowej z użyciem wodzianu hydrazyny w obecności katalizatora palladowego, jak również niklu Raneya.
3. Wykazano, iż efektywność etapu anulacji amin do odpowiednich pirazolopochodnych na drodze ich dwuazowania zwiększa obecność środowiska bezwodnego niwelującego problem słabej rozpuszczalności wyjściowych amin w wodzie z zastosowaniem azotynu izopentyłu jako czynnika dwuazującego (gł. cyklizacja w warunkach PTC oraz MAOS). Opisana w rozprawie cyklizacja stanowi wygodną alternatywę otrzymywania pochodnych indazolu, względnie wielopierścieniowych związków z dobudowanym układem pirazolu. Nie wymaga ona bowiem obecności silnie dezaktywującej grupy, jak NO₂, w pierścieniu benzenowym.
4. Mając na uwadze możliwość oddziaływania zsyntetyzowanych związków z niskocząsteczkowymi ligandami w kontekście ich spodziewanej aktywności biologicznej, podjęto próbę oszacowania współczynnika podziału ($\log P$) otrzymanych związków **35-41**, **43-44** metodami *in silico* (z zastosowaniem oprogramowania *ACD Lab/ChemSketch* oraz platformy *VCCLAB*). Ponadto celem weryfikacji danych teoretycznych, uwzględniając satysfakcjonującą rozpuszczalność analitu w użytej w metodzie HPLC fazie ruchomej, badaniami eksperymentalnymi objęto związki **35-37**, **40-41**. Wykazano przy tym, że największą korelację wyników analizy eksperymentalnej $\log P$ w porównaniu z danymi teoretycznymi zaobserwować można w przypadku związków **35-37**, **41**. Powstałe rozbieżności wynikać mogą z różnorodnych algorytmów obliczeniowych implementowanych w

- wykorzystanych programach komputerowych (analiza teoretyczna log P) oraz niedoskonałości fazy ruchomej (pomiar HPLC).
5. Dla finalnych produktów **35-41**, **43-44** przeprowadzono analizę konformacyjną w celu znalezienia dla nich najbardziej trwałego energetycznie izomeru i wykazano, że poszczególne systemy aromatyczne nie są do siebie w pełni koplanarne, co pozostaje w zgodzie z danymi z piśmiennictwa dotyczącymi innych azahetarenów o aktywności interkalującej DNA. Ponadto dane strukturalne **35** okazały się zbieżne z wynikami przeprowadzonej dla wymienionej pochodnej analizy rentgenostrukturalnej popartej analizą DSC.
 6. Celem zbadania komórkowego mechanizmu działania otrzymanych związków, oprócz zastosowanych technik cytometrii przepływowej, zaproponowano prostą i skuteczną metodę oceny miejsc oszacowania miejsc oddziaływania ksenobiotyku z niskocząsteczkowymi ligandami. Wykorzystując w tym celu analizę ^1H NMR związku **41** bez i z dodatkiem soli magnezu w temperaturach 25, 40 i 60 °C oraz komputerowe techniki *teorii funkcjonalu gęstości* DFT (B3LYP/6-31G(d,p)/IGLO-II) w modelu rozpuszczalnikowym PCM, stwierdzono, iż obecne w środowisku jony Mg^{2+} ulegają istotnemu oddziaływaniu z atomem wodoru związanym z pozycją 7 i związanym z pirolowym atomem azotu analizowanej pochodnej **41**.
 7. Słuszność podjętych przez autora założeń w zakresie przewidywanej aktywności biologicznej otrzymywanych układów potwierdziły wstępne badania aktywności **35** i **39** w modelu *in vitro* względem linii komórek nowotworowych HT29 i wykazały ich aktywność cytotoksyczną i proapoptotyczną, przy czym większym indeksem cytotoksyczności IC_{50} cechowała się pochodna **35**.

7. STRESZCZENIE

W trakcie wykonywania rozprawy doktorskiej zrealizowano opisane poniżej zadania badawcze.

1. Na podstawie zebranych danych literaturowych oraz przewidywania metodą *PASS Inet* zaprojektowano syntezę związków zawierających układ pirazolu skondensowany z pierścieniem aromatycznym lub heteroaromatycznym, a mogących wykazywać działanie przeciwnowotworowe.
2. Skondensowane pochodne pirazolu otrzymano w wyniku trój- lub czteroetapowej metodyki składającej się z syntezy związków nitroaromatycznych, dołączenia w pozycji *orto* do grupy nitrowej podstawnika tosylometyloвого (reakcja zastępczej substytucji nukleofilowej, VNS), redukcji grupy nitrowej do aminowej i dwuazowania-cyklizacji prowadzącej do utworzenia pierścienia pirazolu dobudowanego do istniejącego układu aromatycznego bądź heteroaromatycznego. Dwa ostatnie etapy wymagały optymalizacji warunków reakcji. W jej trakcie zaobserwowano, że najbardziej selektywną i jednocześnie najbardziej wydajną metodą redukcji grupy nitrowej było uwodornienie za pomocą systemu H_2N-NH_2 /katalizator (Nikiel Raneya lub Pd/C). Natomiast najbardziej korzystną metodą cyklizacji, pozwalającą na wymuszenie reakcji także w przypadku szczególnie trudno rozpuszczalnych w wodzie lub rozpuszczalnikach organicznych substratów aminowych, okazała się technika MAOS wykorzystująca stałe podłoże (żel krzemionkowy), azotyn izopentylu i niewielkie ilości kwasu octowego.
3. Badania krystalograficzne wykonane dla **19** i **35** wykazały, że pierwszy z nich cechują ciekawe właściwości związane najprawdopodobniej z podwyższoną kwasowością grupy metylenowej, a mianowicie zdolność do tworzenia słabych wiązań wodorowych typu $CH\cdots O$, zarówno wewnątrz- jak i międzycząsteczkowych. Możliwość tworzenia tego typu wiązań jest interesująca ze względu na ich ewentualny udział w wiązaniu z receptorem biologicznym. Studia nad słabymi wiązaniami wodorowymi w niektórych innych otrzymanych w pracy związków są obecnie kontynuowane.

4. We współpracy z zespołem z Katedry i Zakładu Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej oraz Katedry i Zakładu Biochemii Farmaceutycznej przeprowadzono wstępne badania na aktywność przeciwnowotworową dwóch związków, z których **35** wykazał obiecujące działanie przeciwrakowe na linii komórkowej HT29 .
5. Dla **41**, będącego obecnie w fazie badań skринingowych na aktywność przeciwnowotworową, wykonano teoretyczne i eksperymentalne studia nad możliwym mechanizmem jego działania, zasadzającym się na kompleksowaniu jonów magnezowych. Wykazano, że w kompleksowanie szczególnie zaangażowane są następujące elementy strukturalne tego związku: pirydynowy atom azotu pirazolu i pozycja 7 indazolu.
6. Na drodze teoretycznej i doświadczalnej dokonano wstępnej oceny fundamentalnego dla właściwości ADME/Tox parametru $\log P$ (lipofilność) dla sześciu skondensowanych pochodnych pirazolu. Dobrą korelację wyników odnotowano dla związków **35-37, 41**.
7. W celu zbadania możliwości polimorfizmu związku **35** we współpracy z zespołem Katedry i Zakładu Technologii Postaci Leku wykonano analizę termiczną. Wykazała ona, że związek ten nie tworzy postaci amorficznej.

8. SUMMARY

“Synthesis and biological properties of some fused pyrazole derivatives”

The below described scientific tasks have been fulfilled during the preparation of the doctor thesis.

- 1 Basing on the literature data and prediction by the *PASS Inet* program, the synthesis of compounds consisted of a pyrazole ring fused to an aromatic or heteroaromatic unit was designed, taking into account their possible anticancer activity.
- 2 The above condensed pyrazole analogues were obtained by a three- or four-step methodology including synthesis of nitroderivatives followed by the attachment of a tosylmethyl moiety *ortho* to the nitro group (the vicarious nucleophilic substitution, VNS), reduction of the nitro functionality to an amino group, and diazotization-cyclization. The latter step provided compounds in which the pyrazole ring was fused to an arene or hetarene. Both reduction and cyclization were optimized. The hydrogenation with the use of hydrazine as a source of molecular hydrogen and Raney Nickel or Pd/C as catalysts was proved to be the best reduction method whereas the most efficient cyclization method was that involving solid phase (silica gel) and microwave reactor. This cyclization was carried out using isopentyl nitrite and small amount of acetic acid.
- 3 The crystallographic studies done for **19** and **35** showed that the first compound has an interesting properties connected with increased acidity of the methylene protons. It is able to form both intra- and intermolecular weak hydrogen bonds of the CH \cdots O type. These hydrogen bondings might be involved in interactions substrate–biological receptor. Investigations on their occurring in other compounds obtained in this dissertation are currently in progress.
- 4 In cooperation with the Department of Clinical Chemistry and the Department of Biopharmaceutical Chemistry group, preliminary studies involving anticancer activity were carried out on two condensed derivatives. Compound **35** showed promising activity against HT29 cell lines.
- 5 Another compound, namely **41**, that undergoes currently anticancer tests, was subjected to theoretical and experimental studies dealing with its possible mechanism

of biological action. The mechanism may involve complexation of magnesium cations. The investigations showed that the possible complexation centre comprises of the pyrazole pyridinic nitrogen and position 7 of indazole ring.

- 6 Preliminary studies on lipophilicity (log P) of selected six condensed pyrazole derivatives, including these active against cancer cell lines, were carried out by theoretical and experimental methods.
- 7 The thermal analysis executed in cooperation with the Department of Pharmaceutical Technology group showed that compound **35** does not exist in an amorphous form.

9. PIŚMIENNICTWO

1. Kujawski, J.; Janusz, A.; Kuźma, W.; Ożarowski, M.; Kujawski, R. *Farm. Pol.* **2010**, 66, 2, 117-125 i literatura tam cytowana.
2. Eicher, T.; Hauptmann, S. *The Chemistry of Heterocycles* **2003**, 2nd Ed. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/>; data ostatniego logowania: 23.03.2012.
4. <http://vls.icm.edu.pl/>; data ostatniego logowania: 23.03.2012.
5. Makino, K.; Kim, H.S.; Kurasawa, Y. *Heterocycl. Chem.* **1999**, 36, 321-332.
6. Dadiboyena, S.; Nefzi, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 5258-5275.
7. Bernard, M.K. *Tetrahedron* **2000**, 56, 7273-7284.
8. Malinowska, K.; Gałęcka, E.; Modranka, R.; Rutkowski, M.; Kędziora, J. *Pol. Merk. Lek.* **2008**, XXIV, 140, 151-157.
9. Keter, F.K.; Darkwa, J. *Biometals* **2012**, 25, 9-21.
10. Makino, K.; Kim, H.S.; Kurasawa, Y. *Heterocycl. Chem.* **1999**, 36, 321-332.
11. Fustero, S.; Simón-Fuentes A.; Sanz-Cervera J.F. *Org. Prep. Proced. Int.* **2009**, 41, 253–290.
12. Kujawski, J.; Popielarska, H.; Myka, A.; Drabińska, B.; Bernard, M.K. *Comput. Meth. Sci. Technol.* **2012**, 18, 2, 81-88 i literatura tam cytowana.
13. Mannhold, R. *Molecular Drug Properties: Measurement and Prediction* **2008** Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
14. Stefaniak, M.; Niestrój, A.; Klupsch, Sliwiok, A.; Pyka, A. *Chromatographia* **2005**, 62, 1-2, 87-89.
15. Pyka, A.; Rusek, D.; Bocheńska, P.; Gurak, D. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* **2009**, 33, 179-190.
16. Giaginis, C.; Tsantili-Kakoulidou, A. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* **2008**, 31, 79-96.
17. Héberger, K. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1158, 273-305.
18. Kujawski, J.; Bernard, M.K.; Janusz, A.; Kuźma, W. *J. Chem. Educ.* **2012**, 89, 64-67 i literatura tam cytowana.
19. Mowbray, C.E.; Corbau, R.; Hawes, M.; Jones, L.H.; Mills, J.E.; Perros, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 5603-5606.

20. Bandgar, B.P.; Gawande, S.S.; Bodade, R.G.; Gawande, N.M.; Khobragade, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 8168-8173.
21. Lemoine, R.C.; Petersen, A.C.; Setti, L.; Jekle, A.; Heilek, G.; deRosier, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4753–4756.
22. Makarov, V.A.; Riabova, O.B.; Granik, V.G.; Dahse, H-M.; Stelzner, A.; Wutzlerc, P.; Schmidtkec, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 37-39.
23. Yakaiah, T.; Lingaiah, B.P.V.; Narsaiah, B.; Shireesha, B.; Ashok Kumar, B.; Gururaj, S.; Parthasarathy, T.; Sridhar, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3445-3453.
24. Bauer, D.; Whittington, D.A.; Coxon, A.; Bready, J.; Harriman, S.P.; Patel, V.F.; Polverino, A.; Harmange, J-C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4844-4848.
25. Joule, J.A.; Mills, K. *Heterocyclic Chemistry* 5th Ed. **2010** Wiley-VCH, Weinheim.
26. Schmidt, A.; Beutler, A.; Snovydyovych, B. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 4073-4095.
27. Małkosza, M.; Wojciechowski, K. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 2631-2666 i literatura tam cytowana.
28. Herdnon, W.C. *Chem. Rev.* **1972**, *72* (2), 157–179.
29. Kappe, C.O.; Stadler, A. *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry* **2005**, Wiley-VCH, Weinheim.
30. van der Plas, H.C. *Acc. Chem. Res.* **1978**, *11*, 12, 462–468.
31. Varughese, D.J.; Manhas, M.S.; Bose, A.K. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6795–6797.
32. Leszczyński, T.; Duński, H. *Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej* **2006**, 65-76.
33. Martinez, R.; Chacón-García, L. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 127-151 i literatura tam cytowana.
34. Newhouse, B. J.; Hansen, J. D.; Grina, J.; Welch, M.; Topalov, G.; Littman, N.; Callejo, M.; Martinson, M.; Galbraith, S.; Laird, E.R.; Brandhuber, B.J.; Vigers, G.; Morales, T.; Woessner, R.; Randolph, N.; Lyssikatos, J.; Olivero, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3488-3492.
35. Ozscan, S.; Dengiz, C.; Deliömeroglu, M.K.; Sahin, E.; Balci, M. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 1495-1497.
36. Aksenova, I.V.; Aksenov, A.V.; Aksenov, N.A. *Chem. Heterocycl. Comp.* **2009**, *45*, 1, 117-118.
37. Fernandez, F.; Caamaño, O.; García, M.D.; Alkorta, I.; Elguero, J. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *62*, 3362-3369.

38. Sharma, P.K.; Singh, K.; Kumar, S.; Kumar, P.; Dhawan, S.N.; Lal, S.; Ulbrich, H.; Dannhardt, G. *Med. Chem. Res.* **2011**, 20, 239-244.
39. Samb, I.; Pellegrini-Moise, N.; Chapleur, Y. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 7978-7981.
40. Karci, F.; Karci, F. *Dyes and Pigments* **2008**, 76, 97-103.
41. Avedaño, C.; Menéndez, J. C. *Medicinal Chemistry of Anticancer Agents*, Elsevier, Amsterdam **2008**.
42. Klimczak, A.; Kubiak, K. *Pol. Merk. Lek.* **2009**, XXVII, 158, 148-151.
43. Malinowska, K.; Modranka, R.; Kubiak, K.; Klimczak, A.; Mrowicka, M.; Mrowicki, J. *Pol. Merk. Lek.* **2009**, XXVII, 158, 97-100.
44. Farghaly, A. *ARKIVOC* **2010**, 11, 177-187.
45. Butov, G.M.; Mokhov, V.M.; Parshin, G.Y.; Shevelev, S.A.; Dalinger, I.L.; Vatsadze, I.A.; Shkineva, T.K. *Russ. J. Org. Chem.* **2010**, 46, 1178-1180.
46. Rashad, A.E.; Hegab, M.I.; Abdel-Megeid, R.E.; Micky, J.A.; Abdel-Megeid, F.M.E. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 7102-7106.
47. Gadakh, A.V.; Pandit, C.; Rindhe, S.S.; Karale, B.K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 5572-5576.
48. Damljanovic, I.; Vukicevic, M.; Radulovic, N.; Palic, R.; Ellmerer, E.; Ratkovic, Z.; Joksovic, M.D.; Vukicevic, R.D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 1093-1096.
49. Riyadh, S.M. *Molecules* **2011**, 16, 1834-1853.
50. Wang, D.; Fan, L.; Zheng, C.; Fang, Z. *J. Fluor. Chem.* **2010**, 131, 584-586.
51. Tewari, A.K.; Srivastava, P.; Singh, V.P.; Singh, A.; Goel, R.K.; Mohan, C.G. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, 58, 5, 634-638.
52. Claramunt, R.M.; Bouissane, L.; Cabildo, M.P.; Cornago, M.P.; Elguero, J.; Radziwon, A.; Medina, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 1290-1296.
53. Das, J.; Moquin, R.V.; Dyckman, A.J.; Li, T.; Pitt, S.; Zhang, R.; Shen, D.R.; McIntyre, K.W.; Gillooly, K.; Doweyko, A.M.; Newitt, J.A.; Sack, J.S.; Zhang, H.; Kiefer, S.E.; Kish, K.; McKinnon, M.; Barrish, J.C.; Dodd, J.H.; Schieven, G.L.; Leftheris, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 6886-6889.
54. Patel, Ch.K.; Rami, C.S.; Panigrahi, B.; Patel, C.N. *J. Chem. Pharm. Res.* **2010**, 2, 1, 73-78.
55. Farag, A.M.; Mayhoub, A.S.; Eldebss, T.M.A.; Amr, A.E.; Ali, K.A.K.; Abdel-Hafez, N.A.; Abdulla, M.M. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2010**, 343, 384-396.

56. Lange, J.H.M.; van der Neut, M.A.W.; den Hartog, A.P; Wals, H.C.; Hoogendoorn, J.; van Stuivenberg, H.H., van Vliet, B. J.; Kruse, C.G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 1752-1757.
57. Truong, A.P.; Aubele, D. L.; Probst, G.D.; Neitzel, M.L.; Semko, C. M.; Bowers S.; Dressen, D.; Homa, R.K., Konradi, A.W.; Sham, H.L.; Garofalo, A.W.; Keim, P.S.; Wub, J., Dappen, M.S.; Wong, K.; Goldbach, E.; Quinn, K.P.; Sauer, J.; Brigham, E.F.; Wallace, W.; Nguyen, L.; Hemphill, S.S.; Bova, M.P.; Basi, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 4920-4923.
58. Narlawar, R.; Pickhardt, M.; Leuchtenberger, S.; Baumann, K.; Krause, S.; Dyrks, T.; Weggen, S.; Mandelkow, E.; Schmidt, B. *ChemMedChem.* **2008**, 3, 1, 165-172.
59. Chimenti, F.; Carradori, S.; Secci, D.; Bolasco, A.; Bizzarri, B.; Chimenti, P.; Granese, A.; Yanez, M; Orallo, F. *E. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 800-804.
60. Chmielarczyk, W. *Farm. Pol.* **2006**, 62, 6, 239-249.
61. Wojciechowska, U.; Didkowska, J.; Zatoński, W. *Nowotwory złośliwe w Polsce w 2006 roku*, Zakład Poligraficzno-Wydawniczy „WEDA”, Warszawa **2008**.
62. <http://www.stat.gov.pl>; Główny Urząd Statystyczny; data ostatniego logowania: 26.05.2010 r.
63. Dyzmann-Sroka, A.; Myślińska, W.; Olenderczyk, W.; Plucińska, A.; Rymarczyk-Wciorko, M.; Szczęch, B.; Trojanowski, M.; Wosicka, T. *Nowotwory złośliwe w Wielkopolsce w 2007 roku – Biuletyn nr 6*, Poznań **2009**, 7, 23; Zakład Poligraficzny Moś i Łuczak.
64. <http://www.wco.pl>; data ostatniego logowania: 6.06.2010.
65. Dias, N.; Jacquemard, U.; Baldeyrou, B.; Tardy, C.; Lansiaux, A.; Colson, P.; Tanius, F.; Wilson, W.D.; Routier, S.; Mérour J.Y.; Bailly, C. *Biochemistry* **2004**, 43, 48, 15169-15178.
66. Palchaudhuri, R.; Hergenrother, P.J. *Curr. Opinion Biotech.* **2007**, 18, 497-503.
67. Qui, Y.; Hurley, L.H. *Biochimie* **2008**, 90, 8, 1149-1171.
68. Juskowiak, B.; Gałęzowska, E.; Paczesny, J. *Wiadomości Chemiczne* **2006**, 60, 7-8.
69. Pagano, B.; Giancola, C. *Curr. Cancer Drug Target* **2007**, 7, 6, 520-540.
70. Petraccone, L.; Barone, G.; Giancola, C. *Curr. Med. Chem. - Anticancer Agents* **2005**, 5, 5, 463-475.
71. Strekowski, L.; Wilson, B. *Mutation Research* **2007**, 623, 3-13.

72. Sebolt, J.S.; Scavone, S.V.; Pinter, C.D.; Hamelchle, K.L.; Von Hoff, D.D.; Jackson, R.C. *Cancer Research* **1987**, *47*, 4299-4304.
73. Adjei, A.A. *Investigational New Drugs* **1999**, *17*, 43-48.
74. Umemura, K.; Mizushima, T.; Katayama, H.; Kiryu, Y.; Yamoro, T.; Andoh, T. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 4, 873-880.
75. Supino, R.; Polizzi, D.; Pavesi, R.; Pratesi, G.; Guano, F.; Capranico, G.; Palumbo, M.; Sissi, C.; Richter, S.; Beggiolin, G.; Menta, E.; Pezzoni, G.; Spinelli, S.; Torriani, D.; Carenini, N.; Dal Bo, L.; Facchinetti, F.; Tortoreto, M.; Zunino, F. *Oncology* **2001**, *61*, 234-242.
76. Begleiter, A.; Lin, D.; Larson, K.K.; Lang, J.; Wu, X.; Cabral, T.; Taylor, H.; Guziec, L.J.; Kerr, P.D.; Hasinoff, B.B.; Guziec, Jr.F.S. *Oncology Reports* **2006**, *15*, 1575-1580.
77. Hasinoff, B.B.; Liang, H.; Wu, X.; Guziec, L.J.; Guziec, Jr.F.S.; Marshall, K.; Yalowich, J.C. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 3959-3968.
78. Dees, E.C.; Whitfield, L.R.; Grove, W.R.; Rummel, S.; Grochow, L.B.; Donehower, R.C. *Clinical Cancer Research* **2000**, *6*, 3885-3894.
79. El-Deeb, I.M.; Lee, S.H. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3961-3973.
80. Bindi, S.; Fancelli, D.; Alli, C.; Berta, D.; Bertran, J.A.; Cameron, A.D.; Cappella, P.; Carpinelli, P.; Cervi, G.; Croci, V.; D'Anello, M.; Forte, B.; Giorgini, M.L.; Marsiglio, A.; Moll, J.; Pesenti, E.; Pittalf, V.; Pulici, M.; Riccardi-Sirtori, F.; Roletto, F.; Soncini, C.; Storici, P.; Varasi, M.; Volpi, D.; Zugnoni, P.; Vianello, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7113-7120.
81. Shi, J.; Xu, G.; Zhu, W.; Ye, H.; Yang, S.; Luo, Y.; Han, J.; Yang, J.; Li, R.; Wei, Y.; Chen, L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4273-4278.
82. Porter, J.; Payne, A.; de Candole, B.; Ford, D.; Hutchinson, B.; Trevitt, G.; Turner, J.; Edwards, C.; Watkins, C.; Whitcombe, I.; Davis, J.; Stubberfield, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 230-233.
83. Foloppe, N.; Fisher, L.M.; Howes, R.; Potter, A.; Robertson, A.G.S.; Surgenor, A.E. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 4792-4802.
84. Brnardic, E.J.; Garbaccio, R.M.; Fraley, M.E.; Tasber, E.S.; Steen, J.T.; Arrington, K.L.; Dudkin, V.Y.; Hartman, G.D.; Stirdivant, S.M.; Drakas, B.A.; Rickert, K.; Walsh, E.S.; Hamilton, K.; Buser, C.A.; Hardwick, J.; Tao, W.; Beck, S.C.; Mao, X.; Lobell, R.B.; Sepp-Lorenzino, L.; Yan, Y.; Ikuta, M.; Munshi, S.K.; Kuo, L.C.; Kreatsoulas, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5989-5994.

85. Abadi, A.H.; Eissa, A.A.H.; Hassan, G.S. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, 51, 838-844.
86. Zheng, L.; Li, Y.; Geb, D.; Zhao, B.; Liu, Y.; Lv, H.; Ding, J.; Miao, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 4766-4770.
87. Mancano, M.; Ametller, E.; Gascón, P.; Almendro, V. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, 1816, 105-118.
88. Mutschler, E. *Farmakologia i toksykologia*. MediPharm Polska, Wrocław **2010**.
89. Fossa, P.; Pestarino, M.; Menozzi, G.; Mosti, L.; Schenone, S.; Ranise, A.; Bondavalli, F.; Trincavelli, M.L.; Lucacchini, A.; Martini, C. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 2262-2270.
90. Liu, K.G.; Robichaud, A.J.; Greenfield, A.A.; Lo, J.R.; Grosanu, C.; Mattes, J.F.; Cai, Y.; Zhang, G.M.; Zhang, J.Y.; Kowal, D.M.; Smith, D.L.; Di, L.; Kerns, E.H.; Schechter, L.E.; Comery, T.A. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 650-662.
91. Dosa, P.I.; strah-Pleyne, S.; Jayakumar, H.; Casper, M.; Decaire, M.; Xiong, Y.; Lehmann, J.; Choi, K.; Elwell, K.; Wong, A.; Webb, R.R.; Adams, J.W.; Ramirez, J.; Richamn, J.G.; Thomsen, W.; Semple, G.; Teegarden, B.R. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 19, 5486-5489.
92. Savini, L.; Massarelli, P.; Nencini, C.; Pellerano, C.; Biggio, G.; Maciocco, A.; Tuligi, G.; Carrieri, A.; Cinone, N.; Carotti, A. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 389-399.
93. Tyagarajan, S.; Chakravarty, P.K.; Zhou, B.; Taylor, B.; Fisher, M.H.; Wyvratt, M.J.; Lyons, K.; Klatt, T.; Li, X.; Kumar, S.; Williams, B.; Felix, J.; Priest, B.T.; Brochu, R.M.; Warren, V.; Smith, Mc.; Garcia, M.; Kaczorowski, G.J.; Martin, W.J.; Abbadie, C.; McGowan, E.; Jochnowitz, N.; Parsons, W.H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 5480-5483.
94. Ci, S.; Ren, T.; Su, Zh. *J. Mol. Model.* **2007**, 13, 457-464.
95. Zinzchenko, W. *Synteza pochodnych układów skondensowanej pirydazyny o przypuszczalnym działaniu biologicznym. Rozprawa doktorska* **2007**, Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań.
96. Skierska, U. *Substytucja nukleofilowa w niektórych aryłowych pochodnych pirydazyny i skondensowanej pirydazyny. Rozprawa doktorska* **2009**, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań.
97. Takahashi, M.; Suga, D. *Synthesis* **1998**, 7, 986-990.
98. <http://195.178.207.233/PASS/>; data ostatniego logowania: 21.06.2010.

99. Kujawski, J.; Bernard, M.K.; Dawidziak, J.; Janusz, A.; Kuźma, W.; Michałowski, M.; Lesyk, R. *Laboratorium-Przegląd Ogólnopolski* **2009**, 6, 34-36 i literatura tam cytowana.
100. Mąkosza, M.; Goliński, J.; Baran, J. *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 1488-1494.
101. Street, L.J.; Baker, R.; Davey, W.B.; Guiblin, A.R.; Jelley, R.A.; Reeve, A.J.; Routledge, H.; Sternfeld, F.; Watt, A.P.; Beer, M.S.; Middlemiss, D.N.; Noble, A.J.; Stanton, J.A.; Scholey, K.; Hargreaves, R.J.; Sohal, B.; Graham, M.I.; Matassa, V.G. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 1799-1810.
102. Romagnoli, R.; Baraldi, P.G.; Cruz-Lopez, O.; Cara C.L.; Carrion, M.D.; Brancale, A.; Hamel, E.; Chen, L.; Bortolozzi, R.; Basso, G.; Viola, G. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 4248-4258.
103. Tokmakov, G.P.; Grandberg, I.I. *Tetrahedron* **1995**, 51, 2091-2098.
104. Chakrabarty, M.; Kundu, T.; Arima, S.; Harigaya, Y. *Tetrahedron* **2008**, 64, 6711-6723.
105. Zelenin, K.N.; Tugusheva, A.R.; Yakimovich, S.I.; Alekseev, V.V.; Zerova, E.V. *Chem. Heterocycl. Comp.* **2002**, 38, 6, 668-676 i literatura tam cytowana.
106. Bellina, F.; Calandri, Ch.; Cauteruccio, S.; Rossi, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 13, 2147-2151.
107. Vokin, A.I.; Shulunova, A.M.; Aksamentova, T.N.; Es'kova, L.A.; Elokhina, V.N.; Lopyrev, V.A.; Turchaninov, V.K. *Russ. J. Gen. Chem.* **2001**, 71, 137-142.
108. Watanabe, M.; Nishiyama, M.; Yamamoto, T.; Koie, Y. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 481-483.
109. Lidström, P.; Tierney, J.; Wathey, B.; Westman, J. *Tetrahedron* **2001**, 57, 9225-9283.
110. You, X.; Guo, Q.-X. *Heterocycles* **2004**, 63, 4, 903-974.
111. Aljobour, S.; Hamada, H.; Tagawa, T. *Top. Catal.* **2010**, 53, 7-10, 694-699.
112. Wojciechowski, K.; Mąkosza, M. *Synthesis* **1986**, 8, 651-653.
113. Mąkosza, M.; Kinowski, A.; Danikiewicz, W.; Mudryk, B. *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, 1, 69-77.
114. Bernard, M.K.; Szafran, B.; Wrzeciono, U.; Mąkosza, M. *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 6, 545-549.
115. Bernard, M.K. *P. J. Chem.* **1997**, 71, 1413-1420.
116. Allen, F.H.; Kennard, O.; Watson, D.G.; Brammer, L.; Orpen, A.G.; Taylor, R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1987**, 2, S1-S19.
117. Bernard, M.K.; Szoja, C.; Wrzeciono, U. *niepublikowane dane*.
118. Chakrabarty, M.; Kundu, T.; Arima, S.; Harigaya, Y. *Tetrahedron* **2008**, 64, 6711-6723.

119. Totoń, E.; Ignatowicz, E.; Bernard, M.K.; Kujawski, J.; Rybczyńska, M. *J. Phys. Pharm.* **2013**; w recenzji.
120. *Gaussian 09*, Revision A.1 Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, Jr., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, N. J.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian, Inc., Wallingford CT*, **2009**.
121. Pielan, L. *Idee chemii kwantowej* WN PWN, Warszawa **2006**.
122. Parr, R.G.; Yang, W. *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules* Oxford University Press, New York **1994**.
123. Becke, A.D. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648-5652.
124. Doskocz, M.; Kubas, K.; Frąckowiak, A.; Gancarz, R. *Polyhedron* **2009**, 28, 2201-2205.
125. Doskocz, M.; Malinowska, B.; Lejczak, B.; Kafarski, P. *J. Mol. Struct.* **2009**, 920, 103-109.
126. Petersson, G.A.; Bennett, A.; Tensfeldt, T.G.; Al-Laham, M.A.; Shirley, W.A.; Mantzaris, J. *J. Chem. Phys.* **1988**, 89, 2193-2218.
127. Cammi, R.; Mennucci, B.; Tomasi, J. *J. Phys. Chem. A* **2000**, 104, 5631-5638.
128. Davidson, N. *Statistical Mechanics* McGraw-Hill, New York **1962**.
129. Wolf, F.I.; Maier, J.A.M.; Nasulewicz, A.; Feillet-Condray, C.; Simonacci, M.; Mazur, A.; Cittadini, A. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, 458, 24-32.
130. Gómez-Ariza, J.L.; García-Barrera, T.; Lorenzo, F.; Bernal, V.; Villegas, M.J.; Oliveira, V. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 524, 15-22.
131. Sharma, B.; Frontiera, R.R.; Henry, A.-I.; Ringe, E.; van Duyne, R.P. *Mater. Today* **2012**, 15, 1-2, 16-25.

132. Liu, Sh.; Zheng, G.; Li, J. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2011**, 79, 1739-1746.
133. Bocquet, M.-L.; Wang, B. *Prog. Surf. Sci.* **2010**, 85, 435-459.
134. Vokáčová, Z.; Trantírek, L.; Sychrovsky, V. *J. Phys. Chem. A* **2010**, 114, 10202-10208.
135. Sychrovsky, V.; Sochorova-Vokáčová, Z.; Trantírek, L. *J. Phys. Chem. A* **2012**, 116, 4144-4151.
136. Benda, L.; Schneider, B.; Sychrovsky, V. *J. Phys. Chem. A* **2011**, 115, 2385-2395.
137. Kutzelnigg, W.; Fleischer, U.; Schindler, M. *The IGLO-Method: Ab Initio Calculation and Interpretation of NMR Chemical Shifts and Magnetic Susceptibilities*. Rozdział 3 w *NMR Basic Principles and Progress*, Springer-Verlag, Berlin **1991**, 23, 165-262.
138. Wilson, A.; van Mourik, T.; Dunning Jr., T.H. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **1997**, 388, 339-349.
139. Barfield, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 4158-4168.
140. <http://www.vcclab.org/>; data ostatniego logowania: 3.01.2013.
141. Haky, J.E.; Young, A.M. *J. Liq. Chromatogr.* **1984**, 7, 675-689.
142. Fei, X.; Zheng, Q.-H. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* **2005**, 28, 939-945.
143. <http://www.emolecules.com/>; baza eMolecules; data ostatniego logowania: 10.12.2012.
144. <http://www.chemspider.com/>; baza ChemSpider; data ostatniego logowania: 10.12.2012.
145. Agrafiotis, D.K.; Bandyopadhyay, D.; Wegner, J.K.; Vlijmen, van H. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, 47, 1279-1293.
146. Varnek, A.; Bskin, I. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, 52, 1413-1437.
147. Mąkosza, M.; Danikiewicz, W.; Wojciechowski, K. *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, 711-715.
148. Danikiewicz, W.; Mąkosza, M. *Tetrahedron Letters* **1985**, 26, 3599-3600 i literatura tam cytowana.

10. SUPLEMENT

Tabela S.1. Dane krystalograficzne związku 35.

wzór sumaryczny	$C_{14}H_{11}ClN_2O_2S$
M_{cz}	306.76
układ krystalograficzny	rombowy
grupa przestrzenna	$P2_12_12_1$
parametry komórki elementarnej	$a = 6.5230(10) \text{ \AA}$ $b = 8.511(2) \text{ \AA}$ $c = 25.349(5) \text{ \AA}$ $V = 1407.3(5) \text{ \AA}^3$
liczba cząsteczek w komórce elementarnej	$Z = 4$
gęstość obliczona	1.448 g/cm ³
$F(000)$	632
μ (Mo $K\alpha$)	3.817 mm ⁻¹

Tabela S.2. Dane dotyczące pomiaru dyfraktometrycznego i parametry opisujące jakość rozwiązania struktury związku 35.

wymiary kryształu	0.45 x 0.40 x 0.25 mm
zakres kątowy dla 52 refleksów (do wyznaczenia parametrów komórki elem. i obliczenia macierzy orientacji)	$15.2 \leq \theta \leq 28.3^\circ$
metoda skanowania refleksów	$\omega/2\theta$ scans
temperatura pomiaru	293(2) K
promieniowanie	Cu $K\alpha$ (1.54178 \AA)
zakresy zmierzonych refleksów	$h: -7 \rightarrow 7$; $k: 0 \rightarrow 10$; $l: 0 \rightarrow 30$
liczba refleksów zmierzonych i niezależnych	2753 ($\theta \leq 70.1$), 2551
refleksy obserwowalne [$I \geq 2\sigma(I)$]	2217
liczba udokładnianych parametrów	187
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$, $wR(F^2)$, S	0.033, 0.096, 1.04
stosunek przesunięcia parametru do jego odchylenia standardowego	$(\Delta/\sigma)_{\max} = 0.001$
resztkowe piki na różnicowej mapie Fouriera [$e/\text{\AA}^3$]	-0.17, 0.19

Tabela S.3. Współrzędne ułamkowe oraz równoważne izotropowe czynniki temperaturowe (A^2) dla atomów niewodorowych wraz z odchyleniami standardowymi dla związku 35.

$$U_{\text{eq}} = 1/3(U_{11} + U_{22} + U_{33})$$

Atom	x/a	y/b	z/c	U_{eq}
N1	0.6174(4)	0.7071(3)	0.26680(9)	0.0705(6)
N2	0.5847(3)	0.5622(3)	0.28515(8)	0.0654(6)
C3	0.7402(4)	0.5343(3)	0.31725(8)	0.0568(5)
C4	0.8773(4)	0.6635(3)	0.32050(8)	0.0538(5)
C5	1.0611(4)	0.6968(3)	0.34689(10)	0.0598(6)
C6	1.1424(5)	0.8425(3)	0.33860(10)	0.0696(7)
C7	1.0496(6)	0.9550(3)	0.30597(12)	0.0787(9)
C8	0.8722(5)	0.9216(4)	0.27912(12)	0.0770(8)
C9	0.7881(4)	0.7748(3)	0.28666(9)	0.0615(6)
S10	0.74968(10)	0.35936(7)	0.35240(2)	0.05937(18)
O11	0.6374(3)	0.2423(2)	0.32366(8)	0.0741(5)
O12	0.9609(3)	0.3324(2)	0.36517(8)	0.0718(5)
C13	0.6147(4)	0.4004(3)	0.41064(9)	0.0584(6)
C14	0.4178(4)	0.3482(3)	0.41731(11)	0.0685(7)
C15	0.3132(5)	0.3845(4)	0.46305(12)	0.0767(8)
C16	0.4013(5)	0.4750(3)	0.50185(11)	0.0724(7)
C17	0.6006(5)	0.5279(4)	0.49418(11)	0.0815(9)
C18	0.7086(5)	0.4906(4)	0.44936(10)	0.0754(8)
C19	0.2867(7)	0.5182(5)	0.55133(13)	0.1018(12)
Cl20	1.36821(14)	0.89250(12)	0.37059(4)	0.0984(3)

Tabela S.4. Współrzędne ułamkowe oraz izotropowe czynniki drgań termicznych (A^2) dla atomów wodoru wraz z odchyleniami standardowymi dla związku 35.

Atom	x/a	y/b	z/c	U
H1	0.536(7)	0.757(5)	0.2440(18)	0.117(14)
H5	1.1240	0.6237	0.3688	0.072
H7	1.1092	1.0537	0.3025	0.094
H8	0.8115	0.9948	0.2568	0.092
H14	0.3549	0.2886	0.3912	0.082
H15	0.1805	0.3470	0.4677	0.092
H17	0.6622	0.5898	0.5199	0.098
H18	0.8427	0.5253	0.4450	0.090
H19A	0.2771	0.6304	0.5540	0.153
H19B	0.3585	0.4777	0.5815	0.153
H19C	0.1514	0.4739	0.5501	0.153

Tabela S.5. Dane krystalograficzne związku 19.

wzór sumaryczny	$C_{19}H_{19}N_3O_4S$
M_{cz}	385.43
układ krystalograficzny	jednoskośny
grupa przestrzenna	$P2_1/n$
parametry komórki elementarnej	$a = 16.8425(6) \text{ \AA}$ $b = 5.30288(18) \text{ \AA}$ $c = 21.5561(8) \text{ \AA}$ $\alpha = 90.00^\circ$ $\beta = 107.971(4)^\circ$ $\gamma = 90.00^\circ$ $V = 1831.34(11) \text{ \AA}^3$
liczba cząsteczek w komórce elementarnej	$Z = 4$
gęstość obliczona	1.398 g/cm^3
$F(000)$	808
μ (Mo $K\alpha$)	0.208 mm^{-1}

Tabela S.6. Dane dotyczące pomiaru dyfraktometrycznego i parametry opisujące jakość rozwiązania struktury 19.

wymiary kryształu	0.50 x 0.50 x 0.20 mm
zakres kątowy dla 3449 refleksów (do wyznaczenia parametrów komórki elem. i obliczenia macierzy orientacji)	$2.42 \leq \theta \leq 29.01^\circ$
metoda skanowania refleksów	ω scans
temperatura pomiaru	293(2) K
promieniowanie	Mo $K\alpha$ (0.71073 \AA)
zakresy zmierzonych refleksów	$h: -22 \rightarrow 22$; $k: -7 \rightarrow 7$; $l: -27 \rightarrow 29$
liczba refleksów zmierzonych i niezależnych	21152 ($\theta \leq 29.07$), 4561
refleksy obserwowalne [$I \geq 2\sigma(I)$]	2673
liczba udokładnianych parametrów	259
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$, $wR(F^2)$, S	0.0515, 0.1414, 1.013 $w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0609P)^2 + 0.3620P]$ gdzie $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
stosunek przesunięcia parametru do jego odchylenia standardowego	$(\Delta/\sigma)_{\max} = 0.001$
resztkowe piki na różnicowej mapie Fouriera [$e/\text{\AA}^3$]	-0.299, 0.244

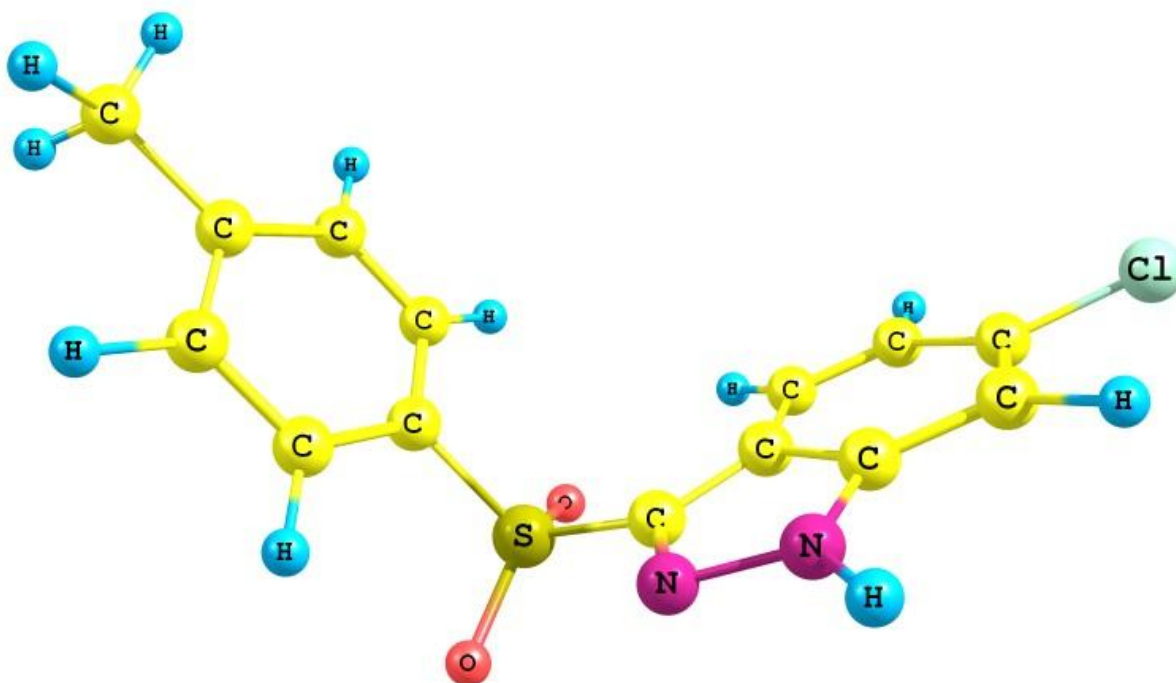
Tabela S.7. Współrzędne ułamkowe oraz równoważne izotropowe czynniki temperaturowe (\AA^2) dla atomów niewodorowych wraz z odchyleniami standardowymi dla związku 19.

$$U_{\text{eq}} = 1/3(U_{11} + U_{22} + U_{33})$$

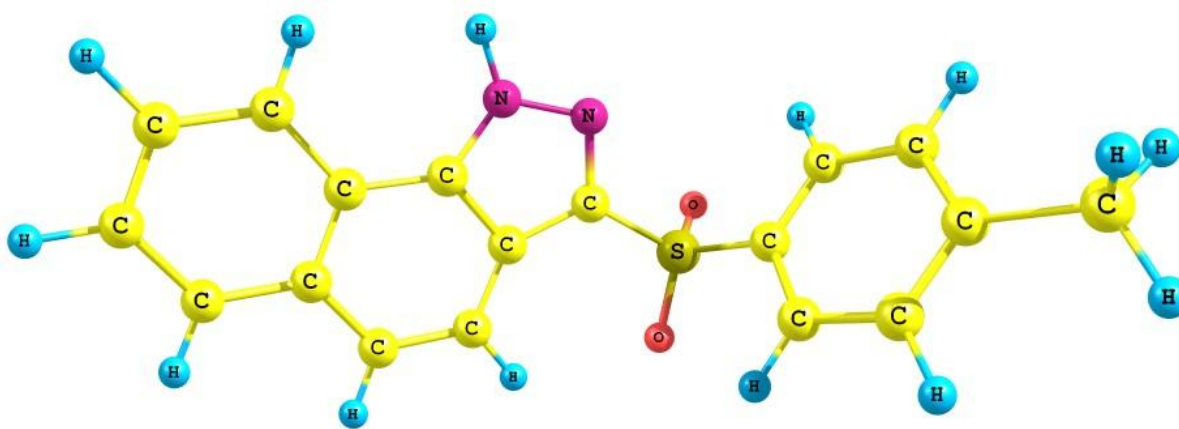
Atom	x/a	y/b	z/c	U_{eq}
N1	0.81725(12)	1.5014(3)	-0.10331(9)	0.0514(5)
N2	0.82509(13)	1.5839(4)	-0.16181(9)	0.0591(5)
C3	0.88516(17)	1.7548(5)	-0.14538(13)	0.0642(7)
C4	0.91630(16)	1.7805(6)	-0.07768(14)	0.0705(7)
C5	0.87295(15)	1.6193(5)	-0.05138(12)	0.0610(6)
C6	0.75552(14)	1.3179(4)	-0.10449(11)	0.0478(5)
C7	0.71859(14)	1.3062(4)	-0.05575(11)	0.0467(5)
C8	0.65981(13)	1.1252(4)	-0.05433(10)	0.0464(5)
C9	0.63718(14)	0.9537(4)	-0.10648(11)	0.0496(5)
C10	0.67186(16)	0.9702(5)	-0.15697(12)	0.0586(6)
C11	0.73061(15)	1.1493(5)	-0.15620(11)	0.0571(6)
C12	0.62788(16)	1.1326(5)	0.00362(11)	0.0497(6)
S13	0.69914(4)	0.96663(11)	0.07048(3)	0.04916(19)
O14	0.77902(10)	1.0882(4)	0.08577(8)	0.0656(5)
O15	0.69452(11)	0.7029(3)	0.05491(8)	0.0640(5)
C16	0.65964(13)	1.0118(4)	0.13606(10)	0.0431(5)
C17	0.68707(14)	1.2154(4)	0.17714(11)	0.0526(6)
C18	0.66065(15)	1.2399(4)	0.23135(11)	0.0552(6)
C19	0.60765(14)	1.0659(4)	0.24547(11)	0.0517(6)
C20	0.57906(14)	0.8676(4)	0.20254(11)	0.0533(6)
C21	0.60482(14)	0.8385(4)	0.14819(11)	0.0500(5)
C22	0.58195(19)	1.0911(6)	0.30637(13)	0.0773(8)
N23	0.57566(13)	0.7506(4)	-0.11219(11)	0.0601(5)
O24	0.54237(13)	0.7234(4)	-0.06993(10)	0.0849(6)
O25	0.56042(12)	0.6145(4)	-0.15988(10)	0.0839(6)
C26	0.9110(2)	1.9018(6)	-0.19553(15)	0.0870(9)
C27	0.88479(17)	1.5638(7)	0.01901(12)	0.0814(9)

Tabela S.8. Współrzędne ułamkowe oraz izotropowe czynniki drgań termicznych (\AA^2) dla atomów wodoru wraz z odchyleniami standardowymi dla związku 19.

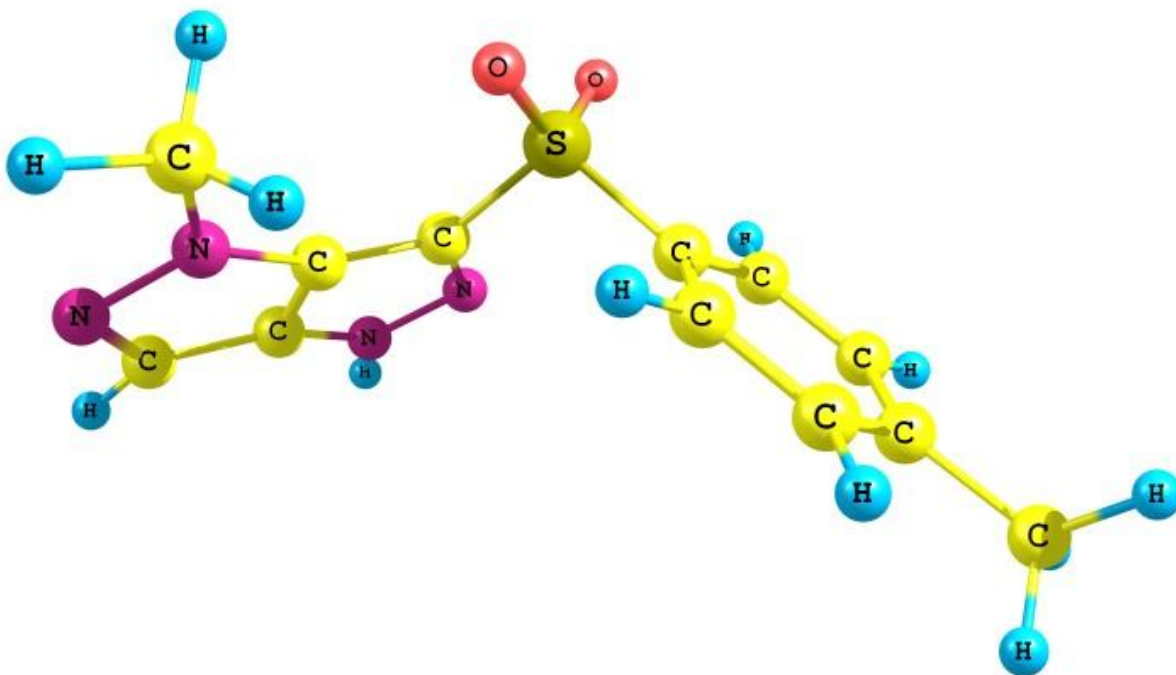
Atom	x/a	y/b	z/c	U
H4	0.9589	1.8883	-0.0548	0.085
H7	0.7315(12)	1.419(4)	-0.0231(10)	0.041(6)
H10	0.6549	0.8582	-0.1918	0.070
H11	0.7538	1.1581	-0.1901	0.069
H12A	0.5753(15)	1.055(4)	-0.0017(11)	0.054(6)
H12B	0.6289(12)	1.302(4)	0.0182(10)	0.043(6)
H17	0.7228	1.3341	0.1684	0.063
H18	0.6789	1.3768	0.2591	0.066
H20	0.5418	0.7521	0.2106	0.064
H21	0.5855	0.7038	0.1199	0.060
H22A	0.6013	0.9471	0.3339	0.116
H22B	0.5222	1.1006	0.2946	0.116
H22C	0.6060	1.2415	0.3293	0.116
H26A	0.8863	1.8277	-0.2377	0.131
H26B	0.9707	1.8984	-0.1849	0.131
H26C	0.8925	2.0732	-0.1960	0.131
H27A	0.8437	1.6536	0.0328	0.122
H27B	0.9396	1.6162	0.0448	0.122
H27C	0.8787	1.3860	0.0245	0.122



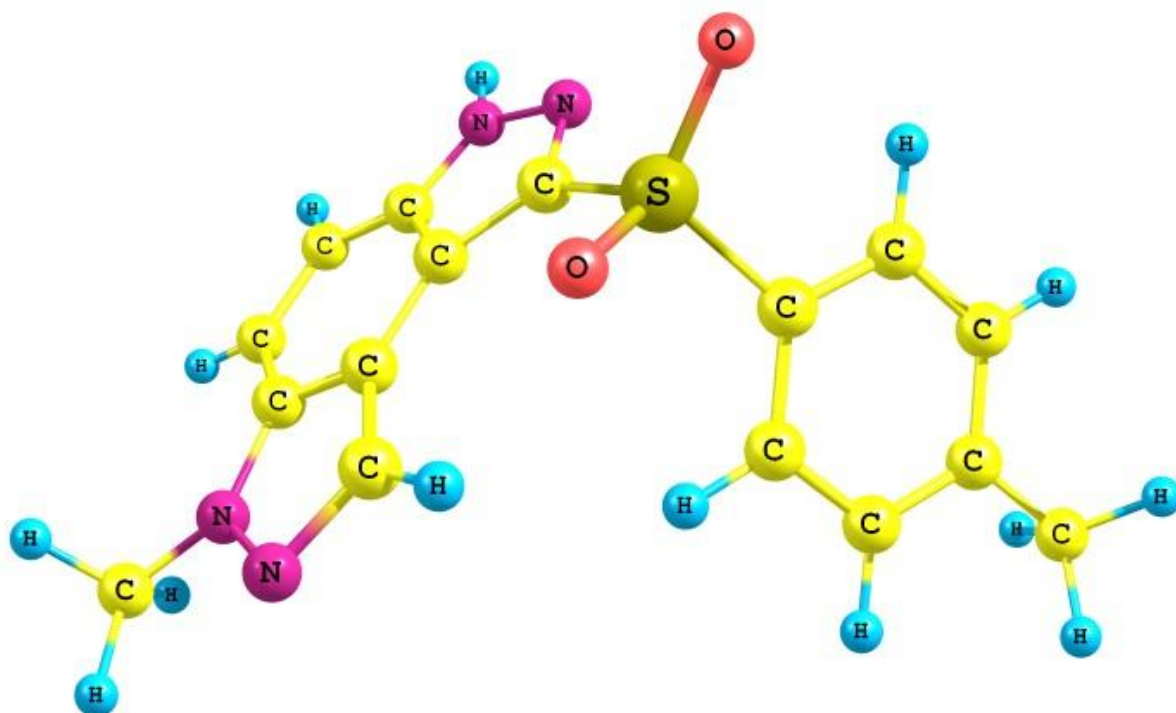
Rys. S.1. Zoptymalizowany konformer związku 35.



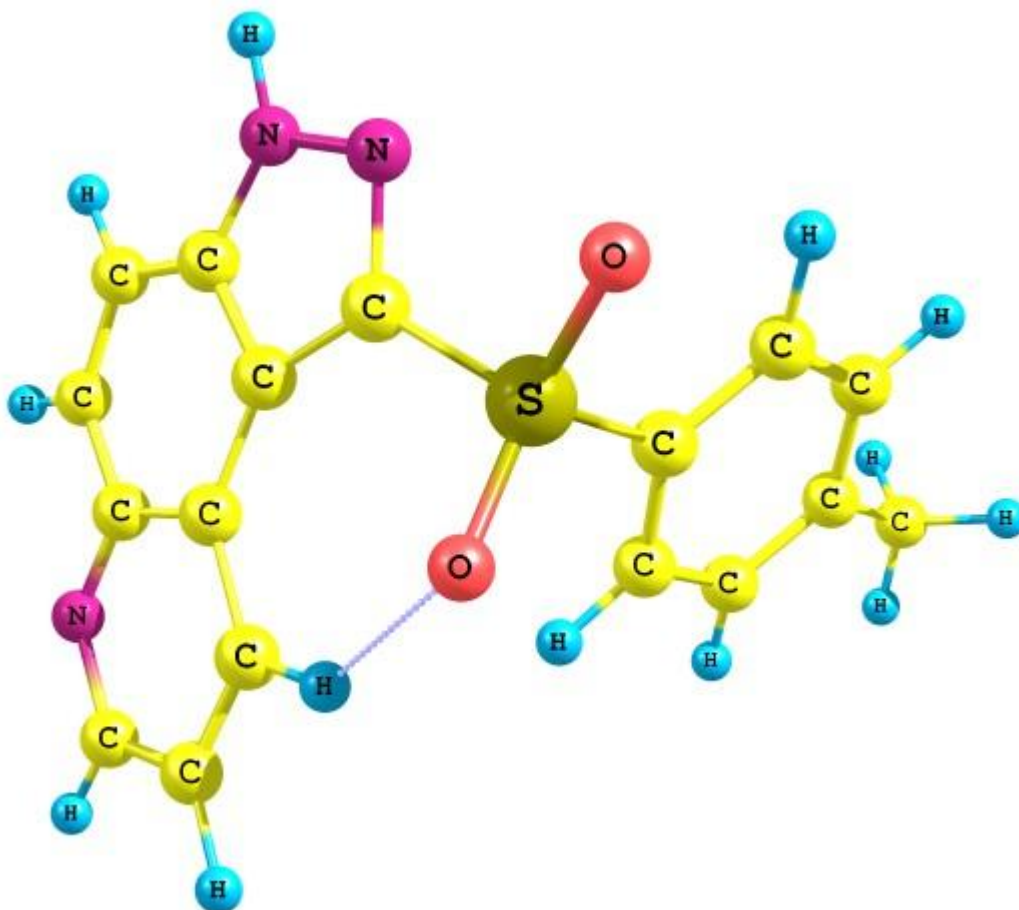
Rys. S.2. Zoptymalizowany konformer związku 36.



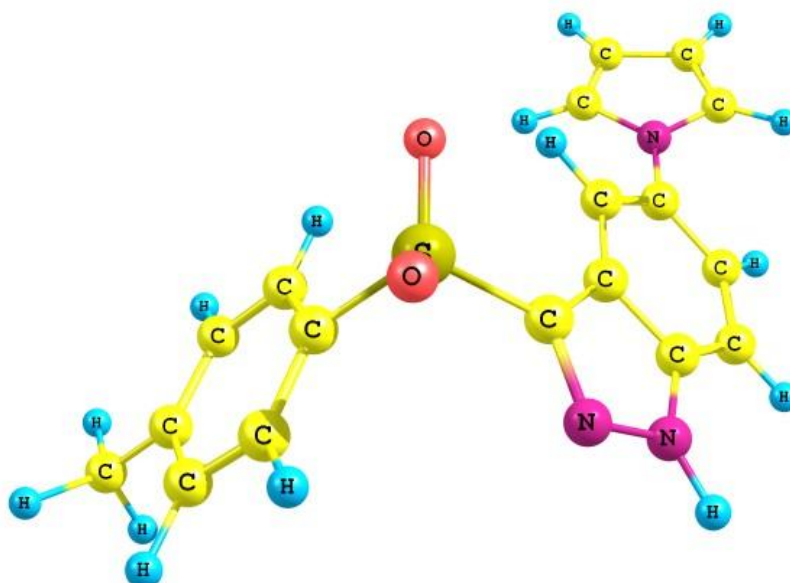
Rys. S.3. Zoptymalizowany konformer związku 37.



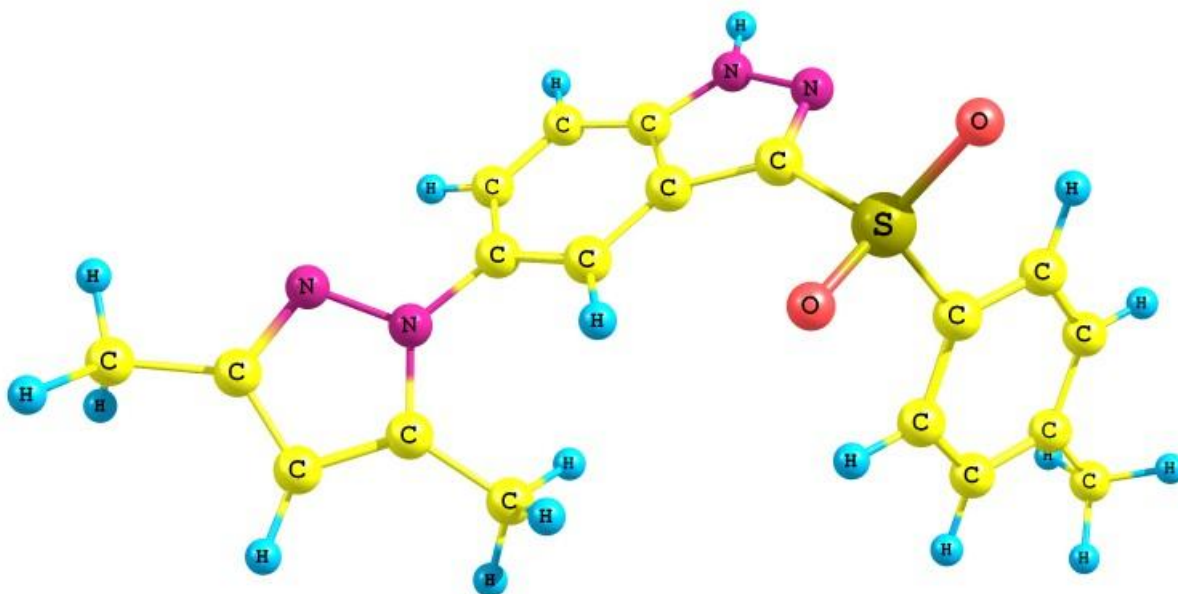
Rys. S.4. Zoptymalizowany konformer związku 38.



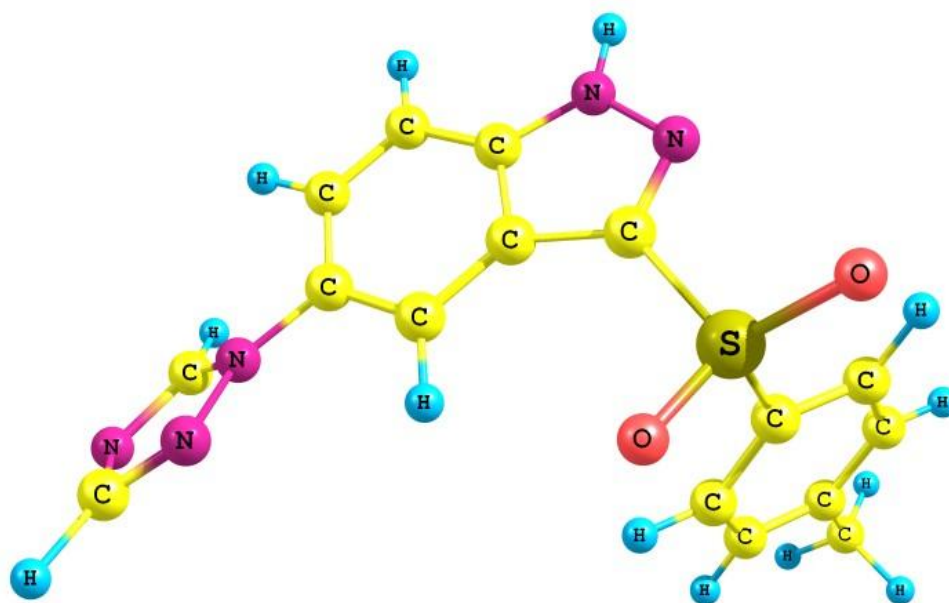
Rys. S.5. Zoptymalizowany konformer związku 39.



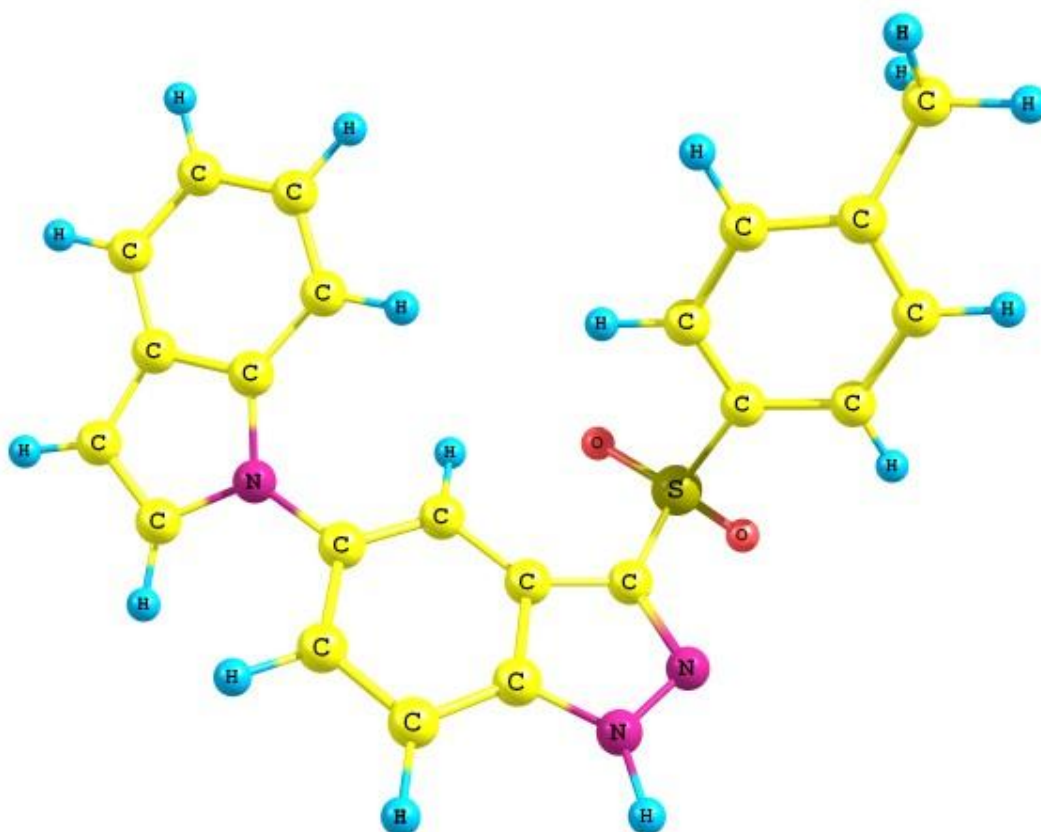
Rys. S.6. Zoptymalizowany konformer związku 40.



Rys. S.7. Zoptymalizowany konformer związku 41.



Rys. S.8. Zoptymalizowany konformer związku 43.

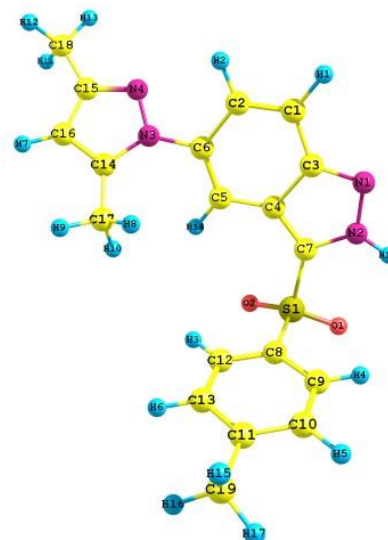


Rys. S.9. Zoptymalizowany konformer związku 44.

Rys. S.10. Współrzędne kartezjańskie zoptymalizowanych konformerów związku 41 (Rys. 4.27).

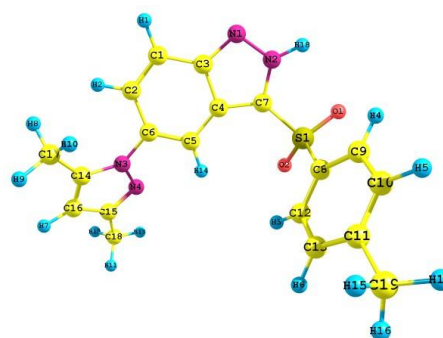
Konformer I

C	-1.834292000	-2.500264000	-1.741057000
C	-2.730038000	-1.528341000	-1.373911000
C	-0.556974000	-2.495134000	-1.126265000
C	-0.230866000	-1.502200000	-0.144041000
C	-1.177264000	-0.526866000	0.245821000
C	-2.404097000	-0.542060000	-0.386725000
N	0.470287000	-3.353387000	-1.335769000
N	1.424970000	-2.917452000	-0.514215000
C	1.081497000	-1.833282000	0.227680000
S	2.237314000	-1.107942000	1.350753000
O	3.277590000	-2.137235000	1.552758000
O	1.463250000	-0.584422000	2.490371000
C	2.978395000	0.277531000	0.497340000
C	4.067322000	0.054073000	-0.350944000
C	4.642039000	1.137401000	-1.008397000
C	4.146062000	2.439831000	-0.835209000
C	2.467150000	1.561917000	0.696113000
C	3.058063000	2.632783000	0.028740000
N	-3.400660000	0.416754000	-0.068056000
N	-4.707511000	0.007400000	-0.009589000
C	-3.275486000	1.769968000	0.157505000
C	-5.407015000	1.104921000	0.268856000
C	-4.556902000	2.232971000	0.381348000
H	-2.084990000	-3.248719000	-2.484812000
H	-3.715553000	-1.487052000	-1.820504000
H	1.636140000	1.721378000	1.373675000
H	4.466190000	-0.945826000	-0.480292000
H	5.493366000	0.971002000	-1.661874000
H	2.670612000	3.634896000	0.186599000
H	-4.838921000	3.256351000	0.583551000
C	-1.989334000	2.532924000	0.104547000
H	-1.343357000	2.186935000	-0.707314000
H	-2.208250000	3.590506000	-0.057606000
H	-1.419637000	2.454287000	1.036992000
C	-6.895951000	1.041103000	0.424211000
H	-7.204682000	1.347987000	1.429405000
H	-7.397513000	1.707632000	-0.285664000
H	-7.251177000	0.022657000	0.251235000
H	-0.952169000	0.180963000	1.032084000
C	4.760642000	3.600043000	-1.576986000
H	4.340679000	3.677268000	-2.587176000
H	4.568138000	4.547563000	-1.067635000
H	5.841793000	3.475928000	-1.684410000
H	2.308282000	-3.410554000	-0.451686000



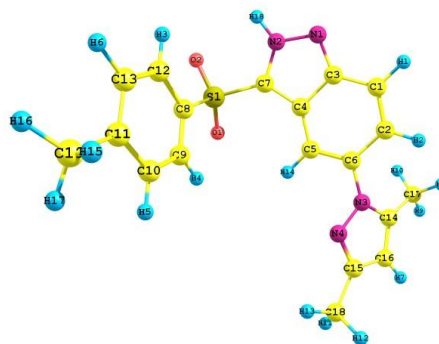
Konformer II

C	-1.733847000	-2.760730000	-1.515396000
C	-2.680185000	-1.804342000	-1.237716000
C	-0.461489000	-2.634591000	-0.907259000
C	-0.185113000	-1.536796000	-0.024691000
C	-1.166531000	-0.557234000	0.240700000
C	-2.394678000	-0.699074000	-0.375049000
N	0.604177000	-3.463387000	-1.030677000
N	1.533688000	-2.906213000	-0.255930000
C	1.140609000	-1.770876000	0.375935000
S	2.261023000	-0.899633000	1.429065000
O	3.345809000	-1.861840000	1.712959000
O	1.465070000	-0.317030000	2.523514000
C	2.940477000	0.439740000	0.459516000
C	4.036954000	0.193778000	-0.371603000
C	4.563099000	1.242817000	-1.120376000
C	4.010824000	2.531661000	-1.054466000
C	2.373948000	1.713350000	0.553368000
C	2.916271000	2.748912000	-0.203579000
N	-3.413350000	0.253767000	-0.104468000
N	-3.536422000	0.739122000	1.171413000
C	-4.282908000	0.872366000	-0.975254000
C	-4.501438000	1.653900000	1.107339000
C	-4.998974000	1.774542000	-0.213770000
H	-1.955341000	-3.602647000	-2.161930000
H	-3.674965000	-1.899428000	-1.654479000
H	1.538231000	1.892387000	1.220049000
H	4.479964000	-0.794732000	-0.418798000
H	5.420115000	1.059494000	-1.761612000
H	2.485725000	3.743076000	-0.127820000
H	-5.771600000	2.439636000	-0.572219000
C	-4.349717000	0.614123000	-2.448304000
H	-4.937066000	-0.278456000	-2.690007000
H	-4.830217000	1.464018000	-2.937593000
H	-3.355670000	0.485411000	-2.885911000
C	-4.932432000	2.394839000	2.336372000
H	-4.823614000	3.476827000	2.205201000
H	-5.985270000	2.201706000	2.569279000
H	-4.328973000	2.089010000	3.194066000
H	-0.982988000	0.274256000	0.908203000
C	4.568735000	3.654087000	-1.892927000
H	4.025074000	3.732496000	-2.842232000
H	4.474012000	4.616975000	-1.383748000
H	5.622394000	3.488824000	-2.131839000
H	2.438519000	-3.349593000	-0.144849000



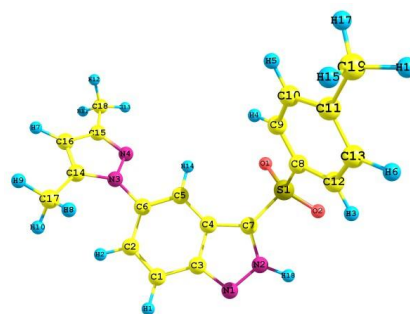
Konformer III

C	1.841030000	-2.572820000	-1.691292000
C	2.733994000	-1.574860000	-1.384374000
C	0.575451000	-2.551197000	-1.056682000
C	0.247613000	-1.507398000	-0.127460000
C	1.187259000	-0.504362000	0.195173000
C	2.415282000	-0.553214000	-0.434749000
N	-0.446199000	-3.428991000	-1.210254000
N	-1.397437000	-2.955887000	-0.406430000
C	-1.060229000	-1.829120000	0.270975000
S	-2.214544000	-1.070188000	1.373913000
O	-1.441667000	-0.511765000	2.497300000
O	-3.251538000	-2.096593000	1.607256000
C	-2.960191000	0.286805000	0.480737000
C	-2.455781000	1.578805000	0.644220000
C	-3.051572000	2.627450000	-0.053266000
C	-4.137674000	2.404723000	-0.912459000
C	-4.046932000	0.033834000	-0.361966000
C	-4.626603000	1.095372000	-1.049923000
N	3.370247000	0.462074000	-0.159026000
N	2.936603000	1.756026000	-0.032373000
C	4.717009000	0.343261000	0.101953000
C	4.020190000	2.458528000	0.291425000
C	5.158120000	1.620012000	0.388899000
H	2.083877000	-3.345742000	-2.412052000
H	3.693370000	-1.541192000	-1.885672000
H	-4.440326000	-0.971473000	-0.463481000
H	-1.626017000	1.761150000	1.317406000
H	-2.669166000	3.635490000	0.076676000
H	-5.476199000	0.906382000	-1.699471000
H	6.168732000	1.903114000	0.646539000
C	5.475474000	-0.947280000	0.113350000
H	5.770212000	-1.268099000	-0.891700000
H	6.389520000	-0.818897000	0.696935000
H	4.894516000	-1.757679000	0.562759000
C	3.934407000	3.940633000	0.495049000
H	4.282713000	4.224224000	1.494004000
H	4.555721000	4.479025000	-0.228953000
H	2.902002000	4.278935000	0.380687000
H	0.968292000	0.278819000	0.908910000
C	-4.757148000	3.540845000	-1.686748000
H	-4.327185000	3.599993000	-2.693952000
H	-5.835691000	3.402481000	-1.802317000
H	-4.580117000	4.501759000	-1.197197000
H	-2.276611000	-3.451083000	-0.308750000



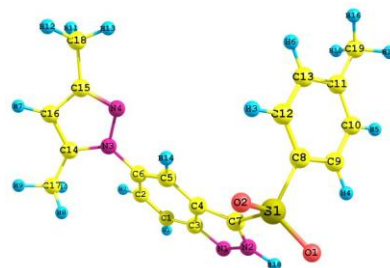
Konformer IV

C	1.733871000	-2.763686000	-1.512323000
C	2.679643000	-1.806651000	-1.234915000
C	0.460996000	-2.637395000	-0.905302000
C	0.183576000	-1.538820000	-0.024030000
C	1.164394000	-0.558596000	0.241079000
C	2.393058000	-0.700590000	-0.373639000
N	-0.604344000	-3.466609000	-1.028820000
N	-1.534689000	-2.908886000	-0.255495000
C	-1.142502000	-1.772787000	0.375521000
S	-2.264094000	-0.901386000	1.427225000
O	-1.470313000	-0.322253000	2.525073000
O	-3.351336000	-1.862254000	1.706321000
C	-2.938259000	0.441075000	0.458256000
C	-2.373321000	1.714168000	0.560589000
C	-2.911721000	2.752735000	-0.196052000
C	-4.000329000	2.538274000	-1.054262000
C	-4.029707000	0.197603000	-0.381049000
C	-4.551598000	1.248822000	-1.128728000
N	3.411083000	0.253034000	-0.103453000
N	3.532895000	0.740148000	1.171886000
C	4.280890000	0.871047000	-0.974408000
C	4.497424000	1.655407000	1.107327000
C	4.995849000	1.774641000	-0.213574000
H	1.956209000	-3.606189000	-2.157805000
H	3.674771000	-1.901780000	-1.650842000
H	-4.471750000	-0.791012000	-0.434905000
H	-1.541861000	1.891181000	1.233108000
H	-2.482211000	3.746739000	-0.113682000
H	-5.404511000	1.067608000	-1.776129000
H	5.768331000	2.439737000	-0.572332000
C	4.348896000	0.611024000	-2.447089000
H	3.355213000	0.481459000	-2.885278000
H	4.829476000	1.460492000	-2.937038000
H	4.936707000	-0.281655000	-2.687283000
C	4.927224000	2.398062000	2.335740000
H	5.979367000	2.203882000	2.570952000
H	4.820187000	3.479938000	2.202288000
H	4.321807000	2.094687000	3.192925000
H	0.980058000	0.273622000	0.907420000
C	-4.556421000	3.661274000	-1.893120000
H	-4.098010000	3.661085000	-2.889486000
H	-5.635941000	3.557632000	-2.032545000
H	-4.355921000	4.635561000	-1.440281000
H	-2.439605000	-3.352212000	-0.144796000



Konformer V

C	-1.840923000	-2.572673000	-1.691502000
C	-2.733913000	-1.574739000	-1.384563000
C	-0.575388000	-2.551087000	-1.056807000
C	-0.247626000	-1.507372000	-0.127461000
C	-1.187310000	-0.504382000	0.195207000
C	-2.415279000	-0.553186000	-0.434819000
N	0.446290000	-3.428848000	-1.210403000
N	1.397473000	-2.955799000	-0.406480000
C	1.060195000	-1.829116000	0.271030000
S	2.214530000	-1.070175000	1.373944000
O	3.251514000	-2.096597000	1.607273000
O	1.441667000	-0.511744000	2.497336000
C	2.960194000	0.286801000	0.480754000
C	4.047026000	0.033821000	-0.361794000
C	4.626762000	1.095357000	-1.049745000
C	4.137794000	2.404680000	-0.912405000
C	2.455720000	1.578817000	0.644110000
C	3.051562000	2.627425000	-0.053342000
N	-3.370285000	0.462074000	-0.159123000
N	-2.936721000	1.756050000	-0.032456000
C	-4.716985000	0.343123000	0.102105000
C	-4.020325000	2.458441000	0.291535000
C	-5.158161000	1.619821000	0.389192000
H	-2.083718000	-3.345559000	-2.412317000
H	-3.693259000	-1.541025000	-1.885921000
H	1.625887000	1.761173000	1.317206000
H	4.440459000	-0.971479000	-0.463212000
H	5.476435000	0.906351000	-1.699184000
H	2.669132000	3.635470000	0.076519000
H	-6.168748000	1.902812000	0.647052000
C	-5.475338000	-0.947482000	0.113507000
H	-4.894146000	-1.757954000	0.562471000
H	-6.389165000	-0.819316000	0.697487000
H	-5.770460000	-1.268055000	-0.891512000
C	-3.934701000	3.940601000	0.494835000
H	-4.552812000	4.478968000	-0.231950000
H	-4.286958000	4.224775000	1.492216000
H	-2.901704000	4.278409000	0.384419000
H	-0.968386000	0.278720000	0.909048000
C	4.757173000	3.540864000	-1.686681000
H	4.323544000	3.603164000	-2.692128000
H	4.584196000	4.501210000	-1.194541000
H	5.834932000	3.400197000	-1.806515000
H	2.276666000	-3.450967000	-0.308814000



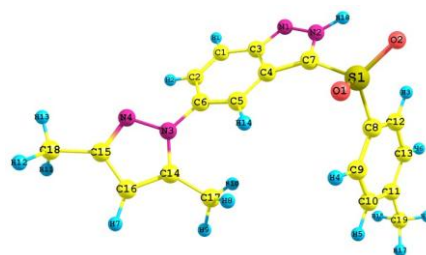
Konformer VI

C	-1.759861000	-2.413335000	-1.904899000
C	-2.691979000	-1.514648000	-1.451890000
C	-0.477235000	-2.404006000	-1.301216000
C	-0.174139000	-1.465792000	-0.259598000
C	-1.143203000	-0.538034000	0.186978000
C	-2.389363000	-0.584569000	-0.404567000
N	0.578855000	-3.205164000	-1.580994000
N	1.530597000	-2.783717000	-0.748533000
C	1.158563000	-1.762815000	0.066290000
S	2.302451000	-1.062729000	1.218125000
O	3.373126000	-2.070162000	1.362471000
O	1.520064000	-0.620610000	2.386178000
C	2.999496000	0.386518000	0.435260000
C	4.085971000	0.242186000	-0.434160000
C	4.624955000	1.376890000	-1.031766000
C	4.096807000	2.653689000	-0.778275000
C	2.457498000	1.642923000	0.713025000
C	3.013124000	2.766656000	0.104230000
N	-3.423529000	0.298025000	0.003401000
N	-4.246782000	0.827541000	-0.955809000
C	-3.789346000	0.694420000	1.270848000
C	-5.126160000	1.573339000	-0.290805000
C	-4.882734000	1.521147000	1.104037000
H	-1.992517000	-3.120598000	-2.693481000
H	-3.687265000	-1.487762000	-1.877622000
H	1.629540000	1.740169000	1.405781000
H	4.510209000	-0.736987000	-0.627056000
H	5.473584000	1.271738000	-1.701395000
H	2.600633000	3.746959000	0.323366000
H	-5.440121000	2.008064000	1.891428000
C	-3.128393000	0.241668000	2.534702000
H	-2.220008000	0.811680000	2.758712000
H	-3.818373000	0.384343000	3.369136000
H	-2.852718000	-0.815890000	2.493562000
C	-6.192863000	2.329232000	-1.022842000
H	-7.191737000	2.032422000	-0.685279000
H	-6.102394000	3.407987000	-0.855543000
H	-6.121641000	2.140425000	-2.096423000
H	-0.906403000	0.186756000	0.953875000
C	4.677021000	3.870392000	-1.454264000
H	4.318286000	3.945547000	-2.487764000
H	4.391732000	4.789651000	-0.937149000
H	5.768934000	3.818978000	-1.495000000
H	2.432574000	-3.245589000	-0.731326000



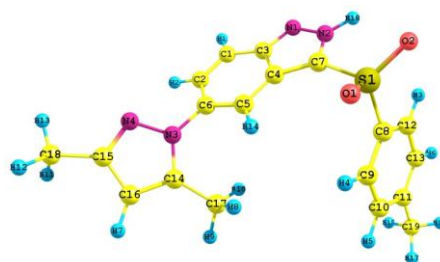
Konformer VII

C	1.834190000	-2.500099000	-1.741142000
C	2.729987000	-1.528234000	-1.373960000
C	0.556909000	-2.494988000	-1.126286000
C	0.230881000	-1.502129000	-0.143961000
C	1.177330000	-0.526867000	0.245943000
C	2.404137000	-0.542032000	-0.386667000
N	-0.470391000	-3.353204000	-1.335785000
N	-1.425007000	-2.917313000	-0.514160000
C	-1.081455000	-1.833218000	0.227842000
S	-2.237434000	-1.107913000	1.350764000
O	-1.463566000	-0.584371000	2.490504000
O	-3.277695000	-2.137262000	1.552594000
C	-2.978485000	0.277536000	0.497285000
C	-2.467149000	1.561914000	0.695912000
C	-3.058040000	2.632753000	0.028487000
C	-4.146116000	2.439790000	-0.835372000
C	-4.067470000	0.054070000	-0.350914000
C	-4.642175000	1.137379000	-1.008418000
N	3.400760000	0.416702000	-0.067967000
N	4.707626000	0.007310000	-0.009839000
C	3.275669000	1.769870000	0.157912000
C	5.407208000	1.104755000	0.268687000
C	4.557137000	2.232796000	0.381612000
H	2.084841000	-3.248503000	-2.484964000
H	3.715475000	-1.486946000	-1.820609000
H	-4.466380000	-0.945826000	-0.480154000
H	-1.636101000	1.721410000	1.373422000
H	-2.670519000	3.634858000	0.186232000
H	-5.493555000	0.970971000	-1.661823000
H	4.839212000	3.256124000	0.583996000
C	1.989553000	2.532916000	0.105374000
H	1.419872000	2.453877000	1.037792000
H	2.208539000	3.590558000	-0.056281000
H	1.343525000	2.187361000	-0.706637000
C	6.896187000	1.040894000	0.423614000
H	7.397630000	1.706361000	-0.287353000
H	7.205304000	1.349109000	1.428274000
H	7.251180000	0.022158000	0.251876000
H	0.952312000	0.180888000	1.032290000
C	-4.760673000	3.599993000	-1.577186000
H	-4.340233000	3.677585000	-2.587146000
H	-5.841735000	3.475597000	-1.685151000
H	-4.568684000	4.547450000	-1.067519000
H	-2.308318000	-3.410412000	-0.451559000



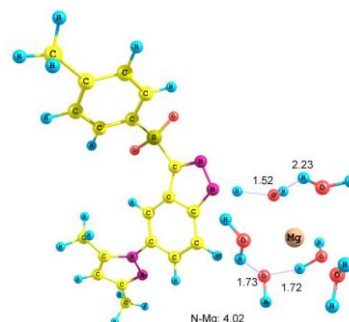
Konformer VIII

C	1.834114000	-2.500157000	-1.741281000
C	2.729889000	-1.528252000	-1.374178000
C	0.556848000	-2.495067000	-1.126356000
C	0.230848000	-1.502177000	-0.144063000
C	1.177291000	-0.526876000	0.245787000
C	2.404051000	-0.542034000	-0.386887000
N	-0.470394000	-3.353366000	-1.335735000
N	-1.425007000	-2.917451000	-0.514076000
C	-1.081457000	-1.833316000	0.227834000
S	-2.237319000	-1.107914000	1.350832000
O	-1.463352000	-0.584389000	2.490514000
O	-3.277624000	-2.137195000	1.552774000
C	-2.978315000	0.277554000	0.497345000
C	-2.467041000	1.561945000	0.696079000
C	-3.057927000	2.632793000	0.028672000
C	-4.145935000	2.439833000	-0.835280000
C	-4.067242000	0.054090000	-0.350927000
C	-4.641933000	1.137415000	-1.008423000
N	3.400641000	0.416747000	-0.068243000
N	4.707477000	0.007344000	-0.009709000
C	3.275477000	1.769926000	0.157541000
C	5.406982000	1.104810000	0.268965000
C	4.556888000	2.232858000	0.381573000
H	2.084735000	-3.248594000	-2.485082000
H	3.715362000	-1.486918000	-1.820860000
H	-4.466137000	-0.945803000	-0.480231000
H	-1.636038000	1.721409000	1.373650000
H	-2.670465000	3.634907000	0.186513000
H	-5.493261000	0.971015000	-1.661897000
H	4.838925000	3.256213000	0.583882000
C	1.989321000	2.532885000	0.104649000
H	1.420029000	2.454800000	1.037392000
H	2.208174000	3.590373000	-0.058218000
H	1.342996000	2.186417000	-0.706721000
C	6.895916000	1.040931000	0.424328000
H	7.397572000	1.706545000	-0.286348000
H	7.204732000	1.348939000	1.429146000
H	7.250960000	0.022228000	0.252494000
H	0.952270000	0.180858000	1.032160000
C	-4.760424000	3.600081000	-1.577075000
H	-4.338140000	3.679193000	-2.586154000
H	-5.841138000	3.474602000	-1.687190000
H	-4.570421000	4.547245000	-1.066102000
H	-2.308352000	-3.410497000	-0.451529000



**Rys. S. 11. Współrzędne kartezyjskie kompleksu 41-Mg (Rys. 4.28).
Konformer IX**

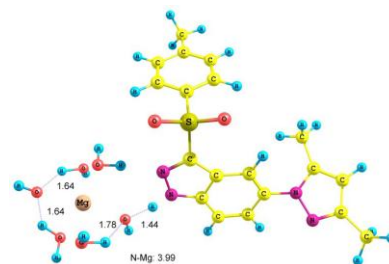
C	-0.933060000	1.954870000	-0.120823000
C	0.108480000	2.817952000	0.156594000
C	-0.590297000	0.679441000	-0.613524000
C	0.759752000	0.296349000	-0.824515000
C	1.806002000	1.200712000	-0.559169000
C	1.465383000	2.447357000	-0.058695000
N	-1.375927000	-0.385725000	-0.970809000
N	-0.637009000	-1.416142000	-1.409027000
C	0.634319000	-1.031610000	-1.331569000
S	1.913308000	-2.166135000	-1.801641000
O	3.161437000	-1.376621000	-1.879522000
O	1.458785000	-2.925713000	-2.983038000
C	2.070293000	-3.318067000	-0.437933000
C	3.050170000	-3.103144000	0.532357000
C	3.166018000	-4.006322000	1.587963000
C	2.313801000	-5.115063000	1.691705000
C	1.209976000	-4.417259000	-0.364825000
C	1.339747000	-5.306460000	0.698141000
N	2.472434000	3.407389000	0.242319000
N	2.265855000	4.712286000	-0.118039000
C	3.660832000	3.241564000	0.913782000
C	3.338715000	5.371108000	0.318121000
C	4.239934000	4.495392000	0.970422000
H	-1.969766000	2.234753000	0.059947000
H	-0.091514000	3.809251000	0.545667000
H	0.462964000	-4.579488000	-1.133761000
H	-2.459452000	-0.443198000	-1.025082000
H	3.717295000	-2.252429000	0.451959000
H	3.933567000	-3.848307000	2.340010000
H	2.832639000	0.929746000	-0.765524000
H	0.678838000	-6.166591000	0.755254000
H	5.183537000	4.742386000	1.435724000
C	4.144911000	1.945204000	1.483672000
H	4.628509000	1.313387000	0.730668000
H	4.882154000	2.149302000	2.263268000
H	3.328971000	1.365657000	1.924781000
C	3.471330000	6.846444000	0.089811000
H	3.582697000	7.386966000	1.036040000
H	4.351197000	7.078500000	-0.520224000
H	2.586839000	7.230504000	-0.423769000
Mg	-5.109562000	0.413668000	0.281079000
O	-3.971522000	-0.484076000	-1.119388000
H	-4.176030000	-0.286284000	-2.041919000
O	-4.167985000	2.183179000	0.659225000
H	-4.440142000	2.820476000	1.330959000
H	-5.335273000	2.383848000	-0.592568000



O	-6.074179000	1.861497000	-1.022978000
H	-5.879556000	1.828204000	-1.969238000
O	-5.821167000	-1.666212000	0.170385000
H	-5.107536000	-1.638034000	-0.527934000
H	-6.651561000	-1.832254000	-0.297010000
O	-3.642393000	-0.042181000	1.835888000
H	-2.872266000	-0.528681000	1.510290000
H	-3.479551000	0.921000000	1.617696000
O	-6.691383000	0.591339000	1.671006000
H	-6.832498000	-0.210459000	2.193953000
H	-6.683829000	1.325352000	2.300899000
C	2.424565000	-6.071626000	2.852928000
H	3.423446000	-6.049174000	3.295980000
H	1.708848000	-5.807854000	3.640991000
H	2.203841000	-7.097798000	2.545859000

Konformer X

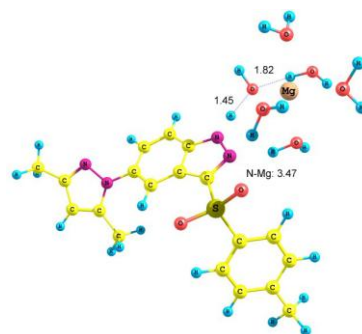
C	1.195831000	-2.609555000	-1.007786000
C	2.568933000	-2.494125000	-0.966011000
C	0.442062000	-1.621059000	-0.344351000
C	1.070320000	-0.555638000	0.355402000
C	2.475343000	-0.469075000	0.413073000
C	3.206580000	-1.430223000	-0.264987000
N	-0.906534000	-1.463455000	-0.214271000
N	-1.188464000	-0.380700000	0.523696000
C	-0.032307000	0.175534000	0.881641000
S	-0.032944000	1.668310000	1.840674000
O	1.303386000	1.757671000	2.464423000
O	-1.242377000	1.664817000	2.685710000
C	-0.186658000	3.008304000	0.662922000
C	0.965390000	3.596064000	0.139098000
C	0.834736000	4.634337000	-0.782627000
C	-0.426995000	5.089690000	-1.189086000
C	-1.459546000	3.443114000	0.279661000
C	-1.568408000	4.479685000	-0.641678000
N	4.627952000	-1.394172000	-0.267090000
N	5.315326000	-2.570256000	-0.123055000
C	5.472635000	-0.323824000	-0.450997000
C	6.602266000	-2.236297000	-0.202958000
C	6.752364000	-0.843102000	-0.408538000
H	0.715786000	-3.423990000	-1.538935000
H	3.196114000	-3.222440000	-1.465617000
H	-2.345140000	2.985472000	0.706113000
H	-1.779630000	-2.067640000	-0.545169000
H	1.944750000	3.255546000	0.456001000
H	1.728086000	5.098836000	-1.189358000
H	2.955600000	0.309997000	0.989736000
H	-2.554528000	4.824811000	-0.939148000



H	7.671284000	-0.286609000	-0.525585000
C	5.026535000	1.084174000	-0.691660000
H	4.777364000	1.606994000	0.238403000
H	5.834627000	1.638954000	-1.173343000
H	4.146365000	1.126325000	-1.339451000
C	7.669908000	-3.280064000	-0.074092000
H	8.314318000	-3.300513000	-0.959596000
H	8.314495000	-3.086150000	0.790173000
H	7.220322000	-4.268248000	0.047737000
Mg	-4.826169000	-1.831071000	-0.255274000
O	-3.069705000	-2.676082000	-0.763686000
H	-3.050766000	-3.363654000	-1.439372000
O	-5.364642000	-0.452677000	-1.881647000
H	-6.213980000	-0.529475000	-1.342203000
H	-5.552420000	-0.787310000	-2.768383000
H	-6.738824000	-2.888686000	-0.491829000
O	-6.092223000	-3.543245000	-0.899940000
H	-5.992959000	-4.252556000	-0.249653000
O	-4.298203000	-3.068915000	1.463333000
H	-3.526276000	-3.242041000	0.862639000
H	-3.945271000	-2.625464000	2.247035000
O	-3.941696000	-0.084393000	0.545930000
H	-2.953475000	-0.108424000	0.646465000
H	-4.109304000	0.579457000	-0.140021000
O	-6.772135000	-1.318934000	-0.019546000
H	-7.152064000	-0.930122000	0.774191000
C	-0.566641000	6.211590000	-2.187722000
H	0.408252000	6.576209000	-2.519204000
H	-1.125789000	5.882810000	-3.070472000
H	-1.117090000	7.054584000	-1.756060000

Konformer XI

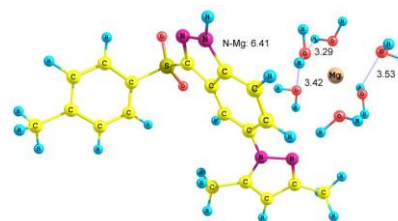
C	1.624142000	-2.429172000	-1.498671000
C	2.955236000	-2.204912000	-1.219111000
C	0.685259000	-1.542098000	-0.936584000
C	1.095040000	-0.466284000	-0.099656000
C	2.457088000	-0.267093000	0.197801000
C	3.372400000	-1.130283000	-0.381319000
N	-0.677423000	-1.504784000	-1.032465000
N	-1.164085000	-0.497506000	-0.294386000
C	-0.139949000	0.135423000	0.268891000
S	-0.524949000	1.404078000	1.444143000
O	0.666929000	1.586373000	2.292787000
O	-1.814664000	0.995399000	2.059272000
C	-0.816940000	2.913252000	0.533923000
C	0.198325000	3.868001000	0.458138000
C	-0.033823000	5.042044000	-0.256228000
C	-1.259995000	5.272180000	-0.896217000



C	-2.051293000	3.111955000	-0.093538000
C	-2.259739000	4.289398000	-0.804632000
N	4.765134000	-0.981426000	-0.142355000
N	5.519677000	-2.107367000	0.057847000
C	5.532263000	0.161269000	-0.128373000
C	6.767773000	-1.669933000	0.213417000
C	6.827527000	-0.258862000	0.104413000
H	1.313416000	-3.249505000	-2.135995000
H	3.718798000	-2.852171000	-1.632403000
H	-2.833350000	2.363489000	-0.027092000
H	-1.466270000	-2.261173000	-1.262819000
H	1.146010000	3.697138000	0.955787000
H	0.750946000	5.790168000	-0.316391000
H	2.764315000	0.519011000	0.874379000
H	-3.215141000	4.450712000	-1.295204000
H	7.701198000	0.373562000	0.171540000
C	5.011897000	1.543018000	-0.372321000
H	4.575721000	1.988808000	0.528356000
H	5.836360000	2.185321000	-0.689274000
H	4.245544000	1.557345000	-1.152398000
C	7.886766000	-2.633276000	0.469133000
H	8.667369000	-2.546266000	-0.294287000
H	8.360652000	-2.445338000	1.438747000
H	7.511721000	-3.659306000	0.463205000
Mg	-4.183731000	-2.198441000	-0.048033000
O	-2.696402000	-3.018630000	-1.161714000
H	-2.429022000	-3.901197000	-0.872701000
O	-5.187267000	-2.985074000	-1.779651000
H	-5.605713000	-2.432419000	-2.453250000
H	-4.261431000	-3.172119000	-2.076155000
H	-4.973949000	-4.733895000	0.456411000
O	-4.717346000	-3.967198000	0.987974000
H	-4.113882000	-4.300698000	1.666817000
O	-3.282333000	-1.543122000	1.764909000
H	-2.665645000	-0.782758000	1.776636000
H	-3.990251000	-1.302656000	2.380920000
O	-3.847136000	-0.251222000	-0.764577000
H	-2.863250000	-0.161912000	-0.640811000
H	-4.030827000	-0.029174000	-1.687570000
O	-5.975513000	-1.463157000	0.820033000
H	-6.408205000	-0.687052000	0.438367000
H	-6.675143000	-2.101260000	1.016883000
C	-1.513600000	6.555256000	-1.646807000
H	-0.578476000	7.036168000	-1.943950000
H	-2.114583000	6.378867000	-2.543394000
H	-2.066493000	7.265701000	-1.020551000

Konformer XII

C	-0.541805000	-0.501067000	2.653958000
C	-1.125647000	0.627597000	2.105187000
C	0.509629000	-1.090993000	1.928991000
C	0.948217000	-0.575317000	0.683913000
C	0.326032000	0.557345000	0.129025000
C	-0.695030000	1.149776000	0.855167000
N	1.291339000	-2.183399000	2.184164000
N	2.187355000	-2.420624000	1.211150000
C	1.993918000	-1.474130000	0.305903000
S	3.013728000	-1.432770000	-1.157017000
O	2.286198000	-0.585759000	-2.123818000
O	3.363005000	-2.820425000	-1.507783000
C	4.510273000	-0.580411000	-0.676363000
C	4.614252000	0.794604000	-0.891278000
C	5.787948000	1.448056000	-0.518221000
C	6.852364000	0.749856000	0.068947000
C	5.556106000	-1.305936000	-0.096699000
C	6.717945000	-0.634482000	0.269605000
N	-1.347854000	2.311296000	0.350933000
N	-2.713034000	2.335060000	0.261899000
C	-0.803653000	3.505187000	-0.043724000
C	-3.034090000	3.544908000	-0.201964000
C	-1.867560000	4.312111000	-0.406595000
H	-0.861031000	-0.891378000	3.613834000
H	-1.919418000	1.139702000	2.636459000
H	5.465308000	-2.376418000	0.049819000
H	1.255044000	-2.801770000	2.982750000
H	3.798755000	1.338207000	-1.354696000
H	5.878516000	2.516359000	-0.690518000
H	0.628567000	0.936787000	-0.838472000
H	7.536850000	-1.193046000	0.713646000
H	-1.805278000	5.329822000	-0.762516000
C	0.661507000	3.802103000	-0.020577000
H	1.181254000	3.373244000	-0.883647000
H	0.809386000	4.883218000	-0.048446000
H	1.138251000	3.411111000	0.882558000
C	-4.464488000	3.922701000	-0.432762000
H	-4.745852000	4.783784000	0.181932000
H	-4.633384000	4.199354000	-1.478190000
H	-5.126325000	3.090235000	-0.183968000
Mg	-4.555257000	-1.383594000	-0.317051000
O	-2.843421000	-2.133357000	0.616512000
H	-2.651510000	-3.070818000	0.753436000
H	-2.426715000	-1.649146000	1.345683000
O	-5.814337000	-2.315497000	1.068253000
H	-6.745912000	-2.053919000	1.070306000
H	-5.566539000	-2.465379000	1.990802000



H	-4.804608000	0.479501000	1.608160000
O	-4.443472000	0.367186000	0.720233000
H	-3.753884000	1.096067000	0.570909000
O	-3.270325000	-0.682866000	-1.821325000
H	-2.324027000	-0.719915000	-1.621521000
H	-3.419782000	0.157042000	-2.277094000
O	-4.746343000	-3.101355000	-1.486855000
H	-4.114600000	-3.284973000	-2.195465000
H	-5.000389000	-3.952666000	-1.105495000
O	-6.273914000	-0.670850000	-1.259665000
H	-6.557749000	-1.003401000	-2.122022000
H	-6.460457000	0.277906000	-1.244816000
C	8.113313000	1.463188000	0.488250000
H	8.173721000	1.533914000	1.580543000
H	9.003613000	0.922812000	0.151972000
H	8.152480000	2.477701000	0.084948000