

Uniwersytet Warszawski  
Wydział Chemii

Ireneusz Tomczyk  
Nr albumu: 408219

# Synteza sondy fluorescencyjnej do badania szlaku NF $\kappa$ B

Praca licencjacka  
na kierunku studiów Chemia

Praca wykonana pod kierunkiem  
dr. hab. Marcina Kałka  
oraz pod opieką naukową  
mgr. inż. Karola Kraszewskiego  
Laboratorium Metodologii Syntezy Chemicznej  
Centrum Nowych Technologii  
Uniwersytet Warszawski

Warszawa, czerwiec 2021

## Streszczenie

W ramach pracy dyplomowej opracowano i wykonano syntezę nieodnotowanej dotychczas w literaturze cząsteczki zaprojektowanej jako selektywna sonda fluorescencyjna do badania szlaku NF $\kappa$ B. Docelowy związek składa się z dwóch części. Pierwsza z nich, będąca pochodną podstawioną amidu piperyny, odpowiada za wiązanie się cząsteczki do białek szlaku NF $\kappa$ B. Druga to barwnik fluorescencyjny BODIPY, odpowiedzialny za właściwości optyczne, umożliwiające detekcję mikroskopową i lokalizację położenia sondy w komórce.

Zaplanowano dwa warianty pięcioetapowej syntezy – jeden z nich udało się w pełni zrealizować. Poszczególne etapy syntezy, obejmujące zabezpieczenie i odbezpieczenie grupy aminowej, sprzęganie krzyżowe C–N oraz otrzymywanie amidów, zostały zoptymalizowane. Najlepsze ustalone warunki zastosowano do syntezy związku na dużą skalę, otrzymując ok. 50 mg ostatecznego produktu w czystej formie. Stanowi to ilość w zupełności wystarczającą do zaplanowanych badań biologicznych. Całkowita wydajność syntezy wyniosła 2,9%, co odpowiada średniej wydajności ok. 49% na etap. W pracy umieszczono zarejestrowane widma  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR,  $^{19}\text{F}$  NMR, widma FT-IR (ATR) oraz HRMS (ESI) otrzymanego produktu końcowego, a także produktów pośrednich zrealizowanej drogi syntezy.

Otrzymana molekula będzie zastosowana w badaniach prowadzonych w Instytucie Biologii Eksperymentalnej im. Marcellego Nenckiego. Właściwości fluorescencyjne otrzymanego związku pozwolą na wykorzystanie go jako sondy molekularnej w technikach mikroskopii fluorescencyjnej.

## Słowa kluczowe

Synteza organiczna, sonda fluorescencyjna, reakcja Buchwalda-Hartwiga,  
otrzymywanie amidów, NF $\kappa$ B

## Dziedzina pracy (kody wg programu Socrates-Erasmus)

13.3 chemia

## Tytuł pracy w języku angielskim

Synthesis of fluorescent probe for studies of NF $\kappa$ B pathway

Chciałbym uprzejmie podziękować  
**dr. hab. Marcinowi Kałkowi**  
za ogromną inspirację, poświęcony czas  
oraz opiekę nad moim rozwojem podczas pracy naukowej  
w Laboratorium Metodologii Syntezy Chemicznej,  
Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego.

Pragnę również złożyć wyrazy wdzięczności

**mgr. inż. Karolowi Kraszewskiemu**

za wszechstronną i nieocenioną pomoc

przy stawianiu pierwszych kroków

w praktyce laboratoryjnej.

# Spis treści

<b>1. Wykaz stosowanych skrótów</b> .....	7
<b>2. Cel i założenia pracy</b> .....	11
<b>3. Wstęp literaturowy</b> .....	12
3.1. Szlak NFκB.....	12
3.1.1. Budowa białek NFκB.....	12
3.1.2. Aktywacja transkrypcji przez białka NFκB.....	12
3.1.3. Modulacja aktywności NFκB przez amidy kwasu piperynowego.....	13
3.1.4. Modulacja aktywności NFκB przez 4,4'-sulfonylodianilinę.....	13
3.2. Zastosowanie zjawiska fluorescencji w badaniach biologicznych.....	14
3.2.1. Pochodne 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenu.....	14
3.3. Strategia i metodyka syntezy.....	15
3.3.1. Zabezpieczanie grup aminowych.....	15
3.3.2. Arylowanie amin.....	17
3.3.3. Otrzymywanie amidów z użyciem aktywacji kwasów karboksylowych.....	19
<b>4. Wyniki własne</b> .....	24
4.1. Plan syntezy.....	24
4.2. Zabezpieczanie grup aminowej 4,4'-sulfonylodianiliny.....	26
4.3. Arylowanie pochodnych 4,4'-sulfonylodianiliny.....	27
4.4. Acylowanie aminy drugorzędowej.....	32
4.5. Odbezpieczenie grupy aminowej.....	35
4.6. Acylowanie aminy pierwszorzędowej.....	36
<b>5. Podsumowanie</b> .....	39
<b>6. Część eksperymentalna</b> .....	40
6.1. Uwagi ogólne.....	40
6.2. Procedury optymalizacyjne .....	40
6.2.1. Arylowanie pochodnych 4,4'-sulfonylodianiliny.....	40
6.2.2. Reakcje otrzymywania amidów .....	41
6.3. Procedury syntezy.....	46
6.4. Widma otrzymanych związków chemicznych. ....	52
6.4.1. Widma związku <b>1a</b> .....	52
6.4.2. Widma związku <b>2a</b> .....	54

6.4.3. Widma związku <b>3a</b> .....	56
6.4.4. Widma związku <b>4</b> .....	58
6.4.5. Widma związku <b>5</b> .....	60
<b>7. Literatura</b> .....	<b>63</b>

# 1. Wykaz stosowanych skrótów

AcOEt – octan etylu

APhos – (4-(*N,N*-dimetyloamino)fenylo)di-*tert*-butylofosfina

BINAP – 2,2'-bis(difenylofosfino)-1,1'-binaftyl

Boc – grupa *tert*-butoksykarbonylowa

Catacxiom A – bis(adamant-1-ylo)-1-*n*-butylofosfina

CDI – *N,N'*-karbonylodiimidazol

Cy – grupa cykloheksylova

CyJohnPhos – (bifen-2-ylo)dicykloheksylofosfina

DavePhos – 2-dicykloheksylofosfino-2'-(*N,N*-dimetyloamino)bifenyl

dba – dibenzylidenoaceton

DCC – *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid

DCE – 1,2-dichloroetan

DCM – dichlorometan

DIC – *N,N'*-diizopropylokarbodiimid

DIPEA – diizopropylloaminy

DMSO – dimetylosulfotlenek

DPEPhos – eter bis[2-(difenylofosfino)fenylowy]

dppf – 1,1'-bis(difenylofosfino)ferrocen

DTBMP – 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylopirydyna

ECF – chloromróvczan etylu

EDC – chlorowodorek *N*-etylo-*N'*-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimidu

HRMS – wysokorozdzielcza spektrometria mas

*i*-Pr – grupa izopropylowa

IR – spektroskopia w podczzerwieni

MCF – chloromróvczan metylu

Me – grupa metylowa

MeCN – acetonitryl

NaHMDS – bis(trimetylosililo)amidek sodu

NMR – spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego

Ph – grupa fenylowa

Pht – grupa ftalimidowa

PTLC – preparatywna cienkowarstwowa chromatografia cieczerwowa

RT – temperatura pokojowa

RuPhos – 2-dicykloheksylofosfino-2',6'-diizopropoksybifenyl

SPhos – 2-dicykloheksylofosfino-2',6'-dimetoksybifenyl

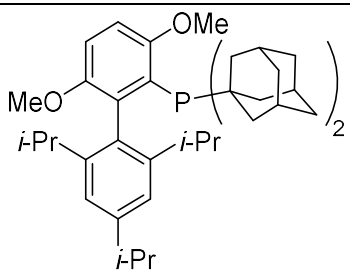
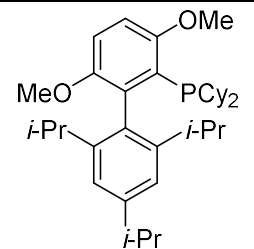
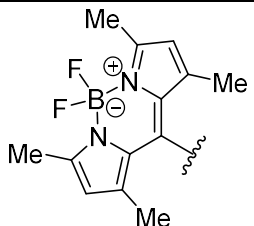
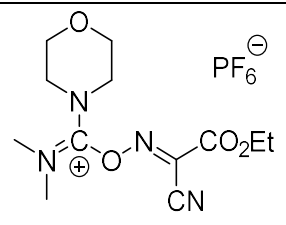
*t*-Bu – grupa *tert*-butylowa

TEA – trietyloamina

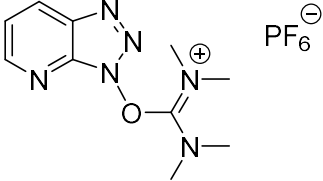
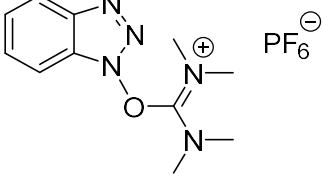
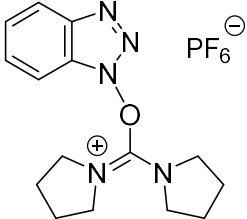
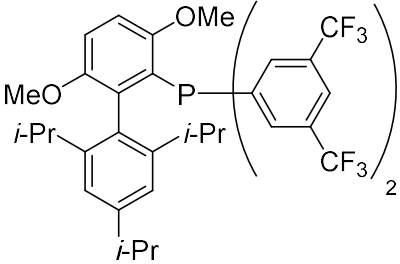
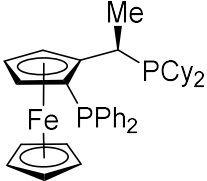
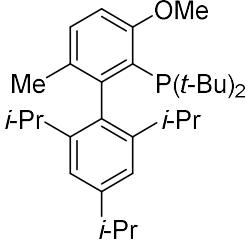
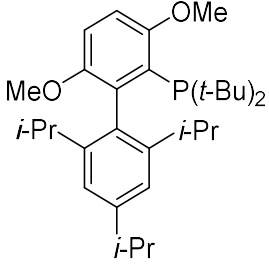
THF – tetrahydrofuran

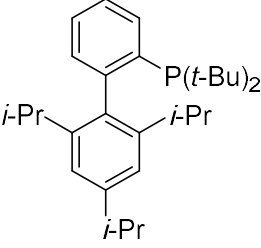
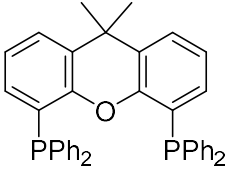
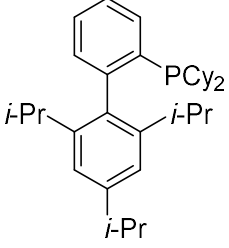
TLC – cienkowarstwowa chromatografia cieczowa

Tabela 1. Akronimy struktur

Akronim	Struktura
AdBrettPhos	
BrettPhos	
BODIPY	
COMU	



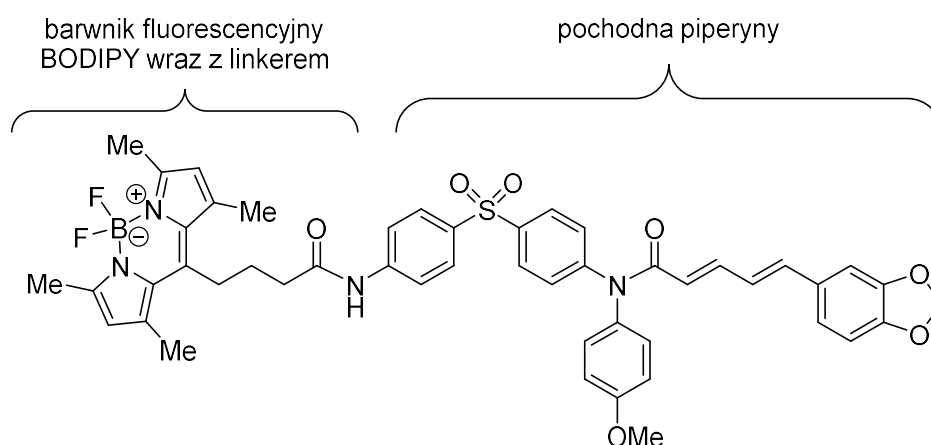
HATU	
HBTU	
HBPYU	
JackiePhos	
JosiPhos	
RockPhos	
<i>t</i> -BuBrettPhos	

<p><i>t</i>-BuXPhos</p>	
<p>XantPhos</p>	
<p>XPhos</p>	

## 2. Cel i założenia pracy

Pochodne związków naturalnych stanowią atrakcyjny obiekt badań dla naukowców zajmujących się projektowaniem nowych leków i substancji wykazujących aktywność biologiczną. Jednym z takich związków naturalnych jest piperyna – żółty, krystaliczny amid pozyskiwany z różnych gatunków pieprzu.<sup>1</sup> Związek ten wykazuje powinowactwo do receptorów uczestniczących w wielu procesach komórkowych. W Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcellego Nenckiego PAN prowadzone są badania nad wykorzystaniem pochodnych piperyny jako substancji modulujących aktywność szlaku NFκB.

Celem mojej pracy było opracowanie oraz przeprowadzenie syntezy nowej, nieodnotowanej dotychczas w literaturze cząsteczki (Schemat 1), którą planuje się zastosować do śledzenia produktów końcowych tego szlaku. Cząsteczka została zaprojektowana tak, aby posiadać duże powinowactwo do białek szlaku NFκB oraz wykazywać fluorescencję, pozwalając na śledzenie lokalizacji tych białek w komórce za pomocą mikroskopii optycznej. Składa się ona z dwóch zasadniczych części: (1) pochodnej piperyny, podstawionej na amidowym atomie azotu grupami dopasowanymi do kieszeni białek szlaku NFκB (amid 4,4'-sulfonylodianiliny i 4-metoksyaniliny) oraz (2) barwnika fluorescencyjnego BODIPY, podłączonego przez linker. Synteza powinna dostarczyć produkt o wysokiej czystości w ilości co najmniej 10 mg, wymaganej w badaniach biologicznych. Dodatkowo związki pośrednie na wszystkich etapach syntezy należy w pełni scharakteryzować za pomocą widm <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, IR oraz HRMS.



**Schemat 1.** Struktura związku docelowego.

## **3. Wstęp literaturowy**

### **3.1. Szlak NFκB<sup>2</sup>**

Jądrowy czynnik transkrypcyjny NFκB odgrywa istotną rolę w licznych procesach zachodzących w komórkach. Kontroluje on ekspresję wielu genów, w tym tych odpowiedzialnych za proliferację i wzrost komórek, czy syntezę inhibitorów apoptozy. Jądrowy czynnik transkrypcyjny NFκB pełni kluczową funkcję w odpowiedzi odpornościowej, w szczególności w reakcjach zapalnych. Reguluje on produkcję cytokin i chemokin, różnicowanie się limfocytów T czy aktywność inflammasomów. Zaburzenia działania NFκB mogą prowadzić do inicjacji procesów nowotworzenia i uodporniania się zmian nowotworowych na stosowane terapie. Zahamowanie aktywności jądrowego czynnika transkrypcyjnego NFκB stało się w ostatnich latach jedną ze strategii badanych w kontekście nowych terapii przeciwzapalnych i przeciwnowotworowych.

#### **3.1.1. Budowa białek NFκB**

Jądrowym czynnikiem transkrypcyjnym NFκB nazywa się heterodimer zbudowany z podjednostek białkowych NFκB1 i RelA. Podjednostki te zaliczane są do rodziny białek NFκB, w której skład wchodzi pięć białek: NFκB1 (p50), NFκB2 (p52), RelA (p65), RelB i cRel. Wszystkie charakteryzują się obecnością domeny RHD znajdującej się w N-końcowym odcinku łańcucha peptydowego. Domena RHD – zbudowana z około 300 aminokwasów, jest odpowiedzialna za utworzenie dimerów białek NFκB oraz wykazuje oddziaływania z białkowymi inhibitorami jądrowego czynnika transkrypcyjnego IκB. W obrębie tej domeny znajduje się również sekwencja odpowiedzialna za translokację czynników do jąder komórkowych NLS. Białka NFκB można podzielić na dwie grupy ze względu na zróżnicowanie ich C-końca. RelA, RelB oraz cRel charakteryzują się obecnością domeny TAD odpowiedzialnej za aktywację transkrypcji. NFκB1 i NFκB2 – białka nie zawierające tej domeny, odpowiadają za hamowanie transkrypcji.

#### **3.1.2. Aktywacja transkrypcji przez białka NFκB**

W literaturze opisano trzy szlaki aktywacji transkrypcji przez NFκB: klasyczny, alternatywny oraz atypowy. Znaczenie fizjologiczne ostatniego z nich nie zostało dotychczas jednoznacznie określone. Jądrowy czynnik transkrypcyjny NFκB występuje zdezaktywowany w cytoplazmie. Aktywność czynnika jest ograniczona głównie poprzez niekwalencyjne oddziaływanie z białkami inhibitorowymi z grupy IκB. Analogicznie dezaktywowane są inne dimery białek NFκB wykazujące zdolność do inicjacji transkrypcji, np. dimer NFκB1 i c-Rel.

Szlak klasyczny prowadzi do uwolnienia czynników transkrypcyjnych. Jest odpowiedzią na obecność wirusów, cytokin prozapalnych lub lipopolisacharydów wchodzących w skład otoczki bakterii Gram-ujemnych. Po zadziałaniu bodźca dochodzi do aktywacji IKK – kinaz inhibitorów jądrowego czynnika transkrypcyjnego NFκB, które katalizują fosforylację IκB. Do fosforylowanych białek IκB przyłączają się następnie jednostki ubikwityny, co skutkuje degradacją IκB w proteasomie 26S. Uwolniony czynnik transkrypcyjny ulega translokacji do jądra, gdzie bierze udział w transkrypcji. Kinazy IKK zaangażowane są również w szlak alternatywny. W odpowiedzi na obecność niektórych białek lub cytokin z rodziny czynników martwicy nowotworów TNF, kinazy IKK katalizują fosforylację białka p100. Białko NFκB2, powstałe w wyniku następczej ubikwitynacji i proteolizy C-końca białka p100, wiąże się z białkiem RelB z utworzeniem aktywnego transkrypcyjnie heterodimeru. Szlak atypowy nie zależy od aktywności kinaz IKK. Jego aktywacja następuje na skutek uszkodzeń DNA. Fosforylacja inhibitorów IκB katalizowana jest przez kinazę kazeinową CK2. Wszystkie trzy szlaki aktywacji transkrypcji tworzą w komórce układ wzajemnych sprzężeń zwrotnych – zarówno dodatnich jak i ujemnych.

### **3.1.3. Modulacja aktywności NFκB przez amidy kwasu piperynowego<sup>3-6</sup>**

W literaturze wielokrotnie wykazano, że piperyna posiada szereg aktywności biologicznych, w tym antyoksydacyjną, przeciwzapalną, immunomodulacyjną i przeciwnowotworową. Związek ten jest zdolny do hamowania indukowanej czynnikami martwicy nowotworów TNF-α aktywacji NFκB poprzez blokowanie aktywacji kinazy IKK. W związku z tym interesująca wydaje się być taktyka projektowania w oparciu o strukturę piperyny lepszych wiodących cząsteczek terapeutycznych przeciwko różnym chorobom zapalnym. Jedną z zaproponowanych w literaturze<sup>7</sup> cząsteczek jest (2*E*,4*E*)-5-(benzo[d][1,3]-dioxol-5-yl)-*N*-(4-(hydroksymetylo)fenylo)penta-2,4-dienamid. Ta pochodna piperyny nie tylko zmniejsza aktywność kinaz IKK, ale również oddziałuje z resztą lizyny 310 podjednostki RelA, zapobiegając jej acetylacji – procesowi niezbędnemu w celu osiągnięcia pełnej aktywności jądrowego czynnika transkrypcyjnego NFκB.

### **3.1.4. Modulacja aktywności NFκB przez 4,4'-sulfonylodianilinę<sup>8-10</sup>**

4,4'-sulfonylodianilina jest związkiem chemicznym o szerokim zastosowaniu medycznym. Substancja ta została wpisana na listę leków podstawowych Światowej Organizacji Zdrowia. 4,4'-sulfonylodianilina zalecana jest w leczeniu trądu, profilaktyce malarii czy zapobieganiu pneumocystozie i toksoplazmozie u osób ze słabszą odpornością. Lek oprócz właściwości przeciwbakteryjnych czy przeciwzarodźcowych wykazuje również

działanie przeciwzapalne oraz immunomodulujące. Stosowanie skutkuje obniżeniem poziomu cytokin, czynników martwicy nowotworów TNF- $\alpha$  oraz hamowaniem aktywności NF $\kappa$ B – mechanizm tych działań nie został dotąd zbadany.

### **3.2. Zastosowanie zjawiska fluorescencji w badaniach biologicznych<sup>11</sup>**

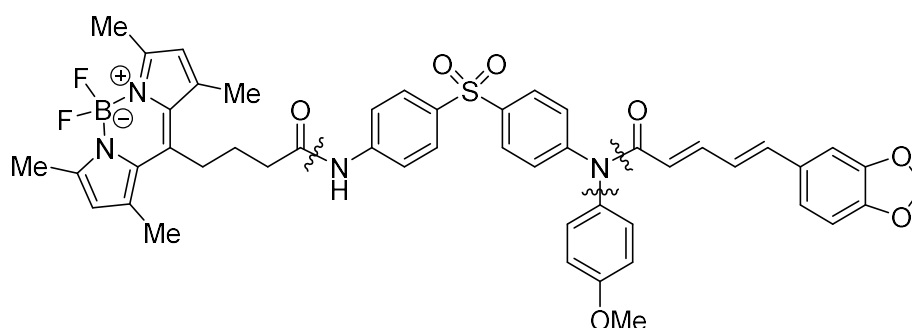
Mikroskopia fluorescencyjna jest powszechnie stosowaną techniką obrazowania w mikrobiologii. Metoda ta opiera się na zjawisku fluorescencji, czyli zjawisku emisji światła widzialnego na skutek powrotu molekuly ze stanu elektronowego wzbudzonego do podstawowego o tej samej multipletowości. Techniki te umożliwiają oznaczenie lokalizacji wybranych substancji lub makromolekuł, np. białek, w danych organellach komórkowych. Fluorescencja lokalizowanego celu może być jego cechą natywną, wynikającą z obecności fluorochromu wewnętrznego, lub wynikiem oddziaływania z odpowiednio zaprojektowanym fluorochromem zewnętrznym charakteryzującym się specyficznym oddziaływaniem z badanym celem. Intensywność i barwa otrzymanego sygnału mogą być zależne od wielu czynników, takich jak: pH, lepkość ośrodka, czy obecność niektórych jonów. Zależność ta pozwala na zastosowanie obrazowania fluorescencyjnego w badaniach analitycznych ilościowych jak i jakościowych.

#### **3.2.1. Pochodne 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenu<sup>12</sup>**

Jedną z grup barwników wykorzystywanych w obrazowaniu fluorescencyjnym są barwniki BODIPY. Barwniki BODIPY to pochodne 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenu charakteryzujące się wąskim pasmem emisji, wysoką wydajnością kwantową fluorescencji i wysokim współczynnikiem ekstynkcji. Szeroki zakres zastosowania wynika z ich charakteru hydrofobowego, dobrej stabilności fotochemicznej i niewielkiej wrażliwości na zmiany pH oraz polarność rozpuszczalnika. Co kluczowe, barwniki BODIPY mogą być, bez utraty właściwości fluorescencyjnych, koniugowane z wieloma typami cząsteczek, umożliwiając otrzymanie sond molekularnych mogących selektywnie łączyć się z peptydami, białkami czy lipidami, co pozwala na śledzenie ich translokacji w trakcie badanych procesów zachodzących w komórkach.

### 3.3. Strategia i metodyka syntezy

Zaprojektowana molekula to związek wielofunkcyjny zawierający dwa ugrupowania amidowe i jedną grupę sulfonową. Jej analiza retrosyntetyczna wskazuje na ścieżkę syntezy opartą na kolejnym tworzeniu wiązań C–N, poprzez acylowanie jednej z grup aminowych oraz arylowanie i acylowanie drugiej grupy aminowej (Schemat 2). Strategia opiera się więc na rozbudowywaniu dostępnej komercyjnie 4,4'-sulfonylodianiliny. Ze względu na obecność dwóch równocennych grup aminowych w tym związku wyjściowym, konieczne będzie zabezpieczenie jednej z grup aminowych w celu zapewnienia selektywności przeprowadzanych reakcji.



Schemat 2. Kluczowe dyskoneksje retrosyntetyczne w strukturze związku docelowego.

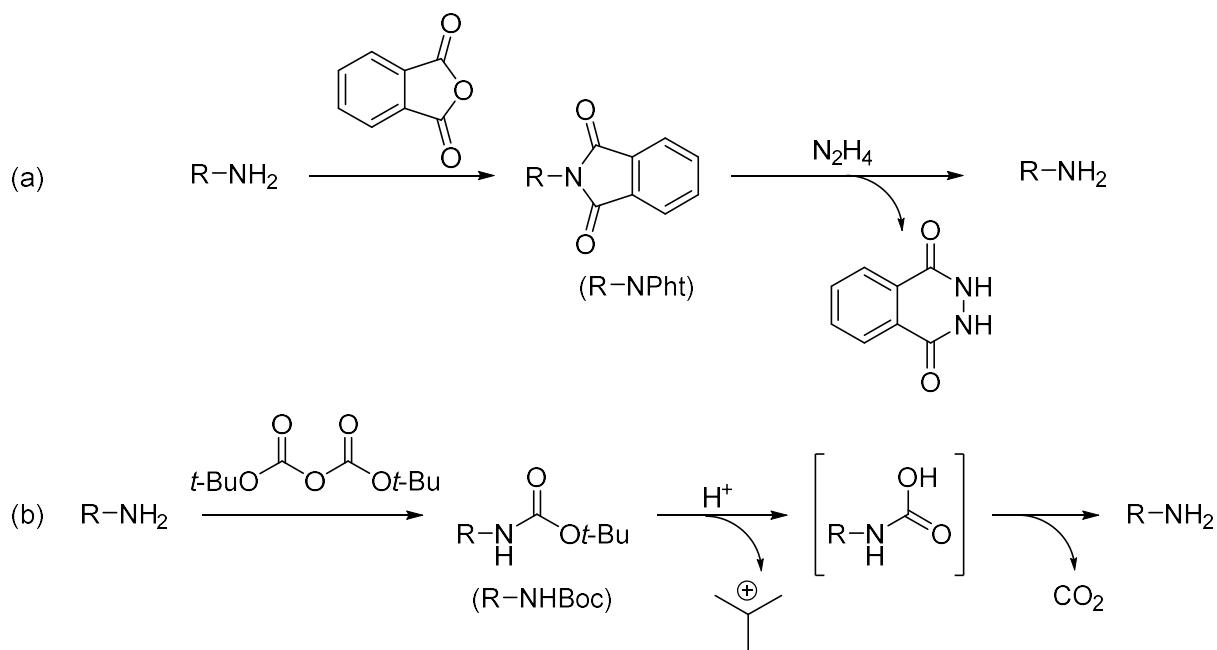
#### 3.3.1. Zabezpieczanie grup aminowych<sup>13</sup>

W celu przeprowadzenia reakcji w sposób selektywny na jednej z wielu podobnych grup związku wielofunkcyjnego należy ograniczyć reaktywność pozostałych, mogących reagować grup poprzez ich związanie z odpowiednimi grupami zabezpieczającymi. Idealną grupę zabezpieczającą cechowałaby wysoka wydajność i selektywność w reakcji zabezpieczania, stabilność w warunkach planowanych reakcji oraz możliwość wydajnego jej zdejmowania.

Reaktywność grupy aminowej można ograniczyć poprzez przeprowadzenie aminy w jej pochodne, które wykazują większą zawadę steryczną – np. benzyloaminy, bądź charakteryzują się niższą nukleofilowością atomu azotu – np. w amidy, imidy, czy karbaminiany.

Pierwsza z wymienionych możliwości, tj. przeprowadzenie aminy w amid, jest jedną z najbardziej elementarnych metod zabezpieczania amin. Amidy cechuje wysoka stabilność, co w licznych syntezach stanowi problem, ponieważ zdjęcie grupy zabezpieczającej poprzez hydrolizę wymaga zastosowania ostrych warunków i cechuje się niską selektywnością względem różnych grup amidowych obecnych w cząsteczce. Alternatywną metodą

zabezpieczenia grupy aminowej jest przeprowadzenie jej w imid. Najczęściej stosowane są pochodne ftalimidowe, otrzymywane w reakcji aminy z bezwodnikiem ftalowym (Schemat 3a). Związki te cechuje nieco niższa stabilność hydrolytyczna od amidów, przez co zabezpieczenie może zostać selektywnie usunięte. Co więcej, ftalimidy reagują łatwo z hydrazyną z wytworzeniem ftalohydrazydu, oferując dodatkowy sposób odbezpieczania (Schemat 3a), kompatybilny np. z amidami, które nie reagują z hydrazyną w tak łagodnych warunkach. Kolejnym sposobem zabezpieczania amin jest tworzenie karbaminianów. Są one bardzo odporne na hydrolizę, jednak zastosowanie odpowiednich labilnych podstawników po stronie alkoksylowej, umożliwia ich łatwe usunięcie w ściśle określonych warunkach. Do najczęściej stosowanych w zabezpieczaniu amin karbaminianów należy Boc (Schemat 3b). Grupa ta ulega łatwemu odszczepieniu w warunkach kwaśnych, poprzez tworzenie stabilizowanego kationu *tert*-butylowego (Schemat 3b).



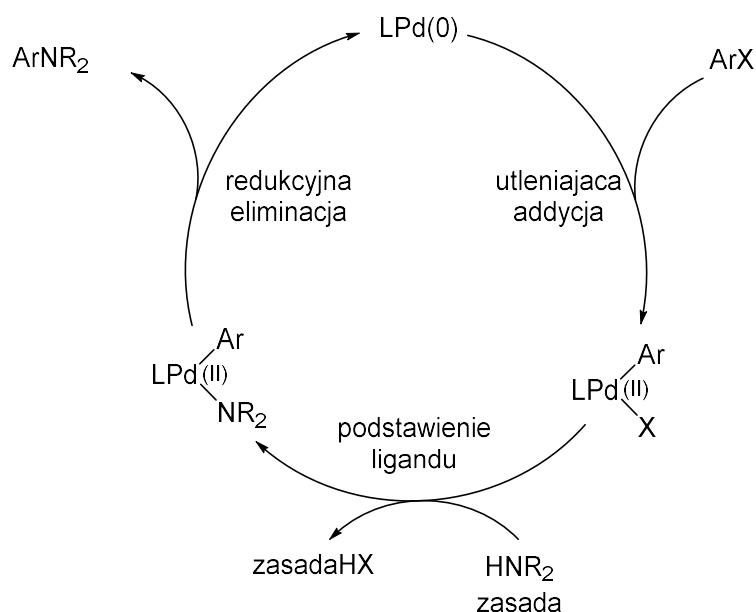
**Schemat 3.** Zabezpieczanie i odbezpieczanie amin w formie (a) ftalimidów oraz (b) karbaminianów *tert*-butylowych.



### 3.3.2. Arylowanie amin<sup>14</sup>

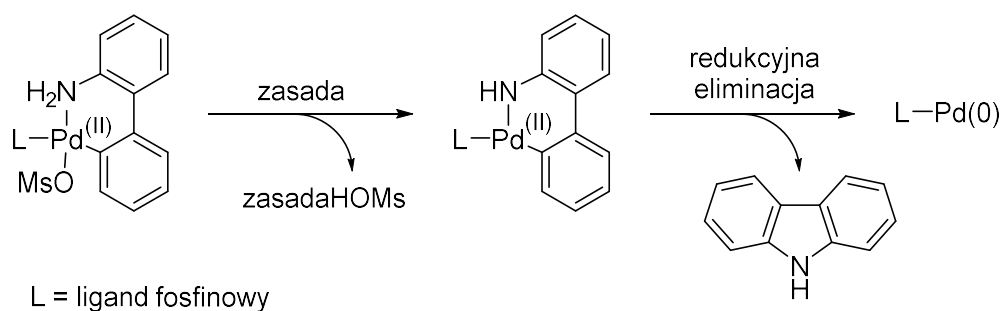
Ze względu na powszechne występowanie arylowanych amin w farmaceutykach, produktach naturalnych, materiałach organicznych i katalizatorach, metody ich selektywnego otrzymywania z wysokimi wydajnościami stanowią obiekt wielu badań. Aminy arylowane historycznie otrzymywano poprzez redukcję nitrozwiązków, bądź w wyniku substytucji aromatycznej. Reakcje te ze względu na liczne ograniczenia związane z warunkami ich prowadzenia, niskimi wydajnościami, niską regioselektywnością i koniecznością zabezpieczania różnych grup funkcyjnych są obecnie rzadko stosowane. Praktycznie w zupełności zostały wyparte przez metody katalitycznego sprzęgania halogenków aryłu z aminami z zastosowaniem kompleksów metali przejściowych. Historycznie pierwszą opracowaną metodą tego typu było sprzęganie Ullmana/Goldberg wykorzystujące związki miedzi. Mimo wielu zastosowań, charakteryzuje się ono zwykle koniecznością użycia wysokiej temperatury i polarnych rozpuszczalników, ograniczających zakres stosowalności.<sup>15</sup> W chwili obecnej dominującą metodą arylowania amin jest reakcja Buchwalda-Hartwiga z użyciem katalizatorów palladowych. Reakcja ta ma liczne zalety: może być prowadzona w obecności małej ilości katalizatora, często 1% lub mniej, dostępne jest wiele ligandów umożliwiających osiągnięcie wysokiej reaktywności w łagodnych warunkach (np. fosfiny lub *N*-heterocykliczne karbeny), można w niej stosować szerokie spektrum rozpuszczalników.<sup>16</sup>

Aktywną formą katalizatora w reakcji Buchwalda-Hartwiga są kompleksy palladu(0). Ogólny mechanizm, podobnie jak w innych procesach sprzęgania katalizowanych palladem(0), jest złożony trzech podstawowych etapów: (1) utleniającej addycji halogenku aryłowego do kompleksu palladu(0), dającej kompleks palladu(II) zawierający ligand aryłowy; (2) wymiany ligandu, podczas której amina jest wprowadzana do kompleksu i deprotonowana, zastępując halogenek; (3) redukcyjnej eliminacji, tworzącej wiązanie Ar–N i odtwarzającej katalizator (Schemat 4). Na każdym etapie mechanizmu atom palladu jest kompleksowany przez dodatkowy ligand L (np. fosfinę), który ma za zadanie zapobieżenie agregacji palladu(0) oraz polepszenie reaktywności kompleksów w poszczególnych etapach reakcji.



**Schemat 4.** Ogólny mechanizm reakcji Buchwalda-Hartwiga.

Ze względu na możliwość zniszczenia katalitycznie aktywnych kompleksów palladu(0) przez utlenianie tlenem z powietrza, sprzężanie halogenków z aminami prowadzi się w atmosferze gazu obojętnego. Z tego samego powodu stosuje się prekatalizatory, będące stabilnymi na powietrzu związkami palladu, które dopiero w środowisku reakcji ulegają przekształceniu w aktywne katalizatory. Prekatalizatory mogą mieć formę odpornych na utlenianie kompleksów palladu(0), np.  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ , które w mieszaninie reakcyjnej wymieniają ligand na właściwy do prowadzenia reakcji. Alternatywnie, można stosować prekatalizatory będące kompleksami palladu(II), ulegającymi *in situ* redukcji do aktywnej formy palladu(0). Szczególnym rodzajem prekatalizatorów zawierających pallad(II) są tzw. katalizatory Buchwalda.<sup>17</sup> Ich współczesna generacja (G3) to kompleksy Pd(II) zawierające jako ligandy 2-aminobifenyl, mesylan oraz fosfinę (która jest właściwym ligandem L biorącym udział katalizie). W warunkach reakcji w obecności zasady podlegają one szybkiej aktywacji poprzez deprotonowanie grupy aminowej i następczą redukcijną eliminację karbazolu. Prowadzi to do ilościowego otrzymania niskoskoordynowanego, a przez to bardzo aktywnego, kompleksu LPd(0) (Schemat 5).



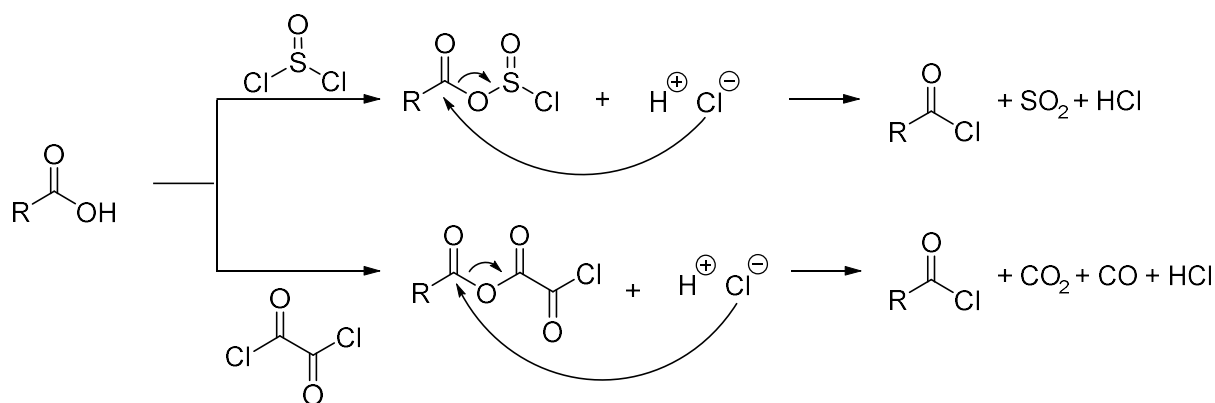
**Schemat 5.** Aktywacja prekatalizatorów Buchwalda G3.

### 3.3.3. Otrzymywanie amidów z użyciem aktywacji kwasów karboksylowych<sup>18</sup>

Ugrupowanie amidowe występuje w wielu prostych jak i rozbudowanych związkach chemicznych o dużym znaczeniu. W przyrodzie amidy stanowią podstawę struktury białek. Syntetyczne amidy charakteryzuje szeroki zakres zastosowań – od leków po tworzywa sztuczne.

Najczęściej stosowaną metodą syntezy amidów jest ich otrzymywanie w wyniku acylowania amin. Jednakże uzyskanie amidu w bezpośredniej reakcji między kwasem karboksylowym i aminą jest reakcją trudną. Dopiero w ostatnich latach opracowano szereg metod katalitycznych, pozwalających wykonać taką transformację, ale metodologia ta jest jeszcze na wczesnym etapie rozwoju.<sup>19</sup> W chwili obecnej najefektywniejszą drogą syntezy amidów jest uprzednia aktywacja kwasów karboksylowych w postaci różnych pochodnych, o zwiększonej elektrofilowości grupy karbonylowej.

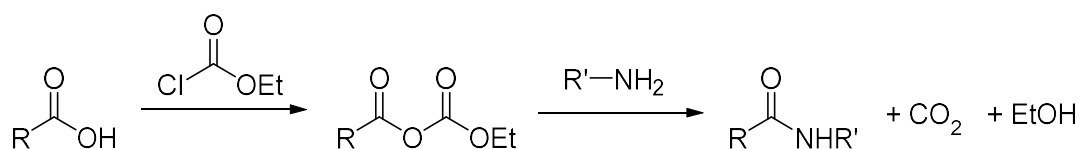
Jedną z najstarszych, ale w dalszym ciągu powszechnie stosowaną metodą aktywacji kwasów karboksylowych jest ich przekształcenie w chlorki kwasowe. Reakcje otrzymywania amidów z użyciem chlorków kwasowych przeprowadza się zazwyczaj dwuetapowo. Najpierw otrzymuje się chlorek kwasowy, a następnie dodaje aminy. Chlorek kwasowy można otrzymać w reakcjach między kwasem karboksylowym a odczynnikami takimi jak chlorek tionylu czy chlorek oksalilu. Mechanizm obu reakcji został przedstawiony na Schemacie 6. Zastosowanie tych odczynników do syntezy chlorków kwasowych wiąże się z powstawaniem kwasu chlorowodorowego. Wiele substratów może być wrażliwych na działanie HCl – np. aminokwasy z zabezpieczeniem -Boc mogą ulegać deprotekcji. Istnieją metody otrzymywania chlorków kwasowych w środowisku obojętnym, np. przy użyciu  $\text{Ph}_3\text{P}$  w  $\text{CCl}_4$ , jak i zasadowym – za pomocą chlorku cyjanurowego w obecności zasady.



**Schemat 6.** Mechanizm otrzymywania chlorków kwasowych z kwasów karboksylowych z użyciem chlorku tionylu i chlorku oksalilu.

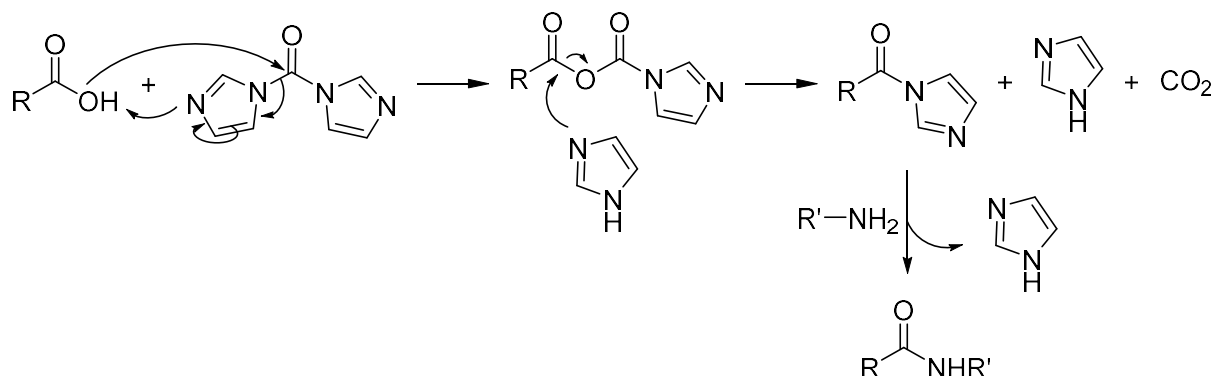
Otrzymane chlorki kwasowe wykazują wysoką aktywność w reakcjach acylowania amin. Reakcje otrzymywania amidów za pośrednictwem chlorków kwasowych prowadzi się w zasadowych warunkach w celu uniknięcia przekształcenia aminy w niereaktywny chlorowodorek oraz zapobiegnięcia hydrolizy kwasowej produktu z udziałem powstającego w reakcji HCl. W celu zapewnienia zasadowego środowiska reakcji dodaje się aminy trzeciorzędowe, np. DIPEA czy TEA. Chlorki kwasowe zawierające atomy wodoru w pozycji  $\alpha$  mogą w takich warunkach ulegać eliminacji prowadzącej do powstania ketenów. Keteny w reakcji z aminą dają amid, taki sam jak w wyniku reakcji z chlorkiem kwasowym. Zachodzenie reakcji przez keteny uznaje się za przyczynę racemizacji w reakcji otrzymywania amidów z użyciem chlorków kwasowych. Ograniczenia związane z użyciem chlorków kwasowych wynikają również z możliwości zachodzenia na obu etapach syntezy pobocznych reakcji hydrolizy, odbezpieczenia grup funkcyjnych, czy tworzenia się bezwodników.

Alternatywną dwuetapową metodą otrzymywania amidów jest przekształcenie kwasów karboksylowych w bezwodniki mieszane. Jednym z powszechnie stosowanych odczynników jest chloromrówczan etylu (ECF). Reakcja kwasu karboksylowego z ECF prowadzi do otrzymania bezwodnika mieszanego zawierającego grupę węglanową. Produkty uboczne otrzymywania amidów tą metodą są stosunkowo niereaktywne i mogą być łatwo usuwane ze środowiska reakcji ekstrakcją do fazy wodnej (Schemat 7).



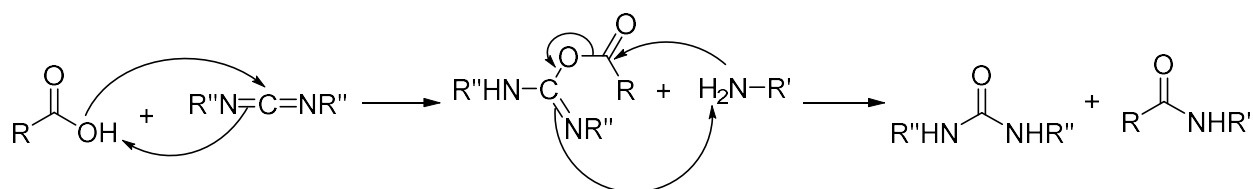
**Schemat 7.** Otrzymywanie amidów poprzez aktywację kwasu karboksylowego w formie mieszanego bezwodnika.

Kolejnym odczynnikiem do aktywacji kwasów karboksylowych, znajdującym zastosowanie m. in. w przemyśle farmaceutycznym,<sup>20</sup> jest karbonyldiimidazol (CDI). Reakcja kwasu karboksylowego z CDI prowadzi do wytworzenia acyloimidazolu, wykazującego wysoką reaktywność wobec amin (Schemat 8). Istotną zaletą tej metody w porównaniu z przedstawionymi powyżej jest jej jednoetapowość – CDI dodaje się bezpośrednio do mieszaniny kwasu karboksylowego i aminy.



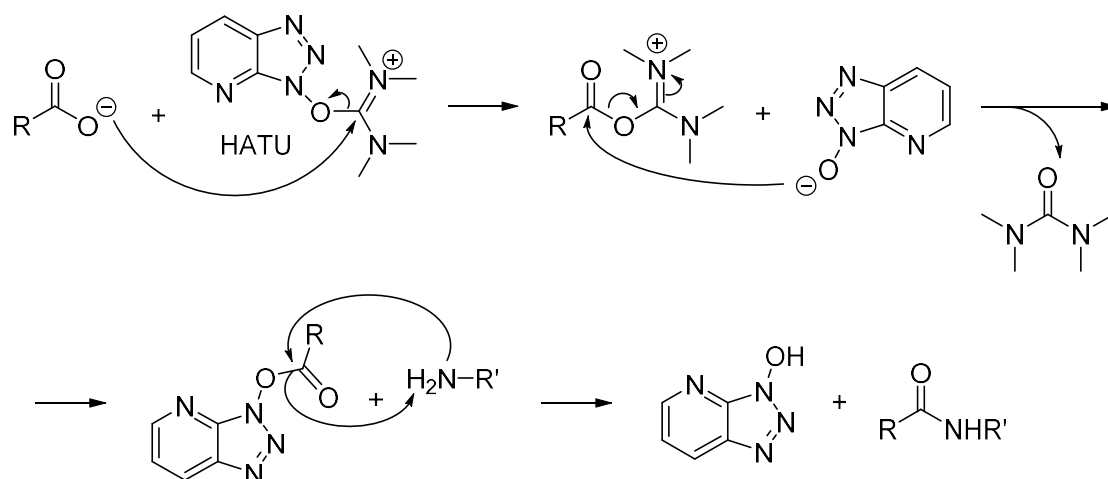
**Schemat 8.** Otrzymywanie amidów poprzez aktywację kwasu karboksylowego za pomocą CDI.

Reaktywne czynniki acylujące można również uzyskać w reakcji kwasu karboksylowego z karbodiimidami. Podobnie jak w przypadku reakcji z CDI, tutaj również dodaje się karbodiimid, np. DCC, EDC lub DIC, bezpośrednio do mieszaniny kwasu karboksylowego z aminą. Ogólny mechanizm kondensacji przy użyciu karbodiimidów przedstawiono na Schemacie 9. Produktem ubocznym reakcji jest odpowiedni podstawiony mocznik.



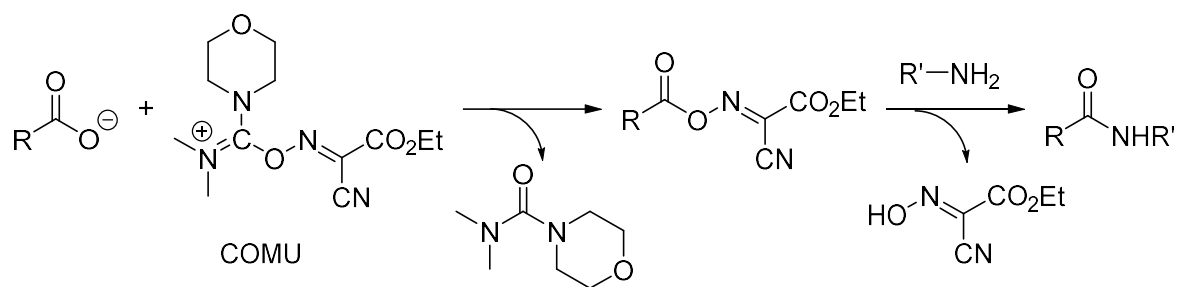
**Schemat 9.** Otrzymywanie amidów poprzez aktywację kwasu karboksylowego za pomocą karbodiimidu.

W ostatnich latach popularność jako czynniki aktywujące w reakcjach otrzymywania amidów zyskały sole uroniowe zawierające *N*-hydroksybenzotriazol lub jego pochodne. Odczynniki te umożliwiają szybkie i wydajne tworzenie wiązań amidowych i mogą być bardzo przydatne do sprzęgania sterycznie zabudowanych aminokwasów w syntezie peptydów. Stosuje się je w obecności zasady (np. DIPEA) i ich działanie polega na przekształceniu karboksylanu w aktywny ester z *N*-hydroksybenzotriazolem, stanowiący właściwy czynnik acylujący (Schemat 10). Sole uroniowe, takie jak: HATU, HBTU, czy HBPYU, znalazły szerokie zastosowanie w syntezie peptydów zarówno w roztworach jak i na fazie stałej.



**Schemat 10.** Otrzymywanie amidów poprzez aktywację kwasu karboksylowego za pomocą soli uroniowej HATU.

Ze względu na obecność ugrupowania benzotriazolowego sole uroniowe zostały sklasyfikowane jako potencjalne materiały wybuchowe.<sup>21</sup> Przypisanie im tej kategorii sprawiło, że ich ekonomiczny transport i przechowywanie staje się coraz trudniejszy. W poszukiwaniu skutecznych zamienników, opracowane zostały nowe generacje soli uroniowych pozbawionych tego ugrupowania. Jednym z nowo opracowanych czynników aktywujących kwasy karboksylowe jest COMU, którego reaktywność jest porównywalna a czasem nawet wyższa niż HATU. W przypadku tego odczynnika, kwas ulega aktywacji w postaci estru z *N*-hydroksyliminą, o strukturze zoptymalizowanej, aby uczynić z niej jak najlepszą grupę odchodzącą (Schemat 11).



**Schemat 11.** Otrzymywanie amidów poprzez aktywację kwasu karboksylowego za pomocą soli uroniowej COMU.

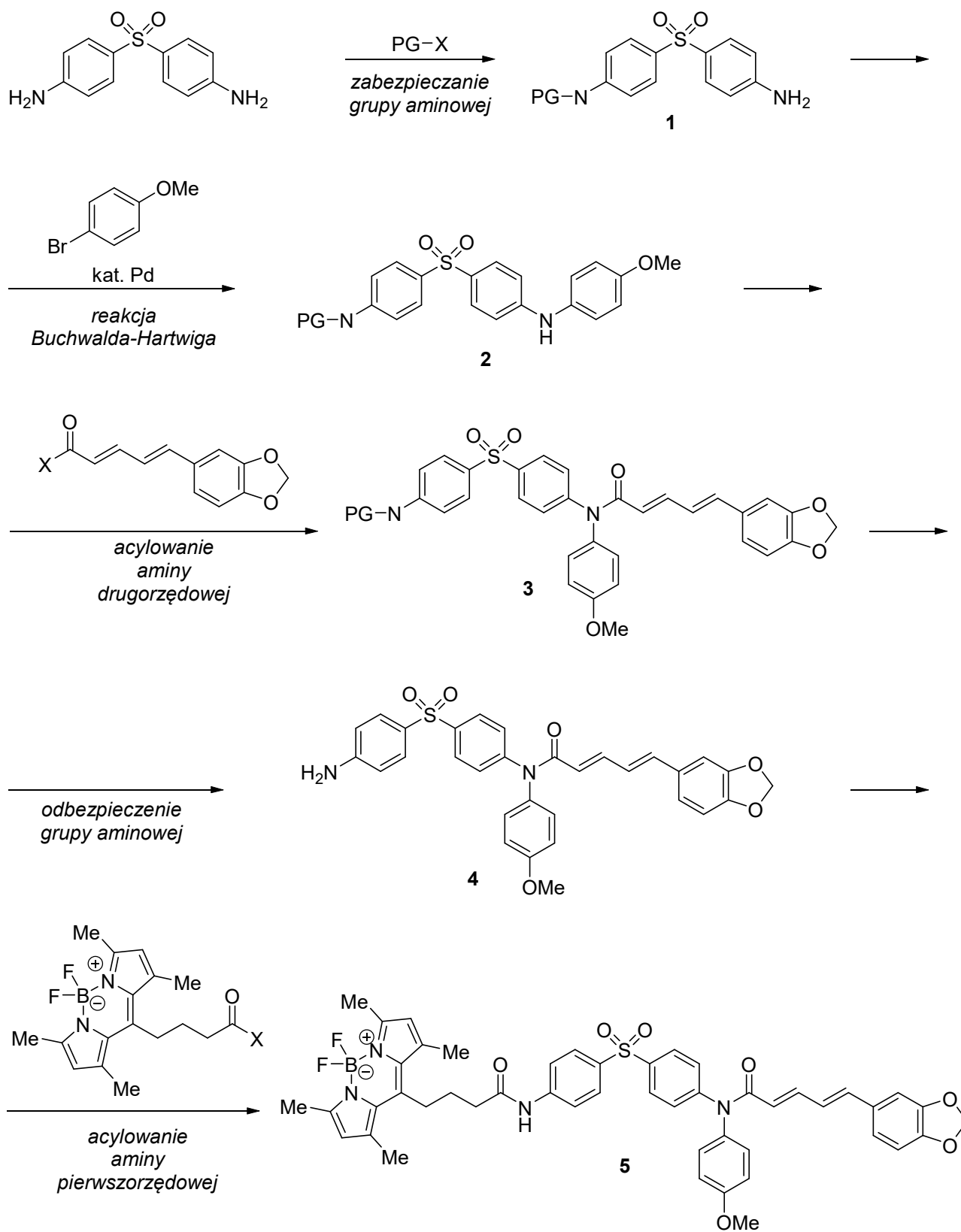
## 4. Wyniki własne

### 4.1. Plan syntezy

W oparciu o ogólną strategię syntezy oraz analizę literatury zaprezentowane w części 3.3, zaplanowano otrzymanie cząsteczki docelowej w sekwencji reakcji przedstawionej na Schemacie 12. Synteza obejmie następujące etapy: (1) zabezpieczenie jednej z grup aminowych 4,4'-sulfonylodianiliny; (2) wprowadzenie grupy 4-metoksyfenylowej poprzez sprzężanie krzyżowe C–N typu Buchwalda-Hartwiga; (3) acylowanie aminy drugorzędowej za pomocą aktywowanej pochodnej kwasu piperynowego; (4) odbezpieczenie grupy aminowej; (5) acylowanie aminy pierwszorzędowej z użyciem aktywowanego kwasu 4-BODIPY-butanowego.

W etapie pierwszym zostaną przygotowane pochodne 4,4'-sulfonylodianiliny zawierające różne grupy zabezpieczające, ponieważ mogą one wykazywać inną skuteczność w kolejnych etapach syntezy. Procedury syntetyczne na pozostałych etapach zostaną poddane wyczerpującej optymalizacji, tak aby osiągnąć jak najwyższą wydajność całej sekwencji. W szczególności, w reakcji sprzężania krzyżowego Buchwalda-Hartwiga (etap 2) zostaną przetestowane różnorodne układy katalityczne (prekatalizatory, ligandy; patrz część 3.3.2) oraz dobrane odpowiednie rozpuszczalniki i zasada. Z kolei dla procesów acylowania aminy (etapy 3 i 5), będą zbadane różne sposoby aktywacji kwasów karboksylowych, omówione w części 3.3.3.



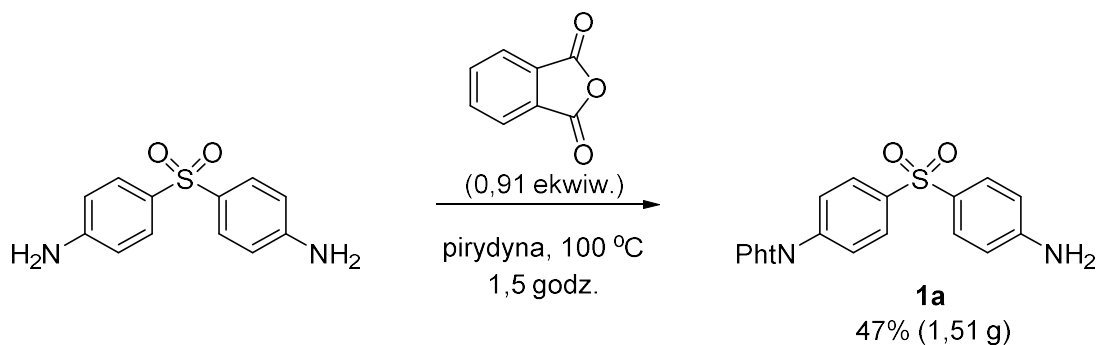


Schemat 12. Plan syntezy związku docelowego (PG=grupa zabezpieczająca).

## 4.2. Zabezpieczanie grup aminowej 4,4'-sulfonylodianiliny

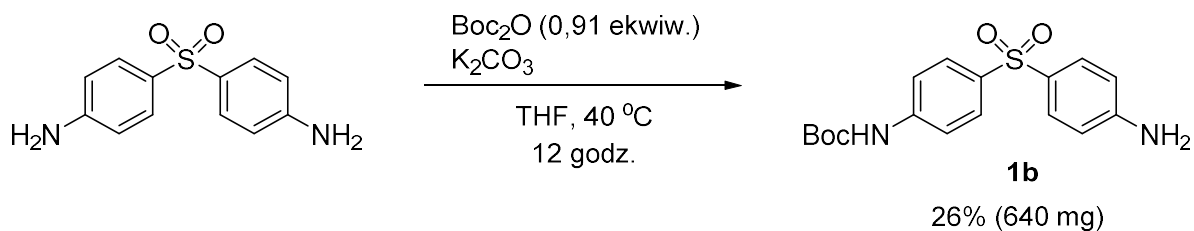
Biorąc pod uwagę aspekty omówione w części 3.3.1, postanowiono zsyntezować dwie pochodne 4,4'-sulfonylodianiliny z grupą aminową zabezpieczoną, odpowiednio, w postaci ftalimidu (Pht) oraz karbaminianu *tert*-butylowego (Boc). Obie te grupy zabezpieczające powinny być stabilne w warunkach kolejnych etapów syntezy oraz ulegać selektywnemu odbezpieczeniu w obecności grupy amidowej.

Reakcja zabezpieczania jednej z grup aminowych 4,4'-sulfonylodianiliny w postaci ftalimidu jest opisana w literaturze<sup>22</sup> i przeprowadzono ją według istniejącego przepisu (Schemat 13). Reakcja niestety nie wykazuje selektywności – w sposób statystyczny zachodzi następcze przekształcenie produktu **1a** w związek z dwoma grupami ftalimidowymi. Zgodnie z raportem literaturowym, w reakcji zastosowano 0.91 ekwiw. bezwodnika ftalowego, co prowadzi do optymalnej wydajności pożądanego związku, którego otrzymano 47% po oczyszczeniu za pomocą chromatografii kolumnowej od nieprzereagowanego substratu i ubocznego produktu z podwójnym zabezpieczeniem.



**Schemat 13.** Zabezpieczenie 4,4'-sulfonylodianiliny grupą ftalimidową.

Z kolei nie ma literaturze doniesienia o syntezie 4,4'-sulfonylodianiliny z jedną grupą aminową zabezpieczoną przez Boc. Zastosowano więc typową procedurę, używając 0.91 ekwiw. diwęglanu di-*tert*-butylu, w obecności węglanu potasu (Schemat 14). Również w tym wypadku zaobserwowano tworzenie podwójnie zabezpieczonego produktu ubocznego. Pożądany produkt **1b** po oczyszczeniu otrzymano z wydajnością 27%.



**Schemat 14.** Zabezpieczenie 4,4'-sulfonyldianiliny grupą *tert*-butoksykarbonylową.

### 4.3. Arylowanie pochodnych 4,4'-sulfonyldianiliny

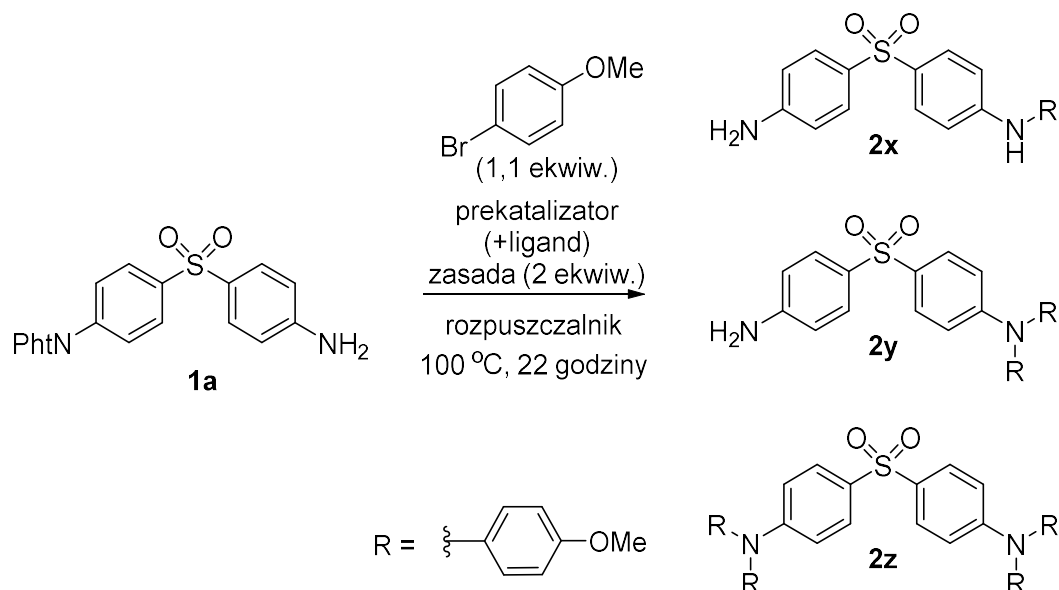
W kolejnym etapie podjęto się optymalizacji reakcji arylowania grupy aminowej w związku **1a** za pomocą 4-bromoanizolu w warunkach sprzęgania krzyżowego Buchwalda-Hartwiga.

W pierwszej kolejności przetestowano różne układy katalityczne, tj. prekatalizatory i ligandy (Tabela 2). Ewaluacji poddano 22 katalizatory palladowe (poz. 1-22) i jeden oparty na miedzi (poz. 23). W trzech przypadkach zastosowano jako źródło palladu kompleks  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3 \cdot \text{CHCl}_3$  (poz. 1-3), zawierający od razu pallad(0), w kombinacji z różnymi ligandami fosfinowymi. Kolejne dwie reakcje przeprowadzono stosując prekatalizatory zawierające pallad(II) z dodatkiem odpowiednich ligandów (poz. 4-5). Wreszcie przetestowano serię prekatalizatorów Buchwalda typu G3 (zob. Schemat 5), z różnymi fosfinami (poz. 6-22). W reakcji katalizowanej miedzią, użyto kombinacji jodku miedzi(I) z proliną, jako ligandem. Wszystkie reakcje prowadzono w temperaturze 100 °C przez 22 godziny. Dla danego układu katalitycznego stosowano warunki, które wcześniej były opisane w literaturze jako standardowe, w większości wypadków użyto *tert*-butanolanu sodu jako zasady oraz toluenu jako rozpuszczalnika. Wynik reakcji ustalono na podstawie widm  $^1\text{H}$  NMR surowych mieszanin poreakcyjnych (po filtracji przez krótką warstwę silikażelu, odparowaniu i rozpuszczeniu w  $\text{CDCl}_3$ ). Produkty identyfikowano na przez porównanie z widmami czystych próbek wyizolowanych z wybranych mieszanin reakcyjnych za pomocą PTLC.

W żadnej z przeprowadzonych reakcji nie zaobserwowano tworzenia się pożądanego produktu. Jednakże w kilku przypadkach wykryto związki z utworzonym w wyniku sprzęgania krzyżowego wiązaniem C–N (czasem więcej niż jednym), pozbawione zabezpieczenia ftalimidowego (**2x**, **2y**, **2z**). Wynika stąd, że grupa ftalimidowa jest labilna w zastosowanych warunkach reakcji, jednak pożądanego sprzęgania ma miejsce. W szczególności, najaktywniejsze okazały się prekatalizatory Buchwalda Pd G3 zawierające ligandy *t*-BuBrettPhos, BrettPhos,

AdBrettPhos, RockPhos, DTBMPPhos (odpowiednio poz. 6-10). Zostały one więc wybrane do dalszych etapów optymalizacji.

**Tabela 2.** Ewaluacja układów katalitycznych.

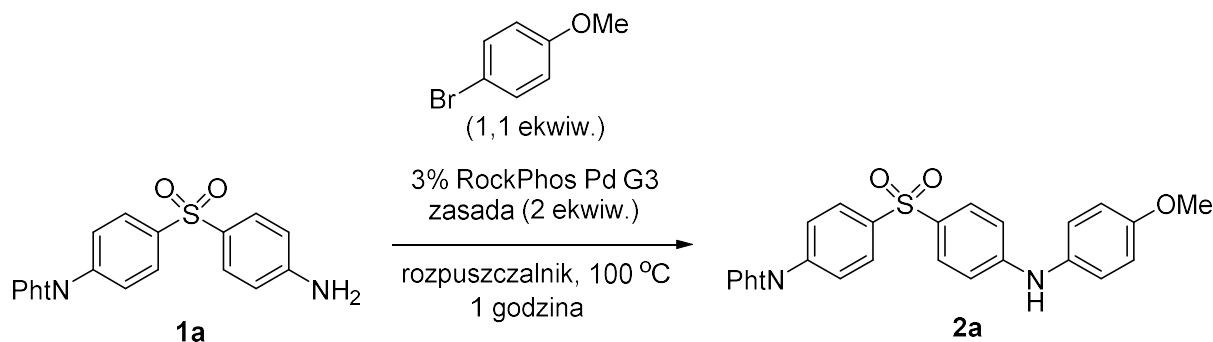


Lp.	Prekatalizator (+ligand)	Zasada, rozpuszczalnik	Wydajność wyznaczona na podstawie $^1\text{H NMR}$ (%)		
			2x	2y	2z
1	1,5% $\text{Pd}_2(\text{dba})_3 \cdot \text{CHCl}_3$ + 3% XantPhos	<i>t</i> -BuONa, toluen	-	-	-
2	1% $\text{Pd}_2(\text{dba})_3 \cdot \text{CHCl}_3$ + 6% <i>t</i> -Bu <sub>3</sub> P	<i>t</i> -BuONa, toluen	-	-	-
3	1,5% $\text{Pd}_2(\text{dba})_3 \cdot \text{CHCl}_3$ + 3% BINAP	<i>t</i> -BuONa, toluen	-	-	-
4	3% $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ + 6% XPhos	$\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , toluen/ <i>t</i> -BuOH	-	-	-
5	3% $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{DCM}$ + 3% dppf	<i>t</i> -BuONa, toluen	5	-	-
6	3% <i>t</i> -BuBrettPhos Pd G3	<i>t</i> -BuONa, toluen	33	17	17
7	3% BrettPhos Pd G3	<i>t</i> -BuONa, toluen	13	7	19
8	3% AdBrettPhos Pd G3	<i>t</i> -BuONa, toluen	11	7	7
9	3% RockPhos Pd G3	<i>t</i> -BuONa, toluen	27	7	5
10	3% DTBMPPhos Pd G3	<i>t</i> -BuONa, toluen	27	14	-
11	3% <i>t</i> -BuXPhos Pd G3	<i>t</i> -BuONa, toluen	14	-	-
12	3% RuPhos Pd G3	<i>t</i> -BuONa, toluen	10	-	-
13	3% APhos Pd G3	<i>t</i> -BuONa, toluen	3	-	-
14	3% Catacium A Pd G3	<i>t</i> -BuONa, toluen	-	-	-
15	3% JosiPhos Pd G3	<i>t</i> -BuONa, toluen	-	-	-
16	3% SPhos Pd G3	<i>t</i> -BuONa, toluen	-	-	-
17	3% <i>t</i> -Bu <sub>3</sub> P Pd G3	<i>t</i> -BuONa, toluen	-	-	-
18	3% Cy <sub>3</sub> P Pd G3	<i>t</i> -BuONa, toluen	-	-	-
19	3% JackiePhos Pd G3	<i>t</i> -BuONa, toluen	-	-	-
20	3% DavePhos Pd G3	<i>t</i> -BuONa, toluen	-	-	-
21	3% CyJohnPhos Pd G3	<i>t</i> -BuONa, toluen	-	-	-
22	3% DPEPhos Pd G3	<i>t</i> -BuONa, toluen	-	-	-
23	10% CuI + 20% L-prolina	$\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMSO	-	-	-

Najbardziej prawdopodobnym powodem utraty zabezpieczającej grupy ftalimidowej było zastosowanie w reakcji mocnej zasady – *tert*-butanolanu sodu. Stąd, postanowiono zastąpić ją słabszymi zasadami nieorganicznymi –  $K_2CO_3$ ,  $Cs_2CO_3$  oraz  $K_3PO_4$ . Przeprowadzono szereg reakcji arylowania związku **1a** w obecności tych zasad oraz, dodatkowo, w trzech różnych rozpuszczalnikach (toluen, *tert*-butanol i 1,4-dioksan), stosując prekatalizator RockPhos Pd G3, który poprzednio wykazał najlepszą selektywność monoarylacji (Tabela 2, poz. 9). Co więcej, czas reakcji skrócono do 1 h.

Otrzymane wyniki podsumowano w Tabeli 3. Zdecydowanie najlepsze wyniki otrzymano w reakcjach prowadzonych w 1,4-dioksanie, w których pożądaný produkt **2a** tworzył się z wydajnością ok. 40%, niezależnie od zastosowanej zasady (poz. 7-9). W dalszym ciągu następowało częściowa utrata zabezpieczenia ftalimidowego i generowanie produktu ubocznego **2x**, jednak w znacznie mniejszym stopniu niż wcześniej.

**Tabela 3.** Ewaluacja rozpuszczalników i zasad.

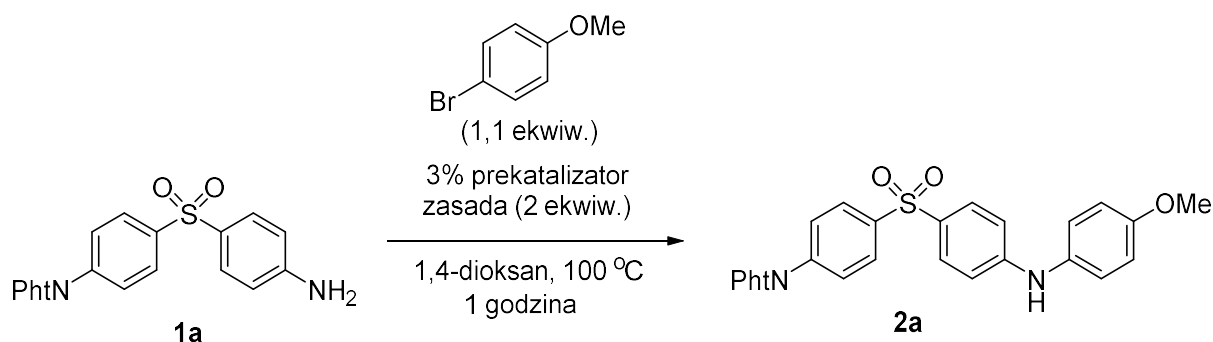


Lp.	Rozpuszczalnik	Zasada	Wydajność wyznaczona na podstawie $^1H$ NMR (%)	
			<b>2a</b>	<b>2x</b>
1	toluen	$Cs_2CO_3$	9	6
2	toluen	$K_2CO_3$	-	-
3	toluen	$K_3PO_4$	-	-
4	<i>tert</i> -BuOH	$Cs_2CO_3$	18	14
5	<i>tert</i> -BuOH	$K_2CO_3$	3	2
6	<i>tert</i> -BuOH	$K_3PO_4$	9	7
7	1,4-dioksan	$Cs_2CO_3$	41	13
8	1,4-dioksan	$K_2CO_3$	43	9
9	1,4-dioksan	$K_3PO_4$	43	13

Biorąc pod uwagę wysoką skuteczność 1,4-dioksanu jako rozpuszczalnika w optymalizowanej reakcji Buchwalda-Hartwiga, przeprowadzono jeszcze test 5 wcześniej wytypowanych prekatalizatorów w tym rozpuszczalniku, w obecności trzech różnych zasad

(Tabela 4). Podobnie jak w Tabeli 3, reakcje prowadzono przez 1 h w temperaturze 100 °C. Najwyższą wydajność pożądanego produktu, 55%, otrzymano, gdy prekatalizatorem był BrettPhos Pd G3, a zasadą węglan cezu (poz. 4).

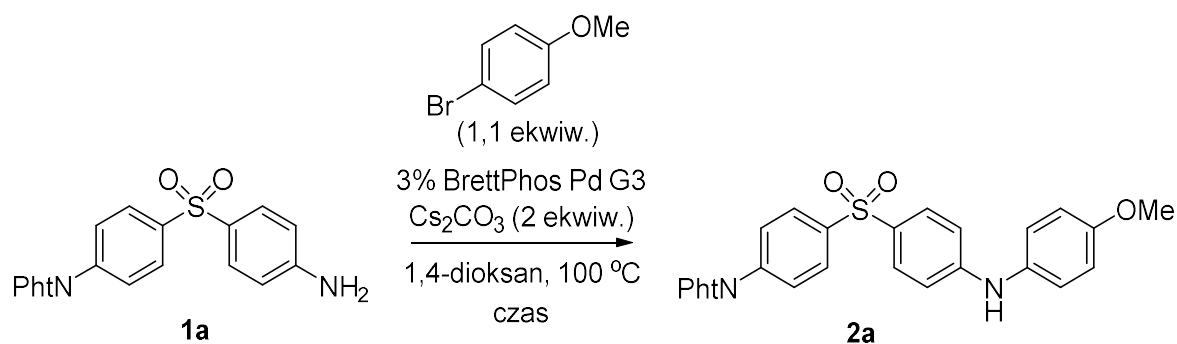
**Tabela 4.** Ostateczny dobór warunków reakcji.



Lp.	Prekatalizator	Zasada	Wydajność wyznaczona na podstawie <sup>1</sup> H NMR (%)	
			<b>2a</b>	<b>2x</b>
1	<i>t</i> -BuBrettPhos Pd G3	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	40	20
2	<i>t</i> -BuBrettPhos Pd G3	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	-	50
3	<i>t</i> -BuBrettPhos Pd G3	<i>t</i> -BuONa	7	7
4	BrettPhos Pd G3	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	55	15
5	BrettPhos Pd G3	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	45	10
6	BrettPhos Pd G3	<i>t</i> -BuONa	-	22
7	AdBrettPhos Pd G3	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	47
8	AdBrettPhos Pd G3	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	-	33
9	AdBrettPhos Pd G3	<i>t</i> -BuONa	-	-
10	RockPhos Pd G3	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	41	13
11	RockPhos Pd G3	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	43	9
12	RockPhos Pd G3	<i>t</i> -BuONa	-	17
13	DTBMPPhos Pd G3	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20	7
14	DTBMPPhos Pd G3	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	13	5
15	DTBMPPhos Pd G3	<i>t</i> -BuONa	-	-

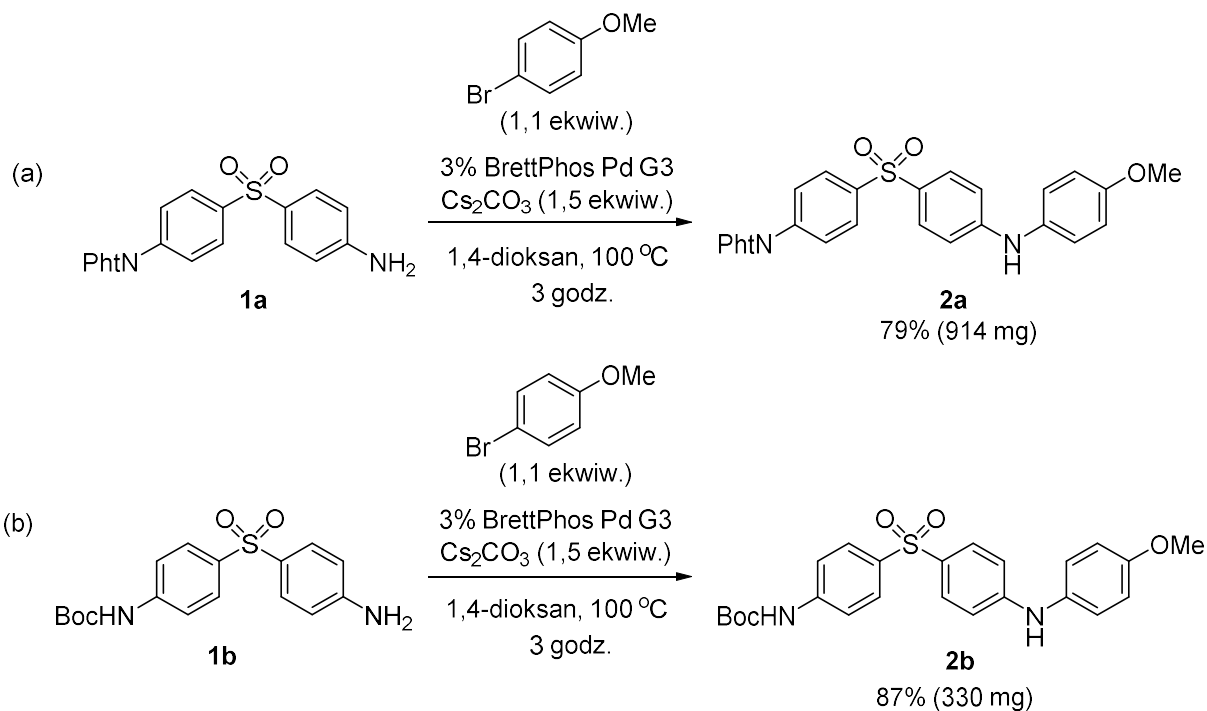
Ostatnim etapem optymalizacji był dobór czasu reakcji. Tabela 5 przedstawia wydajności reakcji zakończonych po różnym czasie. Pełną konwersję substratu zaobserwowano po 3 godzinach (poz. 2). Po tym czasie również wydajność pożądanego produktu była najwyższa. Dłuższe prowadzenie reakcji prowadzi do stopniowej deprotekcji funkcji aminowej (poz. 3). Wydajność 79% uzyskana po 3 h została uznana za satysfakcjonującą.

**Tabela 5.** Dobór czasu reakcji.



Lp.	Czas reakcji	Wydajność wyznaczona na podstawie $^1\text{H NMR}$ (%)	
		<b>2a</b>	<b>2x</b>
1	1 h	55	15
2	3 h	79	21
3	24 h	71	28

Zoptymalizowane warunki reakcji sprzęgania krzyżowego zostały zastosowane do syntezy związków **2a** i **2b** w dużej skali. Wyizolowano masy substancji odpowiadające wydajnościom odpowiednio 79% i 87% (Schemat 15).

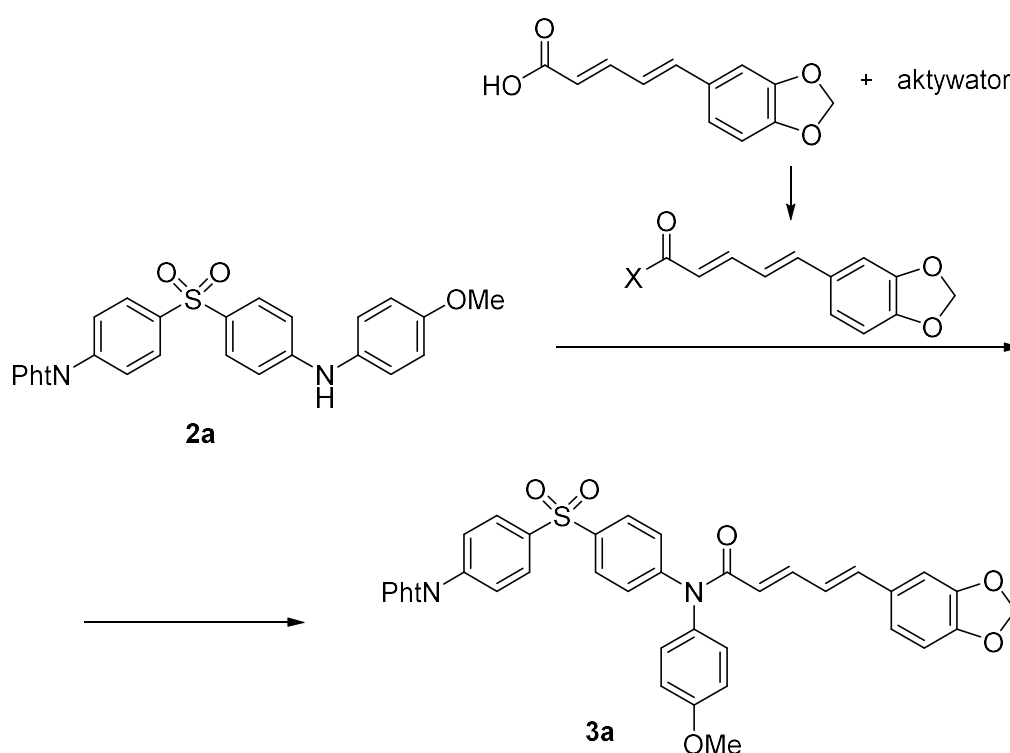


**Schemat 15.** Arylowanie pochodnych 4,4'-sulfonylodianiliny.

#### 4.4. Acylowanie aminy drugorzędowej

Kolejnym etapem syntezy jest acylowanie aminy drugorzędowej. W celu wyboru najodpowiedniejszej metody przeprowadzono szereg reakcji w małej skali między związkiem **2a** i różnie aktywowanymi pochodnymi kwasu piperynowego. Użyto standardowych dla poszczególnych metod warunków aktywacji kwasu i samego acylowania. W Tabeli 6 przedstawiono wydajności tworzenia związku **3a** w poszczególnych reakcjach, ustalone na podstawie analizy mieszanin poreakcyjnych za pomocą spektroskopii  $^1\text{H}$  NMR.

**Tabela 6.** Ewaluacja metod acylowania grupy aminowej w związku **2a**.



Lp.	Warunki aktywacji kwasu	Warunki acylowania	Wydajność reakcji wyznaczona na podstawie $^1\text{H}$ NMR (%)
1	EDC, DCM	bez oddzielnej aktywacji, RT, 24 h	-
2	DCC, toluen	bez oddzielnej aktywacji, 100 °C, 24 h	-
3	CDI, DCM, RT, 4 h	DCM, RT, 24 h	-
4	MCF, TEA, DCM, RT, 1 h	DCM, RT, 24 h	-
5	HATU, DIPEA, DCM	bez oddzielnej aktywacji, RT, 24 h	-
6	COMU, DIPEA, DMF, 0 °C, 1 h	DMF, RT, 24 h	-
7	(COCl) <sub>2</sub> , kat. DMF, DCM, RT, 4 h	DIPEA, DCM, RT, 24 h	-
8	SOCl <sub>2</sub> , RT, 4 h	DIPEA, DCM, RT, 24 h	6
9	SOCl <sub>2</sub> , RT, 4 h	DIPEA, DCM, 35 °C, 24 h	35
10	SOCl <sub>2</sub> , RT, 4 h	DIPEA, DCE, 80 °C, 24 h	50

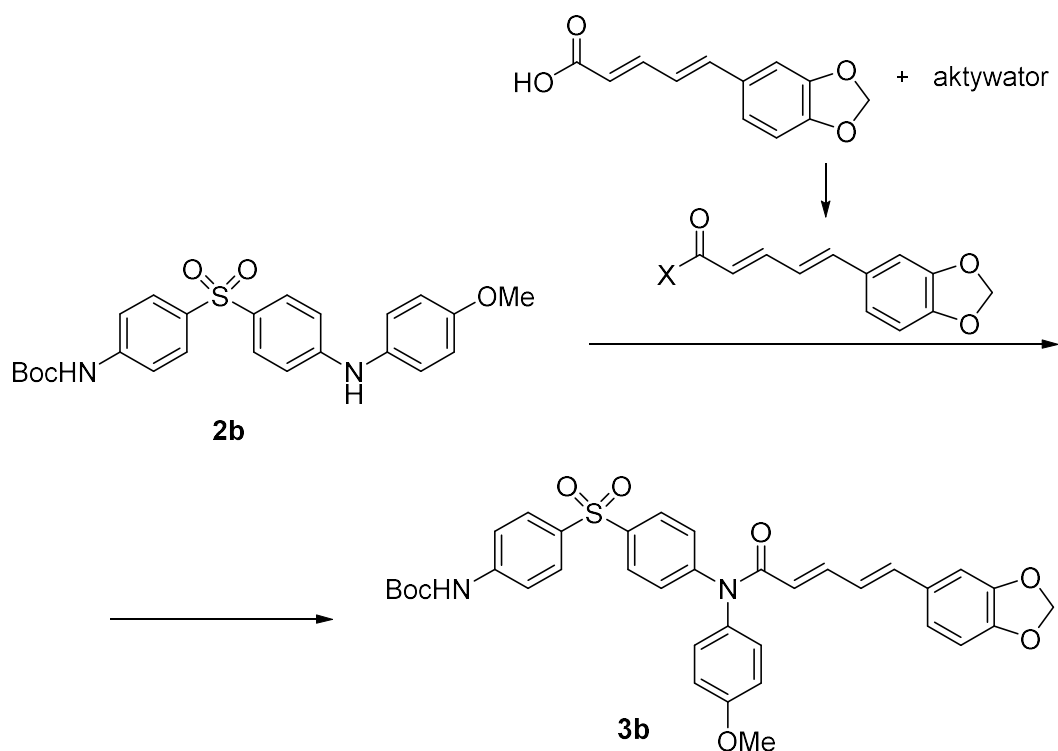


Większość reakcji nie doprowadziła do powstania pożądanego amidu. W szczególności produktu nie zaobserwowano, gdy zastosowano karbodimidy EDC i DCC (poz. 1-2), nawet w podwyższonej temperaturze (poz. 2). Również aktywacja kwasu w postaci pochodnej imidazolowej (poz. 3) oraz bezwodnika mieszanego (poz. 4) nie przyniosła oczekiwanych rezultatów. Także użycie soli uroniowych (poz. 5-6), w tym jednego z najsilniejszych aktywatorów COMU (poz. 6), nie zaowocowało powstaniem wiązania amidowego. W końcu najbardziej klasyczna aktywacja poprzez przekształcenie kwasu w chlorek kwasowy doprowadziła do utworzenia związku **3a**, jednak co ciekawe tylko w przypadku użycia chlorku tionylu (poz. 8), a nie chlorku oksailu (poz. 7). Nawet w tym przypadku do uzyskania akceptowalnej wydajności konieczne było prowadzenie reakcji w temperaturze 80 °C przez 24 h (poz. 10).

Niską reaktywności w procesie acylowania można tłumaczyć małą nukleofilowością aminy **2a**, której wolna para elektronowa na atomie azotu jest silnie zdelokalizowana na dwa pierścienie aromatyczne, tworząc razem z ich elektronami  $\pi$  układ rezonansowy

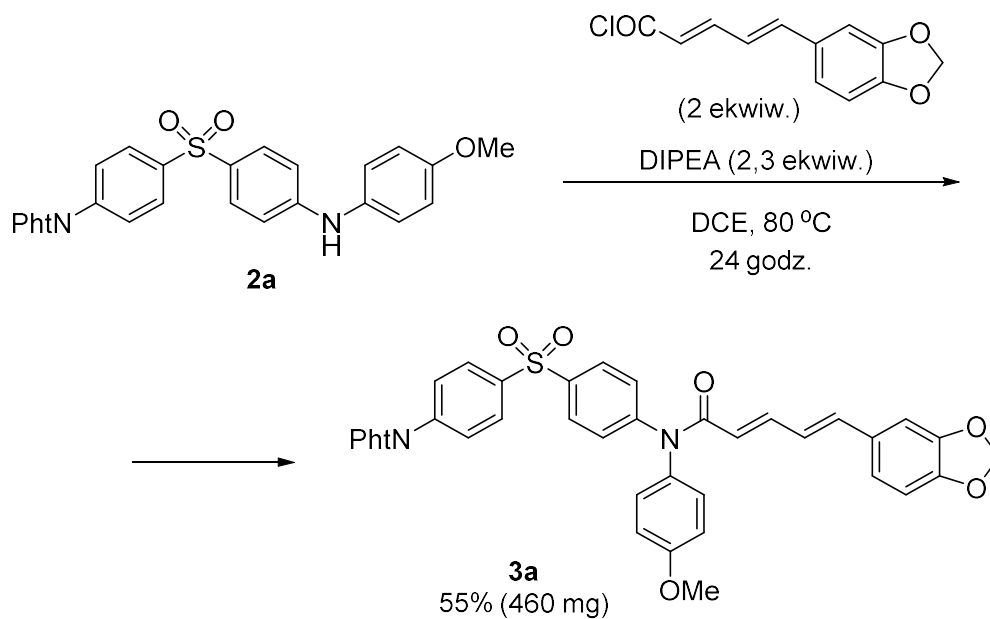
Podobne testy różnych metod acylowania przeprowadzono dla aminy drugorzędowej **2b**, zawierającej zabezpieczenie Boc. Otrzymane wyniki przedstawiono w Tabeli 7. Niestety w żadnym wypadku nie zaobserwowano tworzenia się pożądanego produktu **3b**. W przypadku zastosowania aktywacji w postaci chlorku kwasowego i późniejszego acylowania w 80 °C (poz. 5), produkt nie powstał, ale w widmie  $^1\text{H}$  NMR mieszaniny poreakcyjnej zauważono, że doszło do usunięcia grupy zabezpieczającej Boc (tj. wykryto związek **2x**). Prawdopodobnie warunki te są za ostre dla utrzymania się karbaminianu. Podjęto jeszcze jedną próbę otrzymania amidu **3b** w silnie zasadowych warunkach, mogących spowodować wygenerowanie amidku z aminy, znacznie zwiększając nukleofilowość atomu azotu. Niestety również to podejście zakończyło się niepowodzeniem (poz. 6). Wobec powyższego postanowiono nie kontynuować ścieżki syntezy z grupą zabezpieczającą Boc.

**Tabela 7.** Ewaluacja metod acylowania grupy aminowej w związku **2b**.



Lp.	Warunki aktywacji kwasu	Warunki acylowania	Wydajność reakcji wyznaczona na podstawie <sup>1</sup> H NMR (%)
1	EDC, DCM	bez oddzielnej aktywacji, RT, 24 h	-
2	HATU, DIPEA, DCM	bez oddzielnej aktywacji, RT, 24 h	-
3	COMU, DIPEA, DMF, 0 °C, 1 h	DMF, RT, 24 h	-
4	SOCl <sub>2</sub> , RT, 4 h	DIPEA, DCM, RT, 24 h	-
5	SOCl <sub>2</sub> , RT, 4 h	DIPEA, DCE, 80 °C, 24 h	-
6	SOCl <sub>2</sub> , RT, 4 h	NaHMDS, toluen, RT, 24 h	-

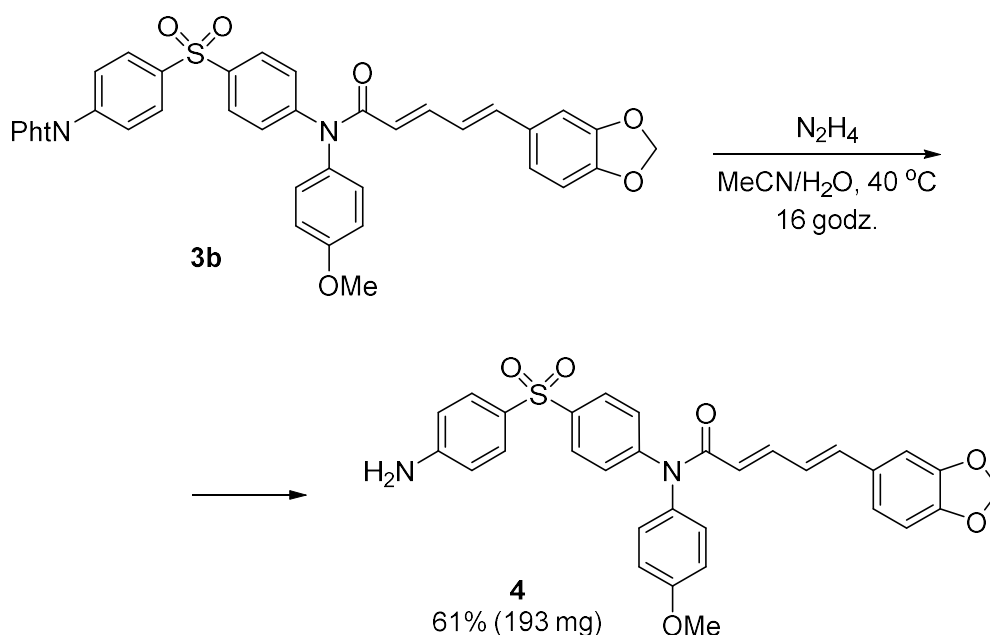
Warunki acylowania dobrane na podstawie doświadczeń z Tabeli 6, konkretnie te z pozycji 10, zostały wykorzystane do syntezy związku **3a** w dużej skali (Schemat 16). Po reakcji wyizolowano z zastosowaniem metod chromatografii kolumnowej produkt o masie odpowiadającej wydajności 55%.



Schemat 16. Acylowanie aminy drugorzędowej.

#### 4.5. Odbezpieczenie grupy aminowej

Czwartym etapem syntezy jest usunięcie zabezpieczenia ftalimidowego. Zastosowano w tym celu standardową procedurę, wykorzystującą hydrazynę w układzie rozpuszczalników woda-acetonitryl. Wstępne eksperymenty w małej skali wykazały, że dla pełnej konwersji substratu reakcja musi być prowadzona w temperaturze 40 °C przez 16 h (kontrola TLC). Przy zastosowaniu takich warunków w pełnej skali uzyskano 61% odbezpieczonego związku 4, po oczyszczeniu za pomocą metod chromatografii kolumnowej (Schemat 17).



Schemat 17. Odbezpieczenie grupy aminowej.

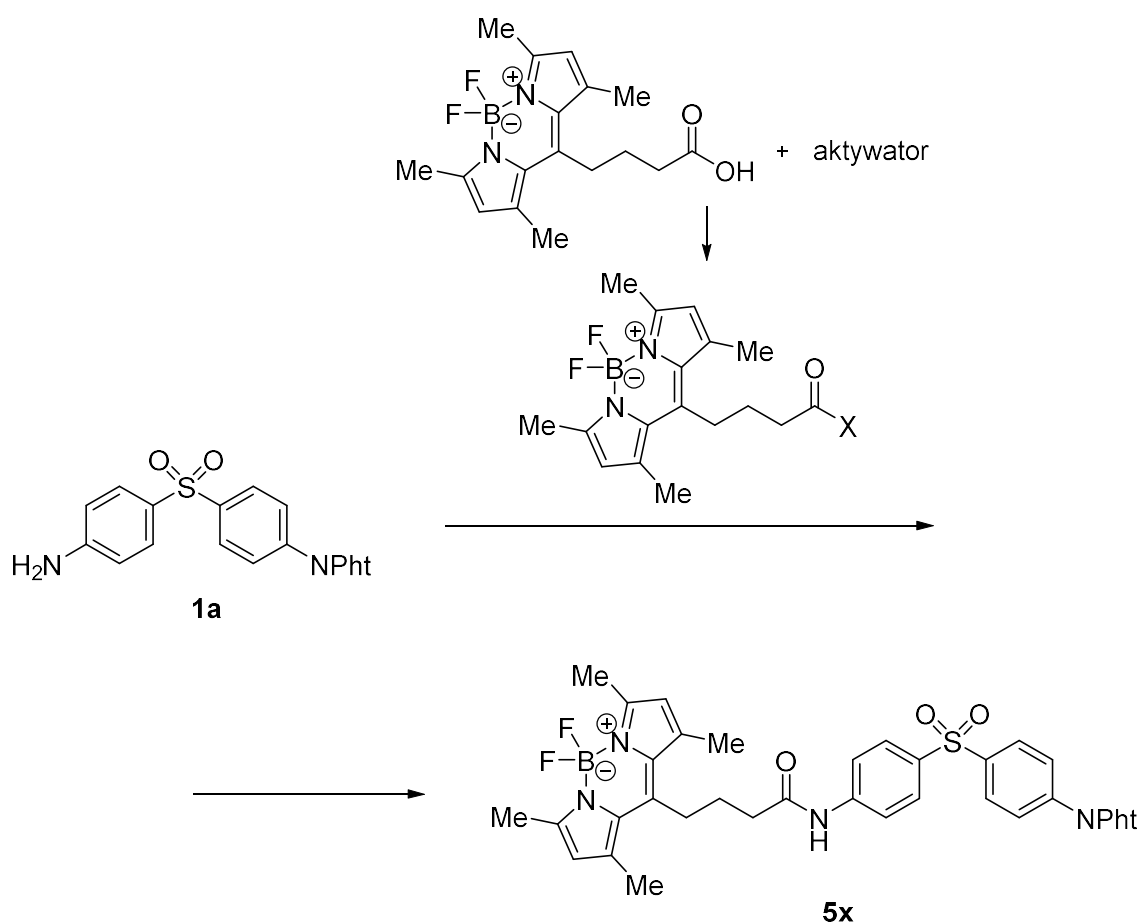
#### 4.6. Acylowanie aminy pierwszorzędowej

Ostatnim etapem kończącym syntezę jest acylowanie pierwszorzędowej grupy aminowej kwasem karboksylowym zawierającym barwnik fluorescencyjny BODIPY.

Podobnie jak w przypadku wcześniejszego acylowania aminy drugorzędowej, wpierw przeprowadzono ewaluację różnych metod przeprowadzenia tego procesu. Reakcje testowe zostały przeprowadzone w małej skali z użyciem aminy **1a** zamiast **4**, ze względu na dostępność i łatwość otrzymania tego pierwszego związku, wymagającego jedynie jednego etapu syntezy. Z punktu widzenia reakcji acylowania, grupy aminowe związków **1a** i **4** powinny wykazywać bardzo zbliżoną reaktywność, stąd **1a** stanowi dobry związek modelowy.

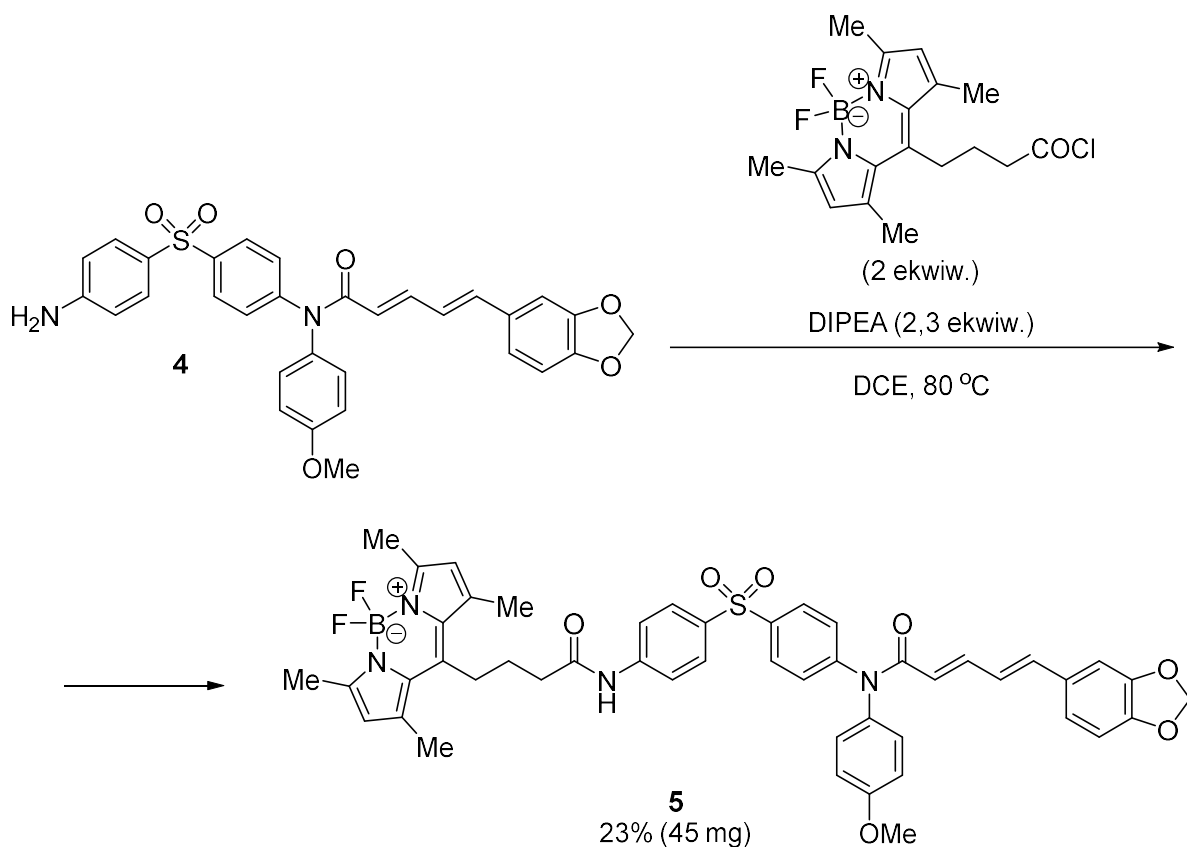
W Tabeli 8 przedstawiono zastosowane warunki reakcji i odpowiadające im wydajności wyznaczone za pomocą analizy  $^1\text{H NMR}$  mieszanin poreakcyjnych. W przypadku zastosowania do aktywacji kwasu karboksylowego karbimidu EDC amid **5x** powstaje z wydajnością 30%, jeśli reakcja prowadzona była w temperaturze pokojowej (poz. 1) lub 50%, gdy zastosowano 80 °C (poz. 2). Aktywacje za pomocą CDI, HATU oraz COMU okazały się nieskuteczne (poz. 3-5). Z kolei użycie chlorku kwasowego, uzyskanego przy zastosowaniu chlorku oksalilu, dało produkt **5x** z wydajnościami odpowiednio 30% i 50%, dla reakcji w temperaturze pokojowej (poz. 6) i w 80 °C (poz. 7). Ze względu na rozkład grupy BODIPY w warunkach aktywacji, nie zastosowano generowania chlorku kwasowego za pomocą chlorku tionylu.

**Tabela 8.** Ewaluacja metod acylowania 1-rz. aminy – związku 1a.



Lp.	Warunki aktywacji kwasu	Warunki acylowania	Wydajność reakcji wyznaczona na podstawie <sup>1</sup> H NMR (%)
1	EDC, DCM	bez oddzielnej aktywacji, RT, 24 h	30
2	EDC, DCE	bez oddzielnej aktywacji, 80 °C, 24 h	50
3	CDI, DCM, RT, 4 h	DCM, RT, 24 h	-
4	HATU, DIPEA, DCM	bez oddzielnej aktywacji, RT, 24 h	-
5	COMU, DIPEA, DMF, 0 °C, 1 h	DMF, RT, 24 h	-
6	(COCl) <sub>2</sub> , kat. DMF, DCM, RT, 4 h	DIPEA, DCM, RT, 24 h	30
7	(COCl) <sub>2</sub> , kat. DMF, DCE, RT, 4 h	DIPEA, DCE, 80 °C, 24 h	50

Z uwagi na wcześniejsze lepsze rezultaty w acylowaniu aminy **2a** przy użyciu chlorku kwasowego w porównaniu z aktywacją za pomocą EDC (Tabela 6, poz. 10 vs. 1), postanowiono również teraz zastosować tę pierwszą metodę do syntezy finalnego produktu **5** w dużej skali (Schemat 18). Produkt został wyizolowany z zastosowaniem chromatografii kolumnowej z wydajnością 23% w ilości 45 mg.



Schemat 18. Acylowanie aminy pierwszorzędowej.

Wynik zauważalnie słabszy niż ten w Tabeli 8, pozycja 7, wynika prawdopodobnie z występującej jednak różnicy w reaktywności pomiędzy aminami **1a** i **4**. Ze względu zużycie całej dostępnej ilości substratu **4** nie była jednak możliwa dalsza optymalizacja reakcji acylowania (np. poprzez wykonanie dodatkowych prób aktywacji kwasu za pomocą innych karbimidów, np. DCC). Szczęśliwie, zsyntetyzowana ilość produktu końcowego jest w zupełności wystarczająca do zaplanowanych badań biologicznych (wymagane było co najmniej 10 mg związku).

## 5. Podsumowanie

W ramach pracy licencjackiej zsyntezowano docelowy produkt **5**, który zostanie wykorzystany jako sonda fluorescencyjna do badania szklaku NFκB.

W szczególności, na podstawie analizy struktury związku opracowano ścieżkę jego syntezy obejmującą pięć etapów. Celem zwiększenia prawdopodobieństwa sukcesu, syntezę rozpoczęto i prowadzono równoległe z użyciem dwóch różnych grup zabezpieczających funkcję aminową. Wykonano optymalizację poszczególnych etapów, szczególnie dokładną w przypadku arylowania aminy metodą Buchwalda-Hartwiga. Droga syntetyczna obejmująca zabezpieczenie grupy aminowej w postaci karbaminianu Boc nie została w pełni zrealizowana. Wynikło to z zbyt małej stabilności karbaminianu w ostrych warunkach potrzebnych do acylowania mało reaktywnej aminy diarylowej. Druga droga syntezy, obejmująca zabezpieczenie grupy aminowej w postaci ftalimidu, została doprowadzona do końca.

Całkowita wydajność syntezy wyniosła 2,9%, co odpowiada średniej wydajności ok. 49% na etap. Wartość ta nie jest być może imponująca, jednak głównym celem pracy było dostarczenie związku w ilości potrzebnej do badań biologicznych w rozsądnym czasie. Cel ten został w pełni zrealizowany, ale wymagało to pójścia na kompromis w kwestii dokładności optymalizacji poszczególnych etapów. W szczególności, najniższą pojedynczą wydajność uzyskano podczas finalnego acylowania aminy, co wynikało z dość powierzchownej optymalizacji na tym etapie syntezy.

Uzyskane produkty poszczególnych etapów syntezy zostały starannie oczyszczone i w pełni scharakteryzowane. Ich tożsamość i czystość została potwierdzona spektroskopowo – zarejestrowano widma  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR,  $^{19}\text{F}$  NMR, FT-IR oraz HRMS. Wszystkie sygnały obecne na widmach NMR szczegółowo przypisano do poszczególnych jąder atomów obecnych w analizowanych związkach chemicznych na podstawie widm 2D.

## 6. Część eksperymentalna

### 6.1. Uwagi ogólne

Jeżeli nie zaznaczono inaczej, wszystkie materiały zostały zakupione od komercyjnych dostawców i użyte w dostarczonej postaci. Kwas 4-BODIPY-butanowy zsyntezowano wg procedury opisanej w literaturze.<sup>12</sup> Kwas (2*E*,4*E*)-5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2,4-pentadienoinowy (kwas piperynowy) przed użyciem przekryształizowano z THF. Chlorek tionylu przedestylowano przed użyciem. TEA i DIPEA zostały pozbawione wody przez suszenie nad sitami molekularnymi 4 Å. Wszystkie bezwodne rozpuszczalniki zostały zakupione w butelkach z zamknięciem septycznym w atmosferze gazu obojętnego. Chromatografię kolumnową przeprowadzono na żelu krzemionkowym 60 Å, 43-60 µm (SiliCycle) i żelu krzemionkowym modyfikowanym C18 90 Å, 50 µm (Biotage).

Widma <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C i <sup>19</sup>F NMR zostały zarejestrowane na spektrometrach Bruker 500 MHz i Varian 400 MHz w temperaturze otoczenia. Przesunięcia chemiczne skalibrowano względem sygnałów rozpuszczalników. Przypisanie sygnałów NMR zostało dokonane na podstawie eksperymentów korelacyjnych 2D (przyjęte oznaczenie atomów jest umowne). Widma HRMS (ESI) zarejestrowano na spektrometrze masowym Thermo QExactive. Widma FT-IR (ATR) zostały zarejestrowane na spektrometrze FT-IR Shimadzu IR Prestige-21 z przystawką ATR.

### 6.2. Procedury optymalizacyjne

Wszystkie eksperymenty optymalizacyjne zostały przeprowadzone używając 0,05 mmol głównego substratu. Wydajności wyznaczono za pomocą widm <sup>1</sup>H NMR, stosując 1-fluorododekan w charakterze wzorca wewnętrznego.

#### 6.2.1. Arylowanie pochodnych 4,4'-sulfonylodianiliny<sup>23-26</sup>

##### Ogólna procedura dla reakcji w Tabeli 2, poz. 1-5 i 23

Do wysuszonej w piecu fiolki o pojemności 4 mL wprowadzono *prekatalizator* (1-3 %mol), *ligand* (2-6 %mol), **1a** (25,1 mg, 0,05 mmol) i *zasadę* (0,10 mmol). Fiolkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Następnie do fiolki dodano za pomocą strzykawek *rozpuszczalnik* (bezwodny, 0,5 mL) i 4-bromoanizol (6,9 µL, 10,4 mg, 0,055 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 22 godziny w temperaturze 100 °C. Po schłodzeniu do temperatury pokojowej dodano 1-fluorododekan (11,6 µL, 9,7 mg,



0,05 mmol) oraz nasycony wodny roztwór NaHCO<sub>3</sub> (1 mL). Zawartość fiolki wstrząśnięto, a następnie ekstrahowano za pomocą AcOEt (2 x 1 mL). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i przefiltrowano z użyciem filtra strzykawkowego. Rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w DMSO-*d*<sub>6</sub> (0,5 mL) i zarejestrowano widmo <sup>1</sup>H NMR.

### **Ogólna procedura dla reakcji w Tabeli 2, poz. 6-22 oraz Tabel 3-5**

Do wysuszonej w piecu fiolki o pojemności 4 mL wprowadzono *prekatalizator* (0,0015 mmol), **1a** (25,1 mg, 0,05 mmol) i *zasadę* (0,10 mmol). Fiolkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Następnie do fiolki dodano za pomocą strzykawek *rozpuszczalnik* (bezwodny, 0,5 mL) i 4-bromoanizol (6,9 μL, 10,4 mg, 0,055 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez wskazany *czas* w temperaturze 100 °C. Po schłodzeniu do temperatury pokojowej dodano 1-fluorododekan (11,6 μL, 9,7 mg, 0,05 mmol) oraz nasycony wodny roztwór NaHCO<sub>3</sub> (1 mL). Zawartość fiolki wstrząśnięto, a następnie ekstrahowano za pomocą AcOEt (2 x 1 mL). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i przefiltrowano z użyciem filtra strzykawkowego. Rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w DMSO-*d*<sub>6</sub> (0,5 mL) i zarejestrowano widmo <sup>1</sup>H NMR.

### **6.2.2. Reakcje otrzymywania amidów**

#### **Ogólna procedura reakcji z EDC (Tabela 6, poz. 1; Tabela 7, poz. 1; Tabela 8, poz. 1-2)**

Do wysuszonej w piecu fiolki o pojemności 4 mL wprowadzono *aminę* (0,05 mmol) oraz *kwask karboksylowy* (0,055 mmol). Fiolkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Następnie do fiolki dodano za pomocą strzykawki *rozpuszczalnik* (bezwodny, 0,5 mL). Fiolkę otwarto, szybko dodano EDC (10,5 mg, 0,055 mmol) i ponownie zamknięto. Mieszaninę reakcyjną mieszano we wskazanej *temperaturze* przez 24 godziny. Następnie dodano 1-fluorododekan (11,6 μL, 9,7 mg, 0,05 mmol) oraz nasycony wodny roztwór NaHCO<sub>3</sub> (1 mL). Zawartość fiolki wstrząśnięto, a następnie ekstrahowano za pomocą AcOEt (2 x 1 mL). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i przefiltrowano z użyciem filtra strzykawkowego. Rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w DMSO-*d*<sub>6</sub> (0,5 mL) i zarejestrowano widmo <sup>1</sup>H NMR.

### **Ogólna procedura reakcji z DCC (Tabela 6, poz. 2)**

Do wysuszonej w piecu fiolki o pojemności 4 mL wprowadzono *aminę* (0,05 mmol) oraz *kwaskarboksyłowy* (0,055 mmol). Fiolkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Następnie do fiolki dodano za pomocą strzykawki toluen (bezwodny, 0,5 mL). Fiolkę otwarto, szybko dodano DCC (11,3 mg, 0,055 mmol) i ponownie zamknięto. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze 100 °C przez 24 godziny. Po schłodzeniu do temperatury pokojowej dodano 1-fluorododekan (11,6 μL, 9,7 mg, 0,05 mmol) oraz nasycony wodny roztwór NaHCO<sub>3</sub> (1 mL). Zawartość fiolki wstrząśnięto, a następnie ekstrahowano za pomocą AcOEt (2 x 1 mL). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i przefiltrowano z użyciem filtra strzykawkowego. Rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w DMSO-*d*<sub>6</sub> (0,5 mL) i zarejestrowano widmo <sup>1</sup>H NMR.

### **Ogólna procedura reakcji z CDI (Tabela 6, poz. 3; Tabela 8, poz. 3)**

Do wysuszonej w piecu fiolki o pojemności 4 mL wprowadzono *kwaskarboksyłowy* (0,055 mmol). Fiolkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Następnie do fiolki dodano za pomocą strzykawki DCM (bezwodny, 0,3 mL). Fiolkę otwarto, szybko dodano CDI (13,5 mg, 0,075 mmol) i ponownie zamknięto. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 4 godziny, otrzymując roztwór imidazolowej pochodnej kwasu. Do drugiej wysuszonej w piecu fiolki o pojemności 4 mL wprowadzono *aminę* (0,05 mmol). Fiolkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Następnie do fiolki dodano za pomocą strzykawek DCM (bezwodny, 0,2 mL) oraz poprzednio otrzymany roztwór imidazolowej pochodnej. Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 1-fluorododekan (11,6 μL, 9,7 mg, 0,05 mmol) oraz nasycony wodny roztwór NaHCO<sub>3</sub> (1 mL). Zawartość fiolki wstrząśnięto, a następnie ekstrahowano za pomocą AcOEt (2 x 1 mL). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i przefiltrowano z użyciem filtra strzykawkowego. Rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w DMSO-*d*<sub>6</sub> (0,5 mL) i zarejestrowano widmo <sup>1</sup>H NMR.

### **Ogólna procedura reakcji z MCF (Tabela 6, poz. 4)**

Do wysuszonej w piecu fiolki o pojemności 4 mL wprowadzono *kwaskarboksyłowy* (0,05 mmol). Fiolkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Za pomocą strzykawki dodano DCM (bezwodny, 0,25 mL). Po uzyskaniu jednorodnego roztworu dodano za pomocą strzykawek MCF (4,7 μL, 5,7 mg, 0,06 mmol)

i TEA (10,4  $\mu\text{L}$ , 7,6 mg, 0,075 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, otrzymując roztwór bezwodnika mieszanego. Do drugiej wysuszonej w piecu fiolki o pojemności 4 mL wprowadzono *aminę* (0,15 mmol). Fiolkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Dodano za pomocą strzykawek DCM (bezwodny, 0,35 mL) i roztwór bezwodnika mieszanego. Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 1-fluorododekan (34,8  $\mu\text{L}$ , 29,1 mg, 0,15 mmol) oraz nasycony wodny roztwór  $\text{NaHCO}_3$  (1 mL). Zawartość fiolki wstrząśnięto, a następnie ekstrahowano za pomocą AcOEt (2 x 1 mL). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i przefiltrowano z użyciem filtra strzykawkowego. Rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w  $\text{DMSO-}d_6$  (0,5 mL) i zarejestrowano widmo  $^1\text{H NMR}$ .

#### **Ogólna procedura reakcji z HATU (Tabela 6, poz.5; Tabela 7, poz. 2; Tabela 8, poz. 4)**

Do wysuszonej w piecu fiolki o pojemności 4 mL wprowadzono *aminę* (0,05 mmol), *kwaskarboksyłowy* (0,06 mmol) oraz HATU (28,5 mg, 0,075 mmol). Fiolkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Następnie do fiolki dodano za pomocą strzykawki DCM (bezwodny, 0,5 mL). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej. Po 24 godzinach dodano 1-fluorododekan (11,6  $\mu\text{L}$ , 9,7 mg, 0,05 mmol) oraz nasycony wodny roztwór  $\text{NaHCO}_3$  (1 mL). Zawartość fiolki wstrząśnięto, a następnie ekstrahowano za pomocą AcOEt (2 x 1 mL). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i przefiltrowano z użyciem filtra strzykawkowego. Rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w  $\text{DMSO-}d_6$  (0,5 mL) i zarejestrowano widmo  $^1\text{H NMR}$ .

#### **Ogólna procedura reakcji z COMU (Tabela 6, poz. 6; Tabela 7, poz. 3; Tabela 8, poz. 5)**

Do wysuszonej w piecu fiolki o pojemności 4 mL wprowadzono COMU (24 mg, 0,055 mmol). Fiolkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Za pomocą strzykawki dodano DMF (bezwodny, 0,1 mL). Do drugiej wysuszonej w piecu fiolki o pojemności 4 mL wprowadzono *kwaskarboksyłowy* (0,055 mmol). Fiolkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Za pomocą strzykawek dodano DMF (bezwodny, 0,3 mL) oraz DIPEA (9,5  $\mu\text{L}$ , 7,2 mg, 0,055 mmol). Następnie fiolkę schłodzono do 0 °C i wprowadzono do niej za pomocą strzykawki wcześniej przygotowany roztwór COMU. Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 1 godzinę w temperaturze 0 °C. Do kolejnej wysuszonej w piecu fiolki o pojemności 4 mL wprowadzono *aminę* (0,05 mmol). Fiolkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono z powietrza

i wypełniono azotem. Dodano za pomocą strzykawki DMF (bezwodny, 0,1 mL). Fiolkę schłodzono do 0 °C. Otrzymany roztwór aminy wprowadzono za pomocą strzykawki do fiolki zawierającej aktywowany kwas. Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 30 minut w temperaturze 0 °C i przez kolejne 24 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 1-fluorododekan (11,6 µL, 9,7 mg, 0,05 mmol) oraz nasycony wodny roztwór NaHCO<sub>3</sub> (1 mL). Zawartość fiolki wstrząsnięto, a następnie ekstrahowano za pomocą AcOEt (2 x 1 mL). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i przefiltrowano z użyciem filtra strzykawkowego. Rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w DMSO-*d*<sub>6</sub> (0,5 mL) i zarejestrowano widmo <sup>1</sup>H NMR.

#### **Ogólna procedura reakcji z (COCl)<sub>2</sub> (Tabela 6, poz. 7; Tabela 8, poz. 6-7)**

Do wysuszonej w piecu fiolki o pojemności 4 mL wprowadzono *kwas karboksylowy* (0,10 mmol). Fiolkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Za pomocą strzykawki dodano *rozpuszczalnik* (bezwodny, 0,25 mL). Po uzyskaniu jednorodnego roztworu dodano za pomocą strzykawek chlorku oksalilu (9,5 µL, 12,7 mg, 0,10 mmol) i kroplę DMF. Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 4 godziny w temperaturze pokojowej, otrzymując roztwór chlorku acylu. Do drugiej wysuszonej w piecu fiolki o pojemności 4 mL wprowadzono *aminę* (0,05 mmol). Fiolkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Dodano za pomocą strzykawki *rozpuszczalnik* (bezwodny, 0,25 mL). Fiolkę schłodzono do 0 °C. Następnie dodano za pomocą strzykawek DIPEA (17,2 µL, 13,1 mg, 0,10 mmol) i roztwór chlorku acylu. Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 30 minut w temperaturze 0 °C i przez kolejne 24 godziny we wskazanej *temperaturze*. Następnie dodano 1-fluorododekan (11,6 µL, 9,7 mg, 0,05 mmol) oraz nasycony wodny roztwór NaHCO<sub>3</sub> (1 mL). Zawartość fiolki wstrząsnięto, a następnie ekstrahowano AcOEt (2 x 1 mL). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i przefiltrowano z użyciem filtra strzykawkowego. Rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w DMSO-*d*<sub>6</sub> (0,5 mL) i zarejestrowano widmo <sup>1</sup>H NMR.

#### **Ogólna procedura reakcji z SOCl<sub>2</sub> (Tabela 6, poz. 8-10; Tabela 7, poz. 4-5)**

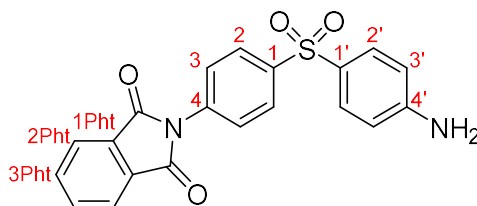
Do wysuszonej w piecu fiolki o pojemności 4 mL wprowadzono *kwas karboksylowy* (0,055 mmol). Fiolkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Następnie do fiolki dodano za pomocą strzykawki chlorek tionylu (0,5 mL). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej. Po upływie 4 godzin nadmiar chlorku tionylu odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie fiolkę ponownie

zamknięto, trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Zawartość fiołki rozpuszczono w *rozpuszczalnik* (bezwodny, 0,25 mL) dodawanym za pomocą strzykawki. Do kolejnej wysuszonej w piecu fiołki o pojemności 20 mL wprowadzono *aminę* (0,05 mmol). Fiołkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Do fiołki za pomocą strzykawek dodano *rozpuszczalnik* (bezwodny, 0,25 mL), otrzymany roztwór chlorku acylu oraz DIPEA (20,6  $\mu$ L, 15,7 mg, 0,12 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 24 godziny we wskazanej *temperaturze*. Następnie dodano 1-fluorododekan (11,6  $\mu$ L, 9,7 mg, 0,05 mmol) oraz nasycony wodny roztwór NaHCO<sub>3</sub> (1 mL). Zawartość fiołki wstrząsnięto, a następnie ekstrahowano za pomocą AcOEt (2 x 1 mL). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i przefiltrowano z użyciem filtra strzykawkowego. Rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w DMSO-*d*<sub>6</sub> (0,5 mL) i zarejestrowano widmo <sup>1</sup>H NMR.

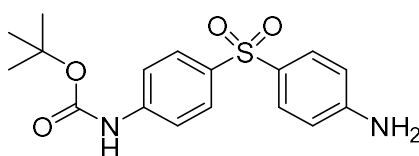
#### **Ogólna procedura reakcji z SOCl<sub>2</sub> z użyciem NaHMDS (Tabela 7, poz. 6)**

Do wysuszonej w piecu fiołki o pojemności 4 mL wprowadzono *kwas karboksylowy* (0,055 mmol). Fiołkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Następnie do fiołki dodano za pomocą strzykawki chlorek tionylu (0,5 mL). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej. Po upływie 4 godzin nadmiar chlorku tionylu odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie fiołkę ponownie zamknięto, trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Zawartość fiołki rozpuszczono w toluenie (bezwodny, 0,25 mL) dodawanym za pomocą strzykawki. Do kolejnej wysuszonej w piecu fiołki o pojemności 4 mL wprowadzono *aminę* (0,05 mmol). Fiołkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Do fiołki za pomocą strzykawki dodano toluen (bezwodny, 0,25 mL). Następnie za pomocą strzykawki dodano powoli NaHMDS. Fiołkę schłodzono do 0 °C. Do fiołki dodano następnie za pomocą strzykawki roztwór chlorku acylu. Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 30 minut w temperaturze 0 °C i przez kolejne 24 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 1-fluorododekan (11,6  $\mu$ L, 9,7 mg, 0,05 mmol) oraz nasycony wodny roztwór NaHCO<sub>3</sub> (1 mL). Zawartość fiołki wstrząsnięto, a następnie ekstrahowano za pomocą AcOEt (2 x 1 mL). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i przefiltrowano z użyciem filtra strzykawkowego. Rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczono w DMSO-*d*<sub>6</sub> (0,5 mL) i zarejestrowano widmo <sup>1</sup>H NMR.

### 6.3. Procedury syntezy

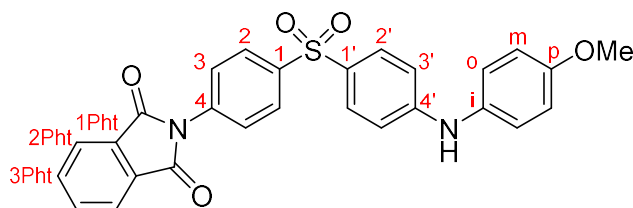


**2-(4-((4-aminofenylo)sulfonylo)fenylo)izoindolino-1,3-dion (1a).** Bezwodnik ftalowy (1,27 g, 8,46 mmol) dodano do roztworu 4,4'-diaminodifenylosulfonu (2,38 g, 9,31 mmol) w pirydynie (bezwodna, 4,7 mL), a następnie mieszaninę reakcyjną mieszano przez 1,5 godziny w temperaturze 100 °C. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej, zestaloną masę roz tarto z 10% wodnym HCl (18 mL), odsączono i przemyto wodą. Powstałą substancję stałą rozpuszczono w DCM, roztwór wysuszono nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i przesączono. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, DCM:MeOH/99:1→95:5) i otrzymano jako bladeżółte ciało stałe (1,51 g, 47%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,02 – 7,96 (m, 4H, *H*<sup>2</sup>, *H*<sup>2Ph<sup>t</sup></sup>), 7,93 – 7,89 (m, 2H, *H*<sup>3Ph<sup>t</sup></sup>), 7,67 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, *H*<sup>3</sup>), 7,60 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, *H*<sup>2'</sup>), 6,64 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, *H*<sup>3'</sup>), 6,23 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 166,5 (C=O), 153,8 (C<sup>4'</sup>), 142,3 (C<sup>4</sup>), 135,5 (C<sup>1</sup>), 134,9 (C<sup>3Ph<sup>t</sup></sup>), 131,5 (C<sup>1Ph<sup>t</sup></sup>), 129,6 (C<sup>2'</sup>), 127,8 (C<sup>3</sup>), 127,2 (C<sup>2</sup>), 124,9 (C<sup>1'</sup>), 123,6 (C<sup>2Ph<sup>t</sup></sup>), 113,1 (C<sup>3'</sup>); FT-IR (ATR): 3444, 3361, 1710, 1593, 1499, 1373, 1287, 1140, 883, 826, 739 cm<sup>-1</sup>. HRMS (ESI): *m/z* 379,0745 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S<sup>+</sup> *obl.* 379,0747).

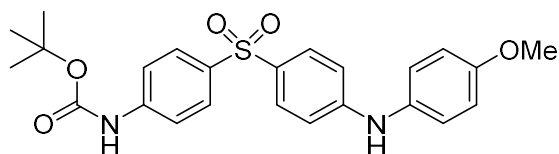


**Karbaminian (4-((4-aminofenylo)sulfonylo)fenylu) *tert*-butylu (1b).** Diwęglan di-*tert*-butylu (1,57 g, 7,1 mmol) dodano do zawiesiny 4,4'-diaminodifenylosulfonu (2,00 g, 7,8 mmol) i K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,08 g, 7,8 mmol) w THF (bezwodny, 7,8 mL). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 12 godzin w temperaturze 40 °C. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej, zestaloną masę roz tarto z nasyconym roztworem wodnym NH<sub>4</sub>Cl (5 mL), odsączono i przemyto wodą. Powstałą substancję stałą rozpuszczono w DCM, roztwór wysuszono nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i przesączono. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, *n*-heksan:AcOEt/ 3:2→2:3) i otrzymano jako bladeżółte ciało stałe (640 mg, 26%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$  7,81 (d,  $J = 8,8$  Hz, 2H), 7,67 (d,  $J = 8,8$  Hz, 2H), 7,45 (d,  $J = 8,8$  Hz, 2H), 6,67 – 6,60 (m, 3H), 4,10 (s, 2H), 1,50 (s, 9H).

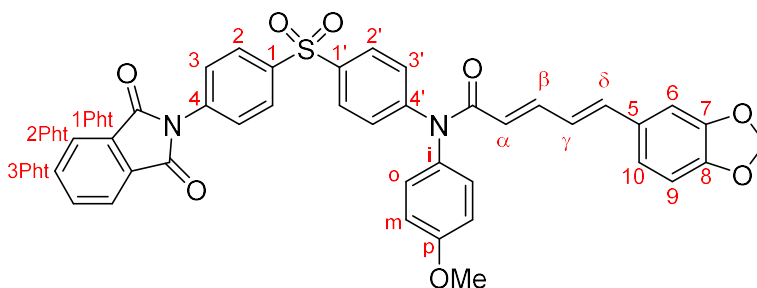


**2-(4-((4-((4-metoksyfenylo)amino)fenylo)sulfonylo)fenylo)izoindolino-1,3-dion (2a).** Do fiolki o pojemności 40 mL wysuszonej w piecu wprowadzono BrettPhos Pd G3 (64,7 mg, 0,071 mmol), związek **1a** (900 mg, 2,38 mmol) i  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (1,16 g, 3,57 mmol). Fiolkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Następnie do fiolki dodano za pomocą strzykawek 1,4-dioksan (bezwodny, 24 mL) i 4-bromoanizol (328  $\mu\text{L}$ , 490 mg, 2,62 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 3 godziny w temperaturze 100 °C. Po schłodzeniu do temperatury pokojowej dodano nasycony wodny roztwór  $\text{NaHCO}_3$  (125 mL). Mieszaninę przeniesiono do rozdzielacza i ekstrahowano za pomocą AcOEt (5 x 100 mL). Połączone warstwy organiczne wysuszone nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i przesączone. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, DCM:MeOH/ 99:1→95:5) i otrzymano jako bledożółte ciało stałe (914 mg, 79%).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,72 (s, 1H, NH), 8,03 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H,  $H^2$ ), 8,02 – 7,96 (m, 2H,  $H^{2Ph}$ ), 7,94 – 7,90 (m, 2H,  $H^{3Ph}$ ), 7,72 (d,  $J = 8,9$  Hz, 2H,  $H^{2'}$ ), 7,69 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H,  $H^3$ ), 7,13 (d,  $J = 8,8$  Hz, 2H,  $H^o$ ), 6,94 – 6,90 (m, 4H,  $H^{3'}$ ,  $H^m$ ), 3,74 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  166,5 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 155,7 ( $C^p$ ), 150,6 ( $C^{4'}$ ), 141,9 ( $C^4$ ), 135,7 ( $C^1$ ), 134,9 ( $C^{3Ph}$ ), 133,1 ( $C^i$ ), 131,5 ( $C^{1Ph}$ ), 129,7 ( $C^{2'}$ ), 127,9 ( $C^3$ ), 127,4 ( $C^2$ ), 127,2 ( $C^{1'}$ ), 123,7, 123,6 ( $C^{2Ph}$ ,  $C^o$ ), 114,7 ( $C^{3'}$ ), 113,0 ( $C^m$ ), 55,2 ( $\text{CH}_3$ ). FT-IR (ATR): 3376, 1717, 1590, 1522, 1345, 1289, 1245, 1147, 1111, 883, 825, 745  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (ESI):  $m/z$  485,1170 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{27}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}^+$  *obl.* 485,1166).



**Karbaminian *tert*-butylu (4-((4-((4-metoksyfenylo)amino)fenylo)sulfonylo)fenylo) (2b).**

Do wysuszonej w piecu fiolki o pojemności 20 mL wprowadzono BrettPhos Pd G3 (22,6 mg, 0,025 mmol), związek **1b** (290 mg, 0,83 mmol) i Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (407 mg, 1,25 mmol). Fiolkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Następnie do fiolki dodano za pomocą strzykawek 1,4-dioksan (bezwodny, 8,3 mL) i 4-bromoanizol (115 μL, 171 mg, 0,92 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 3 godziny w temperaturze 100 °C. Po schłodzeniu do temperatury pokojowej dodano nasycony wodny roztwór NaHCO<sub>3</sub> (40 mL). Mieszaninę przeniesiono do rozdzielacza i ekstrahowano za pomocą AcOEt (5 x 35 mL). Połączone warstwy organiczne wysuszone nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i przesączono. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, *n*-heksan:AcOEt/3:2→2:3) i otrzymano jako bledożółte ciało stałe (330 mg, 87%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,82 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,68 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,45 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,10 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 6,89 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 6,78 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 6,63 (s, 1H), 5,85 (s, 1H), 1,51 (s, 9H).

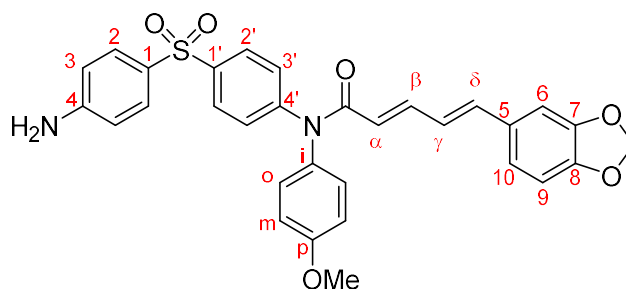


**(2*E*,4*E*)-5-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(4-((4-(1,3-dioksaizindolin-2-yl)fenylo)sulfonylo)fenylo)-*N*-(4-metoksyfenylo)penta-2,4-dienamid (3a).**

Do wysuszonej w piecu fiolki o pojemności 20 mL wprowadzono kwas (2*E*,4*E*)-5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2,4-pentadienoinowy (545 mg, 2,42 mmol). Fiolkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Następnie do fiolki dodano za pomocą strzykawki chlorek tionylu (5 mL). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej. Po upływie 4 godzin nadmiar chlorku tionylu odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie fiolkę ponownie zamknięto, trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Zawartość fiolki rozpuszczono w DCE (bezwodny, 6 mL) dodawanym za pomocą strzykawki, otrzymując roztwór chlorku acylu. Do drugiej wysuszonej w piecu fiolki o pojemności 20 mL

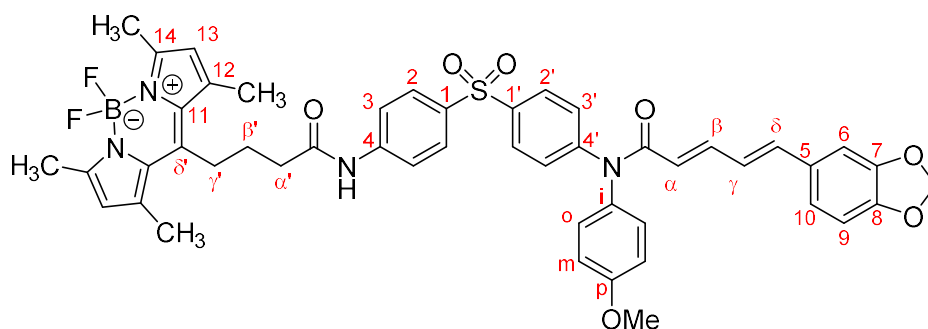


wprowadzono związek **2a** (587 mg, 1,21 mmol). Fiolkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Do fiolki za pomocą strzykawek dodano DCE (bezwodny, 6 mL), roztwór chlorku acylu oraz DIPEA (481  $\mu$ L, 361 mg, 2,79 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 24 godziny w temperaturze 80 °C. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej dodano nasycony wodny roztwór NaHCO<sub>3</sub> (10 mL). Mieszaninę przeniesiono do rozdzielacza i ekstrahowano za pomocą DCM (5 x 10 mL). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i przesączono. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej (C18-żel krzemionkowy, H<sub>2</sub>O:MeCN/1:0→0:1) i otrzymano jako ciemnożółte ciało stałe (460 mg, 55%). W roztworze DMSO-*d*<sub>6</sub> związek występuje jako mieszanina dwóch rotamerów w stosunku ~95:5. Przedstawione dane NMR dotyczą głównego rotameru. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  8,13 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, *H*<sup>2</sup>), 8,02 - 7,96 (m, 4H, *H*<sup>2'</sup>, *H*<sup>2Ph<sup>t</sup></sup>), 7,94 - 7,90 (m, 2H, *H*<sup>3Ph<sup>t</sup></sup>), 7,74 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, *H*<sup>3</sup>), 7,47 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, *H*<sup>3'</sup>), 7,36 (dd, *J* = 14,6 Hz, *J* = 10,1 Hz, 1H, *H* <sup>$\beta$</sup> ), 7,28 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, *H*<sup>o</sup>), 7,23 (s, 1H, *H*<sup>6</sup>), 7,04 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, *H*<sup>m</sup>), 7,00 - 6,85 (m, 4H, *H*<sup>o</sup>, *H*<sup>10</sup>, *H*<sup>7</sup>, *H*<sup>8</sup>), 6,02 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 5,94 (d, *J* = 14,6 Hz, 1H, *H* <sup>$\alpha$</sup> ), 3,79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  166,5 (C=O<sup>Ph<sup>t</sup></sup>), 165,6 (C=O), 158,8 (C<sup>p</sup>), 148,1, 148,0 (C<sup>7</sup>, C<sup>8</sup>), 147,7 (C<sup>4'</sup>), 143,7 (C <sup>$\beta$</sup> ), 140,04, 139,97 (C<sup>4</sup>, C<sup>o</sup>), 136,8 (C<sup>1</sup>), 136,5 (C<sup>1</sup>), 135,0 (C<sup>3Ph<sup>t</sup></sup>), 134,0 (C<sup>i</sup>), 131,5 (C<sup>1Ph<sup>t</sup></sup>), 130,6 (C<sup>5</sup>), 130,2 (C<sup>o</sup>), 128,3 (C<sup>2'</sup>), 128,1 (C<sup>2</sup>), 128,0 (C<sup>3</sup>), 126,5 (C<sup>3'</sup>), 125,2 (C<sup>9</sup>), 123,7 (C<sup>2Ph<sup>t</sup></sup>), 123,4 (C<sup>10</sup>), 121,4 (C <sup>$\alpha$</sup> ), 115,2 (C<sup>m</sup>), 108,4 (C <sup>$\delta$</sup> ), 105,7 (C<sup>6</sup>), 101,3 (OCH<sub>2</sub>O), 55,4 (CH<sub>3</sub>). FT-IR (ATR): 1717, 1654, 1589, 1489, 1369, 1246, 1154, 1034, 832, 743 cm<sup>-1</sup>. HRMS (ESI): *m/z* 685,1634 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>39</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sup>+</sup> *obl.* 685,1639).



**(2E,4E)-N-(4-((4-aminofenyl)sulfonyl)fenyl)-5-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-N-(4-metoksyfenyl)penta-2,4-dienamid (4).** Związek **3a** (390 mg, 0,568 mmol) wprowadzono do mieszaniny MeCN (60 mL) i H<sub>2</sub>O (30 mL). Następnie dodano 40% wodnego roztworu hydratu hydrazyny (0,69 mL, 5,68 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 16 godzin w temperaturze 40 °C. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej dodano nasycony wodny

NH<sub>4</sub>Cl (30 mL). Mieszaninę przeniesiono do rozdzielacza i ekstrahowano za pomocą AcOEt (3 x 50 mL) i DCM (3 x 50 mL). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i przesączono. Rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej (C18-żel krzemionkowy, H<sub>2</sub>O:MeCN/1:0→0:1) i otrzymano jako ciemnożółte ciało stałe (193 mg, 61%). W roztworze DMSO-*d*<sub>6</sub> związek występuje jako mieszanina dwóch rotamerów w stosunku ~95:5. Przedstawione dane NMR dotyczą głównego rotameru. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7,80 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, *H*<sup>2</sup>), 7,54 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, *H*<sup>2</sup>), 7,41 – 7,32 (m, 3H, *H*<sup>3</sup>, *H*<sup>β</sup>), 7,27 – 7,21 (m, 3H, *H*<sup>6</sup>, *H*<sup>o</sup>), 7,04 – 6,87 (m, 6H, *H*<sup>o</sup>, *H*<sup>l'o</sup>, *H*<sup>m</sup>, *H*<sup>r</sup>, *H*<sup>δ</sup>), 6,61 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, *H*<sup>3</sup>), 6,19 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6,02 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 5,94 (d, *J* = 14,6 Hz, 1H, *H*<sup>α</sup>), 3,79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 165,5 (C=O), 158,6 (*C*<sup>p</sup>), 153,7 (*C*<sup>d</sup>), 148,1, 148,0 (*C*<sup>7</sup>, *C*<sup>8</sup>), 146,6 (*C*<sup>d</sup>), 143,5 (*C*<sup>β</sup>), 139,9 (*C*<sup>o</sup>), 137,4 (*C*<sup>l</sup>), 134,3 (*C*<sup>i</sup>), 130,7 (*C*<sup>5</sup>), 130,0 (*C*<sup>o</sup>), 129,5 (*C*<sup>2</sup>), 127,3 (*C*<sup>2</sup>), 126,7 (*C*<sup>3</sup>), 125,34, 125,25 (*C*<sup>l</sup>, *C*<sup>o</sup>), 123,4 (*C*<sup>l'o</sup>), 121,3 (*C*<sup>α</sup>), 115,1 (*C*<sup>m</sup>), 113,0 (*C*<sup>3</sup>), 108,4 (*C*<sup>δ</sup>), 105,7 (*C*<sup>6</sup>), 101,3 (OCH<sub>2</sub>O), 55,4 (CH<sub>3</sub>). FT-IR (ATR): 3475, 3379, 1647, 1591, 1490, 1381, 1248, 1140, 1103, 1034, 1013, 831, 740 cm<sup>-1</sup>. HRMS (ESI): *m/z* 555,1589 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>31</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sup>+</sup> *obl.* 555,1584).



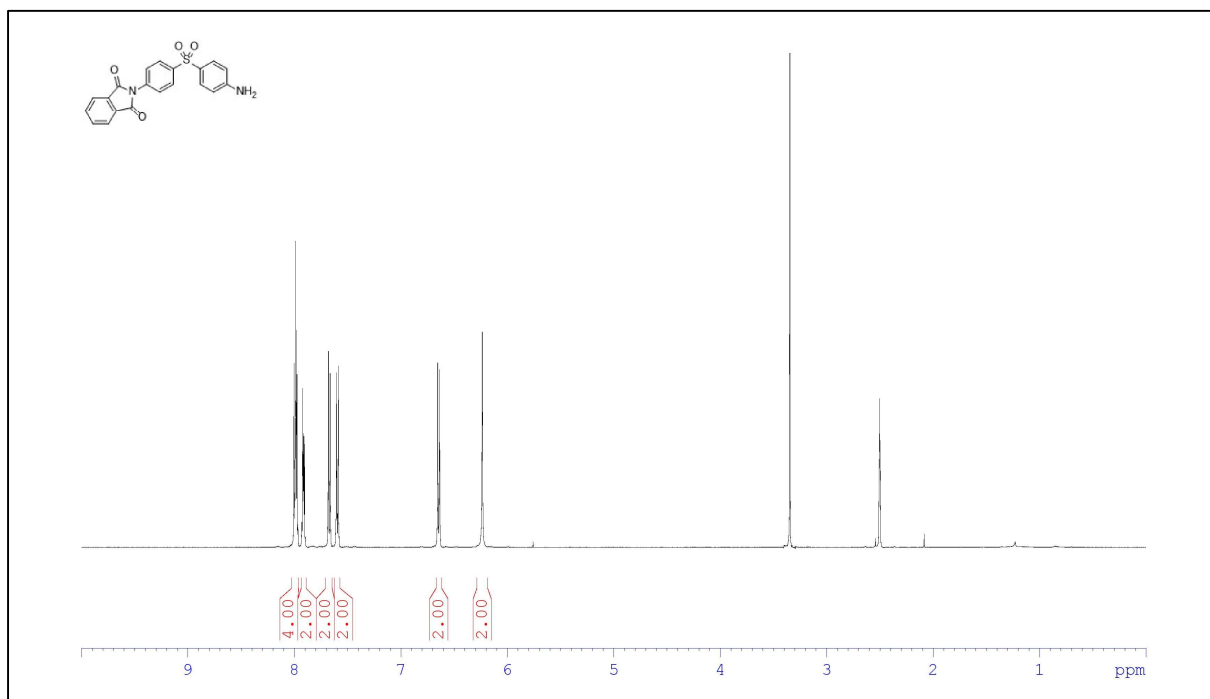
**(2*E*,4*E*)-5-(benzo[d][1,3]dioksol-5-yl)-*N*-(4-(((4-(4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametylo-5*H*-4[4,5]4-dipyrrolo[1,2-*c*: 2',1'-*f*][1,3,2]diazaborin-10-yl)butanamido)fenylo)sulfonyl)fenylo)-*N*-(4-metoksyfenylo)penta-2,4-dienamid (5).** Do wysuszonej w piecu fiołki o pojemności 4 mL wprowadzono kwas 4-BODIPY-butanowy (155 mg, 0,451 mmol). Fiołkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono z powietrza i wypełniono azotem. Za pomocą strzykawki dodano DCE (bezwodny, 1,1 mL). Po uzyskaniu jednorodnego roztworu dodano za pomocą strzykawek chlorkek oksalilu (42,9 μL, 57,2 mg, 0,451 mmol) i kroplę DMF. Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 4 godziny w temperaturze pokojowej, otrzymując roztwór chlorku acylu. Do drugiej wysuszonej w piecu fiołki o pojemności 4 mL wprowadzono związek 4 (125 mg, 0,225 mmol). Fiołkę zakorkowano, po czym trzykrotnie opróżniono

z powietrza i wypełniono azotem. Dodano za pomocą strzykawki DCE (bezwodny, 1,1 mL). Fiolkę schłodzono do 0 °C. Następnie dodano za pomocą strzykawek DIPEA (78 µL, 58 mg, 0,451 mmol) i roztwór chlorku acylu. Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 30 minut w temperaturze 0 °C i przez kolejne 24 godziny w temperaturze 80 °C. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej dodano nasycony wodny roztwór NaHCO<sub>3</sub> (10 mL). Mieszaninę przeniesiono do rozdzielacza i ekstrahowano za pomocą AcOEt (3 x 10 mL) i DCM (3 x 10 mL). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i przesączono. Rozpuszczalniki odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy, *n*-heksan:AcOEt/5:5→3:7) i otrzymano jako ciemnoczerwone ciało stałe (45 mg, 23%). W roztworze DMSO-*d*<sub>6</sub> związek występuje jako mieszanina rotamerów w stosunku ~95:5/główny:pozostałe. Przedstawione dane NMR dotyczą rotameru głównego. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 10,47 (s, 1H, NH), 7,92 – 7,86 (m, 4H, H<sup>2</sup>, H<sup>2'</sup>), 7,80 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H, H<sup>3</sup>), 7,43 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, H<sup>3</sup>), 7,35 (dd, *J* = 15,0 Hz, *J* = 9,8 Hz, 1H, H<sup>β</sup>), 7,27 – 7,21 (m, 3H, H<sup>6</sup>, H<sup>6'</sup>), 7,04 – 6,86 (m, 6H, H<sup>9</sup>, H<sup>10</sup>, H<sup>m</sup>, H<sup>r</sup>, H<sup>δ</sup>), 6,23 (s, 2H, H<sup>13</sup>), 6,02 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 5,93 (d, *J* = 14,6 Hz, 1H, H<sup>α</sup>), 3,79 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,03 – 2,95 (m, 2H, H<sup>r'</sup>), 2,60 – 2,54 (m, 2H, H<sup>α'</sup>), 2,40, 2,38 (2×s, 12H, CH<sub>3</sub><sup>BODIPY</sup>), 1,91 – 1,84 (m, 2H, H<sup>β'</sup>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 171,2 (C=O<sup>BODIPY</sup>), 165,6 (C=O), 158,7 (C<sup>p</sup>), 153,2 (C<sup>14</sup>), 148,1, 147,9 (C<sup>7</sup>, C<sup>8</sup>), 147,3 (C<sup>4</sup>), 146,0 (C<sup>δ</sup>), 143,7, 143,6 (C<sup>4'</sup>, C<sup>β</sup>), 141,0 (C<sup>12</sup>), 139,9 (C<sup>r</sup>), 139,1, 138,0 (C<sup>1</sup>, C<sup>1'</sup>), 134,6 (C<sup>i</sup>), 130,8, 130,6 (C<sup>5</sup>, C<sup>11</sup>), 130,1 (C<sup>o</sup>), 128,7, 127,9 (C<sup>2</sup>, C<sup>2'</sup>), 126,6 (C<sup>3'</sup>), 125,2 (C<sup>9</sup>), 123,4 (C<sup>10</sup>), 121,8 (C<sup>13</sup>), 121,3 (C<sup>α</sup>), 119,2 (C<sup>3</sup>), 115,1 (C<sup>m</sup>), 108,4 (C<sup>δ</sup>), 105,7 (C<sup>6</sup>), 101,3 (OCH<sub>2</sub>O), 55,4 (OCH<sub>3</sub>), 36,4 (C<sup>α'</sup>), 27,02, 26,97 (C<sup>β'</sup>, C<sup>r'</sup>), 15,8, 14,1 (2×CH<sub>3</sub>). <sup>19</sup>F NMR (376 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = -143,8 (m). FT-IR (ATR): 2924, 1589, 1549, 1507, 1246, 1198, 1151, 1035, 984, 835, 740 cm<sup>-1</sup>. HRMS (ESI): *m/z* 871,3135 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>48</sub>H<sub>46</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S<sup>+</sup> *obl.* 871,3143).

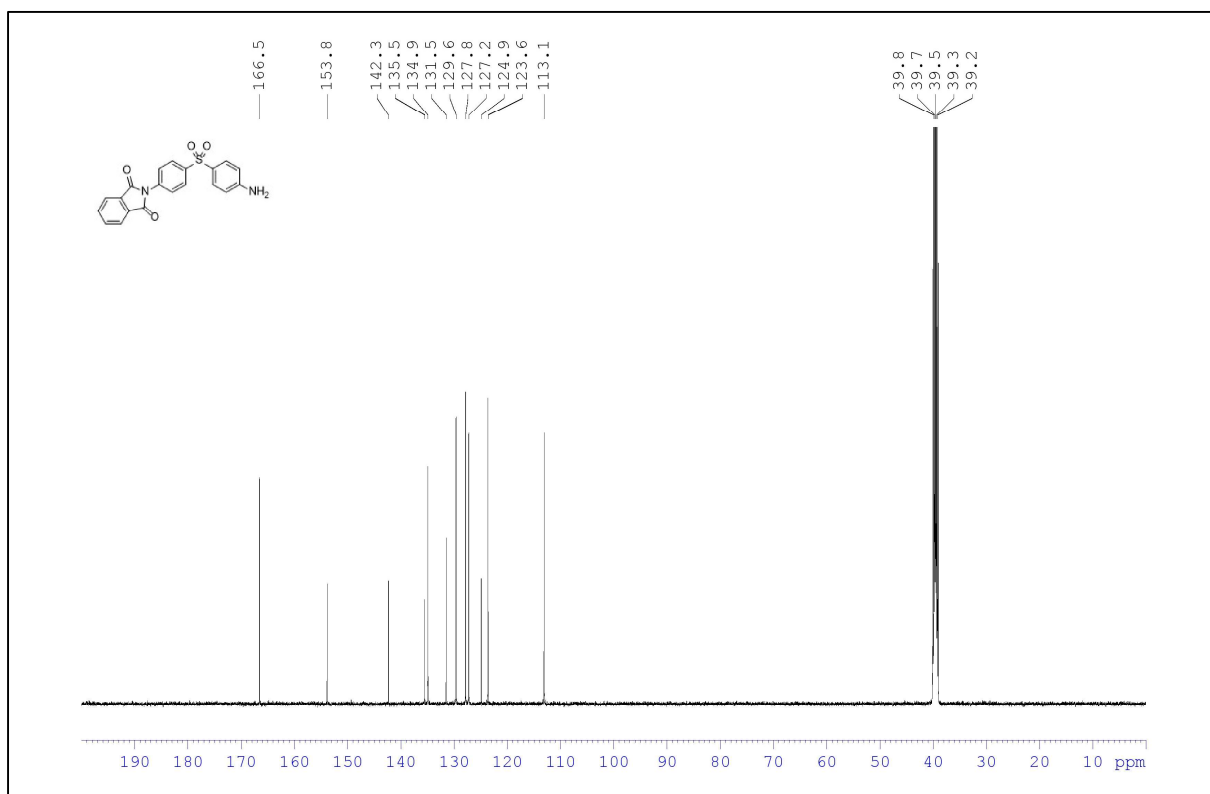
## 6.4. Widma otrzymanych związków chemicznych.

### 6.4.1. Widma związku 1a

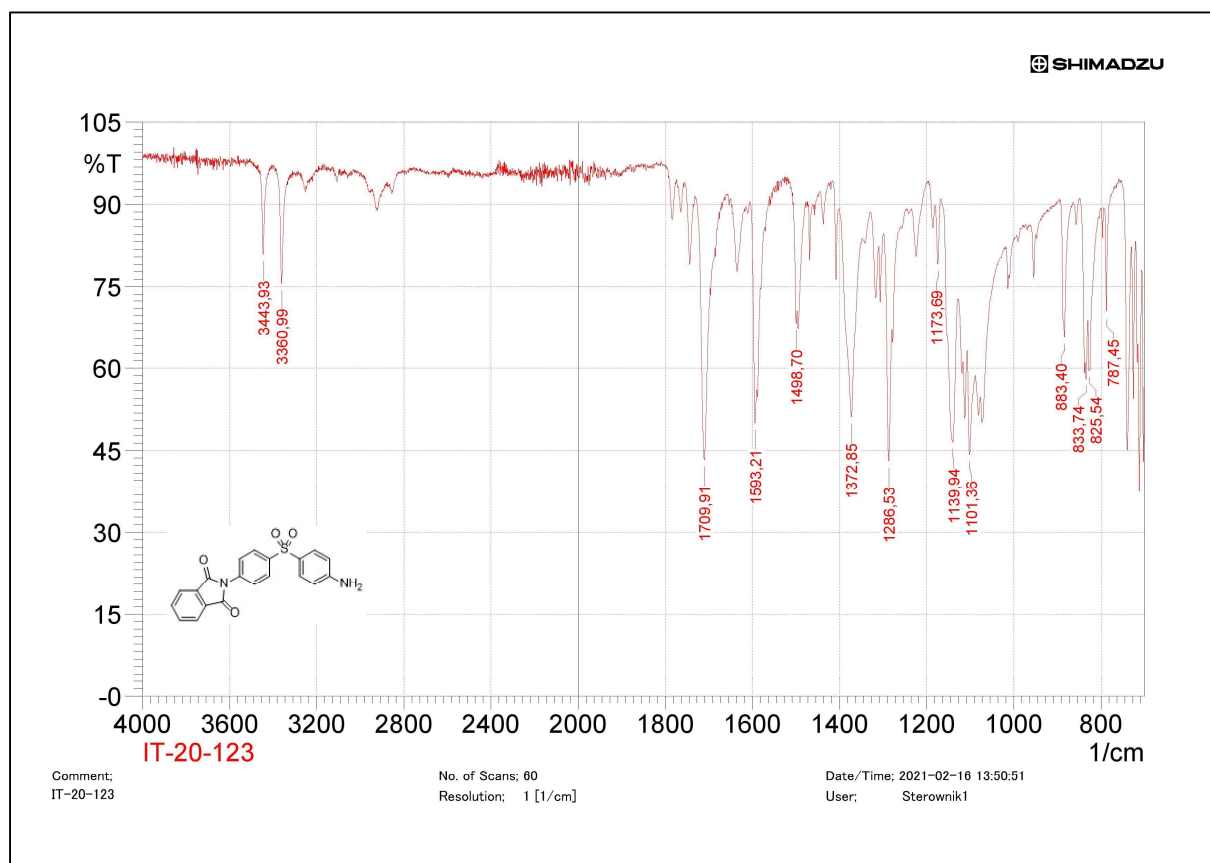
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



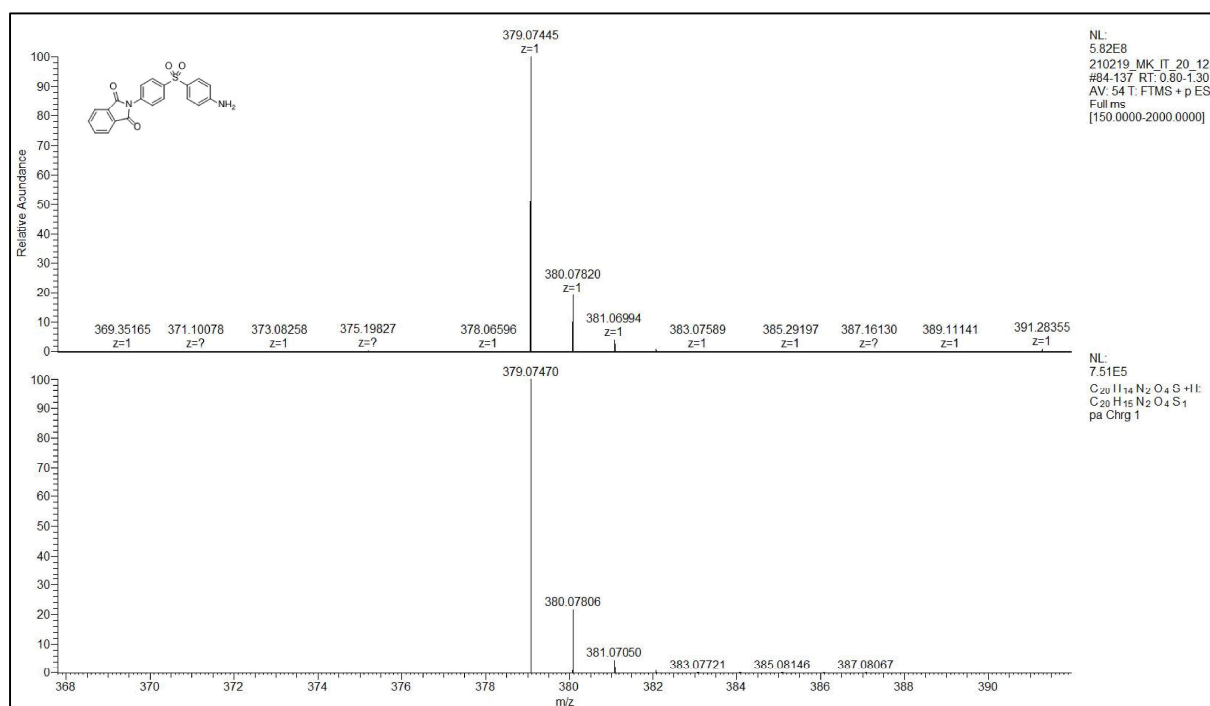
$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



## FT-IR (ATR)

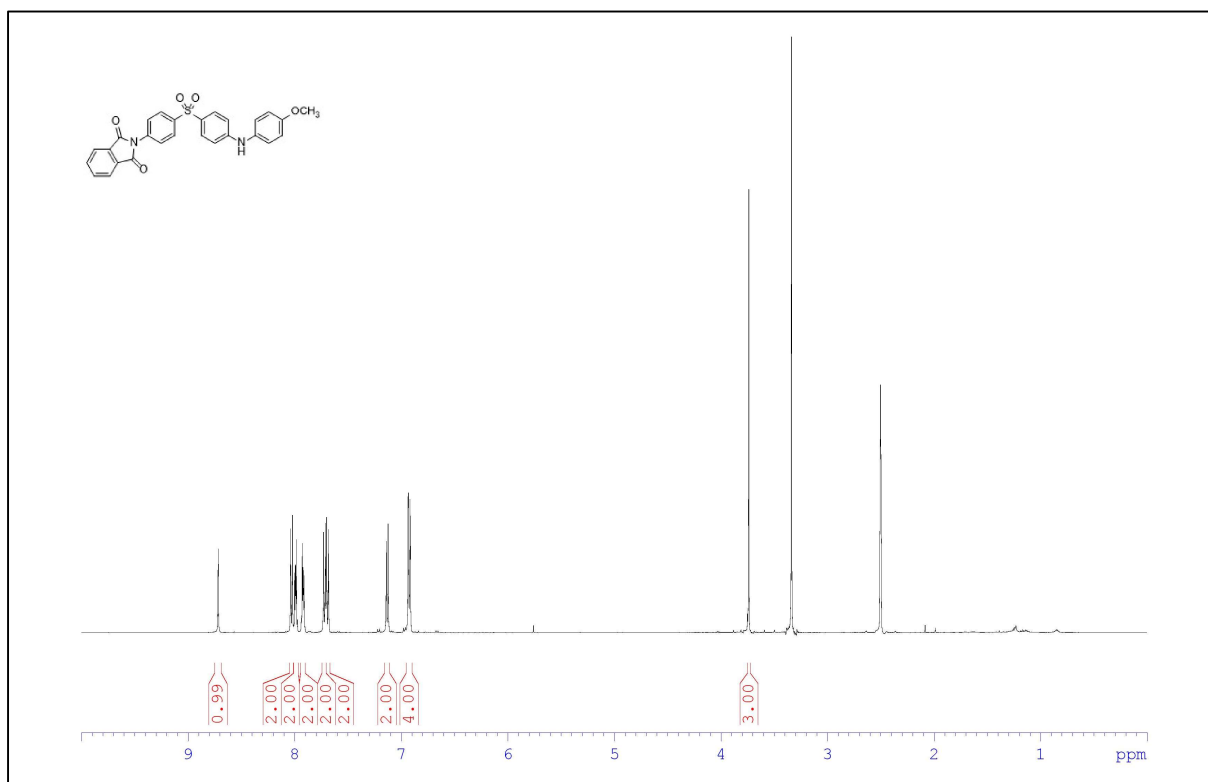


## HRMS (ESI)

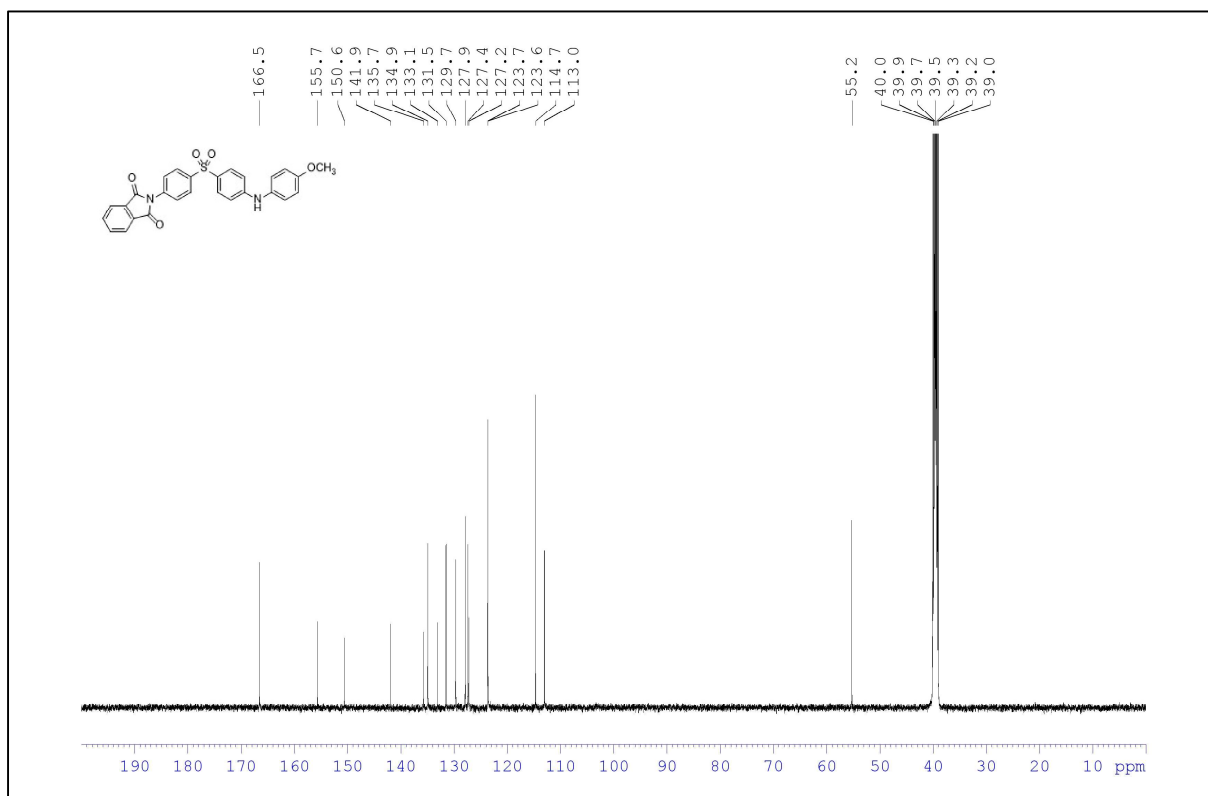


## 6.4.2. Widma związku 2a

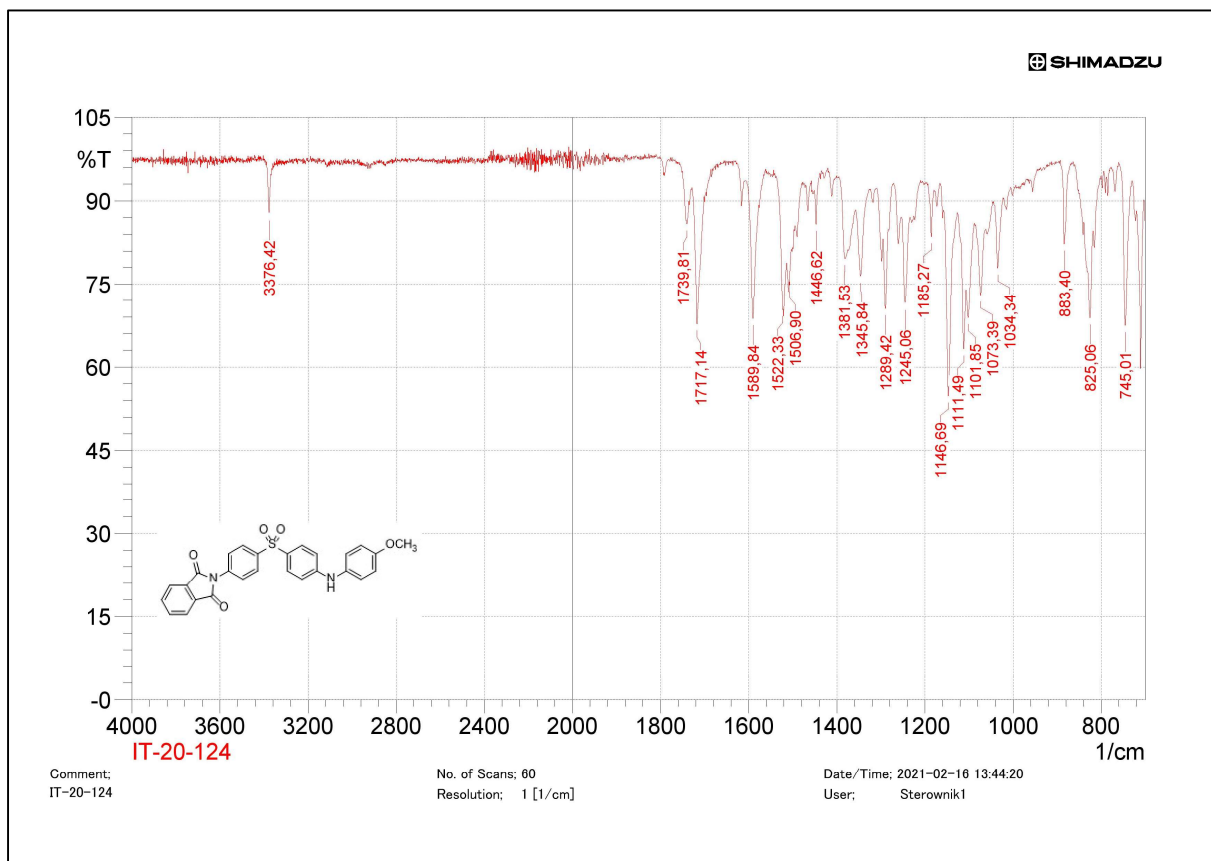
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



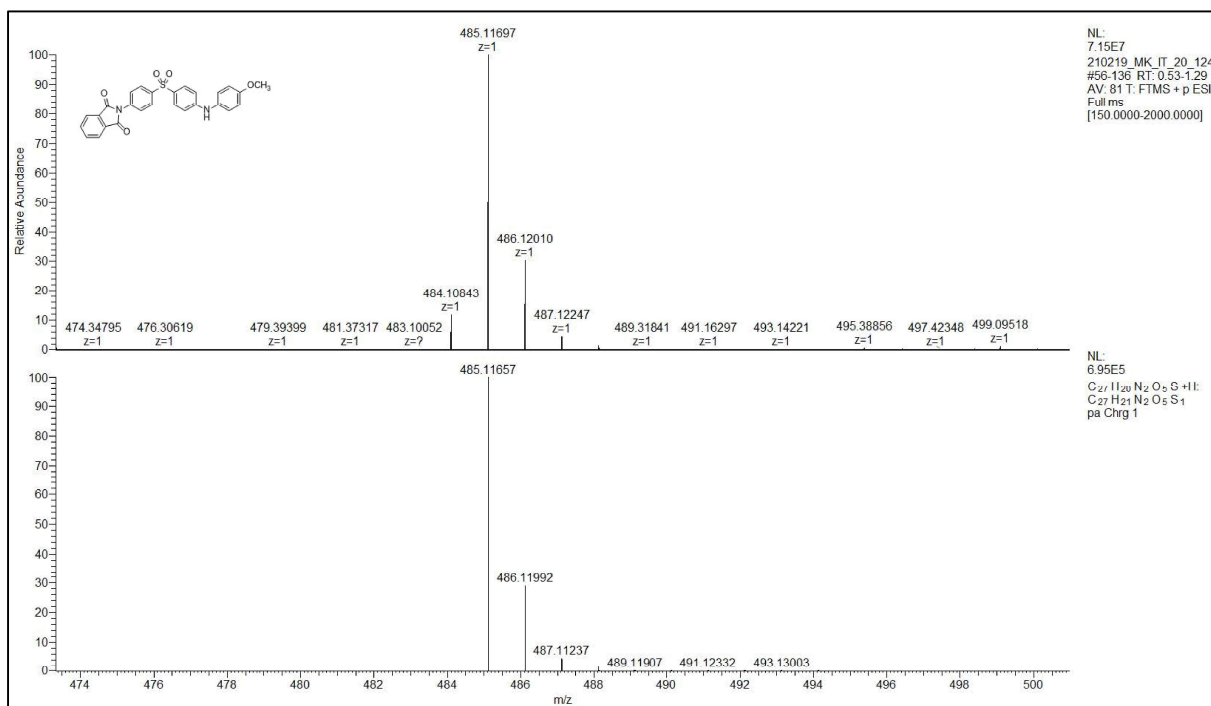
$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



# FT-IR (ATR)

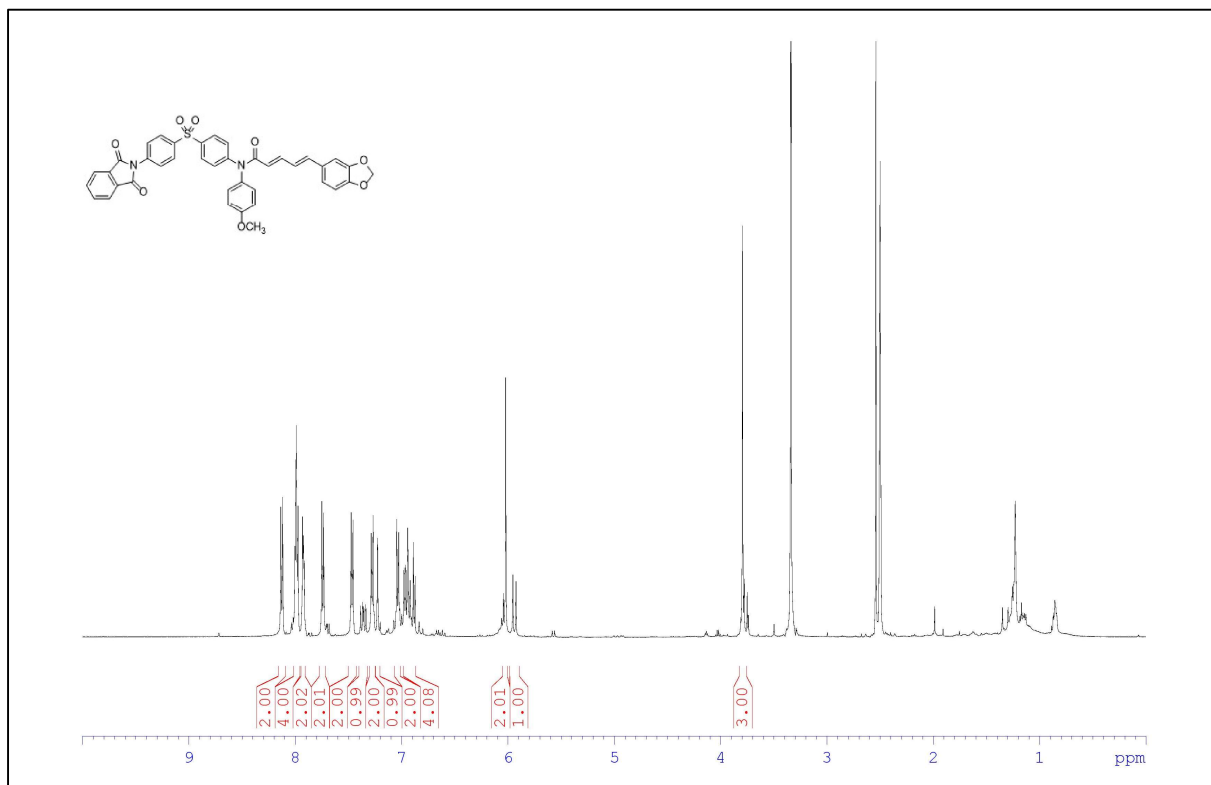


# HRMS (ESI)

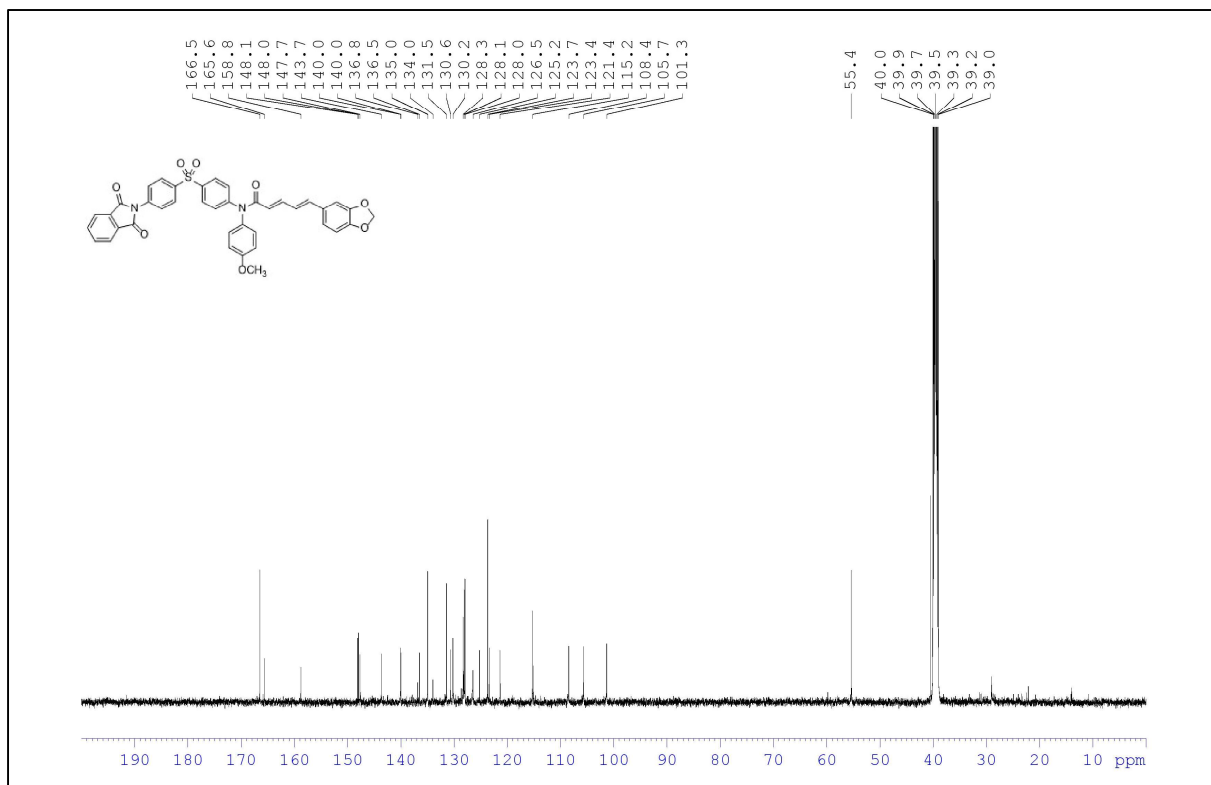


### 6.4.3. Widma związku 3a

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )

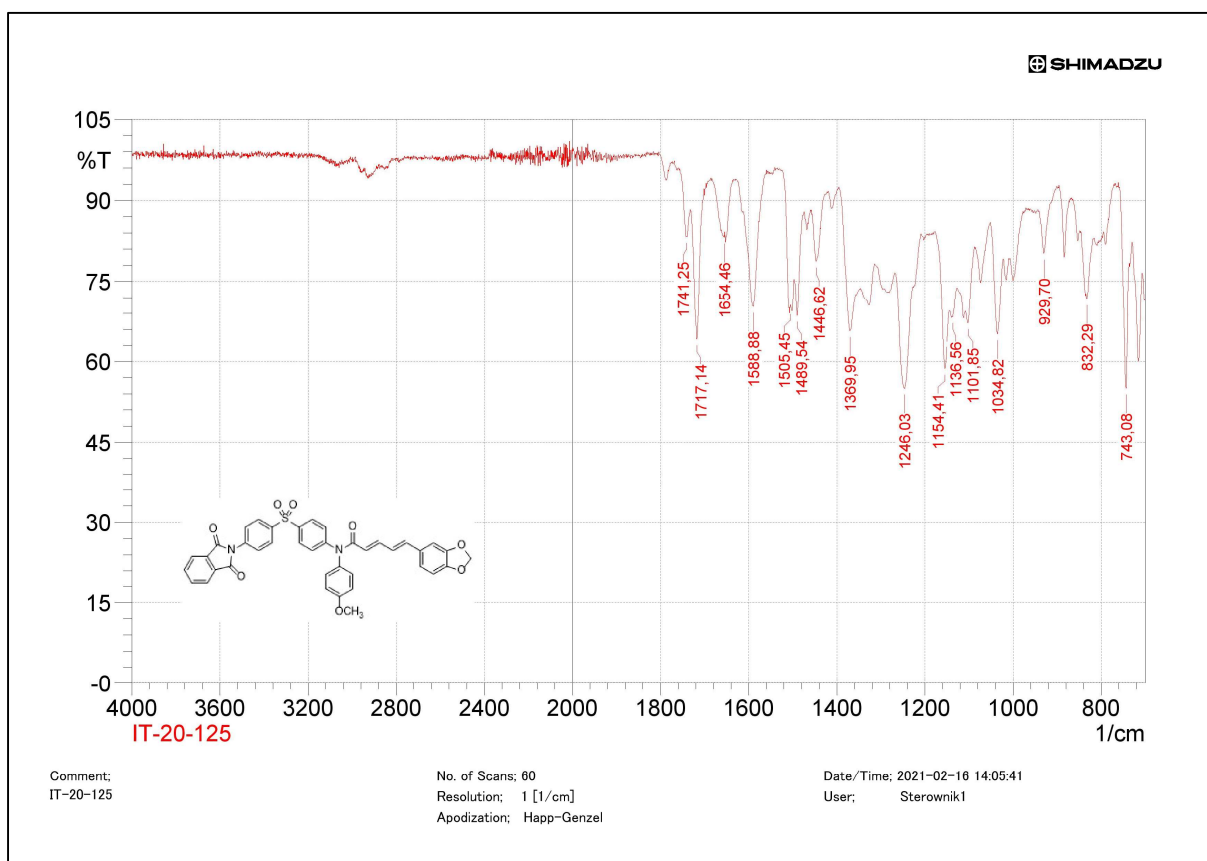


$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )

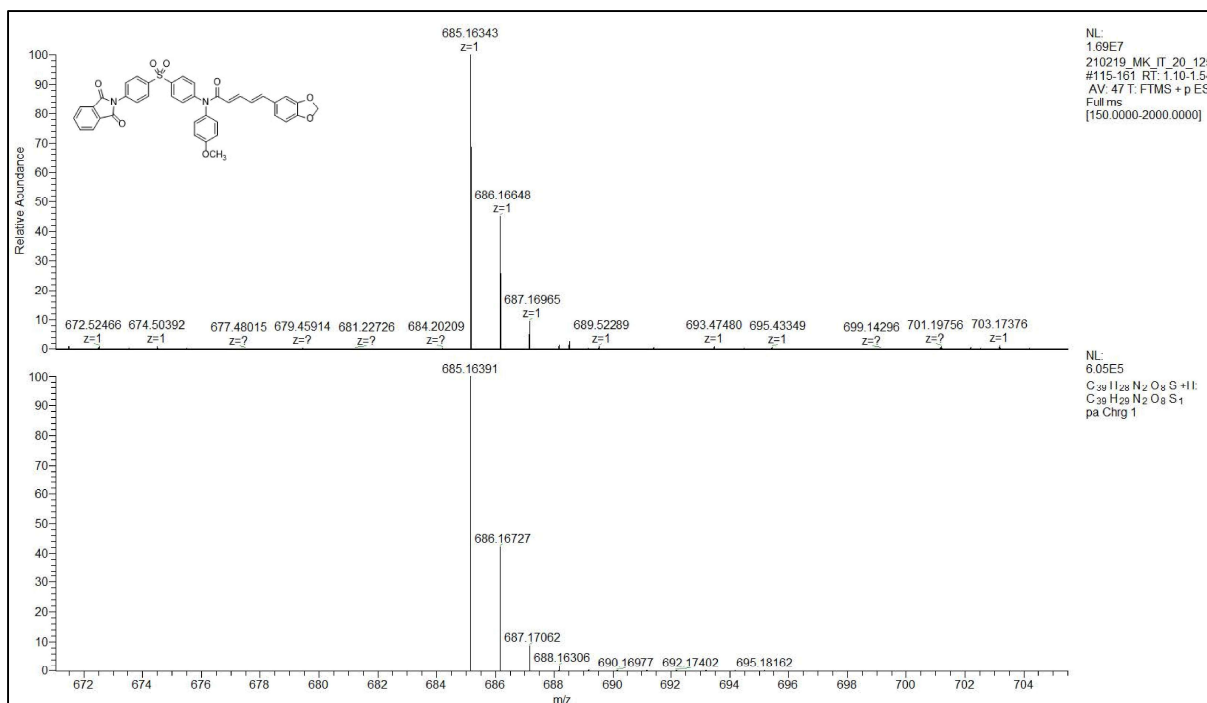




# FT-IR (ATR)

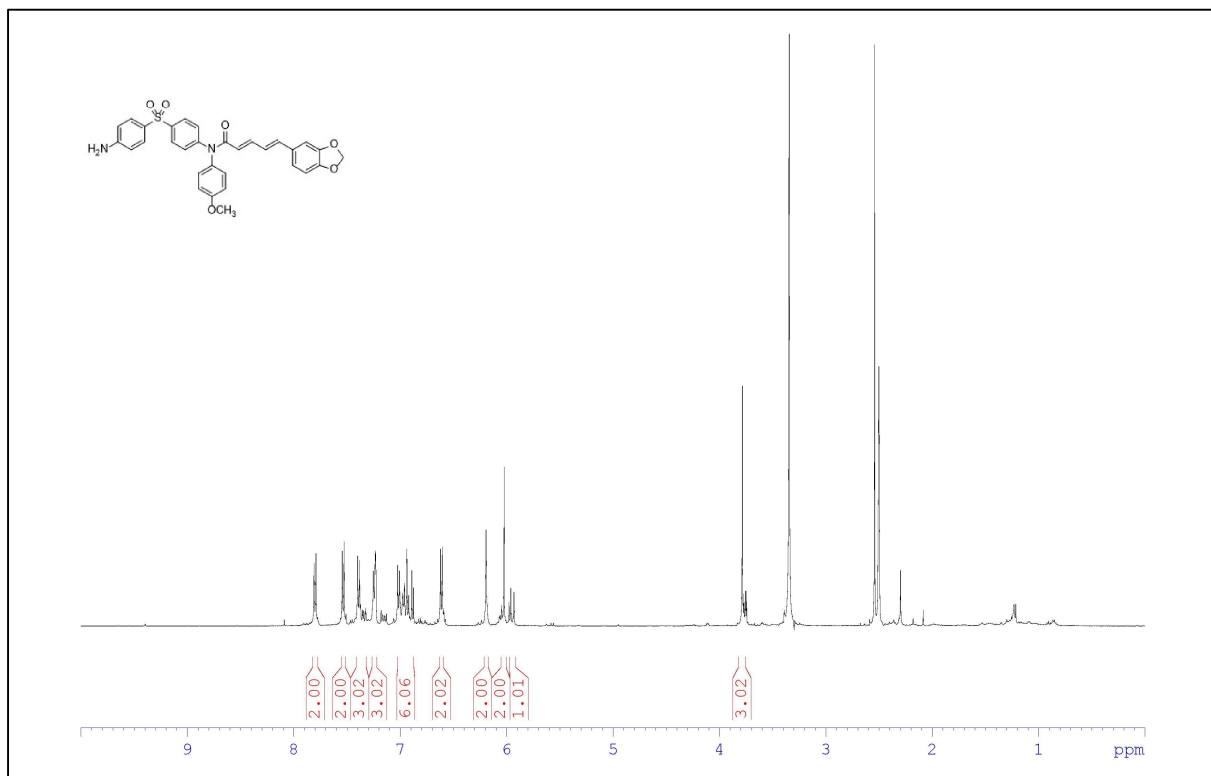


# HRMS (ESI)

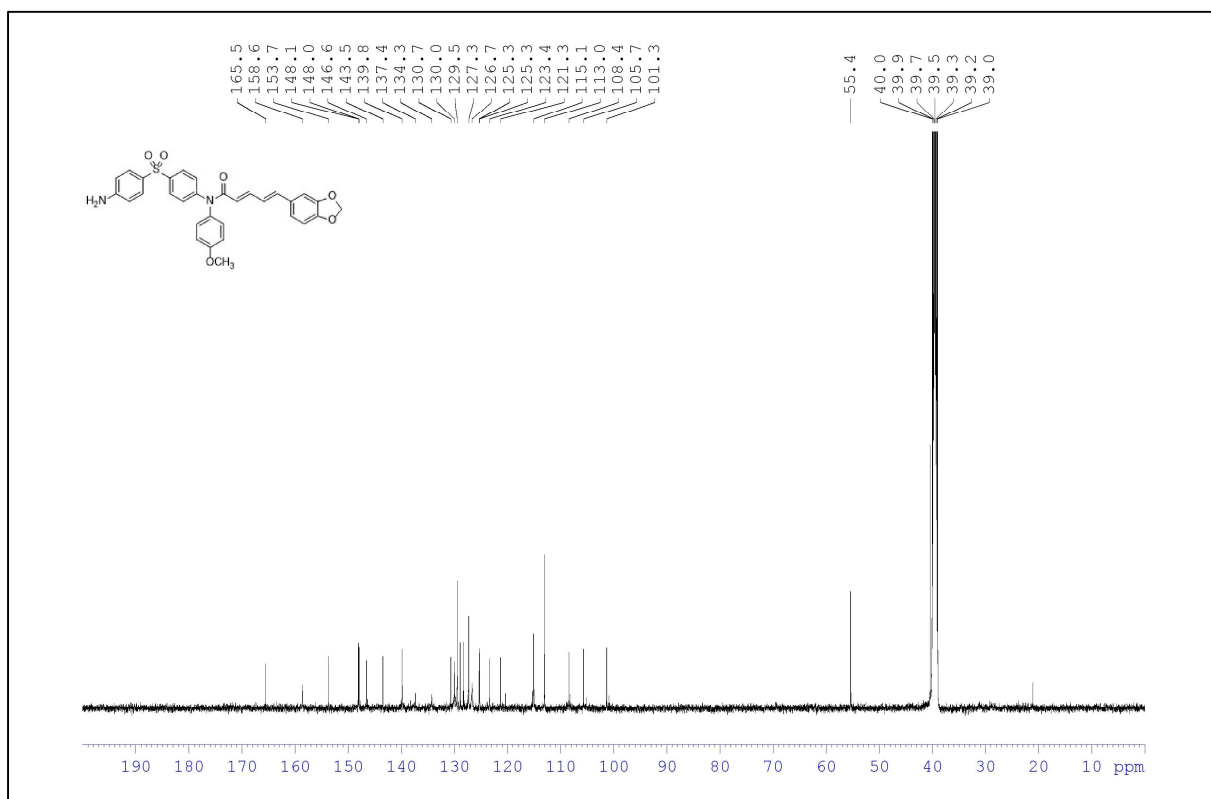


#### 6.4.4. Widma związku 4

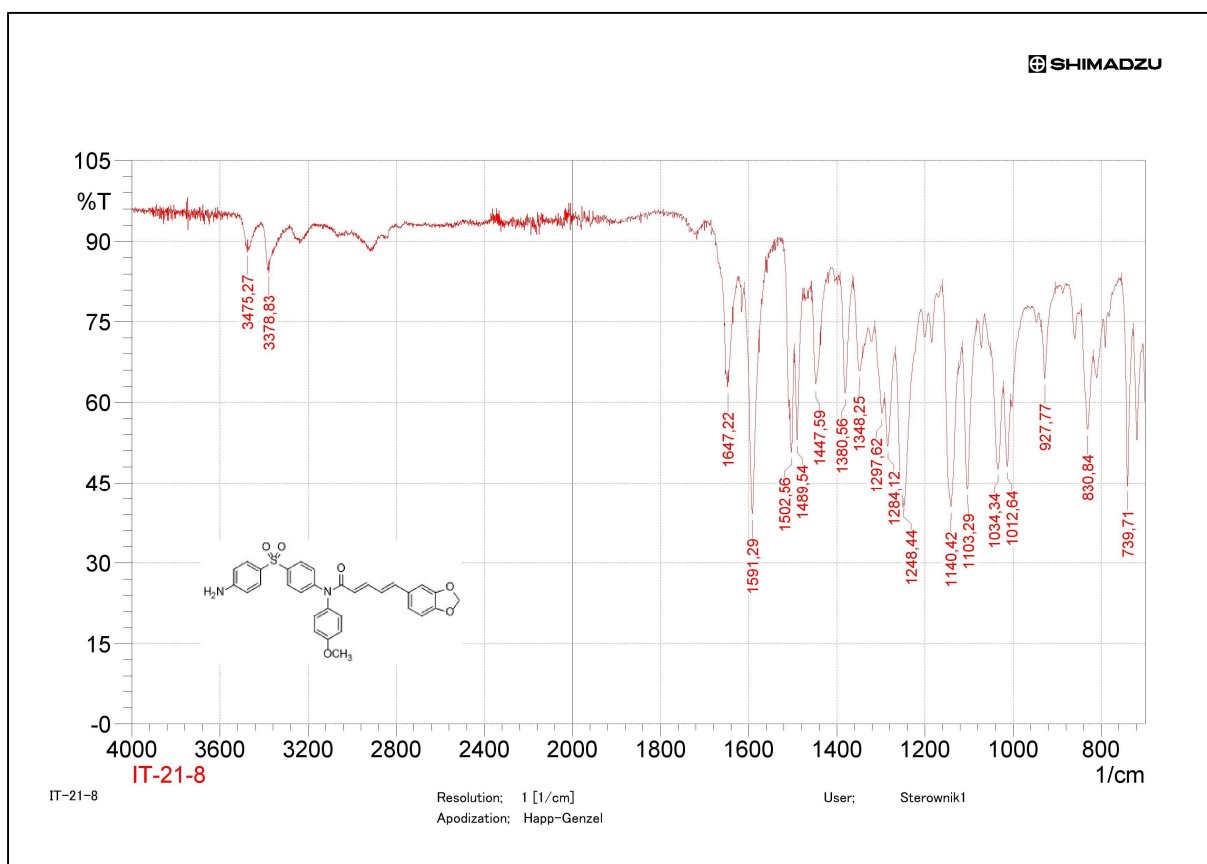
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



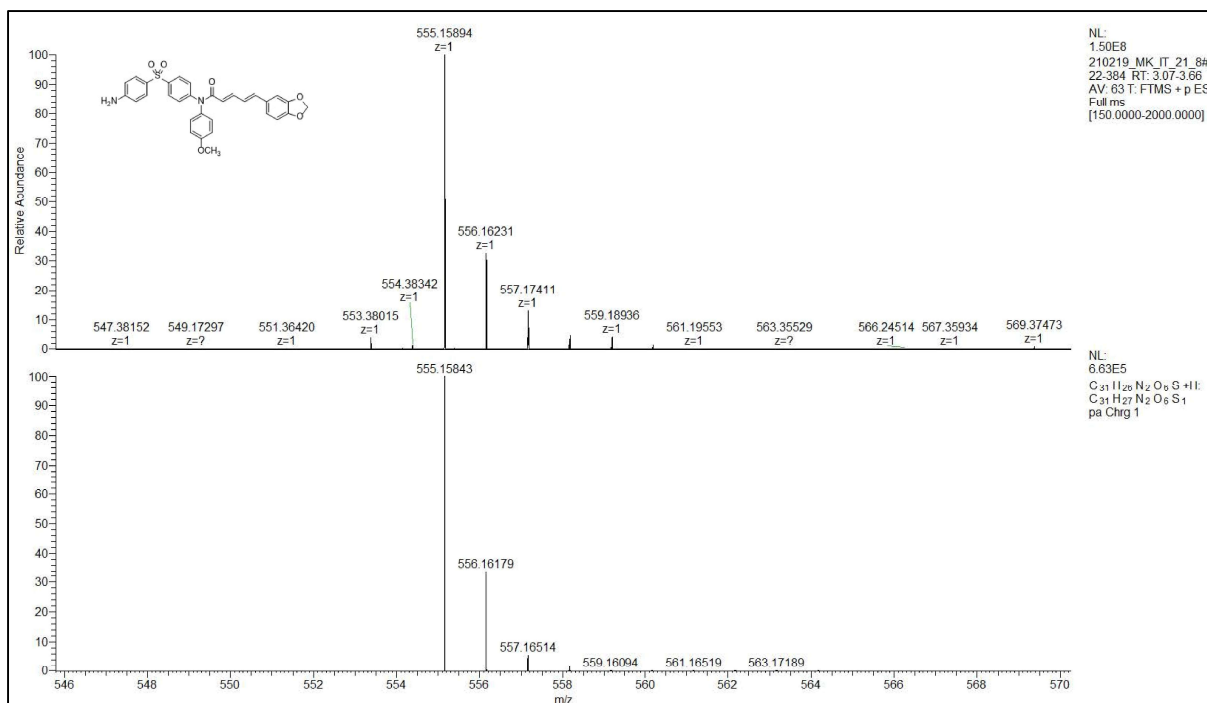
$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



# FT-IR (ATR)

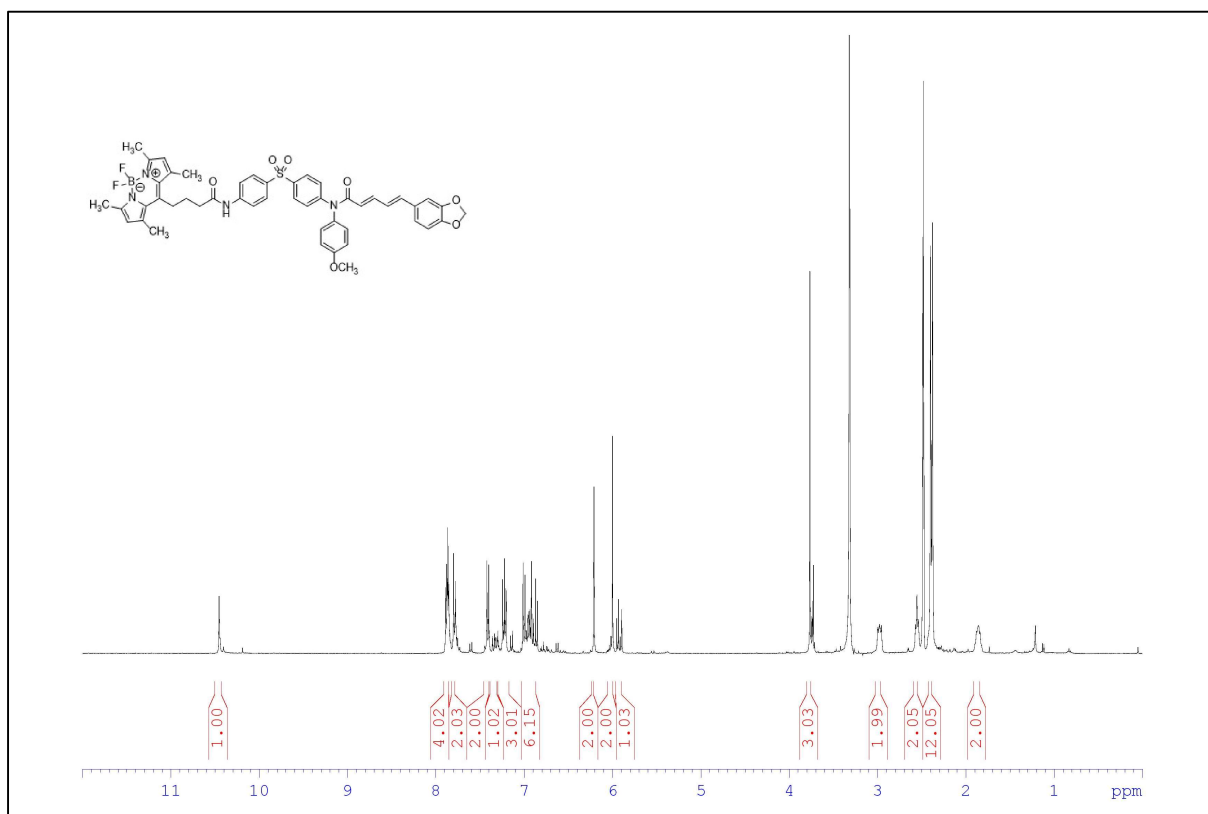


# HRMS (ESI)

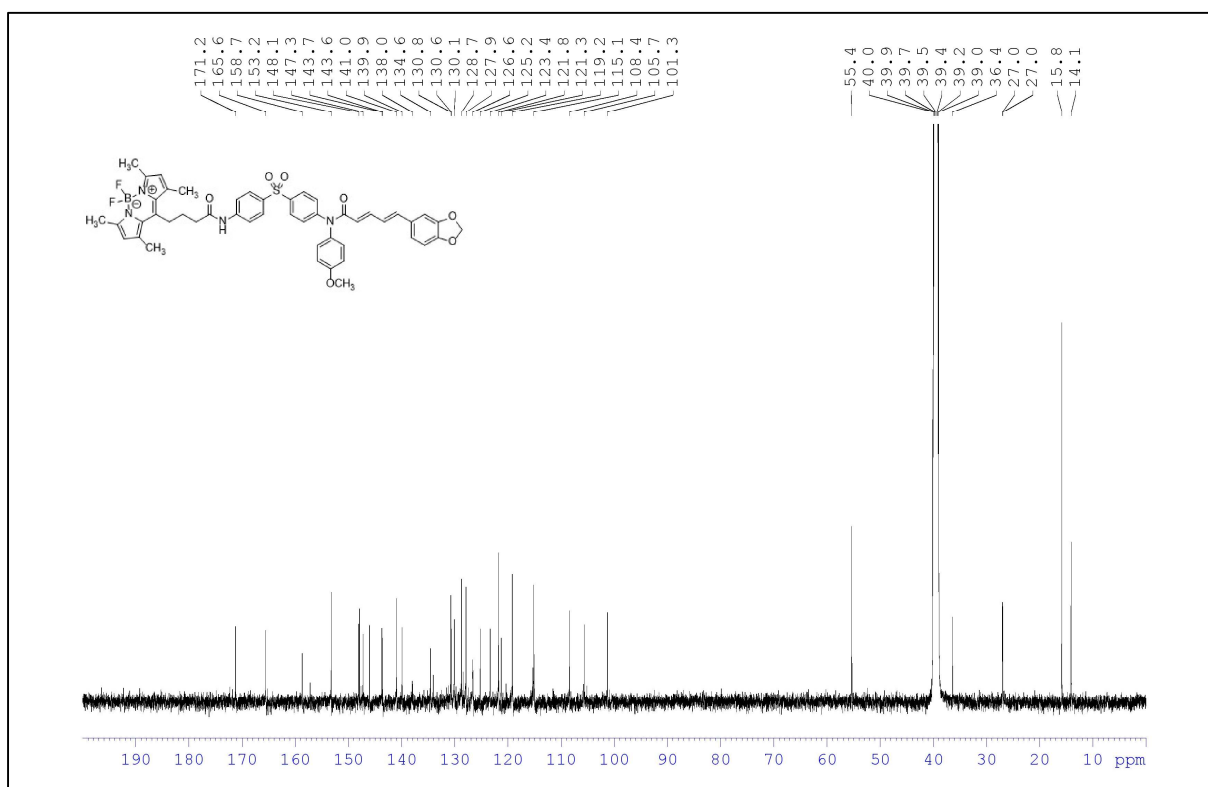


### 6.4.5. Widma związku 5

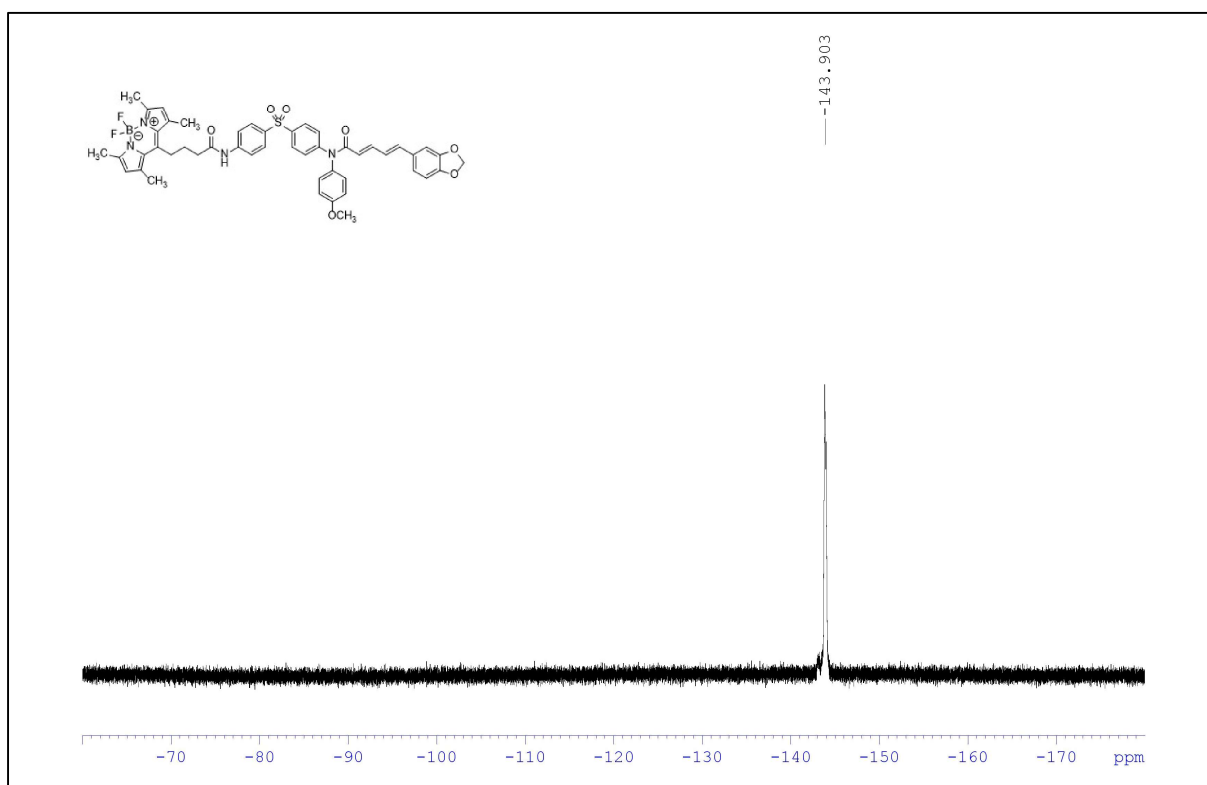
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



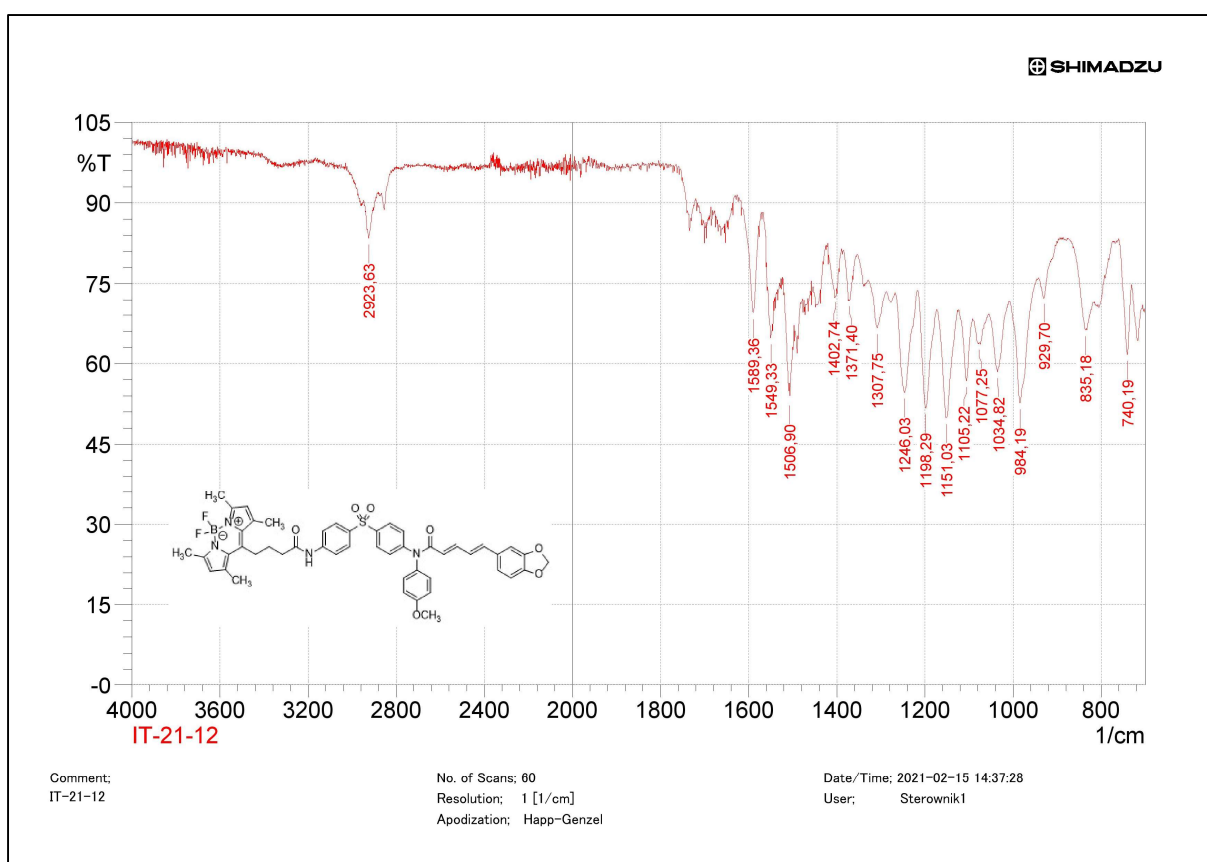
$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )



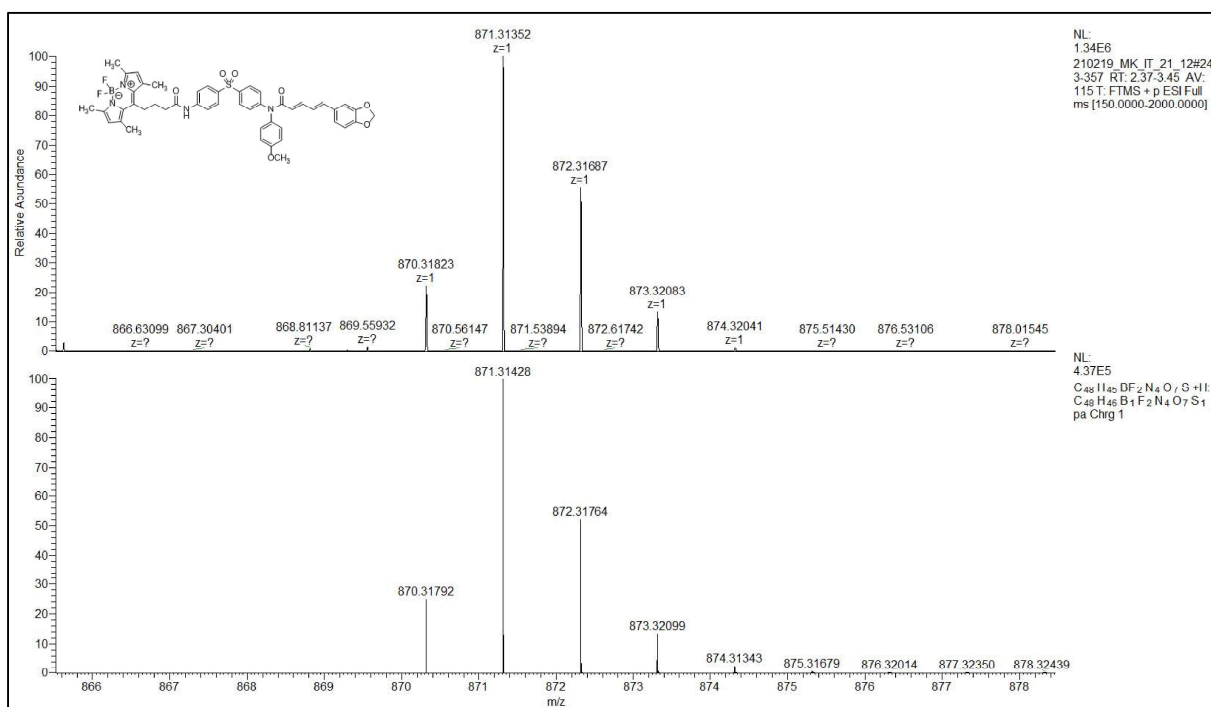
<sup>19</sup>F NMR (376 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)



FT-IR (ATR)



# HRMS (ESI)



## 7. Literatura

- <sup>1</sup> Srinivasan, K. "Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects" *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2007**, *47*, 735-48.
- <sup>2</sup> Oeckinghaus A.; Ghosh S. "The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation" *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2009**, *1*, a000034.
- <sup>3</sup> Sunila E. S.; Kuttan G. "Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn. and piperine" *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *90*, 339-346.
- <sup>4</sup> Mittal R.; Gupta R. L. "In vitro antioxidant activity of piperine" *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **2000**, *22*, 271-274.
- <sup>5</sup> Kumar, S.; Singhal, V.; Roshan, R.; Sharma, A.; Rembhotkar, G. W.; Ghosh, B. "Piperine inhibits TNF- $\alpha$  induced adhesion of neutrophils to endothelial monolayer through suppression of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B kinase activation" *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *575*, 177-186.
- <sup>6</sup> Shahbazi, S.; Kaur, J.; Singh, S.; Achary, K. G.; Wani, S.; Jema, S.; Akhtar, J.; Sobti, R. C. "Impact of novel *N*-aryl piperamide NO donors on NF- $\kappa$ B translocation in neuroinflammation: rational drug-designing synthesis and biological evaluation" *J. Innate Immun.* **2018**, *24*, 24-39.
- <sup>7</sup> Shahbazi, S.; Zakerali, T.; Frycz, B.; Kaur, J. "Impact of novel *N*-aryl substituted piperamide on NF-kappa B translocation as a potent anti-neuroinflammatory agent." *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *127*, 110199.
- <sup>8</sup> Begon, E.; Chosidow, O.; Wolkenstein, P. "Disulone" *Ann. Dermatol. Venereol.* **2004**, *131*, 1062-1073.
- <sup>9</sup> Rashidian, A.; Rashki, A.; Abdollahi, A.; Haddadi, N. S.; Chamanara, M.; Mumtaz, F.; Dehpour, A. R. "Dapsone reduced acetic acid-induced inflammatory response in rat colon tissue through inhibition of NF- $\kappa$ B signaling pathway" *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2019**, *41*, 607-613.
- <sup>10</sup> Sheibani, M.; Nezamoleslami, S.; Rahimi, N.; Abbasi, A.; Dehpour, A. R. "Dapsone attenuates the severity of gastric erosion induced by rthanol; stress; and indomethacin in rats: A pharmacological approach" *Research Square* preprint, 10.21203/rs.3.rs-72758/v1.
- <sup>11</sup> Alberts B.; Johnson A.; Lewis J.; Raff M.; Roberts K.; Walter P. "Molecular biology of the cell" (5th Edition) Garland Science: New York, 2008.
- <sup>12</sup> Sampedro, A.; Ramos-Torres, Á.; Schwöppe, C.; Mück-Lichtenfeld, C.; Helmers, I.; Bort, A.; Díaz-Laviada, I.; Fernández, G. "Hierarchical self-assembly of BODIPY dyes as a tool to improve the antitumor activity of capsaicin in prostate cancer" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 17235-17239.
- <sup>13</sup> Green, T. W.; Wuts P. G. M., "Protective groups in organic synthesis" Wiley-Interscience: New York, 1999.
- <sup>14</sup> Ruiz-Castillo, P.; Buchwald, S. L. "Applications of palladium-catalyzed C–N cross-coupling reactions" *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 12564-12649.
- <sup>15</sup> Beletskaya, I. P.; Cheprakov, A. V. "Copper in cross-coupling reactions: The post-Ullmann chemistry" *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248*, 2337-2364.
- <sup>16</sup> Dorel, R.; Grugel, C. P.; Haydl, A. M. "The Buchwald-Hartwig amination after 25 Years" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *25*, 17118-17129.

- <sup>17</sup> Bruneau, A.; Roche, M.; Alami, M.; Messaoudi, S. "2-Aminobiphenyl palladacycles: The most powerful precatalysts in C–C and C–heteroatom cross-couplings" *ACS Catal.* **2015**, *5*, 1386-1396.
- <sup>18</sup> Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. "Amide bond formation and peptide coupling" *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.
- <sup>19</sup> Todorovic, M.; Perrin, D. M. "Recent developments in catalytic amide bond formation" *J. Pept. Sci.* **2020**, *112*, e24210.
- <sup>20</sup> Pierce, M. E.; Harris, G. D.; Islam, Q.; Radesca, L. A.; Storace, L.; Waltermire, R. E.; Wat, E.; Jadhav, P. K.; Emmett, G. C. "Stereoselective synthesis of HIV-1 protease inhibitor, DMP 323" *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 444-450.
- <sup>21</sup> El-Faham, A.; Subirós-Funosas, R.; Prohens, R.; Albericio, F. "COMU: A safer and more effective replacement for benzotriazole-based uronium coupling reagents" *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9404-9416.
- <sup>22</sup> Gray, W. H.; Platt, B. C. "Carboxylic acid derivatives of 4:4'-diaminodiphenylsulphone" *J. Chem. Soc.* **1942**, 42-45.
- <sup>23</sup> Ward, J. S.; Nobuyasu, R. S.; Batsanov, A. S.; Data, P.; Monkman, A. P.; Dias, P. B.; Bryce, M. R. "The interplay of thermally activated delayed fluorescence (TADF) and room temperature organic phosphorescence in sterically-constrained donor–acceptor charge-transfer molecules" *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 2612-2615.
- <sup>24</sup> Gawroński, J.; Gawrońska, K.; Kacprzak, K.; Kwit, M. „Współczesna synteza organiczna” Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, 2004.
- <sup>25</sup> Grimstrup, M.; Rist, Ø.; Receveur, J. M.; Hoegberg, T.; Frimurer, T. M. "Amino-substituted azo-heterocyclic compounds for treating inflammatory conditions" WO/2007/062797.
- <sup>26</sup> Muthaiah, S.; Yesudoss, C. R.; Hong-Cheu, L. "Synthesis of novel triarylamine-based dendrimers with *N*<sup>4</sup>,*N*<sup>6</sup>-dibutyl-1,3,5-triazine-4,6-diamine probe for electron/energy transfers in H-bonded donor–acceptor–donor triads and as efficient Cu<sup>2+</sup> sensors" *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 8976-8987.