

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

DYSCYPLINA NAUKOWA — NAUKI CHEMICZNE
DZIEDZINA NAUK — NAUKI ŚCISŁE I PRZYRODNICZE

Rozprawa doktorska

mgr inż. Piotr Tobiasz

**Otrzymywanie, badania spektroskopowe i biologiczne *azo-*
związków, potencjalnych przełączników molekularnych do
zastosowania w fotofarmakologii**

Promotor

dr hab. inż. Hanna Krawczyk, prof. uczelni

WARSZAWA 2025

Składam serdeczne podziękowania Pani dr hab. inż. Hannie Krawczyk, prof. uczelni za wskazanie interesującej tematyki badawczej, wspieranie mnie przez te wszystkie lata trwania dyplomu inżynierskiego, magisterskiego, a także doktorskiego oraz przede wszystkim cierpliwość.

Szczególne podziękowania chciałbym również złożyć swoim rodzicom oraz przyjaciołom, bez których wiary i wsparcia nie byłoby to możliwe.

Streszczenie Rozprawy

Tematyka niniejszej rozprawy dotyczy syntezy oraz badań spektroskopowych i biologicznych azowych pochodnych związków bioaktywnych, stanowiących potencjalne fotochromowe przełączniki molekularne. W pierwszej części pracy przedstawiono szczegółowy przegląd literaturowy, który rozpoczyna się omówieniem podstaw koncepcji fotofarmakologii. Jest to nowoczesna dziedzina nauki, koncentrująca się na projektowaniu i badaniu związków chemicznych, których aktywność biologiczną można precyzyjnie modulować za pomocą światła. Dzięki takiemu podejściu możliwe staje się zewnętrzne i selektywne sterowanie działaniem terapeutycznym substancji czynnych, ograniczające ich aktywność jedynie do wybranych tkanek lub obszarów organizmu. Strategia ta ma na celu istotne zmniejszenie ryzyka wystąpienia działań niepożądanych poprzez lokalną aktywację leku wyłącznie w miejscu docelowym. Kolejna część przeglądu poświęcona została charakterystyce fotochromowych przełączników molekularnych — związków chemicznych zdolnych do odwracalnej zmiany swojej struktury i właściwości fizykochemicznych pod wpływem światła o określonej długości fali. Szczególną uwagę poświęcono azobenzenom — ich mechanizmowi działania, właściwościom fotoizomeryzacyjnym oraz metodom syntezy. Dodatkowo przedstawiono przykłady zastosowań przełączników fotochromowych w kontekście scenariuszy terapeutycznych, ukazując ich potencjał w precyzyjnie sterowanej światłem farmakoterapii. W dalszej części rozdziału dokonano przeglądu wybranych związków bioaktywnych oddziałujących z domeną kolchicynową białka α,β -tubuliny. Substancje te, poprzez wiązanie się z tym miejscem, wykazują działanie przeciwnowotworowe, polegające na zahamowaniu polimeryzacji α,β -tubuliny — procesu niezbędnego do formowania mikrotubul, a tym samym do prawidłowego przebiegu podziałów komórkowych.

W kolejnej części rozprawy przedstawiono wyniki badań własnych. Rozdział ten podzielono na podrozdziały, z których każdy poświęcono analizie poszczególnych klas związków.

Na początku skoncentrowano się na badaniach chemicznych dotyczących pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepy, prowadzonych w celu opracowania nowych, bardziej zaawansowanych fotochromowych przełączników molekularnych. Otrzymano szereg zróżnicowanych struktur, z których pierwsze stanowiły oligomery metoksyowych pochodnych 3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepy połączonych mostkiem metylenowym. Dalsze badania obejmowały syntezę dimerów 6-metoksy-3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepy z zastosowaniem

alternatywnych łączników, takich jak pochodne benzytowe zawierające grupy nitrowe lub halogenowe. Udowodniono tym samym możliwość wprowadzania dodatkowych ugrupowań nitrowych, co jest istotne z punktu widzenia dalszych reakcji prowadzących do tworzenia grup azowych. W kolejnych etapach zsyntetyzowano również struktury dibenzo[*b,f*]oksepiny połączone z 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylem poprzez reakcję z różnymi aldehydami w obecności eteratu trifluorku boru. Otrzymane związki wykazywały potencjał do dalszej funkcjonalizacji w kierunku otrzymywania związków azowych. Następnie skupiono się na badaniu właściwości chemicznych pochodnych nitrodibenzo[*b,f*]oksepiny, co umożliwiło syntezę pierwszych związków azowych zawierających ten szkielet. Opracowano metodę syntezy symetrycznych związków azowych opartych na szkielecie dibenzo[*b,f*]oksepiny, które następnie wykorzystano do otrzymywania struktur „wyższej generacji”, zawierających więcej niż jedno ugrupowanie azowe. Tak uzyskane związki posłużyły do budowy dimerów, trimerów oraz pentamerów, w których łączniki stanowiły grupy metylenowe lub zawierające 2,4-dinitrofenylowy podstawnik w grupie metylenowej. W dalszej części przeprowadzono syntezę niesymetrycznych związków azowych, zawierających fragmenty dibenzo[*b,f*]oksepiny oraz *p*-fluorofenyłu, co pozwoliło na wprowadzenie podstawnika halogenowego do struktury związku. Ostatecznie dokonano również syntezy niesymetrycznych związków azowych, zawierających więcej niż jedno wiązanie azowe i opartych na szkielecie dibenzo[*b,f*]oksepiny. Część końcowa rozdziału została poświęcona badaniom fotochemicznych właściwości wybranych związków azowych. Analizowano ich zdolność do izomeryzacji z formy *E* do *Z* pod wpływem światła o różnych długościach fal w celu określenia optymalnych warunków aktywacji. Dodatkowo wykonano pomiary widm UV–Vis, które umożliwiły oszacowanie stopnia separacji pasm absorpcyjnych. Zbadano również kinetykę procesu reizomeryzacji z izomeru *Z* do *E*, co pozwoliło na ocenę stabilności fotochemicznej formy *Z* w czasie.

W kolejnym podrozdziale badań własnych zaprezentowano wyniki dotyczące syntezy oraz charakterystyki chemicznej, fotochemicznej i biologicznej azowych pochodnych chalkonu. Opracowano trzyetapową metodę syntezy tych związków, a następnie przeprowadzono szczegółowe badania ich właściwości fotochemicznych. W pierwszej kolejności oceniono zdolność otrzymanych związków do izomeryzacji geometrycznej z formy *E* do formy *Z* pod wpływem światła o różnych długościach fal, celem określenia optymalnych warunków ich aktywacji. Wykazano, że badane pochodne mogą być skutecznie aktywowane światłem zielonym, które uznawane jest za biozgodne i przyjazne dla żywych organizmów. Kolejnym etapem było zarejestrowanie widm UV–Vis, co umożliwiło ocenę stopnia separacji pasm

absorpcyjnych. Zaobserwowano korzystne rozdzielenie pasm $\pi \rightarrow \pi^*$ oraz $n \rightarrow \pi^*$, przy czym pasmo absorpcyjne izomeru *Z* charakteryzowało się większą intensywnością w porównaniu z izomerem *E*. Dalsze badania wykazały, że izomery *Z* azowych pochodnych chalkonu wykazują stosunkowo wysoką stabilność termodynamiczną w czasie, co potwierdzono poprzez analizę kinetyki reizomeryzacji z formy *Z* do *E*. Dodatkowo przeprowadzono testy trwałości jednego z wybranych związków, które potwierdziły powtarzalność i stabilność procesu fotokonwersji. Poza analizą fotochemiczną wykonano również dokowanie molekularne wybranych pochodnych, które wykazało wysokie powinowactwo badanych ligandów do kompleksu α, β -tubuliny. Na tej podstawie można wnioskować o potencjale tych związków jako fotokontrolowanych inhibitorów oddziałujących z mikrotubulami. Uzupełnieniem prac badawczych były testy biologiczne przeprowadzone na jednym z wyselekcjonowanych związków. Zaobserwowano, że izomer *Z* tej pochodnej chalkonu powoduje zatrzymanie komórek linii ludzkiego raka prostaty PC-3 w fazie G2/M cyklu komórkowego, przy jednoczesnym znacznym nagromadzeniu komórek w fazie S, co wskazuje na jego potencjalną aktywność cytotoksyczną oraz zdolność do hamowania proliferacji komórek.

W ostatnim podrozdziale badań własnych przedstawiono wyniki dotyczące syntezy oraz charakterystyki chemicznej, fotochemicznej i biologicznej azowych pochodnych kolchicyny. Opracowano wieloetapową syntezę tych związków, pozwalającą na efektywne otrzymanie nowych układów zawierających szkielet kolchicyny oraz grupę azową, z potencjałem do zastosowania jako fotokontrolowane związki bioaktywne. W dalszym etapie przeprowadzono badania fotochemiczne, koncentrując się na analizie zdolności izomeryzacji geometrycznej z izomeru *E* do izomeru *Z* pod wpływem światła o różnych długościach fal. Zaobserwowano, że również pochodne kolchicyny mogą być aktywowane za pomocą światła zielonego, które jest uznawane za biozgodne, co czyni te związki szczególnie interesującymi z punktu widzenia fotofarmakologii. W celu dalszej charakterystyki przeprowadzono pomiary widm UV–Vis, które wykazały korzystne rozdzielenie pasm absorpcyjnych typu $\pi \rightarrow \pi^*$ oraz $n \rightarrow \pi^*$. Zaobserwowano również, że pasmo absorpcyjne izomeru *Z* jest bardziej intensywne niż odpowiadające mu pasmo izomeru *E*, co może być istotne przy projektowaniu selektywnych fotoprzełączników. Dodatkowo przeanalizowano kinetykę procesu reizomeryzacji z izomeru *Z* do *E*, co pozwoliło na ocenę stabilności formy *Z* w czasie. Na podstawie uzyskanych danych potwierdzono, że izomery *Z* otrzymanych pochodnych kolchicyny cechują się zadowalającą trwałością termodynamiczną. Przeprowadzono także testy stabilności fotochemicznej wybranego związku modelowego, na podstawie których pokazano wysoką powtarzalność i

trwałość procesu fotokonwersji, co jest kluczowe dla zastosowań w warunkach biologicznych. Uzupełnieniem badań były analizy dokowania molekularnego, w oparciu o które stwierdzono, że uzyskane azowe pochodne kolchicyny mają zdolność wiązania się w miejscu aktywnym domeny kolchicynowej, zlokalizowanym na granicy podjednostek α - i β -tubuliny, co potwierdza zachowanie mechanizmu działania charakterystycznego dla kolchicyny. Ponadto przeprowadzono badania biologiczne dla dwóch wyselekcjonowanych związków. W świetle uzyskanych wyników udowodniono, że izomery *Z* charakteryzują się wyższą selektywnością wobec komórek nowotworowych (linia komórek raka prostaty LNCaP) w porównaniu z komórkami prawidłowymi (linia komórek ludzkiej embrionalnej nerki HEK-293), co wskazuje na ich potencjał terapeutyczny jako fotokontrolowanych, selektywnych cytostatyków.

Ostatnia część rozprawy obejmuje dane eksperymentalne oraz zawiera podsumowanie i wnioski z przeprowadzonych badań.

Słowa kluczowe:

Fotofarmakologia, fotochromowe przełączniki molekularne, dibenzo[*b,f*]oksepina, chalkon, kolchicyna, związki azowe, azologizacja, rozszerzenie struktury Bona Fide, fotoizomeryzacja.

Abstract of the Thesis

The subject of this Dissertation concerns the synthesis, spectroscopic studies, and biological evaluation of azo derivatives of bioactive compounds, serving as potential molecular photoswitches. The first part of the Dissertation presents a detailed literature review, beginning with an introduction to the fundamentals of photopharmacology. This modern scientific field focuses on the design and study of chemical compounds whose biological activity can be precisely modulated by light. This approach enables external and selective control over the therapeutic action of active substances, limiting their activity to specific tissues or regions of the body. The goal of this strategy is to significantly reduce the risk of side effects by locally activating the drug exclusively at the target site. The next section of the review is dedicated to molecular photoswitches — chemical compounds capable of reversible changes in their structure and physicochemical properties upon exposure to light of a specific wavelength. Particular attention is given to azobenzenes, including their mechanism of action, photoisomerization properties, and methods of synthesis. Additionally, examples of the application of photoswitches in therapeutic scenarios are presented, highlighting their potential in light-controlled pharmacotherapy. The chapter also includes a review of selected bioactive compounds that interact with the colchicine-binding domain of the α,β -tubulin protein. These substances exhibit anticancer activity by binding to this site and inhibiting the polymerization of α,β -tubulin — a process essential for microtubule formation and, consequently, for proper cell division.

The next part of the dissertation presents the results of the author's original research. This chapter is divided into subsections, each focusing on the analysis of a specific class of compounds.

The research begins with the chemical studies of dibenzo[*b,f*]oxepine derivatives, aimed at developing new, more advanced molecular photoswitches. A series of diverse structures were obtained, starting with methoxy-substituted 3-nitrodibenzo[*b,f*]oxepine oligomers connected by a methylene bridge. Further studies involved the synthesis of 6-methoxy-3-nitrodibenzo[*b,f*]oxepine dimers using alternative linkers, such as benzyl derivatives bearing nitro or halogen groups. These studies confirmed the possibility of introducing additional nitro groups, which is important for subsequent reactions leading to azo group formation. Subsequent steps included the synthesis of dibenzo[*b,f*]oxepine structures linked to 4,4'-diethoxy-1,1'-biphenyl via reactions with various aldehydes in the presence of

boron trifluoride etherate. The obtained compounds showed potential for further functionalization toward the formation of azo compounds. Next, the chemical properties of nitrodibenzo[*b,f*]oxepine were examined, leading to the synthesis of the first azo compounds containing this scaffold. A method for synthesizing symmetrical azo compounds based on dibenzo[*b,f*]oxepine was developed, which were subsequently used to create “higher-generation” structures — containing more than one azo group. These compounds were used to build dimers, trimers, and pentamers with methylene or 2,4-dinitrobenzyl linkers. Later, unsymmetrical azo compounds were synthesized, incorporating dibenzo[*b,f*]oxepine and *p*-fluorophenyl fragments, allowing for the introduction of a halogen substituent into the molecular structure. Finally, unsymmetrical azo compounds containing more than one azo bond and based on the dibenzo[*b,f*]oxepine scaffold were also synthesized. The final part of this chapter is devoted to the photochemical properties of selected azo compounds. Their ability to isomerize from the *E* to the *Z* form under light of different wavelengths was analysed to determine optimal activation conditions. UV–Vis spectra were recorded to estimate the degree of absorption band separation. The kinetics of *Z* to *E* reversion were also studied to assess the photochemical stability of the *Z* form over time.

The next subsection of the original research presents results concerning the synthesis and chemical, photochemical, and biological characterization of azo chalcone derivatives. A three-step synthesis method was developed for these compounds, followed by detailed investigations of their photochemical properties. First, the compounds' ability to undergo *E*-to-*Z* geometric isomerization under different wavelengths of light was evaluated to determine optimal activation conditions. It was shown that the tested derivatives can be effectively activated by green light, which is considered biocompatible and safe for living organisms. Subsequently, UV–Vis spectra were recorded to assess the degree of absorption band separation. Favorable separation of $\pi \rightarrow \pi^*$ and $n \rightarrow \pi^*$ bands was observed, with the *Z*-isomer showing higher absorption intensity compared to the *E*-isomer. Further studies revealed that the *Z*-isomers of azo chalcone derivatives exhibit relatively high thermodynamic stability over time, confirmed by the kinetics of *Z*-to-*E* reversion. Stability tests were also conducted on a selected compound, demonstrating the repeatability and stability of the photoconversion process. In addition to the photochemical analysis, molecular docking of selected derivatives was performed, revealing high binding affinity of the studied ligands to the α,β -tubulin complex. This suggests the potential of these compounds as light-controllable inhibitors of microtubule interactions. The research was complemented by biological tests conducted on one of the selected compounds. It was observed that the *Z*-isomer of this chalcone derivative causes

arrest of human prostate cancer PC-3 cells in the G2/M phase of the cell cycle, along with significant accumulation of cells in the S phase, indicating its potential cytotoxic activity and ability to inhibit cell proliferation.

The final subsection of the original research presents results related to the synthesis and chemical, photochemical, and biological characterization of azo colchicine derivatives. A multi-step synthesis of these compounds was developed, enabling the efficient preparation of new systems containing a colchicine scaffold and an azo group, with potential application as light-controlled bioactive agents. Photochemical studies focused on the geometric isomerization ability from the *E* to *Z* form under light of various wavelengths. It was observed that colchicine derivatives can also be activated with green light, which is considered biocompatible, making these compounds especially interesting for photopharmacology. To further characterize the compounds, UV–Vis spectra were recorded, showing favorable separation of $\pi \rightarrow \pi^*$ and $n \rightarrow \pi^*$ absorption bands. The *Z*-isomer's absorption band was more intense than that of the *E*-isomer, which may be important in designing selective photoswitches.

Additionally, the kinetics of *Z*-to-*E* reversion were analysed to evaluate *Z*-isomer stability over time. The data confirmed that *Z*-isomers of the synthesized colchicine derivatives exhibit satisfactory thermodynamic stability. Photochemical stability tests of a selected model compound demonstrated high repeatability and durability of the photoconversion process, which is crucial for biological applications. The research was further supplemented by molecular docking studies, which showed that the synthesized azo colchicine derivatives are capable of binding to the colchicine-binding domain, located at the interface of the α - and β -tubulin subunits, confirming the retention of the mechanism of action characteristic of colchicine. Biological studies were also carried out on two selected compounds. The results demonstrated that the *Z*-isomers show higher selectivity toward cancer cells (LNCaP human prostate cancer cell line) compared to normal cells (HEK-293 human embryonic kidney cell line), indicating their therapeutic potential as light-controllable selective cytostatic agents.

The final part of the Dissertation includes experimental data as well as a summary and conclusions of the conducted research.

Keywords:

Photopharmacology, molecular photoswitches, dibenzo[*b,f*]oxepine, chalcone, colchicine, azo compounds, azologization, Bona Fide Extension, photoisomerization.

Życiorys naukowy

EDUKACJA:

Studia I stopnia: Technologia Chemiczna, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska, 2018 rok.

Uzyskanie tytułu zawodowego inżyniera na podstawie pracy dyplomowej pt. „Synteza cyklicznych pochodnych stilbenu z grupami hydroksylowymi i metoksyłowymi”.

Studia II stopnia: Technologia Chemiczna, Chemia medyczna, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska, 2019 rok.

Uzyskanie tytułu zawodowego magistra inżyniera na podstawie pracy dyplomowej pt. „Synteza pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny podstawionych w pierścieniu aromatycznym”.

ARTYKUŁY Z LISTY FILADELFIJSKIEJ:

[P1] **P. Tobiasz**, F. Borys, M. Kucharska, H. Krawczyk, Synthesis and Investigations of Building Blocks with Dibenzo[*b,f*] Oxepine for Use in Photopharmacology, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22, 11033, DOI: 10.3390/ijms222011033, IF = 6,208.

[P2] **P. Tobiasz**, F. Borys, M. Kucharska, M. Poterała, H. Krawczyk, Synthesis and Study of Building Blocks with Dibenzo[*b,f*]oxepine: Potential Microtubule Inhibitors, *Int. J. Mol. Sci.*, 2024, 25(11), 6155, DOI: 10.3390/ijms25116155, IF = 5,7.

[P3] **P. Tobiasz**, M. Poterała, E. Jaśkowska, H. Krawczyk, Synthesis and investigation of new cyclic molecules using the stilbene scaffold, *RSC Adv.*, 2018, 8, 30678, DOI: 10.1039/C8RA04249G, IF = 3,4.

[P4] D. Garbicz, **P. Tobiasz**, F. Borys, M. Poterała, E. Grzesiuk, H. Krawczyk, The stilbene and dibenzo[*b,f*]oxepine derivatives as anticancer compounds, *Biomed. Pharmacother.*, 2020, 123, 109781, DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109781, IF = 6,29.

[P5] F. Borys, **P. Tobiasz**, M. Poterała, H. Krawczyk, Development of novel derivatives of stilbene and macrocyclic compounds as potent of anti-microtubule factors, *Biomed. Pharmacother.*, 2021, 133, 110973, DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110973, IF = 7,19.

[P6] F. Borys, **P. Tobiasz**, J. Sobel, H. Krawczyk, Synthesis and Study of Dibenzo[*b,f*]oxepine Combined with Fluoroazobenzenes — New Photoswitches for Application in Biological Systems, *Molecules*, 2022, 27, 5836, DOI: 10.3390/molecules27185836, IF = 4,93.

[P7] F. Borys, **P. Tobiasz**, M. Poterała, H. Fabczak, H. Krawczyk, E. Joachimiak, Systematic Studies on Anti-Cancer Evaluation of Stilbene and Dibenzo[*b,f*]oxepine Derivatives, *Molecules*, 2023, 28(8), 3558, DOI: 10.3390/molecules28083558, IF = 4,6.

[P8] F. Borys, **P. Tobiasz**, H. Fabczak, E. Joachimiak, H. Krawczyk, First-in-Class Colchicine-Based Visible Light Photoswitchable Microtubule Dynamics Disrupting Agent, *Cells*, 2023, 12(14), 1866, DOI: 10.3390/cells12141866, IF = 5,1.

ARTYKUŁY W RECENZJI:

1. **P. Tobiasz**, D. Mielecki, A. Stachurska-Skrodzka, J. Miętus, F. Borys, H. Krawczyk, Synthesis and Study of Substituted Chalcones Combined with Fluoroazobenzenes — New Photoswitches for Application in Biological Systems, *Molecules*.

ARTYKUŁY W PRZYGOTOWANIU:

1. **P. Tobiasz**, M. Koźbiał, M. Mirzaei-Behbahani, I. Żukow, H. Krawczyk, Synthesis and physicochemical investigation of tubulin polymerization inhibitors colchicine with chloroazobenzenes.

ROZDZIAŁY W KSIĄŻKACH:

1. I. Witkowska, **P. Tobiasz**, H. Krawczyk, M. Poterała, E. Jaśkowska, Synteza bifen[*n*]arenów — nowych arenów makrocyklicznych stosowanych w systemach supramolekularnych, Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości, praca zbiorowa pod redakcją prof. Zbigniewa Hubickiego, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, 2018, 134–137, Lublin, ISBN: 978-83-945225-4-4.

2. M. Przyłucki, **P. Tobiasz**, M. Więclaw, E. Jaśkowska, H. Krawczyk, M. Poterała, Synteza i badanie właściwości biologicznie czynnych stilbenów, Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości, praca zbiorowa pod redakcją prof. Zbigniewa Hubickiego, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, 2018, 384–388, Lublin, ISBN: 978-83-945225-4-4.

3. **P. Tobiasz**, M. Przyłucki, E. Jaśkowska, M. Poterała, H. Krawczyk, Synteza cyklicznych pochodnych stilbenu, Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości, praca zbiorowa pod redakcją prof. Zbigniewa Hubickiego, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, 2018, 138–142, Lublin, ISBN: 978-83-945225-4-4.
4. A. Arbaszewska, **P. Tobiasz**, F. Borys, E. Joachimiak, H. Fabczak, H. Krawczyk, Selektowna redukcja grup nitrowych w pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepin, Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości, praca zbiorowa pod redakcją prof. Zbigniewa Hubickiego, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, 2019, 149–153, Lublin, ISBN: 978-83-227-9219-3.
5. F. Borys, A. Arbaszewska, **P. Tobiasz**, E. Joachimiak, H. Fabczak, H. Krawczyk, Synteza aminowych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepin, Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości, praca zbiorowa pod redakcją prof. Zbigniewa Hubickiego, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, 2019, 154–157, Lublin, ISBN: 978-83-227-9219-3.
6. **P. Tobiasz**, J. Sobel, F. Borys, H. Krawczyk, Synteza azowych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepin, Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości, praca zbiorowa pod redakcją prof. Zbigniewa Hubickiego, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, 2020, 89–93, Lublin, ISBN: 978-83-227-9369-5.
7. F. Borys, J. Sobel, **P. Tobiasz**, M. Poterała, E. Joachimiak, H. Fabczak, H. Krawczyk, Otrzymywanie związków azowych dla dibenzo[*b,f*]oksepin, Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości, praca zbiorowa pod redakcją prof. Zbigniewa Hubickiego, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, 2020, 85–88, Lublin, ISBN: 978-83-227-9369-5.
8. F. Borys, **P. Tobiasz**, H. Krawczyk, Synteza pochodnych chalkonów zawierających wiązanie azowe, Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości, praca zbiorowa pod redakcją prof. Zbigniewa Hubickiego, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, 2021, 89–91, Lublin, ISBN 978-83-227-9504-0.
9. **P. Tobiasz**, M. Kucharska, H. Krawczyk, Synteza rozgałęzionych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepin, Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania

i możliwości, praca zbiorowa pod redakcją prof. Zbigniewa Hubickiego, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, 2021, 85–88, Lublin, ISBN: 978-83-227-9504-0.

10. **P. Tobiasz**, F. Borys, M. Kucharska, H. Krawczyk, Synteza azowych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny — potencjalnych fotochromowych przełączników molekularnych, *Badania i osiągnięcia z zakresu nauk przyrodniczych*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL Sp. z o. o., 2021, 140–150, Lublin, ISBN: 978-83-66489-69-1.

11. **P. Tobiasz**, H. Krawczyk, Synteza pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny podstawionych w pierścieniu aromatycznym, *Wiadomości Chemiczne*, 2021, 75, 1237–1257, Warszawa, ISSN: 0043-5104, DOI: 10.53584/wiadchem.2021.12.5.

12. F. Borys, **P. Tobiasz**, H. Krawczyk, Zastosowanie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego ^{19}F do badań fotoizomeryzacji *orto*-fluoroazobenzenów, *Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości*, praca zbiorowa pod redakcją prof. Zbigniewa Hubickiego, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, 2022, 332–335, Lublin, ISBN: 978-83-227-9602-3.

13. **P. Tobiasz**, F. Borys, Z. Żelewska, H. Krawczyk, Synteza połączeń dibenzo[*b,f*]oksepiny z 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylem, *Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości*, praca zbiorowa pod redakcją prof. Zbigniewa Hubickiego, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, 2022, 347–350, Lublin, ISBN: 978-83-227-9602-3.

14. **P. Tobiasz**, M. Koźbiał, M. Kucharska, F. Borys, T. Ostrowski, H. Krawczyk, Opracowanie metody syntezy pochodnej dibenzo[*b,f*]oksepiny z wielokrotnym wiązaniem azowym, *Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości*, praca zbiorowa pod redakcją prof. Zbigniewa Hubickiego, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, 2023, 489–492, Lublin, ISBN: 978-83-227-9700-6.

15. J. Miętus, **P. Tobiasz**, I. Zdaniewicz, F. Borys, K. Wojciechowski, A. Susdorf, H. Krawczyk, Study of substituted chalcones combined with azobenzenes — new photoswitches, *Science and industry — challenges and opportunities*, praca zbiorowa pod redakcją prof. Zbigniewa Hubickiego, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, 2024, 16–19, Lublin, ISBN: 978-83-227-9805-8.

16. **P. Tobiasz**, M. Koźbiał, F. Borys, H. Krawczyk, Sposób otrzymywania pochodnych aminowych dihydrodibenzo[*b,f*]oksepin, *Science and industry — challenges and opportunities*,

praca zbiorowa pod redakcją prof. Zbigniewa Hubickiego, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, 2024, 415–418, Lublin, ISBN: 978-83-227-9805-8.

17. J. Podsiedlik, M. Poterała, **P. Tobiasz**, A. Kawecki, I. Żukow, H. Krawczyk, Study of NMR relaxation times of ^{19}F nuclei in azo-fluorostilbene photoswitch, Science and industry — challenges and opportunities, praca zbiorowa pod redakcją prof. Zbigniewa Hubickiego, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, 2025, 283–286, Lublin, ISBN: 978-83-227-9909-3.

PRZYZNANE PATENTY:

1. **P. Tobiasz**, M. Poterała, H. Krawczyk, Sposób otrzymywania 7-metoksy-1,2,3-tris(4-metoksyfenylo)-1,2,3,4-tetrahydronaftalenu, data zgłoszenia: 10.01.2018, nr zgłoszenia: P.424245, data udzielenia prawa: 05.09.2019, nr patentu: PL 233977.

2. **P. Tobiasz**, H. Krawczyk, Sposób otrzymywania podstawionych w pierścieniu aromatycznym pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny, data zgłoszenia: 05.03.2018, nr zgłoszenia: P.424768, data udzielenia prawa: 23.04.2021, nr patentu: PL 238243.

3. A. Arbaszewska, **P. Tobiasz**, F. Borys, H. Krawczyk, Sposób otrzymywania pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny, data zgłoszenia: 25.03.2019, nr zgłoszenia: P.429386, data udzielenia prawa: 10.09.2021, nr patentu: PL 239208.

4. **P. Tobiasz**, H. Krawczyk, Pochodne azowe dibenzo[*b,f*]oksepiny podstawione w pierścieniu aromatycznym grupami metoksy i sposób ich otrzymywania, data zgłoszenia: 19.11.2020, nr zgłoszenia: P.436017, data udzielenia prawa: 11.07.2023, nr patentu: PL 243766.

5. M. Kucharska, **P. Tobiasz**, H. Krawczyk, Rozgałęzione pochodne dibenzo[*b,f*]oksepiny i sposób ich otrzymywania, data zgłoszenia: 01.04.2021, nr zgłoszenia: P.437481, data udzielenia prawa: 03.09.2024, nr patentu: PL 246178.

6. **P. Tobiasz**, H. Krawczyk, Bifenylowe pochodne dibenzo[*b,f*]oksepiny oraz sposób ich otrzymywania, data zgłoszenia: 03.03.2022, nr zgłoszenia: P.440540, data udzielenia prawa: 12.08.2024, nr patentu: PL 245987.

7. **P. Tobiasz**, H. Krawczyk, Aminowe pochodne dihydrodibenzo[*b,f*]oksepin i sposób ich otrzymywania, data zgłoszenia: 01.02.2023, nr zgłoszenia: P.443656, data udzielenia prawa: 10.03.2025, nr patentu: PL 247188.

ZGŁOSZENIA PATENTOWE KRAJOWE:

1. F. Borys, **P. Tobiasz**, J. Sobel, H. Krawczyk, Fluorowe pochodne metoksydibenzo[*b,f*]oksepiny, data zgłoszenia: 20.05.2020, nr zgłoszenia: P.441238.

2. **P. Tobiasz**, J. Miętus, H. Krawczyk, Pochodna chalkonu zawierająca wiązanie azowe w układzie stilbenu oraz sposób jej otrzymywania, data zgłoszenia: 01.07.2024, nr zgłoszenia: P.449110.

3. **P. Tobiasz**, H. Krawczyk, Chloro-azobenzenowe pochodne kolchicyny, sposób otrzymywania chloro-azobenzenowych pochodnych kolchicyny i ich zastosowanie, data zgłoszenia: 25.04.2025, nr zgłoszenia: P.451884.

ZGŁOSZENIA PATENTOWE MIĘDZYNARODOWE:

1. F. Borys, **P. Tobiasz**, J. Sobel, H. Krawczyk, Fluorinated derivatives of methoxydibenzo[*b,f*] oxepin and method for obtaining thereof, data udzielenia prawa: 19.05.2023, nr patentu: PCT/PL2023/050036.

WYSTĄPIENIA KONFERENCYJNE:

1. **P. Tobiasz**, H. Krawczyk, Reakcja Prinsa w pochodnych stilbenu, XI Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Organicznej, Polska Akademia Nauk, poster, 2018, Warszawa.

2. I. Witkowska, **P. Tobiasz**, H. Krawczyk, M. Poterała, E. Jaśkowska, Synteza bifen[*n*]arenów — nowych arenów makrocyclicznych stosowanych w systemach supramolekularnych, XI Ogólnopolskie Sympozjum — Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, poster, 2018, Lublin.

3. M. Przyłucki, **P. Tobiasz**, M. Więclaw, E. Jaśkowska, H. Krawczyk, M. Poterała, Synteza i badanie właściwości biologicznie czynnych stilbenów, XI Ogólnopolskie Sympozjum — Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, poster, 2018, Lublin.

4. **P. Tobiasz**, M. Przyłucki, E. Jaśkowska, M. Poterała, H. Krawczyk, Synteza cyklicznych pochodnych stilbenu, XI Ogólnopolskie Sympozjum — Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, poster, 2018, Lublin.
5. E. Gryciuk, **P. Tobiasz**, H. Krawczyk, Synthesis and investigation of new cyclic molecules using the stilbene scaffold, III Sesja Posterowa Wolontariatu Naukowego, Politechnika Warszawska, poster, 2018, Warszawa.
6. A. Arbaszewska, **P. Tobiasz**, F. Borys, E. Joachimiak, H. Fabczak, H. Krawczyk, Selektowna redukcja grup nitrowych w pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny, XII Ogólnopolskie Sympozjum — Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, poster, 2019, Lublin.
7. F. Borys, A. Arbaszewska, **P. Tobiasz**, E. Joachimiak, H. Fabczak, H. Krawczyk, Synteza aminowych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny, XII Ogólnopolskie Sympozjum — Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, poster, 2019, Lublin.
8. **P. Tobiasz**, F. Borys, A. Arbaszewska, M. Poterała, E. Joachimiak, H. Fabczak, H. Krawczyk, Synteza azowych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny — potencjalnych fotochromowych przełączników molekularnych, ChemSession'19, Uniwersytet Warszawski, poster, 2019, Warszawa.
9. **P. Tobiasz**, H. Krawczyk, Synthesis and studies of new potential photoswitches based on dibenzo[*b,f*]oxepine scaffold, 1st InterBioMed Young Scientists Forum, poster, 2019, Warszawa.
10. **P. Tobiasz**, J. Sobel, F. Borys, H. Krawczyk, Synteza azowych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny, Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, poster, 2020, online, Lublin.
11. F. Borys, J. Sobel, **P. Tobiasz**, M. Poterała, E. Joachimiak, H. Fabczak, H. Krawczyk, Otrzymywanie związków azowych dla dibenzo[*b,f*]oksepin, Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, poster, 2020, online, Lublin.

12. **P. Tobiasz**, F. Borys, M. Kucharska, H. Krawczyk, Synteza azowych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepy — potencjalnych fotochromowych przełączników molekularnych, II Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauki przyrodnicze na rzecz człowieka i środowiska” — Tygiel, wystąpienie ustne, 2020, online, Lublin.
13. **P. Tobiasz**, F. Borys, H. Krawczyk, Synthesis of hybrid dibenzo[*b,f*]oxepine and 4,4'-diethoxybiphenyl subunits, Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka Okiem Młodego Naukowca”, wystąpienie ustne, 2021, online.
14. F. Borys, J. Sobel, **P. Tobiasz**, H. Krawczyk, Synthesis and study of dibenzo[*b,f*]oxepine combined with fluoroazobenzenes — New photoswitches for application in biological systems, Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka Okiem Młodego Naukowca”, poster, 2021, online.
15. **P. Tobiasz**, H. Krawczyk, Synteza pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepy podstawionych w pierścieniu aromatycznym, 63. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, poster, 2021, online.
16. F. Borys, **P. Tobiasz**, H. Krawczyk, Synteza pochodnych chalkonów zawierających wiązanie azowe, Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, poster, 2021, online, Lublin.
17. **P. Tobiasz**, M. Kucharska, H. Krawczyk, Synteza rozgałęzionych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepy, Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, poster, 2021, online, Lublin.
18. F. Borys, **P. Tobiasz**, H. Krawczyk, Zastosowanie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego ^{19}F do badań fotoizomeryzacji *orto*-fluoroazobenzenów, Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, poster, 2022, online, Lublin.
19. **P. Tobiasz**, F. Borys, Z. Żelewska, H. Krawczyk, Synteza połączeń dibenzo[*b,f*]oksepy z 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylem, Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, poster, 2022, online, Lublin.
20. **P. Tobiasz**, M. Koźbiał, M. Kucharska, F. Borys, T. Ostrowski, H. Krawczyk, Opracowanie metody syntezy pochodnej dibenzo[*b,f*]oksepy z wielokrotnym wiązaniem azowym, Nauka i

przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, poster, 2023, Lublin.

21. **P. Tobiasz**, F. Borys, M. Koźbiał, H. Krawczyk, Sposób otrzymywania pochodnych aminowych dihydrodibenzo[*b,f*]oksepin. Nauka i przemysł: metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, poster, 2023, Lublin.

22. **P. Tobiasz**, H. Krawczyk, Synteza azowych pochodnych bauhinoksepiny. Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, poster, 2023, Łódź.

23. J. Miętus, **P. Tobiasz**, I. Zdaniewicz, F. Borys, K. Wojciechowski, A. Susdorf, H. Krawczyk, Study of substituted chalcones combined with azobenzenes — new photoswitches, Science and industry — challenges and opportunities, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, poster, 2024, Lublin.

24. **P. Tobiasz**, H. Krawczyk, Synthesis of azo derivatives of chalcones, Międzynarodowa Konferencja Młodych Chemików — International Young Chemists Conference — Augmenting Chemistry, poster, 2024, Augustów.

25. **P. Tobiasz**, F. Borys, M. Poterała, H. Krawczyk, Synteza azowych pochodnych kolchicyny, XX Warszawskie Seminarium Doktorantów Chemików — ChemSession'24, Politechnika Warszawska, poster, 2024, Warszawa.

26. J. Podsiedlik, M. Poterała, **P. Tobiasz**, A. Kawecki, I. Żukow, H. Krawczyk, Study of NMR relaxation times of ¹⁹F nuclei in azo-fluorostilbene photoswitch. Science and industry — challenges and opportunities, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, poster, 2025, Lublin.

WYKŁAD NA ZAPROSZENIE:

1. **P. Tobiasz**, H. Krawczyk, Chloro derivatives of colchicine — potential molecular photoswitches, Instytut Biochemii i Biofizyki IBB Polskiej Akademii Nauk, online, 2025.

GRANTY:

1. Diamentowy Grant, Synteza i charakteryzacja nowych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny/stilbenu — potencjalnych fotochromowych przełączników

molekularnych, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, kierownik projektu: **P. Tobiasz**, nr projektu: 0154/DIA/2019/48, 2019–2023.

NAGRODY:

1. Wyróżnienie (IV miejsce) za pracę inżynierską pt. „Synteza cyklicznych pochodnych stilbenu z grupami hydroksylowymi i metoksyłowymi” w konkursie Złoty Medal Chemii, Instytut Chemii Fizycznej PAN i firma DuPont, 2018, Warszawa.
2. Laureat (I miejsce) za pracę magisterską pt. „Synteza pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny podstawionych w pierścieniu aromatycznym” w konkursie PTChem za wyróżnioną pracę magisterską, Polskie Towarzystwo Chemiczne, 2020, Łódź.

STAŻE:

1. Staż w Instytucie Chemii Organicznej PAN, zespół prof. Daniela Gryko, 31.07.2017–27.08.2017.

Indeks Hirsha (cytowania Scopus): 5

Sumaryczny Impact Factor: 41,634

Sumaryczny SNIP: 3,948

Sumaryczny CiteScore: 67,3

Sumaryczna punktacja MNIŚW/MEN: 1855

Wykaz skrótów i symboli

4-PL – czteroparametrowy model logistyczny

5-LOX – 5-lipoksygenaza

AMPA – kwas 2-amino-3-(5-(2-benzyl-2*H*-tetrazol-5-yl)-3-hydroksyizoksazol-4-yl)propionowy

ANOVA – dwuczynnikowa analiza wariancji

ARV 771 – (2*S*,4*R*)-1-((*S*)-2-(*tert*-butylo)-15-((*S*)-4-(4-chlorofenylo)-2,3,9-trimetylo-6*H*-tieno[3,2-*f*]triazolo[4,3-*a*]diazepino-6-yl)-4,14-diokso-6,10-dioksa-3,13-diazapentadekanoyl)-4-hydroksy-*N*-((*S*)-1-(4-(4-metyltiazol-5-yl)fenylo)etylo)pirolidyno-2-karboksyamid

B3LYP – hybrydowy funkcjonal gęstości (ang. *Becke's Three-Parameter Lee-Yang-Parr*)

BFGS – algorytm Broydena–Fletcher–Goldfarba–Shanno

Boc – grupa *tert*-butoksykarbonylowa

BI-1 – 3-(1-oktanoylopiperydylo-4-yl)-1,3-dihydro-2*H*-benzo[*d*]imidazol-2-on

BIDA – benzyloksydimetylobenzen

BODIPY – borodifluorek difenylopirrometanowy

CGP 3466 – *N*-(dibenzo[*b,f*]azepin-5-yl)-*N'*-propargiloamina

CI – przedział ufności (ang. *confidence interval*)

CKIδ/α – kinaza kazeinowa I

COSY – dwuwymiarowe widmo korelacyjne (ang. *correlation spectroscopy*)

COX-2 – cyklooksygenaza 2

CPL – światło spolaryzowane kołowo (ang. *circularly polarized light*)

CRY1 – kryptochrom 1

DBU – 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en

DCM – dichlorometan

DDQ – 2,3-dichloro-5,6-dicyjano-1,4-benzochinon

DHC – dihydrochalkony

DIPEA – *N,N*-diizopropylloetyloamina

DMAP – 4-(dimetyloamino)pirydyna

DMF – dimetyloformamid

DMSO – dimetylosulfotlenek

DFT – teoria funkcjonałów gęstości (ang. *density functional theory*)

EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*)

FACS – sortowanie komórek aktywowane fluorescencją (ang. *fluorescence activated cell sorting*)

FaDu – linia komórkowa pochodząca z raka płaskonabłonkowego gardła

FBS – płodowa surowica bydlęca

FID – zanik swobodnej precesji (ang. *free induction decay*)

FraC – fragaceatoksyna C

GABA – kwas γ -aminomasłowy

HATU – heksafluorofosforan azabenzotriazol tetrametylo uronium

HEK-293 – linia diploidalnych komórek zarodka ludzkiego

HeLa – linia komórkowa wywodząca się z komórek raka szyjki macicy

HMBC – dwuwymiarowe widmo korelacyjne (ang. *heteronuclear multiple bond correlation*)

HSQC – dwuwymiarowe widmo korelacyjne (ang. *heteronuclear single quantum coherence*)

iGluR2 – jonotropowy receptor glutaminianu 2

IC-50 – połowa maksymalnego stężenia hamującego

IL-1 β – interleukina 1 beta

IL-2 – interleukina 2

IL-2R – receptor interleukiny 2

IL-6 – interleukina 6

iNOS – indukowalna syntaza tlenku azotu (ang. *inducible nitric oxide synthase*)

LED – dioda elektroluminescencyjna (ang. *light-emitting diode*)

LNCaP – linia komórkowa wyizolowana z przerzutów raka gruczołu krokowego do nadobojczykowego węzła chłonnego

MAO-A – monoaminooksydaza-A

MAO-B – monoaminooksydaza-B

MASE – średni absolutny błąd skalowany (ang. *mean absolute scaled error*)

MCF-7 – linia komórkowa ludzkiego raka piersi

MDA-MB-231 – linia komórkowa ludzkiego gruczolaka piersi

mGluR2 – metabotropowy receptor glutaminianu 2

MRI – rezonans magnetyczny (ang. *magnetizing resonance imaging*)

MTS – 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-5-(karboksymetoksyfenylo)-2-(4-sulfofenylo)-2*H*-tetrazol

MTT – bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-2,5-difenylotetrazoliowy

Nalm6 – ludzka prekursorowa linia komórkowa ostrej białaczki limfoblastycznej

NBS – *N*-bromosukcynoimid

NCS – *N*-chlorosukcynoimid

NF- κ B – jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NIR – bliska podczerwień (ang. *near infrared*)

NIS – *N*-jodosukcynoimid

NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne

U2 – linia komórkowa glejaka i gwiaździaka

U2OS – linia komórkowa pochodząca z ludzkiego kostniakomięsaka

P-gp – P-glikoproteina

PBS – sól fizjologiczna buforowana fosforanem (ang. *phosphate buffered saline*)

PC-3 – linia komórkowa ludzkiego raka prostaty

PCM – metoda modelowania efektów solwatacji (ang. *polarizable continuum model*)

PDT – terapia fotodynamiczna (ang. *photodynamic therapy*)

PI3K/Akt – wewnątrzkomórkowy szlak sygnałowy fosfatydyloinozytydo-3-kinaza/Akt

PIDA – (diacetoksyjodo)benzen

PPG – fotousuwalne grupy ochronne (ang. *photoremovable protecting groups*)

PPG – fotopletyzmografia (ang. *photoplethysmography*)

PROTAC – chimera ukierunkowana na proteolizę (ang. *proteolysis targeting chimeras*)

PSS – stan fotostacjonarny (ang. *photostationary state*)

RET – kinaza tyrozynowa

ROR γ – receptor jądrowy ROR gamma

RPMI 1640 – pożywka do hodowli komórkowych

SCF – pole samouzgodnione (ang. *self-consistent field*)

SCS – przesunięcie chemiczne podstawnika (ang. *substituent chemical shift*)

S_EAr – aromatyczna substytucja elektrofilowa

SOD – dysmutaza nadtlenkowa (ang. *superoxide dismutase*)

STAT3 – przetwornik sygnału i aktywator transkrypcji 3 (ang. *signal transducer and activator of transcription 3*)

TEA – trietyloamina

TFA – kwas trifluorooctowy

TNF- α – czynnik martwicy nowotworów alfa (ang. *tumor necrosis factor α*)

TRPC3 – białko pełniące funkcję kanału jonowego (ang. *transient receptor potential cation channel subfamily C member 3*)

ZR-75-1 – linia komórkowa pochodząca ze złośliwego wysięku puchliny brzusznej

Spis treści

Streszczenie Rozprawy	5
Abstract of the Thesis.....	9
Życiorys naukowy	12
Wykaz skrótów i symboli.....	22
1. Wstęp i cel pracy	31
2. Przegląd literaturowy	32
2.1 Koncepcja fotofarmakologii.....	34
2.1.1 Metody terapeutyczne wykorzystujące światło.....	36
2.1.2 Wykorzystanie fotofarmakologii w regulacji funkcji białek.....	40
2.1.3 Fotochromowe przełączniki molekularne	42
2.1.4 Klasy fotochromowych przełączników molekularnych	53
2.1.5 Fotochromowe przełączniki molekularne w medycynie.....	56
2.1.6 Pochodne azobenzenu jako jedna z najlepiej poznanych klas fotochromowych przełączników molekularnych.....	58
2.1.7 Projektowanie i modulacja fotochromowych przełączników molekularnych na przykładzie pochodnych azobenzenu	62
2.1.8 Metody otrzymywania fotochromowych przełączników molekularnych zawierających ugrupowanie azowe	66
2.2 Związki aktywne biologicznie oddziałujące z domeną kolchicynową w tubulinie .	67
2.2.1 Dibenzo[<i>b,f</i>]oksepy	68
2.2.2 Chalkony	72
2.2.3 Kolchicina	76
2.3 Podsumowanie przeglądu literaturowego i podstawy hipotezy badawczej	86
3. Badania własne.....	88
3.1 Wprowadzenie.....	88
3.2 Synteza oraz badanie właściwości chemicznych i fotochemicznych pochodnych dibenzo[<i>b,f</i>]oksepy	89

3.2.1	Badanie właściwości chemicznych pochodnych dibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny	89
3.2.2	Badanie właściwości chemicznych hybrydowych połączeń pochodnych dibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny z bifenylem w obecności różnych aldehydów	93
3.2.3	Synteza azowych pochodnych dibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny — potencjalnych fotochromowych przełączników molekularnych — azologizacja	95
3.2.4	Synteza symetrycznych pochodnych dibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny zawierających więcej niż jedną grupę azową	98
3.2.5	Synteza niesymetrycznych <i>azo</i> -pochodnych dibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny	99
3.2.6	Synteza niesymetrycznych pochodnych azowych dibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny zawierających więcej niż jedną grupę azową	101
3.2.7	Analiza fotochemiczna azowych pochodnych dibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny	102
3.2.8	Modelowanie molekularne azowych pochodnych dibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny	114
3.2.9	Dyskusja	117
3.3	Synteza oraz badanie właściwości fotochemicznych i biologicznych azowych pochodnych chalkonu	119
3.3.1	Synteza azowych pochodnych chalkonu	120
3.3.2	Analiza fotochemiczna azowych pochodnych chalkonu	121
3.3.3	Modelowanie molekularne azowych pochodnych chalkonu	129
3.3.4	Badania biologiczne azowych pochodnych chalkonu	131
3.3.5	Dyskusja	137
3.4	Synteza oraz badanie właściwości fotochemicznych i biologicznych azowych pochodnych kolchicyny	139
3.4.1	Synteza azowych pochodnych kolchicyny	139
3.4.2	Analiza fotochemiczna azowych pochodnych kolchicyny	142
3.4.3	Modelowanie molekularne azowych pochodnych kolchicyny	150
3.4.4	Badania biologiczne azowych pochodnych kolchicyny	152
3.4.5	Dyskusja	154
4.	Podsumowanie badań własnych i wnioski końcowe	156
4.1	Założenia i podstawy badań	156

4.2	Osiągnięcia w obszarze przeprowadzonych badań	156
4.2.1	Pochodne dibenzo[<i>b,f</i>]oksepy	156
4.2.2	Azowe pochodne chalkonu	158
4.2.3	Azowe pochodne kolchicyny	159
4.3	Wnioski końcowe	159
5.	Część eksperymentalna	163
5.1	Synteza	163
5.2	Badania fotochemiczne	164
5.2.1	Analiza składu stanu fotostacjonarnego (PSS) metodą ¹ H NMR lub ¹⁹ F NMR 164	
5.2.2	Badania fotoizomeryzacji metodą spektroskopii UV–Vis	164
5.2.3	Badanie stabilności fotochemicznej	165
5.2.4	Badanie kinetyki izomeryzacji <i>Z/E</i>	165
5.3	Aspekty obliczeniowe i modelowanie molekularne.....	165
5.3.1	Obliczone struktury	165
5.3.2	Orbitale molekularne.....	177
5.3.3	Dokowanie molekularne	178
5.4	Badania biologiczne	179
5.4.1	Analiza proliferacji komórkowej	179
5.4.2	Analiza cyklu komórkowego.....	180
5.4.3	Analiza statystyczna	181
5.5	Otrzymywanie pochodnych dibenzo[<i>b,f</i>]oksepy	182
5.5.1	Otrzymywanie metoksyowych pochodnych 3-nitrodibenzo[<i>b,f</i>]oksepy 1a–e 182	
5.5.2	Otrzymywanie oligomerycznych połączeń metoksyowych pochodnych 3-nitrodibenzo[<i>b,f</i>]oksepy z łącznikiem metylenowym 2a, 2c–e.....	182
5.5.3	Otrzymywanie dimerów 6-metoksy-3-nitrodibenzo[<i>b,f</i>]oksepy z różnymi łącznikami 3a–e, 3f	186

5.5.4	Otrzymywanie hybrydowych połączeń metoksyowych pochodnych 3-nitrodibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny z 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylem z różnymi łącznikami 4a–e, 4f–j	192
5.5.5	Otrzymywanie metoksyowych pochodnych 10,11-dihydrodibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny-3-aminy 5a–b, 5d.....	204
5.5.6	Otrzymywanie metoksyowych pochodnych dibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny-3-aminy 6a–b, 6d	207
5.5.7	Otrzymywanie pochodnych 1,3-diamino-4-fenyletylobenzenu 8a–g	211
5.5.8	Otrzymywanie azowych pochodnych dibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny 9a–h.....	218
5.5.9	Otrzymywanie symetrycznych pochodnych dibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny zawierających więcej niż jedno ugrupowanie azowe 10a–b, 11, 12	225
5.5.10	Otrzymywanie połączenia (<i>E</i>)-bis(6-metoksydibenzo[<i>b,f</i>]oksepin-3-yl)diazenu z 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylem i łącznikiem metylenowym 13	229
5.5.11	Otrzymywanie niesymetrycznych <i>azo</i> -pochodnych dibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny po reakcji z 4-fluoroaniliną 14a–b, 14e–g.....	230
5.5.12	Otrzymywanie oligomerycznych połączeń metoksyowych pochodnych dibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny-3-aminy z różnymi łącznikami 15a–b	236
5.5.13	Otrzymywanie niesymetrycznych <i>azo</i> -pochodnych dibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny zawierających więcej niż jedno ugrupowanie azowe 16a–b	238
5.6	Otrzymywanie azowych pochodnych chalkonu 21a–l.....	240
5.7	Otrzymywanie azowych pochodnych kolchicyny 29a–d, 29e–h	254
5.7.1	Otrzymywanie <i>N</i> -deacetylokolchicyny 25	254
5.7.2	Otrzymywanie karboksylowych pochodnych chloroazobenzenów 28a–d, 28e–h	255
5.7.3	Otrzymywanie azowych pochodnych kolchicyny 29a–d, 29e–h	255
6.	Bibliografia.....	264
7.	Spis rysunków	275
8.	Spis tabel	285
9.	Spis schematów	287

1. Wstęp i cel pracy

Współczesna farmakoterapia opiera się głównie na wykorzystaniu związków bioaktywnych, które oddziałują z wybranymi celami molekularnymi organizmu, takimi jak enzymy, kanały jonowe, białka transportowe czy receptory. Pomimo istotnych postępów w rozwoju leków, problem ich niskiej selektywności pozostaje jednym z najpoważniejszych wyzwań medycyny XXI wieku. Substancje lecznicze, wykazujące działanie systemowe, nierzadko powodują toksyczne skutki uboczne, ograniczając ich zastosowanie i skuteczność. Ponadto, nieprecyzyjne oddziaływanie leków może przyczyniać się do rozwoju lekooporności, szczególnie w przypadku nowotworów oraz szczepów bakterii opornych na antybiotyki.

W odpowiedzi na te ograniczenia, dynamicznie rozwija się interdyscyplinarna dziedzina nauki — fotofarmakologia, która oferuje możliwość precyzyjnej, czasowo i przestrzennie kontrolowanej aktywacji leków z wykorzystaniem światła. Zastosowanie związków fotokontrolowanych, tj. takich, których aktywność biologiczna zależy od długości fali elektromagnetycznej w zakresie widzialnym, umożliwia minimalizację skutków ubocznych i maksymalizację efektu terapeutycznego. Kluczowym komponentem tej technologii są fotochromowe przełączniki molekularne — cząsteczki zdolne do odwracalnych zmian strukturalnych indukowanych fotonami. Zmiany te mogą prowadzić do transformacji między formą aktywną a nieaktywną, dając możliwość dokładnej regulacji aktywności leku w organizmie.

Wśród wielu struktur wykorzystywanych do tworzenia fotoaktywnych cząsteczek, szczególne miejsce zajmują pochodne azobenzenu — związki zdolne do odwracalnej izomeryzacji *E/Z* pod wpływem światła. Integracja biologicznie aktywnych cząsteczek z fragmentami zawierającymi grupy azowe, bądź ich azologizacja, otwiera nowe możliwości w otrzymywaniu związków o pożądanej fotoaktywności. Szkielet dibenzo[*b,f*]oksepiny oraz struktury chalkonowe wykazujące powinowactwo do domeny kolchicynowej α,β -tubuliny, cechują się wysokim potencjałem przeciwnowotworowym i stanowią doskonałą bazę do konstruowania molekularnych przełączników światłoczułych.

Głównym celem niniejszej rozprawy było projektowanie, synteza oraz charakterystyka nowych potencjalnych fotochromowych przełączników molekularnych opartych na szkieletach dibenzo[*b,f*]oksepiny, chalkonu i kolchicyny. Przeprowadzone badania miały na celu otrzymanie i analizę tych pochodnych jako zaawansowanych struktur fotoprzełączalnych o możliwym zastosowaniu w terapii nowotworowej oraz jako narzędzi do precyzyjnej regulacji procesów biologicznych światłem.

2. Przegląd literaturowy

W zdecydowanej większości współcześnie stosowanych terapii medycznych wykorzystuje się związki bioaktywne. Substancje te posiadają zdolność wywoływania odpowiedzi farmakologicznej poprzez specyficzne oddziaływanie z molekularnymi celami terapeutycznymi (miejscami docelowymi) obecnymi w komórkach organizmu ludzkiego. Do tych struktur zalicza się między innymi kanały jonowe, enzymy, białka transportowe oraz receptory [1]. Farmakoterapia umożliwia leczenie schorzeń oraz łagodzenie ich objawów za pomocą farmaceutyków [2]. Skuteczność tej metody leczenia jest istotnie ograniczana przez niską selektywność wielu stosowanych substancji, co skutkuje występowaniem ogólnoustrojowej toksyczności oraz rozwojem oporności wśród patogennych szczepów bakteryjnych, prowadząc do poważnych działań niepożądanych, a w skrajnych przypadkach do rozwoju lekooporności [2]. Procesy te generują zarówno krótkotrwałe, jak i średnio- oraz długoterminowe skutki uboczne, znacząco ograniczając skuteczność terapeutyczną leku w miejscu jego zamierzonego działania [3].

W celu zwiększenia selektywności farmakoterapii opracowano kilka strategii, obejmujących, między innymi:

- Unikanie reakcji krzyżowych w trakcie stosowania związków bioaktywnych oddziałujących na wybrane cele molekularne [4];
- Precyzyjne ukierunkowanie leków na miejsca docelowe ograniczone do odpowiednich narządów lub tkanek, bądź wykazujące nadekspresję w określonych stanach patologicznych, pozwala ograniczyć działanie poza celem terapeutycznym, zmniejszając tym samym ryzyko działań niepożądanych oraz, na przykład w immunoterapii, ryzyko przerzutów [5];
- Miejscowe podawanie leku, jak ma to miejsce między innymi w terapii okulistycznej [6].

Problem niskiej selektywności leków wynika w dużej mierze z braku kontroli nad ich aktywnością zarówno w czasie, jak i w przestrzeni. W wielu przypadkach osiągnięcie wysokiej selektywności pozostaje niemożliwe, co związane jest z szerokim rozmieszczeniem celów molekularnych w organizmie, zarówno w tkankach zmienionych chorobowo, jak i zdrowych [5]. Przykładem może być receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR), który, pomimo nadekspresji w nowotworach głowy i szyi, występuje również w prawidłowych tkankach nabłonkowych [7]. Fakt ten istotnie ogranicza możliwość zwiększenia dawki cetuksymabu

stosowanego do leczenia raka jelita grubego oraz nowotworów głowy i szyi [8]. Analogicznie, niską selektywność wykazują cytotoksyczne środki przeciwnowotworowe, takie jak alkaloidy barwinka różyczkowego (źródła winblastyny i winkrystyny) czy taksany (leki chemioterapeutyczne stosowane w leczeniu raka piersi). Pomimo szerokiego zastosowania w terapii nowotworowej, środki te są „obarczone” wysokim ryzykiem działań niepożądanych, wynikających z ich mechanizmu działania polegającego na zaburzaniu procesu mitozy [9], co wpływa również na proliferujące komórki zdrowe, prowadząc do skutków ubocznych takich jak łysienie [10], zapalenie błon śluzowych [11] oraz niedokrwistość [12].

Dodatkowo, ograniczona selektywność leków skutkuje zmniejszeniem dopuszczalnego poziomu toksyczności, zawężając tym samym okno terapeutyczne i zmuszając do stosowania suboptymalnych dawek, co ogranicza wykorzystanie ich pełnego potencjału terapeutycznego [13]. Ponadto, szacuje się, iż ponad 85% związków o niskiej masie cząsteczkowej [14] zostaje wyeliminowanych na etapie badań klinicznych właśnie z powodu niekorzystnego stosunku skuteczności do toksyczności. W konsekwencji wiele potencjalnie aktywnych cząsteczek, mogących znaleźć zastosowanie w leczeniu nieuleczalnych schorzeń, jest odrzucanych wyłącznie na podstawie niewystarczającej selektywności działania.

Kolejnym istotnym wyzwaniem współczesnej farmakologii jest narastająca oporność na leki. Szczególnie niepokojące jest zjawisko oporności wielu szczepów bakterii na środki przeciwbakteryjne [15]. Zjawisko to w dużej mierze wynika z nadmiernego i niewłaściwego stosowania antybiotyków w środowiskach społecznych oraz szpitalnych, co prowadzi do eliminacji wrażliwych bakterii oraz selektywnej presji sprzyjającej namnażaniu się szczepów opornych. Proces ten można również rozpatrywać w kontekście ograniczonej selektywności antybiotyków, które oddziałują nie tylko na patogeny zakażające organizm ludzki, lecz także na mikroorganizmy bytujące w środowisku [2].

W związku z powyższym, kluczowe znaczenie mają strategie umożliwiające selektywną, czasowo i przestrzennie kontrolowaną aktywację terapeutyku w obrębie miejsca docelowego. W ostatnich latach intensywnie rozwijane są nowatorskie metody terapeutyczne, zapewniające precyzyjne sterowanie dynamiką i lokalizacją działania związków bioaktywnych. Jednym z najbardziej obiecujących kierunków rozwoju jest fotofarmakologia.

2.1 Koncepcja fotofarmakologii

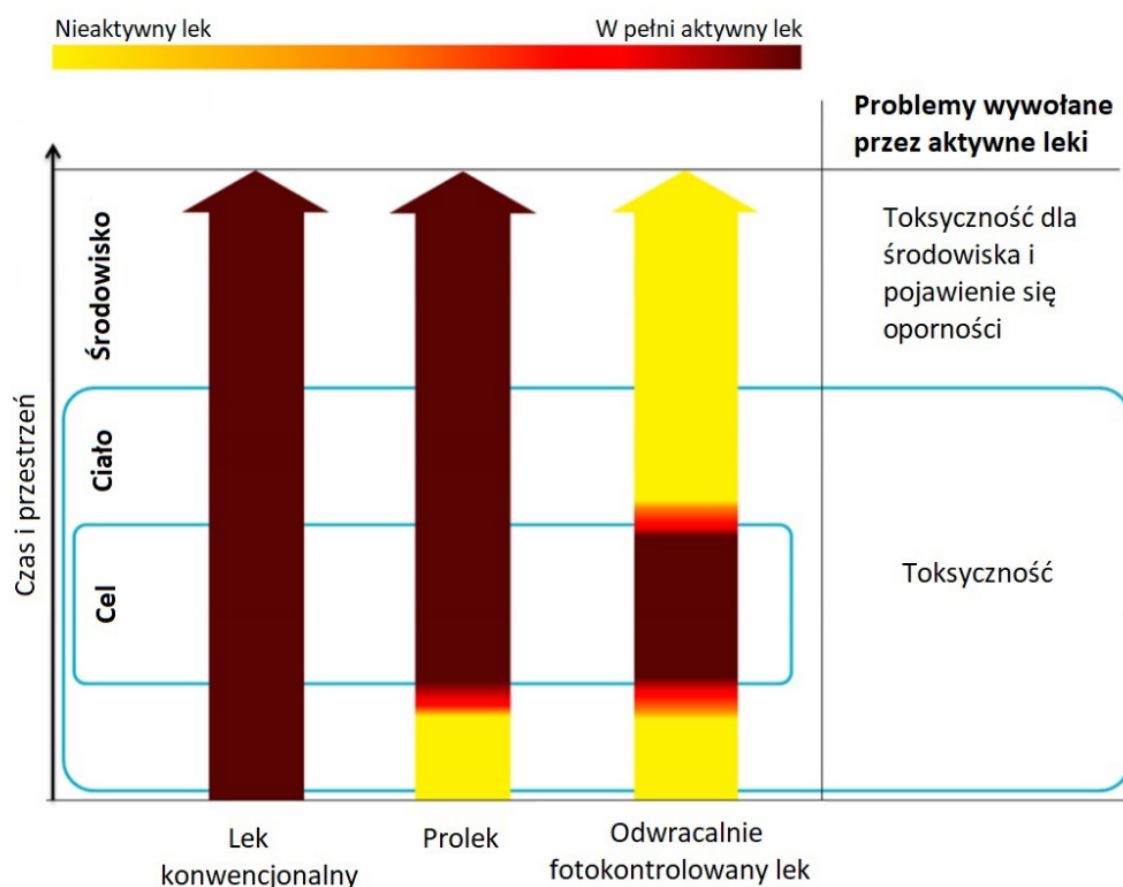
Fotofarmakologia wyłoniła się jako dziedzina na styku chemii organicznej, fotochemii i chemii medycznej [2, 16–17]. Zasada fotofarmakologii opiera się na włączaniu grup reagujących na światło do istniejących leków, umożliwiając im reagowanie na światło na poziomie strukturalnym. Fotofarmakologia stanowi interdyscyplinarną dziedzinę nauki zajmującą się projektowaniem, syntezą, charakterystyką oraz zastosowaniem związków terapeutycznych, których aktywność biologiczna może być modulowana za pomocą światła. Technologia ta umożliwia wysoce selektywną aktywację leków wyłącznie w obrębie zmienionych chorobowo tkanek, minimalizując ryzyko działań niepożądanych związanych z ich działaniem poza miejscem docelowym [8].

Światło widzialne (część promieniowania elektromagnetycznego w zakresie 380–780 nm) stanowi doskonały czynnik aktywujący ze względu na swoje unikalne właściwości. Wyróżnia się wysokim stopniem ortogonalności względem procesów chemicznych i biochemicznych, a w przeciwieństwie do chemicznych regulatorów biologicznych nie powoduje zanieczyszczeń badanego układu i charakteryzuje się niską, często pomijalną toksycznością. Dodatkowo światło umożliwia niezwykle precyzyjne dostarczanie sygnału aktywującego zarówno w wymiarze przestrzennym, jak i czasowym, co jest niezbędne do skutecznego sterowania działaniem bioaktywnych cząsteczek. Istnieje również możliwość modulacji parametrów światła, takich jak intensywność czy długość fali, co dodatkowo zwiększa kontrolę nad procesem aktywacji [2].

Dzięki powyższym właściwościom światło oferuje wyjątkowo wysoką rozdzielczość czasoprzestrzenną oraz nieinwazyjny charakter działania, umożliwiając zewnętrzną aktywację cząsteczek bez ryzyka zanieczyszczenia próbki [17].

Na **rysunku 1** i **tabeli 1** przedstawiono schematyczne porównanie aktywności konwencjonalnych leków, proleków oraz leków odwracalnie fotokontrolowanych w odniesieniu do przestrzeni i czasu. Konwencjonalne leki wykazują aktywność w całym organizmie pacjenta przez cały okres w nim obecności, co może prowadzić do działań niepożądanych, a po wydaleniu — do negatywnego wpływu na środowisko oraz rozwoju patogenów opornych na leczenie. Proleki umożliwiają częściowe ograniczenie tego problemu poprzez opóźnione uwalnianie aktywnej formy związku. Natomiast pełną eliminację działań

niepożądanych oraz wpływu na środowisko umożliwia zastosowanie leków, których aktywność jest odwracalnie kontrolowana za pomocą światła, zarówno w czasie, jak i w przestrzeni [2].



Rysunek 1. Porównanie aktywności leków konwencjonalnych, proleków i leków fotokontrolowanych [2].

Tabela 1. Porównanie właściwości leków konwencjonalnych, proleków i leków fotokontrolowanych.

Właściwość	Konwencjonalne leki	Proleki	Leki fotokontrolowane
Aktywność przestrzenna	Cały organizm	Zwiększona w miejscu aktywacji	Precyzyjna w miejscu docelowym
Aktywność czasowa	Stała, od momentu podania do eliminacji	Opóźniona, zależna od metabolizmu	Dynamiczna, sterowana światłem
Selektywność działania	Niska	Średnia	Wysoka
Ryzyko działań niepożądanych	Wysokie	Ograniczone	Minimalne

Wpływ na środowisko	Wysoki (pozostałości leków)	Umiarkowany	Niski (kontrolowana aktywność)
Sterowalność	Brak	Ograniczona (przez szlaki metaboliczne)	Wysoka (światłem: długość fali, intensywność, czas)
Przykłady	Antybiotyki, klasyczne cytostatyki	Leki aktywowane enzymatycznie	Fotomodulowane środki przeciwnowotworowe, fotouczulacze

2.1.1 Metody terapeutyczne wykorzystujące światło

Fotofarmakologia (rys. 2a), pomimo iż na chwilę obecną nie osiągnęła etapu wdrożenia klinicznego, postrzegana jest przez środowisko medyczne jako perspektywiczna strategia terapeutyczna w medycynie przyszłości. Wynika to z możliwości precyzyjnej, fotokontrolowanej modulacji aktywności leków w organizmie, umożliwiającej selektywne oddziaływanie na wybrane cele molekularne. Warto jednak zaznaczyć, że fotofarmakologia nie stanowi pierwszego przypadku wykorzystania światła w zastosowaniach medycznych. Do najistotniejszych wcześniej rozwiniętych metod należą [8]:

a) **Terapia fotodynamiczna (PDT, ang. *photodynamic therapy*) (rys. 2b)** [8], [18] — metoda terapeutyczna oparta na generowaniu singletowego tlenu (tlen cząsteczkowy O_2 na najniższym stopniu wzbudzenia) oraz wolnych rodników pod wpływem światła. Tlen singletowy jest aktywniejszy od tlenu trypletowego, ale wiąże się to z jego mniejszą trwałością. Taka postać tlenu oddziałuje z błonami komórkowymi oraz strukturami wewnątrzkomórkowymi, indukując autolizę komórek. Ze względu na krótki czas życia singletowego tlenu jego działanie ograniczone jest do niewielkiej objętości przestrzennej, co skutkuje zwiększoną selektywnością efektu terapeutycznego [19]. Niemniej jednak, pełna selektywność nie jest osiągalna, a uszkodzenia zdrowych tkanek są możliwe. PDT znajduje zastosowanie kliniczne w leczeniu schorzeń dermatologicznych i onkologicznych, m.in. w terapii raka podstawnokomórkowego, czerniaka złośliwego, mięsaka Kaposiego oraz choroby Bowena [8]. Zastosowania te obejmują głównie zmiany położone powierzchownie, co ogranicza efektywność PDT w leczeniu nowotworów głębokotkankowych. Technologie opracowane dla PDT mogą jednak znaleźć zastosowanie w bardziej selektywnych terapiach fotofarmakologicznych [8, 18].

b) **Optogenetyka** (rys. 2c) [8] — zaawansowana technika biologii molekularnej i neurobiologii, polegająca na wykorzystaniu światła do kontrolowania aktywności zmodyfikowanych genetycznie kanałów jonowych, wywodzących się z fotoczułych rodopsyn [20–22]. Wektorowa manipulacja genomem umożliwia ekspresję tych białek w neuronach, co otwiera nowe możliwości terapeutyczne, np. w leczeniu choroby Parkinsona. Jednak konieczność stosowania technologii inżynierii genetycznej znacząco ogranicza potencjał kliniczny optogenetyki w porównaniu z podejściem fotofarmakologicznym [8].

c) **Chronofotofarmakologia** (rys. 3) — dyscyplina łącząca elementy chronobiologii, zajmującej się badaniem rytmów biologicznych, oraz fotofarmakologii, koncentrującej się na modulacji aktywności biologicznej związków chemicznych za pomocą światła [23].

Chronofotofarmakologia umożliwia przestrzenno-czasową kontrolę nad funkcjonowaniem rytmów okołodobowych organizmu poprzez stosowanie fotokontrolowanych cząsteczek bioaktywnych [23]. Pozwala to na precyzyjną modulację procesów biologicznych zależnych od zegara molekularnego poprzez selektywną aktywację lub dezaktywację wybranych ścieżek sygnałowych za pomocą światła o określonej długości fali (**rys. 3**) [23–24].

Strategie stosowane w ramach chronofotofarmakologii można podzielić na dwa główne podejścia:

– Systemy nieodwracalne, oparte na zastosowaniu fotousuwalnych grup ochronnych (PPG, ang. *photoremovable protecting groups*), które, po ekspozycji na światło, trwale aktywują związek bioaktywny [23, 25–27];

– Systemy odwracalne, wykorzystujące fotochromowe przełączniki molekularne (np. pochodne azobenzenu), które umożliwiają wielokrotne przełączanie cząsteczki pomiędzy formami aktywną i nieaktywną poprzez naprzemienną ekspozycję na światło o różnych długościach fal (np. światło zielone i fioletowe) [16, 23].

W praktyce pozwala to na uzyskanie zewnętrznej, dynamicznej i odwracalnej kontroli nad kluczowymi elementami molekularnymi regulującymi rytm okołodobowy.

Chronofotofarmakologia umożliwia wpływanie na molekularne mechanizmy zegara biologicznego poprzez światłoczułe modulatory oddziałujące na istotne białka, takie jak:

- CK1 δ/α (kinazy odpowiedzialne za fosforylację elementów zegara molekularnego) [23, 28–31];
- CRY1 (białko kryptochromowe hamujące aktywność zegara) [23, 32];
- ROR γ (receptor jądrowy regulujący ekspresję genów zegarowych) [23].

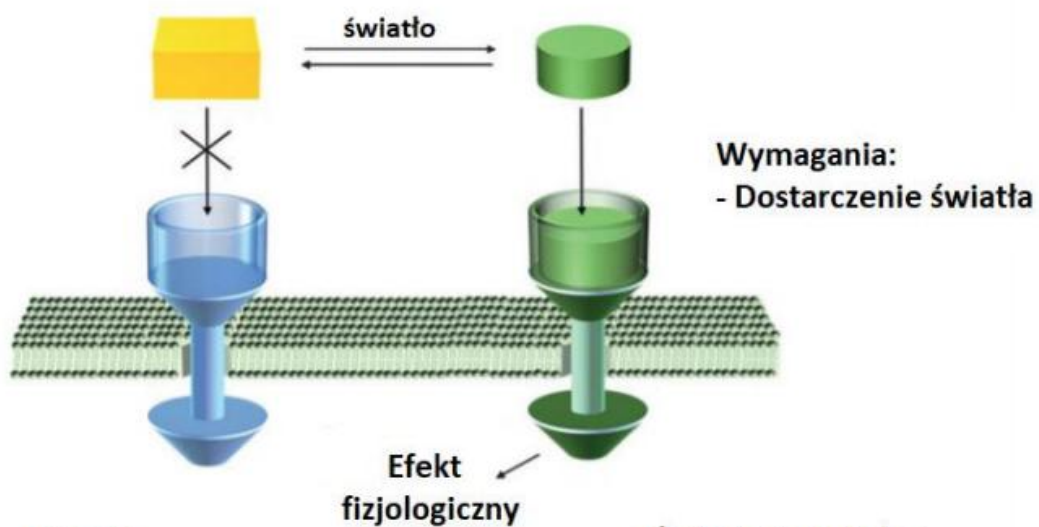
Światło, w odpowiednio dobranych warunkach czasowych, umożliwia wydłużenie lub skrócenie okresu rytmu okołodobowego, a także zmianę fazy rytmu, co ma zastosowanie w leczeniu zaburzeń takich jak jet lag (zespół nagłej zmiany strefy czasowej) [23, 28], bezsenność [23, 33] czy zaburzenia afektywne sezonowe [23].

Skuteczność tej strategii została udokumentowana zarówno na poziomie hodowli komórkowych (np. na liniach komórkowych U2OS pochodzących z kostniakomięsaka) [23, 30], eksplantatów tkankowych (np. śledziona, jądro nadskrzyżowaniowe myszy) [23, 28, 30], jak również całego organizmu (np. larwy danio pręgowanego) [23, 28]. W celu zapewnienia kompatybilności biologicznej oraz uzyskania głębszej penetracji tkanek, preferowane jest wykorzystanie światła z zakresu widzialnego, w przeciwieństwie do światła ultrafioletowego.

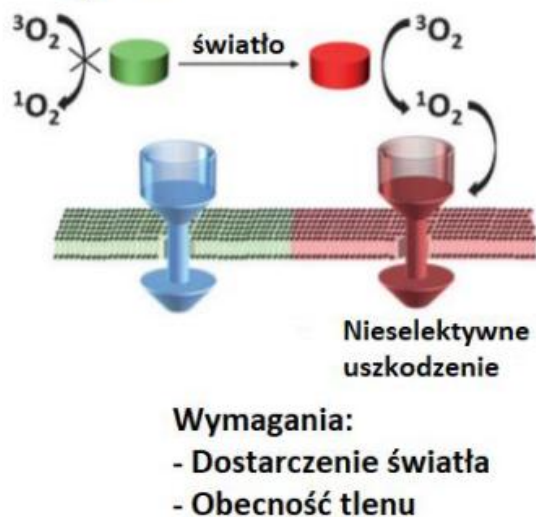
Podsumowując chronofotofarmakologia oferuje możliwość precyzyjnej i nieinwazyjnej regulacji rytmów biologicznych, minimalizacji efektów ubocznych wynikających z nieselektywnego działania farmakoterapii, a także możliwość opracowania nowych strategii leczenia chorób związanych z zaburzeniami rytmów okołodobowych, takich jak nowotwory, choroby neurodegeneracyjne czy zaburzenia snu. Technologia ta otwiera nowe perspektywy dla medycyny spersonalizowanej, umożliwiając dostosowanie terapii nie tylko do odpowiedniego miejsca w organizmie, ale również do optymalnego czasu ich działania.

d) **Inne strategie terapeutyczne** [8] — obejmujące zastosowanie fotoaktywnych kompleksów metali [34], fotoklatkowych związków bioaktywnych [35] oraz fotouczulaczy, takich jak klinicznie stosowane pochodne psoralenu [36].

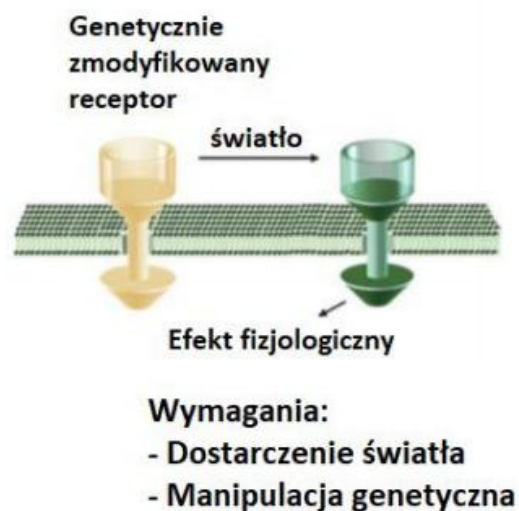
a) Fotofarmakologia



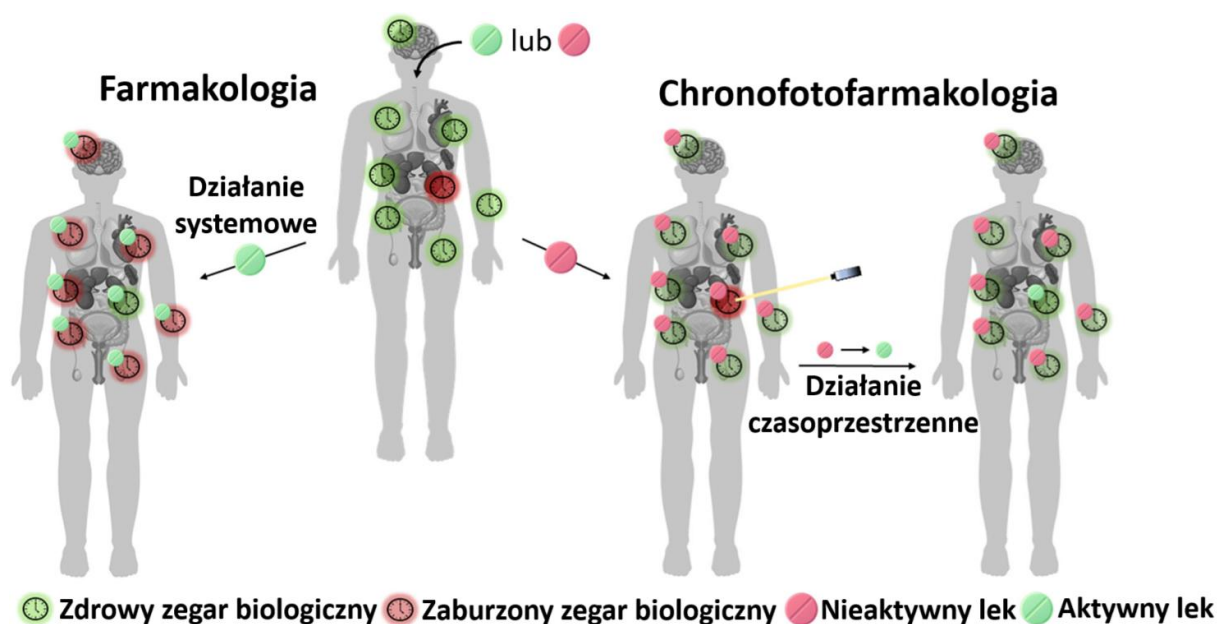
b) PDT



c) Optogenetyka



Rysunek 2. Zilustrowanie podstawowych zasad dotyczących metod leczenia kontrolowanych światłem na przykładzie receptora błony komórkowej: a) fotofarmakologia; b) PDT; c) optogenetyka [8].



Rysunek 3. Zaburzenie obwodowego zegara okołodobowego oraz dwa podejścia do przywracania prawidłowych rytmów: farmakologiczne (działanie systemowe) oraz chronofotofarmakologiczne (działanie czasoprzestrzenne) [23].

2.1.2 Wykorzystanie fotofarmakologii w regulacji funkcji białek

Fotofarmakologia to obiecująca i innowacyjna strategia umożliwiająca precyzyjną, nieinwazyjną kontrolę funkcji białek za pomocą światłoczułych modyfikacji chemicznych. Przykładem takiego działania jest modyfikacja toksyny tworzącej pory — fragaceatoksyny C (FraC) — w taki sposób, aby reagowała na światło widzialne dzięki kowalencyjnemu przyłączeniu rozpuszczalnego w wodzie, tetra-*orto*-fluorowanego przełącznika azobenzenowego [37–38]. Modyfikacja ta umożliwia odwracalną modulację aktywności cytolitycznej FraC w wyniku fotokonwersji między konfiguracjami *E* i *Z* (rys. 4) [37]. Fotoprzełącznik azobenzenowy został zsyntetyzowany z wykorzystaniem reakcji aromatycznej substytucji nukleofilowej, co umożliwiło wprowadzenie grupy sulfonianowej zwiększającej rozpuszczalność w wodzie [37]. Konfiguracja *E*, indukowana przez światło niebieskie (430 nm), utrzymuje FraC w stanie nieaktywnym, uniemożliwiając jego wiązanie z błoną lipidową. Z kolei naświetlanie światłem zielonym (530 nm) powoduje przejście do formy *Z*, która umożliwia FraC wiązanie z błoną komórkową, oligomeryzację i tworzenie porów, prowadząc do lizy komórek (rys. 4) [37, 39]. Mechanizm ten został potwierdzony *in vitro* i ujawnił istotne różnice w aktywności hemolitycznej pomiędzy poszczególnymi stanami izomerycznymi. Co istotne, podejście to rozszerzono na ludzkie komórki nowotworowe — linię FaDu (rak

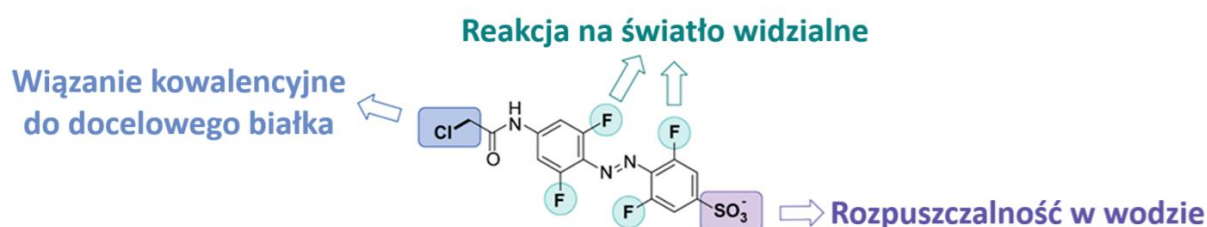
płaskonabłonkowy gardła dolnego) — gdzie aktywowana forma Z FraC wykazywała wyższą aktywność cytolityczną w porównaniu z formą *E* [37]. Na podstawie tego potwierdzono potencjał tej technologii jako fotokontrolowanego narzędzia terapeutycznego w leczeniu nowotworów. Przedstawione badania stanowią pierwszy znany przypadek pełnej kontroli aktywności cytolitycznej białka przy użyciu światła widzialnego, ukierunkowanej na selektywne niszczenie komórek rakowych.

(a) Kontrola toksyczności białek przy pomocy światła widzialnego

(b) Badane mutacje



(c) Budowa fotoprzełącznika



Rysunek 4. (a) Schematyczne przedstawienie monomeru FraC znakowanego przełącznikiem azobenzenowym; izomer *E* hamuje wiązanie monomeru z dwuwarstwą lipidową, natomiast po naświetleniu światłem zielonym powstały izomer *Z* umożliwia wiązanie z błoną oraz dalsze formowanie oligomerycznego kompleksu porowego w docelowej błonie (żółtej); (b) Schematyczne przedstawienie monomeru FraC wbudowanego w docelową błonę, gdzie zaznaczono reszty aminokwasowe zmutowane do cysteiny (szare sfery), a także cząsteczki sfingomieliny stabilizujące por (pomarańczowe); (c) Elementy konstrukcyjne docelowego przełącznika, reagującego na światło widzialne, zawierającego grupę zwiększającą rozpuszczalność w wodzie oraz część do kowalencyjnej modyfikacji białek [37].

2.1.3 Fotochromowe przełączniki molekularne

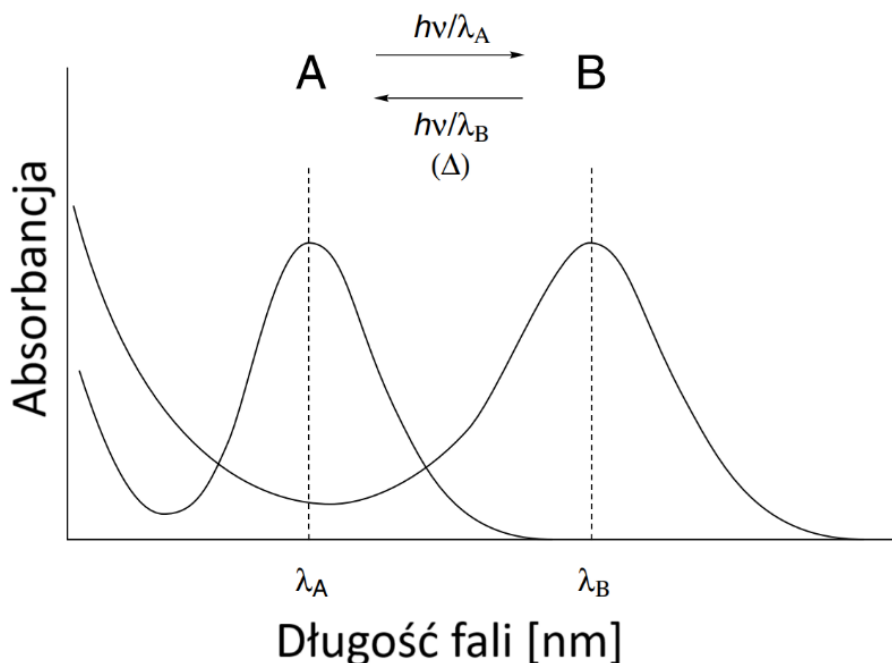
Jak już wspomniano w poprzednim podrozdziale, aby cząsteczka aktywna reagowała z dostarczonym z zewnątrz światłem wbudowuje się w nią element przełączalny lub łączy z przełącznikiem molekularnym. Molekularne przełączniki to cząsteczki zdolne do odwracalnego przechodzenia pomiędzy co najmniej dwoma stanami stabilnymi termodynamicznie, z których każdy charakteryzuje się unikalną strukturą przestrzenną. Przełączenie pomiędzy tymi stanami może być inicjowane różnorodnymi bodźcami zewnętrznymi, takimi jak zmiana pH, temperatura, długość fali promieniowania elektromagnetycznego czy też natężenie prądu elektrycznego [40].

Każdy z tych stanów, będąc odmiennie ukształtowaną strukturą chemiczną, wykazuje również różne właściwości fizykochemiczne, co przekłada się na ich zastosowanie w zaawansowanych systemach molekularnych [41]. Ze względu na mechanizmy działania, przełączniki molekularne można sklasyfikować w kilku głównych kategoriach:

1. Przełączniki typu gość–gospodarz, w których różnice w budowie przekładają się na odmienne powinowactwo do cząsteczki gościa.
2. Przełączniki zawierające struktury rotaksanów i katenanów, w których elementy makrocycliczne mogą poruszać się względem siebie, co prowadzi do zmiany właściwości całego układu.
3. Fotochromowe przełączniki molekularne, które zmieniają swoją konfigurację pod wpływem światła, zazwyczaj w sposób całkowicie odwracalny.

W fotofarmakologii szczególne znaczenie mają fotochromowe przełączniki molekularne, będące biologicznie aktywnymi związkami zdolnymi do zmiany swojej konfiguracji po absorpcji fotonu [2, 8, 17]. Ponieważ ich aktywność biologiczna zależy bezpośrednio od struktury chemicznej, kontrola tej struktury za pomocą światła umożliwia precyzyjne sterowanie właściwościami farmakologicznymi, zarówno farmakokinetycznymi, jak i farmakodynamicznymi [8]. Takie przełączniki występują również w naturze — przykładem mogą być naturalne procesy biologiczne inicjowane przez światło, jak np. fotosynteza [17, 42]. W mechanizmach tych kluczową rolę odgrywa chromofor, który po absorpcji światła ulega przemianie, wywołując zmianę konformacyjną powiązanego białka. Dzięki temu światło może działać jako selektywny i odwracalny czynnik kontrolny w regulacji funkcji biomolekuł [43].

Termin „fotochromowy przełącznik molekularny” wywodzi się z pojęcia fotochromizmu, czyli odwracalnego procesu przejścia związku chemicznego pomiędzy dwoma formami izomerycznymi pod wpływem światła. Przejściu temu towarzyszą zmiany w widmach absorpcyjnych obu form, co może być obserwowane m.in. jako zmiana koloru substancji (rys. 5) [44].

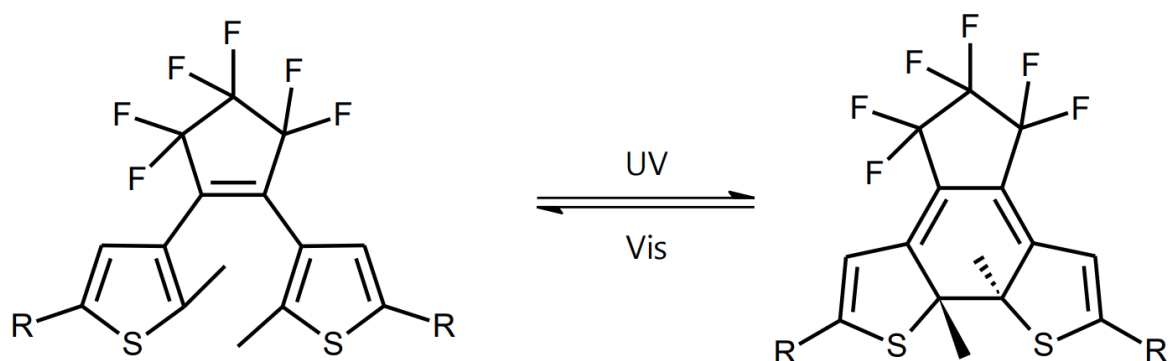


Rysunek 5. Maksima absorpcji charakteryzujące dwa termodynamicznie stabilne stany fotochromowego przełącznika molekularnego.

Warto zaznaczyć, że oprócz światła, także inne czynniki fizykochemiczne, takie jak zmiana pH, temperatury czy pola elektrycznego, mogą inicjować przełączenia molekularne [40]. Efektem tych „przełączeń” są m.in. zmiany takich parametrów jak: moment dipolowy, przewodnictwo elektryczne, właściwości optyczne (np. współczynnik załamania światła), a nawet potencjał redoks [45]. Zmiana koloru przełącznika stanowi często bezpośredni, wizualny wskaźnik jego aktywnego stanu, co pozwala na monitorowanie jego działania bez użycia zaawansowanych metod pomiarowych [44].

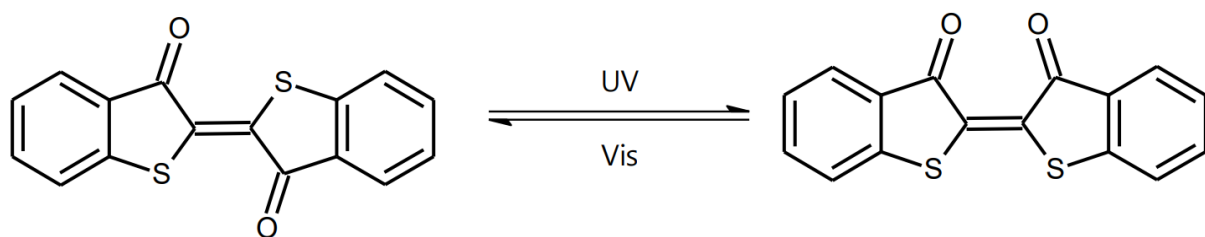
Zmiana izomeryczna przełączników molekularnych może przebiegać na różne sposoby, zależnie od ich struktury chemicznej i typu reakcji indukowanej bodźcem zewnętrznym. Do najczęstszych mechanizmów należą:

a) Otwarcie i zamknięcie pierścienia — w tym mechanizmie izomeryzacja odbywa się na drodze fotoinicjowanej reakcji elektrocyklicznej, prowadzącej do cyklizacji lub odwrotnej transformacji cząsteczki (**schem. 1**) [44].

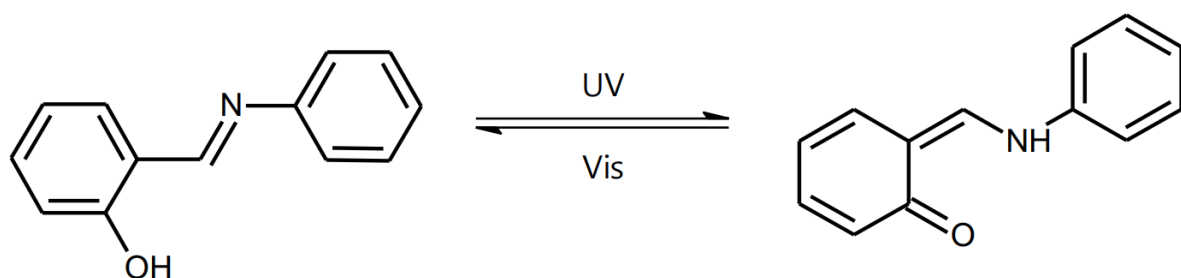


Schemat 1. Zamykanie/otwieranie pierścienia w ditiofenoetenach.

b) Przemiana konfiguracyjna *E/Z* — zmiana geometrii wokół wiązania podwójnego zachodząca pod wpływem światła, która może także obejmować wewnątrzcząsteczkowy transfer protonu (**schem. 2**, **schem. 3**) [44].

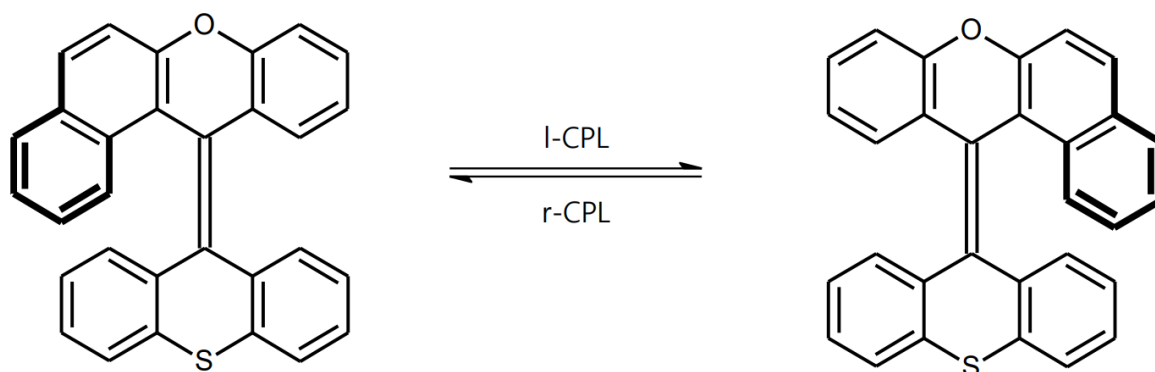


Schemat 2. Zmiana konfiguracji *E/Z* w tioindygo.



Schemat 3. Zmiana konfiguracji *E/Z* wraz z wewnątrzcząsteczkową migracją wodoru (tautomeria keto-enolowa) w *N*-salicylidenoanilinie.

c) Zmiana konfiguracji absolutnej — dotyczy związków chiralnych zawierających oś chiralną. W tym przypadku konwersja pomiędzy izomerami zachodzi z użyciem światła spolaryzowanego kołowo (CPL), co jest unikalne dla tego typu układów (**schem. 4**) [44].



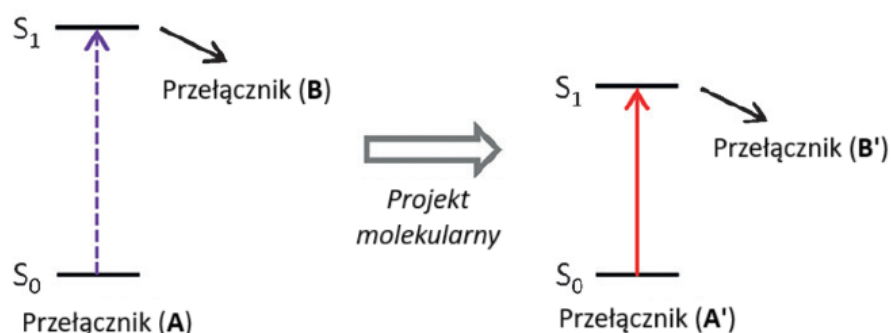
Schemat 4. Zmiana konfiguracji absolutnej w związkach chiralnooptycznych.

W literaturze opisano wiele syntetycznych fotochromowych przełączników molekularnych, które ulegają odwracalnym zmianom struktury pod wpływem światła. Zazwyczaj ich właściwości charakteryzuje się poprzez analizę spektralną w zakresie absorpcji UV–Vis [17]. Dla większości zastosowań fotochromowych przełączników molekularnych widzialny i bliski podczerwieni (NIR, ang. *near infrared*) zakres promieniowania jest niewątpliwie bardziej odpowiedni niż światło UV. Jednak fotoprzełączniki to tradycyjnie raczej małe cząsteczki, co wymaga zastosowania fotonów o wysokiej energii do izomeryzacji przynajmniej w jednym kierunku. W związku z tym rozwój takich systemów, które nie wymagają światła UV do aktywacji, znacząco się rozwinął w ostatnich latach. Pierwsze przełączniki działające wyłącznie w zakresie światła widzialnego zostały opisane około dwóch dekad temu dla diaryloetenów [46–47], a w 2009 roku dla pochodnych azobenzenu [46, 48]. Oprócz tradycyjnych kryteriów wydajnościowych dla związków fotochromowych, takich jak fotokonwersja, czyli skład mieszaniny w stanie fotostacjonarnym (PSS), wydajność kwantowa przełączania w obu kierunkach, czas połowicznego rozpadu termicznego mniej stabilnych izomerów oraz odporność na zmęczenie, zdolność do izomeryzacji bez udziału światła UV jest uważana za kluczową cechę jaką powinien posiadać fotochromowy przełącznik molekularny [46].

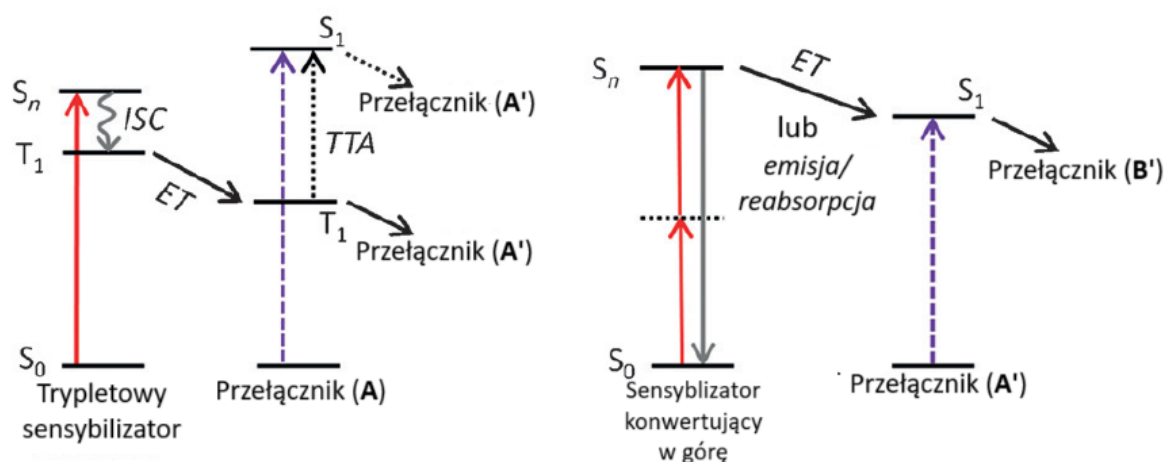
Dotychczas opracowano wiele różnych sposobów aktywacji fotochromowych przełączników molekularnych przy użyciu światła widzialnego zamiast UV [46]. Strategie te można podzielić na 3 odrębne grupy:

1. Bezpośrednie fotowzbudzenie (**rys. 6a**) — ogólna i najbardziej „bezpośrednia” strategia (choć niekoniecznie najprostsza). Dotyczy projektowania struktury fotochromowych przełączników molekularnych w taki sposób, aby dzięki odpowiedniemu dostrojeniu luki dla orbitali HOMO–LUMO (np. poprzez wstawianie różnych podstawników) doprowadzić fotoprzełączniki do bezpośredniej aktywacji za pomocą światła widzialnego [46].
2. Pośrednie fotowzbudzenie (**rys. 6b**) — polega na transferze energii przy użyciu sensybilizatorów (związków dodawanych do emulsji światłoczułej w celu zrównoważenia i powiększenia czułości negatywowego materiału światłoczułego w większym zakresie częstotliwości fal świetlnych, które są przez tę substancję pochłaniane), takich jak trypletowe fotosensybilizatory, a także przy użyciu nanocząstek lub anten wielofotonowych, które są w stanie zaabsorbować jeden lub wiele kwantów światła długofalowego, w wyniku czego „napędzają” izomeryzację poprzez nietrywialny transfer energii do przełącznika [46].
3. Pośrednie fotowzbudzenie poprzez fotoindukowany transfer elektronu (**rys. 6c**) — opiera się na projektowaniu fotochromowych przełączników, w których zastąpienie aktywacji światłem UV osiąga się poprzez indukowanie przełączenia w jednym kierunku za pomocą reakcji utleniania/redukcji. Procesy te można wyzwolić elektrochemicznie lub poprzez napromieniowanie światłem widzialnym wykorzystując fotoindukcję (przeniesienie elektronu do/z sensybilizatora) [46].

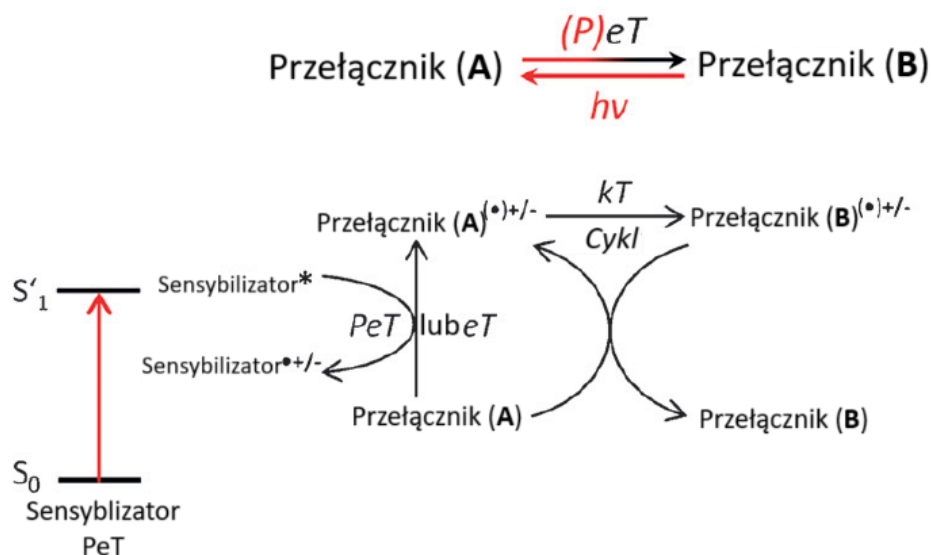
a) Bezpośrednie fotowzbudzenie



b) Pośrednie fotowzbudzenie poprzez transfer energii



c) Pośrednie wzbudzenie przez fotoindukowany transfer elektronu



Rysunek 6. Ogólne strategie zastępowania światła UV (fioletowe przerywane strzałki) światłem widzialnym (czerwone ciągłe strzałki) w celu wywołania przemiany między dwoma przełącznikami — A i B. S_0 : stan podstawowy; S_1 : pierwszy stan wzbudzony singletowy; T_1 : pierwszy stan trypletowy; ISC: przejście między stanami o różnej multipletowości (ang. *intersystem crossing*); TTA: anihilacja tryplet–tryplet; ET: transfer energii; (P)eT: (fotoindukowany) transfer elektronów [46].

Ze względu na stabilność termiczną dwóch przechodzących w siebie izomerów, fotochromowe przełączniki molekularne można podzielić na dwa typy [48]:

1. Fotochromizm typu T — obejmuje związki, dla których jeden z izomerów jest termicznie niestabilny i zazwyczaj powraca do formy stabilnej termodynamicznie w ciągu milisekund do kilku minut. Chociaż tego typu związki zazwyczaj nie mogą być przełączane w obu kierunkach za pomocą światła widzialnego, to jednak wysoka szybkość termicznej reizomeryzacji pozwala na odwrócenie przełączenia poprzez zwykłe przerwanie naświetlania [46, 48].

2. Fotochromizm typu P — dotyczy związków dla których oba izomery są stabilne termicznie. Typowym kryterium stosowanym do rozróżnienia tych dwóch klas jest termiczny czas połowicznego rozpadu ($t_{1/2}$) termodynamicznie mniej stabilnego izomeru [46, 48].

Określone zastosowanie fotoprzełączników w fotofarmakologii determinuje wymagania dotyczące aktywującej długości fali, rozkładów stanów fotostacjonarnych, wydajności przemiany fotochemicznej oraz okresu półtrwania stanu metastabilnego. Należy jednak zauważyć, że nie istnieje jedna uprzywilejowana kombinacja tych parametrów — w zależności od zastosowania można zdefiniować różne scenariusze (**rys. 7**), które opierają się na odmiennych właściwościach fotoprzełączalnych [49].

Scenariusz 1 — Aktywacja przed podaniem do organizmu

W tym scenariuszu cząsteczka fotoreaktywna jest aktywowana światłem przed podaniem pacjentowi. Po wprowadzeniu do organizmu forma aktywna (izomer metastabilny, MS) stopniowo przekształca się w mniej aktywną lub nieaktywną formę (izomer stabilny, S) poprzez relaksację termiczną (powrót do stanu równowagi po podgrzaniu) (**rys. 7–1**) [49].

Kluczowe wymagania:

- Izomer MS musi być biologicznie aktywny;
- Okres półtrwania izomeru MS powinien wynosić kilka godzin, aby zapewnić aktywność w trakcie krążenia w organizmie;
- Aktywacja może odbywać się poza oknem terapeutycznym (UV), ponieważ naświetlanie odbywa się poza organizmem;

- Wskazana jest znaczna różnica w aktywności między izomerami, choć często trudna do osiągnięcia.

Przykładami takich związków mogą być antybiotyki na bazie azobenzenu aktywowane do formy *Z* światłem UV (365 nm). W czasie około 2 godzin powracają do mniej aktywnej formy *E*. Pozwala to kontrolować „siłę działania” antybiotyku zależnie od momentu podania [49–50]. Scenariusz ten pozwala ograniczyć obecność aktywnych leków (np. antybiotyków) w środowisku. Jest to również dobra metoda w przypadku sytuacji wymagających ograniczonego czasu działania leku (np. znieczulenie miejscowe).

Scenariusz 2 — Aktywacja *in vivo* i szybka dezaktywacja termiczna

W tym scenariuszu cząsteczka podawana jest w nieaktywnej, stabilnej formie (*S*), a aktywacja następuje miejscowo w ciele pacjenta za pomocą światła. Poza obszarem naświetlania, aktywna forma szybko powraca do formy nieaktywnej dzięki relaksacji termicznej (**rys. 7–2**) [49].

Kluczowe wymagania:

- Bardzo krótki czas półtrwania formy *MS* (milisekundy do sekund);
- Aktywacja za pomocą światła czerwonego lub NIR, zdolnego do penetracji tkanek;
- Wysoka wydajność konwersji fotoizomerów w kierunku formy aktywnej.

Przykładami takich związków są *azo*-pochodne sulfonilomocznika, kontrolujące wydzielanie insuliny przez komórki β trzustki. Po naświetleniu światłem 560 nm przechodzą z nieaktywnej formy *E* do aktywnej *Z*, która wraca do *E* w ciągu milisekund [49, 51]. Scenariusz ten znajduje zastosowanie w przypadku neurobiologii i endokrynologii podczas kontroli neuroprzekaźników i hormonów. Ogranicza on również działanie ogólnoustrojowe poprzez dokładną aktywację tylko w miejscu działania [51].

Scenariusz 3 — Dezaktywacja przed podaniem i reaktywacja *in vivo*

W tym scenariuszu cząsteczka jest dezaktywowana światłem przed podaniem (np. przekształcona w izomer *MS*), a następnie reaktywowana w miejscu działania inną długością fali. Zapobiega to przedwczesnemu działaniu i pozwala na precyzyjną aktywację (**rys. 7–3**) [49].

Kluczowe wymagania:

- Stabilna forma (S) musi być bardziej aktywna biologicznie;
- Izomer MS powinien mieć długi okres półtrwania, by nie reaktywował się samorzutnie;
- Dwukierunkowe przełączanie powinno być możliwe przy użyciu światła czerwonego/NIR;
- Wysoki udział formy MS przed podaniem.

Przykładami takich związków są blokery kanałów potasowych, które są aktywowane tylko w miejscu działania [52], a także diazocyny (cykliczne azobenzeny) [53–54]. Scenariusz ten stosuje się w przypadku leczenia nowotworów i chorób neurologicznych, gdy konieczna jest aktywacja tylko w określonym miejscu [49].

Scenariusz 4 — Pełna kontrola izomeryzacji *in vivo*

Lek jest podawany w nieaktywnej, stabilnej formie, aktywowany lokalnie światłem (λ_1), a następnie dezaktywowany w otaczających tkankach innym światłem (λ_2). Pozwala to na pełną przestrzenną i czasową kontrolę (rys. 7–4) [49].

Kluczowe wymagania:

- Obie formy izomerów muszą być aktywowane inną długością fali w zakresie czerwonym/NIR;
- Wydajna konwersja w obu kierunkach;
- Długi okres półtrwania formy MS.

Przykładem takiego związku jest fotoaktywna cząsteczka kontrastowa (zawierająca gadolin), stosowana w MRI (ang. *magnetic resonance imaging*), aktywowana światłem 505 nm, dezaktywowana 435 nm. Choć jeszcze poza „idealnym” zakresem NIR, pokazuje potencjał tego podejścia [55–56]. Scenariusz ten stosuje się w precyzyjnej diagnostyce czy też leczeniu nowotworów gdzie aktywacja leku następuje tylko w guzie, nie w zdrowej tkance [49].

Scenariusz 5 — Nieodwracalna aktywacja (fotoklatkowanie)

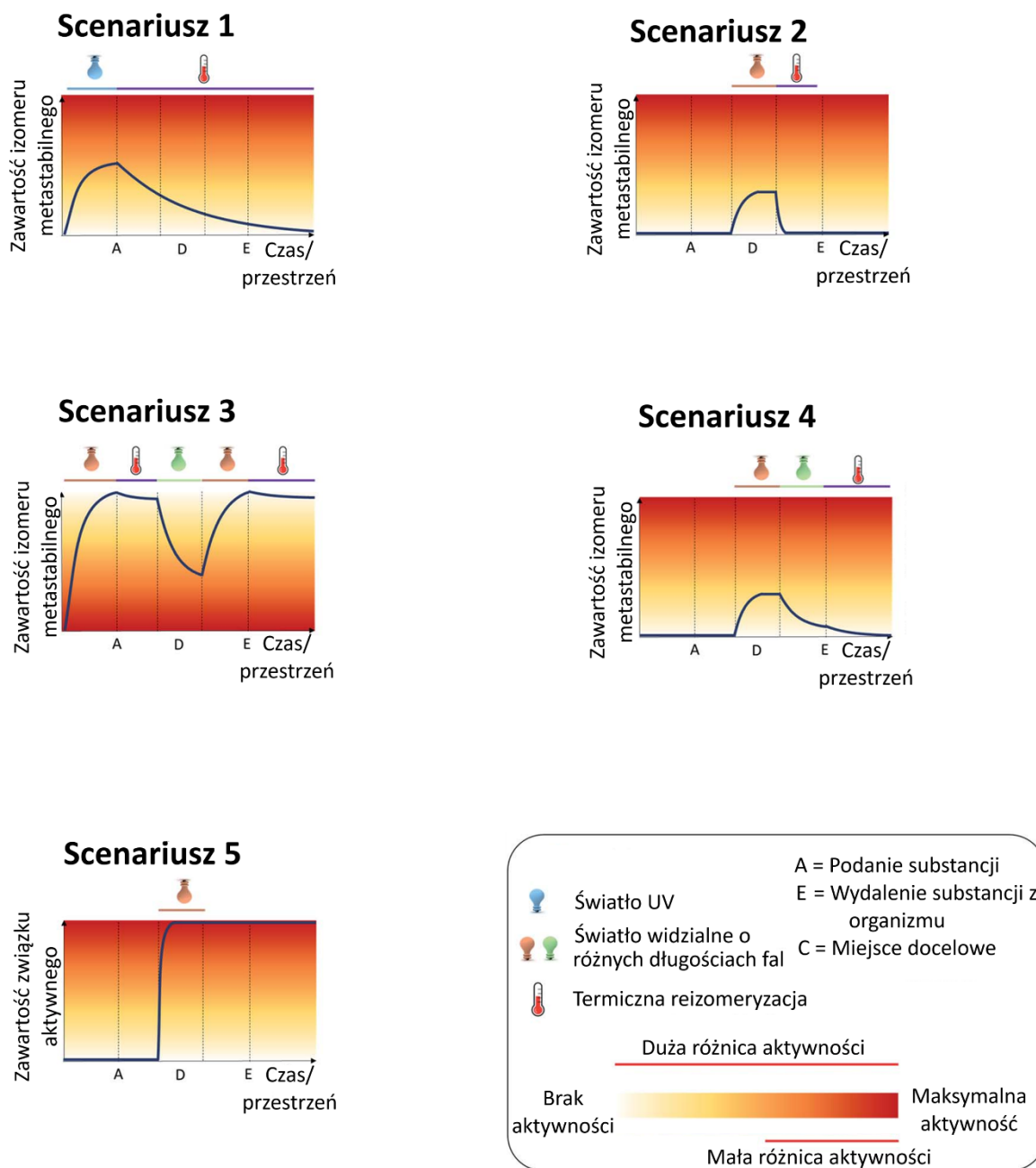
W tym scenariuszu stosuje się fotoklatki (PPG, ang. *photoplethysmography*), które po naświetleniu nieodwracalnie uwalniają lek lub aktywną cząsteczkę. Jest to bardzo skuteczne narzędzie do celowanego uwalniania leków i obrazowania (rys. 7–5) [49].

Kluczowe wymagania:

- Aktywacja światłem czerwonym/NIR;
- Wysoka wydajność odblokowania (absorpcja $\times$ wydajność kwantowa);
- Stabilność związków fotoklatkowanych w warunkach biologicznych.

Przykładami takich związków są inhibitory kinazy RET (wpływające na rozwój neuronów u zarodków ryb), które odblokowywane są światłem UV [57]. Również pochodna dopaminy z podstawnikiem bazującym na BODIPY (borodifluorek difenylopirrometanowy) jest stosowana w tym scenariuszu (aktywowana jest światłem o długości 652 nm). Układ ten jest odpowiedzialny za kontrolę rytmu serca [58]. Scenariusz ten stosuje się podczas celowanego dostarczania leków, obrazowania i terapii (dokładna kontrola czasu i miejsca działania), a także terapii fotodynamicznej (selektywne uwalnianie toksyn) [49].

Pięć przedstawionych scenariuszy terapeutycznych ukazuje wszechstronność i potencjał cząsteczek fotoreaktywnych w zastosowaniach medycznych. Nowe strategie fotofarmakologii i fotomedycyny umożliwiają stworzenie terapii spersonalizowanych, selektywnych i minimalnie inwazyjnych, przybliżając zastosowanie światła w medycynie do praktyki klinicznej.

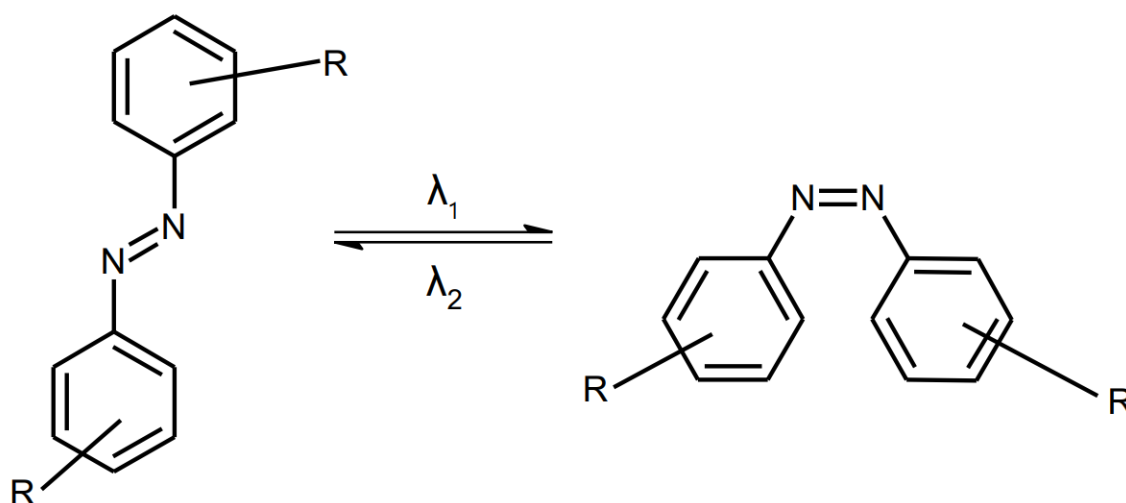


Rysunek 7. Scenariusze terapeutyczne dotyczące zastosowania odwracalnych (1–4) i nieodwracalnych (5) systemów fotokontrolowanych w medycynie, uwzględniające sytuacje, w których związek ma być aktywowany na zewnątrz (1) lub wewnątrz organizmu (2–5), oraz biorąc pod uwagę, czy forma stabilna (2), czy metastabilna (1, 3, 4) przełącznika jest bardziej aktywna biologicznie. Intensywność koloru w tle wykresów odpowiada rosnącej aktywności biologicznej, którą można uzyskać poprzez zmianę stężenia izomeru metastabilnego (niebieska linia) [49].

2.1.4 Klasy fotochromowych przełączników molekularnych

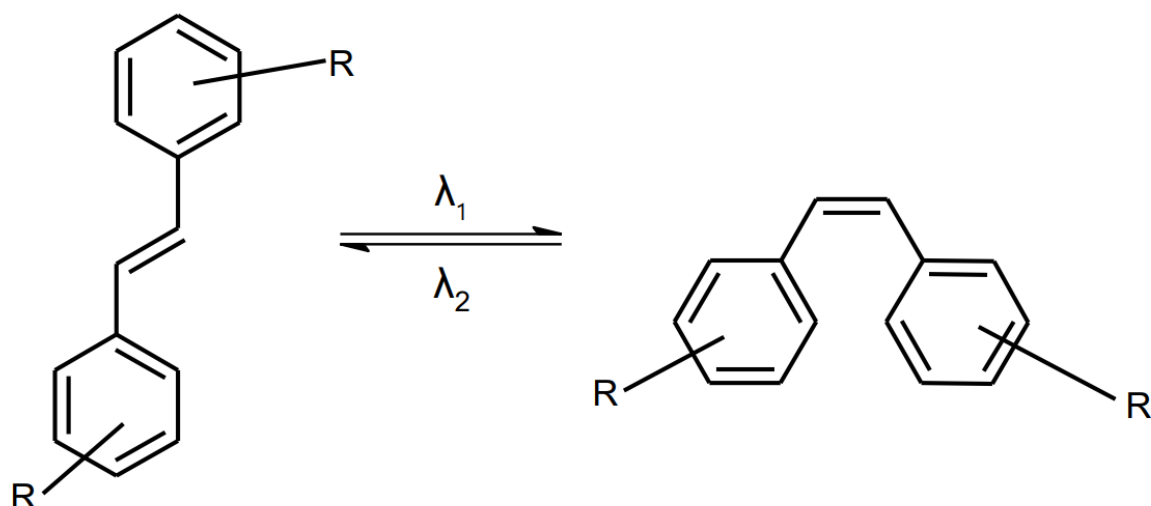
Do najważniejszych klas fotochromowych przełączników molekularnych należą:

1. **Pochodne azobenzenu** — jedna z najlepiej poznanych i najczęściej stosowanych klas przełączników. Występują w dwóch formach izomerycznych (*E* i *Z*), z których forma *E* jest energetycznie bardziej stabilna. Izomeryzacja jest często indukowana przyjaznym dla organizmów światłem zielonym i prowadzi do wyraźnych zmian właściwości fizycznych, w tym momentu dipolowego (**schem. 5**) [17, 59–60].



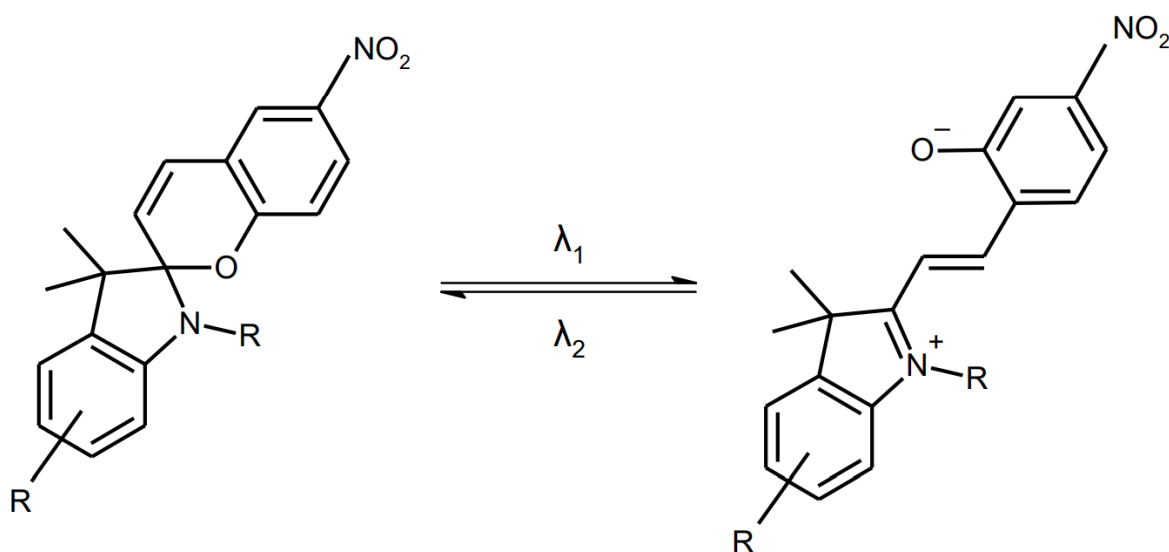
Schemat 5. Różne struktury pochodnych azobenzenu powstające poprzez zmianę konfiguracji *E/Z*.

2. **Pochodne stilbenu** — strukturalnie zbliżone do azobenzenów, również ulegają izomeryzacji *E/Z*. Różnice w mechanizmie przejścia wynikają z odmiennego charakteru stanu wzbudzonego formy *E* (**schem. 6**) [61].



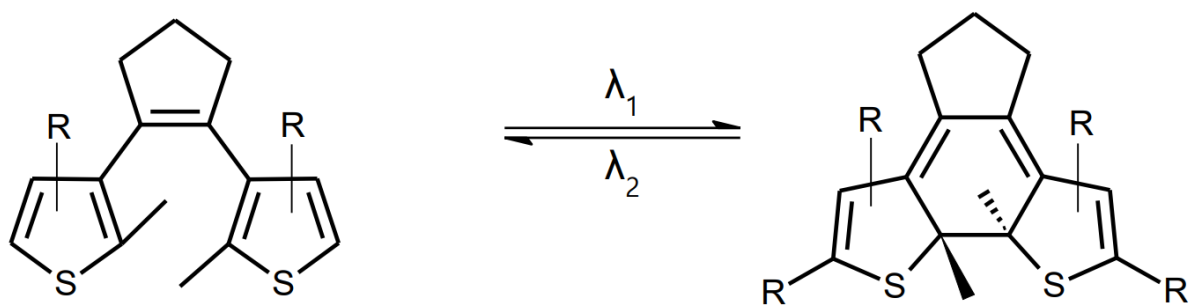
Schemat 6. Różne struktury pochodnych stilbenu powstające poprzez zmianę konfiguracji *E/Z*.

3) **Pochodne spiropiranu** — pod wpływem światła UV przechodzą w formę merocyjaninową, która jest bardziej polarna i barwna. Proces ten jest odwracalny i może być cofnięty termicznie lub za pomocą światła widzialnego (**schem. 7**) [62–66].



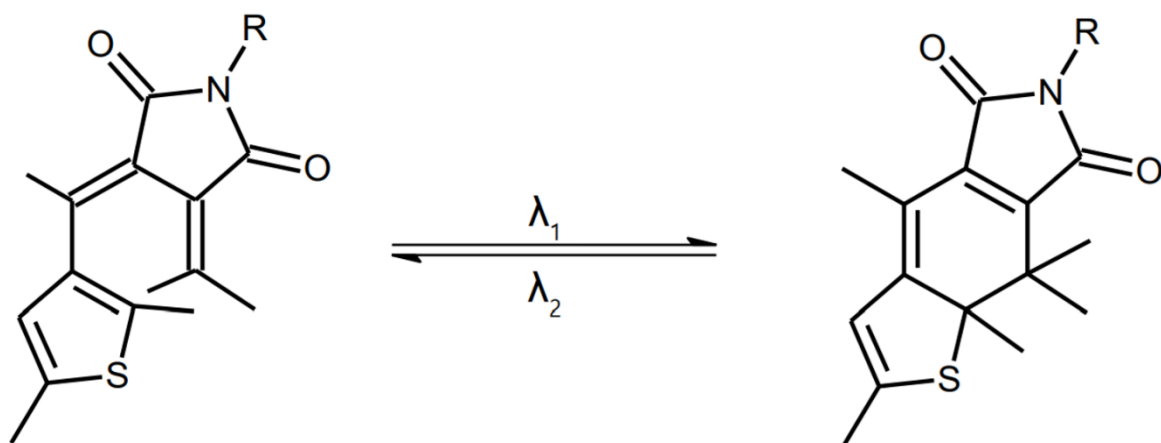
Schemat 7. Różne struktury pochodnych spiropiranu powstające poprzez zamykanie/otwieranie pierścienia.

4) **Pochodne ditiofenoetenu** — ich przełączanie związane jest z odwracalną fotocyklizacją ugrupowania heksatrienowego. Posiadają dobrą stabilność i wysoką trwałość cyklu przełączeń, osiągając nawet 10^4 cykli (**schem. 8**) [17, 67–68].



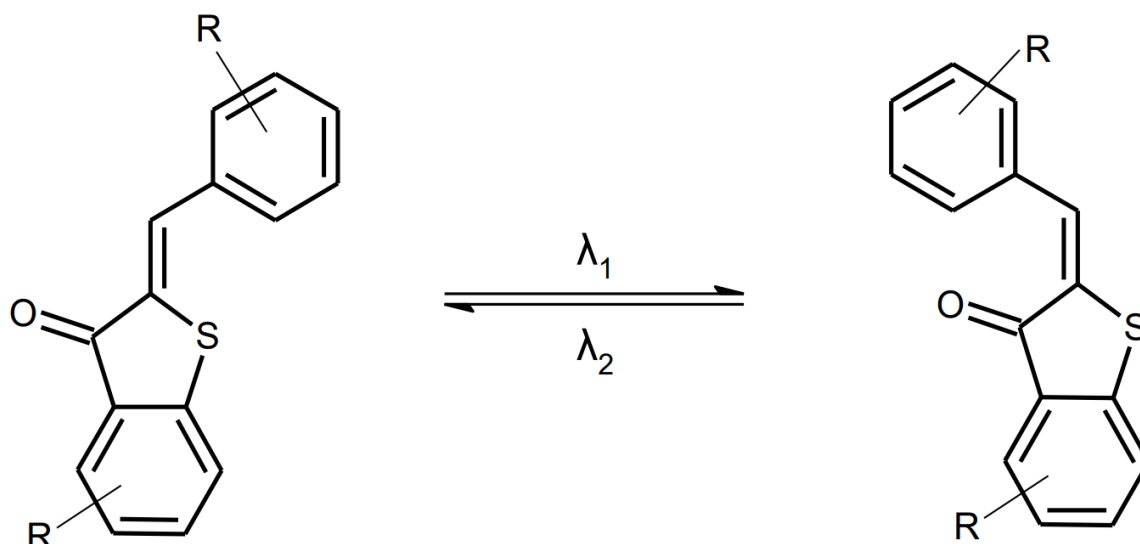
Schemat 8. Różne struktury pochodnych ditiofenoetenu powstające poprzez zamykanie/otwieranie pierścienia.

5) **Pochodne tiofenofulgidu** — podobnie jak pochodne ditiofenoetenu — ulegają cyklizacji pod wpływem światła. Jeśli struktura zawiera podstawione wiązania lub pierścienie heterocykliczne, reakcja ta może być termicznie nieodwracalna (**schem. 9**) [69–72].



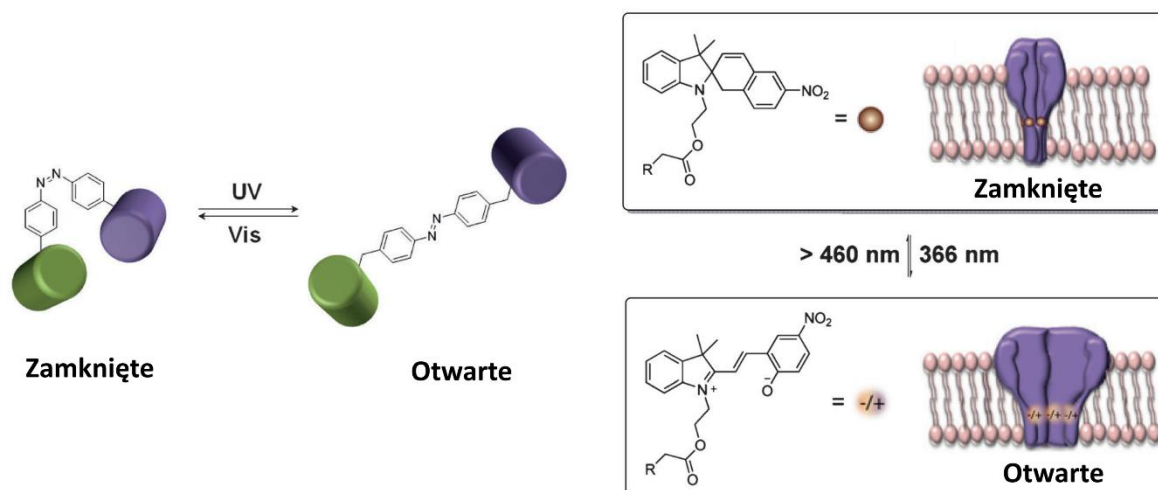
Schemat 9. Różne struktury pochodnych tiofenofulgidu powstające poprzez zamykanie/otwieranie pierścienia.

6) **Pochodne hemitioindygo** — izomeryzują poprzez zmianę konfiguracji *E/Z* przy wiązaniu olefinowym. Choć zmiana momentu dipolowego nie jest tak znacząca jak w pochodnych spiropiranu, to proces ten także jest odwracalny i aktywowany określonymi długościami fal (**schem. 10**) [17, 73–75].



Schemat 10. Różne struktury pochodnych hemitioidyny powstające poprzez zmianę konfiguracji *E/Z*.

Fotoizomeryzacja, szczególnie dotycząca wiązań olefinowych ($-C=C-$) lub azowych ($-N=N-$), ma szerokie zastosowania praktyczne. Przykładem jest kontrolowane uwalnianie leków do wnętrza komórki przez aktywację światłem kanału błonowego, w który wbudowano cząsteczkę przełącznika. Pod wpływem światła kanał ulega otwarciu, umożliwiając dostarczenie substancji aktywnej (rys. 8) [8].



Rysunek 8. Schemat wykorzystania fotochromowych przełączników molekularnych do wprowadzania leków do komórek [8].

2.1.5 Fotochromowe przełączniki molekularne w medycynie

Koncepcja fotopodatności na lek stanowi rozwinięcie ogólnego pojęcia podatności terapeutycznej. Aby dany receptor lub enzym, który odgrywa rolę w patogenezie choroby, mógł

być uznany za cel terapeutyczny, powinien wykazywać wysokie powinowactwo do leku oraz wpływać na jego aktywność biologiczną [8]. Fotopodatność uwzględnia te kryteria, rozszerzając je o konieczność reagowania na zmiany struktury fotochromowych przełączników molekularnych, które zachodzą pod wpływem światła.

Warunki niezbędne do uznania danego celu molekularnego za fotopodatny obejmują:

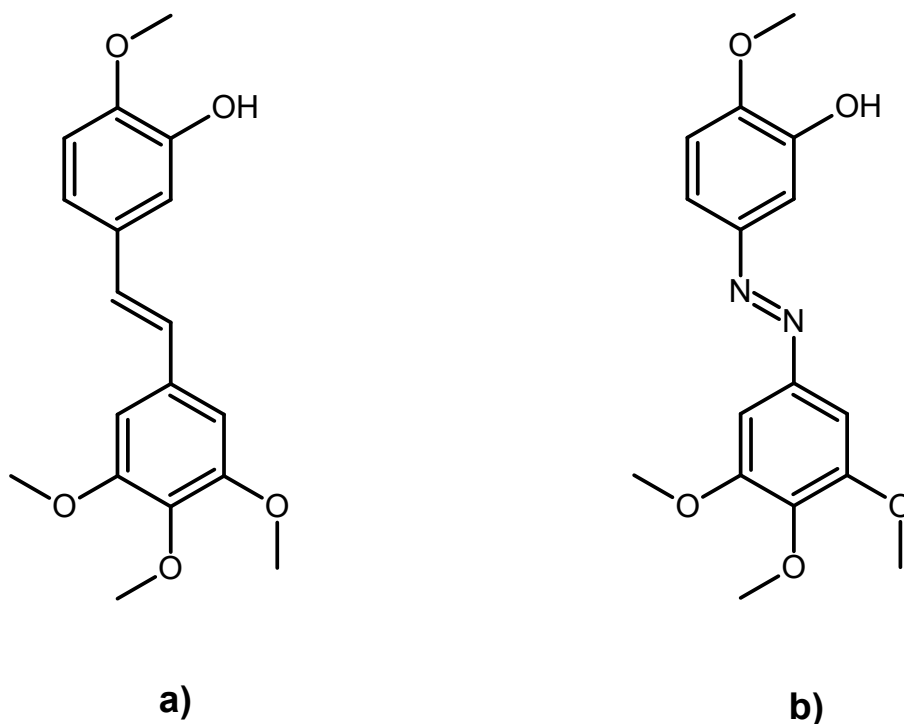
- Reagowanie z ligandem fotokontrolowanym, którego struktura i funkcja ulegają zmianie po ekspozycji na światło;
- Lokalizację celu w obrębie zmienionej chorobowo tkanki, do której światło może zostać precyzyjnie dostarczone;
- Możliwość efektywnego dotarcia światła do tego miejsca.

Z myślą o tych wymaganiach zaproponowano klasyfikację narządów człowieka w zależności od stopnia łatwości z jakim można do nich doprowadzić światło:

1. **Klasa 1** — organy łatwo dostępne, takie jak skóra [76] oraz oczy [77];
2. **Klasa 2** — organy dostępne przy użyciu technik endoskopowych, m.in. jama ustna i gardło [78], układ oddechowy [79], przewód pokarmowy [80], zatoki [81], drogi żółciowe [82], szyjka macicy [83] oraz pęcherz moczowy [84];
3. **Klasa 3** — struktury znajdujące się bezpośrednio pod powierzchnią skóry, m.in. jądra, powierzchniowe węzły chłonne, mięśnie, kości oraz tarczyca [8];
4. **Klasa 4** — narządy wymagające drobnych nacięć chirurgicznych, takie jak wątroba [85], naczynia krwionośne [86], otrzewna [87], trzustka [88], żołądek, jelita, jajniki, nerki, śledziona, prostata [89], a także inne gruczoły i tkanki głębokie [8];
5. **Klasa 5** — struktury wymagające większej inwazyjności zabiegów, w tym szpik kostny [8] oraz mózg [90].

Przykład praktycznego zastosowania fotofarmakologii w leczeniu nowotworów dotyczy pochodnych kombretastatyny (**rys. 9**). Związki te, wykorzystywane w terapii celowanej nowotworów zlokalizowanych w obrębie struktur klasy 3, wykazują zdolność do hamowania polimeryzacji tubuliny — kluczowego białka cytoszkieletu komórek nowotworowych. Szczególne właściwości ujawnia azowa pochodna kombretastatyny A-4, której forma Z

charakteryzuje się nawet 250 razy wyższą cytotoksycznością w porównaniu do formy *E*, niewykazującej aktywności w ciemności (**rys. 9**) [8].



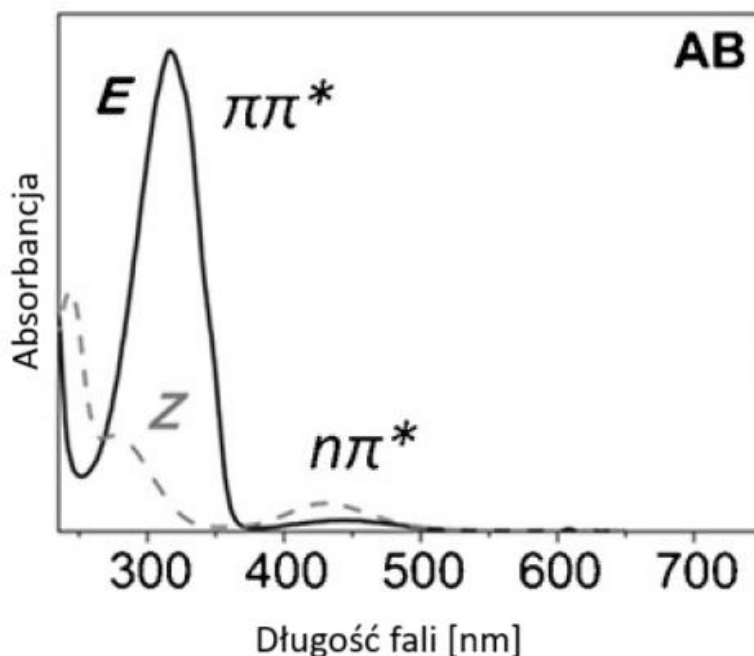
Rysunek 9. Struktura kombretastatyny A4 (a) i jej azo-pochodnej (b).

Forma *Z* tej pochodnej wiąże się specyficznym z miejscem kolchicynowym w strukturze tubuliny, co warunkuje szybki efekt fotobiologiczny związany z cytotoksycznością. Na podstawie badań *in vitro* przeprowadzonych na komórkach gruczolaka oraz komórkach śródbłonna żyły pępowinowej potwierdzono skuteczność działania tej fotokontrolowanej cząsteczki. Dodatkowo wykazano, że azo-fosforanowy analog kombretastatyny A-4 skutecznie destabilizuje mikrotubule w środowisku z udziałem światła [8].

2.1.6 Pochodne azobenzenu jako jedna z najlepiej poznanych klas fotochromowych przełączników molekularnych

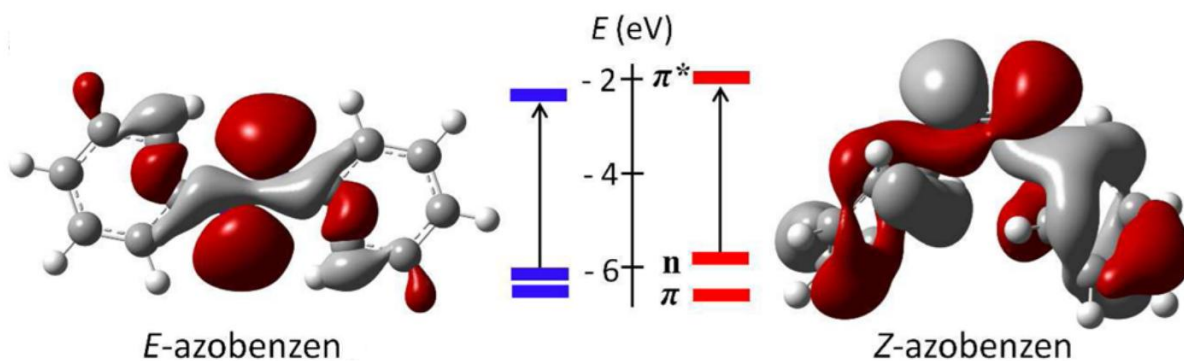
Jedną z kluczowych zalet stosowania przełączników azowych w porównaniu z tradycyjnymi lekami jest możliwość ich miejscowej aktywacji poprzez kontrolowane naświetlanie. Najbardziej korzystnym zakresem długości fali światła stosowanym do aktywacji jest przedział 650–900 nm (tzw. okno życia) — pozwala on uniknąć niepożądanego absorpcji przez hemoglobinę i wodę, a także eliminuje potrzebę stosowania potencjalnie szkodliwego promieniowania UV [46].

Azobenzeny podczas absorpcji fotonów wykazują dwa główne przejścia elektronów (**rys. 10**). Pasmo $\pi \rightarrow \pi^*$ zlokalizowane jest w obszarze UV (zazwyczaj między 310 a 360 nm) i wywołuje ono izomeryzację E/Z , natomiast pasmo $n \rightarrow \pi^*$ zlokalizowane jest w widocznym obszarze (zazwyczaj około 450 nm) i także aktywować może izomeryzację E/Z [46].



Rysunek 10. Widmo absorpcyjne UV–Vis izomerów E/Z azobenzenu (AB) [46].

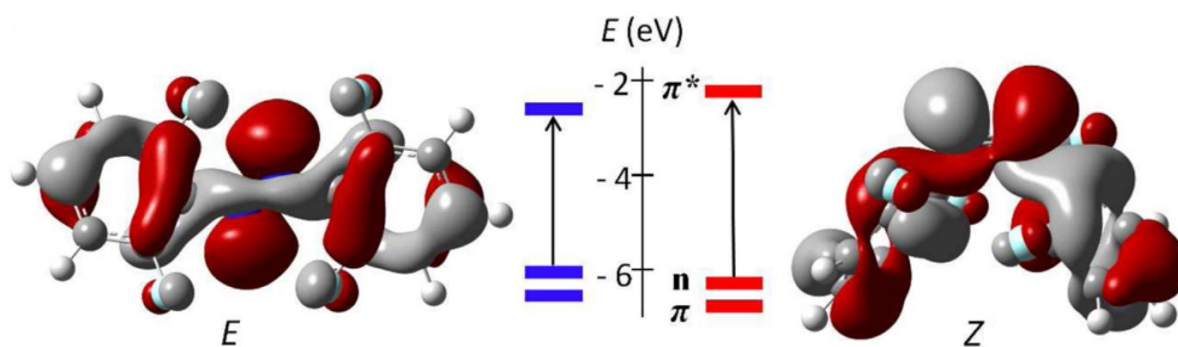
W przypadku azobenzenu, energie wzbudzeń typu $n \rightarrow \pi^*$ dla obu izomerów (E i Z) są do siebie zbliżone ze względu na porównywalne zmiany energetyczne orbitali π^* i n (**rys. 11**). W izomerze Z delokalizacja elektronów π jest zmniejszona z powodu dużych kątów dwuściennych wokół pojedynczych wiązań N-C. W rezultacie poziom orbitalu π^* jest wyższy niż w izomerze E . Jednak poziom energetyczny orbitalu n w izomerze Z również jest wyższy niż w izomerze E , przez co energie wzbudzeń $n \rightarrow \pi^*$ są bardzo zbliżone dla obu izomerów E i Z (**rys. 11**) [91].



Rysunek 11. Diagram energetyczny orbitali π , n oraz π^* azobenzenu [91].

Najbardziej celowe podejście do projektowania przełączników aktywnych w świetle widzialnym to rozszerzenie systemu sprzężenia π aby obniżyć lukę HOMO–LUMO, a tym samym przesunąć pasmo absorpcyjne w kierunku promieniowania czerwonego [46]. Wadą tej strategii jest jednak to, że przez rozszerzenie sprzężenia π , zdolność fotoprzełączania może zostać utracona, a zatem uzyskanie pozytywnych wyników nie jest łatwe. Rozszerzenie systemu π w azobenzenach znacznie przesuwa w kierunku „światła czerwonego” pasmo $\pi \rightarrow \pi^*$, podczas gdy pasmo $n \rightarrow \pi^*$ zmienia się tylko nieznacznie. W wyniku tego te dwa pasma mają tendencję do nakładania się [46].

Klasyczną metodą rozszerzenia sprzężenia orbitali π i obniżenia luki HOMO–LUMO, a tym samym, przesuwania absorpcji azobenzenów w stronę światła widzialnego jest wprowadzanie grup elektronoakceptorowych (EWG) w pozycjach *orto* lub *para* względem wiązania N=N. Z uwagi na względnie wysokie poziomy energetyczne orbitalu n w azobenzenie, wynikające z odpychających oddziaływań wolnych par elektronowych azotu, redukcja gęstości elektronowej n poprzez sąsiednie grupy o charakterze wyciągającym elektrony σ powinna obniżyć energię orbitalu n . Można to skutecznie osiągnąć poprzez wprowadzenie np. podstawników fluorowych w pozycjach *orto* (**rys. 12**). Należy zauważyć, że atomy fluoru wykazują silny efekt indukcyjny, podczas gdy ich efekt mezomeryczny jest raczej pomijalny [91].

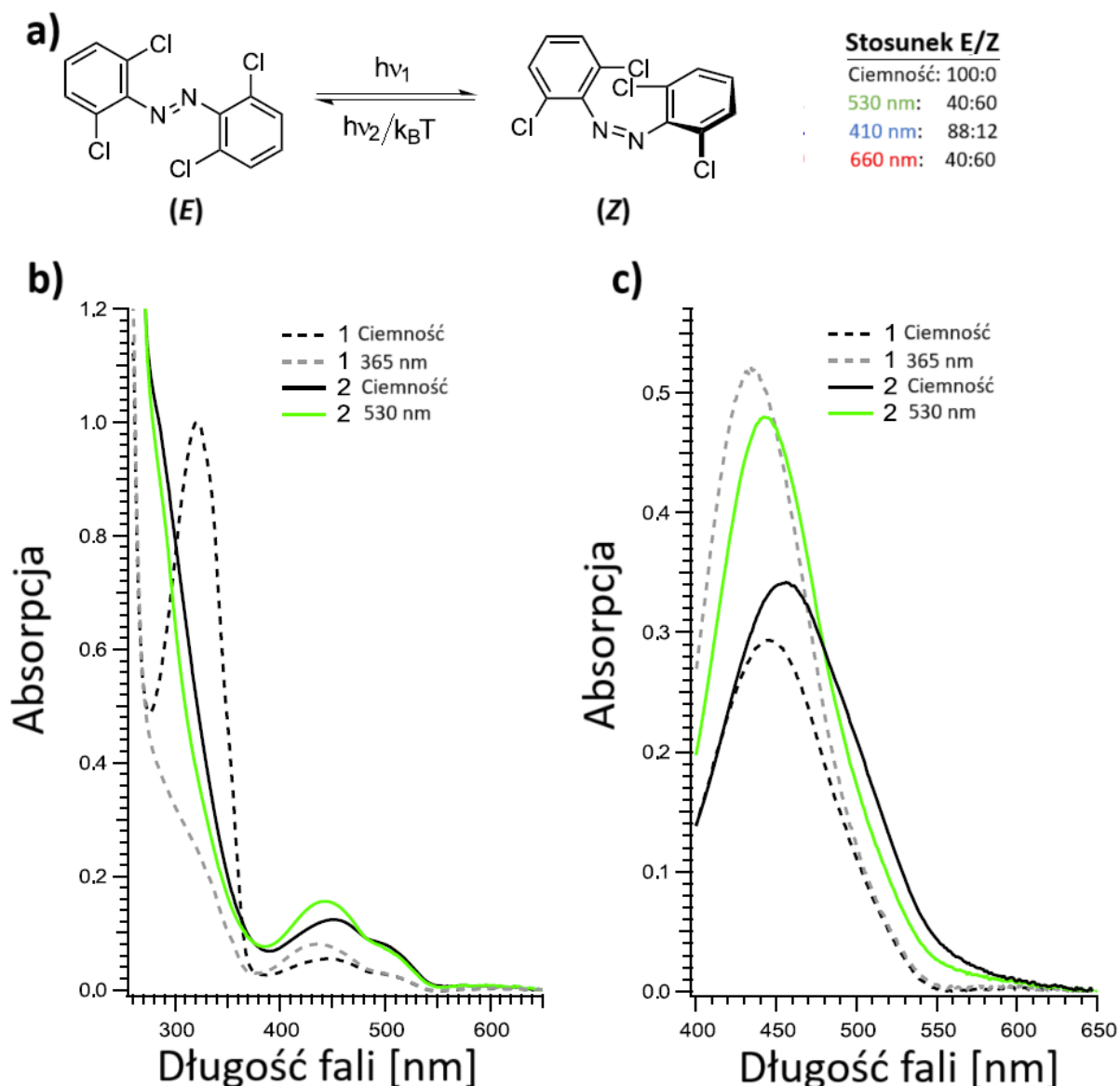


Rysunek 12. Diagram energetyczny orbitali π , n oraz π^* *o*-tetrafluoroazobenzenu [91].

Jak już wcześniej wspomniano problemem pozostaje fakt, że wiele azowych przełączników bioaktywnych ulega aktywacji właśnie pod wpływem światła UV, co ogranicza ich zastosowanie w warunkach biologicznych. Jednym z rozwiązań tego ograniczenia jest modyfikacja azobenzenów poprzez podstawienie pozycji *orto* pierścieni aromatycznych, co skutkuje przesunięciem pasma absorpcji w stronę widzialną [46]. Wśród najczęściej stosowanych podstawników w tego typu modyfikacjach znajdują się grupy metoksy, fluoro i chloro. Opracowano również struktury zawierające podstawienia bromowe [92] oraz pochodne

typu OPh, SPh czy też SePh [93]. Jednym z kluczowych kierunków „rozwoju związków azowych” jest przesunięcie ich maksimum absorpcji ku większym długościom fal. Szczególnie obiecujące okazuje się podstawienie czterema atomami chloru w pozycjach *orto*, co powoduje przesunięcie pasma absorpcji z około 200 nm aż do 560 nm [94–95]. Co istotne, nawet pojedynczy atom chloru w pozycji *orto* może wyraźnie oddzielić pasma $n \rightarrow \pi^*$ (pomiędzy izomerami *E* i *Z*), prowadząc do przesunięcia maksimum absorpcji w stronę fal dłuższych (efekt batochromowy) [46].

Wpływ liczby i rozmieszczenia podstawników halogenkowych w pozycjach *orto* został szczegółowo przeanalizowany. W tych badaniach odkryto, że mieszane podstawienie, w szczególności kombinacji di-*orto*-chloro i di-*orto*-fluoro, znacząco skraca czas ekspozycji na światło o długości 660 nm. Tego typu właściwości czynią je bardziej użytecznymi w zastosowaniach fotofarmakologicznych. Wyniki tych analiz wskazują również, że związki zawierające mieszane podstawienia tetra-*orto* przewyższają „czysto” chloro- lub fluoro-podstawione analogi pod względem właściwości fotochemicznych. Dodatkowo zaobserwowano, że podstawienie grupami zmniejszającymi gęstość elektronową w pozycji *para* może dalej zwiększać efekt batochromowy w obu formach izomerycznych, co dodatkowo poszerza możliwości ich zastosowania (**rys. 13**) [95].



Rysunek 13. a) Fotoizomeryzacja tetra-*orto*-chloroazobenzenu (1 — azobenzen, 2 — tetra-*orto*-chloroazobenzen); b) Widmo UV–ViS związków 1 i 2 (50uM roztwór w DMSO) c) Widmo UV–ViS związków 1 i 2 (500uM roztwór w DMSO) [95].

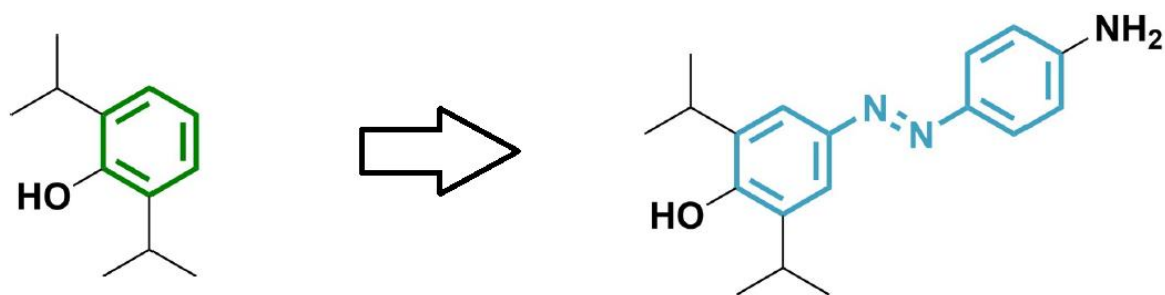
2.1.7 Projektowanie i modulacja fotochromowych przełączników molekularnych na przykładzie pochodnych azobenzenu

Fotofarmakologia, jak już wspomniano, jest obiecującym podejściem umożliwiającym ukierunkowane działanie leków za pomocą światła. W fotofarmakologii do struktury biologicznie aktywnych małych cząsteczek wprowadza się światłoczułe przełączniki molekularne, co pozwala na optyczną kontrolę ich aktywności. Wychodząc poza metodę prób i błędów, „fotofarmakologia coraz częściej wykorzystuje” racjonalne metody projektowania

leków do opracowywania biologicznie aktywnych ligandów sterowanych światłem. Istnieje wiele strategii projektowania i modulacji fotochromowych przełączników molekularnych [96]:

1. Rzeczywiste rozszerzenie struktury (*Bona Fide Extension*)

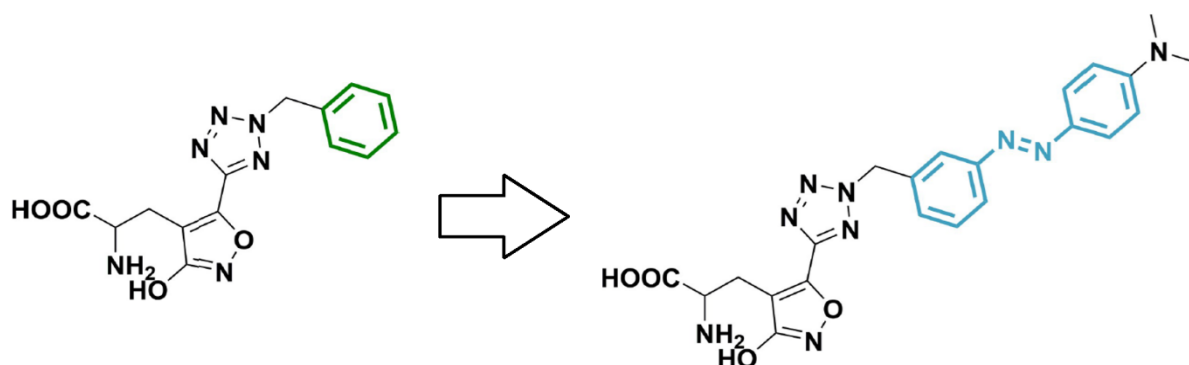
Strategia ta polega na dodaniu pierścienia aromatycznego zawierającego izomeryzowalny układ (np. azobenzen) do struktury wyjściowej leku, bez usuwania istniejących podstawników. Takie rozszerzenie może wpływać na interakcję z kieszenią hydrofobową receptora, zależnie od izomeru (*E* lub *Z*) (schem. 11) [96–97].



Schemat 11. Pochodna propofolu (środek do podtrzymania znieczulenia ogólnego) zawierająca azobenzen, która w postaci izomeru *E* działa jako aktywator receptorów GABA, pełniąc funkcję fotosterowalnego środka znieczulającego.

2. Projektowanie oparte na strukturze (*Structure-Based Design*)

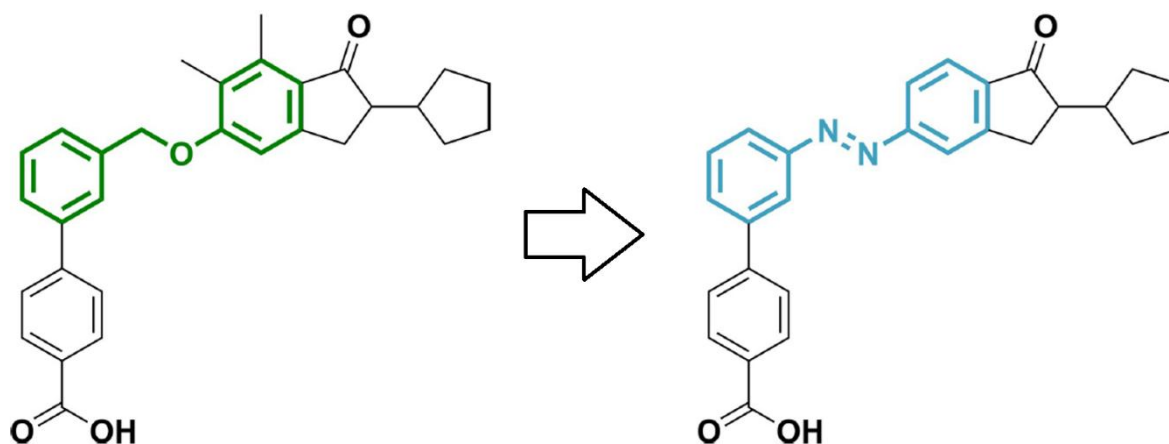
Metoda wykorzystuje dane krystalograficzne i dokowanie molekularne do zaplanowania modyfikacji związku bazowego. Analiza miejsca wiązania pozwala określić optymalne pozycje podstawników dla fotoprzełącznika (schem. 12) [96, 98].



Schemat 12. Pochodna BnTetAMPA — agonisty receptora AMPA (kwas 2-amino-3-(5-(2-benzylo-2*H*-tetrazol-5-yl)-3-hydroksyizoksazol-4-yl)propionowy) — zawierająca pochodną azobenzenu w pozycji *meta*, zaprojektowana na podstawie struktury krystalicznej receptora iGluR2 (jonotropowy receptor glutaminianu 2), aktywna w formie *E*.

3. Azologizacja (*Azologization*)

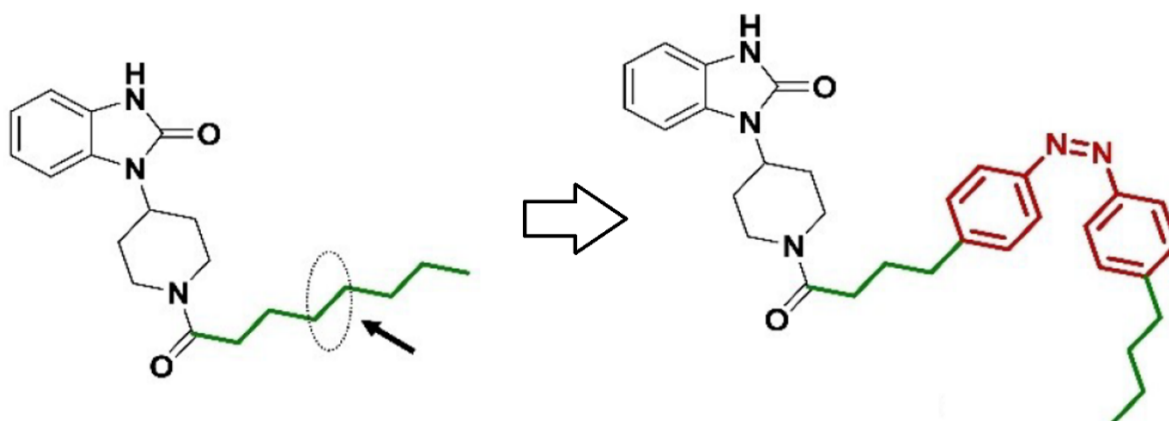
Strategia ta polega na bioizosterycznym zastąpieniu fragmentu struktury związku aktywnego farmakologicznie fotoprzełączalnym układem, najczęściej azobenzenem, tak aby zmiana konfiguracji prowadziła do zmiany aktywności biologicznej (**schem. 13**) [96, 99].



Schemat 13. BINA (benzyloksydimetylobenzen) — allosteryczny agonista receptora mGluR2 (metabotropowy receptor glutaminianu typu 2) zawierający azobenzen; tylko forma *E* tworzy wiązanie jonowe z resztą Arg635, aktywując receptor.

4. Insercja przełącznika (*Insertion Approach*)

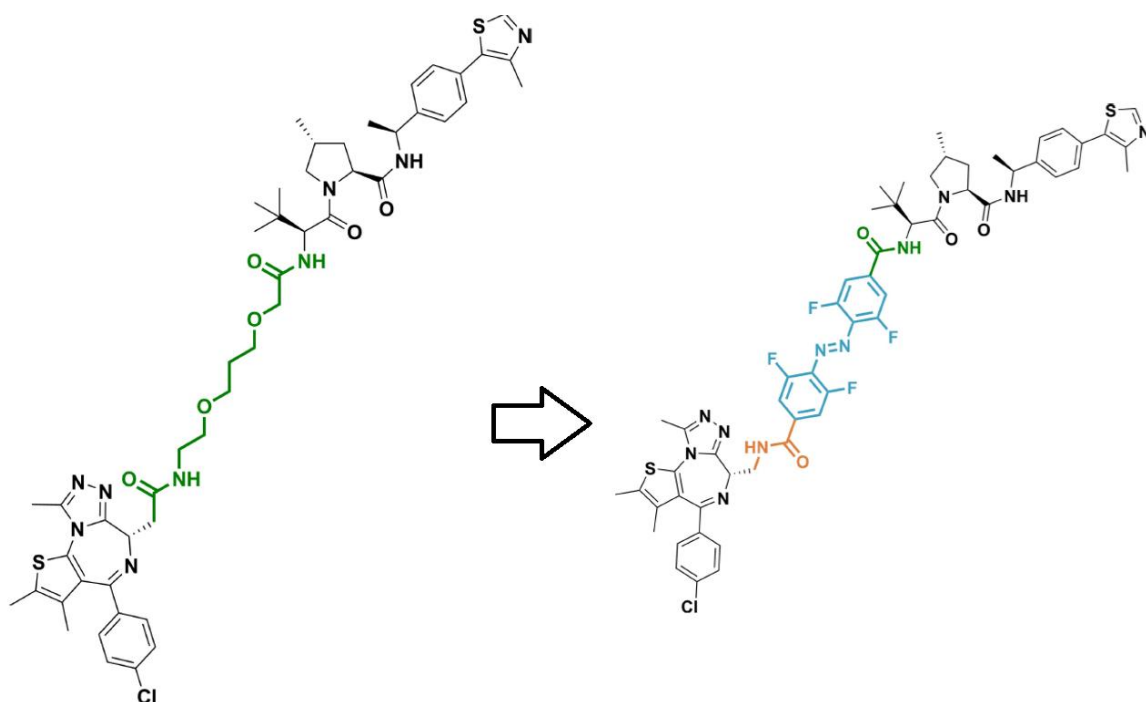
Fotochromowy przełącznik molekularny (np. azobenzen) zostaje wbudowany pomiędzy dwa atomy oryginalnej cząsteczki, pełniąc rolę wewnętrznego, aktywowanego światłem łącznika (**schem. 14**) [96, 100].



Schemat 14. Fotochromowy przełącznik molekularny wbudowany w łańcuch alifatyczny BI-1 (3-(1-oktanoylopiperydy-4-yl)-1,3-dihydro-2*H*-benzo[*d*]imidazol-2-on) — agonisty TRPC3 (kanał jonowy odgrywający kluczową rolę w sygnalizacji wapniowej w komórkach); forma *Z* aktywuje kanał jonowy i umożliwia optyczne sterowanie aktywnością neuronów.

5. Zastąpienie łącznika w ligandach bifunkcyjnych

W przypadku złożonych ligandów, takich jak ARV 771 (**schem. 15**), fotochromowy przełącznik molekularny może zastąpić łącznik pomiędzy dwiema jednostkami farmakoforowymi. ARV 771 jest związkiem należącym do klasy związków PROTAC (ang. *proteolysis targeting chimeras*) — są to dwufunkcyjne cząsteczki, które wiążą się z białkiem docelowym oraz z ligazą ubikwityny E3, co prowadzi do ubikwitynacji białka docelowego. Ubikwitynacja to proces, w którym białko zostaje oznaczone do degradacji przez system ubikwityna-proteasom (UPS). Zmiana długości układu po ekspozycji na światło zmienia efektywność oddziaływania cząsteczki [96, 101].

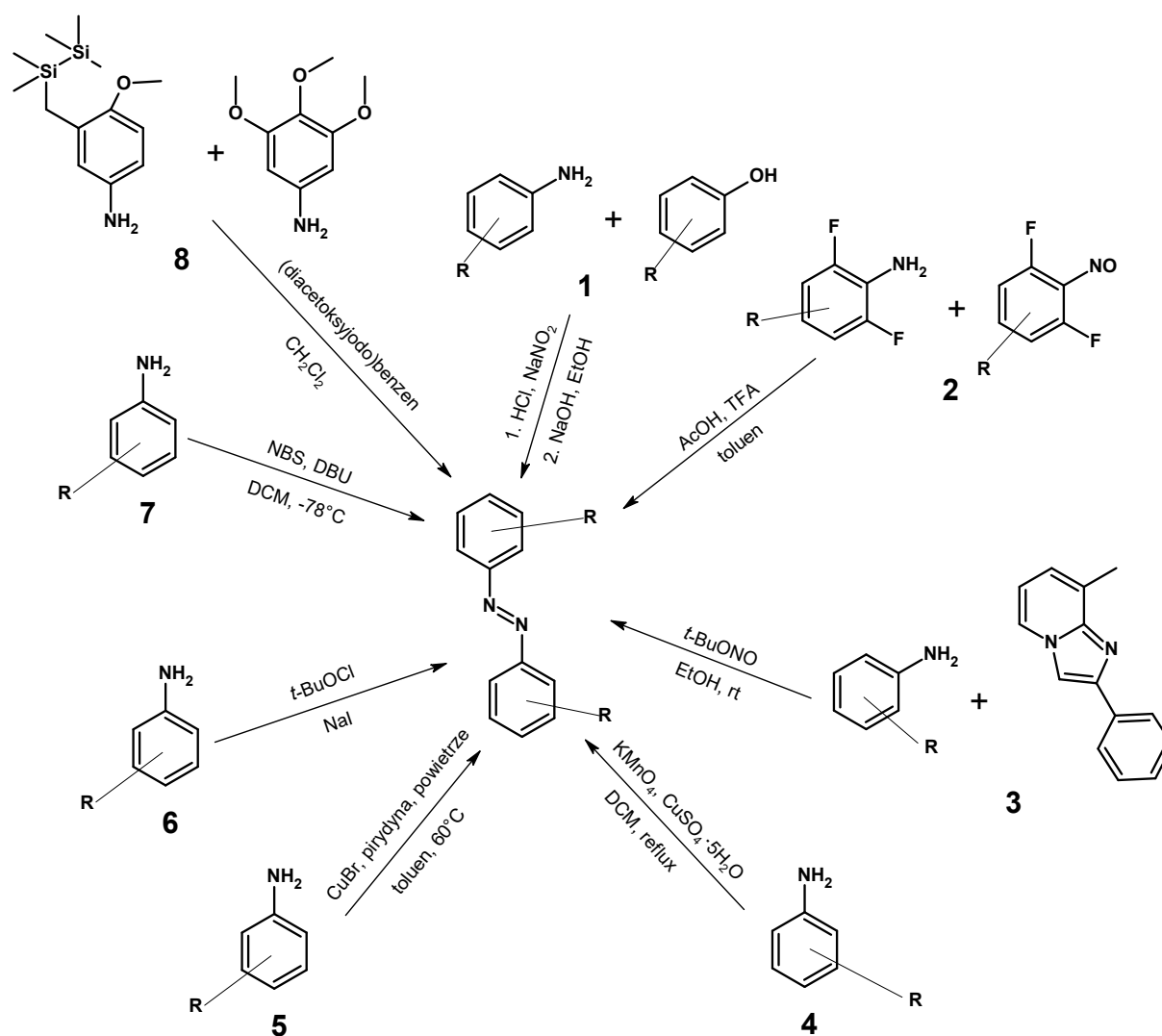


Schemat 15. ARV 771 zawierający azobenzen jako przełącznik; tylko izomer *E* umożliwia skuteczną degradację białka, forma *Z* pozostaje biologicznie nieaktywna.

Powyższe strategie pokazują różnorodne możliwości projektowania fotochromowych przełączników molekularnych zawierających grupę azową, które umożliwiają precyzyjne, czasowo i przestrzennie kontrolowane działania farmakologiczne. Takie podejście może być szczególnie przydatne w terapii celowanej oraz w badaniach nad regulacją funkcji białek w środowisku *in vivo*.

2.1.8 Metody otrzymywania fotochromowych przełączników molekularnych zawierających ugrupowanie azowe

Pochodne azobenzenu stanowią najlepiej zbadaną grupę przełączników molekularnych, co przełożyło się na rozwój wielu metod ich syntezy. Związki zawierające ugrupowanie azowe są obecnie najczęściej wykorzystywanymi fotochromowymi przełącznikami molekularnymi w zastosowaniach biomedycznych. **Schemat 16** podsumowuje najważniejsze metody syntezy pochodnych azobenzenu:



Schemat 16. Metody syntezy pochodnych azobenzenu.

1. Klasyczna reakcja diazowania, w której pochodna aniliny sprzęga się z aktywowanym pierścieniem aromatycznym w obecności HCl i NaNO₂ (**schem. 16–1**) [102];
2. Reakcja nitrozopochodnej z pochodną aniliny prowadzona w obecności kwasu trifluorooctowego (TFA) (**schem. 16–2**) [103];

3. Sprzęganie pochodnej aniliny z aktywowanym pierścieniem aromatycznym z wykorzystaniem azotynu *tert*-butylu (**schem. 16–3**) [104];
4. Oksydatywne sprzęganie pochodnych aniliny w obecności nadmanganianu potasu (**schem. 16–4**) [105];
5. Oksydatywne sprzęganie w obecności bromku miedzi(I) (**schem. 16–5**) [105];
6. Oksydatywne sprzęganie przeprowadzane przy użyciu podchlorynu *tert*-butylu (**schem. 16–6**) [105];
7. Oksydatywne sprzęganie z zastosowaniem NXS (*N*-halogenosukcynoimid, gdzie X = Cl, Br, I) oraz DBU (1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en) (**schem. 16–7**) [105];
8. Oksydatywne sprzęganie pochodnych aniliny z użyciem hiperwalencyjnego związku jodu — PIDA ((diacetoksyjodo)benzen) jako reagenta (**schem. 16–8**) [106].

2.2 Związki aktywne biologicznie oddziałujące z domeną kolchicynową w tubulinie

Związki wiążące się z domeną kolchicynową w tubulinie wykazują właściwości przeciwnowotworowe dzięki specyficznemu mechanizmowi działania. Tubulina jest białkiem budującym mikrotubule, które stanowią kluczowy element cytoszkieletu komórkowego [107]. Mikrotubule odgrywają fundamentalną rolę w wielu procesach komórkowych, zwłaszcza w mitozie — podziale komórkowym. Domena kolchicynowa to miejsce wiążące leki na tubulinie. Kiedy związek (np. kolchicina, kombretastatyna czy ich pochodne) przyłączy się do tej domeny, hamuje polimeryzację tubuliny, czyli proces łączenia podjednostek tubuliny w mikrotubule [108–109]. Blokowanie polimeryzacji mikrotubul zakłóca tworzenie wrzeciona podziałowego, które jest niezbędne do prawidłowego rozdziału chromosomów podczas podziału komórki [110]. W efekcie komórki nowotworowe, które charakteryzują się bardzo szybkim tempem podziału, są szczególnie wrażliwe na tego typu leki. Przyłączanie kolchicyny do tubuliny to proces powolny, praktycznie nieodwracalny i wyraźnie zależny od temperatury [111]. Gdy ligand zajmie miejsce wiążące kolchicynę, dochodzi do stabilizacji zakrzywionej formy heterodimeru $\alpha\beta$ -tubuliny. W trakcie formowania się mikrotubul heterodimery $\alpha\beta$ -tubuliny muszą zmienić swoją zakrzywioną formę na prostą, co wymaga przesunięcia niektórych struktur drugorzędowych w obrębie β -tubuliny, zbliżając je do siebie. To powoduje

zmniejszenie objętości miejsca wiążącego kolchicynę. Jeśli jednak w tym miejscu obecny jest ligand, nie dochodzi do wymaganych zmian konformacyjnych. W efekcie kompleks utworzony przez ligand i heterodimer $\alpha\beta$ -tubuliny nie jest w stanie uczestniczyć w procesie polimeryzacji mikrotubul [112–113]. Zahamowanie procesu mitozy prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego (najczęściej w fazie G2/M), a w konsekwencji do apoptozy (programowanej śmierci komórki) [114–115]. Ważnym aspektem jest także szybkość i odwracalność działania niektórych z tych związków, co umożliwia precyzyjną kontrolę terapeutyczną, zwłaszcza w przypadku fotomodulowanych leków (np. azowych pochodnych kombretastatyny), które można aktywować światłem w sposób selektywny w tkankach nowotworowych [116–117].

2.2.1 Dibenzo[*b,f*]oksepy

Dibenzo[*b,f*]oksepy (**rys. 14–1**), podobnie jak stilbeny, wykazują wiele interesujących aktywności biologicznych i są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie. Strukturalnie przypominają stilbeny, jednak różnią się obecnością mostka winylowego oraz atomu tlenu, który łączy dwa pierścienie aromatyczne.

2.2.1.1 Właściwości biologiczne pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepy

Wśród ważniejszych przedstawicieli dibenzo[*b,f*]oksepin znajdują się 8-metoksy-7-metylodibenzo[*b,f*]oksepi-1,6-diol, znany jako pacharyna (**rys. 14–2**), oraz 6-metoksy-7-metylodibenzo[*b,f*]oksepi-1,8-diol, znany jako bauhiniastatyna (**rys. 14–3**). Po raz pierwszy wyizolowano je z rośliny *Bauhinia purpurea*, stosowanej w terapii nowotworowej w tradycyjnej medycynie indyjskiej i afrykańskiej. Na podstawie badań stwierdzono, że związki te skutecznie hamują proliferację komórek nowotworowych [118–119].

Pacharyna i bauhiniastatyna są spokrewnione strukturalnie z innymi przedstawicielami tej grupy, takimi jak bauhinioksepina B (**rys. 14–4**) czy artokarpol A (**rys. 14–5**), które wykazują odpowiednio działanie przeciwgrzybicze oraz przeciwzapalne [119]. Artokarpol A posiada również pochodną — artokarpol G — która skutecznie blokuje uwalnianie β -glukuronidazy i histaminy z komórek tucznych podczas ich degranulacji [120].

Wiele związków z tej grupy wykazuje różnorodne działanie farmakologiczne, m.in. przeciwpsychotyczne [119, 121, 122], przeciwzapalne [119, 123], przeciwdepresyjne [119, 124], owadobójcze [119, 125] oraz przeciwpadaczkowe [119, 126]. Stosowane są również w terapii hipertensji [119]. Przykładem szczególnie interesującego związku jest antagonist

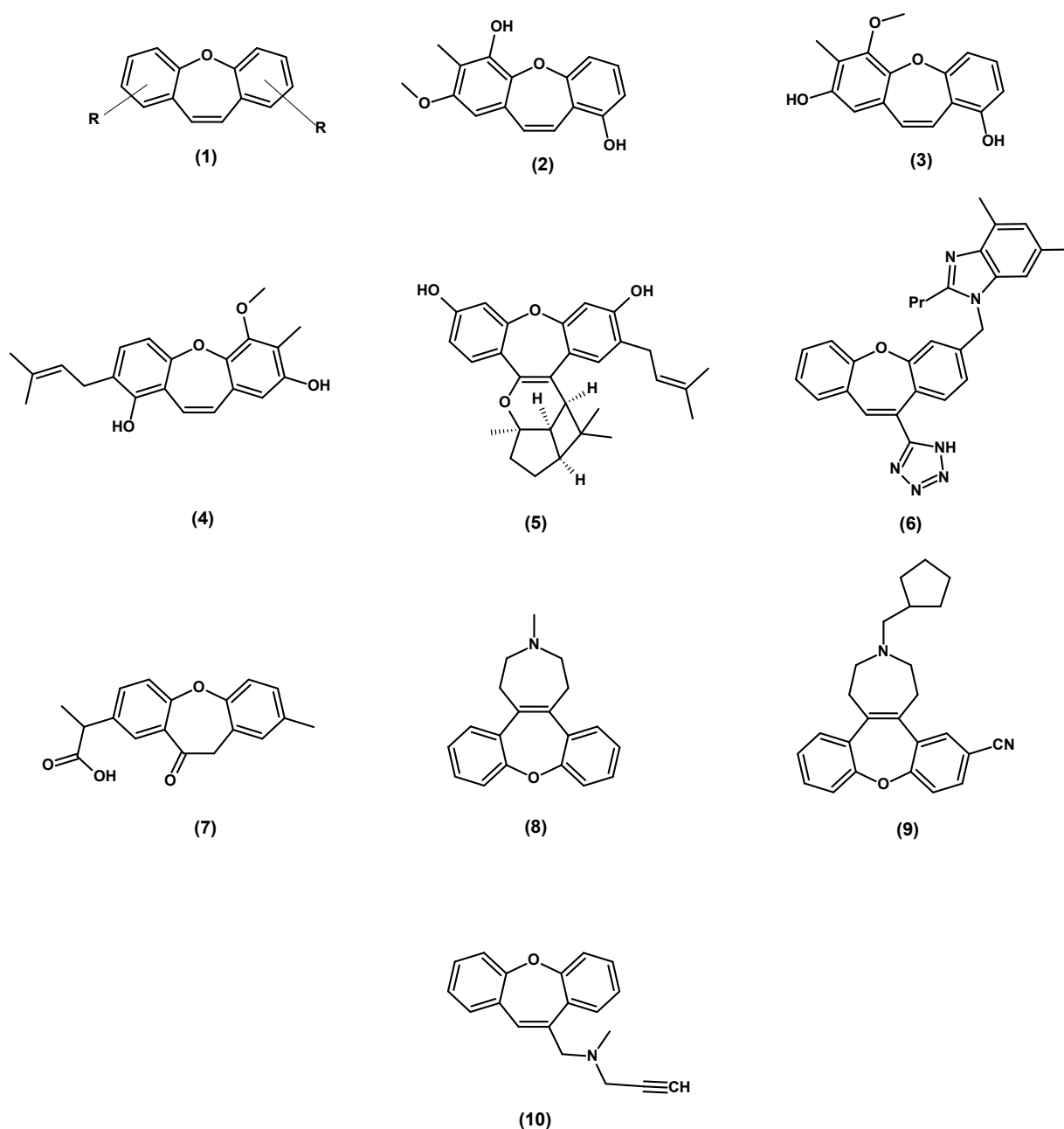
receptora angiotensyny II (AII) (**rys. 14–6**), który dzięki blokowaniu receptorów angiotensynowych zapobiega działaniu angiotensyny II, wpływając tym samym na obniżenie ciśnienia tętniczego i ochronę naczyń krwionośnych oraz serca [126].

Spośród dibenzo[*b,f*]oksepin znane są również związki o działaniu przeciwzapalnym, jak bermoprofen (**rys. 14–7**), będący produktem utleniania wiązania podwójnego w pierścieniu siedmioczłonowym, zaliczany do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) [123, 127].

Część dibenzo[*b,f*]oksepin zawierających dodatkowy, skondensowany pierścień heterocykliczny w pozycjach 4 i 5, wykazuje silne działanie psychoaktywne [127–128]. Tetracykliczne związki, takie jak maroksepina (**rys. 14–8**) czy sawoksepina (**rys. 14–9**), znajdują zastosowanie jako leki przeciwdepresyjne, w terapii zaburzeń lękowych oraz schizofrenii [127, 129–131].

Warto wspomnieć również o związku CGP 3466 (**rys. 14–10**), zawierającym szkielet dibenzo[*b,f*]oksepin, który posiada działanie neuroprotekcyjne dzięki zdolności zapobiegania apoptozie komórek nerwowych [129, 132].

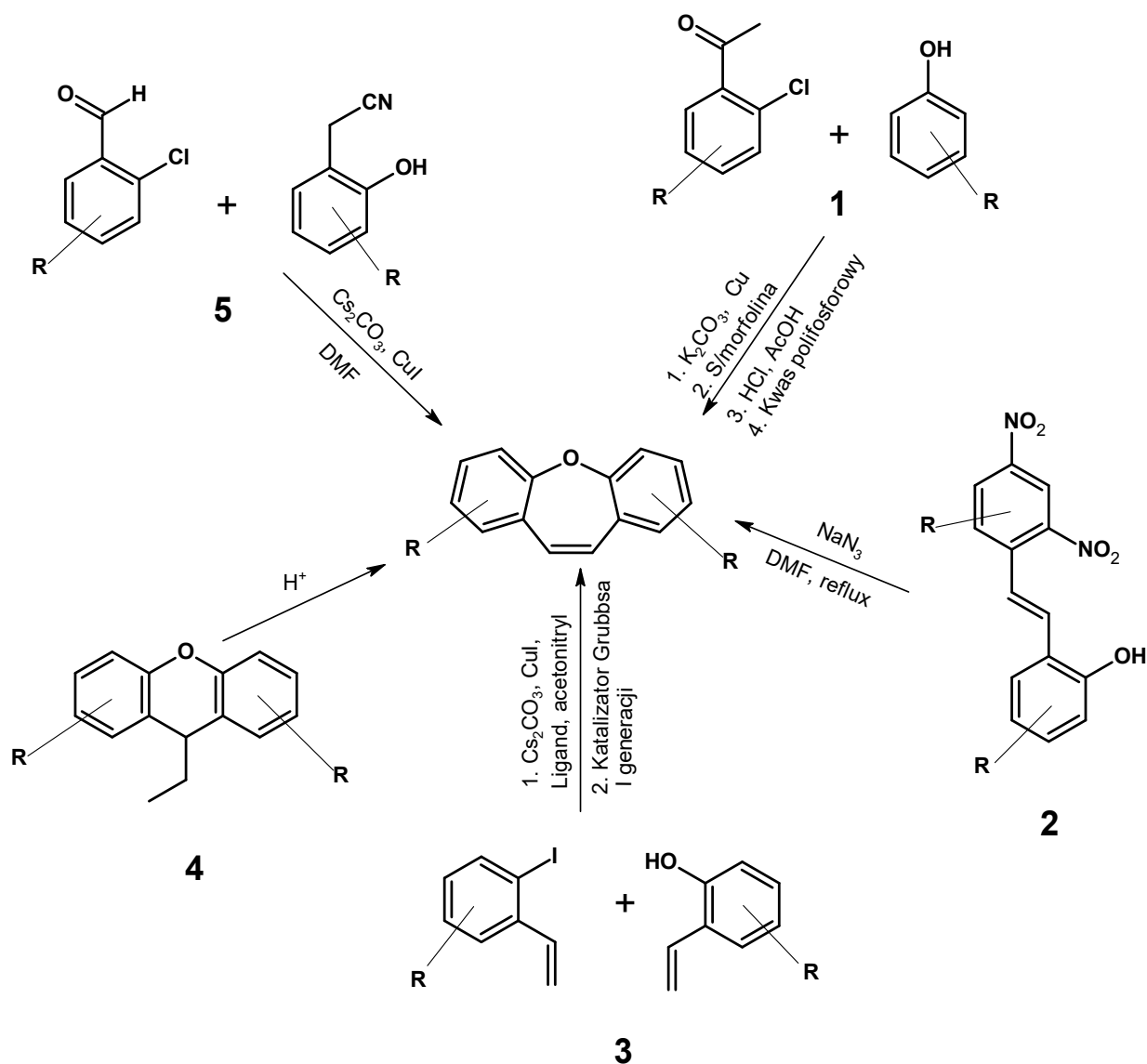
Właściwości syntetycznych analogów dibenzo[*b,f*]oksepin są szczególnie obiecujące w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona czy Alzheimer [129, 133–134].



Rysunek 14. Przykłady biologicznie czynnych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny.

2.2.1.2 Metody otrzymywania pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny

Pochodne dibenzo[*b,f*]oksepiny można otrzymywać różnymi metodami. Najczęściej wykorzystuje się w tym celu etery difenylowe jako substraty lub przeprowadza reakcje kondensacji pomiędzy związkami zawierającymi pierścień aromatyczny. Jednym z prostszych podejść jest nukleofilowa aromatyczna substytucja w cząsteczce stilbenu. Do najważniejszych metod syntezy zalicza się (schem. 17):



Schemat 17. Podsumowanie metod syntezy pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny.

1. Sprzężanie Ullmana połączone z reakcją Friedla-Craftsa (schem. 17–1)

W tej metodzie reakcja rozpoczyna się od sprzężania odpowiedniej halogenopochodnej acetofenonu z pochodną fenolu, co prowadzi do powstania eteru diarylowego. Następnie grupa ketonowa jest przekształcana do kwasu lub jego pochodnej, a później przeprowadzana jest reakcja Friedla-Craftsa, w wyniku której powstaje keton. Ostatni etap to redukcja grupy karbonylowej połączona z odwodnieniem, co ostatecznie pozwala otrzymać dibenzo[*b,f*]oksepinę [123–124, 135].

2. Aromatyczna wewnątrzcząsteczkowa substytucja nukleofilowa ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$) (schem. 17–2)

Ta metoda to reakcja wewnątrzcząsteczkowa, w której stilben zawierający grupę hydroksylową w jednym pierścieniu aromatycznym i grupę nitrową w drugim ulega cyklizacji z utworzeniem

dibenzo[*b,f*]oksepinę. Reakcja przeprowadzana jest w obecności azotku sodu [136], najczęściej w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. W metodzie tej uzyskuje się wysokie wydajności produktów, osiągające 88–95% [136].

3. Sprzęganie Ullmana i metateza olefin (schem. 17–3)

W tym podejściu stosuje się reakcję halogenopochodnej styrenu z jego hydroksypochodną, otrzymując produkt pośredni, który następnie w wyniku metatezy olefin przekształcany jest w dibenzo[*b,f*]oksepinę [120]. W etapie sprzęgania Ullmana uzyskuje się produkt z wydajnością około 85%, natomiast w drugim etapie uzyskuje się produkt końcowy ilościowo. Ważną rolę odgrywa tutaj ligand, którym najczęściej jest 2-[(*E*)-(hydroksylimino)metylo]fenol [120].

4. Przegrupowanie Wagnera-Meerweina (schem. 17–4)

Metoda ta polega na przegrupowaniu karbokationu w pochodnej ksantenu, co prowadzi do powstania dibenzo[*b,f*]oksepinę [137–138].

5. Synteza z 2-halobenzaldehydów (schem. 17–5)

W tej reakcji 2-halobenzaldehyd reaguje z 2-(2-hydroksyfenylo)acetonitrylem lub jego pochodnymi, w efekcie uzyskując dibenzo[*b,f*]oksepinę [118, 133]. Początkowo reakcję prowadzono w obecności węglanu cezu [118], ale wprowadzenie jodku miedzi pozwoliło na optymalizację warunków i osiągnięcie wydajności przekraczających 90% [133].

2.2.2 Chalkony

Kolejnymi związkami dokującymi się w miejscu wiązania kolchicyny w tubulinie są pochodne chalkonu. Są to związki należące do grupy polifenoli, które charakteryzują się obecnością struktury α,β -nienasyconego ketonu (aryl-aryl-propenon) (rys. 15–1). Stanowią one ważną grupę naturalnych i syntetycznych związków o szerokim spektrum aktywności biologicznej, co sprawia, że są intensywnie badane w celu opracowywania nowych leków.

2.2.2.1 Właściwości biologiczne pochodnych chalkonu

Pochodne chalkonu wykazują silne działanie przeciwnowotworowe poprzez różne mechanizmy, takie jak hamowanie proliferacji komórek nowotworowych, indukcję apoptozy, zatrzymanie cyklu komórkowego czy hamowanie angiogenezy i metastazy. Przykładem takiego związku jest ksantoangelol (rys. 15–2), będący naturalnym chalkonem wyizolowanym

z rośliny *Angelica keiskei*. Wykazuje on aktywność przeciwnowotworową wobec różnych linii komórkowych, m.in. raka jelita grubego i piersi, poprzez indukcję apoptozy oraz zahamowanie migracji i inwazji komórek nowotworowych [139]. Izolikiwirytygenina (**rys. 15–3**) natomiast zawarta jest w lukrecji *Glycyrrhiza glabra* i hamuje wzrost komórek raka płuc i okrężnicy, a także działa synergistycznie z niektórymi lekami przeciwnowotworowymi [140].

Dodatkowo chalkony wykazują również aktywność przeciwzapalną poprzez hamowanie działania enzymu COX-2 (enzym będący kluczowym celem niesteroidowych leków przeciwzapalnych) i 5-LOX (enzym odgrywający rolę w procesie powstawania leukotrienów — związków biorących udział w stanach zapalnych), zmniejszanie poziomu cytokin prozapalnych, a także hamowanie aktywacji NF- κ B (rodzina czynników transkrypcyjnych, które odgrywają kluczową rolę w różnych procesach komórkowych, takich jak odporność, stan zapalny, proliferacja komórek i przeżycie komórek). Przykładem chalkonu o takim działaniu jest popularna buteina (**rys. 15–4**) występująca w *Butea monosperma* i *Dalbergia odorifera*, która hamuje aktywność COX-2 oraz zmniejsza wydzielanie TNF- α i IL-6 (cytokiny związane z procesem zapalnym) [141].

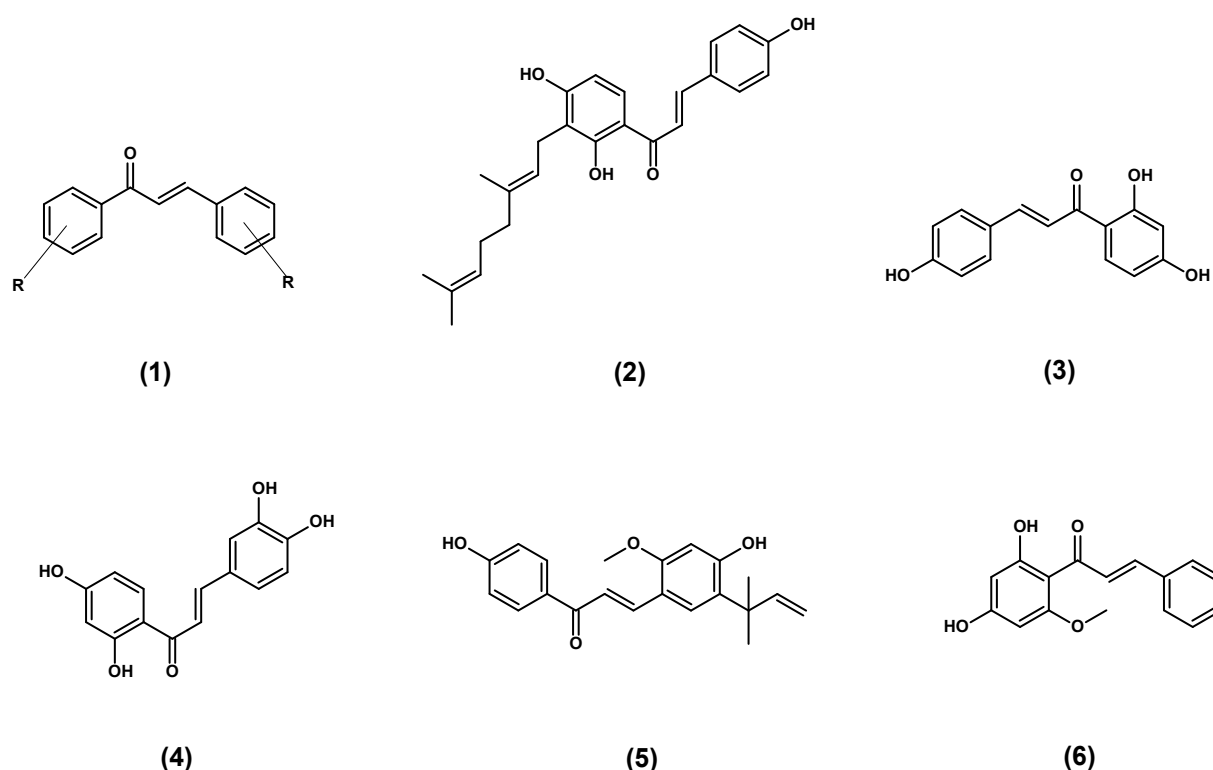
Chalkony znane są również ze swoich silnych właściwości przeciwdrobnoustrojowych, zwłaszcza oddziałują na Gram-dodatnie bakterie i niektóre grzyby. Ich działanie przeciw drobnoustrojom opiera się na uszkodzaniu błony komórkowej, hamowaniu biosyntezy kwasów nukleinowych i białek, a także synergistycznym działaniu z antybiotykami. Związkiem o podanym działaniu jest chociażby likochalkon A (**rys. 15–5**), który hamuje pompy efflux w bakteriach, zwiększając skuteczność antybiotyków [142].

Chalkony zdolne są również do neutralizacji wolnych rodników i zwiększania aktywności enzymów antyoksydacyjnych (np. SOD, ang. *superoxide dismutase*, katalaza). Dzięki swoim właściwościom przeciwutleniającym chronią przed stresem oksydacyjnym i działają ochronnie na komórki nerwowe i sercowe. Związkiem o takim działaniu jest chalkon wyodrębniony z *Alpinia katsumadai* zwany kardamoninem (**rys. 15–6**), który chroni neurony przed uszkodzeniami wywołanymi przez aktywne formy tlenu [143].

Niektóre chalkony są zdolne do oddziaływania na układ nerwowy poprzez hamowanie enzymów degradujących neuroprzekaźniki, takich jak MAO-A (monoaminooksydaza-A) i MAO-B (monoaminooksydaza-B), modulację układu serotonergicznego i dopaminergicznego oraz działanie przeciwlękowe i przeciwdepresyjne. Syntetyczne

hydroksychalkony wykazały *in vitro* silne właściwości hamujące MAO-B, co wskazuje na ich potencjalne zastosowanie w chorobie Parkinsona [144].

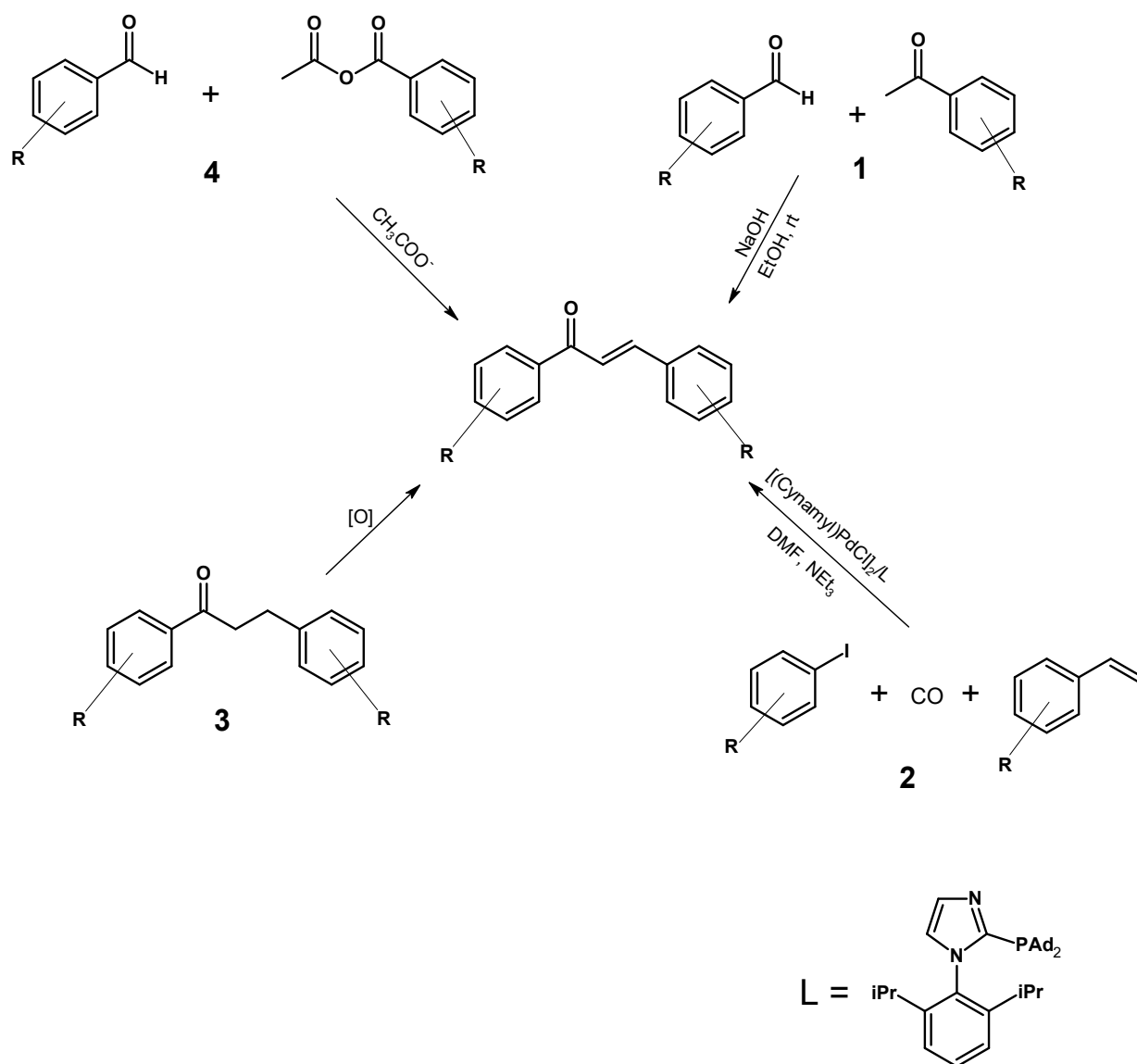
Na podstawie badań z 2013 roku wykazano również, że chalkony mogą ujawniać właściwości hipoglikemiczne poprzez hamowanie działania enzymów α -glukozydazy i α -amylazy. Są one zdolne do poprawy wrażliwości komórek na insulinę, a także działają ochronnie na komórki β -trzustki. Wcześniej wspomniana izolikwirytygenina, oprócz swoich właściwości przeciwnowotworowych, jest zdolna do hamowania aktywności α -glukozydazy, zmniejszania poziomu glukozy we krwi oraz poprawiania tolerancji glukozy, co zostało udowodnione w badaniach na myszach z cukrzycą [145].



Rysunek 15. Przykłady biologicznie czynnych pochodnych chalkonu.

2.2.2.2 Metody otrzymywania pochodnych chalkonu

Chalkony są klasą związków, które można otrzymać przy użyciu stosunkowo prostych i standardowych metod syntezy (**schem. 18**). Do najważniejszych metod syntezy zalicza się:



Schemat 18. Podsumowanie metod syntezy pochodnych chalkonu.

1. Kondensacja aldolowa (schem. 18–1)

Najbardziej klasyczna i powszechnie stosowana metoda otrzymywania chalkonów. Polega na kondensacji odpowiedniego aldehydu aromatycznego z ketonem aromatycznym (najczęściej acetofenonem) w warunkach zasadowych (np. w obecności NaOH, KOH w etanolu). Reakcja prowadzi do powstania α,β -nienasyconego ketonu [146].

Choć najczęściej kondensację aldolową prowadzi się w warunkach zasadowych, w niektórych przypadkach stosuje się katalizę kwasową (np. HCl, H₂SO₄), zwłaszcza gdy reagenty są wrażliwe na zasady [147].

2. Reakcja Hecka (schem. 18–2)

W tej metodzie chalkony powstają w wyniku sprzęgania (ang. *cross-coupling*) styrenów z arylobromkami lub arylojodkami w obecności tlenku węgla(II) i katalizatora palladowego. Jest to szczególnie korzystne, gdy chcemy wprowadzić trudniej dostępne grupy aryłowe (posiadające reaktywne podstawniki) [148].

3. Utlenianie dihydrochalkonów (schem. 18–3)

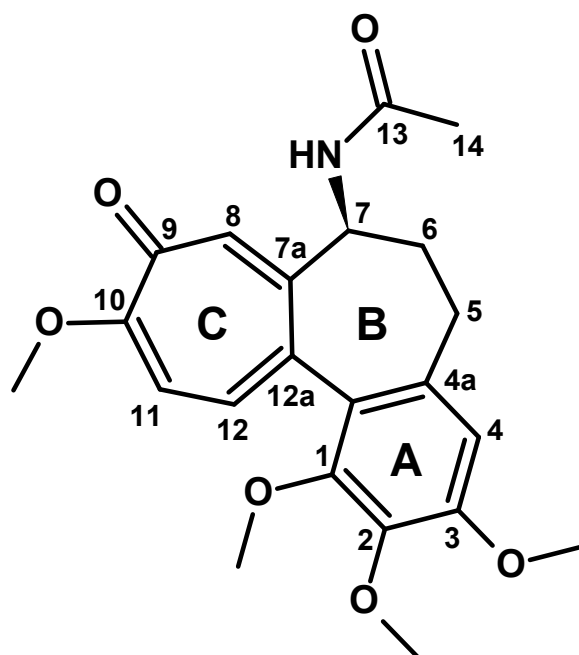
Chalkony można otrzymać przez utlenianie odpowiednich dihydrochalkonów (DHC) przy użyciu środków utleniających takich jak jod, DDQ (2,3-dichloro-5,6-dicyjano-1,4-benzochinon) lub MnO_2 [149].

4. Kondensacja Perkina (schem. 18–4)

Choć nie jest to klasyczna metoda syntezy chalkonów, w niektórych przypadkach można wykorzystać reakcję Perkina, w której bezwodniki kwasowe reagują z aldehydami w obecności soli sodowych kwasów karboksylowych, co prowadzi do otrzymania α,β -nienasyconych ketonów [150].

2.2.3 Kolchicyna

Kolchicyna (rys. 16) to naturalny alkaloid izolowany głównie z roślin z rodzaju *Colchicum*, takich jak zimowit jesienny (*Colchicum autumnale*), która od wieków była wykorzystywana w leczeniu dny moczanowej, ale obecnie stosuje się ją głównie do leczenia choroby Behçeta, skrobiawicy czy też rodzinnej gorączki śródziemnomorskiej [151]. Związek ten wykazuje szerokie spektrum aktywności biologicznej, co czyni go przedmiotem intensywnych badań farmakologicznych i klinicznych [152–153].



Rysunek 16. Schemat struktury kolchicyny wraz z oznaczeniem pierścieni w cząsteczce i numeracją atomów węgla.

Cząsteczka kolchicyny zbudowana jest z 3 pierścieni — jednego aromatycznego pierścienia sześciocząłowego oraz dwóch pierścieni siedmiocząłowych, z czego jeden jest pierścieniem tropolonowym, a drugi zawiera centrum stereogeniczne znajdujące się na atomie węgla C7.

2.2.3.1 Właściwości biologiczne kolchicyny

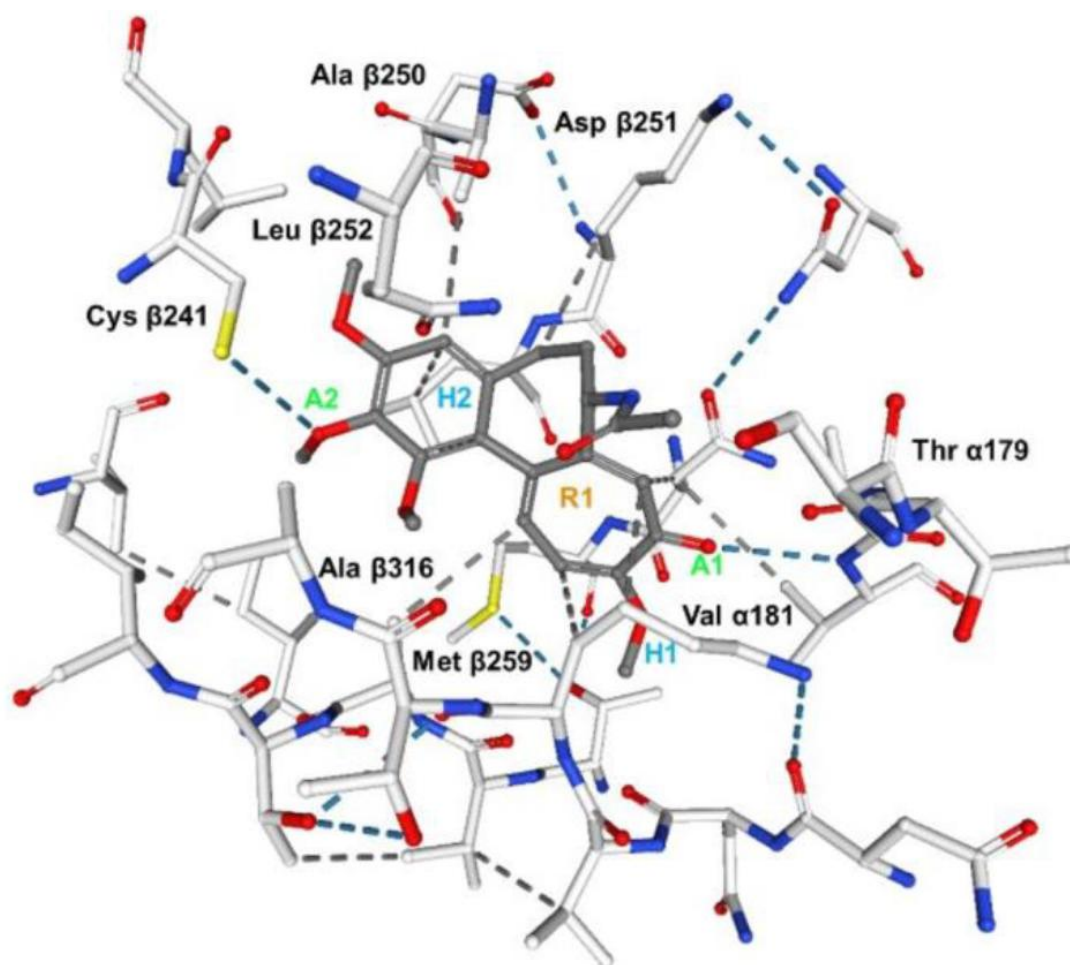
Jednym z kluczowych mechanizmów działania kolchicyny jest jej zdolność do wiązania się z tubuliną, co prowadzi do destabilizacji mikrotubul. Kolchicina wiąże się w tzw. domenie kolchicynowej tubuliny, hamując proces polimeryzacji heterodimerów $\alpha\beta$ -tubuliny w mikrotubulach [154–155]. Powoduje to zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie metafazy, co skutkuje zahamowaniem proliferacji komórek, w tym komórek nowotworowych [156–157]. Kolchicina wykazuje działanie przeciwzapalne, ponieważ hamuje migrację neutrofili do ognisk zapalnych, zmniejsza wydzielanie cytokin prozapalnych (np. IL-1 β , TNF- α) oraz redukuje produkcję reaktywnych form tlenu [158–159]. Z tego względu jest stosowana w terapii dny moczanowej, choroby Behçeta oraz zapalenia osierdzia [160–161]. Co więcej, kolchicina wykazuje właściwości przeciwnowotworowe, co potwierdzono w wielu modelach przedklinicznych. Ogranicza angiogenezę, wpływa na apoptozę komórek nowotworowych oraz zmniejsza inwazyjność i zdolność do tworzenia przerzutów [162–163]. Przykładowo, wykazano, że kolchicina indukuje apoptozę w komórkach raka płuc poprzez aktywację kaspaz oraz zahamowanie szlaku PI3K/Akt [164]. Ponadto, dzięki swoim właściwościom

antymitotycznym, kolchicina badana jest jako potencjalny składnik terapii skojarzonych w nowotworach jajnika i piersi [165].

Podsumowując, kolchicina jest związkiem o wielokierunkowym działaniu biologicznym, wykorzystywanym zarówno w leczeniu chorób zapalnych, jak i jako potencjalny kandydat w terapii przeciwnowotworowej.

2.2.3.2 Aktywność biologiczna pochodnych kolchicyny — modyfikacja strukturalna kolchicyny

Jak już wcześniej wspomniano kolchicina jest zdolna do wiązania się z domeną kolchicynową w tubulinie w wyniku czego hamuje polimeryzację mikrotubul. Szczegółową strukturę miejsca wiązania kolchicyny na tubulinie poznano już w 2004 roku [166]. Na podstawie tych danych, a także właściwości kolchicyny i innych związków o działaniu antymitotycznym, opracowano bazę danych, która umożliwiła stworzenie modelu farmakoforowego. Model ten obejmuje trzy miejsca zdolne do akceptowania wiązań wodorowych, mogące oddziaływać z wybranymi aminokwasami w obrębie tubuliny (Val β 181, Cys β 241, Ala β 250, Asp β 251 i Leu β 252) (**rys. 17**), jedno miejsce będące donorem wiązania wodorowego, które wchodzi w interakcję z Thr β 179, a także dwa centra hydrofobowe oraz element strukturalny o charakterze planarnym. Na podstawie kolejnych analiz wykazano, że skuteczne wiązanie do miejsca kolchicyny wymaga obecności co najmniej dwóch centrów hydrofobowych, jednej grupy akceptora wiązania wodorowego oraz płaskiej struktury aromatycznej [166].



Rysunek 17. Domena kolchicynowa w tubulinie i miejsca wiązania się z nią kolchicyny.

Jak już wcześniej wspomniano kolchicina zawiera trzy pierścienie, które oznacza się literami A, B, C (**rys. 16**). Na podstawie badań strukturalnych możliwe jest zidentyfikowanie fragmentów cząsteczki, które odpowiadają za kluczowe właściwości biologiczne związku, co pozwala na ukierunkowane modyfikacje chemiczne bez utraty aktywności [166]. Zmiany w obrębie pierścienia A zazwyczaj prowadzą do całkowitej utraty zdolności wiązania do miejsca aktywnego, natomiast pierścienie B i C wykazują większą tolerancję na modyfikacje. Szczególne znaczenie mają grupy metoksyłowe obecne w pierścieniach A i C — odpowiadają one za cytotoksyczność związku, choć nie wpływają istotnie na jego interakcję z białkiem transportującym — P-glikoproteiną (P-gp). Kluczową rolę w rozpoznawaniu kolchicyny przez P-gp odgrywa atom azotu zlokalizowany przy węglu C7 (w formie aminy lub amidu). W związku z tym wiele badań koncentrowało się na chemicznej modyfikacji pozycji C7, z zamiarem opracowania nowych analogów o lepszym profilu terapeutycznym — wyższej skuteczności, mniejszej toksyczności i ograniczonej podatności na mechanizmy oporności lekowej.

Modyfikacja pierścienia A:

Jak wcześniej zaznaczono, ingerencja w strukturę pierścienia A zwykle prowadzi do obniżenia aktywności biologicznej związku, nie przynosząc jednocześnie redukcji działań niepożądanych charakterystycznych dla kolchicyny. Z tego względu liczba przebadanych analogów z modyfikacjami w tym obszarze — zarówno związków naturalnych, jak i syntetycznych — pozostaje ograniczona. Usunięcie jednej lub kilku grup metoksyowych skutkuje wyraźnym spadkiem właściwości antymitotycznych [167].

Modyfikacja pierścienia B:

W przeciwieństwie do pierścienia A, charakteryzującego się niską tolerancją na modyfikacje strukturalne, pierścień B wykazuje większą elastyczność w tym zakresie [168]. Możliwe są zarówno zmiany jego rozmiaru, jak i substytucja w pozycjach bocznych, które w wielu przypadkach nie wpływają negatywnie na aktywność biologiczną. Szczególnie obiecujące okazały się pochodne z modyfikacjami przy atomie węgla C7, które często zachowują silne działanie cytotoksyczne [151].

Do przykładów modyfikacji pierścienia B zaliczają się reakcje prowadzące do jego kondensacji, ekspansji, tworzenia dodatkowych pierścieni czy wprowadzania heteroatomów. Jednym z przykładów modyfikacji jest synteza pochodnych tiokolchicyny z sześcioczłonowym pierścieniem B [169]. Otrzymane związki przebadano pod kątem ich zdolności do hamowania polimeryzacji tubuliny na różnych liniach komórkowych. Spośród analizowanych struktur, największą aktywność przeciwnowotworową wykazały pochodne estrowe tiokolchicyny (**rys. 18–1**). Wysoką cytotoksycznością charakteryzowały się również analogi zawierające wiązania olefinowe oraz estry z krótkimi łańcuchami. Co więcej, jeden z alkenowych pochodnych tiokolchicyny (**rys. 18–2**), stosowany w połączeniu z winkrystyną, wykazywał działanie synergiczne wobec komórek nowotworowych opornych na ten lek [170].

Kolchicynę można również modyfikować w pozycjach 7 (pierścienia B) i 8 (pierścienia C) poprzez dodanie nowego pierścienia. Przykładem takiego związku jest tetracykliczny kolchicyd (**rys. 18–3**). Związek ten wykazał cytotoksyczne działanie wobec wielu różnych linii komórkowych, a w niektórych przypadkach jego skuteczność była zbliżona do działania paklitakselu [171].

Wprowadzenie heteroatomu do pierścienia B najczęściej polega na insercji atomu azotu lub tlenu do jego struktury. Jeden z takich analogów, zawierający atom tlenu (**rys. 18–4**), charakteryzuje się umiarkowaną aktywnością biologiczną, jednak istotnie potęguje działanie cytostatyczne dokсорubicyny w stosunku do komórek nowotworowych linii ostrej białaczki limfoblastycznej Nalm6 [172].

Jednym ze sposobów poprawy rozpuszczalności kolchicyny w środowisku wodnym jest wprowadzenie cukrów do struktury kolchicyny, czyli synteza glikozydowanych pochodnych, których ogólną strukturę przedstawiono na **rysunku 18–5** [173]. Na podstawie analizy biologicznej tych analogów stwierdzono, że ich działanie cytotoksyczne jest słabsze niż w przypadku samej kolchicyny. Warto zauważyć, że zaobserwowano również nietypowy efekt związany z dwukrotnym podstawieniem deoksypentozy, które prowadziło do stabilizacji mikrotubul — efektu odwrotnego do tego, który zazwyczaj wywołują kolchicynowe pochodne [173].

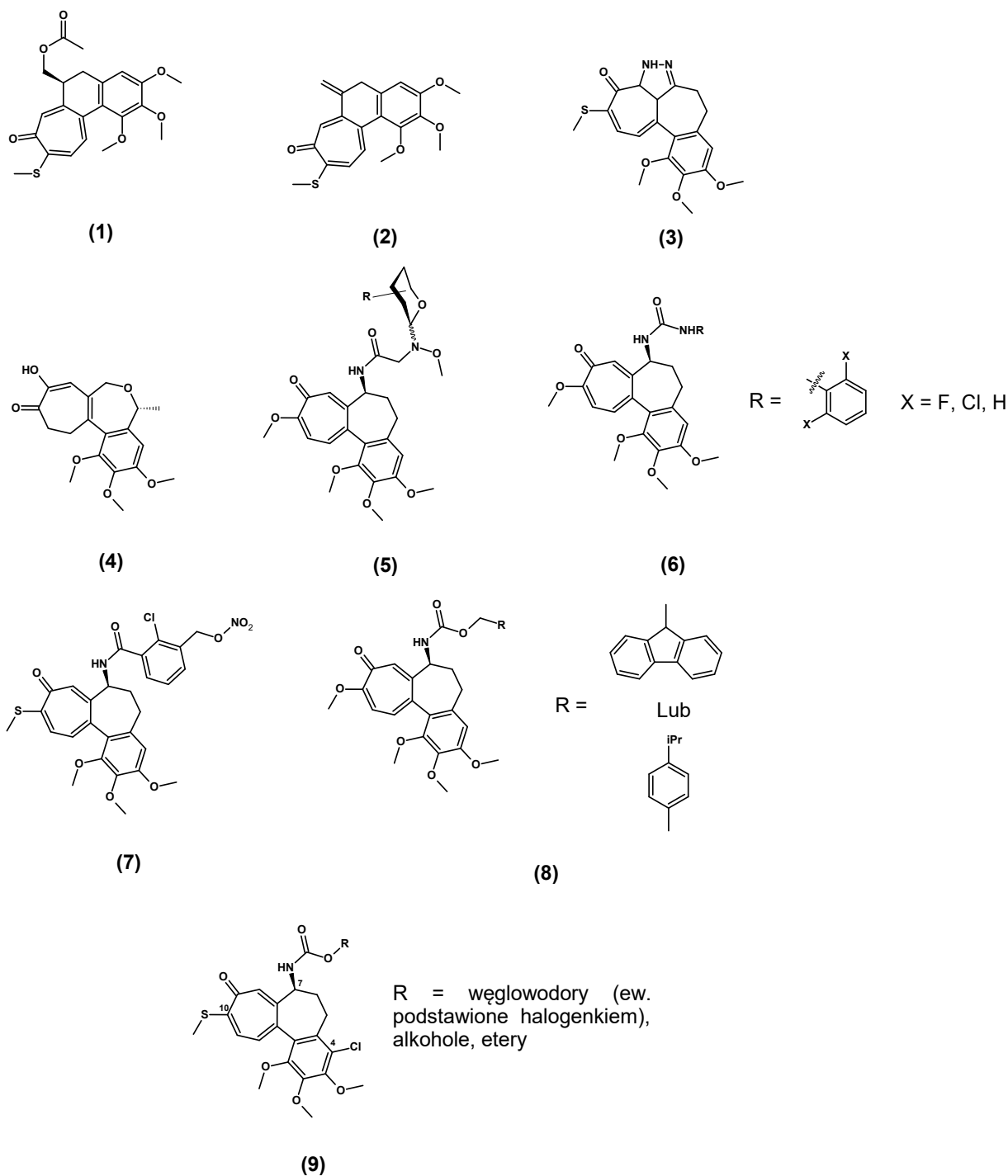
Zostały również przeprowadzone badania szeregu pochodnych kolchicyny, w których modyfikowano łańcuch boczny, aby ocenić wpływ obecności grup hydrofilowych i hydrofobowych na aktywność biologiczną związku. Na podstawie eksperymentów *in vivo* dowiedziono, że po podaniu kolchicyna początkowo akumuluje się w błonie komórkowej, a jedynie niewielka jej część przenika do wnętrza komórki i dociera do tubuliny. Dopiero w późniejszym etapie cząsteczka uwalniana jest do cytozolu, gdzie niemal nieodwracalnie wiąże się z tubuliną. Na tej podstawie stwierdzono, że błona komórkowa pełni rolę swego rodzaju magazynu kolchicyny, regulując tempo jej uwalniania i dostępność wewnątrzkomórkową [174].

Jednym z kierunków modyfikacji kolchicyny jest dołączanie ugrupowań mocznikowych do jej struktury (**rys. 18–6**). Przeprowadzone testy na liniach komórkowych wykazały, że większość tak zmodyfikowanych analogów zachowuje wysoką aktywność biologiczną. Co więcej, stwierdzono, że wprowadzenie atomu chloru w pozycji *orto* pierścienia *N*-fenyłowego dodatkowo zwiększało skuteczność działania tych związków. Szczególnie interesujące okazały się pochodne o strukturze 2,2-difluoro oraz 2-chloro, których zdolność do hamowania aktywności kinaz była porównywalna do sunitinibu — leku zatwierdzonego przez FDA w 2006 roku do leczenia raka nerki i nowotworów przewodu pokarmowego opornych na inne terapie [175].

Związek oznaczony jako CT20126, będący pochodną tiokolchicyny (**rys. 18–7**), wykazuje zdolność hamowania proliferacji komórek bez wywoływania przy tym typowej cytotoksyczności [176]. Ponadto obserwuje się jego wpływ na obniżenie ekspresji genów prozapalnych, takich jak iNOS i TNF- α , w komórkach makrofagów. Co istotne, mechanizm indukowanej przez ten związek apoptozy różni się od tego, który jest charakterystyczny dla kolchicyny i jej znanych analogów. Choć początkowo CT20126 został zaprojektowany jako potencjalny inhibitor polimeryzacji tubuliny, okazało się, że w przeciwieństwie do kolchicyny, nie tylko prowadzi do szybkiej depolimeryzacji mikrotubul, ale jednocześnie stymuluje polimeryzację dimerów tubuliny do krótkich, nieprawidłowych filamentów, które nie są zdolne do pełnienia swoich fizjologicznych funkcji [177].

Znane są również pochodne kolchicyny zawierające grupę karbaminianową (**rys. 18–8**), które wykazują działanie immunosupresyjne [178]. Związki te wpływają na proliferację komórek T typu CD8⁺ oraz CD4⁺ poprzez hamowanie polimeryzacji tubuliny, zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2, oraz osłabienie polimeryzacji mitochondrialnej. Ponadto ograniczają aktywację limfocytów T poprzez zahamowanie działania receptora IL-2 (IL-2R) i szlaku sygnałowego STAT3. Właściwości te wskazują, że związki te mogą być wykorzystane w terapii potransplantacyjnej, zwłaszcza w synergicznym działaniu z cyklosporyną A [178].

Przeprowadzono również syntezę oraz ocenę aktywności biologicznej potrójnie podstawionych pochodnych kolchicyny (przy węglach C4, C7 i C10), w tym 4-chlorotiolchicyny zawierającej grupę karbaminianową (**rys. 18–9**) [179–180]. Wiele z otrzymanych związków wykazywało znacznie wyższą cytotoksyczność w porównaniu do standardowej kolchicyny, a także do leków takich jak doksorubicyna i cisplatyna, co potwierdzono w testach na liniach komórkowych. Co więcej, niektóre z tych pochodnych cechowały się podwyższoną selektywnością wobec komórek nowotworowych przy ograniczonym działaniu na zdrowe komórki.



Rysunek 18. Przykłady biologicznie czynnych pochodnych kolchicyny ze zmodyfikowanym pierścieniem B.

Podsumowując, modyfikacja łańcucha bocznego w pierścieniu B kolchicyny pozwala na uzyskanie związków o odmiennym profilu biologicznym oraz może zwiększać ich selektywność wobec komórek nowotworowych, przy zachowaniu ich cytotoksycznych właściwości. Ponadto podstawienie atomu węgla w pozycji C7 pierścienia B stwarza możliwości tworzenia proleków, związków hybrydowych oraz koniugatów z polimerowymi nośnikami, co może poszerzyć potencjalne zastosowania terapeutyczne kolchicyny.

Modyfikacja pierścienia C:

Jak już wcześniej wspomniano, obecność pierścienia tropolonowego odgrywa istotną rolę w wiązaniu kolchicyny do tubuliny [181–182]. W porównaniu do pierścienia A, pierścień C wykazuje większą tolerancję wobec modyfikacji strukturalnych. Dzięki temu opracowano wiele pochodnych kolchicyny z przekształconym pierścieniem C, które charakteryzują się podwyższoną aktywnością biologiczną — często poprzez jego kontrakcję. Pierścień tropolonowy cechuje się także dużą łatwością funkcjonalizacji, co czyni go atrakcyjnym obiektem do dalszych modyfikacji chemicznych.

Wśród znanych analogów kolchicyny z pomniejszonym pierścieniem C znajdują się *N*-acetylokolchinol (**rys. 19–1**), jego rozpuszczalna w wodzie pochodna — ZD6126 (**rys. 19–2**) [183], a także pochodna eterowa NCME (**rys. 19–3**). Są to związki przeciwnowotworowe silnie niszczące unaczynienie guza.

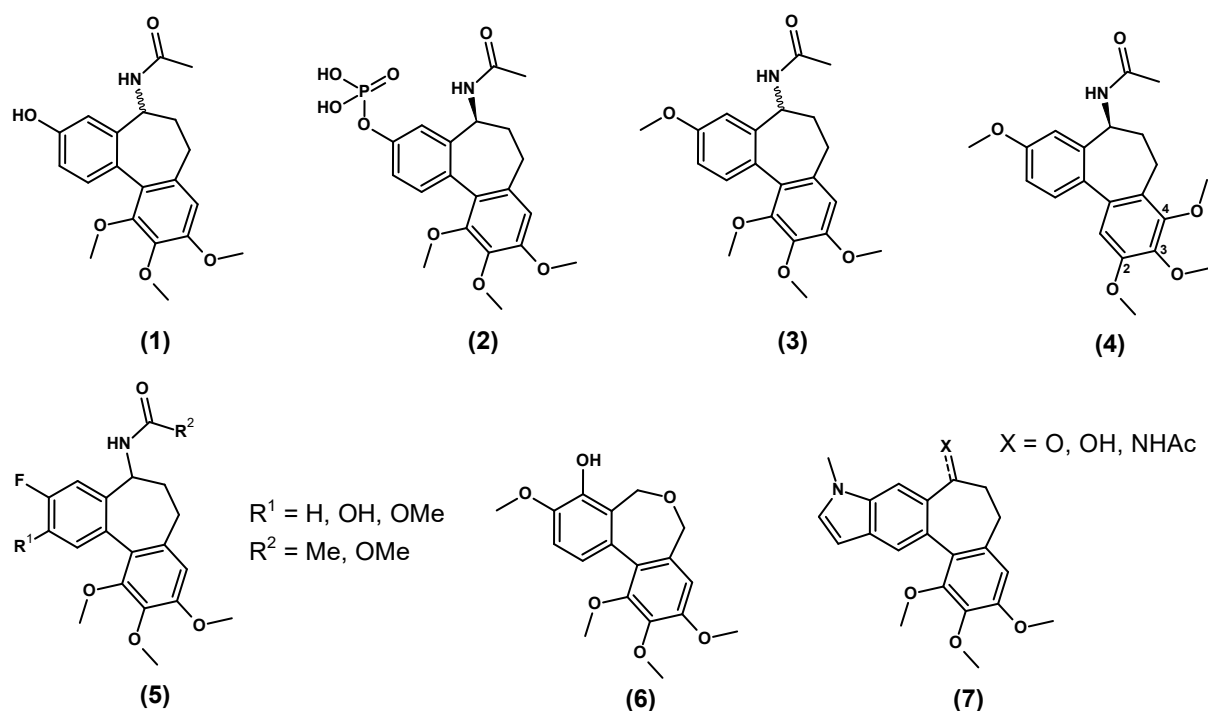
Jednym z interesujących analogów kolchicyny jest również związek określany jako „Green 1” (**rys. 19–4**) [184]. Stanowi on izomeryczną formę NCME, różniącą się od niego pozycją grup metoksyowych w pierścieniu A — są one przesunięte o jedną pozycję. W odróżnieniu od kolchicyny, Green 1 nie wpływa na proces polimeryzacji tubuliny. Green 1 indukuje autofagię w komórkach nowotworowych, takich jak komórki raka trzustki oraz białaczki E6, natomiast nie wykazuje takiego działania wobec prawidłowych ludzkich fibroblastów. Co więcej, związek ten powoduje zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu w mitochondriach izolowanych z komórek rakowych trzustki. Na podstawie eksperymentów *in vivo* potwierdzono również dobrą tolerancję Green 1 po podaniu myszom [184].

Zastąpienie grupy metoksyowej atomem fluoru w strukturze NCME prowadzi do powstania pochodnych o wyższej stabilności metabolicznej i większej lipofilowości, a także do ujawnienia nowych, dotąd nieznanых efektów biologicznych [185]. Na podstawie przeprowadzonych badań nad cytotoksycznością fluorowanych kolchinoli (**rys. 19–5**) wobec komórek nowotworowych prostaty i trzustki wykazano, że związki te skutecznie hamują ich wzrost — na poziomie porównywalnym z *N*-acetylokolchinolem i NCME. Warto zaznaczyć, że fluoropochodne charakteryzowały się niższą toksycznością wobec zdrowych komórek w porównaniu do innych znanych analogów kolchicyny.

Również pochodne dibenzo[*c,e*]oksepiny (**rys. 19–6**) są związkami o wysokim potencjale biologicznym [186]. Ich zdolność do hamowania polimeryzacji tubuliny jest porównywalna z

efektem wywieranym przez kombretastatynę A–4, mimo istotnych różnic w budowie tych związków [187–188].

Znane są również pochodne kolchinelu zawierające dodatkowy pierścień heterocykliczny skondensowany z pierścieniem C (**rys. 19–7**) [189–190]. Związki te wykazują silne działanie antyproliferacyjne oraz zdolność do indukowania apoptozy w komórkach chłoniaka Burkitta. Nie bez znaczenia jest fakt, że pochodne te odznaczały się niską toksycznością wobec zdrowych komórek.



Rysunek 19. Przykłady biologicznie czynnych pochodnych kolchicyny ze zmodyfikowanym pierścieniem C.

Podsumowując, jedną z najczęściej stosowanych strategii modyfikacji pierścienia C kolchicyny jest jego kontrakcja — czyli przekształcenie pierścienia tropolonowego w pierścień benzenowy posiadający różne podstawniki. Wśród najczęściej spotykanych grup funkcyjnych w zmniejszonym pierścieniu C znajdują się grupy hydroksylowe i metoksyłowe, charakterystyczne m.in. dla *N*-acetylokolchinelu i NCME. Opis działania i synteza tych związków jest dobrze udokumentowana w literaturze, a badania nad ich nowymi analogami są nadal aktywnie prowadzone. Warto również zaznaczyć, że modyfikacje pierścienia C budzą zainteresowanie środowiska naukowego ze względu na fakt, iż nie wpływają istotnie na cytotoksyczne właściwości kolchicyny.

2.3 Podsumowanie przeglądu literaturowego i podstawy hipotezy badawczej

Niniejszy przegląd literaturowy dotyczy zagadnień związanych z fotofarmakologią — dziedziną badającą zastosowanie światłoczułych związków chemicznych w medycynie. Kluczową rolę odgrywają tu fotochromowe przełączniki molekularne, czyli związki zdolne do odwracalnej zmiany swojej struktury pod wpływem światła. Taka właściwość umożliwia kontrolowanie ich aktywności biologicznej — zazwyczaj tylko jedna z form danego związku wykazuje działanie farmakologiczne, co pozwala na jej precyzyjne aktywowanie lub dezaktywowanie za pomocą odpowiedniego bodźca świetlnego. Związki te mogą również wchodzić w interakcje z określonymi celami biologicznymi, ułatwiając transport leków lub modulując ich działanie w zależności od konformacji. Najczęściej spotykanym motywem strukturalnym w przełącznikach molekularnych wykorzystywanych w fotofarmakologii jest ugrupowanie azowe ($-N=N-$), które ulega efektywnej fotoizomeryzacji między formami *E* i *Z*. Z tego względu opracowano wiele metod syntezy związków zawierających ten fragment strukturalny.

Przedstawiono również opis działania i otrzymywania dibenzo[*b,f*]oksepy i jej pochodnych, które wykazują wiele interesujących właściwości biomedycznych, takich jak działanie przeciwpsychotyczne, przeciwdepresyjne, przeciwzapalne czy owadobójcze, i są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie. Strukturalnie przypominają stilbeny, jednak różnią się obecnością mostka winylowego oraz atomu tlenu, który łączy dwa pierścienie aromatyczne. Do popularnych metod otrzymywania tej klasy związków należą m.in. reakcja Ullmana z późniejszą metatezą olefin, reakcja Friedla-Craftsa, przegrupowanie Wagnera-Meerweina oraz wewnątrzcząsteczkowa aromatyczna substytucja nukleofilowa.

Kolejna opisana grupa związków to pochodne chalkonu. Są to związki należące do grupy polifenoli, które charakteryzują się obecnością struktury α,β -nienasyconego ketonu (1,3-diaryl-2-propen-1-on). Stanowią one ważną grupę naturalnych i syntetycznych związków o szerokim spektrum aktywności biologicznej. Chalkony wykazują silne działanie przeciwnowotworowe poprzez różne mechanizmy, takie jak hamowanie proliferacji komórek nowotworowych, indukcja apoptozy, zatrzymanie cyklu komórkowego czy hamowanie angiogenezy i metastazy. Ponadto chalkony znane są ze swoich właściwości przeciwdrobnoustrojowych, antyoksydacyjnych czy też hipoglikemicznych. Wśród

najpopularniejszych metod syntezy tej klasy związków można zaliczyć kondensację aldolową, reakcję Hecka czy też kondensację Perkina.

Przedstawiono także przegląd literaturowy dotyczący kolchicyny i jej pochodnych. Kolchicyna jest naturalnym alkaloidem izolowanym głównie z roślin z rodzaju *Colchicum*. Związek ten wykazuje szerokie spektrum aktywności biologicznej, co czyni go przedmiotem intensywnych badań farmakologicznych i klinicznych. Kolchicyna jest związkiem o wielokierunkowym działaniu biologicznym, wykorzystywanym zarówno w leczeniu chorób zapalnych, jak i jako potencjalny kandydat w terapii przeciwnowotworowej. Modyfikacja jej struktury prowadzi do otrzymania mniej lub bardziej aktywnych biologicznie związków.

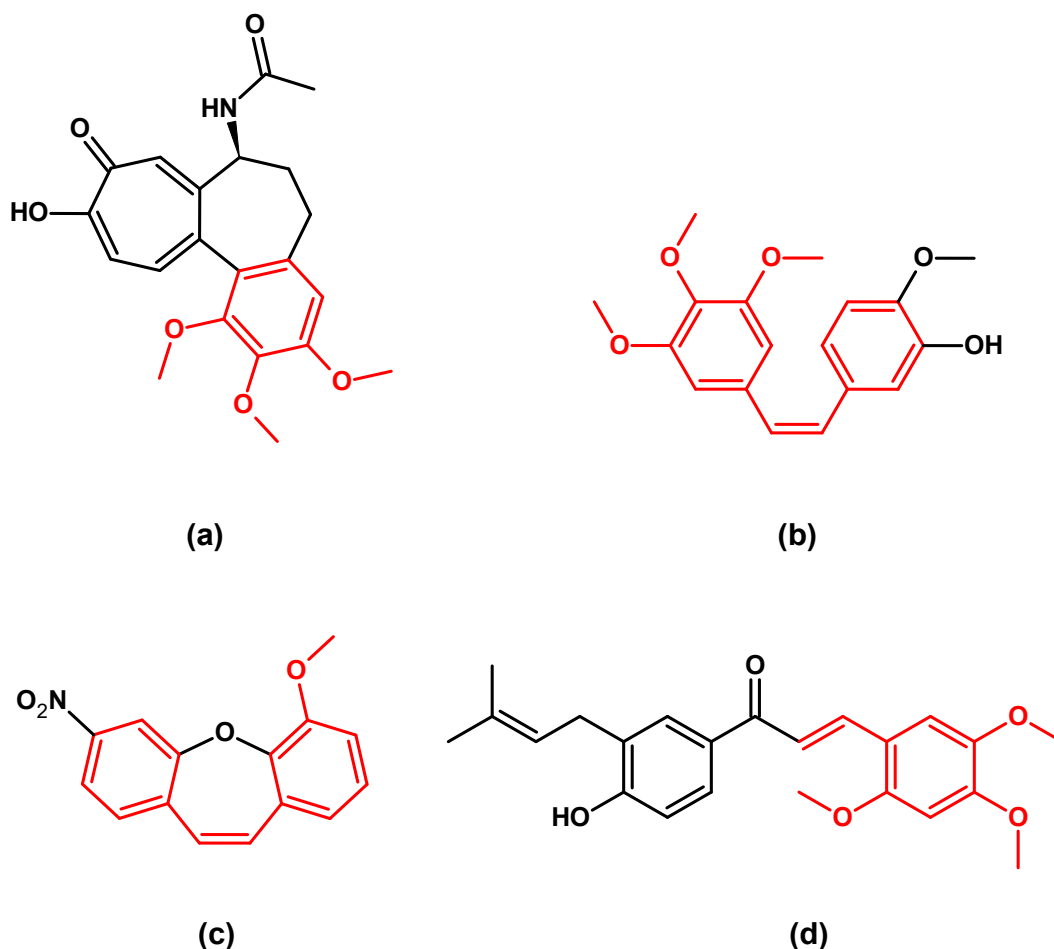
Wszystkie wymienione związki wykazują właściwości przeciwnowotworowe poprzez ich zdolność do wiązania się z tubuliną w tzw. domenie kolchicynowej. Kiedy związek (np. kolchicyna, kombretastatyna czy ich pochodne) przyłączy się do tej domeny, hamuje polimeryzację tubuliny, czyli proces łączenia podjednostek tubuliny w mikrotubule. Blokowanie polimeryzacji mikrotubul zakłóca tworzenie wrzeciona podziałowego, które jest niezbędne do prawidłowego rozdziału chromosomów podczas podziału komórki. W efekcie komórki nowotworowe, które charakteryzują się bardzo szybkim tempem podziału, są szczególnie wrażliwe na tego typu leki.

Na podstawie powyższych faktów sformułowano hipotezę badawczą, że syntezywanie pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny, chalkonu czy kolchicyny zawierających ugrupowanie azowe może być niezwykle korzystne ze względu na połączenie właściwości medycznych takiego bioaktywnego związku z funkcją fotochromowego przełącznika molekularnego. Hipoteza ta stanowiła podstawę niniejszej pracy.

3. Badania własne

3.1 Wprowadzenie

Prowadząc badania nad inhibitorami mikrotubul, przeanalizowano strukturę aktywnej kolchicyny (**rys. 20–1**), aktywnej kombretastatyny A–4 (**rys. 20–2**), metoksyłowej pochodnej dibenzo[*b,f*]oksepiny (**rys. 20–3**) oraz metoksyłowej pochodnej chalkonu (**rys. 20–4**). Zaobserwowano, że obecność grup metoksyłowych decyduje o ich aktywnościach biologicznych. Dodatkowo związki te wykazują działanie przeciwnowotworowe poprzez oddziaływanie z domeną kolchicynową. Metoksyłowa pochodna dibenzo[*b,f*]oksepiny wykazuje działanie cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych HeLa i U87 [191] i posiada w swoim szkielecie motyw (*Z*)-stilbenu, a jej pierścienie aromatyczne są połączone tlenem. Metoksyłowa pochodna chalkonu ujawnia działanie cytotoksyczne wobec komórek nowotworowych ZR-75-1, MCF-7 oraz MDA-MB-231 [192] i posiada w swojej strukturze motyw (*E*)-stilbenu. Z kolei kolchicina wykazuje zdolność hamowania proliferacji komórek raka piersi linii MCF-7 oraz indukowania ich apoptozy, co potwierdzono w badaniach [193]. Jak wcześniej wspomniano, związek ten indukuje również apoptozę w komórkach raka płuc poprzez aktywację kaspaz oraz zahamowanie szlaku PI3K/Akt [164]. Dzięki swoim właściwościom antymitotycznym kolchicina stanowi także przedmiot badań jako potencjalny składnik terapii skojarzonych w leczeniu nowotworów jajnika oraz raka piersi [165]. Mając na uwadze dotychczasowe obserwacje, zdecydowano się na przeprowadzenie badań obejmujących metoksyłowe pochodne dibenzo[*b,f*]oksepiny, metoksyłowe pochodne chalkonu oraz kolchicynę.



Rysunek 20. Podobieństwa w strukturze kolchicyny (a), kombretastatyny A-4 (b), metoksyłowej pochodnej dibenzo[*b,f*]oksepiny (c) oraz metoksyłowej pochodnej chalkonu (d).

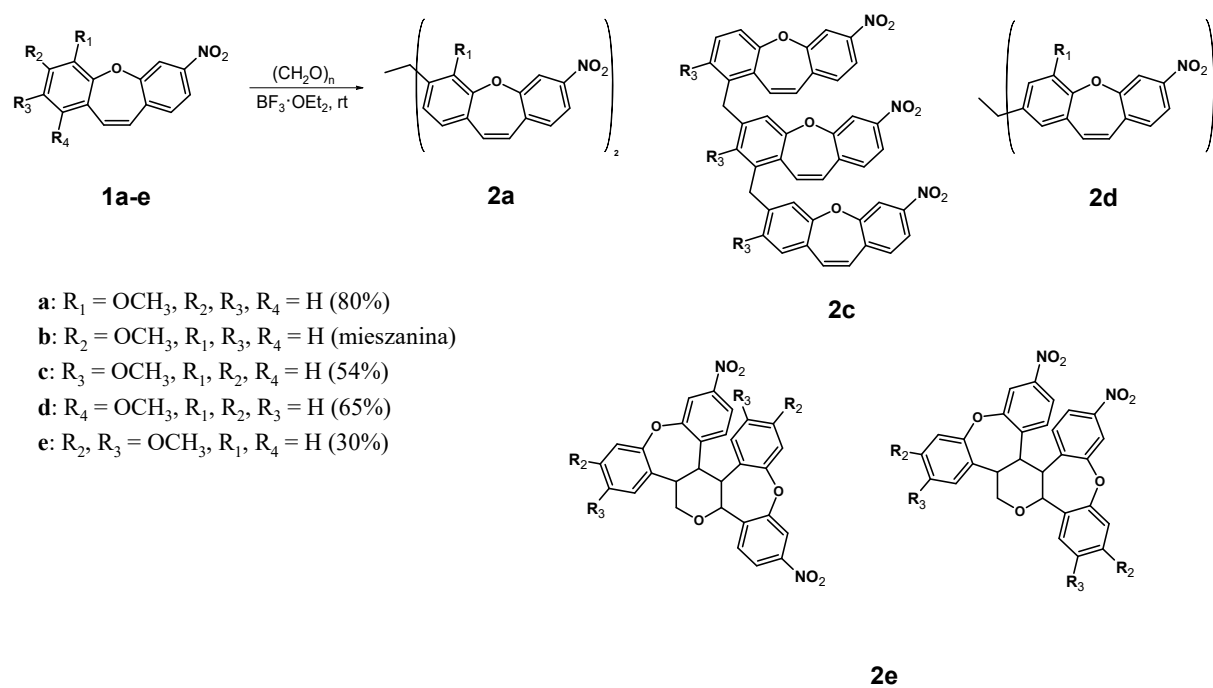
3.2 Synteza oraz badanie właściwości chemicznych i fotochemicznych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny

Dibenzo[*b,f*]oksepina oraz jej pochodne, jak wspomniano wcześniej, wykazują obiecujące właściwości medyczne i zdolność do oddziaływania z domeną kolchicynową tubuliny. W związku z założeniami niniejszej pracy, jako pierwszy obiekt badań przyjęto szkielet dibenzo[*b,f*]oksepiny.

3.2.1 Badanie właściwości chemicznych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny

W celu poszukiwania nowych połączeń mogących pełnić rolę fotochromowych przełączników molekularnych bazujących na szkielecie dibenzo[*b,f*]oksepiny, zdecydowano się na przeprowadzenie reakcji pomiędzy pochodnymi dibenzo[*b,f*]oksepiny a różnymi odczynnikami chemicznymi. Działania te miały na celu zbadanie właściwości chemicznych analizowanych pochodnych oraz ich przydatności w dalszych badaniach nad materiałami fotoaktywnymi.

Kierując się powyższym założeniem 5 różnych pochodnych 3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepiny **1a–e** poddano reakcji z paraformaldehydem w obecności katalizatora ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$), w wyniku czego otrzymano oligomeryczne połączenia dibenzo[*b,f*]oksepin **2a–e** (schem. 19) o zróżnicowanej strukturze.

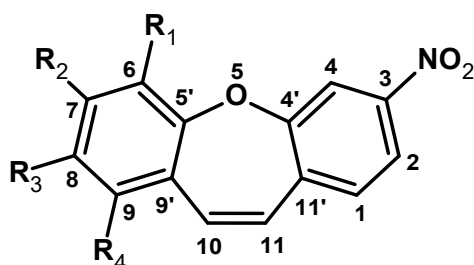


Schemat 19. Schemat syntezy oligomerycznych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny.

W wyniku reakcji substytucji elektrofilowej tworzą się oligomery wyjściowej dibenzo[*b,f*]oksepiny. Przeprowadzono również reakcje z użyciem innych katalizatorów — ZnCl_2 , AlCl_3 , TiCl_4 oraz $\text{Sc}(\text{SO}_3\text{CF}_3)_3$ — jednak najlepsze wyniki otrzymano w przypadku $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. Ilość użytego katalizatora również ma znaczenie w przebiegu reakcji. Wyższe wydajności otrzymywania produktów obserwowano przy zwiększeniu ilości katalizatora użytego w reakcji. Wpływ ma na to najprawdopodobniej fakt, że katalizator będący kwasem Lewisa oddziałuje również z wolnymi parami elektronowymi na atomie tlenu w pierścieniu dibenzo[*b,f*]oksepinowym. Na podstawie analizy strukturalnej produktów powstających w powyższej reakcji można było zaobserwować, że pochodne dibenzo[*b,f*]oksepiny (w zależności od lokalizacji podstawnika w pierścieniu) tworzyły różne oligomery. W celu uzyskania czytelnego obrazu zmian wywołanych podstawnikiem zastosowano rezonans ^{13}C NMR i konwencję SCS (ang. *substituent chemical shift*) dla wszystkich węgli w związkach **2a–e**. Oprócz zmierzenia standardowych jednowymiarowych widm ^{13}C NMR, do przyporządkowania sygnałów poszczególnym atomom układu dibenzo[*b,f*]oksepiny posłużono się dwuwymiarową homojądrową spektroskopią korelacyjną H-H (COSY) i dwuwymiarową

heterojądrową spektroskopią korelacyjną C-H (HSQC) i (HMBC). Stosując przesunięcie chemiczne podstawników spodziewano się, że uda się wyjaśnić różnicę w przebiegu reakcji dla związków **2a–e**. Interpretacja SCS w widmach ^{13}C NMR jest dobrze ugruntowaną metodą badania oddziaływań elektronowych w różnych układach molekularnych, pomimo braku prostego i ogólnego związku pomiędzy przesunięciami chemicznymi a gęstością elektronową na danym jądrze. Dla węgla oznaczonego jako i , SCS definiuje się jako różnicę przesunięć pomiędzy pochodną RX a związkiem wyjściowym HX: $\text{SCSi}(\text{RX}) = \delta i(\text{RX}) - \delta i(\text{HX})$. Wyniki tych obliczeń zostały przedstawione w tabeli 2.

Tabela 2. Przesunięcia chemiczne jąder ^{13}C dla 3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepiny, współczynniki SCS obliczone dla atomów węgla w różnie podstawionych metoksyłowych pochodnych 3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepiny.

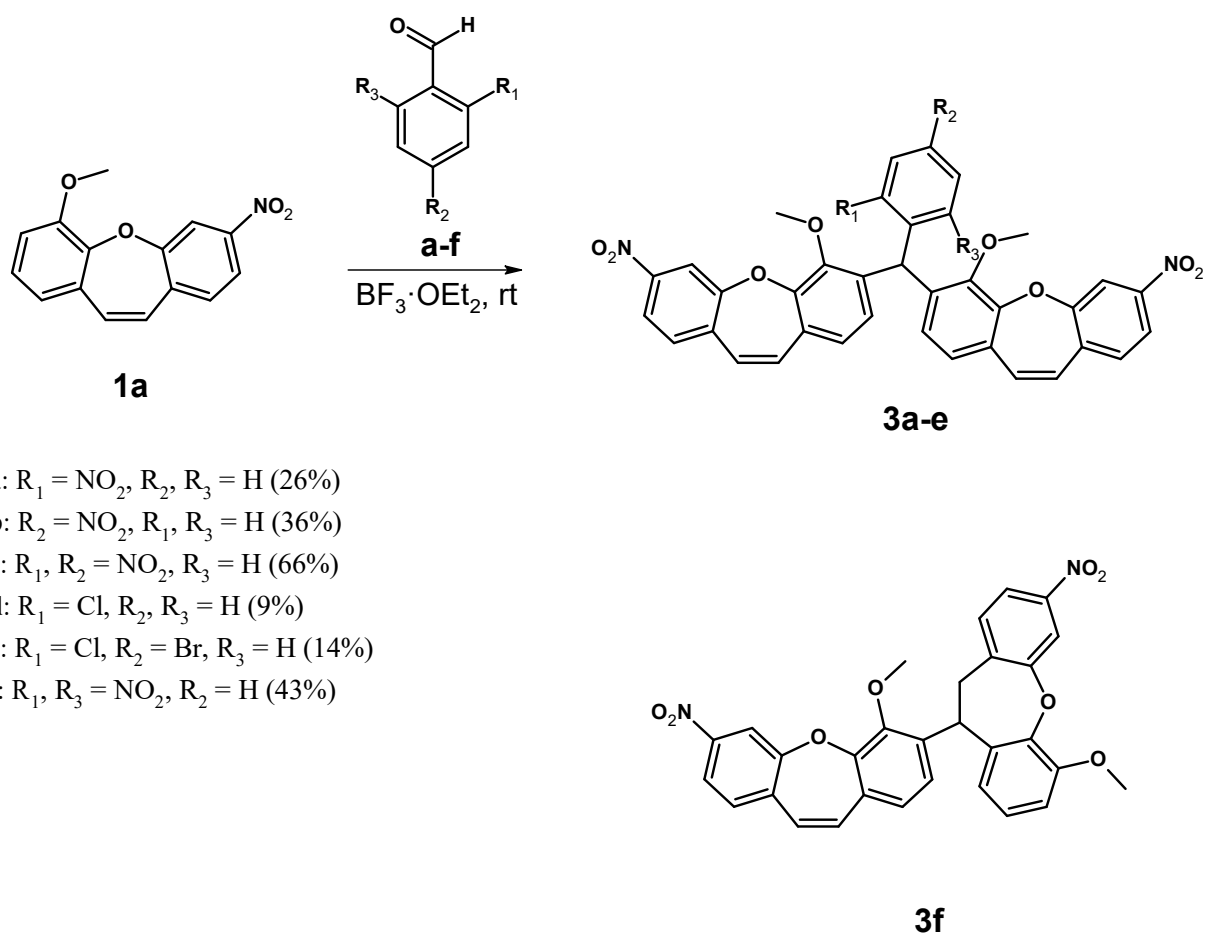


R	C1	C2	C3	C4	C4'	C5'	C6	C7	C8	C9	C9'	C10	C11	C11'
R ₁ – R ₄ =H	131,12	121,26	149,05	117,46	156,93	156,86	122,35	132,06	126,73	130,80	130,43	134,36	129,10	138,01
1a: R ₁ = OCH ₃	–0,05	0,02	–0,19	–0,27	–0,2	–12,4	29,91	–17,08	–4,98	–3,99	1,11	0,03	0,09	0,3
1b: R ₂ = OCH ₃	–0,27	0,07	–0,29	0,23	–0,66	1,09	–14,34	30,97	–13,93	0,82	–7,34	–0,08	–2,49	0,54
1c: R ₃ = OCH ₃	0,08	–0,13	0,01	–0,18	0,35	–6,34	0,75	–14,87	30,84	–15,84	0,69	–0,06	0,32	–0,03
1d: R ₄ = OCH ₃	–0,25	0,12	–0,05	0,03	0,04	1,72	–7,89	0,51	–17,37	27,18	–11,26	–5,41	–0,73	0,58
1e: R ₂ , R ₃ = OCH ₃	–0,37	–0,13	–0,25	0,04	–0,33	–6,38	–15,64	19,98	20,33	–18,02	–8,43	0,12	–1,99	0,55
1f: R ₁ , R ₃ = OCH ₃	–0,01	–0,14	–0,21	–0,49	0,13	–18,31	30,42	–29,70	31,00	–25,95	1,12	0,15	0,36	0,26

Na podstawie analizy obliczonych współczynników SCS można uzasadnić, dlaczego metoksyłowe pochodne 3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepiny **1a–e** w reakcji z paraformaldehydem "prowadzą do powstania" związków **2a–e**. Wskaźniki te odzwierciedlają aktywność

poszczególnych atomów węgla w reakcji substytucji elektrofilowej, wskazując na zwiększoną gęstość elektronową w określonych pozycjach. Wyjaśnia to, dlaczego 6-metoksy-3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepina **1a** reaguje w pozycji *orto*, co prowadzi do utworzenia dimerycznego produktu **2a** (węgiel C7 posiadający najmniejszy współczynnik SCS, wynoszący -17,08), dlaczego 7-metoksy-3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepina **1b** reaguje w dwóch pozycjach *orto* tworząc trimer **2b** (węgle C6 i C8 posiadające współczynniki SCS o zbliżonych wartościach — odpowiednio -14,34 i -13,93), czy też dlaczego 1-metoksy-7-nitrodibenzo[*b,f*]oksepina **1d** reaguje w pozycji *orto* tworząc dimer **2d** (węgiel C8 posiadający najmniejszy współczynnik SCS, wynoszący -17,37). W przypadku związku **2b** otrzymano złożoną mieszaninę produktów, niemożliwą do rozdzielenia standardowymi metodami. Najprawdopodobniej w mieszaninie znajdowały się różne produkty podstawienia węgla C6 (współczynnik SCS wynoszący -14,34) i C8 (współczynnik SCS wynoszący -13,93). W przypadku związku **2e** nie obserwowano produktów reakcji S_EAr co wynika najprawdopodobniej z zatłoczenia sterycznego wokół węgla C6 (współczynnik SCS wynoszący -15,64) i C9 (współczynnik SCS wynoszący -18,02). Zamiast tego otrzymano produkty **2e**, które powstały w wyniku reakcji Prinsa pomiędzy olefinowym wiązaniem podwójnym a paraformaldehydem. Ponadto obliczono również współczynniki SCS dla związku **2f**, dla którego nie przeprowadzono reakcji w warunkach laboratoryjnych.

W celu sprawdzenia czy analiza współczynników SCS dla podstawionych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny ma zastosowanie w przypadku innych, bardziej rozbudowanych aldehydów, zdecydowano się na przeprowadzenie syntezy oligomerów dibenzo[*b,f*]oksepiny z łącznikiem innym niż metylenowy. Do badań wybrano 6-metoksy-3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepinę **1a**. W tym celu związek ten poddano reakcji z pochodnymi benzaldehydu, w obecności kwasu Lewisa — $BF_3 \cdot OEt_2$, otrzymując dimery z łącznikami benzyłowymi **3a–e** (schem. 20) oraz produkt **3f**. Wprowadzenie kolejnych grup nitrowych do związku **1a** pozwala na dalszą funkcjonalizację cząsteczki i ostatecznie tworzenie potencjalnych fotochromowych przełączników molekularnych wykorzystujących grupę azową.



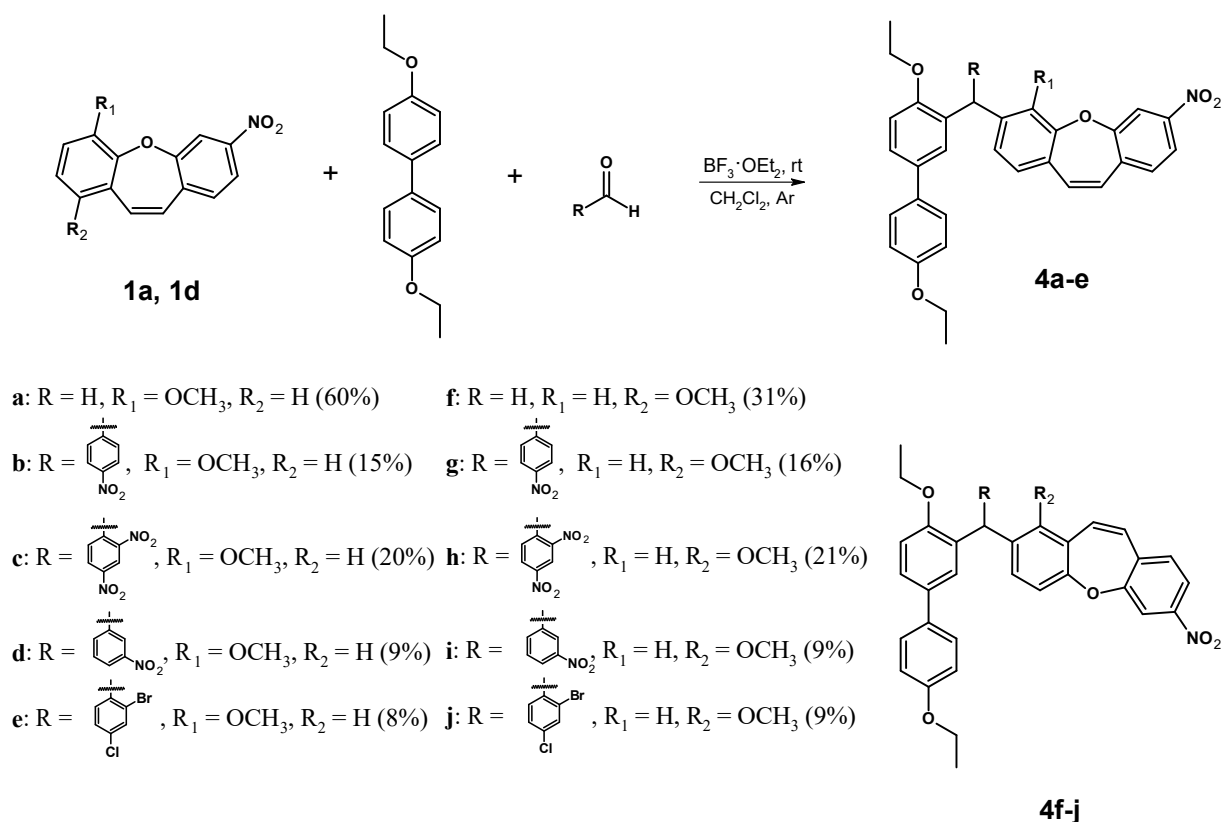
Schemat 20. Schemat syntezy dimerów 6-metoksy-3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepiny z różnymi łącznikami.

W przypadku reakcji z aldehydami **a–e** otrzymano oczekiwane dimery wyjściowej dibenzo[*b,f*]oksepiny, podobnie jak w przypadku wcześniej wspomnianego związku **2a**. W przypadku aldehydu **f** nie zaobserwowano produktu reakcji 6-metoksy-3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepiny ze wspomnianym aldehydem, tylko produkt **3f**, który jest wynikiem elektrofilowego ataku węgla C6 6-metoksy-3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepiny na węgiel z wiązania olefinowego w drugiej cząsteczce tego samego związku, co prowadzi do powstania dimeru **3f** bez łącznika.

3.2.2 Badanie właściwości chemicznych hybrydowych połączeń pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny z bifenylenem w obecności różnych aldehydów

Po sukcesie syntezy różnych oligomerów dibenzo[*b,f*]oksepiny przedstawionych w **podrozdziale 3.2.1**, zdecydowano się na dalsze tworzenie nowych prekursorów fotochromowych przełączników molekularnych bazujących na szkieletie dibenzo[*b,f*]oksepiny.

Na początku skupiono się na zbadaniu najbardziej (**tab. 2**) aktywnych w reakcji substytucji elektrofilowej atomów węgla pochodnych 3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepiny **1a** oraz **1d**. W tym celu postanowiono przeprowadzić reakcję 6-metoksy-3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepiny **1a** oraz 1-metoksy-7-nitrodibenzo[*b,f*]oksepiny **1d** z 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylem stosując różne łączniki pochodzące od aldehydu i w obecności kwasu Lewisa — $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. Uzyskano produkty **4a–e** oraz **4f–j** będące hybrydowymi połączeniami pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny z bifenylem z różnymi łącznikami (**schem. 21**). Wybór 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylu był podyktowany jego korzystnymi właściwościami biochemicznymi. 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenyl charakteryzuje się stabilną, aromatyczną strukturą bifenylową, wzbogaconą o dwie grupy etoksyłowe w pozycjach 4 i 4'. Grupy te zwiększają polarność cząsteczki oraz poprawiają jej rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych o charakterze polarno-apolarnym. Dzięki temu związek może efektywnie oddziaływać z różnorodnymi środowiskami biologicznymi, w tym z lipidowymi błonami komórkowymi. Jest to również popularny substrat wykorzystywany do syntezy bifen[*n*]arenów. Są to związki makrocycliczne, które posiadają w swojej strukturze wnękę zdolną do oddziaływania z różnymi związkami np. lekami.

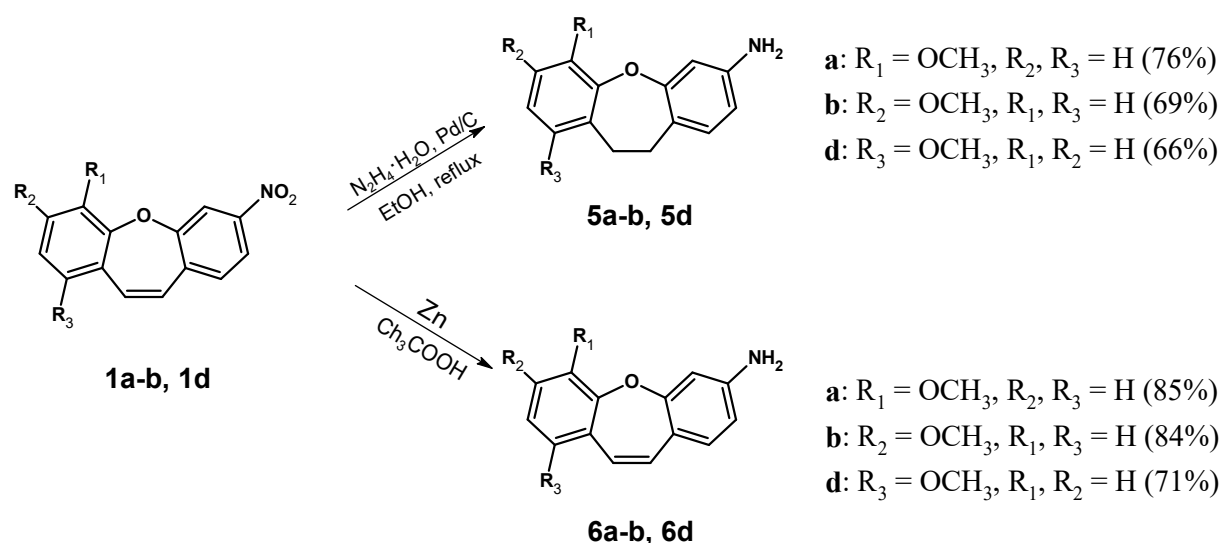


Schemat 21. Schemat syntezy hybrydowych połączeń metoksyłowych pochodnych 3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepiny z 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylem w obecności różnych aldehydów.

Zgodnie z oczekiwaniami uzyskano produkty **4a–e** i **4f–j**, co pokrywa się z wcześniej przedstawionym rozkładem gęstości elektronowej w cząsteczce dibenzo[*b,f*]oksepy (tab. 2). Na podstawie wykonanych eksperymentów wykazano, że dołączenie podjednostki bifenylowej do pochodnej dibenzo[*b,f*]oksepy poprzez łącznik benzyłowy jest możliwe i przebiega z wydajnością od 8% do 60% w zależności od użytego aldehydu.

3.2.3 Synteza azowych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepy — potencjalnych fotochromowych przełączników molekularnych — azologizacja

Realizując syntetyczny cel niniejszej rozprawy skoncentrowano się na otrzymaniu *azo*-pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepy. W pierwszym etapie należało uzyskać grupy aminowe w pochodnych 3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepy. Grupa aminowa jest niezbędna do wytworzenia grupy azowej występującej w fotochromowych przełącznikach molekularnych. Użyte pochodne dibenzo[*b,f*]oksepy zawierają dwa ugrupowania wrażliwe na czynniki redukujące — grupę nitrową oraz wiązanie olefinowe. W celu optymalizacji warunków reakcji zbadano dwa różne układy redukujące (schem. 22).

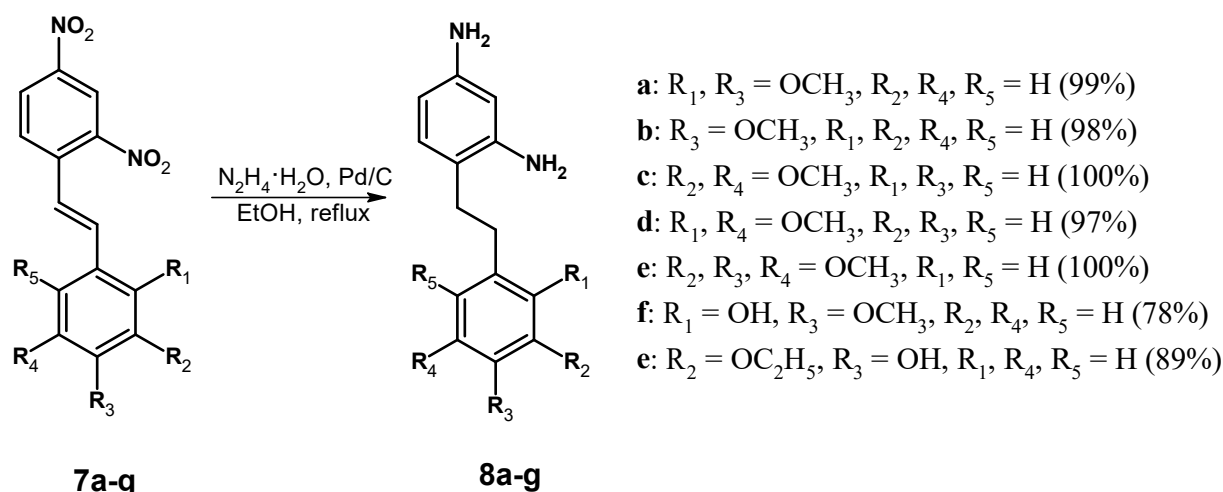


Schemat 22. Schemat redukcji metoksyłowych pochodnych 3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepy w różnych środowiskach.

Sprawdzono, że układ zawierający monohydrat hydrazyny oraz pallad na węglu jako czynnik redukujący, jest zdolny do redukcji zarówno grupy nitrowej, jak i wiązania olefinowego. Natomiast zastosowanie osłabionego czynnika redukującego — pyłu cynkowego w kwasie octowym — powoduje selektywną redukcję jedynie grupy nitrowej, co umożliwia syntezę

po pochodnych aminowych wykorzystywanych do produkcji azobenzenowych przełączników molekularnych.

Analogiczną reakcję z monohydratem hydrazyny przeprowadzono z udziałem pochodnych stilbenu w celu sprawdzenia przebiegu reakcji redukcji związków z wiązaniem olefinowym w konfiguracji *E*. Otrzymano analogiczne wyniki (**schem. 23**), które zostały opatentowane i opublikowane.



Schemat 23. Schemat redukcji nitrowych pochodnych (*E*)-stilbenu.

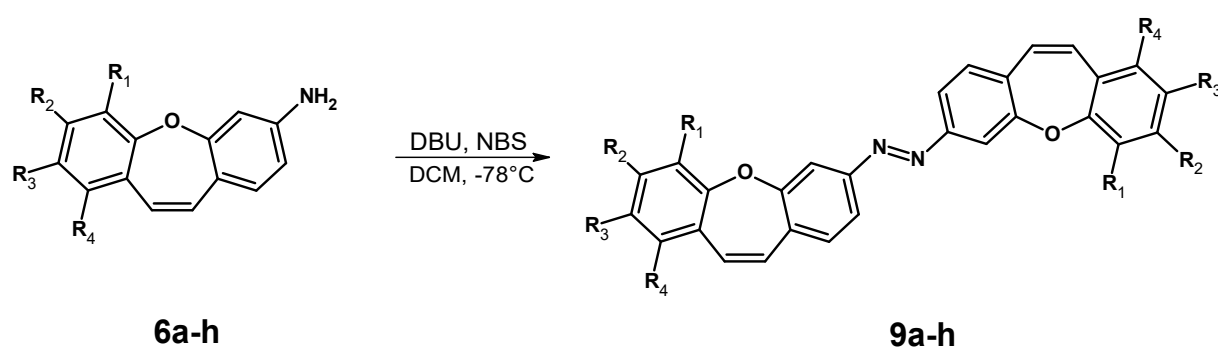
W kolejnym etapie pracy skupiono się na opracowaniu najbardziej efektywnej i optymalnej metody syntezy azowych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny. W tym celu przetestowano dziesięć różnych procedur syntezy związków azowych, opisanych w literaturze (**tab. 3**). Spośród nich wyselekcjonowano metodę, która wyróżniała się najwyższą wydajnością, stanowiącą najbardziej efektywne rozwiązanie do dalszych badań.

Tabela 3. Zestawienie zbadanych metod syntezy azowych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny.

Metoda	Warunki	Wydajność [%]
1 [105]	NBS, DBU, CH₂Cl₂, Ar, -78°C	45
2 [104]	<i>t</i> -BuONO (1,2 eq), EtOH, rt, 48h	0
3 [105]	KMnO ₄ , CuSO ₄ ·5H ₂ O, CH ₂ Cl ₂ , 24h, rt	20
4 [105]	KMnO ₄ , CuSO ₄ ·5H ₂ O, CH ₂ Cl ₂ , ucieranie	10
5 [103]	1) okson, H ₂ O, CH ₂ Cl ₂ 2) AcOH, TFA, toluen	5

6 [105]	NCS, DBU, CH ₂ Cl ₂ , Ar, -78°C	45
7 [105]	NIS, DBU, CH ₂ Cl ₂ , Ar, -78°C	37
8 [105]	NCS, DBN, CH ₂ Cl ₂ , Ar, -78°C	10
9 [105]	NCS, <i>t</i> -BuOK, CH ₂ Cl ₂ , Ar, -78°C	20
10 [194]	KOH, DMF, N ₂ , 150°C	złożona mieszanina

Następnie, wykorzystując wybraną metodę, przeprowadzono syntezę ośmiu symetrycznych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny **9a–h**, które w swojej strukturze zawierały grupę azową oraz dwie cząsteczki dibenzo[*b,f*]oksepiny, tworząc dimer wyjściowej pochodnej (schem. 24).



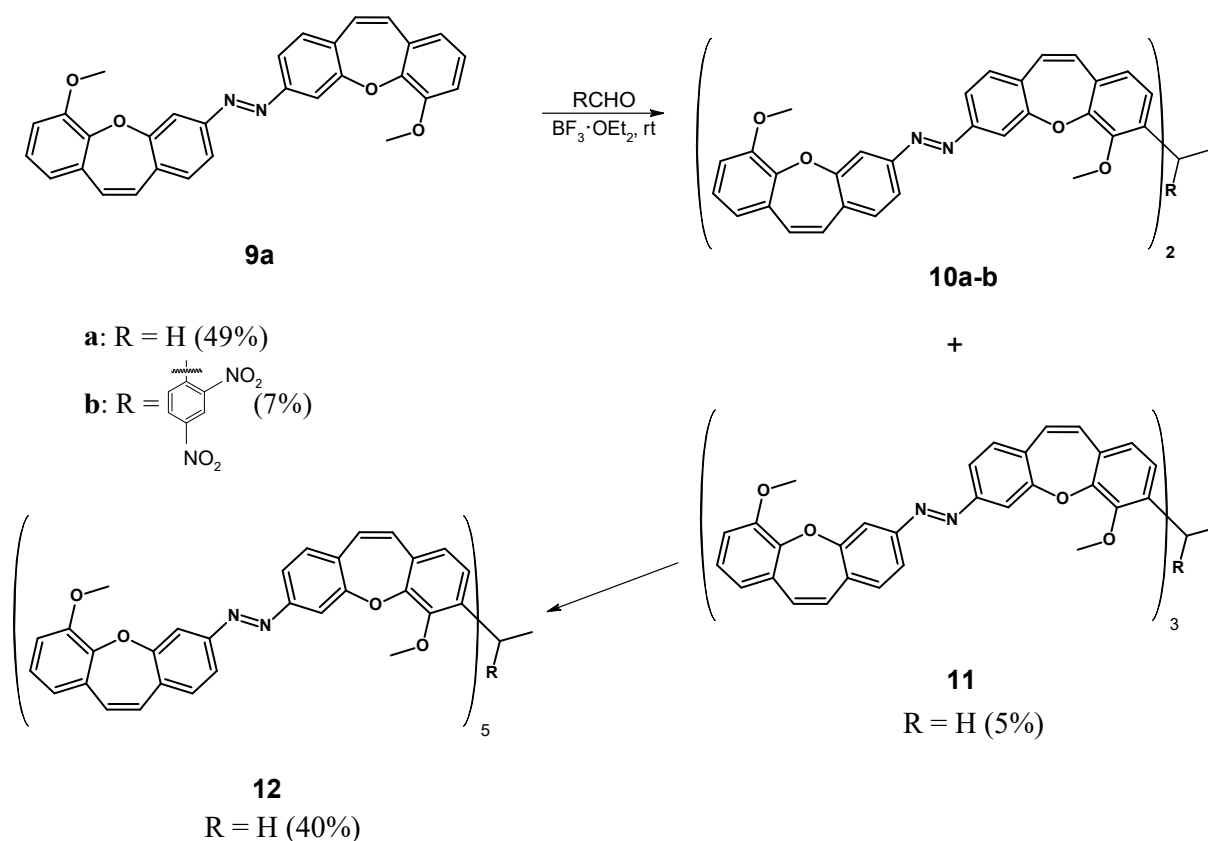
- a:** R₁ = OCH₃, R₂, R₃, R₄ = H (45%)
b: R₂ = OCH₃, R₁, R₃, R₄ = H (27%)
c: R₃ = OCH₃, R₁, R₂, R₄ = H (35%)
d: R₄ = OCH₃, R₁, R₂, R₃ = H (37%)
e: R₂, R₃ = OCH₃, R₁, R₄ = H (15%)
f: R₁, R₂, R₃, R₄ = H (10%)
g: R₂ = OCOCH₃, R₁, R₃, R₄ = H (25%)
h: R₃ = NO₂, R₁, R₂, R₄ = H (23%)

Schemat 24. Schemat syntezy symetrycznych azowych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny.

W celu otrzymania związków **9a–h** odpowiednie aminowe pochodne dibenzo[*b,f*]oksepiny **6a–h** poddano reakcji utleniania w obecności DBU i NBS. Uzyskane związki azowe stanowią potencjalne fotochromowe przełączniki molekularne, zawierające szkielet dibenzo[*b,f*]oksepiny, który — podobnie jak sama dibenzo[*b,f*]oksepina — może wykazywać korzystne właściwości biologiczne i biomedyczne. Charakterystyka właściwości fotochromowych otrzymanych związków została szczegółowo przedstawiona w dalszej części pracy.

3.2.4 Synteza symetrycznych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny zawierających więcej niż jedną grupę azową

Na podstawie wyników przedstawionych w **podrozdziałach 3.2.2** oraz **3.2.3** postanowiono przeprowadzić syntezę związków azowych "wyższej generacji", czyli takich, które zawierają w swojej strukturze więcej niż jedną grupę azową, co może przełożyć się na ich zwiększoną aktywność fotochromową i funkcjonalność. W tym celu wcześniej otrzymany *azo*-dimer 6-metoksy-3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepiny **9a** poddano reakcji z paraformaldehydem lub 2,4-dinitrobenzaldehydem w obecności kwasu Lewisa — $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. W wyniku tego procesu otrzymano związki azowe **10a–b**, **11**, **12** bazujące na strukturze dibenzo[*b,f*]oksepiny, zawierające więcej niż jedno ugrupowanie azowe (**schem. 25**).



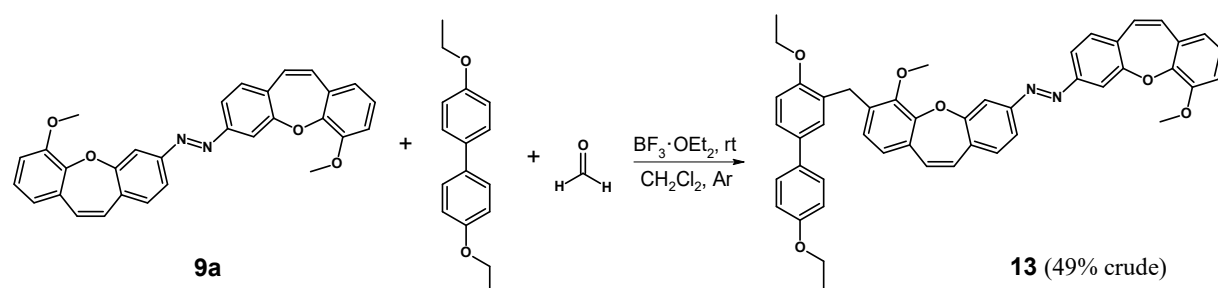
Schemat 25. Schemat syntezy związków azowych „wyższej generacji” zawierających szkielet dibenzo[*b,f*]oksepiny.

Jak można zauważyć, w analizowanej reakcji powstawały różne oligomery wyjściowego związku azowego — dimer, trimer oraz pentamer, który prawdopodobnie powstał wskutek wtórnej reakcji między dimerem a trimerem. Reakcję przeprowadzono dwukrotnie z różnym czasem jej trwania. W pierwszym przypadku, gdy reakcja trwała 24 h, zaobserwowano jedynie powstawanie dimeru **10a** z wydajnością 49% oraz trimeru **11** z wydajnością 5%. Po 36 h

zaobserwowano pentamer **12** jako główny produkt, powstający z wydajnością 40% oraz niewielką ilość dimeru powstającego z wydajnością 11%. Wszystkie te produkty charakteryzują się obecnością więcej niż jednej azowej.

3.2.5 Synteza niesymetrycznych azo-pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny

Po zbadaniu redystrybucji gęstości elektronowej w szkielecie pochodnych 3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepiny (**tab. 2**) i otrzymaniu interesującej klasy związków hybrydowych **4a–e** i **4f–j** (**schem. 26**) postanowiono zsyntetyzować związek zawierający w swojej strukturze ugrupowanie azowe. Jako obiekt do badań wybrano związek azowy **9a**, który poddano reakcji z paraformaldehydem i 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylem (**schem. 26**).

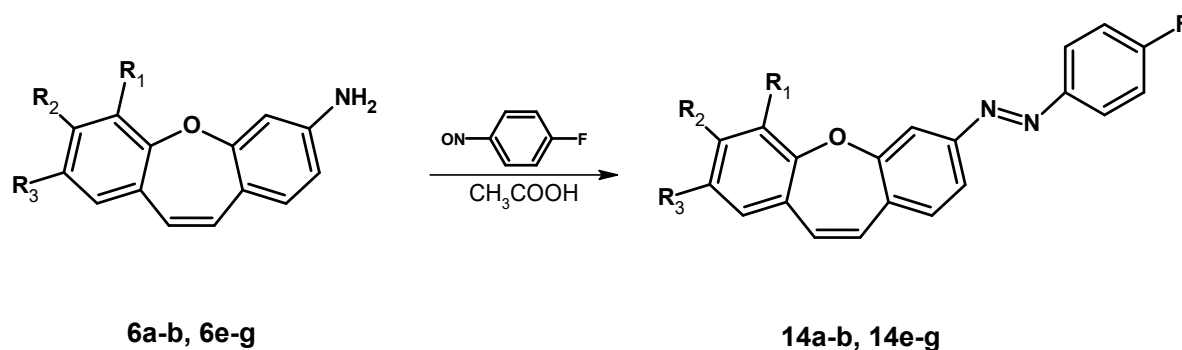


Schemat 26. Schemat syntezy związku azowego opartego na szkielecie dibenzo[*b,f*]oksepiny i 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylu.

W celu uzyskania związku azowego **13** przeprowadzono reakcję substytucji elektrofilowej związku **9a** z paraformaldehydem oraz 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylem w obecności kwasu Lewisa $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. Niestety, reakcja ta okazała się mało selektywna, a oczyszczenie otrzymanego produktu sprawiało znaczne trudności. Z tego powodu zrezygnowano z syntezy dalszych pochodnych zawierających inne łączniki, takie jak pochodne benzyłowe, ponieważ przewidywano wzrost liczby produktów ubocznych. Analiza widm masowych częściowo oczyszczonej mieszaniny poreakcyjnej pozwala wnioskować, że oprócz powstającego produktu monopodstawienia występują również produkty dipodstawienia oraz dłuższe oligomery, których nie dało się wyodrębnić w czystej postaci.

Jak to zostało przedstawione w **podrozdziale 2.1.6**, zgodnie z danymi literaturowymi [46], wprowadzenie podstawników halogenkowych powinno przesunąć maksimum absorpcji pasma $n \rightarrow \pi^*$ w kierunku wyższych długości fal. Ze względu na stosunkowo wysoką energię orbitalu n w cząsteczce azobenzenu, wynikającą z obecności odpychających oddziaływań pomiędzy wolnymi parami elektronowymi atomów azotu, podstawienie układu aromatycznego atomami

halogenów — wykazującymi charakter elektronoakceptorowy w zakresie oddziaływań σ — prowadzi do zmniejszenia gęstości elektronowej, a tym samym do stabilizacji i obniżenia energii orbitalu n. Prowadzi to do rozszerzenia sprzężenia orbitali π i obniżenia luki HOMO(n)–LUMO(π^*), a tym samym przesunięcia absorpcji azobenzenów w stronę światła widzialnego. Aby sprawdzić czy jest to prawda w przypadku dibenzo[*b,f*]oksepin zdecydowano się na syntezę mieszanych związków azowych, zawierających szkielet dibenzo[*b,f*]oksepinu oraz podstawnik *p*-fluorofenyłowy. Dlatego też przeprowadzono reakcję syntezy mieszanych związków azowych **14a–b**, **14e–g** (schem. 27).



a: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2, R_3, R_4 = \text{H}$ (68%)

b: $R_2 = \text{OCH}_3$, $R_1, R_3, R_4 = \text{H}$ (56%)

e: $R_2, R_3 = \text{OCH}_3$, $R_1, R_4 = \text{H}$ (50%)

f: $R_1, R_2, R_3, R_4 = \text{H}$ (49%)

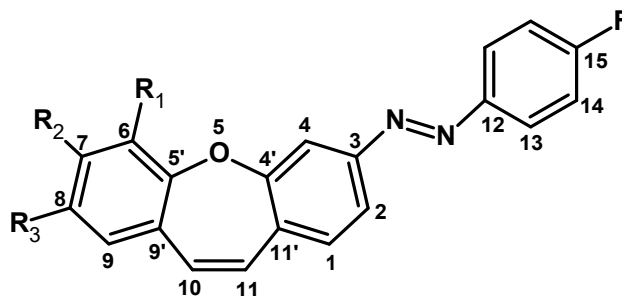
g: $R_2 = \text{OCOCH}_3$, $R_1, R_3, R_4 = \text{H}$ (61%)

Schemat 27. Schemat syntezy mieszanych związków azowych zawierających szkielet dibenzo[*b,f*]oksepinu i *p*-fluorofenyłu.

W celu otrzymania powyższych związków **14a–b**, **14e–g**, aminową pochodną dibenzo[*b,f*]oksepinu **6a–b**, **6e–g** poddano reakcji utleniania wraz z *p*-fluoronitrozobenzenem, w obecności kwasu octowego. *p*-fluoronitrozobenzene otrzymany został *in situ* poprzez reakcję częściowego utleniania *p*-fluoroaniliny za pomocą oksonu ($2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$). Fluor został zastosowany jako podstawnik w aminie ze względu na jego wysoką biokompatybilność

oraz korzystny profil tolerancji w organizmie [103]. Dla związków **14a–b**, **14e–g** obliczono również parametr SCS, a uzyskane wyniki przedstawiono w **tabeli 4**.

Tabela 4. Przesunięcia chemiczne jąder ^{13}C dla (*E*)-1-(dibenzo[*b,f*]oksepin-3-yl)-2-(4-fluorofenylo)diazenu **14f** i współczynniki SCS obliczone dla atomów węgla w różnych pochodnych mieszanych związków azowych **14a–b**, **14e**, **14g** zawierających szkielet dibenzo[*b,f*]oksepinu i *p*-fluorofenyłu.



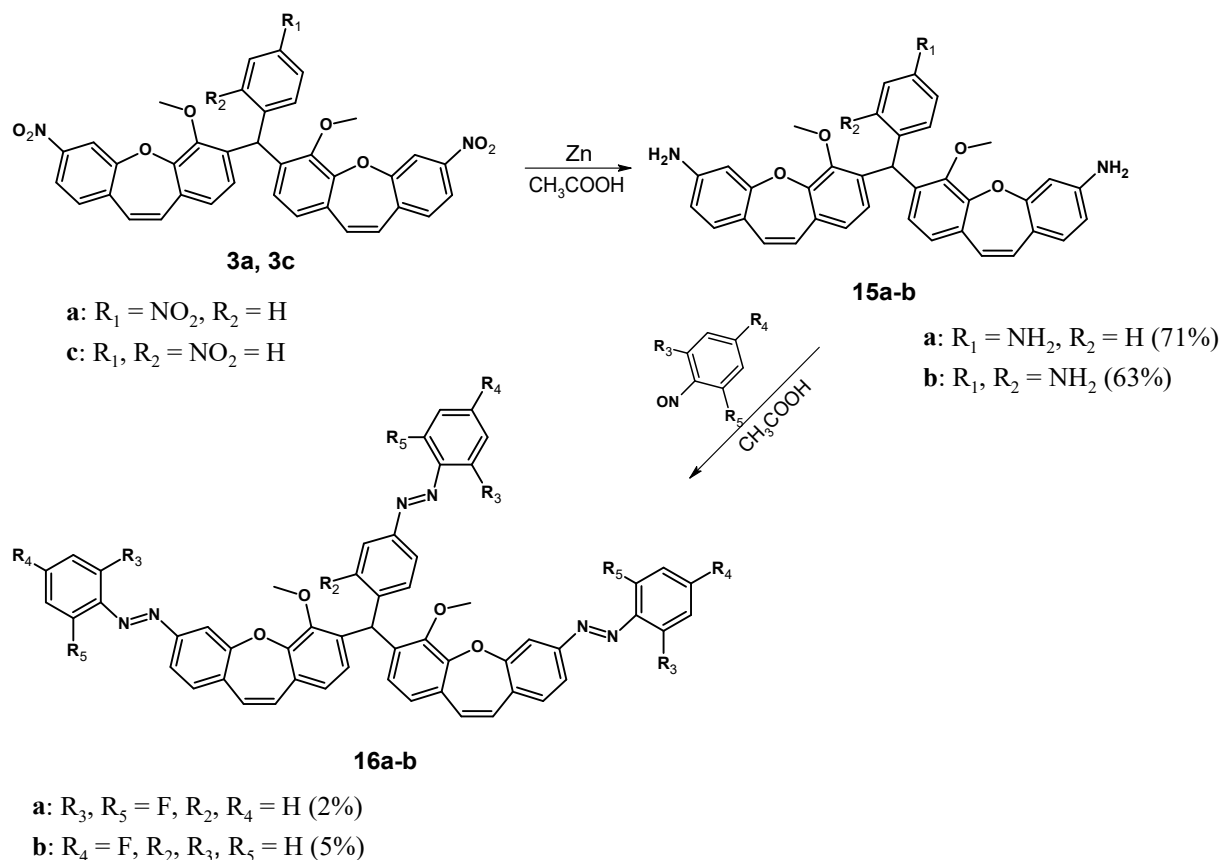
R	C1	C2	C3	C4	C4'	C5'	C6	C7	C8	C9	C9'	C10	C11	C11'	C12	C13	C14	C15
14f: R ₁ – R ₄ =H	129,68	120,85	153,67	114,56	157,87	156,98	121,52	130,28	125,14	129,48	130,35	131,46	129,33	133,28	149,13	124,98	116,09	164,49
14a: R ₁ = OCH ₃	–0,16	–0,05	–0,04	1,47	–0,11	–11,91	30,38	–17,44	–5,32	–4,49	1,27	–0,13	0,03	0,24	0,04	0,00	–0,05	–0,05
14b: R ₂ = OCH ₃	–0,11	–0,01	–0,02	0,13	–0,41	1,25	–14,31	31,78	–13,89	0,79	–7,10	–0,19	–2,26	0,44	0,23	–0,02	–0,02	0,06
14e: R ₂ , R ₃ = OCH ₃	–0,12	0,16	–0,14	–0,36	–0,23	–6,32	–18,19	20,45	21,02	–18,22	–8,38	–0,24	–1,51	0,28	0,01	–0,04	0,00	–0,03
14g: R ₂ = OCH ₃	0,01	0,44	–0,02	–0,18	–0,58	0,46	–6,30	21,87	–6,74	0,27	–2,19	–0,89	–0,19	–0,21	–0,03	0,01	–0,01	0,00

Na podstawie analizy uzyskanych wyników można stwierdzić, że zastąpienie grupy nitrowej grupą azową nie powoduje istotnych zmian w gęstości elektronowej wokół atomów węgla w pierścieniu zawierającym grupę metoksyłową, co pozwala przypuszczać, że właściwości chemiczne dibenzo[*b,f*]oksepinu pozostały niezmienione.

3.2.6 Synteza niesymetrycznych pochodnych azowych dibenzo[*b,f*]oksepinu zawierających więcej niż jedną grupę azową

Mając na uwadze opisaną w **podrozdziałach 3.2.1 i 3.2.2** zdolność pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepinu do tworzenia dimerów z udziałem różnych typów łączników, zdecydowano się na zaprojektowanie i syntezę związków zawierających trzy grupy azowe. Proces syntezy związków **16a–b**, zawierających trzy grupy azowe zdolne do zmiany

konfiguracji (**schem. 28**), przeprowadzono w dwóch etapach, wykorzystując jako substraty wyjściowe związki **3a**, **3c**.



Schemat 28. Schemat syntezy związków z trzema grupami azowymi, zawierających pierścień dibenzo[*b,f*]oksepiny.

Pierwszy etap syntezy polegał na redukcji trzech (**3a**) lub czterech (**3c**) grup nitrowych do grup aminowych, przeprowadzonej z wykorzystaniem układu redukującego cynk/kwas octowy. Otrzymane pochodne aminowe (**15a–b**) poddano następnie reakcji sprzęgania z fluoronitrozobenzenem, otrzymywanym *in situ* poprzez utlenianie fluoroaniliny za pomocą oksonu. W wyniku tej reakcji otrzymano związki zawierające trzy grupy azowe **16a–b**.

3.2.7 Analiza fotochemiczna azowych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny

3.2.7.1 Analiza fotochemiczna symetrycznych *azo*-pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny

W celu weryfikacji czy zsyntetyzowane azowe pochodne dibenzo[*b,f*]oksepiny **9a–h** wykazują korzystne właściwości fotochemiczne przeprowadzono szereg badań:

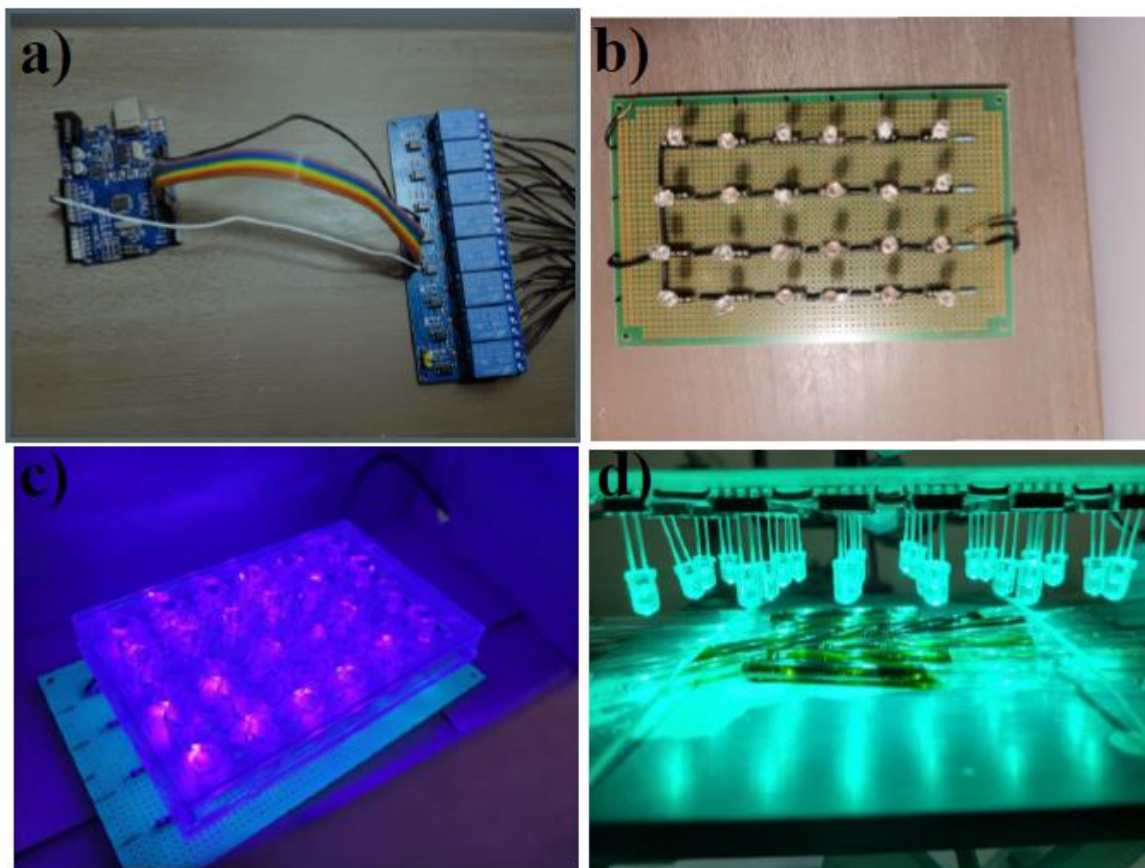
a) Fotoizomeryzacja:

Dla określenia w jakim stopniu związki **9a–h** fotoizomeryzują pod wpływem promieniowania o różnych długościach fal przeprowadzono eksperyment, w którym wybrane związki poddano naświetlaniu światłem o długościach fal 365 nm, 395 nm, 410 nm oraz 465 nm (**tab. 5**).

Tabela 5. Udział procentowy izomeru Z w stanie fotostacjonarnym (PSS) wybranych azowych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny.

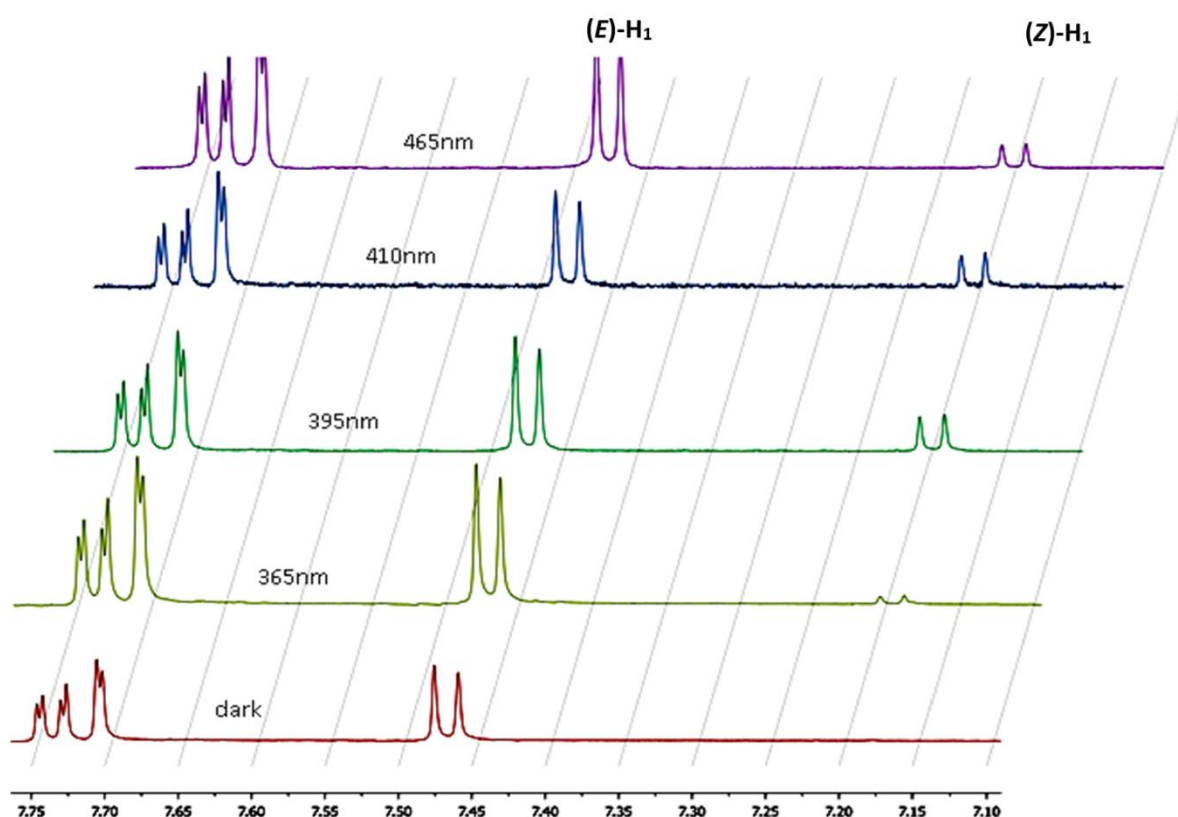
Związek	Udział izomeru Z w stanie fotostacjonarnym (PSS)			
	365 nm	395 nm	410 nm	465 nm
9a	44%	51%	46%	48%
9b	28%	47%	50%	48%
9e	15%	40%	45%	42%
9g	38%	49%	51%	49%

Do naświetlania próbek podczas eksperymentów użyto samodzielnie wykonanego zestawu diod LED (ang. *light-emitting diode*). Zestaw ten składał się z płytek, w które wlutowano cztery rzędy po 6 diod LED. Sterowanie pracą odpowiednich płytek umożliwiała platforma Arduino Uno (zawierająca mikrokontroler) połączona z modułem 8 przekaźników (**rys. 21**).



świadczy o ich właściwościach fotochemicznych. Najskuteczniejsza aktywacja zachodzi jednak przy użyciu promieniowania o długości fali około 400 nm.

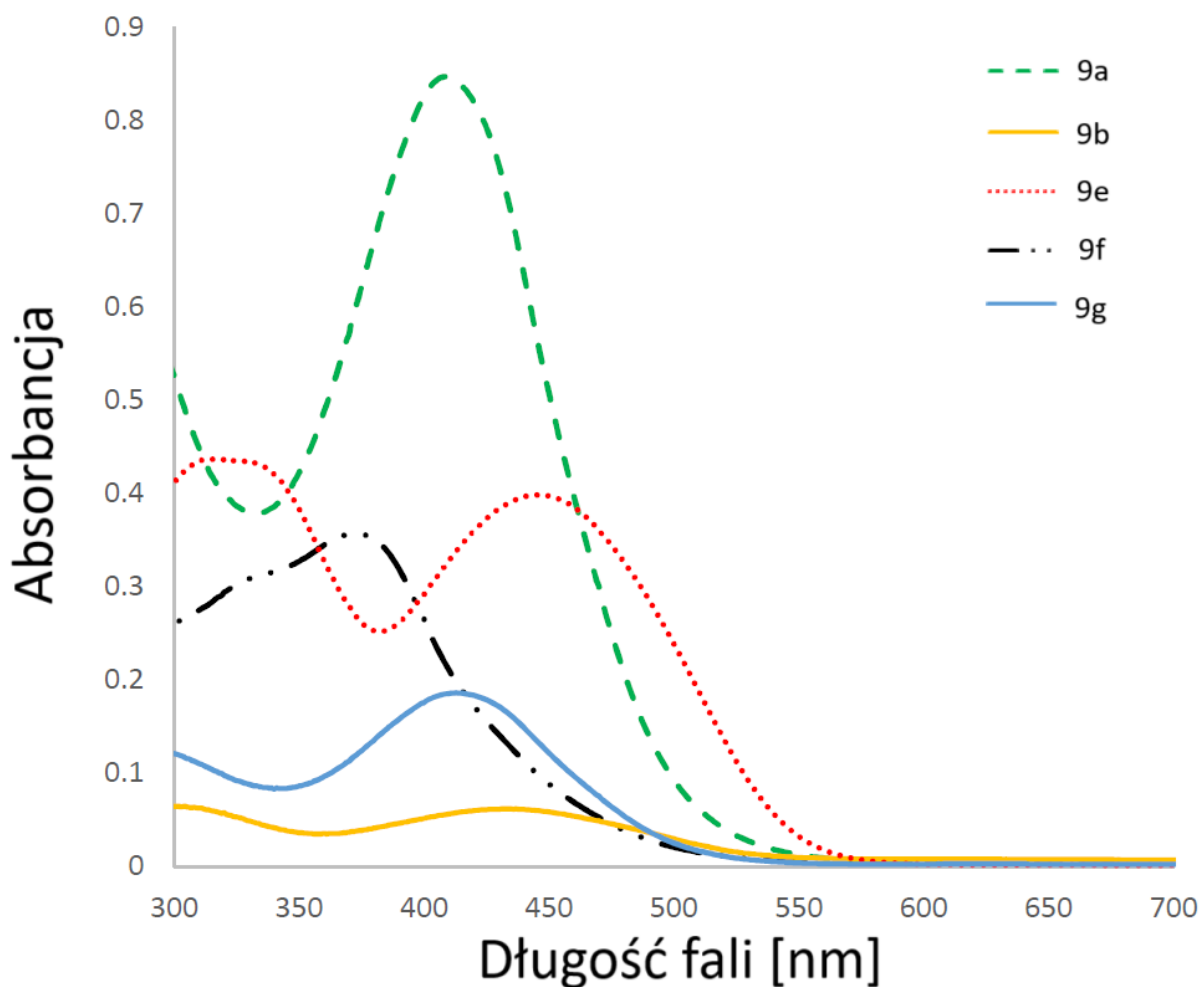
Procentowy udział izomeru *Z* w mieszaninie tworzącej się w stanie fotostacjonarnym (PSS) został obliczony za pomocą analizy intensywności sygnałów w widmach ^1H NMR mieszaniny w danym stanie fotostacjonarnym. Zmiana konfiguracji prowadzi do wyraźnych zmian w widmach NMR, które przejawiają się pojawieniem się nowych sygnałów charakterystycznych dla protonów izomeru *Z*, obok sygnałów odpowiadających izomerowi *E* (rys. 22).



Rysunek 22. Zmiany zachodzące w widmach ^1H NMR na przykładzie sygnału pochodzącego od protonu H_1 w związku 9e podczas naświetlania światłem o różnych długościach fal. Dark oznacza widmo związku, na które nie działało żadne światło (związek był przechowywany w ciemności).

b) Widma UV–Vis:

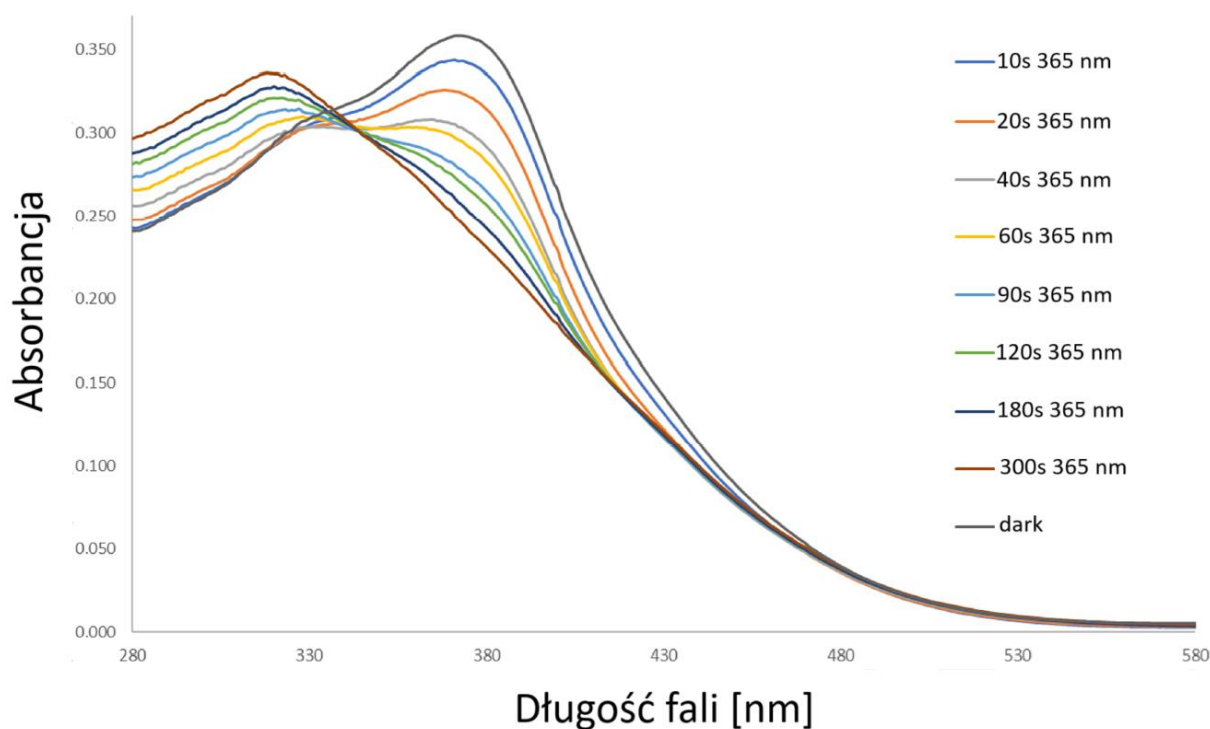
W celu określenia stopnia rozdzielania pasm $\pi \rightarrow \pi^*$ i $n \rightarrow \pi^*$ izomerów *E* i *Z* oraz wyznaczenia maksimum absorpcji tych pasm zmierzono widma UV–Vis związków 9a–b, 9e–g, które zostały przedstawione na rysunku 23 i rysunku 24.



Rysunek 23. Widma UV–Vis izomeru *E* związków **9a–b**, **9e–g**.

Na podstawie widm UV–Vis izomeru *E* związków **9a–b**, **9e–g** stwierdzono obecność pasm typu $\pi \rightarrow \pi^*$, pochodzących od ugrupowania azowego i zlokalizowanych w zakresie 371–446 nm (maksima absorpcji). Pasma odpowiadające przejściom $n \rightarrow \pi^*$ nie były wyraźnie rozdzielone od pasm $\pi \rightarrow \pi^*$. Wszystkie widma zarejestrowano w DMSO przy stężeniu roztworu wynoszącym 10 μM .

Określono również fotoprzełączalne właściwości związku **9f** poprzez badanie zmiany maksimum absorpcji pasma $\pi \rightarrow \pi^*$ dla izomeru *E* i izomeru *Z* (rys. 24).



Rysunek 24. Widma UV–ViS związku 9f bez naświetlania (dark) i po naświetlaniu światłem o długości 365 nm.

Jak można zauważyć podczas naświetlania związku 9f dochodzi do przesunięcia maksimum absorpcji pasma $\pi \rightarrow \pi^*$ w kierunku fal krótszych — efekt hipsochromowy, co potwierdza powstawanie izomeru Z w trakcie naświetlania. Nie zaobserwowano jednak ponownie separacji pasm $\pi \rightarrow \pi^*$ i $n \rightarrow \pi^*$ dla izomeru Z. Rozdzielenie tych pasm jest pożądane, gdyż prowadzi ono do wydzielenia pasma $n \rightarrow \pi^*$, którego maksimum absorpcji znajduje się bliżej „przyjaznego” światła zielonego niż maksimum absorpcji pasma $\pi \rightarrow \pi^*$ (podrozdz. 2.1.6).

3.2.7.2 Analiza fotochemiczna niesymetrycznych azowych pochodnych dibenzo[b,f]oksepiny

Analogicznie jak w przypadku symetrycznych związków azowych, w celu oceny, czy zsyntetyzowane azowe pochodne dibenzo[b,f]oksepiny (14a–b, 14e–g oraz 16a–b) — rozpatrywane jako potencjalne fotochromowe przełączniki molekularne — wykazują korzystne właściwości fotochemiczne, przeprowadzono serię eksperymentów.

a) Fotoizomeryzacja:

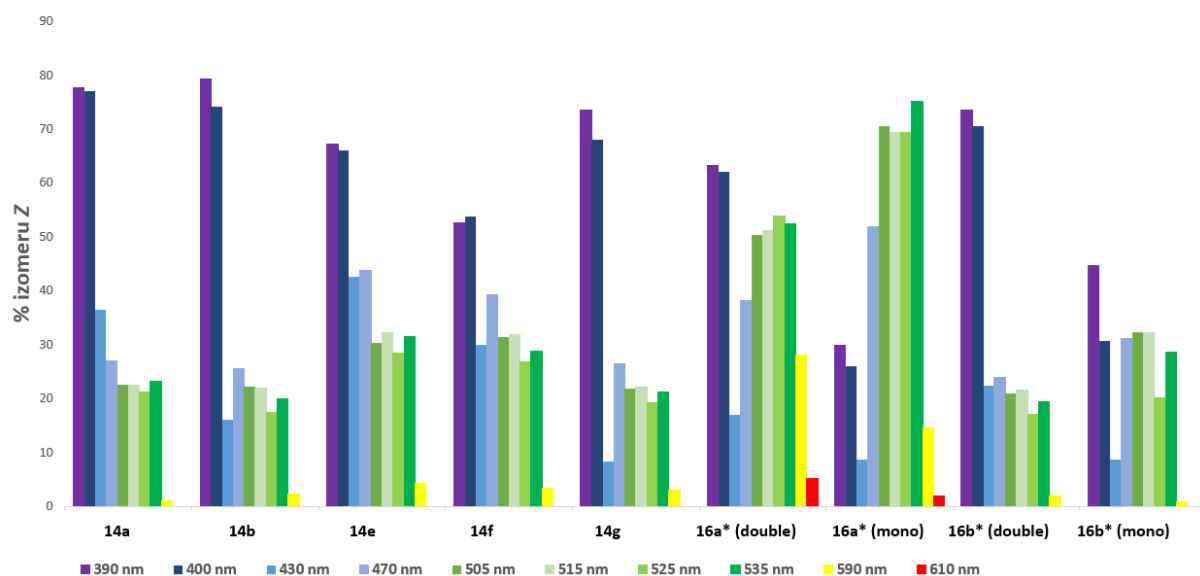
Aby określić stopień fotoizomeryzacji związków 14a–b, 14e–g oraz 16a–b pod wpływem promieniowania o różnych długościach fal, przeprowadzono eksperyment polegający na naświetlaniu wybranych związków światłem o dziesięciu długościach fal z zakresu 390–610

nm (tab. 6, rys. 25). W trakcie ekspozycji na światło zaobserwowano przejście konfiguracji z termodynamicznie stabilnej formy *E* do mniej trwałej formy *Z*.

Tabela 6. Wartości procentowego udziału izomeru *Z* w stanie fotostacjonarnym (PSS) w związkach 14a–b, 14e–g i 16a–b.

Długość fali	Udział procentowy izomeru <i>Z</i> [%]								
	Związek								
	14a	14b	14e	14f	14g	16a* (double)	16a* (mono)	16b* (double)	16b* (mono)
390 nm	77,66	79,24	67,23	52,63	73,48	63,18	29,9	73,49	44,71
400 nm	77,03	74,08	65,97	53,8	68,01	61,99	26,01	70,62	30,61
430 nm	36,39	16,16	42,67	29,92	8,28	16,98	8,62	22,47	8,69
470 nm	27,03	25,54	43,73	39,31	26,46	38,15	51,85	23,96	31,05
505 nm	22,61	22,12	30,39	31,47	21,92	50,31	70,49	20,98	32,39
515 nm	22,48	22,02	32,22	31,8	22,07	51,17	69,3	21,53	32,26
525 nm	21,18	17,35	28,43	26,77	19,24	53,88	69,33	17,14	20,15
535 nm	23,28	19,88	31,57	28,76	21,21	52,49	75,17	19,33	28,68
590 nm	0,96	2,32	4,17	3,38	3,06	28,15	14,51	1,88	0,83
610 nm	0	0	0	0	0	5,2	1,92	0	0

*double — grupa azowa z części dibenzo[*b,f*]oksepinowej związku; mono — grupa azowa z części azobenzenowej związku.

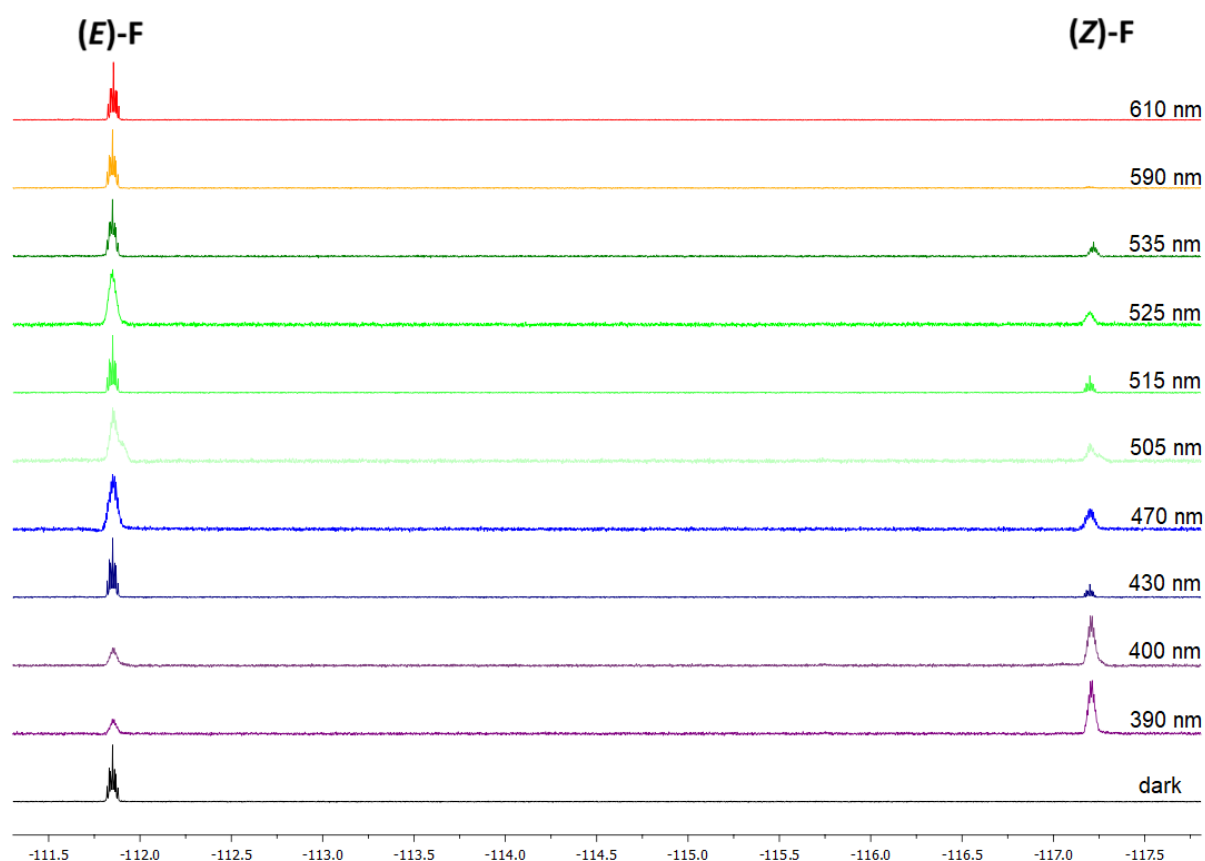


Rysunek 25. Udział procentowy izomeru *Z* w stanie fotostacjonarnym (PSS) w związkach 14a–b, 14e–g i 16a–b przedstawiony w formie wykresu słupkowego.

Jak można zauważyć dla związków **14a–b**, **14e–g** największa aktywacja (największa ilość izomeru *Z*) zachodzi pod wpływem światła o długości 390–400 nm (zakres ultrafioletu). Związki **16a–b** posiadają kilka wiązań azowych — ugrupowania azowe połączone ze szkieletem dibenzo[*b,f*]oksepiny (double) są głównie aktywowane światłem o długości 390–400 nm, a grupa azowa niepołączona ze szkieletem dibenzo[*b,f*]oksepiny (mono) jest już aktywowana głównie przez światło zielone z zakresu 505–535 nm. Na podstawie tych eksperymentów można stwierdzić, że obecność szkieletu dibenzo[*b,f*]oksepiny przesuw

maksimum absorpcji grupy azowej ku falom krótszym, podczas gdy szkielet fluoroazobenzenowy przesuwa maksimum absorpcji w stronę fal dłuższych.

Procentowy udział izomeru *Z* w mieszaninie tworzącej się w stanie fotostacjonarnym (PSS) został obliczony za pomocą analizy intensywności sygnałów na widmach ^{19}F NMR mieszanin w stanie fotostacjonarnym. Zmiana konfiguracji prowadzi do wyraźnych zmian w widmach NMR, które przejawiają się pojawieniem się nowych sygnałów charakterystycznych dla fluorów izomeru *Z*, obok sygnałów odpowiadających izomerowi *E* (rys. 26).



Rysunek 26. Zmiany zachodzące w widmie ^{19}F NMR na przykładzie sygnału pochodzącego od fluoru w związku 14b podczas naświetlania światłem o różnych długościach fal. Dark oznacza widmo związku, na które nie działało żadne światło (związek był przechowywany w ciemności).

b) Kinetyka fotoizomeryzacji:

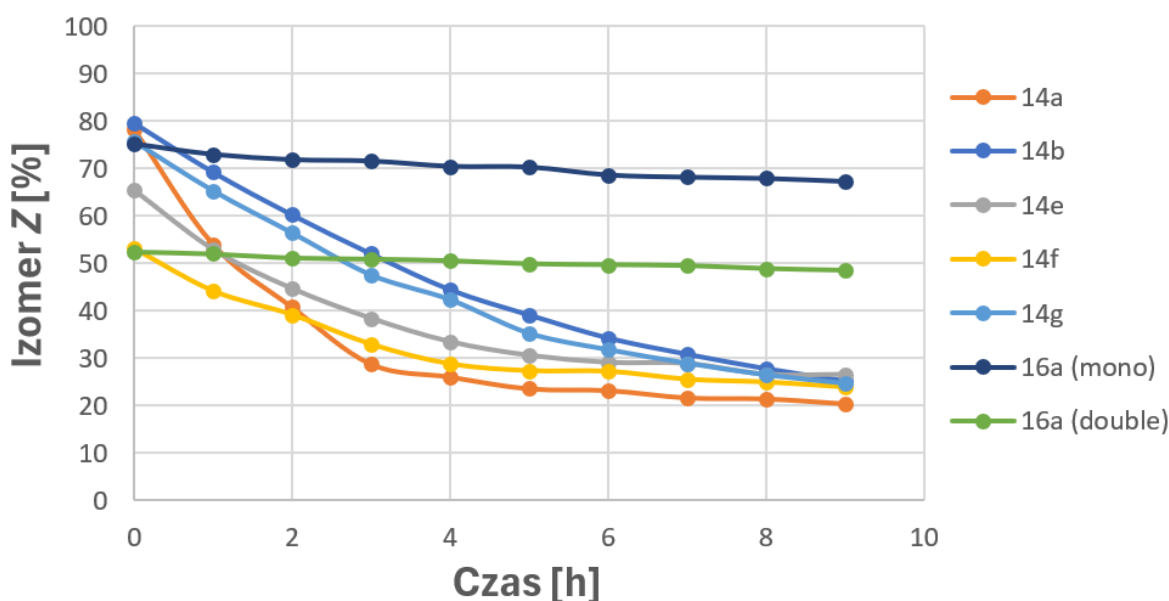
Aby ocenić szybkość reizomeryzacji z izomeru *Z* do *E* dla związków **14a–b**, **14e–g** oraz **16a**, przeprowadzono pomiary zmian ich stężenia w funkcji czasu (tab. 7, rys. 27). Pomiary przeprowadzono po uprzednim doprowadzeniu powyższych związków do stanu fotostacjonarnego (PSS). W przypadku związków **14a–b**, **14e–g** uczyniono to poprzez

naświetlenie ich światłem o długości fali 390 nm, a w przypadku związku **16a** po naświetleniu go światłem o długości fali 535 nm.

Tabela 7. Zmiana ilości izomeru *Z* związków 14a–b, 14e–g oraz 16a w funkcji czasu.

	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h	9 h	Δ [%]	Długość fali
14a	77,66%	53,45%	40,23%	28,26%	25,56%	23,08%	23,13%	21,18%	20,97%	19,93%	57,73	390 nm
14b	79,24%	68,87%	59,85%	51,64%	44,06%	38,75%	33,89%	30,47%	27,42%	24,86%	54,38	390 nm
14e	67,23%	54,70%	46,41%	40,12%	35,17%	32,30%	30,79%	30,59%	28,29%	28,27%	38,96	390 nm
14f	52,63%	43,70%	38,69%	32,46%	28,33%	26,89%	26,77%	25,09%	24,50%	23,45%	29,18	390 nm
14g	73,48%	63,10%	54,24%	45,36%	40,15%	33,07%	29,62%	26,80%	24,30%	22,50%	50,98	390 nm
16a (double)	52,49%	52,03%	51,16%	50,91%	50,58%	49,89%	49,70%	49,50%	48,85%	48,47%	4,02	535 nm
16a (mono)	75,17%	72,97%	71,86%	71,58%	70,47%	70,31%	68,65%	68,20%	67,93%	67,30%	7,87	535 nm

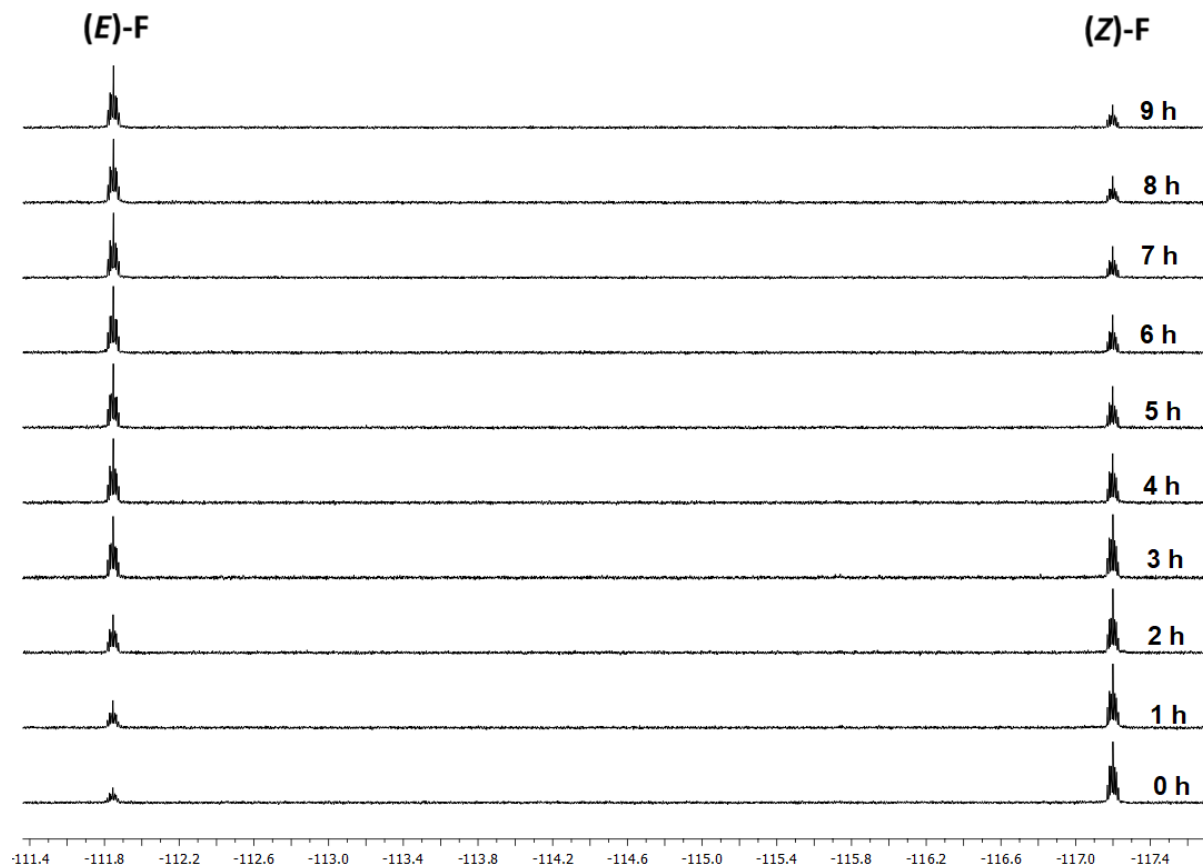
Kinetyka fotoizomeryzacji *Z*→*E*



Rysunek 27. Zmiana ilości izomeru *Z* związków 14a–b, 14e–g oraz 16a w funkcji czasu w formie wykresu.

Procentowy udział izomeru *Z* w mieszaninie określano za pomocą analizy pól powierzchni pod sygnałami w widmach ^{19}F NMR, mierzonych co godzinę przez 9 godzin (rys. 28). Po 9 godzinach ilość izomeru *Z* w związkach **14a–b**, **14e–g** spadła z poziomu 52,63–79,24% do

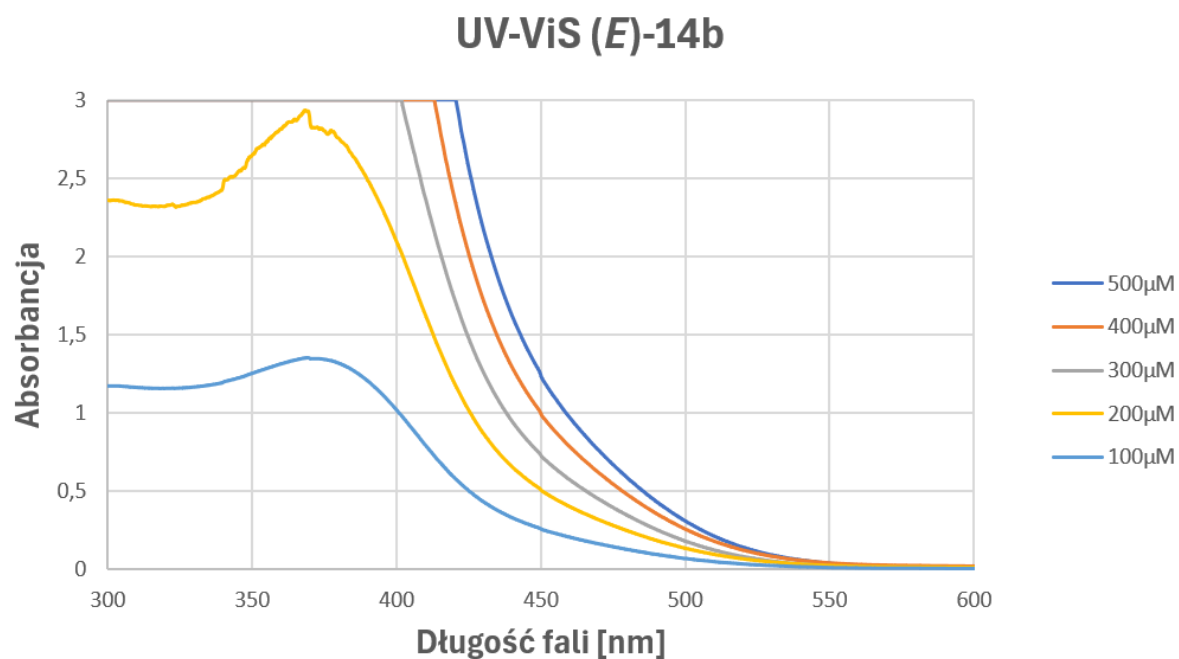
poziomu 19,93–28,27%, czyli od około 30 aż do 60%. Świadczy to o niestabilności izomeru *Z* tych pochodnych w czasie. Natomiast izomer *Z* związku **16a** wykazywał znaczną stabilność w czasie — po 9 godzinach jego udział procentowy zmniejszył się jedynie o około 4–8%.



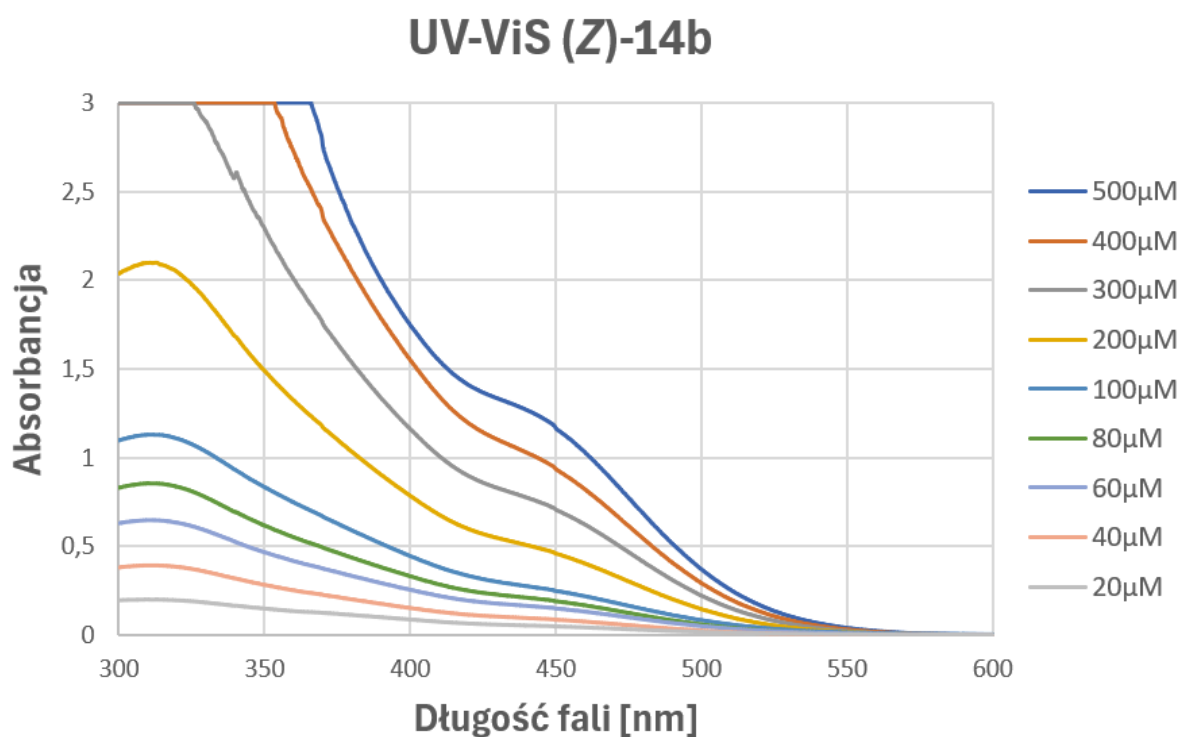
Rysunek 28. Zmiany w funkcji czasu zachodzące w widmie ^{19}F NMR, na przykładzie sygnału pochodzącego od fluoru w związku **14b**.

c) Widma UV–Vis:

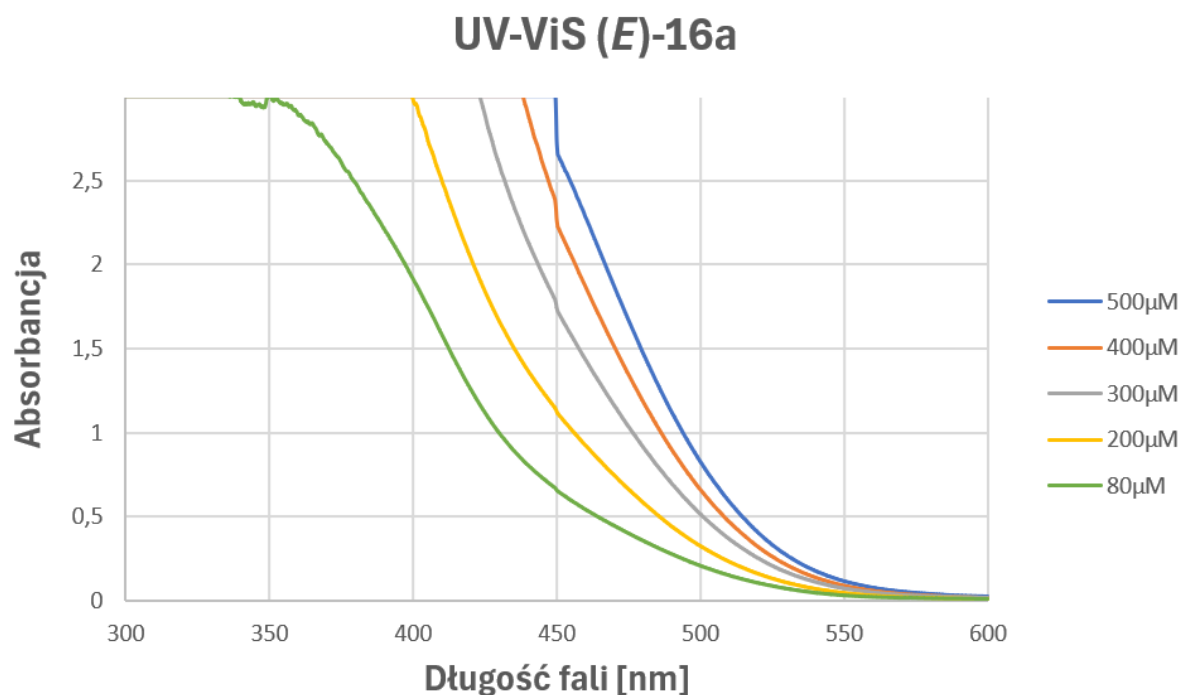
Podobnie jak w przypadku symetrycznych pochodnych azowych dibenzo[*b,f*]oksepy, przeprowadzono analizę stopnia rozdzielania pasm przejść elektronowych typu $\pi \rightarrow \pi^*$ oraz $n \rightarrow \pi^*$ dla izomerów *E* i *Z*. Widma UV–Vis zarejestrowano dla związków **14b** (rys. 29, rys. 30) oraz **16a** (rys. 31, rys. 32).



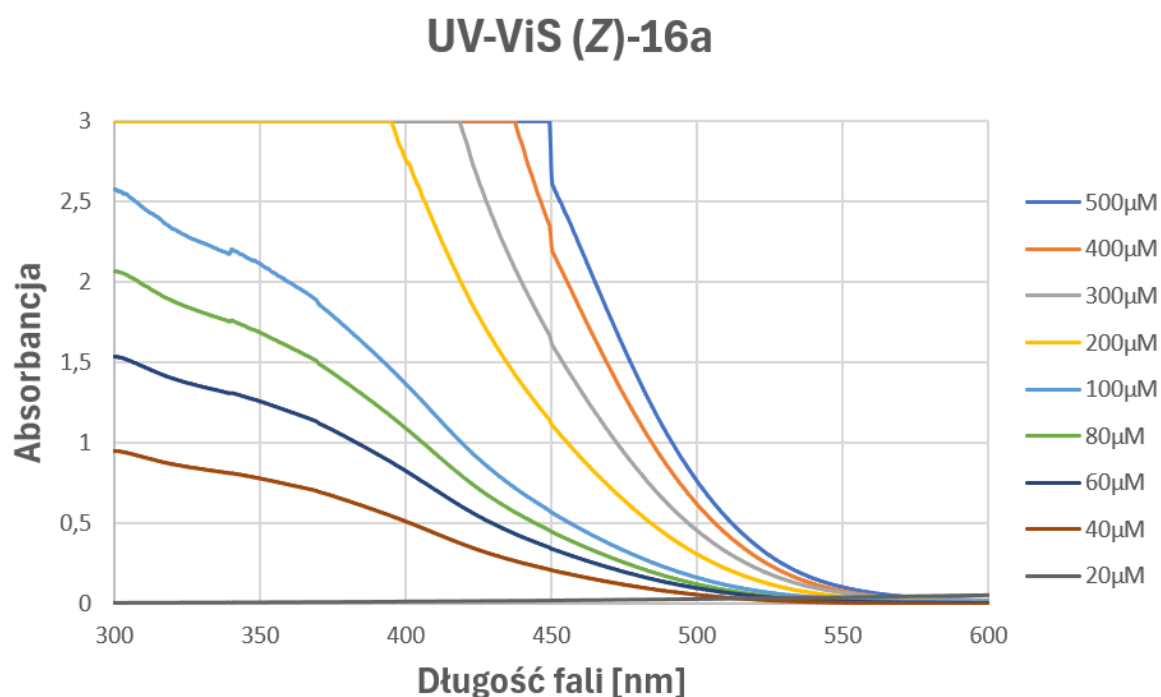
Rysunek 29. Widmo UV–Vis izomeru *E* związku 14b.



Rysunek 30. Widmo UV–Vis izomeru *Z* związku 14b.



Rysunek 31. Widmo UV–ViS izomeru *E* związku 16a.



Rysunek 32. Widmo UV–ViS izomeru *Z* związku 16a.

W przypadku izomeru *E* związku **14b** maksimum absorpcji pasma $n \rightarrow \pi^*$ nie jest widoczne, natomiast ujawnia się ono w widmie UV–ViS izomeru *Z* i występuje przy długości fali około 450 nm. Pasmo odpowiadające przejściu $\pi \rightarrow \pi^*$ jest dobrze widoczne w widmach obu

izomerów, przy czym obserwuje się wyraźny efekt hipsochromowy dla tego pasma. Dla związku **16a** zarejestrowano jedynie pasmo związane z przejściem $\pi \rightarrow \pi^*$, bez wyraźnie rozdzielonego pasma $n \rightarrow \pi^*$. Może to wynikać z obecności dużej liczby wiązań azowych, które wpływają na strukturę elektronową układu. We wszystkich przypadkach intensywność pasm absorpcyjnych dla izomerów *Z* była niższa niż dla odpowiadających im izomerów *E*. Można wnioskować, że w izomerze *Z* dochodzi do zmiany geometrii cząsteczki, co wpływa na osłabienie nakładania się orbitali π , a tym samym zmniejsza prawdopodobieństwo przejścia elektronowego i prowadzi do obniżenia intensywności tego pasma absorpcji.

3.2.8 Modelowanie molekularne azowych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny

Synergia metod eksperymentalnych i obliczeniowych odgrywa kluczową rolę w identyfikacji oraz optymalizacji nowych, skutecznych związków przeciwnowotworowych [195]. Dokowanie molekularne to zaawansowana technika komputerowa, która pozwala ocenić, w jaki sposób konformacja ligandu dopasowuje się do centrum aktywnego białka lub innej makrocząsteczki, dążąc do układu o najniższej energii wiązania. Co istotne, metoda ta umożliwia również ilościową ocenę energii oddziaływań ligand-cel biologiczny, z uwzględnieniem kluczowych procesów odpowiedzialnych za molekularne rozpoznawanie [195]. W oparciu o dostępne dane literaturowe [118–119] oraz wyniki badań cytotoksyczności [191] przewidywano, że niektóre pochodne dibenzo[*b,f*]oksepiny mogą działać jako inhibitory polimeryzacji tubuliny, wykazując zdolność wiązania się w miejscu aktywnym dla kolchicyny. Z tego względu, równolegle do prac syntetycznych, przeprowadzono badania interakcji związków **4a**, **4f** oraz izomerów *E* i *Z* związków **9a–c**, **9e–f**, **14b** i **16a–b** z heterodimerem α,β -tubuliny (struktura o kodzie PDB: 1SA0 z międzynarodowej bazy danych — Protein Data Bank) z wykorzystaniem modelowania molekularnego. Geometrie badanych związków optymalizowano przy użyciu teorii funkcjonału gęstości (DFT) z wykorzystaniem funkcjonału B3LYP oraz w bazie 6-31G*, z zastosowaniem metody PCM (ang. *the polarizable continuum model*) w celu modelowania efektów solwatacji przy użyciu programu Gaussian 03W [196]. Dokowanie molekularne przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania AutoDock Vina [197]. Szacunkowe wartości energii oddziaływania związków **4a**, **4f** oraz izomerów *E* i *Z* związków **9a–c**, **9e–f**, **14b** i **16a–b** zostały przedstawione w **tabeli 8** (energia oddziaływania związków kontrolnych, kolchicyny i CA-4, wynosi odpowiednio $-8,6$ kcal/mol i $-7,62$ kcal/mol) [198–199].

Tabela 8. Szacunkowa wartość energii oddziaływania związków **4a**, **4f** oraz izomerów *E* i *Z* związków **9a–c**, **9e–f**, **14b**, **16a–b** z tubuliną.

Związek	Powinowactwo izomeru <i>E</i> (kJ/mol)	Powinowactwo izomeru <i>Z</i> (kJ/mol)	Δ Powinowactwa (kJ/mol)
4a*	–10,0		
4f*	–10,4		
9a	–13,9	–12,3	1,6
9b	–13,5	–14,2	–0,7
9c	–14,2	–13,5	0,7
9e	–12,8	–12,4	0,4
9f	–13,4	–12,4	1
14b	–9,6	–9,2	0,4
16a	–9,1	–9,7	–0,6
16b	–6,0	–11,0	–5,0

* Brak izomerów *E/Z* ponieważ nie występuje grupa azowa

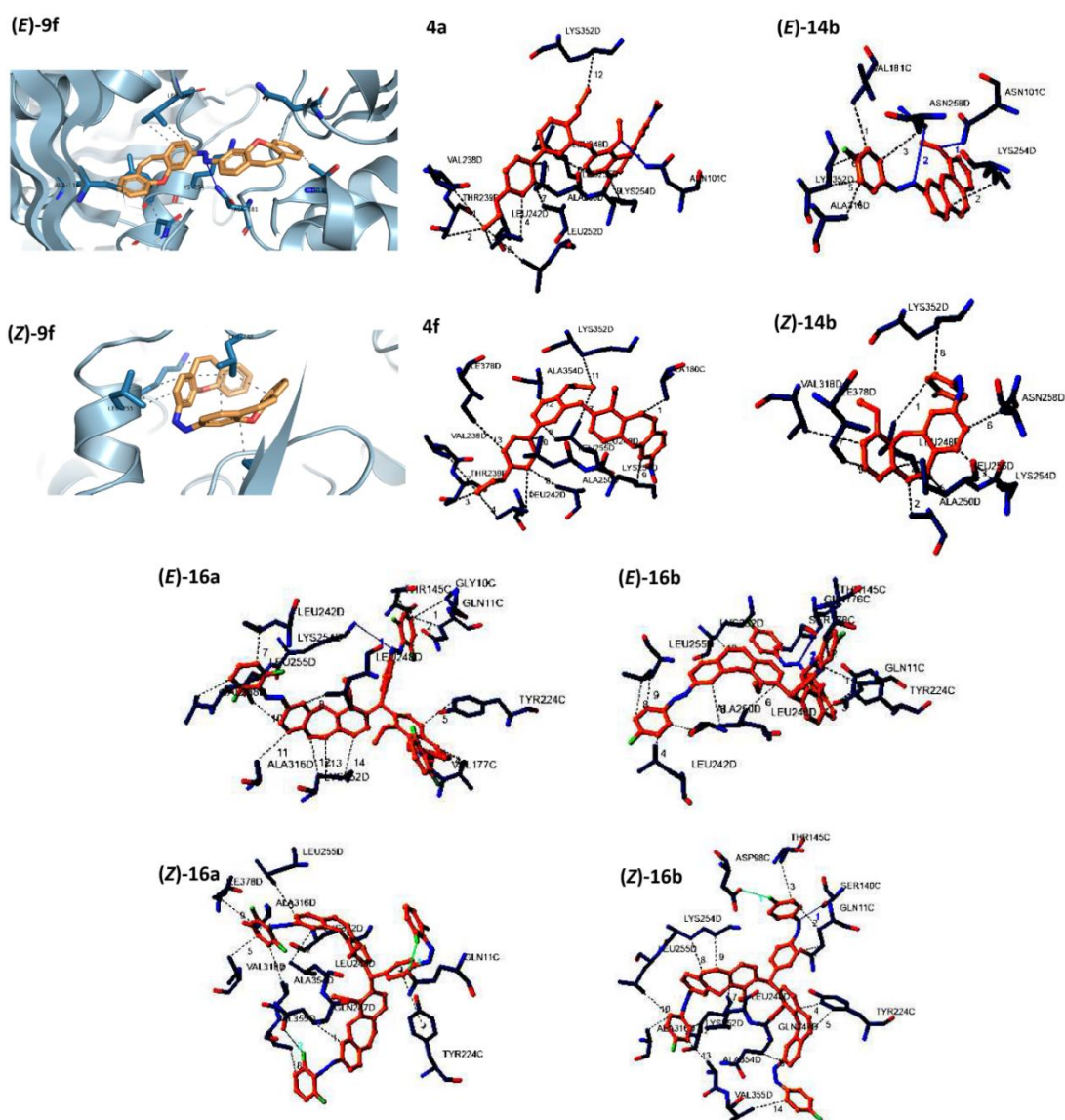
W przypadku związków **9a**, **9c**, **9e**, **9f** oraz **14b** energia oddziaływania izomeru *Z* z heterodimerem α,β tubuliny była wyższa niż energia oddziaływania izomeru *E*. Dla związków **9b**, **16a–b** energia oddziaływania izomeru *Z* z białkiem była niższa niż energia oddziaływania izomeru *E*, a w przypadku związku **16b** wartość ta była prawie dwukrotnie niższa. Warto również zaznaczyć, że energia oddziaływania wszystkich związków była niższa niż energia oddziaływania związku kontrolnego — kolchicyny. Jedynie izomer *E* związku **16b** posiadał energię wiązania wyższą niż energia oddziaływania kolchicyny z heterodimerem α,β -tubuliny.

Na podstawie analizy energii oddziaływań dla związków **4a**, **4f** oraz izomerów *E* i *Z* związków **9a–c**, **9e–f**, **14b** i **16a–b** w α,β -tubulinie, zidentyfikowano główne interakcje odpowiedzialne za powinowactwo ligandów do miejsca wiązania kolchicyny (rys. 33). Badane ligandy **9a–c**, **9e–f** były stabilizowane głównie poprzez oddziaływania hydrofobowe z podjednostkami α i β tubuliny, takimi jak Leu248, Lys254, Leu255, Lys352 dla izomerów *Z* oraz Gly11, Thr145, Leu248, Lys254, Leu255, Asn258, Ala316, Lys352 dla izomerów *E*. W przypadku izomerów *E* występowała również stabilizacja poprzez wiązanie wodorowe z Asn101. Badane ligandy **4a**,

4f, **14b** i **16a–b** były głównie stabilizowane przez oddziaływania Van der Waalsa z α,β -tubuliną, takie jak:

- Val β 238, Thr β 239, Leu β 255, Leu β 252, Leu β 248, Leu β 242, Lys β 352, Lys β 254 i Ala β 250 dla **4a**;
- Ile β 378, Val β 238, Thr β 239, Leu β 255, Leu β 248, Leu β 242, Lys β 352, Lys β 254 i Ala β 250 dla **4f**;
- Lys352, Lys β 254, Ala β 316, Asn β 258 i Val α 181 dla izomeru *E* związku **14b**;
- Ile β 378, Val β 318, Lys β 352, Lys β 254, Leu β 255, Leu β 248, Asn β 258 i Ala β 250 dla izomeru *Z* związku **14b**;
- Val β 238, Leu β 255, Leu β 248, Leu β 242, Lys β 352 i Ala β 316 dla izomeru *E* związku **16a**;
- Ile β 378, Val β 318, Ala β 316, Leu β 255, Leu β 248 i Lys β 352 dla izomeru *Z* związku **16a**;
- Lys β 352, Leu β 255, Leu β 248, Leu β 242 i Ala β 250 dla izomeru *E* związku **16b**;
- Lys β 352, Lys β 254, Ala β 316, Leu β 255 i Leu β 248 dla izomeru *Z* związku **16b**.

Na **rysunku 33** dla związków **4a**, **4f** oraz izomerów *E* i *Z* związków **9f**, **14b** i **16a–b** pokazano wizualizację oddziaływań ligandu z domeną kolchicynową w α,β -tubulinie.



Rysunek 33. Model interakcji związków 4a, 4f oraz izomerów *E* i *Z* związków 9f, 14b, 16a–b z domeną kolchicynową α,β -tubuliny.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że badane ligandy wykazują wysokie powinowactwo do kompleksu α,β -tubuliny, porównywalne z obserwowanym dla kolchicyny. Ponadto, przeprowadzone analizy dokowania molekularnego potwierdziły hipotezę, że pochodne te oddziałują z miejscem wiązania kolchicyny, zlokalizowanym na styku podjednostek α i β tubuliny, co stanowiło uzasadnienie dla podjęcia opisanych wcześniej prac syntetycznych.

3.2.9 Dyskusja

Jak już wcześniej wspomniano, zasadniczym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było otrzymanie związków o potencjalnej aktywności biologicznej, zawierających grupę azową i

posiadających określone właściwości spektroskopowe. Jako pierwszy obiekt badań wybrano szkielet dibenzo[*b,f*]oksepiny. W pierwszej kolejności, posługując się interpretacją SCS w widmach ^{13}C NMR, określono miejsca reaktywne umożliwiające tworzenie różnie podstawionych dimerów dibenzo[*b,f*]oksepiny. Następny etap badań obejmował próbę syntezy oligomerów dibenzo[*b,f*]oksepiny z wykorzystaniem łączników innych niż metylenowy, co zaowocowało otrzymaniem dimerów zawierających różnorodne mostki strukturalne. Interesującym wynikiem jest obserwacja, że szybkość tworzenia połączenia pochodnej dibenzo[*b,f*]oksepiny z 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylem w obecności różnych aldehydów jest większa niż szybkość tworzenia symetrycznych dimerów dibenzo[*b,f*]oksepiny. W przewodzie zawsze powstawał produkt podstawienia 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylu. Udowodniono też, że pochodne dibenzo[*b,f*]oksepiny są zdolne do tworzenia większych oligomerów oraz związków z trzema wiązaniami azowymi, bazujących na pierścieniu dibenzo[*b,f*]oksepiny. W kolejnym kroku przystąpiono już do uzyskania docelowych *azo*-dibenzo[*b,f*]oksepin. Z sukcesem otrzymano serię pochodnych *azo*-dibenzo[*b,f*]oksepiny i zbadano ich właściwości fotochemiczne.

Otrzymane związki nie wykazały jednak rozdzielania pasm absorpcyjnych odpowiadających przejściom elektronowym typu $\pi \rightarrow \pi^*$ i $n \rightarrow \pi^*$ w widmach izomerów *E* i *Z*. Brak takiej separacji uniemożliwia selektywne wzbudzanie poszczególnych stereoizomerów przy użyciu światła o określonej długości fali, co znacząco ogranicza możliwość ich zastosowania w badaniach biologicznych opartych na kontrolowanej fotokonwersji. Wprowadzenie podstawników fluorowych tylko w nieznacznym stopniu przesunęło maksimum absorpcji w kierunku zielonego światła. Badania nad syntezą rozgałęzionych azowych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny dowiodły, że sam szkielet dibenzo[*b,f*]oksepinowy przesunęło maksimum absorpcji w kierunku fal krótszych, mniej korzystnych dla organizmu żywego. Dodatkowo w większości przypadków nie była zauważalna separacja pasm przejść typu $\pi \rightarrow \pi^*$ i $n \rightarrow \pi^*$. Rozdzielenie pasm absorpcyjnych w molekularnych przełącznikach fotochromowych ma kluczowe znaczenie dla ich efektywnego działania. W szczególności dąży się do batochromowego przesunięcia pasma $n \rightarrow \pi^*$, co umożliwia selektywne wzbudzanie wybranych izomerów (*E* lub *Z*) przy użyciu światła o odpowiednio dobranej energii. Pasma to odgrywa istotną rolę w inicjowaniu procesu fotoizomeryzacji, a jego wyraźne oddzielenie od pasma $\pi \rightarrow \pi^*$ stwarza możliwość selektywnej aktywacji przy użyciu światła o dłuższej długości fali, na przykład w zakresie światła zielonego.

Dodatkowo izomery *Z* azowych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepy 14a–b, 14e–g były również niestabilne w czasie, co wykazały badania nad kinetyką fotoizomeryzacji. Częściowy sukces otrzymano w przypadku rozgałęzionych niesymetrycznych azowych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepy zawierających więcej niż jedno ugrupowanie azowe (16a). W tym przypadku dowiedziono, że szkielet fluoroazobenzenowy, w odróżnieniu od szkieletu dibenzo[*b,f*]oksepy, jest zdolny do przesuwania maksimum absorpcji w kierunku światła zielonego. Dodatkowo udowodniono, że izomer *Z* związku 16a jest stabilny w czasie, ponieważ stopień jego reizomeryzacji nie przekraczał 8%. Niestety związek ten otrzymuje się po wieloetapowej syntezie, dlatego też wydajność całkowita otrzymywania tego związku jest niska.

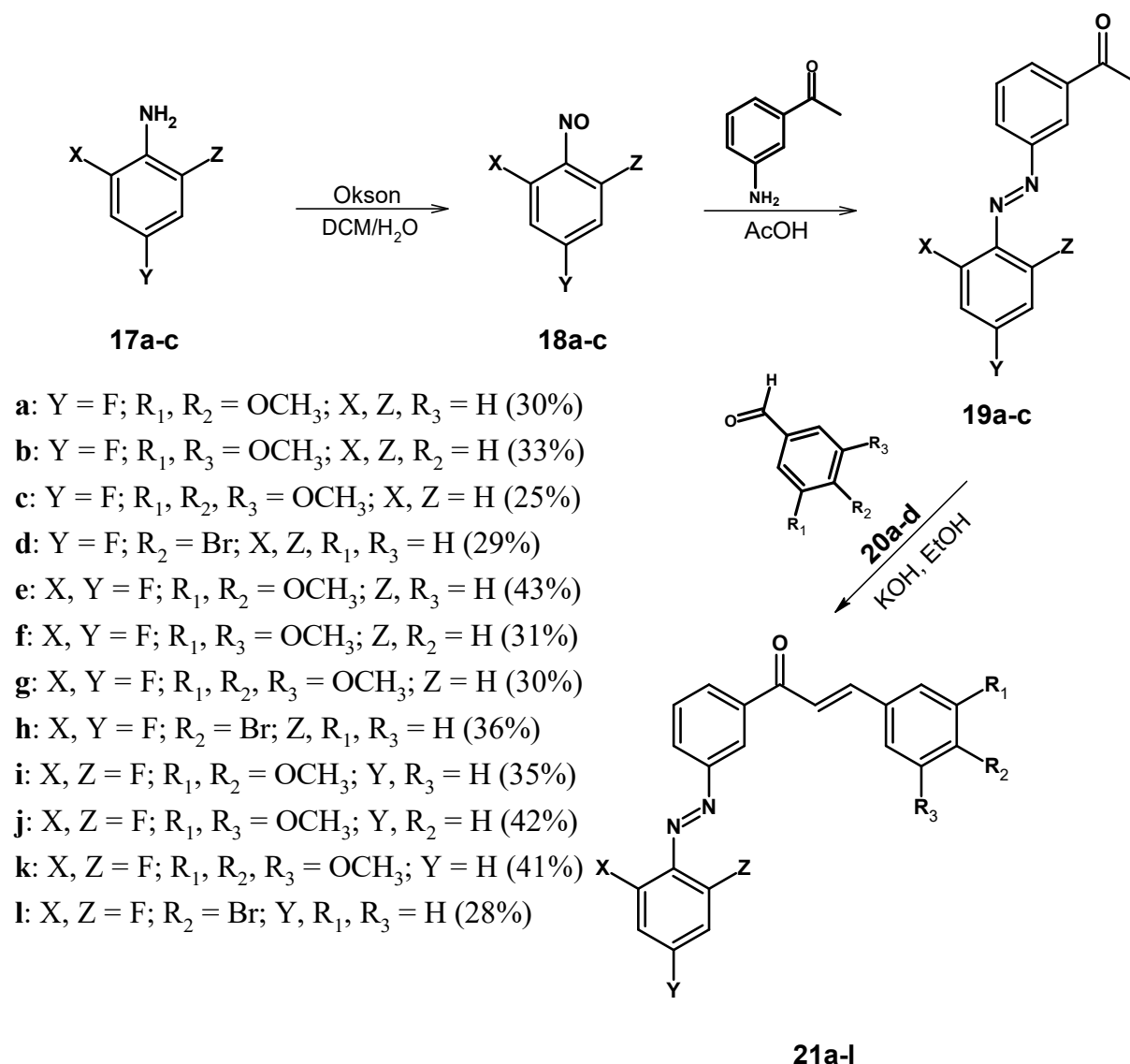
Z wykorzystaniem modelowania molekularnego wykazano, że otrzymane związki zawierające pierścień dibenzo[*b,f*]oksepy 4a, 4f oraz ugrupowanie azowe 9f, 14b i 16a–b mogą oddziaływać z miejscem wiązania kolchicyny w strukturze tubuliny, co wskazuje na ich potencjalną aktywność biologiczną związaną z modulacją funkcji mikrotubul. Pomimo obiecujących wyników analiz dokowania molekularnego, otrzymane pochodne dibenzo[*b,f*]oksepy nie wykazały oczekiwanej aktywności jako molekularne przełączniki fotoaktywne w zakresie promieniowania widzialnego, co wskazało na konieczność poszukiwania alternatywnych struktur chemicznych. Podjęto decyzję o skierowaniu dalszych badań na nową klasę związków — pochodne chalkonu — wykazujące także korzystne właściwości biomedyczne oraz zdolność oddziaływania z domeną kolchicynową.

3.3 Synteza oraz badanie właściwości fotochemicznych i biologicznych azowych pochodnych chalkonu

Pochodne chalkonu należą do jednych z najaktywniejszych biologicznie flawonoidów o potencjale terapeutycznym, który został potwierdzony w szeregu badań przedklinicznych i klinicznych obejmujących szerokie spektrum aktywności biologicznej [200]. Zgodnie z założeniami niniejszej pracy przystąpiono do syntezy pochodnych chalkonu z dodanym pierścieniem aromatycznym zawierającym izomeryzowalny układ (azobenzen). W tym przypadku zastosowano strategię rozszerzenia struktury (*Bona Fide Extension*) omówioną wcześniej, w podrozdziale dotyczącym projektowania i modulacji fotochromowych przełączników molekularnych.

3.3.1 Synteza azowych pochodnych chalkonu

W celu otrzymania związków **21a–l**, będących azowymi pochodnymi chalkonu, przeprowadzono trójetapową syntezę (**schem. 30**). W pierwszym etapie odpowiednie pochodne aniliny **17a–c** poddano utlenianiu do pochodnych nitrozo **18a–c** z użyciem oksonu. Drugi etap polegał na sprzęganiu pochodnych nitrozo **18a–c** z 3-aminobenzaldehydem w obecności kwasu octowego, co doprowadziło do utworzenia ugrupowania azowego w związkach **19a–c**. W ostatnim etapie przeprowadzono kondensację aldolową otrzymanych związków **19a–c** z odpowiednimi pochodnymi benzaldehydu **20a–d**, co pozwoliło na otrzymanie azowych pochodnych zawierających szkielet chalkonu — związków **21a–l**. W efekcie syntezy uzyskano dwanaście zróżnicowanych strukturalnie pochodnych chalkonu, zawierających podstawniki metoksykowe oraz halogenowe.



Schemat 30. Schemat syntezy azo-pochodnych chalkonu.

3.3.2 Analiza fotochemiczna azowych pochodnych chalkonu

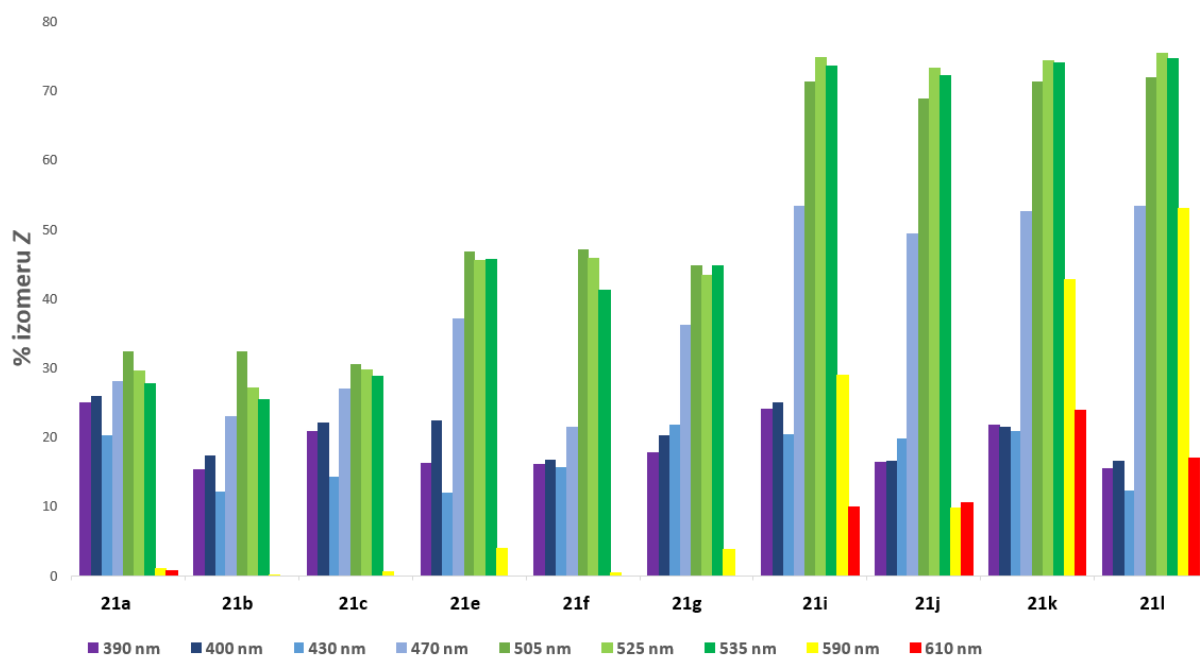
W celu weryfikacji, czy zsyntetyzowane *azo*-pochodne chalkonu **21a–l** wykazują pożądane właściwości fotochemiczne w zakresie światła widzialnego, przeprowadzono na nich szereg badań:

a) Fotoizomeryzacja:

Aby ocenić zdolność związków **21a–l** do fotoizomeryzacji pod wpływem promieniowania o różnych długościach fal, przeprowadzono eksperyment, w którym wybrane związki poddano naświetlaniu światłem o dziewięciu różnych długościach fal, mieszczących się w zakresie od 390 do 610 nm (**tab. 9, rys. 34**). W wyniku oddziaływania światłem związki te ulegały zmianie konfiguracji z bardziej stabilnej formy *E* do mniej stabilnej formy *Z*. Związki **21d** oraz **21h** cechowały się bardzo niską rozpuszczalnością w używanym rozpuszczalniku — DMSO, dlatego nie zbadano ich właściwości fotochemicznych.

Tabela 9. Wartości procentowego udziału izomeru *Z* w stanie fotostacjonarnym (PSS) dla związków **21a–c**, **21e–g** oraz **21i–l**.

Długość fali	Udział procentowy izomeru <i>Z</i> [%]									
	Związek									
	21a	21b	21c	21e	21f	21g	21i	21j	21k	21l
390 nm	24,94	15,28	20,75	16,18	16,05	17,75	24,02	16,39	21,68	15,46
400 nm	25,92	17,33	22,06	22,41	16,75	20,2	25,04	16,51	21,51	16,55
430 nm	20,28	12,11	14,3	11,94	15,7	21,74	20,47	19,78	20,88	12,27
470 nm	28,04	22,89	26,96	37,12	21,39	36,2	53,33	49,38	52,56	53,26
505 nm	32,44	32,38	30,59	46,84	47,13	44,82	71,32	68,87	71,35	71,88
525 nm	29,47	27,08	29,75	45,56	45,85	43,41	74,84	73,2	74,39	75,44
535 nm	27,72	25,4	28,75	45,63	41,18	44,75	73,53	72,24	73,94	74,61
590 nm	1,02	0,02	0,62	3,99	0,36	3,82	28,97	9,82	42,8	52,99
610 nm	0,69	0	0	0	0	0	9,88	10,49	23,81	16,98

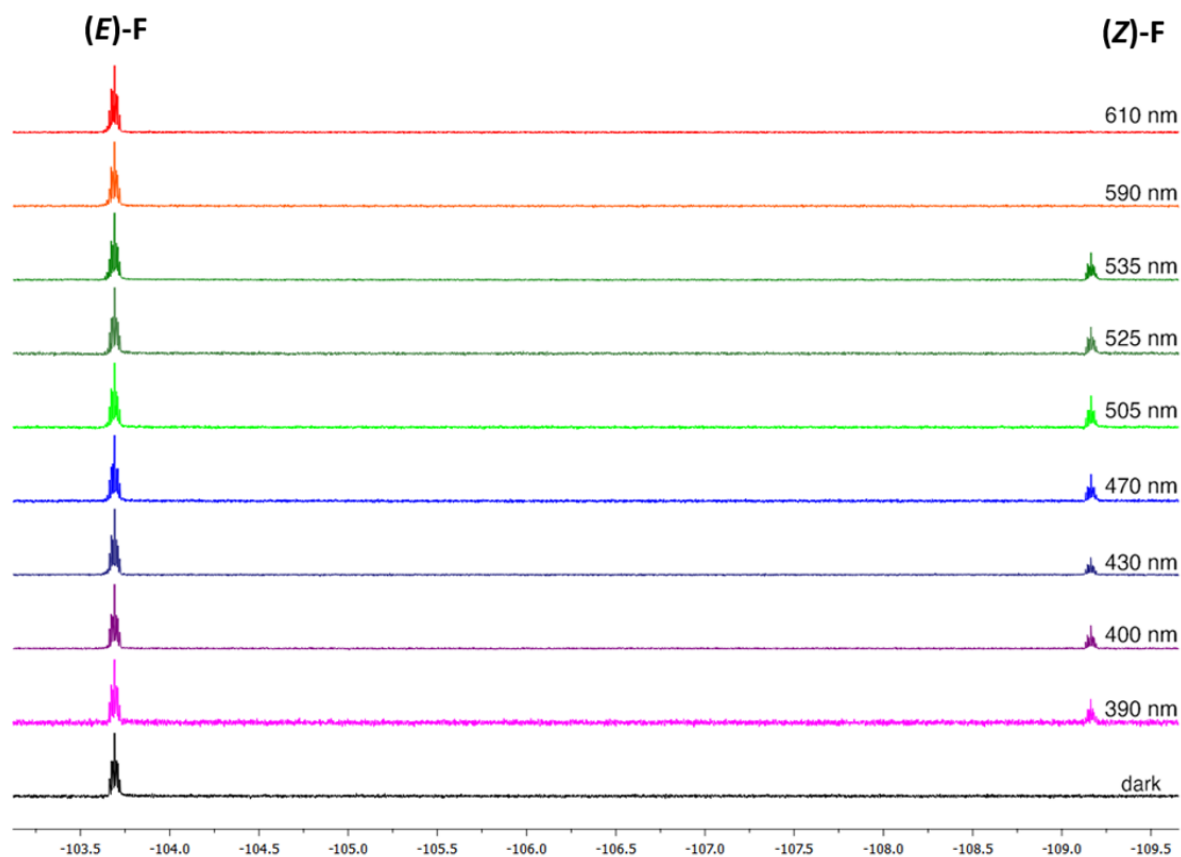


Rysunek 34. Udział procentowy izomeru Z w stanie fotostacjonarnym (PSS) w związkach 21a–c, 21e–g oraz 21i–l w formie wykresu słupkowego.

Na podstawie przeprowadzonych badań potwierdzono, że azowe pochodne chalkonu wykazują zdolność do odwracalnej izomeryzacji *E/Z* pod wpływem światła o odpowiedniej długości fali, a zatem charakteryzują się właściwościami fotochemicznymi. W oparciu o uzyskane wyniki, można zauważyć, że największy stopień aktywacji w przypadku związków **21a–c**, **21e–g** oraz **21i–l** obserwuje się po naświetlaniu światłem zielonym o długości 505–525 nm. Świadczy to o tym, że wprowadzenie do struktury chalkonu podstawników halogenkowych prowadzi do przesunięcia maksimum absorpcji w kierunku zakresu światła zielonego, korzystnego z punktu widzenia zastosowań biologicznych i medycznych. Z analizy danych przedstawionych na wykresie wynika również, że dla związków zawierających jeden podstawnik fluorowy w pozycji 4 (**21a–c**) i dwa podstawniki fluorowe w pozycjach 2,4 (**21e–g**), zawartość izomeru Z w stanie fotostacjonarnym (PSS) mieściła się w przedziale 30,59–47,13%, natomiast w przypadku pochodnych z dwoma podstawnikami fluorowymi w pozycjach 2,6 (**21i–l**) wartość ta wzrastała do około 75%. Wskazuje to jednoznacznie, że obecność podstawników fluorowych istotnie wpływa na właściwości fotochemiczne chalkonowych układów azowych. Z kolei podstawniki metoksyłowe i bromowe nie wywoływały istotnych zmian w składzie mieszaniny izomerów w stanie fotostacjonarnym.

Procentowy udział izomeru Z w mieszaninie tworzącej się w stanie fotostacjonarnym (PSS) został obliczony za pomocą analizy intensywności sygnałów na widmach ^{19}F NMR mieszanin

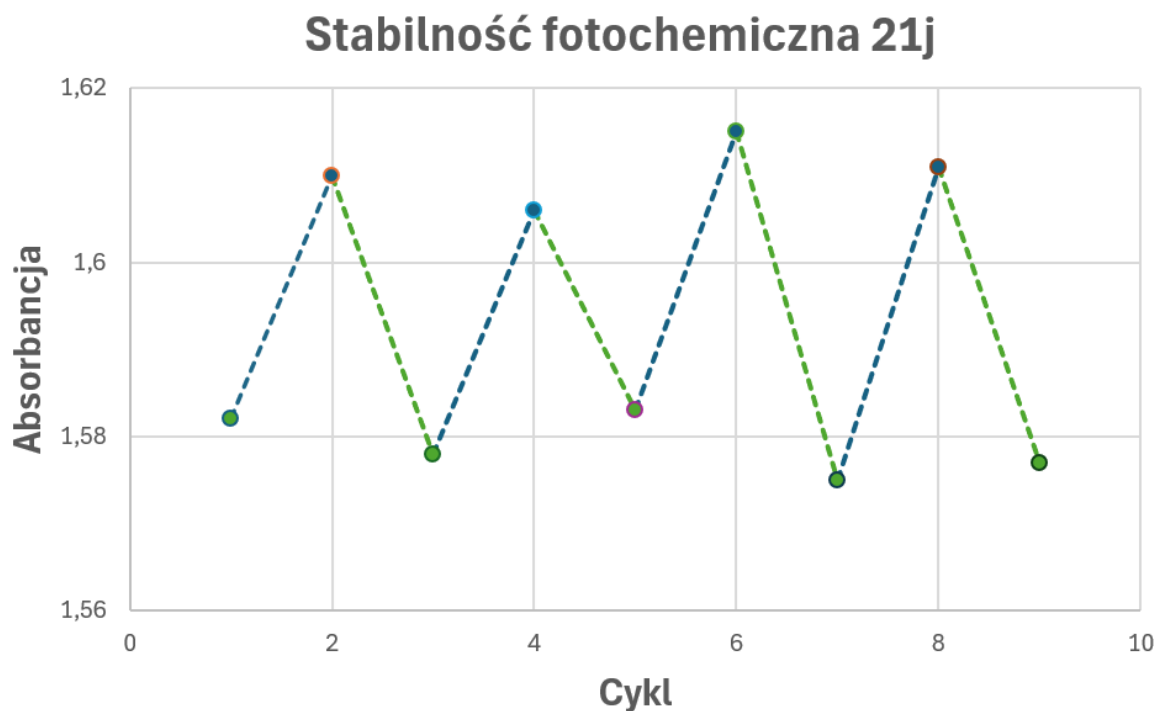
w stanie fotostacjonarnym. Zmiana konfiguracji prowadzi do istotnych modyfikacji widm NMR, które przejawiają się pojawieniem się nowych sygnałów charakterystycznych dla fluorów izomeru *Z*, obok sygnałów odpowiadających izomerowi *E* (rys. 35).



Rysunek 35. Zmiany zachodzące w widmie ^{19}F NMR na przykładzie sygnału pochodzącego od fluoru w związku 21a podczas naświetlania światłem o różnych długościach fal. Dark oznacza widmo związku, na które nie działało żadne światło (związek był przechowywany w ciemności).

b) Stabilność fotochemiczna:

W celu oceny fotochemicznej stabilności otrzymanych związków przeprowadzono eksperyment, w którym związek **21j** poddano powtarzającym się cyklom naświetlania światłem o długościach fal 525 oraz 430 nm (rys. 36). Wielokrotne, odwracalne cykle naświetlania związku **21j** naprzemiennie światłem zielonym i niebieskim nie powodowały istotnego „fotowysielania” ani degradacji, co potwierdza powtarzalność i trwałość fotochemicznej konwersji tego związku.



Rysunek 36. Wykres przedstawiający stabilność fotochemiczną związku 21j.

c) Kinetyka fotoizomeryzacji:

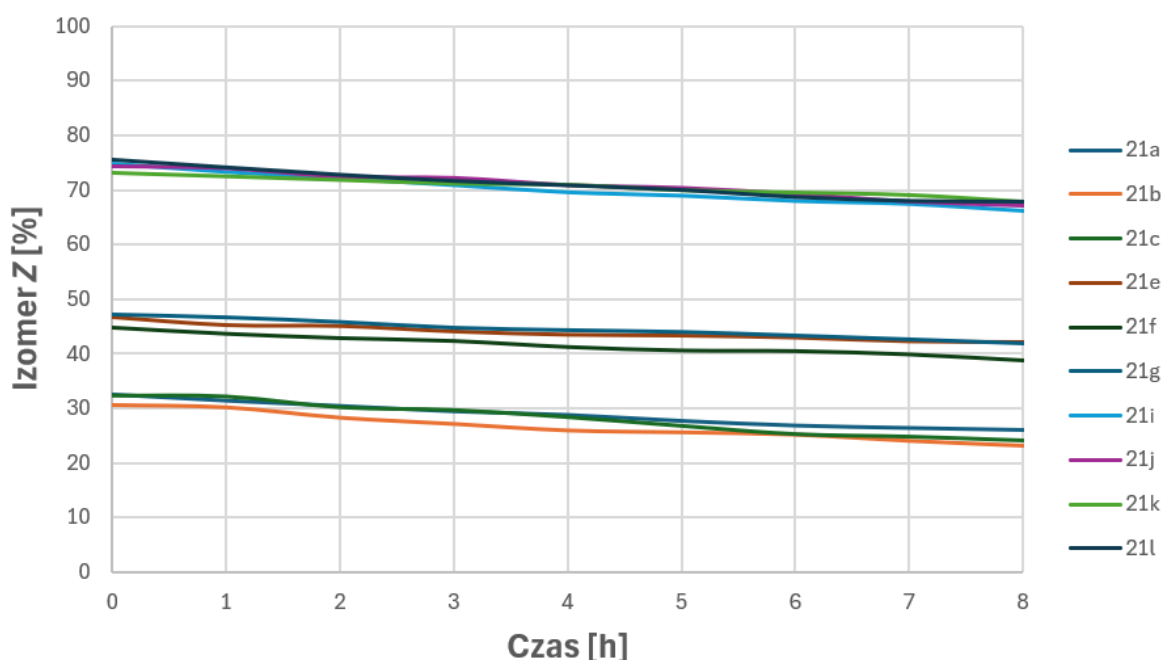
W celu zbadania szybkości reizomeryzacji z izomeru *Z* do *E* dla związków **21a–c**, **21e–g** oraz **21i–l** przeprowadzono pomiary zmian ich stężenia w funkcji czasu (tab. 10, rys. 37). Pomiary przeprowadzono po uprzednim doprowadzeniu powyższych związków do stanu fotostacjonarnego (PSS). W przypadku związków **21a–c**, **21e–g** wykonano to poprzez naświetlenie ich światłem o długości fali 505 nm, a w przypadku związków **21i–l** po naświetleniu ich światłem o długości fali 525 nm.

Tabela 10. Zmiana ilości izomeru *Z* związków 21a–c, 21e–g oraz 21i–l w funkcji czasu.

	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h	Δ [%]	Długość fali
21a	32,44%	31,33%	30,37%	29,40%	28,74%	27,66%	26,82%	26,38%	26,02%	6,42	505 nm
21b	32,38%	32,21%	30,20%	29,69%	28,37%	26,74%	25,21%	24,74%	24,03%	8,35	505 nm
21c	30,59%	30,16%	28,28%	27,14%	25,95%	25,61%	25,18%	24,05%	23,17%	7,42	505 nm
21e	46,84%	45,35%	45,18%	44,16%	43,55%	43,39%	43,01%	42,31%	42,17%	4,67	505 nm

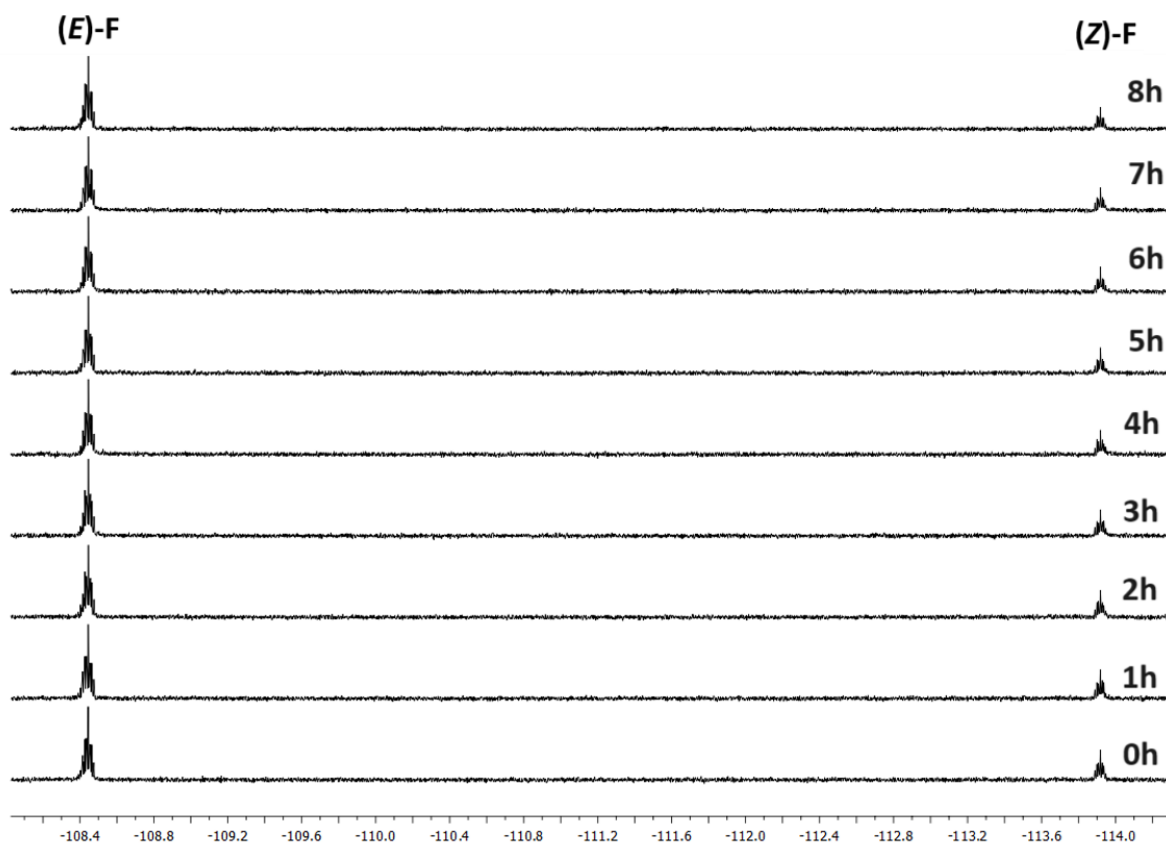
21f	47,13%	46,61%	45,77%	44,72%	44,28%	43,95%	43,30%	42,60%	41,87%	5,26	505 nm
21g	44,82%	43,69%	42,89%	42,36%	41,25%	40,61%	40,50%	39,88%	38,78%	6,04	505 nm
21i	74,84%	73,32%	72,17%	70,90%	69,59%	68,98%	68,00%	67,46%	66,19%	8,65	525 nm
21j	73,20%	72,55%	71,89%	71,23%	71,00%	70,01%	69,58%	69,12%	67,90%	5,30	525 nm
21k	74,39%	74,02%	72,48%	72,26%	70,95%	70,43%	69,33%	67,93%	67,18%	7,21	525 nm
21l	75,44%	74,04%	72,70%	71,56%	70,77%	69,92%	68,63%	67,93%	67,78%	7,66	525 nm

Kinetyka fotoizomeryzacji Z->E



Rysunek 37. Zmiana ilości izomeru Z związków 21a–c, 21e–g oraz 21i–l w funkcji czasu w formie wykresu.

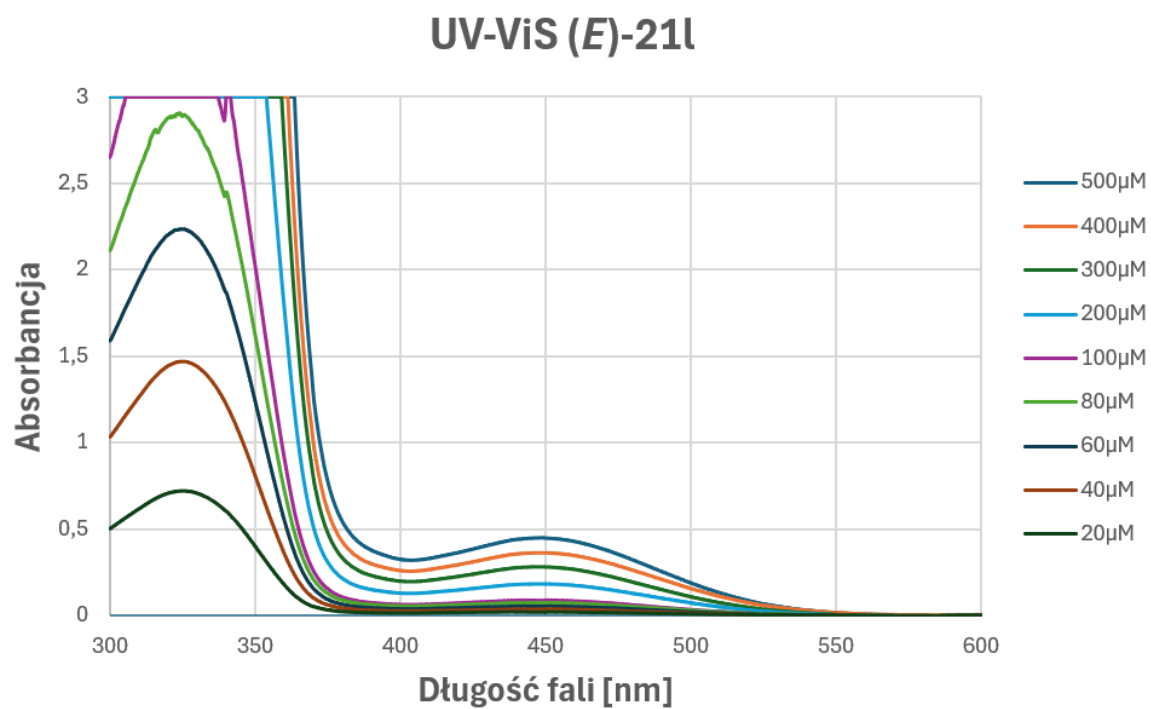
Procentowy udział izomeru Z w mieszaninie określano za pomocą analizy pól powierzchni pod sygnałami w widmach ^{19}F NMR, mierzonych co godzinę przez 8 godzin (rys. 38). Po 8 godzinach ilość izomeru Z w związkach **21a–c**, **21e–g** oraz **21i–l** obniżyła się o około 5–9%. Świadczy to o stabilności izomeru Z tych pochodnych w czasie. Nie stwierdzono istotnego wpływu liczby podstawników fluorowych na zmiany zawartości izomeru Z w funkcji czasu.



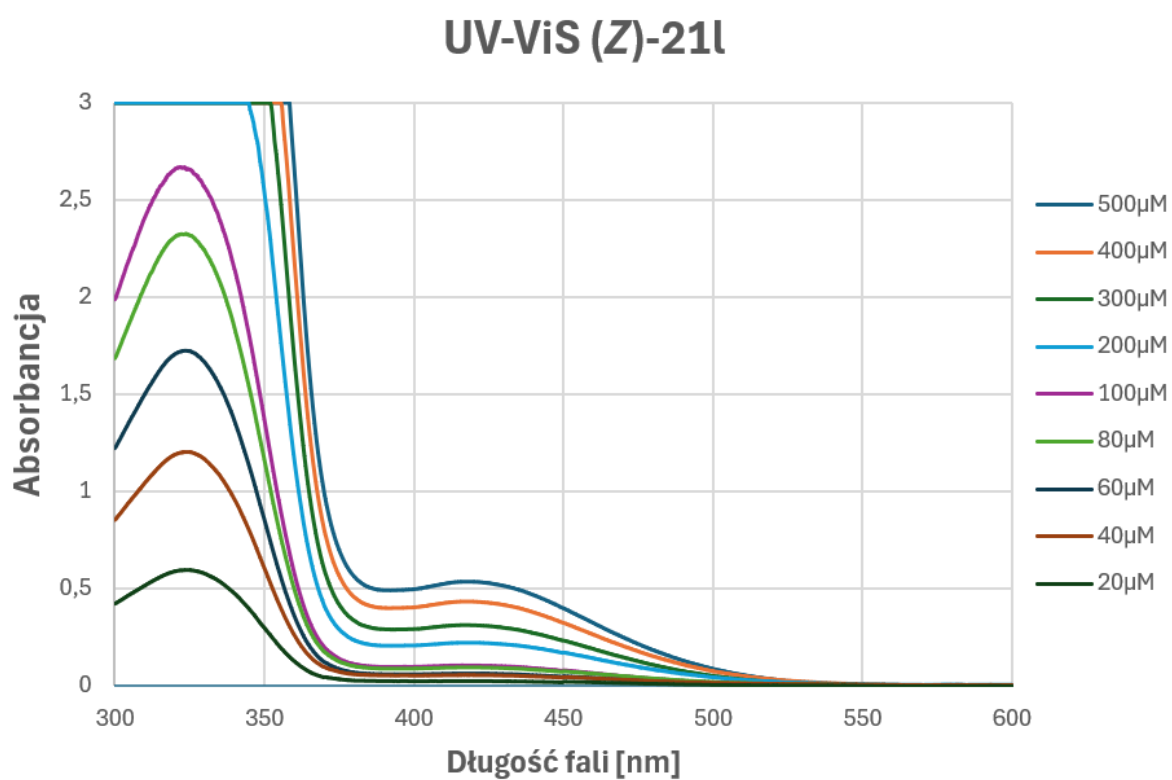
Rysunek 38. Zmiany w funkcji czasu zachodzące w widmie ^{19}F NMR na przykładzie sygnału fluoru w związku 21a.

d) Widma UV–Vis:

Podobnie jak w przypadku pochodnych azowych dibenzo[*b,f*]oksepiny, przeprowadzono analizę stopnia rozdzielania pasm przejść elektronowych typu $\pi \rightarrow \pi^*$ oraz $n \rightarrow \pi^*$ dla izomerów *E* i *Z* związków **21a–l**. Zarejestrowano widma UV–Vis wszystkich związków, a wybrany przykład przedstawiono na **rysunku 39** i **rysunku 40**. Stężenia stosowane w próbkach były na tyle niskie, że było możliwe rozpuszczenie również związków **21d** i **21h**, które nie są rozpuszczalne w DMSO w wysokich stężeniach.



Rysunek 39. Widmo UV–ViS izomeru *E* związku 21l.



Rysunek 40. Widmo UV–ViS izomeru *Z* związku 21l.

Zmierzone zostały również wartości maksimum absorpcji pasm $n \rightarrow \pi^*$ izomerów *E* i *Z* dla związków **21b**, **21d**, **21f**, **21h**, **21j** i **21l**, a także obliczone wartości ich współczynników ekstynkcji (tab. 11).

Tabela 11. Wybrane dane spektroskopowe UV–Vis dla związków **21b**, **21d**, **21f**, **21h**, **21j** oraz **21l**.

Związek	$\lambda_{\max n \rightarrow \pi^*}$ (<i>E</i>) [nm]	$\epsilon_{\max n \rightarrow \pi^*}$ (<i>E</i>) [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	$\lambda_{\max n \rightarrow \pi^*}$ (<i>Z</i>) [nm]	$\epsilon_{\max n \rightarrow \pi^*}$ (<i>Z</i>) [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	$\Delta\lambda_{\max n \rightarrow \pi^*}$ [nm]
21b	442,1	688	434,0	898	8,1
21d	440,8	660	434,1	850	6,7
21f	441,9	872	427,9	1150	14,0
21h	441,2	796	426,9	1016	14,3
21j	448,3	922	417,4	1130	30,9
21l	448,6	902	417,9	1074	30,7

Molowy współczynnik absorpcji ϵ obliczany był za pomocą prawa Lamberta-Beera:

$$\epsilon = \frac{A}{cl}$$

gdzie:

A — absorbancja;

c [dm³/mol] — stężenie roztworu;

l [cm] — długość ścieżki kuwety (badania były prowadzone na kuwetach o długości ścieżki 1 cm).

W przypadku związków **21a–l** obserwuje się wyraźne rozdzielenie pasm $\pi \rightarrow \pi^*$ oraz $n \rightarrow \pi^*$ zarówno dla izomeru *E*, jak i *Z*. Porównanie widm obu izomerów ujawnia korzystny efekt batochromowy, polegający na przesunięciu pasm absorpcyjnych w kierunku dłuższych fal. Co istotne, maksima absorpcji zarówno izomeru *E*, jak i *Z* mieszczą się w zakresie światła widzialnego, co czyni te związki szczególnie obiecującymi w kontekście zastosowań fotochemicznych. Dla związków **21j** i **21l** różnica ta przekraczała 30 nm. Ponadto, w przypadku

izomeru *Z* zaobserwowano wzrost intensywności pasma $n \rightarrow \pi^*$ w porównaniu z izomerem *E*, co wskazuje na zwiększone prawdopodobieństwo przejścia wynikające ze zmiany energii przejścia elektronowego. Dla pozostałych związków (**21a**, **21c**, **21e**, **21g**, **21i**, **21k**) również była obserwowalna separacja pasm przejść typu $n \rightarrow \pi^*$, niestety pasmo to było na tyle rozmyte, że niemożliwe było jednoznaczne określenie maksimum absorpcji pasma $n \rightarrow \pi^*$, a jedynie przybliżony zakres jego występowania.

3.3.3 Modelowanie molekularne azowych pochodnych chalkonu

Przeprowadzono również badania powinowactwa izomerów *E* i *Z* związków **21b**, **21d**, **21f**, **21h**, **21j** i **21l** z heterodimerem α,β -tubuliny (struktura o kodzie PDB: 1SA0) z wykorzystaniem modelowania molekularnego. Geometrie badanych związków optymalizowano przy użyciu teorii funkcjonału gęstości (DFT) z wykorzystaniem funkcjonału B3LYP oraz w bazie 6-31G*, z zastosowaniem metody PCM w celu modelowania efektów solwatacji przy użyciu programu Gaussian 03W [196]. Dokowanie molekularne przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania AutoDock Vina [197]. Szacunkowe wartości energii oddziaływania izomerów *E* i *Z* związków **21b**, **21d**, **21f**, **21h**, **21j** i **21l** zostały przedstawione w tabeli 12 (energia oddziaływania związku kontrolnego — kolchicyny — wynosi $-8,6$ kcal/mol) [198–199].

Tabela 12. Szacunkowa wartość energii oddziaływania izomerów *E* i *Z* związków **21b**, **21d**, **21f**, **21h**, **21j** i **21l**.

Związek	Powinowactwo izomeru <i>E</i> (kJ/mol)	Powinowactwo izomeru <i>Z</i> (kJ/mol)	Δ Powinowactwa (kJ/mol)
21b	$-8,9$	$-8,9$	0
21d	$-9,4$	$-9,8$	$-0,4$
21f	$-9,4$	$-9,0$	0,4
21h	$-9,4$	$-10,0$	$-0,6$
21j	$-9,2$	$-9,1$	0,1
21l	$-9,5$	-10	$-0,5$

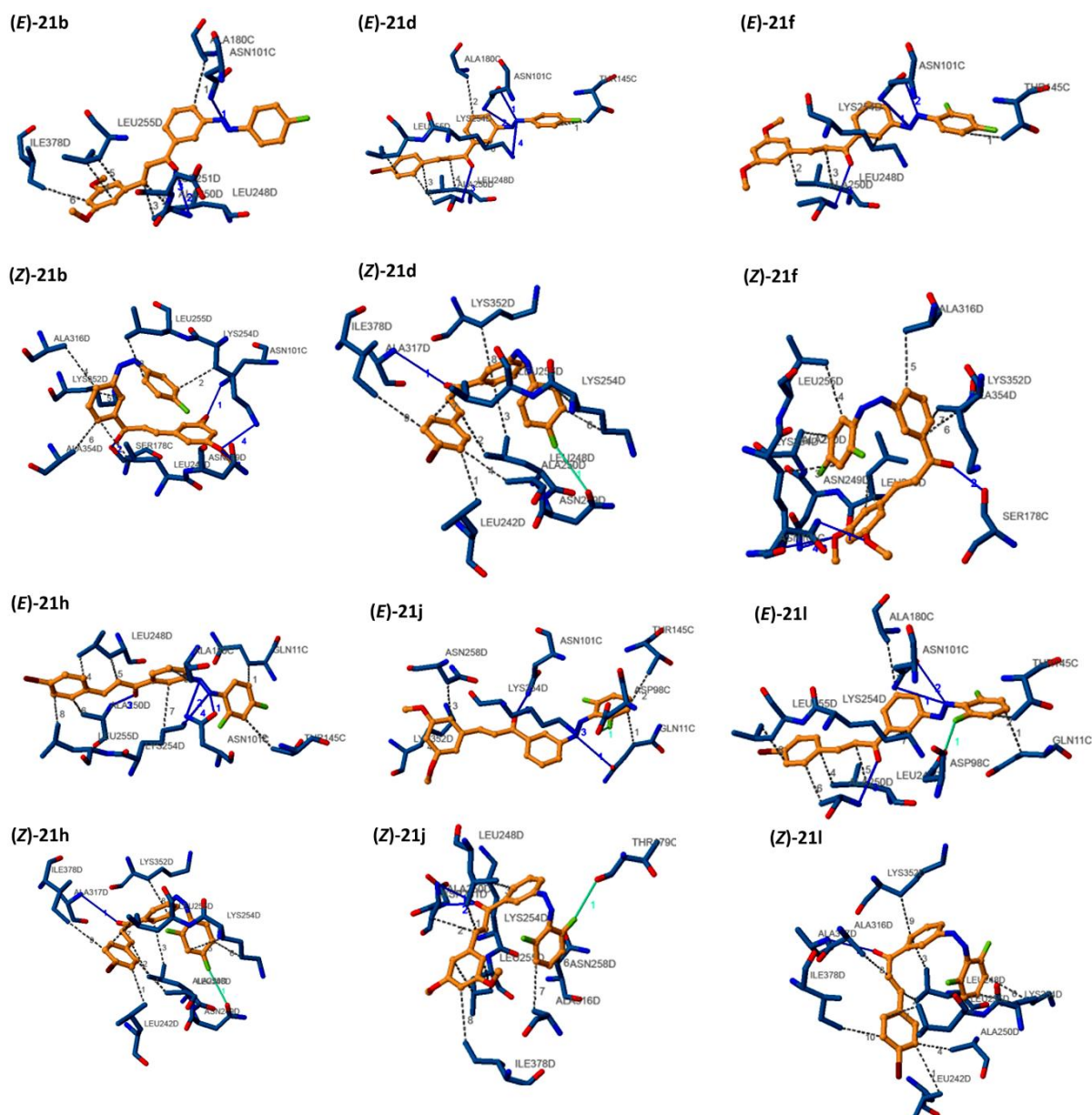
W przypadku związków **21f** oraz **21j** energia oddziaływania izomeru *Z* z heterodimerem α,β -tubuliny była wyższa niż energia oddziaływania izomeru *E*. Dla związków **21d**, **21h** oraz

21i energia oddziaływania izomeru *Z* była niższa niż energia oddziaływania izomeru *E*, natomiast dla związku **21b** była ona identyczna. Warto również zaznaczyć, że energia oddziaływania wszystkich związków z heterodimerem α,β -tubuliny była niższa niż energia oddziaływania związku kontrolnego — kolchicyny.

Na podstawie analizy energii oddziaływań dla izomerów *E* i *Z* związków **21b**, **21d**, **21f**, **21h**, **21j**, **21i** w α,β -tubulinie zidentyfikowano główne interakcje odpowiedzialne za powinowactwo ligandów do miejsca wiązania kolchicyny (**rys. 41**). Badane ligandy były stabilizowane głównie przez hydrofobowe oddziaływania Van der Waalsa z α,β -tubuliną, takie jak:

- Leu β 255, Leu β 248, Ile β 378 oraz Ala β 250 dla izomeru *E* związku **21b**;
- Ala β 316, Leu β 255, Leu β 248, Lys β 352, Lys β 254 oraz Ser178 dla izomeru *Z* związku **21b**;
- Lys β 254, Ala β 250, Leu β 255 oraz Leu β 248 dla izomeru *E* związku **21d**;
- Ile β 378, Lys β 352, Lys β 254, Leu β 255, Leu β 248, Leu β 242, Ala β 317 oraz Ala β 250 dla izomeru *Z* związku **21d**;
- Leu β 248, Lys β 254 oraz Ala β 250 dla izomeru *E* związku **21f**;
- Lys β 352, Ala β 316, Leu β 255, Leu β 248, Lys β 254, Ala β 250 oraz Ser178 dla izomeru *Z* związku **21f**;
- Leu β 255, Leu β 248, Lys β 254 oraz Ala β 250 dla izomeru *E* związku **21h**;
- Ile β 378, Lys β 352, Lys β 254, Ala β 317, Leu β 255, Leu β 248, Leu β 242 oraz Ala β 250 dla izomeru *Z* związku **21h**;
- Lys β 352 oraz Lys β 254 dla izomeru *E* związku **21j**;
- Ile β 378, Ala β 316, Leu β 255, Leu β 248, Lys β 254, Ala β 250 oraz Asn258 dla izomeru *Z* związku **21j**;
- Lys β 254, Leu β 255, Leu β 248 oraz Ala β 250 dla izomeru *E* związku **21i**;
- Ile β 378, Ala β 317, Ala β 316, Lys β 352, Leu β 255, Leu β 248, Leu β 242, Lys β 254 oraz Ala β 250 dla izomeru *Z* związku **21i**.

Na **rysunku 41** dla izomerów *E* i *Z* związków **21b**, **21d**, **21f**, **21h**, **21j**, **21i** przedstawiono wizualizację oddziaływań ligandu z domeną kolchicynową w α,β -tubulinie.



Rysunek 41. Model interakcji izomerów *E* i *Z* związków 21b, 21d, 21f, 21h, 21j, 21l z domeną kolchicynową α,β -tubuliny.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że badane ligandy charakteryzują się wysokim powinowactwem do kompleksu α,β -tubuliny, porównywalnym z obserwowanym dla kolchicyny. Dodatkowo, potwierdzają hipotezę, iż związki te oddziałują z miejscem wiązania kolchicyny, zlokalizowanym na granicy podjednostek α - i β -tubuliny.

3.3.4 Badania biologiczne azowych pochodnych chalkonu

Fototoksyczność jest zjawiskiem zależnym od wielu jednocześnie działających czynników. Odpowiednia optymalizacja parametrów optycznych pozwala znacząco ograniczyć

uszkodzenia komórek. Kluczowym elementem jest energia fotonów wykorzystywana podczas napromieniania, która w istotny sposób wpływa na poziom fototoksyczności. Dlatego tak ważne jest precyzyjne dobranie nie tylko długości fali, ale również intensywności światła. Przykładowo, podczas gdy naświetlanie komórek światłem o długości fali 488 nm z intensywnością $0,2 \text{ kW/cm}^2$ przez 240 sekund powoduje ich całkowitą śmierć, to przy przesunięciu długości fali do 514 nm — mimo że komórki otrzymują tę samą dawkę światła ($\sim 48 \text{ kJ/cm}^2$) — przeżywa 100% z nich. Już niewielka zmiana długości fali, wynosząca zaledwie 26 nm, ukazuje wyraźną wrażliwość komórek na promieniowanie w zależności od jej długości fali. Zwiększenie intensywności światła do 2 kW/cm^2 przy długości fali 514 nm ($\sim 480 \text{ kJ/cm}^2$) skutkowało śmiercią wszystkich komórek, natomiast przy tej samej intensywności i dawce przeżywało odpowiednio 85% i 100% komórek naświetlanych światłem o długościach fal 558 nm i 640 nm [201]. Dlatego też w badaniach fotochemicznych i biologicznych otrzymanych związków użyto diod LED o niskiej intensywności światła, które zapewniały bezpieczniejsze warunki w badaniach biologicznych (parametry techniczne diod LED umieszczono w części eksperymentalnej).

3.3.4.1 Analiza proliferacji komórkowej

Po przeprowadzeniu analizy spektroskopowej zsyntetyzowanych związków zdecydowano się sprawdzić wpływ wybranego związku **21j** na określoną linię nowotworową. Komórki linii ludzkiego raka prostaty PC-3 wykazują cechy charakterystyczne dla zaawansowanych stadiów choroby, co czyni je szczególnie cennym modelem do oceny strategii terapeutycznych ukierunkowanych na tę agresywną postać nowotworu. Wybrany związek, w badanym zakresie stężeń do $40 \mu\text{M}$, wykazywał wyraźnie zauważalny negatywny wpływ na proliferację komórek PC-3 (**rys. 42**). Efekt ten był bardziej nasilony po dodatkowym 24-godzinym traktowaniu komórek. Zastosowany czteroparametrowy model logistyczny (4PL) okazał się odpowiedni dla uzyskanych danych (**rys. 42A**), z ogólną tendencją wskazującą na konieczność zwiększania stężenia związku w celu uzyskania wyższej wartości stężenia hamującego (IC) (**rys. 42B**).

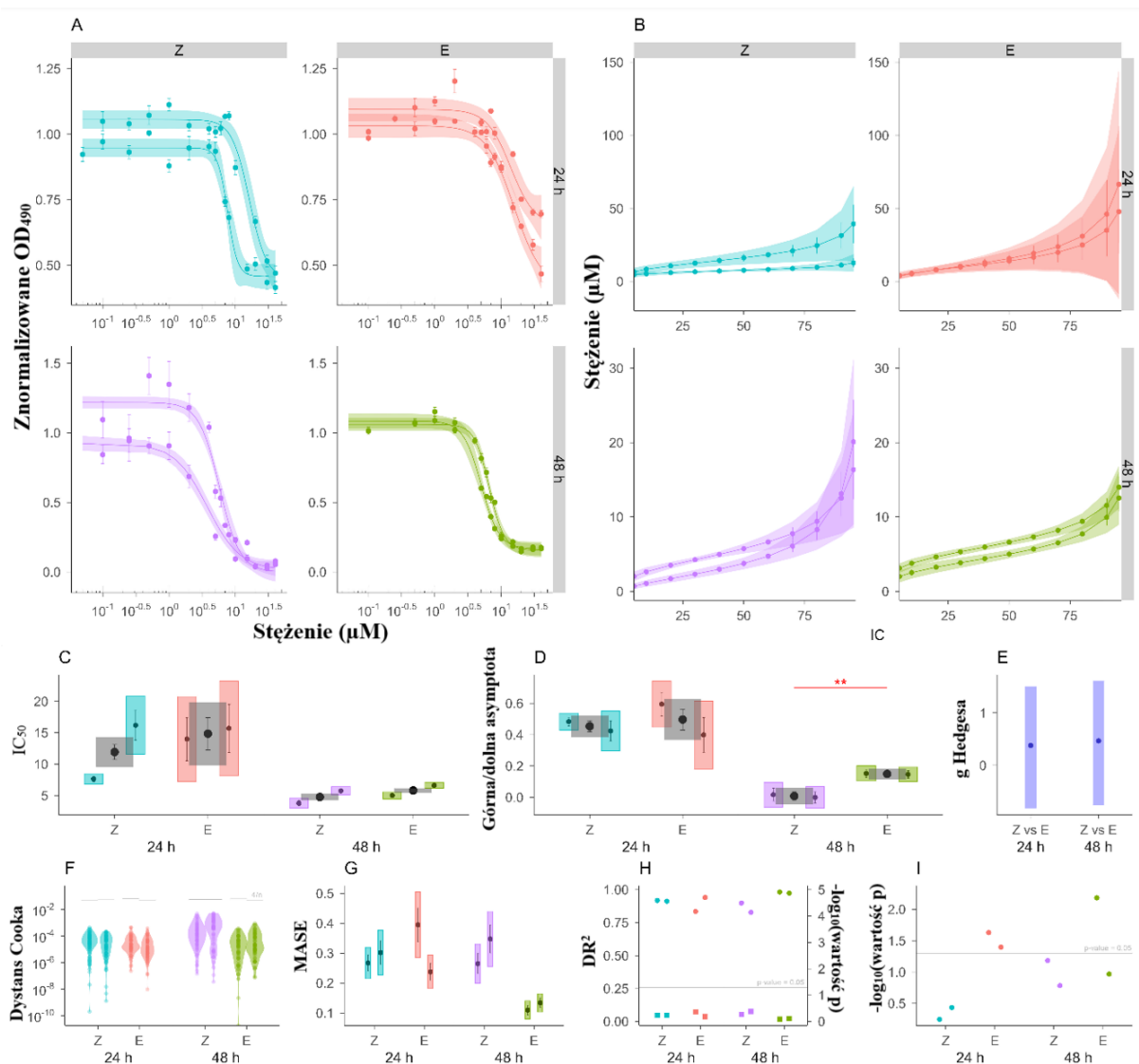
Wartości IC_{50} dla izomeru *Z* zostały oszacowane na $11,91 \mu\text{M}$ (95% CI: 9,59–14,25) po 24 godzinach oraz $4,75 \mu\text{M}$ (95% CI: 4,24–5,26) po 48 godzinach traktowania. Izomer *E* był nieco mniej aktywny w porównaniu do izomeru *Z*, z wartościami IC_{50} wynoszącymi $14,83 \mu\text{M}$ (95% CI: 9,79–19,88) po 24 godzinach oraz $5,81 \mu\text{M}$ (95% CI: 5,45–6,16) po 48 godzinach inkubacji, choć bez statystycznie istotnej różnicy (**rys. 42C**).

Hamowanie proliferacji, wyrażone jako stosunek dolnej do górnej asymptoty, oceniony na podstawie dopasowanego modelu (czyli maksymalna proliferacja komórek w warunkach eksperymentalnych), wykazywało podobną tendencję jak wartości IC_{50} (**rys. 42D**). Mniej skuteczny był izomer *Z*, z wartościami znormalizowanej asymptoty wynoszącymi 45,3% (95% CI: 38,4–52,3) po 24 godzinach oraz 0,9% (95% CI: –4,4–6,1) po 48 godzinach. Z kolei izomer *E* wykazywał mniej wyraźną aktywność hamującą (wyrażoną w postaci znormalizowanego limitu) z wartościami wynoszącymi 49,6% (95% CI: 36,5–62,7) po 24 godzinach oraz 15,0% (95% CI: 11,6–18,3) po 48 godzinach inkubacji (**rys. 42D**). Dla obu izomerów po 48 godzinach różnica była statystycznie istotna ($p < 0,05$). Wielkość efektu wynikającego ze zmiany konfiguracji z *Z* na *E*, oceniona przy użyciu wskaźnika g Hedgesa, była na umiarkowanym poziomie i wyniosła 0,38 po 24 godzinach oraz 0,47 po 48 godzinach inkubacji (**rys. 42E**).

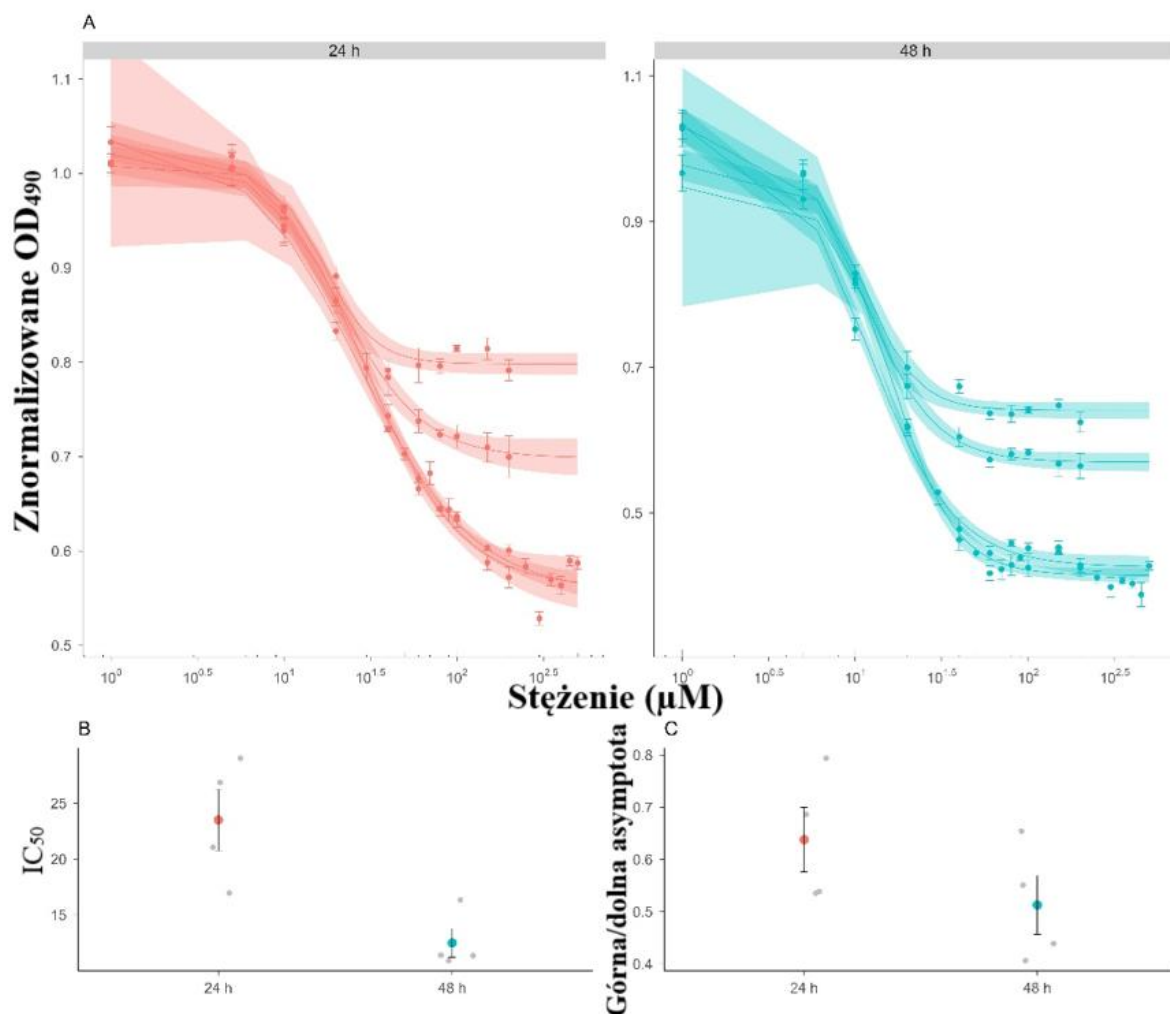
Wybrane metryki oceny dopasowania modelu 4PL wskazują na dobrą jakość dopasowania dla każdego biologicznego powtórzenia (**rys. 42F–I**):

- Wartości odległości Cooka nie przekraczają granicznej wartości $4/n$;
- Wartości MASE są poniżej 1;
- Wartości DR^2 (wskaźnik dopasowania do modelu idealnego) wynoszą wszystkie powyżej 0,83 i są statystycznie istotne ($p > 0,05$);
- Test dopasowania Neilla potwierdził dobrą jakość dopasowania dla niemal wszystkich powtórzeń biologicznych.

Dla porównania oceniono aktywność kolchicyny wobec komórek PC-3 w podobnych warunkach jako kontrolę pozytywną. Kolchicina charakteryzowała się wartościami IC_{50} wynoszącymi 23,51 μM (95% CI: 16,86–30,16) po 24 godzinach i 12,50 μM (95% CI: 9,55–15,45) po 48 godzinach traktowania (**rys. 43**). Wyniki te są zgodne z wartością IC_{50} równą 57,56 μM po 24 godzinach, uzyskaną przez Ergul i Bakar-Ates [202], co potwierdza wiarygodność zastosowanego układu eksperymentalnego. Ponadto, wartości znormalizowanej asymptoty zostały obliczone na 63,79% (95% CI: 59,70–67,88) oraz 51,28% (95% CI: 47,11–55,45) po odpowiednio 24 i 48 h traktowania komórek PC-3 kolchicyną.



Rysunek 42. Proliferacja komórek PC-3 w obecności związku 21j została oceniona za pomocą testu MTS, a znormalizowane wartości OD₄₉₀ dopasowano do modelu czteroparametrowego logistycznego (4PL). Znormalizowane wartości OD₄₉₀ oraz dopasowane modele przedstawiono oddzielnie dla każdego izomeru związku 21j — Z i E oraz dla dwóch czasów inkubacji: 24 i 48 godzin (A), wraz z wartościami stężeń hamujących w zakresie od 5 do 90% (B). Wartości IC₅₀ oraz znormalizowane wartości dolnej asymptoty zostały przedstawione wraz z odpowiadającymi im średnimi (C i D). Wskaźnik g Hedgessa został obliczony dla różnicy wartości IC₅₀ pomiędzy izomerami Z i E (E). Wybrane metryki jakości dopasowania modelu zostały przedstawione w rysunkach F–I. Paski błędów na każdym wykresie przedstawiają błędy standardowe, natomiast pola i wstęgi odpowiadają 95% przedziałom ufności. Istotność wartości p oznaczono w następujący sposób: 0–0,001 (***), 0,001–0,01 (**), 0,01–0,05 (*), 0,05–0,1 (.), >0,1 (NS, brak istotności).

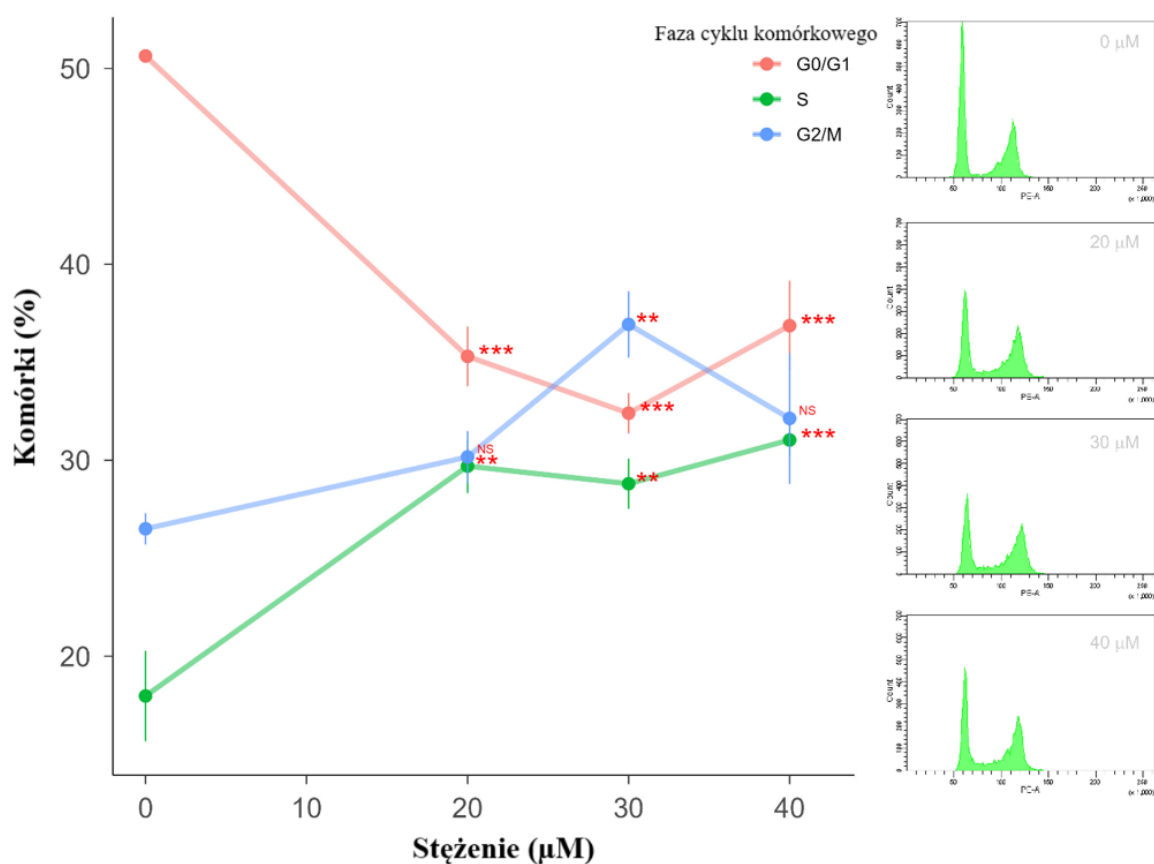


Rysunek 43. Proliferacja komórek PC-3 w obecności kolchicyny została oceniona za pomocą testu MTS, a znormalizowane wartości OD₄₉₀ dopasowano do modelu czteroparametrowego logistycznego (4PL). Znormalizowane wartości OD₄₉₀ oraz dopasowane modele zostały pokazane osobno dla każdego czasu, 24 i 48 h (A). Wartości IC₅₀ oraz znormalizowane wartości dolnej asymptoty zostały przedstawione razem z odpowiadającymi im średnimi, a indywidualne wartości jako szare kropki (B i C). Słupki błędów oraz wstęgi w każdym panelu przedstawiają 95% przedziały ufności.

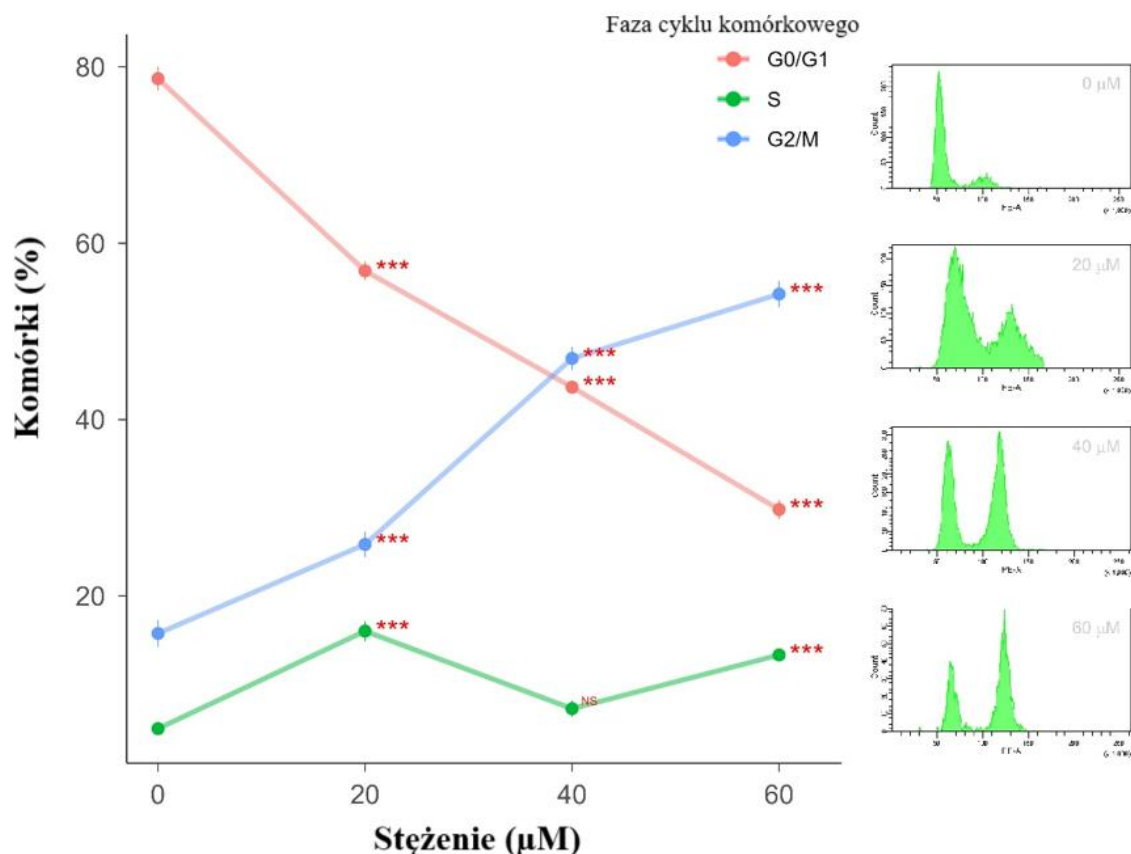
3.3.4.2 Analiza cyklu komórkowego

Wpływ izomeru Z związku **21j** na przebieg cyklu komórkowego komórek PC-3 oceniano dla stężeń 20, 30 i 40 μM (rys. 44). Wyniki wykazały, że związek **21j** znacząco zwiększał akumulację komórek w fazach S i G2/M, a jednocześnie istotnie zmniejszał populację komórek znajdujących się w fazie G0/G1. Odsetek komórek PC-3 w fazie G2/M wynosił 30,2% (20 μM), 37,0% (30 μM) oraz 32,1% (40 μM) w porównaniu do komórek kontrolnych, gdzie wartość ta wynosiła 26,5%. Ilość komórek PC-3 w fazie S również był wyższy i wynosił odpowiednio 29,7% (20 μM), 28,8% (30 μM) i 31% (40 μM). Niemal wszystkie zmiany były statystycznie istotne przy $p < 0,01$ (dwuczynnikowa ANOVA z testem post hoc Tukeya). Wyniki te

wskazują, że izomer *Z* związku **21j** jest zdolny do zatrzymania komórek PC-3 w fazie G2/M, przy jednoczesnej znaczącej akumulacji komórek w fazie S. Podobnie działała kolchicyna, która również powodowała zatrzymanie komórek PC-3 w fazie G2/M [202]. Odsetek komórek w fazie G2/M wzrósł z 15,73% (20 μ M) do 54,23% (60 μ M). W konsekwencji odsetek komórek w fazie G0/G1 odpowiednio się zmniejszył (rys. 45). Niemal wszystkie zmiany, w porównaniu do komórek traktowanych nośnikiem (DMSO), były statystycznie istotne przy $p < 0,001$ (dwuczynnikowa ANOVA z testem post hoc Tukeya). Uzyskane wyniki są zgodne z powszechnie akceptowanym mechanizmem działania kolchicyny polegającym na zatrzymywaniu cyklu komórkowego w fazie G2/M [202].



Rysunek 44. Wpływ izomeru *Z* związku **21j** został oceniony za pomocą cytometrii przepływowej. Liczba komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego — G0/G1, S i G2/M — została zmierzona tak jak przedstawiono na przykładowych histogramach. Wartości dla każdego stężenia były porównywane do stężenia 0 μ M (komórki traktowane 0,5% DMSO) za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem post-hoc Tukeya. Istotność wartości p oznaczono w następujący sposób: 0–0,001 (***), 0,001–0,01 (**), 0,01–0,05 (*), 0,05–0,1 (.), >0,1 (NS, brak istotności).



Rysunek 45. Wpływ kolchicyny został oceniony za pomocą cytometrii przepływowej. Liczba komórek w każdej fazie cyklu komórkowego — G0/G1, S oraz G2/M — została zmierzona, tak jak przedstawiono na przykładowych histogramach. Wartości dla każdego stężenia były porównywane do stężenia 0 μM (komórki traktowane 0,5% DMSO) za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem post hoc Tukeya. Istotność wartości p została oznaczona w następujący sposób: 0–0,001 (***), 0,001–0,01 (**), 0,01–0,05 (*), 0,05–0,1 (.), >0,1 (NS, brak istotności).

3.3.5 Dyskusja

Rozdział ten poświęcony został projektowaniu, syntezie oraz badaniom strukturalnym, fizykochemicznym i biologicznym związków azowych opartych na szkielecie chalkonu. Z sukcesem otrzymano serię nowych pochodnych i przeprowadzono analizę ich właściwości fotochemicznych. Po raz pierwszy w literaturze opisano syntezę związków azowych opartych na strukturze chalkonu (**21a–l**). Wykazano, że związki te można aktywować światłem zielonym o długości fali w zakresie 505–525 nm, które jest bezpieczne dla organizmu żywego. Ponadto stwierdzono, że obecność atomów fluoru powoduje przesunięcie maksimum pasm absorpcyjnych ku falom o większej długości. Na efekt ten wpływają zarówno liczba, jak i rozmieszczenie atomów fluoru, przy czym najsilniejsze przesunięcie obserwuje się dla podstawienia 2,6-difluoro. Na podstawie badań spektroskopowych potwierdzono, że we

wszystkich otrzymanych związkach (izomerach *E* i *Z*) dochodzi do wyraźnej separacji pasm $\pi \rightarrow \pi^*$ oraz $n \rightarrow \pi^*$. Podstawienie atomów fluoru prowadzi do przesunięcia pasma $n \rightarrow \pi^*$ ku dłuższym długościom fal, co skutkuje możliwością aktywacji związków światłem o zwiększonej długości fali.

Zależność ta wynika z faktu, że im mniejsza jest różnica energetyczna pomiędzy orbitalem HOMO(*n*) a orbitalem LUMO(π^*) tym niższa energia wymagana do przejścia elektronowego, co przekłada się na absorpcję promieniowania o dłuższej długości fali. W przypadku pochodnych fluorowych efekt ten wiąże się z obecnością atomów fluoru w pozycjach *orto*, które obniżają gęstość elektronową w pobliskim wiązaniu N=N, skutkując obniżeniem energii orbitalu *n*, co powoduje mniejsze energie wzbudzeń $n \rightarrow \pi^*$ i przesunięcie maksimum absorpcji ku większym długościom fal [91]. Ze względu na niewielki promień atomu fluoru, geometria planarnego izomeru *E*-azobenzenu pozostaje praktycznie niezmieniona (obliczenia zawarte w części eksperymentalnej). W izomerze *Z* delokalizacja elektronów π jest osłabiona wskutek dużych kątów dwuściennych wokół wiązań pojedynczych N-C. W efekcie poziom energetyczny orbitalu π^* w izomerze *Z* (LUMO dla izomeru *Z* związku **21j** wynosi -2,433 eV) jest znacznie wyższy niż w płaskim izomerze *E* (LUMO dla izomeru *E* związku **21j** wynosi -2,552 eV). Poziom orbitalu *n* w izomerze *Z* jest niemal taki sam jak w izomerze *E* (HOMO dla izomeru *Z* związku **21j** wynosi -6,054 eV, a dla izomeru *E* -6,051 eV), co prowadzi do różnic w energiach wzbudzenia $n \rightarrow \pi^*$ dla obu izomerów (różnica energetyczna HOMO-LUMO dla izomeru *E* związku **21j** wynosi 3,499 eV, a dla izomeru *Z* 3,621 eV). W rezultacie wprowadzenie atomów fluoru do układu azobenzenowego spowodowało zaburzenie jego struktury, co przełożyło się na zróżnicowanie energetyczne oraz przesunięcie położenia pasm $n \rightarrow \pi^*$ pomiędzy izomerami *E* i *Z*.

Udział izomeru *Z* w mieszaninie w stanie fotostacjonarnym (PSS) wykazywał zależność od liczby atomów fluoru obecnych w danym związku. Warto zauważyć, że największą ilość izomeru *Z* obserwowano w związkach podstawionych atomami fluoru w pozycjach 2,6, następnie w pozycjach 2,4, a najmniejszą wykazywały związki zawierające pojedynczy atom fluoru. Na podstawie analiz kinetyki fotoizomeryzacji stwierdzono, że izomery *Z* wszystkich otrzymanych związków charakteryzują się wysoką stabilnością w czasie. Stopień ich reizomeryzacji nie przekraczał 9% niezależnie od ilości atomów fluoru i pozycji podstawienia. Co istotne badania stabilności chemicznej związku **21j** nie ujawniły istotnych efektów „fotowysbielenia” ani degradacji, co potwierdza wysoką powtarzalność oraz trwałość fotochemicznej konwersji tego związku.

Na podstawie uzyskanych wyników można również stwierdzić, że badane ligandy charakteryzują się wysokim powinowactwem do kompleksu α,β -tubuliny, porównywalnym z obserwowanym dla kolchicyny. Dodatkowo potwierdzają hipotezę, iż związki te oddziałują z miejscem wiązania kolchicyny, zlokalizowanym na granicy podjednostek α i β tubuliny. Badania biologiczne przeprowadzone na związku **21j** wskazały również, że izomer *Z* tego związku jest zdolny do zatrzymania komórek PC-3 w fazie G2/M, przy jednoczesnej znaczącej akumulacji komórek w fazie S. Zadawalające wyniki uzyskane dla pochodnych chalkonu stanowiły podstawę do rozszerzenia badań na nową klasę związków o potencjale biomedycznym, oddziałujących z domeną kolchicynową — azowe pochodne kolchicyny.

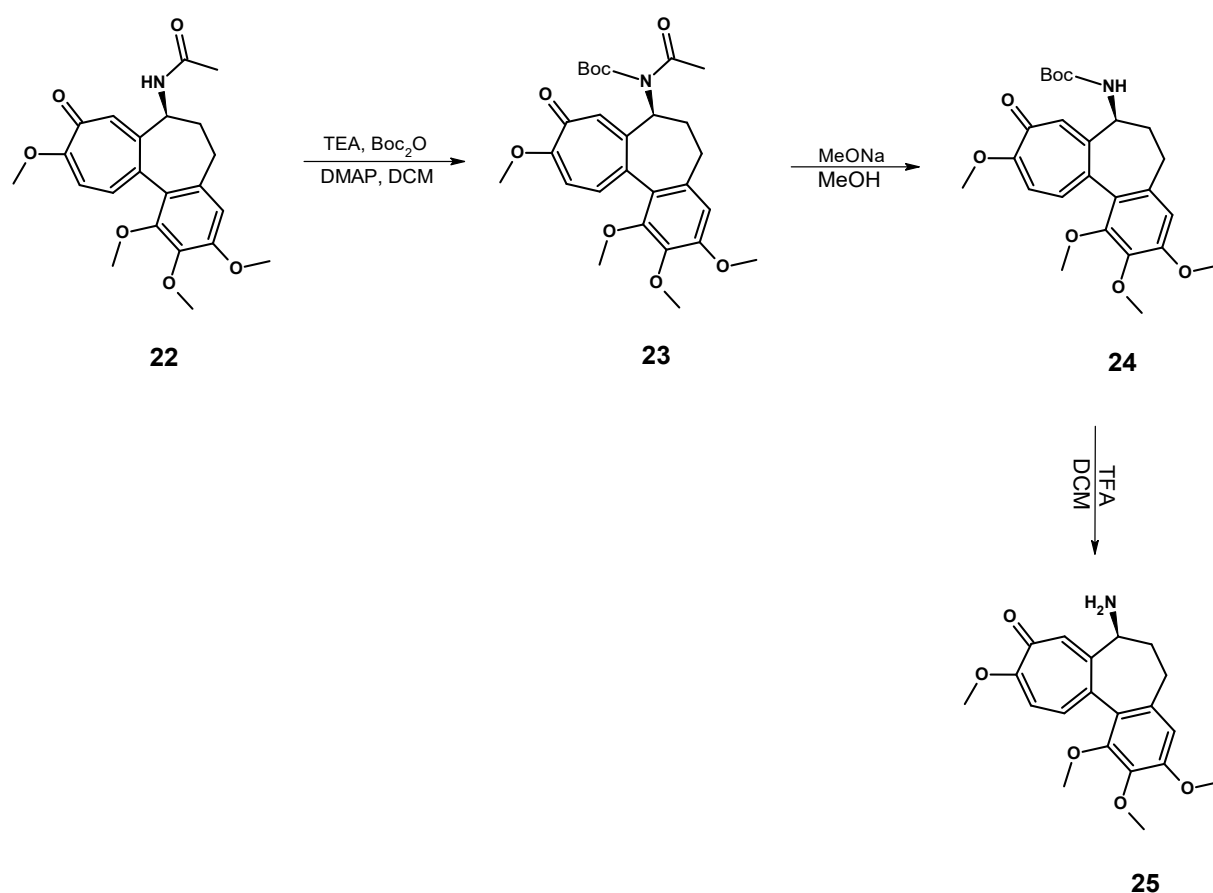
3.4 Synteza oraz badanie właściwości fotochemicznych i biologicznych azowych pochodnych kolchicyny

Kolchicyna to naturalny alkaloid, który od wieków wykorzystywany był w leczeniu różnych chorób, takich jak dna moczanowa czy też rodzinna gorączka śródziemnomorska [151]. Związek ten wykazuje szerokie spektrum aktywności biologicznej, co czyni go przedmiotem intensywnych badań farmakologicznych i klinicznych [152–153]. W celu realizacji założeń niniejszej pracy przeprowadzono syntezę pochodnych kolchicyny, zawierających w swojej strukturze pierścień aromatyczny z izomeryzowalnym układem azobenzenowym.

3.4.1 Synteza azowych pochodnych kolchicyny

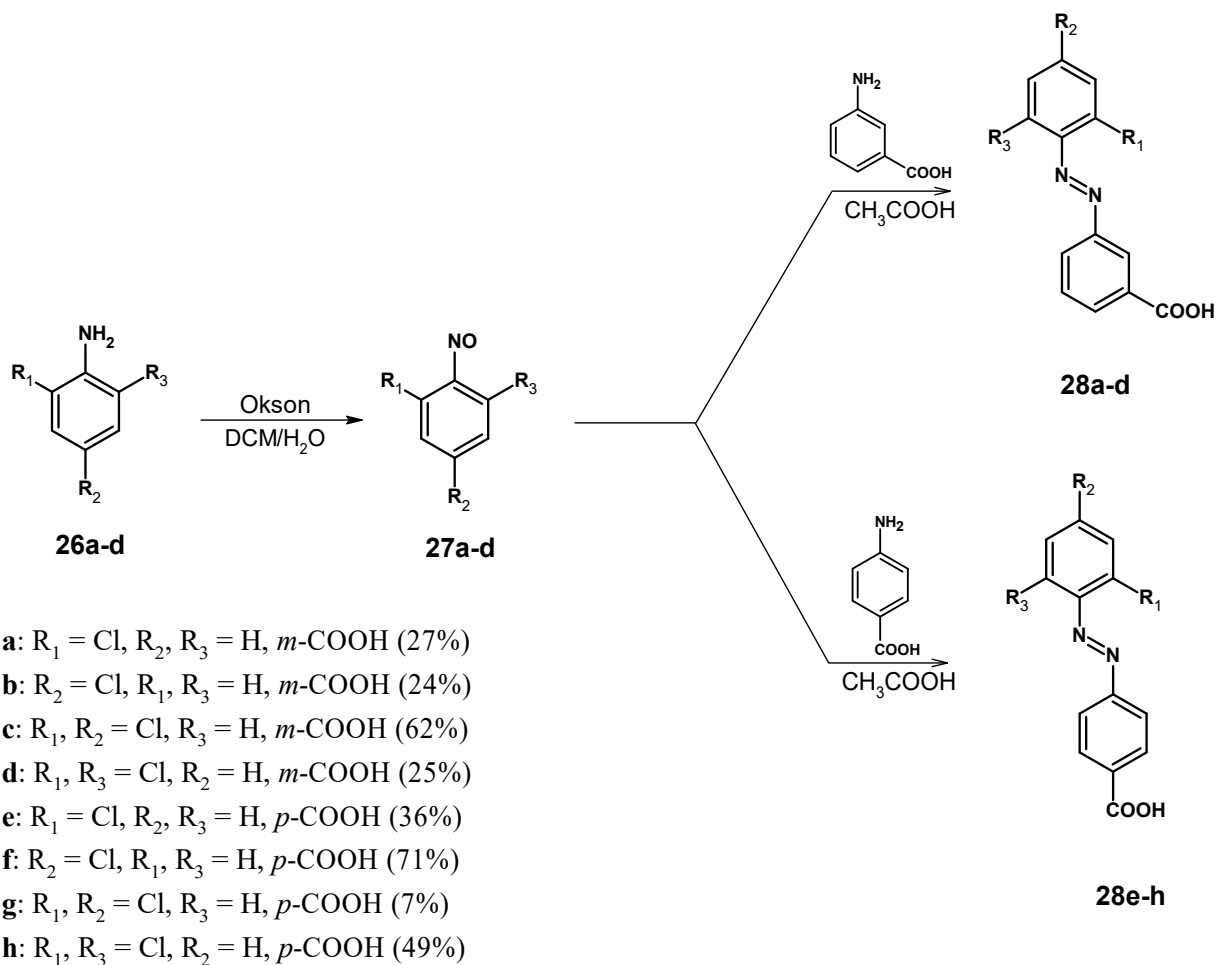
Przy projektowaniu azowych pochodnych kolchicyny zdecydowano się na zastosowanie związków zawierających atomy chloru w swojej strukturze. W przypadku azobenzenu podstawienie czterech chlorów w pozycjach 2,2',6,6' prowadzi do batochromowego przesunięcia pasma typu $n \rightarrow \pi^*$ w porównaniu do macierzystego azobenzenu [203]. Zjawisko to związane jest z efektem indukcyjnym atomów chloru, który stabilizuje orbital π^* izomeru *E*, obniżając tym samym energię wymaganą do przejścia $n \rightarrow \pi^*$, podobnie jak obserwowany efekt podstawników fluorowych. Można to również przypisać oddziaływaniom odpychającym między atomami chloru a wolnymi parami elektronowymi atomów azotu, co prowadzi do znacznej destabilizacji orbitalu *n*. W rezultacie zmniejsza się różnica energii pomiędzy orbitalami *n* i π^* , powodując przesunięcie batochromowe pasma $n \rightarrow \pi^*$. W porównaniu do fluoru, chlor wywołuje znacznie silniejszy efekt batochromowy pasma $n \rightarrow \pi^*$ dla izomeru *Z* względem macierzystego azobenzenu [203]. Podobnego efektu oczekiwano również w przypadku wprowadzenia atomów chloru do azowych pochodnych kolchicyny.

W celu otrzymania związków **29a–d** i **29e–h** zrealizowano wieloetapową ścieżkę syntezy (**schem. 31**, **schem. 32**, **schem. 33**). W pierwszej części przeprowadzono trójetapową syntezę *N*-deacetylokolchicyny **25** z kolchicyny **22**. Bezpośrednia hydroliza wiązania amidowego prowadzi do racemizacji produktu, dlatego też niezbędne jest uprzednie zabezpieczenie związku grupą *tert*-butoksykarbonylową (Boc) **23**. Umożliwia to następnie przeprowadzenie procesu hydrolizy zasadowej, bez racemizacji produktu **24**. Ostatni etap syntezy *N*-deacetylokolchicyny **25** polega na odbezpieczeniu atomu azotu za pomocą kwasu trifluorooctowego (**schem. 31**).



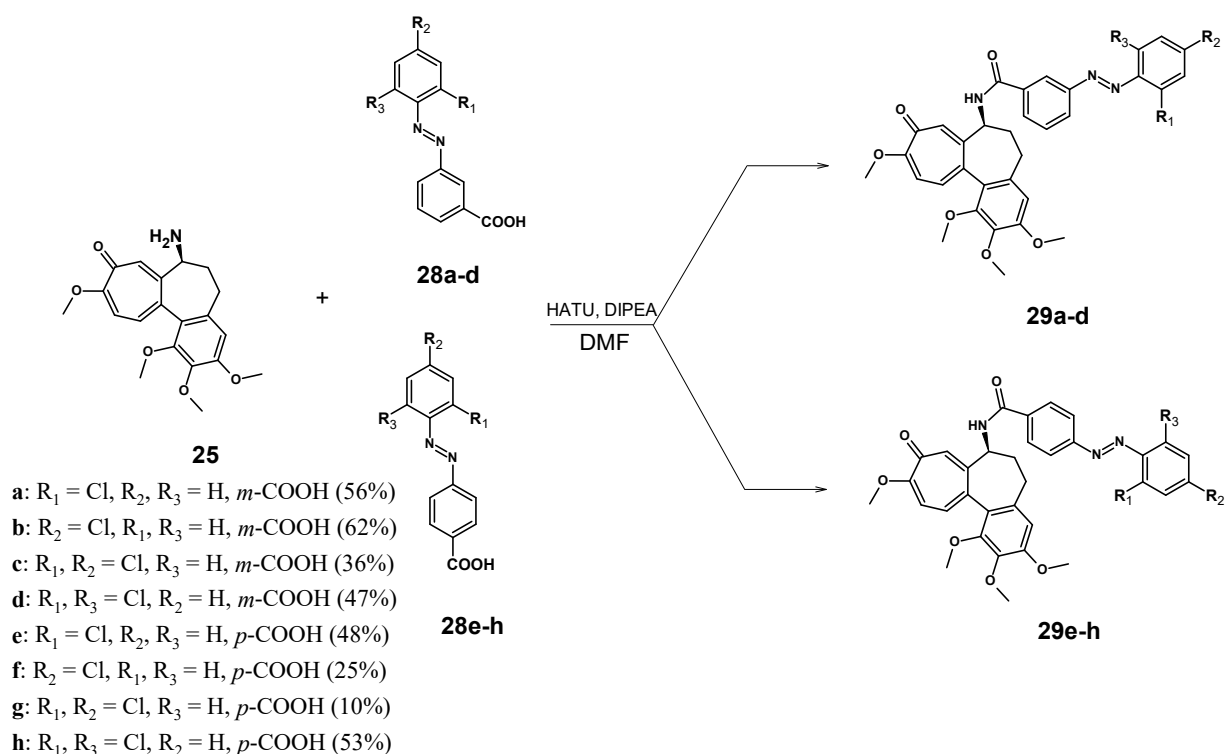
Schemat 31. Schemat syntezy *N*-deacetylokolchicyny.

W drugiej części wykonano dwuetapową syntezę pochodnych azobenzenu **28a–d** i **28e–h** z odpowiedniej chloroaniliny **26a–d**. Pierwszy etap reakcji polegał na niecałkowitym utlenieniu określonej chloroaniliny **26a–d** do pochodnych nitrozo **27a–d** za pomocą oksonu. Drugi etap polegał na reakcji sprzęgania otrzymanych wcześniej pochodnych nitrozo **27a–d** z kwasem *meta* lub *para* aminobenzoowym, prowadząc do otrzymania pochodnych azobenzenu **28a–d** i **28e–h** zawierających atomy chloru w pozycjach 2, 4 i/lub 6 oraz grupę karboksylową w pozycji *meta* lub *para* (**schem. 32**).



Schemat 32. Schemat syntezy pochodnych azobenzenu zawierających atomy chloru i grupę karboksylową.

Ostatni etap syntezy zrealizowano poprzez reakcję amidacji uprzednio otrzymanych azobenzenów **28a–d** oraz **28e–h** z *N*-deacetylokolchicyną **25**, prowadząc do utworzenia wiązania amidowego w końcowych związkach **29a–d** i **29e–h**. W wyniku przeprowadzonej syntezy uzyskano osiem zróżnicowanych strukturalnie pochodnych kolchicyny, zawierających atomy chloru (**schem. 33**).



Schemat 33. Schemat syntezy *azo*-pochodnych kolchicyny.

3.4.2 Analiza fotochemiczna azowych pochodnych kolchicyny

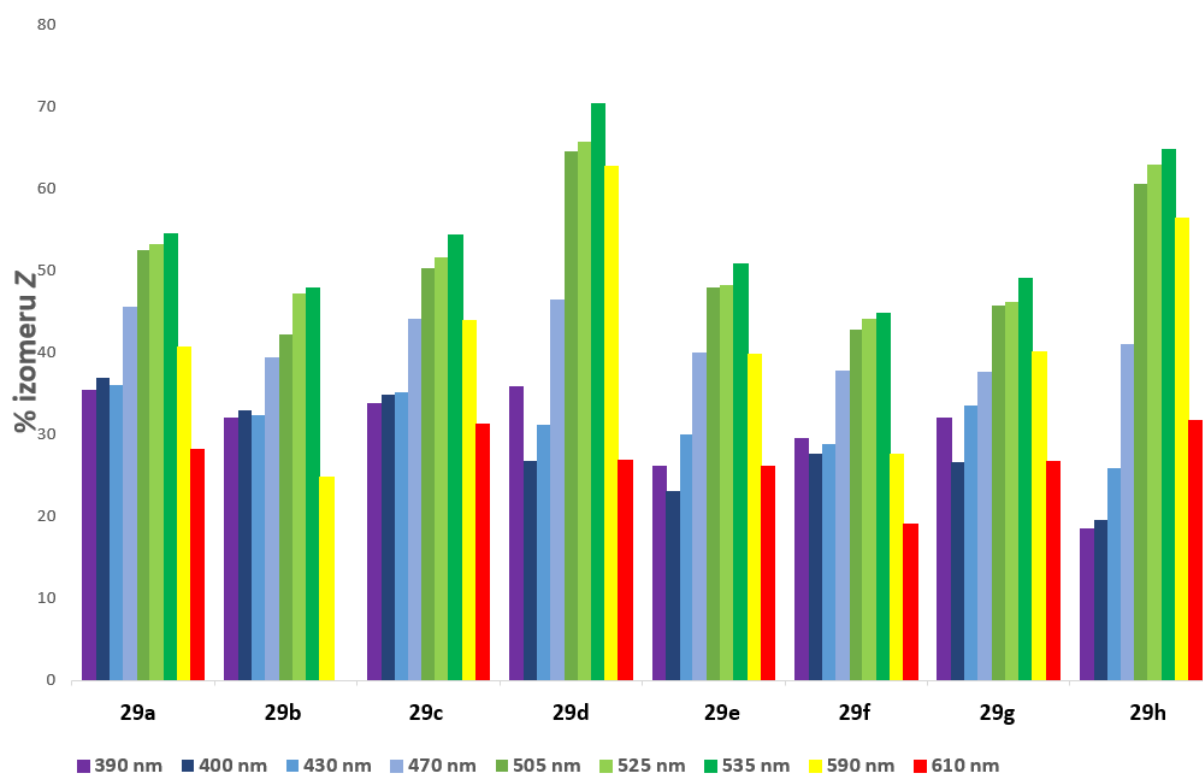
W celu weryfikacji, czy zsyntetyzowane *azo*-pochodne kolchicyny **29a–d**, **29e–h** wykazują pożądane właściwości fotochemiczne w zakresie światła widzialnego, przeprowadzono na nich szereg badań:

a) Fotoizomeryzacja:

Aby ocenić zdolność związków **29a–d**, **29e–h** do fotoizomeryzacji pod wpływem promieniowania o różnych długościach fal, przeprowadzono eksperyment, w którym wybrane związki naświetlano światłem o dziewięciu długościach fal mieszczących się w zakresie 390–610 nm (**tab. 13**, **rys. 46**). W wyniku oddziaływania światłem związki te ulegały zmianie konfiguracji z bardziej stabilnej formy *E* do mniej stabilnej formy *Z*.

Tabela 13. Wartości procentowego udziału izomeru Z w stanie fotostacjonarnym (PSS) dla związków 29a–d, 29e–h.

Długość fali	Udział procentowy izomeru Z [%]							
	Związek							
	29a	29b	29c	29d	29e	29f	29g	29h
390 nm	35,37	31,98	33,78	35,75	26,17	29,52	31,97	18,53
400 nm	36,88	32,87	34,82	26,73	23,11	27,65	26,6	19,53
430 nm	36,09	32,33	35,07	31,18	30,06	28,76	33,49	25,85
470 nm	45,49	39,4	44,07	46,42	39,96	37,67	37,59	40,89
505 nm	52,46	42,24	50,26	64,56	47,94	42,84	45,72	60,52
525 nm	53,17	47,15	51,52	65,61	48,19	44	46,07	62,9
535 nm	54,47	47,81	54,36	70,27	50,86	44,79	49,09	64,77
590 nm	40,64	24,77	43,87	62,74	39,7	27,59	40,11	56,37
610 nm	28,19	0	31,22	26,88	26,13	18,98	26,73	31,7

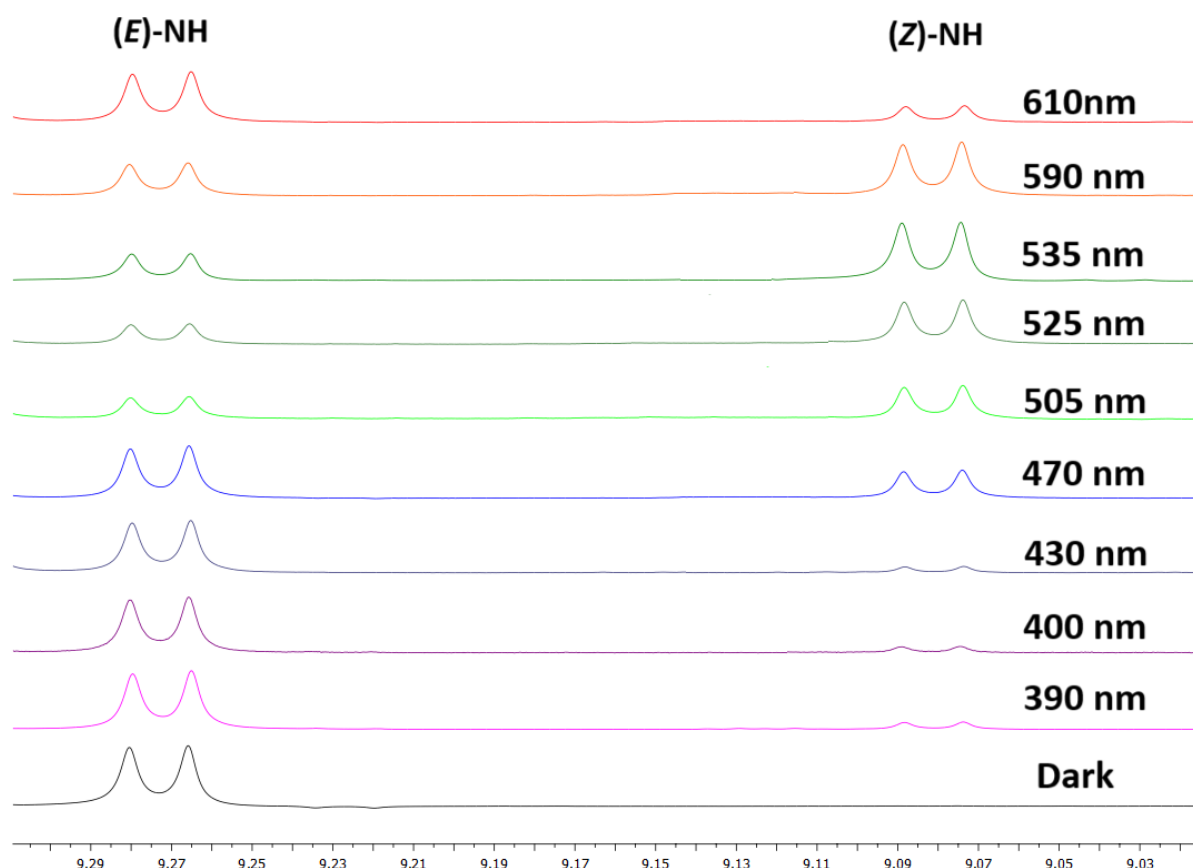


Rysunek 46. Udział procentowy izomeru Z w stanie fotostacjonarnym (PSS) w związkach 29a–d, 29e–h w formie wykresu słupkowego.

Na podstawie przeprowadzonych badań potwierdzono, że azowe pochodne kolchicyny wykazują zdolność do odwracalnej izomeryzacji *E/Z* pod wpływem światła o odpowiedniej długości fali, a zatem charakteryzują się właściwościami fotochemicznymi. W oparciu o uzyskane wyniki, można zauważyć, że największy stopień aktywacji obserwuje się po naświetlaniu światłem zielonym o długości 535 nm (w przypadku azowych pochodnych chalkonu 505 nm lub 525 nm). Świadczy to o tym, że wprowadzenie do struktury kolchicyny

podstawników halogenkowych prowadzi do przesunięcia maksimum absorpcji w kierunku zakresu światła zielonego, korzystnego z punktu widzenia zastosowań biologicznych i medycznych. Z analizy danych przedstawionych na wykresie wynika również, że dla związków zawierających jeden atom chloru (**29a–b**, **29e–f**), zawartość izomeru *Z* w stanie fotostacjonarnym (PSS) mieściła się w przedziale 44,79–54,47%, natomiast w przypadku pochodnych z dwoma atomami chloru (**29c–d**, **29g–h**) wartość ta mieściła się w przedziale 49,09–70,27%. Największy stopień izomeryzacji zaobserwowano dla pochodnych zawierających dwa atomy chloru w pozycji *orto*. Wskazuje to jednoznacznie, że obecność atomów chloru istotnie wpływa na właściwości fotochemiczne kolchicynowych układów azowych. Położenie wiązania amidowego w pozycji *meta* lub *para* w niewielki sposób wpływało na właściwości fotochemiczne badanych związków, z różnicą około 5% na korzyść podstawienia *meta*.

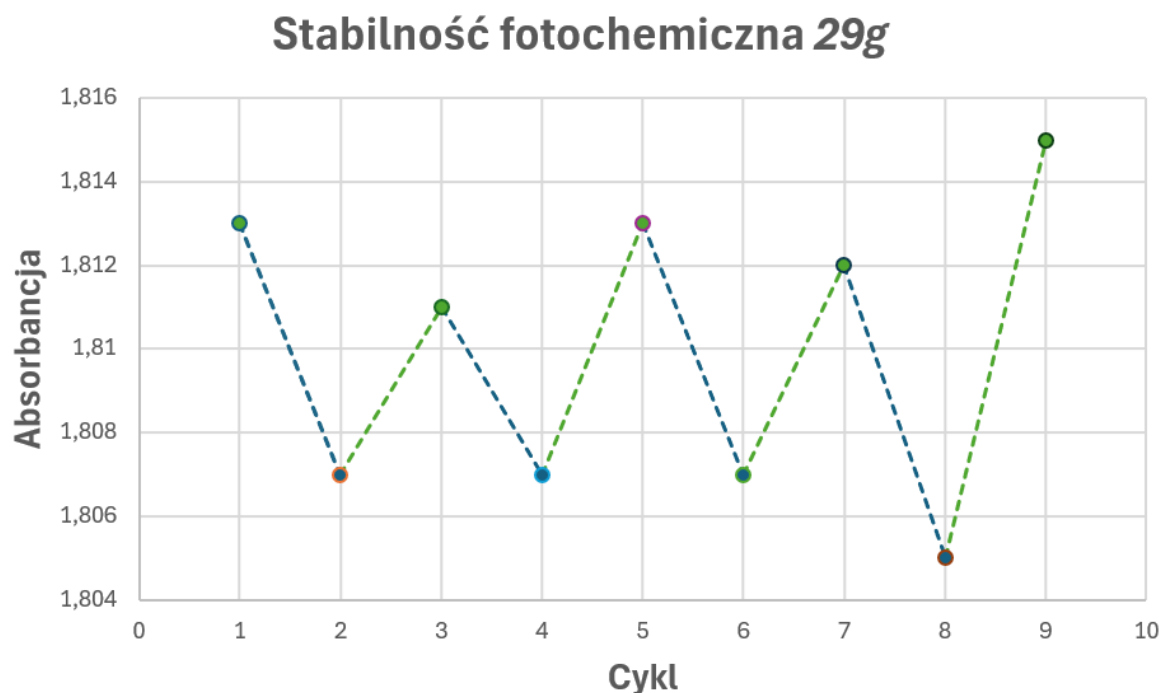
Procentowy udział izomeru *Z* w mieszaninie tworzącej się w stanie fotostacjonarnym (PSS) został obliczony za pomocą analizy intensywności sygnałów na widmach ^1H NMR mieszanin w stanie fotostacjonarnym. Zmiana konfiguracji prowadzi do istotnych modyfikacji widm NMR, które przejawiają się pojawieniem się nowych sygnałów charakterystycznych dla protonów izomeru *Z*, obok sygnałów odpowiadających izomerowi *E* (**rys. 47**).



Rysunek 47. Zmiany zachodzące w widmie ^1H NMR na przykładzie sygnału pochodzącego od protonu NH związku **29h** podczas naświetlania światłem o różnych długościach fal. Dark oznacza widmo związku, na które nie działało żadne światło (związek był przechowywany w ciemności).

b) Stabilność fotochemiczna:

W celu oceny fotochemicznej stabilności otrzymanych związków przeprowadzono eksperyment, w którym związek **29g** poddano powtarzającym się cyklom naświetlania światłem o długościach fal 535 oraz 430 nm (rys. 48). Wielokrotne, odwracalne cykle naświetlania związku **29g** naprzemiennie światłem zielonym i niebieskim nie powodowały istotnego „fotowysielania” ani degradacji, co potwierdza powtarzalność i trwałość fotochemicznej konwersji tego związku.



Rysunek 48. Wykres przedstawiający stabilność fotochemiczną związku 29g.

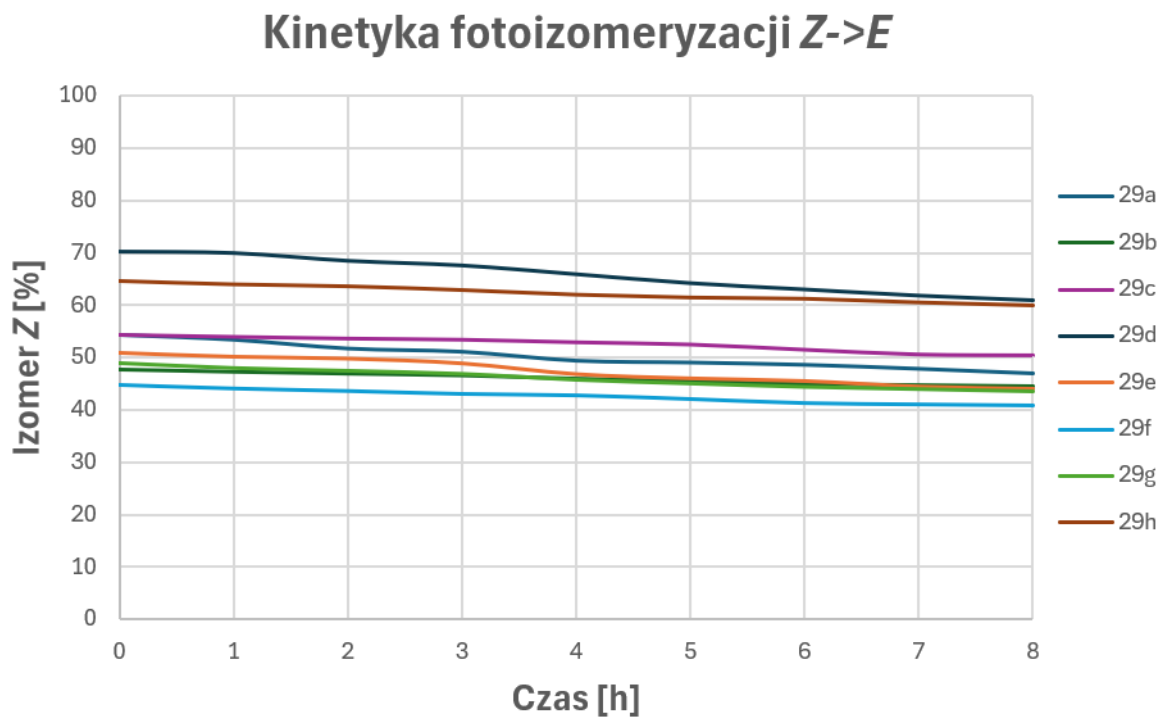
c) Kinetyka fotoizomeryzacji:

W celu zbadania szybkości reizomeryzacji z izomeru *Z* do *E* dla związków **29a–d**, **29e–h** przeprowadzono pomiary zmian ich stężenia w funkcji czasu (tab. 14, rys. 49). Pomiary przeprowadzono po uprzednim doprowadzeniu powyższych związków do stanu fotostacjonarnego (PSS) za pomocą światła zielonego o długości fali 535 nm.

Tabela 14. Zmiana ilości izomeru *Z* związków 29a–d, 29e–h w funkcji czasu.

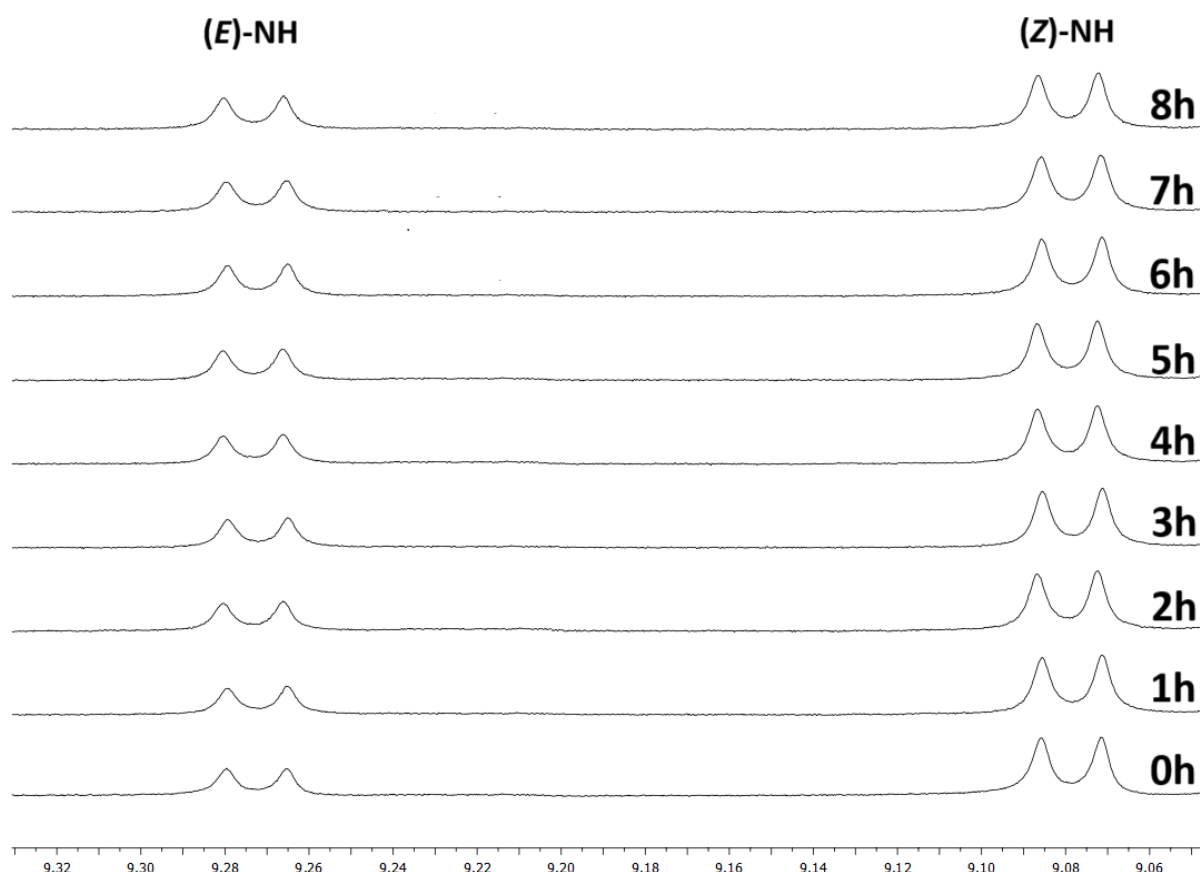
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h	Δ [%]	Długość fali
29a	54,47%	53,54%	51,84%	51,22%	49,49%	49,14%	48,70%	47,93%	47,04%	7,43	535 nm
29b	47,81%	47,37%	47,01%	46,66%	46,03%	45,55%	44,99%	44,77%	44,55%	3,26	535 nm
29c	54,36%	53,99%	53,66%	53,45%	52,96%	52,54%	51,56%	50,66%	50,50%	3,86	535 nm
29d	70,27%	70,00%	68,53%	67,65%	65,99%	64,30%	63,11%	61,94%	61,06%	9,21	535 nm
29e	50,86%	50,13%	49,77%	48,87%	46,83%	46,03%	45,53%	44,48%	44,06%	6,80	535 nm
29f	44,79%	44,11%	43,64%	43,08%	42,81%	42,11%	41,34%	41,09%	40,89%	3,90	535 nm

29g	49,09%	48,13%	47,59%	46,99%	45,83%	45,11%	44,45%	44,01%	43,57%	5,52	535 nm
29h	64,77%	64,12%	63,74%	63,01%	62,11%	61,55%	61,32%	60,60%	60,02%	4,75	535 nm



Rysunek 49. Zmiana ilości izomeru Z związków 29a–d, 29e–h w funkcji czasu w formie wykresu.

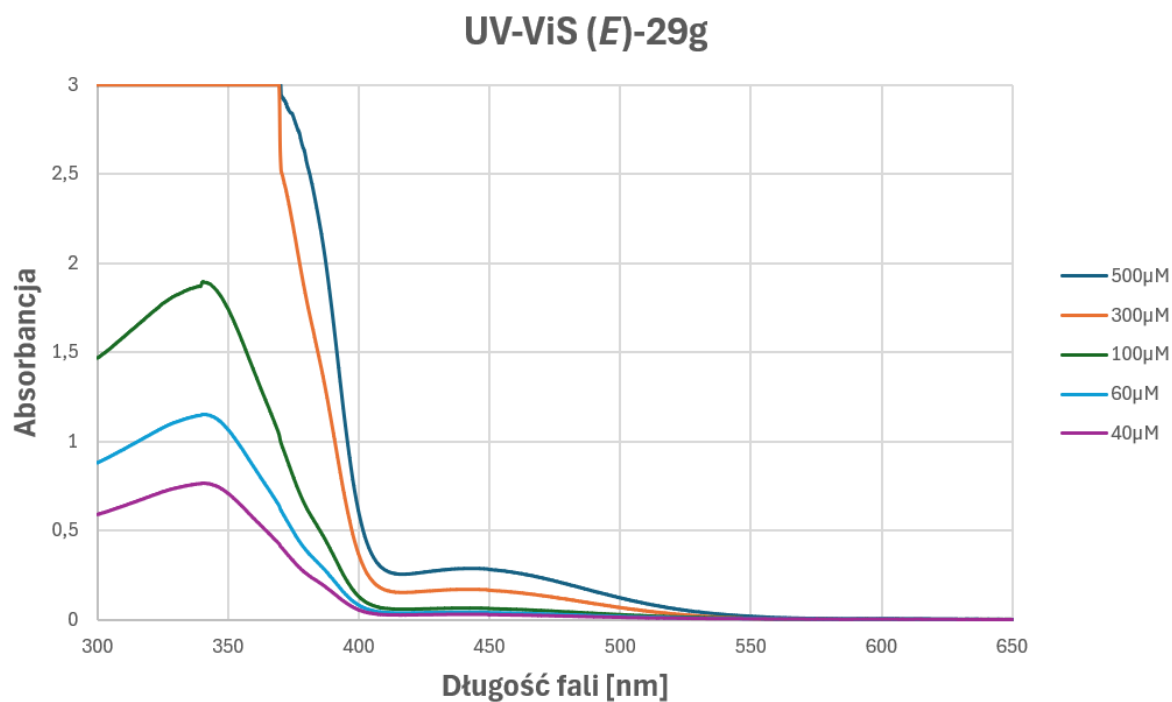
Procentowy udział izomeru Z w mieszaninie określano za pomocą analizy pól powierzchni pod sygnałami w widmach ^1H NMR, mierzonych co godzinę przez 8 godzin (rys. 50). Po 8 godzinach ilość izomeru Z w związkach **29a–d**, **29e–h** spadła o około 3–9,5%. Świadczy to o stabilności izomeru Z tych pochodnych w czasie. Nie stwierdzono istotnego wpływu liczby podstawników chlorowych czy też położenia wiązania amidowego na zmiany zawartości izomeru Z w funkcji czasu.



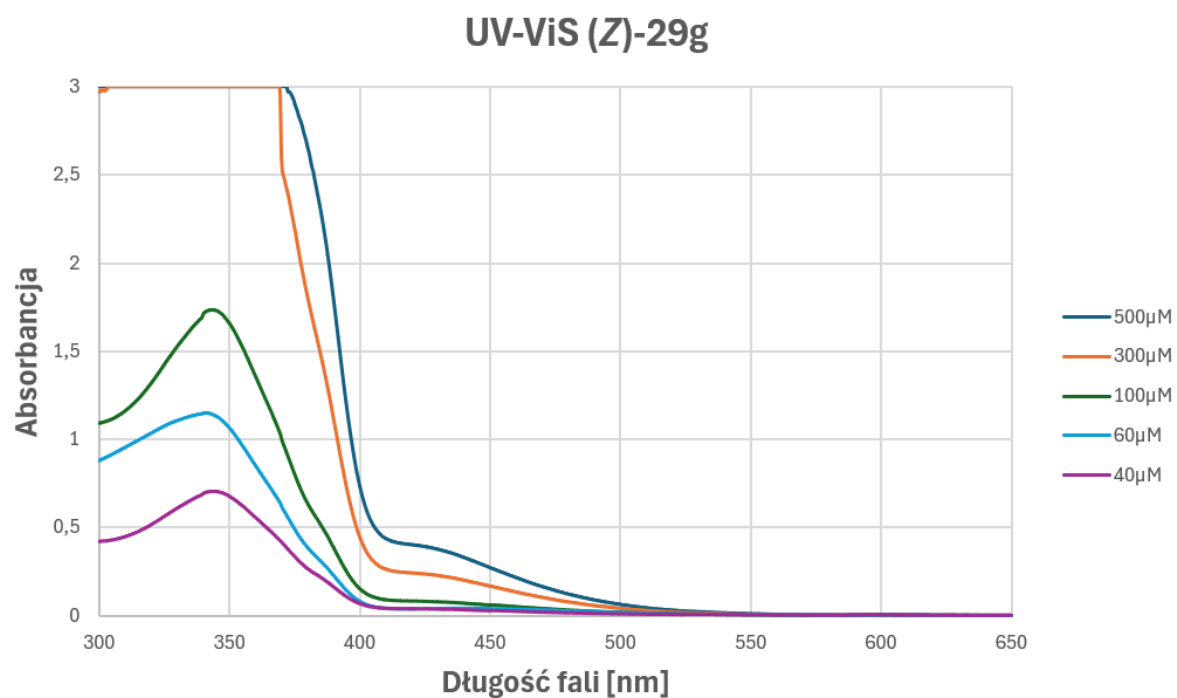
Rysunek 50. Zmiany w funkcji czasu zachodzące w widmie ^1H NMR na przykładzie sygnału pochodzącego od protonu NH związku **29h**.

d) Widma UV–Vis:

Podobnie jak w przypadku pochodnych azowych chalkonu, przeprowadzono analizę stopnia rozdzielania pasm przejść elektronowych typu $\pi \rightarrow \pi^*$ oraz $n \rightarrow \pi^*$ dla izomerów *E* i *Z* związków **29a–d**, **29e–h**. Zarejestrowano widma UV–Vis dla wszystkich związków, a wybrany przykład przedstawiono na **rysunku 51** i **rysunku 52**.



Rysunek 51. Widmo UV–ViS izomeru *E* związku 29g.



Rysunek 52. Widmo UV–ViS izomeru *Z* związku 29g.

Zmierzone zostały również wartości maksimum absorpcji pasm $n \rightarrow \pi^*$ izomerów *E* i *Z* dla związków **29b**, **29d**, **29f** i **29h**, a także obliczone wartości ich współczynników ekstynkcji (tab. 15).

Tabela 15. Wybrane dane spektroskopowe UV–Vis dla związków 29b, 29d, 29f oraz 29h.

Związek	$\lambda_{\max n \rightarrow \pi^*}$ (<i>E</i>) [nm]	$\epsilon_{\max n \rightarrow \pi^*}$ (<i>E</i>) [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	$\lambda_{\max n \rightarrow \pi^*}$ (<i>Z</i>) [nm]	$\epsilon_{\max n \rightarrow \pi^*}$ (<i>Z</i>) [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	$\Delta\lambda_{\max n \rightarrow \pi^*}$ [nm]
29b	432,8	760	430,8	798	2,0
29d	443,4	574	418,6	812	24,8
29f	441,0	1084	437,2	1196	3,8
29h	442,8	720	415,8	1022	27

W przypadku związków **29a–d**, **29e–h** obserwuje się wyraźne rozdzielanie pasm $\pi \rightarrow \pi^*$ oraz $n \rightarrow \pi^*$ zarówno dla izomeru *E*, jak i *Z*. Porównanie widm obu izomerów ujawnia korzystny efekt batochromowy, polegający na przesunięciu pasm absorpcyjnych w kierunku dłuższych fal. Co istotne, maksima absorpcji zarówno izomeru *E*, jak i *Z* mieszczą się w zakresie światła widzialnego, co czyni te związki szczególnie obiecującymi w kontekście zastosowań fotochemicznych. Dla związków **29d** i **29h** różnica pomiędzy pasmami $n \rightarrow \pi^*$ (*E*) i $n \rightarrow \pi^*$ (*Z*) wynosiła odpowiednio 24,8 nm i 27 nm. Ponadto, w przypadku izomerów *Z* zaobserwowano wzrost intensywności pasma $n \rightarrow \pi^*$ w porównaniu z izomerami *E*, co wskazuje na zwiększone prawdopodobieństwo przejścia wynikające ze zmiany energii przejścia elektronowego. Efekt ten jest większy dla dichloro podstawionych pochodnych w stosunku do monochloro podstawionych pochodnych. Dla pozostałych związków (**29a**, **29c**, **29e**, **29g**) również zaobserwowano rozdzielanie pasm typu $n \rightarrow \pi^*$. Niestety, pasma te wykazywały znaczne rozmycie, co uniemożliwiało jednoznaczne wyznaczenie maksimum absorpcji, pozwalając jedynie na oszacowanie przybliżonego zakresu ich występowania.

3.4.3 Modelowanie molekularne azowych pochodnych kolchicyny

Przeprowadzono również badania powinowactwa izomerów *E* i *Z* związków **29d** oraz **29h** do heterodimeru α,β -tubuliny (struktura o kodzie PDB: 1SA0) z wykorzystaniem modelowania molekularnego. Geometrie badanych związków optymalizowano przy użyciu teorii funkcyjnału gęstości (DFT) z wykorzystaniem funkcyjnału B3LYP oraz w bazie 6-31G*, z zastosowaniem metody PCM (ang. *the polarizable continuum model*) w celu modelowania efektów solwatacji przy użyciu programu Gaussian 03W [196]. Dokowanie molekularne przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania AutoDock Vina [197] i metody Broyden–

Fletcher–Goldfarb–Shanno [204]. Szacunkowe wartości energii oddziaływania izomerów *E* i *Z* związków **29d** oraz **29h** zostały przedstawione w **tabeli 16** (energia oddziaływania związku kontrolnego — kolchicyny — wynosi $-8,8$ kcal/mol) [198–199].

Tabela 16. Szacunkowa wartość energii oddziaływania izomerów *E* i *Z* związków **29d** oraz **29h**.

Związek	Powinowactwo izomeru <i>E</i> (kJ/mol)	Powinowactwo izomeru <i>Z</i> (kJ/mol)	Δ Powinowactwa (kJ/mol)
29d	$-9,5$	$-9,4$	$0,1$
29h	$-9,8$	$-9,2$	$0,6$

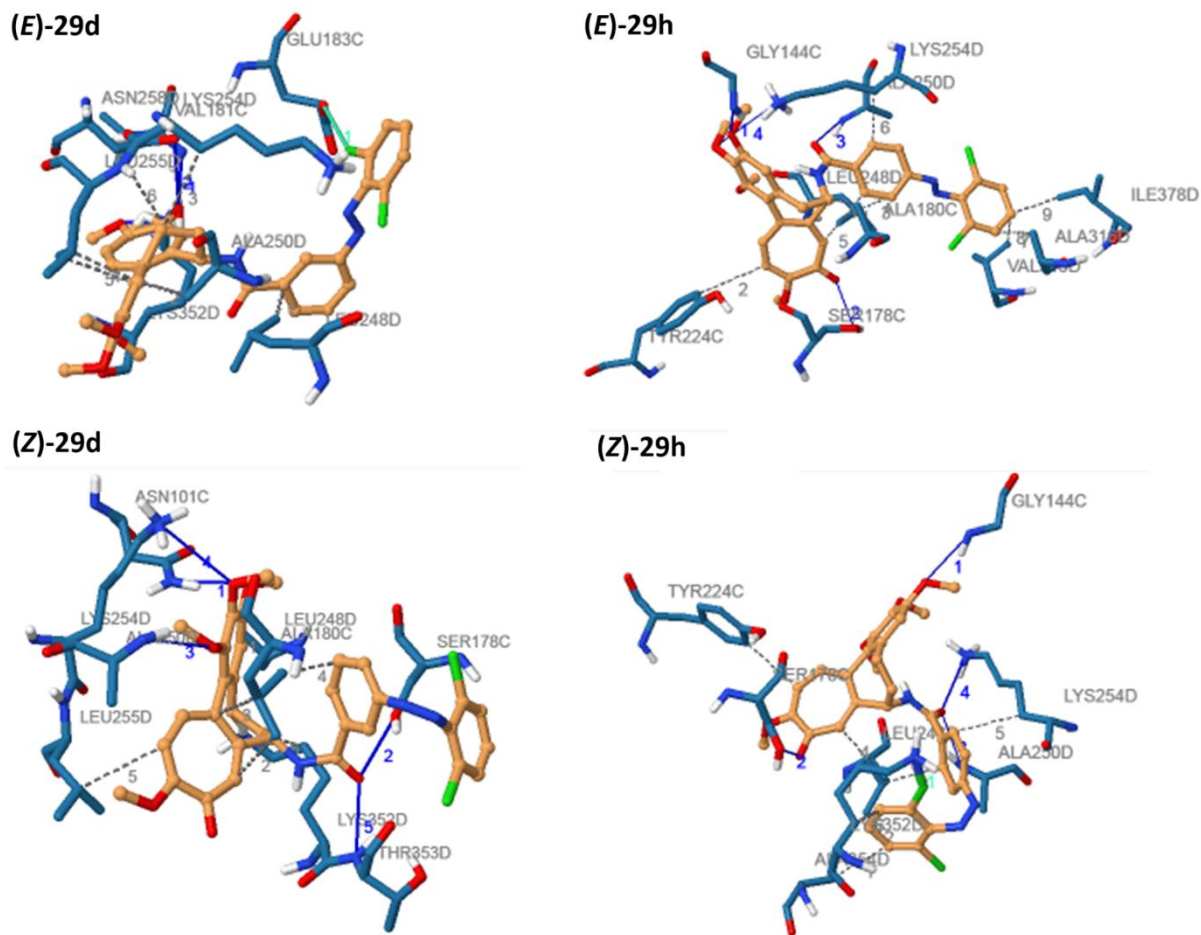
Energia oddziaływania izomeru *Z* związków **29d** oraz **29h** z heterodimerem α,β -tubuliny była niewiele wyższa niż energia oddziaływania izomeru *E*. Warto również zaznaczyć, że energia oddziaływania obu tych związków była niższa niż energia oddziaływania związku kontrolnego — kolchicyny — z heterodimerem α,β -tubuliny.

Na podstawie analizy energii oddziaływań dla izomerów *E* i *Z* związków **29d** oraz **29h** w α,β -tubulinie, zidentyfikowano główne interakcje odpowiedzialne za powinowactwo ligandów do miejsca wiązania kolchicyny (**rys. 53**). Badane ligandy były stabilizowane głównie przez hydrofobowe oddziaływania Van der Waalsa z α,β -tubuliną, takie jak:

- Ala β 250, Lys β 254, Leu β 255, Leu β 248 oraz Asn β 258 dla izomeru *E* związku **29d**;
- Leu β 255, Leu β 248 oraz Lys β 352 dla izomeru *Z* związku **29d**;
- Leu β 248, Lys β 254, Ala β 316, Val β 318 oraz Ile β 378 dla izomeru *E* związku **29h**;
- Leu β 248, Lys β 352 oraz Lys β 254 dla izomeru *Z* związku **29h**.

Oba związki zlokalizowane były w kieszeni hydrofobowej, która w warunkach normalnych jest zajmowana przez pierścień A kolchicyny, oraz wykazywały silne wiązania wodorowe.

Na **rysunku 53** przedstawiono wizualizację oddziaływań izomerów *E* i *Z* związków **29d** oraz **29h** z domeną kolchicynową w strukturze α,β -tubuliny.



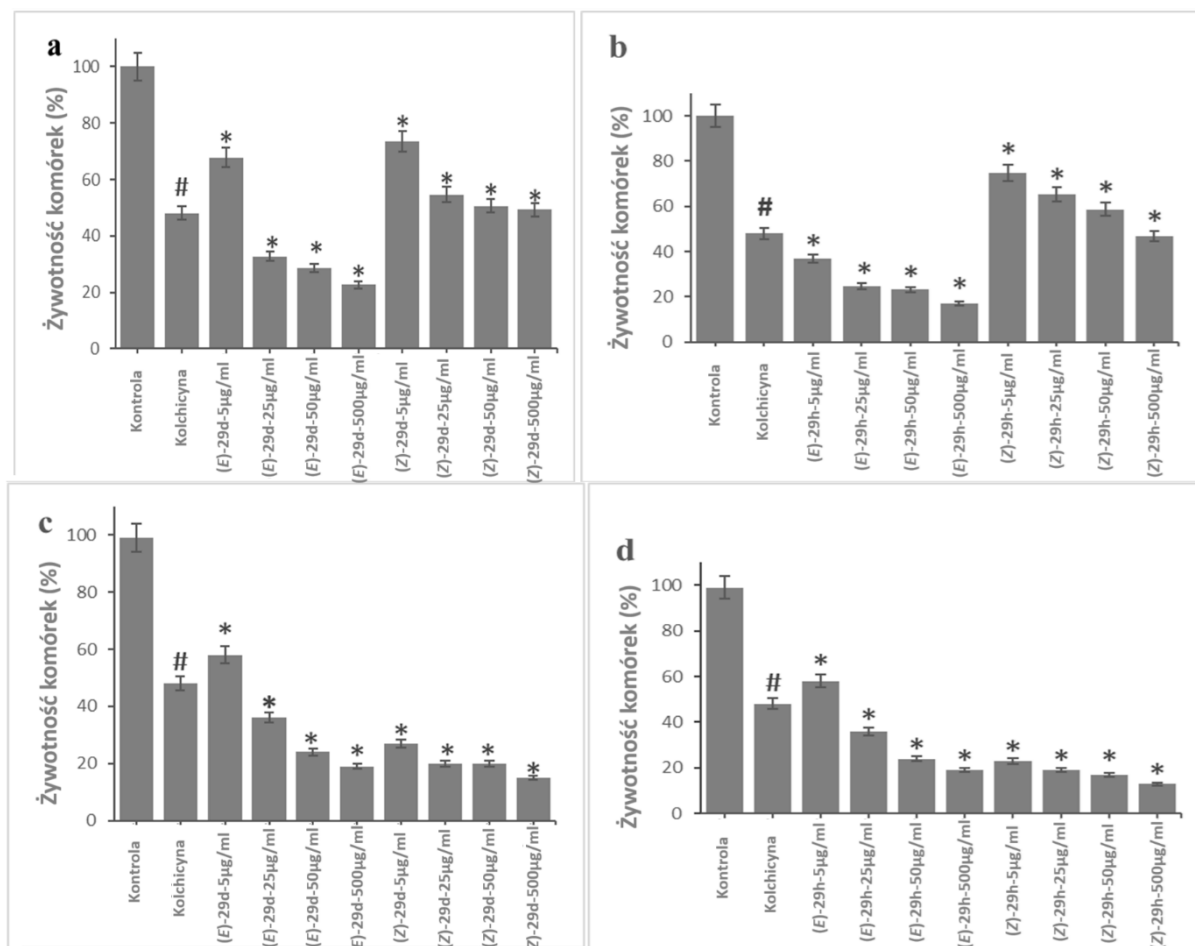
Rysunek 53. Model interakcji izomerów *E* i *Z* związków 29d oraz 29h z domeną kolchicynową α,β -tubuliny.

Analiza wyników dokowania wskazuje, że dominującym typem oddziaływań w przypadku badanych związków są interakcje hydrofobowe, podczas gdy wiązania wodorowe odgrywają istotną rolę w stabilizacji i odpowiedniej orientacji ligandów w obrębie kieszeni wiążącej. Na podstawie uzyskanych danych można wnioskować, że badane ligandy charakteryzują się wysokim powinowactwem do kompleksu α,β -tubuliny, porównywalnym z obserwowanym dla kolchicyny. Dodatkowo potwierdzają hipotezę, iż związki te oddziałują z miejscem wiązania kolchicyny, zlokalizowanym na granicy podjednostek α - i β -tubuliny.

3.4.4 Badania biologiczne azowych pochodnych kolchicyny

Po przeprowadzeniu analizy spektroskopowej zsyntetyzowanych związków zdecydowano się sprawdzić wpływ wybranych związków **29d** i **29h** na linię komórek raka prostaty (LNCaP). W pierwszym kroku sprawdzono cytotoksyczne działanie związków na nienowotworowe komórki HEK-293 (komórki ludzkiej embrionalnej nerki) (rys. 54a–b). Oba związki redukowały przeżywalność komórek w sposób zależny od dawki w warunkach ciemności. Jednak

ekspozycja na światło prowadziła do istotnego wzrostu przeżywalności przy wszystkich testowanych stężeniach, co potwierdza, że promieniowanie osłabia cytotoksyczny efekt tych związków w komórkach prawidłowych. Pozytywna kontrola — kolchicina, zastosowana w stężeniu IC_{50} (1,3 $\mu\text{g/ml}$), konsekwentnie zmniejszała przeżywalność komórek o około 50%, potwierdzając wiarygodność warunków testu. Z kolei profile cytotoksyczności związków **29d** i **29h** w komórkach LNCaP przedstawiono na **rysunku 54c–d**. W przeciwieństwie do komórek HEK-293, oba związki wykazywały istotną, zależną od dawki, cytotoksyczność wobec komórek LNCaP, która ulegała znacznemu nasileniu po naświetlaniu światłem. Ekspozycja na światło prowadziła do dalszego zmniejszenia przeżywalności komórek we wszystkich stężeniach w porównaniu do warunków bez światła, co wskazuje na zwiększoną skuteczność przeciwnowotworową związków po przełączeniu fotonowym. Dla komórek LNCaP wartość IC_{50} kolchicyny wyniosła 1,1 $\mu\text{g/ml}$, co stanowi potwierdzenie stabilności testu.



Rysunek 54. Przeżywalność komórek HEK-293 traktowanych rosnącymi stężeniami związków **29d** (a) i **29h** (b) w warunkach braku światła oraz w obecności światła. Przeżywalność komórek LNCaP traktowanych rosnącymi stężeniami związków **29d** (c) i **29h** (d) w warunkach braku światła oraz w obecności światła. #/* $p < 0,01$ w porównaniu z komórkami kontrolnymi niepoddanymi działaniu związków.

3.4.5 Dyskusja

Niniejszy rozdział został poświęcony projektowaniu, syntezie oraz charakterystyce strukturalnej, fizykochemicznej i biologicznej związków azowych zawierających szkielet kolchicyny. W wyniku przeprowadzonych prac uzyskano serię nowych pochodnych, które poddano szczegółowej analizie właściwości fotochemicznych. Związki te można otrzymać poprzez kilkuetapową syntezę, której końcowym etapem jest reakcja amidacji pomiędzy *N*-deacetylokolchicyną a odpowiednią pochodną azobenzenu.

Zgodnie z oczekiwaniami dowiedziono, że związki te można aktywować za pomocą światła zielonego o długości fali 535 nm — „przyjaznego” dla organizmu żywego. Dodatkowo udowodniono, że atomy chloru powodują przesunięcie maksimum pasm absorpcyjnych w kierunku fal dłuższych (w porównaniu do azobenzenu). Wpływ na to ma zarówno ilość jak i rozmieszczenie atomów chloru. Największa różnica jest zauważalna dla podstawienia 2,6-dichloro. Na podstawie badań spektroskopowych potwierdzono, że dla wszystkich otrzymanych związków i dla każdego z ich izomerów dochodziło do zauważalnej separacji pasm $\pi \rightarrow \pi^*$ i $n \rightarrow \pi^*$. Powodowało to przesunięcie pasma $n \rightarrow \pi^*$ w kierunku fal dłuższych, a więc i aktywację związków światłem o większej długości fali. Dla związków **29d** i **29h** różnica pomiędzy pasmami $n \rightarrow \pi^*$ (*E*) i $n \rightarrow \pi^*$ (*Z*) wynosiła odpowiednio 24,8 nm i 27 nm. Wskazuje to na znaczną różnicę w energii między orbitalami HOMO(*n*) i LUMO(π^*) w przypadku izomerów *E* i *Z* (dla izomeru *E* związku **29d** różnica wynosi 2,949 eV, a dla izomeru *Z* 3,193 eV; dla izomeru *E* związku **29h** różnica wynosi 3,022 eV, a dla izomeru *Z* 3,195 eV). Różnica ta może wynikać, analogicznie jak w przypadku podstawników fluorowych, z obecności atomów chloru w pozycjach *orto*, które — poprzez efekt indukcyjny — obniżają gęstość elektronową w pobliżu wiązania N=N. Ze względu na większy promień atomowy chloru w porównaniu do fluoru, występuje odchylenie od planarności w cząsteczce *E*-izomeru (obliczenia zawarte w części eksperymentalnej). Z kolei w izomerze *Z*, delokalizacja elektronów π jest ograniczona z powodu znacznych kątów torsyjnych wokół wiązań pojedynczych N–C. W efekcie poziom energetyczny orbitalu LUMO(π^*) w izomerze *Z* (dla izomeru *Z* związku **29d** –2,418 eV; dla izomeru *Z* związku **29h** –2,48 eV) jest wyższy niż w izomerze *E* (dla izomeru *E* związku **29d** –2,591 eV; dla izomeru *E* związku **29h** –2,658 eV). Poziom orbitalu *n* wynosi dla izomeru *Z* związku **29d** –5,611 eV, a dla izomeru *Z* związku **29h** –5,675 eV, co prowadzi do różnic w energiach wzbudzenia $n \rightarrow \pi^*$ dla obu izomerów (różnica energetyczna HOMO–LUMO dla izomeru *E* związku **29d** wynosi 2,949 eV, dla izomeru *Z*

związku **29d** 3,193 eV, dla izomeru *E* związku **29h** wynosi 3,022 eV, a dla izomeru *Z* związku **29h** 3,195 eV). Znaczna różnica energii pomiędzy orbitalami n i π^* dla obu izomerów prowadzi do wyraźnej separacji pasm $n \rightarrow \pi^*$, co umożliwia selektywne wzbudzenie jednego z izomerów. Ilość izomeru *Z* w mieszaninie w stanie fotostacjonarnym (PSS) również zależała od ilości atomów chloru w danym związku. Największa ilość tego izomeru występowała dla związków zawierających chlory w pozycjach 2,6, a przybliżona dla związków zawierających dwa atomy chloru w pozycji 2,4 lub jeden w pozycji 2 lub 4.

Na podstawie przeprowadzonych badań kinetyki fotoizomeryzacji wykazano, że izomery *Z* wszystkich otrzymanych związków cechują się wysoką stabilnością w czasie. Stopień ich reizomeryzacji nie przekraczał 9,5% niezależnie od ilości atomów chloru i pozycji podstawienia. Badania stabilności chemicznej związku **29g** nie ujawniły istotnego „fotowysielania” ani degradacji, co potwierdza powtarzalność oraz trwałość fotochemicznej konwersji tego związku.

Jak przewidywano, na podstawie przeprowadzonego modelowania molekularnego, mającego na celu ocenę powinowactwa izomerów *E* i *Z* związków **29d** oraz **29h** do heterodimeru α,β -tubuliny (PDB: 1SA0), badane ligandy cechują się wysokim powinowactwem do kompleksu α,β -tubuliny, porównywalnym z kolchicyną. Dodatkowo potwierdza to hipotezę, iż związki te oddziałują z miejscem wiązania kolchicyny, zlokalizowanym na granicy podjednostek α i β tubuliny.

Interesujące wyniki uzyskano sprawdzając wpływ najbardziej „ obiecujących ” związków **29d** i **29h** (dane z badań spektroskopowych) na linię komórek raka prostaty (LNCaP) i nienowotworowych komórek HEK-293. Izomery *Z* (w obecności światła) obu związków, w przypadku nienowotworowych komórek, były znacząco mniej toksyczne niż izomery *E* (w warunkach braku światła). Można zatem stwierdzić, że promieniowanie osłabia cytotoksyczny efekt związków o konfiguracji *Z* w komórkach prawidłowych. Z kolei w przypadku linii komórek raka prostaty (LNCaP), oba związki wykazywały istotną, zależną od dawki cytotoksyczność, która ulegała znacznemu nasileniu po naświetlaniu światłem (zmiana konfiguracji na *Z*). Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że izomery *Z* związków **29d** oraz **29h** charakteryzują się wyższą selektywnością wobec komórek nowotworowych w porównaniu do komórek zdrowych, co jest zgodne z przyjętą hipotezą badawczą.

4. Podsumowanie badań własnych i wnioski końcowe

4.1 Założenia i podstawy badań

W niniejszej rozprawie doktorskiej przeprowadzono kompleksowe badania trzech klas związków organicznych — pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny, chalkonu oraz kolchicyny — z uwzględnieniem ich potencjalnego zastosowania jako fotochromowych przełączników molekularnych o właściwościach przeciwnowotworowych. Inspiracją do rozpoczęcia badań była analiza strukturalna znanych inhibitorów mikrotubul — kolchicyny i kombretastatyny A-4 — które wiążą się z tzw. domeną kolchicynową w heterodimerze α,β -tubuliny i wykazują silne działanie cytotoksyczne. Obie te cząsteczki, podobnie jak wybrane do badań pochodne dibenzo[*b,f*]oksepiny oraz chalkonu, zawierają sztywne szkieletowe układy aromatyczne oraz grupy metoksyłowe, które odgrywają kluczową rolę w oddziaływaniu z miejscem wiązania kolchicyny. Na tej podstawie postawiono hipotezę, że odpowiednio zmodyfikowane pochodne dibenzo[*b,f*]oksepiny, chalkonu oraz kolchicyny mogą wykazywać podobne właściwości biologiczne, a dodatkowo — dzięki wprowadzeniu ugrupowań azowych — funkcjonować jako odwracalne fotochromowe przełączniki molekularne aktywowane światłem.

Celem pracy była synteza oraz charakterystyka fotochemiczna i biologiczna nowych związków zawierających szkielet dibenzo[*b,f*]oksepiny, chalkonu lub kolchicyny, wykazujących światłoczułą aktywność, zdolnych do selektywnego oddziaływania z domeną kolchicynową α,β -tubuliny.

4.2 Osiągnięcia w obszarze przeprowadzonych badań

4.2.1 Pochodne dibenzo[*b,f*]oksepiny

Zbadano szeroką gamę pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny, koncentrując się na ich zdolności do tworzenia oligomerów i połączeń hybrydowych. Na podstawie analizy przesunień chemicznych w widmach ^{13}C NMR oraz współczynników SCS określono redystrybucję gęstości elektronowej na poszczególnych atomach węgla w metoksyłowych pochodnych 3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepiny. Pozwoliło to na identyfikację wpływu efektów strukturalnych, takich jak zatłoczenie przestrzenne oraz lokalna gęstość elektronowa, na aktywność poszczególnych pozycji związku, co w konsekwencji umożliwiło przewidzenie przebiegu reakcji substytucji elektrofilowej w tych miejscach. Uzyskano dimery, trimery i pentamery dibenzo[*b,f*]oksepiny z różnymi łącznikami, a także związki hybrydowe z

4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylem. Przeprowadzone badania dostarczyły podstaw niezbędnych do zaprojektowania oraz syntetycznego wytworzenia kolejnych związków, umożliwiając dalszą optymalizację ich właściwości chemicznych i biologicznych. Szczególny nacisk położono na syntezę i badanie właściwości azowych pochodnych — zarówno symetrycznych, jak i niesymetrycznych — zawierających jedną lub więcej grup azowych. Wykazano, że związki te pod wpływem światła ulegają fotoizomeryzacji *E/Z*. Na podstawie badań fotochemicznych potwierdzono zdolność otrzymanych związków do izomeryzacji *E/Z* pod wpływem światła z zakresu 390–450 nm (zakres promieniowania w obszarze ultrafioletu i światła fioletowo-niebieskiego). Szczegółowa analiza ilości izomeru *Z* w stanie fotostacjonarnym wykazała, że efektywność konwersji osiągała maksymalnie około 80%. Jednak w widmach UV–Vis nie obserwowano rozdzielania pasm przejść $n \rightarrow \pi^*$ oraz $\pi \rightarrow \pi^*$, a izomery *Z* cechowały się ograniczoną stabilnością — w wielu przypadkach obserwowano szybką reizomeryzację, co znacząco ograniczało potencjał badanych związków do zastosowań *in vivo*. Pomimo prób przesunięcia maksimum absorpcji do zakresu światła zielonego poprzez wprowadzenie podstawników fluorofenylowych, efekt ten był niewielki. Ponadto, izomery *Z* wykazywały ograniczoną stabilność w czasie, co wykazały badania kinetyczne. Częściowym sukcesem było dodanie motywu fluoroazobenzenowego, który w przeciwieństwie do układu dibenzo[*b,f*]oksepinowego, umożliwiał przesunięcie maksimum absorpcji do zakresu światła zielonego (505–535 nm) i zapewniał większą trwałość izomeru *Z*. Związki rozgałęzione zawierające szkielet azobenzenowy były bardziej stabilne, ale proces syntezy przebiegał z ograniczoną wydajnością. Na podstawie przeprowadzonego modelowania molekularnego wykazano, że zarówno izomery *E*, jak i *Z* mają wysokie powinowactwo do miejsca wiązania kolchicyny w heterodimerze α,β -tubuliny. Szczególnie interesujące były związki **9b** oraz **16b**. Dla związków **9b**, **16a–b** energia oddziaływania izomeru *Z* z białkiem była niższa niż energia oddziaływania izomeru *E*, a w przypadku związku **16b** wartość ta była prawie dwukrotnie niższa. Analiza oddziaływań ligandów potwierdziła możliwość wiązania z tym samym miejscem aktywnym w α,β -tubulinie.

Podsumowując, dibenzo[*b,f*]okseпина stanowi obiecujący szkielet do projektowania fotochromowych przełączników molekularnych, jednak wymaga dalszej optymalizacji strukturalnej, m.in. poprzez wprowadzenie kolejnych podstawników, szczególnie w celu poprawy wydajności izomeryzacji indukowanej światłem widzialnym oraz zwiększenia stabilności termodynamicznej izomeru *Z*.

4.2.2 Azowe pochodne chalkonu

W drugiej części pracy skoncentrowano się na badaniach azowych pochodnych chalkonu — pochodnych flawonoidów, znanych z aktywności biologicznej. Zastosowano trójetapową syntezę, obejmującą: utlenienie aniliny do nitrozopochodnej, sprzężanie z 3-aminobenzaldehydem, oraz kondensację aldolową z pochodną benzaldehydu. Uzyskano dwanaście nowych związków zawierających szkielet chalkonowy oraz grupę azową.

Na podstawie badań procesu fotoizomeryzacji wykazano, że związki te efektywnie przechodzą izomeryzację *E/Z* pod wpływem światła zielonego (505–525 nm), osiągając stany fotostacjonarne zawierające nawet ~75% izomeru *Z* (zwłaszcza przy obecności dwóch podstawników fluorowych). W porównaniu do pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny, chalkony cechowały się:

- Lepszym przesunięciem maksimum absorpcji przejścia $n \rightarrow \pi^*$ do zakresu światła „przyjaznego” biologicznie;
- Wyższą stabilnością izomeru *Z* (reizomeryzacja *Z/E* po 8 godzinach wynosiła zaledwie 5–9%);
- Możliwością przeprowadzania wielokrotnych cykli izomeryzacji bez degradacji związku (brak tzw. fotowysbielania).

W oparciu o modelowanie molekularne potwierdzono, że zarówno izomery *E*, jak i *Z* charakteryzują się wysokim powinowactwem do miejsca wiązania kolchicyny w heterodimerze α,β -tubuliny. Obliczone energie oddziaływania były niższe niż w przypadku kolchicyny, co oznacza silniejsze oddziaływanie z białkiem. Analiza interakcji badanych ligandów potwierdziła ich zdolność do wiązania w obrębie tego samego miejsca aktywnego w α,β -tubulinie. Dodatkowo przeprowadzono badania biologiczne na związku **21j**. Zaobserwowano, że izomer *Z* tej pochodnej chalkonu powoduje zatrzymanie komórek linii ludzkiego raka prostaty PC-3 w fazie G2/M cyklu komórkowego, przy jednoczesnym znacznym nagromadzeniu komórek w fazie S, co dowodzi jego potencjalnej aktywności cytotoksycznej oraz zdolności do hamowania proliferacji komórek.

Podsumowując, pochodne chalkonu, zwłaszcza z podstawnikami fluorowymi, prezentują wysoce pożądane właściwości fotochromowe i stanowią obiecujące molekularne przełączniki, zdolne do aktywacji pod wpływem światła widzialnego.

4.2.3 Azowe pochodne kolchicyny

W trzecim etapie pracy skoncentrowano się na projektowaniu, syntezie oraz fotochemicznej charakterystyce azowych pochodnych kolchicyny, reprezentujących nową klasę związków zdolnych do światłoczułego wiązania z domeną kolchicynową α,β -tubuliny. W przeciwieństwie do chalkonów i dibenzo[*b,f*]oksepin, których szkielety jedynie imitowały strukturę kolchicyny, opracowane związki zawierały bezpośrednio zmodyfikowany rdzeń kolchicyny, wzbogacony o ugrupowanie azowe — potencjalnie umożliwiające fotokontrolę aktywności biologicznej. Na podstawie badań procesu fotoizomeryzacji wykazano, że związki te efektywnie przechodzą izomeryzację *E/Z* pod wpływem światła zielonego (535 nm), osiągając stany fotostacjonarne zawierające nawet ~70% izomeru *Z* (zwłaszcza przy obecności 2 podstawników chlorowych). Widma UV–Vis ilustrują wyraźne rozszczenie pasm absorpcyjnych przejść typu $n \rightarrow \pi^*$ oraz $\pi \rightarrow \pi^*$. Izomery *Z* cechowały się ponadto dobrą stabilnością z reizomeryzacją sięgającą maksymalnie 9,21% po 8 h. Stabilność izomerów *Z* była porównywalna do stabilności izomerów *Z* w pochodnych chalkonu. Dokonano również dokowania molekularnego izomerów *E* i *Z* dla wybranych związków w domenie kolchicynowej α,β -tubuliny, które potwierdziły wysokie powinowactwo do miejsca wiązania kolchicyny. Energia oddziaływania tych związków była niższa niż energia oddziaływania niepodstawionej kolchicyny. Ponadto przeprowadzono badania biologiczne dla dwóch wyselekcjonowanych związków. W świetle uzyskanych wyników udowodniono, że izomery *Z* charakteryzują się wyższą selektywnością wobec komórek nowotworowych (linia komórek raka prostaty — LNCaP) w porównaniu z komórkami prawidłowymi (linia komórek ludzkiej embrionalnej nerki — HEK-293), co wskazuje na ich potencjał terapeutyczny jako fotokontrolowanych, selektywnych cytostatyków.

Pochodne kolchicyny, w szczególności chloropodstawione analogi, charakteryzują się korzystnymi właściwościami fotochromowymi i wykazują potencjał jako światłowrażliwe, biologicznie aktywne przełączniki molekularne, które mogą być aktywowane światłem widzialnym.

4.3 Wnioski końcowe

Celem badań przedstawionych w niniejszej pracy było opracowanie nowych związków organicznych charakteryzujących się zdolnością do fotoizomeryzacji, które jednocześnie wykazują potencjał do oddziaływania z miejscem kolchicynowym α,β -tubuliny, kluczowym

dla regulacji dynamiki mikrotubul oraz przebiegu cyklu komórkowego. W ramach eksperymentów zrealizowano strategię projektowania, syntezy i charakterystyki strukturalnej trzech klas związków: pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepy, chalkonu oraz kolchicyny. Każda z analizowanych klas związków została wybrana w oparciu o wcześniejsze doniesienia literaturowe, dotyczące ich aktywności biologicznej, obecności sztywnych struktur aromatycznych oraz potencjału do modyfikacji przez wprowadzenie grupy azowej — istotnego elementu umożliwiającego kontrolę aktywności światłem. Wszystkie trzy serie związków zostały zsyntetyzowane, scharakteryzowane różnymi metodami (^1H , ^{13}C , ^{19}F NMR, COSY, HSQC, HMBC, MS, UV–Vis) i poddane szczegółowej analizie ich fotofizycznej reaktywności, ze szczególnym uwzględnieniem efektywności oraz odwracalności izomeryzacji *E/Z*, długości fali aktywującej proces oraz stabilności izomerów *Z*. Dodatkowo, przeprowadzono dokowanie molekularne wybranych struktur do miejsca kolchicynowego białka α,β -tubuliny, w celu określenia potencjalnej aktywności biologicznej.

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące uogólnione wnioski:

1. Możliwe jest racjonalne projektowanie cząsteczek organicznych zdolnych do światłoczułego przełączania aktywności biologicznej

- Wszystkie trzy klasy związków — dibenzo[*b,f*]oksepina, chalkon i kolchicyna — umożliwiły funkcjonalizację poprzez wprowadzenie grupy azowej, zachowując przy tym integralność strukturalną;
- Zsyntetyzowane związki wykazywały zróżnicowaną efektywność izomeryzacji *E/Z*, zależną od podstawników, długości fali promieniowania elektromagnetycznego oraz symetrii cząsteczki;
- Uzyskano znaczne ilości izomerów *Z* w stanie fotostacjonarnym oraz wykazano możliwość wielokrotnego przeprowadzania cykli przełączania bez obserwowanej fotodegradacji.

2. Azowe pochodne chalkonu okazały się jednymi z najbardziej efektywnych grup przełączników molekularnych

- Wykazały dużą zawartość izomeru *Z* w stanie fotostacjonarnym, aktywację światłem zielonym (505–525 nm), wysoką stabilność izomeru *Z* (spadek tylko 5–9% po 8 h) i doskonałą odporność na fotowysbielanie;

- Struktura badanych związków umożliwiała skuteczną modyfikację rozkładu gęstości elektronowej, jednocześnie zachowując układ sprzyjający przesunięciu widma absorpcji w zakres promieniowania widzialnego;
- Pochodne chalkonu łączą właściwości fotochromowe z naturalną aktywnością biologiczną i wykazują duży potencjał w kontekście rozwoju innowacyjnych fotofarmaceutyków.

3. Azowe pochodne kolchicyny pełnią funkcję naturalnych fotomodulatorów mikrotubul

- Azowe pochodne kolchicyny zachowują farmakofor kolchicynowy, jednocześnie nabywając zdolność do światłoczułej modulacji aktywności biologicznej;
- Różnice w energii oddziaływania izomerów *E* i *Z* z białkiem α,β -tubuliną potwierdzają możliwość kontroli inhibitora tubuliny, w zależności od konformacji przestrzennej cząsteczki;
- Proponowane podejście stanowi innowacyjne rozwiązanie, które może umożliwić rozwój światłoczułych inhibitorów mikrotubul cechujących się wysoką selektywnością oraz ograniczonym działaniem ogólnoustrojowym.

4. Pochodne dibenzo[*b,f*]oksepy okazały się użyteczne jako wstępne modele do badań, jednak ich struktury wymagają dalszych modyfikacji w celu optymalizacji właściwości fotochemicznych

- Pomimo, że pochodne dibenzo[*b,f*]oksepy wykazały zdolność do izomeryzacji i silnego wiązania z α,β -tubuliną, ich aktywacja wymaga światła w zakresie UV (390–410 nm), co jest przyczyną ograniczonego zastosowania w układach biologicznych z uwagi na potencjalną fototoksyczność;
- Niska stabilność izomerów *Z* oraz niższa wydajność konwersji ograniczają ich użyteczność w zastosowaniach biologicznych bez dalszych modyfikacji strukturalnych;
- Zmiana symetrii cząsteczki i wprowadzenie dodatkowych grup fluorowych poprawiło te właściwości, co wskazuje na możliwości dalszego rozwoju tej grupy związków, jako światłoczułych regulatorów aktywności biologicznej.

5. Modelowanie molekularne potwierdza aktywność biologiczną i selektywność izomerów *Z*

- We wszystkich badanych klasach związków zaobserwowano, że izomery *Z* wykazują silniejsze lub odmienne powinowactwo do domeny kolchicynowej α,β -tubuliny w porównaniu z izomerami *E*;
- Umożliwia to precyzyjne, sterowane światłem włączanie lub wyłączanie aktywności biologicznej;
- Zsyntetyzowane związki mogą działać jako fotofarmaceutyki, wykazujące aktywność jedynie w określonej formie, czasie i w kontrolowanych warunkach naświetlania, co pozwala na precyzyjne ukierunkowanie efektu terapeutycznego i minimalizację działań niepożądanych.

6. Wnioski aplikacyjne i dalsze kierunki badań

- Przedstawione podejście może być wykorzystane do projektowania przełączników molekularnych w fotofarmakologii, regulacji aktywności enzymów i białek, celowanego dostarczania leków oraz inteligentnych materiałów bioaktywnych;
- Dalsze badania powinny obejmować ocenę cytotoksyczności *in vitro* w różnych liniach komórek nowotworowych, analizę kinetyki działania w środowisku biologicznym (w tym stabilność i biodostępność), syntezę związków o ulepszonych właściwościach spektralnych (zwłaszcza w przypadku dibenzo[*b,f*]oksepiny), oraz opracowanie fotomodulowanych nośników leków.

Wyniki przedstawionej rozprawy doktorskiej potwierdzają, że kontrolowana światłem modulacja aktywności biologicznej, realizowana za pomocą precyzyjnie zaprojektowanych związków fotochromowych, jest zarówno wykonalna, jak i obiecująca. Wykazano, że odpowiednio zaprojektowane pochodne chalkonu, kolchicyny oraz dibenzo[*b,f*]oksepiny mogą stanowić fundament nowej generacji światłoczułych leków, biosensorów oraz przełączników molekularnych.

Rozwój tej koncepcji niesie ze sobą potencjał stworzenia innowacyjnych, selektywnych i mniej inwazyjnych strategii terapeutycznych, które wykorzystują światło jako precyzyjny czynnik regulacyjny, wpisując się tym samym w założenia fotofarmakologii XXI wieku.

5. Część eksperymentalna

5.1 Synteza

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR): Wszystkie widma zostały zarejestrowane za pomocą spektrometrów JEOL (JNM-ECZL) pracującego przy polu magnetycznym 14,1 T, Varian VNMRs pracującego przy polu magnetycznym 11,7 T oraz spektrometru Varian Mercury VX pracującego przy polu 9,4 T. Pomiary wykonano dla ok. 1 mM roztworów wszystkich związków w DMSO- d_6 lub $CDCl_3$. Resztkowe sygnały DMSO- d_6 (2,54 ppm) i $CDCl_3$ (7,26 ppm) w widmach 1H NMR oraz sygnały DMSO- d_6 (40,4 ppm) i $CDCl_3$ (77,0 ppm) w widmach ^{13}C NMR zostały użyte jako odniesienia przesunięcia chemicznego. Wielkości spinowe opisane zostały jako: s (singlet), d (dublet), t (tryplet), q (kwartet), m (multiplet), dd (dublet dubletów), td (tryplet dubletów), ddd (dublet dubletów dubletów), tt (tryplet trypletów), tdd (tryplet dubletów dubletów). Stałe sprzężenia podano w hercach (Hz). Wszystkie widma protonowe zostały zarejestrowane przy użyciu standardowego oprogramowania spektrometru i zestawu parametrów: czas akwizycji 3s, kąt impulsu 30° . Standardowy zestaw parametrów pomiarowych dla widm ^{13}C NMR był następujący: długość impulsu 7 μs (90° długość impulsu wynosiła 12,5 μs), czas akwizycji 1s, szerokość widmowa 200 ppm, wykonano 1000 skanów z 32 K punktami danych, po czym przeprowadzono uzupełnianie zerami do 64 K; sygnały FID poddano transformacji Fouriera po zastosowaniu poszerzenia linii o 1 Hz. Widma 1H - ^{13}C gs-HSQC oraz 1H - ^{13}C gs-HMBC również zostały zarejestrowane przy użyciu standardowego oprogramowania Varian. Parametry pomiarowe dla widm ^{19}F NMR były następujące: długość impulsu 1 μs (90° długość impulsu wynosiła 8 μs), czas akwizycji 2,3 s, szerokość widmowa 241 ppm, wykonano 32 skany z 524 K punktami danych.

Spektrometria mas (MS): Widma masowe zostały zarejestrowane na spektrometrze QTOF Premier firmy Waters oraz spektrometrze LTQ Orbitrap Velos.

Temperatura topnienia: Do tych pomiarów użyto aparatu do pomiaru temperatury topnienia Stuart SMP10. Temperaturę topnienia mierzono z dokładnością 1– $2^\circ C$.

Wszystkie komercyjnie dostępne związki zostały zakupione od firm Merck i Sigma-Aldrich i użyte bez dalszego oczyszczania. Rozpuszczalniki suszono zgodnie ze standardowymi procedurami.

5.2 Badania fotochemiczne

Do naświetlania próbek wykorzystano samodzielnie zbudowane matryce 24 niskonapięciowych diod elektroluminescencyjnych (LED), sterowane przez płytkę Arduino. Tak zautomatyzowany system umożliwia precyzyjne, impulsowe oświetlanie w trakcie długoterminowych testów. Co najważniejsze, wykazano jego kompatybilność z warunkami hodowli komórek. Proponowany system składał się z mikrokomputera Arduino sterującego 8-kanałowym modułem przekaźników, który włączał i wyłączał zestawy matryc LED, emitujących błyski o identycznym czasie trwania (500 ms). W niniejszych badaniach zastosowano diody LED o następujących długościach fal (w nm): 390, 400, 430, 470, 505, 515, 525, 535, 590, 610. Wszystkie diody LED zakupiono w Mouser Electronics, Inc., a odpowiadające im numery katalogowe to odpowiednio: 749-UV5TZ-390-30, 749-UV5TZ-400-15, 749-5BWC, 630-HLMP-CB3A-UV0DD, 630-HLMP-CE34-Y1CDD, 859-LTL2V3TCYK2, 630-HLMP-CM3A-Z10DD, 859-LTL2V3TGX3KS, 630-HLMP-EL1A-Z1KDD. W każdej matrycy LED stosowano tylko jedną długość fali.

5.2.1 Analiza składu stanu fotostacjonarnego (PSS) metodą ^1H NMR lub ^{19}F NMR

Skład stanu fotostacjonarnego określano na podstawie pomiarów widm ^1H lub ^{19}F NMR (DMSO- d_6 , $C \approx 1$ mM) odpowiednich związków po naświetlaniu. W eksperymentach dostosowanych termicznie, próbki były przechowywane w ciemności w temperaturze 120°C przez noc w celu zapewnienia pełnego powrotu do izomeru *E*. Następnie próbkę naświetlano diodami LED o różnych długościach fal, stopniowo wydłużając czas ekspozycji, aż nie obserwowano dalszych zmian w widmie. Łączny czas naświetlania wynosił 20 godzin.

5.2.2 Badania fotoizomeryzacji metodą spektroskopii UV–Vis

Spektrometr UV–Vis: Do pomiarów spektroskopii UV–Vis użyto czytnika mikropłytkowego EnSpire® (PerkinElmer, Turku, Finlandia) z oprogramowaniem EnSpire Workstation w wersji 4.10.3005.1440 (PerkinElmer), w trybie pomiaru absorbancji.

Wszystkie eksperymenty wykonano trzykrotnie. Stężone roztwory wybranych związków przygotowano w DMSO w odpowiednich stężeniach i wygrzewano w temperaturze 120°C przez noc, aby zapewnić pełny powrót do izomeru *E*. Następnie odpowiednią ilość roztworu przenoszono możliwie jak najszybciej do kuwety i dokonywano pomiaru absorbancji. Następnie próbki były naświetlane odpowiednim światłem przez 20 godzin przy użyciu

samodzielnie zbudowanego systemu LED, po czym odpowiednią ilość roztworu przenoszono możliwie jak najszybciej do kuwety i dokonywano pomiaru absorpcji.

5.2.3 Badanie stabilności fotochemicznej

Przygotowane próbki najpierw naświetlano światłem zielonym przez 5 minut, po czym przenoszono je możliwie jak najszybciej i odczytywano absorpcję. Następnie próbki były naświetlane światłem niebieskim przez 5 minut, po czym ponownie przenoszono je jak najszybciej i dokonywano pomiaru absorpcji. Następnie cały protokół powtarzano kilkakrotnie.

5.2.4 Badanie kinetyki izomeryzacji *Z/E*

Próbki przygotowano w rurkach NMR i naświetlano odpowiednią długością światła za pomocą matrycy LED przez 20 godzin. Następnie próbki pozostawiono i mierzono widma ^1H NMR lub ^{19}F NMR co godzinę przez 8–9 godzin.

5.3 Aspekty obliczeniowe i modelowanie molekularne

Optymalną geometrię stanu podstawowego izomeru *E* i *Z* związków **21j** oraz **29d** i **29h** wyznaczono przy użyciu teorii funkcjonału gęstości (DFT). W obliczeniach zastosowano funkcjonał B3LYP oraz bazę 6-31G*. Efekty środowiska rozpuszczalnika symulowano za pomocą modelu ciągłego (PCM; Gaussian 03W) [196]. Dla wszystkich badanych związków (izomerów *E* i *Z* związków **21j** oraz **29d** i **29h**) obliczono również molekularne orbitale HOMO i LUMO. Wszystkie obliczenia przeprowadzono na serwerze wyposażonym w procesor Intel XEON® E7310 (16 rdzeni quad-core) o taktowaniu 1,60 GHz, działającym pod systemem operacyjnym Open SUSE 10.3. Jako rozpuszczalnik zastosowano DMSO. Do uzyskania rozkładów różnicy gęstości elektronowej wykorzystano program Avogadro (wersja 1.2.0; <http://avogadro.cc/>).

5.3.1 Obliczone struktury

– Obliczone współrzędne atomowe izomeru *E* związku **21j** (fragment pliku log):

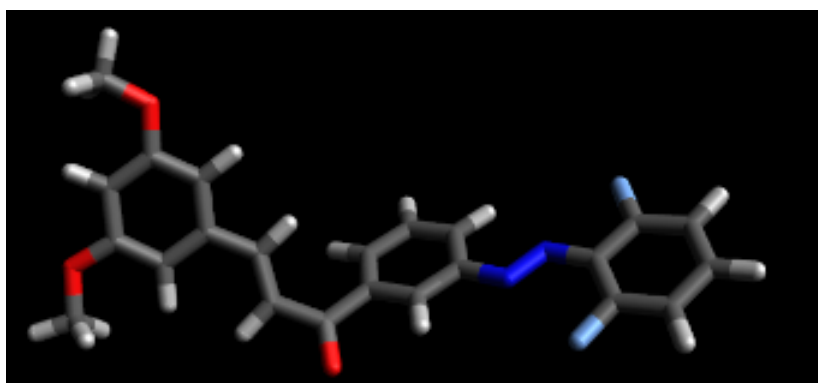
Standard orientation:

Center	Atomic	Atomic	Coordinates (Angstroms)		
Number	Number	Type	X	Y	Z

1	6	0	4.168835	-0.019217	-0.090935
2	6	0	4.441196	1.331001	-0.326114
3	6	0	5.762113	1.765705	-0.523160
4	6	0	6.809973	0.849722	-0.481709
5	6	0	6.533849	-0.510335	-0.240398
6	6	0	5.228369	-0.952738	-0.045552
7	6	0	2.768961	-0.405682	0.105620
8	6	0	2.278441	-1.654940	0.257951
9	6	0	0.846979	-2.006648	0.344411
10	6	0	-0.175972	-1.004719	0.800929
11	8	0	0.484121	-3.140070	0.024195
12	6	0	0.081715	-0.047066	1.792609
13	6	0	-0.932787	0.817067	2.223041
14	6	0	-2.202888	0.747432	1.665244
15	6	0	-2.473286	-0.214901	0.673724
16	6	0	-1.466818	-1.091762	0.262406
17	7	0	-3.729130	-0.390514	0.032763
18	7	0	-4.609254	0.437013	0.403598
19	6	0	-8.093392	1.370069	-0.368635
20	6	0	-6.791815	1.344849	0.108034
21	6	0	-5.880250	0.306530	-0.180582
22	6	0	-6.379272	-0.741715	-0.987477
23	6	0	-7.679229	-0.749237	-1.473070
24	6	0	-8.532809	0.311544	-1.164165
25	9	0	-5.593677	-1.784316	-1.291098
26	9	0	-6.369455	2.362549	0.874988
27	8	0	5.913931	3.100836	-0.746384
28	6	0	7.229967	3.605584	-0.950633
29	8	0	7.634409	-1.313992	-0.217236
30	6	0	7.451262	-2.705970	0.019729
31	1	0	3.640830	2.063744	-0.363445
32	1	0	7.843057	1.140725	-0.626596
33	1	0	5.021341	-1.997266	0.145796
34	1	0	2.067764	0.426034	0.097604
35	1	0	2.927217	-2.525886	0.200601
36	1	0	1.063345	0.007592	2.251891
37	1	0	-0.722187	1.545547	3.001170
38	1	0	-2.996349	1.415931	1.980413
39	1	0	-1.693677	-1.842283	-0.487408
40	1	0	-8.737377	2.204725	-0.113526
41	1	0	-8.004324	-1.585427	-2.083303
42	1	0	-9.549134	0.310937	-1.545925
43	1	0	7.116224	4.679659	-1.105925
44	1	0	7.866428	3.429081	-0.074514
45	1	0	7.697706	3.156705	-1.835830

46	1	0	8.449233	-3.146446	-0.008606
47	1	0	7.000407	-2.888812	1.003194
48	1	0	6.827846	-3.165776	-0.757316

Po uwzględnieniu poprawek modelu PCM, energia SCF wynosi -1422.05666789 jednostek atomowych (a.u.).



Rysunek 55. Wizualizacja obliczonej geometrii izomeru *E* cząsteczki **21j**.

– Obliczone współrzędne atomowe izomeru *Z* związku **21j** (fragment pliku log):

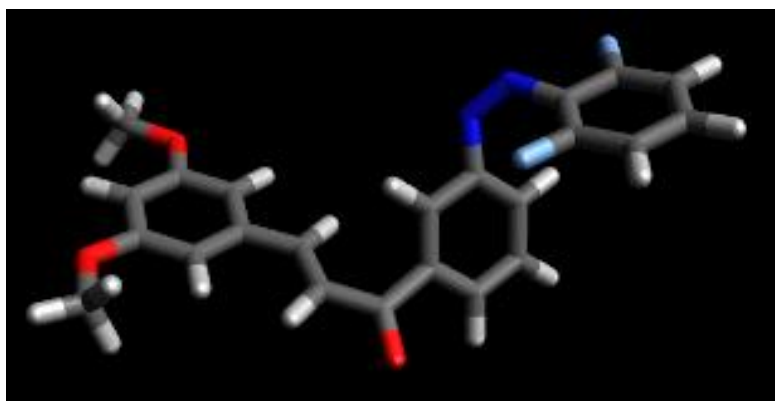
Standard orientation:

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z

1	6	0	3.492298	-0.146379	0.231375
2	6	0	3.770450	1.162755	0.633114
3	6	0	5.009685	1.750853	0.331299
4	6	0	5.968583	1.029712	-0.375282
5	6	0	5.685097	-0.288702	-0.782541
6	6	0	4.461127	-0.882347	-0.486891
7	6	0	2.180616	-0.699486	0.578483
8	6	0	1.739349	-1.956735	0.357037
9	6	0	0.449497	-2.504873	0.819464
10	6	0	-0.720730	-1.609054	1.119375
11	8	0	0.330680	-3.721374	0.974585
12	6	0	-1.601611	-1.994480	2.143632
13	6	0	-2.717176	-1.217286	2.444000
14	6	0	-3.009052	-0.079782	1.689682
15	6	0	-2.158907	0.283594	0.636959
16	6	0	-0.995812	-0.453410	0.381558
17	7	0	-2.325207	1.494086	-0.106973
18	7	0	-3.413663	1.857285	-0.604772
19	6	0	-5.753038	-0.949576	-1.537717

20	6	0	-4.579600	-0.250870	-1.291375
21	6	0	-4.568716	1.008256	-0.674405
22	6	0	-5.818070	1.558217	-0.355732
23	6	0	-7.011114	0.884217	-0.565751
24	6	0	-6.970262	-0.377088	-1.165084
25	9	0	-5.835211	2.777245	0.216397
26	9	0	-3.404901	-0.783124	-1.681994
27	8	0	5.176253	3.028589	0.772140
28	6	0	6.411406	3.681891	0.496392
29	8	0	6.693534	-0.895698	-1.469453
30	6	0	6.495250	-2.229587	-1.926281
31	1	0	3.038481	1.744827	1.184900
32	1	0	6.936132	1.443769	-0.631417
33	1	0	4.245918	-1.893512	-0.805918
34	1	0	1.520838	-0.003959	1.092843
35	1	0	2.384760	-2.710231	-0.088237
36	1	0	-1.385487	-2.896069	2.707521
37	1	0	-3.370113	-1.497132	3.265842
38	1	0	-3.872101	0.531588	1.931914
39	1	0	-0.344027	-0.134992	-0.425038
40	1	0	-5.699092	-1.919849	-2.020318
41	1	0	-7.945212	1.349289	-0.268889
42	1	0	-7.894808	-0.916214	-1.346067
43	1	0	6.325694	4.677609	0.934407
44	1	0	7.255310	3.152549	0.956187
45	1	0	6.583967	3.771914	-0.583394
46	1	0	7.416628	-2.507728	-2.440543
47	1	0	6.323093	-2.918153	-1.089595
48	1	0	5.653769	-2.291561	-2.627653

Po uwzględnieniu poprawek modelu PCM, energia SCF wynosi -1422.04005349 jednostek atomowych (a.u.).



Rysunek 56. Wizualizacja obliczonej geometrii izomeru Z cząsteczki 21j.

– Obliczone współrzędne atomowe izomeru *E* związku **29d** (fragment pliku log):

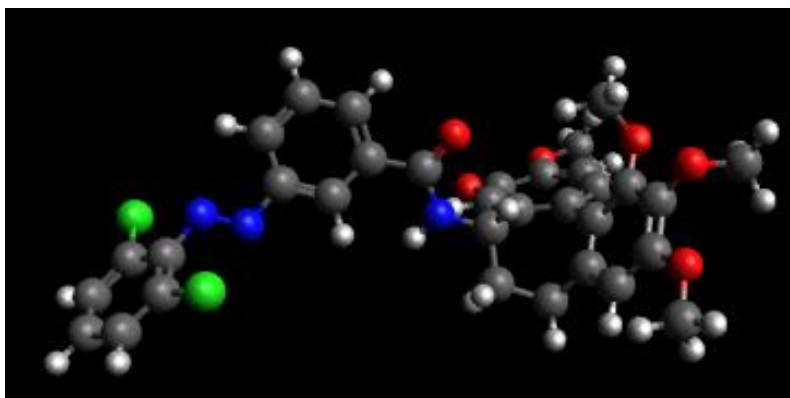
Standard orientation:

Center	Atomic	Atomic	Coordinates (Angstroms)		
Number	Number	Type	X	Y	Z

1	6	0	4.255221	-0.548630	-0.526022
2	6	0	5.127885	-0.965672	0.501649
3	6	0	5.587968	-2.284939	0.575503
4	6	0	5.201721	-3.217642	-0.405818
5	6	0	4.321535	-2.817979	-1.417054
6	6	0	3.845194	-1.504982	-1.478419
7	6	0	2.839201	-1.107660	-2.536743
8	6	0	1.430459	-0.888285	-1.939269
9	6	0	1.468091	-0.108943	-0.608063
10	6	0	2.370747	1.136724	-0.705592
11	6	0	3.788288	0.871733	-0.617433
12	6	0	1.755600	2.346869	-0.888440
13	6	0	2.198743	3.722626	-1.042166
14	6	0	3.626542	4.101722	-0.900944
15	6	0	4.697448	3.259820	-0.717459
16	6	0	4.764187	1.846276	-0.620308
17	8	0	3.760815	5.441073	-0.989463
18	6	0	5.050518	6.038020	-0.867257
19	8	0	1.360269	4.608285	-1.271645
20	7	0	0.111742	0.151327	-0.150800
21	8	0	5.723888	-4.467058	-0.273629
22	8	0	6.372274	-2.685087	1.631756
23	8	0	5.557450	-0.073704	1.459074
24	6	0	4.779150	-0.099785	2.664707
25	6	0	7.774611	-2.471907	1.434109
26	6	0	5.375089	-5.445735	-1.247574
27	6	0	-0.159992	0.296637	1.180264
28	6	0	-8.258610	0.301956	-0.470646
29	6	0	-9.337918	-0.145943	-1.224108
30	6	0	-9.370126	-1.476821	-1.638590
31	6	0	-8.332738	-2.344355	-1.303478
32	6	0	-7.245060	-1.877035	-0.566761
33	6	0	-7.176828	-0.535980	-0.136145
34	7	0	-6.171407	0.003123	0.704592
35	17	0	-8.223945	1.981687	0.037861
36	17	0	-6.012803	-3.045481	-0.120080
37	7	0	-4.992113	-0.243957	0.345836
38	6	0	-3.990798	0.258437	1.220224

39	6	0	-2.675228	0.060588	0.784835
40	6	0	-1.600103	0.503391	1.561632
41	6	0	-1.861036	1.131097	2.786873
42	6	0	-3.174215	1.337567	3.217139
43	6	0	-4.244094	0.904660	2.441313
44	8	0	0.722925	0.253792	2.038780
45	1	0	3.996777	-3.525526	-2.171913
46	1	0	-0.610154	0.330060	-0.838019
47	1	0	2.781020	-1.876062	-3.314388
48	1	0	0.812275	-0.346647	-2.668794
49	1	0	0.945292	-1.853668	-1.749897
50	1	0	1.909995	-0.752504	0.155168
51	1	0	0.669796	2.321332	-0.930563
52	1	0	5.672018	3.733262	-0.657511
53	1	0	5.780159	1.475999	-0.528157
54	1	0	4.883230	7.112283	-0.956591
55	1	0	5.501654	5.816225	0.107226
56	1	0	5.721725	5.704068	-1.667482
57	1	0	3.166595	-0.183711	-3.028749
58	1	0	5.193438	0.676610	3.312083
59	1	0	3.724762	0.119584	2.454389
60	1	0	4.865742	-1.074232	3.157733
61	1	0	8.270387	-2.832000	2.338845
62	1	0	8.138352	-3.039882	0.569390
63	1	0	7.992117	-1.406429	1.297483
64	1	0	5.907255	-6.353611	-0.958710
65	1	0	4.295615	-5.642029	-1.250050
66	1	0	5.691304	-5.142119	-2.253389
67	1	0	-10.139444	0.539404	-1.478126
68	1	0	-10.212273	-1.842113	-2.218460
69	1	0	-8.361219	-3.385399	-1.607174
70	1	0	-2.530092	-0.466862	-0.153373
71	1	0	-1.019594	1.449087	3.393598
72	1	0	-3.359077	1.833679	4.165788
73	1	0	-5.270179	1.048858	2.761227

Po uwzględnieniu poprawek modelu PCM, energia SCF wynosi -2810.86093841 jednostek atomowych (a.u.).



Rysunek 57. Wizualizacja obliczonej geometrii izomeru *E* cząsteczki **29d**.

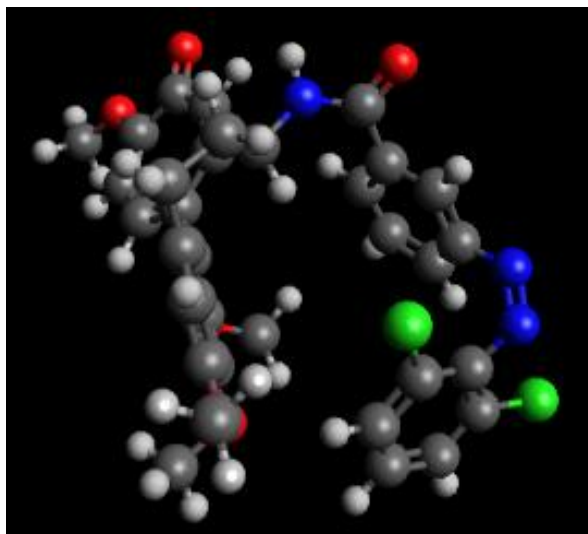
– Obliczone współrzędne atomowe izomeru *Z* związku **29d** (fragment pliku log):

Standard orientation:

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	1.723365	1.591513	0.443843
2	6	0	0.839119	2.153578	-0.507424
3	6	0	-0.244020	2.945182	-0.104678
4	6	0	-0.465795	3.193513	1.262380
5	6	0	0.420958	2.669363	2.206206
6	6	0	1.506096	1.885448	1.805731
7	6	0	2.450254	1.310423	2.836022
8	6	0	2.247640	-0.205132	3.021337
9	6	0	2.036949	-0.971429	1.690812
10	6	0	3.077046	-0.560555	0.627380
11	6	0	2.886532	0.743169	0.023932
12	6	0	4.081691	-1.457525	0.369334
13	6	0	5.257315	-1.492968	-0.486858
14	6	0	5.585586	-0.381449	-1.411435
15	6	0	4.893641	0.795269	-1.569617
16	6	0	3.722571	1.280750	-0.933874
17	8	0	6.700531	-0.671749	-2.110822
18	6	0	7.203675	0.258773	-3.068421
19	8	0	6.002430	-2.484180	-0.447280
20	7	0	2.003060	-2.402841	1.999723
21	8	0	-1.559648	3.952188	1.552028
22	8	0	-1.117036	3.441447	-1.046568
23	8	0	1.069937	1.968830	-1.849354
24	6	0	0.125869	1.138480	-2.540155
25	6	0	-0.882834	4.810090	-1.403588
26	6	0	-1.834846	4.239881	2.920965
27	6	0	0.935288	-3.253127	1.869957

28	6	0	-4.995274	-0.649437	-1.602539
29	6	0	-4.915682	0.582434	-2.243884
30	6	0	-4.270385	1.640703	-1.604084
31	6	0	-3.722489	1.471919	-0.333586
32	6	0	-3.806254	0.227810	0.288479
33	6	0	-4.416031	-0.868389	-0.344049
34	7	0	-4.674722	-2.109938	0.345151
35	17	0	-5.792249	-1.992469	-2.410002
36	17	0	-3.157907	0.057480	1.912409
37	7	0	-3.780891	-2.931810	0.630042
38	6	0	-2.423283	-2.799019	0.190639
39	6	0	-1.440203	-3.054513	1.150924
40	6	0	-0.089307	-2.949715	0.811545
41	6	0	0.272382	-2.693938	-0.518601
42	6	0	-0.715213	-2.546021	-1.494950
43	6	0	-2.064620	-2.574097	-1.146554
44	8	0	0.828748	-4.260600	2.568092
45	1	0	0.281156	2.868179	3.262924
46	1	0	2.631648	-2.708883	2.740883
47	1	0	2.311955	1.809167	3.800901
48	1	0	3.119292	-0.625168	3.541518
49	1	0	1.370369	-0.396122	3.651385
50	1	0	1.051929	-0.703529	1.302145
51	1	0	4.023328	-2.393798	0.917187
52	1	0	5.299247	1.494588	-2.293465
53	1	0	3.439153	2.269062	-1.279782
54	1	0	8.091886	-0.211899	-3.491944
55	1	0	6.472272	0.446140	-3.863460
56	1	0	7.481736	1.206843	-2.593089
57	1	0	3.485482	1.500166	2.527809
58	1	0	0.485718	1.068153	-3.569211
59	1	0	0.096373	0.137430	-2.094592
60	1	0	-0.873848	1.579913	-2.523432
61	1	0	-1.626787	5.058900	-2.163876
62	1	0	-1.010743	5.468073	-0.537325
63	1	0	0.123211	4.934397	-1.821454
64	1	0	-2.741037	4.847401	2.918714
65	1	0	-2.011526	3.320847	3.492395
66	1	0	-1.016256	4.805916	3.381848
67	1	0	-5.350495	0.704652	-3.230409
68	1	0	-4.197184	2.606084	-2.094397
69	1	0	-3.222701	2.294544	0.165279
70	1	0	-1.732585	-3.304139	2.165860
71	1	0	1.321659	-2.650086	-0.794684
72	1	0	-0.432625	-2.408437	-2.534795
73	1	0	-2.828267	-2.464847	-1.908162

Po uwzględnieniu poprawek modelu PCM, energia SCF wynosi -2810.84066236 jednostek atomowych (a.u.).



Rysunek 58. Wizualizacja obliczonej geometrii izomeru *Z* cząsteczki **29d**.

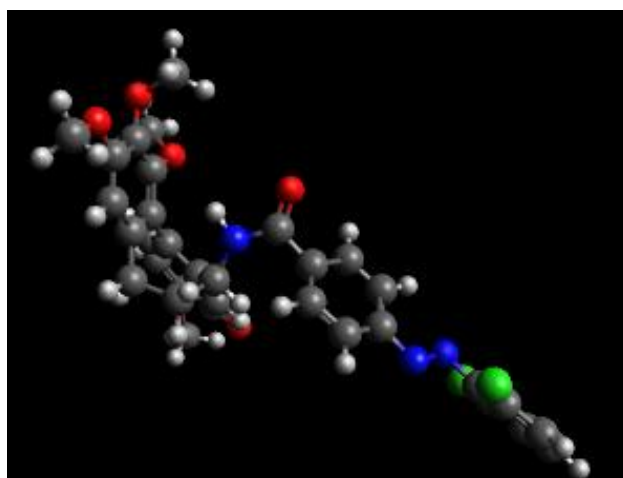
– Obliczone współrzędne atomowe izomeru *E* związku **29h** (fragment pliku log):

Standard orientation:					
Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	-4.323056	0.025850	-0.404283
2	6	0	-5.025627	-0.387222	0.754515
3	6	0	-5.760782	-1.581436	0.755177
4	6	0	-5.840295	-2.359579	-0.417699
5	6	0	-5.144548	-1.956404	-1.560816
6	6	0	-4.380146	-0.786388	-1.553981
7	6	0	-3.569778	-0.395270	-2.766789
8	6	0	-2.054825	-0.593906	-2.548914
9	6	0	-1.500854	-0.067133	-1.197777
10	6	0	-2.135090	1.275034	-0.774323
11	6	0	-3.532500	1.299424	-0.411540
12	6	0	-1.264691	2.339699	-0.788165
13	6	0	-1.338658	3.755318	-0.449860
14	6	0	-2.633733	4.426890	-0.241172
15	6	0	-3.849586	3.809145	-0.053738
16	6	0	-4.230795	2.449556	-0.096452
17	8	0	-2.672146	5.771230	-0.097479
18	6	0	-1.794723	6.637547	-0.841780
19	8	0	-0.280491	4.403547	-0.359568
20	7	0	-1.567980	-1.079607	-0.130585

21	8	0	-6.591745	-3.488354	-0.321852
22	8	0	-6.409874	-1.991492	1.896800
23	8	0	-4.881077	0.349807	1.901507
24	6	0	-6.071555	0.854531	2.524785
25	6	0	-5.704990	-2.998530	2.637477
26	6	0	-6.674569	-4.341193	-1.461108
27	6	0	-0.600665	-1.404041	0.784379
28	6	0	7.830502	-1.498085	-0.321561
29	6	0	9.211074	-1.419964	-0.500671
30	6	0	9.892046	-0.253558	-0.159091
31	6	0	9.203745	0.831818	0.381342
32	6	0	7.830700	0.733025	0.576760
33	6	0	7.101428	-0.417303	0.216764
34	7	0	5.721359	-0.442184	0.538001
35	17	0	7.055354	-3.025863	-0.706261
36	17	0	6.974319	2.109084	1.250405
37	7	0	4.972913	-0.872205	-0.376518
38	6	0	3.597996	-0.948927	-0.027418
39	6	0	2.755449	-1.432002	-1.035482
40	6	0	1.386075	-1.549498	-0.806428
41	6	0	0.847784	-1.188698	0.436018
42	6	0	1.704404	-0.725093	1.450819
43	6	0	3.065665	-0.591175	1.224294
44	8	0	-0.896968	-1.926626	1.859777
45	1	0	-5.182443	-2.551492	-2.466301
46	1	0	-3.881961	-0.980497	-3.638092
47	1	0	-3.759382	0.657293	-3.010918
48	1	0	-1.804320	-1.659537	-2.612394
49	1	0	-1.519464	-0.085779	-3.360693
50	1	0	-0.439696	0.121318	-1.347886
51	1	0	-0.233909	2.105467	-1.047347
52	1	0	-4.659210	4.505149	0.155564
53	1	0	-5.286656	2.299464	0.107734
54	1	0	-2.294024	7.609021	-0.831063
55	1	0	-0.812461	6.698559	-0.376324
56	1	0	-1.688582	6.293750	-1.875006
57	1	0	-2.494355	-1.303986	0.216014
58	1	0	-5.726787	1.503809	3.332433
59	1	0	-6.662371	1.445870	1.813651
60	1	0	-6.686114	0.046296	2.924687
61	1	0	-6.294192	-3.182416	3.538747
62	1	0	-5.623973	-3.923794	2.057290
63	1	0	-4.705134	-2.645653	2.917257
64	1	0	-7.310520	-5.174925	-1.159783
65	1	0	-7.130388	-3.824119	-2.314239
66	1	0	-5.686535	-4.720282	-1.749467

67	1	0	9.743888	-2.274463	-0.904028
68	1	0	10.966062	-0.193391	-0.306656
69	1	0	9.722326	1.745306	0.652063
70	1	0	3.192449	-1.717587	-1.987492
71	1	0	0.743146	-1.948108	-1.585545
72	1	0	1.281807	-0.477969	2.419662
73	1	0	3.730322	-0.223568	1.998219

Po uwzględnieniu poprawek modelu PCM, energia SCF wynosi -2810.84381735 jednostek atomowych (a.u.).



Rysunek 59. Wizualizacja obliczonej geometrii izomeru *E* cząsteczki **29h**.

– Obliczone współrzędne atomowe izomeru *Z* związku **29h** (fragment pliku log):

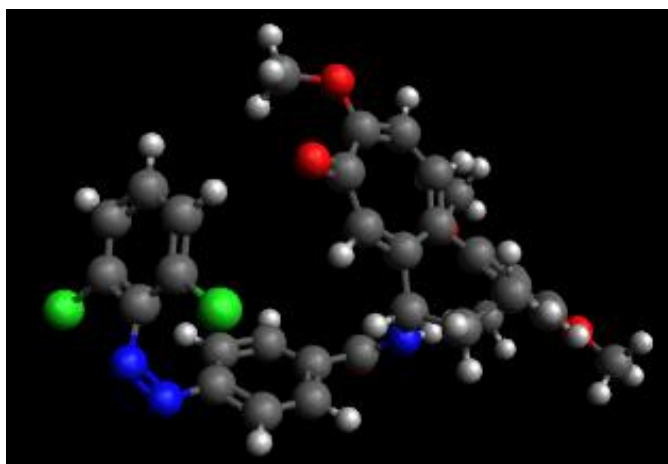
Standard orientation:

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	-3.507530	0.670699	-0.336840
2	6	0	-4.216169	0.528465	0.882540
3	6	0	-5.401459	-0.218186	0.936031
4	6	0	-5.926028	-0.795410	-0.238198
5	6	0	-5.227702	-0.660910	-1.441153
6	6	0	-4.022522	0.045862	-1.490530
7	6	0	-3.225799	0.095619	-2.773094
8	6	0	-1.962957	-0.789568	-2.708923
9	6	0	-1.115789	-0.629462	-1.417778
10	6	0	-1.043180	0.840215	-0.949062
11	6	0	-2.229468	1.450309	-0.398458
12	6	0	0.177438	1.439316	-1.164816

13	6	0	0.723955	2.777849	-0.995766
14	6	0	0.028515	3.788746	-0.181286
15	6	0	-1.290480	3.744563	0.213338
16	6	0	-2.280222	2.747580	0.076875
17	8	0	0.650418	4.950869	0.121805
18	6	0	2.066659	5.014098	0.366342
19	8	0	1.811537	3.059234	-1.536918
20	7	0	-1.551345	-1.557499	-0.360666
21	8	0	-7.088731	-1.482045	-0.084756
22	8	0	-6.053211	-0.393590	2.134934
23	8	0	-3.656948	1.035842	2.026252
24	6	0	-4.436344	1.960258	2.799288
25	6	0	-5.765379	-1.649504	2.767920
26	6	0	-7.647598	-2.124997	-1.227775
27	6	0	-0.772250	-2.153602	0.597988
28	6	0	5.961440	-0.187880	1.198943
29	6	0	5.846967	1.157547	1.531858
30	6	0	5.172108	2.016709	0.664280
31	6	0	4.631112	1.539109	-0.528189
32	6	0	4.765553	0.189033	-0.847122
33	6	0	5.398999	-0.711916	0.024934
34	7	0	5.686062	-2.079451	-0.333608
35	17	0	6.779242	-1.281908	2.305317
36	17	0	4.155438	-0.363664	-2.398836
37	7	0	4.799479	-2.949180	-0.460895
38	6	0	3.422748	-2.712083	-0.150808
39	6	0	2.492099	-3.187173	-1.083434
40	6	0	1.133723	-2.974366	-0.872640
41	6	0	0.689168	-2.355017	0.304697
42	6	0	1.622519	-1.993524	1.285046
43	6	0	2.986197	-2.145827	1.055920
44	8	0	-1.257432	-2.555879	1.655051
45	1	0	-5.604259	-1.115503	-2.350512
46	1	0	-3.843780	-0.228968	-3.616810
47	1	0	-2.925701	1.129582	-2.982892
48	1	0	-2.235906	-1.847995	-2.796020
49	1	0	-1.327398	-0.547148	-3.569412
50	1	0	-0.100382	-0.930242	-1.667619
51	1	0	0.935257	0.814523	-1.634573
52	1	0	-1.621778	4.654342	0.709889
53	1	0	-3.253987	3.064725	0.436471
54	1	0	2.206194	5.934751	0.937292
55	1	0	2.399134	4.160494	0.964811
56	1	0	2.626842	5.046153	-0.566883
57	1	0	-2.513031	-1.466160	-0.052763
58	1	0	-3.774050	2.307423	3.595246

59	1	0	-4.744717	2.817489	2.186945
60	1	0	-5.319549	1.480559	3.224194
61	1	0	-6.274692	-1.628501	3.734104
62	1	0	-6.149134	-2.482847	2.169509
63	1	0	-4.686100	-1.768021	2.921497
64	1	0	-8.562122	-2.606081	-0.877691
65	1	0	-7.894186	-1.399769	-2.012713
66	1	0	-6.967131	-2.884138	-1.632540
67	1	0	6.274588	1.520795	2.460433
68	1	0	5.075602	3.068002	0.917507
69	1	0	4.080968	2.192263	-1.196791
70	1	0	2.847417	-3.683487	-1.981272
71	1	0	0.414807	-3.311323	-1.614283
72	1	0	1.271422	-1.575236	2.223299
73	1	0	3.701739	-1.852810	1.815878

Po uwzględnieniu poprawek modelu PCM, energia SCF wynosi -2810.82980500 jednostek atomowych (a.u.).



Rysunek 60. Wizualizacja obliczonej geometrii izomeru *Z* cząsteczki **29h**.

5.3.2 Orbitale molekularne

– Orbitale molekularne dla izomeru *E* związku **21j**:

Orbital HOMO (-6,051 eV), orbital LUMO (-2.552 eV).

– Orbitale molekularne dla izomeru *Z* związku **21j**:

Orbital HOMO (-6,054 eV), orbital LUMO (-2.433 eV).

– Orbitale molekularne dla izomeru *E* związku **29d**:

Orbital HOMO (−5,54 eV), orbital LUMO (−2.591 eV).

– Orbitale molekularne dla izomeru *Z* związku **29d**:

Orbital HOMO (−5,611 eV), orbital LUMO (−2.418 eV).

– Orbitale molekularne dla izomeru *E* związku **29h**:

Orbital HOMO (−5,68 eV), orbital LUMO (−2.658 eV).

– Orbitale molekularne dla izomeru *Z* związku **29h**:

Orbital HOMO (−5,675 eV), orbital LUMO (−2.48 eV).

5.3.3 Dokowanie molekularne

Dokowanie molekularne związków **4a**, **4f** oraz izomerów *E* i *Z* związków **9a–c**, **9e–f**, **14b**, **16a–b**, **21b**, **21d**, **21f**, **21h**, **21j**, **21l**, **29d**, **29h** do trójwymiarowej struktury krystalograficznej tubuliny (PDB: 1SA0) [205] zostało przeprowadzone z wykorzystaniem oprogramowania AutoDock Vina, stosującego metodę Broydena–Fletcher–Goldfarba–Shanno (BFGS) [204]. Konfiguracje kompleksów białko/metoksydibenzo[*b,f*]oksepina, białko/chalkon oraz białko/kolchicina zostały przygotowane przy użyciu programu UCSF Chimera [206]. Interfejs graficzny AutoDock Tools (ADT) posłużył do przygotowania enzymu — dodano wszystkie atomy wodoru, a dla makrocząsteczek zapisano pliki pdbqt. Trójwymiarowe struktury ligandów zostały zbudowane, zoptymalizowane metodą DFT (funkcjonał B3LYP, baza 6-31G*), oddzielnie dla izomerów *E* i *Z*, i zapisane w formacie Mol2. Przygotowanie ligandów oraz ich zapis w formacie pdbqt również przeprowadzono z wykorzystaniem interfejsu ADT. Do wszystkich obliczeń dokowania użyto programu AutoDock Vina. Pliki wejściowe do dokowania wygenerowano w AutoDockTools. Ustalono rozmiar siatki (ang. *grid box*) na 21 × 21 × 21 punktów w kierunkach x, y, z, a jej środek zlokalizowano w miejscu aktywnym białka na współrzędnych (39,82, 53,24, −8,21). Odstęp siatki wynosił 0,375 Å, co odpowiada w przybliżeniu jednej czwartej długości wiązania kowalencyjnego C-C. Wszystkie obliczenia przeprowadzono na procesorze Intel® Core™ i7-4702MQ 3.2 GHz z systemem operacyjnym Ubuntu 18.04 (dystrybucja Linux — Workstation). Do analizy wyników dokowania wykorzystano oprogramowanie PyMOL (www.pymol.org/) [207]. W celu przewidzenia możliwych interakcji pomiędzy białkiem a ligandem zastosowano również narzędzie Protein–Ligand Interaction Profiler (PLIP) [208].

5.4 Badania biologiczne

Analiza proliferacji komórkowej oraz cyklu komórkowego związku **21j** została przeprowadzona we współpracy z dr. inż. Damianem Mieleckim z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego oraz z dr hab. Anną Stachurską-Skrodzką z Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego. Analiza proliferacji komórkowej związków **29d** oraz **29h** została przeprowadzona we współpracy z dr. Igorem Żukowem oraz Behnaz Mirzaei-Behbahani z Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk.

5.4.1 Analiza proliferacji komórkowej

Związek **21j**:

Ludzka linia komórkowa raka prostaty PC-3 (ATCC, USA, CRL-1435), wyizolowana z przerzutów do kości, była rutynowo hodowana w pożywce Ham F-12K (Kaighn) (ThermoFisher, USA, 21127-022), uzupełnionej o 10% surowicę płodową cielęcą inaktywowaną termicznie (Biowest, Francja, S181B) oraz 1% roztwór antybiotyków (Biowest, Francja, L0022), w atmosferze nawilżonej zawierającej 5% CO₂, w temperaturze 37°C. Komórki były wykorzystywane pomiędzy 9 a 21 pasażem. Płytki 96-dołkowe były przygotowywane poprzez wysiewanie 5×10^3 lub $2,5 \times 10^3$ komórek na dołek, odpowiednio dla 24- i 48-godzinnych traktowań, z co najmniej pięcioma powtórzeniami technicznymi i dwoma biologicznymi. Po 24 godzinach pożywka była wymieniana na pożywkę bez surowicy, w której FBS zastąpiono buforem fosforanowym PBS bez jonów Mg²⁺ i Ca²⁺ (Biowest, Francja, L0615), uzupełnionym o wybrane stężenia związku **21j** w zakresie od 0,1 do 40 µM (pożywka w grupie kontrolnej zawierała 0,5% DMSO). Komórki były traktowane izomerem *E* lub *Z* związku **21j**, przy ciągłym oświetleniu światłem o długości fali 525 nm. Proliferacja komórek była analizowana za pomocą testu CellTiter Aqueous One Solution Cell Proliferation MTS (Promega, USA, G5430) po 24 lub 48 godzinach traktowania. Wartości absorbancji przy 490 i 670 nm były mierzone za pomocą czytnika płytek FLUOStar Omega (BMG LABTECH GmbH, Niemcy). Dodatkowo, aktywność kolchicyny wobec komórek PC-3 była oceniana w zakresie stężeń 1–200 µM, w podobnych warunkach eksperymentalnych.

Związki **29d** i **29h**:

Komórki hodowano w inkubatorze z kontrolowaną wilgotnością w temperaturze 37°C i atmosferze zawierającej 5% CO₂. Ludzkie embrionalne komórki nerkowe (HEK-293)

utrzymywano w zmodyfikowanym podłożu Eagle’a (DMEM) (Thermo Fisher Scientific, USA), uzupełnionym o 10% surowicę płodową bydlęcą (Gibco, Billings, USA, 10270-106) oraz 1% penicylinę-streptomycynę (Sigma-Aldrich, USA, P4333). Komórki ludzkiego raka prostaty (LNCaP — rak węzłów chłonnych prostaty) utrzymywano w podłożu RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific, USA, 16-40-3187-0025), uzupełnionym o 1% L-glutaminy, 10% surowicy płodowej bydlęcej i 1% penicyliny-streptomycyny. Komórki były pasażowane przy osiągnięciu konfluencji na poziomie około 70–90%, aby utrzymać je w fazie logarytmicznego wzrostu.

Komórki wysiewano do płytek 96-dołkowych w gęstości 7×10^3 komórek na dołek w 200 μ L pełnego podłoża hodowlanego i inkubowano przez 24 h w temperaturze 37°C w inkubatorze z kontrolowaną wilgotnością i 5% CO₂. Po inkubacji usuwano podłoże i zastępowano je świeżym podłożem (200 μ L) zawierającym różne stężenia badanych związków. Grupy kontrolne traktowano w ten sam sposób, jednak otrzymywały jedynie podłoże hodowlane bez dodatku związków. Komórki ekspozowano na działanie związków przez kolejne 24 h. Następnie usuwano podłoże, a do każdego dołka dodawano 100 μ L roztworu MTT (0,5 mg/mL). Płytki inkubowano przez 4 h w temperaturze 37°C, aby umożliwić powstanie kryształów formazanu. Po inkubacji delikatnie usuwano roztwór MTT, a powstałe kryształy formazanu rozpuszczano poprzez dodanie 100 μ L DMSO do każdego dołka, po czym inkubowano przez 10 min w temperaturze 37°C w celu całkowitego rozpuszczenia. Absorbancję każdego dołka mierzono przy długości fali 540 nm za pomocą czytnika mikropłytek.

5.4.2 Analiza cyklu komórkowego

Komórki PC-3 były traktowane zgodnie z wcześniej opisanym protokołem, z wyjątkiem tego, że do dołków płytek 6-dołkowych wysiewano $0,15 \times 10^6$ komórek na dołek. Po 24 godzinach traktowania komórki zostały zebrane poprzez trypsynizację (Biowest, Francja, L0931), dwukrotnie przemyte, zawieszone w PBS i dodane do zimnego 70% etanolu w celu utrwalenia przez noc w –20°C. Następnie komórki odwirowano i zawieszono w PBS zawierającym 5 μ g/mL jodku propidyny w PBS (Sigma-Aldrich, USA, 4170), 0,1% Triton X-100 oraz 10 μ g/mL RNAzy wolnej od DNAzy (A&A Biotechnology, Polska, 1006-10), inkubując w ciemności przez 4 godziny w temperaturze 37°C. Analiza FACS została przeprowadzona za pomocą cytometru przepływowego FACSCanto II oraz oprogramowania FACSDiva (BD Biosciences). Prędkość przepływu ustawiono na około 1000 zdarzeń/komórek na sekundę. Zarejestrowano sygnały z 10 000 zdarzeń na próbkę. Procentowe udziały komórek PC-3 w

fazach cyklu komórkowego (G0/G1, S, G2/M) określono za pomocą oprogramowania ModFit LT 4.1.7 (Verity Software House).

5.4.3 Analiza statystyczna

Związek **21j**:

Analizy statystyczne zostały przeprowadzone w ramach projektu R 4.2.2 [209]. W przypadku testu MTS oceniającego proliferację komórek, przed dopasowaniem do modelu odpowiedzi na dawkę, wartości OD₄₉₀ zostały znormalizowane poprzez: 1) odjęcie wartości OD₆₇₀, 2) odjęcie średniej wartości OD₄₉₀ dla kontroli negatywnej (MTS inkubowany z pożywką wzrostową), oraz 3) podzielenie przez średnią wartość OD₄₉₀ dla kontroli pozytywnej (komórki hodowane w obecności 0,5% DMSO). Do dopasowania danych dotyczących proliferacji komórek zastosowano czteroparametrowy model logistyczny (4PL) w skali log-log, z dolnym ograniczeniem ustawionym na 0 i dopasowaniem grupowym, dostępny w pakiecie drc [210]. Reszty modelu były sprawdzane pod kątem normalności za pomocą wykresów QQ i wykresów gęstości. Metryki oceny jakości dopasowania modelu zostały obliczone za pomocą funkcji dostępnych w pakiecie drc oraz niestandardowych funkcji użytkownika. Gdy było to stosowne, do oszacowania błędu tendencji centralnej zastosowano metodę delty. W celu oceny jakości dopasowania dla każdego z powtórzeń biologicznych zastosowano: odległość Cooka, średni absolutny błąd skalowany (MASE), współczynnik dewiacji R^2 (DR^2) oraz test dopasowania Neilla [211]. Wartość DR^2 została obliczona zgodnie ze wzorem: $1 - (D_{res}/D_{null})$, gdzie D_{res} to dewiacja resztkowa, a D_{null} to dewiacja modelu zerowego (modelu, w którym przewidywaną wartością jest średnia). Różnice w procentowym udziale faz cyklu komórkowego oceniano za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem post hoc Tukeya [212]. Wszystkie wykresy zostały przygotowane przy użyciu pakietu ggplot2 w wersji 3.5.1 [213].

Związki **29d** i **29h**:

Wszystkie testy MTT przeprowadzono niezależnie dwukrotnie, w każdym przypadku z pięcioma powtórzeniami dla każdej badanej grupy. Dane przedstawiono jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe (SD) i wyrażono w procentach względem nieleczonych komórek kontrolnych. Istotność statystyczną określono za pomocą nieparzystego testu *t*-Studenta. * $p < 0,01$ oznacza istotną różnicę pomiędzy badanymi związkami a nieleczoną grupą kontrolną, natomiast # $p < 0,01$ oznacza istotną różnicę pomiędzy kolhicyną a nieleczoną grupą kontrolną.

5.5 Otrzymywanie pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny

5.5.1 Otrzymywanie metoksyłowych pochodnych 3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepiny **1a–e**

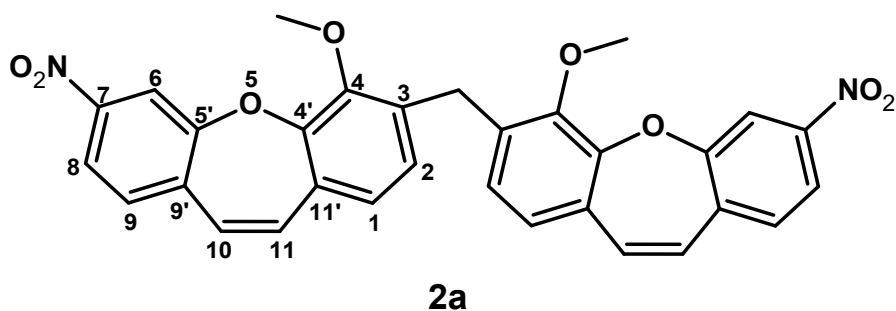
6-metoksy-3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepina **1a**, 7-metoksy-3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepina **1b**, 2-metoksy-7-nitrodibenzo[*b,f*]oksepina **1c**, 1-metoksy-7-nitrodibenzo[*b,f*]oksepina **1d** oraz 2,3-dimetoksy-7-nitrodibenzo[*b,f*]oksepina **1e** zostały otrzymane według procedury opracowanej w ramach dyplomu magisterskiego [214].

5.5.2 Otrzymywanie oligomerycznych połączeń metoksyłowych pochodnych 3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepiny z łącznikiem metylenowym **2a, 2c–e**

Przykładowa synteza:

W kolbie Schlenka o pojemności 25 mL umieszczono element mieszający oraz 1 mmol odpowiedniej metoksyłowej pochodnej 3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepiny **1a–e**. Do układu dodano następnie 1 mmol paraformaldehydu, po czym całość rozpuszczono w ok. 15 mL chlorku metylenu. Początkowo mieszający się roztwór przepłukiwano argonem przez 30 minut. Po tym czasie do układu dodano ok. 0,3 mL BF₃·Et₂O. Roztwór przyjął barwę żółtozieloną. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej oraz w atmosferze argonu. Przebieg reakcji badano za pomocą analizy położenia plamek na płytkach do chromatografii cienkowarstwowej z użyciem chlorku metylenu jako eluenta. Po zakończeniu reakcji mieszaninę poreakcyjną przelano do 20 mL metanolu. Całość mieszało przez następne 5 minut, po czym ekstrahowano 2× z 20 mL wody, a następnie 2× z 30 mL chlorku metylenu. Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym MgSO₄, po czym rozpuszczalnik odparowano na wyparce obrotowej. Powstały osad rozpuszczono w niewielkiej ilości chlorku metylenu i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z użyciem chlorku metylenu jako eluenta, otrzymując osady związków **2a, 2c–e**.

Związek 2a:



Rysunek 61. Schemat struktury związku 2a wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 3 h

Wydajność: 80%

Postać: żółty osad

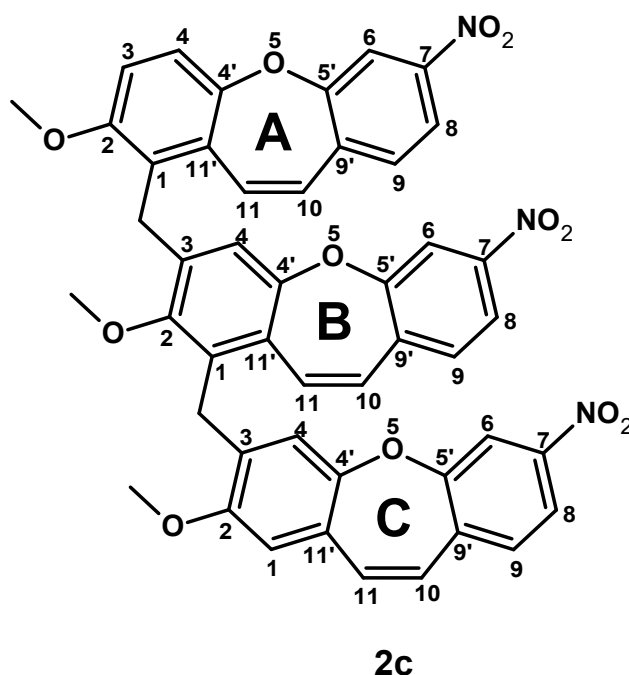
Temp. topnienia: rozkład powyżej 123°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 8,19 (2H, d, ⁴J_{H6,H8} = 2,5 Hz, H₆), 8,01 (2H, dd, ³J_{H8,H9} = 8,5 Hz, H₈), 7,32 (2H, d, H₉), 6,98 (2H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₁), 6,89 (2H, d, ³J_{H1,H2} = 8,5 Hz, H₁), 6,83 (2H, układ spinowy AB, d, H₁₀), 6,67 (2H, d, H₂), 3,96 (2H, s, CH₂), 3,94 (6H, s, OCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 157,4 (C5'), 150,5 (C4), 148,5 (C7), 145,8 (C4'), 137,5 (C9'), 130,5 (C11), 129,4 (C3), 129,2 (C11'), 128,9 (C9), 128,7 (C10), 126,6 (C2), 120,1 (C8), 117,5 (C6), 112,0 (C1), 56,2 (OCH₃), 35,4 (CH₂).

HRMS (ESI): C₃₁H₂₂N₂O₈Na, obliczono *m/z*: 573,1274; znaleziono *m/z*: 573,1277.

Związek 2c:



Rysunek 62. Schemat struktury związku 2c wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 2 h

Wydajność: 54%

Postać: ciemnożółty osad

Temp. topnienia: rozkład powyżej 295°C

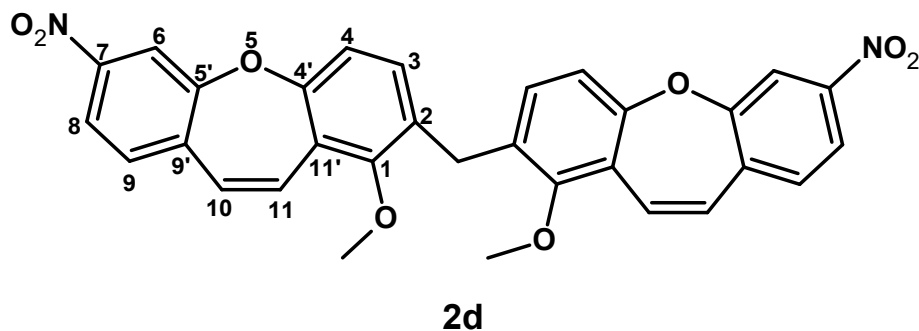
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): pierścień A: 8,08 (1H, d, ⁴J_{H6,H8} = 2,5 Hz, H₆), 8,01 (1H, dd, ³J_{H8,H9} = 8,5 Hz, H₈), 7,27 (1H, d, H₉), 7,24 (1H, d, ³J_{H3,H4} = 8,5 Hz, H₄), 6,99 (1H, d, H₃), 6,92 (1H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₁), 6,72 (1H, układ spinowy AB, d, H₁₀), 3,79 (3H, s, OCH₃); **pierścień B:** 7,95 (1H, dd, ³J_{H8,H9} = 8,5 Hz, ⁴J_{H6,H8} = 2,5 Hz, H₈), 7,93 (1H, d, H₆), 7,26 (1H, d, H₉), 6,93 (1H, s, H₄), 6,84 (1H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₁), 6,70 (1H, układ spinowy AB, d, H₁₀), 3,84 (3H, s, OCH₃); **pierścień C:** 7,93 (1H, dd, ³J_{H8,H9} = 8,5 Hz, ⁴J_{H6,H8} = 2 Hz, H₈), 7,80 (1H, d, H₆), 7,24 (1H, d, H₉), 6,81 (1H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₁), 6,67 (1H, układ spinowy AB, d, H₁₀), 6,64 (1H, s, H₁), 6,51 (1H, s, H₄), 3,89 (3H, s, OCH₃), 4,02 (4H, s, CH₂).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 157,9, 157,2, 157,2, 155,4, 154,9, 154,8, 154,5, 151,9, 150,3, 150,1, 148,5, 148,4, 137,4, 137,3, 137,3, 133,7, 133,6, 131,6, 131,5, 131,3, 129,8,

129,5, 129,4, 129,3, 128,5, 128,1, 127,9, 127,6, 126,0, 123,1, 122,2, 121,4, 120,1, 120,0, 119,9, 116,9, 116,7, 115,9, 114,2, 112,6, 110,7, 110,2, 56,2, 55,9, 55,8, 25,6, 25,6.

HRMS (ESI): C₄₇H₃₂N₃O₁₂, obliczono *m/z*: 830,19859, znaleziono *m/z*: 830,19805.

Związek **2d**:



Rysunek 63. Schemat struktury związku 2d wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 2,5 h

Wydajność: 65%

Postać: jasnożółty osad

Temp. topnienia: 263,5°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 7,93 (2H, dd, ³J_{H8,H9} = 8,5 Hz, ⁴J_{H6,H8} = 2 Hz, H₈), 7,72 (2H, d, H₆), 7,27 (2H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₁), 7,27 (2H, d, H₉), 7,03 (2H, d, ³J_{H3,H4} = 8,5 Hz, H₃), 6,76 (2H, układ spinowy AB, d, H₁₀), 6,59 (2H, d, H₄), 4,45 (2H, s, CH₂), 3,81 (6H, s, OCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 156,7 (C5'), 156,4 (C1), 156,2 (C4'), 148,1 (C7), 138,5 (C9'), 132,1 (C3), 129,1 (C11), 129,1 (C9), 127,1 (C10), 124,6 (C2), 120,1 (C8), 119,4 (C11'), 117,3 (C6), 107,3 (C4), 56,0 (OCH₃), 29,7 (CH₂).

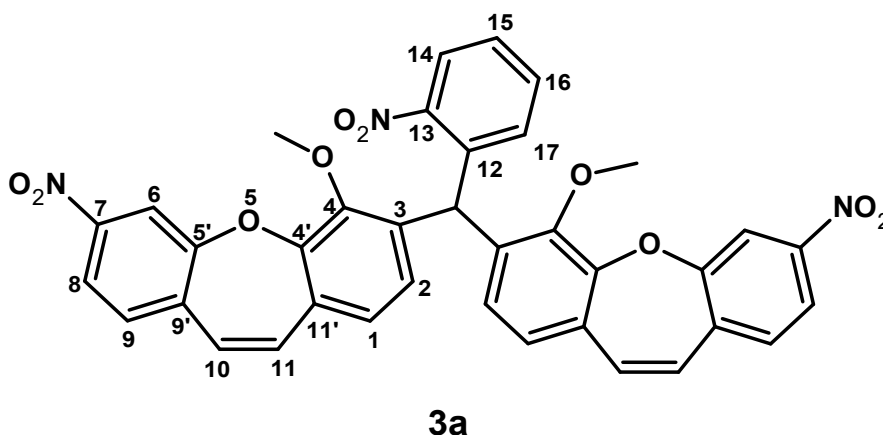
HRMS (ESI): C₃₁H₂₂N₂O₈, obliczono *m/z*: 550,13761, znaleziono *m/z*: 550,13707.

5.5.3 Otrzymywanie dimerów 6-metoksy-3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepy z różnymi łącznikami 3a–e, 3f

Przykładowa synteza:

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 mL umieszczono element mieszający oraz 1 mmol 6-metoksy-3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepy **1a**. Do układu dodano następnie 0,5 mmol odpowiedniego aldehydu, po czym całość rozpuszczono w ok. 5 mL chlorku metylenu. Początkowo mieszający się roztwór przepłukiwano argonem przez 30 minut. Po tym czasie do układu dodano ok. 0,5 mL $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. Roztwór przyjął barwę brązową. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej oraz w atmosferze argonu. Przebieg reakcji badano za pomocą analizy położenia plamek na płytkach do chromatografii cienkowarstwowej z użyciem chlorku metylenu jako eluenta. Po zakończeniu reakcji mieszaninę poreakcyjną przelano do 20 mL metanolu. Całość mieszano przez następne 5 minut, po czym ekstrahowano 2× z 20 mL wody, a następnie 2× z 30 mL chlorku metylenu. Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym MgSO_4 , po czym rozpuszczalnik odparowano na wyparce obrotowej. Powstały osad rozpuszczono w niewielkiej ilości chlorku metylenu i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z użyciem układu octan etylu/heksan 1:1 jako eluenta, otrzymując osady związków **3a–e**, **3f**.

Związek **3a**:



Rysunek 64. Schemat struktury związku **3a** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 3 tyg.

Wydajność: 26%

Postać: jasnożółty osad

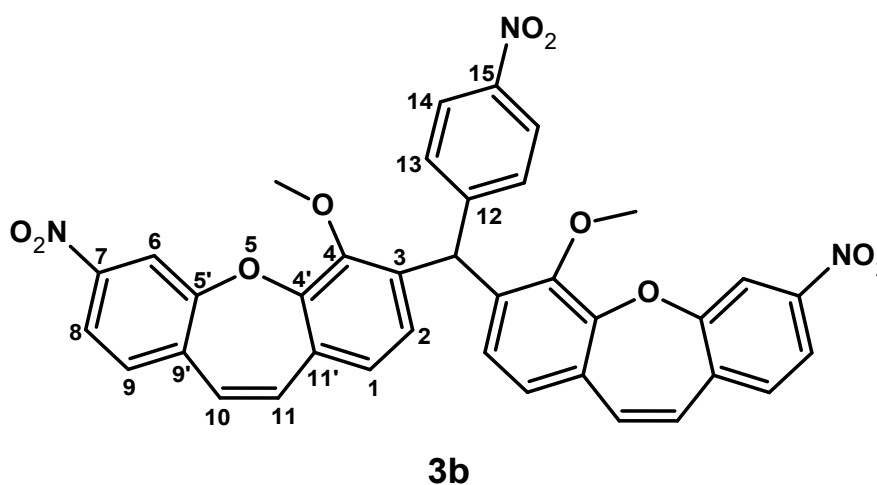
Temp. topnienia: 167°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 8,19 (2H, d, ⁴J_{H6,H8} = 2,5 Hz, H₆), 8,00 (1H, dd, ³J_{H14,H15} = 8,5 Hz, ⁴J_{H14,H16} = 2 Hz, H₁₄), 8,00 (2H, dd, ³J_{H8,H9} = 8,5 Hz, H₈), 7,34-7,32 (1H, m, H₁₆), 7,30 (2H, d, H₉), 7,11 (2H, d, ³J_{H1,H2} = 8,5 Hz, H₁), 7,03 (2H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₁), 6,93-6,83 (2H, m, H₁₅, H₁₇), 6,82 (2H, układ spinowy AB, d, H₁₀), 6,67 (2H, d, H₂), 6,66 (1H, s, CH), 3,94 (6H, s, OCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 157,5 (C5'), 151,5 (C4), 148,6 (C13), 147,2 (C7), 146,1 (C4'), 145,2 (C12), 137,4 (C9'), 135,4 (C16), 133,2 (C17), 130,3 (C10), 130,0 (C11) 128,8 (C3), 128,7 (C11'), 128,5 (C9), 126,6 (C15), 124,2 (C2), 120,1 (C14), 120,1 (C8), 117,5 (C6), 112,8 (C1), 56,1 (OCH₃), 40,8 (CH).

HRMS (ESI): C₃₇H₂₅N₃O₁₀+H, obliczono *m/z*: 672,16127, znaleziono *m/z*: 672,16127.

Związek **3b**:



Rysunek 65. Schemat struktury związku **3b** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 2 tyg.

Wydajność: 36%

Postać: jasnożółty osad

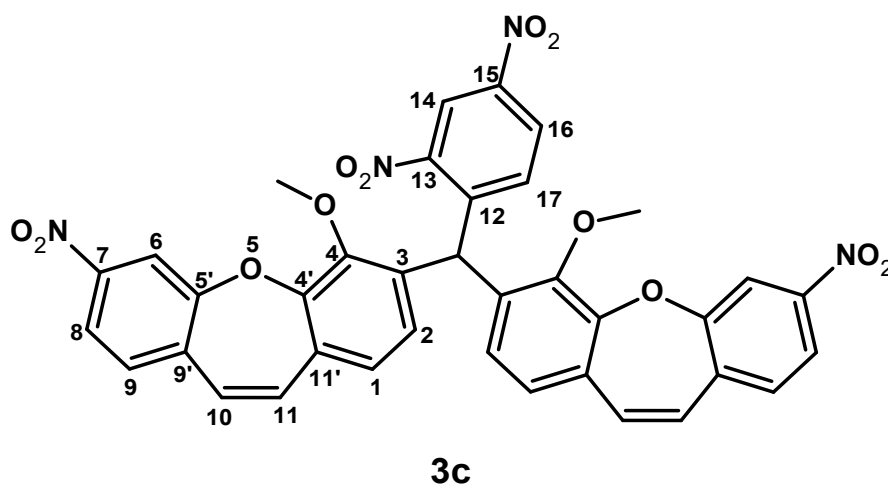
Temp. topnienia: 145°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 8,19 (2H, d, ⁴J_{H6,H8} = 2,5 Hz, H₆), 8,12 (2H, d, ³J_{H13,H14} = 8,5 Hz, H₁₄), 8,01 (2H, dd, ³J_{H8,H9} = 8,5 Hz, H₈), 7,30 (2H, d, H₉), 7,13 (2H, d, H₁₃), 6,87 (2H, d, ³J_{H1,H2} = 8,5 Hz, H₁), 6,79 (2H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₁), 6,75 (2H, układ spinowy AB, d, H₁₀), 6,45 (2H, d, H₂), 5,79 (1H, s, CH), 3,94 (6H, s, OCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 157,5 (C5'), 151,0 (C4), 150,0 (C12), 148,7 (C7), 146,9 (C15), 146,2 (C4'), 137,1 (C9'), 131,3 (C3), 130,4 (C13), 129,7 (C11), 129,4 (C10), 129,1 (C11'), 129,0 (C9), 127,0 (C2), 123,8 (C14), 120,2 (C8), 117,5 (C6), 112,5 (C1), 56,1 (OCH₃), 49,3 (CH).

HRMS (ESI): C₃₇H₂₅N₃O₁₀, obliczono *m/z*: 671,15399, znaleziono *m/z*: 671,15345.

Związek **3c**:



Rysunek 66. Schemat struktury związku **3c** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 2 tyg.

Wydajność: 66%

Postać: jasnożółty osad

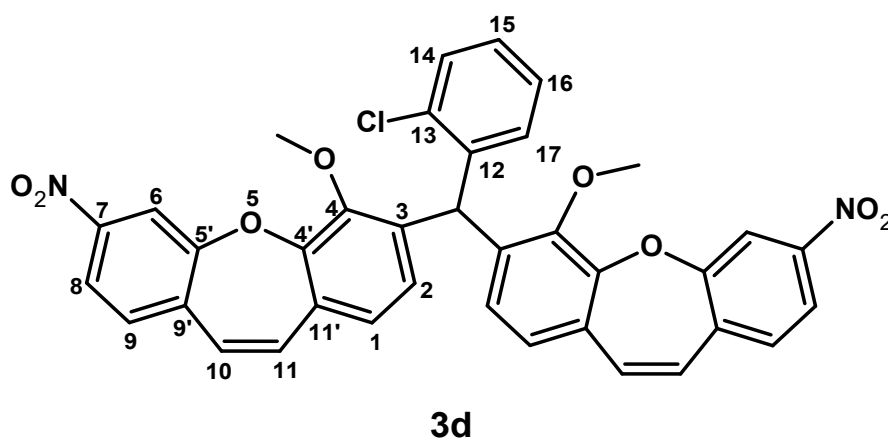
Temp. topnienia: 185,5°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 8,77 (1H, d, ⁴J_{H14,H16} = 2,5 Hz, H₁₄), 8,24 (1H, dd, ³J_{H16,H17} = 8,5 Hz, H₁₆), 8,18 (2H, d, ⁴J_{H6,H8} = 2,5 Hz, H₆), 8,01 (2H, dd, ³J_{H8,H9} = 8,5 Hz, H₈), 7,31 (2H, d, H₉), 7,11 (1H, d, H₁₇), 6,84 (2H, d, ³J_{H1,H2} = 8,5 Hz, H₁), 6,82 (2H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₁), 6,79 (2H, układ spinowy AB, d, H₁₀), 6,66 (1H, s, CH), 6,36 (2H, d, H₂), 3,94 (6H, s, OCH₃).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm): 157,5 (C5'), 151,4 (C4), 148,9 (C13), 148,7 (C7), 146,9 (C15), 146,4 (C4'), 144,1 (C12), 136,9 (C9'), 133,2 (C17), 129,9 (C10), 129,5 (C3), 129,4 (C11'), 129,2 (C9), 129,0 (C11), 126,7 (C16), 126,5 (C2), 120,8 (C14), 120,3 (C8), 117,5 (C6), 112,5 (C1), 56,1 (OCH_3), 44,4 (CH).

HRMS (ESI): $\text{C}_{37}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_{12}$, obliczono m/z : 715,13124, znaleziono m/z : 715,13070.

Związek **3d**:



Rysunek 67. Schemat struktury związku 3d wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 3 tyg.

Wydajność: 9%

Postać: jasnożółty osad

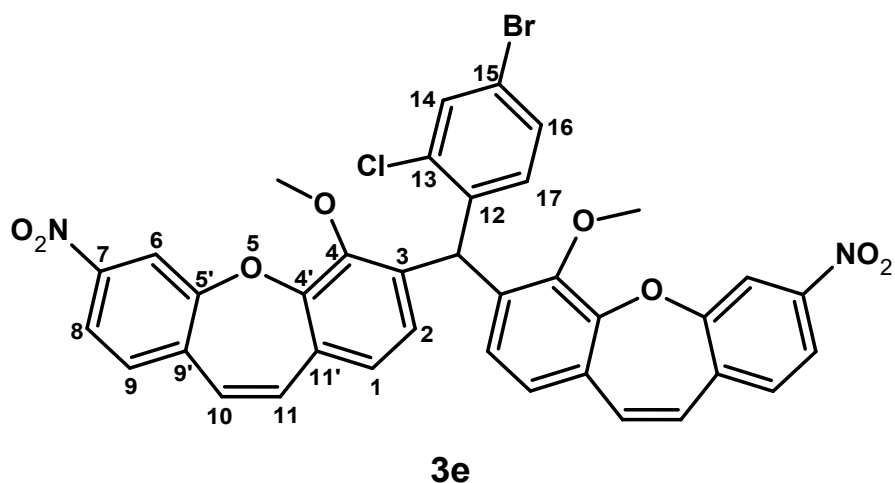
Temp. topnienia: 141°C

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm): 8,19 (2H, d, $^4J_{\text{H}_6,\text{H}_8} = 2,5$ Hz, H_6), 7,99 (2H, dd, $^3J_{\text{H}_8,\text{H}_9} = 8,5$ Hz, H_8), 7,53 (1H, dd, $^3J_{\text{H}_{16},\text{H}_{17}} = 8,5$ Hz, $^4J_{\text{H}_{15},\text{H}_{17}} = 2$ Hz, H_{17}), 7,28 (2H, d, H_9), 7,23-7,19 (1H, m, H_{16}), 6,92 (1H, ddd, $^3J_{\text{H}_{14},\text{H}_{15}} = 8,5$ Hz, $^3J_{\text{H}_{15},\text{H}_{16}} = 8,5$ Hz, H_{15}), 6,83 (2H, d, $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 8,5$ Hz, H_1), 6,81 (2H, układ spinowy AB, d, $^3J_{\text{H}_{10},\text{H}_{11}} = 11,5$ Hz, H_{11}), 6,73 (2H, układ spinowy AB, d, H_{10}), 6,46 (1H, dd, $^4J_{\text{H}_{14},\text{H}_{16}} = 1,5$ Hz, H_{14}), 6,45 (2H, d, H_2), 6,00 (1H, s, CH), 3,93 (6H, s, OCH_3).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm): 157,5, 150,7, 148,5, 146,1, 140,0, 137,3, 131,7, 131,3, 130,1, 129,4, 129,0, 128,8, 128,4, 126,6, 126,3, 125,1, 120,1, 119,1, 117,5, 112,3, 56,1, 46,5.

HRMS (ESI): $C_{37}H_{25}ClN_2O_8+H$, obliczono m/z : 661,13721, znaleziono m/z : 661,13722.

Związek **3e**:



Rysunek 68. Schemat struktury związku **3e** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 3 tyg.

Wydajność: 14%

Postać: jasnożółty osad

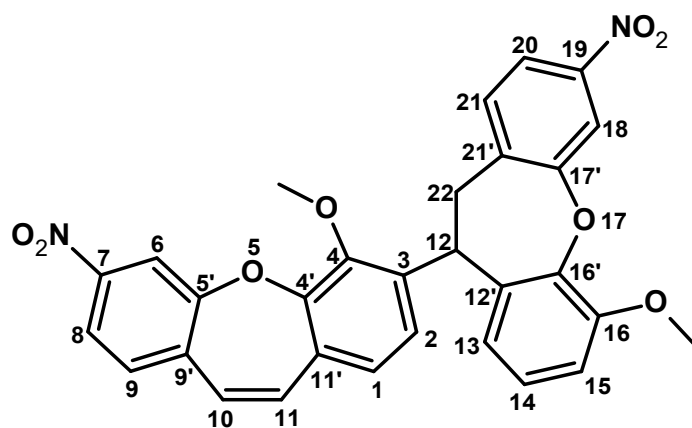
Temp. topnienia: 133,5°C

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 298 K): δ (ppm): 8,19 (2H, d, $^4J_{H_6,H_8} = 2,5$ Hz, H_6), 8,00 (2H, dd, $^3J_{H_8,H_9} = 8,5$ Hz, H_8), 7,60 (1H, d, $^4J_{H_{14},H_{16}} = 2$ Hz, H_{14}), 7,29 (2H, d, H_9), 7,14 (1H, dd, $^3J_{H_{16},H_{17}} = 8,5$ Hz, H_{16}), 6,84 (2H, d, $^3J_{H_1,H_2} = 8,5$ Hz, H_1), 6,78 (2H, układ spinowy AB, d, $^3J_{H_{10},H_{11}} = 11,5$ Hz, H_{11}), 6,75 (2H, układ spinowy AB, d, H_{10}), 6,65 (1H, d, H_{17}), 6,42 (2H, d, H_2), 5,91 (1H, s, CH), 3,93 (6H, s, OCH_3).

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$, 298 K): δ (ppm): 157,5 ($C_{5'}$), 150,9 (C_4), 148,6 (C_7), 146,1 ($C_{4'}$), 140,5 (C_{12}), 137,2 ($C_{9'}$), 133,6 (C_{15}), 132,9 (C_{14}), 132,2 (C_{17}), 131,2 ($C_{11'}$), 129,9 (C_{11}), 129,3 (C_3), 129,1 (C_9), 129,0 (C_{10}), 127,7 (C_{16}), 126,6 (C_2), 125,3 (C_{13}), 120,1 (C_8), 117,5 (C_6), 112,4 (C_1), 56,1 (OCH_3), 48,8 (CH).

HRMS (ESI): $C_{37}H_{24}BrClN_2O_8+H$, obliczono m/z : 739,04773, znaleziono m/z : 739,04773.

Związek 3f:



3f

Rysunek 69. Schemat struktury związku 3f wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 3 tyg.

Wydajność: 43%

Postać: jasnożółty osad

Temp. topnienia: 266°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 8,20 (1H, d, ⁴J_{H6,H8} = 2,5 Hz, H₆), 8,18 (1H, d, ⁴J_{H18,H20} = 2,5 Hz, H₁₈), 8,01 (1H, dd, ³J_{H8,H9} = 8,5 Hz, H₈), 7,85 (1H, dd, ³J_{H20,H21} = 8,5 Hz, H₂₀), 7,33 (d, 1H, H₉), 7,11 (1H, d, H₂₁), 7,09 (1H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₁), 6,91 (1H, t, ³J_{H14,H13,15} = 8 Hz, H₁₄), 6,91 (1H, d, ³J_{H1,H2} = 8,5 Hz, H₁), 6,87 (1H, układ spinowy AB, d, H₁₀), 6,82 (1H, dd, ⁴J_{H13,H15} = 1 Hz, H₁₅), 6,79 (1H, d, H₂), 6,27 (1H, dd, H₁₃), 4,95 (1H, dd, ³J_{H12,H22} = 10 Hz, ³J_{H12,H22'} = 4 Hz, H₁₂), 3,96 (3H, s, OCH₃), 3,95 (3H, s, OCH₃), 3,48 (1H, dd, ²J_{H22,H22'} = 15 Hz, H₂₂), 3,41 (1H, dd, H_{22'}).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 157,5 (C5'), 157,2 (C17'), 151,5 (C16), 150,6 (C4), 148,5 (C7), 147,2 (C19), 146,1 (C4'), 145,2 (C16'), 138,7 (C21'), 137,4 (C9'), 134,9 (C12'), 133,2 (C3), 131,1 (C21), 130,1 (C11), 129,0 (C9), 129,0 (C10), 128,9 (C11'), 125,5 (C2), 125,0 (C14), 121,4 (C13), 120,1 (C8), 119,1 (C20), 117,4 (C6), 117,1 (C18), 112,7 (C1), 110,6 (C15), 56,1 (OCH₃), 56,1 (OCH₃), 40,8 (C12), 37,2 (C22).

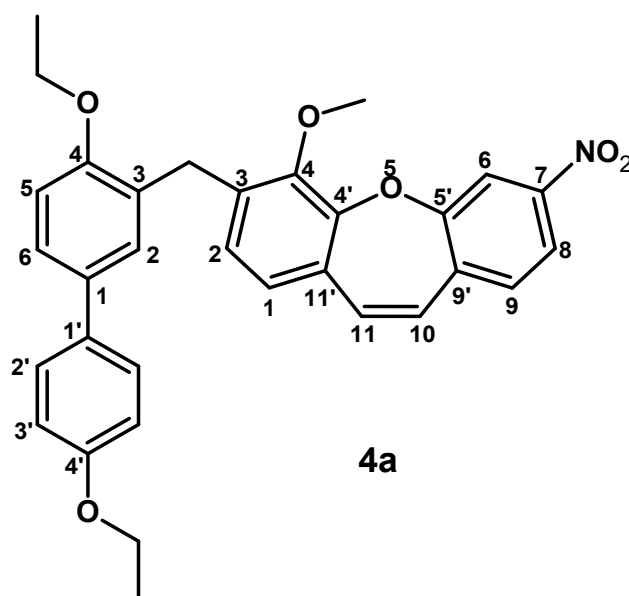
HRMS (ESI): C₃₀H₂₂N₂O₈+H, obliczono *m/z*: 539,14489, znaleziono *m/z*: 539,14489.

5.5.4 Otrzymywanie hybrydowych połączeń metoksyłowych pochodnych 3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepy z 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylem z różnymi łącznikami 4a–e, 4f–j

Przykładowa synteza:

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 mL umieszczono element mieszający oraz 1 mmol 6-metoksy-3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepy **1a** lub 1-metoksy-7-nitrodibenzo[*b,f*]oksepy **1d**. Do układu dodano następnie 0,5 mmol odpowiedniego aldehydu, po czym całość rozpuszczono w ok. 5 mL chlorku metylenu. Początkowo mieszający się roztwór przepłukiwano argonem przez 30 minut. Po tym czasie do układu dodano ok. 1 mL BF₃·Et₂O. Roztwór przyjął barwę ciemnozieloną, która powoli ciemniała. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej oraz w atmosferze argonu. Przebieg reakcji badano za pomocą analizy położenia plamek na płytkach do chromatografii cienkowarstwowej z użyciem chlorku metylenu jako eluenta. Po zakończeniu reakcji mieszaninę poreakcyjną przelano do 20 mL metanolu. Całość mieszano przez następne 5 minut, po czym ekstrahowano 2× z 20 mL wody, a następnie 2× z 30 mL chlorku metylenu. Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym MgSO₄, po czym rozpuszczalnik odparowano na wyparce obrotowej. Powstały osad rozpuszczono w niewielkiej ilości chlorku metylenu i oczyszczono dwukrotnie na kolumnie chromatograficznej z użyciem układu DCM/heksan 1:2, a następnie heksan/octan etylu/DCM 8:2:1 jako eluentów, otrzymując osady związków **4a–e**, **4f–j**.

Związek **4a**:



Rysunek 70. Schemat struktury związku **4a** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 2,5 h

Wydajność: 60%

Postać: żółty osad

Temp. topnienia: rozkład powyżej 115°C

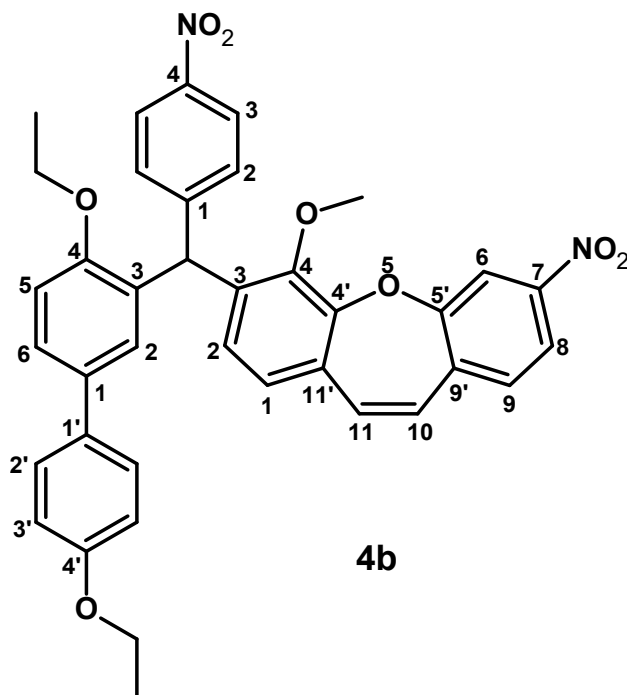
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): **pierścień dibenzo[*b,f*]oksepiny:** 8,20 (1H, d, $^4J_{H_6,H_8} = 2,5$ Hz, H₆), 7,99 (1H, dd, $^3J_{H_8,H_9} = 8,5$ Hz, H₈), 7,29 (H, d, H₉), 7,15 (1H, układ spinowy AB, d, $^3J_{H_{10},H_{11}} = 11,5$ Hz, H₁₁), 6,97 (1H, d, $^3J_{H_1,H_2} = 8,5$ Hz, H₂), 6,93 (1H, d, H₁), 6,81 (1H, układ spinowy AB, d, H₁₀), 3,95 (3H, s, OCH₃); **pierścień 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylu:** 7,33 (1H, dd, $^3J_{H_5,H_6} = 8,5$ Hz, $^4J_{H_2,H_6} = 2,5$ Hz, H₆), 7,25 (2H, d, $^3J_{H_2',H_3'} = 8,5$ Hz, H_{2'}), 6,96 (1H, d, H₂), 6,90 (1H, d, H₅), 6,83 (2H, d, H_{3'}), 4,09 (2H, q, $^3J_{OCH_2,CH_3} = 7$ Hz, OCH₂), 4,01 (2H, q, $^3J_{OCH_2,CH_3} = 7$ Hz, OCH₂), 1,43 (3H, t, CH₃); 1,41 (3H, t, CH₃); **łącznik:** 4,01 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): **pierścień dibenzo[*b,f*]oksepiny:** 157,9 (C14), 150,2 (C4), 148,4 (C7), 145,8 (C13), 137,8 (C15), 131,7 (C11), 129,6 (C12), 128,8 (C3), 128,1 (C9), 127,9 (C10), 127,4 (C2), 119,9 (C8), 117,5 (C6), 113,0 (C1), 56,2 (OCH₃); **pierścień 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylu:** 157,4 (C4'), 155,5 (C4), 133,3 (C1), 133,1 (C1'), 130,6 (C3),

127,6 (C2), 127,6 (C2'), 127,6 (C6'), 125,4 (C6), 114,6 (C3', C5'), 111,3 (C5) 63,7 (OCH₂), 63,5 (OCH₂), 15,0 (CH₃), 14,8 (CH₃); **łącznik**: 32,6 (CH₂).

HRMS (ESI): C₃₂H₂₉NO₆Na, obliczono *m/z*: 546,1893; znaleziono *m/z*: 546,1873.

Związek **4b**:



Rysunek 71. Schemat struktury związku 4b wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 3 dni

Wydajność: 15%

Postać: jasnożółty osad

Temp. topnienia: 160°C

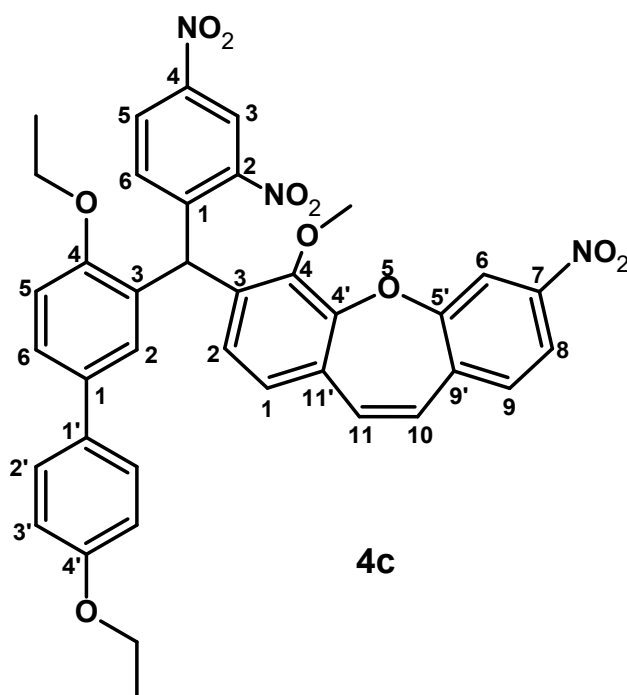
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): pierścień dibenzo[*b,f*]oksepinu: 8,20 (1H, d, ⁴J_{H6,H8} = 2 Hz, H₆), 7,99 (1H, dd, ³J_{H8,H9} = 8,5 Hz, H₈), 7,28 (1H, d, H₉), 7,00 (1H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₁), 6,87 (1H, d, ³J_{H1,H2} = 8,5 Hz, H₁), 6,79 (1H, układ spinowy AB, d, H₁₀), 6,58 (1H, d, H₂), 3,95 (3H, s, OCH₃); **pierścień 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylu:** 7,41 (1H, dd, ³J_{H5,H6} = 8,5 Hz, ⁴J_{H2,H6} = 2,5 Hz, H₆), 7,21 (2H, d, ³J_{H2',H3'} = 8,5 Hz, H_{2'}), 6,91 (1H, d, H₅), 6,85 (1H, d, H₂), 6,84 (2H, d, H_{3'}), 4,02 (2H, q, ³J_{OCH₂,CH₃} = 7 Hz, OCH₂), 3,97-3,89 (2H,

m, OCH₂), 1,41 (3H, t, CH₃), 1,12 (3H, t, CH₃); **łącznik**: 8,12 (2H, d, ³J_{H2,H3} = 9 Hz, H₃), 7,24 (2H, d, H₂), 6,08 (1H, s, CH).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 158,1, 157,5, 155,1, 151,0, 150,5, 148,5, 146,6, 146,2, 137,5, 133,3, 132,9, 132,2, 130,8, 130,7, 130,3, 129,4, 128,9, 128,6, 128,2, 127,6, 126,6, 126,6, 123,5, 120,0, 117,4, 114,7, 112,4, 111,9, 63,9, 63,5, 56,1, 46,5, 14,8, 14,6.

HRMS (ESI): C₃₈H₃₂N₂O₈, obliczono *m/z*: 644,21532, znaleziono *m/z*: 644,21502.

Związek **4c**:



Rysunek 72. Schemat struktury związku 4c wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 3 dni

Wydajność: 20%

Postać: jasnożółty osad

Temp. topnienia: 94,5°C

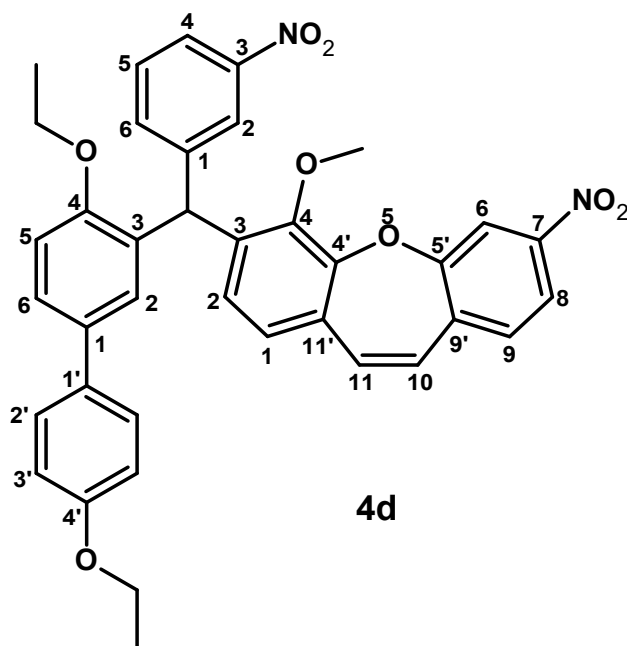
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): pierścień dibenzo[*b,f*]oksepiny: 8,21 (1H, d, ⁴J_{H6,H8} = 2,5 Hz, H₆), 7,99 (1H, dd, ³J_{H8,H9} = 8,5 Hz, H₈), 7,28 (1H, d, H₉), 6,93 (1H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₁), 6,86 (1H, d, ³J_{H1,H2} = 8,5 Hz, H₁), 6,80 (1H, układ spinowy AB, d, H₁₀), 6,52 (1H, d, H₂), 3,95 (3H, s, OCH₃); **pierścień**

4,4'-dietoksy-1,1'-bifenyłu: 7,42 (1H, dd, $^3J_{H5,H6} = 8,5$ Hz, $^4J_{H2,H6} = 2,5$ Hz, H₆), 7,14 (2H, d, $^3J_{H2',H3'} = 8,5$ Hz, H_{2'}), 6,89 (1H, d, H₅), 6,81 (2H, d, H_{3'}), 6,76 (1H, d, H₂), 4,01 (2H, q, $^3J_{OCH_2,CH_3} = 7$ Hz, OCH₂), 3,98 (1H, qd, $^3J_{OCH_2,CH_3} = 7$ Hz, $^2J_{OCH_2,OCH_2'} = 2$ Hz, OCH₂), 3,88 (1H, qd, OCH_{2'}), 1,41 (3H, t, CH₃), 1,15 (3H, t, CH₃); **łącznik:** 8,76 (1H, d, $^4J_{H3,H5} = 2,5$ Hz, H₃), 8,24 (1H, dd, $^3J_{H5,H6} = 8,5$ Hz, H₅), 7,31 (1H, d, H₆), 6,62 (1H, s, CH).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 158,2, 157,5, 154,8, 150,9, 149,4, 148,5, 146,5, 146,4, 145,2, 137,3, 133,4, 133,1, 132,7, 130,2, 129,9, 129,6, 129,3, 129,1, 129,0, 127,9, 127,6, 127,2, 126,2, 125,9, 120,2, 120,1, 117,4, 114,7, 112,3, 111,9, 63,9, 63,5, 56,1, 42,5, 14,8, 14,5.

HRMS (ESI): C₃₈H₃₁N₃O₁₀, obliczono *m/z*: 689,20040, znaleziono *m/z*: 689,20020.

Związek **4d**:



Rysunek 73. Schemat struktury związku 4d wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 4 dni

Wydajność: 9%

Postać: jasnożółty osad

Temp. topnienia: 184°C

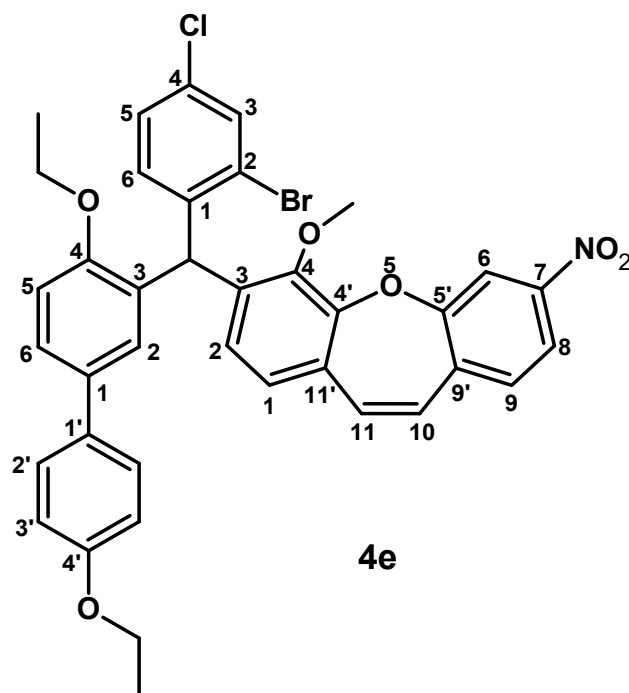
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): pierścień dibenzo[*b,f*]oksepiny: 8,20 (1H, d, $^4J_{H6,H8} = 2,5$ Hz, H₆), 7,99 (1H, dd, $^3J_{H8,H9} = 8,5$ Hz, H₈), 7,28 (1H, d, H₉), 7,01 (1H, układ

spinowy AB, d, $^3J_{H_{10},H_{11}} = 11,5$ Hz, H_{11}), 6,88 (1H, d, $^3J_{H_{11},H_2} = 8,5$ Hz, H_1), 6,80 (1H, układ spinowy AB, d, H_{10}), 6,60 (1H, d, H_2), 3,95 (3H, s, OCH_3); **pierścień 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylu**: 7,41 (1H, dd, $^3J_{H_5,H_6} = 8,5$ Hz, $^4J_{H_2,H_6} = 2,5$ Hz, H_6), 7,21 (2H, d, $^3J_{H_2',H_3'} = 9$ Hz, H_2'), 6,91 (1H, d, H_5), 6,86 (1H, d, H_2), 6,84 (2H, d, H_3'), 4,02 (2H, q, $^3J_{OCH_2,CH_3} = 7$ Hz, OCH_2), 3,95-3,91 (2H, m, OCH_2), 1,40 (3H, t, CH_3), 1,11 (3H, t, CH_3); **łącznik**: 8,10-8,08 (1H, m, H_4), 7,98 (1H, t, $^4J_{H_2,H_{4,6}} = 2$ Hz, H_2), 7,43 (1H, t, $^3J_{H_5,H_{4,6}} = 8$ Hz, H_5), 7,41-7,39 (1H, m, H_6), 6,09 (1H, s, CH).

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$, 298 K): δ (ppm): 158,1, 157,5, 155,1, 150,5, 148,5, 148,4, 146,2, 145,3, 137,5, 135,5, 133,3, 133,0, 132,3, 130,8, 130,8, 129,4, 129,1, 128,9, 128,6, 128,2, 127,7, 126,6, 126,6, 124,3, 121,6, 120,0, 117,4, 114,7, 112,4, 111,9, 63,8, 63,5, 56,1, 46,3, 14,8, 14,6.

HRMS (ESI): $C_{38}H_{32}N_2O_8$, obliczono m/z : 644,21532, znaleziono m/z : 644,21572.

Związek 4e:



Rysunek 74. Schemat struktury związku 4e wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 4 dni

Wydajność: 8%

Postać: jasnożółty osad

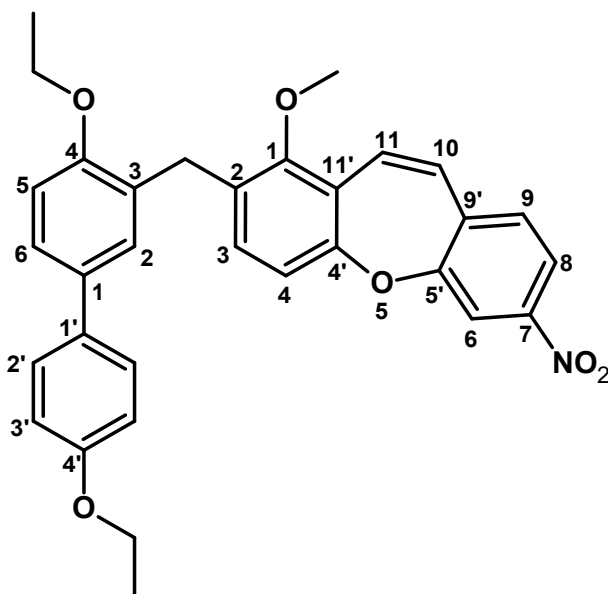
Temp. topnienia: 72°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): **pierścień dibenzo[*b,f*]oksepiny:** 8,19 (1H, d, ⁴J_{H6,H8} = 2 Hz, H₆), 7,97 (1H, dd, ³J_{H8,H9} = 8,5 Hz, H₈), 7,26 (1H, d, H₉), 6,98 (1H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 12 Hz, H₁₁), 6,85 (1H, d, ³J_{H1,H2} = 8,5 Hz, H₁), 6,77 (1H, układ spinowy AB, d, H₁₀), 6,54 (1H, d, H₂), 3,94 (3H, s, OCH₃); **pierścień 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylu:** 7,39 (1H, dd, ³J_{H5,H6} = 8,5 Hz, ⁴J_{H2,H6} = 2,5 Hz, H₆), 7,18 (2H, d, ³J_{H2',H3'} = 8,5 Hz, H_{2'}), 6,89 (1H, d, H₅), 6,82 (2H, d, H_{3'}), 6,76 (1H, d, H₂), 4,01 (2H, q, ³J_{OCH₂,CH₃} = 7 Hz, OCH₂), 3,95 (1H, qd, ³J_{OCH₂,CH₃} = 7 Hz, ²J_{OCH₂,OCH₂'} = 2 Hz, OCH₂), 3,88 (1H, qd, OCH₂'), 1,40 (3H, t, CH₃), 1,14 (3H, t, CH₃); **łącznik:** 7,60 (1H, d, ⁴J_{H3,H5} = 2 Hz, H₃), 7,14 (1H, dd, ³J_{H5,H6} = 8,5 Hz, H₅), 6,81 (1H, d, H₆), 6,22 (1H, s, CH).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 158,1, 157,5, 155,3, 150,4, 148,4, 146,1, 141,1, 137,6, 133,1, 133,0, 132,8, 132,5, 131,9, 131,7, 130,9, 130,8, 129,5, 128,9, 128,3, 128,1, 127,6, 127,3, 126,3, 126,2, 125,7, 120,0, 117,4, 114,7, 112,2, 112,0, 64,0, 63,5, 56,0, 46,0, 14,8, 14,7.

HRMS (ESI): C₃₈H₃₁BrClNO₆, obliczono *m/z*: 711,10178, znaleziono *m/z*: 711,10167.

Związek 4f:



4f

Rysunek 75. Schemat struktury związku 4f wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 3 h

Wydajność: 31%

Postać: jasnożółty osad

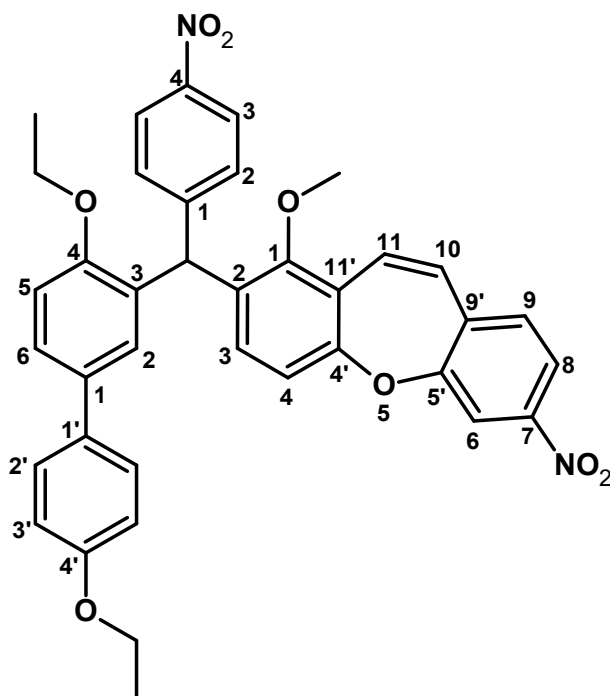
Temp. topnienia: 158,5°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): pierścień dibenzo[*b,f*]oksepiny: 7,89 (1H, dd, ³J_{H8,H9} = 8,5 Hz, ⁴J_{H6,H8} = 2 Hz, H₈), 7,71 (1H, d, H₆), 7,23 (1H, d, H₉), 7,22 (1H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₁), 7,19 (1H, d, ³J_{H3,H4} = 8,5 Hz, H₃), 6,70 (1H, układ spinowy AB, d, H₁₀), 6,64 (1H, d, H₄), 3,84 (3H, s, OCH₃); **pierścień 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylu:** 7,35 (1H, dd, ³J_{H2,H3} = 8,5 Hz, ⁴J_{H2,H6} = 2,5 Hz, H₆), 7,24 (2H, d, ³J_{H2',H3'} = 9 Hz, H_{2'}), 7,08 (1H, d, H₅), 6,98 (1H, d, H₂), 6,84 (2H, d, H_{3'}), 4,17 (2H, q, ³J_{OCH₂,CH₃} = 7 Hz, OCH₂), 4,02 (2H, q, ³J_{OCH₂,CH₃} = 7 Hz, OCH₂), 1,45 (3H, t, CH₃), 1,40 (3H, t, CH₃); **łącznik:** 4,25 (2H, s, CH₂).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 157,9, 156,9, 156,4, 155,9, 155,7, 148,0, 138,3, 133,5, 133,0, 132,6, 129,1, 129,1, 128,9, 128,3, 127,6, 126,9, 125,7, 125,2, 119,9, 119,1, 117,6, 114,6, 111,7, 107,2, 63,8, 63,4, 55,9, 29,8, 14,9, 14,9.

HRMS (ESI): C₃₂H₂₉NO₆, obliczono *m/z*: 523,19948, znaleziono *m/z*: 523,19920.

Związek **4g**:



4g

Rysunek 76. Schemat struktury związku 4g wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 3 dni

Wydajność: 16%

Postać: jasnożółty osad

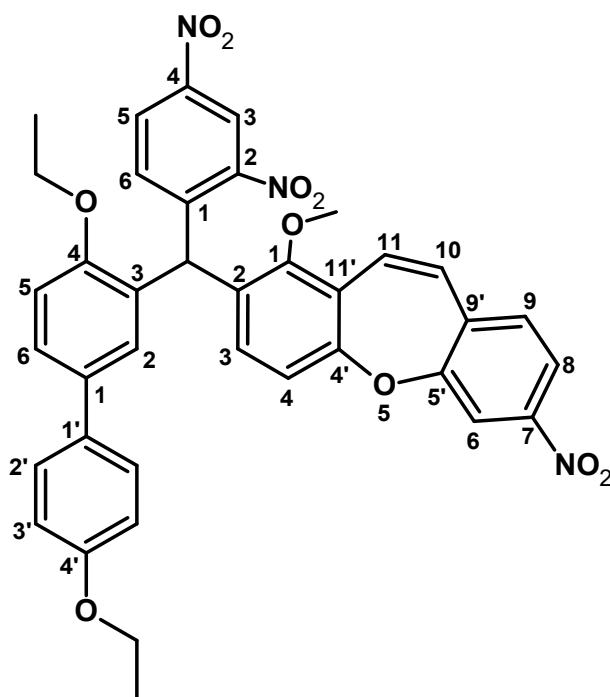
Temp. topnienia: 108°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): pierścień dibenzo[*b,f*]oksepiny: 7,85 (1H, dd, ³J_{H8,H9} = 8,5 Hz, ⁴J_{H6,H8} = 2,5 Hz, H₈), 7,37 (1H, d, H₆), 7,20 (1H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₁), 7,19 (1H, d, H₉), 6,81 (1H, d, ³J_{H3,H4} = 8,5 Hz, H₃), 6,70 (1H, układ spinowy AB, d, H₁₀), 6,62 (1H, d, H₄), 3,84 (3H, s, OCH₃); **pierścień 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenyłu:** 7,41 (1H, dd, ³J_{H5,H6} = 8,5 Hz, ⁴J_{H2,H6} = 2 Hz, H₆), 7,19 (2H, d, ³J_{H2',H3'} = 9 Hz, H_{2'}), 7,02 (1H, d, H₅), 6,90 (1H, d, H₂), 6,84 (2H, d, H_{3'}), 4,16 (1H, qd, ³J_{OCH₂,CH₃} = 7 Hz, ²J_{OCH₂,OCH₂'} = 2 Hz, OCH₂), 4,01 (1H, qd, OCH₂'), 4,01 (2H, q, ³J_{OCH₂,CH₃} = 7 Hz, OCH₂), 1,39 (3H, t, CH₃), 1,23 (3H, t, CH₃); **łącznie:** 8,16 (2H, d, ³J_{H2,H3} = 9 Hz, H₃), 7,34 (2H, d, H₂), 6,65 (1H, s, CH).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): pierścień dibenzo[*b,f*]oksepiny: 156,6 (C5'), 156,4 (C1), 156,0 (C4'), 148,0 (C7), 138,0 (C9'), 131,9 (C3), 129,0 (C9), 128,8 (C11), 127,3 (C10), 127,0 (C2), 120,0 (C8), 119,3 (C11'), 117,4 (C6), 107,0 (C4), 55,9 (OCH₃); **pierścień 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenyłu:** 158,0 (C4'), 155,3 (C4), 133,2 (C1'), 133,1 (C1), 130,7 (C3), 127,9 (C2), 127,6 (C2'), 126,7 (C6), 114,7 (C3'), 112,2 (C5), 63,9 (OCH₂), 63,5 (OCH₂), 14,8 (CH₃), 14,6 (CH₃); **łącznie:** 151,5 (C1), 146,6 (C4), 130,2 (C2), 123,5 (C3), 43,6 (CH).

HRMS (ESI): C₃₈H₃₂N₂O₈+H, obliczono *m/z*: 645,22314, znaleziono *m/z*: 645,22302.

Związek **4h**:



4h

Rysunek 77. Schemat struktury związku **4h** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 3 dni

Wydajność: 21%

Postać: jasnożółty osad

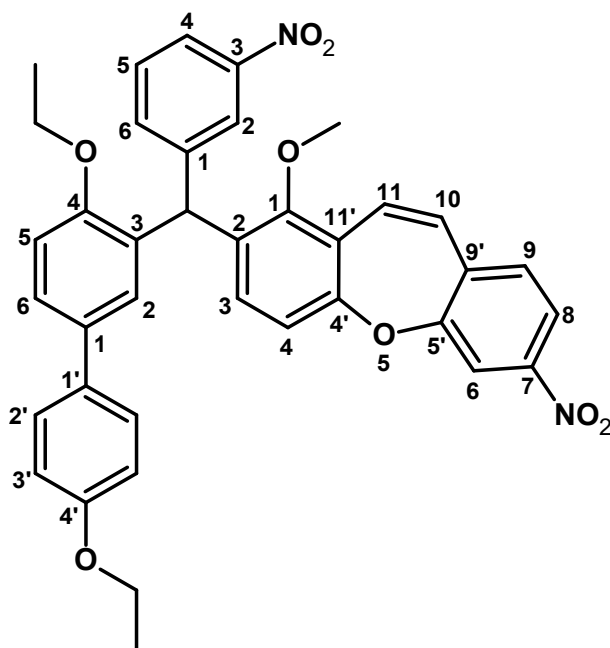
Temp. topnienia: 106°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): **pierścień dibenzo[*b,f*]oksepiny:** 7,84 (1H, dd, $^3J_{H8,H9} = 8,5$ Hz, $^4J_{H6,H8} = 2,5$ Hz, H₈), 7,35 (1H, d, H₆), 7,19 (1H, układ spinowy AB, d, $^3J_{H10,H11} = 11,5$ Hz, H₁₁), 7,19 (1H, d, H₉), 6,74 (1H, d, $^3J_{H3,H4} = 8,5$ Hz, H₃), 6,70 (1H, układ spinowy AB, d, H₁₀), 6,60 (1H, d, H₄), 3,84 (3H, s, OCH₃); **pierścień 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenyłu:** 7,41 (1H, dd, $^3J_{H5,H6} = 8,5$ Hz, $^4J_{H2,H6} = 2,5$ Hz, H₆), 7,14 (2H, d, $^3J_{H2',H3'} = 8,5$ Hz, H_{2'}), 7,01 (1H, d, H₅), 6,85 (1H, d, H₂), 6,83 (2H, d, H_{3'}), 4,16 (1H, qd, $^3J_{OCH2,CH3} = 7$ Hz, $^2J_{OCH2,OCH2'} = 2,5$ Hz, OCH₂), 4,00 (1H, qd, OCH₂'), 4,00 (2H, q, $^3J_{OCH2,CH3} = 7$ Hz, OCH₂), 1,39 (3H, t, CH₃), 1,26 (3H, t, CH₃); **łącznik:** 8,78 (1H, d, $^4J_{H3,H5} = 2,5$ Hz, H₃), 8,31 (1H, dd, $^3J_{H5,H6} = 8,5$ Hz, H₅), 7,42 (1H, d, H₆), 7,16 (1H, s, CH).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm): 158,1, 156,8, 156,5, 156,0, 155,1, 149,6, 148,0, 146,4, 145,2, 137,8, 133,3, 132,9, 132,9, 130,6, 129,4, 129,0, 128,6, 127,8, 127,7, 127,6, 127,5, 126,2, 124,9, 120,2, 120,1, 119,8, 117,6, 114,7, 112,2, 106,7, 64,0, 63,5, 55,9, 39,9, 14,8, 14,5.

HRMS (ESI): $\text{C}_{38}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_{10}$, obliczono m/z : 689,20040, znaleziono m/z : 689,19995.

Związek **4i**:



4i

Rysunek 78. Schemat struktury związku **4i** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 4 dni

Wydajność: 9%

Postać: jasnożółty osad

Temp. topnienia: 75°C

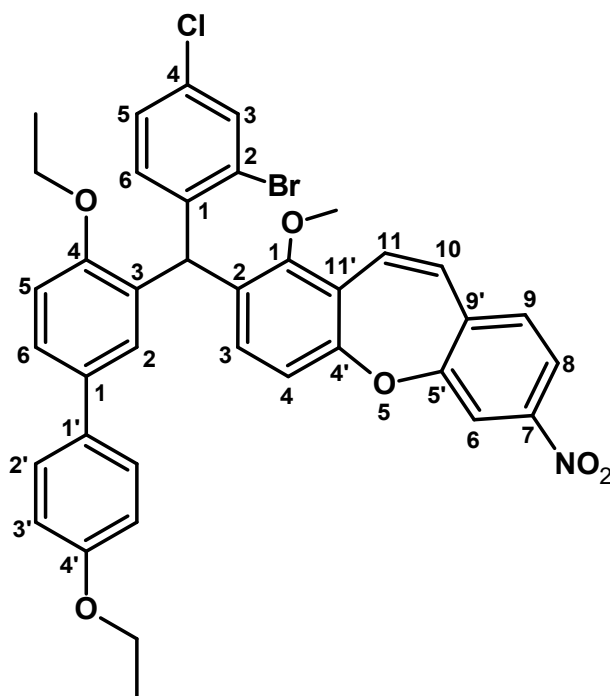
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm): pierścień dibenzo[*b,f*]oksepiny: 7,85 (1H, dd, $^3J_{\text{H}8,\text{H}9} = 8,5$ Hz, $^4J_{\text{H}6,\text{H}8} = 2$ Hz, H₈), 7,37 (1H, d, H₆), 7,20 (1H, układ spinowy AB, d, $^3J_{\text{H}10,\text{H}11} = 11,5$ Hz, H₁₁), 7,19 (1H, d, H₉), 6,84 (1H, d, $^3J_{\text{H}3,\text{H}4} = 8,5$ Hz, H₃), 6,70 (1H, układ spinowy AB, d, H₁₀), 6,62 (1H, d, H₄), 3,84 (3H, s, OCH_3); pierścień 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylu: 7,40 (1H, dd, $^3J_{\text{H}5,\text{H}6} = 8,5$ Hz, $^4J_{\text{H}2,\text{H}6} = 2,5$ Hz, H₆), 7,20 (2H, d, $^3J_{\text{H}2',\text{H}3'} = 9$ Hz, H_{2'}), 7,02 (1H, d, H₅), 6,91 (1H, d, H₂), 6,84 (2H, d, H_{3'}), 4,14 (1H, qd, $^3J_{\text{OCH}_2,\text{CH}_3} = 7$ Hz, $^2J_{\text{OCH}_2,\text{OCH}_2'} = 2$ Hz,

OCH₂), 4,02 (1H, qd, OCH₂'), 4,01 (2H, q, ³J_{OCH₂,CH₃} = 7 Hz, OCH₂), 1,39 (3H, t, CH₃), 1,23 (3H, t, CH₃); **łącznik:** 8,11-8,09 (1H, m, H₄), 8,03 (1H, t, ⁴J_{H₂,H_{4,6}} = 1,5 Hz, H₂), 7,55-7,52 (1H, m, H₆), 7,47 (1H, t, ³J_{H₅,H_{4,6}} = 8 Hz, H₅), 6,66 (1H, s, CH).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 158,0, 156,6, 156,4, 156,0, 155,2, 148,4, 147,9, 145,8, 138,1, 135,6, 133,3, 133,1, 131,9, 130,8, 129,2, 129,0, 128,9, 127,9, 127,7, 127,3, 127,0, 126,7, 124,1, 121,6, 120,0, 119,3, 117,4, 114,7, 112,2, 107,1, 63,9, 63,5, 55,9, 43,3, 14,8, 14,6.

HRMS (ESI): C₃₈H₃₂N₂O₈, obliczono *m/z*: 644,21532, znaleziono *m/z*: 644,21512.

Związek **4j**:



4j

Rysunek 79. Schemat struktury związku **4j** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 4 dni

Wydajność: 9%

Postać: jasnożółty osad

Temp. topnienia: 65,5°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): pierścień dibenzo[*b,f*]oksepiny: 7,86 (1H, dd, ³J_{H₈,H₉} = 8,5 Hz, ⁴J_{H₆,H₈} = 2,5 Hz, H₈), 7,66 (1H, d, H₆), 7,19 (1H, układ spinowy AB, d, ³J_{H₁₀,H₁₁}

= 11,5 Hz, H₁₁), 7,19 (1H, d, H₉), 6,77 (1H, d, ³J_{H₃,H₄} = 8,5 Hz, H₃), 6,68 (1H, układ spinowy AB, d, H₁₀), 6,59 (1H, d, H₄), 3,83 (3H, s, OCH₃); **pierścień 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylu**: 7,39 (1H, dd, ³J_{H₅,H₆} = 8,5 Hz, ⁴J_{H₂,H₆} = 2,5 Hz, H₆), 7,21 (2H, d, ³J_{H₂',H₃'} = 8,5 Hz, H₂'), 6,99 (1H, d, H₅), 6,86 (1H, d, H₂), 6,85 (2H, d, H₃'), 4,13 (1H, qd, ³J_{OCH₂,CH₃} = 7 Hz, ²J_{OCH₂,OCH₂'} = 2 Hz, OCH₂), 4,02 (2H, q, ³J_{OCH₂,CH₃} = 7 Hz, OCH₂), 3,98 (1H, qd, OCH₂'), 1,40 (3H, t, CH₃), 1,27 (3H, t, CH₃); **łącznik**: 7,64 (1H, d, ⁴J_{H₃,H₅} = 2 Hz, H₃), 7,17 (1H, dd, ³J_{H₅,H₆} = 8 Hz, H₅), 6,90 (1H, d, H₆), 6,78 (1H, s, CH).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 157,9, 156,7, 156,3, 156,1, 155,4, 148,0, 141,4, 138,1, 133,4, 132,9, 132,8, 132,7, 131,4, 130,9, 129,8, 128,9, 128,9, 127,9, 127,6, 127,3, 127,2, 126,6, 126,4, 125,8, 119,9, 119,3, 117,9, 114,6, 112,2, 106,8, 64,0, 63,5, 55,6, 43,4, 14,8, 14,7.

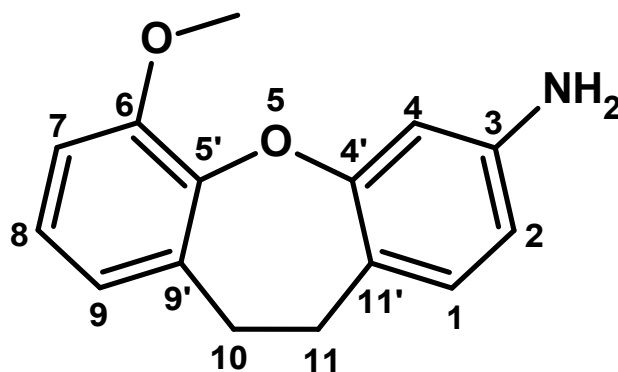
HRMS (ESI): C₃₈H₃₁BrClNO₆, obliczono *m/z*: 711,10178, znaleziono *m/z*: 711,10174.

5.5.5 Otrzymywanie metoksyłowych pochodnych 10,11-dihydrodibenzo[*b,f*]oksepin-3-aminy 5a–b, 5d

Przykładowa synteza:

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 mL umieszczono element mieszający oraz 1 mmol odpowiedniej metoksyłowej pochodnej 3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepinu **1a–b**, **1d**. Do układu dodano następnie 120 mg Pd/C 5% wag., po czym całość rozpuszczono w 10 mL bezwodnego etanolu. Mieszaninę doprowadzono do wrzenia, po czym dodano kroplami 1,5 mL monohydratu hydrazyny. Roztwór przyjął barwę czarną. Reakcję prowadzono w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Przebieg reakcji badano za pomocą analizy położenia plamek na płytkach do chromatografii cienkowarstwowej z użyciem chlorku metylenu jako eluenta. Po zakończeniu reakcji mieszaninę poreakcyjną przefiltrowano z użyciem celitu. Przesącz ekstrahowano z chlorkiem metylenu. Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym MgSO₄, po czym rozpuszczalnik odparowano na wyparce obrotowej otrzymując osady związków **5a–b**, **5d**.

Związek **5a**:



5a

Rysunek 80. Schemat struktury związku **5a** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 3 h

Wydajność: 76%

Postać: biały osad

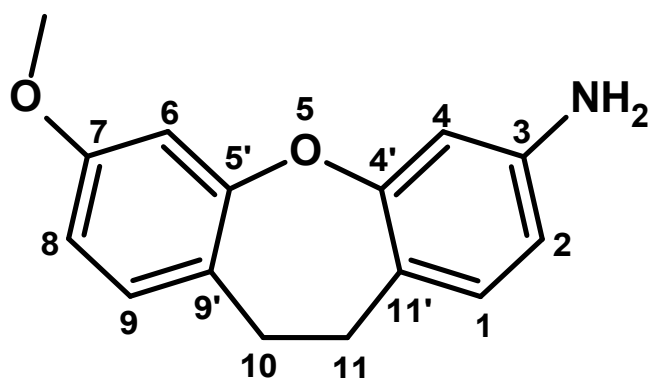
Temp. topnienia: 137°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 6,97 (1H, t, $^3J_{H8,H7,9} = 8,5$ Hz, H₈), 6,86 (1H, d, $^3J_{H1,H2} = 8$ Hz, H₁), 6,77 (1H, dd, $^4J_{H7,H9} = 1,5$ Hz, H₇), 6,75 (1H, dd, H₉), 6,65 (1H, d, $^4J_{H2,H4} = 2,5$ Hz, H₄), 6,37 (1H, dd, $^3J_{H1,H2} = 8$ Hz, H₂), 3,88 (3H, s, OCH₃), 3,59 (2H, br. s, NH₂), 3,13-3,11 (2H, m, H₁₀), 3,02-2,99 (2H, m, H₁₁).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 157,1, 151,4, 146,6, 145,5, 135,0, 131,3, 124,0, 121,3, 120,7, 111,0, 110,2, 108,1, 56,1, 30,5, 30,4.

HRMS (ESI): C₁₅H₁₆NO₂, obliczono m/z : 242,11756, znaleziono m/z : 242,11731.

Związek **5b**:



5b

Rysunek 81. Schemat struktury związku **5b** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 3 h

Wydajność: 69%

Postać: biały osad

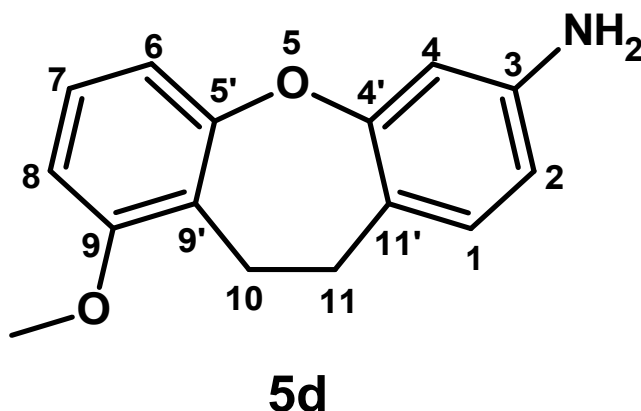
Temp. topnienia: 136°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 7,00 (1H, d, ³J_{H8,H9} = 8,5 Hz, H₉), 6,89 (1H, d, ³J_{H1,H2} = 8 Hz, H₁), 6,70 (1H, d, ⁴J_{H6,H8} = 2,5 Hz, H₆), 6,59 (1H, dd, H₈), 6,52 (1H, d, ⁴J_{H2,H4} = 2,5 Hz, H₄), 6,38 (1H, dd, H₂), 3,78 (3H, s, OCH₃), 3,55 (2H, br. s, NH₂), 3,04-3,01 (2H, m, H₁₁), 3,00-2,97 (2H, m, H₁₀).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 158,7, 157,4, 157,4, 145,7, 131,0, 130,7, 124,0, 121,7, 111,0, 109,9, 107,5, 106,2, 55,4, 30,9, 30,7.

HRMS (ESI): C₁₅H₁₆NO₂, obliczono *m/z*: 242,11756, znaleziono *m/z*: 242,11722.

Związek **5d**:



Rysunek 82. Schemat struktury związku **5d** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 3 h

Wydajność: 66%

Postać: biały osad

Temp. topnienia: 121°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 7,10 (1H, t, $^3J_{H7,H6,8} = 8,5$ Hz, H₇), 6,93 (1H, d, $^3J_{H1,H2} = 8$ Hz, H₁), 6,82 (1H, dd, $^4J_{H6,H8} = 1$ Hz, H₆), 6,62 (1H, dd, H₈), 6,53 (1H, d, $^4J_{H2,H4} = 2,5$ Hz, H₄), 6,39 (1H, dd, H₂), 3,81 (3H, s, OCH₃), 3,58 (2H, br. s, NH₂), 3,03 (4H, s, H₁₀, H₁₁).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 158,2, 158,2, 157,7, 145,7, 130,2, 126,6, 123,2, 120,6, 113,6, 111,2, 107,5, 105,7, 55,7, 29,0, 24,7.

HRMS (ESI): C₁₅H₁₆NO₂, obliczono m/z : 242,11756, znaleziono m/z : 242,11734.

5.5.6 Otrzymywanie metoksyłowych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny-3-aminy **6a–b**, **6d**

Przykładowa synteza:

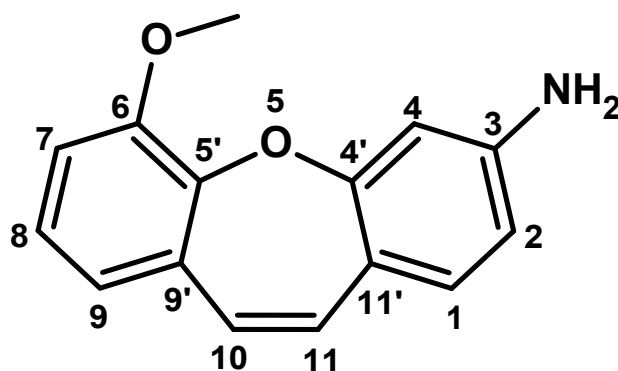
W kolbie okrągłodennej o pojemności 100 mL umieszczono element mieszający oraz 0,37 mmol odpowiedniej metoksyłowej pochodnej 3-nitrodibenzo[*b,f*]oksepiny **1a–b**, **1d**. Następnie całość rozpuszczono w ok. 50 mL kwasu octowego. Roztwór przyjął barwę żółtą. Do układu

dodano następnie 74 mmol uprzednio zaktywowanego cynku. Roztwór zaczął przyjmować barwę jasnozieloną. Przebieg reakcji był badany poprzez analizę położenia plamek znajdujących się na płytkach TLC z wykorzystaniem układu heksan:octan etylu 1:1 jako eluenta. Reakcja prowadzona była w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji mieszaninę poreakcyjną przesączono przez celit, kilkakrotnie przemywając ją chlorkiem metylenu. Przesącz zateżono następnie na wyparce obrotowej. Powstały osad najpierw zakwaszono przy użyciu 1 M HCl, a fazę wodną następnie zobojętniono przy pomocy NaHCO₃. Powstały osad odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano osady związków **6a–b**, **6d**.

Aktywacja cynku:

Uprzednio odważoną ilość cynku umieszczono we fiolce, po czym wypełniono ją 1 M HCl do $\frac{3}{4}$ objętości. Zatkano korkiem i całość mieszano przez około 2 minuty. Następnie całość przesączono na lejku Schotta. Pozostały cynk przemywano następnie jednokrotnie 1 M HCl, trzykrotnie wodą, dwukrotnie etanolem oraz jednokrotnie eterem dietylowym.

Związek **6a**:

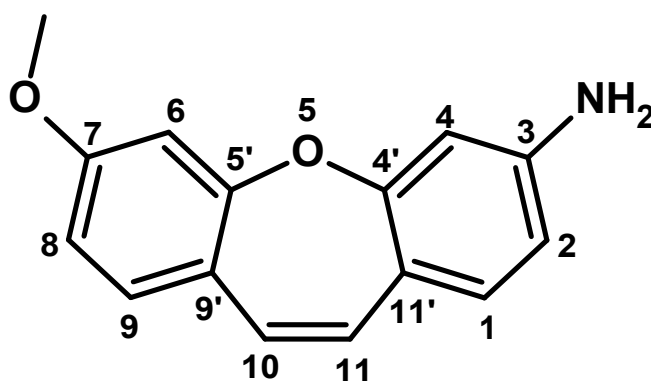


¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 7,01 (1H, t, ³J_{H8,H7,9} = 8 Hz, H₈), 6,95 (1H, d, ³J_{H1,H2} = 8 Hz, H₁), 6,87 (1H, dd, ⁴J_{H7,H9} = 1,5 Hz, H₉), 6,73 (1H, dd, H₇), 6,66 (1H, d, ⁴J_{H2,H4} = 2 Hz, H₄), 6,64 (1H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₁), 6,53 (1H, układ spinowy AB, d, H₁₀), 6,42 (1H, dd, H₂), 3,91 (3H, s, OCH₃), 3,79 (2H, br. s, NH₂).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 158,6 (C6), 151,9 (C3), 148,8 (C5'), 144,9 (C4'), 132,6 (C9'), 130,5 (C8), 130,2 (C1), 126,7 (C11), 124,8 (C10), 121,6 (C11'), 120,7 (C9), 111,9 (C7), 111,6 (C2), 108,5 (C4), 56,3 (OCH₃).

HRMS (ESI): C₁₅H₁₄NO₂+H, obliczono *m/z*: 240,1019, znaleziono *m/z*: 240,1016.

Związek **6b**:



6b

Rysunek 84. Schemat struktury związku 6b wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 24 h

Wydajność: 85%

Postać: szary osad

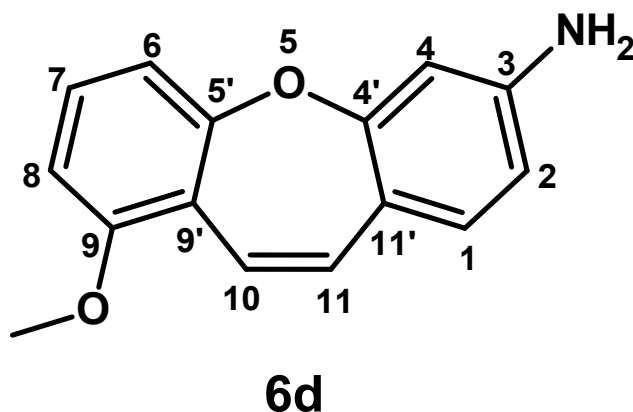
Temp. topnienia: 156°C

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 7,02 (1H, d, ³J_{H8,H9} = 8,4 Hz, H₉), 6,92 (1H, d, ³J_{H1,H2} = 8,2 Hz, H₁), 6,69 (1H, d, ⁴J_{H6,H8} = 2,6 Hz, H₆), 6,65 (1H, dd, H₈), 6,52 (1H, d, ⁴J_{H2,H4} = 2,3 Hz, H₄), 6,48 (1H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 12 Hz, H₁₁), 6,45 (1H, dd, H₂), 6,44 (1H, układ spinowy AB, H₁₀), 3,80 (3H, s, OCH₃).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm): 160,9, 157,9, 157,6, 147,8, 130,2, 129,7, 127,8, 126,4, 123,7, 121,5, 111,7, 110,8, 107,9, 106,8, 55,5.

HRMS (ESI): $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{NO}_2 + \text{H}$, obliczono m/z : 240,1019, znaleziono m/z : 240,1015.

Związek **6d**:



Rysunek 85. Schemat struktury związku **6d** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 24 h

Wydajność: 71%

Postać: szary osad

Temp. topnienia: 170°C

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm): 7,19 (1H, t, $^3J_{\text{H}7,\text{H}6,8} = 8,5$ Hz, H_7), 6,94 (1H, d, $^3J_{\text{H}1,\text{H}2} = 8$ Hz, H_1), 6,84 (1H, układ spinowy AB, d, $^3J_{\text{H}10,\text{H}11} = 11,5$ Hz, H_{11}), 6,77 (1H, dd, $^4J_{\text{H}6,\text{H}8} = 0,5$ Hz, H_6), 6,65 (1H, dd, H_8), 6,64 (1H, układ spinowy AB, d, H_{10}), 6,49 (1H, d, $^4J_{\text{H}2,\text{H}4} = 2,5$ Hz, H_4), 6,42 (1H, dd, H_2), 3,83 (3H, s, OCH_3).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm): 158,6, 158,5, 157,0, 148,5, 130,1, 129,3, 129,3, 121,6, 121,3, 120,2, 113,8, 111,5, 107,6, 106,9, 55,9.

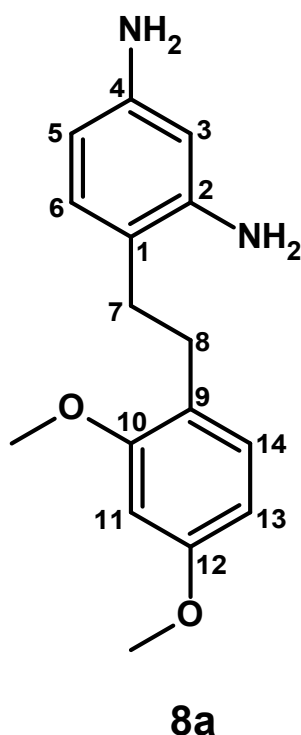
HRMS (ESI): $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_2 + \text{H}$, obliczono m/z : 240,1019, znaleziono m/z : 240,1019.

5.5.7 Otrzymywanie pochodnych 1,3-diamino-4-feniloetylobenzenu 8a–g

Przykładowa synteza:

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 mL umieszczono element mieszający oraz 1 mmol odpowiedniej pochodnej 2,4-dinitrostilbenu **7a–b**. Do układu dodano następnie 120 mg Pd/C 5% wag., po czym całość rozpuszczono w 10 mL bezwodnego etanolu. Mieszaninę doprowadzono do wrzenia, po czym dodano kroplami 1,5 mL monohydratu hydrazyny. Roztwór przyjął barwę czarną. Reakcję prowadzono w temperaturze wrzenia. Przebieg reakcji badano za pomocą analizy położenia plamek na płytkach do chromatografii cienkowarstwowej z użyciem chlorku metylenu jako eluenta. Po zakończeniu reakcji mieszaninę poreakcyjną przefiltrowano z użyciem celitu. Przesącz ekstrahowano z chlorkiem metylenu. Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym MgSO_4 , po czym rozpuszczalnik odparowano na wyparce obrotowej otrzymując osady związków **8a–g**.

Związek **8a**:



Rysunek 86. Schemat struktury związku **8a** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 8 h

Wydajność: 99%

Postać: ciemnobrązowy osad

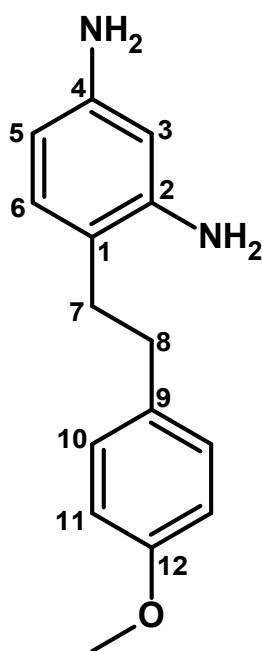
Temp. topnienia: 135°C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 7,04 (1H, d, ³J_{H13,H14} = 8,4 Hz, H₁₄), 6,85 (1H, d, ³J_{H5,H6} = 7,8 Hz, H₆), 6,49 (1H, d, ³J_{H11,H13} = 1,8 Hz, H₁₁), 6,44-6,42 (1H, m, H₁₃), 6,11 (1H, dd, ⁴J_{H3,H5} = 2,4 Hz, H₅), 6,08 (1H, d, H₃), 3,83 (3H, s, OCH₃), 3,81 (3H, s, OCH₃), 3,64 (4H, br. s NH₂), 2,75-2,73 (2H, m, CH₂), 2,61-2,59 (2H, m, CH₂).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 159,3, 158,2, 145,3, 130,4, 130,1, 122,9, 117,6, 105,9, 103,9, 102,5, 98,6, 98,6, 55,3, 55,3, 32,0, 30,6.

HRMS (ESI): C₁₆H₂₁N₂O₂, obliczono *m/z*: 273,15975, znaleziono *m/z*: 273,15952.

Związek **8b**:



8b

Rysunek 87. Schemat struktury związku 8b wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 8 h

Wydajność: 98%

Postać: szary osad

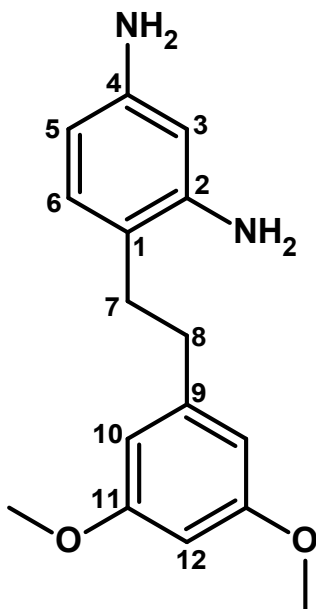
Temp. topnienia: 101°C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 7,10 (2H, d, ³J_{H10,H11} = 8,4 Hz, H₁₀), 6,83 (2H, d, H₁₁), 6,81 (1H, d, ³J_{H5,H6} = 7,8 Hz, H₆), 6,12 (1H, dd, ⁴J_{H3,H5} = 2,4 Hz, H₅), 6,05 (1H, d, H₃), 3,79 (3H, s, OCH₃), 3,28 (4H, br. s, NH₂), 2,83-2,80 (2H, m, CH₂), 2,67-2,65 (2H, m, CH₂).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 157,8, 145,4, 144,9, 134,2, 130,3, 129,3, 117,0, 113,8, 106,3, 102,6, 55,2, 34,9, 32,9.

HRMS (ESI): C₁₅H₁₉N₂O, obliczono *m/z*: 243,14919, znaleziono *m/z*: 243,14920.

Związek **8c**:



8c

Rysunek 88. Schemat struktury związku **8c** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 8 h

Wydajność: 100%

Postać: ciemnoczerwony osad

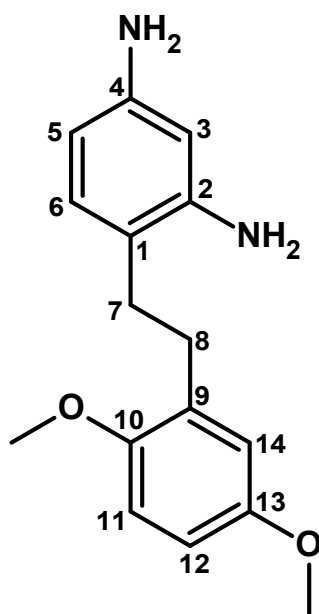
Temp. topnienia: 97°C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 6,84 (1H, d, ³J_{H5,H6} = 8,4 Hz, H₆), 6,37 (2H, d, ⁴J_{H10,H12} = 1,8 Hz, H₁₀), 6,33 (1H, t, H₁₂), 6,15 (1H, dd, ⁴J_{H3,H5} = 1,2 Hz, H₅), 6,08 (1H, d, H₃), 3,77 (3H, s, OCH₃), 3,63 (4H, br. s, NH₂), 2,83-2,80 (2H, m, CH₂), 2,70-2,67 (2H, m, CH₂).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 160,7, 145,0, 144,9, 144,5, 130,2, 117,1, 106,5, 106,4, 102,9, 97,9, 55,2, 36,0, 32,4.

HRMS (ESI): C₁₆H₂₁N₂O₂, obliczono *m/z*: 273,15975, znaleziono *m/z*: 273,15958.

Związek **8d**:



8d

Rysunek 89. Schemat struktury związku 8d wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 8 h

Wydajność: 97%

Postać: ciemnoszary osad

Temp. topnienia: 86°C

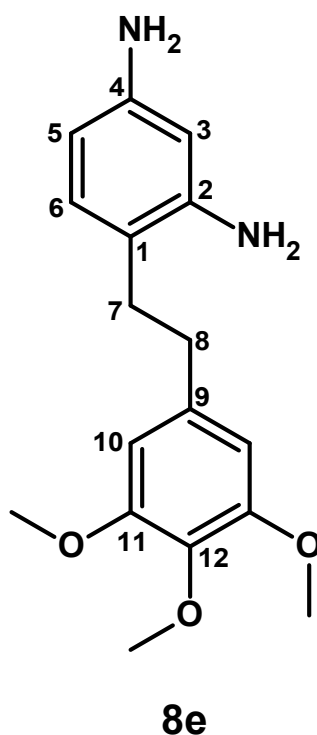
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 6,87 (1H, d, ³J_{H5,H6} = 7,8 Hz, H₆), 6,82 (1H, d, ³J_{H11,H12} = 9 Hz, H₁₁), 6,77 (1H, d, ⁴J_{H12,H14} = 3,6 Hz, H₁₄), 6,74 (1H, dd, H₁₂), 6,11 (1H, dd,

$^4J_{H_3,H_5} = 2,4$ Hz, H_5), 6,08 (1H, d, H_3), 3,83 (3H, s, OCH_3), 3,77 (3H, s, OCH_3), 3,63 (4H, br. s, NH_2), 2,80-2,78 (2H, m, CH_2), 2,66-2,63 (2H, m, CH_2).

^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$, 298 K): δ (ppm): 153,5, 151,6, 145,4, 145,3, 131,7, 130,4, 117,3, 116,3, 111,2, 111,2, 105,9, 102,5, 55,8, 55,6, 31,9, 31,5.

HRMS (ESI): $C_{16}H_{21}N_2O_2$, obliczono m/z : 273,15975, znaleziono m/z : 273,15948.

Związek **8e**:



Rysunek 90. Schemat struktury związku **8e** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 8 h

Wydajność: 100%

Postać: brązowy osad

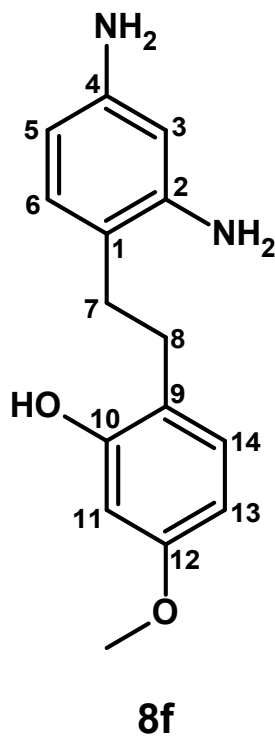
Temp. topnienia: 125,5°C

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$, 298 K): δ (ppm): 6,81 (1H, d, $^3J_{H_5,H_6} = 7,8$ Hz, H_6), 6,37 (2H, s, H_{10}), 6,15 (1H, dd, $^4J_{H_3,H_5} = 2,4$ Hz, H_5), 6,10 (1H, d, H_3), 3,82 (3H, s, OCH_3 -12), 3,81 (6H, s, OCH_3 -11), 3,69 (4H, br. s, NH_2), 2,81-2,79 (2H, m, CH_2), 2,69-2,67 (2H, m, CH_2).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm): 153,0, 144,9, 144,6, 137,7, 136,2, 130,4, 117,4, 106,9, 105,4, 103,2, 77,0, 60,8, 56,0, 36,1, 32,6.

HRMS (ESI): $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3$, obliczono m/z : 303,17032, znaleziono m/z : 303,17020.

Związek **8f**:



Rysunek 91. Schemat struktury związku **8f** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 8 h

Wydajność: 78%

Postać: czarny osad

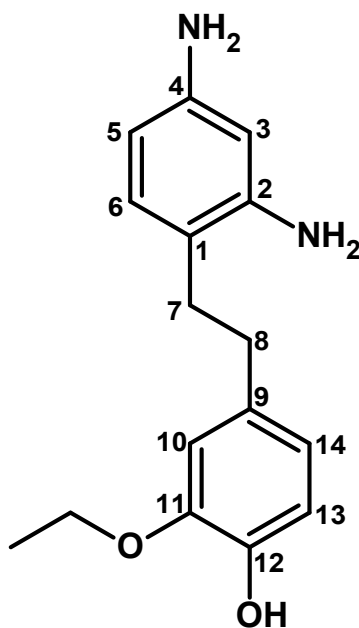
Temp. topnienia: 99°C

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm): 7,01 (1H, d, $^3J_{\text{H}_{13},\text{H}_{14}} = 7,8$ Hz, H_{14}), 6,81 (1H, $^3J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7,8$ Hz, H_6), 6,52 (1H, d, $^4J_{\text{H}_{11},\text{H}_{13}} = 2,4$ Hz, H_{11}), 6,42 (1H, dd, H_{13}), 6,14 (1H, dd, $^4J_{\text{H}_3,\text{H}_5} = 2,4$ Hz, H_5), 6,11 (1H, d, H_3), 3,85 (3H, s, OCH_3), 3,76 (3H, s, OCH_3), 2,78-2,75 (2H, m, CH_2), 2,67-2,65 (2H, m, CH_2).

^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm): 163,8, 162,8, 161,7, 133,5, 131,1, 111,1, 111,1, 107,5, 105,9, 105,9, 101,4, 101,2, 55,5, 55,3, 14,8.

HRMS (ESI): C₁₅H₁₉N₂O₂, obliczono *m/z*: 259,14410, znaleziono *m/z*: 259,14403.

Związek **8g**:



8g

Rysunek 92. Schemat struktury związku **8g** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 8 h

Wydajność: 89%

Postać: ciemnoczerwony osad

Temp. topnienia: 103°C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 6,84 (1H, d, ³J_{H13,H14} = 7,8 Hz, H₁₃), 6,81 (1H, d, ³J_{H5,H6} = 7,8 Hz, H₆), 6,68 (1H, dd, ⁴J_{H10,H14} = 1,8 Hz, H₁₄), 6,63 (1H, d, H₁₀), 6,12 (1H, dd, ⁴J_{H3,H5} = 2,4 Hz, H₅), 6,04 (1H, d, H₃), 4,05 (2H, q, ³J_{CH₂,CH₃} = 7,2 Hz, CH₂), 3,37 (4H, br. s, NH₂), 2,80-2,78 (2H, m, CH₂), 2,67-2,65 (2H, m, CH₂), 1,42 (3H, t, CH₃).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 145,6, 145,5, 145,0, 143,9, 133,9, 130,4, 120,8, 116,9, 114,2, 112,1, 106,3, 102,7, 64,4, 35,5, 32,9, 14,9.

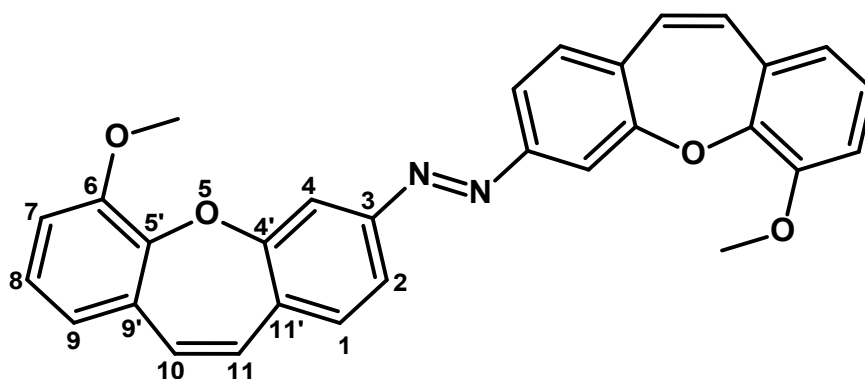
HRMS (ESI): C₁₆H₂₁N₂O₂, obliczono *m/z*: 273,15975, znaleziono *m/z*: 273,15933.

5.5.8 Otrzymywanie azowych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny 9a–h

Przykładowa synteza:

W kolbie okrągłodennej o pojemności 25 mL umieszczono element mieszający oraz 0,21 mmol odpowiedniej pochodnej dibenzo[*b,f*]oksepino-3-aminy **6a–h** i 0,42 mmol NBS. Następnie całość rozpuszczono w ok. 3 mL chlorku metylenu. Mieszający się roztwór przepłukiwano argonem przez 5 minut. Następnie całość ochłodzono do temperatury -78°C poprzez zanurzenie w łaźni zawierającej aceton i suchy lód. Po ochłodzeniu do tej temperatury do układu dodano 0,42 mmol DBU. Roztwór przyjął czerwoną barwę. Po zakończeniu reakcji kolbę ogrzano do temperatury pokojowej, po czym do mieszaniny poreakcyjnej dolano ok. 10 mL wodnego roztworu wodorowęglanu sodu. Całość mieszano przez następne 5 minut, po czym ekstrahowano z 10 mL 1 M kwasu solnego, a następnie $2 \times$ z 20 mL chlorku metylenu. Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym MgSO_4 i zatężono na wyparce obrotowej. Powstały osad rozpuszczono w chlorku metylenu, po czym oczyszczono go na kolumnie chromatograficznej. Stosowanym eluentem był chlorek metylenu. Otrzymano osady związków **9a–h**.

Związek **9a**:



9a

Rysunek 93. Schemat struktury związku **9a** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 15 min.

Wydajność: 45%

Postać: pomarańczowoczerwony osad

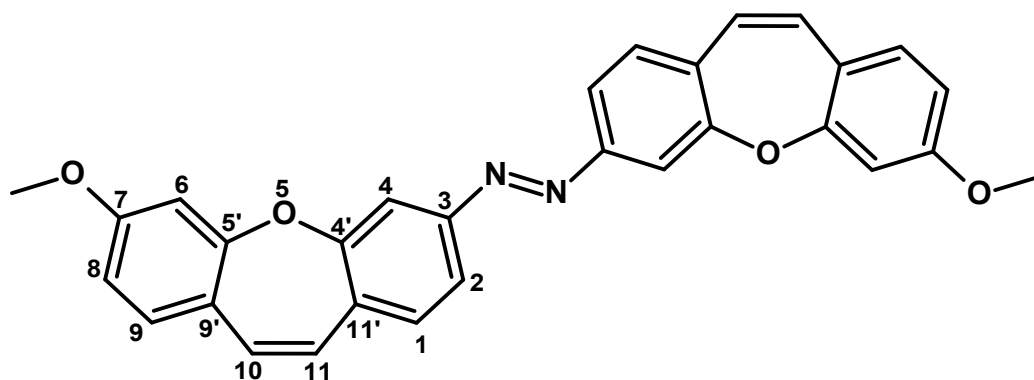
Temp. topnienia: 193°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 7,88 (2H, d, ⁴J_{H2,H4} = 2 Hz, H₄), 7,71 (2H, dd, ³J_{H1,H2} = 8,5 Hz, H₂), 7,30 (2H, d, H₁), 7,07 (2H, t, ³J_{H8,H7,9} = 8,5 Hz, H₈), 6,96 (2H, dd, ⁴J_{H7,H9} = 1,5 Hz, H₉), 6,82 (2H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₀), 6,79 (2H, dd, H₇), 6,79 (2H, układ spinowy AB, d, H₁₁), 3,98 (6H, s, OCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 157,7, 153,8, 151,9, 145,1, 133,6, 131,6, 131,4, 129,6, 129,3, 125,0, 120,8, 119,9, 116,2, 112,9, 56,3.

HRMS (ESI): C₃₀H₂₃N₂O₄+H, obliczono *m/z*: 475,16523, znaleziono *m/z*: 475,16524.

Związek 9b:



9b

Rysunek 94. Schemat struktury związku 9b wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 15 min.

Wydajność: 27%

Postać: pomarańczowy osad

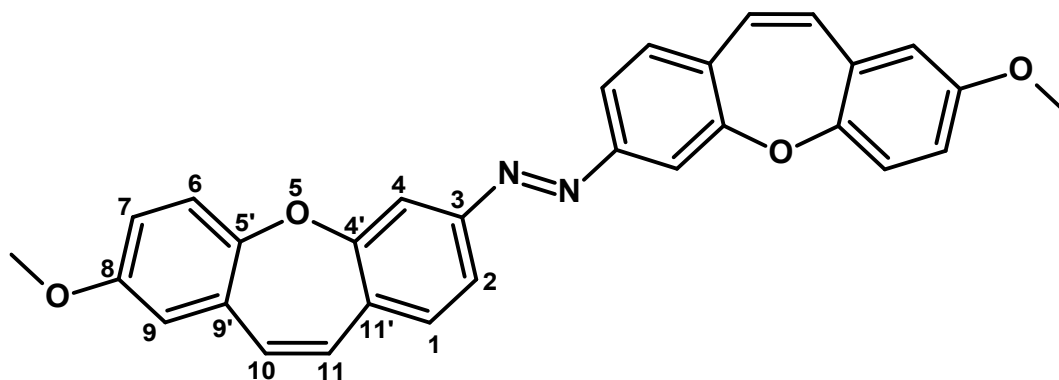
Temp. topnienia: 250°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 7,72 (2H, dd, ³J_{H1,H2} = 8 Hz, ⁴J_{H2,H4} = 2 Hz, H₂), 7,71 (2H, d, H₄), 7,27 (2H, d, H₁), 7,08 (2H, d, ³J_{H8,H9} = 8,5 Hz, H₉), 6,80 (2H, d, ⁴J_{H6,H8} = 2,5 Hz, H₆), 6,71 (2H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₀), 6,70 (2H, dd, H₈), 6,61 (2H, układ spinowy AB, d, H₁₁), 3,84 (6H, s, OCH₃).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm): 161,9, 158,0, 157,3, 153,6, 133,8, 131,3, 130,2, 129,6, 127,0, 123,1, 121,2, 114,6, 111,3, 107,0, 55,6.

HRMS (ESI): $\text{C}_{30}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4 + \text{H}$, obliczono m/z : 475,16523, znaleziono m/z : 475,16498.

Związek **9c**:



9c

Rysunek 95. Schemat struktury związku 9c wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 15 min.

Wydajność: 35%

Postać: pomarańczowy osad

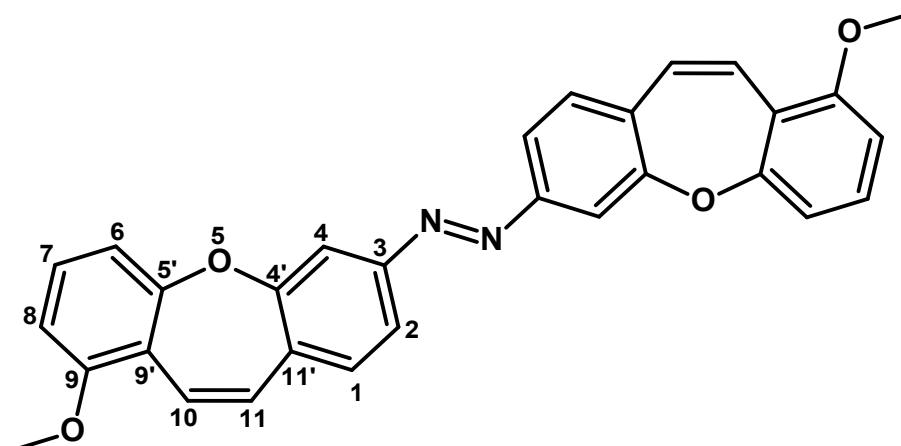
Temp. topnienia: 251,5°C

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm): 7,72 (2H, dd, $^3J_{\text{H1,H2}} = 8,5$ Hz, $^4J_{\text{H2,H4}} = 2$ Hz, H₂), 7,72 (2H, d, H₄), 7,30 (2H, d, H₁), 7,17 (2H, d, $^3J_{\text{H6,H7}} = 9$ Hz, H₆), 6,85 (2H, dd, $^4J_{\text{H7,H9}} = 3$ Hz, H₇), 6,77 (2H, układ spinowy AB, d, $^3J_{\text{H10,H11}} = 11,5$ Hz, H₁₀), 6,74 (2H, układ spinowy AB, d, H₁₁), 6,70 (2H, d, H₉), 3,78 (6H, s, OCH₃).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm): 158,2, 156,7, 153,8, 147,1, 133,3, 131,4, 130,9, 129,8, 129,8, 124,0, 120,9, 119,1, 115,4, 114,1, 55,7.

HRMS (ESI): $\text{C}_{30}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4 + \text{H}$, obliczono m/z : 475,16523, znaleziono m/z : 475,16523.

Związek **9d**:



9d

Rysunek 96. Schemat struktury związku **9d** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 15 min.

Wydajność: 37%

Postać: pomarańczowy osad

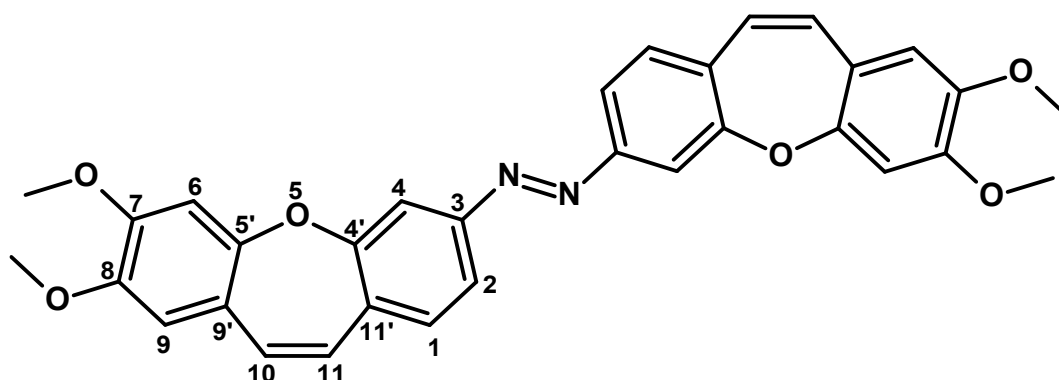
Temp. topnienia: rozkład powyżej 258°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 7,97 (2H, d, ⁴J_{H2,H4} = 2 Hz, H₄), 7,73 (2H, dd, ³J_{H1,H2} = 8,5 Hz, H₂), 7,50 (2H, d, H₁), 6,64 (2H, t, ³J_{H7,H6,8} = 8,5 Hz, H₇), 6,21 (2H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₀), 6,17 (2H, układ spinowy AB, d, H₁₁), 5,76 (2H, d, H₆), 5,65 (2H, d, H₈), 3,93 (6H, s, OCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 157,4, 157,1, 154,3, 153,7, 134,2, 134,0, 129,7, 129,5, 127,5, 118,6, 118,5, 117,4, 107,7, 107,1, 56,6.

HRMS (ESI): C₃₀H₂₃N₂O₄+H, obliczono *m/z*: 475,16523, znaleziono *m/z*: 475,16523.

Związek 9e:



9e

Rysunek 97. Schemat struktury związku 9e wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 15 min.

Wydajność: 15%

Postać: ciemnopomarańczowy/czerwony osad

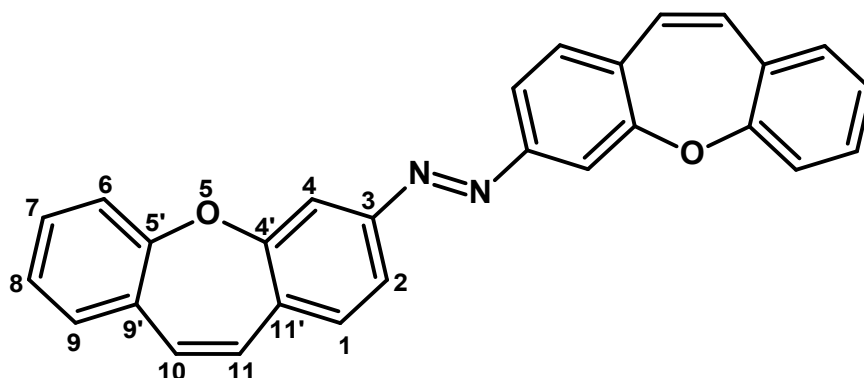
Temp. topnienia: 254°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 7,73 (2H, d, $^4J_{H2,H4} = 2$ Hz, H₄), 7,71 (2H, dd, $^3J_{H1,H2} = 8$ Hz, H₂), 7,28 (2H, d, H₁), 6,81 (2H, s, H₆), 6,70 (2H, układ spinowy AB, d, $^3J_{H10,H11} = 11,5$ Hz, H₁₀), 6,67 (2H, układ spinowy AB, d, H₁₁), 6,64 (2H, s, H₉), 3,92 (6H, s, OCH₃), 3,86 (6H, s, OCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 157,6, 153,7, 150,8, 150,6, 146,2, 133,7, 131,3, 129,6, 127,8, 122,0, 121,2, 114,3, 111,3, 105,4, 56,3, 56,1.

HRMS (ESI): C₃₂H₂₇N₂O₆+H, obliczono m/z : 535,18636, znaleziono m/z : 535,18601.

Związek **9f**:



9f

Rysunek 98. Schemat struktury związku **9f** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 15 min.

Wydajność: 10%

Postać: pomarańczowy osad

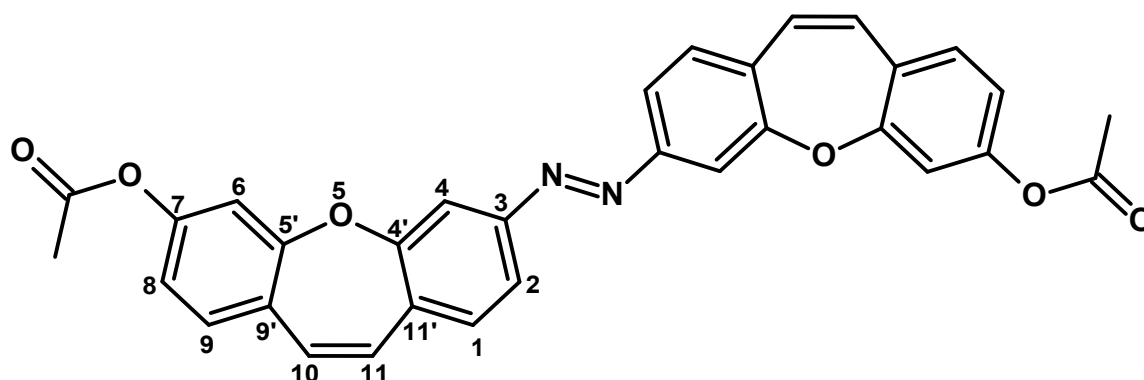
Temp. topnienia: rozkład powyżej 255°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 7,74-7,73 (2H, m, H₄), 7,71 (2H, dd, ³J_{H1,H2} = 8,5 Hz, ⁴J_{H2,H4} = 2,5 Hz, H₂), 7,32 (2H, ddd, ³J_{H6,H7} = 8 Hz, ³J_{H7,H8} = 7,5 Hz, ⁴J_{H7,H9} = 2 Hz, H₇), 7,30 (2H, d, H₁), 7,24 (2H, dd, ⁴J_{H6,H8} = 1,5 Hz, H₆), 7,19 (2H, dd, ³J_{H8,H9} = 7,5 Hz, H₉), 7,14 (2H, ddd, H₈), 6,79 (2H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₀), 6,74 (2H, układ spinowy AB, d, H₁₁).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 158.1 (C4'), 157.2 (C5'), 154.0 (C3), 133.7 (C11'), 131.8 (C10), 130.6 (C9'), 130.5 (C7), 129.9 (C1), 129.7 (C9), 129.6 (C11), 125.4 (C8), 121.8 (C6), 121.3 (C2), 114.9 (C4).

HRMS (ESI): C₂₈H₁₉N₂O₂+H, obliczono m/z : 415,14410, znaleziono m/z : 415,04201.

Związek **9g**:



9g

Rysunek 99. Schemat struktury związku **9g** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 15 min.

Wydajność: 25%

Postać: żółty osad

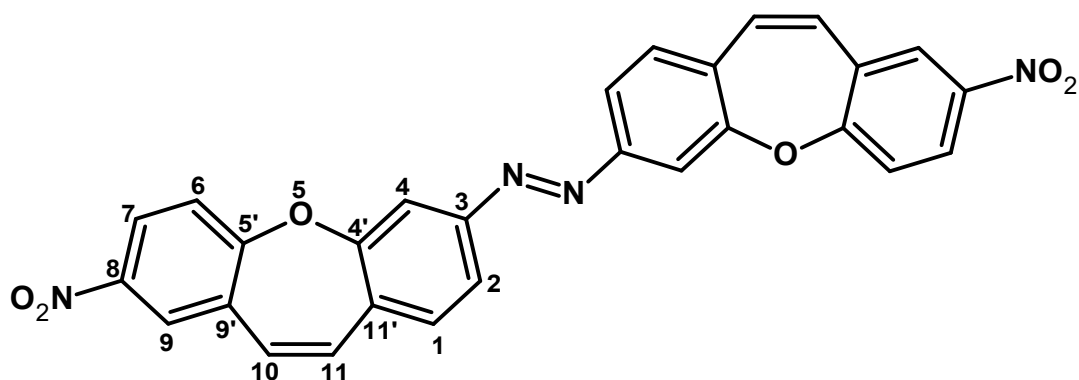
Temp. topnienia: 251,5°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 7,73 (2H, dd, ³J_{H1,H2} = 8 Hz, ⁴J_{H2,H4} = 2 Hz, H₂), 7,69 (2H, d, H₄), 7,29 (2H, d, H₁), 7,17 (2H, d, ³J_{H8,H9} = 8,5 Hz, H₉), 7,03 (2H, d, ⁴J_{H6,H8} = 2 Hz, H₆), 6,91 (2H, dd, H₈), 6,75 (2H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₀), 6,72 (2H, układ spinowy AB, d, H₁₁), 2,30 (6H, s, CH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 169,0 (C_{karb.}), 157,4 (C7), 157,3 (C4'), 153,8 (C5'), 152,2 (C3), 133,3 (C9'), 130,7 (C10), 129,8 (C9), 129,7 (C1), 129,2 (C11), 128,2 (C11'), 121,5 (C2), 118,4 (C4), 115,2 (C8), 114,5 (C6), 21,1 (CH₃).

HRMS (ESI): C₃₂H₂₃N₂O₆+H, obliczono *m/z*: 531,15506, znaleziono *m/z*: 531,15505.

Związek 9h:



9h

Rysunek 100. Schemat struktury związku 9h wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 15 min.

Wydajność: 23%

Postać: pomarańczowy osad

Temp. topnienia: 248°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 8,32 (2H, d, ⁴J_{H7,H9} = 3 Hz, H₉), 8,28 (2H, dd, ³J_{H6,H7} = 9 Hz, H₇), 8,23 (2H, d, ⁴J_{H2,H4} = 2,5 Hz, H₄), 8,09 (2H, dd, ³J_{H1,H2} = 8,5 Hz, H₂), 7,67 (2H, d, H₆), 7,62 (2H, d, H₁), 7,16 (2H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₀), 7,08 (2H, układ spinowy AB, d, H₁₁).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 160,4, 155,2, 148,6, 145,1, 136,4, 131,7, 130,7, 130,6, 130,2, 126,2, 125,3, 123,0, 121,1, 117,0.

HRMS (ESI): C₂₈H₁₆N₄O₆+H, obliczono *m/z*: 505,11426, znaleziono *m/z*: 505,11426.

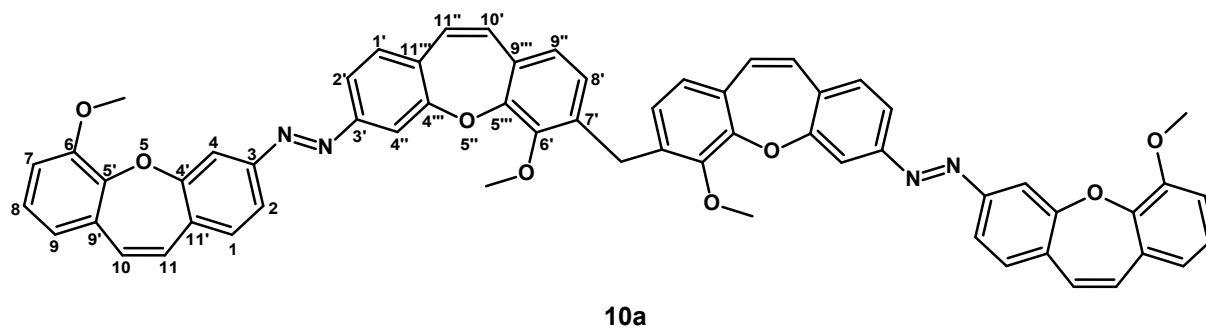
5.5.9 Otrzymywanie symetrycznych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny zawierających więcej niż jedno ugrupowanie azowe 10a–b, 11, 12

Przykładowa synteza:

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 mL umieszczono element mieszający oraz 1 mmol (*E*)-bis(6-metoksydibenzo[*b,f*]oksepin-3-yl)diazenu **9a**. Całość rozpuszczono w chlorku metylenu w celu otrzymania roztworu o stężeniu 5 mM. Początkowo mieszający się roztwór

przepłukiwano argonem przez 30 minut. Po tym czasie do układu dodano ok. 1 mL $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. Następnie przez 2 h do układu dodawano kroplami 2 mmol odpowiedniego aldehydu. Roztwór przyjął barwę ciemnoniebieską. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej oraz w atmosferze argonu. Przebieg reakcji badano za pomocą analizy położenia plamek na płytkach do chromatografii cienkowarstwowej z użyciem chlorku metylenu jako eluenta. Po zakończeniu reakcji mieszaninę poreakcyjną przelano do 20 mL metanolu. Całość mieszano przez następne 5 minut, po czym ekstrahowano $2 \times$ z 20 mL wody, a następnie $2 \times$ z 30 mL chlorku metylenu. Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym MgSO_4 , po czym rozpuszczalnik odparowano na wyparce obrotowej. Powstały osad rozpuszczono w niewielkiej ilości chlorku metylenu i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z użyciem chlorku metylenu jako eluenta, otrzymując osady związków **10a–b**, **11**, **12**.

Związek **10a**:



Rysunek 101. Schemat struktury związku **10a** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 24 h

Wydajność: 49%

Postać: pomarańczowy osad

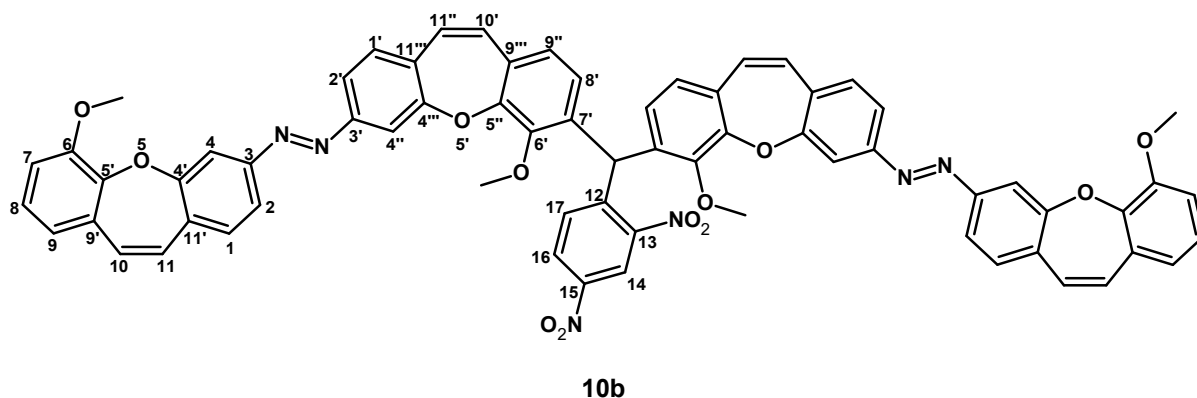
Temp. topnienia: 240°C

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm): 7,92 (2H, d, $^4J_{\text{H}2',\text{H}4''} = 2$ Hz, $\text{H}_{4''}$), 7,88 (2H, d, $^4J_{\text{H}2,\text{H}4} = 2$ Hz, H_4), 7,73 (2H, dd, $^3J_{\text{H}1',\text{H}2'} = 8$ Hz, $\text{H}_{2'}$), 7,72 (2H, dd, $^3J_{\text{H}1,\text{H}2} = 8$ Hz, H_2), 7,32 (2H, d, $\text{H}_{1'}$), 7,31 (2H, d, H_1), 7,08 (2H, t, $^3J_{\text{H}8,\text{H}7,9} = 8$ Hz, H_8), 6,97 (2H, dd, $^4J_{\text{H}7,\text{H}9} = 1,5$ Hz, H_9), 6,92 (2H, układ spinowy AB, d, $^3J_{\text{H}10',\text{H}11''} = 11,5$ Hz, $\text{H}_{10'}$), 6,87 (2H, układ spinowy AB, d, $\text{H}_{11''}$), 6,87 (2H, d, $^3J_{\text{H}8',9''} = 8,5$ Hz, $\text{H}_{8'}$), 6,82 (2H, układ spinowy AB, d, $^3J_{\text{H}10,\text{H}11} = 11,5$ Hz, H_{10}), 6,80 (2H, dd, H_7), 6,79 (2H, układ spinowy AB, d, H_{11}), 6,67 (2H, d, $\text{H}_{9''}$), 3,98 (6H, s, OCH_3), 3,97 (2H, s, CH_2), 3,96 (6H, s, OCH_3).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm): 158,3, 157,8, 153,9, 153,8, 151,9, 150,5, 146,1, 145,1, 133,7, 133,7, 131,6, 131,4, 129,9, 129,9, 129,6, 129,5, 129,4, 129,1, 128,5, 126,1, 125,0, 120,8, 120,0, 119,9, 116,2, 116,2, 112,9, 112,5, 56,3, 56,3, 35,5.

HRMS (ESI): $\text{C}_{61}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_8 + \text{H}$, obliczono m/z : 961,32319, znaleziono m/z : 961,32319.

Związek **10b**:



Rysunek 102. Schemat struktury związku 10b wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 3 tyg.

Wydajność: 7%

Postać: czerwony osad

Temp. topnienia: rozkład powyżej 251°C

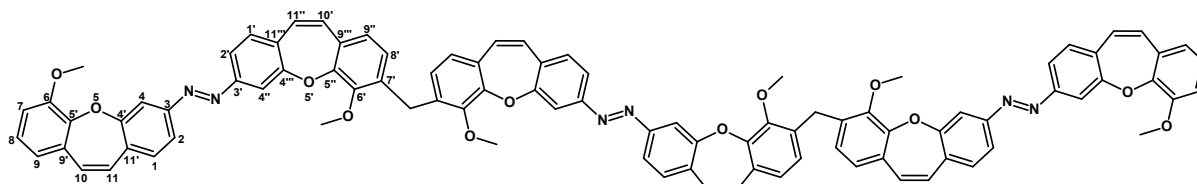
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm): 8,78 (1H, d, $^4J_{\text{H}14,\text{H}16} = 2,5$ Hz, H_{14}), 8,24 (1H, dd, $^3J_{\text{H}16,\text{H}17} = 8,5$ Hz, H_{16}), 7,89 (2H, d, $^4J_{\text{H}2',\text{H}4''} = 2$ Hz, $\text{H}_{4''}$), 7,88 (2H, d, $^4J_{\text{H}2,\text{H}4} = 2$ Hz, H_4), 7,73 (2H, dd, $^3J_{\text{H}1',\text{H}2'} = 8$ Hz, $\text{H}_{2'}$), 7,71 (2H, d, $^3J_{\text{H}1,\text{H}2} = 8$ Hz, H_2), 7,31 (2H, d, $\text{H}_{1'}$), 7,29 (2H, d, H_1), 7,14 (1H, d, H_{17}), 7,08 (2H, t, $^3J_{\text{H}8,\text{H}7,9} = 8$ Hz, H_8), 6,97 (2H, dd, $^4J_{\text{H}7,\text{H}9} = 1,5$ Hz, H_9), 6,82 (2H, układ spinowy AB, d, $^3J_{\text{H}10',\text{H}11''} = 11,5$ Hz, $\text{H}_{10'}$), 6,82 (2H, układ spinowy AB, d, $^3J_{\text{H}10,\text{H}11} = 11,5$ Hz, H_{10}), 6,79 (2H, dd, H_7), 6,79 (2H, układ spinowy AB, d, $\text{H}_{11''}$), 6,75 (1H, s, CH), 6,73 (2H, d, $^3J_{\text{H}8',\text{H}9''} = 8,5$ Hz, $\text{H}_{8'}$), 6,72 (2H, układ spinowy AB, H_{11}), 6,33 (2H, d, $\text{H}_{9''}$), 3,98 (6H, s, OCH_3), 3,95 (6H, s, OCH_3).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm): 158,3, 157,7, 154,1, 153,8, 151,9, 151,5, 146,7, 146,7, 145,0, 144,7, 144,2, 135,8, 133,8, 133,4, 131,6, 131,5, 131,1, 130,6, 130,1, 129,6, 129,5,

129,4, 129,4, 127,1, 126,6, 126,0, 125,0, 120,8, 120,2, 120,0, 116,2, 115,9, 112,9, 112,0, 56,3, 56,2, 44,6.

HRMS (ESI): C₆₇H₄₆N₆O₁₂+H, obliczono *m/z*: 1127,32464, znaleziono *m/z*: 1127,32465.

Związek 11:



11

Rysunek 103. Schemat struktury związku 11 wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 24 h

Wydajność: 5%

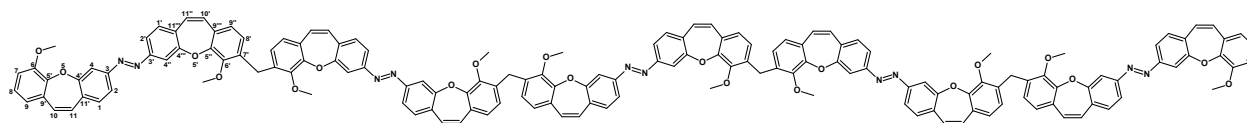
Postać: czerwony osad

Temp. topnienia: rozkład powyżej 255°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 7,92 (4H, d, ⁴J_{H2',H4''} = 2 Hz, H_{4''}), 7,88 (2H, d, ⁴J_{H2,H4} = 2 Hz, H₄), 7,73 (4H, dd, ³J_{H1',H2'} = 7,5 Hz, H_{2'}), 7,72 (2H, dd, ³J_{H1,H2} = 8 Hz, H₂), 7,32 (4H, d, H_{1'}), 7,31 (2H, d, H₁), 7,08 (2H, t, ³J_{H8,H7,9} = 8 Hz, H₈), 6,97 (2H, dd, ⁴J_{H7,H9} = 1,5 Hz, H₉), 6,92 (4H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10',H11''} = 11,5 Hz, H_{10'}), 6,87 (4H, układ spinowy AB, d, H_{11''}), 6,87 (4H, d, ³J_{H8',H9''} = 8,5 Hz, H_{8'}), 6,82 (2H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₀), 6,80 (2H, dd, H₇), 6,79 (2H, układ spinowy AB, d, H₁₁), 6,67 (4H, d, H_{9''}), 3,98 (12H, s, OCH₃), 3,97 (4H, s, CH₂), 3,96 (6H, s, OCH₃).

HRMS (ESI): C₉₂H₆₇N₆O₁₂+H, obliczono *m/z*: 1447,48114, znaleziono *m/z*: 1447,48115.

Związek 12:



12

Rysunek 104. Schemat struktury związku 12 wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 36 h

Wydajność: 40%

Postać: czerwony osad

Temp. topnienia: rozkład powyżej 245°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 7,92 (8H, d, ⁴J_{H2',H4''} = 2 Hz, H_{4''}), 7,88 (2H, d, ⁴J_{H2,H4} = 2 Hz, H₄), 7,74 (8H, dd, ³J_{H1',H2'} = 8 Hz, H_{2'}), 7,72 (2H, dd, ³J_{H1,H2} = 8 Hz, H₂), 7,33 (8H, d, H_{1'}), 7,32 (2H, d, H₁), 7,07 (2H, t, ³J_{H8,H7,9} = 8 Hz, H₈), 6,96 (2H, dd, ⁴J_{H7,H9} = 1,5 Hz, H₉), 6,92 (8H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10',H11''} = 11,5 Hz, H_{10'}), 6,91 (8H, układ spinowy AB, d, H_{11''}), 6,87 (8H, d, ³J_{H8',9''} = 8,5 Hz, H_{8'}), 6,82 (2H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₀), 6,79 (2H, dd, H₇), 6,79 (2H, układ spinowy AB, d, H₁₁), 6,67 (8H, d, H_{9''}), 3,98 (6H, s, OCH₃), 3,98 (8H, s, CH₂), 3,96 (24H, s, OCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 158,3, 157,8, 153,9, 153,9, 152,0, 150,5, 146,2, 145,2, 133,8, 133,7, 131,7, 131,4, 129,9, 129,9, 129,6, 129,6, 129,4, 129,1, 128,5, 126,1, 125,0, 120,8, 120,0, 119,9, 116,3, 116,2, 112,0, 112,6, 56,3, 56,3, 35,5.

HRMS (ESI): C₁₅₄H₁₁₀N₁₀O₂₀+H, obliczono *m/z*: 2419,79706, znaleziono *m/z*: 2419,79708.

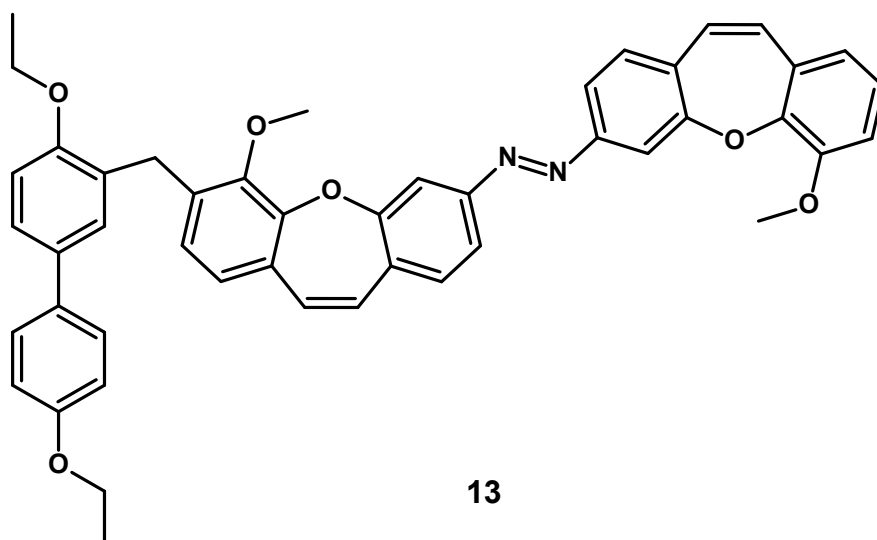
5.5.10 Otrzymywanie połączenia (*E*)-bis(6-metoksydibenzo[*b,f*]oksepin-3-yl)diazenu z 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylem i łącznikiem metylenowym 13

Przykładowa synteza:

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 mL umieszczono element mieszający, 1 mmol (*E*)-bis(6-metoksydibenzo[*b,f*]oksepin-3-yl)diazenu **9a** oraz 2 mmole 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylu. Całość rozpuszczono w chlorku metylenu w celu otrzymania roztworu o stężeniu 5 mM. Początkowo mieszający się roztwór przepłukiwano argonem przez 30 minut. Po tym czasie do układu dodano ok. 0,5 mL BF₃·Et₂O. Następnie przez 2 h do układu dodawano kroplami 2 mmol paraformaldehydu. Roztwór przyjął barwę ciemnoniebieską. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej oraz w atmosferze argonu. Przebieg reakcji badano za pomocą analizy położenia plamek na płytkach do chromatografii cienkowarstwowej z użyciem chlorku metylenu jako eluenta. Po zakończeniu reakcji mieszaninę poreakcyjną przelano do 20 mL metanolu. Całość mieszano przez następne 5 minut, po czym ekstrahowano

2× z 20 mL wody, a następnie 2× z 30 mL chlorku metylenu. Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym MgSO₄, po czym rozpuszczalnik odparowano na wyparce obrotowej. Powstały osad rozpuszczono w niewielkiej ilości chlorku metylenu i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z użyciem chlorku metylenu jako eluenta. Otrzymano zanieczyszczony osad związku **13**.

Związek **13**:



Rysunek 105. Schemat struktury związku **13**.

Czas reakcji: 24 h

Wydajność: 49% (crude)

Postać: czerwony osad

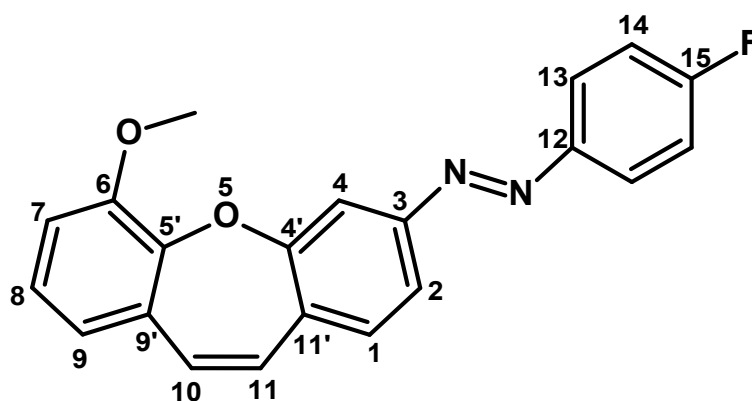
5.5.11 Otrzymywanie niesymetrycznych *azo*-pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepyń po reakcji z 4-fluoroaniliną **14a–b**, **14e–g**

Przykładowa synteza:

W kolbie stożkowej o pojemności 100 mL umieszczono element mieszający oraz 5 mmol *p*-fluoroaniliny. Całość rozpuszczono w 25 mL chlorku metylenu. Następnie do układu dodano 10 mmol roztwór oksonu w 25 mL wody. Roztwór przybrał barwę jasnozieloną lub pomarańczową, który ciemniał z czasem. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej oraz w atmosferze argonu. Przebieg reakcji badano za pomocą analizy położenia plamek na płytkach do chromatografii cienkowarstwowej z użyciem chlorku metylenu jako eluenta. Po 3 godzinach

oddzielono warstwę organiczną, a warstwę wodną ekstrahowano dwukrotnie DCM. Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym MgSO_4 , po czym rozpuszczalnik odparowano na wyparce obrotowej a powstały osad użyto bez dalszego oczyszczania do kolejnej reakcji, w której do kolby dodano 2,5 mmol odpowiedniej pochodnej dibenzo[*b,f*]oksepiny **6a–b**, **6e–g**. Całość rozpuszczono w 25 mL kwasu octowego. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej oraz w atmosferze argonu. Po zakończeniu reakcji mieszaninę poreakcyjną odparowano na wyparce obrotowej. Powstały osad rozpuszczono w niewielkiej ilości chlorku metylenu i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z użyciem chlorku metylenu jako eluenta. Otrzymano osady związków **14a–b**, **14e–g**.

Związek **14a**:



14a

Rysunek 106. Schemat struktury związku **14a** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 16 h

Wydajność: 68%

Postać: pomarańczowy osad

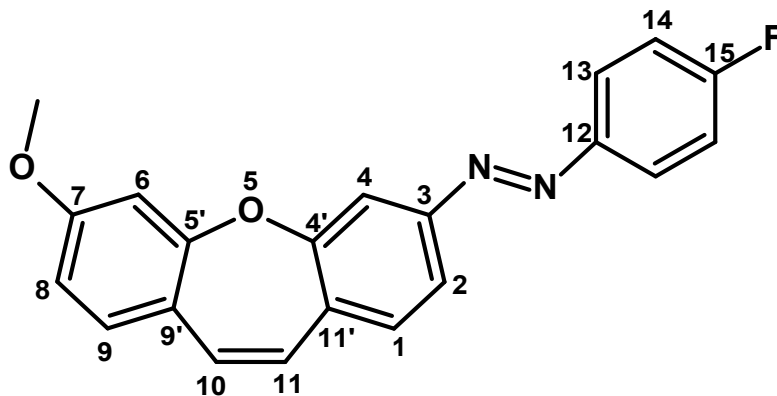
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm): 7,95 (2H, dd, $^3J_{\text{H}13,\text{H}14} = 9$ Hz, $^4J_{\text{H}13,\text{F}} = 5,5$ Hz, H_{13}), 7,86 (1H, d, $^4J_{\text{H}2,\text{H}4} = 2$ Hz, H_4), 7,69 (1H, dd, $^3J_{\text{H}1,\text{H}2} = 8,5$ Hz, H_2), 7,30 (1H, d, H_1), 7,20 (2H, dd, $^3J_{\text{H}14,\text{F}} = 9$ Hz, H_{14}), 7,07 (1H, t, $^3J_{\text{H}8,\text{H}7,9} = 8$ Hz, H_8), 6,96 (1H, dd, $^4J_{\text{H}7,\text{H}9} = 1,5$ Hz, H_9), 6,82 (1H, układ spinowy AB, d, $^3J_{\text{H}10,\text{H}11} = 11,5$ Hz, H_{10}), 6,79 (1H, dd, H_7), 6,79 (1H, układ spinowy AB, d, H_{11}), 3,96 (3H, s, OCH_3).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm): 164,4 (d, $^1J_{\text{C}15,\text{F}} = 251,25$ Hz, C_{15}), 157,8 ($\text{C}_{4'}$), 153,6 (C_3), 151,9 (C_6), 149,2 (d, $^4J_{\text{C}12,\text{F}} = 2,5$ Hz, C_{12}), 145,1 ($\text{C}_{5'}$), 133,5 ($\text{C}_{11'}$), 131,6

(C9'), 131,3 (C10), 129,5 (C1), 129,4 (C11), 125,0 (C9), 125,0 (d, $^3J_{C13,F} = 8,75$ Hz, C13), 120,8 (C2), 119,8 (C8), 116,0 (d, $^2J_{C14,F} = 22,5$ Hz, C14), 116,0 (C4), 112,8 (C7), 56,3 (OCH₃).

HRMS (ESI): C₂₁H₁₅FN₂O₂+H, obliczono m/z : 347,11903, znaleziono m/z : 347,11867.

Związek **14b**:



14b

Rysunek 107. Schemat struktury związku **14b** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 16 h

Wydajność: 56%

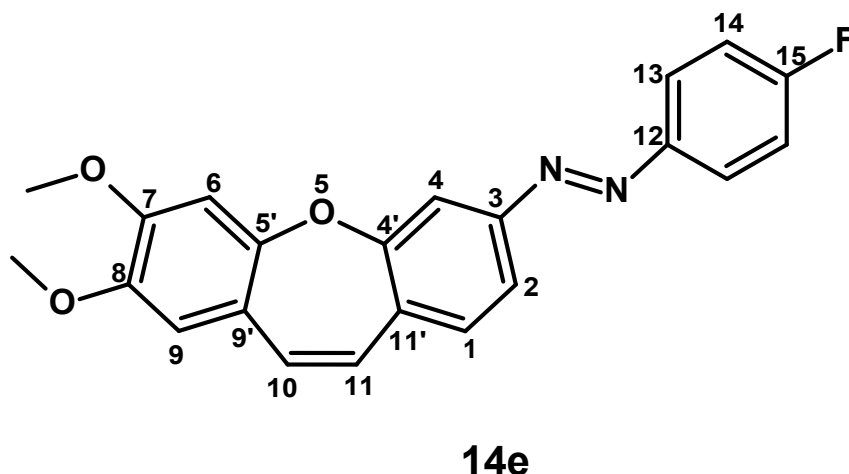
Postać: pomarańczowy osad

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 7,97 (2H, dd, $^3J_{H13,H14} = 9$ Hz, $^4J_{H13,F} = 5,5$ Hz, H₁₃), 7,73 (1H, dd, $^3J_{H1,H2} = 8$ Hz, $^4J_{H2,H4} = 2$ Hz, H₂), 7,71 (1H, d, H₄), 7,47 (1H, d, H₁), 7,44 (2H, t, $^3J_{H14,F} = 9$ Hz, H₁₄), 7,23 (1H, d, $^3J_{H8,H9} = 8,5$ Hz, H₉), 6,97 (1H, d, $^4J_{H6,H8} = 2,5$ Hz, H₆), 6,83 (1H, układ spinowy AB, d, $^3J_{H10,H11} = 11,5$ Hz, H₁₀), 6,79 (1H, dd, H₈), 6,72 (1H, układ spinowy AB, d, H₁₁), 3,79 (3H, s, OCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 164,6 (d, $^1J_{C15,F} = 251$ Hz, C15), 162,1 (C7), 158,2 (C5'), 157,5 (C4'), 153,7 (C3), 149,4 (d, $^4J_{C12,F} = 2,875$ Hz, C12), 133,7 (C11'), 131,3 (C10), 130,3 (C9), 129,6 (C1), 127,1 (C11), 125,0 (d, $^3J_{C13,F} = 8,75$ Hz, C13), 123,3 (C9'), 120,8 (C2), 116,1 (d, $^2J_{C14,F} = 22,875$ Hz, C14), 114,7 (C4), 111,3 (C8), 107,2 (C6), 55,6 (OCH₃).

HRMS (ESI): C₂₁H₁₅FN₂O₂+H, obliczono m/z : 347,11903, znaleziono m/z : 347,11871.

Związek 14e:



Rysunek 108. Schemat struktury związku 14e wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 16 h

Wydajność: 50%

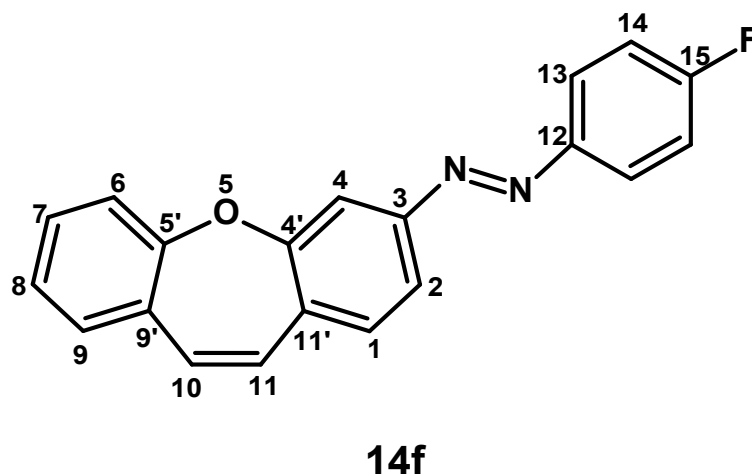
Postać: pomarańczowy osad

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 7,97 (2H, dd, ³J_{H13,H14} = 9 Hz, ⁴J_{H13,F} = 5,5 Hz, H₁₃), 7,73 (1H, dd, ³J_{H1,H2} = 8 Hz, ⁴J_{H2,H4} = 2 Hz, H₂), 7,70 (1H, d, H₄), 7,47 (1H, d, H₁), 7,44 (2H, t, ³J_{H14,F} = 9 Hz, H₁₄), 7,03 (1H, s, H₆), 6,89 (1H, s, H₉), 6,82 (1H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₀), 6,76 (1H, układ spinowy AB, d, H₁₁), 3,80 (3H, s, OCH₃), 3,73 (3H, s, OCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 164,5 (d, ¹J_{C15,F} = 251,125 Hz, C15), 157,6 (C4'), 153,5 (C3), 150,7 (C7), 150,7 (C5'), 149,1 (d, ⁴J_{C12,F} = 3 Hz, C12), 146,2 (C8), 133,6 (C11'), 131,2 (C10), 129,6 (C1), 127,8 (C11), 124,9 (d, ³J_{C13,F} = 8,875 Hz, C13), 122,0 (C9'), 121,0 (C2), 116,1 (d, ²J_{C14,F} = 22,75 Hz, C14), 114,2 (C4), 111,3 (C9), 105,4 (C6), 56,3 (OCH₃), 56,1 (OCH₃).

HRMS (ESI): C₂₂H₁₇FN₂O₃+H, obliczono *m/z*: 377,12960, znaleziono *m/z*: 377,12948.

Związek 14f:



Rysunek 109. Schemat struktury związku 14f wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 16 h

Wydajność: 49%

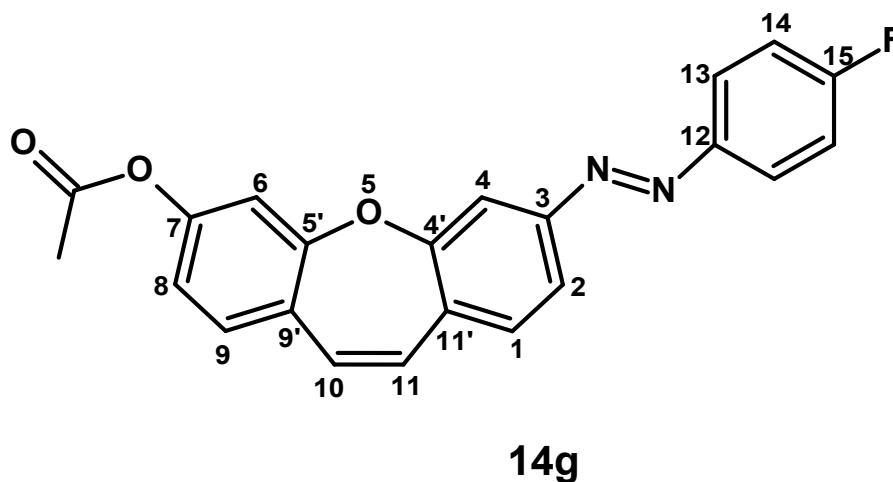
Postać: pomarańczowy osad

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 7,98 (2H, dd, ³J_{H13,H14} = 9 Hz, ⁴J_{H13,F} = 5,5 Hz, H₁₃), 7,75 (1H, dd, ³J_{H1,H2} = 8,5 Hz, ⁴J_{H2,H4} = 2 Hz, H₂), 7,71 (1H, d, H₄), 7,52 (1H, d, H₁), 7,45 (2H, t, ³J_{H14,F} = 9 Hz, H₁₄), 7,39 (1H, dd, ³J_{H6,H7} = 7 Hz, ⁴J_{H6,H8} = 1,5 Hz, H₆), 7,35-7,33 (2H, m, H₇, H₈), 7,22 (1H, dd, ³J_{H8,H9} = 7 Hz, ⁴J_{H7,H9} = 1 Hz, H₉), 6,92 (1H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₀), 6,89 (1H, układ spinowy AB, d, H₁₁).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 164,4 (d, ¹J_{C15,F} = 251,25 Hz, C₁₅), 157,9 (C_{4'}), 157,0 (C_{5'}), 153,7 (C₃), 149,1 (d, ⁴J_{C12,F} = 3 Hz, C₁₂), 133,3 (C_{11'}), 131,5 (C₁₀), 130,4 (C_{9'}), 130,3 (C₇), 129,7 (C₁), 129,5 (C₉), 129,3 (C₁₁), 125,1 (C₈), 125,0 (d, ³J_{C13,F} = 8,875 Hz, C₁₃), 121,5 (C₆), 120,9 (C₂), 116,1 (d, ²J_{C14,F} = 22,75 Hz, C₁₄), 114,56 (C₄).

HRMS (ESI): C₂₀H₁₃FN₂O+H, obliczono *m/z*: 317,10847, znaleziono *m/z*: 317,10829.

Związek **14g**:



Rysunek 110. Schemat struktury związku **14g** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 16 h

Wydajność: 61%

Postać: pomarańczowy osad

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 7,95 (2H, dd, ³J_{H13,H14} = 9 Hz, ⁴J_{H13,F} = 5 Hz, H₁₃), 7,71 (1H, dd, ³J_{H1,H2} = 8,5 Hz, ⁴J_{H2,H4} = 2 Hz, H₂), 7,68 (1H, d, H₄), 7,28 (1H, d, H₁), 7,20 (2H, dd, ³J_{H14,F} = 9 Hz, H₁₄), 7,17 (1H, d, ³J_{H8,H9} = 8,5 Hz, H₉), 7,03 (1H, d, ⁴J_{H6,H8} = 2,5 Hz, H₆), 6,91 (1H, dd, H₈), 6,74 (1H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₀), 6,71 (1H, układ spinowy AB, d, H₁₁), 2,30 (3H, s, OCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 169,0 (C_{karb.}), 164,5 (d, ¹J_{C15,F} = 251,13 Hz, C₁₅), 157,4 (C_{5'}), 157,3 (C_{4'}), 153,7 (C₃), 152,2 (C₇), 149,1 (d, ⁴J_{C12,F} = 3 Hz, C₁₂), 133,1 (C_{11'}), 130,6 (C₁₀), 129,8 (C₉), 129,7 (C₁), 129,1 (C₁₁), 128,2 (C_{9'}), 125,0 (d, ³J_{C13,F} = 8,75 Hz, C₁₃), 121,3 (C₂), 118,4 (C₈), 116,1 (d, ²J_{C14,F} = 22,75 Hz, C₁₄), 115,2 (C₆), 114,38 (C₄), 21,09 (CH₃).

HRMS (ESI): C₂₂H₁₅FN₂O₃+H, obliczono *m/z*: 375,11395, znaleziono *m/z*: 375,11403.

5.5.12 Otrzymywanie oligomerycznych połączeń metoksyowych pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny-3-aminy z różnymi łącznikami 15a–b

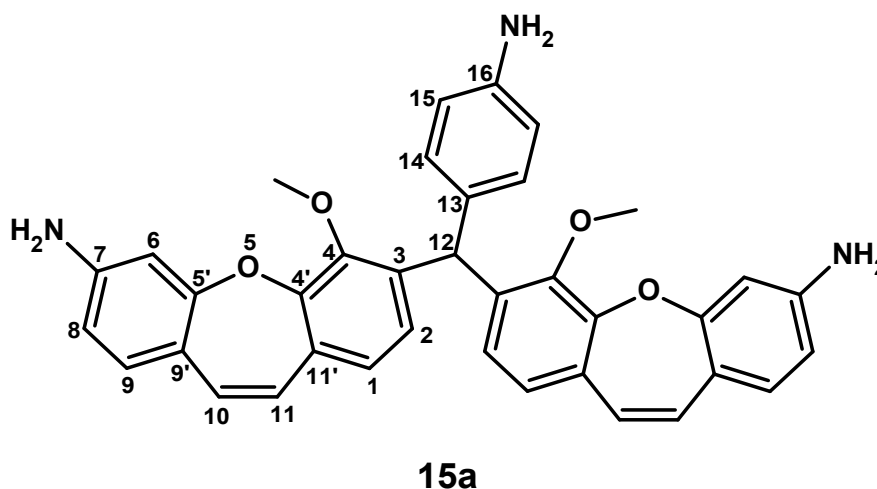
Przykładowa synteza:

W kolbie okrągłodennej o pojemności 100 mL umieszczono element mieszający oraz 0,15 mmol związku **3a** lub **3c**. Następnie całość rozpuszczono w ok. 50 mL kwasu octowego. Roztwór przyjął barwę żółtą. Do układu dodano następnie 30 mmol uprzednio zaktywowanego cynku. Roztwór zaczął przyjmować barwę jasnozieloną. Przebieg reakcji był badany poprzez analizę położenia plamek znajdujących się na płytkach TLC z wykorzystaniem układu heksan:octan etylu 1:1 jako eluenta. Reakcja prowadzona była w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji mieszaninę poreakcyjną przesączono przez celit, kilkakrotnie przemywając ją chlorkiem metylenu. Przesącz zatężono następnie na wyparce obrotowej. Powstały osad najpierw zakwaszono przy użyciu 1 M HCl, a fazę wodną następnie zobojętniono przy pomocy NaHCO₃. Powstały osad odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano osady związków **15a–b**.

Aktywacja cynku:

Uprzednio odważoną ilość cynku umieszczono we fiolce, po czym wypełniono ją 1 M HCl do $\frac{3}{4}$ objętości. Zatkano korkiem i całość mieszano przez około 2 minuty. Następnie całość przesączono na lejku Schotta. Pozostały cynk przemywano następnie jednokrotnie 1 M HCl, trzykrotnie wodą, dwukrotnie etanolem oraz jednokrotnie eterem dietylowym.

Związek **15a**:



Rysunek 111. Schemat struktury związku 15a wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 48 h

Wydajność: 71%

Postać: szary osad

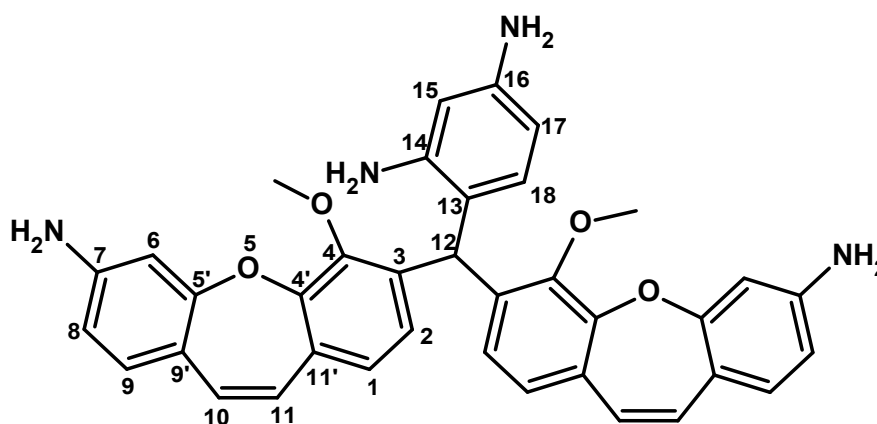
Temp. topnienia: rozkład powyżej 255°C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 6,88 (2H, d, ³J_{H8,H9} = 9 Hz, H₉), 6,88 (2H, d, ³J_{H14,H15} = 8 Hz, H₁₄), 6,59 (2H, d, ³J_{H1,H2} = 8 Hz, H₁), 6,54 (2H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₀), 6,45 (2H, d, H₂), 6,43 (2H, d, ⁴J_{H6,H8} = 2,5 Hz, H₆), 6,36 (2H, d, H₁₅), 6,33 (2H, układ spinowy AB, d, H₁₁), 6,32 (2H, dd, H₈), 5,46 (1H, s, CH), 3,78 (6H, s, OCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 158,5, 151,4, 149,9, 146,9, 144,9, 133,5, 130,9, 130,0, 129,8, 129,7, 129,6, 125,4, 121,7, 118,4, 114,0, 111,0, 110,4, 106,1, 55,8, 47,8.

HRMS (ESI): C₃₇H₃₁N₃O₄+H, obliczono *m/z*: 582,23873, znaleziono *m/z*: 582,23869.

Związek **15b**:



15b

Rysunek 112. Schemat struktury związku 15b wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 48 h

Wydajność: 63%

Postać: szary osad

Temp. topnienia: rozkład powyżej 255°C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 6,87 (2H, d, ³J_{H8,H9} = 8,5 Hz, H₉), 6,87 (1H, d, ³J_{H17,H18} = 9 Hz, H₁₈), 6,53 (2H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₀), 6,43 (2H, d, ⁴J_{H6,H8} = 2,5 Hz, H₆), 6,38 (2H, d, ³J_{H1,H2} = 8,5 Hz, H₁), 6,32 (2H, dd, ⁴J_{H6,H8} = 2,5 Hz, H₈), 6,27 (2H, układ spinowy AB, d, H₁₁), 5,99 (2H, d, H₂), 5,90 (1H, d, ⁴J_{H15,H17} = 2,5 Hz, H₁₅), 5,75 (1H, dd, H₁₇), 5,49 (1H, s, CH), 3,77 (3H, s, OCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 159,8, 158,6, 151,4, 150,5, 150,1, 144,9, 132,5, 131,0, 130,4, 129,9, 125,2, 121,8, 118,5, 111,2, 110,5, 106,2, 105,7, 105,3, 104,2, 101,6, 55,9, 47,7.

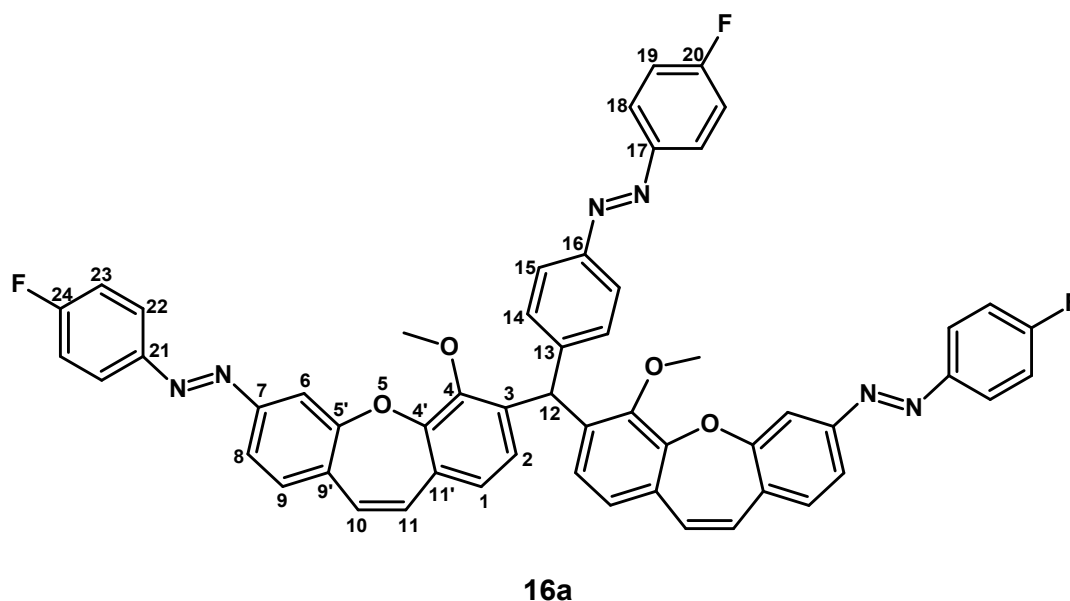
HRMS (ESI): C₃₇H₃₂N₄O₄+H, obliczono *m/z*: 597,24963, znaleziono *m/z*: 597,24930.

5.5.13 Otrzymywanie niesymetrycznych azo-pochodnych dibenzo[*b,f*]oksepiny zawierających więcej niż jedno ugrupowanie azowe 16a–b

Przykładowa synteza:

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 mL umieszczono element mieszający oraz 34,4 mmol odpowiedniej fluoroaniliny. Całość rozpuszczono w 172 mL chlorku metylenu. Następnie do układu dodano 68,8 mmol roztwór oksonu w 172 mL wody. Roztwór przybrał barwę jasnozieloną lub pomarańczową, który ciemniał z czasem. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej oraz w atmosferze argonu. Przebieg reakcji badano za pomocą analizy położenia plamek na płytkach do chromatografii cienkowarstwowej z użyciem chlorku metylenu jako eluenta. Po 3 godzinach oddzielono warstwę organiczną, a warstwę wodną ekstrahowano dwukrotnie DCM. Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym MgSO₄, po czym rozpuszczalnik odparowano na wyparce obrotowej, a powstały osad użyto bez dalszego oczyszczania do kolejnej reakcji, w której w kolbie okrągłodennej umieszczono 172 μmol związku **15a**. Całość rozpuszczono w 250 mL kwasu octowego. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej oraz w atmosferze argonu. Po zakończeniu reakcji mieszaninę poreakcyjną odparowano na wyparce obrotowej. Powstały osad rozpuszczono w niewielkiej ilości chlorku metylenu i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z użyciem układu heksan/octan etylu 3:1 jako eluenta. Otrzymano osady związków **16a–b**.

Związek 16a:



Rysunek 113. Schemat struktury związku 16a wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 6 dni

Wydajność: 2%

Postać: czerwony osad

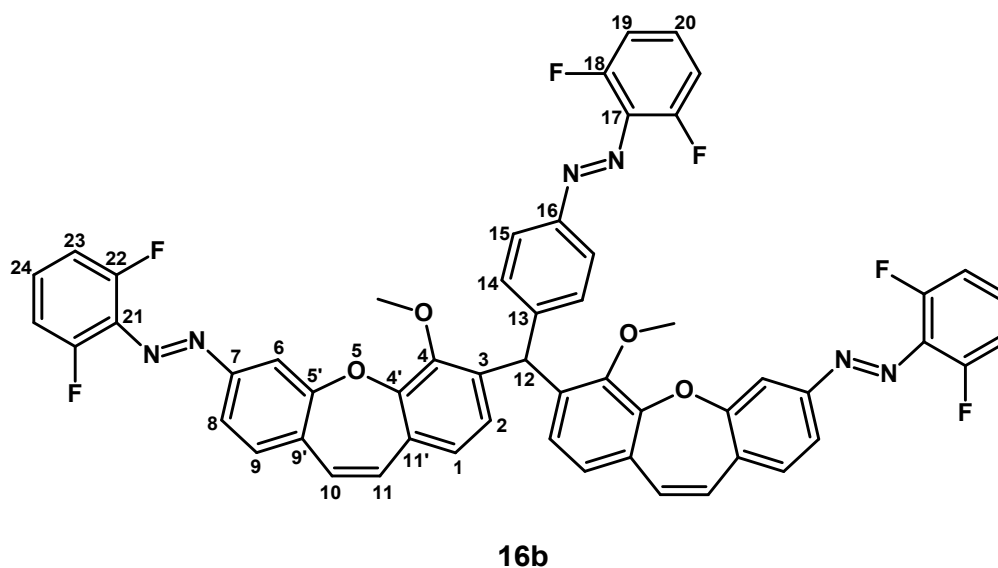
Temp. topnienia: rozkład powyżej 260°C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 7,95 (4H, dd, ³J_{H22,H23} = 9 Hz, ⁴J_{H22,F} = 5,5 Hz, H₂₂), 7,92 (2H, dd, ³J_{H18,H19} = 9 Hz, ⁴J_{H18,F} = 5,5 Hz, H₁₈), 7,89 (2H, d, ⁴J_{H6,H8} = 2 Hz, H₆), 7,80 (2H, d, ³J_{H14,H15} = 8,5 Hz, H₁₅), 7,71 (2H, dd, ³J_{H8,H9} = 8,5 Hz, H₈), 7,30 (2H, d, H₉), 7,20 (4H, dd, ³J_{H23,F} = 9 Hz, H₂₃), 7,19 (2H, dd, ³J_{H19,F} = 9 Hz, H₁₉), 7,15 (2H, d, H₁₄), 6,84 (2H, d, ³J_{H1,H2} = 8,5 Hz, H₁), 6,79 (2H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 12 Hz, H₁₀), 6,77 (2H, układ spinowy AB, d, H₁₁), 6,52 (2H, d, H₂), 5,81 (1H, s, CH), 3,95 (6H, s, OCH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 298 K): δ (ppm): 164,4 (d, ¹J_{C24,F} = 250 Hz, C₂₄), 164,4 (d, ¹J_{C20,F} = 250,75 Hz, C₂₀), 158,4, 153,7, 151,2, 150,7, 149,2 (d, ⁴J_{C21,F} = 2,625 Hz, C₂₁), 149,2 (d, ⁴J_{C17,F} = 2,625 Hz, C₁₇), 146,4, 146,1, 133,5, 132,5, 130,5, 130,2, 129,8, 129,2, 128,3, 126,7, 125,0 (d, ³J_{C22,F} = 8,875 Hz, C₂₂), 124,8 (d, ³J_{C18,F} = 8,625 Hz, C₁₈), 122,9, 119,9, 116,1 (d, ²J_{C23,F} = 22,75 Hz, C₂₃), 116,0 (d, ²J_{C19,F} = 22,75 Hz, C₁₉), 115,8, 111,9, 56,1, 49,5.

HRMS (ESI): C₅₅H₃₈F₃N₆O₄, obliczono *m/z*: 903,29011, znaleziono *m/z*: 903,29020.

Związek **16b**:



Rysunek 114. Schemat struktury związku **16b** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 4 dni

Wydajność: 5%

Postać: czerwony osad

Temp. topnienia: rozkład powyżej 250°C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 7,80 (2H, d, ³J_{H14,H15} = 8,5 Hz, H₁₅), 7,73 (2H, dd, ³J_{H8,H9} = 8 Hz, ⁴J_{H6,H8} = 2 Hz, H₈), 7,64 (2H, d, H₆), 7,58 (2H, tt, ³J_{H23,H24} = 8,5 Hz, ⁴J_{H24,F} = 6,5 Hz, H₂₄), 7,58 (1H, tt, ³J_{H19,H20} = 8,5 Hz, ⁴J_{H20,F} = 6,5 Hz, H₂₀), 7,53 (2H, d, H₉), 7,34 (4H, t, ³J_{H23,F} = 8,5 Hz, H₂₃), 7,32 (2H, t, ³J_{H19,F} = 8,5 Hz, H₁₉), 7,24 (2H, d, H₁₄), 7,08 (2H, d, ³J_{H1,H2} = 8,5 Hz, H₁), 7,06 (2H, układ spinowy AB, d, ³J_{H10,H11} = 11,5 Hz, H₁₁), 6,94 (2H, układ spinowy AB, d, H₁₀), 6,45 (2H, d, H₂), 6,15 (1H, s, CH), 3,86 (6H, s, OCH₃).

HRMS (ESI): C₅₅H₃₄F₆N₆O₄+H, obliczono *m/z*: 957,26185, znaleziono *m/z*: 957,26190.

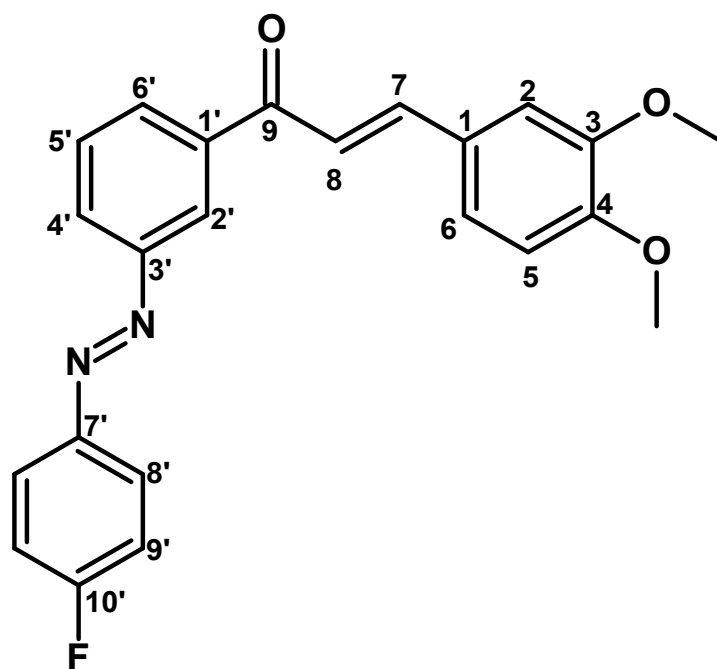
5.6 Otrzymywanie azowych pochodnych chalkonu **21a–l**

Przykładowa synteza:

W kolbie stożkowej o pojemności 500 mL umieszczono element mieszający oraz 9 mmol odpowiedniej fluoroaniliny **17a–c**. Całość rozpuszczono w 180 mL chlorku metylenu.

Następnie do układu dodano 31,5 mmol roztwór oksonu w 180 mL wody. Roztwór przybrał barwę jasnozieloną lub pomarańczową, który ciemniał z czasem. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej oraz w atmosferze argonu. Przebieg reakcji badano za pomocą analizy położenia plamek na płytkach do chromatografii cienkowarstwowej z użyciem chlorku metylenu jako eluenta. Po 4 godzinach oddzielono warstwę organiczną, a warstwę wodną ekstrahowano dwukrotnie DCM. Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym MgSO_4 , po czym rozpuszczalnik odparowano na wyparce obrotowej, a następnie surowe fluoronitrozoareny **18a–c** użyto bez dalszego oczyszczania do kolejnej reakcji, w której do kolby dodano 9 mmol 3-aminoacetofenonu. Całość rozpuszczono w 400 mL kwasu octowego. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej oraz w atmosferze argonu. Po 24 h mieszaninę poreakcyjną odparowano na wyparce obrotowej. Powstały osad rozpuszczono w niewielkiej ilości chlorku metylenu i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z użyciem chlorku metylenu jako eluenta. Otrzymano osady związków **19a–c**. Następnie w kolbie okrągłodennej o pojemności 5 mL umieszczono odpowiednią pochodną benzaldehydu **20a–d** oraz element mieszający. Całość rozpuszczono w 0,826 mL MeOH. Powstały roztwór mieszano przez 15 minut, po czym dodano otrzymane wcześniej osady związków **19a–c**. Powstały roztwór mieszano przez kolejne 5 minut, po czym dodano 0,413 mL 6 M NaOH. Roztwór mieszano przez kolejne 2 godziny, po czym umieszczono go w zamrażalniku. Po zakończeniu reakcji powstały osad przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem, a przesącz krystalizowano z metanolu otrzymując osady związków **21a–l**.

Związek **21a**:



21a

Rysunek 115. Schemat struktury związku 21a wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 18 h (ostatni etap)

Wydajność: 30%

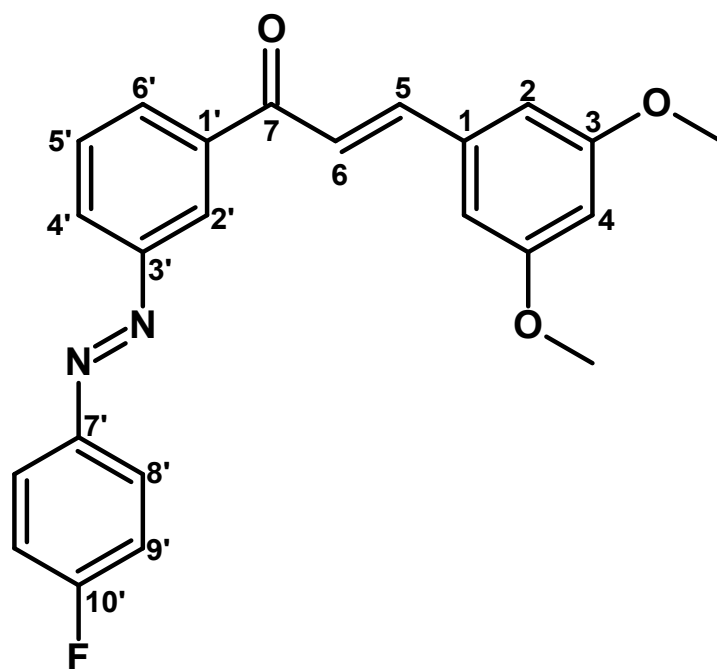
Postać: żółty osad

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 8,55 (1H, t, ⁴J_{H2',H4',6'} = 1,8 Hz, H_{2'}), 8,35 (1H, dt, ³J_{H5',H6'} = 7,8 Hz, ⁴J_{H4',H6'} = 1,8 Hz, H_{6'}), 8,12 (1H, ddd, ³J_{H4',H5'} = 8,4 Hz, H_{4'}), 8,03 (2H, dd, ³J_{H8',H9'} = 9 Hz, ⁴J_{H8',F} = 5,4 Hz, H_{8'}), 7,95 (1H, układ spinowy AB, d, ³J_{H7,H8} = 15,6 Hz, H₇), 7,79 (1H, t, H_{5'}), 7,78 (1H, układ spinowy AB, d, H₈), 7,58 (1H, d, ⁴J_{H2,H6} = 1,8 Hz, H₂), 7,47 (2H, t, ³J_{H9',F} = 9 Hz, H_{9'}), 7,44 (1H, dd, ³J_{H5,H6} = 8,4 Hz, H₆), 7,04 (1H, d, H₅), 3,87 (3H, s, OCH₃), 3,83 (3H, s, OCH₃).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 189,4, 165,0 (d, ¹J_{C10',F} = 249 Hz, C10'), 154,6, 152,9, 152,4, 149,9, 149,5 (d, ⁴J_{C7',F} = 3 Hz, C7'), 146,2, 140,0, 130,9, 128,3, 126,7, 126,1 (d, ³J_{C8',F} = 12 Hz, C8'), 125,1, 120,3, 117,4 (d, ²J_{C9',F} = 22,5 Hz, C9'), 112,5, 112,4, 111,8, 56,7, 56,5.

HRMS (ESI): C₂₃H₁₉FN₂O₃+H, obliczono *m/z*: 391,14525, znaleziono *m/z*: 391,14518.

Związek **21b**:



21b

Rysunek 116. Schemat struktury związku **21b** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 18 h (ostatni etap)

Wydajność: 33%

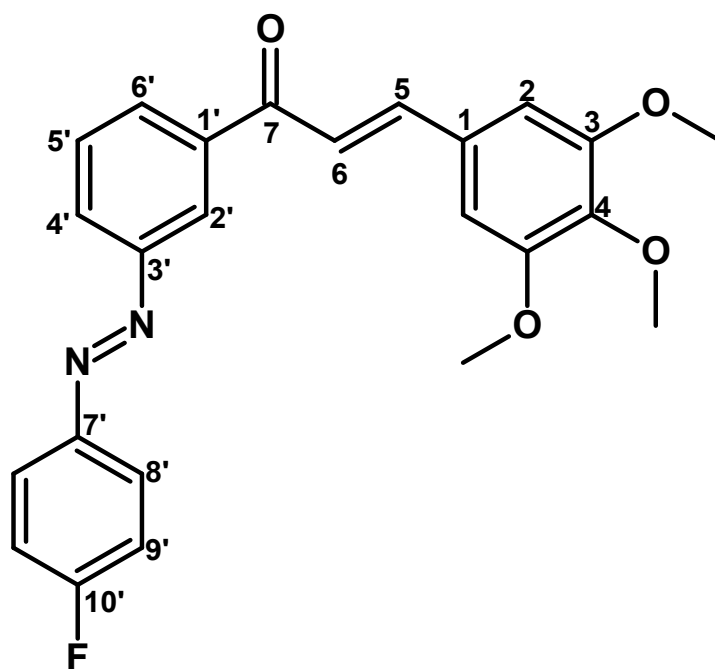
Postać: żółty osad

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 8,56 (1H, t, ⁴J_{H2',H4',6'} = 1,8 Hz, H_{2'}), 8,36 (1H, dt, ³J_{H5',H6'} = 7,8 Hz, ⁴J_{H4',H6'} = 1,8 Hz, H_{6'}), 8,14 (1H, ddd, ³J_{H4',H5'} = 7,8 Hz, H_{4'}), 8,04 (2H, dd, ³J_{H8',H9'} = 9 Hz, ⁴J_{H8',F} = 4,8 Hz, H_{8'}), 8,02 (1H, układ spinowy AB, d, ³J_{H5,H6} = 15,6 Hz, H₅), 7,80 (1H, t, H_{5'}), 7,74 (1H, układ spinowy AB, d, H₆), 7,47 (1H, t, ³J_{H9',F} = 9 Hz, H_{9'}), 7,12 (2H, d, ⁴J_{H2,H4} = 2,4 Hz, H₂), 6,61 (1H, t, H₄), 3,82 (6H, s, OCH₃).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 189,6, 165,0 (d, ¹J_{C10',F} = 250,5 Hz, C10), 161,6, 152,9, 149,5 (d, ⁴J_{C7',F} = 3 Hz, C7), 145,8, 139,6, 137,4, 132,2, 131,00, 126,9, 126,1 (d, ³J_{C8',F} = 9 Hz, C8), 123,7, 123,3, 117,4 (d, ²J_{C9',F} = 22,5 Hz, C9), 107,8, 103,9, 56,4.

HRMS (ESI): C₂₃H₁₉FN₂O₃+H, obliczono *m/z*: 391,14525, znaleziono *m/z*: 391,14505.

Związek **21c**:



21c

Rysunek 117. Schemat struktury związku 21c wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 18 h (ostatni etap)

Wydajność: 25%

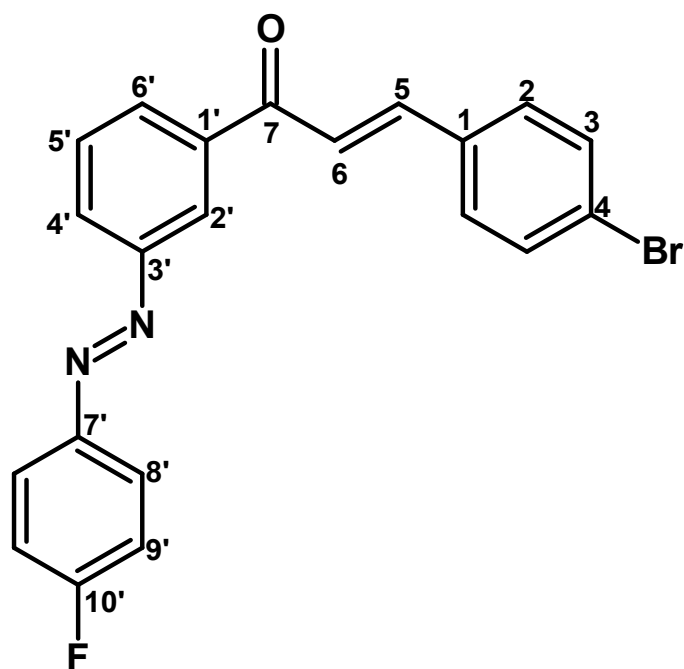
Postać: żółty osad

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , 298 K): δ (ppm): 8,55 (1H, t, $^4J_{\text{H}2',\text{H}4',6'} = 1,8$ Hz, $\text{H}_{2'}$), 8,36 (1H, dt, $^3J_{\text{H}5',\text{H}6'} = 7,8$ Hz, $^4J_{\text{H}4',\text{H}6'} = 1,8$ Hz, $\text{H}_{6'}$), 8,13 (1H, ddd, $^3J_{\text{H}4',\text{H}5'} = 9$ Hz, $\text{H}_{4'}$), 8,03 (2H, dd, $^3J_{\text{H}8',\text{H}9'} = 9$ Hz, $^4J_{\text{H}8',\text{F}} = 5,4$ Hz, $\text{H}_{8'}$), 7,97 (1H, układ spinowy AB, d, $^3J_{\text{H}5,\text{H}6} = 15,6$ Hz, H_5), 7,81 (1H, t, $\text{H}_{5'}$), 7,77 (1H, układ spinowy AB, d, H_6), 7,47 (2H, t, $^3J_{\text{H}9',\text{F}} = 9$ Hz, $\text{H}_{9'}$), 7,27 (2H, s, H_2), 3,87 (6H, s, OCH_3 -3), 3,73 (3H, s, OCH_3 -4).

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6 , 298 K): δ (ppm): 189,5, 165,0 (d, $^1J_{\text{C}10',\text{F}} = 250,5$ Hz, $\text{C}10'$), 154,0, 152,9, 149,5 (d, $^4J_{\text{C}7',\text{F}} = 1,5$ Hz, $\text{C}7'$), 146,2, 140,9, 139,8, 132,2, 131,0, 130,9, 126,8, 126,1 (d, $^3J_{\text{C}8',\text{F}} = 9$ Hz, $\text{C}8'$), 123,7, 122,0, 117,5 (d, $^2J_{\text{C}9',\text{F}} = 22,5$ Hz, $\text{C}9'$), 107,7, 61,0, 57,1.

HRMS (ESI): $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{FN}_2\text{O}_4 + \text{H}$, obliczono m/z : 421,15581, znaleziono m/z : 421,15559.

Związek **21d**:



21d

Rysunek 118. Schemat struktury związku 21d wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 18 h (ostatni etap)

Wydajność: 29%

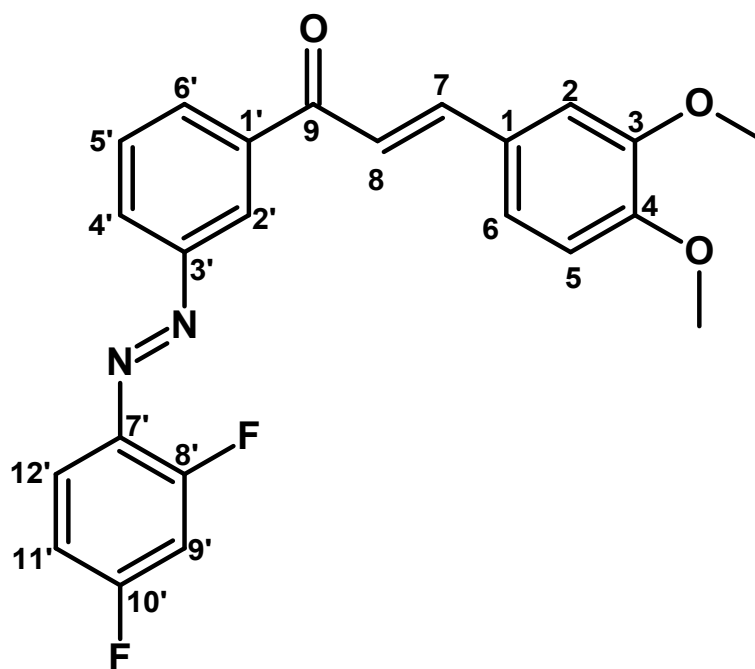
Postać: żółty osad

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 8,59 (1H, t, $^4J_{H2',H4',6'} = 1,8$ Hz, H_{2'}), 8,37 (1H, dt, $^3J_{H5',H6'} = 7,8$ Hz, $^4J_{H4',H6'} = 1,8$ Hz, H_{6'}), 8,17 (1H, ddd, $^3J_{H4',H5'} = 7,8$ Hz, H_{4'}), 8,07 (2H, dd, $^3J_{H8',H9'} = 9,0$ Hz, $^4J_{H8',F} = 5,4$ Hz, H_{8'}), 8,06 (1H, układ spinowy AB, d, $^3J_{H5,H6} = 15,6$ Hz, H₅), 7,92 (2H, d, $^3J_{H2,H3} = 8,4$ Hz, H₃), 7,83 (1H, t, H_{5'}), 7,81 (1H, układ spinowy AB, d, H₆), 7,71 (2H, d, H₂), 7,49 (2H, t, $^3J_{H9',F} = 9$ Hz, H_{9'}).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 189,4, 164,8 (d, $^1J_{C10',F} = 249$ Hz, C10'), 152,9, 149,5 (d, $^4J_{C7',F} = 1,5$ Hz, C7'), 144,0, 139,5, 134,6, 132,6, 131,6, 130,78, 126,8, 125,9 (d, $^3J_{C8',F} = 10,5$ Hz, C8'), 124,8, 123,6, 123,4, 123,3, 117,3 (d, $^2J_{C9',F} = 22,5$ Hz, C9').

HRMS (ESI): C₂₁H₁₄BrFN₂O+H, obliczono m/z : 409,03463, znaleziono m/z : 409,03459.

Związek **21e**:



21e

Rysunek 119. Schemat struktury związku 21e wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 18 h (ostatni etap)

Wydajność: 43%

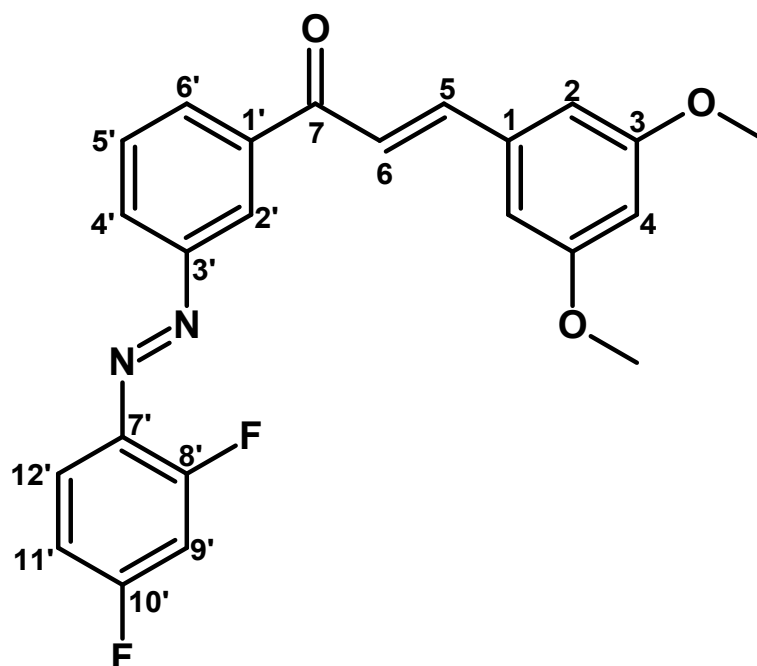
Postać: żółty osad

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 8,58 (1H, t, ⁴J_{H2',H4',6'} = 1,8 Hz, H_{2'}), 8,41 (1H, dt, ³J_{H5',H6'} = 7,8 Hz, ⁴J_{H4',H6'} = 1,8 Hz, H_{6'}), 8,16 (1H, ddd, ³J_{H4',H5'} = 7,8 Hz, H_{4'}), 7,93 (1H, układ spinowy AB, d, ³J_{H7,H8} = 15,6 Hz, H₇), 7,90 (1H, dt, ³J_{H11',H12'} = 9 Hz, ⁴J_{H12',F} = 6,6 Hz, H_{12'}), 7,84 (1H, t, H_{5'}), 7,82 (1H, układ spinowy AB, d, H₈), 7,64 (1H, ddd, ³J_{H11',F} = 9 Hz, ⁴J_{H9',H11'} = 2,6 Hz, H_{11'}), 7,61 (1H, d, ⁴J_{H2,H6} = 1,8 Hz, H₂), 7,47 (1H, dd, ³J_{H5,H6} = 7,8 Hz, H₆), 7,32 (1H, td, ³J_{H9',F} = 8,4 Hz, H_{9'}), 7,08 (1H, d, H₅), 3,91 (3H, s, OCH₃), 3,87 (3H, s, OCH₃).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 189,3, 165,3 (dd, J = 252 Hz, J = 12 Hz), 160,8 (dd, J = 256,5 Hz, J = 12 Hz), 152,9, 152,4, 149,96, 146,2, 140,0, 138,9, 137,8 (dd, J = 15 Hz, J = 7,5 Hz), 132,2, 131,0, 128,3, 126,5, 125,1, 124,0, 120,2 (d, J = 13,5 Hz), 113,5 (dd, J = 27 Hz, J = 3 Hz), 111,9, 106,6 (dd, J = 27 Hz, J = 24 Hz), 56,7, 56,5.

HRMS (ESI): C₂₃H₁₈F₂N₂O₃+H, obliczono m/z: 409,13583, znaleziono m/z: 409,13569.

Związek **21f**:



21f

Rysunek 120. Schemat struktury związku 21f wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 18 h (ostatni etap)

Wydajność: 31%

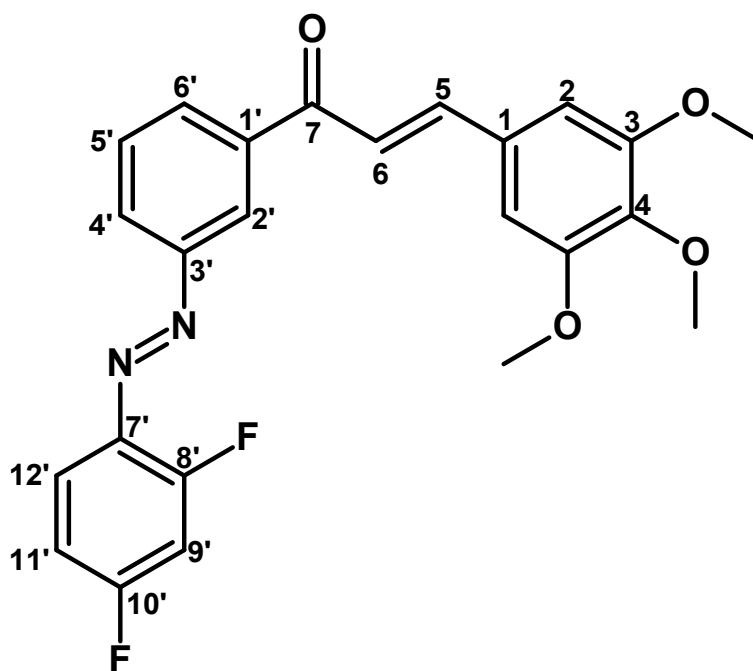
Postać: pomarańczowy osad

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 8,60 (1H, t, $^4J_{H2',H4',6'} = 1,8$ Hz, H_{2'}), 8,43 (1H, dt, $^3J_{H5',H6'} = 7,2$ Hz, $^4J_{H4',H6'} = 1,8$ Hz, H_{6'}), 8,16 (1H, ddd, $^3J_{H4',H5'} = 7,8$ Hz, H_{4'}), 8,05 (1H, układ spinowy AB, d, $^3J_{H5,H6} = 15,6$ Hz, H₅), 7,92 (1H, dt, $^3J_{H11',H12'} = 9$ Hz, $^4J_{H12',F} = 6,6$ Hz, H_{12'}), 7,85 (1H, t, H_{5'}), 7,78 (1H, układ spinowy AB, d, H₆), 7,64 (1H, ddd, $^3J_{H11',F} = 9$ Hz, $^4J_{H9',H11'} = 2,6$ Hz, H_{11'}), 7,32 (1H, td, $^3J_{H9',F} = 8,4$ Hz, H_{9'}), 7,15 (2H, d, $^4J_{H2,H4} = 2,4$ Hz, H₂), 6,64 (1H, t, H₄), 3,86 (6H, s, OCH₃).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 189,5, 165,3 (dd, J = 250,5 Hz, J = 12 Hz), 161,6, 160,8 (dd, J = 258 Hz, J = 13,5 Hz), 153,1, 145,8, 139,7, 137,8, (dd, J = 7,5 Hz, J = 4,5 Hz), 137,3, 132,6, 131,0, 126,7, 124,2, 123,2, 120,2 (d, J = 10,5 Hz), 113,5 (dd, J = 24 Hz, J = 4,5 Hz), 107,8, 106,6 (dd, J = 27 Hz, J = 24 Hz), 103,9, 56,3.

HRMS (ESI): C₂₃H₁₈F₂N₂O₃+H, obliczono m/z : 409,13583, znaleziono m/z : 409,13568.

Związek **21g**:



21g

Rysunek 121. Schemat struktury związku 21g wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 18 h (ostatni etap)

Wydajność: 30%

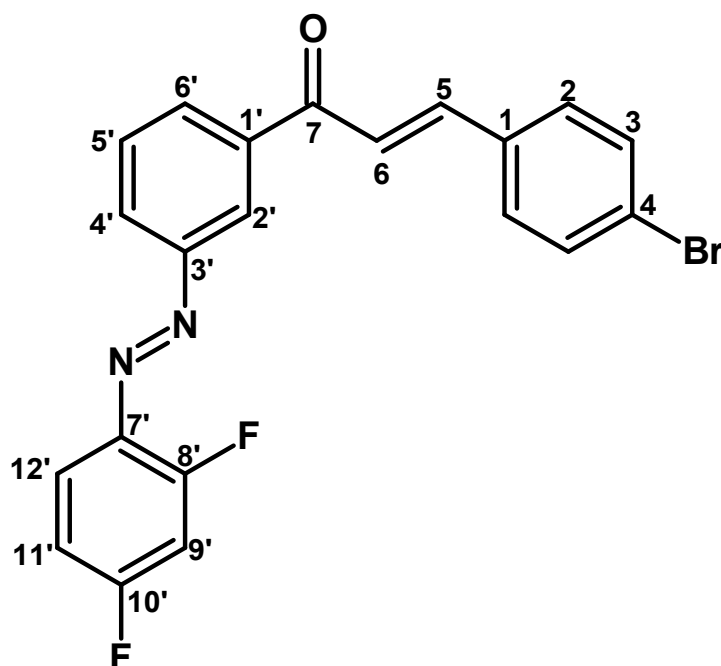
Postać: pomarańczowy osad

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 8,59 (1H, t, $^4J_{H2',H4',6'} = 1,8$ Hz, H_{2'}), 8,43 (1H, dt, $^3J_{H5',H6'} = 7,8$ Hz, $^4J_{H4',H6'} = 1,8$ Hz, H_{6'}), 8,16 (1H, ddd, $^3J_{H4',H5'} = 7,8$ Hz, H_{4'}), 8,00 (1H, układ spinowy AB, d, $^3J_{H5,H6} = 15,6$ Hz, H₅), 7,91 (1H, dt, $^3J_{H11',H12'} = 9$ Hz, $^4J_{H12',F} = 6,6$ Hz, H_{12'}), 7,85 (1H, t, H_{5'}), 7,81 (1H, układ spinowy AB, d, H₆), 7,64 (1H, ddd, $^3J_{H11',F} = 9$ Hz, $^4J_{H9',H11'} = 2,6$ Hz, H_{11'}), 7,32 (1H, td, $^3J_{H9',F} = 8,4$ Hz, H_{9'}), 7,31 (2H, s, H₂), 3,91 (6H, s, OCH₃-3), 3,77 (3H, s, OCH₃-4).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 189,5, 165,3 (dd, J = 250,5 Hz, J = 10,5 Hz), 160,8 (dd, J = 258 Hz, J = 13,5 Hz), 154,0, 153,1, 146,2, 140,9, 139,9, 137,8 (dd, J = 6 Hz, J = 3 Hz), 132,6, 131,0, 130,9, 126,6, 124,1, 121,9, 120,2 (d, J = 10,5 Hz), 113,5 (dd, J = 24 Hz, J = 4,5 Hz), 107,7, 106,6 (dd, J = 25,5 Hz, J = 24 Hz), 61,0, 57,0.

HRMS (ESI): C₂₄H₂₀F₂N₂O₄+H, obliczono *m/z*: 439,14639, znaleziono *m/z*: 439,14627.

Związek **21h**:



21h

Rysunek 122. Schemat struktury związku 21h wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 18 h (ostatni etap)

Wydajność: 36%

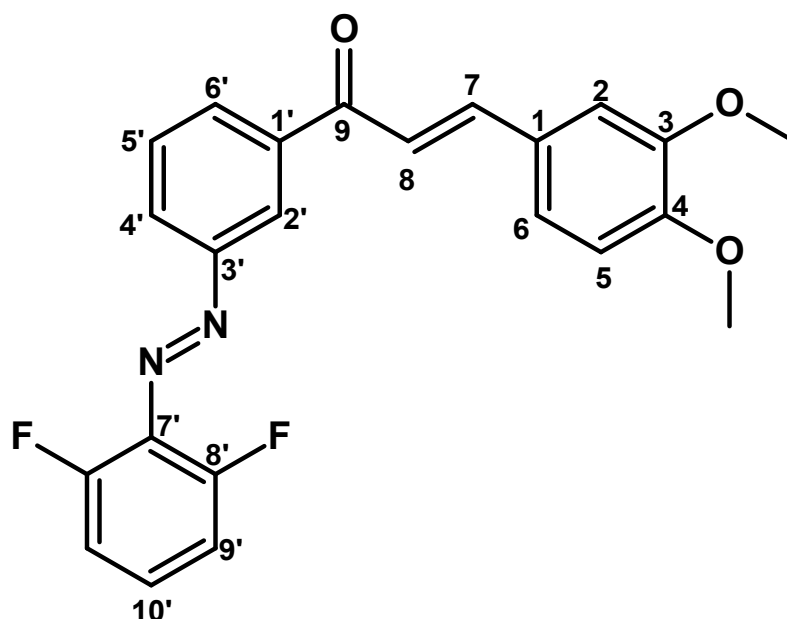
Postać: pomarańczowy osad

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 8,60 (1H, t, $^4J_{H2',H4',6'} = 2$ Hz, H_{2'}), 8,42 (1H, dt, $^3J_{H5',H6'} = 8$ Hz, $^4J_{H4',H6'} = 1,5$ Hz, H_{6'}), 8,15 (1H, ddd, $^3J_{H4',H5'} = 8$ Hz, H_{4'}), 8,10 (1H, układ spinowy AB, d, $^3J_{H5,H6} = 15,5$ Hz, H₅), 7,93 (2H, d, $^3J_{H2,H3} = 8,5$ Hz, H₃), 7,91 (1H, dt, $^3J_{H11',H12'} = 8,5$ Hz, $^4J_{H12',F} = 6$ Hz, H_{12'}), 7,84 (1H, t, H_{5'}), 7,82 (1H, układ spinowy AB, d, H₆), 7,71 (2H, d, H₂), 7,64 (1H, ddd, $^3J_{H11',F} = 9,5$ Hz, $^4J_{H9',H11'} = 3$ Hz, H_{11'}), 7,32 (1H, tdd, $^3J_{H9',F} = 8$ Hz, H_{9'}).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 189,4, 164,9 (dd, $J = 250,5$ Hz, $J = 12$ Hz), 160,2 (dd, $J = 258$ Hz, $J = 12$ Hz), 153,0, 143,7, 139,51, 137,7 (dd, $J = 7,5$ Hz, $J = 4,5$ Hz), 134,5, 132,4, 132,0, 131,3, 130,6, 126,3, 124,6, 123,7, 123,6, 120,3 (d, $J = 10,5$ Hz), 113,0 (dd, $J = 22,5$ Hz, $J = 3$ Hz), 106,1 (dd, $J = 27$ Hz, $J = 24$ Hz).

HRMS (ESI): C₂₁H₁₃BrF₂N₂O+H, obliczono m/z : 407,02521, znaleziono m/z : 407,02526.

Związek **21i**:



21i

Rysunek 123. Schemat struktury związku 21i wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 18 h (ostatni etap)

Wydajność: 35%

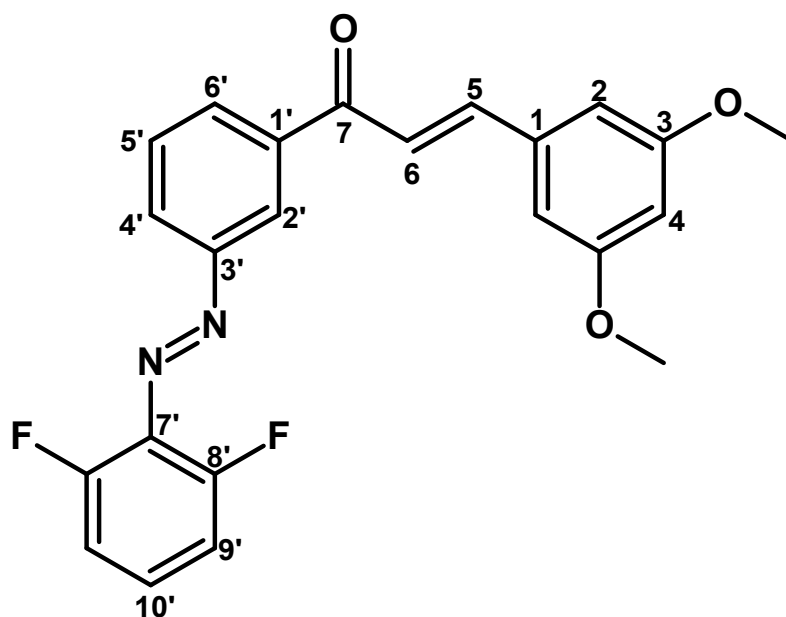
Postać: pomarańczowy osad

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 8,58 (1H, t, ⁴J_{H2',H4',6'} = 1,8 Hz, H_{2'}), 8,45 (1H, dt, ³J_{H5',H6'} = 7,2 Hz, ⁴J_{H4',H6'} = 1,8 Hz, H_{6'}), 8,15 (1H, ddd, ³J_{H4',H5'} = 7,8 Hz, H_{4'}), 7,95 (1H, układ spinowy AB, d, ³J_{H7,H8} = 15,6 Hz, H₇), 7,86 (1H, t, H_{5'}), 7,82 (1H, układ spinowy AB, d, H₈), 7,65 (1H, tt, ³J_{H9',H10'} = 9,0 Hz, ⁴J_{H10',F} = 6,0 Hz, H_{10'}), 7,62 (1H, d, ⁴J_{H2,H6} = 1,8 Hz, H₂), 7,48 (1H, dd, ³J_{H5,H6} = 8,4 Hz, H₆), 7,41 (2H, t, ³J_{H9',F} = 9 Hz, H_{9'}), 7,07 (1H, d, H₅), 3,91 (3H, s, OCH₃), 3,87 (3H, s, OCH₃).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 189,3, 155,8 (dd, ¹J_{C8',F} = 256,5 Hz, ³J_{C8',F} = 4,5 Hz, C8'), 153,6, 152,4, 149,9, 146,3, 140,1, 133,2 (t, ²J_{C7',F} = 10,5 Hz, C7'), 133,0, 131,1 (t, ³J_{C10',F} = 10 Hz, C10'), 131,0, 128,3, 125,1, 123,7, 119,9, 114,0, (dd, ²J_{C9',F} = 19,5 Hz, ⁴J_{C9',F} = 3 Hz, C9'), 111,9, 56,6, 56,5.

HRMS (ESI): C₂₃H₁₈F₂N₂O₃+H, obliczono *m/z*: 409,13583, znaleziono *m/z*: 409,13565.

Związek 21j:



21j

Rysunek 124. Schemat struktury związku 21j wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 18 h (ostatni etap)

Wydajność: 42%

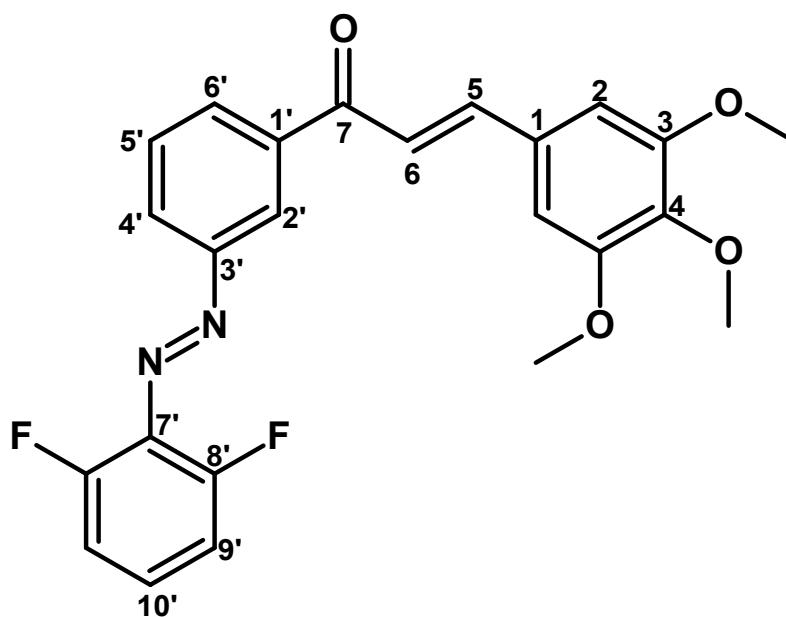
Postać: pomarańczowy osad

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , 298 K): δ (ppm): 8,59 (1H, t, $^4J_{\text{H}2',\text{H}4',6'} = 1,8$ Hz, $\text{H}_{2'}$), 8,47 (1H, dt, $^3J_{\text{H}5',\text{H}6'} = 7,8$ Hz, $^4J_{\text{H}4',\text{H}6'} = 1,8$ Hz, $\text{H}_{6'}$), 8,16 (1H, ddd, $^3J_{\text{H}4',\text{H}5'} = 7,8$ Hz, $\text{H}_{4'}$), 8,06 (1H, układ spinowy AB, d, $^3J_{\text{H}5,\text{H}6} = 15,6$ Hz, H_5), 7,87 (1H, t, $\text{H}_{5'}$), 7,78 (1H, układ spinowy AB, d, H_6), 7,65 (1H, tt, $^3J_{\text{H}9',\text{H}10'} = 9,0$ Hz, $^4J_{\text{H}10',\text{F}} = 6,0$ Hz, $\text{H}_{10'}$), 7,41 (2H, t, $^3J_{\text{H}9',\text{F}} = 9$ Hz, $\text{H}_{9'}$), 7,15 (2H, d, $^4J_{\text{H}2,\text{H}4} = 1,8$ Hz, H_2), 6,64 (1H, t, H_4), 3,85 (6H, s, OCH_3).

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6 , 298 K): δ (ppm): 189,6, 161,6, 155,2 (dd, $^1J_{\text{C}8',\text{F}} = 256,5$ Hz, $^3J_{\text{C}8',\text{F}} = 4,5$ Hz), 153,6, 145,9, 139,7, 137,4, 133,3 (t, $^2J_{\text{C}7',\text{F}} = 10,5$ Hz, $\text{C}7'$), 133,1, 131,1 (t, $^3J_{\text{C}10',\text{F}} = 10,5$ Hz, $\text{C}10'$), 124,0, 123,8, 123,3, 114,1 (dd, $^2J_{\text{C}9',\text{F}} = 19,5$ Hz, $^4J_{\text{C}9',\text{F}} = 3$ Hz, $\text{C}9'$), 108,0, 107,7, 104,0, 56,4.

HRMS (ESI): $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_3 + \text{H}$, obliczono m/z : 409,13583, znaleziono m/z : 409,13577.

Związek **21k**:



21k

Rysunek 125. Schemat struktury związku 21k wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 18 h (ostatni etap)

Wydajność: 41%

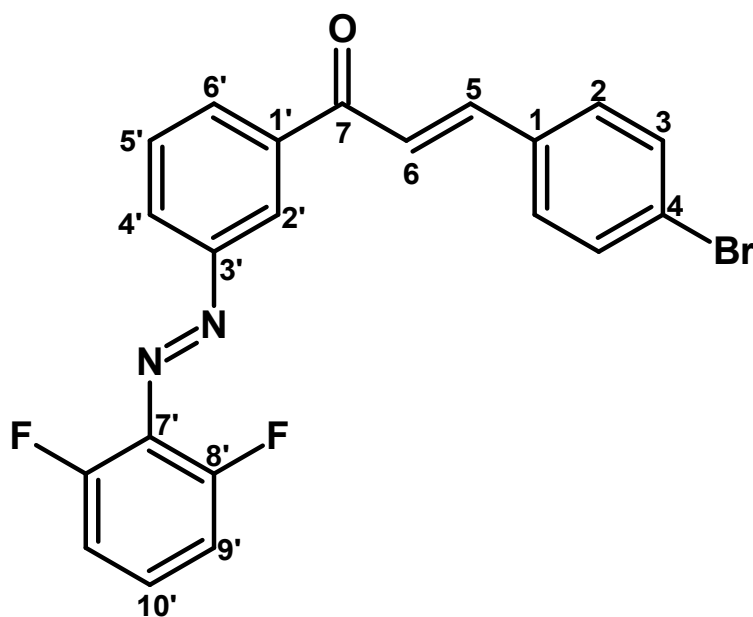
Postać: czerwony osad

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , 298 K): δ (ppm): 8,58 (1H, t, $^4J_{\text{H}2',\text{H}4',6'} = 1,8$ Hz, $\text{H}_{2'}$), 8,46 (1H, dt, $^3J_{\text{H}5',\text{H}6'} = 7,8$ Hz, $^4J_{\text{H}4',\text{H}6'} = 1,8$ Hz, $\text{H}_{6'}$), 8,16 (1H, ddd, $^3J_{\text{H}4',\text{H}5'} = 7,8$ Hz, $\text{H}_{4'}$), 8,01 (1H, układ spinowy AB, d, $^3J_{\text{H}5,\text{H}6} = 15,6$ Hz, H_5), 7,87 (1H, t, $\text{H}_{5'}$), 7,82 (1H, układ spinowy AB, d, H_6), 7,65 (1H, tt, $^3J_{\text{H}9',\text{H}10'} = 9,0$ Hz, $^4J_{\text{H}10',\text{F}} = 6,0$ Hz, $\text{H}_{10'}$), 7,41 (2H, t, $^3J_{\text{H}9',\text{F}} = 9$ Hz, $\text{H}_{9'}$), 7,31 (2H, s, H_2), 3,91 (6H, s, OCH_3 -3), 3,77 (3H, s, OCH_3 -4).

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6 , 298 K): δ (ppm): 189,3, 155,8 (dd, $^1J_{\text{C}8',\text{F}} = 256,5$ Hz, $^3J_{\text{C}8',\text{F}} = 4,5$ Hz, $\text{C}8'$), 153,6, 152,4, 149,9, 146,3, 140,1, 133,2 (t, $^2J_{\text{C}7',\text{F}} = 10,5$ Hz, $\text{C}7'$), 133,0, 131,1 (t, $^3J_{\text{C}10',\text{F}} = 10$ Hz, $\text{C}10'$), 131,0, 128,3, 125,1, 123,7, 119,9, 114,0, (dd, $^2J_{\text{C}9',\text{F}} = 19,5$ Hz, $^4J_{\text{C}9',\text{F}} = 3$ Hz, $\text{C}9'$), 111,9, 56,6, 56,5.

HRMS (ESI): $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_4 + \text{H}$, obliczono m/z : 439,14639, znaleziono m/z : 439,14637.

Związek 21I:



21I

Rysunek 126. Schemat struktury związku 21I wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 18 h (ostatni etap)

Wydajność: 28%

Postać: czerwony osad

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , 298 K): δ (ppm): 8,60 (1H, t, $^4J_{\text{H}2',\text{H}4',6'} = 1,8$ Hz, $\text{H}_{2'}$), 8,45 (1H, dt, $^3J_{\text{H}5',\text{H}6'} = 7,8$ Hz, $^4J_{\text{H}4',\text{H}6'} = 1,8$ Hz, $\text{H}_{6'}$), 8,16 (1H, ddd, $^3J_{\text{H}4',\text{H}5'} = 7,8$ Hz, $\text{H}_{4'}$), 8,12 (1H, układ spinowy AB, d, $^3J_{\text{H}5,\text{H}6} = 15,6$ Hz, H_5), 7,94 (2H, d, $^3J_{\text{H}2,\text{H}3} = 8,4$ Hz, H_3), 7,86 (1H, t, $\text{H}_{5'}$), 7,83 (1H, układ spinowy AB, d, H_6), 7,71 (2H, d, H_2), 7,65 (1H, tt, $^3J_{\text{H}9',\text{H}10'} = 9,0$ Hz, $^4J_{\text{H}10',\text{F}} = 6,0$ Hz, $\text{H}_{10'}$), 7,41 (2H, t, $^3J_{\text{H}9',\text{F}} = 9$ Hz, $\text{H}_{9'}$).

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6 , 298 K): δ (ppm): 189,3, 155,8 (dd, $^1J_{\text{C}8',\text{F}} = 256,5$ Hz, $^3J_{\text{C}8',\text{F}} = 4,5$ Hz, $\text{C}8'$), 153,6, 144,3, 139,6, 134,8, 133,3 (t, $^2J_{\text{C}7',\text{F}} = 10,5$ Hz, $\text{C}7'$), 133,2, 133,0, 132,8, 131,9, 131,1 (t, $^3J_{\text{C}10',\text{F}} = 10,5$ Hz, $\text{C}10'$), 125,1, 124,0, 123,9, 123,5, 114,1 (dd, $^2J_{\text{C}9',\text{F}} = 19,5$ Hz, $^4J_{\text{C}9',\text{F}} = 3$ Hz, $\text{C}9'$).

HRMS (ESI): $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{BrF}_2\text{N}_2\text{O}+\text{H}$, obliczono m/z : 407,02521, znaleziono m/z : 407,02520.

5.7 Otrzymywanie azowych pochodnych kolchicyny 29a–d, 29e–h

5.7.1 Otrzymywanie *N*-deacetylokolchicyny 25

W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 mL umieszczono element mieszający oraz 1,25 mmol kolchicyny **22**. Całość rozpuszczono w 20 mL chlorku metylenu. Następnie do układu dodano 2,35 mmol TEA oraz 2,05 mmol DMAP. Roztwór mieszano przez 5 minut, po czym dodano porcjami 43,5 mmol Boc₂O. Układ wyposażono w chłodnicę zwrotną, a reakcję prowadzono w temperaturze wrzenia oraz w atmosferze argonu. Przebieg reakcji badano za pomocą analizy położenia plamek na płytkach do chromatografii cienkowarstwowej z użyciem układu octan etylu/aceton 4:1 jako eluenta. Po 24 godzinach mieszaninę odparowano na wyparce obrotowej. Powstały osad rozpuszczono w niewielkiej ilości chlorku metylenu i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z użyciem układu octan etylu/aceton 4:1 jako eluenta. Połączone fazy organiczne odparowano na wyparce obrotowej otrzymując żółty osad (*N*-boc)kolchicyny **23**. Następnie w kolbie okrągłodennej o pojemności 50 mL umieszczono element mieszający oraz 2,44 mmol uprzednio otrzymanej (*N*-boc)kolchicyny **23**. Do układu dodano następnie 7,51 mmol MeONa, a całość rozpuszczono w 22 mL metanolu. Roztwór mieszano przez 30 minut w temperaturze 0°C. Po reakcji do układu dodano NH₄Cl. Całość przeniesiono do rozdzielacza, a fazę organiczną, po wydzieleniu, wysuszono nad bezwodnym MgSO₄, po czym rozpuszczalnik odparowano na wyparce obrotowej. Powstały osad rozpuszczono w niewielkiej ilości chlorku metylenu i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z użyciem układu octan etylu/aceton 4:1 jako eluenta. Połączone fazy organiczne odparowano na wyparce obrotowej otrzymując jasnożółty osad (*N*-boc)deacetylokolchicyny **24**. Następnie w kolbie okrągłodennej o pojemności 50 mL umieszczono element mieszający oraz 1,72 mmol uprzednio otrzymanej (*N*-boc)deacetylokolchicyny **24**. Całość rozpuszczono w 22 mL chlorku metylenu. Do układu dodano następnie 3,5 mL TFA. Roztwór mieszano przez 3 godziny w temperaturze pokojowej. Po reakcji do układu dodano toluen, a całość odparowano na wyparce obrotowej. Powstały osad rozpuszczono w niewielkiej ilości chlorku metylenu i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z użyciem układu DCM/metanol 9:1 jako eluenta. Połączone fazy organiczne odparowano na wyparce obrotowej otrzymując żółty osad *N*-deacetylokolchicyny **25**.

5.7.2 Otrzymywanie karboksylowych pochodnych chloroazobenzenów **28a–d**, **28e–h**

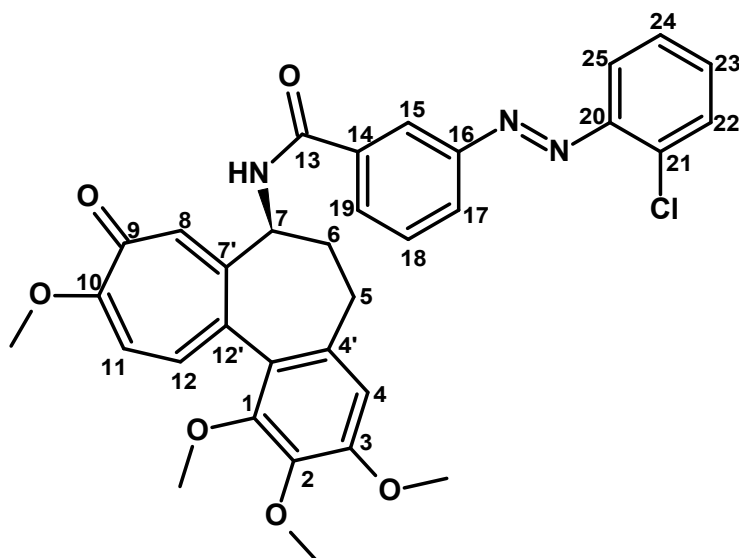
Przykładowa synteza:

W kolbie stożkowej o pojemności 500 mL umieszczono element mieszający oraz 1 mmol odpowiedniej chloroaniliny **26a–d**. Całość rozpuszczono w 20 mL chlorku metylenu. Następnie do układu dodano 3,5 mmol roztwór oksonu w 35 mL wody. Roztwór przybrał barwę pomarańczową, który ciemniał z czasem. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej oraz w atmosferze argonu. Przebieg reakcji badano za pomocą analizy położenia plamek na płytkach do chromatografii cienkowarstwowej z użyciem chlorku metylenu jako eluenta. Po 4 godzinach oddzielono warstwę organiczną, a warstwę wodną ekstrahowano dwukrotnie DCM. Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym MgSO_4 , po czym rozpuszczalnik odparowano na wyparce obrotowej, a następnie surowe chloronitrozoareny **27a–d** użyto bez dalszego oczyszczania do kolejnej reakcji, w której do kolby dodano 1 mmol kwasu *para* lub *meta* aminobenzoowego. Całość rozpuszczono w 50 mL kwasu octowego. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej oraz w atmosferze argonu. Po 24 h mieszaninę poreakcyjną odparowano na wyparce obrotowej. Powstały osad rozpuszczono w niewielkiej ilości chlorku metylenu i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z użyciem chlorku metylenu jako eluenta. Otrzymano osady związków **28a–d**, **28e–h**.

5.7.3 Otrzymywanie azowych pochodnych kolchicyny **29a–d**, **29e–h**

W kolbie okrągłodennej o pojemności 10 mL umieszczono element mieszający oraz 0,15 mmol *N*-deacetylokolchicyny **25**. Do układu dodano następnie 0,3 mmol odpowiedniej pochodnej chloroazobenzenu **28a–d**, **28e–h**, 0,9 mmol *N,N*-diizopropylloetyloaminy oraz 0,15 mmol HATU. Następnie całość rozpuszczono w 5 mL DMF, tak by otrzymać maksymalne stężenie. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej oraz w atmosferze argonu. Przebieg reakcji badano za pomocą analizy położenia plamek na płytkach do chromatografii cienkowarstwowej z użyciem układu DCM/metanol 9:1 jako eluenta. Po zakończeniu reakcji mieszaninę poreakcyjną przemyto zimną wodą i ekstrahowano octanem etylu. Fazę organiczną wysuszono nad bezwodnym MgSO_4 , a przesącz odparowano na wyparce obrotowej. Powstały osad oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z użyciem układu DCM/metanol 9:1 jako eluenta, otrzymując osady azowych pochodnych kolchicyny **29a–d**, **29e–h**.

Związek **29a**:



29a

Rysunek 127. Schemat struktury związku 29a wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 4 h (ostatni etap)

Wydajność: 56%

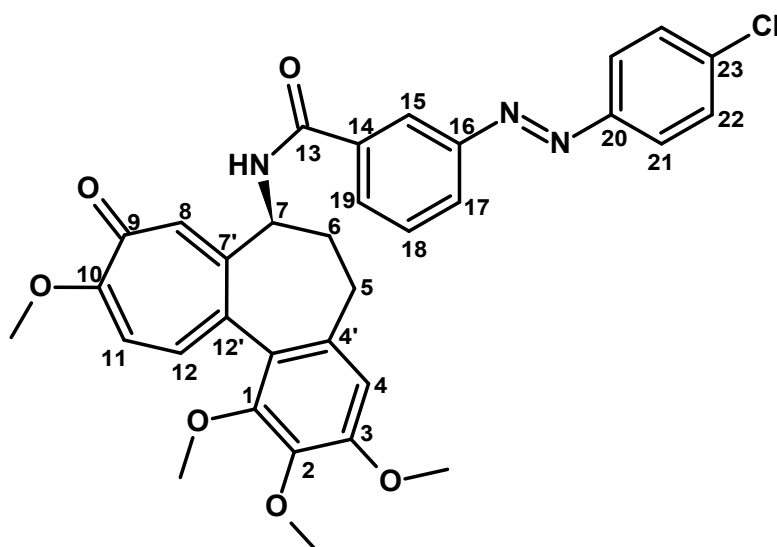
Postać: pomarańczowy osad

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 9,29 (1H, d, ³J_{H7,NH} = 7,3 Hz, NH), 8,44 (t, ⁴J_{H15,H17,19} = 1,8 Hz, 1H, H₁₅), 8,11 (1H, m, H₁₇), 8,07 (1H, dd, ³J_{H18,H19} = 7,9 Hz, ⁴J_{H17,H19} = 1,1 Hz, H₁₉), 7,74 (2H, m, H₁₈, H₂₂), 7,70 (1H, dd, ³J_{H24,H25} = 8,0 Hz, ⁴J_{H23,H25} = 1,6 Hz, H₂₅), 7,60 (1H, m, H₂₄), 7,51 (1H, m, H₂₃), 7,27 (1H, s, H₈), 7,17 (1H, d, ³J_{H11,H12} = 10,7 Hz, H₁₂), 7,06 (1H, d, H₁₁), 6,81 (s, 1H, H₄), 4,63 (1H, dd, ³J_{H6,H7} = 17,0 Hz, ³J_{H6',H7} = 8,6 Hz, H₇), 3,88 (3H, s, OCH₃-10), 3,85 (3H, s, OCH₃-1), 3,82 (3H, s, OCH₃-3), 3,62 (3H, s, OCH₃-2), 2,67 (1H, m, H₆), 2,31 (1H, m, H₆), 2,16 (2H, m, H₅).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 178,4, 165,4, 164,1, 153,9, 153,5, 152,5, 151,1, 151,0, 150,9, 148,4, 141,3, 135,8, 135,7, 135,0, 134,7, 131,3, 130,9, 129,2, 128,6, 128,2, 125,9, 125,9, 123,1, 118,1, 112,7, 108,3, 61,4, 61,2, 56,5, 56,4, 52,8, 35,7, 29,7.

HRMS (ESI): C₃₃H₃₀ClN₃O₆+H, obliczono *m/z*: 600,18959, znaleziono *m/z*: 600,18963.

Związek **29b**:



29b

Rysunek 128. Schemat struktury związku **29b** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 4 h (ostatni etap)

Wydajność: 62%

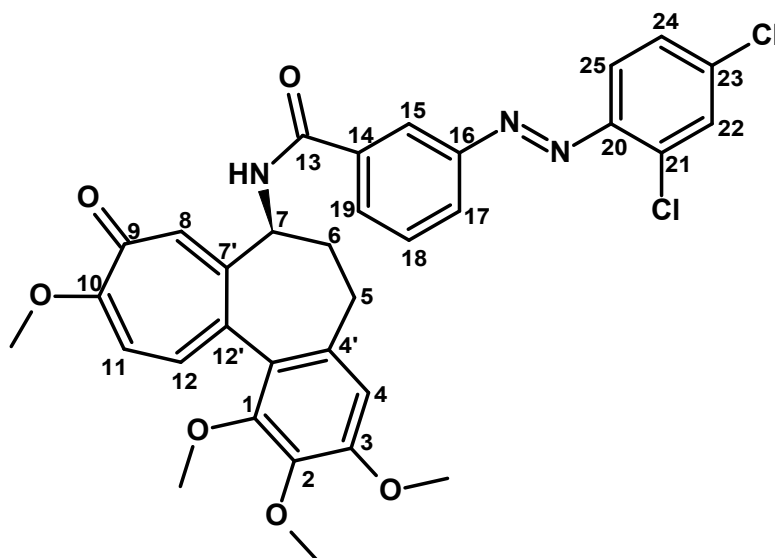
Postać: pomarańczowy osad

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 9,28 (1H, d, ³J_{H7,NH} = 7,3 Hz, NH), 8,42 (1H, t, ⁴J_{H15,H17,19} = 1,8 Hz, H₁₅), 8,07 (2H, dt, ³J_{H17,H18} = 7,8 Hz, ³J_{H18,H19} = 7,8 Hz, ⁴J_{H17,H19} = 1,1 Hz, H₁₇, H₁₉), 7,95 (2H, d, ³J_{H21,H22} = 8,5 Hz, H₂₂), 7,72 (1H, t, H₁₈), 7,69 (2H, d, H₂₁), 7,26 (1H, s, H₈), 7,17 (1H, d, ³J_{H11,H12} = 10,7 Hz, H₁₂), 7,06 (1H, d, H₁₁), 6,81 (1H, s, H₄), 4,62 (1H, dd, ³J_{H6,H7} = 17,8 Hz, ³J_{H6',H7} = 7,8 Hz, H₇), 3,87 (3H, s, OCH₃-10), 3,85 (3H, s, OCH₃-1), 3,82 (3H, s, OCH₃-3), 3,61 (3H, s, OCH₃-2), 2,66 (1H, m, H₆), 2,30 (1H, m, H₆), 2,16 (2H, m, H₅).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 178,4, 165,4, 164,1, 153,5, 152,2, 151,1, 151,0, 150,9, 141,3, 136,8, 135,7, 135,6, 135,0, 134,7, 131,0, 130,9, 130,2, 130,1, 129,4, 125,9, 124,8, 122,3, 112,7, 108,3, 61,4, 61,2, 56,5, 56,4, 52,8, 35,7, 29,7.

HRMS (ESI): C₃₃H₃₀ClN₃O₆+H, obliczono *m/z*: 600,18959, znaleziono *m/z*: 600,18962.

Związek **29c**:



29c

Rysunek 129. Schemat struktury związku **29c** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 4 h (ostatni etap)

Wydajność: 36%

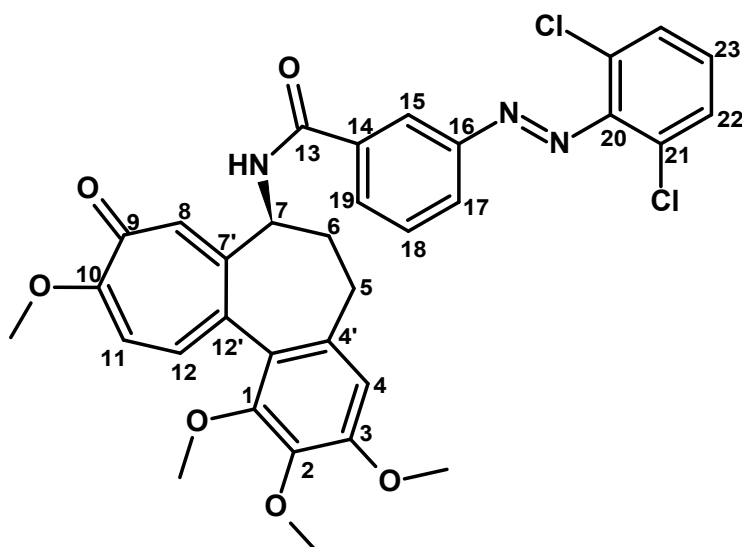
Postać: pomarańczowy osad

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 9,30 (1H, d, $^3J_{\text{H7,NH}} = 7,3$ Hz, NH), 8,43 (1H, t, $^4J_{\text{H15,H17,19}} = 1,6$ Hz, H₁₅), 8,12 (1H, d, $^3J_{\text{H17,H18}} = 7,7$ Hz, H₁₇), 8,06 (1H, d, $^3J_{\text{H18,H19}} = 8,1$ Hz, H₁₉), 7,92 (1H, d, $^4J_{\text{H22,H24}} = 2,1$ Hz, H₂₂), 7,75 (1H, t, H₁₈), 7,72 (1H, d, $^3J_{\text{H24,H25}} = 8,7$ Hz, H₂₅), 7,59 (1H, dd, H₂₄), 7,26 (1H, s, H₈), 7,17 (1H, d, $^3J_{\text{H11,H12}} = 10,7$ Hz, H₁₂), 7,05 (1H, d, H₁₁), 6,80 (1H, s, H₄), 4,63 (1H, dd, $^3J_{\text{H6,H7}} = 17,2$ Hz, $^3J_{\text{H6',H7}} = 8,4$ Hz, H₇), 3,87 (3H, s, OCH₃-10), 3,85 (3H, s, OCH₃-1), 3,81 (3H, s, OCH₃-3), 3,61 (3H, s, OCH₃-2), 2,66 (1H, m, H₆), 2,30 (1H, m, H₆), 2,16 (2H, m, H₅).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 178,4, 165,4, 164,1, 153,5, 152,3, 151,1, 152,0, 147,1, 141,3, 137,3, 135,8, 135,7, 135,6, 134,7, 132,6, 130,9, 130,7, 130,2, 128,9, 128,4, 125,9, 125,3, 123,2, 119,3, 112,7, 108,3, 61,4, 61,2, 56,5, 56,3, 52,8, 35,8, 29,7.

HRMS (ESI): C₃₃H₂₉Cl₂N₃O₆+H, obliczono m/z : 634,150617; znaleziono m/z : 634,150620.

Związek **29d**:



29d

Rysunek 130. Schemat struktury związku **29d** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 4 h (ostatni etap)

Wydajność: 47%

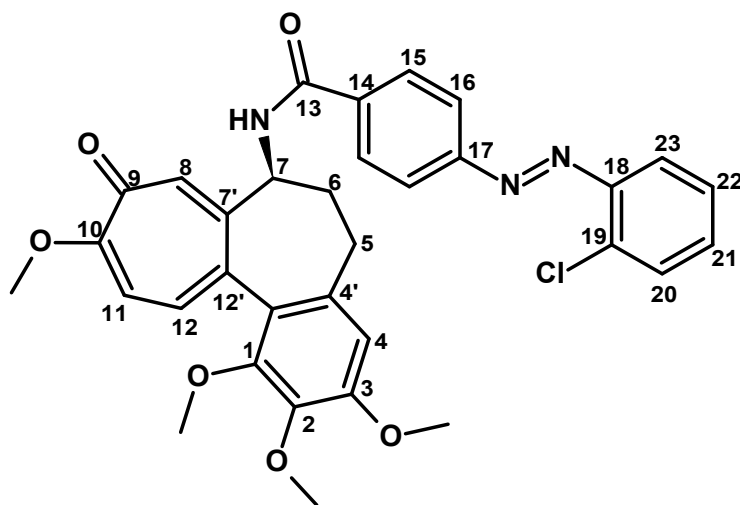
Postać: czerwony osad

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 9,31 (1H, d, ³J_{H7,NH} = 7 Hz, NH), 8,44 (1H, t, ⁴J_{H15,H17,19} = 1,6 Hz, H₁₅), 8,17 (1H, d, ³J_{H17,H18} = 7,5 Hz, H₁₇), 8,08 (1H, d, ³J_{H18,H19} = 8,0 Hz, H₁₉), 7,77 (1H, t, ³J_{H22,H23} = 8,0 Hz, H₂₃), 7,66 (2H, d, H₂₂), 7,45 (1H, dd, H₁₈), 7,24 (1H, s, H₈), 7,16 (1H, d, ³J_{H11,H12} = 10,5 Hz, H₁₂), 7,05 (1H, d, H₁₁), 6,80 (1H, s, H₄), 4,61 (1H, dd, ³J_{H6,H7} = 16,5 Hz, ³J_{H6',H7} = 9,0 Hz, H₇), 3,86 (3H, s, OCH₃-10), 3,84 (3H, s, OCH₃-1), 3,80 (3H, s, OCH₃-3), 3,60 (3H, s, OCH₃-2), 2,66 (1H, m, H₆), 2,29 (1H, m, H₆), 2,14 (2H, m, H₅).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 178,4, 165,4, 164,1, 153,5, 152,2, 151,1, 151,0, 150,9, 141,3, 136,8, 135,7, 135,6, 135,0, 134,7, 131,0, 130,9, 130,2, 130,1, 129,4, 125,9, 124,8, 122,3, 112,7, 108,3, 61,4, 61,2, 56,5, 56,4, 52,8, 35,7, 29,7.

HRMS (ESI): C₃₃H₂₉Cl₂N₃O₆+H, obliczono *m/z*: 634,150617; znaleziono *m/z*: 634,150622.

Związek **29e**:



29e

Rysunek 131. Schemat struktury związku 29e wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 4 h (ostatni etap)

Wydajność: 48%

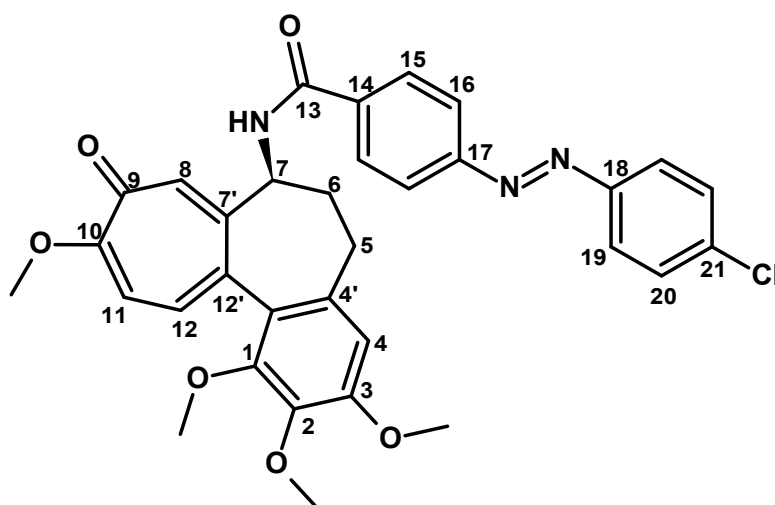
Postać: pomarańczowy osad

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 9,24 (1H, d, ³J_{H7,NH} = 7,3 Hz, NH), 8,12 (2H, d, ³J_{H15,H16} = 8,5 Hz, H₁₆), 8,00 (2H, d, H₁₅), 7,75 (1H, dd, ³J_{H20,H21} = 8,0 Hz, ⁴J_{H20,H22} = 1,2 Hz, H₂₀), 7,71 (1H, dd, ³J_{H22,H23} = 8,0 Hz, ⁴J_{H21,H23} = 1,6 Hz, H₂₃), 7,61 (1H, m, H₂₂), 7,52 (1H, m, H₂₁), 7,25 (1H, s, H₈), 7,17 (1H, d, ³J_{H11,H12} = 10,7 Hz, H₁₂), 7,06 (1H, d, H₁₁), 6,81 (1H, s, H₄), 4,61 (1H, dd, ³J_{H6,H7} = 16,7 Hz, ³J_{H6',H7} = 9,0 Hz, H₇), 3,88 (3H, s, OCH₃-10), 3,85 (3H, s, OCH₃-1), 3,82 (3H, s, OCH₃-3), 3,61 (3H, s, OCH₃-2), 2,67 (1H, m, H₆), 2,30 (1H, m, H₆), 2,15 (2H, m, H₅).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 178,4, 165,4, 164,1, 154,0, 153,5, 151,1, 151,0, 150,9, 148,4, 141,3, 136,9, 135,7, 134,8, 134,7, 131,3, 129,3, 128,8, 128,6, 125,9, 123,2, 119,5, 118,0, 112,7, 108,3, 61,4, 61,2, 56,5, 56,4, 52,8, 35,7, 29,7.

HRMS (ESI): C₃₃H₃₀ClN₃O₆+H, obliczono *m/z*: 600,18959; znaleziono *m/z*: 600,18962.

Związek **29f**:



29f

Rysunek 132. Schemat struktury związku **29f** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 4 h (ostatni etap)

Wydajność: 25%

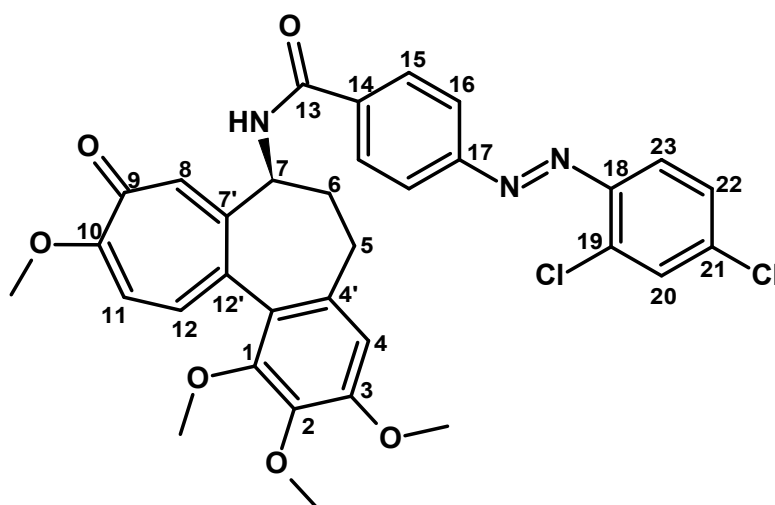
Postać: pomarańczowy osad

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3 , 298 K): δ (ppm): 8,57 (1H, s, NH), 8,00 (2H, d, $^3J_{\text{H}15,\text{H}16} = 8,4$ Hz, H_{16}), 7,88 (1H, s, H_8), 7,75 (2H, d, H_{15}), 7,64 (2H, d, $^3J_{\text{H}19,\text{H}20} = 8,3$ Hz, H_{20}), 7,44 (3H, m, H_{12} , H_{19}), 6,95 (1H, d, $^3J_{\text{H}11,\text{H}12} = 11,0$ Hz, H_{11}), 6,55 (1H, s, H_4), 4,91 (1H, dt, $^3J_{\text{H}6,\text{H}7} = 11,1$ Hz, $^3J_{\text{H}6',\text{H}7} = 5,7$ Hz, H_7), 4,00 (3H, s, OCH_3 -10), 3,95 (3H, s, OCH_3 -1), 3,90 (3H, s, OCH_3 -3), 3,74 (3H, s, OCH_3 -2), 2,56 (1H, m, H_6), 2,41 (2H, m, H_5), 2,21 (1H, m, H_6).

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d_6 , 298 K): δ (ppm): 178,4, 165,4, 164,1, 153,8, 153,5, 151,2, 151,0, 150,9, 141,3, 137,0, 136,7, 135,7, 135,0, 134,7, 130,9, 130,1, 129,3, 125,9, 124,9, 123,0, 112,7, 108,3, 61,4, 61,2, 56,6, 56,4, 52,8, 35,7, 29,8.

HRMS (ESI): $\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{ClN}_3\text{O}_6 + \text{H}$, obliczono m/z : 600,18959; znaleziono m/z : 600,18955.

Związek **29g**:



29g

Rysunek 133. Schemat struktury związku **29g** wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 4 h (ostatni etap)

Wydajność: 10%

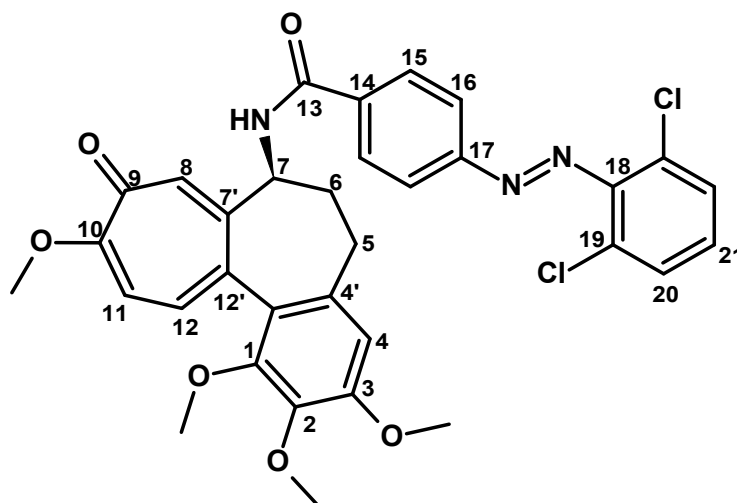
Postać: pomarańczowy osad

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 9,25 (1H, d, ³J_{H7,NH} = 7,3 Hz, NH), 8,12 (2H, d, ³J_{H15,H16} = 8,5 Hz, H₁₆), 8,00 (2H, d, H₁₅), 7,95 (1H, d, ⁴J_{H20,H22} = 2,0 Hz, H₂₀), 7,73 (1H, d, ³J_{H22,H23} = 8,7 Hz, H₂₃), 7,60 (1H, dd, H₂₂), 7,25 (1H, s, H₈), 7,17 (1H, d, ³J_{H11,H12} = 10,7 Hz, H₁₂), 7,06 (1H, d, H₁₁), 6,81 (1H, s, H₄), 4,61 (1H, dd, ³J_{H6,H7} = 16,8 Hz, ³J_{H6',H7} = 8,8 Hz, H₇), 3,88 (3H, s, OCH₃-10), 3,85 (3H, s, OCH₃-1), 3,81 (3H, s, OCH₃-3), 3,61 (3H, s, OCH₃-2), 2,67 (1H, m, H₆), 2,29 (1H, m, H₆), 2,16 (2H, m, H₅).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 178,5, 165,5, 164,1, 153,9, 153,5, 151,2, 151,0, 147,1, 141,3, 137,6, 137,2, 135,9, 135,7, 135,1, 134,7, 130,9, 130,8, 129,4, 129,0, 126,0, 123,4, 119,3, 112,8, 108,3, 61,5, 61,2, 56,6, 56,4, 55,4, 35,8, 29,8.

HRMS (ESI): C₃₃H₂₉Cl₂N₃O₆+H, obliczono *m/z*: 634,150617; znaleziono *m/z*: 634,150618.

Związek 29h:



29h

Rysunek 134. Schemat struktury związku 29h wraz z numeracją atomów węgla.

Czas reakcji: 4 h (ostatni etap)

Wydajność: 53%

Postać: czerwony osad

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 9,27 (1H, d, ³J_{H7,NH} = 7 Hz, NH), 8,13 (2H, d, ³J_{H15,H16} = 8,5 Hz, H₁₆), 8,00 (2H, d, H₁₅), 7,65 (2H, d, ³J_{H20,H21} = 8 Hz, H₂₀), 7,44 (1H, t, H₂₁), 7,25 (1H, s, H₈), 7,17 (1H, d, ³J_{H11,H12} = 10,7 Hz, H₁₂), 7,05 (1H, d, H₁₁), 6,80 (1H, s, H₄), 4,61 (1H, dd, ³J_{H6,H7} = 16,5 Hz, ³J_{H6',H7} = 8,5 Hz, H₇), 3,87 (3H, s, OCH₃-10), 3,84 (3H, s, OCH₃-1), 3,80 (3H, s, OCH₃-3), 3,60 (3H, s, OCH₃-2), 2,65 (1H, m, H₆), 2,29 (1H, m, H₆), 2,15 (2H, m, H₅).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 298 K): δ (ppm): 178,4, 165,4, 164,1, 153,8, 153,5, 151,2, 151,0, 150,9, 141,3, 137,0, 136,7, 135,7, 135,0, 134,7, 130,9, 130,1, 129,3, 125,9, 124,9, 124,0, 112,7, 108,3, 61,4, 61,2, 56,6, 56,4, 52,8, 35,7, 29,8.

HRMS (ESI): C₃₃H₂₉Cl₂N₃O₆+H, obliczono *m/z*: 634,150617; znaleziono *m/z*: 634,150617.

6. Bibliografia

- [1] H. P. Rang, J. M. Ritter, R. J. Flower, J. Henderson, *Rang & Dale's Pharmacology*, Churchill Livingstone, Londyn, 2015
- [2] W. A. Velema, W. Szymański, B. L. Feringa, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 136, 2178–2191
- [3] I. R. Edwards, J. K. Aronson, *Lancet*, 2000, 356, 1255–1259
- [4] K. Lewis, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2013, 12, 371–387
- [5] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell*, 2011, 144, 646–674
- [6] R. Gaudana, H. K. Ananthula, A. Parenky, A. K. Mitra, *AAPS J.*, 2010, 12, 348–360
- [7] D. E. Gerber, *Am. Fam. Physician*, 2008, 77, 311–319
- [8] M. M. Lerch, M. J. Hansen, G. M. van Dam, W. Szymański, B. L. Feringa, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2016, 55, 10978–10999
- [9] V. Malhotra, M. C. Perry, *Cancer Biol. Ther.*, 2003, 2, 2–4
- [10] R. Paus, I. S. Haslam, A. A. Sharov, V. A. Botchkarev, *Lancet Oncol.*, 2013, 14, 50–59
- [11] S. Sonis, L. Elting, D. Keefe, D. Peterson, M. Schubert, M. Hauer-Jensen, B. Bekele, J. Raber-Durlacher, J. Donnelly, E. Rubenstein, *Cancer*, 2004, 100, 1995–2025
- [12] H. Ludwig, S. Van Belle, P. Barrett-Lee, G. Birgegard, C. Bokemeyer, P. Gascon, P. Kosmidis, M. Krzakowski, J. Nortier, P. Olmi, M. Schneider, D. Schrijvers, *Eur. J. Cancer*, 2004, 40, 2293–2306
- [13] J. Lehar, A. S. Krueger, W. Avery, A. M. Heilbut, L. M. Johansen, E. R. Price, R. J. Rickles, G. F. Short, J. E. Staunton, X. Jin, M. S. Lee, G. R. Zimmermann, A. A. Borisy, *Nat. Biotechnol.*, 2009, 27, 659–666
- [14] J. A. DiMasi, L. Feldman, A. Seckler, A. Wilson, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2010, 87, 272–277
- [15] J. Carlet, P. Collignon, D. Goldmann, H. Goossens, I. C. Gyssens, S. Harbarth, V. Jarlier, S. B. Levy, B. N'Doye, D. Pittet, R. Richtmann, W. H. Seto, J. W. M. van der Meer, A. Voss, *Lancet*, 2011, 378, 369–371
- [16] J. Broichhagen, J. A. Frank, D. Trauner, *Acc. Chem. Res.*, 2015, 48(7), 1947–1960
- [17] W. Szymański, J. M. Beierle, H. A. V. Kistemaker, W. A. Velema, B. L. Feringa, *Chem. Rev.*, 2013, 113(8), 6114–6178
- [18] S. K. Sharma, P. Mroz, T. Dai, Y. Y. Huang, T. G. St. Denis, M. R. Hamblin, *Isr. J. Chem.*, 2012, 52 (8–9), 691–705
- [19] O. Tour, R. M. Meijer, D. A. Zacharias, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Nat. Biotechnol.*, 2003, 21, 1505–1508

- [20] L. Fenno, O. Yizhar, K. Deisseroth, *Annu. Rev. Neurosci.*, 2011, 34, 389–412
- [21] B. V. Zemelman, N. Nesnas, G. A. Lee, G. Miesenböck, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2003, 100, 1352–1357
- [22] B. V. Zemelman, G. A. Lee, M. Ng, G. Miesenböck, *Neuron*, 2002, 33, 15–22
- [23] D. Kolarski, W. Szymański, B. L. Feringa, *Medicinal Research Reviews*, 2025, 45, 968–984
- [24] A. M. Schroeder, C. S. Colwell, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2013, 34(11), 605–619
- [25] E. D. Anderson, A. P. Gorka, and M. J. Schnermann, *Nat. Commun.*, 2016, 7(1), 13378
- [26] T. Rodat, M. Krebs, A. Döbber, *Photoch. Photobiol. Sci.*, 2020, 19(10), 1319–1325
- [27] G. Alachouzos, A. M. Schulte, A. Mondal, W. Szymański, B. L. Feringa, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2022, 61(27), 202201308
- [28] D. Kolarski, C. Miró-Vinyals, A. Sugiyama, *Nat. Commun.*, 2021, 12, 3164
- [29] D. Kolarski, A. Sugiyama, T. Rodat, *Org. Biomol. Chem.*, 2021, 19(10), 2312–2321
- [30] D. Kolarski, A. Sugiyama, G. Breton, *J. Am. Chem. Soc.*, 2019, 141(40), 15784–15791
- [31] A. M. Schulte, D. Kolarski, V. Sundaram, *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, 23(10), 5326
- [32] F. Fagiani, D. Di Marino, A. Romagnoli, *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2022, 7(1), 41
- [33] A. M. Chang, D. Aeschbach, J. F. Duffy, and C. A. Czeisler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2015, 112(4), 1232–1237
- [34] N. A. Smith, P. J. Sadler, *Phil. Trans. R. Soc. A.*, 2013, 371, 20120519
- [35] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, 51, 8446–8476
- [36] R. S. Stern, *N. Engl. J. Med.*, 2007, 357, 682–690
- [37] J. Volarić, N. J. van der Heide, N. L. Mutter, D. F. Samplonius, W. Helfrich, G. Maglia, W/ Szymański, B. L. Feringa, *ACS Chem. Biol.*, 2024, 19, 451–461
- [38] N. L. Mutter, J. Volarić, W. Szymański, B. L. Feringa, G. Maglia, *J. Am. Chem. Soc.* 2019, 141(36), 14356–14363
- [39] K. Tanaka, J. M. M. Caaveiro, K. Morante, J.M. Gonzalez-Manas, K. Tsumoto, *Nat. Commun.*, 2015, 6(1), 6337
- [40] B. L. Feringa, *Molecular Switches*, WileyVCH, Weinheim, 2001
- [41] L. Lucas, J. van Esch, *Tetrahedron Lett.*, 1999, 40, 1775
- [42] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, 5th ed., W. H. Freeman, Nowy Jork, 2002
- [43] C. Dugave, L. Demange, *Chem. Rev.*, 2003, 103, 2475–2532

- [44] K. Bartyzel, *Przełączniki molekularne: Rodzaje i zastosowania*, Praca dyplomowa, Kraków, 2015
- [45] S. Polyakova, V. Belov, *Eur. J. Org. Chem.*, 2011, 3301–3312
- [46] D. Blegler, S. Hecht, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, 54, 11338–11349
- [47] G. M. Tsivgoulis, J.-M. Lehn, *Adv. Mater.*, 1997, 9, 627–630
- [48] R. Siewertsen, H. Neumann, B. Buchheim-Stehn, R. Herges, C. Nather, F. Renth, F. Temps, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 15594–15595
- [49] I. M. Welleman, M. W. H. Hoorens, B. L. Feringa, H. H. Boersma, W. Szymański, *Chem Sci.*, 2020, 11(43), 11672–11691
- [50] W. A. Velema, J. P. van der Berg, M. J. Hansen, W. Szymański, A. J. M. Driessen, B. L. Feringa, *Nat. Chem.*, 2013, 5, 924–928
- [51] J. Broichhagen, J. A. Frank, N. R. Johnston, R. K. Mitchell, K. Šmid, P. Marchetti, M. Bugliani, G. A. Rutter, D. Trauner, D. J. Hodson, *Chem. Commun.*, 2015, 51, 6018–6021
- [52] M. R. Banghart, A. Mourot, D. L. Fortin, J. Z. Yao, R. H. Kramer, D. Trauner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, 48, 9097–9101
- [53] J. B. Trads, K. Hüll, B. S. Matsuura, L. Laprell, T. Fehrentz, N. Görlidt, K. A. Kozek, C. D. Weaver, N. Klöcker, D. M. Barber, D. Trauner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2019, 58, 15421–15428
- [54] P. Lentès, E. Stadler, F. Röhricht, A. Brahms, J. Gröbner, F. D. Sönnichsen, G. Gescheidt, R. Herges, *J. Am. Chem. Soc.*, 2019, 141, 13592–13600
- [55] M. Dommaschk, M. Peters, F. Gutzeit, C. Schütt, C. Näther, F. D. Sönnichsen, S. Tiwari, C. Riedel, S. Boretius and R. Herges, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, 137, 7552–7555
- [56] M. Dommaschk, J. Gröbner, V. Wellm, J. Hovene, C. Riedel, R. Herges, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2019, 21, 24296–24299
- [57] D. Bliman, J. R. Nilsson, P. Kettunen, J. Andréasson, M. Grötli, *Sci. Rep.*, 2015, 5, 13109
- [58] K. Sitkowska, M. F. Hoes, M. M. Lerch, L. N. Lameijer, P. van der Meer, W. Szymański, B. L. Feringa, *Chem. Commun.*, 2020, 56, 5480–5483
- [59] F. Hamon, F. Djedaini-Pilard, F. Barbot, C. Len, *Tetrahedron*, 2008, 65, 10105–10123
- [60] P. Cattaneo, M. Persico, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 1999, 1, 4739–4743
- [61] D. H. Waldeck, *Chem. Rev.*, 1991, 91, 415–436
- [62] G. Berkovic, V. Krongauz, V. Weiss, *Chem. Rev.*, 2000, 100, 1741–1754
- [63] B. S. Lukyanov, M. B. Lukyanova, *Chem. Heterocycl. Comp.*, 2005, 41, 281–311

- [64] M. Levitus, G. Glasser, D. Neher, P. Aramendía, *Chem. Phys. Lett.*, 1997, 277, 118–124
- [65] A. K. Chibisov, H. Görner, *J. Phys. Chem. A*, 1997, 101, 4305–4312
- [66] J. B. Flannery, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, 90, 5660–5671
- [67] S. L. Gilat, S. H. Kawai, J. M. Lehn, *Chem. A Eur. J.*, 1995, 1, 275–284
- [68] M. Irie, *Chem. Rev.*, 2000, 100, 1685–1716
- [69] A. Santiago, R. S. Becker, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, 90, 3654–3658
- [70] Y. Yokoyama, *Chem. Rev.*, 2000, 100, 1717–1740
- [71] H. G. Heller, S. Oliver, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1981, 197–201
- [72] P. J. Darcy, H. G. Heller, P. J. Strydom, J. Whittall, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1981, 202–205
- [73] T. Loughheed, V. Borisenko, T. Hennig, K. Rück-Braun, G. A. Woolley, *Org. Biomol. Chem.*, 2004, 2, 2798–2801
- [74] T. Yamaguchi, T. Seki, T. Tamaki, K. Ichimura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1992, 65, 649–656
- [75] T. Cordes, D. Weinrich, S. Kempa, K. Riesselmann, S. Herre, C. Hoppmann, K. Rück-Braun, W. Zinth, *Chem. Phys. Lett.*, 2006, 428, 167–173
- [76] B. Zhao, Y. Y. He, *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 2010, 10, 1797–1809
- [77] N. M. Bessler, *Retina*, 2004, 24, 512–520
- [78] S. Sobaniec, P. Bernaczyk, J. Pietruski, M. Cholewa, A. Skurska, E. Dolińska, E. Duraj, G. Tokajuk, A. Paniczko, E. Olszewska, *Lasers/Medical Sci.*, 2013, 28, 311–316
- [79] I. I. Simone, J. S. Friedberg, E. Glatstein, J. P. Stevenson, D. H. Sterman, S. M. Hahn, K. A. Cengel, *J. Thorac. Dis.*, 2011, 4, 63–75
- [80] A. Nanashima, T. Nagayasu, *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, 16, 3434–3440
- [81] K. J. Lorenz, H. Maier, F. Wilde, *J. Otol. Rhinol.*, 2014, 3(5), 1–8
- [82] T. H. Baron, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2008, 6, 266–267
- [83] P. Soergel, X. Wang, H. Stepp, H. Hertel, P. Hillemanns, *Lasers Surg. Med.*, 2008, 40, 611–615
- [84] G. Bozzini, P. Colin, N. Betrouni, P. Nevoux, A. Ouzzane, P. Puech, A. Villers, S. Mordon, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2012, 9, 261–273
- [85] T. J. Vogl, K. Eichler, M. G. Mack, S. Zangos, C. Herzog, A. Thalhammer, K. Engelmann, *Eur. Radiol.*, 2004, 14, 1063–1073
- [86] D. J. Kereiakes, A. M. Szyniszewski, D. Wahr, H. C. Herrmann, D. I. Simon, C. Rogers, P. Kramer, W. Shear, A. C. Yeung, K. A. Shunk, *Circulation*, 2003, 108, 1310–1315

- [87] K. A. Cengel, E. Glatstein, S. M. Hahn, *Cancer Treat. Res.*, 2007, 134, 493–514
- [88] S. G. Bown, A. Z. Rogowska, D. E. Whitelaw, W. R. Lees, L. B. Lovat, P. Ripley, L. Jones, P. Wyld, A. Gillams, A. W. R. Hatfield, *Gut*, 2002, 50, 549–557
- [89] T. R. Nathan, D. E. Whitelaw, S. C. Chang, W. R. Lees, P. M. Ripley, H. Payne, L. Jones, M. C. Parkinson, M. Emberton, A. R. Gillams, *J. Urol.*, 2002, 168, 1427–1432
- [90] B. J. Quirk, G. Brandal, S. Donlon, J. C. Vera, T. S. Mang, A. B. Foy, S. M. Lew, A. W. Girotti, S. Jogal, P. S. LaViolette, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2015, 12, 530–544
- [91] D. Bléger, J. Schwarz, A. M. Brouwer, S. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134, 20597–20600
- [92] Q. Liu, X. Luo, S. Wei, *Tetrahedron Lett.*, 2019, 60(26), 1715–1719
- [93] S. Mehrparvar, Z. N. Scheller, C. Wölper, G. Haberhauer. *J. Am. Chem. Soc.*, 2021, 143(47), 19856–19864
- [94] D. B. Konrad, J. A. Frank, D. Trauner, *Chem. Eur. J.*, 2016, 22(13), 4364–4368
- [95] D. B. Konrad, G. Savasci, L. Allmendinger, D. Trauner, C. Ochsenfeld, A. M. Ali, *J. Am. Chem. Soc.*, 2020, 142(14), 6538–6547
- [96] P. Kobauri, F. J. Dekker, W. Szymański, B. L. Feringa, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2023, 62, 202300681
- [97] M. Stein, S. J. Middendorp, V. Carta, E. Pejo, D. E. Raines, S. A. Forman, E. Sigel, D. Trauner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, 51, 10500–10504
- [98] P. Stawski, M. Sumser, D. Trauner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, 51, 5748–5751
- [99] P. Donthamsetti, D. B. Konrad, B. Hetzler, Z. Fu, D. Trauner, E. Y. Isacoff, *J. Am. Chem. Soc.*, 2021, 143, 8951–8956
- [100] O. Tiapko, N. Shrestha, S. Lindinger, G. Guedes De La Cruz, A. Graziani, C. Klec, C. Butorac, W. F. Graier, H. Kubista, M. Freichel, L. Birnbaumer, C. Romanin, T. Glasnov, K. Groschner, *Chem. Sci.*, 2019, 10, 2837–2842
- [101] X. Sun, H. Gao, Y. Yang, M. He, Y. Wu, Y. Song, Y. Tong, Y. Rao, *Sig. Transduct. Target. Ther.*, 2019, 4, 64
- [102] A. J. Engdahl, E. A. Torres, S. E. Lock, T. B. Engdahl, P. S. Mertz, C. N. Streu, *Org. Lett.*, 2015, 17, 4546–4549
- [103] L. Agnetta, M. Bermudez, F. Riefolo, C. Matera, E. Claro, R. Messerer, T. Littmann, G. Wolber, U. Holzgrabe, M. Decker, *J. Med. Chem.*, 2019, 62(6), 3009–3020
- [104] A. Chakraborty, S. Jana, G. Kibriya, A. Dey, A. Hajra, *RSC Adv.*, 2016, 6, 34146–34152
- [105] A. A. John, Q. Lin, *J. Org. Chem.*, 2017, 82, 9873–9876

- [106] J. E. Sheldon, M. M. Dcona, C. E. Lyons, J. C. Hackett, M. C. T. Hartman, *Org. Biomol. Chem.*, 2016, 40–49
- [107] M. A. Jordan, L. Wilson, *Nat. Rev. Cancer*, 2004, 4(4), 253–265
- [108] C. Dumontet, M. A. Jordan, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2010, 9(10), 790–803
- [109] R. B. G. Ravelli, B. Gigant, P. A. Curmi, I. Jourdain, S. Lachkar, A. Sobel, M. Knossow, *Nature*, 2004, 428(6979), 198–202
- [110] E. Nogales, H. W. Wang, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2006, 18(2), 179–184
- [111] M. Zielińska-Przyjemska, M. Kaczmarek, V. Krajka-Kuźniak, M. Wierzchowski, W. Baer-Dubowska, *Mol. Cell. Biochem.*, 2020, 474, 113–123
- [112] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, Gaussian 03, Revision E.01, dostępny online: <https://gaussian.com/g03citation/> (dostęp 21 maja 2025 r.)
- [113] J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, *Chem. Rev.*, 2005, 105, 2999–3093
- [114] M. Kavallaris, *Nat. Rev. Cancer*, 2010, 10(3), 194–204
- [115] M. A. Verdecia, M. E. Bowman, K. P. Lu, T. Hunter, J. P. Noel, *Nat. Struct. Biol.*, 2000, 7(8), 639–643
- [116] O. Thorn-Seshold, J. Meiring, *Cell Chem. Biol.*, 2021, 28(7), 1030–1047
- [117] R. Gaspari, A. E. Prota, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021 22(7), 3696
- [118] Y. L. Choi, H. S. Lim, H. J. Lim, J. N. Heo, *Org. Lett.*, 2012, 14(19), 5102–5105
- [119] G. R. Pettit, A. Numata, C. Iwamoto, Y. Usami, T. Yamada, H. Ohishi, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.*, 2006, 69(3), 323–327
- [120] Y. Bharath, B. Thirupathi, G. Ranjit, D. K. Mohapatra, *Asian J. Org. Chem.*, 2013, 2, 848–851
- [121] J. Fernández, J. M. Alonso, J. I. Andrés, J. M. Cid, A. Diaz, L. Iturrino, P. Gil, A. Megens, V. K. Sipido, A. A. Trabanco, *J. Med. Chem.*, 2005, 48, 1709–1712
- [122] A. A. Trabanco, J. M. Alonso, J. M. Cid, L. M. Font, A. Megens, *II Farm.*, 2005, 60, 241–248
- [123] Y. Nagai, A. Irie, H. Nakamura, K. Hino, H. Uno, H. Nishimura, *J. Med. Chem.*, 1982, 25, 1065–1070
- [124] H. H. Ong, J. A. Profitt, V. B. Anderson, T. C. Spaulding, J. C. Wilker, H. M. Geyer, H. Kruse, *J. Med. Chem.*, 1980, 23, 494–501
- [125] T. Roeder, J. A. Nathanson, *Neurochem. Res.*, 1993, 18, 921–925

- [126] R. Kiyama, T. Honma, K. Hayashi, M. Ogawa, M. Hara, M. Fujimoto, T. Fujishita, *J. Med. Chem.*, 1995, 38, 2728–2741
- [127] R. Olivera, R. San Martin, F. Churrua, E. Dominguez, *J. Org. Chem.*, 2002, 67, 7215–7225
- [128] A. Missir, C. Limban, C. Stecoza, L. Morusciag, I. Chirita, *Farmacia*, 1998, 46, 17–30
- [129] K. Zimmermann, P. C. Waldmeier, W. G. Tatton, *Pure Appl. Chem.*, 1999, 71, 2039–2046
- [130] W. Sperling, J. Demling, *Drugs Today*, 1997, 33, 95–102
- [131] J. Claghorn, M. D. Lesem, *Prog. Drug Res.*, 1996, 46, 243–262
- [132] Y. Sagot, N. Toni, D. Perrelet, S. Lurot, B. King, H. Rixner, L. Mattenberger, P. C. Waldmeier, A. C. Kato, *J. Pharmacol.*, 2000, 131, 721–728
- [133] Y. Wang, Y. Chen, Q. He, Y. Xie, C. Yang, *Helv. Chim. Acta*, 2013, 96, 296–308
- [134] P. G. Nantermet, H. A. Rajapakse, *PCT Int. Appl.*, WO2007019080
- [135] T. W. Harris, H. E. Smith, P. L. Mobley, D. H. Manier, F. Sulser, *J. Med. Chem.*, 1982, 25, 855–858
- [136] H. Krawczyk, M. Wrzesiński, D. Mielecki, P. Szczeciński, E. Grzesiuk, *Tetrahedron*, 2016, 72 3877–3884
- [137] T. Storz, E. Vangrevelinghe, P. Dittmar, *Synthesis*, 2005, 15, 2562–2570
- [138] B. A. Jr. Hess, A. S. Bailey, V. Boekelheide, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, 89, 2746–2747
- [139] S. Takaoka, H. Hibasami, K. Ogasawara, N. Imai, *J. Herbs Spices Med. Plants.*, 2008, 14(3–4), 166–174
- [140] C. Chen, A. K. Shenoy, R. Padia, D. Fang, Q. Jing, P. Yang, S.-B. Su, S. Huang, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2018, 37(1), 243
- [141] I. Okoye, S. Yu, F. Caruso, M. Rossi, *Molecules*, 2021, 26(21), 6511
- [142] A. Friis-Møller, M. Chen, K. Fuursted, S. R. B. G. Christensen, A. Kharazmi, *Planta Med.*, 2002, 68(5), 416–419
- [143] K. Barber, P. Mendonca, K. F. A. Soliman, *Brain Sci.*, 2023, 13(1), 145
- [144] F. Chimenti, R. Fioravanti, A. Bolasco, P. Chimenti, D. Secci, F. Rossi, M. Yáñez, F. Orallo, F. Ortuso, S. Alcaro, *J. Med. Chem.*, 2009, 52(9), 2818–2824
- [145] J.-L. Tian, X. Si, Y.-H. Wang, E.-S. Gong, X. Xie, Y. Zhang, B. Li, C. Shu, *Food Chem.*, 2021, 341, 128149
- [146] N. A. A. Elkanzi, H. Hrichi, R. A. Alolayan, W. Derafa, F. M. Zahou, R. B. Bakr, *ACS Omega*, 2022, 7(32), 27769–27786

- [147] M. R. Sazegar, S. Mahmoudian, A. Mahmoudi, S. Triwahyono, A. A. Jalil, R. R. Mukti, N. H. Nazirah Kamarudin, M. K. Ghoreishi, *RSC Adv.*, 2016, 6, 11023–11031
- [148] K. Rullah, M. F. F. M. Aluwi, B. M. Yamin, J. C. Juan, L. K. Wai, *Asian J. Org. Chem.*, 2019, 8(8), 1174–1193
- [149] M. Alsharif, Q. A. Raja, N. A. Majeed, R. S. Jassas, A. A. Alsimaree, A. Sadiq, N. Naeem, E. U. Mughal, R. I. Alsantali, Z. Moussa, S. A. Ahmed, *RSC Adv.*, 2021, 11, 29826–29858
- [150] March, J., *Advanced Organic Chemistry*, 4th ed., Wiley, 1992
- [151] A. Kumar, P. R. Sharma, D. M. Mondhe, *Anticancer Drugs*, 2016, 28(3), 250–262
- [152] Y. Y. Leung, L. L. Y, Hui, V. B. Kraus, *Semin. Arthritis Rheum.*, 2015, 45(3), 341–350
- [153] A. Slobodnick, B. Shah, S. Krasnokutsky, M. H. Pillinger, *Rheumatology*, 2018, 57, 4–11
- [154] G. G. Borisy, E. W. Taylor, *J. Cell. Biol.*, 1967, 34(2), 525–533
- [155] M. A. Jordan, L. Wilson, *Nat. Rev. Cancer.*, 2004, 4(4), 253–265
- [156] D. L. Sackett, J. K. Varma, *J. Biol. Chem.*, 1993, 268(25), 18303–18306
- [157] B. Bhattacharyya, J. Wolff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1974, 71(7), 2627–2631
- [158] B. N. Cronstein, Y. Molad, J. Reibman, E. Balakhane, R. I. Levin, G. Weissmann, *J. Clin. Invest.*, 1995, 96(2), 994–1002
- [159] R. A. Terkeltaub, *Semin. Arthritis Rheum.*, 2009, 38(6), 411–419
- [160] G. Nuki, *Curr. Rheumatol. Rep.*, 2008, 10(3), 218–227
- [161] M. Imazio, A. Brucato, R. Cemin, S. Ferrua, S. Maggiolini, F. Beqaraj, D. Demarie, D. Forno, S. Ferro, S. Maestroni, R. Belli, R. Trincherro, D. H. Spodick, Y. Adler, *N. Engl. J. Med.*, 2013, 369(16), 1522–1528
- [162] M. M.-Y Chan, *Biochem. Pharmacol.*, 1995, 49(11), 1551–1556
- [163] J. H. Miller, V. M. Miller, *Cancer Lett.*, 1999, 146(1), 59–65
- [164] T. Zhang, W. Chen, X. Jiang, L. Liu, K. Wei, H. Du, H. Wang, J. Li, *Biosci. Rep.*, 2019, 39(1), 20181802
- [165] J. J. Lee, S. M. Swain, *J. Clin. Oncol.*, 2006, 24(10), 1633–1642
- [166] R. M. Chabin, F. Feliciano, S. B. Hastie, *Biochem.*, 1990, 29(7), 1869–1875
- [167] J. Guan, X. K. Zhu, Y. Tachibana, K. F. Bastow, A. Brossi, E. Hamel, K. H. Lee, *J. Med. Chem.*, 1998, 41(11), 1956–1961
- [168] E. A. Pyles, S. B. Hastie, *Biochem.*, 1993, 32(9), 2329–2336
- [169] L. Sun, A. T. McPhail, E. Hamel, C. M. Lin, S. B. Hastie, J. J. Chang, K. H. Lee, *J. Med. Chem.*, 1993, 36(5), 544–551

- [170] J. D. Bagnato, A. L. Eilers, R. A. Horton, C. B. Grissom, *J. Org. Chem.*, 2004, 69(26), 8987–8996
- [171] B. Danieli, G. Lesma, D. Passarella, D. Prosperi, A. Sacchetti, A. Silvani, R. Destro, E. May, E. Bombardelli, *Helv. Chim. Acta*, 2003, 86(6), 2082–2089
- [172] N. Nicolaus, S. Strauss, J. M. Neudörfl, A. Prokop, H. G. Schmalz, *Org. Lett.*, 2009, 11(2), 341–344
- [173] A. Ahmed, N. R. Peters, M. K. Fitzgerald, J. A. Watson, F. M. Hoffmann, J. S. Thorson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128(44), 14224–14225
- [174] X. Zheng, F. Dong, J. Yang, X. Duan, T. Niu, W. Wu, J. Wang, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2011, 287, 113–117
- [175] V. Blasco, A. C. Cuñat, J. F. Sanz-Cervera, J. A. Marco, E. Falomir, J. Murga, M. Carda, *Eur. J. Med. Chem.*, 2018, 150, 817–828
- [176] S.-K. Kim, S.-M. Cho, H. Kim, H. Seok, S.-O. Kim, T. K. Kwon, J.-S. Chang, *Exp. Mol. Med.*, 2013, 45, 19
- [177] L. Son-Jin, N. Seung, H. Kwon-Soo, N. Woo-Dong, *Exp. Mol. Med.*, 2007, 39(2), 230–238
- [178] M. Y. Choi, Y. M. Wee, Y. H. Kim, S. Shin, S. E. Yoo, D. J. Han, *J. Cell Biochem.*, 2019, 120(8), 12436–12449
- [179] G. Klejborowska, M. Moshari, E. Maj, U. Majcher, *Chem. Biol. Drug. Des.*, 2019, 95(1), 182–191
- [180] G. Klejborowska, A. Urbaniak, E. Maj, J. Preto, M. Moshari, J. Wietrzyk, J. A. Tuszyński, T. C. Chambers, A. Huczyński, *Bioorg. Chem.*, 2020, 97, 103664
- [181] G. G. Choudhury, A. Banerjee, B. Bhattacharyya, B. B. Biswas, *FEBS Lett.*, 1983, 161(1), 55–59
- [182] S. B. Hastie, *Pharmacol. Ther.*, 1991, 51(3), 377–401
- [183] P. D. Davis, G. J. Dougherty, D. C. Blakey, S. M. Galbraith, G. M. Tozer, A. L. Holder, M. A. Naylor, J. Nolan, M. R. L. Stratford, D. J. Chaplin, S. A. Hill, *Cancer Res*, 2002, 62(24), 7247–7253
- [184] K. Larocque, P. Ovadje, S. Djurdjevic, M. Mehdi, J. Green, S. Pandey, *PLOS ONE*, 2014, 9(1), 87064
- [185] K. Takubo, K. Furutsu, T. Ide, H. Nemoto, Y. Ueda, K. Tsujikawa, T. Ikawa, T. Yoshimitsu, S. Akai, *Eur. J. Org. Chem.*, 2016, 8, 1562–1576
- [186] A. Joncour, A. Décor, J. M. Liu, M.-E. Tran Huu Dau, O. Baudoin O. *Chemistry.*, 2007, 13(19), 5450–5465

- [187] D. J. Edwards, J. A. Hadfield, T. W. Wallace, S. Ducki, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, 9(1), 219–231
- [188] L. C. Young, C. M. Yu, T. K. Bum, J. N. Heo, *J. Org. Chem.*, 2009, 74(10), 3948–3951
- [189] N. Sitnikov, J. Velder, L. Abodo, N. Cuvelier, J. Neudörfl, A. Prokop, G. Krause, A. Y. Fedorov, H.-G. Schmalz, *Chemistry.*, 2012, 18(38), 12096–12102
- [190] N. S. Sitnikov, A. V. Sinzov, D. Allegro, P. Barbier, S. Combes, L. A. Onambele, A. Prokop, H.-G. Schmalz, A. Y. Fedorov, *Medchemcomm.*, 2015, 6(12), 2158–2162
- [191] D. Garbicz, D. Mielecki, M. Wrzesiński, T. Pilzys, M. Marcinkowski, J. Piwowarski, J. Dębski, E. Palak, P. Szczeciński, H. Krawczyk, E. Grzesiuk, *Curr Cancer Drug Targets*, 2018, 18(7), 706–717
- [192] L. Bustos, C. Echiburú-Chau, A. Castro-Alvarez, B. Bradhsaw, M. J. Simirgiotis, M. Mellado, C. Parra, M. Cuellar, *Molecules*, 2022, 27(14), 4387
- [193] Y. Sun, X. Lin, H. Chang, *JBUON*, 2016, 21(3), 570–575
- [194] R. Zhao, C. Tan, Y. Xie, C. Gao, H. Liu, Y. Jiang, *Tetrahedron Lett.*, 2011, 52(29), 3805–3809
- [195] M. S. Taghizadeh, A. Niazi, A. Moghadam, A. Afsharifar, *PLOS ONE*, 2020, 17(5), e0267961
- [196] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, J. A. Pople, Gaussian 03, Revision C.02, Gaussian, Inc. [oprogramowanie], Wallingford, 2004
- [197] J. Eberhardt, D. Santos-Martins, A. F. Tillack, S. Forli, *J. Chem. Inf. Model.*, 2021, 61, 3891–3898

- [198] Y. Luo, K. Qiu, X. Lu, K. Liu, J. Fu, H. L. Zhu, *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, 19, 4730–4738
- [199] G. C. Tron, T. Pirali, G. Sorba, F. Pagliai, S. Busacca, A. A Genazzani, *J. Med. Chem.*, 2006, 49, 3033–3044
- [200] B. Salehi, C. Quispe, I. Chamkhi, N. El Omari, A. Balahbib, J. Sharifi-Rad, A. Bouyahya, M. Akram, M. Iqbal, A. O. Docea, C. Caruntu, G. Leyva-Gómez, A. Dey, M. Martorell, D. Calina, V. López, F. Les, *Front. Pharmacol.*, 2021, 11, 592654
- [201] S. Wäldchen, J. Lehmann, T. Klein, S. van de Linde, M. Sauer, *Sci. Rep.*, 2015, 5, 15348
- [202] M. Erguk, F. Bakar-Ates, *Toxicol. In Vitro*, 2021, 73, 105138
- [203] F. Cardano, R. M. García, W. Szymański, *Angewandte Chemie*, 2025, 64, e202423506
- [204] O. Trott, A. J. Olson. *J. Comput. Chem.*, 2010, 31, 455–461
- [205] RCSB Protein Data Bank – RCSB PDB, dostępny online: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (dostęp 21 maja 2025 r.)
- [206] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, *J. Comput. Chem.*, 2004, 25, 1605–1612
- [207] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger LLC, 2010
- [208] S. Salentin, S. Schreiber, V. J. Haupt, M. F. Adasme, M. Schroeder, *Nucleic Acids Res.*, 2015, 43, 443–447
- [209] The R Core Team, *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, R Foundation for Statistical Computing, Wiedeń, 2014
- [210] C. Ritz, F. Baty, J. C. Streibig, D. Gerhard, *PLOS ONE*, 2015, 10(12), e0146021
- [211] J. W. Neill, *Ann. Statist.*, 1988, 16, 733–740
- [212] J. W. Tukey, *Biometrics*, 1949, 5, 99–114
- [213] H. Wickham, *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*, 2nd ed., Springer Cham, 2016
- [214] P. Tobiasz, *Synteza pochodnych dibenzo[b,f]oksepiny podstawionych w pierścieniu aromatycznym*, Praca dyplomowa, Warszawa, 2019

7. Spis rysunków

Rysunek 1. Porównanie aktywności leków konwencjonalnych, proleków i leków fotokontrolowanych [2].....	35
Rysunek 2. Zilustrowanie podstawowych zasad dotyczących metod leczenia kontrolowanych światłem na przykładzie receptora błony komórkowej: a) fotofarmakologia; b) PDT; c) optogenetyka [8].....	39
Rysunek 3. Zaburzenie obwodowego zegara okołodobowego oraz dwa podejścia do przywracania prawidłowych rytmów: farmakologiczne (działanie systemowe) oraz chronofotofarmakologiczne (działanie czasoprzestrzenne) [23].....	40
Rysunek 4. (a) Schematyczne przedstawienie monomeru FraC znakowanego przełącznikiem azobenzenowym; izomer <i>E</i> hamuje wiązanie monomeru z dwuwarstwą lipidową, natomiast po naświetleniu światłem zielonym powstały izomer <i>Z</i> umożliwia wiązanie z błoną oraz dalsze formowanie oligomerycznego kompleksu porowego w docelowej błonie (żółtej); (b) Schematyczne przedstawienie monomeru FraC wbudowanego w docelową błonę, gdzie zaznaczono reszty aminokwasowe zmutowane do cysteiny (szare sfery), a także cząsteczki sfingomieliny stabilizujące por (pomarańczowe); (c) Elementy konstrukcyjne docelowego przełącznika, reagującego na światło widzialne, zawierającego grupę zwiększającą rozpuszczalność w wodzie oraz część do kowalencyjnej modyfikacji białek [37].....	41
Rysunek 5. Maksima absorpcji charakteryzujące dwa termodynamicznie stabilne stany fotochromowego przełącznika molekularnego.	43
Rysunek 6. Ogólne strategie zastępowania światła UV (fioletowe przerywane strzałki) światłem widzialnym (czerwone ciągłe strzałki) w celu wywołania przemiany między dwoma przełącznikami — A i B. S ₀ : stan podstawowy; S ₁ : pierwszy stan wzbudzony singletowy; T ₁ : pierwszy stan trypletowy; ISC: przejście między stanami o różnej multipletowości (ang. <i>intersystem crossing</i>); TTA: anihilacja tryplet–tryplet; ET: transfer energii; (P)eT: (fotoindukowany) transfer elektronów [46].	47
Rysunek 7. Scenariusze terapeutyczne dotyczące zastosowania odwracalnych (1–4) i nieodwracalnych (5) systemów fotokontrolowanych w medycynie, uwzględniające sytuacje, w których związek ma być aktywowany na zewnątrz (1) lub wewnątrz organizmu (2–5), oraz	

biorąc pod uwagę, czy forma stabilna (2), czy metastabilna (1, 3, 4) przełącznika jest bardziej aktywna biologicznie. Intensywność koloru w tle wykresów odpowiada rosnącej aktywności biologicznej, którą można uzyskać poprzez zmianę stężenia izomeru metastabilnego (niebieska linia) [49].	52
Rysunek 8. Schemat wykorzystania fotochromowych przełączników molekularnych do wprowadzania leków do komórek [8].	56
Rysunek 9. Struktura kombretastatyny A4 (a) i jej <i>azo</i> -pochodnej (b).	58
Rysunek 10. Widmo absorpcyjne UV–Vis izomerów <i>E/Z</i> azobenzenu (AB) [46].	59
Rysunek 11. Diagram energetyczny orbitali π , n oraz π^* azobenzenu [91].	59
Rysunek 12. Diagram energetyczny orbitali π , n oraz π^* <i>o</i> -tetrafluoroazobenzenu [91].	60
Rysunek 13. a) Fotoizomeryzacja tetra- <i>orto</i> -chloroazobenzenu (1 — azobenzen, 2 — tetra- <i>orto</i> -chloroazobenzen); b) Widmo UV–Vis związków 1 i 2 (50uM roztwór w DMSO) c) Widmo UV–Vis związków 1 i 2 (500uM roztwór w DMSO) [95].	62
Rysunek 14. Przykłady biologicznie czynnych pochodnych dibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny.	70
Rysunek 15. Przykłady biologicznie czynnych pochodnych chalkonu.	74
Rysunek 16. Schemat struktury kolchicyny wraz z oznaczeniem pierścieni w cząsteczce i numeracją atomów węgla.	77
Rysunek 17. Domena kolchicynowa w tubulinie i miejsca wiązania się z nią kolchicyny.	79
Rysunek 18. Przykłady biologicznie czynnych pochodnych kolchicyny ze zmodyfikowanym pierścieniem B.	83
Rysunek 19. Przykłady biologicznie czynnych pochodnych kolchicyny ze zmodyfikowanym pierścieniem C.	85
Rysunek 20. Podobieństwa w strukturze kolchicyny (a), kombretastatyny A-4 (b), metoksyłowej pochodnej dibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny (c) oraz metoksyłowej pochodnej chalkonu (d).	89

Rysunek 21. (a) Arduino Uno połączone z modułem 8 przekaźników; (b) diody LED wlutowane w płytkę; (c) zestaw stosowany podczas badań biologicznych do naświetlania próbek; (d) zestaw do naświetlania próbek stosowany w spektroskopii NMR.	104
Rysunek 22. Zmiany zachodzące w widmach ^1H NMR na przykładzie sygnału pochodzącego od protonu H_1 w związku 9e podczas naświetlania światłem o różnych długościach fal. Dark oznacza widmo związku, na które nie działało żadne światło (związek był przechowywany w ciemności).	105
Rysunek 23. Widma UV–Vis izomeru <i>E</i> związków 9a–b, 9e–g.	106
Rysunek 24. Widma UV–Vis związku 9f bez naświetlania (dark) i po naświetlaniu światłem o długości 365 nm.	107
Rysunek 25. Udział procentowy izomeru <i>Z</i> w stanie fotostacjonarnym (PSS) w związkach 14a–b, 14e–g i 16a–b przedstawiony w formie wykresu słupkowego.	108
Rysunek 26. Zmiany zachodzące w widmie ^{19}F NMR na przykładzie sygnału pochodzącego od fluoru w związku 14b podczas naświetlania światłem o różnych długościach fal. Dark oznacza widmo związku, na które nie działało żadne światło (związek był przechowywany w ciemności).	109
Rysunek 27. Zmiana ilości izomeru <i>Z</i> związków 14a–b, 14e–g oraz 16a w funkcji czasu w formie wykresu.	110
Rysunek 28. Zmiany w funkcji czasu zachodzące w widmie ^{19}F NMR, na przykładzie sygnału pochodzącego od fluoru w związku 14b.	111
Rysunek 29. Widmo UV–Vis izomeru <i>E</i> związku 14b.	112
Rysunek 30. Widmo UV–Vis izomeru <i>Z</i> związku 14b.	112
Rysunek 31. Widmo UV–Vis izomeru <i>E</i> związku 16a.	113
Rysunek 32. Widmo UV–Vis izomeru <i>Z</i> związku 16a.	113
Rysunek 33. Model interakcji związków 4a, 4f oraz izomerów <i>E</i> i <i>Z</i> związków 9f, 14b, 16a–b z domeną kolchicynową α,β -tubuliny.	117

Rysunek 34. Udział procentowy izomeru <i>Z</i> w stanie fotostacjonarnym (PSS) w związkach 21a–c, 21e–g oraz 21i–l w formie wykresu słupkowego.	122
Rysunek 35. Zmiany zachodzące w widmie ^{19}F NMR na przykładzie sygnału pochodzącego od fluoru w związku 21a podczas naświetlania światłem o różnych długościach fal. Dark oznacza widmo związku, na które nie działało żadne światło (związek był przechowywany w ciemności).	123
Rysunek 36. Wykres przedstawiający stabilność fotochemiczną związku 21j.	124
Rysunek 37. Zmiana ilości izomeru <i>Z</i> związków 21a–c, 21e–g oraz 21i–l w funkcji czasu w formie wykresu.	125
Rysunek 38. Zmiany w funkcji czasu zachodzące w widmie ^{19}F NMR na przykładzie sygnału fluoru w związku 21a.	126
Rysunek 39. Widmo UV–Vis izomeru <i>E</i> związku 21l.	127
Rysunek 40. Widmo UV–Vis izomeru <i>Z</i> związku 21l.	127
Rysunek 41. Model interakcji izomerów <i>E</i> i <i>Z</i> związków 21b, 21d, 21f, 21h, 21j, 21l z domeną kolchicynową α,β -tubuliny.	131
Rysunek 42. Prolifерacja komórek PC-3 w obecności związku 21j została oceniona za pomocą testu MTS, a znormalizowane wartości OD_{490} dopasowano do modelu czteroparametrowego logistycznego (4PL). Znormalizowane wartości OD_{490} oraz dopasowane modele przedstawiono oddzielnie dla każdego izomeru związku 21j — <i>Z</i> i <i>E</i> oraz dla dwóch czasów inkubacji: 24 i 48 godzin (A), wraz z wartościami stężeń hamujących w zakresie od 5 do 90% (B). Wartości IC_{50} oraz znormalizowane wartości dolnej asymptoty zostały przedstawione wraz z odpowiadającymi im średnimi (C i D). Wskaźnik <i>g</i> Hedgesa został obliczony dla różnicy wartości IC_{50} pomiędzy izomerami <i>Z</i> i <i>E</i> (E). Wybrane metryki jakości dopasowania modelu zostały przedstawione w rysunkach F–I. Paski błędów na każdym wykresie przedstawiają błędy standardowe, natomiast pola i wstęgi odpowiadają 95% przedziałom ufności. Istotność wartości <i>p</i> oznaczono w następujący sposób: 0–0,001 (***), 0,001–0,01 (**), 0,01–0,05 (*), 0,05–0,1 (.), >0,1 (NS, brak istotności).	134

Rysunek 43. Prolifерacja komórek PC-3 w obecności kolchicyny została oceniona za pomocą testu MTS, a znormalizowane wartości OD₄₉₀ dopasowano do modelu czteroparametrowego logistycznego (4PL). Znormalizowane wartości OD₄₉₀ oraz dopasowane modele zostały pokazane osobno dla każdego czasu, 24 i 48 h (A). Wartości IC₅₀ oraz znormalizowane wartości dolnej asymptoty zostały przedstawione razem z odpowiadającymi im średnimi, a indywidualne wartości jako szare kropki (B i C). Słupki błędów oraz wstęgi w każdym panelu przedstawiają 95% przedziały ufności. 135

Rysunek 44. Wpływ izomeru Z związku 21j został oceniony za pomocą cytometrii przepływowej. Liczba komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego — G0/G1, S i G2/M — została zmierzona tak jak przedstawiono na przykładowych histogramach. Wartości dla każdego stężenia były porównywane do stężenia 0 μ M (komórki traktowane 0,5% DMSO) za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem post-hoc Tukeya. Istotność wartości p oznaczono w następujący sposób: 0–0,001 (***), 0,001–0,01 (**), 0,01–0,05 (*), 0,05–0,1 (.), >0,1 (NS, brak istotności). 136

Rysunek 45. Wpływ kolchicyny został oceniony za pomocą cytometrii przepływowej. Liczba komórek w każdej fazie cyklu komórkowego — G0/G1, S oraz G2/M — została zmierzona, tak jak przedstawiono na przykładowych histogramach. Wartości dla każdego stężenia były porównywane do stężenia 0 μ M (komórki traktowane 0,5% DMSO) za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem post hoc Tukeya. Istotność wartości p została oznaczona w następujący sposób: 0–0,001 (***), 0,001–0,01 (**), 0,01–0,05 (*), 0,05–0,1 (.), >0,1 (NS, brak istotności). 137

Rysunek 46. Udział procentowy izomeru Z w stanie fotostacjonarnym (PSS) w związkach 29a–d, 29e–h w formie wykresu słupkowego. 143

Rysunek 47. Zmiany zachodzące w widmie ¹H NMR na przykładzie sygnału pochodzącego od protonu NH związku 29h podczas naświetlania światłem o różnych długościach fal. Dark oznacza widmo związku, na które nie działało żadne światło (związek był przechowywany w ciemności). 145

Rysunek 48. Wykres przedstawiający stabilność fotochemiczną związku 29g. 146

Rysunek 49. Zmiana ilości izomeru Z związków 29a–d, 29e–h w funkcji czasu w formie wykresu. 147

Rysunek 50. Zmiany w funkcji czasu zachodzące w widmie ^1H NMR na przykładzie sygnału pochodzącego od protonu NH związku 29h.	148
Rysunek 51. Widmo UV–Vis izomeru <i>E</i> związku 29g.	149
Rysunek 52. Widmo UV–Vis izomeru <i>Z</i> związku 29g.	149
Rysunek 53. Model interakcji izomerów <i>E</i> i <i>Z</i> związków 29d oraz 29h z domeną kolchicynową α,β -tubuliny.	152
Rysunek 54. Przeżywalność komórek HEK-293 traktowanych rosnącymi stężeniami związków 29d (a) i 29h (b) w warunkach braku światła oraz w obecności światła. Przeżywalność komórek LNCaP traktowanych rosnącymi stężeniami związków 29d (c) i 29h (d) w warunkach braku światła oraz w obecności światła. #/* $p < 0,01$ w porównaniu z komórkami kontrolnymi niepoddanymi działaniu związków.	153
Rysunek 55. Wizualizacja obliczonej geometrii izomeru <i>E</i> cząsteczki 21j.	167
Rysunek 56. Wizualizacja obliczonej geometrii izomeru <i>Z</i> cząsteczki 21j.	168
Rysunek 57. Wizualizacja obliczonej geometrii izomeru <i>E</i> cząsteczki 29d.	171
Rysunek 58. Wizualizacja obliczonej geometrii izomeru <i>Z</i> cząsteczki 29d.	173
Rysunek 59. Wizualizacja obliczonej geometrii izomeru <i>E</i> cząsteczki 29h.	175
Rysunek 60. Wizualizacja obliczonej geometrii izomeru <i>Z</i> cząsteczki 29h.	177
Rysunek 61. Schemat struktury związku 2a wraz z numeracją atomów węgla.	183
Rysunek 62. Schemat struktury związku 2c wraz z numeracją atomów węgla.	184
Rysunek 63. Schemat struktury związku 2d wraz z numeracją atomów węgla.	185
Rysunek 64. Schemat struktury związku 3a wraz z numeracją atomów węgla.	186
Rysunek 65. Schemat struktury związku 3b wraz z numeracją atomów węgla.	187
Rysunek 66. Schemat struktury związku 3c wraz z numeracją atomów węgla.	188
Rysunek 67. Schemat struktury związku 3d wraz z numeracją atomów węgla.	189

Rysunek 68. Schemat struktury związku 3e wraz z numeracją atomów węgla.	190
Rysunek 69. Schemat struktury związku 3f wraz z numeracją atomów węgla.	191
Rysunek 70. Schemat struktury związku 4a wraz z numeracją atomów węgla.	193
Rysunek 71. Schemat struktury związku 4b wraz z numeracją atomów węgla.	194
Rysunek 72. Schemat struktury związku 4c wraz z numeracją atomów węgla.	195
Rysunek 73. Schemat struktury związku 4d wraz z numeracją atomów węgla.	196
Rysunek 74. Schemat struktury związku 4e wraz z numeracją atomów węgla.	197
Rysunek 75. Schemat struktury związku 4f wraz z numeracją atomów węgla.	198
Rysunek 76. Schemat struktury związku 4g wraz z numeracją atomów węgla.	199
Rysunek 77. Schemat struktury związku 4h wraz z numeracją atomów węgla.	201
Rysunek 78. Schemat struktury związku 4i wraz z numeracją atomów węgla.	202
Rysunek 79. Schemat struktury związku 4j wraz z numeracją atomów węgla.	203
Rysunek 80. Schemat struktury związku 5a wraz z numeracją atomów węgla.	205
Rysunek 81. Schemat struktury związku 5b wraz z numeracją atomów węgla.	206
Rysunek 82. Schemat struktury związku 5d wraz z numeracją atomów węgla.	207
Rysunek 83. Schemat struktury związku 6a wraz z numeracją atomów węgla.	208
Rysunek 84. Schemat struktury związku 6b wraz z numeracją atomów węgla.	209
Rysunek 85. Schemat struktury związku 6d wraz z numeracją atomów węgla.	210
Rysunek 86. Schemat struktury związku 8a wraz z numeracją atomów węgla.	211
Rysunek 87. Schemat struktury związku 8b wraz z numeracją atomów węgla.	212
Rysunek 88. Schemat struktury związku 8c wraz z numeracją atomów węgla.	213

Rysunek 89. Schemat struktury związku 8d wraz z numeracją atomów węgla.....	214
Rysunek 90. Schemat struktury związku 8e wraz z numeracją atomów węgla.	215
Rysunek 91. Schemat struktury związku 8f wraz z numeracją atomów węgla.	216
Rysunek 92. Schemat struktury związku 8g wraz z numeracją atomów węgla.....	217
Rysunek 93. Schemat struktury związku 9a wraz z numeracją atomów węgla.	218
Rysunek 94. Schemat struktury związku 9b wraz z numeracją atomów węgla.....	219
Rysunek 95. Schemat struktury związku 9c wraz z numeracją atomów węgla.	220
Rysunek 96. Schemat struktury związku 9d wraz z numeracją atomów węgla.....	221
Rysunek 97. Schemat struktury związku 9e wraz z numeracją atomów węgla.	222
Rysunek 98. Schemat struktury związku 9f wraz z numeracją atomów węgla.	223
Rysunek 99. Schemat struktury związku 9g wraz z numeracją atomów węgla.....	224
Rysunek 100. Schemat struktury związku 9h wraz z numeracją atomów węgla.....	225
Rysunek 101. Schemat struktury związku 10a wraz z numeracją atomów węgla.	226
Rysunek 102. Schemat struktury związku 10b wraz z numeracją atomów węgla.....	227
Rysunek 103. Schemat struktury związku 11 wraz z numeracją atomów węgla.....	228
Rysunek 104. Schemat struktury związku 12 wraz z numeracją atomów węgla.....	228
Rysunek 105. Schemat struktury związku 13.	230
Rysunek 106. Schemat struktury związku 14a wraz z numeracją atomów węgla.	231
Rysunek 107. Schemat struktury związku 14b wraz z numeracją atomów węgla.....	232
Rysunek 108. Schemat struktury związku 14e wraz z numeracją atomów węgla.	233
Rysunek 109. Schemat struktury związku 14f wraz z numeracją atomów węgla.	234

Rysunek 110. Schemat struktury związku 14g wraz z numeracją atomów węgla.....	235
Rysunek 111. Schemat struktury związku 15a wraz z numeracją atomów węgla.	236
Rysunek 112. Schemat struktury związku 15b wraz z numeracją atomów węgla.....	237
Rysunek 113. Schemat struktury związku 16a wraz z numeracją atomów węgla.	239
Rysunek 114. Schemat struktury związku 16b wraz z numeracją atomów węgla.....	240
Rysunek 115. Schemat struktury związku 21a wraz z numeracją atomów węgla.	242
Rysunek 116. Schemat struktury związku 21b wraz z numeracją atomów węgla.....	243
Rysunek 117. Schemat struktury związku 21c wraz z numeracją atomów węgla.	244
Rysunek 118. Schemat struktury związku 21d wraz z numeracją atomów węgla.....	245
Rysunek 119. Schemat struktury związku 21e wraz z numeracją atomów węgla.	246
Rysunek 120. Schemat struktury związku 21f wraz z numeracją atomów węgla.	247
Rysunek 121. Schemat struktury związku 21g wraz z numeracją atomów węgla.....	248
Rysunek 122. Schemat struktury związku 21h wraz z numeracją atomów węgla.....	249
Rysunek 123. Schemat struktury związku 21i wraz z numeracją atomów węgla.....	250
Rysunek 124. Schemat struktury związku 21j wraz z numeracją atomów węgla.....	251
Rysunek 125. Schemat struktury związku 21k wraz z numeracją atomów węgla.....	252
Rysunek 126. Schemat struktury związku 21l wraz z numeracją atomów węgla.....	253
Rysunek 127. Schemat struktury związku 29a wraz z numeracją atomów węgla.	256
Rysunek 128. Schemat struktury związku 29b wraz z numeracją atomów węgla.....	257
Rysunek 129. Schemat struktury związku 29c wraz z numeracją atomów węgla.	258
Rysunek 130. Schemat struktury związku 29d wraz z numeracją atomów węgla.....	259

Rysunek 131. Schemat struktury związku 29e wraz z numeracją atomów węgla.	260
Rysunek 132. Schemat struktury związku 29f wraz z numeracją atomów węgla.	261
Rysunek 133. Schemat struktury związku 29g wraz z numeracją atomów węgla.....	262
Rysunek 134. Schemat struktury związku 29h wraz z numeracją atomów węgla.....	263

8. Spis tabel

Tabela 1. Porównanie właściwości leków konwencjonalnych, proleków i leków fotokontrolowanych.	35
Tabela 2. Przesunięcia chemiczne jąder ^{13}C dla 3-nitrodibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny, współczynniki SCS obliczone dla atomów węgla w różnie podstawionych metoksyłowych pochodnych 3-nitrodibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny.	91
Tabela 3. Zestawienie zbadanych metod syntezy azowych pochodnych dibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny.	96
Tabela 4. Przesunięcia chemiczne jąder ^{13}C dla (<i>E</i>)-1-(dibenzo[<i>b,f</i>]oksepin-3-yl)-2-(4-fluorofenylo)diazenu 14f i współczynniki SCS obliczone dla atomów węgla w różnych pochodnych mieszanych związków azowych 14a–b, 14e, 14g zawierających szkielet dibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny i <i>p</i> -fluorofenyłu.	101
Tabela 5. Udział procentowy izomeru <i>Z</i> w stanie fotostacjonarnym (PSS) wybranych azowych pochodnych dibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny.	103
Tabela 6. Wartości procentowego udziału izomeru <i>Z</i> w stanie fotostacjonarnym (PSS) w związkach 14a–b, 14e–g i 16a–b.	108
Tabela 7. Zmiana ilości izomeru <i>Z</i> związków 14a–b, 14e–g oraz 16a w funkcji czasu.	110
Tabela 8. Szacunkowa wartość energii oddziaływania związków 4a, 4f oraz izomerów <i>E</i> i <i>Z</i> związków 9a–c, 9e–f, 14b, 16a–b z tubuliną.	115
Tabela 9. Wartości procentowego udziału izomeru <i>Z</i> w stanie fotostacjonarnym (PSS) dla związków 21a–c, 21e–g oraz 21i–l.	121
Tabela 10. Zmiana ilości izomeru <i>Z</i> związków 21a–c, 21e–g oraz 21i–l w funkcji czasu.	124
Tabela 11. Wybrane dane spektroskopowe UV–Vis dla związków 21b, 21d, 21f, 21h, 21j oraz 21l.	128
Tabela 12. Szacunkowa wartość energii oddziaływania izomerów <i>E</i> i <i>Z</i> związków 21b, 21d, 21f, 21h, 21j i 21l.	129

Tabela 13. Wartości procentowego udziału izomeru <i>Z</i> w stanie fotostacjonarnym (PSS) dla związków 29a–d, 29e–h.	143
Tabela 14. Zmiana ilości izomeru <i>Z</i> związków 29a–d, 29e–h w funkcji czasu.	146
Tabela 15. Wybrane dane spektroskopowe UV–Vis dla związków 29b, 29d, 29f oraz 29h.	150
Tabela 16. Szacunkowa wartość energii oddziaływania izomerów <i>E</i> i <i>Z</i> związków 29d oraz 29h.	151

9. Spis schematów

Schemat 1. Zamykanie/otwieranie pierścienia w ditiofenoetenach.	44
Schemat 2. Zmiana konfiguracji <i>E/Z</i> w tioindygo.	44
Schemat 3. Zmiana konfiguracji <i>E/Z</i> wraz z wewnątrzcząsteczkową migracją wodoru (tautomeria keto-enolowa) w <i>N</i> -salicylidenoanilinie.	44
Schemat 4. Zmiana konfiguracji absolutnej w związkach chiralooptycznych.....	45
Schemat 5. Różne struktury pochodnych azobenzenu powstające poprzez zmianę konfiguracji <i>E/Z</i>	53
Schemat 6. Różne struktury pochodnych stilbenu powstające poprzez zmianę konfiguracji <i>E/Z</i>	54
Schemat 7. Różne struktury pochodnych spiropiranu powstające poprzez zamykanie/otwieranie pierścienia.....	54
Schemat 8. Różne struktury pochodnych ditiofenoetenu powstające poprzez zamykanie/otwieranie pierścienia.	55
Schemat 9. Różne struktury pochodnych tiofenofulgidu powstające poprzez zamykanie/otwieranie pierścienia.	55
Schemat 10. Różne struktury pochodnych hemitioindygo powstające poprzez zmianę konfiguracji <i>E/Z</i>	56
Schemat 11. Pochodna propofolu (środek do podtrzymania znieczulenia ogólnego) zawierająca azobenzen, która w postaci izomeru <i>E</i> działa jako aktywator receptorów GABA, pełniąc funkcję fotosterowalnego środka znieczulającego.	63
Schemat 12. Pochodna BnTetAMPA — agonisty receptora AMPA (kwas 2-amino-3-(5-(2-benzyl-2 <i>H</i> -tetrazol-5-yl)-3-hydroksyizoksazol-4-yl)propionowy) — zawierająca pochodną azobenzenu w pozycji <i>meta</i> , zaprojektowana na podstawie struktury krystalicznej receptora iGluR2 (jonotropowy receptor glutaminianu 2), aktywna w formie <i>E</i>	63

Schemat 13. BINA (benzyloksydimetylobenzen) — allosteryczny agonista receptora mGluR2 (metabotropowy receptor glutaminianu typu 2) zawierający azobenzen; tylko forma <i>E</i> tworzy wiązanie jonowe z resztą Arg635, aktywując receptor.	64
Schemat 14. Fotochromowy przełącznik molekularny wbudowany w łańcuch alifatyczny BI-1 (3-(1-oktanoylopiperydy-4-yl)-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-2-on) — agonisty TRPC3 (kanał jonowy odgrywający kluczową rolę w sygnalizacji wapniowej w komórkach); forma <i>Z</i> aktywuje kanał jonowy i umożliwia optyczne sterowanie aktywnością neuronów.	64
Schemat 15. ARV 771 zawierający azobenzen jako przełącznik; tylko izomer <i>E</i> umożliwia skuteczną degradację białka, forma <i>Z</i> pozostaje biologicznie nieaktywna.	65
Schemat 16. Metody syntezy pochodnych azobenzenu.	66
Schemat 17. Podsumowanie metod syntezy pochodnych dibenzo[<i>b,f</i>]oksepin.	71
Schemat 18. Podsumowanie metod syntezy pochodnych chalkonu.	75
Schemat 19. Schemat syntezy oligomerycznych pochodnych dibenzo[<i>b,f</i>]oksepin.	90
Schemat 20. Schemat syntezy dimerów 6-metoksy-3-nitrodibenzo[<i>b,f</i>]oksepin z różnymi łącznikami.	93
Schemat 21. Schemat syntezy hybrydowych połączeń metoksyowych pochodnych 3-nitrodibenzo[<i>b,f</i>]oksepin z 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylem w obecności różnych aldehydów.	94
Schemat 22. Schemat redukcji metoksyowych pochodnych 3-nitrodibenzo[<i>b,f</i>]oksepin w różnych środowiskach.	95
Schemat 23. Schemat redukcji nitrowych pochodnych (<i>E</i>)-stilbenu.	96
Schemat 24. Schemat syntezy symetrycznych azowych pochodnych dibenzo[<i>b,f</i>]oksepin. .	97
Schemat 25. Schemat syntezy związków azowych „wyższej generacji” zawierających szkielet dibenzo[<i>b,f</i>]oksepin.	98
Schemat 26. Schemat syntezy związku azowego opartego na szkielecie dibenzo[<i>b,f</i>]oksepin i 4,4'-dietoksy-1,1'-bifenylu.	99

Schemat 27. Schemat syntezy mieszanych związków azowych zawierających szkielet dibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny i <i>p</i> -fluorofenylu.....	100
Schemat 28. Schemat syntezy związków z trzema grupami azowymi, zawierających pierścień dibenzo[<i>b,f</i>]oksepiny.	102
Schemat 29. Zmiana konfiguracji z <i>E</i> na <i>Z</i> zachodząca w związkach 9a–h podczas naświetlania światłem o różnych długościach fal, na przykładzie związku 9e.	104
Schemat 30. Schemat syntezy <i>azo</i> -pochodnych chalkonu.	120
Schemat 31. Schemat syntezy <i>N</i> -deacetylokolchicyny.	140
Schemat 32. Schemat syntezy pochodnych azobenzenu zawierających atomy chloru i grupę karboksylową.	141
Schemat 33. Schemat syntezy <i>azo</i> -pochodnych kolchicyny.	142