

**POLITECHNIKA ŚLĄSKA
WYDZIAŁ CHEMICZNY
KATEDRA CHEMII ORGANICZNEJ, BIOORGANICZNEJ
I BIOTECHNOLOGII**

Mgr inż. Karolina Juszcak

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Synteza pochodnych aldehydów
hydroksybenzoesowych o potencjalnych
właściwościach inhibitorów ludzkiej heksokinazy 2
(HK2)**

PROMOTOR: prof. dr hab. inż. Krzysztof Walczak

GLIWICE 2024

Pragnę serdecznie podziękować mojemu promotorowi prof. dr hab. inż. Krzysztofowi Walczakowi za przekazaną wiedzę, nieocenione wsparcie, wyrozumiałość oraz motywację w chwilach zwątpienia.

Dziękuję mojej rodzinie i bliskim za zrozumienie, cierpliwość i nieustającą wiarę w moje możliwości.

Dziękuję pracownikom oraz doktorantom Katedry Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej za życzliwość, chęć pomocy oraz stworzenie wspianiałej atmosfery do pracy.

Chciałabym również podziękować wszystkim osobom, z którymi miałam przyjemność współpracować podczas mojego doktoratu, których wkład w moje badania przyczynił się do ich jakości i znaczenia.

Streszczenie

Metabolizm glukozy jest jednym z fundamentalnych procesów metabolicznych zachodzących w komórkach ludzkich. W procesie glikolizy glukoza rozkładana jest do pirogronianu, który wprowadzony do macierzy mitochondrialnej ulega szeregu reakcji redoks. Końcowym etapem tych przemian jest mitochondrialna fosforylacja oksydacyjna, prowadząca do powstania adenozyntrifosforanu (ATP). ATP jest donorem grup fosforanowych, a także źródłem energii niezbędnej w procesach komórkowych. Komórki nowotworowe charakteryzują się odmiennym metabolizmem glukozy, w którym glikolizie towarzyszy synteza mleczanu, nawet w warunkach wystarczającej ilości tlenu. Pierwszym etapem glikolizy jest reakcja fosforylacji glukozy do glukozo-6-fosforanu, katalizowana przez enzym heksokinazę 2 (HK2). W komórkach nowotworowych HK2 wykazuje nadekspresję ze względu na zwiększone zapotrzebowanie na glukozę, spowodowane małą efektywnością glikolizy w generowaniu ATP w porównaniu do fosforylacji oksydacyjnej. Wzrost stężenia HK2 w komórkach nowotworowych jest rozpatrywany obecnie jako obiecujący cel molekularny w terapiach przeciwnowotworowych. W przeprowadzonych badaniach zsyntezowano szereg związków mogących pełnić rolę inhibitorów aktywności enzymatycznej HK2.

Celem pracy było opracowanie efektywnych metod syntezy pochodnych z grupy hydrazonów i N acylowanych hydrazyn aldehydów mono- oraz polihydroksybenzoesowych, w których fragment N acylowy stanowiły: kwasy aromatyczne o różnych obszarach molekularnych (benzen, naftalen, antracen), 4-pochodne kwasu benzoesowego, kwas propionowy oraz aminokwasy endogenne. Są to syntezy wieloetapowe, wymagające indywidualnej strategii syntezy ze względu na różne właściwości chemiczne stosowanych substratów. Podstawowe etapy syntezy to synteza estrów poszczególnych kwasów karboksylowych, ich transformacja w hydrazydy i kondensacja z pochodnymi aldehydu hydroksybenzoesowego do odpowiednich N'-acylowanych hydrazonów. W przypadku zastosowania aminokwasów jako donorów acylu koniecznym było zabezpieczenie w nich grupy aminowej. Dla wybranych hydrazonów zredukowano ugrupowanie iminowe, dobierając odpowiednie metody redukcji, uzyskując ostatecznie pochodne N-podstawionych hydrazydów aldehydów mono- i polihydroksybenzoesowych. Dla otrzymanych związków zbadano właściwości fizykochemiczne i potwierdzono ich strukturę metodami spektroskopii ^1H i ^{13}C NMR oraz spektrometrii masowej HRMS.

Dla otrzymanych pochodnych została określona aktywność hamująca w odniesieniu do heksokinazy 2. Porównanie aktywności inhibicyjnej ze strukturą zsyntezowanych pochodnych pozwoliło ustalić niezbędne fragmenty strukturalne jakie powinien posiadać potencjalny inhibitor HK2. Spośród otrzymanych związków, najbardziej obiecującą pochodną jest (*E*)-4-fluoro-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydazyd, wykazujący wyższą aktywność inhibicyjną *in vitro* względem HK2, niż opisane w literaturze benserazyd oraz benitrobenrazyd.

Przedstawione w rozprawie doktorskiej wyniki badań stanowią punkt wyjścia w projektowaniu skutecznych inhibitorów HK2 o potencjalnym zastosowaniu w terapiach przeciwnowotworowych.

Abstract

Glucose metabolism is one of the most important metabolic processes occurring in human cells. As a result of glycolysis, pyruvate is produced, which when introduced into the mitochondrial matrix undergoes a series of redox reactions. The end result of these transformations is mitochondrial oxidative phosphorylation and the formation of adenosine triphosphate (ATP). ATP is a donor of phosphate groups and a source of energy necessary for cellular processes. Cancer cells are characterized by a different glucose metabolism, in which glycolysis is accompanied by lactate synthesis, even in the presence of sufficient oxygen. The first step in glycolysis is the phosphorylation of glucose to glucose-6-phosphate, catalyzed by hexokinase 2 (HK2). In cancer cells, HK2 is overexpressed due to the increased demand for glucose caused by the low efficiency of glycolysis in generating ATP compared to oxidative phosphorylation. The overexpressed HK2 in cancer cells is currently being considered as a promising molecular target in anticancer therapies. In the conducted research, a number of compounds that could act as inhibitors of the enzymatic activity of HK2 were synthesized.

The aim of the work was to develop effective methods for the synthesis of derivatives from the group of hydrazones and N-acylated hydrazines of mono- and polyhydroxybenzoic aldehydes, in which the N-acyl fragment consisted of aromatic acids with various molecular regions (benzene, naphthalene, anthracene), 4-derivatives of benzoic acid, propionic acid and endogenous amino acids. These are multi-step syntheses that require an individual synthesis strategy due to the different chemical properties of the substrates used. The basic steps of the synthesis were the synthesis of esters of individual carboxylic acids, their transformation into hydrazides and condensation with hydroxybenzaldehyde derivatives to the corresponding N'-acylated hydrazones. When amino acids were used as acyl donors, it was necessary to protect the amino group in them. For selected hydrazones, the imine moiety was reduced by selecting appropriate reduction methods, ultimately obtaining derivatives of N-substituted hydrazides of mono- and polyhydroxybenzoic aldehydes. The physicochemical properties of the obtained compounds were examined, and the structures were confirmed using ¹H and ¹³C NMR spectroscopy and HRMS mass spectrometry.

For the obtained derivatives, the inhibitory activity with respect to hexokinase 2 was determined. Comparison of the inhibitory activity with the structure of the obtained derivatives allowed to determine the necessary structural fragments that a potential HK2 inhibitor should have. Among the synthesized compounds, the most promising derivative was (*E*)-4-fluoro-N'-(2,3,4-trihydroxybenzylidene)benzhydrazide, which showed higher in vitro inhibitory activity against HK2 than benserazide and benitrobenrazide described in previous studies.

These research results presented in the doctoral dissertation thesis are a starting point in designing effective HK2 inhibitors with potential use in anticancer therapies.

Spis treści

Wykaz skrótów i symboli.....	9
1. Wprowadzenie i cel pracy	11
2. Część literaturowa	11
2.1. Charakterystyka i znaczenie zasad Schiffa.....	11
2.2. Omówienie i klasyfikacja pochodnych hydrazyny	13
2.2.1. Hydrazyna	13
2.2.2. Hydrazydy	13
2.2.3. Hydrazony.....	15
2.2.4. Hydrazono-hydrazydy.....	16
2.3. Redukcja wiązania iminowego	19
2.4. Zabezpieczanie grupy aminowej	20
2.4.1. Grupa benzyloksykarbonylowa Cbz.....	20
2.4.2. Grupa 9-fluorenyloktoksykarbonylowa Fmoc.....	21
2.4.3. Grupa tert-butyloksykarbonylowa Boc.....	21
2.4.4. Grupa tosylowa Ts	22
2.5. Metabolizm komórki nowotworowej - Efekt Warburga	22
2.6. Heksokinaza jako istotny enzym procesu glikolizy	24
2.7. Heksokinaza 2 - cel molekularny w terapii przeciwnowotworowej.....	26
2.8. Terapia skojarzeniowa w onkologii	27
2.8.1. Zastosowanie inhibitorów HK2 w terapii kombinowanej	27
2.9. Inhibitory Heksokinazy 2	28
2.10. Identyfikacja potencjalnych inhibitorów HK2 o największej skuteczności	33
2.10.1. Analiza wyników literatury dokowania molekularnego dla benserazydu oraz benitrobenrazydu	33
2.10.2. Porównanie aktywności biologicznej BNBZ oraz Benz	34
2.10.3. Określenie struktur wiodących inhibitorów HK2.....	36
3. Część badawcza	37
3.1. Uzasadnienie tematu badań, założenia i cel pracy.....	37
3.2. Opracowanie metody syntezy 2,3,4-trihydroksybenzaldhydrazonów pochodnych kwasów aromatycznych oraz kwasu propionowego.....	38
3.2.1. Otrzymywanie estrów kwasów aromatycznych	38
3.2.2. Otrzymywanie N-acylohydrazyn.....	40
3.2.3. Otrzymywanie hydrazonów.....	44

3.3. Izomeria geometryczna oraz tautomeria keto-enolowa w syntezowanych zasadach Schiffa	48
3.4. Opracowanie metody syntezy 2,3,4-trihydroksybenzaldehydrazonów pochodnych N-benzylotykarbonyloaminokwasów	50
3.4.1. Otrzymywanie estrów aminokwasów	51
3.4.2. Otrzymywanie estrów N-Cbz-aminokwasów	52
3.4.3. Otrzymywanie hydrazydów N-Cbz-aminokwasów	55
3.4.4. Otrzymywanie hydrazonów	56
3.5. Opracowanie metody syntezy N-Acylohydrazonów di- i monohydroksybenzaldehydu	63
3.5.1. Otrzymywanie 4-nitrobenzoilohydrazonów pochodnych dihydroksybenzaldehydów	63
3.5.2. Otrzymywanie di- oraz monohydroksybenzaldehydrazonów pochodnych N-benzylotykarbonylo-L-seryny	65
3.5.3. Otrzymywanie (<i>E</i>)-4-amino- <i>N'</i> -(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazidu	66
3.6. Opracowanie metody syntezy hydrazydów z N-acylowych pochodnych hydrazonów	69
3.6.1. Badania nad redukcją wiązania podwójnego C=N hydroksyhydrazonów jako pochodnych N-benzylotykarbonylo-L-seryny w celu otrzymania pochodnych benserazydu	69
3.6.2. Otrzymywanie analogów aminokwasowych benserazydu w wyniku redukcji hydrazonów pochodnych N-benzylotykarbonyloaminokwasów	74
3.6.3. Otrzymywanie 4-amino- <i>N'</i> -(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazidu oraz 4-amino- <i>N'</i> -(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazidu	77
3.6.4. Próba redukcji wiązania azometinowego (<i>E</i>)-4-Nitro- <i>N'</i> -(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazidu	78
3.7. Badania biologiczne	80
3.7.1. Widma UV-VIS związków poddanych badaniom biologicznym	81
3.7.2. Optymalizacja fragmentu 2,3,4-trihydroksybenzenowego w BNBZ oraz Benz	82
3.7.2.1. Badania wpływu liczby oraz rozmieszczenia grup hydroksylowych pochodnych benserazydu	84
3.7.2.2. Badania wpływu liczby oraz położenia grup hydroksylowych pochodnych benitrobenzazydu	85
3.7.2.3. Podsumowanie wyników przeprowadzanych badań nad wpływem ilości oraz położenia grup hydroksylowych pochodnych benitrobenzazydu	91
3.7.3. Badania nad wpływem ilości oraz położenia grup hydroksylowych z zastosowaniem pochodnych (<i>E</i>)-4-amino- <i>N'</i> -(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazidu oraz (<i>E</i>)-4-amino- <i>N'</i> -(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazidu na aktywność inhibicyjną HK2	91
3.7.4. Badania nad wpływem braku obecności ugrupowania polihydroksybenzenowego na aktywność hamującą HK2	92
3.7.5. Wpływ zmian strukturalnych w benserazydzie na aktywność hamującą HK2	93
3.7.6. Optymalizacja fragmentu para-nitrowego benitrobenzazydu	95

3.7.6.1. Badania nad wpływem wymiany grupy nitrowej na inne podstawniki w strukturze BNBZ na aktywność HK2	95
3.7.7. Wpływ obecności wiązania iminowego N=CH pochodnych benitrobenrazydu na aktywność HK2	96
3.7.8. Wpływ różnych podstawników poliaromatycznych oraz łańcucha alkilowego w strukturze N-acylowych pochodnych hydrazonów benzaldehydu 2,3,4-trihydroksyowego na aktywność HK2.	98
3.7.9. Badania <i>in vitro</i> przy stężeniu 1 μ M dla najbardziej obiecujących potencjalnych inhibitorów HK2.....	100
3.7.10. Badania nad określeniem aktywności heksokinazy 2 z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami	101
3.7.11. Podsumowania Badań <i>in vitro</i> pod kątem oceny hamowania aktywności ludzkiej heksokinazy 2 wobec zsyntezowanych, potencjalnych inhibitorów HK2.	103
4. Część eksperymentalna	103
4.1. Stosowane reagenty	103
4.2. Aparatura oraz materiały pomocnicze użyte do badań	104
4.3. Procedury syntez	104
4.3.1. Syntezy estrów	104
4.3.1.1. Synteza estrów kwasów aromatycznych	104
4.3.1.2. Synteza estrów metylowy N-Cbz-aminokwasów.....	106
4.3.1.3. Synteza 4-[(<i>t</i> -butoksykarbonylo)amino]benzoesanu metylu	107
4.3.2. Synteza pochodnych hydrazyny	107
4.3.2.1. Otrzymywanie N-acylohydrazyn.....	107
4.3.2.2. Synteza (<i>E</i>)-4-(hydrazonometylo)benzeno-2,3,4-triolu.....	109
4.3.2.3. Otrzymywanie hydrazydów N-Cbz-aminokwasów	109
4.3.3. Synteza hydrazonów.....	111
4.3.3.1. Synteza N-acylowych pochodnych hydrazonów 2,3,4-trihydroksybenzaldehydu	111
4.3.3.2. Synteza hydrazonów N-benzyloksykarbonyloaminokwasów.....	113
4.3.3.3. Synteza (<i>E</i>)-2-amino-3-(4-hydroksyfenylo)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)propanohydrazydu	115
4.3.4. Synteza N-Acylohydrazonów dihydroksy- i monohydroksybenzaldehydu.....	115
4.3.4.1. Synteza 4-nitrobenzoilo hydrazonów pochodnych dihydroksybenzaldehydów	115
4.3.4.2. Synteza hydrazonów N-benzyloksykarbonylo-L-seryny pochodnych di- oraz monohydroksybenzaldehydu	116
4.3.4.3. Synteza (<i>E</i>)-4-amino-N'-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazydu	117
4.3.4.4. Synteza (<i>E</i>)-4-Amino-N'-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazydu.....	118

4.3.5. Synteza hydrazydów	118
4.3.5.1. Synteza 2-(2,3,4-trihydroksybenzylo)hydrazidu L-seryny (Benz) oraz jego pochodnych	118
4.3.5.2. Synteza 4-amino-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylo)benzohydrazidu oraz 4-amino-N'-(2,4-dihydroksybenzylo)benzohydrazidu	119
4.3.5.3. Synteza 2-amino-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylo)acetohydrazidu	120
4.4. Badania wpływu otrzymanych pochodnych na aktywność enzymatyczną heksokinazy 2	121
4.4.1. Warunki hodowli linii komórkowych	121
4.4.2. Testy na cytotoksyczność	121
4.4.3. Test klonogenności	121
4.4.4. Test aktywności heksokinazy <i>in vitro</i>	122
4.4.5. Ocena aktywności heksokinazy 2 metodą RP-HPLC	123
4.4.6. Badania termoforezy mikroskalowej (MST)	123
4.5. Badania spektrofotometryczne UV-Vis	124
4.6. Obliczenia chemiczne: Metoda DFT (Density Functional Theory)	124
5. Podsumowanie i wnioski	124
6. Bibliografia	127
Załączniki	127
Wykaz dorobku naukowego związanego z doktoratem	163

Wykaz skrótów i symboli

2-DG - 2-Deoksy-D-glukoza

3-BrPa - kwas 3-bromopirogronowy

ATP - adenozyno-5'-trifosforan

Benz - benserazyd

BNBZ - benitrobenrazyd

Boc - grupa *tert*-butoksykarbonylowa

Cbz - grupa benzyloksykarbonylowa

Cbz-Cl - chloromrówczan benzylu

DFT - Teoria Funkcjonału Gęstości (ang. Density Functional Theory)

DMA - dimetyloacetamid

DMF - dimetyloformamid

EDC - 1-(3-dimetyloaminopropyl)-3-etylokarbodiimid

FDA - Agencja Żywności i Leków, (ang. Food and Drug Administration)

Fmoc-Cl - chloromrówczan 9-fluorenylometylu

G6P - glukoza-6-fosforanu

GLUT - transporter glukozy

HK - heksokinaza

HK1 - heksokinaza 1

HK2 - heksokinaza 2

HK3 - heksokinaza 3

HK4 - heksokinaza 4

HObt - 1-hydroksybenzotriazol

JM - jasmonian metylu

LD - Ionidamid

MCT - transporter monokarboksylanu

Met - metformina

MST - termoforeza mikroskalowa

PFK-1 - fosfofruktokinaza

PGI - izomeraza glukoza-6-fosforanowa

PHPLC - Preparatywna Wysokosprawna Chromatografia Cieczowa (ang. Preparative High-Performance Liquid Chromatography)

PK - kinaza pirogronowa

PT - kompleks porów przejścia przepuszczalności

ROS - reaktywne formy tlenu

Ts - grupa tosylowa

VDAC1 - zależny od napięcia kanał anionowy 1

VS - badania przesiewowe (ang. Virtual Screening)

1. Wprowadzenie i cel pracy

Choroby nowotworowe współcześnie stanowią jedną z najczęstszych przyczyn zgonów na całym świecie. Ze względu na nieodpowiedni tryb życia człowieka, charakteryzujący się brakiem ruchu oraz nieodpowiednią dietą, ekspozycją na czynniki rakotwórcze takie jak dym tytoniowy, zanieczyszczone powietrze, czy też ulepszacze i konserwanty w przetworzonej żywności, prognozuje się, że częstotliwość zachorowalności na nowotwory nadal będzie wysoka. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (ang. The International Agency for Research on Cancer) przewiduje, że zachorowalność na raka od 2018 do 2040 roku w przybliżeniu wzrośnie od 18,1 miliona do 27,5 miliona przypadków [1].

Nowotwór powstaje w procesie przekształcenia normalnych komórek w komórki, które dzielą się w niekontrolowany sposób, rozrastając się poza swoje normalne granice. Jedną z cech charakterystycznych tych komórek jest brak różnicowania w tkanki oraz brak reakcji na sygnalizację komórkową. Niektóre z tych komórek mają zdolność do przerzutów i angiogenezy, czyli tworzenia własnego systemu sieci naczyń krwionośnych i w ten sposób naciekania komórek nowotworowych na kolejne tkanki i narządy, powodując ich następczą degradację. Powszechnie przerzuty są główną przyczyną śmierci z powodu raka.

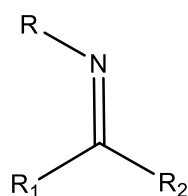
Pomimo niezwykłego postępu w leczeniu nowotworów na przestrzeni ostatnich lat, nadal istnieje silna potrzeba skutecznego zwalczania chorób nowotworowych. Głównymi problemami współczesnej medycyny i farmacji w leczeniu nowotworów są:

- Krótki okres przeżycia chorych na nowotwory złośliwe, pomimo zastosowania nowoczesnych metod chemioterapii.
- Brak selektywnych terapii nowotworowych charakteryzujących się wysoką skutecznością.
- Działanie toksyczne stosowanych chemioterapeutyków związane z licznymi skutkami ubocznymi i powikłaniami.

Z przedstawionych powyżej faktów wynika, że poszukiwanie nowych potencjalnych leków przeciwnowotworowych jest wciąż aktualnym i ważnym zagadnieniem. Proponowana tutaj strategia zakłada syntezę chemiczną nowych inhibitorów heksokinazy 2 jako środków mogących mieć zastosowanie w terapii skierowanej na enzymy aktywne w komórkach nowotworowych, wpisując się w trend chemii organicznej. Do badań wybrano pochodne hydrazydów oraz hydrazonów, które mają znaczenie zarówno w dziedzinie naukowej, jak i w praktycznych zastosowaniach, takich jak leki czy badania biologiczne.

2. Część literaturowa

2.1. Charakterystyka i znaczenie zasad Schiffa

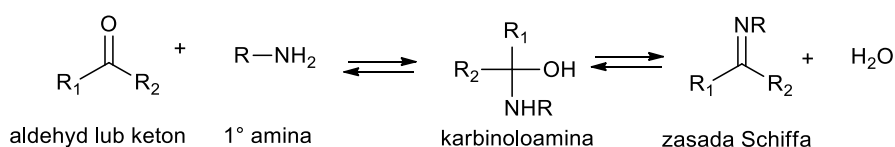


Rysunek 1. Podstawowa struktura zasady Schiffa.

Zasady Schiffa, iminy, to szeroka klasa związków organicznych o ogólnym wzorze $\text{R}^1\text{R}^2\text{C}=\text{NR}$ ($\text{R}\neq\text{H}$). Zostały odkryte w roku 1864 przez niemieckiego chemika, laureata Nagrody Nobla, Hugo Schiffa

[2]. W swojej budowie chemicznej posiadają ugrupowanie iminowe -HC=N-, umożliwiające połączenie ze sobą dwóch pożądaných elementów strukturalnych, dając w ten sposób dostęp do biblioteki hybryd molekularnych. Z tego względu zasady Schiffa charakteryzują się różnorodnymi właściwościami biologicznymi, między innymi reprezentując aktywności takie jak: przeciwwgrzybiczne, przeciwnowotworowe, przeciwmalaryczne, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe [3,4]. Znajdują także zastosowanie w przemyśle farbiarskim, technologii polimerów, rolnictwie, analityce chemicznej oraz w wielu innych dziedzinach [4].

Zasady Schiffa zyskują na popularności ze względu na prosty sposób otrzymania ze stosunkowo niedrogich materiałów wyjściowych i możliwość ich funkcjonalizowania na wiele różnych sposobów. Najpowszechniejszą stosowaną metodą syntezy zasad Schiffa jest reakcja kondensacji alifatycznych lub aromatycznych aldehydów bądź ketonów z alifatycznymi lub aromatycznymi pierwszorzędowymi aminami [4]. Reakcja zazwyczaj prowadzona jest w roztworze alkoholowym. Mechanizm formowania zasad Schiffa polega na nukleofilowej addycji aminy do grupy karbonylowej aldehydu lub ketonu, tworząc niestabilny addukt, karbinoloaminę. Eliminacja cząsteczki wody z karbinoloaminy daje finalną iminę (Schemat 1).



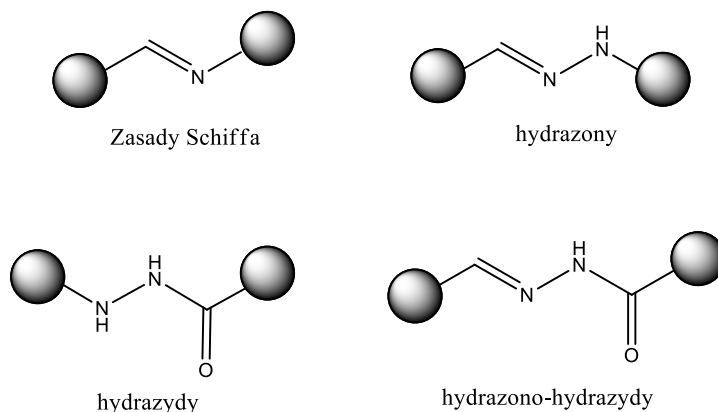
Schemat 1. Ogólny schemat otrzymywania zasad Schiffa.

Reakcja otrzymywania zasad Schiffa jest odwracalna i niektóre z nich w wodnym roztworze kwasu lub zasady mogą hydrolizować z powrotem do wyjściowych aldehydów lub ketonów oraz aminy. Powstająca w reakcji woda, może być usunięta poprzez użycie środków odwadniających lub tworząc mieszaninę azeotropową, zapobiegając w ten sposób następcej hydrolizie do substratów. Reakcje można również przyspieszyć stosując katalizatory kwasowe takie jak: kwasy mineralne, kwasy organiczne lub kwasy Lewisa [4]. Ze względu na mniejszą zawadę przestrzenną aldehydów i mniej elektrofilowy węgiel karbonylowy ketonów, reakcja syntezy zasad Schiffa zachodzi szybciej w przypadku użycia aldehydów niż ketonów.

Syntezę zasad Schiffa zwykle prowadzi się w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, wyłączając z tej reguły reakcje z zastosowaniem aldehydów aromatycznych, które są reaktywne z aminami pierwszorzędowymi. Zasady Schiffa zawierające podstawniki aryłowe charakteryzują się dużo wyższą stabilnością niż pochodne zawierające podstawniki alkilowe, które są stosunkowo niestabilne. Dzieje się tak ze względu na efekt sprzężenia elektronowego, występującego pomiędzy pierścieniem aromatycznym a wiązaniem iminowym. Również podstawniki elektronodonorowe podwyższają trwałość tych związków, zmniejszając cząstkowy ładunek dodatni na iminowym atomie węgla [5].

Ze względu na atom azotu w wiązaniu iminowym, zawierający wolną parę elektronową, zasady Schiffa są donorami elektronów o charakterze zasadowym i znane są z tworzenia trwałych kompleksów z jonami metali. Uznaje się je za uniwersalne ligandy do koordynacji wszystkich metali z bloku d, a także z lantanowców na różnych stopniach utlenienia i o różnych liczbach koordynacyjnych [2]. Kompleksy zasad Schiffa są używane jako skuteczne katalizatory w reakcjach organicznych oraz w różnych systemach biologicznych [3]. Ponadto mają również zastosowanie terapeutyczne, cechując się między innymi działaniem przeciwnowotworowym, czy przeciwgruźliczym [2,4]. Ponieważ kompleksy metali tych związków są substancjami barwnymi, stosuje się je także jako barwniki pigmentowe w przemyśle farbiarskim [6].

Powszechnie wiadomo, że zasady Schiffa oraz ich pochodne stanowią klasę związków stosowaną w leczeniu, stanowiąc istotne fragmenty leków bądź potencjalnych kandydatów na leki. Na Rysunku 2 przedstawiono ogólne struktury związków należących do grupy zasad Schiffa oraz innych pochodnych azotowych, głównie hydrazyny, odgrywających kluczową rolę w przemyśle farmaceutycznym.



Rysunek 2. Charakterystyczne elementy strukturalne stanowiące fragmenty farmaceutyków.

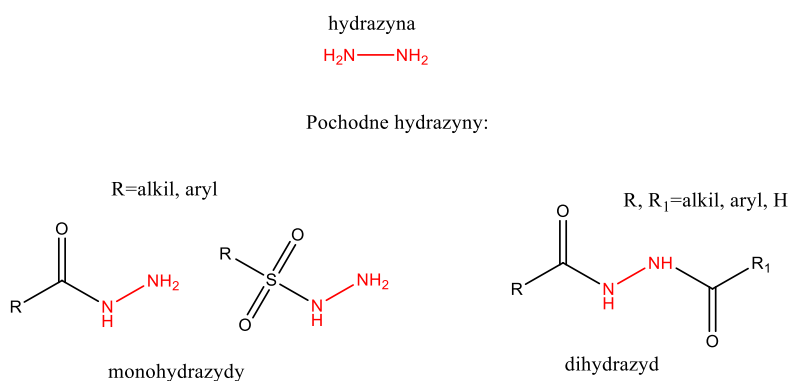
2.2. Omówienie i klasyfikacja pochodnych hydrazyny

2.2.1. Hydrazyna

Hydrazyna (diazan) jest bezbarwną higroskopijną cieczą o wzorze (N_2H_4) H_2N-NH_2 , zbudowaną z dwóch identycznych grup aminowych, połączonych ze sobą pojedynczym wiązaniem między atomami azotu. Hydrazyna jest związkiem niezwykle reaktywnym, stosowanym między innymi jako prekursor w syntezach chemicznych [7]. Pochodne hydrazyny stanowią rodzinę związków o zastosowaniach w różnych dziedzinach, począwszy od środków farmaceutycznych, po produkty przemysłowe i agrochemikalia.

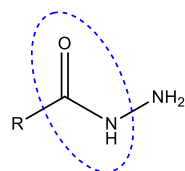
2.2.2. Hydrazydy

Są to pochodne hydrazyny odnoszących się do klasy substancji organicznych powstałych w wyniku zastąpienia jednego lub więcej atomów wodoru w hydrazynie grupą acylową ($-C=O$) lub sulfonylową ($-O=S=O-$) [3].



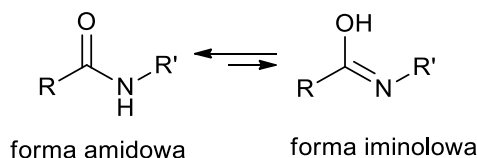
Rysunek 3. Ogólne struktury hydrazydów.

Strukturalne podobieństwo ugrupowania N-acylohydrazyn $R(CO)NHNH_2$ do wiązania amidowego w peptydach $-(O)C-NH-$ sprawia, że pochodne hydrazyny cieszą się zainteresowaniem jako peptydomimetyki - potencjalni kandydaci na leki o ulepszonych profilach farmakologicznych [8].



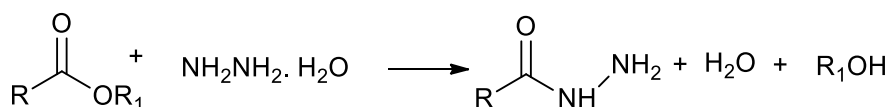
Rysunek 4. Wiązanie amidowe występujące w hydrazydach naśladujące wiązanie peptydowe.

W hydrazydzie, podobnie jak w peptydzie, występuje charakterystyczna tautomeria wiązań amidowych, z relokacją protonu i utworzeniem formy iminolowej (Schemat 2).



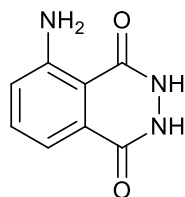
Schemat 2. Tautomeria amidowo-iminolowa charakterystyczna dla hydrazydów oraz peptydów.

Najprostszy sposób otrzymywania hydrazydów to reakcje substytucji nukleofilowej monohydratu hydrazyny ze związkami posiadającymi centrum elektrofilowe [7]. Najczęściej badane są hydrazydy typu karbonylowego, otrzymywane przez nukleofilowe podstawienie estru kwasu karboksylowego hydrazyną w roztworach alkoholowych (Schemat 3). Alternatywnie, hydrazydy można wytworzyć przez kondensację kwasów karboksylowych z hydrazyną w obecności środków sprzęgających takich jak: 1-hydroksybenzotriazol (HOBT) i chlorowodorek 1-(3-dimetyloaminopropyl)-3-etylokarbodiimidu (EDC) [9].



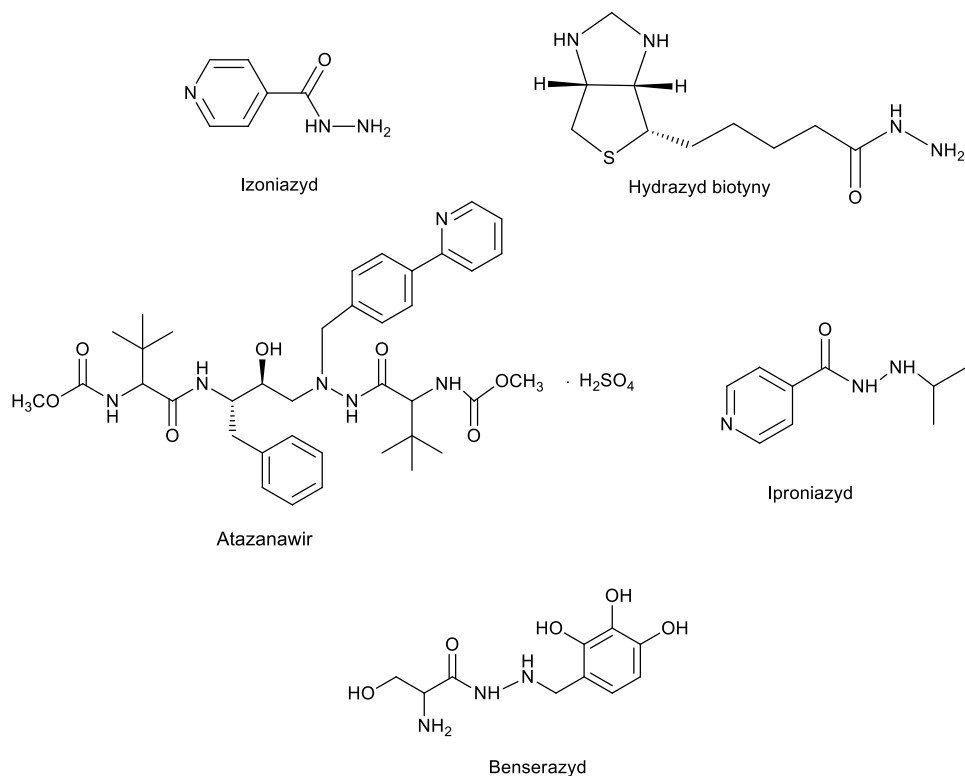
Schemat 3. Reakcja otrzymywania hydrazydów wychodząc z estrów kwasu karboksylowego.

Niektóre z hydrazydów charakteryzują się chemiluminescencją, czyli zjawiskiem emisji fal świetlnych powstałych na skutek reakcji chemicznych. Jednym z przykładów takich związków jest hydrazyd kwasu ftalowego – luminol (Rysunek 5), który wykorzystywany jest w analityce do oznaczania DNA [10]. Monopodstawione hydrazydy oraz dihydrazydy wykorzystywane są także jako katalizatory do enancjoselektywnych reakcji chemicznych [11].



Rysunek 5. Struktura chemiczna luminolu.

Hydrazydy cechują się szerokim spektrum działania terapeutycznego, wykazując aktywność przeciwdrgawkową, przeciwdepresyjną, przeciwwirusową, przeciwzapalną czy przeciwmalaryczną [12]. Poniżej przedstawiono struktury związków mających zastosowanie w medycynie.



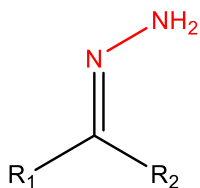
Schemat 4. Struktury hydrazydów stosowanych w lecznictwie.

Spośród grupy związków należących do hydrazydów wykorzystywanych w celach terapeutycznych można wyróżnić:

- Isoniazid - hydrazid kwasu pirydyno-4-karboksylowego, powszechnie stosowany lek przeciwgruźliczy [3],
- Atazanawir - popularny lek przeciwretrowirusowy stosowany w zakażeniach HIV-1 [13],
- Hydrazid biotyny - nieizotopowa sonda wykorzystywana do diagnozy infekcji oraz chorób genetycznych [14],
- Iproniazid - farmaceutyk stosowany w leczeniu gruźlicy, wykazujący również działanie przeciwdepresyjne [15],
- Benserazyd - powszechnie stosowany środek w leczeniu choroby Parkinsona [16].

2.2.3. Hydrazony

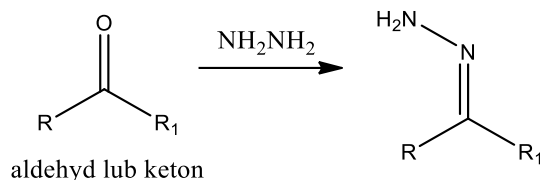
Są to pochodne hydrazyny o wzorze ogólnym $R_1R_2C=NNH_2$ zawierające w łańcuchu głównym ugrupowanie azometinowe $-N=CH-$.



Rysunek 6. Ogólna struktura hydrazonów.

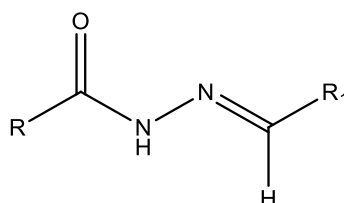
Hydrazony głównie syntezuje się ze stechiometrycznych ilości hydrazyny z ketonami bądź aldehydami, stosując jako rozpuszczalniki: alkohole, THF, lodowaty kwas octowy [17] (Schemat 5).

Alternatywną metodą otrzymywania hydrazonów jest reakcja Japp–Klingemanna polegająca na sprzęganiu soli aryldiazoniowych ze związkami posiadającymi aktywny wodór takimi jak: β -keto-kwasy lub β -keto-estry [18].



Schemat 5. Generalna metoda otrzymywania hydrazonów.

2.2.4. Hydrazono-hydrazydy

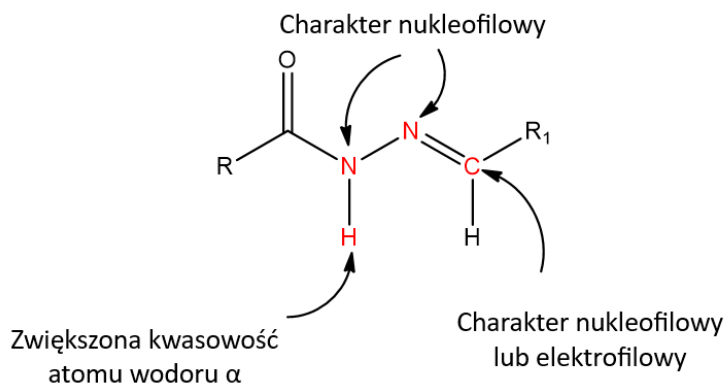


Rysunek 7. Struktura ogólna hydrazono-hydrazydów.

Są to struktury hybrydowe hydrazonu oraz hydrazydu zawierające mostek amidowo-iminowy -C(=O)-NH-N=CH-. Są często rozpatrywane jako N'-acylowane hydrazony. Ich nazewnictwo zależy od podwójnej możliwości odczytania kolejności atomów w ugrupowaniu [3]. Jeśli za początek numeracji przyjmujemy wiązanie iminowe, mamy do czynienia z monopodstawionym hydrazonem, natomiast jeśli uznamy grupę karbonylową za początkowe ugrupowanie, związek nazwiemy monopodstawionym hydrazydem.

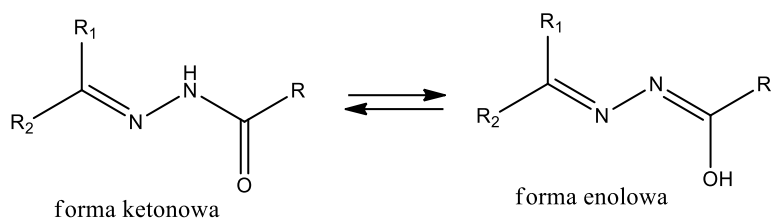
Konwencjonalną metodą otrzymywania hydrazono-hydrazydów jest kondensacja odpowiednich hydrazydów z aldehydami lub ketonami w roztworze alkoholu (metanol, etanol, etc.) [19]. Reakcja ta zwykle zapewnia wysokie wydajności i w większości przypadków stereoselektywność z przewagą (*E*)-izomeru przy podwójnym wiązaniu iminowym [20]. Ze względu na heterogeniczność strukturalną hydrazono-hydrazydów oraz na możliwość zastosowania podczas syntezy różnorodnych związków karbonylowych, stanowią one ważną klasę pochodnych w opracowywaniu nowych leków.

Charakterystyczny element strukturalny hydrazonów oraz hybryd jest ugrupowanie amino-azometinowe -NH-N=CH-, które nadaje tej grupie związków unikalny charakter chemiczny [21,22]. Oba atomy azotu mają charakter nukleofilowy, a wolna para elektronów końcowego atomu azotu jest sprzężona z układem elektronów pi wiązania podwójnego. Azometinowy atom α -wodoru N-acylowanych hydrazonów charakteryzuje się wysoką nukleofilowością, sprawiając, że jest on 10 razy bardziej kwaśny w porównaniu z wodorem ketonu w pozycji α . Atom węgla związany z azotem ma charakter nukleofilowy lub elektrofilowy [21]. Taka budowa wiązania iminowego odpowiada za jego reaktywność, sprawiając, że związki te posiadają zdolność do reagowania z odczynnikami elektrofilowymi i nukleofilowymi. Dlatego też hydrazony oraz ich hybrydy są szeroko stosowane w syntezie organicznej, zwłaszcza do wytwarzania związków heterocyklicznych [21,22].



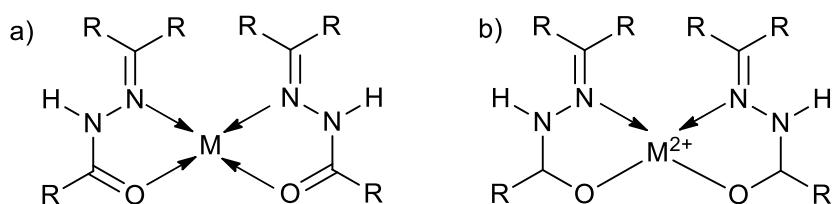
Rysunek 8. Charakter chemiczny wiązania amino-azometinowego.

Związki organiczne zawierające ugrupowanie $-C(=O)-NH-N=CH-$, w roztworach wykazują równowagę tautomerię keto-enolową [22].



Rysunek 9. Tautomeria keto-enolowa występująca w N-acylohydrazonach.

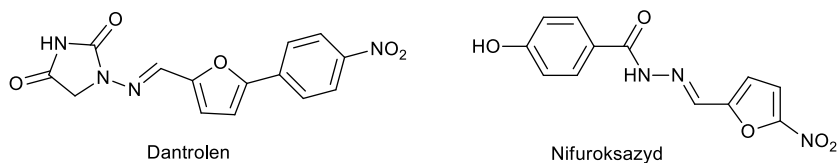
Wszechstronność wiązania iminowego uczyniła hydrazony oraz ich hybrydy znakomitymi wielokleszczowymi środkami chelatującymi, które mogą tworzyć różnorodne kompleksy z różnymi metalami przejściowymi [22,23]. Cecha ta ma znaczenie medyczne, ponieważ poprzez tworzenie stabilnych chelatów z metalami przejściowymi obecnymi w komórce, następuje zahamowanie ważnych reakcji enzymatycznych katalizowanych właśnie przez te metale [23].



Rysunek 10. Schematyczne przedstawienie chelatowania metali przejściowych za pomocą hydrazonów w formie ketonowej (a) oraz w formie enolowej (b).

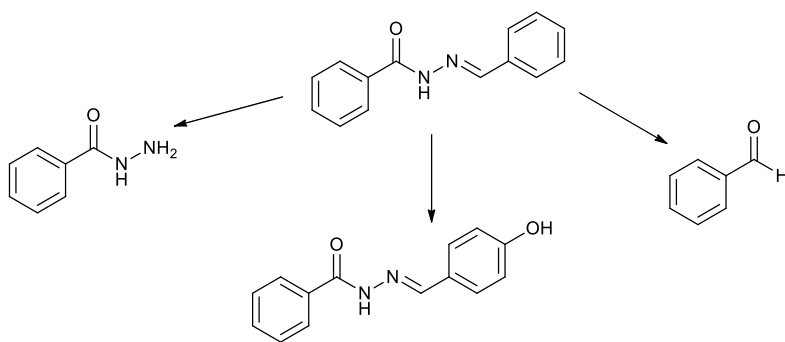
W ostatnich latach zsyntezowano wiele hydrazonów oraz hydrazono-hydrazydów, które wykazały zastosowanie farmakologiczne i przemysłowe. Można je stosować jako herbicydy, insektydy, regulatory wzrostu roślin, plastyfikatory, stabilizatory oraz inicjatory polimeryzacji [24]. Jako środki lecznicze są znane od lat 70 XX wieku, kiedy to niemiecka big pharma Bayer po raz pierwszy zgłosiła N-acylohydrazony jako środki grzybobójcze [20]. Z biegiem lat udowodniono, że ugrupowanie azometinowe stanowi niezwykle wszechstronny rdzeń, który można zastosować w projektowaniu leków o szerokim zakresie farmakologicznym, wykazujących działanie takie jak: przeciwbakteryjne [19, 15], przeciwdepresyjne [25], przeciwdrgawkowe [26], przeciwzapalne [25], przeciwmalaryczne [15], przeciwbólowe [15], przeciwpltkowe [25], przeciwwirusowe [22], przeciwgrzybiczne [19, 22] i przeciwnowotworowe [3, 15, 27, 25]. Przykładowymi związkami należącymi do grupy hydrazonów

i hybryd hydrazonowych o powszechnym zastosowaniu w lecznictwie są dantrolen – lek działający rozkurczowo na mięśnie szkieletowe [20] oraz nifuroksazyd – stosowany jako jelitowy środek antyseptyczny [15].



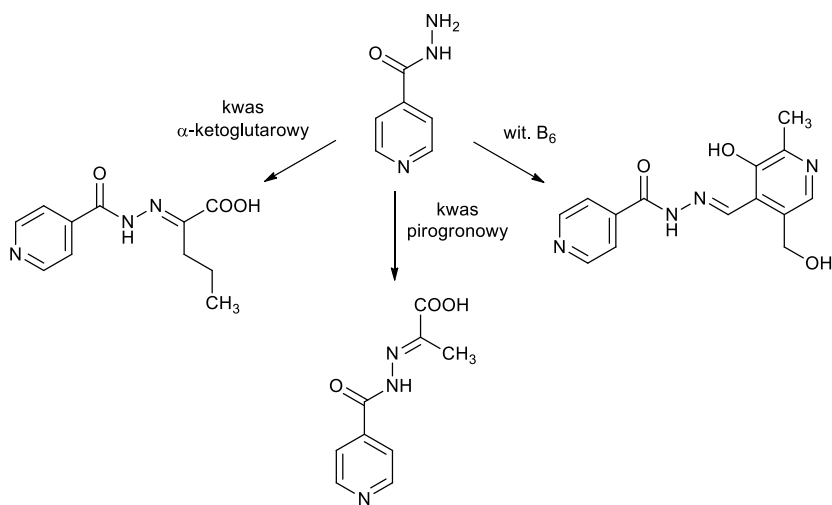
Rysunek 11. Struktury powszechnie stosowanych leków zawierających ugrupowanie $-C(=O)-NH-N=CH-$.

Podczas projektowania leków, opartych na strukturze hydrazonu, hydrazydu bądź ich hybrydy, należy wziąć pod uwagę ich reaktywność oraz stabilność, a tym samym właściwości toksykologiczne. Istnieją doniesienia naukowe, że hydrazone-hydrazydy ulegają hydrolizie, a pierścienie aromatyczne reakcjom aromatycznej hydroksylacji, tak jak to pokazano na Schemacie 6 [28].



Schemat 6. Hydroliza oraz hydroksylacja układów hydrazone-hydrazydowych.

Wiadomo też, że hydrazydy takie jak izoniazyd po wprowadzeniu do organizmu reagują z kwasem α -ketoglutarynowym, witaminą B6 i kwasem pirogronowym tworząc odpowiednie hydrazone-hydrazydy. Dlatego istotnym jest, aby podczas leczenia izoniazylem pacjentom podawać witaminę B6, by nie dopuścić do jej niedoboru [15].



Schemat 7. Reakcje jakim ulega izoniazyd w organizmie ludzkim.

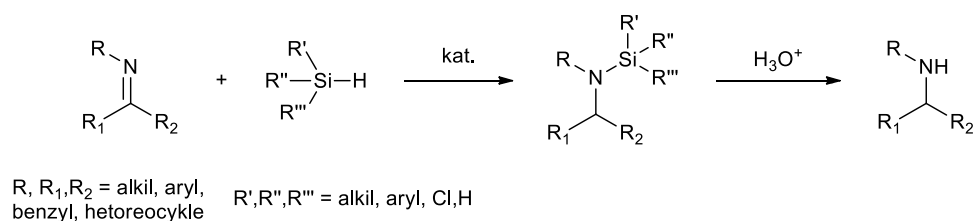
2.3. Redukcja wiązania iminowego

Redukcja wiązania iminowego (C=N) stanowi kluczową transformację w syntezach złożonych struktur organicznych, zarówno w zastosowaniach laboratoryjnych jak i przemysłowych. Powszechnie znanymi, klasycznymi metodami redukcji jest uwodornienie katalityczne oraz redukcja wodorkami z zastosowaniem stechiometrycznych ilości środków redukcyjnych takich jak np. borowodurek sodu NaBH_4 [29].

NaBH_4 jest wysoce aktywnym środkiem redukującym, preferencyjnie redukującym grupy karbonylowe ketonów, aldehydów, kwasów karboksylowych i ich estrów. Wykazuje niską reaktywność w stosunku do wiązań podwójnych, redukując wiązanie iminowe w przypadku niektórych substratów. Stosując borowodorki jako reduktory wiązania iminowego dominującą rolę odegrały modyfikowane odczynniki borowodorkowe, takie jak NaBH_3CN [30] i $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ [31]. Cyjanoborowodurek sodu jest łagodnym środkiem redukującym, powszechnie stosowanym do redukcji jonu iminowego [32], świetnie nadającym się do redukcji hydrazonów [33, 34], który zapewnia dobrą chemoselektywność reakcji z pewnymi grupami funkcyjnymi w obecności innych. Jednakże odczynnik ten jest niebezpieczny poprzez wytwarzanie toksycznych produktów ubocznych takich jak HCN i NaCN, które należy neutralizować podczas reakcji [35]. Szukając alternatywy dla toksycznego NaBH_3CN , do redukcji wiązania iminowego zastosowano $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, który jest również wysoce selektywnym i łagodnym środkiem redukującym, ponadto pozwalającym na eliminację pozostałości cyjanku z mieszaniny reakcyjnej [31]. Do borowodorków oraz ich modyfikowanych odmian bardzo często stosuje się dodatki, takie jak kwasy Lewisa (AcOH [32], $p\text{-TsOH}$ [33], TiCl_4 [33]) czy nikiel Ranneya [29], które poprawiają efektywność procesu redukcji [32].

Podczas reakcji z borowodorkami należy mieć na uwadze, że związki te są wrażliwe na wilgoć i rozkładają się w kontakcie z wodą. Kolejną wadą stosowania borowodorków jest wytwarzanie sporych ilości odpadów, które są szczególnie uciążliwe w przypadku prowadzenia procesów przemysłowych na dużą skalę [35]. Ważnym aspektem dla przemysłu chemicznego jest koncepcja ekonomii atomowej, która zakłada, że w idealnym procesie chemicznym, wszystkie atomy materiału wyjściowego są przekształcane w produkt, pozwalając w ten sposób na minimalizację odpadów oraz oszczędność surowców [35]. W tym kontekście odpowiednim środkiem redukcyjnym wydaje się być wodór cząsteczkowy, H_2 . Podejście to zakłada zastosowanie gazowego wodoru z użyciem katalizatora heterogenicznego zawierającego metale takie jak Pt, Pd, Ni, Ir czy Ru. Dobór odpowiedniego katalizatora metalicznego, warunków reakcji i źródła wodoru zapewnia różnorodność metod tej transformacji opisanych w literaturze [36]. Jednakże chociaż wydaje się to być wysoce efektywna metoda redukcji, niejednokrotnie wymaga zastosowania drogich katalizatorów i prowadzenia procesu w warunkach wysokich ciśnień.

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat znaczącą rewolucję przeszła dziedzina asymetrycznego hydrosililowania jako efektywne podejście do asymetrycznej redukcji wiązania C=N. Jedną z głównych zalet tego procesu są wyjątkowo łagodne warunki reakcji [37, 38]. Przebieg hydrosililowania przedstawiono na schemacie 8.



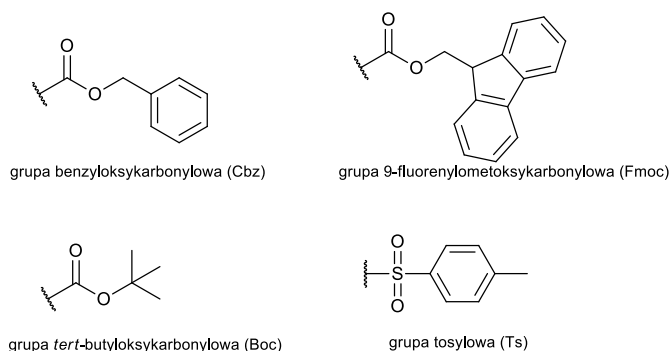
Schemat 8. Reakcja asymetrycznego hydrosililowania.

Jako układy katalityczne stosuje się różne kombinacje metali przejściowych i ligandów. Początkowo katalizatory bazowały na kationowych prekursorach rodu(I) w połączeniu z chiralnymi ligandami dwukleszczowymi, jednakże prężny rozwój tej dziedziny doprowadził do odkrycia wszechstronnych ligandów, z zastosowaniem takich metali jak tytan, cynk, miedź i cyna [37, 38].

Dobrą alternatywą dla istniejących metod redukcji wiązania iminowego, która wpasowuje się w trend zielonej chemii, jest zastosowanie elektrochemii. Wykorzystanie elektronu jako środka redukującego, zapewnia wysoką chemoselektywność oraz wydajność redukcji [39, 40]. Jednakże nie jest to rozpowszechniona metoda redukcji, gdyż wymaga ona specjalistycznego sprzętu [41].

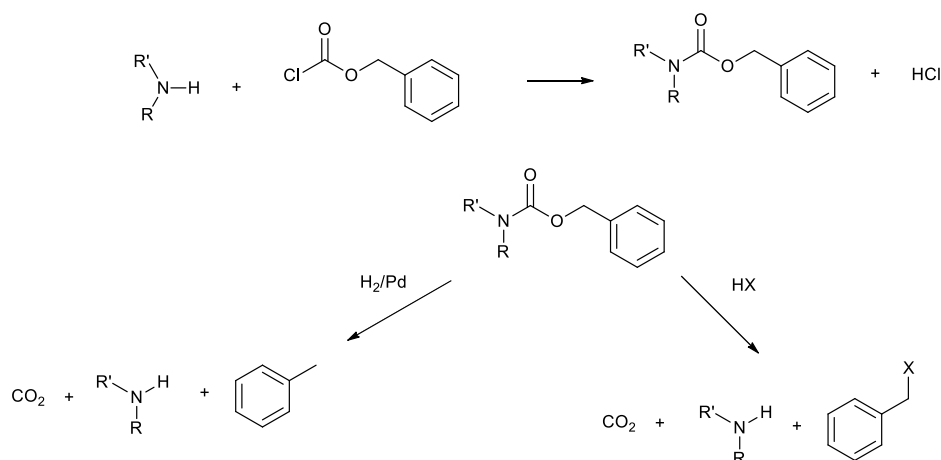
2.4. Zabezpieczanie grupy aminowej

Rzeczony selektywnych i skutecznych metod zabezpieczania i odbezpieczania grup funkcyjnych pozostaje znaczącym narzędziem w wieloetapowych syntezach organicznych. Szczególnie istotną transformacją jest zabezpieczenie grupy aminowej, powszechnie obecnej w syntezach pochodnych aminokwasów, peptydów oraz związków naturalnych, a także w syntezie wielu farmaceutyków. Wolna grupa aminowa charakteryzuje się wysoką nukleofilowością oraz polarnością, dlatego też jej protekcja pozwalająca na ograniczenie reaktywności, jest powszechnym zabiegiem stosowanym w syntezie wieloetapowej [42]. Poniżej na Rysunku 12 przedstawiono struktury wybranych grup protekcyjnych stosowanych do zabezpieczania amin.



Rysunek 12. Struktury chemiczne podstawowych grup zabezpieczających stosowanych do protekcji grupy aminowej.

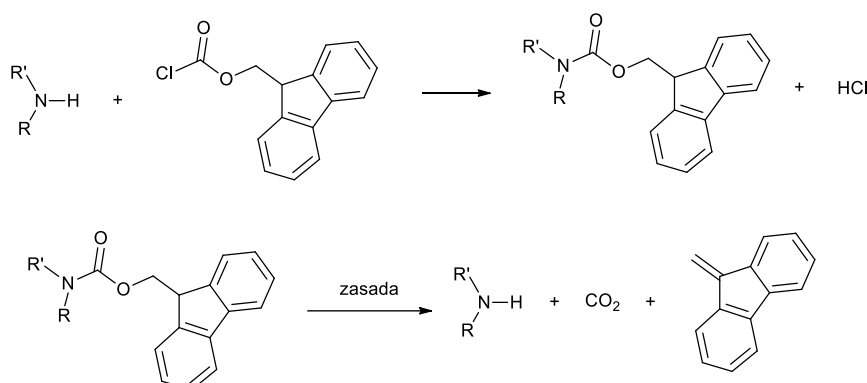
2.4.1. Grupa benzyloksykarbonylowa Cbz



Schemat 9. Zabezpieczenie grupy aminowej za pomocą Cbz i odbezpieczenie jej z użyciem kwasów lub H_2/Pd .

Grupa benzyloksykarbonylowa jest powszechnie stosowana do protekcji grupy α -aminowej w syntezie oligopeptydów, ze względu na zdolność zapobiegania racemizacji, podczas tworzenia wiązania peptydowego [42]. Konwencjonalną metodą zabezpieczania grup aminowych Cbz jest reakcja amin z chloromrówczanem benzylu (Cbz-Cl) w obecności zasad [43]. Cbz wykazuje stabilność zarówno w warunkach zasadowych oraz w większości mediów kwasowych, a także charakteryzuje się wszechstronną deprotekcją [42]. Cbz jest łatwo oraz skutecznie usuwana poprzez katalityczne uwodornienie, w reakcji w podwyższonej temperaturze z mocnymi kwasami takimi jak HBr, HF czy TFA oraz za pomocą sodu w ciekłym amoniaku [42].

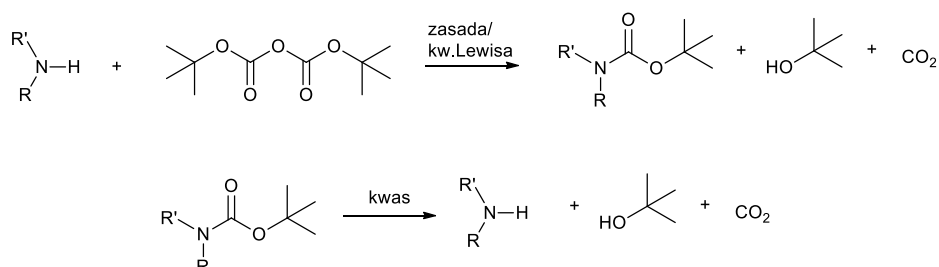
2.4.2. Grupa 9-fluorenylometoksykarbonylowa Fmoc



Schemat 10. Zabezpieczenie grupy aminowej za pomocą Fmoc i jej odbezpieczenie w warunkach zasadowych.

Fmoc można wprowadzić na drodze reakcji aminy z chloromrówczan 9-fluorenylometylu (Fmoc-Cl) w rozpuszczalnikach organicznych takich jak benzen, eter [44]. Grupa 9-fluorenylometoksykarbonylowa jest odporna na działanie kwasów i wykazuje częściową stabilność wobec katalitycznego uwodornienia. Jednakże już w warunkach lekko zasadowych ulega rozszczepieniu [42, 44]. Odbezpieczenie grupy Fmoc można przeprowadzić efektywnie w polarnych rozpuszczalnikach organicznych, w warunkach zasadowych za pomocą ciepłego amoniaku, dimetyloacetamidu (DMA), etanoloaminy bądź przy użyciu drugorzędowych amin takich jak: piperydyna, piperazyna, morfolina, dietyloamina [42, 44]. Preferowane jest zastosowanie amin drugorzędowych, gdyż pozwala to na wytworzenie stabilnego adduktu z produktem ubocznym-dibenzofulwenem powstałym podczas odbezpieczenia grupy Fmoc.

2.4.3. Grupa tert-butyluksykarbonylowa Boc

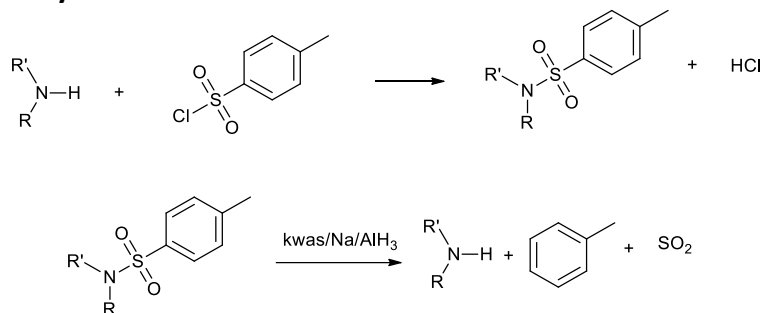


Schemat 11. Zabezpieczenie grupy aminowej za pomocą Boc i odbezpieczenie jej w warunkach kwaśnych.

Wśród wszystkich grup zabezpieczających grupę aminową, Boc cieszy się największą popularnością, ze względu na dużą stabilność, dostępność handlową oraz niski koszt produkcji [45].

Grupa *tert*-butyloksykarbonylowa wykazuje wysoką odporność na warunki zasadowe, odczynniki nukleofilowe, a także na uwodornienie katalityczne. Standardową procedurą zabezpieczenia N-Boc jest zastosowanie diwęglanu di-*tert*-butylu (Boc)₂O w obecności zasady takiej jak np. NaOH, DMAP bądź stosując katalizatory kwasowe Lewisa (przykładowo: Zn(ClO₄)₂·6H₂O, LiClO₄, ZrCl₄, HClO₄/SiO₂) [46, 47]. Deprotekcja Boc odbywa się w środowisku kwasu: CF₃COOH, CH₃COOH, HCl lub 10 % H₂SO₄ [45, 48].

2.4.4. Grupa tosyłowa Ts



Schemat 12. Zabezpieczenie grupy aminowej za pomocą Ts i jej deprotekcja.

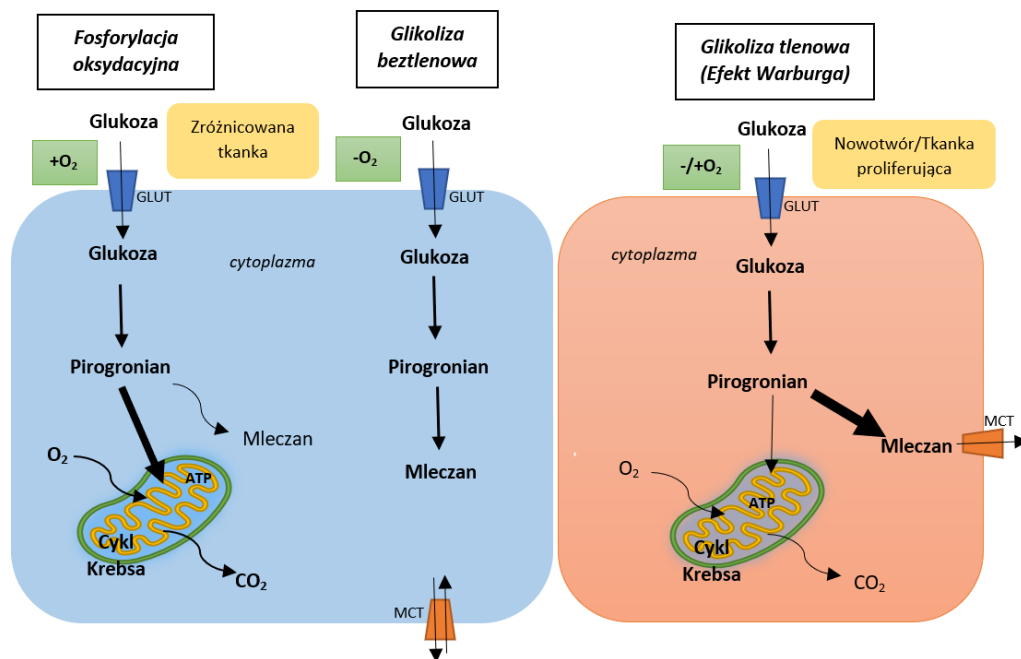
Grupa tosyłowa charakteryzuje się wyjątkową stabilnością, niemalże w większości warunków chemicznych. Sufonoamidy są odporne na atak nukleofilowy i przydatne w syntezach, gdy cząsteczka reaguje z odczynnikiem metaloorganicznym [49, 50]. Do deprotekcji Ts stosowane są metody hydrolityczne oraz redukcyjne z zastosowaniem mocnych kwasów, sodu w ciekłym amoniaku, wodorków glinu czy redukcji elektrochemicznych [49, 50].

2.5. Metabolizm komórki nowotworowej - Efekt Warburga

Komórki nowotworowe, aby promować proces proliferacji oraz przeżycia, charakteryzują się zmienionym przebiegiem metabolizmu glukozy w porównaniu z komórkami prawidłowymi [51, 52, 53]. Objawia się to anormalnym, wysokim zapotrzebowaniem na glukozę, która w procesie glikolizy, niezależnie od dostępności tlenu, przebiega ze zwiększonym wytwarzaniem mleczanu (Rysunek 13). Zjawisko to odkryte w 1920 roku przez biochemika Otto Warburga jest znane jako „Efekt Warburga” lub „glikoliza tlenowa” [52, 54, 55]. Warburg wykazał, że komórki nowotworowe preferują proces oddychania beztlenowego w warunkach normoksyicznych, w przeciwieństwie do komórek prawidłowych, których aktywność metaboliczna opiera się głównie na mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej. Fenotyp Warburga zaobserwowano w wielu typach nowotworów, w tym w nowotworach jelita grubego, czerniaka, piersi, płuc, trzustki, szyi, głowy, prostaty i glejaka wielopostaciowego [52, 53, 54, 56].

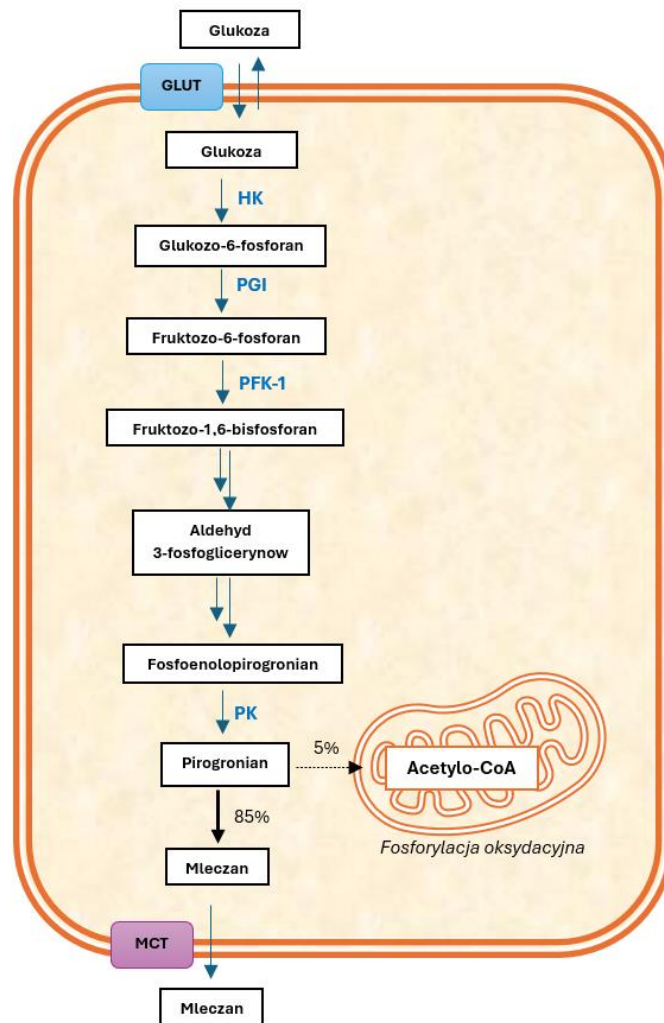
W ostatnich latach stwierdzono również, że wzmożony proces glikolizy tlenowej zaangażowany jest w progresję nowotworów złośliwych oraz w oporność na konwencjonalne terapie przeciwnowotworowe [51]. Pomimo tego, że glikoliza tlenowa jest procesem energetycznie mniej efektywnym niż fosforylacja oksydacyjna, proliferujące komórki preferencyjnie wykazują metabolizm opisany przez Warburga [51, 55]. Według przeprowadzonych badań naukowych, podczas glikolizy beztlenowej w trakcie przemiany jednej cząsteczki glukozy do pirogronianu, generowane są dwie cząsteczki ATP (adenozyno-5'-trifosforanu), natomiast fosforylacja oksydacyjna zapewnia maksymalnie około 36 cząsteczek ATP z utlenienia jednej cząsteczki glukozy [54]. Udowodniono, że metabolizm glukozy do mleczanu poprzez tlenową glikolizę zachodzi 10–100 razy szybciej niż całkowite utlenianie glukozy w mitochondriach [55]. Wynika z tego, że Efekt Warburga gwarantuje ilościowo znacznie wyższe dostarczenie cząsteczek ATP na jednostkę czasu, w porównaniu z oddychaniem tlenowym [51].

Przeprogramowanie metabolizmu glukozy szybko proliferujących komórek nowotworowych, można wytłumaczyć zwiększonym zapotrzebowaniem na wysokoenergetyczne prekursorsy wymagane do biosyntezy nowych nukleotydów, lipidów, białek i heksozoaminy [52, 53, 55, 57] oraz wpływem na zmianę sygnalizacji komórkowej, która wspiera w ten sposób procesy onkogenezy [55, 58].



Rysunek 13: Różnice między metabolizmem glukozy w prawidłowych komórkach oraz w komórkach nowotworowych. Zdrowe tkanki metabolizują glukozę do pirogronianu na drodze glikolizy, a następnie mitochondria utleniają powstały pirogronian do CO_2 w procesie fosforylacji oksydacyjnej. W przypadku niedoboru O_2 , prawidłowe komórki mogą skierować pirogronian na szlak glikolizy beztlenowej, gdzie jest redukowany do mleczanu. Natomiast komórki szybko proliferujące mają tendencję do czerpania energii z procesu glikolizy, przekształcając większość pirogronianu w mleczan, nawet w obecności prawidłowego stężenia tlenu [54].

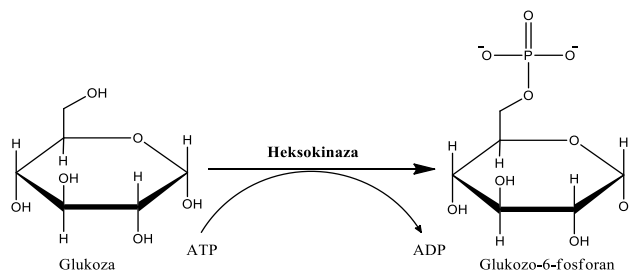
Szczegółowy przebieg reakcji biochemicznych glikolizy tlenowej w komórkach nowotworowych przedstawia Rysunek 14. Proces glikolizy zachodzi w cytozolu komórki, dlatego też wzmożony import glukozy do wnętrza komórki zachodzi za pomocą transporterów GLUT. Kolejno w następujących po sobie reakcjach biochemicznych przebiega katabolizm cząsteczki glukozy do dwóch cząsteczek pirogronianu. Powstający w glikolizie pirogronian ulega w większości fermentacji do mleczanu, który jest eksportowany do przestrzeni zewnątrzkomórkowej z udziałem transporterów MCT. Poszczególne etapy szlaku metabolicznego glikolizy są kontrolowane przez konkretne enzymy glikolityczne, między innymi takie jak: HK (heksokinaza), PGI (izomeraza glukozy-6-fosforanowa), PFK-1 (fosfofruktokinaza), PK (kinaza pirogronowa). Zahamowanie tych enzymów może zatrzymać proces wytwarzania energii w komórkach nowotworowych.



Rysunek 14. Główne etapy biochemiczne zachodzące w fenotypie Warburga.

2.6. Heksokinaza jako istotny enzym procesu glikolizy

Kluczową rolę w glikolizie odgrywa enzym z klasy transferaz - heksokinaza (HK), uczestnicząc w pierwszym, nieodwracalnym etapie glikolizy jakim jest fosforylacja glukozy. (Schemat 13) [59].



Schemat 13. Fosforylacja glukozy do glukozy-6-fosforanu z udziałem heksokinazy.

Reakcja polega na przeniesieniu grupy fosforanowej z cząsteczki ATP na cząsteczkę glukozy za pomocą biokatalizatora jakim jest heksokinaza, z wytworzeniem glukozy-6-fosforanu (G6P). W procesie tym uczestniczy jon Mg^{2+} bądź inny dwuwartościowy jon metalu, który jest potrzebny do aktywacji HK. Fosforylowana glukoza, która w przeciwieństwie do glukozy nie może swobodnie opuścić komórki, poddawana jest dalszym etapom przemian szlaku metabolicznego, otwierając działanie anaboliczne

w komórkach nowotworowych [59]. Heksokinaza, ze względu na swoją istotną rolę w glikolizie, uważana jest m.in. za ważny cel terapii przeciwnowotworowej.

Istnieją cztery izoenzymatyczne formy ludzkiej heksokinazy: heksokinaza 1 (HK1), heksokinaza 2 (HK2), heksokinaza 3 (HK3), heksokinaza 4 (HK4). Każda z izoform posiada różną lokalizację subkomórkową oraz funkcje fizjologiczne i inne właściwości regulacyjne [60, 61, 62]. Wykazują także odrębne właściwości kinetyczne, takie jak wartości K_m i V_{max} , które świadczą o odmiennym powinowactwie do substratów [60, 61, 62].

HK1 oddziałuje z zewnętrzną błoną mitochondrialną wiążąc się z nią poprzez N-końcowy region hydrofobowy enzymu [63]. Występuje we wszystkich tkankach, szczególnie w mózgu i w krwinkach czerwonych [61, 62]. HK1 jest homodimerem składającej się z dwóch podjednostek o masie cząsteczkowej równej 50 kDa, z jedną aktywną domeną katalityczną [64].

HK2 zwykle jest również umiejscowiona na zewnętrznej błonie mitochondrialnej, wiążąc się z nią, tak jak HK1 poprzez N-końcowy region hydrofobowy. HK2 znajduje się również w cytozolu [63, 64, 65]. Podobieństwo strukturalne dwóch izoform HK1 oraz HK2 jest duże, ponieważ są one w 73% identyczne, a w 87% podobne [62]. HK2 jest także homodimerem składającym się z dwóch podobnych podjednostek o masie cząsteczkowej 50 kDa, jednakże w przeciwieństwie do HK1 posiada dwa miejsca aktywne [66]. HK2 rzadko ulega ekspresji w prawidłowych tkankach, z wyjątkiem niektórych tkanek wrażliwych na insulinę takich jak: mięsień sercowy, mięsień szkieletowy oraz tkanka tłuszczowa [61, 62].

HK3 zlokalizowana jest w przedziale około jądrowym [61, 67]. Podobnie jak w przypadku HK1, HK3 jest homodimerem o masie cząsteczkowej 100 kDa i ma tylko jedną domenę o zdolnościach katalitycznych [64]. Dystrybucja HK3 jest stosunkowo niska w większości tkanek, występuje głównie w wątrobie i nerkach [67].

HK4 zwana glukokinazą, umiejscowiona jest w cytozolu i występuje głównie w wątrobie i trzustce [68, 69]. Glukokinaza to białko o masie cząsteczkowej równej 50 kDa, co odróżnia je od reszty izoenzymów [64]. HK4, tak jak HK2 posiada dwa miejsca wiążące glukozę [66].

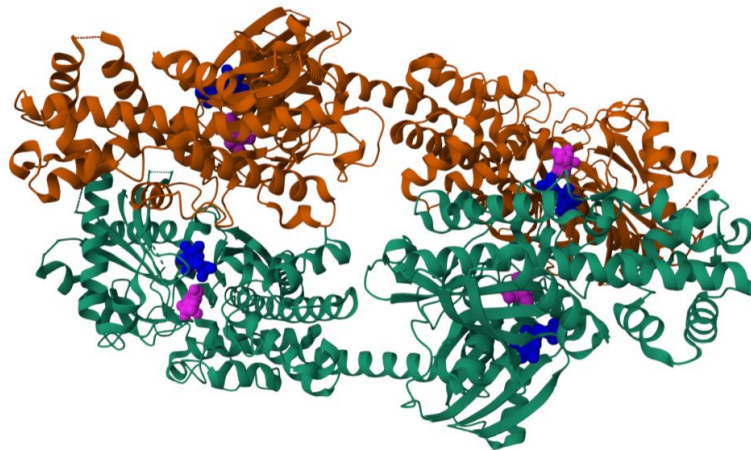
Izoformy HK1, HK2 i HK3 mają duże powinowactwo do glukozy, z K_m rzędu 1-100 μM (Tabela 1), w odróżnieniu od glukokinazy dla której K_m dla glukozy wynosi 8 mM [61, 64, 66, 68, 70]. Produkt reakcji enzymatycznej G6P, poprzez ujemne sprzężenie zwrotne, hamuje trzy izoenzymy: HK1, HK2, HK3 (Tabela 1). Również podwyższony poziom nieorganicznego fosforanu (PO_4^{3-}) inhibuje te same izoformy. Jednakże w przypadku HK1, niski poziom PO_4^{3-} stymuluje działanie tego enzymu [71].

Tabela 1. Parametry kinetyczne charakterystyczne dla izoenzymów ludzkiej heksokinazy.

Izoenzymy	K_m dla glukozy [μM] [68]	K_m dla ATP [mM] [61]	K_i dla GP6 [μM] [61]
HK1	≈ 10	$\approx 0,5$	≈ 20
HK2	≈ 100	$\approx 0,7$	≈ 20
HK3	≈ 1	$\approx 1,0$	≈ 100
HK4	$\approx 8\ 000$ (8mM)	$\approx 0,6$ [18]	Brak inhibicji

2.7. Heksokinaza 2 - cel molekularny w terapii przeciwnowotworowej

Z pośród czterech izoenzymów ludzkiej heksokinazy, HK2 wykazuje nadekspresję w komórkach nowotworowych [54, 56, 69, 65, 72]. Ze względu na duże zainteresowanie tym izoenzymem, jako ważnym celem molekularnym w terapiach nowotworowych, struktura krystalograficzna tej izoformy została już poznana i opisana (Rysunek 15).



Rysunek 15. Struktura krystaliczna ludzkiej heksokinazy 2 wraz z dokowaniem substratu oraz produktu. Struktura została zaczerpnięta z bazy PDB (ang. Protein Data Bank), numer ID: 2NZT. Kolorem zielonym zaznaczono podjednostkę A, natomiast brązowym kolorem podjednostkę B, kolorem różowym oznaczono glukozę, a niebieskim 6GP.

Według doniesień naukowych HK2 jest markerem nowotworów takich jak: rak piersi, płuc, prostaty, glejaka wielopostaciowego, raka wątrobowokomórkowego, żołądka i wątroby [54, 56, 72]. Udowodniono, że HK2 jest związana z agresywnym fenotypem nowotworu, sprzyjając inwazji i rozwojowi przerzutów w szybko rosnących komórkach raka [66, 72]. Nadekspresja HK2 warunkuje również odporność na chemioterapię oraz radioterapię [73]. Powiązanie HK2 ze złym rokowaniem choroby nowotworowej przeważnie opiera się na występowaniu w guzach litych stref niedotlenienia, co pociąga za sobą przeprogramowanie metabolizmu glukozy na glikolizę tlenową, gdzie heksokinaza odgrywa znaczącą rolę [74].

Ważnym aspektem kwalifikującym HK2 jako cel molekularny w terapii nowotworowej jest utworzenie kompleksu między enzymem HK2, a zależnym od napięcia kanałem anionowym 1 (VDAC1) [66, 70, 75, 76]. Liczne badania naukowe udowodniły nadekspresję VDAC1 w komórkach nowotworowych [76, 77]. VDAC1, białko zlokalizowane na zewnętrznej błonie mitochondrialnej, jest transporterem jonów i cząsteczek między cytozolem a mitochondriami [66] [70]. Mitochondria to wewnątrzkomórkowe organelle odpowiedzialne między innymi za produkcję energii w postaci adenylo-5'-trifosforanu (ATP). W ten sposób utworzenie kompleksu VDAC1-HK2 zapewnia heksokinazie łatwy dostęp do wewnątrzmitochondrialnego ATP, substratu wykorzystywanego w reakcji fosforylacji glukozy, co powoduje, że komórki nowotworowe mogą zwiększyć tempo glikolizy [69]. Ponadto połączenie HK2 z VDAC1 pozwala na wydalanie produktu reakcji fosforylacji – G6P, zapobiegając w ten sposób hamowaniu enzymu poprzez ujemne sprzężenie zwrotne [75]. Oprócz enzymatycznych funkcji kompleksu HK2 z VDAC1 wspomagających progresję nowotworu, takie połączenie białek chroni komórki nowotworowe przed zaprogramowaną śmiercią komórki. Interakcja HK2 z VDAC1 uniemożliwia dostarczanie i uwalnianie czynników apoptycznych z mitochondriów do

cytozolu, zakłócając w ten sposób szlak apoptozy, pozwalając na dalszą proliferację komórek nowotworowych [76].

2.8. Terapia skojarzeniowa w onkologii

Opieranie się na tradycyjnym profilu cytotoksyczności pojedynczego środka w walce z nowotworem wydaje się niewystarczającym podejściem w leczeniu onkologicznym. Odpowiedzi kliniczne w monoterapii są na ogół krótkotrwałe [78]. U większości pacjentów z guzami litymi, podczas leczenia, rak rozwija się szybko i staje się oporny w ciągu kilku miesięcy [1]. Chemo- i radiooporność stały się powszechnym problemem monoterapii. Wynika to z tego, że stałe leczenie tym samym środkiem powoduje, że komórki nowotworowe, charakteryzujące się heterogenicznością, poszukują alternatywnych szlaków przeżycia. Terapie skojarzone zapewniające ulepszoną formę leczenia, stanowią potencjalne rozwiązanie zagadnienia związanego z opornością nowotworów. Terapia skojarzeniowa (kombinowana) polega na wykorzystaniu połączenia dwóch lub więcej cytostatyków o odrębnym mechanizmie działania, ukierunkowanych na odmienne cele molekularne lub jest to kombinacja różnych strategii terapeutycznych, między innymi takich jak [1]:

- Chemioterapia - uszkodzenie komórek nowotworowych za pomocą naturalnych bądź syntetycznych cytostatyków,
- Radioterapia - miejscowe naświetlanie nowotworu promieniowaniem jonizującym,
- Immunoterapia - modulacja układu odpornościowego w celu wykorzystania go do walki z komórkami nowotworowymi,
- Hormonoterapia - zmiana środowiska hormonalnego w celu zahamowania wzrostu nowotworów hormonozależnych,
- Leczenie chirurgiczne - wykonanie zabiegów chirurgicznych mających na celu usunięcie bądź zniszczenie zmiany nowotworowej.

Terapia skojarzeniowa zapewnia skuteczną i ulepszoną formę leczenia nowotworów. Wynika to z wykorzystania odrębnych mechanizmów działania wielu środków terapeutycznych, zdolności do celowania w wiele szlaków biochemicznych komórek nowotworowych, zapewniając w ten sposób addytywny efekt działania [79].

2.8.1. Zastosowanie inhibitorów HK2 w terapii kombinowanej

Łączenie inhibitorów HK2 z typowymi lekami przeciwnowotworowymi pozwala na jednoczesne oddziaływanie na komórki tlenowe oraz niedotlenione, zapewniając synergistyczny efekt działania na komórki nowotworowe, np. w przypadku leczenia pacjentów z zaawansowanymi guzami litymi docetakselem w skojarzeniu ze znanym inhibitorem HK2: 2-deoksy-D-glukozą [80]. Taka forma leczenia onkologicznego również zasadniczo minimalizuje radio- oraz chemooporność, ponieważ komórki nowotworowe często nie są w stanie przystosować się do równoczesnych toksycznych skutków dwóch środków terapeutycznych, ukierunkowanych na różne ścieżki działania. Dla przykładu, stosowanie tylko typowych leków przeciwnowotworowych powodujących uszkodzenia DNA, po czasie sprawia, że komórki mogą stać się odporne na leczenie ze względu na włączenie mechanizmów naprawy DNA. Wykorzystując inhibitory HK2, które hamują proces glikolizy, aktywacja procesów naprawczych komórek nowotworowych jest utrudniona z powodu obniżonego poziomu ATP w komórkach, dostarczającego energii w systemie naprawczym [81].

Udowodniono, że lekooporność bardzo często wiąże się z dużym zapotrzebowaniem energetycznym komórek nowotworowych, a co za tym idzie zwiększonym tempem glikolizy i nadekspresją HK2. W przypadku ludzkiej linii raka piersi MCF-7 typu dzikiego oraz wywodzącej się

z niej lekoopornej linii komórkowej MCF-7, 3-krotnie większą szybkość glikolizy przypisuje się chemoopornej linii komórkowej [82]. Obniżenie poziomu ATP przez inhibitory HK2 wykazało synergistyczny efekt w terapii skojarzonej w zakresie hamowania wzrostu i zapobiegania nawrotom kilku typów komórek nowotworowych [79, 83, 84, 79, 85].

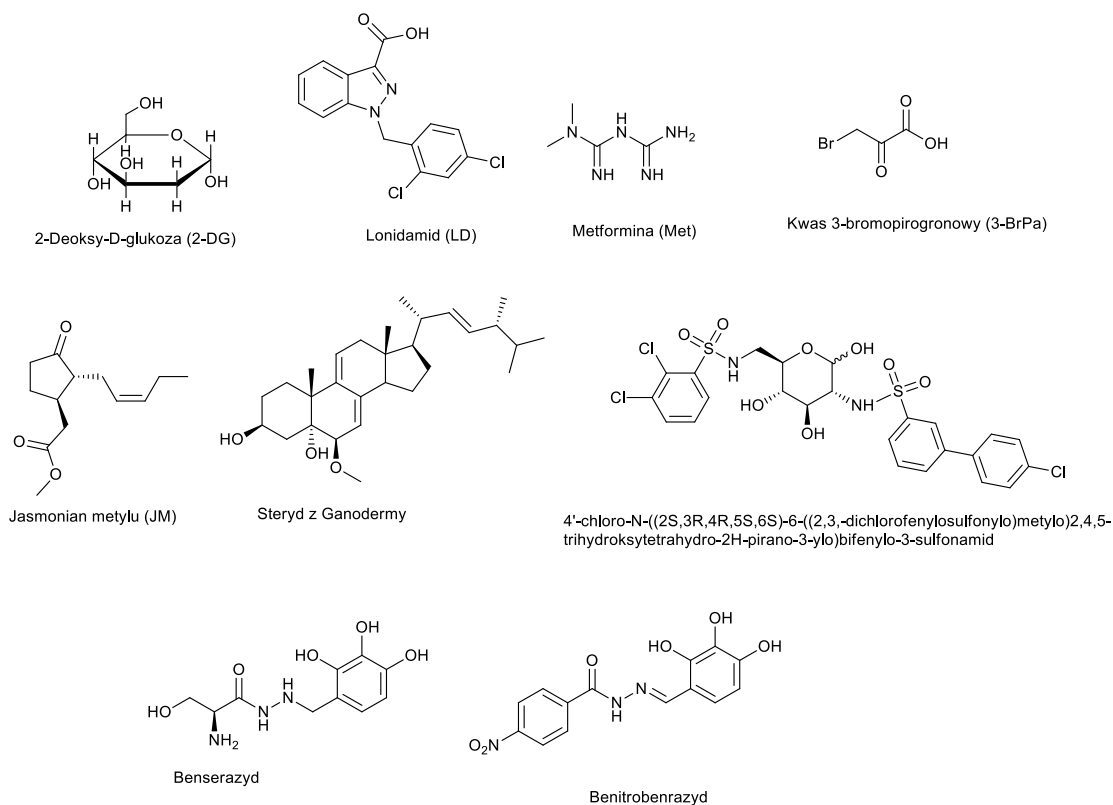
Niedotlenienie komórek nowotworowych w guzach litych jest także przyczyną oporności w radioterapii. Hipoksja powoduje zmniejszenie poziomu reaktywnych form tlenu, a co za tym idzie ograniczenie uszkodzeń DNA spowodowanych promieniowaniem jonizującym. Inhibitory HK2 pozwalają na odwrócenie tego efektu i poprawę w skuteczności prowadzenia radioterapii [86]. Przeprowadzono badania kliniczne z zastosowaniem inhibitorów HK2 takich jak: 2-deoksyglukoza oraz Ionidamid w skojarzeniu z radioterapią, wykazując selektywną wrażliwość na promieniowanie jonizujące, wydłużenie czasu przeżycia pacjenta oraz poprawę jakości życia chorego [83, 84, 87].

Ponadto, dzięki addytywnym efektom występującym w leczeniu skojarzeniowym, możliwe jest zastosowanie mniejszych dawek terapeutycznych, pozwalając w ten sposób ograniczyć toksyczność leczenia onkologicznego. Zastosowanie doustnej dawki 200 µg/ml metforminy (inhibitor HK2) z wstrzyknięciem 1 mg/kg doksorubicyny spowodowało taki sam efekt przeciwnowotworowy jak w przypadku monoterapii doksorubicyną z użyciem leku w dawce 4 mg/kg. W tym przypadku terapia kombinowana pozwala na 4-krotne zmniejszenie dawki doksorubicyny, co przekłada się na zniwelowanie skutków ubocznych podczas leczenia [88].

Liczne badania potwierdzają, że zastosowanie inhibitorów HK2 w terapii skojarzeniowej zapewnia skuteczną i ulepszoną formę leczenia onkologicznego, znacznie poprawiając wyniki terapeutyczne, pozwalając na długoterminową kontrolę choroby.

2.9. Inhibitory Heksokinazy 2

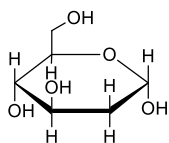
W literaturze opisano kilkanaście potencjalnych inhibitorów HK2, które bezpośrednio lub pośrednio wpływają na aktywność heksokinazy 2 (Rysunek 16) [62, 77]. Pierwsza grupa związków wpływa na centrum aktywne enzymu poprzez oddziaływanie z miejscem wiązania glukozy bądź naśladując produkt fosforylacji G6P. Druga grupa inhibitorów zakłóca oddziaływanie kompleksu HK2-VDAC1 wskutek oddysocjowania enzymu od zależnego od napięcia kanału anionowego [89]. Niektóre związki, takie jak Ionidamid (LD) i metformina (Met), wykazują dwojaki sposób działania: bezpośredni wpływ na aktywność HK2 oraz interakcję z kompleksem HK2-VDAC1. Pomimo długoletnich badań nad inhibitorami HK2, żaden z nich nie spełnia podstawowych kryteriów, takich jak: wysoka selektywność działania, znacząca aktywność inhibicyjna oraz niska toksyczność ogólnoustrojowa.



Rysunek 16. Potencjalne inhibitory HK2 zgłaszane w literaturze.

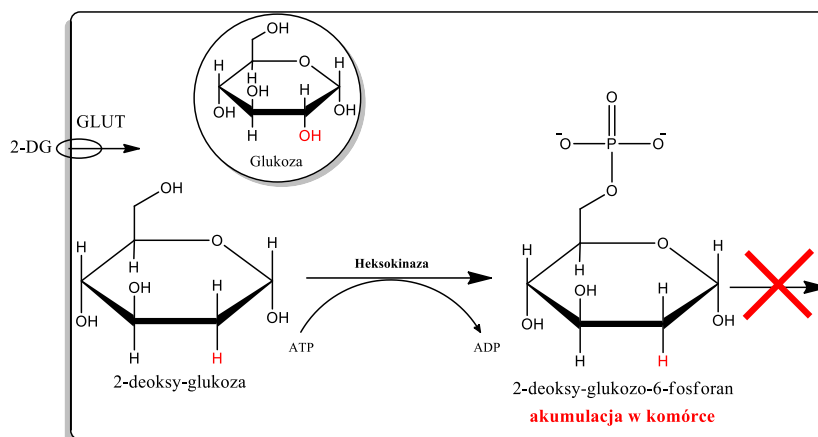
Poniżej przedstawiono opisy powszechnie znanych inhibitorów HK2.

2-Deoksy-D-glukoza (2-DG)



2-Deoksy-D-glukoza (2-DG)

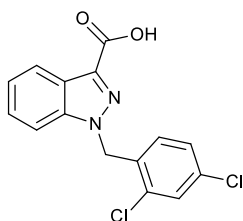
2-DG jest mimetykiem glukozy, gdzie grupa hydroksylowa w pozycji 2 została zastąpiona wodorem. Z racji dużego podobieństwa do naturalnego substratu heksokinazy, charakteryzuje się wysokim powinowactwem do HK ($K_m=27 \mu M$), konkurując o miejsce aktywne z glukozą [90]. Mechanizm działania inhibitora został przedstawiony na Rysunku 17. 2-DG hamuje HK na skutek inhibicji niekompetencyjnej. 2-DG jest transportowana za pomocą GLUT (transportery glukozy) do wnętrza komórki, gdzie ulega fosforylacji przez HK do 2-deoksy-D-glukozo-6-fosforanu. Produkt tej reakcji, ze względu na brak grupy 2-OH, nie może być dalej metabolizowany, co prowadzi do jego akumulacji w komórce, zatrzymania metabolizmu glukozy i w konsekwencji śmierci komórki [57].



Rysunek 17. Mechanizm działania 2-DG w komórce.

Z uwagi na hamowanie wzrostu komórek nowotworowych przez 2-DG, prowadzone są nad nim badania kliniczne jako leku do zastosowania w terapii przeciwnowotworowej oraz terapii kombinowanej [57, 83, 84]. Krótkotrwałe podawanie 2-DG jest nietoksyczne dla ludzi i zwierząt, jednak długotrwałe leczenie tym środkiem może być toksyczne w szczególności dla mózgu, powodując hiperglikemię. Niska selektywność, słaby profil farmakokinetyczny i farmakodynamiczny ograniczają aktywność terapeutyczną 2-DG [91].

Lonidamid (LD)



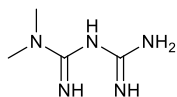
Lonidamid (LD)

Lek przeciwnowotworowy stosowany w niektórych krajach europejskich jako inhibitor glikolizy, jednakże nie został jeszcze zatwierdzony przez Agencję Żywności i Leków FDA (ang. Food and Drug Administration) [92]. Mechanizm hamowania glikolizy opiera się na bezpośrednim obniżeniu aktywności HK2 oraz zakłóceniu wiązania kompleksu HK2 z VDAC1 [93]. Ostatnie badania wykazały, że LD może mieć więcej celów molekularnych poza HK2, takich jak: kompleks porów przejścia przepuszczalności (PT), transporter monokarboksylanu (MCT), mitochondrialny nośnik pirogronianu (MPC) [94]. Jego obiecujące właściwości przeciwnowotworowe i stosunkowo niska toksyczność wobec komórek zdrowych skłoniły naukowców do przeprowadzenia badań klinicznych:

- II faza badań klinicznych w leczeniu glejaka złośliwego z nadekspresją HK2 [95],
- II faza badań klinicznych w leczeniu raka jajnika w terapii kombinowanej z cisplatyną/paklitakselem [96],
- III faza badań klinicznych w leczeniu nowotworów głowy i szyi w skojarzeniu z radioterapią [87].

Badania kliniczne nad LD wykazały, że skojarzenie LD z chemioterapią i radioterapią jest stosunkowo bezpieczne i potencjalnie skuteczne, zastosowanie LD w monoterapii potwierdziły ograniczoną aktywność terapeutyczną [87, 95, 96].

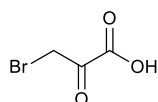
Metformina (Met)



Metformina (Met)

Jest to lek zatwierdzony przez FDA stosowany w leczeniu cukrzycy typu 2. Charakteryzuje się dobrym profilem bezpieczeństwa z ograniczonymi skutkami ubocznymi takimi jak: niedobór witaminy B12, dolegliwości żołądkowo-jelitowe [97]. Lek ten wykazuje również działanie przeciwnowotworowe, przez obniżenie aktywności HK2, wiążąc się w miejsce produktu reakcji G6P oraz dodatkowo oddysocjując enzym z zewnętrznej błony mitochondrialnej [98]. Badania wykazały, że stosowanie Met w skojarzeniu ze znanymi cytostatykami zapewnia skuteczną formę terapii przeciwnowotworowej dla raka jajnika, piersi, prostaty i płuc, przyspieszając regresję nowotworu oraz przedłużając jego remisję [88, 99].

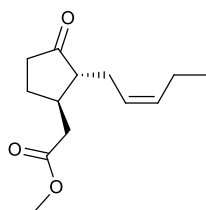
Kwas 3-bromopirogronowy (3-BrPa)



Kwas 3-bromopirogronowy (3-BrPa)

3-BrPa to analog kwasu pirogronowego, wykazujący obiecujące działanie przeciwnowotworowe wobec różnych typów nowotworów zarówno *in vivo* jak i *in vitro* [100][101][102][103]. Udowodniono, że 3-BrPa powoduje kowalencyjną modyfikację heksokinazy poprzez reakcję z resztą cysteiny w łańcuchu białkowym, znacząco indukując rozszczepienie kompleksu HK2-VDAC, inicjując w ten sposób apoptozę [102]. Ograniczona skuteczność zastosowania 3-BrPa wynika z jego silnych właściwości alkilujących. Cecha ta powoduje, że 3-BrPa może mieć wiele celów molekularnych, czyniąc związek cytotoksyczny. Przykładowo, 3-BrPA wykazuje zależną od dawki toksyczność wobec wątroby i dwunastnicy [104].

Jasmonian metylu (JM)

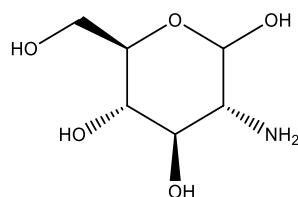


Jasmonian metylu (JM)

JM to pochodna cyklopentanonu należąca do roślinnych hormonów stresu [105]. Badania potwierdzają przeciwnowotworowe działanie JM dla licznych typów nowotworów, między innymi czerniaka, raka prostaty, sutka, białaczki limfoblastycznej oraz chłoniaka [106]. Cytotoksyczna dawka JM przyjmuje wartości milimolowe, preferencyjnie wpływając na komórki nowotworowe. Według Federalnej Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych JM, jako substancja powszechnie spożywana w owocach, jest bezpieczna dla ludzi [105]. Udowodniono, że JM ma wiele celów molekularnych, w tym wpływ na kompleks HK2-VDAC1. Mechanizm działania JM polega na wiązaniu się z mitochondrialnym HK1 oraz HK2, wpływając w ten sposób na interakcję enzymu z kanałem VDAC,

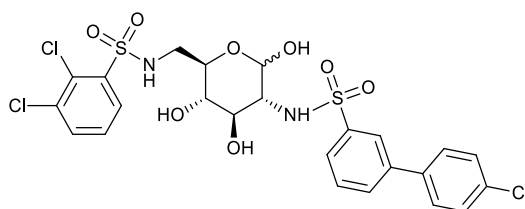
powodując dysocjację HK z kompleksu. Odłączenie enzymu od VDAC powoduje utratę funkcji mitochondriów, prowadząc do martwicy i apoptozy komórek [107].

Pochodne glukozyminy



Rysunek 18. Podstawowa struktura glukozyminy

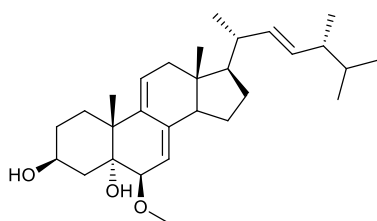
Glukozyminy (Rysunek 18) są to pochodne glukozy, w których grupa hydroksylowa w pozycji 2 została zastąpiona grupą aminową. Na podstawie wysokoprzepustowych badań przesiewowych (ang. *High-throughput screening HTS*) pochodne glukozyminy określono jako selektywne inhibitory HK2 [108]. Związki te zostały zgłoszone w patencie jako inhibitory heksokinazy 2 [109]. Optymalizacja ich struktury w oparciu o analizę SAR (ang. *Structure-activity relationship*) doprowadziła do odkrycia obiecującej pochodnej glukozyminy 4'-chloro-N-((2S,3R,4R,5S,6S)-6-((2,3,-dichlorofenylosulfonyl)metylo)2,4,5-trihydroksytetrahydro-2H-pirano-3-ylo)bifenylo-3-sulfonamidu (Rysunek 19), która wykazuje wartość IC_{50} dla HK2 i HK1 odpowiednio: $IC_{50} = 0,0079 \mu M$ i $1,0 \mu M$. Badania krystalograficzne wykazały, że związek ten dopasowuje się do centrum aktywnego HK2, naśladując zarówno glukozę jak i G6P [108].



4'-chloro-N-((2S,3R,4R,5S,6S)-6-((2,3,-dichlorofenylosulfonyl)metylo)2,4,5-trihydroksytetrahydro-2H-pirano-3-ylo)bifenylo-3-sulfonamid

Rysunek 19. Struktura chemiczna pochodnej glukozyminy, zgłoszonej jako obiecujący inhibitor HK2.

Steryd z Ganodermy



Steryd z Ganodermy

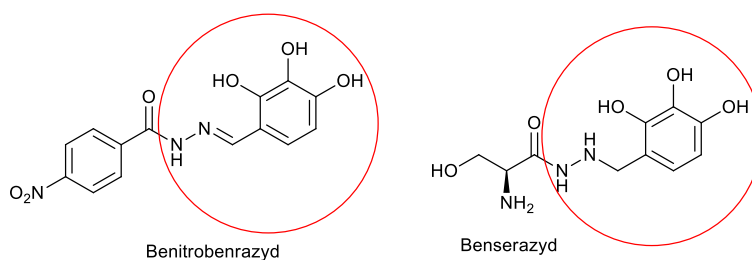
Na podstawie wirtualnych badań przesiewowych (ang. *Virtual screening, VS*) stwierdzono, że jeden ze steroli będący składnikiem szczepu grzybów *Ganoderma sinense*, należy do grupy potencjalnych silnych inhibitorów HK2, o IC_{50} równym $2,06 \pm 0,15 \mu M$. Wykazuje również silne powinowactwo do enzymu, ze stałą K_d o wartości $114,5 \pm 2,7 \mu M$. Hamuje progresję nowotworu, z 4-krotną selektywnością wobec komórek nowotworowych względem normalnych [110].

2.10. Identyfikacja potencjalnych inhibitorów HK2 o największej skuteczności

W 2017 roku na podstawie badań przesiewowych (VS), wykorzystując bazę danych leków zatwierdzonych przez FDA, zidentyfikowano nowy potencjalny inhibitor HK2: 2-amino-3-hydroksy-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylo)propanohydrazyd - benserazyd. Zastosowana metoda obliczeniowa VS oparta na strukturze (ang. Structure-based virtual ligand screening) polega na określeniu siły oddziaływania małej cząsteczki do struktury celu molekularnego, w tym przypadku białka HK2 i następnie ocenia ich potencjalną interakcję/komplementarność z miejscem wiązania. Benserazyd (Benz) jako inhibitor DOPA-dekarboksylazy jest lekiem powszechnie stosowanym w leczeniu Parkinsona w skojarzeniu z lewodopą. Ze względu na to, że Benz jest lekiem zatwierdzonym przez FDA, ma zweryfikowaną odpowiednią farmakodynamikę i farmakokinetykę oraz niską toksyczność, co znacznie ułatwia opracowanie nowego inhibitora HK2 na bazie struktury benserazydu [16].

Ta sama grupa badawcza, która zidentyfikowała benserazyd jako inhibitor HK2, w 2020 roku wyłoniła nowy potencjalny inhibitor HK2: 4-nitro-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazyd (benitrobenrazyd, BNBZ). W swoich badaniach, na podstawie metod obliczeniowych, określiła ona fragment (*E*)-N'-2,3,4-trihydroksybenzylidenoarylohydrazydowy podstawową strukturą związku wiodącego [27, 111].

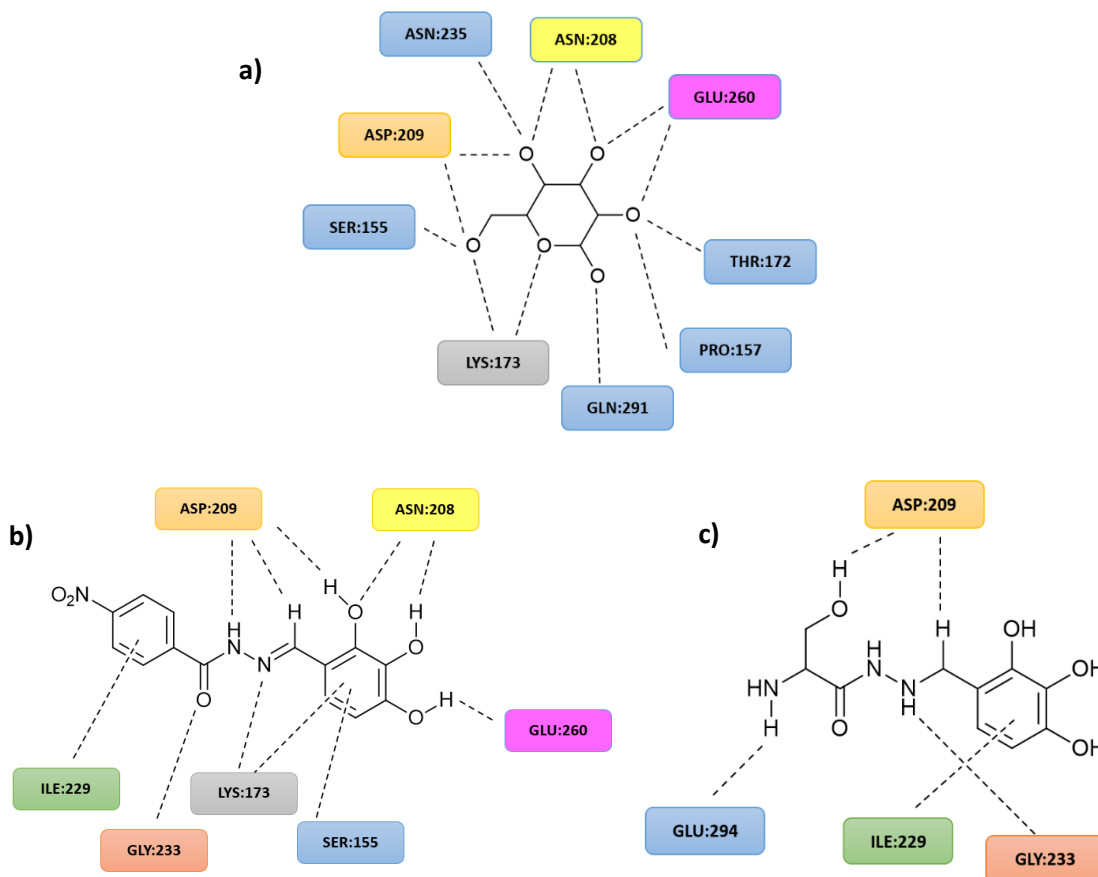
Między dwoma potencjalnymi inhibitorami BNBZ i Benz istnieje duże podobieństwo strukturalne (co zaznaczono na rysunku kolorem czerwonym). Jednakże Benitrobenrazyd w odróżnieniu od Benz zawiera w swoim łańcuchu głównym, charakterystyczne ugrupowanie azometinowe -N=CH-, co kwalifikuje BNBZ do grupy N-acylohydrazonów, natomiast benserazyd posiadający pojedyncze wiązanie -NH-CH₂- do hydrazydów.



Rysunek 20. Potencjalnie skuteczne inhibitory HK2 wyłonione na podstawie wirtualnych badań przesiewowych [111] [27] [16].

2.10.1. Analiza wyników literatury dokowania molekularnego dla benserazydu oraz benitrobenzazydu

Ze względu na duże podobieństwo strukturalne Benz i BNBZ udowodniono, że przewidywany sposób wiązania związków w miejscu aktywnym HK2 jest podobny. Według dokowania molekularnego fragment pierścienia trihydroksybenzenowego potencjalnych inhibitorów, zajmuje dokładnie takie samo miejsce w centrum katalitycznym heksokinazy 2 jak pierścień cukrowy D-glukozy, która jest naturalnym substratem enzymu [16, 111]. Benserazyd nie wykazał żadnych oddziaływań hydrofobowych w wysoce polarnym miejscu wiązania substratu z glukozą, w ten sposób dobrze wpasowując się w centrum aktywne HK2 [16]. Z analizy dokowania molekularnego benitrobenzazydu wynika, że podstawnik aromatyczny ugrupowania acylohydrazonowego obniża swobodną energię cząsteczki dla pewnej konformacji BNBZ, sprawiając że wiąże się ona skuteczniej z celem molekularnym niż benserazyd [111].



Rysunek 21. Oddziaływania glukozy (a), BNBZ (b), Benz (c) z miejscem wiążącym HK2, opracowane na podstawie modelowania molekularnego przedstawionego w literaturze [77].

Na Rysunku 21 przedstawiono interakcje pomiędzy aminokwasami białka HK2 a glukozą (a), BNBZ (b), Benz (c), wiążących się z domeną N-kończącą enzymu. Liczne oddziaływania polarne między naturalnym substratem, a enzymem sugerują wysoce polarny charakter miejsca aktywnego, co jest zgodne z innymi badaniami [16, 111]. Jak można zauważyć wszystkie spośród trzech przedstawionych ligandów oddziałują z tym samym aminokwasem: kwasem asparaginowym ASP:209, odpowiednio dla glukozy oraz Benz przez 2 wiązania wodorowe oraz dla BNBZ przez 3 wiązania wodorowe. Oprócz tego, BNBZ wykazuje także oddziaływania pomiędzy ugrupowaniem acylohydrazonowym, a GLY:233 oraz LYS:173. Podstawnik aromatyczny BNBZ, wykazuje interakcję z aminokwasem ILE:229. Można także zauważyć, że ugrupowanie pirogalowe BNBZ jest silnie powiązane z aminokwasami w miejscu aktywnym HK2. Natomiast w przypadku Benz, jego pierścień aromatyczny oddziałuje hydrofobowo z aminokwasem ILE:229, grupa aminowa pochodząca od seryny tworzy wiązania wodorowe z GLU:294. Dodatkowo wiązania wodorowe występują między ugrupowaniem acylohydrazonowym Benz, a aminokwasem GLY:233.

2.10.2. Porównanie aktywności biologicznej BNBZ oraz Benz

Udowodniono, że Benz oraz BNBZ wykazują aktywność przeciwnowotworową *in vitro* i *in vivo*. Potwierdzono także specyficzne ukierunkowanie tych dwóch związków na heksokinazę 2, poprzez wykonanie testów hamowania aktywności HK2 oraz określenie stałej oddziaływania (K_d) ligand-HK2 za pomocą termoforezy mikroskalowej (MST), co przedstawiono poniżej w tabelach [27, 16, 111]. Jak wynika z danych przedstawionych w Tabeli 2 zarówno BNBZ i Benz charakteryzują się znaczącą

aktywnością hamującą heksokinazę 2, przy czym BNBZ prezentuje się trochę korzystniej w tych badaniach, wykazując o rząd niższą wartość IC_{50} w porównaniu z Benz. Obydwa związki cechują się umiarkowaną, podobną selektywnością wobec różnych izoform heksokinazy. Tak samo jak BNBZ, Benz przejawia 8-krotnie wyższą selektywność wobec HK2 w porównaniu z HK4 oraz około 5-krotnie lepszą selektywność wobec HK2 w porównaniu z HK1 dla Benz i około 4-krotną dla BNBZ. Selektywność w stosunku do jednej izoformy heksokinazy 2 jest ważnym aspektem podczas projektowania inhibitorów HK2, gdyż potencjalne leki nie powinny wpływać na inne izoenzymy heksokinazy, które są potrzebne do utrzymania prawidłowych funkcji komórkowych. Stwierdzono, że inhibitory o wysokiej specyficzności dla jednej izoformy HK2 zmniejszają skutki uboczne terapii przeciwnowotworowej.

Tabela 2. Określenie hamowania aktywności izoenzymów heksokinazy wobec Benz oraz BNBZ.

Izoforma HK	IC_{50} (μM) dla BNBZ	IC_{50} (μM) dla Benz
HK1	2,20 \pm 0,12 (4 razy)	25,13 \pm 0,24 (5 razy)
HK2	0,53 \pm 0,13	5,52 \pm 0,17
HK4	4,17 \pm 0,16 (8 razy)	40,53 \pm 2,94 (8 razy)

Dla BNBZ oraz Benz wyznaczono stałe równowagi dysocjacji K_d określające wartość stężenia potencjalnych inhibitorów, przy którym połowa miejsc wiążących na enzymie jest zajęta. Do przeprowadzenia badania wykorzystano metodę MST (ang. MicroScale Thermophoresis), porównując dane z wartościami otrzymanymi dla dwóch innych, dobrze znanych inhibitorów HK2 takich jak bromopirogronian oraz metformina. Przedstawione poniżej wyniki pokazują, że BNBZ oraz Benz wykazują najsilniejsze powinowactwo do wiązania się z HK2 w porównaniu z wcześniej zgłaszanymi inhibitorami HK2, przy czym BNBZ jest lepszym inhibitorem wykazując najniższą wartość stałej K_d .

Tabela 3. Wartości parametrów K_d uzyskane z testu MST.

Inhibitor	K_d [μM]
Benz	149 \pm 4,9
BNBZ	4,99 \pm 0,41
3-BrPA	742 \pm 96.8
Met	3930 \pm 282

BNBZ oraz Benz jako inhibitory glikolizy, powodują zmniejszenie wychwytu glukozy i wytwarzanie mleczanu oraz zwiększenie produkcji reaktywnych form tlenu (ROS), co skutkuje zahamowaniem proliferacji komórek nowotworowych i indukowanie apoptozy. Bardzo podobne aktywności hamowania heksokinazy 2 przez BNBZ i Benz, jak również ich zbliżone powinowactwa do enzymu i porównywalne dokowanie molekularne sugerują, że oba te związki przejawiają podobny mechanizm inhibicji.

Tabela 4. Wartości IC₅₀ dla BNBZ oraz BENZ wobec nowotworowych linii komórkowych oraz prawidłowych linii komórkowych (LO2, VERO).

Linia komórkowa	IC ₅₀ (μM) dla BNBZ	IC ₅₀ (μM) dla Benz
SW480	7,13 ± 1,12	143,0 ± 7,0
Lovo	-	151,0 ± 4,5
HCT116	-	181,4 ± 11,5
MCF-7	-	186,0 ± 12,5
SMMC-7721	-	210,4 ± 7,9
Aspc-1	43,10 ± 3,12	-
SW1990	24,00 ± 8,45	-
PANC-1	>100	-
MIApaca-2	28,58 ± 1,46	-
LO2	>400	>500
Vero	>400	>500

Według przeprowadzonych badań *in vitro* [27, 16, 111] zarówno BNBZ, jak i Benz nie wykazywały cytotoksyczności wobec prawidłowych linii komórkowych tkanek LO2 i Vero. Jednocześnie wykazywały one działanie cytotoksyczne wobec linii komórkowych różnych typów nowotworów, szczególnie tych z nadekspresją HK2 (Tabela 4). W badaniach *in vivo*, udowodniono, że wstrzyknięcie BNBZ lub Benz znacząco hamuje wzrost guza u myszy z nowotworem SW480 (w przypadku Benz) oraz u myszy z nowotworem SW1990 i SW480 (w przypadku BNBZ). Nie zaobserwowano przy tym toksyczności dla zdrowych tkanek.

2.10.3. Określenie struktur wiodących inhibitorów HK2

Na podstawie doniesień literaturowych benserazyd oraz benitrobenrazyd wydają się być najbardziej obiecującą grupą inhibitorów heksokinazy 2. Benz jako lek zatwierdzony przed FDA charakteryzuje się już określoną, zdefiniowaną niską toksycznością i ustalonym metabolizmem leku w ustroju po wprowadzeniu do organizmu, czyli właściwościami w zakresie: wchłaniania, dystrybucji, wydalania i toksyczności. Według badań zmian histomorfologicznych myszy leczonej BNBZ, które nie wykazały nieprawidłowości, można przypuszczać, że benitrobenrazyd również charakteryzuje się obiecującą niską toksycznością. W oparciu o dotychczasowe wyniki badań *in vitro* i *in vivo* można wnioskować, że pochodne obu związków wyjściowych Benz i BNBZ stanowią podstawę do dalszych modyfikacji ich struktury w celu otrzymania związków o polepszonych właściwościach inhibicyjnych. W niniejszej pracy podjęto się transformacji strukturalnej scharakteryzowanych wcześniej w literaturze inhibitorów HK2: benitrobenrazydu oraz benserazydu, w celu zoptymalizowania struktury związku wiodącego.

3. Część badawcza

3.1. Uzasadnienie tematu badań, założenia i cel pracy

Przytoczone w przeglądzie literaturowym liczne badania naukowe, wskazują na to, że enzym glikolityczny – HK2 stanowi potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu onkologicznym, szczególnie w przypadku nowotworów złośliwych. W literaturze znanych jest kilkanaście potencjalnych inhibitorów HK2, które przedstawiono w części literaturowej w rozdziale: 2.9. *Inhibitory heksokinazy 2*. Pomimo tego, że niektóre z tych związków zostały dobrze poznane i zbadane, nadal żaden ze zgłaszanych inhibitorów HK2, nie wywołuje znaczącego efektu terapeutycznego. Pewne nadzieje wiązano z dopuszczonym w niektórych krajach europejskich lekiem przeciwnowotworowym o nazwie Ionidamid. Nie został on jednak jeszcze zatwierdzony przez FDA ze względu na ograniczoną selektywność i skuteczność. Przeprowadzono badania kliniczne wśród najczęściej postulowanych w literaturze inhibitorów heksokinazy, takich jak 2-DG oraz 3-BrPa [57, 112]. Jednakże słaby profil farmakokinetyczny i farmakodynamiczny 2-DG [57] oraz toksyczność ogólnoustrojowa 3-BrPA [112] jest główną przyczyną ich niewystarczającej aktywności terapeutycznej [112]. Wykonanie licznych badań przedklinicznych oraz klinicznych nad inhibitorami glikolizy potwierdza istotność związków wpływających na aktywność HK2. Niemniej jednak, ze względu na słabe działanie i skutki uboczne tych związków, opracowanie nowych, małowcząsteczkowych substancji o skutecznej aktywności inhibicyjnej HK2 pozostaje nadal silną potrzebą w dziedzinie chemii medycznej.

Celem moich badań było zaprojektowanie i synteza N-acylowych pochodnych hydrazonów aldehydów mono- oraz polihydroksybenzoesowych, których atom azotu N-2 był acylowany kwasami benzoesowymi, kwasem propionowym lub aminokwasami. Otrzymane związki, ze względu na swoje podobieństwo strukturalne do Benz i BNBZ, mogą stanowić skuteczne inhibitory heksokinazy 2 (HK2) o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. Zsyntezowane pochodne poddano ocenie ich zdolności pod kątem hamowania heksokinazy 2 oraz wstępnych badań biologicznych pod względem aktywności przeciwnowotworowej.

Realizacja tego celu wymagała:

- Dokonania przeglądu literaturowego na temat znaczenia heksokinazy 2 w komórkach nowotworowych oraz inhibitorów HK2,
- Optymalizacji struktury znanych inhibitorów HK2 jakim są benserazyd oraz benitrobenrazyd,
- Zaprojektowanie w oparciu o przegląd literatury naukowej, biblioteki nowych pochodnych hydrazonów i hydrazydów aldehydów mono- oraz polihydroksybenzoesowych w celu określenia zależności SAR (Structure-Activity Relationship),
- Opracowanie nowych metod syntezy związków organicznych zawierających w swojej budowie ugrupowanie hydrazonowe i hydrazydowe oraz scharakteryzowanie ich pod względem fizykochemicznym (NMR, HRMS),
- Badania efektu inhibicyjnego wybranych, otrzymanych pochodnych w odniesieniu do HK2,
- Przetestowanie najbardziej obiecujących inhibitorów spośród syntezowanych związków w kierunku aktywności antyproliferacyjnej.

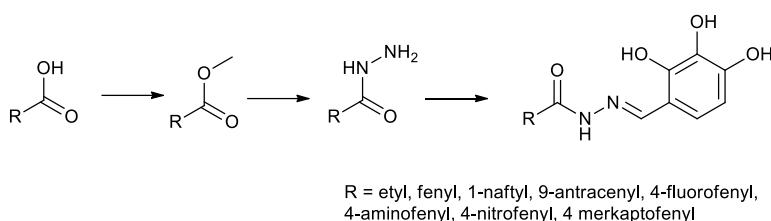
Zakres badań obejmujący syntezę związków poddanych ocenie aktywności hamowania HK2 dotyczył:

- Zmiany ilości oraz położenia grup hydroksylowych we fragmencie aromatycznym,
- Zastąpienia grupy nitrowej w strukturze BNBZ innymi grupami funkcyjnymi,

- Syntezy analogów benserazydu, w których seryna w benserazydzie została zastąpiona odmiennymi aminokwasami,
- Wprowadzenia różnych objętościowo podstawników aromatycznych oraz grupy etylowej w strukturze N-acylowych pochodnych hydrazonów 2,3,4-trihydroksybenzaldehydu,
- Redukcji wiązania iminowego w wybranych pochodnych N-acylowanych hydrazonów.

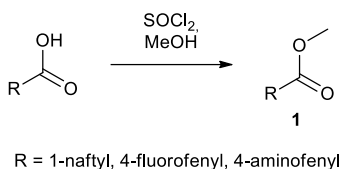
Wyselekcjonowane w badaniach związki mogą stać się punktem wyjścia do przyszłego opracowania nowych leków, które mogą usprawnić terapię przeciwnowotworową, zwłaszcza w przypadku szybko proliferujących nowotworów złośliwych.

3.2. Opracowanie metody syntezy 2,3,4-trihydroksybenzaldehydrazonów pochodnych kwasów aromatycznych oraz kwasu propionowego.



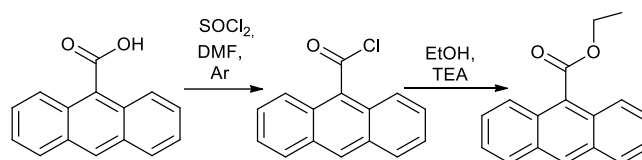
Schemat 14. Schemat reakcji otrzymywania N-acylowych pochodnych hydrazonów 2,3,4-trihydroksybenzaldehydu.

3.2.1. Otrzymywanie estrów kwasów aromatycznych



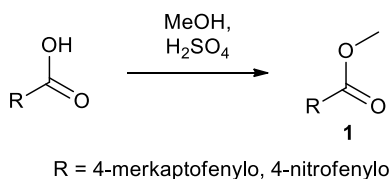
Schemat 15. Synteza odpowiednich estrów za pomocą reakcji z chlorkiem tionylu.

1-naftoesan metylu otrzymano w reakcji odpowiedniego kwasu z alkoholem wobec chlorku tionylu w temp. pokojowej lub wrzenia, metodą one-pot opisaną w literaturze [113]. Po 24 godzinach metanol odparowano z mieszaniny reakcyjnej, a pozostałość wylano do wodnego roztworu NaHCO_3 . Po wykonanej neutralizacji wytrącił się brunatny olej. Z tego względu, wykonano ekstrakcję octanem etylu. Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym MgSO_4 i następnie odparowano rozpuszczalnik uzyskując ester z 97% wydajnością jako brunatny olej. Ester metylowy kwasu 4-fluorobenzoesowego otrzymano według tej samej metody, jednakże po dodaniu chlorku tionylu reakcję prowadzono w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 24 godziny. Produkt wydzielono, po neutralizacji roztworem NaHCO_3 i ekstrakcji octanem etylu, jako bezbarwny olej o charakterystycznym zapachu z wydajnością 73%. W ten sam sposób, prowadząc reakcję w temperaturze pokojowej, otrzymano 4-aminobenzoesan metylu. W tym wypadku, w trakcie neutralizacji mieszaniny poreakcyjnej wytrącił się osad produktu, który po odsączeniu suszono pod zmniejszonym ciśnieniem, pomijając etap ekstrakcji. Otrzymano 4-aminobenzoesan metylu jako żółtawy osad z 85% wydajnością. Czystość otrzymywanych produktów potwierdzono analizą NMR i TLC (układ rozwijający 100% CHCl_3).



Schemat 16. Synteza estru kwasu antraceno-9-karboksylowego.

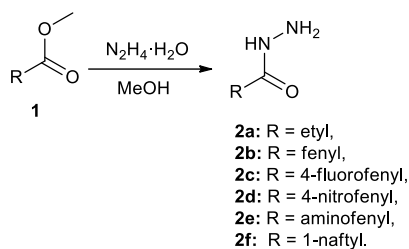
Reakcję estryfikacji z użyciem chlorku tionyłu próbowano zastosować w syntezie estru kwasu antraceno-9-karboksylowego, jednakże wydajność uzyskanego estru była niska (5%). Antraceno-9-karboksylan metylu otrzymano w dwuetapowej syntezie, w pierwszym etapie otrzymano chlorek kwasu antraceno-9-karboksylowego [114], w obecności nadmiaru chlorku tionyłu i niewielkiej ilości dimetyloformamidu jako katalizatora. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej w atmosferze argonu przez 4 godziny. W trakcie trwania reakcji, po dodaniu DMF kwas całkowicie się rozpuścił, a klarowny roztwór przybrał żółtą barwę. Po 4 godzinach usunięto SOCl_2 pod zmniejszonym ciśnieniem i przemyto pozostałość toluenem. Otrzymany pomarańczowy osad chlorku acylu estryfikowano etanolem w obecności trietyloaminy w temperaturze pokojowej 24 godziny. Po zakończonej reakcji, nadmiar etanolu usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem. Sól trietyloamoniową, DMF oraz pozostałości kwasu usunięto, przemywając roztwór estru w chloroformie wodą. Czysty produkt otrzymano stosując kolumnę chromatograficzną wypełnioną żelalem krzemionkowym, stosując 50% AcOEt:*n*-heksan, v/v jako eluent. Otrzymano ester etylowy kwasu antraceno-9-karboksylowego jako czerwony osad z wydajnością 90%.



Schemat 17. Synteza wybranych estrów metodą estryfikacji Fishera.

4-merkaptobenzoosan metylu otrzymano poprzez estryfikację z użyciem chlorku tionyłu oraz metanolu. Początkowo reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 12 godzin, jednakże z powodu braku konwersji kwasu do estru, reakcję kontynuowano przez następne 12 godzin w temperaturze wrzenia. Ester otrzymano z niską wydajnością 40%. W kolejnej próbie syntezy estru metylowego kwasu 4-merkaptobenzoosowego wykorzystano metodę estryfikacji Fishera opisaną w literaturze [115], która jest prostą oraz wydajną metodą otrzymywania estrów podstawionych kwasów aromatycznych. W tym celu do zawiesiny kwasu 4-merkaptobenzoosowego w metanolu wkroplono katalityczną ilość H_2SO_4 . Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia metanolu przez 24 godziny. W trakcie ogrzewania zawiesina kwasu powoli roztwarzała się, a po 12 godzinach całkowicie zanikła. Po zakończonej reakcji odparowano metanol, do pozostałości dodano octan etylu i otrzymany roztwór przemywano roztworem NaHCO_3 , a następnie wodą. Warstwę organiczną suszono nad Na_2SO_4 , kolejno odparowano uzyskując białawy osad będący oczekiwanym estrem z wydajnością 90%. 4-Nitrobenzoosan metylu również otrzymano metodą estryfikacji Fishera. Metodę zmodyfikowano na etapie wydzielenia produktu, gdzie mieszaninę reakcyjną po zakończeniu reakcji wylano do mieszającego się wodnego roztworu K_2CO_3 , neutralizując w ten sposób kwasy, których sole nieorganiczne łatwo rozpuszczają się w wodzie. W tych warunkach ester wytrąca się w postaci osadu, który łatwo można odsączyć. Czysty ester otrzymano z wydajnością 98%.

3.2.2. Otrzymywanie N-acylohydrazyn



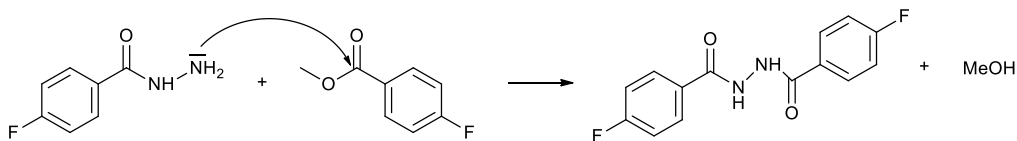
Schemat 18. Reakcja otrzymywania N-acylohydrazyn.

N-Acylohydrazyny (hydrazydy) **2** syntezowano z dobrą wydajnością (60-89%) w reakcji odpowiednich estrów z nadmiarem monohydratu hydrazyny w roztworze metanolu [116].

W przypadku otrzymywania hydrazydu kwasu propionowego **2a**, do roztworu propionianu metylu w metanolu dodano 98% monohydratu hydrazyny (4 ekw.). Mieszaninę reakcyjną początkowo mieszano w temperaturze pokojowej, jednak po 12 godz. stwierdzono znikomy przyrost produktu, reakcję kontynuowano w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez kolejne 24 godziny. Po zakończonej reakcji metanol odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, uzyskując oleistą pozostałość. Hydrazyd kwasu propionowego **2a** oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, elując 3% MeOH/CHCl₃ (v/v). Metoda ta pozwoliła w łatwy sposób oddzielić pozostałość estru metylowego kwasu propionowego oraz nadmiar hydrazyny, która jako ciecz polarna, tak silnie oddziałuje z powierzchnią sorbentu fazy stacjonarnej, że zastosowany układ elucyjny nie jest w stanie wymyć hydrazyny z kolumny. Frakcje z produktem odparowano i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem 12 godzin, uzyskując biały osad z 89% wydajnością.

Podczas syntezy benzohydazydu **2b**, komercyjnie dostępny benzoesan etylu rozpuszczony w etanolu traktowano 98% monohydratem hydrazyny (4 ekw.), w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Analiza TLC wskazywała nadal na obecność estru, dodano jeszcze jeden ekwiwalent hydrazyny i mieszano kolejne 24 godziny. Po tym czasie mieszaninę odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość krystalizowano z mieszaniny etanol:woda (1:2 v/v). Czysty produkt **2b** otrzymano w postaci białych płatków z wydajnością 77%.

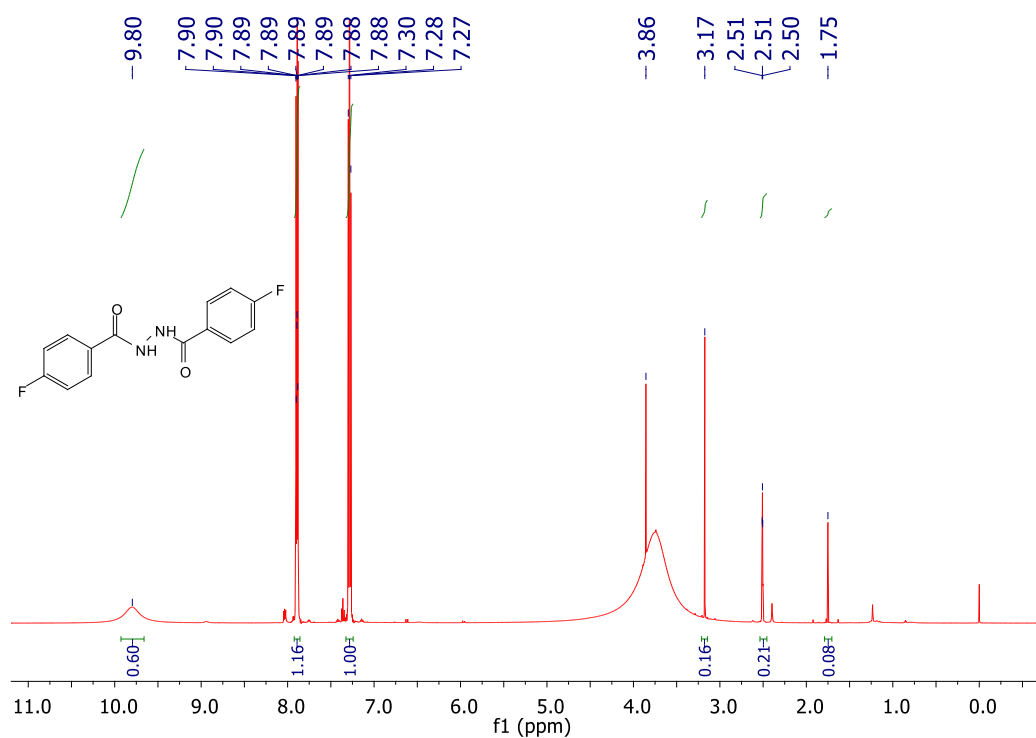
Fluorobenzohydazyd **2c** otrzymano przez mieszanie roztworu estru i 98% monohydratu hydrazyny (4 ekw.) w metanolu, w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 24 godz. Podczas monitorowania postępu reakcji za pomocą TLC (układ rozwijający 10% MeOH/CHCl₃) zaobserwowano, że w miarę upływu czasu powstaje produkt uboczny o wyższym niż docelowy produkt współczynnika R_f (R_f = 0,5). Współczynnik R_f produktu reakcji wynosi 0,25. Po zakończonej reakcji odparowano część metanolu z mieszaniny reakcyjnej i przesączono wytrącony osad, oceniając na podstawie TLC, że jest to głównie produkt uboczny o R_f = 0,5. Białawy osad zanalizowano za pomocą spektroskopii NMR, stwierdzając że jest to N,N'-bis(4-fluorobenzoylo)hydrazyna, powstająca w reakcji hydrazydu z estrem (Schemat 19).



Schemat 19. Schemat możliwej reakcji ubocznej zachodzącej podczas syntezy 4-Fluorobenzohydazydu.

Strukturę produktu ubocznego potwierdzają na widmie ¹H NMR (Rysunek 22) dwa multiplety protonów pochodzących od symetrycznych, pierścieni aromatycznych: 7.27-7.30 ppm i 7.88-7.90 ppm,

a także singlet przy przesunięciu 9.80 ppm, dwóch protonów grup amidowych oraz brak sygnału w okolicy 4.50 ppm pochodzący od protonów wolnej grupy NH₂ 4-fluorobenzohydrazynu. Dodatek 4-krotnego nadmiaru hydrazyny powinien zapobiec konkurencyjnej reakcji diacylowania. Powstanie produktu diacylowania mogło być spowodowane zastosowaną podwyższoną temperaturą reakcji. Próba otrzymania hydrazynu w temperaturze pokojowej zakończyła się jednak niepowodzeniem, po 72 godz. analiza TLC wykazała brak produktu. Ostatecznie hydrazyd **2c** otrzymano w wyniku ogrzewania reagentów przez 24 godziny, wydzielając go z mieszaniny poreakcyjnej poprzez dwukrotną krystalizację z mieszaniny rozpuszczalników H₂O:EtOH (2:1, v/v) uzyskując biały osad z wydajnością 60%.



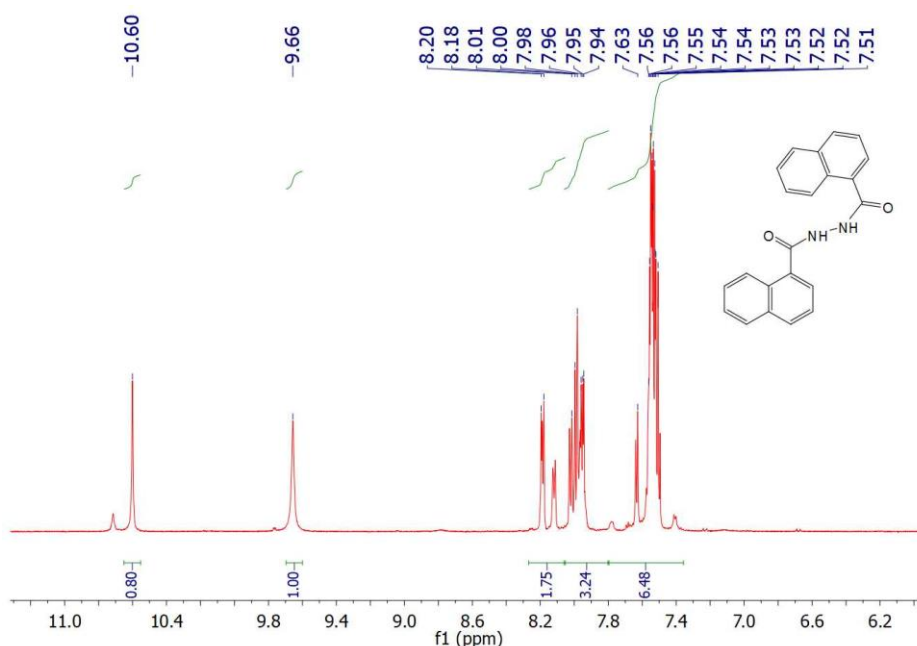
Rysunek 22. Widmo ¹H NMR (DMSO) N,N'-bis(4-fluorobenzoyl)hydrazyny.

Hydrazyd kwasu 4-nitrobenzoesowego **2d** otrzymano z wydajnością 65%, poprzez traktowanie trzykrotnym nadmiarem hydrazyny metanolowego roztworu 4-nitrobenzoesanu, w temperaturze pokojowej. Zastosowano łagodniejsze warunki reakcji niż przedstawiane w literaturze [111], prowadząc reakcję w temperaturze pokojowej oraz ograniczając ilość hydrazyny. Ponadto, ustalono maksymalny czas prowadzenia reakcji na 4 godziny, stwierdzając po wykonaniu dwóch równoległych eksperymentów, że wydłużenie czasu nie wpływa znacząco na konwersję substratu, a jedynie generuje powstawanie produktów ubocznych.

Zgodnie z danymi literaturowymi reakcję otrzymywania 4-aminobenzohydrazynu **2e** należy prowadzić przez 4 godziny we wrzącym etanolu z zastosowaniem 1,5 ekwiwalentu hydrazyny [117]. Niestety, w tych warunkach syntezy otrzymano produkt z wydajnością jedynie 24%. W celu optymalizacji metody syntezy, wydłużono czas ogrzewania mieszaniny reakcyjnej do 24 godzin oraz zastosowano 4 ekwiwalenty hydrazyny. Jednakże dłuższy czas reakcji, w podwyższonej temperaturze spowodował powstanie produktów ubocznych, trudnych do usunięcia poprzez krystalizację w metanolu. Ostatecznie, do roztworu 4-aminobenzoesanu metylu w metanolu dodano 6 ekwiwalentów monohydratu hydrazyny i mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 6 dni. Po 5 dniach z roztworu wypadł białawy osad. Stwierdzając brak jakichkolwiek zmian oraz brak dalszej konwersji substratu, odparowano rozpuszczalnik i mieszaninę krystalizowano. Początkowo

krystalizowano mieszaninę z metanolu, jednakże w wyniku dużych strat produktu, który przechodził do przesączu, zmieniono rozpuszczalnik na mieszaninę etanolu z wodą w stosunku objętościowym 2:1, a po krystalizacji mieszaninę umieszczono w zamrażalniku (-20°C), w celu całkowitego wykrystalizowania produktu. Otrzymano 4-aminobenzohydrazyd **2e** jako biały osad z wydajnością 60%.

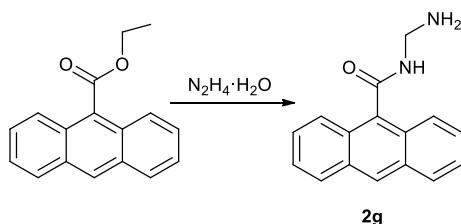
W syntezie 1-naftohydrazynu **2f** zastosowano w jednej porcji 5 ekwiwalentów monohydratu hydrazyny. Reakcję prowadzono w metanolu przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Analiza TLC wykazała niską konwersję substratu, reakcję kontynuowano w temperaturze wrzenia metanolu. Po 24 godzinach stwierdzono prawie całkowite zużycie 1-naftoesanu metylu i powstawanie produktów ubocznych. Odparowano mieszaninę reakcyjną pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość krystalizowano z mieszaniny rozpuszczalników etanol:woda 1:1 (v/v). Z powodu dalszego zanieczyszczenia produktu nadmiarem hydrazyny i pozostałością estru oraz sporymi stratami produktu podczas krystalizacji, podjęto próbę oczyszczania produktu za pomocą kolumny chromatograficznej na żelu krzemionkowym. Początkowo, do momentu zejścia z kolumny pozostałości estru, jako eluent zastosowano 100% CHCl₃, następnie zastosowano układ rozpuszczalników 10% CHCl₃:MeOH (v/v). Zebrana frakcja z oczekiwanym produktem została poddana analizie NMR. Na podstawie widma ¹H NMR oszacowano ilość 1-naftohydrazynu **2f** na 40%, ale nadal był on zanieczyszczony, prawdopodobnie hydrazyną oraz produktem ubocznym zawierającym protony aromatyczne. Frakcję tę oczyszczano jeszcze raz za pomocą PHPLC w układzie faz odwróconych z wykorzystaniem MeOH jako eluentu. Zebrano dwie frakcje, które analizowano za pomocą NMR. Jedna z frakcji była oczekiwanym hydrazylem z małymi zanieczyszczeniami niewiadomego pochodzenia. Druga frakcja zawierała produkt uboczny, który zidentyfikowano jako N,N'-bis(1-naftobenzoilo)hydrazynę (Rysunek 23). Co jest zgodne z wcześniejszymi rozważaniami na temat możliwej reakcji dipodstawienia estrów hydrazyną w warunkach reakcji prowadzonej w podwyższonej temperaturze.



Rysunek 23. Fragment widma ¹H NMR (DMSO) przedstawiający produkt uboczny: N'-(1-naftoilo)-1-naftohydrazyd, powstający w trakcie syntezy 1-naftohydrazynu.

Reakcje powtórzono, 1-naftoesan metylu rozpuszczono w metanolu, dodano monohydrat hydrazyny (4 ekw.) i mieszano w temperaturze pokojowej 4 dni. Tym razem nieco ograniczono ilość dodawanej hydrazyny, która wpływa na dalsze oczyszczenie produktu. Obniżona temperatura reakcji zminimalizowała powstawanie produktów ubocznych, co można było zaobserwować po analizie TLC

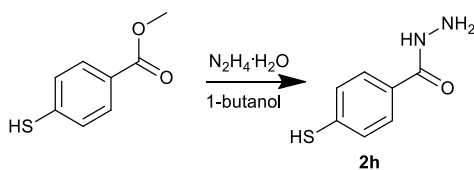
mieszaniny reakcyjnej. Po tym czasie odparowano metanol i pozostałość krystalizowano dwukrotnie z EtOH:H₂O w stosunku objętościowym 1:2, pozostawiając mieszaninę na 3 godziny w temp. -20°C do wykrystalizowania osadu. Otrzymano 1-naftohydrazyd **2f** jako biały osad z wydajnością 81%.



Schemat 20. Synteza antraceno-9-karbohydrazynu.

Synteza antraceno-9-karbohydrazynu **2g** wymagała zastosowania ostrzejszych warunków prowadzenia reakcji. Początkowo roztwór antraceno-9-karboksylationu metylu w metanolu zawierający 4 ekwiwalenty hydrazyny mieszano w temperaturze pokojowej przez 2 dni. Po stwierdzeniu braku postępu reakcji dodano kolejne 4 ekwiwalenty hydrazyny i ogrzewano 3 dni w temperaturze wrzenia metanolu. Po tym czasie roztwór odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość krystalizowano z wody. Otrzymano osad, który był w większości nieprzereagowanym antraceno-9-karboksylationem metylu, natomiast nieznaczna ilość produktu znajdowała się w przesączu.

Kolejną próbę syntezy hydrazynu wykonano bez użycia metanolu. Ester zmieszano z hydrazyną i mieszano w temperaturze pokojowej przez 3 dni. Na podstawie analizy TLC można było stwierdzić śladowe ilości powstającego produktu. W konsekwencji mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia hydrazyny przez kolejne 3 dni. Po tym czasie mieszaninę zatężono, a wypadnięty osad przesączono. Uzyskany osad oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Początkowo jako eluent zastosowano 100% CHCl₃, wymywając pozostałości nieprzereagowanego estru, kolejno eluowano mieszaniną rozpuszczalników 20% MeOH/CHCl₃ (v/v). Frakcje z oczekiwanym produktem analizowano za pomocą NMR, identyfikując antraceno-9-karbohydrazyd z czystością na poziomie około 90%, uzyskując produkt **2g** z wydajnością 60%. Doczyszczanie hydrazynu przeprowadzono za pomocą HPLC w układzie faz odwróconych stosując MeOH jako eluent.

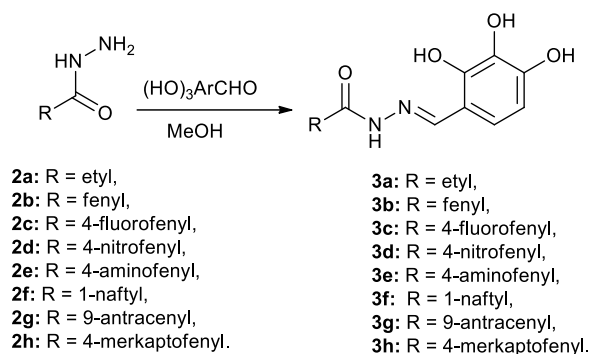


Schemat 21. Synteza 4-merkaptobenzohydrazynu.

4-Merkaptobenzoesan metylu poddano reakcji z 3 ekwiwalentami monohydratu hydrazyny w metanolu. Początkowo roztwór mieszano w temperaturze pokojowej przez 5 godzin, jednakże na podstawie TLC nie zauważono żadnego postępu reakcji. W konsekwencji dodano kolejne 3 ekwiwalenty hydrazyny i kontynuowano ogrzewanie mieszaniny reakcyjnej w temperaturze wrzenia metanolu. Po 12 godzinach z roztworu wypadł osad, który przesączono. Na podstawie analizy TLC okazało się, że wytrąconym osadem jest czysty substrat reakcji, natomiast docelowy produkt znajduje się w przesączu. Po odparowaniu przesączu, uzyskano śladowe ilości oczekiwanego hydrazynu. W kolejnej próbie otrzymywania 4-merkaptobenzohydrazynu **2h** do reakcji zastosowano 8 ekwiwalentów hydrazyny, ogrzewając mieszaninę w temperaturze wrzenia metanolu przez 5 dni. Niestety, w mieszaninie reakcyjnej nadal był obecny w większości ester. Wykonano kolejny eksperyment otrzymywania hydrazynu zgodnie z procedurą przedstawioną w literaturze [118]. 4-merkaptobenzoesan metylu

(1,78 mmol) rozpuszczono w nadmiarze hydrazyny (201,64 mmol) i ogrzewano w 100°C przez 3 godziny. Jednakże po upływie tego czasu na płytce TLC nadal można było zaobserwować nieprzereagowany substrat. Z tego powodu mieszaninę ogrzewano kolejne 21 godzin. Po tym czasie roztwór ochłodzono, dodano 10 ml wody, dodano roztwór 1M HCl do uzyskania pH około 6. Po kilku godzinach z roztworu wypadł osad, który zgodnie z literaturą miał być oczekiwanym produktem, jednakże okazał się być mieszaniną produktu oraz substratu. Osad przesączono i oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym z użyciem mieszaniny rozpuszczalników 5% MeOH/CHCl₃ (v/v) jako eluentu. Udało się wydzielić produkt **2h**, który według analizy NMR, nie był całkowicie czysty. Z tego powodu otrzymany hydrazyd krystalizowano z wody. Powstały osad zawierał 4-merkaptobenzoesan metylu oraz jego kwas, natomiast w przesączu znajdował się czysty 4-merkaptobenzohydrazyd. Przesącz pozostawiono do odparowania na powietrzu uzyskując białawy osad z wydajnością 40%. W kolejnej próbie otrzymywania 4-merkaptobenzohydrazydu, 4-merkaptobenzoesan metylu (1,78 mmol) rozpuszczono w 1-butanolu, dodano hydrazynę (201,64 mmol) i ogrzewano w 115°C przez 48 godzin. Po zakończonej reakcji wydzielono produkt **2h** w ten sam sposób jak opisano powyżej, pomijając proces ostatniej krystalizacji, uzyskując czysty, oczekiwany produkt **2h** z wydajnością 64%.

3.2.3. Otrzymywanie hydrazonów



Schemat 22. Synteza odpowiednich hydrazonów.

Finalnym etapem reakcji była kondensacja otrzymanych hydrazydów **2** z 2,3,4-trihydroksybenzaldehydem w celu otrzymania docelowych hydrazonów **3** jako analogów benitrobenrazydu.

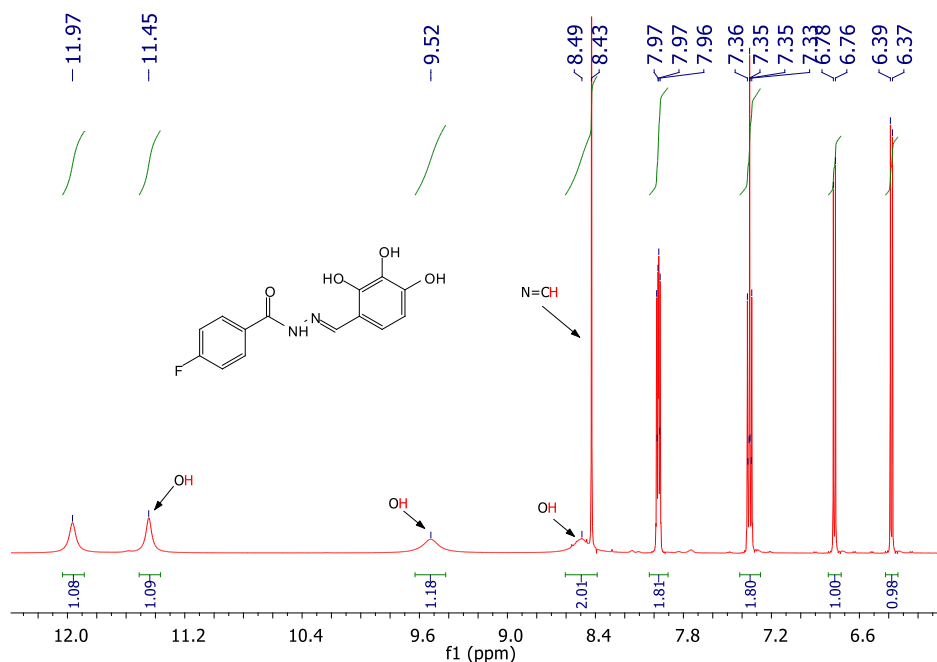
(*E*)-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)propionohydrazyd **3a** początkowo próbowano otrzymać w temperaturze pokojowej. Analiza TLC po 24 godzinach wskazywała na obecność substratów, z tego względu reakcję zaprzestano. W kolejnym eksperymencie 2,3,4-trihydroksybenzaldehyd (1,20 ekw.) dodano do mieszanego roztworu hydrazydu w bezwodnym metanolu. Roztwór mieszano w temperaturze 50°C przez 5 godzin, a następnie mieszano w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Roztwór przez cały czas trwania reakcji był klarowny w kolorze brunatnym. Już po 5 godzinach trwania reakcji, na podstawie analizy TLC stwierdzono prawie całkowity zanik substratów. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczano na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żelami krzemionkowymi. Podczas chromatografii zastosowano elucję gradientową polegającą na zwiększaniu siły elucyjnej fazy ruchomej w trakcie oczyszczania (3-90% MeOH/CHCl₃). Po odparowaniu rozpuszczalników z frakcji z oczekiwanym produktem, otrzymano osad w kolorze ciemnobrązowym hydrazonu **3a** w minimalnej ilości. Produkt w trakcie rozdziału chromatograficznego uległ zanieczyszczeniu, prawdopodobnie rozłożył się na kolumnie chromatograficznej, bądź też silnie związał się z powierzchnią sorbentu. W konsekwencji podjęto próbę krystalizacji (*E*)-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)propionohydrazydu z etanolu. W temperaturze -20°C

z etanolowego roztworu nie wykrystalizował oczekiwany produkt. Do roztworu dodano chloroform do całkowitego wytrącenia osadu. Przesączony, beżowy osad okazał się być produktem z małą ilością zanieczyszczeń. Ulepszono metodę oczyszczania hydrazonu **3a**, która polegała na rozpuszczeniu osadu w małej ilości mieszaniny rozpuszczalników EtOH:H₂O 2:1 (v/v), w temperaturze pokojowej i następnie wytrącenie produktu czterokrotnie większą objętością chloroformu w stosunku do objętości mieszaniny etanolu z wodą. Roztwór schłodzono do -20°C na 5 godzin, a uzyskany osad przesączono. Zrezygnowano z klasycznej krystalizacji, gdzie stosuje się temperaturę wrzenia rozpuszczalników, gdyż podwyższona temperatura powoduje rozpad (*E*)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)propionohydrazynu **3a** do wyjściowego aldehydu i hydrazynu. Zasady Schiffa charakteryzują się stosunkowo łatwą hydrolizą, której szybkość zależy od struktury iminy. W szczególności zasady Schiffa zawierające podstawniki alkilowe wykazują mniejszą trwałość, co tłumaczy trudności w otrzymaniu związku **3a**.

W przypadku hydrazonu **3b**, benzohydrazyn rozpuszczono w bezwodnym metanolu, następnie wprowadzono 2,3,4-trihydroksybenzaldehyd (1,0 ekw.) i mieszano w temperaturze pokojowej 48 godzin. Po upływie 2 godzin, z klarownego żółtego roztworu zaczął wypadać żółty osad. Po 48 godzinach trwania reakcji stwierdzono prawie całkowity zanik aldehydu. Roztwór zatężono i przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie osad krystalizowano z mieszaniny rozpuszczalników EtOH:H₂O 1:1 v/v, otrzymując osad (*E*)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazynu **3b** z wydajnością 85%.

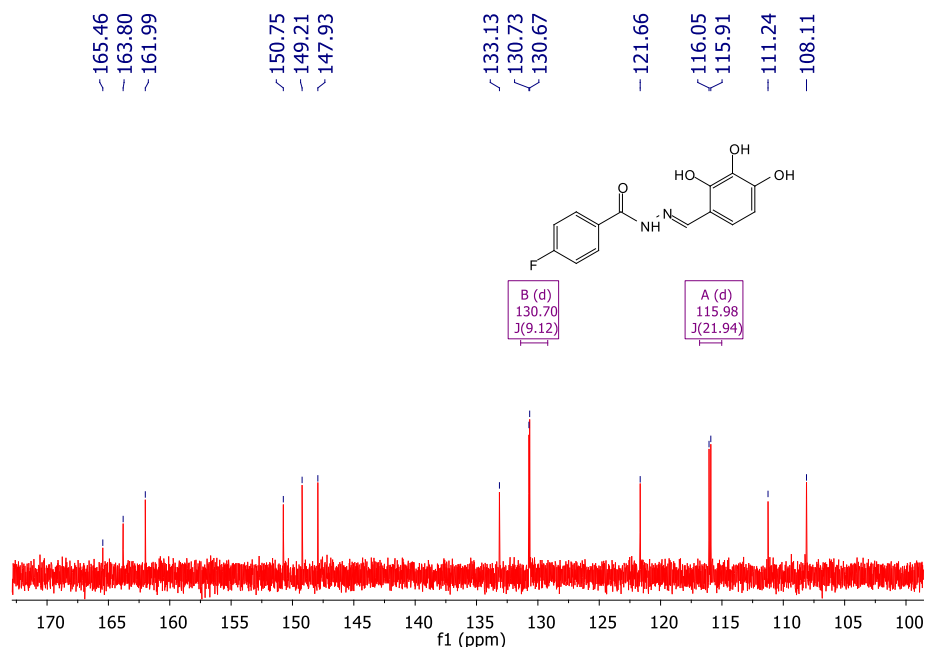
Według metody syntezy (*E*)-4-fluoro-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazynu **3c** opracowanej przez Kim i zespół [119], reakcja prowadzona była w temperaturze 30°C z 1,5 krotnym nadmiarem aldehydu, w stosunku do hydrazynu, przez 12 godz. Po odtworzeniu tych warunków reakcji, na podstawie analizy TLC (układ rozwijający 10% MeOH/CHCl₃), stwierdzono obecność nieprzereagowanych substratów. Z tego powodu powtórzono eksperyment w podwyższonej temperaturze, prowadząc reakcję w 50°C przez 5 godz. Ustalono, że hydrazyn wciąż nie uległ całkowitej konwersji, dlatego też temperaturę reakcji podwyższono do 60°C, prowadząc ją przez 12 godz. Po tym czasie klarowna, brunatna mieszanina reakcyjna, zmieniła barwę na ciemnobrązową oraz powstał czarny, lepki osad. Próbowano wydzielić z mieszaniny produkt reakcji poprzez krystalizację, początkowo w mieszaninie rozpuszczalników EtOH:H₂O (1:1, v/v), jednak skutkowało to otrzymaniem osadu o barwie brązowej zanieczyszczonego aldehydem oraz prawdopodobnie produktami jego rozkładu. Powtórzono krystalizację wydzielonego osadu z zastosowaniem eteru naftowego, jednakże w tych warunkach osad się nie rozpuścił.

Podjęto kolejną próbę syntezy (*E*)-4-fluoro-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazynu **3c** w zmienionych warunkach. 4-Fluorobenzohydrazyn rozpuszczono w bezwodnym metanolu, dodano 2,3,4-trihydroksybenzaldehyd (1,2 ekw.) i mieszano w temperaturze pokojowej w atmosferze argonu przez 24 godziny. Zastosowano nieco mniejszy nadmiar aldehydu ze względu na trudności związane z usuwaniem pozostałości nieprzereagowanego odczynnika podczas procesu oczyszczania. W miarę trwania reakcji z brunatnego klarownego roztworu mieszaniny wytrącał się beżowy osad. Po zakończonej reakcji odparowano metanol i pozostałość krystalizowano z mieszaniny rozpuszczalników EtOH: H₂O (1:1; v/v). Proces krystalizacji przeprowadzono dwukrotnie, ze względu na obecność w osadzie po pierwszej krystalizacji pozostałości aldehydu. Otrzymano beżowy osad produktu **3c** z wydajnością 85%. Analiza ¹H NMR potwierdziła strukturę produktu po krystalizacji oraz obecność jednego izomeru geometrycznego *E*. Na przedstawionym poniżej widmie (Rysunek 24) można zaobserwować pojedynczy singlet przy 8.43 ppm, pochodzący od protonu połączony z węglem iminowym N=CH oraz rozmyty singlet przy przesunięciu równym 11.45 ppm, który pochodzi od grupy hydroksylowej położonej w pozycji orto, co potwierdza występowanie pojedynczego izomeru *E*.



Rysunek 24. Widmo ^1H NMR (DMSO) (*E*)- N' -(2,3,4-trihydroksybenzylideno)-4-fluorobenzohydrazidu.

Ponieważ Fluor-19, posiada podobnie jak wodór i węgiel spin jądrowy równy 0,5, na widmie ^{13}C NMR widać sprzężenia ^{19}F - ^{13}C . Prawdopodobnie są to sprzężenia przez 2 lub przez 2 i 3 wiązania, gdyż stała sprzężenia $J(^{19}\text{F} - ^{13}\text{C})$ wynosi około 22 Hz, a druga około 10 Hz. Sprzężenie $^1J(^{19}\text{F} - ^{13}\text{C})$ przyjmuje wartości 160-400 Hz, więc trudno określić czy piki pochodzą od sygnałów konkretnych węgli, czy są to sprzężenia między węglem a fluorem. Na widmie ^1H NMR trudno stwierdzić występowanie konkretnych sprzężeń wodoru z fluorem, ponieważ w tym obszarze, gdzie przypuszczalnie występują sprzężenia ^{19}F - ^1H można zaobserwować multiplety pochodzące od protonów aromatycznych.



Rysunek 25. Widmo ^{13}C NMR (DMSO) (*E*)- N' -(2,3,4-trihydroksybenzylideno)-4-fluorobenzohydrazidu **3c**.

Kondensacja hydrazidu kwasu 4-nitrobenzoesowego **2d** z aldehydem 2,3,4-trihydroksybenzoesowym nie zachodzi w temperaturze pokojowej, tak jak podają to autorzy publikacji

grupy badawczej Liu [111], koniecznym było zastosowanie podwyższonej temperatury reakcji. Reakcję prowadzono w temperaturze 50°C przez 24 godziny. Otrzymano oczekiwany BNBZ **3d** z wydajnością 53% oczyszczając go poprzez dwukrotną rekrytalizację z etanolu.

W celu otrzymania 4-amino-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazidu **3e**, 2,3,4-trihydroksybenzaldehyd rozpuszczono w bezwodnym metanolu i dodano 4-aminobenzohydrazdu **2e**, mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Po dwukrotnym przeprowadzeniu syntezy docelowej pochodnej **3e** stwierdzono, że wydłużenie czasu reakcji nie wpływa na konwersję substratu, natomiast użycie mniejszej objętości rozpuszczalnika może nieco podwyższyć wydajność otrzymywania hydrazidu. Powstały brunatny osad przesączono, a na podstawie analizy TLC stwierdzono, że ciemnobrązowy przesącz zawiera większość nieprzereagowanych substratów. Produkt **3e** oczyszczono przez rekrytalizację z EtOH:H₂O (2:1, v/v) otrzymując 4-amino-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazdu **3e**, w postaci beżowego ciała stałego z wydajnością 72%.

(E)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)-1-naftohydrazdu **3f** otrzymano w reakcji 1-naftohydrazdu z 2,3,4-trihydroksybenzaldehydem (1,2 ekw) w roztworze metanolowym i mieszanym w temperaturze pokojowej 3 dni. Po odparowaniu metanolu z roztworu otrzymano zielony osad. Otrzymałą pozostałość próbowano oczyścić za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, przepuszczając mieszaninę przez małą warstwę żelu krzemionkowego z użyciem 10% MeOH/CHCl₃ jako eluentu. Niestety, nawet pochodne 2,3,4-trihydroksybenzaldehydu, które posiadają w swojej strukturze dwa pierścienie benzenowe, obniżając w konsekwencji polarność całej cząsteczki, trudno jest oczyścić na kolumnie chromatograficznej. Po elucji uzyskano małą ilość zanieczyszczonego produktu **3f** w formie brunatnego osadu. W kolejnej próbie syntezy (E)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)-1-naftohydrazdu, hydrazdu rozpuszczono w bezwodnym metanolu oraz dodano równomolową ilość 2,3,4-trihydroksybenzaldehydu (1,0 ekw.). Klarowny, brunatny roztwór mieszano w temperaturze pokojowej 24 godziny. Po 5 godzinach trwania reakcji zaczął wypadać kremowy osad. Analiza TLC wskazała na prawie całkowity zanik substratów, wytworzony podczas reakcji osad przesączono. Stwierdzono, że większość pozostałości nieprzereagowanych substratów pozostało w przesączu. Uzyskany osad jeszcze raz zawieszono w bezwodnym metanolu i mieszano w temperaturze pokojowej 24 godziny, następnie przesączono uzyskując czysty (E)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)-1-naftohydrazdu **3f** z wydajnością 69% w formie żółtawego ciała stałego.

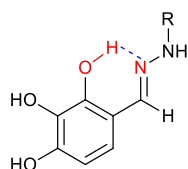
W przypadku otrzymywania (E)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)antraceno-9-karbohydrazdu **3g** wstępnie sprawdzono, czy reakcja kondensacji trihydroksybenzaldehydu z antraceno-9-karbohydrazdem zachodzi w temperaturze pokojowej. Na podstawie analizy TLC, po 24 godzinach trwania reakcji, stwierdzono, że hydrazon **3g** praktycznie nie powstaje. W rezultacie reakcję prowadzono w podwyższonej temperaturze. W tym celu antraceno-9-karbohydrazdu rozpuszczono w metanolu i kolejno dodano 2,3,4-trihydroksybenzaldehyd (1,2 ekw.). Mieszaninę mieszano i ogrzewano przez 24 godziny. Po tym czasie, pomimo braku całkowitego przereagowania substratów, w mieszaninie reakcyjnej zaczęła się wydzielać żywiczna, ciemnobrązowa maź, która prawdopodobnie wynikała z rozłożenia 2,3,4-trihydroksybenzaldehydu. Przerwano reakcję i roztwór zdekantowano, oddzielając ciemnobrązową maź z mieszaniny reakcyjnej, a następnie odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, uzyskując pozostałość w formie brązowej pianki. Podjęto próbę wydzielania (E)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)antraceno-9-karbohydrazdu **3g** poprzez krystalizację otrzymanej pozostałości w etanolu lub mieszaninie etanolu z wodą. Najlepszą metodą krystalizacji, powodującą najmniejsze straty oraz pozwalającą na uzyskanie najczystszej postaci produktu reakcji, była krystalizacja z mieszaniny EtOH:H₂O 1:2 (v/v). Związek po wstępnej krystalizacji dodatkowo oczyszczono za pomocą HPLC z odwróconym układem faz ODS, stosując 100% metanol jako eluent z natężeniem przepływu 14 ml/min. Procedura ta pozwoliła na otrzymanie czystego (E)-N'-(2,3,4-

trihydroksybenzylideno)antraceno-9-karbohydrazynu **3g** w postaci beżowego osadu z wydajnością 50%.

4-Merkaptobenzohydrazyd (0,9 mmol) kondensowano z 1,2 ekw. 2,3,4-trihydroksybenzaldehydem w metanolu w temperaturze pokojowej w celu zyskania hydrazonu **3h**. Po 1 godzinie trwania reakcji wytrącił się beżowy osad, natomiast już po 3 kolejnych godzinach, powstała ciemnobrunatna żywiczna, lepka substancja. Podejrzewając rozkład trihydroksybenzaldehydu zakończono reakcję, metanol wraz z beżowym osadem przeniesiono do osobnej kolby i odparowano, pozostawiając żywiczną substancję w kolbie reakcyjnej. Na podstawie NMR, stwierdzono, że odparowana pozostałość zawiera docelowy produkt **3h**, jednakże w bardzo małej ilości, resztę stanowił aldehyd. Zbadano również żywiczną substancję za pomocą spektroskopii NMR, stwierdzając, że jest to 2,3,4-trihydroksybenzaldehyd wraz z produktami jego rozkładu. W następnym eksperymencie 4-merkaptobenzohydrazyd rozpuszczono w THF, dodano 2,3,4-trihydroksybenzaldehyd (1,2 ekw.) i reakcję prowadzono w atmosferze argonu przez 6 godzin. Po tym czasie odparowano THF, otrzymując brunatną pozostałość, którą oczyszczano za pomocą HPLC z odwróconym układem faz ODS, stosując metanol jako eluent. Na podstawie spektroskopii rezonansu jądrowego oszacowano wydajność otrzymanego produktu na poziomie 15%, jednakże nie udało się wydzielić czystego produktu **3h**.

3.3. Izomeria geometryczna oraz tautomeria keto-enolowa w syntezowanych zasadach Schiffa

Otrzymane hydrazony ze względu na obecność w strukturze wiązania iminowego (-N=CH-) blokującego swobodną rotację, mogą występować w postaci dwóch izomerów geometrycznych *E* i *Z*. Pod wpływem światła oraz temperatury wiązanie podwójne N=C zmniejsza swój charakter podwójnego wiązania iminowego, co sprzyja izomeryzacji *E/Z* [120], [121]. W przypadku hydrazonów posiadających grupę hydroksylową w pozycji orto fragmentu benzenowego związek przyjmuje konformację *E*, stabilizowaną utworzonym wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem wodorowym pomiędzy grupą hydroksylową 2-OH, a atomem azotu iminy [122] (Rysunek 26).

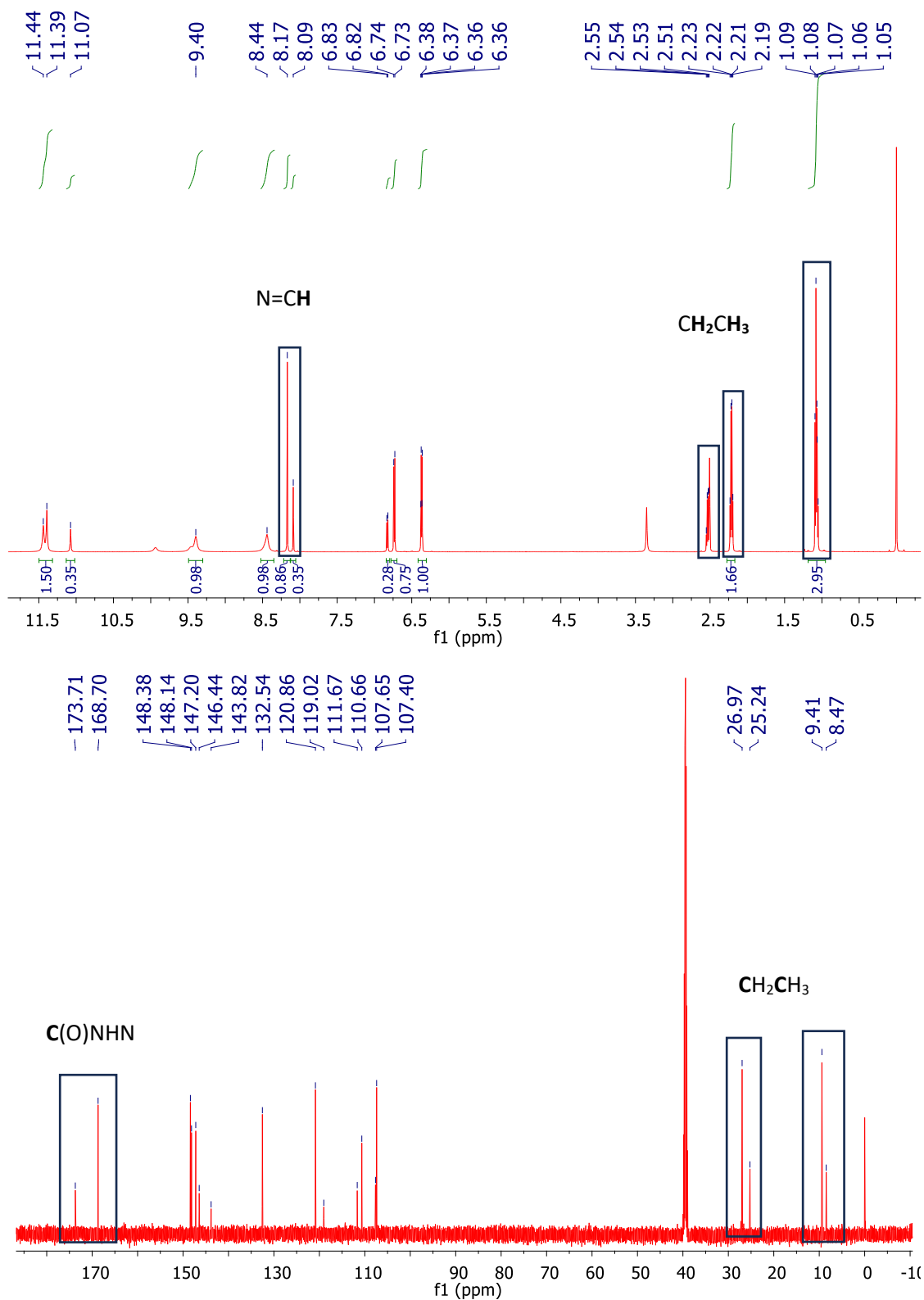


Rysunek 26. Oddziaływanie wewnątrzcząsteczkowe w hydrazonie aldehydu 2,3,4-trihydroksybenzoesowego.

Hipotezę tę potwierdzono obliczeniami chemicznymi oraz analizą NMR. Za pomocą obliczeń kwantowo chemicznych opartych o teorię funkcjonału gęstości elektronowej (DFT) zbadano, czy istnieje równowaga pomiędzy konformerami *E* i *Z* dla (*E*)-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)propionohydrazynu **3a**. Symulacje z utworzeniem wiązania wodorowego wykazały wyższą stabilność izomeru *E* niż *Z*. W przypadku izomeru *E* wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe pomiędzy protonem grupy hydroksylowej, a azotem występującym w wiązaniu iminowym (N=C) ma długość 2,1 Å, a siła wiązania wodorowego w konfiguracji *E* (wartość entalpii Gibbsa dla izomeru *E*: -500421,1050 kcal/mol) jest o około 7 kcal/mol korzystniejsza niż izomeru *Z* (wartość entalpii Gibbsa dla izomeru *Z*: -500414,3093 kcal/mol), co jest zgodne z umiarkowaną siłą wiązań wodorowych opisanych w literaturze [123]. Na tej podstawie można przypuszczać preferencyjne powstawanie konformeru *E* dla *N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)propionohydrazynu.

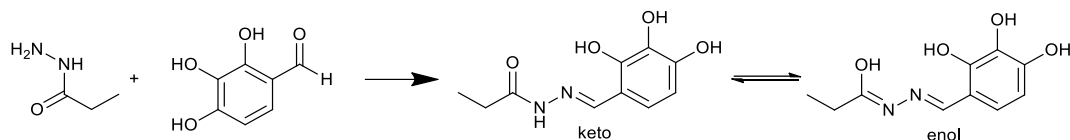
Spektroskopia ¹H NMR wykonana dla syntezowanych pochodnych hydrazonów 2,3,4-trihydroksybenzaldehydu potwierdziła wyniki obliczeń teoretycznych. Protony grup 3-OH i 4-OH dają

sygnały w postaci singletów przy δ 8.4–9.6 ppm, podczas gdy sygnał protonu grupy 2-OH jest przesunięty w stronę niższego pola i występuje w obszarze δ 11.0–12.4 ppm. Zmianę przesunięcia chemicznego dla grupy 2-OH w kierunku niższego pola przypisano utworzeniu się wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego.



Rysunek 27. Widmo ^1H NMR oraz ^{13}C NMR (DMSO) sugerujące występowanie dwóch izomerów konstytucyjnych hydrazonu **3a**.

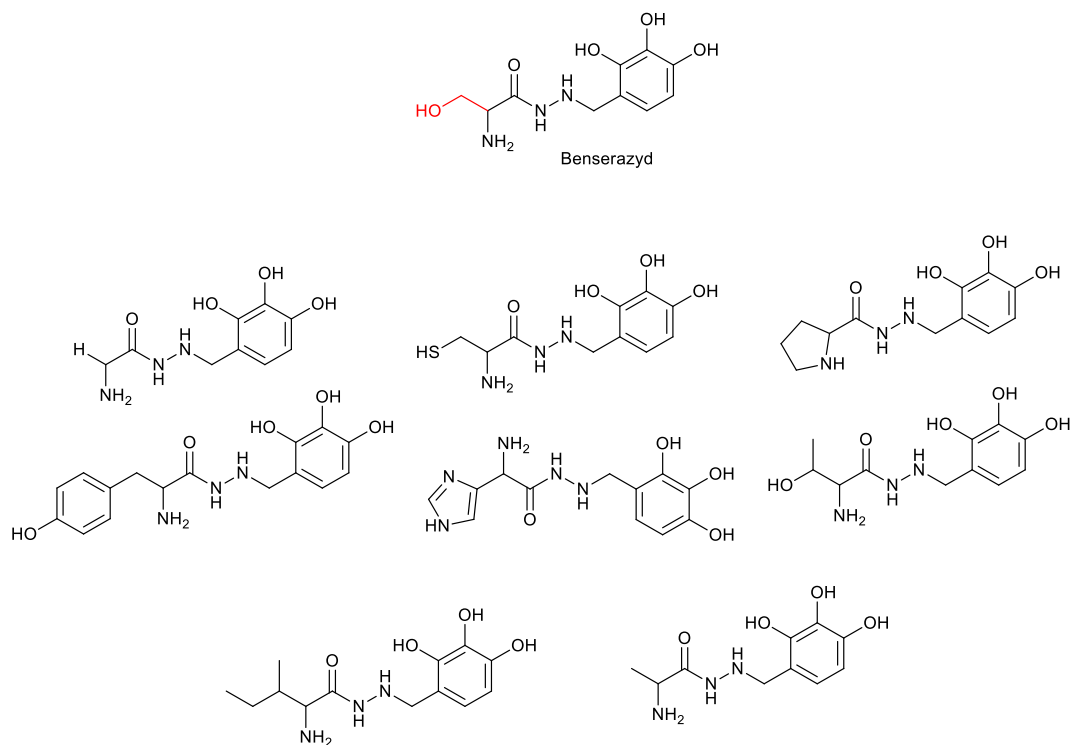
Na widmie ^1H NMR hydrazonu **3a** w DMSO zaobserwowano podwójne sygnały chemiczne dla protonu iminowego ($\text{N}=\text{CH}$) odpowiednio przy 8.09 i 8.17 ppm, natomiast protony grupy etylowej ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$) występowały w postaci dwóch trypletów w zakresie 1.05–1.09 ppm i dwóch kwartetów w zakresie 2.19–2.23 i 2.51–2.54. Na widmie ^{13}C NMR zidentyfikowano podwójne sygnały przy przesunięciu 173.71 i 168.70 ppm pochodzące od atomu węgla amidowej grupy karbonylowej ($-\text{C}(\text{O})\text{NHN}-$). Sygnały dla węgla z grup etylowych (CH_2CH_3) występowały odpowiednio przy 8.47 i 9.41 ppm oraz 25.24 i 26.97 ppm. Widma te sugerują istnienie innej cechy strukturalnej hydrazonu **3a**, a mianowicie tautomerii keto-enolowej (Schemat 23).



Schemat 23. Równowaga keto-enolowa w (*E*)-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)propionohydrazynie.

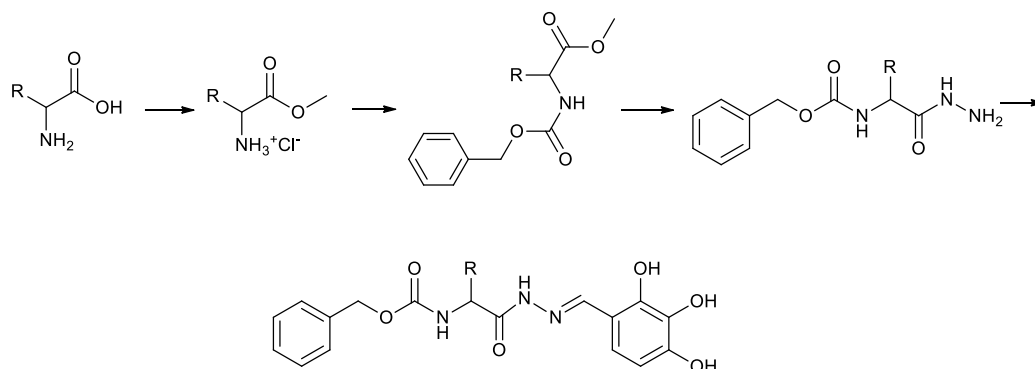
Do ilościowego określenia energii wolnej Gibbsa dla konstytucyjnych izomerów hydrazonu **3a** wykorzystano obliczenia chemii kwantowej z wykorzystaniem DFT. Zgodnie z obliczeniami wykonanymi na danych zebranych bez uwzględniania rozpuszczalnika, tautomer ketonowy jest bardziej preferowany niż tautomer enolowy, jest termodynamicznie bardziej stabilny niż postać enolowa o około 11 kcal/mol. Jednak z obliczeń przeprowadzonych z uwzględnieniem obecności DMSO wynika, że proces solwatacji zmienia energię swobodną Gibbsa obu tautomerów. Przeprowadzone obliczenia wyraźnie wskazują, że w polarnym rozpuszczalniku aprotycznym, takim jak DMSO, forma enolowa jest bardziej stabilna o 5 kcal/mol w porównaniu z formą ketonową, ze względu na oddziaływanie enolowej grupy OH z atomem tlenu sulfotlenku dimetylu.

3.4. Opracowanie metody syntezy 2,3,4-trihydroksybenzaldhydrazonów pochodnych *N*-benzyloksykarbonyloaminokwasów.



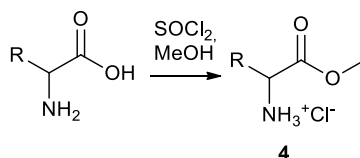
Rysunek 28. Planowana optymalizacja benserazydu poprzez zastąpienie układu seryny w benserazydzie odmiennymi aminokwasami.

W ramach przeprowadzanych badań syntezowano 2,3,4-trihydroksybenzaldehydrazony pochodnych aminokwasów, które stanowiły substraty w następnym etapie badań jakim była redukcja wiązania azometinowego hydrazonów, w celu otrzymania analogów znanego inhibitora HK2 - benserazydu (Rysunek 28). Seryna będąca aminokwasem obecnym w strukturze benserazydu została wymieniona na inne aminokwasy, znacznie różniące się łańcuchem bocznym, zawierającym w swojej strukturze ugrupowania alifatyczne lub aromatyczne, heterocykliczne bądź zawierające charakterystyczne układy takie jak pierścień imidazolowy lub grupa tiolowa. Poniżej przedstawiono schemat otrzymywania 2,3,4-trihydroksybenzaldehydrazonów pochodnych N-benzylloksykarbonyloaminokwasów.



Schemat 24. Ogólna synteza 2,3,4-trihydroksybenzaldehydrazonów pochodnych aminokwasów.

3.4.1. Otrzymywanie estrów aminokwasów



R - łańcuch boczny aminokwasów: L-seryny, glicyny, L-alaniny, L-cysteiny, L-tyrozyny, L-proliny, L-histydyny, L-treoniny, L-izoleucyny

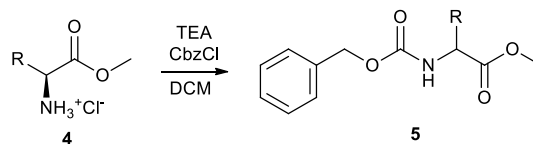
Schemat 25. Synteza estrów aminokwasów.

Wszystkie estry metylowe odpowiednich aminokwasów syntezowano według znanej metody estryfikacji aminokwasów [124] z wykorzystaniem chlorku tionyłu i metanolu. Aminokwasy w nieodwracalnej reakcji z SOCl_2 przekształcają się w bardziej reaktywne chlorki kwasowe, które szybko reagują z obecnym w mieszaninie reakcyjnej alkoholem, tworząc odpowiednie estry. Reakcję prowadzono w bezwodnym metanolu (33,3 ekw. względem aminokwasu), stosując mały nadmiar SOCl_2 w stosunku do aminokwasu (1,1 ekw.). Chlorek dodawano porcjami do roztworu aminokwasu w metanolu w 0°C , po czym mieszanie kontynuowano w temperaturze pokojowej przez 24 godz. Po zakończeniu reakcji nadmiar metanolu odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Chlorowodorki estru metylowego aminokwasu otrzymano w postaci ciała stałego.

Otrzymany osad rozpuszczono ponownie w bezwodnym metanolu i odparowano. Ten proces powtórzono 3-krotnie w celu wstępnego usunięcia kwaśnych produktów ubocznych reakcji takich jak: SO_2 i HCl . Chlorowodorek estru metylowego aminokwasu suszono pod zmniejszonym ciśnieniem przez 12 godzin i następnie użyto w kolejnym etapie reakcji bez dodatkowego oczyszczania. Powyższa procedura otrzymania estru metylowego w temperaturze pokojowej, nie jest możliwa w przypadku otrzymania estru metylowego glicyny oraz proliny, gdzie podczas syntezy konieczne było prowadzenie

reakcji w temperaturze wrzenia metanolu przez dwa dni. Dla estru metylowego tyrozyny konieczne było wydłużenie czasu reakcji do 72 godzin. Po 24 godzinach w temperaturze pokojowej kwas nie przereagował całkowicie, a w wyniku ogrzewania mieszaniny reakcyjnej powstawały produkty uboczne.

3.4.2. Otrzymywanie estrów N-Cbz-aminokwasów



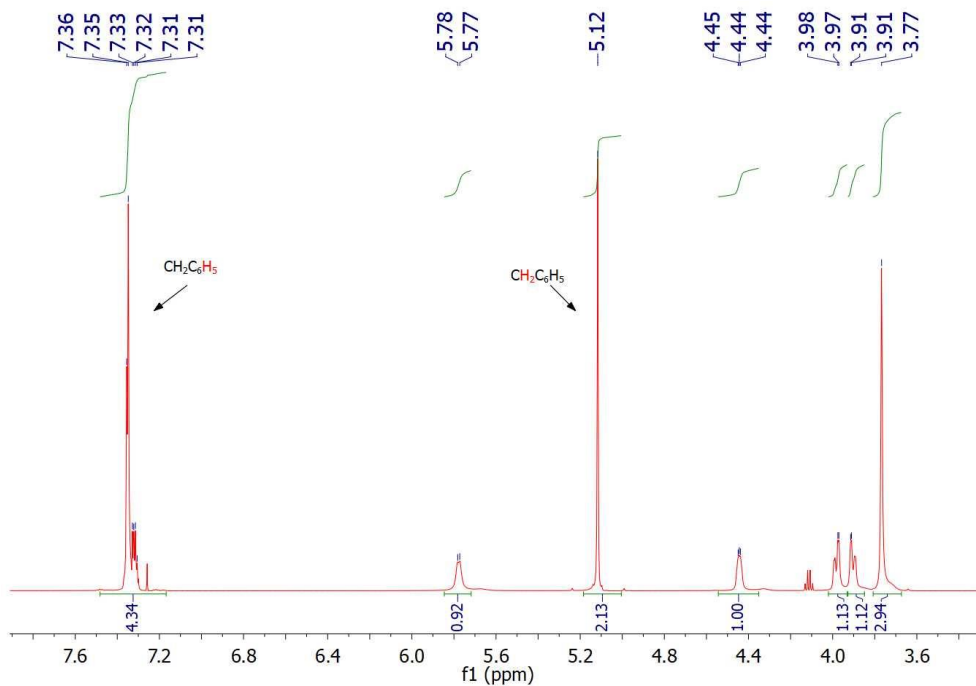
R - łańcuch boczny aminokwasów: L-seryny, glicyny, L-alaniny, L-cysteiny, L-tyrozyny, L-proliny, L-histydyny, L-treoniny, L-izoleucyny

Schemat 26. Zabezpieczenie grupy aminowej estrów aminokwasów za pomocą grupy benzyloksykarbonylowej.

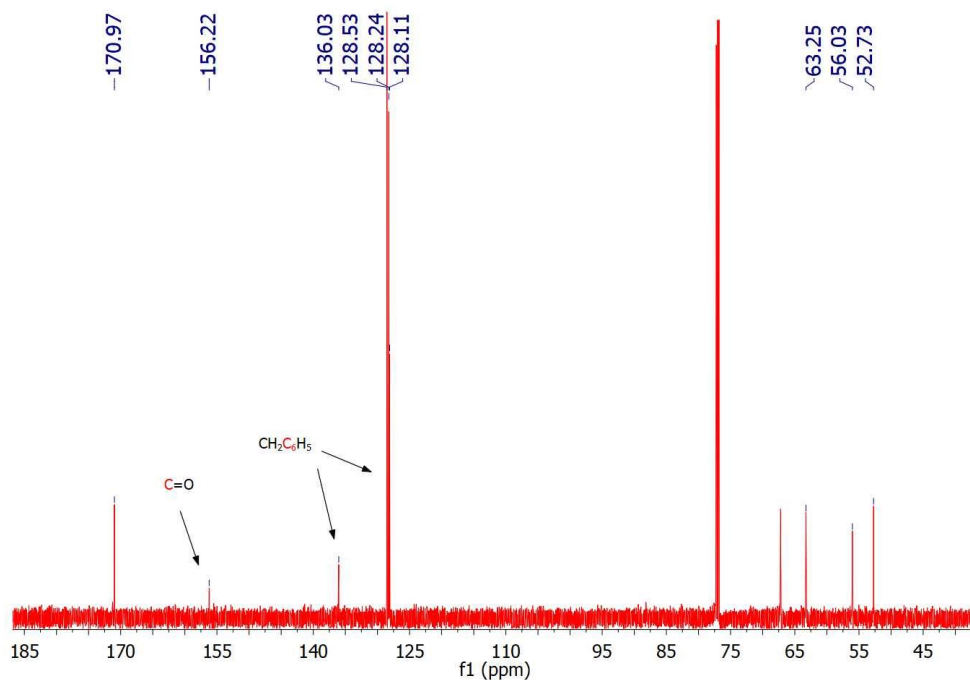
Kolejnym etapem reakcji było zabezpieczenie nukleofilowej grupy aminowej estru metylowego aminokwasu. Jest to istotny etap syntezy N-acylohydrazonów, ponieważ atom azotu wolnej grupy NH₂ estru aminokwasu, jako nukleofil, może atakować karbonylowy atom węgla aldehydu, w konsekwencji dając niepożądane produkty uboczne. Do zabezpieczenia grupy aminowej estrów metylowych zastosowano łatwo odchodzącą grupę benzyloksykarbonylową (Cbz). Przy wyborze tej grupy protekcyjnej kierowano się możliwością równoczesnego jej usunięcia, podczas ostatniego etapu syntezy analogów benserazydu, jakim jest katalityczna redukcja wiązania podwójnego C=N w obecności katalizatora. Jak wiadomo rozszczepienie grupy benzyloksykarbonylowej w karbaminianach zachodzi z wysoką wydajnością w warunkach katalitycznego uwodornienia. Zabezpieczenie grupy aminowej przeprowadzono za pomocą chloromrówczanu benzylu na podstawie znanej metody opisanej w literaturze [124]. Procedurę zabezpieczania grupy aminowej estru seryny, zmodyfikowano stosując zamiast wody dichlorometan (DCM), który dobrze rozpuszcza substraty reakcji, nie powodując rozkładu chloromrówczanu benzylu, ulegającego hydrolizie w wodzie. Zastąpiono także nieorganiczną zasadę wodorowęglan sodu, organiczną zasadą jaką jest trietyloamina (TEA).

Chlorowodorek estru metylowego aminokwasu **4** (25,0 mmol) w dichlorometanie zawierającym trietyloaminę (2,5 ekw.), ochłodzono do 0°C i dodano chloromrówczan benzylu (1,2 ekw.). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 12 godzin, następnie dodano do niej wodę w celu zatrzymania reakcji, rozpuszczenia wszystkich soli i hydrolizy pozostałości chloromrówczanu benzylu. Warstwę organiczną zawierającą produkt przemyto nasyconym roztworem NaHCO₃, kolejno wodą i suszono nad bezwodnym Na₂SO₄. Następnie zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono na kolumnie z żelem krzemionkowym, stosując mieszaninę AcOEt:*n*-heksan, 1:1 v/v, otrzymując przeważnie bezbarwne oleje jako estry metylowe Cbz-L-aminokwasów **5**.

Zabezpieczenie grupy aminowej potwierdzono spektroskopią NMR. Na widmie ¹H NMR dla estru metylowego Cbz-L-seryny pojawił się singlet przy przesunięciu 5.12 ppm pochodzący od dwóch protonów metylenowych grupy benzylowej oraz sygnały protonów pierścienia aromatycznego w obszarze 7.31-7.36, potwierdzając obecność grupy Cbz. Natomiast na widmie ¹³C NMR można zaobserwować sygnał należący do węgla grupy karbonylowej Cbz przy przesunięciu 156.22 ppm oraz 4 sygnały pochodzących od węgli układu aromatycznego: 128.11, 128.24, 128.53, 136.03 ppm.



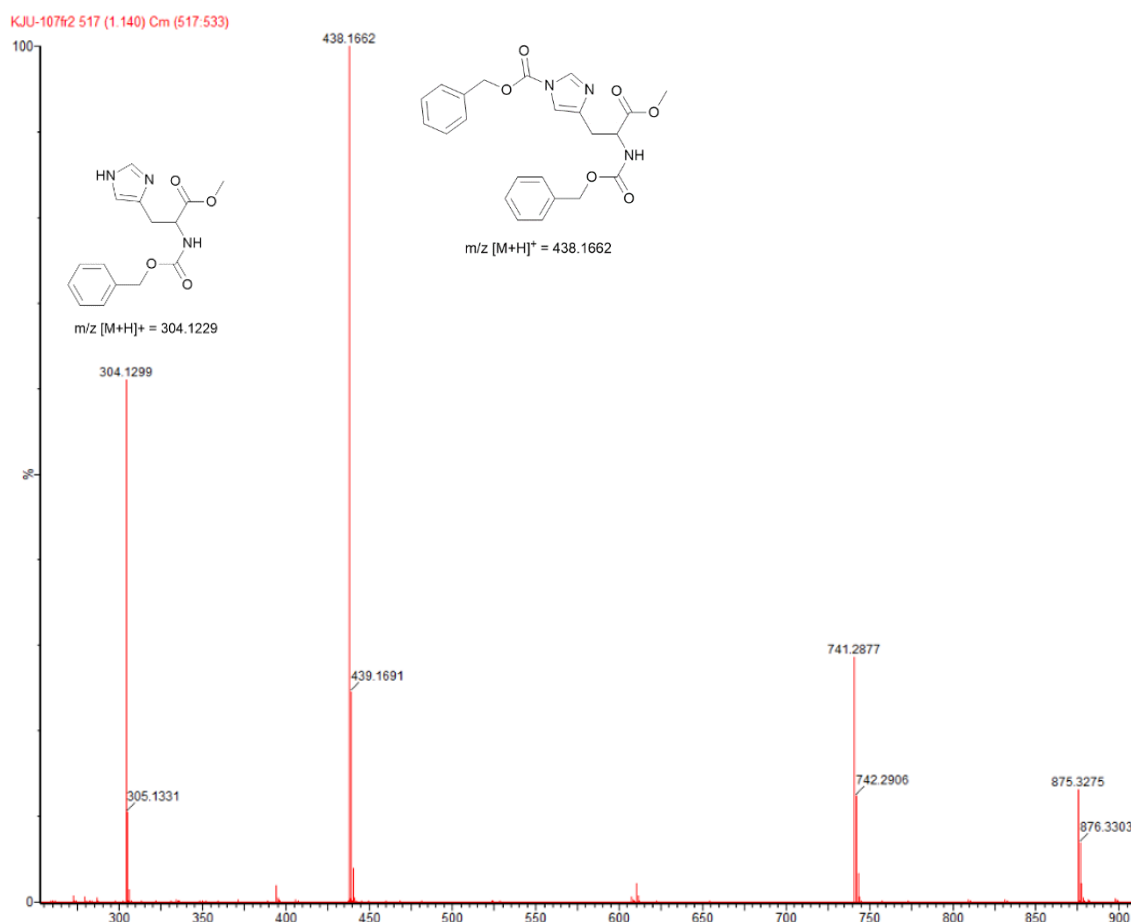
Rysunek 29: Widmo ^1H NMR (CDCl_3) zabezpieczonego estru L-seryny potwierdzające obecność grupy protekcyjnej Cbz.



Rysunek 30: Widmo ^{13}C NMR (CDCl_3) zabezpieczonego estru L-seryny potwierdzające obecność grupy protekcyjnej Cbz.

W przypadku syntezy estru metylowego Cbz-glicyny reakcja w temperaturze pokojowej zachodzi powoli, co potwierdzono analizą TLC. Mieszaninę należało podgrzać do 40°C , już po 5 godzinach kontynuowania reakcji można było zauważyć przyrost produktu i znaczny ubytek substratów. Dalej podążano za ogólną procedurą otrzymując produkt z wydajnością 58%. Podczas zabezpieczania

estru histydyny, z powodu ciągłej obecności substratów w mieszaninie reakcyjnej, wydłużono czas reakcji do 3 dni. Po tym czasie, po wydzieleniu produktu z mieszaniny reakcyjnej za pomocą ekstrakcji, wykonano analizę TLC warstwy organicznej. Na płycie TLC, oprócz pozostałości nieprzereagowanych substratów zidentyfikowano dwie plamki o podobnym R_f , z których jedna pochodziła od docelowego produktu. R_f dla tych dwóch substancji w układzie rozpuszczalników AcOEt:*n*-heksan 1:1 (v/v) wynoszą odpowiednio $R_{f1} = 0,24$ oraz $R_{f2} = 0,37$. Za pomocą kolumny chromatograficznej (eluent: AcOEt:*n*-heksan 1:1 v/v) rozdzielono te dwie substancje i analizowano za pomocą spektrometrii mas w celu zidentyfikowania produktu ubocznego. Na podstawie widma MS przedstawionego poniżej, można było stwierdzić, że jedna z frakcji o $R_{f2} = 0,37$ oprócz docelowego produktu (pik o masie: $m/z [M+H]^+ = 304,1299$) zawiera również ester histydyny, gdzie oprócz grupy aminowej zacylowany został atom azotu NH pierścienia imidazolowego (pik o masie: $m/z [M+H]^+ = 438,1662$).



Rysunek 31. Fragment widma MS frakcji wydzielonej z kolumny podczas oczyszczania estru metylowego Cbz-L-histydyny.

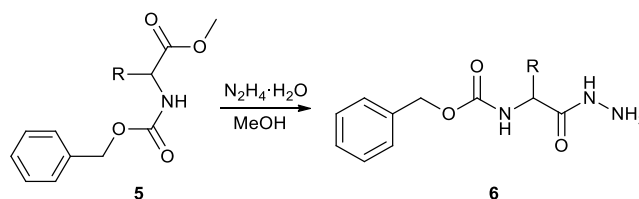
Histydyna oprócz wolnej grupy NH_2 , posiada również grupę NH w heterocyklicznym łańcuchu bocznym aminokwasu. Pięciorzędowy pierścień imidazolowy, z dwoma atomami azotu, tworzy układ aromatyczny, w którym uczestniczy wolna para elektronowa atomu azotu typu pirolu, wolna para elektronowa drugiego atomu azotu tzw. pirydynowego jest skierowana na zewnątrz pierścienia. W układzie imidazolowym występuje prototropia, w niepodstawionym na azocie pierścieniu imidazolowym, atom wodoru jest labilny i może się przemieszczać na drugi atom azotu, tworząc dwie równoważne formy tautomeryczne. Z tego względu możliwe jest acylowanie jednego z atomów azotu, przy czym pozycja acylowania może zależeć od uwarunkowań przestrzennych przy obu atomach azotu. Różnica pomiędzy pK_a grupy aminowej ($pK_a = 9,33$) i azotu pirydynowego ($pK_a = 6,04$) w histydynie powoduje preferencyjny atak nukleofilowy grupy aminowej. Jednakże wydłużony czas reakcji mógł

spowodować przebieg reakcji konkurencyjnej, acylowania w pierścieniu imidazolowym. Z tego względu kolejną syntezę estru metylowego Cbz-L-histydyny prowadzono w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Podczas ekstrakcji, wykonano analizę TLC warstwy wodnej, stwierdzając w niej obecność produktu. Pierścień imidazolowy, z uwagi na znaczny moment dipolowy ($\mu=3,8-5,6$ D), istotnie zwiększa polarność estru metylowego Cbz-L-histydyny, co powoduje, że związek zdecydowanie lepiej rozpuszcza się w wodzie. Z tego powodu warstwę wodną ekstrahowano octanem etylu. W ten sposób udało się otrzymać docelowy produkt z wydajnością 50%.

Ester metylowy Cbz-L-tyrozyny otrzymano z wydajnością 20% stosując ogólny przepis. Wydłużenie czasu reakcji i podwyższenie temperatury do 40°C powoduje powstanie produktów ubocznych znacznie utrudniających izolację czystego produktu. W trakcie ekstrakcji, podczas wydzielania produktu zneutralizowano fazę wodną (pH-7-8) za pomocą nasyconego wodnego roztworu NaHCO₃. Próbowano oczyścić ester metylowy Cbz-L-tyrozyny za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym z zastosowaniem 5% MeOH/CHCl₃ lub 10% MeOH/CHCl₃ v/v jako eluentów. Niestety, nie udało się wydzielić czystego produktu. Podobnie krystalizacja produktu z eteru naftowego (zakres temperatury wrzenia: 40-60°C), prowadzi do częściowego oczyszczenia produktu (prawdopodobnie podwyższona temperatura podczas krystalizacji generowała powstawanie innych produktów ubocznych).

W kolejnej próbie produkt oczyszczano za pomocą HPLC z układem faz normalnych, a jako eluent zastosowano DCM (natężenie przepływu: 6ml/min). Zebrano 4 frakcje, które według interpretacji widma ¹H NMR pozwoliły na wydzielenie śladowych ilości produktu w ostatniej frakcji, o najdłuższym czasie retencji. Po wykonaniu kolejnych prób syntezy estru metylowego Cbz-L-tyrozyń, ustalono, że do reakcji należy zastosować uprzednio oczyszczony ester tyrozyny, a reakcję powinno się prowadzić w temperaturze pokojowej przez 2 dni. Podczas etapu ekstrakcji warstwy organicznej należy mieszaninę reakcyjną ekstrahować początkowo NaHCO₃, następnie przemyć dwukrotnie solanką i wodą. Najlepszą metodą oczyszczania estru metylowego Cbz-L-tyrozyny jest przeprowadzenie chromatografii kolumnowej z zastosowaniem eluentu AcOEt:*n*-heksan, 1:1 v/v. Następnie frakcje zawierające oczekiwany produkt odparowywano i przemyto eterem naftowym. Przemycanie polegało na intensywnym mieszanii otrzymanej, żółtej, oleistej pozostałości w eterze naftowym, w temperaturze pokojowej przez 5 godzin, a następnie zdekantowaniu rozpuszczalnika. Procedurę należało powtórzyć 2 razy, uzyskując biały osad docelowego produktu z wydajnością 87%.

3.4.3. Otrzymywanie hydrydów N-Cbz-aminokwasów



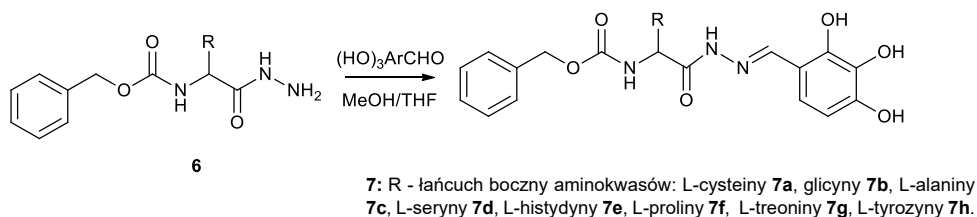
R - łańcuch boczny aminokwasów: L-seryny, glicyny, L-alaniny, L-cysteiny, L-tyrozyny, L-proliny, L-histydyny, L-treoniny, L-izoleucyny

Schemat 27. Synteza hydrydów odpowiednich aminokwasów.

Hydrydy odpowiednich aminokwasów otrzymano w reakcji estrów metylowych N-Cbz-aminokwasów **5** z 98% monohydratem hydrazyny (4 ekw.) w bezwodnym metanolu. Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej [125]. Wydzielanie odpowiednich hydrydów **6** z mieszaniny reakcyjnej różniło się w zależności od użytego estru aminokwasu. Hydrydy N-Cbz aminokwasów takich jak: seryna, tyrozyna, treonina, cysteina, glicyna, podczas reakcji wytrącały

się z roztworów w postaci białawych osadów. W tym przypadku po zakończonej reakcji, otrzymany osad odsączono, w przesączu pozostaje nadmiar hydrazyny oraz nieprzereagowane substraty. Hydrazydy seryny, cysteiny oraz treoniny oczyszczano za pomocą rekrytalizacji z etanolu. Analog glicyny krystalizowano dwukrotnie z mieszaniny rozpuszczalników EtOH:H₂O (1:1, v/v). Hydrazid tyrozyny początkowo również krystalizowano z takiej mieszaniny rozpuszczalników, po czym stwierdzono na podstawie analizy TLC, że w przesączu znajduje się produkt. W konsekwencji przy kolejnej krystalizacji zastosowano samą wodę, która pozwoliła na całkowite usunięcie pozostałości hydrazyny z osadu produktu. Hydrazydy proliny, histydyny, alaniny oraz izoleucyny nie wytrącały się z metanolu podczas reakcji. Jedynie hydrazid histydyny udało się oczyścić za pomocą krystalizacji z użyciem mieszaniny 10% MeOH:CHCl₃. Z tego powodu po zakończeniu reakcji odparowano metanol z mieszaniny reakcyjnej, a pozostałość oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Dla hydrazidu proliny, w pierwszej próbie zastosowano elucję gradientową z użyciem początkowo 100% CHCl₃, zwiększając siłę elucji z czasem, stosując 5-50% MeOH/CHCl₃ v/v uzyskując hydrazid z niską wydajnością 30%. W kolejnej próbie oczyszczania zastosowano jako eluent mieszaninę 3% MeOH/CHCl₃ v/v, co pozwoliło wyizolować produkt z największą wydajnością równą 67%. W przypadku hydrazidu alaniny najlepszym eluentem zapewniającym dobrą izolację produktu była mieszanina 5% MeOH/CHCl₃ v/v. Ten sam układ rozpuszczalników w chromatografii kolumnowej zastosowano dla pochodnej izoleucyny, wydzielając docelowy produkt z wydajnością 14%. Z powodów trudności w wydzieleniu produktu za pomocą klasycznej chromatografii kolumnowej, hydrazid izoleucyny spróbowano oczyszczać za pomocą HPLC z odwróconym układem faz ODS, używając jako eluentu 70% MeOH/CHCl₃ v/v, jednakże tą metodą również wydzielono oczekiwany produkt w bardzo małej ilości.

3.4.4. Otrzymywanie hydrazonów



Schemat 28. Synteza hydrazonów N-benzylloksykarbonyloaminokwasów.

Hydrazony **7** zsyntetyzowano w reakcji kondensacji hydrazydów **6** z 2,3,4-trihydroksybenzaldehydem, otrzymując związki o konfiguracji *E*, co potwierdzono metodą spektroskopii NMR.

N-(N-Benzylloksykarbonylo-L-cysteino)-2,3,4-trihydroksybenzaldehydrazon/ (*E*)-benzylo(3-merkaptio-1-okso-1-(2-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)hydrazynylo)propan-2-ylo)karbaminian **7a** otrzymano w reakcji 2,3,4-trihydroksybenzaldehydu (16,92 mmol) z zawiesiną hydrazidu N-Cbz-L-cysteiny (14,10 mmol) w metanolu w temperaturze pokojowej, prowadząc reakcję przez 48 godzin. Po godzinie reakcji nierozpuszczalny osad hydrazidu rozpuścił się, a roztwór przybrał barwę żółto-brązową. Po kolejnych kilku godzinach wytrąciła się mała ilość brązowego osadu. Metanol odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem i przystąpiono do oczyszczania produktu. Początkowo hydrazon **7a** krystalizowano z etanolu, następnie umieszczono mieszaninę w zamrażarce (-20°C) w celu wykrystalizowania produktu. W trakcie dwóch dni wykrystalizowała bardzo mała ilość osadu będąca mieszaniną hydrazonu **7a** i substratów. Przesącz z osadem zawrócono i krystalizowano ponownie z etanolu, do klarownego roztworu dodano wodę. Po ochłodzeniu roztworu natychmiast krystalizuje

spora ilość żółtawego osadu. Proces powtórzono kolejny raz uzyskując czysty produkt z wydajnością 49%.

Podobnie otrzymano (*E*)-benzylo(2-okso-2-(2-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)-hydrazynylo)-etylo)karbaminian **7b**. Roztwór metanolowy 2,3,4-trihydroksybenzaldehydu mieszano z hydrazidem N-Cbz-glicyny w temperaturze pokojowej przez 24 godziny, następnie ogrzewano mieszaninę reakcyjną w 40°C przez kolejne 72 godziny. Po tym czasie zakończono reakcję, ponieważ na podstawie TLC zaobserwowano rozkład aldehydu i ciągłą obecność hydrazidu. Odparowano rozpuszczalnik z mieszaniny reakcyjnej i podjęto próbę krystalizacji pozostałości z mieszaniny rozpuszczalników EtOH:H₂O (1:1, v/v). Uzyskany osad po krystalizacji zawierał docelowy produkt **7b**, aldehyd oraz hydrazyd. Ten sam osad spróbowano oczyścić za pomocą HPLC z układem faz odwróconych ODS z zastosowaniem eluentu 70% MeOH/H₂O (natężenie przepływu eluentu 6ml/min). Podjęta próba oczyszczenia okazała się nieskuteczna, ponieważ nie udało się wyizolować czystego produktu **7b**. Podczas obserwacji widma z detektora, w drugim cyklu można było zauważyć wzrost absorpcji dla frakcji zawierającej aldehyd. Świadczyć to może o hydrolizie związku, powodującym rozpad hydrazonu **7b** z powrotem do pierwotnego aldehydu oraz hydrazidu. W kolejnym eksperymencie otrzymywania N-(N-benzylloksykarbonyloglicyno)-2,3,4-trihydroksybenzaldehydrazonu reakcję prowadzono przez dwa dni w temperaturze pokojowej, ograniczając ilość użytego metanolu do 1/3 użytej w poprzedniej próbie. Po zakończonej reakcji z roztworu wypadła spora ilość białego osadu. Otrzymany osad przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem, przemywając go schłodzonym etanolem. Ta metoda syntezy hydrazonu **7b** doprowadziła do otrzymania czystego produktu z wydajnością 85%, bez konieczności dalszego jego oczyszczania, które może powodować rozpad docelowego produktu.

Hydrazon analogu L-alaniny **7c** otrzymano w reakcji 2,3,4-trihydroksybenzaldehydu z odpowiednim hydrazidem w metanolu. Roztwór reakcyjny mieszano w temperaturze pokojowej. Wobec braku postępu reakcji po trzech godzinach, mieszaninę reakcyjną ogrzewano w 50°C przez 5 godzin, a następnie kontynuowano w temperaturze pokojowej przez noc. Po tym czasie metanol odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując początkowo jako eluent mieszaninę 50% *n*-heksan/octan etylu (v/v), a następnie zwiększając polarność rozpuszczalników używając 50% metanol/octan etylu v/v. Udało się wydzielić czystą frakcję produktu, z umiarkowaną wydajnością 60%. Znacznie lepszym sposobem oczyszczania finalnego produktu okazała się krystalizacja z mieszaniny EtOH:H₂O (1:1 v/v) pozwalająca na uzyskanie czystego hydrazonu **7c** z wydajnością 80%.

W przypadku reakcji hydrazidu N-Cbz-L-seryny z aldehydem 2,3,4-trihydroksybenzoesowym w temperaturze pokojowej, synteza hydrazonu **7d** zachodzi z niewystarczającą wydajnością rzędu 20%. Dlatego w kolejnym eksperymencie podniesiono temperaturę reakcji do 50°C, kontrolując postęp reakcji na płytkach TLC. Po upływie 24 godz. stwierdzono zanik substratu i odparowano metanol. Podjęto próbę oczyszczania pozostałości dwoma metodami: wykorzystując chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym z użyciem eluentu: MeOH/CHCl₃ (v/v) w różnym gradiencie stężeń oraz krystalizację z mieszaniny rozpuszczalników etanol:woda 1:1. Na podstawie tych prób można stwierdzić, że proces oczyszczania pochodnych aldehydu trihydroksybenzoesowego przez krystalizację jest lepszy niż chromatografia kolumnowa, gdyż pozwala uzyskać czysty produkt jako beżowy osad z wydajnością 67%.

Hydrazon analogu histydyny **7e** otrzymano w reakcji hydrazidu N-Cbz-L-histydyny z 2,3,4-trihydroksybenzaldehydem w bezwodnym metanolu w temperaturze pokojowej. Reakcje prowadzono w atmosferze argonu przez 12 godzin. Ponieważ analiza TLC nie wykazała postępu reakcji, mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia metanolu przez 12 godzin. Rozpuszczalnik odparowano otrzymując żółtą piankę jako pozostałość. Po analizie NMR stwierdzono obecność

produktu w mieszaninie, ale w bardzo małej ilości. Próba krystalizacji produktu z etanolu, zakończyła się niepowodzeniem. Hydrazon **7e** spróbowano wydzielić za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym z użyciem mieszaniny 20% MeOH/CHCl₃ v/v jako eluentu. Udało się wydzielić ślady produktu, który posiadał zanieczyszczenia. Na widmie ¹H NMR zauważono również sygnały o dużej powierzchni pików pochodzące od wody, co może świadczyć o higroskopijnych właściwościach produktu.

Podczas otrzymywania hydrazonu analogu proliny **7f** również napotkano problemy. Początkowo zastosowano standardową procedurę kondensacji hydrazynu z 1,2 równoważnika 2,3,4-trihydroksybenzaldehydu rozpuszczonych w metanolu i mieszanemu w temperaturze pokojowej. Jednakże w tych warunkach reakcja nie zachodzi. W konsekwencji reakcję ogrzewano w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 2 dni. Na podstawie spektroskopii rezonansu magnetycznego stwierdzono obecność produktu w mieszaninie, jednak w niewielkiej ilości. Próbowano wydzielić hydrazon **7f** z mieszaniny reakcyjnej, odparowując rozpuszczalnik i krystalizując pozostałość z EtOH:H₂O (1:1 v/v), jednakże osad nie wypadał z roztworu. Z tego powodu produkt oczyszczano za pomocą HPLC z odwróconym układem faz ODS, z użyciem jako eluentu mieszaniny rozpuszczalników 70% MeOH/H₂O. Po zebraniu dwóch głównych frakcji i ich analizie TLC ustalono, że produkt w całości uległ hydrolizie do pierwotnego aldehydu i hydrazynu.

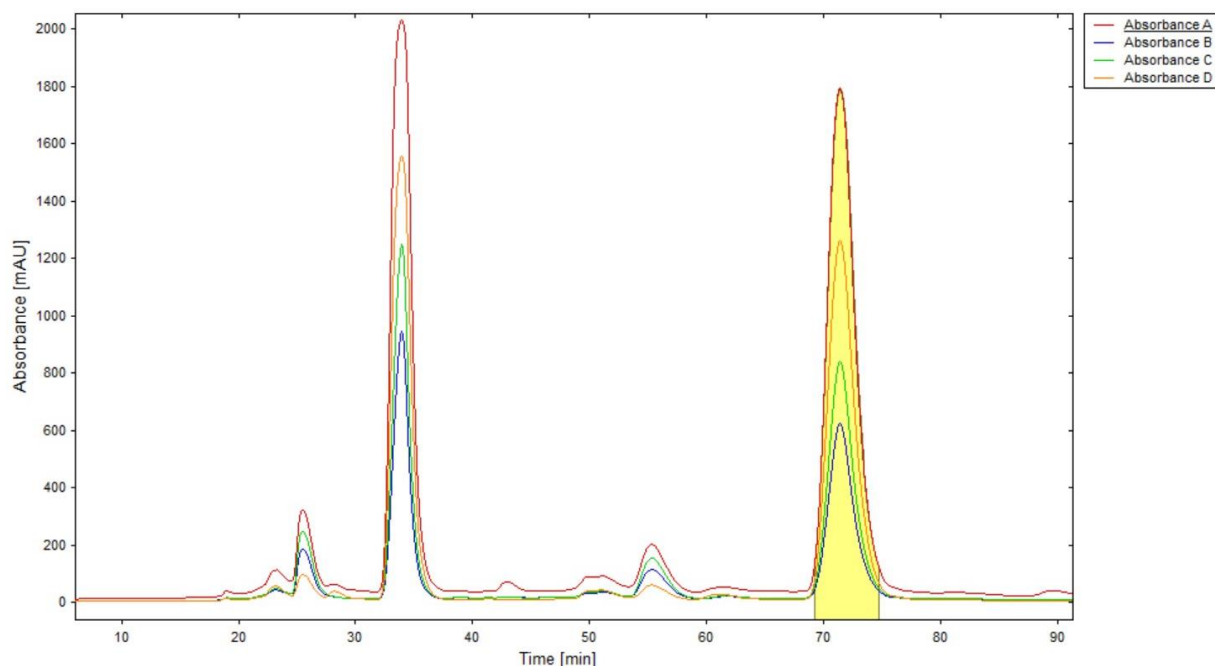
W kolejnej próbie syntezy hydrazonu proliny **7f** stopiono oba substraty, ogrzewając kolbę płaszczem grzejnym, jednocześnie odprowadzając powstającą w reakcji wodę za pomocą obniżonego ciśnienia. Po 4 godzinach trwania reakcji mieszanina zmieniła barwę. Po kolejnych 4 godzinach analiza TLC potwierdziła obecność oczekiwanego produktu, jednakże mieszanina reakcyjna zawierała dalej sporą ilość nieprzereagowanych substratów. Ostatecznie zrezygnowano z tej metody syntezy, gdyż po 24 godzinach ogrzewania, nie zauważono dalszych zmian reakcji. Kondensację aldehydu z hydrazynem przeprowadzono również w temperaturze wrzenia tetrahydrofuranu, co pozwoliło uzyskać produkt **7f** z wydajnością 15%, bez wydzielenia hydrazonu z mieszaniny reakcyjnej. Niemniej jednak, należy zoptymalizować zarówno metodę otrzymywania, jak i proces wydzielenia hydrazonu **7f**.

Podjęto próby otrzymania hydrazonu analogu treoniny **7g** standardową metodą mieszania substratów w metanolu, początkowo w temperaturze pokojowej następnie, stwierdzając brak przereagowania substratów, w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Po zakończonej reakcji zidentyfikowano ślady produktu **7g** w mieszaninie reakcyjnej oraz znaczną zawartość aldehydu i produktu jego rozkładu. Kolejną próbę otrzymywania hydrazonu przeprowadzono w warunkach wspomaganego promieniowaniem mikrofalowym w reaktorze mikrofalowym (Rysunek 32). Zastosowanie promieniowania mikrofalowego umożliwia szybsze i bardziej efektywne ogrzewanie reakcji w porównaniu z tradycyjnymi metodami ogrzewania konwekcyjnego. Według mechanizmu działania cząsteczki absorbują promieniowanie elektromagnetyczne mikrofal, co wprawia je w rotację, a w konsekwencji tarcie i kolizje między cząsteczkami, generując w ten sposób ciepło wewnątrz próbki. Reakcję prowadzono w etanolu z temperaturą maksymalną 100°C, z zastosowaniem mocy 200 W przez 4 godziny. Podczas reakcji wytrącił się czerwony osad, a roztwór przybrał ciemnobrązową barwę. Analizowano mieszaninę reakcyjną za pomocą NMR, jednakże z powodu licznej obecności sygnałów trudno było stwierdzić co zawiera. Kolejną syntezę z zastosowaniem promieniowania mikrofalowego przeprowadzono przez godzinę, bez zastosowania rozpuszczalnika, stosując moc 200 W. Niestety reakcja w tych warunkach nie zachodzi. Finalnie nie udało się wydzielić czystego (*E*)-2-amino-3-hydroksy-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)butanohydrazynu **7g**.



Rysunek 32. Reaktor mikrofalowy.

Podczas otrzymywania N-(N-Benzyloksykarbonylo-L-tyrozyno)-2,3,4-trihydroksybenzaldehydu **7h** napotkano trudności, związane z tworzeniem się produktów ubocznych podczas reakcji oraz wydzielenia produktu z mieszaniny poreakcyjnej. Pierwszą próbą syntezy hydrazonu analogu tyrozyny **7h** była reakcja hydrazynu N-benzyloksykarbonylo-L-tyrozyny z trihydroksybenzaldehydem prowadzona w bezwodnym metanolu, początkowo w temperaturze pokojowej przez 48 godzin. W trakcie trwania reakcji, nierozpuszczalny w metanolu substrat rozтворяł się, a roztwór przyjął barwę żółtą. Kolejno, ustalając obecność substratów w mieszaninie reakcyjnej, stosowano temperaturę wrzenia rozpuszczalnika przez 24 godziny. Nastąpiła zmiana barwy roztworu z koloru żółtego na ciemnobrązową. Analiza TLC wykazała produkty rozkładu aldehydu, więc zakończono reakcję. Produkt izolowano z mieszaniny reakcyjnej przez krystalizację w etanolu, a następnie dodawano wody w celu wykrystalizowania docelowego hydrazonu **7h**. Podczas procesu krystalizacji wypadł osad oraz powstała ciemno brązowa substancja o konsystencji lepkiej mazi. W konsekwencji zlano przesącz wraz z uzyskanym brązowym osadem, pozostawiając żywiczną maź przyklejoną do kolby. Otrzymanym ciemnobrązowym osadem był głównie produkt **7h**, jednakże zanieczyszczony substratami. Kolejna krystalizacja z EtOH:H₂O 1:1 v/v, ponownie dała wciąż zanieczyszczony produkt. Z tego powodu postanowiono oczyścić produkt za pomocą kolumny chromatograficznej na żelu krzemionkowym z użyciem mieszaniny 10% MeOH/CHCl₃ v/v. Udało się wydzielić hydrazon **7h**, jednakże bez grupy zabezpieczającej Cbz oraz z niewielkimi zanieczyszczeniami pochodzącymi od substratów reakcji. Problemy podczas syntezy i oczyszczania hydrazonu pochodnej tyrozyny mogą wynikać z zastosowania do reakcji nieco zanieczyszczonego hydrazynu N-benzyloksykarbonylo-L-tyrozyny. W konsekwencji w kolejnej próbie otrzymywania hydrazonu **7h** zastosowano dodatkowo oczyszczony hydrazyn oraz trihydroksybenzaldehyd (1,2 ekw.), początkowo prowadząc reakcję przez 48 godzin w temperaturze pokojowej, następnie 3 dni w temperaturze wrzenia metanolu. Reakcja była prowadzona pod argonem bez dostępu światła w celu ograniczenia rozpadu trihydroksybenzaldehydu. Roztwór po zakończonej reakcji był klarowny o barwie żółtej, jednakże na podstawie analizy TLC w mieszaninie zidentyfikowano sygnały pochodzące od nieprzereagowanych substratów. Z powodu obawy o duże straty produktu podczas procesu krystalizacji od razu przystąpiono do wydzielenia produktu z mieszaniny reakcyjnej za pomocą HPLC z użyciem 70% MeOH/H₂O. Na widmie z detektora pojawiły się trzy sygnały pochodzące od aldehydu, hydrazynu oraz hydrazonu **7h** (Rysunek 33).



Rysunek 33. Chromatogram przedstawiający rozdział N-(N-Benzoyloxycarbonyl-L-tyrozyno)-2,3,4-trihydroksybenzaldehydrazonu z mieszaniny reakcyjnej.

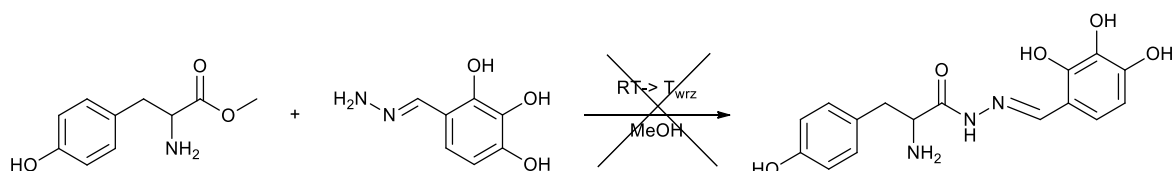
Udało się wyizolować czysty hydrazon pochodnej tyrozyny **7h** z wydajnością 39%. Przystąpiono do optymalizacji metody syntezy hydrazonu **7h**. Ponieważ produktem ubocznym kondensacji jest woda, postanowiono przesunąć równowagę reakcji w kierunku tworzenia się produktów przez zastosowanie środków odwadniających, które usuwałyby powstającą w trakcie reakcji wodę. Środkami odwadniającymi stosowanymi do reakcji były bezwodne sole Na_2SO_4 oraz CuSO_4 . Przed użyciem siarczynu (VI) miedzi (II) przygotowano świeżą porcję bezwodnej soli wygrzewając pentahydrat w 250°C przez 4 godziny, do uzyskania biało-szarego proszku. Hydrazyn oraz aldehyd (1,10 ekw.) zawieszono w bezwodnym metanolu i po chwili dodano około 100 mg odpowiedniego środka suszącego. Ilość dodawanego środka suszącego obliczono na podstawie stechiometrii reakcji oraz założono nadmiar około 50 mg ze względu na wodę zawartą w rozpuszczalniku. W przypadku reakcji z użyciem CuSO_4 na podstawie TLC, po godzinie trwania reakcji w temperaturze pokojowej, zidentyfikowano powstający produkt reakcji, jednakże po upływie 24 godzin plamka pochodząca od produktu znikła. Przymuszczenie powstający hydrazon **7h** mógł utworzyć związek kompleksowy z jonami miedzi. Hipoteza ta potwierdziłaby rozważania na temat koordynujących właściwości zasad Schiffa [2]. Dla eksperymentu z zastosowaniem Na_2SO_4 , synteza N-(N-Benzoyloxycarbonyl-L-tyrozyno)-2,3,4-trihydroksybenzaldehydrazonu zachodzi, jednakże nie zauważono poprawy wydajności otrzymywanego hydrazonu.

Kolejną próbą optymalizacji tej reakcji była zmiana rozpuszczalnika z MeOH na THF. Ogrzewano mieszaninę reakcyjną przez 72 godziny w obojętnej atmosferze argonu, bez dostępu światła. Podczas tego eksperymentu zastosowano substraty na poziomie czystości około 95-100%. Po zakończonej reakcji rozpuszczalnik odparowywano, pozostałość krystalizowano z roztworu MeOH:H₂O (1:1, v/v). Uzyskany osad oczyszczano dodatkowo za pomocą HPLC (kolumna ODS, eluent 70%MeOH/H₂O) uzyskując docelowy hydrazon **7h** jako białawy osad z wydajnością 55%.

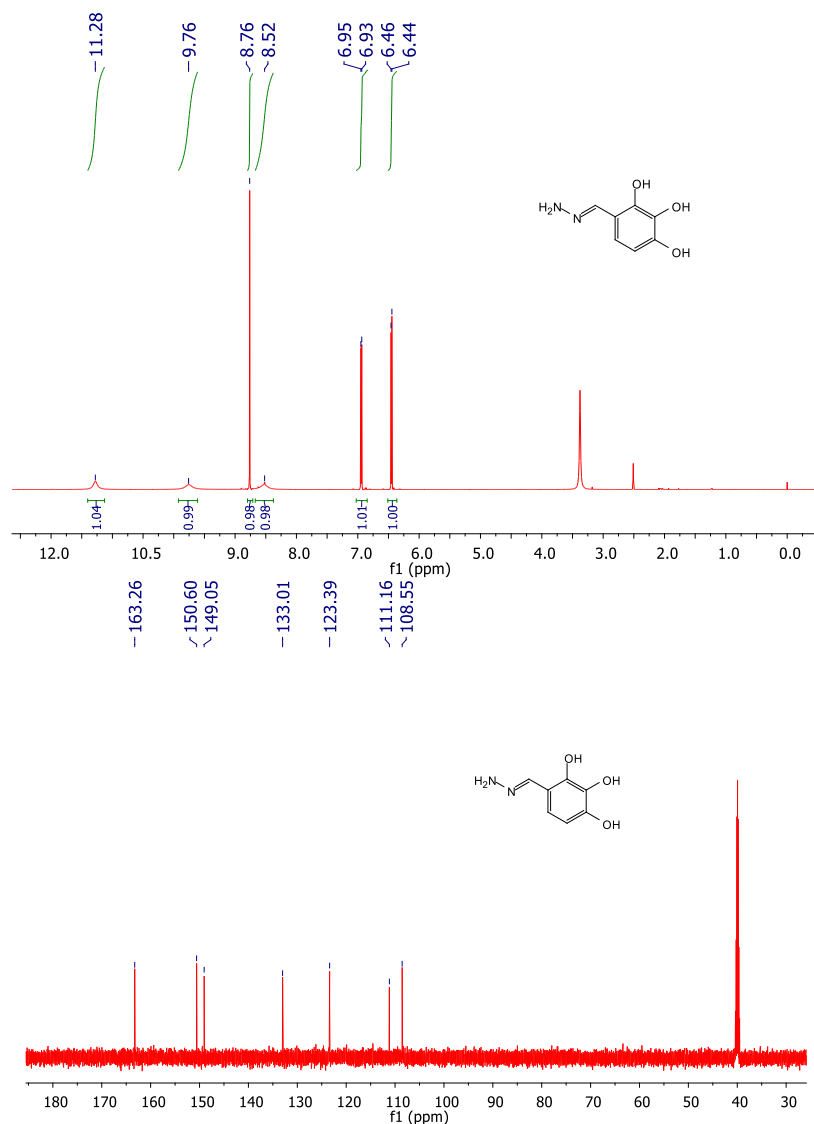
Tabela 5. Optymalizacja syntezy N-(N-Benzylloksykarbonylo-L-tyrozyno)-2,3,4-trihydroksybenzaldehydrazonu.

Czas oraz temp reakcji	Rozpuszczalnik	Uwagi	Wydzielenie	Obserwacje
48 godz. ->R.T. 24 godz. ->Twrz	MeOH	Zastosowanie zanieczyszczonego N-benzylloksykarbonylo-L-tyrozyny	Krystalizacja EtOH:H ₂ O 1:1 v/v. krystalizacja z EtOH, następnie dodano H ₂ O do wytrącenia. Chromatografia kolumnowa (eluent: 10% MeOH/CHCl ₃ v/v)	Wydzielono ślady hydrazonu bez grupy zabezpieczającej Cbz
48 godz. ->R.T. 72 godz. ->Twrz	MeOH	Reakcja prowadzona pod Ar bez dostępu światła, Zastosowanie czystego N-benzylloksykarbonylo-L-tyrozyny	HPLC z ODS (eluent: 70% MeOH/H ₂ O)	Uzyskano czysty produkt z wydajnością 39%
24 godz., R.T.	MeOH	Zastosowanie Na ₂ SO ₄	HPLC z ODS (eluent: 70% MeOH/H ₂ O)	Wydzielono ślady produktu oraz liczne zanieczyszczenia pochodzące od aldehydu i produktów jego rozkładu
24 godz., R.T.	MeOH	Zastosowanie CuSO ₄	-	Na podstawie analizy TLC po godzinie powstał produkt, który następnie zanikł w czasie, stwierdzając niepowodzenie reakcji
72 godz., Twrz	THF	Reakcja prowadzona pod Ar, bez dostępu światła, zastosowanie czystego N-benzylloksykarbonylo-L-tyrozyny	Krystalizacja z MeOH:H ₂ O 1:1 v/v. HPLC z ODS (eluent: 70% MeOH/H ₂ O)	Uzyskano czysty produkt z wydajnością 55%

Z powodu trudności w otrzymywaniu hydrazonu **7h** podjęto próbę metody syntezy tej pochodnej poprzez kondensację estru tyrozyny z (*E*)-hydrazonem aldehydu 2,3,4-trihydroksybenzoowego (Schemat 29). Ta droga syntezy wydaje się być obiecująca ze względu na możliwość pominięcia reakcji zabezpieczania i odbezpieczania grupy aminowej.



Schemat 29. Próba otrzymania (*E*)-2-amino-3-(4-hydroksyfenylo)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)propanohydrazydu.



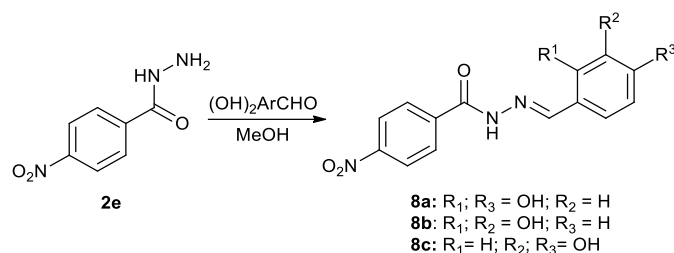
Rysunek 34. Widmo ^1H oraz ^{13}C NMR (DMSO) (*E*)-4-(hydrazonometylo)benzeno-1,2,3-triolu potwierdzające czystość otrzymanego hydrazynu.

W pierwszym etapie otrzymano (*E*)-hydrazon 2,3,4-trihydroksybenzaldehydu w reakcji 2,3,4-trihydroksybenzaldehydu (3,73 mmol) z równomolową ilością monohydratu hydrazyny w metanolu. Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej przez 3 dni. W trakcie reakcji wypadł żółty osad, który po zakończeniu syntezy przesączono i krystalizowano z mieszaniny etanolu i wody w stosunku objętościowym 1:9. Tak, otrzymany hydrazon, którego czystość potwierdzono za pomocą NMR, (Rysunek 34) kondensowano z estrem tyrozyny. W tym celu zawieszono ester metylowy tyrozyny (0,120 g), dodano 2 ekwiwalenty hydrazonu i mieszano początkowo w temperaturze pokojowej jeden dzień. Po tym czasie na podstawie analizy TLC nie zaobserwowano postępu reakcji. Reakcję kontynuowano w temperaturze wrzenia metanolu przez 48 godzin. Na podstawie analizy NMR trudno było zidentyfikować obecność produktu w mieszaninie reakcyjnej, ze względu na obecność licznych sygnałów w obszarze przesunięć charakterystycznych dla protonów aromatycznych. W konsekwencji próbkę poddano analizie MS, poszukując sygnału od docelowego produktu. Z powodu stwierdzenia braku sygnału w okolicach m/z 332 pochodzącego od oczekiwanego hydrazonu **7h** na widmie MS, zrezygnowano z tej metody syntezy. Próbowano jeszcze dokładnie tą samą metodą otrzymać hydrazynid analogu alaniny, jednakże również i w tym przypadku metoda okazała się być nieskuteczna.

Dla niektórych analogów aminokwasów takich jak: prolina, histydyna, treonina, izoleucyna, nie udało się wydzielić czystych hydrazonów, bądź wydzielono tylko ślady produktu. Należałoby udoskonalić ich metody syntezy oraz oczyszczania. Z tego względu nie uwzględniono ich w dalszych etapach badań.

3.5. Opracowanie metody syntezy N-Acylohydrazonów di- i monohydroksybenzaldehydu

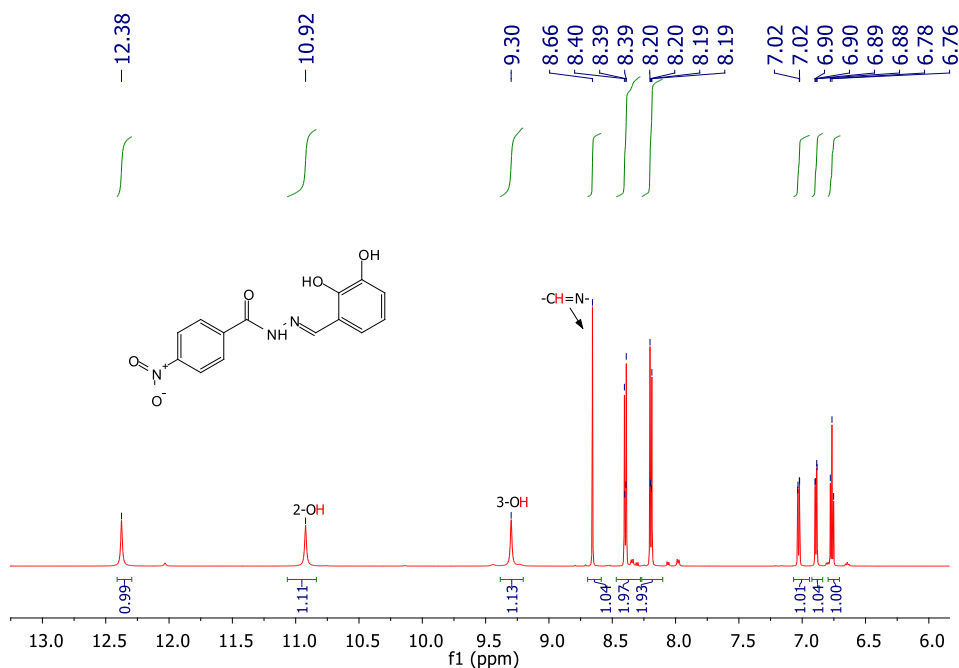
3.5.1. Otrzymywanie 4-nitrobenzoilohydrazonów pochodnych dihydroksybenzaldehydów



Schemat 30. Otrzymywanie pochodnych dihydroksybenzaldehydów pochodnych kwasu 4-nitrobenzoesowego.

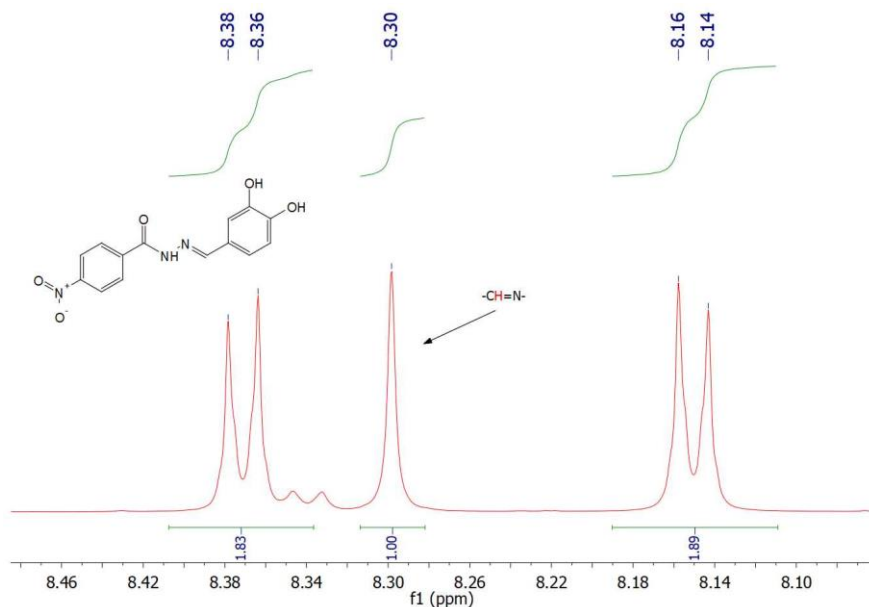
Kondensację hydrazydów z hydroksylowymi pochodnymi benzaldehydu wykonano w roztworze metanolowym stosując mały nadmiar odpowiedniego benzaldehydu (3,30 mmola) w odniesieniu do hydrazidu (2,80 mmola). W przypadku pochodnych aldehydów dihydroksybenzoesowych (2,4 i 2,3) **8a** oraz **8b** reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Natomiast dla pochodnych aldehydu 3,4-dihydroksybenzoesowego **8c** analiza TLC po 24 godzinach nadal wykazywała obecność substratu, dlatego wydłużono czas reakcji do 48 godzin.

Otrzymane dihydroksybenzaldehydony ze względu na obecność w strukturze wiązania iminowego (-N=CH-) mogą występować w postaci dwóch izomerów geometrycznych *E* i *Z*. Widmo ¹H NMR sugeruje, że w przypadku związków **8a** i **8b** występuje tylko izomer *E*. Związki posiadające w układzie aromatycznym grupę OH w pozycji orto, czyli pochodne 2,3-dihydroksy i 2,4-dihydroksy wykazują sygnały protonów grup 3-OH i 4-OH jako szerokie singlety odpowiednio przy δ 8.5–10.0 ppm, podczas gdy sygnał pochodzący od protonu grupy 2-OH jest przesunięty w stronę niższego pola w obszarze δ 10.9–11.3 ppm. Pojawienie się sygnałów przy niższych wartościach częstotliwości, przypisuje się tworzeniu wiązania wodorowego między atomem azotu iminowego i wodoru grupy hydroksylowej [122] o czym pisano w rozdziale 3.3. *Izomeria geometryczna oraz tautomeria keto-enolowa w syntezowanych zasadach Schiffa*. Ponadto obecność jednego izomeru geometrycznego potwierdza występowanie pojedynczego singletu dla protonu pochodzącego od wiązania iminowego przy przesunięciu równym około 8.5 ppm, co można zaobserwować np. na widmie związku (*E*)-*N'*-(2,3-dihydroksybenzylideno)-4-nitrobenzohydrazidu **8b** przedstawionym poniżej.



Rysunek 35. Widmo ^1H NMR (DMSO) związku (*E*)-*N'*-(2,3-dihydroksybenzylideno)-4-nitrobenzohydrazynu **8b**.

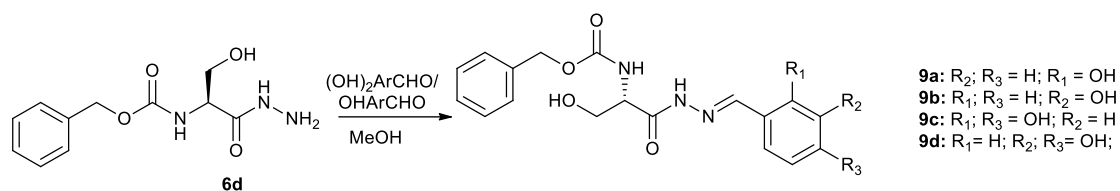
W przypadku (*E*)-*N'*-(3,4-dihydroksybenzylideno)-4-nitrobenzohydrazynu **8c** trudno jest stwierdzić obecność tylko jednego izomeru. Brak grupy hydroksylowej w pozycji 2 pierścienia benzenowego uniemożliwia utworzenie stabilizującej konfiguracji *E* wiązania wodorowego. Poszerzenie sygnałów przy 8.3 ppm sugeruje, że związek **8c** występuje jako mieszanina obu izomerów *E/Z*.



Rysunek 36. Widmo ^1H NMR *N'*-(3,4-dihydroksybenzylideno)-4-nitrobenzohydrazynu **8c**.

W przypadku pochodnych BNBZ (*E*)-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)-4-nitrobenzohydrazynu zsyntezowano tylko serię pochodnych z dwiema grupami hydroksylowymi, gdyż monohydroksylowe pochodne są bardzo słabo rozpuszczalne w buforze wykorzystywanym do oceny aktywności związków, uniemożliwiając w ten sposób ich badanie.

3.5.2. Otrzymywanie di- oraz monohydroksybenzaldehydrazonów pochodnych N-benzylloksykarbonylo-L-seryny

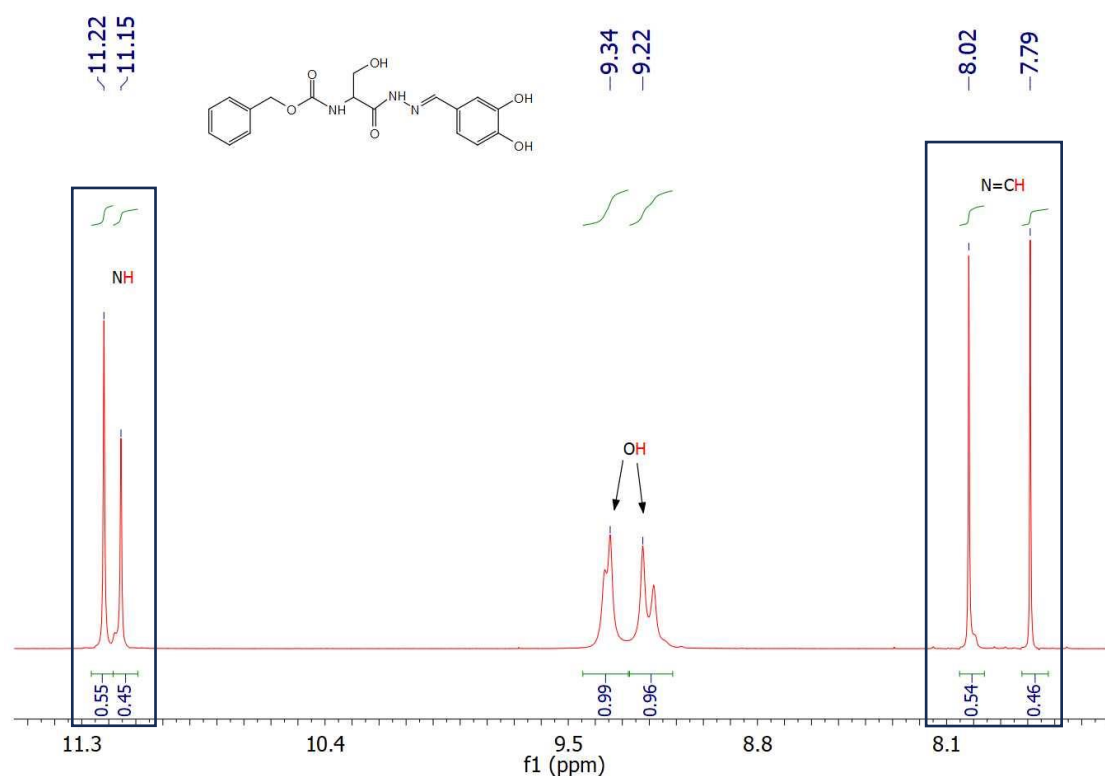


Schemat 31. Otrzymywanie hydrazonów pochodnych di- oraz monohydroksybenzaldehydu.

Hydrazyd **6d** kondensowano z hydroksy pochodnymi benzaldehydu, o różnej ilości i położeniu grup hydroksylowych. Związki syntezowano na podstawie procedury opisanej w literaturze [124]. Mieszaninę hydrazynu L-seryny i odpowiedniego benzaldehydu (1,2 ekw.): 2-hydroksybenzaldehydu, 3-hydroksybenzaldehydu, 2,4-dihydroksybenzaldehydu, 3,4-dihydroksybenzaldehydu w metanolu, mieszano w temperaturze pokojowej przez 24 godziny, obserwując w miarę upływu czasu roztworzenie osadu pochodzącego od hydrazynu i ponowne wypadanie niewielkiej ilości osadu. Postęp reakcji monitorowano metodą TLC z zastosowaniem układu 10% MeOH/CHCl₃ (v/v). Po stwierdzeniu zakończenia reakcji mieszaninę reakcyjną odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. W przypadku syntezy di- i monohydroksybenzaldehydrazonów N-benzylloksykarbonylo-L-seryny wystarczająca była temperatura pokojowa prowadzenia reakcji, a nie tak jak w przypadku analogicznej syntezy trihydroksybenzaldehydrazonu, kiedy reakcję prowadzono w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Na tej podstawie można stwierdzić obniżoną reaktywność grupy karbonylowej aldehydu 2,3,4-trihydroksybenzenowego w reakcji kondensacji z hydrazidem L-seryny. Wpływ ilości grup hydroksylowych na reaktywność hydroksylowych pochodnych benzaldehydu można również zauważyć podczas syntezy mono- i dihydroksy podstawionych pochodnych benserazydu, otrzymując w tych samych warunkach 2-(3-hydroksybenzylideno)hydrazyd L-seryny **9b** z wyższą wydajnością równą 70% w porównaniu z 2-(3,4-dihydroksybenzylideno)hydrazidem L-seryny **9d** otrzymanym z wydajnością 59%.

Podjęto próbę oczyszczania produktów kondensacji dwoma metodami: wykorzystując chromatografię kolumnową na żelu krzemionkowym z użyciem eluentu: MeOH/CHCl₃ (v/v) w różnym gradiencie stężeń oraz krystalizację z mieszaniny rozpuszczalników etanol:woda 1:1. Na podstawie tych prób można stwierdzić, że proces oczyszczania pochodnych aldehydu dihydroksybenzenowych przez krystalizację jest lepszy niż chromatografia kolumnowa, ponieważ zapewnia znacznie wyższą czystość i wydajność produktu. Natomiast dla pochodnych monohydroksybenzaldehydu oczyszczanie produktu jest efektywne zarówno za pomocą chromatografii kolumnowej (10% MeOH/CHCl₃ v/v) oraz krystalizacji (EtOH:H₂O 1:1 v/v). W ten sposób zaobserwowano, że im więcej grup hydroksylowych jest obecnych w pierścieniu benzenowym pochodnych benserazydu, tym bardziej utrudnione jest oczyszczanie z zastosowaniem chromatografii kolumnowej. Prawdopodobnie ma to związek z wiązaniem się grup hydroksylowych z powierzchnią żelu, ponieważ grupy OH, z racji swojej polarności, mogą tworzyć wiązania wodorowe lub oddziaływać siłami dipolowymi z powierzchnią żelu.

Na podstawie widm ¹H NMR syntezowanych N-acylohydrazonów pochodnych benserazydu zidentyfikowano dwa izomery geometryczne (*E* i *Z*) przy wiązania iminowym N=CH. Świadczą o tym podwójne sygnały dla protonów iminowych N=CH oraz podwójne sygnały dla labilnych protonów układu NH-N=CH. Na przedstawionym poniżej widmie można zauważyć, że zabezpieczony hydrazon N-(N-benzylloksykarbonylo-(*S*)-serynylo)-3,4-dihydroksybenzaldehydu **9d** wykazuje dwie różne konformacje w proporcji niemalże 1:1. Podobna sytuacja występuje także dla pochodnej hydrazonu N-(N-benzylloksykarbonylo-(*S*)-serynylo)-3-hydroksybenzaldehydu **9b**.

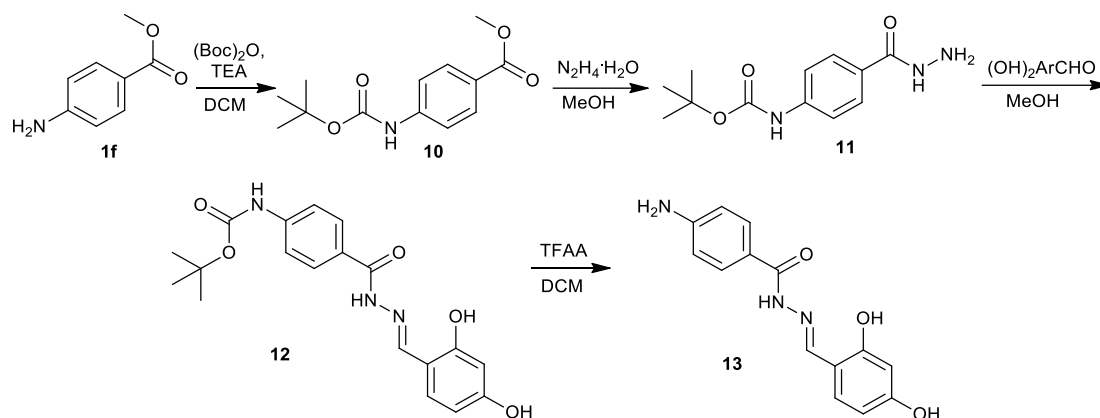


Rysunek 37. Fragment widma ¹H NMR 2-(3,4-dihydroksybenzylideno)hydrazidu L-seryny **9d** sugerujący występowanie dwóch izomerów geometrycznych *E* i *Z*. Widmo wykonane w roztworze DMSO.

Zsyntezowane di- i monohydroksybenzoesowe pochodne aldehydu, które nie posiadają grupy hydroksylowej w pozycji orto, nie mają możliwości utworzenia wiązań wodorowych pomiędzy grupą hydroksylową, a atomem azotu wiązania iminowego, co wyklucza jednoznaczne stwierdzenie utworzenia izomerów o preferencyjnej konfiguracji *E*. Udowadnia to również widmo ¹H NMR przedstawione powyżej, gdzie przesunięcia dla grup hydroksylowych występują w obszarze 9.2-9.3 ppm, co potwierdza brak tworzenia się wiązań wodorowych między OH, a N=CH. Odmienna sytuacja występuje w przypadku pochodnej hydrazonu z układem 2,4-dihydroksy **9c** oraz 2-hydroksybenzenowym **9a**, gdzie w przewodzie występuje jeden izomer geometryczny *E* zdefiniowany na podstawie badań NMR. Moje rozważania dotyczące izomerów geometrycznych hydrazonowych pochodnych benzohydrazidu pokrywają się z sugestią zawartą w publikacji Pinheiro i innych [126].

3.5.3. Otrzymywanie (*E*)-4-amino-*N'*-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazidu

Podczas otrzymywania (*E*)-4-amino-*N'*-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazidu zabezpieczono nukleofilową grupę 4-aminową, która może reagować konkurencyjnie w reakcji kondensacji aldehydu z hydrazidem. Jednakże grupa aminowa zlokalizowana w pozycji para pierścienia benzenowego powinna reagować znacznie wolniej niż grupa aminowa hydrazidu. Wynika to ze zmniejszonej nukleofilowości grupy 4-NH₂, w której wolna para elektronowa azotu jest zaangażowana w sprzężenie z elektronami pierścienia benzenowego. Aby to przypuszczenie sprawdzić wykonano dwie różne syntezy docelowych pochodnych aldehydu benzoowego, z zabezpieczeniem grupy 4-aminowej oraz bez zabezpieczania.



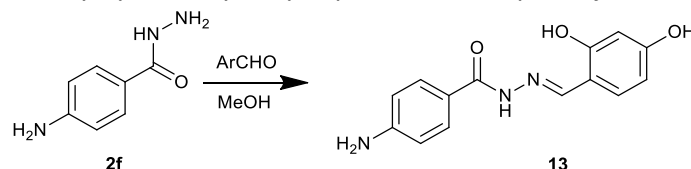
Schemat 32. Otrzymywanie hydrazonu **13** z zabezpieczeniem grupy 4-aminowej.

Do zabezpieczenia grupy aminowej użyto grupy Boc, jednej z najczęściej stosowanych grup do tego typu protekcji, znacznie korzystniejszej pod względem cenowym niż grupa Cbz. Grupę aminową w 4-aminobenzoesanie metylu (18,3 mmola) zabezpieczono w reakcji z diwęglanem di-*t*-butylu (1,2 ekw.) [127]. Ponieważ diwęglan di-*t*-butylu jest higroskopijny, jako rozpuszczalnik w reakcji zastosowano bezwodny DCM, używając $(\text{Boc})_2\text{O}$ rozpuszczonego w bezwodnym THF. Reakcję prowadzono w obecności trietyloaminy (1,1 ekw.) w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Po tym czasie analiza TLC (układ rozwijający 100% CHCl_3) wykazała niskie przereagowanie substratu, dlatego też postanowiono ogrzewać mieszaninę reakcyjną w temperaturze wrzenia DCM przez kolejne 24 godziny. Niestety, podwyższenie temperatury reakcji nie wpłynęło widocznie na konwersję estru. Dlatego dodano kolejny 1 ekwiwalent diwęglanu di-*tert*-butylu i reakcję kontynuowano w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez kolejnych 12 godzin. Dodanie nadmiaru $(\text{Boc})_2\text{O}$ spowodowało całkowite przereagowanie 4-aminobenzoesanu metylu. Po zakończonej reakcji mieszaninę zneutralizowano rozcieńczonym kwasem solnym i przemyto wodą. Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem magnezu (VI). Po odparowaniu rozpuszczalnika pozostałość oczyszczano za pomocą chromatografii na żelu krzemionkowym, eluując 100% chloroformem, otrzymując 4-[(*t*-butoksykarbonyloamino)benzoesan metylu **10** z wydajnością 60%.

Zabezpieczony ester poddano reakcji z hydrazyną. Według danych literaturowych [128, 129] podczas otrzymywania 4-(*t*-butoksykarbonyloamino)benzohydrazynu, należało zastosować 10-krotny nadmiar hydrazyny. W swoich badaniach nad syntezą hydrazynu **11** ograniczono ilość dodawanej toksycznej hydrazyny do 4 ekwiwalentów. Synteza polegała na ogrzewaniu w temperaturze wrzenia roztworu 98% monohydratu hydrazyny (4 ekw.) i 4-[(*t*-butoksykarbonyloamino)benzoesanu metylu w metanolu przez 24 godziny. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalnik usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymaną surową substancję stałą oczyszczono metodą chromatografii na żelu krzemionkowym, eluując 5% mieszaniną rozpuszczalników MeOH/ CH_2Cl_2 (v/v). Eluent ten pozwolił na dobre oddzielenie pozostałości nieprzereagowanego estru oraz nadmiaru hydrazyny i wydzielenie produktu z wydajnością 60%. Otrzymany hydrazyn kondensowano z 2,4-dihydroksybenzaldehydem. W tym celu roztwór 4-(*t*-butoksykarbonyloamino)benzohydrazynu i 2,4-dihydroksybenzaldehydu (1,2 ekw.) w metanolu mieszało w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Wytrącony podczas reakcji osad przesączono i dwukrotnie rekrytalizowano z roztworu etanol:woda (1:2, v/v). Uzyskano żółtawy osad z wydajnością 68%. Ostatnim etapem syntezy było rozszczepienie grupy *tert*-butoksykarbonylowej z zastosowaniem znanej metody odbezpieczania grupy N-Boc za pomocą kwasu trifluorooctowego [130]. Zawiesinę 4-*tert*-Butoksykarbonyloamino-*N'*-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazynu **12** w dichlorometanie, poddano działaniu kwasu trifluorooctowego (5 ekw.). Mieszaninę reakcyjną mieszało przez 72 godziny w temperaturze pokojowej. Po 15 minutach

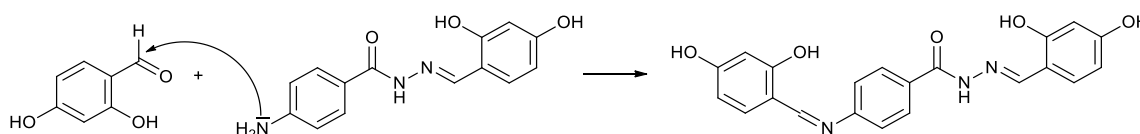
od dodania kwasu, beżowy osad pochodzący od hydrazynu rozwarzył się, a roztwór przyjął żółtą barwę, natomiast po godzinie trwania reakcji wypadł ponownie żółty osad. Na podstawie TLC, stwierdzono całkowity zanik substratu, przesączono osad pod zmniejszonym ciśnieniem. Wytrącony w DCM osad jest trifluoroocetanem amoniowym, z tego względu osad rozpuszczono w metanolu i neutralizowano go do uzyskania pH około 8 za pomocą trietyloaminy, następnie rozpuszczalnik usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozdzielono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Na podstawie TLC dobrano eluent, używając mieszaninę rozpuszczalników 30% MeOH/CHCl₃ (v/v), która pozwoliła na dobry rozdział mieszaniny reakcyjnej z różnicą współczynnika podziału R_f między reagentami oraz produktami ubocznymi równą 1. Zebrane frakcje z oczekiwanym produktem zidentyfikowano za pomocą spektroskopii NMR. Na podstawie widma ¹H NMR stwierdzono, że otrzymano (*E*)-4-amino-*N'*-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazynu, jednakże z zanieczyszczeniami pochodzącymi od trietyloaminy. W celu usunięcia zanieczyszczeń ponownie oczyszczono hydrazon **13** na kolumnie chromatograficznej w tych samych warunkach. Docelowy produkt **13** otrzymano z wydajnością równą 56%.

W kolejnym etapie badań reakcję otrzymywania 4-amino-*N'*-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazynu **13**, przeprowadzono bez zabezpieczania grupy aminowej we fragmencie benzenowym. Schemat otrzymywania hydrazynu przedstawiono poniżej.



Schemat 33. Schemat reakcji syntezy 4-amino-*N'*-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazynu bez zastosowania zabezpieczania grupy aminowej.

W przypadku syntezy (*E*)-4-amino-*N'*-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazynu **13** opisanej w literaturze, autorzy prowadzili reakcję początkowo przez 30 min. w temperaturze pokojowej, następnie ogrzewając mieszaninę przez 2 godziny w temperaturze 40°C. Według innej grupy badawczej ogrzewanie 4-amino-*N'*-(2-hydroksybenzylideno)benzohydrazynu wraz z aldehydem 2,4-dihydroksybenzoowym prowadzi do powstania (*N'*)-4-((2,4-dihydroksybenzylideno)amino)-*N'*-(2-hydroksybenzylideno)benzohydrazynu z wydajnością 71.3% (Schemat 34). W celu uniknięcia konkurencyjnej reakcji zrezygnowano z ogrzewania mieszaniny reakcyjnej.



Schemat 34. Możliwa reakcja uboczna zachodząca podczas reakcji kondensacji p-aminobenzohydrazynu z pochodną benzaldehydu w warunkach podwyższonej temperatury.

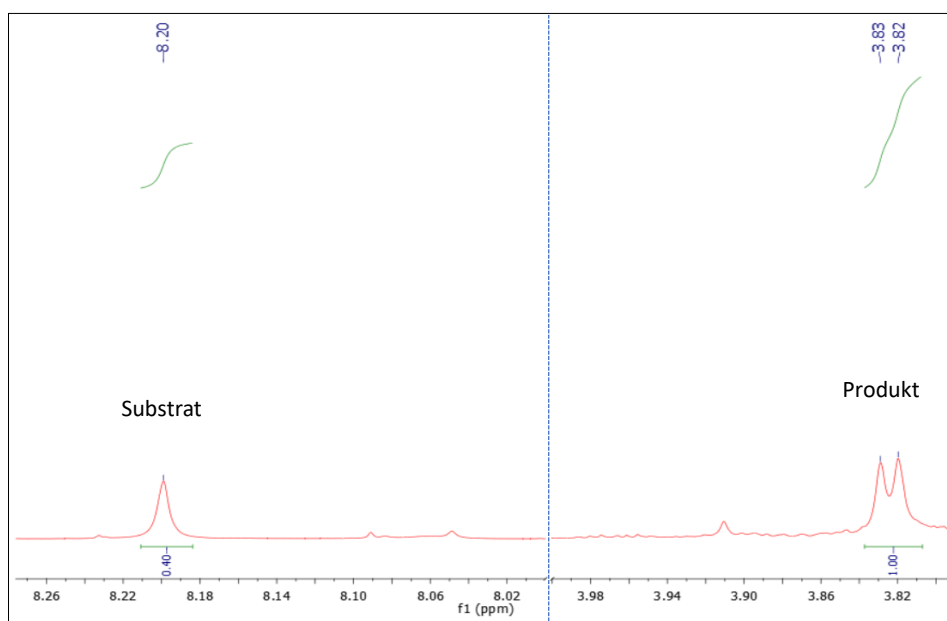
4-Aminobenzohydrazyn i 2,4-dihydroksybenzaldehyd (1,2 ekw.) rozpuszczono w bezwodnym metanolu i mieszano w temperaturze pokojowej przez noc. Po tym czasie z klarownego żółtego roztworu wytrąciła się spora ilość osadu. Na podstawie analizy TLC stwierdzono dalej obecność substratu w roztworze, więc reakcję prowadzono jeszcze 12 godzin. Po tym czasie mieszaninę zatężono, odparowując część rozpuszczalnika, a następnie powstały osad przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Osad rekrytalizowano z etanolu, jednakże część produktu przeszła do przesączu, a otrzymany osad zawierał pozostałości nieprzereagowanego aldehydu. Z powodu problemów z oczyszczaniem (*E*)-4-amino-*N'*-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazynu, podczas kolejnej reakcji

jego otrzymywania do syntezy zużyto 0,9 ekwiwalentna 2,4-dihydroksybenzaldehydu, który prawie całkowicie zużył się podczas reakcji i nie wpływał istotnie na proces oczyszczania osadu. Do krystalizacji zastosowano również inny układ rozpuszczalników EtOH:H₂O (2:1, v/v), gdzie dodatek wody w znaczący sposób ograniczył rozpuszczalność produktu. (E)-4-Amino-N'-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazyd otrzymano jako żółty osad z wydajnością 65%. Zadawalająca wydajność produktu, sugeruje, że ewentualne reakcje uboczne z udziałem grupy 4-amino pierścienia benzenowego zachodzą w ograniczonym stopniu. Produkt syntezowany tą metodą uzyskano z zadawalającą wydajnością, porównywalną do metody syntezy stosującej protekcję grupy aminowej. Ponadto synteza ta pozwala na uniknięciu dwóch dodatkowych etapów reakcji i wiąże się z łatwiejszym oczyszczaniem docelowego produktu **13**.

3.6. Opracowanie metody syntezy hydrazydów z N-acylowych pochodnych hydrazonów

3.6.1. Badania nad redukcją wiązania podwójnego C=N hydroksyhydrazonów jako pochodnych N-benzylloksykarbonylo-L-seryny w celu otrzymania pochodnych benserazydu.

W celu otrzymania pochodnych benserazydu dokonano optymalizacji redukcji wiązania iminowego C=N oraz równoczesnego odbezpieczenia grupy benzylloksykarbonylowej. Redukcję hydrazonu N-(N-benzylloksykarbonylo-(S)-serynylo)-2,3,4-trihydroksybenzaldehydu **7d** do 2-(2,3,4-trihydroksybenzylo)hydrazidu L-seryny **14e** opisano w patencie w 2019 roku (*Synthesis method of benserazide hydrochloride*) [131], gdzie zastosowano gazowy wodór pod ciśnieniem około 2 barów z użyciem 10% Pd/C. Syntezę benserazydu powtórzono według procedury opisanej w patencie. Na podstawie analizy NMR, stwierdzono całkowite odbezpieczenie grupy Cbz, jednakże konwersja substratu z wiązaniem iminowym N=CH do produktu z wiązaniem pojedynczym NH-CH₂ była niska. Współczynnik konwersji obliczono na podstawie stosunku sygnałów analitycznych substratu (NH-N=CH; około 8.2 ppm) i produktu (NH-NH-CH₂; około 3.8 ppm) (Rysunek 38), pamiętając że, powierzchnię całkowania pików substratu należy odnieść do połowy powierzchni całkowania pików produktu, ponieważ sygnał substratu reprezentuje jeden proton, ale sygnał produktu reprezentują dwa protony.



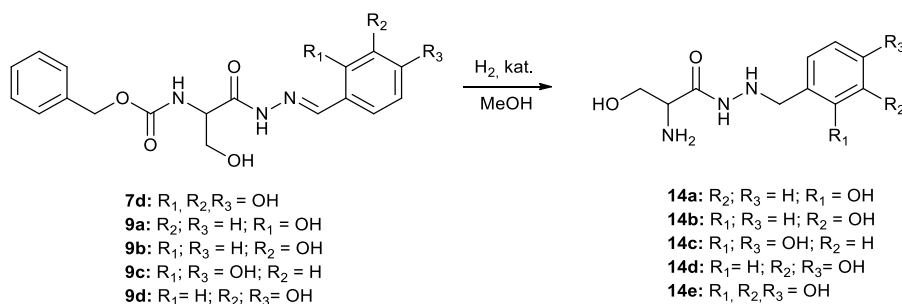
Rysunek 38. Fragmenty widma ¹H NMR (DMSO) z reakcji redukcji hydrazonu N-(N-benzylloksykarbonylo-(S)-serynylo)-2,3,4-trihydroksybenzaldehydu **7d**, wskazujące sygnały analityczne substratu i produktu.

W nowym patencie z roku 2021 [132] opisano ulepszoną wersję redukcji wiązania podwójnego przy użyciu urządzenia do uwodornienia ze złożem nieruchomym, z zastosowaniem katalizatora Pd/Al₂O₃. Z racji braku odpowiedniego sprzętu wiążącego się z możliwością przeprowadzenia syntezy według tej procedury, przystąpiono do poszukiwania optymalnej metody redukcji wiązania iminowego w celu uzyskania pochodnych benserazydu. W celu przeprowadzenia badań wykonano optymalizację finalnego etapu reakcji, wykonując szereg eksperymentów dla pochodnych hydrazonu zawierających jedną, dwie lub trzy grupy OH w pierścieniu benzenowym. W ten sposób sprawdzając dodatkowo jak ilość grup hydroksylowych wpływa na efektywność redukcji wiązania podwójnego.



Rysunek 39. Reaktor firmy Parr, w którym przeprowadzano redukcję katalityczną.

Pierwsze badania nad metodą redukcji wiązania iminowego polegały na znalezieniu optymalnych warunków reakcji uwodornienia z zastosowaniem gazowego wodoru (Schemat 35). Redukcję katalityczną prowadzono w autoklawie firmy Parr (Rysunek 39) poprzez intensywne wytrząsanie roztworu hydrazonu z katalizatorem w atmosferze wodoru, pod zadany ciśnieniem. Do reakcji zastosowano dwa różne katalizatory palladowe: 10% palladu na węglu aktywnym oraz 10% wodorotlenku palladu na węglu aktywnym.



Schemat 35. Reakcja katalitycznego uwodornienia hydrazonów do hydrazydów.

Procedura polegała na rozpuszczeniu 0,5 g danego hydrazonu w 20 mL bezwodnym metanolu, następnie na dodaniu do roztworu 15% masowych w stosunku do substratu katalizatora (około 75 mg) i umieszczeniu naczynia reakcyjnego w reaktorze ciśnieniowym firmy Parr, który wypełniono gazowym wodorem pod ciśnieniem 1,8-2,3 bara. Mieszaninę reakcyjną wytrząsano w różnym czasie i temperaturze. Po zakończonej reakcji stały katalizator odsączono, a rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie obliczono wydajność, mierząc ilość utworzonego produktu w stosunku do znanej ilości substratu przy użyciu spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego NMR. Wyniki z badań nad reakcją redukcji odpowiednich hydrazonów zebrano w tabeli poniżej.

Tabela 6. Optymalizacja warunków redukcji wiązania iminowego hydrazonów **7d** i **9a-9d** z użyciem wodoru jako środka redukującego.

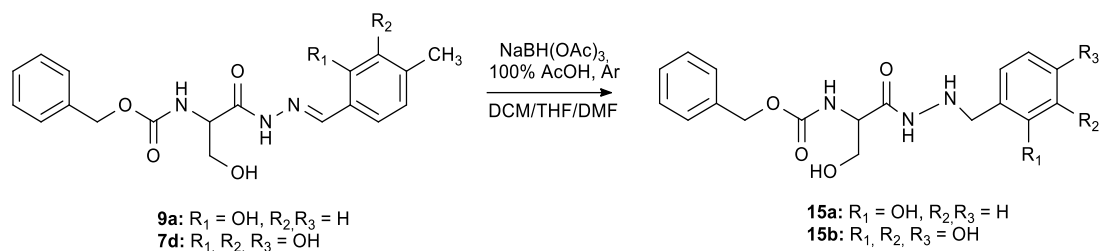
Produkt	Podstawienie			czas [h]	Temp. [°C]	katalizator	Ciśnienie [bar]	Wydajność [%]
	R ¹	R ²	R ³					
14a	OH	H	H	5	RT	Pd/C	1,8	75
14a	OH	H	H	7	RT	Pd/C	2,3	100
14b	H	OH	H	7	RT	Pd/C	2,2	95%
14e	OH	OH	OH	5	RT	Pd/C	2	30
14e	OH	OH	OH	5,5	50	Pd/C	2	50
14e	OH	OH	OH	5,5	50	Pd(OH) ₂ /C	2	84
14d	H	OH	OH	4	RT	Pd/C	2	60
14c	OH	H	OH	5,5	RT	Pd(OH) ₂ /C	2	100

Jak wynika z danych przedstawionych w tabeli 6, redukcja pochodnej aldehydu 2-hydroksybenzoesowego **9a** z użyciem katalizatora Pd/C w temperaturze pokojowej przebiega z dobrą wydajnością. Wydłużenie czasu reakcji z 5 godz. do 7 godz. oraz podniesienie ciśnienia wodoru z 1,8 bara do 2,3 bara skutkowało otrzymaniem 2-(2-hydroksybenzylo)hydrazynu L-seryny **14a** ze 100% wydajnością. Redukcję dla pochodnej aldehydu 3-hydroksybenzoesowego **9b** przeprowadzono w analogicznych warunkach uzyskując produkt **14b** z wysoką wydajnością 95%. Redukcja wiązania iminowego w przypadku trihydroksybenzoesowej pochodnej aldehydu jest utrudniona w temperaturze pokojowej, dlatego też podwyższono temperaturę do 50°C, otrzymując produkt z nieco większą wydajnością. Zmiana katalizatora Pd/C na Pd(OH)₂/C powoduje znacznie wydajniejszą redukcję związku **7d**. Analizując te wyniki, podczas redukcji 3,4-dihydroksybenzenowej pochodnej aldehydu zastosowano tańszy katalizator palladowy Pd/C, który świetnie sprawdzał się podczas redukcji hydrazonu aldehydu 2- i 3-hydroksybenzoesowego, uzyskując 2-(3,4-dihydroksybenzylo)hydrazyn L-seryny **14d** z wydajnością 60%. Ta umiarkowana wydajność procesu redukcji wiązania iminowego dla dihydroksybenzoesowej pochodnej aldehydu zadecydowała o użyciu Pd(OH)₂/C w przypadku syntezy 2-(2,4-dihydroksybenzylo)hydrazynu L-seryny **14c**, który otrzymano z 100% wydajnością.

Przeprowadzone eksperymenty potwierdzają, że reakcja katalitycznego uwodornienia jest dobrą metodą rozszczepienia grupy N-Cbz oraz w znacznym stopniu jest selektywna względem wiązań podwójnych, nie redukując przy tym grupy karbonylowej. Z przedstawionych rezultatów badań wynika również, że katalizator Pd(OH)₂/C jest selektywny w przypadku syntezy di- oraz trihydroksylowych pochodnych benserazydu, natomiast tańszy katalizator palladowy Pd/C zapewnia otrzymanie monohydroksylowej pochodnej benserazydu ze znakomitą wydajnością. Na podstawie przeprowadzonych prób można stwierdzić, że redukcja wiązania iminowego badanych hydrazonów za pomocą gazowego wodoru wobec katalizatora Pd/C jest tym mniej skuteczna, im więcej grup hydroksylowych jest obecnych w pierścieniu benzenowym hydrazonu.

Jednakże katalityczne uwodornienie hydrazonów w celu otrzymania benserazydu wymaga specjalistycznego sprzętu, generującego wysokie koszty oraz istnieje potrzeba zapewnienia wysokociśnieniowych reakcji, które stwarzają zagrożenia dla bezpieczeństwa. Ponadto katalizatory używane do redukcji również charakteryzują się wysoką ceną, a ilość dodawanego katalizatora jest duża, co może powodować śladowe zanieczyszczenia produktu, pogarszające jego jakość. Z tego powodu postanowiono przetestować inną metodę redukcji. Zgodnie z przesłankami literaturowymi [36]

triacetoksyborowodorek sodu $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ uchodzi za łagodny i skuteczny środek redukujący stosowany w redukcyjnym aminowaniu aldehydów i ketonów. Przedstawione w literaturowe liczne przykłady syntez z użyciem $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ potwierdzają jego selektywność w redukcji wiązania iminowego i tolerancję wobec wielu grup funkcyjnych.



Schemat 36. Redukcja wiązania iminowego za pomocą środka redukującego $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$.

Redukcję za pomocą triacetoksyborowodorku sodu przeprowadzono na podstawie jednej z procedur opisanych w publikacji E. Podyacheva i innych [35], dokonując optymalizacji tej reakcji na podstawie informacji zawartych w pracy przeglądowej Ahmed F. Abdel-Magid [133]. Zgodnie z tym do zawiesiny hydrazonu **9a** w DCM dodano równomolową ilość lodowatego kwasu octowego. Po 15 minutach dodano $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (2,2 ekw.) i mieszano w atmosferze argonu, w temperaturze pokojowej przez 24 godziny, zatrzymując reakcję poprzez dodanie NaHCO_3 . Użyto nadmiar środka redukcyjnego w celu skompensowania możliwego rozkładu wodorku przez obecność wody w rozpuszczalniku lub wilgoci z powietrza, która rozkłada triacetoksyborowodorek sodu [133]. Postęp reakcji monitorowano za pomocą spektroskopii NMR, stwierdzając niski stopień przereagowania substratu z wiązaniem iminowym, otrzymując hydrazyd **15a** z wydajnością 20%. Prawdopodobnie ma to związek z rozpuszczalnikiem stosowanym podczas reakcji, który nie rozpuszcza zarówno $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ jak i hydrazonu **9a**, utrudniając w ten sposób reakcję. Podczas doboru innego rozpuszczalnika zwrócono uwagę na fakt, że należy wykluczyć wodę oraz metanol, które nie są kompatybilne z triacetoksyborowodorkiem, który hydrolizuje w tych warunkach [133]. Postanowiono zastosować bezwodny THF, który według literatury zapewnia pomyślne wyniki w wielu reakcjach redukcji z udziałem $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$. W przypadku hydrazonu, pochodnej 2-hydroksybenzaldehydu, THF rozpuszcza substrat **9a** częściowo, natomiast nie rozpuszcza triacetoksyborowodorku. Po 2 godz. reakcji, w tych samych warunkach, zmieniając rozpuszczalnik, na podstawie NMR nadal stwierdzono niski stopień przereagowania hydrazonu, produkt powstaje z wydajnością 29%. Z tego powodu reakcję prowadzono dalej, przerywając ją po 24 godzinach, ustalając brak jakiegokolwiek dalszego przereagowania substratu po wydłużonym czasie reakcji. Pochodna 2,3,4-trihydroksybenzaldehydu **7d** rozpuszcza się całkowicie w THF, dlatego też zastosowanie tych samych warunków reakcji, co w przypadku syntezy hydrazynu **14a**, skutkowało otrzymaniem hydrazynu **15b** z wydajnością równą 58%.

Postanowiono również sprawdzić wpływ zastosowania większego nadmiaru $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ na syntezę pochodnej benserazydu **15a**. W jednej porcji dodano 4 ekwiwalenty środka redukującego, sprawdzając po 24 godzinach postęp reakcji, stwierdzając około 50% przereagowania substratu. Po tym czasie dodano kolejny ekwiwalent $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ i reakcję mieszano kolejne 24 godz., jednakże nie wpłynęło to w żaden sposób na reakcję.

Z powodu dalszej niezadawalającej wydajności otrzymywania pochodnych benserazydu, zmieniono stosowany rozpuszczalnik na DMF, który bardzo dobrze rozpuszcza wszystkie substraty, zapewniając homogeniczną mieszaninę reakcyjną. Poskutkowało to zwiększeniem wydajności otrzymywania hydrazynu **15a** do 74%. Syntezę **15a** powtórzono, jednakże w temperaturze 55°C z użyciem rurki chlorowapniowej, ograniczającą kontakt z wilgocią. Spowodowało to wzrost wydajności reakcji do 85%. Stosując DMF oraz 4 ekwiwalenty $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ w przypadku redukcji pochodnej 2,3,4-

trihydroksybenzaldehydu **7d**, produkt uzyskano z wydajnością 66%. Dane z optymalizacji warunków redukcji z użyciem triacetoksyborowodoru sodu jako środka redukującego przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela 7. Optymalizacja warunków redukcji wiązania iminowego z zastosowaniem NaBH(OAc)₃.

Produkt	Podstawienie			Czas [h]	Temp. [°C]	Rozpuszczalnik	NaBH(OAc) ₃ ekw.	Wydajność ^a [%]
	R ¹	R ²	R ³					
15a	OH	H	H	24	r.t.	DCM	2,2	20
15a	OH	H	H	24	r.t.	THF	2,2	29
15a	OH	H	H	48	r.t.	THF	5	59
15a	OH	H	H	24	r.t.	DMF	4	74
15a	OH	H	H	24	55	DMF	4	85
15b	OH	OH	OH	24	r.t.	THF	2,2	58
15b	OH	OH	OH	24	r.t.	DMF	4	66

^a Wydajność obliczono mierząc ilość utworzonego produktu w stosunku do znanej ilości substratu przy użyciu spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego

Z powyższych badań nad redukcją wiązania iminowego wynika, że podczas syntezy hydrazydów **15** konieczne jest zastosowanie nadmiaru NaBH(OAc)₃, równego 4 ekwiwalenty. Ważne jest również zastosowanie odpowiedniego rozpuszczalnika, który zapewni homogeniczność mieszaniny reakcyjnej. W przypadku otrzymywania pochodnych benserazydu właściwym rozwiązaniem jest DMF, który dobrze rozpuszcza wszystkie hydrazony oraz NaBH(OAc)₃. Podwyższenie temperatury reakcji podczas syntezy zabezpieczonej pochodnej 2-(2-hydroksybenzyl)hydrazidu L-seryny **15a**, nieznacznie wpływa na podwyższenie wydajności otrzymanego produktu, natomiast dłuższy czas reakcji nie wpływa na podwyższenie konwersji substratu. Synteza pochodnych benserazydu **15a** z układem monohydroksylowym oraz **15b** z układem trihydroksylowym w tych samych warunkach, skutkowało otrzymaniem **15a** oraz **15b** z wydajnością odpowiednio 74% i 66%, co sugeruje, że redukcja wiązania iminowego pochodnych benserazydu z układem monohydroksybenzenowym zachodzi nieco łatwiej niż w przypadku benserazydu posiadającego w pierścieniu trzy grupy hydroksylowe.

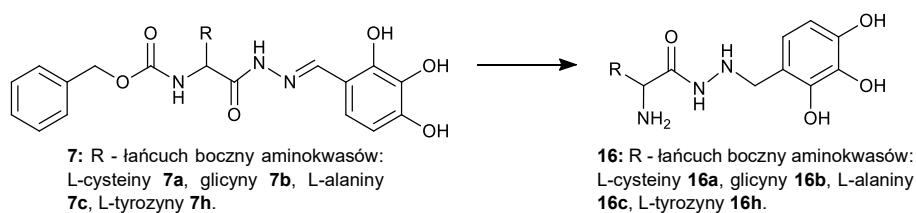
Z pośród borowodorów sodu stosowanych do odbezpieczenia grupy Cbz w obecności katalizatora palladowego [134] zastosowano triacetoksyborowodorek sodu. Substrat **7d** w roztworze DMF, zawierającym kwas octowy (1 ekw.) i Pd/C (10% wagowych) potraktowano NaBH(OAc)₃ (4 ekw.). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej, w atmosferze argonu przez 24 godziny. Na podstawie widma ¹H NMR stwierdzono, że grupa Cbz pozostała nienaruszona, a zatem triacetoksyborowodorek sodu w obecności katalizatora palladowego nie rozszczepia grupy benzyloksykarbonylowej. Ze względu na brak odbezpieczenia Cbz tą metodą oraz niższą wydajność otrzymywanych produktów redukcji wiązania iminowego z zastosowaniem NaBH(OAc)₃ jako czynnika redukującego, w porównaniu do metody uwodornienia katalitycznego, nie podjęto próby wydzielenia finalnych związków z mieszaniny poreakcyjnej, rezygnując z tej metody redukcji w celu otrzymywania pochodnych benserazydu.

Otrzymane w wyniku redukcji wodorem w obecności katalizatora palladowego pochodne benserazydu należało oczyścić. W tym celu należało opracować efektywną metodę izolacji tych związków. Pierwszą próbę podjęto z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym z zastosowaniem polarnego układu eluującego 50% MeOH/CHCl₃. W przypadku 2-(2-hydroksybenzylideno)hydrazidu L-seryny przy użyciu tego eluentu udało się zebrać frakcje zawierające produkt. Jednakże produkt po chromatografii kolumnowej przyjął barwę ciemnobrunatną i według

analizy NMR zawierał nieznaczne zanieczyszczenia w obszarze przesunięć protonów alifatycznych. Ponadto uzyskano małą ilość produktu, co sugeruje, że większość produktu pozostała na kolumnie chromatograficznej, ze względu na silne oddziaływanie z wypełnieniem kolumny, bądź też uległa rozkładowi podczas procesu oczyszczania. W przypadku oczyszczania macierzystego benserazydu, rozdział mieszaniną rozpuszczalników 50% MeOH/CHCl₃ nie był możliwy, dlatego do elucji produktu z kolumny chromatograficznej wykorzystano 100% metanol. Tym sposobem otrzymano śladowe ilości czystej pochodnej benserazydu. Pochodne benserazydu ze względu na obecność grup hydroksylowych oraz wolnej grupy aminowej charakteryzują się wysoką polarnością, silnie oddziałując z polarnymi centrami aktywnymi powierzchni sorbentu. Z tego powodu zrezygnowano z oczyszczania hydrazydów **14** z użyciem chromatografii kolumnowej i podjęto próbę krystalizacji pochodnej **14e** z etanolu, zgodnie z metodą oczyszczania benserazydu opisaną w patencie [131]. Jednakże osad który wykrystalizował zawierał zarówno 2-(2,3,4-trihydroksybenzylo)hydrazyd L-seryny oraz nieprzereagowany substrat i niemożliwym było rozdzielanie obu związków poprzez krystalizację z EtOH.

Benserazydowe pochodne **14** z powodzeniem udało się oczyścić z wykorzystaniem preparatywnej wysokosprawnej chromatografii cieczowej – PHPLC (ang. preparative high-performance liquid chromatography) w układzie faz odwróconych na kolumnie ODS (ang. octadecyl-silica). Jako eluent zastosowano metanol, dobierając natężenie przepływu eluentu równą 7 ml/min, pozwalający na dobry rozdział hydrazonów od hydrazydów.

3.6.2. Otrzymywanie analogów aminokwasowych benserazydu w wyniku redukcji hydrazonów pochodnych N-benzylotoksykarbonyloaminokwasów



Schemat 37. Schematyczne przedstawienie redukcji wiązania iminowego oraz rozszczepienia grupy Cbz hydrazonów pochodnych N-benzylotoksykarbonyloaminokwasów.

W celu otrzymania pochodnych analogów aminokwasowych benserazydu podjęto próby redukcji wiązania iminowego hydrazonów i odbezpieczenia grupy Cbz związków **7** przedstawionych na schemacie powyżej.

Podczas otrzymywania 2-amino-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylo)acetohydrazidu **16b** przeprowadzono serię eksperymentów z zastosowaniem uwodornienia w autoklawie firmy Parr w obecności katalizatorów palladowych. Metanолоwый roztwór hydrazonu **7b**, do którego dodano 20% masowych 10% Pd/C wytrząsano w autoklawie przez 3 godziny w atmosferze wodoru pod ciśnieniem 1,5 bara w temperaturze pokojowej. Po skończonej reakcji oddzielono katalizator, odparowano metanol i poddano pozostałość analizie NMR. W tym przypadku reakcja była nieskuteczna, stwierdzono w widmie ¹H NMR ślady odbezpieczonego substratu oraz produkty uboczne.

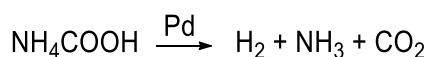
W kolejnej próbie zastosowano ten sam katalizator oraz rozpuszczalnik, jednak wydłużono czas reakcji do 6,5 godziny oraz podwyższono ciśnienie wodoru do 2,2 bara. Następnie usunięto katalizator z mieszaniny reakcyjnej i odparowano metanol pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość podzielono na dwie równe porcje i krystalizowano z etanolu oraz eteru dietylowego, by sprawdzić który rozpuszczalnik jest skuteczniejszy w procesie oczyszczania. W obu przypadkach, zaraz po ochłodzeniu roztworu wypada beżowy osad. W trakcie sączenia pod zmniejszonym ciśnieniem, na sączku otrzymany osad przemienia się w brązowy olej, co świadczy o silnej higroskopijności otrzymanego związku. Z tego

powodu trudno było ocenić, która metoda oczyszczania jest lepsza, uznając eter dietylowy oraz EtOH jako efektywne rozpuszczalniki stosowane podczas tej krystalizacji. Uzyskaną oleistą pozostałość liofilizowano i zbadano za pomocą NMR. Nawiązując do widma ^1H NMR, otrzymanym związkiem był hydrazon pochodnej benzaldehydu trihydroksylowego, bez grupy zabezpieczającej. W przesączu zaś znajdował się substrat reakcji N-(N-Cbz-glicyno)-2,3,4-trihydroksybenzaldehydu. Syntezę 2-amino-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylo)acetohydrazynu przeprowadzono jeszcze raz według tej samej procedury jednak zastosowano inny rozpuszczalnik jakim był DMF. W rezultacie również otrzymano mieszaninę substratu oraz hydrazonu z odbezpieczoną grupą cbz, jednak wciąż z obecnym wiązaniem iminowym.

W następnym eksperymencie jako katalizatora palladowego wykorzystano 50% masowych mieszaniny Pd/C: Pd(OH)₂/C w stosunku wagowym 1:1. Reakcję prowadzono 8 godzin w metanolu z zastosowaniem ciśnienia wodoru równym 3 bary. Po analizie NMR stwierdzono, że mieszanina reakcyjna zawiera odbezpieczony hydrazon analogu glicyny oraz ślady oczekiwanego produktu ze zredukowanym wiązaniem podwójnym. Postanowiono wydzielić produkt na kolumnie HPLC z układem faz odwróconych z użyciem 70% MeOH/H₂O. Niestety, produkt oraz substrat uległy rozpadowi na kolumnie podczas procesu oczyszczania.

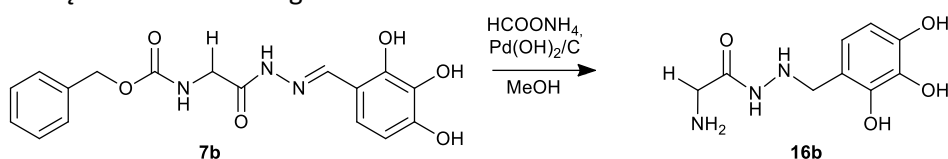
Reakcję uwodornienia katalitycznego postanowiono również przeprowadzić bez zastosowania reaktora firmy Parr, w celu sprawdzenia czy wydłużony czas reakcji do 2 dni może wpłynąć na redukcję wiązania iminowego. W tym celu zawieszono substrat w metanolu i kolbę przedmuchano argonem. Roztwór intensywnie mieszano przez 48 godzin, z ciągłym dozowaniem H₂. Podczas analizy TLC mieszaniny reakcyjnej stwierdzono brak oczekiwanego produktu oraz obecność aldehydu oraz produktów jego rozkładu. Nieobecny był również substrat reakcji, co sugeruje rozpad N-(N-Cbz-glicyno)-2,3,4-trihydroksybenzaldehydu. Z tego powodu zaniechano metody klasycznej redukcji katalitycznej.

Hydrazon analogu glicyny **7b** udało się zredukować w zmodyfikowanych warunkach stosując jako donor wodoru mrówczan amonu [135]. Według danych literaturowych [135] wodór powstaje *in situ* w reakcji rozkładu mrówczanu amonu pod wpływem palladu, co ilustruje schemat reakcji.



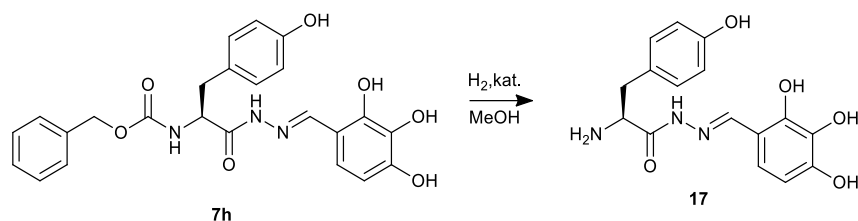
Schemat 38. Reakcja rozkładu mrówczanu amonu za pomocą palladu.

Podążając wedle procedury przedstawionej w literaturze [135], N-(N-Cbz-glicyno)-2,3,4-trihydroksybenzaldehyd (0,150 g, 0,417 mmol) zawieszono w metanolu, dodano 2,2 ekwiwalenty NH₄COOH oraz 40% masowych (względem substratu) 10% Pd(OH)₂. Mieszaninę mieszano w temperaturze 50°C przez 12 godzin. Po upływie tego czasu, analiza TLC nie tylko potwierdziła obecność produktu, ale też zidentyfikowano aldehyd 2,3,4-trihydroksybenzoowy oraz inne nierozpoznane produkty uboczne. W konsekwencji powtórzono syntezę w tych samych warunkach, jednakże ograniczając czas reakcji do 2 godzin. Po tym czasie, usunięto katalizator palladowy poprzez sączenie grawitacyjne oraz odparowano metanol. Pozostałość krystalizowano z etanolu, uzyskując beżowy osad, który po krótkiej chwili zamieniał się w brązowy olej. Z uwagi na higroskopijne właściwości związku zliofilizowano go.



Schemat 39. Redukcja hydrazonu N-(N-Cbz-glicyny)-2,3,4-trihydroksybenzaldehydu za pomocą mrówczanu amonu.

Po analizie NMR potwierdzono strukturę glicynowego analogu benserazydu **16b**, który otrzymano z wydajnością 48%.



Schemat 40. Katalityczne uwodornienie hydrazonu **7h**.

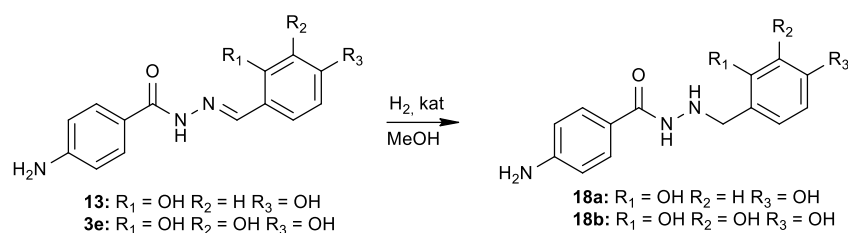
Dla hydrazonu tyrozyny **7h** uwodornienie przeprowadzano w autoklawie firmy Parr gazowym wodorem pod ciśnieniem 2.5 bara, w obecności 20% masowych (względem substratu), mieszanki katalizatorów palladowych Pd/C oraz Pd(OH)₂ w stosunku 1:1. Mieszaninę reakcyjną wytrząsano w temperaturze pokojowej, w roztworze metanolu przez 6,5 godziny. Tą metodą udało się jedynie rozszczepić zabezpieczenie Cbz, jednakże nie udało się efektywnie zredukować wiązania podwójnego N=C. Postanowiono dokonać próby redukcji wiązania iminowego za pomocą katalizatora palladowego oraz mrówczanu amonu jako donora wodoru. W tym celu rozpuszczono hydrazon **7h** w metanolu, dodano 2,2 ekwiwalenty NH₄COOH oraz 60% masowych względem hydrazonu **7h** 10% Pd(OH)₂. Reakcję prowadzono pod argonem w temperaturze 50°C przez 2 godziny. Po tym czasie oddzielono stały katalizator od mieszaniny reakcyjnej i odparowano metanol pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymaną pozostałość krystalizowano z etanolu. Wykonano analizę NMR otrzymanego osadu oraz przesącza. Jak wynika z analizy widm ¹H NMR w żadnej z badanych próbek nie znaleziono oczekiwanego produktu **16h**, natomiast na obu widmach były obecne sygnały pochodzące od 2,3,4-trihydroksybenzaldehydu. Z powodu małej ilości substratu nie przystąpiono do dalszej optymalizacji redukcji wiązania iminowego.

W przypadku cysteinowego analogu benserazydu **7a** nie doszło do uwodornienia katalitycznego w powyżej opisanych warunkach ani przy zastosowaniu redukcji z borowodorkami. Prawdopodobną przyczyną jest to, że związek ten zawiera w swojej strukturze grupę merkaptanową, która powoduje zatrucie katalizatorów palladowych, co skutkuje utratą jego funkcji [136]. Nie wykonano również uwodornienia z użyciem niklu ranneya, ponieważ według udowodnionych doniesień naukowych katalizator ten powoduje desulfuryzację [137]. Podjęto jednak próbę redukcji elektrochemicznej N-(N-benzyloksykarbonylo-L-cysteino)-2,3,4-trihydroksybenzaldehydrazonu **7a**. W tym celu N-(N-Cbz-L-cysteino)-2,3,4-trihydroksybenzaldehydrazon (0,05 g, 0,123 mmol) rozpuszczono w 5 ml CH₃CN:H₂O w stosunku 1:1 oraz dodano tetrafluoroboran tetraetyloamoniowy (0,032 g, 0,147 mmol) oraz Na₂CO₃ (0,042 g, 0,396 mmol), umieszczając mieszaninę w reaktorze do elektrosyntezy. Elektroliza była przeprowadzana w temperaturze pokojowej przez 30 min, z zastosowaniem prądu stałego (50 mA) oraz 6 F/mol. Jako katodę użyto platynę, natomiast grafit wykorzystano jako anodę. Po zakończeniu reakcji mieszaninę ekstrahowano AcOEt. Warstwę organiczną przemyto solanką i suszono nad Na₂SO₄. Po analizie NMR, niestety stwierdzono brak oczekiwanego produktu **16a** oraz liczne niezidentyfikowane produkty uboczne.

Spróbowano przeprowadzić redukcję hydrazonu analogu alaniny **7c** zgodnie z ogólną metodą katalitycznego uwodornienia. Hydrazon N-(N-benzyloksykarbonylo-L-alanino)-2,3,4-trihydroksybenzaldehydu (1,73 mmol) rozpuszczono w bezwodnym metanolu w naczyniu do redukcji. Następnie dodano do mieszaniny 125 mg 10% Pd/C i umieszczono w aparacie Parra. Mieszaninę wytrząsano przez 6 godzin w temperaturze pokojowej pod ciśnieniem wodoru 2 bary. Po skończonej reakcji, roztwór zmienił barwę z żółtej na brunatną. Oddzielono katalizator od mieszaniny reakcyjnej za pomocą sączenia grawitacyjnego, odparowano metanol uzyskując pomarańczową pozostałość, którą

oczyszczano za pomocą HPLC w odwróconym układzie faz ODS z zastosowaniem metanolu jako eluentu. Przystąpiono do analizy NMR otrzymanych frakcji. W trakcie przygotowywania próbki, rozpuszczając próbkę z oczekiwanym produktem w deuterowanym metanolu, wytrącił się ceglasty osad, który przesączono i próbowano rozpuścić w DMSO, jednak bez skutecznie. Podczas analizy rozpuszczonej frakcji nie zidentyfikowano docelowego produktu **16c** ani substratu reakcji **7c**. Widmo było trudne do interpretacji, ponieważ w obszarze przesunięć pola charakterystycznych dla protonów alifatycznych pojawiła się liczna ilość sygnałów. Redukcję wiązania iminowego oraz deprotekcja Cbz w przypadku pochodnej **7c** zawierającej układ alaniny, nie jest możliwa z zastosowaniem metody uwodornienia katalitycznego w tych warunkach.

3.6.3. Otrzymywanie 4-amino-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylo)benzohydrazynu oraz 4-amino-N'-(2,4-dihydroksybenzylo)benzohydrazynu



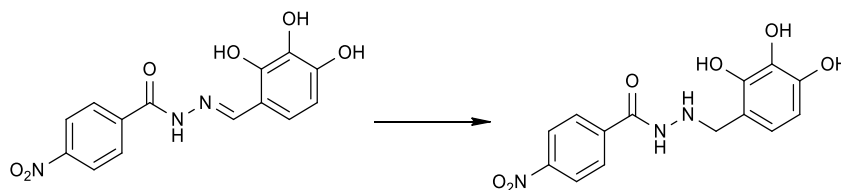
Schemat 41. Redukcja wiązania azometinowego za pomocą uwodornienia katalitycznego.

Otrzymano hydrazydy **18a** i **18b** w wyniku redukcji hydrazonu **13** oraz **3e** za pomocą uwodornienia katalitycznego z wykorzystaniem katalizatorów palladowych. Na podstawie wcześniej przeprowadzonych eksperymentów dotyczących redukcji wiązania iminowego stwierdzono, że katalizator Pd(OH)₂/C zachowuje się bardziej selektywnie w stosunku do wiązania N=C w przypadku pochodnych z układem di- oraz trihydroksybenzenowym niż Pd/C, zapewniając efektywniejszą metodę otrzymania odpowiednich hydrazydów. Podczas otrzymywania 4-amino-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylo)benzohydrazynu **18b** z (*E*)-4-amino-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazynu **3e** wykorzystano gazowy wodór oraz Pd(OH)₂/C. Zgodnie z procedurą rozpuszczono hydrazon **3e** (1.07 mmol) w bezwodnym metanolu, dodano 20% wagowych, w odniesieniu do substratu, katalizatora Pd(OH)₂ i naczynie reakcyjne umieszczono w reaktorze ciśnieniowym firmy Parr. Mieszaninę wytrząsano przez 6 godzin w temperaturze pokojowej, pod ciśnieniem gazowego wodoru równym 2,3 bara. Po zakończonej reakcji, katalizator przesączono, a rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskaną brązowo-różową pozostałość zbadano za pomocą spektroskopii rezonansu jądrowego. Ustalono, że substrat uległ konwersji do produktu **18b** w 75%. Postanowiono kolejny raz podjąć się redukcji tej samej mieszaniny substratu z produktem. Zastosowano identyczne warunki reakcji, z zastosowaniem nowej porcji katalizatora. Na podstawie analizy NMR stwierdzono brak postępu reakcji, co sugeruje, że reakcja zachodzi do pewnego momentu, a kolejna porcja wodoru oraz katalizatora nie wyptywa na przesunięcie równowagi reakcji oraz, że katalizator nie uległ dezaktywacji podczas poprzedniej reakcji. Z powodu znacznego podobieństwa strukturalnego produktu do substratu oraz wspólnego polarnego charakteru związków, izolacja 4-amino-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylo)benzohydrazynu jest utrudniona. Pozostałość stałą próbowano oczyścić za pomocą krystalizacji z etanolu lub mieszaniny DMF:CHCl₃ (1:5 v/v), jednakże nie udało się wydzielić czystego produktu. Dopiero krystalizacja z mieszaniny etanolu i H₂O (1:2, v/v) jako rozpuszczalników pozwoliła na wydzielenie 95 mg (40%) czystego produktu **18b** w formie beżowego osadu. Metoda ta generuje duże straty, gdyż spora ilość produktu przeszła do przesączu, jednakże użycie mniejszej objętości rozpuszczalników do krystalizacji, powoduje jednoczesne wytrącenie substratu wraz z produktem. Z tego względu podjęto próbę oczyszczania hydrazydu za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Na podstawie TLC dobrano układ

eluentów DCM:MeOH:AcOEt w stosunku objętościowym 4:3:2,5 (v/v), niestety wydzielono tylko 50 mg, pomimo przemywania kolumny metanolem przy ostatnim etapie chromatografii kolumnowej.

Syntezę 4-amino-N'-(2,4-dihydroksybenzylo)benzohydrazynu **18a** wykonano analogicznie do syntezy hydrazynu **18b**, przeprowadzając ją również w reaktorze ciśnieniowym firmy Parr, z zastosowaniem tego samego katalizatora, czasu reakcji oraz ciśnienia wodoru. Przeprowadzono trzy eksperymenty redukcji (*E*)-4-amino-N'-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazynu **13** z użyciem różnej ilości katalizatora, dodając 20%, 30% lub 40% wagowo h10% Pd(OH)₂ w przeliczeniu na substrat **13**. W pierwszym przypadku wiązanie iminowe hydrazonu uległo redukcji w 60%, zastosowanie dodatku katalizatora jako 30% masowych substratu spowodowało wzrost konwersji substratu do produktu w 93%, kolejne zwiększanie stężenia katalizatora w mieszaninie reakcyjnej nie wpłynęło na przebieg reakcji. Korzystnym rozpuszczalnikiem do krystalizacji 4-amino-N'-(2,4-dihydroksybenzylo)benzohydrazynu **18a** jest EtOH. Rekrystalizacja 140 mg surowego produktu w 1 mL EtOH pozwala uzyskać 80 mg czystego hydrazynu **18a**.

3.6.4. Próba redukcji wiązania azometinowego (*E*)-4-Nitro-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazynu



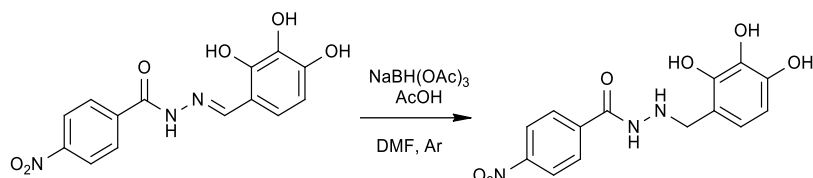
Schemat 42. Schemat otrzymywania 4-nitro-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylo)benzohydrazynu z (*E*)-4-nitro-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazynu.

Podjęto próbę redukcji wiązania N=CH dla macierzystego inhibitora HK2 – benitrobenrazydu. Redukcję (*E*)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)-4-nitrobenzohydrazynu wykonano w roztworze bezwodnego metanolu w obecności 20% masowych katalizatora Pd/C w reaktorze ciśnieniowym firmy Parr pod ciśnieniem 3 bar. Mieszaninę wytrząsano przez 5 godzin. analizy NMR, grupa nitrowa została zredukowana, natomiast wiązanie podwójne uległo tylko Po zakończonej reakcji katalizator oddzielono od roztworu, a rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Klarowny roztwór podczas reakcji zmienił barwę z pomarańczowej na czerwoną. Według częściowej redukcji, proporcję hydrazonu do hydrazynu na podstawie sygnałów analitycznych substratu i produktu oszacowano na 2:3.

Podczas drugiej próby redukcji (*E*)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)-4-nitrobenzohydrazynu postanowiono zastosować odmienny katalizator, Nikiel Ranneya, proponowany w literaturze jako katalizator stosowany w redukcji wiązania iminowego [138]. Reakcję redukcji prowadzono w kolbie, (*E*)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)-4-nitrobenzohydrazyn (0,8 mmol) rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników MeOH:THF w stosunku objętościowym 1:1 i 80 mg dodano Nikiel Ranneya. Kolbę przedmuchano argonem i wypełniono gazowym wodorem. Zawiesinę intensywnie mieszano przez 24 godziny, z ciągłym dozowaniem H₂. Po pół godzinie roztwór zmienił barwę z pomarańczowej na żółtą. Wykonana po godzinie analiza TLC, wykazała obecność substratu, który zanikł po 24 godz. prowadzenia reakcji. Po tym czasie katalizator przesączono przez celit pod zmniejszonym ciśnieniem i rozpuszczalnik odparowano. Pozostałość analizowano za pomocą NMR. Niestety interpretacja widma ¹H NMR była zbyt trudna, ze względu na obecność licznych produktów ubocznych i prawdopodobnie pozostałość katalizatora niklowego, która silnie wpływa na jakość widma. Z tego powodu próbkę oczyszczono za pomocą HPLC, w układzie faz odwróconych na kolumnie ODS, z użyciem metanolu jako eluentu. Zebrano dwie frakcję i analizowano je po raz kolejny za pomocą NMR. Jedna z otrzymanych frakcji

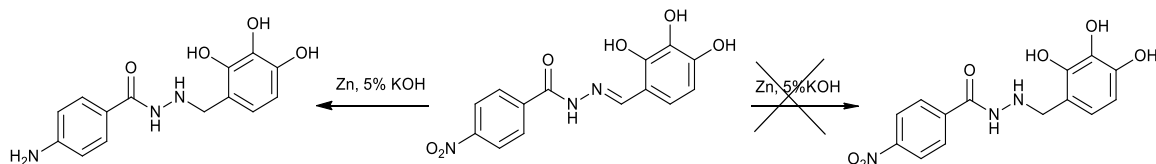
okazała się być związkami, który miał całkowicie zredukowaną grupę nitrową oraz zredukowane wiązanie podwójne N=C, o czym świadczy brak sygnałów w obszarze przesunięć dla protonu iminowego (8.0-8.5 ppm). Pomimo oczyszczania, oprócz sygnałów pochodzących od hydrazynu można było również zauważyć liczne, niezidentyfikowane sygnały. Na podstawie tych reakcji udowodniono, że grupa nitrowa w strukturze (*E*)-4-nitro-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazynu ulega zredukowaniu do grupy aminowej pod wpływem redukcji gazowym wodorem wobec Ni Raneya.

W kolejnych próbach redukcji zastosowano związki selektywnie redukujące wiązanie iminowe takie jak: NaBH(OAc)₃ [133] oraz Zn [41].



Schemat 43. Redukcja wiązania iminowego za pomocą triacetoksyborowodoru sodu.

Redukcję (*E*)-4-nitro-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazynu wykonano na podstawie wcześniejszych eksperymentów redukcji hydrazonów pochodnych benzohydrazynu. Roztwór hydrazonu (0,315 mmola) w DMF zawierający lodowaty kwas octowy (0.315 mmol) mieszano przez 15 minut, a następnie dodano nadmiar NaBH(OAc)₃ (4 ekw.) i mieszano w atmosferze argonu w temperaturze pokojowej przez 5 dni. Postęp reakcji monitorowano za pomocą spektroskopii NMR. Podczas reakcji mieszanina pozostaje heterogeniczna, z powodu tylko częściowego rozpuszczenia hydrazonu w DMF, przyjmując kolor krwistoczerwony. Z analizy NMR wynika, że w tych warunkach redukcja wiązania podwójnego praktycznie nie zachodzi, natomiast na widmie ¹H NMR w obszarze przy przesunięciach 6.06-6.10 ppm pojawia się niezidentyfikowany kwartet, który nie pochodzi od żadnego reagenta oraz produktu. Z tego powodu reakcję przeprowadzono jeszcze raz w tych samych warunkach, jednak stosując podwyższoną temperaturę równą 70°C. Nawet w tej temperaturze, substrat nie rozpuszcza się całkowicie, a mieszanina przyjmuje taką samą krwistoczerwoną barwę. Zgodnie z analizą ¹H NMR, substrat uległ tylko częściowej konwersji, ilość produktu oszacowano na 15%. Przy przesunięciu równym 6.07-6.10 ppm również pojawia się niezidentyfikowany kwartet. Zaniechano dalszej próby syntezy *N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)-4-nitrobenzohydrazynu tą metodą, ze względu na niezadawalającą wydajność otrzymanego produktu oraz powstawania produktów ubocznych w trakcie syntezy. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów, można stwierdzić, że triacetoksyborowodorek sodu jest selektywny względem wiązania N=C, nie redukując przy tym grupy nitrowej. Świadczy o tym brak sygnału na wykonanym widmie ¹H NMR w obszarze przesunięć 5.6-5.7 ppm, pochodzącym od grupy NH₂, protonów zredukowanej grupy nitrowej.



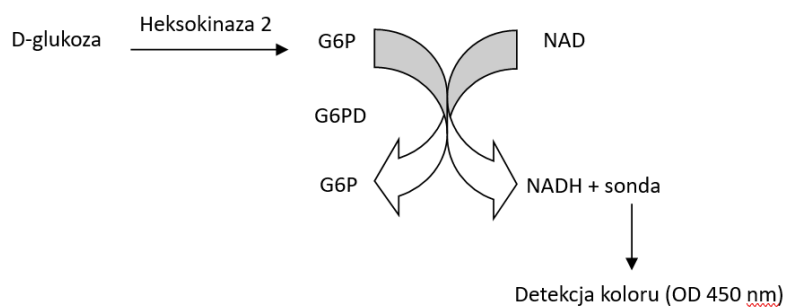
Schemat 44. Próba redukcji *N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)-4-nitrobenzohydrazynu cynkiem.

Podjęto próbę otrzymania *N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)-4-nitrobenzohydrazynu w warunkach zasadowych, opisanych przez zespół Giovenzana [41]. Do 5% wodnego roztworu wodorotlenku potasu dodano hydrazon (0,94 mmol) oraz pył cynkowy (15 ekw., 14,18 mmol). Substrat rozpuścił się w wodnym roztworze, a roztwór przybrał czerwonobrunatną barwę. Całkowite rozpuszczenie hydrazonu w r-r KOH świadczy o jego przekształceniu w sól potasową. Mieszaninę reakcyjną

intensywnie mieszano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie dokonano analizy TLC i zwizualizowano plamki ninhydriną. Zabarwienie plamki pochodzącej od otrzymanego produktu na kolor intensywnie fioletowy świadczy o redukcji grupy nitrowej do aminowej. Zawiesinę przesączono, by pozbyć się pozostałości cynku, a uzyskany przesącz zakwaszono 1M HCl. W trakcie procesu zobojętniania wytrąciła się bardzo mała ilość pomarańczowego osadu, jednakże większość produktu została w roztworze co może świadczyć, że podczas dodawania HCl powstała kolejna sól: chlorowodorek 4-amino-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylo)benzohydrazdu. Z powodu utrudnionej izolacji produktu z mieszaniny reakcyjnej oraz redukcji grupy nitrowej zaniechano tej metody syntezy docelowego hydrazdu. Nie kontynuowano dalszych prób redukcji.

3.7. Badania biologiczne.

Dla wybranych zsyntezowanych, pochodnych N-acylohydrazonów oraz hydrazdów i analogów benserazydu oraz benitrobenzazydu, wyznaczono aktywność hamującą w odniesieniu do heksokinazy 2 (HK2). Badania nad aktywnością HK2, opisane w literaturze, zazwyczaj bazują na spektroskopii UV-Vis, w której mierzy się zmiany absorbancji NADPH w zakresie 320–490 nm [16, 111, 139]. Należało dobrać taką metodę, w której otrzymane związki nie wykazują interferencji z testem, to znaczy nie wykazują absorpcji przy długości fali analitycznej. W ramach pracy doktorskiej zostały wykonane badania na czystym enzymie za pomocą komercyjnie dostępnych testów do oznaczania aktywności enzymów (Hexokinase II Inhibitor Screening, nr kat. ab211114, firmy Abcam), wykorzystujących metodę spektrofotometryczną poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 450 nm, przy której badane związki nie wykazują absorbancji. Test opiera się na zdolności HK2 do przekształcania glukozy w glukozo-6-fosforan. Glukozo-6-fosforan następnie jest utleniany przez dehydrogenazę glukozo-6-fosforanową w obecności NAD, który jest jednocześnie redukowany do NADH. Powstały NADH redukuje bezbarwną sondę do barwnego produktu wykazującego silną absorbancję przy 450 nm (Rysunek 40).



Rysunek 40. Zasada działania komercyjnie dostępnego testu opartego na metodzie spektrofotometrycznej.

Aktywność heksokinazy oceniano w odniesieniu do kontroli niezawierającej inhibitora (kontrola negatywna - aktywność HK2 100%). Jako kontrolę pozytywną zastosowano znany inhibitor HK2: kwas 3-bromopirogronowy będący częścią komercyjnego testu. Wyniki z wykonanych testów są średnią \pm z odchyleniem standardowym pochodzącym z trzech niezależnych eksperymentów. Pomiary wykonano przy stężeniach testowanych związków na poziomie 50, 5 i 1 μ M. Decyzja o ustaleniu w badaniach takiego zakresu stężeń została podjęta autorytarnie. Podjęto za górną granicę stężenia inhibującego enzym 50 μ M. Ustalenie to było oparte o publikowane w literaturze dane inhibicji enzymu i umożliwiły ocenę aktywności w porównaniu z opisanymi dotychczas inhibitorami.

W celach porównawczych wyniki z oznaczenia spektrofotometrycznego dla wybranej pochodnej zostały porównane z rezultatami drugiej, alternatywnej metody opisanej przez grupę badawczą Guan [140], bazującej na określeniu aktywności HK2 metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconym układem faz. W metodzie tej oznacza się ilość powstałego ADP w katalizowanej heksokinazą 2 reakcji fosforylacji D-glukozy do glukozo-6-fosforanu adenozynotrifosforanem (ATP). Aktywność heksokinazy została oceniona w porównaniu do kontrolnej próby bez inhibitora (kontrola negatywna - aktywność HK2 wynosząca 100%). Jako kontrolę pozytywną zastosowano benserazyd, znany inhibitor HK2, opisany w literaturze. Wyniki testów, uzyskane z trzech niezależnych eksperymentów, zostały przedstawione jako średnia \pm odchylenie standardowe. Pomiar przeprowadzono przy stężeniach testowanych związków na poziomie 1 oraz 10 μ M. Równoległe przeprowadzenie testów dwoma niezależnymi metodami pozwoliło na porównanie otrzymanych w nich wyników i uwiarygodniło otrzymane wartości inhibicji.

Ze względu na obiecującą aktywność przeciwnowotworową benitrobenrazydu, dla macierzystego BNBZ oraz jej analogów polihydroksybenzenowych, we współpracy z Wydziałem Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, wykonano dodatkowe testy hamowania aktywności HK2 na modelowych liniach komórkowych. Ponadto dla wybranych pochodnych przeprowadzono badania na cytotoksyczność i klonogenność. Określono dla nich także stałą dysocjacji ligand-enzym przy użyciu termoforezy mikroskalowej (ang. MicroScale Thermophoresis MST). Wyniki przeprowadzonych eksperymentów pozwolą na rozwinięcie wiedzy dotyczącej projektowania lepszych inhibitorów HK2 oraz ich wpływu na funkcje komórek nowotworowych.

3.7.1. Widma UV-VIS związków poddanych badaniom biologicznym

Niektóre z badanych przeze mnie związków, zawierających wiązanie iminowe lub układy aromatyczne, posiadają chromofory, wykazujące absorpcję w zakresie UV-Vis. Przed przystąpieniem do badania zdolności inhibicyjnej zsyntezowanych związków metodą spektrofotometryczną należało sprawdzić w jakim zakresie absorbują badane związki. Ich pasma absorpcji nie mogą nakładać się na pasmo próby użytej w teście komercyjnym (450 nm). Badane związki absorbują w zakresie długości fal 250-370 nm, a zatem nie wykazują interferencji z próbą zastosowaną w komercyjnie dostępnym teście.

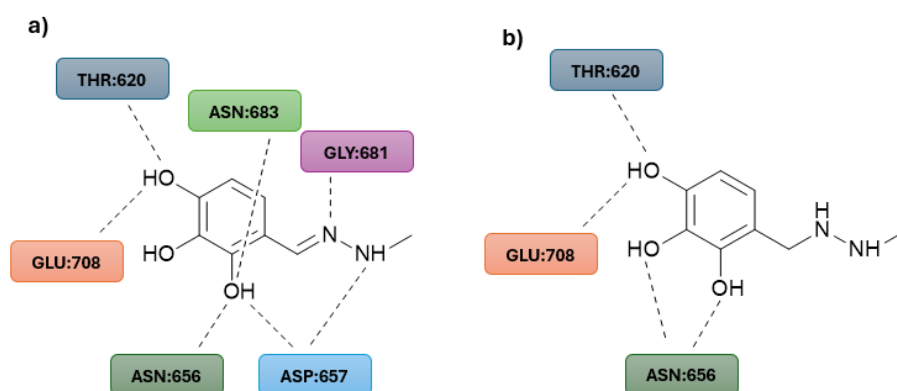
W tabeli 8 przedstawiono współczynniki ekstynkcji wyznaczone dla niektórych testowanych potencjalnych inhibitorów o różnej strukturze, zawierających odmienne chromofory: (*E*)-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)propionohydrazyd **3a**, (*E*)-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)antraceno-9-karbohydrazyd **3d**, (*E*)-4-amino-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazyd **3f**, (*E*)-2-amino-3-(4-hydroksyfenilo)-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)propanohydrazyd **17**, (2,3,4-trihydroksybenzylideno)hydrazyd-L-seryny **14a**, hydrazyd N-benzylloksykarbonylo-L-tyrozyny **6h**.

Tabela 8. Współczynniki ekstynkcji wybranych, testowych związków przy stężeniu 50 μM .

Związek	Długość fali analitycznej λ [nm]	A	ϵ [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
3a	303,5	0,1721	3321,333 \pm 131,001
		0,1670	
		0,1591	
3d	308,0	0,6389	12491,330 \pm 273,183
		0,6117	
		0,6231	
3f	323,5	0,4621	8950,667 \pm 259,109
		0,4373	
		0,4432	
14a	258,5	0,1296	2634,667 \pm 37,806
		0,1395	
		0,1332	
17	291,0	0,2732	5670,667 \pm 217,736
		0,2825	
		0,2949	
6h	274,5	0,0904	1760 \pm 53,702
		0,0885	
		0,8951	

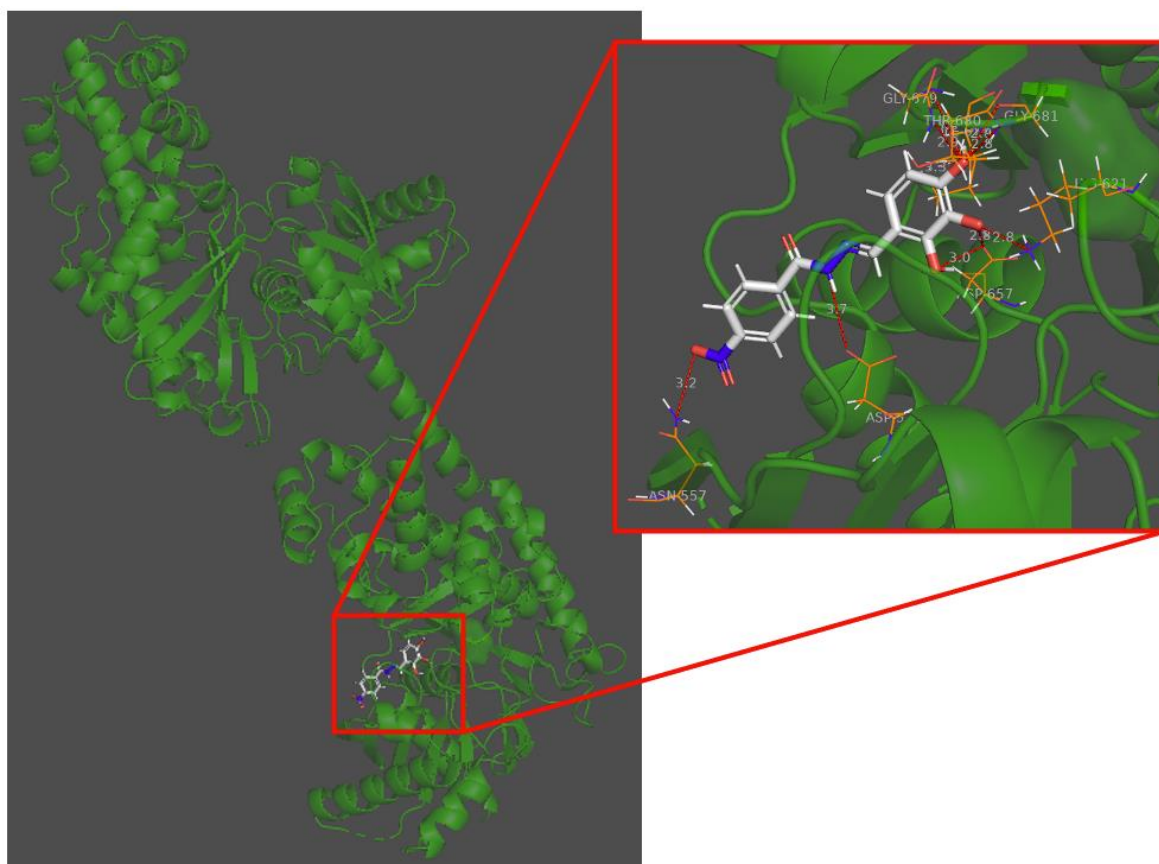
3.7.2. Optymalizacja fragmentu 2,3,4-trihydroksybenzenowego w BNBZ oraz Benz

Wspólną cechą BNBZ i Benz jest ugrupowanie 2,3,4-trihydroksybenzenowe, które według modelowania molekularnego przeprowadzonego przez grupę badawczą Zhenga [111] dopasowuje się do miejsca wiązania D-glukozy. Jednakże zgodnie z ich analizą dokowania molekularnego BNBZ, nie wszystkie grupy OH w układzie hydroksybenzylidenowym są zaangażowane w interakcję z miejscem wiążącym HK2, co można zobaczyć na Rysunku 41a przedstawionym poniżej. W przypadku dokowania molekularnego Benz tej samej grupy badawczej, wszystkie grupy hydroksylowe ugrupowania pirogalowego tworzą wiązania wodorowe z aminokwasami białka w miejscu katalitycznym (Rysunek 41b). Natomiast modelowanie molekularne dla benserazydu wykonane przez inną grupę badawczą [77] sugerują brak oddziaływania grup OH w miejscu wiązania ligandu z HK2.



Rysunek 41: Model prawdopodobnego oddziaływania fragmentu ugrupowania 2,3,4-trihydroksybenzenowego BNBZ (a) oraz Benz (b) w kieszeni HK2 zaproponowanych przez grupę badawczą Zhenga [111].

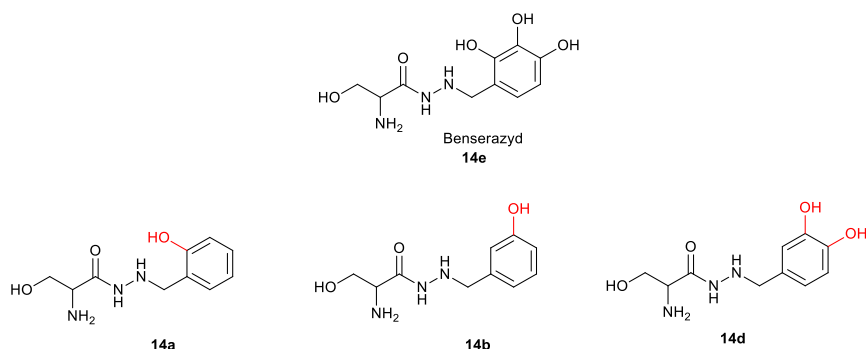
W ramach przeprowadzonych badań, oceniono sposób wiązania ligandu z miejscem aktywnym heksokinazy HK2 dla pochodnych 4-nitro-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazdu wykonując dokowanie molekularne za pomocą programu AutoDock Vina z użyciem trójwymiarowej struktury HK2 zaczerpniętej z bazy danych PDB (Protein Data Bank) (PDB ID: 2NZT). Zgodnie z przypuszczeniami oraz informacjami zawartymi w literaturze, grupy hydroksylowe BNBZ są zaangażowane w oddziaływania z miejscem aktywnym enzymu. Jednakże ustalono, że liczba grup hydroksylowych we fragmencie polihydroksybenzenowym oddziałujących z białkiem może być modyfikowana bez ograniczenia aktywności inhibicyjnej.



Rysunek 42. Wizualizacja wiązania 4-nitro-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazdu w miejscu aktywnym HK2.

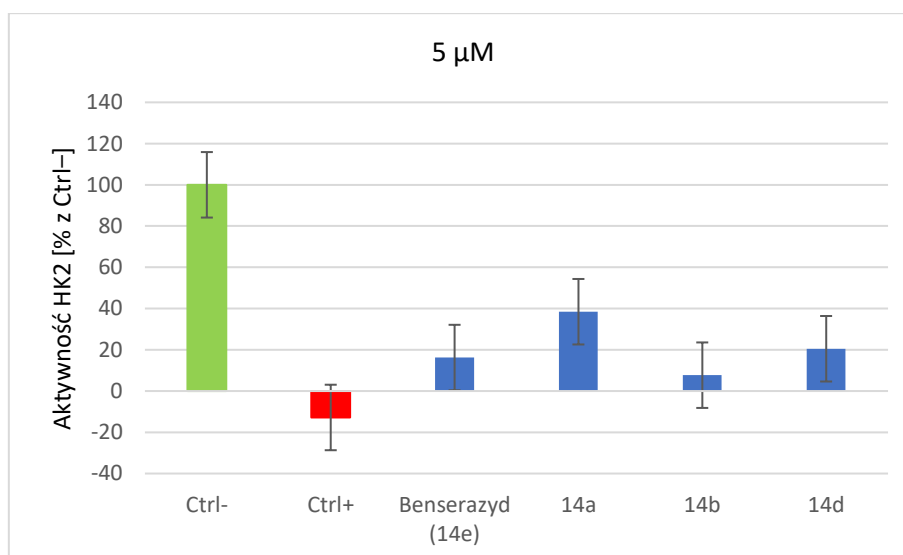
W celu sprawdzenia wpływu liczby koniecznych grup OH i ich położenia we fragmencie benzenowym potencjalnych inhibitorów na aktywność enzymatyczną HK2, w badaniach *in vitro*, dokonano modyfikacji ugrupowania pirogalolowego. Zsyntezowano zarówno macierzyste inhibitory Benz i BNBZ oraz ich pochodne mono- oraz dihydroksylowe w pozycjach orto, meta i para. W przypadku pochodnych BNBZ dokonano dodatkowych badań takich jak: MST, cytotoksyczność oraz testy klonogenności.

3.7.2.1. Badania wpływu liczby oraz rozmieszczenia grup hydroksylowych pochodnych benserazydu



Rysunek 43. Pochodne benserazydu z różnym układem hydroksyaromatycznym poddane ocenie aktywności hamującej HK2.

Dla syntezowanych benserazydowych pochodnych posiadających w swojej strukturze różne układy hydroksybenzenowe wykonano badania określające hamowanie aktywności enzymu HK2 za pomocą komercyjnego testu kolorymetrycznego. Wszystkie analizowane związki badano w stężeniu 5 μM .



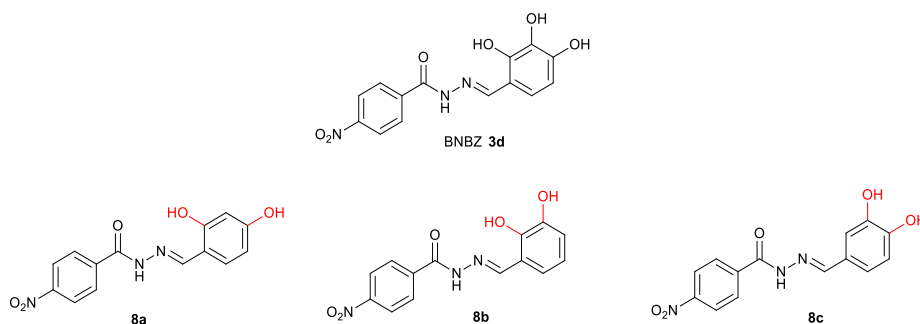
Rysunek 44. Wykres analizy aktywności enzymatycznej HK2 wobec pochodnych benserazydu z różnymi układami grup hydroksylowych.

Spośród testowanych pochodnych benserazydu najlepiej rokującym inhibitorem jest pochodna z ugrupowaniem 3-hydroksybenzenowym **14b**, gdzie aktywność enzymatyczna została zahamowana w 92%. Pochodna dihydroksybenzenowa **14d** wykazywała aktywność zbliżoną do aktywności benserazydu, natomiast przejawiała wyższą aktywność w porównaniu z 2-(2-hydroksybenzylo)hydrazidem L-seryny **14a**, który hamował aktywność enzymu w tych samych warunkach w 61,5%. Przeprowadzona analiza pokazuje, że zarówno pochodna monohydroksylowa jak i dihydroksylowa wykazują znaczący efekt inhibicyjny, co może świadczyć o możliwości dopasowania miejsca aktywnego enzymu do cząsteczki inhibitora, w zależności od ilości oraz położenia grup hydroksylowych w pierścieniu benzenowym.

3.7.2.2. Badania wpływu liczby oraz położenia grup hydroksylowych pochodnych benitrobenrazydu

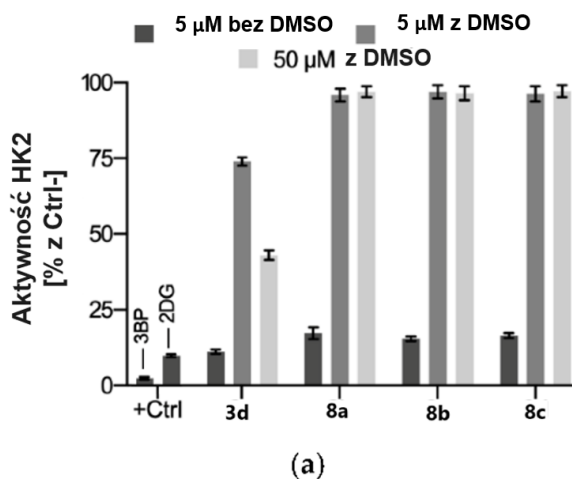
Badania hamowania aktywności HK2

Dla syntezowanych dihydroksylowych pochodnych benitrobenrazydu z różnym położeniem grup hydroksylowych w układzie polihydroksybenzenowym, jak i dla samej macierzystej cząsteczki BNBZ, została określona aktywność hamująca w odniesieniu do heksokinazy 2 wobec czystego, wyizolowanego enzymu oraz enzymu w komórce.



Rysunek 45. Dihydroksylowe pochodne BNBZ poddane badaniom biologicznym.

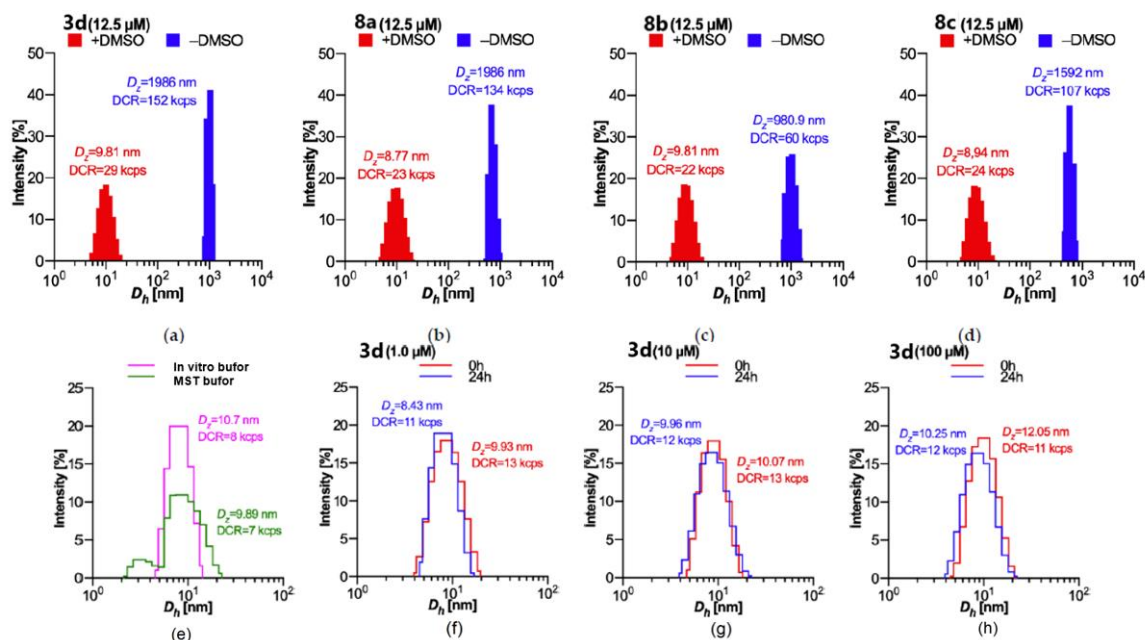
W testach tych, jako kontrolę pozytywną, zastosowano dwa najczęściej zgłaszane inhibitory: 2-DG oraz 3-BrPA, charakteryzujące się odmiennym mechanizmem inhibicji HK2. Aby ocenić efekt hamujący pochodnych BNBZ na komórki, wybrano dwie linie komórkowe raka wątroby, a mianowicie HepG2 i Huh7, które zostały poddane działaniu zsyntezowanych pochodnych w różnych czasach inkubacji: 24 godziny, 48 godzin i 72 godziny. Testy komórkowe zostały przeprowadzone przy stężeniach IC_{50} (dla linii Huh7 **3d**: 57.10 μ M, **8a**: 58.25 μ M, **8b**: 213.70 μ M, **8c**: 105.30 μ M; dla linii HepG2: **3d**: 14.96 μ M, **8a**: 2.84 μ M, **8b**: 302.10 μ M, **8c**: 16.34 μ M), które powodowały 50% zahamowanie proliferacji w odpowiednich liniach komórkowych. Wyniki badań biologicznych dla pochodnych *N*-benzylidenobenzenuhydrazyny przedstawiono na wykresach.



Rysunek 46. Zdolność pochodnych BNBZ do hamowania wyizolowanego HK2 ocenione za pomocą testów kolorymetrycznych przy stężeniu 5 μ M. Porównanie aktywności HK2 wybranych pochodnych BNBZ wykonano względem kwasu 3-bromopirogronowego oraz 2-deoksy-D-glukozy przy stężeniu 5 μ M jako kontroli pozytywnej. Aktywność heksokinazy została oceniona w porównaniu z kontrolą negatywną (aktywność HK2 100%), gdzie nie zastosowano żadnego inhibitora.

Podczas przygotowywania próbek do badań nad hamowaniem czystego enzymu w obecności pochodnych BNBZ za pomocą testu kolorymetrycznego, stwierdzono, że przy wyższym stężeniu badanych związków (50 μM) utrudniona jest ich rozpuszczalność w stosowanym podczas analizy buforze. W konsekwencji pochodne benitrobenrazydu uprzednio rozpuszczono w DMSO i rozcieńczono buforem, tak aby końcowe stężenie DMSO nie przekroczyło 1%. Przygotowane w ten sposób próbki poddano analizie aktywności inhibicyjnej HK2. Powtórzono analizę dla badanych związków o stężeniu 5 μM , stosując tą samą procedurę rozpuszczania, w celu wyeliminowania ewentualnych błędów. Jak się okazało, miało to diametralny wpływ na wyniki badań. Wszystkie próbki o stężeniu 5 μM przygotowane w buforze wolnym od DMSO wykazały hamujący wpływ na HK2, osiągając podobny poziom skuteczności, w zakresie od 11,2% do 17,3% w porównaniu z kontrolą negatywną (Rysunek 46). W serii roztworów zawierających DMSO, tylko próbka związku **3d** utrzymała zdolność do hamowania HK2, aczkolwiek i w tym przypadku obserwowano znaczne zmniejszenie siły inhibicji. Wyniki te sugerują, możliwość tworzenia przez badane związki w roztworach wodnych agregatów. Jest to zjawisko znane w literaturze [141, 142], gdzie według badań w stężeniach mikromolowych, wiele cząsteczek tworzy agregaty w roztworze wodnym. W tej formie hamują one enzymy w sposób nieswoisty, co może prowadzić do fałszywych wyników w testach enzymatycznych. Autorzy sugerują, że niespodziewane tworzenie agregatów wydaje się tłumaczyć aktywność wielu inhibitorów o charakterze nieswoistym i może być przyczyną przypadkowych wyników aktywności w testach przesiewowych. Jest to istotny aspekt, który powinien być brany pod uwagę podczas projektowania leków. W celu potwierdzenia tej hipotezy wykonano pomiary dynamicznego rozpraszania światła (ang. Dynamic Light Scattering DLS).

DLS jest to technika stosowana w analizie dynamicznych właściwości cząstek w roztworach [143]. Metoda ta opiera się na pomiarze rozpraszania światła przez cząsteczki znajdujące się w ruchu termicznym. DLS wykorzystuje efekt ruchów Browna, czyli chaotycznego ruchu termicznego cząsteczek w roztworze. Analiza tego ruchu pozwala na wyznaczenie rozmiarów i rozkładów wielkości cząstek. Przeprowadzone badania DLS potwierdziły zdolność pochodnych BNBZ do agregacji, ale dodatek DMSO rozбивa powstałe zespoły cząstek.



Rysunek 47. Wyniki z analizy DLS pochodnych BNBZ określających zależność średnicy hydrodynamicznej (D_h) i szybkości zliczeń (DCR) cząstek o uśrednionej średnicy hydrodynamicznej (D_z).

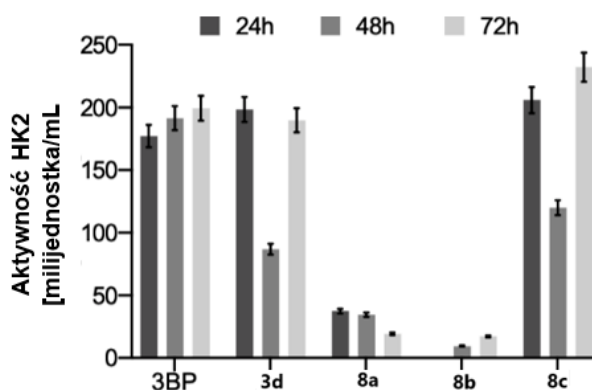
Badania z wykorzystaniem pochodnych BNBZ **3d** (a), **8a** (b), **8b** (c), **8c** (d) w stężeniu 12,5 μM w buforze z dodatkiem lub bez DMSO. Wykres e): Wyniki DLS dla Buforów - Kontrola Tłā. Wykresy f-h:

Sygnaty DLS przed i po 24-godzinnej inkubacji (f) 1,0 μM , (g) 10 μM i (h) 100 μM roztworu związku **3d** w buforze zawierającym DMSO.

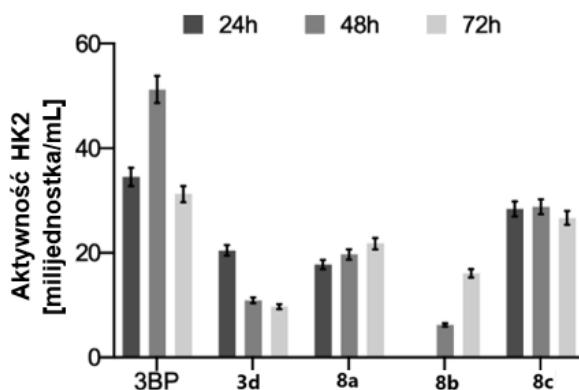
Analizując przedstawione wykresy (Rysunek 47 a), b), c), d)), średnica hydrodynamiczna badanych cząsteczek (D_h) w buforach niezawierających dodatku DMSO jest znacząco większa, a uzyskana szybkość zliczeń (DCR) tych cząstek również istotnie przewyższa wartości uzyskane w roztworze zawierającym DMSO. Do badań wykorzystano pochodne BNBZ: **3d**, **8a**, **8b**, **8c** w stężeniu 12,5 μM , rozpuszczonych w buforze do MST (25 mM bufor fosforanowy, pH 8,0, 500 mM NaCl i 0,05% Tween-20). Wykres e) uzyskano z badań DLS dla buforów stosowanych do badań *in vitro* oraz MST, dzięki czemu można było wykluczyć wpływ tła na wyniki eksperymentu. Dane z rysunku f-h pokazują korelację między wzrostem stężenia związku **3d** (1 μM , 10 μM , 100 μM), a średnicą hydrodynamiczną agregatów przed inkubacją oraz po 24 godzinnej inkubacji w buforze do badań *in vitro* zawierających dodatek DMSO. Oznacza to, że im większe jest stężenie substancji **3d**, tym większe są tworzące się agregaty cząstek.

Analizując badania *in vitro* na liniach komórkowych, testowane związki wpływają na aktywność HK2 znajdującej się wewnątrz komórki (Rysunek 48). Aktywność hamująca HK2 przez badane pochodne zmniejsza się w kolejności **8b** > **8a** > **3d** > **8c** dla linii HepG2 (Rysunek 48a) i **8b** > **3d** > **8a** > **8c** dla linii Huh7 (Rysunek 48b). W obu przypadkach największy efekt inhibicyjny zaobserwowano dla pochodnej **8b**, jednakże należy tutaj zaznaczyć, że testowano ją przy wysokich stężeniach 213,7 i 302,1 μM . Linia Huh7 wykazuje niższą wrażliwość na badane związki (wyłączając z tej reguły pochodną **8b**, która wykazuje słabą aktywność wobec obu linii komórkowych), co najprawdopodobniej wynika z wyższej ekspresji HK2 w liniach komórkowych Huh7 niż w HepG2, więc konieczne jest zastosowanie wyższego stężenia związków w celu zahamowania enzymu.

Rysunek 48. Analiza aktywności enzymatycznej HK2:



- (a) Zmiany w aktywności HK2 w liniach komórkowych HepG2 po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji z badanymi związkami w stężeniu IC_{50} . Jako kontrolę pozytywną zastosowano kwas 3-bromopirogronowy przy stężeniu 100 μM . Dane przedstawiono w milijednostkach aktywności enzymatycznej HK2 na mililitr mieszaniny reakcyjnej. Wyniki przedstawiono jako średnią i SD z trzech niezależnych pomiarów.

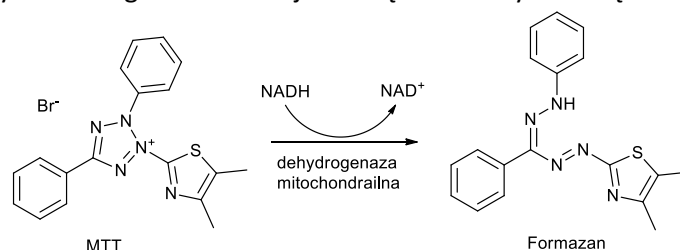


(b) Zmiany w aktywności HK2 w liniach komórkowych HuH7 po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji z badanymi związkami w stężeniu IC_{50} . Jako kontrolę pozytywną zastosowano kwas bromopirogronowy przy stężeniu $100 \mu M$. Dane przedstawiono w milijednostkach aktywności enzymatycznej HK2 na mililitr mieszaniny reakcyjnej. Wyniki przedstawiono jako średnią i SD z trzech pomiarów.

Oceniając powyższe dane można jednoznacznie stwierdzić, że tylko związek BNBZ z ugrupowaniem 2,3,4-trihydroksybenzenowym hamuje enzym zarówno *in vitro* jak i wewnątrz komórki. Podczas gdy pochodne dihydroksylowe **8a-8c**, nie wykazują efektu inhibicyjnego dla izolowanego enzymu, natomiast hamują HK2 w środowisku komórkowym. Można zatem przypuszczać, że pochodne dihydroksylowe mogą odłączać enzym z mitochondriów, w ten sposób wpływając na jego aktywność, tak jak dzieje się to w przypadku niektórych znanych inhibitorów jak np. jasmonianu metylu [107]. Jednakże, żeby potwierdzić moje spekulacje, należałoby wykonać więcej szczegółowych badań biologicznych.

Badania cytotoksyczne względem linii komórkowych HepG2 oraz Huh7

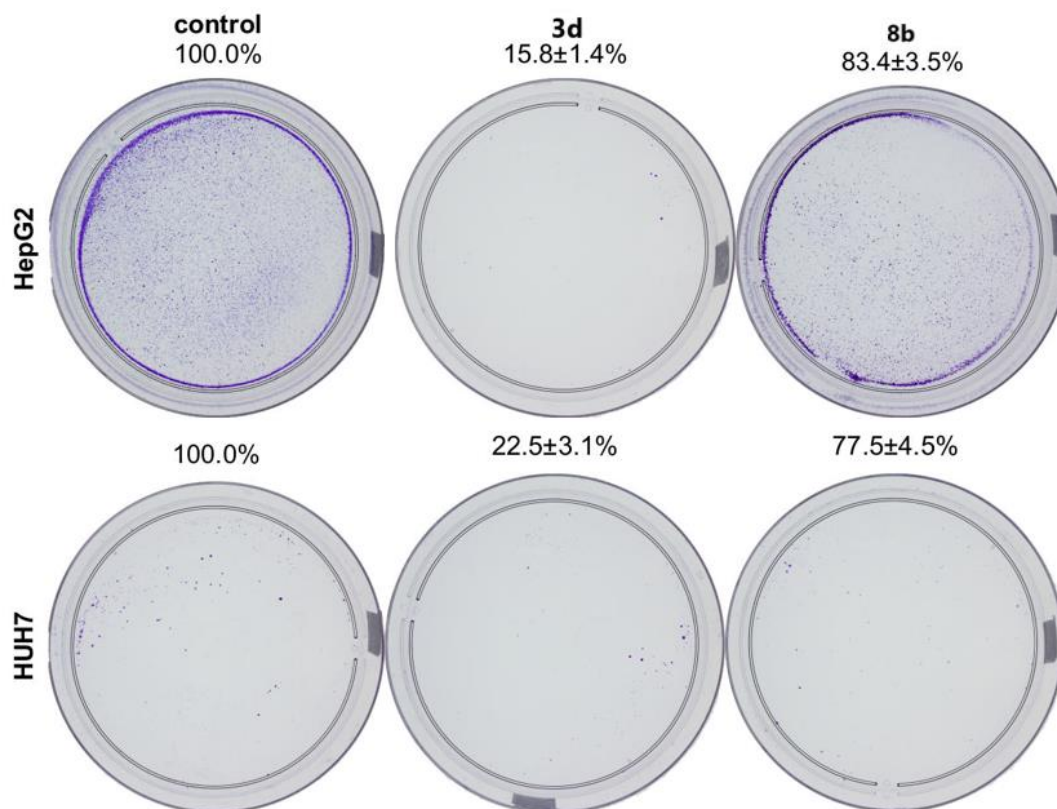
Wykonano testy na cytotoksyczność za pomocą metody MTT, inkubując wybrane linie komórkowe przez 72 godziny z otrzymanymi pochodnymi BNBZ. Zasada oznaczenia żywotności komórek opiera się na reakcji, która zachodzi w komórkach i polega na redukcji przez dehydrogenazę mitochondrialną żywych komórek żółtej soli tetrazoliowej (MTT) do ciemno niebieskiego formazanu (Schemat 45). Ilość wytworzonego formazanu jest związana z aktywnością metaboliczną komórki.



Schemat 45. Enzymatyczna redukcja MTT do Formazanu.

Dla porównania wyników z badań nad cytotoksycznością potencjalnych inhibitorów wykonano także testy na klonogenność, które polegały na wyhodowaniu kolonii komórek w obecności badanych związków z zastosowaniem stężenia IC_{50} przez 72 godziny. Następnie kolonie utrwalono i barwiono fioletem krystalicznym, sfotografowano określając ilościowo za pomocą oprogramowania ImageJ

software. Test klonogenności to badanie mające na celu ocenę zdolności substancji chemicznych do indukowania procesów klonogenności, czyli zdolności do tworzenia klonów komórkowych.



Rysunek 49. Wyniki z testów klonogenności obrazujących zdolność komórek do podziału i tworzenia identycznych kopii klonów w obecności związków **3d** oraz **8b**.

Tabela 9. Wartości IC_{50} dla otrzymanego BNBZ **3d** oraz jego pochodnych **8a-8c** wobec dwóch linii komórkowych: Huh7 i HepG2 oraz wpływ badanych związków **3d**, **8a-8c** na zdolność tworzenia kolonii przy zastosowaniu wyznaczonego stężenia IC_{50}

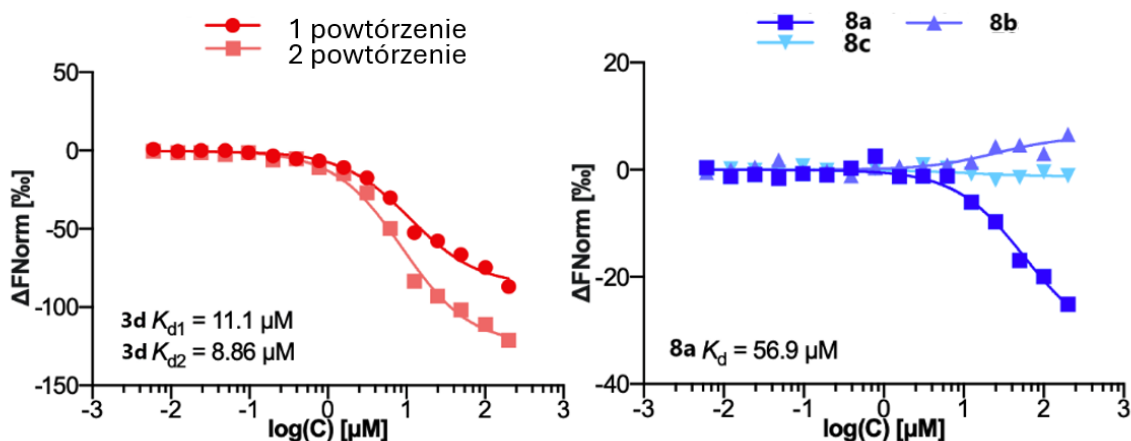
symbol związku	podstawienie	IC_{50} dla Huh7 [$\mu\text{mol/l}$]	IC_{50} dla HepG2 [$\mu\text{mol/l}$]	Klonogenność Huh7 [% z Ctrl-]	Klonogenność HepG2 [% z Ctrl-]
3d		57.10±2.86	14.96±0.75	22.5±3.1	15.8±1.4
8a		58.25±2.93	2.84±0.14	25.5±3.6	9.9±0.9
8b		213.70±10.69	302.10±15.11	77.5±4.5	83.4±3.5
8c		105.30±5.27	16.34±0.82	40.0±4.1	13.0±1.4

Analizując powyższe dane można stwierdzić, że wszystkie badane związki, za wyjątkiem pochodnej **8b**, z ugrupowaniem 2,3-dihydroksybenzenowym, wykazały znaczną cytotoksyczność w stosunku do komórek nowotworowych linii Huh7 oraz HepG2. Wyniki badań na cytotoksyczność przekładają się na badania klonogenności, w których BNBZ oraz jego pochodne, oprócz związku **8b**, widocznie wpływają na ograniczenie ilości tworzenia kolonii komórek w porównaniu z próbą kontrolną.

Określenie powinowactwa badanych związków do HK2 metodą MST

Dla polifenolowych pochodnych BNBZ oraz samego benitrobenrazydu określono stałą dysocjacji (K_d) ligand-enzym za pomocą termoforezy mikroskalowej (ang. MST - Microscale Thermophoresis). MST to technika służąca do pomiaru oddziaływań pomiędzy biomolekułami. Podstawowym mechanizmem termoforezy mikroskalowej jest różnica w ruchu cząsteczek w obszarze o zmiennym gradiencie temperatury. Metoda ta wykrywa najmniejsze zmiany w konformacji czy ładunku cząsteczki podczas tworzenia/rozpadu wiązania między białkiem, a ligandem. Ruch znakowanej fluorescencyjnie cząsteczki, jest mierzony przez obserwację rozkładu fluorescencji wewnątrz kapilary. Przeprowadzono pomiary określające powinowactwo zsyntezowanych związków do H6-hHK2 (ludzki enzym HK2 ze znacznikiem N-końcowym His6). Obecność H6 usprawnia przebieg eksperymentu, ułatwiając oczyszczanie enzymu oraz zapewniając stabilność podczas eksperymentu.

W dwóch niezależnych eksperymentach MST uzyskano wyniki dla **3d**, otrzymując K_d równą 11,1 μM i 8,86 μM . K_d obliczone dla tego samego związku przez grupę badawczą Zheng wynosi 4,99 μM [111]. Różnica w otrzymanych wartościach może wynikać z zastosowania nieco innych warunków takich jak np. końcowe stężenie HK2, odmienny sposób znakowania białka, różnica w użyciu mocy lasera oraz diody LED. Nie mniej jednak wartości K_d dla (*E*)-4-nitro-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazidu są tego samego rzędu, co świadczy o wiarygodności wykonywanych badań. Warto zaznaczyć, że wszystkie pochodne dihydroksylowe wykazywały słabsze oddziaływanie z H6-hHK2 w porównaniu do **3d** macierzystego BNBZ z fragmentem trihydroksybenzenowym. Ponadto, analiza wykresu (rysunek 50) wykazała, że wpływ na powinowactwo wiązania HK2 z badanymi związkami, ma nie tylko liczba, ale również pozycja grup hydroksylowych. Z wyjątkiem pochodnej **3d**, tylko **8a** wykazało umiarkowane powinowactwo do enzymu, osiągając K_d równą 56,9 μM , podczas gdy dla **8b** i **8c** nie zaobserwowano wiązania, lub jakość sygnału nie była wiarygodna.



Rysunek 50. Ocena powinowactwa wiązania (a) **3d** i (b) **8a–8c** do H6-hHK2.

3.7.2.3. Podsumowanie wyników przeprowadzanych badań nad wpływem ilości oraz położenia grup hydroksylowych pochodnych benitrobenzazydu

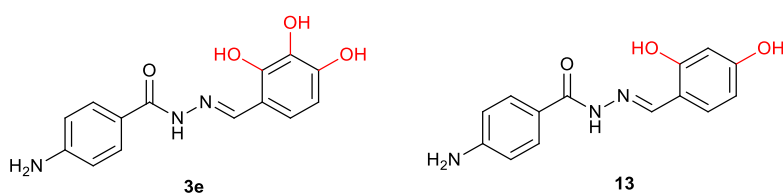
Przedstawione wyniki pokazują, że położenie oraz ilość grup hydroksylowych w badanych związkach silnie wpływa na ich efekt biologiczny. Jednakże pochodna z trzema grupami hydroksylowymi **3d** wykazuje najsilniejsze właściwości cytotoksyczne oraz powinowactwo do heksokinazy 2, a układ pirogalolowy w pochodnych BNBZ jest wymagany do utrzymania aktywności hamującej HK2 *in vitro* oraz w komórce.

Na podstawie analizy przeprowadzonych badań można wysnuć hipotezę o możliwym mechanizmie działania badanych pochodnych BNBZ. Po wnikięciu do komórki cząsteczka pochodnej BNBZ może oddziaływać z heksokinazą 2 na dwa sposoby:

- Związek może wiązać się z centrum aktywnym enzymu i w ten sposób zahamować bezpośrednio jego działanie.
- Związek po wejściu do komórki może także oddziaływać z heksokinazą 2 przyłączoną do błony mitochondrialnej w taki sposób, że powoduje jej oderwanie. W wyniku takich interakcji możliwa jest indukcja kaskady zmian molekularnych, które w konsekwencji prowadzą do indukcji śmierci komórki. Ten mechanizm działania można przypuszczalnie przypisać dihydroksylowym pochodnym BNBZ, które nie wykazują powinowactwa do enzymu oraz aktywności hamującej HK2 *in vitro*, jednakże inhibują HK2 w środowisku komórkowym.

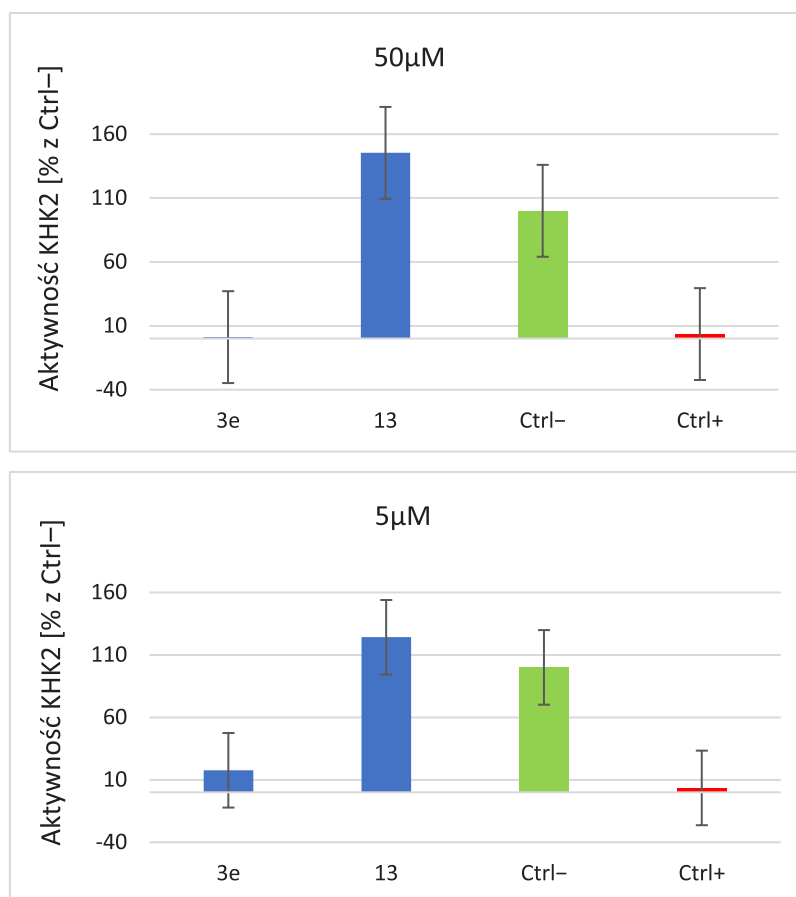
3.7.3. Badania nad wpływem ilości oraz położenia grup hydroksylowych z zastosowaniem pochodnych (*E*)-4-amino-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazdu oraz (*E*)-4-amino-*N'*-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazdu na aktywność inhibicyjną HK2

W celu potwierdzenia znacznie efektywniejszego hamowania aktywność HK2 w warunkach *in vitro* przez pochodne BNBZ zawierające układ 2,3,4-trihydroksybenzenowy, niż jego analogi dihydroksylowe, wykonano kolejny test oparty na metodzie kolorymetrycznej z wykorzystaniem (*E*)-4-amino-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazdu **3e** oraz (*E*)-4-amino-*N'*-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazdu **13** (Rysunek 51). Zastosowano dwa różne stężenia związków: 50 μ M i 5 μ M oraz 3-BrPa jako kontrolę negatywną.



Rysunek 51. Struktura związków poddanych ocenie hamowania aktywności HK2.

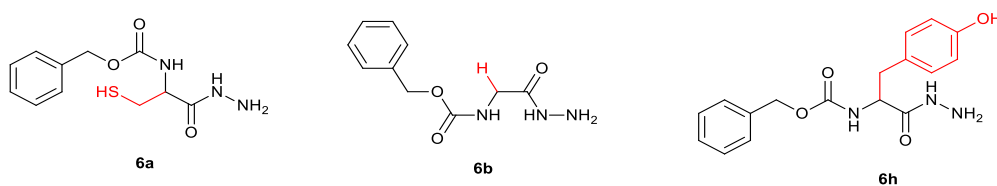
Wybrano pochodną z ugrupowaniem 2,4-dihydroksylowym **13**, ponieważ we wcześniejszych badaniach nad pochodnymi BNBZ stwierdzono, że tylko ta pochodna z układem 2,4-dihydroksy, poza macierzystym BNBZ wykazuje powinowactwo do HK2. Jak można zauważyć na przedstawionym wykresie, (*E*)-4-amino-*N'*-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazd **13** nie wykazuje inhibicji enzymu, a wręcz podwyższa aktywność HK2, zarówno przy zastosowaniu stężeniu 50 μ M oraz 5 μ M. Natomiast pochodna **3e** przy tym samym stężeniu silnie wpływa na obniżenie aktywności HK2. Nawiązując do tych badań oraz badań *in vitro* nad pochodnymi BNBZ zawartych w rozdziale 3.7.2.2. *Badania wpływu liczby oraz położenia grup hydroksylowych pochodnych benitrobenzazydu*, można stwierdzić, że układ 2,3,4-trihydroksylowy w pochodnych opartych na strukturze BNBZ jest niezbędnym do hamowania aktywności wyizolowanego enzymu HK2.



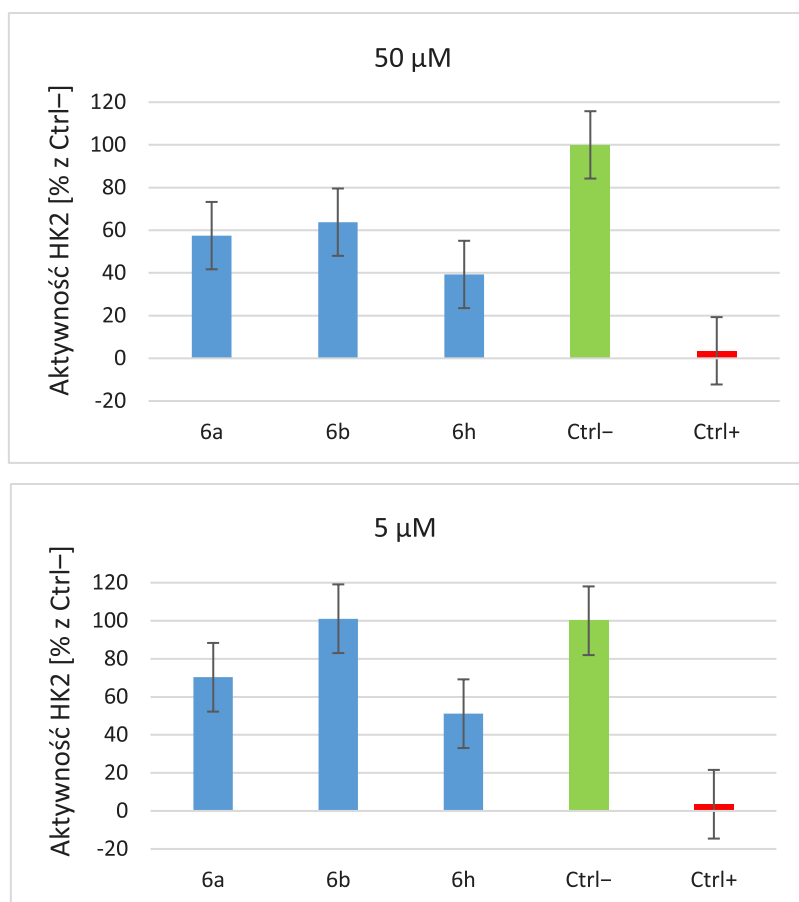
Rysunek 52. Wykres analizy wyników hamowania aktywności HK2 za pomocą związków **3e** oraz **13**.

3.7.4. Badania nad wpływem braku obecności ugrupowania polihydroksybenzenowego na aktywność hamującą HK2

W kolejnym etapie badań oceniono aktywność N-acylohydrazyn, prekursorów badanych inhibitorów HK2, niezawierających fragmentu aldehydu 4-pirogalowego. Do badań wykorzystano pochodne hydrazyny zawierające w swojej strukturze łańcuchy boczne takich aminokwasów jak: glicyna, cysteina, tyrozyna (Rysunek 53). Związki testowano w dwóch różnych stężeniach 50 μM oraz 5 μM, z zastosowaniem 3-BrPa jako kontroli pozytywnej oraz bez użycia inhibitora (Ctrl-).



Rysunek 53. Wybrane N-acylohydrazyny poddane ocenie aktywności hamującej HK2.

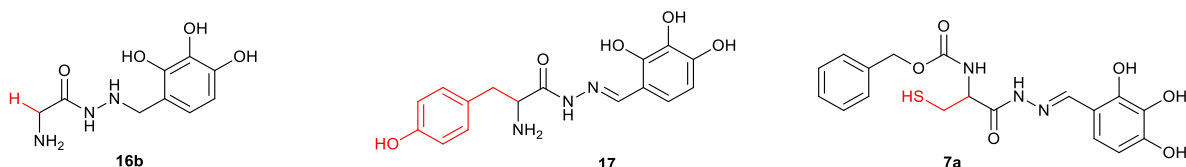


Rysunek 54. Wykres obrazujący hamujący wpływ N-acylohydrazyn **6a**, **6b**, **6h** na aktywność enzymu HK2.

Wykonane badania *in vitro* za pomocą testów kolorymetrycznych w dwóch stężeniach, wskazują na mało znaczący wpływ badanych hydrazydów pochodnych aminokwasów na aktywność HK2. Najniższą aktywność wykazała pochodna glicyny **6b**, hamując enzym w 36% przy stężeniu 50 μM, a przy 5 μM nie wykazując żadnej inhibicji. Wynika to prawdopodobnie z braku oddziaływań z łańcuchem bocznym aminokwasu. Badania te również potwierdziły, że ugrupowanie polihydroksybenzenowe jest potrzebne do zachowania aktywności hamującej HK2.

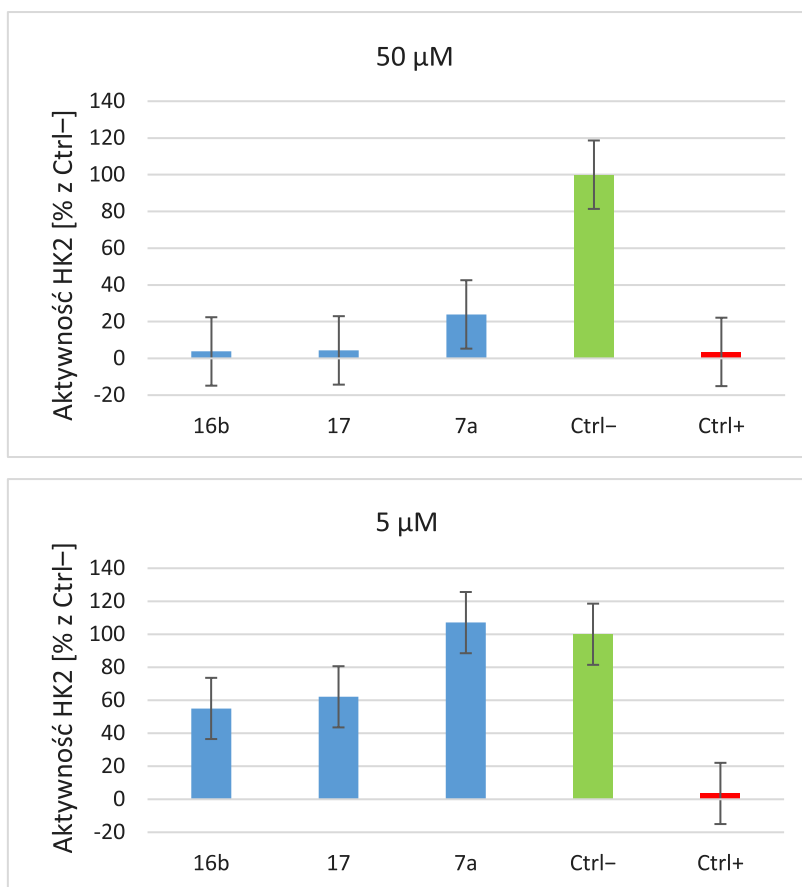
3.7.5. Wpływ zmian strukturalnych w benserazydzie na aktywność hamująca HK2

Benserazyd został zmodyfikowany poprzez zastąpienie łańcucha bocznego seryny innymi fragmentami aminokwasów. Do analizy wybrano reprezentatywne analogi benserazydu, które udało się oczyścić do czystości odpowiedniej do zastosowania w kolorymetrycznych badaniach *in vitro* (Rysunek 55). Zastosowano analog glicyny, która jest jedynym aminokwasem achiralnym, analog tyrozyny zawierającej pierścień benzenowy z grupą OH w pozycji para oraz analog cysteiny podobny do seryny, jednakże posiadający ugrupowanie tiolowe zamiast hydroksylowego. Zastosowanie różniących się budową aminokwasów do syntezy analogów benserazydu powinno dostarczyć odpowiedzi na pytanie jakie znaczenie w hamowaniu heksokinazy 2 ma obecność ugrupowania seryny.



Rysunek 55. Analogi aminokwasowe benserazydu ocenione pod kątem hamowania aktywności HK2.

Związek zawierający łańcuch boczny tyrozyny **17**, w swojej strukturze ma obecne wiązanie iminowe, natomiast cysteinowa pochodna benserazydu **7a** oprócz niezredukowanego wiązania C=N, ma obecną grupę benzylotykarbonylową. Analog glicynowy **16b** dokładnie tak jak benserazyd, nie posiada ugrupowania azometinowego ani grupy Cbz. Analiza aktywności enzymatycznej HK2 wobec pochodnych benserazydu w stężeniu 50 μM oraz 5 μM oraz z zastosowaniem 3-BrPa jako kontroli pozytywnej, z wykorzystaniem testu kolorymetrycznego została przedstawiona poniżej.



Rysunek 56. Analiza wyników z oceny hamowania aktywności HK2 w obecności analogów benserazydu **16b**, **17**, **7a**.

Analog glicynowy **16b** oraz tyrozynowy **17** przy stężeniu równym 50 μM hamują aktywność heksokinazy 2 powyżej 95%. Analog cysteinowy **7a** prezentuje nieco słabszą aktywność inhibicyjną na poziomie 75%. Przy niższym stężeniu 5 μM cysteinowa pochodna **7a** nie wykazuje żadnego efektu inhibicyjnego, co może być związane z obecnością stosunkowo dużej objętościowo grupy Cbz. Pozostałe benserazydowe pochodne **16b**, **17** w tym stężeniu hamują aktywność HK2 w około 50%, wykazując w ten sposób wartość IC_{50} podobną do macierzystego benserazydu opisywaną w literaturze (IC_{50} dla Benz: $5,52 \pm 0,17$ [16]).

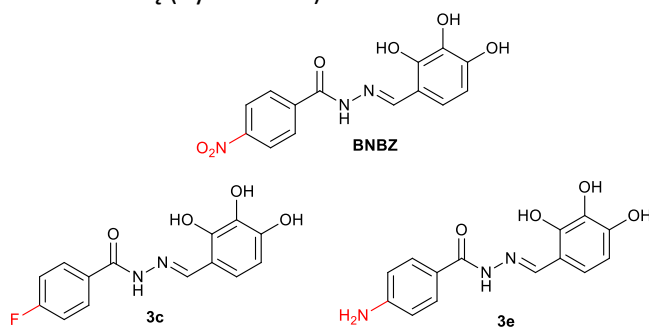
3.7.6. Optymalizacja fragmentu para-nitrowego benitrobenrazydu

Benitrobenrazyd w swojej strukturze zawiera układ 4-nitrofenylowy, charakteryzujący się unikalnymi cechami. Grupa nitrowa jest stosunkowo mała objętościowo, polarna, może tworzyć wiązania wodorowe, ponadto jest grupą silnie elektronoakceptorową [144]. Na podstawie licznych badań opisanych w literaturze, stwierdzono, że pomimo tego że $-NO_2$ stanowi wszechstronną grupę funkcyjną w chemii medycznej, klasyfikowana jest jako toksykofofor [145] [146]. Leki zawierające nitroaryle są w dużym stopniu powiązane z rakotwórczością, hepatoksycnością, mutagennością i genotoksycnością. Grupa nitrowa w pierścieniu aromatycznym wpływa na wiązanie DNA, tworząc addukty odgrywające kluczową rolę w mutageniezie. Ponadto grupa nitrowa może być bioaktywowana przez redukcję enzymatyczną do stosunkowo stabilnych amin poprzez wytworzenie reaktywnych form takich jak związki nitrozowe i hydroksyloaminowe, które mogą reagować z biomolekułami, wywierając działanie toksyczne i mutagenne [146]. Z drugiej jednak strony związki zawierające $-NO_2$ zostały zgłoszone jako proleki aktywowane hipoksją. Przypisuje się im działanie bioredukcyjne ukierunkowane na niedotlenione guzy łe, o silnym efekcie cytotoksycznym [145].

Z tych powodów w swoich badaniach nad modyfikacją znanych inhibitorów HK2 zdecydowano się zastąpić toksykofoforyczną grupę nitrową, obecną w strukturze BNBZ, podstawnikami o różnej polarności takimi jak atom fluoru oraz grupa aminowa. Ugrupowania te mają odwrotny wpływ na rozkład gęstości elektronowej w pierścieniu aromatycznym. Silnie elektroujemny atom fluoru, podobnie jak grupa nitrowa, posiada właściwość wyciągania elektronów z pierścienia benzenowego. Silne wiązanie C-F (108 kcal/mol) sprawia, że wiązanie to jest chemicznie obojętne w większości warunków biologicznych. Polaryzacja wiązania C-F powoduje tworzenie się dipola, który może wpływać na konformację cząsteczki poprzez wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania elektrostatyczne z innymi wiązaniami polarnymi. Natomiast grupa aminowa jest typową grupą elektronodonorową w pierścieniu aromatycznym. Ponadto ugrupowanie $-NH_2$ zwiększa polarność cząsteczki związku, tym samym poprawiając jej rozpuszczalność w wodzie, co jest pożądaną cechą leków [131]. Wprowadzenie w miejsce grupy nitrowej atomu fluoru lub grupy aminowej ma na celu nie tylko wymianę toksykofoforu, ale także zbadanie ewentualnego wpływu warunków elektronowych w pierścieniu benzenowym benitrobenrazydu na aktywność HK2.

3.7.6.1. Badania nad wpływem wymiany grupy nitrowej na inne podstawniki w strukturze BNBZ na aktywność HK2

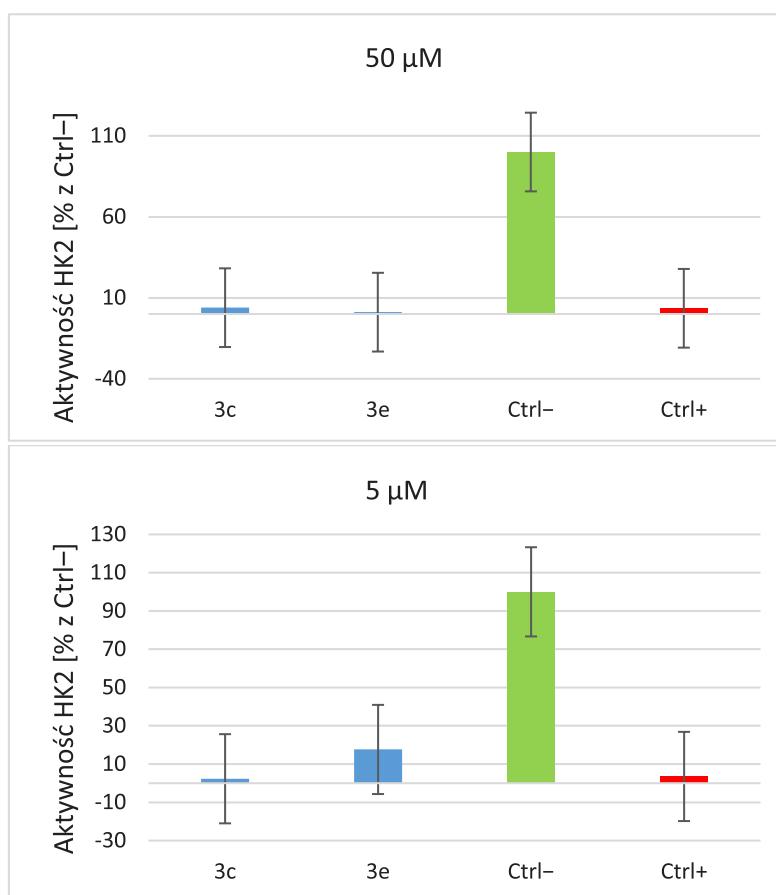
W tym zadaniu badawczym dokonano eliminacji toksycznej grupy nitrowej w strukturze BNBZ, utrzymując przy tym jednocześnie odpowiedni efekt inhibicji enzymu. W tym celu oceniono aktywność hamowania HK2 w badaniach *in vitro*, testem kolorymetrycznym, wobec dwóch pochodnych BNBZ (*E*)-4-fluoro-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazydu **3c** oraz (*E*)-4-amino-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazydu **3e**, w których ugrupowanie 4-nitrofenylowe zostało zastąpione grupą 4-fluorofenolową i 4-aminofenolową (Rysunek 57).



Rysunek 57. Struktury pochodnych BNBZ **3c** oraz **3e** poddanych testom enzymatycznym.

Analiza aktywności enzymatycznej HK2 wobec badanych pochodnych przy stężeniu 50 μM oraz 5 μM wykazała, że obie pochodne hamują aktywność HK2 prawie całkowicie.

Po porównaniu tych wyników z badaniami *in vitro*, gdzie zastosowano stężenie 5 μM (*E*)-4-nitro-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazdu (rozdział 3.7.2.2. *Badania wpływu liczby oraz położenia grup hydroksylowych pochodnych benitrobenrazydu*), który w tych warunkach hamuje HK2 na poziomie 45%, stwierdzono, że zmodyfikowane pochodne BNBZ wykazują wyższą aktywność inhibicyjną niż macierzysty BNBZ. Wyniki te kwalifikują (*E*)-4-amino-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazd **3e** oraz **3c** (*E*)-4-fluoro-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazd do potencjalnych inhibitorów HK2 z wysoką aktywnością inhibicyjną HK2, o strukturze podobnej do BNBZ, jednakże nie zawierającej toksykoforycznej grupy nitrowej w pozycji para w pierścieniu aromatycznym.



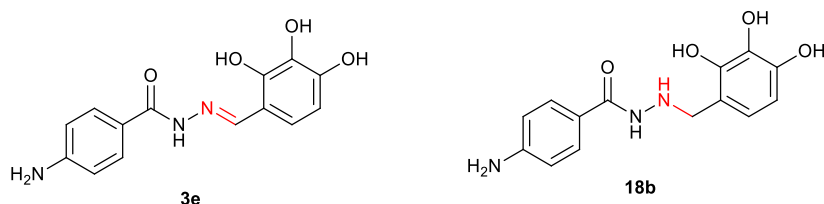
Rysunek 58. Analiza oceny aktywności HK2 pod wpływem działania pochodnych BNBZ **3c** oraz **3e** w dwóch stężeniach równych 50 μM oraz 5 μM .

3.7.7. Wpływ obecności wiązania iminowego $\text{N}=\text{CH}$ pochodnych benitrobenrazydu na aktywność HK2

Jak pisano w części teoretycznej (rozdział 2.1 *Charakterystyka i znaczenie zasad Schiffa*), zasady Schiffa stanowią szeroką klasę związków o udowodnionej aktywności biologicznej. Wiązanie iminowe $-\text{CH}=\text{N}-$ obecne w tych związkach odpowiada za możliwość wiązania różnych grup o właściwościach nukleofilowych i elektrofilowych, dzięki czemu może oddziaływać z docelowymi enzymami i hamować ich aktywność enzymatyczną. Ponadto rdzeń ten może brać udział w tworzeniu kompleksów z enzymami. Benserazyd posiada w swojej strukturze fragment *N*-acylohydrazyny, i jak

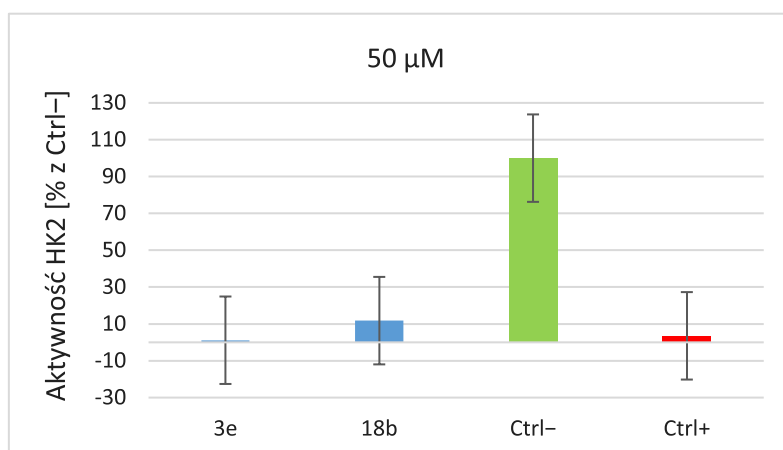
wynika z danych literaturowych jest aktywnym inhibitorem HK2. Z tego względu postanowiono zbadać czy redukcja ugrupowania iminowego w otrzymanych pochodnych benitrobenrazydu wpłynie w jakikolwiek sposób na jego aktywność.

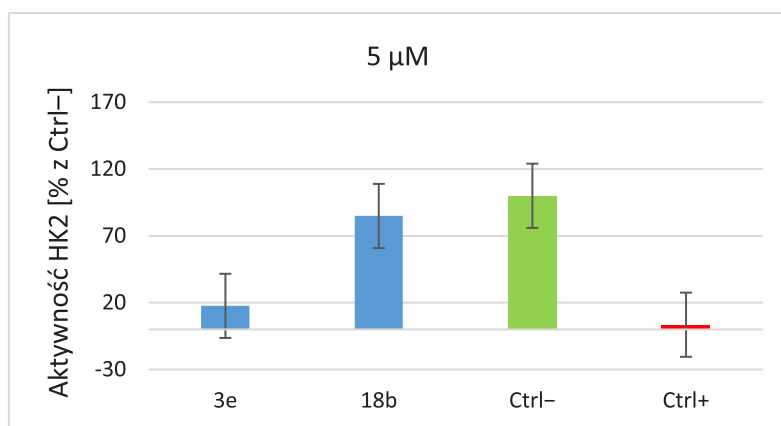
Przeprowadzono analizę aktywności enzymatycznej HK2 wobec pochodnych (*E*)-4-amino-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazynu **3e** oraz 4-amino-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzyl)-benzohydrazynu **18b**, odpowiednio zawierających w swojej strukturze wiązanie iminowe C=N oraz ze zredukowanym, pojedynczym wiązaniem węgiel azot C-N.



Rysunek 59. Struktury hydrazoneu **3e** oraz hydrazynu **18b** poddanych ocenie hamowania aktywności HK2.

Do analizy wykorzystano komercyjnie dostępny test kolorymetryczny. W przypadku zastosowania stężenia 50 μM dla badanych związków oby dwie pochodne hamują enzym w sposób efektywny, przy czym związek zawierający ugrupowanie azometinowe wykazuje w tych badaniach nieco lepszą aktywność inhibicyjną. Natomiast zastosowanie o rząd mniejszego stężenia równego 5 μM , pokazuje wyraźną różnicę w aktywności HK2 wobec zastosowanych związków. (*E*)-4-amino-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazyn **3e** hamuje aktywność HK2 na poziomie 92%, w odróżnieniu od 4-amino-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzyl)benzohydrazynu **18b** hamującego HK2 tylko w 15%. Porównanie tych wyników ewidentnie wskazuje znaczenie wiązania azometinowego jako istotnego fragmentu dla zahamowania aktywności HK2.

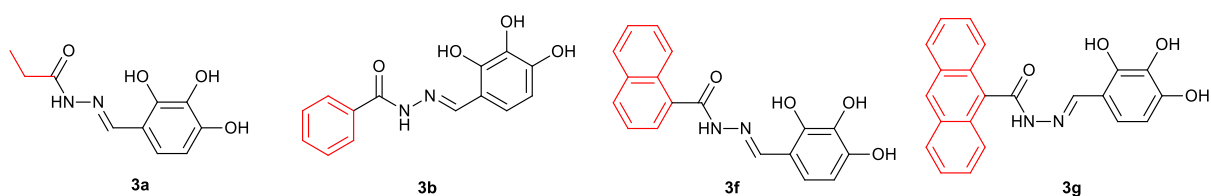




Rysunek 60. Wykresy przedstawiające hamowanie aktywności HK2 przez (*E*)-4-amino-*N*'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazyd **3e** oraz 4-amino-*N*'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazyd **18b**.

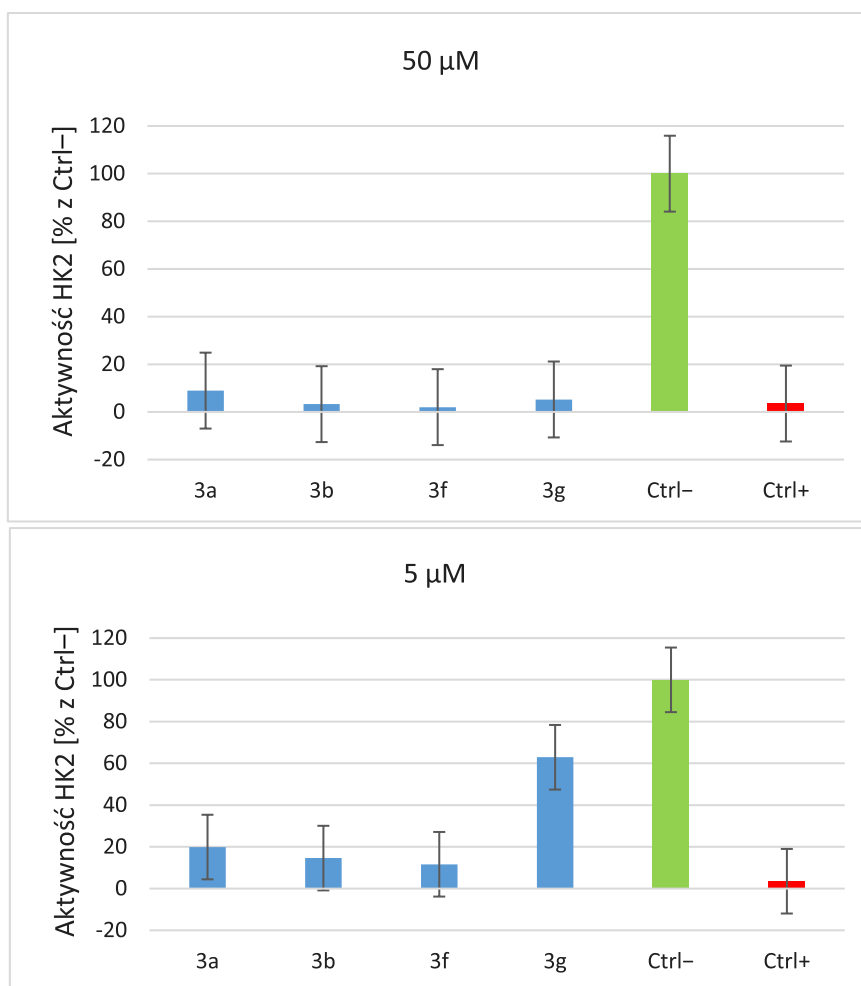
3.7.8. Wpływ różnych podstawników poliarymatycznych oraz łańcucha alkilowego w strukturze *N*-acylowych pochodnych hydrazonów benzaldehydu 2,3,4-trihydroksyowego na aktywność HK2.

Zsyntezowano *N*-acylowe hydrazony aldehydu 2,3,4-trihydroksybenzoesowego o strukturze podobnej do BNBZ, w których podstawnik 4-nitrofenolowy został wymieniony na grupę etylową **3a**, benzen **3b**, naftalen **3f** i antracen **3g**, w celu określenia wpływu tej zmiany strukturalnej na aktywność inhibicyjną w odniesieniu do HK2.



Rysunek 61. Struktury związków poddanych ocenie hamowania HK2.

Badania *in vitro* hamowania aktywności HK2 wobec potencjalnych inhibitorów **3a-3b** oraz **3f-3g** za pomocą testu kolorymetrycznego umożliwiły wstępną ocenę pojemności miejsca wiążącego HK2 z potencjalnymi inhibitorami opartymi na strukturze BNBZ.

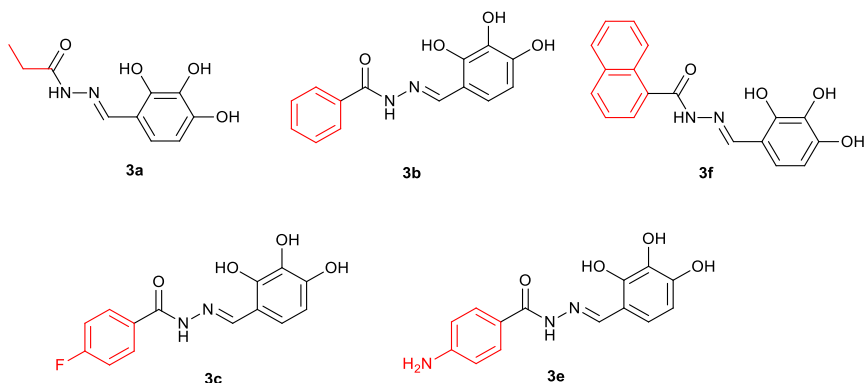


Rysunek 62. Wykresy analizy badania *in vitro*, oceniającego aktywność heksokinazy HK2 w obecności badanych związków **3a**, **3b**, **3f**, **3g** w dwóch stężeniach równych 50 μM oraz 5 μM , z zastosowaniem 3-BrPa jako Ctrl+ oraz Ctrl- jako test bez użycia inhibitora.

Analiza przedstawionych danych pokazuje, że przy zastosowaniu stężenia 50 μM , podczas inkubacji testowanych pochodnych, wszystkie związki hamują aktywność heksokinazy poniżej 80%. Natomiast przy niższym stężeniu równym 5 μM , można zauważyć, że pochodna **3g** zawierająca grupę antracenyłową nie wykazała znacznego działania hamującego HK2, w porównaniu z pochodnymi zawierającymi objętościowo mniejsze podstawniki (**3a**, **3b**, **3f**). Na tej podstawie można przypuszczać, że pochodna z największą objętością podstawnika aromatycznego nie dopasowuje się skutecznie do centrum aktywnego HK2. Niższą aktywność wykazuje także pochodna zawierająca łańcuch alkilowy zamiast układu aromatycznego, co może świadczyć o udziale pierścienia benzenowego w wiązaniu się inhibitora w miejscu katalitycznym, poprzez oddziaływania niewiążące np. siły Van der Waalsa. Najbardziej obiecujące wyniki uzyskano dla pochodnych z ugrupowaniem benzenowym **3b** oraz naftalenowym **3f**, dla których hamowanie aktywność HK2 przy stężeniu 5 μM , wynosi 85% i 88%, odpowiednio dla związku **3b** i **3f**. Ponadto obecność podstawnika aromatycznego zwiększa jego hydrofobowość polepszając jego właściwości penetracyjne do wnętrza enzymu. Obecność fragmentu polarnego z trzema grupami hydroksylowymi typu fenolowego, zapewnia dobre wpasowanie się w polarne centrum aktywne HK2. Te zmiany strukturalne mogą znacząco polepszać skuteczność *in vivo* potencjalnych inhibitorów.

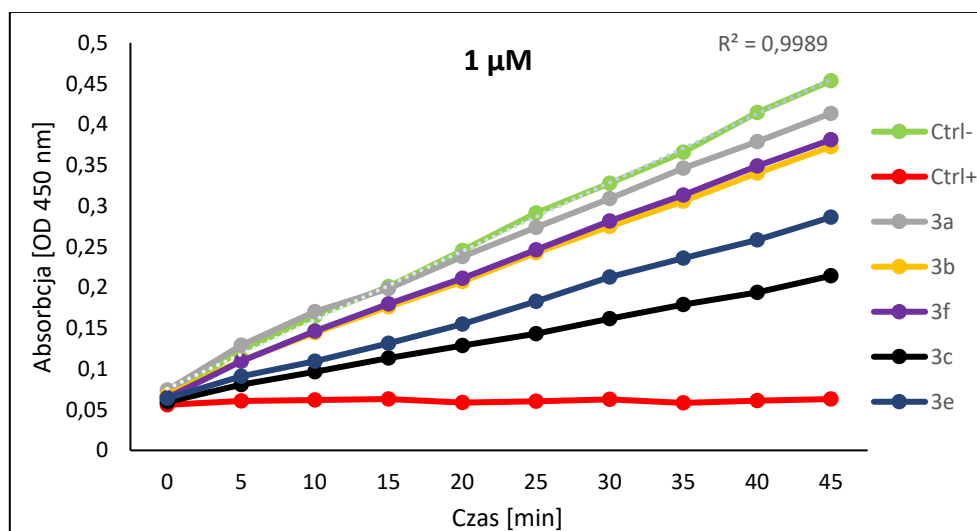
3.7.9. Badania *in vitro* przy stężeniu 1 μM dla najbardziej obiecujących potencjalnych inhibitorów HK2

Dla pochodnych, które wykazały najsilniejsze działanie hamujące aktywność HK2, wykonano oznaczenie aktywności hamującej przy stężeniu 1 μM . Do badań wybrano zasady Schiffa, posiadające w strukturze wiązanie iminowe, oparte na strukturze BNBZ, gdyż pochodne te wykazywały znacznie silniejszy efekt inhibicyjny przy stężeniu 5 μM niż analogi benserazydu.

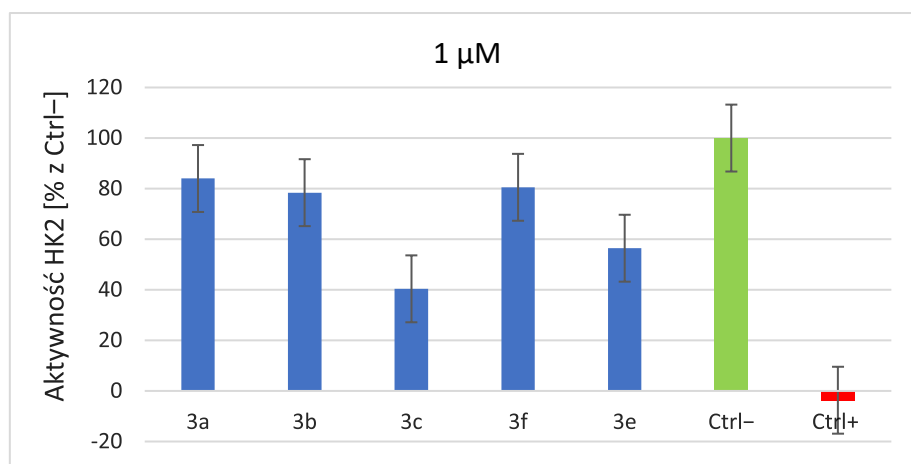


Rysunek 63. Pochodne hydrazonów bezaldehydu 2,3,4-trihydroksylowego poddane ocenie aktywności hamującej HK2 przy stężeniu 1 μM .

Rysunek 64 przedstawia przebieg reakcji enzymatycznej fosforylacji D-glukozy katalizowanej HK2 w obecności wybranych pochodnych. Obserwowano zmiany absorpcji przy λ_{max} 450 nm w trakcie reakcji enzymatycznej w czasie 5-45 minut. Hamowanie aktywności HK2 wobec badanych związków, wykazano jako zmniejszenie absorpcji w czasie, zależnej od HK2 przy 450 nm.



Rysunek 64. Zmiany absorpcji w czasie, powstałe w wyniku hamowania reakcji enzymatycznej katalizowanej przez HK2 w obecności wybranych pochodnych. Ctrl- oznacza kontrolę ujemną, która pokazuje normalną szybkość fosforylacji przez HK2, bez zastosowania inhibitora, Ctrl+ to kontrola pozytywna z użyciem 3-BrPa, jako inhibitora HK2.



Rysunek 65. Wykres analizy badań hamowania aktywności HK2 wobec zasad Schiffa.

Pochodna BNBZ zawierająca łańcuch alkilowy **3a** oraz pochodne BNBZ z układami aromatycznymi zamiast ugrupowania 4-nitrofenylowego **3b**, **3f**, hamując aktywność heksokinazy w tym stężeniu (1 μM) na poziomie około 20%. Natomiast pochodne BNBZ zawierające w pozycji para w układzie fenylowym podstawnik fluorowy **3c** oraz grupę aminową **3e**, nawet w tak niskim stężeniu jak 1 μM wykazują efekt inhibicyjny, hamując aktywność HK2 w obecności **3e** 44% oraz **3c** 60%.

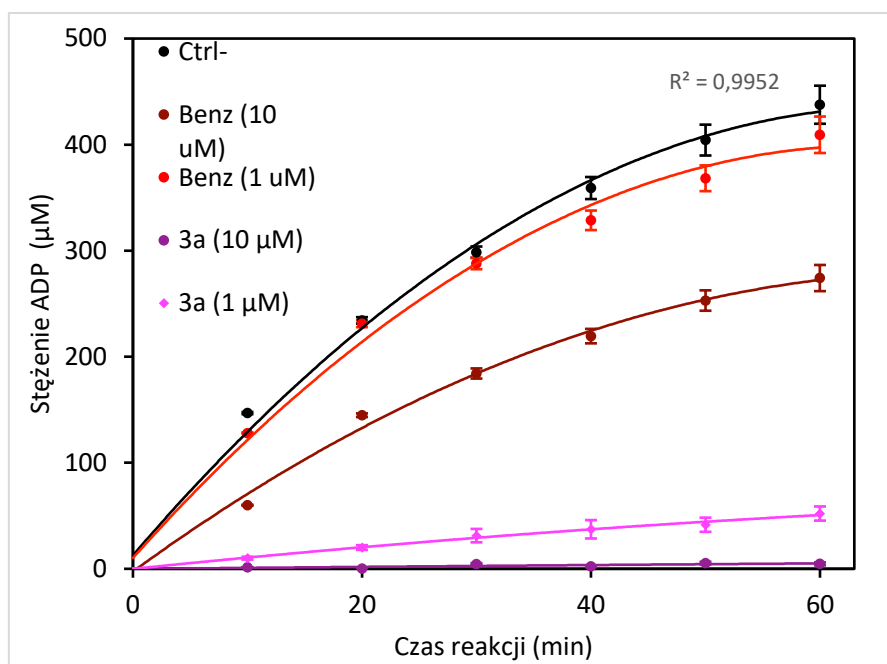
3.7.10. Badania nad określeniem aktywności heksokinazy 2 z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami

Dla pochodnej (*E*)-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)propionohydrazidu **3a** wyniki z oceny wpływu na aktywność HK2 z użyciem kolorymetrycznego testu porównano z analizą efektu inhibicyjnego z zastosowaniem metody HPLC. Aktywność HK2 względem badanego związku określono poprzez pomiar ilości ADP, wytworzonego w reakcji przekształcającej D-glukozę w D-gluko-6-fosforan (G6P). Ta metoda wydaje się być bardziej korzystna, ponieważ wymaga jednego kroku enzymatycznego, jakim jest fosforylacja glukozy, w przeciwieństwie do używanego zestawu do oznaczania aktywności enzymatycznej. W tym zestawie ilość powstałego NADPH mierzona jest w następczej reakcji przekształcania G6P za pomocą dehydrogenazy gluko-6-fosforanowej.

Ustalenie ilości wytworzonego ADP przy użyciu metody HPLC obejmowało zastosowanie detektora spektrofotometrycznego w zakresie UV-VIS, przy pomiarze absorbancji przy długości fali 254 nm, charakterystycznej dla ATP oraz ADP. Stężenie ATP określono za pomocą wzorca wewnętrznego, sporządzając krzywą kalibracyjną ADP przy użyciu siedmiu roztworów ADP w wodzie dejonizowanej, o różnym stężeniu (50, 100, 200, 300, 400, 500 i 1000 μM).

Ze względu na różnice w specyfikacji aparatury w porównaniu do metody opisanej w literaturze, przeprowadzono optymalizację procesu chromatograficznego, ustalając odpowiednie warunki, takie jak skład fazy ruchomej, przepływ eluentu, temperaturę oraz pH. Dzięki tym dostosowaniom udało się skutecznie odseparować sygnały pochodzące od ATP i ADP, co umożliwiło wiarygodny pomiar wielkości sygnału.

Wpływ na aktywność HK2 wobec **3a** testowano w stężeniach 10 μM oraz 1 μM . Jako kontrolę pozytywną zastosowano inhibitor HK2- benserazyd. Kontrola negatywna przedstawia, powstawanie ADP w czasie bez zastosowanie inhibitora.



Rysunek 66. Korelacja między stężeniem ADP, a czasem reakcji podczas fosforylacji D-glukozy katalizowanej HK2 z zastosowaniem inhibitorów oraz bez użycia inhibitora (Ctrl-). Każdy punkt danych reprezentuje średnią \pm SD z trzech pomiarów.

Na podstawie wyników powyższej analizy, jednoznacznie można stwierdzić, że pochodna (*E*)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)propionohydrazidu **3a** w sposób istotny hamuje aktywność heksokinazy 2 zarówno przy stężeniu 10 μ M oraz 1 μ M. Wykazuje ona także znacznie większą siłę działania niż benserazyd, uznawany w literaturze za silny inhibitor HK2 (literaturowe IC_{50} $5,52 \pm 0,17 \mu$ M) [16]. Badania z wykorzystaniem metody HPLC częściowo pokrywają się z wynikami z testów kolorymetrycznych, gdzie Benz przy stężeniu 10 μ M hamował aktywność HK2 na poziomie 40% (metoda HPLC), natomiast przy stężeniu 5 μ M Benz inhibował enzym w 84% (metoda wykorzystująca test kolorymetryczny).

W przypadku pochodnej **3a** przy stężeniu 10 μ M oraz 1 μ M, z zastosowaniem metody HPLC, **3a** hamowała aktywność HK2 odpowiednio 98% oraz 86%. Odnosząc się z tymi wynikami do badań enzymatycznych z użyciem testów kolorymetrycznych, ta sama pochodna **3a** hamowała aktywność HK2 przy stężeniu 5 μ M oraz 1 μ M odpowiednio 80%, 16%. Różnice w wynikach oceny aktywności enzymatycznej HK2 między dwoma metodami mogły wynikać z odmiennych mechanizmów pomiaru aktywności enzymatycznej. W przypadku komercyjnego testu kolorymetrycznego aktywność HK2 jest badana pośrednio, w dwóch krokach enzymatycznych. Natomiast w metodzie HPLC mierzono bezpośredni wpływ związków na reakcję fosforylacji glukozy katalizowanej przez HK2.

Różne metody pomiarowe mogą mieć także odmienną czułość, przez co niektóre techniki mogą lepiej wykrywać niewielkie zmiany aktywności enzymatycznej niż inne. Ponadto, inne źródła pozyskiwania enzymów czy zmiany strukturalne białka podczas stosowania odmiennych technik, mogą wpływać na ich czułość wobec inhibitorów, sprawiając, że niektóre enzymy są bardziej podatne na hamowanie przy niższych stężeniach. Mogłoby to tłumaczyć podobną siłę hamowania HK2 dwoma niezależnymi metodami związku **3a** przy stężeniach 5 i 10 μ M, natomiast odmiennie wartości mocy inhibicji HK2 przy zastosowaniu stężenia 1 μ M. Jednakże zastosowanie dwóch różnych metod oceny aktywności hamowania heksokinazy 2 pozwoliło na jednoznacznie stwierdzenie, że związek **3a** jako pochodna N-acylowych hydrazonów beznaldehydu 2,3,4-trihydroksylowego znacząco wpływa na aktywność HK2.

3.7.11. Podsumowania Badań *in vitro* pod kątem oceny hamowania aktywności ludzkiej heksokinazy 2 wobec zsyntezowanych, potencjalnych inhibitorów HK2.

Przeprowadzono badania *in vitro* syntezowanych pochodnych BNBZ oraz Benz, N-acylowych pochodnych hydrazonów i hydrazydów 2,3,4-trihydroksybenzaldehydu oraz N-acylohydrazyn. Oceniając wpływ hamowania HK2 przez testowane związki w stężeniu 5 μ M, stwierdzono, że związki: **3a-3c** oraz **3e-3g**, budową strukturalną podobne do znanego inhibitora - BNBZ, wykazują silniejszą inhibicję niż **7a**, **16b**, **17**, analogi innego znanego inhibitora - Benz, które w swojej strukturze posiadają między innymi zmodyfikowany fragment L-aminokwasu. Maksymalna inhibicja enzymu przez pochodne oparte na strukturze benserazydu **7a**, **16b**, **17**, przy stężeniu 5 μ M wynosiła około 50%. Spośród testowanych inhibitorów HK2 (**3a-3c**, **3e-3f**) przeciwko ludzkiej heksokinazie 2 w stężeniu 1 μ M, największą skuteczność odnotowano w przypadku pochodnej **3c** (*E*)-4-fluoro-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazidu. Zasadę Schiffa **3a** (*E*)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)-propionohydrazid badano pod kątem hamowania aktywności heksokinazy 2 *in vitro*, dwoma niezależnymi metodami (test kolorymetryczny, metoda HPLC). Potwierdzono inhibicyjny efekt **3a** wobec HK2, który okazał się silniejszy w porównaniu z benserazydem, znanym inhibitorem HK2.

4. Część eksperymentalna

4.1. Stosowane reagenty

- 98% Monohydrat hydrazyny Sigma-Aldrich
- Chloromrówczan benzylu Thermo Scientific (zawartość składnika głównego wg specyfikacji 97%, stab. około 0,1% węglanu sodu)
- L-aminokwasy ABCR (zawartość składnika głównego wg specyfikacji 99%)
- Triacetoksyborowodorek sodu Fluorochem
- Kwas 4-aminobenzoowy Alfa Aesar (zawartość składnika głównego wg specyfikacji 99%)
- Kwas 4-nitrobenzoowy Alfa Aesar (zawartość składnika głównego wg specyfikacji 99%)
- Kwas 4-fluorobenzoowy Alfa Aesar (zawartość składnika głównego wg specyfikacji 99%)
- Kwas 4-merkaptobenzoowy Alfa Aesar (zawartość składnika głównego wg specyfikacji 99%)
- Kwas 1-naftoesowy TCI (zawartość składnika głównego wg specyfikacji 99%)
- kwas antraceno-9-karboksylowy
- Propionian metylu Alfa Aesar (zawartość składnika głównego wg specyfikacji 99%)
- Benzozean etylu Alfa Aesar (zawartość składnika głównego wg specyfikacji 99%)
- Diwęglanem di-tert-butylu Thermo Scientific (zawartość składnika głównego wg specyfikacji 99%)
- Aldehyd salicylowy Alfa Aesar (zawartość składnika głównego wg specyfikacji 99%)
- 3-hydroksybenzaldehyd Acros Organic (zawartość składnika głównego wg specyfikacji 98,5%)
- 4-hydroksybenzaldehyd Acros Organic (zawartość składnika głównego wg specyfikacji 99%)
- 2,3-dihydroksybenzaldehyd Acros Organic (zawartość składnika głównego wg specyfikacji 98%)
- 2,4-dihydroksybenzaldehyd Acros Organic (zawartość składnika głównego wg specyfikacji 98%)
- 3,4-dihydroksybenzaldehyd Acros Organic (zawartość składnika głównego wg specyfikacji 98%)
- 2,3,4-trihydroksybenzaldehyd Thermo Scientific (zawartość składnika głównego wg specyfikacji 98%)
- Katalizator 10 %Pt/C w 50% zawierający wodę Sigma Aldrich
- Katalizator 10% Pd/C w 50% zawierający wodę, niezredukowany – Thermo Scientific
- Trietyloamina ChemPur (zawartość składnika głównego wg specyfikacji 98%)
- Chlorek tionylu Thermo Scientific (zawartość składnika głównego wg specyfikacji 99,5%)

- DCM/MeOH/THF Acros Organic (zawartość składnika głównego wg specyfikacji powyżej 99%)
- DMF Acros Organic (zawartość składnika głównego wg specyfikacji 99,8%)
- kwasu trifluorooctowy Alfa Aesar (zawartość składnika głównego wg specyfikacji 99%)
- Kwas siarkowy cz.d.a. ChemPur (zawartość składnika głównego wg specyfikacji 95%)
- Kwas solny cz.d.a. ChemPur (zawartość składnika głównego wg specyfikacji 35 – 38%)
- Odczynniki użyte do badań biologicznych z zastosowaniem metody HPLC: ATP, ADP, metanol, glukoza, KH_2PO_4 , NaOH, MgCl_2 , EDTA i Tris – czystość analityczna (Merc, Darmstadt, Niemcy), Rekombinowana ludzka heksokinaza 2 (z *Escherichia coli*) (nr kat. #ab85920; Abcam, Cambridge, MA, USA)

4.2. Aparatura oraz materiały pomocnicze użyte do badań

- Widma ^1H NMR i ^{13}C NMR rejestrowano na spektrometrze 600 MHz (Varian, Palo Alto, Kalifornia, USA) w roztworach CD_3OD , DMSO, CDCl_3 z tetrametylosilanem (TMS) jako wzorcem. Przesunięcia chemiczne NMR podano w ppm (δ), a stałe sprzężenia (J) w Hz.
- Temperaturę topnienia (Tt) określono przy użyciu aparatu Boethius PHMK (VEB Analytik, Jena, Niemcy).
- Spektroskopię masową o wysokiej rozdzielczości (HRMS) z jonizacją przez elektrorozpylanie (ESI-HRMS) przeprowadzono przy użyciu aparatu Waters Xevo G2 Q-TOF (Waters, Milford, MA, USA).
- Reakcje monitorowano za pomocą TLC na płytkach aluminiowych pokrytych żelem krzemionkowym 60 F254 (Merck, Darmstadt, Niemcy).
- Chromatografię kolumnową przeprowadzono na żelu krzemionkowym 40–60 μm 60A (Merck).
- Preparatywną chromatografię cieczową wykonano na chromatografie LaboACE LC-5060 (20 mm \times 50 cm, 10 μm ; Japan Analytical Industry Co., Ltd., Tokio, Japonia), z kolumną ODS (JAIGEL-ODS-AP, model SP-12-10, Japan Analytical Industry, Co. Ltd. Tokio, Japonia), detektor UV.
- W ocenie aktywności HK2 w testach *in vitro* wykorzystano czytnik mikroplatkowy Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX.
- Do analizy HPLC użyto systemu HPLC Dionex wyposażonego w detektor o zmiennych długościach fal UltiMate 3000 RS i komorę kolumnową UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Sunnyvale, CA, USA), razem z kolumną TSKgel ODS-100V (4.6 mm \times 15 cm, 5 μm ; TOSOH Corporation Tokyo, Japonia).
- Widma UV-VIS wykonano za pomocą spektrofotometru Hitachi U-2910.
- Próbki liofilizowano za pomocą liofilizatora alpha 1-2 Id plus.

4.3. Procedury syntez

4.3.1. Syntezy estrów

4.3.1.1. Synteza estrów kwasów aromatycznych

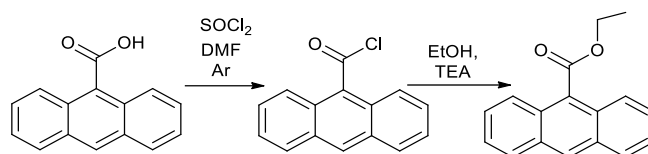


Estry metylowe syntezowano według dwóch procedur ogólnych:

Procedura A: Do mieszanego i chłodzonego roztworu kwasu karboksylowego (30 mmol) w bezwodnym metanolu (40 ml, 988,71mmol), powoli wdroplono 1,10 ekwiwalenta SOCl_2 (2,39 ml, 33,00 mmol). Mieszaninę reakcyjną ogrzano do temperatury pokojowej i mieszano przez 24 godziny.

Temperaturę wrzenia rozpuszczalnika zastosowano w przypadku syntezy 4-fluorobenzoesanu metylu. Po zakończonej reakcji nadmiar metanolu usunięto, a pozostałość suszono pod obniżonym ciśnieniem bądź mieszaninę wylewano do zlewki z 150 ml wodnego roztworu NaHCO₃, otrzymany osad w przypadku 4-aminobenzoesanu metylu sączono i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem, natomiast dla 4-fluorobenzoesanu metylu oraz 1-naftoesanu metylu wykonano ekstrakcje z octanu etylu (3x40 ml), warstwę organiczną suszono nad bezwodnym MgSO₄ i następnie odparowano.

Procedura B: Do roztworu substratu (20 mmol) w bezwodnym metanolu (30 ml, 741,53 mmol) wkroplono katalityczną ilość (0.2 ml) H₂SO₄. Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia metanolu przez 24 godziny. Po zakończonej reakcji odparowano metanol, pozostałość rozpuszczono w 35 ml octanu etylu i przemywano wodnym nasyconym roztworem NaHCO₃ (2x30 ml), a następnie wodą do odczynu obojętnego. Roztwór suszono nad bezw. siarczanem magnezu, a następnie odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. W przypadku wydzielania 4-nitrobenzoesanu metylu mieszaninę wylewano do 150 ml wodnego roztworu K₂CO₃, a wytrącony osad przesączono. Otrzymane estry suszono pod zmniejszonym ciśnieniem.



Procedura C: Ester etylowy kwasu antraceno-9-karboksylowego otrzymano dwuetapowo.

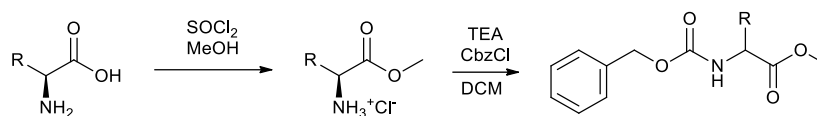
Do kolby wprowadzono kwas antraceno-9-karboksylowy (0,5 g, 2,25 mmol), 7 ml świeżo przedestylowanego SOCl₂ (96,50 mmol) oraz 0,4 ml DMF. Mieszano w temperaturze pokojowej w atmosferze argonu przez 4 godziny. Po zakończonej reakcji usunięto SOCl₂ pod zmniejszonym ciśnieniem i przemyto pozostałość toluenem. Do kolby z otrzymanym osadem umieszczonej w łaźni lodowo-wodnej wprowadzono około 10 ml EtOH, następnie po ochłodzeniu roztworu powoli dodano TEA (1,2 ekw. 0,298 ml, 2,15 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej 24 godziny bez dostępu wilgoci (zastosowano rurkę chlorowapniową). Po zakończonej reakcji, etanol usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem. Do uzyskanej pozostałości dodano 10 ml chloroformu i uzyskany roztwór przemywano wodą (2 x 15 ml). Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym Na₂SO₄, następnie odparowano, a pozostałość oczyszczano na kolumnie wypełnionej żelem krzemionkowym, stosując mieszaninę AcOEt:*n*-heksan (1:1, v/v) jako eluent.

Tabela 10. Wydajności oraz identyfikacja otrzymanych estrów kwasów aromatycznych.

Ester	Procedura syntezy	Wydajność [%]	Tt [°C]	HRMS [M+H] ⁺
1-naftoesan metylu	A	97	48-49; (lit: 51-52 [147])	187,0743
4-nitrobenzoesan metylu	B	98	92-93; Lit: 89-91 [148])	182,0447
4-fluorobenzoesan metylu	A	73	90-91; (Lit: 89-90 [149])	155,0513
4-aminobenzoesan metylu	A	85	107-108; (Lit: 110 [150])	152,0715
4-merkaptobenzoesan metylu	B	90	124-125; (lit:53-55 [151])	169,0428
antraceno-9-karboksylan etylu	C	90	109-110; (lit: 110-111 [152])	237,0932

4.3.1.2. Synteza estrów metylowy N-Cbz-aminokwasów

Otrzymywanie estrów metylowy N-Cbz-aminokwasów (przepis ogólny):



R - łańcuch boczny aminokwasów

Do mieszanego i chłodzonego roztworu substratu (30 mmol) w bezwodnym metanolu (40 ml, 987,71 mmol), powoli wkroplono 1,10 ekw. SOCl_2 . Mieszaninę reakcyjną ogrzano do temperatury pokojowej i mieszano przez 24 godziny. Po zakończonej reakcji nadmiar metanolu usunięto, a pozostałość suszono pod obniżonym ciśnieniem. W przypadku syntezy chlorowodoru estru tyrozyny wydłużono czas reakcji do 72 godz., natomiast dla estru glicyny i proliny oprócz przedłużenia czasu reakcji do 48 godzin, dodatkowo mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze wrzenia metanolu. Surowy ester użyto w kolejnym etapie syntezy bez dodatkowego oczyszczania. Ester metylowy aminokwasu (25,0 mmol) rozpuszczono w dichlorometanie (30 ml) dodano 2,5 ekw. trietyloaminy (8,71 ml, 62,50 mmol). Po chwili do mieszaniny reakcyjnej w temperaturze 0°C powoli wkroplono chloromrówczan benzylu (1,2 ekw., 30,0 mmol, 4,26 ml). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 12 godzin, następnie dodano do niej wodę (25 ml). Warstwy rozdzielono, warstwę organiczną przemyto nasyconym roztworem NaHCO_3 (25 ml), a następnie dwukrotnie wodą (2 x 25 ml) i suszono nad bezwodnym Na_2SO_4 , a następnie zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. W przypadku estru metylowego Cbz-L-histydyny, warstwę wodną ekstrahowano octanem etylu (3 x 25 ml). Ekstrakt suszono nad bezw. Na_2SO_4 , odparowano a pozostałość oczyszczono na kolumnie z żelem krzemionkowym, stosując mieszaninę $\text{AcOEt}:n$ -heksan (1:1 v/v). Podczas zabezpieczania estru metylowego glicyny zmodyfikowano procedurę, ogrzewając mieszaninę reakcyjną w 40°C przez 5 godzin. Syntezę estru metylowego N-benzylloksykarbonylo-L-tyrozyny prowadzono przez 48 godzin, a podczas oczyszczania po chromatografii kolumnowej zastosowano dodatkowo przemywanie pozostałości eterem naftowym.

Tabela 11. Wydajności oraz identyfikacja otrzymanych estrów N-Cbz-L-aminokwasów.

Ester metylowy N-Cbz-aminokwasu	Wydajność [%]	Tt [$^\circ\text{C}$]	HRMS m/z [M+H] ⁺
ester metylowy N-benzylloksykarbonylo-L-seryny	80	Olej; (lit:31-33 [153])	224,0917
ester metylowy N-benzylloksykarbonylo-glicyny	58	Olej; (lit: 22-25[154])	224,1273
ester metylowy N-benzylloksykarbonylo-L-alaniny	52	Olej; (lit:45-47 [155])	238,1203
ester metylowy N-benzylloksykarbonylo-L-cysteiny	48	Olej; (lit:20-25 [156])	270,0691
ester metylowy N-benzylloksykarbonylo-L-tyrozyny	87	90-93; (lit:93-94 [157])	330,1737
ester metylowy N-benzylloksykarbonylo-L-proliny	69	Olej	264,1261
ester metylowy N-benzylloksykarbonylo-L-histydyny	50	74	304,1299
ester metylowy N-benzylloksykarbonylo-L-treoniny	58	85-86; (lit:90-91 [158])	268,1289
ester metylowy N-benzylloksykarbonylo-L-izoleucyny	83	Olej	280,1865

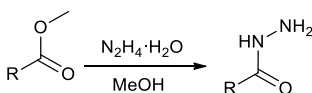
4.3.1.3. Synteza 4-[(*t*-butoksykarbonylo)amino]benzoesanu metylu

TEA wkroplono (0,6 ml, 1,1 ekw.) do roztworu 4-aminobenzoesanu metylu (2,76 g, 18,26 mmol) w bezwodnym CH₂Cl₂ (25 ml), następnie dodano 2M roztwór (Boc)₂O w THF (4,58 ml, 2,2 ekw., 40,17 mmol) i mieszano roztwór przez 12 godziny w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Po zakończonej reakcji mieszaninę zneutralizowano 0,1 M kwasem solnym i ekstrahowano wodą (2 x 15 ml). Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem magnezu (VI). Po przesączeniu i odparowaniu warstwy organicznej, pozostałość oczyszczano za pomocą chromatograficznej na żelu krzemionkowym, produkt wymywno z kolumny chloroformem. Otrzymano 4-[(*t*-butoksykarbonylo)amino]benzoesan metylu z wydajnością 60%. Tt 160-161°C (Lit: 166-168°C [159]). HRMS (ESI-TOF): *m/z* obliczone dla C₁₃H₁₇NO₄ [M+H]⁺ : 252,1230; znalezione: 252,1228.

4.3.2. Synteza pochodnych hydrazyny

4.3.2.1. Otrzymywanie N-acylohydrazyn

(przepis ogólny):



R = etyl, fenyl, 1-naftyl, 4-fluorofenyl, 4-aminofenyl, 4-nitrofenyl, 4-[(*t*-butoksykarbonylo)amino]fenyl

Do roztworu odpowiedniego estru (20,0 mmoli) w metanolu (30,0 ml) dodano nadmiar 98% monohydratu hydrazyny (od 3 do 6 ekwiwalentów) i roztwór mieszano w temperaturze pokojowej bądź w temperaturze wrzenia do zaniku estru. Po zakończonej reakcji wytrącony osad przesączono lub jeśli osad nie powstał, odparowywano metanol pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkty oczyszczano za pomocą krystalizacji lub metodą chromatografii kolumnowej. Dane ze stosowanymi warunkami reakcji oraz wydajnościami dla syntezy odpowiednich N-acylohydrazyn przedstawiono w tabeli 12.

Tabela 12. Warunki reakcji oraz wydajności otrzymywania odpowiednich hydrazydów.

hydrazyd	Ilość dodawanych ekw. N ₂ H ₄ ·H ₂ O	Temp. reakcji [°C]	Czas reakcji [godz]	Metoda oczyszczania	Wydajność [%]
propionohydrazyd	4	Twrz	24	Chromatografia kolumnowa (eluent: 3% MeOH/CHCl ₃ (v/v))	89
benzohydrazyd	5	R.T. (ang. room temperature)	48	Krystalizacja (EtOH:H ₂ O 1:2 v/v)	77
1-naftohydrazyd	4	R.T.	96	Krystalizacja (EtOH:H ₂ O 1:2 v/v)	81
4-(hydrazynokarbonylo)fenylo) karbaminian <i>tert</i> -butylu	4	Twrz	24	Chromatografia kolumnowa (eluent: MeOH/CH ₃ Cl (v/v))	60
4-nitrobenzohydrazyd	3	R.T.	4	Krystalizacja (MeOH)	65
4-fluorobenzohydrazyd	4	Twrz	24	Krystalizacja (EtOH:H ₂ O 1:2 v/v)	60
4-aminobenzohydrazyd	6	R.T.	144	Krystalizacja (EtOH:H ₂ O 1:2 v/v)	60

Propionohydrazyd: Tt 36-38°C (lit. Tt 38-40°C [160]). ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 0,99 (q, J=7,62, 2H), 2,01 (t, J=7,61, 3H), 4,13 (s, 2H), 8,90 (s, 1H), ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 10,37, 27,07, 172,86, HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₃H₈N₂O [M+H]⁺ 89,0709; znalezione: 89,0736.

Benzohydrazyd: Tt 114-115°C. (lit. Tt 116-118°C [161]). ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 4,48 (s, 2H) 7,53-7,46 (m, 2H), 7,49-7,51 (m, 1H), 7,81-7,83 (m, 2H), 9,76 (s, 1H). ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 132.08, 133.44, 136.18, 138.46, 171.02. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₇H₈N₂O [M+H]⁺: 137,0709; znalezione: 137,0724.

4-(Hydrazynokarbonylo)fenylo)karbaminian *tert*-butylu: Tt 187-188°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 1.48 (s, 9H), 4.40 (s, 2H), 7.50 (d, J=8.59, 2H), 7.73 (d, J=8.69, 2H), 9.58 (s, 2H). ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 28.51, 79.89, 117.60, 127.06, 128.15, 142.56, 153.03, 166.03. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₂H₁₇N₃O₃ [M+H]⁺: 252,1342; znalezione: 252,1357.

4-Nitrobenzohydrazyd: Tt 210°C. (lit. Tt 212-214°C [162]) ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 4.64 (s, 2H), 8.06 (d, J=9.01, 2H), 8.30 (d, J=9.01 Hz, 2H), 10.13 (s, 1H). ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 123.45, 128.35, 138.93, 148.82, 163.81. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₇H₈O₃N₃ [M+H]⁺:182,0566; znalezione: 182,0073.

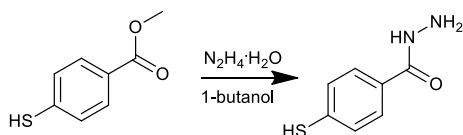
4-Fluorobenzohydrazyd: Tt 164-165°C. (lit. Tt 162-164°C [161]) ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 4.48 (s, 2H), 7.24-7.27 (m, 2H), 7.86-7.88 (m, 2H), 9.76 (s, 1H). ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 115.66 (d, J=21.75), 129.96 (d, J=8.98), 163.36, 165.01, 165.31. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₇H₇FN₂O [M+H]⁺: 155,0615. znalezione: 155,0623.

4-Aminobenzohydrazyd: Tt 224-226°C (lit. Tt 225-227°C [161]). ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 4.59 (d, J = 3.53 Hz, 2H), 7.51-7.58 (m, 4H), 7.96-7.98 (m, 1H), 8.00-8.01 (m, 1H), 8.20-8.22 (m, 1H), 9.68 (s, 2H) ¹³C NMR 600 MHz, DMSO): δ 130.16, 130.51, 130.60, 131.40, 131.80, 133.35, 135.02, 135.18, 135.138.30, 138.55, 173.14. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₁H₁₀N₂O [M+H]⁺ 187,0866; znalezione: 187,0610.

1-Naftohydrazyd: Tt 156-157°C (lit. Tt 160-163°C [163]). ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 4.59 (d, J = 3.53 Hz, 2H), 7.51-7.58 (m, 4H), 7.96-7.98 (m, 1H), 8.00-8.01 (m, 1H), 8.20-8.22 (m, 1H), 9.68 (s, 2H) ¹³C NMR 150 MHz, DMSO): 130.16, 130.51, 130.60, 131.40, 131.80, 133.35, 135.02, 135.18, 135.138.30, 138.55, 173.14. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₁H₁₀N₂O [M+H]⁺: 187,0866; znalezione: 187,0610.

Dla otrzymania 4-merkaptobenzohydrazynu oraz antraceno-9-karbohydrazynu zastosowano odmienne procedury syntezy.

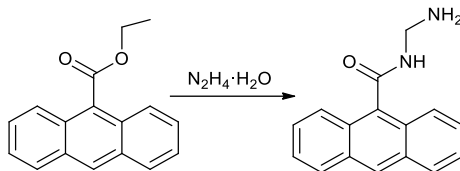
Synteza 4-merkaptobenzohydrazynu:



4-Merkaptobenzoesan metylu (0,300 g, 1,78 mmola) rozpuszczano w 10 ml 1-butanolu, dodano nadmiar 98% monohydratu hydrazyny (10 ml, 201,64 mmol) i ogrzewano w 115°C przez 48 godzin. Po tym czasie roztwór ochłodzono, dodano 10 ml wody, zakwaszono 1M HCl do uzyskania pH około 6. Wytrącony osad przesączono i oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym z użyciem mieszaniny rozpuszczalników 5% MeOH/CHCl₃ (v/v) jako eluentu. Otrzymano 4-merkaptobenzohydrazyd z wydajnością 64%. Tt 151-152°C (lit Tt 152-153°C [164]).

^1H NMR (600 MHz, DMSO): δ 4.46 (s, 2H), 7.57 (d, $J=8.45$, 2H), 7.78 (d, $J=8.49$, 2H), 9.77 (s, 1H). ^{13}C NMR 600 MHz, DMSO): δ 165.54, 139.18, 132.72, 128.47, 126.75. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_2\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 169,0430; znalezione: 169,0428.

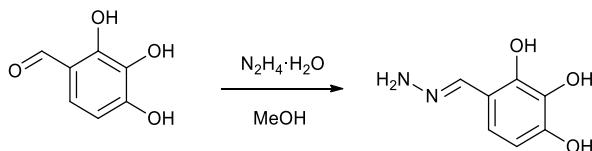
Synteza Antraceno-9-karbohydrazynu:



Do 10 ml 98% monohydratu hydrazyny (199,76 mmol) dodano antraceno-9-karboksylian etylu (0,400 g, 1,60 mmola). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 72 godziny. Roztwór zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem, a wytracony osad przesączono. Otrzymane ciało stałe oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując początkowo 100% CHCl_3 , a następnie 20% $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ (v/v) jako elenty. Dodatkowe oczyszczenie wykonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), stosując kolumnę ODS z metanolem jako eluentem (6 ml/min). Produkt uzyskano z wydajności 60%. Temp. rozkładu 242°C .

^1H NMR (600 MHz, DMSO): δ 4.81 (d, $J = 3.10$ Hz, 2H), 7.52-7.57 (m, 4H), 7.98-8.00 (m, 2H), 8.10-8.12 (m, 2H), 8.65 (s, 1H), 9.83 (s, 1H). ^{13}C NMR 600 MHz, DMSO): δ 125.92, 126.02, 126.76, 127.83, 128.33, 128.77, 131.10, 132.51, 167.96. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 237,1028; znalezione: 237,1031.

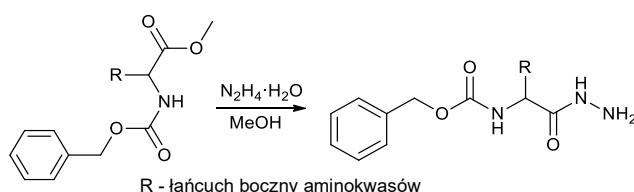
4.3.2.2. Synteza (*E*)-4-(hydrazonometylo)benzeno-2,3,4-triolu



2,3,4-Trihydroksybenzaldehyd (1,0 g, 3,73 mmola) rozpuszczono w 20 ml metanolu, a następnie dodano 3 ekwiwalenty 98% monohydratu hydrazyny (0,56 ml, 11.19 mmol) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 72 godziny. Osad, który wypadł w trakcie reakcji przesączono i krystalizowano z mieszaniny $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ w stosunku objętościowym 1:9. Otrzymano produkt z wydajnością 67% jako żółte ciało stałe. $T_t > 250^\circ\text{C}$. ^1H NMR (600 MHz, DMSO): δ 6.45 (d, $J=8.46$, 1H), 6.94 (d, $J=8.59$, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 9.76 (s, 1H), 11.28 (s, 1H). ^{13}C NMR 600 MHz, DMSO): δ 108.55, 111.16, 123.39, 133.01, 149.05, 150.60, 163.26. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 237,1028; znalezione: 237,1031.

4.3.2.3. Otrzymywanie hydrazydów N-Cbz-aminokwasów

(Przepis ogólny):



Hydrazydy N-Cbz-aminokwasów otrzymano traktując roztwory estrów metylowych N-Cbz-aminokwasów (16,5 mmola) w 30 ml bezwodnego metanolu 98% monohydratem hydrazyny (4 ekw., 66 mmoli). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Hydrazydy N-zabezpieczonych aminokwasów takich jak: seryna, tyrozyna, treonina, cysteina, glicyna podczas reakcji wytrącały się z roztworów w postaci białawych osadów, które po zakończonej reakcji przesączono. Roztwory hydrazydów N-Cbz-L-aminokwasów: proliny, histydyny, alaniny oraz izoleucyny odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Metody oczyszczania poszczególnych hydrazydów przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Sposoby oczyszczania otrzymanych hydrazydów N-zabezpieczonych aminokwasów.

Hydrazyd	Metoda oczyszczania	Wydajność [%]
Hydrazyd N-benzyloksykarbonylo-glicyny	Przemycie osadu ochłodzonym metanolem	97
Hydrazyd N-benzyloksykarbonylo-L-seryny	Rekrystalizacja z etanolu	88
Hydrazyd N-benzyloksykarbonylo-L-cysteiny	Rekrystalizacja z etanolu	60
Hydrazyd N-benzyloksykarbonylo-L-treoniny	Rekrystalizacja z etanolu	45
Hydrazyd N-benzyloksykarbonylo-L-tyrozyny	Krystalizacja z wody	36
Hydrazyd N-benzyloksykarbonylo-L-histydyny	Krystalizacji z MeOH:CHCl ₃ 1:9 v/v	50
Hydrazyd N-benzyloksykarbonylo-L-proliny	Chromatografia kolumnowa (eluent: 3% MeOH/CHCl ₃ v/v)	67
Hydrazyd N-benzyloksykarbonylo-L-alaniny	Chromatografia kolumnowa (eluent: 3% MeOH/CHCl ₃ v/v)	51
Hydrazyd N-benzyloksykarbonylo-L-izoleucyny	HPLC z ODS (eluent: 70% MeOH/H ₂ O v/v, przepływ: 6ml/min)	14

Hydrazyd N-benzyloksykarbonylo-glicyny: Tt 114–115°C (lit. Tt 112–114°C [165]). ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 3.55 (d, J=6.16, 2H), 4.17(s,2H), 5.00 (s, 2H), 7.28-7.39 (m, 5H), 9.02 (s, 1H), ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 42.65, 65.91, 128.13, 128.23, 128.77, 137.44, 156.86, 168.93. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₀H₁₃O₃N₃ [M+H]⁺: 224,1030; znalezione: 224,1046.

Hydrazyd N-benzyloksykarbonylo-L-tyrozyny: Tt 218–219°C (lit. Tt 219–221°C [166]). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-): δ 2.62-2.66 (m,1H), 2.77-2.81 (m, 1H), 4.08-4.12 (m, 1H), 4.21 (s, 2H) 4.91-4.96 (m, 2H), 5.04 (s, 1H), 6.65 (d, J=8.36, 2H), 7.04 (d, J=8.30, 2H), 7.24-7.35 (m, 3H), 7.44 (d, J=8.71, 2H), 8.94 (s, 1H), 9.02 (s, 1H). ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 37.48, 55.72, 65.57, 115.30, 127.86, 128.07, 128.49, 128.70, 128,76, 130.52, 137.52, 156.24, 169.60. (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₁H₁₅N₃O₃S [M+H]⁺: 330,1454; znalezione: 330,1417.

Hydrazyd N-benzyloksykarbonylo-L-cysteiny: Tt 138–139°C (lit. Tt 141–143°C [167]). ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 1.23 (s, 3H), 2.84-2.88 (m, 1H), 3.03-3.06 (m, 1H), 4.26 (s, 2H), 5.00-5.04 (m, 2H), 7.31-7.36 (m, 4H), 7.56 (d, J=8.53, 1H) 9.30 (s, 2H) ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 53.00, 56.47, 66.00, 128.16, 128.23, 128.75, 137.33, 156.24, 169.60. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₁H₁₅N₃O₃S [M-H]⁻: 268,0761; znalezione: 268,0763.

Hydrazyd N-benzylloksykarbonylo-L-proliny: Tt 178-180°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 1.74-1.85 (m, 6H), 2.02-2.10 (m, 2 H), 3.34-3.37 (m, 2H), 3.41-3.47 (m, 2H), 4.08-4.17 (m, 4H), 5.00-5.04 (m, 4H), 7.26-7.35 (m, 10 H), 9.12 (d, J=14.81, 2H) ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 27.72, 28.01, 28.93, 32.18, 34.78, 35.85, 49.35, 51.81, 61.97, 70.63, 132.13, 132.55, 132.58, 132.87, 133.42, 133.55, 142.35, 159.11, 159.93, 169.78, 172.36. HRMS (ESI-TOF): 178-180 m/z obliczona dla dla C₁₃H₁₇N₃O₃ m/z [M+H]⁺: 264,1342; znalezione: 264,1336. Na widmach widoczne są obecności sygnałów pochodzących od rotamerów hydrazydów, co jest zgodne z danymi zawartymi w literaturze [168].

Hydrazyd N-benzylloksykarbonylo-L-histydyny: Tt 173°C (lit: 172-173°C [169]). ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 2.72-2.76 (m, 1H), 2.82-2.85 (m, 1H) 4.17-4.19 (m, 3H), 4.96 (s, 2H), 6.75 (s, 1H) 7.28-7.47 (m, 5H), 7.67 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 9.12 (s, 1H) ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 30.28, 62.31, 68.32, 119.22, 127.30, 127.52, 128.31, 132.52, 136.23, 136.94, 157.21, 169.41. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₄H₁₇N₅O₃ m/z [M+H]⁺: 264,13336; znalezione: 264,1346.

Hydrazyd N-benzylloksykarbonylo-L-alaniny: Tt 137°C (lit. Tt 138.5°C [170]). ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 1.31 (d, J=7.16, 3H), 4.12(q, J=4.12, 1H), 5.07 (q, J=12.44, 2H), 7.28-7.35 (m, 5H). ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 16.99, 49.34, 66.24, 127.45, 127.59, 128.03, 136.71, 156.71, 173.29. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone C₁₁H₁₅N₃O₃ dla [M+H]⁺: 238,1186; znalezione: 238,1172.

Hydrazyd N-benzylloksykarbonylo-L-seryny: Tt 181-182°C (lit. Tt 181°C [171]). ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 3.56-3.47 (m, 2H), 4.01-3.98 (m, 1H), 4.19 (d, J= 3.02, 2H), 4.82 (t, J= 5.73, 1H), 5.02 (s, 2H), 7.13 (d, J=8.41, 1H), 7.35-7.29 (m, 5H), 9.08 (s, 1H). ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 56.46, 62.19, 65.91, 128.15, 128.76, 137.43, 156.21, 169.79. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₁H₁₅N₃O₄ [M+H]⁺: 254,1135 znalezione: 254,1123.

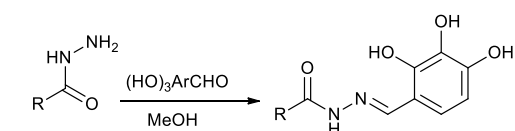
Hydrazyd N-benzylloksykarbonylo-L-izoleucyny: Tt 159-161°C (lit. Tt 156-158°C [172]). ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 0.87 (t, J=6.56, 3H), 1.09 (t, J=6.21, 3H), 1.52-1.57 (m, 2H), 2.09 (s, J=6.64, 1H), 3.95-3.98 (m, 1H), 4,19 (s, 2H) 5.06 (s, 1H), 7.24-7.39 (m, 5H), 9.07 (s, 1H). ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 11.63, 16.77, 22.98, 32.51, 60.11, 66.41, 128.14, 128.43, 128.98, 136.15, 156.13, 170.43. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczona dla C₁₄H₂₁N₃O₃ [M+H]⁺: 280,1655 Znalezione: 280,1554

Hydrazyd N-benzylloksykarbonylo-L-treoniny: Tt 188-189°C (lit. Tt 190-191.5°C [173]). ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 1.00 (d, J=6.07, 3H), 3.83-3.86 (m, 1H), 4.19 (d, J=3.67, 1H) 4.77 (d, J=5.47, 1H), 4.98-5.03 (m, 1H), 6.86 (d, J=6.86, 1H), 7.29-7.34 (m, 4H), 9.05 (s, 1H) ¹³C NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 20.48, 60.14, 65.97, 67.01, 128.07, 128.23, 128.78, 137.39, 156.45, 170.10. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₂H₁₇N₃O₄ 268,1291, znalezione:268,1039.

4.3.3. Synteza hydrazonów

4.3.3.1. Synteza N-acylowych pochodnych hydrazonów 2,3,4-trihydroksybenzaldehydu

Generalna metoda otrzymywania hydrazonów:



2a: R = etyl,
 2b: R = fenyl,
 2c: R = 4-fluorofenyl,
 2d: R = 4-nitrofenyl,
 2e: R = 4-aminofenyl,
 2f: R = 1-naftyl,
 2g: R = 9-antracenył,

3a: R = etyl,
 3b: R = fenyl,
 3c: R = 4-fluorofenyl,
 3d: R = 4-nitrofenyl,
 3e: R = 4-aminofenyl,
 3f: R = 1-naftyl,
 3g: R = 9-antracenył,

Do roztworów odpowiednich hydrazydów (3,50 mmola) w metanolu (20 ml) dodano ustaloną ilość 2,3,4-trihydroksybenzaldehydu (ilość ekwiwalentów aldehydu zależna od zastosowanych hydrazonów) i mieszano w temperaturze pokojowej bądź podwyższonej w różnym czasie (Tabela 14). Po zakończonej reakcji w większości przypadków syntez hydrazonów wytrącił się osad, który przesączono, a następnie oczyszczano. Podczas otrzymywania (*E*)-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)antraceno-9-karbohydrazidu oraz (*E*)-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)propionohydrazidu osad nie powstaje. Roztwór reakcyjny odparowywano a następnie pozostałość poddawano procesowi oczyszczania. W trakcie syntezy (*E*)-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)-4-fluorobenzenohydrazidu reakcję prowadzono w atmosferze argonu.

Tabela 14. Warunki reakcji oraz wydajności otrzymywanych hydrazonów.

Hydrazon	Ilość ekw. (HO) ₃ ArCHO	Temp. reakcji [°C]	Czas reakcji [godz]	Metoda oczyszczania	Wydajność [%]
(<i>E</i>)- <i>N'</i> -(2,3,4-trihydroksybenzylideno)-propionohydrazyd	1,2	50	5	Rozpuszczenie hydrazonu w EtOH:H ₂ O 2:1 (v/v), następnie wytrącenie osadu za pomocą CHCl ₃	89
(<i>E</i>)- <i>N'</i> -(2,3,4-trihydroksybenzylideno)-benzohydrazyd	1,0	R.T.	48	Krystalizacja (EtOH:H ₂ O, 1:1 v/v)	85
(<i>E</i>)- <i>N'</i> -(2,3,4-trihydroksybenzylideno)-1-naftohydrazyd	1,0	R.T.	24	Osad przemyto metanolem	69
(<i>E</i>)- <i>N'</i> -(2,3,4-trihydroksybenzylideno)antraceno-9-karbohydrazyd	1,2	Twrz	24	Krystalizacja (EtOH:H ₂ O, 1:2 v/v), następnie HPLC z ODS (eluent: MeOH, przepływ 14 mL/min)	50
(<i>E</i>)-4-nitro- <i>N'</i> -(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazyd	1,2	50	24	Dwukrotna rekrytalizacja (EtOH)	53
(<i>E</i>)-4-fluoro- <i>N'</i> -(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazyd	1,2	R.T.	24	Krystalizacja (EtOH:H ₂ O, 1:1 v/v)	85
(<i>E</i>)-4-amino- <i>N'</i> -(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazyd	0,9	R.T.	24	Rekrytalizacja (EtOH:H ₂ O, 2:1 v/v)	72

(*E*)-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)propionohydrazyd: Temp. rozkładu: 184°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 1.08 (t, J = 7.57, 3H), 2.21 (q, J = 7.55, 2H) 6.37 (d, J=8.41), 6.73 (d, J=8.46), 8.17 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 9.40 (s, 1H), 11.07 (s, 1H), 11.39 (s, 1H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO): δ 9.41, 26.97, 107.40, 110.66, 120.86, 132.54, 147.20, 148.14, 148.38, 168.70 (HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₀H₁₂N₂O₄ [M+H]⁺: 225,0869; znalezione: 225,0874.

(*E*)-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazyd: Temp. rozkładu: 187-189°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 6.41 (d, J=8.39 Hz, 1H), 6.80 (d, J=8.48 Hz, 1H), 7.53-7.56 (m, 2H), 7.59-7.62 (m, 1H) 7.93-7.94 (m, 2H), 8.48 (s, 1H) 8.54 (s, 1H), 9.46 (s, 1H), 11.56 (s, 1H), 11.97 (s, 1H). ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 108.10, 111.28, 121.63, 127.98, 128.96, 132.27, 133.16, 133.38, 147.97, 149.21, 150.63, 162.94. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₄H₁₂N₂O₄ [M+H]⁺: 273,0870; znalezione: 273,0882.

(*E*)-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)-1-naftohydrazyd: Temp. rozkładu: 109-110°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 6.38 (d, J=8.42), 6.77 (d, J=8.50), 7.58-7.61 (m, 3H), 7.76 (dd, J=1.12, J=7.03 1H), 8.00-8.02 (m, 1H), 8.09 (d, J=8.27, 1H), 8.23 (dd, J= 1.51, 8.15 1H), 8.35 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 9.48 (s, 1H), 11.47 (s, 1H), 12.07 (s, 1H) ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 108.14, 111.23, 121.60, 125.42, 125.59, 126.44, 126.90, 127.56, 128.81, 130.41, 131.08, 132.77, 133.16, 133.62, 147.99, 149.26, 150.51, 164.49. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₈H₁₄N₂O₄ [M+H]⁺: 323,1026; znalezione: 323,1033.

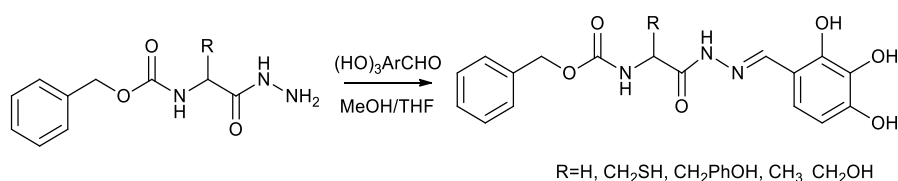
(*E*)-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)antraceno-9-karbohydrazyd: Temp. rozkładu: 167-169°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 6.43 (d, *J*=8.37, 1H), 6.82 (d, *J*=8.48, 1H) 7.54-7.62 (m, 4H), 8.01-8.02 (m, 2H), 8.16-8.19 (m, 2H), 8.33 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 9.57 (s, 1H), 11.43 (s, 1H), 12.33 (s, 1H). ¹³C NMR 600 MHz, DMSO): δ 108.25, 111.20, 121.66, 125.31, 126.22, 127.16, 127.51, 128.19, 128.35, 128.65, 128.99, 129.11, 130.74, 130.99, 131.07, 132.63, 133.20, 148.01, 149.40, 150.70, 164.38, 170.12. HRMS (ESI-TOF): *m/z* obliczone dla C₂₂H₁₆N₂O₄ [M+H]⁺: 373,1188; znalezione: 373,1185.

(*E*)-4-Fluoro-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazyd: Temp. rozkładu: 217°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 6.41(d, *J*=8.42, 1H), 6.80 (d, *J*=8.49, 1H) 7.38 (t, *J*= 8.84 2H), 7.99-8.03 (m, 2H), 8.47 (s, 1H) 11.98 (s, 1H) ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 108.09, 111.24, 115.95 (d, *J*=21.87), 121.59, 130.70 (d, *J*=9.12), 133.13, 147.94, 149.22, 150.66, 161.88, 163.37, 165.85. HRMS (ESI-TOF): *m/z* obliczone dla C₁₄H₁₁FN₂O₄ [M+H]⁺ : 291.0781; znalezione: 291,0875.

(*E*)-4-Nitro-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazyd: Temp. rozkładu: 248°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 6.42 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.39 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.51 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 9.55 (s, 1H), 11.43 (br. s, 1H), 12.24 (s, 1H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO): δ 107.68, 110.67, 121.13, 123.67, 129.01, 132.64, 138.53, 147.53, 148.52, 149.20, 150.92, 160.72. HRMS (ESI-TOF): *m/z* obliczone dla C₁₄H₁₀N₃O₆ [M-H]⁻: 316,0575; znalezione: 316,1483.

(*E*)-4-Amino-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazyd: Tt >250°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 5.79 (s, 2H) 6.38 (d, *J* = 8.39 Hz, 1H), 6.60 (d, *J* = 8,63, 2H) 6.72 (d, *J* = 8.48 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.41 Hz, 2H), 8.39 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 9.36 (s,1H), 11.55 (s, 1H). 11.78 (s, 1H) ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 107.93, 111.47, 113.11, 119.41, 121.41, 129.68, 133.13, 147.79, 148.79, 149.01, 152.81, 162.85. HRMS (ESI-TOF): *m/z* obliczone dla C₁₄H₁₃N₃O₄ [M+H]⁺: 288,0979; znalezione: 288,0990.

4.3.3.2. Synteza hydrazonów *N*-benzyloksykarbonylo-aminokwasów



2,3,4-trihydroksybenzaldehyd (1,2 ekw. 2,61 g, 16,92 mmola) dodano do zawiesiny hydrazynu *N*-Cbz-aminokwasu (14,10 mmola) w metanolu (30 ml) i mieszano w temperaturze pokojowej lub w podwyższonej, w różnym czasie (Tabela 15). Po zakończonej reakcji w większości przypadków syntez hydrazonów odparowano rozpuszczalnik z mieszaniny, a pozostałość oczyszczano, uzyskując czyste produkty jako ciała stałe z wydajnością 49-85%. Podczas otrzymywania hydrazonu pochodnej glicyny wytrąca się osad pochodzący od produktu, który po zakończonej reakcji przesączono. W trakcie syntezy hydrazonu pochodnej tyrozyny reakcję prowadzono w atmosferze argonu bez dostępu światła, stosując jako rozpuszczalnik THF zamiast MeOH.

Tabela 15. Warunki reakcji oraz wydajności otrzymywania hydrazonów N-(N-benzylloksykarbonyloaminokwasów)-2,3,4-trihydroksybenzaldehydu.

Hydrazon	Temp. reakcji [°C]	Czas reakcji [godz]	Metoda oczyszczania	Postać produktu	Wydajność [%]
hydrazon N-benzylloksykarbonylo-glicyny	RT	48	Przesączenie osadu wytworzonego podczas reakcji i przemycie go ochłodzonym etanolem.	Biały osad	85
hydrazon N-benzylloksykarbonylo-L-cysteiny	R.T.	48	Rozpuszczenie hydrazonu w 20 ml EtOH, następnie wytrącenie osadu za pomocą 20 ml H ₂ O. Proces powtórzono kolejny raz,	Bładożółty osad	49
hydrazon N-benzylloksykarbonylo-L-tyrozyny	66	72	Krystalizacja (MeOH:H ₂ O 1:1 v/v). następnie HPLC z ODS (eluent: 70% MeOH/H ₂ O v/v, przepływ: 6ml/min)	Białawy osad	55
hydrazon N-benzylloksykarbonylo-L-alaniny	50->RT	5->12	Krystalizacja (EtOH:H ₂ O, 1:1 v/v)	Białawy osad	80
hydrazon N-benzylloksykarbonylo-L-seryny	50	24	Krystalizacja (EtOH:H ₂ O, 1:1 v/v)	Beżowy osad	67

(E)-Benzylo(2-okso-2-(2-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)hydrazynylo)etylo)karbaminian: Tt 215°C (lit. Tt 211-212°C [109]). ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 3.75 (d, J = 4.41, 2H), 5.06 (s, 2H), 6.38 (d, J = 7.92, 1H) 6.77 (d, J=7.87, 1H), 7.32-7.37 (m, 4H), 7.60 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.47 (s, 1H) 9.45, (s, 1H), 9.52 (d, J=15.50, 1H) (m, 1H), 11.32 (s, 1H), 11.54 (s, 1H) ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 43.09 66.03, 108.04, 111.16, 121.48, 128.11, 128.19, 128.26, 128.79, 133.11, 137.41, 147.80, 149.12, 149.62, 157.00, 165.65. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₇H₁₇N₃O₆ [M+H]⁺: 360,1190; znalezione: 360,1197.

(E)-Benzylo(3-merkpto-1-okso-1-(2-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)hydrazynylo)propan-2-ylo)-karbaminian: Tt 134-135°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 1.24 (s, 1H), 2.96-2.99 (m,1H), 3.18-3.21 (m, 1H), 4.39 (dd, J=8.54, 14.07 1H), 5.05 (s, 2H), 6.37 (d, J=8.41, 1H), 6.75 (d, J=8.41, 1H, 7.30-7.37 (m, 4H), 7.84 (d, J=8.21, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 9.14 (s, 1H), 9.48 (s, 1H), 11.25 (s, 1H), 11.78 (s, 1H). ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 53.50, 65.97, 66.18, 108.10, 111.13, 121.56, 128.21, 128.29, 128.78, 133.10, 137.21, 147.88, 149.26, 150.40, 156.40, 166.49. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₈H₁₉N₃O₆S [M-H]⁻: 404,0921; znalezione: 404,0916.

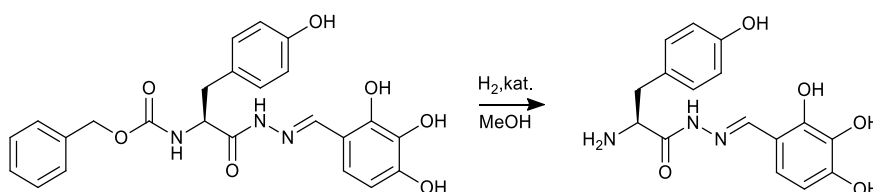
(E)-Benzylo(3-(4-hydroksyfenylo)-1-okso-1-(2-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)hydrazynylo)-propan-2-ylo)karbaminian: Tt 106-108°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 2.72-2.746 (m,1H), 2.88-2.91 (m, 1H), 4.20-4.21 (m, 1H), 4.94-5.00 (m, 2H), 6.66 (d, J=8.16, 2H), 6.38 (d, J=8.40, 1H), 6.77 (d, J=8.47, 1H), 7.08 (d, J=8.00, 2H), 8.24 (s, 1H) 8.46 (s, 1H), 9.21 (s, 1H) 9.46 (s, 1H), 11.27 (s, 1H). ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 36.96, 56.11, 65.76, 108.05, 111.18, 115.37, 121.45, 127.87, 127.94, 128.15, 128.70 128.73, 130.56, 133.10, 137.40, 147.81, 149.14, 149.86, 156.29, 168.02. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₂₄H₂₃N₃O₇ [M+H]⁺: 466,1609 ; znalezione: 466,1610.

(E)-Benzylo(1-okso-1-(2-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)hydrazynylo)propan-2-ylo)karbaminian: Tt 120-121°C. ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 1.40 (d, J=7.00, 3H), 4.22 (q, J=7.04, 1H), 5.08 (q, J=7.04, 2H), 6.41 (d, J=8.68, 1H), 6.69 (d, J=8.47, 1H), 7.31-7.34 (m, 5H), 8.16 (s, 1H) ¹³C NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 16.88, 49.68, 66.35, 107.26, 110,70, 121,97, 127.47, 127.61, 128.04, 132.50, 136.66, 147.13, 148.72, 151.53,

156.86, 169.89. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla $C_{18}H_{19}N_3O_6$ $[M+H]^+$: 374,1346; znalezione: 374,1359.

(*E*)-Benzylo(3-hydroksy-1-okso-1-(2-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)hydrazynylo)propan-2-ylo)karbaminian: Tt 198-199°C. 1H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 3.83 (d, $J=5.49$, 2H), 4.31 (t, $J=5.42$, 1H), 5.11 (q, $J=12.56$, 2H), 6.41 (m, 1H), 6.70 (d, $J=8.47$, 1H), 7.28-7.37 (m, 5H), 8.19 (s, 1H) ^{13}C NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 54.22, 61.71, 66.53, 107.26, 110.68, 122.03, 127.54, 127.65, 128.06, 132.50, 136.58, 147.16, 148.73, 151.71, 157.02, 167.36. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla $C_{18}H_{19}N_3O_7$ $[M+H]^+$: 390,1295; znalezione: 390,1356.

4.3.3.3. Synteza (*E*)-2-amino-3-(4-hydroksyfenylo)-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)propanohydrazynu

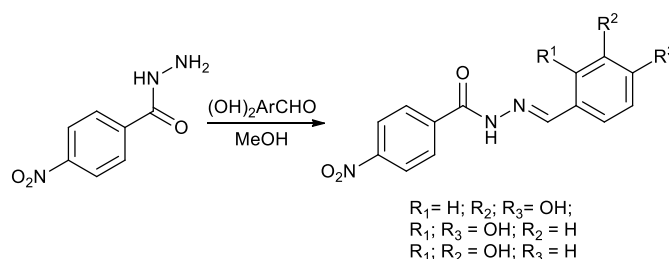


(*E*)-Benzylo(3-(4-hydroksyfenylo)-1-okso-1-(2-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)hydrazynylo)-propan-2-ylo)karbaminian (0,140 g, 0,3 mmola) rozpuszczono w bezwodnym metanolu (20 ml), następnie dodano 20% masowych względem substratu, mieszanki katalizatorów palladowych Pd/C oraz $Pd(OH)_2/C$ w stosunku 1:1. Naczynie reakcyjne umieszczono w reaktorze firmy Parr i kolejno wytrząsano 6,5 godziny, w obecności wodoru pod ciśnieniem 2,5 bara, w temperaturze pokojowej. Po zakończonej reakcji stały katalizator przesączono, a rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono metodą preparatywnej HPLC z odwróconymi fazami na kolumnie ODS, stosując 70% MeOH:H₂O (v/v) z natężeniem przepływu eluenta 7 ml/min.

(*E*)-2-Amino-3-(4-hydroksyfenylo)-*N'*-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)propanohydrazyn: Wydajność: 20%. Temp. rozkładu 176-178°C. 1H NMR (600 MHz, DMSO): δ 2.58-2.61 (m, 1H), 2.76-2.79 (m, 1H), 3.65-3.69 (m, 1H), 4.41 (d, $J=7.43$, 1H), 4.51 (d, $J=7.37$, 1H), 6.18-6.21 (m, 1H), 6.36-6.40 (m, 1H), 6.62-6.68 (m, 2H), 6.91-7.07 (m, 2H), 8.04 (s, 1H), 8.31 (s, 1H). ^{13}C NMR (600 MHz, DMSO): δ 29.44, 55.19, 106.65, 115.40, 119.68, 128.19, 128.39, 130.57, 130.65, 133.47, 145.62, 146.02, 156.26, 171.12 HRMS (ESI-TOF): m/z znalezione dla $C_{16}H_{17}N_3O_5$ $[M+H]^+$: 332,1241; obliczone: 332,1256.

4.3.4. Synteza *N*-Acylohydrazonów dihydroksy- i monohydroksybenzaldehydu

4.3.4.1. Synteza 4-nitrobenzoilo hydrazonów pochodnych dihydroksybenzaldehydów



Do roztworu 4-nitrobenzohydrazynu (0,500 g, 2,80 mmola,) w MeOH (20 ml), dodano 1,2 ekwiwalenta odpowiedniego dihydroksybenzaldehydu (3,36 mmola, 0,464 g). Roztwór mieszano

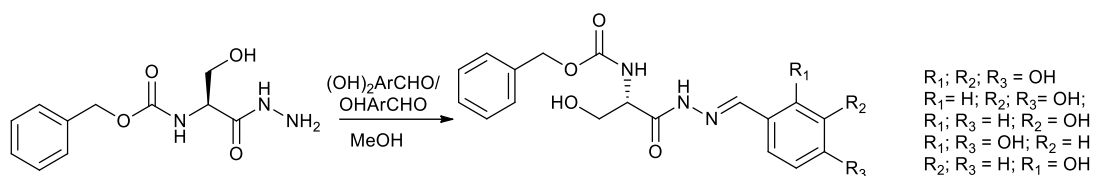
w temperaturze pokojowej przez 24 godziny w przypadku pochodnych 2,3-dihydroksybenzaldehydu i 2,4-dihydroksybenzaldehydu, natomiast dla pochodnej 3,4-dihydroksybenzaldehydu zastosowano dłuższy czas reakcji wynoszący 48 godzin. Z mieszaniny reakcyjnej wypada osad, który po zakończonej reakcji przesączono i rekrystalizowano dwukrotnie z etanolu (15 ml). Uzyskane osady o barwie intensywnie pomarańczowej suszono w 60°C przez 6 godzin.

(*E*)-4-Nitro-*N'*-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazyd: Wydajność 42%. Tt >250°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 6.34 (d, J=2.42, 1H), 6.38 (dd, J=8.42, 2.42, 1H), 7.35 (d, J=8.44, 1H), 8.17 (d, J=8.41, 2H), 8.38 (d, J=8.42, 2H), 8.55 (s, 1H), 10.01 (s, 1H), 11.30 (s, 1H), 12.18 (s, 1H). ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 102.55, 107.75, 110.36, 123.57, 128.98, 131.13, 138.62, 149.17, 149.79, 159.45, 160.70, 160.92. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₄H₁₀N₃O₅ [M-H]⁻: 300,0626; znalezione: 300,1619.

(*E*)-4-Nitro-*N'*-(2,3-dihydroksybenzylideno)benzohydrazyd: Wydajność 76%. Tt >250°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 6.76 (t, J=7.81, 1H), 6.89 (dd, J=8.42, 2.42, 1H), 7.03 (dd, J=8.41, 2.43, 1H), 8.19 (d, J=8.42, 2H), 8.39 (d, J=8.45, 2H), 8.66 (s, 1H), 9.30 (s, 1H), 10.92 (s, 1H), 12.38 (s, 1H). ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 117.50, 118.70, 119.13, 119.77, 123.60, 129.10, 138.40, 145.56, 146.10, 149.28, 149.64, 161.06. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₄H₁₀N₃O₅ [M-H]⁻: 300,0626; znalezione: 300,1625.

(*E*)-4-Nitro-*N'*-(3,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazyd: Wydajność 50%. Tt >250°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 6.81 (d, J=7.82, 1H), 6.97 (dd, J=8.41, 1.82, 1H), 7.28 (d, J = 1.83, 1H), 8.15 (d, J=8.43, 2H), 8.30 (s, 1H), 8.37 (d, J=8.42, 2H), 9.38 (s, 2H), 11.90 (s, 1H). ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 112.68, 115.50, 120.81, 123.51, 125.39, 128.97, 139.27, 145.67, 148.19, 149.05, 149.36, 161.02. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₄H₁₀N₃O₅ [M-H]⁻: 300,0626; znalezione: 300,1621.

4.3.4.2. Synteza hydrazonów *N*-benzylloksykarbonylo-*L*-seryny pochodnych di- oraz monohydroksybenzaldehydu



Do mieszaniny hydrazynu *N*-benzylloksykarbonylo-*L*-seryny (1,5 g, 5,92 mmola) w metanolu (25 ml) dodano 1,2 ekwiwalentna odpowiedniego hydroksybenzaldehydu (7,10 mmola) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość krystalizowano z mieszaniny woda:etanol 1:1 (v/v), otrzymując odpowiednie hydrazony w formie białych osadów.

2-(2-hydroksybenzylideno)hydrazyd *L*-seryny: Wydajność 74%. Tt 162-163°C (lit. Tt 160°C [126]). ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ: 3.67-3.57 (m, 2H), 4.10-4.14 (m, 1H), 5.01-5.04 (m, 3H), 6.87-6.90 (m, 2H), 7.21-7.36 (m, 6H), 7.41 (d, J=7.80 1H), 7.49 (dd, J= 7.81, 1.21, 1H), 8.44 (s, 1H), 11.01 (s, 1H), 11.74 (s, 1H). ¹³C NMR (600 MHz, DMSO) δ: 55.01, 61.52, 65.94, 116.59, 119.93, 126.72, 128.31, 128.32, 129.82, 131.63, 137.42, 141.2, 156.42, 157.83, 171.62. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₈H₁₉N₃O₅ [M+H]⁺: 358,1397; znalezione: 358,1410.

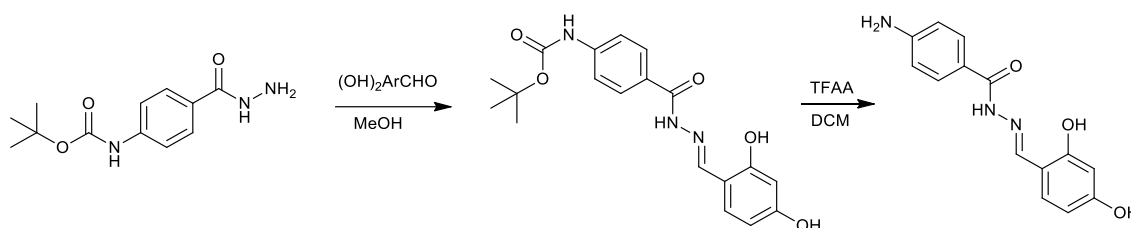
2-(3-Hydroksybenzylideno)hydrazyd *L*-seryny: Wydajność 70%. Tt 184-186°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ: 3.57-3.67 (m, 2H), 4.09-4.13 (m, 1H), 4.98-5.03 (m, 3H), 6.81-6.89 (m, 1H), 7.36-7.49 (m, 8H), 7.36-7.34 (m, 1H), 8.13 (s, 1H), 9.58 (s, 1H), 11.42 (s, 1H). ¹³C NMR (600 MHz, DMSO) δ: 56.24, 61.74, 66.58, 112.94, 117.16, 117.56, 118.87, 119.36, 127.52, 127.56, 128.02, 128.05, 129.40,

129.44, 135.15, 135.34, 145.12, 149.19, 157.54. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla $C_{18}H_{19}N_3O_5$ $[M+H]^+$: 358,1397; znalezione: 358,1461.

2-(2,4-dihydroksybenzylideno)hydrazyd L-seryny: Wydajność 63%. Tt 169-170°C (lit. Tt 166°C [126]). 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 3.81 (d, $J=5.57$, 2H), 4.29 (t, $J=5.48$, 1H), 5.08 (s, 1H), 5.11 (q, $J=5.48$, 2H), 6.31-6.32 (m, 1H), 6.35-6.37 (m, 1H), 7.16 (d, $J=8.45$, 1H), 7.15-7.38 (m, 5H), 8.23 (s, 1H). ^{13}C NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 56.20, 61.72, 66.53, 102.45, 107.47, 110.23, 127.53, 127.65, 128.06, 132.07, 136.61, 151.14, 157.01, 160.02, 161.25, 167.35. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla $C_{18}H_{19}N_3O_6$ $[M+H]^+$: 374,1346; znalezione: 374,1127.

2-(3,4-dihydroksybenzylideno)hydrazyd L-seryny: Wydajność: 59%. Tt 104°C (lit. 105°C [126]). 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 3.82 (d, $J=5.61$, 2H) 4.30 (t, $J=5.49$, 1H), 5.11 (m, 2H), 6.77-6.79 (m, 1H), 6.99-7.01 (m, 2H), 7.23-7.36 (m, 5H), 7.99 (s, 1H). ^{13}C NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 56.20, 61.79, 66.51, 112.84, 114.83, 121.29, 125.75, 127.52, 127.64, 128.02, 128.05, 145.40, 145.63, 147.85, 148.26, 149.72, 156.99, 168.01. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla $C_{18}H_{19}N_3O_6$ $[M+H]^+$: 374,1346; znalezione: 374,1283.

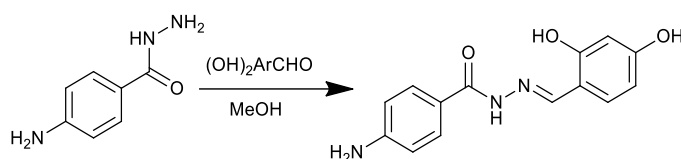
4.3.4.3. Synteza (*E*)-4-amino-*N'*-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazdu



Do roztworu 4-(*t*-butoksykarbonyloamino)benzohydrazdu (0,800 g, 3,18 mmola) w metanolu (15 ml) dodano 1,2 ekwiwalenta 2,4-dihydroksybenzaldehydu (0,393g, 3,82 mmola) i mieszano w temperaturze pokojowej 24 godziny. Po skończonej reakcji, wytrącony osad przesączono i rekrytalizowano z roztworu EtOH:H₂O (1:2 v/v), uzyskując żółte ciało stałe. Kolejno do mieszaniny 4-*tert*-Butoksykarbonyloamino-*N'*-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazdu (0,8 g; 2,15 mmola) w dichlorometanie (15 ml) dodano kwas trifluoroctowy (5 ekw., 0,824 ml, 10,77 mmola). Reakcję prowadzono przez 72 godziny w temperaturze pokojowej. Wytrącony osad przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem i rozpuszczono w metanolu, doprowadzając pH roztworu do około 8 za pomocą trietyloaminy. Następnie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozdzielono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym z zastosowaniem eluentu 30% MeOH/ $CHCl_3$ (v/v), uzyskując końcowy produkt z wydajnością 56%.

4-*tert*-Butoksykarbonyloamino-*N'*-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazyd: Wydajność 68%. Tt 210-211°C. 1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 1.47 (s, 9H), 6.30 (d, $J=2.18$, 1H), 6.34 (dd, $J=2.21$, 8.41, 1H), 7.26 (d, $J=8.47$, 1H), 7.57 (d, $J=8.66$, 1H), 7.83 (d, $J=8.70$, 1H), 8.46 (s, 1H) 9.68 (s, 1H), 9.92 (s, 1H), 11.53 (s, 1H), 11.76 (s, 1H). ^{13}C NMR (600 MHz, CD_3OD) δ : 33.26, 84.79, 107.86, 112.81, 115.76, 122.44, 131.25, 133.64, 136.55, 148.07, 153.92, 157.76, 164.66, 165.78, 167.15. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla $C_{19}H_{21}N_3O_5$ $[M+H]^+$: 372,1553; znalezione: 372,1572.

4.3.4.4. Synteza (*E*)-4-Amino-*N'*-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazynu



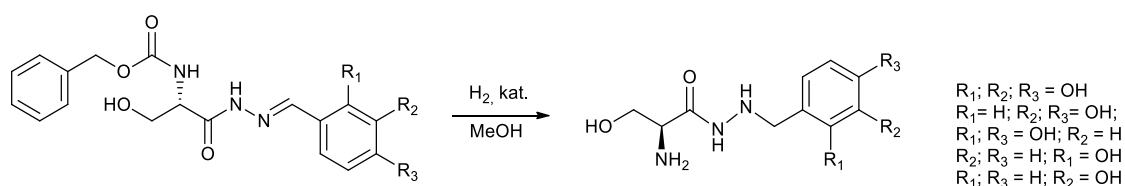
2,4-Dihydroksybenzaldehyd (0,9 ekw., 0,321 g, 2,04 mmola) i 4-aminobenzohydrazyd (0,32 g; 2,32 mmola) rozpuszczono w bezwodnym metanolu (15 ml) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Po tym czasie mieszaninę zatężono, odparowując część rozpuszczalnika, a powstały osad przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem i następnie krystalizowano z EtOH:H₂O (2:1, v/v), uzyskując produkt z wydajnością 65% w formie żółtego ciała stałego.

(*E*)-4-Amino-*N'*-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazyd: Tt >250°C ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 5.79 (s, 2H), 6.31 (d, J=2.25 Hz, 1H), 6.36 (dd, J = 2.31 8.42, 1H), 6.61 (d, J=8.71, 2H), 7.24 (d, J=8.52, 1H), 7.67 (d, J=8.55, 1H), 8.44 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 11.54 (s, 1H), 11.73 (s, 1H). ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 103.13, 107.93, 111.15, 113.10, 119.48, 129.67, 131.74, 148.23, 152.78, 159.84, 160.74, 162.84. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₄H₁₃N₃O₃ [M+H⁺]⁺: 272,1029; znalezione: 272,0789.

4.3.5. Synteza hydrazydów

4.3.5.1. Synteza 2-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)hydrazynu L-seryny (Benz) oraz jego pochodnych

(przepis ogólny):



W naczyniu reakcyjnym rozpuszczono 0,500 g odpowiedniego hydrazonu pochodnej L-seryny w bezwodnym metanolu (20 ml). Kolejno do roztworu dodano około 75 mg odpowiedniego katalizatora palladowego (w ilości 15% masowych w stosunku do substratu), po czym naczynie umieszczono w reaktorze ciśnieniowym firmy Parr i doprowadzono wodór pod ciśnieniem 2-2,3 bara. Mieszaninę intensywnie wytrząsano przy zróżnicowanym czasie oraz temperaturze zależnym od syntezowanej pochodnej (Tabela 16). Po zakończonej reakcji, stały katalizator oddzielono od roztworu przez sączenie grawitacyjne, a metanol odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymane hydrazydy oczyszczano za pomocą preparatywnej wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych na kolumnie ODS (eluent: MeOH, natężenie przepływu: 7 ml/min).

Tabela 16. Warunki katalitycznego uwodornienia hydrazonów pochodnych L-seryny.

Otrzymywany hydrazyd	Czas [godz]	Temp. [°C]	katalizator	Ciśnienie [bar]
2-(2,3,4-trihydroksybenzylo)hydrazyd L-seryny	5.5	50	Pd(OH) ₂ /C	2
2-(2-hydroksybenzylo)hydrazyd L-seryny	7	R.T.	Pd/C	2.3
2-(3-hydroksybenzylo)hydrazyd L-seryny	7	RT	Pd/C	2.2
2-(3,4-dihydroksybenzylo)hydrazyd L-seryny	4	R.T.	Pd/C	2
2-(2,4-dihydroksybenzylideno)hydrazyd L-seryny	5.5	R.T.	Pd(OH) ₂ /C	2

2-(2,3,4-trihydroksybenzylo)hydrazyd L-seryny: Wydajność: 84%. Tt 55-56°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 3.34-3.36 (m, 1H), 3.43-3.46 (m, 1H), 3.53-3.55 (m, 1H), 3.74 (s, 2H), 6.18-6.22 (m, 1H), 6.38-6.42 (m, 1H) ¹³C NMR (600 MHz, CD₃OD): 51.40, 53.77, 60.79, 106.77, 115.69, 119.89, 133.42, 145.46, 146.06, 165.77. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₀H₁₅N₃O₅ [M+H]⁺: 258,1084; znalezione: 258,1079.

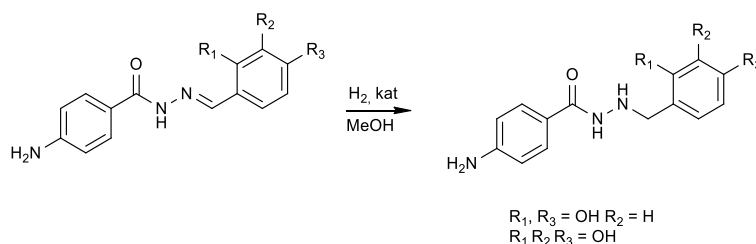
2-(3,4-dihydroksybenzylo)hydrazyd L-seryny: Wydajność: 55%. Tt 64-65°C. ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 3.30 (m, 1H), 3.58 (dd, J=10.81, 5.92 Hz, 1H), 3.63 (dd, J=10.82, 5.46, 1H), 3.77 (s, 2H), 6.68 (dd, J=8.09, 2.04, 1H), 6.72 (d, J=8.12, 1H), 6.81 (d, J=2.01, 1H). ¹³C NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 54.87, 55.33, 64.14, 114.82, 115.93, 120.33, 128.68, 144.59, 144.87, 172.50. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₀H₁₅N₃O₄ [M+H]⁺: 242,1135; znalezione: 242,1143.

2-(2-hydroksybenzylo)hydrazyd L-seryny: 100%. Tt 49-51°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 3.15 (m, 1H), 3.31 (dd, J = 10.82, 5.71, 1H), 3.43 (dd, J = 10.76, 5.49, 1H), 3.73 (s, 2H), 4.69 (s, 1H), 5.03 (s, 1H), 6.63 (m, 1H), 6.70 (s, 1H), 6.73 (d, J = 2.05, 1H). 7.08 (dd, J = 8.05, 2.03, 1H), 9.16 (s, 1H), ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 55.29, 56.22, 64.77, 114.39, 115.76, 119.49, 129.51, 140.31, 157.71, 172.41. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₀H₁₅N₃O₃ [M+H]⁺: 226,1186; znalezione: 226,1186.

2-(2,4-dihydroksybenzylo)hydrazyd L-seryny: Wydajność: 100%. Tt 76-77°C. ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 3.35 (m, 1H), 3.48 (dd, J=10.75, 5.90 Hz, 1H), 3.70 (dd, J=10.72, 5.36, 1H), 3.80 (s, 2H), 6.33-6.36 (m, 1H), 6.38-6.41 (m, 1H), 7.05 (d, J=8.42, 1H). ¹³C NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 55.17, 56.12, 64.99, 114.53, 116.23, 120.52, 128.18, 144.26, 145.09, 172.33. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₀H₁₅N₃O₄ [M+H]⁺: 242,1135; znalezione: 242,1093.

2-(3-hydroksybenzylo)hydrazyd L-seryny: 100%. Tt 37-39°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 3.09 (m, 1H), 3.21 (dd, J = 10.82, 5.71, 1H), 3.29 (dd, J = 10.70, 5.40, 1H), 3.70 (s, 2H), 4.69 (s, 1H), 5.00 (s, 1H), 6.59 (m, 1H), 6.72 (s, 1H), 6.75 (d, J = 2.07, 1H). 7.03 (dd, J = 8.15, 2.13, 1H), 9.20 (s, 1H), ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 55.27, 56.21, 64.77, 114.38, 115.74, 119.50, 129.59, 140.33, 157.69, 172.41. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₀H₁₅N₃O₃ [M+H]⁺: 226,1186; znalezione: 226,1100.

4.3.5.2. Synteza 4-amino-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylo)benzohydrazdu oraz 4-amino-N'-(2,4-dihydroksybenzylo)benzohydrazdu

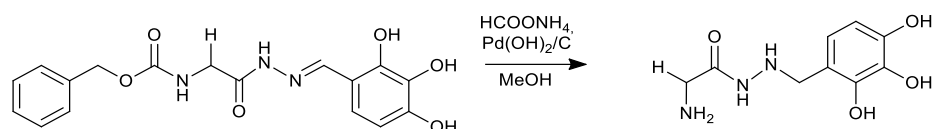


(*E*)-4-Amino-N'-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazyd/(*E*)-4-amino-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazyd (1,00 mmol) rozpuszczono w bezwodnym metanolu (20 ml) w naczyniu reakcyjnym. Do roztworu dodano odpowiednią ilość katalizatora Pd(OH)₂/C: w przypadku syntezy dihydroksylowej pochodnej 30% masowych w stosunku do substratu, w przypadku trihydroksylowej pochodnej 25% masowych. Naczynie reakcyjne umieszczono w reaktorze ciśnieniowym firmy Parr, wytrząsając mieszaninę pod ciśnieniem gazowego wodoru 2,3 bara, przez 6 godzin w temperaturze pokojowej. Po zakończonej reakcji katalizator oddzielono przez sączenie grawitacyjne, a metanol odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymaną pozostałość krystalizowano: w przypadku N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)-4-aminobenzohydrazynu 1ml mieszaniny EtOH:H₂O 2:1 v/v, w przypadku N'-(2,4-dihydroksybenzylideno)-4-aminobenzohydrazynu 1ml EtOH.

4-amino-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazyd: Wydajność: 40%. Temp. rozkładu: 190°C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 3.78 (d, J = 5.42, 2H), 5.17 (d, J = 5.13, 1H), 5.61 (s, 2H), 6.18 (d, J = 8.12, 1H), 6.40 (d, J=8.13, 1H), 6.51 (d, J = 8.51, 2H), 7.53 (d, J=8.52, 2H), 8.10 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 9.72 (s, 1H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO): δ 52.50, 106.56, 113.00, 115.65, 119.58, 119.88, 129.07, 133.56, 140.43, 145.81, 145.98, 152.25, 166.39. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₄H₁₅N₃O₄ [M+H]⁺: 290,1135; znalezione: 290,1137.

4-amino-N'-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazyd: Wydajność: 67%. Tt 170-173°C ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 3.75 (d, J = 6.34, 2H), 5.17 (d, J = 6.21, 1H), 5.60 (s, 2H), 6.13 (dd, J=2.45, J=8.12, 1H), 6.23 (d, J=2.4 5, 1H), 6.50 (m, 2H), 6.90 (d, J = 8.23, 1H), 7.51 (m 2H), 9.08 (s, 1H), 9.56 (s, 1H), 9.66 (d, J = 5.6, 1H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO): δ 51.66, 103.07, 106.25, 113.00, 114.99, 120.02, 130.85, 129.01, 152.18, 157.53, 158.07, 166.14. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₁₄H₁₅N₃O₃ [M+H]⁺: 274,1186 znalezione: 274,1195.

4.3.5.3. Synteza 2-amino-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)acetohydrazynu



Do mieszaniny hydrazonu N-(N-Cbz-glicyny)-2,3,4-trihydroksybenzaldehydu (0,150 g, 0,417 mmola) w bezwodnym metanolu (10 ml), dodano 2,2 ekwiwalentu HCOONH₄ (0,060 g, 0,951 mmola) oraz 40% masowych względem substratu 10% Pd(OH)₂ (60 mg). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze 50°C w atmosferze argonu, przez 2 godziny. Po tym czasie roztwór ochłodzono do temperatury pokojowej, usunięto katalizator poprzez przesączenie i odparowano metanol pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono przez krystalizację z etanolu, a następnie uzyskany osad zliofilizowano. Higroskopijny, beżowy osad otrzymano z wydajnością 48%.

2-Amino-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)acetohydrazyd: Brak możliwości oznaczenia temperatury topnienia ze względu na higroskopijność badanego związku. ¹H NMR (600 MHz, DMSO): δ 1.99 (s, 2H), 3.06 (s, 2H), 3.49 (s, 2H), 3.60 (s, 1H), 6.12 (d, J=8.06, 1H), 6.28 (d, J= 8.09), 8.86 (s, 1H). ¹³C NMR (600 MHz, DMSO): δ 43.17, 44.11, 106.75, 115.31, 119.81, 133.78, 145.00, 145.16, 172.52. HRMS (ESI-TOF): m/z obliczone dla C₉H₁₃N₃O₄ [M+H]⁺: 228,0978; znalezione dla: 228,0331.

4.4. Badania wpływu otrzymanych pochodnych na aktywność enzymatyczną heksokinazy 2

4.4.1. Warunki hodowli linii komórkowych

Wszystkie badania przeprowadzono na dwóch zróżnicowanych liniach komórkowych ludzkiego raka wątroby, HepG2 (ATCC, Manassas, Wirginia, USA) i Huh7 (ECACC, Salisbury, Wielka Brytania). Obie linie komórkowe były hodowane jednowarstwowo na pożywce Eagle'a modyfikowanej Dulbecco (DMEM; Lonza, Bornem, Belgia), z dodatkiem 10% (v/v) płodowej surowicy (Gibco, Waltham, MA, USA) i 1% (v/v) antybiotyków: penicyliny oraz streptomycyny (10 000 jednostek/ml penicyliny i 10 mg/ml streptomycyny; Lonza). Hodowlę prowadzono w standardowych warunkach, w 100% wilgotnej atmosferze o zawartości 5% CO₂ i 95% powietrza w temperaturze 37°C.

4.4.2. Testy na cytotoksyczność

W celu oceny wpływu cytotoksycznego badanych związków na linie komórkowe skorzystano z powszechnie stosowanej metody MTT. W tym celu, badane komórki zostały wysiane dołków mikropłytki 96-dołkowej (5 x 10³ komórek/dołek). Po upływie 24 godzin do odpowiednich dołków dodano badane związki w stężeniach 500 μM, 250 μM, 125 μM, 62,5 μM, 31,25 μM, 15,67 μM, 7,81 μM, 0 μM (kontrola), a następnie komórki inkubowano przez 72 godziny w 37°C. Po zakończonej inkubacji usunięto pożywkę, a do każdego dołka dodano 10 μl MTT ([bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenyloctetrazoliowy) rozpuszczonego w PBS o końcowym stężeniu 0,5 mg/ml. Po 4 godzinach inkubacji roztwór MTT został usunięty i dodano 100 μl DMSO w celu rozpuszczenia fioletowych kryształów formazanu powstałych w metabolicznie aktywnych komórkach. Następnie odczytano absorbancję przy długości fali 540 nm za pomocą czytnika mikropłytek. Eksperyment powtórzono co najmniej trzy razy w tych samych warunkach. Cytotoksyczność badanych związków oceniano na podstawie ich wartości IC₅₀, czyli stężenia, które powoduje 50% zmniejszenie populacji komórek w porównaniu z komórkami w próbie kontrolnej (nietraktowanymi).

Wartość proliferacji obliczono z równania:

$$prolifracja = \frac{OD_{inhibitor} - OD_{ślepa}}{OD_{kontrola} - OD_{ślepa}}$$

gdzie: $OD_{inhibitor}$ – średnia wartość absorbancji przy danym stężeniu badanego związku, $OD_{ślepa}$ – średnia wartość absorbancji dla próby ślepej, w obecności samego DMSO, bez badanych związków, $OD_{kontrola}$ – średnia wartość absorbancji dla nietraktowanej kontroli.

$$Efekt = 1 - proliferacja$$

Badania zostały wykonane na uniwersytecie Łódzkim na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska przez dr K. Matczak oraz Mgr A. Kubicką.

4.4.3. Test klonogenności

Aby określić wpływ badanych związków na zdolność komórek do przetrwania, dzielenia się i tworzenia kolonii, wykonano test klonogenności na dwóch liniach komórkowych HepG2 oraz Huh7. Komórki wysiano na sterylne szalki Petriego w ilości 500 komórek/ml w medium hodowlanym (DMEM). Następnie poddano działaniu badanych związków w stężeniach IC₅₀ przez 72 godziny, w temperaturze 37°C i stężeniu CO₂ na poziomie 5%. Po tym czasie usunięto starą pożywkę i zastąpiono świeżą, hodując komórki przez kolejne 14 dni. Następnie pożywkę usunięto, komórki przepłukano roztworem PBS i utrwalano metanolem przez godzinę. Kolejno barwiono je 0.1% fioletem krystalicznym w roztworze

35% etanolu przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Szalki przepłukiwano 5-10 razy wodą, aż do momentu, gdy barwnik nie został całkowicie usunięty. Po wyschnięciu na powietrzu, kolonie sfotografowano, określając liczbę utworzonych kolonii za pomocą oprogramowania ImageJ software. Badania zostały wykonane na uniwersytecie Łódzkim na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska przez dr K. Matczak oraz Mgr A. Kubicką.

4.4.4. Test aktywności heksokinazy *in vitro*

Aktywność heksokinazy była oceniana za pomocą sprzężonego testu enzymatycznego, w którym glukoza ulega przekształceniu w glukozo-6-fosforan pod wpływem heksokinazy 2, a następnie podlega utlenieniu przez dehydrogenazę glukozo-6-fosforanową, prowadząc do powstania NADH. Wytworzone NADH redukuje bezbarwną sondę, dając barwny produkt (absorbpcja przy długości fali 450 nm), którego ilość jest proporcjonalna do aktywności enzymu.

a) Na czystym enzymie

W celu zbadania potencjału inhibitorów HK2, wykorzystano komercyjnie dostępny kolorymetryczny test (Hexokinase II Inhibitor Screening, nr kat. ab211114, Abcam). W pierwszej kolejności przygotowano roztwory koenzymu oraz dewelopera, poprzez rozpuszczenie liofilizowanej zawartości fiolek w 220 μ l dwukrotnie destylowanej wody (ddH₂O), natomiast konwerter rozpuszczono w 220 μ l buforu dołączonego do testu (HK Assay Buffer). Kwas bromopirogronowy (kontrola pozytywna uwzględniona w zestawie), rozpuszczono w 100 μ l ddH₂O i bezpośrednio przed użyciem rozcieńczono 50-krotnie (5 μ l roztworu inhibitora + 245 μ l ddH₂O). Przygotowano roztwory badanych związków, poprzez sporządzenie podstawowych roztworów potencjalnych inhibitorów, rozpuszczając je w DMSO do stężeń 5000 μ M oraz 500 μ M, które następnie rozcieńczano wodą otrzymując stężenia końcowe: 50 μ M, 5 μ M i 1 μ M, przy czym ostateczne stężenie DMSO w badanych roztworach nie przekraczało 1% v/v. Do dołków 96-dołkowej mikropłytki dodano po 50 μ l roztworów testowanych związków, 3-BrPa (kontrola pozytywna) oraz buforu (kontrola negatywna). Kolejno rozcieńczono 100-krotnie enzym buforem (10 μ l HK-II + 990 μ l HK Assay Buffer) i dodano po 5 μ l do dołków zawierających badane związki i następnie inkubowano je przez 5 minut w temperaturze 25°C. W tym czasie przygotowano po 45 μ l mieszaniny substratów (HK substrat, HK koenzym, HK konwerter, HK deweloper, HK bufor) przypadającej na każdy dołek, zgodnie ze stosunkiem objętościowym poddanym w instrukcji. Po zakończonej wcześniejszej inkubacji, do dołków dodano po 45 μ l roztworu mieszaniny substratów, po czym mierzono absorbpcję przez 45 minut w punktach czasowych co 5 minut, przy długości fali 450 nm, korzystając z czytnika płytek Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX. Dla każdej próby wykonano po 3 pomiary.

b) Na liniach komórkowych

Aktywność heksokinazy w komórkach została zmierzona przy użyciu komercyjnie dostępnego testu kolorymetrycznego (nr kat. MAK091-1KT, Merck). W tym celu komórki kontrolne i komórki poddawane działaniu potencjalnego inhibitora, zostały odklejone z monowarstwy poprzez trypsynizację i przepłukane dwukrotnie roztworem PBS, w celu usunięcia nadmiaru trypsyny i zatrzymania jej działania. Następnie komórki homogenizowano w 200 μ l dobrze schłodzonego buforu dołączonego do testu (HK Assay Buffer) i wirowano przy 13,000 X g przez 10 min w celu usunięcia nierozpuszczalnego materiału. W kolejnym kroku przygotowano roztwory koenzymu oraz mieszanki enzymu HK (HK Enzyme Mix) rozpuszczając zawartość fiolek w 220 μ l buforu dołączonego do testu (HK Assay Buffer), natomiast deweloper rozpuszczono w 220 μ l dwukrotnie destylowanej wody (ddH₂O). Kontrolę pozytywną (HK Positive Control) w 100 μ l buforu (HK Assay Buffer). NADH dołączony do zestawu (NADH standard) rozpuszczono w 400 μ l ddH₂O, uzyskując roztwór wyjściowy o stężeniu 1,25 mM. Z tak przygotowanego roztworu do dołków mikropłytki 96-dołkowej dodano odpowiednio po 0, 2, 4, 6, 8, 10 μ l oraz buforu

tak by objętość końcowa wynosiła 50 μ l). Przygotowano badane związki w roztworze buforu w stężeniach IC₅₀ dla linii Huh7 **3d**: 57,10 μ M, **8a**: 58,25 μ M, **8b**: 213,70 μ M, **8c**: 105,30 μ M; dla linii HepG2: **3d**: 14,96 μ M, **8a**: 2,84 μ M, **8b**: 302,10 μ M, **8c**: 16,34 μ M (uprzednio rozpuszczając je w DMSO, następnie rozcieńczając wodą, tak że ostateczne stężenie DMSO nie przekraczało 1% v/v). Do dołków 96-dołkowej mikropłytki dodano po 50 μ l roztworów testowanych związków i uprzednio rozcieńczoną kontrolę pozytywną (3-BrPa) (1 μ l roztworu pozytywnej kontroli + 99 μ l buforu). Do każdego dołka zadozowano po 50 μ l mieszaniny substratów (34 μ l buforu + 2 μ l mieszanki enzymów HK + 2 μ l developera + 2 μ l koenzymu i 10 μ l substratu) i kolejno inkubowano je w ciemności przez 5 minut w temperaturze 25°C. W dalszej kolejności, mierzono absorbcję przez 45 minut w odstępach czasowych co 5 minut przy długości fali 450 nm. Dla każdej próby wykonano po trzy powtórzenia. Porównano absorbancje próbek z absorbancją krzywej wzorcowej przygotowanej z roztworów NADH. Jedna jednostka HK to ilość enzymu, która wytwarza 1,0 μ mol NADH na minutę przy pH 8,0 w temperaturze pokojowej. Badania zostały wykonane na uniwersytecie Łódzkim na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska przez dr K. Matczak oraz Mgr A. Kubicką.

4.4.5. Ocena aktywności heksokinazy 2 metodą RP-HPLC

Badania wpływu testowanych związków na aktywność HK2 przeprowadzono za pomocą HPLC (HPLC DIONEX) z kolumną ODS-100V, przeprowadzając reakcję enzymatyczną w 1,5 ml fiołce stosowanej do pomiarów HPLC. Układ reakcyjny zawierał 200 μ L 0,5 M Tris-HCl (pH 7,8), 200 μ L 50 mM MgCl₂, 200 μ L 0,01 mM EDTA, 200 μ l 10 mM glukozy. Następnie dodawano 20 μ L roztworu enzymu przygotowanego w stężeniu 0,20 mg/ml przy użyciu wody dejonizowanej oraz 50 μ L roztworu badanego inhibitora w stężeniu 1 i 10 μ M (wyłączając dodatek inhibitora w kontroli negatywnej), co daje końcową objętość mieszaniny 870 μ L. Komercyjnie dostępną rekombinowaną ludzką heksokinazę 2 (z *Escherichia coli*) uprzednio przygotowano w stężeniu 0,20 mg/ml w roztworze wody dejonizowanej. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temperaturze 30°C przez 10 min w blokach grzejnych. Po tym czasie do badanych roztworów dodano 130 μ L ATP o stężeniu 6,15 mM, tak by całkowita objętość wynosiła 1 mL. Pierwszy nastrzyk próbek wykonano po dodaniu ATP, a kolejne nastrzyki powtarzano co 10 minut, uzyskując łączny czas reakcji 60 min. Podczas analizy zastosowano poniższe warunki chromatograficzne: Fazę ruchomą przygotowano przez zmieszanie 70 mM KH₂PO₄ i metanolu w stosunku 98:2 (v/v). Elucja izokratyczna przeprowadzona była przy przepływie 0,7 ml/min i temperaturze kolumny 30°C. Detekcja odbywała się przy długości fali 254 nm (charakterystyczna długość fali dla ATP oraz ADP), a objętość wstrzyknięcia wynosiła 10 μ L. Średnie czasy retencji dla pików ATP i ADP wynosiły odpowiednio 2,487 i 3,180 min.

4.4.6. Badania termoforezy mikroskalowej (MST)

Doświadczenia zostały przeprowadzone na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie na Wydziale Chemii przez dr inż. R. Kitla przy użyciu aparatu Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies, Monachium, Niemcy). Zastosowano znakowanie fluorescencyjne H6-HK2 barwnikiem RED-Tris-NTA, przygotowanym zgodnie z protokołem producenta zestawu do etykietowania Monolith His-Tag RED-Tris-NTA drugiej generacji (NanoTemper Technologies). Przed przystąpieniem do pomiarów, białko zostało rozcieńczone do stężenia 200 nM w 25 mM buforze fosforanowym, 500 mM NaCl i 0,05% Tween-20 (v/v). Następnie przygotowano równą objętość 100 nM barwnika, który został zmieszany z roztworem białka H6-HK2 i inkubowany przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Znakowane białko było następnie odwirowane przez 10 minut przy prędkości 16 900 obr./min. i przechowywane w lodzie. Roztwory podstawowe badanych związków (400 μ M) przygotowano w 25 mM buforze fosforanowym, 500 mM NaCl, 1% DMSO i 0,05% Tween-20 (v/v), pH 8,0. Wykonano dwukrotne seryjne rozcieńczenia każdego związku w dwóch 8-dołkowych paskach PCR. Następnie do każdego dołka dodano 10 μ L białka

o stężeniu 80 nM, co doprowadziło do końcowego stężenia HK2 wynoszącego 40 nM. Najwyższe stężenie związku w teście wynosiło 200 μ M. Roztwory związków z białkiem były wirowane przez 10 minut, a następnie ładowane do kapilar MST Premium. Pomiar został przeprowadzony przy mocy lasera IR na poziomie 80% i średnim natężeniu diody LED. Dane analizowano przy użyciu oprogramowania NanoTemper Analysis, a wyniki w postaci wartości F_{norm} ($F_{norm} = F_{hot}/F_{cold}$) oraz początkowej fluorescencji zostały wyeksportowane do plików Excel i poddane ocenie w oprogramowaniu GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, Kalifornia, USA). Dodatkowo, obliczono wartości stałych dysocjacji (K_d) przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism.

4.5. Badania spektrofotometryczne UV-Vis

Badania spektrofotometryczne UV-Vis przeprowadzono za pomocą spektrofotometru Hitachi U-2910. Przygotowano roztwory testowanych związków w DMSO o stężeniu 5000 μ M, następnie rozcieńczono je 100-krotnie wodą i przeniesiono do kuwety do pomiarów UV-VIS (kuweta kwarcowa, 10 mm). Badaną próbkę, wraz ze ślepą próbą umieszczono w spektrofotometrze i dokonano rejestracji widma absorpcji UV-VIS w zakresie 250-600 nm. Wykonano po trzy powtórzenia dla każdego związku. Obliczono współczynniki ekstynkcji molowej w maksimum absorpcji zgodnie z prawem Lamberta Beera ($A = \epsilon \cdot l \cdot c$), gdzie ϵ to współczynnik ekstynkcji molowej, l -długość drogi optycznej, c -stężenie w molach/l.

4.6. Obliczenia chemiczne: Metoda DFT (Density Functional Theory)

Obliczenia przeprowadzono za pomocą pakietu Orca 4.2.1 package [Neese, F. (2017) Software update: the ORCA program system, version 4.0, Wiley Interdiscip. Rev.: Comput. Mol. Sci., 8, e1327.] na poziomie DFT (B3LYP/def2-SVP). Dokładność procesu optymalizacji została określona przy użyciu analizy wartości własnych hesjanu. Wszystkie obliczone wartości własne hesjanu były dodatnie dla badanych związków. W przypadku obliczeń w środowisku rozpuszczalnika, użyto ciągłego modelu solwatacji CPCM dla DMSO. Obliczenia wykonał prof. W. Szczepankiewicz.

5. Podsumowanie i wnioski

Celem mojej pracy doktorskiej było opracowanie syntezy małowcząsteczkowych związków organicznych z grupy hydrazydów i hydrazonów, zdolnych do hamowania aktywności heksokinazy 2, enzymu katalizującego 6-fosforylację glukozy w glikolizie. Zapotrzebowanie na D-glukozę jest szczególnie widoczne w komórkach nowotworowych, gdzie w wyniku zmiany w metabolizmie istnieje zwiększone zapotrzebowanie na ten cukier prosty. Badania syntetyczne opierały się na chemicznej modyfikacji dwóch obiecujących inhibitorów HK2, opisanych w literaturze w ostatnich latach: benserazydu (2-amino-3-hydroksy-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylo)propanohydrazidu) i benitrobenazydu (4-nitro-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazidu). Obydwa związki wykazują duże podobieństwo strukturalne ze względu na obecność układu 2,3,4-trihydroksybenzenowego oraz grupy N-acylo przy atomie azotu hydrazydowym (N1) lub hydrazonowym (N2). W pierwszej części badawczej - chemicznej, otrzymano N-acylowe pochodne hydrazonów aldehydów mono- oraz polihydroksybenzoowych. Fragment acylowy stanowiły podstawione kwasy benzoowe, kwas propionowy i aminokwasy. Redukcja ugrupowania iminowego hydrazonów daje ostateczne hydrazydy. Na podstawie przeprowadzonych syntez można było wyciągnąć następujące wnioski:

- W zależności od wyjściowego estru kwasu karboksylowego synteza hydrazidu wymaga dobrania indywidualnych warunków reakcji, ilości hydrazyny, czasu i temperatury reakcji.
- Synteza N'-acylowanych hydrazonów aldehydów trihydroksybenzaldehydu pochodnych N-benzylloksykarbonylo-L-seryny oraz pochodnych kwasu 4-nitrobenzoowego zachodzi wolniej niż w przypadku pochodnych hydrazonów di- i monohydroksybenzaldehydu, co jest

spowodowane elektronodonorowym charakterem grup hydroksylowych obecnych w cząsteczce aldehydu, zmniejszających charakter elektronoakceptorowy atomu węgla grupy karbonylowej.

- Chromatografia kolumnowa z użyciem żelu krzemionkowego N-Acylohydrazonów tri- oraz dihydroksybenzaldehydu jest mało efektywna ze względu na oddziaływania grup hydroksylowych z polarnymi grupami hydroksylowymi na powierzchni żelu.
- Podczas syntezy (*E*)-4-amino-N'-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazidu nie jest wymagane zabezpieczenie grupy aminowej. Zaangażowanie grupy 4-amino w sprzężenie z pierścieniem benzenowym, obniża na tyle jej charakter nukleofilowy, że możliwa reakcja kondensacji z 2,4-dihydroksybenzaldehydem zachodzi w ograniczonym stopniu. Fakt ten uprościł syntezę docelowego hydrazonu poprzez brak etapu zabezpieczania i odbezpieczania grupy NH₂.
- Obecność w strukturze hydrazonów sztywnego wiązania iminowego (-N=CH-), sprzyja powstaniu izomerów geometrycznych *E* oraz *Z*. Hydrazony aldehydów zawierających grupę 2-OH w pierścieniu benzenowym występują w konformacji *E*, stabilizowanej wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem wodorowym między grupą 2-OH, a atomem azotu iminy.
- W przypadku (*E*)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)propionohydrazidu może występować równowaga keto-enolowa i w zależności od warunków w roztworze można obserwować występowanie dwóch tautomerów, formy enolowej oraz ketonowej.
- Triacetoksyborowodorek sodu selektywnie redukuje wiązanie iminowe (*E*)-4-Nitro-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazidu, nie naruszając grupy nitrowej, jednakże wydajność tej reakcji jest niska (około 15%).
- Grupa nitrowa (*E*)-4-Nitro-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazidu ulega redukcji do grupy aminowej w reakcji z cynkiem w roztworze KOH oraz w wyniku katalitycznego uwodornienia z zastosowaniem niklu Ranneya czy Palladu. Reakcje te prowadzą również do redukcji wiązania iminowego (*E*)-4-Nitro-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazidu.
- (*E*)-4-Amino-N'-(2,4,3-trihydroksybenzylideno)benzohydrazid jest efektywnie redukowany gazowym wodorem w obecności Pd(OH)₂. Ilość użytego katalizatora zależy od redukowanego związku. W przypadku redukcji (*E*)-4-Amino-N'-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazidu, koniecznym było zastosowanie 30% wagowych katalizatora względem substratu.
- Katalityczna redukcja hydrazonów pochodnych N-Cbz-L-seryny do pochodnych benserazydu efektywnie usuwa grupę Cbz i wiązanie podwójne, nie naruszając grupy karbonylowej. Z uzyskanych wyników można również wnioskować, że katalizator Pd(OH)₂/C jest preferowany przy syntezie di- i trihydroksylowych pochodnych benserazydu, natomiast tańszy katalizator Pd/C zapewnia wysoką wydajność w otrzymywaniu monohydroksylowej pochodnej benserazydu.
- Redukcja wiązań iminowych badanych hydrazonów wodorem gazowym wobec Pd/C, jest mniej efektywna w przypadku obecności większej liczby grup hydroksylowych w pierścieniu benzenowym. Redukcja wiązania iminowego w hydrazonie aldehydu trihydroksybenzoowego jest utrudniona w temperaturze pokojowej.
- Triacetoksyborowodorek sodu efektywnie redukuje wiązanie iminowe w pochodnych N-Cbz-L-seryny. Wymagany jest 4-krotny nadmiar NaBH(OAc)₃ oraz rozpuszczalnik zapewniający homogeniczność mieszaniny (w tym przypadku zastosowano DMF). W warunkach tej reakcji, z zastosowaniem katalizatora palladowego, nie zaobserwowano rozszczepienia grupy N-Cbz.

- Uwodornienie katalityczne pod ciśnieniem nie jest skuteczne w przypadku redukcji N-(N-benzylloksykarbonyloglicyno)-2,3,4-trihydroksybenzaldehydrazonu oraz N-(N-Benzylloksykarbonylo-L-tyrozyno)-2,3,4-trihydroksybenzaldehydrazonu. W tych warunkach zachodzi rozszczepienie grupy N-Cbz.
- Mrówczan amonu w obecności Pd(OH)₂/C efektywnie usuwa grupę protekcyjną Cbz oraz redukuje wiązanie iminowe N-(N-benzylloksykarbonyloglicyno)-2,3,4-trihydroksybenzaldehydrazonu.
- Redukcja N-(N-Benzylloksykarbonylo-L-cysteino)-2,3,4-trihydroksybenzaldehydrazonu nie zachodzi w warunkach uwodornienia katalitycznego (zatrucie katalizatora), ani z użyciem borowodorków, ani za pomocą redukcji elektrochemicznej.

Podsumowując metody redukcji wiązania iminowego w otrzymanych hydrazonach oraz odbezpieczania grupy Cbz, katalityczne uwodornienie prowadzone w autoklawie pod ciśnieniem około 2 barów jest wygodną oraz ekonomiczną techniką redukcji wiązania iminowego dla większości stosowanych substratów. Niemniej jednak w niektórych przypadkach, w których hydrazon zawierał w swojej strukturze aminokwas taki jak: glicyna, L-tyrozyna, L-alanina redukcja wiązania C=N nie zachodzi. Jednakże metoda ta ma ograniczenia w przypadku związków zawierających wiązania wielokrotne węgiel-węgiel oraz obecności redukowalnych grup funkcyjnych, takich jak grupa nitrowa. Dodatkowe ograniczenia mogą dotyczyć związków zawierających w swojej strukturze siarkę, które mogą prowadzić do hamowania lub dezaktywacji katalizatora. Triacetoksyborowodorek sodu jest łagodnym oraz efektywnym środkiem stosowanym do redukcji wiązania iminowego, z wysoką tolerancją na inne grupy funkcyjne (brak redukcji grupy nitrowej), jednakże generuje znacznie więcej produktów ubocznych, uzyskując produkty redukcji z mniejszą wydajnością niż w reakcji uwodornienia katalitycznego. Redukcja mrówczanem amonu jest efektywną alternatywą pozwalającą na zredukowanie wiązania iminowego i rozszczepienie grupy N-Cbz w jednym etapie reakcji (synteza 2-amino-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylo)acetohydrazidu).

Druga część prac doświadczalnych dotyczyła oceny aktywności inhibicyjnej otrzymanych pochodnych w odniesieniu do aktywności enzymatycznej HK2 oraz określeniu elementów strukturalnych wpływających na tę aktywność. W ramach moich badań testowano analogi benitrobenrazydu i benserazydu, w których fragment N-acylowy, stanowiły różne endogenne aminokwasy (np. glicyna, tyrozyna, cysteina), kwas propionowy lub 4-pochodne kwasu benzoowego (4-NH₂ i 4-F). Dodatkowo uwzględniono także pochodne kwasów aromatycznych o zróżnicowanych obszarach molekularnych (benzen, naftalen i antracen). Ponadto zbadano wpływ ugrupowania polihydroksybenzenowego oraz liczby grup hydroksylowych na aktywność inhibicyjną wobec HK2.

Spośród wszystkich otrzymanych modeli strukturalnych hydrazydów oraz hydrazonów, część pochodnych wykazywała wyższą aktywność inhibicyjną HK2, niż znane inhibitory (Benz oraz BNBZ), które stanowiły podstawę tworzenia nowych inhibitorów heksokinazy 2. Najwyższą aktywność hamującą enzym HK2 odnotowano dla (E)-4-fluoro-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylieno)benzohydrazidu, który inhibiował HK2 przy stężeniu 5 μM i 1 μM odpowiednio 98% i 60%. Na podstawie przeprowadzonych badań *in vitro* można wnioskować, że podczas projektowania związków mających doprowadzić do opracowania silniejszych i selektywnych inhibitorów HK2, należy uwzględnić kluczowe cechy strukturalne, takie jak: obecność układu 2,3,4-trihydroksybenzenowego i ugrupowania iminowego oraz podstawnik aromatyczny z podstawieniem w pozycji para dla N-acylowej pochodnej hydrazonu benzaldehydu 2,3,4-trihydroksylowego.

6. Bibliografia

- [1] Liang P, Ballou B, Lv X, i in. Monotherapy and Combination Therapy Using Anti-Angiogenic Nanoagents to Fight Cancer. *Adv Mater.* 2021;33:2005155. doi:10.1002/ADMA.202005155
- [2] Hameed A, al-Rashida M, Uroos M, Abid Ali S, Khan KM. Schiff bases in medicinal chemistry: a patent review (2010-2015). *Expert Opin Ther Pat.* 2017;27:63-79. doi:10.1080/13543776.2017.1252752
- [3] Raczuk E, Dmochowska B, Samaszko-Fiertek J, Madaj J. Different Schiff Bases—Structure, Importance and Classification. *Mol.* 2022;27:787. doi:10.3390/MOLECULES27030787
- [4] Saddam Hossain M, Nuruzzaman Khan M, Md Zakaria C, i in. A short review on chemistry of schiff base metal complexes and their catalytic application. *Int J Chem Stud.* 2018;6:2859-2866.
- [5] Subasi NT, Subasi NT. Overview of Schiff Bases. *Schiff Base Org Inorg Phys Chem.* 2022;116:303-309. doi: 10.5772/INTECHOPEN.108178.
- [6] Lasri J, Elsherbiny AS, Eltayeb NE, Haukka M, El-Hefnawy ME. Synthesis and characterization of ferrocene-based Schiff base and ferrocenecarboxaldehyde oxime and their adsorptive removal of methyl blue from aqueous solution. *J Organomet Chem.* 2018;866:21-26. doi:10.1016/J.JORGANCHEM.2018.04.004
- [7] Barqi MM, Bhutta ZA, Javed M, Ashar A, Abdellah IM, Eletmany MR. Comprehensive Investigation of the Potential of Hydrazine and its Derivatives for the Synthesis of Various Molecules with Biological Activity. *IJCBS.* 2023;24:369-385. doi:10.13140/RG.2.2.21354.49602
- [8] Gloaguen E, Brenner V, Alauddin M, i in. Direct spectroscopic evidence of hyperconjugation unveils the conformational landscape of hydrazides. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014;53:13756-13759. doi:10.1002/ANIE.201407801
- [9] Zhang X, Breslav M, Grimm J, i in. A new procedure for preparation of carboxylic acid hydrazides. *J Org Chem.* 2002;67:9471-9474. doi:10.1021/JO026288N
- [10] Kricka LJ. Chemiluminescent and bioluminescent techniques. *Clin Chem.* 1991;37:1472-1481. doi:10.1093/CLINCHEM/37.9.1472
- [11] Cheng C, Sun J, Wang C, i in. Protonated N'-benzyl-N'-propyl proline hydrazide as highly enantioselective catalyst for direct asymmetric aldol reaction. *Chem Commun (Camb).* 2006:215-217. doi:10.1039/B511992H
- [12] de Oliveira Carneiro Brum J, França TCC, LaPlante SR, Villar JDF. Synthesis and Biological Activity of Hydrazones and Derivatives: A Review. *Mini-Reviews Med Chem.* 2019;20:342-368. doi:10.2174/1389557519666191014142448
- [13] Le Tiec C, Barrail A, Goujard C, Taburet AM. Clinical pharmacokinetics and summary of efficacy and tolerability of atazanavir. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44:1035-1050. doi:10.2165/00003088-200544100-00003/FIGURES/TAB3
- [14] Arakawa H, Maeda M, Tsuji A, Takasashi T. Highly Sensitive Biotin-Labelled Hybridization Probe. *Chem Pharm Bull.* 1989;37:1831-1833. doi:10.1248/CPB.37.1831
- [15] Rollas S, Küçükgülzel ŞG. Biological Activities of Hydrazone Derivatives. *Mol.* 2007;12:1910-1939. doi:10.3390/12081910
- [16] Li W, Zheng M, Wu S, i in. Benserazide, a dopadecarboxylase inhibitor, suppresses tumor growth by targeting hexokinase 2. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36:1-12. doi:10.1186/S13046-017-0530-4

- [17] Singh RB, Jain P, Singh RP. Hydrazones as analytical reagents: a review. *Talanta*. 1982;29:77-84. doi:10.1016/0039-9140(82)80024-6
- [18] Rollas S, Küçükgülzel ŞG. Biological Activities of Hydrazone Derivatives. *Mol*. 2007;12:1910-1939. doi:10.3390/12081910
- [19] Popiołek Ł. Hydrazide–hydrazones as potential antimicrobial agents: overview of the literature since 2010. *Med Chem Res*. 2017; 26: 287-301. doi:10.1007/S00044-016-1756-Y/FIGURES/30
- [20] Do Couto Maia R, Tesch R, Fraga CAM. Acylhydrazone derivatives: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2014;24:1161-1170. doi:10.1517/13543776.2014.959491
- [21] Bala S, Uppal G, Kamboj S, Saini M. Therapeutic review exploring antimicrobial potential of hydrazones as promising lead Scholars Research Library Therapeutic Review Exploring Antimicrobial Potential of Hydrazones as Promising Lead. *Der Pharma Chem*. 2011;3:250-268.
- [22] Mali SN, Thorat BR, Gupta DR, Pandey A. Mini-Review of the Importance of Hydrazides and Their Derivatives—Synthesis and Biological Activity. *Eng Proc*. 2021;11:21. doi:10.3390/ASEC2021-11157
- [23] El Sayed L, Iskander MF. Coordination compounds of hydrazine derivatives with transition metals—III: The reaction of aroyl hydrazones with Ni(II) and Cu(II) salts. *J Inorg Nucl Chem*. 1971; 33: 435-443. doi:10.1016/0022-1902(71)80386-X
- [24] Lei Y, Li TZ, Fu C, Guan XL, Tan Y. Synthesis, crystal structures, and antibacterial activity of a series of hydrazone compounds derived from 4-methylbenzohydrazide. *J Chil Chem Soc*. 2015;60:2961-2965. doi:10.4067/S0717-97072015000200021
- [25] Verma G, Marella A, Shaquiquzzaman M, Akhtar M, Ali MR, Alam MM. A review exploring biological activities of hydrazones. *J Pharm Bioallied Sci*. 2014;6:69. doi:10.4103/0975-7406.129170
- [26] Angelova V, Karabeliov V, Andreeva-Gateva PA, Tchekalarova J. Recent Developments of Hydrazide/Hydrazone Derivatives and Their Analogs as Anticonvulsant Agents in Animal Models. *Drug Dev Res*. 2016;77:379-392. doi:10.1002/DDR.21329
- [27] Zheng M, Wu C, Yang K, i in. Novel selective hexokinase 2 inhibitor Benitrobenrazide blocks cancer cells growth by targeting glycolysis. *Pharmacol Res*. 2021;164:105367. doi:10.1016/j.phrs.2020.105367
- [28] Ulgen M, Durgun BB, Rollas S, Gorrod JW. The in vitro hepatic microsomal metabolism of benzoic acid benzylidenehydrazide. *Drug Metabol Drug Interact*. 1997;13:285-294. doi:10.1515/DMDI.1997.13.4.285/MACHINEREADEABLECITATION/RIS
- [29] Yang Y, Liu S, Li J, Tian X, Zhen X, Han J. Convenient method for reduction of C-N double bonds in oximes, imines, and hydrazones using sodium Borohydride-Raney ni system. *Synth Commun*. 2012;42:2540-2554. doi:10.1080/00397911.2011.562063
- [30] Borch RF, Bernstein MD, Durst HD. The Cyanohydridoborate Anion as a Selective Reducing Agent. *J Am Chem Soc*. 1971;93:2897-2904. doi:10.1021/JA00741A013/ASSET/JA00741A013.FP.PNG_V03
- [31] Dalpathado DS, Jiang H, Kater MA, Desaire H. Reductive amination of carbohydrates using NaBH(OAc)3. *Anal Bioanal Chem*. 2005;381:1130-1137. doi:10.1007/S00216-004-3028-9/FIGURES/7
- [32] Weber D, Berger C, Eickelmann P, Antel J, Kessler H. Design of selective peptidomimetic agonists

- for the human orphan receptor BRS-3. *J Med Chem.* 2003;46:1918-1930. doi:10.1021/JM0210921/SUPPL_FILE/JM0210921_S.PDF
- [33] Bonnet D, Margathe JF, Radford S, i in. Combinatorial aid for underprivileged scaffolds: Solution and solid-phase strategies for a rapid and efficient access to novel aza-diketopiperazines (aza-DKP). *ACS Comb Sci.* 2012;14:323-334. doi:10.1021/CO300015K/SUPPL_FILE/CO300015K_SI_002.PDF
- [34] Laurencin M, Bauchat P, Baudy-Floc'h M. Preparation of N β -Fmoc-Protected Aza- β^3 -Amino Acids with Nonproteinogenic Hydrophobic Side Chains for Solid-Phase Syntheses of Pseudopeptides. *Synthesis (Stuttg).* 2009;2009:1007-1013. doi:10.1055/S-0028-1087969
- [35] Podyacheva E, Afanasyev OI, Tsygankov AA, Makarova M, Chusov D. Hitchhiker's Guide to Reductive Amination. *Synthesis (Stuttg).* 2019;51:2667-2677. doi:10.1055/S-0037-1611788
- [36] Tripathi R, Verma S, Pandey J, Tiwari V. Recent Development on Catalytic Reductive Amination and Applications. *Curr Org Chem.* 2008;12:1093-1115. doi:10.2174/138527208785740283
- [37] Jones S, Warner CJA. Trichlorosilane mediated asymmetric reductions of the CN bond. *Org Biomol Chem.* 2012;10:2189-2200. doi:10.1039/C2OB06854K
- [38] Riant O, Mostefai N, Courmarcel J. Recent Advances in the Asymmetric Hydrosilylation of Ketones, Imines and Electrophilic Double Bonds. *Synthesis (Stuttg).* 2004;2004:2943-2958. doi:10.1055/S-2004-834932
- [39] Sci-Hub | Reductive Amination of Ketones and Aldehydes at the Mercury-Cathode. *Synthesis*, 1987: 1005–1007. doi:10.1055/s-1987-28148
- [40] Yan M, Kawamata Y, Baran PS. Synthetic Organic Electrochemical Methods since 2000: On the Verge of a Renaissance. *Chem Rev.* 2017;117(21):13230-13319. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00397
- [41] Giovenzana GB, Imperio D, Penoni A, Palmisano G. Reductive amination with zinc powder in aqueous media. *Beilstein J Org Chem.* 2011:1095-1099. doi:10.3762/bjoc.7.125
- [42] Isidro-Llobet A, Álvarez M, Albericio F. Amino acid-protecting groups. *Chem Rev.* 2009;109:2455-2504. doi:10.1021/cr800323s
- [43] Venkateswarlu K, Vijitha R. Indian Journal of Advances in Chemical Science A Green and Convenient Protocol for the Chemoselective N-Benzyloxycarbonylation of Amines in Water. *Indian J Adv Chem Sci.* 2014;3:82-86.
- [44] Carpino LA, Han GY. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group. *J Org Chem.* 1972;37:3404-3409. doi:10.1021/JO00795A005
- [45] Karmakar B, Banerji J. An expeditious, efficient green methodology for the Boc protection of amines and silyl protection of alcohols over tungstophosphoric acid-doped mesoporous silica. *Tetrahedron Lett.* 2010;51:3855-3858. doi:10.1016/J.TETLET.2010.05.080
- [46] Jahani F, Tajbakhsh M, Golchoubian H, Khaksar S. Guanidine hydrochloride as an organocatalyst for N-Boc protection of amino groups. *Tetrahedron Lett.* 2011;52:1260-1264. doi:10.1016/J.TETLET.2011.01.023
- [47] Koodehi TG, Shirini F, Goli-Jolodar O. Preparation, characterization and application of 1,4-disulfopiperazine-1,4-dium chloride ([Piper-(SO₃H)₂]₂·2Cl) as an efficient dicationic ionic catalyst for the N-Boc protection of amines. *J Iran Chem Soc.* 2017;14:443-456. doi:10.1007/S13738-016-0992-X/FIGURES/8

- [48] Ragnarsson U, Grehn L. Dual protection of amino functions involving Boc. *RSC Adv.* 2013;3:18691-18697. doi:10.1039/C3RA42956C
- [49] Roemmele RC, Rapoport H. Removal Of N-Arylsulfonyl Groups From Hydroxy α -Amino Acids. *J Org Chem.* 1988;53:2367-2371. doi:10.1021/JO00245A049
- [50] Nyasse B, Grehn L, Ragnarsson U. Mild, efficient cleavage of arenesulfonamides by magnesium reduction. *Chem Commun.* 1997:1017-1018. doi:10.1039/A701408B
- [51] Vaupel P, Multhoff G. Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *J Physiol.* 2021;599:1745-1757. doi:10.1113/JP278810
- [52] Potter M, Newport E, Morten KJ. The Warburg effect: 80 years on. *Biochem Soc Trans.* 2016;44:1499-1505. doi:10.1042/BST20160094
- [53] Hall A, Meyle KD, Lange MK, i in. Dysfunctional oxidative phosphorylation makes malignant melanoma cells addicted to glycolysis driven by the V600EBRAF oncogene. *Oncotarget.* 2013;4:584. doi:10.18632/ONCOTARGET.965
- [54] Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science.* 2009;324:1029. doi:10.1126/SCIENCE.1160809
- [55] Liberti M V., Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci.* 2016;41:211. doi:10.1016/J.TIBS.2015.12.001
- [56] Ciscato F, Ferrone L, Masgras I, Laquatra C, Rasola A. Hexokinase 2 in cancer: A prima donna playing multiple characters. *Int J Mol Sci.* 2021;22. doi:10.3390/ijms22094716
- [57] Pajak B, Siwiak E, Sołtyka M, i in. 2-Deoxy-d-Glucose and Its Analogs: From Diagnostic to Therapeutic Agents. *Int J Mol Sci.* 2019;21:234. doi:10.3390/IJMS21010234
- [58] Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell.* 2012;21:297-308. doi:10.1016/J.CCR.2012.02.014
- [59] Hay N. Aerobic glycolysis Oxidative phosphorylation Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nat Publ Gr.* 2016;16:635. doi:10.1038/nrc.2016.77
- [60] Tsai HJ, Wilson JE. Functional organization of mammalian hexokinases: characterization of the rat type III isozyme and its chimeric forms, constructed with the N- and C-terminal halves of the type I and type II isozymes. *Arch Biochem Biophys.* 1997;338:183-192. doi:10.1006/ABBI.1996.9850
- [61] Wilson JE. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol.* 2003;206:2049-2057. doi:10.1242/JEB.00241
- [62] Garcia SN, Guedes RC, Marques MM. Unlocking the Potential of HK2 in Cancer Metabolism and Therapeutics. *Curr Med Chem.* 2019;26:7285-7322. doi:10.2174/0929867326666181213092652
- [63] Polakis PG, Wilson JE. An intact hydrophobic N-terminal sequence is critical for binding of rat brain hexokinase to mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 1985;236:328-337. doi:10.1016/0003-9861(85)90633-2
- [64] Magalhães RSS, Boechat FC, Brasil AA, i in. Hexokinase 2: The preferential target of trehalose-6-phosphate over hexokinase 1. *J Cell Biochem.* 2022;123:1808-1816. doi:10.1002/JCB.30317
- [65] Bryan N, Raisch KP. Identification of a mitochondrial-binding site on the N-terminal end of

- hexokinase II. *Biosci Rep*. 2015;35:205. doi:10.1042/BSR20150047/56751
- [66] Krasnov GS, Dmitriev AA, Lakunina VA, Kirpiy AA, Kudryavtseva A V. Targeting VDAC-bound hexokinase II: a promising approach for concomitant anti-cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2013;17:1221-1233. doi:10.1517/14728222.2013.833607
- [67] Wyatt E, Wu R, Rabeh W, Park HW, Ghanefar M, Ardehali H. Regulation and Cytoprotective Role of Hexokinase III. *PLoS One*. 2010;5:13823. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0013823
- [68] Van Schaftingen E. Hexokinase/Glucokinase. *Encycl Biol Chem Second Ed*. 2013:543-547. doi:10.1016/B978-0-12-378630-2.00073-6
- [69] Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase-2 bound to mitochondria: Cancer's stygian link to the "Warburg effect" and a pivotal target for effective therapy. *Semin Cancer Biol*. 2009;19:17. doi:10.1016/J.SEMCANCER.2008.11.006
- [70] Xu LZ, Harrison RW, Weber IT, Pilkis SJ. Human beta-cell glucokinase. Dual role of Ser-151 in catalysis and hexose affinity. *J Biol Chem*. 1995;270:9939-9946. doi:10.1074/JBC.270.17.9939
- [71] Aleshin AE, Zeng C, Bartunik HD, Fromm HJ, Honzatko RB. Regulation of hexokinase I: crystal structure of recombinant human brain hexokinase complexed with glucose and phosphate. *J Mol Biol*. 1998;282:345-357. doi:10.1006/JMBI.1998.2017
- [72] Wu J, Hu L, Hu F, Zou L, He T. Poor prognosis of hexokinase 2 overexpression in solid tumors of digestive system: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8:32332. doi:10.18632/ONCOTARGET.15974
- [73] Liu Y, Sun Y, Guo Y, i in. An Overview: The Diversified Role of Mitochondria in Cancer Metabolism. *Int J Biol Sci*. 2023;19:897-915. doi:10.7150/ijbs.81609
- [74] Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev*. 2010;20:51-56. doi:10.1016/J.GDE.2009.10.009
- [75] Lis P, Dylag M, Niedźwiecka K, i in. The HK2 Dependent "Warburg Effect" and Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Cancer: Targets for Effective Therapy with 3-Bromopyruvate. *Mol*. 2016;21:1730. doi:10.3390/MOLECULES21121730
- [76] Galluzzi L, Kepp O, Tajeddine N, Kroemer G. Disruption of the hexokinase–VDAC complex for tumor therapy. *Oncogene*. 2008;27:4633-4635. doi:10.1038/onc.2008.114
- [77] Shan W, Zhou Y, Tam KY. The development of small-molecule inhibitors targeting hexokinase 2. *Drug Discov Today*. 2022;27:2574-2585. doi:10.1016/j.drudis.2022.05.017
- [78] Bozic I, Reiter JG, Allen B, i in. Evolutionary dynamics of cancer in response to targeted combination therapy. *Elife*. 2013;2013. doi:10.7554/ELIFE.00747
- [79] Valera V, Ferretti M, Prabharasuth D, i in. Is targeting glycolysis with 2-deoxyglucose a viable therapeutic approach to bladder cancer? *Int J Cancer Ther Oncol*. 2017;5:2330-4049. doi:10.14319/IJCTO.55.1
- [80] Raez LE, Papadopoulos K, Ricart AD, i in. A phase I dose-escalation trial of 2-deoxy-D-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;71:523-530. doi:10.1007/S00280-012-2045-1
- [81] De Cesare M, Pratesi G, Giusti A, Polizzi D, Zunino F. Stimulation of the apoptotic response as a basis for the therapeutic synergism of lonidamine and cisplatin in combination in human tumour xenografts. *Br J Cancer*. 1998;77:434-439. doi:10.1038/BJC.1998.69

- [82] Kaplan O, Cohen JS. Metabolism of breast cancer cells as revealed by non-invasive magnetic resonance spectroscopy studies. *Breast Cancer Res Treat.* 1994;31:285-299. doi:10.1007/BF00666161
- [83] Singh D, Banerji AK, Dwarakanath BS, i in. Optimizing cancer radiotherapy with 2-deoxy-d-glucose dose escalation studies in patients with glioblastoma multiforme. *Strahlenther Onkol.* 2005;181:507-514. doi:10.1007/S00066-005-1320-Z
- [84] Dwarakanath BS, Singh D, Banerji AK, i in. Clinical studies for improving radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose: present status and future prospects. *J Cancer Res Ther.* 2009;5 doi:10.4103/0973-1482.55136
- [85] Gupta S, Mathur R, Dwarakanath BS. The glycolytic inhibitor 2-deoxy-D-glucose enhances the efficacy of etoposide in ehrlich ascites tumor-bearing mice. *Cancer Biol Ther.* 2005;4:94-101. doi:10.4161/CBT.4.1.1381
- [86] Sharda N, Yang C-R, Kinsella T, Boothman D. Radiation Resistance. *Encycl Cancer.* 2002;1-11. doi:10.1016/B0-12-227555-1/00519-0
- [87] Magno L, Terraneo F, Bertoni F, i in. Double-blind randomized study of lonidamine and radiotherapy in head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1994;29:45-55. doi:10.1016/0360-3016(94)90225-9
- [88] Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. Metformin decreases the dose of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types. *Cancer Res.* 2011;71:3196-3201. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3471
- [89] Goldin N, Arzoine L, Heyfets A, i in. Methyl jasmonate binds to and detaches mitochondria-bound hexokinase. *Oncogene.* 2008;27:4636-4643. doi:10.1038/onc.2008.108
- [90] Nirenberg M W, Hogg J F. Inhibition of Anaerobic Glycolysis in Ehrlich Ascites Tumor Cells by 2-Deoxy-d-Glucose. *Cancer Res.* 1958;18:518-21.
- [91] Stein M, Lin H, Jeyamohan C, i in. Targeting tumor metabolism with 2-deoxyglucose in patients with castrate-resistant prostate cancer and advanced malignancies. *Prostate.* 2010;70:1388-1394. doi:10.1002/PROS.21172
- [92] Nath K, Nelson DS, Heitjan DF, Leeper DB, Zhou R, Glickson JD. Lonidamine induces intracellular tumor acidification and ATP depletion in breast, prostate and ovarian cancer xenografts and potentiates response to doxorubicin. *NMR Biomed.* 2015;28:281-290. doi:10.1002/NBM.3240
- [93] Floridi A, Paggi MG, Marcante ML, Caputo A, Silvestrini B, Martino C De. Lonidamine, a Selective Inhibitor of Aerobic Glycolysis of Murine Tumor Cells. *J Natl Cancer Inst.* 1981;66:497-499. doi:10.1093/JNCI/66.3.497
- [94] Bhutia YD, Babu E, Ganapathy V. Re-programming tumour cell metabolism to treat cancer: no lone target for lonidamine. *Biochem J.* 2016;473:1503-1506. doi:10.1042/BCJ20160068
- [95] Carapella CM, Paggi MG, Cattani F, i in. The potential role of lonidamine (LND) in the treatment of malignant glioma - Phase II study. *J Neurooncol.* 1989;7:103-108. doi:10.1007/BF00149384
- [96] De Lena M, Lorusso V, Latorre A, i in. Paclitaxel, cisplatin and lonidamine in advanced ovarian cancer. A phase II study. *Eur J Cancer.* 2001;37:364-368. doi:10.1016/S0959-8049(00)00400-7
- [97] DeFronzo RA, Goodman AM. Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. *N Engl J Med.* 1995;333:541-549. doi:10.1056/NEJM199508313330902

- [98] Salani B, Rio A Del, Marini C, Sambuceti G, Cordera R, Maggi D. Metformin, cancer and glucose metabolism. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21:461-71 doi:10.1530/ERC-14-0284
- [99] Han CY, Patten DA, Lee SG, i in. p53 Promotes chemoresponsiveness by regulating hexokinase II gene transcription and metabolic reprogramming in epithelial ovarian cancer. *Mol Carcinog*. 2019;58:2161-2174. doi:10.1002/MC.23106
- [100] Ko YH, Pedersen PL, Geschwind JF. Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: Characterization and targeting hexokinase. *Cancer Lett*. 2001;173:83-91. doi:10.1016/S0304-3835(01)00667-X
- [101] Zhang Q, Zhang Y, Zhang P, i in. Hexokinase II inhibitor, 3-BrPA induced autophagy by stimulating ROS formation in human breast cancer cells. *Genes and Cancer*. 2014;5:100-112. doi:10.18632/genesandcancer.9
- [102] Chen Z, Zhang H, Lu W, Huang P. Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2009;1787:553-560. doi:10.1016/J.BBABIO.2009.03.003
- [103] Jae HJ, Chung JW, Park HS, i in. The Antitumor Effect and Hepatotoxicity of a Hexokinase II Inhibitor 3-Bromopyruvate: In Vivo Investigation of Intraarterial Administration in a Rabbit VX2 Hepatoma Model. *Korean J Radiol*. 2009;10:596-603. doi:10.3348/kjr.2009.10.6.596
- [104] Chang JM, Chung JW, Jae HJ, i in. Local Toxicity of Hepatic Arterial Infusion of Hexokinase II Inhibitor, 3-Bromopyruvate: In Vivo Investigation in Normal Rabbit Model. *Acad Radiol*. 2007;14:85-92. doi:10.1016/J.ACRA.2006.09.059
- [105] Cesari IM, Carvalho E, Figueiredo Rodrigues M, Mendonça BDS, Amôedo ND, Rumjanek FD. Methyl jasmonate: putative mechanisms of action on cancer cells cycle, metabolism, and apoptosis. *Int J Cell Biol*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/572097
- [106] Uludağ D, Bay S, Sucu BO, i in. Potential of Novel Methyl Jasmonate Analogs as Anticancer Agents to Metabolically Target HK-2 Activity in Glioblastoma Cells. *Front Pharmacol*. 2022;13:1525. doi:10.3389/FPHAR.2022.828400
- [107] Li J, Chen K, Wang F, i in. Methyl jasmonate leads to necrosis and apoptosis in hepatocellular carcinoma cells via inhibition of glycolysis and represses tumor growth in mice. *Oncotarget*. 2017;8:45965. doi:10.18632/ONCOTARGET.17469
- [108] Lin H, Zeng J, Xie R, i in. Discovery of a Novel 2,6-Disubstituted Glucosamine Series of Potent and Selective Hexokinase 2 Inhibitors. *ACS Med Chem Lett*. 2015;7:217-222. doi:10.1021/ACSMEDCHEMLETT.5B00214
- [109] Espacenet – search results. Accessed February 21, 2024. <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/046245122/publication/WO2012083145A1?q=WO2012083145A1>
- [110] Bao F, Yang K, Wu C, i in. New natural inhibitors of hexokinase 2 (HK2): Steroids from *Ganoderma sinense*. *Fitoterapia*. 2018;125:123-129. doi:10.1016/J.FITOTE.2018.01.001
- [111] Liu Y, Li M, Zhang Y, i in. Structure based discovery of novel hexokinase 2 inhibitors. *Bioorg Chem*. 2020;96:103609. doi:10.1016/j.bioorg.2020.103609
- [112] Fan T, Sun G, Sun X, Zhao L, Zhong R, Peng Y. Tumor Energy Metabolism and Potential of 3-Bromopyruvate as an Inhibitor of Aerobic Glycolysis: Implications in Tumor Treatment. *Cancers (Basel)*. 2019;11. doi:10.3390/CANCERS11030317

- [113] Hosangadi BD, Dave RH. An efficient general method for esterification of aromatic carboxylic acids. *Tetrahedron Lett.* 1996;37:6375-6378. doi:10.1016/0040-4039(96)01351-2
- [114] Ren JM, Wiltshire JT, Blencowe A, Qiao GG. Synthesis of a star polymer library with a diverse range of highly functionalized macromolecular architectures. *Macromolecules.* 2011;44:3189-3202. doi:10.1021/MA200283C
- [115] Heine NB, Studer A. Radical Difluoromethylation of Thiols with (Difluoromethyl)triphenylphosphonium Bromide. *Org Lett.* 2017;19:4150-4153. doi:10.1021/ACS.ORGLETT.7B02109
- [116] Khan KM, Rasheed M, Ullah Z, i in. Synthesis and in vitro leishmanicidal activity of some hydrazides and their analogues. *Bioorg Med Chem.* 2003;11:1381-1387. doi:10.1016/S0968-0896(02)00611-9
- [117] He H, Cheng Z, Zheng L. Aqueous Zn²⁺ analysis: Specific recognition and instant imaging by Schiff base fluorescent probes. *J Mol Struct.* 2021;1227:129522. doi:10.1016/J.MOLSTRUC.2020.129522
- [118] Katz L, Karger LS, Cohen MS. Hydrazine bisbenzaldithio-salicylhydrazides. 1953;(3):1380-1402.
- [119] Kim BK, Ko H, Jeon ES, Ju ES, Jeong LS, Kim YC. 2,3,4-Trihydroxybenzyl-hydrazide analogues as novel potent coxsackievirus B3 3C protease inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2016;120:202-216. doi:10.1016/J.EJMECH.2016.03.085
- [120] Romero EL, D'Vries RF, Zuluaga F, Chaur MN. Multiple dynamics of hydrazone based compounds. *J Braz Chem Soc.* 2015;26:1265-1273. doi:10.5935/0103-5053.20150092
- [121] Chaur MN, Collado D, Lehn JM. Configurational and Constitutional Information Storage: Multiple Dynamics in Systems Based on Pyridyl and Acyl Hydrazones. *Chem – A Eur J.* 2011;17:248-258. doi:10.1002/CHEM.201002308
- [122] Kareem HS, Ariffin A, Nordin N, i in. Correlation of antioxidant activities with theoretical studies for new hydrazone compounds bearing a 3,4,5-trimethoxy benzyl moiety. *Eur J Med Chem.* 2015;103:497-505. doi:10.1016/j.ejmech.2015.09.016
- [123] Özen AS, De Proft F, Aviyente V, Geerlings P. Interpretation of hydrogen bonding in the weak and strong regions using conceptual DFT descriptors. *J Phys Chem A.* 2006;110:5860-5868. doi:10.1021/JP0568374
- [124] Campbell Pinheiro A, Roland Kaiser C, Cristina Mendonca Nogueira T, i in. Synthesis and antitubercular activity of new L-serinyl hydrazone derivatives. *Med Chem.* 2011;7:611-623. doi:10.2174/157340611797928325
- [125] Verardo G, Geatti P, Lesa B. Fast and convenient synthesis of α -N-protected amino acid hydrazides. *Synthesis (Stuttg).* 2005:559-564. doi:10.1055/s-2004-837300
- [126] Campbell Pinheiro A, Roland Kaiser C, Cristina Mendonca Nogueira T, i in. Synthesis and Antitubercular Activity of New L-serinyl Hydrazone Derivatives. *Med Chem (Los Angeles).* 2012;7:611-623. doi:10.2174/157340611797928325
- [127] Xiong X, Yeung Y-Y. Highly *ortho* -Selective Chlorination of Anilines Using a Secondary Ammonium Salt Organocatalyst. *Angew Chemie Int Ed.* 2016;55:16101-16105. doi:10.1002/anie.201607388
- [128] Tagad HD, Hamada Y, Nguyen JT, i in. Design of pentapeptidic BACE1 inhibitors with carboxylic acid bioisosteres at P1' and P4 positions. *Bioorg Med Chem.* 2010;18:3175-3186.

doi:10.1016/J.BMC.2010.03.032

- [129] Jakopin Z. Orthogonally Protected Oxadiazole-Based Building Blocks: Synthesis and Characterization. *Curr Org Synth.* 2015;13(1):126-131. doi:10.2174/1570179412666150505184852
- [130] Shendage DM, Fröhlich R, Haufe G. Highly efficient stereoconservative amidation and deamidation of α -amino acids. *Org Lett.* 2004;6:3675-3678. doi:10.1021/OL048771L
- [131] Espacenet – search results. Accessed January 18, 2024. <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/068631582/publication/CN110511159A?q=pn%3DCN110511159A>
- [132] Espacenet – search results. Accessed January 18, 2024. <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/076051898/publication/CN112876379A?q=pn%3DCN112876379A>
- [133] Abdel-Magid AF, Mehrman SJ. A review on the use of sodium triacetoxyborohydride in the reductive amination of ketones and aldehydes. *Org Process Res Dev.* 2006;10:971-1031. doi:10.1021/OP0601013/ASSET/IMAGES/OP0601013.SOCIAL.JPEG_V03
- [134] Sultane PR, Mete TB, Bhat RG. A convenient protocol for the deprotection of N-benzyloxycarbonyl (Cbz) and benzyl ester groups. *Tetrahedron Lett.* 2015;56:2067-2070. doi:10.1016/J.TETLET.2015.02.131
- [135] Koziół A, Lenzion-Paluch A, Manikowski A. A fast and effective hydrogenation process of protected pentasaccharide: A key step in the synthesis of fondaparinux sodium. *Org Process Res Dev.* 2013;17:869-875. doi:10.1021/op300367c
- [136] Bartholomew CH. Mechanisms of catalyst deactivation. *Appl Catal A Gen.* 2001;212:17-60. doi:10.1016/S0926-860X(00)00843-7
- [137] Pettit GR, Tamelen EE van. Desulfurization with Raney Nickel*The authors are indebted to Dr. Brian Green and Dr. John C. Knight for checking the final draft of this chapter. *Org React.* 2011:356-529. doi:10.1002/0471264180.OR012.05
- [138] Ge X, Luo C, Qian C, Yu Z, Chen X. Raney nickel-catalyzed reductive N -methylation of amines with paraformaldehyde: theoretical and experimental study. *RSC Adv.* 2014;4:43195-43203. doi:10.1039/C4RA04414B
- [139] Agnihotri S, Mansouri S, Burrell K, i in. Ketoconazole and Posaconazole Selectively Target HK2-expressing Glioblastoma Cells. *Clin Cancer Res.* 2019;25:844-855. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-1854/74118/AM/KETOCONAZOLE-AND-POSACONAZOLE-SELECTIVELY-TARGET
- [140] Guan Y, Wang J, Sun J. A method for determination of hexokinase activity by RP-HPLC. *Wuhan Univ J Nat Sci.* 2011;16:535-540. doi:10.1007/s11859-011-0793-0
- [141] Coan KED, Shoichet BK. Stability and equilibria of promiscuous aggregates in high protein milieus. *Mol Biosyst.* 2007;3:208-213. doi:10.1039/B616314A
- [142] McGovern SL, Caselli E, Grigorieff N, Shoichet BK. A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening. *J Med Chem.* 2002;45:1712-1722. doi:10.1021/JM010533Y
- [143] Gómez-Merino AI, Rubio-Hernández FJ, Velázquez-Navarro JF, Aguiar J, Jiménez-Agredano C. Study of the aggregation state of anatase water nanofluids using rheological and DLS methods. *Ceram Int.* 2014;40:14045-14050. doi:10.1016/J.CERAMINT.2014.05.132

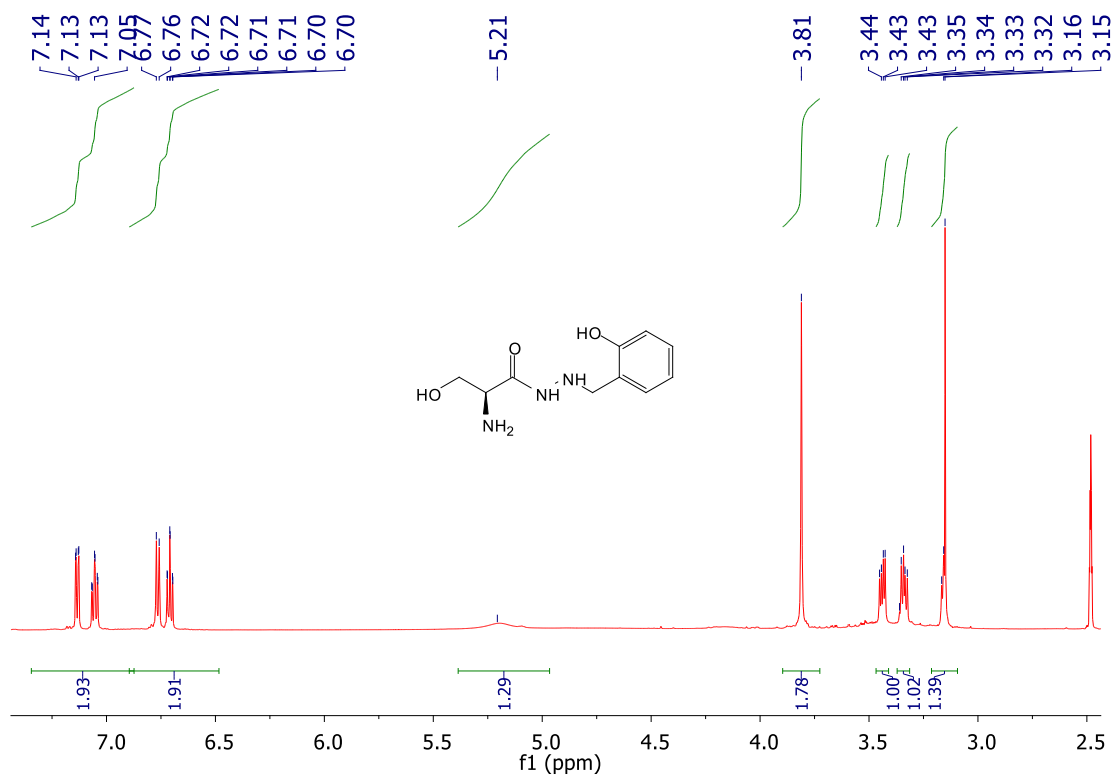
- [144] Meanwell NA. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. *J Med Chem.* 2011;54:2529-2591. doi:10.1021/JM1013693
- [145] Nepali K, Lee HY, Liou JP. Nitro-Group-Containing Drugs. *J Med Chem.* 2019;62:2851-2893. doi:10.1021/ACS.JMEDCHEM.8B00147
- [146] Patterson S, Wyllie S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: Past, present, and future prospects. *Trends Parasitol.* 2014;30:289-298. doi:10.1016/j.pt.2014.04.003
- [147] Khusnutdinov RI, Shchadneva NA, Mayakova YY, Konovalova YS, Khazipova AN, Kutepov BI. Methylation of mono- and dicarboxylic acids with dimethyl carbonate catalyzed with binder-free zeolite NaY. *Russ J Org Chem.* 2017;53:163-168. doi:10.1134/S107042801702004X/METRICS
- [148] Chakravarthy ASJ, Madhura MJ, Gayathri V. A Novel Polymer Supported Copper(II) Complex as Reusable Catalyst in Oxidative Esterification. *Catal Letters.* 2023;154:725-736. doi:10.1007/S10562-023-04337-8/FIGURES/11
- [149] Shaikh TMA, Emmanuvel L, Sudalai A. NaIO₄/LiBr-Mediated Direct Conversion of Benzylic Alcohols and Aromatic Aldehydes to Aromatic Esters. *Synth Commun.* 2007;37:2641-2646. doi:10.1080/00397910701465032
- [150] Wang Z, Zhang Y, Wang T, i in. Organic flux synthesis of covalent organic frameworks. *Chem.* 2023;9:2178-2193. doi:10.1016/J.CHEMPR.2023.03.026
- [151] Croft RA, Mousseau JJ, Choi C, Bull JA. Lithium-Catalyzed Thiol Alkylation with Tertiary and Secondary Alcohols: Synthesis of 3-Sulfanyl-Oxetanes as Bioisosteres. *Chem – A Eur J.* 2018;24:818-821. doi:10.1002/CHEM.201705576
- [152] Zhu L, Agarwal A, Lai J, i in. Solid-state photochemical and photomechanical properties of molecular crystal nanorods composed of anthracene ester derivatives. *J Mater Chem.* 2011;21:6258-6268. doi:10.1039/C1JM10228A
- [153] Doores KJ, Davis BG. "Polar patch" proteases as glycopeptidylgases. *Chem Commun.* 2005:168-170. doi:10.1039/B412030B
- [154] Geurts M, Poupaert JH, Scriba GKE, Lambert DM. N-(benzyloxycarbonyl)glycine esters and amides as new anticonvulsants. *J Med Chem.* 1998;41:24-30. doi:10.1021/JM970086F
- [155] Zheng Y, Zhao Y, Tao S, i in. Green Esterification of Carboxylic Acids Promoted by tert-Butyl Nitrite. *European J Org Chem.* 2021;2021:2713-2718. doi:10.1002/EJOC.202100326
- [156] Schlatzer T, Schröder H, Trobe M, i in. Pd/BIPHEPHOS is an Efficient Catalyst for the Pd-Catalyzed S-Allylation of Thiols with High n-Selectivity. *Adv Synth Catal.* 2020;362:331-336. doi:10.1002/ADSC.201901250
- [157] Kolesinska B, Kaminski ZJ. Design, synthesis, and application of enantioselective coupling reagent with a traceless chiral auxiliary. *Org Lett.* 2009;11:765-768. doi:10.1021/OL802691X
- [158] Ferreira PMT, Maia HLS, Monteiro LS, Sacramento J. High yielding synthesis of dehydroamino acid and dehydropeptide derivatives. *J Chem Soc Perkin Trans 1.* 1999:3697-3703. doi:10.1039/A904730A
- [159] Dai Q, Li P, Ma N, Hu C. Palladium-Catalyzed Decarboxylative Synthesis of Arylamines. *Org Lett.* 2016;18:5560-5563. doi:10.1021/ACS.ORGLETT.6B02724
- [160] Saha A, Kumar R, Kumar R, Devakumar & C. Note Development and assessment of green synthesis of hydrazides. *Indian J Chem.* 2010;49:526-531.

- [161] Rodrigues DA, Guerra FS, Sagrillo FS, i in. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of First-in-Class Multitarget N-Acylhydrazone Derivatives as Selective HDAC6/8 and PI3K α Inhibitors. *ChemMedChem*. 2020;15:539-551. doi:10.1002/CMDC.201900716
- [162] Radia AJ, Lalpara JN, Modasiya IJ, Dubal GG. Design and synthesis of novel 1,3,4-oxadiazole based azaspirocycles catalyzed by NaI under mild condition and evaluated their antidiabetic and antibacterial activities. *J Heterocycl Chem*. 2021;58:612-621. doi:10.1002/JHET.4200
- [163] Li X, Zhao Z, Li G, Shi P. Design and Synthesis of Novel Molecular Tweezer Anion Receptors based on Diphenic Acid Carbonyl Thiosemicarbazide. *J Chem Res*. 2010;34:410-413. doi:10.3184/030823410X12790364267642
- [164] Katz L, Karger LS, Schroeder W, Cohen MS. Hydrazine derivatives. I. benzalithio- and bisbenzaldithio-salicylhydrazides. *J Org Chem*. 1953;18:1380-1402. doi:10.1021/JO50016A019/ASSET/JO50016A019.FP.PNG_V03
- [165] De Fátima A, Barreto S, Alves V, i in. Synthesis of acylhydrazino-peptomers, a new class of peptidomimetics, by consecutive Ugi and hydrazino-Ugi reactions. *Beilstein J Org Chem* 12285. 2016;12:2865-2872. doi:10.3762/BJOC.12.285
- [166] Determann VH, Wieland T. Ein synthetisches pentapeptid als plastein-monomeres. Untersuchungen über die plasteinreaktion. II. *Die Makromol Chemie*. 1961;44:312-323. doi:10.1002/MACP.1961.020440127
- [167] Schnabel E. Nebenreaktionen bei der Synthese von Peptiden nach dem Azidverfahren von Curtius. *Justus Liebigs Ann Chem*. 1962;659:168-184. doi:10.1002/JLAC.19626590118
- [168] Stewart HL, Hanby AR, King TA, i in. An efficient, stereocontrolled and versatile synthetic route to bicyclic partially saturated privileged scaffolds. *Chem Commun*. 2020;56:6818-6821. doi:10.1039/D0CC02728F
- [169] Inouye K, Voynick IM, Delpierre GR, Fruton JS. New Synthetic Substrates for Pepsin. *Biochemistry*. 1966;5:2473-2483. doi:10.1021/BI00871A044
- [170] Erlanger BF, Brand E. Optical Rotation of Peptides. I. Glycine and Alanine Dipeptides. *J Am Chem Soc*. 1951;73:3508-3510. doi:10.1021/JA01151A512
- [171] Fruton JS. SYNTHESIS OF PEPTIDES OF L-SERINE. *J Biol Chem*. 1942;146:463-470. doi:10.1016/S0021-9258(18)44966-6
- [172] Niedrich H, Oehme C. Hydrazinverbindungen als Heterobestandteile in Peptiden. XV. Synthese von Eledoisin-Octapeptiden mit den Carbazylresten Azaglycin und α -Azaasparagin statt Glycin und Asparagin. *J für Prakt Chemie*. 1972;314:759-768. doi:10.1002/PRAC.19723140508
- [173] Schröder E, Gibian H. Über Peptidsynthesen, XII. Synthese von Glukagon-Teilsequenzen. *Justus Liebigs Ann Chem*. 1962;656:190-204. doi:10.1002/JLAC.19626560130

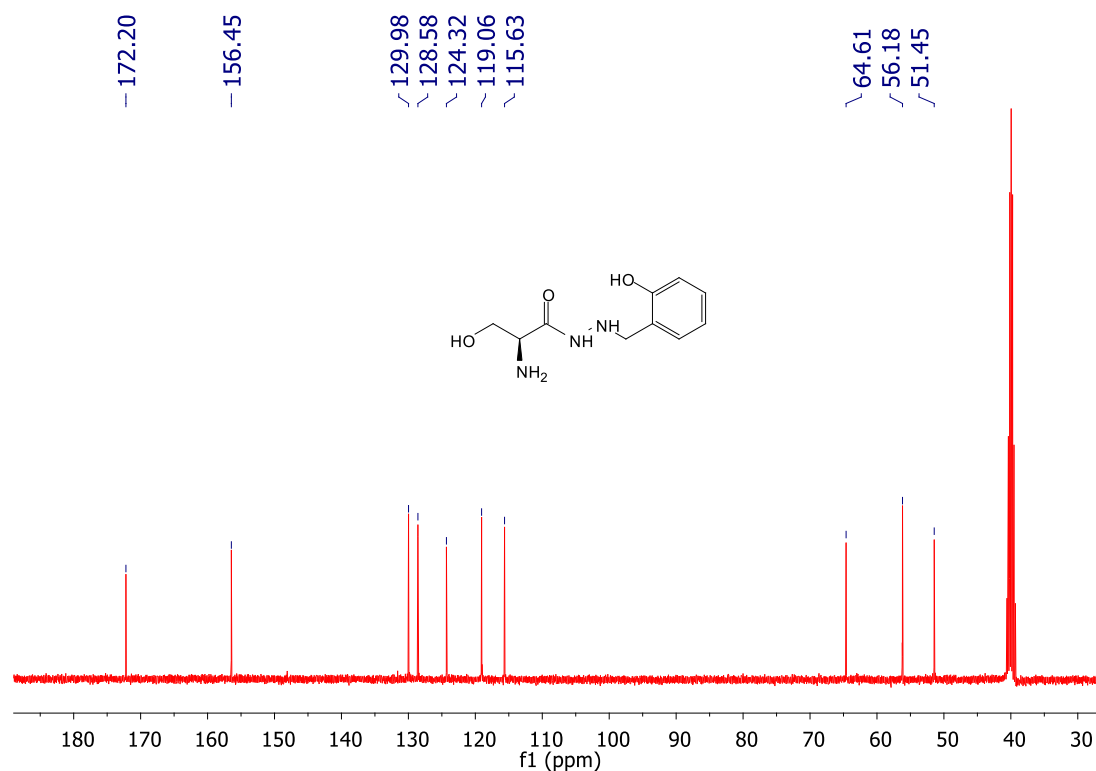
Załączniki

Dla związków testowanych pod kątem aktywności hamowania HK2, zaprezentowano poniżej widma powstałe w wyniku analizy spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego oraz spektrometrii masowej wysokiej rozdzielczości.

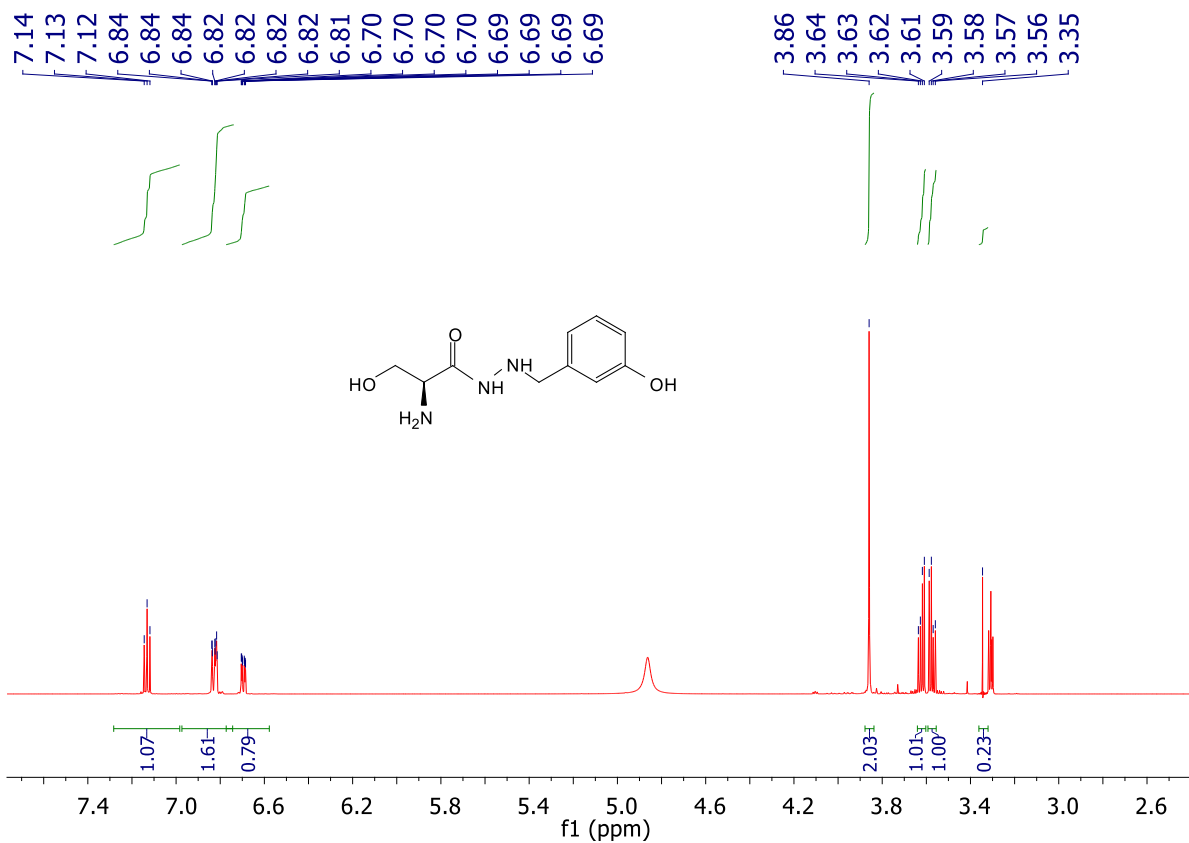
Widma ¹H oraz ¹³C NMR:



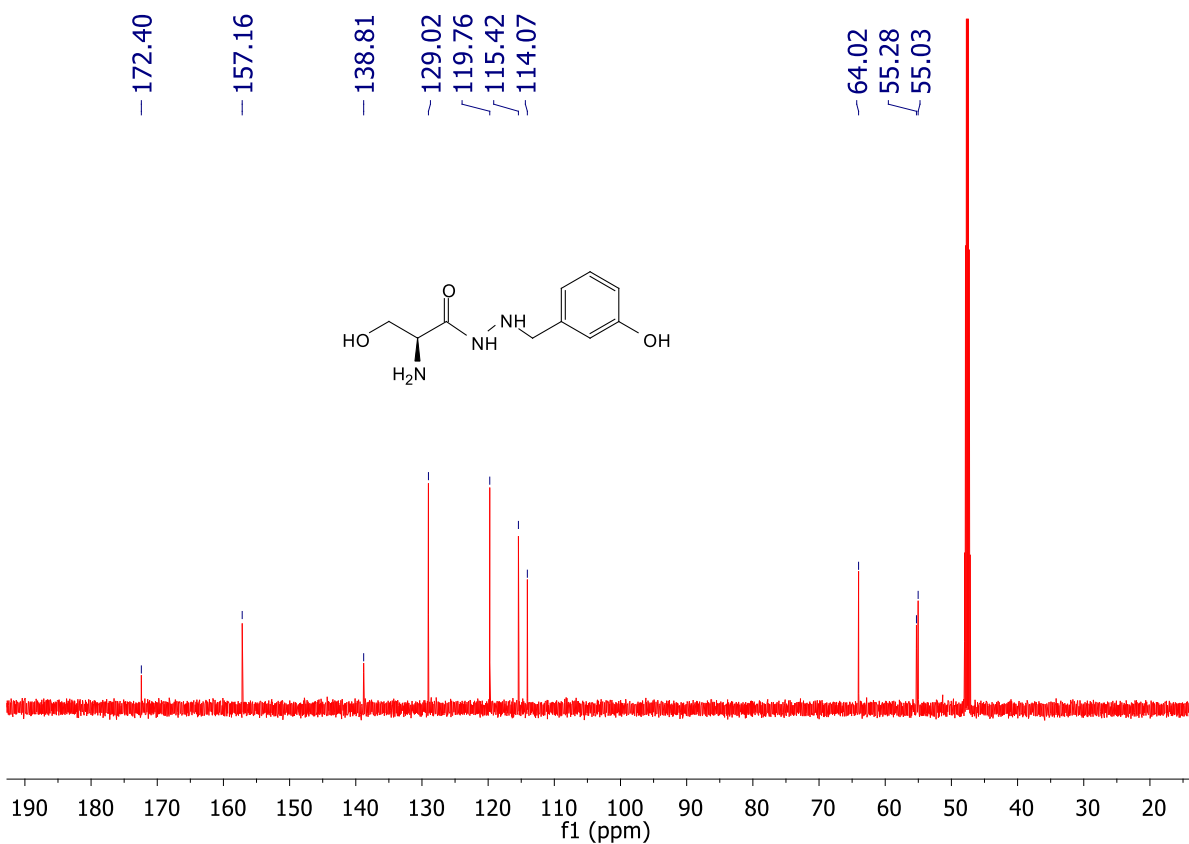
Widmo ¹H NMR (DMSO) 2-(2-hydroksybenzyl)hydrazidu L-seryny.



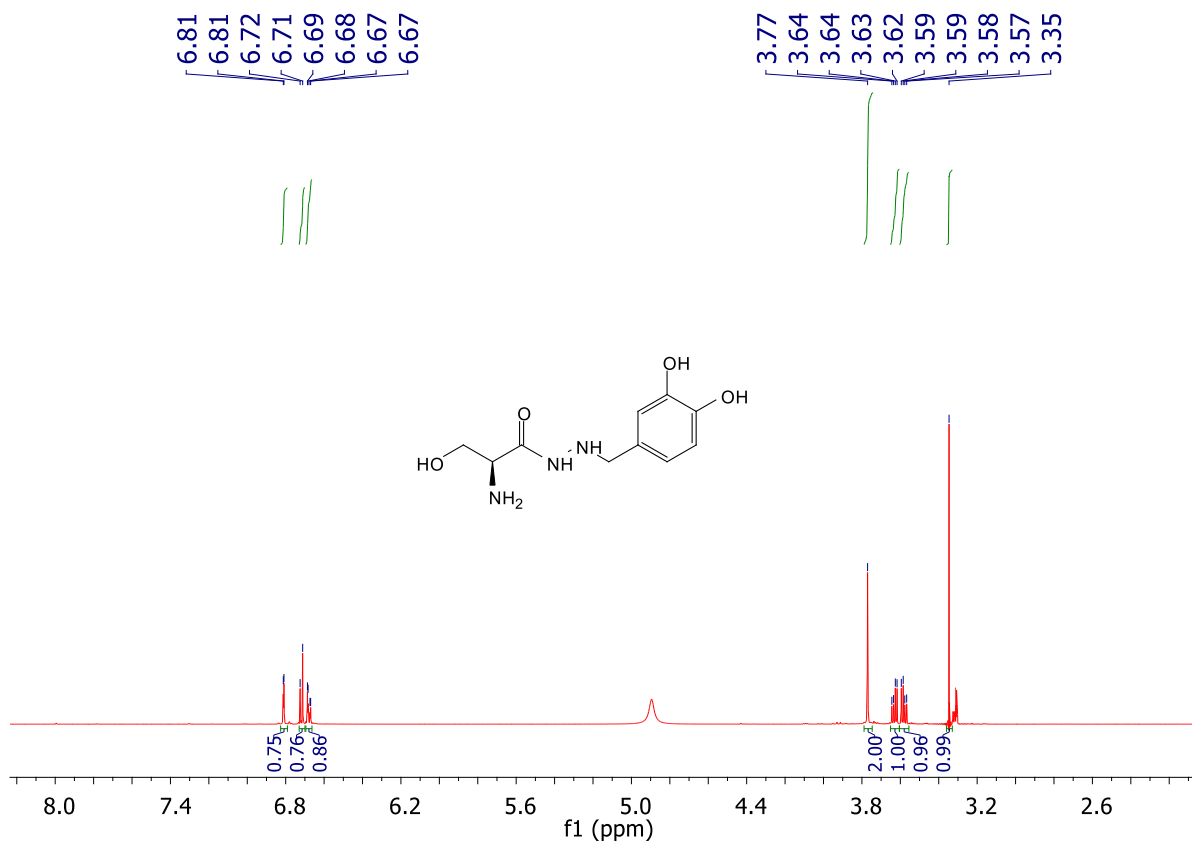
Widmo ¹³C NMR (DMSO) 2-(2-hydroksybenzyl)hydrazidu L-seryny.



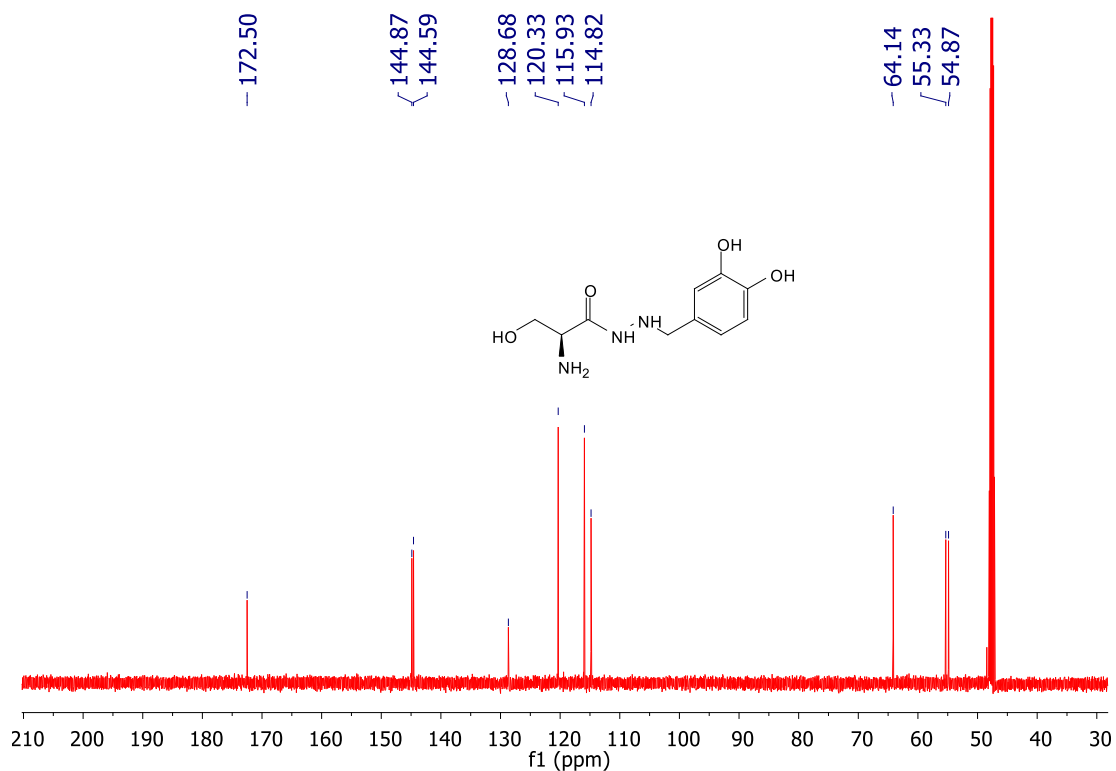
Widmo ¹H NMR (CD₃OD) 2-(3-hydroksybenzyl)hydrazidu L-seryny.



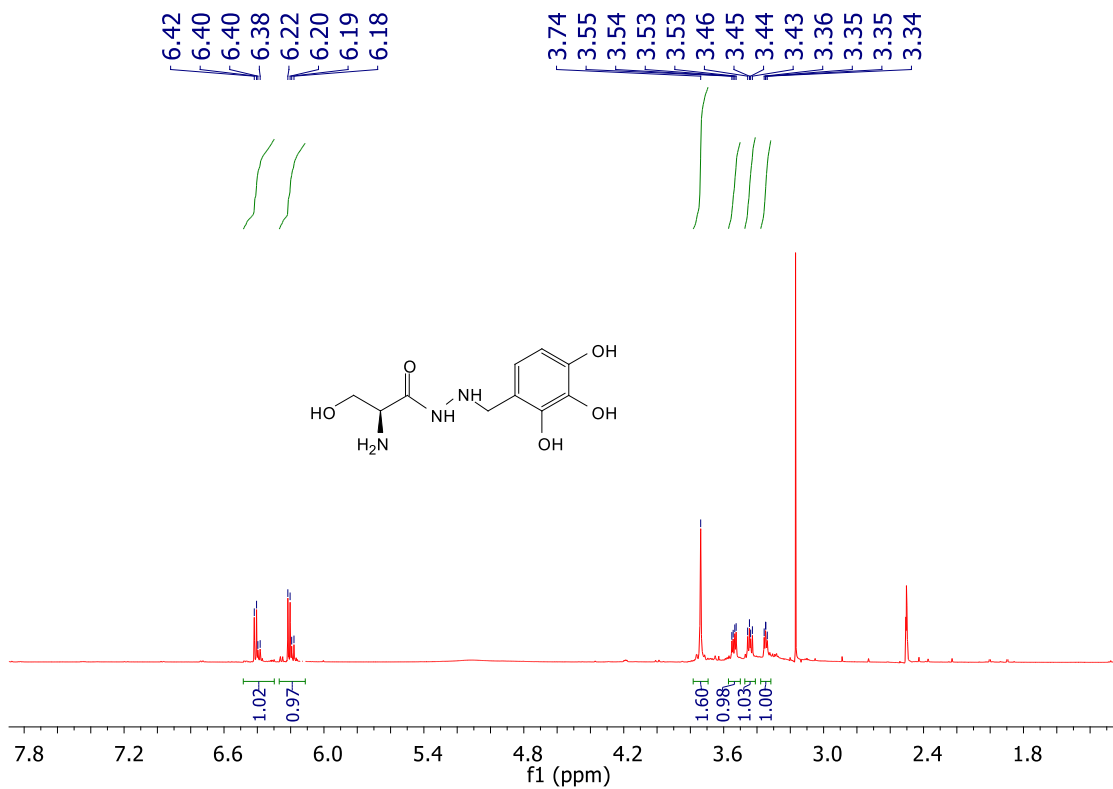
Widmo ¹³C NMR (CD₃OD) 2-(2-hydroksybenzyl)hydrazidu L-seryny.



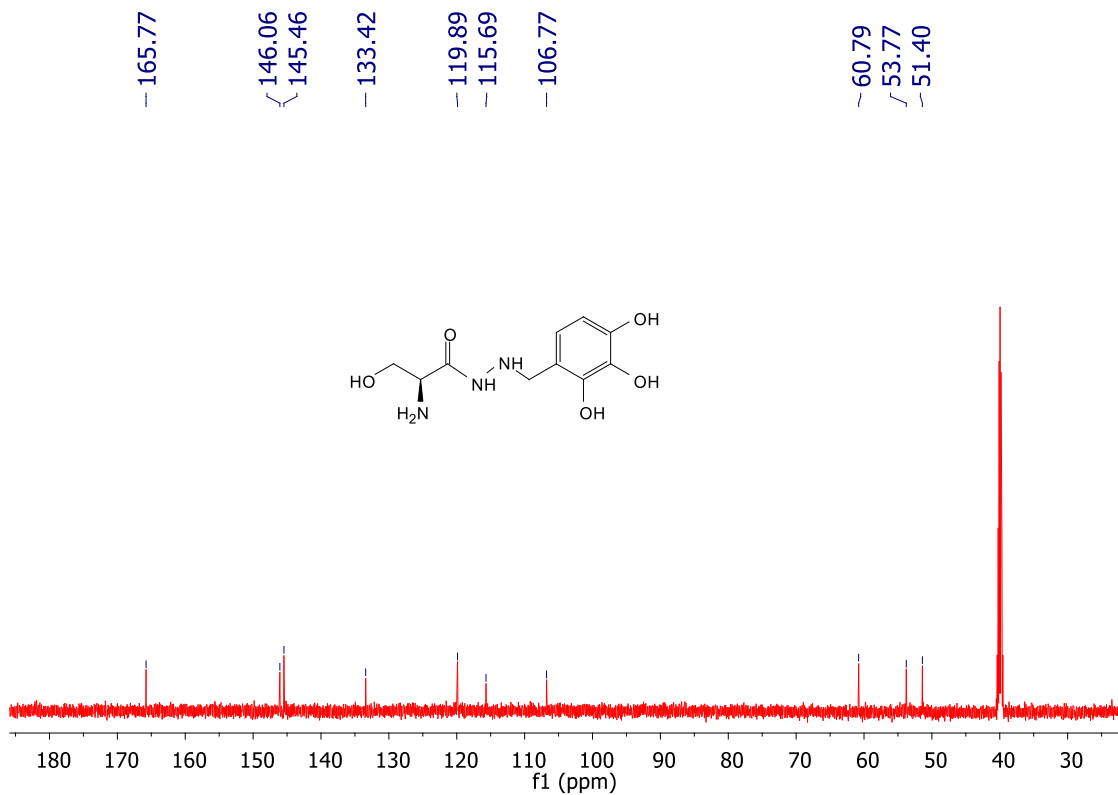
Widmo ¹H NMR (CD₃OD) 2-(3,4-dihydroksybenzyl)hydrazynu L-seryny.



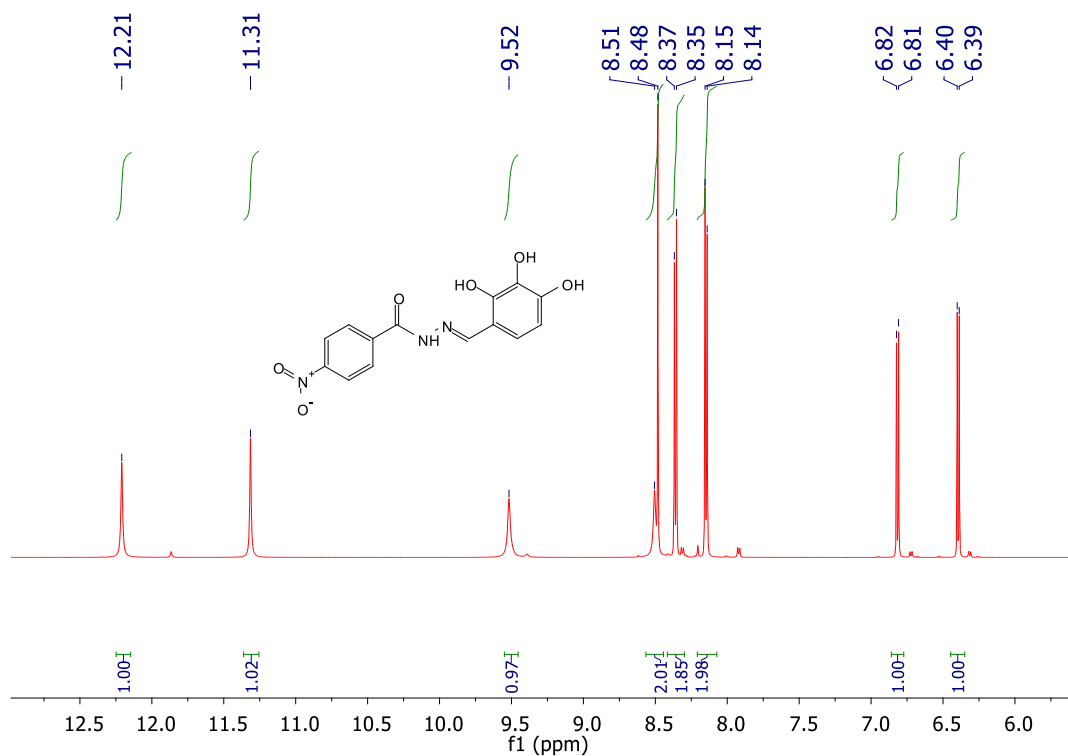
Widmo ¹³C NMR (CD₃OD) 2-(3,4-dihydroksybenzyl)hydrazynu L-seryny.



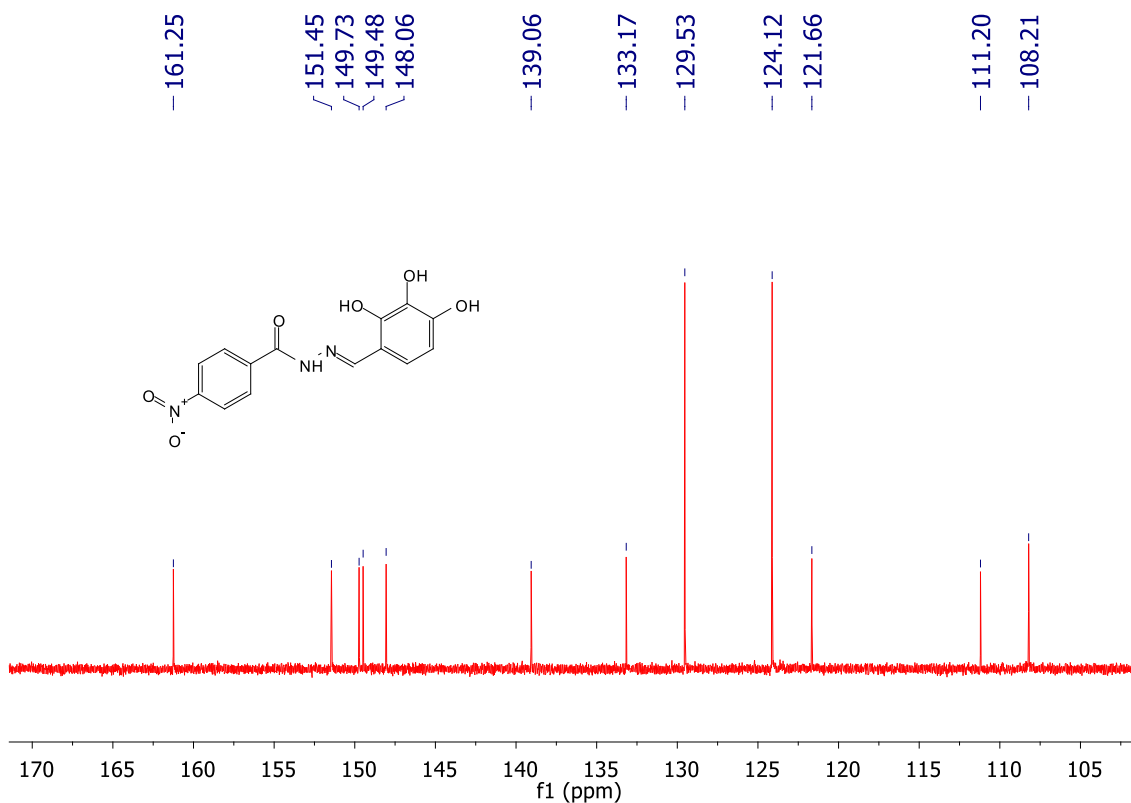
Widmo ¹H NMR (DMSO) 2-(2,3,4-trihydroksybenzyl)hydrazidu L-seryny.



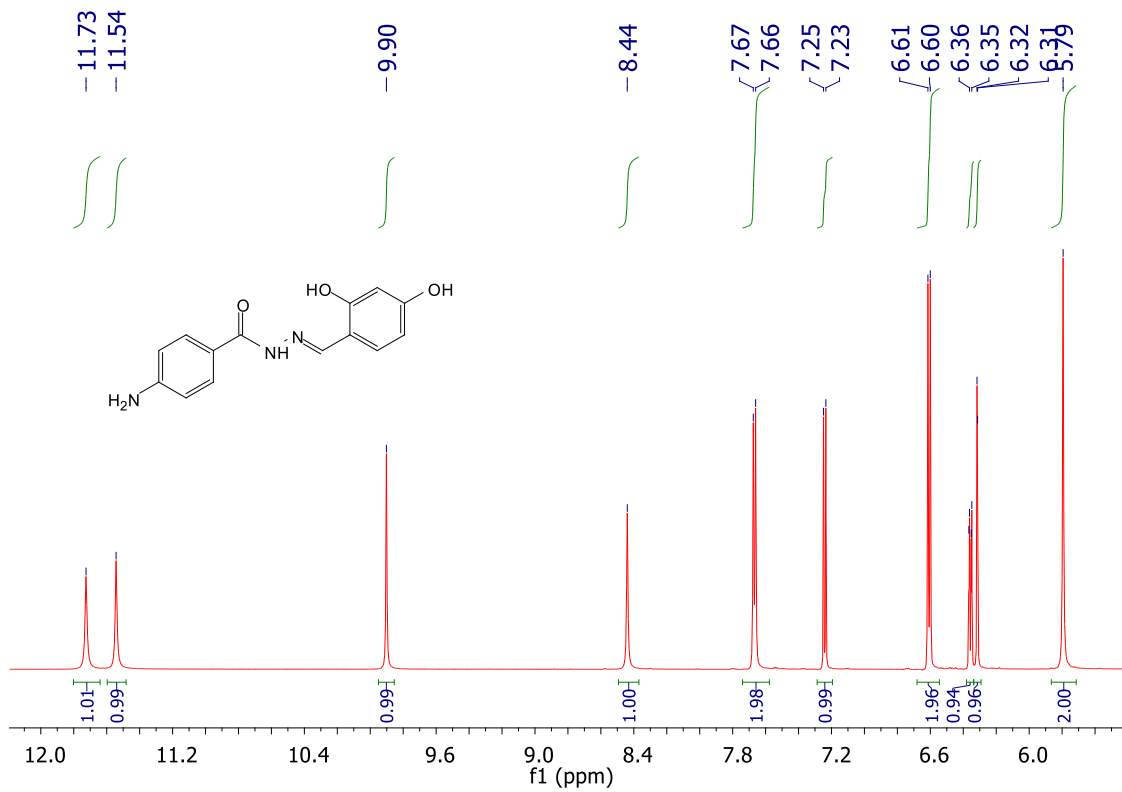
Widmo ¹³C NMR (DMSO) 2-(2,3,4-trihydroksybenzyl)hydrazidu L-seryny.



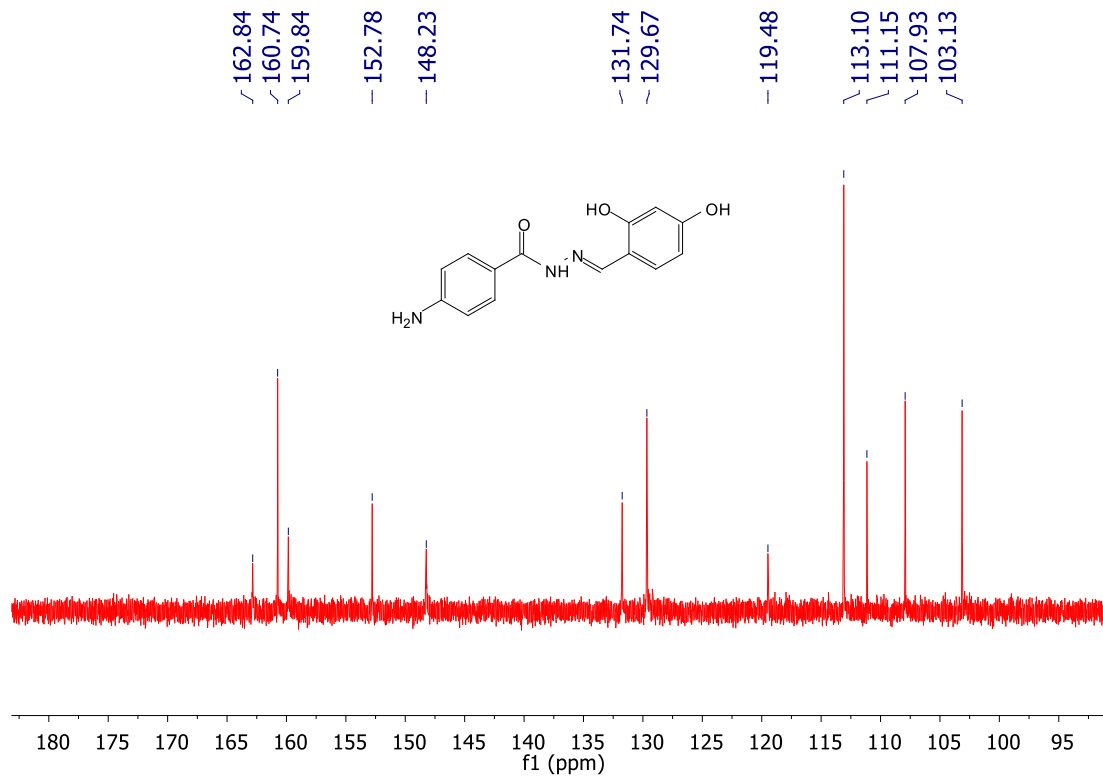
Widmo ^1H NMR (DMSO) (E)-4-nitro-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazidu.



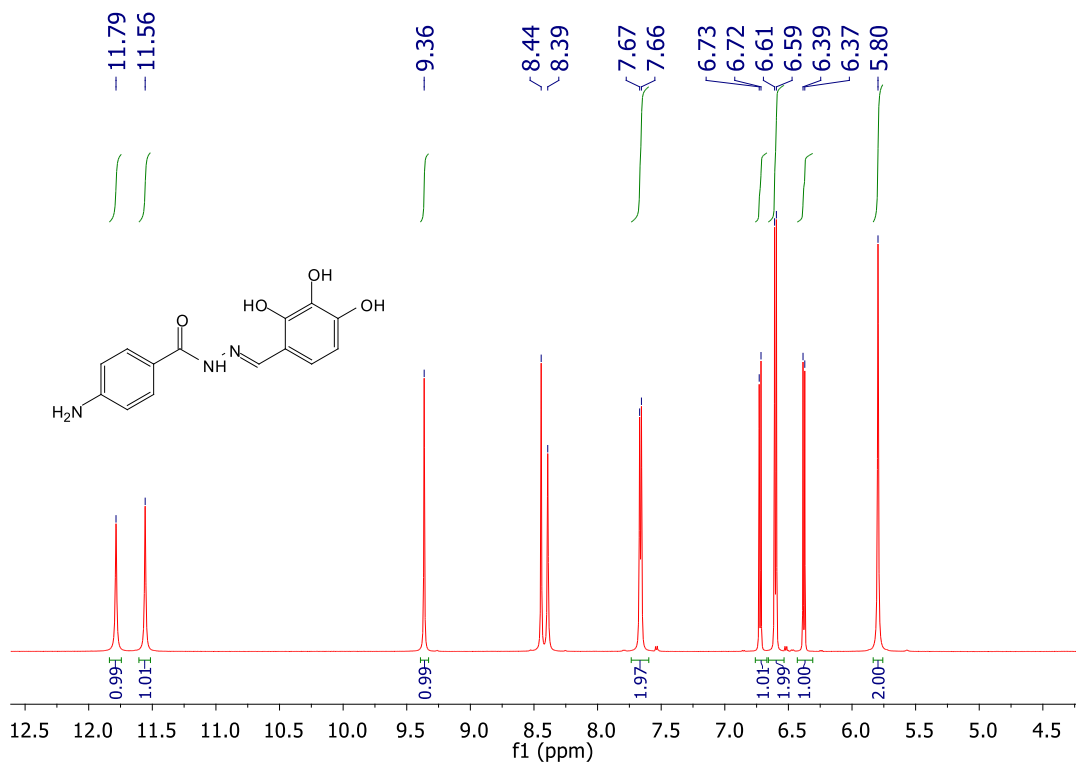
Widmo ^{13}C NMR (DMSO) (E)-4-nitro-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazidu.



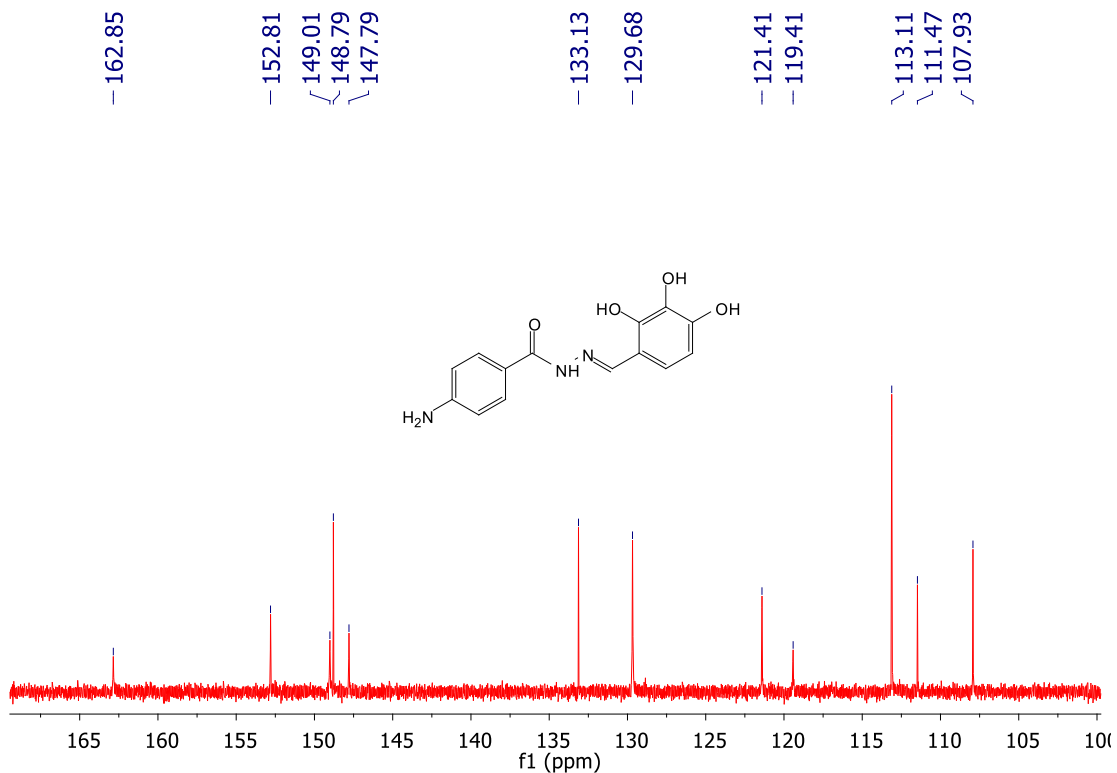
Widmo ^1H NMR (DMSO) (E)-N'-(2,4-dihydroksybenzylideno)-4-aminobenzohydrazidu.



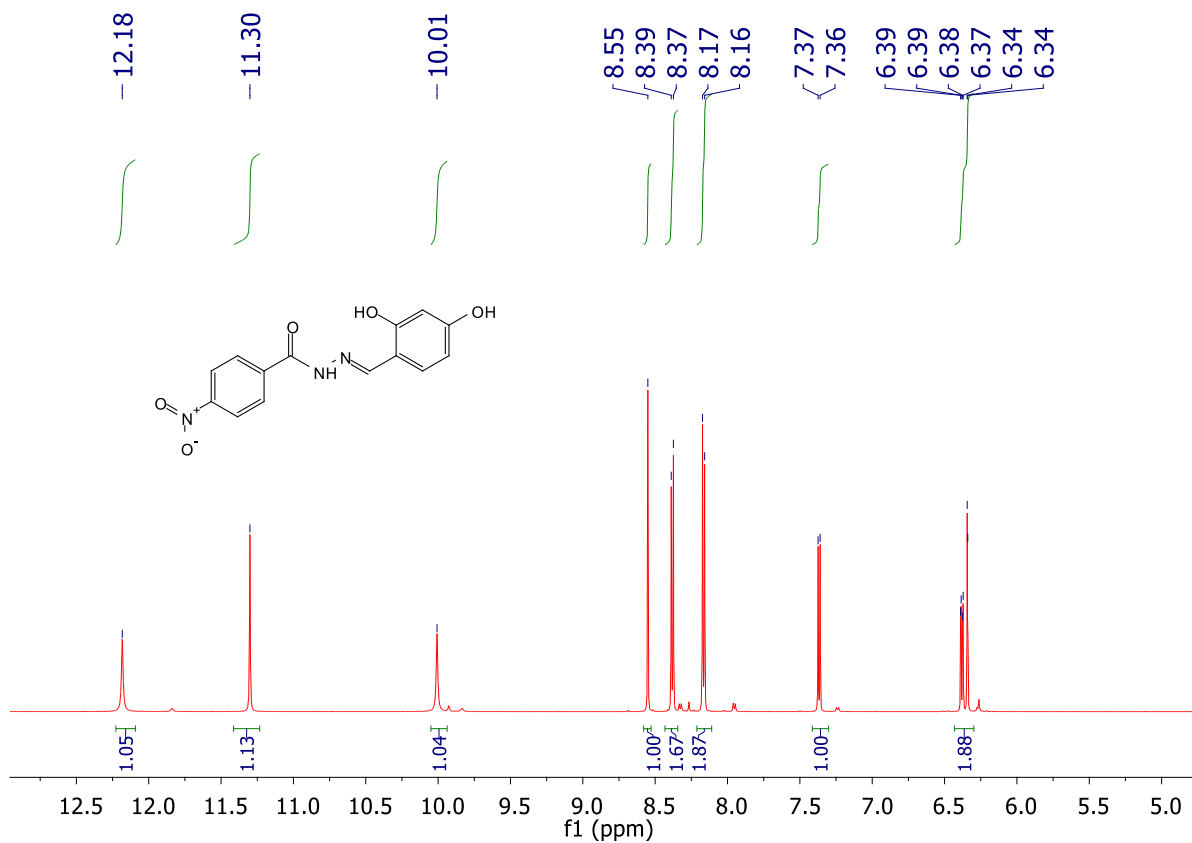
Widmo ^{13}C NMR (DMSO) (E)-N'-(2,4-dihydroksybenzylideno)-4-aminobenzohydrazidu.



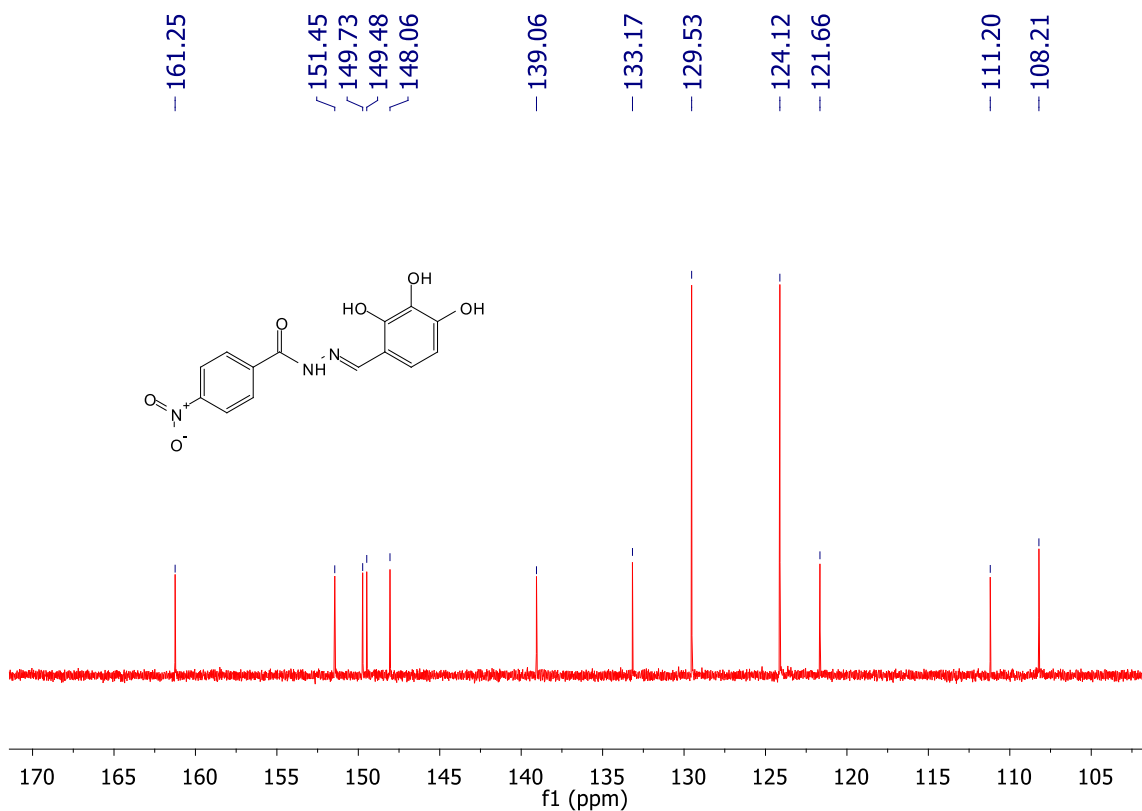
Widmo ^1H NMR (DMSO) (E)-N'-(2,4,3-trihydroksybenzylideno)-4-aminobenzohydrazidu.



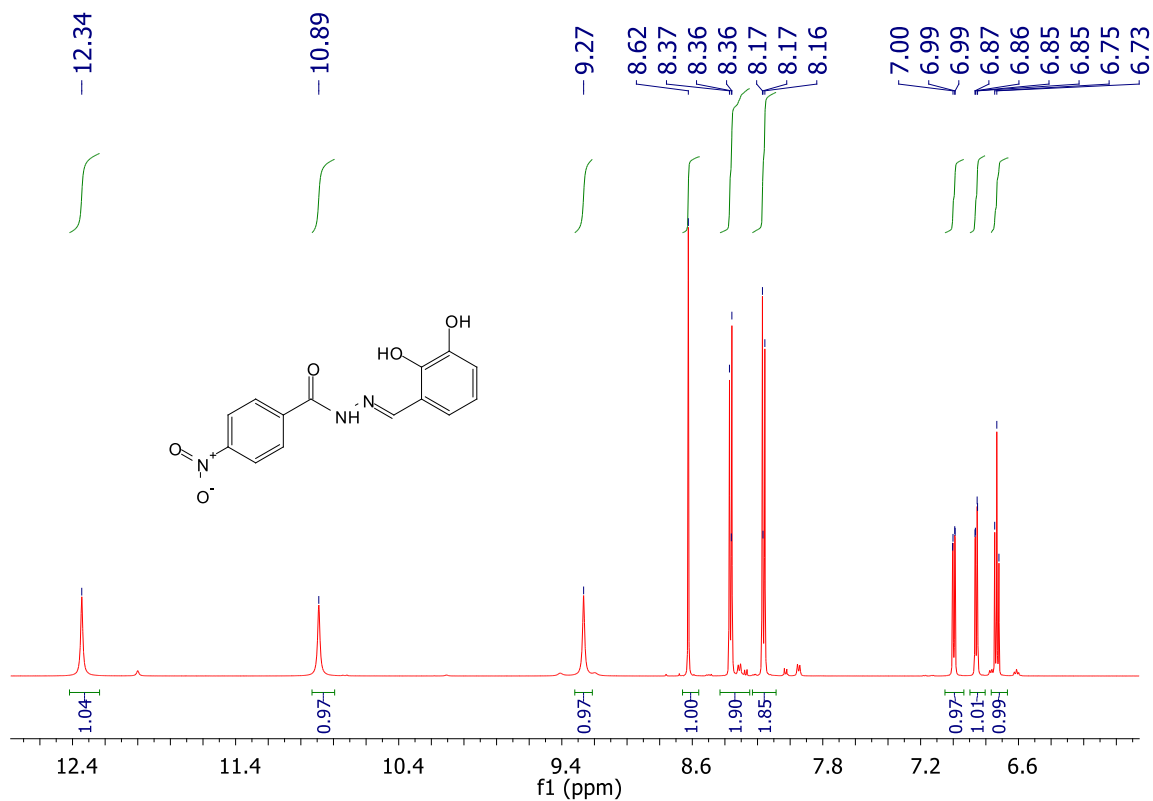
Widmo ^{13}C NMR (DMSO) (E)-N'-(2,4,3-trihydroksybenzylideno)-4-aminobenzohydrazidu.



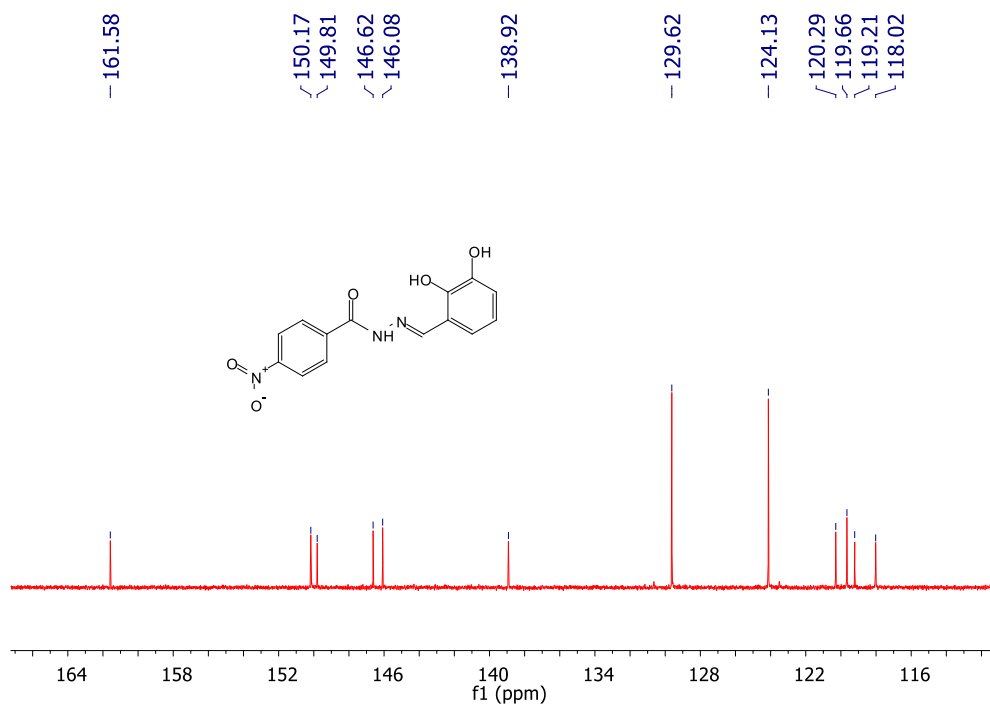
Widmo ^1H NMR (DMSO) (E)-N'-(2,4-dihydroksybenzylideno)-4-aminobenzohydrazidu.



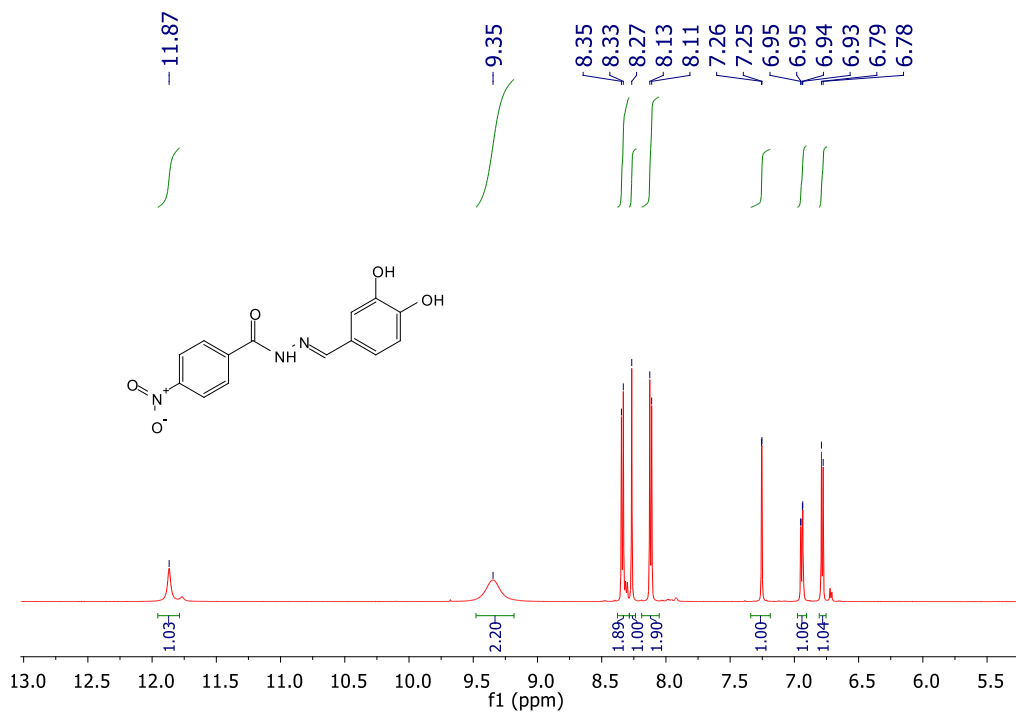
Widmo ^{13}C NMR (DMSO) (E)-N'-(2,4-dihydroksybenzylideno)-4-aminobenzohydrazidu.



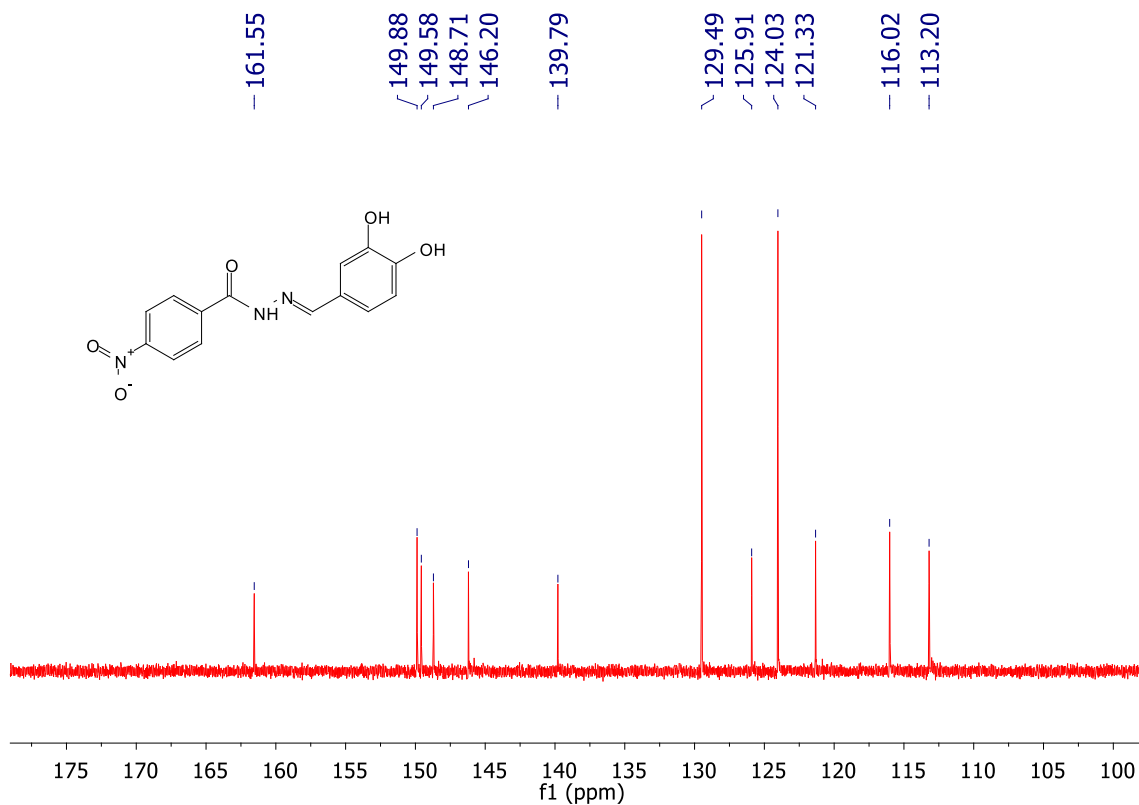
Widmo $^1\text{H NMR}$ (DMSO) (E)-N'-(2,3-dihydroksybenzylideno)-4-aminobenzohydrazidu.



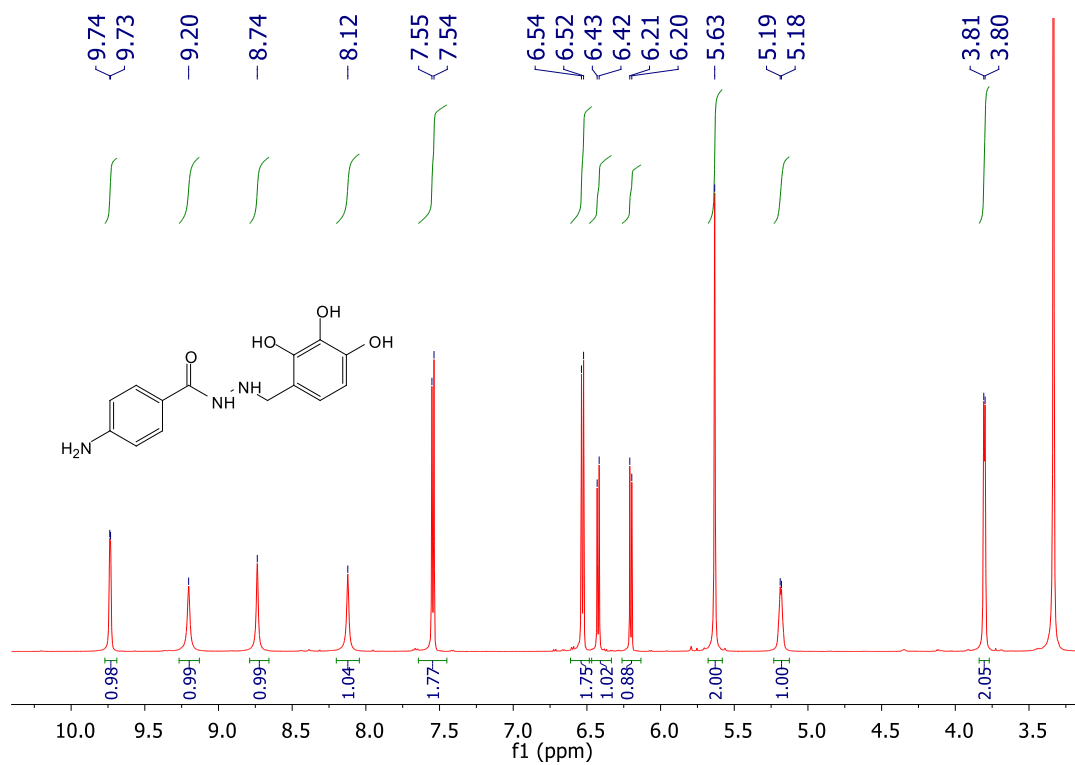
Widmo $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO) (E)-N'-(2,3-dihydroksybenzylideno)-4-aminobenzohydrazidu.



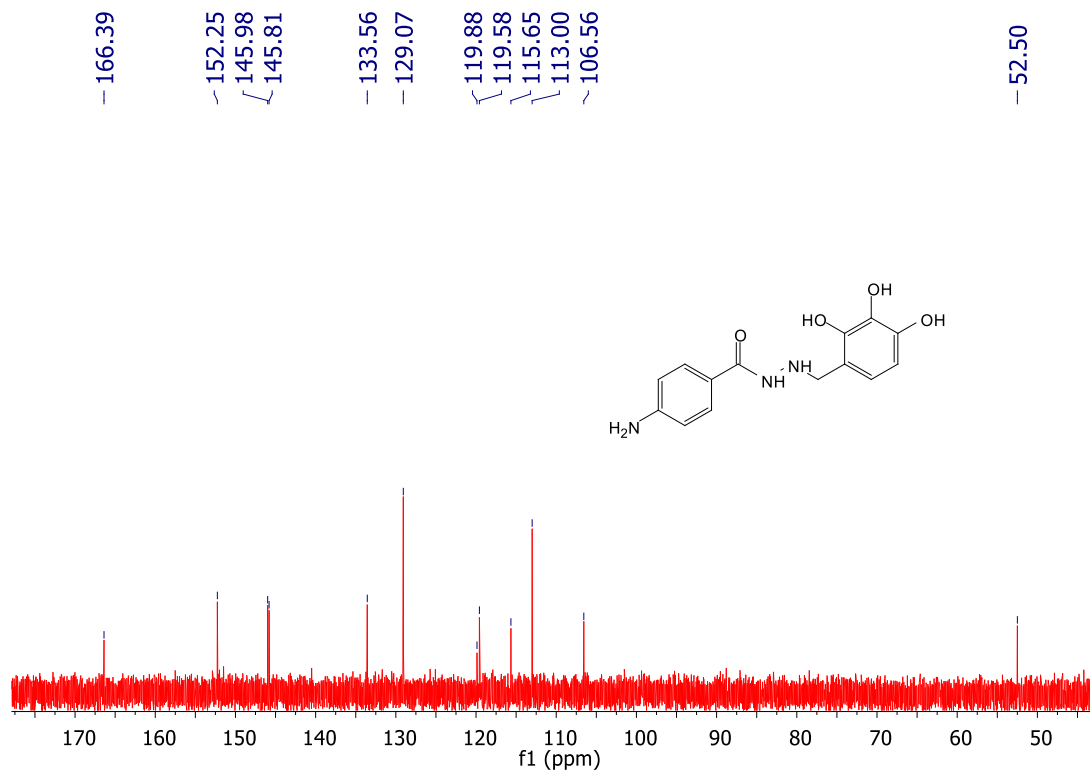
Widmo ^1H NMR (DMSO) (E)-N'-(3,4-dihydroksybenzylideno)-4-aminobenzohydrazidu.



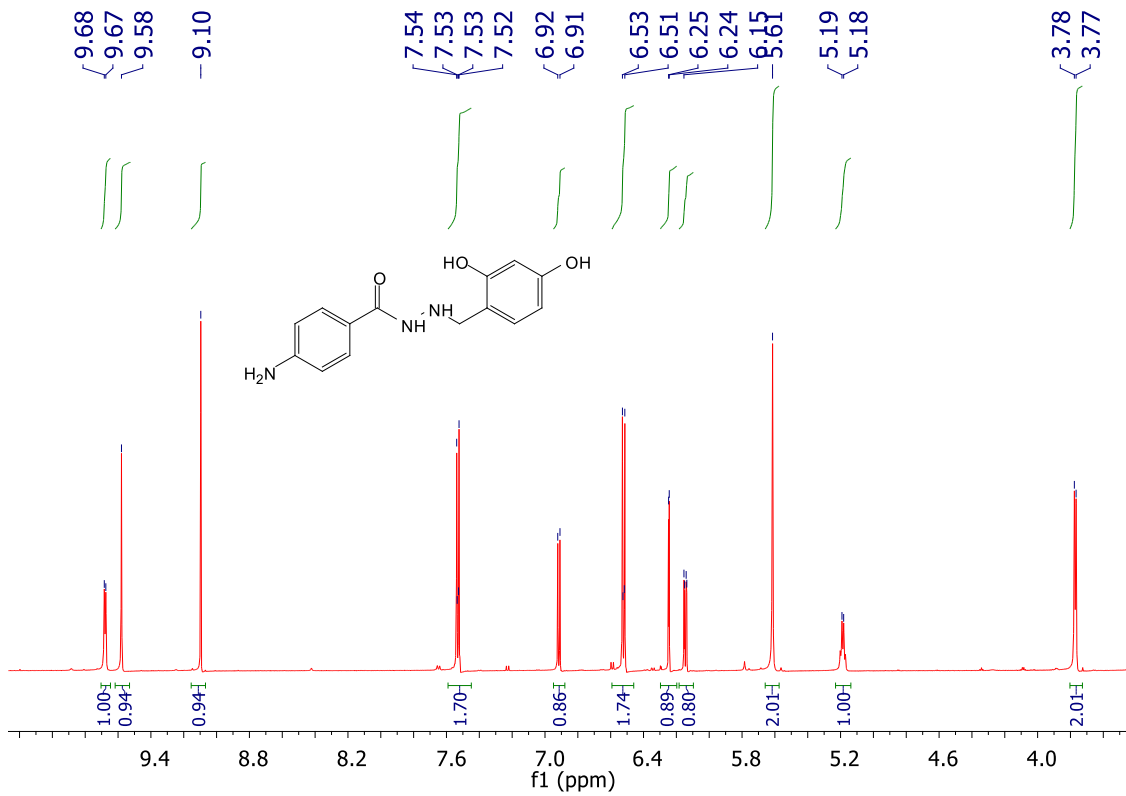
Widmo ^{13}C NMR (DMSO) (E)-N'-(3,4-dihydroksybenzylideno)-4-aminobenzohydrazidu.



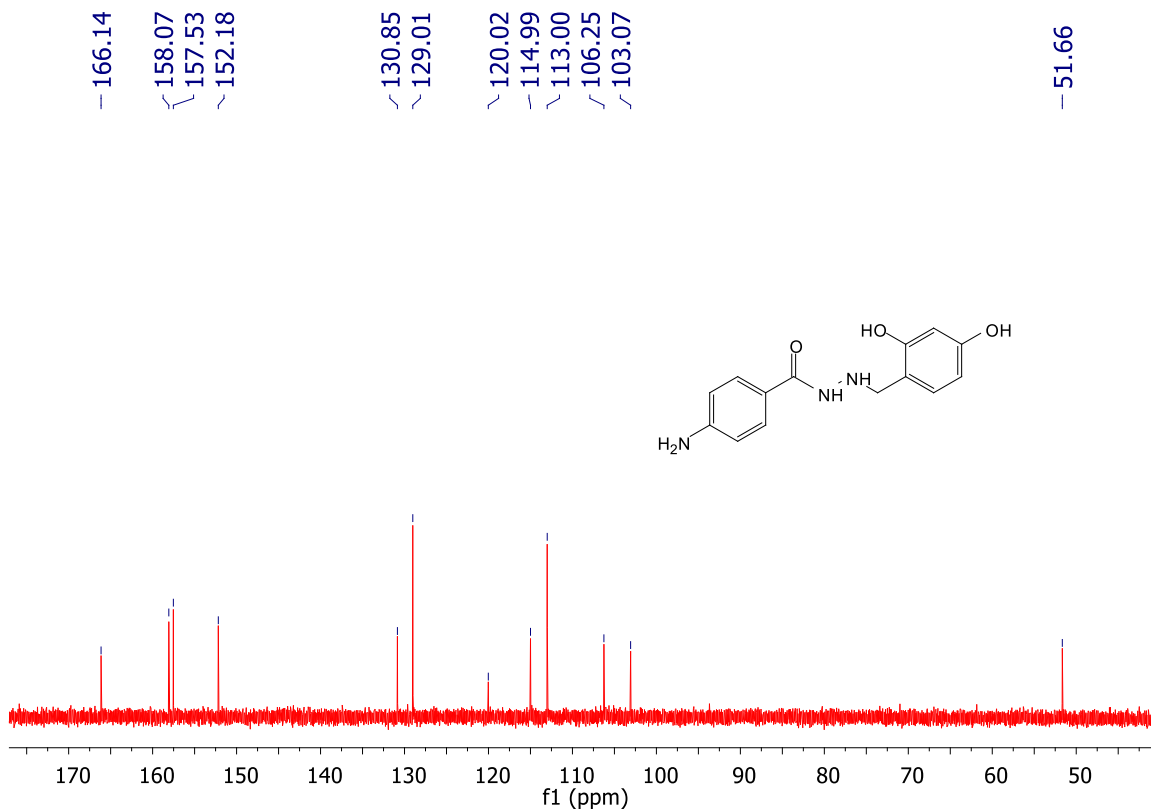
Widmo ^1H NMR (DMSO) N'-(2,3,4-trihydroksybenzyl)-4-aminobenzohydrazidu.



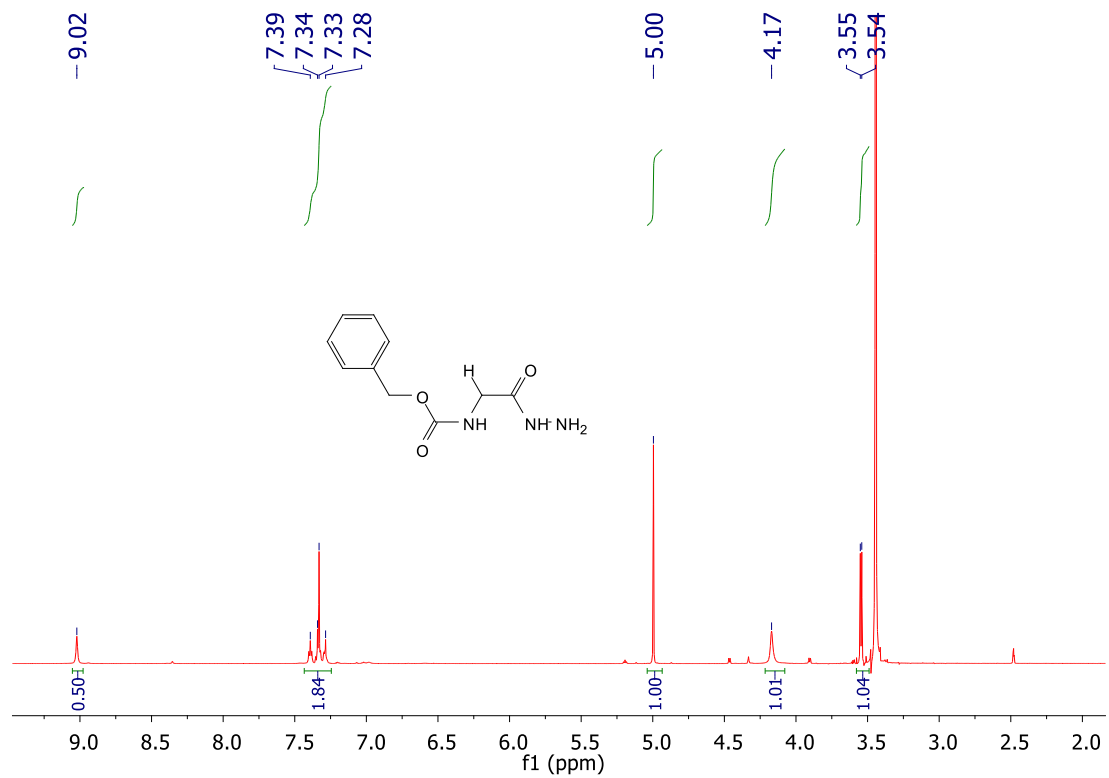
Widmo ^{13}C NMR (DMSO) N'-(2,3,4-trihydroksybenzyl)-4-aminobenzohydrazidu.



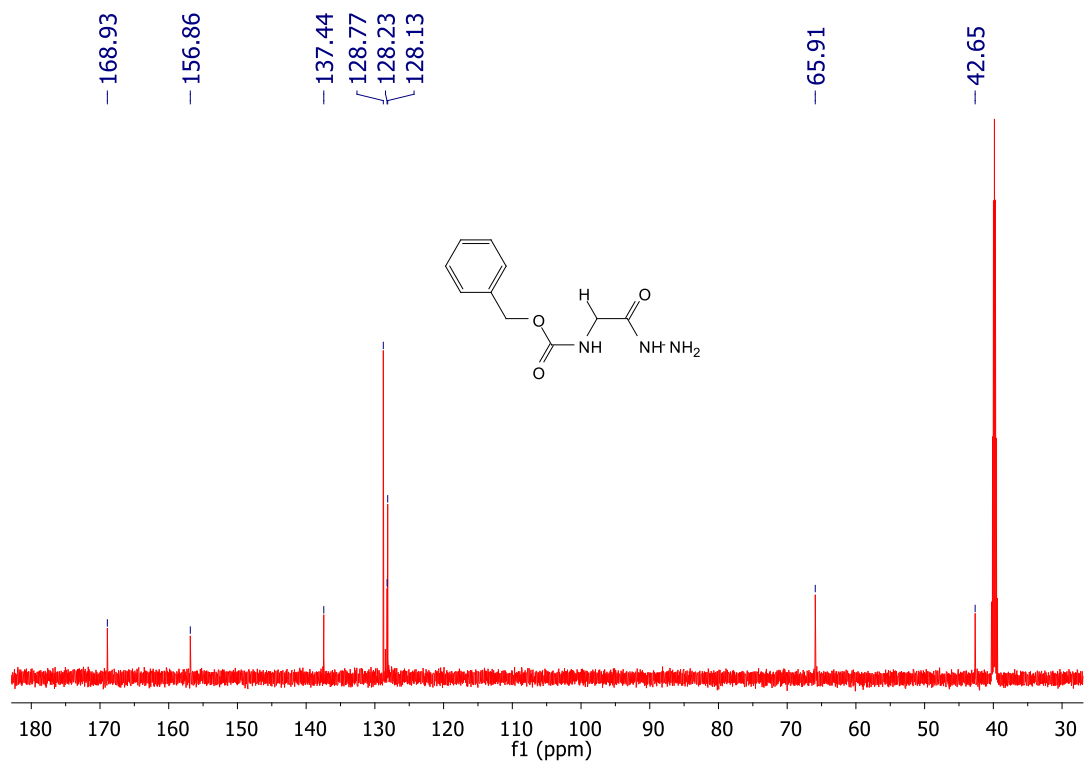
Widmo ^1H NMR (DMSO) N'-(2,4-dihydroksybenzyl)-4-aminobenzohydrazidu.



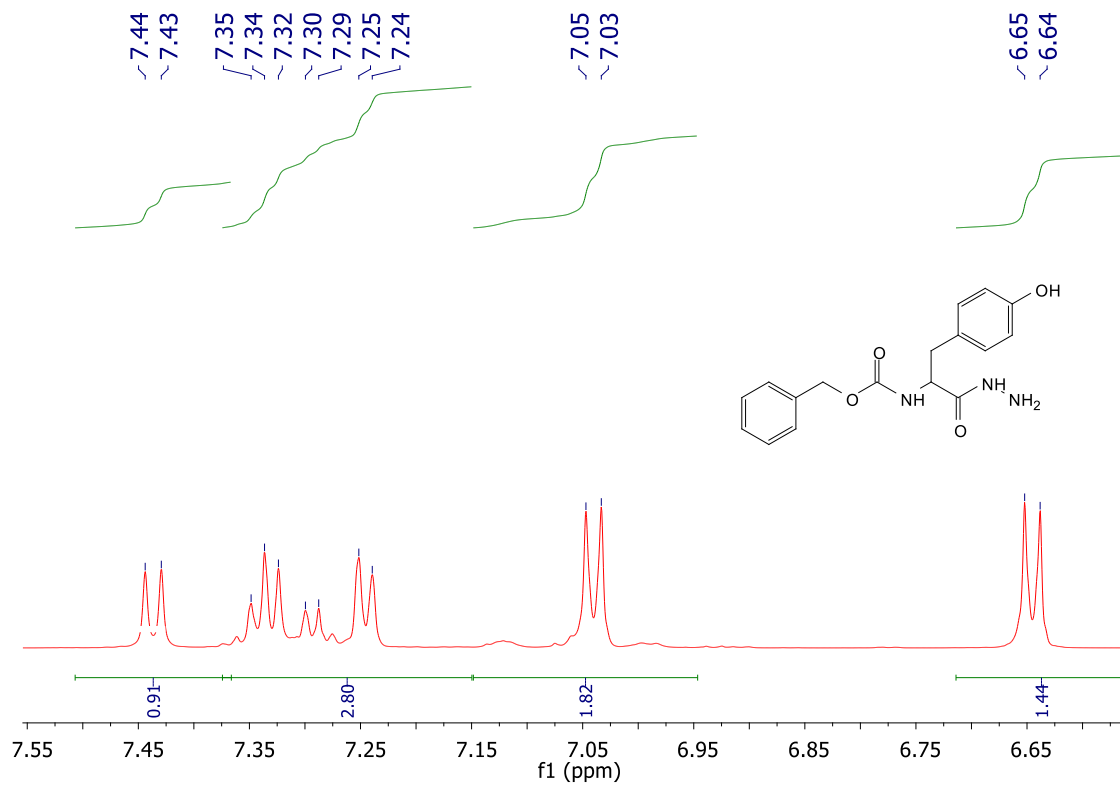
Widmo ^{13}C NMR (DMSO) N'-(2,4-dihydroksybenzyl)-4-aminobenzohydrazidu.



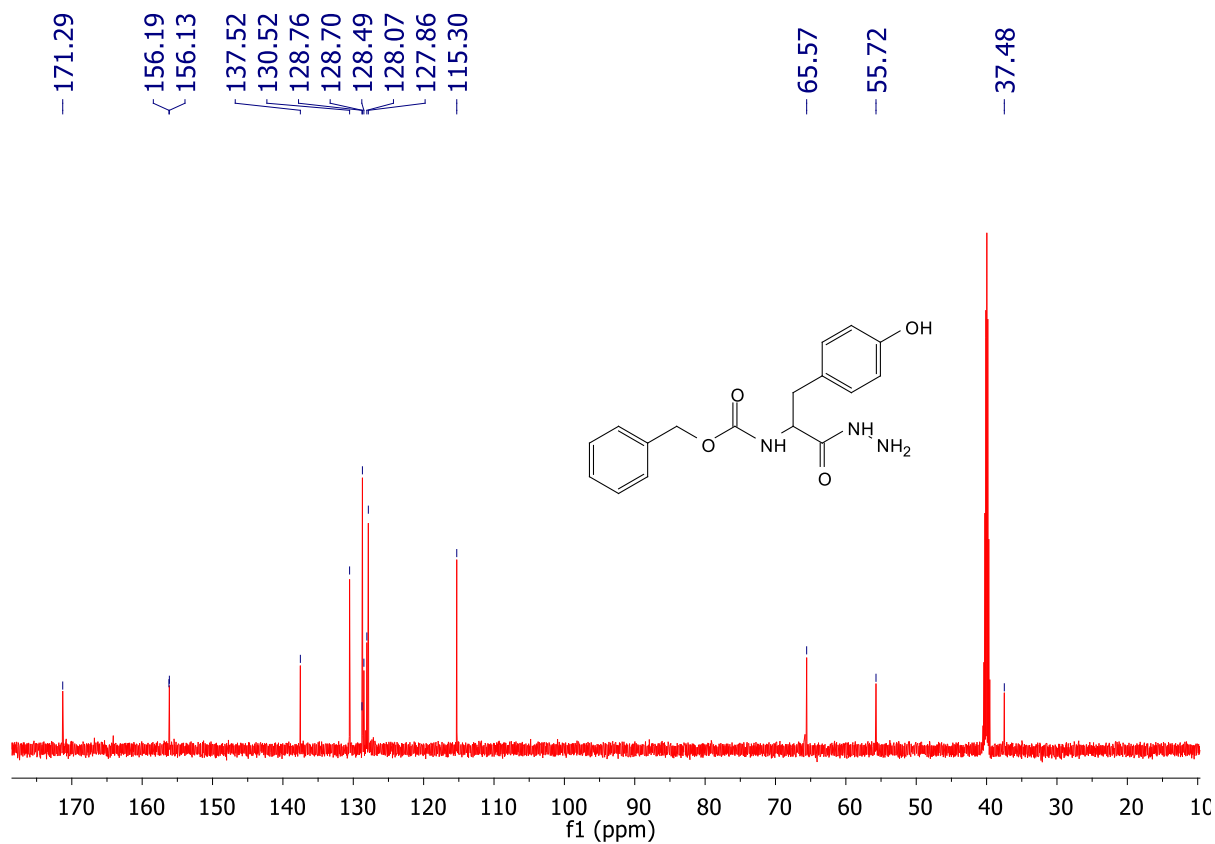
Widmo ^1H NMR (DMSO) hydrazydu N-benzyloksykarbonylo glicyny.



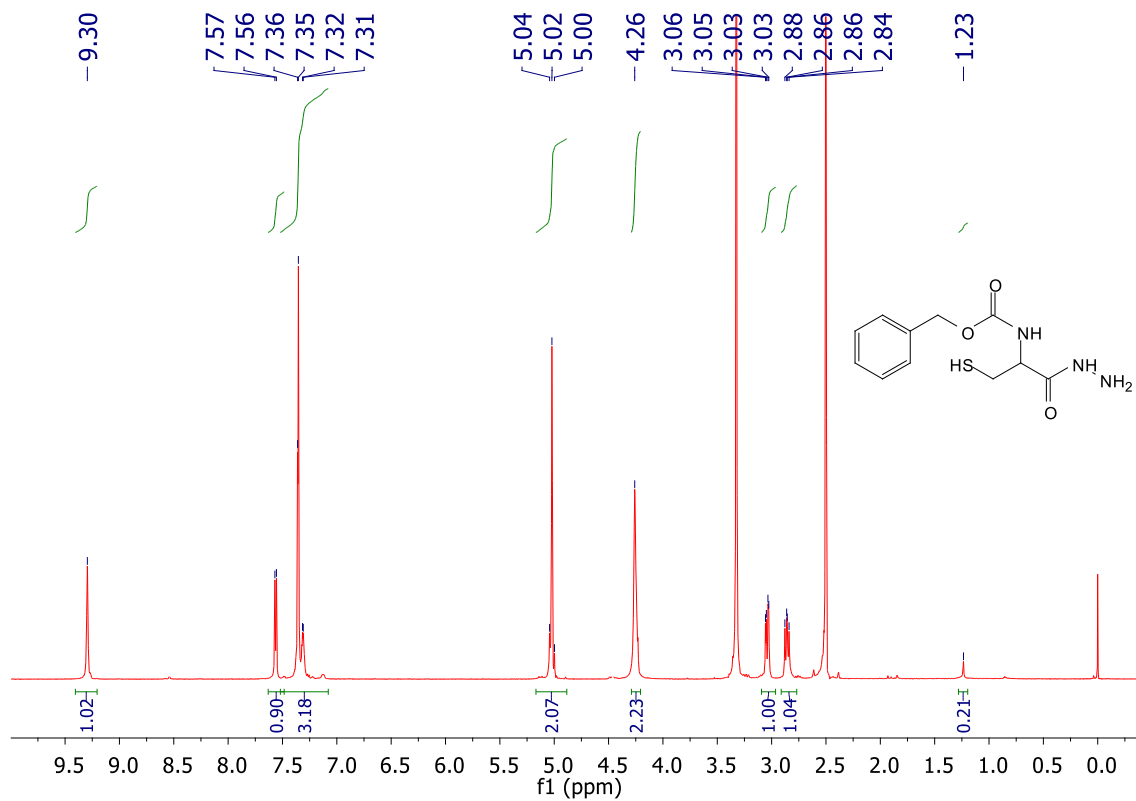
Widmo ^{13}C NMR (DMSO) hydrazydu N-benzyloksykarbonylo glicyny.



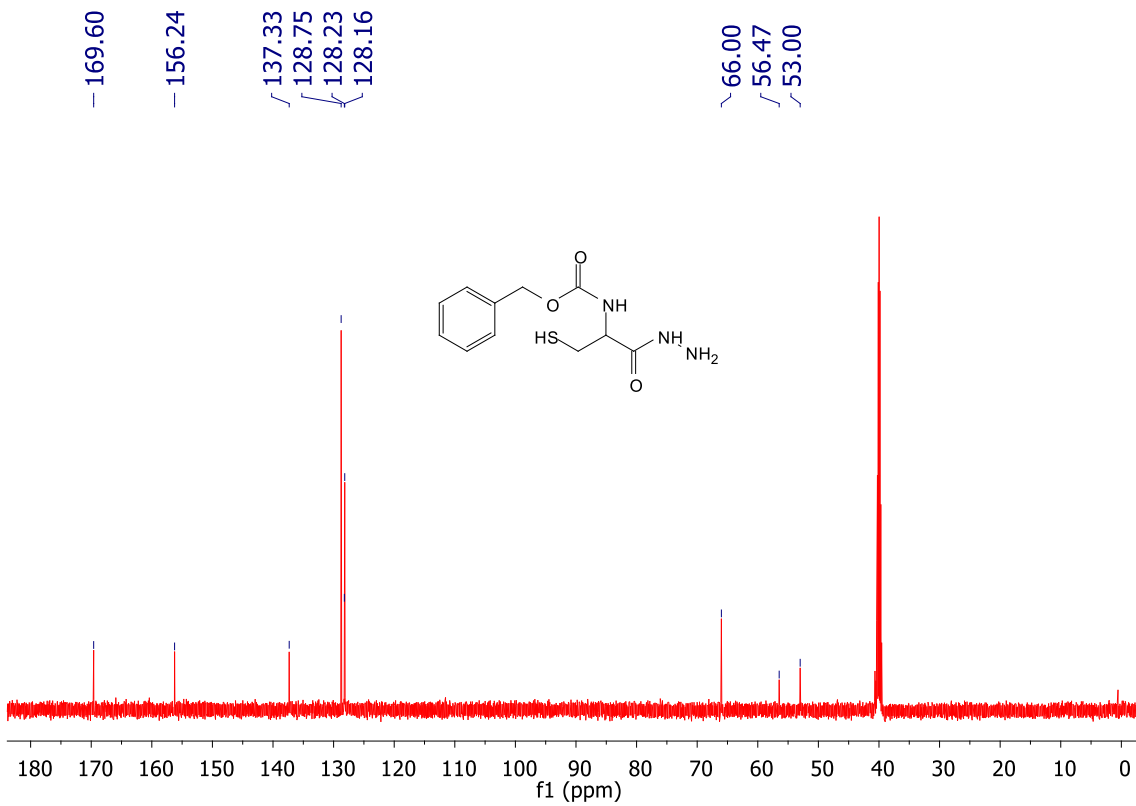
Widmo ¹H NMR (DMSO) hydrazynu N-benzyloksykarbonylo-L-tyrozyny.



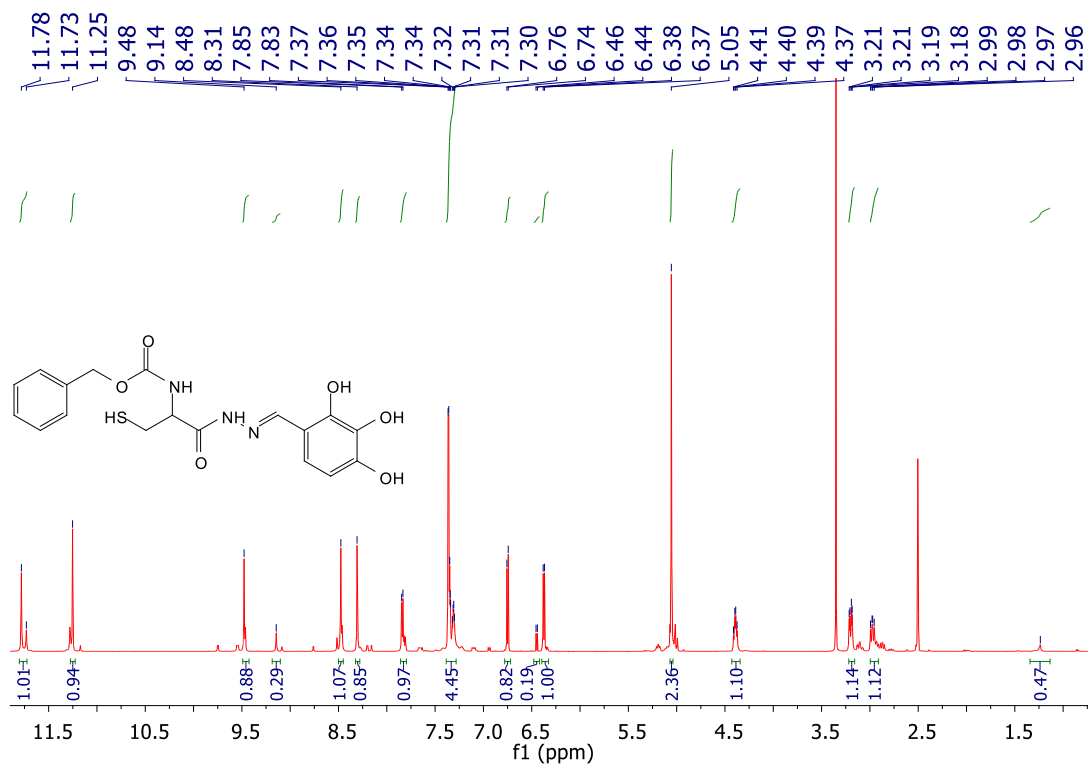
Widmo ¹³C NMR (DMSO) hydrazynu N-benzyloksykarbonylo-L-tyrozyny.



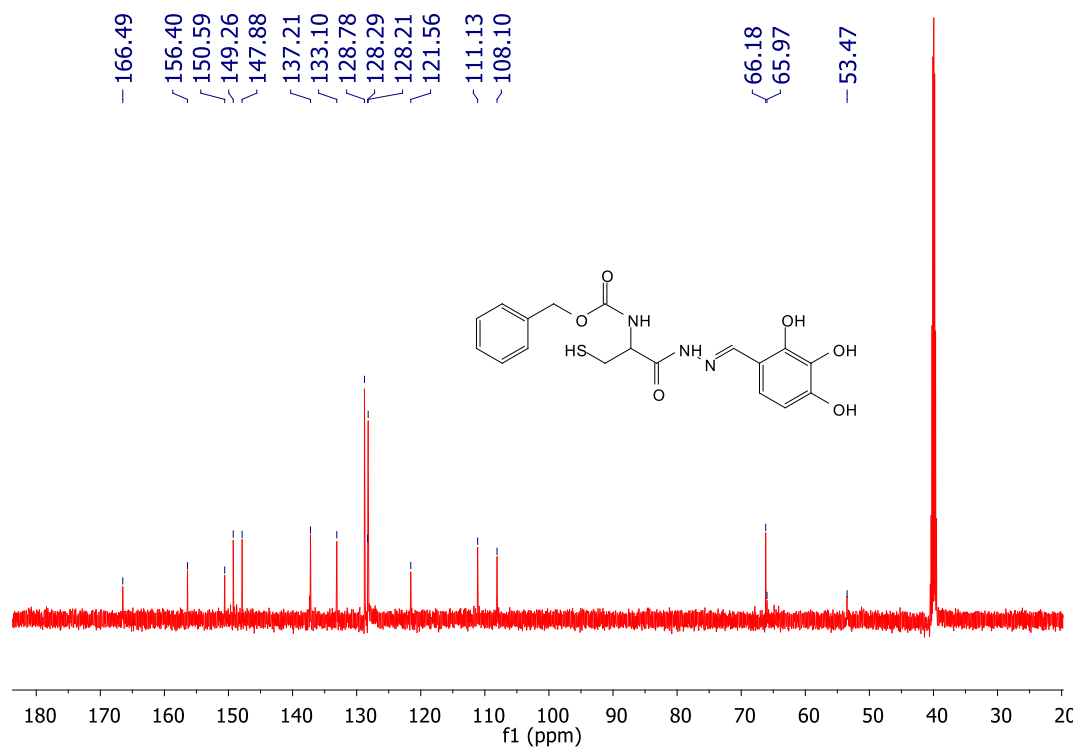
Widmo ^1H NMR (DMSO) hydrazynu N-benzyloksykarbonylo-L-cysteiny.



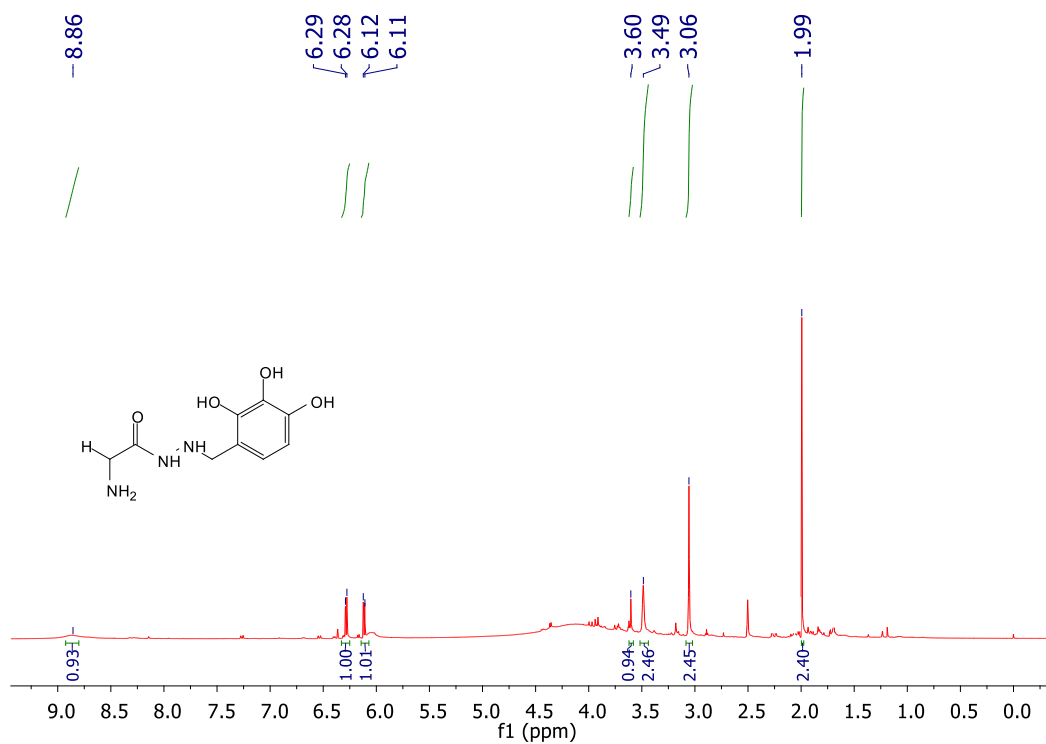
Widmo ^{13}C NMR (DMSO) hydrazynu N-benzyloksykarbonylo-L-cysteiny.



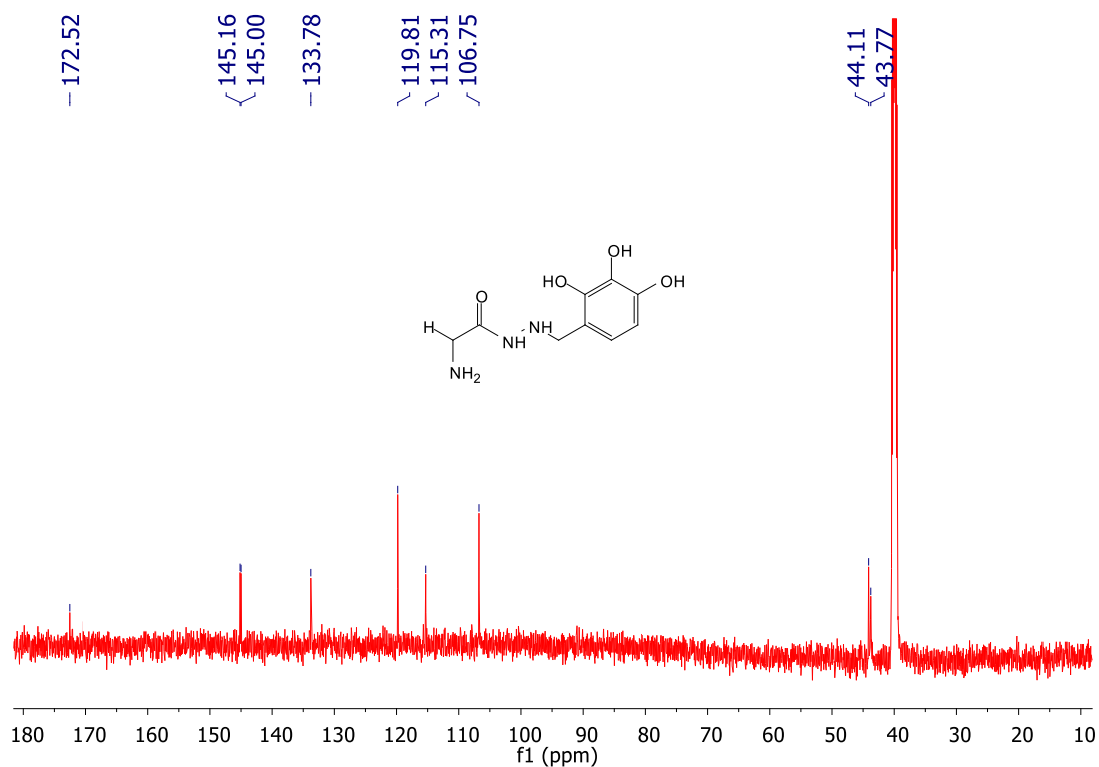
Widmo ^1H NMR (DMSO) (E)-benzyl(3-merkapto-1-okso-1-(2-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)hydrazynylo)propan-2-yl)karbaminianu.



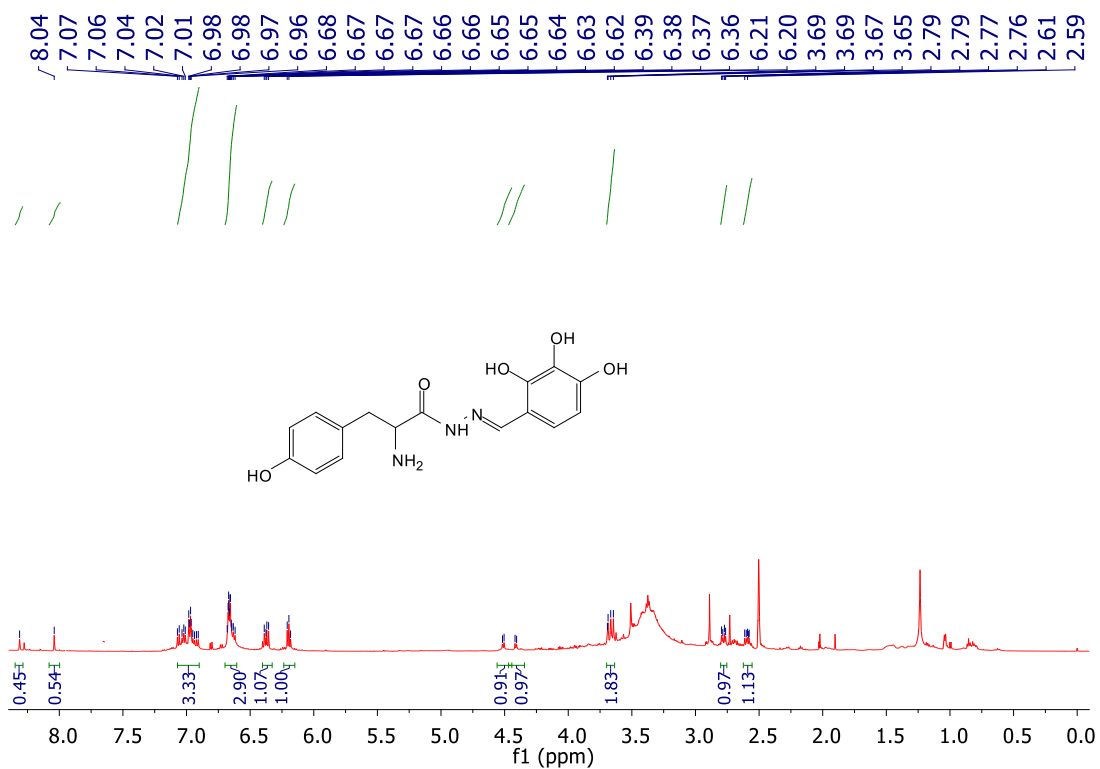
Widmo ^{13}C NMR (DMSO) (E)-benzyl(3-merkapto-1-okso-1-(2-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)hydrazynylo)propan-2-yl)karbaminianu.



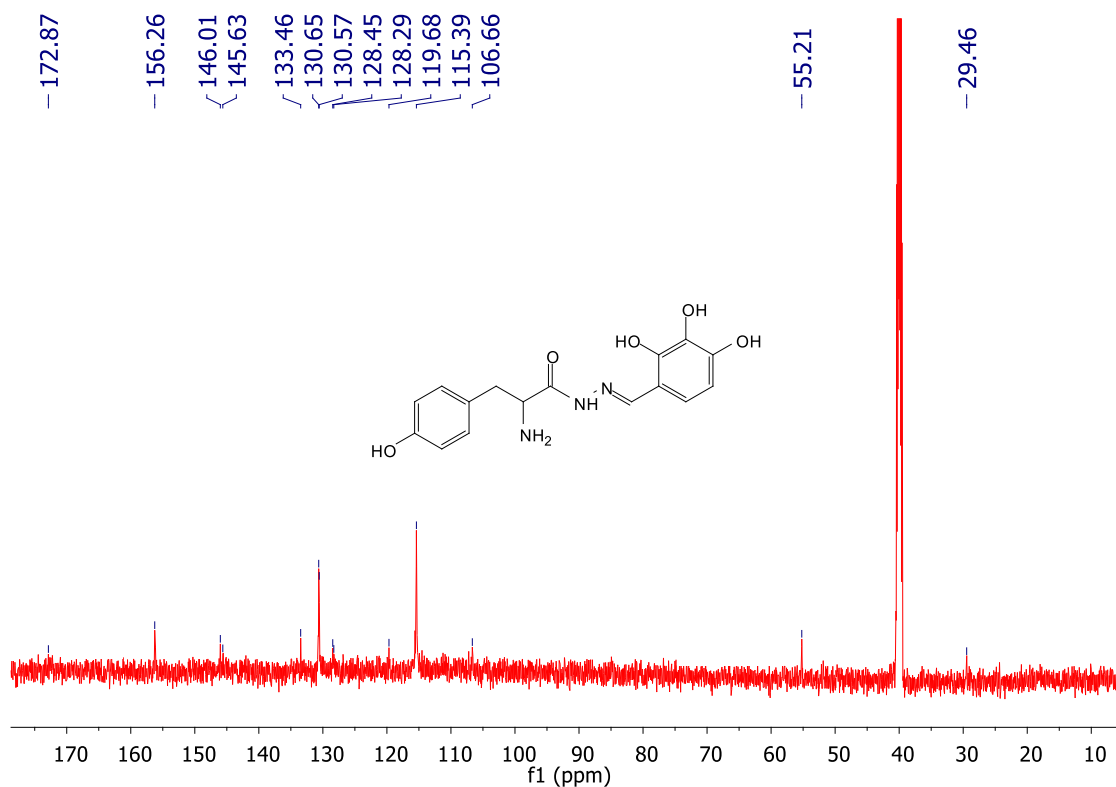
Widmo ¹H NMR (DMSO) 2-amino-N'-(2,3,4-trihydroksybenzyl)acetohydrazidu.



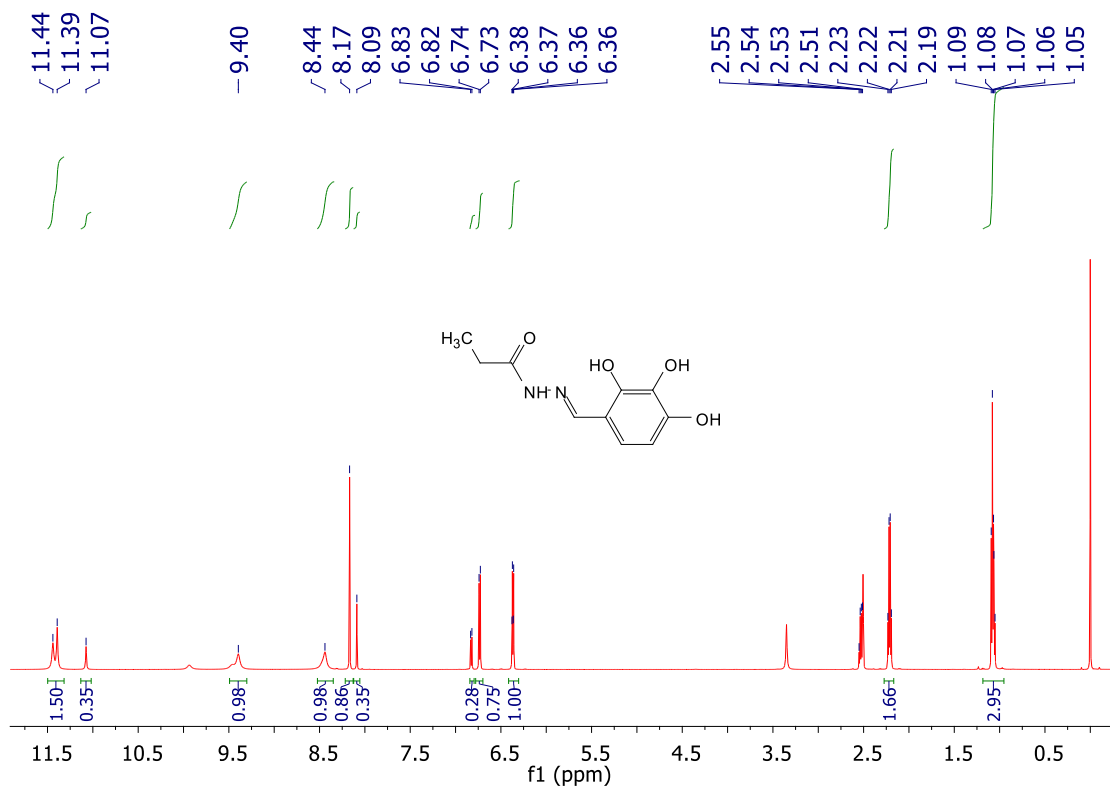
Widmo ¹³C NMR (DMSO) 2-amino-N'-(2,3,4-trihydroksybenzyl)acetohydrazidu.



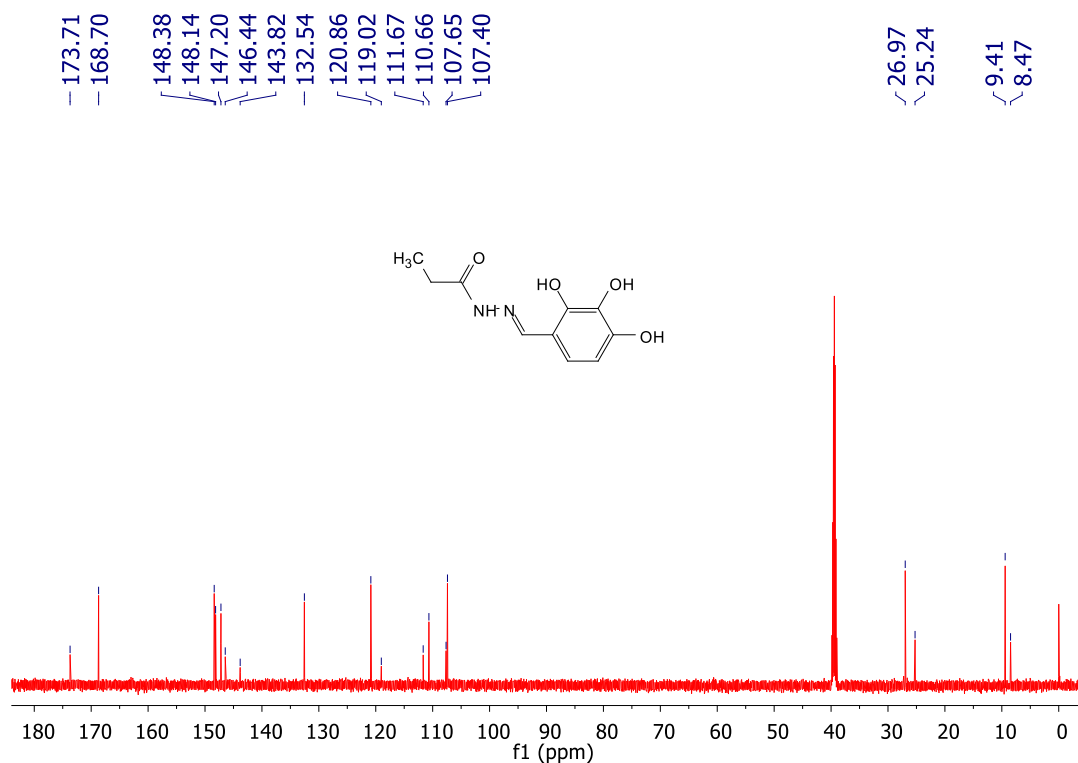
Widmo ¹H NMR (DMSO) (E)-2-amino-3-(4-hydroksyfenylo)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)propanohydrazidu.



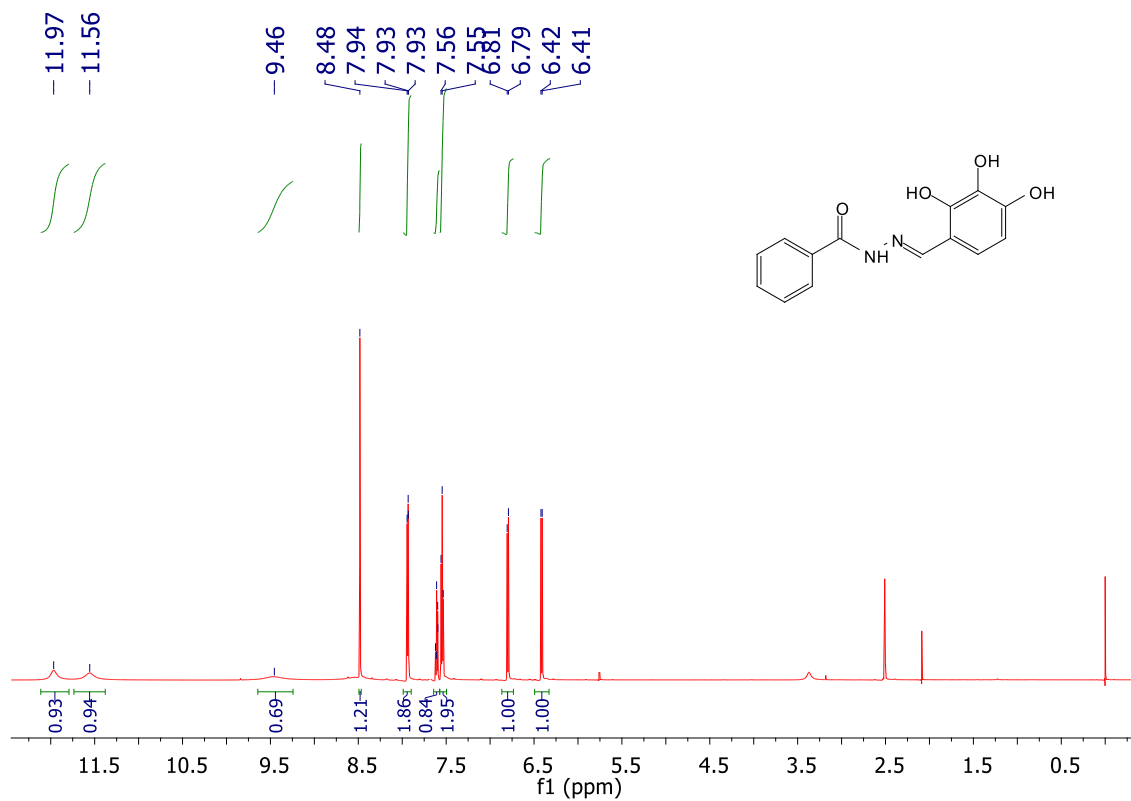
Widmo ¹³C NMR (DMSO) (E)-2-amino-3-(4-hydroksyfenylo)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)propanohydrazidu.



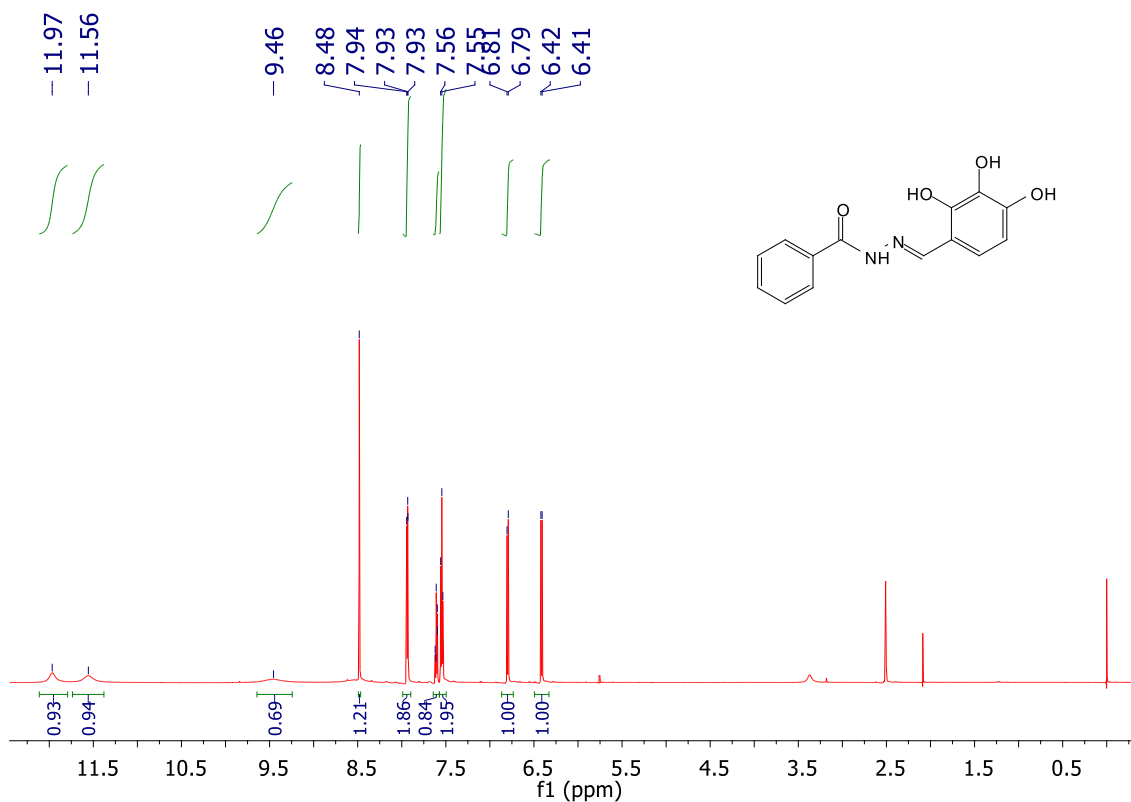
Widmo ¹H NMR (DMSO) (E)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)propionohydrazidu.



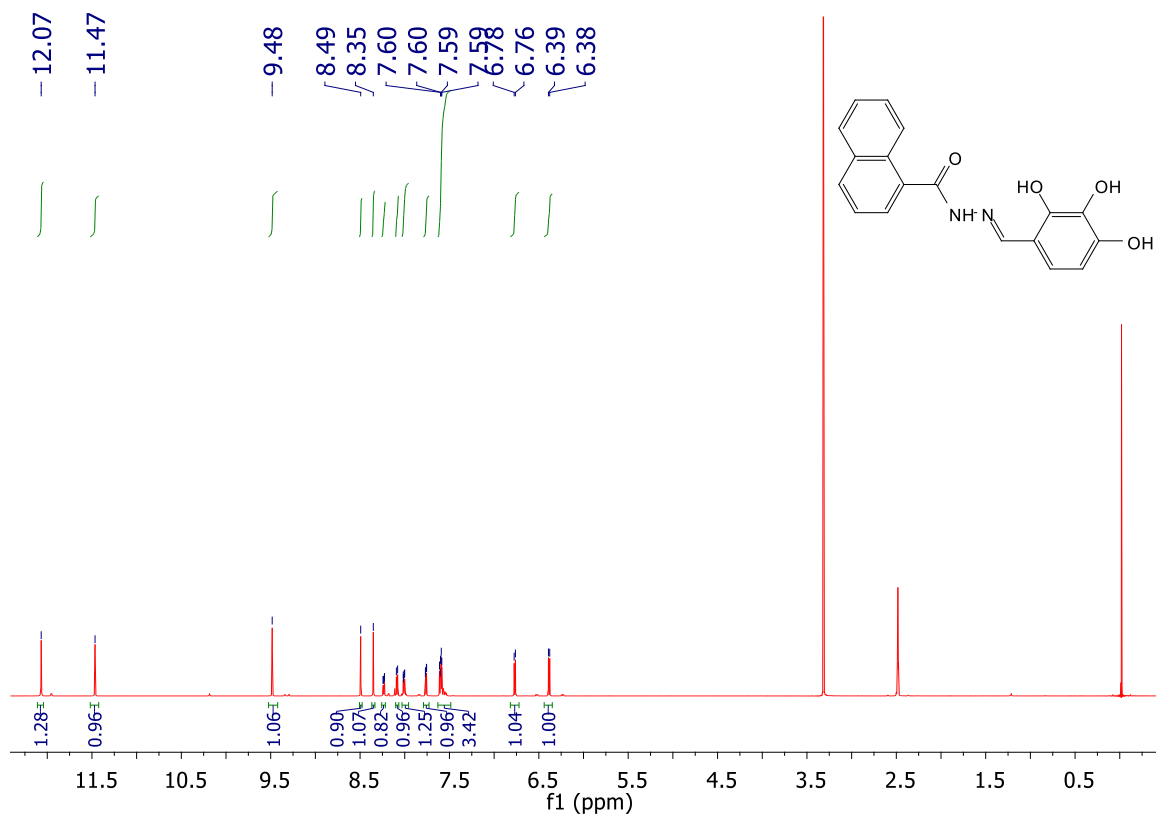
Widmo ¹³C NMR (DMSO) (E)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)propionohydrazidu.



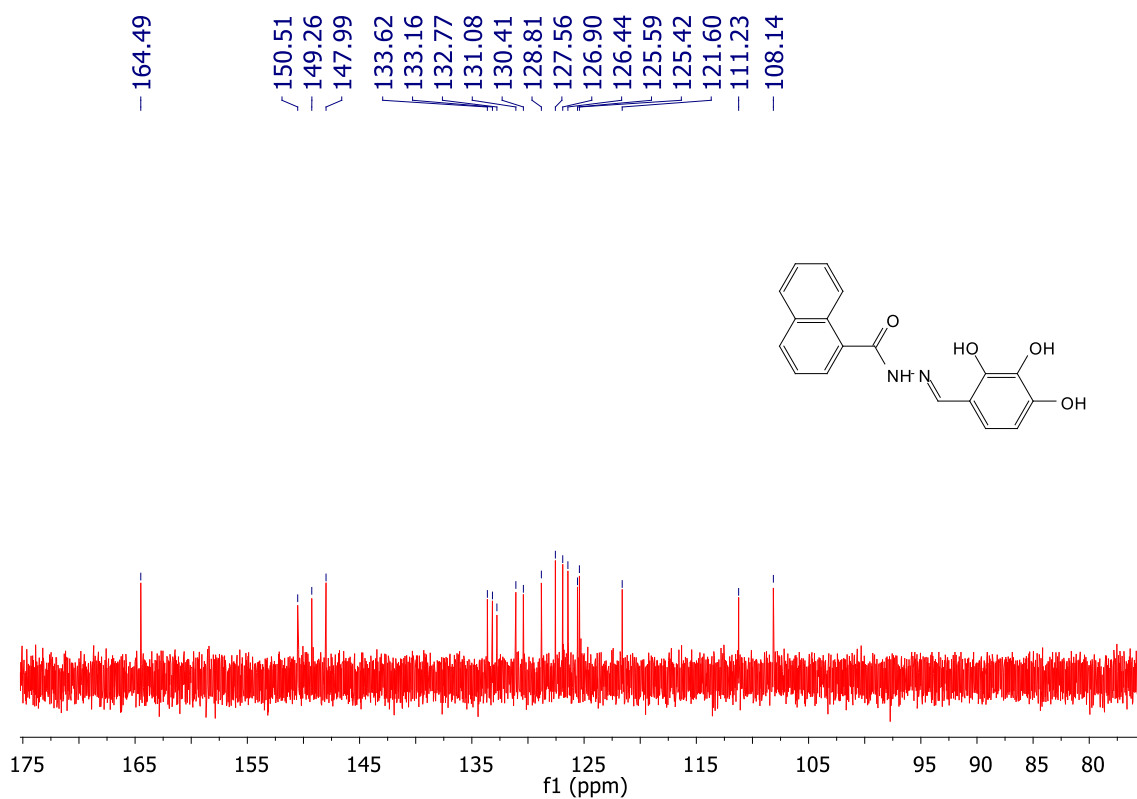
Widmo ^1H NMR (DMSO) (E)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazidu.



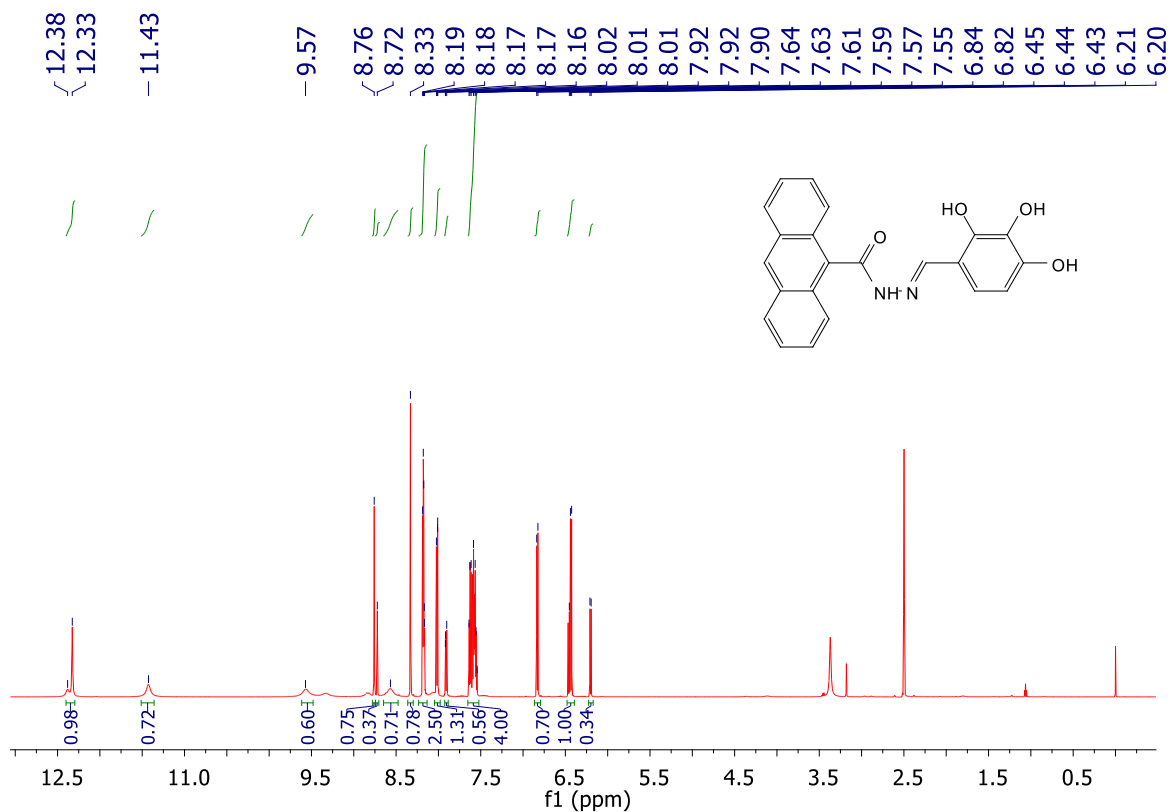
Widmo ^{13}C NMR (DMSO) (E)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazidu.



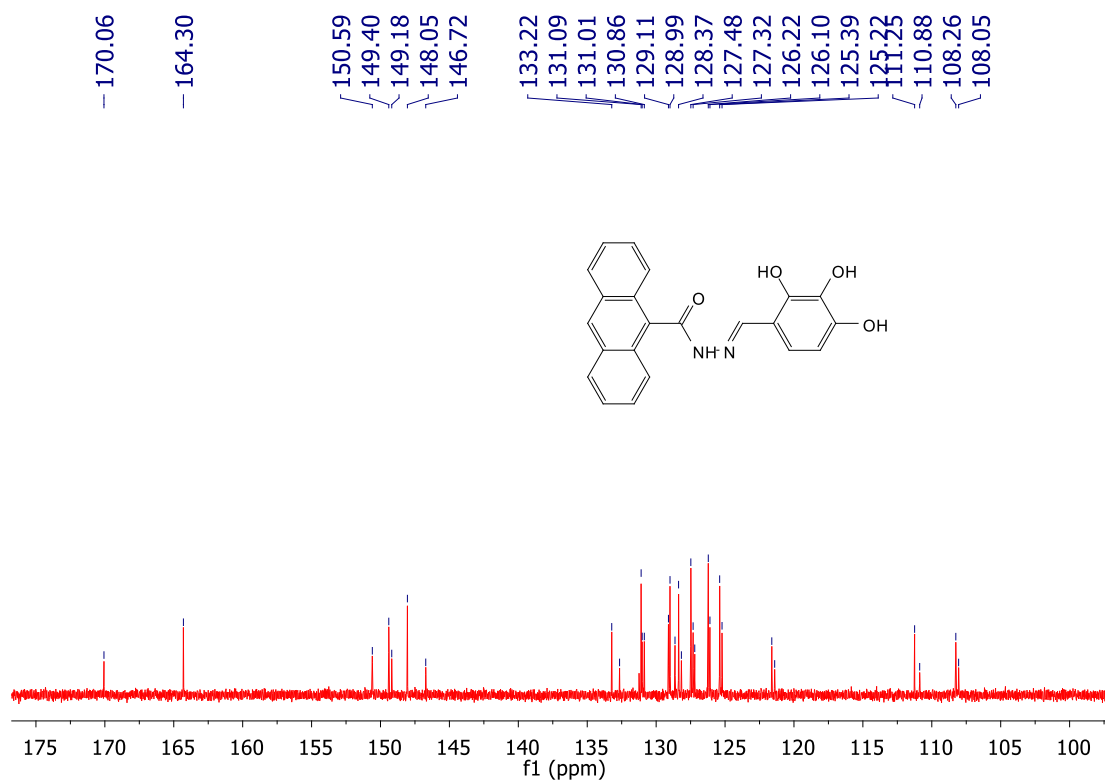
Widmo ^1H NMR (DMSO) (E)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)-1-naftohydrazidu.



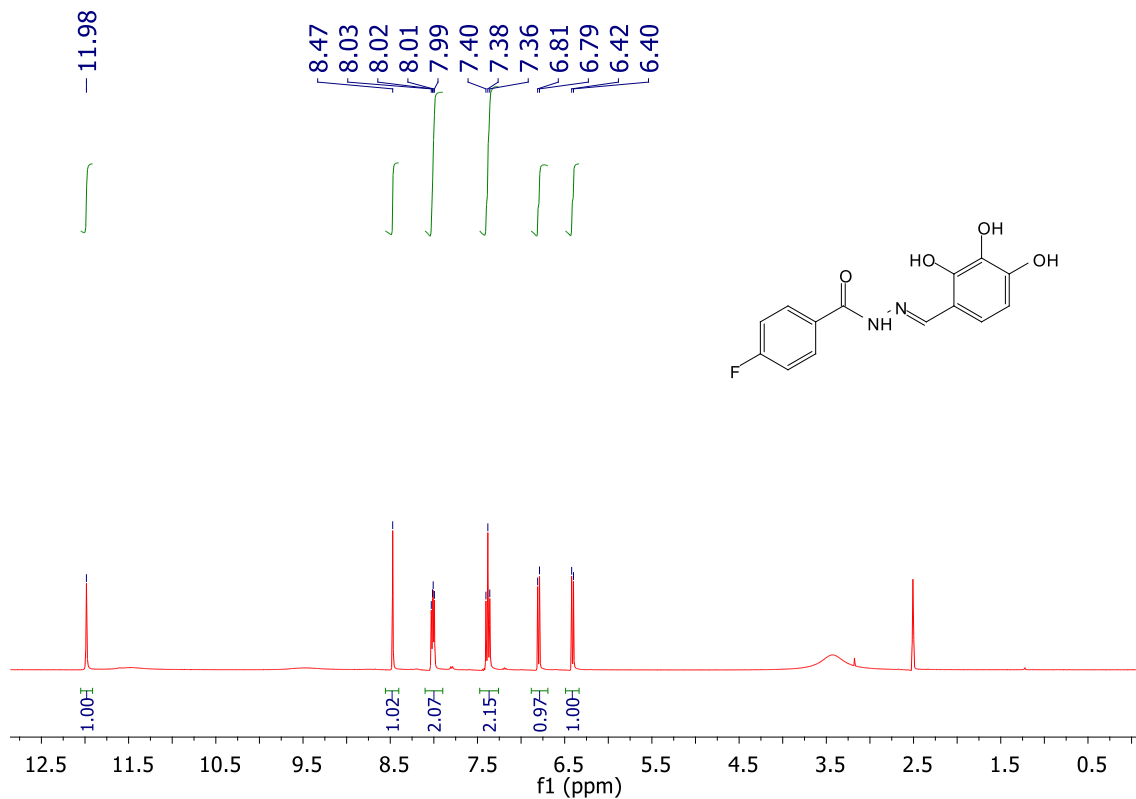
Widmo ^{13}C NMR (DMSO) (E)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)-1-naftohydrazidu.



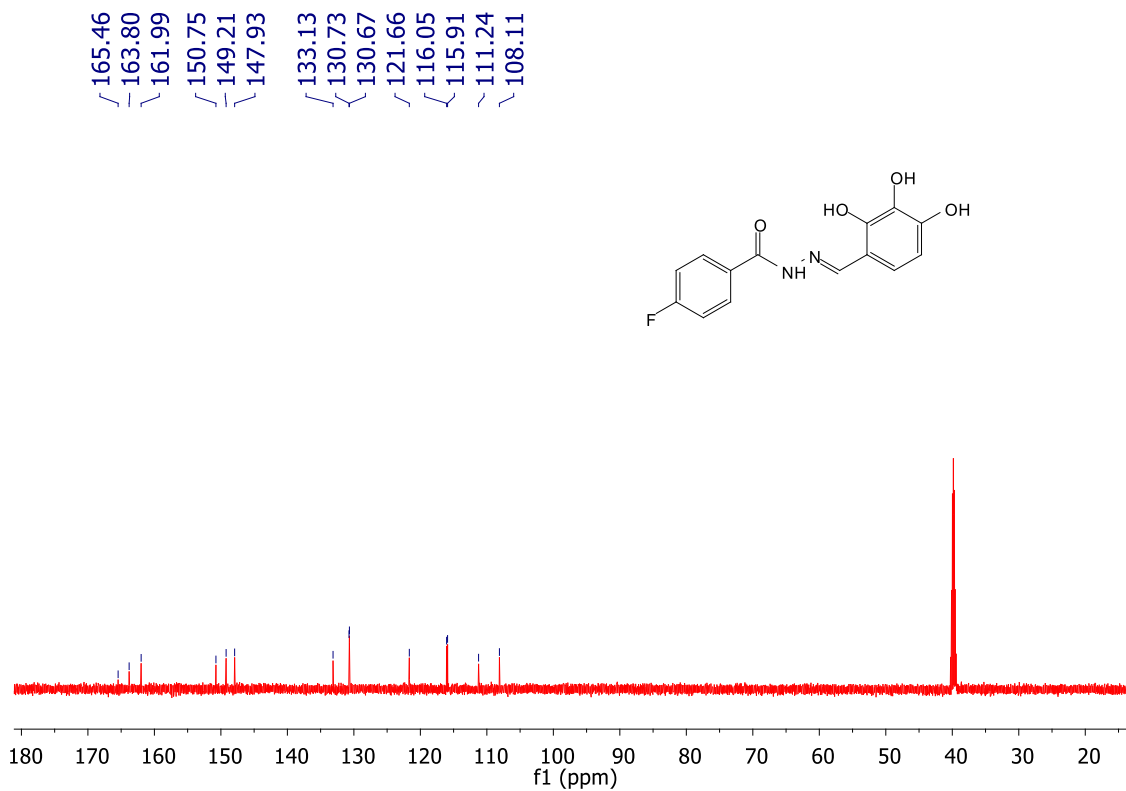
Widmo ^1H NMR (DMSO) (E)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)antraceno-9-karbohydrazidu.



Widmo ^{13}C NMR (DMSO) (E)-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)antraceno-9-karbohydrazidu.

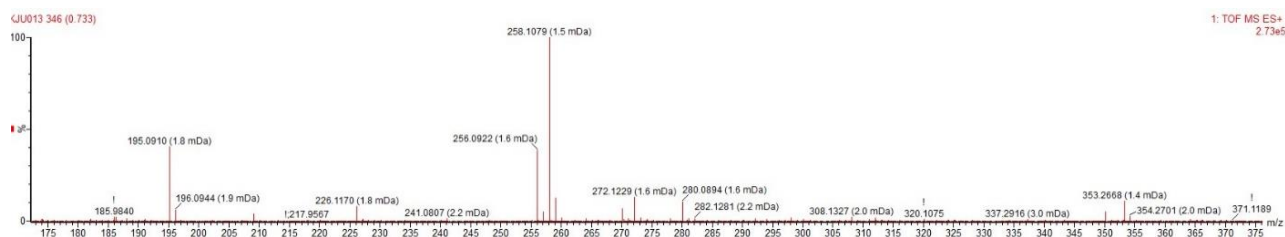


Widmo ^1H NMR (DMSO) (E)-4-fluoro-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazidu.

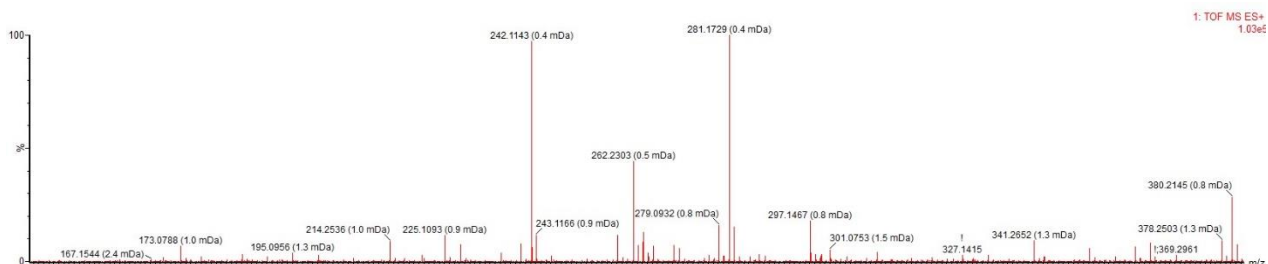


Widmo ^{13}C NMR (DMSO) (E)-4-fluoro-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazidu.

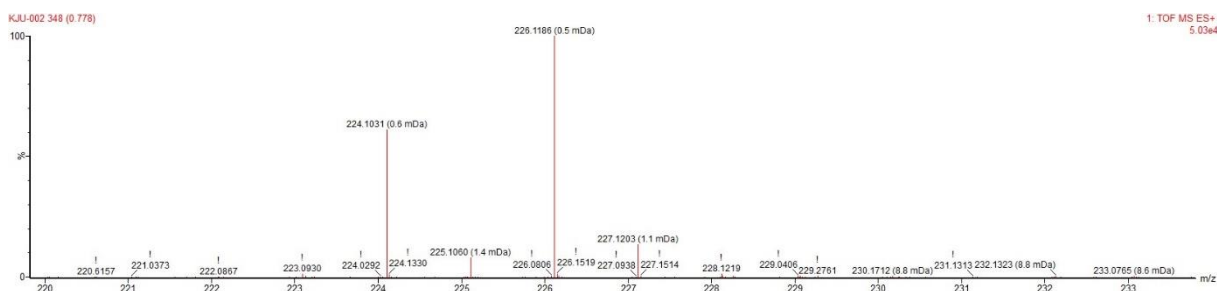
Widma masowe HRMS



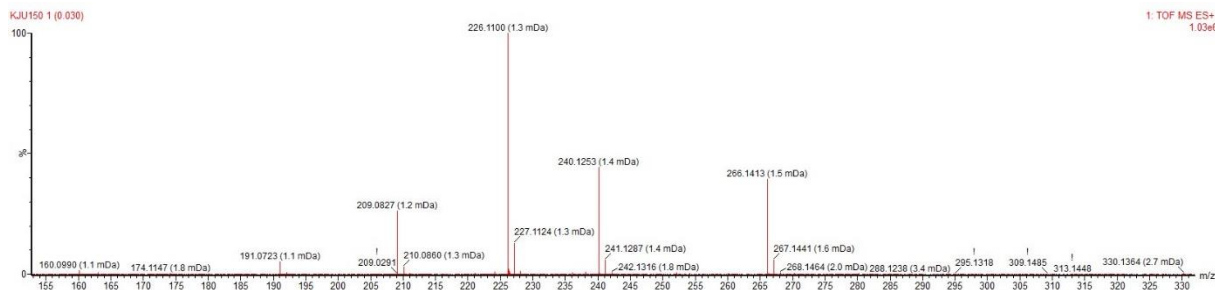
Widmo HRMS 2-(2,3,4-trihydroksybenzylo)hydrazynu L-seryny.



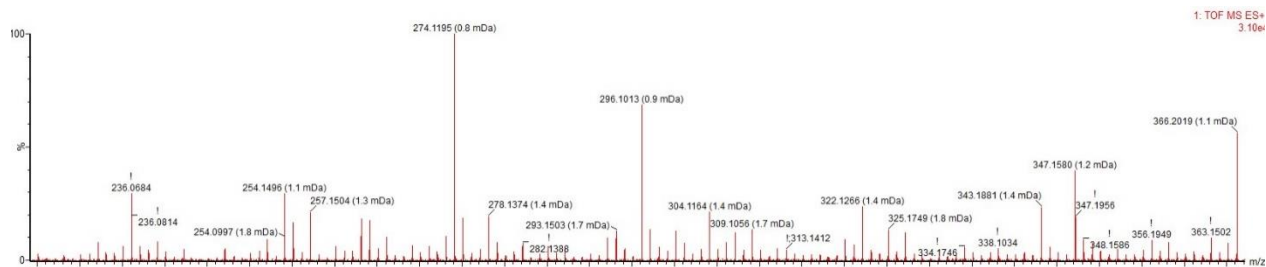
Widmo HRMS 2-(2,3-dihydroksybenzylo)hydrazynu L-seryny.



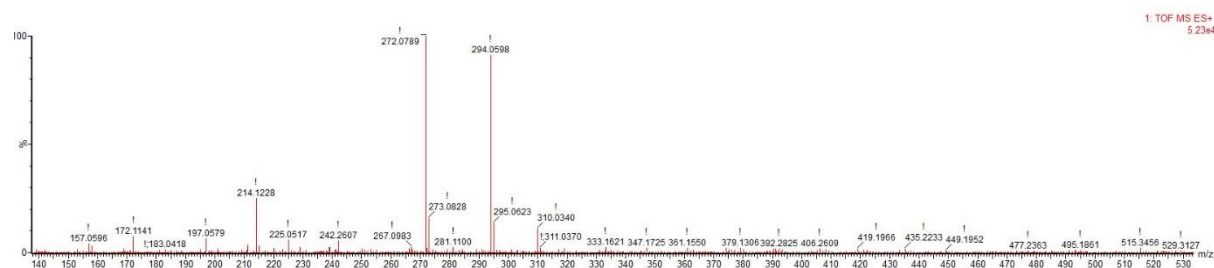
Widmo HRMS 2-(2-hydroksybenzylo)hydrazynu L-seryny.



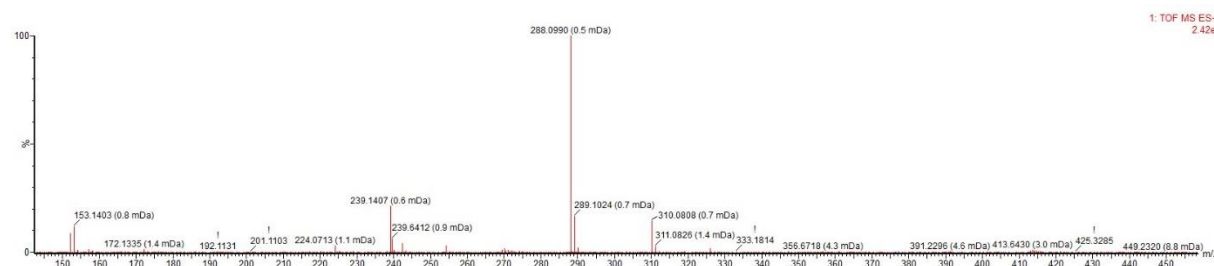
Widmo HRMS 2-(2-hydroksybenzylo)hydrazynu L-seryny.



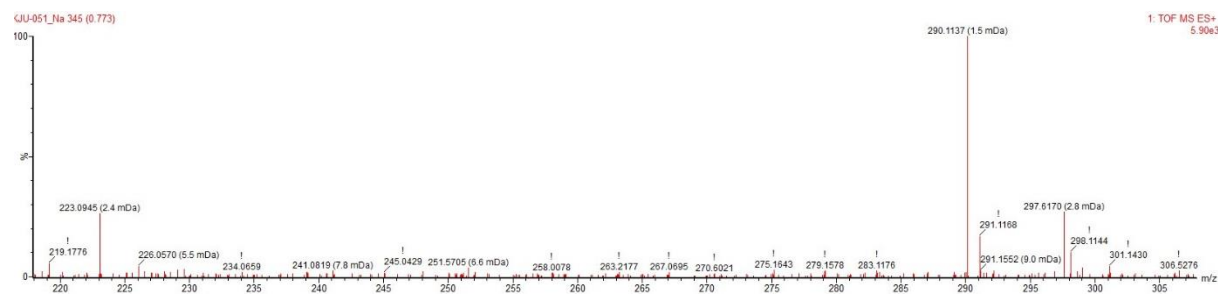
Widmo HRMS 4-amino-N'-(2,4-dihydroksybenzyl)benzohydrazidu.



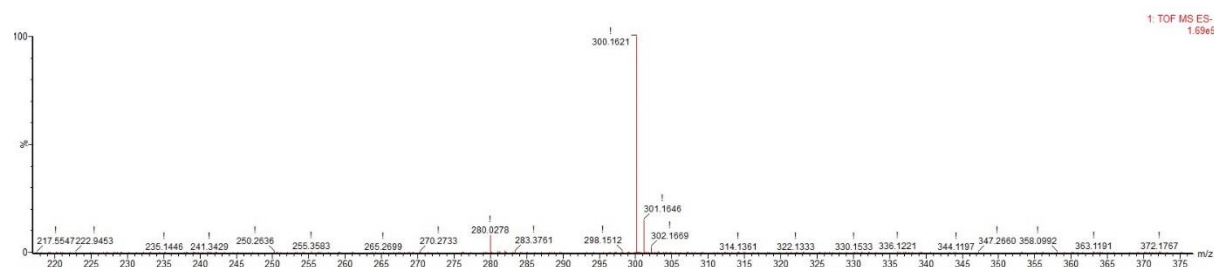
Widmo HRMS (E)-4-Amino-N'-(2,4-dihydroksybenzylideno)benzohydrazidu.



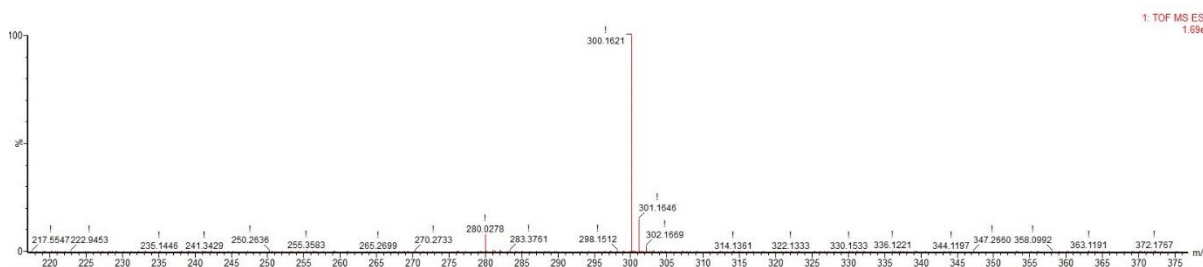
Widmo HRMS (E)-4-Amino-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazidu.



Widmo HRMS (E)-4-Amino-N'-(2,3,4-trihydroksybenzyl)benzohydrazidu.



Widmo HRMS (E)-4-Nitro-N'-(2,3-dihydroksybenzylideno)benzohydrazidu.



Widmo HRMS (*E*)-4-Nitro-N'-(3,4-dihydroxybenzylideno)benzohydrazidu.

Wykaz dorobku naukowego związanego z doktoratem

Publikacje naukowe

1. Karolina Juszcak, Wojciech Szczepankiewicz, Krzysztof Walczak; Synthesis and primary activity assay of novel benitrobenrazide and benserazide derivatives; *Molecules*; 2024, 29; 1-19; DOI:10.3390/molecules29030629; punktacja MEiN=140, IF=4.6.
2. Karolina Juszcak, Anna Kubicka, Radosław Kitel, Grzegorz Dzido, Magdalena Łabieniec-Watała, Serafin Zawadzki, Agnieszka Marczak, Krzysztof Walczak, Karolina Matczak, Mateusz Dawid Tomczyk; Hexokinase 2 inhibition and biological effects of BNBZ and its derivatives: the influence of the number and arrangement of hydroxyl groups; *International Journal of Molecular Sciences*; 2022; 23; 1-23; DOI:10.3390/ijms23052616; punktacja MEiN=140, IF=5.6.

Wystąpienia konferencyjne

1. XXVII Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, November 16-17, 2023,
Karolina Juszcak, Krzysztof Walczak
Novel 2,3,4-trihydroxybenzaldehyde derivatives as a HK2 inhibitors in anticancer therapy
2. VIII Międzynarodowa Interdyscyplinarna Konferencja Doktorantów Uczelni Technicznych InterTechDOC'2023, Ustroń, 19-20 kwiecień 2023.
Karolina Juszcak
Synteza pochodnych benserazydu w celu otrzymania inhibitorów heksokinazy 2
3. VII Międzynarodowa Interdyscyplinarna Konferencja Doktorantów Uczelni Technicznych InterTechDOC'2022, Ustroń, 5-6 kwiecień 2022.
Karolina Juszcak
Synteza i ocena biologiczna pochodnych benserazydu oraz benitrobenrazidu jako potencjalnych inhibitorów heksokinazy 2
4. 63. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Łódź, 13-17 września 2021.
Karolina Juszcak, A. Kubicka, K. Matczak, M. Łabieniec-Watała, H. Perez-Sanchez, Krzysztof Walczak, Mateusz Dawid Tomczyk
Effect of modification of the structure of benitrobenrazide and benserazide derivatives on the inhibition of hexokinase 2
5. Konferencja Onkologia obliczeniowa i spersonalizowana medycyna - TU i TERAZ! : Computational Oncology and Personalized Medicine. COPM2021 Conference, Gliwice, 21 kwietnia 2021 r.
Karolina Juszcak, Katarzyna Szleper, Mateusz Dawid Tomczyk, Anna Chmurska, Karolina Matczak, Magdalena Łabieniec-Watała, Horacio Perez Sanches, Krzysztof Walczak
Wpływ modyfikacji struktury pochodnych benitrobenrazidu na inhibicję heksokinazy 2