



You have downloaded a document from
RE-BUŚ
repository of the University of Silesia in Katowice

Title: Synteza i aktywność biologiczna nowych analogów tiosemikarbazonowych chelatorów żelaza

Author: Maciej Serda

Citation style: Serda Maciej. (2013). Synteza i aktywność biologiczna nowych analogów tiosemikarbazonowych chelatorów żelaza. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIWERSYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

UNIWERSYTET ŚLĄSKI
WYDZIAŁ MATEMATYKI FIZYKI I CHEMII
INSTYTUT CHEMII
ZAKŁAD CHEMII ORGANICZNEJ

mgr inż. Maciej Serda

**SYNTEZA I AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA
NOWYCH ANALOGÓW
TIOSEMIKARBAZONOWYCH
CHELATORÓW ŻELAZA**

Promotor:

prof. dr hab. inż. Jarosław Polański

Katowice 2013



Dr BG 3400

*Praca finansowana w ramach projektu **NCN PRELUDIUM 1** (DEC-2011/01/N/NZ4/01166) oraz Programu Stypendialnego **TWING** (Projekt współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego CZŁOWIEK - NAJLEPSZA INWESTYCJA)*



Pragnę złożyć podziękowania:

Prof. dr hab. inż. Jarosławowi Polańskiemu, za umożliwienie wykonywania pracy,
nowe idee oraz poświęcony czas;

Dr hab. Robertowi Musiołowi, za pomoc w pracy laboratoryjnej, owocne dyskusje oraz
atmosferę w laboratorium;

Dr Annie Mrozek-Wilczkiewicz, za dyskusje badawcze oraz pomoc w oznaczeniach
biologicznych;

Chciałbym podziękować swojej ***Żonie*** oraz ***Rodzinie*** za cierpliwość oraz pomoc
w każdym momencie;

Pracę dedykuję Żonie.

Spis treści

1. Założenia i cel pracy	12
2. CZĘŚĆ LITERATUROWA.....	13
2.1 Wstęp	13
2.2 Biochemia żelaza w ludzkim organizmie.....	13
2.3 Metabolizm żelaza w komórkach nowotworowych	16
2.4 Reduktaza rybonukleotydowa	17
2.5 Reakcja Fentona. Reaktywne formy tlenu	19
2.6 Spektroskopia EPR w badaniu reaktywnych form tlenu. Pułapkowanie spinowe	20
2.7 Zastosowanie chelatorów w leczeniu zaburzeń metabolizmu żelaza.....	23
2.8 Żelazo jako cel molekularny terapii przeciwnowotworowej	24
2.8.1 Siderofory.....	24
2.8.2 Deferypron	28
2.8.3 Hydrazonoizonikotynylo pirydoksalu.....	29
2.8.4 O-Trensox.....	31
2.8.5 Deferasirox.....	31
2.8.6 Tachpirydyna.....	34
2.9 Tiosemikarbazony	35
2.9.1 Główne metody syntezy tiosemikarbazonów i ich prekursorów tiosemikarbazonowych .	36
2.9.2 Tiosemikarbazony jako leki przeciwgruźlicze i przeciwwirusowe.....	38
2.9.3 Zastosowanie tiosemikarbazonów w terapii przeciwnowotworowej	40
3. Badania własne	43
3.1 Tiosemikarbazony oparte o szkielet chinolinowy	43
3.2 Retrofragmentacyjne projektowanie nowych chelatorów żelaza	49
3.3 Fenyltiosemikarbazony	62
3.4 Terapia kombinowana chelatory żelaza-PDT.....	69
3.5 Inne tiosemikarbazony oraz ich prekursory.....	71
3.6 Właściwości fizykochemiczne	74
3.6.1 Badania spektrofotometryczne kompleksowania żelaza.....	74
3.6.2 Ustalanie konfiguracji E i Z tiosemikarbazonów za pomocą spektroskopii NMR	76
3.6.3 Omówienie syntez.....	84
3.6.3.1 Synteza w reaktorze mikrofalowym.....	84
3.6.3.2 Synteza tiosemikarbazonów.....	87
3.6.3.3 Synteza benzoilowych pochodnych kwasu pirazyнового	89

3.6.3.4 Synteza prekursorów karbonylowych z układem acetylenowym. Reakcja Sonogashiry.	95
3.7 Eksperymenty pułapkowania spinowego.....	97
4. WNIOSKI	100
5. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	102
5.1. Synteza tiosemikarbazydów i ich pochodnych	103
5.1.1. Otrzymywanie kwasu 2-[(cykloheksylometylo(tiokarbamoilo)tio]octowego	103
5.1.2 Otrzymywanie <i>N</i> -cykloheksylo- <i>N</i> -metylohydrazynokarbotioamidu.....	105
5.1.3 Ogólna procedura otrzymywania monopodstawionych pochodnych bis(imidazolilo)tioketonu.	106
5.1.3.1 1'-Imidazolilo-(4-metylo-1-piperazylo)-tioketon	106
5.1.3.2 (4-etylo-1-piperazylo)-1'-imidazolilotioketon	107
5.1.3.3 (4-fenylo-1-piperazylo)-1'-imidazolilotioketon	107
5.1.1.4 4-(1-imidazolilotiokarbonylo)morfolina.....	108
5.1.3.5 1'-Imidazolilo-(4-pirydynylo-1-piperazylo)tioketon	109
5.1.3.6 1'-imidazolilo-[4-(2-pirazylo)-1-piperazylo]tioketon.....	109
5.1.3.7 [4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazylo]-1'-imidazolilotioketon.....	110
5.1.4 Ogólna procedura otrzymywania pochodnych morfolino- i piperazyntiosemikarbazydów.	111
5.1.4.1 (4-metylo-1-piperazylo)tiokarbonylhydrazyd.....	111
5.1.4.2 (4-etylo-1-piperazylo)tiokarbonylhydrazyd	112
5.1.4.3 (4-fenylo-1-piperazylo)tiokarbonylhydrazyd	113
5.1.4.4 (4-morfolino)tiokarbonylhydrazyd	113
5.1.4.5 [4-(2-pirydynylo)-1-piperazylo]tiokarbonylhydrazyd	114
5.1.4.6 [4-(2-pirazylo)1-piperazylo]tiokarbonylhydrazyd	115
5.1.4.7 4-(2-hydroksyetylo)piperazylo-1-tiokarbonylhydrazyd	115
5.2. Synteza prekursorów karbonylowych	116
5.2.1. Ogólna procedura otrzymywania pochodnych kwasowych oraz amidowych 2(hydroksybenzoilo)pirazylo.....	116
5.2.1.1. Synteza kwasu 2-[5-(2-hydroksybenzoilo)]pirazylokarbonylowego	117
5.2.1.2. Synteza kwasu 2-[5-(4-hydroksybenzoilo)]pirazylokarbonylowego.....	118
5.2.1.3. Synteza amidu kwasu 2-[5-(2-hydroksybenzoilo)]pirazylokarbonylowego.....	118
5.2.2 Reakcja Sonogashiry dla pochodnych benzaldehydu	120
5.2.2.1 Otrzymywanie 4-[(trimetylosililo)etynylo]benzaldehydu	120
5.2.2.2 Otrzymywanie 4-etynylobenzaldehydu	121
5.2.2.3 Otrzymywanie 4-[(3,3-dimetylo)-1-butyn-1-ylo]benzaldehydu.....	122

5.3 Synteza modelowych chelatorów metali przejściowych	123
5.3.1 Synteza Z-2-[2-di(pirydynylo)metyleno]-N,N-dimetylohydrazynotiokarboamidu.....	123
5.4 Ogólna procedura syntezy tiosemikarbazonów w reaktorze mikrofalowym	124
5.4.1 Otrzymywanie (E)-2-[(8-hydroksy-2-chinolinylometyleno)-N,N-dimetylo-hydrazyno-tiokarboamidu.....	124
5.4.2 Otrzymywanie N-metylo-2-[(8-hydroksy-2-chinolinylometyleno)-hydrazynotio-karbo-amidu	125
5.4.3 Otrzymywanie N-etylo-2-[(8-hydroksy-2-chinolinylometyleno)-hydrazynotio-karbo-amidu	126
5.4.4 Otrzymywanie (E)-2-[(8-hydroksy-2-chinolinylometyleno)-N-fenylhydrazyno-tiokarbo-amidu	127
5.4.5 Otrzymywanie (E)-N-cykloheksylo-2-[(8-hydroksy-2-chinolinylometyleno)-N-metylo-hydrazynotiokarboamidu.....	128
5.4.6 Otrzymywanie (E)-4-etylo-N'-[(8-hydroksy-2-chinolinylometyleno)-1-piperazylo-1-tiokarbohydrazynu	129
5.4.7 Otrzymywanie (E)-N'-[(8-hydroksy-2-chinolinylometyleno)-4-fenyl-1-piperazylo-1-tiokarbohydrazynu	130
5.4.8 Otrzymywanie (E)-N'-[(8-hydroksy-2-chinolinylometyleno)-4-(2-pirydynylo)-piperazylo-1-tiokarbohydrazynu	131
5.4.9 Otrzymywanie (E)-N'-[(8-hydroksy-2-chinolinylometyleno)-4-(2-pirazylylo)-piperazylo-1-tiokarbohydrazynu	132
5.4.10 Otrzymywanie (E)-N'-[(8-hydroksy-2-chinolinylometyleno)-4-morfolino-tiokarbo-hydrazynu.....	133
5.4.11 Otrzymywanie N,N-dimetylo-2-[(2-chinolinylometyleno)hydrazynotiokarboamidu ...	134
5.4.12 Otrzymywanie N-metylo-2-[(2-chinolinylometyleno)hydrazynotiokarboamidu.....	135
5.4.13 Otrzymywanie N-etylo-2-[(2-chinolinylometyleno)hydrazynotiokarboamidu	136
5.4.14 Otrzymywanie N-fenyl-2-[(2-chinolinylometyleno)hydrazynotiokarboamidu	137
5.4.15 Otrzymywanie (E)-N-cykloheksylo-N-metylo-2-[(2-chinolinylometyleno)-hydrazynotio-karboamidu	138
5.4.16 Otrzymywanie (E)-4-etylo-N'-[(2-chinolinylometyleno)piperazylo-1-tiokarbohydrazynu	139
5.4.17 Otrzymywanie (E)-4-fenyl-N'-[(2-chinolinylometyleno)piperazylo-1-tiokarbo-hydrazynu.....	140
5.4.18 Otrzymywanie (E)-4-(2-pirydynylo)-N'-[(2-chinolinylometyleno)piperazylo-1-tio-karbo-hydrazynu.....	141
5.4.19 Otrzymywanie (E)-4-(2-pirazylylo)-N'-[(2-chinolinylometyleno)piperazylo-1-tiokarbo-hydrazynu.....	142
5.4.20 Otrzymywanie (E)-N'-[(2-chinolinylometyleno)morfolino-4-tiokarbohydrazynu.....	143

5.4.21 Otrzymywanie <i>N,N</i> -dimetylo-2-[(7-hydrokso-8-chinolinyl)metyleno]tiokarbo-hydrazylu	144
5.4.22 Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-[(7-hydrokso-8-chinolinyl)metyleno]- <i>N</i> -metylotiokarbo-hydrazylu	145
5.4.23 Otrzymywanie (<i>E</i>)- <i>N</i> -etylo-2-[(7-hydrokso-8-chinolinyl)metyleno]tiokarbo-hydrazylu	146
5.4.24 Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-[(7-hydrokso-8-chinolinyl)metyleno]- <i>N</i> -fenylhydrazyno-tiokarbo-amidu	147
5.4.25 Otrzymywanie (<i>E</i>)- <i>N</i> -cykloheksylo-2-[(7-hydrokso-8-chinolinyl)metyleno]- <i>N</i> -metylo-hydrazynotiokarboamidu	148
5.4.26 Otrzymywanie (<i>E</i>)-4-etylo- <i>N'</i> -[(7-hydrokso-8-chinolinyl)metyleno]-piperazylo-1-tio-karbohydrazylu	149
5.4.27 Otrzymywanie (<i>E</i>)- <i>N'</i> -[(7-hydrokso-8-chinolinyl)metyleno]-4-fenyl-piperazylo-1-tio-karbohydrazylu	150
5.4.28 Otrzymywanie (<i>E</i>)- <i>N'</i> -[(7-hydrokso-8-chinolinyl)metyleno]-4-(2-pirydynyl)-piperazylo-1-tiokarbohydrazylu	151
5.4.29 Otrzymywanie (<i>E</i>)- <i>N'</i> -[(7-hydrokso-8-chinolinyl)metyleno]-4-(2-pirazylo)-piperazylo-1-tiokarbohydrazylu	152
5.4.30 Otrzymywanie (<i>E</i>)- <i>N'</i> -[(7-hydrokso-8-chinolinyl)metyleno]morfolino-4-tio-karbo-hydrazylu	153
5.4.31. Otrzymywanie (<i>E</i>)- <i>N</i> -cykloheksylo- <i>N</i> -metylo-2-[(2-chinoksalinyl)metyleno]-hydrazyno-tiokarboamidu	154
5.4.32 Otrzymywanie (<i>E</i>)-4-etylo- <i>N'</i> -[(2-chinoksalinyl)metyleno]piperazylo-1-tiokarbo-hydrazylu	155
5.4.33 Otrzymywanie (<i>E</i>)-4-fenyl- <i>N'</i> -[(2-chinoksalinyl)metyleno]piperazylo-1-tiokarbo-hydrazylu	156
5.4.34 Otrzymywanie (<i>E</i>)-4-(2-pirydynyl)- <i>N'</i> -[(2-chinoksalinyl)metyleno]-piperazylo-1-tio-karbohydrazylu	157
5.4.35 Otrzymywanie (<i>E</i>)-4-(2-pirazylo)- <i>N'</i> -[(2-chinoksalinyl)metyleno]-piperazylo-1-tio-karbohydrazylu	158
5.4.36 Otrzymywanie (<i>E</i>)- <i>N'</i> -[2-chinoksalinyl)metyleno]morfolino-4-tiokarbohydrazylu	159
5.4.37 Otrzymywanie <i>N'</i> -[di(2-pirydynyl)metyleno]-4-etylopiperazylo-1-tiokarbo-hydrazylu	160
5.4.38 Otrzymywanie <i>N'</i> -[di(2-dipirydynyl)metyleno]-4-fenylpiperazylo-1-tio-karbo-hydrazylu	161
5.4.39 Otrzymywanie <i>N'</i> -[di(2-pirydynyl)metyleno]-4-(2-pirydynyl)piperazylo-1-tiokarbo hydrazylu	162
5.4.40 Otrzymywanie <i>N'</i> -[di(2-pirydynyl)metyleno]-4-(2-pirazylo)piperazylo-1-tio-karbo hydrazylu	163

5.4.41 Otrzymywanie <i>N'</i> -[di(2-pirydynylo)metyleno]morfolino-4-tiokarbohydrazynu	164
5.4.42 Otrzymywanie <i>N'</i> -[di(2-pirydynylo)metyleno]-4-(2-hydroksyetylo)piperazyno-1-tiokarbohydrazynu.....	166
5.4.43 Otrzymywanie (<i>E</i>)- <i>N</i> -cykloheksylo-2-(2-hydroksybenzylideno)- <i>N</i> -metylohydrazynotio- karboamidu	167
5.4.44 Otrzymywanie (<i>E</i>)-4-etylo- <i>N'</i> -(2-hydroksybenzylideno)piperazyno-1-tiokarbohydrazynu	168
5.4.45 Otrzymywanie (<i>E</i>)- <i>N'</i> -(2-hydroksybenzylideno)-4-fenylpiperazyno-1-tiokarbo- hydrazynu	169
5.4.46 Otrzymywanie (<i>E</i>)- <i>N'</i> -(2-hydroksybenzylideno)-4-(2-pirydynylo)piperazyno-1-tio- karbo- hydrazynu.....	170
5.4.47 Otrzymywanie (<i>E</i>)- <i>N'</i> -(2-hydroksybenzylideno)-4-(2-pirazynylo)piperazyno-1-tiokarbo- hydrazynu.....	171
5.4.48 Otrzymywanie (<i>E</i>)- <i>N'</i> -(2-hydroksybenzylideno)morfolino-4-tiokarbohydrazynu	172
5.4.49 Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(4-bromobenzylideno)- <i>N,N</i> -dimetylohydrazynotio- karboamidu... ..	173
5.4.50 Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(4-bromobenzylideno)- <i>N</i> -metylohydrazynotio- karboamidu	174
5.4.51 Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(4-bromobenzylideno)- <i>N</i> -etylohydrazynotio- karboamidu	175
5.4.52 Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(4-bromobenzylideno)- <i>N</i> -fenylohydrazynotio- karboamidu	176
5.4.53 Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(4-bromobenzylideno)hydrazynotio- karboamidu	177
5.4.54 Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(2,3-dichlorobenzylideno)- <i>N,N</i> -dimetylohydrazyno- tiokarbo- amidu	178
5.4.55 Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(2,3-dichlorobenzylideno)- <i>N</i> -metylohydrazynotio- karboamidu	179
5.4.56 Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(2,3-dichlorobenzylideno)- <i>N</i> -etylohydrazynotio- karboamidu	180
5.4.57 Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(2,3-dichlorobenzylideno)- <i>N</i> -fenylohydrazynotio- karboamidu	180
5.4.58 Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(2,3-dichlorobenzylideno)hydrazynotio- karboamidu	182
5.4.59 Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(3,4-dichlorobenzylideno)- <i>N,N</i> -dimetylohydrazynotio- karboamidu	183
5.4.60 Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(3,4-dichlorobenzylideno)- <i>N</i> -metylohydrazynotio- karboamidu	184
5.4.61 Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(3,4-dichlorobenzylideno)- <i>N</i> -etylohydrazynotio- karboamidu	185
5.4.62 Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(3,4-dichlorobenzylideno)- <i>N</i> -fenylohydrazynotio- karboamidu	186
5.4.63 Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(3,4-dichlorobenzylideno)hydrazynotio- karboamidu	186
5.4.64 Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(4-(3,3-dimetylo-1-butyn-1-ylo)benzylideno)- <i>N</i> -metylo- hydrazyno- tiokarboamidu.....	188
5.4.65 Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(4-(3,3-dimetylo-1-butyn-1-ylo)benzylideno)- <i>N</i> -etylo- hydrazynotio- karboamidu	189
5.4.66 Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(4-(3,3-dimetylo-1-butyn-1-ylo)benzylideno)- <i>N</i> -fenylo- hydrazyno- tiokarboamidu.....	190

5.4.67 Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(4-(3,3-dimetylo-1-butyn-1-ylo)benzylideno)hydrazynotio-karboamidu	191
5.5. PUŁAPKOWANIE SPINOWE	192
5.5.1 Oczyszczanie <i>N</i> -tlenku 5,5-dimetylo-1-piroliny (DMPO).....	192
5.5.2 Synteza kompleksu tiosemikarbazonowego z żelazem (III)	192
5.5.3 Pułapkowanie spinowe kompleksu żelaza (III) z ligandem tiosemikarbazonowym.....	193
5.6 Pomiar kompleksowania żelaza wybranymi tiosemikarbazonami.	193
6. LITERATURA.....	195
7. SUPLEMENT.....	215
7.1 Struktura krystalograficzna kwasu 2-[5-(4-hydroksybenzoilo)]pirazynokarboksyłowego..	215
7.2 Struktura krystalograficzna (<i>E</i>)-2-(2,3-dichlorobenzylideno)hydrazynotiokarboamidu	216
7.3 Struktura krystalograficzna (<i>E</i>)-2-(3,4-dichlorobenzylideno)hydrazynotiokarboamidu	217
7.4 Struktura krystalograficzna (<i>E</i>)-2-(4-bromobenzylideno)- <i>N</i> -etylohydrazynotiokarboamidu	218
7.5 Struktura krystalograficzna <i>N'</i> -[di(2-pirydynylo)metyleno]-4-(2-pirydynylo)-piperazino-1-tiokarbohydrazynu	219
7.6 Struktura krystalograficzna (4-etylo-1-piperazyno)tiokarbohydrazynu	220
7.7 Widmo spektrometrii masowej (ESI) dla kompleksu Fe(III) z <i>N</i> -etylo-2-[(8-hydroksy-chinolin-2-ylo)metyleno]hydrazynotiokarboamidem	221

Stosowane skróty i akronimy

2D-NOESY- dwuwymiarowa spektroskopia jądrowego efektu Overhausera (ang. *Two Dimensional Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*)

ALA – kwas 5-aminolewulinowy (ang. *5-aminolevulinic acid*)

CI – współczynnik kombinacji (ang. *combination index*)

DFO – deferoksamina

DMF – dimetyloformamid

DMPO- N-tlenek 5,5-dimetylo-1-piroliny

DMSO – dimetylosulfotlenek

DMT1 – transporter metali dwuwartościowych (ang. *divalent metal transporter*)

DNA- kwas deoksyrybonukleinowy

EPR- spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego

H₂O₂ – nadtlenek wodoru

Hb – hemoglobina

IRP – białka regulujące jony żelaza (ang. *iron regulatory protein*)

LDL – lipoproteiny niskiej gęstości (ang. *low density lipoprotein*)

MIC- minimalne stężenie hamujące (ang. *minimum inhibitory concentration*)

mTOR- kinaza mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin kinase*)

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

NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *nuclear magnetic resonance*)

OH[•] – rodnik hydroksylowy

$O_2^{\cdot-}$ – anionorodnik ponadtlenny

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

PET- fotosyntetyczny transport elektronów (ang. *photosynthetic electron transport*)

PIH- Hydrazon izonikotynoilo pirydoksalu (ang. *pyridoxal isonicotinoyl hydrazone*)

PpIX – protoporfiryna IX

PS- struktura uprzywilejowana (ang. *privileged structures*)

ROS – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

RR – reduktaza rybonukleotydowa

τ_m - czas mieszania

TP53 – gen kodujący białko p53 (ang. *transcription protein 53*)

TLC – chromatografia cienkowarstwowa (ang. *thin layer chromatography*)

TfR1- receptor transferynowy 1 (ang. *transferrin receptor 1*)

TP53 – gen kodujący białko p53 (ang. *transcription protein 53*)

TSC- tiosemikarbazon (ang. *thiosemicarbazone*)

1. Założenia i cel pracy

Jednym z podstawowych problemów chemii medycznej jest racjonalne projektowanie leków, począwszy od wstępnych badań *in silico*, a skończywszy na skreeningu biologicznym. Co roku liczba zsyntezowanych związków organicznych zwiększa się, osiągając 50 milionów. W dobie XXI wieku poważnym wyzwaniem dla chemika nie jest już więc synteza kolejnych związków, lecz produkowanie specyficznych właściwości cząsteczek pozwalających na aplikacje danej klasy związków.

Choroby nowotworowe, dotyczą coraz większą część społeczeństwa. W związku z tym rodzi się potrzeba poszukiwania nowych chemioterapeutyków o działaniu przeciwnowotworowym. Ważnym problemem jest przy tym lepsze poznanie mechanizmów działania takich środków oraz ich stałe doskonalenie. Ciekawą grupą potencjalnych leków w tym obszarze stanowią chelatory żelaza.

Podstawowym celem mojej pracy było poszukiwanie nowych heteroaromatycznych chelatorów żelaza, obejmujących funkcję tiosemikarbazonu. Badania obejmowały projektowanie, syntezę oraz analizę wyników testów biologicznych otrzymanych związków.

Studium badawcze pracy obejmowało ponadto badania chemoinformatyczne, syntezę i analizę fizykochemiczną ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, 2D-NMR, IR, UV-VIS, HRMS) otrzymanych związków, opracowanie metod oczyszczania produktów, oraz analizę wyników z testów biologicznych.

2. CZĘŚĆ LITERATUROWA

2.1 Wstęp

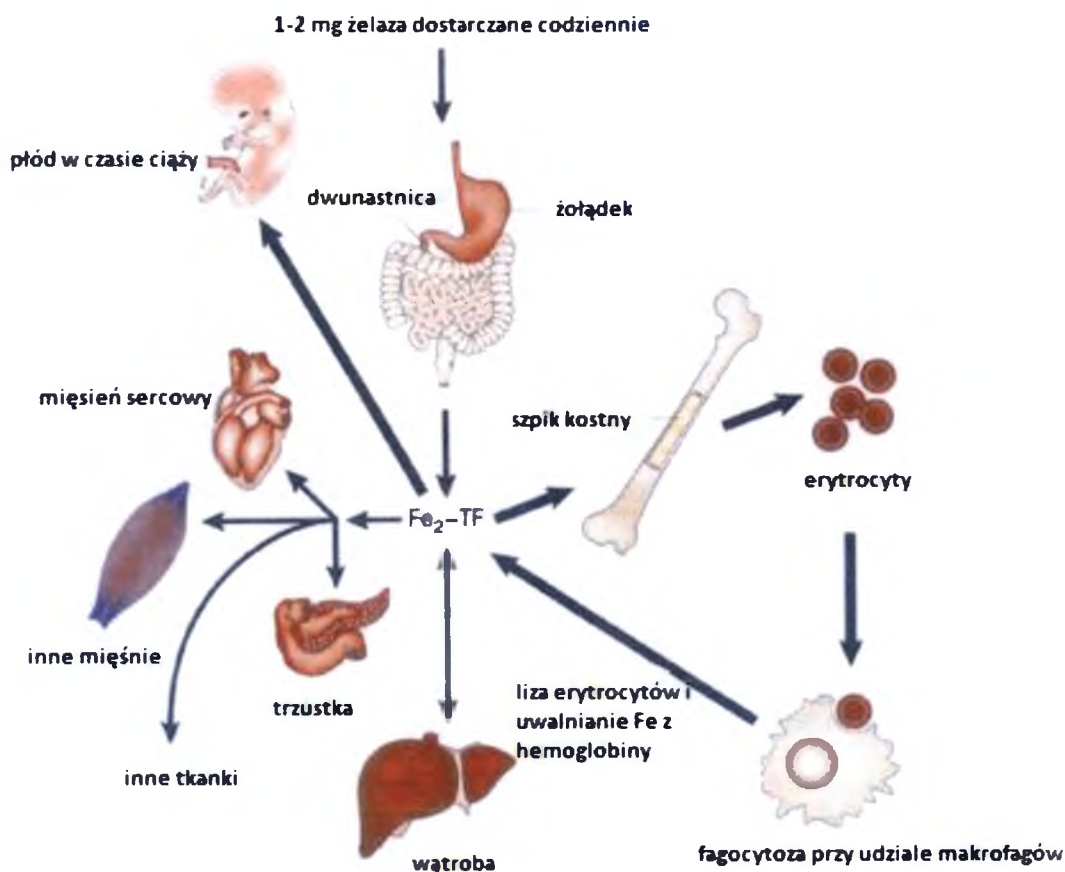
Choroby nowotworowe dotykają coraz większą część społeczeństwa i stanowią obecnie przyczynę połowy zgonów, co odpowiada około 8 milionom ludzi w skali światowej¹. Niestety pomimo milionów dolarów inwestowanych w nowoczesne i selektywne małowązasteczkowe chemioterapeutyki, nie udało się wykluczyć raka z rejestru dominujących chorób. W Polsce najczęstszą przyczynę zgonów stanowią obecnie dysfunkcje związane z układem krążenia oraz choroby nowotworowe (155 000 zachorowań o podłożu nowotworowym i około 93 000 zgonów)². W populacji mężczyzn nowotwory złośliwe stanowią 26 % zgonów, zaś w populacji kobiet 23 %. Wśród mężczyzn dominują nowotwory płuca (26 % zachorowań), jelita grubego (12 % zachorowań) oraz prostaty (8 % zachorowań). Wśród kobiet najbardziej dotkliwe są nowotwory piersi (30 % zachorowań), płuca (9 % zachorowań) oraz jelita grubego (8 % zachorowań)³. Projektowanie nowych związków przeciwnowotworowych jest więc ambitnym wyzwaniem badawczym, którego celem jest zwiększenie szansy na poprawę i przedłużenie życia pacjentów. Biorąc pod uwagę dużą różnorodność genetyczną komórek neoplastycznych oraz ich oporność na nowoczesne leki przeciwnowotworowe, poszukiwanie nowych, selektywnych chemioterapeutyków jest niezwykle potrzebne i wpisuje się w najbardziej aktualne problemy badawcze w chemii medycznej^{4,5}.

2.2 Biochemia żelaza w organizmie człowieka

Dzięki swoim unikatowym właściwościom biochemicznym oraz biofizycznym żelazo uczestniczy w organizmie ludzkim w wielu ważnych procesach na poziomie komórkowym jak i na poziomie całego organizmu. Aby podkreślić jego rolę, można wymienić chociażby takie procesy jak transport tlenu czy też syntezę DNA⁶. Biologiczne funkcje żelaza są dobrze opisane. Podwyższone stężenie Fe w organizmie może skutkować zwiększeniem ryzyka rozwoju komórek nowotworowych⁷.

Rys. 1

Schemat biodystrybucji żelaza w zdrowym organizmie. Zmodyfikowano wg Cooka⁸



Proces wchłaniania żelaza z pożywienia następuje w jelicie cienkim oraz w dwunastnicy. W trakcie tego procesu enterocyty pobierają żelazo w dwóch formach, jako tzw. żelazo nieorganiczne (niehemowe) oraz żelazo w postaci skompleksowanej z hemem⁹. Żelazo nieorganiczne jest transportowane poprzez błonę komórkową enterocyty za pomocą specjalnego białka transportowego *DMT1* (ang. *divalent metal transporter 1*). Co ciekawe, cechą charakterystyczną tego białka jest to, że potrafi ono transportować tylko metale znajdujące się na II stopniu utlenienia¹⁰. Jako że żelazo niehemowe znajduje się w większości przypadków na III stopniu utlenienia, konieczny jest czynnik redukujący, który umożliwi konwersję pomiędzy stopniami utlenienia. Rolę tę spełnia membranowy cytochrom b znajdujący się w dwunastnicy i posiadający aktywność redukcyjną na tyle specyficzną, aby dokonać szybkiej transformacji między

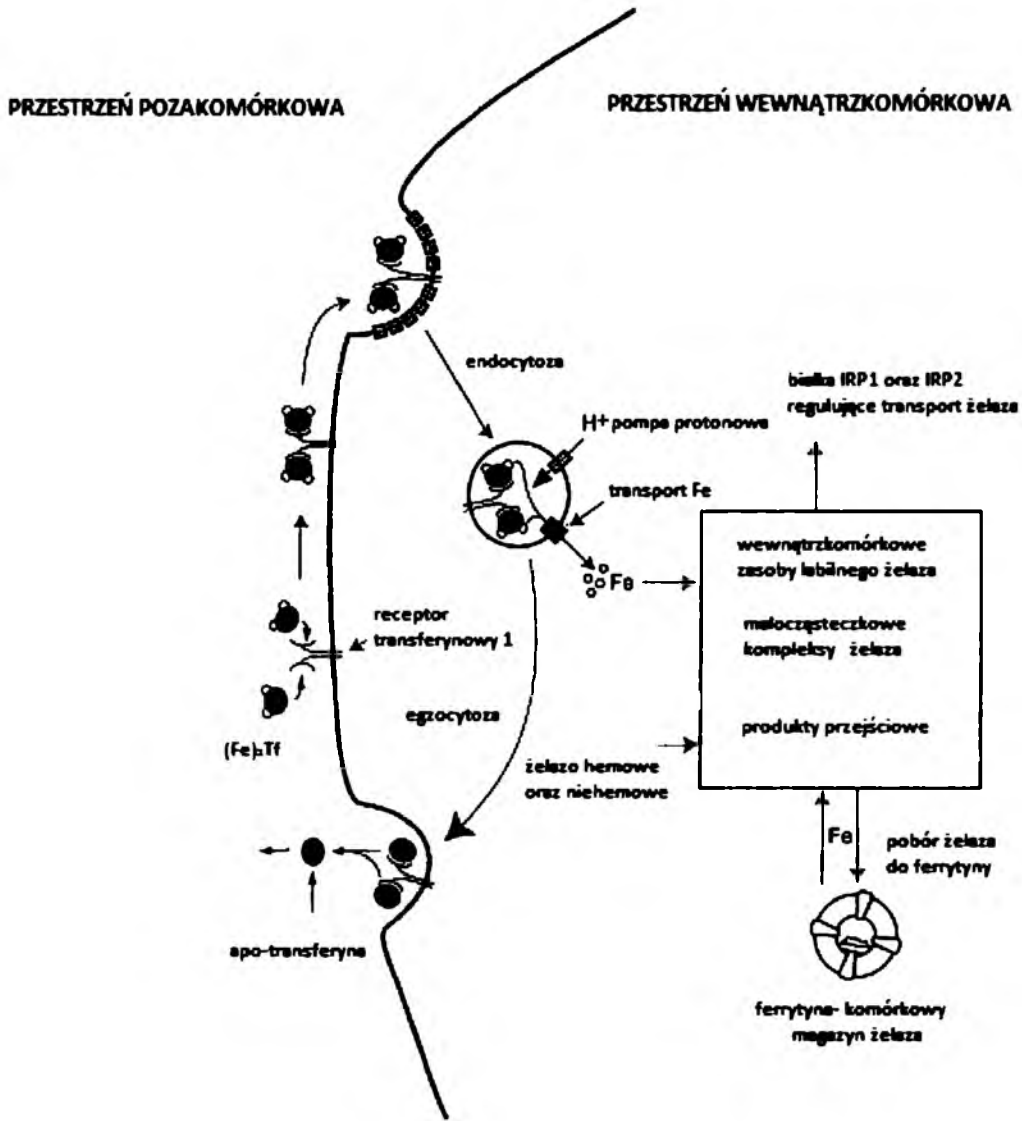
stanami utlenienia żelaza¹¹. Niestety szlak metaboliczny odpowiedzialny za transport hemu przez enterocyty nie został do końca wyjaśniony.

Rozpatrując szlaki metaboliczne żelaza w ludzkim organizmie, należy podkreślić, iż pierwiastek ten praktycznie nie występuje w postaci wolnej, będąc związanym z białkami lub czynnikami kompleksującymi¹². Jako swoisty magazyn tego pierwiastka może być postrzegana hemoglobina, zawierająca około 2,5 g żelaza, z całkowitej puli około 5 g żelaza znajdującego się w dobrze odżywionym ludzkim organizmie¹³. W surowicy żelazo występuje formie związanej z białkiem transportującym – transferyną, tworząc łatwo rozpuszczalny kompleks. Transferyna wiąże dwie cząsteczki żelaza(III) w dwóch miejscach ulokowanych odpowiednio na N i C-końcu białka. Po związaniu żelaza dwie cząsteczki transferyny łączą się ze specyficznym receptorem *TfR1* (ang. *transferrin receptor 1*) znajdującym się na powierzchni komórki¹⁴. W ostatnich latach zaproponowano mechanizm wiązania transferyny z powyższym receptorem, potwierdzający występowanie zmiany konformacyjnej w transferynie po jej związaniu i pozwalającej na swobodne uwalnianie żelaza(II)¹⁵. W końcowych etapie szlaku metabolicznego białko *DMT1* transportuje zredukowany biometal przez membranę endosomalną do cytozolu. Po uwolnieniu żelaza z endosomów, pierwiastek ten tworzy zasoby labilnego żelaza (ang. *labile iron pools*), w których występuje w postaci niskocząsteczkowych kompleksów powiązanych z nukleotydami, cukrami bądź aminokwasami¹⁶

W komórce ludzkiej białkiem przechowującym nadmiar żelaza jest ferrytyna. Białko to ma zdolność do przechowywania do 4500 atomów żelaza, zaś jego waga mieści się w granicach 450 kDa. Składa się ono z dwóch podjednostek L i H, o masie odpowiednio 19 kDa oraz 21 kDa¹⁷. Mechanizm wg którego ferrytyna pobiera żelazo jest nadal mało znany. Badania przeprowadzone *in vitro* sugerują, że żelazo(III) jest przechowywane w postaci wodoronadtlenku (FeOOH)₈ oraz fosforanu (FeO-OPO₃H₂)¹⁸. Proces uwalniania żelaza z ferrytyny jest intensywnie badany. Eksperymenty *in vitro* wskazują, iż obecność wewnątrzkomórkowych reduktorów, typu FMNH, FADH oraz zredukowanej ryboflawiny, powoduje uwalnianie żelaza z białka ferrytyny¹⁹. Najnowsze prace sugerują, iż proces wewnątrzkomórkowy może odbywać się wg mechanizmu zakładającego lizosomalną proteolizę ferrytyny²⁰.

Rys 2

Schemat poboru żelaza z transferyny na drodze endocytozy. Zmodyfikowano za Richardsonem²¹



2.3 Metabolizm żelaza w komórkach nowotworowych

W latach 80 XX wieku zaczęły pojawiać się informacje potwierdzające eksperymentalnie tezę, iż komórki neoplastyczne posiadają znacznie większe zapotrzebowanie na żelazo²². Wynika to z faktu że zachodzą w nich intensywne procesy proliferacyjne związane z syntezą DNA. Skutkiem tych procesów jest całkowita zmiana metabolizmu tego biopierwiastka, co uwidacznia się szczególnie w zwiększonym występowaniu na powierzchni komórek nowotworowych receptorów

*TfR1*²³. Dalsze badania *in vitro* przeprowadzone przez Trowbridge'a ujawniły proces hamowania wzrostu komórek nowotworowych białaczki w trakcie podawania przeciwciał monoklonalnych przeciwko *TfR1*²⁴. Ostatnie doniesienia literaturowe podkreślają również istotny wpływ procesu nadekspresji białek importujących żelazo (DMT1 oraz TfR1) na rozwój raka odbytu, podkreślając jednocześnie wyraźnie zmniejszoną ekspresję białek eksportujących żelazo (FPN1 oraz hefastyna)²⁵. Zasadniczą rolę w przemianach i transporcie żelaza potwierdza również eksperyment, w którym przeprowadzono knock-out mysiego genu kodującego receptor *TfR1*, skutkujący śmiercią mysich embrionów²⁶. Co ciekawe, badaczom udało się wyizolować i sklonować kolejny receptor powiązany z transferyną- *TfR2*²⁷. Zaobserwowano ponadto, że komórki wykazujące ekspresję tego receptora występują szczególnie często w dużych guzach mysich²⁸.

Wiele doniesień wskazuje na powiązanie ferrytyny z procesami proliferacji komórek nowotworowych. Nie wykryto wprawdzie wzrostu stopnia magazynowania żelaza, lecz zaobserwowano występowanie ferrytyny w osoczu krwi²⁹. Efekt ten został wykorzystany do oceny stopnia zaawansowania nerwiaka płodowego, gdyż występuje tylko w ostatnich etapach jego tworzenia³⁰. Można więc przyjąć, że zubożenie zasobów żelaza komórkowego m.in. poprzez proces jego chelatowania, ma wpływ na intensywnie proliferujące komórki nowotworowe, a co za tym idzie procesy angażujące żelazo mogą być potencjalnym celem terapii przeciwnowotworowych.

2.4 Reduktaza rybonukleotydoma

Aktywność przeciwnowotworową ukierunkowaną na zaburzenie metabolizmu żelaza w komórkach nowotworowych, często obejmuje także hamowanie reduktazy rybonukleotydomowej (RR)³¹. Enzym ten bierze udział w kluczowej reakcji w czasie syntezy DNA- jest odpowiedzialny za przemianę rybonukleotydomów do odpowiednich deoksyrybonukleotydomów³². Jako, że komórki nowotworowe ulegają intensywnym podziałom przy wzmożonej syntezie DNA, poziom reduktazy rybonukleotydomowej jest relatywnie większy w porównaniu do normalnych komórek³³. Nadekspresja receptora

TfR1 na powierzchni komórek nowotworowych jest zatem spowodowana przez duże zapotrzebowanie RR na żelazo³⁴. Ponadto wzmożona aktywność RR została powiązana ze wzrostem guzów i powstawaniem komórek nowotworowych.

Schemat 1

Konwersja rybonukleotydów do deoksyrybonukleotydów przy udziale RR

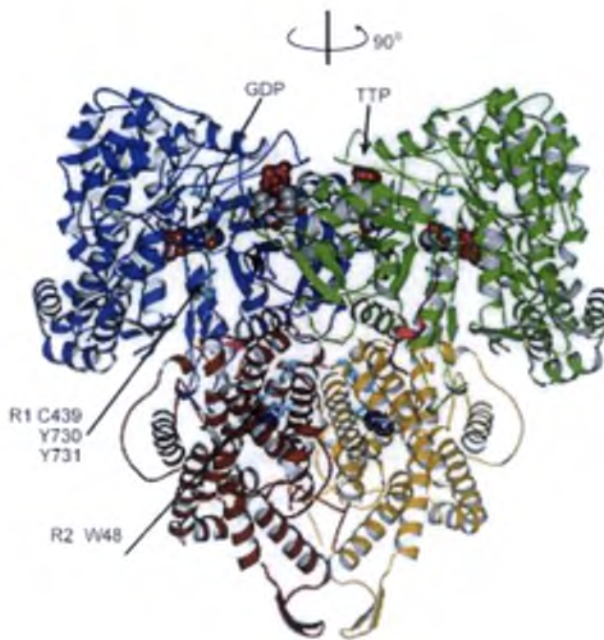


Stwierdzono, że reduktaza rybonukleotydowa składa się z dwóch podjednostek R1 oraz R2³⁵. Część katalityczna enzymu znajduje się w podjednostce R1, jednakże przed reakcją przemiany rybonukleotydów do deoksyrybonukleotydów następuje szereg reakcji aktywujących enzym poprzez rodnik tyrozylowy³⁶. Rodnik ten może być ponadto destabilizowany m.in. poprzez reaktywne formy tlenu generowane w skutek podawania leków przeciwnowotworowych, a w szczególności chelatorów żelaza³⁷. Uważa się, że w podjednostce R2 oraz w małym fragmencie enzymu o nazwie p53R2 znajdują się miejsca wiążące żelazo, współodpowiedzialne za aktywność enzymatyczną³⁸.

Skoro redukcja rybonukleotydów jest kluczowym etapem w syntezie DNA, inaktywacja reduktazy rybonukleotydowej wiąże się z poważnymi konsekwencjami na poziomie komórkowym. Może to być zahamowanie procesu syntezy DNA oraz zatrzymanie proliferacji skutkujące apoptozą. Wszystkie te fakty, potwierdzają dużą atrakcyjność reduktazy rybonukleotydowej jako celu molekularnego dla nowoczesnych leków przeciwnowotworowych³⁹.

Rvs 3

Struktura podjednostek R1 oraz R2 reduktazy rybonukleotydowej⁴⁰

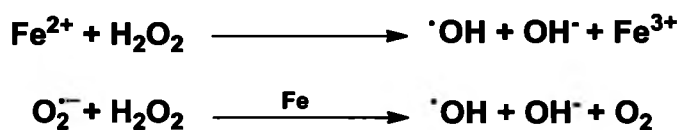


2.5 Reakcja Fentona. Reaktywne formy tlenu

Obecność żelaza jest kluczowa dla transportu tlenu w organizmie. Trzeba wobec tego odnotować konsekwencje wynikające z oddziaływań między tymi dwoma pierwiastkami. Pod koniec XIX w Fenton opisał reakcję zachodzącą pomiędzy nadtlenkiem wodoru a żelazem (II) prowadzącą do tworzenia rodnika hydroksylowego (Schemat 1)⁴¹.

Schemat 2

Generowanie rodnika hydroksylowego w reakcji Fentona oraz Habera-Weissa



Przedstawione reakcje mogą zachodzić spontanicznie, charakteryzując się relatywnie dużymi stałymi szybkości reakcji ($k \geq 100 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)⁴². Pierwsza z powyższych reakcji uważana jest za główne źródło rodnika hydroksylowego, reaktywnej formy tlenu ROS (ang., *reactive oxygen species*)⁴³, posiadającej zdolność wywoływania śmierci komórkowej. Podkreślić należy fakt, iż anionorodnik ponadtlenkowy spełnia w komórkach rolę reduktora żelaza(III), będąc jednocześnie prekursorem nadtlenu wodoru w reakcji katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową⁴⁴. Żelazo(III) znajdujące się w organizmie, może ulegać również procesom konwersji przy udziale bioreduktorów takich jak askorbinian, NADH, zredukowany glutation a nawet grupy tiolowe białek⁴⁵. Uważa się również, że czynnikiem limitującym generowanie rodnika hydroksylowego jest biodostępność żelaza (II), gdyż nadtlenek wodoru łatwo penetruje błony komórkowe, mogąc się przemieszczać na stosunkowo duże odległości⁴⁶.

Chemia reakcji Fentona dotyczy nie tylko żelaza lecz także takich metali jak miedź, kobalt, mangan, chrom oraz ich kompleksów z labilnymi ligandami^{47,48}. Przykładowo grupa Xie opisała⁴⁹ sposób na wykrywanie katalizowanej przez miedź reakcji Fentona poprzez zastosowanie sondy fluorescencyjnej. W podobnej pracy badano wpływ katalizowanej kationami kobaltu(II) reakcji Fentona na uszkodzenia DNA. Wykazano że inkubacja soli Co(II) z nadtlakiem wodoru, w obecności komórkowego chelatora anseryny, prowadzi do wytworzenia rodnika hydroksylowego⁵⁰. Ponadto, przeprowadzone pomiary fizykochemiczne potwierdziły, że układ Fe(II)-EDTA jest reaktywny w reakcji Fentona, zaś kompleks żelaza z transferyną nie katalizuje reakcji Habera-Weissa (reakcja 2, **Schemat 1**)⁵¹. Stworzono również model eksperymentalny, pozwalający na ilościowe oszacowanie zdolności szeregu chelatorów żelaza (m.in EDTA, cytryniany, pochodne kwasu nitrylotriooctowego), do generowania rodnika hydroksylowego w reakcji Fentona⁵²

2.6 Spektroskopia EPR w badaniu reaktywnych form tlenu. Pułapkowanie spinowe

Narzędziem badawczym, pozwalającym na obserwacje paramagnetycznych indywiduów chemicznych, takich jak rodniki organiczne i nieorganiczne oraz stanów trypletowych⁵³ jest spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR, ang. *Electron Paramagnetic Resonance*). Technika ta skupia się na oddziaływaniu

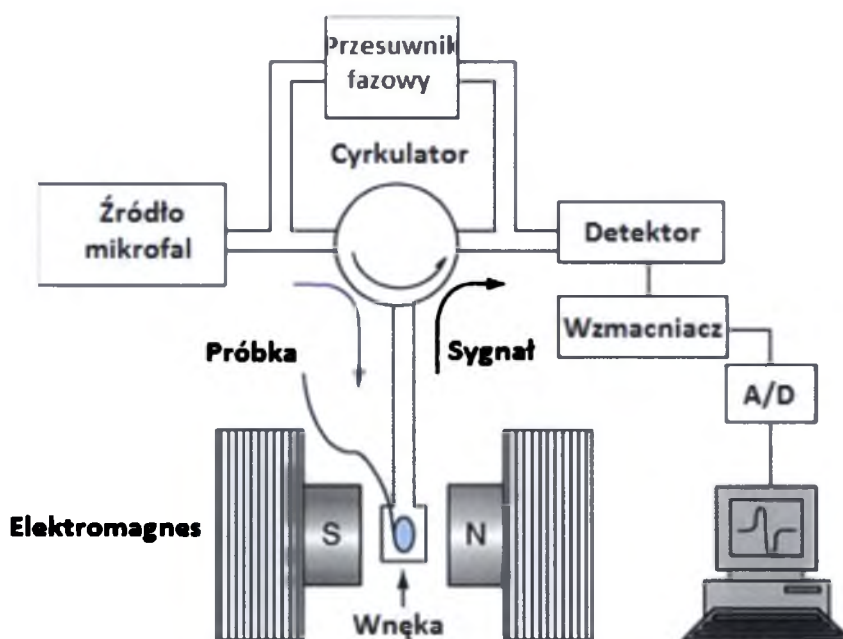
zewnętrznego pola magnetycznego z niesparowanymi elektronami w danej cząsteczce⁵⁴. Kiedy atom lub cząsteczka z niesparowanym elektronem znajdzie się w zasięgu silnego pola magnetycznego (typowa wartość dla spektroskopu EPR to 0,3 T), spin elektronu może przyjąć ułożenie zgodne lub niezgodne z liniami pola magnetycznego. Te dwie orientacje różnią się między sobą energią, a różnica ta może być opisana wzorem:

$$E_1 - E_2 = h\nu = g\mu_B\theta$$

Gdzie: h - stała Plancka, $6,63 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$; ν - częstość [Hz]; g -współczynnik giromagnetyczny; μ_B - magneton Bohra, $9,274 \cdot 10^{-24} \text{ J}\cdot\text{T}^{-1}$; θ - indukcja pola magnetycznego [T]

Rys 4

Schemat budowy spektroskopu EPR⁵⁵.



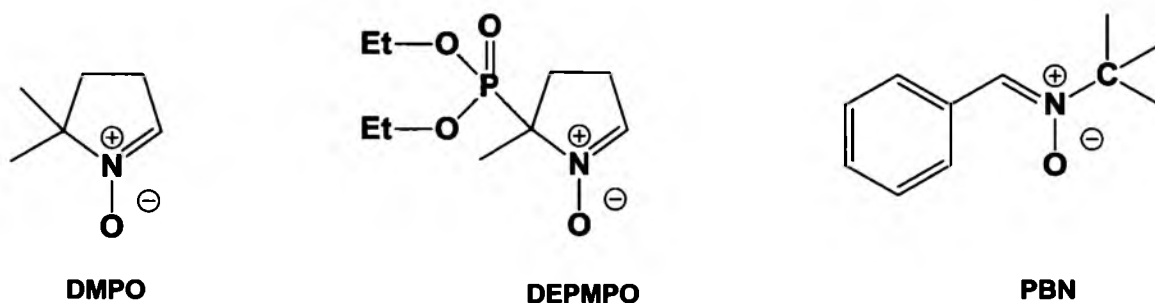
Typowe spektroskopy EPR posiadają stałą wartość częstości, różniąc się wartościami generowanego pola magnetycznego (w przeciwieństwie do spektroskopii NMR). Większość aparatów działa w zakresie 8-10 GHz (pasmo X), co wiąże się z zastosowaniem pola mikrofalowego w celu osiągnięcia rezonansu⁵⁶. (Rys 4). Po

zarejestrowaniu widma cząsteczki paramagnetycznej, możemy przypisać charakterystyczne dla niej sygnały, analizując jej strukturę nadsubtelną, czyli rozszczepienie linii rezonansu na składowe. Źródłem struktury nadsubtelnej w spektroskopii EPR są oddziaływania magnetyczne pomiędzy spinem elektronu, a magnetycznymi momentami dipolowymi jąder występujących w danym rodniku⁵⁷.

Rodniki posiadają niezwykle krótkie czasy życia, co powoduje szereg trudności związanych z ich detekcją. W celu poprawy warunków rejestracji tych niezwykle reaktywnych indywiduów chemicznych⁵⁸ zaproponowano użycie tzw. pułapek spinowych (ang. *spin traps*). Jako pułapki spinowe przejęto określać związki chemiczne (najczęściej nitrony) tworzące z wolnymi rodnikami paramagnetyczne addukty, będące bardziej stabilne w porównaniu do wyjściowych związków⁵⁹. Do najczęściej stosowanych pułapek spinowych należą (Rys 5) DMPO (*N*-tlenek 5,5-dimetylo-1-piroliny), DEPMPO (*N*-tlenek 5-(dietoksyfosforylo)-5-etylo-1-piroliny) oraz PBN (*N*-*tert*-butylofenylnitron).

Rys 5

Wzory wybranych pułapek spinowych



Optymalne warunki pułapkowania spinowego osiąga się w taki sposób by:

- Widmo danego adduktu pozwalało na swobodną identyfikację przyłączonego rodnika,
- Powstały paramagnetyczny addukt powinien być trwały. Np. addukt DMPO-OH[•] charakteryzuje się okresem półtrwania wynoszącym około 25 minut⁶⁰,

- Stała szybkości reakcji powstawania adduktu była na tyle duża, aby uniknąć stosowania nadmiernych stężeń pułapki spinowej.

2.7 Zastosowanie chelatorów w leczeniu zaburzeń metabolizmu żelaza

Ze względu na dużą liczbę białek zaangażowanych w transport żelaza w komórce oraz stopień skomplikowania jego przemian, niewielkie zmiany w szlaku metabolicznym mogą spowodować poważne problemy z jego biodystrybucją i magazynowaniem. Na przykład, nadmiar żelaza, który nie może zostać związany przez ferrytynę, może uczestniczyć w reakcji Habera-Weissa a w rezultacie prowadzić do stresu oksydacyjnego⁶¹. Proces ten sprowadza się do generowania reaktywnych form tlenu niebezpiecznych dla organelli komórkowych. W celu przeciwdziałania powyższym czynnikom stosuje się terapie polegające na chelatowaniu żelaza, wyłączając je z szeregu reakcji katalitycznych prowadzących do powstawania wolnych rodników⁶².

Jednym z pierwszych zastosowań chelatorów żelaza w medycynie było leczenie pacjentów z niedokrwistością tarczowatokrwinkową (β -telasemią)⁶³. Jako przyczynę powyższej choroby uważa się mutację w genie kodującym podjednostkę β hemoglobiny, co powoduje zaburzenia w jej syntezie, a w rezultacie prowadzi do poważnej anemii. W pierwszym etapie terapii β -telasemii przeprowadza się transfuzję krwi, prowadzącą w niektórych przypadkach do nadmiernego stężenia żelaza we krwi oraz uszkodzenia organów wewnętrznych. W walce ze skutkami ubocznymi transfuzji używa się nietoksycznego chelatora żelaza (np. DFO), który wpływa na poprawę morfologii krwi u pacjentów⁶⁴.

Ataksja Friedreicha (ang. Friedreich's Ataxia) jest dziedziczną chorobą genetyczną charakteryzującą się poważnymi zwyrodnieniami układu nerwowego prowadzących m.in. do ataksji chodu⁶⁵. W tych warunkach następuje gromadzenie się żelaza w organizmie w wyniku zmniejszonej ekspresji białka frataksyny⁶⁶, biorącego udział w homeostazie żelaza w mitochondrium. Nadmiarowe żelazo gromadzące się w mitochondriach jest niebezpieczne ze względu na możliwość uszkodzenia mitochondrium poprzez procesy wolnorodnikowe⁶⁷. Dlatego zastosowanie chelatorów żelaza, o odpowiednich właściwościach fizykochemicznych pozwalających na

swobodne penetrowanie mitochondriów, jest atrakcyjną i aktualnie testowaną strategią walki z tą chorobą⁶⁸.

2.8 Żelazo jako cel molekularny terapii przeciwnowotworowej

Terapie oparte o chelatowanie żelaza komórkowego mają obecnie zastosowanie nie tylko w walce z patologiami związanymi z metabolizmem żelaza, lecz również w walce z chorobami nowotworowymi^{69,70}. Chelatory posiadające większą lipofilowość są znacznie bardziej skuteczne w terapii, ze względu na łatwość przenikania przez błony biologiczne a co za tym idzie możliwość lepszego wiązania żelaza wchodzącego w skład podjednostki R2 reduktazy rybonukleotyduowej⁷¹. Ponadto chelatory o dużej aktywności przeciwnowotworowej, nie tylko posiadają zdolność do kompleksowania żelaza lecz także wzmagają jego aktywność w reakcjach redoks^{72,73} (Tabela 1). Dotyczy to zwłaszcza ligandów posiadających zdolność do kompleksowania zarówno Fe(II) i Fe (III). Dla przykładu, chelatory posiadające w swojej strukturze „miękkie” atomy takie jak azot, wykazują niższe potencjały redoks a skompleksowane przez nie żelazo może być enzymatycznie zredukowane w warunkach biologicznych⁷³. W rezultacie żelazo (II) może katalizować powstawanie reaktywnych form tlenu prowadzące do śmierci komórki. Z drugiej strony, chelatory zawierające w miejscu koordynacji „twarde” atomy takie jak tlen (przykładem może być tutaj Deferoksamina, DFO) posiadają większe powinowactwo do żelaza (III). Jako że DFO jest ligandem heksadentnym, jego sfera koordynacyjna jest w pełni zapełniona, uniemożliwiając tym samym dostęp nadtlenkowi wodoru do atomu centralnego⁷².

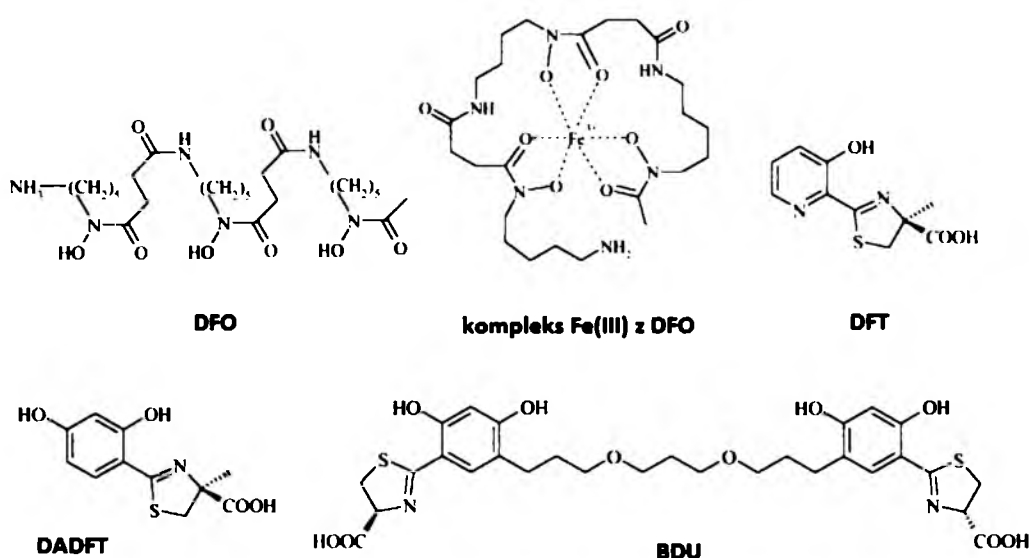
2.8.1 Siderofory

Siderofory to substancje pochodzenia naturalnego, wytwarzane przez mikroorganizmy w celu absorpcji nierozpuszczalnego w środowisku naturalnym żelaza⁷⁴. Te niskocząsteczkowe chelatory są odpowiedzialne za przeprowadzenie metali w rozpuszczalną formę potrzebną do transportu i metabolizmu w mikroorganizmach. Ich swoistą cechą jest wysokie powinowactwo do żelaza⁷⁵. Ich struktury stanowią interesujący model, który może być wykorzystany w celu projektowania nowych chelatorów żelaza o działaniu przeciwnowotworowym.

Deferoksamina (Desferal®) (**Rys 4**) należy do grupy ligandów heksadentnych pochodzenia naturalnego, a za jej wytwarzanie odpowiedzialne są bakterie *Streptomyces pilosus*. Substancja ta jest z powodzeniem stosowana w przypadku chorób związanych z zaburzeniami metabolizmu żelaza w ludzkim organizmie (rozdział 1.5)^{76,77}.

Rys 4

Wybrane struktury sideroforów i ich pochodnych⁷⁸



Wysokie powinowactwo DFO do żelaza na III stopniu utlenienia przekłada się na tworzenie kompleksów w stosunku 1:1, prowadząc do dezaktywacji żelaza w procesach wolnorodnikowych. Przeprowadzono szereg badań dotyczących przeciwnowotworowych właściwości DFO, badając modele zwierzęce oraz wykonując testy kliniczne. Obserwowano proces hamowania wzrostu komórek nowotworowych dla nerwiaka płodowego, nowotworu krtani, jajników oraz białaczki⁷⁹⁻⁸¹. Badano również wpływ dodatku soli żelaza na właściwości przeciwnowotworowe DFO, obserwując znaczny spadek w aktywności przeciwrakowej siderofora⁸². Kolejnym czynnikiem modulowanym przez terapię wykorzystującą Deferoksaminę jest zwiększona ekspresja receptora *TfR1* oraz obniżenie poziomu ferrytyny⁸³. Najnowsze wyniki badań

klinicznych wskazują na potencjalną efektywność terapii z użyciem DFO jako chemioterapeutyka. W testach na 10 pacjentach z opornymi na chemoterapię nowotworami wątroby zaobserwowano efekt przeciwnowotworowy u dwóch pacjentów oraz zatrzymanie stopnia zaawansowania choroby u trzech pacjentów⁸⁴.

Tabela 1

Aktywność biologiczna wybranych chelatorów żelaza.

Chelator	Koordynacja	Efekt na komórki nowotworowe	Zastosowania	Specyficzność	Zalety	Wady
DFO	heksadentna	zatrzymanie cyklu w fazie G ₀ -G ₁ ; apoptoza (+) synteza DNA (-); p53 (+)	standard leczenia w zaburzeniach metabolizmu żelaza	inhibitor (RR)	stosowany w chorobach związanych z metabolizmem Fe	droga wprowadzania; szybki metabolizm
deferypron	bidentna	zatrzymanie cyklu w fazie G ₀ -G ₁ ; apoptoza (+); synteza DNA (-)	dopuszczony do leczenia klinicznego (wadliwy obieg Fe)	-	podawany ustnie	nieaktywny <i>in vivo</i> niepożądane skutki uboczne
PIH	tridentna	slabe dzialanie przeciwnowotworowe	-	-	neutralny w fizjologicznym pH	slabe wlasnosci przeciwrakowe
O-Trensox	heksadentna	apoptoza (+); synteza DNA (-)	-	areszt G ₀ -G ₁	-	analogi, niska aktywnosc
deferasirox	tridentna	zatrzymanie cyklu w fazie G ₀ -G ₁ ; apoptoza (+);	sukcesy w leczeniu białaczki	NK-κB (-) mTOR (-)	aktywny doustnie	w trakcie dalszych badań

Poza szeregiem zalet DFO, posiada również istotne mankamenty. Duża hydrofilowość siderofora prowadzi do jego słabej absorpcji z układu pokarmowego oraz do szybkiego metabolizmu we krwi (okres półtrwania leku wynosi tylko 12 minut)⁸⁵. W związku z tym DFO jest wprowadzane do organizmu w postaci zastrzyków podskórnych około pięć razy w tygodniu (w dawce od 20 do 60 mg/kg ludzkiego ciała). Poza uciążliwym i kosztownym sposobem podawania deferoksaminy jedna trzecia pacjentów odczuwa bóle oraz uciążliwe skutki uboczne związane z wprowadzeniem leku do organizmu^{86,87}.

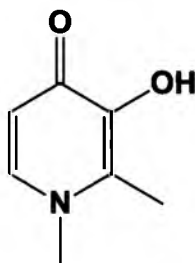
Desferytiocyna (DFT) należy do grupy tridentatnych sideroforów syntezowanych przez bakterie z rodziny *Streptomyces antibioticus*⁸⁸. Za koordynację atomów żelaza odpowiedzialne są w tym przypadku fenolowe grupy –OH oraz azot z pierścienia tiazolowego⁷⁷. Badania prowadzone na małpach z zaburzonym metabolizmem żelaza, potwierdziły trzykrotnie większą skuteczność DFT nad DFO⁸⁹. Badania przeprowadzone w grupie Bakera potwierdziły atrakcyjne właściwości przeciwnowotworowe na komórkach nowotworu wątroby, przy relatywnie niskiej toksyczności dla normalnych hepatocytów⁹⁰. Pomimo obiecujących wyników na modelach *in vivo* niepokojącym skutkiem ubocznym DFT oraz jej syntetycznego analogu DADFT, jest duża nefrotoksyczność oraz zaburzenia w trawieniu⁸⁸.

2.8.2 Deferypron

Deferypron (Ferriprox®) jest syntetycznym ligandem chelatującym metale grupy d, stosowanym początkowo w terapiach związanych z nadmiernym gromadzeniem żelaza w organizmie⁹¹. Chelator ten kompleksuje kationy metali jako ligand bidentny, wykazując szczególne powinowactwo do żelaza, miedzi oraz glinu⁹². Deferypron przeszedł testy kliniczne i został zaakceptowany do walki z β -telasemią wśród pacjentów nie tolerujących DFO (akceptacja w Europie, brak akceptacji w USA i Kanadzie)⁹³.

Rvs 5

Struktura Deferypronu



Deferypron

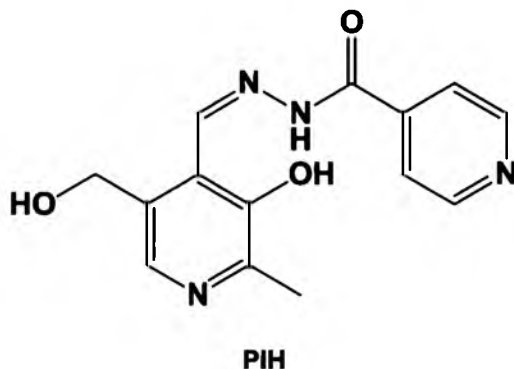
Wykazano, iż Deferypron posiada właściwości przeciwnowotworowe, które opisano dla szeregu linii komórkowych (nowotwory: skóry, wątroby, jajników oraz niektóre typy białaczek^{80,94,95}. Podczas prowadzonych badań udowodniono zarówno wysoką selektywność w działaniu chelatora (nietoksyczny dla fibroblastów) jak również brak aktywności przeciwnowotworowej dla nowotworu ślinianki⁹⁵. Badania przeprowadzone na cytometrze przepływowym wskazały apoptozę jako model śmierci komórkowej w wyniku traktowania komórek deferypronem oraz potwierdziły aktywację przez niego szlaku kaspaz⁹⁴. Pomimo atrakcyjnych właściwości przeciwnowotworowych *in vitro*, chelator ten okazał się nieaktywnym chemioterapeutycznym na modelu mysim⁸⁶. Obserwowano jednocześnie szereg skutków ubocznych dla powyższego związku, takich jak spadek poziomu neutrofilii we krwi, bóle stawów oraz zaburzenia w trawieniu⁹³.

2.8.3 Hydrazonoizonikotynylo pirydoksalu

Hydrazon izonikotynoilo pirydoksalu PIH (ang. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone) został zsyntezowany w 1954 roku jako związek o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych⁹⁶. Jego synteza polega na stosunkowo prostej kondensacji pirydoksalu z odpowiednim hydrazylem, otrzymując w rezultacie tridentny ligand typu zasady Schiffa⁹⁷. PIH koordynuje żelazo poprzez układ składający się z iminowego atomu azotu, tlenu z grupy fenolowej oraz tlenu grupy karbonylowej, tworząc preferencyjnie kompleksy z żelazem(III)⁹⁸

Rys 6

Struktura hydrazonu izonikotynylo-pirydoksalu



Przeprowadzone dotychczas badania wskazują, że hydrazon izonikotynylo-pirydoksalu może być stosowany jako zamiennik DFO w chorobach związanych z zaburzeniami metabolizmu żelaza⁹⁹. Warto zauważyć, że powyższy chelator wykazuje znacznie większą efektywność w poborze żelaza komórkowego z transferyny, co jest tłumaczone poprzez jego większą hydrofobowość oraz korzystną wartość pK_a w porównaniu do siderofora DFO¹⁰⁰. Korzystne właściwości farmakokinetyczne PIH-u pozwalają na doustną formę jego podawania, co jest jego dużą zaletą w porównaniu do chelatorów żelaza podawanych poprzez długotrwałe wstrzykiwania podskórne¹⁰¹.

Dzięki dobrym właściwości kompleksujących żelazo, oraz skuteczności leczenia telassemi spodziewano się, że hydrazon izonikotynylo-pirydoksalu będzie wykazywał efekty cytotoksyczne na komórkach nowotworowych. Niestety w porównaniu do DFO ($IC_{50} = 22 \mu M$) PIH wykazuje umiarkowane właściwości przeciwnowotworowe ($IC_{50} = 75 \mu M$), wskazując, iż aktywność przeciwnowotworowa nie jest w prosty sposób powiązana ze zdolnościami kompleksującymi liganda⁷¹. Dalsze badania hydrazonu przeprowadzone na zwierzętach, wykazały bezpieczny profil toksykologiczny związku, sugerując dalsze badania kliniczne w kierunku zastosowań chelatora w chorobach związanych z nagromadzeniem żelaza w organizmie¹⁰².

2.8.4 O-Trensox

O-Trensox (tris-*N*-(2-aminoetylo-[8-hydroksychinolino-5-sulfono-7-karboks-amido])amina należy do grupy ligandów heksadentnych wiążących zarówno żelazo(II) jak (III) w stosunku 1:1¹⁰³. Stała trwałości kompleksu z Fe(III) wynosi 30 co potwierdza, że ligand ten należy do najsilniejszych syntetycznych chelatorów żelaza¹⁰⁴.

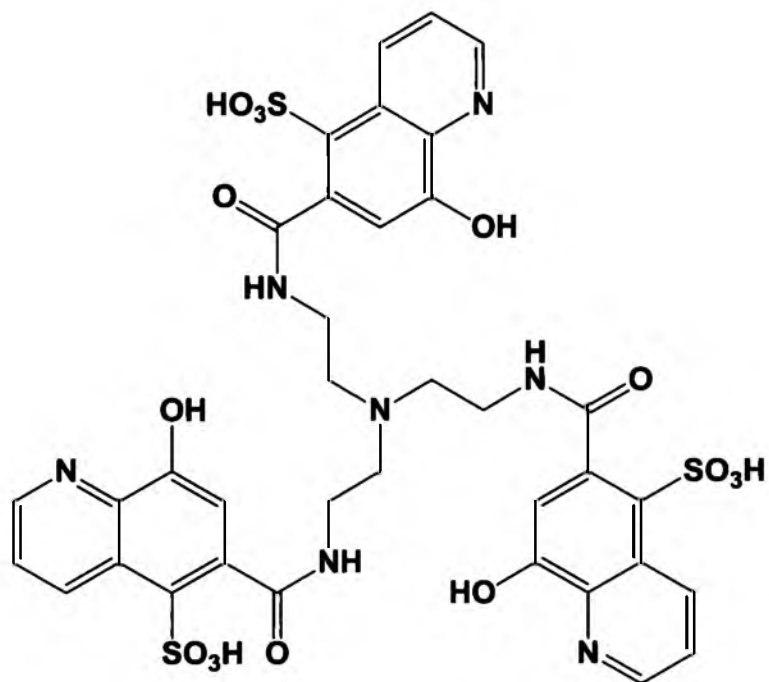
Badania prowadzone na hepatocytach wskazują, iż DFO jest skuteczniejsze od liganda hydroksychinolinowego w wychwycie żelaza z ferrytyny¹⁰⁵. Z drugiej jednak strony O-Trensox okazał się skuteczniejszy w obniżaniu poziomu żelaza w szczurzych hepatocytach w porównaniu do DFO. W układach pseudofentonowskich¹⁰⁵ O-Trensox wykazał zdolność do zapobiegania uszkodzeniom wobec reakcji wolnorodnikowych. Pozytywne wyniki eksperymentów zainspirowały do badań nad potencjalnym zastosowaniem związku w terapii nowotworów wątroby. Eksperymenty przeprowadzone na czterech liniach nowotworowych potwierdziły hipotezę, że O-Trensox posiada właściwości cytotoksyczne, hamując jednocześnie proces syntezy DNA indukując apoptozę poprzez szlak kaspaz¹⁰⁶. Powyższe efekty były częściowo odwracalne, gdyż po dodaniu do medium komórkowego kationów żelaza lub cynku, obserwowano spadek aktywności związku¹⁰⁶. Przedstawione dane eksperymentalne świadczą o ścisłym powiązaniu działania przeciwnowotworowego tego związku, z chelatowaniem metali. Możliwe również, że powstały kompleks z O-Trensoxem nie jest w stanie przedostać się do wnętrza komórki i w ten sposób limituje jego aktywność.

2.8.5 Deferasirox

Exjade® (Deferasirox, **Rys 8**) jest komercyjnym lekiem chelatującym żelazo, zarejestrowanym przez FDA oraz EMA, i wprowadzonym na rynek przez firmę Novartis w 2005 roku¹⁰⁷. Związek ten posiada zdolność do koordynowania żelaza(III), tworząc kompleksy w stosunku 2:1 (L : Fe³⁺)¹⁰⁸. Podobnie do Deferypronu jest podawany doustnie, a jego okres półtrwania mieści się w granicach 7-18 godzin, co czyni go lekiem konkurencyjnym w stosunku do DFO¹⁰⁷.

Rvs 7

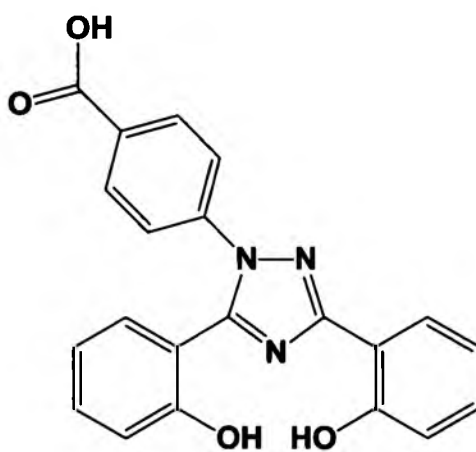
Struktura O-Trensoxu



O-Trensox

Rvs 8

Struktura deferasiroxu



Deferasirox

Podobnie jak w przypadku poprzednich chelatorów, przeprowadzono eksperymenty mające na celu ocenę działania przeciwnowotworowego Deferasiroxu^{109–111}. Opisano działanie przeciwnowotworowe chelatora oparte na indukowaniu apoptozy oraz hamowanie procesu replikacji DNA na przykładzie chronicznych nowotworów wątroby¹⁰⁹. W przytoczonych badaniach obserwowano również efekt nasycenia liganda żelazem, który spowodował obniżenie efektów cytotoksycznych dla badanego związku. Jest jednak kwestią bezsporną, że mechanizm działania powyższego chelatora nie opiera się wyłącznie na zdolności do kompleksowania żelaza komórkowego, lecz jest sumą interakcji związku z różnymi celami molekularnymi. Najnowsze badania wskazują, że Deferasirox wpływa na aktywność kompleksu białkowego NF-κB (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), kluczowego podczas transkrypcji DNA¹¹². Desferasirox jest inhibitorem czynnika NF-κB działającym poprzez blokowanie jego transportu z cytozolu do jądra komórkowego, a tym samym brak możliwości udziału w procesie transkrypcji. Inne prace wskazują, że Exjade® ma wpływ na zaburzenia w działaniu kinazy mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin kinase*) regulującej wzrost i proliferację komórek¹¹¹. Aktywność tego białka w komórkach neoplastycznych odbiega od normy i prowadzi do powstawania zmian nowotworowych¹¹³. Fakt ten jest niezwykle ciekawy i ma duże znaczenie dla pełnego poznania i wyjaśnienia efektów cytotoksycznych Desferasiroxu.

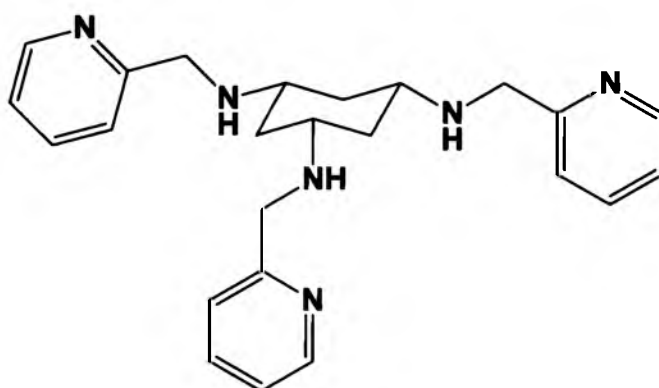
Desferasirox został również przebadany na modelu *in vivo*. Przeprowadzone eksperymenty potwierdziły jego skuteczność w hamowaniu wzrostu mysich guzów przy jednoczesnym braku skutków ubocznych¹¹¹. Zebrane dane pozwoliły na rozpoczęcie kolejnego etapu w badaniu właściwości przeciwnowotworowych- testom na pacjentach. Przeprowadzone w 2011 roku badania na pacjentach z białaczką odporną na chemioterapeutyki, potwierdziły efektywność działania chelatora prowadzącą do całkowitego zaniku nowotworu¹¹⁴.

2.8.6 Tachpirydyna

Tachpirydyna (ang. tachpyridine, **Rys 9**) należy do grupy heksadentnych chelatorów żelaza o potencjalnym zastosowaniu w walce z chorobami nowotworowymi¹¹⁵. Związek ten wykazuje zdolność do kompleksowania wielu kationów metali m.in. Fe(II), Zn, Cu(II) oraz Mn(II)¹¹⁵. W obecności tlenu kompleks tachpirydyna-Fe(II) ulega procesowi dehydrogenacji tworząc skomplikowaną mieszaninę mono- i diiminowych kompleksów żelaza (II).

Rys 9

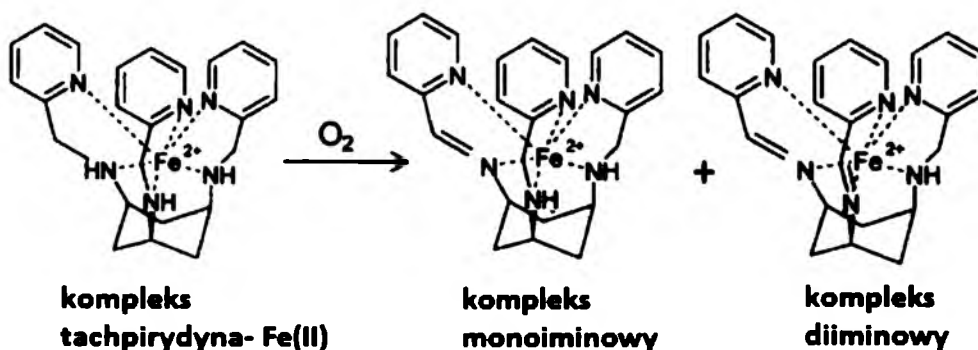
Struktura tachpirydyny



Tachpirydyna

Rys 10

Schematyczne przedstawienie możliwości tworzenia kompleksów iminowych tachpirydyny z żelazem(II)¹¹⁶



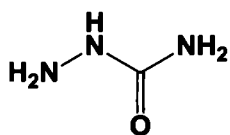
W porównaniu do umiarkowanie aktywnego DFO ($IC_{50} = 70 \mu M$), tachpirydyna wykazuje większą aktywność przeciwnowotworową ($IC_{50} = 5 \mu M$) powiązaną z indukcją apoptozy oraz degradacją jądra komórkowego¹¹⁷. Równocześnie związek ten zachowuje stosunkowo dużą selektywność działania w porównaniu do fibroblastów¹¹⁵. Badania nad mechanizmem działania chelatora wykazały, że jego kompleksy z wapniem, magnezem oraz manganem(II) wykazują znaczną cytotoksyczność, porównywalną z tachpirydyną. Przeciwnie działanie obserwowano dla kompleksów liganda z żelazem(III), miedzią(II) i cynkiem. Jest to spowodowane tym, że w pierwszym przypadku stała trwałości kompleksów jest niska i obserwowany efekt cytotoksyczny jest de facto wynikiem aktywności samego liganda¹¹⁸. Podobnie jak wcześniej omówione chelatory tachpirydyna wykazuje zdolność indukowania apoptozy w komórkach nowotworowych zatrzymując cykl komórkowy w fazie G2¹¹⁹. Co ciekawe jej pochodna *N*-metylowa z ograniczoną zdolnością chelatowania metali, nie wykazuje podobnych efektów przeciwrakowych, co potwierdza mechanizm działania chelatora poprzez wiązanie zasobów żelaza w proliferujących komórkach neoplastycznych¹¹⁹.

2.9 Tiosemikarbazony

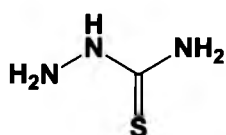
Z punktu widzenia chemii organicznej semikarbazony zaliczyć można do szerokiej grupy pochodnych iminowych powstałych w wyniku kondensacji pomiędzy semikarbazydem a odpowiednim ketonem lub aldehydem. Tiosemikarbazony są ich siarkowymi analogami o interesujących właściwościach kompleksujących i szerokich zastosowaniach w medycynie^{78,120,121}.

Rvs 11

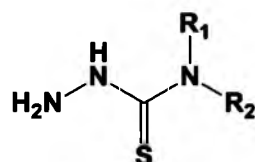
Przykładowe wzory ogólne pochodnych (tio)iminowych



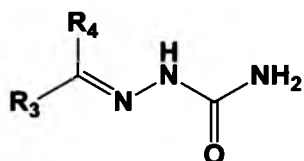
semikarbazyd



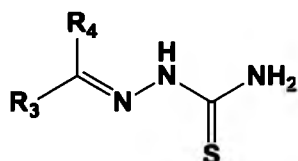
tiosemikarbazyd



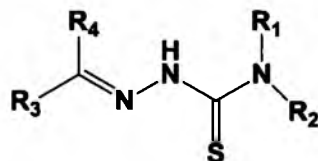
N-podstawiony tiosemikarbazyd



semikarbazon



tiosemikarbazon



N-podstawiony tiosemikarbazon

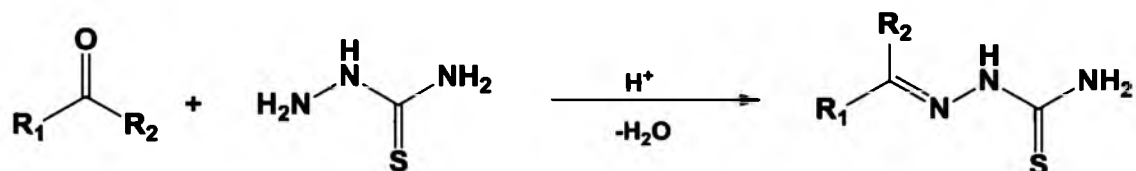
$R_1, R_2, R_3, R_4 = \text{H, alkil, aryl}$

2.9.1 Główne metody syntezy tiosemikarbazonów i ich prekursorów tiosemikarbazydowych

Klasyczna metoda otrzymywania tiosemikarbazonów polega na ogrzewaniu odpowiedniego ketonu lub aldehydu z tiosemikarbazydem z zastosowaniem kwaśnego katalizatora¹²² (**Schemat 3**). Ta stosunkowo prosta reakcja pozwala również na otrzymywanie bardziej złożonych tiosemikarbazonów np. pochodnych steroidów¹²³. Najnowsze doniesienia literaturowe podają również szereg modyfikacji w szczególności z wykorzystaniem pola mikrofalowego oraz cieczy jonowych^{124,125}.

Schemat 3

Reakcja otrzymywania tiosemikarbazonów z prekursorów tiosemikarbazydowych



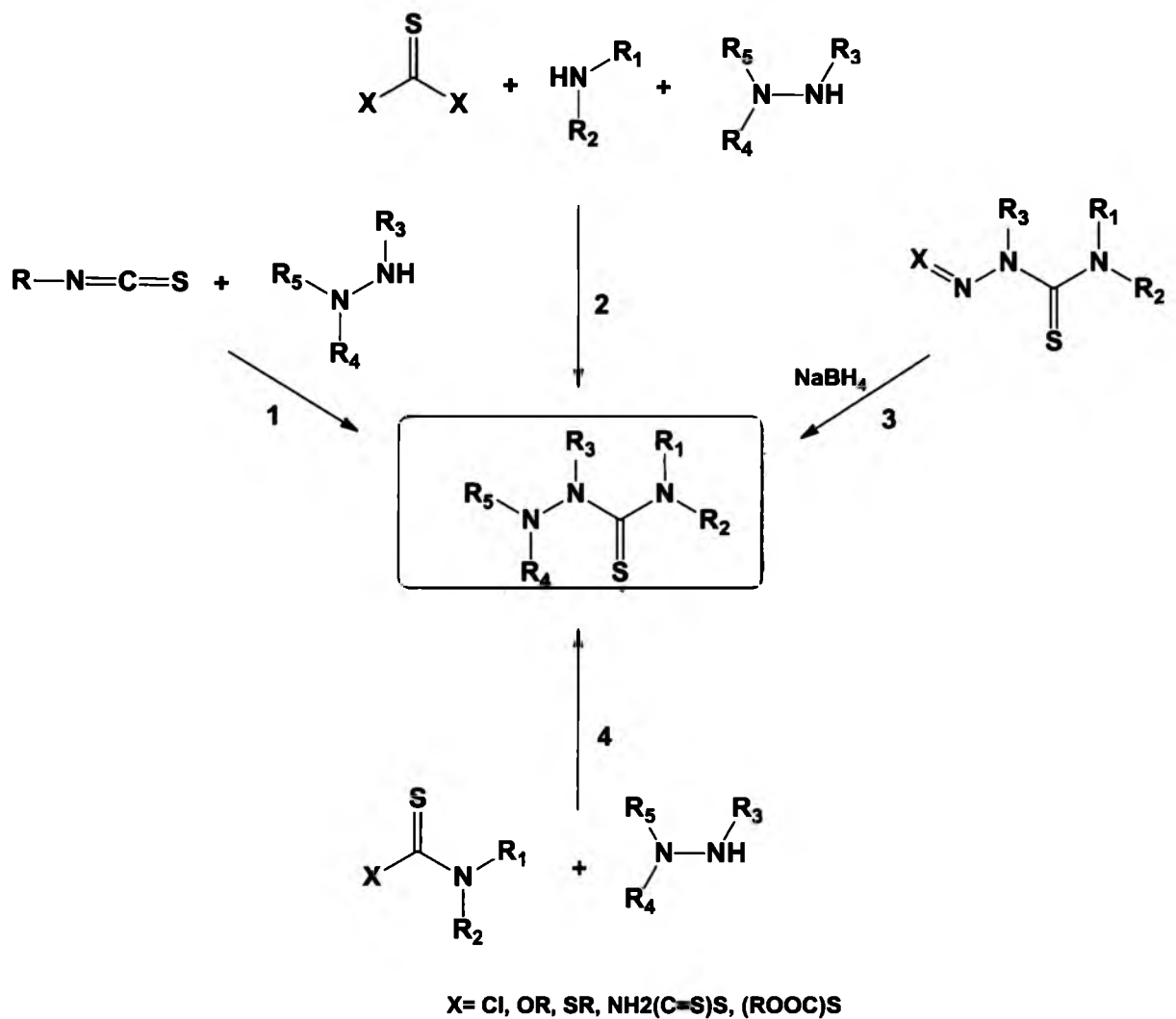
$\text{R}_1, \text{R}_2 = \text{H}, \text{alkil}, \text{aryl}, \text{heteroaryl}$

Prekursory tiosemikarbazydowe są dogodnymi substratami do syntezy tiosemikarbazonów oraz pięcioczłonowych związków heterocyklicznych¹²⁶. Główne podejścia syntetyczne do otrzymywania tej klasy związków sprowadzają się do 4 najważniejszych typów reakcji (**Rys 12**):

- reakcje pomiędzy izotiocyanianami a pochodnymi hydrazyny (**1**). Ta grupa reakcji prowadzi do otrzymywania tiosemikarbazydów z umiarkowanymi wydajnościami; kłopotliwe przechowywanie izotiocyanianów oraz ich reaktywność¹²⁷,
- reakcje pomiędzy pochodnymi tioketonów ($\text{X} = \text{imidazol}$ lub benzotriazol) podstawionymi aminami i hydrazynami (**2**). Zaletami powyższej dwuetapowej metody są bardzo wysokie wydajności obu etapów oraz proste wyodrębnienie produktów¹²⁸,
- redukcje tiosemikarbazonów z użyciem borowodoru sodu (**3**). Ograniczeniem tej metody jest możliwość otrzymania tiosemikarbazydów, które w pozycji R_2 oraz R_5 posiadają atom wodoru¹²⁹,
- reakcje pochodnych hydrazyny z kwasami tiokarbaminowymi (**4**). Ta grupa reakcji charakteryzuje się umiarkowanymi wydajnościami oraz dużą ilością produktów ubocznych, co komplikuje oczyszczanie tiosemikarbazynu.

Rvs 12

Wybrane metody otrzymywania tiosemikarbazydów



2.9.2 Tiosemikarbazony jako leki przeciwgruźlicze i przeciwwirusowe

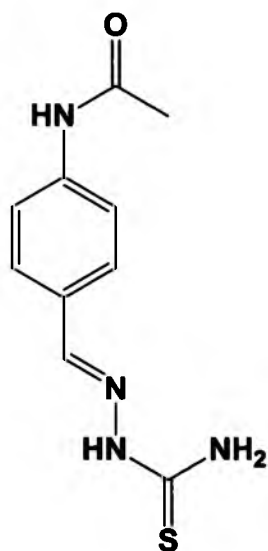
Od początku lat 50 XX w. znane są liczne przykłady bioaktywności tiosemikarbazonów¹³⁰. Dzięki prostej syntezie oraz łatwym metodom oczyszczania heteroaromatyczne tiosemikarbazony są wartościowymi bioefektorami z szerokimi wachlarzem zastosowań farmaceutycznych. Niektóre z nich należą do leków przeciwwirusowych, przeciwbakteryjnych, czy przeciwgrzybiczych¹³¹⁻¹³³.

Tioacetazon (**Rys 13**) jest prolekiem stosowanym w praktyce klinicznej we wspomaganie leczenia gruźlicy¹³⁴. Związek ten jest podawany w kombinacji z izoniazidem w celu zwiększenia jego aktywności przeciwko opornym szczepom *Mycobacterium tuberculosis*. Szczegółowy mechanizm działania tego leku nie jest znany, aczkolwiek wielu autorów sugeruje zaburzenie przez niego szlaku metabolicznego kwasów mykoloowych, wchodzących w skład ściany komórkowej bakterii z rodziny *Mycobacterium*¹³⁵. Ze względu na uporczywe skutki uboczne w przypadku pacjentów dotkniętych wirusem HIV¹³⁶ opracowano szereg analogów strukturalnych tioacetazonu o lepszym działaniu biologicznym¹³⁷.

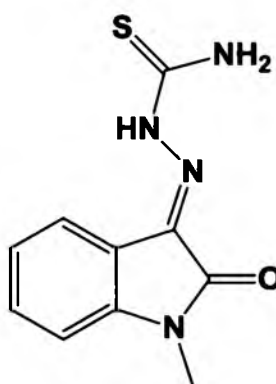
Methizason (marboran, isatyno- β -tiosemikarbazon) (IBN) (**Rys 13**) należy do grupy związków o właściwościach przeciwwirusowych, hamujących syntezę wirusowego mRNA i mających liczne zastosowania w praktyce klinicznej^{138,139}. Badania przeprowadzone w grupie Quenelle¹⁴⁰ potwierdzają na modelu mysim iż powyższe tiosemikarbazony wykazują działanie przeciwwirusowe i wskazują na potencjalne zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej¹⁴¹.

Rys 13

Wzory aktywnych biologicznie tiosemikarbazonów



Tioacetazon



Metisazon

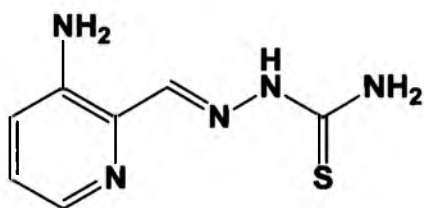
2.9.3 Zastosowanie tiosemikarbazonów w terapii przeciwnowotworowej

Tiosemikarbazony należą do grupy najwcześniej opisanych w literaturze chelatorów żelaza o działaniu przeciwnowotworowym¹⁴². Ligandy z tej grupy wykazują szczególne powinowactwo do Fe(II), Fe(III), Cu(II), Ga(III), Co(II), oraz Zn(II), przy czym aktywność biologiczna kompleksów jest niejednokrotnie większa od wyjściowego liganda¹⁴³. Tiosemikarbazony koordynują metale jako ligandy *N,N,S*-donorowe zarówno w formie obojętnej jak i anionowej¹⁴⁴.

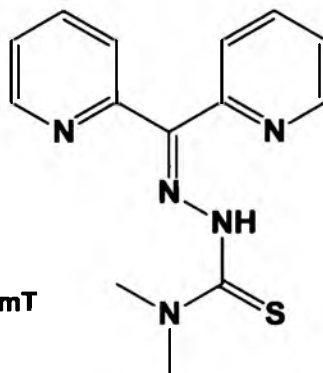
Tiosemikarbazonowe chelatory żelaza wykazują działanie przeciwnowotworowe poprzez następujące mechanizmy:

- hamowanie reduktazy rybonukleotydowej (RR), poprzez wiązanie się chelatora w podjednostce R2 enzymu. Proces ten prowadzi do destabilizacji rodnika tyrozyłowego, a tym samym hamowania reakcji enzymatycznej^{145,146} i hamowania procesu syntezy DNA. Najnowsze doniesienia literaturowe wskazują ponadto, że konkurującym mechanizmem działania jest proces kompleksowania żelaza komórkowego niezbędnego do regulacji działania tegoż enzymu¹⁴⁷,
- generowanie reaktywnych form tlenu (ROS) w reakcji Fentona zainicjowanej obecnością toksycznych dla komórki kompleksów chelatorów z żelazem (II) oraz miedzią (I)¹⁴⁸,
- zatrzymanie cyklu komórkowego na poziomie interfazy G1/S i prowadzące do indukowania apoptozy¹⁴⁹,
- zaburzenie metabolizmu żelaza komórkowego poprzez proces jego chelatowania w efekcie do dezaktywacji RR^{21,32},
- prawdopodobne hamowanie topoiizomerazy II α oraz uszkodzenia DNA¹⁵⁰.

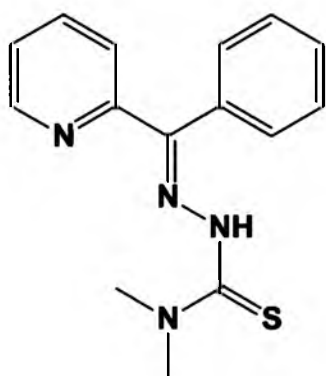
Struktury wybranych tiosemikarbazonów o działaniu przeciwnowotworowym



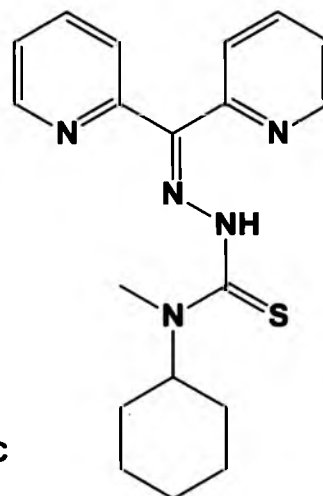
Triapina



Dp44mT



Bp44mT



DpC

Triapina® (Vion Pharmaceuticals) należy do grupy inhibitorów reduktazy rybonukleotydowej o silnym działaniu przeciwnowotworowym, będąc obecnie w III fazie badań klinicznych^{38,151}. Chelator ten nie tylko doskonale kompleksuje żelazo, lecz także posiada zdolność do generowania reaktywnych form tlenu poprzez kompleks Fe(II)-Triapina¹⁵². Przewiduje zastosowanie Triapiny w walce z takimi nowotworami jak rak płuc, jajników oraz w przypadku niektórych białaczek¹⁵³.

Najnowsze doniesienia literaturowe wskazują niezwykle wysoką aktywność heteroaromatycznego tiosemikarbazonu- Dp44mT. Związek ten został przebadany na 28 liniach nowotworowych, wykazując w większości przypadków aktywności na

poziomie nanomolowym¹⁴⁹. Porównanie aktywności antyneoplastycznych oraz indeksu terapeutycznego dla Triapiny, doxorubicyny oraz Dp44mT wskazuje, że ten ostatni związek jest najbardziej aktywną substancją na poziomie *in vitro*. Dalsze testy komórkowe wykazały, że Dp44mT przejawia wysoką aktywność w przypadku chemo- i radioopornych linii nowotworowych¹⁴⁹. Kontynuując badania biologiczne pochodnej ketonu dipirydylowego, przeprowadzono eksperymenty na modelu mysim, potwierdzające wysoką aktywność chelatora, z równoczesnym całkowitym zanikiem guza¹⁵⁴. Niestety badania *in vivo* wykazały kardiotoksyczność Dp44mT w wyższych zakresach stężeń, stąd w grupie Richardsona prowadzono intensywne badania nad syntezą nowych analogów Dp44mT, zaowocowane odkryciem związku DpC, który nie wykazuje powyższych negatywnych efektów¹⁵⁵.

3. Badania własne¹

3.1 Tiosemikarbazony oparte o szkielet chinolinowy

Interesującą koncepcją we współczesnym projektowaniu leków jest teoria dotycząca tzw. fragmentów uprzywilejowanych (**PS**, ang. *privileged structures*) i ich użycia w procesie poszukiwania nowych prekursorów leków^{156,157}. Jako fragmenty uprzywilejowane postrzega się tutaj takie „struktury”, które wykazują zwiększone powinowactwo do celów biologicznych w porównaniu do innych struktur. Zgodnie z tą teorią, użycie odpowiedniego trzonu molekularnego (ang. *Scaffold, framework*) powinno zwiększać szansę na identyfikację fragmentów o wysokim powinowactwie do określonej rodziny receptorów^{158,159}. Przykładem takiego wysokiego powinowactwa do różnego typu obiektów na poziomie molekularnym jest struktura chinoliny¹⁶⁰, której motyw można odnaleźć w szerokiej liczbie leków przeciwnowotworowych¹⁶¹, przeciwwirusowych¹⁶² oraz przeciwgrzybiczych¹⁶³.

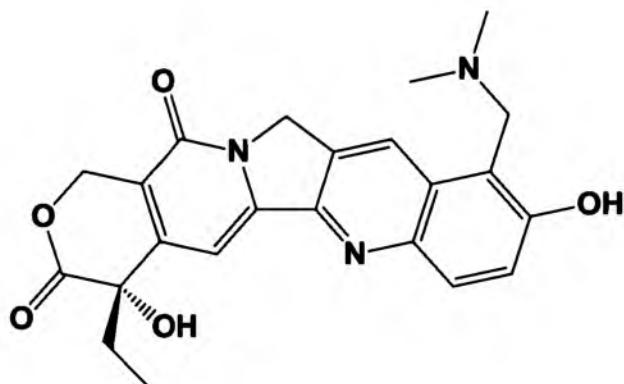
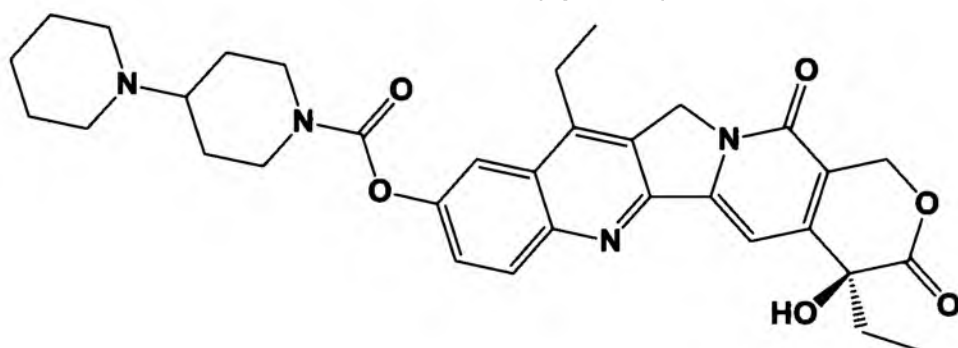
W związku z interesującą aktywnością przeciwnowotworową półsyntetycznych związków naturalnych zawierających motyw chinoliny (m.in. używanych w praktyce klinicznej Hycamtin® oraz Camptosar®)^{161,164}, postanawiano zaprojektować nowe pochodne tiosemikarbazonów zawierające w swojej strukturze ugrupowanie chinolinowe. Podczas projektowania nowych pochodnych heteroaromatycznych tiosemikarbazonów podzielono je na trzy podgrupy.

¹ Badania biologiczne zsyntezowanych chelatorów żelaza zostały przeprowadzone we współpracy z:

- Mgr Anną Mrozek-Wilczkiewicz (Zakład Fizyki Ciała Stałego, Instytut Fizyki UŚ, grupa prof. Alicji Ratusznej)- badania na linii HTC116 oraz fibroblastach, testy klonogenności
- Dr Angeliką Muchowicz (Zakład Immunologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, grupa prof. Jakuba Gołąba)
- Prof. Des Richardsonem (University of Sydney, Australia)- badania na linii komórkowej SK-N-MC, badania nad poborem oraz wychwytem żelaza komórkowego
- Dr Marcelą Vejsową, (Zakład Mikrobiologii Klinicznej, Wydział Farmacji, Uniwersytet Karola, Hradec Kralove, Czechy)- badania aktywności przeciwgrzybiczej

Badania krystalograficzne zsyntezowanych związków oraz ich kompleksy z prekursorami rutenowymi zostały wykonane we współpracy z dr hab. Janem Grzegorzem Małeckim (Zakład Krystalografii, Instytut Chemii UŚ).

Wybrane pochodne chinoliny o działaniu przeciwnowotworowym

**topotecan(Hycamtin)****irinotecan(Camptosar)**

Pierwsza podgrupa zawierała pochodne 8-hydroksy-2-chinolinokarbaldydu, druga opierała się na motywie 2-chinolinokarbaldydu, zaś do ostatniej zaliczyć można tiosemikarbazony oparte na strukturze 7-hydroksy-8-chinolinokarbaldydu. Odpowiednie wzory przedstawiono w **Tabeli 2**. W dwóch pierwszych podgrupach związków można wyodrębnić charakterystyczny fragment (N=C-C=N) znajdujący się w znanych chelatorach z serii DpT oraz BpT. W trzeciej podgrupie fragment ten został zmodyfikowany do formy (N=C-C-C-OH), tzn. do formy analogicznej z chelatorami typu 311 oraz serii NT⁷⁸. Dokładne dane dotyczące syntezy oraz właściwości chemicznych tej rodziny tiosemikarbazonowych chelatorów żelaza opisane zostały w rozdziale 5.4.

Tabela 2

Wzory zsyntezowanych tiosemikarbazonów opartych na fragmencie chinolinowym oraz ich lipofilowość (clogP) obliczonych w programie Chemoffice 12.

Nr	Struktura	clogP	Nr	Struktura	clogP
1a		2,16	2a		2,11
1b		2,06	2b		1,97
1c		2,59	2c		2,50
1d		4,15	2d		4,06
3a		2,16	3c		2,66
3b		2,13	3d		4,22

Aktywność przeciwnowotworowa nowych chelatorów żelaza została przetestowana na komórkach nowotworowych linii: HCT116 p53 +/+ (nowotwór okrężnicy z aktywacją białka p53), HCT116 p53 -/- (nowotwór okrężnicy bez aktywacji białka p53), SK-N-MC (ludzki nerwiak płodowy) oraz NHDF (ludzkie fibroblasty), używając standardowych procedur do wyznaczania parametru IC_{50} ^{71,165}. Linia komórkowa SK-N-MC została wybrana do testowania właściwości przeciwnowotworowych tiosemikarbazonów, ze względu na jej dobrze opisany metabolizm żelaza oraz podatność na działanie metali (Dp44mT, DFO)^{165,166}. Celem tej części prac było określenie aktywności nowych chelatorów żelaza względem wybranych komórek nowotworowych. Wybrane linie komórkowe odpowiadają nowotworom o szczególnym znaczeniu w epidemiologii naszego społeczeństwa bowiem rak okrężnicy jest drugi na liście nieuleczalnych nowotworów złośliwych w Polsce³. Rozszerzeniem tych badań była ocena działania nowych związków na komórki z ekspresją (lub bez) białka p53. Białko to należy do grupy tzw. supresorów nowotworowych¹⁶⁷ (ang. *tumor suppressor*) modulujących procesy proliferacyjne w komórce, zaś mutacje w genie je kodującym (*TP53*) są wykrywane w dużej liczbie nowotworów¹⁶⁸. Odpowiednie wartości aktywności przeciwnowotworowej przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3

Aktywność przeciwnowotworowa chinolinowych chelatorów żelaza w porównaniu do Dp44mT, 311 oraz DFO*.

Nr	IC_{50} [μ mol/l] (HCT116 p53 +/+)	IC_{50} [μ mol/l] (HCT116 p53 -/-)	IC_{50} [μ mol/l] (SK-N-MC)	IC_{50} [μ mol/l] (NHDF)
1a	>15,00	0,27 \pm 0,01	9,69 \pm 1,50	15,84 \pm 2,65
1b	1,71 \pm 0,34	2,17 \pm 0,47	>12,50	>25,00
1c	2,62 \pm 0,59	3,15 \pm 0,68	>12,50	>25,00
1d	24,97 \pm 4,29	20,87 \pm 3,22	>12,50	-

2a	4,86 ± 1,48	0,37 ± 0,02	0,81 ± 0,30	11,66 ± 2,63
2b	>25,00	>25,00	>12,50	-
2c	23,25 ± 4.02	19,56 ± 3,92	>12,50	-
2d	22,34 ± 5.18	21,39 ± 5,69	>12,50	-
3a	20,75 ± 5.34	>25,00	0,11 ± 0,04	>25,00
3b	>25,00	8,06 ± 1,03	0,62 ± 0,09	>25,00
3c	>25,00	>25,00	0,19 ± 0,07	>25,00
3d	16,28 ± 1,69	18,62 ± 2,79	1,63 ± 0,34	14,94 ± 1,61
DFO	-	-	12,50 ± 1,00	-
311	-	-	1,3 ± 0,19	-
Dp44mT	0,002 ± 0.001	0,005 ± 0.002	0,014 ± 0,016	15,38 ± 5.06

*badania wykonane przez mgr Annę Mrozek-Wilczkiewicz (Katowice) oraz prof. Desa Richardsona (Sydney, Australia).

Zastosowane jako wzorce w eksperymencie chelatory DFO ($IC_{50} = 12,50 \pm 1,00 \mu M$) oraz 311 ($IC_{50} = 1,30 \pm 0,19 \mu M$) wykazują umiarkowane właściwości przeciwnowotworowe na linii komórkowej nerwiaka płodowego. W przeciwieństwie do wyżej wymienionych związków, Dp44mT okazuje się być niezwykle aktywny na wszystkich trzech liniach komórkowych wykazując cytotoksyczność w skali nanomolowej. Najbardziej aktywne chelatory z serii **1a** oraz **3a-3d** wykazują umiarkowane aktywności przeciwnowotworowe na linii komórkowej *SK-N-MC* ($IC_{50} = 0,11 - 1,63 \mu M$). Co ciekawe, grupa związków **3a-3d** okazała się praktycznie nieaktywna na linii HCT116, zaś seria **1a-2d** tylko w dwóch przypadkach potwierdziła umiarkowane właściwości antyproliferacyjne (**1a**, **2a**). Badania zależności między strukturą a aktywnością (ang. SAR, *structure activity relationship*) wskazują, że podstawienie terminalnego atomu azotu N4, wpływa na zwiększenie aktywności przeciwnowotworowej w tej grupie związków (**1a**, **2a** oraz **3a**). Efekt taki obserwuje się

także w szeregu innych pochodnych tiosemikarbazonów (DpT oraz BpT)^{165,166}. Grupa pochodnych serii **3** posiada charakterystyczny fragment (N=C-C-C-OH), z donorową grupą hydroksylową w pozycji α do ugrupowania tiosemikarbazonowego; motyw ten pojawia się również w strukturze chelatora 311 analogów chelatora NT, u których obserwuje się zwiększoną aktywność biologiczną. Wzrost ten tłumaczyć można poprzez zwiększenie możliwości kompleksowania metali przez powyższe struktury.

Porównując aktywność chinolintiosemikarbazonów w obrębie linii HTC116 p53+/+ oraz p53 -/-, obserwuje się bardzo podobne wyniki oznaczania cytotoksyczności, z nieznacznie wyższą wartością IC₅₀ dla linii z ekspresją białka p53. Tak więc wydaje się, że brak ekspresji białka p53 nie jest powiązany ze zwiększoną opornością linii HTC116 na chinolintiosemikarbazony, co jest również obserwowane dla innych heteroaromatycznych tiosemikarbazonów¹⁴⁹. Wyniki te są interesujące, gdyż większość nowotworów posiada mutacje genie kodującym białko p53, co wpływa na wzrost oporność tych nowotworów na chemioterapeutyki.

W przypadku aktywnych chelatorów żelaza (**1a-1c**, **2a**, **3a-3d**) oszacowano cytotoksyczność względem nieproliferujących ludzkich fibroblastów (linia NHDF). Uzyskane wyniki potwierdzają wysoką selektywność działania zsyntezowanych związków. W przypadku pochodnych **2a** oraz **3a** wyznaczony indeks terapeutyczny wynosi odpowiednio 14 oraz 131. Obserwowana wysoka selektywność w działaniu przeciwnowotworowym charakterystyczna dla powyższych związków jest więc niezwykle interesująca z punktu widzenia przyszłych badań na modelach *in vivo*.

Obliczane wartości lipofilowości clogP dla zsyntezowanych związków nie korelują z aktywnościami przeciwnowotworowymi chinolintiosemikarbazonów ($r = 0,16$). Analiza danych pozwala zauważyć jednak pewne tendencje. Przykładowo porównując wartości lipofilowości dla związków **3a** oraz **3d** można zauważyć znaczący spadek w aktywności przeciwnowotworowej na linii SK-N-MC. Brak ogólnego powiązania lipofilowości otrzymanych związków z ich aktywnością biologiczną, wskazuje na to że to inne czynniki limitują ich działanie (np. zdolność do kompleksowania metali), a sama lipofilowość jest tutaj jedynie dodatkową składową po części wpływającą na ich aktywność.

Dane przedstawione w Tabeli 3 dowodzą, iż zaprojektowane heteroaromatyczne tiosemikarbazony wykazują wysokie aktywności przeciwnowotworowe przy zachowaniu selektywności działania. Dalsza analiza syntezowanych związków w połączeniu z ich aktywnościami biologicznymi wskazuje, że miejscem przyszłych modyfikacji strukturalnych powinien być fragment wokół terminalnego atomu azotu (N4).

3.2 Retrofragmentacyjne projektowanie nowych chelatorów żelaza

Biorąc pod uwagę wnioski płynące z badań nad aktywnością biologiczną chinolintiosemikarbazonów (związki **1a-3d**), podjęto próbę zaprojektowania nowych heteroaromatycznych chelatorów żelaza, używając zmodyfikowanej metody fragmentów molekularnych (ang. *fragmental design*)¹⁶⁹⁻¹⁷¹. Identyfikacja takich fragmentów uprzywilejowanych jest złożonym procesem, angażującym zarówno metody komputerowe jak i eksperymentalne. Pierwsza ze wspomnianych metod opiera się na ekstrakcji danych z baz komputerowych połączonych z identyfikacją farmakoforów oraz korzystnych linkerów¹⁷². Przykładem drugiego typu metod jest użycie spektroskopii NMR do analizy oddziaływań ligand białko. Uzyskane w wyniku tego dane są następnie używane do analizy statystycznej oddziaływań i opracowania korzystnego modelu liganda¹⁷¹.

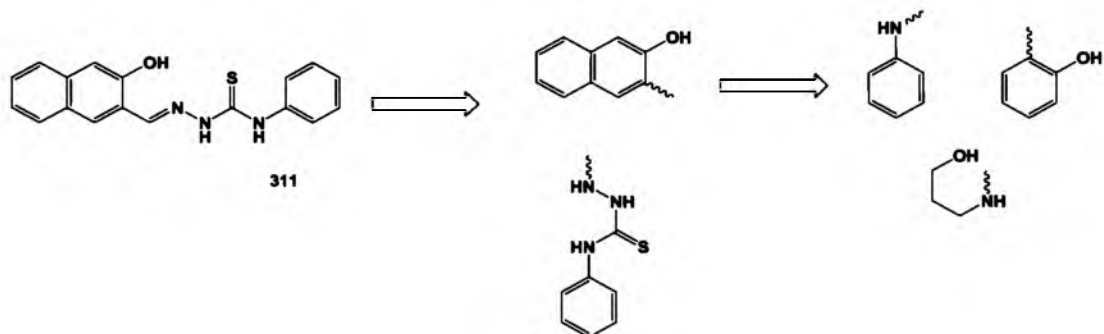
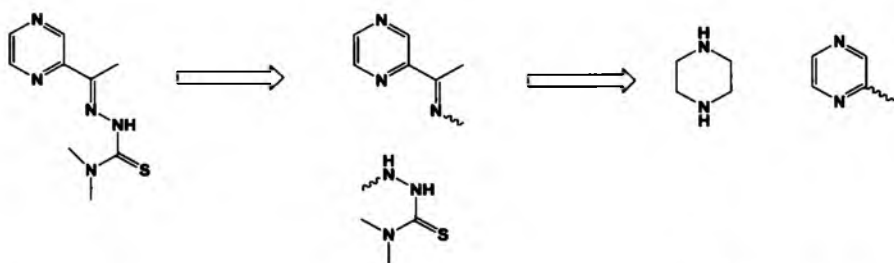
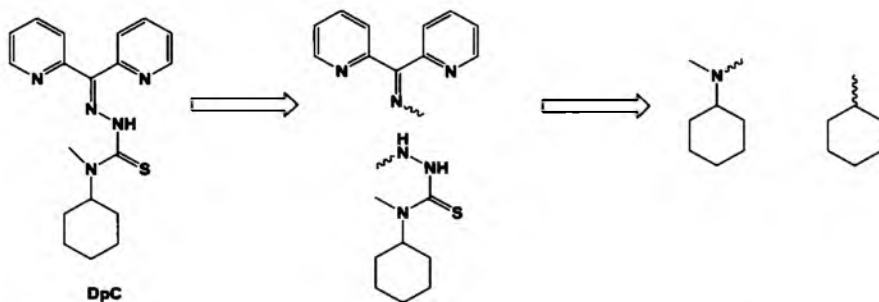
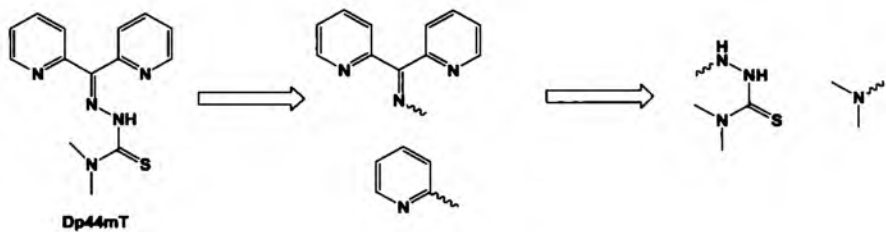
W ciągu ostatnich 10 lat pojawiła się duża ilość doniesień literaturowych dotyczących poszukiwania nowych tiosemikarbazonowych chelatorów żelaza potencjalnych analogów Triapiny oraz DFO. Badania wymienionych chelatorów i ich aktywności przeciwnowotworowej wykazują ich interesujące działania, ukazujące jednak szereg skutków ubocznych takich jak hipoksja oraz kardiotoksyczność^{151,173}. Przedstawione dane pochodzące z badań *in vivo* potwierdzają konieczność poszukiwania nowych selektywnych heteroaromatycznych tiosemikarbazonów z korzystniejszymi profilami toksyczności.

Projektując nową generację heteroaromatycznych tiosemikarbazonów, zaproponowałem metodę projektowania retrofragmentacyjnego. Metoda ta jest analogiczna w swych założeniach do analizy retrosyntetycznej, bazuje jednak na ocenie aktywności biologicznej wcześniej otrzymanych syntonów. Wybraną aktywną strukturę

poddaje się procedurze fragmentacji, a otrzymane małe fragmenty łączy się ponownie (**Rys 16**), otrzymując w rezultacie nowe połączenia. Główną hipotezą leżącą u podstaw tej metody jest założenie, że nowo utworzone konstrukty powinny zachować wysoką aktywność macierzystych tiosemikarbazonów. Nowe połączenia tworzy się także w nadziei obniżenia niekorzystnych właściwości biologicznych (np. niskiej selektywności lub też kardiotoksyczności). Zaprojektowane pochodne przedstawiono w **Tabeli 4**.

Rys 16

Rysunek obrazujący proces retrofragmentacji wybranych tiosemikarbazonów



NOWE FRAGMENTY

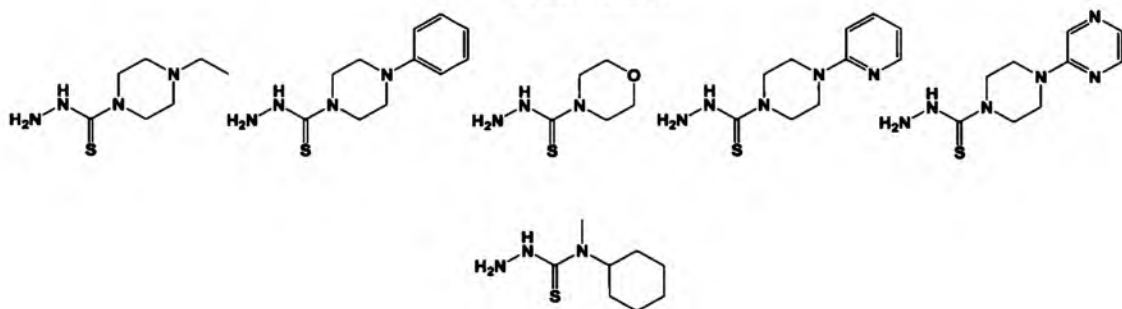
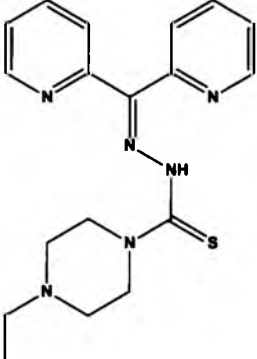
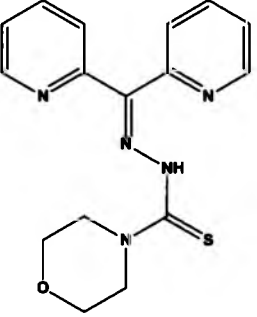
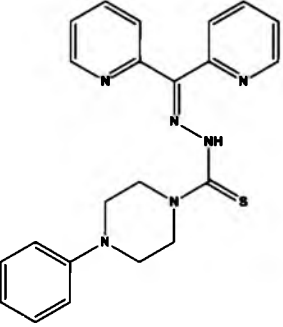
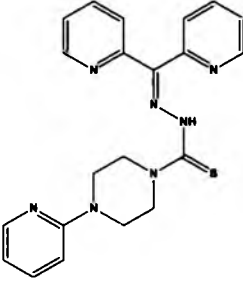
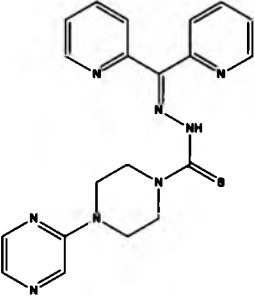
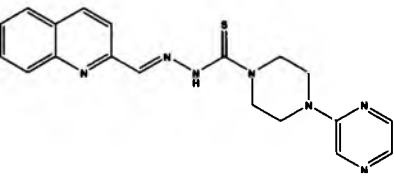
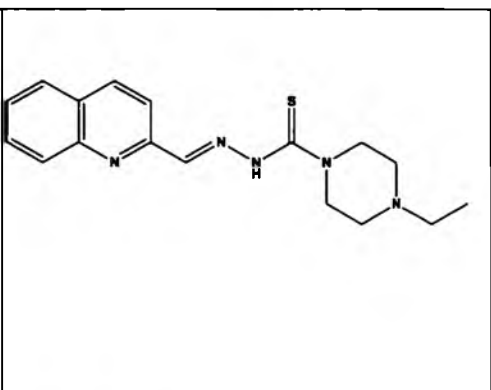
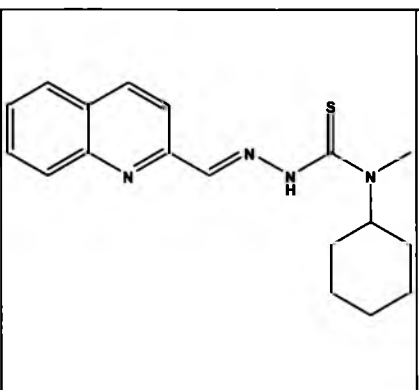
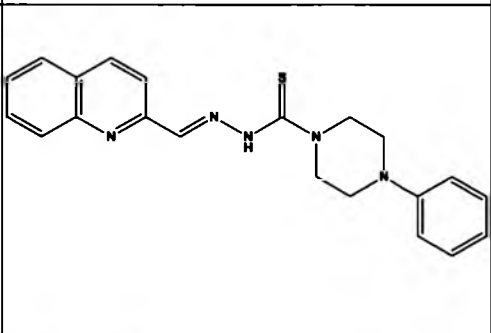
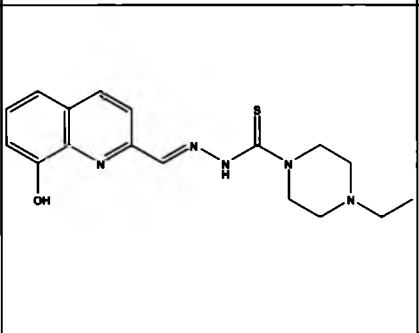
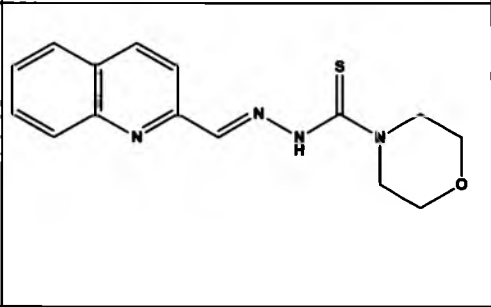
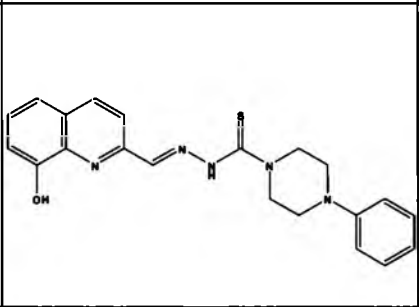
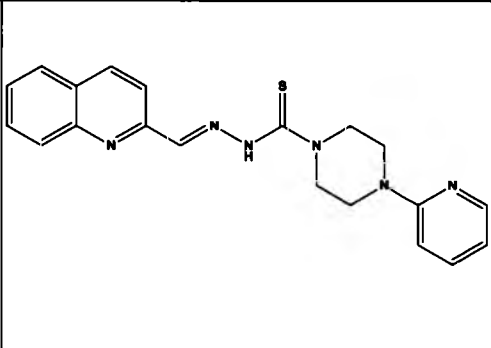
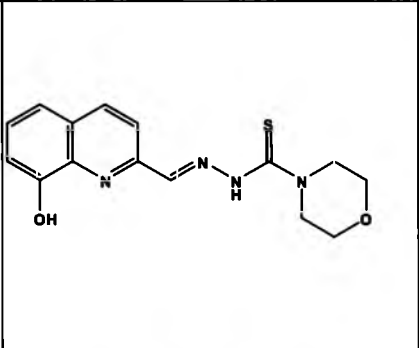
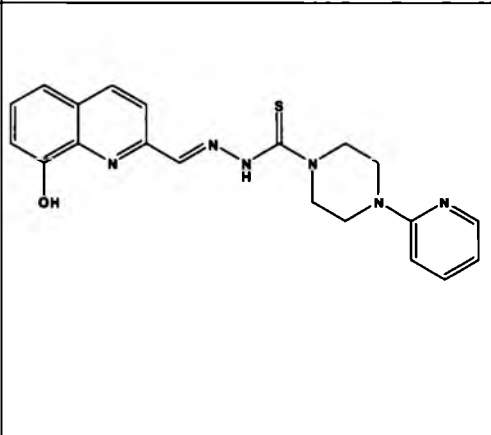
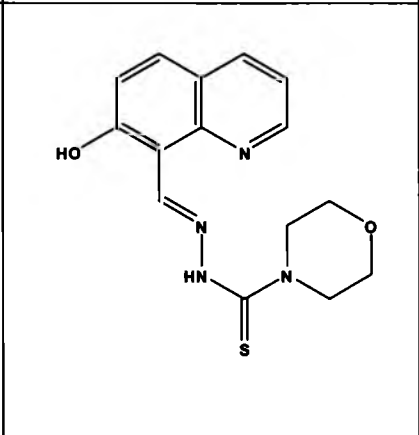
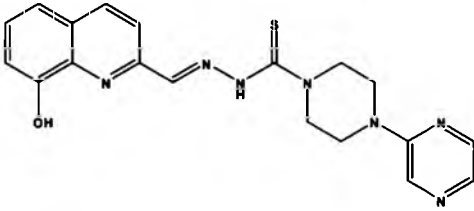
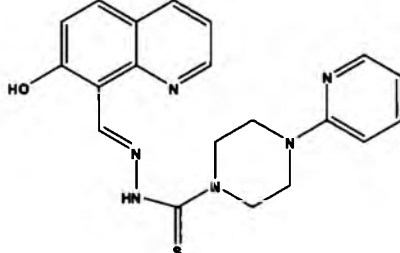
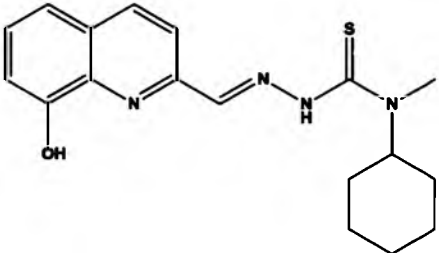
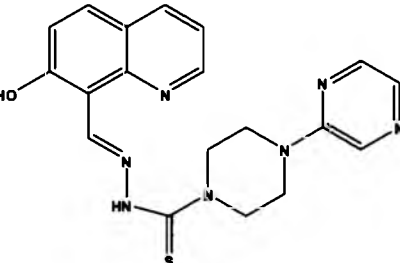
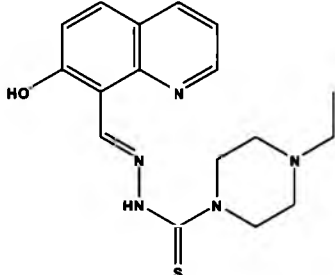
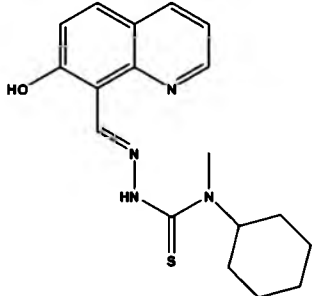
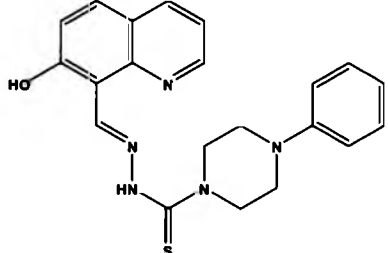
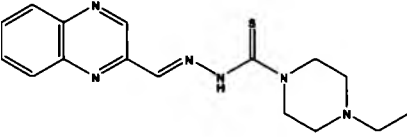


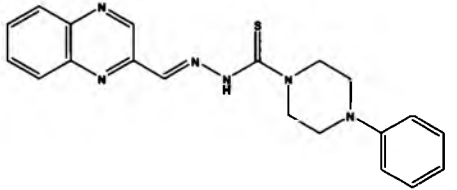
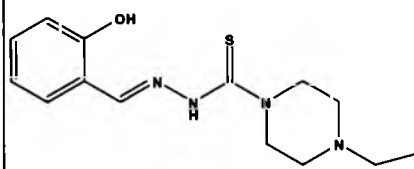
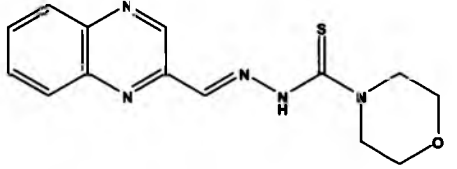
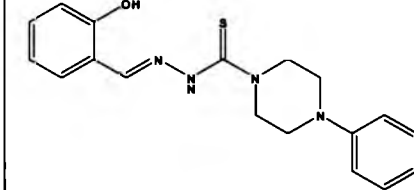
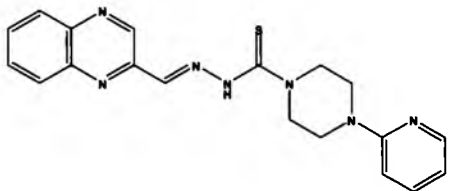
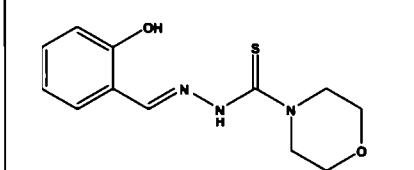
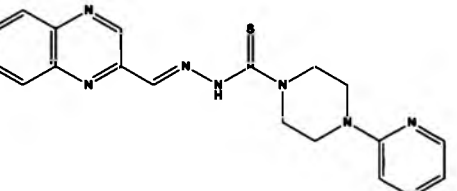
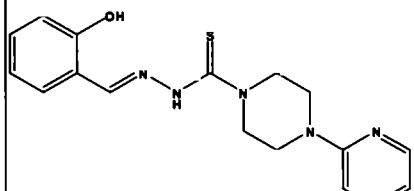
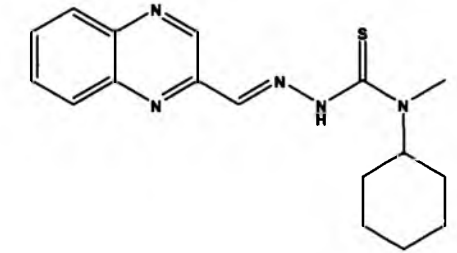
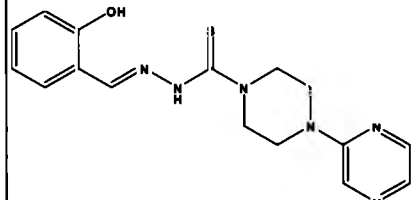
Tabela 4

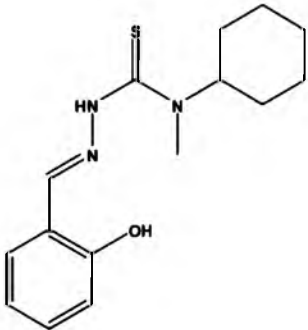
Struktury otrzymanych związków 4a-9f

Nr	Struktura	clogP	Nr	Struktura	clogP
4a		1,84	4c		0,75
4b		2,74	4d		1,80
4e		1,03	5e		2,07

5a		2,88		5f		4,14
5b		3,78		6a		2,93
5c		1,79		6b		3,83
5d		2,84		6c		1,84
6d		2,88		7c		1,84

6e		2,12	7d		2,88
6f		4,19	7e		2,12
7a		2,93	7f		4,19
7b		3,83	8a		2,14

8b		3,04		2,83
8c		1,05		3,23
8d		2,09		1,24
8e		1,32		2,28
8f		3,40		1,52

9f		3,59			
----	---	------	--	--	--

Otrzymane związki zostały poddane badaniom cytotoksyczności na czterech nowotworowych liniach komórkowych : HCT116 p53 +/+ oraz p53-/- (rak okrężnicy), HeLa (rak szyjki macicy), Raji (chłoniak Burkitta) oraz na ludzkich fibroblastach (linia NHDF). Wyniki podsumowujące skринing biologiczny dla otrzymanych heteroaromatycznych tiosemikarbazonów przedstawiono w **Tabeli 5**. Analiza parametru IC₅₀ wskazuje, że komórki linii Raji są najbardziej podatne na działanie tiosemikarbazonowych chelatorów żelaza, a najbardziej aktywny związek (**4b**) wykazuje aktywność rzędu nanomolowego (IC₅₀= 0,3 nM). Jest to najwyższa jak dotąd odkryta aktywność heteroaromatycznego tiosemikarbazonu. Komórki nowotworu okrężnicy wykazywały ten sam sposób odpowiedzi biologicznej na tiosemikarbazonowe chelatory, bez względu na mutacje w genie TP53, co jest zgodnie z danymi wcześniej opisanymi (punkt 3.1). W grupie syntezowanych tiosemikarbazonów można ponadto wyróżnić związki (**5a**, **5c**, **5e**, **6a-6f**, **7a-9f**) o niskiej korzystnej cytotoksyczności względem ludzkich fibroblastów (NHDF).

Przedstawione poniżej dane, dotyczące cytotoksyczności zsyntezowanych chelatorów żelaza, przedstawiłem za pomocą charakterystycznych dla danej linii komórkowej map aktywności pozwalających wizualizować i dogodnie omówić krajobraz aktywności chelatorów (**Rys 17**). Przedstawione mapy aktywności obrazują chelatory żelaza o silnym działaniu przeciwnowotworowym (kolor czerwony, IC₅₀ < 0.1 μM), umiarkowanej aktywności (kolor żółty 1 μM < IC₅₀ < 10 μM) oraz te sklasyfikowane jako nieaktywne (kolor szary, IC₅₀ > 10 μM)

Tabela 5**Aktywność przeciwnowotworowa tiosemikarbazonowych chelatorów żelaza***

Nr	IC ₅₀ [μmol/l]	IC ₅₀ [μmol/l]	IC ₅₀ [μmol/l]	IC ₅₀ [μmol/l]	IC ₅₀ [μmol/l]
	HCT116 p53+/+	HCT116 p53 -/-	Raji	HeLa	NHDF
4a	0,0198 ± 0,0018	0,0399 ± 0,0034	0,0766 ± 0,0209	0,4762 ± 0,3052	0,0166 ± 0,0037
4b	0,00081 ± 0,00013	0,00076 ± 0,00007	0,00032 ± 0,00003	0,570 ± 0,155	0,001726 ± 0,00071
4c	0,0138 ± 0,0054	0,0141 ± 0,0058	0,0316 ± 0,0038	2,210 ± 0,468	0,0161 ± 0,0061
4d	0,0021 ± 0,0079	0,0092 ± 0,0014	0,0013 ± 0,0001	0,0286 ± 0,0185	0,1609 ± 0,04455
4e	0,0378 ± 0,003	0,0313 ± 0,0032	0,0395 ± 0,0187	0,7246 ± 0,0675	0,0138 ± 0,003
5a	1,44 ± 0,69	3,55 ± 1,23	0,0587 ± 0,0246	0,4328 ± 0,1617	9,619 ± 1,795
5b	0,0422 ± 0,0031	0,0851 ± 0,0368	0,0425 ± 0,0085	0,2 ± 0,07	0,0325 ± 0,0071
5c	1,49 ± 0,02	1,56 ± 1,12	0,0610 ± 0,0079	1,751 ± 0,332	3,269 ± 0,875
5d	0,39 ± 0,15	0,2660 ± 0,1586	0,0513 ± 0,02	5,142 ± 2,872	0,0315 ± 0,0082
5e	0,0877 ± 0,0439	0,48 ± 0,15	0,2855 ± 0,1054	1,558 ± 0,437	9,441 ± 3,839
5f	0,0262 ± 0,001	0,0351 ± 0,0026	0,8081 ± 0,1043	0,9365 ± 0,4472	0,0145 ± 0,0045
6a	9,25 ± 1,42	8,83 ± 0,63	0,2015 ± 0,0179	3,4110 ± 1,4605	15,79 ± 4,63
6b	4,18 ± 1,46	4,67 ± 2,04	0,1851 ± 0,0244	8,453 ± 2,0925	8,878 ± 1,070
6c	0,0038 ± 0,0015	0,0168 ± 0,0056	0,0212 ± 0,0057	0,176 ± 0,069	10,64 ± 3,479
6d	8,41 ± 1,78	8,46 ± 0,25	0,1154 ± 0,0369	6,589 ± 0,128	10,18 ± 2,442
6e	0,0504 ± 0,0282	5,01 ± 2,55	0,0350 ± 0,0215	2,389 ± 0,0169	12,14 ± 3,577
6f	3,11 ± 1,92	4,35 ± 1,35	0,0127 ± 0,0368	2,571 ± 0,4608	5,355 ± 1,994
7a	20,2 ± 0,26	20,33 ± 0,86	3,352 ± 1,114	11,26 ± 1,62	12,14 ± 4,172
7b	7,45 ± 0,66	8,88 ± 2,53	2,225 ± 1,198	4,379 ± 0,948	10,08 ± 1,229

7c	20,09 ± 0,28	19,84 ± 4,87	3,525 ± 1,869	10,20 ± 1,17	>25
7d	9,15 ± 1,19	6,84 ± 5,48	1,546 ± 0,404	2,734 ± 0,548	10,12 ± 2,713
7e	10,09 ± 0,70	9,44 ± 1,35	4,546 ± 2,517	3,493 ± 0,036	9,556 ± 1,437
7f	18,99 ± 0,54	18,89 ± 3,645	0,4571 ± 0,2263	13,28 ± 1,00	9,182 ± 3,68
8a	6,150 ± 1,284	8,723 ± 1,643	0,1093 ± 0,0168	1,1170 ± 0,0305	2,728 ± 1,771
8b	3,92 ± 0,74	2,24 ± 1,47	0,5016 ± 0,0457	6,048 ± 2,7255	9,611 ± 0,899
8c	2,03 ± 1,24	5,84 ± 1,65	0,2401 ± 0,0368	0,862 ± 0,093	11,62 ± 1,759
8d	9,4 ± 0,79	9,41 ± 1,04	0,4915 ± 0,0935	1,776 ± 0,767	7,132 ± 0,824
8e	5,73 ± 0,75	8,49 ± 3,05	0,2664 ± 0,0086	3,773 ± 1,71	15,81 ± 5,08
8f	1,24 ± 0,45	1,02 ± 0,54	0,723 ± 0,293	4,0920 ± 2,066	0,50 ± 0,21
9a	>25	>25	10,24 ± 6,64	22,12 ± 5,4	>25
9b	6,94 ± 2,3	8,86 ± 1,46	1,957 ± 0,853	5,799 ± 0,475	13,52 ± 4,758
9c	15,39 ± 1,66	16,44 ± 3,11	3,788 ± 0,084	18,20 ± 1,25	>25
9d	9,66 ± 2,5	10,59 ± 1,19	2,601 ± 0,328	16,36 ± 4,53	18,41 ± 1,905
9e	10,88 ± 0,65	10,69 ± 1,03	9,825 ± 2,045	19,22 ± 2,46	>25
9f	>25	>25	0,6907 ± 0,5109	10,08 ± 3,64	>25
D P 44 m T	0,002 ± 0,001	0,005 ± 0,002	0,0065 ± 0,0012	0,0355 ± 0,0073	15,38 ± 5,06
D F O	>25	>25	4,74 ± 1.80	14,34 ± 0,96	>25

*badania wykonane przez mgr Annę Mrozek-Wilczkiewicz (Katowice, UŚ), dr Angelikę Muchowicz (WUM, Warszawa) oraz prof. Desa Richardsona (Sydney, Australia)

Rys 17

Mapy aktywności tiosemikarbazonowych chelatorów żelaza

4a	5a	6a	7a	8a	9a
4b	5b	6b	7b	8b	9b
4c	5c	6c	7c	8c	9c
4d	5d	6d	7d	8d	9d
4e	5e	6e	7e	8e	9e
4f	5f	6f	7f	8f	9f

HCT116 p53 +/-

4a	5a	6a	7a	8a	9a
4b	5b	6b	7b	8b	9b
4c	5c	6c	7c	8c	9c
4d	5d	6d	7d	8d	9d
4e	5e	6e	7e	8e	9e
4f	5f	6f	7f	8f	9f

HCT116 p53 -/-

1a	5a	6a	7a	8a	9a
1b	5b	6b	7b	8b	9b
1c	5c	6c	7c	8c	9c
1d	5d	6d	7d	8d	9d
1e	5e	6e	7e	8e	9e
1f	5f	6f	7f	8f	9f

Raji

4a	5a	6a	7a	8a	9a
4b	5b	6b	7b	8b	9b
4c	5c	6c	7c	8c	9c
4d	5d	6d	7d	8d	9d
4e	5e	6e	7e	8e	9e
4f	5f	6f	7f	8f	9f

HeLa

Związki zawierające w swojej strukturze fragment układu dipirydylowego (**4a-4e**), syntezowane jako analogi strukturalne Dp44mT oraz DpC, wykazują najwyższą aktywność przeciwnowotworową ze wszystkich dotychczas otrzymanych tiosemikarbazonów. Wśród tej podgrupy najbardziej aktywną pochodną jest związek **4b** (0,3 nM-Raji) zaś pochodna *N*-pirydylowa (**4d**) wykazuje najłagodniejsze działanie

cytotoksyczne pośród pochodnych ketonu dipirydylowego. W podgrupie związków chinolinowych najwyższą aktywność antyneoplastyczną na wszystkich przebadanych liniach komórkowych wykazują związki **5b** oraz **5f**. Spośród układów 8-hydroksychinolinowych bardzo ciekawy przypadek stanowi związek zawierający w swojej strukturze fragment morfoliny (**6c**). Pochodna ta wykazuje bardzo wysoki indeks terapeutyczny będąc szczególnie aktywna na linii komórkowej HCT116 ($IC_{50} = 3,8$ nM). Układy zawierające w swej strukturze fragment chinazoliny oraz fragment aldehydu salicylowego, wykazują umiarkowane bądź słabe aktywności przeciwnowotworowe, a w przypadku tych ostatnich pochodnych wzrost aktywności jest związany z obecnością fragmentu (hetero)aromatycznego w *N*-terminalnym końcu piperazyny (**9b**, **9d**).

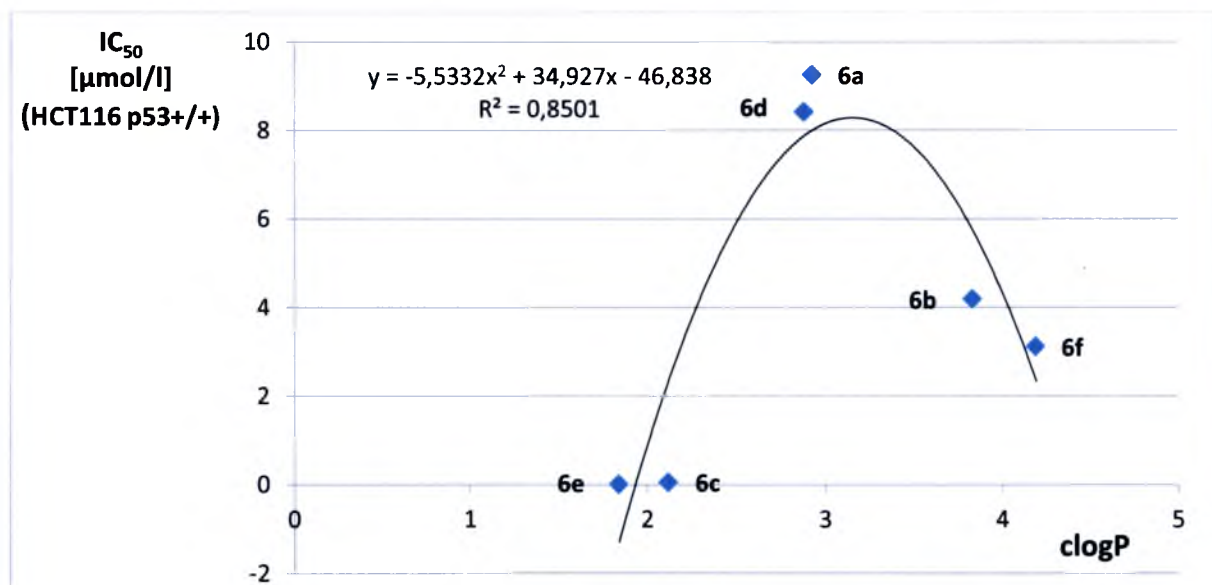
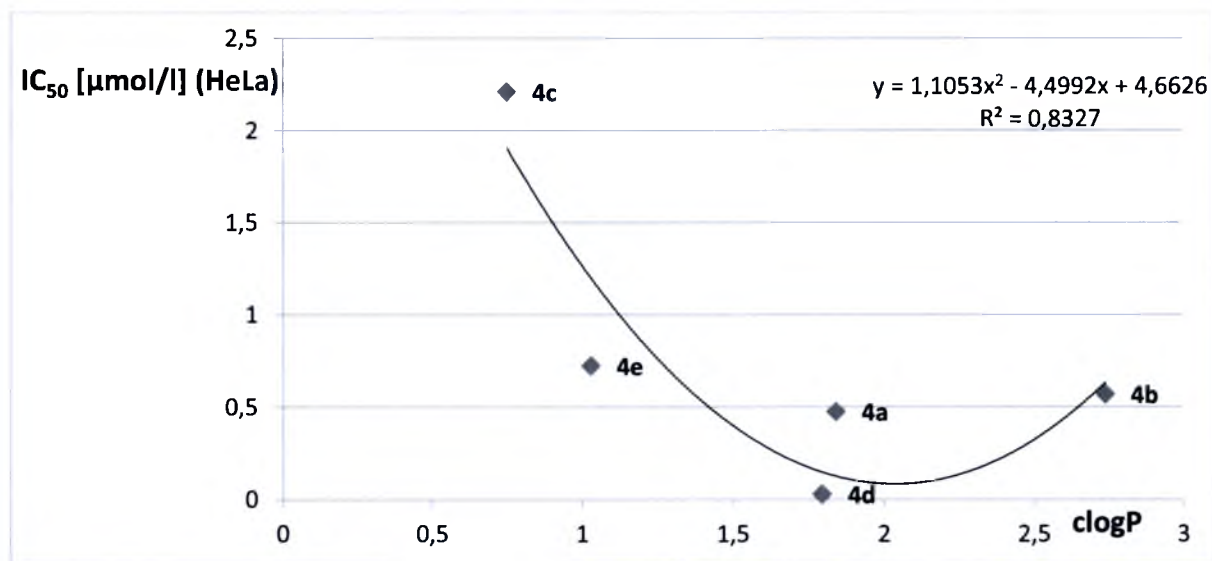
Analizując selektywność działania zsyntezowanych chelatorów żelaza, można zaobserwować interesujące zachowania zachodzące w podgrupach **4-9**. Przykładowo, związki oparte na fragmencie dipirydylowym wykazują aktywności przeciwnowotworowe na poziomie nanomolowym, jednak ich toksyczność na ludzkich fibroblastach jest czynnikiem niekorzystnym. W tym szeregu najkorzystniejszą pochodną jest związek **4d**, wykazujący indeks terapeutyczny 123 (Raji). Związki szeregu chinolinowego **5b** oraz **5f** wykazywały natomiast większą aktywność cytotoksyczną na ludzkich fibroblastach niż na komórkach nowotworowych.

Analizując dalej wyniki badań SAR dla tiosemikarbazonów z grup **4-9**, nie zaobserwowano ogólnej zależności pomiędzy deskryptorem lipofilowości- $clogP$ a aktywnością przeciwnowotworową otrzymanych związków. Do ciekawych obserwacji prowadzi podział zsyntezowanych związków na mniejsze podgrupy. W przypadku związków **4a-4e** obserwuje się korzystny zakres lipofilowości około 2,0 pozwalający na osiągnięcie wysokich wartości IC_{50} . W podgrupie pochodnych 8-hydroksychinolinowych (**6a-6f**) można również zaobserwować korzystną aktywność związków przy wartościach parametrów $clogP$ około 2,0. Współczynniki korelacji modelu (r^2) na poziomie około 0,85 wskazują na względnie dobre dopasowanie obu parametrów. Brak ogólnej zależności lipofilowość-aktywność biologiczna, dla wszystkich zsyntezowanych chelatorów, potwierdza że optymalne powinowactwo związku do struktur lipidowych

jest tylko jednym z kilku parametrów, które nie determinują wysokiej aktywności badanych układów.

Rys 18

Zależność parametru clogP od aktywności przeciwnowotworowej zsyntezowanych chelatorów podgrupy 4 i 6

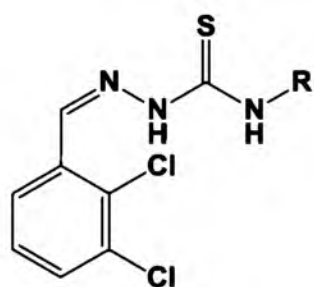


3.3 Fenyltiosemikarbazony

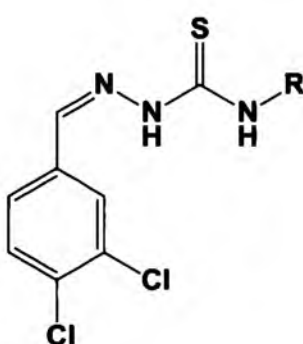
Projektowanie związków o działaniu polifarmakologicznym jest szczególnie użyteczne w przypadku terapii przeciwnowotworowych, gdyż patogenne grzyby oraz bakterie stanowią coraz większy problem dla pacjentów zmagających się z chorobami nowotworowymi¹⁷⁴. Badania przeprowadzone w grupie Li wskazują, że benzytowe tiosemikarbazony modulują aktywność grzybiej tyrozynazy¹⁷⁵. Ponadto pochodne 4-fenyl-3-tiosemikarbazonu wykazują szeroką aktywność biologiczną i mogą być wykorzystane w walce z toksoplazmozą¹⁷⁶. Bazując na licznych doniesieniach literaturowych dotyczących tiosemikarbazonów i ich działania przeciwgrzybicznego^{120,177} oraz przeciwbakteryjnego¹⁷⁸ zaprojektowano nową serię tiosemikarbazonowych chelatorów żelaza opartych na strukturze halogenowanego benzaldehydu. Fragment ten został zaprojektowany na podstawie podobieństwa strukturalnego do wcześniej otrzymanych chelatorów **1a-3d**. W przypadku związków **1a-3d** oraz nowo otrzymanych fenyltiosemikarbazonów (**10-12**) przebadano ich właściwości przeciwgrzybicze oraz zdolność do hamowania procesu fotosyntetycznego transportu elektronów (ang. PET, *photosynthetic electron transport*) w chloroplastach szpinaku. Badania tego ostatniego procesu mogą pomóc w ocenie możliwości aplikacyjnych wybranych tiosemikarbazonów w chemii rolniczej, zwłaszcza jako potencjalnych herbicydów.

Rvs 19

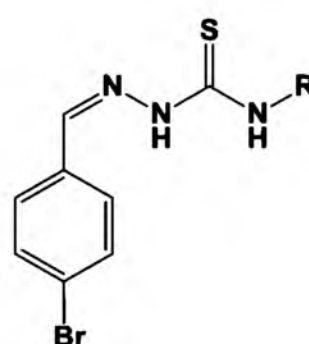
Wzory ogólne nowych tiosemikarbazonów opartych o szkielet halogenobenzaldehydu



10



11



12

Tabela 6

Struktury zsyntezowanych fenyltiosemikarbazonów

Numer	R ¹	R ²	R ³	clogP
10a	(2,3-Cl)-FENYL	H	H	3,473
10b	(2,3-Cl)-FENYL	H	-CH ₃	3,177
10c	(2,3-Cl)-FENYL	H	-CH ₂ CH ₃	3,706
10d	(2,3-Cl)-FENYL	H	-FENYL	5,266
10e	(2,3-Cl)-FENYL	-CH ₃	-CH ₃	3,533
11a	(3,4-Cl)-FENYL	H	H	3,473
11b	(3,4-Cl)-FENYL	H	-CH ₃	3,177
11c	(3,4-Cl)-FENYL	H	-CH ₂ CH ₃	3,706
11d	(3,4-Cl)-FENYL	H	-FENYL	5,266
11e	(3,4-Cl)-FENYL	-CH ₃	-CH ₃	3,533
12a	(4-Br)-FENYL	H	H	2,952
12b	(4-Br)-FENYL	H	-CH ₃	2,734
12c	(4-Br)-FENYL	H	-CH ₂ CH ₃	3,263
12d	(4-Br)-FENYL	H	-FENYL	4,823
12e	(4-Br)-FENYL	-CH ₃	-CH ₃	3,090

Tabela 7Aktywność przeciwnowotworowa tiosemikarbazonów **10a-12e***

Nr	IC₅₀ [μmol/l] HCT116 p53+/+
10a	41,5 ± 1,7
10b	>60
10c	58,5 ± 0,2
10d	>60
10e	brak danych
11a	46,0 ± 0,9
11b	55,5 ± 6,2
11c	48,5 ± 2,8
11d	>60
11e	47,0 ± 1,3
12a	>60
12b	>60
12c	>60
12d	>60
12e	47,5 ± 2,4

*doświadczenia wykonane przez mgr Annę Mrozek-Wilczkiewicz

Tabela 8

Właściwości przeciugrzybicze oraz parametr inhibicji PET dla wybranych tiosemikarbazonów*.

Nr	IC ₅₀ [μmol/l] PET	MIC (^a IC ₈₀ / ^b IC ₅₀)[μmol/L]							
		24 godziny				48 godzin			
		CA ^a	CT ^a	CK ^a	CG ^a	TB ^a	AF ^b	AC ^b	TM ^b
1a	brak	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
		>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
1b	302	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
1d	brak	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
2a	1368	1,95	1,95	3,90	1,95	1,95	3,90	3,90	3,90
		1,95	7,81	3,90	1,95	1,95	3,90	3,90	3,90
2b	brak	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
3a	520,4	125	>250	>250	125	125	>250	>250	125
		>250	>250	>250	125	>250	>250	>250	125
3b	brak	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
		>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
3c	brak	>500	>500	>500	62,50	>500	>500	>500	62,50
		>500	>500	>500	500	>500	>500	>500	62,50
3d	brak	31,25	125	31,25	15,62	15,62	125	15,62	15,62
		62,50	125	125	31,25	125	125	62,50	15,62

10a	brak	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
10b	170,1	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
10c	brak	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
10d	499,3	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
10e	brak	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
11a	283,3	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
11b	135,6	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
11c	280,2	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
11d	425,9	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
11e	329,3	15.62	15.62	15.62	15.62	125	>500	>500	31.25
		31.25	31.25	31.25	31.25	500	>500	>500	62.50
12a	586,4	500	>500	>500	>500	500	>500	>500	>500
		500	>500	>500	>500	500	>500	>500	>500
12b	brak	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
		62,50	>500	>500	>500	15,62	>500	>500	62,50
12c	brak	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
12d	brak	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
12e	594,6	62,50	>500	>500	>500	15,62	>500	>500	62,50
		250	>500	>500	>500	62,50	>500	>500	62,50
DCMU	1,9	-	-	-	-	-	-	-	-
FLU	-	0.06	0.12	3.91	0.98	0.24	>125	>125	1.95

		0.12	125	15.62	3.91	0.48	>125	>125	3.91
--	--	-------------	-----	-------	------	------	------	------	-------------

* badania wykonane w grupie prof. Josefa Jampilka (Brno, Republika Czeska)

Legenda:

CA= *Candida albicans*, CT= *Candida tropicalis*, CK= *Candida krusei*, CG= *Candida glabrata*, TB= *Trichosporon beigeli*, AF= *Aspergillus fumigatus*, AC= *Absidia corymbifera*, oraz TM = *Trichophyton mentagrophytes*; DCMU= 3-(3,4-dichlorofenylo)-1,1-dimetylomocznik; FLU= 2-(2,4-difluorofenylo)-1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-ilo)propan-2-ol.

Badania aktywności biologicznej heteroaromatycznych tiosemikarbazonów serii **1, 2, 3, 10, 11** i **12** przeprowadzono względem chloroplastów szpinaku (*Spinacia oleracea*), używając jako wzorca DCMU (Diuron®, 3-(3,4-dichlorofenylo)-1,1-dimetylomocznik). Związek ten jest obecnie dostępny komercyjnie jako herbicyd, dezaktywujący fotosystem II. Wszystkie zsyntezowane związki okazały się umiarkowanymi lub też słabymi inhibitorami PET, przy czym najaktywniejszy związek (**11b**) wykazuje aktywność rzędu 135,6 $\mu\text{mol/L}$ (IC_{50}). Przy analizie zależności struktura aktywność można zauważyć, że duża liczba związków nie wykazuje aktywności co dodatkowo utrudnia opis. Generalnie tiosemikarbazony oparte o szkielet 4-bromofenyli wykazują najslabsze właściwości hamowania fotosystemu II. Widoczne jest również uprzywilejowanie związków zawierających podstawienie 3,4-dichloro w stosunku do serii 2,3-dichloro, przy czym analiza aktywności wskazuje obniżenie aktywności związków zawierających trójpodstawiony terminalny atom azotu. Na zwiększoną aktywność związków **11a-11e** może mieć ponadto wpływ ich podobieństwo strukturalne do wzorca DCMU zawierającego również układ 2,3-dichlorofenyli. Jeśli rozpatrujemy aktywność hamowania PET dla związków z serii pochodnych chinoliny, (**1-3**) to większość związków wykazuje całkowity brak aktywności, zaś związek **1b** wykazuje najkorzystniejszy parametr IC_{50} wynoszący 302 $\mu\text{mol/l}$.

W Zakładzie Chemii Organicznej UŚ prowadzone są od 2004 roku badania dotyczące projektowania nowych pochodnych chinoliny o działaniu

przeciwgrzybiczym^{163,179,180}. Do tej pory udało się otrzymać szereg aktywnych pochodnych monoazanaftalenów o aktywnościach porównywalnych bądź lepszych niż standard kliniczny flukonazolu^{179,180}. Biorąc pod uwagę powyższe doświadczenia w pracy ze związkami przeciwgrzybicznymi, postanowiono zaprojektować nowe heteroaromatyczne chelatory żelaza, o potencjalnie interesującym profilu aktywności biologicznej. Przegląd literatury pod kątem czynników molekularnych warunkujących procesy patogenne potwierdza fakt, że grzyby potrzebują odpowiedniej ilości żelaza do prawidłowego funkcjonowania oraz do nabywania oporności na leki¹⁸¹. Mikroorganizmy wykształciły na drodze ewolucji odpowiedni sposób na pozyskiwanie żelaza z organizmu gospodarza- używają w tym celu sideroforów¹⁸². Można zaobserwować, iż w warunkach obniżonego stężenia żelaza, grzyby wykazują znacznie mniejszą wirulencję i zdolność do atakowania komórek nabłonkowych. Co więcej, opisano również zastosowanie Deferasiroxu jako leku pomocniczego w terapii z użyciem amfoterycyny B w trakcie testów klinicznych¹⁸³. Przesłanki te sprawiają, że niezwykle ciekawym problemem badawczym staje się ocena aktywności przeciwgrzybiczej zsyntezowanych chelatorów żelaza a zwłaszcza ocena ich działania względem patogennych grzybów z rodziny *Candida*.

Aktywności przeciwgrzybicze związków zostały określone poprzez wyznaczenie parametrów MIC (ang. *minimum inhibitory concentration*) dla każdego tiosemikarbazonu. Jako wzorca do badań używano flukonazolu. Substancja ta jest oparta o pierścień triazolu i działa na zasadzie inhibicji cytochromu P450. Gatunki grzybów wybrane do badań reprezentują gatunki ważne z punktu widzenia częstości zakażeń przez nie wywoływanych i problemów z jakimi wiąże się terapia zwłaszcza u pacjentów z obniżoną odpornością. Większość z przetestowanych związków okazała się słabo lub nieaktywna na powyższe rodziny grzybów, przy czym związki **3d**, **11e** oraz **12e** wykazały umiarkowane aktywności względem *Candida albicans*, *Trichosporon beigeli*, oraz *Trichophyton mentagrophytes*. Związek **2a** przedstawia największą aktywność spośród wszystkich przebadanych chelatorów żelaza. Jest on bardziej aktywny od flukonazolu w przypadku działania na *Aspergillus fumigatus* i *Absidia corymbifera*. Ponadto zsyntezowany chinolinotiosemikarbazon wykazuje ciekawe właściwości przeciwgrzybicze w długoterminowym eksperymencie (utrzymująca się

aktywność po 48 godzinach). Niska efektywność większości związków i słabe zróżnicowanie odpowiedzi biologicznej utrudnia przeprowadzenie analizy zależności między strukturą i aktywnością. Ogólna analiza danych, wskazuje na zwiększoną aktywność przeciwrzybiczą chinolintiosemikarbazonów, w porównaniu do fenylo-tiosemikarbazonów. Ponadto badania zespołu Opletalovej¹⁸⁴ potwierdzają uzyskane wyniki zwiększonej aktywności tiosemikarbazonów posiadających trójpodstawiony atom azotu N4.

3.4 Terapia kombinowana chelatory żelaza-PDT

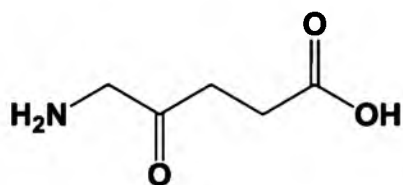
Duża efektywność przeciwnowotworowa oraz selektywność w działaniu otrzymanych związków pozwala mieć nadzieję na zastosowanie w terapii. Ze względu na proces chelatowania żelaza, tiosemikarbazony mogą modyfikować metabolizm tego metalu w komórkach¹⁸⁵. Zainspirowało to badania nad terapią łączoną tiosemikarbazony - terapia fotodynamiczna. Badania eksperymentalne zostały przeprowadzone przez mgr Annę Mrozek-Wilczkiewicz i są częścią jej rozprawy doktorskiej¹⁸⁶

Terapia fotodynamiczna (PDT ang. *photodynamic therapy*) jest rodzajem terapii przeciwnowotworowej, w którym kluczową rolę odgrywają trzy składowe: fotosensybilizator, światło oraz obecność tlenu¹⁸⁷. W procesie terapii fotodynamicznej następuje generowanie reaktywnych formy tlenu, które indukują śmierć komórek. Duże zróżnicowanie fotosensybilizatorów oraz możliwość sterowania długością fali pozwalają na optymalizację parametrów leczenia chorób dermatologicznych, grzybic jak i nowotworów^{188,189}. Ciekawym przypadkiem terapii fotodynamicznej jest zastosowanie kwasu 5-aminolewulinowego (5-ALA), który w kaskadzie reakcji enzymatycznych jest przekształcany w komórkach do odpowiedniej protoporfiryny IX (PpIX), pełniącej rolę fotosensybilizatora¹⁹⁰. W komórkach nowotworowych następuje wzmożony proces gromadzenia się PpIX. Jest to spowodowane niewłaściwą aktywnością enzymów regulujących wytwarzanie protoporfiryny IX (deaminaza porfobilinogenu) oraz hemu (ferrochelatazy). Fakt ten ma istotny wpływ na selektywność terapii i może być wykorzystany w próbach terapii łączonej ALA-

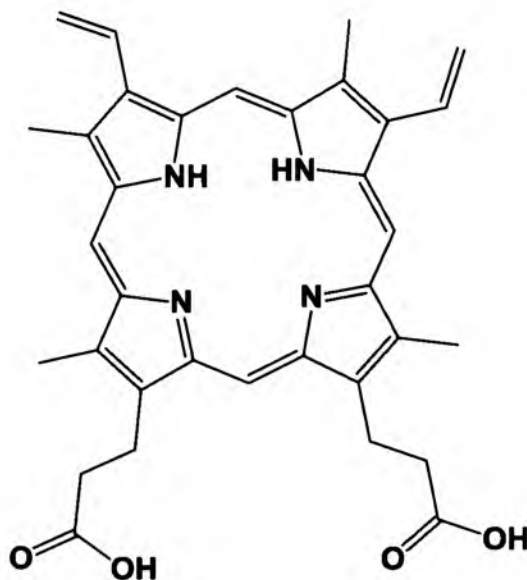
chelatory. Podstawą takiej łączonej terapii jest blokowanie ostatniego etapu tworzenia hemu przez kompleksowanie żelaza.

Rvs 20

Struktura kwasu 5-ALA oraz PpIX



Kwas 5-aminolewulinowy



Protoporfiryna IX

Do eksperymentów z kwasem 5-ALA wybrano dwa chelatory o największej aktywności przeciwnowotworowej i korzystnej selektywności (**4b** i **6c**) oraz dwa nietoksyczne chelatory (**3a** i **9a**). Wybór do eksperymentu silnie aktywnych tiosemikarbazonów wiązał się z próbą oceny efektów synergistycznych (synergia, addytywność lub też antagonizm) dla terapii kombinowanej PDT-chelatory. Efekt ich działania są porównywalne z chelatorami nietoksycznymi. Jako miarę oddziaływań w terapii kombinowanej wybrano indeks CI (ang. *Combination Index*), który określa ilościowo zachodzące efekty: synergię (CI < 1), addytywność (CI = 1) oraz antagonizm (CI > 1).

Pierwszym etapem eksperymentów było określenie aktywności związków na linii komórkowej HTC116 (rak okrężnicy) w warunkach ograniczonego dostępu światła (tzw. *dark toxicity*). Kolejnym etapem w badaniach było opracowanie metodyki pomiaru kinetyki wzrostu protoporfiryny IX w komórkach nowotworowych. Jako

hipotezę badawczą wysunięto przypuszczenie, że nietoksyczne chelatory mogą zaburzać tworzenie się PpIX, ze względu na chelatację żelaza komórkowego bądź też inhibicję enzymu ferrochelatazy. Przeprowadzone eksperymenty potwierdzają wysoki efekt synergistyczny w przypadku chelatorów **4b** (indeks CI= 0,47) oraz **6c** (indeks CI= 0,08) przy wartościach CI dla chelatora **9a** zbliżonych do 1 (0,95). W przypadku tiosemikarbazonu **9a** obserwuje się działanie antagonistyczne w terapii kombinowanej. Jako kontrolnego chelatora użyto DFO, który wykazuje addytywność w działaniu w terapii kombinowanej.

Badanie wpływu chelatorów żelaza na tworzenie protoporfiryny IX przeprowadzono w serii eksperymentów, inkubując komórki w obecności kwasu ALA oraz zmiennych stężeń tiosemikarbazonu. Dodatek chelatora nie spowodował istotnych statystycznie zaburzeń w tworzeniu PpIX w linii komórkowej HTC116. Aktywne chelatory były podawane do komórek w stężeniach nanomolowych, stąd ilość wygenerowanego kompleksu TSC- Fe jest tak mała, że faktycznie nie może mieć wpływu na syntezę hemu. Takie same efekty zaobserwowano dla chelatorów nietoksycznych, zaś próba zwiększenia ich stężenia (do około 50 μM) skutkowała śmiercią komórek.

3.5 Inne tiosemikarbazony oraz ich prekursorzy

Analizując wyniki aktywności przeciwnowotworowej dla tiosemikarbazonów z grupy **10-12**, stwierdzono że związki te wykazują jedynie umiarkowane bądź słabe właściwości antyneoplastyczne. Jedną z przyczyn takiego zachowania może być nieosiągnięcie optymalnej wartości parametru lipofilowości. Postanowiono więc odpowiednio zmodyfikować pierścień fenyltiosemiakarbazonu, wprowadzając wiązanie potrójne przyłączone ($\text{Csp}^2\text{-Csp}$) do pierścienia fenylowego. W wyniku przeprowadzonych reakcji sprzęgania Sonogashiry, udało się otrzymać związki podstawione w pozycji 4. Brak aktywności przeciwnowotworowej oraz przeciwrzybiczej był przyczyną zaniechania dalszych badań dotyczących tej serii.

Rys 21

Struktury otrzymanych pochodnych fenyltiosemikarbazonu

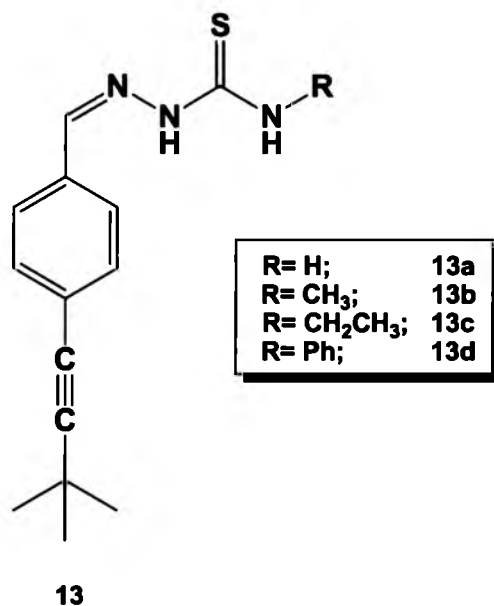


Tabela 9

Aktywności przeciwnowotworowe grupy związków **13a-13d**

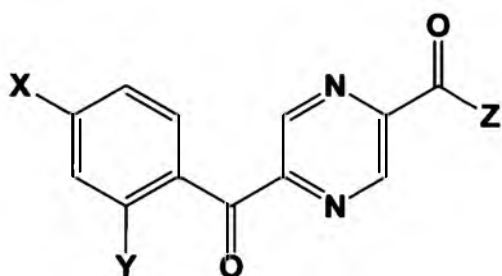
Nr	IC ₅₀ [μmol/l] HCT116 p53-/-	clogP
13a	>25	4,0
13b	>25	4,0
13c	>25	4,5
13d	>25	6,1

Ze względu na ciekawe właściwości przeciwnowotworowe i przeciwgrzybicze tiosemikarbazonów zawierających układ pirazynowy^{184,191} postanowiono otrzymać zmodyfikowane pirazynotiosemikarbazony. Jako prekursor karbonylowy postanowiono zastosować pochodną kwasu pirazynowego podstawionego w pozycji 4 grupą

(hydroksy)benzoilową. Fragment ten miał w zamierzeniu wykazywać właściwości kompleksujące (ligand typu *N*-donorowego, grupa hydroksylowa w korzystnej pozycji α). Nie bez znaczenie była także szeroka możliwość tworzenia dalszych pochodnych (obecność grupy karboksylowej).

Rys 22

Struktura prekursorów benzoilopirazynowych



14a; X= H; Y= OH; Z= OH
14b; X= H; Y= OH; Z= NH ₂
14c; X= OH; Y= H; Z= OH
14d; X= OH; Y= H; Z= NH ₂

14

Na wczesnym etapie projektowania tiosemikarbazonów pirazynowych przebadano aktywności przeciwnowotworowe ich prekursorów oraz kompleksów z rutenem. Przeprowadzone badania potwierdziły korzystne właściwości kompleksujące tych układów przy braku aktywności biologicznej wolnego ligandu jak również kompleksu z rutenem¹⁹². Duże problemy z otrzymaniem końcowych tiosemikarbazonów (opis w paragrafie 3.5.3.2) oraz brak aktywności biologicznej ich prekursorów spowodowały porzucenie tego wątku syntetycznego.

3.6 Właściwości fizykochemiczne

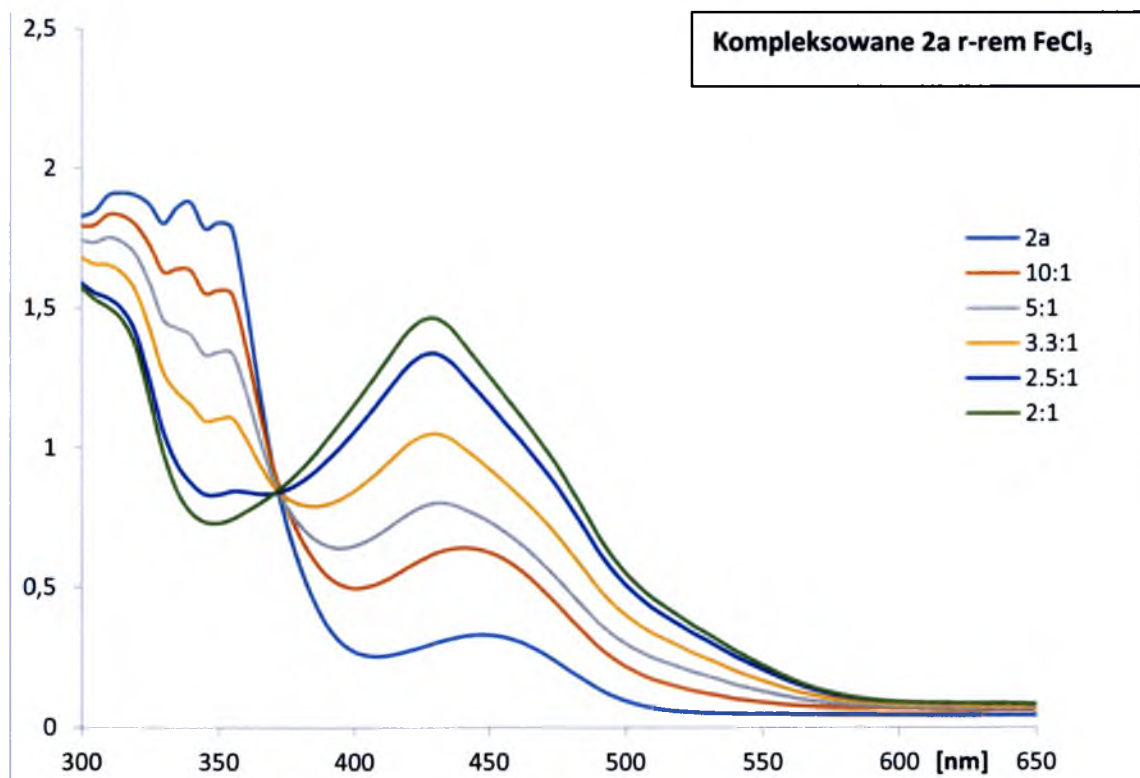
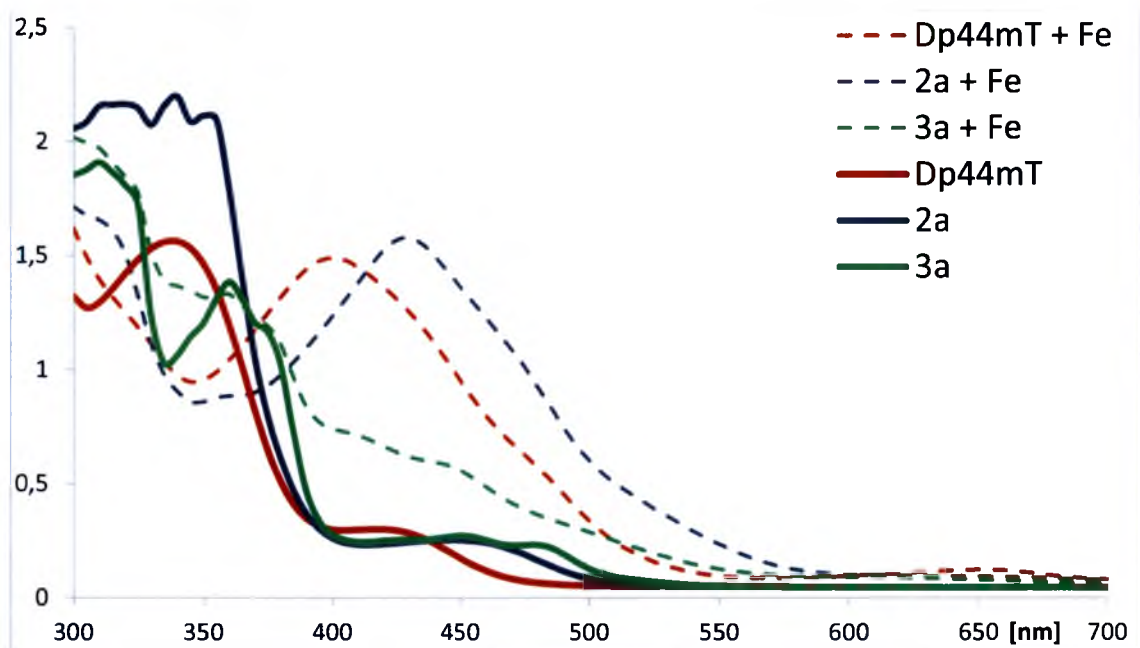
3.6.1 Badania spektrofotometryczne kompleksowania żelaza

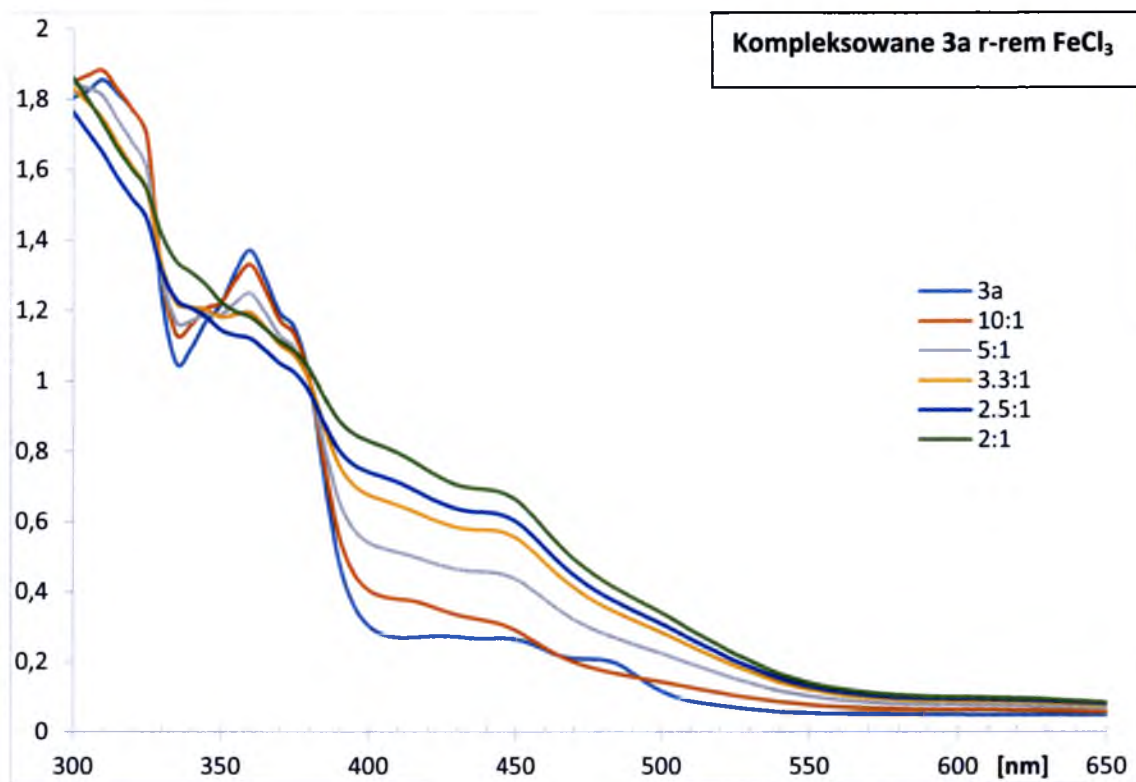
Wszystkie zaprojektowane i zsyntezowane związki mogą działać w sposób analogiczny jak Dp44mT, kompleksując żelazo na poziomie komórkowym. W celu potwierdzenia właściwości chelatujących dla najaktywniejszych tiosemikarbazonów, przeprowadzono pomiary spektrofotometryczne procesu kompleksowania żelaza (dla FeCl_3) wykonując krzywe izobestyczne (Rys 22). Ligandy **2a** i **3a** traktowano chlorkiem żelaza(III) i rejestrowano widma powstałych kompleksów, stosując odpowiednie układy ligand : metal (2:1; 2,5:1; 3,3:1; 5:1 oraz 10:1). Związkiem referencyjnym w powyższych badaniach był dobrze opisany w literaturze chelator Dp44mT, którego kompleks z Fe(III) posiada maksimum absorpcji przy długości fali około 400 nm. Kompleks ten ponadto charakteryzuje się dwoma punktami izobestycznymi przy długościach fali 310 i 365 nm. Kompleksy żelaza(III) z ligandami **2a** oraz **3a** wykazują podobny efekt przesunięcia maksimum absorpcji kompleksu w stronę światła widzialnego, w porównaniu do wolnych ligandów. Proces ten jest spowodowany wytworzeniem oddziaływań typu charge-transfer co jest charakterystyczne dla tej klasy związków^{193,194}. W przypadku układu (Fe^{3+} : **2a**) można zaobserwować intensywne pasmo absorpcji przy 430 nm z punktem izobestycznym przy 375 nm. Dla kompleksu żelaza(III) z ligandem **3a** zaobserwowano maksimum absorpcji przy 450 nm oraz dwa punkty izobestyczne przy 330 oraz 385 nm. Ponadto wykonano pomiary fluorescencji dla wolnych ligandów **2a** oraz **3a**, poprzez ich wzbudzenie w maksimum absorpcji. Nie zaobserwowano emisji promieniowania świetlnego.

Zmierzone widma elektronowe dla kompleksów są charakterystyczne dla heteroaromatycznych tiosemikarbazonów i potwierdzają ich wysoką zdolność chelatowania żelaza. Następnym krokiem do uzyskania pełnej analizy kompleksów tiosemikarbazonów powinno być wyznaczenie stałych protonacji wolnych ligandów, obliczenie stałych kompleksowania oraz wykonanie analiz cyklowoltamperometrycznej kompleksu, co nie było jednak celem niniejszej pracy.

Rys 23

Krzywe izobestyczne procesu kompleksowania ligandów **1a** i **2a** za pomocą FeCl_3



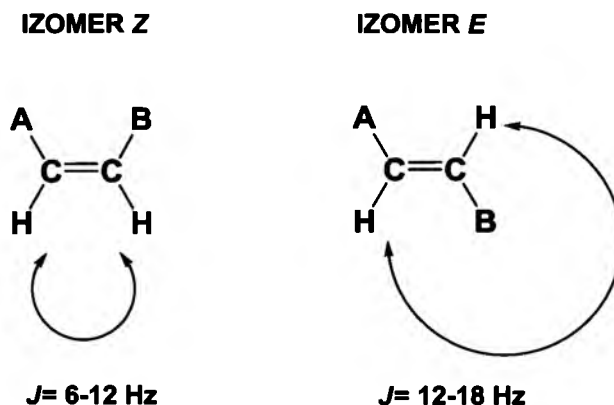


3.6.2 Ustalanie konfiguracji *E* i *Z* tiosemikarbazonów za pomocą spektroskopii NMR

Problem precyzyjnego określenia konfiguracji substancji biologicznie aktywnej ma szczególne znaczenie w chemii medycznej, zwłaszcza od czasu tragicznych eksperymentów z Talidomidem¹⁹⁵. Dzięki dobrze rozwiniętym metodom spektroskopii NMR, takich jak 2D-NOESY możemy pokonać trudności związane z identyfikacją izomerów *E* i *Z* tiosemikarbazonów. W przypadku prostych stereoizomerów (układ C=C) możemy je odróżnić na podstawie porównania wartości stałej sprzężenia $^3J_{H-H}$, która dla każdego z nich jest inna. Dla izomeru *Z* stała sprzężenia mieści się w zakresie 6-12 Hz, zaś dla izomeru *E* wynosi od 12 do 18 Hz¹⁹⁶.

Rys 24

Wartości stałych sprzężenia ${}^3J_{H-H}$ dla prostych izomerów E i Z



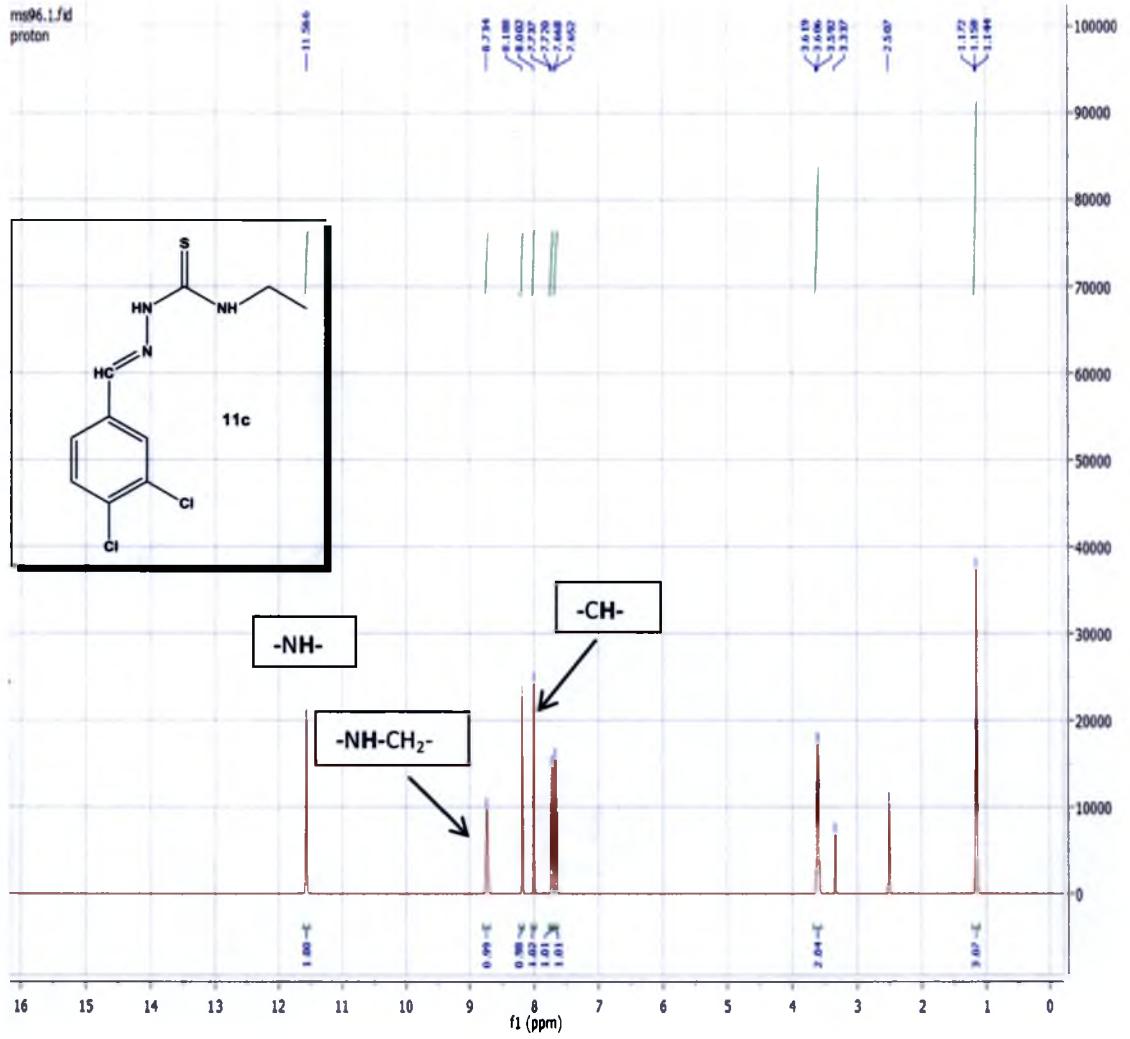
W przypadku pochodnych imin ($-\text{HC}=\text{N}-$) sytuacja jest jednak bardziej skomplikowana, gdyż brak jest sprzęgającego się drugiego protonu $\text{H}-\text{C}=\text{C}-\text{H}$. Stąd nie możemy porównywać stałych sprzężenia, gdyż nie są one rejestrowane. Z pomocą przychodzi nam tutaj dwuwymiarowa spektroskopia NMR, a zwłaszcza takie metody jak spektroskopia korelacyjna NMR 2D-NOESY (ang. *Two Dimensional Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*). Efekt Overhausera możemy tutaj w skrócie wytłumaczyć, jako efekt wzmocnienia lub też osłabienia sygnału rezonansowego protonu, który znajduje się blisko przestrzennie do protonu naświetlanego¹⁹⁷. Zjawisko to, jest obserwowalne dla protonów oddalonych od siebie o maksymalną odległość 4-5 Å. Widma NOESY wizualnie przypominają widma COSY z tym, że rejestrowane są tutaj oddziaływania dipol-dipol protonów przez przestrzeń. Intensywność pików powstałych w czasie pomiaru zależy od tzw. czasu mieszania τ_m (ang. *mixing time*). Im większy czas mieszania, tym większy efekt Overhausera jest obserwowany przy jednoczesnym zmniejszeniu różnicy w intensywności sygnałów. Ponadto odpowiednie dobranie czasu mieszania τ_m dla eksperymentu 2D-NOESY, jest powiązane masą mierzonej cząsteczki. Dla związków o masie poniżej 400 Da czas mieszania mieści się zazwyczaj w granicach 300- 500 ms¹⁹⁸. Podsumowując, metoda 2D-NOESY jest wygodnym narzędziem badawczym wykorzystywanym w:

- analizie konformacyjnej produktów pochodzenia naturalnego m.in. steroidów, glikokoniugatów a nawet w analizie białek,
- określaniu konfiguracji względnej, a w niektórych przypadkach konfiguracji absolutnej cząsteczek chiralnych.

Jako cel analizy spektroskopowej postanowiono obrać proste tiosemikarbazony z grupy fenyltiosemikarbazonów **10-12**. Analiza danych literaturowych wskazuje, że protony grupy NH są obserwowalne przy różnym przesunięciu chemicznym (ppm), w zależności od konfiguracji *E* i *Z* danego heteroaromatycznego tiosemikarbazonu¹⁹⁹. Najczęstszym efektem obserwowanym w polarnych rozpuszczalnikach jest proces równowagi, w którym pozostają obydwa izomery, w zależności od pH roztworu²⁰⁰. Zaobserwowano również, iż izomer *E* dają sygnał grupy NH w zakresie 10-11 ppm, zaś izomer *Z*- 14-15 ppm. Ten ostatni izomer jest preferowany, gdy jest możliwe utworzenie wiązania wodorowego pomiędzy pierścieniem heteroaromatycznym a grupą NH²⁰¹.

Rys 25

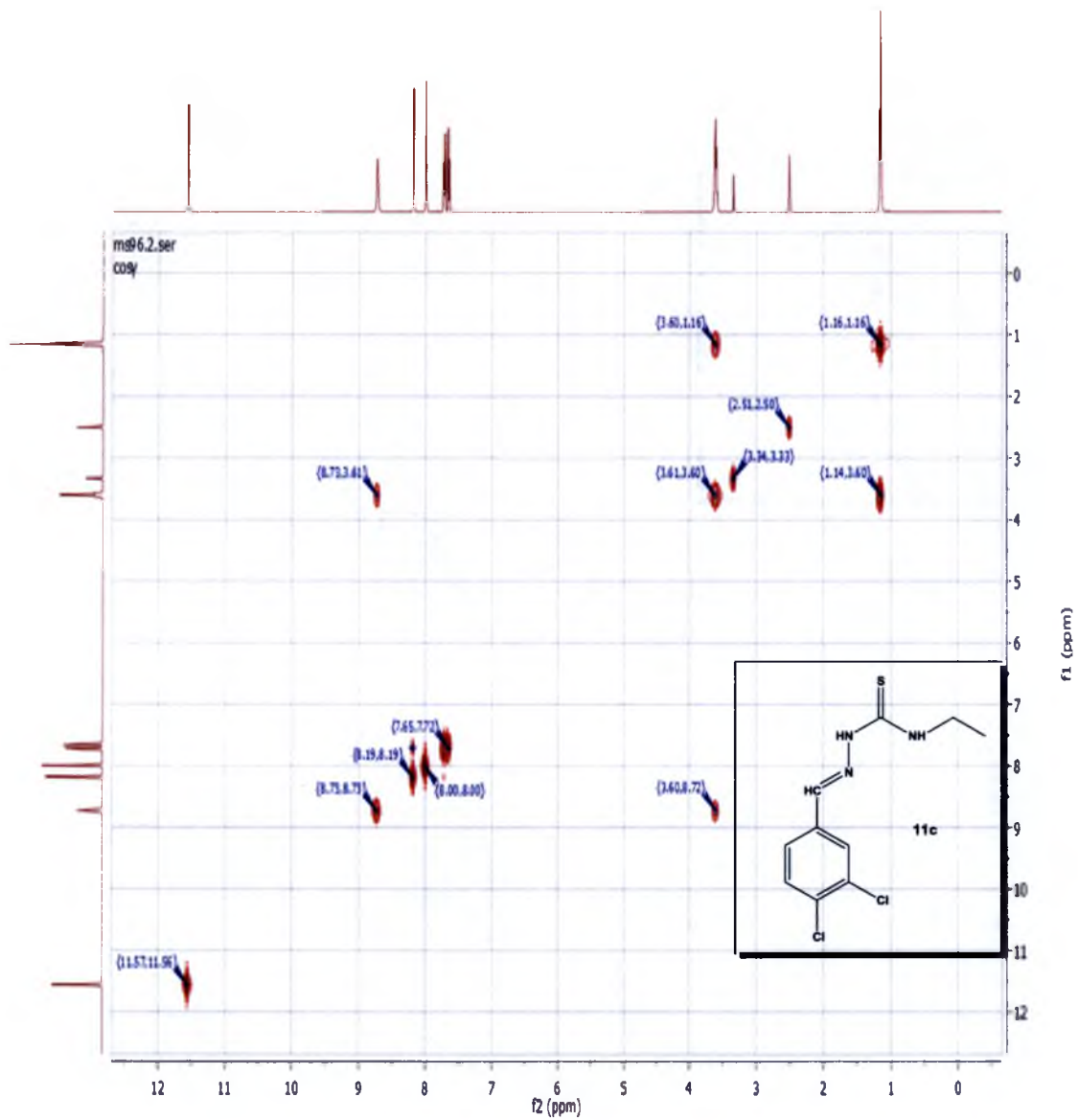
Widmo $^1\text{H-NMR}$ dla związku 11c



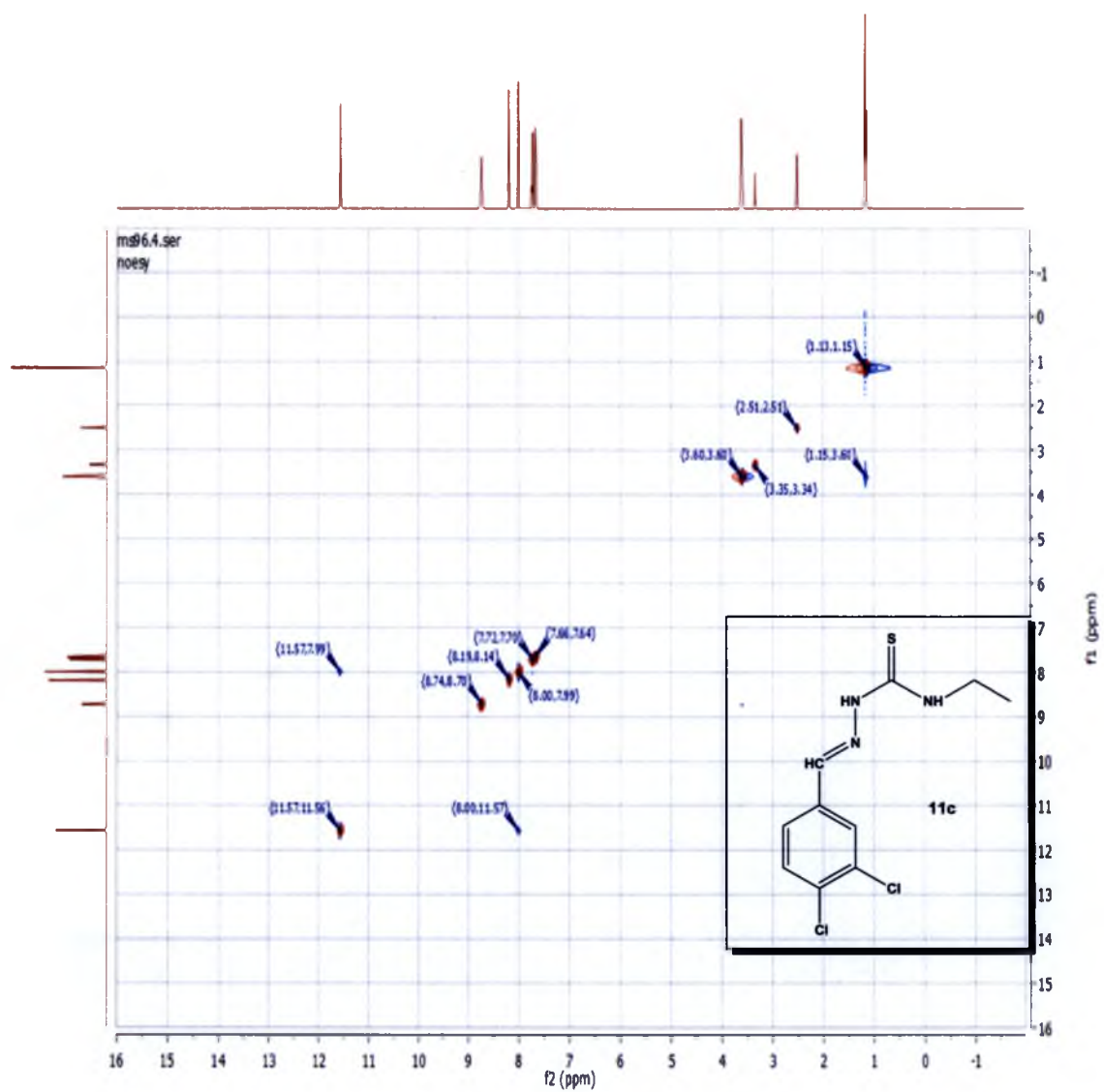
Rys 26

Widma COSY oraz 2D-NOESY dla związku 11c

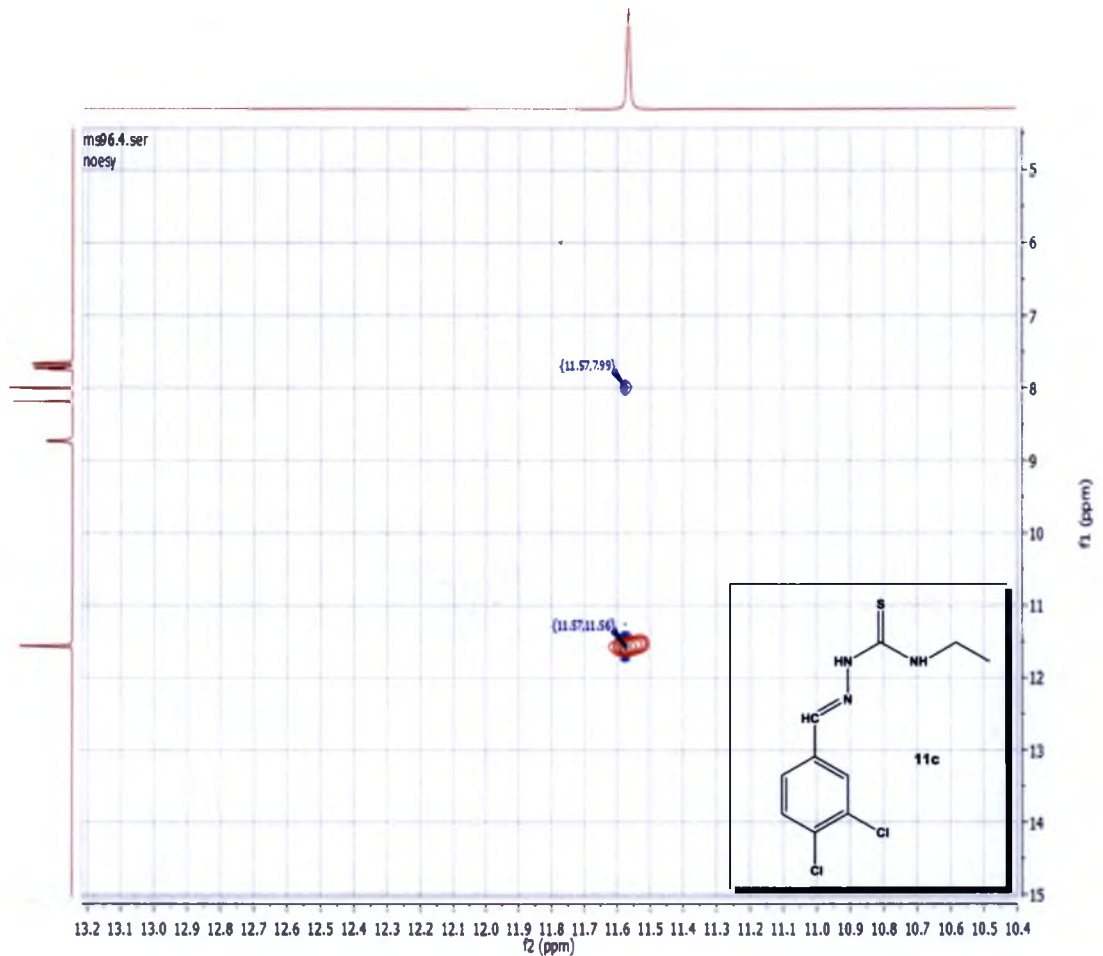
COSY



2D-NOESY



2D-NOESY



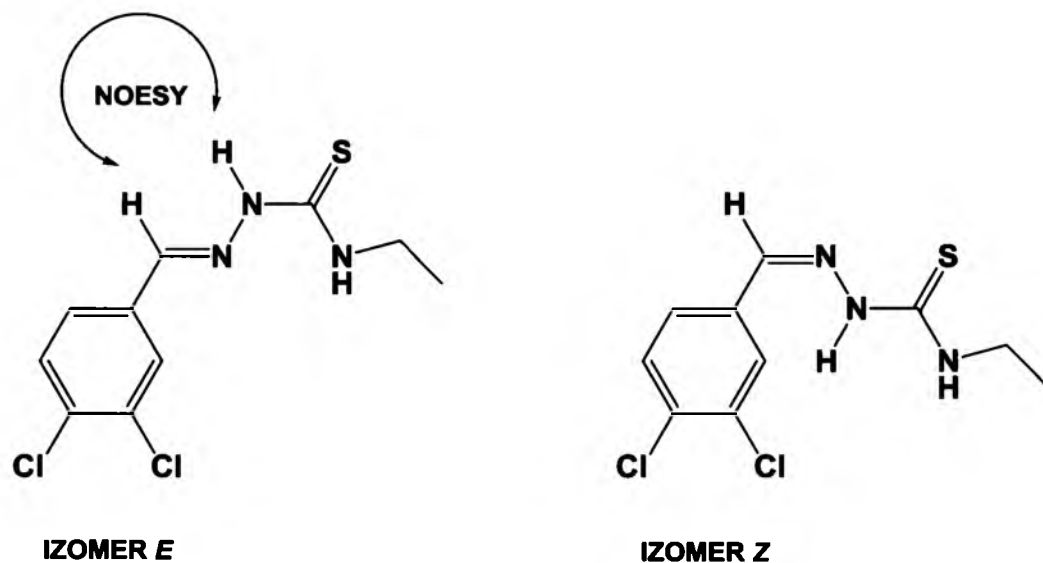
Analizując widmo $^1\text{H-NMR}$ jednowymiarowe tiosemikarbazonu **11c**, można z łatwością przypisać charakterystyczne wartości przesunięcia chemicznego (ppm) odpowiadające powyższym fragmentom związku:

- 11,57 ppm- poszerzony singlet grupy NH znajdującej się przy wiązaniu iminowym. Zgodnie z danymi literaturowymi przesunięcie to odpowiada izomerowi E,
- 8,74 ppm- poszerzony singlet terminalna grupa NH podstawiona etylem,
- 8,00 (7,99) ppm- singlet grupy metinowej.

Powyższe przypisania sygnałów z widma jednowymiarowego powinny być potwierdzone przez eksperyment COSY, na którym widać sprzęgające się sąsiadujące protony. I tak poza pikami autokorelacyjnymi możemy zaobserwować na widmie punkt o koordynatach (8,73; 3,61). Pik ten potwierdza wcześniej postulowaną tezę, że proton o wartości przesunięcia 8,73 ppm, należy do terminalnej grupy NH, sprzęgającej się z sąsiednimi protonami metylenowymi (multiplet przy 3,61 ppm, -CH₂). Kluczowych informacji dostarcza jednak widmo 2D-NOESY. Można na nim zaobserwować pik, który jest bezpośrednim dowodem na oddziaływanie przestrzenne pomiędzy grupą NH oraz protonem metinowym CH. Obecność pików (11,57; 7,99) jest bezpośrednim dowodem na to, że badany związek występuje w postaci izomeru *E*. W przypadku izomeru *Z*, nie jest możliwe takie oddziaływanie, gdyż proton NH jest w zbyt dużej odległości od grupy metinowej (Rys 27)

Rys 27

Różnice w budowie przestrzennej pomiędzy izomerami *E* i *Z* tiosemikarbazonu 11c



3.6.3 Omówienie syntez

Część syntetyczna pracy doktorskiej była realizowana z zamiarem otrzymania heteroaromatycznych tiosemikarbazonów, a zwłaszcza pochodnych azanaftalenów. Przeprowadzone eksperymenty dotyczyły zarówno syntezy tiosemikarbazydów, jak również próby syntezy prekursorów heteroaromatycznych z grupą karbonylową. Główny etap reakcji otrzymywania tiosemikarbazonów był przeprowadzany w polu mikrofalowym, zaś tytułowe tiosemikarbazony były oczyszczane za pomocą wielokrotnej krystalizacji lub też chromatografii kolumnowej z użyciem polarnych rozpuszczalników.

3.6.3.1 Synteza w reaktorze mikrofalowym

Od początku lat 90 XX w obserwuje się gwałtowny rozwój technik prowadzenia reakcji chemicznych w polu mikrofalowym²⁰². Od tej chwili opublikowano wiele doniesień literaturowych opisujących syntezy związków heterocyklicznych w fazie ciekłej jak również na nośnikach takich jak Al_2O_3 oraz żel krzemionkowy²⁰³. Tak duże zainteresowanie badaczy tą techniką eksperymentalną jest zrozumiałe. Otrzymuje się w ten sposób m.in szereg substancji biologicznie aktywnych²⁰⁴. Ponadto, reakcje prowadzone w polu mikrofalowym charakteryzują się wieloma udogodnieniami w stosunku do klasycznej syntezy:

- następuje wyraźne skrócenie czasu reakcji
- w przypadku syntezy na nośniku stałym, nie trzeba stosować drogich rozpuszczalników (zielona chemia)
- w większości przypadków zwiększa się wydajność reakcji
- w niektórych przypadkach następuje ułatwienie oczyszczania finalnego produktu

Należy jednak podkreślić, że nie ma dowodów naukowych na obecność specyficznego „efektu mikrofalowego”²⁰⁵. Poprawa wydajności reakcji oraz skrócenie jej czasu, nie są związane z obniżeniem energii aktywacji dla danej reakcji. Możemy mówić tutaj

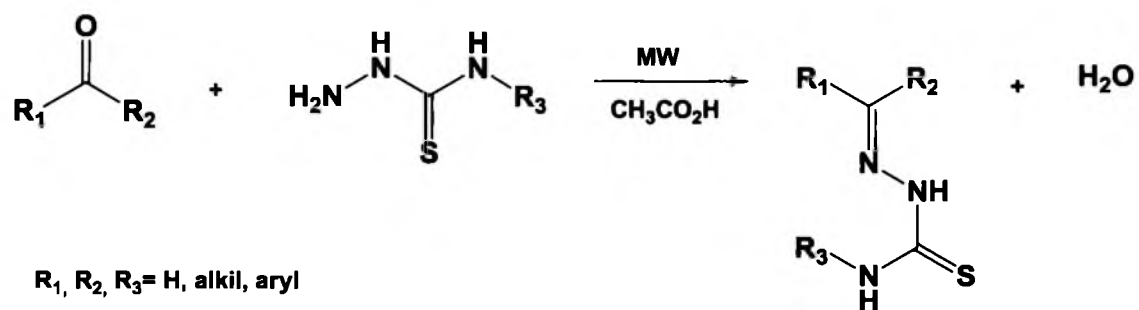
jedynie o efektach związanych miejscowymi efektami przegrzania próbki (efekty termiczne) oraz ogrzewaniem w całej jej masie²⁰⁶. Przykładem takich termalnych efektów jest woda, która podgrzewana w reaktorze mikrofalowym do temperatury 200 - 300 °C zmienia wartość stałej dielektrycznej (ϵ), zachowując się jak rozpuszczalnik organiczny²⁰⁷.

W Zakładzie Chemii Organicznej Uniwersytetu Śląskiego prowadzone są badania dotyczące syntezy związków organicznych wspomagane reaktorem mikrofalowym²⁰⁸. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na opracowanie metodyki badawczej w syntezie związków heterocyklicznych, a zwłaszcza azanaftalenów²⁰⁹. Postanowiłem zatem zoptymalizować wcześniej opracowane protokoły eksperymentalne i przystosować je do syntezy heteroaromatycznych tiosemikarbazonów.

Kluczowy etap syntezy tiosemikarbazonów- addycję *N*-nukleofili do grupy karbonylowej (**Schemat 4**), przeprowadzano w reaktorze mikrofalowym CEM-DISCOVERY. Do reakcji używano polarnych rozpuszczalników takich jak etanol, 2-propanol, acetonitryl oraz DMF. Jako katalizatora reakcji używano lodowatego kwasu octowego. Wyjątek stanowiła seria związków **10-11**, dla której reakcja niekatalizowana miała taką samą wydajność, jak ta z dodatkiem CH₃COOH. Przeprowadzono również próby syntezy tiosemikarbazonów na żelu krzemionkowym jako nośniku. Niestety, z powodu prawdopodobnego rozkładu tiosemikarbazynu w temperaturze topnienia, reakcja nie zachodziła (analiza TLC ekstraktu). Zaobserwowano brak istotnej różnicy w wydajności reakcji w funkcji mocy reaktora (standardowo stosowano moc 50 W). Optymalizację czasu reakcji prowadzono eksperymentalnie dla każdej podgrupy związków; jako przykład podano związek **2a** (**Rys 28**).

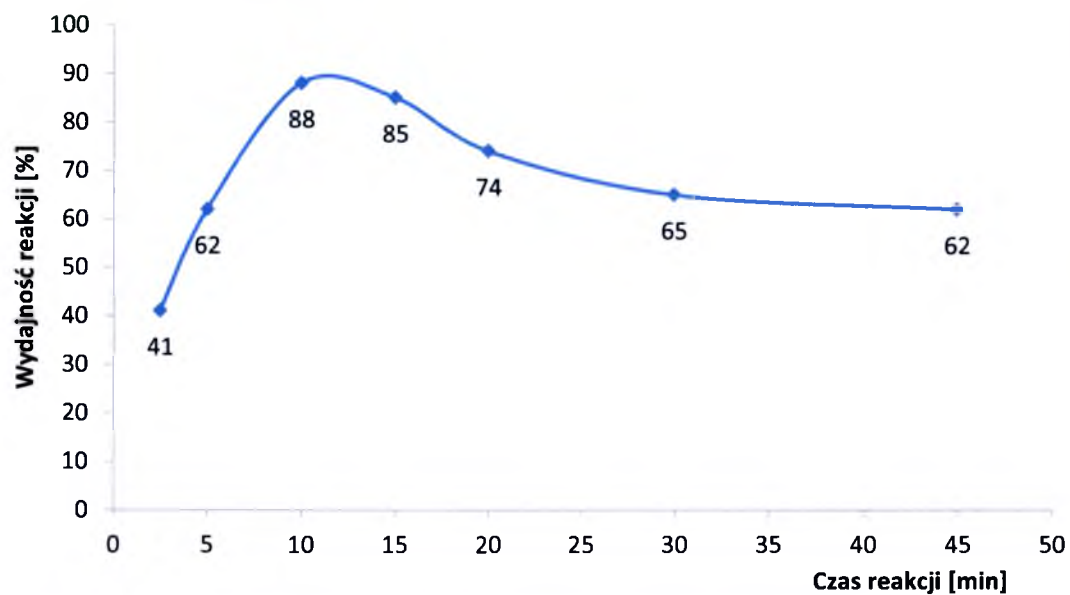
Schemat 4

Główny etap syntezy tiosemikarbazonów



Rys 28

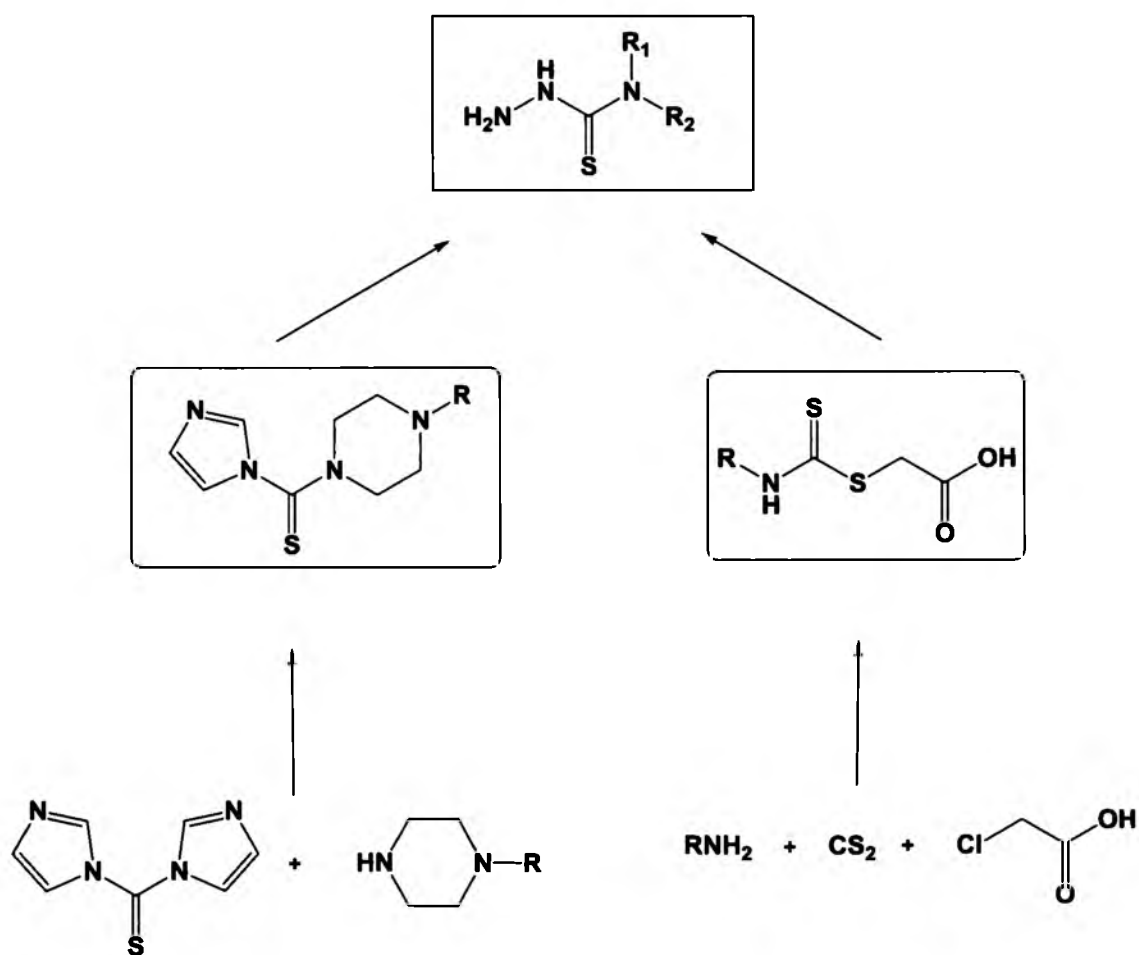
Wydajności reakcji tworzenia tiosemikarbazonu **2a** w funkcji czasu



3.6.3.2 Synteza tiosemikarbazydów

Zaprojektowane tiosemikarbazydy otrzymywano wg zmodyfikowanych przeze mnie dwóch procedur^{210,211} (Schemat 5). W pierwszej z przedstawionych reakcji używano disiarczku węgla jako donora grupy tiokarbonylowej oraz kwasu chlorooctowego. Powstały półprodukt, pochodną kwasu (tiokarbamoilo)tiooctowego ogrzewano w obecności wodzianu hydrazyny, otrzymując finalny tiosemikarbazyd. Procedura ta posiada jednak liczne utrudnienia. Używany do reakcji disiarczek węgla jest silnie toksyczny dla układu nerwowego, a cała procedura jest efektywna dla amin z relatywnie małą zawadą steryczną.

Schemat 5

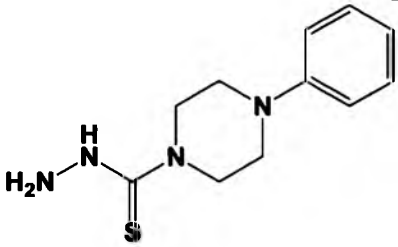
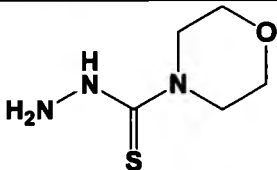
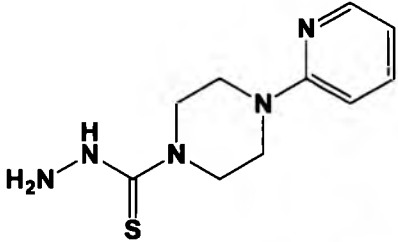
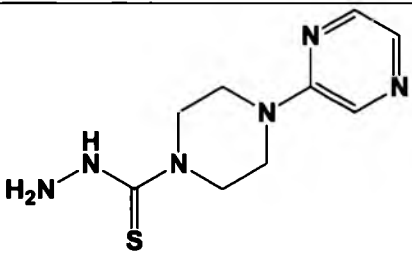
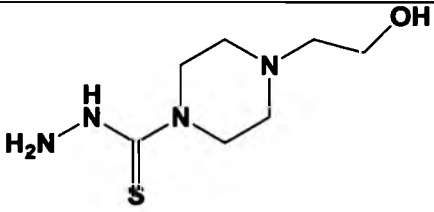


Jedną z nowocześniejszych metod otrzymywania pochodnych tiomocznika została opisana przez grupę Katritzky'ego²¹². Używał on pochodnych bis(benzotriazolilo)tiomocznika jako ekwiwalentów izotiocyjanianów, otrzymując w rezultacie *N*-podstawione tiosemikarbazydy. Związki powyższego typu oraz ich sole, są wyjątkowo reaktywne względem *N*-nukleofili²¹³. Modyfikacja pierwotnej metody Katritzky'ego poprzez zastąpienie pochodnej benzotriazolilowej układem zawierającym fragment bis(imidazoilowy) lub jego sól, została zoptymalizowana dla pochodnych mocznika oraz tiomocznika²¹⁴. W powyższej reakcji pochodna bis(imidazoilo)tiomocznika ogrzewana z *N*-podstawioną piperazyną tworzy półprodukt, który reaguje dalej z wodzianem hydrazyny tworząc ostatecznie tiosemikarbazyd (Schemat 5). Otrzymane tiosemikarbazydy zaprezentowano w Tabeli 10.

Tabela 10

Przykłady otrzymanych tiosemikarbazydów

Nr	Struktura	Wydajność [%]	Temp. topnienia [°]
15a		66	138-139
15b		64	157-158
15c		47	137-138

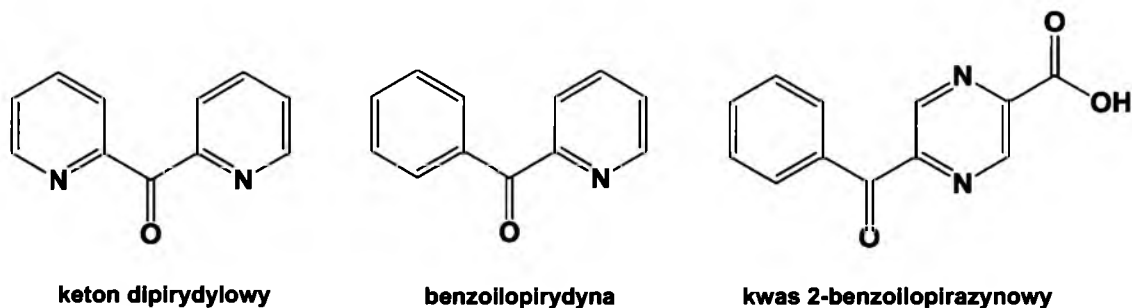
15d		58	177
15e		76	170-171
15f		95	181
15g		95	167-168
15h		55	145

3.6.3.3 Synteza benzoilowych pochodnych kwasu pirazynowego

Podczas projektowania prekursorów karbonylowych niezbędnych do syntezy tiosemikarbazonów, zaobserwowano wysokie podobieństwo strukturalne benzoilopirydyny do pochodnych benzoilowych kwasu pirazynowego (Rys 29). Pochodne te, charakteryzują się wysoką aktywnością biologiczną, zarówno przeciwnowotworową jak i przeciwgrzybiczną^{191,215}. Ponadto wcześniejsze prace sugerują¹⁸⁴, że pirazynotiosemikarbazony mogą być związkami modelowymi do otrzymywania nowej generacji chelatorów żelaza.

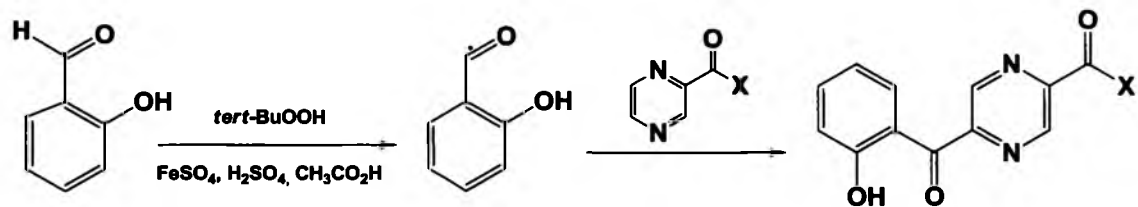
Rys 29

Wybrane prekursory karbonylowe do syntezy tiosemikarbazonów



Reakcje otrzymywania pochodnych kwasu pirazydowego były prowadzone w warunkach silnie utleniających. Do przeprowadzenia reakcji zastosowano następujący układ oksydacyjny: wodoronadtlenek *tert*-butylu, FeSO₄, kwas siarkowy, lodowaty kwas octowy. Generuje on w reakcji typu Fentona, ogromne ilości niezwykle reaktywnego rodnika hydroksylowego. Dokładny mechanizm tej reakcji, polega na wytworzeniu odpowiedniego rodnika acylowego, który zachowując się jak nukleofili, ulega addycji do pochodnej kwasu pirazydowego, a następnie procesowi rearomatyzacji²¹⁶. Głównym produktem utleniania rodnikowego są tutaj pochodne aldehydu stosowanego do reakcji- w tym przypadku otrzymywano głównie kwasy hydroksyalicylowe (**Schemat 6**), stąd wydajności otrzymywania pochodnych benzoilopirazydny nie przekraczają 30%. Dodatek kwasu octowego poprawia rozpuszczalność substratu podczas wkrapiania mieszaniny utleniającej, w obniżonej temperaturze. Zachowanie obniżonej temperatury w pierwszych 30 minutach reakcji ma kluczowe znaczenie w otrzymywaniu produktu, gdyż limituje tworzenie interesującego nas produktu ubocznego^{216,217}.

Schemat 6



X = OH, NH₂

Tabela 11

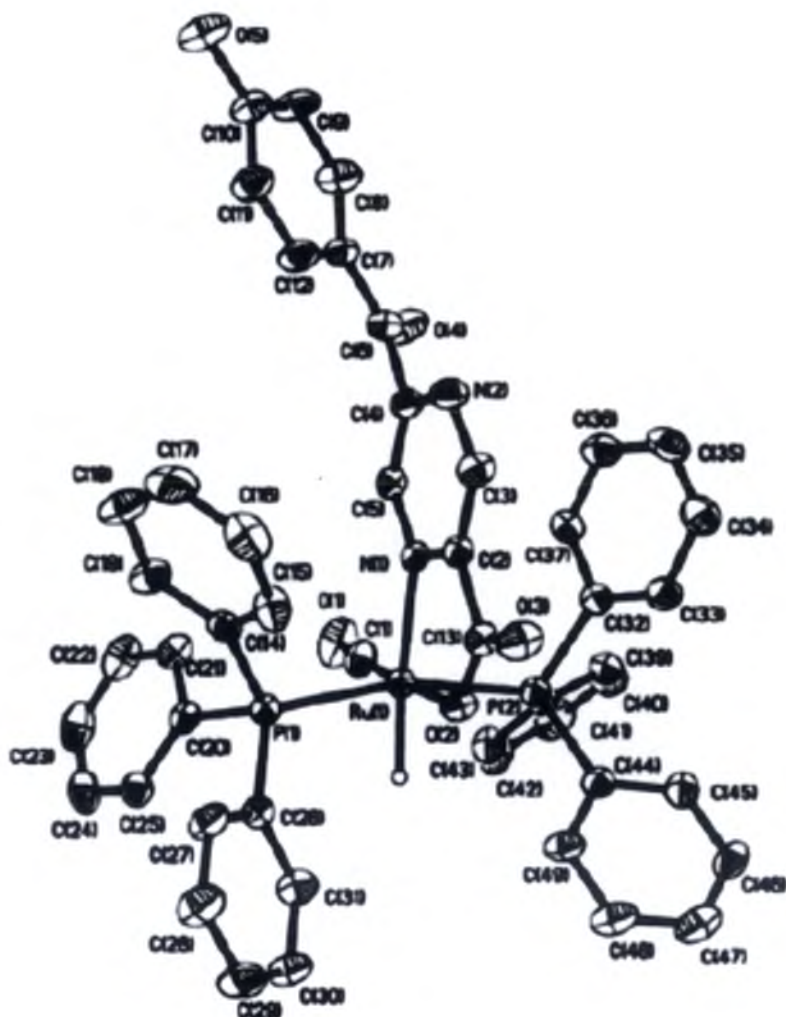
Otrzymane pochodne kwasu pirazynowego, wydajności ich tworzenia oraz temperatury topnienia.

Nr	Struktura	Wydajność [%]	Temp. topnienia [°]
14a		30	138-139
14b		14	195-196
14c		22	246-247
14d		11	235

W celu sprawdzenia właściwości kompleksujących dla układu benzoilopirazynowego, przeprowadzono reakcje jego kompleksowania przy użyciu hydrydowego kompleksu rutenu- $\text{RuHCl}(\text{CO})(\text{PPh}_3)_3$ ¹⁹². Kompleks ten, wykazuje niezwykle interesujące właściwości fizykochemiczne, pozwalające na dogodnie koordynowanie ligandów *N*-donorowych, co zostało potwierdzone badaniami zespołu dr hab. Jana Małeckiego^{218,219}. Ligandy hydrydowe posiadają bardzo silne właściwości σ -donorowe, pozwalające na kompensację deficytu elektronowego metalu w kompleksie. Pochodne pirazyny wykazują ciekawe właściwości fizykochemiczne, spowodowane nisko położonym nieobsadzonym orbitalem π oraz ich zdolnością do tworzenia układów mostkowych²¹⁹.

Rys 30

Struktura krystalograficzna kompleksu rutenu z kwasem benzoilopirazynowym

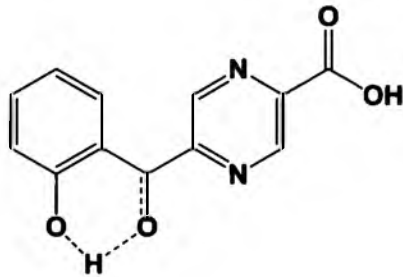


Po uzyskaniu prekursorów karbonylowych kwasów (amidów) kwasu pirazynowego przeprowadzono próby syntezy odpowiednich tiosemikarbazydów. Niestety, bazując na wynikach spektroskopii NMR oraz IR a także spektrometrii mass, nie udało się otrzymać zaprojektowanych tiosemikarbazonów. Niesatysfakcjonujący wynik syntezy może być spowodowany następującymi przyczynami:

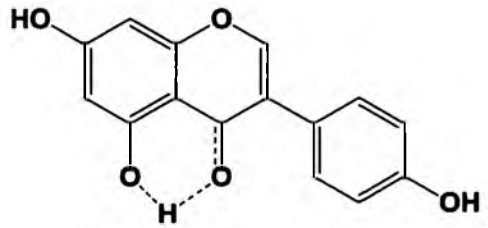
- obecnością intramolekularnego wiązania wodorowego pomiędzy grupą -OH w pozycji α do grupy karbonylowej. Obecność takiego wiązania potwierdza wykonane widmo spektroskopii w podczerwieni ($3200 - 3000 \text{ cm}^{-1}$). Tak silne wiązanie wodorowe wpływa na obniżenie ujemnego ładunku cząstkowego na atomie tlenu i utrudnia addycję *N*-nukleofila do grupy karbonylowej. Podobne efekty związane z obecnością silnego wiązania wodorowego w cząsteczce heterocyklicznej można zaobserwować na przykładzie genisteiny²²⁰ (**Rys 31**).
- konkurencyjną reakcją tiosemikarbazydu z grupą karboksylową pochodzącą od kwasu pirazynowego. Grupa ta, wykazuje większą reaktywność w porównaniu do grupy karbonylowej. Potwierdziły to analizy widma ^{13}C -NMR, na którym praktycznie brak charakterystycznych sygnałów pochodzących od węgla iminowego (C=N) przy około 155-145 ppm. Podczas oczyszczania produktu reakcji nie udało się jednak wyodrębnić możliwego produktu reakcji pochodnej 1,3,4-tiadiazolu (**Schemat 7**)²²¹. Widmo ^{13}C -NMR mieszaniny reakcyjnej wskazuje na brak węgla karboksylowego (pik przy około 170 ppm) oraz węgla C=S (pik przy 180 ppm) w układzie reakcyjnym, co może świadczyć o proponowanym mechanizmie. Prawdopodobnie otrzymany produkt jest nietrwały i rozkłada się na żelu krzemionkowym podczas oczyszczania chromatograficznego.

Rys 31

Porównanie struktur genisteiny oraz kwasu 2-[5-(2-hydroksy-benzoilo)]-pirazynokarboksylowego



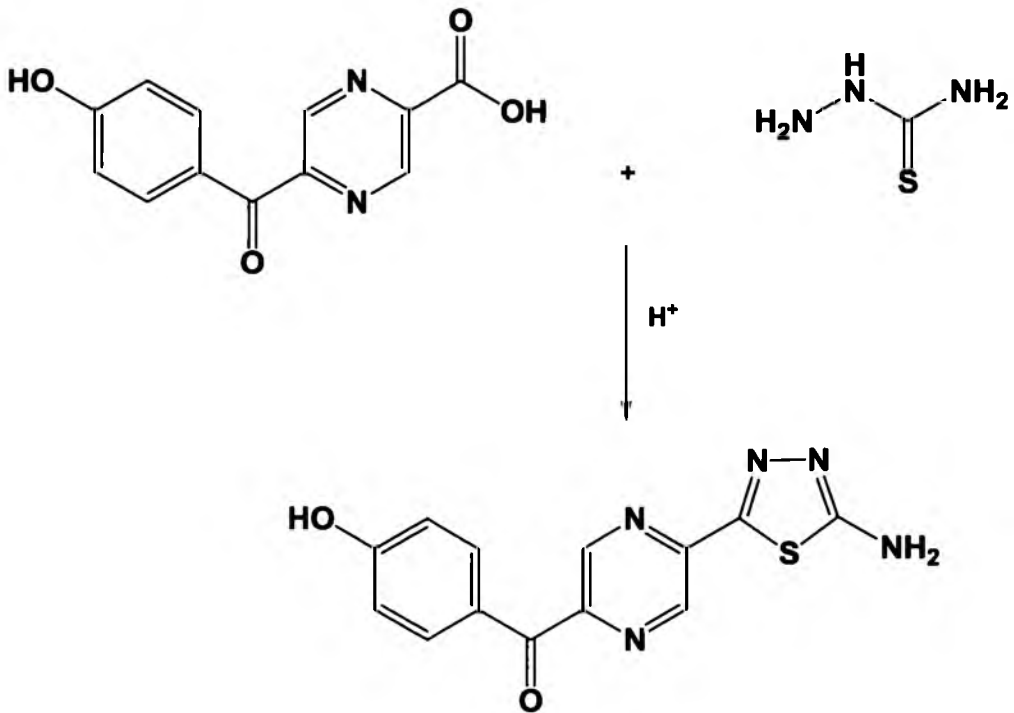
kwas 2-[5-(2-hydroksy-benzoilo)]pirazynokarboksylowy



genisteina

Schemat 7

Proponowany schemat otrzymywania pochodnych 1,3,4-tiadiazolu



Brak aktywności przeciwnowotworowej dla prekursorów benzoilopirazynowych oraz kłopoty z uzyskaniem ich pochodnych tiosemikarbazonowych, wpłynęły na zawieszenie tego wątku syntetycznego.

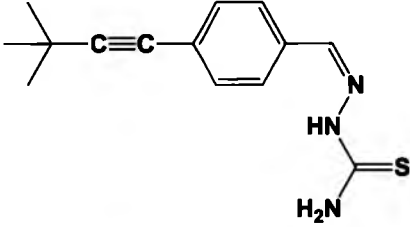
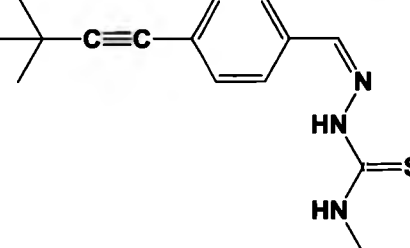
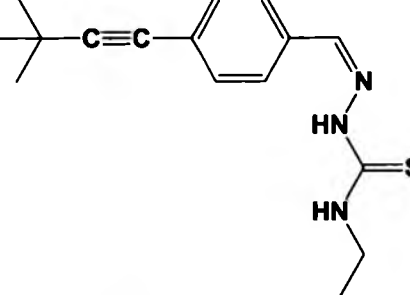
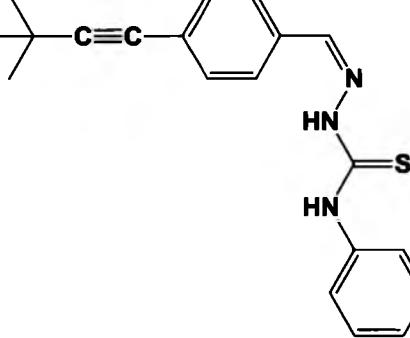
3.6.3.4 Synteza prekursorów karbonylowych z układem acetylenowym. Reakcja Sonogashiry

Prekursory karbonylowe zawierające wiązanie potrójne połączone z do pierścieniem fenylowym zostały zsyntezowane wg zmodyfikowanej procedury reakcji Sonogashiry²²². Reakcja ta, należy do szerokiej grupy reakcji sprzęgania, w której halogenek arylowy reaguje z odpowiednim terminalnym alkinem w obecności katalizatora palladowego i soli miedzi(I). W poniższej reakcji (**Schemat 8**) kompleks palladu(II) ulega oksydatywnej addycji do halogenu alkilowego, tworząc w rezultacie kompleks w kształcie płaskiego kwadratu. Kolejnym etapem reakcji jest transmetalacja nowo powstałego kompleksu acetylenkiem miedzi, po czym ligandy w tymże kompleksie, ulegają reakcji izomeryzacji. Kompleks posiadający już właściwą orientację przestrzenną (forma *cis*) uwalnia cząsteczkę produktu, w wyniku reduktywnej eliminacji, zaś kompleks palladu się odtwarza.

W zastosowanym układzie reakcyjnym jako katalizatorów reakcji używano chlorku palladu(II) oraz chlorku bis(trifenylfosfino)palladu(II), w obecności trifenylfosfiny, trietyloaminy oraz jodku miedzi(I) (**Schemat 8**). Reakcję prowadzono w warunkach beztlenowych przepuszczając przez układ azot w ciągu 15 minut. Po reakcji produkt główny oczyszczano na kolumnie chromatograficznej w układzie octan etylu: heksan. W przypadku otrzymywania pochodnej alkinowej zabezpieczonej grupą trimetylosililową, przeprowadzano reakcję usuwania grupy zabezpieczającej w obecności K_2CO_3 w metanolu. Powyższa reakcja przebiega w sposób ilościowy. Reakcje tworzenia odpowiedniego tiosemikarbazonu przeprowadzano w reaktorze mikrofalowym według wcześniej opracowanych procedur (**Rozdział 5.4**). Badania aktywności przeciwnowotworowej dla otrzymanych tiosemikarbazonów wykazały, że otrzymane związki nie wykazują aktywności przeciwnowotworowej dlatego zawieszono dalsze syntezy związków serii **13**

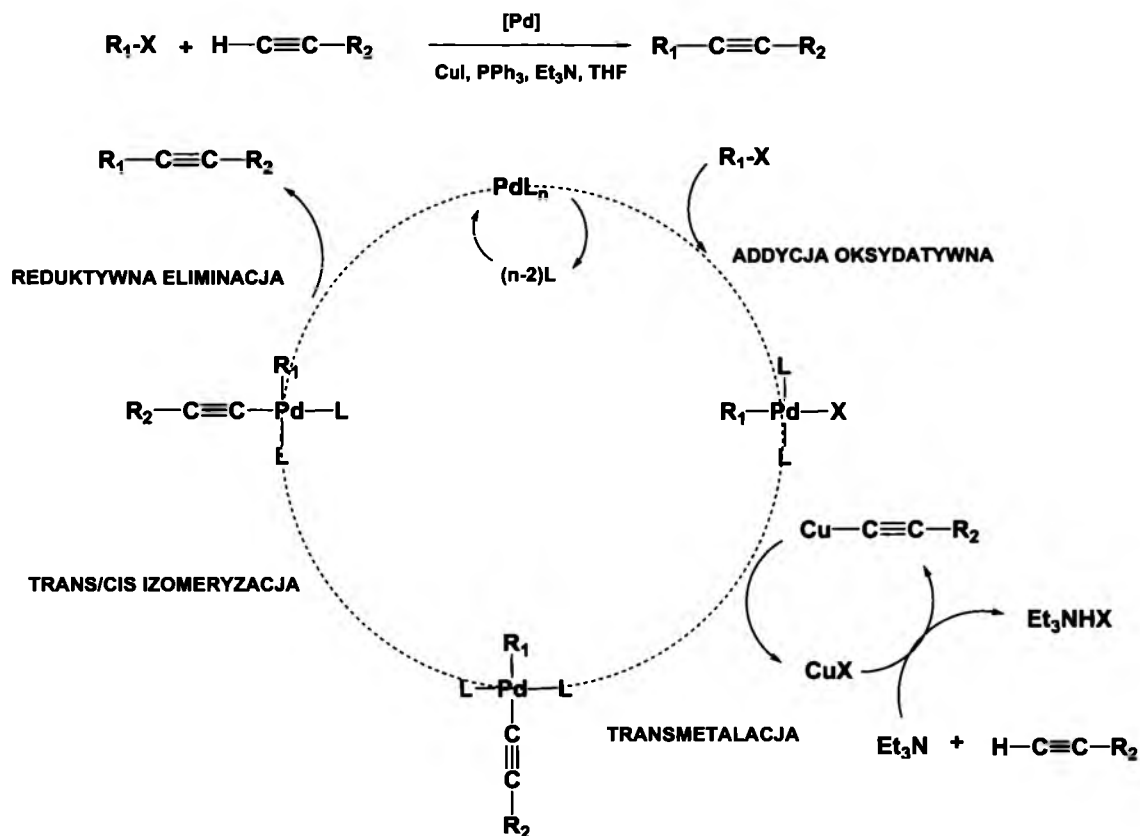
Tabela 12

Struktury otrzymanych fenyloacetylenowych tiosemikarbazonów oraz wydajności ich tworzenia

Nr	Struktura	Wydajność [%]
13a		67
13b		56
13c		65
13d		50

Schemat 8

Schemat reakcji Sonogashiry wraz z proponowanym mechanizmem



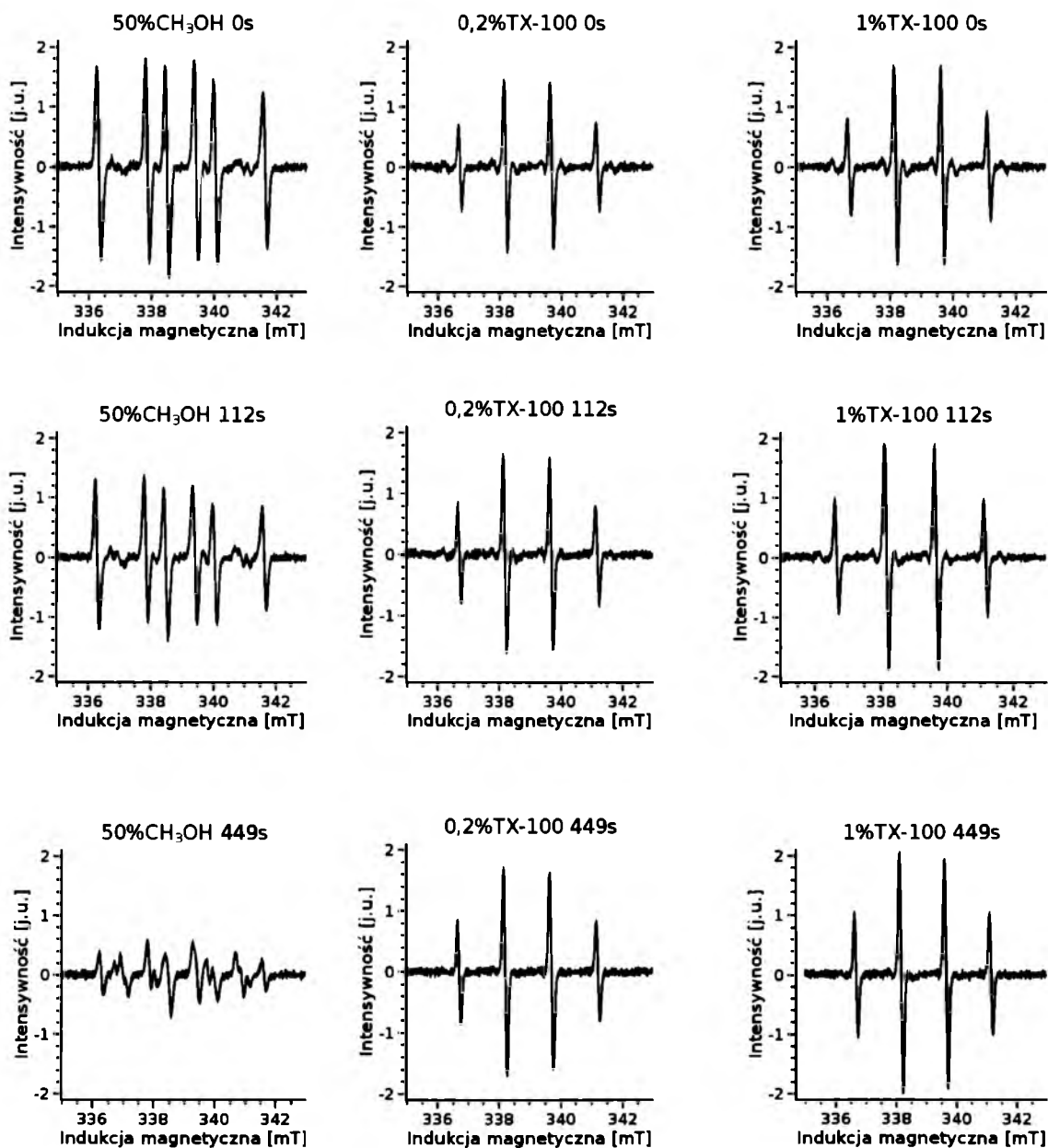
3.7 Eksperymenty pułapkowania spinowego

Postanowiono sprawdzić hipotezę, zakładającą iż tiosemikarbazonowe kompleksy żelaza generują reaktywne formy tlenu w reakcji Fentona. Badania przeprowadzono w zespole prof. dr hab. Tadeusza Sarny (Zakład Biofizyki UJ, Wydział Biochemii Biofizyki i Biotechnologii UJ) we współpracy z doktorem Andrzejem Żądło. Przeprowadzone eksperymenty pułapkowania spinowego, pozwalają na obserwację paramagnetycznych adduktów rodnika hydroksylowego z DMPO. Eksperymenty wykonywano w roztworze metanolewym używając do reakcji wody traktowanej Chelexem-100, w celu usunięcia ewentualnych artefaktów, mogących powstać z obecności innych metali w wodzie. W celu wyeliminowania rozpuszczalnika organicznego z reakcji, zastosowano układ zawierający wodę oraz środek powierzchniowo czynny- Triton X. Jako, że otrzymano kompleks żelaza(III) z ligandem

tiosemikarbazonowym, zastosowano dodatkowy reduktor (kwas askorbinowy) do reakcji Fentona.

Rys 32

Widma spektroskopii EPR z pułpkowania spinowego kompleksu żelaza(II) z *N*-etylo-2-[(8-hydroksychinolin-2-ylo)metyleno]hydrazynotiokarboamidem



Rysunek 32 można podzielić na kilka fragmentów, w zależności od użytego rozpuszczalnika oraz czasu pułapkowania. W kolumnie po lewej stronie znajdują się widma z wyraźnym sygnałem pochodzącym od rodnika karbocentrycznego (a właściwie jego adduktu z DMPO). Rodnik ten powstał zapewne w skutek reakcji bardzo reaktywnego rodnika hydroksylowego z rozpuszczalnikiem organicznym jakim był metanol. Co ciekawe, zaobserwować można również fakt, że sygnał rodnika karbocentrycznego słabnie w funkcji czasu. W celu wyeliminowania sygnału rodnika karbocentrycznego przeprowadzano próby zmiany rozpuszczalnika organicznego. Ostatecznie, ze względu na niską rozpuszczalność kompleksu w roztworach wodnych zastosowano wodny roztwór środka powierzchniowo czynnego tworzącego micelle- Tritonu X. Centralna oraz prawa kolumna obrazują sygnały rodnika hydroksylowego, którego sygnał nie słabnie w funkcji czasu. Wyniki eksperymentu jednoznacznie potwierdzają tezę, iż tiosemikarbazonowe kompleksy żelaza generują ROSy w reakcji Fentona. przeprowadzone badania zgadzają się z najnowszymi doniesieniami literaturowymi²²³.

4. WNIOSKI

1. Otrzymano **8** tiosemikarbazydów oraz odpowiadające im prekursory. Związki zsyntezowano według dwóch ogólnych procedur z użyciem disiarczku węgla oraz bis(imidazolilo)tioketonu. Dla jednego tiosemikarbazydu wyznaczono strukturę krystalograficzną.
2. Przeprowadzono syntezy prekursorów karbonylowych, pochodnych kwasu pirazynowego oraz acetylenowych pochodnych benzaldehydu. Niestety nie udało się otrzymać tiosemikarbazonów z odpowiednich kwasów benzoilopirazynowych. Pochodne fenyloacetylenowe okazały się nieaktywne biologicznie.
3. Opracowano metodykę syntezy tiosemikarbazonów w polu mikrofalowym, co zaowocowało otrzymaniem **67** (hetero)aromatycznych tiosemikarbazonów. Dla wszystkich tiosemikarbazonów oznaczono ich działanie przeciwnowotworowe, zaś dla tiosemikarbazonów serii **1, 2, 10-12** oznaczono aktywność przeciwgrzybiczą oraz właściwości hamujące fotosyntetyczny transfer elektronów.
3. Dwa spośród otrzymanych związków (**4b, 5c**) wykazują bardzo dużą aktywność przeciwnowotworową. Związek **5c** charakteryzuje się bardzo wysokim indeksem terapeutycznym, zaś związek **4b** wykazuje największą z dotychczas opisanych, w tej klasie związków, aktywność przeciwnowotworową ($IC_{50} = 0,3$ nM). Badania wykonane przy współpracy z Instytutem Fizyki UŚ pozwoliły na wykazanie wysokiej synergii związku **4b** w skojarzonej terapii TSC-PDT
4. Konfigurację *E* i *Z* dla poszczególnych tiosemikarbazonów określano za pomocą spektroskopii 1H -NMR oraz eksperymentu 2D-NOESY. Badania spektroskopowe zostały uzupełnione poprzez metody rentgenografii strukturalnej.
5. Dla poszczególnych klas związków wykonano pomiary krzywych izobestycznych, potwierdzających kompleksowanie ligandów tiosemikarbazonowych poprzez kationy Fe^{3+} .

6. Metody pułapkowania spinowego EPR, pozwoliły na udowodnienie generowania rodnika hydroksylowego w reakcji Fentona, przez kompleks TSC-Fe(II).

5. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

Temperatury topnienia substancji krystalicznych oznaczano w dedykowanych, szklanych kapilarach za pomocą aparatu firmy Optimelt MPA100 instrument (SRS, USA); nie były one korygowane. Widma $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ oraz eksperymenty dwuwymiarowe (COSY, HMQC, HMBC, NOESY) wykonywano na spektrometrze Bruker (Bruker BioSpin Comp., Karlsruhe, Germany) model Avance III 400 MHz FT-NMR, przy częstotliwości 400 oraz 100 MHz. Część widm spektroskopii NMR zarejestrowano również na aparacie Bruker Avance 500 MHz z użyciem sondy szerokopasmowej SmartProbe™, przy częstotliwości 500 i 125 MHz. Jako wzorca w przypadku widm $^1\text{H-}$, $^{13}\text{C-NMR}$ używano tetrametylosilanu- $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$. Przesunięcia chemiczne (δ) podawano w skali ppm, a stałe sprzężenia spinowego (J) w Hz.

Reakcje w polu mikrofalowym wykonywano za pomocą reaktora firmy CEM (Matthews, NC, USA) model DISCOVERY. Reakcje przeprowadzano w hermetycznie zamkniętych, szklanych probówkach (system zamykania probówek firmy Sigma-Aldrich). Chromatografie kolumnowe wykonywano w kolumnach wypełnionych żelem krzemionkowym (silicagel 60, 70-230 mesh, Merck). Do chromatografii cienkowarstwowych stosowano aluminiowe płytki chromatograficzne firmy Merck pokryte żelem krzemionkowym 60 F254 (grubość warstwy 0,2 mm). Plamki na płytkach chromatograficznych obserwowano w świetle lampy UV przy długości fali 254 lub 365 nm, bądź wywoływano w komorze nasyconej parami jodu. Chromatografię preparatywną wykonywano na aparacie BUCHI Sepacore® zaopatrzonym w kolektor frakcji oraz detektor UV-VIS (pomiar długości fali przy 359 nm). Dodatkowe analizy czystości zsyntezowanych produktów wykonywano przy użyciu aparatu

Niskorozdzielcze widma masowe LRMS (ESI) były wykonywane za pomocą aparatu Varian LC-920. Badanie wysokorozdzielczej spektrometrii masowej wykonywano używając aparatów: Finnigan MAT95 spectrometer (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) oraz Mariner ESI-TOF (Applied Biosystems), używając soli sodowej glikolu polietylenowego 400 jako wzorca.

Eksperymenty pułapkowania spinowego wykonywano używając aparatu BRUKER EMX. Pomiary widm UV-VIS oraz widm emisyjnych, dla zsyntezowanych związków wykonywano na spektrofotometrach U-2900 i F-7000 (Hitachi) oraz na czytniku płytek wielodołkowych Synergy4 (BioTek, USA).

Wszystkie stosowane rozpuszczalniki firmy POCH, Acros Organics oraz CHEMTRADE destylowano w razie potrzeby, oraz suszono nad sitami molekularnymi 4Å (Acros Organics), przy czym stosowano standardowe procedury według literatury²²⁴. Parametry lipofilowości dla zsyntezowanych związków obliczano w programie ChemBioOffice 12.0, zaś widma spektroskopii NMR opracowywano w programie MestreNova 8.2.

Odczynniki używane do syntez zakupiono w poniższych firmach:

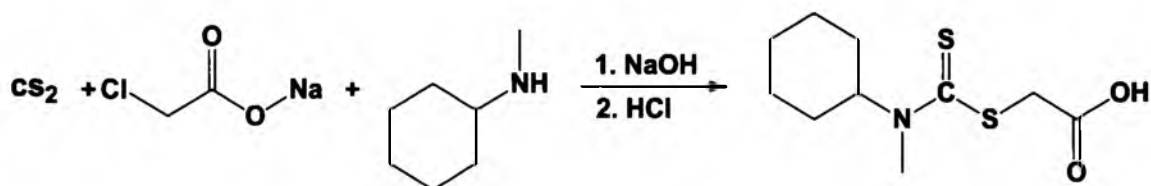
- POCH S.A.
- Acros Organics
- Sigma-Aldrich
- Chempur
- Princeton Chemicals Ltd

Wszystkie dane spektralne przedstawiono wg anglosaskiej konwencji zapisu

Synteza substratów

5.1. Synteza tiosemikarbazydów i ich pochodnych

5.1.1. Otrzymywanie kwasu 2-[(cykloheksylometylo(tio)karbamoilo)tio]octowego^{210*}



W kolbie dwuszyjnej o pojemności 500 cm³ zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne oraz wkraplacz (50 cm³) umieszczono 250 cm³ 0,8 M roztworu wodorotlenku sodu. Następnie wkraplano przez 10 minut 26.3 cm³ (0.2 mol; 22.6 g) *N*-cykloheksylo-*N*-metyloaminy. Mieszaninę reakcyjną mieszano przez około 15 minut do zaniku układu

dwufazowego. Do tak przygotowanej mieszaniny reakcyjnej dodawano małymi porcjami (w ciągu 15 minut) 12,06 cm³ (0.2 mol; 15.2 g) disiarczku węgla. Podczas dodawania CS₂ obserwowano zmianę zabarwienia roztworu z bezbarwnej na żółtą. Kolejnym krokiem było dodanie 23.3 g (0.2 mol) chlorooctanu sodu, co zaowocowało zmianą koloru mieszaniny reakcyjnej z żółtego na bezbarwny. Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 15 godzin. Po upływie tego czasu, w celu strącenia osadu produktu dodawano stężonego kwasu solnego do mieszaniny reakcyjnej (4 porcje po 5 cm³ HCl). Mieszaninę reakcyjną pozostawiono w obniżonej temperaturze (około -5 °C) przez 60 minut. Obserwowano wytrącanie się białego osadu, który przesączono na lejku Büchnera a następnie przemywano wodą do zaniku odczynu kwaśnego. Surowy produkt (49 g; wydajność 98 %) w postaci białego, krystalicznego proszku suszono pod obniżonym ciśnieniem (2-4 mmHg) i stosowano do dalszych syntez bez dalszego oczyszczania.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 5.29 (m, 1H, N-CH); 4.35 (s, 2H, -CH₂); 3.19 (s, 3H, -CH₃); 1.79-1.73 (m, 2H, cykloheksyl); 1.67-1.59 (m, 3H, cykloheksyl); 1.55-1.46 (m, 2H, cykloheksyl); 1.36-1.23 (m, 2H, cykloheksyl); 1.13-1.08 (m, 1H, cykloheksyl).

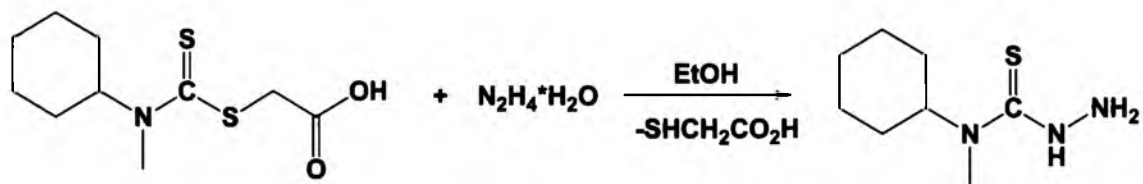
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 195,8; 169,8; 62,8; 37,8; 34,5; 29,9; 29,0; 25,7; 25,6; 25,2.

LR-MS (ESI): 359,1 [M + Na]⁺

clogP: 2,639

*Cytowana literatura nie podaje danych spektralnych oraz temperatury topnienia produktu.

5.1.2 Otrzymywanie *N*-cykloheksylo-*N*-metylohydrazynokarbotoamidu^{225*}



W kolbie okrągłodennej o pojemności 250 cm³, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne oraz chłodnicę zwrotną umieszczono 19,76 g (0,08 mol) kwasu 2-[(cykloheksylometylo(tio)karbamoilo)tio]octowego a następnie dodano 10 cm³ wody destylowanej oraz 20 cm³ (0,41 mol; 20,62 g) wodzianu hydrazyny. Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną ogrzewano łagodnie w 5 cyklach (aż do momentu pojawienia intensywnie wydzielających się białych oparów), przy czym każdy cykl trwał około 15 minut. Po tym czasie kolbę z mieszaniną reakcyjną umieszczono na 30 minut w obniżonej temperaturze (około -5 °C). Obserwowano wytrącenie się białego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany surowy produkt, krystalizowano trzykrotnie z układu metanol : woda (1:1; v/v) zaś finalny produkt suszono pod zmniejszonym ciśnieniem (2-4 mmHg) i przechowywano w obniżonej temperaturze (około -20 °C). Wydajność reakcji wynosiła 66 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 8,67 (bs, 1H, NH); 4,84(m, 1H, N-CH); 4,68 (bs, 2H, NH); 2,83 (s, 3H, -CH₃); 1,76-1,73 (m, 2H, cykloheksyl); 1,61-1,55 (m, 3H, cykloheksyl); 1,46-1,36 (m, 2H, cykloheksyl); 1,33-1,27 (m, 2H, cykloheksyl); 1,13-1,02 (m, 1H, cykloheksyl).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 182.65; 59.00; 56.54; 31.53, 29.72, 25.80, 25.41.

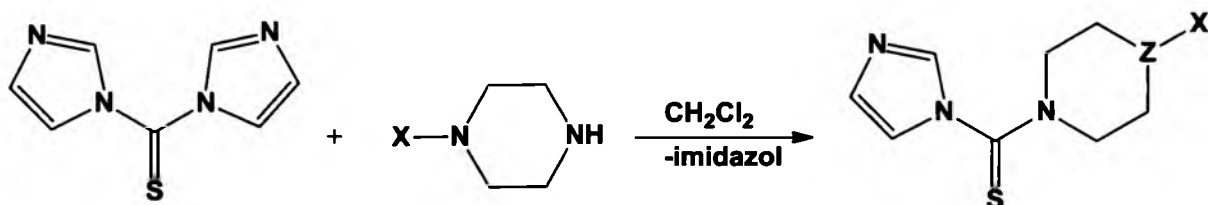
Temperatura topnienia: 138-139° C

LR-MS (ESI): 210,4 [M + Na]⁺

cLogP: 1.733

*Cytowana literatura nie podaje danych spektralnych oraz temperatury topnienia produktu.

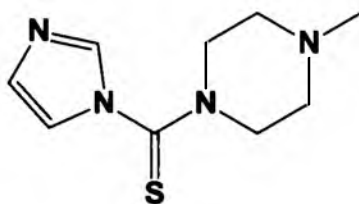
5.1.3 Ogólna procedura otrzymywania monopodstawionych pochodnych bis(imidazolilo)tioketonu.



X= Alkil, aryl
Z= N, O

Do zamykanej septą probówki o pojemność 30 cm³, zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne wprowadzano 1,068 g (6mmol)(1,1'-tiokarbonylo)bis-1*H*-imidozu, 6 mmola odpowiedniej *N*-pochodnej piperazyny oraz 25 cm³ chlorku metylenu. Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Surowy produkt oczyszczano poprzez ekstrakcję wodą destylowaną (3 porcje po 25 cm³). Ekstrakty organiczne suszono nad bezwodnym siarczanem(VI) magnezu a następnie odparowywano na wyparce rotacyjnej. Tak otrzymane substraty wykorzystywano do dalszych syntez, bez dalszego oczyszczania.

5.1.3.1 1'-Imidazolilo-(4-metylo-1-piperazylo)-tioketon²¹¹



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.1.3. używając do reakcji 0,665 cm³ (6mmol) *N*-metylopiperazyny. Produkt końcowy tej reakcji otrzymano w postaci żółtego, lepkiego oleju. Wydajność reakcji wynosiła 99 %.

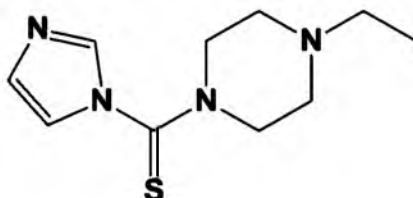
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 8.02 (bs, 1H, N-CH-N, imidazol); 7.49 (bs, 1H, imidazol); 7.03 (bs, 1H, imidazol); 4.24-3.50 (m, 4H, -CH₂, piperazyna); 2.48-2.39 (m, 4H, -CH₂, piperazyna); 2.22 (s, 3H, -CH₃).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 177.6; 138.0; 129.5; 120.2; 54.3; 51.4; 45.5.

LR-MS (ESI): 233,0 [M + Na]⁺

cLogP: 1.363

5.1.3.2 (4-etylo-1-piperazyńlo)-1'-imidazolilotioketon



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.1.3. używając do reakcji 0,765 cm³ (6mmol) *N*-etylopiperazyńy. Produkt końcowy tej reakcji otrzymano w postaci żółtej lepkiej żywicy. Wydajność reakcji wynosiła 99 %.

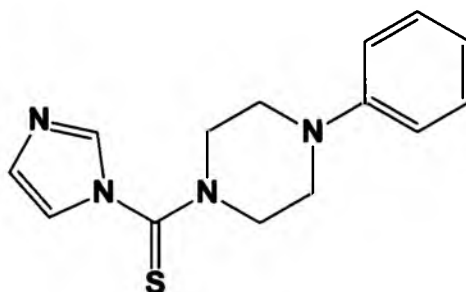
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 8.02 (bs, 1H, N-CH-N, imidazol); 7.49 (bs, 1H, imidazol), 7.04 (bs, 1H, imidazol), 3.84 (m, 4H, -CH₂, piperazyna), 2.50 (m, 4H, -CH₂, piperazyna), 2.39 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, -CH₂), 1.02 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, -CH₃).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 178.3; 137.9; 129.3; 120.4; 59.3; 57.2; 49.9; 15.1.

LR-MS (ESI): 225,3 [M+H]⁺

cLogP: 1.892

5.1.3.3 (4-fenylo-1-piperazyńlo)-1'-imidazolilotioketon



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.1.3. używając do reakcji 0,916 cm³ (6mmol) *N*-fenylopiiperazyny. Produkt końcowy tej reakcji otrzymano w postaci żółtego oleju. Wydajność reakcji wynosiła 98 %.

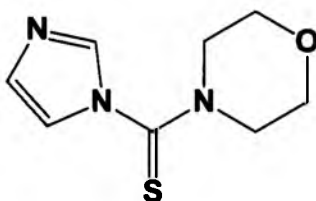
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 8.08 (bs, 1H, N-CH-N, imidazol), 7.56 (t, *J* = 1.3 Hz, 1H, imidazol), 7.25 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, fenyl), 7.06 (t, *J* = 1.2Hz, 1H, imidazol), 6.96 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, fenyl), 6.83 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, fenyl), 4.00 (m, 4H, -CH₂, piperazyna), 3.36 (m, 4H, -CH₂, piperazyna).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 177.8; 150.4; 138.0; 129.5; 120.4; 119.8; 116.01; 55.4; 51.4.

LR-MS (ESI): 295,6 [M + Na]⁺

cLogP: 2.962

5.1.1.4 4-(1-imidazolilotiokarbonylo)morfolina²¹⁴



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.1.3. używając do reakcji 0,519 cm³ (6 mmol) morfoliny. Produkt końcowy tej reakcji otrzymano w postaci kremowej żywicy. Wydajność reakcji wynosiła 76 %.

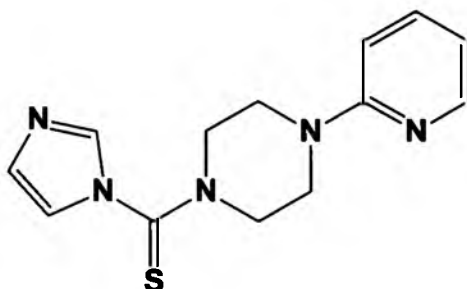
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 8.04 (bs, 1H, N-CH-N, imidazol), 7.51 (t, *J* = 1.3 Hz, 1H, imidazol), 7.04 (bs, 1H, imidazol), 3.89 (m, 4H, -CH₂, morfolina), 3.73 (m, 4H, -CH₂, morfolina).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 177.9; 137.9; 129.6, 120.3, 65.9, 52.2.

LR-MS (ESI): 198,3 [M + H]⁺

cLogP: 0.937

5.1.3.5 1'-Imidazolilo-(4-pirydynylo-1-piperazyńnylo)tioketon²¹¹



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.1.3. używając do reakcji 0,915 cm³ (6mmol) *N*-pirydylopiperazyńny. Produkt końcowy tej reakcji otrzymano w postaci żółtego oleju. Wydajność reakcji wynosiła 87 %.

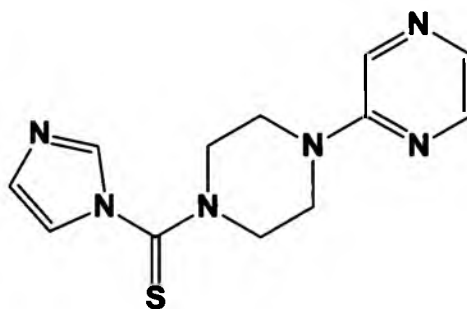
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 8.15 (dd, *J*₁= 4.9Hz, *J*₂=1.3 Hz, 1H, pirydyna); 8.08 (bs, 1H, N-CH-N, imidazol); 7.61 – 7.58 (m, 1H, pirydyna); 7.56 (m, 1H, imidazol); 7.08 (m, 1H, imidazol); 6.84 (d, *J*= 8.6 Hz, 1H, pirydyna); 6.70 (dd, *J*₁= 7.0Hz, *J*₂= 4.9 Hz, 1H, pirydyna); 3.97 (m, 4H, -CH₂, piperazyńna); 3.72 (m, 4H, -CH₂, piperazyńna).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm):177.9; 158.6; 148.1; 138.2; 138.0; 129.5; 120.4; 113.9; 107.6; 55.4; 51.3.

LR-MS (ESI): 296,4 [M + Na]⁺

cLogP: 2.014

5.1.3.6 1'-imidazolilo-[4-(2-pirazyńnylo)-1-piperazyńnylo]tioketonu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.1.3. używając do reakcji 0.985 g (6mmol) *N*-pirazylopiperazyny. Produkt końcowy tej reakcji otrzymano w postaci żółtej, lepkiej żywicy. Wydajność reakcji wynosiła 92 %.

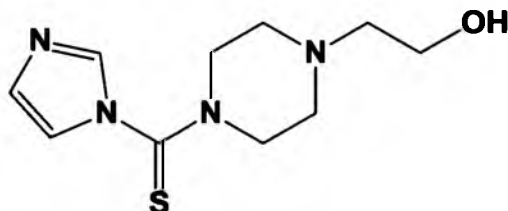
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 8.32 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, pirazyna), 8.13 (dd, *J*₁ = 2.6; *J*₂ = 1.5 Hz, 1H, pirazyna), 8.08 (t, *J* = 1.0 Hz, 1H, N-CH-N, imidazol); 7.90 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, pirazyna), 7.56 (t, *J* = 1.4 Hz, 1H, imidazol), 7.08 (bs, 1H, imidazol);); 3.99 (m, 4H, -CH₂, piperazyna); 3.81 (m, 4H, -CH₂, piperazyna).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm):178.0; 154.4; 141.9; 138.0; 133.4; 131.7; 129.6; 120.4; 55.4, 51.0

LR-MS (ESI): 297,5 [M + Na]⁺

cLogP: 1.249

5.1.3.7 [4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazyńnylo]-1'-imidazoliliotioketon



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.1.3. używając do reakcji 0,781 g(6mmol) 2-piperazyńnoetanolu. Odpowiednią objętość substratu przenoszono na wagę laboratoryjną i w ten sposób szacowano jego wagę, ze względu na jego bardzo dużą lepkość i trudności w dokładnym pipetowaniu. Produkt końcowy tej reakcji otrzymano w postaci żółtej, lepkiej żywicy. Wydajność reakcji wynosiła 85 %.

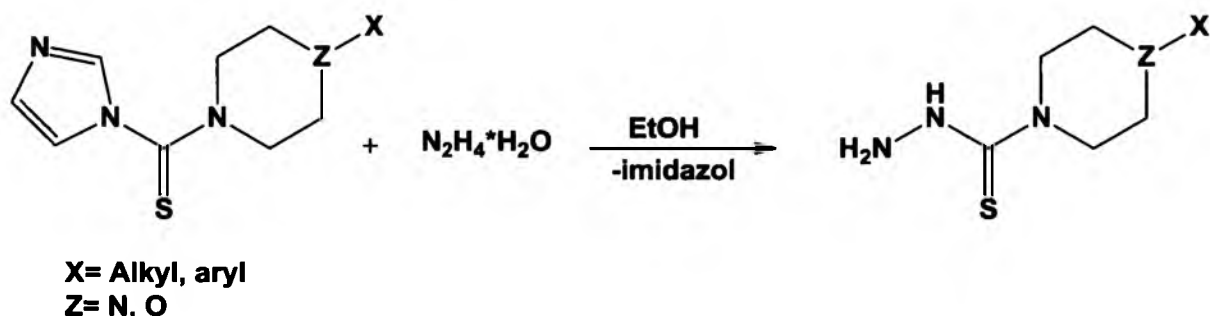
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 8.02 (bs, 1H, N-CH-N, imidazol); 7.49 (bs, 1H, imidazol); 7.03 (bs, 1H, imidazol); 3.95 (m, 4H, -CH₂, piperazyna); 3.69 (m, 4H, -CH₂, piperazyna); 3.51 (m, 2H, CH₂-OH); 2.42 (t, *J* = 6.0 Hz; 2H, CH₂-N); 2.30 (bs, 1H, -OH).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm):177.6; 137.8; 129.45, 120.23, 60.21, 58.98, 55.64, 55.37.

LR-MS (ESI): 241,4 [M + H]⁺

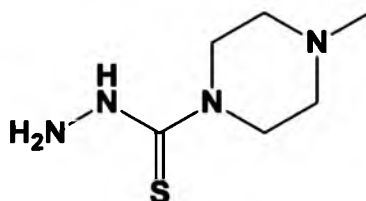
cLogP: 0.788

5.1.4 Ogólna procedura otrzymywania pochodnych morfolino- i piperazyno-
tiosemikarbazydów.



W kolbie okrągłodennej o pojemności 50 cm³, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, umieszczano wcześniej przygotowaną pochodną imidazolilotioketonu, 0,29 cm³ (0,3 g; 6mmol) wodzianu hydrazyny oraz 25 cm³ etanolu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano przez 2 godziny w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, otrzymując w rezultacie różowawy roztwór. Tak przygotowane związki umieszczano w obniżonej temperaturze (-20 °C) przez około godzinę. Po tym czasie obserwowano wytrącenie się białego osadu, który krystalizowano z metanolu (bądź układu metanol : woda; 1:1, v/v, bądź etanolu).

5.1.4.1 (4-metylo-1-piperazyno)tiokarbonylhydrazid²²⁶



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.1.4. używając do reakcji 1,044 g (6mmol)1-Imidazolilo-(4-metylo-1-piperazynylo)tioketonu. Produkt reakcji otrzymano w postaci różowego osadu, który po dwóch krystalizacjach

z metanolu przybierał postać białego krystalicznego proszku. Wydajność reakcji wynosiła 64 %.

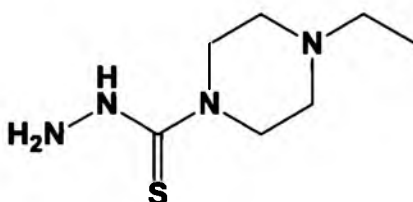
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 3.69 (m, 4H, -CH₂, piperazyna); 2.28 (m, 4H, CH₂, piperazyna); 2.17 (s, 3H, -CH₃).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm):183.1; 54.6; 47.6; 45.9.

Temperatura topnienia: 157-158 ° C [lit: 156-157 ° C]

cLogP: 0,041

5.1.4.2 (4-etylo-1-piperazyno)tiokarbonylhydrazid



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.1.4. używając do reakcji 1,344 g (6 mmol) (4-etylo-1-piperazynylo)-(1'-imidazolilo)tioketonu. Produkt reakcji otrzymano w postaci lekko różowego osadu, który krystalizowano dwukrotnie z absolutnego etanolu. Wydajność reakcji wynosiła 47 %. Dla otrzymanego tiosemikarbazydu uzyskano strukturę monokrystaliczną (hodowano monokryształy produktu z roztworu absolutnego etanolu).

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 3.71-3.68 (m, 4H, -CH₂, piperazyna); 2.35-2.29 (m, 6H, -CH₂, piperazyna, -CH₂-), 1.00 (t, *J*= 7.2 Hz, 3H -CH₃).

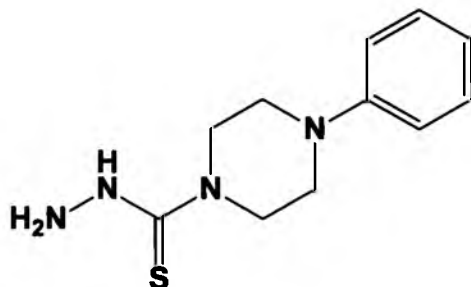
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm):183.0; 52.4; 51.9; 47.7; 12.3;

HRMS-ESI-TOF: 189.1171 [M + H]⁺ (C₇H₁₇N₄S; Obliczono: 189.1174)

Temperatura topnienia:137-138° C

cLogP: 0.57

5.1.4.3 (4-fenyl-1-piperazyno)tiokarbonylhydrazyd²²⁷



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.1.4. używając do reakcji 1,632 g(6mmol)(4-fenyl-1-piperazynylo)-1'-imidazoliotioketonu oraz 30 cm³ etanolu. Produkt reakcji otrzymano w postaci pomarańczowego sypkiego osadu, który krystalizowano dwukrotnie z metanolu otrzymując ciekisty, krystaliczny tiosemikarbazyd. Wydajność reakcji wynosiła 58 %.

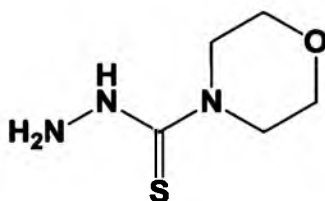
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 9.18 (bs, 1H, NH); 7.23 (t, *J*= 7.9 Hz, 2H, fenyl); 6.95 (d, , *J*= 8.0 Hz, 2H, fenyl); 6.80 (t,*J*= 7.2 Hz, 1H, fenyl); 4.77 (bs, 2H, NH); 3.88 (m, 4H, -CH₂, piperazyna); 3.15 (m, 4H, -CH₂, piperazyna).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm):183.0; 151.0; 129.4; 119.6; 116.0; 48.3; 47.5.

Temperatura topnienia: 177 ° C [178-179 °C, lit]

cLogP: 1.472

5.1.4.4 (4-morfolino)tiokarbonylhydrazyd²²⁷



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.1.4. używając do reakcji 1,182 g (6mmol)4-(1-imidazoliotiokarbonylo)morfoliny oraz 30 cm³ etanolu. Produkt reakcji otrzymano w postaci różowego osadu, który krystalizowano dwukrotnie z mieszaniny woda - metanol (1:1, v/v) otrzymując biały krystaliczny produkt. Wydajność reakcji wynosiła 76 %.

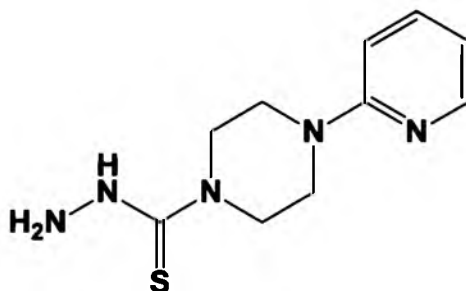
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm):6.20 (bs, 2H, NH); 3.68 (m, 4H, -CH₂, morfolina); 3.57 (m, 4H, -CH₂, morfolina).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm):183.4; 66.1; 48.20.

Temperatura topnienia: 170-171°C [170-171 °C, lit]

cLogP: -0.52

5.1.4.5 [4-(2-pirydynylo)-1-piperazyno]tiokarbonylami²²⁷



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.1.4. używając do reakcji 1,638 g (6mmol) 1'-Imidazolilo-(4-pirydynylo-1-piperazynylo)tioketonu. Produkt reakcji otrzymano w postaci różowego osadu, który krystalizowano dwukrotnie z metanolu, otrzymując różowawy, krystaliczny produkt. Wydajność reakcji wynosiła 95 %.

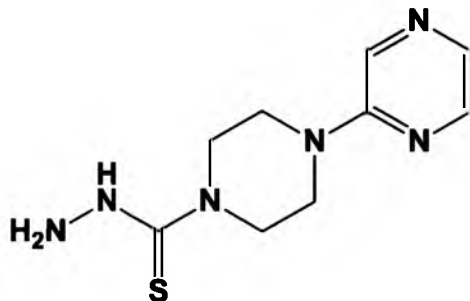
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm):9.12 (bs, 1H, NH); 8.12 (m, 1H, pirydyna); 7.55 (t, *J*= 8.0 Hz, 1H, pirydyna); 6.82 (d, *J*= 8.6 Hz, 1H, pirydyna);6.66 (dd, *J*₁= 6.9 Hz, *J*₂= 5.0 Hz, 1H, pirydyna); 4.81 (bs, 2H, NH); 3.85 (m, 4H, -CH₂, piperazyna); 3.53 (m, 4H, -CH₂, piperazyna).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm):183.0; 159.0; 148.0; 138.0; 113.6; 107.5; 47.2; 44.4.

Temperatura topnienia: 181 ° C [lit: 179-181 ° C]

cLogP: 0.524

5.1.4.6 [4-(2-pirazynylo)1-piperazyno]tiokarbonyd



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.1.4. używając do reakcji 1,644 g (6mmol) 1'-imidazolilo-[4-(2-pirazynylo)-1-piperazynylo]tioketonu. Produkt reakcji otrzymano w postaci pomarańczowego osadu, który krystalizowano dwukrotnie z absolutnego etanolu. Wydajność reakcji wynosiła 95 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 9.17 (bs, 1H, NH); 8.31 (bs, 1H, pirazyna); 8.09 (bs, 1H, pirazyna); 7.86 (bs, 1H, pirazyna); 4.83 (bs, 2H, NH); 3.89 (m, 4H, -CH₂, piperazyna); 3.61 (m, 4H, -CH₂, piperazyna).

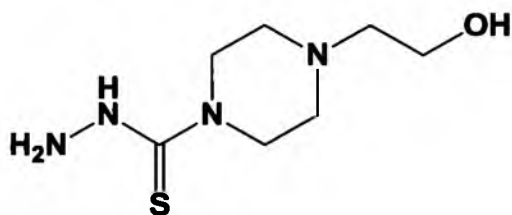
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm):183.0; 154.7; 141.9; 133.1; 131.7; 47.0; 43.7.

HRMS-ESI-TOF:239.1080 [M + H]⁺(C₉H₁₅N₆S; Obliczono: 239.1079)

Temperatura topnienia:167-168° C

cLogP: -0.241

5.1.4.7 4-(2-hydroksyetylo)piperazyno-1-tiokarbonyd²²⁸



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.1.4. używając do reakcji 1,56 g [4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynylo]-1'-imidazolilotioketonu (6 mmol) Produkt reakcji otrzymano w postaci pomarańczowego osadu, który krystalizowano dwukrotnie z metanolu. Wydajność reakcji wynosiła 55 %.

$^1\text{H-NMR}$ ($d_6\text{-DMSO}$, 400 MHz, ppm): 3.73-3.65 (m, 4H, $-\text{CH}_2$, piperazyna), 3.50 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2$); 2.38 (m, 6H, piperazyna, $-\text{CH}_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($d_6\text{-DMSO}$, 100 MHz, ppm): 183.0; 60.4; 58.9; 53.2; 47.8.

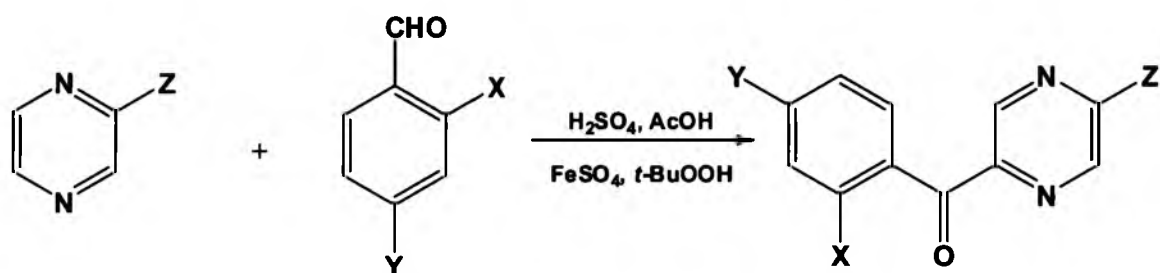
Temperatura topnienia: 145 °C [143-144, lit]

cLogP: -0.614

5.2. Synteza prekursorów karbonylowych

5.2.1. Ogólna procedura otrzymywania pochodnych kwasowych oraz amidowych

2-(hydroksybenzoilo)pirazyny.

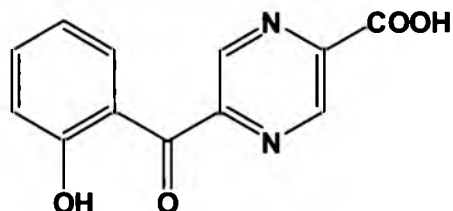


X, Y= H, OH
Z= COOH, CONH₂

W kolbie okrągłodennej o pojemności 500 cm³ zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne umieszczono (0,04 mol) pochodnej pirazyny oraz (0,12 mol) odpowiedniego izomeru aldehydu hydroksybenzoesowego. Kolbę umieszczono w łaźni lodowej, z dodatkiem soli (osiągnięto temperaturę -20 °C), a reagenty rozpuszczono w mieszaninie kwasów: 80 cm³ 98 % kwasu siarkowego oraz 80 cm³ kwasu octowego. Tak otrzymany żółty roztwór mieszano intensywnie przez 15 minut a następnie dodawano mieszaninę utleniającą składającą się z 33,4 g siedmiowodnego siarczanu(VI) żelaza(II) (0,12 mol) oraz 16,5 cm³ (0,12 mol) 70% wodoronadtlenku tertbutylu. Mieszaninę utleniającą podzielono na sześć porcji i dodawano w przeciągu 30 minut, uważając żeby temperatura mieszaniny reakcyjnej nie przekroczyła -5 °C. Podczas dodawania mieszaniny utleniającej zaobserwowano zmianę koloru układu reakcyjnego na czarny oraz wydzielanie się bąbelków tlenu. Po zakończeniu wkraplania utleniacza, odstawiano łaźnię lodową i mieszano intensywnie reagenty w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Po tym czasie zaobserwowano powstanie charakterystycznego

kożucha na powierzchni roztworu. Następnie kolbę reakcyjną pozostawiono na 12 godzin w temperaturze -25 °C. Powstały surowy produkt przesączono na lejku Büchnera, przemywano wodą do zaniku odczynu kwaśnego i krystalizowano dwukrotnie z etanolu.

5.2.1.1. Synteza kwasu 2-[5-(2-hydroksybenzoilo)]pirazynokarboksylowego¹⁹¹



Związek otrzymano wg procedury opisanej wg podpunktu 5.2.1 używając do reakcji 4,96 g (0,04 mol) kwasu 2-pirazynokarboksylowego oraz 12,55 cm³ (0,12 mol) aldehydu salicylowego. Surowy produkt rodnikowego utleniania oczyszczano poprzez krystalizację z absolutnego etanolu otrzymując 2,94 g intensywnie żółtej pochodnej kwasu pirazynowego. Wydajność reakcji wynosi 30%.

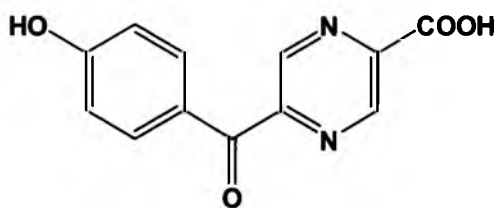
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 10.52 (bs, 1H, -OH); 9.25 (d, *J*= 1,4 Hz, 1H, pirazyna); 9.10 (d, *J*= 1,4 Hz, 1H, pirazyna), 7.68 (dd, *J*₁= 7.69Hz, *J*₂=1.4 Hz, 1H, fenyl), 7.58 - 7.48 (m 1H, fenyl), 7.07 - 6.97 (m, 2H, fenyl).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm):195.3; 165.9; 157.9; 153.0; 145.0; 144.4; 143.0; 136.4; 132.9; 123.4; 119.7; 117.2.

Temperatura topnienia:138-139°C [141-142 °C lit]

cLogP: 1.985

5.2.1.2. Synteza kwasu 2-[5-(4-hydroksybenzoilo)]pirazynokarboksyłowego¹⁹²



Związek otrzymano wg procedury opisanej wg podpunktu 5.2.1 używając do reakcji 4,96 g (0,04 mol) kwasu 2-pirazynokarboksyłowego oraz 14,64 g (0,12 mol) 4-hydroksybenzoesowego. Tak otrzymany żółty, surowy produkt główny krystalizowano z absolutnego etanolu, otrzymując 1,29 g pochodnej hydroksybenzoilowej kwasu pirazynowego z wydajnością 14 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 10.66 (s, 1H, -OH); 9.25 (m, 1H, pirazyna); 9.14 (m, 1H, pirazyna); 7.93 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, fenyl); 6.91 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, fenyl).

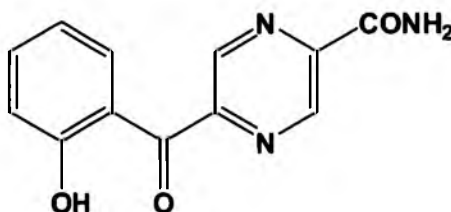
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 190.2; 165.1; 163.5; 152.9; 145.2; 144.9; 144.3; 134.0; 126.8; 115.9.

Temperatura topnienia: 195–196°C [195-196 °C lit]

cLogP: 1.525

Dla powyższego związku otrzymano strukturę krystalograficzną

5.2.1.3. Synteza amidu kwasu 2-[5-(2-hydroksybenzoilo)]pirazynokarboksyłowego¹⁹¹



Związek otrzymano wg procedury opisanej w podpunkcie 5.2.1 używając do reakcji 4,92 g (0,04 mol) amidu kwasu 2-pirazynokarboksyłowego oraz 12,55 cm³ (0,12 mol)

aldehydu salicylowego. Surowy, czerwono-brązowy amid oczyszczano poprzez krystalizację z metanolu otrzymując 2,0 g pochodnej amidu kwasu pirazynowego. Wydajność reakcji wynosi 22%.

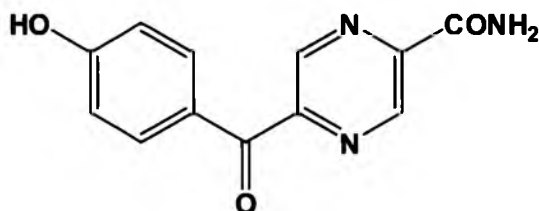
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 10.48 (bs, 1H, -OH); 9.17 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, pirazyna); 9.00 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, pirazyna); 8.36 (bs, 2H, -NH₂); 7.60-7.58 (m, 1H, fenyl); 7.50-7.45 (m, 1H, fenyl); 6.98-6.85 (m, 2H, fenyl).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 196.2; 164.4; 158.9; 152.5; 148.3; 141.3; 135.5; 131.0; 123.0; 119.4; 118.1.

Temperatura topnienia: 246-247 °C [245-246 °C lit]

cLogP: 1.063

5.2.1.4 Synteza amidu kwasu 2-[5-(4-hydroksybenzoilo)]pirazynokarboksyłowego¹⁹²



Związek otrzymano wg procedury opisanej w podpunkcie 5.2.1 używając do reakcji 4,92 g (0,04 mol) amidu kwasu 2-pirazynokarboksyłowego oraz 12,55 cm³ (0,12 mol) aldehydu salicylowego. Surowy, czerwono-brązowy amid oczyszczano poprzez krystalizację z absolutnego etanolu otrzymując 2,0 g pochodnej amidu kwasu pirazynowego. Wydajność reakcji wynosi 11%.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 10.55 (bs, 1H, -OH); 9.23 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, pirazyna); 9.06 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, pirazyna); 8.43 (bs, 1H, -NH₂); 7.99 (bs, 1H, -NH₂); 7.96-7.88 (m, 2H, fenyl); 6.94-6.87 (m, 2H, fenyl).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 190.2; 164.9; 163.2; 152.6; 146.2; 143.8; 142.2; 134.0; 126.7; 115.6.

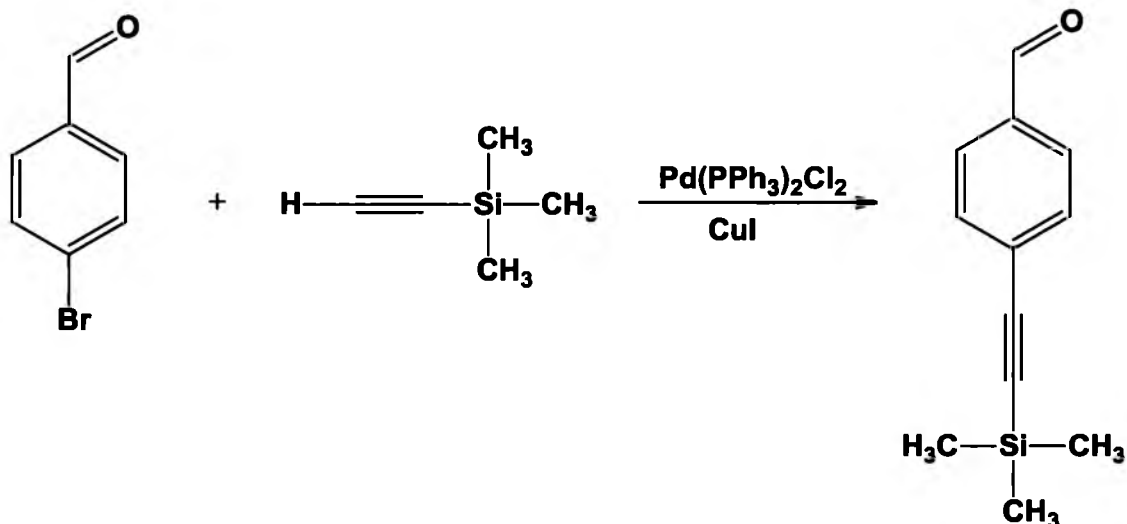
Temperatura topnienia: 235 °C [235 °C lit]

cLogP: 0.603

Dla powyższego związku otrzymano strukturę krystalograficzną

5.2.2 Reakcja Sonogashiry dla pochodnych benzaldehydu

5.2.2.1 Otrzymywanie 4-[(trimetylosililo)etynylo]benzaldehydu



W kolbie okrągłodennej o pojemności 25 cm³, szczelnie zamykanej septą i zaopatrzonej w balon wypełniony azotem, umieszczono 0,37 g (2mmol) 4-bromobenzaldehydu, 20 mg (0,046 mmol) katalizatora palladowego- Pd(PPh₃)₂Cl₂, 50 mg (0,26 mmol) jodku miedzi(I) oraz 0,1 g (0,38 mmol) trifenylofosfiny. Stałe substraty rozpuszczono w 3 cm³ dimetyloformamidu z dodatkiem 4 cm³ świeżo przedestylowanej trietyloaminy. Przez tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną przedmuchiwano przez 5 minut azot, a następnie dodano 0,284 cm³ (2 mmol) trimetylosililoacetyleny. Całość mieszano w temperaturze 70 ° C przez 12 godzin. Po zakończeniu reakcji przesączono mieszaninę reakcyjną od nieorganicznego osadu, a następnie traktowano roztwór 0,1 M kwasem solnym, aż do uzyskania odczynu obojętnego. Kolejnym etapem w przerobie mieszaniny reakcyjnej była trzykrotna ekstrakcja mieszaniny reakcyjnej eterem dietylowym (3 x 8 cm³ Et₂O). Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym NaHCO₃ a następnie odparowano na wyparce rotacyjnej, otrzymując surowy produkt sprzęgania w postaci żółtego, lepkiego oleju. W reakcji otrzymano 0,38 g 4-[(trimetylosililo)etynylo]benzaldehydu z wydajnością 94

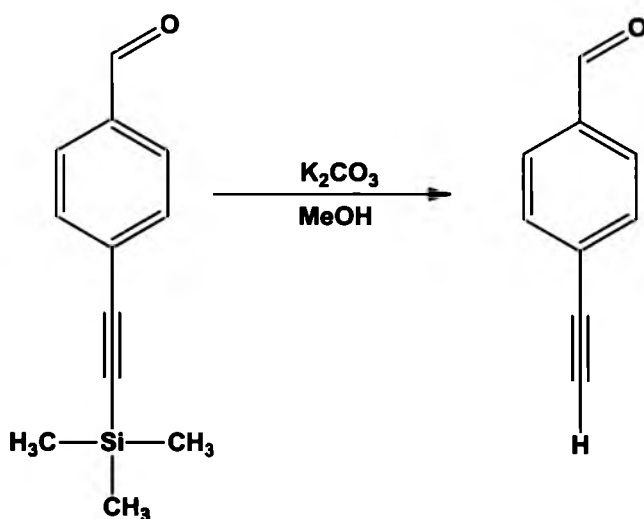
%, który bez dalszego oczyszczania używano w kolejnych etapach strategii syntetycznej.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 10.01 (s, 1H, -CHO); 7,90 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H, fenyl); 7,67 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H, fenyl); 0.49 (s, 9H, -CH₃).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 192,4; 136.3; 133.5; 129.8; 129.5; 104.2; 99.1; 1.2

cLogP: 3.986

5.2.2.2 Otrzymywanie 4-etynylobenzaldehydu



W kolbie okrągłodennej o pojemności 25 cm³, umieszczono 0,404 g (2 mmol) 4-[(trimetylosililo)etynylo]benzaldehydu oraz 0,414 g (3 mmol) węgla(IV) potasu. Dodano 10 cm³ metanolu a następnie przedmuchiwno przez układ reakcyjny azot w czasie 5 minut. Kolbę zatkało Parafilmem® i mieszano w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Po zakończeniu reakcji odparowano mieszaninę reakcyjną na wyparce rotacyjnej. Pozostałość ekstrahowano trzykrotnie w układzie eter dietylowy : woda (10 cm³ : 10cm³). Warstwę organiczną suszono nad MgSO₄ a następnie odparowano eter dietylowy otrzymując 0,252 g kremowego osadu 4-etynylobenzaldehydu z wydajnością 97 %.

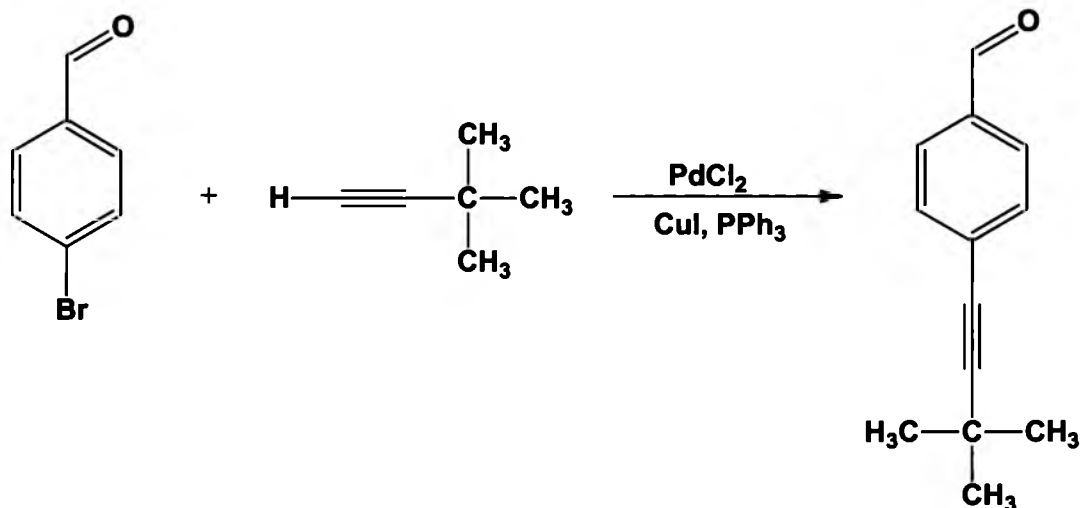
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 10.03 (s, 1H, -CHO); 7.92 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H, fenyl); 7.7 (d, *J*= 8.0 Hz, 2H, fenyl); 4.54 (s, 1H, -CH).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 191.3; 136.3; 133.0; 129.6; 128.4; 83.2; 80.9

Temperatura topnienia: 85°C

cLogP: 0.852

5.2.2.3 Otrzymywanie 4-[(3,3-dimetylo)-1-butyn-1-ylo]benzaldehydu²²⁹



W kolbie okrągłodennej o pojemności 25 cm³, szczelnie zamykanej septą i zaopatrzonej w balon wypełniony azotem, umieszczono 0,185 g (1mmol) 4-bromobenzaldehydu, 10 mg (0,057 mmol) chlorku palladu, 50 mg (0,26 mmol) jodku miedzi(I) oraz 0,1 g (0,38 mmol) trifenylfosfiny. Dodano 3 cm³ świeżo przedestylowanej trietyloaminy oraz 1 cm³ DMF-u. Kolbę zamknięto szczelnie septą, przepuszczano azot przez układ reakcyjny po czym dodano 0,15 cm³ (1,2 mmol) 3,3-dimetylo-1-butynu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze 50 °C przez 20 godzin. Po zakończeniu reakcji do kolby dodano 10 cm³ eteru dietylowego, po czym odsączono nierozpuszczalny osad. Powstały przesącz ekstrahowano 4 razy 0,1 M kwasem solnym (4 x 10 cm³). Oddzieloną warstwę eterową przemyto NaHCO₃, po czym suszono bezwodnym MgSO₄ i odparowano rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej. Otrzymany osad oczyszczano metodą chromatografii kolumnowej. W tym celu uzyskaną pozostałość rozpuszczono w niewielkiej ilości eluentu (octan etylu : heksan, 1 : 4) i wprowadzono na kolumnę chromatograficzną (ϕ = 1,5 cm, l = 45 cm). Odbierano frakcje o objętości ok. 10 cm³. Przebieg procesu kontrolowano nakładając kroplę eluatu na płytkę TLC i rozwijając w tym samym układzie. Obserwowano R_f

produktu wynoszący 0,53. Frakcje 5 – 16 połączono i odparowano otrzymując kremowy produkt sprzęgania z wydajnością 41 %.

$^1\text{H-NMR}$ ($d_6\text{-DMSO}$, 400 MHz, ppm): 10.00 (s, 1H, -CHO); 7.87 (d, J = 8.4 Hz, 1H, fenyl), 7.56 (d, J = 8.2 Hz, 1H, fenyl); 1.31 (s, 9H, $-\text{CH}_3$).

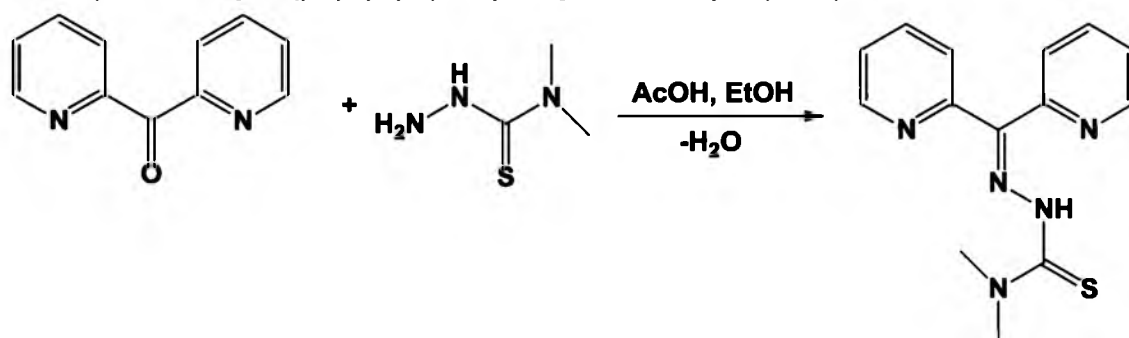
$^{13}\text{C-NMR}$ ($d_6\text{-DMSO}$, 100 MHz, ppm): 192.9; 135.5; 132.3; 130.0; 129.6; 103.3; 79.0; 31.0; 28.2.

Temperatura topnienia: 99 °C

cLogP: 3.621

5.3 Synteza modelowych chelatorów metali przejściowych

5.3.1 Synteza Z-2-[2-di(pirydynylo)metyleno]-*N,N*-dimetylohydrazynotiokarboamidu¹⁶⁶



W kolbie okrągłodennej o pojemności 25 cm³, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną i mieszadło magnetyczne, umieszczono 0,184 g (1 mmol) 2-dipirydyloketonu oraz 0,119 g (1mmol) *N,N*-dimetylohydrazynotiokarboamidu. Następnie dodano 12 cm³ absolutnego etanolu oraz 0,5 cm³ kwasu octowego jako katalizatora. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, po czym ostudzono i umieszczono w temperaturze 0° C na 2 godziny. Po tym czasie obserwowano strącenie się żółtego osadu na dnie kolby, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem, przemyto eterem dietylowym i suszono. W celu otrzymania oczyszczonego produktu, krystalizowano go dwukrotnie z bezwodnego metanolu. W wyniku reakcji otrzymano 0,245 g żółtego, kłaczkowatego produktu z wydajnością 86 %.

$^1\text{H-NMR}$ ($d_6\text{-DMSO}$, 400 MHz, ppm): 15.16 (s, 1H, NH); 8.70 (d, J = 4.0 Hz, 1H, pirydyna); 8,59 (d, J = 4,8 Hz, 1H, pirydyna); 8.11 (d, J = 8.0 Hz, 1H, pirydyna); 7.85-7.80 (m, 2H,

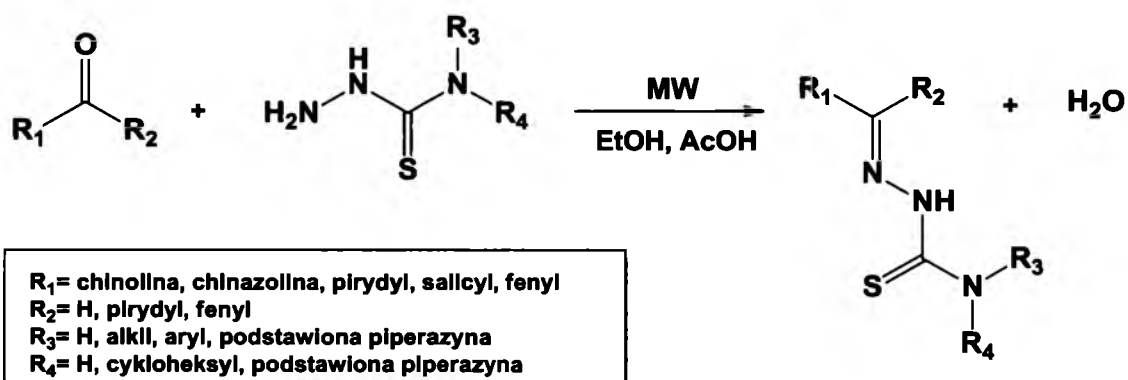
pirydyna); 7,71 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, pirydyna); 7.39-7.29 (m, 1H, pirydyna); 3.47 (s, 6H, -CH₃).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 181.2; 156.2; 151.9; 148.0; 147.1; 142.9; 137.3; 137.2; 126.9; 124.8; 123.9; 123.3; 42.0

Temperatura topnienia: 145 °C [lit. 144 °C]

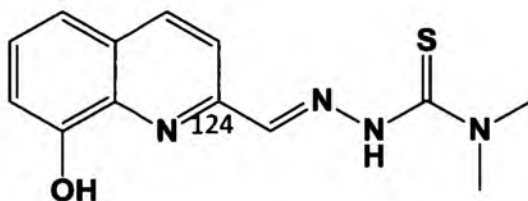
cLogP: 0.992

5.4 Ogólna procedura syntezy tiosemikarbazonów w reaktorze mikrofalowym



W dedykowanej probówce do reaktora mikrofalowego o pojemności 10 cm³, zaopatrzonej w dipol magnetyczny umieszczono 1 mmol prekursora karbonylowego oraz 1 mmol odpowiedniego tiosemikarbazynu. Substraty rozpuszczano w 5 cm³ etanolu, dodając 0,15 cm³ kwasu octowego jako katalizatora. Probówkę zamykano szczelnie aluminiowym kapslem zawierającym septum, a następnie ogrzewano w temperaturze 85° C, przy czym maksymalna moc reaktora nie przekraczała 50 W. Otrzymany produkt oczyszczano przez krystalizację w polarnym rozpuszczalniku bądź też z użyciem chromatografii kolumnowej.

5.4.1 Otrzymywanie (E)-2-[(8-hydroksy-2-chinolinyl)metyleno]-N,N-dimetylohydrazynotiokarboamidu.



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4. Przed reakcją krystalizowano dwukrotnie handlowy substrat tiosemikarbazydowy z metanolu, gdyż chromatografia cienkowarstwowa wykazała jego zanieczyszczenie. Do reakcji używano 0,173 g (1mmol) 8-hydroksychinolino-2-karbaldehydu, 0,119 g (1mmol) *N,N*-dimetylohydrazynotiokarboamidu. Substraty rozpuszczono w etanolu, dodano 2 krople lodowego kwasu octowego i ogrzewano mieszaninę reakcyjną w reaktorze mikrofalowym przez 7 minut. Otrzymany produkt oczyszczano metodą chromatografii kolumnowej używając jako eluentu układu octan etylu : heksan (5 : 1, v/v), następnie połączono frakcje 15-20 i odparowano produkt na wyparce rotacyjnej ($R_{f\text{produktu}} = 0.42$). Tak otrzymany produkt główny koloru żółtego, krystalizowano z absolutnego etanolu, otrzymując 0,225 g (*E*)-2-[(8-hydroksy-2-chinolinylo)metyleno]-*N,N*-dimetylohydrazynotiokarboamidu z wydajnością 82 %.

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 400 MHz, ppm): 11.41 (s, 1H, -NH); 9.77 (s, 1H, -OH); 8.39 (s, 1H, -CH); 8.29 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, chinolina); 8.02 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, chinolina); 7.40 (m, 2H, chinolina); 7.11 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, chinolina); 3.35 (s, 6H, -CH₃).

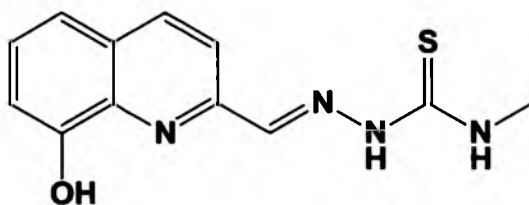
$^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -DMSO, 100 MHz, ppm): 181.2; 153.6; 152.5; 144.1; 138.6; 136.9; 129.1; 128.5; 118.3; 118.1; 112.6; 42.9.

HR-MS (EI): 274.0888 (obliczono dla C₁₃H₁₄N₄OS: 274.0888)

Temperatura topnienia: 188-189°C

cLogP: 2.165

5.4.2 Otrzymywanie *N*-metylo-2-[(8-hydroksy-2-chinolinylo)metyleno]-hydrazynotiokarboamidu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4 używając do reakcji 0,173 g (1mmol) aldehydu 2-(8-hydroksy)chinolinowego oraz 0,105 g *N*-metylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 10 minut, po czym przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem powstały żółty osad i przemyto eterem dietylowym. Surowy produkt krystalizowano z bezwodnego metanolu otrzymując 0,226 g *N*-metylo-2-[(8-hydroksy-2-chinolinylometyleno)-hydrazynotiokarboamidu z wydajnością 87 %.

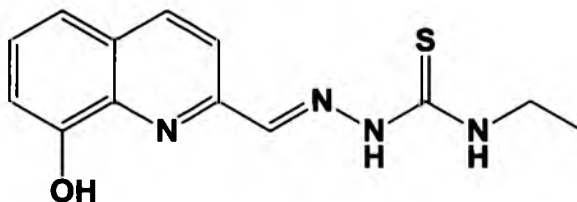
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.92 (s, 1H, -NH); 9.84 (s, 1H, -OH), 8.80 (m, 1H, -NH), 8.42 (d, *J*= 8.8 Hz, 1H, chinolina), 8.30 (d, *J*=8.8 Hz, 1H, chinolina), 8.27 (s, 1H, -CH), 7.46-7.38 (m, 2H, chinolina), 7.10 (d, *J*= 7.2 Hz, 1H, chinolina), 3.07 (d, *J*= 4.4 Hz, 3H, -CH₃).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 178.4; 153.8; 152.4; 142.3; 138.6; 136.6; 129.2; 128.5; 118.7; 118.2; 112.6; 31.4.

Temperatura topnienia: 233°C (rozkład)

cLogP: 2.064

5.4.3 Otrzymywanie *N*-etylo-2-[(8-hydroksychinolin-2-ylometyleno)-hydrazynotiokarboamidu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4 używając do reakcji 0,173 g (1mmol) aldehydu 2-(8-hydroksy)chinolinowego oraz 0,119 g *N*-etylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 12 minut, po czym przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem powstały żółty osad i przemyto eterem dietylowym. Surowy produkt krystalizowano z absolutnego

etanolu otrzymując 0,26 g *N*-etylo-2-[(8-hydroksy-2-chinolinylometyleno)-hydrazynotiokarboamidu z wydajnością 95 %.

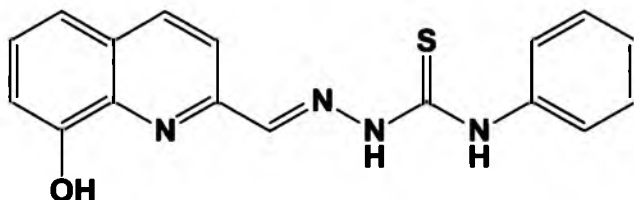
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.86 (s, 1H, -NH), 9.83(s, 1H, -OH), 8.84 (m, 1H, -NH), 8.43 (d, *J*= 8.8 Hz, 1H, chinolina), 8.30 (d, *J*= 8.8 Hz, 1H, chinolina), 8.28 (s, 1H, CH), 7.44-7.38 (m, 2H, chinolina), 7.10 (d, *J*= 7.2 Hz, 1H, chinolina), 3.65 (m, 2H, -CH₂), 1.19 (t, *J*= 7.2 Hz, 3H, -CH₃).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 177.4; 153.9; 152.3; 142.4; 138.7; 136.5; 129.2; 128.5; 118.8; 118.2; 112.6; 41.2; 15.0.

Temperatura topnienia: 244-245°C

cLogP: 2.593

5.4.4 Otrzymywanie (*E*)-2-[(8-hydroksy-2-chinolinylometyleno)-*N*-fenylohydrazynotiokarboamidu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w podpunkcie 5.4. używając do reakcji 0,173 g (1mmol) aldehydu 2-(8-hydroksy)chinolinowego oraz 0,167 g (1mmol) *N*-fenylo hydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 12 minut, a następnie umieszczono mieszaninę reakcyjną w temperaturze -20 ° C na 2 godziny. Po tym czasie nie zaobserwowano wytrącania produktu, stąd odparowano rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej. Pozostałość potraktowano 4 cm³ chlorku metylenu, wstawiono na 30 minut do zamrażarki (-20 °C) a następnie dodano 1 cm³ heksanu. Obserwowano wytrącanie żółtego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt krystalizowano z absolutnego etanolu otrzymując 0,228 g *N*-fenylo-2-[(8-hydroksy-2-chinolinylometyleno)hydrazynotiokarboamidu z wydajnością 69 %.

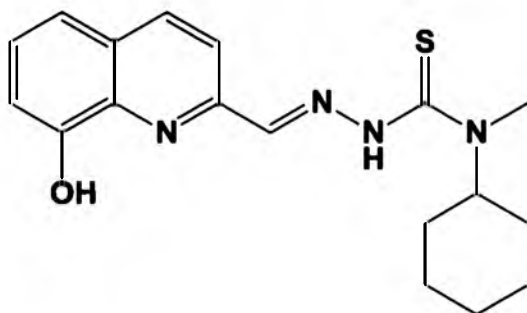
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.81 (s, 1H, -NH); 8.85 (m, 1H, -NH); 8.46-8.38 (m, 2H, chinolina,-OH); 8.24 (s, 1H, -CH); 8.00 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H, fenyl); 7.77 (t, *J*=7.2 Hz, 1H, fenyl); 7.62 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, fenyl); 7.59 (m, 2H, chinolina, fenyl); 7.43-7.39 (m, 2H, chinolina); 7.26 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, chinolina).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 178.4; 153.8; 152.4; 142.3; 138.6; 138.2; 136.6; 129.4; 129.2; 128.5; 128.3; 126.7; 118.7; 118.2; 112.6.

Temperatura topnienia: 199-200°C

cLogP: 4.153

5.4.5 Otrzymywanie (*E*)-*N*-cykloheksylo-2-[(8-hydroksy-2-chinolinyl)metyleno]-*N*-metylohydrazynotiokarboamidu.



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,173 g (1mmol) aldehydu 2-(8-hydroksy)chinolinowego oraz 0,187 g (1mmol) *N*-cykloheksylo-*N*-metylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 30 minut, a po studzeniu do temperatury pokojowej umieszczono ją w obniżonej temperaturze (-20° C) przez 60 minut. Analiza techniką TLC, wskazała zanieczyszczenie produktu substratem, stąd przeprowadzono rozdział chromatograficzny używając chromatografu preparatywnego Buchi Sepacore®. Jako eluentu używano układu octan etylu : metanol (8 : 1), a następnie połączono frakcje 13-19 i odparowano na wyparce rotacyjnej otrzymując zielono-żółty osad tiosemikarbazonu (*R*_f = 0,34). Wydajność reakcji wyniosła 65 % (0,222 g produktu).

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.33 (bs, 1H, -NH); 9.77 (bs, 1H, -OH); 8.39 (s, 1H, -CH); 8.30 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, chinolina); 7.99 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, chinolina); 7.44 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, chinolina); 7.38 (dd, *J*₁ = 8.0 Hz; *J*₂ = 1.2 Hz, 1H, chinolina); 7.11 (dd, *J*₁ = 7.2 Hz; 1.2 Hz, 1H, chinolina); 4.74 (bs, 1H, C₁-cykloheksyl); 3.14 (s, 3H, -CH₃); 1.80 (m, 4H, cykloheksyl); 1.58 (m, 3H, cykloheksyl); 1.32 (m, 2H, cykloheksyl); 1.16 (t, *J* = 11.4 Hz, 1H, cykloheksyl).

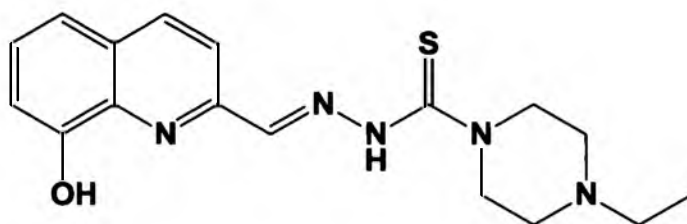
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 181.2; 153.8; 152.5; 144.1; 138.6; 136.9; 129.1; 128.4; 118.3 117.90; 112.6; 61.2; 39.8; 35.0; 29.7; 25.7; 25.4.

HR-MS (EI): 342.1513 (obliczono dla: C₁₈H₂₂N₄OS: 342.1514)

Temperatura topnienia: 164-165 ° C

cLogP: 4.193

5.4.6 Otrzymywanie (*E*)-4-etylo-*N'*-[(8-hydroksy-2-chinolinilylo)metyleno]-1-piperazyno-1-tiokarbohydrydu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,173 g (1mmol) aldehydu 2-(8-hydroksy)chinolinowego oraz 0,188 g (1mmol) 4-etylopiperazyno-1-tiokarbohydrydu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 30 minut, po czym wstawiono do obniżonej temperatury (-20 ° C) na 60 minut. Po tym czasie zaobserwowano wytrącenie się żółtego osadu, który przesączono na lejku Büchnera i przemyto eterem dietylowym. Tak otrzymany surowy tiosemikarbazon krystalizowano z absolutnego etanolu otrzymując 0,254 g (*E*)-4-etylo-

N'-[(8-hydroksy-2-chinolinilo)metyleno]-1-piperazyno-1-tiokarbohydrazydu z wydajnością 74 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 15.29 (bs, 1H, -NH); 8.33 (s, 1H, -CH); 8.30 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, chinolina); 7.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, chinolina); 7.44 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, chinolina); 7.38 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, chinolina); 7.11 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, chinolina); 3.95 (m, 4H, piperazyna); 2.50 (m, 6H, piperazyna); 1.04 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, -CH₃).

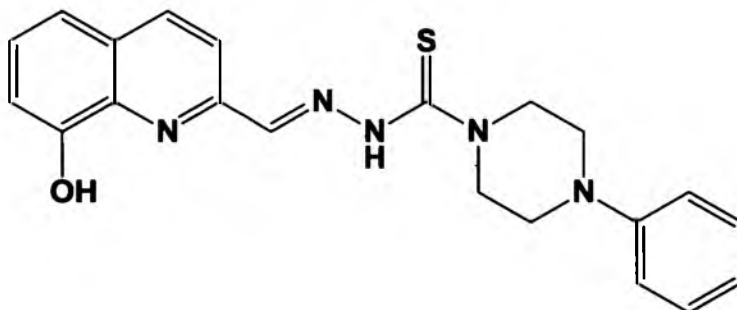
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 181.2; 153.8; 152.3; 144.0; 138.6; 136.9; 129.1; 128.5; 118.2; 117.9; 112.6; 52.7; 51.7, 50.5; 12.4.

HRMS-ESI-TOF: 366.1362 [M + Na]⁺ (obliczono dla C₁₇H₂₁N₅OSNa: 366.1365)

Temperatura topnienia: 167-168 ° C

cLogP: 2.931

5.4.7 Otrzymywanie (*E*)-*N'*-[(8-hydroksy-2-chinolinilo)metyleno]-4-fenylo-1-piperazyno-1-tiokarbohydrazyd



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,173 g (1mmol) aldehydu 2-(8-hydroksy)chinolinowego oraz 0,236 g (1mmol) 4-fenylo-1-piperazyno-1-tiokarbohydrazydu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 30 minut, po czym wstawiono do obniżonej temperatury (-20 °C) na 60 minut. Po tym czasie zaobserwowano wytrącenie się żółtego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem a następnie przemyto

heksanem. Tak otrzymany surowy produkt główny krystalizowano z absolutnego etanolu otrzymując 0,262g (*E*)-4-fenyl-*N'*-[(8-hydroksy-2-chinolinyl)metyleno]-1-piperazyno-1-tiokarbo-hydrazidu z wydajnością 67 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.71 (bs, 1H, -NH); 9.83 (bs, 1H, -OH); 8.38 (bs, 1H, -CH); 8.32 (d, *J*= 8,7 Hz, 1H, chinolina); 8.01 (d, *J*= 8.7 Hz, 1H, chinolina); 7.44 (m, 1H, chinolina); 7.39 (m, 1H, chinolina); 7.25 (t, *J*= 7.9 Hz, 2H, fenyl); 7.13 (d, *J*= 7.1 Hz, 1H, chinoliona); 6.99 (d, *J*= 8.2 Hz, 2H, fenyl); 6.82 (t, *J*= 7.1 Hz, 1H, fenyl); 4.13 (m, 4H, piperazina); 3.32 (m, 4H, piperazyna).

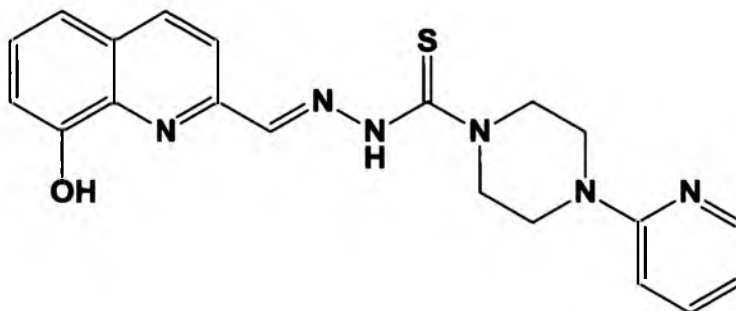
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 181.3; 153.8; 152.3; 151.0; 144.2; 138.6; 137.0; 129.5; 129.2; 128.6; 119.6; 118.3; 117.9; 115.9; 112.7; 50.4; 48.6.

HRMS-ESI-TOF: 392.1540 [M + H]⁺ (obliczono dla C₂₁H₂₂N₅OS: 392.1545)

Temperatura topnienia: 175-176 ° C

cLogP: 3.833

5.4.8 Otrzymywanie (*E*)-*N'*-[(8-hydroksy-2-chinolinyl)metyleno]-4-(2-pirydynyl)-piperazyno-1-tiokarbohydrazidu



Związek otrzymano wg procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,173 g (1mmol) aldehydu 2-(8-hydroksy)chinolinowego oraz 0,237 g (1mmol) 4-(2-pirydynyl)piperazyno-1-tiokarbohydrazidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 30 minut, po czym wstawiono do obniżonej temperatury (-20 °C) na 24 godziny. Po tym czasie odparowano rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej, a do pozostałości dodano 5 cm³ chlorku metylenu. Mieszaninę

reakcyjną umieszczono na 30 minut w zamrażarce laboratoryjnej (-20 °C). Do tak schłodzonej mieszaniny reakcyjnej wdroplono 2 cm³ eteru dietylowego, obserwując jednocześnie wytrącanie się kłaczkowatego osadu. Otrzymano 0,301 g (*E*)-*N'*-[(8-hydroksy-2-chinolinilo)metyleno]-4-(2-pirydynylo)piperazyno-1-tiokarbohidrazynu z wydajnością 77 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.70 (bs, 1H, -NH); 9.82 (bs, 1H, -OH); 8.38 (s, 1H, -CH); 8.31 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, chinolina); 8.16 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, pirydyna); 8.02 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, chinolina); 7.58 (m, 1H, pirydyna); 7.45 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, chinolina); 7.39 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, chinolina); 7.13 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, chinolina); 6.86 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, pirydyna); 6.68 (m, 1H, pirydyna); 4.11 (m, 4H, piperazyna); 3.70 (m, 4H, piperazyna).

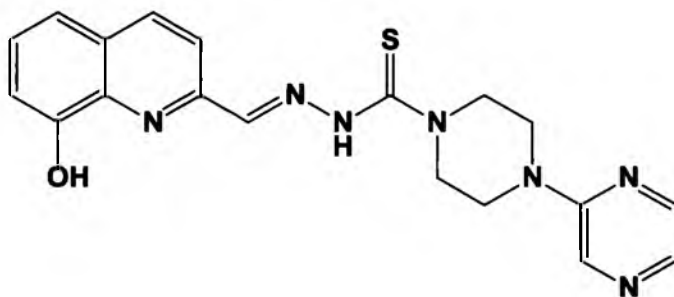
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 181.3; 159.0; 153.8; 152.3; 148.0; 144.2; 138.6; 138.1; 137.0; 129.1; 128.6; 118.3; 118.0; 113.6; 112.6; 107.5; 50.2; 44.7.

HRMS-ESI-TOF: 393.1490 [M + H]⁺ (obliczono dla C₂₀H₂₁N₆OS: 393.1498)

Temperatura topnienia: 176-177 °C

cLogP: 2.885

5.4.9 Otrzymywanie (*E*)-*N'*-[(8-hydroksy-2-chinolinilo)metyleno]-4-(2-pirazyńnylo)piperazyno-1-tiokarbohidrazynu



Związek otrzymano wg procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,173 g (1mmol) aldehydu 2-(8-hydroksy)chinolinowego oraz 0,238 g (1mmol) 4-(2-pirazyńnylo)piperazyno-1-tiokarbohidrazynu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w

reaktorze mikrofalowym przez 20 minut, zaś po wyjęciu z reaktora (wstępne schłodzenie do 50 °C) obserwowano natychmiastowe strącanie się białego osadu. Otrzymany osad przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemyto eterem dietylowym, uzyskując 0,33 g (*E*)-*N'*-[(8-hydroksy-2-chinolinyl)metyleno]-4-(2-pirazyńlo)piperazyńno-1-tiokarbohydrydu z wydajnością 86 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.72 (bs, 1H, -NH); 9.82 (bs, 1H, -OH); 8.38 (s, 1H, -CH); 8.36 (m, 1H, pirazyńa); 8.31 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, chinolina); 8.13 (m, 1H, pirazyńa); 8.02 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, chinolina); 7.89 (m, 1H, pirazyńa); 7.45 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, chinolina); 7.39 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, chinolina); 7.13 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, chinolina); 4.13 (m, 4H, piperazyńa); 3.78 (m, 4H, piperazyńa).

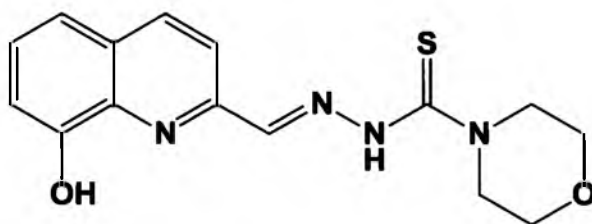
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 181.4; 154.7; 153.8; 152.2; 144.3; 141.9; 138.6; 137.0; 133.1; 131.7; 129.2; 128.6; 118.3; 118.0; 112.6; 49.9; 44.0

HRMS-ESI-TOF: 394.1448 [M + H]⁺ (obliczono dla C₁₉H₂₀N₇OS: 394.1450)

Temperatura topnienia: 200-201 °C

cLogP: 2.121

5.4.10 Otrzymywanie (*E*)-*N'*-[(8-hydroksy-2-chinolinyl)metyleno]-4-morfolinotiokarbohydrydu



Związek otrzymano wg procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,173 g (1mmol) aldehydu 2-(8-hydroksy)chinolinowego oraz 0,161 g (1mmol) 4-morfolinotiokarbohydrydu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 30 minut, a następnie umieszczono w obniżonej temperaturze (-5

°C). Zaobserwowano wytrącenie się intensywnie żółtego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemyto heksanem. Otrzymany tiosemikarbazon krystalizowano z bezwodnego metanolu uzyskując 0,24g produktu z wydajnością 76 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.66 (bs, 1H, -NH); 9.81 (bs, 1H, -OH); 8.35 (s, 1H, -CH); 8.30 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, chinolina), 7.97 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, chinolina), 7.45 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, chinolina), 7.39 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, chinolina), 7.12 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, chinolina); 3.98 (m, 4H, piperazyna); 3.72 (m, 4H, piperazyna).

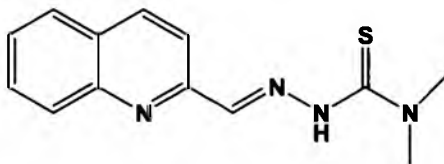
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 181.4; 153.8; 152.2; 144.3; 138.6; 137.0; 129.1; 128.6; 118.3; 117.9; 112.6; 66.5; 51.2.

HRMS-EI: 316.0984 (obliczono dla: C₁₅H₁₆N₄O₂S: 316.0994)

Temperatura topnienia: 181-182° C

cLogP: 1.841

5.4.11 Otrzymywanie *N,N*-dimetylo-2-[(2-chinolinylo)metyleno]hydrazynotiokarboamidu



Związek otrzymano wg procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,157 g 2-chinolinokarbonydu oraz 0,119 g *N,N*-dimetylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 12 minut, po czym odparowano rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej uzyskując żółty lepki olej. Do oleju dodano 5 cm³ metanolu i odstawiono do obniżonej temperatury (-20 °C) na 24 godziny. Po tym czasie dodano 2 cm³ heksanu i obserwowano wytrącenie się kłaczkowatego osadu, który przemyto heksanem. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano z absolutnego etanolu, uzyskując 0,227 g *N,N*-dimetylo-2-[(2-chinolinylo)metyleno]hydrazynotiokarboamidu z wydajnością 88%.

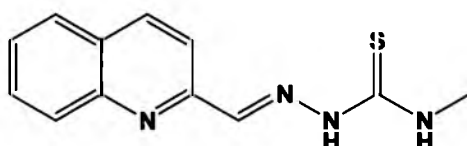
¹H-NMR (*d*-CDCl₃, 400 MHz, ppm): 11.07 (s, 1H, -NH); 8.31 (d, *J*= 8.8 Hz, 1H, chinolina); 7.90 (t, *J*=8.4 Hz, 2H, chinolina); 7.80 (m, 1H, chinolina); 7.69 (s, 1H, -CH); 7.65 (m, 1H, chinolina); 7.54 (d, 1H, *J*=7.8 Hz, chinolina); 3.62 (s, 6H, -CH₃).

¹³C-NMR (*d*₁-CDCl₃, 100 MHz, ppm): 181.5; 152.1; 145.9; 138.0; 136.4; 130.9; 128.0; 127.9; 127.6; 127.2; 122.5; 47.1.

Temperatura topnienia: 162-163°C

cLogP: 2.114

5.4.12 Otrzymywanie *N*-metylo-2-[(2-chinolinylo)metyleno]hydrazynotiokarboamidu



Związek otrzymano wg procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,157 g 2-chinolinokarbonydu oraz 0,105 g *N*-metylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 12 minut, po czym odparowano rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej uzyskując żółty osad. Analiza ¹H-NMR wskazała zamieszczenie produktu głównego aldehydem chinolinowym. W celu oczyszczenia surowego produktu, zastosowano dwukrotną krystalizację tiosemikarbazonu z bezwodnego metanolu, uzyskując 0,19 g *N*-metylo-2-[(2-chinolinylo)metyleno]-hydrazynotiokarboamidu z wydajnością 78%.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.87 (s, 1H, -NH); 8.80 (m, 1H, -NH); 8.45-8.37 (m, 2H, chinolina); 8.24 (s, 1H, -CH); 8.00 (m, 2H, chinolina); 7.77 (t, *J*=7.6 Hz, 1H, chinolina); 7.62 (t, *J*=7.6, 1H, chinolina); 3.07 (d, *J*=4.8 Hz, 3H, -CH₃).

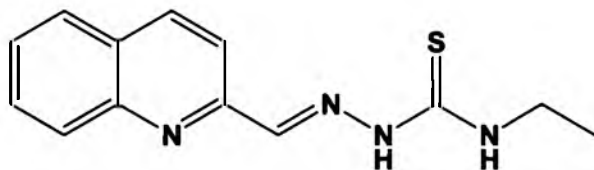
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 177.5; 153.1; 148.9; 137.5; 134.2; 131.9; 128.1; 127.9; 127.5; 127.2; 122.9; 45.2.

HR-MS (EI): 244.0777 (obliczno dla: C₁₂H₁₂N₄S: 244.0783).

Temperatura topnienia: 225-227°C.

clogP= 1.968

5.4.13 Otrzymywanie *N*-etylo-2-[(2-chinolinylo)metyleno]hydrazynotiokarboamidu



Związek otrzymano wg procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,157 g 2-chinolinokarbonylowego oraz 0,119 g *N*-etylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 12 minut, a po tym czasie obserwowano gwałtowne wytrącanie się kłaczkowatego osadu (mieszanina reakcyjna schłodzona do temperatury 50 °C). Osad przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemywano eterem dietylowym. Surowy produkt krystalizowano z absolutnego etanolu, uzyskując 0,217 g *N*-etylo-2-[(2-chinolinylo)metyleno]hydrazynotiokarboamidu z wydajnością 84 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 12.25 (s, 1H, -NH), 8.42 (m, 1H, -NH), 8.48-8.38 (m, 2H, chinolina), 8.39 (s, 1H, -CH), 8.00 (m, 2H, chinolina), 7.77 (t, *J*= 7.8 Hz, 1H, chinolina), 7.58 (t, *J*= 7.6 Hz, 1H, chinolina), 3.55 (m, 2H, -CH₂), 1.18 (t, *J*= 7.4 Hz, 3H, -CH₃).

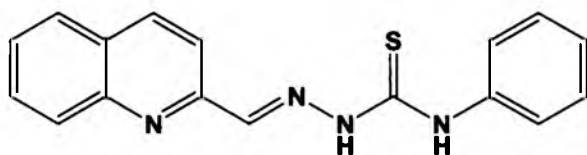
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 177.0; 153.9; 143.4; 139.4; 136.5; 129.3; 128.7; 128.6; 126.8; 126.1; 118.2; 44.2; 15.1

HR-MS (EI): 258.0944 (obliczono dla: C₁₃H₁₄N₄S: 258.0939).

Temperatura topnienia= 231-232°C

clogP= 2.497

5.4.14 Otrzymywanie *N*-fenylo-2-[(2-chinolinylo)metyleno]hydrazynotiakarboamidu.



Związek otrzymano wg procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,157 g 2-chinolinokarbonylu oraz 0,167 g *N*-fenylohydrazynotiakarboamidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 12 minut, a następnie odparowano rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej. Do pozostałości dodano 5 cm³ acetonitrylu i pozostawiono na 12 godzin w obniżonej temperaturze (- 20 °C). Po tym czasie dodano do mieszaniny reakcyjnej 2 cm³ heksanu i ponownie odstawiono do zamrażarki laboratoryjnej na 2 godziny. Wytrącony osad przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemywano heksanem. Surowy produkt krystalizowano z bezwodnego acetonitrylu, uzyskując 0,254 g *N*-fenylo-2-[(2-chinolinylo)metyleno]hydrazynotiakarboamidu z wydajnością 83 %.

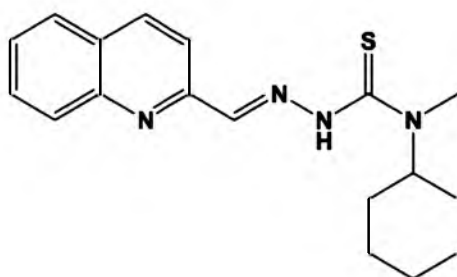
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.81 (s, 1H, -NH), 8.72 (m, 1H, -NH), 8.44-8.38 (m, 1H, chinolina), 8.30 (s, 1H, -CH), 8.02 (t, *J*=8.8 Hz, 2H, chinolina), 7.78 (t, *J*=7.2 Hz, 1H, chinolina), 7.77 (t, 1H, *J*=7.2 Hz, fenyl), 7.70-7.59 (m, 3H, chinolina, fenyl), 7.45-7.38 (m, 2H, fenyl), 7.26 (d, 1H, *J*=7.6 Hz, fenyl).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 179.4; 151.3; 144.2; 138.6; 137.7; 136.4; 129.4; 129.8; 128.6; 128.5; 128.3; 126.8; 118.9; 118.2; 113.1.

Temperatura topnienia: 185-186°C

cLogP: 4.057

5.4.15 Otrzymywanie (E)-N-cykloheksylo-N-metylo-2-[(2-chinolinyl)metyleno]-hydrazynotiokarboamidu



Związek otrzymano wg procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,157 g 2-chinolinokarbonydu oraz 0,187 g N-cykloheksylo-N-metylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 30 minut, a następnie odstawiono do obniżonej temperatury na 2 godziny. Po tym czasie zaobserwowano strącenie się żółtego osadu, przesączono na lejku Büchnera i przemywano heksanem. Surowy produkt krystalizowano z bezwodnego metanolu, uzyskując 0,189 g (E)-N-cykloheksylo-N-metylo-2-[(2-chinolinyl)metyleno]hydrazynotiokarboamidu z wydajnością 58 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.25 (bs, 1H, -NH); 8.39 (m, 2H, -CH, chinolina); 8.03-7.98 (m, 3H, chinolina); 7.78 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, chinolina); 7.62 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, chinolina); 4.74 (bs, 1H, C₁-cykloheksyl); 3.14 (s, 3H, -CH₃); 1.80 (m, 4H, cykloheksyl); 1.58 (m, 3H, cykloheksyl); 1.30 (m, 2H, cykloheksyl); 1.15 (t, *J* = 12.0 Hz, 1H, cykloheksyl).

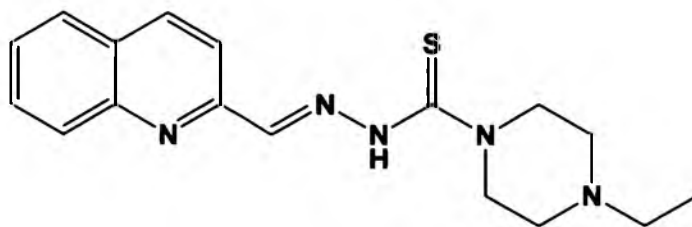
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 181.1; 154.5; 147.9; 144.2; 137.0; 130.5; 129.2; 128.4; 128.1; 127.5; 117.7; 61.2; 39.8; 34.9; 29.7; 25.8; 25.7; 25.4.

HRMS-EI: 326.1564 (obliczono dla: C₁₈H₂₂N₄S: 326.1565)

Temperatura topnienia: 125-126 ° C

cLogP: 4.145

5.4.16 Otrzymywanie (E)-4-etylo-N'-[(2-chinolinyllo)metyleno]piperazyno-1-tiokarbohydrydu



Związek otrzymano wg procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,157 g 2-chinolinokarbonydu oraz 0,188 g 4-etylopiperazyno-1-tiokarbohydrydu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 30 minut, a następnie odparowano mieszaninę reakcyjną na wyparce rotacyjnej otrzymując lepki olej. Analiza $^1\text{H-NMR}$ wskazała zanieczyszczenie produktu głównego nieprzereagowanym tiosemikarbazidem. Otrzymany surowy produkt oczyszczano metodą chromatografii kolumnowej (CH_2Cl_2 : etanol, 10 : 1, v/v), łącząc frakcje 10-17 ($R_f = 0,48$) i odparowując na wyparce rotacyjnej. Ponowna krystalizacja z etanolu pozwoliła uzyskać czysty (E)-4-etylo-N'-[(2-chinolinyllo)metyleno]piperazyno-1-tiokarbohydryd (0,255 g) z wydajnością 78 %.

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 400 MHz, ppm): 8.39 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, chinolina); 8.32 (s, 1H, -CH); 8.03-7.98 (m, 3H, chinolina); 7.77 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H, chinolina); 7.62 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, chinolina); 3.97 (m, 4H, piperazyna); 2.51 (m, 6H, $-\text{CH}_2$, piperazyna); 1.04 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, $-\text{CH}_3$).

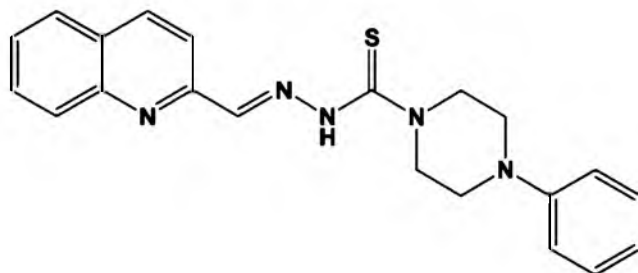
$^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -DMSO, 100 MHz, ppm): 181.1; 154.3; 147.8; 144.2; 137.1; 130.5; 129.2; 128.5; 128.2; 127.6; 117.7; 52.6; 51.8; 50.5; 12.3.

HRMS-ESI-TOF: 350.1414 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (obliczono dla: $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{SNa}$: 350.1415)

Temperatura topnienia: 168-169 °C

cLogP: 2.883

5.4.17 Otrzymywanie (*E*)-4-fenyl-*N'*-[(2-chinolinyl)metyleno]piperazyno-1-tiokarbohidrazynu



Związek otrzymano wg procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,157 g 2-chinolinokarbonydu oraz 0,236 g 4-fenylpiperazyno-1-tiokarbohidrazynu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 30 minut, po czym odstawiono mieszaninę reakcyjną do lodówki laboratoryjnej (-20 °C) na 2 godziny. Po tym czasie zaobserwowano wytrącenie się pomarańczowego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemywano heksanem. W celu uzyskania czystego tiosemikarbazonu, surowy produkt reakcji poddawano dwukrotnej krystalizacji z bezwodnego metanolu uzyskując 0,304 g czystego (*E*)-4-fenyl-*N'*-[(2-chinolinyl)metyleno]piperazyno-1-tiokarbohidrazynu z wydajnością 81%.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.66 (bs, 1H, -NH); 8.39 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, chinolina); 8.35 (s, 1H, -CH); 8.03 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, chinolina); 7.99 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, chinolina); 7.79 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, chinolina); 7.62 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, chinolina); 7.25 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, fenyl); 6.99 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, fenyl); 6.82 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, fenyl); 4.14 (m, 4H, piperazyna); 3.32 (m, 4H, piperazyna).

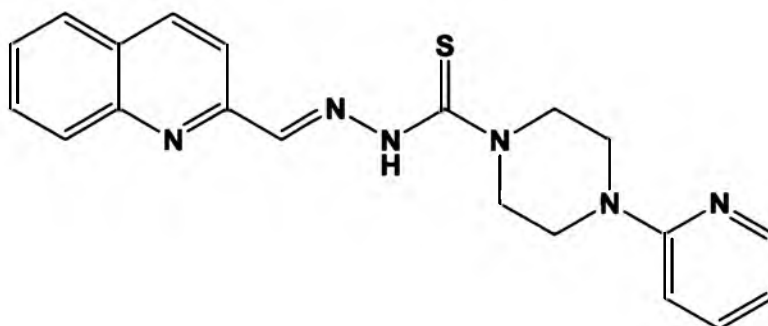
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 181.2; 154.3; 150.9; 147.9; 144.4; 137.1; 130.5; 129.5; 129.3; 128.5; 128.2; 127.6; 119.6; 117.8; 116.0; 50.3; 48.5.

HRMS-ESI-TOF: 376.1591 [M + H]⁺ (obliczono dla: C₂₁H₂₂N₅S: 376.1596)

Temperatura topnienia: 162-163° C

cLogP: 3.785

5.4.18 Otrzymywanie (*E*)-4-(2-pirydynylo)-*N'*-[(2-chinolinyl)metyleno]piperazyno-1-tio- karbohidrazynu



Związek otrzymano wg procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,157 g 2-chinolinokarbalddehydu oraz 0,237 g 4-(2-pirydynylo)piperazyno-1-tiokarbohidrazynu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 30 minut, po czym odparowano mieszaninę reakcyjną na wyparce rotacyjnej otrzymując pomarańczowy osad, który przesączono na lejku Büchnera i przemyto eterem dietylowym. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano z bezwodnego acetonitrylu, uzyskując 0,259 g czystego (*E*)-4-(2-pirydynylo)-*N'*-[(2-chinolinyl)metyleno]piperazyno-1-tiokarbohidrazynu z wydajnością 69 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.50 (bs, 1H, -NH); 8.38 (m, 2H, chinolina, pirydyna); 8.16 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, pirydyna); 8.03 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, chinolina); 7.98 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, chinolina); 7.79 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, chinolina); 7.64-7.56 (m, 2H, chinolina, pirydyna); 6.85 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, pirydyna); 6.68 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, pirydyna); 4.12 (m, 4H, piperazyna); 3.71 (m, 4H, piperazyna).

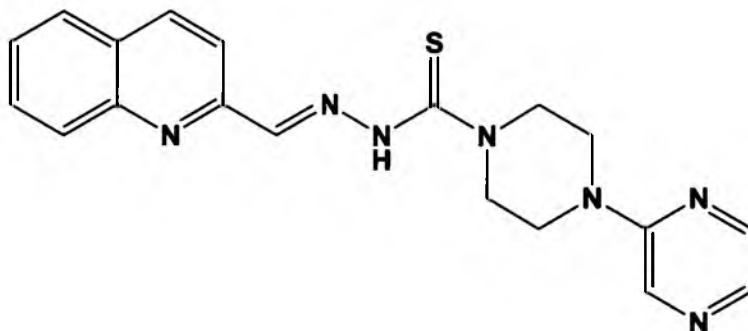
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 181.5; 159.0; 154.3; 148.0; 147.9; 144.5; 138.0; 137.1; 130.4; 129.3; 128.4; 128.2; 127.6; 117.8; 113.6; 107.5; 50.2; 44.7.

HRMS-ESI-TOF: 377.1549 [M + H]⁺ (obliczono dla: C₂₀H₂₁N₆S: 377.1548)

Temperatura topnienia: 133-134 °C

cLogP: 2.837

5.4.19 Otrzymywanie (*E*)-4-(2-pirazynylo)-*N'*-[(2-chinolinylo)metyleno]piperazyno-1-tiokarbohydrazidu



Związek otrzymano wg procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,157 g 2-chinolinokarbaldydu oraz 0,238 g 4-(2-pirazynylo)piperazyno-1-tiokarbohydrazynu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 30 minut, zaś po tym czasie obserwowano intensywne wytrącanie się żółtego osadu (ochłodzenie do 50 ° C). Surowy osad tiosemikarbazonu przesączono na lejku Büchnera i przemyto eterem dietylowym. Produkt finalny krystalizowano z bezwodnego metanolu, uzyskując 0,362 g czystego (*E*)-4-(2-pirazynylo)-*N'*-[(2-chinolinylo)metyleno]piperazyno-1-tiokarbohydrazynu z wydajnością 96 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.77 (bs, 1H, -NH); 8.39 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, chinolina); 8.35 (m, 2H, -CH, pirazyna); 8.13 (m, 1H, pirazyna); 8.03 (m, 2H, chinolina); 8.00 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, 1H, chinolina); 7.89 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, pirazyna); 7.79 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, chinolina); 7.63 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, chinolina); 4.13 (m, 4H, piperazyna); 3.78 (m, 4H, piperazyna).

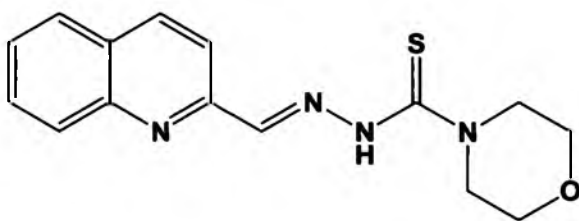
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 181.3; 154.7; 154.3; 147.9; 144.4; 141.9; 137.1; 133.1; 131.7; 130.5; 129.3; 128.5; 128.2; 127.6; 117.8; 49.9; 44.0.

HRMS-ESI-TOF: 378.1498 [M + H]⁺(obliczono dla: C₁₉H₂₀N₇S: 378.1501)

Temperatura topnienia: 188-189 ° C

cLogP: 2.072

5.4.20 Otrzymywanie (*E*)-*N'*-[(2-chinolinyl)metyleno]morfolino-4-tiokarbohidrazynu



Związek otrzymano wg procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,157 g 2-chinolinokarbonydu oraz 0,161 g 4-morfolinotiokarbohidrazynu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 30 minut, a następnie odparowano mieszaninę reakcyjną pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w 5 cm³ chlorku metylenu i pozostawiono w obniżonej temperaturze (-20 ° C) na 24 godziny. Po tym czasie dodano do mieszaniny reakcyjnej 2 cm³ eteru dietylowego, obserwując jednocześnie strącanie się żółtego osadu. Surowy osad tiosemikarbazonu przesączono na lejku Büchnera i przemyto eterem dietylowym. Produkt finalny krystalizowano z bezwodnego metanolu, uzyskując 0,255 g czystego (*E*)-*N'*-[(2-chinolinyl)metyleno]morfolino-4-tiokarbohidrazynu z wydajnością 85 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.61 (bs, 1H, -NH); 8.38 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, chinolina); 8.32 (s, 1H, -CH); 8.01 (m, 3H, chinolina); 7.80 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, chinolina); 7.64 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, chinolina); 3.99 (m, 4H, piperazyna); 3.72 (m, 4H, piperazyna).

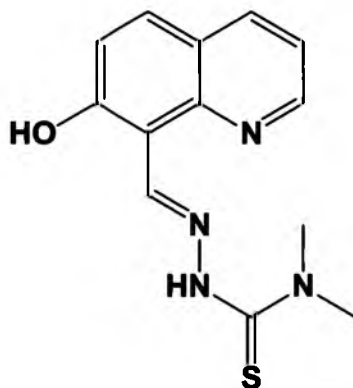
¹³C-NMR(*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 181.4; 154.3; 147.8; 144.4; 137.1; 130.5; 129.3; 128.4; 128.2; 127.6; 117.7; 66.5; 51.2.

HRMS-EI: 300.1034 (obliczono dla: C₁₅H₁₆N₄OS: 300.1045)

Temperatura topnienia: 145-146° C

cLogP: 1.793

5.4.21 Otrzymywanie *N,N*-dimetylo-2-[(7-hydroksy-8-chinolinyl)metyleno]tiokarbohydrazynu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,173 g 7-hydroksy-8-chinolinokarbalddehydu oraz 0,119 g *N,N*-dimetylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 12 minut a następnie ochłodzono do temperatury 50 °C, obserwując jednocześnie wytrącanie się ceglastoczerwonego osadu tiosemikarbazonu. Strącony osad przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie krystalizowano dwukrotnie z absolutnego etanolu, otrzymując 0,216 g *N,N*-dimetylo-2-[(7-hydroksy-8-chinolinyl)metyleno]tiokarbohydrazynu z wydajnością 79 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz): 12.18 (s, 1H, -NH), 11.47 (s, 1H, -OH), 9.83 (s, 1H, -CH), 8.85 (m, 1H, chinolina), 8.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, chinolina), 7.93 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, chinolina), 7,43 (m, 1H, chinolina), 7.30 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, chinolina), 3.33 (s, 6H, -CH₃).

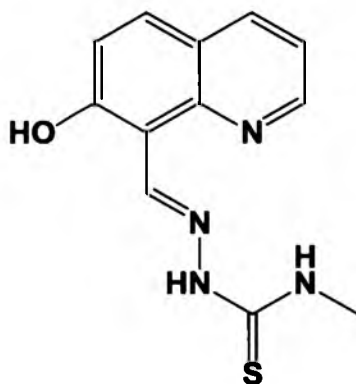
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz): 179.4; 163.7; 150.6; 146.9; 144.8; 137.0 ; 131.4; 122.3; 120.5; 119.8; 111.3; 41.2.

HR-MS (EI): 274.0883 (obliczono dla: C₁₃H₁₄N₄OS: 274.0888).

Temperatura topnienia: 172-173°C

cLogP: 2.162

5.4.22 Otrzymywanie (E)-2-[(7-hydroksy-8-chinolinyl)metyleno]-N-metylotiokarbohydrydu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,173 g 7-hydroksy-8-chinolinokarbonydu oraz 0,105 g N-metylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 12 minut a następnie odstawiono do zamrażarki laboratoryjnej (-20° C) na dwie godziny. Po tym czasie zaobserwowano wytrącenie się pomarańczowego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie krystalizowano dwukrotnie surowy tiosemikarbazon z bezwodnego metanolu otrzymując 0,218 g N-metylo-2-[(7-hydroksy-8-chinolinyl)-metyleno]tiokarbohydrydu z wydajnością 84 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz): 11.66 (s, 1H, -OH), 10.92 (m, 1H, -NH), 9.60 (s, 1H, -CH), 8.87 (m, 1H, chinolina), 8.48 (m, 1H, -NH), 8.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, chinolina), 7.96 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, chinolina), 7.45 (m, 1H, chinolina), 7.32 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, chinolina), 3.03 (d, *J* = 4.0 Hz, 3H, -CH₃).

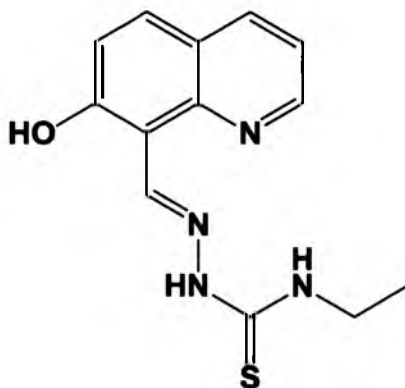
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz): 178.1; 158.6; 150.8; 147.2; 144.3; 137.0; 132.0; 122.7; 120.1; 120.0; 111.1; 31.7.

HR-MS (EI): 260.0720 (obliczono dla C₁₂H₁₂N₄OS: 260.0732)

Temperatura topnienia: 211-213°C

cLogP: 2.131

5.4.23 Otrzymywanie (E)-N-etylo-2-[(7-hydroksy-8-chinolinyl)metyleno]tiokarbohydrazynu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,173 g 7-hydroksy-8-chinolinokarbonylu oraz 0,119 g N-etylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 12 minut a następnie ochłodzono do temperatury 50 °C, obserwując jednocześnie wytrącanie się pomarańczowego osadu tiosemikarbazonu. Strącony osad przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie krystalizowano dwukrotnie z absolutnego etanolu, otrzymując 0,244 g N-etylo-2-[(7-hydroksy-8-chinolinyl)metyleno]tiokarbohydrazynu (wydajność 89%).

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz): 11.58 (s, 1H, -OH); 10.95 (m, 1H, -NH), 9.59 (s, 1H, -CH), 8.87 (m, 1H, chinolina), 8.53 (m, 1H, -NH), 8.31 (d, *J*= 8.0 Hz, 1H, chinolina), 7.96 (d, *J*= 8.8 Hz, chinolina), 7.40 (m, 1H, chinolina), 7.32 (d, 1H, *J*= 9.2 Hz, chinolina), 3.59 (m, 2H, -CH₂), 1.16 (t, *J*= 7.0 Hz, 3H, -CH₃).

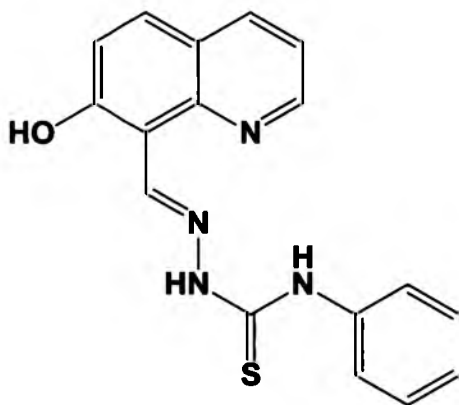
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz): 177.2; 158.7; 150.8; 147.2; 144.2; 137.0; 131.9; 122.7; 120.1; 120.0; 111.2; 39.8; 14.9.

HR-MS (EI): 274.0881 (obliczono dla C₁₃H₁₄N₄OS: 274.0888).

MP: 166-167 °C

cLogP: 2.66

5.4.24 Otrzymywanie (E)-2-[(7-hydroksy-8-chinolinilo)metyleno)-N-fenylohydrazynotiokarboamidu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,173 g 7-hydroksy-8-chinolinokarbonylu oraz 0,167 g N-fenylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze przez 12 minut a następnie wstawiono do zamrażarki laboratoryjnej na 24 godziny. Po tym czasie odparowano mieszaninę reakcyjną na wyparce rotacyjnej otrzymując żółty, lepki osad tiosemikarbazonu. Surowy produkt potraktowano 5 cm³ chlorku metylenu i lekko podgrzano (50 °C) uzyskując żółty roztwór, który ochłodzono (0 °C) po czym dodawano kropla po kropli 1 cm³ eteru dietylowego. Obserwowano wytrącanie się żółtego kłaczkowatego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt krystalizowano z bezwodnego metanolu, otrzymując 0,222 g (E)-2-[(7-hydroksy-8-chinolinilo)metyleno)-N-fenylohydrazynotiokarboamidu z wydajnością 69 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz): 11.96 (s, 1H, -OH); 10.25 (s, 1H, -NH); 9.68 (s, 1H, -CH); 8.88 (m, 1H, chinolina); 8.34 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, chinolina); 7.98 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, chinolina); 7.54 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, fenyl); 7.49 (m, 1H, chinolina); 7.38 (m, 2H, fenyl); 7.33 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, chinolina); 7.20 (m, 1H, fenyl).

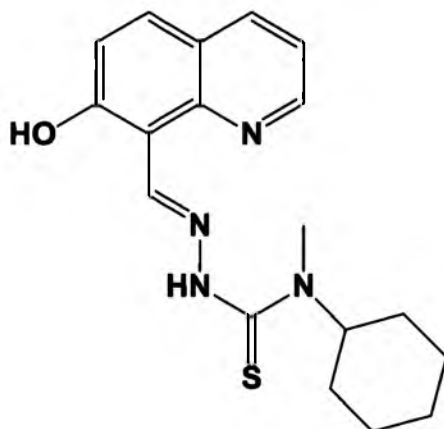
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz): 177.0; 159.0; 150.8; 145.0; 139.0; 137.0; 132.1; 128.8; 125.6; 125.4; 122.7; 120.2; 120.1; 119.9; 111.2.

HR-MS (EI): 322.0867 (obliczono dla C₁₇H₁₄N₄OS: 322.0888).

Temperatura topnienia: 162-163 °C.

cLogP: 4.22

5.4.25 Otrzymywanie (*E*)-*N*-cykloheksylo-2-[(7-hydroksy-8-chinolinyl)metyleno]-*N*-metylohydrazynotiakarboamidu



Związek otrzymano wg procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,173 g 7-hydroksy-8-chinolinokarbalddehydu oraz 0,187 g *N*-cykloheksylo-*N*-metylohydrazynotiakarboamidu. Tak otrzymaną mieszaninę reakcyjną ogrzewano w polu mikrofalowym przez 30 minut a następnie odstawiono do zamrażarki laboratoryjnej na 12 godzin. Po tym czasie zaobserwowano wytrącenie się żółtego osadu, który przesączono na lejku Büchnera. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano dwukrotnie z bezwodnego acetonitryl, otrzymując 0,26 g *N*-cykloheksylo-2-[(7-hydroksy-8-chinolinyl)-metyleno]-*N*-metylo-hydrazynotiakarboamidu wydajnością 76%.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 13.26 (bs, 1H, -NH); 11.20 (bs, 1H, -OH); 9.82 (s, 1H, -CH); 8.85 (dd, *J*₁= 4.0 Hz; *J*₂= 1.6 Hz, 1H, chinolina); 8.30 (dd, *J*₁= 8.0 Hz, *J*₂= 1.9 Hz, 1H, chinolina); 7.92 (d, *J*= 9.0 Hz, 1H, chinolina); 7.43 (dd, *J*₁= 8.1 Hz, *J*₂= 4.3 Hz, 1H, chinolina); 7.29 (d, *J*= 9.0 Hz, 1H, chinolina); 5.00 (bs, 1H, C₁-cykloheksyl); 3.10 (s, 3H, -CH₃); 1.79 (m, 4H, cykloheksyl); 1.50 (m, 3H, cykloheksyl); 1.35 (m, 2H, cykloheksyl); 1.06 (t, *J*= 6.8 Hz, 1H, cykloheksyl).

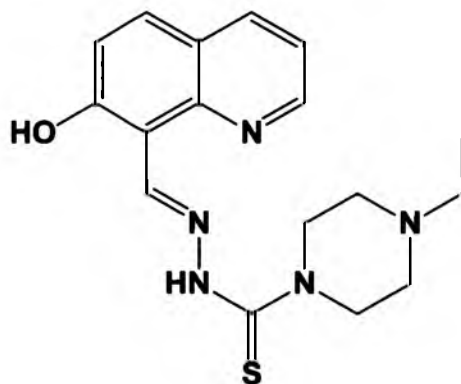
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 179.0; 160.1; 150.5; 147.0; 144.8; 136.9; 131.4; 122.3; 120.6; 119.7; 111.2; 59.5; 32.7; 29.6; 25.7; 25.4; 24.2.

HRMS-EI: 342.1512 (obliczono dla C₁₈H₂₂N₄OS: 342.1514)

Temperatura topnienia: 184-185 ° C

cLogP: 4.193

5.4.26 Otrzymywanie (*E*)-4-etylo-*N'*-[(7-hydroksy-8-chinolinyl)metyleno]-piperazyno-1-tiokarbohydrazynu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4 używając do reakcji 0,173 g 7-hydroksy-8-chinolinokarbonylu oraz 0,188 g 4-etylopiperazyno-1-tiokarbohydrazynu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w polu mikrofalowym przez 30 minut, a następnie po ochłodzeniu do temperatury pokojowej wstawiono do zamrażarki laboratoryjnej (-20 °C). Po tym czasie, odparowano rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej otrzymując pomarańczowy lepki olej. Pozostałość traktowano metanolem (4 cm³) i wstawiono na 60 minut do obniżonej temperatury (-5 °C). Następnie dodano 1 cm³ heksanu do mieszaniny reakcyjnej, a tak otrzymany roztwór umieszczono w zamrażarce laboratoryjnej na 48 godzin. W rezultacie zaobserwowano wytrącenie się pomarańczowego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano z acetonitrylu, otrzymując 0,264 g (*E*)-4-etylo-*N'*-[(7-hydroksy-8-chinolinyl)metyleno]piperazyno-1-tiokarbohydrazynu z wydajnością 77%.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 13.23 (bs, 1H, -NH); 11.59 (bs, 1H, -OH); 9.76 (s, 1H, -CH); 8.84 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, chinolina), 8.30 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, chinolina), 7.92 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, chinolina); 7.42 (dd, *J*₁ = 8.1 Hz, *J*₂ = 4.3 Hz, 1H, chinolina), 7.28 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, chinolina); 3.97 (m, 4H, piperazyna); 2.51 (m, 6H, piperazyna); 1.05 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, -CH₃).

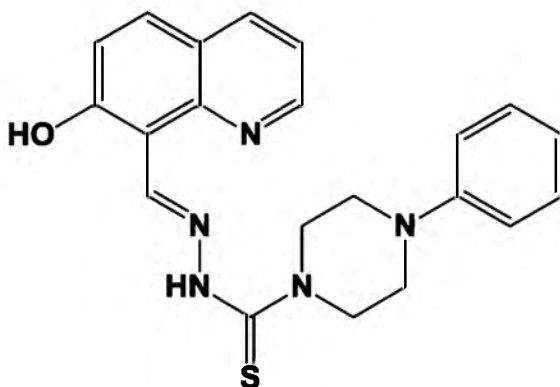
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 179.2; 160.4; 150.6; 147.0; 144.9; 136.9; 131.6; 122.2; 120.8; 119.7; 111.0; 52.3; 51.7; 48.2; 12.1.

HRMS-EI: 343.1464 (obliczono dla C₁₇H₂₁N₅OS: 343.1467)

Temperatura topnienia: 145-146° C

cLogP: 2.931

5.4.27 Otrzymywanie (*E*)-*N'*-[(7-hydroksy-8-chinolinilylo)metyleno]-4-fenylo-piperazyno-1-tiokarbonylhydrazynu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,173 g 7-hydroksy-8-chinolinokarbonylhydrazynu oraz 0,236 g 4-fenylo-piperazyno-1-tiokarbonylhydrazynu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w polu mikrofalowym przez 30 minut, a następnie ochłodzono do temperatury 50 °C. Obserwowano gwałtowne wytrącenie się pomarańczowego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt krystalizowano z metanolu, uzyskując 0,262 g (*E*)-*N'*-[(7-hydroksy-8-chinolinilylo)metyleno]-4-fenylo-piperazyno-1-tiokarbonylhydrazynu z wydajnością 67 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 13.14 (bs, 1H, -NH); 11.83 (bs, 1H, -OH); 9.83 (s, 1H, -CH); 8.87 (m, 1H, chinolina); 8.32 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, chinolina); 7.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, chinolina); 7.45 (dd, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 4.2 Hz, 1H, chinolina); 7.31 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, chinolina); 7.25 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, fenyl); 7.00 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, fenyl); 6.82 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, fenyl); 4.13 (m, 4H, piperazyna); 3.29 (m, 4H, piperazyna).

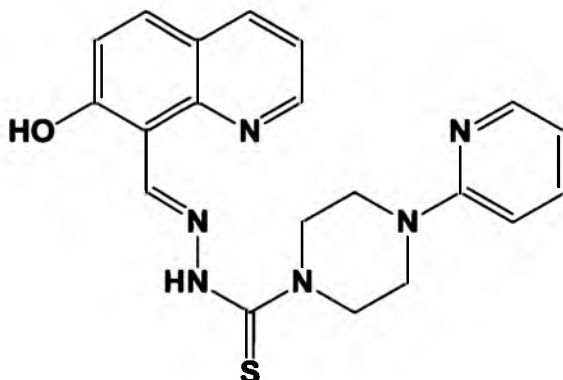
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 179.2; 159.8; 150.9; 150.7; 146.9; 145.2; 137.0; 131.6; 129.5; 122.4; 120.4; 119.9; 119.6; 115.9; 111.2; 48.3 48.2.

HRMS-EI: 391.1470 (obliczono dla C₂₁H₂₁N₅OS: 391.1467)

MP: 212-213 ° C

cLogP: 3.833

5.4.28 Otrzymanie (*E*)-*N'*-[(7-hydroksy-8-chinolinyl)metyleno]-4-(2-pirydynyl)-piperazyno-1-tiokarbohydrazynu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,173 g 7-hydroksy-8-chinolinokarbalddehydu oraz 0,237 g 4-(2-pirydynyl)piperazyno-1-tio-karbohydrazynu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w polu mikrofalowym przez 30 minut, a następnie ostudzono i wstawiono do zamrażarki laboratoryjnej (-20 °C) na 12 godzin. Obserwowano wytrącenie się ceglastoczerwonego osadu, który przesączono na lejku Büchnera. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano z bezwodnego acetonitrylu, uzyskując 0,282 g (*E*)-*N'*-[(7-hydroksy-8-chinolinyl)metyleno]-4-(2-pirydynyl)-piperazyno-1-tiokarbo-hydrazynu z wydajnością 72 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 13.14 (bs, 1H, -NH); 11.80 (s, 1H, -OH); 9.83 (s, 1H, -CH); 8.86 (dd, *J*₁ = 4.2, *J*₂ = 1.6 Hz, 1H, chinolina); 8.32 (dd, *J*₁ = 8.2, *J*₂ = 1.7 Hz, 1H, chinolina); 8.15 (dd, *J*₁ = 4.9, *J*₂ = 1.6 Hz, 1H, pirydyna); 7.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, chinolina), 7.58 (ddd, *J*₁ = 8.8 Hz, *J*₂ = 7.2 Hz, *J*₃ = 1.9 Hz, 1H, pirydyna); 7.45 (dd, *J*₁ = 8.2 Hz; *J*₂ = 4.3 Hz, 1H, chinolina); 7.32 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, chinolina); 6.87 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, pirydyna), 6.68 (dd, *J*₁ = 7.0, *J*₂ = 5.0 Hz, 1H, pirydyna); 4.11 (m, 4H, piperazyna); 3.66 (m, 4H, piperazyna).

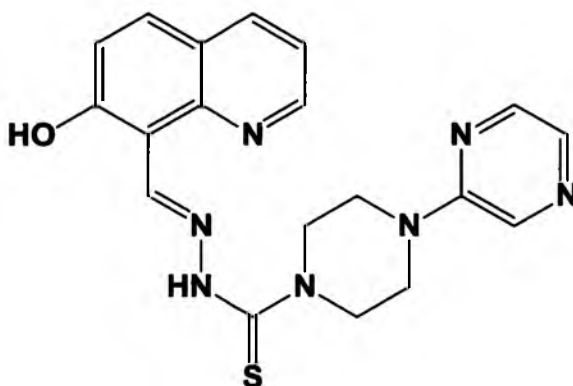
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 179.2; 159.3; 158.9; 150.6; 148.0; 146.9; 145.2; 138.1; 137.0; 131.6; 122.3; 120.4; 119.8; 113.7; 111.9; 107.5; 56.5; 48.1

HRMS-ESI-TOF: 393.1493 [M + H]⁺ (obliczono dla C₂₀H₂₁N₆OS: 393.1498)

Temperatura topnienia: 186-187° C

cLogP: 2.885

5.4.29 Otrzymywanie (E)-N'-[(7-hydroksy-8-chinolinyl)metyleno]-4-(2-pirazynylo)-piperazyno-1-tiokarbohydrazynu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,173 g 7-hydroksy-8-chinolinokarbalddehydu oraz 0,238 g 4-(2-pirazynylo)piperazyno-1-tio-karbohydrazynu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w polu mikrofalowym przez 30 minut, po czym ochłodzono roztwór do temperatury 50 °C. Obserwowano gwałtowne wytrącenie się ceglastoczerwonego osadu, który przesączono na lejku Büchnera. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano z bezwodnego metanolu, uzyskując 0,299 g (E)-N'-[(7-hydroksy-8-chinolinyl)metyleno]-4-(2-pirazynylo)-piperazyno-1-tio-karbohydrazynu z wydajnością 76 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 13.13 (bs, 1H, -NH); 11.82 (bs, 1H, -OH); 9.84 (s, 1H, -CH); 8.87 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, chinolina); 8.37 (s, 1H, pirazyna); 8.33 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, chinolina); 8.13 (s, 1H, pirazyna); 7.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, chinolina); 7.89 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, pirazyna); 7.45 (dd, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 4.2 Hz, 1H, chinolina); 7.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, chinolina); 4.13 (m, 4H, piperazyna); 3.74 (m, 4H, piperazyna).

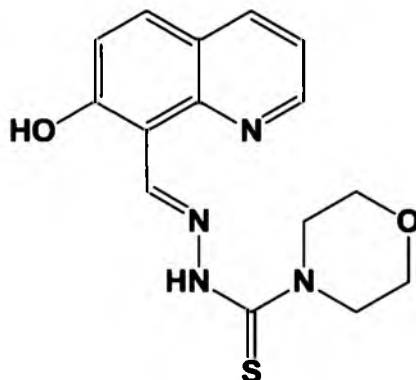
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 179.3; 159.8; 154.7; 150.7 146.9; 145.3; 141.9; 137.0; 133.1; 131.8; 131.6; 122.4; 120.4; 119.9; 111.2; 56.5; 47.8.

HRMS-ESI-TOF: 394.1446 [M + H]⁺ (obliczono dla C₁₉H₂₀N₇OS: 394.1450)

Temperatura topnienia: 209-210 °C

cLogP: 2.121

5.4.30 Otrzymywanie (*E*)-*N'*-[(7-hydroksy-8-chinolinyl)metyleno]morfolino-4-tio-
karbohydrazynu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,173 g 7-hydroksy-8-chinolinokarbalddehydu oraz 0,161 g morfolino-4-tiokarbohydrazynu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w polu mikrofalowym przez 30 minut, po czym ochłodzono roztwór do temperatury 50 °C. Obserwowano gwałtowne wytrącenie się ceglasto-czerwonego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano z absolutnego etanolu, uzyskując 0,24 g (*E*)-*N'*-[(7-hydroksy-8-chinolinyl)metyleno]morfolino-4-tiokarbohydrazynu z wydajnością 76 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 13.10 (bs, 1H, -NH); 11.75 (bs, 1H, -OH); 9.81 (s, 1H, -CH); 8.87 (m, 1H, chinolina); 8.33 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, chinolina); 7.95 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, chinolina); 7.45 (dd, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 4.3 Hz, 1H, chinolina); 7.31 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, chinolina); 3.97 (m, 4H, piperazyna); 3.69 (m, 4H, piperazyna).

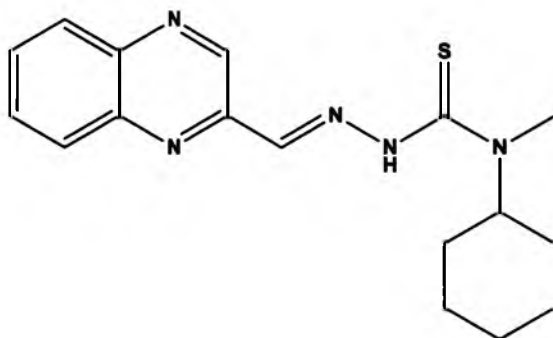
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 179.5; 159.7; 150.7; 146.8; 145.3; 137.1; 131.6; 122.4; 120.4; 119.9; 111.2; 66.2; 49.1.

HRMS-EI: 316.0982 (obliczono dla C₁₅H₁₆N₄O₂S: 316.0994)

Temperatura topnienia: 198-199 °C

cLogP: 1.841

5.4.31. Otrzymywanie (*E*)-*N*-cykloheksylo-*N*-metylo-2-[(2-chinoksalinylo)metyleno]-hydrazynotiokarboamidu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,158 g 2-chinoksalinokarbonylu oraz 0,187 g *N*-cykloheksylo-*N*-metylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną umieszczono w reaktorze mikrofalowym i ogrzewano przez 30 minut, po czym wstawiono do zamrażarki laboratoryjnej (-20 °C) na 12 godzin. Następnie odparowano rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej, otrzymując żółtą, lepłą żywicę. Całość potraktowano chlorkiem metylenu (5 cm³), a następnie delikatnie podgrzano (temperatura nie przekraczała 50 °C), do całkowitego rozpuszczenia żywicy. Roztwór ostudzono, a następnie umieszczono w zamrażarce laboratoryjnej (-20 °C) na 12 godzin. Następnie dodano do roztworu 2 cm³ eteru dietylowego i kolejny raz umieszczono w obniżonej temperaturze na 24 godziny. Po tym czasie obserwowano wytrącenie się drobnokrystalicznego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt krystalizowano z bezwodnego metanolu otrzymując 0,255 g (*E*)-*N*-cykloheksylo-*N*-metylo-2-[(2-chinoksalinylo)metyleno]hydrazynotiokarboamidu z wydajnością 78 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.44 (bs, 1H, -NH); 9.36 (s, 1H, chinoksalina); 8.38 (s, 1H, -CH); 8.12-8.07 (m, 2H, chinoksalina); 7.88-7.85 (m, 2H, chinoksalina); 4.74 (bs, 1H, C₁-cykloheksyl); 3.16 (s, 3H, -CH₃); 1.80 (m, 4H, cykloheksyl); 1.58 (m, 3H, cykloheksyl); 1.32 (m, 2H, cykloheksyl); 1.16 (t, *J* = 12.8 Hz, 1H, cykloheksyl).

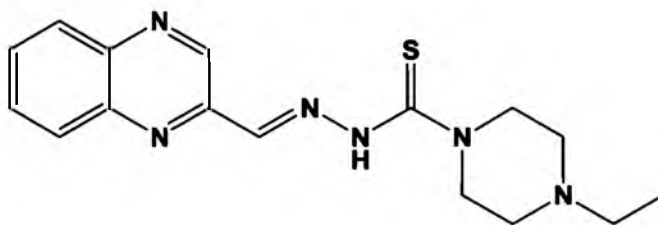
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 181.0; 149.3; 143.2; 141.9; 141.8; 131.2; 130.8; 129.4; 129.4; 61.3; 35.1; 29.7; 25.7; 25.4.

HRMS-EI: 327.1513 (obliczono dla C₁₇H₂₁N₅S: 327.1518)

Temperatura topnienia: 154-155 ° C

cLogP: 3.398

5.4.32 Otrzymywanie (*E*)-4-etylo-*N'*-[(2-chinoksalinylo)metyleno]piperazyno-1-tiokarbohydrazynu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,158 g 2-chinoksalinokarbalddehydu oraz 0,188 g 4-etylopiperazyno-1-tiokarbohydrazidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w polu mikrofalowym przez 25 minut, po czym wstawiono do zamrażarki laboratoryjnej na 48 godzin. Po tym czasie zaobserwowano wytrącenie się żółtego osadu, który przesączono na lejku Büchnera i przemyto heksanem. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano trzykrotnie z acetonitrylu, otrzymując 0,282 g czystego (*E*)-4-etylo-*N'*-[(2-chinoksalinylo)metyleno]piperazyno-1-tiokarbohydrazynu z wydajnością 86 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 500 MHz, ppm): 11.69 (bs, 1H, -NH), 9.34 (s, 1H, chinoksalina), 8.32 (s, 1H, chinoksalina), 8.09 (t, *J* = 9.1 Hz, 2H, chinoksalina), 7.91 – 7.80 (m, 2H, chinoksalina), 3.98 (m, 4H, piperazyna), 3.34 (m, 4H, piperazyna), 2.39 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, -CH₂), 1.04 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, -CH₃).

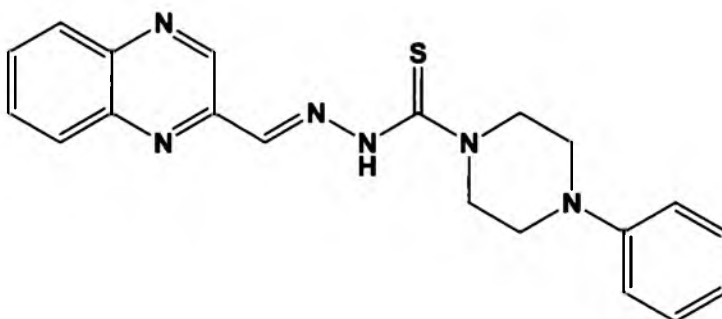
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 125 MHz, ppm): 181.0; 149.1; 148.9; 143.2; 141.8; 141.8; 131.2; 130.9; 129.4; 129.4; 52.7; 51.8; 50.7; 12.4.

HRMS-ESI-TOF: 329.1544 [M + H]⁺ (obliczono dla C₁₆H₂₁N₆S: 329.1548)

Temperatura topnienia: 150-151 ° C

cLogP: 2.136

5.4.33 Otrzymywanie (E)-4-fenyl-N'-[(2-chinoksalinylo)metyleno]piperazyno-1-tiokarbonylhydrazynu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,158 g 2-chinoksalinokarbonylhydrazynu oraz 0,236 g 4-fenylpiperazyno-1-tiokarbonylhydrazynu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w polu mikrofalowym przez 30 minut, a następnie ochłodzono do temperatury 50 °C. Obserwowano gwałtowne wytrącenie się białoróżowego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt krystalizowano z metanolu, uzyskując 0,259 g z (E)-4-fenyl-N'-[(2-chinoksalinylo)metyleno]-piperazyno-1-tiokarbonylhydrazynu wydajnością 69 %.

¹H-NMR (d₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.82 (bs, 1H, -NH); 9.39 (s, 1H, chinoksalina); 8.36 (s, 1H, -CH); 8.10 (t, J = 7.2 Hz, 2H, chinoksalina); 7.87 (m, 2H, chinoksalina); 7.26 (t, J = 8.0 Hz, 2H, fenyl); 7.00 (d, J = 8.1 Hz, 2H, fenyl); 6.82 (t, J = 7.2 Hz, 1H, fenyl); 4.15 (m, 4H, piperazyna); 3.33 (m, 4H, piperazyna).

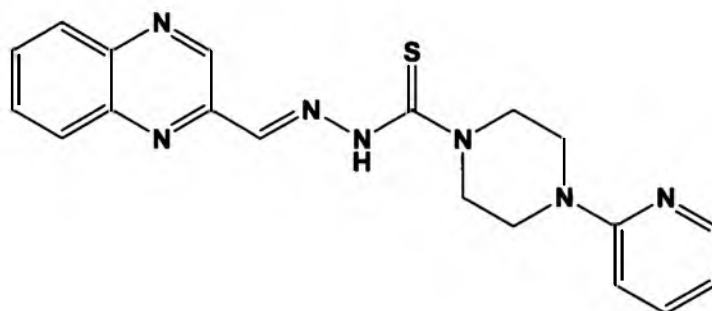
$^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -DMSO, 100 MHz, ppm): 181.1; 150.9; 149.1; 143.3; 142.0; 141.9; 141.8; 131.2; 130.9; 129.5; 129.5; 119.6; 115.9; 50.4; 48.5.

HRMS-ESI-TOF: 377.1546 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (obliczono dla: $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{S}$: 377.1548)

Temperatura topnienia: 168-169 °C

cLogP: 3.038

5.4.34 Otrzymywanie (*E*)-4-(2-pirydynylo)-*N'*-[(2-chinoksalinylo)metyleno]-piperazyno-1-tiokarbohydrazynu



Związek otrzymano wg procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,158 g 2-chinoksalinokarbalddehydu oraz 0,237 g 4-(2-pirydynylo)piperazyno-1-tiokarbohydrazynu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 30 minut, po czym odparowano mieszaninę reakcyjną na wyparce rotacyjnej otrzymując czerwony osad, który przesączono na lejku Büchnera i przemywano heksanem. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano z bezwodnego metanolu, uzyskując 0,26 g czystego (*E*)-4-(2-pirydynylo)-*N'*-[(2-chinoksalinylo)metyleno]piperazyno-1-tiokarbohydrazynu z wydajnością 69 %

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 400 MHz, ppm): 11.79 (s, 1H, -NH); 9.39 (s, 1H, chinoksalina); 8.36 (s, 1H, -CH), 8.15 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, pirydyna); 8.10 (m, 2H, chinoksalina); 7.87 (m, 2H, chinoksalina); 7.58 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, pirydyna); 6.85 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, pirydyna); 6.68 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, pirydyna); 4.12 (m, 4H, piperazyna); 3.70 (m, 4H, piperazyna).

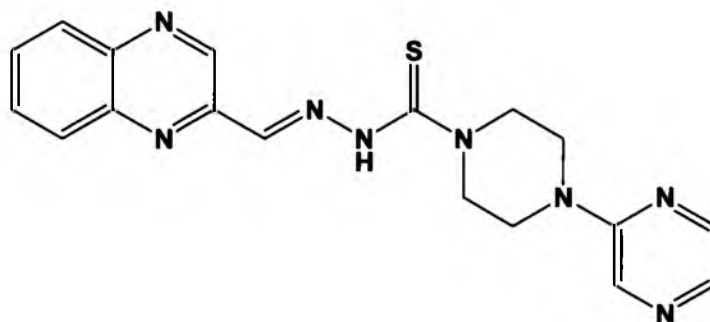
$^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -DMSO, 100 MHz, ppm): 181.2; 159.0; 149.1; 148.1; 143.3; 141.9; 141.9; 141.8; 138.1; 131.2; 130.9; 129.5; 113.7; 107.5; 50.3; 44.7.

HRMS-EI: 377.1405 (obliczono dla C₁₉H₁₉N₇S: 377.1423)

Temperatura topnienia: 190-191 °C

cLogP: 2.09

5.4.35 Otrzymywanie (*E*)-4-(2-pirazynylo)-*N'*-[(2-chinoksalinylo)metyleno]-piperazyno-1-tiokarbohydrazynu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,158 g 2-chinoksalinokarbalddehydu oraz 0,238 g 4-(2-pirazynylo)piperazyno-1-tiokarbohydrazynu. Mieszaninę ogrzewano w polu mikrofalowym w czasie 30 minut, po czym wstawiono do zamrażarki laboratoryjnej (50 °C) na 12 godzin. Po tym czasie obserwowano wytrącenie się pomarańczowego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemywano heksanem. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano z etanolu, otrzymując 0,299 g (*E*)-4-(2-pirazynylo)-*N'*-(chinoksalin-2-ylo)metyleno]piperazyno-1-tiokarbohydrazynu z wydajnością 79 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.81 (bs, 1H, -NH); 9.40 (s, 1H, chinoksalina); 8.36 (m, 2H, -CH, pirazyna); 8.13-8.08 (m, 3H, chinoksalina, pirazyna); 7.89-7.84 (m, 3H, chinoksalina, pirazyna); 4.15 (m, 4H, piperazyna); 3.79 (m, 4H, piperazyna).

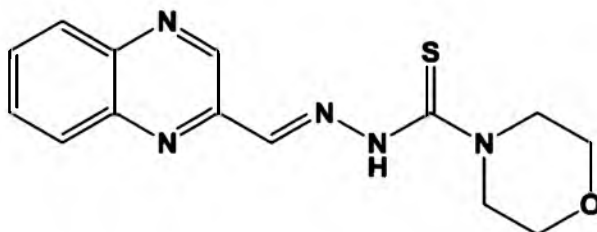
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 181.2; 154.7; 149.1; 143.3; 142.0; 141.9; 141.9; 141.8, 133.1; 131.7; 131.2; 130.9; 129.4; 129.3 50.01; 44.0

HRMS-ESI-TOF: 401.1270 [M + Na]⁺ (obliczono dla C₁₈H₁₈N₈SNa: 401.1273)

Temperatura topnienia: 186-187° C

cLogP: 1.325

5.4.36 Otrzymywanie (*E*)-*N'*-[2-chinoksalinylo)metyleno]morfolino-4-tiokarbohidrazynu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,158 g 2-chinoksalinokarbonylu oraz 0,161 g morfolino-4-tiokarbohidrazynu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w polu mikrofalowym przez 30 minut po czym ostudzono do temperatury pokojowej i wstawiono do zamrażarki laboratoryjnej (-20 °C) na 12 godzin. Po tym czasie zaobserwowano wytrącenie się pomarańczowego osadu, który przesączono na lejku Büchnera i przemywano heksanem. Surowy produkt tiosemikarbazon krystalizowano dwukrotnie z absolutnego etanolu, uzyskując 0,25 g (*E*)-*N'*-[2-chinoksalinylo)metyleno]-morfolino-4-tiokarbohidrazynu z wydajnością 83 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.56 (bs, 1H, -NH); 9.34 (s, 1H, chinoksalina); 8.33 (s, 1H, -CH); 8.09 (m, 2H, chinoksalina); 7.85 (m, 2H, chinoksalina); 4.00 (m, 4H, piperazyna); 3.73 (s, 4H, piperazyna).

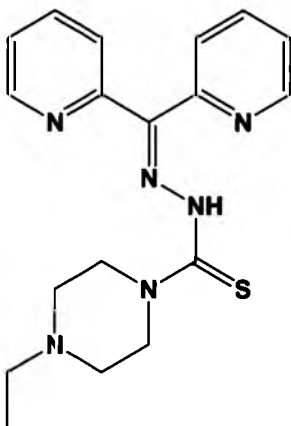
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 181.3; 149.0; 143.3; 142.0; 141.8; 141.7; 131.2; 130.9 129.4; 66.5; 51.3.

HRMS-ESI-TOF: 324.0892 [M + Na]⁺ (obliczono dla: C₁₄H₁₅N₅OSNa: 324.0895)

Temperatura topnienia: 176-177 ° C

cLogP: 1.046

5.4.37 Otrzymywanie *N'*-[di(2-pirydynylo)metyleno]-4-etylopiperazyno-1-tiokarbohydrydu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,184 g 2-dipirydyloketonu oraz 0,188 g 4-etylopiperazyno-1-tiokarbohydrydu. Mieszaninę reakcyjną umieszczono w reaktorze mikrofalowym i ogrzewano przez 30 minut. Po ostudzeniu odparowano rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej otrzymując zielono-żółty, lepki olej. Analiza widma $^1\text{H-NMR}$ dla surowego produktu wskazała na zanieczyszczenie tiosemikarbazonu nieprzereagowanym ketonem 2-dipirydylowym. Otrzymany surowy produkt oczyszczano dalej metodą chromatografii kolumnowej ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{etanol}$, 16:1 [v/v]) przy użyciu chromatografu preparatywnego Buchi Sepacore® ($R_{f\text{produktu}} = 0,52$). Ponowna krystalizacja z układu metanol/ Et_2O (5:1 [v/v]) pozwoliła uzyskać 0,219 g czystego *N'*-[di(2-pirydynylo)metyleno]-4-etylopiperazyno-1-tiokarbohydrydu z wydajnością 62%.

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 400 MHz, ppm): 14.47 (bs, 1H, -NH); 8.85 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, pirydyna); 8.60 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, pirydyna); 8.01-7.91 (m, 3H, pirydyna); 7.59 (m, 2H, pirydyna); 7.58 (m, 1H, pirydyna); 4.00 (m, 4H, piperazyna); 2.50 (m, 6H, piperazyna); 1.06 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz, CH_3).

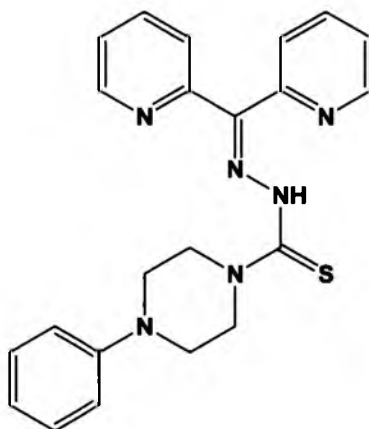
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 180.8; 148.9; 148.3; 138.3; 127.4; 125.1; 124.2; 56.5; 52.4; 51.7; 12.4.

HRMS-EI: 354.1626 (obliczono dla C₁₈H₂₂N₆S: 354.1627)

Temperatura topnienia: 144-145° C

cLogP: 1.842

5.4.38 Otrzymywanie *N'*-[di(2-dipirydynylo)metyleno]-4-fenylopiperazyno-1-tiokarbonydu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,184 g 2-dipirydyloketonu oraz 0,266 g 4-fenylopiperazyno-1-tiokarbonydu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w polu mikrofalowym przez 30 minut, po czym ostudzono do temperatury pokojowej i wstawiono do zamrażarki laboratoryjnej na 12 godzin. Po tym czasie odparowano mieszaninę reakcyjną otrzymując żółty osad. Analiza TLC surowego produktu wskazała na zanieczyszczenie tiosemikarbazonu nieprzereagowanym prekursorem tiosemikarbazynowym. Podjęto próbę wielokrotnej krystalizacji surowego produktu z absolutnego etanolu. Analiza widma ¹H-NMR osadu wskazała na ciągłe zanieczyszczenie substratem. Ostatecznie oczyszczano surowy produkt za pomocą chromatografii kolumnowej, używając chromatografu preparatywnego Buchi Sepacore®. Jako eluent stosowano układ CH₂Cl₂/metanol (40:1 [v/v]), zaś frakcje 10-20 połączyliśmy (R_F produktu = 0,28) i odparowaliśmy rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej, otrzymując 0,314 g czystego *N'*-[di(2-dipirydynylo)metyleno]-4-fenylopiperazyno-1-tiokarbonydu z wydajnością 78%.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 14.59 (bs, 1H, -NH); 8.89 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, pirydyna); 8.60 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, pirydyna); 8.01-7.91 (m, 3H, pirydyna); 7.60 (m, 2H, pirydyna); 7.49 (m, 1H, pirydyna); 7.25 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, fenyl); 6.96 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, fenyl); 6.81 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, fenyl); 4.17 (m, 4H, piperazyna); 3.34 (m, 4H, piperazyna)

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 180.7; 150.8; 148.7; 148.4; 138.3; 137.7; 129.5; 127.3; 125.1; 119.4; 115.7; 49.6; 48.1.

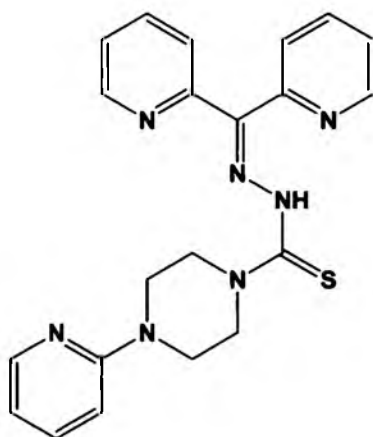
*R*_f = 0.28 [dichlorometane : methanol 40/1 (v/v)]

HRMS-EI: 402.1628 (obliczono dla: C₂₂H₂₂N₆S; Exact Mass: 402.1627)

Temperatura topnienia: 151-152 °C

cLogP: 2.744

5.4.39 Otrzymywanie *N'*-[di(2-pirydynylo)metyleno]-4-(2-pirydynylo)piperazyno-1-tio-
karbohydrazynu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,184 g 2-dipirydyloketonu oraz 0,237 g 4-(2-pirydynylo)piperazyno-1-tiokarbohydrazynu. Mieszaninę reakcyjną umieszczono w reaktorze mikrofalowym i ogrzewano przez 30 minut, po czym ostudzono do temperatury 20 °C i wkroplono 2 cm³ eteru dietylowego. Następnie wstawiono mieszaninę reakcyjną do zamrażarki laboratoryjnej (-20 °C) na 48 godzin. Po tym czasie zaobserwowano wytrącenie się żółtego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Czysty tiosemikarbazon uzyskano poprzez dwukrotną krystalizację z absolutnego etanolu, otrzymując 0,298 g *N'*-[di(2-

pirydynylo)metyleno]-4-(2-pirydynylo)piperazino-1-tio-karbohydrazynu z wydajnością 74 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 14.65 (bs, 1H, -NH); 8.90 (d, *J*= 5.2 Hz, 1H, pirydyna); 8.62 (d, *J*= 4.4 Hz, 1H, pirydyna); 8.15 (dd, *J*₁= 4.6 Hz, *J*₂= 1.5 Hz, 1H, pirydyna); 8.05-7.93 (m, 3H, pirydyna); 7.62-7.55 (m, 3H, pirydyna); 7.49 (t, *J*= 7.2 Hz, 1H, pirydyna); 6.82 (d, *J*= 8.6 Hz, 1H, pirydyna); 6.68 (dd, *J*₁= 6.8 Hz, *J*₂= 5.2 Hz, 1H, pirydyna); 4.15 (m, 4H, piperazyna); 3.72 (m, 4H, piperazyna).

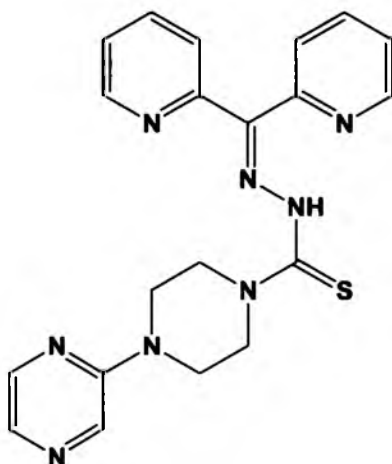
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 180.7; 158.9; 148.9; 148.4; 148.0138.3; 137.8; 127.3; 125.1; 124.2; 113.5; 107.3; 49.0; 44.2

HRMS-ESI-TOF: 404.1652 [M + H]⁺ (obliczono dla C₂₁H₂₂N₇S: 404.1657)

Temperatura topnienia: 143-144 °C

cLogP: 1.796

5.4.40 Otrzymywanie *N'*-[di(2-pirydynylo)metyleno]-4-(2-pirazynylo)piperazyno-1-tio-karbohydrazynu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,184 g 2-dipirydyloketonu oraz 0,238 g 4-(2-pirazynylo)piperazyno-1-tio-karbohydrazynu. Mieszaninę reakcyjną umieszczono w reaktorze mikrofalowym i ogrzewano przez 35 minut, po czym ostudzono do temperatury pokojowej i wstawiono do obniżonej temperatury (-20 °C) na 12 godzin. Po tym czasie odparowano

rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej, otrzymując kremową żywicę, którą potraktowano 5 cm³ mieszaniny CH₂Cl₂ : Et₂O (4:1, v/v) i umieszczono w zamrażarce laboratoryjnej (-20 °C) na 48 godzin. Obserwowano wytrącenie się kremowego osadu, który przesączono na lejku Büchnera i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano z bezwodnego metanolu, otrzymując 0,267 g *N'*-[di(2-pirydynylo)metyleno]-4-(2-pirazynylo)piperazyno-1-tio-karbohydrazynu z wydajnością 66 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 14.66 (bs, 1H, -NH); 8.89 (d, *J*= 4.7 Hz, 1H, pirydyna); 8.62 (d, *J*= 4.0 Hz, 1H, pirydyna); 8.31 (bs, 1H, pirazyna); 8.12 (bs, 1H, pirazyna); 8.06 – 7.91 (m, 3H, pirydyna); 7.88 (d, *J*= 2.2 Hz, 1H, pirazyna); 7.61 (t, *J*= 6.4 Hz, 2H, pirydyna); 7.49 (t, *J*= 5.6 Hz, 1H, pirydyna); 4.18 (m, 4H, piperazyna); 3.80 (m, 4H, piperazyna).

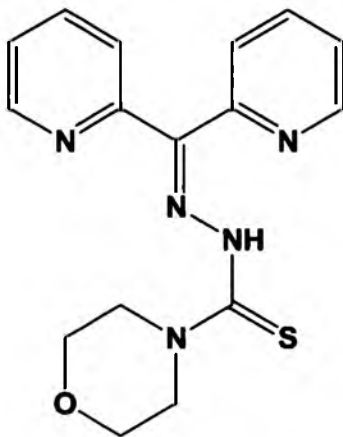
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 180.7; 154.5; 149.4; 148.9; 148.4; 141.9; 138.2; 137.8; 127.3; 125.1; 124.2; 48.8; 43.5

HRMS-ESI-TOF: 405.1606 [M + H]⁺ (obliczono dla C₂₀H₂₁N₈S: 405.1610)

Temperatura topnienia: 175-176 ° C

cLogP: 1.031

5.4.41 Otrzymywanie *N'*-[di(2-pirydynylo)metyleno]morfolino-4-tiokarbohydrazynu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,184 g 2-dipirydyloketonu oraz 0,161 g morfolino-4-tiokarbohidrazynu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w polu mikrofalowym przez 30 minut po czym ostudzono i odparowano rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej. Otrzymano żółto-brązową maź, która okazała się (po analizie TLC oraz $^1\text{H-NMR}$) mieszaniną tiosemikarbazonu oraz nieprzereagowanego ketonu dipirydylowego. Surowy produkt oczyszczano metodą chromatografii kolumnowej w układzie AcOEt : CH_2Cl_2 (8 : 1, v/v) przy użyciu chromatografu preparatywnego Buchi Sepacore®. Zbierano frakcje 8-15 i odparowywano rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej ($R_{\text{produktu}} = 0,57$) otrzymując żółty osad. W celu trzymania czystego tiosemikarbazonu, krystalizowano surowy produkt z bezwodnego metanolu. W rezultacie uzyskano 0,255 g *N'*-[di(2-pirydynylo)metyleno]-morfolino-4-tiokarbohidrazynu z wydajnością 78 %.

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO, 400 MHz, ppm): 14.50 (bs, 1H, -NH); 8.85 (d, $J = 3,7$ Hz, 1H, pirydyna); 8.61 (d, $J = 3,5$ Hz, 1H, pirydyna); 8.01-7.91 (m, 3H, pirydyna); 7.58 (m, 2H, pirydyna); 7.49 (m, 1H, pirydyna); 4.00 (m, 4H, morfolina); 3.71 (m, 4H, morfolina).

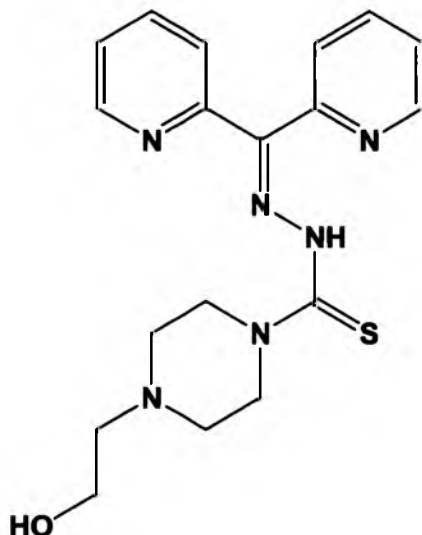
$^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -DMSO, 100 MHz, ppm): 180.2; 148.3; 148.4; 138.7; 127.5; 125.1; 124.0; 68.5; 52.6

HRMS-EI: 327.1158 (obliczono dla $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{OS}$: 327.1154)

Temperatura topnienia: 124-125° C

cLogP: 0.752

5.4.42 Otrzymywanie *N'*-[di(2-pirydynylo)metyleno]-4-(2-hydroksyetylo)piperazyno-1-tiokarbohydrazynu



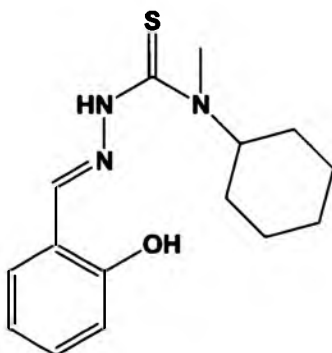
Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,184 g 2-dipirydyloketonu oraz 0,204 g 4-(2-hydroksyetylo)piperazyno-1-tiokarbohydrazynu. Mieszaninę reakcyjną umieszczono w reaktorze mikrofalowym i ogrzewano przez 40 minut, po czym ostudzono i wstawiono do zamrażarki laboratoryjnej (-20 °C) na 48 godzin. Po tym czasie zaobserwowano wytrącenie się pomarańczowego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemywano heksanem. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano z bezwodnego metanolu, uzyskując 0,233 g *N'*-[di(2-pirydynylo)metyleno]-4-(2-hydroksyetylo)piperazyno-1-tiokarbohydrazynu w postaci lepkiej żywicy (wydajność 63 %).

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 14.47 (bs, 1H, -NH); 8.85 (d, *J*= 4.6 Hz, 1H, pirydyna); 8.60 (m, 1H, pirydyna); 7.99 (dt, *J*₁= 17.9 Hz, *J*₂= 7.7 Hz, 2H, pirydyna); 7.90 (d, *J*= 7.0 Hz, 1H, pirydyna); 7.61 – 7.54 (m, 2H, pirydyna), 7.48 (t, *J*= 5.5 Hz, 1H, pirydyna); 3.98 (m, 4H, piperazyna); 3.54 (t, *J*= 5.8 Hz, 2H, -CH₂); 3.44 (m, 1H, -OH); 2.55 (m, 4H, piperazyna); 2.44 (t, *J*= 5.5 Hz, 2H, -CH₂).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 180.6; 156.0; 148.9; 138.2; 127.3; 125.1; 124.1; 60.3; 59.0; 53.3; 52.6.

cLogP: 0.738

5.4.43 Otrzymywanie (*E*)-*N*-cykloheksylo-2-(2-hydroksybenzylideno)-*N*-metylohydrazynotiokarboamidu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,11 cm³ aldehydu salicylowego oraz 0,187 g *N*-cykloheksylo-*N*-metylohydrazynotiokarbo-amidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w polu mikrofalowy przez 30 minut, po czym ostudzono do temperatury pokojowej i umieszczono w zamrażarce laboratoryjnej (-20 °C) na 12 godzin. Po tym czasie zaobserwowano wytrącenie się kremowego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemywano eterem dietylowym. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano dwukrotnie z acetonitrylu, otrzymując 0,215 g (*E*)-*N*-cykloheksylo-2-(2-hydroksybenzylideno)-*N*-metylohydrazynotiokarboamidu z wydajnością 74 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.73 (bs, 1H, -NH); 11.13 (bs, 1H, -OH); 8.52 (s, 1H, -CH); 7.38 (dd, *J*₁= 7.8, *J*₂= 1.4 Hz, 1H, fenyl); 7.27 (t, *J*= 7.6 Hz, 1H, fenyl); 6.94 – 6.85 (m, 2H, fenyl); 4.98 (bs, 1H, C₁-cykloheksyl); 3.07 (s, 3H, -CH₃); 1.79 (m, 4H, cykloheksyl); 1.50 (m, 3H, cykloheksyl); 1.29 (m, 2H, cykloheksyl); 1.14 (t, *J* = 15.4 Hz, 1H, cykloheksyl).

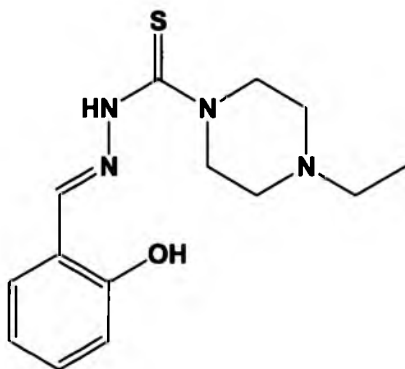
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 179.4; 157.6; 146.8; 131.2; 130.6; 119.5; 118.9; 117.0; 59.8; 32.9; 29.5; 25.7; 25.4.

HRMS-EI: 291.1401 (obliczono dla C₁₅H₂₁N₃OS: 291.1405)

Temperatura topnienia: 145-146 ° C

cLogP: 3.591

5.4.44 Otrzymywanie (*E*)-4-etylo-*N'*-(2-hydroksybenzylideno)piperazyno-1-tiokarbonydrazyny



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,11 cm³ aldehydu salicylowego oraz 0,188 g 4-etylopiperazyno-1-tiokarbonydrazyny. Mieszaninę reakcyjną umieszczono w reaktorze mikrofalowym i ogrzewano przez 30 minut. Po tym czasie mieszaninę ostudzono do temperatury 50 °C, obserwując jednocześnie wytrącanie się kremowego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemywano heksanem. Surowy produkt krystalizowano z bezwodnego metanolu uzyskując 0,251 g (*E*)-4-etylo-*N'*-(2-hydroksybenzylideno)piperazyno-1-tiokarbonydrazyny z wydajnością 86 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.60 (bs, 1H, -NH), 8.46 (s, 1H, -CH), 7.41 (dd, *J*₁ = 7.9 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz, 1H, fenyl), 7.27 (td, *J*₁ = 7.8 Hz, *J*₂ = 7.4 Hz, *J*₃ = 1.7 Hz, 1H, fenyl), 6.92-6.88 (m, 2H, fenyl), 3.92 (m, 4H, piperazyna), 2.45 (m, 4H, piperazyna), 2.35 (m, 2H, -CH₂), 1.03 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, -CH₃).

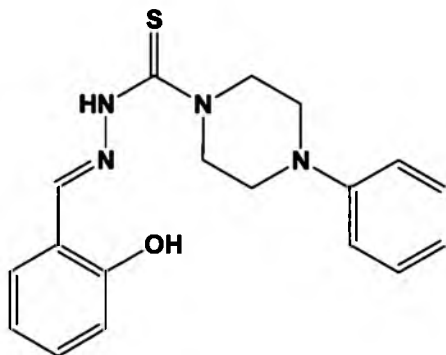
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 183.0; 159.0; 148.0; 138.0; 128.5; 121.2; 118.6; 117.5; 57.2; 44.4; 12.5.

HRMS-ESI-TOF: 293.1434 [M + H]⁺ (obliczono dla C₁₄H₂₁N₄OS: 293.1436)

Temperatura topnienia: 160-161° C

cLogP: 2.832

5.4.45 Otrzymywanie (E)-N'-(2-hydroksybenzylideno)-4-fenylopiperazyno-1-tiokarbohydrazynu²²⁸



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,11 cm³ aldehydu salicylowego oraz 0,266 g 4-fenylopiperazyno-1-tiokarbohydrazynu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w polu mikrofalowym przez 30 minut, po czym ostudzono do temperatury pokojowej i wstawiono do zamrażarki laboratoryjnej (-20 °C) na 12 godzin. Po tym czasie przesączono kremowy osad na lejku Büchnera i przemywano heksanem. Surowy produkt krystalizowano z bezwodnego acetonitrylu uzyskując 0,302 g (E)-N'-(2-hydroksybenzylideno)-4-fenylopiperazyno-1-tiokarbohydrazynu z wydajnością 89 %.

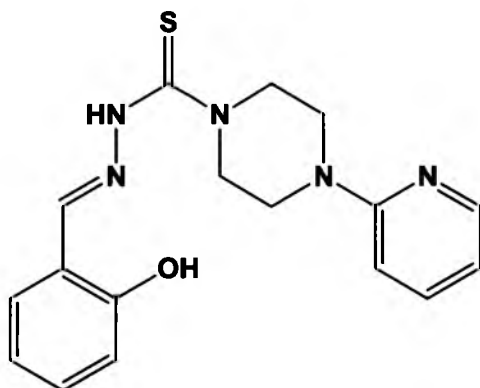
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 10.97 (bs, 1H, -NH); 10.63 (bs, 1H, -OH); 8.55 (s, 1H, -CH); 7,50 (d, *J*= 8.0 Hz, 1H, fenyl); 7.25 (m, 1H, fenyl); 7.05-6.80 (m, 7H, fenyl); 3.95 (m, 4H, piperazyna); 2.40 (m, 4H, piperazyna).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 183.2; 159.5; 150.0; 148.9; 138.3; 129.6; 127.0; 122.1; 122.0; 118.9; 117.5; 112.4; 57.2; 48.3.

Temperatura topnienia: 206-207 ° C

cLogP: 3.231

5.4.46 Otrzymywanie (*E*)-*N'*-(2-hydroksybenzylideno)-4-(2-pirydynylo)piperazyno-1-tio- karbohydrydu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,11 cm³ aldehydu salicylowego oraz 0,237 g 4-(2-pirydynylo)piperazyno-1-tiokarbohydrydu. Mieszaninę reakcyjną umieszczono w reaktorze mikrofalowym i ogrzewano przez 30 minut, po czym ostudzono do temperatury 50 °C, obserwując gwałtowne wytrącanie się beżowego osadu. Produkt przesączono na lejku Büchnera a następnie przemywano eterem dietylowym. Tak otrzymany tiosemikarbazon krystalizowano z bezwodnego metanolu otrzymując 0,3 g (*E*)-*N'*-(2-hydroksybenzylideno)-4-(2-pirydynylo)-piperazyno-1-tiokarbohydrydu z wydajnością 88%.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.56 (bs, 1H, -NH); 11.54 (bs, 1H, -OH); 8.50 (s, 1H, -CH); 8.15 (dd, *J*₁= 4.7 Hz, *J*₂= 1.4 Hz, 1H, pirydyna); 7.58 (ddd, *J*₁ = 8.9 Hz, *J*₂= 7.2 Hz, *J*₃= 1.9 Hz, 1H, pirydyna); 7.45 – 7.40 (m, 1H, fenyl); 7.32 – 7.24 (m, 2H, fenyl); 6.91 (dd, *J*₁= 7.7 Hz, *J*₂= 4.5 Hz, 1H, fenyl); 6.86 (d, *J*= 8.6 Hz, 1H, pirydyna); 6.68 (dd, *J*₁= 6.9 Hz, *J*₂= 5.0 Hz, 1H, pirydyna); 4.14 – 3.98 (m, 4H, piperazyna); 3.67 – 3.59 (m, 4H, piperazyna).

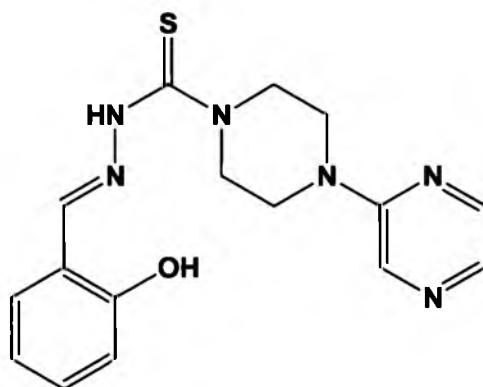
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 179.8; 158.9; 157.6; 148.0; 146.8; 138.1; 131.3; 130.4; 119.5; 119.0, 117.0, 113.7; 107.5; 48.4; 44.4.

HRMS-ESI-TOF: 342.1385 [M+H]⁺ (obliczono dla C₁₇H₂₀N₅OS: 342.1389)

Temperatura topnienia: 191-192° C

cLogP: 2.283

5.4.47 Otrzymywanie (*E*)-*N'*-(2-hydroksybenzylideno)-4-(2-pirazynylo)piperazyno-1-tiokarbohydrazynu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,11 cm³ aldehydu salicylowego oraz 0,238 g 4-(2-pirazynylo)piperazyno-1-tiokarbohydrazynu. Mieszaninę reakcyjną umieszczono w reaktorze mikrofalowym i ogrzewano przez 30 minut, po czym ostudzono do temperatury 50 °C, obserwując gwałtowne wytrącanie się kremowego osadu. Produkt przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie przemywano eterem dietylowym. Tak otrzymany tiosemikarbazon krystalizowano z bezwodnego metanolu otrzymując 0,342 g (*E*)-*N'*-(2-hydroksybenzylideno)-4-(2-pirazynylo)piperazyno-1-tiokarbohydrazynu z wydajnością 89%.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.56 (bs, 1H, -NH); 11.54 (bs, 1H, -OH); 8.51 (s, 1H, -CH); 8.35 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, pirazyna); 8.12 (s, 1H, pirazyna); 7.88 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, pirazyna); 7.43 (dd, *J*₁ = 7.8 Hz, *J*₂ = 1.7 Hz, 1H, fenyl), 7.28 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, fenyl); 6.97 – 6.82 (m, 2H, fenyl), 4.09 (m, 4H, piperazyna); 3.73 (m, 4H, piperazyna).

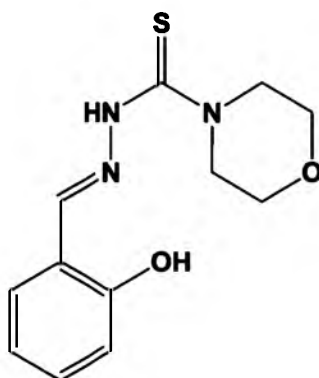
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 179.8; 157.6; 154.7; 141.9; 133.1; 131.8; 131.4; 130.4; 119.6; 119.0; 117.0; 48.1; 43.7.

HRMS-ESI-TOF: 343.1343 (obliczono dla C₁₆H₁₉N₆OS: 343.1341)

Temperatura topnienia: 189-190° C

cLogP: 1.518

5.4.48 Otrzymywanie (*E*)-*N'*-(2-hydroksybenzylideno)morfolino-4-tiokarbohidrazynu²²⁸



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,11 cm³ aldehydu salicylowego oraz 0,161 g morfolino-4-tiokarbohidrazynu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w polu mikrofalowym przez 40 minut, po czym odstawiono do zamrażarki laboratoryjnej (-20 °C) na 48 godzin. Po tym czasie odparowano rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej, otrzymując beżową żywicę, którą potraktowano 4 cm³ chlorku metylenu i ogrzano (intensywnie mieszając) do temperatury 50 °C. Do tak uzyskanego roztworu dodano 1 cm³ heksanu i umieszczono w zamrażarce laboratoryjnej na 12 godzin. Po tym czasie zaobserwowano wytrącenie się beżowego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemywano eterem dietylowym. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano bezwodnego metanolu uzyskując 0,241 g (*E*)-*N'*-(2-hydroksybenzylideno)-morfolino-4-tiokarbohidrazynu z wydajnością 91%.

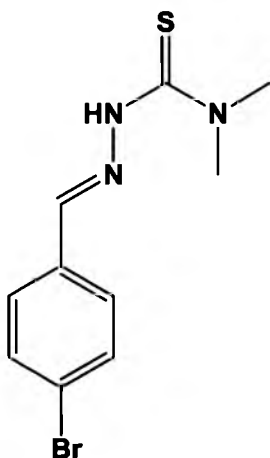
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 10.71 (bs, 1H, -NH); 10.17 (bs, 1H, -OH); 8.62 (s, 1H, -CH); 7.24 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, fenyl); 7.02 – 6.90 (m, 2H, fenyl); 6.81 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, fenyl); 4.08 (m, 4H, piperazyna); 3.28 (m, 4H, piperazyna).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 182.2; 158.4; 148.3; 138.1; 128.1; 121.2; 118.0; 117.9; 68.5; 52.6.

Temperatura topnienia: 196-197 ° C

cLogP: 1.239

5.4.49 Otrzymywanie (*E*)-2-(4-bromobenzylideno)-*N,N*-dimetylohydrazynotiokarboamidu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,185 g 4-bromobenzaldehydu oraz 0,119 g *N,N*-dimetylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 15 minut, po czym ostudzono do temperatury pokojowej i odstawiono do zamrażarki laboratoryjnej (-20 °C) na 12 godzin. Po tym czasie zaobserwowano wytrącenie się białego osadu, który przesączono i przemywano eterem dietylowym. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano z bezwodnego metanolu, otrzymując 0,174 g (*E*)-2-(4-bromobenzylideno)-*N,N*-dimetylohydrazynotiokarboamidu z wydajnością 61 %.

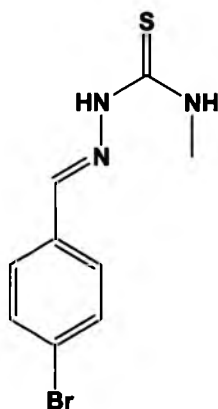
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.00 (s, 1H, -NH); 8.17 (s, 1H, -CH); 7.71–7.45 (m, 4H, fenyl); 3.29 (s, 6H, -CH₃).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 181.0, 143.0, 134.4, 132.2, 129.0, 123.1, 42.6.

Temperatura topnienia: 150–151 °C

clogP: 3.09

5.4.50 Otrzymywanie (*E*)-2-(4-bromobenzylideno)-*N*-metylohydrazynotiokarboamidu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,185 g 4-bromobenzaldehydu oraz 0,105 g *N*-metylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 15 minut, po czym ostudzono do temperatury 50 ° C obserwując wytrącanie się białego, kłaczkowatego osadu. Surowy tiosemikarbazon przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemywano eterem dietylowym. Czysty (*E*)-2-(4-bromobenzylideno)-*N*-metylohydrazynotiokarboamid otrzymano przez krystalizację produktu z absolutnego etanolu. W wyniku reakcji w polu mikrofalowym otrzymano 0,196 g aromatycznego tiosemikarbazonu z wydajnością 72 %.

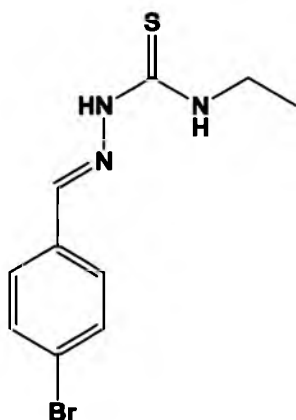
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.54 (s, 1H, -NH); 8.57 (d, *J*= 4.0 Hz, 1H, fenyl); 8.01 (s, 1H, -CH); 7.77 (d, *J*= 8.3 Hz, 2H, fenyl); 7.61 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H, fenyl); 3.02 (d, *J*= 4.4 Hz, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 178.3; 140.8; 134.1; 132.0; 129.4; 123.4; 31.2.

Temperatura topnienia: 204–205 °C

clogP: 2.734

5.4.51 Otrzymywanie (*E*)-2-(4-bromobenzylideno)-*N*-etylohydrazynotiokarboamidu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,185 g 4-bromobenzaldehydu oraz 0,119 g *N*-etylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 15 minut, po czym ostudzono do temperatury 50 °C obserwując wytrącanie się białego, drobnokrystalicznego osadu. Surowy produkt przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemywano eterem dietylowym. Czysty tiosemikarbazon otrzymano przez dwukrotną krystalizację produktu z absolutnego etanolu, otrzymując 0,223 g (*E*)-2-(4-bromobenzylideno)-*N*-etylohydrazynotiokarboamidu z wydajnością 78 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.47 (s, 1H, -NH); 8.61 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, -NH); 8.02 (s, 1H, -CH); 7.77 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, fenyl); 7.61 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, fenyl); 3.63–3.56 (m, *J* = 7.0 Hz, 2H, -CH₂); 1.15 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, -CH₃).

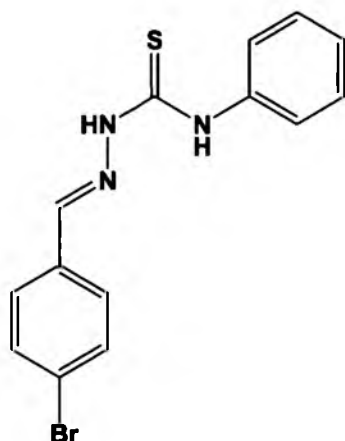
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 177.2; 140.9; 134.1; 132.0; 129.6; 123.4; 38.8; 15.0.

Temperatura topnienia: 199–200 °C

HRMS(EI): 284.9944 (obliczono dla C₁₀H₁₂BrN₃S: 284,9935)

cLogP: 3.263

5.4.52 Otrzymywanie (*E*)-2-(4-bromobenzylideno)-*N*-fenylohydrazynotiokarboamidu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,185 g 4-bromobenzaldehydu oraz 0,167 g *N*-fenylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 15 minut, po czym ostudzono do temperatury pokojowej i umieszczono w zamrażarce laboratoryjnej (-20 °C) na 12 godzin. Po tym czasie zaobserwowano wytracenie się białego, kłaczkowatego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemywano heksanem. Czysty tiosemikarbazon uzyskano poprzez dwukrotną krystalizację z bezwodnego metanolu, uzyskując 0,227 g (*E*)-2-(4-bromo-benzylideno)-*N*-fenylohydrazynotiokarboamidu z wydajnością 68%.

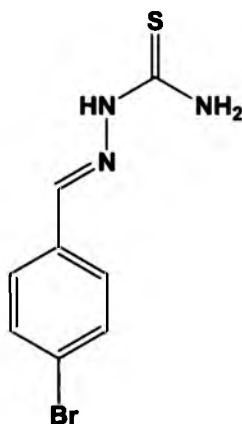
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.88 (s, 1H, -NH); 10.17 (s, 1H, -NH); 8.13 (s, 1H, -CH); 7.89 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, fenyl); 7.63 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, fenyl); 7.56 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, fenyl); 7.38 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, fenyl); 7.22 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, fenyl).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 176.6; 142.0; 139.5; 133.9; 132.1; 130.0; 128.5; 126.5; 125.9; 123.7.

Temperatura topnienia: 197–198 °C

clogP: 4.823

5.4.53 Otrzymywanie (*E*)-2-(4-bromobenzylideno)hydrazynotiokarboamidu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,185 g 4-bromobenzaldehydu oraz 0,091 g hydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 15 minut, po czym ostudzono do temperatury 50 °C obserwując wytrącanie się białego, drobnokrystalicznego osadu. Surowy produkt przesączono na lejku Büchnera i przemywano eterem dietylowym. Czysty tiosemikarbazon uzyskano poprzez krystalizację osadu z absolutnego etanolu, otrzymując ostatecznie 0,178 g (*E*)-2-(4-bromobenzylideno)hydrazynotiokarboamidu z wydajnością 69 %.

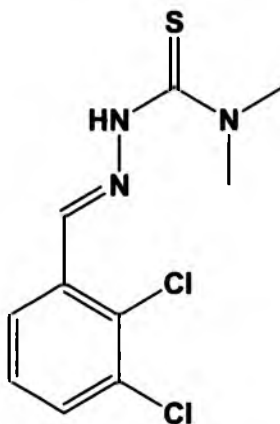
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.48 (s, 1H, -NH); 8.23 (s, 1H, -NH); 8.07 (s, 1H, -NH); 8.02 (s, 1H, -CH); 7.77 (d, *J*= 8.5 Hz, 2H, fenyl); 7.59 (d, *J*= 8.5 Hz, 2H, fenyl).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 178.6, 141.4, 134.0, 132.1, 129.6, 123.5.

Temperatura topnienia: 222 °C

clogP: 2.952

5.4.54 Otrzymywanie (*E*)-2-(2,3-dichlorobenzylideno)-*N,N*-dimetylohydrazyno-tiokarboamidu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,175 g aldehydu 2,3-dichlorobenzoesowego oraz 0,119 g *N,N*-dimetylo-hydrazyno-tiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną umieszczono w reaktorze mikrofalowym i ogrzewano przez 15 minut, po czym ochłodzono do temperatury pokojowej i umieszczono w zamrażarce laboratoryjnej (-20 °C) na 12 godzin. Po tym czasie odparowano rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej otrzymując żółty, lepki olej. Analiza widma ¹H-NMR wskazała zanieczyszczenie produktu tiosemikarbazydem, stąd w celu uzyskania czystego produktu dodano do oleju 5 cm³ mieszaniny CH₂Cl₂ : Et₂O (4 :1, v/v) i odstawiono do obniżonej temperatury na 12 godzin. Po tym czasie zaobserwowano wytrącenie się kremowego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano dwukrotnie z bezwodnego metanolu, uzyskując 0,19 g (*E*)-2-(2,3-dichlorobenzylideno)-*N,N*-dimetylohydrazynotiokarboamidu z wydajnością 69%.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.27 (s, 1H, -NH); 8.64 (s, 1H, -CH), 7.92 (dd, *J*₁= 7.9 Hz, *J*₂= 1.4 Hz, 1H, fenyl); 7.66 (dd, *J*₁= 7.9 Hz, *J*₂= 1.5 Hz, 1H, fenyl); 7,42 (t, *J*= 8.0 Hz, 1H, fenyl), 3.31 (s, 6H, -CH₃).

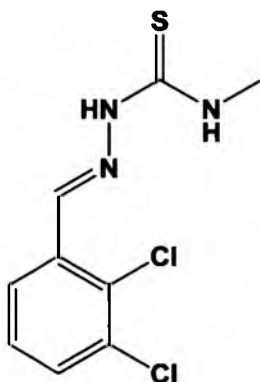
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 180.8; 140.0; 134.7; 132.7; 131.5; 131.0; 128.8; 125.7; 42.4.

Temperatura topnienia: 145–146 °C

HRMS (EI): 275.0047 (obliczono dla C₁₀H₁₁Cl₂N₃S: 275.0051)

clogP: 3.53

5.4.55 Otrzymywanie (*E*)-2-(2,3-dichlorobenzylideno)-*N*-metylohydrazynotiokarboamidu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,175 g aldehydu 2,3-dichlorobenzoesowego oraz 0,105 g *N*-metylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną umieszczono w reaktorze mikrofalowym i ogrzewano przez 15 minut, po czym ochłodzono do temperatury pokojowej i umieszczono w zamrażarce laboratoryjnej (-20 °C) na 12 godzin. Po tym czasie zaobserwowano wytrącenie się żółtego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemywano heksanem. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano dwukrotnie z bezwodnego metanolu, otrzymując 0,194 g (*E*)-2-(2,3-dichlorobenzylideno)-*N*-metylohydrazynotiokarboamidu z wydajnością 74 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.76 (s, 1H, -NH); 8.68 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, -NH); 8.49 (s, 1H, -CH); 8.29 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, fenyl); 7.67 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, fenyl); 7.41 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, fenyl); 3.02 (d, *J* = 4.5 Hz, 3H, -CH₃).

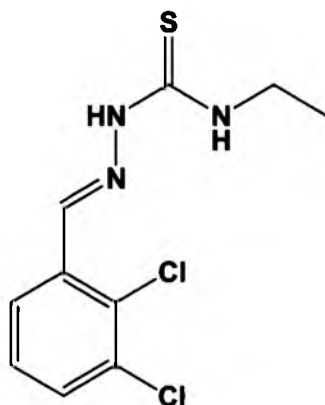
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 178.5; 137.7; 134.5; 132.5; 131.4; 131.3; 128.4; 126.2; 31.4.

Temperatura topnienia: 223–224 °C

HRMS-EI: 260.9891 (obliczono dla C₉H₉Cl₂N₃S: 260.9894)

clogP: 3.177

5.4.56 Otrzymywanie (*E*)-2-(2,3-dichlorobenzylideno)-*N*-etylohydrazynotiokarboamidu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,175 g aldehydu 2,3-dichlorobenzoesowego oraz 0,119 g *N*-etylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną umieszczono w reaktorze mikrofalowym i ogrzewano przez 15 minut, po czym ochłodzono do temperatury pokojowej i umieszczono w zamrażarce laboratoryjnej (-20 °C) na 12 godzin. Po tym czasie zaobserwowano wytrącenie się kremowego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemywano eterem dietylowym. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano trzykrotnie z absolutnego etanolu, otrzymując 0,185 g (*E*)-2-(2,3-dichlorobenzylideno)-*N*-etylohydrazynotiokarboamidu z wydajnością 67 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.70 (s, 1H, -NH); 8.70 (m, 1H, -NH); 8.49 (s, 1H, -CH); 8.31 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, fenyl); 7.67(d, *J* = 7.9 Hz, 1H, fenyl); 7.41 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, fenyl); 3.70–3.52 (m, 2H, -CH₂); 1.16 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, -CH₃).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 177.4; 137.6; 134.4; 132.5; 131.5; 131.3; 128.5; 126.0; 38.9; 14.7.

Temperatura topnienia: 213–214 °C

HRMS (EI): 275.0054 (obliczono dla C₁₀H₁₁Cl₂N₃S: 275.0051)

clogP: 3.706

5.4.57 Otrzymywanie (*E*)-2-(2,3-dichlorobenzylideno)-*N*-fenylohydrazynotiokarboamidu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,175 g aldehydu 2,3-dichlorobenzoesowego oraz 0,167 g *N*-fenylohydrazynotiokarbonylamidu . Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 15 minut, po czym ostudzono do temperatury 50 °C obserwując wytrącanie się białego, drobnokrystalicznego osadu. Surowy produkt przesączono na lejku Büchnera i przemywano eterem dietylowym. Czysty tiosemikarbazon uzyskano poprzez krystalizację osadu z absolutnego etanolu, otrzymując ostatecznie 0,256 g (*E*)-2-(2,3-dichlorobenzylideno)-*N*-fenylohydrazynotiokarbonylamidu z wydajnością 79 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 12.08 (bs, 1H, -NH); 10.26 (s, 1H, -NH); 8.62 (s, 1H, -CH); 8.47 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, fenyl); 7.68 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, fenyl); 7.55 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, fenyl); 7.43–7.37 (m, 3H, fenyl); 7.23 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, fenyl).

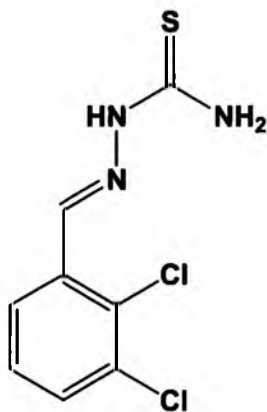
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 176.9; 139.5; 138.9; 134.3; 132.6; 131.8; 131.5; 128.6; 126.8; 126.6; 126.0.

Temperatura topnienia: 203–204 °C

HRMS (EI): 323.0066 (obliczono dla C₁₄H₁₁Cl₂N₃S: 323.0051)

clogP: 5.266

5.4.58 Otrzymywanie (*E*)-2-(2,3-dichlorobenzylideno)hydrazynotiokarboamidu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,175 g aldehydu 2,3-dichlorobenzoesowego oraz 0,091 g hydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 15 minut, po czym ostudzono do temperatury pokojowej i odstawiono do zamrażarki laboratoryjnej (-20 °C) na 24 godziny. Po tym czasie odparowano rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej, uzyskując w rezultacie szklisty olej. Do pozostałości po odparowaniu dodano 5 cm³ acetonitrylu i ogrzano do temperatury 50 °C, po czym ostudzono to temperatury pokojowej i dodano 1 cm³ heksanu. Tak otrzymany roztwór umieszczono w zamrażarce laboratoryjnej (-20 °C) na 12 godzin. Po tym czasie zaobserwowano wytrącanie się białego, puszystego osadu który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Czysty tiosemikarbazon uzyskano poprzez krystalizację surowego produktu z bezwodnego metanolu. W wyniku reakcji w polu mikrofalowym uzyskano 0,193 g (*E*)-2-(2,3-dichlorobenzylideno)hydrazynotiokarboamidu z wydajnością 78 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.69 (bs, 1H, -NH); 8.49 (s, 1H, -CH); 8.36 (s, 1H, -NH); 8.30 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, fenyl); 8.18 (bs, 1H, -NH); 7.66 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, fenyl); 7.38 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, fenyl).

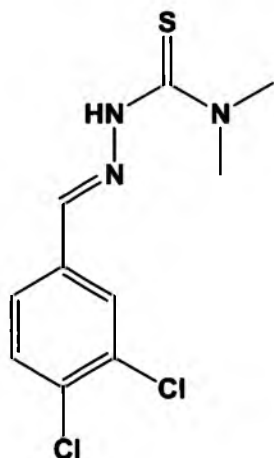
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 178.8; 138.2; 134.2; 132.6; 131.6; 131.2; 128.5; 126.5;

Temperatura topnienia: 226–227 °C

HRMS (EI): 246.9745 (obliczono dla C₈H₇Cl₂N₃S: 246.9738).

clogP: 3.473

5.4.59 Otrzymywanie (E)-2-(3,4-dichlorobenzylideno)-N,N-dimetylohydrazynotio-
karboamidu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,175 g aldehydu 3,4-dichlorobenzoesowego oraz 0,119 g *N,N*-dimetylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną umieszczono w reaktorze mikrofalowym i ogrzewano przez 15 minut, po czym ochłodzono do temperatury pokojowej i umieszczono w zamrażarce laboratoryjnej (-20 °C) na 12 godzin. Po tym czasie zaobserwowano wytrącenie się żółtego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano dwukrotnie z bezwodnego metanolu, uzyskując 0,218 g (E)-2-(3,4-dichloro-benzylideno)-*N,N*-dimetylohydrazynotiokarboamidu z wydajnością 79%.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.12 (s, 1H, -NH), 8.17 (s, 1H, -CH), 7.86 (d, *J*= 1.7 Hz, 1H, fenyl), 7.70–7.63 (m, 1H, fenyl), 3.30 (s, 6H, -CH₃).

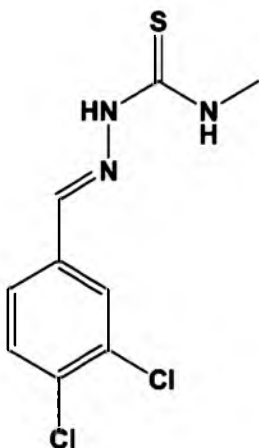
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 181.0; 141.5; 136.0; 132.1; 132.0; 131.5; 128.4; 127.0; 42.5.

Temperatura topnienia: 138–139 °C

HRMS (EI): 275.0048 (obliczono dla C₁₀H₁₁Cl₂N₃S: 275.0051)

clogP: 3.533

5.4.60 Otrzymywanie (*E*)-2-(3,4-dichlorobenzylideno)-*N*-metylohydrazynotiokarboamidu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,175 g aldehydu 3,4-dichlorobenzoesowego oraz 0,105 g *N*-metylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną umieszczono w reaktorze mikrofalowym i ogrzewano przez 15 minut, po czym ochłodzono do temperatury pokojowej i umieszczono w zamrażarce laboratoryjnej (-20 °C) na 12 godzin. Po tym czasie zaobserwowano wytrącenie się białego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemywano eterem dietylowym. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano dwukrotnie z bezwodnego metanolu, otrzymując 0,233 g (*E*)-2-(3,4-dichlorobenzylideno)-*N*-metylohydrazynotiokarboamidu z wydajnością 89 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.63 (s, 1H, -NH); 8.68 (d, *J*= 3.8 Hz, 1H, -NH), 8.20 (s, 1H, -CH); 8.00 (s, 1H, fenyl); 7.69 (dd, *J*₁= 23.9 Hz, *J*₂= 8.3 Hz, 2H, fenyl); 3.03 (d, *J*= 4.3 Hz, 3H, -CH₃).

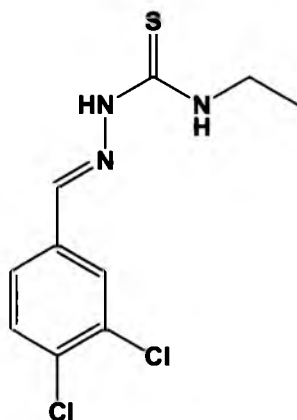
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 178.4; 139.4; 135.7; 132.2; 132.2; 131.2; 128.5; 128.1; 31.62.

Temperatura topnienia: 202–203 °C.

HRMS (EI): 260.9902 (obliczono dla C₉H₉Cl₂N₃S: 260.9894).

clogP: 3.177

5.4.61 Otrzymywanie (*E*)-2-(3,4-dichlorobenzylideno)-*N*-etylohydrazynotiokarboamidu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,175 g aldehydu 3,4-dichlorobenzoesowego oraz 0,119 g *N*-etylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną umieszczono w reaktorze mikrofalowym i ogrzewano przez 15 minut, po czym ochłodzono do temperatury pokojowej i umieszczono w zamrażarce laboratoryjnej (-20 °C) na 12 godzin. Po tym czasie zaobserwowano wytrącenie się kremowego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemywano eterem dietylowym. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano trzykrotnie z absolutnego etanolu, otrzymując 0,229 g (*E*)-2-(3,4-dichlorobenzylideno)-*N*-etylohydrazynotiokarboamidu z wydajnością 83 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.56 (s, 1H, -NH); 8.73 (t, *J*= 5.7 Hz, 1H, -NH); 8.19 (d, *J*= 1.7 Hz, 1H, fenyl); 8.00 (s, 1H, -CH); 7.78–7.70 (m, 1H, fenyl); 7.67 (d, *J*= 8.3 Hz, 1H); 3.61 (m, 2H, -CH₂); 1.16 (t, *J*= 7.1 Hz, 3H, -CH₃).

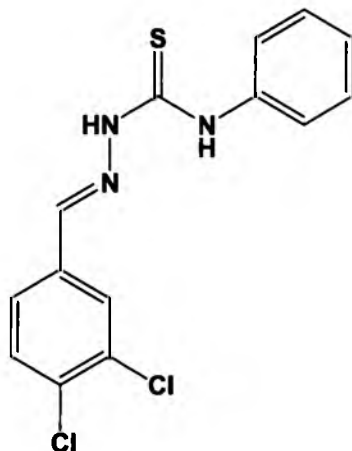
¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 177.3; 139.5; 135.6; 132.2; 132.2; 131.3; 128.6; 128.1; 38.8; 15.0.

MP: 177–178 °C

HRMS (EI): 275.0058 (obliczono dla C₁₀H₁₁Cl₂N₃S: 275.0051)

clogP: 3.706

5.4.62 Otrzymywanie (*E*)-2-(3,4-dichlorobenzylideno)-*N*-fenylohydrazynotiokarboamidu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,175 g aldehydu 3,4-dichlorobenzoesowego oraz 0,167 g *N*-fenylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 15 minut, po czym ostudzono do temperatury 50 °C obserwując wytrącanie się białego, kłaczkowatego osadu. Surowy produkt przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemywano eterem dietylowym. Czysty tiosemikarbazon uzyskano poprzez krystalizację osadu z bezwodnego acetonitrylu, otrzymując ostatecznie 0,279 g (*E*)-2-(3,4-dichlorobenzylideno)-*N*-fenylohydrazynotiokarboamidu z wydajnością 86 %.

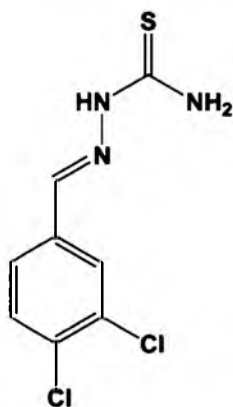
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.96 (s, 1H, -NH); 10.27 (s, 1H, -NH); 8.35 (s, 1H, -CH); 8.12 (s, 1H, fenyl); 7.82 (dd, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 1.7 Hz, 1H, fenyl); 7.68 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, fenyl); 7.53 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, fenyl); 7.39 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, fenyl); 7.24 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, fenyl).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 176.9; 140.6; 139.5; 135.4; 132.5; 132.3; 131.2; 128.9; 128.6; 126.9; 126.1.

Temperatura topnienia: 200–201 °C [28].

clogP: 5.266

5.4.63 Otrzymywanie (*E*)-2-(3,4-dichlorobenzylideno)hydrazynotiokarboamidu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,175 g aldehydu 3,4-dichlorobenzoesowego oraz 0,091 g hydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w reaktorze mikrofalowym przez 15 minut, po czym ostudzono do temperatury pokojowej i odstawiono do zamrażarki laboratoryjnej (-20° C) na 24 godziny. Po tym czasie zaobserwowano wytrącenie się białego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemywano heksanem. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano dwukrotnie z bezwodnego metanolu otrzymując w rezultacie 0,211 g (*E*)-2-(3,4-dichlorobenzylideno)hydrazynotiokarboamidu z wydajnością 85 %.

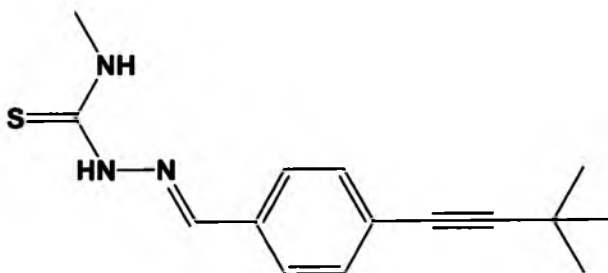
¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.56 (s, 1H, -NH); 8.28 (s, 1H, -NH); 8.24 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, fenyl); 8.00 (s, 1H, -CH); 7.72 (dd, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 1.8 Hz, 1H, fenyl); 7.64 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, fenyl).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 178.7; 139.9; 135.6; 132.3; 132.3; 131.2; 128.7; 128.2.

Temperatura topnienia: 205–206 °C

clogP: 3.473

5.4.64 Otrzymanie (*E*)-2-(4-(3,3-dimetylo-1-butyń-1-ylo)benzylideno)-*N*-metylohydrazynotiokarboamidu



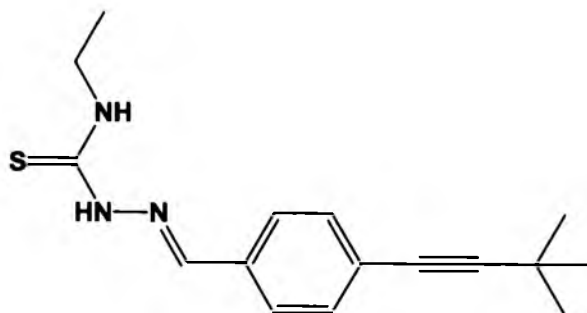
Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,186 g 4-(3,3-dimetylo-1-butyń-1-ylo)benzaldehydu oraz 0,105 g *N*-metylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną umieszczono w reaktorze mikrofalowym i ogrzewano przez 15 minut, po czym ostudzono do temperatury pokojowej i umieszczono w zamrażarce laboratoryjnej (-20 °C) na 12 godzin. Po tym czasie zaobserwowano wytrącenie się żółtego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Próby krystalizacji z metanolu prowadziły do otrzymywania kremowej żywicy. Ostatecznie w wyniku reakcji w polu mikrofalowym uzyskano 0,153 g (*E*)-2-(4-(3,3-dimetylo-1-butyń-1-ylo)benzylideno)-*N*-metylohydrazynotiokarboamidu z wydajnością 56 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.51 (bs, 1H, -NH); 8.55 (m, 1H, -NH); 8.03 (s, 1H, -CH); 7.76 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, fenyl); 7.38 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, fenyl); 3.02 (d, *J* = 4.4 Hz, 3H, -CH₃); 1.30 (s, 9H, -CH₃).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 178.1; 141.3; 134.1; 131.9; 127.7; 124.6; 100.8; 79.3; 31.3; 31.1; 28.1.

clogP: 3.997

5.4.65 Otrzymywanie (E)-2-(4-(3,3-dimetylo-1-butyń-1-ylo)benzylideno)-N-etylohydrazynotiokarboamidu



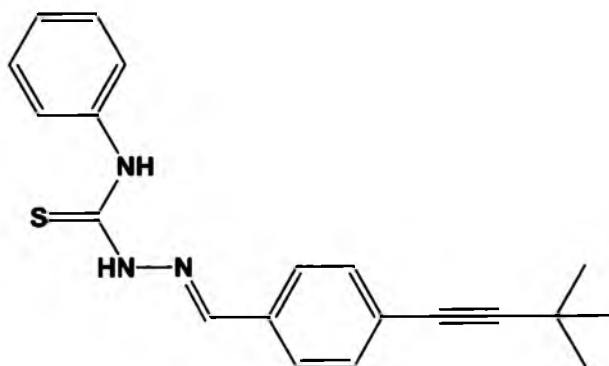
Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,186 g 4-(3,3-dimetylo-1-butyń-1-ylo)benzaldehydu oraz 0,119 g N-etylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną umieszczono w reaktorze mikrofalowym i ogrzewano przez 15 minut po czym ostudzono do temperatury pokojowej i umieszczono w obniżonej temperaturze (-20 °C) przez 24 godziny. Po tym czasie zaobserwowano wytrącenie się kremowego osadu, który przesączono na lejku Büchnera i przemyto heksanem. Podjęto próby krystalizacji tiosemikarbazonu z absolutnego etanolu, zakończone uzyskaniem kremowej żywicy. Finalnie otrzymano 0,187 g (E)-2-(4-(3,3-dimetylo-1-butyń-1-ylo)benzylideno)-N-etylohydrazynotiokarboamidu z wydajnością 65 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.44 (bs, 1H, -NH); 8.59 (bs, 1H, -NH); 8.03 (s, 1H, -CH); 7.76 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, fenyl); 7.38 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, fenyl); 3.67 – 3.51 (m, 2H, -CH₂); 1.30 (s, 9H, -CH₃), 1.15 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, -CH₃).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 179.0; 141.4; 134.2; 131.9; 128.0; 124.5; 100.1; 79.5; 31.2; 31.1; 27.6; 14.0.

clogP: 4.526

5.4.66 Otrzymywanie (E)-2-(4-(3,3-dimetylo-1-butyń-1-ylo)benzylideno)-N-fenylohydrazynotiokarboamidu



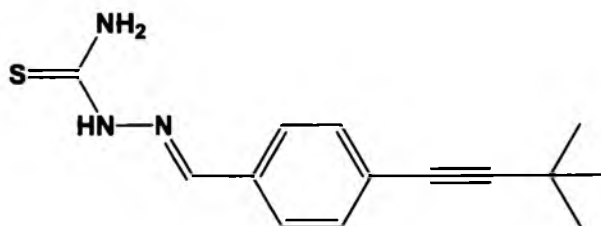
Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,186 g 4-(3,3-dimetylo-1-butyń-1-ylo)benzaldehydu oraz 0,167g N-fenylohydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną umieszczono w polu mikrofalowym i ogrzewano w czasie 15 minut, po czym ochłodzono do temperatury 50 °C i obserwowano wytrącanie się kremowego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemywano eterem dietylowym. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano dwukrotnie z bezwodnego acetonitrylu, otrzymując w rezultacie 0,167 g kremowej żywicy (E)-2-(4-(3,3-dimetylo-1-butyń-1-ylo)benzylideno)-N-fenylohydrazynotiokarboamidu z wydajnością 50 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.84 (s, 1H, -NH); 10.16 (s, 1H, -NH); 8.14 (s, 1H, -CH); 7.88 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, fenyl); 7.55 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, fenyl); 7.38 (t, *J* = 8.0 Hz, 4H, fenyl); 7.22 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, fenyl); 1.31 (s, 9H, -CH₃).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 179.2; 163.5; 146.2; 141.6; 134.3; 133.5; 132.0; 131.4; 127.3; 125.4; 124.8 124.0; 100.4; 79.9; 30.1; 27.9.

clogP: 6.086

5.4.67 Otrzymywanie (*E*)-2-(4-(3,3-dimetylo-1-butyń-1-ylo)benzylideno)hydrazynotio- karboamidu



Związek otrzymano wg ogólnej procedury opisanej w punkcie 5.4, używając do reakcji 0,186 g 4-(3,3-dimetylo-1-butyń-1-ylo)benzaldehydu oraz 0,091 g hydrazynotiokarboamidu. Mieszaninę reakcyjną umieszczono w polu mikrofalowym i ogrzewano w czasie 15 minut, po czym ochłodzono do temperatury pokojowej i umieszczono w zamrażarce laboratoryjnej na 24 godziny. Po tym czasie zaobserwowano wytrącenie się kremowego osadu, który przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem i przemyto eterem dietylowym. Surowy tiosemikarbazon krystalizowano dwukrotnie z bezwodnego metanolu uzyskując 0,173 g kremowej żywicy (*E*)-2-(4-(3,3-dimetylo-1-butyń-1-ylo)benzylideno)hydrazynotiokarboamidu z wydajnością 67 %.

¹H-NMR (*d*₆-DMSO, 400 MHz, ppm): 11.44 (s, 1H, -NH); 8.21 (s, 1H, -NH); 8.03 (s, -NH, 1H); 8.01 (s, 1H, -CH); 7.75 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, fenyl), 7.34 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, fenyl), 1.28 (s, 9H, -CH₃).

¹³C-NMR (*d*₆-DMSO, 100 MHz, ppm): 178.2; 164.5; 147.2; 141.6; 133.8; 131.6; 127.5; 124.5; 100.6; 79.1; 30.9; 27.9.

Temperatura topnienia:

clogP: 3.991

5.5. PUŁAPKOWANIE SPINOWE

5.5.1 Oczyszczanie *N*-tlenku 5,5-dimetylo-1-piroliny (DMPO)

Do oczyszczania DMPO używano wody demineralizowanej, dodatkowo oczyszczanej poprzez mieszanie z czynnikiem chelatującym kationy metali- Chelex100. Pierwszym etapem oczyszczania było przygotowanie roztworu DMPO w wodzie demineralizowanej, poprzez dodanie 1 cm³ DMPO do 4 cm³ wody. Tak przygotowany roztwór rozdzielono do 5 probówek Eppendorfa o objętości 2 cm³. Następnie dodawano do wszystkich frakcji po 1 cm³ toluenu i wytrząsano 5 probówek na wytrząsarce „Vortex” przez 20 minut. Po tym czasie odwirowano próbki (1 minuta, 14000 obr/min) i odciągnięto pipetą warstwę toluenową, zachowując warstwę wodną do kolejnych etapów puryfikacji. Następnym krokiem w procesie oczyszczania DMPO było przedmuchiwanie próbek azotem przez 5 minut i umieszczenie w obniżonej temperaturze (0 ° C) przez 1 godzinę. W tym czasie do 5 oddzielnych probówek Eppendorfa (objętość 2 cm³) dodano 0,3 cm³ węgla aktywnego oraz 1,5 cm³ wody demineralizowanej. Próbki wytrząsano na wytrząsarce „Vortex” (20 minut) i odwirowano przez 5 minut (14000 obr/min). Następnie odciągnięto warstwę wodną i dodano wcześniej oczyszczone warstwy wodne DMPO wytrząsając na wytrząsarce „Vortex” przez 15 minut a następnie odwirowano przez 5 minut (14000 obr/min). Pobrano wodne roztwory DMPO poprzez strzykawkę a następnie przepuszczono przez filtr membranowy. Zmierzono absorbancję DMPO (współczynnik ekstynkcji DMPO, $\epsilon = 8000 \text{ dm}^3/\text{mol}\cdot\text{cm}$) w celu porównania stężenia początkowego i końcowego pułapki spinowej. Wodny roztwór pułapki spinowej przeniesiono do Eppendorfek o objętości 0,5 cm³, owinięto parafilmem i przechowywano w temperaturze -20 ° C.

5.5.2 Synteza kompleksu tiosemikarbazonowego z żelazem (III)

W kolbie okrągłodennej o pojemności 25 cm³ zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne oraz chłodnicę zwrotną umieszczono 0,26 g (1 mmol) *N*-etylo-2-[(8-hydroksychinolin-2-yl)metylene]hydrazynotiokarboamidu oraz 0,28 cm³ (2 mmol) trietyloaminy. Następnie dodano 0,541 g (2mmol) sześciowodnego chlorku żelaza(III) oraz 12 cm³ etanolu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano przez 30 minut w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, a następnie pozostawiono tak otrzymany produkt

w temperaturze 0 °C na 2 godziny. Po tym czasie zaobserwowano strącenie się czarnego osadu, który krystalizowano z metanolu. Wydajność reakcji wynosiła 36 %.

LR-MS(ESI): 576,11 [Fe(L)₂]⁺

5.5.3 Pułapkowanie spinowe kompleksu żelaza (III) z ligandem tiosemikarbazonowym

Do pomiarów używano jako pułapki spinowej DMPO, przygotowanej wg procedury opisanej w podpunkcie 2.1. Pomiaru były wykonywane w płaskiej kuwecie kwarcowej o drodze optycznej 0,3 mm zaś całkowita objętość układu wynosiła 200 µl. Przed pomiarem mierzono widmo samej pułapki spinowej w celu określenia i dobrania centrum pola (wartość około 340 mT). Pozostałe parametry pomiarowe wynosiły: częstotliwość mikrofal 9,57 GHz; moc mikrofal 1mW; pasmo przemiatania 0,3 mT; czas przemiatania 10s; wzmocnienie sygnału 20000.

W przypadku pułapkowania spinowego w roztworze metanolowym (50 % CH₃OH), skład mieszaniny reakcyjnej układu Fentonowskiego wynosił: 100 µl CH₃OH; 6,9 µl DMPO (50 mmol); 2 µl H₂O₂ (100 mmol); 20 µl Fe(L)₂Cl (1mmol); 40 µl kwasu askorbinowego (4 mmol) oraz 31,1 µl wody po Chelexie100, przy czym jako ostatni składnik dodawano kwas askorbinowy. Jako początek pomiaru traktowano moment dodania kwasu askorbinowego.

W przypadku użycia jako rozpuszczalnika niejonowego surfaktantu Tritonu X100, używano odpowiednio 2 µl Tritonu X 100 (1% surfaktantu w mieszaninie reakcyjnej) lub też 0,4 µl (0,2 % surfaktantu w mieszaninie reakcyjnej). Ilość wody po chelexie 100 obliczono proporcjonalnie, tak by całkowita objętość układu nie przekraczała 200µl.

5.6 Pomiaru kompleksowania żelaza wybranymi tiosemikarbazonami. Krzywe izozbestyczne

Pomiarów dokonywano na płytce 96 dołkowej (NunC, New York, USA) przy użyciu czytnika płytek Synergy (Biotek, Winooski, VT, USA) stosując do pomiarów zakres długości fali od 300 do 700 nm i rozdzielczość pomiaru 5 nm. Na wstępie przygotowano odważki liganda (0,01 mmol) oraz chlorku żelaza (FeCl₃·6H₂O; 0,01 mmol) rozpuszczając je w 1 cm³ odpowiedniego rozpuszczalnika (ligandy rozpuszczano w DMSO, zaś chlorek żelaza w wodzie destylowanej) i otrzymując roztwory początkowe o stężeniu 10⁻² M. Następnie przygotowano rozcieńczenia odpowiedniego liganda tak

aby uzyskać roztwory o stężeniu 10^{-3} M, 10^{-4} M, $5 \cdot 10^{-4}$ M oraz 10^{-5} M, które przeniesiono do odpowiednich dołków na płytce. Ostatnim krokiem było przygotowanie rozcieńczeń chlorku żelaza oraz dodane go do odpowiedniego dołka płytki (całkowita objętość dołka płytki nie mogła być większa od $0,2 \text{ cm}^3$), tak aby stosunek ligand : metal w przygotowanych roztworach kompleksów znajdował się w zakresie 1 : 1; 2 : 1; 4 : 1; 5 : 1 oraz 10 : 1. Dane z czytnika analizowano za pomocą programu Excel, przygotowując odpowiednie krzywe izobestyczne kompleksowania odpowiednich ligandów.

6. LITERATURA

- (1) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html> (30.09.2013).
- (2) Didkowska, J. *Podstawy onkologii klinicznej*; Meder, J., Ed.; Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego: Warszawa, 2011.
- (3) Zatoński W., D. J. W. U. *Nowotwory złośliwe w Polsce w 2007 roku*; Centrum Onkologii – Instytut: Warszawa, 2009.
- (4) Wang, F.; Travins, J.; Delabarre, B.; Penard-Lacronique, V.; Schalm, S.; Hansen, E.; Straley, K.; Kernytsky, A.; Liu, W.; Gliser, C.; Yang, H.; Gross, S.; Artin, E.; Saada, V.; Mylonas, E.; Qivoron, C.; Popovici-Muller, J.; Saunders, J. O.; Salituro, F. G.; Yan, S.; Murray, S.; Wei, W.; Gao, Y.; Dang, L.; Dorsch, M.; Agresta, S.; Schenkein, D. P.; Biller, S. A.; Su, S. M.; de Botton, S.; Yen, K. E. Targeted Inhibition of Mutant IDH2 in Leukemia Cells Induces Cellular Differentiation. *Science (New York, N.Y.)* **2013**.
- (5) Burgess, D. J. Anticancer drugs: Assault on MALT1. *Nature reviews. Drug discovery* **2013**, *12*, 100.
- (6) Ferrer, M.; Golyshina, O. V; Beloqui, A.; Golyshin, P. N.; Timmis, K. N. The cellular machinery of *Ferroplasma acidiphilum* is iron-protein-dominated. *Nature* **2007**, *445*, 91–4.
- (7) Toyokuni, S. Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation. *Free radical biology & medicine* **1996**, *20*, 553–66.
- (8) Cook, J. D.; Marsaglia, G.; Eschbach, J. W.; Funk, D. D.; Finch, C. A. Ferrokinetics: a biologic model for plasma iron exchange in man. *The Journal of clinical investigation* **1970**, *49*, 197–205.
- (9) Conrad, M. E.; Umbreit, J. N. Pathways of iron absorption. *Blood cells, molecules & diseases* **29**, 336–55.
- (10) Napier, I.; Ponka, P.; Richardson, D. R. Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease. *Blood* **2005**, *105*, 1867–74.
- (11) McKie, A. T.; Barrow, D.; Latunde-Dada, G. O.; Rolfs, A.; Sager, G.; Mudaly, E.; Mudaly, M.; Richardson, C.; Barlow, D.; Bomford, A.; Peters, T. J.; Raja, K. B.; Shirali, S.; Hediger, M. A.; Farzaneh, F.; Simpson, R. J. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science (New York, N.Y.)* **2001**, *291*, 1755–9.
- (12) Aisen, P.; Listowsky, I. Iron transport and storage proteins. *Annual review of biochemistry* **1980**, *49*, 357–93.

- (13) Andrews, N. C. Disorders of iron metabolism. *The New England journal of medicine* **1999**, *341*, 1986–95.
- (14) Daniels, T. R.; Bernabeu, E.; Rodríguez, J. A.; Patel, S.; Kozman, M.; Chiappetta, D. A.; Holler, E.; Ljubimova, J. Y.; Helguera, G.; Penichet, M. L. The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochimica et biophysica acta* **2012**, *1820*, 291–317.
- (15) Cheng, Y.; Zak, O.; Aisen, P.; Harrison, S. C.; Walz, T. Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell* **2004**, *116*, 565–76.
- (16) Jacobs, A. Low molecular weight intracellular iron transport compounds. *Blood* **1977**, *50*, 433–9.
- (17) Drysdale, J. W. Human ferritin gene expression. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **1988**, *35*, 127–72.
- (18) Munro, H. N.; Linder, M. C. Ferritin: structure, biosynthesis, and role in iron metabolism. *Physiological reviews* **1978**, *58*, 317–96.
- (19) Funk, F.; Lenders, J. P.; Crichton, R. R.; Schneider, W. Reductive mobilisation of ferritin iron. *European journal of biochemistry / FEBS* **1985**, *152*, 167–72.
- (20) Kidane, T. Z.; Sauble, E.; Linder, M. C. Release of iron from ferritin requires lysosomal activity. *American journal of physiology. Cell physiology* **2006**, *291*, C445–55.
- (21) Richardson, D. R.; Ponka, P. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochimica et biophysica acta* **1997**, *1331*, 1–40.
- (22) Sutherland, R.; Delia, D.; Schneider, C.; Newman, R.; Kemshead, J.; Greaves, M. Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells is proliferation-associated receptor for transferrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1981**, *78*, 4515–9.
- (23) Larrick, J. W.; Cresswell, P. Modulation of cell surface iron transferrin receptors by cellular density and state of activation. *Journal of supramolecular structure* **1979**, *11*, 579–86.
- (24) Trowbridge, I. S.; Lopez, F. Monoclonal antibody to transferrin receptor blocks transferrin binding and inhibits human tumor cell growth in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1982**, *79*, 1175–9.
- (25) Brookes, M. J.; Hughes, S.; Turner, F. E.; Reynolds, G.; Sharma, N.; Ismail, T.; Berx, G.; McKie, A. T.; Hotchin, N.; Anderson, G. J.; Iqbal, T.; Tselepis, C.

Modulation of iron transport proteins in human colorectal carcinogenesis. *Gut* **2006**, *55*, 1449–60.

- (26) Levy, J. E.; Jin, O.; Fujiwara, Y.; Kuo, F.; Andrews, N. C. Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nature genetics* **1999**, *21*, 396–9.
- (27) Kawabata, H.; Yang, R.; Hiramata, T.; Vuong, P. T.; Kawano, S.; Gombart, A. F.; Koeffler, H. P. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *The Journal of biological chemistry* **1999**, *274*, 20826–32.
- (28) Kawabata, H.; Germain, R. S.; Vuong, P. T.; Nakamaki, T.; Said, J. W.; Koeffler, H. P. Transferrin receptor 2- α supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and in vivo. *The Journal of biological chemistry* **2000**, *275*, 16618–25.
- (29) Kew, M. C.; Torrance, J. D.; Derman, D.; Simon, M.; Macnab, G. M.; Charlton, R. W.; Bothwell, T. H. Serum and tumour ferritins in primary liver cancer. *Gut* **1978**, *19*, 294–9.
- (30) Hann, H. W.; Levy, H. M.; Evans, A. E. Serum ferritin as a guide to therapy in neuroblastoma. *Cancer research* **1980**, *40*, 1411–3.
- (31) Shao, J.; Zhou, B.; Chu, B.; Yen, Y. Ribonucleotide reductase inhibitors and future drug design. *Current cancer drug targets* **2006**, *6*, 409–31.
- (32) Kolberg, M.; Strand, K. R.; Graff, P.; Andersson, K. K. Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochimica et biophysica acta* **2004**, *1699*, 1–34.
- (33) Thelander, L.; Gräslund, A.; Thelander, M. Continual presence of oxygen and iron required for mammalian ribonucleotide reduction: possible regulation mechanism. *Biochemical and biophysical research communications* **1983**, *110*, 859–65.
- (34) Dayani, P. N.; Bishop, M. C.; Black, K.; Zeltzer, P. M. Desferoxamine (DFO)--mediated iron chelation: rationale for a novel approach to therapy for brain cancer. *Journal of neuro-oncology* **2004**, *67*, 367–77.
- (35) Nordlund, P.; Reichard, P. Ribonucleotide reductases. *Annual review of biochemistry* **2006**, *75*, 681–706.
- (36) Offenbacher, A. R.; Minnihan, E. C.; Stubbe, J.; Barry, B. A. Redox-Linked Changes to the Hydrogen-Bonding Network of Ribonucleotide Reductase β 2. *Journal of the American Chemical Society* **2013**.

- (37) Zhu, L.; Zhou, B.; Chen, X.; Jiang, H.; Shao, J.; Yen, Y. Inhibitory mechanisms of heterocyclic carboxaldehyde thiosemicabazones for two forms of human ribonucleotide reductase. *Biochemical pharmacology* **2009**, *78*, 1178–85.
- (38) Shao, J.; Zhou, B.; Zhu, L.; Qiu, W.; Yuan, Y.-C.; Xi, B.; Yen, Y. In vitro characterization of enzymatic properties and inhibition of the p53R2 subunit of human ribonucleotide reductase. *Cancer research* **2004**, *64*, 1–6.
- (39) Tsimberidou, A.-M.; Alvarado, Y.; Giles, F. J. Evolving role of ribonucleoside reductase inhibitors in hematologic malignancies. *Expert review of anticancer therapy* **2002**, *2*, 437–48.
- (40) Stubbe, J.; Nocera, D. G.; Yee, C. S.; Chang, M. C. Y. Radical initiation in the class I ribonucleotide reductase: long-range proton-coupled electron transfer? *Chemical reviews* **2003**, *103*, 2167–201.
- (41) Fenton, H. J. H. LXXIII. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions* **1894**, *65*, 899.
- (42) Kehrer, J. P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **2000**, *149*, 43–50.
- (43) Apel, K.; Hirt, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual review of plant biology* **2004**, *55*, 373–99.
- (44) Deby, C.; Goutier, R. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochemical pharmacology* **1990**, *39*, 399–405.
- (45) Jeelani, G.; Husain, A.; Sato, D.; Ali, V.; Suematsu, M.; Soga, T.; Nozaki, T. Two atypical L-cysteine-regulated NADPH-dependent oxidoreductases involved in redox maintenance, L-cystine and iron reduction, and metronidazole activation in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. *The Journal of biological chemistry* **2010**, *285*, 26889–99.
- (46) Rhee, S. G.; Chang, T.-S.; Bae, Y. S.; Lee, S.-R.; Kang, S. W. Cellular regulation by hydrogen peroxide. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **2003**, *14*, S211–5.
- (47) Stohs, S. J.; Bagchi, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free radical biology & medicine* **1995**, *18*, 321–36.
- (48) Lloyd, D. R.; Phillips, D. H. Oxidative DNA damage mediated by copper(II), iron(II) and nickel(II) Fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **1999**, *424*, 23–36.

- (49) Ruan, Y.-B.; Li, C.; Tang, J.; Xie, J. Highly sensitive naked-eye and fluorescence "turn-on" detection of Cu(2+) using Fenton reaction assisted signal amplification. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2010**, *46*, 9220–2.
- (50) Mao, Y.; Liu, K. J.; Jiang, J. J.; Shi, X. Generation of reactive oxygen species by Co(II) from H₂O₂ in the presence of chelators in relation to DNA damage and 2'-deoxyguanosine hydroxylation. *Journal of toxicology and environmental health* **1996**, *47*, 61–75.
- (51) Buettner, G. R. The reaction of superoxide, formate radical, and hydrated electron with transferrin and its model compound, Fe(III)-ethylenediamine-N,N'-bis[2-(2-hydroxyphenyl)acetic acid] as studied by pulse radiolysis. *The Journal of biological chemistry* **1987**, *262*, 11995–8.
- (52) Smith, J. B.; Cusumano, J. C.; Babbs, C. F. Quantitative effects of iron chelators on hydroxyl radical production by the superoxide-driven fenton reaction. *Free radical research communications* **1990**, *8*, 101–6.
- (53) Weil, J. A.; Bolton, J. R. *Electron Paramagnetic Resonance*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2006.
- (54) Ohanian, H. C. What is spin? *American Journal of Physics* **1986**, *54*, 500.
- (55) Nakagawa, K. Electron paramagnetic resonance investigation of stratum corneum lipid structure. *Lipids* **2010**, *45*, 91–6.
- (56) <http://www.bruker.com/products/mr/epr.html> (30.09.2013).
- (57) Atkins, P. *Chemia Fizyczna*; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, 2003.
- (58) Janzen, E. G. Spin trapping. *Accounts of Chemical Research* **1971**, *4*, 31–40.
- (59) Rehorek, D. Spin trapping of inorganic radicals. *Chemical Society Reviews* **1991**, *20*, 341.
- (60) Carmichael, A. J.; Makino, K.; Riesz, P. Quantitative aspects of ESR and spin trapping of hydroxyl radicals and hydrogen atoms in gamma-irradiated aqueous solutions. *Radiation research* **1984**, *100*, 222–34.
- (61) Leeuwenburgh, C.; Heinecke, J. Oxidative Stress and Antioxidants in Exercise. *Current Medicinal Chemistry* **2001**, *8*, 829–838.
- (62) Chaston, T. B.; Richardson, D. R. Iron chelators for the treatment of iron overload disease: relationship between structure, redox activity, and toxicity. *American journal of hematology* **2003**, *73*, 200–10.

- (63) Wong, C.; Richardson, D. R. Beta-thalassaemia: emergence of new and improved iron chelators for treatment. *The international journal of biochemistry & cell biology* **2003**, *35*, 1144–9.
- (64) Ragab, L. A.; Hamdy, M. M.; Shaheen, I. A.; Yassin, R. N. Blood transfusion among thalassaemia patients: A single Egyptian center experience. *Asian journal of transfusion science* **2013**, *7*, 33–6.
- (65) Pandolfo, M. Iron metabolism and mitochondrial abnormalities in Friedreich ataxia. *Blood cells, molecules & diseases* **29**, 536–47; discussion 548–52.
- (66) Puccio, H.; Simon, D.; Cossée, M.; Criqui-Filipe, P.; Tiziano, F.; Melki, J.; Hindelang, C.; Matyas, R.; Rustin, P.; Koenig, M. Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nature genetics* **2001**, *27*, 181–6.
- (67) Cooper, J. M.; Schapira, A. H. V Friedreich's Ataxia: disease mechanisms, antioxidant and Coenzyme Q10 therapy. *BioFactors (Oxford, England)* **2003**, *18*, 163–71.
- (68) Richardson, D. R. Friedreich's ataxia: iron chelators that target the mitochondrion as a therapeutic strategy? *Expert opinion on investigational drugs* **2003**, *12*, 235–45.
- (69) Kicic, A.; Chua, A. C.; Baker, E. Effect of iron chelators on proliferation and iron uptake in hepatoma cells. *Cancer* **2001**, *92*, 3093–110.
- (70) Buss, J. L.; Greene, B. T.; Turner, J.; Torti, F. M.; Torti, S. V Iron chelators in cancer chemotherapy. *Current topics in medicinal chemistry* **2004**, *4*, 1623–35.
- (71) Richardson, D. R.; Tran, E. H.; Ponka, P. The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents. *Blood* **1995**, *86*, 4295–306.
- (72) Hider, R. C. Design of therapeutic chelating agents. *Biochemical Society transactions* **2002**, *30*, 751–4.
- (73) Liu, Z. D.; Hider, R. C. Design of iron chelators with therapeutic application. *Coordination Chemistry Reviews* **2002**, *232*, 151–171.
- (74) Neilands, J. B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *The Journal of biological chemistry* **1995**, *270*, 26723–6.
- (75) Zheng, T.; Nolan, E. M. Siderophore-based detection of Fe(III) and microbial pathogens. *Metallomics : integrated biometal science* **2012**, *4*, 866–80.

- (76) Aouad, F.; Florence, A.; Zhang, Y.; Collins, F.; Henry, C.; Ward, R. J.; Crichton, R. R. Evaluation of new iron chelators and their therapeutic potential. *Inorganica Chimica Acta* **2002**, *339*, 470–480.
- (77) Brittenham, G. M. Iron chelators and iron toxicity. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)* **2003**, *30*, 151–8.
- (78) Kalinowski, D. S.; Richardson, D. R. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacological reviews* **2005**, *57*, 547–83.
- (79) Becton, D. L.; Roberts, B. Antileukemic effects of deferoxamine on human myeloid leukemia cell lines. *Cancer research* **1989**, *49*, 4809–12.
- (80) Simonart, T.; Boelaert, J. R.; Mosselmans, R.; Andrei, G.; Noel, J.-C.; De Clercq, E.; Snoeck, R. Antiproliferative and apoptotic effects of iron chelators on human cervical carcinoma cells. *Gynecologic oncology* **2002**, *85*, 95–102.
- (81) Brard, L.; Granai, C. O.; Swamy, N. Iron chelators deferoxamine and diethylenetriamine pentaacetic acid induce apoptosis in ovarian carcinoma. *Gynecologic oncology* **2006**, *100*, 116–27.
- (82) Lederman, H. M.; Cohen, A.; Lee, J. W.; Freedman, M. H.; Gelfand, E. W. Deferoxamine: a reversible S-phase inhibitor of human lymphocyte proliferation. *Blood* **1984**, *64*, 748–53.
- (83) Brodie, C.; Siriwardana, G.; Lucas, J.; Schleicher, R.; Terada, N.; Szepesi, A.; Gelfand, E.; Seligman, P. Neuroblastoma sensitivity to growth inhibition by deferroxamine: evidence for a block in G1 phase of the cell cycle. *Cancer research* **1993**, *53*, 3968–75.
- (84) Yamasaki, T.; Terai, S.; Sakaida, I. Deferoxamine for advanced hepatocellular carcinoma. *The New England journal of medicine* **2011**, *365*, 576–8.
- (85) Summers, M. R.; Jacobs, A.; Tudway, D.; Perera, P.; Ricketts, C. Studies in desferrioxamine and ferrioxamine metabolism in normal and iron-loaded subjects. *British journal of haematology* **1979**, *42*, 547–55.
- (86) Selig, R. A.; White, L.; Gramacho, C.; Sterling-Levis, K.; Fraser, I. W.; Naidoo, D. Failure of iron chelators to reduce tumor growth in human neuroblastoma xenografts. *Cancer research* **1998**, *58*, 473–8.
- (87) Blatt, J. Deferoxamine in children with recurrent neuroblastoma. *Anticancer research* **14**, 2109–12.
- (88) Bergeron, R. J.; Streiff, R. R.; Creary, E. A.; Daniels, R. D.; King, W.; Luchetta, G.; Wiegand, J.; Moerker, T.; Peter, H. H. A comparative study of the iron-clearing

properties of desferrithiocin analogues with desferrioxamine B in a Cebus monkey model. *Blood* **1993**, *81*, 2166–73.

- (89) Bergeron, R. J.; Wiegand, J.; McManis, J. S.; Weimar, W. R.; Huang, G. Structure-activity relationships among desazadesferrithiocin analogues. *Advances in experimental medicine and biology* **2002**, *509*, 167–84.
- (90) Kicic, A.; Chua, A. C.; Baker, E. The desferrithiocin (DFT) class of iron chelators: potential as antineoplastic agents. *Anti-cancer drug design* **16**, 195–207.
- (91) Barman Balfour, J. A.; Foster, R. H. Deferiprone: a review of its clinical potential in iron overload in beta-thalassaemia major and other transfusion-dependent diseases. *Drugs* **1999**, *58*, 553–78.
- (92) Sheppard, L. N.; Kontoghiorghes, G. J. Competition between deferiprone, desferrioxamine and other chelators for iron and the effect of other metals. *Arzneimittel-Forschung* **1993**, *43*, 659–63.
- (93) Kontoghiorghes, G. J. The proceedings of the 20th International Conference on Chelation held in the USA: advances on new and old chelation therapies. *Toxicology mechanisms and methods* **2013**, *23*, 1–4.
- (94) Simonart, T.; Degraef, C.; Andrei, G.; Mosselmans, R.; Hermans, P.; Van Vooren, J. P.; Noel, J. C.; Boelaert, J. R.; Snoeck, R.; Heenen, M. Iron chelators inhibit the growth and induce the apoptosis of Kaposi's sarcoma cells and of their putative endothelial precursors. *The Journal of investigative dermatology* **2000**, *115*, 893–900.
- (95) Yasumoto, E.; Nakano, K.; Nakayachi, T.; Morshed, S. R. M.; Hashimoto, K.; Kikuchi, H.; Nishikawa, H.; Kawase, M.; Sakagami, H. Cytotoxic activity of deferiprone, maltol and related hydroxyketones against human tumor cell lines. *Anticancer research* **24**, 755–62.
- (96) Sah, P. Nicotinoyl and Isonicotinoyl Hydrazones of Pyr-idoxal. *Journal of the American Chemical Society* **1954**, *76*, 300.
- (97) Ponka, P.; Borová, J.; Neuwirt, J.; Fuchs, O. Mobilization of iron from reticulocytes. Identification of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone as a new iron chelating agent. *FEBS letters* **1979**, *97*, 317–21.
- (98) Brittenham, G. M. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone. Effective iron chelation after oral administration. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1990**, *612*, 315–26.
- (99) Szuber, N.; Buss, J. L.; Soe-Lin, S.; Felfly, H.; Trudel, M.; Ponka, P. Alternative treatment paradigm for thalassemia using iron chelators. *Experimental hematology* **2008**, *36*, 773–85.

- (100) Richardson, D. R.; Tran, E. H.; Ponka, P. The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents. *Blood* **1995**, *86*, 4295–306.
- (101) Richardson, D. R.; Wis Vitolo, L. M.; Hefter, G. T.; May, P. M.; Clare, B. W.; Webb, J.; Wilairat, P. Iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class Part I. Ionisation characteristics of the ligands and their relevance to biological properties. *Inorganica Chimica Acta* **1990**, *170*, 165–170.
- (102) Lovejoy, D. B.; Kalinowski, D.; Bernhardt, P. V; Richardson, D. R. PCTH: a novel orally active chelator for the treatment of iron overload disease. *Hemoglobin* **2006**, *30*, 93–104.
- (103) Biaso, F.; Baret, P.; Pierre, J. L.; Serratrice, G. Comparative studies on the iron chelators O-TRENTOX and TRENTOAMS: selectivity of the complexation towards other biologically relevant metal ions and Al(3+). *Journal of inorganic biochemistry* **2002**, *89*, 123–30.
- (104) Serratrice, G.; Boukhalfa, H.; Béguin, C.; Baret, P.; Caris, C.; Pierre, J.-L. O-TRENTOX, a New Tripodal Iron Chelator Based on 8-Hydroxyquinoline Subunits: Thermodynamic and Kinetic Studies. *Inorganic Chemistry* **1997**, *36*, 3898–3910.
- (105) Rakba, N.; Aouad, F.; Henry, C.; Caris, C.; Morel, I.; Baret, P.; Pierre, J. L.; Brissot, P.; Ward, R. J.; Lescoat, G.; Crichton, R. R. Iron mobilisation and cellular protection by a new synthetic chelator O-Trensox. *Biochemical pharmacology* **1998**, *55*, 1797–806.
- (106) Rakba, N.; Loyer, P.; Gilot, D.; Delcros, J. G.; Glaise, D.; Baret, P.; Pierre, J. L.; Brissot, P.; Lescoat, G. Antiproliferative and apoptotic effects of O-Trensox, a new synthetic iron chelator, on differentiated human hepatoma cell lines. *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 943–51.
- (107) Lindsey, W. T.; Olin, B. R. Deferasirox for transfusion-related iron overload: a clinical review. *Clinical therapeutics* **2007**, *29*, 2154–66.
- (108) Bernhardt, P. V Coordination chemistry and biology of chelators for the treatment of iron overload disorders. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)* **2007**, 3214–20.
- (109) Chantrel-Groussard, K.; Gaboriau, F.; Padeloup, N.; Havouis, R.; Nick, H.; Pierre, J.-L.; Brissot, P.; Lescoat, G. The new orally active iron chelator ICL670A exhibits a higher antiproliferative effect in human hepatocyte cultures than O-trensox. *European journal of pharmacology* **2006**, *541*, 129–37.
- (110) Lescoat, G.; Chantrel-Groussard, K.; Padeloup, N.; Nick, H.; Brissot, P.; Gaboriau, F. Antiproliferative and apoptotic effects in rat and human hepatoma cell cultures of the orally active iron chelator ICL670 compared to CP20: a

- possible relationship with polyamine metabolism. *Cell proliferation* **2007**, *40*, 755–67.
- (111) Ohyashiki, J. H.; Kobayashi, C.; Hamamura, R.; Okabe, S.; Tauchi, T.; Ohyashiki, K. The oral iron chelator deferasirox represses signaling through the mTOR in myeloid leukemia cells by enhancing expression of REDD1. *Cancer science* **2009**, *100*, 970–7.
- (112) Messa, E.; Carturan, S.; Maffè, C.; Pautasso, M.; Bracco, E.; Roetto, A.; Messa, F.; Arruga, F.; Defilippi, I.; Rosso, V.; Zanone, C.; Rotolo, A.; Greco, E.; Pellegrino, R. M.; Alberti, D.; Saglio, G.; Cilloni, D. Deferasirox is a powerful NF-kappaB inhibitor in myelodysplastic cells and in leukemia cell lines acting independently from cell iron deprivation by chelation and reactive oxygen species scavenging. *Haematologica* **2010**, *95*, 1308–16.
- (113) Guertin, D. A.; Sabatini, D. M. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer cell* **2007**, *12*, 9–22.
- (114) Fukushima, T.; Kawabata, H.; Nakamura, T.; Iwao, H.; Nakajima, A.; Miki, M.; Sakai, T.; Sawaki, T.; Fujita, Y.; Tanaka, M.; Masaki, Y.; Hirose, Y.; Umehara, H. Iron chelation therapy with deferasirox induced complete remission in a patient with chemotherapy-resistant acute monocytic leukemia. *Anticancer research* **2011**, *31*, 1741–4.
- (115) Torti, S. V; Torti, F. M.; Whitman, S. P.; Brechbiel, M. W.; Park, G.; Planalp, R. P. Tumor cell cytotoxicity of a novel metal chelator. *Blood* **1998**, *92*, 1384–9.
- (116) Merlot, A. M.; Kalinowski, D. S.; Richardson, D. R. Novel chelators for cancer treatment: where are we now? *Antioxidants & redox signaling* **2013**, *18*, 973–1006.
- (117) Abeyasinghe, R. D.; Greene, B. T.; Haynes, R.; Willingham, M. C.; Turner, J.; Planalp, R. P.; Brechbiel, M. W.; Torti, F. M.; Torti, S. V p53-independent apoptosis mediated by tachpyridine, an anti-cancer iron chelator. *Carcinogenesis* **2001**, *22*, 1607–14.
- (118) Zhao, R.; Planalp, R. P.; Ma, R.; Greene, B. T.; Jones, B. T.; Brechbiel, M. W.; Torti, F. M.; Torti, S. V Role of zinc and iron chelation in apoptosis mediated by tachpyridine, an anti-cancer iron chelator. *Biochemical pharmacology* **2004**, *67*, 1677–88.
- (119) Turner, J.; Koumenis, C.; Kute, T. E.; Planalp, R. P.; Brechbiel, M. W.; Beardsley, D.; Cody, B.; Brown, K. D.; Torti, F. M.; Torti, S. V Tachpyridine, a metal chelator, induces G2 cell-cycle arrest, activates checkpoint kinases, and sensitizes cells to ionizing radiation. *Blood* **2005**, *106*, 3191–9.

- (120) Beraldo, H.; Gambino, D.; H. Beraldo, B. S. P.; D. Gambino, B. S. P. The Wide Pharmacological Versatility of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Their Metal Complexes. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2004**, *4*, 31–39.
- (121) Paterson, B. M.; Donnelly, P. S. Copper complexes of bis(thiosemicarbazones): from chemotherapeutics to diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals. *Chemical Society reviews* **2011**, *40*, 3005–18.
- (122) Sah, P. P. T.; Daniels, T. C. Thiosemicarbazide as a reagent for the identification of aldehydes, ketones, and quinones. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1950**, *69*, 1545–1556.
- (123) Zhao, Z.; Shi, Z.; Liu, M.; Liu, X. Microwave-assisted synthesis and in vitro antibacterial activity of novel steroidal thiosemicarbazone derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2012**, *22*, 7730–4.
- (124) Cun-De, W.; Jun, L.; Xin-zhong, S.; Yun-hua, F. Synthesis of Thiosemicarbazones Under Microwave Irradiation. *Synthetic Communications* **1999**, *29*, 3057–3061.
- (125) Gautam, D.; Gautam, P.; Chaudhary, R. P. N-Methylpyridinium tosylate catalyzed green and efficient synthesis of some novel 2,4-disubstituted thiazoles and 4-thiazolidinones. *Chinese Chemical Letters* **2012**, *23*, 1221–1224.
- (126) Kappel, J. C.; Yokum, T. S.; Barany, G. Parallel solid-phase syntheses of 1,3,4-thiadiazolium-2-aminides. *Journal of combinatorial chemistry* **2004**, *6*, 746–52.
- (127) Liu, T.-T.; Yang, T.-S. Stability and antimicrobial activity of allyl isothiocyanate during long-term storage in an oil-in-water emulsion. *Journal of food science* **2010**, *75*, C445–51.
- (128) Larsen, C.; Harpp, D. N. THIOCARBONYL TRANSFER REAGENT CHEMISTRY. IV. THE PREPARATION OF 1,1- AND 1,2-DISUBSTITUTED THIOSEMICARBAZIDES UNSUBSTITUTED IN THE 4-POSITION. *Phosphorous and Sulfur and the Related Elements* **1984**, *19*, 91–98.
- (129) Klayman, D. L.; Scovill, J. P.; Bartosevich, J. F.; Bruce, J. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones. 5. 1-[1-(2-Pyridyl)ethyl]-3-thiosemicarbazides as potential antimalarial agents. *Journal of medicinal chemistry* **1983**, *26*, 35–9.
- (130) Floyd E. Anderson, Charles J. Duca, J. V. S. Some Heterocyclic Thiosemicarbazones. *Journal of the American Chemical Society* **1951**, *73*, 4967–4968.
- (131) Glisoni, R. J.; Cuestas, M. L.; Mathet, V. L.; Oubiña, J. R.; Moglioni, A. G.; Sosnik, A. Antiviral activity against the hepatitis C virus (HCV) of 1-indanone thiosemicarbazones and their inclusion complexes with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* **2012**, *47*, 596–603.

- (132) Alomar, K.; Gaumet, V.; Allain, M.; Bouet, G.; Landreau, A. Synthesis, crystal structure, characterisation, and antifungal activity of 3-thiophene aldehyde semicarbazone (3STCH), 2,3-thiophene dicarboxaldehyde bis(semicarbazone) (2,3BSTCH₂) and their nickel (II) complexes. *Journal of inorganic biochemistry* **2012**, *115*, 36–43.
- (133) Glisoni, R. J.; García-Fernández, M. J.; Pino, M.; Gutkind, G.; Moglioni, A. G.; Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A.; Sosnik, A. β -Cyclodextrin hydrogels for the ocular release of antibacterial thiosemicarbazones. *Carbohydrate polymers* **2013**, *93*, 449–57.
- (134) Alahari, A.; Trivelli, X.; Guérardel, Y.; Dover, L. G.; Besra, G. S.; Sacchettini, J. C.; Reynolds, R. C.; Coxon, G. D.; Kremer, L. Thiacetazone, an antitubercular drug that inhibits cyclopropanation of cell wall mycolic acids in mycobacteria. *PloS one* **2007**, *2*, e1343.
- (135) Grzegorzewicz, A. E.; Korduláková, J.; Jones, V.; Born, S. E. M.; Belardinelli, J. M.; Vaquié, A.; Gundi, V. A. K. B.; Madacki, J.; Slama, N.; Laval, F.; Vaubourgeix, J.; Crew, R. M.; Gicquel, B.; Daffé, M.; Morbidoni, H. R.; Brennan, P. J.; Quémard, A.; McNeil, M. R.; Jackson, M. A common mechanism of inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* mycolic acid biosynthetic pathway by isoxyl and thiacetazone. *The Journal of biological chemistry* **2012**, *287*, 38434–41.
- (136) Nunn, P.; Porter, J.; Winstanley, P. Thiacetazone--avoid like poison or use with care? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1993**, *87*, 578–82.
- (137) Coxon, G. D.; Craig, D.; Corrales, R. M.; Vialla, E.; Gannoun-Zaki, L.; Kremer, L. Synthesis, antitubercular activity and mechanism of resistance of highly effective thiacetazone analogues. *PloS one* **2013**, *8*, e53162.
- (138) Bauer, D. J.; St Vincent, L.; Kempe, C. H.; Young, P. A.; Downie, A. W. Prophylaxis of smallpox with methisazone. *American journal of epidemiology* **1969**, *90*, 130–45.
- (139) Heiner, G. G.; Fatima, N.; Russell, P. K.; Haase, A. T.; Ahmad, N.; Mohammed, N.; Thomas, D. B.; Mack, T. M.; Khan, M. M.; Knatterud, G. L.; Anthony, R. L.; McCrumb, F. R. Field trials of methisazone as a prophylactic agent against smallpox. *American journal of epidemiology* **1971**, *94*, 435–49.
- (140) Quenelle, D. C.; Keith, K. A.; Kern, E. R. In vitro and in vivo evaluation of isatin-beta-thiosemicarbazone and marboran against vaccinia and cowpox virus infections. *Antiviral research* **2006**, *71*, 24–30.
- (141) Hall, M. D.; Brimacombe, K. R.; Varonka, M. S.; Pluchino, K. M.; Monda, J. K.; Li, J.; Walsh, M. J.; Boxer, M. B.; Warren, T. H.; Fales, H. M.; Gottesman, M. M. Synthesis and structure-activity evaluation of isatin- β -thiosemicarbazones with

improved selective activity toward multidrug-resistant cells expressing P-glycoprotein. *Journal of medicinal chemistry* **2011**, *54*, 5878–89.

- (142) Agrawal, K. C.; Booth, B. A.; Sartorelli, A. C. Potential antitumor agents. I. A series of 5-substituted 1-formylisoquinoline thiosemicarbazones. *Journal of medicinal chemistry* **1968**, *11*, 700–3.
- (143) Antholine, W.; Knight, J.; Whelan, H.; Petering, D. H. Studies of the reaction of 2-formylpyridine thiosemicarbazone and its iron and copper complexes with biological systems. *Molecular pharmacology* **1977**, *13*, 89–98.
- (144) Casas, J. S.; García-Tasende, M. S.; Sordo, J. Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. A structural review. *Coordination Chemistry Reviews* **2000**, *209*, 197–261.
- (145) Sartorelli, A. C.; Agrawal, K. C.; Moore, E. C. Mechanism of inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by a-(N)-heterocyclic aldehyde thiosemicarbazones. *Biochemical pharmacology* **1971**, *20*, 3119–23.
- (146) Agrawal, K. C.; Booth, B. A.; Moore, E. C.; Sartorelli, A. C. Potential antitumor agents. 6. Possible irreversible inhibitors of ribonucleoside diphosphate reductase. *Journal of medicinal chemistry* **1972**, *15*, 1154–8.
- (147) Green, D. A.; Antholine, W. E.; Wong, S. J.; Richardson, D. R.; Chitambar, C. R. Inhibition of malignant cell growth by 311, a novel iron chelator of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class: effect on the R2 subunit of ribonucleotide reductase. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **2001**, *7*, 3574–9.
- (148) Bisceglie, F.; Pinelli, S.; Alinovi, R.; Tarasconi, P.; Buschini, A.; Mussi, F.; Mutti, A.; Pelosi, G. Copper(II) thiosemicarbazone molecular modifications modulate apoptotic and oxidative effects on U937 cell line. *Journal of inorganic biochemistry* **2012**, *116*, 195–203.
- (149) Whitnall, M.; Howard, J.; Ponka, P.; Richardson, D. R. A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to chemotherapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 14901–6.
- (150) Yalowich, J. C.; Wu, X.; Zhang, R.; Kanagasabai, R.; Hornbaker, M.; Hasinoff, B. B. The anticancer thiosemicarbazones Dp44mT and triapine lack inhibitory effects as catalytic inhibitors or poisons of DNA topoisomerase II α . *Biochemical pharmacology* **2012**, *84*, 52–8.
- (151) Tam, T. F.; Leung-Toung, R.; Li, W.; Wang, Y.; Karimian, K.; Spino, M. Iron chelator research: past, present, and future. *Current medicinal chemistry* **2003**, *10*, 983–95.

- (152) Shao, J.; Zhou, B.; Di Bilio, A. J.; Zhu, L.; Wang, T.; Qi, C.; Shih, J.; Yen, Y. A Ferrous-Triapine complex mediates formation of reactive oxygen species that inactivate human ribonucleotide reductase. *Molecular cancer therapeutics* **2006**, *5*, 586–92.
- (153) Finch, R. A.; Liu, M.; Grill, S. P.; Rose, W. C.; Loomis, R.; Vasquez, K. M.; Cheng, Y.; Sartorelli, A. C. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone): A potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity. *Biochemical pharmacology* **2000**, *59*, 983–91.
- (154) Yuan, J.; Lovejoy, D. B.; Richardson, D. R. Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: in vitro and in vivo assessment. *Blood* **2004**, *104*, 1450–8.
- (155) Kovacevic, Z.; Chikhani, S.; Lovejoy, D. B.; Richardson, D. R. Novel thiosemicarbazone iron chelators induce up-regulation and phosphorylation of the metastasis suppressor N-myc down-stream regulated gene 1: a new strategy for the treatment of pancreatic cancer. *Molecular pharmacology* **2011**, *80*, 598–609.
- (156) Evans, B. E.; Rittle, K. E.; Bock, M. G.; DiPardo, R. M.; Freidinger, R. M.; Whitter, W. L.; Lundell, G. F.; Veber, D. F.; Anderson, P. S.; Chang, R. S. Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. *Journal of medicinal chemistry* **1988**, *31*, 2235–46.
- (157) De Sá Alves, F. R.; Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. From nature to drug discovery: the indole scaffold as a “privileged structure”. *Mini reviews in medicinal chemistry* **2009**, *9*, 782–93.
- (158) Agrafiotis, D. K.; Wiener, J. J. M. Scaffold explorer: an interactive tool for organizing and mining structure-activity data spanning multiple chemotypes. *Journal of medicinal chemistry* **2010**, *53*, 5002–11.
- (159) Schnur, D. M.; Hermsmeier, M. A.; Tebben, A. J. Are target-family-privileged substructures truly privileged? *Journal of medicinal chemistry* **2006**, *49*, 2000–9.
- (160) Polanski, J.; Kurczyk, A.; Bak, A.; Musiol, R. Privileged structures - dream or reality: preferential organization of azanaphthalene scaffold. *Current medicinal chemistry* **2012**, *19*, 1921–45.
- (161) Koster, D. A.; Palle, K.; Bot, E. S. M.; Bjornsti, M.-A.; Dekker, N. H. Antitumour drugs impede DNA uncoiling by topoisomerase I. *Nature* **2007**, *448*, 213–7.
- (162) Khan, I. A.; Siddiqui, S.; Rehmani, S.; Kazmi, S. U.; Ali, S. H. Fluoroquinolones inhibit HCV by targeting its helicase. *Antiviral therapy* **2012**, *17*, 467–76.

- (163) Musiol, R.; Serda, M.; Hensel-Bielowka, S.; Polanski, J. Quinoline-based antifungals. *Current medicinal chemistry* **2010**, *17*, 1960–73.
- (164) Hare, J. I.; Neijzen, R. W.; Anantha, M.; Dos Santos, N.; Harasym, N.; Webb, M. S.; Allen, T. M.; Bally, M. B.; Waterhouse, D. N. Treatment of colorectal cancer using a combination of liposomal irinotecan (irinophore cTM) and 5-Fluorouracil. *PloS one* **2013**, *8*, e62349.
- (165) Kalinowski, D. S.; Yu, Y.; Sharpe, P. C.; Islam, M.; Liao, Y.-T.; Lovejoy, D. B.; Kumar, N.; Bernhardt, P. V.; Richardson, D. R. Design, synthesis, and characterization of novel iron chelators: structure-activity relationships of the 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone series and their 3-nitrobenzoyl analogues as potent antitumor agents. *Journal of medicinal chemistry* **2007**, *50*, 3716–29.
- (166) Richardson, D. R.; Sharpe, P. C.; Lovejoy, D. B.; Senaratne, D.; Kalinowski, D. S.; Islam, M.; Bernhardt, P. V. Dipyriddy thiosemicarbazone chelators with potent and selective antitumor activity form iron complexes with redox activity. *Journal of medicinal chemistry* **2006**, *49*, 6510–21.
- (167) Weinberg, R. Tumor suppressor genes. *Science* **1991**, *254*, 1138–1146.
- (168) Hollstein, M.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Harris, C. p53 mutations in human cancers. *Science* **1991**, *253*, 49–53.
- (169) Japertas, P.; Didziapetris, R.; Petrauskas, A. Fragmental Methods in the Design of New Compounds. Applications of The Advanced Algorithm Builder. *Quantitative Structure-Activity Relationships* **2002**, *21*, 23.
- (170) Rees, D. C.; Congreve, M.; Murray, C. W.; Carr, R. Fragment-based lead discovery. *Nature reviews. Drug discovery* **2004**, *3*, 660–72.
- (171) Hajduk, P. J.; Greer, J. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. *Nature reviews. Drug discovery* **2007**, *6*, 211–9.
- (172) Arroyo, X.; Goldflam, M.; Feliz, M.; Belda, I.; Giralt, E. Computer-aided design of fragment mixtures for NMR-based screening. *PloS one* **2013**, *8*, e58571.
- (173) Chao, J.; Synold, T. W.; Morgan, R. J.; Kunos, C.; Longmate, J.; Lenz, H.-J.; Lim, D.; Shibata, S.; Chung, V.; Stoller, R. G.; Belani, C. P.; Gandara, D. R.; McNamara, M.; Gitlitz, B. J.; Lau, D. H.; Ramalingam, S. S.; Davies, A.; Espinoza-Delgado, I.; Newman, E. M.; Yen, Y. A phase I and pharmacokinetic study of oral 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP, NSC #663249) in the treatment of advanced-stage solid cancers: a California Cancer Consortium Study. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **2012**, *69*, 835–43.
- (174) Brown, A. E. Overview of fungal infections in cancer patients. *Seminars in oncology* **1990**, *17*, 2–5.

- (175) Li, Z.-C.; Chen, L.-H.; Yu, X.-J.; Hu, Y.-H.; Song, K.-K.; Zhou, X.-W.; Chen, Q.-X. Inhibition Kinetics of Chlorobenzaldehyde Thiosemicarbazones on Mushroom Tyrosinase. *Journal of agricultural and food chemistry* **2010**.
- (176) De Aquino, T. M.; Liesen, A. P.; da Silva, R. E. A.; Lima, V. T.; Carvalho, C. S.; de Faria, A. R.; de Araújo, J. M.; de Lima, J. G.; Alves, A. J.; de Melo, E. J. T.; Góes, A. J. S. Synthesis, anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial activities of benzaldehyde 4-phenyl-3-thiosemicarbazones and 2-[(phenylmethylene)hydrazono]-4-oxo-3-phenyl-5-thiazolidineacetic acids. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2008**, *16*, 446–56.
- (177) Liberta, A. E.; West, D. X. Antifungal and antitumor activity of heterocyclic thiosemicarbazones and their metal complexes: current status. *Biometals* **1992**, *5*, 121–126.
- (178) Lessa, J. A.; Soares, M. A.; dos Santos, R. G.; Mendes, I. C.; Salum, L. B.; Daghestani, H. N.; Andricopulo, A. D.; Day, B. W.; Vogt, A.; Beraldo, H. Gallium(III) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones: antimicrobial and cytotoxic effects and investigation on the interactions with tubulin. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* **2013**, *26*, 151–65.
- (179) Musiol, R.; Jampilek, J.; Buchta, V.; Silva, L.; Niedbala, H.; Podeszwa, B.; Palka, A.; Majerz-Maniecka, K.; Oleksyn, B.; Polanski, J. Antifungal properties of new series of quinoline derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2006**, *14*, 3592–8.
- (180) Cieslik, W.; Musiol, R.; Nycz, J. E.; Jampilek, J.; Vejsova, M.; Wolff, M.; Machura, B.; Polanski, J. Contribution to investigation of antimicrobial activity of styrylquinolines. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2012**, *20*, 6960–8.
- (181) Prasad, T.; Chandra, A.; Mukhopadhyay, C. K.; Prasad, R. Unexpected link between iron and drug resistance of Candida spp.: iron depletion enhances membrane fluidity and drug diffusion, leading to drug-susceptible cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2006**, *50*, 3597–606.
- (182) Nevitt, T. War-Fe-re: iron at the core of fungal virulence and host immunity. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* **2011**, *24*, 547–58.
- (183) Donnelly, J. P.; Lahav, M. Deferasirox as adjunctive therapy for mucormycosis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **2012**, *67*, 519–20.
- (184) Opletalová, V.; Kalinowski, D. S.; Vejsová, M.; Kunes, J.; Pour, M.; Jampilek, J.; Buchta, V.; Richardson, D. R. Identification and characterization of thiosemicarbazones with antifungal and antitumor effects: cellular iron chelation mediating cytotoxic activity. *Chemical research in toxicology* **2008**, *21*, 1878–89.

- (185) Serda, M.; Kalinowski, D. S.; Mrozek-Wilczkiewicz, A.; Musiol, R.; Szurko, A.; Ratuszna, A.; Pantarat, N.; Kovacevic, Z.; Merlot, A. M.; Richardson, D. R.; Polanski, J. Synthesis and characterization of quinoline-based thiosemicarbazones and correlation of cellular iron-binding efficacy to anti-tumor efficacy. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2012**, *22*, 5527–31.
- (186) Mrozek-Wilczkiewicz, A. Poszukiwanie nowych chelatorów żelaza dla terapii przeciwnowotworowych, 2013.
- (187) Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Mroz, P.; Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B. C.; Golab, J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians* **61**, 250–81.
- (188) Kostović, K.; Pastar, Z.; Ceović, R.; Mokos, Z. B.; Buzina, D. S.; Stanimirović, A. Photodynamic therapy in dermatology: current treatments and implications. *Collegium antropologicum* **2012**, *36*, 1477–81.
- (189) Calzavara-Pinton, P.; Rossi, M. T.; Sala, R.; Venturini, M. Photodynamic antifungal chemotherapy. *Photochemistry and photobiology* **88**, 512–22.
- (190) Musiol, R.; Serda, M.; Polanski, J. Prodrugs in photodynamic anticancer therapy. *Current pharmaceutical design* **2011**, *17*, 3548–59.
- (191) Dolezal, M.; Jampílek, J.; Osicka, Z.; Kunes, J.; Buchta, V.; Víchová, P. Substituted 5-arylpyrazine-2-carboxylic acid derivatives: synthesis and biological activity. *Farmaco (Società chimica italiana : 1989)* **2003**, *58*, 1105–11.
- (192) Małeckı, J. G.; Maroń, A.; Serda, M.; Dolezal, M.; Polański, J. Synthesis, characterization and molecular structure of Ru(II) complex with benzoylpyrazine carboxylic acid derivatives. *Polyhedron* **2012**, *41*, 104–114.
- (193) Ceulemans, A.; Vanquickenborne, L. G. Charge-transfer spectra of iron(II)- and ruthenium(II)-tris(2,2'-bipyridyl) complexes. *Journal of the American Chemical Society* **1981**, *103*, 2238–2241.
- (194) Enyedy, É. A.; Primik, M. F.; Kowol, C. R.; Arion, V. B.; Kiss, T.; Keppler, B. K. Interaction of Triapine and related thiosemicarbazones with iron(III)/(II) and gallium(III): a comparative solution equilibrium study. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)* **2011**, *40*, 5895–905.
- (195) <http://www.thalidomide.ca/history-of-thalidomide/> (30.09.2013).
- (196) Roman Mazurkiewicz, Andrzej Rajca, Ewa Salwińska, Andrzej Skibiński, Jerzy Suwiński, W. Z. *Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych*; W, Zieliński, R. A., Ed.; Wydawnictwo Naukowo Techniczne, 1995.

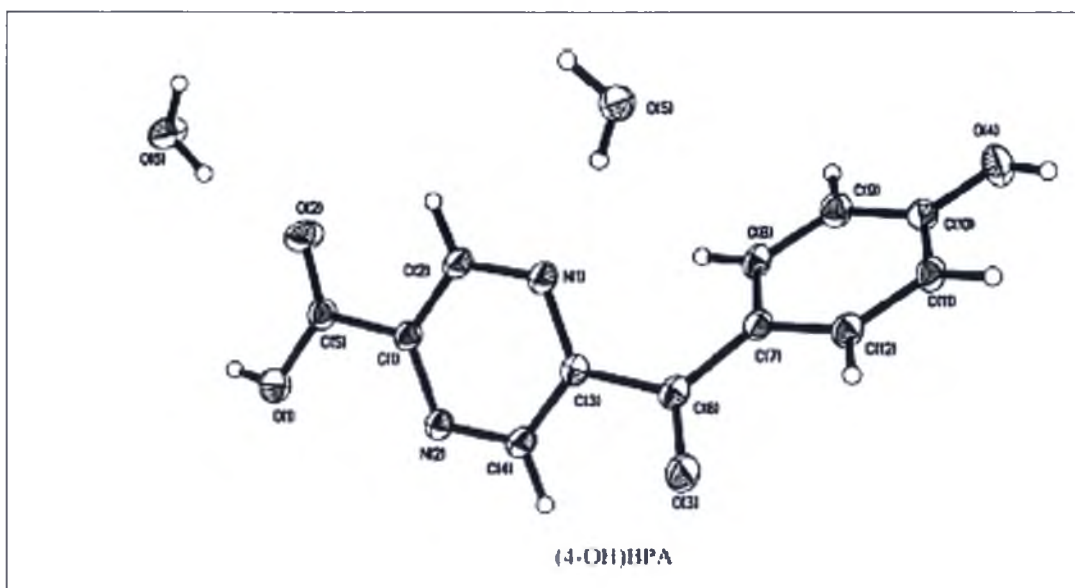
- (197) Keepers, J. W.; James, T. L. A theoretical study of distance determinations from NMR. Two-dimensional nuclear overhauser effect spectra. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1984**, *57*, 404–426.
- (198) Silverstein R., Webster F., K. D. *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych*; Wydawnictwo Naukowe PWN, 2013.
- (199) West, D. X.; Mokijewski, B. L.; Gebremedhin, H.; Romack, T. J. Nuclear magnetic resonance spectral study of 2-acetylpyridine4 N-alkylthiosemicarbazones and their cobalt(III) complexes. *Transition Metal Chemistry* **1992**, *17*, 384–386.
- (200) Debebe, Z.; Nekhai, S.; Ashenafi, M.; Lovejoy, D. B.; Kalinowski, D. S.; Gordeuk, V. R.; Byrnes, W. M.; Richardson, D. R.; Karla, P. K. Development of a sensitive HPLC method to measure in vitro permeability of E- and Z-isomeric forms of thiosemicarbazones in Caco-2 monolayers. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **2012**, *906*, 25–32.
- (201) Nuwan De Silva, N. W. S. V.; Albu, T. V. A theoretical investigation on the isomerism and the NMR properties of thiosemicarbazones. *Central European Journal of Chemistry* **2007**, *5*, 396–419.
- (202) *Microwaves in Organic Synthesis*; Loupy, A., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, Germany, 2006.
- (203) Kappe, C. O.; Dallinger, D.; Murphree, S. S. *Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2008.
- (204) Kappe, C. O.; Dallinger, D. The impact of microwave synthesis on drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* **2006**, *5*, 51–63.
- (205) Kuhnert, N. Microwave-Assisted Reactions in Organic Synthesis—Are There Any Nonthermal Microwave Effects? *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 1863.
- (206) Stadler, A.; Kappe, C. O. Microwave-mediated Biginelli reactions revisited. On the nature of rate and yield enhancements. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **2000**, 1363–1368.
- (207) An, J.; Bagnell, L.; Cablewski, T.; Strauss, C. R.; Trainor, R. W. Applications of High-Temperature Aqueous Media for Synthetic Organic Reactions. *The Journal of organic chemistry* **1997**, *62*, 2505–2511.
- (208) Musiol, R.; Tyman-Szram, B.; Polanski, J. Microwave-Assisted Heterocyclic Chemistry for Undergraduate Organic Laboratory. *Journal of Chemical Education* **2006**, *83*, 632.

- (209) Musiol, R.; Podeszwa, B.; Finster, J.; Niedbala, H.; Polanski, J. An Efficient Microwave-Assisted Synthesis of Structurally Diverse Styrylquinolines. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **2006**, *137*, 1211–1217.
- (210) Bahl, D.; Athar, F.; Soares, M. B. P.; de Sá, M. S.; Moreira, D. R. M.; Srivastava, R. M.; Leite, A. C. L.; Azam, A. Structure-activity relationships of mononuclear metal-thiosemicarbazone complexes endowed with potent antiplasmodial and antiamebic activities. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2010**, *18*, 6857–64.
- (211) Danter W.; R Brown M.; Lepifre F. Compounds And Method For Treatment Of Cancer, 2009.
- (212) Katritzky, A. R.; Ledoux, S.; Witek, R. M.; Nair, S. K. 1-(Alkyl/arylthiocarbamoyl)benzotriazoles as stable isothiocyanate equivalents: synthesis of Di- and trisubstituted thioureas. *The Journal of organic chemistry* **2004**, *69*, 2976–82.
- (213) Singh, A. Bis(benzotriazolyl)methanethione. *Synlett* **2010**, *2010*, 2045–2046.
- (214) Grzyb, J. A.; Shen, M.; Yoshina-Ishii, C.; Chi, W.; Brown, R. S.; Batey, R. A. Carbamoylimidazolium and thiocarbamoylimidazolium salts: novel reagents for the synthesis of ureas, thioureas, carbamates, thiocarbamates and amides. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7153–7175.
- (215) Dolezal, M.; Cmedlova, P.; Palek, L.; Vinsova, J.; Kunes, J.; Buchta, V.; Jampilek, J.; Kralova, K. Synthesis and antimycobacterial evaluation of substituted pyrazinecarboxamides. *European journal of medicinal chemistry* **2008**, *43*, 1105–13.
- (216) Houminer, Y.; Southwick, E. W.; Williams, D. L. Preparation of monoacylpyrazines. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1986**, *23*, 497–500.
- (217) Houminer, Y.; Southwick, E. W.; Williams, D. L. Substituent-directing effects in the homolytic acylation of pyrazine derivatives. *The Journal of Organic Chemistry* **1989**, *54*, 640–643.
- (218) Małecki, J. G.; Serda, M.; Musiol, R.; Polanski, J. Synthesis, characterization and molecular structure of Ru(II) complex with 8-hydroxyquinoline derivative. *Polyhedron* **2012**, *31*, 451–456.
- (219) Małecki, J. G.; Groń, T.; Duda, H. Molecular and spectroscopic properties of hydridecarbonyl ruthenium complexes with pyrazine carboxylic acid ligands. *Polyhedron* **2012**, *31*, 319–331.
- (220) Breton, M.; Precigoux, G.; Courseille, C.; Hospital, M. Génisteine. *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry* **1975**, *31*, 921–923.

- (221) Golovlyova, S. M.; Moskvichev, Y. A.; Alov, E. M.; Kobylinsky, D. B.; Ermolaeva, V. V. Synthesis of Novel Five-membered Nitrogen-containing Heterocyclic Compounds from Derivatives of Arylsulfonyl- and Arylthioacetic and -Propionic Acids. *Chemistry of Heterocyclic Compounds* **2001**, *37*, 1102–1106.
- (222) Sonogashira, K. Development of Pd–Cu catalyzed cross-coupling of terminal acetylenes with sp²-carbon halides. *Journal of Organometallic Chemistry* **2002**, *653*, 46–49.
- (223) Jansson, P. J.; Hawkins, C. L.; Lovejoy, D. B.; Richardson, D. R. The iron complex of Dp44mT is redox-active and induces hydroxyl radical formation: an EPR study. *Journal of inorganic biochemistry* **2010**, *104*, 1224–8.
- (224) Vogel A. *Preparatyka Organiczna*; Wydawnictwo Naukowo Techniczne, 2006.
- (225) Abid, M.; Bhat, A. R.; Athar, F.; Azam, A. Synthesis, spectral studies and antimetastatic activity of new 1-N-substituted thiocarbamoyl-3-phenyl-2-pyrazolines. *European journal of medicinal chemistry* **2009**, *44*, 417–25.
- (226) Agrawal, K. C.; Lee, M. H.; Booth, B. A.; Moore, E. C.; Sartorelli, A. C. Potential antitumor agents. 11. Inhibitors of alkaline phosphatase, an enzyme involved in the resistance of neoplastic cells to 6-thiopurines. *Journal of medicinal chemistry* **1974**, *17*, 934–8.
- (227) Gobis, K.; Foks, H.; Zwolska, Z.; Augustynowicz-Kopeć, E. Synthesis of 2-Aminoaryl-5-Substituted-1,3,4- Thiadiazoles in a Thermal 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* **2005**, *180*, 2653–2666.
- (228) Spalińska, K.; Foks, H.; Kedzia, A.; Wierzbowska, M.; Kwapisz, E.; Gebaska, A.; Zilkówska-Klinkosz, M. Synthesis and Antibacterial Activity of Substituted Thiosemicarbazides and of 1,3,4-Thiadiazole or 1,2,4-Triazole Derivatives. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* **2006**, *181*, 609–625.
- (229) Cieslik W.; Musiol R.; Korzec M. Synthesis of Alkyne-substituted Quinolines as Analogues of Allylamines. *International Bulletin of Pharmaceutical Sciences* **2012**, *1*, 3–9.

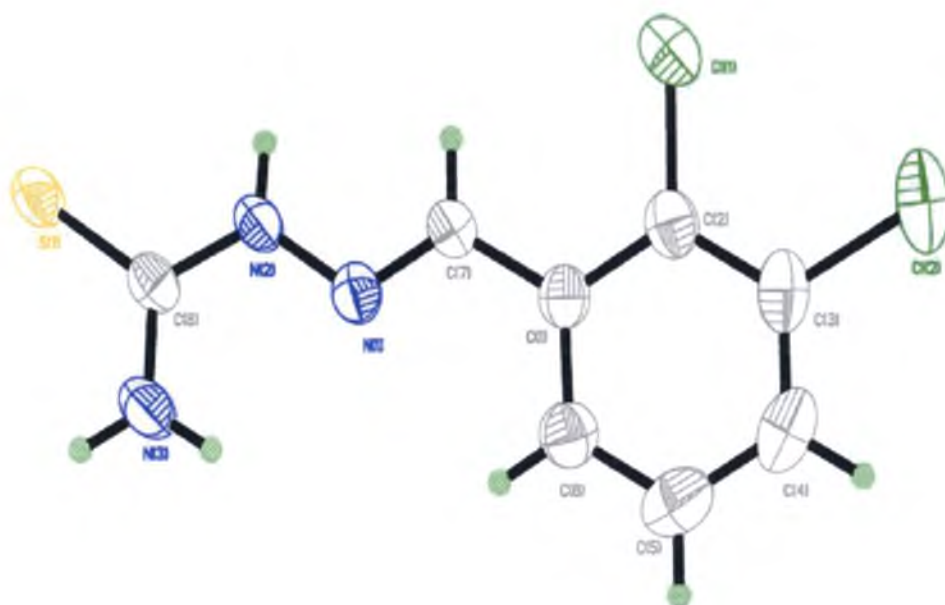
7. SUPLEMENT

7.1 Struktura krystalograficzna kwasu 2-[5-(4-hydroksybenzoilo)]pirazynokarboksylowego



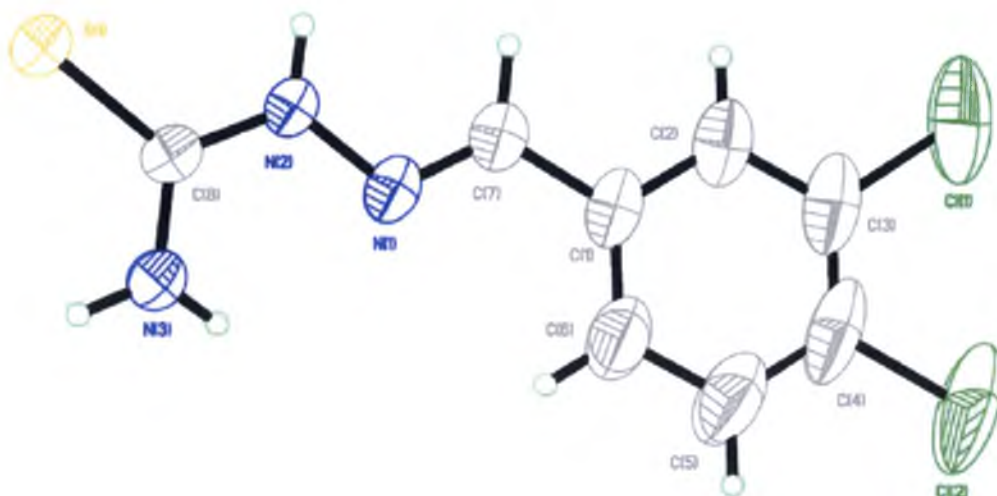
Formuła	$C_{12}H_8N_2O_4 \cdot 2(H_2O)$
Masa [g/mol]	280,24
Układ krystalograficzny	trójskośny
Grupa przestrzenna	P1
a (Å)	6,7346(5)
b (Å)	7,2143(5)
c (Å)	13,9007(10)
α (°)	86,321(6)
β (°)	82,561(6)
γ (°)	66,713(7)
Z	2
Indeks R	$R_1 = 0,0759$; $wR_2 = 0,091$
Baza Cambridge	CCDC 856480

7.2 Struktura krystalograficzna (*E*)-2-(2,3-dichlorobenzylideno)hydrazynotiokarboamidu



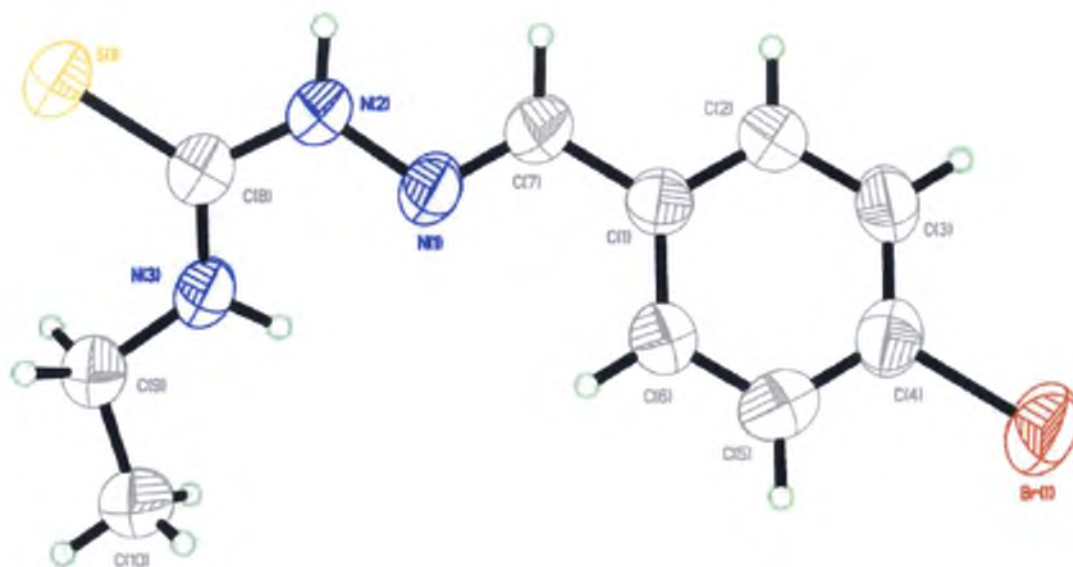
Formuła	C ₈ H ₇ Cl ₂ N ₃ S
Masa [g/mol]	248,14
Układ krystalograficzny	jednoskośny
Grupa przestrzenna	P2 ₁ /C
a (Å)	12,7143(9)
b (Å)	5,6203(3)
c (Å)	16,0382(9)
α (°)	90
β (°)	109,046(7)
γ (°)	90
Z	4
Indeks R	R ₁ = 0,0418; wR ₂ = 0,0865
Baza Cambridge	CCDC 857492

7.3 Struktura krystalograficzna (E)-2-(3,4-dichlorobenzylideno)hydrazynotiokarbamidu



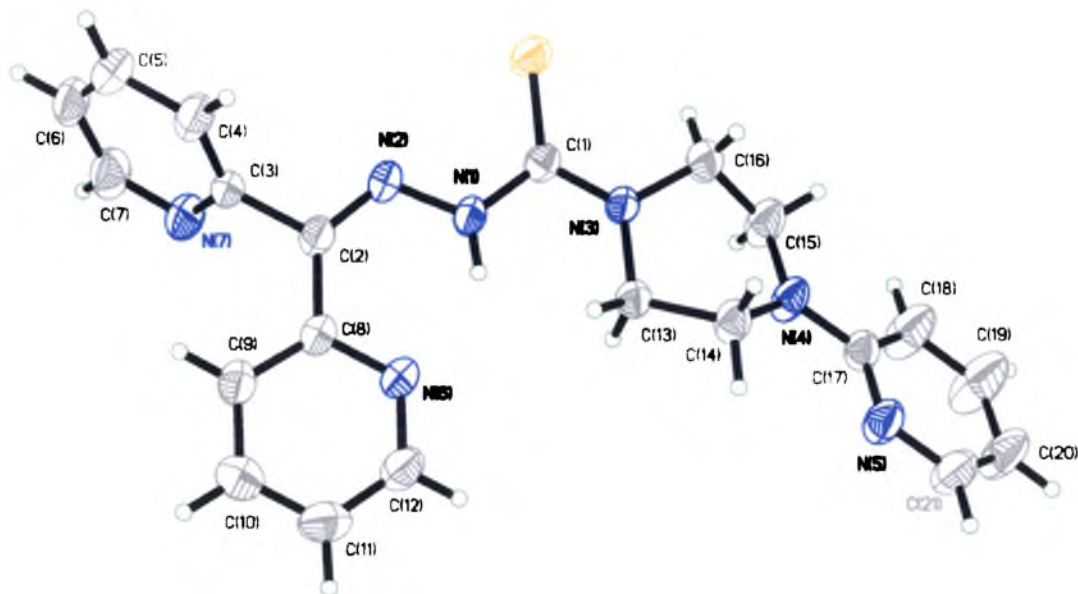
Formuła	C ₈ H ₇ Cl ₂ N ₃ S
Masa [g/mol]	248,14
Układ krystalograficzny	trójskośny
Grupa przestrzenna	P-1
a (Å)	5,8447(3)
b (Å)	7,731695
c (Å)	12,6901(7)
α (°)	96,330(5)
β (°)	95,412(4)
γ (°)	106,992(5)
Z	2
Indeks R	R ₁ = 0,0699; wR ₂ = 0,1234
Baza Cambridge	CCDC 825885

7.4 Struktura krystalograficzna (*E*)-2-(4-bromobenzylideno)-*N*-etylohydrazynotiokarbonylamidu



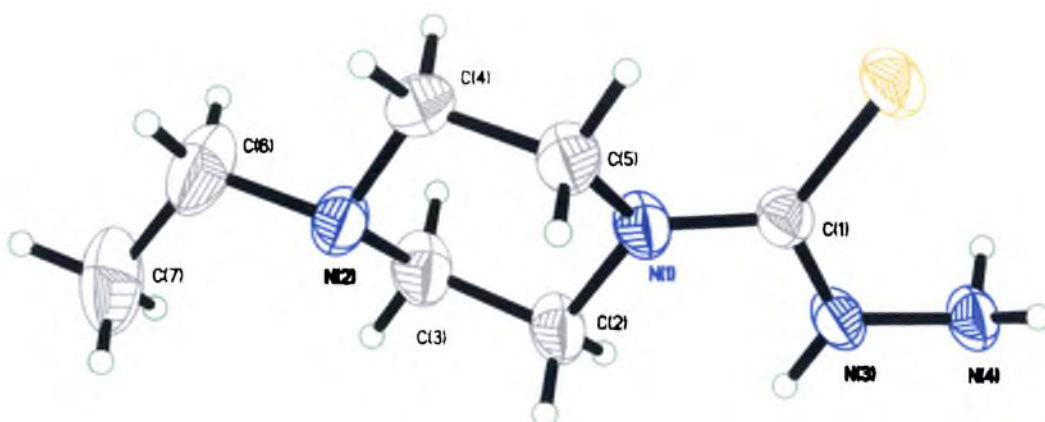
Formuła	C ₁₀ H ₁₂ BrN ₃ S
Masa [g/mol]	286,2
Układ krystalograficzny	trójskośny
Grupa przestrzenna	P-1
a (Å)	6,5767(5)
b (Å)	7,8801(5)
c (Å)	11,8484(9)
α (°)	83,220(6)
β (°)	87,389(5)
γ (°)	89,906(6)
Z	2
Indeks R	R ₁ = 0,0738; wR ₂ = 0,0865
Baza Cambridge	CCDC 825886

7.5 Struktura krystalograficzna *N'*-[di(2-pirydynylo)metyleno]-4-(2-pirydynylo)-piperazino-1-tiokarbonylhydrydu



Formuła	C ₂₁ H ₂₁ N ₇ S
Masa [g/mol]	403,51
Układ krystalograficzny	trójskośny
Grupa przestrzenna	P-1
a (Å)	9,2850(6)
b (Å)	9,5201(8)
c (Å)	11,6512(7)
α (°)	76.265(6)
β (°)	88.780(5)
γ (°)	79.734(6)
Z	2
Indeks R	R ₁ = 0,0444; wR ₂ = 0,1174
Baza Cambridge	CCDC 919683

7.6 Struktura krystalograficzna (4-etylo-1-piperazyνο)tiokarbohydrazynu



Formuła	C ₇ H ₁₆ N ₄ S
Masa [g/mol]	188.3
Układ krystalograficzny	jednoskośny
Grupa przestrzenna	C2/c
a (Å)	12,3069(7)
b (Å)	8,0115(4)
c (Å)	21,0221(12)
α (°)	90
β (°)	101,825(6)
γ (°)	90
Z	8
Indeks R	R ₁ = 0,0350; wR ₂ = 0,0934
Baza Cambridge	CCDC 918418

7.7 Widmo spektrometrii masowej (ESI) dla kompleksu Fe(III) z N-etylo-2-[(8-hydroksychinolin-2-ylo)metyleno]hydrazynotiokarboamidem

