



Agnieszka Witkowska

Rozprawa doktorska pt.:

**„Synteza i badania fizykochemiczne pochodnych
1,2-Bis(pirydylo)etylenu jako potencjalnych, termowrażliwych
znaczników fluorescencyjnych”**

Praca przedstawiona
Radzie Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
celem uzyskania stopnia naukowego
doktora nauk chemicznych

Promotor: dr hab. Marcin K. Chmielewski

Promotor pomocniczy: dr Jolanta Brzezińska

Poznań 2019

Serdecznie dziękuję

***Panu profesorowi Marcinowi Chmielewskiemu
za przekazaną wiedzę oraz umiejętności***

Serdecznie dziękuję

Doktor Jolancie Brzezińskiej

*za mobilizację, wsparcie i niezliczone dyskusje :)
nie tylko w kontekście codziennej pracy*

Serdeczne podziękowania składam

Doktorowi Tomaszowi Pędzińskiemu za współpracę i pomoc w wykonywaniu eksperymentów

Doktorowi Jackowi Kolanowskiemu za okazaną serdeczność, wskazówki merytoryczne i życiowe

Doktorowi Michałowi Gładyszowi za cenne uwagi podczas czytania mojej dysertacji, która okazała się kryminałem ;)

Zespołowi Projektowania i Syntezy Biopolimerów: Magdalenie, Annie, Dominice, Sandrze za okazaną serdeczność i pomoc gdy tylko to potrzebne, a w szczególności Tomaszowi K. i Martynie za niezliczone rozmowy, śmiech i wiarę we mnie 😊

Zakładom Chemii Biologicznej i Sond Molekularnych: Panu profesorowi Wojciechowi Markiewiczowi, pani Katarzynie Rożek, Aleksandrze, Bartoszowi, Adamowi, za dyskusje i miłą atmosferę

Doktorantom z roku za wspólne dyskusje, spotkania i prace nad Nocą Naukowców

Marcie Rachwałak za wysłuchiwanie moich trosk :), śmiech i bycie zawsze kiedy jest to niezbędne

Géraldine who supported me everyday throughout this harsh path and didn't let me to give up

Rodzicom i siostrze za wiarę we mnie i moje możliwości każdego dnia mojego życia

**Pracę dedykuję rodzicom oraz wszystkim
najważniejszym osobom w moim życiu,
które miały bezpośredni wpływ na kształtowanie moich
poglądów, sposobu myślenia i podejmowania decyzji**

Wstęp

Termolabilność jest pożądaną cechą związków znajdującą zastosowanie w wielu dziedzinach chemii. Idealnym przykładem jej wykorzystania, są 2-Pirydynylowe Termolabilne Grupy Ochronne (2-Py TGO) stosowane w protekcji grup hydroksylowych oraz fosforowych. Stosowanie tych grup pozwala na zastosowanie łagodnych metod odblokowania, unikając silnych kwasów lub zasad, w myśl tzw. zielonej chemii. Proces ich usuwania przebiega, według poznanego mechanizmu wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, zależnego ściśle od struktury pochodnej 2-aminopirydynylowej, rozkładu elektronowego oraz pH i temperatury otoczenia. Ze względu na właściwości pierścienia pirydynowego, stanowią one idealne prekursory do projektowania związków o potencjalnych właściwościach biologicznych lub/i zastosowaniu ich jako różnego rodzaju sensory fluorescencyjne.

Pierścień heterocykliczny to ważny element strukturalny barwników fluorescencyjnych, którego obecność często wzmacnia właściwości fotochemiczne, zwiększa stabilność oraz umożliwia wykorzystanie jako sond molekularnych, wrażliwych na zmiany pH lub obecność określonych jonów metali. Takim typem barwników są na przykład barwniki aminostyrylopirydynowe pełniące między innymi funkcję sensorów zmian napięcia powierzchni błon komórkowych obserwowalnych w wyniku zmian intensywności emisji fluorescencji. Celem dysertacji było zatem otrzymanie analogów układów 2-aminopirydynylowych, które zachowując część strukturalną odpowiedzialną za zdolność do wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, zyskałyby właściwości fluorescencyjne. Wiele dziedzin naukowych, takich jak chemia kwasów nukleinowych, medycyna i biologia, wykorzystuje w swych badaniach znakowanie fluorescencyjne, przeprowadzane m.in. do monitorowania przebiegu procesów chemicznych i biologicznych zachodzących w organizmach żywych. Połączenie termowrażliwości i zmian różnic w emisji fluorescencji doprowadziłoby do otrzymania barwnika, użytecznego w znakowaniu oligomerów, a co więcej usuwanego w łagodnych warunkach, w dogodnym momencie i nie naruszając struktury biocząsteczki. Potwierdzenie mechanizmu termo-usuwania fluorescencyjnych analogów 2-Py TGO w warunkach wodnych i neutralnym pH, może również stanowić ważne narzędzie diagnostyczne, gdzie możliwość detekcji jest efektem zmian maksimum emisji fluorescencji pomiędzy dwiema formami: liniową (znakowana biomolekuła), a cykliczną (forma znacznika po jego usunięciu).

W toku realizowanych prac badawczych zsyntetyzowano bibliotekę 2-*N*-podstawionych 6-bromo- i winylopirydynowych analogów termolabilnych grup ochronnych (2-Py TGO), poszerzając tym samym klasę związków o potencjalnym zastosowaniu w syntezie organicznej i biochemii. Opracowano i zoptymalizowano szlaki syntetyczne prowadzące do uzyskania nowej klasy związków pirydynowych - analogów 1,2-Bis(2-pirydylo)etylenu - emitujących fluorescencję. Cel osiągnięto, opierając się głównie na chemii pirydyn, oraz wykorzystując reakcje substytucji nukleofilowej S_N2 i reakcje sprzęgania Hecka, w celu tworzenia wiązań Csp²-Csp². Struktury otrzymanych związków pośrednich oraz produktów ubocznych i końcowych zidentyfikowano na podstawie badań spektroskopowych (¹H NMR, ¹³C NMR, HSQC, COSY, ¹⁹F NMR, ¹H-¹⁵N NMR), spektrometrii mas z jonizacją typu elektrorozpylenie (ang. *Electrospray MS*). Dla pochodnej którą otrzymano w postaci krystalicznej wykonano, badania rentgenograficzne metodą dyfrakcji promieni rentgenowskich na monokryształach. Otrzymano związek modelowy, węglan 3'-*O*-acetylowanej tymidyny, wykorzystany do badań szybkości procesu usuwania znacznika, przeprowadzając analizę przebiegu efektywności uwalniania grupy 5'-OH nukleozydu w zależności od czasu i temperatury, z zastosowaniem Wysokosprawnej Chromatografii Cieczowej. Dodatkowo, dla otrzymanych pochodnych, wyznaczono parametry fotofizyczne charakteryzujące ich właściwości fluorescencyjne takie, jak: maksima absorpcji i emisji, przesunięcia Stokes'a, molowy współczynnik ekstynkcji oraz wydajność kwantową fluorescencji. Zweryfikowano wpływ pH oraz rozpuszczalników różniących się polarnością, na widma absorpcji oraz emisji fluorescencji, dla trzech wybranych związków, różniących się podstawnikiem na egzocyklicznym atomie azotu. Dla trzech analogów, wyznaczono metodą spektrofotometryczną pK_a, a następnie z cyklu Forstera obliczono pK_a* stanu wzbudzonego. Opracowano również, metodę syntezy amidofosforynu wybranego fluoroforu, jego przyłączenia do nici oligonukleotydowej podczas syntezy standardową metodą amidofosforynową na podłożu stałym oraz udowodniono mechanizm odcięcia znacznika, polegający na wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, barwnika z diestru fosforanowego znakowanego oligonukleotydu - uzyskując oligonukleotyd z wolną grupą fosforanową na końcu 5'.

Otrzymane wyniki badań wzbogacają chemię związków heterocyklicznych o nowe pochodne, które mogą zostać wykorzystane w syntezie organicznej. Ich właściwości fotochemiczne oraz charakterystyczny mechanizm usuwania ze znakowanej cząsteczki, będzie mógł znaleźć zastosowanie w chemii oligonukleotydów lub nawet w śledzeniu procesów chemicznych zachodzących w komórkach żywych.

Dorobek naukowy

Publikacje

- Jolanta Brzezińska, **Agnieszka Witkowska**, Dominika Krygier, Tomasz P. Kaczyński, Tomasz Ratajczak, Marcin K. Chmielewski; Experimental and computational studies on a protonated 2-pyridinyl moiety and its switchable effect for the design of thermolytic devices; *Plos One*, wrzesień **2018**
- Jolanta Brzezińska, **Agnieszka Witkowska**, Dominika Krygier, Tomasz P. Kaczyński, Tomasz Ratajczak, Marcin K. Chmielewski; 2-Pyridinyl Thermolabile Groups as General Protectants for Hydroxyl, Phosphate, and Carboxyl Functions; *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, Supplement 68, marzec **2017**
- Jolanta Brzezińska, **Agnieszka Witkowska**, Sandra Bałabańska, Marcin K. Chmielewski; 2-Pyridinyl-N-(2,4-difluorobenzyl)aminoethyl Group As Thermocontrolled Implement for Protection of Carboxylic Acids; *Org. Lett.*, **2016**, 18 (13), pp 3230–3233
- **Agnieszka Witkowska**, Dominika Krygier, Jolanta Brzezińska, Marcin K. Chmielewski; Modulating Stability of 2-Pyridinyl Thermolabile Hydroxyl Protecting Groups by the 'Chemical Switch' Approach; *J. Org. Chem.*, **2015**, 80 (24), pp 12129–12136

Doniesienia konferencyjne

- Agnieszka Witkowska, Sandra Bałabańska, Jolanta Brzezińska, Marcin K. Chmielewski; Stabilizacja 2-Pirydynylowych Termolabilnych Grup Ochronnych (2-Py TGO) w koncepcji "Chemical Switch"; IV Wielkopolskie Seminarium Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów, 02.12.2017r., Poznań
- Agnieszka Witkowska, Sandra Bałabańska, Jolanta Brzezińska, Marcin K. Chmielewski; Chemical Switch Methodology – Adjustment of thermolytic properties; XVIIth Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components, 4-9.06.2017, Český Krumlov
- 59. Zjazd Naukowy PTChem; Poznań; 19-23.09.2016. Współautorstwo posteru pt. „Synteza i przekształcenie fluorowanych estrów kwasów fosfonowych zawierających pierścień oksiranowy”(w j. polskim); Magdalena Rapp, Klaudia Margas-Musielak, Agnieszka Witkowska, Henryk Koroniak;
- 59. Zjazd Naukowy PTChem; Poznań; 19-23.09.2016. Współautorstwo komunikatu pt. „Comprehensive Protection via Thermolabile Groups for Biopolymer synthesis”; Jolanta Brzezińska, Sandra Bałabańska, Dominika Krygier, Agnieszka Witkowska, Marcin K. Chmielewski;
- Agnieszka Witkowska, Dominika Krygier, Jolanta Brzezińska, Marcin K. Chmielewski; Prezentacja posteru pt. „Stabilizacja 2-pirydynylowych Termolabilnych Grup Ochronnych

(2-Py TGO) w koncepcji chemicals switch” (w j. polskim); 58. Zjazd Naukowy PTChem; Gdańsk; 21-25.09.2015.

- A.Witkowska, S. Bałabańska, M. Trojanowicz, D. Krygier, M.K. Chmielewski; Badanie reakcji termocyklizacji 2-pirydynylowych Termolabilnych Grup Ochronnych z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej; VIII Konferencja "Analityczne Zastosowania Chromatografii Cieczowej", Warszawa, 2014
- A.Witkowska, D. Krygier, J. Brzezińska, M.K. Chmielewski; 2-pirydynylowe termo labilne grupy ochronne, 57 Zjazd Naukowy PTChem, Częstochowa, 2014
- A.Witkowska, M. Rapp, J. Karwacka, K. Margas-Musielak, H. Koroniak; Synteza i reaktywność oksiranowych pochodnych estrów kwasów fluorometyleno fosfonowych; 56 Zjazd Naukowy PTChem i SITPChem, Siedlce, 2013
- A. Witkowska, M. Rapp, J. Karwacka, K. Margas, H. Koroniak; Synteza oraz reakcje nukleofilowego otwarcia pierścienia β,γ -epoksydowych monofluorowych pochodnych estrów kwasów fosfonowych. Chiralność – od cząstki elementarnej do Uniwersum”, Poznań 7.06. 2013 r.
- A. Witkowska, M. Rapp, K. Margas, H. Koroniak; Synthesis and ring opening of α -monofluorinated- β,γ -epoxy phosphonate derivatives; 17th European Symposium on Fluorine Chemistry, 2013 r. Paris, France

Projekty (kierownik, wykonawca)

- Kierownik Grantu dla Młodych w roku **2017** pt.: *Analiza właściwości fluorescencyjnych i termolabilnych pochodnych 1,2-bis(2-pirydylo)etyleny*

Zgłoszenia patentowe

- **Witkowska A.**, Krygier D., Brzezińska J., Chmielewski M.K. “Sposób podniesienia trwałości 2-Pirydynylowych Termolabilnych Grup Ochronnych oraz związku do tego sposobu” P.412706 (06.2015) PL412706-A1 19 Dec 2016
- Marcin K. Chmielewski, **Agnieszka Witkowska**, Piotr Putaj, Jolanta Brzezińska „Pochodne pirydyn-2-yl-winylopirydynylowych o właściwościach fluorescencyjnych oraz sposób ich syntezy” 06.12.2018 P. 428083
- Marcin K. Chmielewski, **Agnieszka Witkowska**, Piotr Putaj, Jolanta Brzezińska „Sposób syntezy pochodnych pirydyn-2-yl-winylopirydynylowych (PvP)” 06.12.2018P.428082
- Marcin K. Chmielewski, **Agnieszka Witkowska**, Piotr Putaj, Jolanta Brzezińska „Znaczniki fluorescencyjne oraz sposób ich wytwarzania i zastosowanie” 06.12.2018 P. 428084

Pozostały dorobek

- Działalność w Radzie Samorządu Doktorantów przy IChB PAN w roku akademickim 2015/2016
- Nagroda Dyrektora IChB PAN za najlepszą pracę eksperymentalną z dziedziny chemii opublikowaną w roku 2015 (publikacja *J. Org. Chem.*, 2015, 80 (24), pp 12129–12136)
- Pozyskanie stypendium dla najlepszych doktorantów w roku akademickim 2016/2017

Wykaz stosowanych skrótów

2-Py TGO – 2-pirydynylowe termolabilne grupy ochronne

Ac- acetyl

AcOz – 4-acetoksybenzyloksykarbonyl

Aloc – grupa alliloksykarbonylowa

ASP – barwniki aminostyrylopirydynowe

BMIM - heksafluorofosforan butylometyloimidazoliniowy

BOC – tert-butyloksykarbonyl

BOM –benzyloksymetyl

CAN – azotan nitrowo cerowy (IV)

CBz – benzyloksykarbonyl

CDA - cykloheksano-1,2-diacetal

Co-Cp - kobaltocyklopentadien

CPG – podłoże szklane

DBU - 1,8-Diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en

DCE – 1,2-dichloroetan

DCM- dichlorometan

DDQ – dichlorodicyjanochinon

DEIPS - dietyloizopropylsililu

Desyl – 2-okso-1,2-difenyletyl

DISPOKE – dispiroketal

DMASP – 4-[4 (dimetylamino) styrylo]pirydyny

DMF – dimetyloformamid

Dmpm – 2,4-dimetoksybenzyl

DMSO – dimetylosulfotlenek

DMTr – grupa dimetoksytrytylowa

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

DTBS - bis(trifluorometanosulfonian) di-*tert*-butylosilium

EDG – ang. *electron donatin group*

ESI – elektrorozpylanie

EWG – ang. *electron withdrawing group*

Fmoc - chloromrówczan 9-fluorenylometylu

FRET = Forster Resonance Energy Transfer

GABA – kwas *gamma*-aminomasłowy

HAT – ang. *Human African Trypanosomiasis*

HMBC - ang. Heteronuclear multiple bond correlation

HOMO – najwyższy obsadzony orbital molekularny

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa

HSQC - ang. Heteronuclear single quantum correlation

Hz - Herz

IC – konwersja wewnętrzna

ICT – międzycząsteczkowe przeniesienie ładunku

ISC – przejście międzysystemowe

IUPAC – Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej

k_{rel}^{-1} - relatywna stała hydrolizy

LUMO – najniższy obsadzony orbital molekularny

MALDI – desorpcja laserem

MEM - metoksyetoksymetyl	S _N 1 – substytucja nukleofilowa pierwszego rzędu
MeO-THP – metoksy tetrahydropiranyl	S _N 2 – substytucja nukleofilowa drugiego rzędu
MOM –metoksymetyl	S _N Ar – substytucja nukleofilowa w pierścieniu aromatycznym
MpM – 4-metoksybenzyl	STABASE – 2,2,5,5-tetrametyl-1-aza-2,5-disilacyklopentan
MS – spektrometria mas	<i>t</i> - Bu – <i>tert</i> -butyl
MW – mikrofale	TBAB – bromek tetrabutylamoniowy
NAD ⁺ – forma utleniona dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego	TBAF – fluorek tetrabutylamoniowy
NADH – forma zredukowana dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego	TBDMS – <i>tert</i> -butylodimetylosilil
NMR – magnetyczny rezonans jądrowy	TCA – kwas trichlorooctowy
PAGE – elektroforeza żelowa	TCSPC – Time Correlated Single Photon Counting
PBS – bufor fosforanowy	Teoc – 2-(trimetylsilil)etoksykarbonyl
PCC – chlorochromian pirydyny	TES – eter trietylosililowy
PDC – dichromian pirydyny	TGO – termolabilne grupy ochronne
pH - $-\log[H^+]$	THF – tetrahydrofuran
PhAc – fenyloacetamid	THP - tetrahydropiranyl
PLC – preparatywna chromatografia cienkowarstwowa	TIPDS - tetradiizopropylodisiloksan
ppm – parts per milion	TIPDSCI – chlorek tetradiizopropylodisiloksanu
Pv – piwaloil	TIPS – eter triizopropylsililowy
Py – pirydyna	TLC – chromatografia cienkowarstwowa
PydFBz – grupa 2-pirydynylo- <i>N</i> -(2,4-difluorobenzyl)aminoetylowa	TMG – 1,1,3,3 - tetrametyloguanidyna
PyVnPy – pochodne 1,2-Bis(pirydylo)etylenu	TMS – ester trimetylosililowy
RNA – kwas rybonukleinowy	TMSE – ester trimetylosililoetylowy
RT – temperatura pokojowa	UV-ViS – ultrafiolet-światło widzialne
SEM – 2-(trimetylsilil)etoksymetyl	

UWAGA!

Ze względu na przejrzystość zapisu, w części eksperymentalnej zastosowano anglosaski separator dziesiętny *kropkę (.)* w miejsce stosowanego zwyczajowo w Polsce *przecinka (,)*.

Spis treści

Wstęp	11
Dorobek naukowy	13
Wykaz stosowanych skrótów	15
I. CEL PRACY	25
II. CZĘŚĆ LITERATUROWA.....	31
1. Grupy ochronne w chemii organicznej.....	33
1.1. Podział grup ochronnych.....	34
1.2. Kwasolabilne grupy ochronne.....	35
1.3. Zasadolabilne grupy ochronne.....	38
1.4. Grupy ochronne usuwane fluorkami	40
1.5. Grupy ochronne usuwane enzymatycznie	42
1.6. Grupy fotolabilne	44
1.7. Termolabilne grupy ochronne.....	45
1.7.1. Ochrona centrum fosforowego.....	45
1.7.2. 2- <i>N</i> -pirydynylowe termolabilne grupy ochronne (2-Py TGO).....	47
1.7.3. Ortogonalność grup 2-Pirydynylowych.....	49
2. Pirydyna i jej pochodne	51
2.1. Struktura pirydyny.....	51
2.2. Reaktywność pirydyny i jej pochodnych	52
2.2.1. Substytucja nukleofilowa	53
2.2.1.1. Reakcja z jonami hydroksylowymi	54
2.2.1.2. Reakcje z organolitowymi pochodnymi	54
2.2.2. Substytucja elektrofilowa.....	55
2.2.2.1. Reakcje z kwasami.....	56
2.2.2.2. Reakcje z jonami metali	56
2.3. Reakcje metaloorganiczne	56
2.3.1. Reakcja Hecka	57
2.3.2. Reakcja Hecka dla układów heterocyklicznych	59
2.4. Pochodne 2-aminopirydynowe	61

2.4.1. Właściwości biologiczne 2-aminopirydyn.....	62
3. Spektroskopia związków organicznych.....	63
3.1. Zjawisko absorpcji światła	63
3.2. Zjawisko emisji światła	65
3.3. Fluorescencja	66
3.3.1. Reguła Kashy i Francka-Condon.....	68
3.3.2. Widmo emisyjne i przesunięcie Stokes'a	69
3.3.3. Wydajność kwantowa.....	70
3.3.4. Czas życia fluorescencji.....	71
3.4. Fluorescencyjne znaczniki styrylowe.....	74
4. Synteza oligonukleotydów	77
4.1. Synteza oligonukleotydów metodą amidofosforynową na podłożu stałym	77
III. BADANIA WŁASNE I Dyskusja Wyników	83
1. Modyfikacja struktury 2-pirydynylowych termolabilnych grup ochronnych	85
1.1. Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-bromo-6-(2-pirydyn-2-yl-winylo)pirydyny (PvVnPy) – optymalizacja reakcji Hecka.....	86
1.1.1. Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-bromo-6-(2-pirydyn-2-yl-winylo)pirydyny z zastosowaniem chlorku palladu (II) - ogrzewanie konwencjonalne.....	87
1.1.2. Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-bromo-6-(2-pirydyn-2-yl-winylo)pirydyny z zastosowaniem chlorku palladu (II) - wspomaganie mikrofalowe	88
1.1.3. Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-bromo-6-(2-pirydyn-2-yl-winylo)pirydyny z zastosowaniem octanu palladu (II) - wspomaganie mikrofalowe	91
1.1.4. Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-bromo-6-(2-pirydyn-2-yl-winylo)pirydyny z zastosowaniem węglańca cezu	92
1.2. Wydajna metoda otrzymywania (<i>E</i>)-2-bromo-6-[2-(pirydyn-2-yl)-winylo]pirydyny (3) oraz analiza produktu ubocznego	92
1.3. Otrzymywanie aminoalkoholowych pochodnych (<i>E</i>)-2-bromo-6-[2-(pirydyn-2-yl)-winylo]pirydyny	95
1.3.1. Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(2,4-difluorobenzyl{6-[2-(pyridin-2-yl)winylo]pyridin-2-yl}amino)etan-1-olu (16)	97
1.3.2. Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-((6-(2-(pirydyn-2-yl)winylo)pirydyn-2-yl)(chinolin-2-yl)amino)etanolu (19).....	100
1.4. Odwrotna droga syntezy	101
1.4.1. Otrzymywanie 2-(6-bromo-pirydyn-2-ylamino)-etanolu (21) - ścieżka B.....	102
1.4.2. Arylacja 2-pirydynowego atomu azotu.....	102
1.4.3. Reakcje tworzenia wiązania Csp ² -Csp ²	104

1.5. Synteza jodku (<i>E</i>)-2-(2-(6-((2-hydroksyetylo)(metylo)amino)pirydyn-2-yl)winylo)-1 metylopirydyniowego	107
1.6. Synteza(<i>E</i>)-2-bromo-4-nitro-6-(2-(pirydyn-2-ylo)winylo)pirydyny	111
1.7. Synteza 2-(6-chloro-4-nitropyridin-2-ylamino)etanolu.....	111
1.8. Synteza 2-(3-amino-6-bromopirydyn-2-ylamino)etanolu.....	112
2. Pomiarzy fizykochemiczne.....	113
2.1. Wyznaczanie molowego współczynnika absorpcji (ϵ)	114
2.2. Wyznaczanie wydajności kwantowej fluorescencji [ϕ_F]	115
2.3. Badanie zmian absorpcji i emisji fluorescencji w wyniku zmian polarności i pH.....	119
2.3.1. Solwatochromizm – widma absorpcyjno emisyjne.....	119
2.3.2. Czasy życia fluorescencji w zależności od rozpuszczalnika	124
2.3.3. Określenie oddziaływań z rozpuszczalnikiem	126
2.3.4. pH-wrażliwość	130
3. Synteza węglanów nukleozydów oraz badanie szybkości termocyklizacji	134
3.1. Synteza 3'- <i>O</i> - acetylo-5'-(2- {metylo- [6- (2-pirydyn-2-yl-winylo) -pirydyn-2-yl) – aminoetyloksykarbonylo tymidyny (10).....	135
3.2. Szybkość termocyklizacji	137
3.2.1. Wyznaczenie szybkości termocyklizacji w funkcji czasu	138
3.2.2. Wyznaczanie szybkości termocyklizacji w funkcji temperatury.....	140
3.2.3. Izolacja i potwierdzenie struktury produktu cyklicznego.....	143
3.3. Pomiar zmian fluorescencyjnych dla węglanu nukleozydu.....	145
4. Przyłączanie fluoroforu PyVnPy do nici oligonukleotydowej	147
4.1. Synteza (<i>E</i>)-2-cyanoetylo- 2-(metyl(6-(2-(pyridin-2-yl)winylo)pyridin-2-yl)amino)etylo-diizopropylamidofosforynu – metoda A.....	148
4.2. Przyłączenie znacznika do oligonukleotydu – podejście pierwsze.....	152
4.3. Synteza Bis[2-(pirydyno-2 yl)winylo]pirydynolo] <i>N,N,N',N'</i> -tetraizopropylamidofosforynu– metoda B	153
4.4. Przyłączenie znacznika do oligonukleotydu – podejście drugie.....	154
4.5. Badanie możliwości odłączania barwnika z końca 5'-oligonukleotydu.....	155
IV. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	159
1. Uwagi ogólne	161
1.1. Odczynniki do syntez.....	161
1.1.1. Rozpuszczalniki organiczne	161
1.1.2. Odczynniki stosowane do pomiarów fluorescencyjnych	161
1.2. Chromatografia cienkowarstwowa i kolumnowa	162

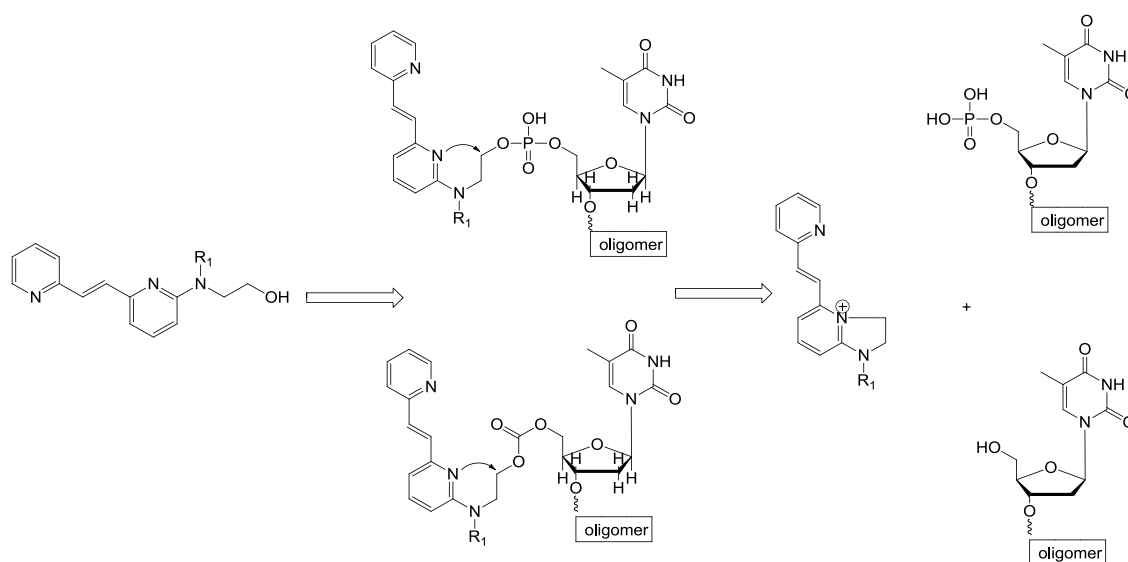
1.3. Reaktory mikrofalowe	162
1.4. Wysokosprawna Chromatografia Cieczowa	162
1.5. Spektroskopia NMR oraz Spektrometria Mas	163
1.6. Krystalografia – pomiary rentgenowskie i metody obliczeniowe	164
2. Synteza chemiczna.....	164
2.1. Otrzymywanie 2-(6-bromo-pirydyn-2-ylo-amino)-etanolu	164
2.2. Ogólna metoda arylicacji 2-pirydynyloowych aminoalkoholi	165
2.3. Otrzymywanie 2-[(6-bromo-pirydyn-2-ylo)-(2,4-difluoro-benzylo)-amino]-etanolu	165
2.4 Otrzymywanie 2-[(6-bromo-pirydyn-2-ylo)-(2,4-dimetylo-benzylo)-amino]-etanolu.....	166
2.5. Otrzymywanie 2-[(6-bromo-pirydyn-2-ylo)-(2-fluoro-benzylo)-amino]-etanolu	167
2.6. Otrzymywanie 2-[(6-bromo-pirydyn-2-ylo)-(2-chloro-benzylo)-amino]-etanolu.....	168
2.7. Otrzymywanie 2-[(6-bromo-pirydyn-2-ylo)-(4-metylo-benzylo)-amino]-etanolu.....	169
2.8. Otrzymywanie 2-[benzylo-(6-bromo-pirydyn-2-ylo)-amino]-etanolu	170
2.9. Otrzymywanie 2-[(6-bromo-pirydyn-2-ylo)-naftaleno-2-ylmetyl-amino]-etanolu.....	170
2.10. Ogólna metoda reakcji sprzęgania	171
2.11. Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-bromo-6-[2-(pirydyn-2-ylo)-winylo]pirydyny	172
2.12. Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(benzylo{6-[2-(pirydyn-2-ylo)winylo] pirydyn-2-ylo}amino)etan-1-olu	172
2.13. Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-((naftalen-2-yl-metylo)(6-(2-(pirydyn-2-ylo)winylo)pyridin-2-yl)amino)etanolu	173
2.14. Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(2,4-difluorobenzylo{6-[2-(pirydyn-2-ylo)winylo]pirydyn-2-yl}amino)etan-1-olu.....	174
2.15. Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(4-metylobenzylo{6-[2-(pirydyn-2-ylo)winylo] pirydyn-2-ylo}amino)etan-1-olu.....	175
2.16. Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-(2-chlorobenzylo{6-[2-(pirydyn-2-ylo)winylo]pirydyn-2-ylo}amino)etan-1-olu.....	176
2.17. Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-{2,4-dimetylobenzylo-[6-(2-pirydyn-2-ylo-winylo)-pirydyn-2-ylo]-aminoetanolu	177
2.18. Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-{2-fluorobenzylo-[6-(2-pirydyn-2-ylo-winylo)-pirydyn-2-ylo]-aminoetanolu	178
2.19. Ogólna metoda substytucji nukleofilowej S _N Ar	179
2.20. Otrzymywanie (<i>E</i>)-6-(2-pirydyn-2-yl-winylo)-pirydyn-2-ylo)-aminoetanolu (8).....	179
2.21. Otrzymywanie (<i>E</i>)-2-{metylo-[6-(2-pirydyn-2-ylo-winylo)-pirydyn-2-ylo)-aminoetanolu	180
2.22. Synteza jodku (<i>E</i>)-2-(2-(6-((2-hydroksyetylo)(metylo)amino)pirydyn-2-ylo)winylo)-1-metylopirydyniowego.....	182

2.23. Otrzymywanie 2-(2,4-difluorofenylamino)etanolu.....	183
2.24. Otrzymywanie 2-(chinolin-2-ylamino)etanolu.....	183
2.25. Ogólna procedura otrzymywania węglanu nukleozydu.....	184
2.26. Otrzymywanie 3'-O-acetylo-5'-(2-{metylo-[6-(2-pirydyn-2-yl-winylo)-pirydyn-2-ylo- aminoetyloksykarbonylo tymidyny (46)	185
2.27. Synteza (E)-2-cyjanoetylo- 2-(metyl(6-(2-(pirydyn-2-ylo)winylo) pirydyn-2- ylo)amino)etylo diizopropylu amidofosforanu (49) - metoda A	186
2.28. Synteza Bis-[2-(pirydyn-2-ylo)winylo]pirydyn-2-ylo]N,N,N',N'-tetraizopropylu amidofosforanu (51)– metoda B.....	186
2.29. Zautomatyzowana Synteza DNA.....	187
3. Pomiary fizykochemiczne.....	189
3.1. Widma absorpcji	189
3.2. Spektrofluorymetria.....	190
V. NAJWAŻNIEJSZE WYNIKI	211
VI. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM	215
VII. BIBLIOGRAFIA.....	219

I. CEL PRACY

Cele niniejszej pracy

Celem mojej pracy doktorskiej było opracowanie metody syntezy nowych znaczników fluorescencyjnych o unikalnych termowrażliwych właściwościach, potwierdzenie sposobu ich usuwania oraz zbadanie właściwości fotofizycznych. Koncepcja badawcza zakładała zaprojektowanie i zoptymalizowanie szlaku syntetycznego pochodnych 1,2-Bis(pirydylo)etylenu, będących prekursorami przyszłych termowrażliwych znaczników fluorescencyjnych. Następnie, przekształcenie tych prekursorów w estry węglanowe lub fosforanowe, co w konsekwencji miało pozwolić na przebadanie wewnątrzcząsteczkowej reakcji cyklizacji i dzięki temu usunięcie znacznika.



Ugrupowania 2-aminopirydynylowe stosowane są w chemii nukleozydów jako tak zwane termolabilne grupy ochronne (2-Py TGO), których mechanizm deprotekcji opiera się na wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji zależnej od rozkładu elektronowego w pierścieniu pirydyny, pH oraz temperatury. Rozbudowanie układu, w taki sposób, aby zachować dotychczasową termowrażliwość i uzyskać emisję fluorescencji w zakresie światła widzialnego, zdecydowanie poszerzyłoby zakres ich użyteczności jak i wzbogaciło chemię związków heterocyklicznych o nowe, interesujące analogi pirydyn. W ramach prowadzonych prac badawczych, zdecydowałam się na utworzenie sprzężonego układu wiązań podwójnych i dołączenie kolejnego pierścienia heterocyklicznego, aby otrzymać analogi, styrylowych znaczników fluorescencyjnych z możliwością ich dowolnej modyfikacji w obrębie całej cząsteczki. Nowe, termowrażliwe znaczniki znajdują

zastosowanie, np. w znakowaniu oligonukleotydów jako funkcjonalnych oligomerów w technice RT-PCR. Z punktu widzenia zastosowań w chemii biopolimerów, połączenie termowrażliwości z emisją fluorescencji, pozwoliłoby na uzyskanie nowego znacznika z unikalnym sposobem usuwania przebiegającym w łagodnych warunkach, nie naruszającym struktury znakowanej biocząsteczki. W tym celu, podjęłam się również wyznaczenia parametrów fotofizycznych otrzymanych związków oraz opracowania metody ich włączania i usuwania z wybranej sekwencji oligonukleotydowej.

Szczegółowe cele syntetyczne:

1. Opracowanie wydajnej drogi syntezy fluorescencyjnych analogów 1,2-(Bis-2-pirydynylo)etylenu oraz ich prekursorów.
2. Optymalizacja reakcji sprzęgania Hecka Csp^2-Csp^2 pomiędzy 2-winylopirydyną a 6-bromo-2-*N*-pirydynylowymi analogami termolabilnych grup ochronnych.
3. Przeprowadzenie reakcji metylacji wybranej pochodnej. Celem było otwarcie potencjalnej drogi do uzyskiwania soli pirydyniowych, które zachowują właściwości termolabilne, a poprzez zmiany elektronowe cechują się odmiennymi właściwościami fotochemicznymi.
4. Synteza modelowego węglanu 3'-*O*-acetylowanej tymidyny z umieszczonym wybranym fluoroforem na końcu 5' nukleozydu.
5. Synteza amidofosforynu wybranego fluoroforu, oraz wprowadzenie go na 5'-koniec oligomeru podczas syntezy oligonukleotydów metodą amidofosforynową na fazie stałej.
6. Opracowanie warunków obróbki post-syntetycznej znakowanego oligomeru pozwalających zachować w formie niezmienionej znakowaną biocząsteczkę.

Szczegółowe cele z zakresu badań fotochemicznych:

1. Wyznaczenie molowego współczynnika ekstynkcji dla każdego z otrzymanych fluoroforów, w wybranym rozpuszczalniku.
2. Wyznaczenie wydajności kwantowej fluorescencji dla każdego z otrzymanych fluoroforów, w wybranym rozpuszczalniku.

3. Dla wszystkich pochodnych, określenie zmian w maksimach absorpcyjno-emisyjnych oraz przesunięciach Stokes'a w zależności od podstawnika na egzocyklicznym atomie azotu.
4. Dla wybranych pochodnych, określenie wpływu polarności, właściwości *H*-donorowych i solwujących rozpuszczalników na przesunięcia Stokesa oraz czasy życia fluorescencji.
5. Dla wybranych pochodnych, określenie wpływu pH na maksima absorpcji i emisji.
6. Dla otrzymanych pochodnych, wyznaczenie pKa metodą spektrofotometryczną oraz pKa* z cyklu Forstera.

Szczegółowe cele z zakresu termowrażliwości i znakowania fluorescencyjnego:

1. Określenie szybkości i efektywności reakcji termocyklizacji na modelowym węglanie 3'-*O*-acetylowanej tymidyny, w zależności od zmian temperatur i czasu z wykorzystaniem techniki HPLC, stosując detektory: DAD oraz FLD.
2. Określenie prawdopodobieństwa oraz szybkości usuwania barwnika ze znakowanego oligonukleotydu z wykorzystaniem techniki HPLC stosując detektory: DAD oraz FLD barwnika. Określenie prawdopodobnego mechanizmu odłączenia barwnika od oligonukleotydu.

II. CZĘŚĆ LITERATUROWA

1. Grupy ochronne w chemii organicznej

Opracowanie wydajnej metody syntezy chemicznej wymaga umiejętności planowania, przewidywania oraz wiedzy z zakresu reaktywności poszczególnych klas związków. Jeżeli szlak syntetyczny jest wieloetapowy i w strukturze związku współistnieją takie same lub różne grupy funkcyjne, ale o zbliżonej reaktywności, wydajność reakcji ulega zmniejszeniu, a otrzymywanie związku docelowego¹ może stać się niemożliwe. W związku z tym, niezbędne jest stosowanie odpowiednich grup ochronnych. Grupy ochronne są narzędziem, w ręku chemika organika, ułatwiającym kontrolowanie przebiegu zaplanowanej syntezy. Odpowiednio opracowana strategia ochrony poszczególnych miejsc reakcyjnych może przyczynić się do zwiększenia liczby kroków syntetycznych, pozwalając jednak uzyskać pożądany produkt w sposób wydajny, często obniżając ilość powstających produktów ubocznych². W 2006 roku Hoffman³ w swojej pracy przeglądowej przedstawił szereg syntez, w których użycie grup ochronnych jest marginalne. W 2009 roku Phil Baran⁴ dowiódł, iż można przeprowadzić syntezę określonego związku docelowego bez stosowania jakichkolwiek grup ochronnych, twierdząc że, tym sposobem unika się również ogromnych strat wydajności związanych z etapami blokowania-odblokowywania^{3,4}. Mimo, że wprawiony chemik organik jest w stanie zaplanować syntezę na kilka sposobów, to nadal stosowanie grup maskujących jest niezwykle przydatne, a niekiedy niezbędne do zachowania chemo- i stereoselektywności czy też prowadzenia reakcji w prostszy sposób. W chemii kwasów nukleinowych, nadal stosuje się szeroki wachlarz grup ochronnych zapewniający selektywną ochronę określonych fragmentów cząsteczki⁵.

Grupy ochronne stanowią narzędzie do precyzyjnego sterowania przebiegiem procesu chemicznego. Jednakże, aby mogły znaleźć zastosowanie w chemii organicznej, muszą spełniać szereg istotnych kryteriów⁶:

- a) blokowanie grupy funkcyjnej musi zachodzić w sposób selektywny i wydajny, w jak najłagodniejszych warunkach reakcyjnych;

- b) stabilność grupy na każdym etapie syntezy, w tym również podczas między-etapowego oczyszczania musi być jak najwyższa;
- c) racemizacja lub epimeryzacja musi zachodzić w minimalnym stopniu
- d) usuwanie grupy ochronnej musi zachodzić w sposób selektywny i wydajny, w warunkach niewpływających na pozostałe grupy funkcyjne;
- e) po odblokowaniu pozostałość grupy ochronnej powinna być łatwo usuwana ze środowiska reakcji;
- f) zastosowanie grupy ochronnej nie powinno wprowadzać dodatkowych centrów asymetrii;

Niestety, istnieje niewiele grup ochronnych spełniających wszystkie z wymienionych powyżej kryteriów. Kompromisem jest praktyczne podejście do doboru grupy ochronnej, skupiające się na najważniejszych cechach, zapewniających przede wszystkim jej stabilność w warunkach prowadzenia reakcji jak i łatwość jej późniejszego usuwania.

1.1. Podział grup ochronnych

Grupy ochronne można, między innymi, podzielić według kryteriów ich wprowadzania (maskowanie grupy funkcyjnej) lub kryteriów usuwania (odbezpieczanie grupy funkcyjnej)^{7,8,9}:

a) maskowanie grupy

- grupy ochronne funkcji hydroksylowej: etery i estry
- grupy ochronne fenoli
- grupy ochronne 1,2- i 1,3- dioli
- grupy ochronne związków karbonylowych
- grupy ochronne kwasów karboksylowych
- grupy ochronne tioli
- grupy ochronne amin i amidów
- grupy ochronne funkcji fosforanowej
- grupy ochronne terminalnych alkinów

b) sposób usuwania

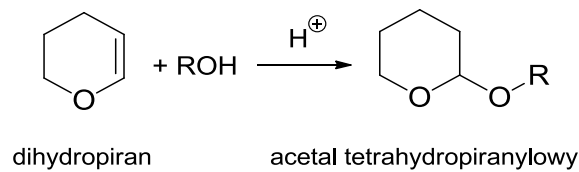
- kwaso-i zasadolabilne
- wrażliwe na kwasy Lewisa
- wrażliwe na działanie nukleofili lub elektrofilii
- ulegające hydrogenolizie
- usuwane poprzez związki metaloorganiczne, czynniki redukujące lub utleniające
- inne: usuwane fluorkami, fotolabilne i termolabilne grupy ochronne

W niniejszej pracy doktorskiej otrzymane przeze mnie związki są analogami 2-pirydynylowych termolabilnych grup ochronnych (2-Py TGO) wykorzystywanych w chemii kwasów nukleinowych, opartych strukturalnie na pierścieniu pirydyny. Ich charakterystyczną właściwością są specyficzne warunki odblokowania i mechanizm odłączania od ochranianej grupy funkcyjnej. Stąd też, w pierwszej części wstępu literaturowego, chciałabym zaprezentować stosowane w chemii organicznej grupy ochronne z podziałem na sposób ich usuwania, podkreślając tym samym zalety stosowania grup termolabilnych (metoda deprotekcji).

1.2. Kwasolabilne grupy ochronne

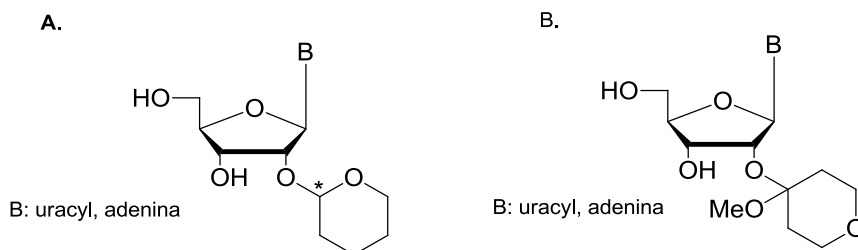
W chemii grup ochronnych jednym z najbardziej rozpowszechnionych podejść podczas prowadzenia złożonych syntez chemicznych, jest stosowanie grup usuwanych za pomocą kwasowej hydrolizy^{5,9}. Jedną z najwcześniej stosowanych grup kwasolabilnych były acetale. Cechuje je wysoka stabilność wobec czynników nukleofilowych oraz zasad, dlatego też wykorzystuje się je do ochrony grup hydroksylowych (alkohole, diole) oraz związków karbonylowych. W roku 1934 Paul, a później Woods i Kramer wykazali w swoich badaniach, że dihydropiran reaguje gwałtownie ze związkami zawierającymi grupy hydroksylowe, w wyniku czego powstają acetale typu pierwszego (**Schemat 1**)⁶. Dlatego też, jedną z najważniejszych znaczących grup ochronnych centrum hydroksylowego stał się acetal tetrahydropiranylowy, otrzymywany w katalizowanej kwasem reakcji alkoholi

z dihydropiraniem^{10,11}. Wydajność wprowadzania THP na alkohole alifatyczne sięgała 70-90%, gdy w przypadku fenoli była znacząco niższa (37%).



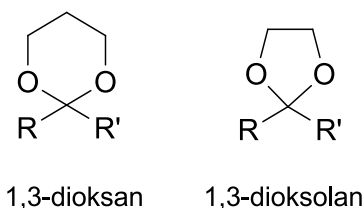
Schemat 1. Reakcja otrzymywania acetalu tetrahydropiranylowego z dihydropiranu¹⁰.

Pomimo, iż tworzenie acetalu jak i jego kwasowa hydroliza, zachodzi niezwykle szybko, to istotnym minusem blokady THP jest to, że w przypadku ochrony optycznie czynnych alkoholi (np. nukleozydy) wprowadzane jest dodatkowe centrum stereogeniczne, przyczyniające się do uzyskania mieszaniny diastereoizomerów. W związku z tym, inny z badaczy Collin Rees^{12,13}, zmodyfikował grupę THP do postaci 4-metoksytetrahydropiranylu (4-MeO-THP)¹² eliminując tym samym problem obecności dodatkowego centrum chiralnego. Symetryczność cząsteczki 4-MeO-THP czyni ją achiralną, jednak nie zmienia możliwości szybkiego jej usuwania w warunkach kwasowych (**Rysunek 1**).



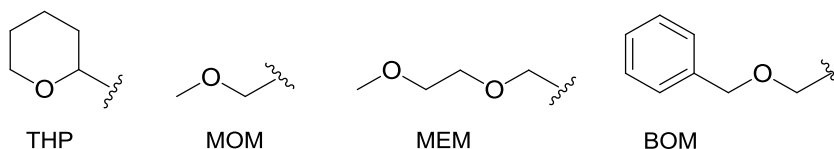
Rysunek 1. Grupa THP (**A**) oraz 4-metoksy THP (**B**) wprowadzona na funkcję 2' - hydroksylową rybonukleozydu.

Acetale typu *N,N*- i *N,O*- znajdują zastosowanie w blokowaniu funkcji aminowych⁶. Acetale cykliczne (*O,O*-acetale) są stosowane do ochrony dioli lub karbonyli – w postaci 1,3- dioksolanu lub dioksanu, powstających w wyniku kondensacji z glikolem etylenowym lub propylenowym (**Rysunek 2**).



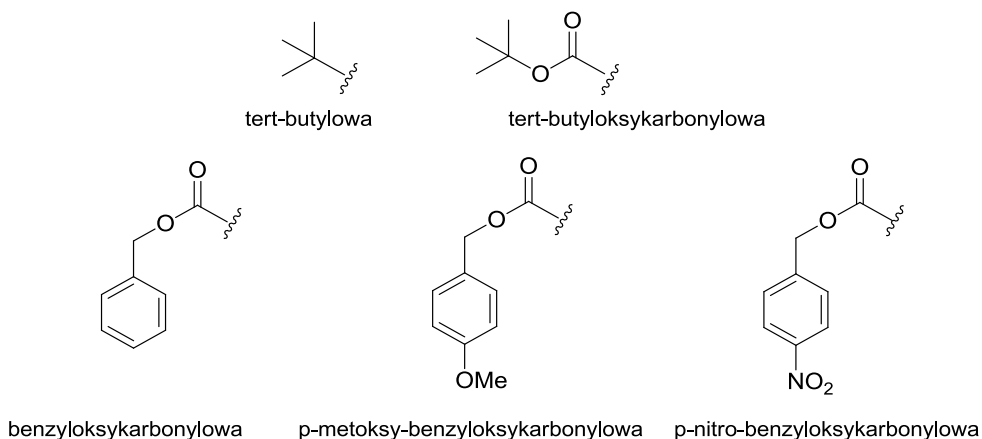
Rysunek 2. Acetale cykliczne otrzymane poprzez kondensację z aldehydami lub ketonami.

Godnymi uwagi grupami ochronnymi typu acetalu są również dispiroketal (DISPOKE)^{14,15,16} oraz cykloheksano-1,2-diacetal (CDA)^{17,18}. Jeżeli chodzi o acetale acykliczne, to do najbardziej znanych zaliczają się wcześniej wspomniany tetrahydropiranyl (THP)^{19,20,21}, metoksymetyl (MOM), benzyloksymetyl (BOM) i metoksyetoksymetyl (MEM) przedstawione na **Rysunku 3**. Ich głównym atutem jest łatwość usuwania w łagodnych warunkach kwasowych⁶.



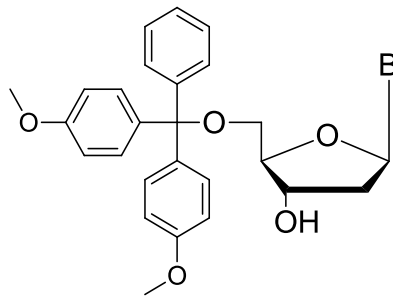
Rysunek 3. Przykładowe acetale acykliczne stosowane w ochronie grup hydroksylowych.

Kolejnymi przykładami kwasolabilnych grup ochronnych są pochodne: *tert*-butyl (t-Bu), *tert*-butyloksykarbonyl²² (BOC), czy benzyloksykarbonyl²³ (CBz) służące do blokowania funkcji alkoholowej, aminowej, tiolowej oraz karboksylowej. Usuwanie ich wiąże się z powstawaniem trwałego kationu ułatwiającego usuwanie grupy, którego labilność jak w przypadku pochodnych benzyloksykarbonylowych (CBz), może być regulowana poprzez wprowadzanie różnych podstawników do pierścienia aromatycznego (**Rysunek 4**).



Rysunek 4. Przykłady kwasolabilnych grup ochronnych.

Dimetoksytrytyl (DMTr) (**Rysunek 5**) stanowi jedną z najważniejszych grup ochronnych w chemii nukleozydów oraz nukleotydów, zwłaszcza w ochronie grupy hydroksylowej pentoz. Po raz pierwszy grupa ta została użyta przez Khoranę i współpracowników w celu utworzenia estrów 5'-O-DMTr urydyny i adenozy. Grupa DMTr od 40 lat znajduje zastosowanie jako standardowa kwasolabilna grupa ochronna, która pozwoliła na rozpowszechnienie wielkoskalowej syntezy oligonukleotydów, w zmodyfikowanej metodzie triestrowej oraz współczesnej syntezie metodą amidofosforynową²⁴.

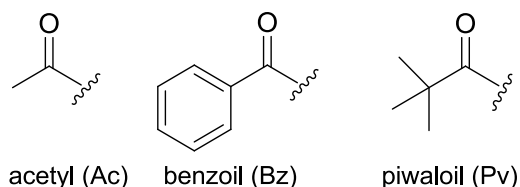


B: cytozyna, adenina, tymina, guanozyna

Rysunek 5. Grupa dimetoksytrytylowa wprowadzona na grupę 5'-hydroksylową pierścienia cukrowego.

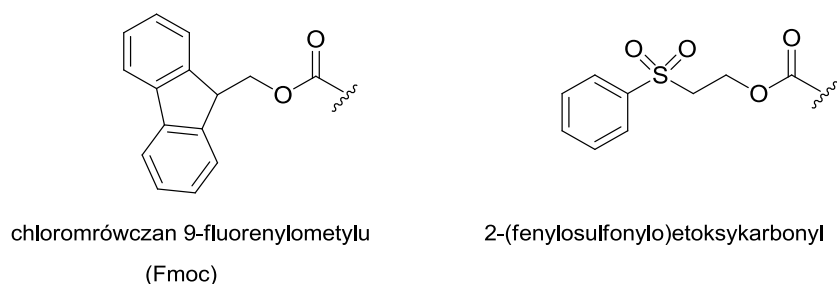
1.3. Zasadolabilne grupy ochronne

Zasadolabilne grupy ochronne są usuwane według dwóch mechanizmów: hydrolizy zasadowej lub β -eliminacji wspomaganej środowiskiem zasadowym. Grupy ochronne usuwane przy użyciu zasad to głównie estry, których najpopularniejszym przedstawicielem jest grupa acetylowa. Kwasy karboksylowe są chronione głównie w postaci estrów alkilowych, podczas gdy alkohole podlegają reakcjom estryfikacji z kwasem octowym, benzoesowym czy piwaloilowym (**Rysunek 6**).



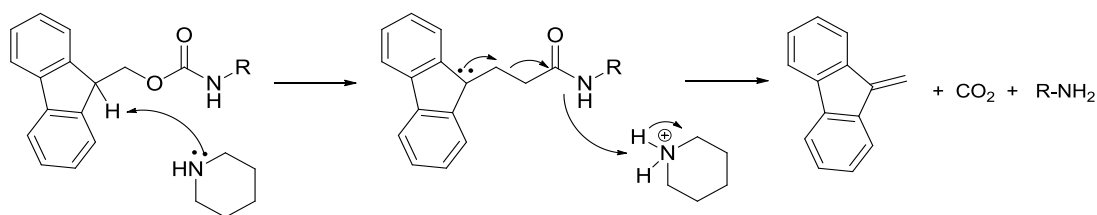
Rysunek 6. Przykłady zasadolabilnych grup ochronnych usuwanych wg. mechanizmu hydrolizy zasadowej.

Dodatkowo, szybkość reakcji hydrolizy może być regulowana poprzez czynniki steryczne lub elektronowe grupy ochronnej, dlatego np. fluoroacetyl może być selektywnie usuwany w obecności grupy acetylowej, natomiast acetyl w obecności piwaloilu⁶. Usuwanie grup ochronnych poprzez beta-eliminację można wykorzystać w przypadku takich grup jak 2-(fenylosulfonylo)etoksykarbonyl lub chloromrówczan 9-fluorenylometylu (**Rysunek 7**), który jest bardzo często używany w syntezie peptydów na podłożu stałym^{25,26}.



Rysunek 7. Zasadolabilne grupy ochronne usuwane na drodze β -eliminacji.

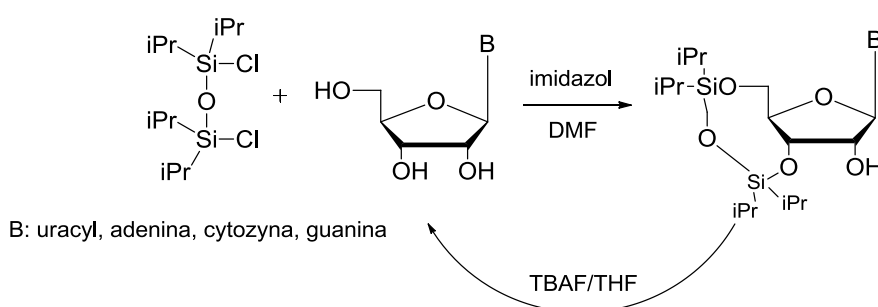
Pierwszym etapem deprotekcji jest oderwanie fluorenylowego protonu przez odpowiednią zasadę (np. piperydyna) - który łatwo ulega eliminacji, gdyż tworzący się w wyniku tej reakcji anion jest stabilizowany poprzez cały układ aromatyczny. Następnie, w wyniku beta eliminacji dochodzi do odcięcia karbaminianu ulegającego rozkładowi do dwutlenku węgla i w efekcie uwolnienia grupy aminowej^{27,28} (**Schemat 2**). Dodatkowym atutem przemawiającym za stosowaniem tej grupy jest fakt, iż fluorenyl posiada właściwości fluorescencyjne. Pozwala to wykorzystać go również w reakcjach z nieaktywnymi w świetle UV molekułami, dając pochodne, które można z łatwością analizować przy użyciu technik analitycznych jak wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) wyposażona w detektor fluorescencyjny²⁹.



Schemat 2. Mechanizm deprotekcji grupy Fmoc.

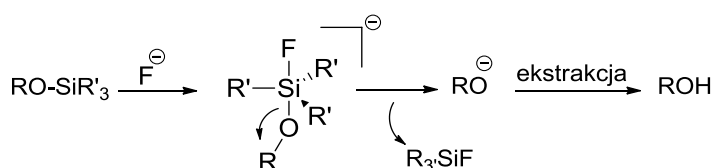
1.4. Grupy ochronne usuwane fluorkami

Pochodne sililowe^{6,30,31} stanowią ważną kategorię grup ochronnych, ze względu na możliwość ich selektywnego odblokowywania w obecności fluorków w środowisku obojętnym, bez naruszenia obecnych w cząsteczce blokad kwaso- i zasadolabilnych. Jedną z przełomowych grup ochronnych bazujących na pochodnej krzemu jest tak zwana blokada Markiewicza³² (**Schemat 3**), wprowadzana między innymi na funkcje 5'/3'-lub 2'/3'-hydroksylowe pentoz (w drugim przypadku, funkcja 5'-OH musi posiadać grupę ochronną (DMTr)).



Schemat 3. Wprowadzenie grupy ochronnej TIPDSiCl₂ na funkcje 5'/3' hydroksylowe oraz jej usuwanie z udziałem źródła anionów fluorkowych (TBAF)³².

Siłą napędową reakcji odblokowania jest tworzenie wiązania krzem-fluor, silniejszego o około 30 kcal/mol niż wiązanie krzem-tlen. Mechanizm ten nie przypomina standardowej reakcji S_N1 ze względu na niską stabilność kationów silylowych, a reakcja przebiega z utworzeniem pentakoordynacyjnego produktu pośredniego (**Schemat 4**).

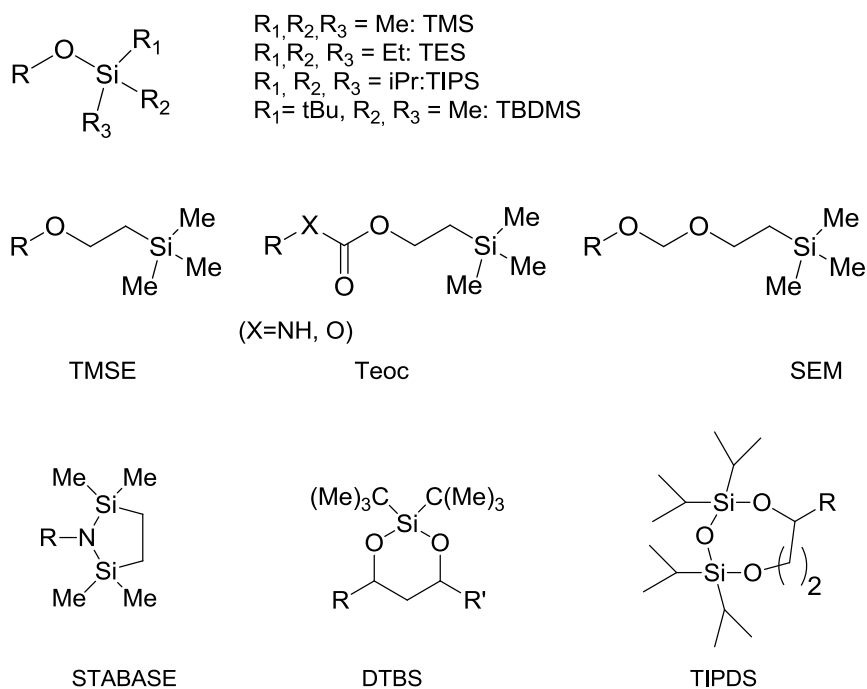


Schemat 4. Mechanizm usuwania silylowych grup ochronnych z udziałem anionów fluorkowych;
źródło: <https://en.chem-station.com/reactions-2/2014/03/silyl-protective-groups.html>

Relatywne stałe hydrolizy (k_{rel}^{-1}) związków krzemowych R-O-SiR'₃ wskazują na ich znaczną odporność zarówno wobec hydrolizy kwasowej jak i zasadowej⁶:

- a) hydroliza kwasowa: R'_3Si : Me_3Si (1) < Et_3Si (64) < $tBuMe_2Si$ (20000) < iPr_3Si (700000) < $tBuPh_2Si$ (5000000);
- b) hydroliza zasadowa: R'_3Si : Me_3Si (1) < Et_3Si (10-100) < $tBuMe_2Si \sim tBuPh_2Si$ (20000) < iPr_3Si (100000);

Stałe szybkości odblokowania grup siliowych fluorkami są zbliżone do powyższych. Główna zasada dotycząca ich stabilności mówi: im większa zawada steryczna tym bardziej stabilna pochodna. Alkohole blokowane są w postaci eterów, dla których trwałość prezentuje się następująco: TMS < TES < TBDMS < TIPS³³. Dla bardziej wymagających reakcji, właściwości grup siliowych mogą zostać odpowiednio zmodyfikowane, jak w przypadku izopropylodimetylosililu, diizopropylometylosililu oraz dietylizopropylsililu (DEIPS)³⁴. 1,3-diole maskowane są przy użyciu pochodnych silanedilowych (**Rysunek 8**), lub poprzez wprowadzenie tetradiizopropylodisiloksanu (TIPDS). Stosunkowo rzadko pochodne siliowe stosuje się do ochrony estrów i amin, ze względu na dużą labilność otrzymanych pochodnych (wyjątek stanowi grupa STABASE³⁵). Otrzymywane estry i karbaminiany trialkiloetylosililowe są odblokowywane przy użyciu fluorków ale zgodnie z mechanizmem podobnym do beta-eliminacji (jak na **Schemacie 2**).

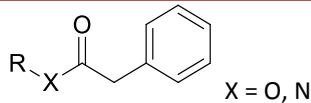
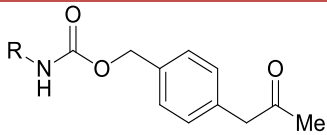
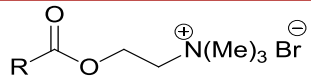
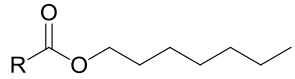
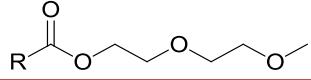
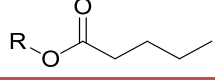
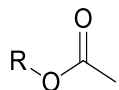


Rysunek 8. Przykładowe krzemoorganiczne grupy ochronne.

1.5. Grupy ochronne usuwane enzymatycznie

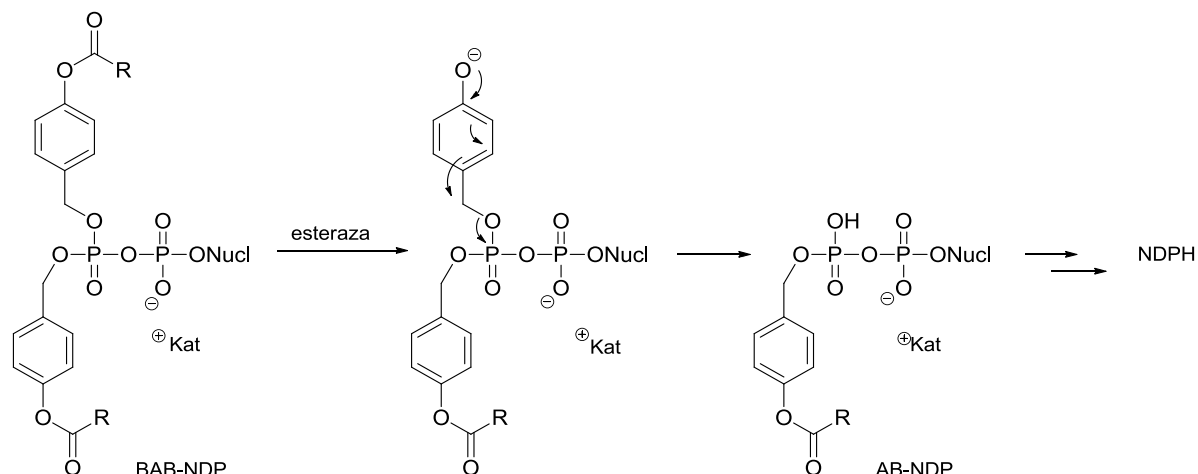
Projektowanie enzymolabilnych grup ochronnych^{36,37} cieszy się ostatnio znaczącą popularnością, gdyż biokataliza pozwala na selektywne usuwanie acylowych grup ochronnych z amin, alkoholi i kwasów karboksylowych. Warunki reakcji odblokowania są łagodne, gdyż enzymy funkcjonują w temperaturze pokojowej, przeważnie w zakresie pH 5-9. Dodatkowo, wykazują nadzwyczajną specyficzność wobec rozpoznawanych przez nie struktur, a tym samym są w stanie reagować z dużą ilością substratów. Powoduje to ich konkurencyjność w stosunku do metod chemicznych, które zazwyczaj nie są na tyle wydajne, chemo- i regioselektywne. Przykłady grup enzymolabilnych są przedstawione w poniższej tabeli, gdzie na szczególną uwagę zasługują grupa fenyloacetamidowa (**Lp.1, Tabela 1**)³⁸ oraz 4-acetoksybenzyloksykarbonylowa (**Lp.2, Tabela 1**), stosowane w ochronie grup aminowych oraz karboksylowych³⁶.

Tabela 1. Przykładowe grupy enzymolabilne^{6,36}.

Lp.	grupa enzymolabilna	cząsteczka ochraniana (R)	enzym
1.		peptyd, nukleozyd, nukleotyd węglowodór,	acylaza penicylinowa
2.		peptyd, lipopeptyd	acetyloesteraza
3.		peptyd, lipopeptyd	butyrylo cholinoesteraza
4.		peptyd, glikopeptyd	lipaza
5.		peptyd, glikopeptyd	lipaza
6.		węglowodór	lipaza
7.		węglowodór, steroid, nukleozyd, fenol	lipaza

Grupy hydroksylowe maskowane w postaci acetyli czy benzoesanów mogą być z powodzeniem odblokowywane enzymatycznie ponieważ ulegają hydrolizie pod wpływem enzymów z grup esteraz. Takiego typu konwersja jest wykorzystywana w syntezie wielofunkcyjnych węglowodanów, nukleozydów, steroidów oraz alkaloidów, gdzie wysoka regioselektywność jest nieosiągalna metodami chemicznymi. Ponadto, zachowanie funkcjonalności enzymów w rozpuszczalnikach organicznych otwiera nowe możliwości w metodologii wprowadzania grup ochronnych⁶.

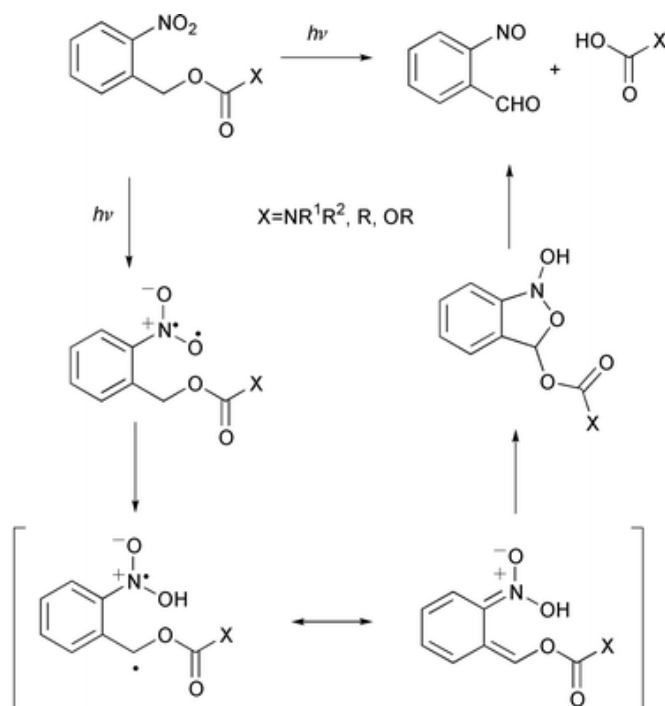
Doskonałym przykładem wykorzystania enzymatycznej metody usuwania grup ochronnych jest zastosowana przez Meiera³⁹ hydroliza estru acylowego mająca inicjować otrzymywanie difosforanu nukleozydu (ang. *Nucleoside diphosphate*; NDP) (**Schemat 5**). Maskowany bis-(acyloksybenzylo)difosforan nukleozydu (BAB-NDP) wprowadzony do komórki, dzięki esterazie traci acylową grupę ochronną. Zmiana właściwości donorowo-akceptorowych w pozycji 4 pierścienia aromatycznego, osłabia wiązanie estrowe fosforbenzyl, a w wyniku 1,4-eliminacji BAB-NDP jest konwertowany do mono podstawionego difosforanu (ang. *mono-substituted*; AB-NDP). Powtórzenie całego mechanizmu z udziałem esterazy, prowadzi do utworzenia NDP, który będzie substratem w reakcji otrzymywania aktywnego biologicznie trifosforanu^{40,41,42}.



Schemat 5. Wykorzystanie enzymatycznej metody usuwania grup ochronnych³⁹.

1.6. Grupy fotolabilne

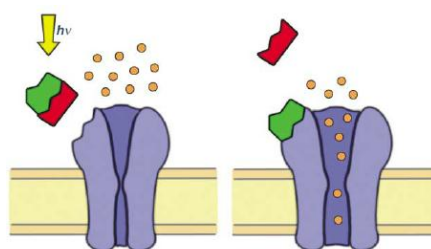
Kolejnym ważnym osiągnięciem w chemii grup ochronnych było zaprojektowanie grup których eliminacja zachodzi na drodze fotolizy⁴³. Grupy te posiadają w swojej strukturze chromofor o wysokiej stabilności, aktywowany promieniowaniem o określonej długości fali^{6,44,45,46}. Przykładem fotolabilnej grupy jest *o*-nitrobenzyl, stosowany w ochronie alkoholi, amin oraz kwasów karboksylowych⁴⁷. W wyniku absorpcji fotonu światła o długości fali pomiędzy 200 a 320 nm, wiązanie π grupy nitrowej ulega rozerwaniu powodując przejście cząsteczki w postaci podwójnego rodnika do stanu wzbudzonego. Następuje oderwanie protonu od benzyłowego atomu węgla po czym cząsteczka powraca do stanu podstawowego. W wyniku rezonansu elektronów π zostaje utworzony pięciocłonowy pierścień, po czym zostaje uwolniona ochraniająca grupa (X-C(O)OH) i 2-nitrozobenzaldehyd (**Schemat 6**).



Schemat 6. Mechanizm deprotekcji fotolabilnej grupy ochronnej; źródło: *Photolabile protecting groups and linkers*, Christian Bochet.

Innymi przykładami fotolabilnych grup są 2-okso-1,2-difenyletyl (Desyl)⁴⁸ oraz *ortho*-hydroksystyryldimetylsilil. Fotolabilne grupy znajdują zastosowanie w kontrolowaniu uwalniania związków bioaktywnych *in vivo*. Związki te stały się istotnym narzędziem

w biologii i neurologii, głównie jako pochodne neurotransmiterów i ich antagoniści. Pośród nich występują pochodne GABA, glicyny, karbamylcholino czy fenylefryny, które w wyniku pochłonięcia kwantu promieniowania podlegają określonym mechanizmom, co znalazło zastosowanie np. w monitorowaniu przebiegu chemicznego przekazywania synaptycznego. Dzięki połączeniu fotoaktywowalnych neurotransmiterów z tak zwaną metodą patch-clamp⁴⁹, można wyznaczyć kinetykę całego procesu (**Rysunek 9**)⁴⁴. Pomimo wysokiej selektywności ich odblokowania inicjowanej wiązką światła, grupy fotolabilne nie należą do najczęściej stosowanych w syntezie chemicznej.



Rysunek 9. Aktywacja receptora poprzez foto-uwolnienie neurotransmitera⁴⁴.

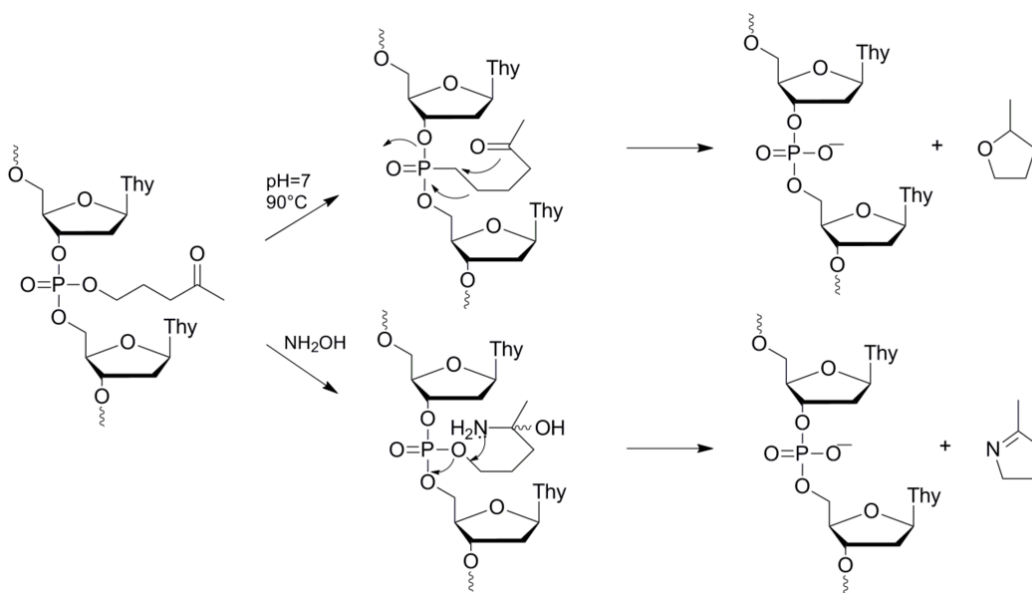
1.7. Termolabilne grupy ochronne

Termolabilne grupy ochronne (TGO) są alternatywą w syntezie organicznej, gdzie wymagane są neutralne warunki odblokowania, bez udziału agresywnych reagentów (kwasy, zasady, utleniacze). Usuwanie tych grup bazuje na zależności procesu cyklizacji (najczęściej wewnątrzcząsteczkowego) od zmian temperatury najlepiej w środowisku o pH zbliżonym do neutralnego. W literaturze znane są przykłady zastosowania TGO jako grup blokujących funkcji fosforanowych, aminowych i hydroksylowych^{50,51,52}.

1.7.1. Ochrona centrum fosforowego

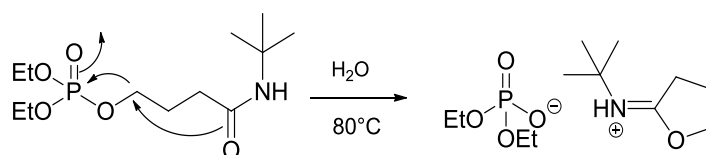
Najczęstsze zastosowanie TGO dotyczy ochrony funkcji fosforanowej podczas automatycznej syntezy kwasów nukleinowych^{52,50} metodą amidofosforynową, gdzie termolabilne grupy stanowią dobrą alternatywę dla powszechnie stosowanej grupy cyjanoetylowej. W trakcie usuwania grupy cyjanoetylowej, z centrum fosforanowego, produktem ubocznym jest kancerogeny akrylonitryl, mogący powodować alkilowanie zasad heterocyklicznych nukleotydów. Natomiast deprotekcja termolabilnej grupy nie generuje mutagennych produktów, dlatego ich użycie jest szczególnie przydatne

w wielkoskalowej syntezie terapeutycznych oligonukleotydów. Wśród grup termolabilnych można wyróżnić grupy: 2-(*N*-formylo-*N*-metyloamino)etylową, 3-(*N*-*tert*-butylokarboksamido)-1-propylołą, 3-(2-pirydył)-1-propylołą czy 2-benzyloamidoetylową, dla których potwierdzono użyteczność w ochronie funkcji fosforanowej w syntezie fragmentów kwasów nukleinowych⁵³. Godna uwagi jest także grupa 4-oksopentylowa, usuwana zarówno w warunkach zasadowych, jak i w wyniku podniesienia temperatury. Mechanizm odblokowania TGO z funkcji fosforanowej, polega na reakcji termodeestryfikacji, podczas której w wyniku podniesienia temperatury, zachodzi wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja (**Schemat 7**).



Schemat 7. Możliwe drogi odblokowywania grupy 4-oksopentylowej.

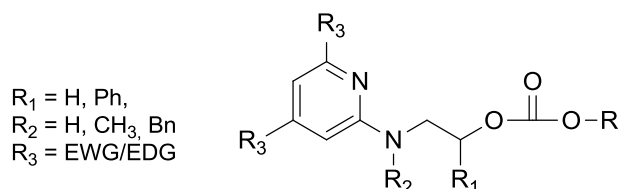
Znaczne przyspieszenie reakcji termodeestryfikacji, w neutralnym pH, uzyskujemy stosując grupę 3-(*N*-*tert*-butylokarboksamido)-propylołą, która jest przekształcana w sól 2-(*tert*-butylimino)tetrahydrofuranową fosforanu; proponowany mechanizm tej reakcji przedstawia **Schemat 8**.



Schemat 8. Mechanizm usuwania termolabilnej grupy 3-(*N*-*tert*-butylkarboksamido)-propylowej.

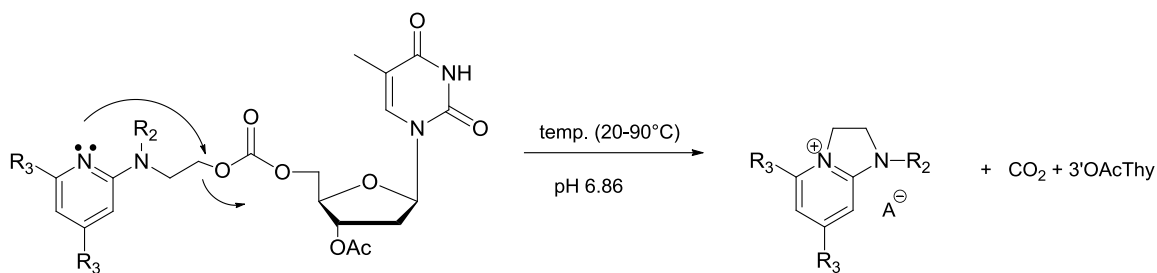
1.7.2. 2-*N*-pirydynylowe termolabilne grupy ochronne (2-Py TGO)

2-*N*-pirydynylowe termolabilne grupy (2-Py TGO)^{54,55,56,57} zostały wykorzystane do maskowania grup aminowych zasad heterocyklicznych nukleozydów, grup hydroksylowych cukrów lub fosforanów i stanowią obecnie jedno z najbardziej obiecujących podejść w wykorzystaniu termowrażliwości układów 2-*N*-pirydynylowych. Ich struktura składa się z rdzenia 2-aminopirydynylowego oraz łańcucha hydroksyetylowego (**Rysunek 10**). Dodatkowe modyfikacje polegają na wprowadzaniu odpowiednich grup funkcyjnych do pierścienia pirydyny lub/i w pozycję 2-*N*-pirydynylową, dając możliwość modyfikacji termowrażliwych właściwości otrzymywanych pochodnych.



Rysunek 10. Rdzeń termolabilnych grup ochronnych z przykładowymi miejscami modyfikacji .

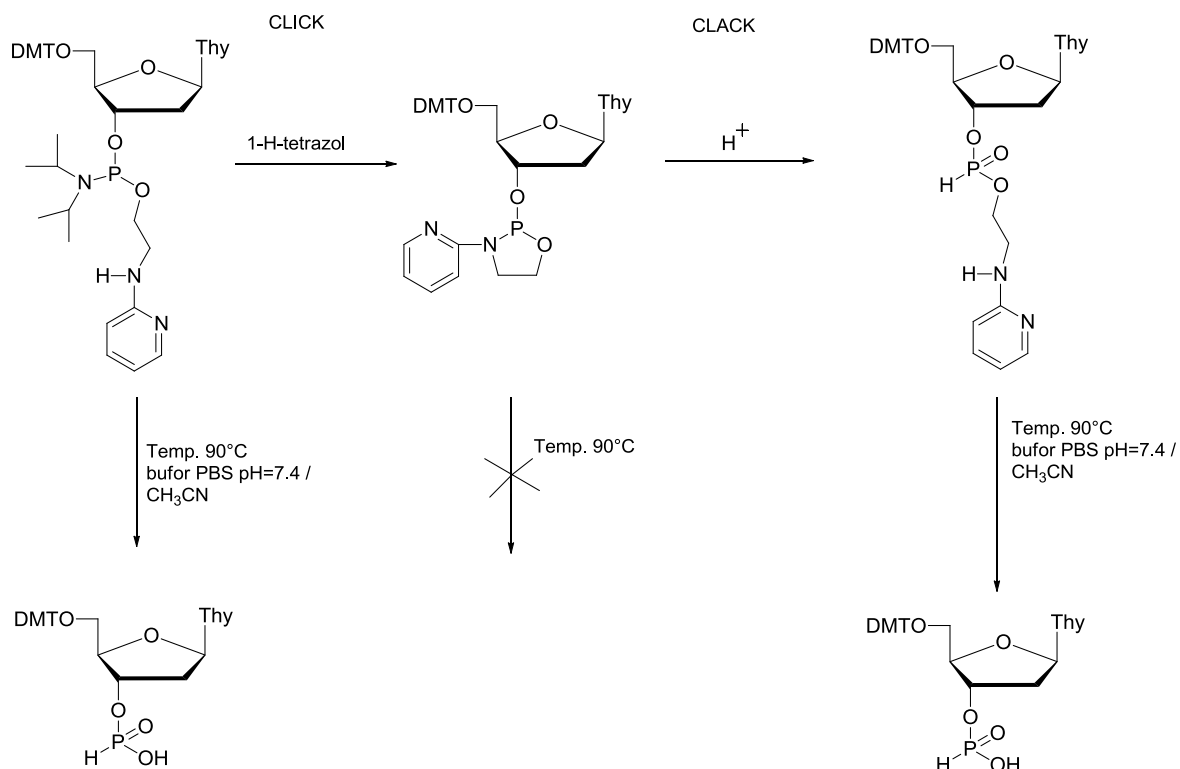
Atutem grup 2-Py TGO jest to, że ich usuwanie przebiegający w łagodnych warunkach, a mechanizm reakcji opiera się na wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji. Nukleofilowość pirydynowego atomu azotu (regulowana za pomocą podstawników R_3 w pierścieniu pirydyny) odgrywa decydującą rolę w sterowaniu szybkością tego procesu, którego siłą napędową jest również tworzenie się termodynamicznie stabilnego produktu cyklicznego. Dodatkowo, zmiany temperatury oraz efekt steryczny grup umiejscowionych w pozycji 2-*N*-pirydynylowej (podstawnik R_2), są kluczowym czynnikiem regulującym szybkość (przyspieszanie/hamowanie) reakcji wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji (**Schemat 9**). W efekcie otrzymujemy wolną grupę funkcyjną oraz produkt bicykliczny, który ze względu na swoje właściwości absorpcyjno-emisyjne, jest łatwy do identyfikacji oraz stanowi potwierdzenie mechanizmu według którego zachodzi odblokowanie. Jonowy charakter związku bicyklicznego, ułatwia oddzielenie go od pozostałych składników mieszaniny w procesie oczyszczania (ekstrakcja, chromatografia kolumnowa), co wpływa na efektywność i wydajność procesu.



3'-O-AcThy = 3'-O-acetylowana tymidyna

Schemat 9. Usunięcie 2-PyTGO z formy węglanowej nukleozydów.

Do ochrony centrum fosforowego za pomocą niektórych 2-Py TGO (gdzie $R_2=H$) możemy wykorzystać podejście typu „click-clack” (**Schemat 10**)⁵⁸. Pozwala ono na tymczasowe „zamrożenie” właściwości termolabilnych grupy ochronnej poprzez zestawienie dwóch przeciwstawnych sobie procesów: cyklizacji oraz hydrolizy w warunkach kwasowych. W pierwszym kroku, 2-Py TGO w obecności 1*H*-tetrazolu, ulega przekształceniu w cykliczną formę - oksazafosolidynę, co pozwala na tymczasowe „wstrzymanie” nukleofilowości endocyklicznego atomu azotu, a tym samym termolabilnych właściwości grupy ochronnej. W wyniku odtworzenia formy liniowej („clack”), 2-Py TGO odzyskuje swoje właściwości, i w wyniku reakcji cyklizacji następuje usunięcie grupy ochronnej. Zaletą takiego podejścia jest możliwość tworzenia mono- i diestrów fosforanowych o wysokim znaczeniu biologicznym^{59,60}.



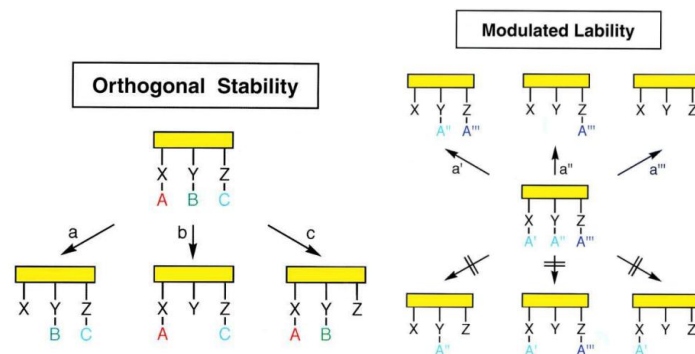
Schemat 10. Podejście „click-clack” w ochronie centrum fosforowego.

1.7.3. Ortogonalność grup 2-Pirydynylowych

Koncepcja ortogonalności stosowana w syntezie chemicznej, została wprowadzona przez Marrifield'a, co dodatkowo przetarło szlak do opracowania syntezy peptydów na podłożu stałym, a następnie także innych biopolimerów, w tym oligosacharydów i oligonukleotydów⁶². Zasada ortogonalności wnosi, iż podczas syntezy należy zastosować wyłącznie te grupy, które można odblokować w warunkach niewpływających na pozostałe reaktywne miejsca w cząsteczce (**Rysunek 11**).

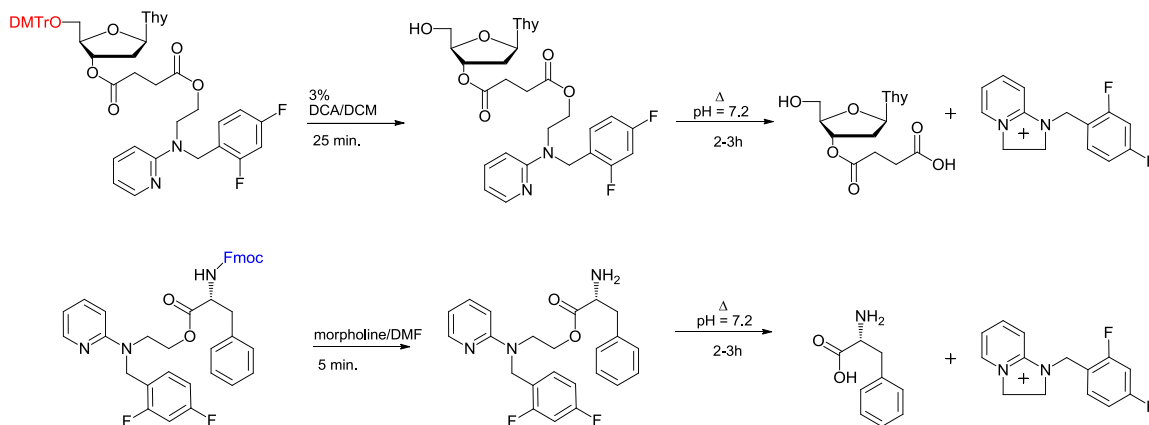
Istnieją dwie metody właściwego doboru grupy ochronnej:

- użycie ortogonalnie stabilnych grup ochronnych
- użycie grup ochronnych o kontrolowanej labilności



Rysunek 11. Dwie metody stosowania ortogonalności⁶.

Dla przykładu: grupy A, B i C są w stosunku do siebie ortogonalne, ponieważ usuwane są odpowiednio przy użyciu kwasu, zasady i hydrogenolizy, i mogą zostać selektywnie usunięte na każdym etapie syntezy. W przypadku metody b) mamy trzy grupy: A', A'' i A''', z których każda jest kwasolabilna. Najbardziej labilną jest grupa A' i może zostać usunięta nie wpływając na trwałość pozostałych, tym samym najbardziej trwała grupa A''' nie może zostać wyeliminowana bez wpływu na grupy A' i A''. Grupy 2-N-pirydynylowe wpisują się idealnie w tego typu strategię. Przykładem może być wykorzystanie grupy (2-pirydynylo-N-(2,4-difluorobenzyl)aminoetylowej (PydFBz) do ochrony funkcji karboksylowej, jako alternatywy użytecznej np. podczas syntezy peptydów⁶¹. Udowodniono, iż grupa PydFBz może być selektywnie usuwana w obecności grup ochronnych takich jak DMTr (kwasolabilna) oraz Fmoc (zasadolabilna), w odpowiednich warunkach pH i temperatury^{6,61} (**Schemat 11**).



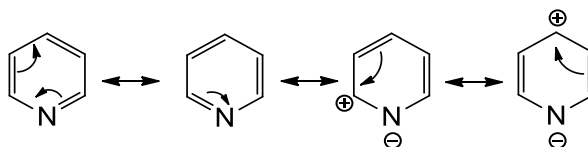
Schemat 11. Przedstawienie ortogonalności grupy 2Py-TGO wobec kwasolabilnej (DMTr) oraz zasadolabilnej (Fmoc) grupy ochronnej⁶¹.

2. Pirydyna i jej pochodne

Rdzeniem strukturalnym 2-pirydynylowych termolabilnych grup ochronnych jest pierścień pirydyny i z punktu widzenia wszelkich modyfikacji oraz sterowania labilnością 2 Py TGO, istotne są jej właściwości fizykochemiczne.

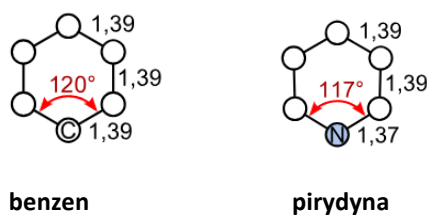
2.1. Struktura pirydyny

Pirydyna należy do aromatycznych sześciocłonowych związków cyklicznych z jednym heteroatomem w pierścieniu⁶³. Pierścień pirydyny, podobnie jak benzenu, jest płaski ze względu na hybrydyzację sp^2 pięciu atomów węgla oraz atomu azotu. Atom azotu uczestniczy w tworzeniu wiązań π wykorzystując swój wolny orbital p, natomiast jego wolna para elektronowa umiejscowiona jest na orbitalu sp^2 w płaszczyźnie ukierunkowanej na zewnątrz, podobnie jak pozostałe wiązania σ (C-H) w pirydynie. Pomimo, iż wolna para elektronowa nie wchodzi w skład systemu zdelokalizowanych elektronów w pierścieniu heterocyklicznym, to wpływa znacząco na właściwości chemiczne cząsteczki, co zostanie opisane w późniejszym podrozdziale. Odseparowanie wolnej pary elektronowej od pozostałych elektronów pierścienia oraz nierównomierny rozkład gęstości elektronowej w pirydynie ma swoje odzwierciedlenie w ujemnym efekcie indukcyjnym i mezomerycznym wywoływanym przez atom azotu, co skutkuje niższą energią stabilizacji (rezonans) oraz warunkuje reaktywność pierścienia pirydyny^{63,64,65} (**Rysunek 12**).



Rysunek 12. Struktury rezonansowe pirydyny⁶³.

Rozkład gęstości elektronowej, wpływa na skrócenie wiązania chemicznego C-N o $\Delta = 2$ pm w porównaniu do wiązania C-C w benzenie (139 pm), podczas gdy, pozostałe wiązania C-C posiadają długość odpowiadającą wartości typowej dla związków aromatycznych⁶³ (**Rysunek 13**).

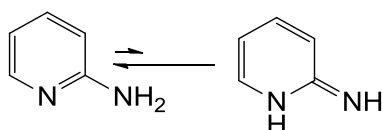


benzen

pirydyna

Rysunek 13. Porównanie długości wiązań i kątów pomiędzy wiązaniami w benzenie i pirydynie⁶³.

W syntezie 2-pirydynylowych termolabilnych grup ochronnych (2-Py TGO), rdzeniem strukturalnym jest aminopirydyna występująca w postaci mieszaniny tautomerów (**Schemat 12**): aminowego oraz iminowego, w stosunku ilościowym 1000:1. Przyjmuje się również, że w pozostałych analogach 2-amino-pirydyn, wiązanie C-NH₂ ma częściowy charakter aromatyczny. Powoduje to rozmycie ładunku elektronowego pomiędzy egzocyklicznym i endocyklicznym atomem azotu, zmniejszając tym gęstość elektronową na obydwu atomach.



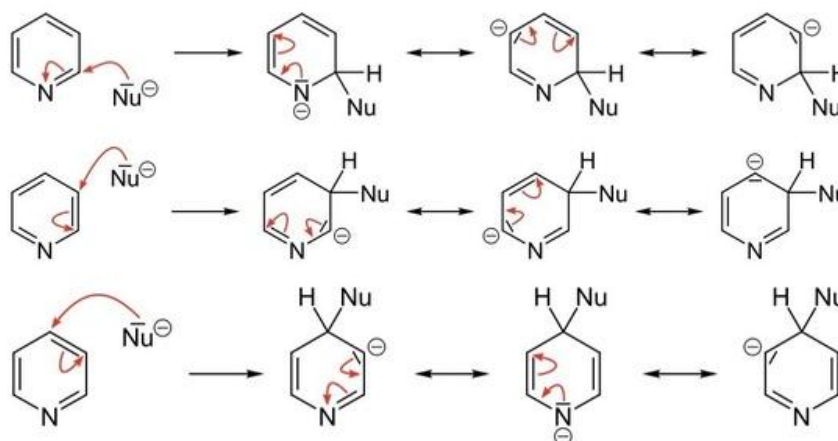
Schemat 12. Tautomery aminowy oraz iminowy aminopirydyny.

2.2. Reaktywność pirydyny i jej pochodnych

Pirydyna należy do tak zwanych słabych zasad, a w reakcjach chemicznych pełni dwojaką rolę: a) jako związek aromatyczny ulegając reakcjom metalacji poprzez silne zasady organometaliczne, substytucji nukleofilowej i elektrofilowej lub b) jako amina trzeciorzędowa, której atom azotu może zostać sprotonowany, zacylowany, zalkilowany lub utleniony do formy *N*-tlenku. Jak już wcześniej zostało wspomniane, ze względu na obecność elektroujemnego atomu azotu w pierścieniu aromatycznym, cząsteczka pirydyny posiada w układzie deficyt elektronowy. Dlatego też w przeciwieństwie do benzenu, pirydyna znacznie rzadziej ulega reakcjom substytucji elektrofilowej. Powiększenie deficytu elektronowego może nastąpić w wyniku np. neutralizacji przez pirydynę uwolnionego podczas reakcji kwasowej^{63,66}, gdzie pK_a kationu pirydyniowego wynosi 5.25.

2.2.1. Substytucja nukleofilowa

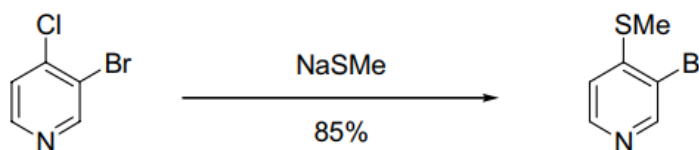
Deficyt elektronowy w pierścieniu pirydyny sprzyja reakcjom substytucji nukleofilowej, najefektywniej w pozycjach 2, 4 i 6, ze względu na większą stabilizację ładunku ujemnego przez atom azotu (**Schemat 13**). W przypadku niepodstawionych pirydyn, reakcja ta zazwyczaj wymaga użycia silnego nukleofila (-OH, związki litoorganiczne). Reakcje S_NAr przebiegają według mechanizmu addycji-eliminacji z uformowaniem odpowiedniego adduktu, dearomatyzacji, a w fazie końcowej eliminacji jonu wodorkowego. Obecność w pierścieniu grup wyciągających elektrony znacznie sprzyja reakcjom podstawienia nukleofilowego, ze względu na zmniejszenie gęstości elektronowej w miejscu ataku nukleofilowego^{63,66}.



Schemat 13. Miejsca podstawienia nukleofilowego: preferowane 2 i 4 oraz mniej stabilne 3, wynikające ze struktur rezonansowych pierścienia pirydyny; źródło:

<https://www.quora.com/Why-nucleophilic-substitution-in-pyridine-favours-at-position-2>

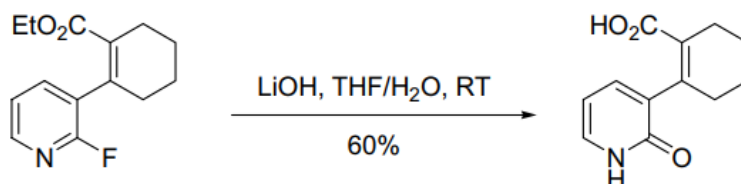
Reakcje S_NAr podstawionych halogenami pierścieni pirydyny zachodzą znacznie szybciej i podobnie jak w przypadku niepodstawionych pirydyn w pozycjach 2 i 4, z udziałem szerokiego wachlarza czynników nukleofilowych^{63,66} (**Schemat 14**).



Schemat 14. Przykładowa reakcja substytucji nukleofilowej.

2.2.1.1. Reakcja z jonami hydroksylowymi

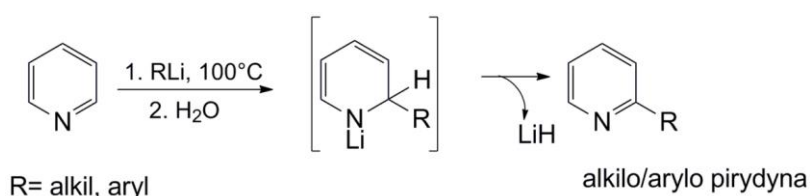
Substytucja jonami hydroksylowymi przebiega zazwyczaj w dość drastycznych warunkach reakcyjnych, gdyż wymaga zastosowania silnej zasady jaką jest KOH oraz ogrzewania w temperaturze do 300°C. W rezultacie otrzymujemy 2-hydroksypyridyny, które można doprowadzić do 2-pirydonów w procesie utleniania. Reakcję tę można przeprowadzić w warunkach łagodniejszych, jeżeli substratem jest pirydyna podstawiona dobrymi grupami opuszczającymi, a podstawniki w pierścieniu są grupami wyciągającymi elektrony. Przykładem takiej reakcji, przebiegającej w temperaturze pokojowej, jest synteza pomiędzy fluoropirydynami z wodorowęglanem litu⁶³ (**Schemat 15**).



Schemat 15. Przykład reakcji z użyciem wodorotlenku litu.

2.2.1.2. Reakcje z organolitowymi pochodnymi

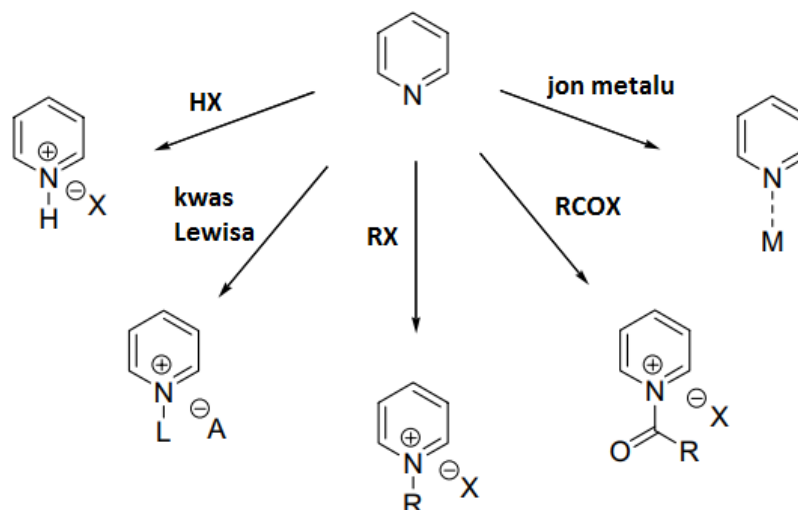
Pirydyny ulegają reakcjom substytucji typu S_NAr z organolitowymi pochodnymi takimi jak pochodne alkilo- czy arylolitowe, w efekcie uzyskujemy 2-alkilo lub 2-arylopirydyny (**Schemat 16**). Warunki reakcji nie należą do łagodnych i wymagają ogrzewania w temperaturze sięgającej 100°C. Natomiast sama reakcja przebiega z utworzeniem *N*-litowych soli pirydynowych jako produktów pośrednich, które można wyizolować i scharakteryzować⁶⁷.



Schemat 16. Reakcja pirydyny ze związkami organolitowymi.

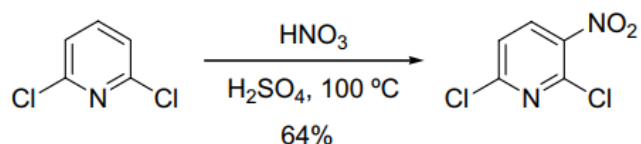
2.2.2. Substytucja elektrofilowa

Pirydyny, a ściślej endocykliczny atom azotu, z łatwością reaguje z elektrofilami, takimi jak kwasy Lewisa, halogenki acylowe czy metale przejściowe, ulegając przekształceniu w czwartorzędowe sole amoniowe (**Schemat 17**).



Schemat 17. Reakcje substytucji elektrofilowej.

W porównaniu do benzenu, pirydyny lub jej pochodne znacznie trudniej ulegają reakcji substytucji elektrofilowej S_EAr i zazwyczaj reakcje te wymagają zastosowania bardziej drastycznych warunków, czego przykładem jest nitrowanie pirydyny przy użyciu kwasów siarkowego (VI) oraz azotowego (V) w temperaturze 300°C. Produkt w postaci 3-nitropirydyny powstaje z wydajnością rzędu 15%. Lepszą wydajność jesteśmy w stanie osiągnąć w reakcji sulfonowania (**Schemat 18**), która wynosi 75% (temperatura reakcji 100-230°C), stosując kwas siarkowy (VI) jako katalizator. Brak zadowalającej reaktywności pirydyn w reakcjach S_NAr , wynika z wcześniej omawianej protonacji pirydynowego atomu azotu w środowisku kwaśnym⁶³.



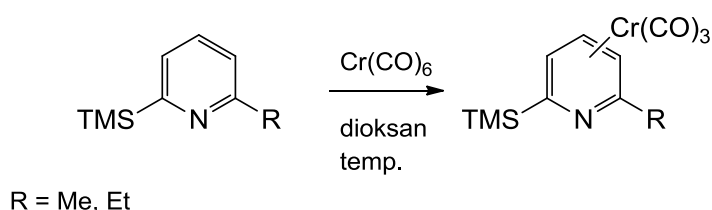
Schemat 18. Przykład reakcji substytucji elektrofilowej 2,6-dichloropirydyny.

2.2.2.1. Reakcje z kwasami

Wartość pKa pirydyny w wodzie wynosi 5.2, co czyni ją znacznie słabszą zasadą od amin alifatycznych o pKa rzędu 9-11. pKa pirydyny możemy zwiększyć poprzez wprowadzenie podstawników donujących elektrony, zwiększając gęstość elektronową endocyklicznego atomu azotu. Z kwasami Bröensteda typu HCl czy H₂SO₄ pirydyna tworzy stabilne sole, z których część wykorzystywana jest jako ogólnodostępne reagenty, takie jak chlorochromian pirydyny (PCC) czy dichromian pirydyny (PDC) – łagodne i selektywne utleniacze. Kwasy Lewisa, takie jak AlCl₃ czy SnCl₄ tworzą z pirydyną stabilne kompleksy, a część z nich również znalazła zastosowanie w postaci reagentów do syntez, na przykład jako reagenty sulfonujące, jak Py*SO₃.

2.2.2.2. Reakcje z jonami metali

Pirydyny mogą również pełnić rolę monokoordynujących ligandów w tworzeniu kompleksów z metalami przejściowymi. W oparciu o pierścień pirydyny, otrzymano wiele, rozbudowanych ligandów w chemii metalo-surpamolekularnej. Co więcej, pirydyny pełnią również rolę tak zwanych π-ligandów tworząc sześćo-koordynacyjne kompleksy z metalami przejściowymi jak chrom czy żelazo (**Schemat 19**). Warunkiem ich tworzenia jest obecność sterycznie dużego podstawnika w pozycji 2 lub 6 pierścienia⁶³.



Schemat 19. Reakcja pirydyn z jonami metali.

2.3. Reakcje metaloorganiczne

Wykorzystanie reakcji sprzęgania, w których substratami są pochodne pirydyny, pozwala otrzymywać bardziej złożone struktury. W reakcjach sprzęgania pochodnych pirydyn, czyli tworzeniu pomiędzy nimi nowego wiązania C-C, istnieją dwa podejścia syntetyczne^{68,69,70,71}:

- i) reakcje halo-pirydyn z pochodnymi organometalicznymi
- ii) reakcje metalo-pirydyn z halogenkami

Reakcje sprzęgania cieszą się obecnie dużą popularnością w syntezie organicznej. W przeciągu ostatnich kilkunastu lat dokonano bardzo dużego postępu w metodologii tych reakcji przeprowadzanych z udziałem związków heterocyklicznych oraz poszerzono bibliotekę reagentów oraz skutecznych katalizatorów⁷². Pierwsze reakcje sprzęgania przeprowadzono w latach 60-tych XX wieku i po dziś dzień większość z nich oparta jest na chemii palladu i jego pochodnych, które pełnią rolę katalizatorów (**Tabela 2**). Do reakcji sprzęgania wlicza się tworzenie wiązań: C-C, C-N oraz C-O czy nawet C-S.

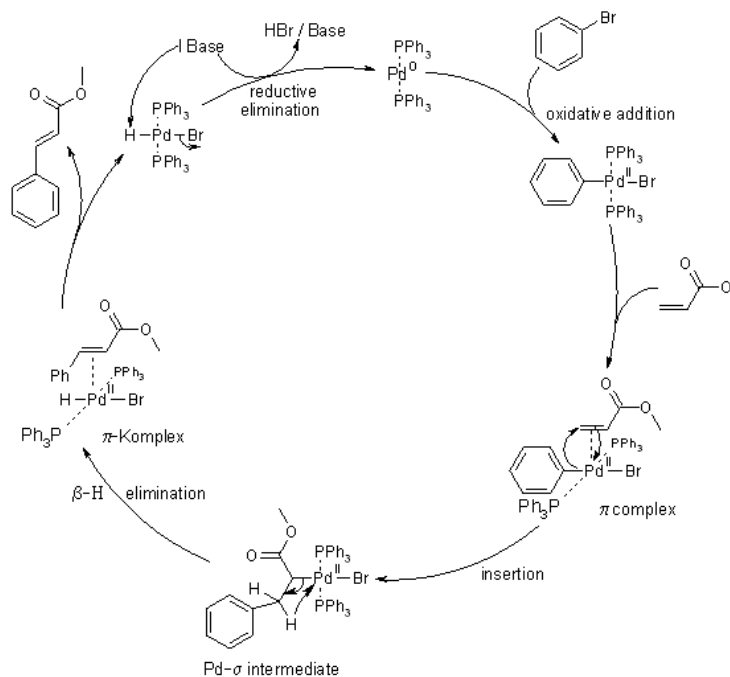
Tabela 2. Zestawienie typów reakcji sprzęgania z uwzględnieniem stosowanych reagentów i podstawników (Z) w pierścieniu pirydyny⁶⁸.

X= halogen

Typ reakcji	Reagent	Z
Stille	$R\text{Sn}(n\text{Bu})_3$	R (alkenyl, alkynyl, aryl)
Suzuki	$\text{RB}(\text{OH})_2/\text{base}$	R (alkenyl, alkynyl, aryl)
Sonogashira	$\text{R}-\text{C}\equiv\text{CH}/\text{Cu}(\text{I})$	$\text{R}-\text{C}\equiv\text{C}$
Heck	$\text{R}-\text{CH}=\text{CH}_2/\text{base}$	$\text{R}-\text{CH}=\text{CH}$
Kumada	RMgX	R (alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl)
Negishi	RZnX	R (alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl)
Hiyama	$\text{RSiR}'_3/\text{F}^-$	R (alkenyl, alkynyl, aryl)
Buchwald	$\text{R}_2\text{NH}/\text{base}$	R_2N

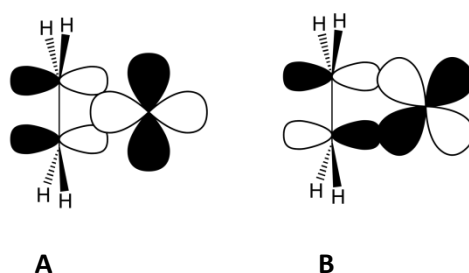
2.3.1. Reakcja Hecka

Reakcje sprzęgania oparte na zastosowaniu katalizatorów palladowych przebiegają według ogólnego mechanizmu⁷³, składającego się z kilku kluczowych etapów: oksydatywnej addycji, transmetalacji, izomeryzacji oraz reduktywnej eliminacji. Na przykład w reakcji sprzęgania Hecka funkcje katalityczne pełni kompleks palladowy $\text{Pd}(0)\text{L}_2$, a wytworzenie palladu na zerowym stopniu utlenienia, z soli palladowych jak $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ lub PdCl_2 z udziałem odpowiedniego ligandu, najczęściej tryfenylofosfinowego, często przebiega *in situ* – etap I.



Schemat 20. Ogólny mechanizm reakcji sprzęgania katalizowanej przez kompleks Pd (0); Źródło: <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/heck-reaction.shtml>

Etap II addycja oksydacyjna, podczas której atom palladu ulega ponownemu utlenieniu (+II) i przyłącza się do pierścienia aromatycznego, tworząc jednocześnie wiązanie z atomem halogenu np. bromu 2,6-dibromopirydyny. W etapie III powstaje π kompleks w wyniku utworzenia wiązania koordynacyjnego palladu z alkenem (np. 2-winylopirydyną), według modelu Dewara-Chatta-Duncansona⁷⁴ (**Rysunek 14**).



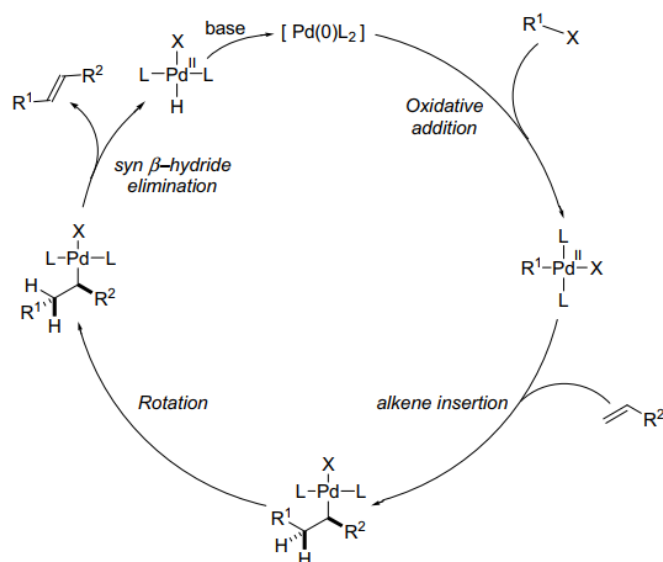
Rysunek 14. Interakcja pomiędzy orbitalami π alkeny i orbitalami d metalu (etap III cyklu katalitycznego)⁷⁴.

W modelu tym zapełniony orbital π alkeny (**A**) nakłada się z wolnym orbitalem d metalu. Następnie atom metalu donuje elektrony z innego zapełnionego orbitalu d, na antywiązący orbital π alkeny (**B**). Obydwa procesy donorowo-akceptorowe doprowadzają do zmiany rzędowości wiązania C-C (oraz jego wydłużenia i tym samym zmniejszenia

drgań wibracyjnych). Interakcja pomiędzy atomem węgla i atomem metalu powoduje rehybrydyzację atomu węgla z sp^2 w kierunku sp^3 , wynikającą z oddalenia się atomów wodoru trzonu etylenowego od atomu metalu. Badania wykazały iż, 75% energii tworzenia wiązania wynika z bezpośredniej donacji elektronów alken \rightarrow metal, a 25% z przekazania elektronów z orbitalu d metalu na orbital π -antywiązący alkenu⁷⁴. Etap IV to utworzenie wiązania węgiel-węgiel w wyniku addycji *syn* do wiązania podwójnego, po którym, w wyniku rotacji wokół wiązania pojedynczego C-C następuje przekształcenie cząsteczki w konformer *trans* o mniejszym naprężeniu torsyjnym (Pitzera). Etap V to *beta*-eliminacja, w wyniku której grupa alkilowa przyłączona do atomu metalu zostaje przekształcona w odpowiedni wodorek i alken (na atomie węgla beta musi być obecny atom wodoru, aby powstało wiązanie podwójne). W efekcie uzyskujemy nowy π -kompleks metal-alken. Kompleks ten ulega rozpadowi podczas etapu VI zwanego reduktywną eliminacją – następuje regeneracja palladu na zerowym stopniu utlenienia, wynik reakcji kompleksu z silną zasadą (np. tBuOK) i uwolnienie związku docelowego^{75,76} (**Schemat 20**). Warto zaznaczyć, iż reakcja sprzęgania Hecka jest stereoselektywna w kierunku tworzenia korzystnego energetycznie izomeru *trans*. Jest to efekt oddalenia się halogenku palladu (Pd-Br) i grupy oznaczonej jako R₁, które odsuwają się od siebie na etapie rotacji wokół wiązania pojedynczego. Tworzenie wiązania C-C w reakcji Heck'a jest powszechnie wykorzystywane w syntezie organicznej, zwłaszcza pochodnych arylowych. W przypadku związków heterocyklicznych wydajność reakcji może być mniejsza, co zależy od rodzaju zastosowanego halogenku oraz charakteru podstawników w pierścieniu heterocyklicznym. W przypadku halogenków reaktywność maleje w szeregu: I > Br >> Cl, przy czym chlorki aryłowe/heterocykliczne mają znacznie obniżoną reaktywność w porównaniu do bromków i jodków.

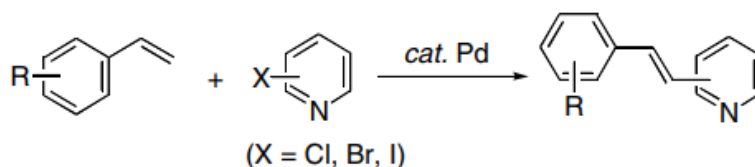
2.3.2. Reakcja Hecka dla układów heterocyklicznych

W przypadku związków heterocyklicznych jak pirydyna lub jej pochodne, istnieje znacząca różnica w mechanizmie sprzęgania: w zastępstwie etapu transmetalacji, wiązanie C-C zostaje utworzone poprzez insercję alkenu do utworzonego kompleksu palladowego, po której następuje β -eliminacja prowadząca do uformowania docelowego produktu.



Schemat 21. Mechanizm reakcji Heck'a dla układów heterocyklicznych⁶⁸.

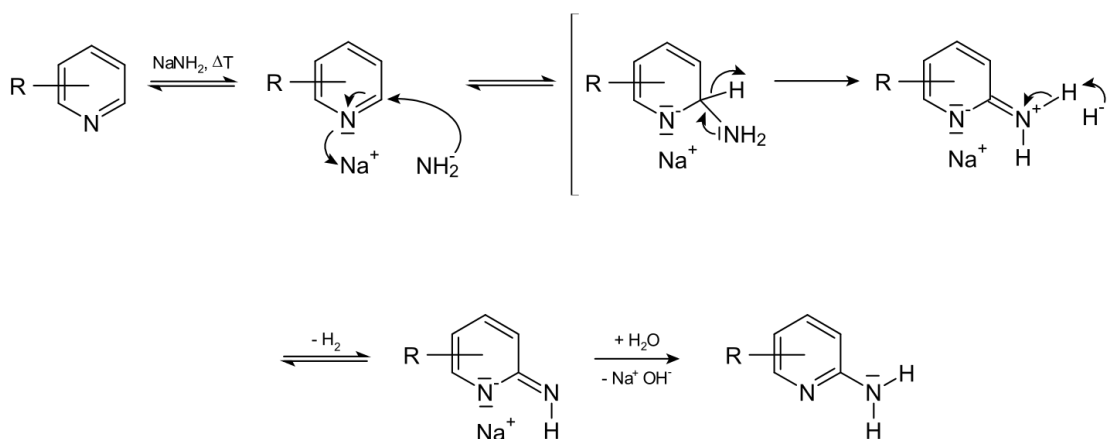
Reakcja Hecka z wykorzystaniem halogenków arylowych została dobrze zbadana, wykluczając również użycie trifenylofosfiny, na rzecz nowych układów katalitycznych, cieczy jonowych oraz z zastosowaniem wspomaganie mikrofalowego^{77,78,79}. W przeciwieństwie do tych osiągnięć, otrzymywanie pochodnych *trans*-2-styrylopirydynowych lub 1,2-dipodstawionych winylowych związków heterocyklicznych poprzez reakcje sprzęgania 2-winylopirydyn z aryłowymi lub heteroaryłowymi halogenkami, nadal pozostaje dużym wyzwaniem⁷⁰. W literaturze dostępny jest opis syntezy kilku pochodnych styrylopirydynowych w reakcji halogenków arylowych z winyloarylami używając odpowiedniego katalizatora palladowego. Podobnie Annapurna⁷⁰ przedstawił w swoich badaniach prace syntetyczne prowadzące do utworzenia *trans*-2-styrylopirydyn (**Schemat 22**), co wnosi niezwykle ważną wiedzę w metodologię otrzymywania sprzężonych pochodnych pirydyny⁸⁰.



Schemat 22. Reakcja sprzęgania Heck'a w celu uzyskania pochodnych styrylo-pirydynowych.

2.4. Pochodne 2-aminopirydynowe

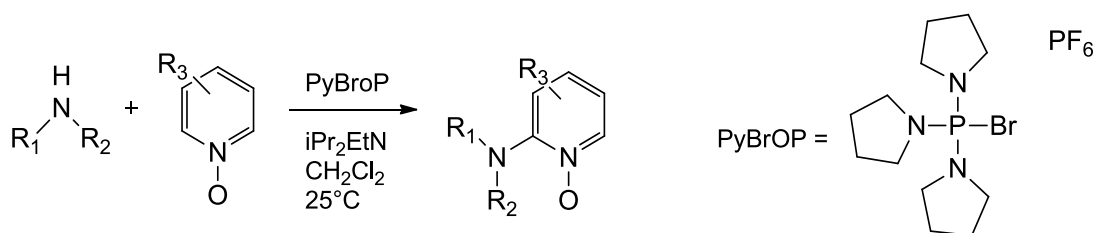
Jednymi z najbardziej znaczących pochodnych pirydyn, cieszącymi się zainteresowaniem w chemii syntetycznej oraz medycznej, są 2-aminopirydyny. Pochodne 2-aminopirydynowe otrzymywane są głównie w reakcji Chichibabina. Reakcja ta została po raz pierwszy przeprowadzona w 1914 roku przez Alekseja Chichibabin'a (**Schemat 23**)^{81,82,83} i wymaga zastosowania wysokiej temperatury (100°C) z zachowaniem warunków bezwodnych. Pirydyna wchodząc w reakcję z amidkiem sodu w toluenie, w obecności amoniaku, ulega przekształceniu do pochodnej 2-aminopirydynowej (75%) oraz w niewielkiej ilości do pochodnej 4-aminopirydynowej.



Schemat 23. Mechanizm reakcji Chichibabina⁶³.

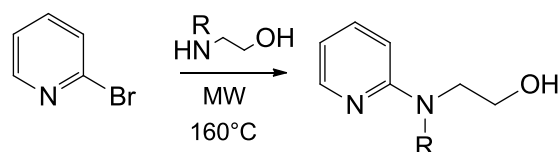
W pierwszym etapie reakcji anion -NH_2 ulega addycji w pozycję 2 pirydyny, powodując przeniesienie elektronów w kierunku endocyklicznego atomu azotu. W rezultacie prowadzi to do powstania anionowego δ -adduktu stabilizowanego atomem sodu (co zwiększa elektrofilowość atomu węgla alfa). W kolejnym kroku elektrony atomu azotu zostają przeniesione na wiązanie C-NH_2 (**Schemat 22**) z eliminacją jonu wodorkowego, który następnie odciąga jeden z atomów wodoru grupy $\text{C=N}^+\text{H}_2$, co prowadzi do uwolnienia obojętnej cząsteczki wodoru. W etapie końcowym endocykliczny atom azotu „wypycha” elektrony w kierunku pierścienia odtwarzając tym samym aromatyczność struktury, a obdarzona ujemnym ładunkiem grupa NH odciąga proton z cząsteczki wody, w efekcie czego tworzy się produkt końcowy⁸¹.

Kolejną reakcją otrzymywania 2-aminopirydyn jest reakcja *N*-tlenków i aktywatora w postaci soli fosfoniowej⁸⁴ (**Schemat 24**).



Schemat 24. Reakcja otrzymywania pochodnej 2-aminopirydynowej w reakcji z aminami i solą fosfoniową.

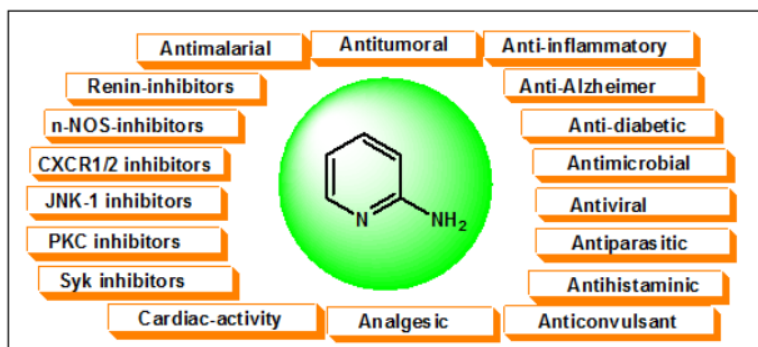
Równie wydajne jest otrzymywanie 2-aminopirydylowych pochodnych w reakcji halogenopirydyn oraz pierwszo i drugorzędowych aminoalkoholi, z zastosowaniem wspomaganie mikrofalowego i wysokiej temperatury⁵⁶ (**Schemat 25**).



Schemat 25. Reakcja otrzymywania 2-pirydylowych aminoalkoholi⁵⁴.

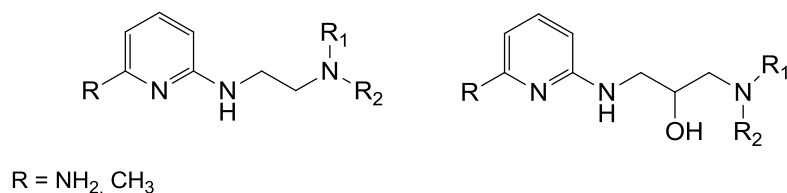
2.4.1. Właściwości biologiczne 2-aminopirydyn

Pochodne pirydyny cieszą się dużym zainteresowaniem, głównie ze względu na ich aktywność biologiczną. Znaczna ilość pochodnych pirydynowych posiada właściwości antybakteryjne, przeciwwirusowe i przeciwzapalne. Dodatkowo, związki te znajdują zastosowanie jako herbicydy jak również wykazują działanie przeciwgrzybiczne⁸⁵ (**Rysunek 15**).



Rysunek 15. Spektrum właściwości biologicznych aminopirydyn⁸⁶.

Oksymowe pochodne pirydyny wykazują właściwości anty-HIV, a także znajdują zastosowanie jako antidotum na zatrucia związkami organicznymi fosforu. Hydrazon 3- i 4-acetylowanej pirydyny jest w stanie hamować replikację wirusa HIV, zarówno w RNA (+) jak i DNA (+). Kolejny przykład stanowią *N*-podstawione tiosemikarbazonowe pochodne acetylo pirydyny, których kompleksy z metalami takimi jak żelazo (III), wykazują znakomitą aktywność przeciwnowotworową. Działają na linie komórkowe raka 41M (nowotwór jajników) oraz SK-BR-3 (nowotwór piersi), a ich cytotoksyczność uwarunkowana jest rodzajem metalu w centrum kompleksu aktywnego. Część pochodnych benzimidazolowych wykazuje inhibicję w stosunku do różnych enzymów, np. H⁺/K⁺-ATPazy lub acetylotransferazy cholesterolowej. Kolejnym znaczącym przykładem jest stosowanie pochodnych aminopirydyn jako leków przeciw pasożytom – głównie *Trypanosoma Brucei*, która wywołuje w krajach afrykańskich chorobę zwaną śpiączką lub HAT (ang. *Human African Trypanosomiasis*)⁶⁷ (**Rysunek 16**).



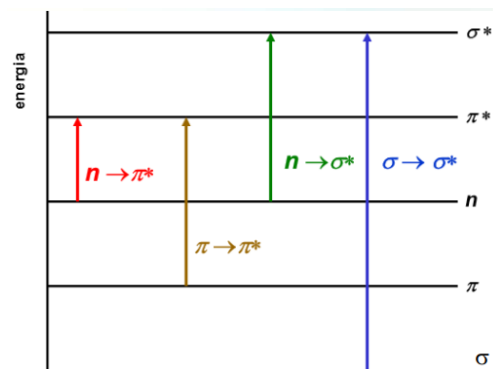
Rysunek 16. Przeciwpasożytnicze analogi aminopirydyn stosowane w chorobie HAT.

3. Spektroskopia związków organicznych

3.1. Zjawisko absorpcji światła

Absorpcja światła polega na pochłanianiu energii w postaci kwantu promieniowania elektromagnetycznego z zakresu UV-ViS i jest zależna od struktury materii, która to promieniowanie pochłania. W procesie tym następuje wzbudzenie elektronu z powłoki walencyjnej cząsteczki zawierającej chromofory, który zostaje przeniesiony ze stanu podstawowego w stan wzbudzony. Zazwyczaj, przeniesienie elektronu następuje z orbitalu molekularnego HOMO na orbital LUMO, a energia potrzebna do zainicjowania procesu jest wartością różnicy energii (ΔE) pomiędzy tymi orbitalami. Możliwe przejścia elektronowe w zależności od struktury cząsteczki, zobrazowane są na **Rysunku 17**. Mogą

one zostać przypisane różnym przejściom, i tak np. przejście elektronowe $\pi\text{-}\pi^*$ jest przejściem tak zwanym dozwolonym, występującym w alkenach lub w związkach aromatycznych. Natomiast przejście $n\text{-}\pi^*$ jest przejściem zabronionym (biorą w nim udział elektrony niewiążące), które dodatkowo, w przeciwieństwie do przejścia $\pi\text{-}\pi^*$ cechuje mała wartość molowego współczynnika ekstynkcji (ϵ)⁸⁷.



Rysunek 17. Przejścia elektronowe: $\delta\text{-}\delta^*$ próżniowe, $\pi\text{-}\pi^*$ bliski UV, $n\text{-}\delta^*$ bliski UV, $n\text{-}\pi^*$ widzialne, $n\text{-}\pi^*$ sprzężone wiązania podwójne; źródło: chemia.biolchem.uwb.edu.pl/spektroskopia_elektronowa

W przypadku związków heterocyklicznych, najczęstsze przejścia elektronowe to $\pi\text{-}\pi^*$ (dozwolone) oraz $n\text{-}\pi^*$ (zabronione). Istnieją reguły, które określają prawdopodobieństwo przeniesienia elektronu; najważniejszą z nich jest tak zwany *moment przejścia*. Określa on prawdopodobieństwo przejścia promienistego z początkowego do końcowego stanu kwantowego w sytuacji, gdy rozkład gęstości elektronowej stanu podstawowego ulegnie przemianie w rozkład gęstości elektronowej stanu wzbudzonego. Kolejne reguły zwane są regułami wyboru:

- a) Przejście pomiędzy stanami elektronowymi musi być dozwolone, według równania (**Rysunek 18**), gdy R_{nw} wynosi 0, to wówczas przejście jest wzbronione.

$$i. R_{nw} = \int_{-\infty}^{\infty} \psi_n^* \mu \psi_w dq \neq 0$$

Rysunek 18. Równanie opisujące elektronowe przejścia dozwolone i wzbronione.

- b) Tylko przejścia o tej samej multipletowości są przejściami dozwolonymi. W praktyce oznacza to, że wyłącznie przejście ze stanu singletowego S_0 na stany

wzbudzone singletowe $S_{1/2/3}$ etc. są dozwolone, natomiast przejście $S_0 \rightarrow T_1$ to przejście wzbronione. Istnieją oddziaływania, które mogą przyczynić się do występowania pasm wzbronionych to tak zwane *sprzężenia wibronowe*.

3.2. Zjawisko emisji światła

Wszystkie procesy związane z emisją światła, których źródłem nie jest podniesienie temperatury, noszą nazwę luminescencji⁸⁸. Gdy następuje emisja promieniowania, dana substancja traci energię, ale żeby proces ten mógł mieć miejsce i być procesem ciągłym, energia musi zostać zaabsorbowana w wyniku działania określonego bodźca. Procesy luminescencyjne możemy podzielić ze względu na mechanizm działania^{89,90}:

- **Chemiluminescencja** – emisja światła jest rezultatem reakcji chemicznej; do procesów z tej grupy zaliczamy: bioluminescencję, która jest efektem procesów biochemicznych w organizmach żywych czy elektrochemiluminescencję – jako rezultat reakcji elektrochemicznej;
- **Krystaloluminescencja** – emisja światła wywołana procesem krystalizacji;
- **Mechanoluminescencja** – rezultat działań mechanicznych na powierzchni ciała stałego;
- **Radioluminescencja** – która jest efektem bombardowania promieniowaniem jonizującym;
- **Fotoluminescencja** – czyli efekt absorpcji fotonów. Dzielimy ją na dwie ważne podgrupy:

- fluorescencję – jako efekt emisji światła ze stanów wzbudzonych singletowych (S),

- fosforescencję – jako efekt emisji światła ze stanów wzbudzonych trypletowych (T).

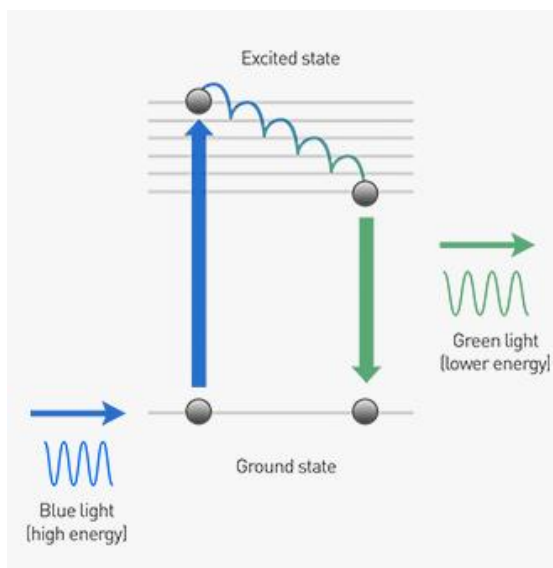
Związki chemiczne, które w wyniku absorpcji promieniowania o określonej długości fali zależnej od ich struktury emitują światło w procesie fluorescencji lub fosforescencji, to fluorofory^{90,91}. Najczęściej, są to związki o sprzężonym układzie wiązań podwójnych oraz o sztywnej strukturze, co sprawia, że ich molowy współczynnik absorpcji ma wysoką wartość, a wydajność kwantowa fluorescencji jest bliska wartości 1. Przykładem ‘dobrego’ fluoroforu jest fluoresceina stosowana jako indykator w wielu dziedzinach diagnostycznych, takich jak kryminologia, serologia, czy znakowanie nici

oligonukleotydowych. Znalazła ona zastosowanie w oftamologii, np. w teście Schirmera^{92,93} suchości gałki ocznej, który jest jednym z kryteriów diagnostycznych zespołu Sjögrena^{94,95}. Dla każdego fluoroforu istotne jest wyznaczenie kluczowych parametrów fizykochemicznych, które będą mówić o jego przydatności w określonych dziedzinach biochemii. Do najważniejszych zaliczają się:

- a) **molowy współczynnik ekstynkcji (ϵ)** - który jest miarą zdolności danego chromoforu do pochłaniania kwantów światła;
- b) **maksimum wzbudzenia i emisji, przesunięcie Stokes'a,**
- c) **wydajność kwantowa oraz czas życia fluorescencji**, o których mowa będzie w dalszych częściach rozdziału.

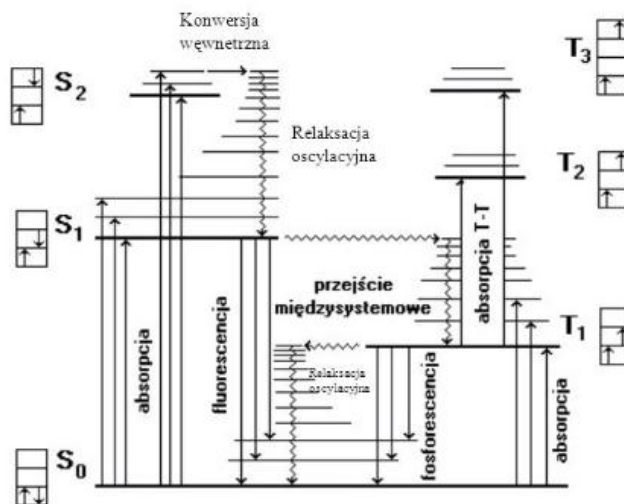
3.3. Fluorescencja

Fluorescencja jest zjawiskiem emisji światła zachodzącym z singletowych stanów wzbudzonych w wyniku absorpcji promieniowania elektromagnetycznego przez fluorofor^{90,96}. Ich istotną cechą jest absorpcja kwantu promieniowania o określonej, specyficznej dla każdego związku, długości fali w wyniku czego zostaje wyemitowane światło o długości fali dłuższej niż zaabsorbowana. Dlaczego tak się dzieje? Fluorofory pochłaniają światło o dużej energii, dzięki czemu elektron zostaje przeniesiony na jeden ze wzbudzonych poziomów singletowych. W idealnym układzie, ilość energii zaabsorbowanej będzie równa energii wyemitowanej. W międzyczasie jednak zachodzi wiele procesów fizycznych, które powodują częściową utratę energii zaabsorbowanej. Stąd wyemitowane kwanty światła o niższej niż początkowa energii, występują przy dłuższych długościach fali (czyli mniejszej częstotliwości) (**Rysunek 19**).



Rysunek 19. Rysunek obrazujący utratę energii następującą po procesie absorpcji kwantu promieniowania; *Ground state* = S_0 , *Excited state* = S_n ; źródło: *Thermofisher Scientific*

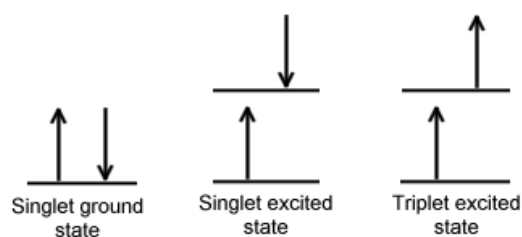
Wszystkie procesy, które mają miejsce od momentu zaabsorbowania kwantu światła, do momentu jego emisji, zostały doskonale opisane i przedstawione w sposób graficzny w roku 1935 przez profesora Aleksandra Jabłońskiego (**Rysunek 20**)^{97,98,99}.



Rysunek 20. Diagram Jabłońskiego; źródło: *Chemia Koloru*, prof. Daniel Gryko

Diagram ten obrazuje istotę procesów fotoluminescencji. Za pomocą fotonów wzbudzamy cząsteczkę, która znajduje się w stanie podstawowym S_0 , jej elektrony absorbują energię i następuje przejście do singletowego stanu wzbudzonego S_n , gdzie $n = 1, 2, 3$ etc. Pomiędzy każdym poziomem S znajdują się poziomy wibracyjne i rotacyjne (nieoznaczone na

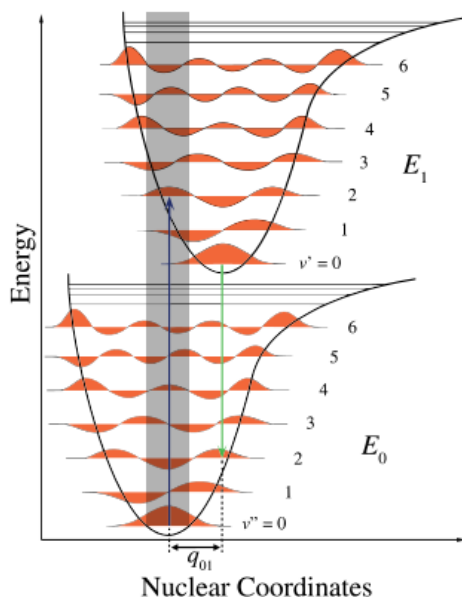
schemacie), które powodują że cząsteczka, w stanie wzbudzonym, traci część energii. W wyniku tych procesów (tzw. wewnętrznej konwersji) elektron traci energię dopóty, dopóki nie zacznie wracać do stanu podstawowego S_0 . Zanim cząsteczka wróci do stanu podstawowego zachodzą dwa rodzaje procesów: (i) cząsteczka emituje określony kwant promieniowania i ten proces nazywamy fluorescencją (F) lub (ii) może mieć miejsce tzw. przejście międzysystemowe (ISC) czyli przejście elektronu ze stanu singletowego w stan trypletowy (T) o innej multipletowości (**Rysunek 21**). Przejście takie nazywamy przejściem zabronionym. W tym wypadku również zachodzą procesy wibracyjno-rotacyjne (obniżające energie), aż do momentu kiedy elektron wróci do stanu podstawowego S_0 , emitując światło w procesie zwanym fosforescencją. Czas trwania fosforescencji jest znacznie dłuższy od fluorescencji, co wynika z różnic energetycznych pomiędzy poziomami: singletowym **S** (ang. *Singlet State*) i trypletowym **T** (ang. *Triplet State*).



Rysunek 21. Prezentacja stanu podstawowego oraz stanów wzbudzonych wraz z wartościami spinów elektronowych; źródło; chem.libretexts.org

3.3.1. Reguła Kashy i Francka-Condona

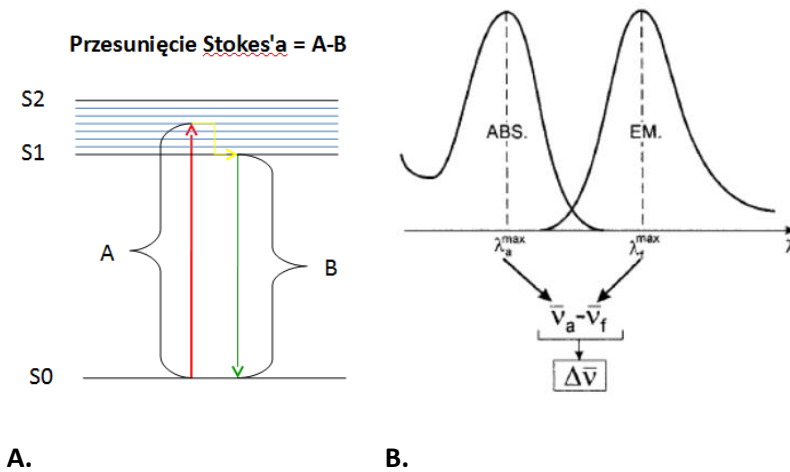
W wyniku absorpcji światła, o długości fali zależnej od struktury cząsteczki, elektron może przejść na którykolwiek ze wzbudzonych stanów elektronowych S_n . Zgodnie z regułą Kashy, emisja fotonu jest jednak najbardziej prawdopodobna z najniższego ze wzbudzonych stanów singletowych (lub trypletowych w przypadku fosforescencji)^{100,101,102}. W związku z tym, że tylko jeden poziom energetyczny S_1 , jest tym z którego może nastąpić emisja światła, prawdziwe jest stwierdzenie że długość fali wzbudzenia jest niezależna od długości fali emisji. To założenie, tłumaczy reguła Francka Condona, która mówi, że: zmiana pomiędzy poziomami wibracyjnymi jest najbardziej prawdopodobna, jeżeli dwie wibracyjne funkcje falowe nakładają się na siebie^{103,104,105} (**Rysunek 22**).



Rysunek 22. Prezentacja reguły Francka Condon przedstawiająca preferowane przejścia elektronowe pomiędzy stanami energetycznymi $v=0$ oraz $v=2$; źródło: <https://chemistry.stackexchange.com/questions/46516/what-is-the-franck-condon-region>

3.3.2. Widmo emisyjne i przesunięcie Stokes'a

Przesunięciem Stokes'a nazywamy różnicę pomiędzy maksimami krzywej absorpcyjnej i emisyjnej (**Rysunek 23**). Jest to różnica energetyczna pomiędzy zaabsorbowanym promieniowaniem elektromagnetycznym powodującym przeniesienie cząsteczki z poziomu S_0 do odpowiedniego poziomu S_n , (Przejście $S_0 \rightarrow S_1$, **Rysunek 23A**), a energią światła wyemitowanego z najniższego wzbudzonego, singletowego poziomu S_1 do stanu podstawowego S_0 . Różnice w przesunięciach Stokes'a (**Rysunek 23B**) odpowiednich barwników fluorescencyjnych zależą zatem od tego ile są w stanie zaabsorbować światła i na który ze wzbudzonych poziomów S_n zostanie przeniesiony elektron, czyli od struktury ich chromoforu. Jeżeli utrata energii z przejściowego stanu S_n do stanu S_1 jest wynikiem tylko konwersji wewnętrznej, to różnica A-B jest nieduża (< 80 nm). Jeżeli natomiast przesunięcia Stokes'a sięgają wartości > 80 nm, to może to świadczyć o dodatkowych procesach zachodzących w stanie wzbudzonym, takich jak: zmiana momentu dipolowego cząsteczki lub przeniesienie protonu⁹⁰.



Rysunek 23. Prezentacja przesunięcia Stokes'a pomiędzy poziomami energetycznymi S_0 i S_1 oraz jako różnica pomiędzy maksimum absorpcji i emisji fluorescencji, wyrażona w cm^{-1}
 źródło B: *Fluorescence Spectroscopy; Aldous McLaughlin*

3.3.3. Wydajność kwantowa

Wydajność kwantowa fluorescencji określa stosunek liczby fotonów wyemitowanych przez cząsteczkę, do liczby fotonów, które zostały przez tę cząsteczkę zaabsorbowane^{106,107,90} (**Rysunek 24**). Maksymalna wartość wydajności kwantowej wynosi 1, co oznacza, że ilość promieniowania zaabsorbowanego, jest równa ilości promieniowania wyemitowanego. Wiemy jednak, iż jest to niemożliwe, chociażby ze względu na zawsze występujący proces konwersji wewnętrznej, skutkujący utratą części zaabsorbowanej energii.

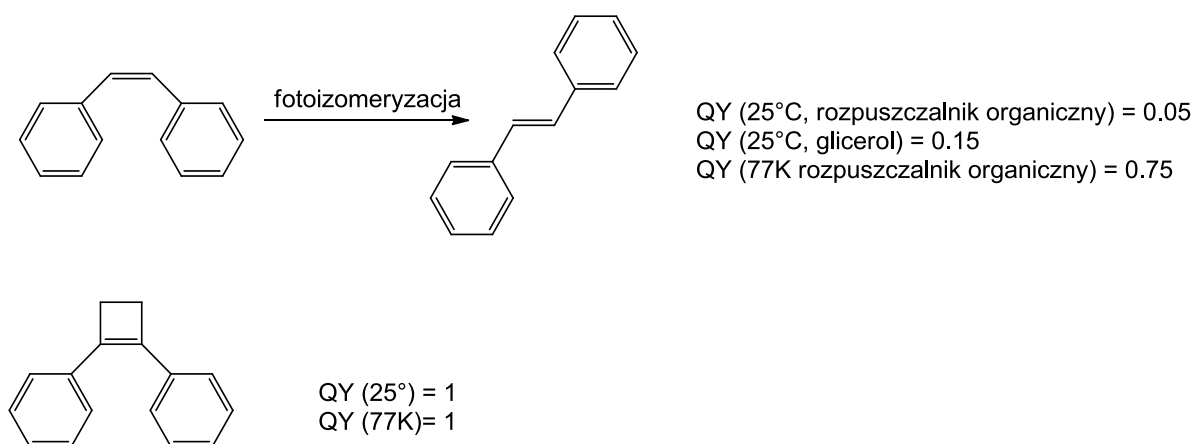
$$\phi = \frac{\text{liczba fotonów wyemitowanych}}{\text{liczba fotonów zaabsorbowanych}}$$

Rysunek 24. Wzór przedstawiający wydajność kwantową fluorescencji.

Istnieje wiele czynników wpływających na wysokość wydajności kwantowej fluorescencji:

- efekt atomu ciężkiego – obecność takich atomów jak chlor czy brom, zwiększa szansę zaistnienia przejścia międzysystemowego (ISC) pomiędzy poziomami S i T, co przyczynia się do obniżenia wydajności kwantowej fluorescencji;

- grupy karbonylowe – podobnie jak atomy ciężkie zwiększają prawdopodobieństwo procesu ISC, przez zmianę przejść elektronowych z $\pi-\pi^*$ na $n-\pi^*$, obniżając tym samym wydajność kwantową;
- obecność auksochromów, czyli grup typu $-\text{NH}_2$ czy $-\text{OH}$, które powodują tzw. przesunięcia batochromowe i zwiększają wydajność kwantową;
- temperatura/rozpuszczalnik – im wyższa, tym większe prawdopodobieństwo rotacji i zmian konformacyjnych, zwłaszcza struktur nieusztynwionych; w stanie wzbudzonym w zależności od polarności rozpuszczalnika oraz temperatury, może zachodzić fotoizomeryzacja, skutkująca zmianami konformacyjnymi (**Rysunek 25**). Dla niższych temperatur i bardziej lepkich rozpuszczalników wydajność kwantowa wzrasta. Największa jest dla struktur sztywnych, gdzie prawdopodobieństwo zmian konformacyjnych jest praktycznie niemożliwe.



Rysunek 25. Wpływ sztywności struktury, lepkości rozpuszczalnika oraz temperatury na wydajność kwantowej fluorescencji; źródło: *Chemia Koloru*, prof. Daniel Gryko

3.3.4. Czas życia fluorescencji

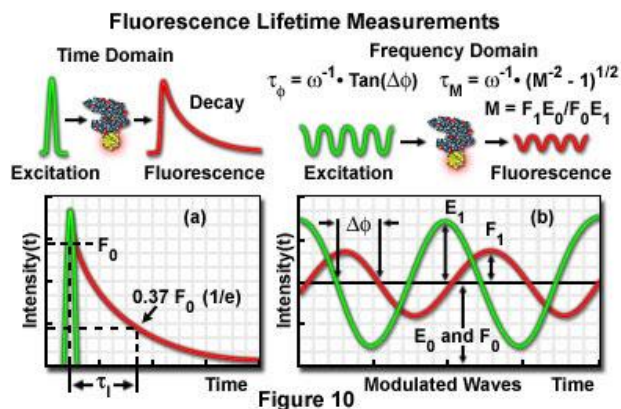
Kolejnym bardzo informatywnym parametrem, który charakteryzuje fluorofory jest czas życia fluorescencji (τ_F). Według definicji, jest to czas jaki fluorofor spędza w stanie wzbudzonym^{90,108,109,110,99}. Znaczącym jest fakt, iż czas życia fluorescencji jest swoistym parametrem cząsteczki, niezależnym od metody pomiaru, długości fali wzbudzenia, stężenia próbki, czasu naświetlania czy fotowygazania^{99,111}. Parametrami

wpływającymi na wartość czasu życia fluorescencji są struktura cząsteczki, zmiana temperatury oraz polarność/pH roztworu. Niezależność τ_F od metod pomiarowych w połączeniu z wrażliwością na środowisko pomiaru, stanowi odrębną, a zarazem komplementarną metodę do tradycyjnych pomiarów intensywności fluorescencji, pozwalającą na uniknięcie błędów wiążących się chociażby z przygotowaniem próbki^{90,108}.

Pomiar ten pozwala m.in. na :

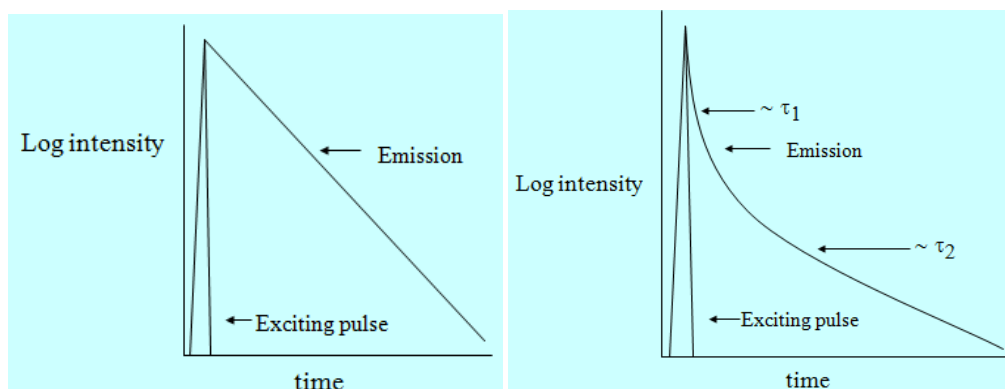
- określenie czasów życia i udziału dwóch lub więcej fluoroforów w roztworze jak i- na podstawie dynamiki konformacyjnej - możliwe jest wyznaczenie wielu czasów życia tego samego fluoroforu;
- w pomiarach wygaszania fluorescencji pozwala na określenie czy ma miejsce wygaszanie dynamiczne czy statyczne;
- w metodzie FRET (*ang. Förster Resonance Energy Transfer*) służy do pomiarów transferu energii pomiędzy molekułami;

Do pomiaru czasu życia fluorescencji można wykorzystać dwie techniki. Pierwsza z nich, wykorzystuje fluorymetr fazowy (*ang. frequency-domain*)¹⁰⁸ i oparta jest na naświetlaniu badanej próbki tak zwanym światłem modułowanym, które posiada czas modulacji dłuższy od mierzonego czasu zaniku fluorescencji. Oznacza to, że dla danej cząsteczki po przejściu do stanu wzbudzonego, częstość jej modulacji będzie taka sama, natomiast zostanie ona przesunięta w fazie. W konsekwencji, do wyznaczenia zaniku fluorescencji mierzy się różnicę faz światła wzbudzającego i emisyjnego. Druga metoda, wykorzystuje fluorymetr impulsowy (*ang. time-domain*) (**Rysunek 26**). Pomiaru zaniku fluorescencji dokonujemy poprzez naświetlenie próbki światłem impulsowym i śledzimy zanik, wykorzystując metodę TCSPC czyli pojedynczego zliczania fotonów. Innymi słowy, jeżeli populacja fluoroforów zostaje wzbudzona, to czas życia jest czasem, po którym z populacji początkowej $1/e$ (37%) molekuł zostaje wygaszona^{110,112}.



Rysunek 26. Prezentacja wyznaczania czasu życia fluorescencji metodą time-domain (lewa strona) i frequency-domain (prawa strona).; źródło: *Czasu życia fluorescencji*; Marta Dziejicka Wasylewska, Instytut farmakologii PAN

W roztworach homogenicznych (fluorofor + rozpuszczalnik), zazwyczaj mamy pojedynczy czas życia rzędu kilku nanosekund. Podczas przebywania w stanie wzbudzonym, mają miejsce różnego rodzaju procesy: IC, ISC, wygaszanie kolizyjne czy ruchy rotacyjne, co wpływa na wartość czasu życia oraz czy funkcja jest jedno czy dwuwykładnicza (**Rysunek 27**). Pozwala to na wysnuć przypuszczeń z jakimi procesami w stanie wzbudzonym mamy do czynienia i jaka jest konformacja molekuly w stanie wzbudzonym.¹¹⁰

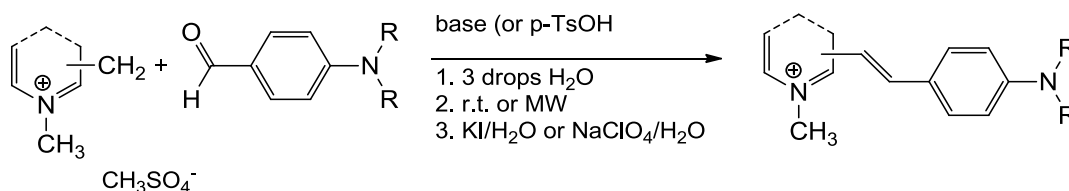


Rysunek 27. Wykresy prezentujące jedno- (lewy) i dwueksponencjalny (prawy) zanik życia fluorescencji wyznaczony metodą zliczania pojedynczych fotonów (ang. *Time Correlated Single Photon Counting*); źródło: *Fluorescence Lifetimes*, Marek Hof

3.4. Fluorescencyjne znaczniki styrylowe

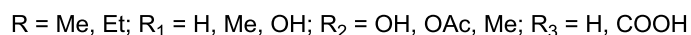
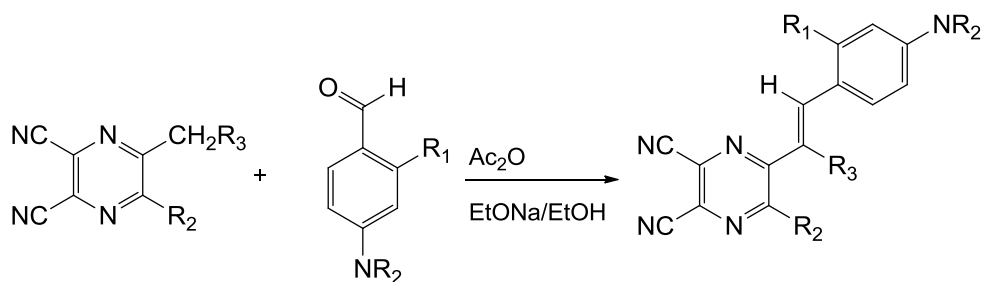
Barwniki zawierające w swojej strukturze linker $C_6H_5-CH=CH-$, noszą nazwę znaczników styrylowych¹¹³. Niektóre fluorofory styrylowe przypominają pod względem strukturalnym barwniki cyjaninowe^{114,115}, a część z nich posiada w swojej strukturze nie tylko monomer arylowinyłowy lecz również heteroarylowinyłowy. W porównaniu do cyjanin, cechuje je większa fotostabilność i lepsze właściwości fluorescencyjne. Otrzymywanie, aplikacyjność oraz właściwości fotofizyczne tych związków zostały dobrze opisane w literaturze¹¹⁶. Ze względu na swoje właściwości, pochodne styrylowe stały się pożądanymi związkami w syntezie organicznej. Znajdują one zastosowanie w chemii materiałowej, jako aktywne biologicznie związki, barwniki w fotografii, znaczniki fluorescencyjne czy chemosensory^{113,117}.

Jedną z powszechnie stosowanych metod syntezy styrylopirydyniowych, styrylochinolinowych oraz styrylobenzotiazolowych znaczników jest reakcja kondensacji pomiędzy metylosiarczanami: 4-metylopirydyniowym, 2-metylobenzotiazolowym oraz 4-metylochinolinowym (**Schemat 26**), a aromatycznymi aldehydami, bez stosowania rozpuszczalnika i ze wspomaganiami mikrofalowym¹¹³.



Schemat 26. Synteza znaczników styrylowych z wykorzystaniem pochodnych metylosiarczanowych¹¹³.

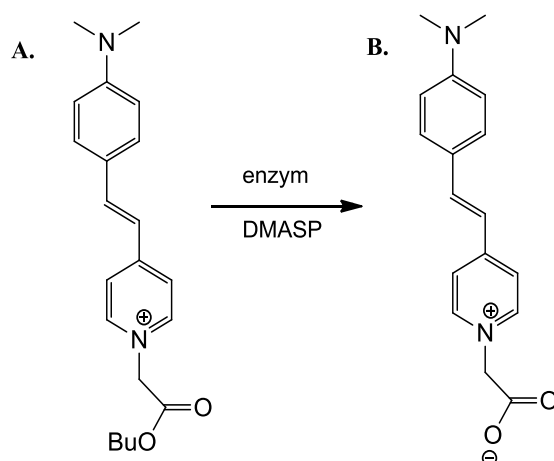
Kolejną metodę otrzymywania znaczników styrylowych stanowi reakcja pomiędzy 2-dicyano- 5-metylopirazyną z aldehydami aryłowymi (**Schemat 27**). Uzyskiwane w ten sposób pochodne posiadają poszerzony układ skoniugowanych wiązań podwójnych i wykazują tendencje do podlegania procesowi wewnętrznego przeniesienia ładunku ICT (ang. *Intramolecular Charge Transfer*)¹¹⁸.



Schemat 27. Synteza znaczników styrylowych z wykorzystaniem 2-dicyano-5-metylopirazyny¹¹³.

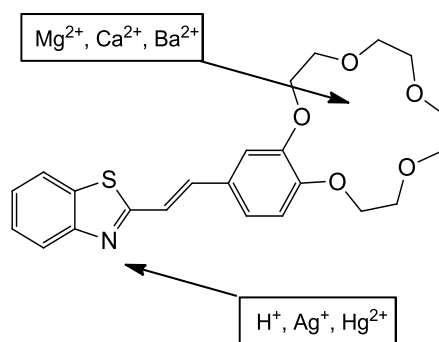
Związki te znajdują zastosowanie jako materiały optyczne, ponieważ charakteryzuje je duży moment dipolowy stanu wzbudzonego, a w konsekwencji, znacząca różnica w momentach dipolowych pod wpływem naświetlania laserem. Analogi tych związków wykazują znaczny solwatochromizm, którego wielkość uzależniona jest od polarności stosowanego w badaniach rozpuszczalnika, a także przesunięcie Stokes'a: w granicach 5700 cm⁻¹¹¹⁹.

Jednymi z interesujących przykładów znaczników styrylowych są pochodne DMASP – 4-[4-(dimetylamino)styrylo]pirydyny, znajdujące zastosowanie jako sondy fluorescencyjne do badania lepkości w komórkach¹²⁰. W roztworach wodnych DMASP wykazują podwójną fluorescencję, wzbudzenie następuje przy długościach fal: 469 i 360 nm, a emisja przy długości fali wynoszącej 600 nm. Struktury formy poza- (A) i wewnątrzkomórkowej (B) przedstawione są na **Schemacie 28**.



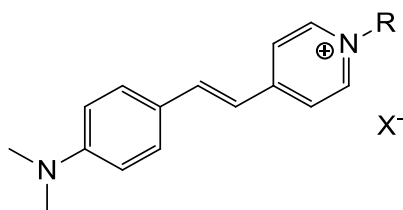
Schemat 28. Przedstawienie formy poza- i wewnątrzkomórkowej DMASP¹¹³.

2-styrylowebenzotriazole, zawierające fragment eteru 15-korona-5, wykazują właściwość wiązania metali ziem alkalicznych, Ag^+ oraz Hg^{2+} , a także wiązania protonów (**Rysunek 28**)^{121,122}. Kompleksowanie zachodzi w dwóch miejscach w cząsteczce: w obrębie eteru koronowego oraz części heterocyklicznej, podczas gdy metale alkaliczne tworzą kompleks wyłącznie z częścią makrocykliczną. W przypadku metali takich jak Ba^{2+} , Ag^+ oraz Hg^{2+} następuje tworzenie silnych kompleksów typu „sandwich” co zostało potwierdzone za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H NMR) oraz spektroskopii UV-Vis^{121,122}.



Rysunek 28. Miejsca kompleksowania metali w 2-styrylowych benzotriazolach¹¹³.

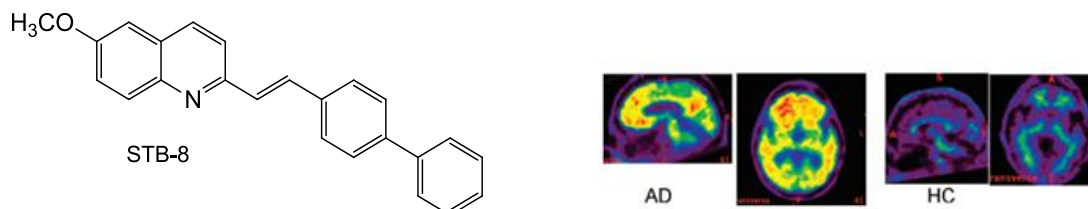
Aminostyrylowe barwniki (ASP) (ang. *Amino styryl pyridinium dyes*) znalazły również zastosowanie w badaniach micelarnych, a ich charakterystyczną cechą jest czułość na różnice potencjału błon biologicznych, skutkującą zmianami emisji fluorescencji^{123,124} (**Rysunek 29**). Użyteczność niektórych analogów jest ograniczona ze względu na długość ich fal wzbudzenia (450-550 nm). Z tego względu, struktury poddawano takim modyfikacjom, aby maksima absorpcji były przesunięte powyżej 700 nm. Zabieg ten miał zminimalizować interferencję z endogennymi chromoforami oraz polepszyć ich wizualizację w komórkach żywych¹²³.



Rysunek 29. Struktura barwnika ASP.

Część związków styrylowych służy do obrazowania złogów amyloidu β w chorobie Alzheimera¹²⁵. Powinowactwo wiązania do amyloidów została określona na podstawie

pomiaru zmian w intensywności fluorescencji. Otrzymany referencyjny związek STB-8 (**Rysunek 30**) został przebadany w eksperymentach *ex vivo* oraz *in vivo* na transgenicznym modelu myszy z chorobą Alzheimera (AD) wykazując bardzo dobrą przenikalność bariery krew-mózg jak i specyfikę wiązania do złogów amyloidu^{113,126}.



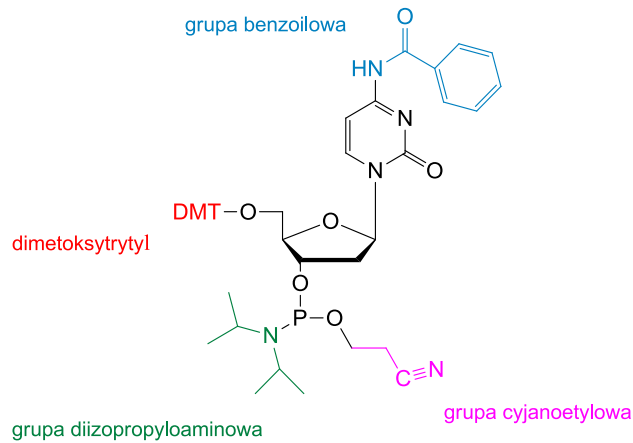
Rysunek 30. Zastosowanie pochodnych styrylowych do obrazowania złogów amyloidu β w chorobie Alzheimera (AD).

4. Synteza oligonukleotydów

Niemalże każda technika biologii molekularnej wykorzystuje DNA lub RNA otrzymane na drodze chemicznej syntezy. Każdy oligonukleotyd składa się z określonej sekwencji nukleotydowej, która została dobrana w zależności od planowanego zastosowania. Od lat 70' dwudziestego wieku rozwój metod syntezy i oczyszczania oligonukleotydów przybrał na sile, w konsekwencji obecne metody charakteryzują się wysokimi wydajnościami oraz niskim kosztem. W tym samym czasie nastąpił również gwałtowny rozwój aplikacyjności oligonukleotydów, co również znacznie poszerzyło zapotrzebowanie na ich modyfikacje.

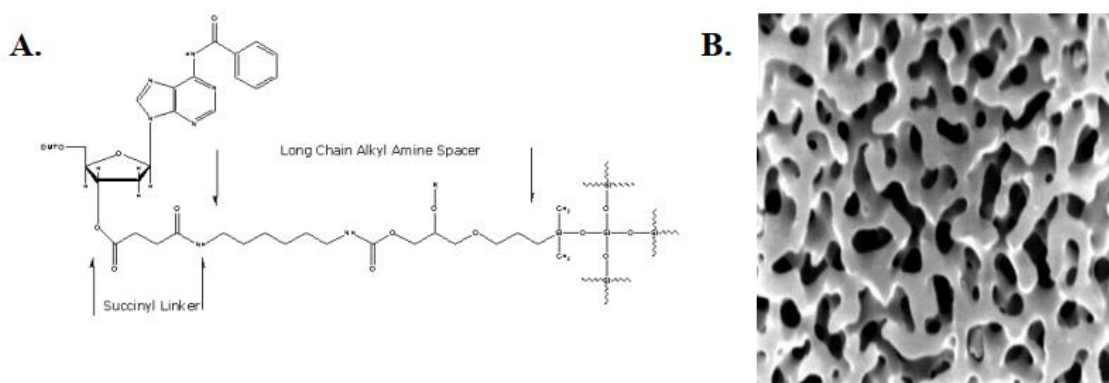
4.1. Synteza oligonukleotydów metodą amidofosforynową na podłożu stałym

Od roku 1983, ze względu na możliwość otrzymywania długich sekwencji oraz dobre wydajności, popularność zdobyła synteza oligonukleotydów metodą amidofosforynową. Synteza ta opiera się na wykorzystaniu bloków budulcowych w postaci monomerów amidofosforynowych. Monomer amidofosforynowy jest nukleotydem, w którym wszystkie grupy funkcyjne zasad heterocyklicznych (oprócz tymidyny) zablokowane są odpowiednimi grupami ochronnymi, opisanymi również w **Rozdziale 1**. Wszystkie grupy ochronne zapobiegają zachodzeniu reakcji ubocznych, wymuszając tym samym powstawanie pożądanego produktu (**Rysunek 31**) i są usuwane selektywnie po zakończeniu syntezy^{127,128,129}.



Rysunek 31. Przykładowy nukleotyd z grupami ochronnymi stosowanymi w syntezie amidofosforynowej na podłożu stałym.

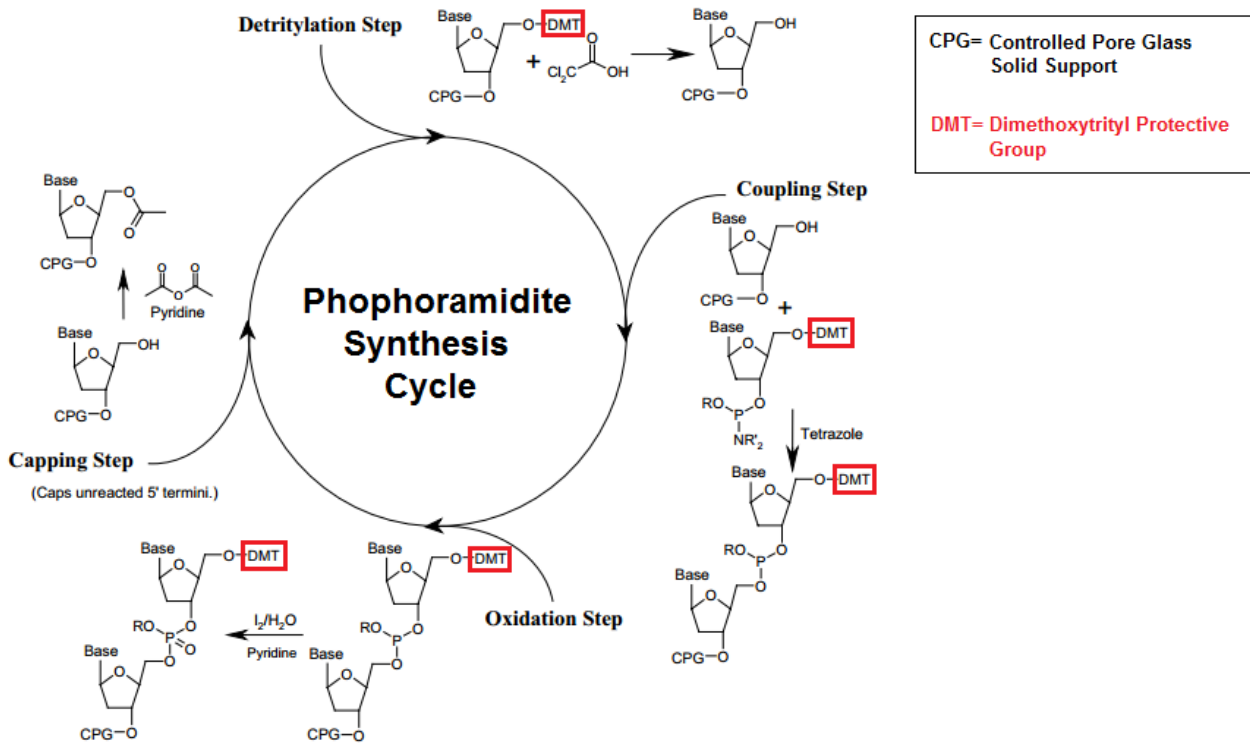
Podłoże stałe na którym odbywa się wydłużanie łańcucha oligonukleotydowego, to tak zwane podłoże szklane CPG (ang. *Controlled pore glass bead*) o wielkości 5 mikronów i porowatej strukturze, zapewniającej efektywne przyłączenie nukleotydów (**Rysunek 32**). Związanie oligomeru z podłożem stałym następuje poprzez atom węgla 3' w pierścieniu pentozy pierwszego nukleotydu danej sekwencji, a proces syntezy następuje od końca 3' do końca 5' Pojedynczy cykl syntetyczny składa się z czterech kroków: deprotekcja, sprzężanie, kapowanie oraz utlenianie i powtarzany jest wielokrotnie aż do momentu przyłączenia ostatniego nukleotydu zaplanowanej sekwencji^{130,131}.



Rysunek 32. A. Podłoże CPG z przyłączonym pierwszym nukleotydem; B. – zdjęcie mikroskopowe powierzchni podłoża CPG; źródło: *Integrated DNA Technologies, „Chemical Synthesis and Purification of Oligonucleotides*.

Każdy z kroków syntetycznych jest niezwykle istotny i wpływa na wydajność pojedynczego przyłączenia:

- a) **deprotekcja** – polega na odblokowaniu grupy trytylowej z funkcji hydroksylowej znajdującej się na końcu 5' pentozy nukleotydu; usuwana jest przy użyciu 2% kwasu trichlorooctowego (TCA) lub 3% kwasu dichlorooctowego (DCA) w obojętnym rozpuszczalniku (DCM lub toluen). Efektem detrytylacji jest pozostawienie wolnej grupy –OH na pierwszym przyłączonym do podłoża nukleotydzie, do której nastąpi przyłączenie kolejnej podjednostki;
- b) **sprzęganie (kondensacja)** – rozpoczyna się od przyłączenia H-tetrazolowego aktywatora do centrum fosforowego P (III) amidofosforynu, w wyniku którego tworzy się reaktywny produkt pośredni – amidofosforyntetrazolowy. Następnie monomer reaguje z wolną (odtrytylowaną) grupą 5'-hydroksylową nukleozydu. Niezwiązana zasada i produkty uboczne są następnie wymywane, a tetrazol ulega regeneracji;
- c) **kapowanie** – polega na przemywaniu podłoża roztworem bezwodnika octowego i 1-metyloimidazolu, w celu zablokowania nieprzereagowanych 5'-hydroksylowych grup nukleozydów. Zapobiega to dalszemu pobocznemu wydłużaniu łańcucha oraz powstawaniu oligonukleotydów z delecjami w obrębie struktury
- d) **utlenianie** – proces stabilizacji triwalentnego linkera fosforynowego, poprzez przeprowadzenie go w formę pentawalentną na drodze utlenienia atomu fosforu P(III) do P(V); roztworem utleniającym jest najczęściej jod w pirydynie.



Rysunek 33. Cykl syntezy oligonukleotydów metodą amidofosforynową na podłożu stałym;

źródło: http://2014.igem.org/Team:Cooper_Union/TdT_project

Podczas syntezy każdorazowo po kolejnym przyłączeniu jednostki nukleotydu, powtarzany jest proces odblokowania kwasolabilnej grupy ochronnej DMTr, a jego wydajność porównywana jest do etapu poprzedzającego za pomocą tak zwanego monitora trytylu (trytyl ON). Działanie to opiera się na pomiarze przewodnictwa roztworu, który zawiera stabilny karbokation dimetoksytrytylowy (powstający w obecności silnego kwasu). Dzięki temu otrzymujemy informację na temat każdego przyłączonego monomeru, ilościowo określając efektywności odblokowania DMTr; dane zostają przedstawione w czasie rzeczywistym na wykresie słupkowym. Po zakończonych cyklach syntezy otrzymujemy oligonukleotyd o zadanej sekwencji, przyłączony końcem 3' do podłoża CPG, z wolną grupą 5'-hydroksylową ostatniego nukleotydu. Ponadto na prawie każdej z zasad purynowych i pirymidynowych (oprócz tymidyny i uracylu) obecne są zasadolabilne grupy ochronne. W związku z powyższym, w następnym kroku przeprowadza się proces odblokowania grup ochronnych i odcinania od podłoża CPG w środowisku zasadowym (woda amoniakalna). W kolejnym kroku odcięty od podłoża oligonukleotyd poddaje się procesowi odsalania, który polega na odseparowaniu

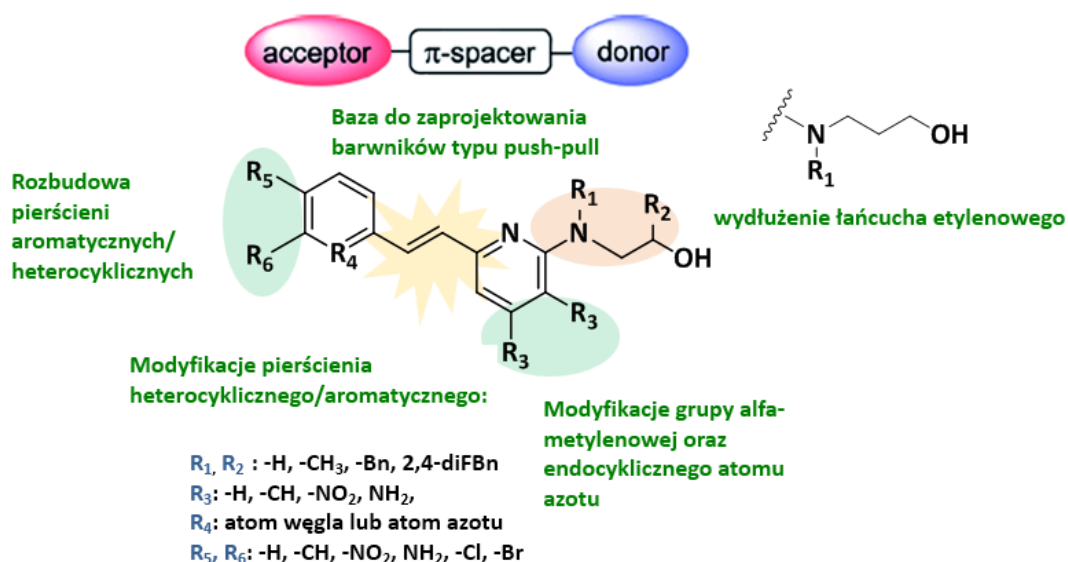
oligonukleotydu od soli organicznych, powstałych w procesie odblokowywania. Proces odsalania kończy się izolacją produktu przy użyciu technik: Wysokosprawnej Chromatografii Cieczowej (HPLC) lub PAGE (ang. *polyacrylamide gel electrophoresis*). W celu identyfikacji oraz potwierdzenia zaplanowanej sekwencji oligonukleotydowej wykonuje się:

- a) widma masowe – z jonizacją typu ESI lub MALDI, w zależności od długości sekwencji
- b) elektroforezę kapilarną, która potwierdza czystość docelowego oligonukleotydu.

III. BADANIA WŁASNE I DYSKUSJA WYNIKÓW

1. Modyfikacja struktury 2-pirydynylowych termolabilnych grup ochronnych

2-pirydynylowe Termolabilne Grupy Ochronne (2-Py TGO) można efektywnie usuwać w środowisku wodnym o pH zbliżonym do obojętnego. Opracowane metody sterowania właściwościami termolabilnymi 2-Py TGO, weryfikacja mechanizmu cyklizacji oraz identyfikacja miejsc protonacji w odpowiednim pH^{57,132}, wzbogaciły zarówno wiedzę, jak i pole zastosowania 2-Py TGO. Aby jeszcze bardziej wyeksponować ich duży potencjał aplikacyjny, celem badawczym mojej pracy doktorskiej stała się modyfikacja układu 2-Py TGO, w celu uzyskania pożądanych właściwości fluorescencyjnych przy jednoczesnym zachowaniu właściwości termowrażliwych. Połączenie termowrażliwości oraz zdolności do emisji światła o określonej długości fali, pozwoliłoby opracować nowego typu znaczniki fluorescencyjne, usuwane ze znakowanej biomolekuły w sposób kontrolowany, stosując zmiany temperatury lub promieniowania elektromagnetycznego. W tym celu zaplanowałam rozbudowę układu 2-N-pirydynylowego o układ sprzężonych wiązań podwójnych, bazujących na strukturze winylenodipirydyny (**Schemat 29**) oraz wprowadzanie różnych podstawników w pozycję 2-N-pirydylową.

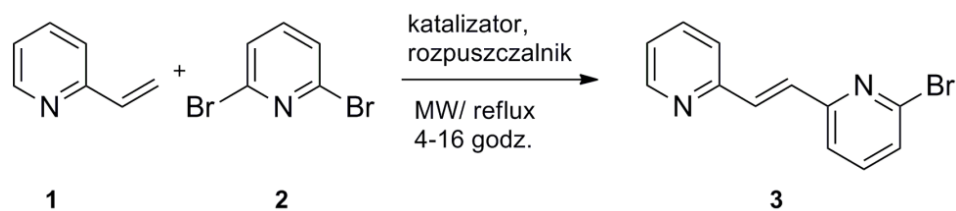


Schemat 29. Proponowane modyfikacje w strukturze fluorescencyjnego aminoalkoholu, mające wpływać na zmiany właściwości fotofizycznych lub/i termolabilnych.

Zaproponowane zmiany strukturalne pozwolą sterować parametrami fotofizycznymi oraz zachować podatność fluoroforów na cyklizację. W pierwszej kolejności modyfikacje mogą dotyczyć obrębu pierścieni heterocyklicznych lub aromatycznych, w przypadku gdy R₄ będzie atomem węgla (**Schemat 29**). Możliwe jest wprowadzenie grup funkcyjnych, a także rozbudowa sprzężonych wiązań podwójnych oraz wprowadzanie innych układów heterocyklicznych jak np. chinolina. Poprzez odpowiedni dobór miejsca wprowadzania grup funkcyjnych o różnym charakterze donorowo-akceptorowym, możemy uzyskać znaczniki typu *push-pull* – grupa EDG (*ang. electron donating group*). Ich działanie polega na przesunięciu ładunku elektronowego do akceptora z deficytem elektronowym, wywołując tym samym batochromowe przesunięcie pasma absorpcyjno-emisyjnego oraz podniesienie wartości molowego współczynnika absorpcji. Z zachowaniem odpowiedniej odległości pomiędzy atomem węgla mostka etylenowego oraz endocyklicznego atomu azotu (część aminoalkoholowa) możemy również wydłużać łańcuch zachowując tendencję do cyklizacji (po przyłączeniu do odpowiedniej cząsteczki) i finalnie przyłączać barwnik do określonej struktury z wolną grupą hydroksylową, karboksylową czy aminową (mogą to być np. biocząsteczki, jak oligonukleotyd czy peptyd).

1.1. Otrzymywanie (*E*)-2-bromo-6-(2-pirydyn-2-yl-winylo)pirydyny (PvVnPy) – optymalizacja reakcji Hecka

W celu uzyskania właściwości fluorescencyjnych, zaplanowałam syntezę nowych analogów 2-aminopirydylowych alkoholi, która opierała się na utworzeniu skondensowanego układu π -elektronów (**Schemat 30**). Według tych założeń struktura zawierać będzie sprzężony układ wiązań podwójnych co pozwoli na swobodny przepływ elektronów π i będzie stanowić rdzeń fluorescencyjnych barwników. W związku tym, przeprowadziłam szereg reakcji testowych, mających na celu optymalizację reakcji tworzenia wiązania Csp²-Csp² pomiędzy 2-winylopirydyną (**1**) oraz 2,6-dibromopirydynam (**2**) z wykorzystaniem reakcji sprzęgania Hecka (**Schemat 30**), przebiegającej w obecności odpowiedniej zasady, rozpuszczalnika i katalizatora palladowego (0) (**Tabela 3**).



Schemat 30. Synteza (*E*)-2-bromo-6-(2-pirydyn-2-yl-winylo)pirydyny.

1.1.1. Otrzymywanie (*E*)-2-bromo-6-(2-pirydyn-2-yl-winylo)pirydyny z zastosowaniem chlorku palladu (II) - ogrzewanie konwencjonalne

Optymalizacja reakcji Hecka, czyli odpowiedni dobór reagentów oraz ich stosunków ilościowych, a także sposobu ogrzewania (łaźnia olejowa/reaktor mikrofalowy) było niezwykle istotne w kontekście otrzymywania związku **3** z wysoką wydajnością. Reakcje optymalizacji prowadziłam w skali 0.5 oraz 1.0 mmol. W pierwszych pracach (**Tabela 3., Lp. 1-4**) zastosowałam chlorek palladu (II) w ilości 0.01 mmol w połączeniu z trifenylfosfiną pełniącą rolę ligandu, w stosunku ilościowym 1:2, a jako zasadę wybrałam węglan potasu. Dodatkowym reagentem był bromek tetrabutylamoniowy (TBAB), pełniący rolę przenośnika fazowego. Węglan potasu nie rozpuszczał się całkowicie w użytym rozpuszczalniku, toteż TBAB miało w tym przypadku przede wszystkim zwiększyć efektywność działania K_2CO_3 . W pierwszych próbach, zamiast aprotycznego polarnego rozpuszczalnika używałam niepolarnego toluenu lub ksylenu, jednakże w reakcji Hecka, korzystne jest stosowanie rozpuszczalnika polarnego takiego jak *N,N*-dimetyloformamid. Wynika to głównie z lepszej rozpuszczalności reagentów w *N,N*-dimetyloformamidzie, co sprzyja efektywności reakcji sprzęgania, ułatwiając uzyskanie niezbędnej wysokiej temperatury mieszaniny reakcyjnej.

Tabela 3. Reakcje pilotażowe mające na celu optymalizację reakcji tworzenia wiązania C-C pomiędzy 2,6-dibromopirydyną, a 2-winylopirydyną.

Lp.	2,6-dibromopirydyna [mmol]	2-winylopirydyna [mmol]	PdCl ₂ [mol%]	K ₂ CO ₃ [mmol]	NaOAc [mmol]	TBAB [mmol]	DMF/H ₂ O [v/v]	PPh ₃ [mmol]	Temp. [°C]	W [%]
1	1	1.25	1	2	-	0,05	3/0	0.0002	80	28
2	1	1.25	1	2	-	1	3/0	0.0002	80	16
3	1	1.25	1	2	-	1	3/0	0.0002	120	16
4	1	1.25	1	2	-	1	8/0.8	0,0002	120	16
5	1	1.25	1	2	-	1	8/0.8	-	120	23
6	1	1.25	1	2	-	1	2/1	-	130	22
7	1	1.25	2	2	-	1	2/1	-	130	27
8	1	1.25	2	-	1.5	1	0.5	-	120	20

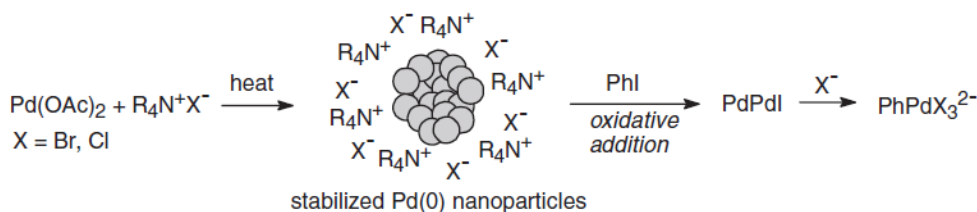
Mieszaninę reakcyjną, początkowo, umieściłam w łaźni olejowej pod chłodnicą zwrotną, osiągając temperaturę 80°C, kontrolując przebieg reakcji z użyciem chromatografii cienkowsarstwowej. Po 12 godzinach nie zaobserwowałam, w żadnym z przypadków (**Tabela 3, L.p.1-2**), znaczącego przyrostu produktu, wobec czego zdecydowałam się na pozostawienie reakcji w zadanej temperaturze przez kolejne 48 godzin. Po tym czasie zwiększyłam temperaturę do 120°C, jednak po kolejnych 48 godzinach nie zauważyłam znaczącego postępu reakcji, ani też finalnie zwiększenia wydajności produktu **3**. Dodanie kolejnych porcji katalizatora, również nie przyniosło zamierzonego efektu, w związku z czym musiałam zastosować kolejne zmiany, tym razem dotyczące sposobu ogrzewania.

1.1.2. Otrzymywanie (*E*)-2-bromo-6-(2-pirydyn-2-yl-winylo)pirydyny z zastosowaniem chlorku palladu (II) - wspomaganie mikrofalowe

Bazując na doniesieniach literaturowych¹³³ zdecydowałam się na przeprowadzenie reakcji sprzęgania ze wspomaganie mikrofalowym, powtarzając kroki **1-3 (Tabela 3)** Synteza wspomagana mikrofalowo ma wiele zalet, takich jak: **i)** skrócenie czasu trwania reakcji, **ii)** mniejsza tendencja do punktowego przegrzewania mieszaniny, co przeciwdziała rozkładowi produktów. Promieniowanie mikrofalowe przenika przez ściany naczyń i ogrzewa bezpośrednio składniki reakcji i w przeciwieństwie do ogrzewania konwencjonalnego, skutkuje jednorodnym rozkładem temperatury i szybkim ich ogrzaniem. Ogrzewanie przy użyciu energii mikrofalowej,

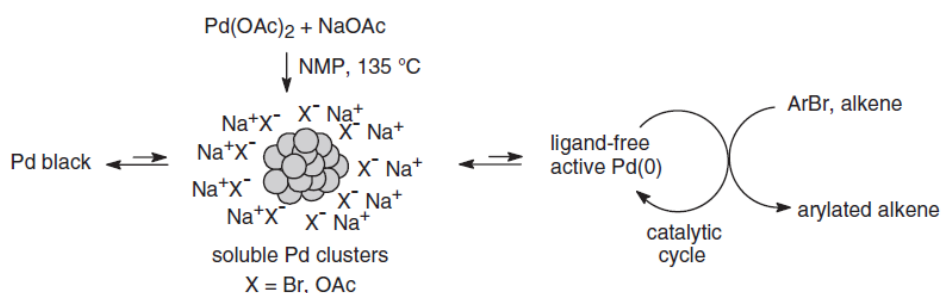
teoretycznie ma również wpłynąć na zwiększenie efektywności reakcji - nie wpływa na samą energię aktywacji, jednakże zapewnia przekroczenie tej bariery i tym samym zakończenia reakcji znacznie szybciej niż w przypadku ogrzewania konwencjonalnego. Dodatkowo zmniejsza ilość produktów ubocznych¹³⁴. Energia jaka zostaje wprowadzona do układu (przy mocy 300 W, dającej 72 kcal/sekundę), znacząco przewyższa energię potrzebną do zainicjowania reakcji. Natomiast zastosowanie rozpuszczalnika posiadającego wysoką wartość stałej dielektrycznej (ϵ), zapewnia dobrą absorpcję promieniowania oraz szybkie osiągnięcie pożądanej temperatury. W związku z powyższym, zdecydowałam się na zastosowanie DMF ($\epsilon = 37$), co w porównaniu z wcześniej stosowanym ksylenem ($\epsilon = 2,27$), powinno pozwolić szybsze osiągnięcie zadanych parametrów temperaturowych¹³⁵. Reakcja przeprowadzana była w reaktorze mikrofalowym w układzie otwartym, a moc początkowa wynosiła 300 W. Po 120 minutach zauważyłam ślady powstającego produktu i kontynuowałam przebieg reakcji w tych samych warunkach przez kolejne 6 godzin. Jednakże, na podstawie analizy TLC okazało się, że wydajność reakcji sprzęgania dla warunków opisanych w testach **1-3 (Tabela 3)** nie przekraczała 20%. Dlatego w kolejnej reakcji pilotażowej (**Tabela 3, Lp. 4**) zwiększyłam ilość katalizatora oraz zmieniłam rozpuszczalnik, dodając wodę w odpowiednim stosunku do DMF. Woda, z założenia, ma przyczynić się do zwiększenia rozpuszczalności zasady nieorganicznej oraz przyspieszyć proces katalityczny, tak aby zapobiec ewentualnym przegrupowaniom labilnych ligandów. Niestety, zmiany te nie przyczyniły się do poprawy wydajności.

Kolejną istotną optymalizacją były próby wyeliminowania ligandu fosfinowego. Działania te zbliżają metodologię reakcji w kierunku przeprowadzenia jej według zasad zielonej chemii (**Tabela 3., Lp. 5-8**). W przypadku eliminacji ligandu „fosfinowego” czynnikiem zmieniającym stopień utlenienia palladu z 2+ na 0 może być bromek tetrabutylamonowy. Według przebadanych mechanizmów⁷³ reakcji Hecka, w obecności czwartorzędowych soli amoniowych i w zakresie temperatur rzędu 100-130°C, następuje rozerwanie wiązania Pd-X i w efekcie uzyskujemy nanocząsteczki Pd(0) stabilizowane przez $R_4N^+X^-$ (**Rysunek 34**).



Rysunek 34. Zmiana stopnia utlenienia Pd (II) na Pd (0) oraz stabilizacja powstałych nanoncząstek Pd (0) poprzez jony czwartorzędowych soli amoniowych⁷³.

Dzięki zastosowaniu tej drogi syntetycznej wydajność reakcji zwiększyła się do 40%. Zachęciło mnie to do wprowadzenia kolejnych zmian, mianowicie postanowiłam zastąpić węglan potasu octanem sodu. Zdecydowałam się na ten krok z dwóch powodów: i) większą rozpuszczalność soli sodowej w DMF w przeciwieństwie do węglanu potasu ii) podobnie jak w przypadku czwartorzędowych soli amoniowych następuje stabilizacja aktywnych katalitycznie cząstek Pd(0) przez jony Na^+ X^- (**Rysunek 35**). Reakcję przeprowadziłam analogicznie do wcześniejszych przykładów (**Tabela 3**), tym razem stosując wyłącznie wspomaganie mikrofalowe i temperaturę 120°C.



Rysunek 35. Stabilizacja powstałych klastrów palladu za pomocą octanu sodu, co prowadzi do uzyskania aktywnej katalitycznie formy Pd (0) lub też, z dużym prawdopodobieństwem, do wytrącenia się nieaktywnych katalitycznie cząstek palladu, obserwowalnych w postaci czarnego osadu (*Pd black*)⁷³.

W każdej z reakcji testowych (**1 - 8; Tabela 3**) wydajność produktu końcowego była niska, według mnie, głównie z powodu zastosowania chlorku palladu. Dodatkowo zaobserwowałam, że dla niektórych reakcji (**Tabela 3, Lp. 4-8**) reakcji pojawienie się czarnego pyłku powstającego po około 5-15 minutach od dodania reagentów. Sugeruje to, iż najprawdopodobniej, część lub nawet całość PdCl_2 ulega redukcji do nieaktywnego katalitycznie palladu powstającego w wyniku agregacji $\text{Pd(PPh}_3\text{)}(\text{OAc})_2$.

1.1.3. Otrzymywanie (*E*)-2-bromo-6-(2-pirydyn-2-yl-winylo)pirydyny z zastosowaniem octanu palladu (II) - wspomaganie mikrofalowe

Mając na celu optymalizację reakcji i otrzymanie produktu **3** z jak największą wydajnością oraz niezadowolające rezultaty poprzednich testów, związane z wytrącającym się błyskawicznie nieaktywnym katalitycznie agregatem palladowym, zdecydowałam się na zmianę stosowanej soli Palladowej. Według literatury⁷⁶ octan palladu, jest stosowany równie często jak chlorek, a dodatkowo uważa się go za znacznie bardziej efektywny w katalizie metaloorganicznej. Ponadto, czwartorzędowe sole amoniowe lub/i NaOAc lepiej stabilizują aktywny Pd (0) w przypadku, gdy prekursorem układu katalitycznego jest octan palladu (**Rysunek 35**). W poniższej tabeli przedstawiłam określone modyfikacje dla każdej z reakcji testowych:

Tabela 4. Optymalizacja reakcji Hecka z zastosowaniem octanu palladu (II).

Lp.	2,6-dibromopirydy-na [mmol]	2-winylopirydyna [mmol]	Pd(AcO) ₂ [mol%]	K ₂ CO ₃ [mmol]	NaOAc [mmol]	TBAB [mmol]	DMF/H ₂ O [v/v]	PPh ₃ [mmol]	Temp. [°C]	W [%]
9	1	1.25	2	-	1.5	1	0.5	-	120	38
10	1	1.25	2	-	1.5	1	-	-	120	-
11	1	1.25	2	-	1.5	1	1	-	120	40
12	1	1.25	A)5 B)10	-	1.5	1	1	-	120	A)38 B) 40
13	1	1.25	2	-	1.5	1	1	6	120	40

Reakcje od **9-13 (Tabela 4)** przeprowadziłam w warunkach (temperatura, wspomaganie mikrofalowe) takich jak we wcześniejszych przykładach (**1-8, Tabela 3**), analizując reakcje przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej. W przykładzie **9 (Tabela 4)** po zmianie soli palladowej z chlorku na octan i pozostawieniu octanu sodu w roli zasady, okazało się, że oczekiwany produkt reakcji powstaje z większą wydajnością wynoszącą około 38 %. Potwierdziło to hipotezę, że być może tworzenie się nieaktywnych cząstek palladu wpływa na niskie wydajności produktu (reakcje gdzie stosowaną solą był PdCl₂). Reakcję powtórzyłam (**Lp. 11, tabela nr 4**) tym razem zwiększając ilość DMF do 1 mililitra. W następnym kroku zdecydowałam się na zwiększenie ilości katalizatora początkowo z 2 % mol do 5 % mol, a następnie do 10 % mol (**Lp. 12 A i B, tabela 4**). Nie spowodowało to znaczących zmian, a wydajność nadal wahała się w granicach 40%. Wprowadzenie ligandu trifenylofosfinowego w ilości 3-krotnie większej niż octanu palladu przyczyniło się

to do powstania bardziej efektywnego układu katalitycznego niż z zastosowaniem wyłącznie TBAB, jednakże ponownie otrzymałam produkt główny z podobną wydajnością (40%). Przeprowadzane reakcje pilotażowe, potwierdzają, że reakcje sprzęgania Hecka pomiędzy 2-winylopirydynami a halogenkami heterocyklicznymi pozostaje nadal wyzwaniem¹³⁶.

1.1.4. Otrzymywanie (*E*)-2-bromo-6-(2-pirydyn-2-yl-winylo)pirydyny z zastosowaniem węglańu cezu

Kolejnym krokiem optymalizacyjnym, była zmiana zasady na węglan cezu (Tabela 5). Węglany metali alkalicznych znajdują zastosowanie w syntezie organicznej jako słabe zasady i w połączeniu z dużymi kationami, takimi jak Rb⁺ czy Cs⁺ przyczyniają się często do wzrostu wydajności reakcji. Węglan cezu jest jednym z najczęściej stosowanych, również w reakcjach sprzęgania C-C czy C-N¹³⁷. Zmiana zasady z węglanu potasu na węglan cezu, w połączeniu z PPh₃ (Lp. 15, 16, Tabela 5) i wspomaganie mikrofalowym spowodowała wzrost wydajności końcowej z 40% do 60%, tym samym zmniejszając powstawanie produktu ubocznego.

Tabela 5. Optymalizacja reakcji Hecka z zastosowaniem węglańu cezu (II).

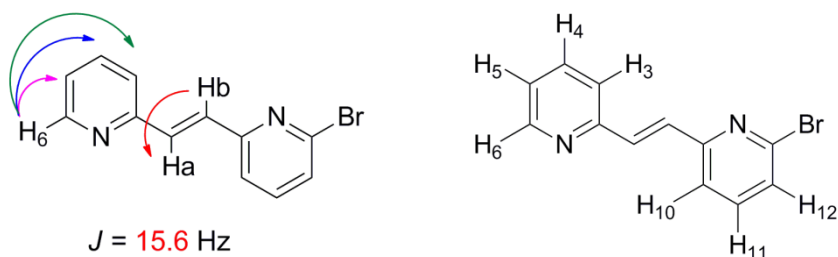
Lp.	2,6-dibromopirydyna [mmol]	2-winylopirydyna [mmol]	PdOAc ₂ [mol%]	Cs ₂ CO ₃ [mmol]	TBAB [mmol]	DMF/H ₂ O [mL]	PPh ₃ [mol%]	T [°C]	W [%]
14	1	1.25	2	1.5	1	0.5	-	120	33
15	1	1.25	2	1.5	1	1	6	120	50-60
16	1	1.25	2	1.5	0.1	1	6	120	60

1.2. Wydajna metoda otrzymywania (*E*)-2-bromo-6-[2-(pirydyn-2-yl)-winylo]pirydyny (**3**) oraz analiza produktu ubocznego

Na podstawie wyżej opisanych działań optymalizacyjnych odnoszących się do reakcji typu Hecka w układach heterocyklicznych, w wyniku której otrzymałam (*E*)-2-bromo-6-[2-(pirydyn-2-yl)-winylo]pirydynę (**3**), najlepsze rezultaty osiągnęłam w podejściach 15 i 16 (Tabela 5). Jak się okazało, kluczowe było zastosowanie węglańu cezu (II) oraz PPh₃ w połączeniu z octanem palladu (II). Reakcje prowadziłam w atmosferze argonu w reaktorze mikrofalowym (120°C, 300 W) przez 3 godziny, kontrolując je przy użyciu TLC. Po oczyszczeniu, czysty produkt **3** poddawałam liofilizacji z bezwodnego benzenu

otrzymując biały proszek. Gdy produkt przybierał barwę lekko różową, świadczyło to o pozostałościach palladu, który nie został usunięty podczas procesu oczyszczania na żelu krzemionkowym. W takich przypadkach podejmowałam działania polegające na przesączeniu rozpuszczonego w tetrahydrofuranie produktu **3** przez warstwę celitu lub poddawałam mieszaninę z węglem aktywnym. Operacje te pozwoliły na uzyskanie poziomu czystości związku **3** niewymagającego wykonywania wielokrotnego podczyszczania na kolumnach chromatograficznych. Związek **3** scharakteryzowałam przy użyciu metod spektroskopowych (NMR oraz MS). Na podstawie widm ^1H NMR potwierdziłam powstanie głównego produktu **3** o konformacji *trans*. Warto w tym miejscu zaznaczyć, iż reakcja sprzężenia Hecka jest stereoselektywna w kierunku tworzenia korzystnego energetycznie izomeru *trans*. Jest to efekt oddalania się halogenku palladu (Pd-Br) i grupy do której przyłączony był halogen, które odsuwają się od siebie w wyniku rotacji wokół wiązania pojedynczego. Potwierdzeniem stereoselektywności reakcji była wielkość stałej sprzężenia pomiędzy wicynalnymi protonami Ha i Hb ($^3J_{trans} = 15 \text{ Hz}$) – w przypadku izomeru *cis*, stała sprzężenia wynosiłaby około 8-9 Hz (**Rysunek 36**).

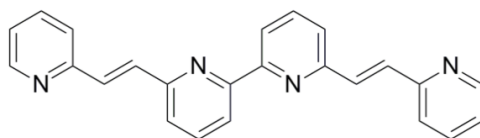
d, 8.64 (ddd, $J = 4.8, 1.9, 0.9 \text{ Hz}$, 1H, H6)



Rysunek 36. Stałe sprzężenia pomiędzy poszczególnymi protonami dla związku **3**.

W czasie trwania reakcji sprzężenia na TLC obserwowałam powstawanie dodatkowego produktu, charakteryzującego się większą polarnością i odmiennym maksimum absorpcji światła UV w przeciwieństwie do produktu głównego – co świadczyło o powstaniu zwiększonej liczby sprzężonych wiązań podwójnych. Ponieważ taki produkt uboczny powstawał zawsze podczas prowadzenia reakcji, zmniejszając tym samym wydajność powstawania produktu głównego, postanowiłam go zidentyfikować przy użyciu technik NMR oraz HRMS-ESI. Na podstawie analizy widma masowego oraz protonowego (^1H i ^{13}C NMR) wysnułam wniosek, iż produktem ubocznym jest

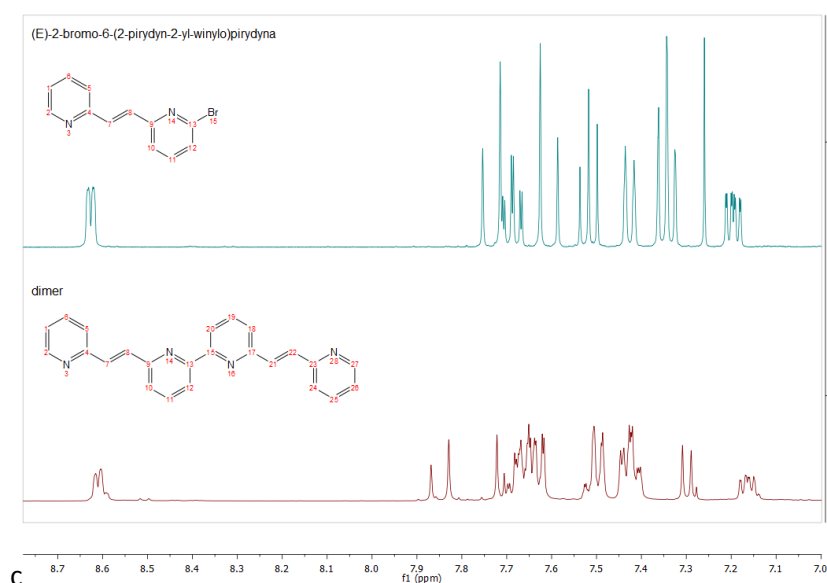
prawdopodobnie dimer, którego potencjalną strukturę zaproponowałam na **Rysunku 37**. Masa teoretyczna dimeru wynosi 362,1531 g/mol, natomiast zaobserwowana w jonizacji dodatniej na detektorze masowym (ESI) to 363,160 m/z, odpowiadająca masie jonu molekularnego.



6

Rysunek 37. Zaproponowana struktura dimeru powstającego w reakcji sprzęgania 2,6-dibromopirydyny oraz 2-winylopirydyny.

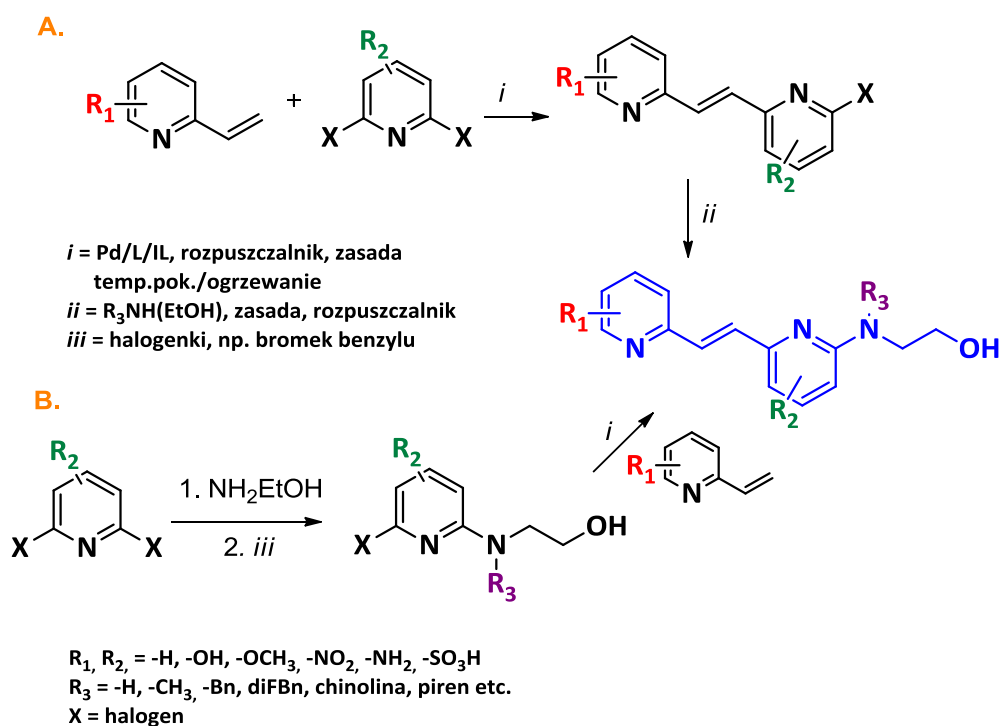
Przesunięcia chemiczne protonów produktu głównego i ubocznego występują w tym samym zakresie, w obszarze związków aromatycznych (od 8.5 ppm do 7 ppm). Proton H6, nie uległ widocznemu przesunięciu, natomiast największe zmiany obserwowałam dla protonów z ugrupowania winylowego. Protony Ha i Hb uległy przesunięciu w dół pola, podobnie jak protony z pierścieni heterocyklicznych (**Rysunek 38**). Przyczyną powstawania tego produktu ubocznego, oprócz obecności drugiego reaktywnego miejsca podstawienia, jest prawdopodobnie wysoka temperatura i ogrzewanie mikrofalowe. W zastosowanych warunkach reakcji wyeliminowanie powstawania produktu ubocznego było niemożliwe.



Rysunek 38. Porównanie widm ^1H NMR produktu głównego i ubocznego.

1.3. Otrzymywanie aminoalkoholowych pochodnych (*E*)-2-bromo-6-[2-(pirydyn-2-yl)-winylo]pirydyny

W celu otrzymania związków fluorescencyjnych w postaci alkoholi (stanowią one prekursorzy termowrażliwych znaczników), możliwe było podjęcie dwóch szlaków syntetycznych. Droga **A** opiera się na reakcji sprzęgania pomiędzy 2,6-dihalogenową pochodną pirydyny, a 2-winylopirydyną, a następnie na przyłączeniu *N*-podstawionych aminoalkoholi. Alternatywna droga **B** rozpoczyna się od arylicacji egzocyklicznego atomu azotu otrzymanego 2-(6-bromo-pirydyn-2-ylamino)-etanolu (**21**), a następnie reakcji sprzęgania Hecka w celu uzyskania finalnego produktu (**Schemat 31**).



Schemat 31. Drogi syntetyczne prowadzące do otrzymywania fluoroforów.

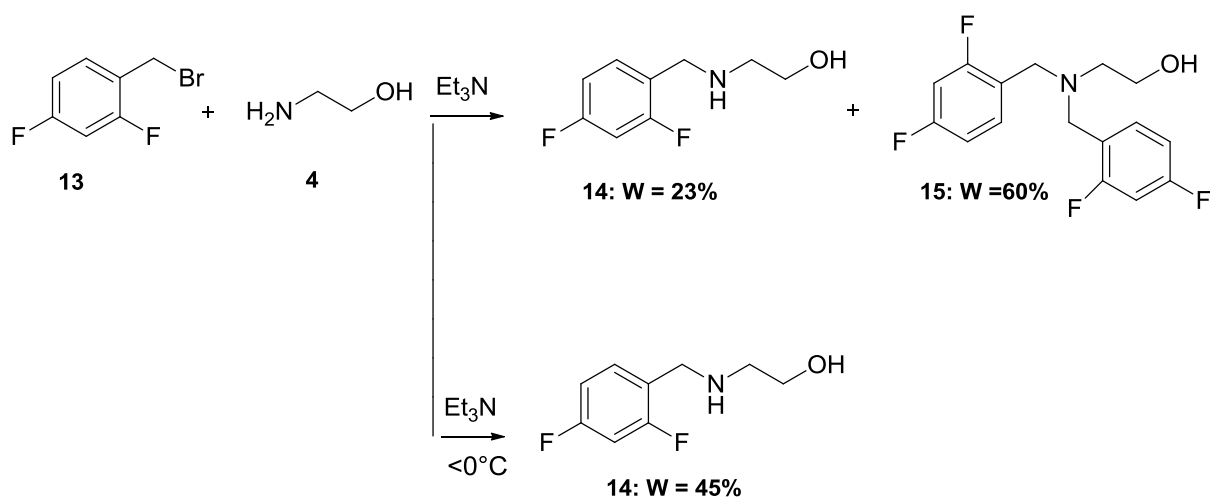
Według zaplanowanej drogi syntetycznej **A**, po optymalizacji parametrów reakcji otrzymywania (*E*)-2-bromo-6-[2-(pirydyn-2-yl)-winylo]pirydyny (**3**) stanowiącej rdzeń strukturalny potencjalnych znaczników fluorescencyjnych, do związku **3** postanowiłam przyłączać aminoalkohole różniące się podstawnikami w pozycji 2-*N*-pirydylowej (**Schemat 32**). Zgodnie z założeniami, zmiany podstawników na egzocyklicznym atomie azotu miały pozwolić na modulację właściwości fotochemicznych oraz termolabilnych znaczników na nich opartych, co opisuję w dalszych rozdziałach.

i *N*-metyloetanolaminy. Uzyskane aminoalkohole scharakteryzowałam przy użyciu spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego oraz spektroskopii mas. Na widmie ¹H NMR każdego z produktów, oprócz charakterystycznych sygnałów pochodzących od związku **3**, pojawiły się sygnały pochodzące od protonów części etylenowej (-CH₂-CH₂-), scharakteryzowane jako dwa tryplety o przesunięciach chemicznych 3.74 ppm oraz 3.47 ppm. Na widmie zaobserwowałam również singlet występujący przy wartości 5.55 ppm odpowiadający przesunięciu chemicznemu grupy -OH oraz tryplet przy 5.32 ppm, pochodzący od grupy -NH w przypadku związku nr **8**. Sygnały pochodzące od protonów H10 i H12 (**rysunek 37**) uległy przesunięciu w górę pola: 6.58 (d, *J* = 7.2 Hz, H10) oraz 6.23 (*J* = 8.3 Hz, H12).

Dla związku **10** otrzymałam kryształ, który został poddany badaniom krystalograficznym (szczegóły w części eksperymentalnej). Ułożenie przestrzenne atomów i kąty płaskie pomiędzy atomami, potwierdziły izomerię geometryczną *trans* uzyskanego produktu **10**.

1.3.1. Otrzymywanie (*E*)-2-(2,4-difluorobenzyl{6-[2-(pyridin-2-yl)winylo]pyridin-2-yl}amino)etan-1-olu (**16**)

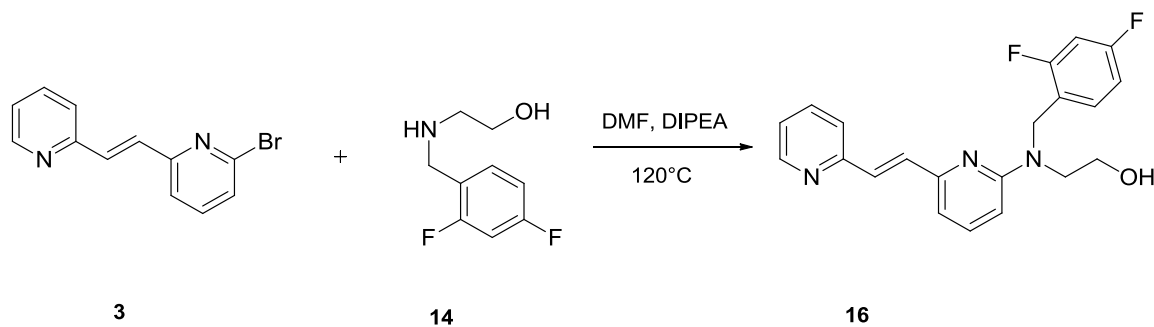
Synteza związku **16** była dwuetapowa, ze względu na brak dostępności *N*-2,4-difluorobenzyl(etanol)aminy i pierwszym krokiem było otrzymanie aminoalkoholu drugorzędowego z podstawnikiem 2,4-difluorobenzylowym w pozycji 2-*N*-pirydylowej (**Schemat 34**). W tym celu mieszałam etanolaminę, bromek 2,4-difluorobenzylu oraz *N,N*-diizopropyl(etanol)aminę w temperaturze pokojowej, kontrolując przebieg reakcji za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Po około godzinie zaobserwowałam całkowity zanik substratu, a na płycie TLC widoczne były dwa produkty znacznie różniące się od siebie polarnością. Okazało się, iż jednym z produktów reakcji była podwójnie podstawiona etanolamina (**Schemat 41**, związek **15**), powstająca z wydajnością 60%. Z kolei oczekiwany produkt **14** otrzymałam z wydajnością 23 %.



Schemat 34. Drogi syntetyczne otrzymywania pochodnej **16**.

Powstawanie produktu ubocznego jest wynikiem dużej reaktywności aminy pierwszorzędowej, stąd też reakcja nie zatrzymuje się wyłącznie na pochodnej monopodstawionej, co również wskazuje na termodynamiczną stabilność produktu **15**. W celu przesunięcia kinetyki reakcji w kierunku tworzenia produktu **14**, zdecydowałam się na obniżenie temperatury. Reakcję prowadziłam w temperaturze 0°C przez trzy godziny i po przereagowaniu substratu wykonałam ekstrakcję w układzie eter dietylowy/ NaHCO_3 w celu pozbycia się nadmiaru etanoloaminy dobrze rozpuszczalnej w warstwie wodnej. Po odparowaniu warstwy organicznej produkt rozpuściłam na gorąco w heksanie i wytrącałam schładzając roztwór w łaźni lodowej. Wydajność końcowa tym razem wzrosła do 45%.

Kolejnym krokiem było przyłączenie produktu **14** do związku **3**. W tym celu oba związki rozpuściłam w DMF dodałam *N,N*-diizopropyletanoaminy, a mieszaninę reakcyjną umieściłam w reaktorze mikrofalowym stosując temperaturę 120°C i moc 300W (**Schemat 35**).



Schemat 35. Schemat syntezy związku **16**.

Ponieważ prowadzenie ogrzewania przez 16 godzin, nie spowodowało znacznego przyrostu produktu, zdecydowałam się na przeprowadzenie reakcji sprzężenia Buchwalda¹³⁸ C-N, stosując warunki reakcji zbliżone do zoptymalizowanych wcześniej dla reakcji Hecka (**Tabela 6**).

Tabela 6. Warunki reakcji testowych otrzymania związku **16** na drodze sprzężenia Buchwalda.

Alkohol	zasada	rozpuszczalnik	Pd(OAc) ₂	IL/L	MW	W [%]
14	DIPEA	DMF	-	-	120-140°C	-
	Cs ₂ CO ₃	DMF	2 mol%	TBAB/PPh ₃	100°C	5d: 13
	Cs ₂ CO ₃	Toluen	2 mol%	TBAB/PPh ₃	100°C	-
	DBU	DCE	2 mol%	TBAB/PPh ₃	130°C	-
	DBU	DMF	2 mol%	TBAB/PPh ₃	130°C	-

W reakcji sprzężenia zastosowałam octan palladu w połączeniu z trifenylofosfiną i dodatkiem TBAB, zmieniając zasadę z DIPEA na węglan cezu albo DBU, kierując się ich różnicami w wartościach pKa. Używany w reakcji Hecka DMF, zastąpiłam w dwóch próbach toluenem oraz DCE, żeby sprawdzić wpływ polarności na jej przebieg. Zastosowanie reakcji sprzężenia C-N, miało przyczynić się do powstania oczekiwanego produktu z większą wydajnością i efektywnością niż reakcja substytucji nukleofilowej bez zastosowania katalizatora. W żadnej z powyższych reakcji, nie udało mi się jednak otrzymać oczekiwanego produktu **16**.

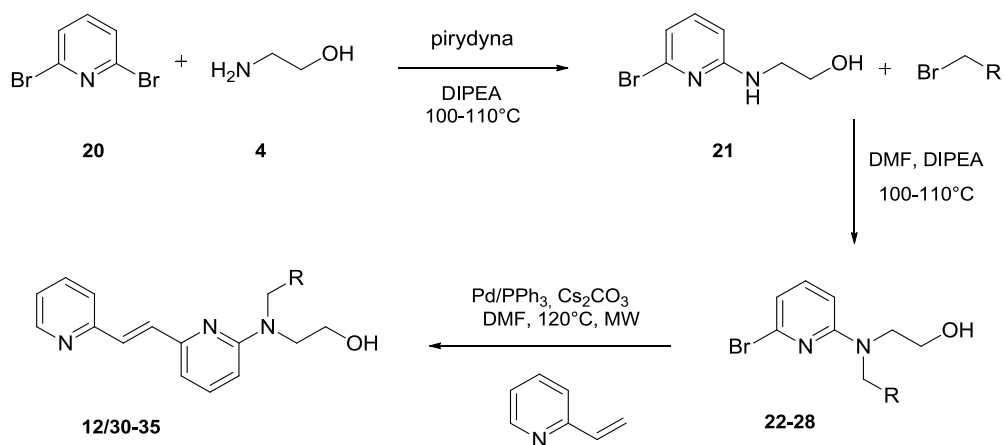
(Tabela 7). W tym celu, łącznie, wykonałam pięć reakcji testowych odpowiednio zmieniając zasadę, rozpuszczalnik oraz wysokość temperatury. W żadnej z przeprowadzonej reakcji nie zaobserwowałam powstawania pożądanego produktu **19**.

Tabela 7. Warunki reakcji testowych otrzymywania związku **19** na drodze sprzęgania Buchwalda.

Alkohol	Zasada	rozpuszczalnik	Pd(OAc) ₂	IL/L	MW	W[%]
18	DIPEA	DMF	-	-	120-140°C	-
	Cs ₂ CO ₃	DMF	2 mol%	TBAB/PPh ₃	100°C	-
	Cs ₂ CO ₃	Toluen	2 mol%	TBAB/PPh ₃	100°C	-
	DBU	DCE	2 mol%	TBAB/PPh ₃	130°C	-
	DBU	DMF	2 mol%	TBAB/PPh ₃	130°C	-

1.4. Odwrotna droga syntezy

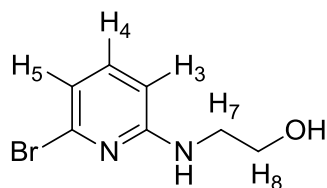
Próby przyłączania drugorzędowych aminoalkoholi do wcześniej zsyntetyzowanego produktu **3**, pokazały jednoznacznie, że im większa zawada steryczna i zmiana charakteru elektronowego podstawnika na egzocyklicznym atomie azotu, tym trudniej jest otrzymać pożądaną produkt. W związku z czym zdecydowałam się na odwrócenie drogi syntetycznej **A** i zaproponowałam ścieżkę **B** (Schemat 38), składającą się z trzech etapów: **i**) przyłączenia etanoloaminy do pierścienia pirydynowego **ii**) arylowania pozycji 2-*N*-pirydynylowej **iii**) reakcji sprzęgania z odpowiednią pochodną alkenową. Pozwoliło mi to na otrzymanie szeregu fluoroforów, różniących się podstawnikiem w pozycji *N*-pirydylowej.



Schemat 38. Schemat drogi syntetycznej **B** prowadzącej do otrzymywania fluorescencyjnych aminoalkoholi.

1.4.1. Otrzymywanie 2-(6-bromo-pirydyn-2-ylamino)-etanolu (**21**) - ścieżka B

Pierwszy etap syntezy opierał się na reakcji substytucji nukleofilowej etanoloaminy do 2,6-dibromopirydyny. Reakcję prowadziłam w pirydynie z dodatkiem *N,N*-diizopropyletanoloaminy, gdyż zauważalnie zwiększała ona wydajność i szybkość reakcji. Związek **21** otrzymałam w postaci bezbarwnego oleju, z wydajnością 73% i scharakteryzowałam go za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego oraz wysokorozdzielczej spektrometrii mas (HRMS-ESI). Przesunięcia chemiczne protonów H₅, H₄ i H₃ (**Rysunek 39**) wynoszą odpowiednio: 6.68 ppm (dd, *J* = 7.5, 0.6 Hz, H₅), 7.19 ppm (dd, *J* = 8.2, 7.5 Hz, H₄), 6.32 ppm (dd, *J* = 8.3, 0.6 Hz, H₃) i każdy z nich sprzęga się z dwoma sąsiadującymi protonami, w efekcie czego ulegają one rozszczepieniu na dublety-dubletów. Sygnał pochodzący od grupy –NH widnieje przy 5.24 ppm (t, *J* = 5.7 Hz), natomiast od grupy hydroksylowej przy 3.98 ppm jako singlet. Przesunięcia chemiczne protonów H₈ i H₇ są dość zbliżone: 3.78 ppm (t, *J* = 4.9 Hz, 2H, H₈), 3.41 ppm (td, *J* = 5.6, 4.4 Hz, 2H, H₇).

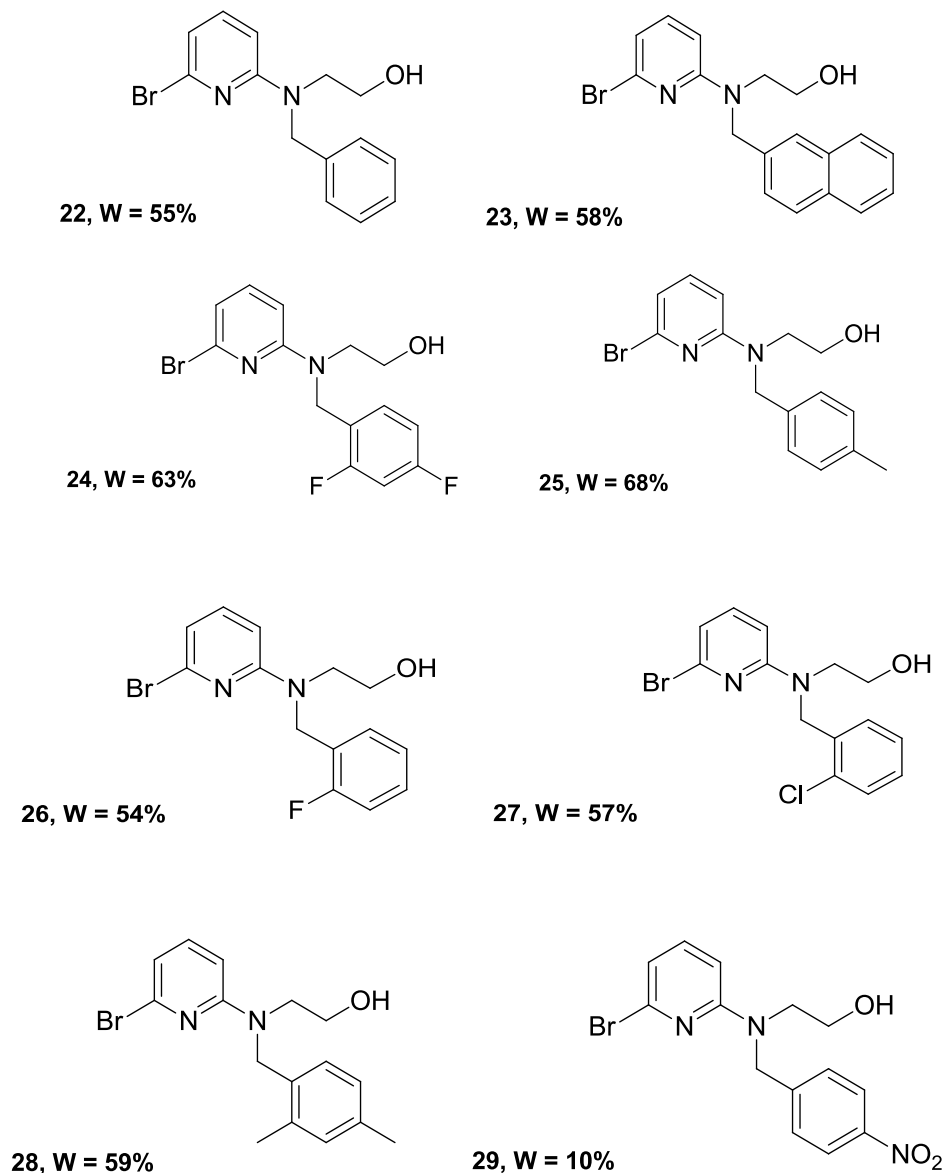


Rysunek 39. Oznaczenia atomów wodoru w związku **21**.

1.4.2. Arylacja 2-pirydylowego atomu azotu

W celu otrzymania związków różniących się podstawnikiem w pozycji 2-*N*-pirydylowej, uprzednio otrzymaną pochodną **21** poddałam arylacji z odpowiednimi bromkami benzyłowymi. W tym celu związek **21** rozpuściłam w DMF wraz z diizopropyletanoaminą, po czym ostrożnie wkraplałam bromek benzylu (**Rysunek 40**). Całość ogrzewałam w łaźni olejowej pod chłodnicą zwrotną do maksymalnie około 120°C, zwracając uwagę aby pochodne bromkowe nie ulotniły się z układu. W zależności od rodzaju substratu, reakcja trwała od kilku do kilkunastu godzin. W żadnym przypadku nie udało mi się przeprowadzić reakcji tak, by substrat **21** przereagował w 100%, co zaniżało nieco wydajności powstających produktów (**22-29**). Dla Związków (z wyjątkiem **29**), które powstawały

w bardzo małej ilości (**Rysunek 40**), nie prowadziłam dalszych reakcji, a jedynie charakteryzowałam za pomocą spektroskopii NMR oraz wysokorozdzielczej spektrometrii mas.



Rysunek 40. Otrzymane 2-*N*-podstawione aminoalkohole (droga syntetyczna **B**).

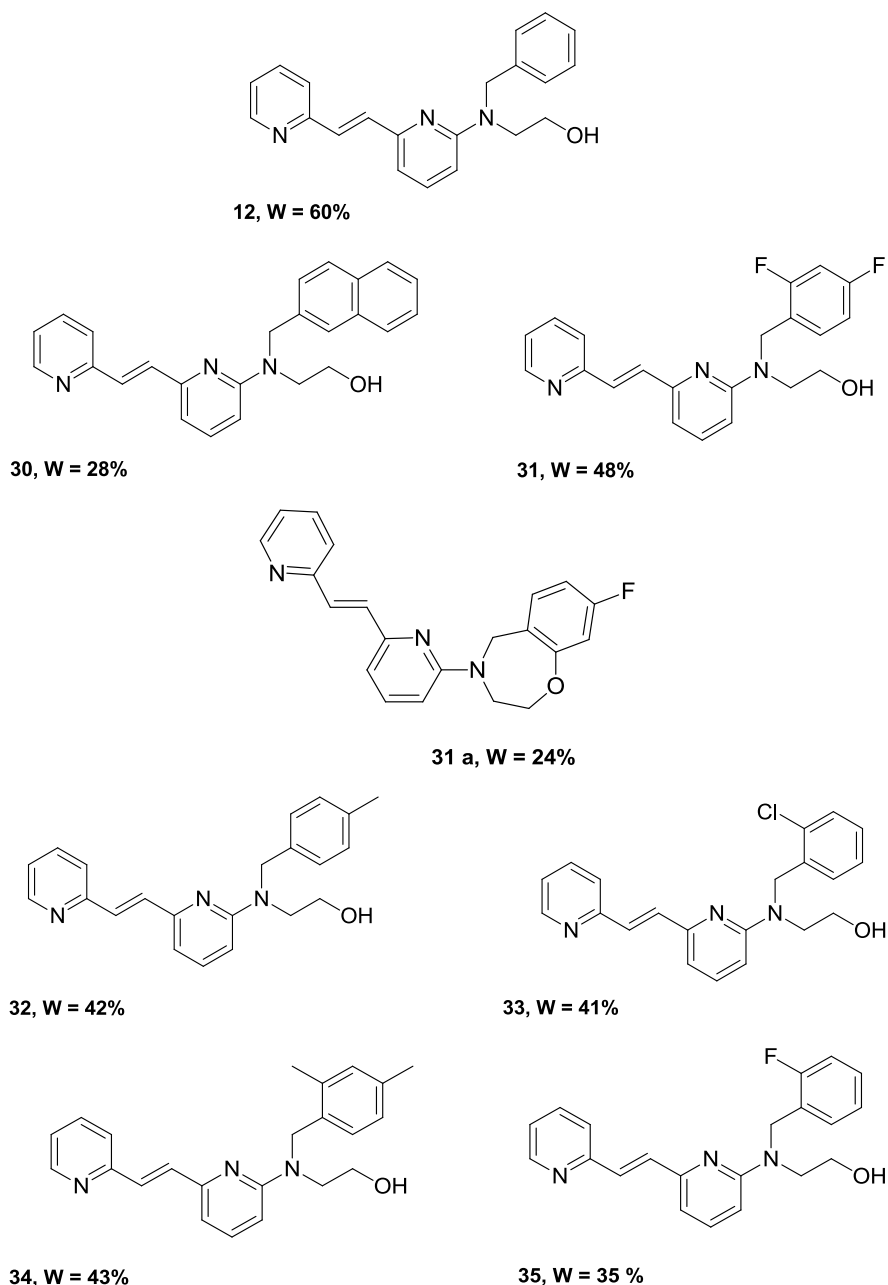
W wyniku powyższych syntez otrzymałam 7 prekursorów związków fluorescencyjnych. Na wydajność reakcji arylicacji wpływał nie tylko stopień przereagowania substratu **21**, lecz również charakter elektronowy grupy pierścienia fenyłowego oraz jego położenie, przy czym największy wpływ zaobserwowałam w przypadku podstawników w pozycji

4 pierścienia aromatycznego grupy benzylovej. Szybkość reakcji, jak i wydajność, zauważalnie wzrastała w przypadku grup donujących elektrony, jak grupa metylowa, i finalna wydajność była również nieco wyższa w porównaniu do pozostałych – 68% dla pochodnej **25** i 55% dla pochodnej **22** (**Rysunek 40**). W przypadku bromku 4-nitrobenzylovego, umiejscowienie grupy nitrowej w pozycji 4 (*para*) pierścienia aromatycznego, znacznie obniżyło jego reaktywność. Grupa nitrowa jak i halogenki posiadają efekt indukcyjny ujemny, wpływają na zmniejszenie gęstości w całej chmurze elektronowej pierścienia aromatycznego w wyniku mezomerii. Grupa metylowa nie wywołuje efektu mezomerycznego lecz wyłącznie efekt indukcyjny dodatni, i poprzez swoją elektronodonorowość zwiększa gęstość elektronową w cząsteczce, tym samym, w przypadku reakcji substytucji, zwiększają reaktywność bromku benzylovego.

W reakcji podstawienia 2-bromochinolinyl oraz bromku 2,3,4,5,6-pentafluorobenzylowego do egzocyklicznego atomu azotu alkoholu **21**, nie otrzymałam pożądaných produktów. W przypadku 2-bromochinolinyl dużą rolę pełni efekt steryczny utrudniający podstawienie. Natomiast perfluorowany bromek benzylovej jest na tyle zdezaktywowany, iż znacząco hamuje reakcję substytucji do atomu azotu.

1.4.3. Reakcje tworzenia wiązania Csp²-Csp²

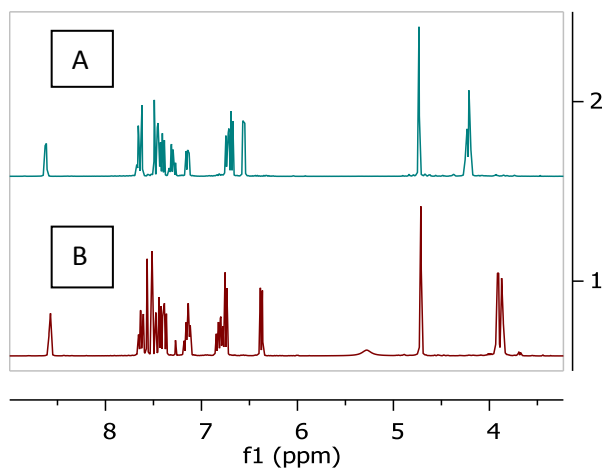
Ostatnim etapem w otrzymywaniu nowych związków fluorescencyjnych, była reakcja sprzęgania pomiędzy 2-winylopirydyną (**1**) oraz wcześniej zsyntetyzowanymi aminoalkoholami (**22-28**). Reakcję przeprowadziłam w oparciu o zoptymalizowaną reakcję Hecka dla pochodnej **3**, omówionej w rozdziale **1.1**. (**Tabela 5, Lp. 16**). Czas trwania reakcji wahał się od 2-4 godzin w zależności od szybkości zaniku substratu. Wydajność reakcji wahała się w granicach 30-50%. Otrzymane pochodne scharakteryzowałam za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego (¹H, ¹³C oraz ¹⁹F) i spektrometrii mas.



Rysunek 41. Wzory strukturalne otrzymanych, drogą B, pochodnych fluorescencyjnych.

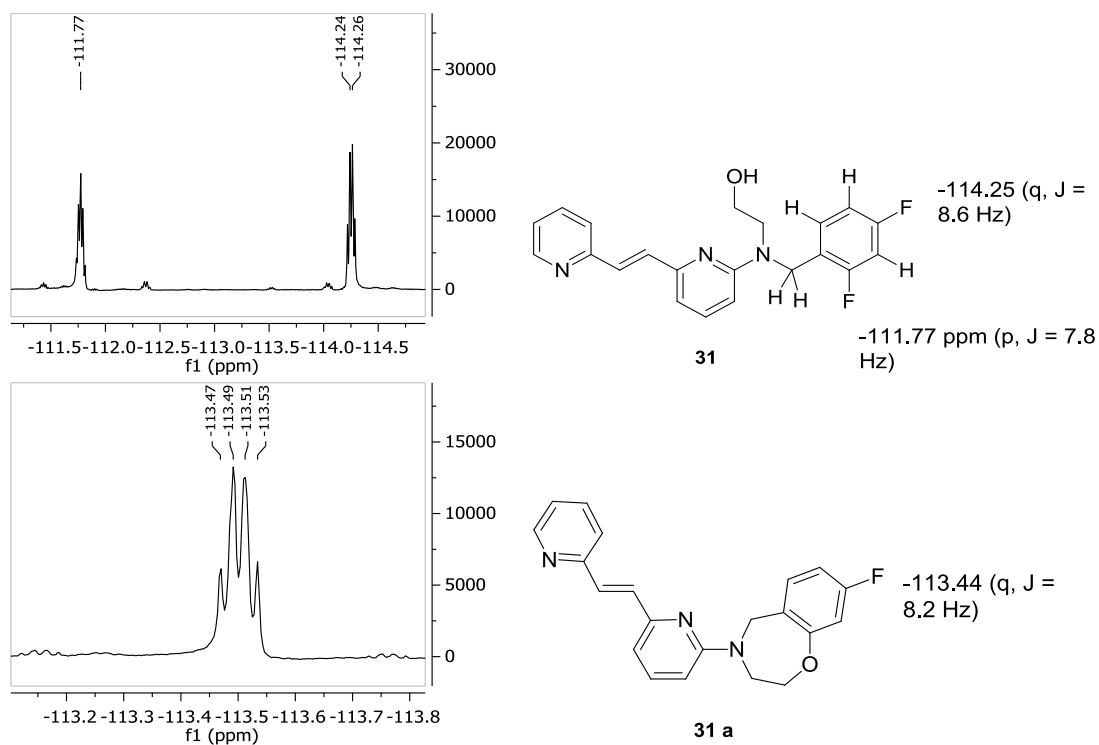
Podczas syntezy związku **31**, w czasie trwania reakcji, zauważyłam powstawanie drugiego produktu, o mniejszej polarności niż związek docelowy. Ponieważ produkt ten powstawał w stosunku ilościowym 1:2 do produktu głównego, postanowiłam wyizolować go z mieszaniny reakcyjnej oraz scharakteryzować. Okazało się, iż przesunięcia chemiczne większości protonów produktu **31** i **31a** są bardzo zbliżone, mimo, że związki te znacznie różnią się polarnością, co było widoczne na płytce TLC. Porównanie dwóch widm protonowych **31** i **31a** pokazało, iż najbardziej znaczące różnice przesunięć chemicznych

występują dla protonów mostka metylenowego, gdzie różnica pomiędzy produktem **31** i **31a** wynosi około 0,3 ppm. Widmo ^1H NMR **31a** nie zawierało sygnału pochodzący od grupy hydroksylowej przy 5,28 ppm, w związku czym musiała nastąpić reakcja wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji z udziałem grupy hydroksylowej (**Rysunek 42**). Po wykonaniu widma masowego okazało się, iż różnica pomiędzy obydwojma związkami wynosi 20,0064 g/mol, co sugeruje brak jednego atomu fluoru oraz atomu wodoru.



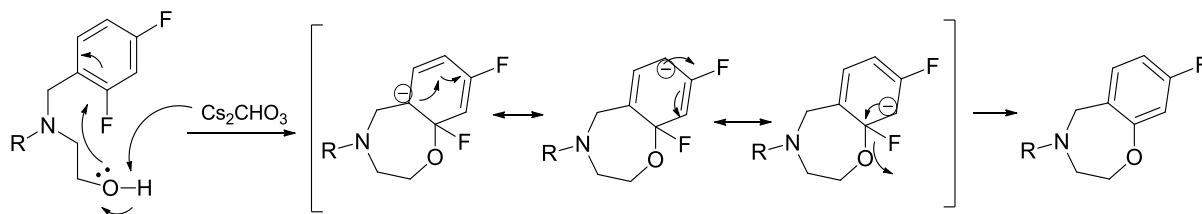
Rysunek 42. Widma ^1H NMR produktu ubocznego **31a** (A) oraz produktu głównego **31** (B).

Dla produktów **31** i **31a**, postanowiłam wykonać widmo fluorowe (^{19}F NMR) (**Rysunek 43**). Na widmie produktu **31** (B) widoczne są dwa sygnały pochodzące od dwóch różnych atomów fluoru połączonych z pierścieniem aromatycznym. Atom fluoru w pozycji *orto* ulega rozszczepieniu przez sąsiadujące atomy wodoru, obserwujemy pentet o średniej stałej sprzężenia wynoszącej 7.8 Hz a jego przesunięcie chemiczne wynosi -111.77 ppm. W przypadku atomu fluoru w pozycji *para* przesunięcie chemiczne jego sygnału wynosi -114.25 ppm i atom ten ulega rozszczepieniu na kwartet o stałej sprzężenia 8.6 Hz. Widmo ^{19}F NMR produktu **31a** upewniło mnie, iż podstawieniu uległ jeden z atomów fluoru, gdyż zaobserwowałam wyłącznie jeden sygnał w postaci kwartetu o przesunięciu chemicznym wynoszącym -113.44 ppm i stałą sprzężenia 8.2 Hz (**Rysunek 43**). W związku z powyższym, zaproponowałam strukturę powstałego związku:



Rysunek 43. Widmo ^{19}F od lewej: produktu głównego **31** i produktu ubocznego **31a**.

Zaproponowałam również mechanizm substytucji $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ atomu fluoru, w którym wolna para elektronowa atomu tlenu grupy hydroksylowej atakuje atom węgla sp^2 eliminując jeden z atomów fluoru (warunki zasadowe). W efekcie powstaje sześcioczłonowy pierścień heterocykliczny, z jednoczesnym odejściem anionu fluorkowego (**Schemat 39**).

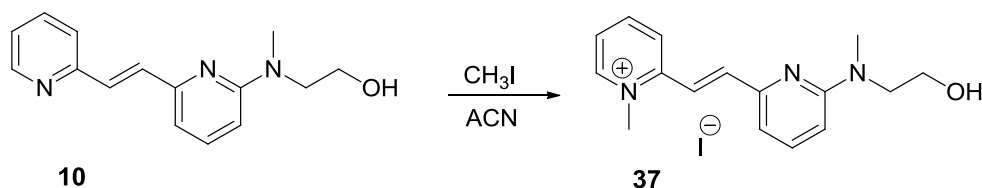


Schemat 39. Proponowany mechanizm tworzenia produktu cyklicznego podczas reakcji sprzęgania C-C.

1.5. Synteza jodku (*E*)-2-(2-(6-((2-hydroksyetylo)(metylo)amino)pirydyn-2-yl)winylo)-1 metylopirydynowego

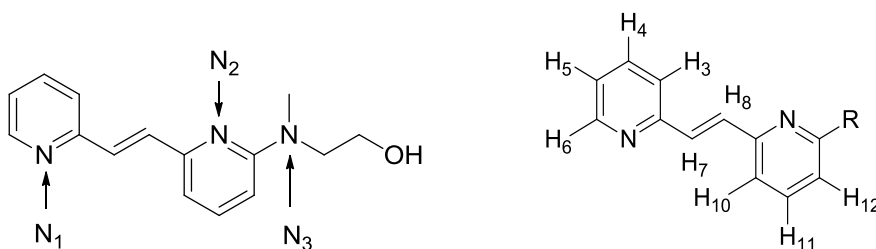
Mając na uwadze możliwość otrzymywania fluorescencyjnych solipirydynowych a co za tym idzie również określenie, który z atomów azotu w cząsteczce ulegnie podstawieniu,

uprzednio zsyntetyzowany związek **10** poddałam reakcji metylacji za pomocą jodku metylu.



Schemat 40. Schemat reakcji metylacji fluorescencyjnego aminoalkoholu (**10**).

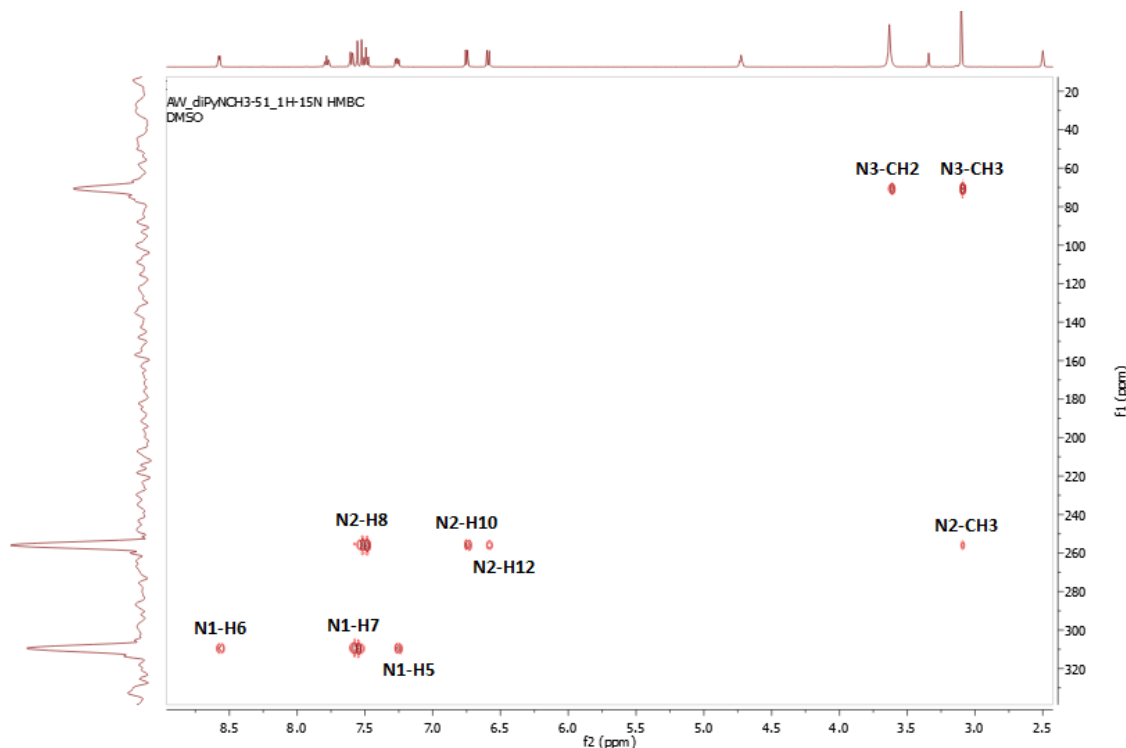
Jako rozpuszczalnik, w tej reakcji, zastosowałam bezwodny acetonitryl. Po przereagowaniu substratu, mieszanina reakcyjna z żółtej przybrała kolor czerwony, co świadczyło o powstaniu soli pirydynowej. Wydajność reakcji wynosiła 80-90% a czysty związek poddałam analizie spektroskopowej. Na widmie ^1H NMR, w porównaniu do widma związku **10**, pojawił się nowy sygnał przy przesunięciu chemicznym 4.36 ppm w postaci singletu odpowiadający protonom grupy metylowej przyłączonej do endocyklicznego atomu azotu. W celu potwierdzenia miejsca podstawienia grupy metylowej (co jest niezwykle istotne z punktu widzenia mechanizmu cyklizacji) wykonałam serię widm dwuwymiarowych ^1H - ^{15}N NMR w DMSO- d_6 dla związku **10** i **37** (**Rysunek 45 i 46**). Oznaczenia protonów i atomów azotu przedstawione są na **Rysunku 44**.



Rysunek 44. Oznaczenia atomów azotu oraz protonów związku **37**.

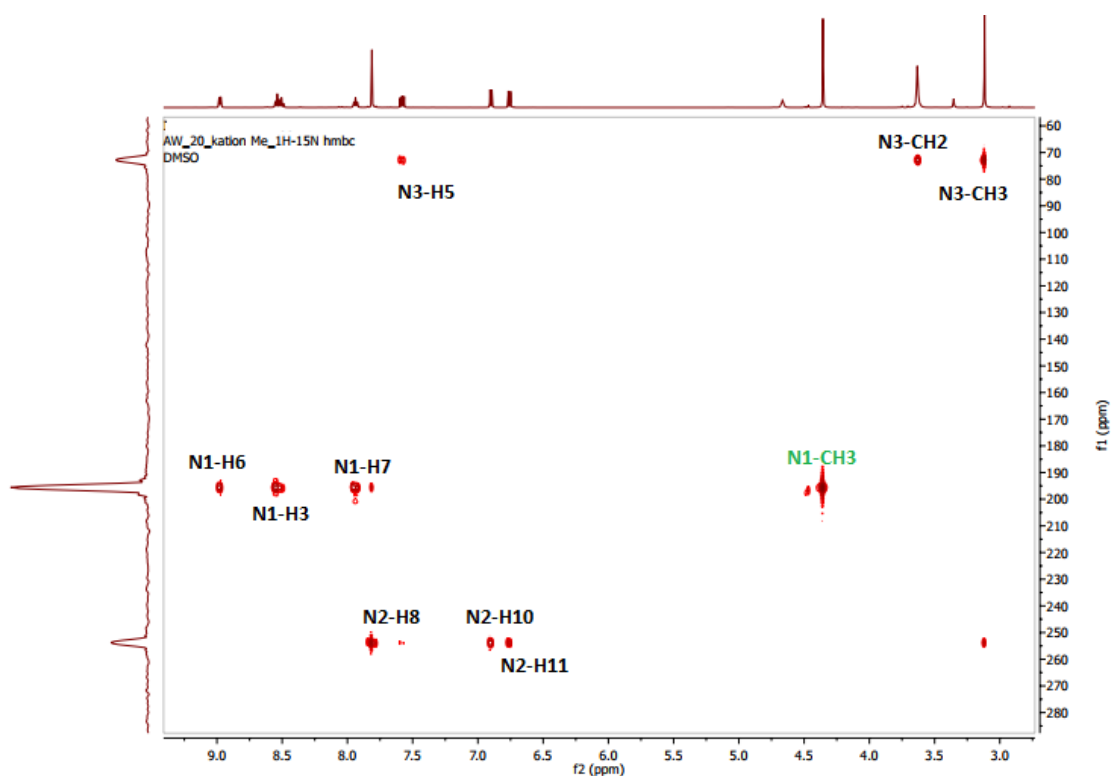
Na podstawie analizy widma dwuwymiarowego HMBC (ang. *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*) dla produktu **10**, na podstawie sygnałów korelacyjnych z protonami oddalonymi o 3, a nawet 5 wiązań przypisałam przesunięcia chemiczne dla wszystkich atomów azotu (**Rysunek 45**). Na widmie, sygnał pochodzący od atomu azotu N_1 posiada przesunięcie chemiczne wynoszące 309.53 ppm i obserwowalne są jego sygnały korelacyjne z protonami H_6 , H_7 i H_5 . Sygnał pochodzący od atomu azotu N_2

charakteryzuje się przesunięciem chemicznym wynoszącym 255.78 ppm i koreluje z protonami H8, H10 i H12. Sygnał pochodzący od atomu azotu *N3* jest mocno oddalony od pozostałych w górę pola, jego przesunięcie wynosi 71.63 ppm i koreluje z protonami metylenowymi oraz grupy –CH₃.



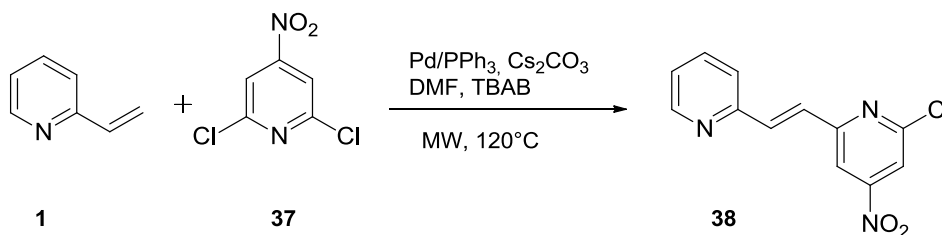
Rysunek 45. Widmo ¹H-¹⁵N HMBC związku **10**.

Na widmie ¹H-¹⁵N HMBC metylowej pochodnej **37** obserwowalne są sygnały świadczące o zmianach w przesunięciach chemicznych jednego z endocyklicznych atomów azotu (**Rysunek 46**). Sygnał atomu *N3* występuje przy zbliżonym przesunięciu chemicznym jak w przypadku pochodnej **10**, wynoszącym 72.81 ppm posiadając te same sygnały korelacyjne. Sygnał pochodzący od atomu azotu *N2* ma również zbliżone przesunięcie chemiczne wynoszące około 254 ppm. Natomiast sygnał atomu azotu *N1* ulega znacznej migracji w górę pola i jest obserwowany przy wartościach 196.46 ppm korelując z nowym sygnałem pochodzącym od grupy –CH₃ bezpośrednio do niego przyłączonej w wyniku metylacji.



Rysunek 46. Widmo ^1H - ^{15}N HMBC związku **37**.

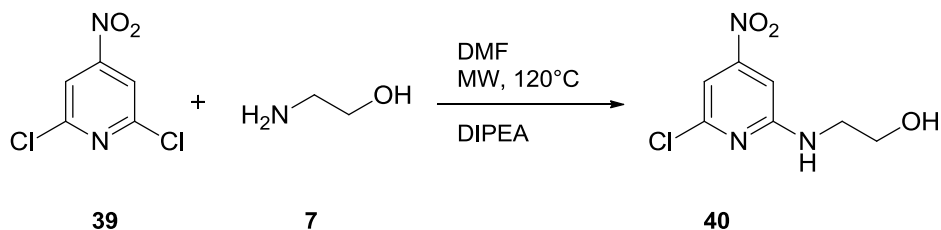
Na podstawie wykonanych analiz widm NMR mogłam jednoznacznie stwierdzić, iż alkilacja endocyklicznego atomu azotu przebiega w pozycji *N1*. Obserwacja ta jest istotna dla dalszych przekształceń oraz zastosowań nowych związków fluorescencyjnych, gdyż metylacja atomu azotu *N1* nie blokuje wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, przebiegającej z udziałem atomu azotu *N2* (**część literaturowa, rozdział 1.7.2. Schemat 9**), Otrzymany aminoalkohol **37** nie zamyka również drogi do badania potencjalnych termowrażliwych i fluorescencyjnych właściwości soli pirydyniowych, po ich przekształceniu w odpowiednie węglany czy fosforany.

1.6. Synteza (*E*)-2-bromo-4-nitro-6-(2-(pirydyn-2-yl)winylo)pirydyny

Schemat 41. Schemat reakcji otrzymywania związku 38.

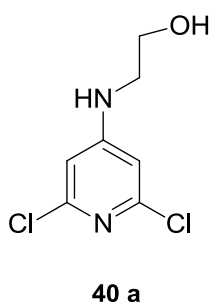
W celu poszerzenia biblioteki związków fluorescencyjnych, planowałam otrzymać związek posiadający grupę nitrową w pozycji 4 jednego z pierścieni pirydyny. Pozwoliłoby mi to modulować właściwości termolabilne przyszłych znaczników stosując redukcję grupy nitrowej do aminowej⁵⁷. Reakcję sprzęgania chciałam przeprowadzić zgodnie z warunkami reakcji otrzymywania związku **3** (Tabela 5, Lp. 16). Octan palladu (II) oraz trifenylofosfinę rozpuściłam w bezwodnym DMF, a po 15 minutach gdy powstała żółta zawiesina dodałam 2,6-dichloro-4-nitropyridynę, TBAB, węglan cezu oraz 2-winylopirydynę. Reakcję prowadziłam przez 9 godzin po tym czasie nie zaobserwowałam śladów powstawania produktu. Zmiany parametrów reakcji, w tym podwyższenie temperatur (do 150°C) zwiększenie ilość katalizatora do 10% mol, nie przyniosło pożądanych efektów. Obserwowalny brak powstawania związku **38**, jest najprawdopodobniej wynikiem obecności dwóch atomów chloru zamiast bromu, jako znacznie gorszych „grup opuszczających”, także w przypadku reakcji sprzęgania. Na podstawie tych obserwacji podjęłam decyzję o zaniechaniu dalszych prac w kierunku otrzymania tego połączenia.

1.7. Synteza 2-(6-chloro-4-nitropyridin-2-ylamino)etanolu



Schemat 42. Schemat reakcji otrzymywania związku 40.

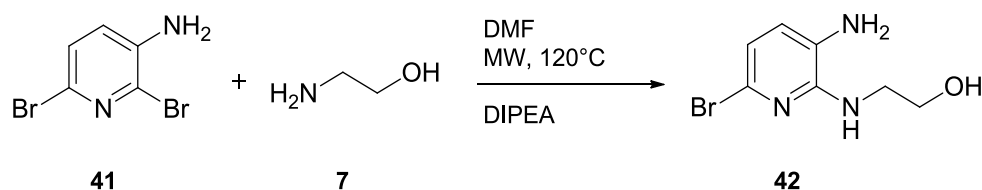
2,6-dichloro-4-nitropyrydynę (**39**) poddałam również reakcji substytucji nukleofilowej etanoloaminą (**7**), w obecności DMF oraz *N,N*-diizopropyletyloaminy. Reakcję prowadziłam w temperaturze pokojowej kontrolując jej przebieg przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej. Po upływie 20 minut na TLC zaobserwowałam całkowite przereagowanie substratu i powstanie dwóch produktów. Jeden z nich o mniejszej polarności miał zabarwienie żółte co świadczyło o obecności grupy nitrowej i prawdopodobnie powstaniu produktu **40**, natomiast w dużo większej ilości (9:1) powstał drugi produkt (**40 a**) (**Rysunek 47**).



Rysunek 47. Struktura związku ubocznego powstającego w wyniku substytucji grupy nitrowej w pierścieniu pirydyny.

Bazując na wcześniejszych doświadczeniach oraz literaturze¹³⁹, mogłam postawić hipotezę, że grupa nitrowa uległa substytucji. Jest to związane z faktem, że grupa nitrowa silnie wyciągająca elektrony (EWG) aktywuje reakcję S_NAr . Dodatkowo wykazuje wysoką podatność na działanie czynników nukleofilowych, a efekt ten jest zwiększony poprzez obecność w pierścieniu innych grup wyciągających elektrony. Strukturę związku **40a** potwierdziłam spektroskopowo oraz zaniechałam otrzymywania kolejnych pochodnych powyższą drogą syntezy.

1.8. Synteza 2-(3-amino-6-bromopirydyn-2-ylamino)etanolu

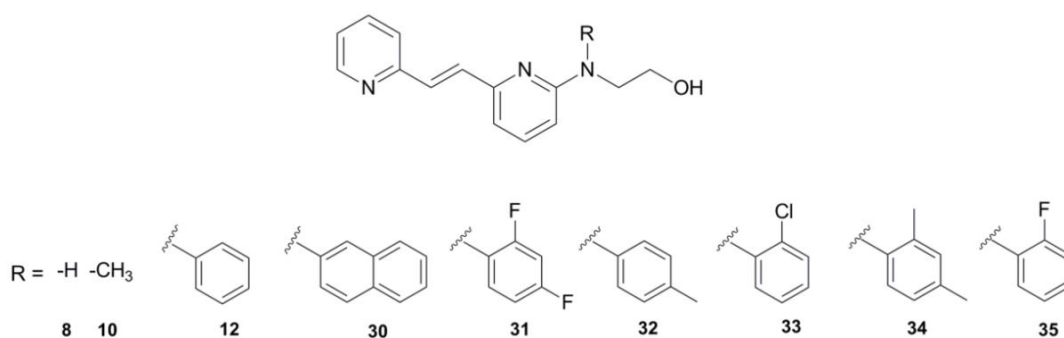


Schemat 43. Schemat reakcji otrzymywania związku **42**.

Kolejnym krokiem w celu otrzymywania nowych fluoroforów miał być związek **42**. W tym celu 3-amino-2,6-dibromopirydynę (**41**) oraz etanoloaminę (**7**) umieściłam w kolbie okrągłodennej w obecności DMF oraz *N,N*-diizopropyletyloaminy. Mieszaninę reakcyjną przenieśliśmy do reaktora mikrofalowego (120°C, 300 W). Po kilku godzinach trwania reakcji i braku pojawiania się produktu (**42**), podniosłam temperaturę do 150°C, co również nie przyniosło oczekiwanego skutku. Podobnie jak w przypadku substytucji drugorzędowych aminoalkoholi do związku **3** (Schemat **32**) przyłączenia etanoloaminy próbowałam dokonać również na drodze reakcji sprzęgania Buchwalda C-N, w obecności katalizatora palladowego (warunki przedstawione w tabeli **6** i **7**). Niestety, żaden ze sposobów nie zakończył się powodzeniem, a analiza mieszaniny reakcyjnej za pomocą TLC, potwierdziła obecność wyłącznie substratu **41**, bez śladów obecności produktu **42**. Powstałe problemy są wynikają najprawdopodobniej z obecności grupy –NH₂, która zwiększając gęstość elektronową w pierścieniu heterocyklicznym, zmniejsza podatność miejsc 2 i 6 na substytucję nukleofilową.

2. Pomiary fizykochemiczne

Kolejnym celem mojej pracy doktorskiej było zbadanie właściwości fotochemicznych otrzymanych fluoroforów (**8**, **10**, **12** oraz **30-35**) o wzorach przedstawionych poniżej (Rysunek **48**).



Rysunek 48. Struktury otrzymanych związków fluorescencyjnych.

Wynikające z doniesień literaturowych¹¹³ obiecujące właściwości fotofizyczne styrylowych oraz aminostyrylopirydynowych fluoroforów, doprowadziły do powstania hipotezy, że możliwe jest otrzymanie nowego znacznika fluorescencyjnego, będącego pochodną 2-pirydynylowych termolabilnych grup ochronnych (2-Py TGO). W założeniu,

modyfikacje skondensowanego układu pirydyn mają prowadzić do uzyskania fluoroforów cechujących się termolitycznym mechanizmem usuwania ze znakowanej cząsteczki, co stanowiłoby ich unikalną właściwość.¹⁴⁰ Dodatkowo, pH-zależność oraz sterowanie termolabilnością 2-Py-TGO może być uzyskane poprzez wprowadzanie do struktury znacznika fluorescencyjnego określonych grup funkcyjnych lub zmianę ich właściwości elektronowych poprzez podejście „chemical switch”⁵⁷. To, z kolei, otworzy drogę do projektowania nowej klasy responsywnych sond fluorescencyjnych.

2.1. Wyznaczanie molowego współczynnika absorpcji (ϵ)

Pierwszym z wyznaczanych przeze mnie parametrów fizykochemicznych był molowy współczynnik ekstynkcji. Pomiary maksimum absorpcji dla każdego ze związków (**8**, **10**, **12**) zostały wykonane według procedury opisanej w części eksperymentalnej (**3.1.1.**), a obliczenia wykonałam w oparciu o Prawo Lamberta-Beera. Średnie wartości współczynnika molowego ekstynkcji zostały wyliczone na podstawie każdorazowo trzech niezależnych pomiarów, wykonanych dla roztworów o wartości absorbancji na poziomie poniżej 0,1 (w celu uniknięcia nieliniowych efektów stężeniowych). Wyniki przedstawiłam w **Tabeli 8** wraz z odchyleniami standardowymi. Niemniej, interpretując te wyniki należy pamiętać, że inherentny błąd tej metody może wynosić nawet do 20%. W każdym przypadku (**Tabela 8**) wyznaczone wartości ϵ nie przekraczały 30000 [M⁻¹cm⁻¹]. Obserwowalne są różnice wynoszące do 10000 M⁻¹cm⁻¹, pomiędzy pochodnymi różniącymi się podstawnikiem na egzocyklicznym atomie azotu. Najwyższe wartości zaobserwowałam dla związków **12** – z podstawnikiem benzylovym, **32** - z podstawnikiem metylovym w pozycji 4 grupy benzylovej oraz **34** - z podstawnikiem metylovym w pozycji 2 i 4 grupy benzylovej. Niższymi wartościami charakteryzowały się związki **8** – bez podstawnika na egzocyklicznym atomie azotu, **35** oraz **31** – zawierające atomy fluoru w pierścieniu aromatycznym grupy benzylovej. Podstawniki elektronodonorowe (grupa metylova), przyłączone bezpośrednio do egzocyklicznego azotu bądź też obecne w pierścieniu aromatycznym grupy benzylovej, przyczyniają się do podniesienia wartości współczynnika ekstynkcji, zazwyczaj o kilkaset jednostek. Obecność grupy benzylovej, w tym przyłączonych do niej grup słabo elektronoakceptorowych - jak halogenki, zazwyczaj obniżało wartość ϵ . Co więcej, odmienne wartości molowego współczynnika

ekstynkcji pomiędzy badanymi związkami wynikają z niewielkich różnic w momentach dipolowych ich stanu podstawowego. Porównując wartości molowego współczynnika ekstynkcji z handlowo dostępnymi znacznikami fluorescencyjnymi, dla których ϵ osiąga wartości nawet rzędu kilkuset tysięcy $M^{-1}cm^{-1}$, wartości te są znacznie niższe. Niemniej jednak, mogą być one wystarczające dla różnego typu zastosowań, w szczególności jeżeli wydajności kwantowe tych związków okazałyby się wysokie.

Tabela 8. Współczynniki molowe absorpcji w metanolu; $C_m = 10^{-5}$ M. Wyniki ϵ są średnią dla trzech niezależnych pomiarów, a wartość absorbancji dla każdej z prób wynosiła poniżej 0,1.

Związek	ϵ [$M^{-1} cm^{-1}$]	SD
8	13700	404
10	16800	402
12	29600	350
30	16600	550
31	16400	410
32	24600	480
33	20500	420
34	20800	550
35	14200	555

2.2. Wyznaczanie wydajności kwantowej fluorescencji [ϕ_F]

Wydajność kwantowa fluorescencji (ϕ_F) jest niezwykle istotnym parametrem określającym z jaką efektywnością przebiega proces emisji fluorescencji przez badany fluorofor. Z rzadkimi wyjątkami, które w wypadku tych związków są pomijalne, maksymalna jej wartość wynosi 1 (czyli 100%) - co oznacza, że ilość zaabsorbowanych przez cząsteczkę kwantów promieniowania elektromagnetycznego, równa się ilości kwantów wyemitowanych w postaci fluorescencji. W tym miejscu warto nadmienić, iż wydajność kwantowa jest parametrem niezależnym od długości fali wzbudzenia, dlatego że emisja kwantu promieniowania następuje z najniższego stanu wzbudzonego S_1 (Reguła Kashy). W celu określenia wartości ϕ_F dla każdego z otrzymanych przeze mnie związków, wykonałam pomiar metodą porównawczą wobec *N*-metyloakrydyny, która posiada pasmo absorpcji oraz emisji fluorescencji w tym samym zakresie spektralnym co badane barwniki (dokładniejszy opis metodyki zamieściłam w części eksperymentalnej). Istnieją dwa podejścia wyznaczania relatywnej wydajności kwantowej z zastosowaniem metody

porównawczej. W moich pracach opierałam się na metodzie „one point”, gdzie wydajność kwantowa jest obliczona na podstawie jednej wartości emisji dla próbki badanej oraz wzorca. Jej zaletą jest szybkość w uzyskaniu wyników, co jednak jest obarczone większym błędem pomiarowym (**Tabela 9**).

Tabela 9. ^aWartości wyznaczonych wydajności kwantowych (ϕ_F) metodą porównawczą (wzorzec: *N*-metyloakrydyna; $\phi_F = 0,88$) dla otrzymanych związków, w metanolu; $C_m = 10^{-5}$ M. Absorbancja dla każdego z pomiarów wynosiła poniżej 0,1 w celu uniknięcia efektu filtra wewnętrznego.

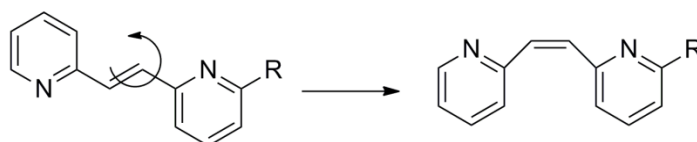
^bJasność fluorescencji została określona na podstawie iloczynu wydajności kwantowej i molowego współczynnika ekstynkcji danego związku ($\phi_F \times \epsilon$).

Związek	^a ϕ_F	^b $\phi_F \times \epsilon$ [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]
8	0,21	2877
10	0,11	1848
12	0,25	7400
30	0,19	2964
31	0,18	2952
32	0,15	3690
33	0,12	2460
34	0,11	2288
35	0,20	2840

Na podstawie danych przedstawionych w tabeli widoczne jest, że wszystkie wartości wydajności kwantowych wynoszą poniżej 0,3. Do ogólnych przyczyn obniżania wartości wydajności kwantowej (< 1) należą wszystkie procesy wytracania energii zanim cząsteczka wyemituje kwant promieniowania. Najwyższą wydajność kwantową zaobserwowałam dla związku **8** i **12**, i ponieważ wartości ϕ_F związków różniących się podstawnikiem na egzocyklicznym atomie azotu są bardzo zbliżone, można wysnuć wniosek, że zmiany w tym obrębie struktury mają niewielki, lecz zauważalny wpływ na efektywność emisji promieniowania. Powiązanie ze strukturą chemiczną ma być może zastosowany przeze mnie rozpuszczalnik: wzrost stałej dielektrycznej i *H*-donorowości rozpuszczalnika może spowodować wzrost (**8**, **12**) lub spadek (**34**, **33**) wydajności kwantowej, w zależności od struktury związku. Im więcej sprzężonych wiązań π oraz grup donujących elektrony - auksochromów (NH_2 , $-\text{OH}$), tym wyższa jej wartość⁹¹. W moim przypadku liczba atomów azotu i tlenu jest zawsze taka sama, toteż parametr ten nie powinien mieć znaczenia w wyjaśnianiu różnic we fluorescencji. Wydaje się, że dominujący wpływ na wartość wydajności kwantowej mają dwa czynniki: i) gęstość elektronowa na egzocyklicznym

atomie azotu oraz ii) ruchy rotacyjne. Niemal dwukrotnie wyższą wydajność kwantową zaobserwowałam dla związku **8**, w porównaniu ze związkiem **10**. Można wyjaśnić to potencjalnie tworzeniem wiązań wodorowych pomiędzy związkiem **8** (odgrywającym rolę H-donorową), a rozpuszczalnikiem i tym samym zwiększeniem gęstości elektronowej na atomie azotu, co nie jest możliwe w przypadku związku **10**. Z kolei, wyższa wydajność kwantowa związku **12** w porównaniu z **10** sugeruje, że istotną rolę w tym procesie odgrywać może efektywność nieradiacyjnej relaksacji poprzez rotację grupy metylowej (związek **10**), podczas gdy rotacja sztywniejszej grupy benzylovej w związku **12** może być ograniczona. Podobną hipotezą o relaksacji poprzez rotację grup metylowych można także wyjaśnić różnicę pomiędzy związkiem **12** oraz **32** i **34**, ale również **10** i **8**. Obecność podstawników halogenowych w pierścieniu benzenowym także wpływa na obniżenie wydajności kwantowej odpowiednich fluoroforów (**31**, **33** i **35** w porównaniu z **12**), choć brak różnic pomiędzy mono i difluorowanym podstawnikiem benzylovej sugeruje, iż efekt ten nie jest powiązany z gęstością elektronową na egzocyklicznym atomie azotu. Wpływ ten może zatem wynikać z dość często obserwowalnego efektu halogenowego, który dla cięższych atomów (w szczególności bromu i jodu, ale potencjalnie także dla chloru) nazywany jest czasem „efektem atomu ciężkiego” i ma związek z wygaszaniem procesu fluorescencji przez wolne pary elektronowe halogenu.

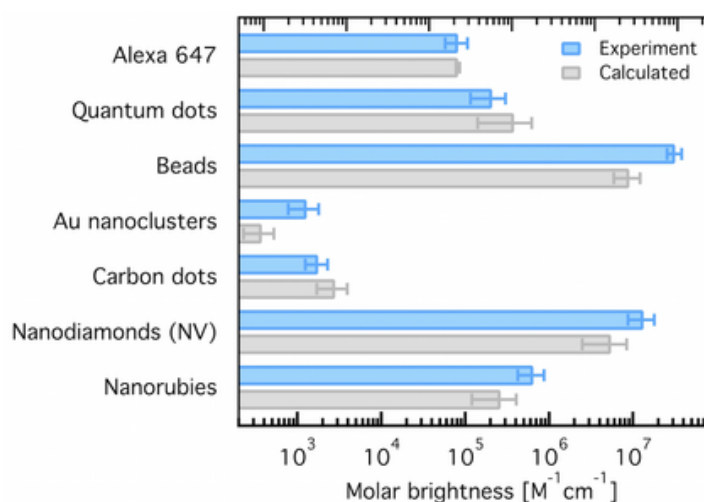
Kolejną istotną rzeczą w procesie fluorescencji tej grupy związków jest brak sztywności rdzenia strukturalnego, ze względu na obecność grupy winylowej. Dzięki temu, w stanie wzbudzonym możliwa jest zmiana konfiguracji z *trans* na *cis*, tak jak w przypadku stilbenu, na skutek fotoizomeryzacji, co przyczyniałoby się do obniżenia wydajności kwantowej (**Schemat 44**)¹⁴¹.



Schemat 44. Prawdopodobna fotoizomeryzacja w stanie wzbudzonym analogów stilbenu.

Co więcej, obecność heteroatomów w związkach zbliżonych strukturalnie do stilbenu, zmniejsza przejściową barierę izomeryzacji, ze względu na obecność przejść $n-\pi^*$. W konsekwencji, dla pirydylowych analogów stilbenów, mała odległość pomiędzy

najniższym stanem $n-\pi^*$ oraz $\pi-\pi^*$ może przyczynić się do zwiększenia prawdopodobieństwa wzbronionego przejścia międzysystemowego (ISC), pomiędzy S_1 i T_1 , obniżającego fluorescencję. Efekt ten jest jednak prawdopodobnie porównywalny dla wszystkich analizowanych związków. W związku z tym, podczas gdy może on odpowiadać za generalne obniżenie wydajności kwantowej, nie jest on kluczowy dla wyjaśnienia różnic pomiędzy związkami z tej samej serii. Niemniej, w celu dokładniejszego zbadania wpływu procesu izomeryzacji na wydajność kwantową fluorescencji, w przyszłych badaniach można dokonać pomiaru wydajności kwantowej w rozpuszczalnikach o większej lepkości niż metanol, np. DMSO, lub/i w niższej temperaturze pomiaru. Dodatkowo wyznaczonym przez mnie parametrem jest „jasność” fluorescencji (ang. *molar brightness*), czyli iloczyn wydajności kwantowej oraz molowego współczynnika ekstynkcji, na podstawie którego możemy określić efektywność „świecenia” fluoroforu (**Tabela 8**). Dla większości otrzymanych związków wartość tego parametru nie przekracza $3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (wyjątek stanowi pochodna **12**). Porównując uzyskane wyniki z częścią handlowo dostępnych fluoroforów, wartości te są dużo niższe, (**Rysunek 49**) co może obniżać ich potencjał w zastosowaniu praktycznym jako barwnika, szczególnie w bardziej złożonych systemach biologicznych, lecz nie wyklucza ich wykorzystania w badaniach *in vitro*.



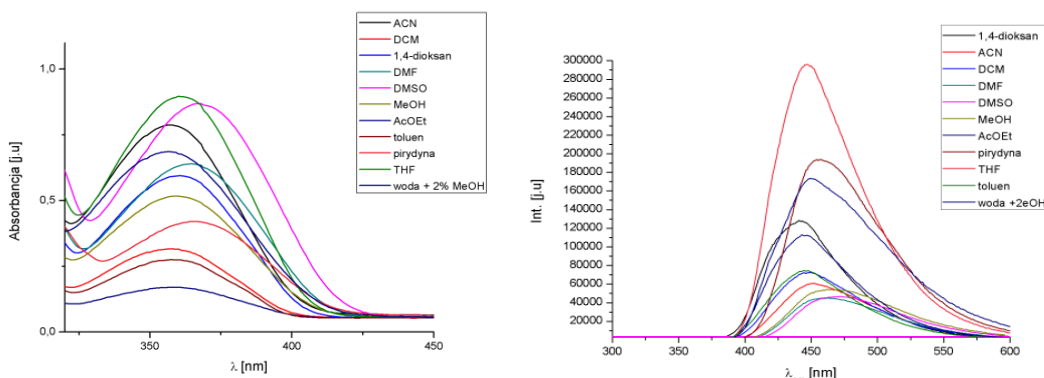
Rysunek 49. Wyznaczone wartości jasności fluorescencji dla wybranych fluoroforów¹⁴².

2.3. Badanie zmian absorpcji i emisji fluorescencji w wyniku zmian polarności i pH

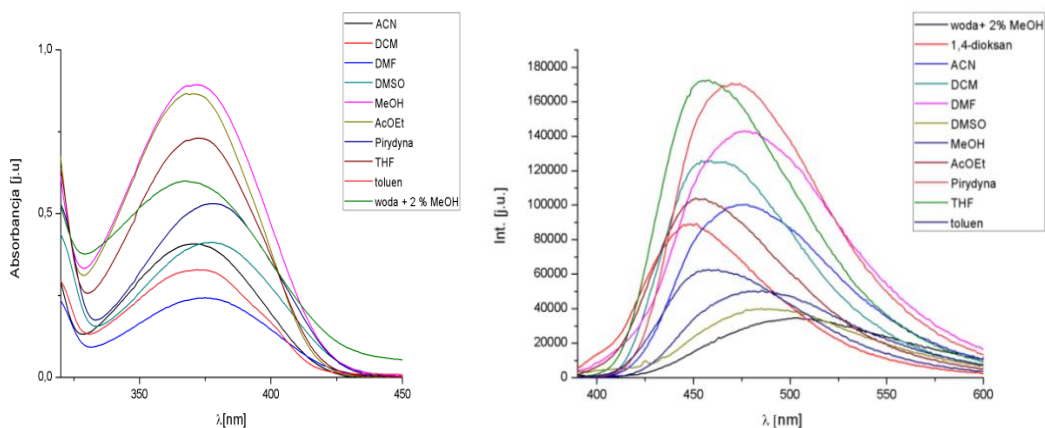
2.3.1. Solwatochromizm – widma absorpcyjno emisyjne

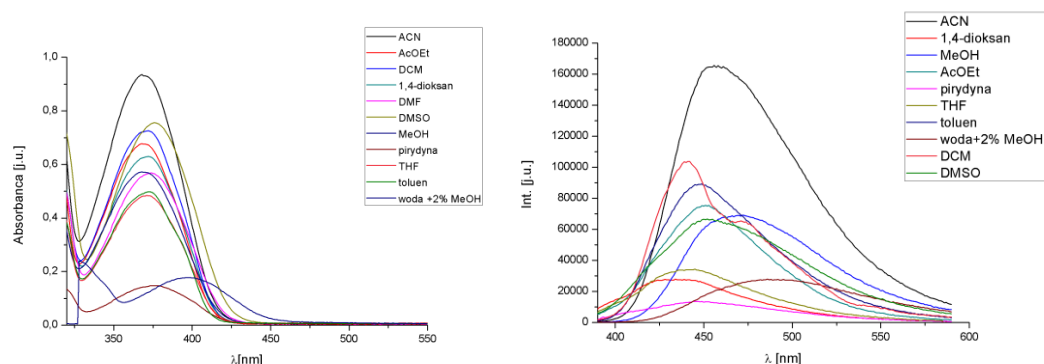
Różnice w długości fali emisji, w zależności od stosowanego rozpuszczalnika, mogą pokazać potencjał znaczników jako sensorów zmian polarności środowiska. W pierwszej kolejności dla trzech wybranych pochodnych różniących się podstawnikiem w pozycji 2-*N*-**(8,10,12)** wykonałam pomiar widm ciągłych absorpcji oraz emisji fluorescencji w rozpuszczalnikach różniących się momentem dipolowym. Chciałam tym samym określić responsywność otrzymanych związków i sposób ich oddziaływania z rozpuszczalnikami o odmiennych właściwościach chemicznych i sposobie oddziaływania. Wszystkie widma wykonywane były w zakresie stężeń 10^{-5} - 10^{-6} M, w kuwecie kwarcowej o drodze optycznej 1 cm oraz zostały skorygowane, w celu zniwelowania efektu filtra wewnętrznego. Wyniki tych pomiarów przedstawiłam na **Rysunku 50**.

Związek 8



Związek 10



Związek 12

Rysunek 50. Wykresy absorpcji (po lewej) i emisji (po prawej) fluorescencji dla wybranych pochodnych (**8,10 i 12**). $C_m = 10^{-4}$ M; widma fluorescencji skorygowane.

Analiza przedstawionych wyżej diagramów wskazuje na różnice w intensywnościach oraz długościach fal absorpcji oraz emisji w zależności od charakteru chemicznego zastosowanego rozpuszczalnika. Wyniki zawarte w **Tabeli 10** przedstawiają oznaczone długości fali maksimum absorpcji i emisji fluorescencji, a także wyznaczone przesunięcia Stokes'a w każdym z zastosowanych rozpuszczalników. Duże wartości przesunięć Stokesa są pożądanym parametrem, gdyż niwelują re-absorpcję wyemitowanego wcześniej przez fluorofor promieniowania.

Tabela 10. Zmiany absorpcyjno-emisyjne dla związku **8, 10 i 12** wywołane polarnością rozpuszczalnika.

Rozpuszczalnik (Związek 8)	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ [nm]	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ [nm]	Δ [nm]	ν_a [cm ⁻¹]	ν_f [cm ⁻¹]	Stokes shift $\nu_a - \nu_f$ [cm ⁻¹]
metanol (MeOH)	359	465	106	27855	21505	6350
acetonitryl (ACN)	356	451	95	28089	22172	5917
dichlorometan (DCM)	357	448	91	28011	22321	5690
tetrahydrofuran (THF)	360	447	87	27777	22371	5406
1,4-dioksan	360	440	80	27777	22727	5050
pirydyna	359	455	96	27855	21978	5877
N,N-dimetyloformamid	365	460	95	27397	21739	5658

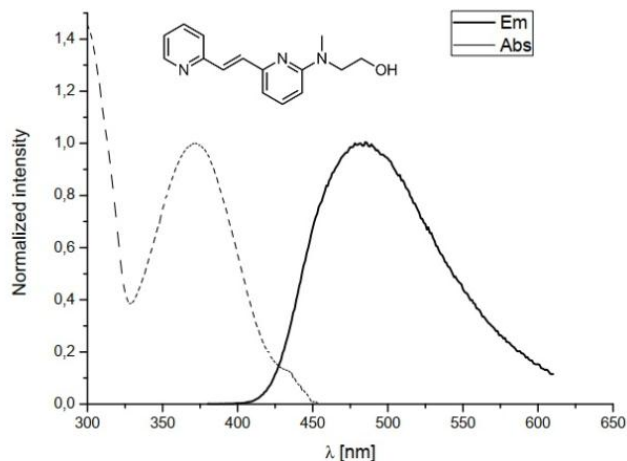
(DMF)						
dimetylosulfotlenek (DMSO)	360	470	110	27777	21276	6501
woda	358	449	91	27932	22271	5661
octan etylu (AcOEt)	357	447	90	28011	22371	5640
toluen	358	445	87	27932	22471	5461

Rozpuszczalnik (Związek 10)	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]	Δ [nm]	ν_a [cm ⁻¹]	ν_f [cm ⁻¹]	Stokes shift $\nu_a - \nu_f$ [cm⁻¹]
metanol (MeOH)	371	485	114	26954	20618	6336
acetonitryl (ACN)	370	476	106	27027	21008	6019
dichlorometan (DCM)	376	460	84	26595	21739	4856
tetrahydrofuran (THF)	372	457	85	26881	21881	5000
1,4-dioksan	372	455	83	26881	21978	4903
pirydyna	378	473	95	26455	21141	5314
N,N-dimetyloformamid (DMF)	375	475	100	26666	21052	5614
dimetylosulfotlenek (DMSO)	376	490	114	26595	20408	6187
woda	369	504	135	27100	19841	7259
octan etylu (AcOEt)	368	452	84	27173	22123	5050
toluen	373	457	84	26809	21881	4928

Rozpuszczalnik (Związek 12)	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]	Δ [nm]	ν_a [cm ⁻¹]	ν_f [cm ⁻¹]	Stokes shift $\nu_a - \nu_f$ [cm⁻¹]
metanol (MeOH)	370	470	100	27027	21276	5751
acetonitryl (ACN)	372	455	83	26881	21978	4903
dichlorometan (DCM)	372	440	68	26881	22727	4154
tetrahydrofuran (THF)	374	442	68	26737	22624	4113
1,4-dioksan	376	435	59	26595	22988	3607
pirydyna	376	447	71	26595	22371	4224

N,N-dimetyloformamid (DMF)	369	451	82	27100	22172	4928
dimetylosulfotlenek (DMSO)	373	450	77	26809	22222	4587
woda	376	470	94	26595	21276	5319
octan etylu (AcOEt)	373	451	78	26809	22172	4637
Ttoluen	371	452	81	26954	22123	4831

Widma ciągłe absorpcyjne UV-Vis charakteryzowały dwa pasma absorpcyjne odpowiadające przejściom HOMO – LUMO, z których w moich rozważaniach skupiłam się na drugim przejściu: π - π^* , występującym powyżej 300 nm, czyli w okolicach światła widzialnego, z uwagi na większe zastosowanie praktyczne dłuższych długości fali w rozwoju sensorów molekularnych. Dla różnych rozpuszczalników, maksimum absorpcji odpowiada długości fali wynoszącej od 356 nm do 365 nm dla pochodnej **8** oraz od 370 nm do 378 nm dla *N*-podstawionych związków **10** i **12**. Różnice w przesunięciach maksimum absorpcji w zależności od rozpuszczalnika są niewielkie i wynoszą od 1 nm do 10 nm. W przypadku widm emisji różnice te są znacznie większe w zależności od rodzaju rozpuszczalnika: dla związku **8** od 445 nm do 470 nm, dla **10** i **12** od 457 nm do 485 nm. Największe przesunięcie Stokes’a dla związku **8** bez podstawnika na egzocyklicznym atomie azotu, zaobserwowałam dla DMSO (6501 cm^{-1}) oraz metanolu (6350 cm^{-1}), najniższe natomiast dla 1,4-dioksanuu (5050 cm^{-1}). W przypadku pochodnej **10**, z podstawnikiem metylovym na egzocyklicznym atomie azotu, najwyższa wartość przesunięcia Stokes’a występuje dla wody (7259 cm^{-1}), DMSO (6187 cm^{-1}) oraz metanolu (6336 cm^{-1} , **Rysunek 51**), natomiast najniższa dla toluenu i THF, wynosząc 4928 cm^{-1} .



Rysunek 51. Przesunięcie Stokesa dla związku **10** w metanolu.

W przypadku związku **12** i obecności podstawnika benzyłowego, zaobserwowałam najniższe różnice pomiędzy maksimami absorpcji i emisji, które wynoszą dla wody i metanolu odpowiednio 5319 cm^{-1} oraz 5751 cm^{-1} , a dla THF i DCM: 4113 oraz 4154 cm^{-1} . Na podstawie powyższych obserwacji wyciągnęłam wniosek, iż mniejsze wartości przesunięć w maksimach absorpcji w porównaniu do maksimum emisji, wskazują na ograniczony wpływ charakteru rozpuszczalnika na rozkład energii stanu podstawowego. Dzieje się tak najprawdopodobniej ze względu na mniej polarną naturę związków **8-12** w stanie podstawowym, która natomiast ulega zwiększeniu w stanie wzbudzonym. Wstępnie określiłam także wpływ efektu solwatacji na stan podstawowy i wzbudzony – w ogólnym rozrachunku wraz ze wzrostem polarności rozpuszczalnika następuje batochromowe przesunięcie maksimum emisji fluorescencji, odpowiadającemu przejściu elektronowemu $\pi\text{-}\pi^*$, co skutkuje wyższą wartością przesunięcia Stokes'a. Dość wysoka wartość tego parametru (nawet do 7000 cm^{-1}) sugeruje, że geometria stanu wzbudzonego badanych związków prawdopodobnie dość znacznie różni się od geometrii stanu podstawowego, być może także ze względu na występowanie zjawiska przeniesienia ładunku w stanie wzbudzonym (ang. *Intramolecular charge transfer* - ICT), które zostało zasugerowane w przeszłości dla podobnych systemów [L. Zhu et al. / *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 311 (2015) 1–15]. Będzie to skutkowało wzrostem momentu dipolowego cząsteczki w stanie wzbudzonym. Trend ten sugeruje zatem wzrost siły oddziaływań pomiędzy fluoroforem w stanie wzbudzonym, a rozpuszczalnikiem wraz ze wzrostem jego polarności. Co więcej, różnice

w przesunięciach emisji w zależności od *H*-donorowości rozpuszczalnika wskazują na kluczową rolę oddziaływań o charakterze wiązania wodorowego pomiędzy rozpuszczalnikiem a cząsteczką. Stabilizacja stanu wzbudzonego przez rozpuszczalniki *H*-donorowe jest szczególnie wyraźna w przypadku związków **10** i **12** będących potencjalnymi akceptorami wiązania wodorowego. Efekt ten jest, natomiast, mniej widoczny w przypadku związku **8**, który może zachowywać się jak *H*-donor i stąd jego siła oddziaływań z protycznymi rozpuszczalnikami jest mniej wyraźna niż w przypadku związków **10** i **12**.

2.3.2. Czasy życia fluorescencji w zależności od rozpuszczalnika

Dla każdego z trzech związków, oprócz pomiarów widm absorpcji i emisji oraz wyznaczenia przesunięcia Stokes'a, dokonałam pomiaru czasu życia fluorescencji metodą zliczania pojedynczych fotonów (*ang. Time Correlated single Photon Counting, TCSPC*). Wyniki zaprezentowane są w poniższej tabeli (**Tabela 11**).

Tabela 11. Czasy życia związków **8**, **10** i **12**, gdzie τ – czas życia fluorescencji, *A* – udział czasu życia [%] w przypadku gdy rozkład funkcji jest wieloeksponencjalny.

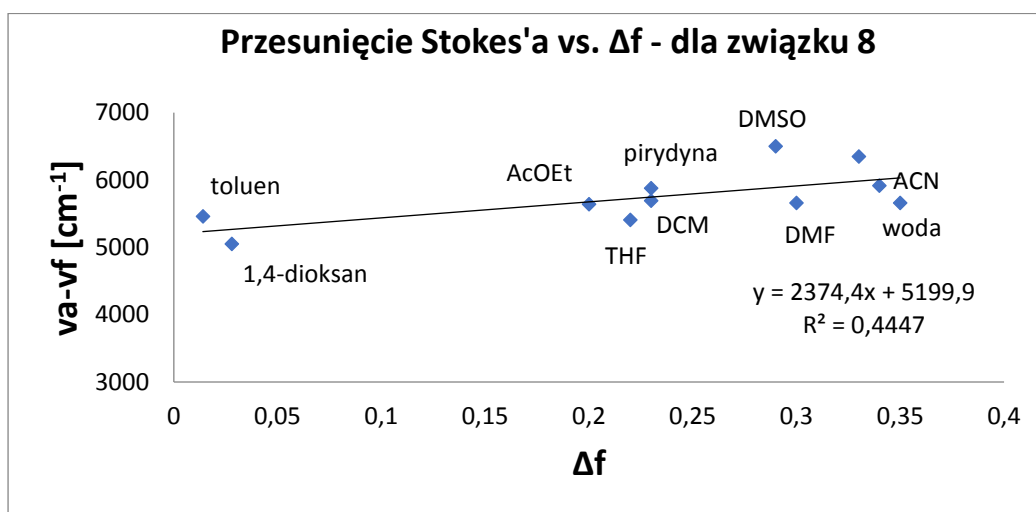
Rozpuszczalnik	Związek 8	Związek 10	Związek 12
metanol (MeOH)	$\tau_1 = 1,26; \tau_2 = 5,61$ $A_1 = 94,65\%; A_2 = 5,35\%$	$\tau_1 = 1,18; \tau_2 = 4,44$ $A_1 = 79,16\%; A_2 = 20,83\%$	$\tau_1 = 1,63; \tau_2 = 5,69$ $A_1 = 77,70\%; A_2 = 22,30\%$
acetonitryl (ACN)	$\tau_1 = 4,20; \tau_2 = 6,39;$ $A_1 = 79,39\%; A_2 = 20,60\%$	$\tau_1 = 4,79; \tau_2 = 7,64$ $A_1 = 68,85\%; A_2 = 31,15\%$	$\tau_1 = 3,19; \tau_2 = 6,56$ $A_1 = 66,81\%; A_2 = 33,19\%$
dichlorometan (DCM)	$\tau_1 = 2,81; \tau_2 = 5,41$ $A_1 = 63,36\%; A_2 = 36,64\%$	$\tau_1 = 2,54; \tau_2 = 6,73$ $A_1 = 81,01\% A_2 = 18,99\%$	$\tau_1 = 1,79; \tau_2 = 4,98$ $A_1 = 83,76\% A_2 = 16,24\%$
tetrahydrofuran (THF)	$\tau_1 = 3,83; \tau_2 = 6,36$ $A_1 = 79,64\%; A_2 = 20,36\%$	$\tau_1 = 3,88; \tau_2 = 7,85$ $A_1 = 80,46\%; A_2 = 19,54\%$	$\tau_1 = 2,76; \tau_2 = 6,71$ $A_1 = 83,80\%; A_2 = 16,19\%$
1,4-dioksan	$\tau_1 = 3,45; \tau_2 = 6,83$ $A_1 = 83,90\% A_2 = 16,10\%$	$\tau_1 = 3,57; \tau_2 = 8,65;$ $A_1 = 82,57\%; A_2 = 17,43\%;$	$\tau_1 = 2,38; \tau_2 = 6,64$ $A_1 = 84,71\%; A_2 = 15,29\%$

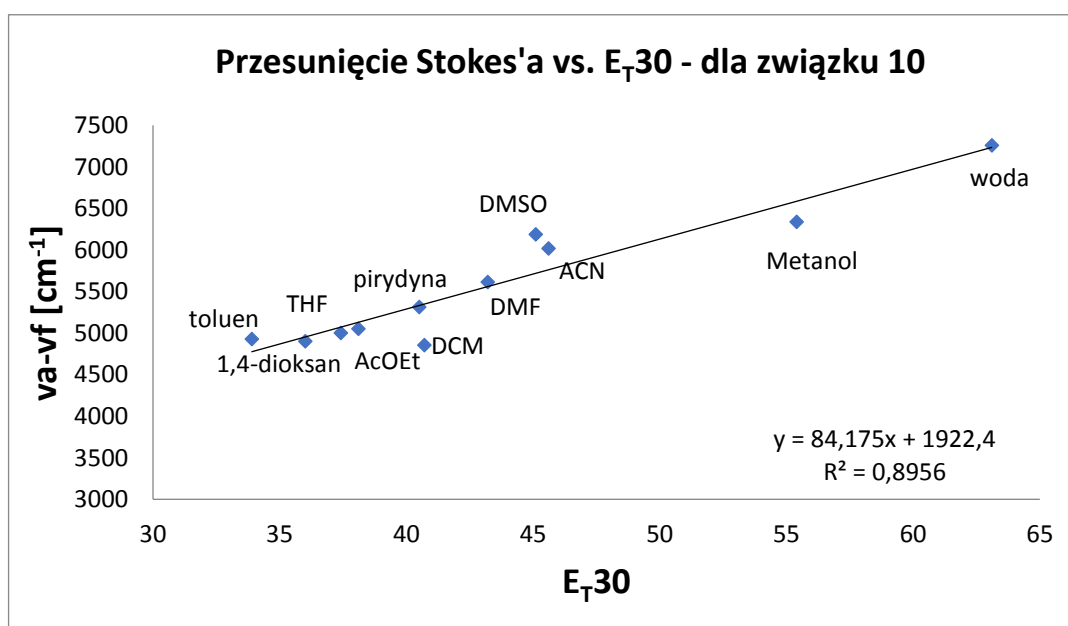
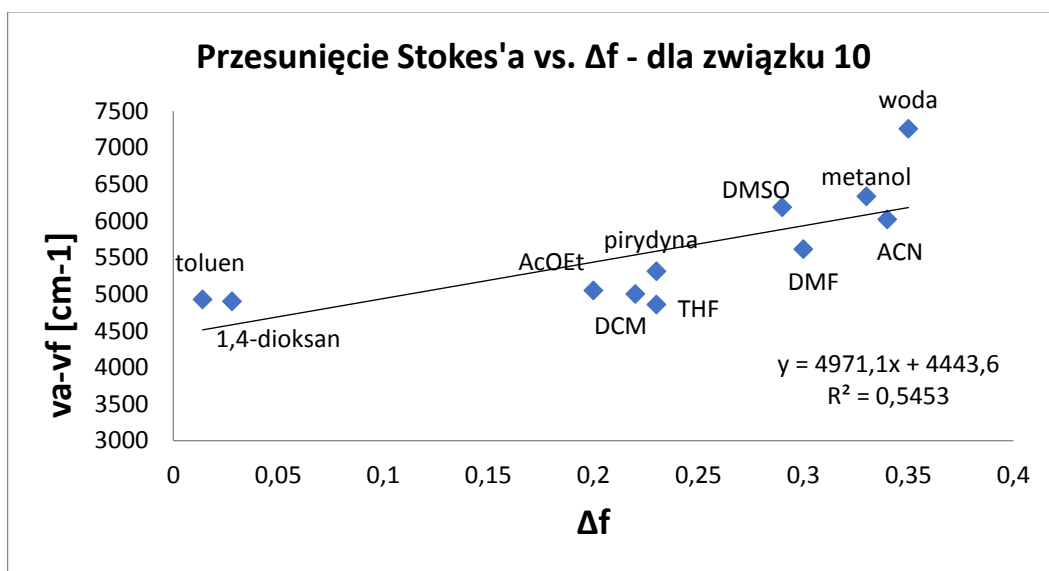
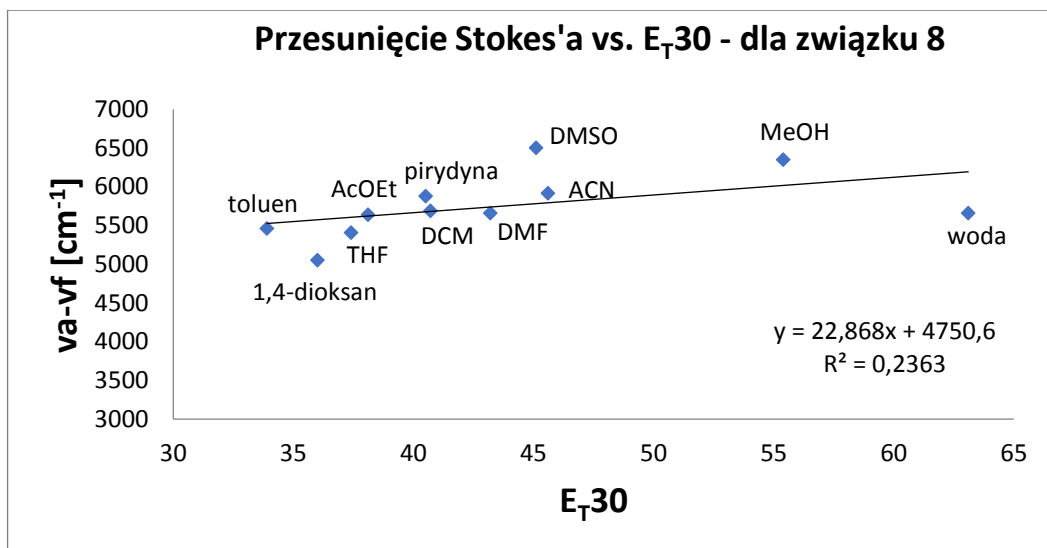
Pirydyna	$\tau_1 = 5,27; \tau_2 = 0,90$ $A_1 = 81,37\%; A_2 = 18,63\%$	$\tau_1 = 5,92; \tau_2 = 9,63$ $A_1 = 77,02\%; A_2 = 22,98\%$	$\tau_1 = 3,41; \tau_2 = 7,21$ $A_1 = 58,46\%; A_2 = 41,54\%$
N,N-dimetyloformamid (DMF)	$\tau_1 = 6,56;$	$\tau_1 = 6,52; \tau_2 = 9,59$ $A_1 = 65,62\%; A_2 = 34,38\%$	$\tau_1 = 5,59; \tau_2 = 8,68$ $A_1 = 68,81\% A_2 = 31,19\%$
dimetylosulfotlenek (DMSO)	$\tau_1 = 7,60$	$\tau_1 = 9,08$	$\tau_1 = 8,83; \tau_2 = 3,42$ $A_1 = 53,50\%; A_2 = 46,50\%$
Woda	$\tau_1 = 1,06; \tau_2 = 3,06$ $A_1 = 54,94\% A_2 = 45,07\%;$	$\tau_1 = 0,61; \tau_2 = 1,82$ $A_1 = 79,24\%; A_2 = 20,76\%$	$\tau_1 = 4,79; \tau_1 = 3,14$ $A_1 = 78,71\%; A_1 = 21,29\%$
octan etylu (AcOEt)	$\tau_1 = 3,31; \tau_2 = 5,58$ $A_1 = 79,93\% A_2 = 20,07\%$	$\tau_1 = 3,12; \tau_2 = 6,33$ $A_1 = 75,29\%; A_2 = 24,71\%$	$\tau_1 = 0,78; \tau_2 = 5,67$ $A_1 = 82,60\%; A_2 = 17,39\%$
Toluen	$\tau_1 = 3,81; \tau_2 = 1,52$ $A_1 = 53,5\%; A_2 = 46,5\%$	$\tau_1 = 2,19; \tau_2 = 5,79$ $A_1 = 67,30\%; A_2 = 32,70\%$	$\tau_1 = 1,50; \tau_2 = 4,61$ $A_1 = 80,35\%; A_2 = 19,65\%$

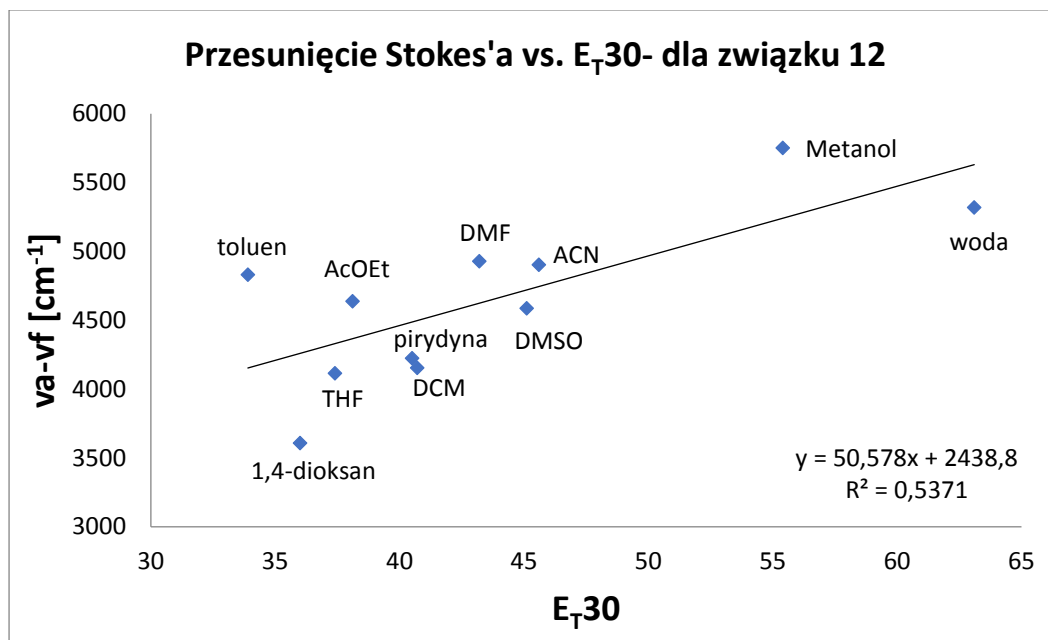
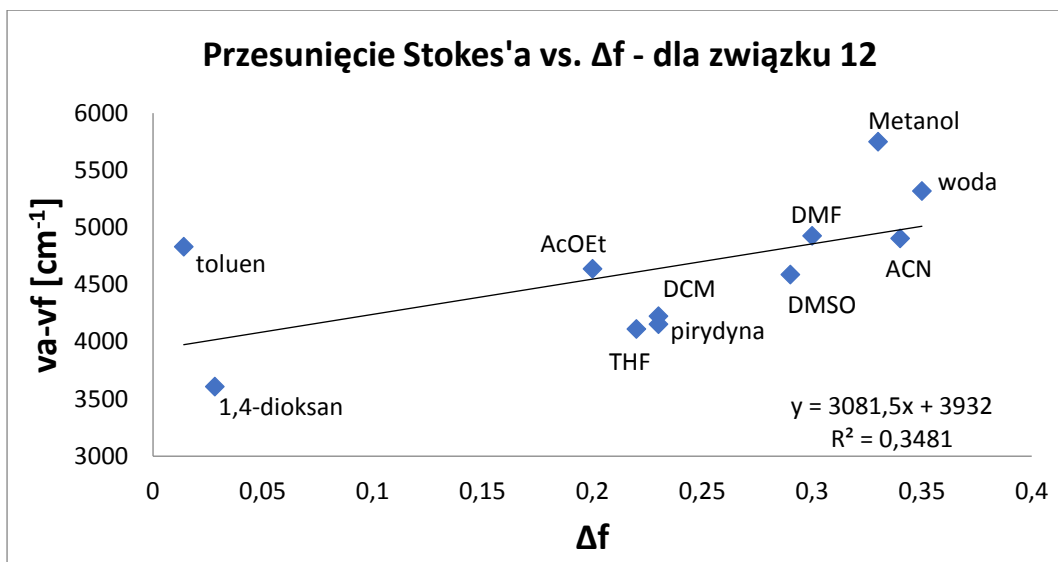
Okazuje się, że zanik fluorescencji badanych związków w prawie każdym rozpuszczalniku jest wieloeksponencjalny, co oznacza, że występuje więcej niż jeden czas życia fluorescencji. Taki stan rzeczy sugeruje obecność dwóch emisyjnych form tych związków w badanych rozpuszczalnikach (i/lub dwóch stanów wzbudzonych, z których następuje emisja). Krótsze czasy życia występują w przewodzie dla każdego ze związków. Zanik fluorescencji wynoszący pomiędzy 1-2 ns, zaobserwowałam w przypadku rozpuszczalników polarnych protycznych (woda, metanol). Czasy życia wynoszące od 2,5 ns do około 4 ns zaobserwowałam głównie dla rozpuszczalników polarnych aprotycznych (ACN), a także toluenu. Wyjątkami w tej serii są rozpuszczalniki o większej polarności i potencjalnie dużej sile oddziaływań związku z rozpuszczalnikiem (**podrozdział 2.3.1. – Solwatochromizm**), takie jak DMSO i DMF. W ich przypadku, dla związku **8** zaobserwowałam tylko jeden długi czas życia fluorescencji, co sugeruje jedną emisyjną i relatywnie stabilną formę tego związku w stanie wzbudzonym.

2.3.3. Określenie oddziaływań z rozpuszczalnikiem

Zmiany w maksimum emisji fluorescencji są dowodem interakcji badanych związków ze środowiskiem oraz wykazują różnice w przesunięciach maksimum emisji w zależności od momentu dipolowego rozpuszczalnika. Z tego względu postanowiłam bliżej zbadać zależność pomiędzy przesunięciem Stokes'a, a polarnością rozpuszczalnika. W tym celu wykorzystałam dwa podejścia wcześniej opisane: Lipperta-Mattagi, w którym wyznaczałam zależność parametru Δf czyli polaryzowalności rozpuszczalnika, od przesunięcia Stokes'a wyrażonego w cm^{-1} . Drugie podejście wykorzystuje parametr Dimrotha $E_T(30)$, który również odnosi się do różnic w polaryzowalności rozpuszczalników, natomiast w przeciwieństwie do pierwszej teorii, bierze pod uwagę oddziaływania specyficzne jakie mogą występować pomiędzy związkiem badanym, a roztworem. Dla każdej serii danych przedstawionych na wykresach (**Rysunek 52**), wyznaczyłam krzywą regresji liniowej metodą najmniejszych kwadratów.







Rysunek 52. Wykresy zależności przesunięcia Stokes'a od parametrów polarności rozpuszczalnika, wg. parametru polaryzowalności Lipperta-Mattagi (Δf) oraz Dimrotha (E_{T30}).

Dla związku **8** i **10** i **12** dopasowanie wobec parametru Δf i E_{T30} jest niewielkie ($R^2 < 0,5$, z wyjątkiem związku **10** i zależności wobec parametru E_{T30}), co wskazuje, że polaryzowalność rozpuszczalnika niewystarczająco precyzyjnie charakteryzuje rodzaj występujących oddziaływań z cząsteczką badaną. Dla związku **10** większe dopasowanie występuje dla parametru Dimroth'a, co w większym stopniu wyjaśnia udział oddziaływań specyficznych w przesunięciu Stokes'a. Dla związku **12** parametr Dimrotha również wskazuje na znaczny wpływ oddziaływań specyficznych z rozpuszczalnikiem, ale jest on w

dużym stopniu nieuporządkowany. W każdym przypadku natomiast widoczne są znaczne odchylenia od liniowości, co wskazuje na udział innych oddziaływań, nie opisanych w.w. parametrami (jak np. dipol-dipol, dyspersyjnych, etc.), których rodzaju nie jesteśmy w stanie określić na podstawie tych dwóch zależności. Zdecydowałam się zatem na zastosowanie zależności przesunięcia Stokes'a od: parametrów Hansen'a i Kamlet-Taft'a. Parametry Hansen'a określają wpływ: dD – czyli sił dyspersyjnych, dP – czyli oddziaływania dipol-dipol, dipol-dipol indukowany oraz dH – wiązań wodorowych. Natomiast parametry Kamlet-Taft'a to: α – wpływ H -donorów, β – wpływ akceptorów protonu, π^* – polarność. Dla każdego związku (**8-12**) wyznaczyłam zależność przesunięcia Stokes'a od poszczególnego parametru, a wszystkie wykresy zostały umieszczone w części eksperymentalnej (**Wykresy 1-21**). Na podstawie otrzymanych danych (**1-21, część eksperymentalna, 2.2. Spektrofluorymetria**) można wysnuć następujące wnioski:

- dla żadnego z wykresów nie zaobserwowałam prostych zależności dla poszczególnych parametrów, ze względu na złożoność oddziaływań pomiędzy związkami a rozpuszczalnikiem
- dla wody obserwowalne są największe odstępstwa od liniowości, ze względu na jej charakter kwasowy (większy niż np. dla metanolu), powodując potencjalnie częściową protonację cząsteczki na endocyklicznym atomie azotu
- parametry Hansena oraz Kamleta- Tafta:
 - i) wpływ sił dyspersyjnych na emisję fluorescencji maleje w szeregu **12>10>8** (**część eksperymentalna, Wykresy 2, 9 i 16, parametr dD**)
 - ii) największy udział oddziaływań dipol-dipol, dipol-dipol indukowany występuje w przypadku związku **10** z rozpuszczalnikami jak octan etylu, DMSO, pirydyna (**część eksperymentalna, wykres 10 , parametr dP**). Dla związku **8** i **12** oddziaływania dipolowe nie wyjaśniają jednoznacznie różnic w przesunięciach Stokes'a ($R^2 < 0,5$, **część eksperymentalna, Wykres 3 i 17**)
 - iii) dopasowanie parametru określającego udział wiązań wodorowych w oddziaływaniach rozpuszczalników z substancjami rozpuszczonymi (**dH**) jest zdecydowanie najlepsze dla związku **10** ($R^2 = 0,7$, **część eksperymentalna, Wykres 11**), natomiast dla pochodnej **12** ($R^2 = 0,3$,

Wykres 18) i **8** ($R^2 = 0,03$, część eksperymentalna, **Wykres 4**), brak jest zauważalnych trendów. Wskazuje to, że *H*-donorowość rozpuszczalnika ma duże znaczenie w oddziaływaniach ze związkami posiadającymi podstawnik na egzocyklicznym atomie azotu. Znikome dopasowanie parametru *dH* dla związku **8** może wskazywać na *H*-donorowy charakter oddziaływania związku z rozpuszczalnikiem. Potwierdzeniem tej obserwacji jest zależność przesunięć Stokes'a w odniesieniu do parametru β (akceptor protonu) i π^* (polarność), który wskazuje na dużą siłę oddziaływania *H*-akceptorów ze związkiem **8** (część eksperymentalna, **Wykresy 6 i 7**), natomiast znikomą na analogi **10** (część eksperymentalna, **Wykresy 13 i 14**) oraz **12** (część eksperymentalna, **Wykresy 20 i 21**).

2.3.4. pH-wrażliwość

Związki pirydyny, ze względu na obecność atomu azotu, podatne są na protonację (pK_a w pobliżu 5,5) i w związku z tym mogą wykazywać silne zmiany wobec zmian w pH środowiska. W celu określenia pH-wrażliwości dokonałam pomiaru absorpcji oraz emisji dla związków **8**, **10** i **12**, w zakresie pH od 2-12. W celu uzyskania odpowiedniego zakresu pH używałam roztworu buforu fosforanowego (zakres $pH=5.8-7.4$), natomiast dla uzyskania wartości poniżej $pH=5$ i powyżej $pH=8$ przekraczając jego pojemność buforową - dokonując zmian odpowiednio kwasem H_3PO_4 lub $NaOH$. Maksima absorpcji i emisji przedstawiłam w **Tabeli 12**.

Tabela 12. Wartości maksimum absorpcji i emisji dla związków **8**, **10** i **12** w zależności od pH.

pH	$\lambda_{abs}[nm]$ 8	$\lambda_{em}[nm]$ 8	$\lambda_{abs}[nm]$ 10	$\lambda_{em}[nm]$ 10	$\lambda_{abs}[nm]$ 12	$\lambda_{em}[nm]$ 12
2	376	485	385	515	382	500
3	374	460	383	490	382	470
4	369	450	376	472	380	460
5	365	448	373	475	378	470
6	362	450	373	490	372	480
7	361	470	368	501	371	490

8	358	480	371	502	372	492
9	353	480	371	504	372	490
10	353	480	371	505	368	490
11	352	478	370	505	368	490
12	352	478	370	504	370	495

Podobnie jak w przypadku określania zmian w profilach absorpcyjno-emisyjnych w zależności od polarności rozpuszczalnika, również w przypadku zmian pH widoczne są takie różnice. Dla wszystkich trzech związków, maksima widm absorpcji przesuwają się w kierunku batochromowym wraz ze wzrostem kwasowości (czyli obniżaniem pH). Dla związku **8**, różnica między maksimum absorpcji w pH 12 i pH 2 wynosi 24 nm, (odpowiednio 352 i 376 nm), dla związku **10** $\Delta = 17$ nm (368 i 385 nm,) a dla związku **12** zmiana jest najmniejsza i wynosi 14 nm (368 nm w pH 12 i 382 nm w pH 2). Co więcej, zmiany w maksimach widm emisji tych związków w zależności od pH są bardziej złożone. W wyniku obniżania pH najpierw dochodzi do przesunięcia hipsochromowego w maksimach widm emisji tych związków między pH 8 i 4, dla związku **8** z 478 nm dla pH 12 do 448 nm dla pH 5, dla związku **10** z 504 nm w pH 12 na 472 nm w pH 3 oraz dla związku **12** z 495 nm dla pH 12 do 460 nm w pH 3. Następnie, dalsze obniżanie pH do 2 prowadzi do ponownego przesunięcia tym razem w kierunku batochromowym do podobnych, choć nie identycznych wartości, jak w przypadku pH 12 (tj. do 485 nm dla związku **8**, 515 nm dla związku **10** i 500 nm dla związku **12**). W efekcie, mamy do czynienia także ze zmianami w przesunięciach Stokesa, które wahają się od 127 nm (480 nm – 353 nm) do 81 nm (450 nm – 369 nm dla **8**, od 134 nm (505 nm – 371 nm) do 96 nm (472 nm – 376 nm) dla związku **10** i od 125 nm (495 nm – 370 nm) do 80 nm (460 nm – 380 nm) dla związku **12**.

Porównanie absorpcji z widmami emisji wskazuje na większe i bardziej dramatyczne zmiany stany uprotonowania związków w stanie wzbudzonym i silniejszy wpływ rozpuszczalnika. W stanie podstawowym mamy zatem prawdopodobnie jednoetapowy

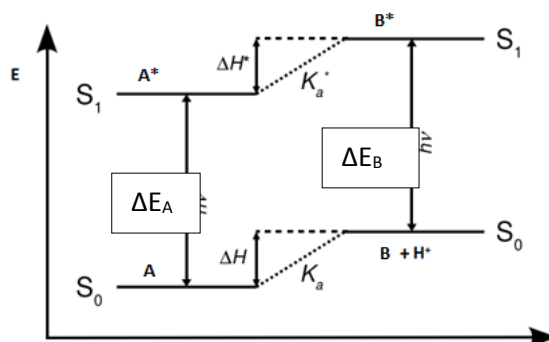
proces protonowania w.w. związków (co również pokazują krzywe miareczkowania, (Wykresy 22-27, część eksperymentalna, 2.2. Spektrofluorymetria). W przypadku stanu wzbudzonego obserwujemy przynajmniej dwa etapy zmian w protonowaniu cząsteczek.

Na podstawie wykresów zależności największych zmian absorpcji w λ_{\min} oraz λ_{\max} od pH środowiska wyznaczyłam pKa dla wybranych analogów 2-Py TGO: **8**, **10** i **12**, a uzyskane wyniki zebrałam w **Tabeli 13**.

Tabela 13. Wyznaczone pKa dla związków **8-10**.

Związek	pKa teoret.	pKa eksp.
8	6,2	6,1+/- 0,3
10	6,0	5,9 +/- 0,3
12	5,9	5,9 +/- 0,3

Wprowadzenie modyfikacji na egzocyklicznym atomie azotu, ma niewielki wpływ na wartość pKa. Najwyższą wartość osiągamy dla związku **8** (-NH), a najniższą dla **12** (-NBn). Wyniki eksperymentalne porównałam z wartościami teoretycznymi wyznaczonymi w programie ChemAxon uzyskując wysoki stopień zbieżności. Pomimo, iż widma emisji fluorescencji wykonywane były w buforze o zmiennej sile jonowej, lecz tym samym składzie, to dla większości przypadków musiałam przekroczyć wartość pojemności buforowej. Zdecydowałam się na to, aby uniknąć stosowania buforów różniących się siłą jonową i składem chemicznym, gdyż może mieć toznaczący wpływ na wydajność kwantową fluorescencji, co znacząco zmniejszyłoby wiarygodność wyznaczania pKa w stanie wzbudzonego. Dostosowywanie pH roztworu przed pomiarami, z użyciem kwasu fosforowego (V) lub NaOH, zmniejszało stabilność danego pH, ale niwelowało efekt powstawania oddziaływań specyficznych składników buforu oraz badanej substancji w stanie wzbudzonego. pKa stanu wzbudzonego wyznaczałam na podstawie cyklu Forstera¹⁴³, który wykorzystuje różnicę energetyczną pomiędzy stanem podstawowym, a singletowym stanem wzbudzonego skoniugowanego kwasu i zasady, która może być przedstawiona jako różnica w zmianach entalpii równowagi kwasowo zasadowej w stanie podstawowym i wzbudzonego (**Rysunek 53**).



Rysunek 53. Powyższy diagram ilustruje ilość energii jaka jest potrzebna aby cząsteczka przeszła ze stanu podstawowego S_0 (ΔE_A i ΔE_B) do stanu wzbudzonego S_1 oraz ilość energii niezbędną do oderwania protonu aby cząsteczka przeszła w formę zasadową (ΔH i ΔH^*). Litera **A** oznacza formę sprotonowaną, **B** – deprotonowaną.

Tabela 14. pK_a w stanie wzbudzonym wyznaczone z widm emisji fluorescencji.

Związek	pK_a^* (exp)
8	8,15+0,01
10	7,69 +0,01
12	7,43 +/ 0,01

Na podstawie uzyskanych wyników widoczne jest, iż pK_a w stanie wzbudzonym osiąga wyższą wartość od pK_a stanu podstawowego o około dwie jednostki. Najwyższa wartość, podobnie jak w pK_a stanu podstawowego, została zaobserwowana dla pochodnej bez podstawnika na egzocyklicznym atomie azotu (**8**). Każda z cząsteczek w stanie podstawowym posiada pK_a niższe niż w stanie wzbudzonym, co oznacza, że prawdopodobnie różnica entalpii stanu podstawowego jest mniejsza niż stanu wzbudzonego. Zwiększenie pK_a^* wyznaczone eksperymentalnie może oznaczać, że cząsteczka jest silniejszą zasadą w stanie wzbudzonym, zatem łatwiej ulega protonacji na endocyklicznym atomie azotu. Protonacja grupy pirydynylowej powinna również ograniczać dezaktywacyjny efekt przejścia $n-\pi^*$, a co za tym idzie – zwiększać potencjalnie udział radiacyjnych przejść¹⁴⁴. Wynika to z faktu, że jeżeli proton utworzył kompleks

z atomem azotu, to zwiększy on energię najniższego stanu $n-\pi^*$, nie wpływając na stan $\pi-\pi^*$.

Na podstawie otrzymanych wartości zaniku fluorescencji w różnym pH (**Tabela 12**), jednoznacznie widać, iż w pH kwaśnym czas życia jest najkrótszy. Bardzo krótki czas życia jest przyczyną izomeryzacji i/lub wygaszania fluorescencji w wyniku protonacji – w pH 2 istnieje w pełni sprotonowana forma każdego ze związków, charakteryzująca się pojedynczym, bardzo krótkim czasem życia (około 0,2 ns). Natomiast w przypadku pH obojętnego i zasadowego (pH 12), prawdopodobnie występuje mieszanina formy sprotonowanej i niesprotonowanej, co pokazują dwa czasy zaniku fluorescencji (z czego udział krótkiego czasu życia jest największy).

Tabela 15. Czasy życia fluorescencji dla związku **8,10** i **12** w pH 2, 7 i 12.

pH	Związek 10	Związek 8	Związek 12
2,0	$\tau_1 = 0,10$	$\tau_1 = 0,21$	$\tau_1 = 0,16$
7,0	$\tau_1 = 0,58; \tau_2 = 1,61$ $A_1 = 78%; A_2 = 22%$	$\tau_1 = 0,73; \tau_2 = 1,90$ $A_1 = 69%; A_2 = 31%$	$\tau_1 = 1,069; \tau_2 = 3,76$ $A_1 = 86%; A_2 = 14%$
12,0	$\tau_1 = 0,54; \tau_2 = 1,44$ $A_1 = 77%; A_2 = 23%$	$\tau_1 = 0,52; \tau_2 = 1,15$ $A_1 = 69%; A_2 = 31%$	$\tau_1 = 0,57; \tau_2 = 1,53$ $A_1 = 71%; A_2 = 29%$

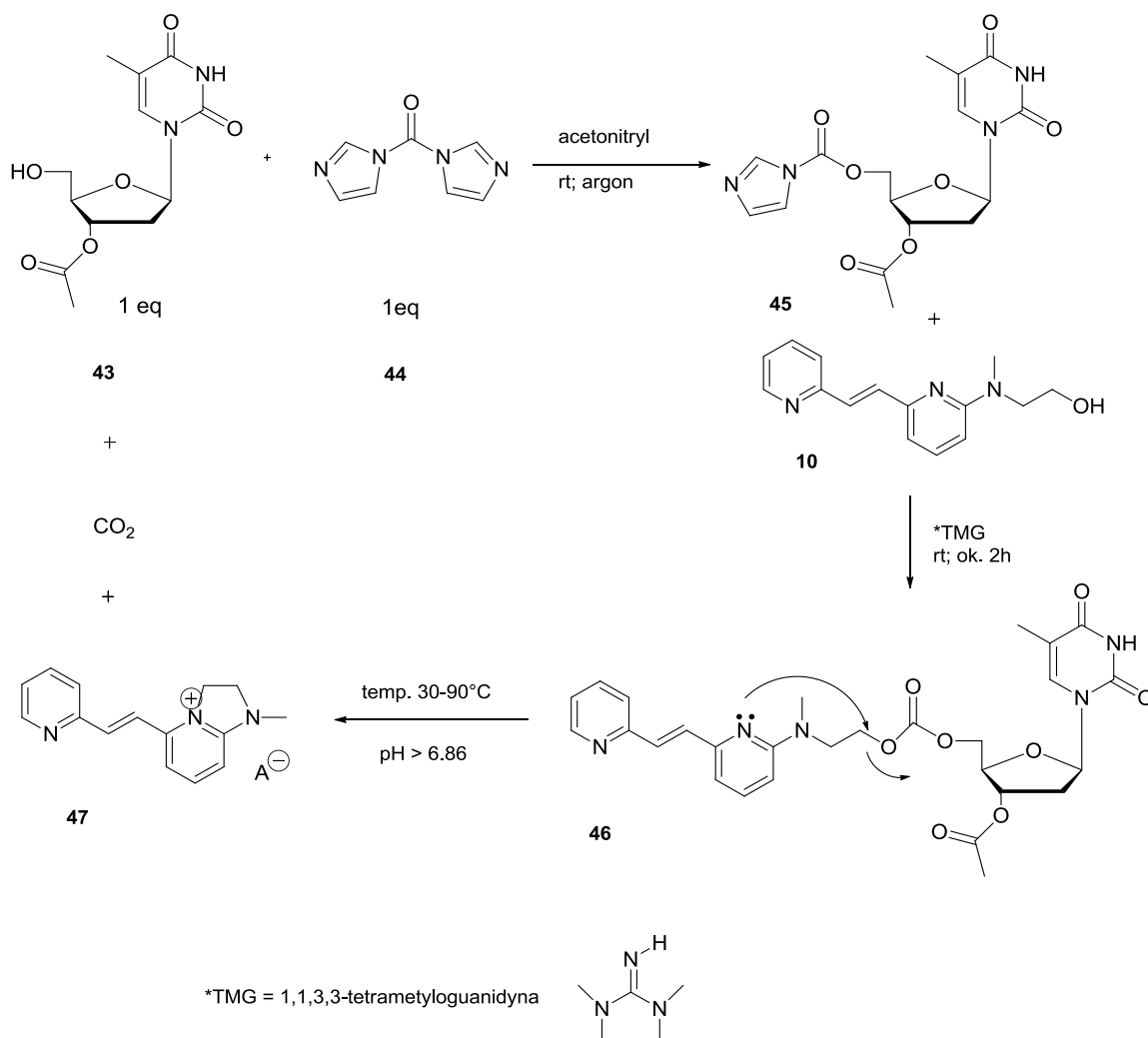
3. Synteza węglanów nukleozydów oraz badanie szybkości termocyklizacji

Na podstawie dotychczasowych badań, wiadome jest, że pochodne 2-aminopirydynylowe pełniące funkcję ochronną grup hydroksylowych, estrowych lub fosforanowej ulegają reakcji wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji pod wpływem temperatury w określonym pH (**część literaturowa, rozdział 1.7.1.**). W wyniku tego procesu tworzy się produkt bicykliczny **47** (**Schemat 52**) o charakterystycznym profilu absorpcyjno-emisyjnym oraz wolna grupa funkcyjna. Produkt bicykliczny, ze względu na jego jonowy charakter, można łatwo zidentyfikować oraz odseparować od pozostałych składników mieszaniny. „Siłą napędową” reakcji cyklizacji jest nukleofilowość pirydynowego atomu azotu, stąd też

modyfikacje pierścienia pirydyny oraz egzocyklicznego atomu azotu, w zależności od charakteru elektronowego grup funkcyjnych, wpływają na przyspieszenie lub spowolnienie tej reakcji. Podczas swoich badań założyłam, że rozbudowa struktury 2-PyTGO w celu uzyskania właściwości fluorescencyjnych, może wpływać na szybkość procesu termo usuwania ze znakowanej cząsteczki, ze względu na większe usztywnienie struktury oraz zmiany w rozkładzie gęstości elektronowej pochodnych 2-aminopirydylowych. W celu weryfikacji postawionej hipotezy, przeprowadziłam badania polegające na określeniu szybkości odłączania jednego z wcześniej otrzymanych fluoroforów (*E*)- 2- {metylo- [6- (2-pirydyn-2-yl-winylo) -pirydyn-2-yl)aminoetanolu (**10**) od modelowego nukleozydu jakim była 3'-*O*-acetylowana tymidyna za pomocą łącznika węglanowego. Badania miały na celu: **i**) potwierdzenie termolabilnych właściwości formy węglanowej fluoroforu **10** **ii**) wyznaczenie temperatury granicznej, w której następuje odłączenie fluoroforu od znakowanej biocząsteczki **iii**) określenie maksymalnej szybkości odblokowania w najwyższej temperaturze granicznej wynoszącej 90°C.

3.1. Synteza 3'-*O*- acetylo-5'-(2- {metylo- [6- (2-pirydyn-2-yl-winylo) -pirydyn-2-yl) – aminoetyloksykarbonylo tymidyny (**10**)

Aminoalkohole 2-PyTGO nie wykazują właściwości termolabilnych (są jedynie prekursorami termowrażliwych grup) i dopiero ich przekształcenie np. w formę węglanową lub fosforanową pozwala badać ten proces. Dlatego też, (*E*)- 2- {metylo- [6- (2-pirydyn-2-yl-winylo) -pirydyn-2-yl)aminoetanol (**10**), przekształciłam w niesymetryczny węglan przeprowadzając reakcję 1,1'-karbonyldiimidazolu z modelowym nukleozydem: 3'-*O*-acetylowaną tymidyną, a następnie z związkiem **10**, według procedury opisanej w części eksperymentalnej (**Schemat 45**). Zastosowanie 3'-*O*-acetylowanej tymidyny ma dwie podstawowe zalety. Po pierwsze dzięki obecności grupy acetylowej zdezaktywowana jest reaktywność grupy 3'-hydroksylowej rybozy, co pozwala na selektywną aktywację wyłącznie grupy 5'-OH. Po drugie, zasadolabilna grupa acetylowa jest wewnątrzcząsteczkowym standardem, pośrednio informującym czy fluorofor usuwany jest wg mechanizmu termocyklizacji (grupa acetylowa pozostaje na swoim miejscu) czy też w wyniku hydrolizy (grupa acetylowa ulega hydrolizie).



Schemat 45. Synteza węglanu 3'-*O*-acetylowanej tymidyny z przyłączonym fluoroforem na grupie 5'-hydroksylowej oraz mechanizm wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji.

Syntezę niesymetrycznego węglanu **46** można przeprowadzić dwiema dwuetapowymi drogami:

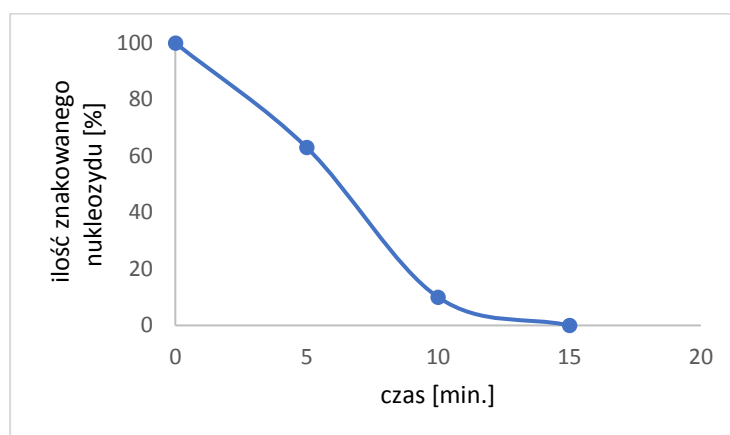
A) pierwsza polega na aktywacji grupy 5'-hydroksylowej nukleozydu 1,1'-karbonyldiimidazolem a następnie w obecności TMG reakcji z aminoalkoholem.

B) w drugiej, najpierw przeprowadzamy aktywację grupy hydroksylowej aminoalkoholu a następnie prowadzimy reakcję z wolną grupą hydroksylową nukleozydu, również w obecności TMG. Z doświadczenia wynika, że kolejność prowadzonej syntezy, jest istotna dla różnych klas pirydynyl-2-ylowych aminoalkoholi. W przypadku przeprowadzanych przeze mnie reakcji zdecydowałam się na drogę **A** i otrzymanie w pierwszej kolejności karbaminianu nukleozydowego (**45**) aby w następnym kroku przyłączyć związek **10**. Główną przyczyną takiego wyboru, był fakt, iż aktywacja grupy hydroksylowej alkoholu

azotu i zahamowanie procesu cyklizacji⁵⁷ oraz cechuje go duża stabilność w szerokim zakresie temperatur.

3.2.1. Wyznaczenie szybkości termocyklizacji w funkcji czasu

Związek **46** po rozpuszczeniu w buforze poddałam ogrzewaniu w temperaturze (90°C), aby określić najkrótszy czas w którym można skutecznie usunąć znacznik bez naruszenia struktury znakowanej biocząsteczki. Temperatura 90 °C została określona jako maksymalna z dwóch powodów: po pierwsze jest to najwyższa temperatura, w której nie zachodzi depurynacja nukleozydu (w przypadku zastosowania guanozyny lub adenozyny) oraz po drugie stosowany roztwór jest roztworem wodnym, a temperatura wyższa niż 90°C spowodowałaby jego wrzenie. Otrzymane wartości szybkości wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji w funkcji czasu pokazały jednoznacznie, iż całkowite odłączenie związku **10** od nukleozydu, w temperaturze granicznej 90°C i pH 6.86, następuje już w przeciągu 15 minut (**Wykres 28**).



Wykres 28. Proces odłączania znacznika od 3'-O-acetylowanej tymidyny w funkcji czasu. Oś y obrazuje stopniowy zanik związku wyjściowego **46**.

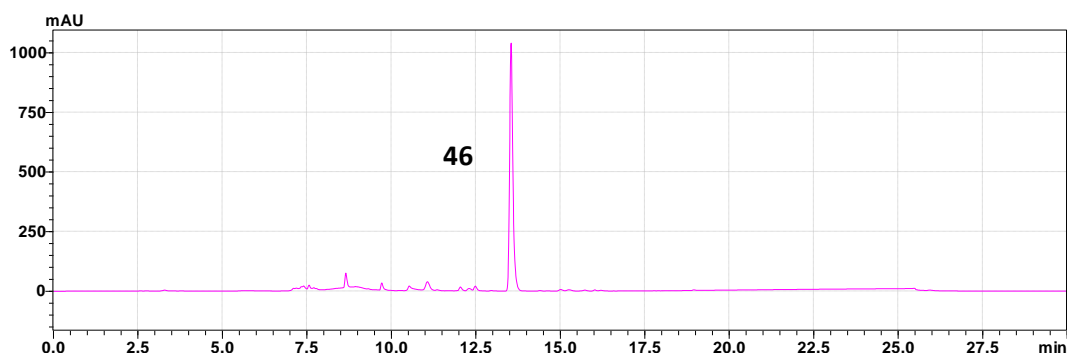
Zaprezentowane chromatogramy (**Rysunek 55**) przedstawiają rezultaty analiz HPLC, na których widoczne jest przekształcenie węglanu nukleozydu (czas retencji 13,54 min.) do 3'-O-acetylowanej tymidyny (czas retencji 8,5 min) oraz produktu cyklicznego (czas retencji 9.6 min). **Rysunek 54** przedstawia wyniki trzech analiz: przed rozpoczęciem ogrzewania (**chromatograf a**), w trakcie ogrzewania (t = 5min, **chromatograf b**) oraz analizę wykonaną po 10 minutach (**chromatograf c**) gdzie zaobserwowano 90% zanik

węglanu **46**. W 15 minucie ogrzewania (**chromatograf d**) nastąpiło 100% odłączenie znacznika od nukleozydu, jednakże zaobserwowałam niewielki sygnał przy czasie retencji 7.6 minuty świadczący o postępującej deacetylacji tymidyny (**chromatograf d**) (**Tabela 16**). Proces ten jest najprawdopodobniej wynikiem powolnej hydrolizy grupy acetylowej.

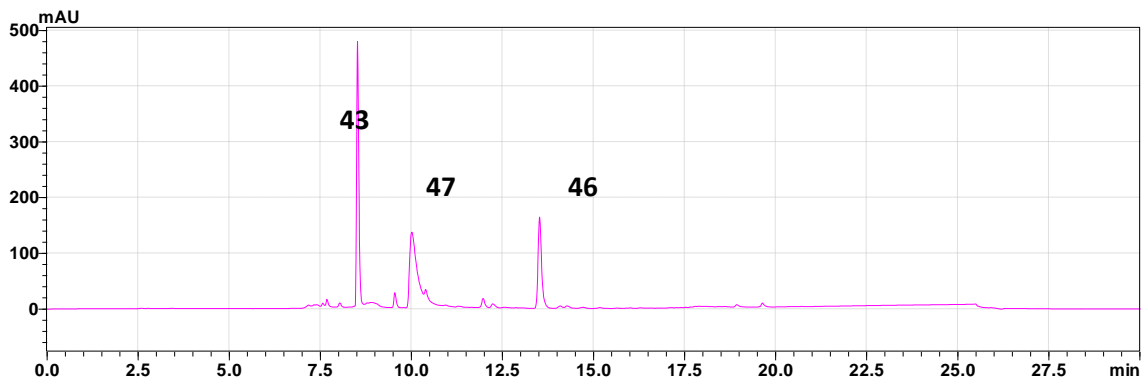
Tabela 16. Czasy retencji poszczególnych składników analizy HPLC.

	Czas retencji [min.]
Węglan 46	13,54
Produkt cykliczny 47	9,6
3-O-Acetylowana tymidyna	8,5
Tymidyna	7,6

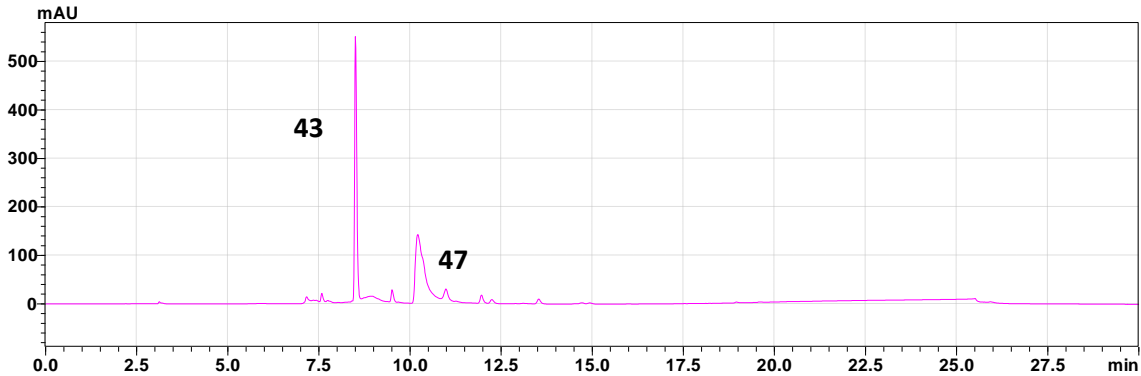
a) chromatogram ilustrujący czas retencji węglanu 46 w temperaturze 20°C



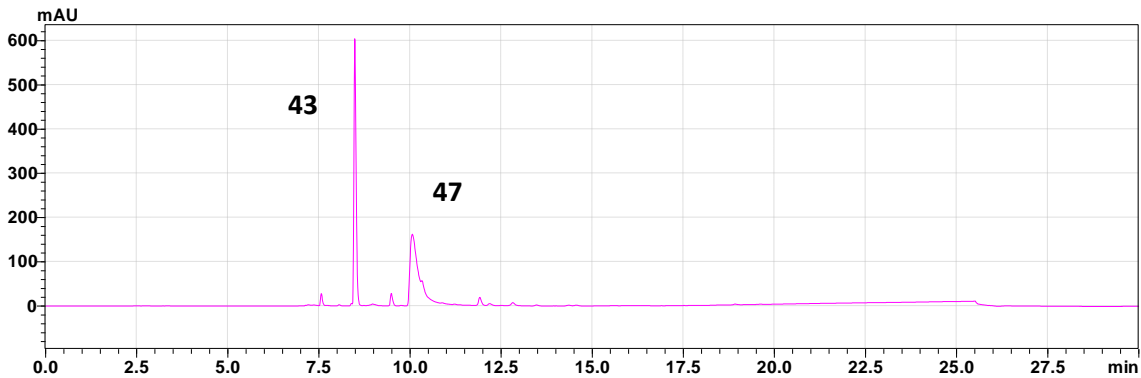
b) chromatogram ilustrujący czasy retencji związków w mieszaninie reakcyjnej: analiza wykonana po 5 minutach ogrzewania w temperaturze 90°C



c) chromatogram ilustrujący czasy retencji związków w mieszaninie reakcyjnej: analiza wykonana po 10 minutach ogrzewania w temperaturze 90°C



d) chromatogram ilustrujący czasy retencji związków w mieszaninie reakcyjnej: analiza wykonana po 15 minutach ogrzewania w temperaturze 90°C

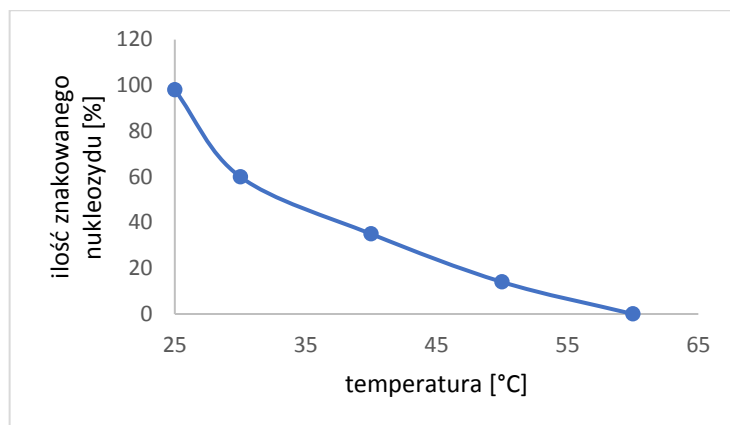


Rysunek 55. Chromatogramy przedstawiające analizy HPLC w trakcie prowadzenia procesu termocyklizacji w funkcji czasu.

3.2.2. Wyznaczanie szybkości termocyklizacji w funkcji temperatury

Po określeniu, najkrótszego z możliwych, czasów niezbędnych do usunięcia fluoroforu ze znakowanej biocząsteczki, rozpoczęłam badania nad wyznaczeniem najniższej możliwej temperatury, w której następuje całkowite odłączenie znacznika. W tym celu wybrałam czas 2 godzin (jest to średni czas przygotowania i obróbki znakowanych kwasów nukleinowych). Wykonałam, analogiczny do poprzedniego, eksperyment tym razem ogrzewając węglan 46 w zmiennych temperaturach (25, 30, 40, 50, 60 °C), przy stałym czasie (2 godziny) i stałym pH (bufor fosforanowy pH=6.86). Na **Wykresie 3** przedstawione są wyniki określające zależność szybkości reakcji cyklizacji od zmiany temperatury. Na podstawie uzyskanych danych można wysnuć wniosek, że już w temperaturze 30°C

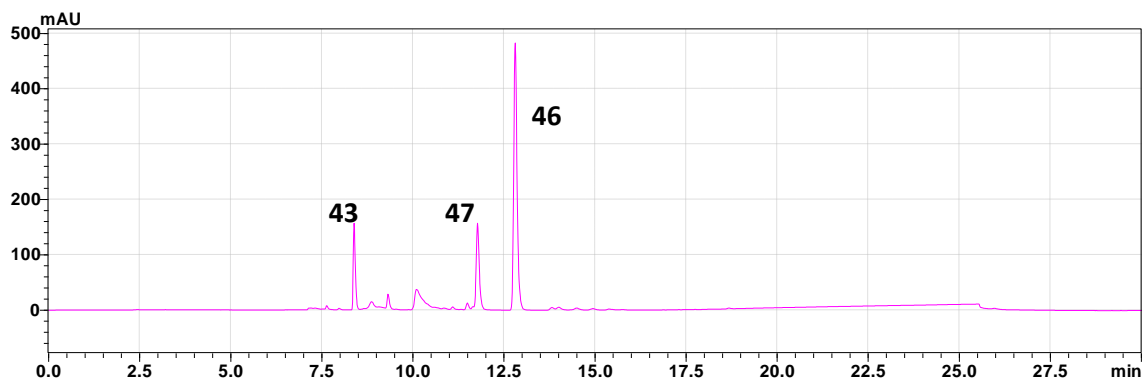
następuje widoczne przyspieszenie procesu termocyklizacji, a dwugodzinne ogrzewanie w temperaturze 60°C, pozwala na całkowite usunięcie barwnika z 3'-O- acetylowanej tymidyny (**Wykres 29**). W związku z powyższym można założyć, iż temperatura około 20°C jest temperaturą optymalną do manipulowania znakowanymi cząsteczkami.



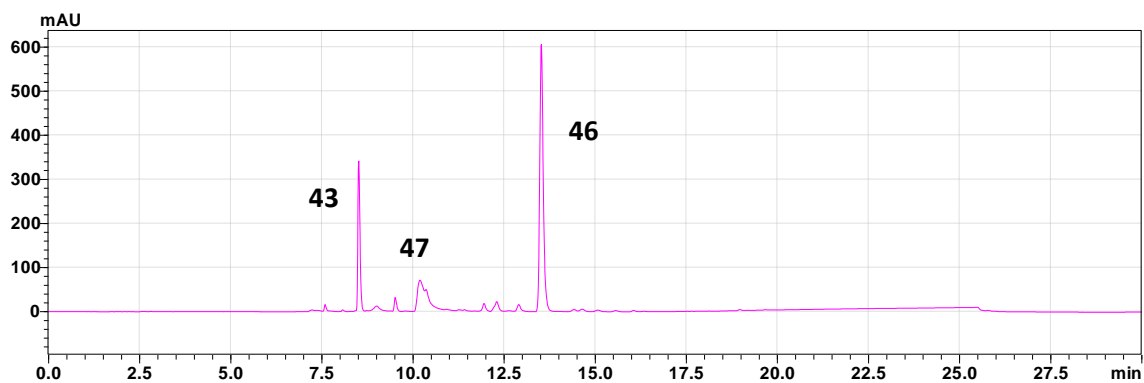
Wykres 29. Proces cyklizacji węglanu 3'-O-acetylowanej tymidyny w funkcji temperatury. Oś y obrazuje stopniowy zanik związku wyjściowego (**46**).

Na przedstawionych chromatogramach (**Rysunek 56**) widać również, iż podniesienie temperatury do 30°C i ogrzewanie związku przez dwie godziny, spowodowało przyspieszenie procesu cyklizacji. W temperaturze 30°C (**chromatogram a**) i 40°C (**chromatogram b**) widać jeszcze dość intensywny sygnał pochodzący od węglanu **46**, jednak obserwowany jest również sygnał o czasie retencji wynoszącym 9,6 minuty, co odpowiada produktowi cyklicznemu oraz 8,6 minuty pochodzący od acetylowanej tymidyny z wolną grupą 5'-hydroksylową (**Tabela 16**). W temperaturze 50°C (**chromatogram c**) widać znaczący przyrost sygnału pochodzącego od acetylowanej tymidyny w stosunku do węglanu, a w temperaturze 60°C (**chromatogram d**) praktycznie cały węglan ulega rozkładowi do produkty cyklicznego (**47**) oraz acetylowanej tymidyny (**43**).

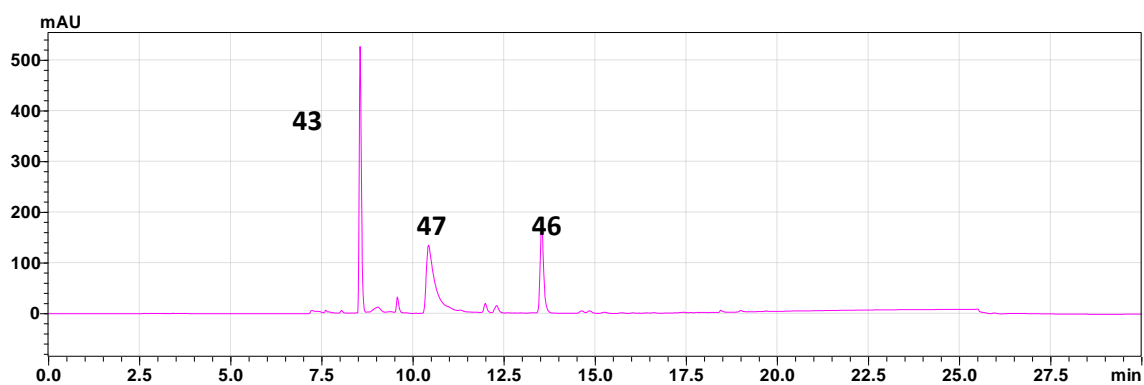
a) chromatogram ilustrujący czasy retencji związków w mieszaninie reakcyjnej: analiza wykonana po 2 godzinach ogrzewania w temperaturze 30°C



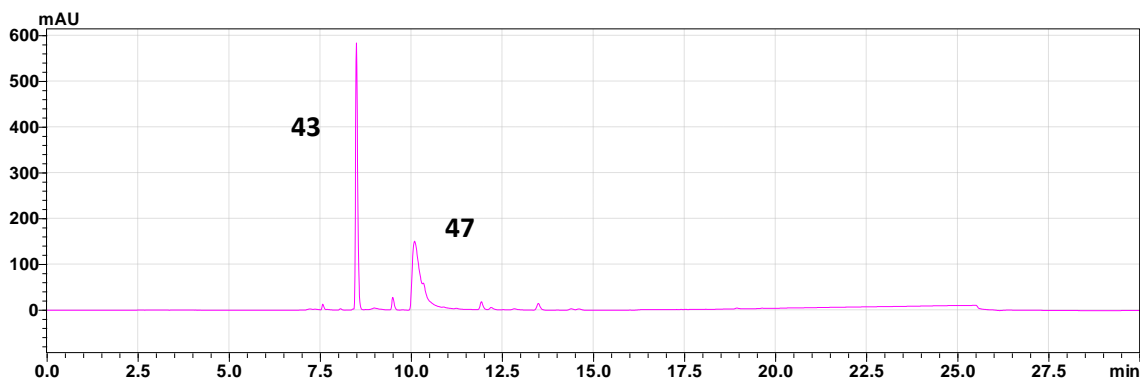
b) chromatogram ilustrujący czasy retencji związków w mieszaninie reakcyjnej: analiza wykonana po 2 godzinach ogrzewania w temperaturze 40°C



c) chromatogram ilustrujący czasy retencji związków w mieszaninie reakcyjnej: analiza wykonana po 2 godzinach ogrzewania w temperaturze 50°C



d) chromatogram ilustrujący czasy retencji związków w mieszaninie reakcyjnej; analiza wykonana po 2 godzinach ogrzewania w temperaturze 60°C

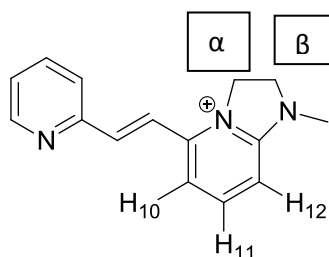


Rysunek 56. Chromatogramy przedstawiające analizy HPLC w trakcie prowadzenia procesu termocyklizacji w funkcji temperatury.

Badanie szybkości cyklizacji w zależności od zmiennej temperatury lub czasu wykazały, że efektywne usunięcie termowrażliwego znacznika fluorescencyjnego jest możliwe w niższych temperaturach (poniżej 90°C), a dzięki możliwości detekcji powstałych produktów proces ten można śledzić za pomocą pomiarów fluorescencyjnych.

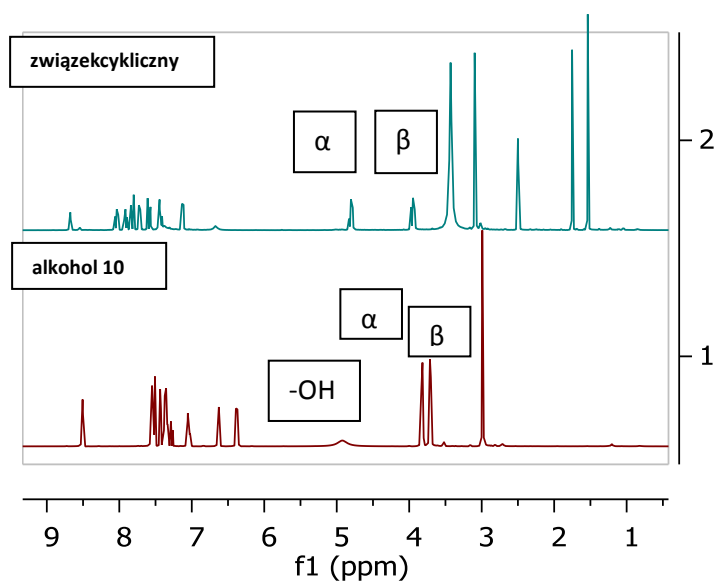
3.2.3. Izolacja i potwierdzenie struktury produktu cyklicznego

Podstawą badania mechanizmu dowolnej reakcji jest dokładna analiza i charakterystyka powstałych produktów. Aby potwierdzić, że usunięcie znacznika następuje na drodze wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, postanowiłam wyizolować produkty pojawiające się w mieszaninie reakcyjnej. W tym celu wykorzystałam mieszaninę pozostałą po rozkładzie termicznym, izolując poszczególne frakcje stosując gradientowy rozdział za pomocą HPLC. Na podstawie analizy widm masowych HRMS-ESI oraz analizy ^1H NMR potwierdziłam, że izolowany produkt charakteryzujący się czasem retencji 10,5 min, to związek bicykliczny (**47**) przedstawiony na **Rysunku 57**. W celu dokładnego potwierdzenia struktury produktu cyklicznego, porównałam jego widmo ^1H NMR z widmem protonowym aminoalkoholu **10**. Na jej podstawie wskazałam różnice w wartościach przesunięć chemicznych protonów grup metylenowych (**Rysunek 58**), które uległy przesunięciu w dół pola: α - z 3.54 ppm na 3.95 ppm oraz β - z 3.71 ppm na 4.80 ppm.



Rysunek 57. Oznaczenia protonów związku cyklicznego (**47**)

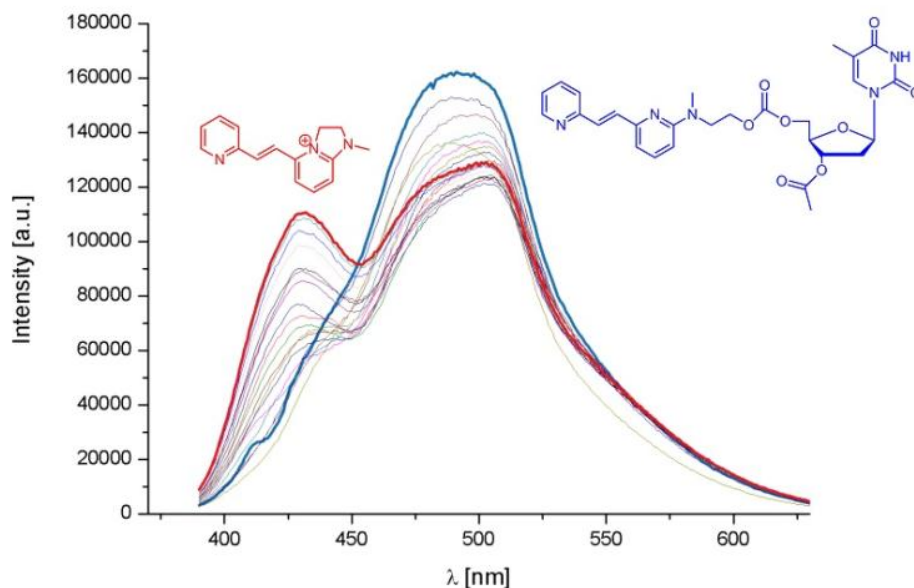
Dla związku **10** protony grup $-CH_2-$ α i β , miały zbliżone przesunięcie chemiczne (różnica niewiele większa od stałej sprzężenia, $\Delta\nu \approx J$). Na widmie produktu cyklicznego wzrosła różnica przesunięć chemicznych między grupami metylenowymi. Kolejną istotną zmianą w widmach formy liniowej i cyklicznej, jest różnica w przesunięciach chemicznych protonów pierścienia pirydyny, ze względu na obecność ładunku dodatniego (zdelokalizowany) i tym samym zmiany w rozkładzie gęstości elektronowej w pierścieniu pirydyny. Sygnał pochodzący od protonu H12 uległ migracji w dół pola i wynosi 7.12 ppm ($\Delta=0.53$ ppm), sygnał protonu H10 przesunął się o $\Delta=0.70$ ppm w dół pola i wynosił 7.45 ppm, natomiast sygnał protonu H11, znajdujący się w pozycji para do azotu pirydynowego, uległ przesunięciu w dół pola 0,54 ppm (**Rysunek 58**), co dodatkowo potwierdziło powstanie układu bicyklicznego **47**. Na podstawie przeprowadzonej analizy mogę stwierdzić, że rozbudowa pirydyny o winylopirydynę nie blokuje właściwości termolabilnych, a usunięcie znacznika PyVnPn następuje na drodze wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, zwanej w literaturze termocyklizacją.



Rysunek 58. Zestawienie widm ^1H NMR: produktu cyklicznego i prekursora aminoalkoholowego.

3.3. Pomiar zmian fluorescencyjnych dla węglanu nukleozydu

Podczas wyznaczania szybkości wewnątrzcząsteczkowej termocyklizacji, widoczne były zmiany w profilach absorpcyjno emisyjnych substratu i produktu bicyklicznego. Zbadałam więc w jakim stopniu możemy śledzić te zmiany wyłącznie przy użyciu spektrofлуorymetrii, gdyż ta metoda byłaby zdecydowanie łatwiejsza do zastosowania niż każdorazowe wykorzystywanie rozdzielacza HPLC. Przeprowadziłam zatem eksperyment detekcji zmian w intensywności oraz długościach fal emisji fluorescencji, a dokładne warunki eksperymentu opisałam w części eksperymentalnej.



Rysunek 59. Zmiany w profilu emisyjnym w procesie cyklizacji. Niebieska linia oznacza wyjściowe maksimum emisji fluorescencji węglanu nukleozydowego związku **10**. Linia czerwona to ostatnia zarejestrowana zmiana podczas procesu cyklizacji pokazująca hipsochromowe przesunięcie maksimum emisji powstającego związku cyklicznego.

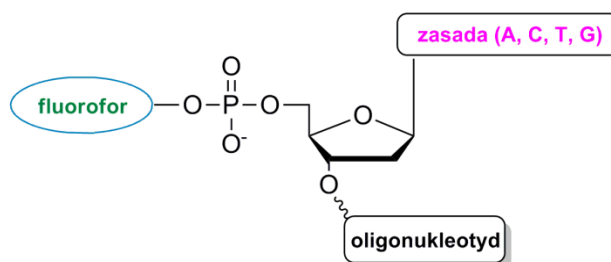
Okazało się, że widać znaczące różnice w długościach fali emisji znakowanego nukleozydu a powstającego w czasie produktu cyklicznego, a różnica wynosi 44 nm. Proces cyklizacji oraz jej przebieg można obserwować za pomocą detekcji zmian maksimum emisji i intensywności fluorescencji. Byłoby to przydatne zwłaszcza w przypadku gdzie izolacja analitu i detekcja na HPLC nie byłyby możliwe. Znaczącą obserwacją jest brak tak zwanego punktu izoemisyjnego, co może świadczyć o tym, że mechanizm reakcji nie przebiega wg. typowego, jednoetapowego przejścia (A-B), a mechanizm tworzenia produktu jest skomplikowany i tworzy się labilny(/e) produkt(y) pośredni(e) o innej absorpcji. Zmiany te nie były obserwowalne dla powyższego związku podczas analiz procesu cyklizacji z wykorzystaniem HPLC -być może ze względu na szybkość reakcji i brak możliwości jej wychwycenia na HPLC. Spektrofluorymetria, dzięki krótszemu czasowi eksperymentu, pozwala zatem na śledzenie szybkich procesów niewidocznych w eksperymentach HPLC.

4. Przyłączanie fluoroforu PyVnPy do nici oligonukleotydu

Wyniki uzyskane podczas badania właściwości fluorescencyjnych aminoalkoholi (PyVnPy) oraz procesu termocyklizacji ich nukleozydowych pochodnych pozwoliły na stwierdzenie że fluorofory PyVnPy mogą pełnić rolę termo wrażliwych znaczników fluorescencyjnych do znakowania np. kwasów nukleinowych. W związku z powyższym zaplanowałam dalsze badania w tym kierunku:

- i) opracowanie sposobu znakowania oligonukleotydów za pomocą pochodnych PyVnPy,
- ii) określenie warunków koniecznych do efektywnego usuwania znacznika PyVnPy, pozostawiając oligonukleotyd w formie nienaruszonej.

Przedstawiony cel badawczy zakłada, iż zsyntetyzowane przeze mnie związki fluorescencyjne mogą być wykorzystane do znakowania kwasów nukleinowych przez np. łącznik fosforanowy (**Rysunek 60**).

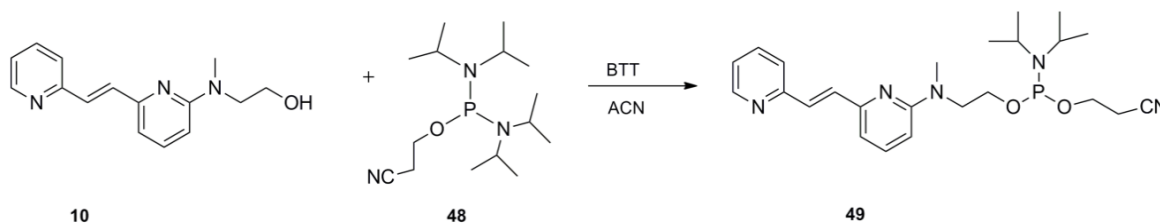


Rysunek 60. Oligonukleotyd znakowany fluorescencyjnie z wykorzystaniem linkera fosforanowego.

Nowe znaczniki fluorescencyjne zgodnie z wcześniejszymi wynikami powinny charakteryzować się jedną, unikalną cechą, której obecnie dostępne komercyjne barwniki nie posiadają, a mianowicie zdolność do ich usunięcia w odpowiednich warunkach pH i temperatury bez wpływu na strukturę uwalnianej cząsteczki. Dodatkowo cechą użyteczną będzie fakt, iż proces ten będzie można ilościowo oznaczyć.

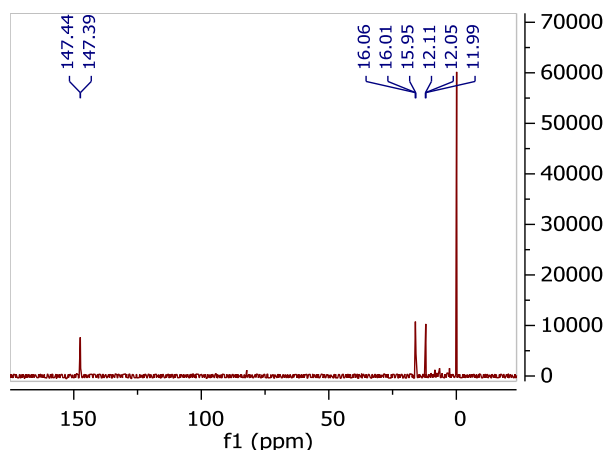
4.1. Synteza (*E*)-2-cyjanoetylo- 2-(metyl(6-(2-(pyridin-2-yl)winy)pyridin-2-yl)amino)etyloizopropylamidofosforynu – metoda A

Pośród metod wykorzystywanych do znakowania oligonukleotydów najbardziej efektywną i wygodną jest przekształcenie barwnika fluorescencyjnego w postać amidofosforynu i przyłączenie go do wolnej grupy hydroksylowej syntetyzowanego oligomeru, w trakcie automatycznej syntezy na fazie stałej. Warunkiem koniecznym wykorzystania danego barwnika jest jego trwałość podczas postsyntetycznego odcinania oligomeru od podłoża, jak i usuwania grup zasado labilnych. Pierwszy etap reakcji opierał się na otrzymaniu amidofosforynu z aminoalkoholu **10**. Syntezę amidofosforynów przeprowadza się w atmosferze argonu, stosując bezwodny acetonitryl lub chlorek metylenu jako rozpuszczalnik. Aminoalkohol **10** oraz aktywator 5-(benzylotio)-1*H*-tetrazol (BTT) poddawany jest liofilizacji bezpośrednio przed reakcją, i łączony z handlowo dostępnym amidofosforynem 2-cyjano-*N,N,N,N*-tetraizopropylowym (**48**) (**Tabela 17**). Postęp reakcji monitorowany jest za pomocą widma fosforowego ³¹P NMR. Badania nad reakcją otrzymania amidofosforynu **49** były przeprowadzane w formie reakcji pilotowych. Syntezę przeprowadziłam trójrotnie dostosowując odpowiednią ilość ekwiwalentów BTT (**Tabela 17**), w celu osiągnięcia jak największej wydajności i zminimalizowania produktów potencjalnej hydrolizy kwasowej. W każdej z reakcji testowych użyłam równomolowych ilości aminoalkoholu **10** oraz amidofosforynu **48**.

Tabela 17. Schemat reakcji syntezy amidofosforynu (**49**) oraz wyniki przeprowadzonych reakcji pilotażowych.

Lp.	Związek 10	Amidofosforyn 49	BTT	Czas [min.]	Sygnały rezonansowe na widmie ³¹ P NMR
1	1 eq	1 eq	0,4 eq	50	δ 147.77 ppm (60%) 16.09 ppm 12.36 ppm
2	1 eq	1 eq	0,4 eq	15	147.78 ppm (85 %) 124.32 ppm (7 %) 16.89 ppm (3 %) 11.795 (5%)
3	1 eq	1 eq	0,8 eq	30	147 ppm (90%) 16 ppm (3%) 12 ppm (7 %)

W pierwszym teście, użyłam aktywatora w postaci 5-(benzylotio)-1*H*-tetrazolu (BTT) w ilości 0,4 eq, a reakcję prowadziłam łącznie przez 50 minut. Po 40 minutach skontrolowałam przebieg reakcji wykonując widmo ³¹P NMR oraz płytkę TLC w układzie eluującym benzen/trietyloamina (9/1 v/v). Na widmie fosforowym pojawił się sygnał rezonujący przy 147 ppm, który świadczy o powstaniu produktu **49** oraz sygnały w rejonie występowania *H*-fosfonianów (będących produktami hydrolizy amidofosforynu) przy 16 oraz 12 ppm (**Rysunek 61**).

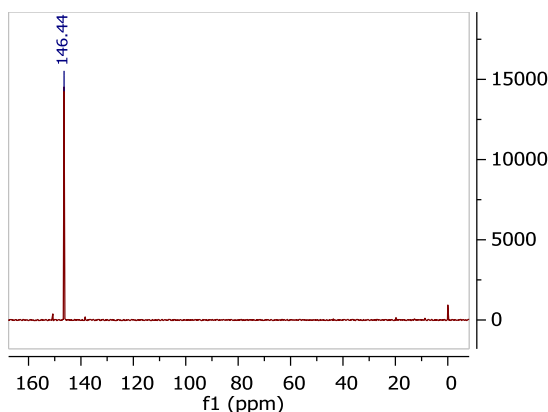


Rysunek 61. Fragment widma ^{31}P NMR przedstawiającego sygnały pochodzące od amidofosforynu **49** (147 ppm) oraz produktów hydrolizy (16 i 12 ppm)

Co więcej, na widmie ^{31}P NMR nie obserwowałam sygnału odpowiadającego związkowi **48** (przesunięcie chemiczne wynoszące 121 ppm) co oznaczało, iż przereagował on w całości z aminoalkoholem **10**, lub jego część uległa hydrolizie, do produktów *H*-fosfonianowych (sygnały obserwowane w widmie). Kontrola reakcji przy użyciu TLC potwierdziła powstawanie produktu głównego, ale wykazała również niepełne przereagowanie aminoalkoholu (**10**). Ze względu na dużą ilość produktów hydrolizy (w postaci *H*-fosfonianów), zdecydowałam się na drugi test, w którym postanowiłam skrócić czas reakcji (**Lp. 2 tabela 17**). W tym przypadku BTT użyłam w ilości 0,4 eq, natomiast czas skróciłam do 15 minut. Po 15 minutach wykonałam widmo ^{31}P NMR, gdzie obserwowałam sygnał pochodzący od produktu głównego **49** którego przesunięcie wynosiło 147 ppm, a także jak w poprzedniej reakcji, sygnały pochodzące od produktów hydrolizy przy 16 oraz 12 ppm. Ze względu na krótszy czas trwania reakcji, na widmie fosforowym pojawił się sygnał pochodzący od nieprzereagowanego amidofosforynu 2-cyjano-*N,N,N,N*-tetraizopropylowego (**48**), przy przesunięciu chemicznym wynoszącym 121 ppm, a na płytce TLC w mieszaninie reakcyjnej widoczny był intensywny sygnał pochodzący od aminoalkoholu **10**. Na podstawie widma ^{31}P NMR, wywnioskowałam, iż ze względu na wysoki stopień nieprzereagowania substratu **10** i **48** jak i hydrolizę produktu **49** do *H*-fosfonianów, skrócenie czasu reakcji nie stanowi optymalnego rozwiązania i nie przyczynia się do zwiększenia jej wydajności. Dlatego też zdecydowałam się na zastosowanie dwukrotnie większej ilości ekwiwalentów BTT (**Lp. 3, tabela 17**) co potencjalnie miało przyspieszyć konwersję substratów. Dodatkowo, do mieszaniny reakcyjnej dodałam sita molekularne eliminując w ten sposób śladowe ilości

wody, która mogłaby dostać się do układu w wyniku otwierania naczynia reakcyjnego. Reakcję prowadziłam aż do potwierdzenia całkowitego przereagowania substratów (30 minut). Tym razem stosunek sygnałów składników mieszaniny reakcyjnej na widmie ^{31}P NMR wskazywał obniżenie ilości produktów hydrolizy związku **49**, co wpłynęło na wzrost wydajności otrzymywania produktu głównego. Finalnie, zdecydowałam się na przeprowadzenie reakcji **nr 3 (Lp.3, Tabela 17)** w większej skali (400 mg aminoalkoholu **10**), przerywając jej przebieg przy użyciu bezwodnej aminy drugorzędowej (diizopropylaminy). Wszystkie operacje związane z oczyszczaniem należy przeprowadzić sprawnie mając świadomość, że amidofosforyn reaguje ze śladami wody w środowisku kwasowym. Aby to wyeliminować, rozdział prowadzi się w obecności aminy (oczyszczanie izokratyczne, w układzie eluującym benzen/ trietyloamina 9/1). Nienukleozydowe amidofosforyny często otrzymuje się w postaci oleistej, która nie sprzyja trwałości tych związków.

W omawianej syntezie, dodatkowo, mamy podatne na rozkład ugrupowanie termolabilne (niestabilne w pH zasadowym oraz wyższej temperaturze). Obydwa czynniki potęgują prawdopodobieństwo rozkładu otrzymanego amidofosforynu. Obecność aminy trzeciorzędowej zmniejsza prawdopodobieństwo kwasowej hydrolizy amidofosforynu **49** podczas rozdziału chromatograficznego z użyciem kwasowego silikażelu. (**Rysunek 62**).

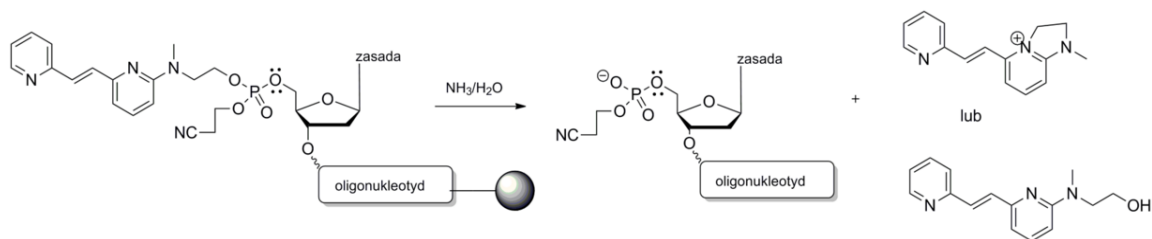


Rysunek 62. Fragment widma ^{31}P NMR otrzymanego amidofosforynu **49**.

4.2. Przyłączenie znacznika do oligonukleotydu – podejście pierwsze

Oczyszczony i wyizolowany amidofosforyn **49** wykorzystałam do funkcjonalizacji końca 5' 12-meru o sekwencji 5' -TTT TTT TTT TTT- 3'. Jest to sekwencja modelowa, która nie zawiera zasadolabilnych grup ochronnych w zasadach heterocyklicznych (np. dla zablokowania reaktywności grupy $-NH_2$). Wybór sekwencji mieszanej wymagałby wydłużenia czasu ekspozycji na działanie zasady (najczęściej stężony amoniak) niezbędnej podczas usuwania grup ochronnych. Na tym etapie badań, chciałam jedynie przetestować termolabilne właściwości barwnika, a zbyt długa ekspozycja na czynniki zasadowe mogłaby spowodować jego niekontrolowane odłączenie na drodze hydrolizy zasadowej. Przed przyłączeniem znacznika, amidofosforyn **49** rozpuściłam w bezwodnym acetonitrylu (roztwór 0,1 M) i umieściłam nad sitami molekularnymi 4Å na 24 godziny. Syntezę oligonukleotydów przeprowadziłam metodą amidofosforynową na podłożu stałym z wykorzystaniem automatycznego syntetyzera DNA/RNA. Po zakończeniu automatycznej syntezy 12-meru przeprowadziłam manualne przyłączenie fluoroforu **49** do oligonukleotydu, a czas trwania kondensacji zwiększyłam do 12 minut. Następnie, oligonukleotyd został odłączony od podłoża i oczyszczony z wykorzystaniem preparatywnego żelu poliakrylamidowego.

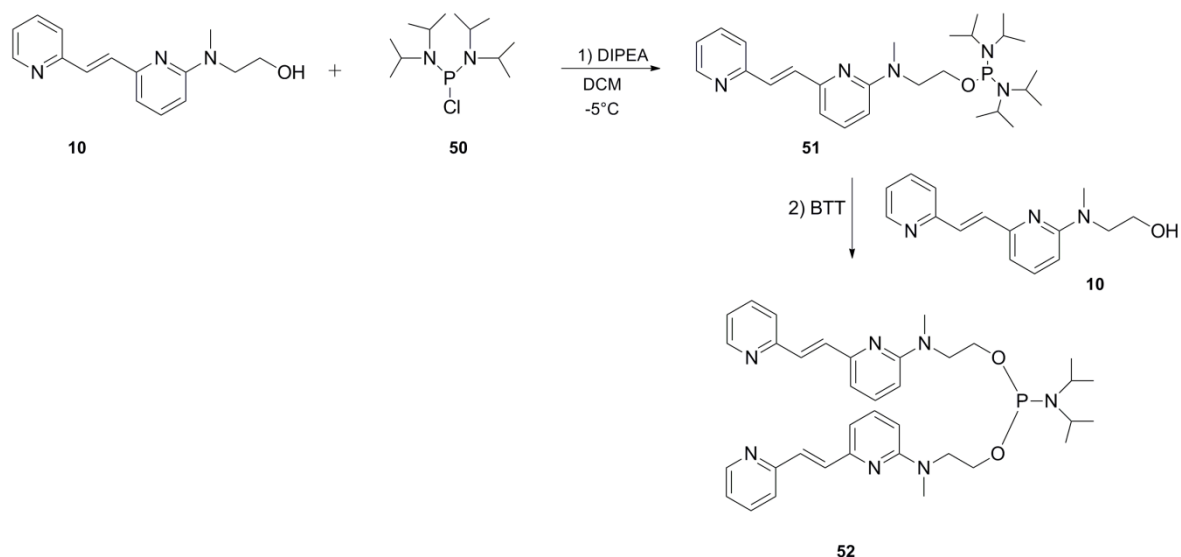
Na podstawie analizy czystości otrzymanego oligomeru wykonanej za pomocą HPLC okazało się, iż podczas procesu odcinania oligomeru od podłoża dochodzi do całkowitego odłączenia barwnika PyVnPy zamiast grupy cyanoetylowej (**Schemat 46**). Dowodem na taki stan rzeczy jest analiza MALDI izolowanych oligonukleotydów, która odpowiada masie oligomeru w postaci diestru fosforowego z pozostałą grupą cyanoetylową na końcu 5'. Dzieje się tak, gdyż triestry fosforanowe są bardzo nietrwałe i szybko następuje ich przekształcenie do trwałego diestru fosforanowego z jednoczesnym usunięciem najbardziej labilnej w warunkach zasadowych grupy. W omawianym przypadku pochodna grupy PyVnPy okazała się bardziej labilna niż stosowana w standardowych warunkach grupa cyanoetylowa.



Schemat 46. Odłączenie barwnika od grupy 5'-fosforanowej na drodze reakcji cyklizacji lub hydrolizy zasadowej.

4.3. Synteza Bis[2-(pirydyno-2 yl)winylo]pirydynolo] *N,N,N',N'*-tetraizopropylamidofosforynu– metoda B

Ponieważ triestry fosforanowe są bardzo nietrwałe w porównaniu z diestrami fosforanowymi oraz ze względu na fakt, iż fluorofor **10** okazał się lepszą grupą opuszczającą niż grupa cyjanoetylowa, nastąpiło przedwczesne odłączenie barwnika z otrzymanego oligomeru. Aby temu przeciwdziałać, postanowiłam zamienić grupę cyjanoetylową na drugą jednostkę alkoholu **10** (**Schemat 47**). Jeżeli faktycznie, wspomniany wcześniej proces odcinania oligonukleotydu od podłoża powoduje szybkie odłączeniem fluoroforu PyVnPy z triestru fosforowego do trwałego diestru, to zastosowanie dwóch podjednostek alkoholu **10** spowoduje że obecny w cząsteczce drugi fluorofor PyVnPy pozostanie nienaruszony. W tym celu zaplanowałam syntezę amidofosforynu Bis[2-(pirydyno-2-yl)winylo]pirydynolo]*N,N,N',N'*tetraizopropylowego (**52**) (**Schemat 48**).



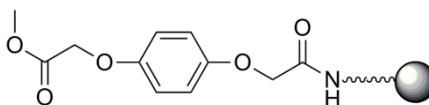
Schemat 47. Synteza Bis[2-(pirydyno-2-yl)winylo]pirydinylo]-*N,N,N',N'* tetraizopropylamidozosteroforynu (**52**).

W celu otrzymania amidozosteroforynu **52** ponownie przeprowadziłam dwuetapową syntezę. Pierwszy etap, ze względu na wysoką reaktywność 1-chloro-*N,N,N',N'*-tetraizopropylfosfinodiaminy (**50**) zachodzi bardzo szybko i w jej wyniku otrzymujemy bisamidozosteroforyn **51**. Obecność *N,N*-diizopropylaminy pozwala na neutralizację powstającego kwasu HCl i tym samym na uniknięcie kwasowej hydrolizy związku **51**. Drugi etap jest wolniejszy, dlatego też wymagał zastosowania aktywatora postaci BTT. Kontrola reakcji przy użyciu spektroskopii ^{31}P NMR potwierdziła powstanie produktu **52**, dającego sygnał rezonujący przy 147 ppm. Dodatkową zaletą tej formy amidozosteroforynu **52** jest fakt, że otrzymujemy go w postaci ciała stałego co znacznie ułatwia proces liofilizacji oraz przechowywania przed zastosowaniem w syntezie oligonukleotydów.

4.4. Przyłączenie znacznika do oligonukleotydu – podejście drugie

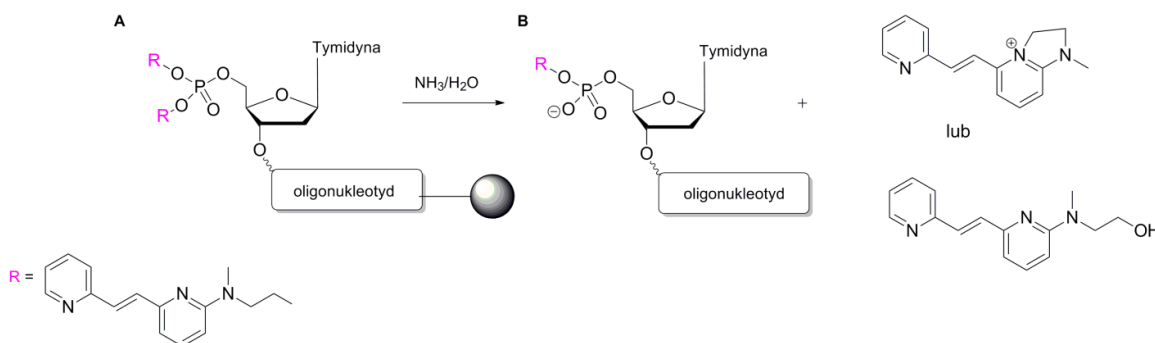
W celu przyłączenia barwnika do oligonukleotydu ponownie przeprowadziłam syntezę oligomeru 12-merowego o sekwencji 5'-TTT TTT TTT TTT-3' na fazie stałej. Ze względu na zaobserwowaną wcześniej niestabilność fluoroforu PvP, zdecydowałam się na zastąpienie podłoża CPG z linkerem bursztynianowym, na podłożu Q-CPG z linkerem będącego pochodną hydrochinonu (**Rysunek 63**). Nowy linkier pozwala na usunięcie oligonukleotydu z fazy stałej pod wpływem działania amoniaku, w bardzo krótkim czasie

(ok. 1 minuta w temperaturze 22°C). Skracza to znacznie czas ekspozycji oligomeru na działanie czynników zasadowych.



Rysunek 63. Struktura linkera na podłożu Q-CPG.

Po zakończeniu reakcji kondensacji i po przeniesieniu syntetycznego oligomeru do roztworu, otrzymany analit poddałam analizie MALDI gdzie obserwowałam masę 3905,561 kDa (wartość masy obliczona teoretycznie dla znakowanego oligonukleotydu wynosiła 3904,6258 kDa). Na podstawie tej analizy można potwierdzić obecność znakowanego fluorescencyjnie oligomeru (**Schemat 48**).



Schemat 48. Odłączenie jednej podjednostki aminoalkoholowej podczas odcinania oligomeru od podłoża, z jednoczesnym zachowaniem drugiego fluoroforu na stabilnym diestrze fosforowym

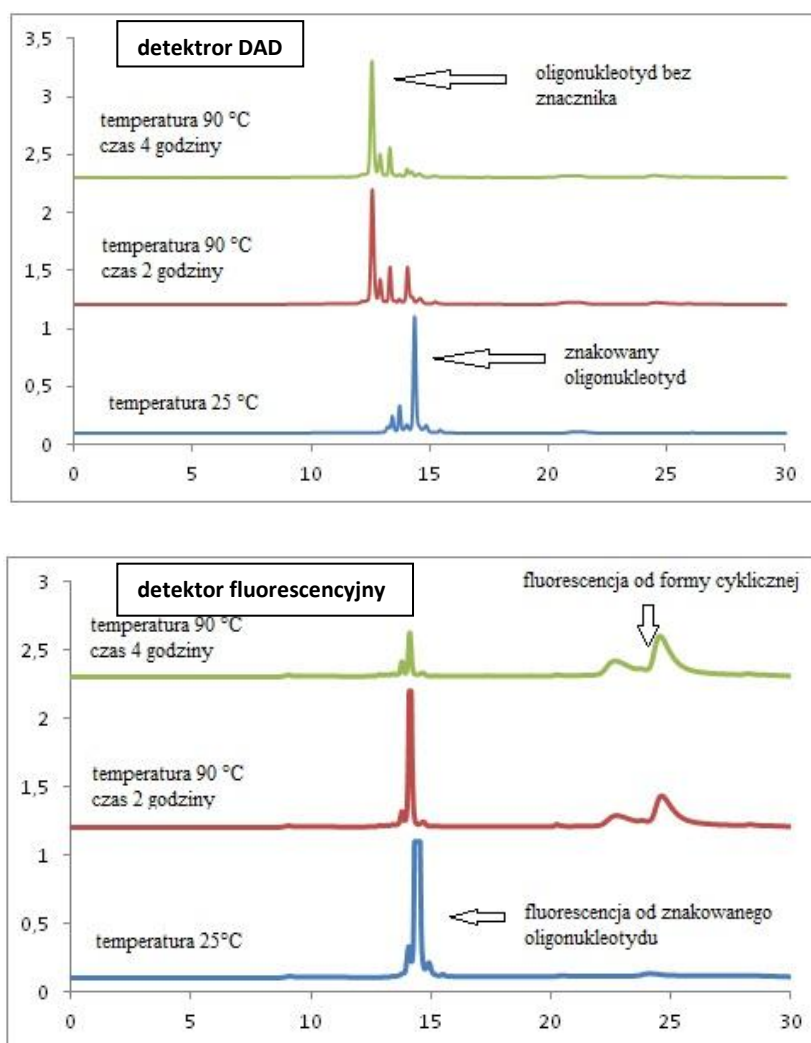
4.5. Badanie możliwości odłączania barwnika z końca 5'-oligonukleotydu

Otrzymanie oligomeru znakowanego fluoroforem PnVny na 5'-końcu pozwoliło na przeprowadzenie dalszych badań nad trwałością diestrów fosforanowych. Ze względu na wysoką stabilność diestrów, odłączenie znacznika z syntetycznego oligomeru, pomimo przeprowadzenia pozytywnych prób na pochodnych węglanowych, nie było rzeczą oczywistą. W celu weryfikacji właściwości termolabilnych znacznika przeprowadziłam ogrzewanie wodnego roztworu oligomeru stosując temperaturę 90°C. Skład mieszaniny poreakcyjnej został zanalizowany z zastosowaniem HPLC zaopatrzonego w dwa detektory:

UV-VIS (DAD) oraz fluorescencyjnego (FLD) (**Tabela 18**). Produkty rozkładu były izolowane i poddane analizie MALDI.

Tabela 18. Czasy retencji składników analizy HPLC reakcji usuwania znacznika z oligomeru.

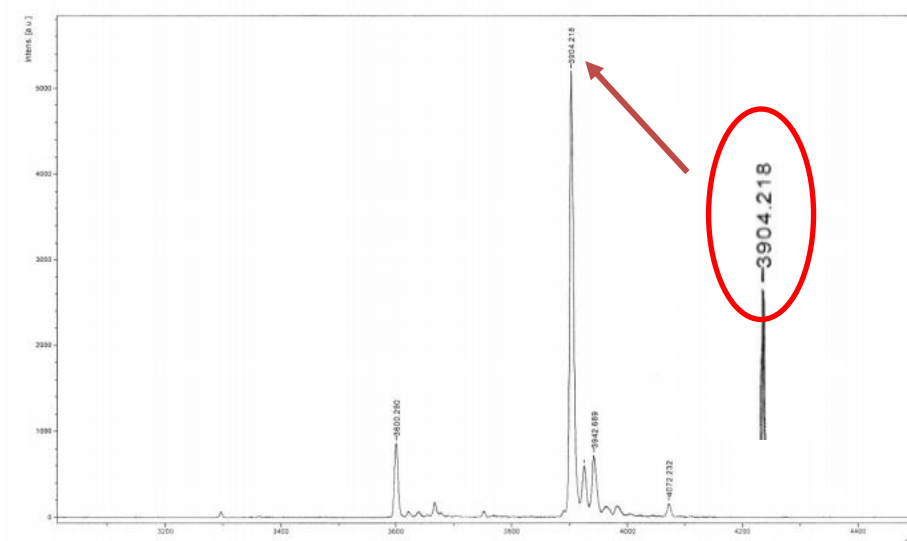
Związek	Czas retencji [min.]
Znakowany oligonukleotyd	14,49
Oligonukleotyd bez znacznika	12,57
Cykliczna forma znacznika	22,64-24,52



Rysunek 64. Czasy retencji dla poszczególnych sygnałów mieszaniny podczas reakcji usuwania znacznika z oligonukleotydu. Przedstawione są dwa chromatogramy, z użyciem odmiennego detektora: DAD lub FLD i opisem odpowiednich sygnałów. Warunki analizy opisane zostały w części eksperymentalnej.

Sygnal który charakteryzował się czasem retencji wynoszącym 14,5 minuty odpowiada znakowanemu fluorescencyjnie oligonukleotydowi, którego sygnał widoczny jest zarówno na detektorze FLD jak i DAD. Po 1 godzinie ogrzewania znakowanego oligonukleotydu zaobserwowałam że 50% oligomeru uległo przekształceniu do oligomeru charakteryzującego się czasem retencji 12,5 minuty (5' fosforylowany oligomer). Dodatkowo, na detektorze UV-VIS oraz FLD pojawia się nowy sygnał przy czasie retencji około 24 minuty, który prawdopodobnie odpowiada bicyklicznemu produktowi będącemu wynikiem termocyklizacji. Po łącznym czasie ogrzewania wynoszącym 4 godziny, 95% znakowanego oligonukleotydu uległo zanikowi co sugerowało odłączenie barwnika.

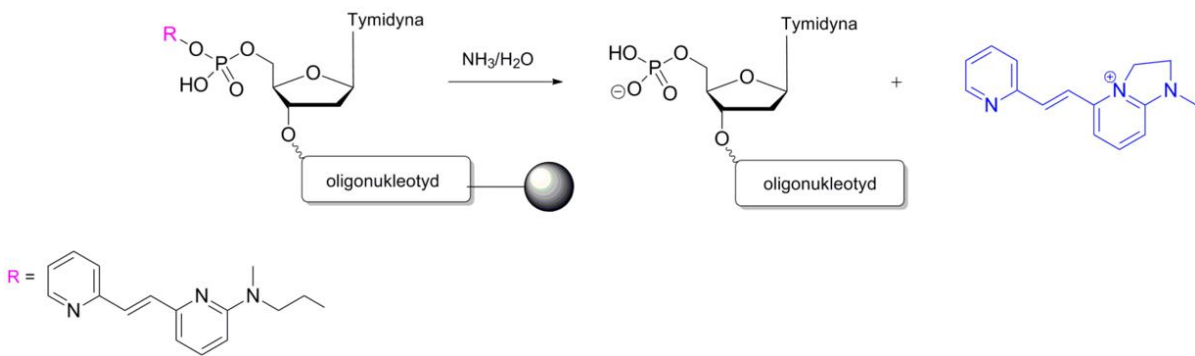
W celu potwierdzenia mechanizmu odblokowania, zebrałam następujące analizy: czas retencji 12,57 oraz 22-24 min., i poddałam analizie MALDI oraz analizie HRMS-ESI. Na widmie MALDI widoczna jest masa nieznakowanego oligomeru w postaci 5'-fosforanu (**Rysunek 65**).



Rysunek 65. Fragment widma MALDI oligonukleotydu po reakcji odblokowania, którego analizę zebrano z HPLC; wartość masy odpowiadająca znakowanemu oligomerowi po usunięciu znacznika.

Wynik uzyskany z analizy ESI produktu cyklicznego udowodnił, że obserwowana masa (238 m/z [M]⁺) odpowiada dokładnie kationowi **47** powstałemu w wyniku wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji. Postulowany mechanizm odblokowania przedstawia poniższy **Schemat 49**. Dzięki przeprowadzonym badaniom, nie tylko opracowałam wydajną metodę syntezy amidofosforanu i jego przyłączenia do oligonukleotydu, lecz

również udowodniłam, że możliwe jest odłączenie barwnika w wyniku zmiany temperatury w środowisku obojętnym. Potwierdziłam nową zaletę moich związków, niedostępną dla innych znaczników fluorescencyjnych stosowanych w znakowaniu oligonukleotydów. Opracowanie metody syntezy fluorescencyjnych analogów pirydyn-2-ylowych wprowadza możliwości tworzenia termo wrażliwych fluoroforów o kontrolowanym sposobie ich odłączania, który nie wpływa destrukcyjnie na strukturę znakowanej biocząsteczki.



Schemat 49. Postulowany mechanizm usuwania znacznika z diestru fosforanowego na końcu 5' oligomeru.

IV. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

1. Uwagi ogólne

1.1. Odczynniki do syntez

Większość reagentów stosowanych do syntez zakupiono w firmie Sigma-Aldrich i stosowano bez dalszego oczyszczania; w razie potrzeby liofilizowano bądź destylowano i przechowywano nad sitami molekularnymi 4 Å.

1.1.1. Rozpuszczalniki organiczne

- Rozpuszczalniki bezwodne, jak *N,N*-dimetyloformamid, toluen, acetonitryl i chlorek metylenu, a także o czystości analitycznej stosowane do wykonywania analiz HPLC, były zakupione w firmie Sigma Aldrich/Merck; w razie potrzeby przechowywane nad sitami molekularnymi 4 Å.
- Pirydyna: zasypana KOH na 24 godziny po czym destylowana znad CaH₂ i przechowywana nad sitami molekularnymi 4Å.
- Benzen: używany głównie do liofilizacji lub oczyszczania nienukleozydowego amidofosforynu; zasypany KOH na 24 godziny po czym destylowany znad CaH₂ i przechowywany nad sitami molekularnymi 4Å.
- Pozostałe rozpuszczalniki używane do pomiarów fluorescencyjnych, oczyszczania mieszanin reakcyjnych na drodze ekstrakcji lub chromatografii kolumnowej, zakupione w firmie POCH, ChemPur lub Sigma Aldrich.

1.1.2. Odczynniki stosowane do pomiarów fluorescencyjnych

- Rozpuszczalniki organiczne: *N,N*-dimetyloformamid, pirydyna, chlorek metylenu, metanol, tetrahydrofuran, dimetylosulfotlenek, ksylen, woda.
- Ludox HS-40 roztwór koloidowy SiO₂
- *N*-metyloakrydyna
- Bufor fosforanowy pH = 5,8-8; w celu adjustacji pH używano odpowiednio 0,1 M roztworu NaOH lub H₃PO₄.

1.2. Chromatografia cienkowarstwowa i kolumnowa

Postęp reakcji monitorowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na płytkach szklanych o wymiarach 2,5 cm × 7,0 cm. Płytki były pokryte 0,25 mm warstwą żelu krzemionkowego - *silica gel* 60 F254 (Merck). Obraz na płytkach odczytywany po naświetlaniu światłem UV, o długościach fali 254 lub 356 nm, bądź wywoływany roztworami: 10% kwasu siarkowego (VI) lub azotanu srebra w alkoholu etylowym, a następnie ogrzewane na płycie grzejnej w celu zobrazowania analizowanych substancji.

Rozdziały chromatograficzne prowadzone na kolumnie chromatograficznej używając żelu krzemionkowego 60 (70-230 mesh).

1.3. Reaktory mikrofalowe

Użyto reaktorów: ERTEC z otwartym naczyniem i chłodnicą zwrotną, zakres mocy 0-750 W z płynną regulacją, częstotliwość pola 2,45 GHz, opcja monitorowania mocy odbitej. Pomiar temperatury reakcji prowadzono za pomocą pirometru z możliwością monitorowania w zakresie 0-500°C oraz reaktor CEM Discover z zamkniętą komorą ciśnieniową, mocy wyjściowej 300 W, częstotliwością magnetronu 2,45 GHz, kontrolą temperatury w zakresie 15-450°C i sterowaniem ciśnieniem w zakresie do 21 bar (200 pomiarów ciśnienia na minutę).

1.4. Wysokosprawna Chromatografia Cieczowa

Wysokosprawną chromatografię cieczową (dla aminoalkoholi, węglanów nukleozydów oraz oligonukleotydów) w układzie faz odwróconych (RP HPLC) wykonywano na aparaturze firmy Shimadzu (UFLC), która była wyposażona w detektor UV-Vis (DAD) oraz detektor fluorescencyjny (FLD). Chromatogramy zostały rejestrowane przy długości fali wynoszącej 260 nm, natomiast dla związków fluorescencyjnych długość fali wzbudzenia i emisji w zakresie fal: 350 – 480 nm. Do analizy wykorzystano kolumnę Synergi 4u Fusion-RP 80 Å PHENOMENEX o wymiarach 150 x 4.6 mm z prekolumną. Analizy wykonywano w układzie gradientowym: bufor A - 0.01 M octan trietyloamoniowy; bufor B: 0.01M octan trietyloamoniowy w 40% roztworze acetonitrylu. Czas trwania jednej analizy

wynosił 30 minut (gradient liniowy 0-100%), a przepływ cieczy został ustawiony na 1mL/min.

1.5. Spektroskopia NMR oraz Spektrometria Mas

Widma spektroskopowe ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC i HMBC, ^1H - ^{15}N HSQC i HMBC, ^{31}P oraz ^{19}F NMR wykonane zostały w Pracowni NMR w Instytucie Chemii Bioorganicznej w Poznaniu na spektrometrach firmy Bruker Avance o częstotliwościach 400 i 500 MHz. Widma rejestrowano w temperaturze 25°C, przesunięcia chemiczne podano w ppm, a sprzężenia w Hz. Widma ^{31}P dla zsyntetyzowanych amidofosforynów były rejestrowane względem wzorca zewnętrznego (85% H_3PO_4 w D_2O). W celu przygotowania próbek do badań wykorzystywałam deuterowane rozpuszczalniki zakupione w firmie Sigma-Aldrich: $\text{DMSO-}d_6$, CdCl_3 , MeOD , $\text{benzen-}d_6$, $\text{Acetonitryl-}d_3$. Próbki przygotowałam rozpuszczając od 10 do 30 mg związku w maksymalnie 0,6 mL deuterowanego rozpuszczalnika. Skróty stosowane w opisie sprzężeń: *s* (singlet), *d* (dublet), *t* (triplet), *br.*(szeroki), *dd* (dublet dubletów), *ddd* (dublet dubletów dubletów), *dt* (dublet trypletów), *td* (tryplet dubletów) oraz *m* (multiplet).

Widma masowe wykonano z zastosowaniem elektrorozpylania (ESI), na spektrometrze mas typu Orbitrap firmy Thermo Scientific, sprzężonym ze źródłem jonów TriVersa NanoMate (Advion) oraz analizatorem q-TOF. Stosowano następujące parametry: napięcie źródła ESI 3,2 kV, nebulizacja azotem w 0,4 bar, natężenie przepływu suchego gazu 4,0 l/min w temperaturze 220 °C, dla węglanów 80-100°C. Stężenie próbek wynosiło około 10^{-5} M, a używanym rozpuszczalnikiem był metanol.

Widma masowe MALDI-TOF w trybie jonizacji dodatniej wykonano na spektrometrze Bruker UltrafleXtreme stosując kwas 3-hydroksypikolinowy jako matrycę i jako kalibrant: peptide calibration standard (Bruker).

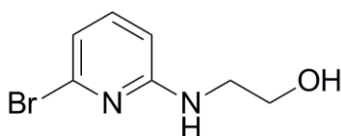
1.6. Krystalografia – pomiary rentgenowskie i metody obliczeniowe

Kryształ dla związku **10** otrzymano z chlorku metylenu przez powolne odparowanie w temperaturze pokojowej a następnie schłodzenie do temperatury -20°C . Analizy przeprowadzono w temperaturze 130K na dyfraktometrze SuperNova142 z lustrzanym monochromatorem na promieniowanie CuK α ($\lambda = 1.5418\text{\AA}$). Skorygowano efekt polaryzacji Lorentza i absorbcję. Parametry komórki elementarnej wyznaczono metodą najmniejszych kwadratów. Do rozwiązywania struktury użyto programu SIR92143. Udoskonalenie z procedurą pełnej matrycy F2 przeprowadzono na SHELXL97144. Funkcja $\sum w(|F_o|^2 - |F_c|^2)^2$, gdzie $w^{-1} = [\sigma^2(F_o)^2 + A \cdot P^2 + B \cdot P]$ i $P = [\text{Max} (F_o^2, 0) + 2F_c^2]/3$, została zminimalizowana. Wszystkie atomy nie będące atomami wodoru uszczegółowiono anizotropowo, a pozycje atomów wodoru zostały obliczone i doprecyzowane dzięki modelowi sztywnego unoszenia.

Pomiary zawartości wody dla rozpuszczalników bezwodnych, przeprowadzono metodą Karla-Fischera na kulometrze TitroLine KF.

2. Synteza chemiczna

2.1. Otrzymywanie 2-(6-bromo-pirydyn-2-ylo-amino)-etanolu



W kolbie okrągłodennej umieszczono 2,6-dibromopirydynę (0,03 mol; 7 g) w 20 mL pirydyny, etanoloaminę (0,033 mol, 2 mL) oraz *N,N*-diizopropylaminoetanoloaminę (0,045 mol, 7,3 mL).

Całość mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego i ogrzewano do 120°C w reaktorze mikrofalowym przez 5 godzin, kontrolując reakcję przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalniki odparowano i wykonano ekstrakcję: DCM/nasycony NaHCO_3 (1/1 v/v). Następnie produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej wypełnionej silikazalem, stosując jako eluent mieszaninę heksan/octan etylu (gradientowo, zaczynając heksan kończąc 7/3 v/v), zebrane frakcje zawierające produkt odparowano na wyparce obrotowej. W celu pozbycia się pozostałości rozpuszczalników, produkt poddano liofilizacji z benzenu. Otrzymano 4,4 g 2-

(6-bromo-pirydyn-2-ylamino)-etanolu (**21**) w postaci bezbarwnego oleju, z wydajnością 73%, który scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR i MS:

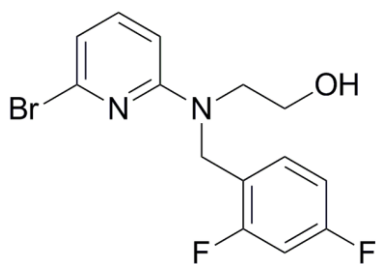
^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 7.19 (dd, $J = 8.2, 7.5$ Hz, 1H), 6.68 (dd, $J = 7.5, 0.6$ Hz, 1H), 6.32 (dd, $J = 8.3, 0.6$ Hz, 1H), 5.24 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, -NH), 3.98 (s, 1H, -OH), 3.78 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H), 3.41 (td, $J = 5.6, 4.4$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 158.96, 139.68, 139.50, 115.74, 105.77, 61.98, 44.59;

HRMS-ESI m/z ; obliczone: 216,9976 $\text{C}_7\text{H}_9\text{BrN}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; obserwowane: 238,9802 $\text{C}_7\text{H}_9\text{BrN}_2\text{ONa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$

2.2. Ogólna metoda aryłacji 2-pirydynylowych aminoalkoholi

W kolbie okrągłodennej umieszczono odpowiedni aminoetanol (1 eq) w 10 mL DMF, bromek (1,2 eq) oraz diizopropylloetyloaminę (1,5 eq). Całość mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego i ogrzewano do 120 °C w łaźni olejowej pod chłodnicą zwrotną przez około 24 godziny, kontrolując reakcję przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalniki odparowano i wykonano ekstrakcję: DCM/nasycony NaHCO_3 (1/1 v/v). Następnie produkt oczyszczano przy użyciu chromatografii kolumnowej wypełnionej silikazelem, stosując jako eluent mieszaninę heksan/octan etylu (gradientowo, zaczynając heksan, kończąc 7/3 v/v), a zebrane frakcje zawierające produkt odparowano na wyparce obrotowej. W celu pozbycia się pozostałości rozpuszczalników, produkt poddano liofilizacji z benzenu.

2.3. Otrzymywanie 2-[(6-bromo-pirydyn-2-yl)-(2,4-difluoro-benzyl)-amino]-etanolu



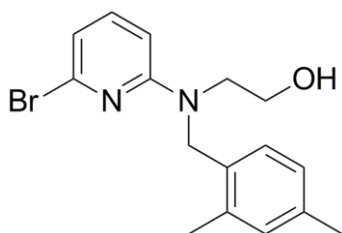
W kolbie okrągłodennej umieszczono 2-(6-bromo-pirydyn-2-ylamino)-etanolu (**21**) (0,0046 mol, 1 g) w 10 mL DMF, bromek-2,4-difluorobenzylowy (0,0055 mol, 0,7 mL) oraz *N,N*-diizopropylloetyloaminę (0,007 mol, 1,13 mL). Całość mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego i ogrzewano do 120°C w łaźni olejowej pod chłodnicą zwrotną przez około 24 godziny,

kontrolując reakcję przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalniki odparowano i wykonano ekstrakcję: DCM/ nasycony NaHCO₃ (1/1 v/v). Następnie produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej wypełnionej silikazelem, stosując jako eluent mieszaninę heksan/octan etylu (gradientowo, zaczynając heksan kończąc 7/3 v/v), a zebrane frakcje zawierające produkt odparowano na wyparce obrotowej. W celu pozbycia się pozostałości rozpuszczalników, produkt poddano liofilizacji z benzenu. Otrzymano 950 mg 2-[(6-bromo-pirydyn-2-yl)-(2,4-difluorobenzyl)-amino]-etanolu (**24**) w postaci oleju, z wydajnością 63%, który scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR i MS:

¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 7.30 – 7.26 (m, 1H), 7.20 (td, *J* = 8.7, 6.4 Hz, 1H), 6.90 – 6.82 (m, 2H), 6.79 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.42 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.71 (s, 2H, H₉), 3.90 (dd, *J* = 5.5, 4.5 Hz, 2H), 3.80 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 162.51 (dd, *J* = 194.7, 11.8 Hz), 160.54 (dd, *J* = 194.3, 11.9 Hz), 158.54, 139.88, 139.37, 129.28 (dd, *J* = 9.6, 5.9 Hz), 119.96 (dd, *J* = 14.9, 3.7 Hz), 115.92, 111.45 (dd, *J* = 21.1, 3.7 Hz), 104.86, 104.61 – 103.48 (m), 62.15, 52.28, 47.04;

HRMS-ESI *m/z*; obliczone: 343,0258 C₁₄H₁₃BrF₂N₂O [M+H]⁺; obserwowane: 343,0255 [M+H]⁺

2.4 Otrzymywanie 2-[(6-bromo-pirydyn-2-yl)-(2,4-dimetylobenzyl)-amino]-etanolu



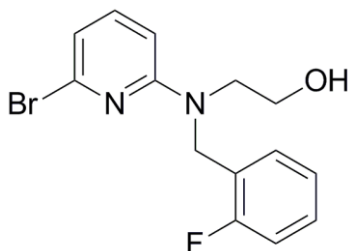
W kolbie okrągłodennej umieszczono 2-(6-bromo-pirydyn-2-ylamino)-etanol (**21**) (0,0029 mol; 0,63 g) w 10 mL DMF, bromek 2,4-dimetylobenzylowy (0,0035 mol; 0,53 mL) oraz *N,N*-diizopropyletyloaminę (0,0045 mol; 0,71 mL). Całość mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego i ogrzewano do 110 °C w łaźni olejowej pod chłodnicą zwrotną przez około 48 godzin, kontrolując reakcję przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalniki odparowano i wykonano ekstrakcję: DCM/ nasycony NaHCO₃ (1/1 v/v). Następnie produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej wypełnionej silikazelem, stosując jako eluent mieszaninę heksan/octan etylu (gradientowo, zaczynając heksan kończąc 7/3 v/v),

a zebrane frakcje zawierające produkt odparowano na wyparce obrotowej. W celu pozbycia się pozostałości rozpuszczalników, produkt poddano liofilizacji z benzenu. Otrzymano 560 mg 2-[(6-bromo-pirydin-2-ylo)-(2,4-dimetylbenzyl)-amino]-etanolu (**28**) w postaci oleju, z wydajnością 58%, który scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR i MS:

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 7.20 (dd, $J = 8.4, 7.5$ Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.96 (dd, $J = 7.9, 1.7$ Hz, 1H), 6.91 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.74 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.27 (d, $J = 8.4$ Hz), 4.55 (s, 2H), 3.87 (td, $J = 4.7, 1.0$ Hz, 2H), 3.82 – 3.72 (m, 2H), 2.31 (s, 3H), 2.28 (s, 3H, m-CH₃). ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 159.10, 139.75, 139.15, 136.87, 135.37, 131.49, 130.89, 126.82, 125.48, 115.43, 105.09, 62.81, 52.35, 51.46, 20.88, 18.88;

HRMS-ESI m/z ; obliczone: 335,0759 C₁₆H₁₉BrN₂O [M+H]⁺; obserwowane: 335,0757 [M+H]⁺

2.5. Otrzymywanie 2-[(6-bromo-pirydyn-2-ylo)-(2-fluoro-benzyl)-amino]-etanolu

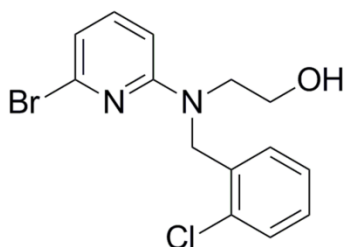


W kolbie okrągłodennej umieszczono 2-(6-bromo-pirydyn-2-ylamino)-etanol (**21**) (0,0037 mol; 0,8 g) w 10 mL DMF, bromek 2-fluorobenzylowy (0,0044 mol; 0,53 mL) oraz *N,N*-diizopropylaminy (0,0055 mol; 0,90 mL). Całość mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego i ogrzewano do 120 °C w łaźni olejowej pod chłodnicą zwrotną przez około 48 godzin, kontrolując reakcję przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalniki odparowano i wykonano ekstrakcję: DCM/ nasycony NaHCO₃ (1/1 v/v). Następnie produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej wypełnionej silikażelem, stosując jako eluent mieszaninę heksan/octan etylu (gradientowo, zaczynając heksan kończąc 7/3 v/v), a zebrane frakcje zawierające produkt odparowano na wyparce obrotowej. W celu pozbycia się pozostałości rozpuszczalników, produkt poddano liofilizacji z benzenu. Otrzymano 640 mg 2-[(6-bromo-pirydyn-2-ylo)-(2-fluoro-benzyl)-amino]-etanolu (**26**) w postaci oleju, z wydajnością 54% i scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR i MS:

^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 7.34 – 7.27 (m, 2H), 7.21 (td, $J = 7.7, 1.8$ Hz), 7.16 – 7.10 (m, 2H), 6.80 (d, $J = 7.4$ Hz), 6.43 (d, $J = 8.4$ Hz), 4.77 (s, 2H), 3.92 (dd, $J = 5.5, 4.3$ Hz, 2H), 3.87 – 3.81 (m, 2H), 3.39 (s, 1H, -OH). ^{13}C NMR [ppm] (126 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 161.75 (d, $J_{\text{C-F}}=250$ Hz), 159.80, 158.76, 139.75, 139.36, 128.95 (d, $J = 7.9$ Hz), 128.11, 124.31 (d, $J = 3.6$ Hz), 115.68, 115.45 (d, $J = 21.2$ Hz), 104.83, 62.38, 52.38, 47.44 (d, $J = 4.8$ Hz);

HRMS-ESI m/z ; obliczone: 325,0352 $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{BrFN}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; obserwowane: 325,0349 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2.6. Otrzymywanie 2-[(6-bromo-pirydyn-2-ylo)-(2-chloro-benzyl)-amino]-etanolu



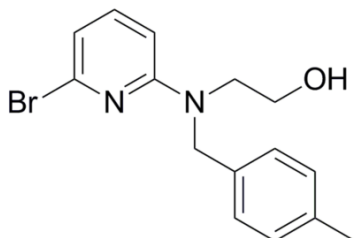
W kolbie okrągłodennej umieszczono 2-(6-bromo-pirydyn-2-ylamino)-etanolu (**21**) (0,0037 mol; 0,8 g) w 10 mL DMF, bromek-2-chlorobenzylowy (0,0043 mol; 0,56 mL) oraz *N,N*-diizopropyletyloaminę (0,0055 mol; 0,8 mL). Całość mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego

i ogrzewano do 120 °C w łaźni olejowej pod chłodnicą zwrotną przez około 48 godzin, kontrolując reakcję przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalniki odparowano i wykonano ekstrakcję: DCM/ nasycony NaHCO_3 (1/1 v/v). Następnie produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej wypełnionej silikazalem, stosując jako eluent mieszaninę heksan/octan etylu (gradientowo, zaczynając heksan kończąc 7/3 v/v), a zebrane frakcje zawierające produkt odparowano na wyparce obrotowej. W celu pozbycia się pozostałości rozpuszczalników, produkt poddano liofilizacji z benzenu. Otrzymano 716 mg 2-[(6-bromo-pirydyn-2-ylo)-(2-chloro-benzyl)-amino]-etanolu (**27**) w postaci oleju, z wydajnością 57% i scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR i MS:

^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 7.30 – 7.19 (m, 4H), 7.11 (dt, $J = 6.9, 1.9$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.36 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.68 (s, 2H), 3.88 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, H8), 3.78 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 158.68, 139.77, 139.46, 134.72, 130.09, 127.53, 126.56, 124.60, 115.78, 104.80, 62.18, 52.86, 52.16;

HRMS-ESI m/z; obliczone: 341,0056 C₁₄H₁₄BrClN₂O [M+H]⁺; obserwowane: 341,0055 [M+H]⁺

2.7. Otrzymywanie 2-[(6-bromo-pirydyn-2-ylo)-(4-metylo-benzyl)-amino]-etanolu

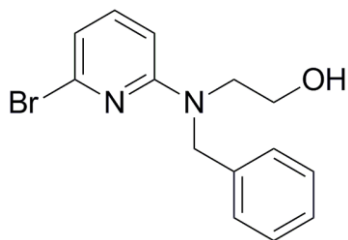


W kolbie okrągłodennej umieszczono 2-(6-bromo-pirydyn-2-ylamino)-etanol (**25**) (0,0046 mol; 1 g) w 10 mL DMF, bromek-4-metylobenzylowy (0,0069 mol; 1,28 g) oraz diizopropylloetyloaminę (0,007 mol; 1,13 mL). Całość mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego i ogrzewano do 110 °C w łaźni olejowej pod chłodnicą zwrotną przez około 24 godziny, kontrolując reakcję przy użyciu chromatografii cienkowsarstwowej. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalniki odparowano i wykonano ekstrakcję: DCM/ nasycony NaHCO₃ (1/1 v/v). Następnie produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej wypełnionej silikażelem, stosując jako eluent mieszaninę heksan/octan etylu (gradientowo, zaczynając heksan kończąc 7/3 v/v), a zebrane frakcje zawierające produkt odparowano na wyparce obrotowej. W celu pozbycia się pozostałości rozpuszczalników, produkt poddano liofilizacji z benzenu. Otrzymano 990 mg 2-[(6-bromo-pirydyn-2-ylo)-(4-metyl-benzyl)-amino]-etanolu (**25**) w postaci oleju, z wydajnością 68% i scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR i MS:

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 7.22 (dd, *J* = 8.4, 7.5 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.10 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.75 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.40 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H3), 4.64 (s, 2H, H9), 3.88 (td, *J* = 4.8, 1.1 Hz, 2H), 3.84 – 3.77 (m, 2H), 3.15 (s, 1H, -OH), 2.34 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 158.50, 139.32, 138.56, 136.64, 133.24 129.07, 125.92, 115.08, 104.80, 62.15, 52.88, 52.10, 20.57;

HRMS-ESI m/z; obliczone: 321,0602 C₁₅H₁₇BrN₂O [M+H]⁺; obserwowane: 321,0600 [M+H]⁺

2.8. Otrzymywanie 2-[benzylo-(6-bromo-pirydyn-2-ylo)-amino]-etanolu



W kolbie okrągłodennej umieszczono 2-(6-bromo-pirydyn-2-ylamino)-etanol (**21**) (0,0046 mol; 1 g) w 10 mL DMF, bromek benzyłu (0,0069 mol; 0,83 mL) oraz *N,N*-diizopropyletyloaminę (0,007 mol; 1,13 mL). Całość

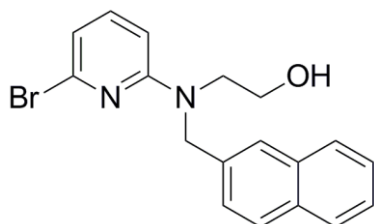
mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego i ogrzewano do 110 °C w łaźni olejowej pod chłodnicą zwrotną przez około 72 godzin, kontrolując reakcję przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalniki odparowano i wykonano ekstrakcję: DCM/ nasycony NaHCO₃ (1/1 v/v). Następnie produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej wypełnionej silikazalem, stosując jako eluent mieszaninę heksan/octan etylu (gradientowo, zaczynając heksan kończąc 7/3 v/v), a zebrane frakcje zawierające produkt odparowano na wyparce obrotowej. W celu pozbycia się pozostałości rozpuszczalników, produkt poddano liofilizacji z benzenu. Otrzymano 790 mg 2-[benzylo-(6-bromo-pirydyn-2-ylo)-amino]-etanolu (**22**) w postaci oleju, z wydajnością 55% i scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR i MS:

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 7.38 – 7.20 (m, 6H), 6.76 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.39 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.69 (s, 2H), 3.93 – 3.85 (m, 2H), 3.84 – 3.77 (m, 2H), 3.17 (s, 1H).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 158.53, 139.29, 138.74, 136.49, 128.38, 126.91, 125.95, 115.12, 104.66, 62.11, 53.05, 52.05;

ESI MS *m/z*; obliczone: 307,0446 C₁₄H₁₅BrN₂O [M+H]⁺; obserwowane: 307,0443 [M+H]⁺

2.9. Otrzymywanie 2-[(6-bromo-pirydyn-2-ylo)-naftaleno-2-ylmetyl-amino]-etanolu



W kolbie okrągłodennej umieszczono 2-(6-bromo-pirydyn-2-ylamino)-etanol (**21**) (0,0069 mol; 1,5 g) w 10 mL DMF, 1-(bromometylo)-naftalen (0,0076 mol; 1,67 g) oraz *N,N*-diizopropyletyloaminę (0,007 mol; 1,13 mL). Całość

mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego i ogrzewano do 110 °C w łaźni olejowej pod chłodnicą zwrotną przez około 24 godzin, kontrolując reakcję przy użyciu

chromatografii cienkowarstwowej. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalniki odparowano i wykonano ekstrakcję: DCM/ nasycony NaHCO_3 (1/1 v/v). Następnie produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej wypełnionej silikazalem, stosując jako eluent mieszaninę heksan/octan etylu (gradientowo, zaczynając heksan kończąc 7/3 v/v), a zebrane frakcje zawierające produkt na wyparce obrotowej. W celu pozbycia się pozostałości rozpuszczalników, produkt poddano liofilizacji z benzenu. Otrzymano 1,4 g 2-[(6-bromo-pirydyn-2-ylo)-naftaleno-2-ylmetyl-amino]-etanolu (**23**) w postaci oleju, z wydajnością 58%, który scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR i MS:

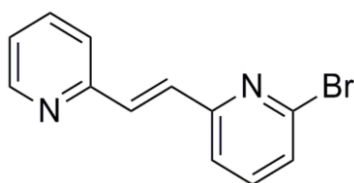
^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] 7.82 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.80 – 7.76 (m, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.52 – 7.41 (m, 2H), 7.33 (dd, $J = 8.5, 1.8$ Hz, 1H), 7.18 (dd, $J = 8.4, 7.4$ Hz, 1H), 6.74 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.40 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.82 (s, 2H), 3.89 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.84 (dd, $J = 5.3, 4.1$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] 158.98, 139.68, 139.34, 134.46, 133.34, 132.68, 128.69, 127.63, 126.30, 125.83, 124.85, 124.63, 115.50, 105.03, 62.43, 53.55, 52.28;

HRMS-ESI m/z: obliczone: 357,0602 $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{BrN}_2\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; obserwowane: 379,0422 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

2.10. Ogólna metoda reakcji sprzęgania

W kolbie okrągłodennej przedmuchanej argonem, umieszczono $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (2 mol %) i PPh_3 (3:1 w stosunku do palladu) w bezwodnym DMF. Po 10 minutach dodano TBAB (0,4 eq), odpowiedni halogenek (1,2), alken (1,2 eq) i Cs_2CO_3 (1,5 eq). Reakcję prowadzono w atmosferze argonu w reaktorze mikrofalowym (120°C, 300 W) przez 3 godziny. Po zakończeniu reakcji DMF odparowano i dokonano wstępnego oczyszczenia za pomocą ekstrakcji dichlorometan/nasycony NaHCO_3 (1/1; v/v). Następnie produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej wypełnionej silikazalem, stosując jako eluent mieszaninę heksan/octan etylu (gradientowo, zaczynając heksan kończąc 7/3 v/v), po czym zebrane frakcje zawierające produkt odparowano na wyparce obrotowej. Aby otrzymać czysty produkt, poddano go liofilizacji z benzenu.

2.11. Otrzymywanie (*E*)-2-bromo-6-[2-(pirydyn-2-yl)-winylo]pirydyny

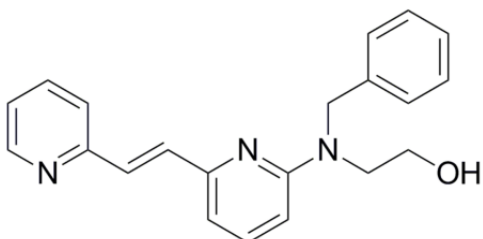


W kolbie okrągłodennej przedmuchanej argonem, umieszczono Pd(OAc)₂ (0,0004 mol, 90 mg) i PPh₃ (0,0012 mol, 314 mg) w 12 mL bezwodnego DMF. Po 10 minutach dodano TBAB (0,4 mmol; 128 mg), 2,6-dibromopirydynę (0,021 mol, 5 g), 2-winylopirydynę (0,025 mol, 2,69 mL) i Cs₂CO₃ (0,031 mol, 10 g). Reakcję prowadzono w atmosferze argonu w reaktorze mikrofalowym (120°C, 300 W) przez 3 godziny. Po zakończeniu reakcji DMF odparowano i dokonano wstępnego oczyszczenia za pomocą ekstrakcji dichlorometan/nasycony NaHCO₃ (1/1; v/v). Następnie produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej wypełnionej silikazalem, stosując jako eluent mieszaninę heksan/octan etylu (gradientowo, zaczynając heksan kończąc 7/3 v/v), po czym zebrane frakcje zawierające produkt odparowano na wyparce obrotowej. Aby otrzymać czysty produkt, poddano go liofilizacji z benzenu. Otrzymano 3 g (*E*)-2-bromo-6-[2-(pirydyn-2-yl)-winylo]pirydyny (**3**) w postaci białego proszku, z wydajnością 60%, który scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR i MS.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 8.63 (ddd, *J* = 4.8, 1.9, 0.9 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.69 (td, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.52 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.43 (dt, *J* = 7.8, 1.1 Hz, 1H), 7.34 (td, *J* = 7.5, 0.8 Hz, 2H), 7.20 (ddd, *J* = 7.6, 4.8, 1.2 Hz, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 156.32, 154.49, 149.81, 142.25, 138.86, 136.69, 133.29, 129.90, 126.76, 123.67, 122.94, 121.97;

HRMS-ESI *m/z*; obliczone: 261,0027 C₁₂H₉BrN₂ [M+H]⁺; obserwowane: 261,0035 [M+H]⁺

2.12. Otrzymywanie (*E*)-2-(benzylo{6-[2-(pirydyn-2-yl)winylo] pirydyn-2-yl}amino)etan-1-olu



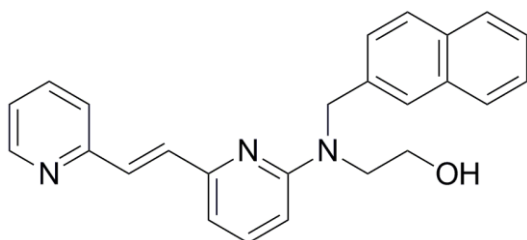
W kolbie okrągłodennej przedmuchanej argonem, umieszczono Pd(OAc)₂ (0,065 mmol, 15 mg) oraz PPh₃ (0,19 mmol, 51 mg) w 5 mL bezwodnego DMF. Po 10 min. dodano TBAB (0,05 mmol; 16

mg), 2-[benzylo-(6-bromo-pirydyn-2-ylo)-amino]-etanol (**22**) (1,6 mmol; 500 mg), winylopirydynę (1,9 mmol; 0,21 mL) i Cs₂CO₃ (2,4 mmol, 760 mg). Reakcję prowadzono w atmosferze argonu w reaktorze mikrofalowym (120°C, 300 W) przez 3 godziny. Po zakończeniu reakcji DMF odparowano i dokonano wstępnego oczyszczenia za pomocą ekstrakcji DCM/ nasycony NaHCO₃ (1/1; v/v). Następnie produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej wypełnionej silikazalem, stosując jako eluent mieszaninę heksan/ octan etylu (gradientowo, zaczynając od heksan, kończąc 7:3 v/v), a zebrane frakcje zawierające produkt odparowano na wyparce obrotowej. W celu usunięcia resztek rozpuszczalnika organicznego czysty produkt poddano liofilizacji z benzenu. Otrzymano 324 mg (*E*)-2-(benzylo{6-[2-(pyridin-2-yl)winylo]pyridin-2-yl}amino)etan-1-olu (**12**) w postaci żółtego oleju, z wydajnością 60%, który scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR i MS:

¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 8.55 – 8.49 (m, 1H, H6), 7.59 (td, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.40 (dt, *J* = 7.9, 1.0 Hz), 7.30 (dd, *J* = 8.5, 7.3 Hz, 1H), 7.25 – 7.22 (m, 1H), 7.19 – 7.13 (m, 4H), 7.08 (ddd, *J* = 7.5, 4.8, 1.1 Hz, 1H), 6.67 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.33 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.62 (s, 2H), 3.85 (t, *J* = 2.7 Hz, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 158.86, 155.05, 152.15, 149.32, 138.50, 137.52, 136.79, 131.94, 130.69, 128.81, 127.22, 126.34, 123.09, 122.50, 113.50, 107.06, 63.33, 53.52, 52.40

HRMS-ESI *m/z*; obliczone: 332,1763 C₂₁H₂₁N₃O [M+H]⁺; obserwowane: 332,1758 [M+H]⁺;

2.13. Otrzymywanie (*E*)-2-((naftalen-2-yl-metylo)(6-(2-(pirydyn-2-ylo)winylo)pyridin-2-yl)amino)etanolu



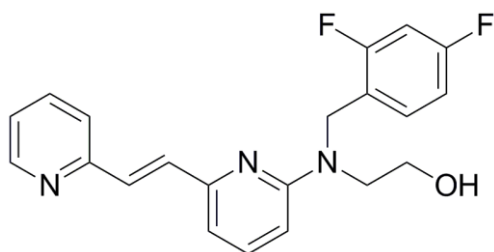
W kolbie okrągłodennej przedmuchanej argonem, umieszczono Pd(OAc)₂ (0,21 mmol, 47 mg) oraz PPh₃ (0,63 mmol, 165 mg) w 5 mL bezwodnego DMF. Po 10 min. dodano TBAB (0,1 mmol; 32 mg), 2-[(6-bromo-pirydyn-2-ylo)-naftaleno-2-ylmetyl-amino]-etanol (**23**) (4,2 mmol; 900 mg), 2-winylopirydynę (5,0 mmol; 0,54 mL) i Cs₂CO₃ (6,3 mmol, 2 g). Reakcję prowadzono w atmosferze argonu w reaktorze mikrofalowym (120°C, 300 W)

przez 3 godziny. Po zakończeniu reakcji DMF odparowano i dokonano wstępnego oczyszczenia za pomocą ekstrakcji DCM/ nasycony NaHCO₃ (1/1; v/v). Następnie produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej wypełnionej silikazalem, stosując jako eluent mieszaninę heksan/ octan etylu (gradientowo, zaczynając od heksan, kończąc 7:3v/v), a zebrane frakcje zawierające produkt odparowano na wyparce obrotowej. W celu usunięcia resztek rozpuszczalnika organicznego czysty produkt poddano liofilizacji z benzenu. Otrzymano 249 mg (*E*)-2-((naftalen-2-yl-metylo)(6-(2-(pirydyn-2-ylo)winylo)pyridin-2-yl)amino)etanolu (**30**) w postaci żółtego oleju, z wydajnością 28%, który scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR i MS:

¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 8.61 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H), 7.85 – 7.77 (m, 3H), 7.69 – 7.66 (m, 2H), 7.63 (d, *J* = 15.8 Hz 1H), 7.55 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 7.52 – 7.46 (m, 3H), 7.41 – 7.36 (m, 2H), 7.17 (dd, *J* = 7.5, 4.9 Hz), 6.77 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.47 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.87 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.98 (s, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 158.91, 155.10, 152.24, 149.43, 138.51, 136.67, 133.44, 132.71, 131.89, 130.80, 128.69, 127.68, 126.26, 125.77, 125.03, 124.34, 123.06, 122.47, 113.56, 107.08, 63.33, 53.70, 52.34;

HRMS-ESI *m/z*; obliczone: 382,1919 C₂₅H₂₃N₃O [M+H]⁺; obserwowane: 382,1915 [M+H]⁺

2.14. Otrzymywanie (*E*)-2-(2,4-difluorobenzyl{6-[2-(pirydyn-2-ylo)winylo]pirydyn-2-yl}amino)etan-1-olu



W kolbie okrągłodennej przedmuchanej argonem, umieszczono Pd(OAc)₂ (0,046 mmol; 10 mg) oraz PPh₃ (0,14 mmol; 36 mg) w 5 mL bezwodnego DMF. Po 10 min. dodano TBAB (0,1 mmol; 32 mg), 2-[(6-bromo-pirydyn-2-ylo)-(2,4-difluorobenzyl)-

amino]-etanol (**24**) (2,33 mmol; 800 mg), 2-winylopirydynę (2,8 mmol; 0,3 mL) i Cs₂CO₃ (2,99 mmol; 971 mg). Reakcję prowadzono w atmosferze argonu w reaktorze mikrofalowym (120°C, 300 W) przez 4 godziny. Po zakończeniu reakcji DMF odparowano i dokonano wstępnego oczyszczenia za pomocą ekstrakcji DCM/ nasycony NaHCO₃ (1/1;

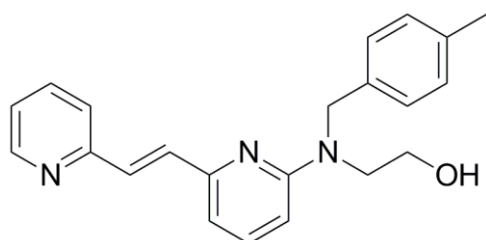
v/v). Następnie produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej wypełnionej silikazelem, stosując jako eluent mieszaninę heksan/ octan etylu (gradientowo, zaczynając od heksan, kończąc 7:3v/v), a zebrane frakcje zawierające produkt odparowano na wyparce obrotowej. W celu usunięcia resztek rozpuszczalnika organicznego czysty produkt poddano liofilizacji z benzenu. Otrzymano 412 mg (*E*)-2-(2,4-difluoro-benzylo{6-[2-(pirydyn-2-ylo)winylo] pirydyn-2-ylo}amino)etan-1-olu (**31**) w postaci żółtego oleju, z wydajnością 48 %, który scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR i MS:

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 8.58 (dd, $J = 4.8, 1.7$ Hz, 1H), 7.63 (td, $J = 7.7, 1.9$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.38 (dd, $J = 8.5, 7.3$ Hz, 1H), 7.19 – 7.11 (m, 2H), 6.87 – 6.75 (m, 2H), 6.74 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.38 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 5.28 (s, 1H, -OH), 4.71 (s, 2H), 3.92 (dd, $J = 7.4, 3.1$ Hz), 3.86 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 162.87, 157.87, 154.69, 152.01, 149.12, 137.97, 136.07, 131.37, 130.49, 127.96, 122.49, 121.99, 120.17, 113.07, 110.85, 105.96, 103.44, 62.17, 51.64, 46.42

^{19}F NMR (376 MHz, Chloroform-*d*) δ -111.77 (p, $J = 7.8$ Hz), -114.25 (q, $J = 8.6$ Hz).

HRMS-ESI m/z ; obliczone: 368,1574 $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; obserwowane: 368,1570 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2.15. Otrzymywanie (*E*)-2-(4-metylobenzylo{6-[2-(pirydyn-2-ylo)winylo] pirydyn-2-ylo}amino)etan-1-olu



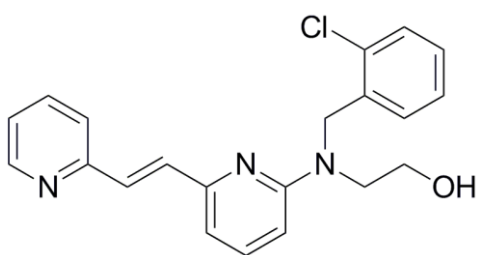
W kolbie okrągłodennej przedmuchiwanej argonem, umieszczono $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,025 mmol; 5,6 mg) oraz PPh_3 (0,075 mmol; 20 mg) w 5 mL bezwodnego DMF. Po 10 min. dodano TBAB (0,05 mmol; 16 mg), 2-[(6-bromo-pirydyn-2-ylo)-(4-metyl-benzylo)-amino]-etanolu (**25**) (0,6 mmol; 200 mg), 2-winylopirydynę (0,74 mmol; 81 μL) i Cs_2CO_3 (0,9 mmol; 305 mg). Reakcję prowadzono w atmosferze argonu w reaktorze mikrofalowym (120°C, 300 W) przez 4 godziny. Po zakończeniu reakcji DMF odparowano i dokonano wstępnego oczyszczenia za pomocą ekstrakcji DCM/ nasycony NaHCO_3 (1/1; v/v). Następnie produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej wypełnionej silikazelem, stosując jako eluent

mieszaninę heksan/ octan etylu (gradientowo, zaczynając od heksan, kończąc 7:3 v/v), a zebrane frakcje zawierające produkt odparowano na wyparce obrotowej. W celu usunięcia resztek rozpuszczalnika organicznego czysty produkt poddano liofilizacji z benzenu. Otrzymano 90 mg (*E*)-2-(4-metylobenzylo{6-[2-(pyridin-2-yl)winylo]pyridin-2-yl}amino)etan-1-olu (**32**) w postaci żółtego oleju, z wydajnością 42%, który scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR:

^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 8.51 (dd, $J = 5.1, 1.7$ Hz, 1H), 7.58 – 7.53 (m, 1H), 7.51 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H), 7.38 – 7.34 (m, 1H), 7.28 (dd, $J = 8.5, 7.2$ Hz, 1H), 7.07 – 7.02 (m, 5H), 6.65 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.33 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.58 (s, 2H), 3.86 – 3.82 (m, 2H), 3.82 – 3.79 (m, 2H), 2.24 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 158.83, 155.15, 152.20, 149.51, 138.27, 136.71, 136.44, 134.34, 131.81, 130.75, 129.37, 126.28, 122.97, 122.33, 113.26, 106.85, 63.21, 53.12, 52.16, 20.97;

ESI MS m/z ; obliczone: 346,1919 $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; obserwowane: 346,1914 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2.16. Otrzymywanie (*E*)-2-(2-chlorobenzylo{6-[2-(pirydyn-2-ylo)winylo]pirydyn-2-ylo}amino)etan-1-olu



W kolbie okrągłodennej przedmuchanej argonem, umieszczono $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,023 mmol; 5,3 mg) oraz PPh_3 (0,07 mmol; 18 mg) w 5 mL bezwodnego DMF. Po 10 min. dodano TBAB (0,05 mmol; 16 mg), 2-[(6-bromo-pirydyn-2-ylo)-(2-chloro-benzylo)-amino]-

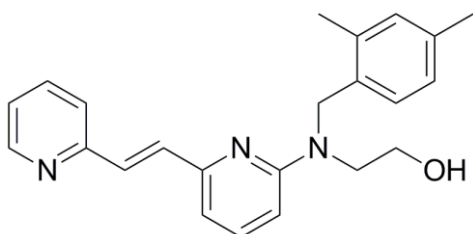
etanolu (**27**) (0,58 mmol; 200 mg), 2-winylopirydynę (0,7 mmol; 76 μL) i Cs_2CO_3 (0,88 mmol; 287 mg). Reakcję prowadzono w atmosferze argonu w reaktorze mikrofalowym (120°C, 300 W) przez 4 godziny. Po zakończeniu reakcji DMF odparowano i dokonano wstępnego oczyszczenia za pomocą ekstrakcji DCM/ nasycony NaHCO_3 (1/1; v/v). Następnie produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej wypełnionej silikazalem, stosując jako eluent mieszaninę heksan/ octan etylu (gradientowo, zaczynając od heksan, kończąc 7:3 v/v), a zebrane frakcje zawierające produkt odparowano na wyparce obrotowej. W celu usunięcia resztek rozpuszczalnika organicznego czysty

produkt poddano liofilizacji z benzenu. Otrzymano 88 mg (*E*)-2-(2-chlorobenzyl{6-[2-(pirydyn-2-yl)winylo] pirydyn-2-ylo}amino)etan-1-olu (**33**) w postaci żółtego oleju, z wydajnością 41%, który scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR i MS:

^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 8.60 (dd, $J = 5.3, 1.5$ Hz, 1H), 7.67 (td, $J = 7.7, 1.9$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.40 (dd, $J = 8.5, 7.2$ Hz, 1H), 7.27 – 7.21 (m, 3H), 7.17 (ddd, $J = 7.5, 4.8, 1.1$ Hz, 1H), 7.13 (dt, $J = 7.1, 1.7$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.38 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.69 (s, 2H), 3.94 (dd, $J = 5.2, 3.8$ Hz, 2H), 3.90 (dd, $J = 7.5, 3.0$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 158.54, 155.00, 152.31, 149.31, 140.07, 138.53, 136.76, 134.72, 131.96, 130.73, 130.08, 127.40, 126.48, 124.51, 123.04, 122.49, 113.68, 106.75, 62.91, 52.96, 52.18;

ESI MS m/z ; obliczone: 366,1373 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{ClN}_3\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; obserwowane: 366,1372 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2.17. Otrzymywanie (*E*)-2-{2,4-dimetylobenzyl-[6-(2-pirydyn-2-ylo-winylo)-pirydyn-2-ylo]-aminoetanolu



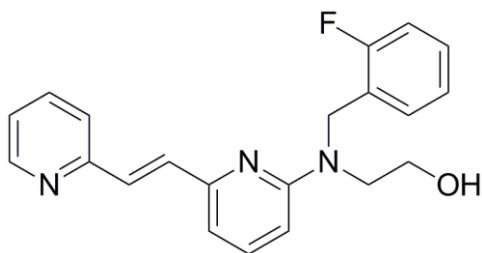
W kolbie okrągłodennej przedmuchanej argonem, umieszczono $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,021 mmol; 4,8 mg) oraz PPh_3 (0,064 mmol; 17 mg) w 5 mL bezwodnego DMF. Po 10 min. dodano TBAB (0,05 mmol; 16 mg), 2-[(6-bromo-pirydyn-2-ylo)-(2,4-dimetylobenzyl)-amino]-etanolu (**28**) (0,54 mmol; 180 mg), 2-winylopirydynę (0,64 mmol; 70 μL) i Cs_2CO_3 (0,8 mmol; 262 mg). Reakcję prowadzono w atmosferze argonu w reaktorze mikrofalowym (120°C, 300 W) przez 4 godziny. Po zakończeniu reakcji DMF odparowano i dokonano wstępnego oczyszczenia za pomocą ekstrakcji DCM/ nasycony NaHCO_3 (1/1; v/v). Następnie produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej wypełnionej silikazalem, stosując jako eluent mieszaninę heksan/ octan etylu (gradientowo, zaczynając od heksan, kończąc 7:3v/v), a zebrane frakcje zawierające produkt odparowano na wyparce obrotowej. W celu usunięcia resztek rozpuszczalnika organicznego czysty produkt poddano liofilizacji z benzenu. Otrzymano 83 mg (*E*)-2-(2,4-dimetylobenzyl{6-[2-(pyridin-2-

yl)winylo]pirydyn-2-yl}amino)etan-1-olu (**34**) w postaci żółtego oleju, z wydajnością 43%, który scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR i MS:

^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 8.60 (dd, $J = 5.0, 1.7$ Hz, 1H), 7.65 (td, $J = 7.7, 1.9$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.36 (dd, $J = 8.5, 7.2$ Hz, 1H), 7.15 (ddd, $J = 7.5, 4.8, 1.1$ Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.98 – 6.93 (m, 2H), 6.75 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.30 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.57 (s, 2H), 4.03 – 3.82 (m, 4H), 2.30 (s, Hz, 1H), 2.28 (s, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 158.91, 155.14, 152.18, 149.51, 138.35, 136.59, 136.48, 135.29, 131.80, 131.49, 131.36, 130.77, 126.74, 125.48, 123.00, 122.37, 113.30, 106.89, 63.43, 52.18, 51.40, 20.84, 18.81;

HRMS-ESI m/z ; obliczone: 360,2076 $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; obserwowane: 360,2071 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2.18. Otrzymywanie (*E*)-2-{2-fluorobenzyl-[6-(2-pirydyn-2-yl-winylo)-pirydyn-2-yl]-amino}etanolu



W kolbie okrągłodennej przedmuchanej argonem, umieszczono $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,025 mmol; 5,6 mg) oraz PPh_3 (0,075 mmol; 20 mg) w 5 mL bezwodnego DMF. Po 10 min. dodano TBAB (0,05 mmol; 16 mg), 2-[(6-bromo-pirydyn-2-yl)-(2-fluoro-benzyl)-

amino]-etanol (**26**) (0,61 mmol; 200 mg), winylopirydynę (0,73 mmol; 79 μL) i Cs_2CO_3 (0,9 mmol; 300 mg). Reakcję prowadzono w atmosferze argonu w reaktorze mikrofalowym (120°C, 300 W) przez 4 godziny. Po zakończeniu reakcji DMF odparowano i dokonano wstępnego oczyszczenia za pomocą ekstrakcji DCM/ nasycony NaHCO_3 (1/1; v/v). Następnie produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej wypełnionej silikazalem, stosując jako eluent mieszaninę heksan/ octan etylu (gradientowo, zaczynając od heksan, kończąc 7:3v/v), a zebrane frakcje zawierające produkt odparowano na wyparce obrotowej. W celu usunięcia resztek rozpuszczalnika organicznego czysty produkt poddano liofilizacji z benzenu. Otrzymano 75 mg (*E*)-2-(2-fluorobenzyl[6-[2-(pirydyn-2-yl)winylo]pirydyn-2-yl]amino)etan-1-olu (**35**) w postaci żółtego oleju, z wydajnością 35%, który scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR i MS:

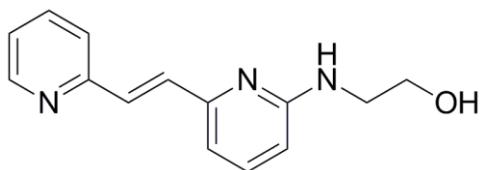
^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 8.61 (dd, $J = 5.0, 1.7$ Hz, 1H), 7.66 (td, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H), 7.46 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.40 (dd, $J = 8.5, 7.3$ Hz, 1H), 7.27 – 7.22 (m, 1H), 7.23 – 7.14 (m, 2H), 7.12 – 7.04 (m, 2H), 6.77 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.40 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.76 (s, 2H), 4.03 – 3.81 (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 160.81 (d, $J_{\text{F-C}} = 245.5$ Hz), 158.67, 155.12, 152.39, 149.51, 138.50, 136.60, 131.84, 130.87, 128.75, 127.87, 124.50, 124.31, 123.10, 122.46, 115.39, 113.57, 106.68, 63.28, 52.36, 47.52;

HRMS-ESI m/z ; obliczone: 350,1169 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; obserwowane: 360,1164 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2.19. Ogólna metoda substytucji nukleofilowej $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$

W kolbie okrągłodennej umieszczono bromopochodną pirydyny (1 eq) w bezwodnym DMF, *N,N*-diizopropyl戒etanolaminę (1,5 eq) oraz duży nadmiar etanolaminy (10-20 eq). Reakcję prowadzono w reaktorze mikrofalowym (120°C, 300 W) przez 3 godziny. Po zakończeniu reakcji DMF odparowano i dokonano wstępnego oczyszczenia za pomocą ekstrakcji DCM/ nasycony NaHCO_3 (1/1; v/v). Następnie produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej wypełnionej silikazalem, stosując jako eluent mieszaninę DCM/metanol (gradientowo, zaczynając od DCM kończąc 95/5 v/v), a zebrane frakcje zawierające produkt odparowano na wyparce obrotowej. W celu usunięcia resztek rozpuszczalnika organicznego czysty produkt poddano liofilizacji z benzenu.

2.20. Otrzymywanie (*E*)-6-(2-pirydyn-2-yl-winylo)-pirydyn-2-yl)-aminoetanolu (8)



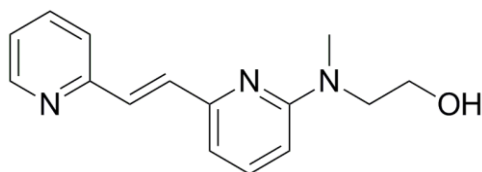
W kolbie okrągłodennej umieszczono (*E*)-2-bromo-6-[2-(pirydyn-2-yl)-winylo]pirydynę (**3**) (1,23 mmol, 320 mg) w 0,5 mL bezwodnego DMF, *N,N*-diizopropyl戒etanolaminę (1,8 mmol, 0,3 mL) oraz duży nadmiar etanolaminy (1,5 mL). Reakcję prowadzono w reaktorze mikrofalowym (120°C, 300 W) przez 3 godziny. Po

zakończeniu reakcji DMF odparowano i dokonano wstępnego oczyszczenia za pomocą ekstrakcji DCM/ nasycony NaHCO₃ (1/1; v/v). Następnie produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej wypełnionej silikazalem, stosując jako eluent mieszaninę DCM/metanol (gradientowo, zaczynając od DCM kończąc 95/5 v/v), a zebrane frakcje zawierające produkt odparowano na wyparce obrotowej. W celu usunięcia resztek rozpuszczalnika organicznego czysty produkt poddano liofilizacji z benzenu. Otrzymano 175 mg (*E*)-6-(2-pirydyn-2-yl-winylo)-pirydyn-2-ylo)-aminoetanolu (**8**) w postaci żółtawego oleju, z wydajnością 60% ,który scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR:

¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 8.48 (dd, *J* = 5.0, 1.8 Hz, 1H), 7.52 (dd, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.21 (dd, *J* = 8.3, 7.2 Hz, 1H), 7.06 – 6.99 (m, 1H), 6.58 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.23 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 5.55 (s, 1H, -OH), 5.32 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, -NH), 3.74 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.45 (q, *J* = 5.1 Hz, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 158.47, 155.05, 152.11, 149.28, 137.63, 136.44, 131.87, 130.28, 122.70, 122.20, 113.39, 108.50, 63.26, 44.71

HRMS-ESI *m/z*; obliczone: 242,1293 C₁₄H₁₅N₃O [M+H]⁺; obserwowane: 242,1277 [M+H]⁺;

2.21. Otrzymywanie (*E*)-2-{metylo-[6-(2-pirydyn-2-yl-winylo)-pirydyn-2-ylo]-aminoetanolu



W kolbie okrągłodennej umieszczono (*E*)-2-bromo-6-[2-(pirydyn-2-yl-winylo)pirydyny

(**3**) (1,23 mmol, 320 mg) w 0,5 mL bezwodnego DMF, *N,N*-diizopropylloetanolaminy (1,8 mmol, 0,3 mL) oraz duży nadmiar *N*-metyloetanolaminy (1,5 mL). Reakcję prowadzono w reaktorze mikrofalowym (120°C, 300 W) przez 2 godziny. Po zakończeniu reakcji DMF odparowano i dokonano wstępnego oczyszczenia za pomocą ekstrakcji DCM/ nasycony NaHCO₃ (1/1; v/v). Następnie produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej wypełnionej silikazalem, stosując jako eluent mieszaninę DCM/metanol (gradientowo, zaczynając od DCM kończąc 95/5 v/v), a zebrane frakcje zawierające produkt odparowano na wyparce obrotowej. W celu usunięcia resztek rozpuszczalnika organicznego czysty produkt poddano liofilizacji z benzenu. Otrzymano 209 mg (*E*)-2-{metylo-[6-(2-pirydyn-2-yl-winylo)-pirydyn-2-ylo)-

aminoetanolu (**10**) w postaci żółtawego oleju, z wydajnością 67 %, który scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR i MS:

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] 8.57 (dd, $J = 4.9, 1.7$ Hz, 1H) 7.78 (td, $J = 7.7, 1.9$ Hz, 1H), 7.61-7.59 (m, 1H), 7.56 (d, 15.6 Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 7.50 – 7.47 (m, 1H), 7.26 (ddd, $J = 7.4, 4.7, 1.0$ Hz, 1H), 6.75 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 6.59 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.73 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H), 3.71 – 3.54 (m, 4H), 3.10 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ [ppm] 157.77, 154.83, 151.88, 149.51, 137.69, 136.77, 132.49, 130.20, 122.51, 122.48, 111.65, 105.93, 58.58, 51.88, 36.73;

HRMS-ESI m/z ; obliczone: 256,1450 $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; obserwowane: 256,1433 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Krystalizacja: Początkowo uzyskany oleisty związek rozpuściłam w niewielkiej ilości dichlorometanu i pozostawiłam do powolnego odparowania w temperaturze pokojowej, po czym umieściłam kolbę w temperaturze -20°C . Po dwóch dniach zauważyłam drobne kryształki na ściankach naczynia szklanego, które następnie zostały wyodrębnione przez dr Tomasza Manszewskiego i poddane działaniu promieniowania rentgenowskiego w celu uzyskania danych krystalograficznych.

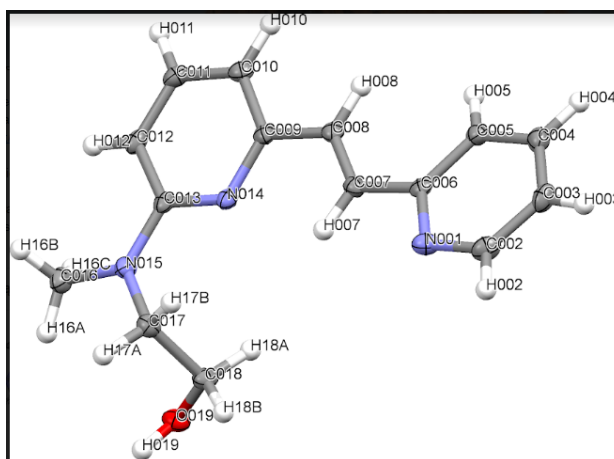
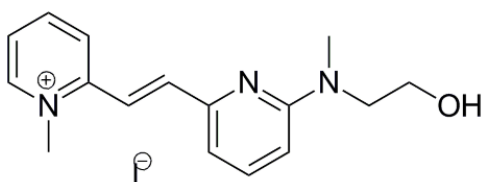


Tabela 19. Parametry krystalograficzne dla związku 10.

Układ krystalograficzny	Grupa przestrzenna	Parametry komórki elementarnej	parametr rozbieżności R:
Jednoskośny	P2 ₁ /c	a=12.8800 Å b=16.5100 Å c=6.3950 Å α=90.000° β= 99.63° γ=90.000°	dla mocnych refleksów: 0.0413 dla wszystkich refleksów: 0.0459

2.22. Synteza jodku (*E*)-2-(2-(6-((2-hydroksyetylo)(metylo)amino)pirydyn-2-ylo)winylo)-1-metylopirydyniowego



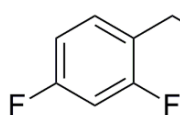
W kolbie okrągłodennej przedmuchiwanej argonem, umieszczono związek (*E*)-2-(4-metylobenzyl(6-[2-(pirydyn-2-ylo)winylo] pirydyn-2-ylo)amino)etan-1-ol (**10**) (1 eq, 0,12 mmol, 30 mg) w bezwodnym acetonitrylu (1 mL) po czym kolbę zamknięto szczelnie septą. Następnie przy użyciu strzykawki dodawano kroplami jodek metylu (1,1 eq, 0,13 mmol, 8,3 μL). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 10 godzin, kontrolując jej przebieg przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej (DCM/MeOH 95/5 v/v). Po przereagowaniu substratu rozpuszczalnik odparowano na wyparce obrotowej, a zanieczyszczenia i ewentualne pozostałości substratu oddzielono na drodze ekstrakcji, korzystnie DCM/woda 1:1 (v/v). Otrzymano 25 mg jodku (*E*)-2-(2-(6-((2-hydroksyetylo)(metylo)amino)pirydyn-2-ylo)winylo)-1-metylopirydyniowego (**37**). Wydajność reakcji: 80-90%.

¹H NMR (500 MHz; DMSO-*d*₆) δ [ppm] 8.98 (dd; *J* = 6.3; 1.4 Hz; 1H; H₆); 8.52 (dtd; *J* = 15.6; 8.2; 1.5 Hz; 2H); 7.94 (ddd; *J* = 7.6; 6.2; 1.7 Hz; 1H); 7.81 (s; 2H); 7.58 (dd; *J* = 8.6; 7.1 Hz; 1H); 6.90 (d; *J* = 7.0 Hz; 1H); 6.76 (d; *J* = 8.6 Hz; 1H); 4.67 (d; *J* = 5.1 Hz; 1H); 4.36 (s; 3H); 3.63 (q; *J* = 4.1; 3.4 Hz; 4H); 3.12 (s; 3H), ¹³C NMR [ppm]: 157.66; 151.82; 149.74; 145.98; 144.35; 142.20; 137.90; 125.38; 125.18; 119.01; 114.09; 108.49; 58.39; 51.97; 45.82; 36.78

^1H - ^{15}N NMR (500 MHz; DMSO- d_6) δ [ppm] 72,81 (N2 pirydynylowy), 195,46 (N⁺-PyCH₃), 253,91 (pirydynowy atom azotu z przyłączoną grupą 2-*N*-(CH₃)CH₂CH₂OH)

HRMS-ESI m/z obliczone: 270,1602; obserwowane: C₁₆H₂₀N₃O⁺ [M]⁺ 270,1601

2.23. Otrzymywanie 2-(2,4-difluorofenylamino)etanolu

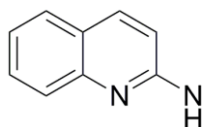


W kolbie okrągłodennej umieszczono bromek 2,4-difluorobenzylu (2,89 mmol; 372 μL), etanoloaminę (14 mmol, 0,8 mL) oraz *N,N*-diizopropylloetyloaminę (8,7 mmol, 1,4 mL) . Mieszaninę umieszczono w łaźni lodowej (woda/NaCl/lód) i mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego przez 3 godziny. Reakcję kontrolowano z użyciem chromatografii cienkowarstwowej. Po zakończeniu reakcji wykonano ekstrakcję w układzie: eter dietylowy/ nasycony NaHCO₃ do osiągnięcia wartości pH \sim 6.8 umożliwiającej usunięcie nadmiaru etanoloaminy. Następnie produkt oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej, a zebrane frakcje zawierające produkt odparowano na wyparce obrotowej. Czysty produkt poddano liofilizacji z benzenu. Związek **14** otrzymano w postaci białego proszku z wydajnością 45 % (230 mg), który scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR oraz spektrometrii mas.

^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ [ppm] 7.28 (td, J = 8.5, 6.5 Hz, 1H), 6.81 (dddd, J = 11.5, 10.2, 5.7, 1.8 Hz, 2H), 3.80 (s, 2H), 3.66 – 3.60 (m, 2H), 2.77 – 2.70 (m, 2H), 2.44 (s, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform- d) δ [ppm] 162.83 (dd, J = 105.3, 12.0 Hz), 160.36 (dd, J = 105.7, 12.0 Hz), 131.07, 122.68, 111.08, 103.74 , 60.74 , 50.31 , 46.29

HRMS-ESI m/z; obliczone 188,0887 C₉H₁₁F₂NO [M+H]⁺; obserwowane: 189,0900 [M+H]⁺;

2.24. Otrzymywanie 2-(chinolin-2-ylamino)etanolu



W kolbie okrągłodennej umieszczono 2-bromochinolinę (1 mmol; 208 mg), etanoloaminę (1,5 mL) and diizopropylloetyloaminę (1,5 mmol, 244 μL) . Mieszaninę umieszczono w łaźni olejowej i ogrzewano w temperaturze 120°C pod chłodnicą zwrotną

przez 1 godzinę. Reakcję kontrolowano z użyciem chromatografii cienkowarstwowej. Po zakończeniu reakcji wykonano ekstrakcję w układzie: eter dietylowy/ nas. NaHCO₃ do osiągnięcia wartości pH ~ 6.8 umożliwiającą usunięcie nadmiaru etanoloaminy. Następnie produkt oczyszczono za pomocą PLC w układzie eluującym heksan/octan etylu/metanol (1:1:0,2 v/v/v), a frakcje zawierające związek odparowano na wyparce obrotowej. Związek **18** otrzymano w postaci białego proszku z wydajnością 70% (210 mg), który scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii NMR oraz spektrometrii mas.

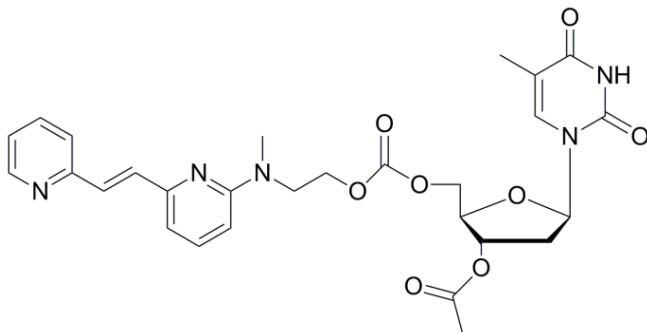
¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 7.78 (dd, *J* = 8.8, 0.6 Hz, 1H), 7.65 (dd, *J* = 8.3, 1.0 Hz, 1H), 7.57 (dd, *J* = 7.9, 1.4 Hz, 1H), 7.52 (ddd, *J* = 8.5, 7.0, 1.5 Hz, 1H), 7.22 (ddd, *J* = 8.1, 7.0, 1.2 Hz, 1H), 6.64 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.34 (s, 1H), 3.91 – 3.81 (m, 2H), 3.67 (q, *J* = 3.7 Hz, 2H), 3.47 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 157.20 , 146.63 , 137.67 , 129.83 , 127.35 , 125.44 , 123.24 , 122.53 , 112.33 , 64.38 , 45.84;

HRMS-ESI *m/z*; obliczone: 189,1028 C₁₁H₁₂N₂O [M+H]⁺; obserwowane: 190,1125[M+H]⁺

2.25. Ogólna procedura otrzymywania węglanu nukleozydu

W kolbie okrągłodennej umieszczono nukleozyd (1 eq) oraz karbonyldiimidazol (1 eq) w bezwodnym acetonitrylu. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 30 minut, kontrolując jej przebieg przy użyciu TLC. Następnie dodano aminoalkohol (**10**, 1 eq) oraz TMG (0,2 eq), pozostawiając mieszaninę w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Rozpuszczalnik odparowano a pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej, używając eluentu w postaci mieszaniny chlorku metylenu i metanolu (gradientowo, zaczynając od DCM kończąc na 95:5 v/v). Czysty produkt zliofilizowano z benzenu i poddano analizie NMR i ESI.

2.26. Otrzymywanie 3'-O-acetylo-5'-(2-{metylo-[6-(2-pirydyn-2-yl-winylo)-pirydyn-2-yl]-aminoetyloksykarbonylo tymidyny (46)



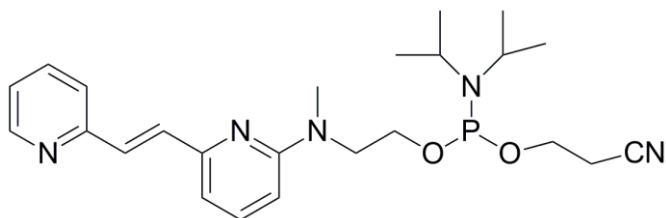
W kolbie okrągłodennej umieszczono 3'-O-acetylowaną tymidynę (0,12 mmol, 34 mg) oraz 1,1'-karbonyldiimidazol (0,24 mmol, 39 mg) w bezwodnym acetonitrylu (2 mL). Reakcję prowadzono

w temperaturze pokojowej przez 30 minut, przebieg kontrolując przy użyciu TLC. Następnie dodano aminoalkohol (0,12 mM, 39 mg) oraz TMG (0.2 mmol, 27 μ L), pozostawiając mieszaninę w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Rozpuszczalnik odparowano a pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej, używając eluentu w postaci mieszaniny chlorku metylenu i metanolu (gradientowo, zaczynając od DCM kończąc na 95:5 v/v). Czysty produkt zliofilizowano i otrzymano 38mg (57%) żółtego proszku , który poddano analizie NMR i ESI.

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 8.66 – 8.55 (m, 1H), 7.70 – 7.65 (m, 1H), 7.63 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 2.2 Hz, 2H), 7.14 (dd, J = 7.5, 4.9 Hz, 1H), 6.71 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 6.45 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.35 (dd, J = 8.8, 5.7 Hz, 1H), 5.16 (dd, J = 5.2, 3.2 Hz, 1H), 4.52 (dt, J = 11.5, 5.9 Hz, 1H), 4.42 (q, J = 4.6, 3.7 Hz, 1H), 4.39 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 4.33 (dd, J = 11.8, 2.8 Hz, 1H), 4.17 (q, J = 2.7 Hz, 1H), 4.02 (tq, J = 14.7, 8.8, 7.4 Hz, 2H), 3.10 (s, 3H), 2.40 – 2.29 (m, 1H), 2.22 – 2.10 (m, 2H), 2.09 (s, 3H), 1.88 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ [ppm] 169.89 , 163.00 , 157.25 , 155.08 , 154.11 , 152.11 , 149.93 , 149.18 , 137.44 , 136.01 , 134.34 , 132.11 , 130.24 , 127.82 , 122.10 , 121.78 , 112.34 , 111.15 , 104.99 , 84.04 , 81.62 , 74.07 , 66.76 , 65.86 , 47.87 , 36.73 , 36.64 , 20.39 , 12.13;

HRMS-ESI m/z; obliczone: 565,2173 [M+H] $^+$; obserwowane: 566,2248 [M+H] $^+$

2.27. Synteza (*E*)-2-cyanoetylo- 2-(metyl(6-(2-(pirydyn-2-ylo)winylo) pirydyn-2-ylo)amino)etylo diizopropylu amidofosforynu (49) - metoda A



W kolbie okrągłodennej umieszczono uprzednio zliofilizowany alkohol 10 (0,55 mmol; 140 mg) oraz sita molekularne, w atmosferze argonu.

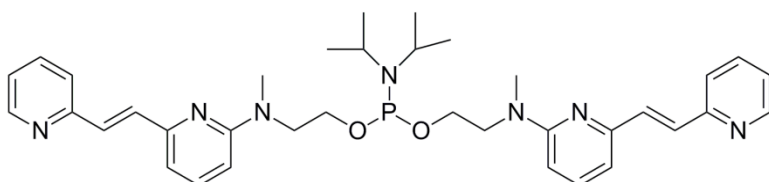
Następnie całość schłodzono do 0°C po czym dodano bis-(diizopropylamino)(2-cyanoetoksy)fosfinę (0,715 mmol; 227 μ L) oraz 5-(benzylotio)-1*H*-tetrazol (BTT) (0,44 mmol; 1,7 mL) i pozostawiono w temperaturze pokojowej, kontrolując reakcję przy użyciu TLC oraz spektroskopii ^{31}P NMR. Reakcję zakończono po 40 minutach dodając do mieszaniny 0,1 mL bezwodnej trietyloaminy, gdy na widmie fosforowym było obserwowalne sygnały pochodzące od substratu fosfinowego, a zaczęły pojawiać się sygnały w obszarze H-fosfonianów (sugerujące rozpad produktu). Acetonitryl odparowano na wyparce obrotowej po czym produkt wyizolowano przy użyciu chromatografii kolumnowej w układzie elującym benzen-trietyloamina (9:1 v/v). Otrzymano około 120 mg czystego produktu **49**, z wydajnością 48%.

Produkt scharakteryzowano przy użyciu analizy TLC oraz spektroskopii ^{31}P NMR:

Analiza TLC w układzie benzen/trietyloamina; 9:1 (v/v); $R_{\text{f}}_{\text{amidofosforynu}}=0.7$;

^{31}P NMR (400 MHz; benzen-*d*6): 146.46 (s)

2.28. Synteza Bis-[2-(pirydyn-2-ylo)winylo]pirydyn-2-ylo*N,N,N',N'*-tetraizopropylu amidofosforynu (51)– metoda B



(*E*)-2-(metyl{6-[2-(pirydyn-2-ylo)winylo] pirydyn-2-ylo}amino)etan-1-ol (80 mg;

0,313 mmol) liofilizowano z benzenu a następnie suszono na próżni przez 12 godzin. Następnie umieszczono w niewielkiej kolbie okrągłodennej przedmuchanej argonem i zabezpieczonej septą. Do kolby dodano 1 ml bezwodnego dichlorometanu otrzymując

klarowny roztwór barwy żółtej. Dodano w jednej porcji 40,9 μl (0,235 mmola) *N,N*-diizopropylaminy, a następnie roztwór schłodzono do temp. ok -5°C . Do klarownego roztworu dodano 41,75 mg (0,156 mmol) bis(diizopropylamino)chlorofosfiny. W momencie gdy analiza TLC w układzie rozwijającym: heksan/dichlorometan/trietyloamina; v/v/v; 6/3/1; wykazała połowiczny zanik substratu, dodano 15 mg (0,078 mmol) 5-(benzylotio)-1*H*-tetrazol (BTT) i reakcję prowadzono do całkowitego zaniku substratu. Roztwór odparowano na wyparce obrotowej; a produkt oczyszczano metodą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy); stosując elucję gradientową w układzie dichlorometan/heksan/trietyloamina; v/v/v; od 1/8/1 do 2/7/1. Połączone frakcje produktu odparowano a pozostałość zliofilizowano z benzenu. Otrzymano 30 mg bis[2-(pirydyn-2-ylo)winylo]pirydyn-2-ylo]-*N,N,N',N'*-tetraisopropylamidofosforyn (**51**) w postaci żółtego oleju z wydajnością 30 %.

Produkt scharakteryzowano przy użyciu analizy TLC oraz spektroskopii ^{31}P NMR: Analiza TLC w układzie heksan/dichlorometan/trietyloamina; v/v/v; 6/3/1; $R_{\text{f}}_{\text{amidofosforynu}} = 0,23$;

^{31}P NMR (400 MHz; benzen-*d*6): 146.46 (s).

2.29. Zautomatyzowana Synteza DNA

A. Synteza i przyłączanie znacznika

0,1 M roztwór amidofosforynu ze znacznikiem fluorescencyjnym przygotowywano wcześniej rozpuszczając w bezwodnym acetonitrylu z dodatkiem sit molekularnych 4Å. Do suszenia kolumnienek stosowano Argon o czystości N 5.0. Przeprowadzono syntezę 12-merowego oligomeru o sekwencji: PyVnPy (**10**) 5' TTT TTT TTT TTT 3'. Syntezy przeprowadzono na fazie stałej stosując podłoże krzemianowe Q – dT (Glen Research) oraz komercyjny amidofosforyn tymidyny. Syntezę prowadzono wykorzystując automatyczny syntetyzer DNA powtarzając cyklicznie dla każdego przyłączonego nukleotydu 4 etapy (detrytylacja, kondensacja, kapowanie, utlenianie). W tym celu kolumnkę ze stałym złożem Q-dT napełnia się roztworami dla każdego etapu stosując następujące warunki:

1. detrytylacja: 3% roztwór kwasu dichlorooctowego w chlorku metylenu czas 2 minuty
2. kondensacja: 0,1 molowy roztwór amidofosforiny-T w acetonitrylu mieszany w równych proporcjach z 0,1 molowym roztworem 5-benzyl-mercaptotetrazolu(BMT) czas 3 minuty
3. kapowanie: mieszanina dwóch roztworów (A i B) o równych proporcjach czas: 1 minuta Roztwór A-10% roztwór 1-*N*-metyloimidazolu w tetrahydrofuranie; roztwór B – 10% roztwór bezwodnika octowego w tetrahydrofuranie.
4. utlenienie: 0,05 molowy roztwór jodu w pirydynie, czas 1 minuta.

Po każdym etapie kolumnę przepłukiwano bezwodnym acetonitrylem i przedmuchiwano argonem. Po przyłączeniu ostatniego oligonukleotydu usunięto ostatnią grupę dimetoksytrytylową (etap detrytylacji) i przeprowadzono etap kondensacji stosując mieszaninę amidofosforiny barwnika (amidofosforyn barwnika 10 (12mg) rozpuszczonego w 200 μ l bezwodnego ACN) oraz 0,1 molowego roztworu BTT. Czas reakcji wynosił 10 minut. Następnie przeprowadzono etap utleniania. Po jego zakończeniu i przepłukaniu kolumny acetonitrylem i przedmuchaniu suchym argonem podłoże umieszczano na 2 minuty w temperaturze 22°C w stężonym roztworze amoniaku (32%).

Następnie odwirowano podłoże krzemianowe, a supernatant zawierający znakowany oligomer naniesiono na kolumnę LGC MicroPure II. Oligonukleotyd oczyszczano przemywając kolumnę: i) 97% 1M TEAA + 3% MeCN v/v ii) H₂O MiliQ iii) 20% MeCN w H₂O w wyniku czego uzyskano trzy frakcje, gdzie znakowany oligonukleotyd znajdował się we frakcji po przemyciu wodą miliQ. Oligonukleotydy analizowane i oczyszczane były na żelu poliakrylamidowym denaturującym (19% akrylamid, 1% *N,N'*-metylenobisakrylamid, 7M mocznik). Wizualizację oligomerów uzyskiwano poprzez umieszczenie żelu na płycie z fluoroforem i oświetlenie lampą UV 254 nm. Oligomery zawierające grupy fluoryzujące wizualizowano poprzez oświetlenie lampą UV 366 nm.

B. Analiza znakowanego oligomeru na HPLC

Przygotowanie analitu: znakowany oligonukleotyd (0,4 OD) rozpuszczono w 500 μ l wody miliQ, wymieszano na Vortexie i odwirowano. Wykonano kolejno pomiar OD przy długości fali 260 nm, na podstawie którego wyznaczono objętość nastrzyku na kolumnę chromatograficzną. (OD₂₆₀ - 0,528; objętość analitu - 100 μ l).

Warunki analizy:

kolumna Synergi Fusion – RP 80Å PHENOMENEX, 150 x 4.6 mm z prekolumną
metoda *gradientowa* czas trwania 30 min:

-szybkość przepływu 1ml/min

-analiza w gradiencie bufor A (0,01M octan trietyloamoniowy)/ bufor B (0,01M octan trietyloamoniowy w 40% roztworze acetonitrylu)

-Detektor DAD diodowy 220-700 nm

-Detektor FLD ($\lambda_{\text{abs.}}=370\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=476\text{nm}$)

3. Pomiar fizykochemiczne

3.1. Widma absorpcji

Widma absorpcyjne rejestrowano na dwuwiązkowym spektrofotometrze Jasco V-750 oraz Cary 100 (Agilent, USA) w kuwecie kwarcowej o długości drogi optycznej wynoszącej 1cm; źródło światła: lampa deuterowa pracująca w zakresie długości fal od 187-900 nm; typ detektora: fotopowielacz. Szerokość wiązki spektralnej wynosiła 2/10nm. Wyznaczone wartości molowego współczynnika ekstynkcji są rezultatem 3-4 niezależnych i uśrednionych wyników, mając na uwadze, że dla zastosowanych stężeń oraz szerokości wiązki spektralnej inherentny błąd pomiarowy może sięgać 20%.

3.1.1. Wyznaczanie molowego współczynnika absorpcji

W celu wyznaczenia molowego współczynnika absorpcji ϵ , dla związków **8**, **10** i **12** oraz **30-35** przygotowano, z dokładnością do 0,1 mg po 3 naważki. Każdą naważkę rozpuszczono w 1 mL czystego metanolu i umieszczono w kolbach miarowych o pojemności 5 mL. Następnie do każdej z kolb miarowych dolano po 4 mL metanolu. Dla

każdego z przygotowanych roztworów dokonano pomiaru wartości maksimum absorpcji w kuwecie kwarcowej o drodze optycznej 1 cm i wyznaczono ϵ [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$] według prawa Lamberta-Beera: $A = \epsilon \times l \times c$, gdzie: A- absorpcja, l- długość drogi optycznej, c- stężenie molowe [mol/L]. Wartości uśredniono, a dla każdej uwzględniono błąd rzędu +/- 20%

3.2. Spektrofluorymetria

Widma fluorescencyjne (wzbudzenia i emisji) zsyntetyzowanych aminoalkoholi (**8-12,30-35**) oraz wybranego węglanu nukleozydu w stężeniach 10^{-4} M zostały rejestrowane na spektrofluorymetrze FluoTime 300 EasyTau (PicoQuant, Germany), wyposażonego w termostat. Źródłem wzbudzającym był laser diodowy ($\lambda = 315-400$ nm) z szybkością powtórzeń rzędu 80 MHz lub lampa rtęciowa. Długość fali wzbudzenia wynosiła 377 nm, szerokość szczelin wzbudzenia oraz emisji wynosiły: $\Delta\lambda = 1$ nm; krok wynosił 1 nm; Każde widmo było wynikiem 4-6 niezależnych i automatycznie uśrednionych pomiarów i automatycznie skorygowane. Jako detektor zastosowano fotopowielacz PMT z funkcją pojedynczego zliczania fotonów rejestrujący emisję światła w zakresie od 185 nm do 820 nm. Pomiaru wykonywane były w rozpuszczalnikach organicznych, wodzie lub buforze fosforanowym (pH 5.8-8.0) oraz poza zakresem jego pojemności buforowej, aż do pH 2 lub 12 (adjustacja pH 0,1 M roztworem wodorotlenku sodu lub H_3PO_4 ; pomiar pH przy użyciu pH-metru przed każdą z analiz). Zakres stężeń próbek: 10^{-4} - 10^{-8} M

Rejestracja widm emisji fluorescencji dla procesu cyklizacji: próbkę z węglanem nukleozydu w buforze fosforanowym o pH = 6.86 umieszczono w termostacie i co 5-10 minut dokonywano pomiaru widma emisji: przez około 120 minut w temperaturze 60°C.

Wyznaczanie wydajności kwantowej: wyznaczana w oparciu o metodę porównawczą ze wzorcem; pomiary wykonane dla próbek w metanolu; warunki eksperymentalne:

- wzorzec – N-metyloakrydyna, której widma absorpcyjne i emisyjne nakładają się z widmami próbek badanych; $C_m = 10^{-5}$ - 10^{-6} M
- dla każdej z próbek pomiary wykonywane były na wykalibrowanych aparatach, nie zmieniając ich ustawień podczas wykonywania eksperymentów

- aby zminimalizować błąd pomiarowy użyto kuwety kwarcowej o drodze optycznej 10 mm, stężenia próbek zostały dobrane tak aby absorbancja w maksimum nie przekraczała 0,1, co niweluje efekt filtra wewnętrznego.

Wyznaczenie wydajności kwantowej: na podstawie skorygowanego widma emisji fluorescencji, obliczając pole powierzchni pod krzywą próbki oraz wzorca, wykonując obliczenia na podstawie wzoru:

$$\frac{S_x}{S_R} \times \frac{A_R^\lambda}{A_x^\lambda} \times \frac{n_x^2}{n_R^2} \times \Phi^R$$

gdzie: x- substancja badana; R- referencja; S- pole powierzchni pod krzywą emisji fluorescencji; A – absorbancja przy tej samej dł. fali dla x i R; n - poprawka uwzględniająca różnice w użytych rozpuszczalnikach dla x i R; Φ - wydajność kwantowa referencji. Współczynniki załamania światła w równaniu pozwalają uwzględnić różnicę w stosowanych rozpuszczalnikach dla próbek badanych jak i wzorca.

Procedura pomiaru:

1. pomiar widma absorpcji dla rozpuszczalnika
2. pomiar widma absorpcji dla próbki
3. odjęcie widma rozpuszczalnika od widma próbki
4. określenie gęstości optycznej dla próbki dla określonej długości fali
5. pomiar widma emisji rozpuszczalnika
6. pomiar widma emisji próbki
7. Skorygowanie widma emisji i wyznaczenie pola powierzchni pod krzywą
8. powtórzenie kroków 1-7 dla standardu

Analiza czasowo-rozdzielcza: pomiar czasów życia fluorescencji dla konkretnych fluoroforów, wykonywano w zależności od środowiska (polarność rozpuszczalnika, pH) metodą TCSPC (ang. Time correlated single photoncounting). Analizę przeprowadzono również na spektrofluorymetrze FluoTime300 stosując adekwatne warunki do poprzednich i te same próbki dla których rejestrowano widma emisji. Krzywe zaniku czasu życia analizowano poprzez program FluoFit (PicoQuant). Wartości czasów życia τ [ns]

obliczono używając Gaussowskiego modelu z dekonwolucją (*ang.* lifetime distribution model with reconvolution). IRF (*ang.* instrument response function), była mierzona z udziałem rozpraszacza światła (LUDOX Colloidal Silica) dla każdej z mierzonych próbek, przed i po wykonaniu pomiaru, by zapewnić stabilność instrumentu.

Analiza wpływu rozpuszczalnika na właściwości fizykochemiczne

Wyznaczanie zależności pomiędzy przesunięciem Stokesa (oś y) a parametrem

Dimrotha, Hansena oraz Kamleta-Tafta;

Tabela 20. Parametry Dimroth'a, Hansena i Kamleta-Taft'a dla zastosowanych rozpuszczalników, zaczerpnięte ze źródeł: Reichardt, Ch.; *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319-2358' https://www.accudynetest.com/solubility_table.html

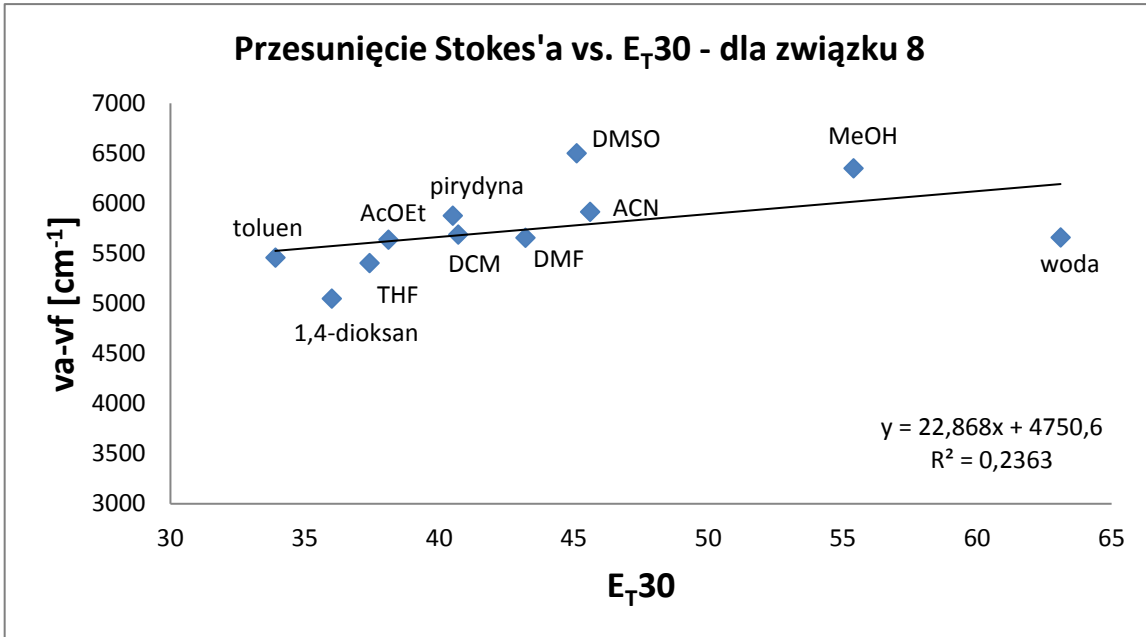
rozpuszczalnik	parametr Dimroth'a	parametry Hansena			parametry Kamlet'a- Taft'a				
		dD	dP	dH	α	β	π^*	Δf	EN/T
metanol (MeOH)	55,4	14,7	12,3	22,3	0,98	0,66	0,6	0,33	0,762
acetonitryl (ACN)	45,6	15,3	18	6,1	0,19	0,4	0,75	0,34	0,46
dichlorometan (DCM)	40,7	18,2	6,3	6,1	0,13	0,1	0,82	0,23	0,309
tetrahydrofuran (THF)	37,4	16,8	5,7	8	0	0,55	0,58	0,22	0,207
1,4-dioksan	36	17,5	1,8	9	0	0,37	0,55	0,028	0,164
pirydyna	40,5	19	8,8	5,9	0	0,64	0,87	0,23	0,302
<i>N,N</i> - dimetyloformamid (DMF)	43,2	17,4	13,7	11,3	0	0,69	0,88	0,3	0,386
dimetylosulfotlenek (DMSO)	45,1	18,4	16,4	10,2	0	0,76	1	0,29	0,444

woda	63,1	15,6	16	42,3	1	0,18	1,09	0,35	1
octan etylu (AcOEt)	38,1	15,8	5,3	7,2	0	0,45	0,55	0,2	0,228
toluen	33,9	18	1,4	2	0	0,11	0,54	0,014	0,099

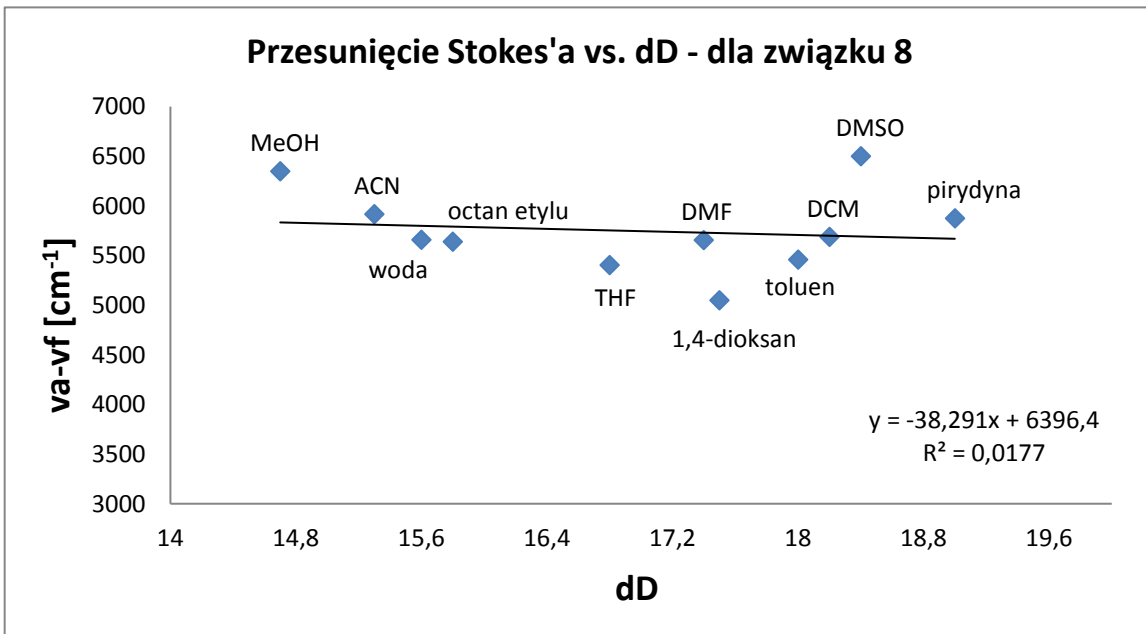
Wykresy zależności przesunięcia Stokes'a od określonego parametru zamieszczonego w.w. Tabeli 1, dla związku 8, 10 i 12.

Związek 8:

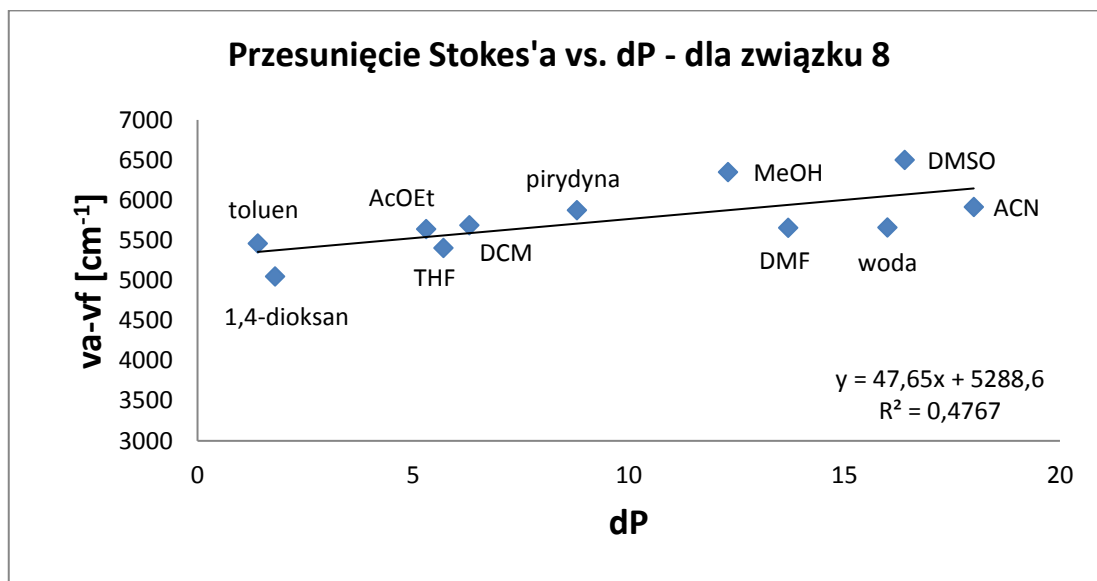
Wykres 1.



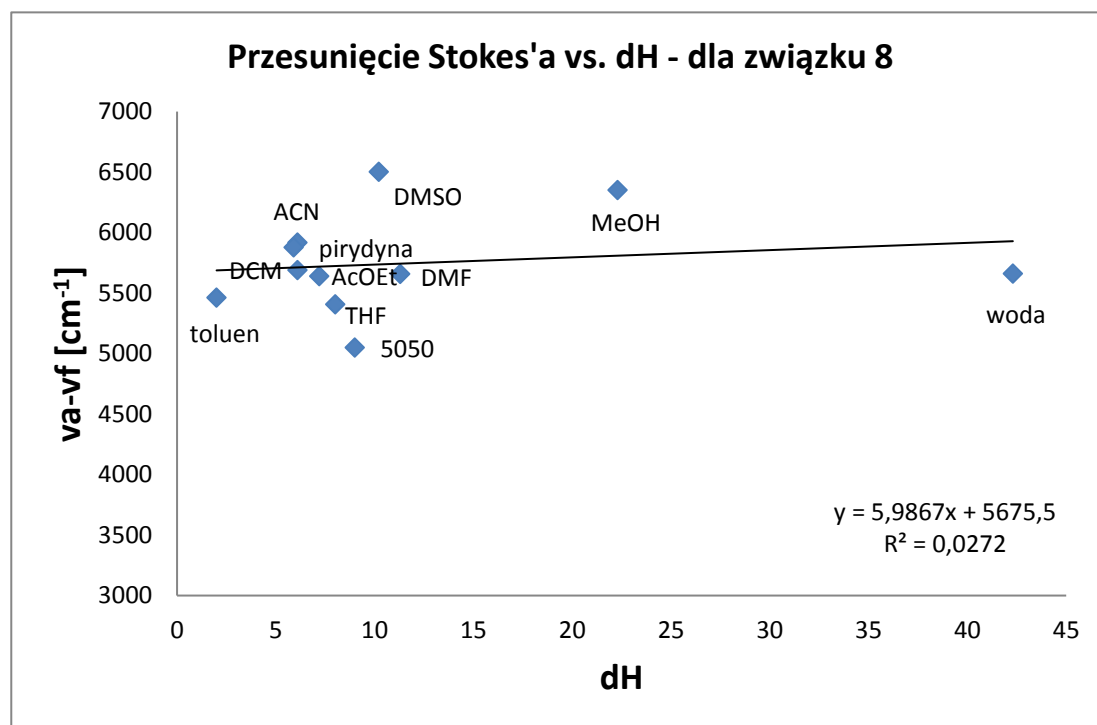
Wykres 2.



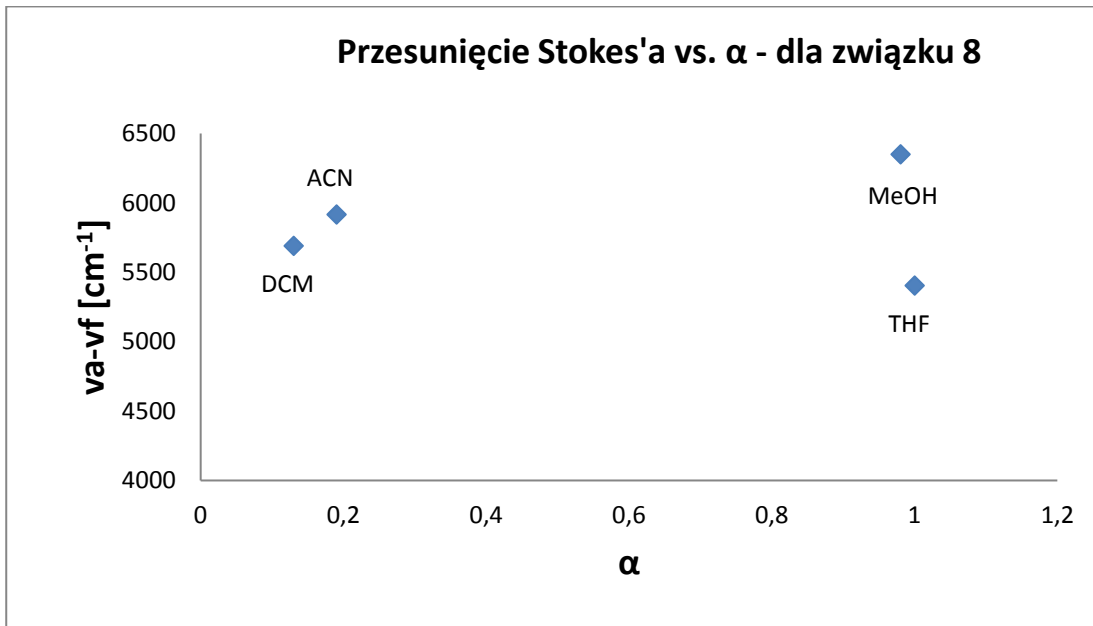
Wykres 3.



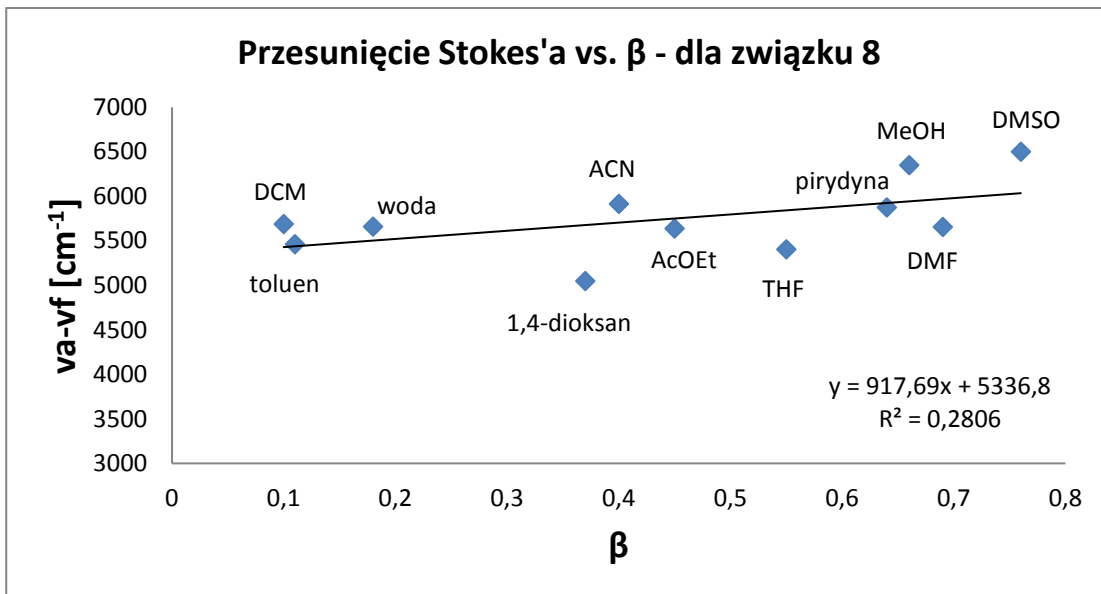
Wykres 4.



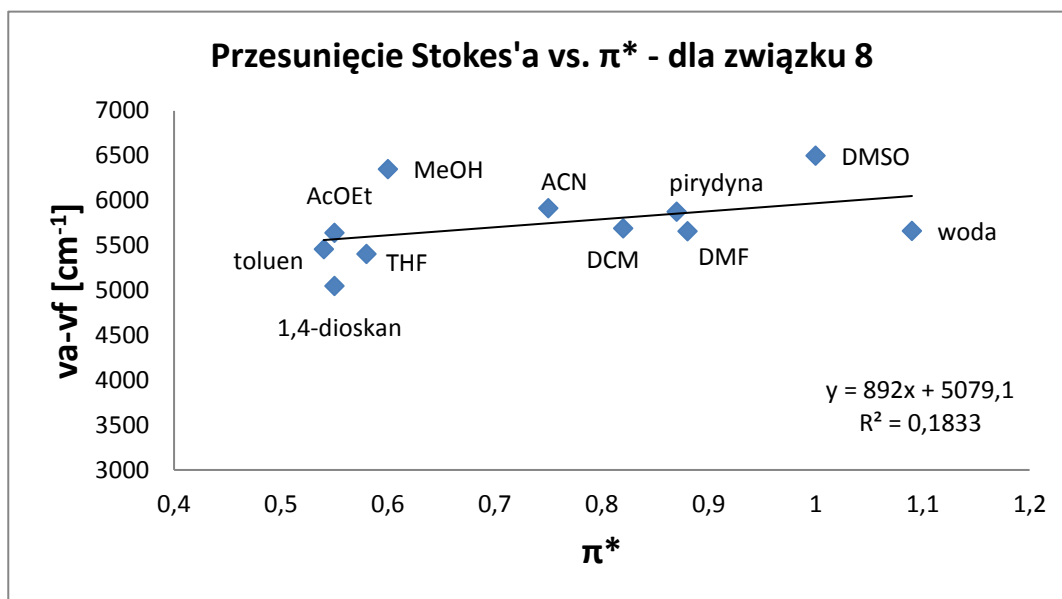
Wykres 5.



Wykres 6.

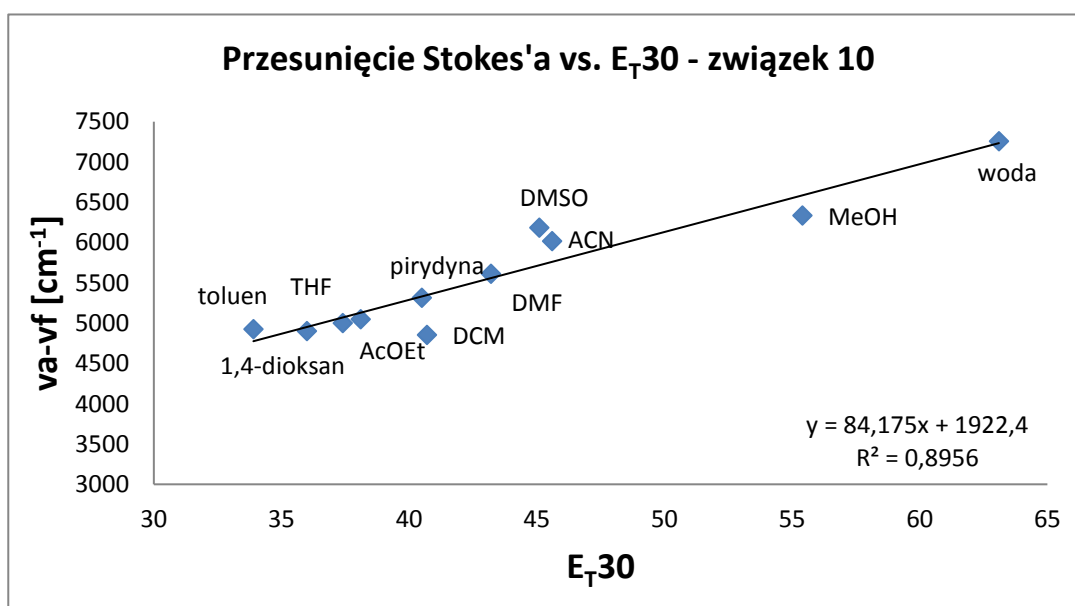


Wykres 7.

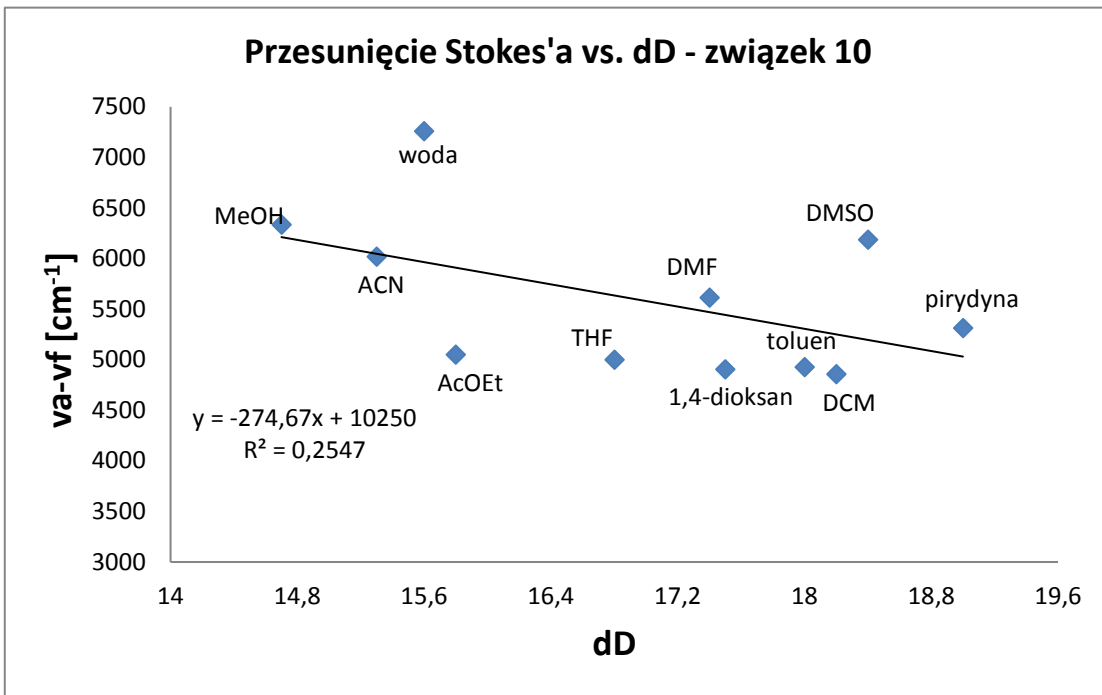


Związek 10

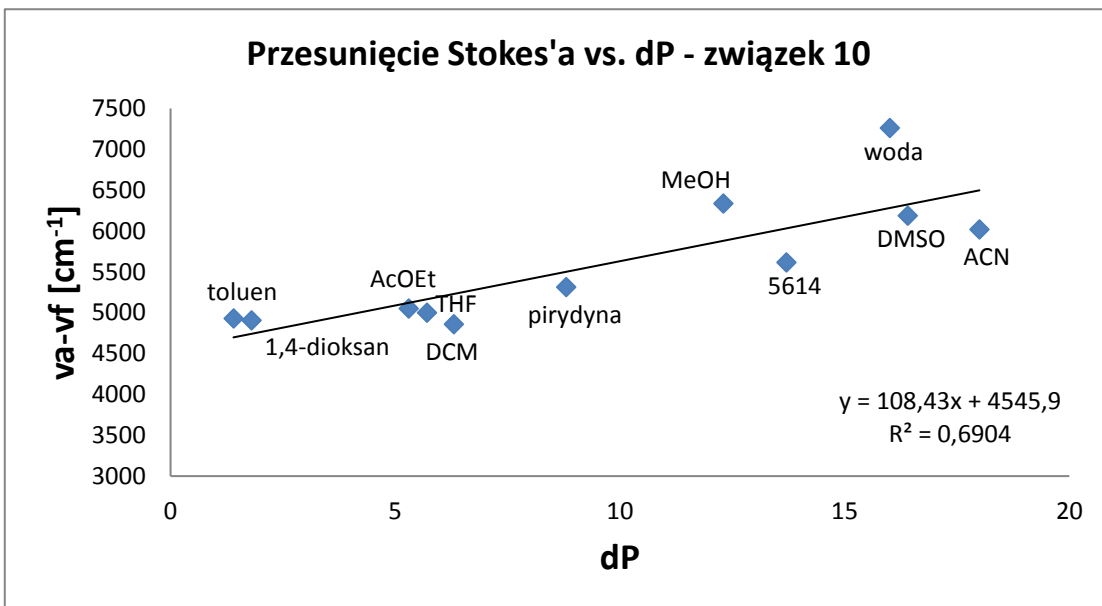
Wykres 8.



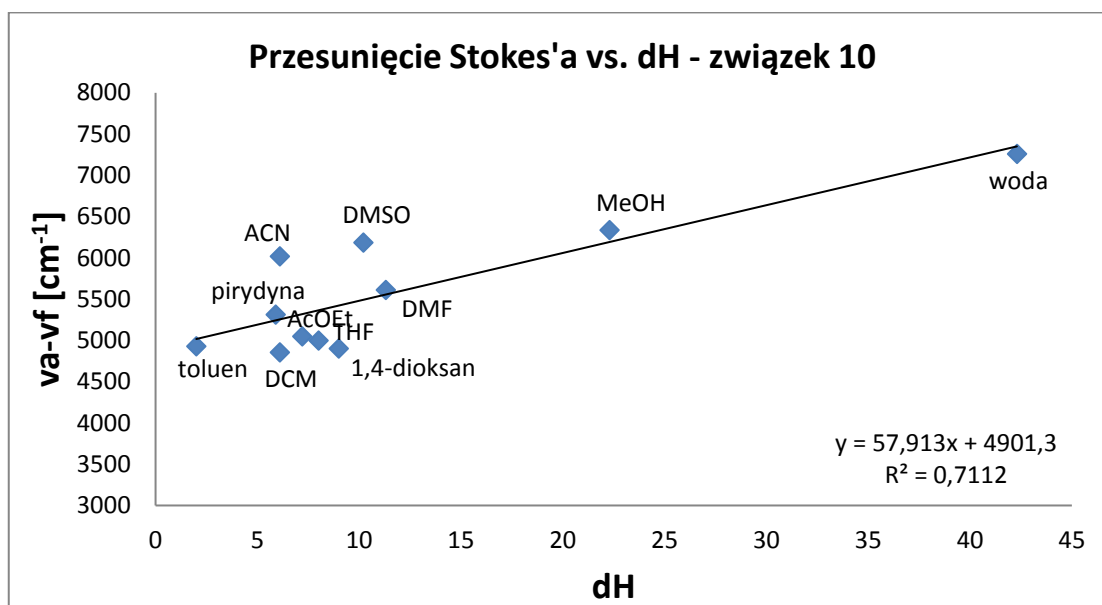
Wykres 9.



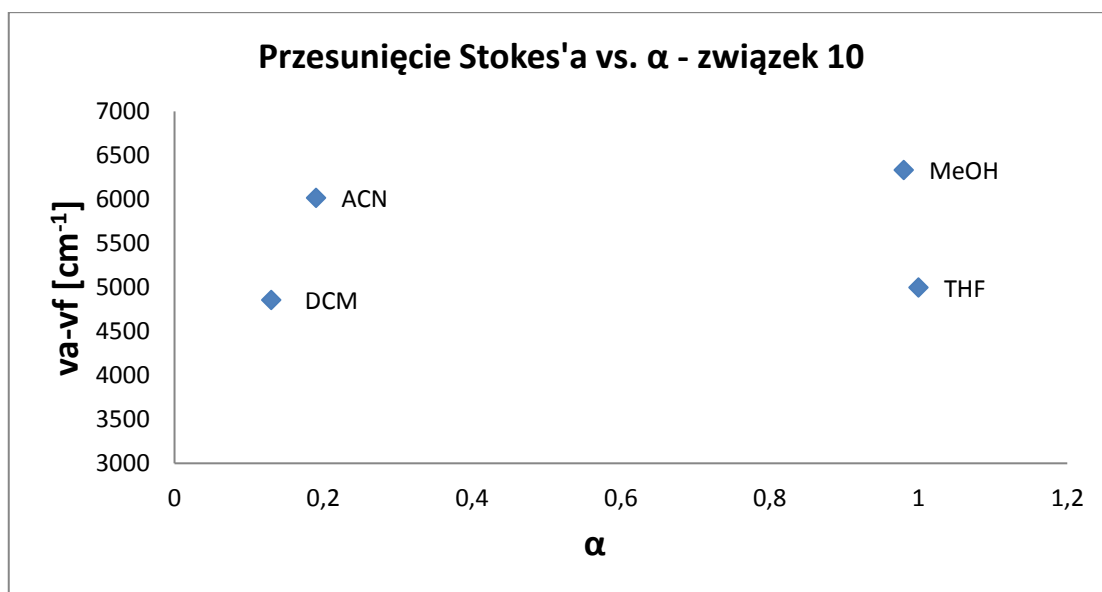
Wykres 10.



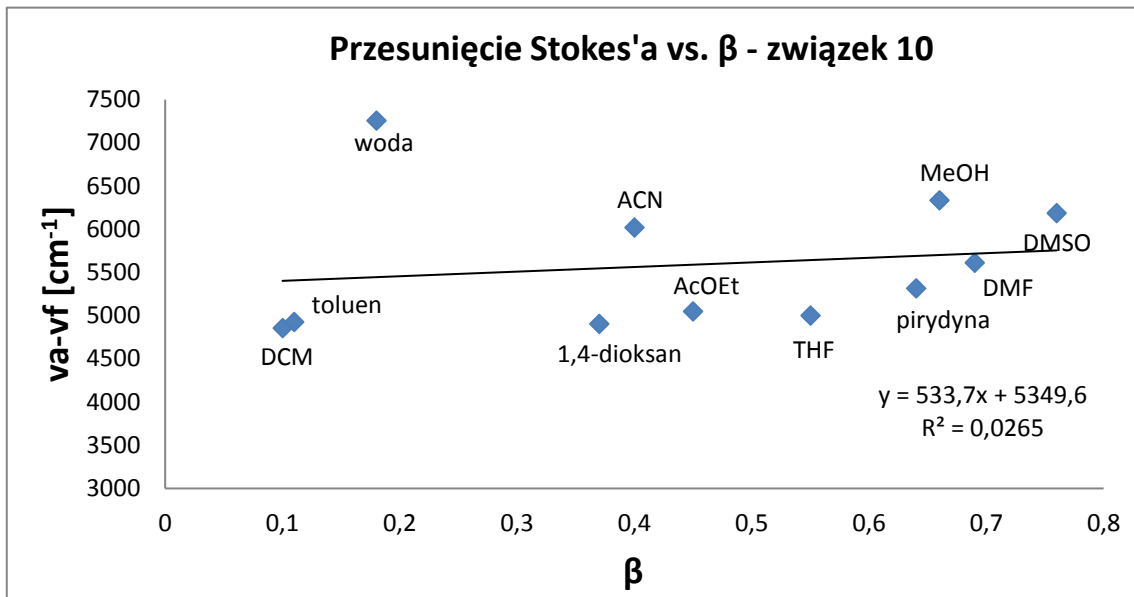
Wykres 11.



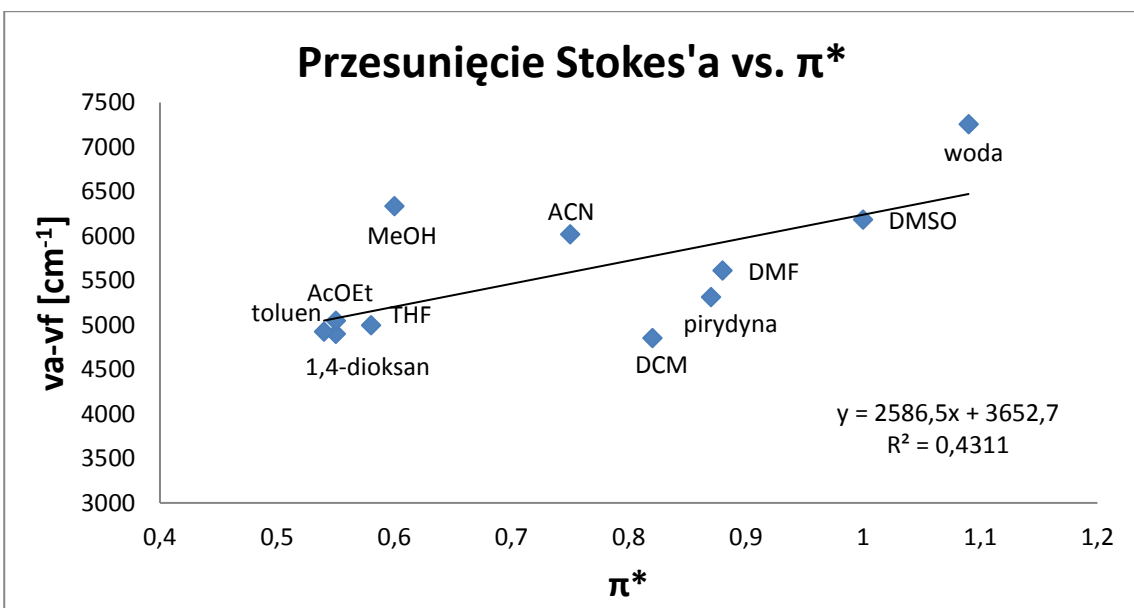
Wykres 12.



Wykres 13.

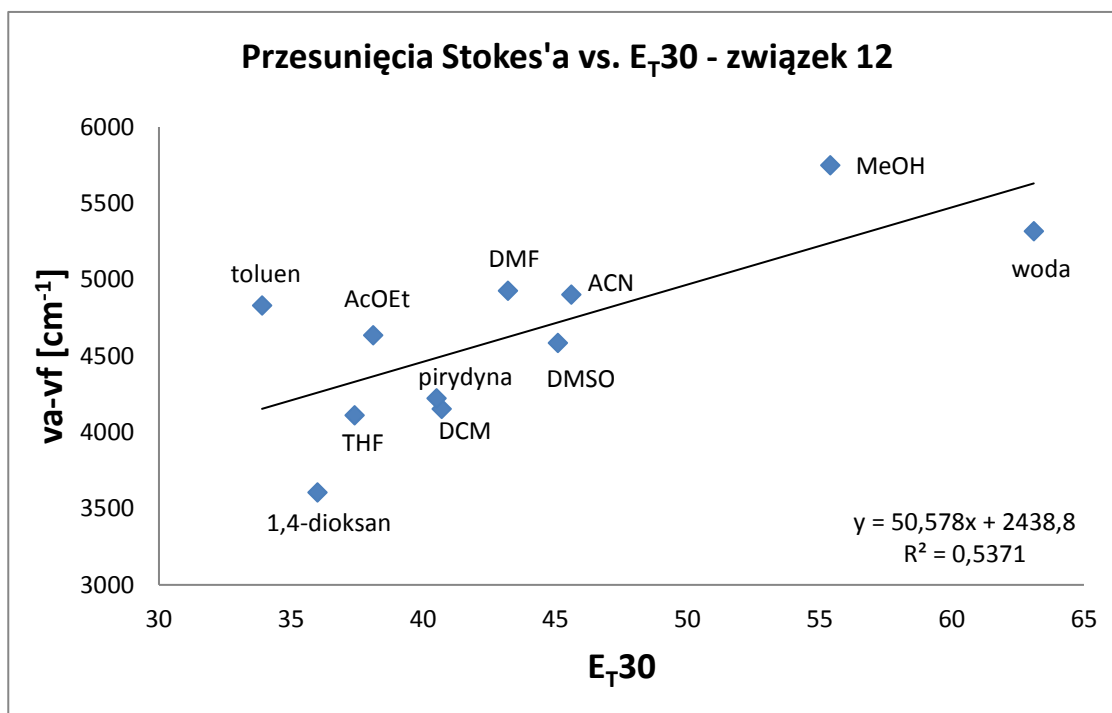


Wykres 14.

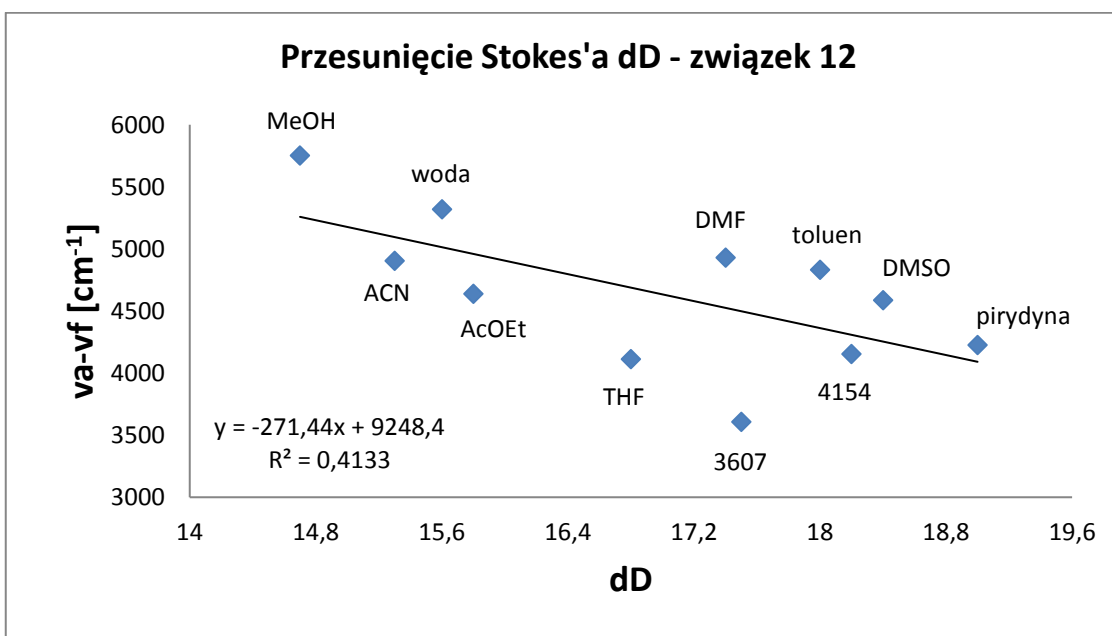


Związek 12.

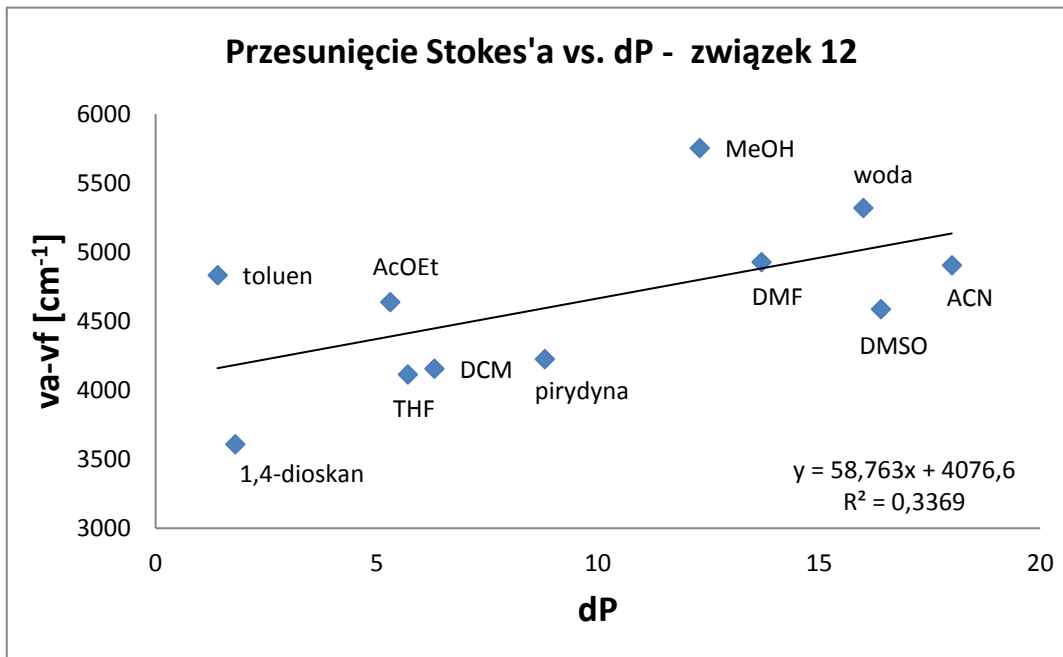
Wykres 15.



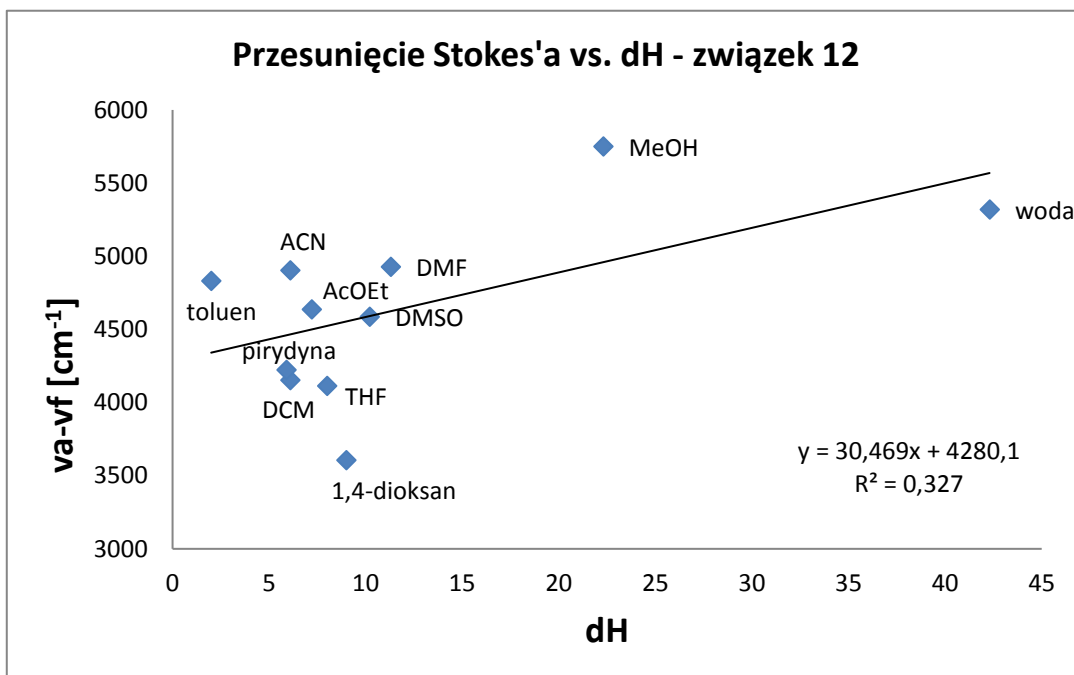
Wykres 16.



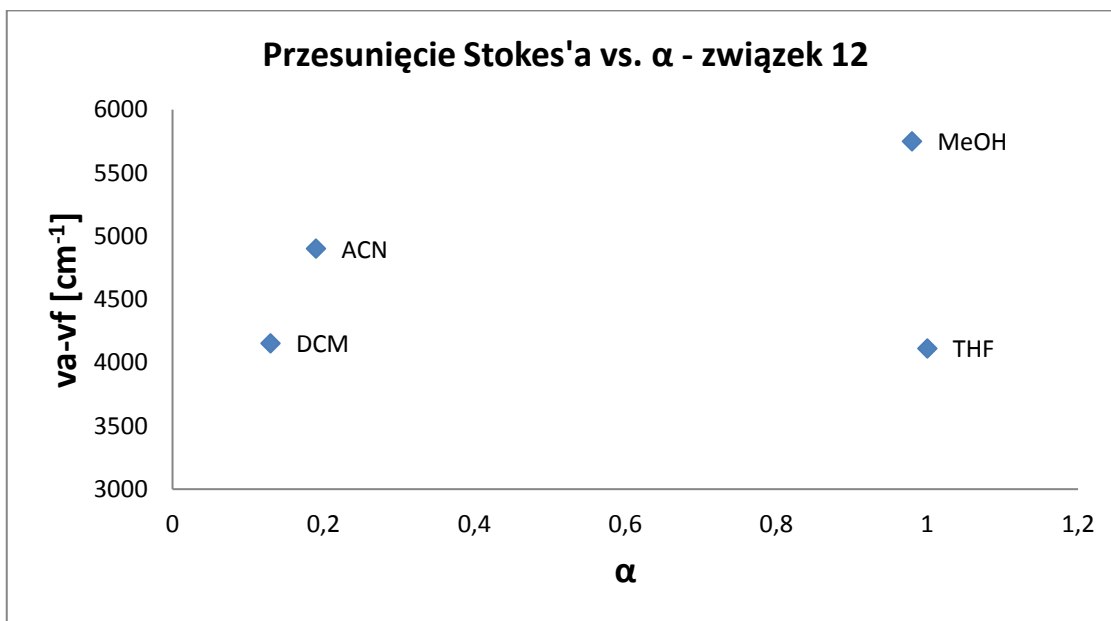
Wykres 17.



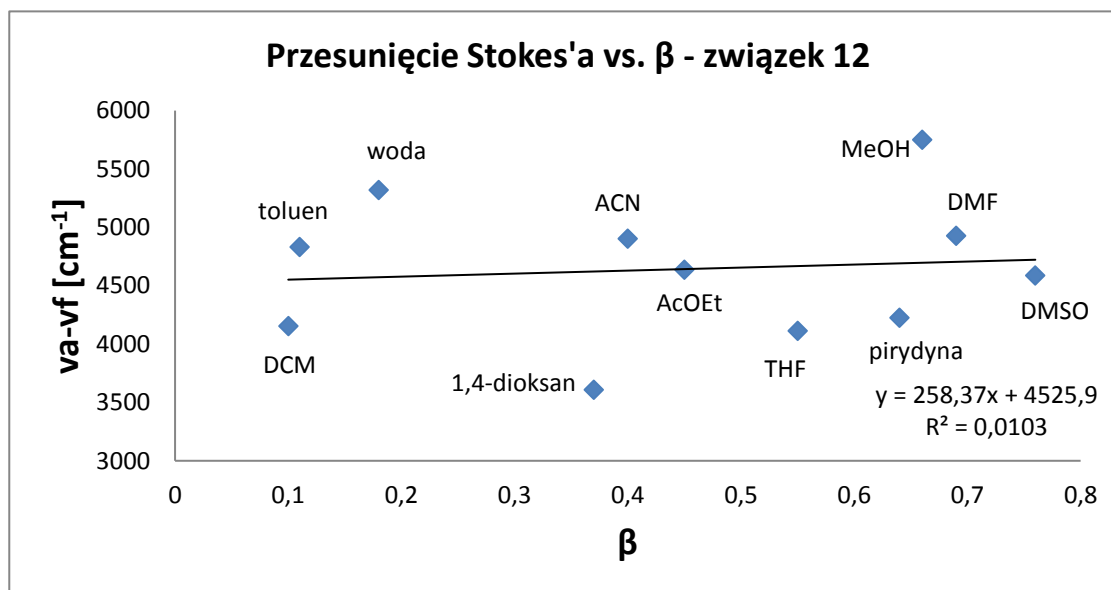
Wykres 18.



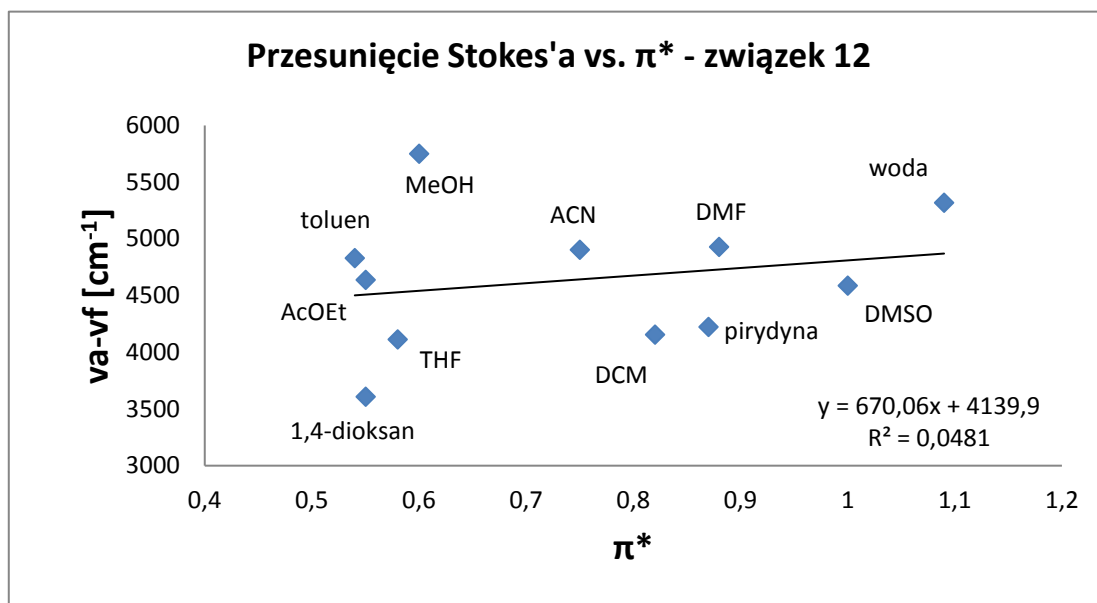
Wykres 19.

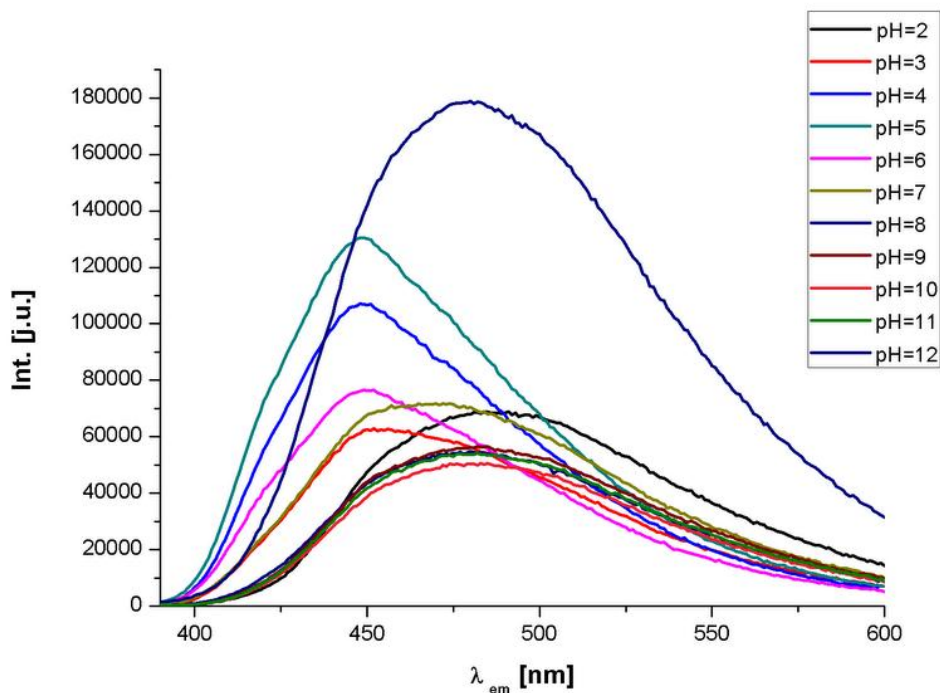


Wykres 20.

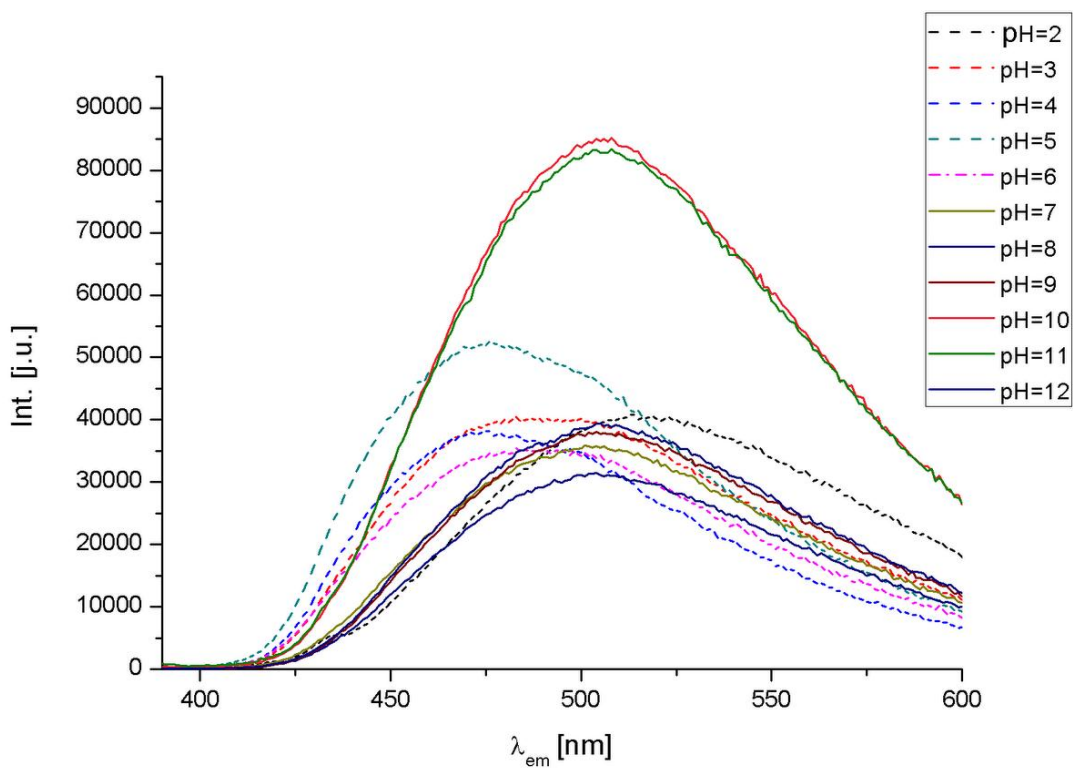


Wykres 21.

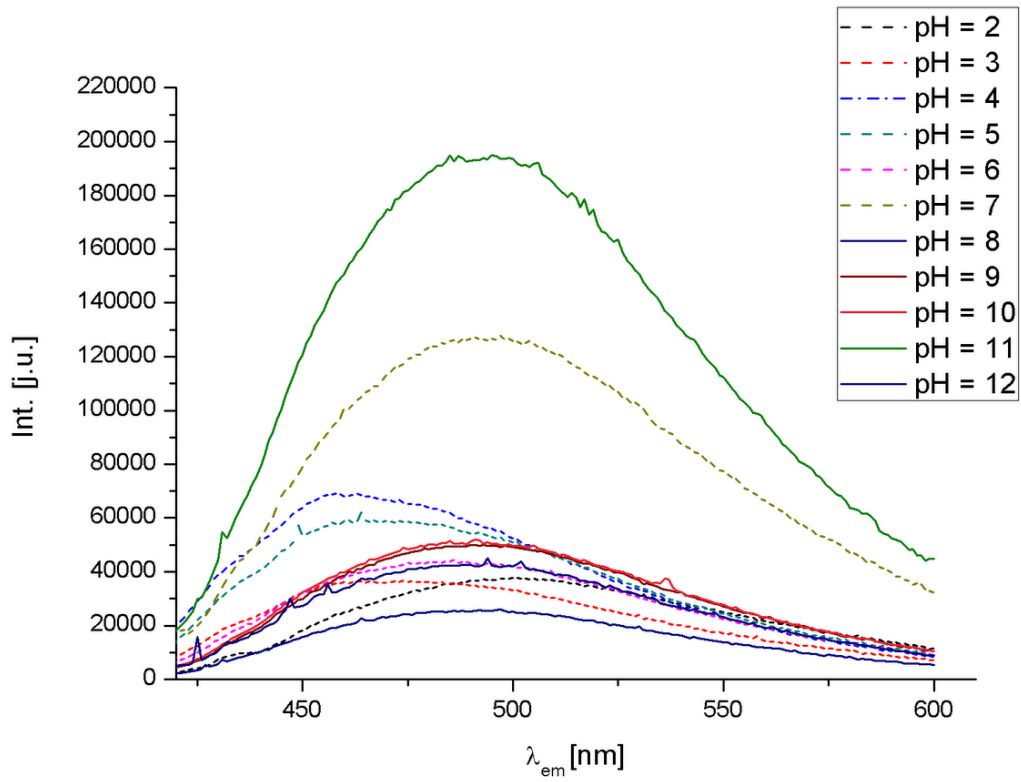


Emisja fluorescencji w zależności od pH

Rysunek 66. Widma emisji fluorescencji dla związku **8** w różnym pH.



Rysunek 67. Widma emisji fluorescencji dla związku **10** w różnym pH.

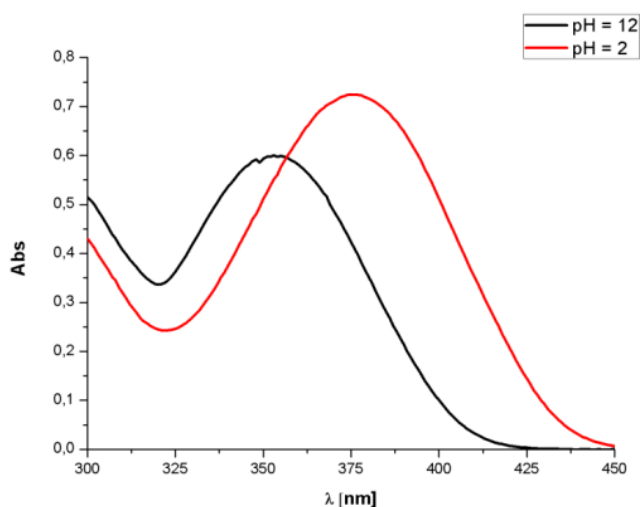


Rysunek 68. Widma emisji fluorescencji dla związku **12** w różnym pH.

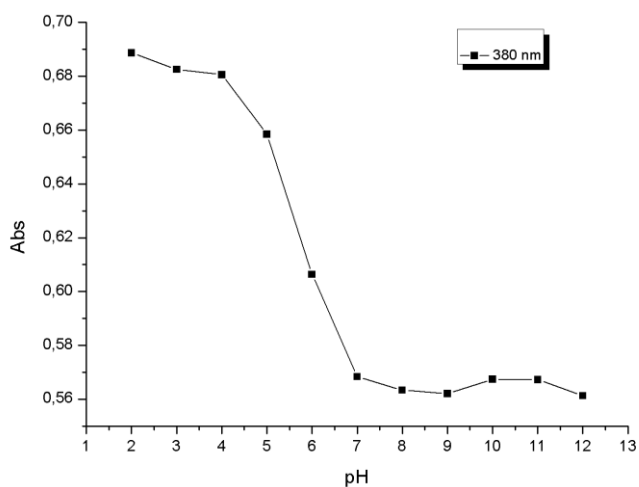
A. wyznaczanie pKa i pKa*

- i) pKa wyznaczono z krzywej miareczkowania, znajdując największą różnicę w maksimach absorpcji pomiędzy skrajnymi pH, po czym wyznaczono krzywe, z których odczytano wartości pKa porównując je z wartościami uzyskanymi metodą obliczeniową.

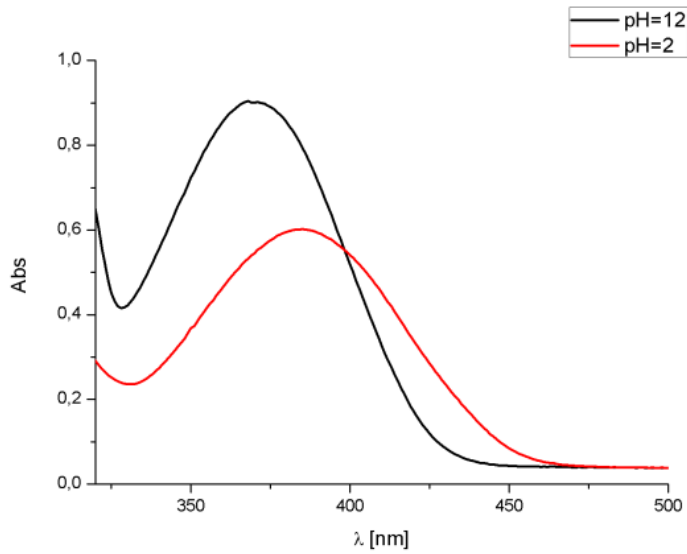
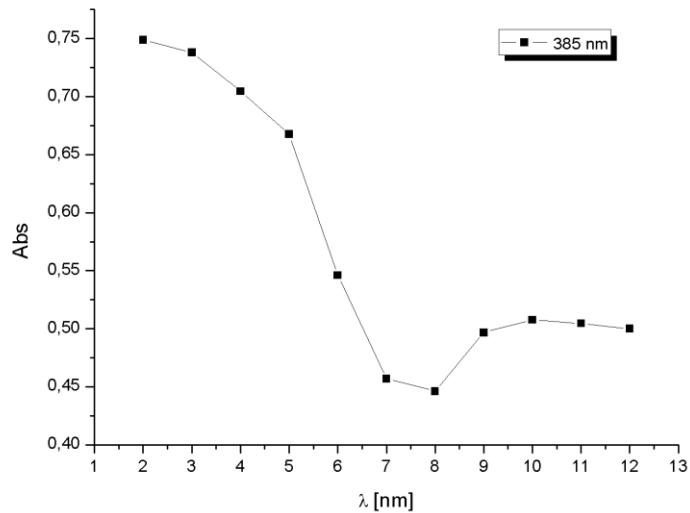
związek 8:

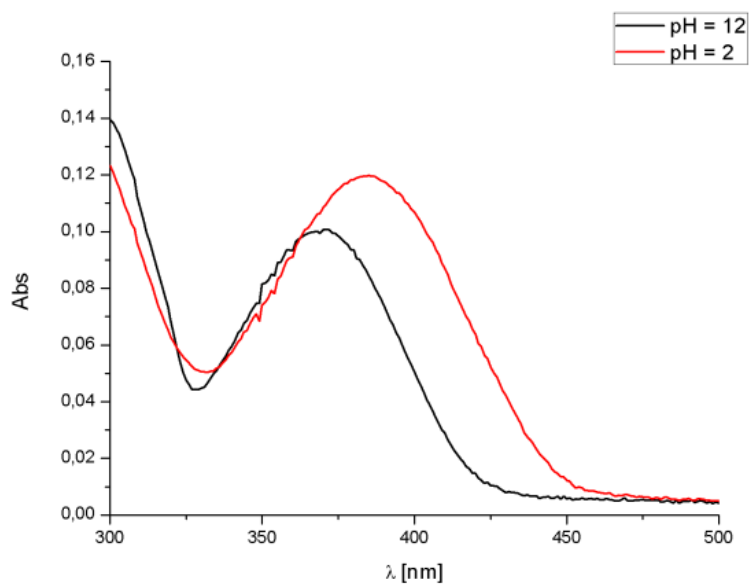
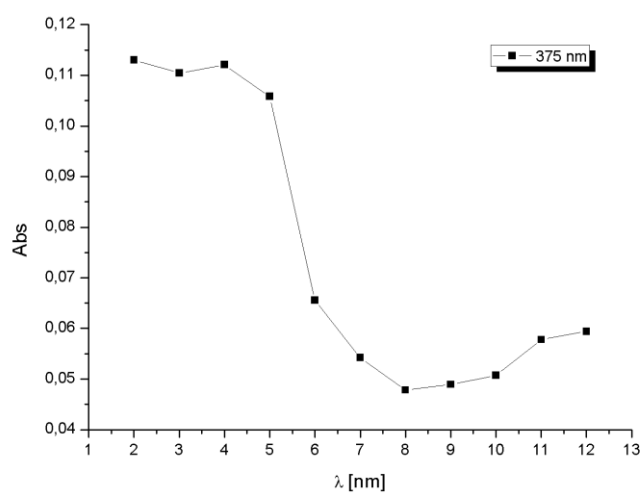


Wykres 22. Pasma absorpcyjne w pH 2 i 12 dla związku 8.



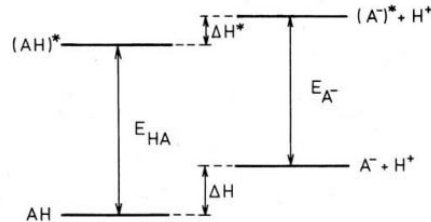
Wykres 23. Krzywa miareczkowania spektrofotometrycznego dla związku 8.

Związek 10**Wykres 24.** Pasma absorpcyjne w pH 2 i 12 dla związku 10.**Wykres 25.** Krzywa miareczkowania spektrofotometrycznego dla związku 10.

Związek 12**Wykres 26.** Pasma absorpcyjne w pH 2 i 12 dla związku 12**Wykres 27.** Krzywa miareczkowania spektrofotometrycznego związku 12.

ii) pK_a^*

Wyznaczono na podstawie cyklu Förstera¹⁴³ – pośrednia metoda wyznaczania równowag stanu wzbudzonego, takich jak pK_a^* .



Dla dwóch skrajnych pH 2 oraz 12 określono maksima absorpcji oraz emisji i wyznaczono różnicę energii stanu wzbudzonego pomiędzy formą anionową A^- oraz kationową HA związku **8**, **10** i **12**, wyrażoną jako różnica w entalpiach reakcji ΔH i ΔH^* : $E_{HA} - E_{A^-} = \Delta H - \Delta H^*$. Następnie z zależności:

$$pK_a - pK_a^* = \frac{E_{HA} - E_{A^-}}{2.3RT}$$

wyznaczono pK_a^* związku **8**, **10** i **12**.

V. NAJWAŻNIEJSZE WYNIKI

Najważniejsze uzyskane wyniki

1. Opracowałam wydajną metodę syntezy 6-bromo-2-*N*-podstawionych pirydynylowych aminoalkoholi.
2. Opracowałam metodę syntezy pochodnych 1,2-Bis(pirydylo)etylenu z wykorzystaniem wspomaganie mikrofalowego.
3. Zoptymalizowałam reakcję sprzęgania Hecka w układach heterocyklicznych, w szczególności dla związku **3**.
4. Otrzymałam kryształ związku **10**, potwierdzający izomerię geometryczną *trans* produktu (badania rentgenograficzne).
5. Przeprowadziłam badania fotofizyczne otrzymanych fluoroforów:
 - i) wyznaczyłam molowe współczynniki absorpcji (związki **8-35**)
 - ii) wyznaczyłam wydajności kwantowe fluorescencji (związki **8-35**)
 - iii) dla trzech wybranych pochodnych (**8,10,12**) zbadałam wpływ polarności rozpuszczalnika na pasma absorpcyjno-emisyjne
 - iv) dla trzech wybranych pochodnych (**8,10,12**) wyznaczyłam zależność przesunięcia Stokes'a od parametrów:
 - a) Lipperta-Mattagi,
 - b) Dimrotha,
 - c) Kameta-Tafta
 - d) Hansena
 - v) dla trzech wybranych pochodnych (**8,10,12**) zbadałam wpływ zmian pH na pasma absorpcyjno-emisyjne
 - vi) dla trzech wybranych pochodnych (**8,10,12**) wyznaczyłam czasy życia fluorescencji w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika oraz pH
 - vii) dla trzech wybranych pochodnych (**8,10,12**) wyznaczyłam pK_a stanu podstawowego wzbudzonego
 - viii) zbadałam mechanizm reakcji termicznej cyklizacji za pomocą pomiarów fluorescencyjnych w czasie rzeczywistym, wykazując, że jest to właściwa technika detekcji odcięcia fluoroforu od znakowanej bio-cząsteczki.

6. Otrzymałam węglan nukleozydu i przeprowadziłam badania umożliwiające określenie szybkości reakcji cyklizacji dla wybranego fluoroforu w funkcji czasu i temperatury, potwierdzając tym samym mechanizm termicznego usuwania na drodze reakcji wewnątrzcząsteczkowej.
7. Zoptymalizowałam dwie metody syntezy amidofosforynu z barwnikiem fluorescencyjnym.
8. Zoptymalizowałam metodę włączania jednostki fluoroforu na koniec 5'-nici oraz oczyszczania znakowanego oligonukleotydu. Przy użyciu techniki HPLC potwierdziłam termiczne odcinanie znacznika z centrum fosforowego nici oligonukleotydowej, na drodze wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji.

**VI. STRESZCZENIE W JĘZYKU
ANGIELSKIM**

Abstract

Thermo-lability is a very desirable feature of compounds, with application in various biochemical approaches. 2-pyridinyl thermolabile protecting groups (2-Py TGO) are an excellent example of such thermo-responsive derivatives. They are a significant tool in organic chemistry and are widely used for protection of hydroxyl and phosphate functions. Their prominent feature is the deprotection process which occurs in mild conditions without the use of strong acids or bases. This reaction is based on the intramolecular cyclization mechanism, highly dependable on physicochemical properties of 2-pyridinyl compounds, pH and temperature. Due to the pyridine ring properties, they are supposedly promising precursors of potential bioactive compounds or fluorescent sensors. Heterocycles are widely described, as a crucial structural part of fluorescent labels, because they are boosting the fluorescence properties, enhancing stability and highering their sensitivity to the environmental factors, like pH or metal ions. Aminostyrylpyridinium dyes are good example of useful sensors for detection of changes in cell membrane potential.

Many scientific branches, such as pharmacy, medicine, and biology, use sensitive analytical methods in their experiments. Most common is fluorescent labeling, conducted, e.g. to track chemical and biological processes in living organisms. Therefore, the challenge facing us was to obtain 2-aminopyridine derivatives, possessing fluorescent properties and ability to intramolecular cyclization. Combination of fluorescent and thermosensitive properties might lead to the new class of fluorescent tags for oligonucleotides, with a unique mechanism of their removal from the labeled molecule, in very mild conditions. Which is why the main aim of this dissertation was to design, synthesize and characterize physicochemical properties of novel 1,2-Bis(2-pyridyl)ethylene derivatives, as potential fluorescent dyes. I designed a conjugated system of 2-aminopyridine derivatives to obtain certain physicochemical properties of potential fluorescent dyes. First I planned and optimized the synthesis of 2-pyridinyl derivatives, based on pyridines chemistry and cross-coupling Heck reaction. Structures of each compound were characterized by spectroscopic techniques (^1H NMR, ^{13}C NMR, HSQC, COSY, ^{19}F NMR, ^1H - ^{15}N NMR, HRMS-ESI, MALDI-TOF and crystallography for one analog). I obtained fluorescently labeled nucleoside, for which I determined the efficiency of the fluorophore removal process in various temperatures and time of heating. I determined photophysical properties of those compounds, such as molar extinction coefficient, maxima of absorption and emission, Stokes shift and quantum yield of fluorescence. For three compounds I have also determined the effect of solvents dipole moments on fluorescence emission and Stokes Shifts and described the effect by several

factors, such as H-bonding, polarizability or dipole-dipole interactions. For three compounds I have examined the pH effect on emission shifts and calculated the pKa of ground and excited states. Moreover, I have developed the method for fluorophore-phosphoramidite synthesis, oligomer labeling and deprotection of fluorescent tag from the oligonucleotide.

All the results will expand the heterocycles chemistry of new derivatives, which may be used in future organic synthesis. Their potentially low toxicity and a specific removal mechanism from the labeled molecule can be applied in tracking chemical and biological processes in living cells.

VII. BIBLIOGRAFIA

Bibliografia

1. Myers, A. G. *Classics in Total Synthesis: Targets, Strategies, Methods* By K. C. Nicolaou and E. J. Sorenson. VCH: Weinheim. 1996. xxii + 798 pp. DM128.00. ISBN 3-527-29284-5. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 7906–7907 (1997).
2. Greene, T. W. *et al.* Protection for the Hydroxyl Group, Including 1,2- and 1,3-Diols. in *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis* 16–366 (John Wiley & Sons, Inc., 1999). doi:10.1002/9780470053485.ch2
3. Hoffmann, R. Protecting-Group-Free Synthesis. *Synthesis (Stuttg)*. **2006**, 3531–3541 (2006).
4. Baran, P. S., Maimone, T. J. & Richter, J. M. Total synthesis of marine natural products without using protecting groups. *Nature* **446**, 404–408 (2007).
5. Greene, T. W. & Wuts, P. G. M. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th ed By Peter G. M. Wuts (Pfizer) and Theodora W. Greene (The Rowland Institute for Science). John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ. 2006. xxviii + 1082 pp. \$94.95. ISBN 0-471-68754-0. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 1009–1009 (2007).
6. Schelhaas, M. & Waldmann, H. Protecting Group Strategies in Organic Synthesis. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **35**, 2056–2083 (1996).
7. Vinet, L. & Zhedanov, A. A 'missing' family of classical orthogonal polynomials. *J. Phys. A Math. Theor.* **44**, 085201 (2010).
8. Jarowicki, K. & Kocienski, P. Protecting groups. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 2495–2527 (2000). doi:10.1039/b003410j
9. Jarowicki, K. & Kocienski, P. Protecting groups. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 4005 (1998). doi:10.1039/a803688h
10. Parham, W. E. & Anderson, E. L. The Protection of Hydroxyl Groups. *J. Am. Chem. Soc.* **70**, 4187–4189 (1948).
11. Vu, M. T. & Maitte, P. Hydrolysis of dihydropyran acetals. *J. Heterocycl. Chem.* (1987).
12. Reese, C. B., Saffhill, R. & Sulston, J. E. 4-methoxytetrahydropyran-4-yl. *Tetrahedron* **26**, 1023–1030 (1970).
13. Reese, C. B., Saffhill, R. & Sulston, J. E. Symmetrical alternative to the tetrahydropyranyl protecting group. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 3366–3368 (1967).
14. Ley, S. V., Woods, M. & Zanotti-Gerosa, A. Dispiroketal in Synthesis: Preparation of a Stable, Sterically Demanding Glyceraldehyde Ketal and Diastereoselective Reactions with Simple Organometallic Reagents. *Synthesis (Stuttg)*. **1992**, 52–54 (1992).
15. Edwards, P. J., Entwistle, D. A., Ley, S. V., Owen, D. R. & Perry, E. J. Dispiroketal in synthesis (part 9): Resolution of 1,2-diols using a C2-symmetric diphenyltetrahydrobipyran. *Tetrahedron: Asymmetry* **5**, 553–556 (1994).
16. Ley, S. V., Leslie, R., D. Tiffin, P. & Woods, M. Dispiroketal in synthesis (part 2): A new group for the selective protection of diequatorial vicinal diols in carbohydrates. *Tetrahedron Lett.* **33**, 4767–4770 (1992).

17. Grice, P. *et al.* A New Strategy for Oligosaccharide Assembly Exploiting Cyclohexane-1,2-diacetal Methodology: An Efficient Synthesis of a High Mannose Type Nonasaccharide. *Chem. - A Eur. J.* **3**, 431–440 (2006).
18. Grice, P., Ley, S. V, Pietruszka, J., Priepke, H. W. M. & Warriner, S. L. Preparation, structure, derivatisation and NMR data of cyclohexane-1,2-diacetal protected carbohydrates. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 351–364 (1997). doi:10.1039/a605851e
19. Sharma, A. *et al.* Understanding Tetrahydropyranyl as a Protecting Group in Peptide Chemistry. *ChemistryOpen* **6**, 168–177 (2017).
20. Liu, J. & Wong, C.-H. An efficient method for the cleavage of p-methoxybenzylidene (PMP), tetrahydropyranyl (THP) and 1,3-dithiane protecting groups by Selectfluor™. *Tetrahedron Lett.* **43**, 4037–4039 (2002).
21. Bodipati, N., Palla, S. R. & Peddinti, R. K. Trifluoroacetic acid catalyzed tetrahydropyranlation of alcohols and phenols and direct conversion of THP ethers into acetates. *Indian J. Chem. - Sect. B Org. Med. Chem.* (2012).
22. Ashworth, I. W., Cox, B. G. & Meyrick, B. Kinetics and Mechanism of N -Boc Cleavage: Evidence of a Second-Order Dependence upon Acid Concentration. *J. Org. Chem.* **75**, 8117–8125 (2010).
23. ElAmin, B., Anantharamaiah, G. M., Royer, G. P. & Means, G. E. Removal of benzyl-type protecting groups from peptides by catalytic transfer hydrogenation with formic acid. *J. Org. Chem.* **44**, 3442–3444 (1979).
24. Seeberger, P. H., Caruthers, M. H., Bankaitis-Davis, D. & Beaton, G. Synthesis of phosphorodithioate DNA by the H-phosphonothioate method. *Tetrahedron* (1999). doi:10.1016/S0040-4020(99)00241-0
25. Merrifield, R. B. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149–2154 (1963).
26. Scott, D. E., Bayly, A. R., Abell, C. & Skidmore, J. Small molecules, big targets: drug discovery faces the protein–protein interaction challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 533–550 (2016).
27. Fields, G. B. Methods for Removing the Finoc Group. in *Peptide Synthesis Protocols* **35**, 17–28 (Humana Press, 1994).
28. Carpino, L. & Han, G. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group. *J. Org. Chem.* **44**, 3739–3739 (1979).
29. Lai, F. & Sheehan, T. Matrix effects in the derivatization of amino acids with naphthalene dicarboxaldehyde, 9-fluorenylmethyl chloroformate and phenylisothiocyanate. *Biotechniques* **14**, 642–9 (1993).
30. Scientific, F. A Review of Organosilanes in Organic Chemistry. *Online* (2012).
31. Ogilvie, K. K., Sadana, K. L., Thompson, E. A., Quilliam, M. A. & Westmore, J. B. The use of silyl groups in protecting the hydroxyl functions of ribonucleosides. *Tetrahedron Lett.* **15**, 2861–2863 (1974).
32. Markiewicz, W. T. & Wiewiorowski, M. A new type of silyl protecting groups in nucleoside

- chemistry. *Nucleic Acids Res.* **1**, s185–s190 (1978).
33. Ruecker, C. The Triisopropylsilyl Group in Organic Chemistry: Just a Protective Group, or More? *Chem. Rev.* **95**, 1009–1064 (1995).
 34. Boltje, T. J., Li, C. & Boons, G.-J. Versatile Set of Orthogonal Protecting Groups for the Preparation of Highly Branched Oligosaccharides. *Org. Lett.* **12**, 4636–4639 (2010).
 35. Djuric, S., Venit, J. & Magnus, P. Silicon in synthesis: stabase adducts - a new primary amine protecting group: alkylation of ethyl glycinate. *Tetrahedron Lett.* **22**, 1787–1790 (1981).
 36. Pathak, T. & Waldmann, H. Enzymes and protecting group chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 112–120 (1998).
 37. Reidel, A. & Waldmann, H. Enzymatic Protecting Group Techniques in bioorganic synthesis. *J. für Prakt. Chemie/Chemiker-Zeitung* **335**, 109–127 (1993).
 38. Waldmann, H., Heuser, A. & Schulze, S. Selective enzymatic removal of protecting groups: The phenylacetamide as amino protecting group in phosphopeptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **37**, 8725–8728 (1996).
 39. Meier, C., Jessen, H. J. & Balzarini, J. Nucleoside Diphosphate Prodrugs. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **52**, 83–84 (2008).
 40. Gollnest, T. *et al.* Membrane-permeable Triphosphate Prodrugs of Nucleoside Analogues. *Angew. Chemie Int. Ed.* **55**, 5255–5258 (2016).
 41. Wang, G. *et al.* Synthesis of AZT 5'-Triphosphate Mimics and Their Inhibitory Effects on HIV-1 Reverse Transcriptase. *J. Med. Chem.* **47**, 6902–6913 (2004).
 42. Meier, C., Jessen, H. J. & Balzarini, J. Nucleoside Diphosphate Prodrugs. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **52**, 83–84 (2008).
 43. Rajasekharan Pillai, V. N. Photoremovable Protecting Groups in Organic Synthesis. *Synthesis (Stuttg.)* **1980**, 1–26 (1980).
 44. Pelliccioli, A. P. & Wirz, J. Photoremovable protecting groups: reaction mechanisms and applications. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**, 441–458 (2002).
 45. Hasan, A. *et al.* Photolabile protecting groups for nucleosides: Synthesis and photodeprotection rates. *Tetrahedron* **53**, 4247–4264 (1997).
 46. Wang, P. Photolabile Protecting Groups: Structure and Reactivity. *Asian J. Org. Chem.* **2**, 452–464 (2013).
 47. Cama, L. D. & Christensen, B. G. Total synthesis of thienamycin analogs. 1. Synthesis of the thienamycin nucleus and dl-decysteaminythienamycin. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 8006–8007 (1978).
 48. Cameron, J. F., Grant Willson, C. & Fréchet, J. M. J. Photogeneration of amines from α -keto carbamates: design and preparation of photoactive compounds. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 2429–2442 (1997). doi:10.1039/a602018f
 49. Kodandaramaiah, S. B., Franzesi, G. T., Chow, B. Y., Boyden, E. S. & Forest, C. R. Automated whole-cell patch-clamp electrophysiology of neurons in vivo. *Nat. Methods* **9**, 585–587

- (2012).
50. Kiuru, E., Ahmed, Z., Lönnberg, H., Beigelman, L. & Ora, M. 2,2-Disubstituted 4-Acylthio-3-oxobutyl Groups as Esterase- and Thermolabile Protecting Groups of Phosphodiester. *J. Org. Chem.* **78**, 950–959 (2013).
 51. Lun, D. J., Waterhouse, G. I. N. & Telfer, S. G. A General Thermolabile Protecting Group Strategy for Organocatalytic Metal–Organic Frameworks. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 5806–5809 (2011).
 52. Wilk, A., Chmielewski, M. K., Grajkowski, A., Beaucage, S. L. & Phillips, L. R. 3-(N-tert-Butylcarboxamido)-1-propyl and 4-Oxopentyl Groups for Phosphate/Thiophosphate Protection in Oligodeoxyribonucleotide Synthesis. in *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry Chapter 3*, 3.9.1-3.9.16 (John Wiley & Sons, Inc., 2002).
 53. Chmielewski, M. K. Thermolabile protecting groups in oligonucleotide synthesis. in *Collection Symposium Series 317–319* (Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, 2011). doi:10.1135/css201112317
 54. Chmielewski, M. K., Tykarska, E., Markiewicz, W. T. & Rypniewski, W. Engineering N-(2-pyridyl)aminoethyl alcohols as potential precursors of thermolabile protecting groups. *New J. Chem.* **36**, 603–612 (2012).
 55. Chmielewski, M. K. *et al.* Thermolytic Carbonates for Potential 5'-Hydroxyl Protection of Deoxyribonucleosides. *J. Org. Chem.* **68**, 10003–10012 (2003).
 56. Chmielewski, M. K. Novel thermolabile protecting groups with higher stability at ambient temperature. *Tetrahedron Lett.* **53**, 666–669 (2012).
 57. Witkowska, A., Krygier, D., Brzezinska, J. & Chmielewski, M. K. Modulating the Stability of 2-Pyridinyl Thermolabile Hydroxyl Protecting Groups via the 'chemical Switch' Approach. *J. Org. Chem.* **80**, 12129–12136 (2015).
 58. Kaczyński, T. P., Manszewski, T. & Chmielewski, M. K. Stereoselective P-Cyclisation and Diastereoisomeric Purification of 5-Phenyl-3-(pyridin-2-yl)-1,3,2-oxazaphospholidine Formed from a Thermolabile Protecting Group. *European J. Org. Chem.* **2016**, 2522–2527 (2016).
 59. Schultz, C. Prodrugs of biologically active phosphate esters. *Bioorg. Med. Chem.* **11**, 885–898 (2003).
 60. Warnecke, S. & Meier, C. Synthesis of Nucleoside Di- and Triphosphates and Dinucleoside Polyphosphates with cyclo Sal-Nucleotides. *J. Org. Chem.* **74**, 3024–3030 (2009).
 61. Brzezinska, J., Witkowska, A., Bałabańska, S. & Chmielewski, M. K. 2-Pyridinyl- N -(2,4-difluorobenzyl)aminoethyl Group As Thermocontrolled Implement for Protection of Carboxylic Acids. *Org. Lett.* **18**, 3230–3233 (2016).
 62. Wong, C.-H. & Zimmerman, S. C. Orthogonality in organic, polymer, and supramolecular chemistry: from Merrifield to click chemistry. *Chem. Commun.* **49**, 1679 (2013).
 63. Alvarez-Builla, J., Vaquero, J. J. & Barluenga, J. *Modern Heterocyclic Chemistry. Modern Heterocyclic Chemistry* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011).
 64. Castor, S. B. & Hedrick, J. B. Pyridine and Pyridine Derivatives. *J. Environ. Radioact.* **102**,

- 769–792 (2001).
65. Zhu, M., Tan, S., Dang, H. & Zhang, Q. Rare earth elements tracing the soil erosion processes on slope surface under natural rainfall. *J. Environ. Radioact.* **102**, 1078–84 (2011).
 66. Ozbey, N. Pre-natal treatment of congenital adrenal hyperplasia and fetal malformations. *J. Endocrinol. Invest.* **25**, 91–2 (2002).
 67. Richey, H. G. & Farkas, J. Reactions of dialkylmagnesium-organolithium solutions with pyridine, quinoline, and cyclohexenone. *Organometallics* **9**, 1778–1784 (1990).
 68. Biffis, A., Zecca, M. & Basato, M. Palladium metal catalysts in Heck C – C coupling reactions. *J. Mol. Catal.* **173**, 249–274 (2001).
 69. Ali, A. *et al.* Double Heck cross-coupling reactions of dibrominated pyridines. *Helv. Chim. Acta* **93**, 1764–1772 (2010).
 70. Annapurna, M., Vishnuvardhan Reddy, P., Singh, S. P. & Kantam, M. L. Heck cross-coupling of vinyl heteroaromatic compounds with aryl and heteroaryl halides using Pd(II) complex under phosphine-free conditions. *Tetrahedron* **69**, 10940–10945 (2013).
 71. Whitcombe, N. J., Hii, K. K. & Gibson, S. E. Advances in the Heck chemistry of aryl bromides and chlorides. *Tetrahedron* **57**, 7449–7476 (2001).
 72. Gockel, B. *et al.* Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions. in *Science of Synthesis Knowledge Updates KU 2010/4* (2013). doi:10.1055/sos-sd-107-00124
 73. Jutand, A. Mechanisms of the Mizoroki–Heck Reaction. in *The Mizoroki–Heck Reaction 1–50* (John Wiley & Sons, Ltd, 2009). doi:10.1002/9780470716076.ch1
 74. Jutand, A. *Mechanisms of the Mizoroki – Heck.* (2009).
 75. Ozawa, F., Kubo, A. & Hayashi, T. Generation of Tertiary Phosphine-Coordinated Pd(0) Species from Pd(OAc)₂ in the Catalytic Heck Reaction. *Chem. Lett.* **21**, 2177–2180 (1992).
 76. Heck, R. F. & Nolley, J. P. Palladium-catalyzed vinylic hydrogen substitution reactions with aryl, benzyl, and styryl halides. *J. Org. Chem.* **37**, 2320–2322 (1972).
 77. Bellina, F. & Chiappe, C. The heck reaction in ionic liquids: Progress and challenges. *Molecules* **15**, 2211–2245 (2010).
 78. Gyton, M. R., Cole, M. L. & Harper, J. B. Ionic liquid effects on Mizoroki–Heck reactions: more than just carbene complex formation. *Chem. Commun. (Camb).* **47**, 9200–9202 (2011).
 79. Lidström, P., Tierney, J., Wathey, B. & Westman, J. Microwave assisted organic synthesis—a review. *Tetrahedron* **57**, 9225–9283 (2001).
 80. Xu, H.-J., Zhao, Y.-Q. & Zhou, X.-F. Palladium-Catalyzed Heck Reaction of Aryl Chlorides under Mild Conditions Promoted by Organic Ionic Bases. *J. Org. Chem.* **76**, 8036–8041 (2011).
 81. McGill, C. K. & Rappa, A. Advances in the Chichibabin Reaction. in *Advances in Heterocyclic Chemistry* 1–79 (1988). doi:10.1016/S0065-2725(08)60261-5

82. Shreve, R. N., Riechers, E. H., Rubenkoenig, H. & Goodman, A. H. Amination in the Heterocyclic Series By Sodium Amide. *Ind. Eng. Chem.* **32**, 173–178 (1940).
83. BERGSTROM, F. W., STURZ, H. G. & TRACY, H. W. THE USE OF THE FUSED EUTECTIC OF SODIUM AMIDE AND POTASSIUM AMIDE IN ORGANIC SYNTHESSES. *J. Org. Chem.* **11**, 239–246 (1946).
84. Londregan, A. T., Jennings, S. & Wei, L. General and mild preparation of 2-aminopyridines. *Org. Lett.* **12**, 5254–5257 (2010).
85. Ali Altaf, A. *et al.* Review on the Medicinal Importance of Pyridine Derivatives. *J. Drug Des. Med. Chem.* (2015). doi:10.11648/J.JDDMC.20150101.11
86. MARINESCU, M. 2-aminopyridine – a classic and trendy pharmacophore. *Int. J. Pharma Bio Sci.* **8**, (2017).
87. Braeuer, A. Absorption Spectroscopy. in *Supercritical Fluid Science and Technology* 347–366 (2015). doi:10.1016/B978-0-444-63422-1.00006-7
88. Spruch, G. M. Luminescence. *Phys. Today* **17**, 40–42 (1964).
89. Siraj, N. *et al.* Fluorescence, Phosphorescence, and Chemiluminescence. *Anal. Chem.* **88**, 170–202 (2016).
90. Lakowicz, J. R. & Masters, B. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition. *J. Biomed. Opt.* **13**, 029901 (2008).
91. Lakowicz, J. R. Fluorophores. in *Principles of Fluorescence Spectroscopy* 63–93 (Springer US, 1999). doi:10.1007/978-1-4757-3061-6_3
92. Cho, P. & Yap, M. Schirmer test. I. A review. *Optom. Vis. Sci.* **70**, 152–6 (1993).
93. Moss, S. E. Prevalence of and Risk Factors for Dry Eye Syndrome. *Arch. Ophthalmol.* **118**, 1264 (2000).
94. Ramos-Casals, M., Brito-Zeron, P., Siso-Almirall, A. & Bosch, X. Primary Sjogren syndrome. *BMJ* **344**, e3821–e3821 (2012).
95. Fox, R. I., Stern, M. & Michelson, P. Update in Sjögren syndrome. *Curr. Opin. Rheumatol.* **12**, 391–398 (2000).
96. Royer, C. A. Fluorescence spectroscopy. *Methods Mol. Biol.* **40**, 65–89 (1995).
97. Barat, A., Ruskin, H. J. & Crane, M. 3D Multi-agent models for protein release from PLGA spherical particles with complex inner morphologies. *Theory Biosci.* **127**, 95–105 (2008).
98. Frackowiak, D. The Jablonski diagram. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2**, 399 (1988).
99. Berezin, M. Y. & Achilefu, S. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chem. Rev.* **110**, 2641–2684 (2010).
100. Demchenko, A. P., Tomin, V. I. & Chou, P.-T. Breaking the Kasha Rule for More Efficient Photochemistry. *Chem. Rev.* **117**, 13353–13381 (2017).
101. Braslavsky, S. E. Kasha rule. in *IUPAC Compendium of Chemical Terminology* (IUPAC, 2010). doi:10.1351/goldbook.K03370

102. Wedzicha, J. A. *et al.* Analysis of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations with the dual bronchodilator QVA149 compared with glycopyrronium and tiotropium (SPARK): a randomised, double-blind, parallel-group study. *Lancet Respir. Med.* **1**, 199–209 (2013).
103. Koch, J. & von Oppen, F. Franck-Condon Blockade and Giant Fano Factors in Transport through Single Molecules. *Phys. Rev. Lett.* **94**, 206804 (2005).
104. Gilmore, F. R., Laher, R. R. & Espy, P. J. Franck-Condon Factors, r -Centroids, Electronic Transition Moments, and Einstein Coefficients for Many Nitrogen and Oxygen Band Systems. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **21**, 1005–1107 (1992).
105. Mustrup, H. & Ernst, S. Das Franck-Condon-Prinzip. *Chemie unserer Zeit* **45**, 256–269 (2011).
106. Birks, J. B. Fluorescence quantum yield measurements. *J. Res. Natl. Bur. Stand. Sect. A Phys. Chem.* **80A**, 389 (1976).
107. Michael W Allen, T. F. S. M. W. I. U. S. a. Measurement of Fluorescence Quantum Yields. *Thermo scientific* (2010).
108. Szmajda, H. & Lakowicz, J. R. Frequency-domain lifetime measurements and sensing in highly scattering media. *Sensors Actuators B Chem.* **30**, 207–215 (1996).
109. BECKER, W. Fluorescence lifetime imaging - techniques and applications. *J. Microsc.* **247**, 119–136 (2012).
110. Lakowicz, J. R. Time-Domain Lifetime Measurements. in *Principles of Fluorescence Spectroscopy* 95–140 (Springer US, 1999). doi:10.1007/978-1-4757-3061-6_4
111. Chen, Y. & Periasamy, A. Characterization of two-photon excitation fluorescence lifetime imaging microscopy for protein localization. *Microsc. Res. Tech.* **63**, 72–80 (2004).
112. Boens, N. *et al.* Fluorescence Lifetime Standards for Time and Frequency Domain Fluorescence Spectroscopy. *Anal. Chem.* **79**, 2137–2149 (2007).
113. Deligeorgiev, T., Vasilev, A., Kaloyanova, S. & Vaquero, J. J. Styryl dyes - synthesis and applications during the last 15 years. *Color. Technol.* **126**, 55–80 (2010).
114. Brooker, L. G. S. The Cyanine Dyes and Related Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 937–938 (1965).
115. Jha, B. N. & Banerji, J. C. Chromophoric chain β -substituted hemicyanines: Effect of the nature of substituents on optical properties. *Dye. Pigment.* **4**, 77–89 (1983).
116. Mishra, A., Behera, R. K., Behera, P. K., Mishra, B. K. & Behera, G. B. Cyanines during the 1990s: A Review. *Chem. Rev.* **100**, 1973–2012 (2000).
117. Jha, B. N. & Banerji, J. C. Substituted benzylidene Cyanines. *Dye. Pigment.* **1**, 161–167 (1980).
118. Jaung, J., Matsuoka, M. & Fukunishi, K. Syntheses and properties of new styryl dyes derived from 2,3-dicyano-5-methylpyrazines. *Dye. Pigment.* **31**, 141–153 (1996).
119. Gawinecki, R. & Trzebiatowska, K. The effect of the amino group on the spectral properties of substituted styrylpyridinium salts. *Dye. Pigment.* **45**, 103–107 (2000).

120. Wandelt, B., Mielniczak, A., Turkewitsch, P., Darling, G. D. & Stranix, B. R. Substituted 4-[4-(dimethylamino)styryl]pyridinium salt as a fluorescent probe for cell microviscosity. *Biosens. Bioelectron.* **18**, 465–471 (2003).
121. Fedorov, Y. V. *et al.* Ditopic complex formation of the crown-containing 2-styrylbenzothiazole. *New J. Chem.* **27**, 280–288 (2003).
122. Fedorov, Y. V. *et al.* Supramolecular assemblies of crown-containing 4-styrylpyridine in the presence of metal cations. *J. Phys. Org. Chem.* **18**, 1032–1041 (2005).
123. Loew, L. M., Cohen, L. B., Salzberg, B. M., Obaid, A. L. & Bezanilla, F. Charge-shift probes of membrane potential. Characterization of aminostyrylpyridinium dyes on the squid giant axon. *Biophys. J.* **47**, 71–77 (1985).
124. Bechem, M. *et al.* Novel hyperpolarizable and fluorescent dyes in lipid membranes: studying membrane potentials using nonlinear optical and fluorescence. *Electrochim. Acta* **48**, 3387–3393 (2003).
125. Kung, H. F., Choi, S. R., Qu, W., Zhang, W. & Skovronsky, D. 18F stilbenes and styrylpyridines for PET imaging of A β plaques in Alzheimer's disease: A miniperspective. *Journal of Medicinal Chemistry* **53**, 933–941 (2010).
126. Li, Q. *et al.* Styryl-Based Compounds as Potential in vivo Imaging Agents for β -Amyloid Plaques. *ChemBioChem* **8**, 1679–1687 (2007).
127. Beaucage, S. L. & Caruthers, M. H. Deoxynucleoside phosphoramidites—A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **22**, 1859–1862 (1981).
128. Reese, C. B. Oligo- and poly-nucleotides: 50 years of chemical synthesis. *Org. Biomol. Chem.* **3**, 3851 (2005).
129. Reese, C. B. The chemical synthesis of oligo- and poly-nucleotides by the phosphotriester approach. *Tetrahedron* **34**, 3143–3179 (1978).
130. Kahl, G. Solid-phase oligonucleotide synthesis. in *The Dictionary of Genomics, Transcriptomics and Proteomics* 1–1 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015). doi:10.1002/9783527678679.dg12242
131. Stephenson, F. H. Oligonucleotide Synthesis. in *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology* 136–142 (Elsevier, 2003). doi:10.1016/B978-012665751-7/50048-2
132. Brzezinska, J. *et al.* Experimental and computational studies on a protonated 2-pyridinyl moiety and its switchable effect for the design of thermolytic devices. *PLoS One* **13**, e0203604 (2018).
133. Larhed, M., Moberg, C. & Hallberg, A. Microwave-accelerated homogeneous catalysis in organic chemistry. *Acc. Chem. Res.* (2002). doi:10.1021/ar010074v
134. Kappe, C. O. Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis. *Angew. Chemie Int. Ed.* **43**, 6250–6284 (2004).
135. Microwaves in organic synthesis. *Choice Rev. Online* (2013). doi:10.5860/choice.40-5819
136. Annapurna, M., Vishnuvardhan Reddy, P., Singh, S. P. & Kantam, M. L. Heck cross-coupling of vinyl heteroaromatic compounds with aryl and heteroaryl halides using Pd(II) complex under phosphine-free conditions. *Tetrahedron* **69**, 10940–10945 (2013).

137. Flessner, T. & Doye, S. ChemInform Abstract: Cesium Carbonate: A Powerful Inorganic Base in Organic Synthesis. *ChemInform* **30**, no-no (2010).
138. Heravi, M. M., Kheilkordi, Z., Zadsirjan, V., Heydari, M. & Malmir, M. Buchwald-Hartwig reaction: An overview. *J. Organomet. Chem.* **861**, 17–104 (2018).
139. Baer, H. H., Coombes, R. G., Myhre, P. C. & Nielsen, A. T. *the Nitro Group in Organic Synthesis*. **3**, (2001).
140. Chmielewski, M. K. Novel thermolabile protecting groups with higher stability at ambient temperature. *Tetrahedron Lett.* **53**, 666–669 (2012).
141. Waldeck, D. H. Photoisomerization dynamics of stilbenes. *Chem. Rev.* **91**, 415–436 (1991).
142. Reineck, P. *et al.* Brightness and Photostability of Emerging Red and Near-IR Fluorescent Nanomaterials for Bioimaging. *Adv. Opt. Mater.* **4**, 1549–1557 (2016).
143. Marciniak, B., Kozubek, H. & Paszyc, S. Estimation of pK_a* in the first excited singlet state. A physical chemistry experiment that explores acid-base properties in the excited state. *J. Chem. Educ.* **69**, 247 (1992).
144. Ginocchietti, G., Mazzucato, U. & Spalletti, A. Protonation effect on the excited state behaviour of some aza-analogues of EE -distyrylbenzene. *Int. J. Photoenergy* **06**, 241–250 (2004).